

2015

Metodika pre  
stanovenie pôdnej  
mikroflóry metódou  
T-RFLP

Národné  
poľnohospodárske a  
potravinárske centrum  
– Výskumný ústav  
rastlinnej výroby

NÁZOV	Metodika pre stanovenie pôdnej mikroflóry metódou T-RFLP
AUTOR	Mgr. Katarína Ondreičková, PhD.
VYDANIE	prvé
VYDAVATEL	Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby Bratislavská cesta 122 921 68 Piešťany
ROK VYDANIA	2015
POČET STRÁN	20

*Metodická príručka vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR a je výstupom riešenia projektu „Biotechnológie rastlín a interagujúcich mikroorganizmov“.*

## OBSAH

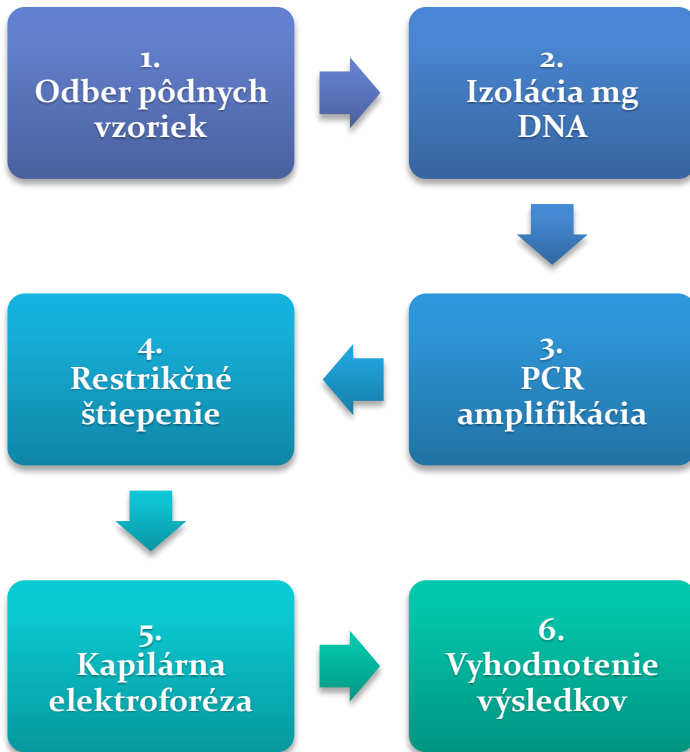
1. Úvod	4
2. Metodika	
2.1 Odber pôdnych vzoriek	6
2.2 Izolácia metagenómovej DNA z pôdy	6
2.3 Polymerázová reťazová reakcia	9
2.4 Agarózová elektroforéza	10
2.5 Purifikácia PCR produktov	10
2.6 Restriččné štiepenie	11
2.7 Kapilárna elektroforéza	11
2.8 Štatistické vyhodnotenie výsledkov	11
3. Záver	13
4. Publikácie, ktoré predchádzali metodike	14
5. Príloha	16

## 1. ÚVOD

Mikrobiálna diverzita je neobyčajne rôznorodá, pretože mikroorganizmy sú najpočetnejšou skupinou zo všetkých prítomných organizmov na Zemi. Výskumom pôdných mikroorganizmov sa ľudia zaoberali oddávna. Samozrejme najskôr pomocou kultivačných techník. Kultivačné techniky prispeli k poznaniu funkcií, ktoré zastáva určitá skupina mikroorganizmov v danom spoločenstve, ale neboli schopné určiť mikrobiálnu diverzitu v dôsledku neschopnosti kultivovať veľké množstvo baktérií a húb. Tieto veľké nedostatky preklenul rozvoj molekulárnej biológie. Vznikli rôzne metódy na detekciu mikroorganizmov, ktoré sú schopné zachytiť široké spektrum kultivovateľných aj nekultivovateľných mikroorganizmov. Jednou s najčastejšie používanou metódou na určenie komplexnosti mikrobiálneho spoločenstva je T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism). Princíp metódy spočíva v určení dĺžky koncového restriktčného fragmentu markerového génu amplifikovaného metódou PCR. Izolovaná DNA z environmentálnych vzoriek je použitá ako templát v PCR na amplifikáciu markerového génu. Forward alebo/aj reverse primer je na 5' konci fluorescenčne značený. Následne po PCR sú produkty štiepené jednou alebo viacerými restriktčnými endonukleázami, ktoré rozoznávajú 4 bp sekvenciu. Po štiepení sa fragmenty separujú pomocou kapilárnej elektroforézy, pričom detegované sú iba koncové restriktčné fragmenty obsahujúce fluorescenčne značený primer. Výsledkom T-RFLP analýzy je profil pozostávajúci z T-RF (Terminal-Restriction Fragment) pík, ktoré sú následne identifikované porovnaním s veľkosťami DNA štandardov. Každý pík reprezentuje špecifický

druh alebo skupinu mikroorganizmov. Pomocou výšky a šírky T-RF pík na elektroforetogramе môžeme získať prehľad o kvalitatívnom, resp. kvantitatívnom zastúpení jednotlivých druhov.

Jednotlivé kroky T-RFLP analýzy:



## 2. METODIKA

### 2.1 Odber pôdnych vzoriek

Pôda musí byť odobieraná do sterilných skúmaviek, pričom vzorka by mala byť dobre homogenizovaná. Vzorka pôdy sa odoberá sterilným skalpelom, pričom odobierané množstvo by malo byť aspoň 3 g. Po odbere je potrebné hneď vykonať izoláciu DNA alebo vzorky uložiť v tme pri 4°C.

### 2.2 Izolácia metagenómovej DNA z pôdy

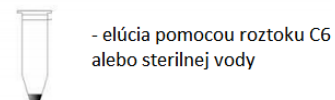
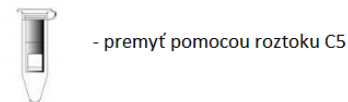
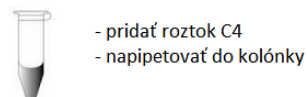
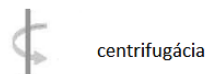
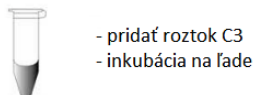
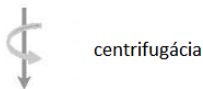
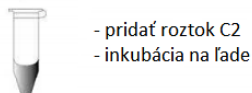
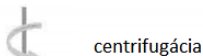
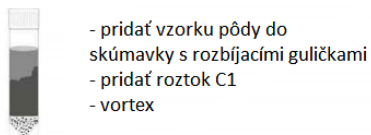
Pri izolácii DNA z pôdy je najvhodnejšie použiť niektorý komerčný kit vzhľadom na prítomnosť kontaminujúcich látok v pôde, ktoré sa pri bežnej izolácii ťažko odstraňujú. Keďže máme najlepšie skúsenosti s kitom PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Inc.; Obr. 1), popíšeme izoláciu DNA s ním:



Obr. 1: PowerSoil DNA Isolation Kit spolu so skúmavkou s rozbíjacími guľičkami.

Navážených 250 mg pôdy je potrebné vložiť do 2 ml skúmavky, ktorá už obsahuje rozbíjacie guľičky a 750  $\mu$ l pufru, ktorý rozptyľuje pôdne častice, začína rozkladať humínové kyseliny a chráni nukleové kyseliny pred degradáciou. Zmes treba jemne premiešať vortexovaním a pridať 60  $\mu$ l roztoku C<sub>1</sub> zohriateho na 60°C. Zmes jemne premiešať prevracaním skúmavky a horizontálne vložiť do mlynčeka MM 301 (Retsch) a vortexovať 10 min. pri maximálnej rýchlosti. Centrifugácia zmesi 30 s pri 10 000  $\times$  g. Supernatant potom preniesť do novej 2 ml skúmavky a pridať 250  $\mu$ l roztoku C<sub>2</sub> a vortexovať 5 s. Následne zmes treba inkubovať 5 min. pri 4°C. Centrifugácia 1 min. pri 10 000  $\times$  g a preniesť 600  $\mu$ l supernatantu do novej 2 ml skúmavky. K zmesi je potrebné pridať 200  $\mu$ l roztoku C<sub>3</sub> a jemne vortexovať. Opätovná inkubácia zmesi 5 min. pri 4°C. Nasleduje centrifugácia 1 min. pri 10 000  $\times$  g a 750  $\mu$ l vzniknutého supernatantu treba preniesť do novej skúmavky, pridať 1,2 ml roztoku C<sub>4</sub> a zmes vortexovať asi 5 s. Do kolónky potom preniesť najviac 675  $\mu$ l zmesi. Centrifugácia 1 min. pri 10 000  $\times$  g, vyliať filtrát a kolónku vložiť naspäť do skúmavky. Do kolónky preniesť ďalších 675  $\mu$ l zmesi. Centrifugácia 1 min. pri 10 000  $\times$  g, vyliať filtrát a kolónku vložili naspäť do skúmavky. Do kolónky preniesť zostávajúce množstvo zmesi. Centrifugácia 1 min. pri 10 000  $\times$  g, vyliať filtrát a kolónku vložiť naspäť do skúmavky. Do kolónky následne pridať 500  $\mu$ l roztoku C<sub>5</sub>. Zmes centrifugovať 30 s pri 10 000  $\times$  g a vyliať filtrát. Opakovane zmes centrifugovať 1 min. pri 10 000  $\times$  g a kolónku preniesť do novej 2 ml skúmavky. Do kolónky pridať 100  $\mu$ l roztoku C<sub>6</sub>. Centrifugovať 30 s pri 10 000  $\times$  g. Po odstránení kolónky je DNA rozpustená v roztoku C<sub>6</sub>. Namiesto posledného roztoku C<sub>6</sub> je možné použiť aj sterilnú vodu. Schematický postup izolácie pomocou kitu je znázornený na Obr. 2.





Po izolácii je vhodné premerať koncentráciu a čistotu DNA prístrojom Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) a izolovanú DNA uložiť pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Obr. 2: Schematický záznam postupu izolácie DNA pomocou kitu PowerSoil DNA Isolation kit.

### 2.3 Polymerázová reťazová reakcia

Na PCR sa používajú univerzálne bakteriálne primery, ktoré amplifikujú vysoko konzervatívny gén kódujúci malú ribozomálnu podjednotku 16S rRNA, ktorý sa nachádza v genóme všetkých baktérií. V našom prípade je to forward primer 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a reverse primer 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'), pričom forward primer je na 5' konci fluorescenčne značený pomocou FAM.

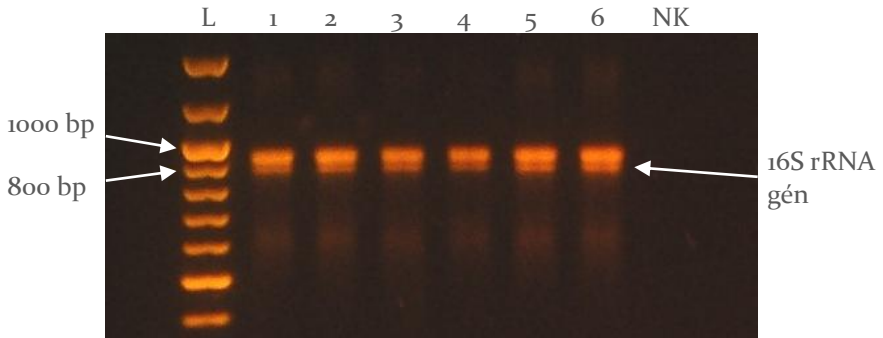
PCR mix (50  $\mu$ l): 1  $\times$  PCR pufor  
1,5 mM Mg<sup>2+</sup>  
0,20  $\mu$ M primer 8f  
0,20  $\mu$ M primer 926r  
0,2 mM dNTP  
1 U Taq DNA polymeráza  
1  $\mu$ l DNA extraktu z pôdy (cca 20 ng/ $\mu$ l)

#### PCR program:

počiatočná denaturácia	95 °C	3 min	} 35 cyklov
denaturácia	94 °C	30 s	
anelácia	47 °C	30 s	
polymerizácia	72 °C	1 min	
konečná polymerizácia	72 °C	10 min	
chladenie	4 °C	-	

## 2.4 Agarózová elektroforéza

Na vizualizáciu PCR produktu (Obr. 3) je vhodné použiť 1 % agarózový gél v 0,5 × TBE tlmivom roztoku (90 mmol/dm<sup>3</sup> Tris – HCl, pH 8,0; 90 mmol/dm<sup>3</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mmol/dm<sup>3</sup> EDTA; pH 8,0). Vzorku DNA (5 - 10 µl) zmiešať s 2 µl nanášacieho pufru a naniest' do gélu, do ktorého bol pridaný ako interkalačné činidlo etídium bromid (0,5 µg/ml) prípadne GoldView (4 µl/100 ml gélu). Separácia vzoriek prebieha v horizontálnej aparatúre GNA – 200 (Pharmacia Biotech) pri 2 – 4 V/cm dĺžky gélu. DNA fragmenty sú detegované na UV lampe pri 254 nm.



Obr. 3: Agarózová elektroforéza 16S rRNA génu pri 6 vzorkách DNA izolovaných z pôdy pomocou kitu PowerSoil DNA Isolation Kit s primermi 8f a 926r a anelačnej teploty 47°C. Dráha s označením L - ladder, dráhy 1 - 6 zodpovedajú označeniu pôdnych vzoriek, NK - negatívna kontrola.

## 2.5 Purifikácia PCR produktov

Na prečistenie PCR produktu sa k reakčnej zmesi pridá 1/10 objemu PCR zmesi 3M octanu sodného (pH 5,2) a 3 × objem 96% etanolu. Zmes je potrebné silno vortexovať a uložiť na 20 min pri

-80°C. Nasleduje centrifugácia 20 min pri 13 500 rpm. Odstrániť supernatant a k peletu pridať 70% etanol o objeme 250 µl. Centrifugácia vzorky 5 min pri max. rpm. Po centrifugácii odstánie supernatant a po usušení peletu DNA rozpustiť v sterilnej vode.

## **2.6 Restričné štiepenie**

Na štiepenie PCR produktov je potrebné použiť restričné enzýmy, ktoré rozpoznávajú 4 bp sekvenciu (t.j. patria medzi často štiepiace enzýmy). Štiepiaca zmes (20 µl) obsahuje: 10 µl purifikovaného PCR produktu, 2 µl 10 × pufru a 10 U enzýmu. Štiepenie prebieha 3 hod pri 37 °C. Po štiepení nasleduje purifikácia podľa kapitoly 2.5.

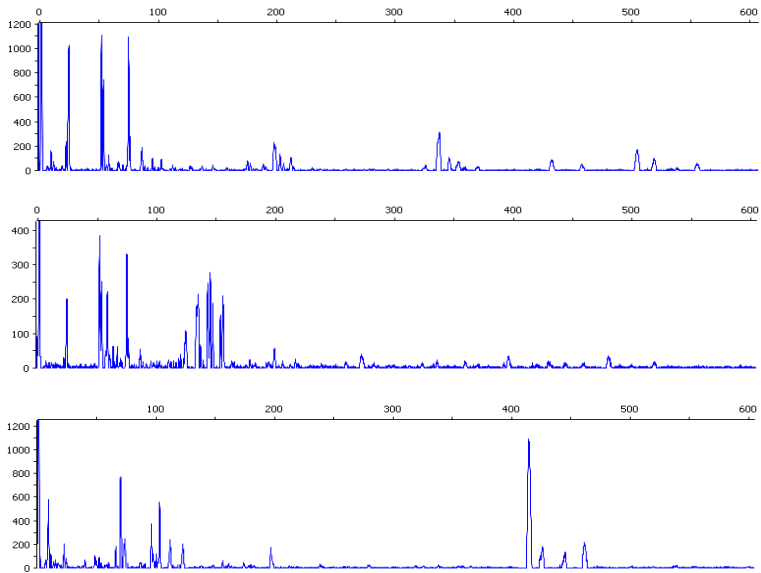
## **2.7 Kapilárna elektroforéza**

Restričné fragmenty sú analyzované na kapilárnej elektroforéze použitím automatického sekvenátora ABI 3100 Prism Avant (Applied Biosystem). Separácia fragmentov prebieha v polyakrylamidovom géli za denaturačných podmienok. Veľkosti terminálnych restričných fragmentov sú determinované použitím GeneMapper (Applied Biosystem). Zloženie zmesi na fragmentovú analýzu: 9 µl HiDi Formamidu; 0,1 µl štandardu LIZ 1200 a 1 µl DNA. Výsledkom kapilárnej elektroforézy je elektroferogram (Obr. 4).

## **2.8 Štatistické vyhodnotenie výsledkov**

Medzi hlavný spôsob ako analyzovať T-RFLP profily je používať viacrozmerné štatistické metódy na ich interpretáciu. Obvykle sú to metódy bežne používané v oblasti ekológie, a to najmä pri štúdiu biodiverzity. Medzi takéto metódy patrí: Principal Component Analysis (PCA, Analýza hlavných komponentov),

Factor Analysis (FA, Faktorová analýza), Canonical Correlation Analysis (CCA), Correspondence Analysis (CA), Cluster Analysis (Klastrová analýza). Aby bolo možné vykonať tieto viacrozmerné štatistické analýzy pri T-RFLP, dáta musia byť najskôr prevedené do tabuľky vo forme “sample by species table“, ktorá zobrazuje rôzne vzorky (T-RFLP profily) v závislosti na druhu (T-RF), ktorý v tomto prípade zodpovedá výške fluorescence.



Obr. 4: Výsledok T-RFLP analýzy tej istej vzorky, ktorá vznikla štiepením tromi rôznymi restriktívnymi enzýmami – *CfoI* (hore), *MspI* (v strede) a *RsaI* (dole).

### 3. ZÁVER

Výhodou tejto metódy je schopnosť pomerne ľahko získať veľké množstvo T-RF dát. Pomocou automatického systému, ktorý je dostupný v mnohých laboratóriách je možnosť získať stovky T-RF v priebehu jedného týždňa. V súčasnosti už existujú rôzne softwéry na fragmentovú analýzu, ktoré automaticky generujú výstup z elektroforézy do štandardného štatistického súboru. Kombinácia rýchlo získaných dát, automatického spracovania informácií a štatistickej analýzy robia z tejto metódy účinný nástroj na monitorovanie mikrobiálneho spoločenstva v priestore a čase. Tak ako každá iná metóda, aj T-RFLP má niekoľko nevýhod. DNA extrakcia, PCR a elektroforéza, ak nie sú správne prevedené, majú schopnosť zanechávať artefakty a skresľujú výsledné T-RF. Tieto nevýhody, ale neplatia iba pre T-RFLP, ale pre všetky ostatné metódy, ktoré využívajú izoláciu DNA, PCR aj elektroforézu. Taktiež správny výber primerov aj restriktčných endonukleáz má vplyv na výsledný efekt.

#### 4. PUBLIKÁCIE, KTORÉ PREDCHÁDZALI METODIKE

Šoltés R., Dítě D., Mihálik D., Ondreičková K., Hrehová Z., Maximová N., Sedláková B. 2015: Seasonal variation in bryophytes cover in the calcareous mire Belianske Luky, Slovakia. *Pakistan Journal of Botany*. 47, 1: s. 255-262.

Ondreičková K., Mihálik D., Ficek A., Hudcovicová M., Kraic J., Drahovská H. 2014: Impact of genetically modified maize on the genetic diversity of rhizosphere bacteria: a two-year study in Slovakia. *Polish Journal of Ecology*. 62, 1: s. 67-76.

Ondreičková K., Ficek A., Mihálik D., Gubišová M., Hudcovicová M., Drahovská H., Kraic J. 2014: Bacterial communities in rhizosphere of maize studied by T-RFLP. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*. 60, 3: s. 98-104.

Ondreičková K., Babulicová M., Mihálik D., Gubišová M., Gubiš J. 2014: Screening of bacterial populations in crop rotations with different proportion of cereals. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*. 60, 1: s. 31-38.

Ondreičková K., Mihálik D., Hudcovicová M., Gubišová M., Klčová L., Kraic J. 2013: Impact of transgenic plants cultivation on the rhizosphere bacterial communities in Slovak and Czech Republic. *Current Opinion in Biotechnology*. 24, Suppl. 1: s. 124.

Ondreičková K., Mihálik D., Ficek A., Hudcovicová M., Drahovská H., Kraic J. 2013: Bacterial diversity in rhizosphere soil of conventional and Bt-maize. GMCC [ the sixth International conference on coexistence between genetically modified (GM)

and non-GM based agricultural supply chains] : 2013 Lisbon, 12-15 Nov, final program and abstracts book. - 2013. - s. 39-40.

Ondreičková K., Drahovská D., Mihálik D., Kraic J. 2011: Impact of genetically modified maize MON 810 on soil bacteria by T-RFLP. The bioenergy question : reality or wishful thinking? : Pannonian plant biotechnology workshops, May 16th-18th 2011. - Tulln; Vienna : Department of agrobiotechnology IFA-Tulln; University of natural resources and life sciences, 2011. - s. 47-48.

Ondreičková K. 2012: Genetická diverzita bakteriálnej komunity v rizosfére transgéennej a netransgéennej kukurice : dizertačná práca. - Univerzita Komenského, Bratislava, 2012. - 109 s.



### Príloha 1:



Pohľad na pôdnu vzorku z koreňového systému kukurice, tzv. rizosféru, čo predstavuje vrstvu pôdy v tesnom kontakte s koreňmi rastlín.

## Príloha 2:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	<b>veľkosť T-RF</b>	<b>vzorka 1</b>	<b>vzorka 2</b>	<b>vzorka 3</b>	<b>vzorka 4</b>	<b>vzorka 5</b>	<b>vzorka 6</b>	<b>vzorka 7</b>	
2	62	2009	1443	1604	568	791	587	456	
3	63	1422	818	821	107	95	541	166	
4	64	195	294	225	59	0	0	171	
5	65	512	333	360	70	130	0	61	
6	67	1995	1053	1229	209	178	0	388	
7	70	3865	2426	2415	560	0	0	1040	
8	71	0	0	879	0	0	87	0	
9	72	4715	6859	6701	0	8117	0	7728	
10	73	0	0	0	8042	0	122	0	
11	74	4584	6655	6581	0	7992	0	0	
12	76	0	0	89	0	56	0	57	
13	77	170	75	96	112	0	0	61	
14	79	221	112	73	0	57	0	0	
15	80	0	0	0	0	676	77	798	
16	81	197	76	787	774	0	0	55	
17	82	0	0	87	0	0	457	456	
18	83	125	0	434	346	0	684	0	
19	84	0	132	0	0	299	0	191	
20	85	0	347	269	0	0	0	0	
21	86	378	0	0	120	0	0	0	
22	87	0	451	0	55	54	0	98	
23	88	568	0	216	105	176	0	0	

T-RFLP dáta prevedené do tabuľky vhodnej k štatistickému spracovaniu (tzv. „sample by species table“), kde prvý stĺpec predstavuje veľkosť získaných T-RF v básových pároch a ostatné stĺpce predstavujú jednotlivé vzorky s prislúchajúcimi výškami fluorescenčných signálov pri jednotlivých T-RF.

*Poznámky:*



© Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum –  
Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2015