

JACEK KOZDRÓJ

*Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
E-mail: j.kozdroj@ur.krakow.pl*

IZOLACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH ZE ŚRODOWISKA – PIERWSZY KROK W ANALIZIE METAGENOMU

Wybór właściwej metody badawczej jest podstawowym wymogiem stawianym przed eksperymentatorem pragnącym opisać rzeczywistość przyrodniczą. W przypadku badań mikrobiologicznych nieodpowiednie decyzje na tym etapie w znacznym stopniu skutkują błędną identyfikacją mikroorganizmów i brakiem rzetelnego poznania ich funkcji w środowisku. Ogromna różnorodność mikroorganizmów w środowisku jest niewątpliwie faktem obiektywnym, lecz jej stopień poznania w zasadniczy sposób zależy od tego, czy w badaniach posłużono się tradycyjnymi technikami hodowlanymi, czy też zastosowano metody oparte na analizach molekularnych wyekstrahowanych kwasów nukleinowych (KOZDRÓJ 2003). Ograniczenia dla tych metod stwarza sam charakter środowiska (np. bardziej homogeniczne lub heterogeniczne), właściwy sposób pobierania prób oraz ich transportu do laboratorium.

Metody oparte na hodowli mikroorganizmów na podłożach są proste, wygodne, pozwalające na równoczesne i szybkie porównanie wielu próbek przy wykorzystaniu minimum sprzętu laboratoryjnego. Podsta-

wową wadą tych metod jest znaczne niedoszacowanie rzeczywistej różnorodności mikroorganizmów, gdyż ogranicza się ona tylko do wyodrębnienia organizmów zdolnych do wzrostu na podłożu (WELLINGTON i współaut. 1997). Przeważająca liczba bakterii występuje w środowisku, np. glebie, w stadium uśpienia (ang. dormant phase), z metabolizmem ograniczonym do minimum. Komórki tych organizmów mają rozmiary ultramikrobakterii (0,2–0,3 μm) i są zaadaptowane do warunków głodowych (tj. niedobór substancji pokarmowych), jakie w glebie dominują. Trudności z wyhodowaniem takich organizmów stanowią kolejne ograniczenie dla poznania bioróżnorodności w glebie (KOZDRÓJ 2003). Dominująca większość mikroorganizmów, które są stwierdzane jako żywe komórki metodami mikroskopowymi, nie jest w stanie wyrosnąć na żadnym z obecnie znanych podłoży mikrobiologicznych (LIESACK i współaut. 1997). Aby poznać bioróżnorodność tych organizmów trzeba posłużyć się technikami molekularnymi, które stosunkowo niedawno wprowadzono do badań nad ekologią mikroorganizmów (COOPER i RAO 2006).

ŚRODOWISKOWY DNA REPREZENTANTEM METAGENOMU

Ograniczenia metod hodowlanych, które rzutują na niemożność rzetelnej oceny bioróżnorodności mikroorganizmów w środowisku mogą być przezwyciężone, jeśli zastosuje się techniki oparte na bezpośrednim wykrywaniu komórek mikroorganizmów, wykorzystując do tego celu związki chemiczne

występujące w każdej komórce. Tego typu substancjami markerowymi są kwasy nukleinowe, DNA oraz RNA, których zróżnicowanie sekwencji nukleotydów decyduje o różnicach strukturalnych oraz funkcjonalnych między poszczególnymi organizmami. Opanowanie efektywnych sposobów ekstrakcji

kwasów nukleinowych z komórek mikroorganizmów lub bezpośrednio ze środowiska oraz umiejętność właściwego odczytu informacji zakodowanej w ich strukturze przez miliardy lat ewolucji są podstawowymi wymogami przy podejmowaniu próby oceny na tej drodze zróżnicowania organizmów występujących w środowisku (MILLING i współaut. 2005). Teoretycznie trudno o bardziej reprezentatywne substancje markerowe do analizy bioróżnorodności, jednakże w praktyce także i w tym przypadku analiza nie jest pozbawiona różnych ograniczeń. Należy pamiętać, że DNA powinien być izolowany z możliwie jak największej liczby mikroorganizmów obecnych w danym biotopie, i co istotne, izolacja

nie powinna go zbyt fragmentować, a zanieczyszczenia w postaci białek, kwasów humusowych czy metali powinny być zredukowane do minimum. Dodatkowo, poszczególne grupy mikroorganizmów (bakterie, archeony, grzyby, pierwotniaki) różnią się podatnością na lizę swych komórek z powodu różnic w budowie ich osłon komórkowych. W większości mikroorganizmy występują w środowisku w postaci form drobnych i metabolicznie uśpionych, charakteryzujących się znaczną opornością na czynniki lityczne. DNA otrzymywany z tych organizmów ma małe rozmiary, nieefektywne w dalszych analizach metagenomu (STEELE i STREIT 2006).

EKSTRAKCYJA DNA ZE ŚRODOWISKA GLEBOWEGO

Pierwszym podstawowym wymogiem większości procedur analizy molekularnej oraz pierwszym ograniczeniem, które musi być przewyżczone jest otrzymanie czystych kwasów nukleinowych po ich ekstrakcji, np. z gleby. Wydajność lizy komórek, efektywność i stopień oczyszczenia kwasów nukleinowych, a także wielkość uzyskanych kwasów nukleinowych, razem w zasadniczy sposób wpływają na dalsze etapy analiz molekularnych. Niektóre grupy bakterii, np. Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria trudniej ulegają lizie z uwagi na grubą warstwę peptydoglikanu w ścianie komórkowej, co ma istotny wpływ na skład izolowanego z gleby DNA. Metody oparte na PCR są zależne od stopnia czystości DNA ze względu na to, że reakcja PCR jest hamowana w obecności szeregu zanieczyszczeń, np. kwasów huminowych lub jonów metali. Z kolei szereg procedur opartych na klonowaniu wymaga względnie dużych fragmentów DNA, zwłaszcza gdy wymagana jest ekspresja całego operonu lub sekwencjonowaniu podlega metagenom. Niekorzystne jest izolowanie dużej ilości małych fragmentów DNA, gdyż zwiększa to częstotliwość tworzenia różnych artefaktów w trakcie PCR (TREVORS i VAN ELSAS 1995, COOPER i RAO 2006).

Wiele metod izolacji bakteryjnego DNA z różnego typu gleb opublikowano w różnych czasopismach od 1980 r., kiedy to Vigdis Torsvik z Uniwersytetu w Bergen (Norwegia) opublikowała po raz pierwszy procedurę izolacji bakteryjnego DNA z gleby (TORSVIK 1980), zapoczątkowując w ten sposób nową subdyscyplinę naukową, ekologię mo-

lekularną mikroorganizmów. Ta oryginalna procedura polegała na separacji w pierwszym etapie komórek bakterii z cząstek gleby przez różnicowe wirowanie, a następnie lizie komórek i oddzieleniu DNA oraz RNA od materii organicznej na drodze szeregu separacji chromatograficznych. Jak wszystkie tego typu początkowe próby ekstrakcji kwasów nukleinowych bezpośrednio ze środowiska, metoda Torsvik była mało efektywna i czasochłonna, wymagała próbek od 60 do 90 g gleby i trwała przynajmniej trzy dni. Od tego czasu metody ekstrakcji uległy znacznej poprawie, osiągając stadium pełnej dojrzałości, dzięki czemu stały się niemal rutynowym narzędziem badawczym w szeregu laboratoriach mikrobiologicznych zajmujących się analizami środowiskowymi.

Współczesne metody ekstrakcji kwasów nukleinowych z gleby są znacznie uproszczone oraz wymagają mniejszych próbek, przez co większa ilość próbek gleby może być równocześnie poddawana analizie. Ogólnie zastosowanie znajdują dwa schematy ekstrakcji kwasów nukleinowych: bezpośrednio z gleby, wprowadzony po raz pierwszy przez OGRAM i współaut. (1987), oraz pośrednio z wcześniej uzyskanej frakcji komórkowej, wprowadzony przez HOLBEN i współaut. (1988). Większość współczesnych procedur opartych jest na bezpośredniej lizie komórek mikroorganizmów w glebie, a następnie ekstrakcji uwolnionych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) i ich dalszym oczyszczaniu. Wysoce krytycznym etapem bezpośrednich procedur jest skuteczność lizy komórek w obecności koloidów glebowych,

choć rozpuszczenia komórek wszystkich mikroorganizmów występujących w glebie prawdopodobnie nigdy nie uda się uzyskać. Stosuje się rozmaite metody lizy komórek mikroorganizmów: (i) enzymatyczna liza używając lizozymu, proteinazy K lub pronazy, (ii) chemiczna liza, np. traktowanie siarczanem dodecylosodowym (SDS), fenolem lub różnymi detergentami, (iii) szok termiczny (cykle zamrażania i podgrzewania), (iv) wykorzystanie mikrofal, (v) wykorzystanie ultradźwięków, (vi) mechaniczna liza przez rozbijanie komórek perełkami szklanymi w młynie udarowym lub mielenie na sucho, albo w obecności ciekłego azotu oraz (vii) różne kombinacje wspomnianych metod. Efektem zastosowanych metod jest uzyskanie kwasów nukleinowych o różnym stopniu zanieczyszczenia białkami, polisacharydami, kwasami humusowymi, lipidami oraz składnikami mineralnymi, a także o różnym stopniu pofragmentowania w zależności od tego, jak drastyczna była metoda bezpośredniej lizy komórek, co z kolei zależy od rodzaju gleby (ROBE i współaut. 2003). Metody fizyczne, jak wspomniane wykorzystanie ultradźwięków, czy rozbijanie komórek w młynie udarowym skutkują znacznym pofragmentowaniem DNA do rozmiarów od 5 do 10 kb, a nawet mniejszych (KUSKE i współaut. 1998). Natomiast, liza komórek oparta na SDS w połączeniu z mieleniem i cyklem zamrażania i topnienia przynosi większy uzysk DNA o fragmentach od 20 do 40 kb otrzymywanymi nawet od większości bakterii gramdodatnich (KRSEK i WELLINGTON 1999).

Różne typy gleb wymagają stosowania odmiennych procedur ekstrakcji kwasów nukleinowych zarówno na etapie lizy komórek mikroorganizmów, jak i podczas etapów oczyszczania. W zasadzie dobór procedur odbywa się eksperymentalnie przez porównanie ilości uzyskiwanego DNA lub RNA (wydajność ekstrakcji) oraz ich jakości (czystość, wielkość fragmentów). Etapy oczyszczania DNA są mniej lub bardziej rozbudowane w zależności od struktury gleby (zawartość frakcji ilastej), ilości substancji organicznych oraz innych potencjalnych inhibitorów (np. jony metali) enzymatycznych reakcji molekularnych, w których uczestniczyć będzie wyizolowane DNA (MILLING i współaut. 2005). Przykładowe sposoby oczyszczania DNA opierają się na strącaniu octanem potasu, glikolem polietylenowym (PEG), etanolem, izopropanolem lub mieszaniną chloroformu z fenolem, stosowanych osobno lub w kom-

binacji. Procedura zaproponowana przez VAN ELSAS i współaut. (1997), w odniesieniu do gleb o większej zawartości materii organicznej, wymagała stosowania wspomnianych reagentów z dodatkowym jednym lub nawet więcej etapami oczyszczania na kolumnach (np. Wizard firmy Promega) zawierającymi specjalną żywicę zatrzymującą zanieczyszczenia. Podobne działanie selektywnego wiązania lub strącania, np. białek oraz substancji humusowych obecnych w surowym ekstrakcie DNA wykazują kolumny Sephadex do filtracji żelowej, kolumny do chromatografii jonowymiennej, mleczko szklane (ang. glassmilk), elektroforeza w żelu agarozowym oraz poliwinylolipirolidon (PVP) lub poliwinylolipolipirolidon (PVPP) (CULLEN i HIRSCH 1998). W celu osłabienia efektu nukleaz uwalnianych z komórek podczas lizy, a także tych obecnych w glebie (zaadsorbowane na koloidach glebowych), które w znacznym stopniu mogą wpływać na reprezentatywność uzyskanego DNA poprzez jego degradację, dodaje się na początku ekstrakcji etylenodiaminotetraoctan (EDTA) a następnie (w niektórych procedurach) fenol. Dodatek EDTA wiąże wolne kationy Mg^{2+} niezbędne dla funkcjonowania nukleaz, podczas gdy fenol inaktywuje wszystkie enzymy obecne w ekstrahowanej próbce gleby. Zwiększając stężenie EDTA w buforze ekstrakcyjnym można otrzymać większy uzysk DNA, kosztem jednakże jego czystości. Dlatego też, wybór odpowiedniego buforu ekstrakcyjnego musi być efektem kompromisu między spodziewaną ilością DNA, a wymaganą czystością tego polimeru (ROBE i współaut. 2003).

Poszczególne procedury ekstrakcji DNA z gleby dają przeciętnie od kilku do kilkudziesięciu μg DNA w gramie gleby, a uzyskane fragmenty DNA mają na ogół od 10 do 40 kb. Im procedury oczyszczania są efektywniejsze, tym uzyskane DNA jest czystsze, co pokazują wartości stosunków mierzonej absorbancji A_{260}/A_{280} ($>1,7$) oraz A_{260}/A_{230} ($>2,0$). Spośród różnych metod ekstrakcji DNA metody zawierające etap(y) rozbijania perełkami szklanymi (ang. bead-beating) próbek gleby w młynie udarowym dają największe ilości DNA (najmniej DNA ulega wtórnej adsorpcji na cząstkach ilastych) oraz mało towarzyszących związków humusowych o brązowym zabarwieniu, przez co stopień czystości DNA jest zwiększony. Natomiast DNA może być bardziej pofragmentowany, zwłaszcza przy nienajlepiej dobranych parametrach rozbijania, chociaż większą fragmentację otrzymuje

się przy stosowaniu ultradźwięków (KRSEK i WELLINGTON 1999, ROBE i współaut. 2003). Wydajność procedury opartej na rozbijaniu sięga 80% z próbek gleby o wielkości od 250 mg do 1 g, podczas gdy, np. liza za pomocą wysokiej temperatury oraz SDS (ang. hot-SDS lysis) prowadzi do strat od 81 do 90 % DNA (CULLEN i HIRSCH 1998). W dużym stopniu na ilość oraz jakość uzyskiwanego DNA wpływa skład buforu ekstrakcyjnego, a zwłaszcza zawartość EDTA oraz obecność kationów Na^+ , które zarówno chronią DNA przed degradacją, jak i zmniejszają jego zdolność adsorpcji do koloidów glebowych. Ta ostatnia cecha DNA znacznie utrudnia możliwość analizy maksymalnej liczby populacji mikroorganizmów występujących w glebie, gdyż tylko część DNA (od kilku do 25%) może być uwolniona z agregatów glebowych, jak wykazały eksperymenty z wprowadzaniem natywnego DNA bakteriofaga lambda do suchej gleby (FROSTEGARD i współaut. 1999). Wynika z tego, że nawet jeśli dojdzie do uwolnienia z agregatów glebowych komórek bakterii, a następnie ich lizy, co samo w sobie jest trudne ze względu na dominowanie (od 50 do 70%) w glebie form drobnych ($< 0,5 \mu\text{m}$) trudno dostępnych, to uzyskanie maksymalnie reprezentatywnego bakteryjnego DNA napotyka znaczne przeszkody.

Pomimo ograniczeń metody bezpośrednie przeważają, jeśli chodzi o uzyskiwanie jak największej ilości DNA, który jest też maksymalnie reprezentatywny dla zespołów mikroorganizmów występujących w badanych glebach. Metody pośrednie ekstrakcji DNA, polegające na wstępnym otrzymaniu frakcji bakteryjnej a następnie ekstrakcji DNA z komórek i jego oczyszczeniu, są mniej wydajne, choć generują niekiedy lepszej jakości DNA (czystszy, większe fragmenty) pozbawiony dodatku zewnątrzkomórkowego DNA, czego nie da się uniknąć podczas ekstrakcji bezpośrednich. Podstawowym ograniczeniem metod pośrednich jest efektywność ekstrakcji frakcji komórkowej z gleby, którą maksymalizuje się przez stosowanie niespecyficznych detergentów w połączeniu z glikolem polietylenowym, żywic jonowymiennych (np. Chelex 100), dyspersji próbek gleby przez homogenizację metodą rotacyjnego tłuczka (ang. rotating pestle) lub w standardowym homogenizatorze Waringa, separacji komórek przez szybkoobrotowe wirowanie w obecności gradientu Nycodenz lub wirowanie w gradiencie sacharozy, Percollu, Ficollu oraz CsCl,

a także przez stosowanie ultradźwięków (ROBE i współaut. 2003).

Metody pośrednie opierają się na różnych zjawiskach fizycznych lub chemicznych służących separacji komórek z cząstek glebowych. Nie ma najlepszej, uniwersalnej metody, gdyż gleby są niezwykle zróżnicowane i dlatego należy odpowiednie metody, a nawet ich kombinacje dobierać indywidualnie. Niemniej wydajność ekstrakcji komórek bakterii rzędu od 30 do 50% w przypadku w gleb torfowych oraz od 20 do 30 % w przypadku gleb ilasto-gliniastych (uprawne oraz leśne) można uzyskać stosując wirowanie w obecności gradientu Nycodenz. Niektóre grupy mikroorganizmów są szczególnie trudne do ekstrakcji z koloidów glebowych. Dotyczy to, na przykład metanotroficznych bakterii w torfie, jak również bakterii utleniających amoniak w glebach ilasto-gliniastych (BAKKEN i LINDAHL 1995).

Wydajną pośrednią metodę ekstrakcji DNA z gleby, która łączy prostotę z wydajnością uzyskiwanego DNA opracowali VAN ELSAS i współaut. (1997). Procedura ta jest stosunkowo szybka i łączy skuteczność pirofosforanu sodu w rozbijaniu wiązań w agregatach glebowych ze skuteczną lizą komórek bakteryjnych oraz dalszą ekstrakcją i oczyszczaniem DNA według procedury stosowanej oryginalnie podczas ekstrakcji bezpośredniej. Otrzymany w ten sposób DNA specyficznie reprezentuje bakterie występujące w glebie, zarówno ich ogół, jak i tę część, która poddaje się hodowli. Jednakże w większości są to populacje lub gatunki dominujące w danej glebie, gdyż tylko w odniesieniu do nich otrzymuje się podobne rezultaty, jak w przypadku DNA ekstrahowanego bezpośrednio z gleby. Bakterie mniej licznie występujące w danej glebie mogą być wykryte jedynie po bezpośredniej ekstrakcji DNA (SAANO i współaut. 1995, STEELE i STREIT 2006).

Łagodne metody lizy otrzymanej frakcji komórkowej w połączeniu z oczyszczaniem DNA poprzez wirowanie w gradiencie CsCl pozwalają uzyskać wysokiej jakości DNA o wielkości przekraczającej 100 kb (ROBE i współaut. 2003). Dalsze zwiększanie wielkości DNA (ponad 300 kb) można uzyskać przez zintegrowanie etapu ekstrakcji komórek bakterii przez wirowanie z łagodną lizą zanurzonych w agarozowych korkach komórek i rozdzieleniem DNA przez elektroforezę żelową w pulsacyjnym polu elektrycznym (PFGE). W ten sposób uzyskano fragmenty DNA umożliwiające skuteczne skonstruowa-

nie fosmidowej biblioteki metagenomu glebowego o wielkości przekraczającej 3,5 Gb (ROBE i współaut. 2003).

Metody pośrednie izolacji DNA z gleby, oparte na wyodrębnianiu frakcji komórkowej bakterii, zapewniają uzyskanie jedynie od 20 do 50% całości DNA bakteryjnego metagenomu glebowego (BAKKEN i LINDAHL 1995). Skuteczniejsze w tym względzie są metody bezpośredniej ekstrakcji, które pozwalają otrzymać DNA z ponad 60% wszystkich bakterii występujących w danej glebie (MORE i współaut. 1994). Jakkolwiek te różnice są wymowne, to jednak należy pamiętać, że istotny wpływ na otrzymane wyniki mają obecne wspólnie z DNA wyekstrahowane zanieczyszczenia oraz wrażliwość na te zanieczyszczenia dalszych stosowanych procedur molekularnych. Przykładem może być różna wrażliwość enzymów restrykcyjnych na obecne kwasy humusowe ekstrahowane w różnej ilości przez metody pośrednie i bezpośrednie. Skutkiem tego jest odmienny profil bakteryjnego DNA otrzymywany w wyniku analizy restrykcyjnej DNA izolo-

wanego wspomnianymi metodami (ROBE i współaut. 2003). Wybór jednej bądź drugiej metody ekstrakcji DNA z gleby zależy od celów badawczych. Jeżeli pragnie się uzyskać względnie dużo DNA o szerokim spektrum reprezentatywności mikroorganizmów występujących w danej glebie, to niewątpliwie należy zastosować metody bezpośredniej ekstrakcji. Natomiast, gdy celem jest uzyskanie DNA wysokiej jakości do procedur molekularnych czułych na różne inhibitory oraz gdy potrzebny jest DNA o dużej masie molekularnej, to preferowane są metody pośrednie bez względu na ich pracochłonność. Ponadto, DNA otrzymany z wyizolowanej bakteryjnej frakcji komórkowej zawiera zaledwie do 8% fragmentów eukariotycznego DNA w porównaniu do 61-93% tych sekwencji obecnych w bezpośrednich ekstraktach DNA z gleby. W konsekwencji, konstruowane biblioteki metagenomu bakteryjnego odpowiednich gleb są znacznie lepszej jakości w przypadku korzystania z pośrednich metod ekstrakcji DNA (GABOR i współaut. 2003).

OCZYSZCZANIE EKSTRAKTÓW DNA

Mimo znacznych postępów poczynionych w kierunku zwiększenia efektywności oraz uproszczenia metod oczyszczania kwasów nukleinowych, ten etap w dalszym ciągu stwarza problemy przy badaniu różnych gleb. Dlatego tak trudno jest opracować uniwersalną procedurę otrzymywania DNA z gleby, co powoduje, że praktycznie dla każdej gleby, zwłaszcza ze względu na jej zmienność składu materii organicznej, musi być optymalizowana specyficzna metoda, która w odniesieniu do innej gleby może być mało skuteczna. Różnice między eksperymentatorami także wpływają na zmienność uzysku DNA między laboratoriami, skłaniając do opracowywania nowych procedur przez każde laboratorium z osobna. Nawet w jednym laboratorium uzyskiwane wyniki (ilość DNA, jego jakość) mogą być znacząco odmienne. Dlatego też znaczne nadzieje wiąże się z opracowaniem jednej metody ekstrakcji DNA, która byłaby jednakowo wydajna w każdej glebie, skutecznie rozpuszczałaby wszystkie komórki, byłaby szybka oraz mogłaby być zastosowana do wielu próbek równocześnie. Dałoby to możliwość automatyzacji procedur oraz ich standaryzacji między różnymi laboratoriami. Kilka firm opracowało i sprzedaje kompletne

zestawy do ekstrakcji DNA z gleby (np. UltraClean™ Soil DNA, FastDNA[®] SPIN[®], Soil Master™ DNA Extraction), które znajdują zastosowanie w przypadku różnych gleb oraz gwarantują otrzymanie czystego DNA w czasie krótszym niż 30 min. Znaczący postęp na drodze opracowania systemu automatyzacji lizy komórek i oczyszczania DNA glebowego, z możliwością przeprowadzania natychmiast reakcji PCR, dokonano przy udziale naukowców z Departamentu Energii Północnoatlantyckich Laboratoriów (USA) oraz Departamentu Obrony (USA) (OGRAM 2000). Również w Narodowym Laboratorium w Los Alamos (USA) zespół naukowców opracował metodę ekstrakcji DNA, która znacząco uprościła szeroko stosowane metody ekstrakcji DNA, jego oczyszczania oraz ilościowego oznaczania w próbkach pochodzących z różnych gleb. W metodzie tej połączono zmodyfikowane protokoły ekstrakcji za pomocą szoku termicznego i detergentu (SDS) oraz rozbijania mieszaniną perelek szklanych o różnej wielkości, dzięki czemu można było wydajnie ekstrahować DNA zarówno z komórek wegetatywnych, jak i spor różnych mikroorganizmów. Uproszczono również etapy oczyszczania DNA, eliminując szkodli-

we reagenty, takie jak fenol, chloroform, hydrochlorek guanidyny, CsCl oraz butanol, do jednego etapu na mikrokolumnach wypełnionych Sephadex G200 (KUSKE i współaut. 1998). Zaletą dodatkową tej metody jest nie tylko prostota i szybkość, ale także możliwość przeprowadzania jej w warunkach polowych, wykorzystując podstawowy przenośny sprzęt laboratoryjny. W celu osiągnięcia większej efektywności oczyszczania DNA na mikrokolumnach oraz większej czułości detekcji fragmentów DNA podczas PCR, zaproponowano przeprowadzanie dwukrotnego oznaczania ilości DNA w trakcie całej procedury jego izolacji z gleby. W pierwszym etapie stężenie DNA należy oznaczać w surowym ekstrakcie przed wprowadzeniem go na mikrokolumny, dzięki czemu wiadoma jest ilość DNA podlegającego oczyszczaniu. W drugim etapie oznaczane jest stężenie DNA w wycieku z mikrokolumny, przez co znana jest dokładna ilość DNA wprowadzanego do mieszaniny reakcyjnej PCR. W obydwu przypadkach, oznaczanie ilości DNA, niezależnie od obecności kwasów humusowych, dokonuje się przez pomiar spektrum absorpcyjnego UV-Vis w połączeniu z pomiarem sygnału fluorescencyjnego kompleksu DNA z bardzo czułym barwnikiem PicoGreen (STARK i współaut. 2000). Połączenie uproszczonej procedury ekstrakcji DNA z dwukrotnym oznaczaniem jego ilości pozwala na sprawne przygotowanie wielu próbek z różnych gleb do kompleksowej analizy genetycznej, redukując do minimum prawdopodobieństwo otrzymywania fałszywie pozytywnych (rozbudowane procedury ekstrakcji) lub fałszywie negatywnych wyników podczas PCR.

Pomimo wspomnianych osiągnięć, w dalszym ciągu trwają próby udoskonalania metod ekstrakcji DNA z gleby. Bardzo newralgiczny dla całości procedury jest etap oczyszczania DNA, w wyniku którego może dochodzić do straty nawet powyżej 50% DNA (CARRIGG i współaut. 2007). Obecne w różnej ilo-

ści, zależnie od typu gleby, kwasy humusowe mają istotny w tym udział, dodatkowo wchodząc w różne interakcje z reagentami użytymi w trakcie ekstrakcji DNA. Dlatego istotne znaczenie w wyeliminowaniu tego problemu ma opracowanie procedury usuwania kwasów humusowych jeszcze na etapie poprzedzającym lizę komórek mikroorganizmów. Znaczącym postępem wydaje się być metoda zaproponowana przez PERŠOH i współaut. (2008) do równoczesnej ekstrakcji DNA i RNA, wykorzystująca różne stężenia $Al_2(SO_4)_3$ (od 40 do 90 μM , zależnie od typu gleby) do strącania kwasów humusowych obecnych w glebie nawet w ilości większej niż 200 mg w przeliczeniu na gram świeżej masy. Również użycie do ekstrakcji DNA buforu zawierającego kompleks bromku cetylotrimetyloamoniowego z ditiotreitolem (CTAB-DTT) dało możliwość otrzymywania wysokiej jakości DNA z różnych gleb, które z sukcesem mogło być użyte do analizy różnorodności bakterii i grzybów (THAKURIA i współaut. 2008). Alternatywnym sposobem izolacji DNA w obecności kwasów humusowych i innych zanieczyszczeń jest wykorzystanie metody wiązania DNA na zasadzie hybrydyzacji w polu magnetycznym, wykorzystując w tym celu albo jednoniciowe DNA znakowane biotyną, albo specyficzne klamry i oligomery peptydowych kwasów nukleinowych pełniących rolę sondy w stosunku do izolowanego DNA (ROBE i współaut. 2003). W celu zwiększenia reprezentatywności wyekstrahowanego DNA dla całego metagenomu glebowego opracowano procedurę sekwencyjnego izolowania pozakomórkowego DNA (eDNA) oraz komórkowego DNA (iDNA). Wykorzystano do tego metodę alkalicznego przemywania gleby 0,12 M roztworem Na_2HPO_4 (pH 8,0), otrzymując surowy eDNA, a następnie pozostały osad gleby poddawano mechaniczno-chemicznej obróbce w celu doprowadzenia do lizy komórek mikroorganizmów i uzyskania iDNA (ASCHER i współaut. 2009).

IZOLACJA DNA ZE ŚRODOWISKA WODNEGO

W porównaniu do gleby, ekstrakcja kwasów nukleinowych z mikroflory wodnej jest prostsza, gdyż środowisko to jest mniej strukturalnie heterogeniczne i nie ma potrzeby stosowania rozbudowanych procedur ekstrakcji i oczyszczania. Komórki mikroorganizmów, pochodzące z 300 do 1000 ml próbki wody, są zagęszczane na filtrach membrano-

wych lub przez odwirowanie, a następnie poddawane alkalicznej lizie oraz proteolizie lub też mogą być rozpuszczane przez lizozym (SOMMERVILLE i współaut. 1989). Surowy ekstrakt kwasów nukleinowych zostaje uwolniony z filtra, a następnie oczyszczany przez wirowanie w gradiencie CsCl lub mieszanie z octanem amonu i wytrącanie etanolem, da-

jąc wystarczająco czyste preparaty chromosomalnego i plazmidowego DNA lub różnych rodzajów RNA (np. 5S, 16S oraz 23S rRNA). Oprócz tego, inne metody ekstrakcji DNA (np. wirowanie w gradiencie CsCl i bromku etyldyny, powtarzalne traktowanie mieszaniną chloroformu i fenolu) lub rRNA (np. wielokrotne traktowanie poliwinylpolipirolidonem, PVPP) znajdują swoje zastosowanie (WELLER i WARD 1989, PAUL i współaut. 1990). Komórki mikroorganizmów występujące w wodzie pitnej lub względnie przejrzystej wodzie powierzchniowej mogą być także zagęszczane na filtrach membranowych opornych na warunki PCR. W ten sposób, przeprowadza się lizę komórek, np. metodą szoku termicznego, a następnie od razu am-

plifikuje się DNA, nie usuwając filtra z próbki reakcyjnej (BEJ i MAHBUBANI 1996). Alternatywnym sposobem jest przeprowadzanie lizy wychwyconych komórek bezpośrednio na filtrze poliwęglanowym przy użyciu lizozymu, a następnie oczyszczanie uwolnionego DNA przez ekstrakcję mieszaniną chloroformu i fenolu oraz wytrącanie etanolem DNA o wystarczającej czystości dla reakcji PCR i innych dalszych analiz molekularnych (BEJ i współaut. 1990). Efektywność ekstrakcji kwasów nukleinowych zwiększa się przez optymalizację etapu zagęszczania komórek mikroorganizmów, stosując różne filtry oraz urządzenia filtrujące, a także przez dobór optymalnej metody lizy komórek (TREVORS i VAN ELSAS 1995).

EKSTRAKCYJA RNA AKTYWNEJ METABOLICZNIE FRAKCJI METAGENOMU

W porównaniu ze stosunkowo dobrze opanowanymi metodami ekstrakcji DNA, otrzymywanie RNA z populacji mikroorganizmów występujących w środowisku jest słabiej opanowane. Niemniej jednak, analiza RNA znajduje zastosowanie przy ocenie różnorodności aktywnej metabolicznie frakcji bakterii, co jest o tyle ułatwione, że sekwencje matrycowe są naturalnie amplifikowane dzięki temu, że komórki zawierają tysiące rybosomów. Ekstrakcja RNA jest procesem trudnym z uwagi na znaczną labilność i krótkotrwałość w przypadku mRNA w warunkach glebowych (rRNA jest bardziej stabilny), a także wszechobecność rybonukleaz, które podczas ekstrakcji DNA nie stanowią problemu, natomiast w przypadku otrzymywania RNA muszą być wyeliminowane. Dlatego też procedury ekstrakcji RNA wymagają większego reżimu laboratoryjnego. Jedne metody wymagają kwaśnych warunków ekstrakcji w celu usunięcia białek, lipidów i DNA przez rozdział fazowy stosując fenol i chloroform (LÜDEMANN i współaut. 2000). Inne metody wykorzystują rozkład enzymatyczny zanieczyszczeń w celu otrzymania czystych preparatów RNA (GRIFFITHS i współaut. 2000). Pierwsze metody ekstrakcji RNA z gleby były mało efektywne z racji częstej obecności DNA oraz zanieczyszczeń pochodzących z gleby (np. kwasy humusowe, minerały ilaste). Rozwiązanie tego problemu powstało w momencie opracowania metody bezpośredniej selektywnej ekstrakcji niektórych rybosomów z mikroorganizmów występujących w glebie (FELSKE i współaut. 1996). W tej metodzie próbkę gleby podda-

je się homogenizacji w specjalnym buforze, co prowadzi do mechanicznej lizy komórek bakterii, a następnie otrzymuje się frakcję rybosomalną przez etapy wirowania, unikając zanieczyszczenia kwasami humusowymi oraz degradacji RNA. Stosując reagenty (poliwinylpolipirolidon oraz albuminę z osocza wołu) blokujące adsorbujące powierzchnie minerałów ilastych oraz eliminujące związki humusopodobne, a następnie przeprowadzając ekstrakcję fenolową, otrzymuje się oczyszczony rRNA gotowy do dalszych analiz molekularnych (hybrydyzacji oraz RT-PCR). Wydajność tej procedury sięga około 0,2 µg rRNA z grama różnych gleb, i jest o wiele większa niż w przypadku początkowych procedur opartych na bezpośredniej fenolowej ekstrakcji rRNA, które dawały około 10 ng rRNA. Metoda bezpośredniej ekstrakcji rybosomów z bakterii glebowych wymaga jednakże stosowania szybkoobrotowych wirówek oraz ultrawirówek, które niekoniecznie są na wyposażeniu każdego laboratorium.

Alternatywna metoda opracowana przez DUARTE i współaut. (1998) pozwala na szybką i prostą pośrednią ekstrakcję rRNA, która do etapów oczyszczania surowego ekstraktu jest wspólna z pośrednią ekstrakcją DNA. Metoda opiera się na działaniu pirofosforanu sodu, rozbijającego wiązania między komórkami a agregatami glebowymi, prowadzącego do otrzymania frakcji bakteryjnej, która następnie poddawana jest etapom lizy przy udziale rozbijania perełkami szklanymi oraz ekstrakcji gorącym kwaśnym fenolem. W rezultacie otrzymuje się od 0,25 do 1 µg rRNA z grama gleby, co stanowi od 2,5 do 5-krotnie mniejszą ilość niż

równocześnie ekstrahowanego DNA. Biorąc pod uwagę przeciętną zawartość rybosomów w komórkach bakterii oraz liczebność bakterii w gramie gleby (np. glinie pylastej) wynoszącą około 10^9 komórek, wydajność tej procedury ekstrakcji rRNA wynosi od 10 do 30% (DUARTE i współaut. 1998). Tej wielkości wydajność jest do zaakceptowania przy badaniu populacji bakterii w glebie, jeśli uwzględni się, jaka jest efektywność ekstrakcji komórek lub DNA oraz

zakładając bezproblemowy przebieg lizy i uzysku kwasów nukleinowych. Porównawcze badania różnych metod stosowanych do ekstrakcji rRNA i mRNA z gleby wykazały, że skład aktywnego metabolicznie zespołu mikroorganizmów oraz udział ilościowy poszczególnych członków tego zespołu zasadniczo zależy od rodzaju wykorzystanej metody ekstrakcji glebowego RNA (SESSITSCH i współaut. 2002).

UWAGI KOŃCOWE

Poznanie metagenomów różnych środowisk lądowych i morskich jest obecnie poważnym wyzwaniem, przed jakim stoją mikrobiolodzy, nie tylko ze względów poznawczych, ale także z uwagi na zrozumienie roli ekologicznej, jaką spełniają zespoły mikroorganizmów w biosferze oraz ze względu na olbrzymi i w znikomym stopniu poznany potencjał do biotechnologicznego wykorzystania. Skuteczne zmierzenie się z tym wyzwaniem jest możliwe pod warunkiem, że do dyspozycji badaczy są wydajne metody ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz odpowiednie techniki ich dalszej analizy. Idealną sytuacją by było opracowanie uniwersalnej

metody izolacji DNA/RNA ze środowiska, zwłaszcza z różnych gleb, która dawałaby dużą ilość czystego i mało pofragmentowanego DNA, a w przypadku RNA, dodatkowo jeszcze odpowiednio stabilnej poza komórką makrocząsteczki. Pojawiają się coraz to nowe propozycje opracowywane w różnych laboratoriach, które próbują pretendować do tej roli. Niestety, są to tylko próby, gdyż zbyt wiele jest różnych zmiennych oddziałujących na proces izolacji DNA/RNA w różnych glebach, utworach geologicznych czy odpadach przemysłowych. W rezultacie, dla każdego biotopu czy siedliska należy dobierać odpowiednią metodę ekstrakcji DNA/RNA.

ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS FROM THE ENVIRONMENT – THE FIRST STEP IN METAGENOME ANALYSIS

Summary

Recently, increasing interest in ecology of microorganisms has been associated with the possibility of direct analysis of microbial community structure due to application of molecular methods based on isolated metagenome DNA. The metagenome approach can provide a cultivation-independent assessment of the largely untapped genetic reservoir of soil or water microbial communities. However, the crucial step in this approach is efficient extraction of high-quality total DNA representing the metagenome of a habitat. The DNA extraction methods for soil habitats are grouped into two major types, i.e. indirect based on the recovery of microbes (e.g. bacterial cells) and their subsequent lysis, and direct lysis of cells in the sample followed by DNA purification. The direct extraction of total DNA from an environmental sample presumably

better represents its bacterial or fungal metagenome; hence, this approach has been used more often than the fractionation methods. Although direct extraction of DNA is less labour-intensive and yield more DNA, the recovered DNA fragments are usually smaller than those obtained by the indirect approach are. The fractionation method is advantageous for soil samples containing higher amounts of organic matter or other substances that interfere with DNA isolation. This method is also applied for DNA extraction from water samples. Microbial ecologists currently use different commercially available kits for total DNA isolation from soil or water. However, it would appear that the most efficient method of DNA extraction from environmental samples is still far from being established.

LITERATURA

- ASCHER J., CECCHERINI M. T., PANTANI O. L., AGNELLI A., BORGOGNI F., GUERRI G., NANNIPIERI P., PIETRAMELLARA G., 2009. *Sequential extraction and genetic fingerprinting of a forest soil metagenome*. Appl. Soil Ecol. 42, 176–181.
- BAKKEN L. R., LINDAHL V., 1995. *Recovery of bacterial cells from soil*. [W:] *Nucleic acids in the environment: methods and applications*. TREVORS J. T., VAN ELSAS J. D. (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, 9–27.
- BEJ K. A., MAHBUBANI M. H., 1996. *Current development and applications of nucleic acid technology in the environmental sciences*. [W:] *Nucleic acid analysis. Principles and bioapplications*. DANTLER CH. A. (red.). Wiley-Liss, Inc., New York, 231–274.

- BEJ K. A., STEFFAN R. J., DiCEASRE J. L., HAFF L., ATLAS R. M., 1990. *Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 307-314.
- CARRIGG C., RICE O., KAVANAGH S., COLLINS G., O'FLAHERTY V., 2007. *DNA extraction metod affects microbial community profiles from soils and sediment*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 955-964.
- COOPER J. E., RAO J. R., 2006. *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. CAB International, Wallingford.
- CULLEN D. W., HIRSCH P. R., 1998. *Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR*. Soil Biol. Biochem. 30, 983-993.
- DUARTE G. F., SOARES ROSADO A., SELDIN L., KEIJZER-WOLTERS A. C., VAN ELSAS J. D., 1998. *Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community*. J. Microbiol. Methods 32, 21-29.
- FELSKE A., ENGELN B., NÜBEL U., BACKHAUS H., 1996. *Direct ribosome extraction from soil to extract bacterial rRNA for community analysis*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4162-4167.
- FROSTEGÅRD Å., COURTOIS S., RAMISSE V., CLERC S., BERNILLON D., LE GALL F., JEANNIN P., NESME X., SIMONET P., 1999. *Quantitation of bias related to the extraction of DNA directly from soil*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5409-5420.
- GABOR E. M., DE VRIES E. J., JANSSEN D. B., 2003. *Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction method*. FEMS Microbiol. Ecol. 44, 153-163.
- GRIFFITHS R. I., WHITELEY A. S., O'DONNELL A. G., BAILEY M. J., 2000. *Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5488-5491.
- HOLBEN W. E., JANSSON J. K., CHELM B. K., TIEDJE J. M., 1988. *DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 703-711.
- KOZDRÓJ J., 2003. *Różnorodność mikroorganizmów glebowych w świetle badań molekularnych*. Post. Mikrobiol. 43, 375-398.
- KRSEK M., WELLINGTON E. M. H., 1999. *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil*. J. Microbiol. Methods 39, 1-16.
- KUSKE C. R., BANTON K. L., ADORADA D. L., STARK P. C., HILL K. K., JACKSON P. J., 1998. *Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2463-2472.
- LIESACK W., JANSSEN P. H., RAINEY F. A., WARD-RAINEY N. L., STACKEBRAND E., 1997. *Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques*. [W:] *Modern soil microbiology*. VAN ELSAS J. D., TREVORS J. T., WELLINGTON E. M. H. (red.). Marcel Dekker Inc., New York, 375-433.
- LÜDEMANN H., ARTH I., LIESACK W., 2000. *Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 754-762.
- MILLING A., GOMES N. C. M., OROS-SICHLER M., GOTZ M., SMALLA K., 2005. *Nucleic acids extraction from environmental samples*. [W:] *Molecular microbial ecology*. OSBORN A. M., SMITH C. J. (red.). Tylor & Francis, New York, 1-24.
- MORE M. I., HERRICK J. B., SILVA M. C., GHORSE W. C., MADSEN E. L., 1994. *Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1572-1580.
- OGRAM A., SAYLER G. S., BARKAY T., 1987. *The extraction and purification of microbial DNA from sediments*. J. Microbiol. Methods 7, 57-66.
- OGRAM A., 2000. *Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future*. Soil Biol. Biochem. 32, 1499-1504.
- PAUL J. H., CAZARES L., THURMOND J., 1990. *Amplification of the rbcL gene from dissolved and particulate DNA from aquatic environments*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1963-1966.
- PERŠOH D., THEUERL S., BUSCOT F., RAMBOLD G., 2008. *Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil*. J. Microbiol. Methods 75, 19-24.
- ROBE P., NALIN R., CAPELLANO C., VOGEL T. M., SIMONET P., 2003. *Extraction of DNA from soil*. Eur. J. Soil. Biol. 39, 183-190.
- SAANO A., TAS E., PIPPOLA S., LINDSTRÖM K., VAN ELSAS J. D., 1995. *Extraction and analysis of microbial DNA*. [W:] *Nucleic acids in the environment: methods and applications*. TREVORS J. T., VAN ELSAS J. D. (red.). Springer-Verlag, Heidelberg, 49-67.
- SESSITSCH A., GYAMFI S., STRALIS-PAVESE N., WEILHARTER A., PFEIFER U., 2002. *RNA isolation from soil for bacterial community analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols*. J. Microbiol. Methods 51, 171-179.
- SOMMERVILLE C. C., KNIGHT I. T., STRAUB W. L., COLWELL R., 1989. *Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 548-554.
- STARK P. C., MULLEN K. I., BANTON K., RUSSOTTI R., SORAN D., KUSKE C. R., 2000. *Pre-PCR DNA quantitation of soil and sediment samples: method development and instrument design*. Soil Biol. Biochem. 32, 1101-1110.
- STEELE H. L., STREIT W. R., 2006. *Metagenomics for the study of soil microbial communities*. [W:] *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. COOPER J. E., RAO J. R. (red.). CAB International, Wallingford, 42-54.
- THAKURIA D., SCHMIDT O., MAC SIÚRTÁIN M., EGAN D., DOOHAN F. M., 2008. *Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses*. Soil Biol. Biochem. 40, 1390-1403.
- TORSVIK V., 1980. *Isolation of bacterial DNA from soil*. Soil Biol. Biochem. 12, 15-21.
- TREVORS J. T., VAN ELSAS J. D., 1995. *Nucleic acids in the environment: methods and applications*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- VAN ELSAS J. D., MÄNTYNEN V., WOLTERS A. C., 1997. *Soil DNA extraction and assessment of the fate of Mycobacterium chlorophenolicum strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence*. Biol. Fertil. Soils 24, 188-195.
- WELLER R., WARD D. M., 1989. *Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1818-1822.
- WELLINGTON E. M. H., MARSH P., WATTS J. E. M., BURDEN J., 1997. *Indirect approaches for studying soil microorganisms based on cell extraction and culturing*. [W:] *Modern soil microbiology*. VAN ELSAS J. D., TREVORS J. T., WELLINGTON E. M. H. (red.). Marcel Dekker, New York, 311-329.