

MIKROBIEN TUTKIMINEN



A. Kasvattamalla
mikrobiviljelminä

B. Molekyyliomenetelmin

Joulupuu ☺ Tähti: *Talaromyces stipitatus*,
Lehvät: *Aspergillus nidulans*, Koristeet:
Penicillium marneffe. Runko: *Aspergillus*
terreus <http://blogs.jcvi.org/tag/christmas-tree>

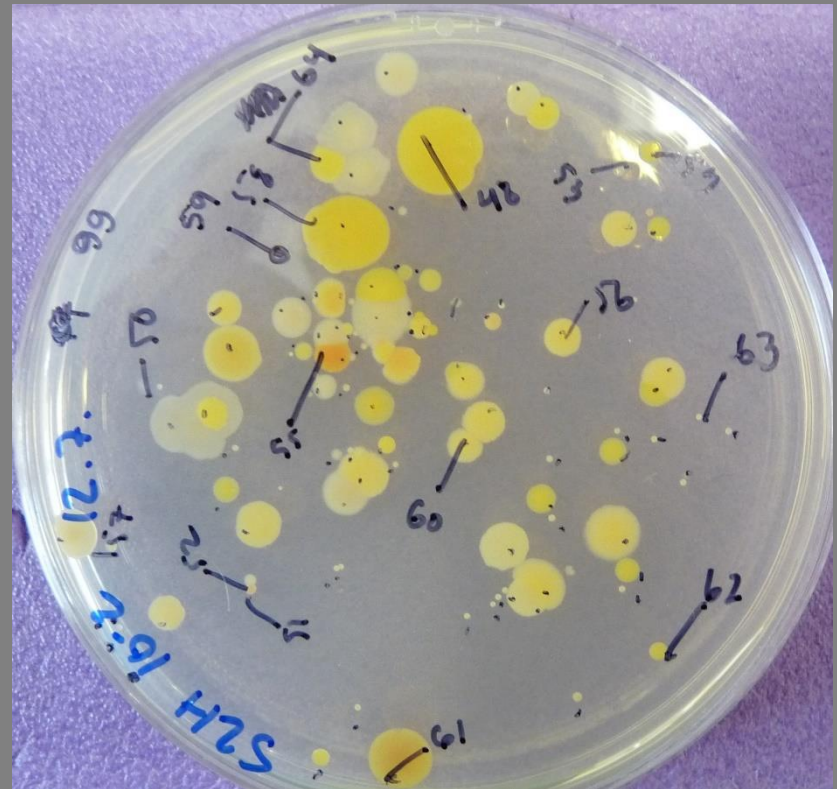
A. Mikrobiviljelmät

Koska yksittäiset mikrobit yleensä ovat liian pieniä tutkittavaksi, niiden määrää lisätään kasvattamalla, jolloin ne muodostavat silmin nähtäviä pesäkkeitä. Yksi pesäke syntyy yhdestä mikrobisolusta

Halutulle mikrobille soveltuvia ravinteita sekoitetaan agariin (hyytelöimisaine), kuumennetaan steriiliksi ja valetaan astioihin. Jäähdyessään elatusaineseos jähmettyy, jolloin sen pinnalle voidaan levittää sopivasti laimennettu mikrobinäyte

Kuvassa on 0,1 ml 1×10^{-2} laimennettu mikrobinäyte tunturikasvin lehden sisältä. Kuinka monta pesäkettä näet? Kuinka monta solua millilitrassa alkuperäistä näytettä oli?

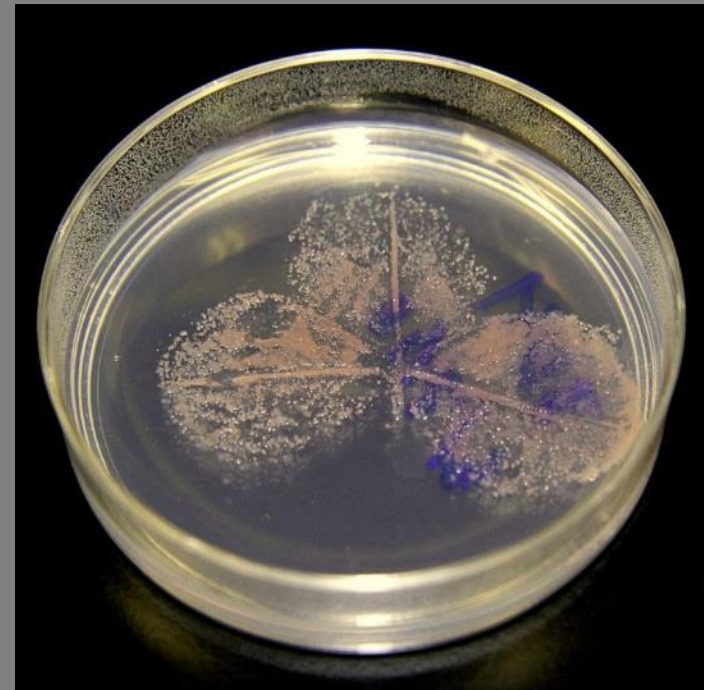
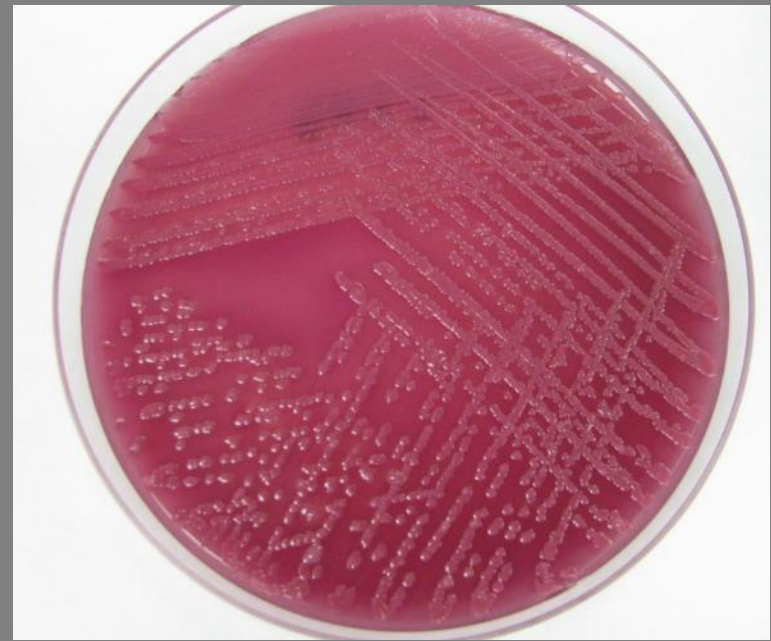
Huomaa erimuotoiset ja eriväriset pesäkkeet: ne kertovat, että näytteessä on useita bakteerilajeja



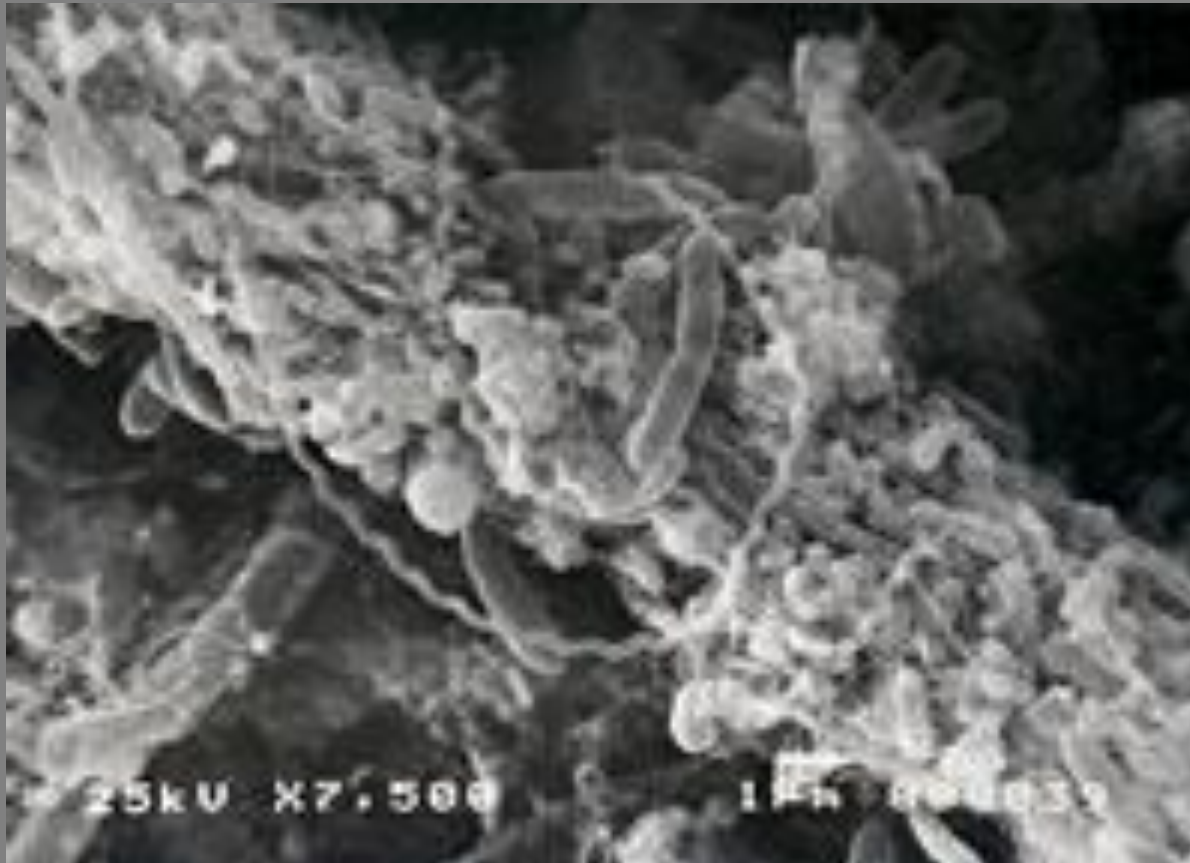
Halutulle mikrobille soveltuvia ravinteita sekoitetaan agariin, kuumennetaan steriiliksi ja valetaan astioihin.

Eri ympäristöistä eristetyille mikrobeille on kehitetty elatusaineita, jotka muistuttavat mahdollisimman paljon niiden alkuperäistä ympäristöä.

Kuvissa on *Salmonella enterica* maljalla, jonka olosuhteet muistuttavat ihmisen suolistoa, ja *Methylobacterium*- bakteereita maljalla, jonka hiilenlähteenä on vain metanolia (jota löytyy luonnosta mm. kasvien lehdistä)



Mikrobit ovat sopeutuneet eri olosuhteisiin, joten emme osaa kasvatata valtaosaa maapallon mikrobeista. Esimerkiksi vain n. 1% maaperän bakteereista on tähän mennessä onnistuttu viljelemään laboratoriossa.



Kuuman lähteen bakteereita monilajisena yhdyskuntana Azoreilla (saariryhmä Atlantissa).

Kuvassa on useita eri bakteerilajeja, kuten solujen erilaisesta koosta ja muodosta käy ilmi, mutta niillä ei ole lajinimiä, koska mitään niitä ei olla onnistuttu viljelemään laboratoriossa.

Useimmat mikrobit ovat pieniä ja jopa mikroskoopilla ulkonäöllinen erottelu on hankalaa. Joillakin sienillä tämä onnistuu hieman paremmin niiden itiöiden ja itiöemän (=”sieni”) morfologian perusteella, mutta valtaosa sienistäkin jää perinteisten tunnistusmenetelmien ulkopuolelle

Molekyylibiologisten menetelmien, erityisesti DNAn monistus- ja sekvensointimenetelmien, nopea kehittyminen on viime vuosina mahdollistanut ymmärrystämme mikrobeista ja koko eliökunnasta.

Tämä perustuu siihen, että kaikki elämä maapallolla perustuu DNAhan ja siihen tallennettuihin geeneihin. Selvittämällä eliöiden geenien samankaltaisuutta saamme tietoa niiden evoluutiosta ja keskinäisistä sukulaisuussuhteista

B. Molekyyliomenetelmät

DNA eliöiden tunnistena



?



?



?



DNA eliöiden tunnistena



...ATTGG**CGTA**AGCGTAGCATTAA**GGGC**...



?



...ATTGG**GGTT**AGCGTAGCATTAA**GATC**...



?



...ATTGG**CCTAT**GCGTAGCATTAA**GCGC**...



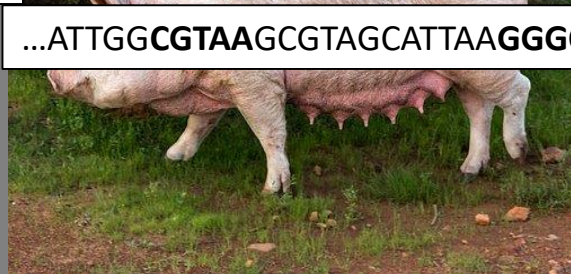
?



...ATTGG**GGTT**AGCGTAGCATTAA**GATC**...



...ATTGG**CGTA**AGCGTAGCATTAA**GGGC**...



...ATTGG**CCTAT**GCGTAGCATTAA**GCGC**...

DNA eliöiden tunnistena



...ATTGG**CGTA**AGCGTAGCATTAA**GGGC**...



...ATTGG**GGTT**AGCGTAGCATTAA**GATC**...



...ATTGG**CCTAT**GCGTAGCATTAA**GCGC**...



...ATTGG**GGTT**AGCGTAGCATTAA**GATC**...



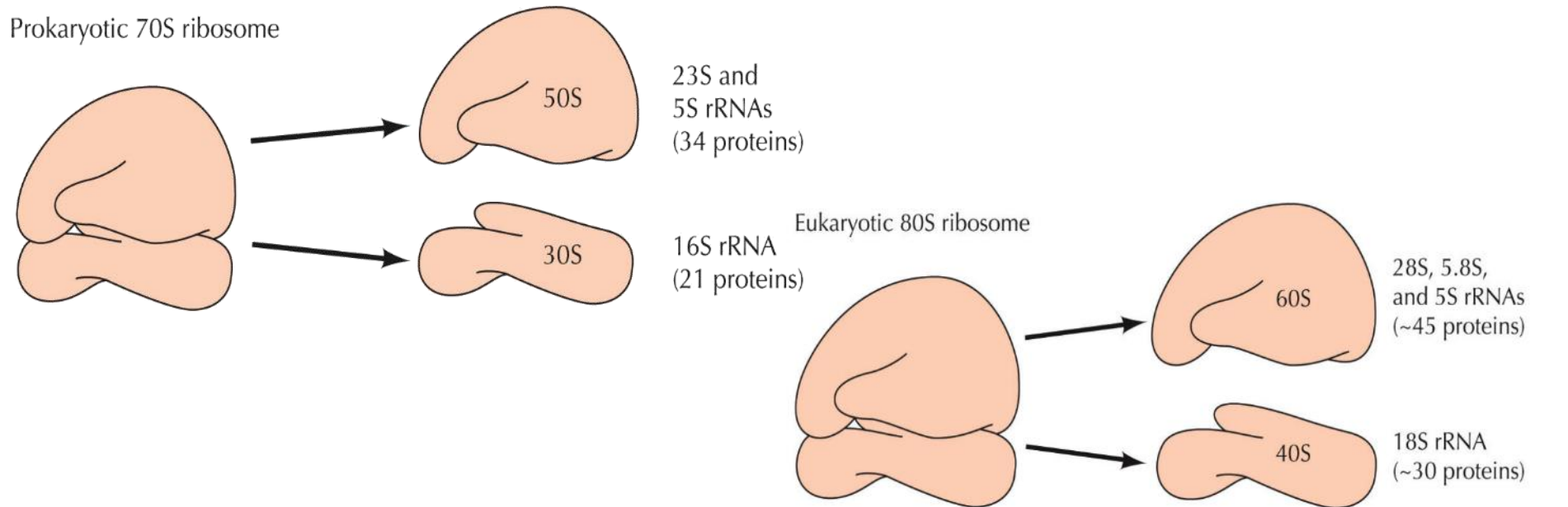
...ATTGG**CGTA**AGCGTAGCATTAA**GGGC**...



...ATTGG**CCTAT**GCGTAGCATTAA**GCGC**...

Molekyyliomenetelmät

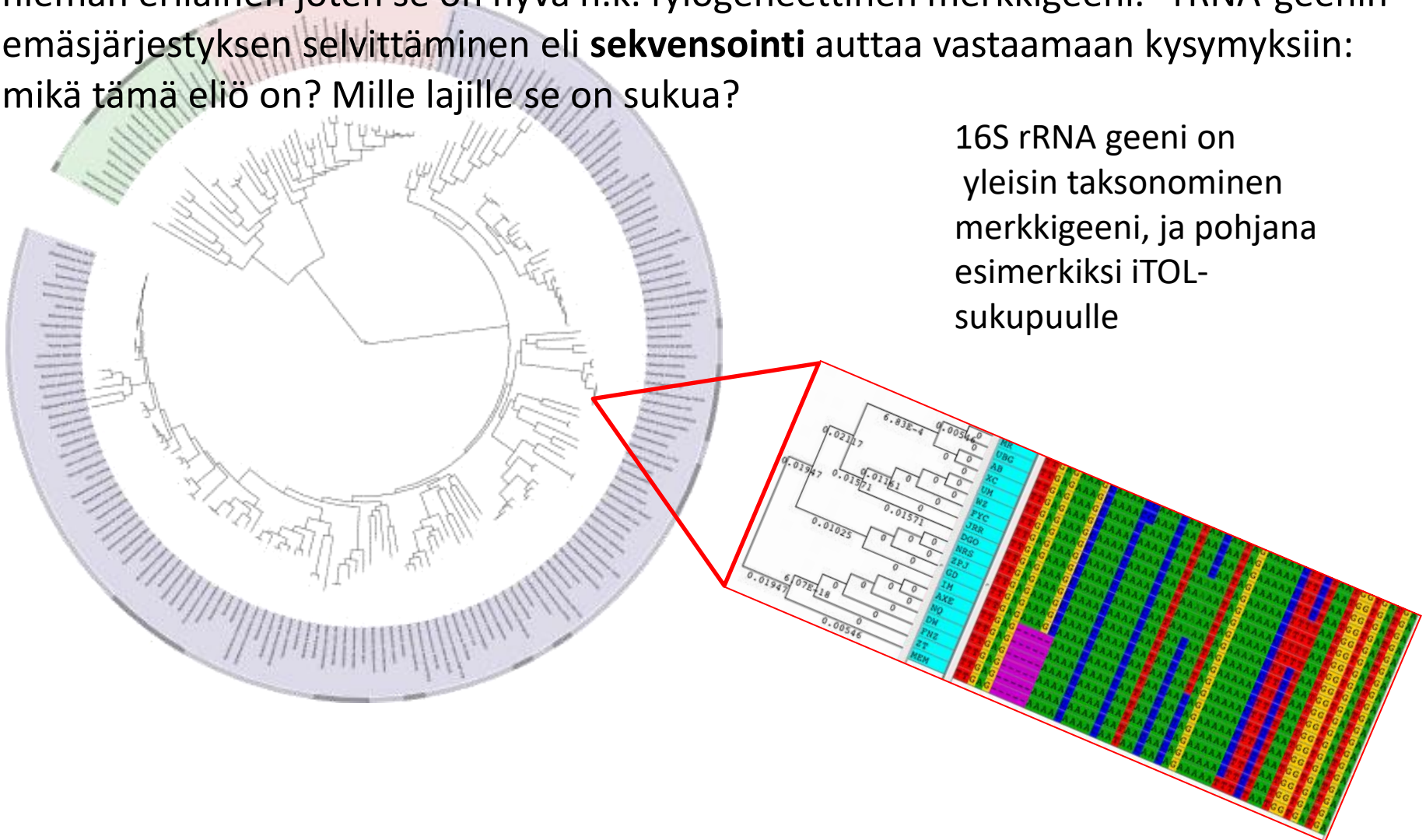
Ribosomit ja niiden ainesosina toimivien **rRNA**-molekyylien geenit löytyvät jokaiselta maapallon eliöltä, koska ne ovat välttämättömiä geneettisen koodin muuntamisessa valkuaisaineeksi, jotka taas puolestaan ovat pohja kaikkien solujen toiminnalle. Evoluution aikana ribosomien toiminta on pysynyt hyvin samankaltaisena, mutta molekyylien rakenteessa on tapahtunut myös mutaatioita ja erilaistumista. Tätä ribosomien ja niiden geenien vaihtelua käytetään hyväksi tunnistettaessa eliöitä molekyyliomenetelmin



Molekyylienetelmät

Ribosomien isomman alayksikön rRNA-geeni (**16S tai 18S-geeni**) on joka lajilla hieman erilainen joten se on hyvä n.k. fylogeneettinen merkkigeeni. rRNA-geenin emäsjärjestyksen selvittäminen eli **sekvensointi** auttaa vastaamaan kysymyksiin: mikä tämä eliö on? Mille lajille se on sukua?

16S rRNA geeni on yleisin taksonominen merkkigeeni, ja pohjana esimerkiksi iTOL-sukupuulle



Mitä näytteille tapahtuu Jyväskylän yliopistossa?

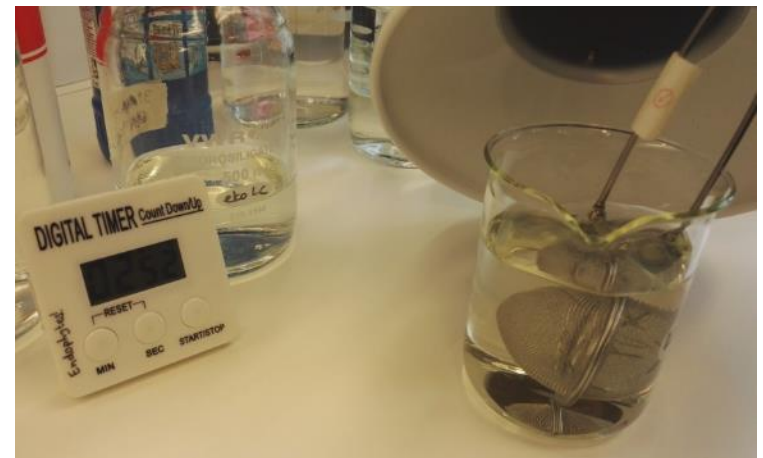
Laittakaa tosiaan näyteloota tulemaan
Eli

Riitta Nissinen
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Survontie 9
40500 Jyväskylä
puh 0503592729



Jyväskylän yliopistolla

1. Näytteet punnitaan – näin osaamme myöhemmin arvioida, kuinka paljon solukoissa on mikrobeja suhteessa painoon
2. Neulaset tai lehdet pintasteriloidaan. Näin poistamme lehtien pinnalla elävät mikrobit, ja pystymme analysoimaan vain endofyyttiset (kasvien sisällä elävät) bakteerit



Jyväskylän yliopistolla

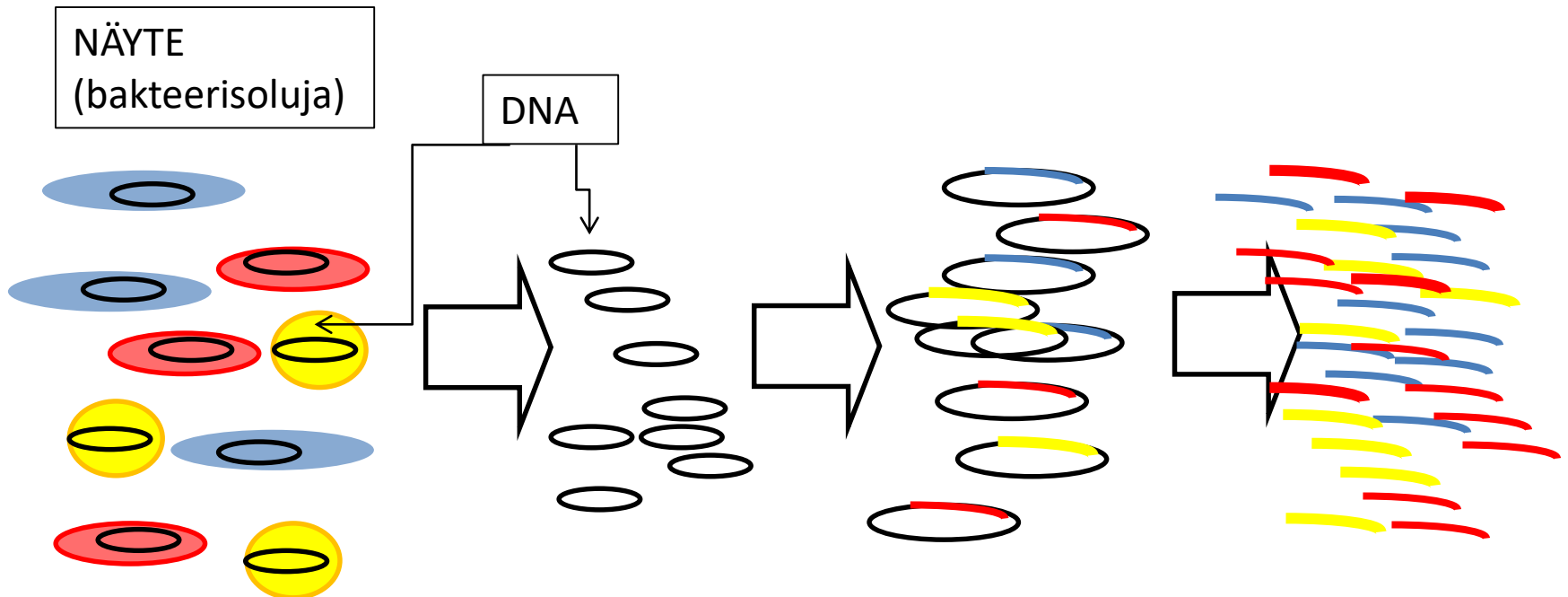
3. Näytteet säilytetään syväjäähäpakkastimessa, kunnes olemme vastaanottaneet ja steriloineet kaikki näytteet.



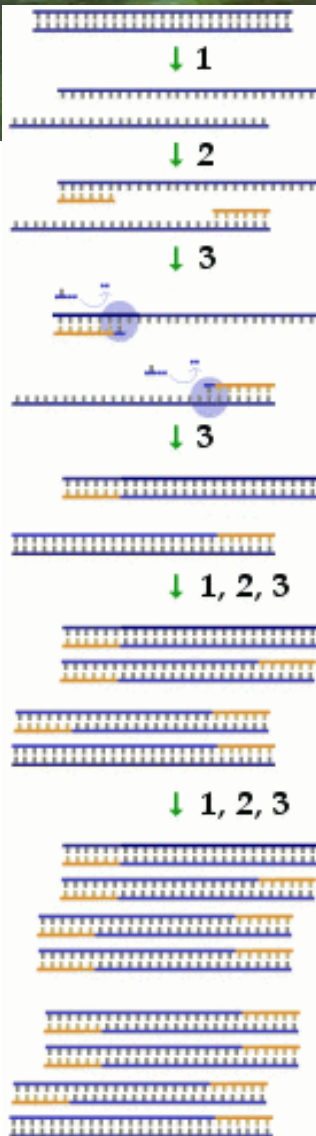
- 80°C lämpötilassa kasvien ja mikrobien elintoiminnot pysähtyvät, ja näytteissä ei tapahdu muutoksia.

Jyväskylän yliopistolla

4. Jotta näytteissä olevat bakteerit voidaan tunnistaa, eristämme näytteistä ensin niiden **DNA**n. Näytteistä eristetään n.k. yhteisöDNA, jossa kaikkien eliöiden DNA on samassa näytteessä.
5. Monistamme näytteistä eristettyä DNASTa jokaisen bakteerin **16S rRNA** geenin käyttäen **polymeraasireaktiota (PCR)**, jokaisesta näytteestä erikseen.



PCR, polymeraasiketjureaktio



PCR-reaktion osat

kopioitava DNA
alukkeet (primerit)
DNA-polymeraasi
nukleotidejä (dNTP)
puskuriliuos
ioneja (Mn^{2+} tai Mg^{2+} , K^{+})

PCR eli polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction) on joustava tapa DNA:n kopiointiin. Sen avulla yksittäistä DNA-molekyylin osaa, esim. haluttua geeniä voidaan monistaa miljooniksi kopioksi.

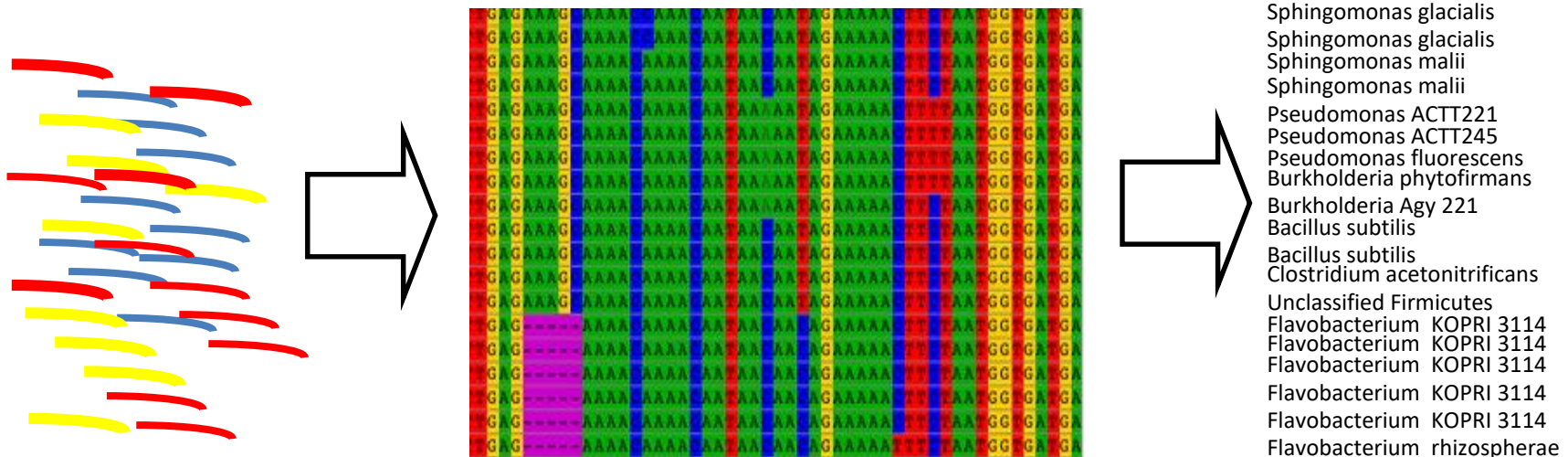
PCR perustuu DNAta kopioivaan polymeraasientsyymiin. Entsyymi on löydetty kuumissa lähteissä elävistä bakteereista.

Polymeraasin lisäksi tarvitaan DNAn rakennuspalikoita, nukleotideja (A,T,G,C), alukkeet, jolla valitsemme monistettavan DNA-pätkän alku- ja loppukohdan, sekä polymeraasin toiminnalle tarpeelliset suolat.

PCR –reaktioita voidaan käyttää DNAn rikastamisesen, mutta se on pohjana myös useimmille DNAn sekvensointimenetelmille, ja muissa sovelluksissa biologian ja lääketieteen laboratorioissa

16S rRNA geenit

6. Sekvensoimme näytteiden sisältämät 16S rRNA-geenit, eli selvitämme niiden DNA:n emäsjärjestyksen. Näin voimme tunnistaa näytteessä olevat bakteerilajit (= vastata kysymykseen ”ketä siellä on?”). Tämä perustuu siihen, että **16S rRNA-geeni** on 1. olemassa jokaisella eliölajilla, koska se on välttämätön proteiinien synteesille ja 2. jokaisella lajilla hieman erilainen. Käyttämämme sekvensointitekniikka mahdollistaa näytteen kaikkien bakteerien 16S rRNA-geenin samanaikaisen sekvensoinnin.

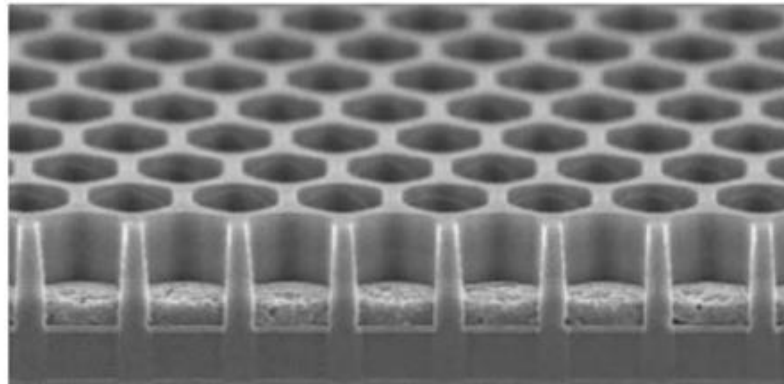


NGS



Käytämme näytteiden analysointiin NGS-sekvensointimenetelmää (Next Generation Sequencing). Menetelmän avulla pystymme samaan aikaan selvittämään jopa 4 000 000 näytteessä olevan bakteerin 16S rRNA-geenin sekvenssin samanaikaisesti.

Tämä perustuu siihen, että kasvinäytteistä eristetystä DNASTa monistetut geenipätkät erotellaan mikrosirujen avulla jokainen omaan mikroskooppiseen kaivoonsa.



DNA-näytteet siirretään mikroskooppisten kaivojen pohjalle linkoamalla hyvin suurella nopeudella

Elektronimikroskooppikuva sekvensointisirun kaivoista. Kaivojen läpimitta on 1,3 μM

NGS

Näytekaivot huuhdellaan vuorotellen eri DNA:n muodostavilla nukleotideilla, yksi kerrallaan (kuvassa nukleotideja A,T,C,G sisältävät putket eri symboleilla merkittynä).



IonTorrent PGM sekvensointilaite – hieman kotimikroa isompi

Nukleotidi sitoutuu kaivossa syntetisoitavaan DNA:han, jos sille komplementaarinen nukleotidi löytyy templaatti-DNA:sta. Nukleotidin sitoutuminen (ja DNA-ketjun kasvaminen) vapauttaa yhden protonin. Tämä havaitaan yksilöllisesti jokaisen näytekaivon pohjassa olevan anturin avulla. Mikäli nukleotidi ei sitoudu (se on ”väärä” sekvenssiin nähden, protonia ei synny. Näin pystymme ”lukemaan” jokaisen näytteen DNA:n sekvenssin yksilöllisesti

Sekvensointi

<https://www.youtube.com/watch?v=jFCD8Q6qS>
TM

lontorrent sequencing tech

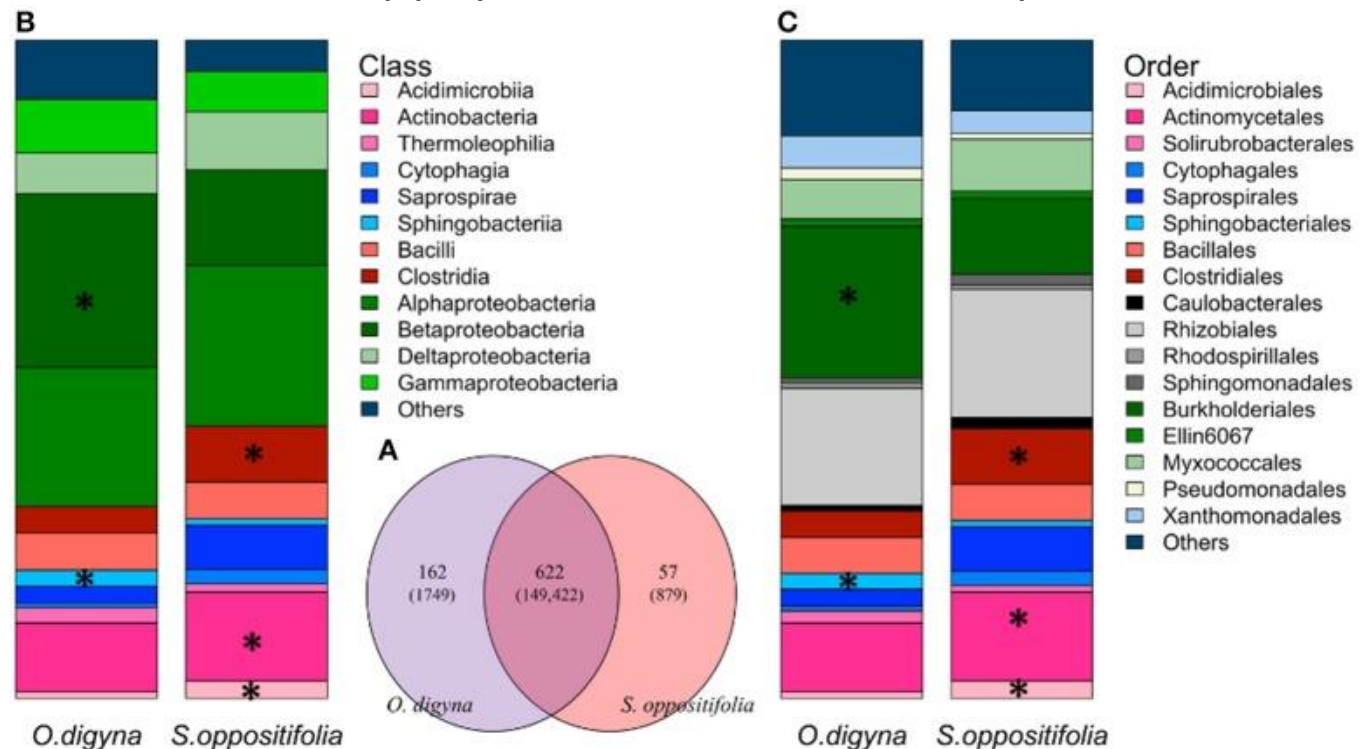
<https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbXlfu>
Ks

Jyväskylän yliopistossa

7. Sekvensointireaktioiden jälkeen jokaisen näytekaivon DNA-pätkän sekvenssi on selvillä. Sekvenssit prosessoidaan, ja niitä verrataan tunnettujen bakteereiden vastaavaan sekvenssiin. Näin tunnistamme eri näytteissä olevat bakteerit, ja pystymme myös arvioimaan niiden suhteellista määrää eri näytteissä. Osa bakteereista on tuntemattomia – nämäkin pystymme kuitenkin yleensä luokittelemaan jollekin tasolle. Näin pystymme vertaamaan eri näytteiden mikrobiyhteisöjä

Esimerkkinä kahden tunturikasvin bakteeriyhteisöjen vertailu.

Kumar et al., 2017, Front Microbiol



Jyväskylän yliopistolla

8. Kun olemme saaneet ”väestölaskennan” tehtyä, pääsemme vertaamaan eri kasvilajien, eri paikkakuntien ja eri vuodenaikoina otettujen näytteiden bakteeriyhteisöjä keskenään.

Voimme vastata kysymyksiin:

- onko eri paikkakuntien mikrobiomeissa eroja? Löydämmekö eri bakteereita Ivalosta kuin Vantaalta?

- onko eri kasvilajien välillä eroja? Edustavatko männyn ja kuusen neulasten endofyyttibakteerit samoja vai eri bakteerisukuja?

ja se tämän projektin tärkein kysymys:

- onko endofyytti-yhteisöissä vuodenaikaisvaihtelua? Vaihtaako esim. mänty bakteerikumppaneitaan talveksi?

Kaikki nämä kysymykset auttavat meitä osaltaan ymmärtämään myös bakteeriyhteisöjen toimintaa ja merkitystä kasvi-isännilleen

Tästä kaikesta lisää huhtikuussa, kun saamme kaikki lähetetyt näytteet analysoitua!