

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Taavi Võsumaa

**Mikroorganismide identifitseerimine keskkonaproovides
nukleiinhapete hübridiseerimise teel mikrokiipidel**

Bakalaureusetöö

Juhendaja prof. PhD Mairo Remm

TARTU 2005

Sisukord	lk
Sisukord	2
Lühendid	3
Sissejuhatus	4
1. Nukleiinhapete hübridiseerimine vs klassikaline kultiveerimine	5
2. Erinevaid meetodeid mikroobide identifitseerimiseks hübridiseerimise abil	7
2. 1 PCR kasutamise eelised	7
2. 2 PCR kasutamise puudused	8
2. 3 Otseselt PCR-ga seotud meetodid	9
2. 3. 1 PCR-geelektroforees	9
2. 3. 2 RFLP analüüs	10
2. 3. 3 Korduvatel elementidel baseeruv PCR	10
2. 4. Valikuliselt PCR-ga seotud meetodid	11
2. 4. 1 Koloonia hübridisatsioon	11
2. 4. 2 <i>In situ</i> hübridisatsioon	11
2. 4. 3 Slot blot ja dot blot hübridisatsioon	11
2. 4. 4 Southern ja northern blot	12
2. 4. 5 Hübridisatsioon mikrokiibil	12
3. Hübridisatsioonil kasutatavad märklaudjärjestused	13
3. 1 DNA klassi märklaud	13
3. 1. 1 rDNA	13
3. 1. 2 16S-23S rDNA vaheline regioon	14
3. 1. 3 Muud geenid	14
3. 2 RNA klassi märklaud	15
3. 2. 1 5S rRNA	15
3. 2. 2 16S rRNA ehk SSU rRNA	15
3. 2. 3 23S rRNA	16
3. 2. 4 tmRNA	16
4. Keskkonnaproovide eeltöötlemine hübridisatsiooniks	17
4. 1 Proovide esialgne töötlemine ja säilitamine	17
4. 2 Rakkude lõhkumine ja nukleiinhapete eraldamine	18
5. Olemasolevad mikrokiipidel põhinevad rakendused	19
5. 1 Sissejuhatus	19
5. 2 Fülogeneetilised oligonukleotiidikiibid (POA)	20
5. 3 Koosluse genoomikiibid (CGA)	22
5. 4 Funktsionaalsed geenikiibid (FGA)	25
5. 4. 1 PCR-ga genereeritud proovidega FGA	25
5. 4. 2 Sünteetiliste oligonukleotiidiproovidega FGA	26
5. 5 Kogu genoomi avatud lugemisraami kiibid	27
5. 6 Kiibid juhuslike genoomifragmentidega	28
5. 6. 1 Tuhandaluseliste proovidega kiip	28
5. 6. 2 Nonameersete proovidega kiip	29
6. Tuleviku arengusuunad	30
Kokkuvõte	33
Summary	34
Kasutatud kirjandus	36
Kasutatud veebiaadressid	42

Lühendid

BAC	– bacterial artificial chromosome – bakteriaalne kunstkromosoom
BOX	– 154 aluspaariline korduselement bakterigenoomis
bp	– base pair – aluspaar
CFU	– colony forming unit – kolooniat moodustav üksus
CGA	– community genome array – koosluse genoomikiip
ERIC	– enterobacterial repetitive intergenic consensus – enterobakteriaalsed korduvad geenidevahelised konsensusjärjestused
FGA	– functional gene array – funktsionaalne geenikiip
FISH	– fluorescent <i>in situ</i> hybridisation
kb	– kilobase – tuhat aluspaari
MPN	– most probable number – kõige tõenäosem arv
ORF	– open reading frame – avatud lugemisraam
PCR	– polymerase chain reaction – polümeraasi ahelreaktsioon
POA	– phylogenetic oligonucleotide array – fülogeneetiline oligonukleotiidikiip
RDP	– Ribosomal Database Project
REP	– repetitive extragenomic palindromic sequences – 35-40 aluspaarilised kromosoomivälised palindroomsed kordusjärjestused
RFLP	– restriction fragment length polymorphism – restriksioonifragmendi pikkuse polümorfism
RSGP	– reverse sample genome probing
SSU	– small subunit (SSU rRNA = 16S rRNA)

Sissejuhatus

Teadmised meid ümbritsevatest mikroobikooslustest on kaua aega olnud tagasihoidlikud, sest mikrobioloogide peamine tööpõld – kultiveerimine – on võimaldanud uurida vähem kui 1% biosfääri eeldatavast mitmekesisusest. Sekvencerimise leiutamine pani aluse mikroobide identifitseerimisele ning fülogeneetilise kuuluvuse määramisele nukleiinhapete järjestuste põhjal ilma kultiveerimiseta. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) kiirendas oluliselt DNA järjestuste eraldamise protsessi, mis eelnevalt sõltus aeganõudvatest kloonimise ja sõelanalüüsimise etappidest, kuid uurida suudeti väheseid järjestusi korraga. Nüüd, mikrokiipide väljaarendamisega, on tekkinud enneolematu võimalus massiivselt paralleelseks nukleiinhapete tuvastamiseks ning mikroobsete koosluste uurimiseks looduslikes keskkondades. Mikrokiipidega on võimalik ühes ainsas katses identifitseerida kümneid geene või muid järjestusi.

Keskkonnaproovide analüüs mikrokiipidega on küll alles lapsekingades, kuid tehnoloogia on pälvinud suurt tähelepanu ning järjest rohkem teadlasi töötab välja uusi kiibiformaate ning täiendab vanu. Töötatakse välja kiipe, uurimaks mikroobikoosluste struktuuri ja funktsiooni ning nende ajalist ja ruumilist dünaamikat, et paremini mõista mikroorganismide rolli ning kasutamisevõimalusi lämmastiku- ja süsinikuringes, fosfori utiliseerimises, orgaaniliste saasteainete lagundamises, metallide ümberjaotamises keskkonnas, fütoremediatsioonis, elavhõbeda eemaldamisel veest ja pinnasest ning paljudes teistes protsessides.

1. Nukleiinhapete hübriidiseerimine vs klassikaline kultiveerimine

Mikrobioloogia sünnist alates on mikroobide identifitseerimine ning arvukuse määramine nii looduslikest keskkondadest kui ka kliinilistest proovidest põhinenud oskusel neid kultiveerida. Isoleeritud puhaskultuuride või defineeritud segakultuuride iseloomustamiseks kasutati ja kasutatakse siiani erinevaid biokeemilisi, füsioloogilisi ning morfoloogilisi omadusi. Levinud meetodid elus bakterite arvukuse määramiseks on erineva lahjendustega proovidest moodustunud CFU-de (kolooniat moodustavate üksuste) loendamine Petri tassilt ja MPN (kõige tõenäosem arv) arvutamine, kuid nende kasutus ei laiene kõikidele mikroorganismidele (Amann jt., 1995).

Kultiveerimisel on aga üks suur puudujääk – enamikke mikroorganisme ei suudeta sobiva meetodika puudumise tõttu tänapäevani kultiveerida. Oleks vale öelda, et neid on võimatu kultiveerida, sest looduses nad ju eksisteerivad. Lisaks, CFU-sid loendades võib bakterite arvukust alahinnata kuni mitmeid suurusjärke, sest mikroobidel on omadus langeda mittekultiveeritavasse olekusse (Amann jt., 1995). Kultuuride identifitseerimine klassikalistel meetodil on ka aeganõudev, paljalt mikroobide kasvatamine vajaliku rakutiheduseni võib aega võtta päevi.

Kuigi bakterite morfoloogiat on võimalik mikroskoobi all jälgida ka ilma kultiveermata, siis erinevalt loomadest ja taimedest on mikroorganismide morfoloogia enamasti liiga lihtne, et olla heaks klassifitseerimise ning identifitseerimise aluseks. Geneetiliselt äärmiselt erinevad bakterid võivad morfoloogiliselt olla eristamatud. Evolutsiooniliselt üks varem hargnevaid baktereid, hüpertermofiil *Aquifex pyrophilus*, näeb välja nagu tüüpiline batsill. On ka vastupidiseid näiteid morfoloogiliselt hästi eristatavatest kultiveeritamatutest mikroobidest (Amann jt., 1995).

Sellest tulenevalt on igasugune identifitseerimine ja usaldusväärne arvukuse määramine ilma kultivatsioonita revolutsiooniline (Amann jt., 1995). Üheks selliseks paljulubavaks ja ennast mitmetes katsetes tõestanud alternatiiviks on nukleiinhapete hübriidiseerimisel põhinevad tehnikad (Amann jt., 1995; Zhou, 2003). Erinevalt klassikalistest meetoditest võivad nad olla kiired, suure läbilaskevõimega (Zhou, 2003)

ning võimaldada väga erinevate mikroobikoosluste analüüsimist otse keskkonnaproovidest (Amann jt., 1995; Smallt., 2001; Keramas, 2004; Zhou, 2003).

Nukleiinhapete hübridiseerimine abil on põhimõtteliselt võimalik tuvastada absoluutselt kõiki erinevaid mikroorganisme, sest ülimuslikult sõltub kõikide organismide fenotüüp nende genotüübist. Senised katsed on näidanud, et hübridisatsioonitehnikad on potentsiaalselt spetsiifilised – suudetakse eristada ühenukleotiidilise erinevusega DNA fragmente (Zhou ja Thompson, 2002; El Fantroussi jt., 2003); tundlikud – nukleiinhappeid on võimalik detekteerida otse keskkonnaproovidest, ilma eelkasvatusest või isegi amplifikatsioonita (Small jt., 2001; El Fantroussi jt., 2003); kvantitatiivsed (Zhou ja Thompson, 2002); suure läbilaskevõimega – kiired (Kempf jt., 2000; Zhou, 2003) ning paralleelanalüüsi võimalusega (Zhou, 2003); paindliku lahutusvõimega – erinevaid sihtmärkjärjestusi ning hübridisatsioonitingimusi valides on võimalik mikroobe identifitseerida nii tüve, liigi, perekonna kui ka kõrgematel tasanditel (Zhou, 2003; Amann, 1995).

2. Erinevaid meetodeid mikroobide identifitseerimiseks hübriidiseerimise abil

Hübriidiseerimisel põhinevaks identifitseerimise meetodiks võib põhimõtteliselt nimetada mistahes meetodit, kus leiab aset DNA-DNA või DNA-RNA molekulide hübriidiseerimine.

Laias laastus võib kasutatavad meetodid jagada kaheks: otseselt PCR-ga seotud, kus PCR on keskse tähtsusega ning valikuliselt PCR-ga seotud meetodid, kus PCR ei kasutata või kasutatakse vastavalt vajadusele, näiteks mikrokiibid.

PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon on meetod, mida kasutatakse DNA molekulide spetsiifiliseks paljundamiseks. PCR koosneb kolmest põhilisest etapist: DNA molekulide denatureerimine üheaahelalisteks, DNA praimerite seondumine paljundatavale DNA-le, uute ahelate süntees termoresistentse polümeraasiga. Neid kolme etappi korratakse, tavaliselt 30-40 tsüklit, kuni saavutatakse piisav DNA kontsentratsioon edasiseks uurimistööks.

Mikrokiipide all mõistetakse antud töös klaasplaati, kuhu on robotite abil kovalentsete sidemetega korrapäraselt kinnitatud erinevad lineaarsed üheaahelalised DNA molekulid. Klaasplaat võib olla vooderdatud polüakrüülamiidgeeliga, mispuhul DNA kinnitatakse kovalentselt geelipatjade külge (Guschin DY, 1997).

2.1 PCR kasutamise eelised

PCR amplifikatsioon on pakkunud võimsat ja kultiveerimisest sõltumatut vahendit mikroobikoosluste analüüsiks, mis on täiendanud teadmisi mikroobide mitmekesisusest ja evolutsioonist. Väljatöötatud PCR protokollide lihtsus, usaldusväärsus, mõistlik kiirus ning tulemuste reprodutseeritavus võimaldab tema kasutamist rutiinsetes analüüsides ning mass-sõelanalüüsimeetodites (Keramas jt., 2004). PCR paljundab üles ka surnud rakke ning tundmatuid mikroobe, mis võib segada arvukuse määramist, kuid toiduanalüüsides on see eeliseks, sest ka inaktiivsed ja tundmatud bakterid võivad tervisele ohtlikud olla (Keramas jt., 2004).

Madala biomassi korral keskkonnaproovides võivad ka hea tundlikkusega hübriidiseerimismeetodid, nagu mikrokiibil põhinevad, anda nõrki ning raskelt

analüüsitavaid signaale. Tundlikkuse parandamiseks on tõenäoliselt lihtsam kasutada PCR; kui optimiseerida hübriidsatsioonitingimusi ning detektsiooniriistvara. Samas kaasneb PCR-ga terve rida unikaalseid ohte.

2. 2 PCR kasutamise puudused

Kõikide eeliste kõrval on PCR meetodil mitmeid puudusi, millest osad põhjustavad lihtsalt ebamugavusi, teised aga võivad viia katsete tulemuste vale tõlgendamiseni.

Esiteks, PCR nõuab lisakulutusi. Nii aparatuur kui kasutatavad lahused ning ensüümid on suhteliselt kallid võrreldes kultiveerimisega. Kulutusi on võimalik kokku hoida, tehes mitu reaktsiooni ühes segus, kuid see nõuab hoolikat praimerite disainimist ning hübriidsatsioonitingimuste valimist, et vältida mittespetsiifilisiprodukte.

PCR võtab aega. PCR kasutamine koos mikrokiibi tehnoloogiaga, kus saab analüüsida tuhandeid nukleiinhappe fragmente korraga, võib muuta läbilaskevõime hoopis piiravaks faktoriks, mis on muidu mikrokiipide suureks eeliseks (Vora jt., 2004). Lisaks võib keskkonnas esineda PCR inhibiitoreid, mis tuleb enne reaktsiooni kõrvaldada (Rasmussen jt., 1996).

PCR-i on keeruline seostada välitingimustes läbiviidavate hübriidseerimiskatsetega (Small, 2001).

Selektiivse praimeerimise, kõrgemat järku struktuuride või sihtmärk järjestuse suhteliselt väikese hulga tõttu võib PCR paljundada erinevaid sihtmärke ebahühtlaselt, anda ebaspetsiifilisi produkte (Amann jt., 1995;). PCR amplifitseerib selektiivselt näiteks madala G + C sisaldusega matriitse, kuna neid on lahuses üheaheelalisena rohkem (Suzuki ja Giovannoni, 1996).

Olenemata matriitside alghulgast lahuses, võivad erinevate amplikonide kontsentratsioonid pärast amplifikatsiooni läheneda suhtele 1:1 nn inhibitoorse efekti tõttu, mis segab efektiivselt kvantitatiivset analüüsi. Seda seletatakse produktide paljunemise käigus amplikonide aina suuremast tõenäosusest praimeril asemel teineteisega seonduda. (Suzuki ja Giovannoni, 1996). Arvukuse määramisel tuleb arvesse võtta ka, et rDNA operonide koopiaarv on mikroobiti erinev ning andmebaaside

andmetel universaalsed praimerid võivad looduses osutada selektiivseteks (Cottrell ja Kirchman, 2000).

Homoloogiliste geenide koamplifikatsioon viib kimääride moodustumiseni (Wang G ja Wang Y, 1996; Amann jt., 1995). Kimäärid on hübriidse järjestusega DNA molekulid, mis tekivad PCR-i käigus kui üks uuritav DNA fragment toimib teise, homoloogse, fragmendi praimerina. Kimäärid segavad proovide analüüsi ning võivad viia olematute liikide „avastamiseni” (Wang G ja Wang Y, 1996). Peaaegu identsete SSU rDNA järjestuste koamplifikatsioonil on täheldatud 30% kimäärsete järjestuste moodustumist, 82% ja 86% sarnasuse puhul tekkis vastavalt 12,9% ning 14,7% kimääre (Wang G ja Wang Y, 1996). Moodustunud kimääre paljundatakse PCR-s edasi võrdselt teiste produktidega (Amann jt., 1995).

Kokkuvõtteks võib siiski öelda, et õigete hübriidisatsioonitingimuste ja praimerite valikul ei ole spetsiifilisuse saavutamise ületamatuks probleemiks. Probleemiks on pigem optimaalsete protokollide väljatöötamine, mis võib võtta palju aega ning ressursse. Esialgsetesse PCR tulemustesse on soovitatav suhtuda kriitiliselt, et võimalikke valeinterpretatsioonide ära hoida.

2. 3. Otseselt PCR-ga seotud meetodid

2. 3. 1 PCR-geelelektroforees

PCR-geelektroforeesi abil saab kontrollida teatud DNA või RNA järjestuste esinemist uuritavas nukleiinhapete segus. PCR etapil on kaks eesmärki: esiteks, kopeerida segust nukleiinhapest ainult uuritav fragment ja teiseks, paljundada seda kuni detekteeritava kontsentratsioonini. Moodustunud ampliconid lahutatakse geelektroforeesiga ning bändide mustri abil saab tuletada informatsiooni nukleiinhapete järjestuse ning mikroobse päritolu kohta.

PCR-geelektroforeesi üheks rakenduseks on nn ribotüüpimine. Ribotüüpimisel paljundatakse PCR-ga üles erinevaid rDNA piirkondi, lahutatakse geelektroforeesil ning saadud mustreid kasutatakse mikroobide identifitseerimiseks.

PCR-geelektroforeesi puuduseks see, et mittespetsiifilised PCR-produktid segavad otseselt tulemusi (Volokhov, 2002). Intensiivse taustavärvumise ning

saastavate PCR produktide juuresolekul muutub bändide eristamine kergesti võimatuks (Fredricks ja Relman, 1999). Kompleksete proovide või mitmete praimerite kasutamise korral võib geelelektroforeesi asemel või talle lisaks PCR siduda hübriidisatsioonietapiga, et tõsta nii detekteerimise tundlikkust kui täpsust (Keramas, 2003). PCR-geelektroforeesi eelisteks on lihtsus ja reprodutseeritavus.

Amplifitseeritavate piirkondade ning lisareaktsioonide spetsiifika põhjal võib PCR-geelektroforeesil põhinevaid meetodeid jaotada alamklassideks.

2. 3. 2 RFLP analüüs

RFLP analüüs ehk restriksioonifragmentide pikkuste polümorfismi analüüs põhineb erinevate pikkustega nukleiinhapete fragmentide tekkimisel erinevate mikroobide DNA lõikamisel samade restriksiooniensüümidega. Erinevatel bakteritel paljundatakse samu primereid kasutades PCR-ga üles uuritavad DNA piirkonnad, mis lõigatakse restriksiooniensüümidega katki ning lahutatakse seejärel geelil. Saadud bändide mustrit saab kasutada mikroobide identifitseerimiseks.

2. 3. 3 Korduvatel elementidel baseeruv PCR

Korduvatel elementidel baseeruv PCR kasutab praimerit seondumiskohtadena kõrgelt konserveerunud DNA kordusjärjestusi, mis esinevad enamikel Gram-positiivsetel ja Gram-negatiivsetel bakteritel (Lupski ja Weinstock, 1992). On leitud kolm kordusjärjestuste perekonda: 35-40 aluspaari pikkused korduvad ekstrageensed palindroomsed järjestused (REP); 124-127 aluspaarilised enterobakteriaalsed korduvad geenidevahelised konsensusjärjestused (ERIC); 154 aluspaarilised BOX elemendid (kordusjärjestused bakterigenoomis). Primerid on suunatud korduselementidest väljapoole, nii et PCR-ga amplifitseeritakse kordusjärjestuste vahelisi genoomi regioone. Amplikonid lahutatakse geelelektroforeesil ning saadakse profiilid ehk sõrmejäljed, millega saab baktereid identifitseerida liigi kuni tüve tasemel (Versalovic jt., 1994). Vastavalt amplifitseeritud kordusjärjestustele nimetatakse meetodit REP-PCR, ERIC-PCR või BOX-PCR (<http://www.msu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>).

2. 4. Valikuliselt PCR-ga seotud meetodid

2. 4. 1 Koloonia hübridisatsioon

Koloonia hübridisatsioonil kantakse eelnevalt söötmeplaadil kasvatatud bakterikolooniad nailonfiltrile, kus rakud lüüsitakse kuumusega ning hübridiseeritakse märgistatud proovidega (Kaufmann jt., 1997). Koloonia hübridisatsioon on aeganõudev ning sobib vaid kultiveeritavate bakterite identifitseerimiseks. PCR ei kasutata.

2. 4. 2 *In situ* hübridisatsioon

In situ hübridisatsioonil kinnitatakse rakulüsaat või fikseeritud terved rakud mikroskoobiklaasile ning hübridiseeritakse rRNA vastu konstrueeritud märgitud proovidega (Amann jt., 1989). Levinum on fluorestseeruvate märgetega *in situ* hübridisatsioon ehk FISH, sest see annab hea lahutusvõimega signaali ja seda saab kohe pärast katset detekteerida (Amann jt., 1995). Tervete rakkude fikseerimisel jääb raku morfoloogia intaktseks, kuid märgetega proovid pääsevad rakku sisse ning hübridiseeruvad sealsete sihtmärkidega. See võimaldab jälgida uuritavate mikroobide morfoloogiat ning ruumilist paigutust proovis (Amann jt., 1989). Erinevalt mikrokiipidest ei sobi *in situ* hübridisatsioon massianalüüsiks ning tema limiteerivateks faktoriteks on ribosoomide arv bakteris, RNA kättesaadavus, raku seina permeabiliseeritavus (Cottrell ja Kirchman, 2000) ning korruga kasutatavate erinevate proovide arv. PCR ei kasutata.

2. 4. 3 Slot blot ja dot blot hübridisatsioon

Slot blot ja dot blot hübridisatsioonil kinnitatakse kogu puhastatud DNA või RNA otse ühte kohta membraanile ning hübridiseeritakse märgitud proovidega. Kuna sihtmärgid on kõik üheskoos, saab uurida vaid nii palju erinevaid sihtmärke kui palju on erinevaid signaale andvate märgetega proove. Varieeruva pikkusega proove kasutades on võimalik sama tüüpi signaalid geelektroforeesiga ruumiliselt lahutada ning tuvastada mitmeid sihtmärke korruga (Wang G ja Wang Y, 1995). Antud töös kasutati

DNA sihtmärkide amplifitseerimiseks PCR-i, kuid RNA-d saab detekteerida ka ilma (Amann jt., 1989).

2. 4. 4 Southern ja northern blot

Southern ja northern blot puhul analüüsitakse vastavalt kas rakkudest eraldatud kogu DNA-d või RNA-d. Nukleiinhapped fragmenteeritakse, lahutatakse geelelektroforeesiga ning kantakse nailonmembraanile. Membraanile kinnitatud nukleiinhapped hübridiseeritakse märgitud proovidega. Southern ja northern blot on aegnõudvad ja ei kõlba massiliseks paralleelanalüüsiks. Nukleiinhapete ülekandeks geelilt filtrile võib kuluda ööpäev.

2. 4. 5 Hübridisatsioon mikrokiibil

Mikrokiibid on tahked klaasist kandjad, mille pinnale on kinnitatud sadu kuni kümneid tuhandeid DNA proove alates üheksanukleotiidilistest oligotest kuni genoomse DNA-ni (Zhou, 2003). Proove võib kinnitada ka polüakrüülamiidgeeli patjadele, mis on eelnevalt klaasalusele kantud. Geelivoodriga kiipidele saab siduda üle 100 korra rohkem materjali kui tavalisele klaaskiibile ning üksikuid proovid on paremini eraldatud, mis aitab tõsta tundlikkust ja vähendada nn „tahke pinna” efekte (Guschin DG, 1997).

Kiibile kinnitatud proovid hübridiseeritakse puhastatud fluorestseeruvalt märgitud DNA või RNA sihtmärkjärjestustega. Olenevalt kasutamiseviisist ning biomassi hulgast keskkonnaproovides võib olla vajalik eelnev nukleiinhapete amplifitseerimine või rakkude kultiveerimine. Mikrokiibitehnoloogia eelisteks on hea kiirus, massiliselt paralleelse analüüsi võime (Zhou, 2003) ning kõrge tundlikkus, mis võimaldab analüüsida väikseid proovihulki ilma eelneva PCR-ta (El Fantroussi jt., 2003). Võrreldes kapillaarelektroforeesiga on mikrokiibid vähemalt 100 korda tundlikumad (Keramas jt., 2003).

Mikrokiibi tehnoloogia lahutamatuks osaks on fluorestsentsmikroskoopia, mis võimaldab tänu heale lahutusvõimele tihedat proovide paigutust ning kiiret hübridiseerimisjärgset detektsiooni. Kuna hübridisatsioonisignaalid on ruumiliselt eraldatud, võivad kõik proovid olla märgitud samade märgistega.

3. Hübridisatsioonil kasutatavad märklaujärjestused

3. 1 DNA klassi märklauad

3. 1. 1 rDNA

rDNA ehk ribosomaalne DNA on kromosomaalse DNA osa, mis kodeerib erinevate ribosomaalsete RNA-de sünteesi – prokarüootidel 5S, 16S ja 23S rRNA. rRNA-de kasutamisest märklauana on juttu allpool. rDNA, eriti just SSU rRNA-le vastavate geenid, on fülogeneetilistes uuringutes ning mikroobide identifitseerimisel enimkasutatavad nukleiinhapped (Zhou, 2003). Nad on üldiselt hästi konserveerunud, kuid võivad sisaldada ka varieeruvaid piirkondi, andes laia spektriga lahutusvõimega taksonite identifitseerimiseks erinevatel tasanditel. Proovide konstrueerimine hüpervarieeruvate alade vastu võimaldab perekondade või isegi liikide tasandil eristamist (Zhou, 2003).

rDNA operone on bakterites üks kuni neliteist koopiat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) rDNA koopiaarvu varieeruvus võib raskendada mikroobirakkude arvukuse määramist (Amann jt., 1995). Väikese koopiaarvu tõttu, võrreldes näiteks rRNA-ga, võib olla vajalik hübridisatsioonieelne rDNA amplifitseerimine PCR-ga – eriti just madala biomassiga proovide puhul (Zhou, 2003).

Tänu kõrgele konserveeruvusastmele on rRNA geenide tarbeks olemas universaalsed praimerid (Zhou, 2003), mis võimaldavad väga erinevate mikroobide rRNA geenide amplifitseerimist ühes reaktsioonisegus minimaalse risthübridisatsiooniohuga.

rRNA geenide universaalsus on samas negatiivse mõjuga hübridisatsiooni spetsiifilisusele (Zhou, 2003), kuid õigete hübridisatsioonitingimuste ning proovide valikul on spetsiifiline sidumine võimalik (Small jt., 2001; Rudi jt., 2000; Guschin DY jt., 1997; Guschin DG jt., 1997; Bavykin jt., 2001; Koizumy jt., 2002).

Pikkade üheaahelaliste rDNA või rRNA fragmentide hübridisatsioonil on oluliseks probleemiks sekundaarstruktuuride teke, mis mõjutab eeskätt tundlikkust, kuid mõju võib olla ka spetsiifilisusele (Smallt., 2001; Zhou ja Thompson, 2002; Peplies jt.,

2003; Chandler jt., 2003). Steeriliste takistuste leevendamiseks kasutatakse „stacking” e. tšaperon-proovi, mis seondub sihtmärgile ning hoiab hübridisatsioonipiirkonna kõrvalt molekuli sirgena (Small jt., 2001).

3. 1. 2 16S-23S rDNA vaheline regioon

rRNA operoni 16S-23S intergeensed regioonid on suhteliselt lühikesed laialt bakterite identifitseerimiseks kasutatud alad. Antud piirkond sisaldab tRNA geene, rDNA protsessingu signaale ning mittefunktsionaalset DNA-d. See piirkond on liikide vahel tihti varieeruv ning sobilik mikroobide identifitseerimiseks (Hurtle jt., 2003).

3. 1. 3 Muud geenid

Põhimõtteliselt saab mikroobide identifitseerimiseks kasutada kõiki geene või DNA piirkondi, mis on piisavalt varieeruvad, et eristada erinevaid taksonid uuritava grupi piires, ning piisavalt konserveerunud, et ära hoida mittespetsiifilist hübridisatsiooni fülogeneetiliselt kaugemate taksonitega ning senini tundmatute järjestustega.

Näiteks mõnede denitrifikatsioonis, lämmastiku fikseerimises, metaani oksüdeerimises ja sulfaadi redutseerimises osalevate puhaskultuuride funktsionaalsete geenide keskmine sarnasus liigi tasemel on 74-84% (Tiquia jt., 2004) ning neil on potentsiaali mikroobide identifitseerimiseks liigi tasandil (Zhou, 2003).

Laialtkasutatavad on *gyrA* ja *gyrB* geenid. Nad on prokarüootset DNA guraasi kodeeruvad järjestused, kus esinevad vaheldumisi konserveerunud ning varieeruvad piirkonnad (Wang JC, 1996). Varieeruvaid piirkondi kasutatakse bakterite identifitseerimiseks (Hurtle jt., 2003; Zhou, 2003).

Näiteks campylobacteri erinevate liikide ning tüvede eristamiseks on kasutatud flagelliini, *mapA*, guanosiin trifosfataasi (Keramas jt., 2004) ning *fur*, *glyA*, *cdtABC*, *cauB-C* ja *fliY* geene (Volkhov jt., 2003). Osad neist on perekonna, teised liigi ja tüve spetsiifilised.

3. 2 RNA klassi märklauad

3. 2. 1 5S rRNA

5S rRNA on ligikaudu 120 nukleotiidi pikkune rRNA (Amann jt., 1995), mis asub suures ribosomaalses subühikus nii prokarüootidel kui eukarüootidel. 5S rRNA oli esimene rRNA, mida kasutati keskkonna kirjeldamiseks (Amann jt., 1995). 5S rRNA-st aga loobuti suuremate ribosomaalsete RNA-de kasuks, sest ta sisaldab suhteliselt vähe informatsiooni ning geelelektroforeesil on raske eristada suure mitmekesisusega 5S rRNA populatsioone (Olsen jt., 1986).

3. 2. 2 16S rRNA ehk SSU rRNA

16S rRNA on keskmiselt 1500 nukleotiidi pikkune ribosomaalne rRNA (Amann jt., 1995), mis asub prokarüootide väikeses ribosomaalses subühikus. 16S rRNA on väga hea molekul fülogeneetilisteks uuringuteks liigist kõrgematel tasanditel, kuid neid on rakendatud ka liikide identifitseerimiseks (Mitterer, 2004; Small jt., 2001). Liikide piires eristamine on problemaatiline väikese varieeruvuse tõttu. 16S rRNA järjestused võivad tüvede, alamliikide või isegi liikide piires olla identsed. (Amann jt., 1997).

rDNA asemel rRNA hübridiseerimise eelisteks on kõrgem matriitsi kontsentratsioon ning väiksem molekuli suurus. rRNA molekule on bakterirakus 10^3 kuni 10^5 korda rohkem kui rDNA operone (Amann jt., 1995). Seetõttu on rRNA-d lihtsam detekteerida kui rDNA-d ning nukleiinhapete amplifitseerimine PCR-ga on vähem oluline (Small jt., 2001). Väiksem matriitsi suurus võimaldab kasutada ka karmimaid nukleiinhapete eraldusviise (Amann jt., 1995).

Suur ribosoomide arvu varieeruvus aga raskendab mikroobirakkude arvukuse määramist. Isegi sama tüve piires võib ribosoomide arv erineda vähemalt kümme korda, sest see on otseselt seotud rakkude füsioloogilise aktiivsusega (Amann jt., 1995).

Nagu üheaahelaline rDNA, moodustab rRNA sekundaarstruktuure, mis võib oluliselt pärssida hübridisatsiooni efektiivsust (vt. peatükk 3.1.1).

3. 2. 3 23S rRNA

23S rRNA on keskmiselt 3000 nukleotiidi pikkune (Amann jt., 1995) ribosomaalne RNA, mis asub prokarüootide suures ribosomaalses subühikus. Nagu SSU rRNA, sisaldab ka 23S rRNA piisvalt informatsiooni usaldusväärseks fülogeneetiliseks analüüsiks (Amann jt., 1995). Mikroobide identifitseerimisel on rohkem teadlasi otsustanud SSU rRNA kasuks, kuid mitmetes töodes, eriti just siis kui SSU rRNA-s ei leita sobiva varieeruvusega piirkonda, rakendatakse hübriidisatsiooniks 23S rRNA vastaseid proove (Mitterer jt., 2004). Tõenäoliselt on SSU rRNA eelistatum valik ka edaspidi, sest vastavaid meetodikaid on rohkem arendatud.

3. 2. 4 tmRNA

tmRNA on suhteliselt lühike, *E. Coli* 363 aluseline, stabiilne valkude lagundamises osalev RNA, millel on nii tRNA kui mRNA omadused (Komine jt., 1994; Ushida jt., 1994). Teda kodeerib ka fülogeneetiliselt kauges bakterites leiduv *ssrA* geen, mille mõlemad otsad on konserveerunud, võimalades geeni amplifikatsiooni universaalsete praimeritega (Schönhuber jt., 2001). *E. Colis* esineb ta ligikaudu 1000 koopiana (Chauhan ja Apirion, 1989; Lee jt., 1978), mis võib anda piisavat hübriidisatsioonisignaali ka ilma eelneva amplifikatsioonita.

tmRNA järjestuste analüüs on näidanud, et seda võib kasutada mikroobide fülogeneetiliseks uurimiseks. Valides proovide sihtmärgiks erineva varieeruvusastmega piirkondi on võimalik saavutada lahutusvõimet riigist kuni liigi tasandini. Võrreldes 16S rRNA-ga on mõnede bakterite, näiteks *Listeria*, tmRNA liikidevaheline varieeruvus küllaltki suur ning sekundaarstruktuuride moodustumine ei ole nii tõenäoline. (Schönhuber jt., 2001).

tmRNA-d on kasutatud *E. Coli* spetsiifiliseks detekteerimiseks fluorestseeruva *in situ* hübriidisatsiooniga (Schönhuber jt., 2001).

4. Keskkonnaproovide eeltöötlemine hübriidsatsiooniks

Peamisteks keskkonnaproovideks on vee-, setete-, mulla-, muda- (Amann jt., 1995), toiduproovid (Chen jt., 1998) ning loomade väljaheidet. Keskkonnaproovideks nimetatakse ka mittekliinilistel eesmärkidel elusorganismidest võetud proove – näiteks inimese suu (Loy jt., 2002) ja mäletsejate vatsa (Stahl jt., 1988) mikrofloora ning kalade ja protistide sümbiondid (Amann jt., 1995).

Eeltöötlemise eesmärkideks on: ära hoida mikroobikoosluste muutumine ning nukleiinhappe lagunemine keskkonnaproovides enne analüüsimist kui ka analüüsimise ajal; eemaldada suuremad pinnaseosakesed ning võimalikud PCR inhibiitorid (Rasmussen jt., 1996) või hübriidiseerimist segavad faktorid; kindlustada ühtlane nukleiinhapete eraldumine kõigist rakkudest (Weinbauer jt., 2002). RNAasidega saastumise vältimiseks on äsjavõetud proovid soovitatav külmutada allapoole RNAaside töötemperatuuri (Hurt jt., 2001).

4. 1 Proovide esialgne töötlemine ja säilitamine

Veeproovide peenemale puhastamisele ja säilitamisele võib eelneeda suurema koguse materjali kohapealne filtreerimine läbi mitmete baktereid läbilaskvate (diameetrid ca 10 μ m ja 3 μ m) ja baktereid pidavate filtrite (diameeter ca 0,2 μ m), misjärel bakteritega kaetud filtrid volditakse anumatesse ning külmutatakse ca -70°C edasise analüüsini (Weinbauer jt., 2002).

Setete ja mullaproovid homogeniseeritakse kohapeal käsitsi (Hurt jt., 2001) või laboris spetsiaalse aparatuuriga (El Fantroussi jt., 2003; Small jt., 2001). Proovid transporditakse laborisse kas külmutatult vedellämmastikus ja kuival jääl (Hurt jt., 2001), kuivalt pimedas külmutamata *in situ* vee temperatuuril (El Fantroussi jt., 2003) või *in situ* veekeskkonnas (Pernthaler ja Amann, 2004). Laboris analüüsitakse proove kohe või säilitatakse -40°C (Hurt jt., 2001) või -80°C juures (El Fantroussi jt., 2003; Pernthaler ja Amann, 2004).

Toiduanalüüsiks kogutakse materjal jahutatult (Panicker jt., 2004), homogeniseeritakse ning vajadusel inkubeeritakse toitepuljongis biomassi

suurendamiseks (Chen jt., 1998). Homogeniseeritud proove võib hoiustada -80°C kraadi juures (Panicker jt., 2004).

4. 2 Rakkude lõhkumine ja nukleiinhapete eraldamine

Hea meetod rakkude lõhkumiseks ning nukleiinhapete vabastamiseks on klaaskuulidega jahvatamine ehk „bead beating” (Stahl jt., 1988; El Fantroussi jt., 2003; Small jt., 2001). Proovilahusesse lisatakse väikese 0,2 kuni 3 mm diameetriga klaaskuulikesi ning seejärel asetatakse lahus spetsiaalsesse raputisse („cell disrupter”, „shaker”, „dismembrator”), kus rakud mehhaaniliselt lõhutakse. See on lihtne ning efektiivne meetod juhaks, kui keskkonnaproovi mitmekesisus pole etteaimatav ning kitsamale mikroobigrupile määratud lüüsi protokolle kasutada ei saa (Stahl jt., 1988). Klaaskuulid ning muu soga eraldatakse nukleiinhapetest tsentrifuugimise teel (Small jt., 2001). Hurt ja kolleegid (2001) purustasid rakud käsitsi uhmri ja steriilse liiva abil.

Erinevalt puhaskultuuridest, võib nukleiinhapete eraldamisele keskkonnaproovidest eelneva täendavad tsentrifuugimis-, sadestamis- ning lahustamisetapid (Hurt jt., 2001), et vabaneda kõikvõimalikust sodist. Seejärel nukleiinhapped eraldatakse üldiste meetoditega (El Fantroussi jt., 2003), nende modifikatsioonidega (Hurt jt., 2001) või spetsiaalsete tööstuslike kittidega (Chen jt., 1998).

El Fantroussi kolleegidega (2003) filtreerisid puhvri koos RNA-ga läbi 0,22 µm diameetriste pooridega filtri, et eemaldada osakesi, mis võiksid vigastada mikrokiibi geelivoodrit.

Small ja kolleegid (2001) näitasid, et võrreldes puhaskultuuridega, oli puhastatud mullaekstrakti hübriidsatsiooni tundlikkus oluliselt madalam. Spetsiifiluse langust aga ei täheldatud (Small jt., 2001).

5. Olemasolevad mikrokiipidel põhinevad rakendused

5.1 Sissejuhatus

Mikrokiibid on hiljuti väljaarendatud perspektiivikad tehnoloogiad, mis on leidnud kasutust erinevates tingimustes kasvavate rakkude geeniekspressiooni uurimisel, DNA molekulis spetsiifiliste mutatsioonide kindlakstegemisel ning keskkonnaproovides leiduvate mikroorganismide identifitseerimisel (Zhou, 2003). Geeniekspressiooni analüüsis on mikrokiipe saatnud edu (Zhou, 2003), kuid selle tehnoloogia esialgsel rakendamisel keskkonnaproovide uurimiseks on kerkinud esile probleemid piisava spetsiifilisuse, tundlikkuse ja kvantitatiivse potentsiaali osas (Zhou ja Thompson, 2002).

Nüüdseks on välja arendatud ja testitud juba mitmeid mikrokiipidel baseeruvaid protokolle bakterite tuvastamiseks ja mikroobikoosluste analüüsiks keerukates keskkondades. Kuigi kõiki probleeme pole veel lahendatud, järeldub tulemustest, et antud tehnoloogial on potentsiaali olla spetsiifiliseks, tundlikuks, kvantitatiivseks, paralleelseks kõrge läbilaskevõimega tööriistaks, millega detekteerida, identifitseerida ja kirjeldada mikroobe nende looduslikes keskkondades (Zhou, 2003).

Keskkonnauuringutes rakendatavaid mikrokiipe saab nendele kinnitatud proovide põhjal jagada kolme suurde klassi: fülogeneetilised oligonukleotiidi kiibid (POA), funktsionaalsed geenikiibid (FGA) ning koosluse genoomikiibid (CGA) (Zhou ja Thompson D, 2002). Neile lisanduvad kogu genoomi avatud lugemisraami kiibid ning juhuslike proovidega kiibid.

Mõningate keskkonnauuringutes kasutatavate kiipide suuremad erinevused				
	CGA	PCR-FGA	Oligo-FGA	POA
Proovi suurus	Genoomne DNA	Funktsionaalsed geenid (~200-1000bp)	Funktsionaalsed geenid (~50-70bp)	rRNA geenid (~18-25bp)
Informatsioon	Fülogeneetiline	Funktsionaalne	Funktsionaalne	Fülogeneetiline
Kiibikonstruktsioon	Keerulisem	Keerulisem	Kergem	Keskmine
Sihtmärkorganismid	Kultiveeritavad	Kultiveeritavad ja mittekultiveeritavad	Kultiveeritavad ja mittekult.	Kultiveeritavad ja mittekult.
Spetsiifilisus	Liigid	< 80-85% järjestuse homoloogia	< 86-90% homoloogia	1bp lahutus
Tundlikkus (ng puhast DNA-d)	~0,2	~1	~8	Määramata
Kvantiseerimine	Jah	Jah	Jah	Teadmata
Lahutusvõime	Perekond-liik	Perekond-liik	Liigid-tüved	Liigid-tüved

(Zhou, 2003, Table 1, muudatustega; bp – aluspaar)

5. 2 Fülogeneetilised oligonukleotiidikiibid (POA)

Fülogeneetilised oligonukleotiidi kiibid on mikrokiibid, kus proovidena kasutatakse ribosomaalse ribonukleiinhappe (rRNA) geenide järjestusi, eesmärgiga analüüsida mikroobikoosluste struktuuri (Zhou, 2002). Sihtmärgiks võib olla nii rDNA kui ka rRNA.

rRNA geenid, millest enimkasutatavad on SSU rRNA geenid, on tõhusad molekulid organismidevahelise fülogeneetilise suguluse ja mikroobikoosluste taksonoomilise koosseisu uurimiseks ning seega head sihtmärgid mikrokiipidel. Mikroobitaksonite tuvastamise resolutsiooni on võimalik vastvalt vajadusele muuta. Konstrueerides proovid väiksema varieeruvusega rRNA alade vastu saab detekteerida fülogeneetiliselt kaugeid organisme. Hüpervarieeruvad piirkonnad võivad anda perekonna ja liigi tasemel lahutuse. (Zhou, 2003).

Kuna rRNA geenide amplifitseerimiseks on olemas universaalsed praimerid, on tehnikat kerge siduda PCR-ga ning saavutada kõrget tundlikkust, mis võib olla vajalik väga väikese biomassiga keskkonnaproovide analüüsiks (Zhou ja Thompson, 2002).

Kuid PCR kasutamine enne hübriidisatsiooni mikrokiibil toob kaasa ka mitmeid probleeme (vt. peatükk 2.2).

Asjaolu, et rRNA geenid on kõrgelt konserveerunud ja esinevad kõikidel mikroorganismidel teeb keeruliseks POA-l baseeruva hübriidisatsiooni spetsiifilisuse tagamise (Zhou ja Thompson, 2002). Kuigi nii klaaskiipidel (Small jt., 2001; Rudi jt., 2000) kui ka geelivoodriga kiipidel (Guschin DY jt., 1997; Guschin DG jt., 1997; Bavykin jt., 2001; Koizumy jt., 2002) on suudetud näidata spetsiifilist sidumist on antud parameeter kriitiliseks probleemiks. Uurides ühenukleotiidiliste terminaalsete ja peaaegu-terminaalsete valepaardumiste mõju geelivoodriga mikrokiipidel, leiti, et valepaardumise asukohal ning tüübil on märkimisväärne mõju hübriidisatsioonisignaali intensiivsusele ja sulamistemperatuurile (Urakawa jt., 2003). Ühenukleotiidiline valepaardumine vähendab klaasil baseeruvate POA-de signaali intensiivsust 3-10 korda. Maksimaalne spetsiifilisus ja signaali intensiivsus saavutati 19 aluseliste proovidega (Zhou ja Thompson, 2002; Zhou X ja Zhou J avaldamata andmed). On näidatud, et ühenukleotiidiline eristamine on võimalik, kuid SSU rRNA geenide täielik diskrimineerimine on problemaatiline (Bavykin jt., 2001; Small jt., 2001; Urakawa jt., 2003; Loy jt., 2002).

POA-d on alles varajases arengujärgus ning neid ei ole veel laialdaselt kasutatud.

Fotolitograafial baseeruva Affimetrix-i tehnoloogia abil disainiti 31179 erineva 20 aluspaarise prooviga POA (Wilson jt., 2002). Kõik proovid sünteesiti lühikese *E.Coli* SSU rRNA geeniregiooni põhjal, mille mõlemat otsa ääristasid universaalsed konserveerunud järjestused, mida saab kasutada PCR praimmeerimiseks. Antud piirkonna alusel on võimalik eristada 1945 prokarüootset ning 431 eukarüootset RDP (Ribosomal Database Project ver. 5.0, sisaldab umbes 3300 SSU järjestust) andmebaasis olevat SSU järjestust. Iga proovi kohta oli kiibil ka kontrolljärjestus, mis erines vastavast proovist 11. positsiooni nukleotiidi poolest. Kontrolljärjestused olid seega valepaardumiste kindlakstegemiseks (Wilson jt., 2002). Koos kontrollidega oli kiibil 62358 proovi, koopiaarvuga suurusjärgus 10^7 . Iga RDP andmebaasis oleva järjestuse vastu tehti 0-70 proovi. Seitsmeteistkümnest puhtast bakterikultuurist identifitseeriti õigesti viisteist. Positiivsed tulemused saadi ka kahe erineva genoomi segu analüüsimisel. Üksikuid järjestusi kompleksetest segaproovidest aga ei suudetud identifitseerida. Meetodil on

aga arenguruumi ning potentiaalset tulevikku kliinilistes diagnoosides, bioremediatsiooni uurimises ning mikroobikoosluste muutumise jälgimises (Wilson jt., 2002).

Loy ja kolleegid (2002) töötasid välja 132 (18 aluspaarise) oligoga klaasil baseeruva mikrokiibi SSU rRNA sihtmärkide vastu, mis esindasid tuntud sulfaatireduktaseerivate bakterite gruppe. Hübridisatsioonil 41 referentstüvega suudeti selgelt eristada enamikke täielikult paardunud proove osaliste valepaardumistega proovidest. Üksikuid mitte. Antud mikrokiipi kasutati sulfaatireduktaseerivate bakterite mitmekesisuse kindlakstegemiseks hambasompudes ning hüpersaliinsete tsüanobakterite mattides. Hübridisatsiooni tulemused olid kooskõlas üldkasutatavate molekulaarsete meetoditega (Loy jt., 2002).

Kokkuvõtteks, fülogeneetilised oligonukleotiidi kiibid on head tööriistad koosluste struktuuri ning dünaamika uurimiseks, kuid võimalike risthübridisatsioonide tõttu peab andmete tõlgendamisse suhtuma suure ettevaatusega (Zhou, 2003). Paremate ja usaldusväärsemate tulemuste saamiseks on vaja teha edasisi katseid, et optimeerida hübridisatsioonitingimusi ning proovide ja sihtmärkide valikut.

5. 3 Koosluse genoomikiibid (CGA)

Looduskeskkondadest on isoleeritud palju mikroorganisme, kuid nende genoomsetest järjestustest on teada vähe. Olemasolevat puhaskultuuride kollektsiooni saaks edukalt ära kasutada mikroobikoosluste struktuuri ja dünaamika jälgimiseks looduslikes keskkondades, kui arendada välja mikrokiibid, mis ei vaja eelnevat infot mikroobigenoomide järjestuste kohta (Zhou, 2003). Tulemuseks on koosluse genoomikiibid ehk mikrokiibid, kus proovideks on puhaskultuuridest eraldatud genoomne DNA. CGA abil saab uurida mikroobikoosluste kultiveeritavat komponenti, ilma eelnevate teadmisteta genoomsetest järjestustest. (Zhou ja Thompson, 2002).

Spetsiifilisuse uurimiseks ning genoomse variatsiooni taseme läviväärtuse määramiseks tehti CGA prototüüp, mis sisaldas genoomset DNA-d 67 referentsbakterist α -, β -, γ -proteobakterite ning Gram positiivsete bakterite hulgast. Mitmed valitud bakteritest on lähedased sugulased SSU rRNA ning *gyrB* geeni alusel ning kuuluvad kolme suurde bakteriperekonda: *Pseudomonas*, *Shewanella* ja *Azoarcus* (Zhou, 2003).

55°C ja 50% formamiidi juures saavutati liigi tasemel lahutusvõime, 65°C ning 75°C juures tüve tasemel lahutusvõime. Tundlikkuse piir puhta märgistatud genoomse DNA korral oli 0,2 ng kolmes mikrolitris. Hübridisatsioonisignaali intensiivsuse ning sihtmärk DNA kontsentratsiooni vahel oli tugev lineaarne korrelatsioon ($r^2 = 0,95 - 0,98$). Seda nii puhaskultuuride, DNA matriitside segu kui ka erinevate rakkude segu korral (Wu jt., avaldamata andmed), viidates CGA kvantitatiivsele potentsiaalile. Mitmekesiste mikroobikoosluste kvantitatiivseks analüüsiks on soovitatav kasutada spetsiifilisi hübridisatsioonitingimusi (näiteks 55-65°C ja 50% formamiidi), et vähendada võimalikke risthübridisatsioone lähedaste liikide ja tüvede vahel (Zhou jt., 2003).

CGA kontseptsioon on analoogne membraanil baseeruva RSGP-ga (reverse sample genome probing; Voordouw jt., 1991), kuid erineb kandematerjali ning hübridisatsioonistrateegia poolest (Zhou, 2003). CGA kasutab mittepoorset pinda ning fluorestsentsil põhinevat detektsiooni. Mittepoorne pind võimaldab kandja täpsemat töötlemist robotitega (Zhou, 2003). Sarnaselt RSGP-ga saab CGA abil uurida vaid mikroobikoosluste kultiveeritavat komponenti, sest kiibi konstruktsiooniks on vaja individuaalseid isolaate. Samas hübridisatsioonietapiks endaks, erinevalt RSGP-st, ei ole vaja keskkonnaproovi eelnevat kultiveerimist (Zhou, 2003). Kultiveeritamatu komponendi analüüsiks CGA-l võib põhimõtteliselt rakendada BAC (bakteri kunstkromosoom) kloone (Zhou, 2003).

CGA-sid saab tõenäoliselt kasutada bakteri liikide ja tüvede eristamiseks. CGA hübridisatsiooni suhete ja järjestuste sarnasuse väärtuste vahel oli tugev lineaarne korrelatsioon ($r^2 = 0,80 - 0,95$). Sarnasuse väärtused saadi SSU rRNA ja *gyrB* geenidest, DNA-DNA reassotsiatsioonist või REP- ja BOX-PCR sõrmejälgede profiilist (Wu jt., avaldamata andmed; Zhou, 2003). Tänu mikrokiibi suurele mahule on võimalik ehitada CGA-sid, mis sisaldavad nii bakterite tüüptüvesid kui ka parajalt lähedasi tüvesid. Eeldades, et kiibil esineb parajalt sarnaseid proove, peaks hübridiseerimisega olema võimalik usaldusväärset tuvastada tundmatuid tüvesid. Tüvede identifitseerimisel on esialgu soovitatav kasutada vähem spetsiifilisi tingimusi (nt. 45°C ja 50% formamiidi), et näha kas kaugemad sihtmärk-liigid annavad häid hübridisatsiooni signaale. Kui mitmed proovid hübridiseeruvad tundmatute sihtmärk tüvedega, tuleb tingimusi spetsiifilisemaks muuta (Zhou, 2003).

Võrreldes traditsioonilise DNA-DNA reassotsiatsioonianalüüsiga on CGA-1 liikide suguluse taseme määramiseks mitmeid eeliseid. Esiteks, mikrokiibi tehnoloogia võimaldab aeganõudva paarikaupa analüüsimise asemel suuremahulist paralleelanalüüsi. Teiseks, DNA-DNA reassotsiatsioonil vajamineva 100 µg genoomse DNA asemel kulub CGA-1 2 µg. See on tähtis bakterite analüüsiks, mida on raske kultiveerida või kasvavad aeglaselt (Zhou, 2003).

5. 4 Funktsionaalsed geenikiibid (FGA)

Funktsionaalsed geenikiibid on mikrokiibid, kus proovideks kasutatakse ensüüme kodeerivate geenide järjestusi. Neid nimetatakse funktsionaalseteks geenikiipideks, sest nende abil analüüsitakse mikroobikoosluse funktsionaalset mitmekesisust (Wu jt., 2001).

Tähtsates biogeokeemilistes protsessides osalevate ensüümide geenid on olulised markerid, mikroobipopulatsioonide ja –koosluste füsioloogilise oleku ning funktsionaalse aktiivsuse jälgimiseks looduslikes keskkondades. Sarnaselt geeniekspressiooni mikrokiipidele saab FGA konstrueerimiseks kasutada nii oligonukleotiide kui ka funktsionaalsetest geenidest PCR-ga genereeritud DNA fragmente (Zhou, 2003).

5. 4. 1 PCR-ga genereeritud proovidega FGA

PCR produktidel põhineva FGA efektiivsust mikroobide identifitseerimisel keskkonnaproovides on süsteemselt hinnatud nii spetsiifilisuse, tundlikkuse kui ka arvukuse määramise suhtes (Wu jt., 2001). Puhaskultuuridest ja meresetetest eraldatud lämmastiku ringluses osalevatest geenidest konstrueeriti FGA prototüüp. Kiip sisaldas umbes 120 geeni, millest igaüks oli 400-800 aluspaari. Hübridisatsiooni tulemused näitasid, et kõrgelt spetsiifilistest tingimustes (65°C) on võimalik eristada gene järjestuse identsusega vähem kui 80-85%. Nitraadireduktaasi geeni *nirS* tuvastamise piiriks oli 1 ng puhast genoomset DNA-d või 25 ng mullakoosluse DNA-d, kasutades optimiseeritud protokollit (Wu jt., 2001) – piisav tundlikkus paljudeks mikrobiökoloogia uuringuteks (Zhou, 2003). Antud kiibil on ka kvantitatiivset potentsiaali. DNA hulga vahemikus 1 – 100 ng oli hübridisatsioonisignaali ja sihtmärk DNA kontsentratsiooni vahel tugev suhe ($r^2 = 0,89-0,94$). Seda nii puhaskultuuridest kui segakooslustest eraldatud genoomse DNA puhul (Wu jt., 2001).

Mikrokiipide võime mõõta sihtmärkgeenide suhtelist rohkest suure mitmekesisusega keskkonnaproovidest on küsitav, sest järjestuste varieeruvus avaldab

tugevat mõju hübriidisatsioonisignaali intensiivsusele. Tundmatu mitmekesisusega koosluste hübriidisatsioonitulemuste objektiivne tõlgendamine on tõsiseimaid probleeme. Teiseks, nagu ka antud meetodi puhul, suurte DNA fragmentidega mikrokiipide proovid paljundatakse üldiselt PCR-ga keskkonna DNA kloonidest või puhaskultuuridest eraldatud genoomsest DNA-st. Sellisel viisil on vajaliku mitmekesisusega proovide konstrueerimine keeruline (Zhou, 2003). Lahendusena töötati välja alternatiivne FGA tüüp.

5. 4. 2 Sünteetiliste oligonukleotiidiproovidega FGA

Oligo-FGA koosneb sünteetiliselt valmistatud 50 aluspaarilistest proovidest. Sünteetiliste proovidega FGA põhiline eelis PCR produktidel baseeruva FGA ees on tema lihtsus. Proove on võimalik disainida ja sünteesida avalike andmebaaside informatsiooni alusel (Zhou, 2003).

Mikrokiibi katsetamiseks sünteesiti oligod 1033 lämmastikuringes (*nirS*, *nirK*, *nifH*, *amoA*, *pmoA*) ja sulfaadi redutseerimises (*dsrA*, *dsrB*) osaleva geeni vastu (Zhou, 2003). Väiksema kui 86-90% järjestuse identsusega geenid olid selgelt eristatavad 50°C ja 50% formamiidi juures – spetsiifilisus kõrgem kui PCR produktidel baseerual FGA-l. Denitrifikatsioonis, lämmastiku fikseerimises, metaani oksüdeerimises ja sulfaadi redutseerimises osalevate puhaskultuuride funktsionaalsete geenide keskmine sarnasus liigi tasemel oli 74-84% (Tiquia jt., 2004). Seega, 50 aluspaarisel FGA-l on potentsiaali nendes biogeokeemilistes protsessides osavõtvate mikroobide identifitseerimiseks liigi tasandil. Tundlikkuse piir on 8 ng puhast genoomset DNA-d – peaaegu suurusjärg madalam PCR produktidel põhinevast FGA-st ning 100 korda madalam CGA-st (Zhou ja Thompson, 2002; Wu jt., 2001). Sarnaselt alternatiivsele FGA tüübile esineb ka siin korrelatsioon hübriidisatsioonisignaali tugevuse ning sihtmärk DNA kontsentratsiooni vahel (vahemikus 8 - 1000 ng) kõigi kuue funktsionaalse geeni grupi puhul ($r^2 = 0,96 - 0,98$) (Tiquia jt., 2004).

Oluliseks limiteerivaks faktoriks 50 aluspaarise FGA tundlikkus tõenäoliselt ei kujune, sest DNA saagikus paljudest pinnase, mulla ja setete proovidest jääb 20 – 400 µg vahele kuivmassi grammi kohta (Hurt jt., 2001). Meresetetest eraldatud 2 µg totaalse DNA hübriidiseerimisel 50 aluspaarisel FGA-l saadi tugevad signaalid (Zhou, 2003).

Kokkuvõtteks, 50 aluspaarisest FGA-st võib kujuneda spetsiifiline, piisavalt tundlik ning potentsiaalselt kvantitatiivne tööriist, mikroobikoosluste funktsiooni ja struktuuri analüüsimiseks looduslikes keskkondades. Käsil on laiahaardelise üle 6000 prooviga 50 aluspaarise FGA konstrueerimine, mis sisaldab lämmastiku- ja süsinikuringes, fosfori utiliseerimises, orgaaniliste saasteainete lagundamises ja metalli resistentsuse tagamises osalevate geenide proove (Zhou, 2003).

5. 5 Kogu genoomi avatud lugemisraami kiibid

Paljud SSU rRNA järjestuste põhjal lähedased liigid on väga erineva fenotüübiga. Selle nähtuse geneetilise põhjuse uurimise üheks võimaluseks on koguda informatsiooni huviorbiidis olevate liikide ja kõigi lähedaste sugulaste kogu-genoomi järjestuse kohta. Järjestuste sarnasuse ja erinevuse mustrid võimaldavad uurida geenifunktsioonide konserveeruvust, füsioloogilist plastilisust ja evolutsioonilisi protsesse (Zhou, 2003).

Üks võimalus oleks kõikide uuritavate genoomide sekveneerimine, kuid see on kallis ning aeganõudev. Piisab ühe uuritava gruppi esindava mikroobi sekveneerimisest, sest lähedaste sugulaste genoomid on suures osas sarnased (Zhou, 2003).

Kogu genoomi avatud lugemisraami kiibid on DNA mikrokiibid, mis sisaldavad teatud sekveneeritud organismi individuaalseid ORF-e (avatud lugemisraame), mille abil saab uurida lähedaste mikroobide sugulust ning genoomide varieeruvust (Zhou, 2003).

Murray ja kolleegid (2001) koostasid *Shewanella oneidensis*-e osasid ORF-e esindava mikrokiibi, mille abil uurida *Shewanella* perekonna metalliredutseerijate bakterite sugulust ja genoomide varieeruvust. Üheksas katsealuses liigis identifitseeriti nii nõrgalt kui ka tugevalt konserveerunud geenid. Tulemused olid kõige informatiivsemad organismidel SSU rRNA sarnasusega üle 93% ning *gyrB* järjestuse sarnasusega üle 80%. Suurema homoloogia puhul korreleerusid mikrokiibi hübriidisatsiooni profiilid tugevalt *gyrB* järjestuse divergentsiga (Zhou, 2003). Kuna enamikud geenid operonides olid piisavalt sarnased, saab antud meetodit potentsiaalselt

kasutada horisontaalselt ülekandunud operonide või geenide identifitseerimiseks (Murray jt., 2001).

Dong ja kolleegid (2001) uurisid *E. Coli* K-12 kogu genoomi ORF kiibiga tuntud maisi endofüüdi *Klebsiella pneumoniae* tüve 342, mis on fülogeneetiliselt lähedane *E. Coli*-le. 70% *E. Coli* geenidest oli Klebsiellal vähemalt 55% identsusega. 24% *E. Coli* geenidest antud *Klebsiella* tüvel puudus. Mikrokiibiga avastatud genoomi erinevused on kooskõlas kummagi tüve füsioloogiliste omadustega (Zhou, 2003).

Kogu genoomi ORF kiipidega on veel uuritud genoomi varieeruvust erineva virulentsusega *Helicobacter pylori* tüvedel (Salama jt., 2000) ning deletsioonide otsimiseks *Mycobacteriumi* tüvedes (Behr jt., 1999).

Senised tulemused on näidanud, et kogu genoomi avatud lugemisraami mikrokiibid on väärtuslikud tööriistad lähedaste mikroorganismide genoomide varieeruvuse ning fülogeneetilise kauguse väljaselgitamiseks. ORF kiipe on koostatud paljude mikroobide jaoks, sealhulgas mitmed keskkonna uurimise poolest tähtsad bakterid: *Shewanella oneidensis MR-1*, *Deinococcus radiodurans R1*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrosomonas europaea*, *Desulfovibrio vulgaris* ja *Geobacter metallireducens* (Zhou, 2003).

5. 6 Kiibid juhuslike genoomifragmentidega

Juhuslike genoomifragmentidega kiipe on kasutatud liikide suguluse määramiseks ning mikroobide identifitseerimiseks juhul, kui genoomsed järjestused on teadmata (Zhou, 2003).

5. 6. 1 Tuhandaluseliste proovidega kiip

Mikrokiibi tootmisel valiti referentsgenoomideks neli fluorestseeruva *Pseudomonase* liiki. Viimastest genereeriti juhuslikult 60-96 ~1 kb (1000 aluspaari) pikkusega genoomifragmenti, kinnitati klaaskiibile, hübriidiseeriti test-genoomidega ning saadud hübriidisatsiooni profiilide statistilise analüüsi abil tuvastati test-tüved (Cho ja Tiedje, 2001).

Kaheteist hästi uuritud fluorestseeruva *Pseudomonase* liigi hübriidisatsiooni profiilide klasteranalüüs näitas, et antud mikrokiibid võivad anda liigi ja tüve tasemel lahutuse. Profiilidest on võimalik koostada andmebaas, millega edasisi katseid võrrelda (Cho ja Tiedje, 2001). Tõenäoliselt on lahutusvõime suurem kui CGA-I, sest informatsiooni saadakse üksikute genoomikomponentide mitte genoomi keskmise kohta (Zhou, 2003). Antud meetodi arendamine on CGA-st aga kallim ning aegnõudvam, sest kuuljahvatuslega genereeritud fragmendid lahutatakse geelil, sisestatakse PCR-vektorisse ning amplifitseeritakse PCR-ga. See on ka kasutamisevõimaluste poolest piiratum, sest üks referentsmikroorganism okupeerib kiibil palju (üle mitmesaja) positsioone (Zhou, 2003). Antud meetodit ei ole katsetatud keskkonnaproovidega.

5. 6. 2 Nonameersete proovidega kiip

Kingsley ja teised töötasid välja juhuslike nonameersete oligonukleotiididega mikrokiibi lähedaste Xanthomonase tüvede sõrmejälgede profiili saamiseks (Kingsley jt., 2002). Kiibi prototüüp sisaldas 47 juhuslikult valitud nonameerset oligonukleotiidi, et eristada 14 lähedast Xanthomonase tüve. Sihtmärk DNA paljundati üles REP-PCR-ga ning seejärel hübriidiseeriti kiibile. Hübriidisatsioonisignaali järgi koostati sõrmejälgede profiilid. Kõik uuritud tüved eristusid selgelt, kaasaarvatud kaks tüve, mida REP-PCR amplikonide geelelektroforeesiga eristada ei suudetud. Järelikult võib väita, et mikrokiibid on tüvede eristamisel potentsiaalselt suurema lahutusvõimega kui traditsiooniline geelelektroforees. Antud lähenemine on atraktiivne, kuna universaalse nonameerse kiibi võib valmistada mistahes mikroorganismide sõrmejälgede saamiseks (Zhou, 2003).

6. Tuleviku arengusuunad

Mitmetes uuringutes on demonstreeritud, et mikrokiibid võivad olla väärtuslikeks tööriistadeks keskkonnaproovide analüüsil, kuid nende hübriidisatsiooniparameetrid, nagu spetsiifilisus, tundlikkus ja kvantitatiivsus, on alles varajases arengujärgus. Seniseid uuringuid on saatnud ka sisemine eksperimentaalne variatsioon, mistõttu katsed ei ole alati reprodutseeritavad ning erinevate uurimisrühmade tulemusi on raske mõistlikult võrrelda (Zhou ja Thompson, 2002). Täieliku potentsiaali realiseerimiseks on vaja teha edasisi läbitöötatud ning süstemaatilisi katseid.

Mikrokiipide tundlikkus ei ole veel piisavalt suur väga madala biomassiga proovide uurimiseks ilma PCR-ta (Zhou ja Thompson, 2002). PCR rakendamine kompleksete proovide analüüsiks võib olla keeruline ja mittesoovitav (vt. peatükk 2.2), kuid see suurendab tundlikkust 100 – 10000 korda (Zhou ja Thompson, 2002). Tundlikkust vähendavad orgaanilised ja anorgaanilised saasteained (Zhou ja Thompson, 2002) ning sekundaarstruktuurid sihtmärkides (vt. peatükk 3. 1. 1), mille mõju mehhanismid pole veel lõpuni selged (Peplies, 2003); lahenduste leidmiseks on vaja läbi viia edasisi süsteemseid uuringuid. Esialgsed andmed siiski näitavad, et nii RNA kui DNA detekteerimine otse keskkonnaproovidest on võimalik: Wu ja kolleegid (2001) vajasid FGA eksperimendiks 25 ng mullakoosluse DNA-d (10 ng rDNA puhul), Small ja kolleegid (2001) 0,5 µg RNA-d POA katseks; mulla ja setete proovidest on eraldatud 1,4 – 56 µg RNA-d ning 23 – 435 µg DNA-d kuivmassi grammi kohta (Hurt, 2001). Tundlikkuse parandamiseks on välja töötatud poorse polüakrüülamiidgeeliga vooderdatud klaaskiibid, kuhu saab siduda üle 100 korra rohkem materjali kui siledale klaaskiibile (Guschin DG, 1997). Geeliga kaetud pind aitab arvatavasti vähendada ka tahke pinna lähedusest tulenevaid efekte hübriidisatsiooni spetsiifilisusele (Guschin DG, 1997). Hübriidisatsioon poorsetel pindadel võib olla 10 – 1000 korda tundlikum, kui siledal klaasplaadil (Wu jt., 2001; Zhou ja Thompson, 2002). Samas, poorsete pindade töötlemine robotitega on keerulisem (Zhou, 2003).

Hübriidisatsiooni kriitiliseks parameetriks on spetsiifilisus. Spetsiifilisus näitab eksperimendis õigesti määratud negatiivse signaalide ning oodatud (tegelike) negatiivsete signaalide suhet. Spetsiifilisust saab tõsta hübriidisatsioonitingimusi, nagu

ioonne jõud, foramiidi kontsentratsioon ja temperatuur, reguleerides, kuid keeruline on valida tingimusi, mis mõjuksid võrdselt hästi kõigile kiibil olevatele proovidele (El Fantroussi jt., 2002). Suurt hulka sarnaste termodünaamiliste omadustega proove on tihti eksperimentaalselt raske või võimatu disainida. Spetsiifilisust tõstab ka lühemate proovide valik – oligo kiipide eelis – kuid see on lõivsuhtes tundlikkusega (Guschin DY, 1997). Keskkonnaproovides on probleemiks erinevate tundmatute mikroobide ja nukleiinhapete järjestuste rohkus, mis võivad kiibil anda vale-positiivseid signaale ning millega on väga keeruline arvestada. Siinkohal tulevad kasuks eelnevad teadmised uuritava keskkonna mikroobikoosluse kohta – eelis näiteks kliinilises diagnostikas kasutatavate mikrokiipide jaoks, sest inimese naturaalne mikrofloora ning võimalikud patogeenid on suhteliselt hästi kirjeldatud. Spetsiifilisust on raske tagada eeskätt kõrgelt konserveerunud rDNA ja rRNA eristamisel, kuid esialgsed katsed näitavad, et isegi ühenukleotiidiliste valepaardumiste detektsioon on võimalik (Zhou ja Thompson, 2002). Kokkuvõtteks, spetsiifilisus on hübriidsatsioonimeetodite tugev omadus ning spetsiifiline sidumine on võimalik, kuid see eeldab hoolikat proovide disainimist ja vastavate sihtmärkide valikut ning õigeid hübriidsatsioonitingimusi, mille väljaselgitamiseks on vaja teha süsteemseid katseid. Kaasa aitavad arengusammud proovide puhastamises, sekundaarstruktuuride vältimine sihtmärkides (Zhou ja Thompson, 2002) ning nn „tahke pinna” efektide uurimine ning vähendamine (Guschin DG, 1997).

Ei ole veel selge, kui suur on mikrokiipide kvantitatiivne potentsiaal. Keskkonnauuringutes on peale mikroorganismide identifitseerimise vaja teada ka nende arvukust (Zhou ja Thompson, 2002). Mitmes töös on näidatud tugevat korrelatsiooni hübriidsatsioonisignaali ning sihtmärgi kontsentratsiooni vahel – ka segakoosluste puhul –, kuid seda vaid teatud kontsentratsioonide vahemikus, mis ei pruugi sobida kõikide proovide jaoks (Zhou, 2003; Wu jt., 2001). Arvukuse määramist segab ka PCR-i kasutamine (vt. peatükk 2.2) ja rDNA operonide ning ribosoomide arvu varieeruvus (vt. peatükid 3.1.1, 3.2.2). Kui analüüsitava proovi mikroobne koostis on ligikaudu teada, siis saab põhimõtteliselt sisse tuua paranduskoeffitsiente, mis võtavad arvesse eeldatavat rDNA operonide arvu bakteri kohta või muid faktoreid, mis aitavad signaaliintensiivsust rakkude arvukuseks tõlgendada. Täpsemat hinnangut ja võimalikke lahendusi antud probleemile saavad tuua vaid edasised uuringud.

Mikrokiipide tõeline eelis varasemate hübriidsatsioonitehnoloogiate ees on võimalus läbi viia sadu kuni kümneid tuhandeid hübriidsatsiooni katseid ühe korraga. See omadus on äärmiselt oluline keskkonnaproovide analüüsimisel, mille mikroobne mitmekesisus, võrreldes näiteks kliiniliste proovidega, võib olla väga lai. Suur DNA proovide hulk mikrokiipidel tuleb siin kasuks kahel põhjusel: esiteks, uurimaks paljusid organisme ühekorraga; teiseks, eristamiseks olulisi signaale mitteolulistest – rakendades ühe mikroorganismi identifitseerimiseks mitmeid proove (Cho ja Tiedje, 2001) on võimalik ära tunda mittespetsiifilisi signaale. Väiksemate ja etteaimatava mitmekesisusega proovide, nagu kindlate sümptomitega haige veri, analüüsiks võivad aga siiski sobida rohkem traditsioonilised meetodid, sest võrreldes näiteks *in situ* hübriidsatsiooniga on mikrokiibi konstruktsioon kallim ning keerulisem. Omaette väljakutseks on siin andmekaevandus. Suuremahuliste mikrokiipide andmehulk kujuneb tõenäoliselt liiga suureks, et neid käsitsi analüüsida – tuleb luua programmid, mis suudavad eristada spetsiifilisi signaale taustamürast ning ebaspetsiifilistest signaalidest. Teatud ulatuses võib saada rakendada olemasolevaid geeniekspressioonis kasutatavaid bioinformaatika tööriistu, kuid keerukamate koosluste uurimiseks tõenäoliselt mitte (Zhou ja Thompson, 2002). Viimaseks, terviklike mikroobikoosluste jälgimiseks jäävad praegused kiibid arvatavasti mahtuvuselt ikka liiga väikesteks – seega tuleb jätkuvalt leida viise kuidas mikrokiipe miniaturiseerida ning proove tihedamalt paigutada.

Mikrokiibi eksperimendi pudelikaelaks võib osutuda nukleiinhapete puhastamise etapp (Zhou ja Thompson, 2002), et seda vältida, tuleb vastavaid protseduure kiirendada uusi protokolle või meetodikaid väljatöötades.

Seniste eksperimentaalsete andmete järgi mikrokiibi tehnoloogial kõik eeldused olla keerukate mikroobikoosluste laiahaardeliseks iseloomustamise vahendiks, kuid mitmekesiste keskkonnaproovide analüüsimist mikrokiibil ei ole veel piisavalt katsetatud, et toota usaldusväärseid rutiinselt rakendatavaid mikrokiipe või rakendamisvõimaluste kohta põhjanevaid järeldusi teha. Kindel on see, et mikrokiipidel on mitmeid eeliseid klassikalise kultiveerimise ja traditsiooniliste hübriidiseerimismeetodite ees, kuid mis määral mikrokiibid neid keskkonnauuringutes täpselt asendama hakkavad on veel raske öelda. Ja lõpetuseks, mikrokiibid on tööriistad, mille efektiivseks kasutamiseks ja suunatud arendamiseks on vaja täpselt defineerida ka nende ökoloogilised ja keskkonnaalased ülesanded.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärk oli anda ülevaade keskkonnaproovide mikroobse komponendi identifitseerimisvõimalustest nukleiinhapete hübriidiseerimise abil mikrokiipidel – olemasolevatest rakendustest, põhilistest probleemidest ning võimalikest arengusuundadest.

Massilist paralleelanalüüsi võimaldava mikrokiibi tehnoloogia ühendamine kõrge lahutusvõimega fluorestsentsmikroskoopiaga on esimest korda ajaloos loonud võimaluse uurida korraga, ühes katses, mõistliku ajaga ning kultiveerimisest sõltumatult terveid mikroobikooslusi või suurt osa sellest nii PCR abiga, kui ilma selleta.

Mikroobide identifitseerimiseks ja mikroobikoosluste analüüsiks otse keskkonnaproovidest on katsetatud mitmeid mikrokiibi formaate, mis kasutavad taksonoomiliste ja funktsionaalsete andmete hankimiseks nii spetsiifiliste RNA ja DNA järjestuste vastaseid kui juhuslike genoomsete fragmentide ja tervete genoomide vastaseid proove.

Esialgsed tulemused näitavad, et antud tehnoloogial on potentsiaali olla spetsiifiliseks, tundlikuks, kvantitatiivseks ning kõrge läbilaskevõimega paralleelanalüüsi tööriistaks mikroobide detekteerimisel, identifitseerimisel ja iseloomustamisel looduslikes keskkondades; on võimalik eristada ühenukleotiidiliste erinevustega nukleiinhappeid, tundlikkus on piisav deteksiooniks paljudest keskkonnaproovidest ning teatud sihtmärgi kontsentratsiooni vahemikus on tugev korrelatsioon hübriidisatsioonisignaali. Selle potentsiaali realiseerimine nõuab aga edasisi korralikult läbitöötatud ning süstemaatilisi uuringuid.

The identification of microorganisms in environmental samples by nucleic acid hybridisation on microarrays

Taavi Võsumaa

Summary

The aim of this work is to give an overview of current applications, primary issues and possible future perspectives regarding the identification of microorganisms in environmental samples by the means of nucleic acid hybridisation on microarrays.

Our knowledge of the microbial diversity in surrounding environments has been modest for a very long time. Traditional well-established cultivation methods are expected to describe less than 1% of total microbial diversity. With the invention of sequencing and polymerase chain reaction (PCR) it became possible to acquire new nucleic acid sequences from environmental samples reasonably fast and to compare them with hybridisation techniques. Traditional hybridisation methods were, however, often tedious and time-consuming because few sequences could be analysed at a time. It was all changed with the invention of microarrays, where thousands of DNA fragments could be bound to a solid surface as probes and simultaneously hybridised with fluorescently labelled DNA or RNA targets, extracted from environmental samples.

Incorporation of the large-scale parallel analysis capacity of microarrays and the rapid and high-resolution detection of fluorescent microscopy has finally provided us with a novel cultivation-independent opportunity to describe all or most of the diversity in complex natural environments in a single hybridisation assay with and without prior PCR amplification of hybridisation targets.

Several microarray formats such as phylogenetic oligonucleotide arrays, functional gene arrays, community genome arrays, whole-genome open reading frame arrays and arrays with random genomic fragments have been developed and tested in order to evaluate the performance of microarrays in the study of microbial community structure and function.

The results indicate that microarray technology has great potential as a specific, sensitive, quantitative and high-throughput parallel analysis tool for the detection,

identification and characterisation of microorganisms in their natural environments. To realise that potential, however, further thorough and systematic evaluation and assessment is required, because microarray hybridisation is still not sensitive enough to provide detection in low biomass samples, not specific enough to eliminate non-specific signals in complex environments and not quantitative enough to provide reliable and reproducible data over a broad range of target concentrations.

Kasutatud kirjandus

- Amann, R. I., Krumholz, L. and Stahl, D. A. (1989). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig W., and Schleifer, K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-69.
- Amann, R., Glöckner, F-O. and Neef, A. (1997). Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 191-200.
- Bavykin, S. G, Akowski, J. P., Zakhariyev, V. M., Barsky, V. E., Perov, A. N. and Mirzabekov, A. D. (2001). Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 922-928.
- Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. and Small, P. M. (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-1523.
- Chandler, D. P., Newton, G. J., Small, J. A. and Daly, D. S. (2003). Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2950-2958.
- Chauhan, A. K. and Apirion, D. (1989). The gene for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3: 1481-5.
- Chen, S., Xu, R., Yee, A., Wu, K. Y., Wang, C-N., Read, S. and de Grandis, S. A. (1998). An automated fluorescent PCT method for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4210-4216.
- Cho, J-C. and Tiedje, J. M. (2001). Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3677-3682.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5116-5122.
- Dong, Y., Glasner, J. D., Blattner, F. R. and Triplett, E. W. (2001). Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1911-1921.

El Fantroussi, S., Urakawa, H., Bernhard, A. E., Kelly, J. J., Noble, P. A., Smidt, H., Yershov, G. M. and Stahl, D. A. (2003). Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2377-2382.

Fredricks, D. N., Relman, D. A. (1999). Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 29: 475-486.

Guschin, D. G., Yershov, G., Zaslavsky, A., Gemmell, A., Shick, V., Proudnikov, D., Arenkov, P. and Mirzabekov, A. (1997). Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA and protein microchips. *Anal. Biochem.* 250: 203-211.

Guschin, D. Y., Mobarry, B. K., Proudnikov, D., Stahl, D. A., Rittmann, B. E. and Mirzabekov, A. D. (1997). Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2397-2402.

Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje J. M. and Zhou, J. (2001). Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4495-4503.

Hurtle, W., Bode, E., Kaplan, R. S., Garrison, J., Kearney, B., Shoemaker, D., Henschel, E. and Norwood, D. (2003). Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify *Bacillus anthracis* by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and *gyrA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4758-4766.

Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. and Meile, L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1268-1273.

Kempf, V. A. J., Trebesius, K. and Autenrieth, I. B. (2000). Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 38: 830-838.

Keramas, G., Bang, D. D., Lund, M., Madsen, M., Bunkenborg, H., Telleman, P. and Christensen, C. B. V. (2004). Use of culture, PCR analysis and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3985-3991.

Kingsley, M. T., Straub, T. M., Call, D. R., Daly, D. S., Wunschel, S. C. and Chandler, D. P. (2002). Fingerprinting closely related *Xanthomonas* Pathovars with random nonamer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6361-6370.

Koizumy, Y., Kelly, J. J., Nakagawa, T., Urakawa, H., El-Fantroussi, S., Al-Muzaini, S., Fukui, M., Urishigawa, Y. and Stahl, D. A. (2002). Parallel characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing

gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization and DNA microarray technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3215-3225.

Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 9223-9227.

Lee, S. Y., Bailey, S. C. and Apirion, D. (1978). Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA. *J. Bacteriol.* 133: 1015-23.

Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K-H. and Wagner M. (2002). Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5064-5081.

Lupski, J. R. and Weinstock, G., M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529.

Mitterer, G., Huber, M., Leidinger, E., Kirisits C., Lubitz, W., Mueller, M. W. and Schmidt, W. M. (2004). Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1048-1057.

Murray, A. E., Lies, D., Li, G., Neelson, K., Zhou, J. and Tiedje, J. M. (2001). DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 9853-9858.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. and Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.

Panicker, G., Myers, M. L. and Bej, A. K. (2004). Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 498-507.

Peplies, J., Glöckner, F. O. and Amann, R. (2003). Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1397-1407.

Pernthaler, A. and Amann, R. (2004). Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5426-5433.

Rasmussen, H. H., Olsen, J. E., Jorgensen, K. and Rasmussen, O. F. (1996). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken faecal samples by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 363-366.

- Rudi, K., Skulberg, O. M., Skulberg, R. and Jakobsen, K. S. (2000). Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of *Cyanobacterial* abundance and diversity by array hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4004-4011.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T. K., Sherlock, G., Tompkins, L. and Falkow, S. (2000). A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 14668-14673.
- Schönhuber, W., Le Bourhis, G., Tremblay, J., Amann, R. and Kulakauskas, S. (2001). Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol.* 1: 20.
- Small, J., Call, D. R., Brockman, F. J., Straub, T. M. and Chandler, D. P. (2001). Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4708-4716.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. and Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079-1084.
- Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625-630.
- Tiquia, S. M., Wu, L., Chong, S. C., Passovets, S., Xu, D., Xu, Y. and Zhou, J. (2004). Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* 36: 664-70, 672, 674-5.
- Urakawa, H., El Fantroussi, S., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A. and Stahl, D. A. (2003). Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2848-2856.
- Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T. and Muto, A. (1994). tRNA-like structures in 10Sa RNA-s or *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 22: 3392-3396.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. and Lupski J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- Volokhov, D., Rasooly, A., Chumakov, K. and Chizhikov, V. (2002). Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4720-4728.
- Volokhov, D., Chizhikov, V., Chumakov, K. and Rasooly, A. (2003). Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4071-4080.

Voordouw, G., Voordouw, J. K., Karkhoff-Schweizer, R. R., Fedorak, P. M. and Westlake, D. W. S. (1991). Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3070-3078.

Vora, G. J., Meador, C. E., Stenger, D. A. and Andreadis J. D. (2004). Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3047-3054.

Wang, G. C. and Wang, Y. (1995). Rapid differentiation of bacterial species with multiple probes of different lengths in a single slot blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4269-4273.

Wang, G. C-Y. and Wang, Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiol.* 142: 1107-1114.

Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 635-692.

Weinbauer, M. G., Fritz, I., Wenderoth, D. F. and Höfle, M. G. (2002). Simultaneous extraction from bacterioplankton to total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1082-1087.

Willse, A., Straub, T. M., Wunschel, S. C., Small, J. A., Call, D. R., Daly, D. S. and Chandler, D. P. (2004). Quantitative oligonucleotide microarray fingerprinting of *Salmonella enterica* isolates. *Nucleic Acids Res.* 32: 1848-1856.

Wilson, K. H., Wilson, W. J., Radosevich, J. L., DeSantis, T. Z., Viswanathan, V. S., Kuczmarski, T. A. and Andersen, G. L. (2002). High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2535-2541.

Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Hurt, R. A., Tiedje, J. M. and Zhou, J. (2001). Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5780-5790.

Zhou, J. and Thompson, D. K. (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 204-207.

Zhou, J. and Thompson, D. 2002. Microarrays: applications in environmental microbiology, p. 1968-1979. *In* G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, vol. 4., John Wiley & Sons, New York.

Zhou, J. (2003). Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 288-294.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.msu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>