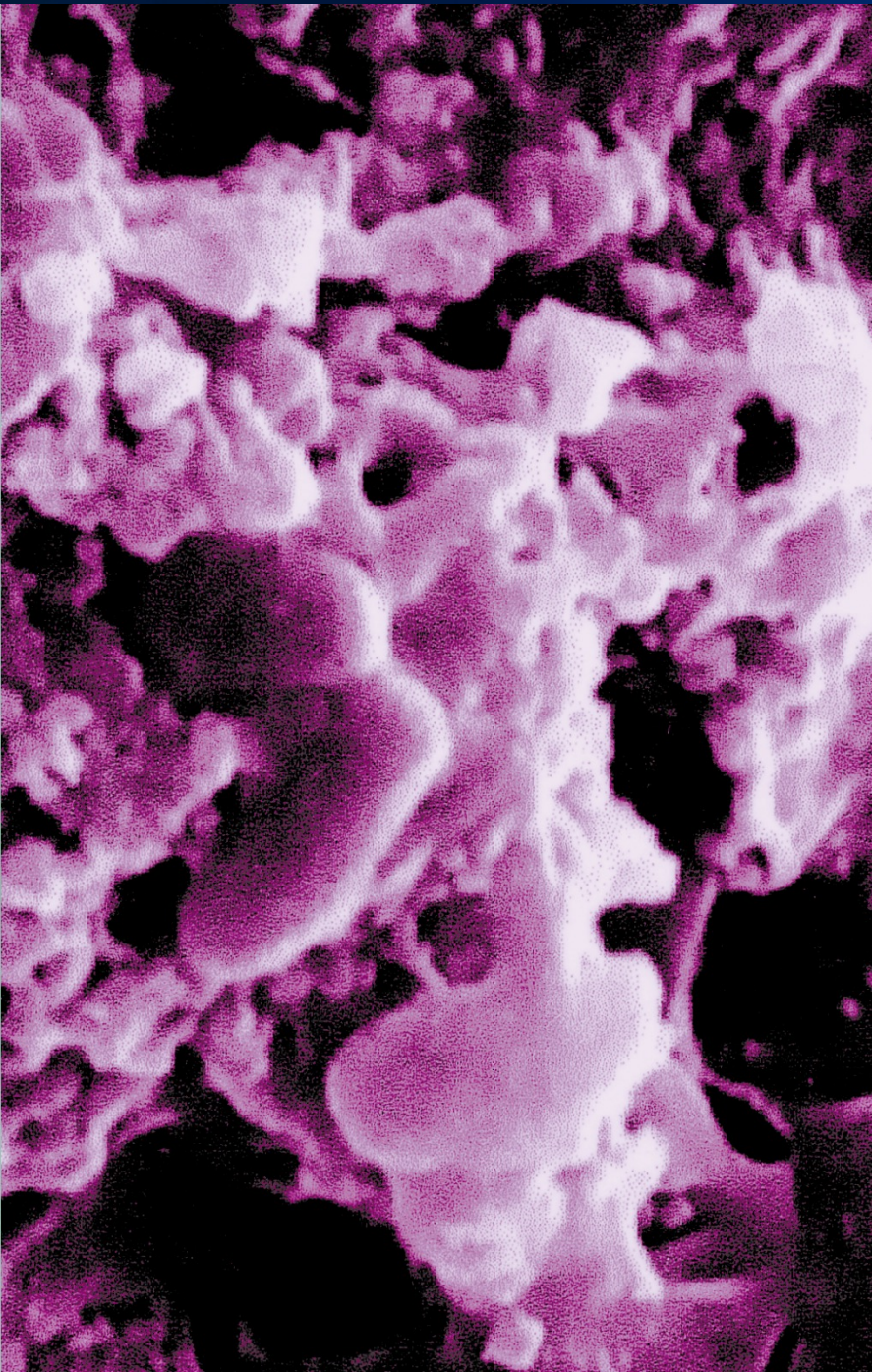


ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Γιώργος Τσιάμης

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας

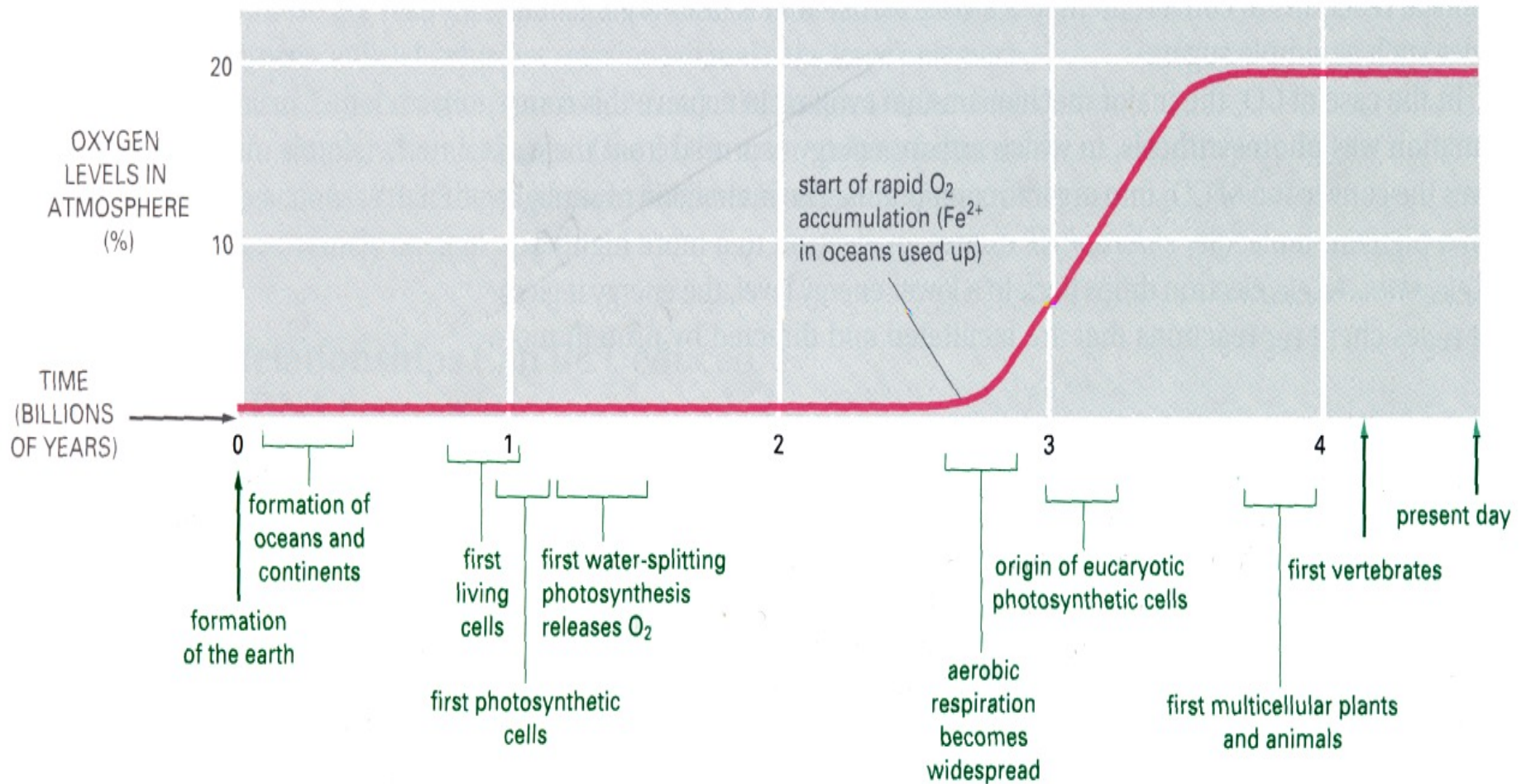


11

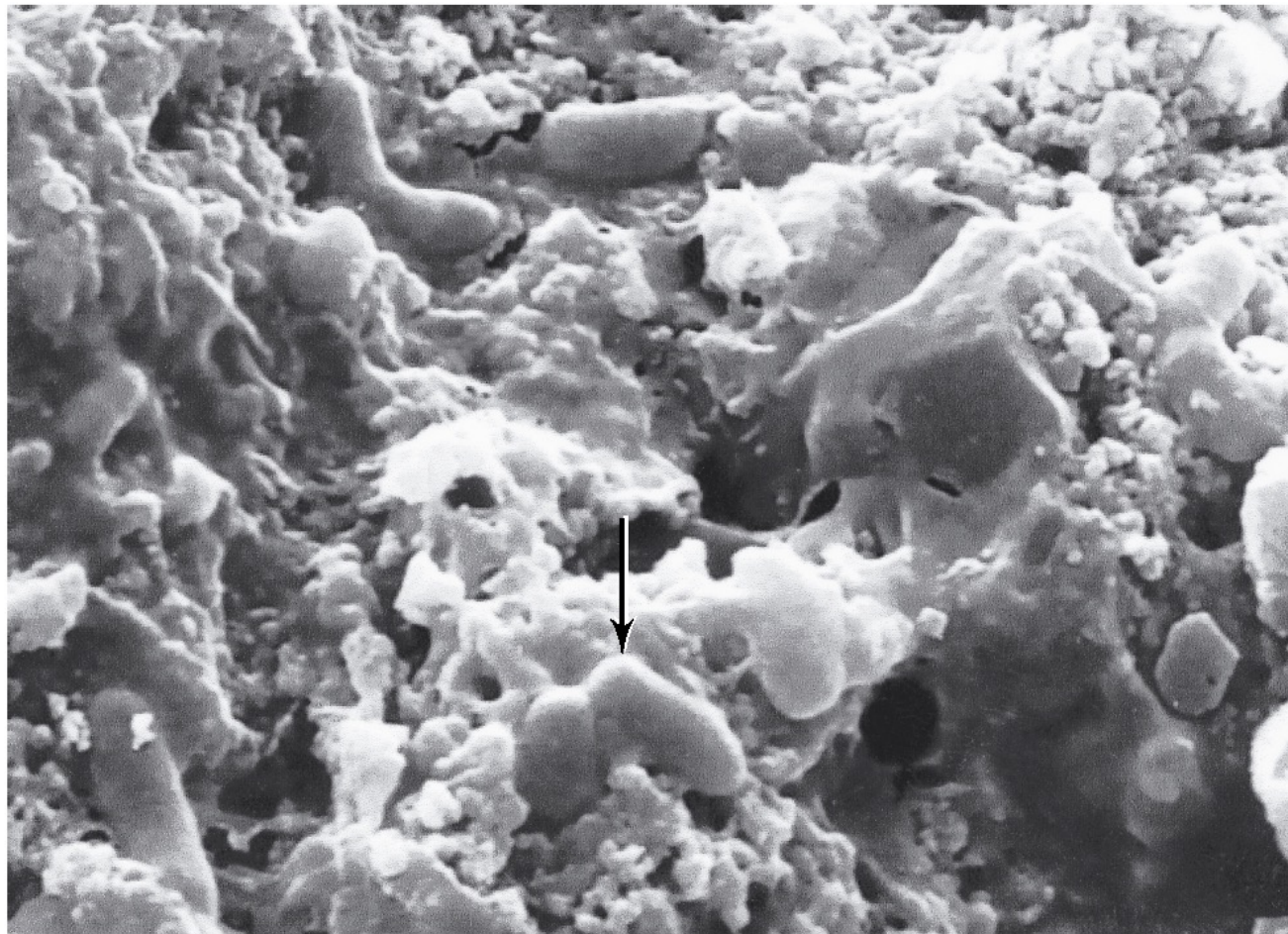
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ

Αν και γνωρίζουμε ότι οι προκαρυώτες είναι πανάρχαιοι οργανισμοί, όπως μαρτυρούν και τα μικροαπολιθώματα κυττάρων που βρέθηκαν σε πετρώματα ηλικίας περίπου 3,5 δισεκατομμυρίων ετών, μέχρι πριν από 20 περίπου χρόνια οι μικροβιολόγοι δεν διέθεταν αποτελεσματικά εργαλεία για να διασαφηνίσουν τις εξελικτικές σχέσεις των εν λόγω οργανισμών. Αυτό είναι κάτι που μπορεί να γίνει σήμερα, σχεδόν σε επίπεδο ρουτίνας, με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων που περιλαμβάνουν τη συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων. Η εξελικτική ιστορία των προκαρυωτών αντικατοπτρίζει την εξελικτική ιστορία της ίδιας της Γης, και τώρα πλέον, όπως συμβαίνει εδώ και χρόνια για τους πολυκύτταρους οργανισμούς, οι μικροοργανισμοί, και κυρίως οι προκαρυώτες, μπορούν αξιόπιστα να τοποθετηθούν στη σωστή θέση τους στο φυλογενετικό δένδρο της ζωής.

Δημιουργία και προέλευση της ζωής



- Ατμοσφαιρικό O_2 και η πορεία της εξέλιξης
- Αβιοτική προέλευση της ζωής πριν 4.5×10^9 χρόνια
- Πρώτο κύτταρο πριν από 3.5×10^9 χρόνια



Frances Westall

Εικόνα 11.1 Ηλεκτρονικό μικρογράφημα σάρωσης μικροαπολιθώματος προκαρυώτη από πετρώματα ηλικίας 3,45 δισεκατομμυρίων ετών της Ζώνης Barberton Greenstone, στη Νότια Αφρική. Προσέξτε τα ραβδόμορφα βακτήρια (βέλος) που είναι προσκολλημένα στα ορυκτά συστατικά. Τα κύτταρα έχουν διάμετρο 0,7 μm περίπου.



(α)

Malcolm Walter



(β)

Malcolm Walter



(γ)

Malcolm Walter



(δ)

Malcolm Walter



(ε)

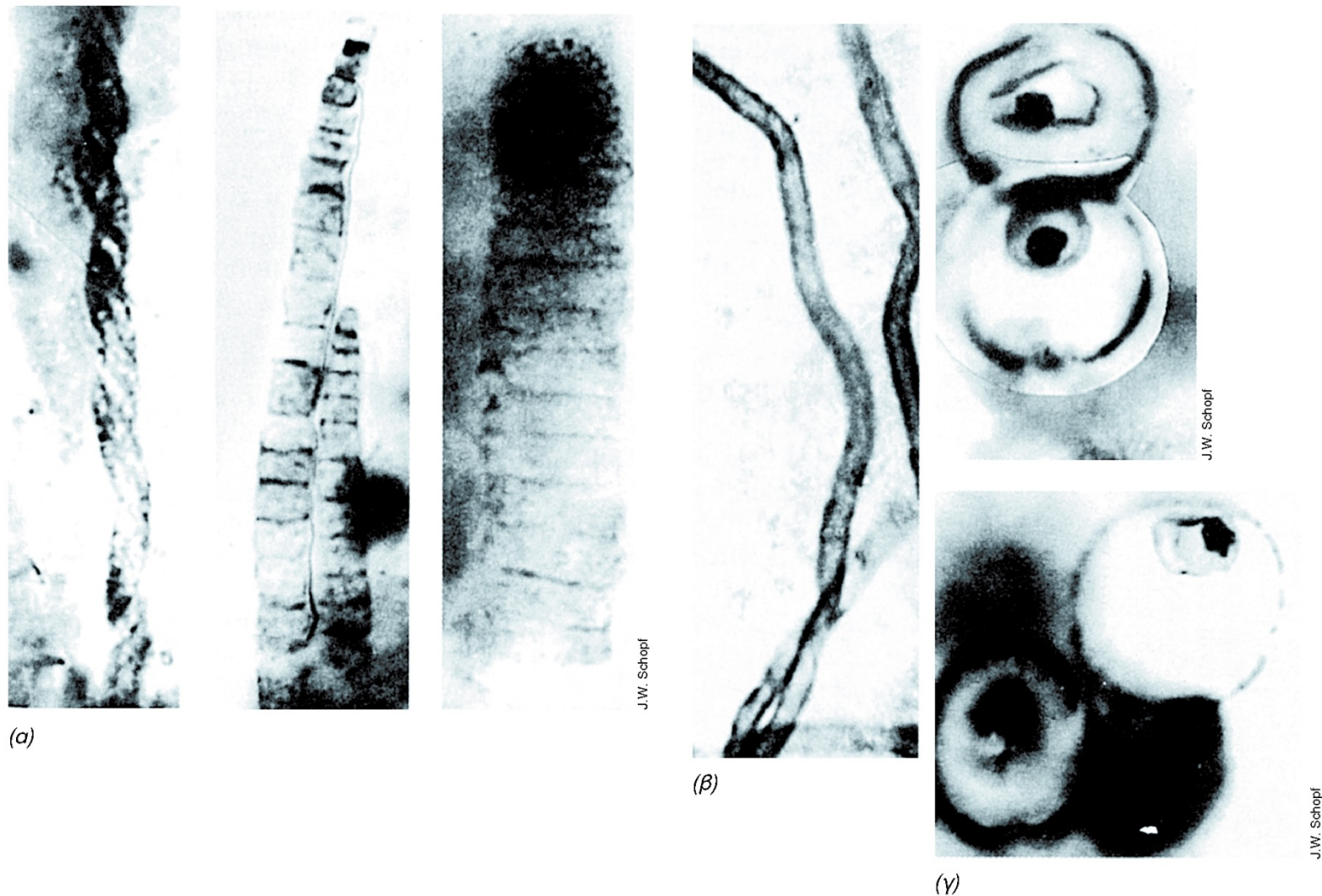
Malcolm Walter

Εικόνα 11.2 Αρχέγονοι και σύγχρονοι στρωματόλιθοι. (α) Οι παλαιότεροι γνωστοί στρωματόλιθοι, που βρέθηκαν σε ένα πέτρωμα ηλικίας 3,5 δισεκατομμυρίων ετών περίπου, στον γεωλογικό σχηματισμό Warrawoopa της Δυτικής Αυστραλίας. Αυτό που φαίνεται είναι μια κάθετη τομή διά μέσου μιας φυλλώδους, ημισφαιρικής δομής, που έχει διατηρηθεί μέσα στο πέτρωμα. Κλίμακα, 10 cm. (β) Στρωματόλιθοι κωνικού σχήματος, από ένα δολομιτικό πέτρωμα ηλικίας 1,6 δισεκατομμυρίων ετών από τη λεκάνη Μακ Άρθουρ του Βόρειου Εδάφους της Αυστραλίας. (γ) Σύγχρονοι στρωματόλιθοι στον θερμό θαλάσσιο Όρμο των Καρχαριών (Shark Bay) της Αυστραλίας. (δ) Άλλη άποψη των μεγάλων στρωματόλιθων του Όρμου των Καρχαριών. Παρατηρήστε την ομοιότητα με τους αρχέγονους στρωματολίθους που απεικονίζονται στο (β). (ε) Υποβρύχια φωτογραφία σύγχρονων στρωματολίθων που αναπτύσσονται στον Όρμο των Καρχαριών. Ο δύτης υποδεικνύει την κλίμακα. Φαίνονται μεγάλες στήλες που σχηματίζονται από μια περίπλοκη κοινωνία διατόμων, κυανοβακτηρίων, και πράσινων φυκών, πάνω στα οποία προσκολλούνται διάφορα μακροσκοπικά φύκη. (στ) Σύγχρονοι στρωματόλιθοι αποτελούμενοι από θερμοφιλά κυανοβακτήρια, που αναπτύσσονται σε μια θερμή υδατοδεξαμενή στο Εθνικό Πάρκο Yellowstone (ΗΠΑ). Κάθε δομή έχει ύψος 2 cm περίπου.



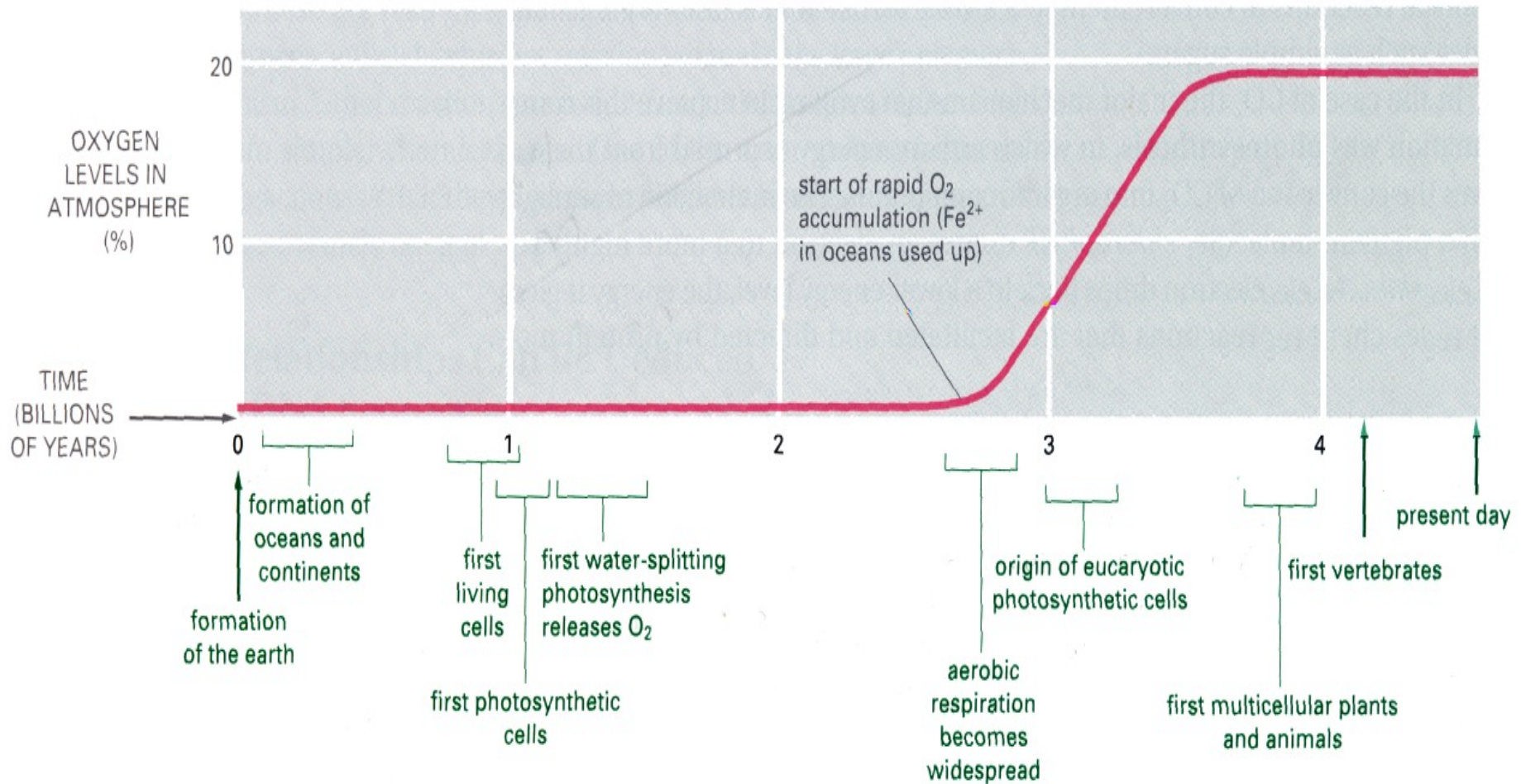
(στ)

T. D. Brock



Εικόνα 11.3 Απολιθωμένοι προκαρυώτες και ευκαρυώτες από πετρώματα νεότερης ηλικίας σε σχέση με εκείνα που απεικονίζονται στην Εικόνα 11.1. Οι τέσσερις φωτογραφίες στο (α) (μεγέθυνση 2000x) και στο (β) (μεγέθυνση 920x) δείχνουν απολιθωμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς που βρέθηκαν στον Σχηματισμό Bitter Springs, έναν πετρολογικό σχηματισμό στην κεντρική Αυστραλία, ηλικίας 1 δισεκατομμυρίου ετών περίπου. Οι μορφές αυτές παρουσιάζουν μια εμφανή ομοιότητα προς τα σύγχρονα νηματοειδή κυανοβακτήρια, φωτοτροφικούς οργανισμούς που δεν παράγουν οξυγόνο, ή προς τα νηματοειδή θειικά χημειολιθότροφα (🔗 Κεφάλαιο 12). Οι δύο φωτογραφίες στο (γ) (μεγέθυνση 2000x) απεικονίζουν μικροαπολιθώματα, πιθανώς κάποιου ευκαρυωτικού φύκου. Η κυτταρική δομή εμφανίζει αξιοσημείωτη ομοιότητα με ορισμένα σύγχρονα πράσινα φύκη, όπως το *Chlorella* sp. Προέρχονται από τον ίδιο σχηματισμό πετρωμάτων όπως και οι προηγούμενοι προκαρυωτικοί οργανισμοί.

Δημιουργία και προέλευση της ζωής



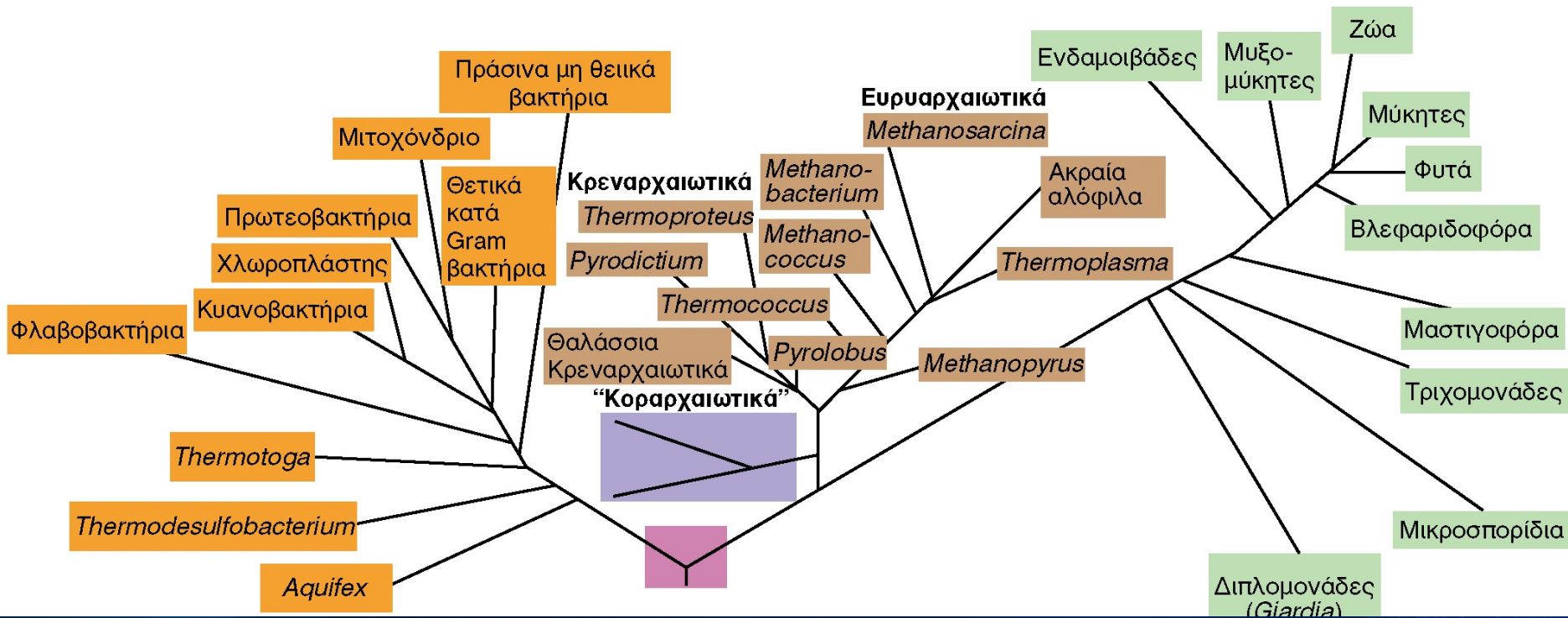
- Ατμοσφαιρικό O_2 και η πορεία της εξέλιξης
- Αβιοτική προέλευση της ζωής πριν 4.5×10^9 χρόνια
- Πρώτο κύτταρο πριν από 3.5×10^9 χρόνια

Οικουμενικό Φυλογενετικό Δέντρο, συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών ριβοσωματικού RNA

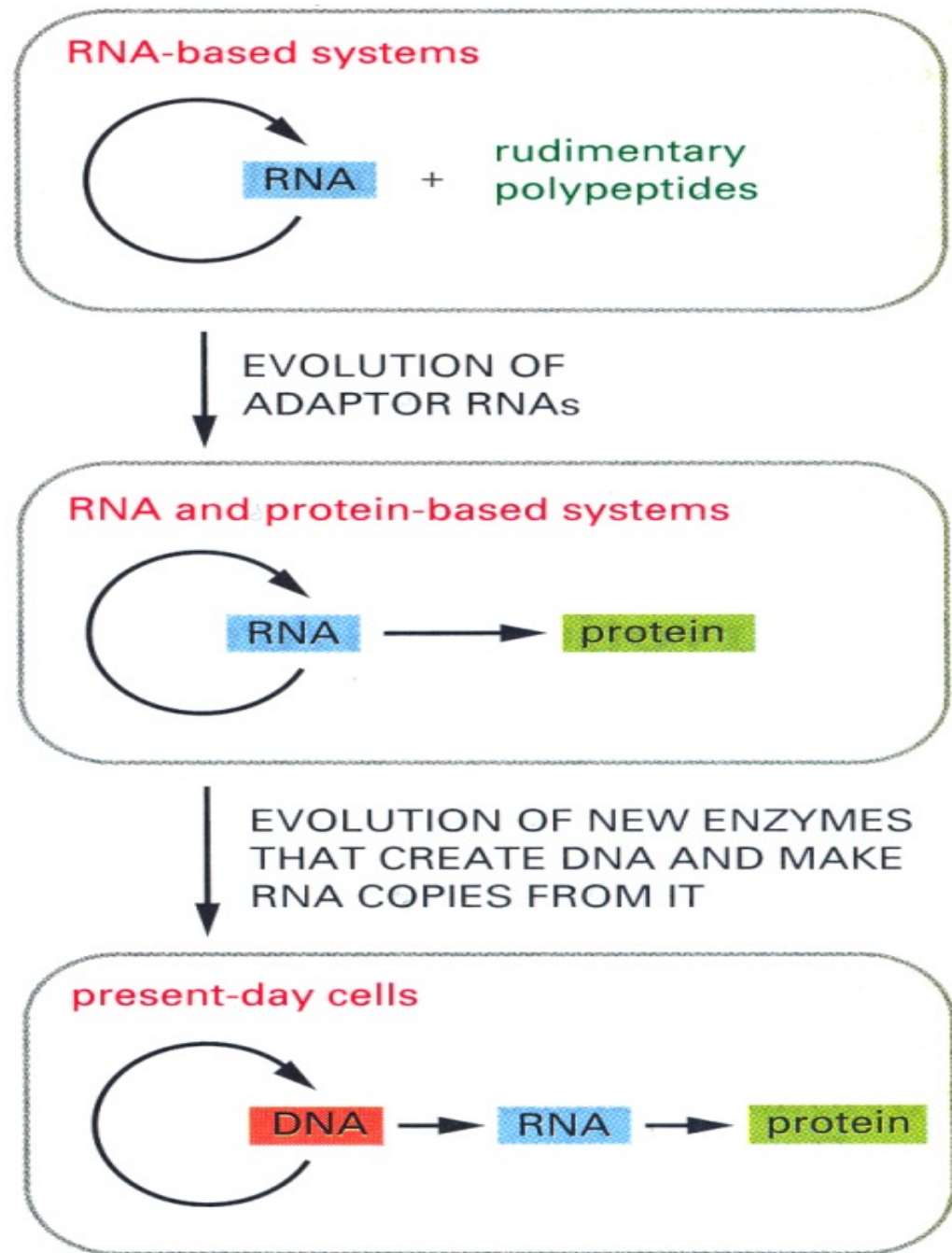
Βακτήρια

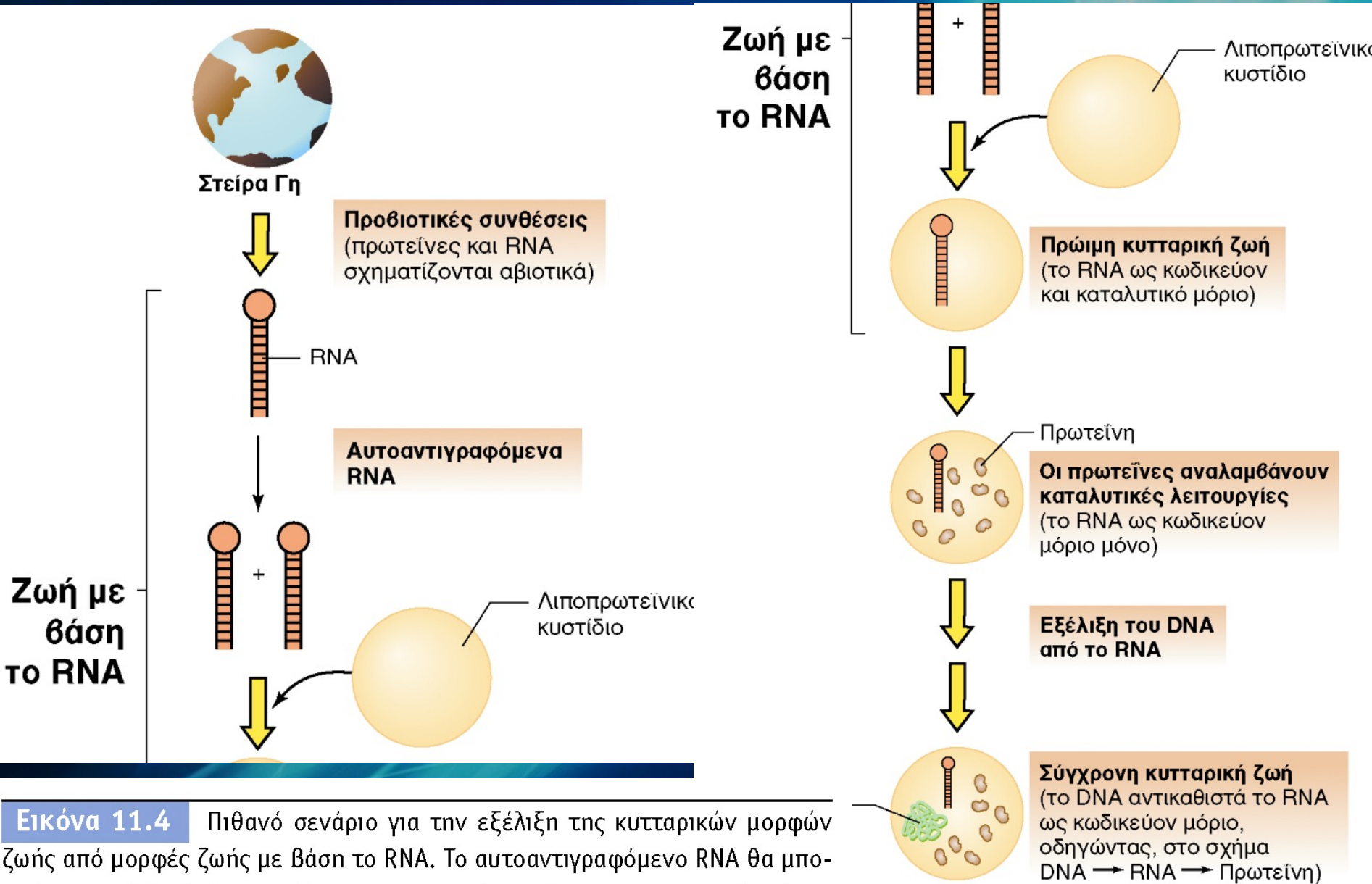
Αρχαία

Ευκάρυα

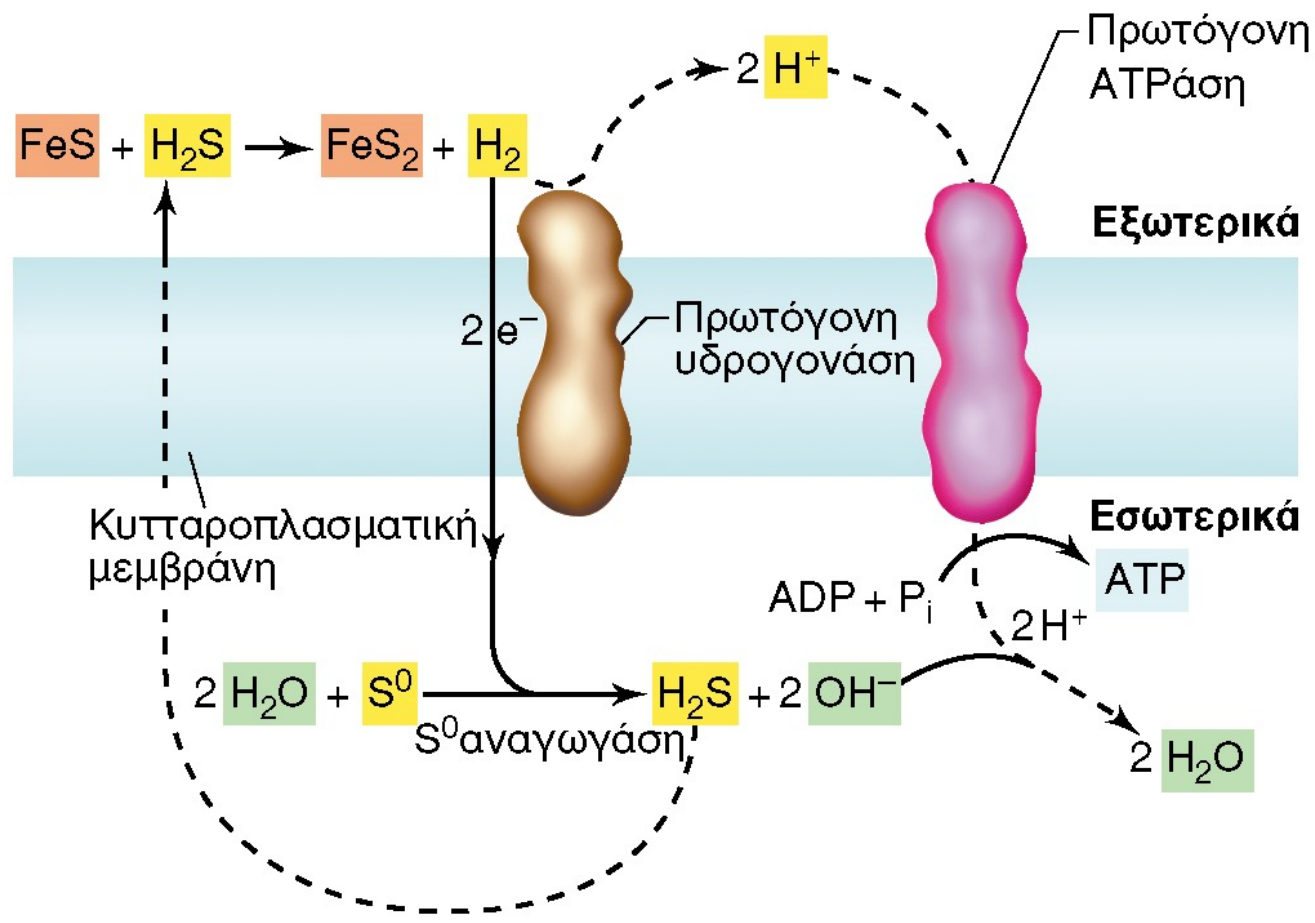


Ξεκίνησε η ζωή από RNA?

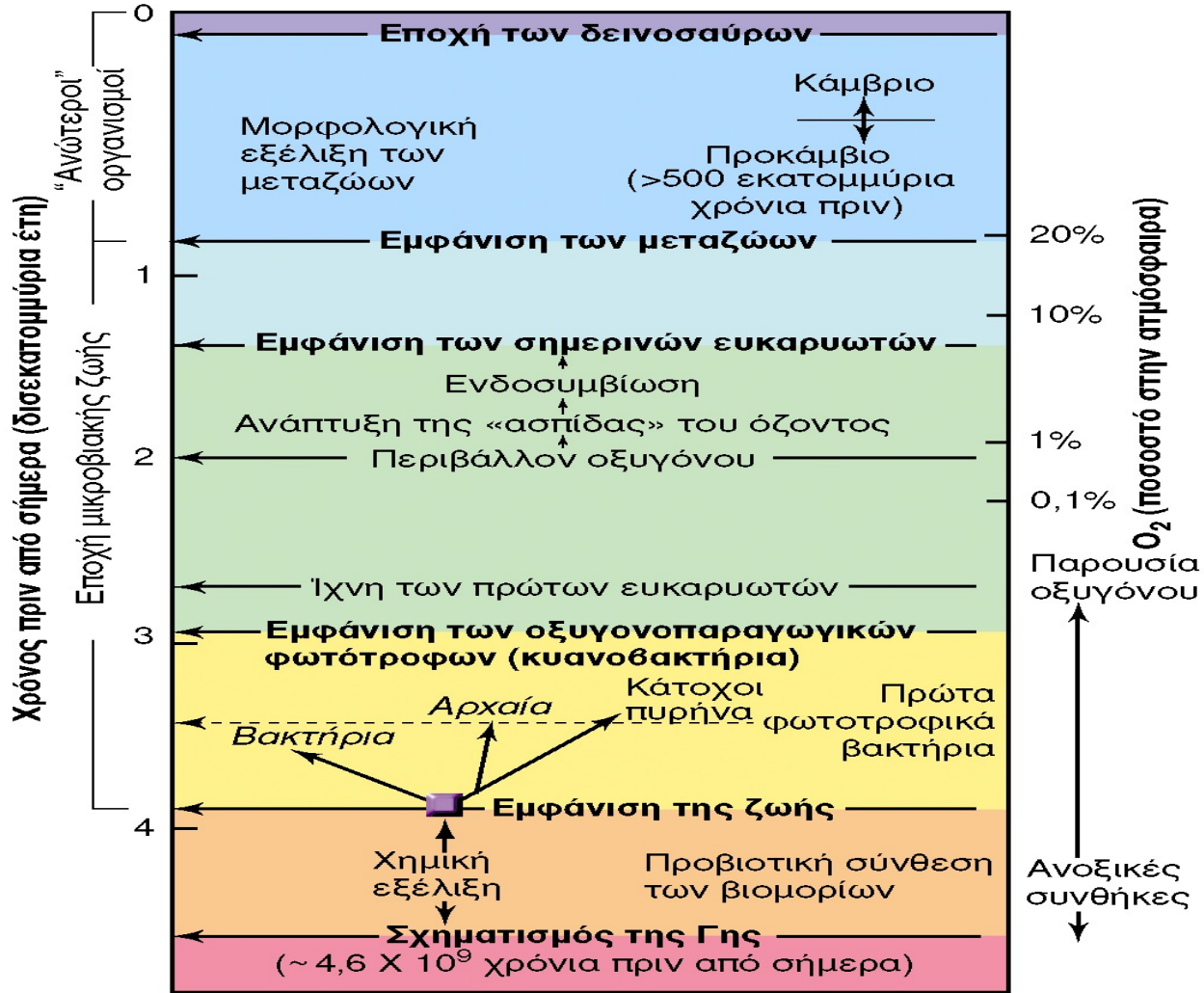




Εικόνα 11.4 Πιθανό σενάριο για την εξέλιξη της κυτταρικών μορφών ζωής από μορφές ζωής με βάση το RNA. Το αυτοαντιγραφόμενο RNA θα μπορούσε να εξελιχθεί σε αυτόνομες κυτταρικές οντότητες με τη σταθερή ενσωμάτωσή του σε κυστίδια λιποπρωτεϊνών. Με την πάροδο του χρόνου, οι πρωτεΐνες αντικατέστησαν τις καταλυτικές λειτουργίες του RNA και το DNA αντικατέστησε της κωδικεύουσες λειτουργίες του RNA.



Εικόνα 11.5 Ένας υποθετικός μηχανισμός παραγωγής ενέργειας από πρωτόγονα κύτταρα. Ο σχηματισμός σιδηροπυρίτη οδηγεί στην παραγωγή H_2 και στην αναγωγή του S^0 , που τροφοδοτεί μια πρωτόγονη ΑΤΡάση. Προσέξτε ότι το H_2S παίζει μόνο καταλυτικό ρόλο· τα καθαυτά υποστρώματα θα ήταν μόνο FeS και S^0 . Παρατηρήστε επίσης πόσο λίγες πρωτεΐνες θα ήταν αναγκαίες. Η ΔG^0 για την αντίδραση $\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{H}_2$ είναι -42 kJ .



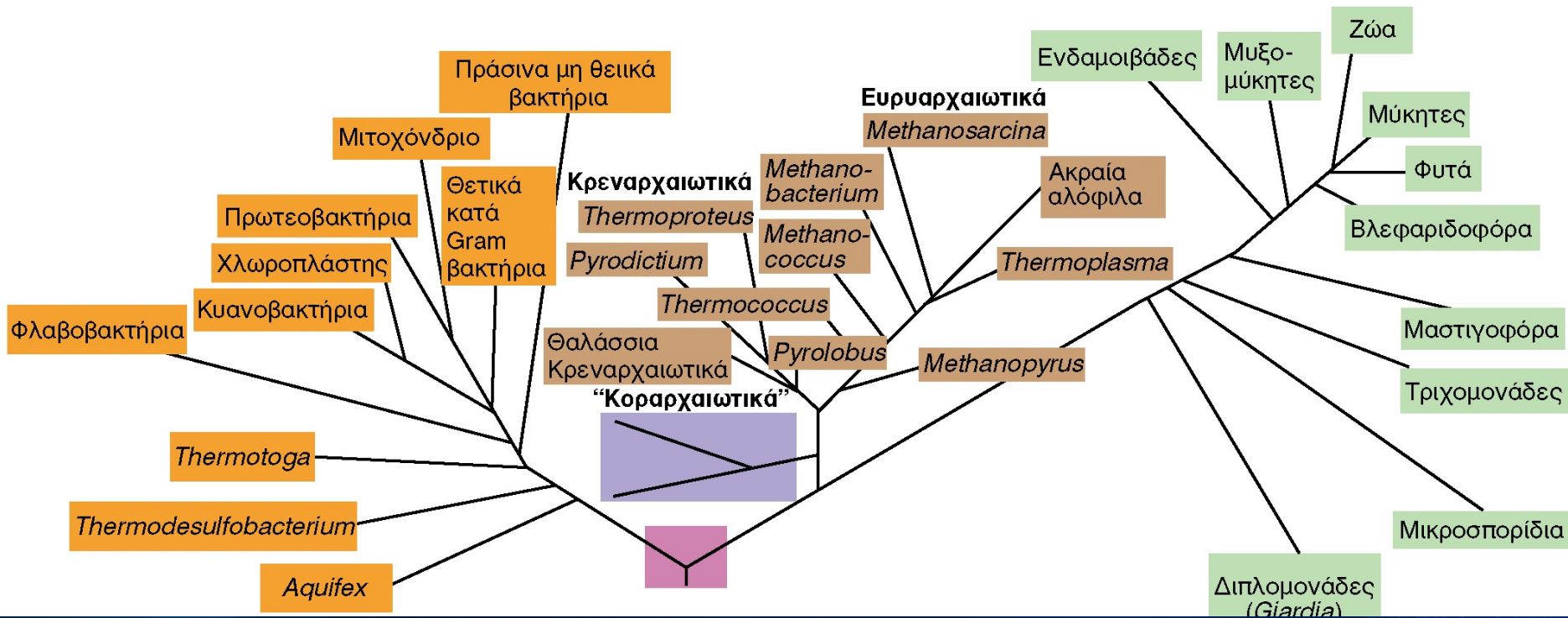
Εικόνα 11.6 Σταθμοί της βιολογικής εξέλιξης. Οι θέσεις των σταδίων πάνω στη χρονολογική κλίμακα είναι κατά προσέγγιση. Παρατηρήστε πώς η οξυγόνωση της ατμόσφαιρας που προκλήθηκε από τον μεταβολισμό των κυανοβακτηρίων υπήρξε μια βαθμιαία διεργασία, που ολοκληρώθηκε σε μια περίοδο 2 δισεκατομμυρίων ετών περίπου. Επίσης, παρατηρήστε ότι στο μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της Γης υπήρχαν μόνο μικροβιακές μορφές ζωής. Αν και απουσιάζουν στοιχεία από μικροαπολιθώματα, οι πρώτες μικροχημικές ενδείξεις για την ύπαρξη ευκαρυωτικών κυττάρων χρονολογούνται πριν από 2,7 δισεκατομμύρια έτη.

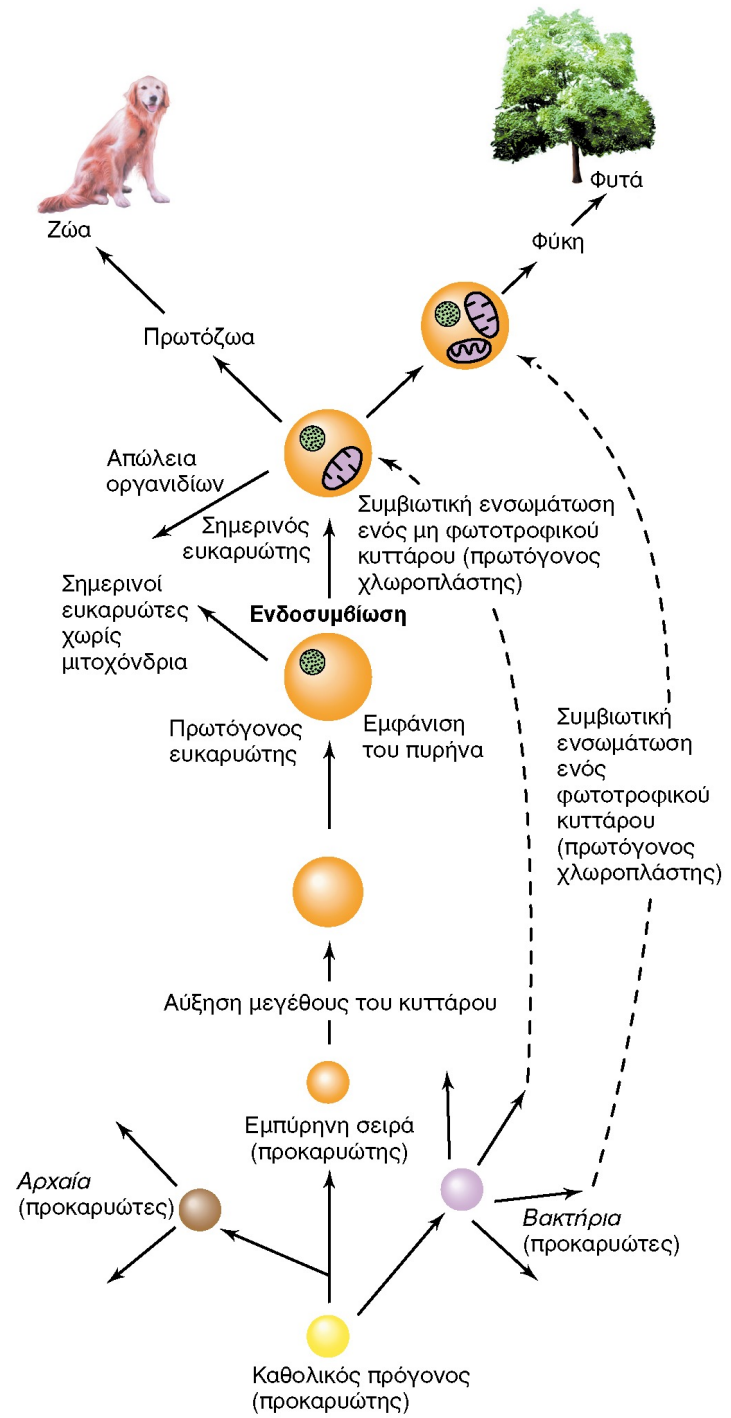
Οικουμενικό Φυλογενετικό Δέντρο, συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών ριβοσωματικού RNA

Βακτήρια

Αρχαία

Ευκάρυα





letters to nature

Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation

Jorge Tovar¹, Gloria León-Avila¹, Lidya B Sánchez^{2*}, Robert Sutak³, Jan Tachezy³, Mark van der Giezen¹, Manuel Hernández¹, Miklós Müller² & John M. Lucocq⁴

¹School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK

²The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, New York 10021, USA

³Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, 12844 Prague 2, Czech Republic

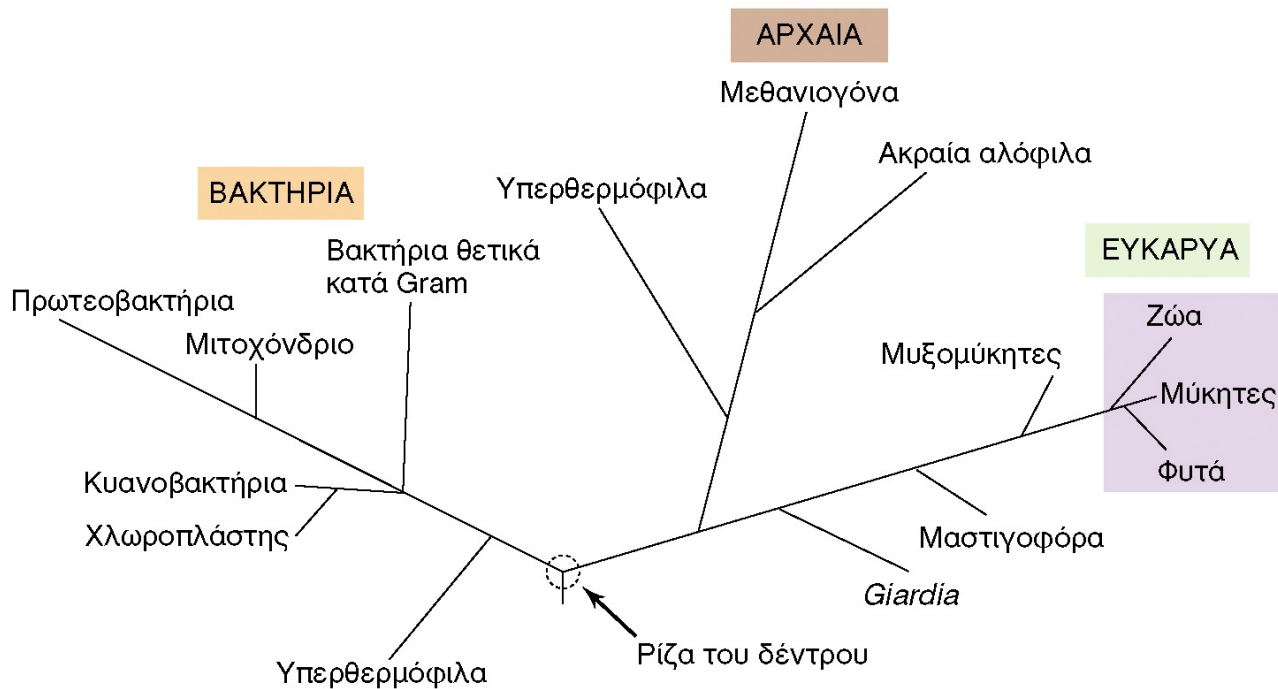
⁴School of Life Sciences, WTB/MSI complex, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, UK

* Present address: Public Health Research Institute, Newark, New Jersey 07103, USA

Giardia intestinalis (syn. *lamblia*) is one of the most widespread

contains mitochondrial remnant organelles (mitosomes) bounded by double membranes that function in iron-sulphur protein maturation. Our results indicate that *Giardia* is not primitively amitochondrial and that it has retained a functional organelle derived from the original mitochondrial endosymbiont.

The assembly and maturation of iron-sulphur (Fe-S) proteins is a recently identified critical function of the mitochondrion¹¹. Proteins containing Fe-S centres are widely distributed in nature and operate in metalloenzyme catalysis and electron transport. Although several Fe-S proteins are important in energy metabolism in amitochondriate organisms (for example, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, ferredoxin, hydrogenase)¹², almost nothing is known about the maturation of these proteins into functional enzymes or about the biosynthesis of their essential Fe-S reactive centres. Genes encoding the soluble enzyme cysteine desulphurase (IscS), a central component of the Fe-S cluster assembly system of prokaryotic and eukaryotic cells, were recently cloned from the amitochondrial protists *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*⁵. Because phylogenetic analyses of these genes support their mitochondrial ancestry, it is possible that their encoded proteins are



Εικόνα 2.7 Το φυλογενετικό δέντρο της ζωής, όπως προκύπτει από τη σύγκριση της αλληλουχίας του ριβοσωματικού RNA. Το δέντρο αποτελείται από τρεις «χώρους»: δύο στους οποίους περιλαμβάνονται μόνο προκαρυωτικά κύτταρα (τα *Βακτήρια* και τα *Αρχαία*), και τα *Ευκάρυα* (ευκαρυώτες). Στην Εικόνα παρουσιάζονται ελάχιστες ομάδες οργανισμών από κάθε «χώρο». Για περισσότερες λεπτομέρειες ως προς τους «χώρους» του δέντρου, βλ. Εικόνες 2.9, 2.18, και 2.22, καθώς και τα φυλογενετικά δέντρα των Κεφαλαίων 11-14. Τα υπερθερμόφιλα είναι προκαρυώτες που αναπτύσσονται άριστα σε θερμοκρασίες ίσες ή μεγαλύτερες των 80°C. Η ομάδα οργανισμών στην περιοχή με την κόκκινη σκίαση είναι οι *μακροοργανισμοί*. Όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί στο δέντρο της ζωής είναι *μικροοργανισμοί*.

OPINION

Open Access



Archaeal ancestors of eukaryotes: not so elusive any more

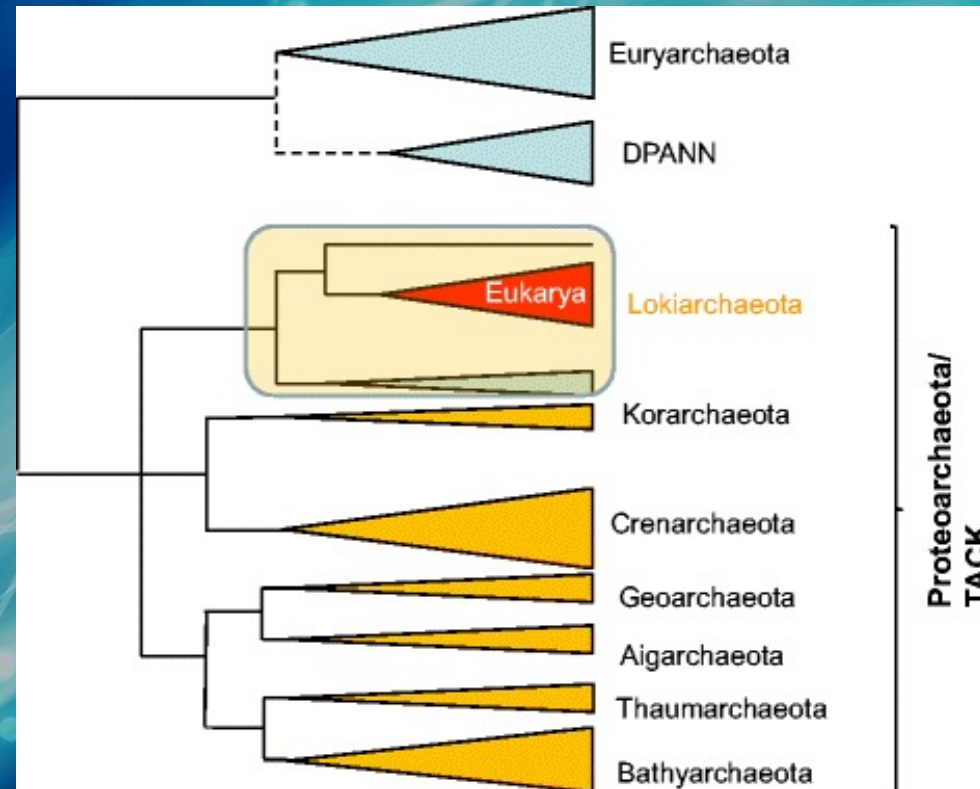
Eugene V. Koonin

Abstract

The origin of eukaryotes is one of the hardest problems in evolutionary biology and sometimes raises the ominous specter of irreducible complexity. Reconstruction of the gene repertoire of the last eukaryotic common ancestor (LECA) has revealed a highly complex organism with a variety of advanced features but no detectable evolutionary intermediates to explain their origin. Recently, however, genome analysis of diverse archaea led to the discovery of apparent ancestral versions of several signature eukaryotic systems, such as the actin cytoskeleton and the ubiquitin network, that are scattered among archaea. These findings inspired the hypothesis that the archaeal ancestor of eukaryotes was an unusually complex form with an elaborate intracellular organization. The latest striking discovery made by deep metagenomic sequencing vindicates this hypothesis by showing that in phylogenetic trees eukaryotes fall within a newly identified archaeal group, the Lokiarchaeota, which combine several eukaryotic signatures previously identified in different archaea. The discovery of complex archaea that are the closest living relatives of eukaryotes is most compatible with the symbiogenetic scenario for eukaryogenesis.

with archaeal and bacterial cells. To begin with, a typical eukaryotic cell has a three to four orders of magnitude larger volume than most bacteria and archaea [3–5]. This size difference translates into a difference in the physical principles of cell functioning: unlike most bacteria and archaea in which proteins, nucleic acids and small molecules diffuse more or less freely, the intracellular space in eukaryotes is fully compartmentalized so that molecules are distributed through specialized transport mechanisms [6, 7]. The compartmentalization and transport are supported by the elaborate system of intracellular membranes which includes the membrane of the eponymous eukaryotic organelle, the nucleus, and by an advanced cytoskeleton that consists of actin filaments and tubulin microtubules and includes numerous additional, dedicated proteins. Crucially, the great majority of eukaryotes possess the power-producing organelles, the mitochondria or their derivatives, that are now commonly accepted to have evolved from α -proteobacteria by endosymbiosis [8, 9]. Although some unicellular eukaryotes lack mitochondria, evolutionary reconstructions clearly point to secondary loss in all amitochondrial groups [10, 11].

Thus, eukaryotes show a qualitatively different level of cellular organization from that of archaea and bacteria, and there are no detectable evolutionary intermediates. Comparative analysis of eukaryotic cells and genomes indicates that the signature advanced functional systems of the eukaryotic cells were already present in the last eukaryotic common ancestor (LECA). These ancestral



ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

- Η επιστήμη της ταξινόμησης (συστηματικής) αποτελείται από την:
 - ταυτοποίηση
 - ονοματολογία
- Η βακτηριακή ταξινόμηση στηρίζεται παραδοσιακά σε φαινοτυπικές αναλύσεις που εξετάζει:
 - με τι μοιάζει ένας οργανισμός
 - ενεργειακό μεταβολισμό
 - ένζυμα

αυτά αποτελούν τη βάση για την ταξινόμηση του.

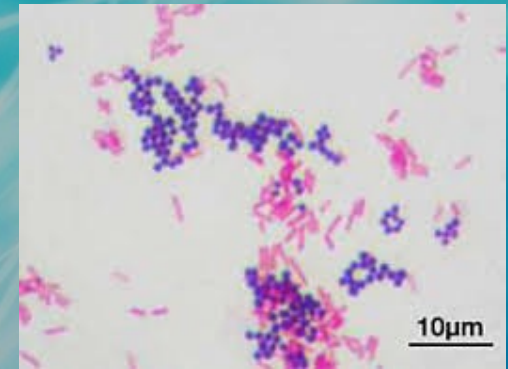
Τα λίγα δομικά στοιχεία που διαθέτουν τα μικρόβια καθιστούν απαραίτητη τη χρησιμοποίηση γονοτυπικών/γενοτυπικών αναλύσεων.

Η έννοια των ειδών στη μικροβιολογία

- **Ευκαρυωτικό είδος:**
 - Μια ομάδα συγγενικών ειδών που μπορούν και διασταυρώνονται μεταξύ τους. Παράγουν γόνιμους απογόνους
 -
- **Προκαρυωτικό είδος:**
 - Ένας πληθυσμός κυτταρών με παρόμοια χαρακτηριστικά
 - Κλώνος: Πληθυσμός που προέρχονται από ένα και μοναδικό κύτταρο
- **Viral species:**
 - Πληθυσμός ιών με κοινά χαρακτηριστικά που καταλαμβάνουν ειδικούς οικολογικούς θώκους

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

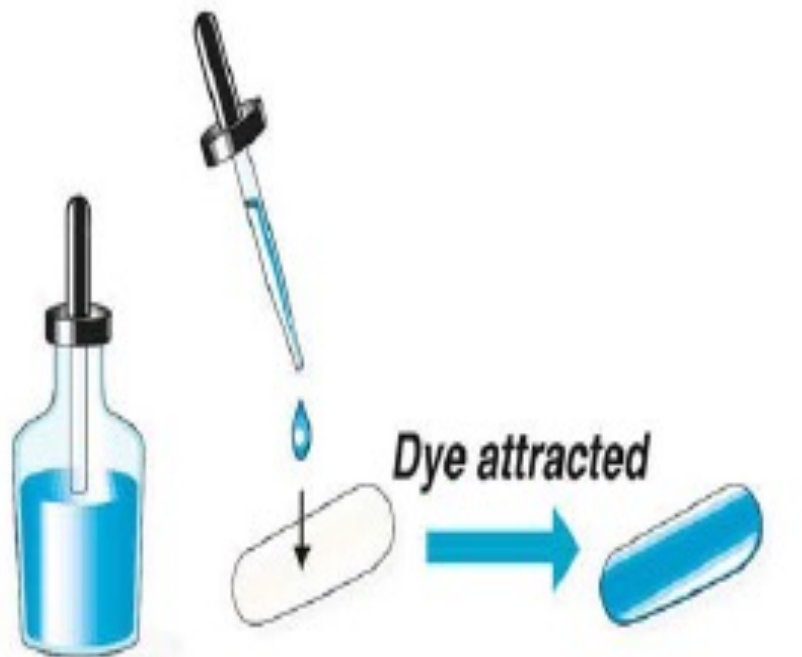
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
Μορφολογία	Σχήμα, μέγεθος, αντίδραση κατά Gram
Αυτοκινησία	Μαστίγια, αεροκυστίδια, απουσία κίνησης
Θρέψη και φυσιολογία	Μηχανισμός διατήρησης ενέργειας (φωτότροφα, χημειοργανότροφα κτλ), οξυγόνο, θερμοκρασία, pH (ανοχές)
Άλλοι παράγοντες	Χρωστικές, κυτταρικά έγκλειστα ευαίσθητα στα αντιβιοτικά



Simple stains

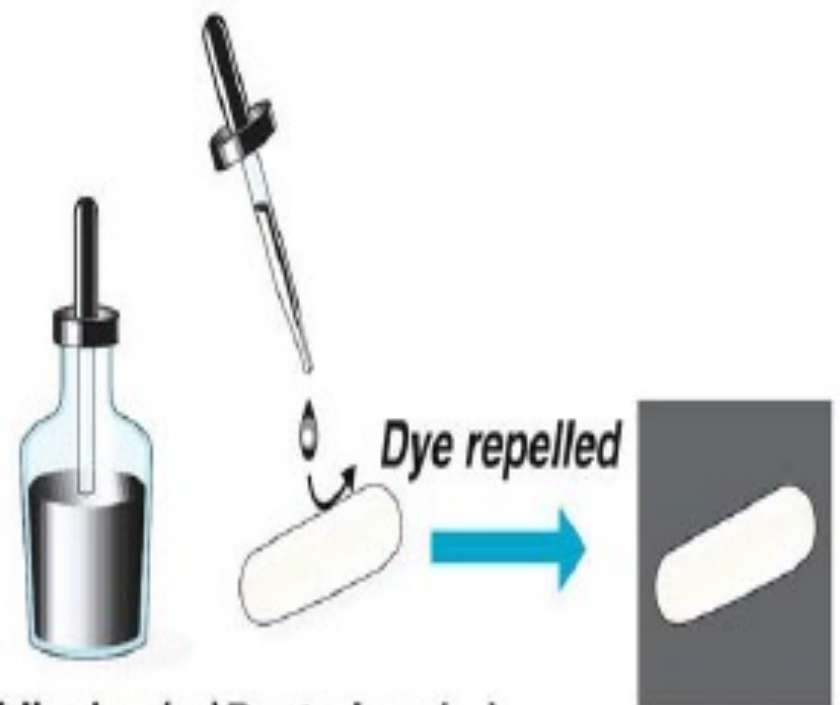
- **Simple stains highlight the organism so basic structures are visible in microscope.**
- **basic dyes - positively charged molecules**
 - crystal violet
 - methylene blue
 - safranin
 - malachite green
- **negative stain**
 - India ink
 - turns medium black cells remain light

Simple stains continued



Basic dye (+) Bacterium (-) Cell stained

(a) Simple stain technique



Acidic dye (-) Bacterium (-) Cell clear

(b) Negative stain technique

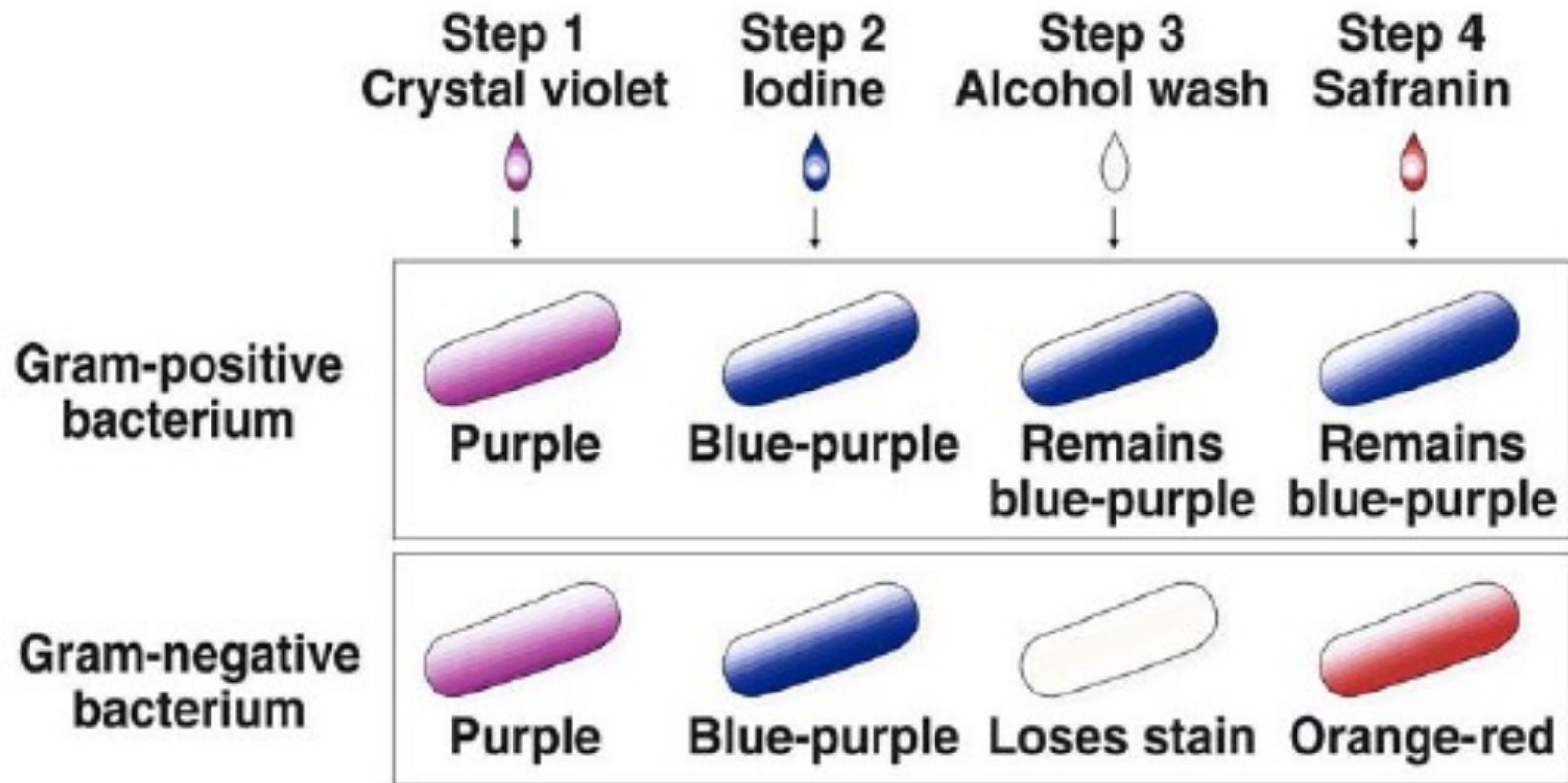
Differential stains

- **Differential stains react differently with different kinds of bacteria.**
- **Gram stain**
 - Gram negative - pink
 - Gram positive - blue
- **Acid-Fast stain**
 - To identify Mycobacteria
 - *M. tuberculosis* and *M. leprae* appear red
 - all other bacteria stain blue

Gram Stain - developed Christian Gram in 1884

- **Gram Stain technique:**
 - **Step 1. Primary stain: Crystal violet**
 - **Step 2. Mordant: Iodine sets stain**
 - **Step 3. Decolorization: Alcohol or Acetone (Gram-negatives lose their purple color)**
 - **Step 4. Counterstain: safranin (pink dye) is added.**
(Decolorized Gram-negatives become pink)

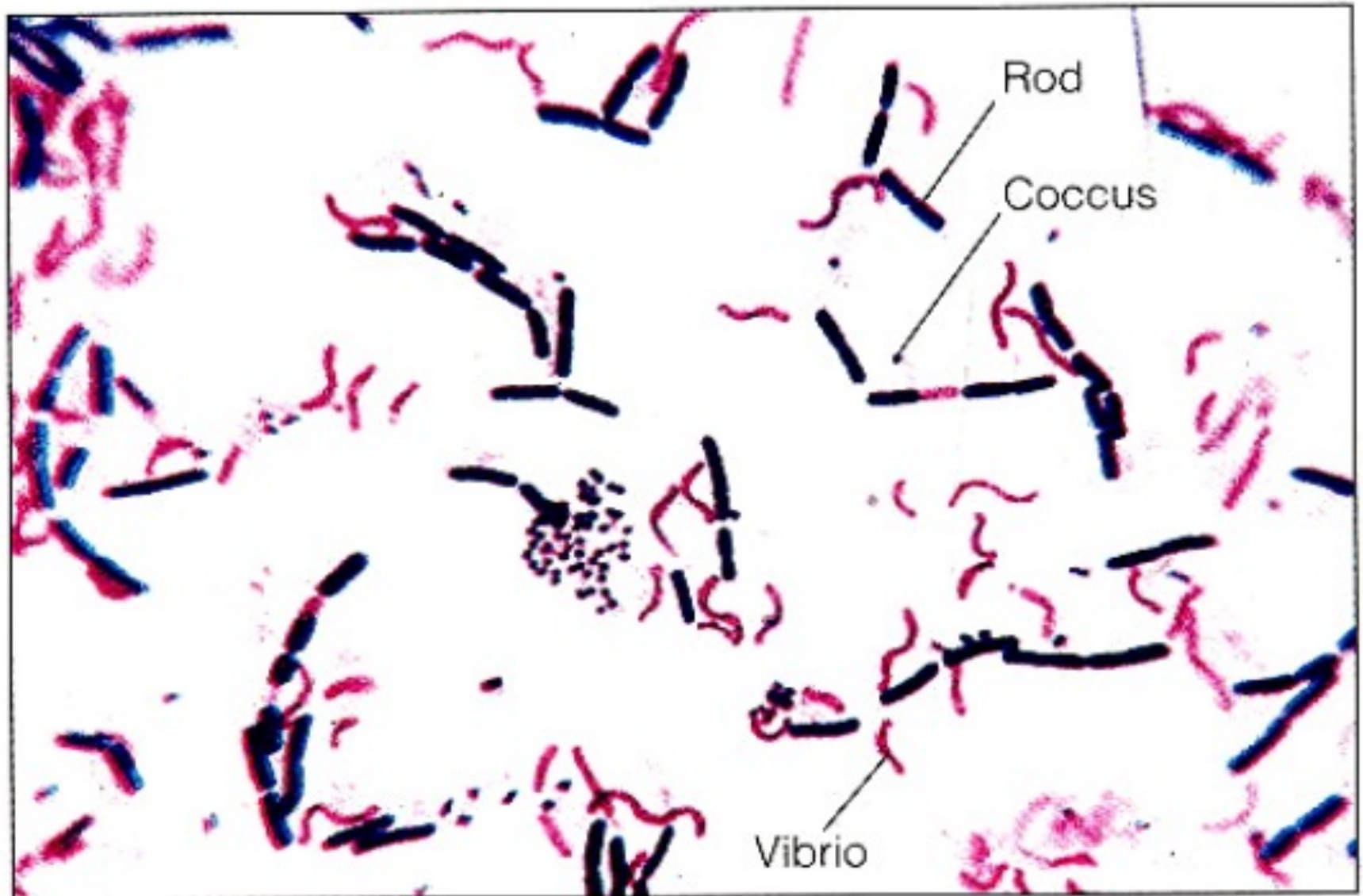
Gram Stain- Graphic



(c) Gram stain technique

Gram+ = dark blue

Gram⁻ = pink



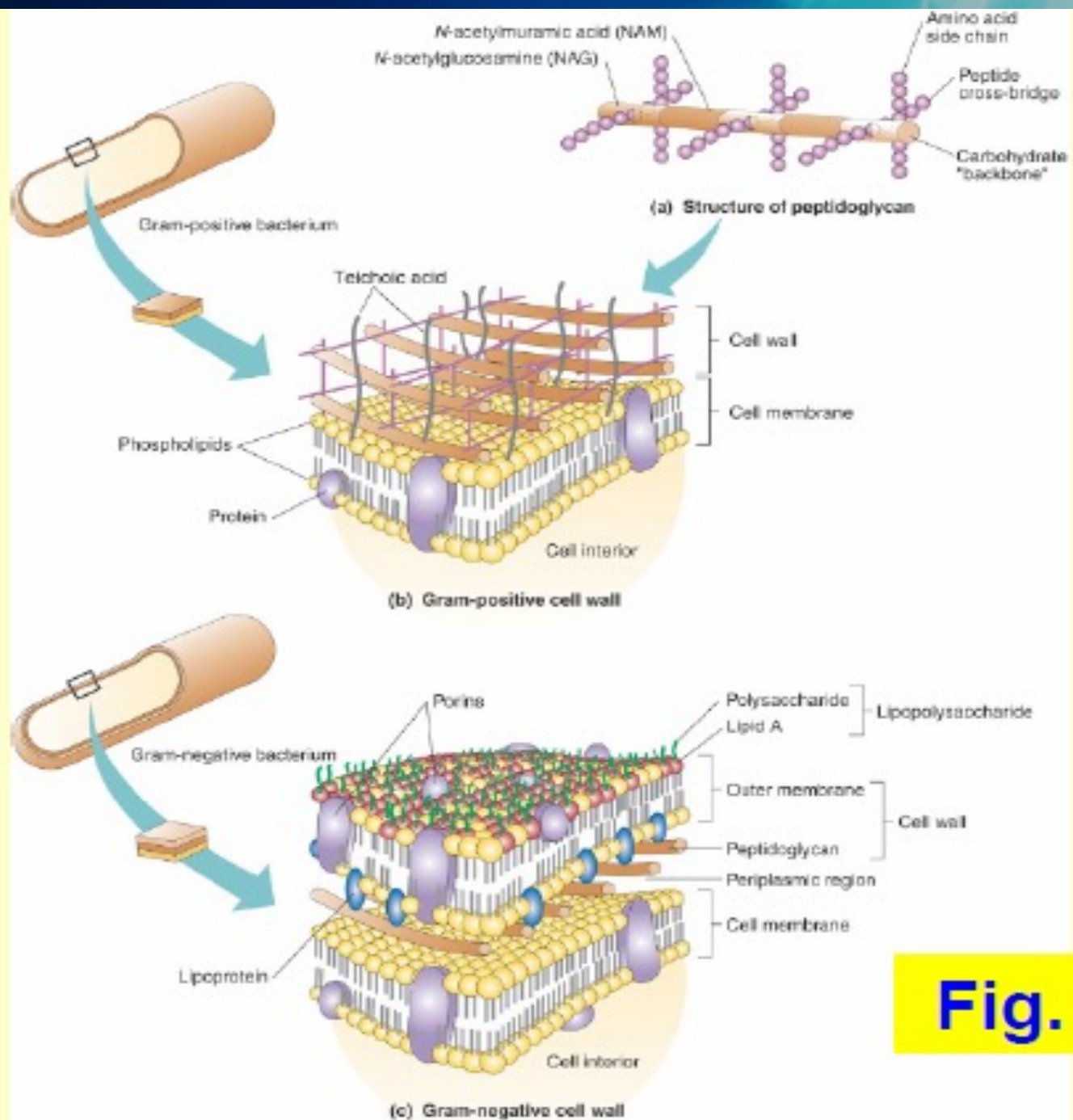


Fig. 4.9

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Υβριδοποίηση DNA:DNA
- Καθορισμός ριβότυπου – Αλληλούχιση και σύγκριση
- Λιπιδική ανάλυση
- GC%

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

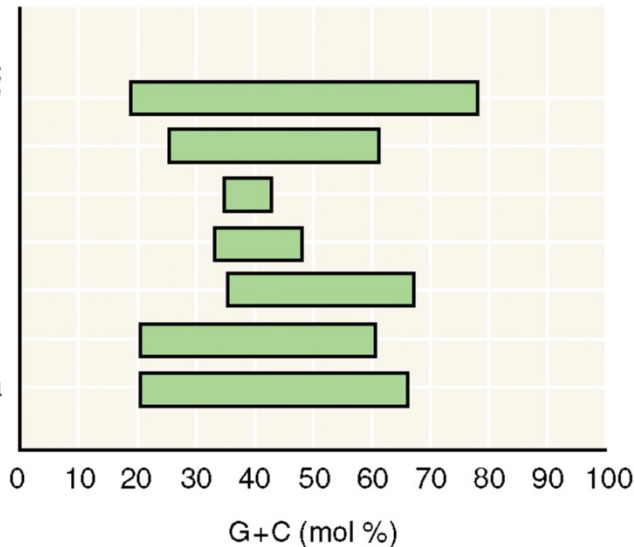
Αναλογία G+C

$$\frac{G+C}{A+T+G+C} \times 100$$

- Στύπωμα κατά Southern
- Χρωματογραφικές μεθόδους

Οργανισμοί

Προκαρυώτες
Βακτήρια
Αρχαία
Ευκαρυώτες
Ζώα
Φυτά
Φύκη
Μύκητες
Πρωτόζωα



Απομόνωση βακτηρίου από
το έντερο θερμόαιμου ζώου



Δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας



Αντίδραση κατά Gram



Αρνητικό κατά Gram



Ραβδόμορφο



Προαιρετικά αναερόβιο



Μεταβολίζει λακτόζη,
παράγοντας οξέα και
αέρια



Εκτέλεση βιοχημικών δοκιμών
(θετικά: ινδόλιο, ερυθρό του μεθυλίου, βλεννικό·
αρνητικά: κιτρικό, δοκιμή Voges-Proskauer, H₂S)



Escherichia coli

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: Ορισμένα ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν.

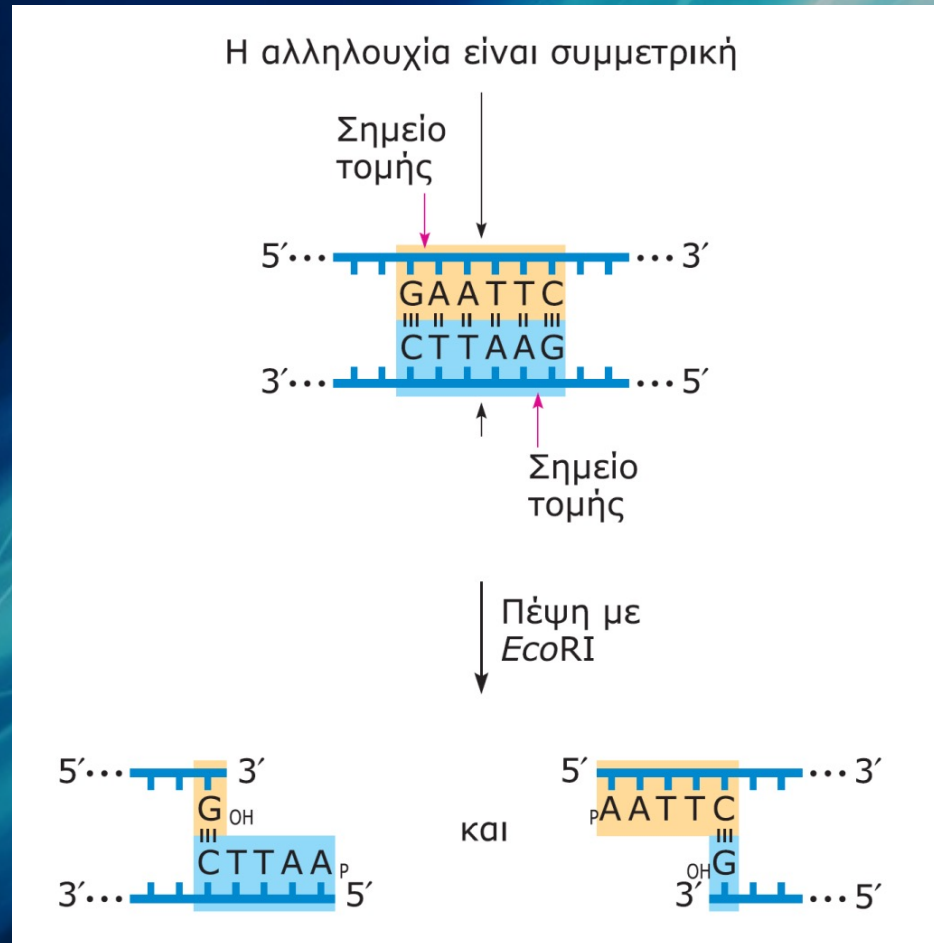
Μικροοργανισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σημειώσεις
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	5' ... G G C C... 3' 3' ... C C G G... 5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	5' ... T C G A... 3' 3' ... A G C T... 5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	5' ... G C G C... 3' 3' ... C G C G... 5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	5' ... C T N A G... 3' 3' ... G A N T C... 5'	4
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'	5
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' ... G A T A T C... 3' 3' ... C T A T A G... 5'	1
	EcoRI	5' ... G A A T T C... 3' 3' ... C T T A A G... 5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	5' ... C T G C A G... 3' 3' ... G A C G T C... 5'	3
<i>Microcoleus</i>	MstII	5' ... C C T N A G G... 3' 3' ... G G A N T C C... 5'	4
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	5' ... G C G G C C G C... 3' 3' ... C G C C G G C G... 5'	6

Τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA



Πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση τμήματα DNA, ενώ εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Θέση περιορισμού συμμετρική ως προς τον άξονα που περνά από το μέσο της.
Στην εικόνα φαίνεται η θέση αναγνώρισης της *EcoRI*. Η αλληλουχία είναι παλίνδρομη: είναι ίδια και στις δύο αλυσίδες του DNA όταν διαβάζεται στην ίδια κατεύθυνση (στο παράδειγμα αυτό είναι 5' GAATTC 3').



Πίνακας 16.1 Χαρακτηριστικά μερικών ενζύμων περιορισμού

	Όνομασία ενζύμου	Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 6 bp	<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{-GGATCC-}3' \\ 3' \text{-CCTAGG-}5' \\ \uparrow \end{array} $
	<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigi</i>	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{AGATCT} \\ \text{TCTAGA} \\ \uparrow \end{array} $
	<i>Eco</i> RI	<i>E. coli</i> RY13	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{GAATTC} \\ \text{CTTAAG} \\ \uparrow \end{array} $
	<i>Hae</i> II	<i>Haemophilus aegypticus</i>	$ \begin{array}{c} \text{RGC} \downarrow \text{CY} \\ \text{Y} \uparrow \text{CGCR} \end{array} $
	<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{AAGCTT} \\ \text{TTCGAA} \\ \uparrow \end{array} $
	<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	$ \begin{array}{c} \text{CTGCA} \downarrow \text{G} \\ \text{G} \uparrow \text{ACGTC} \end{array} $
	<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{GTCGAC} \\ \text{CAGCTG} \\ \uparrow \end{array} $
	<i>Sma</i> I	<i>Serratia macrescens</i>	$ \begin{array}{c} \text{CCC} \downarrow \text{GGG} \\ \text{GGG} \uparrow \text{CCC} \end{array} $

Πίνακας 16.1 Χαρακτηριστικά μερικών ενζύμων περιορισμού

	Όνομασία ενζύμου	Οργανισμός από τον οποίο προέρχεται το ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης και θέση κοπής*
Ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 4 bp	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	G G [↓] C C C C _↑ G G
	<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G [↓] C C _↑ G C G
	<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C [↓] C G C G G C _↑ C
	<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	[↓] G A T C C T A G _↑
Ένζυμο με αλληλουχία αναγνώρισης 8 bp	<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	G C [↓] G G C C G C C G C C G G _↑ C G
Ένζυμο με μη συμμετρική αλληλουχία αναγνώρισης	<i>BstXI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	C C A N N N N N [↓] N T G G G G T N _↑ N N N N N A C C

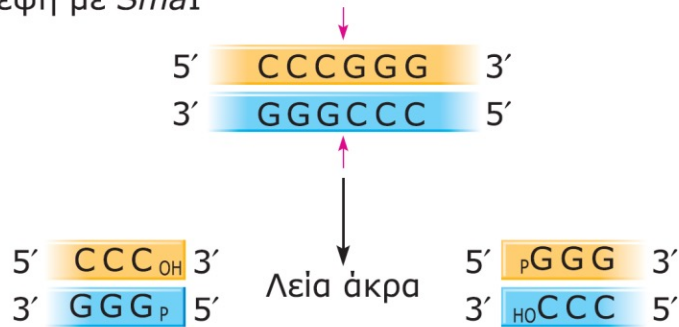
*Σε αυτή τη στήλη παρουσιάζονται οι δύο αλυσίδες του DNA και οι θέσεις κοπής υποδεικνύονται με βέλη.

R = πουρίνη, Y = πυριμιδίνη, N = οποιαδήποτε βάση.

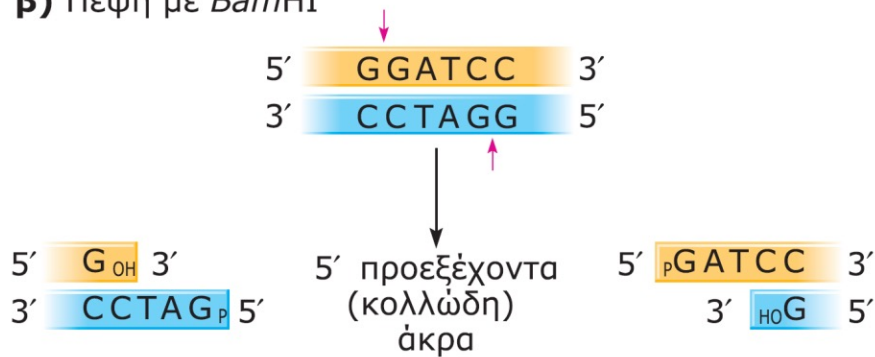
Πίνακας 16.2 Συχνότητα εμφάνισης θέσεων περιορισμού σε DNA στην αλληλουχία του οποίου οι τέσσερις βάσεις αντιπροσωπεύονται εξίσου

Αριθμός bp στη θέση περιορισμού	Συχνότητα εμφάνισης
4	$(1/4)^4 = 1$ ανά 256 bp
5	$(1/4)^5 = 1$ ανά 1.024 bp
6	$(1/4)^6 = 1$ ανά 4.096 bp
8	$(1/4)^8 = 1$ ανά 65.476 bp
n	$(1/4)^n$

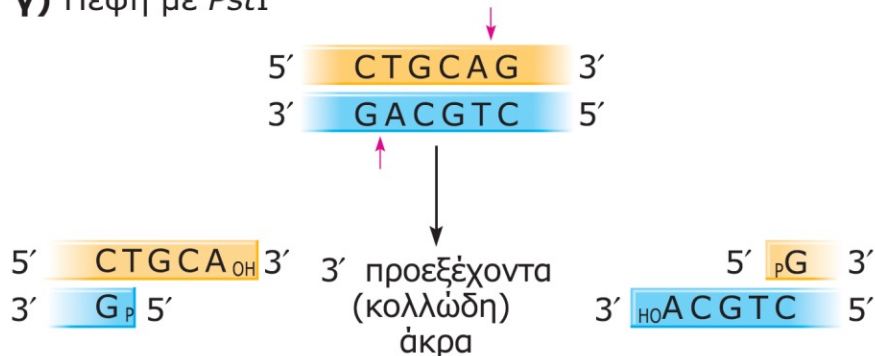
α) Πέψη με *Sma*I



β) Πέψη με *Bam*HI



γ) Πέψη με *Pst*I

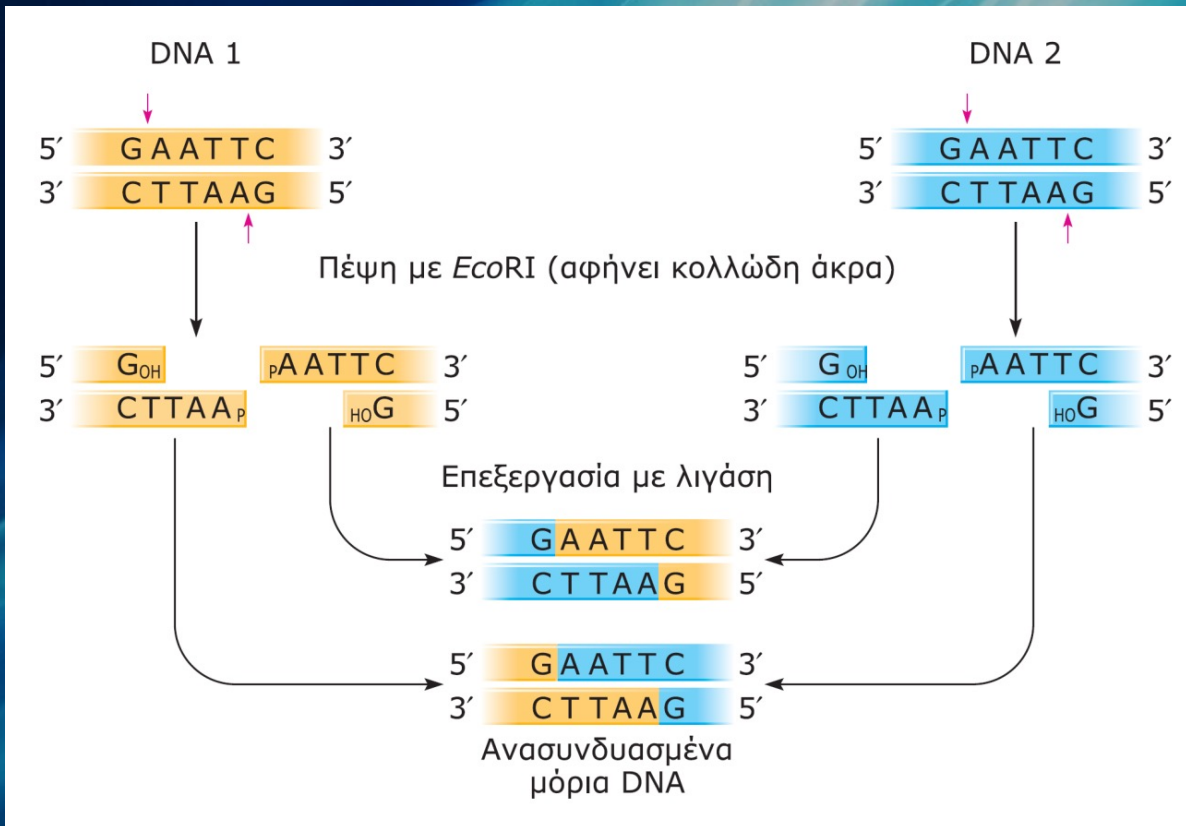


Παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το DNA.

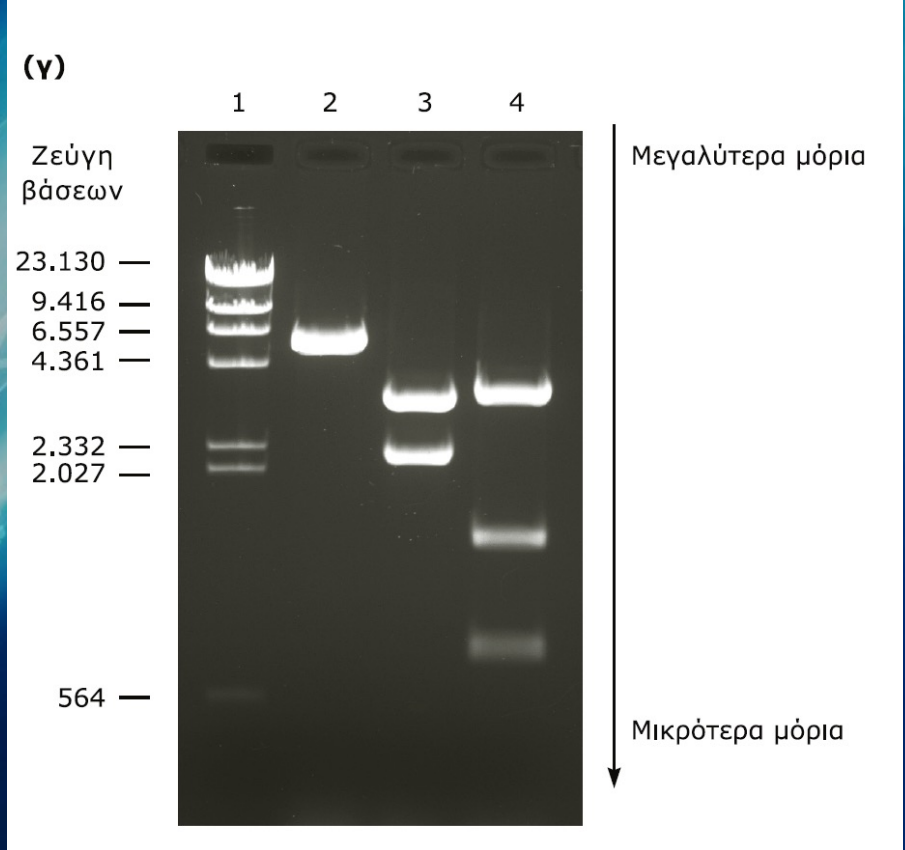
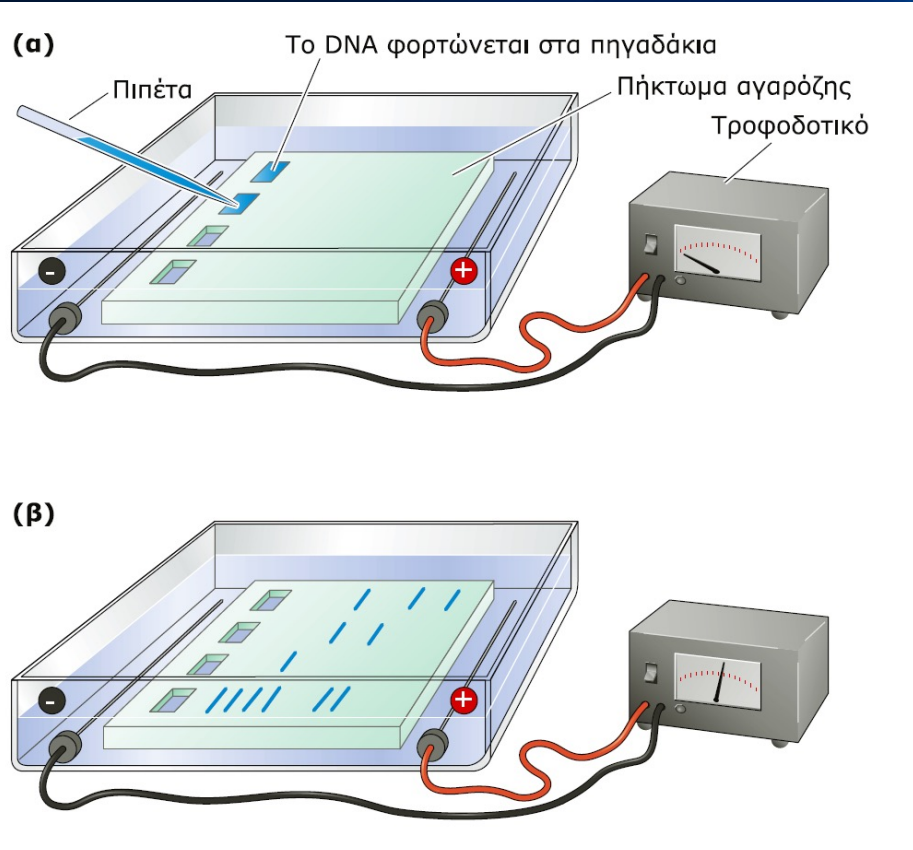
(α) Η *Sma*I δημιουργεί λεία άκρα. (β) Η *Bam*HI δημιουργεί προεξέχοντα 5' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα. (γ) Η *Pst*I δημιουργεί προεξέχοντα 3' μονόκλωνα (κολλώδη) άκρα.

Πέψη του DNA από το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*.

Το ένζυμο *EcoRI* δημιουργεί δύο συμμετρικές εγκοπές που ονομάζονται ασυμπτωτικές. Έτσι προκύπτουν κολλώδη άκρα. Όταν δύο τμήματα DNA προέρχονται από πέψη με το ίδιο ένζυμο, έχουν τα ίδια κολλώδη άκρα και μπορούν να συνδεθούν μέσω ζευγαρώματος των συμπληρωματικών βάσεων. Οι εγκοπές που παραμένουν είναι δυνατόν να κλείσουν με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών από την DNA λιγάση.

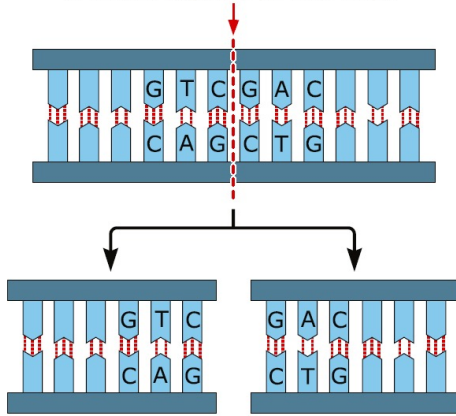


Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.



(α)

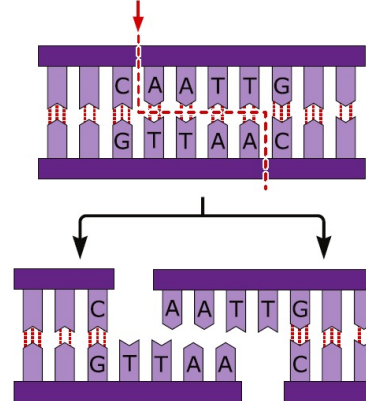
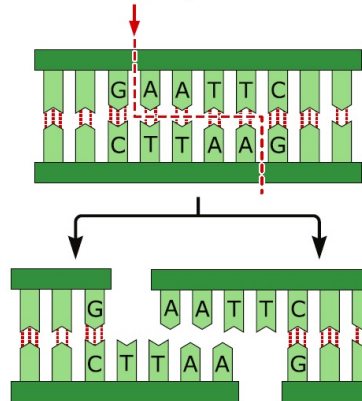
Η HindII δημιουργεί λεία άκρα



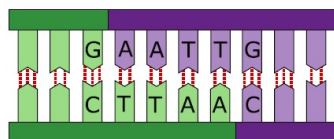
(β)

Η EcoRI δημιουργεί κολλώδη άκρα

Η MfeI δημιουργεί κολλώδη άκρα



Τα συμπληρωματικά άκρα είναι δυνατόν να ενωθούν με τη βοήθεια DNA λιγάσης



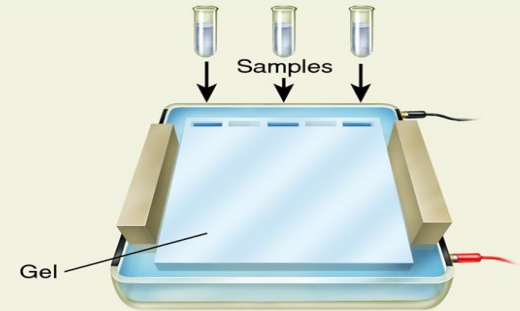
Agarose gel

Buy image at <http://yayimages.com/imagefileid/2898025>

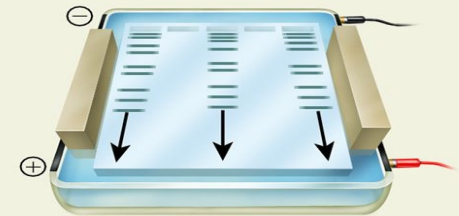
YAY: Quality Images, Low Prices



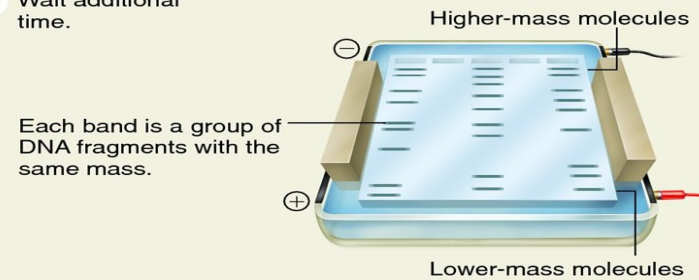
- 1 Load samples of DNA fragments into wells at the top of the gel.



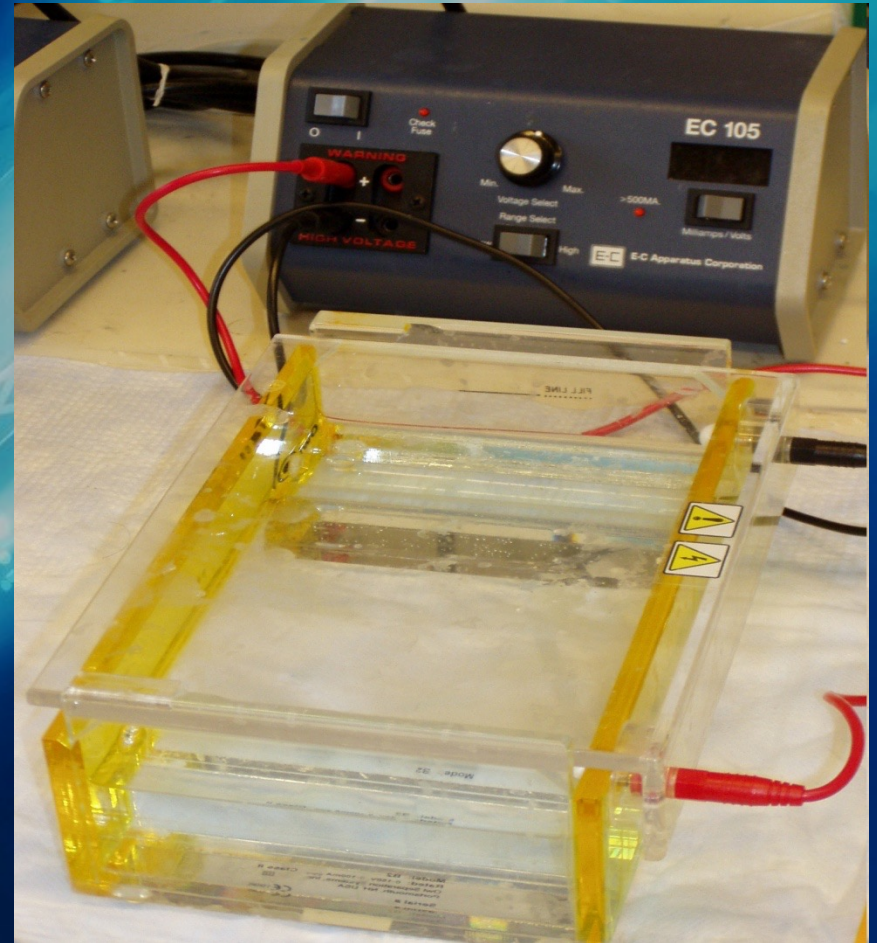
- 2 Apply an electric field.



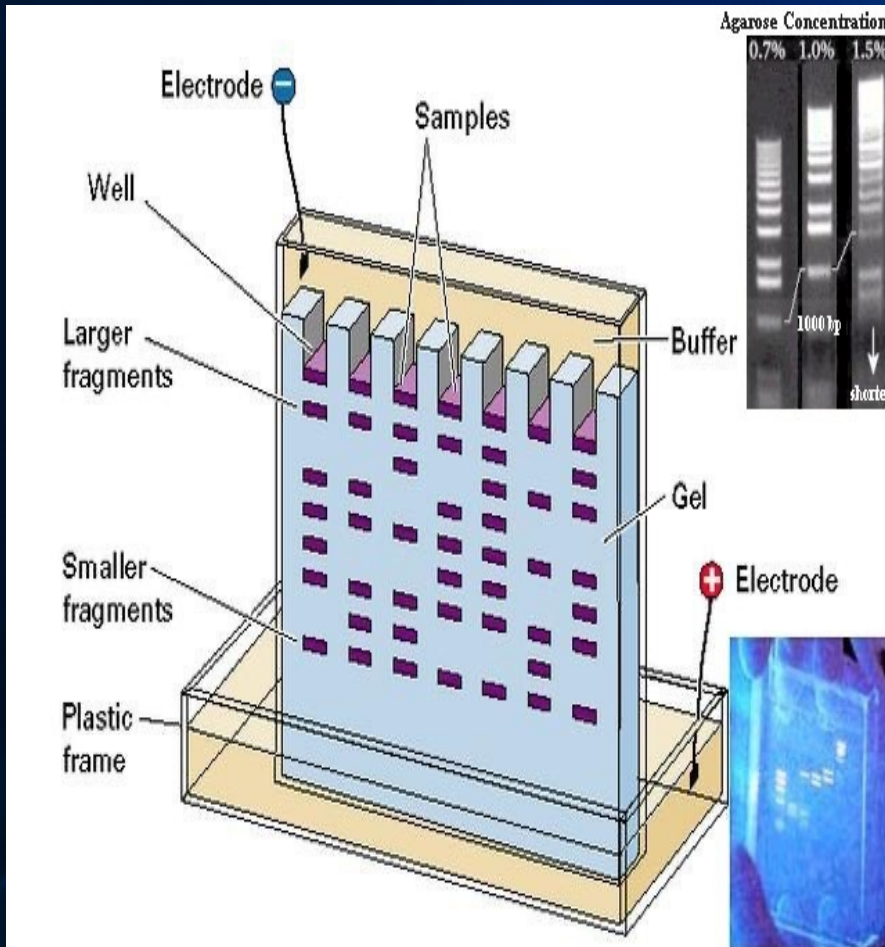
- 3 Wait additional time.

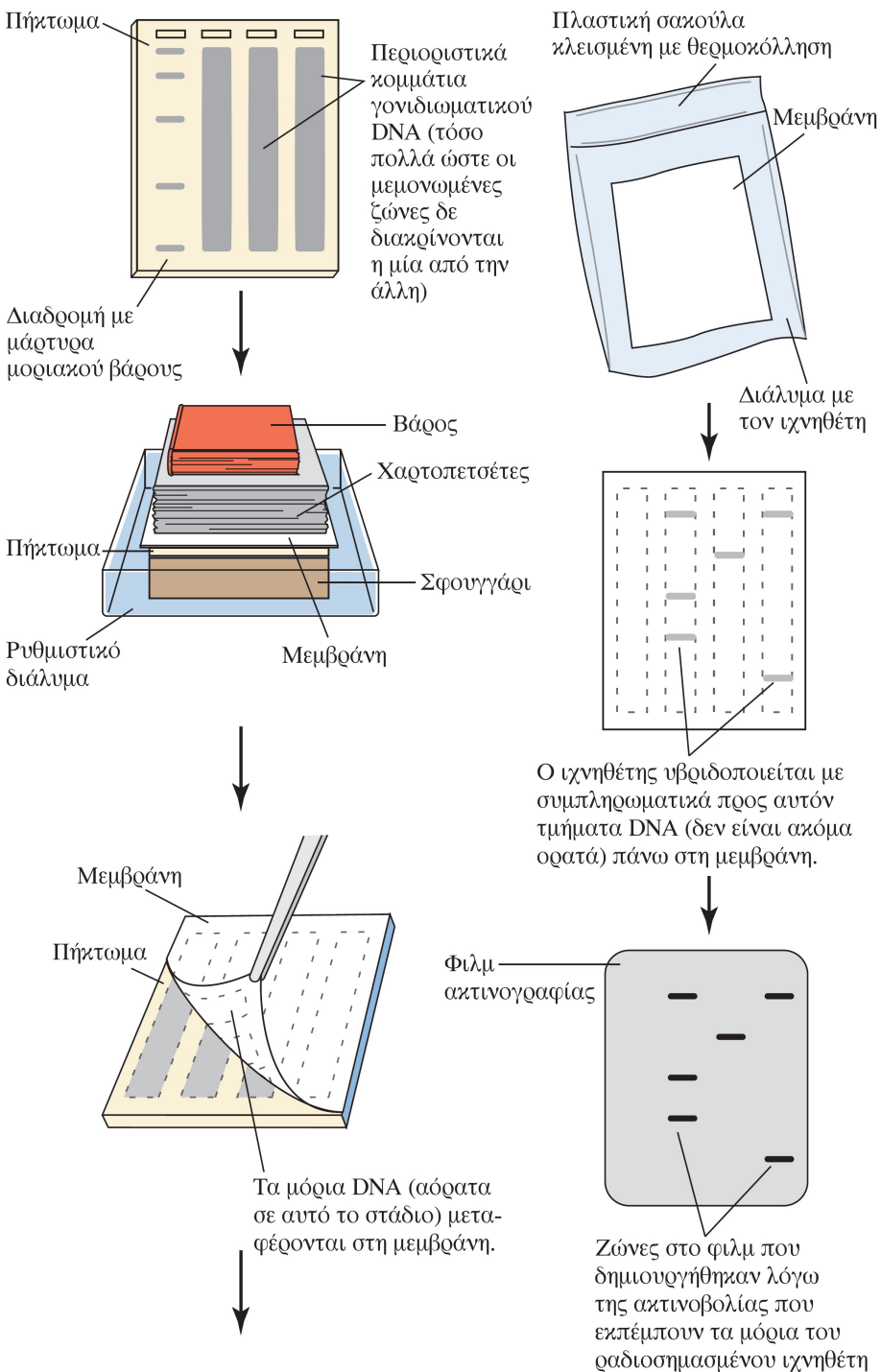


Gel Electrophoresis



Vertical electrophoresis

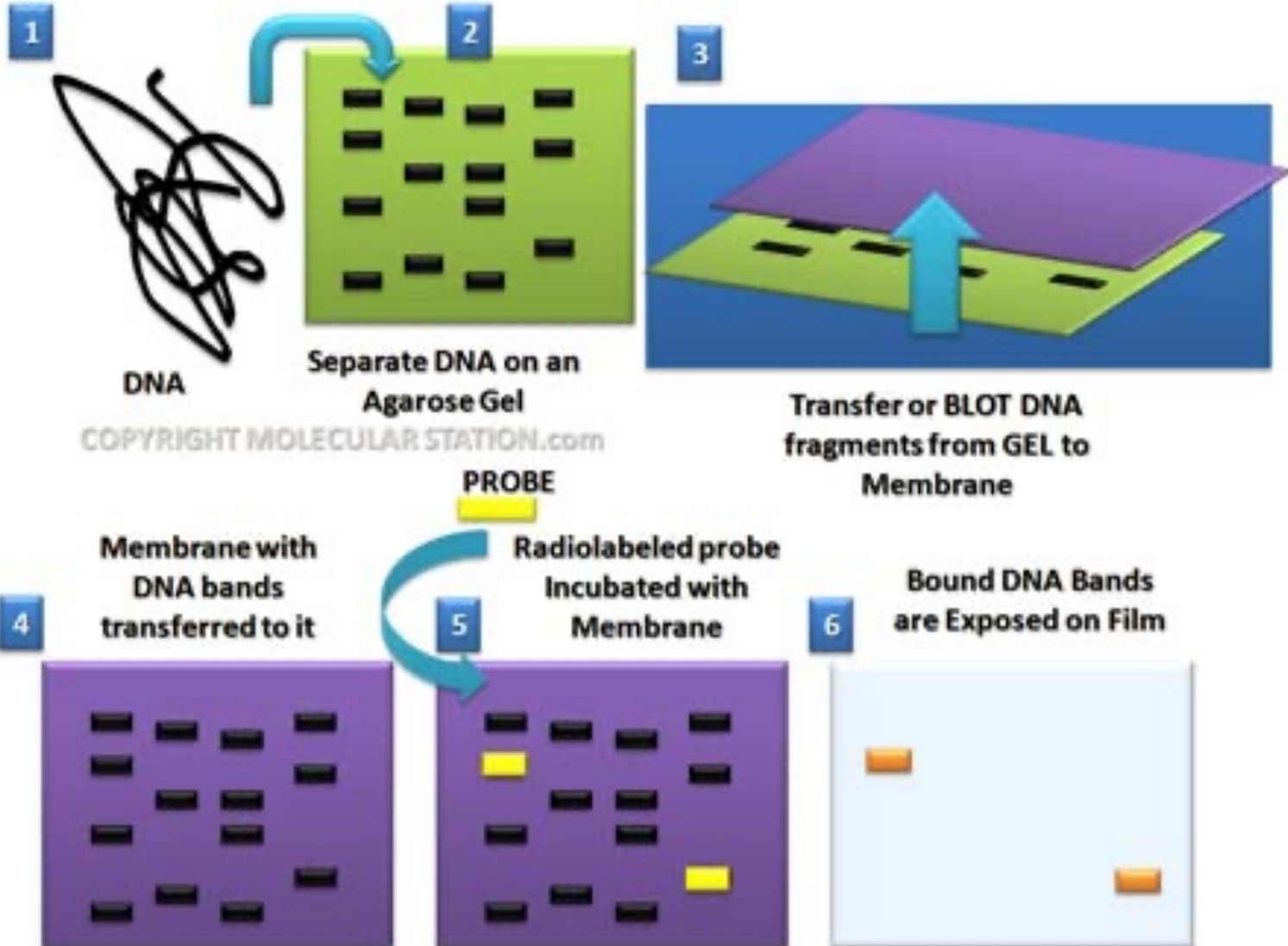




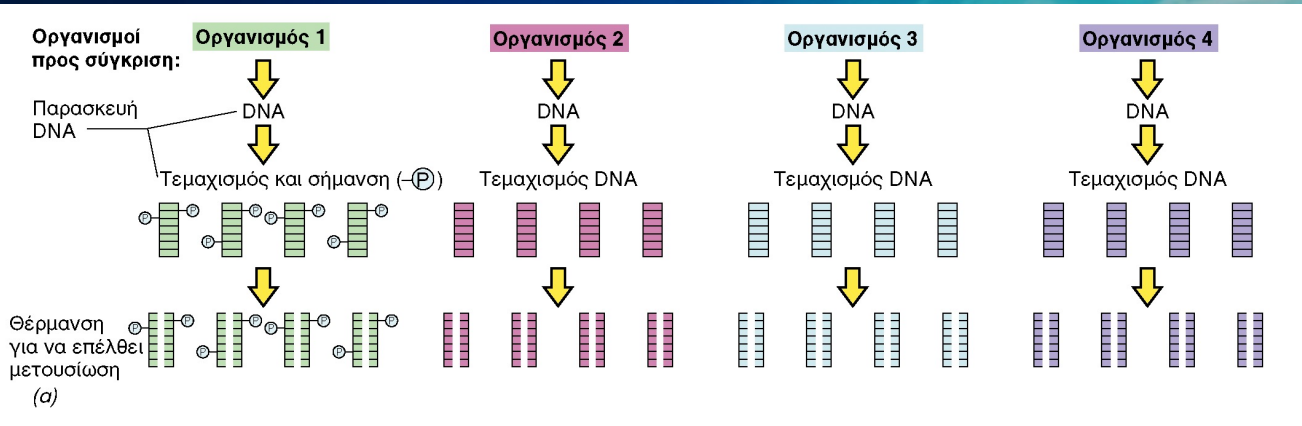
Το στύπωμα κατά Southern επιτρέπει τον εντοπισμό ενός συγκεκριμένου κομματιού DNA σε ένα πήκτωμα

Τα δείγματα DNA κόβονται με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα και κατόπιν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα επώάζεται σε αλκαλικό διάλυμα που προκαλεί την αποδιάταξη των περιοριστικών κομματιών και κατόπιν εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης, ώστε το pH να ξαναγίνει ουδέτερο. Τα αποδιαταγμένα μόρια DNA μεταφέρονται σε μια μεμβράνη η οποία επώάζεται με έναν ιχνηθέτη σημασμένο είτε με ραδιενέργεια είτε με κάποιον άλλο τρόπο. Όταν ο ιχνηθέτης είναι ραδιο-σημασμένος (όπως στο παράδειγμα αυτό), ακολουθεί αυτοραδιογραφία: ένα ακτι-νογραφικό φιλμ εκτίθεται στη μεμβράνη και μετά την εμφάνισή του οι θέσεις στις οποίες υπάρχουν μαύρες ζώνες υποδεικνύουν ποια από τα μόρια DNA που ηλεκτροφορήθηκαν υβριδοποιήθηκαν με τον ιχνηθέτη.

Στύπωμα κατά Southern

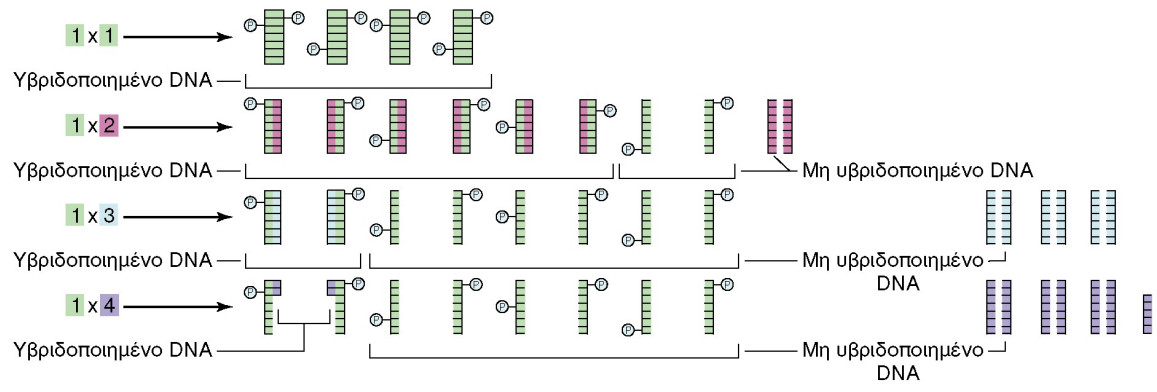


Υβριδοποίηση DNA:DNA



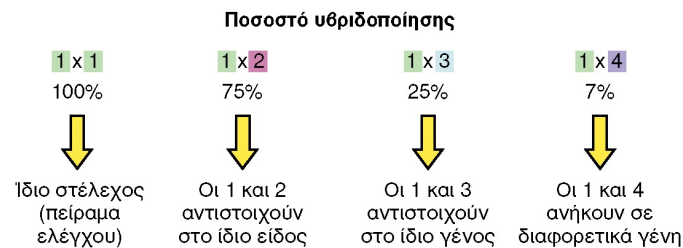
Πείραμα

υβριδοποίησης: Ανάμιξη DNA από δύο οργανισμούς – μη ιχνηθετημένο DNA προστίθεται σε περίσσεια:



(β)

Αποτελέσματα και ερμηνεία:



(γ)

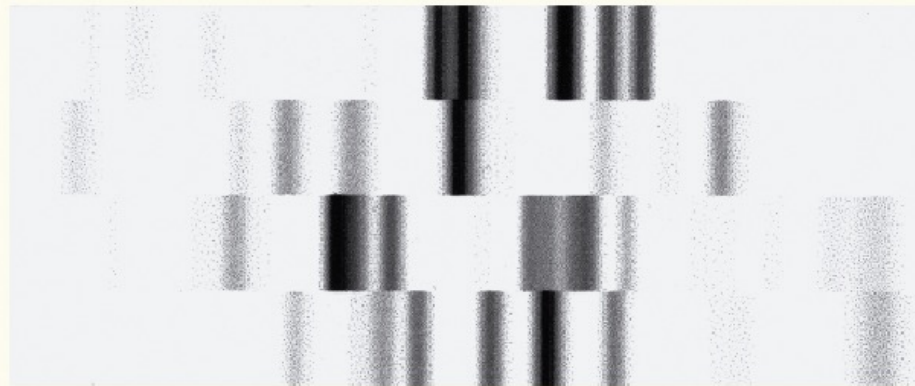
ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΡΙΒΟΤΥΠΟΥ

*Lactococcus
lactis*

*Lactobacillus
acidophilus*

*Lactobacillus
brevis*

*Lactobacillus
kefir*



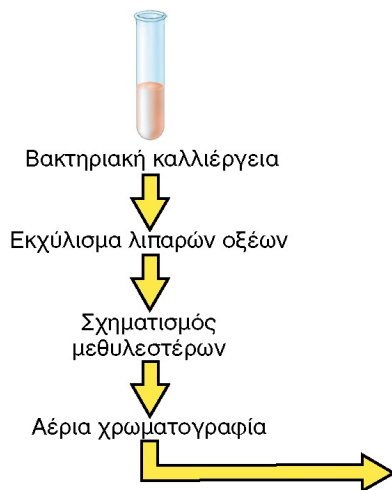
Carl A. Batt

ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

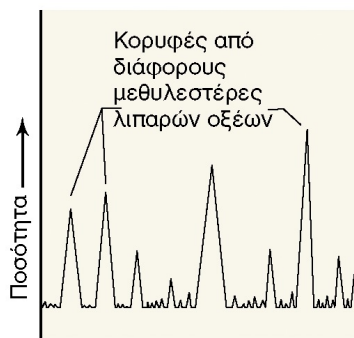
Κατηγορίες λιπαρών οξέων στα *Βακτήρια*

Κατηγορία	Παράδειγμα	Δομή παραδείγματος
Κορεσμένα	δεκατετρανοϊκό οξύ	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$
Ακόρεστα	ω -7- <i>cis</i> δεκαεξανοϊκό οξύ	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{C}(\text{H})_6-\text{CH}_3$
Με τριμελή δακτύλιο (κυκλοπροπάνιο)	<i>cis</i> 7-8 μεθυλοδεκαεξανοϊκό οξύ	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_7-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{C}(\text{H})_5-\text{CH}_3$
Διακλαδισμένα	13-μεθυλοδεκατετρανοϊκό οξύ	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{CH}_3$
Υδροξυοξέα	3-υδροξυδεκατετρανοϊκό οξύ	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{C}(\text{H})_{10}-\text{CH}_3$

(α)

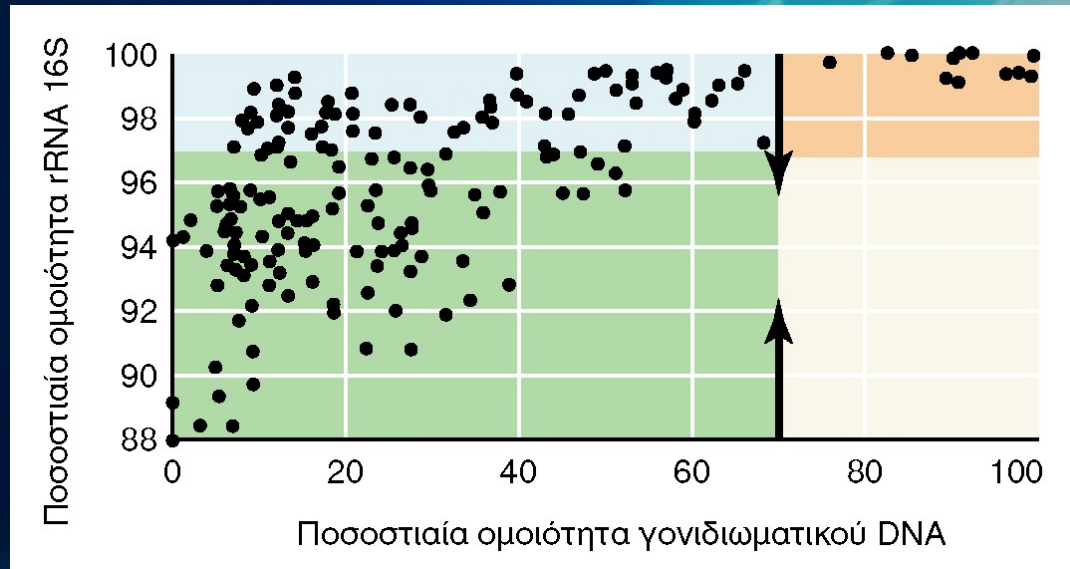


(β)



Σύγκριση του προτύπου των κορυφών με καταχωρημένα πρότυπα σε βάση δεδομένων → ταυτοποίηση οργανισμού

ΠΟΛΥΦΑΣΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΑ

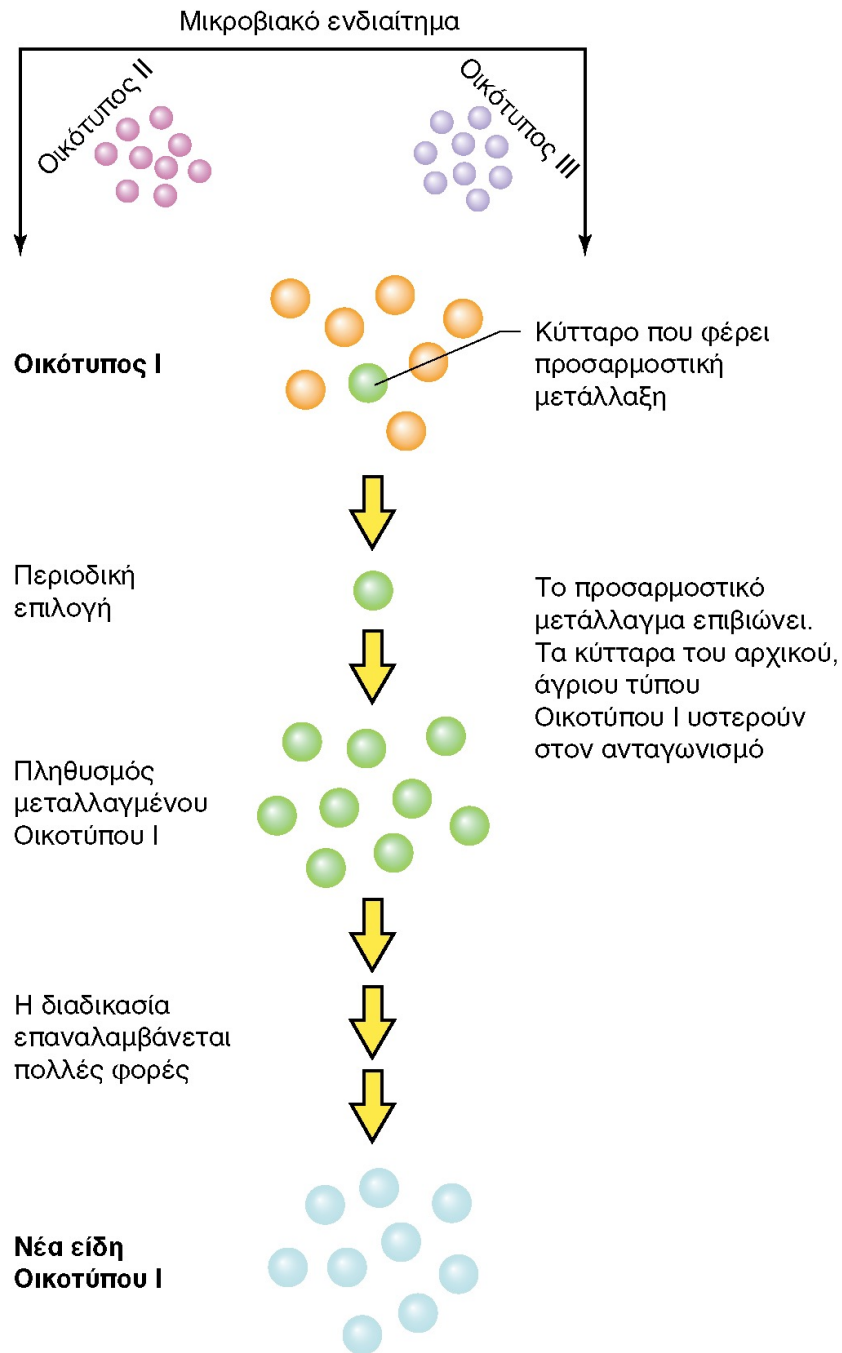


Δύο μικρόβια ανήκουν στο ίδιο είδος αν οι αλληλουχίες του ριβοσωματικού RNA 16S διαφέρουν τουλάχιστον κατά 3%

DNA-DNA υβριδοποίηση χαμηλότερη του 70%

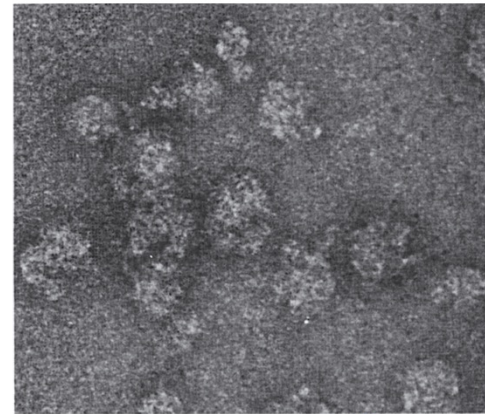
Διαφορές 5-7% σηματοδοτούν νέο γένος

ΠΩΣ ΠΡΟΚΕΙΠΤΟΥΝ ΤΑ ΝΕΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΕΙΔΗ



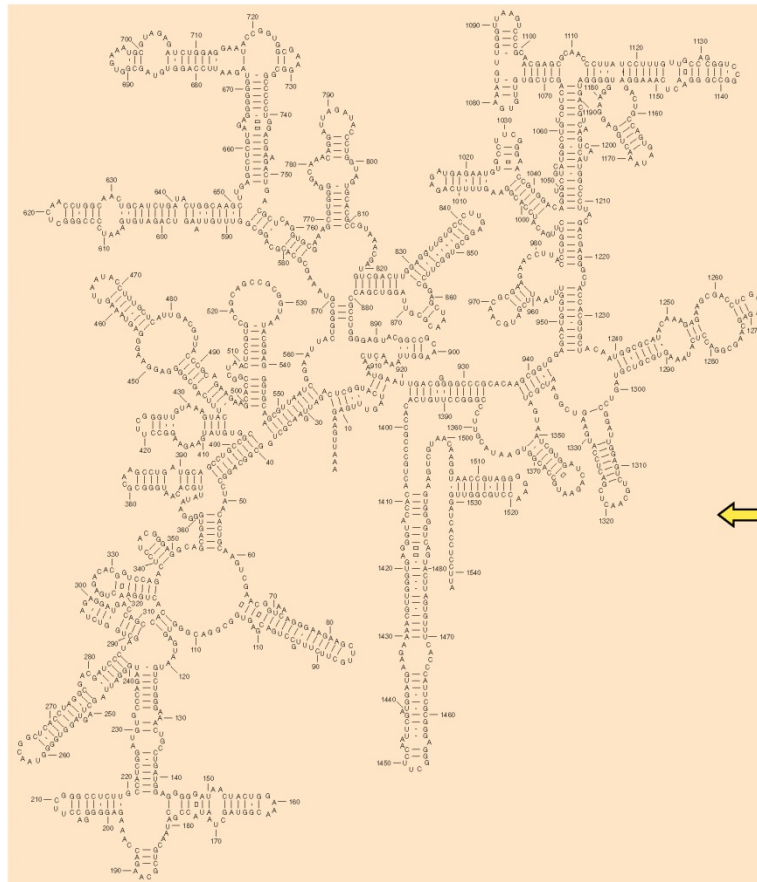
Κατηγορία	Βακτήρια	Αρχαία	Σύνολο
«Χώροι»	1	1	2
Φύλα	23	3	26
Ομοταξίες	32	8	40
Τάξεις	77	12	89
Οικογένειες	182	21	203
Γένη	871	69	941
Είδη	5007	217	5224

Εικόνα 11.8 Ριβοσωματικό RNA (α) Ηλεκτρονικό μικρογράφημα ριβοσωμάτων 70S από *Escherichia coli*. (β) Μέρη ενός ριβοσώματος τα 5S, 16S, και 23S αναφέρονται στους διάφορους τύπους RNA της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος. (γ) Πρωτοταγής και δευτεροταγής δομή του ριβοσωματικού RNA (rRNA) 16S. Πρόκειται για το rRNA 16S της *Escherichia coli* (Βακτήρια): rRNA 16S από Αρχαία έχει γενικές ομοιότητες στη δευτεροταγή δομή (αναδιπλώση), αλλά εμφανίζει πολλές διαφορές στην πρωτοταγή δομή (αλληλουχία των νουκλεοτιδίων). Αντίστοιχο του rRNA 16S στους ευκαρυώτες είναι το rRNA 18S που υπάρχει στα κυτταροπλάσματικά ριβοσώματα. Με τη χρήση εκκινητών ειδικών για συντηρημένες αλληλουχίες rRNA σε οργανισμούς από τον ένα ή τον άλλο «χώρο» (βλ. Πίνακα 11.1), είναι δυνατόν με τη βοήθεια της τεχνικής PCR να ενισχυθούν RNA των μικρών υπομονάδων από κύτταρα δεδομένου «χώρου» αναμεμιγμένα με κύτταρα από άλλους «χώρους» (βλ. Εικόνα 11.9). Αυτό επέτρεψε να εκτιμηθεί άμεσα η ποικιλομορφία συγκεκριμένων «χώρων» της ζωής στο ενδιαίτημα, με «δειγματοληψία κοινοτήτων» (Τμήμα 18.5 και Εικόνα 18.4). Επιπλέον, η πρόσδεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων σε φθορίζουσες χρωστικές προσέφερε ένα νέο εργαλείο στη μικροβιακή οικολογία (βλ. Εικόνες 11.11, 11.12, και 11.14).

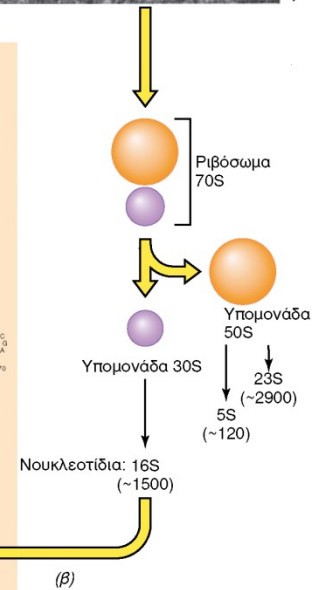


James Lake

(α)

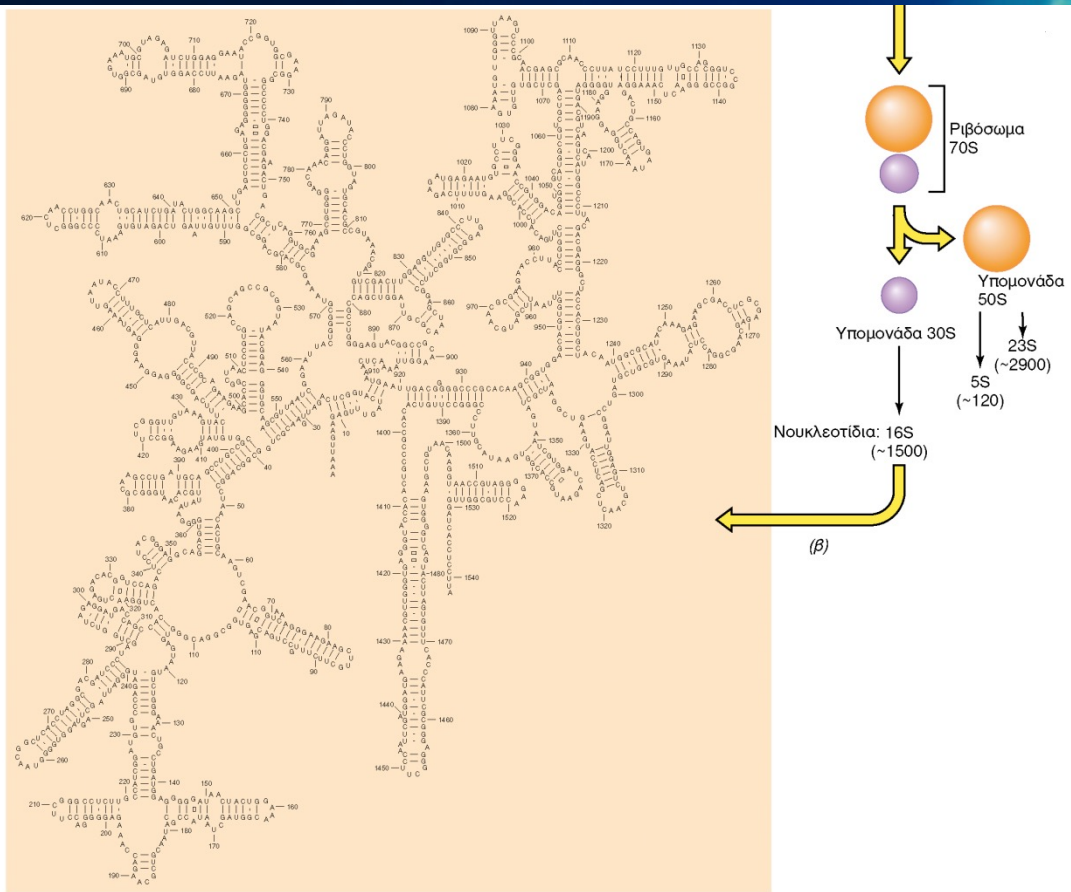


(γ)



(β)

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΜΙΚΡΟ-ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



Η εξελικτική απόσταση μεταξύ 2 οργανισμών μπορεί να υπολογισθεί από τις διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων σε ομόλογα τμήματα DNA.

Ο αριθμός των διαφορών στην αλληλουχία ενός μακρομορίου είναι ανάλογος με τον αριθμό των σταθερών μεταλλάξεων οι οποίες παγιώνονται στο DNA που κωδικεύει το μακρομόριο αυτό στους 2 υπό σύγκριση οργανισμούς.

Επιλέγοντας το σωστό χρονόμετρο

Να βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς

Λειτουργική σταθερότητα (Functional constancy)

Πολυπλοκότητα (Complexity)

Μέγεθος

Συντηρημένες και μη-συντηρημένες περιοχές

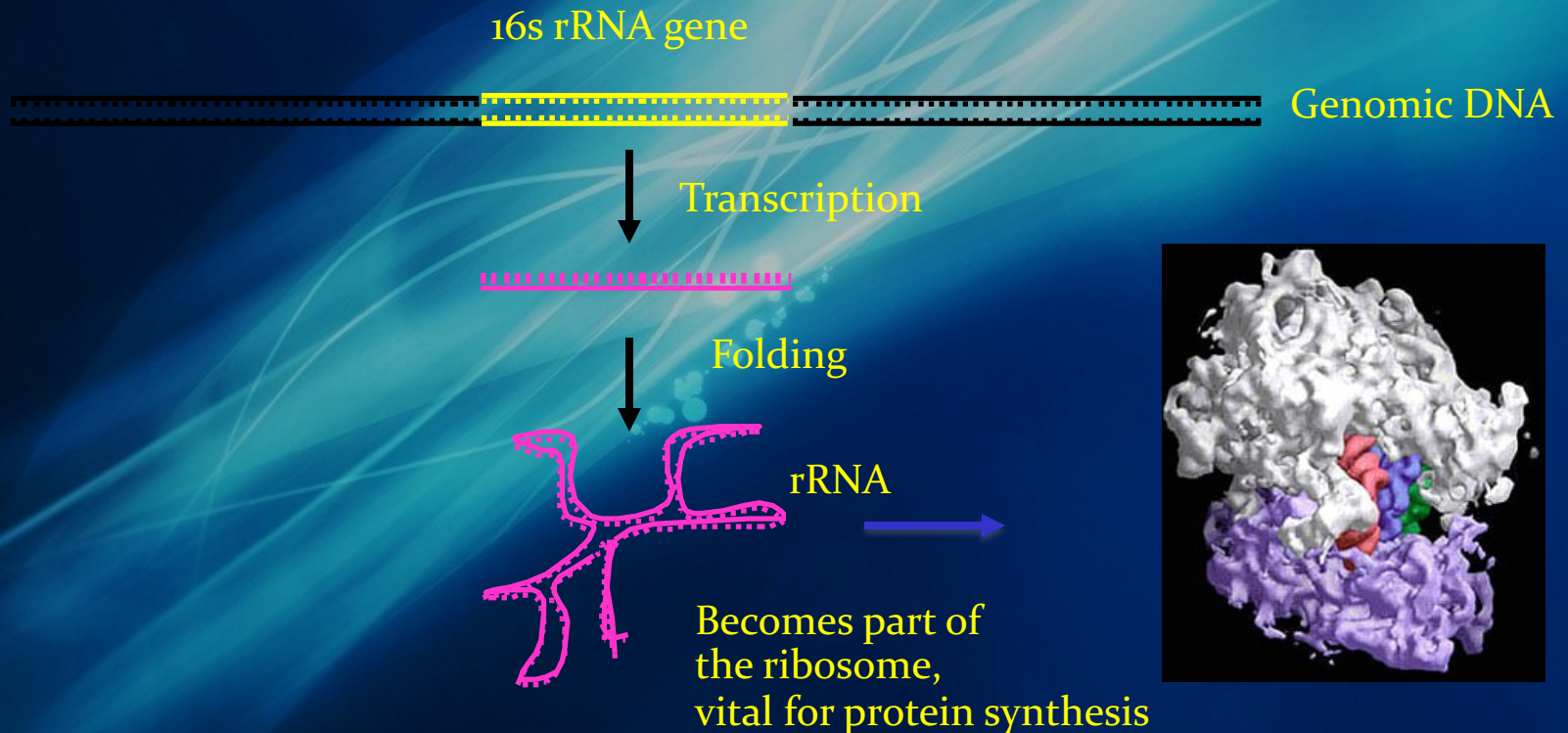
Βάσεις δεδομένων (Comprehensive database)

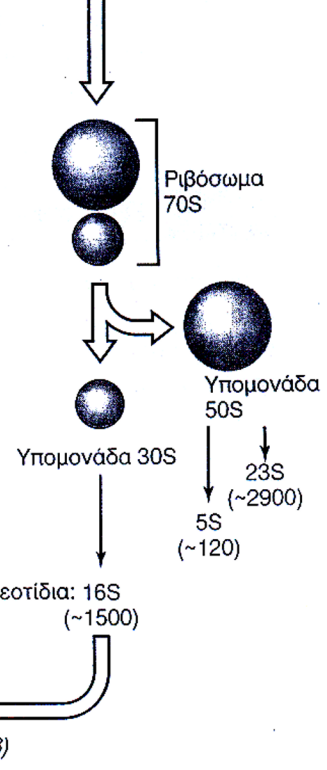
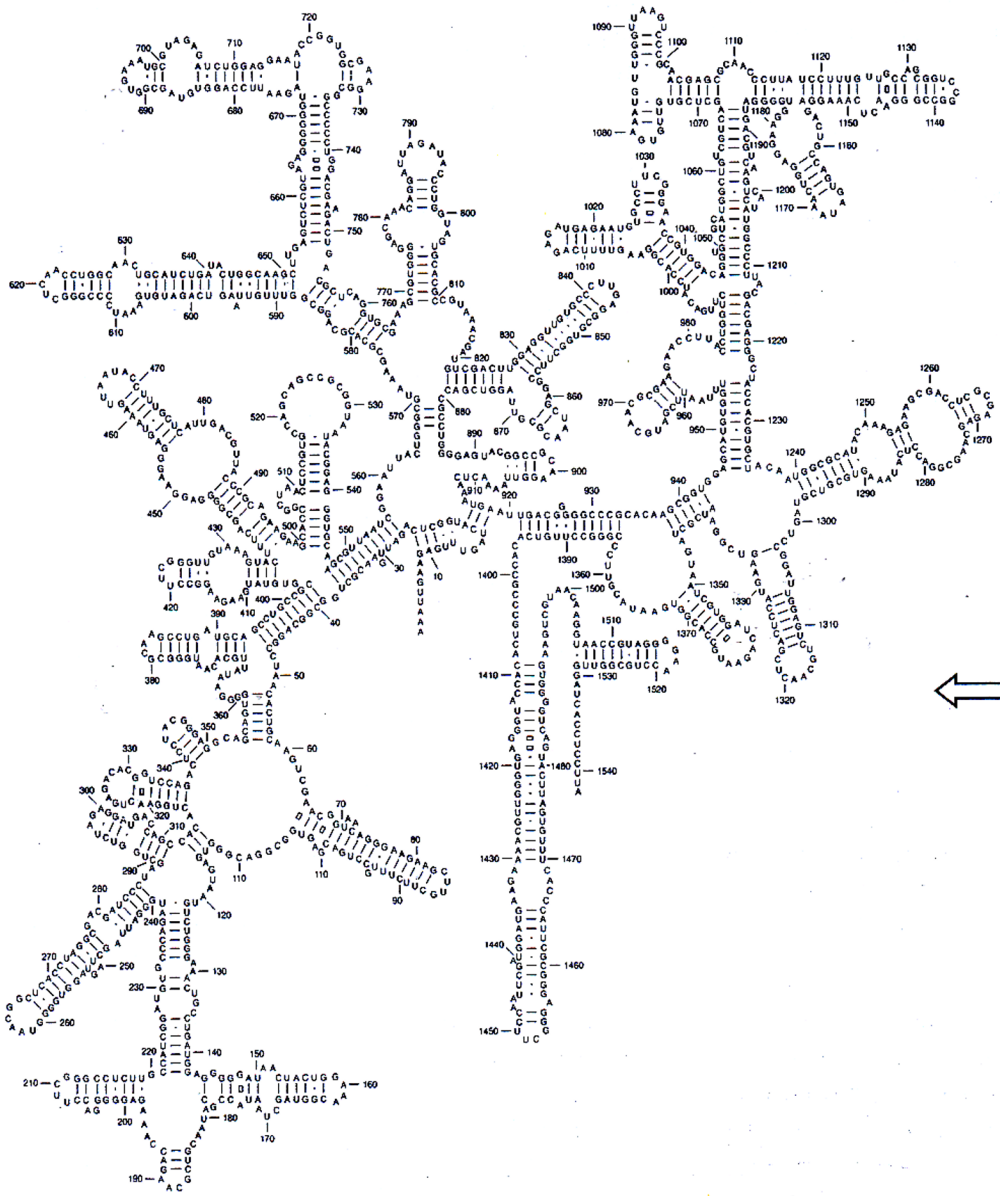
Some examples:

16S rRNA, 23S rRNA, ATP synthase, RNA polymerase....

Ριβοσωμικό RNA ως φυλογενετικός δείκτης

→ Small subunit (SSU) or 16S ribosomal RNA gene





(β)

S: Svedberg unit, μετράει το ποσοστό καθίζησης κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης (δεν μετράει μέγεθος)

Secondary structure of ribosomal RNA: constrained mutation across 2-3 billion years



Escherichia
(Bacteria)

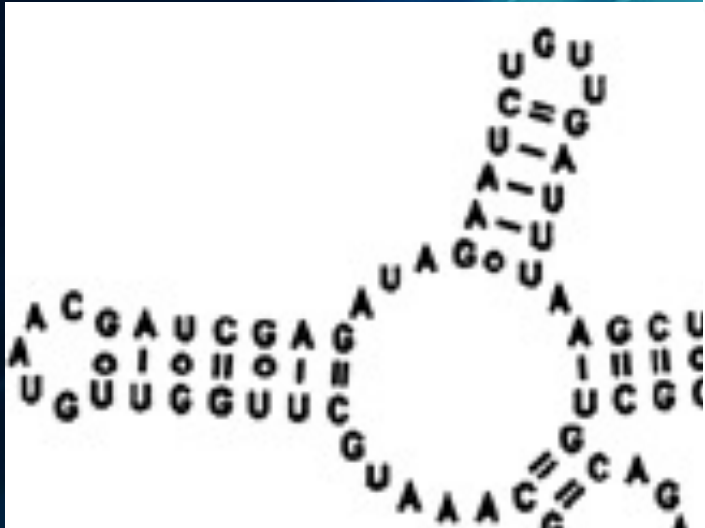
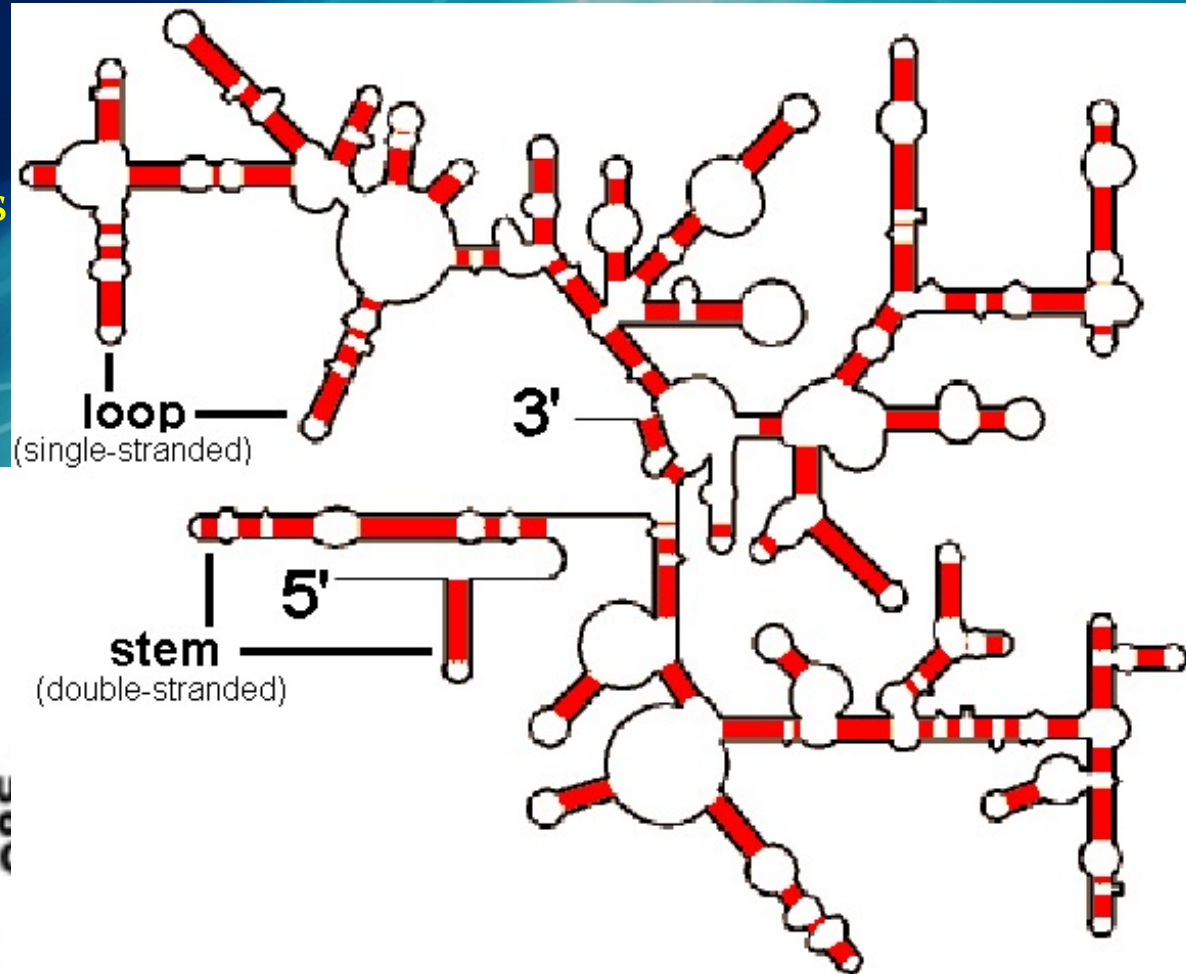
Methanococcus
(Archaea)

Saccharomyces
(Eukarya)

Secondary structure of ribosomal RNA

||

- Complex pattern of short double-stranded stems, unpaired single-stranded loops and bubbles



Secondary structure of ribosomal RNA

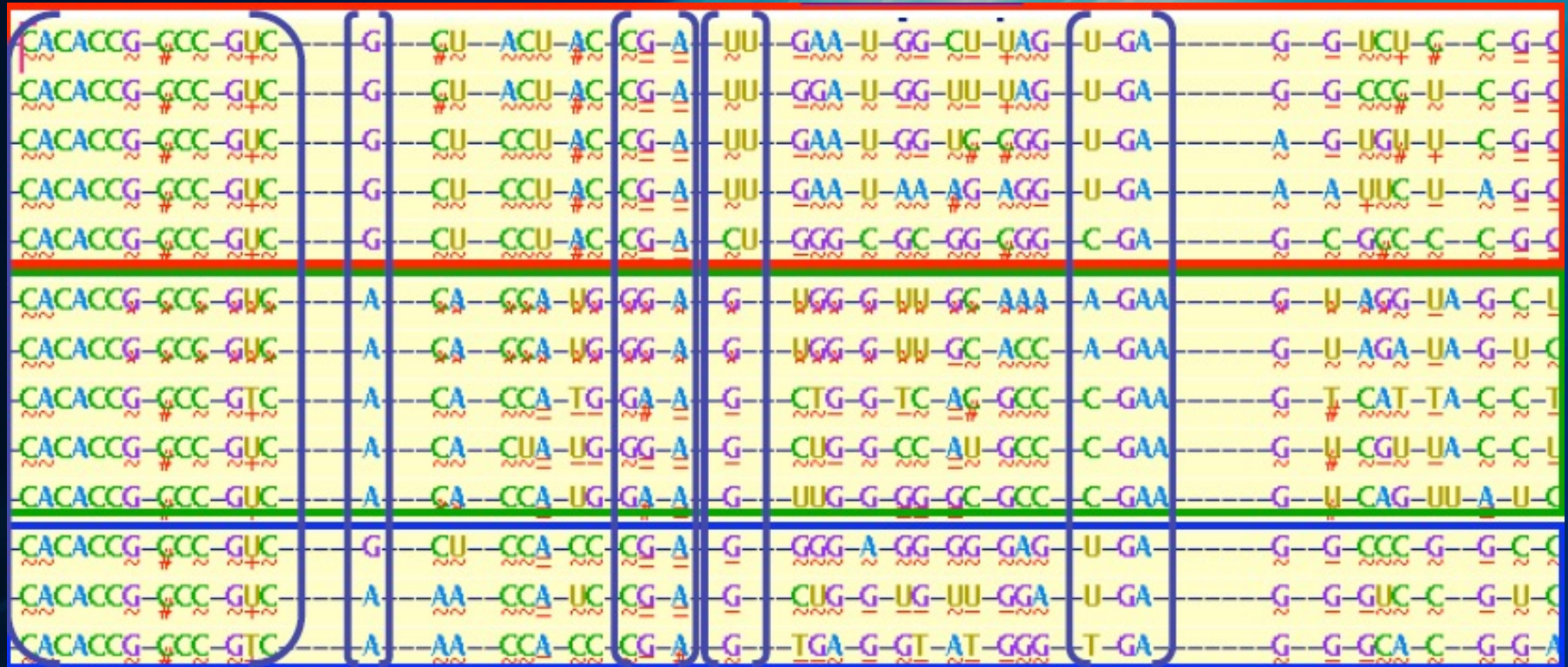
III

Eucarya

Bacteria

Archea

Conserved



Οργανισμός

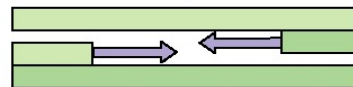


Απομόνωση DNA

Γονίδιο rRNA 16S



Θέρμανση για τον διαχωρισμό των κλώνων· προσθήκη ειδικών εκκινήτων



Επιμήκυνση των εκκινήτων με DNA πολυμεράση



Επανάληψη των προηγούμενων βημάτων για πολλούς κύκλους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ώστε να προκύψουν πολλά αντίγραφα του γονιδίου του rRNA 16S



Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επαληθεύεται το ορθό μέγεθος του προϊόντος της PCR



Καθαρισμός του προϊόντος της PCR



Καθορισμός της αλληλουχίας με τη μέθοδο Sanger

Οργανισμός

Αλληλουχία

Ανάλυση

A	CGUAGA CCUG A C	Για $A \rightarrow B$, υπάρχουν 3 διαφορές σε ένα σύνολο 12 νουκλεοτιδίων άρα $\frac{3}{12} = 0,25$
B	CCUAGA G CUG GC	
C	CCAAGACGUGGC	
D	GCUAGAUGUGCC	

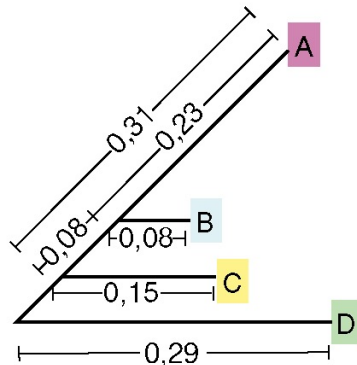
(α) Αντιστοίχιση και ανάλυση αλληλουχίας

Εξελικτική απόσταση

Διορθωμένη εξελικτική απόσταση

E_D	A → B	0,25	0,30
E_D	A → C	0,33	0,44
E_D	A → D	0,42	0,61
E_D	B → C	0,25	0,30
E_D	B → D	0,33	0,44
E_D	C → D	0,33	0,44

(β) Υπολογισμός της εξελικτικής απόστασης



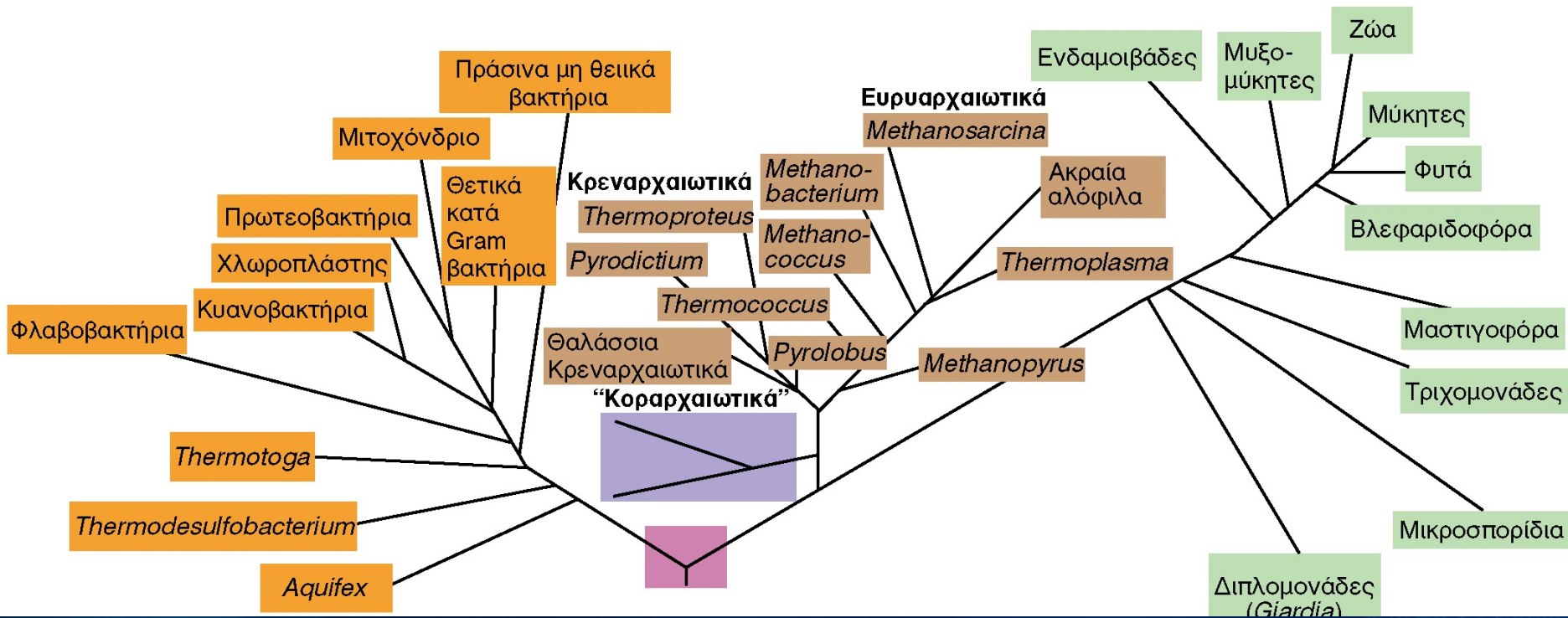
(γ) Φυλογενετικό δέντρο

Οικουμενικό Φυλογενετικό Δέντρο, συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών ριβοσωματικού RNA

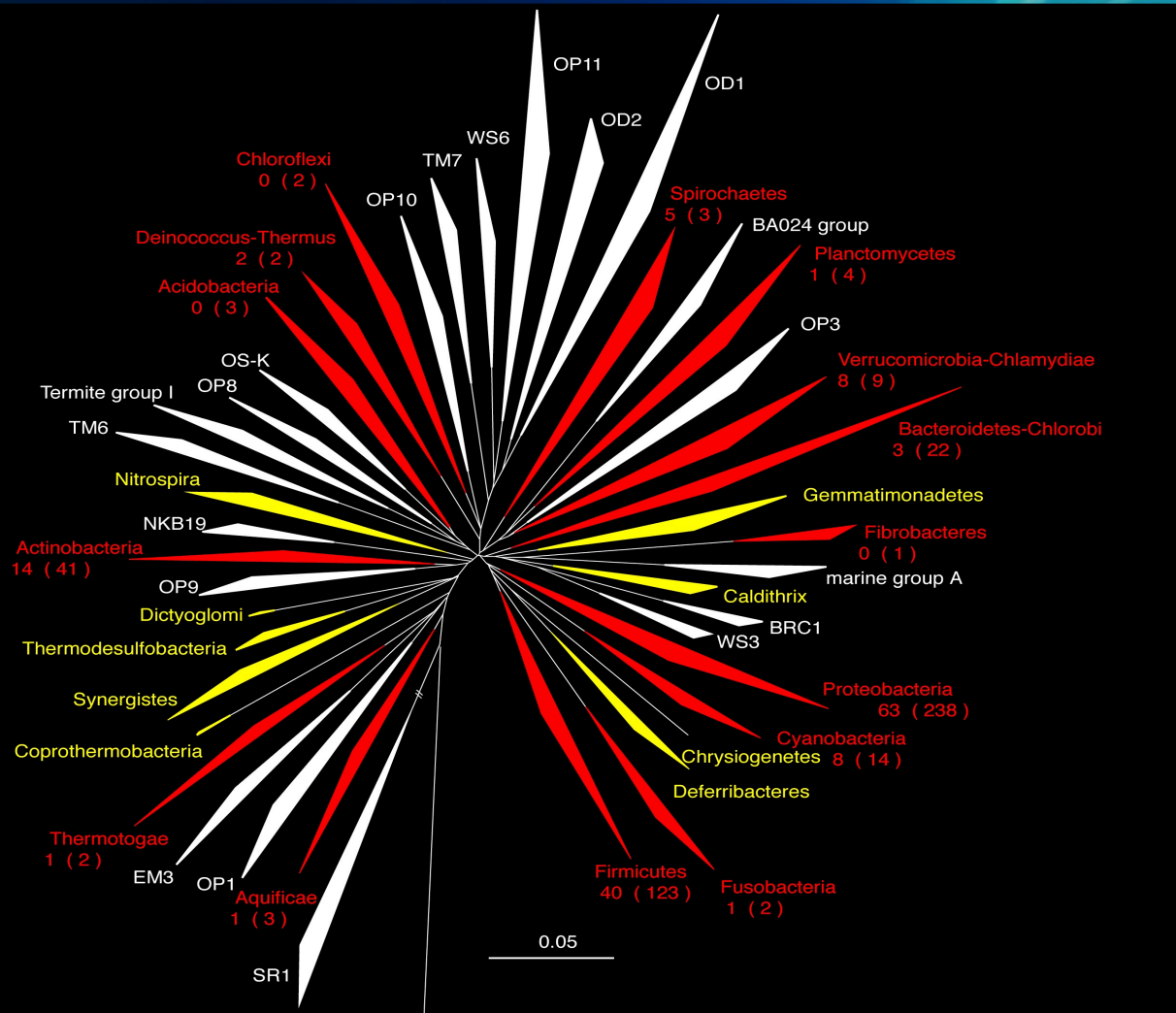
Βακτήρια

Αρχαία

Ευκάρια



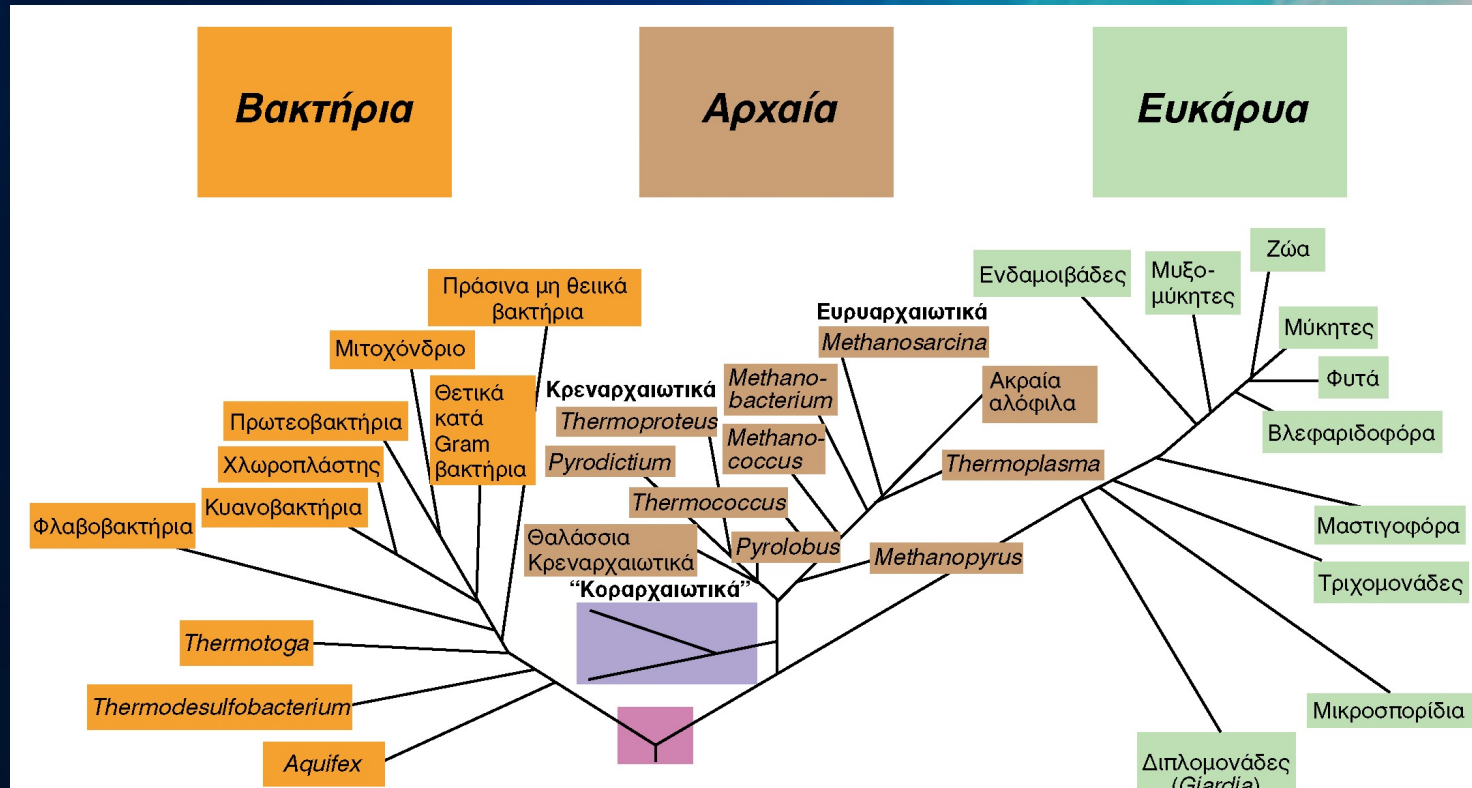
Βακτηριακά Φύλα χωρίς καλλιεργήσιμους οργανισμούς



40 υποδιαιρέσεις (Φύλα)

Πολλά Φύλα
αναγνωρίζονται μόνο
από αλληλουχίες

ΑΡΧΑΙΑ 3 ΥΠΟΔΙΑΙΡΕΣΕΙΣ



Κρεναρχαιωτικά: υπερθερμόφιλα

Ευρυαρχαιωτικά: μεθανιογόνα

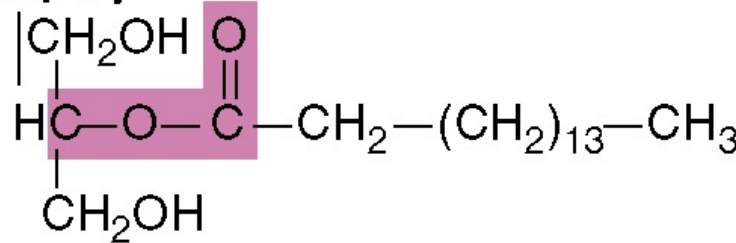
Κοραρχαιωτικά (candidate division): οξεόφιλα θερμοφιλα (Εθνικό Πάρκο Yellowstone)

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΑΡΧΑΙΩΝ: ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΤΟΙΧΩΜΑΤΑ

- Σχεδόν όλα τα βακτήρια έχουν κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν πεπτιδογλυκάνη
 - *Plantomyces* αποτελούνται από πρωτεΐνη
 - *Mycoplasma* – *Chlamydia* στερούνται κυτταρικών τοιχωμάτων
- Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί μόριο υπογραφή για πολλά είδη βακτηρίων (ανίχνευση μουραμικού οξέος)
- Ευκάρυα και αρχαία στερούνται πεπτιδογλυκάνης. Ευκάρυα από κυτταρίνη ή χιτίνη
- Αρχαία υπάρχουν κυτταρικά τοιχώματα που κατασκευάζονται από ψευδοπεπτιδογλυκάνη, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνη και γλυκοπρωτεΐνη.

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΑΡΧΑΙΩΝ: ΛΙΠΙΔΙΑ

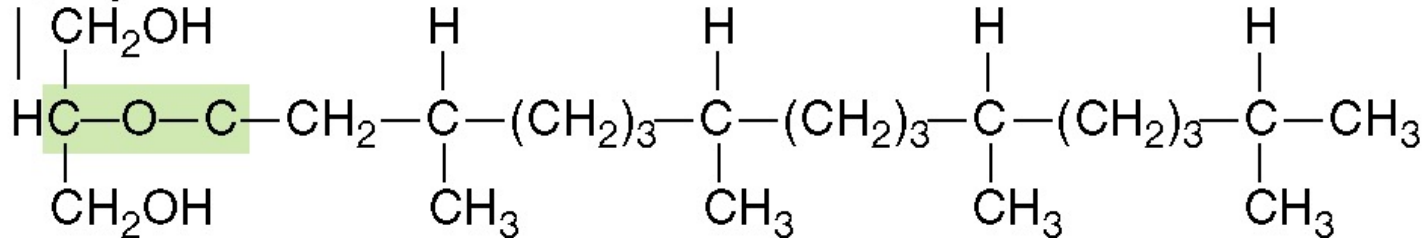
Εστέρας



Βακτήρια, Ευκάρυα

Μεμβρανικά λιπίδια με σκελετό που αποτελείται από λιπαρά οξέα προσδεμένα με εστερικό δεσμό σε μόριο γλυκερόλης. Ο εστερικός δεσμός χαρακτηριστικό.

Αιθέρας



Αρχαία

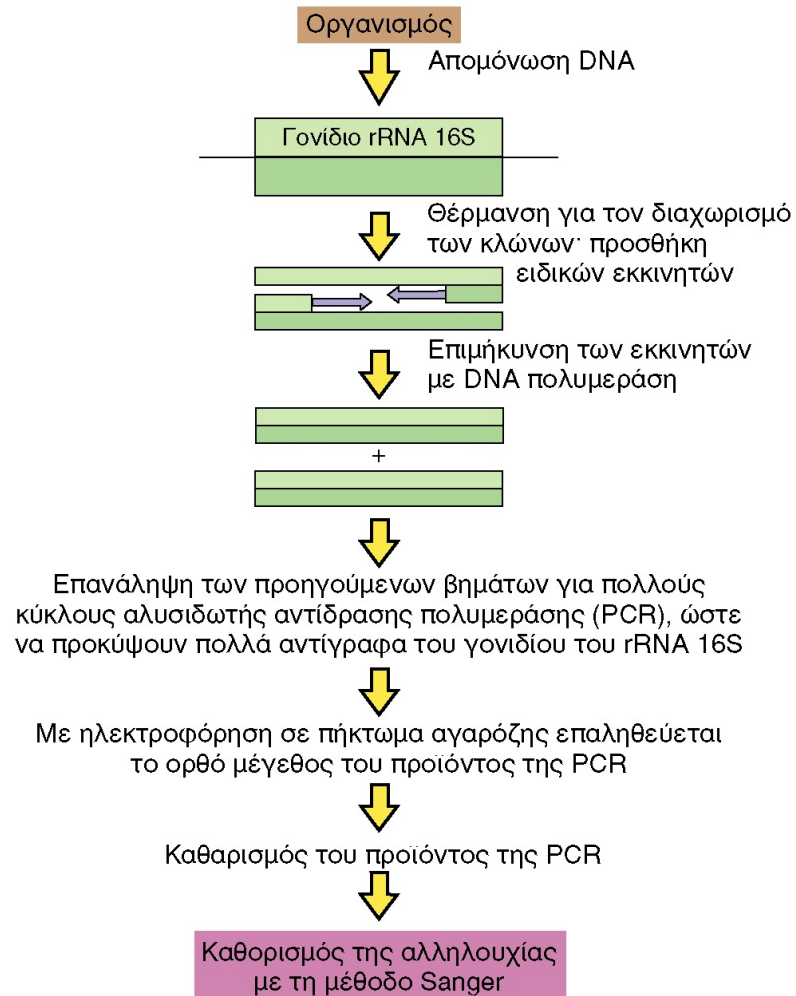
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΑΡΧΑΙΩΝ: RNA πολυμεράση

Βακτήρια: πολυμεράση απλή μορφή, 4 πολυπεπίδια α , β , β' , και σ

Αρχαία: πολυμεράση πολύπλοκη (παρόμοια με αυτή των Ευκάρυων) 8 πολυπεπίδια (ευκάρυα 10-12)

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
Μορφολογία	Σχήμα, μέγεθος, αντίδραση κατά Gram
Αυτοκινησία	Μαστίγια, αεροκυστίδια, απουσία κίνησης
Θρέψη και φυσιολογία	Μηχανισμός διατήρησης ενέργειας (φωτότροφα, χημειοργανότροφα κτλ), οξυγόνο, θερμοκρασία, pH (ανοχές)
Άλλοι παράγοντες	Χρωστικές, κυτταρικά έγκλειστα ευαίσθησία στα αντιβιοτικά



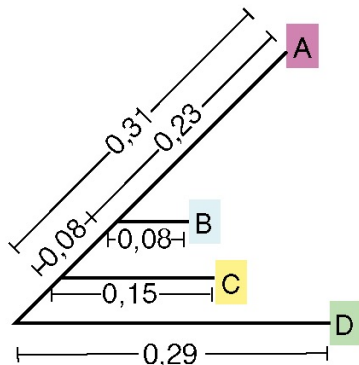
Εικόνα 11.9 Προσδιορισμός αλληλουχίας ριβοσωματικού RNA από αμιγρή καλλιέργεια μικροοργανισμών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το γονίδιο του rRNA 16S ενισχύεται και στη συνέχεια αναλύεται με τη μέθοδο Sanger (Τμήμα 10.13). Οι εκκινητές που προστίθενται είναι συμπληρωματικοί προς τις διατηρημένες αλληλουχίες σε μια από τις περιοχές του rRNA 16S (βλ. Εικόνα 11.8γ). Επίσης, είναι δυνατόν στη διαδικασία αυτή να χρησιμοποιηθεί ένα ακόμα στάδιο, για την κλωνοποίηση του DNA που κωδικεύει το rRNA 16S, μετά την ενίσχυση μέσω PCR.

Οργανισμός	Αλληλουχία	Ανάλυση
A	CGUAGACUCUGAIC	Για $A \rightarrow B$, υπάρχουν 3 διαφορές σε ένα σύνολο 12 νουκλεοτιδίων άρα $\frac{3}{12} = 0,25$
B	CCUAGAGCUCUGGC	
C	CCAAGACGUGGC	
D	GCUAGAUGUGCC	

(α) Αντιστοίχιση και ανάλυση αλληλουχίας

Εξελικτική απόσταση	Διορθωμένη εξελικτική απόσταση
E_D A \rightarrow B	0,25, 0,30
E_D A \rightarrow C	0,33, 0,44
E_D A \rightarrow D	0,42, 0,61
E_D B \rightarrow C	0,25, 0,30
E_D B \rightarrow D	0,33, 0,44
E_D C \rightarrow D	0,33, 0,44

(β) Υπολογισμός της εξελικτικής απόστασης

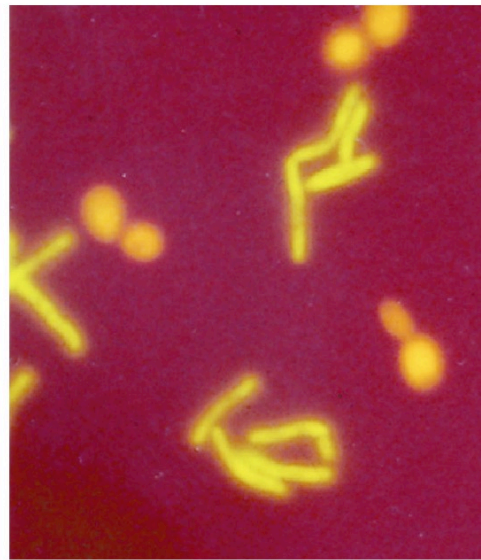


(γ) Φυλογενετικό δέντρο

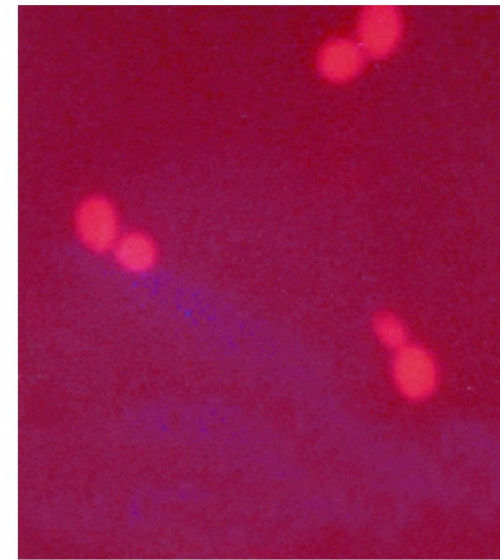
Εικόνα 11.10 Κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου απόστασης από τις αλληλουχίες του ριβοσωματικού RNA 16S. Για τις ανάγκες της αναπαράστασης, απεικονίζονται μόνο μικρές αλληλουχίες. Η εξελικτική απόσταση (E_D) στο (β) υπολογίζεται ως το ποσοστό των μη πανομοιότυπων αλληλουχιών μεταξύ των RNA δύο οιονδήποτε οργανισμών. Η διορθωμένη E_D προκύπτει από μια στατιστική διόρθωση αναγκαία για τον συνυπολογισμό είτε οπισθόδρομων μεταλλάξεων που επανέφεραν τον αρχικό γονότυπο είτε επιπλέον πρόσθιων μεταλλάξεων που ενδέχεται να συνέβησαν στο ίδιο σημείο. Το δέντρο (γ) δημιουργείται εντέλει μέσω ανάλυσης των δεδομένων με ηλεκτρονικό υπολογιστή, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη συμφωνία. Το ολικό μήκος των κλάδων που χωρίζουν δύο οιοσδήποτε οργανισμούς είναι ανάλογο προς την υπολογισθείσα μεταξύ τους εξελικτική απόσταση. Στις πραγματικές αναλύσεις χρησιμοποιείται κατά κανόνα μια στατιστική διεργασία που ονομάζεται *boot-strapping*, με την οποία δημιουργούνται εκατοντάδες εκδοχές του δέντρου, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τελικό δέντρο παρουσιάζει πράγματι τη βέλτιστη συμφωνία για το σύνολο των δεδομένων. Επίσης, η ένθεση αρκετών νουκλεοτιδίων ίσως χωρίζει περιοχές ομόλογων αλληλουχιών στο rRNA δύο οργανισμών· στην πράξη, αυτές οι παρεμβολές «κρύβονται» (δεν συνυπολογίζονται) στις αναλύσεις.



(α)



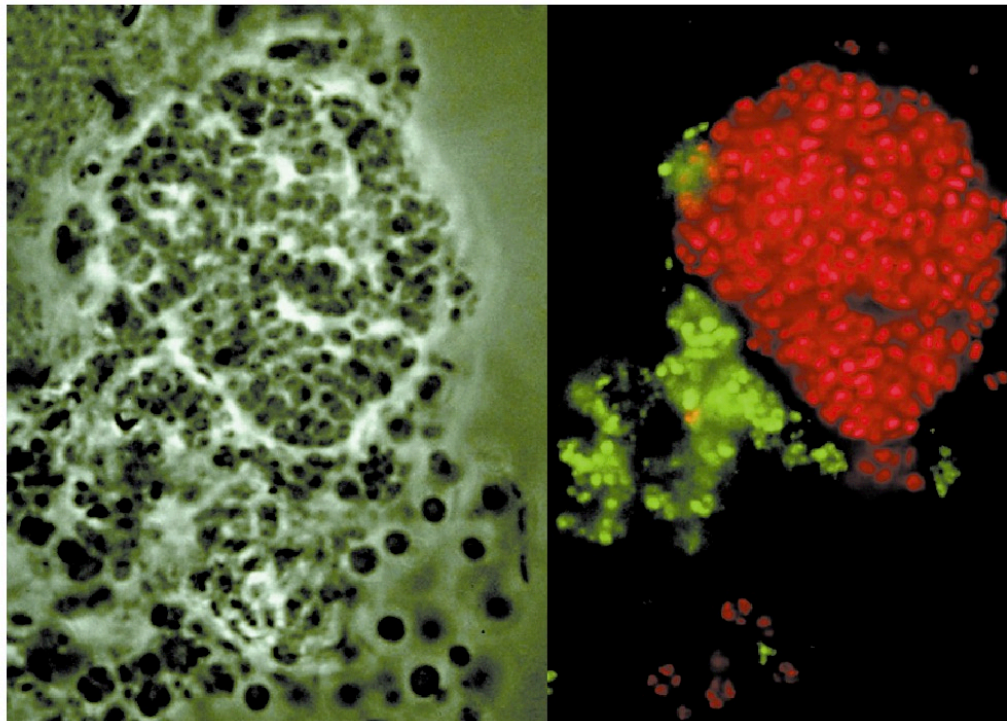
(β)



(γ)

Norman Pace

Εικόνα 11.11 Ανιχνευτές ριβοσωματικού RNA σημασμένοι με φθορίζουσες ουσίες. (α) Μικροφωτογραφία αντίθεσης φάσεων (απουσία ανιχνευτών) κυττάρων του *Bacillus megaterium* (μέλους των Βακτηρίων) και του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Ευκάρυο) (β) Το ίδιο πεδίο· τα κύτταρα έχουν χρωσθεί με έναν κιτρινοπράσινο καθολικό ανιχνευτή rRNA (αυτός ο ανιχνευτής αντιδρά με είδη από κάθε «χώρο»). (γ) Το ίδιο πεδίο· τα κύτταρα έχουν χρωσθεί με έναν ανιχνευτή Ευκαρύων (αντιδρούν μόνο τα κύτταρα του *S. cerevisiae*). Τα κύτταρα του *B. megaterium* έχουν διάμετρο περίπου 1,5 μm, τα κύτταρα του *S. cerevisiae* έχουν διάμετρο περίπου 6 μm.



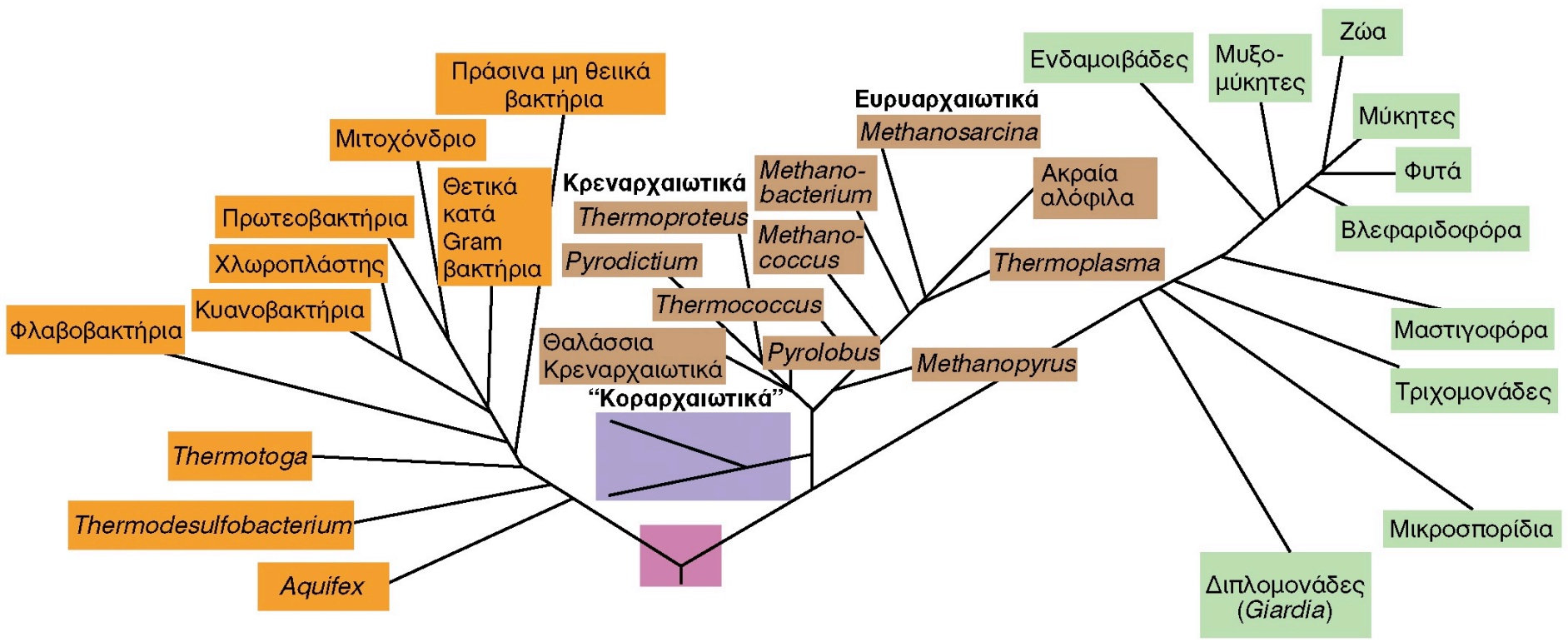
David A. Stahl

Εικόνα 11.12 Χρήση φυλογενετικών χρωστικών για να γίνουν ορατά νιτροποιητικά βακτήρια σε έναν κόκκο ενεργοποιημένης ιλύος αποβλήτων. (Αριστερά) Μικροφωτογραφία αντίθεσης φάσεων. (Δεξιά) Έγχρωμη μικροφωτογραφία του ίδιου πεδίου μετά την εφαρμογή φυλογενετικών χρωστικών. Ο ανιχνευτής που φθορίζει με κόκκινο χρώμα είναι εξειδικευμένος για μια αλληλουχία-υπογραφή (βλ. Πίνακα 11.1) στο rRNA 16S βακτηρίων που οξειδώνουν αμμωνία, ενώ ο ανιχνευτής που φθορίζει με πράσινο χρώμα είναι εξειδικευμένος για μια αλληλουχία που υπάρχει μόνο στα βακτήρια που οξειδώνουν νιτρώδη άλατα. Και οι δύο τύποι βακτηρίων είναι από φυλογενετική άποψη στενοί συγγενείς και μέλη των *Βακτηρίων* (🔗 Τμήματα 12.2 και 17.12) και εκτελούν μια σειρά αλληλένδετων χημειολιθοτροφικών αντιδράσεων (🔗 Τμήμα 19.12).

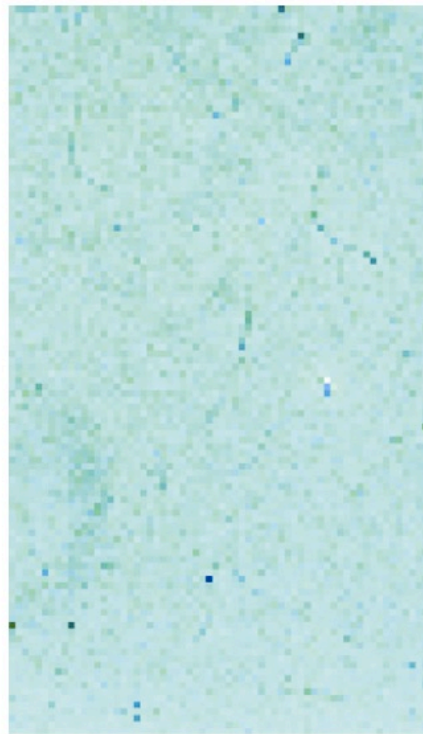
Βακτήρια

Αρχαία

Ευκάρυα

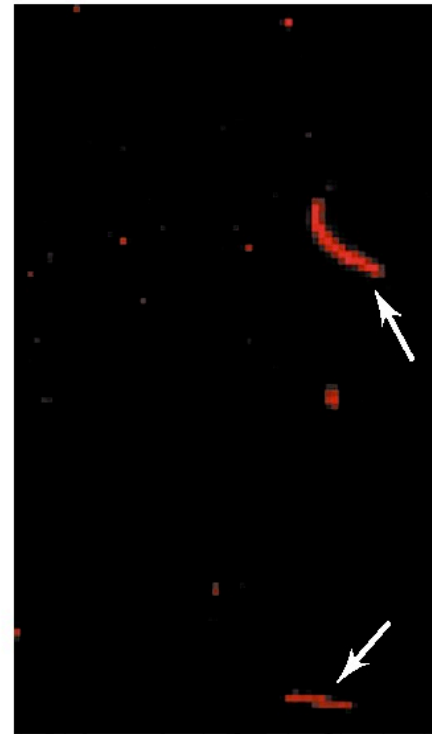


Εικόνα 11.13 Οικουμενικό φυλογενετικό δέντρο, όπως προέκυψε από την συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών ριβοσωματικού RNA. Μόνο λίγοι χαρακτηριστικοί οργανισμοί από κάθε εξελικτική γραμμή απεικονίζονται σε κάθε «χώρο». Για λεπτομερέστερα δέντρα των «χώρων», βλ. Εικόνες 12.1, 13.1, και 14.11. Από τους τρεις «χώρους», οι δύο (Βακτήρια και Αρχαία) περιλαμβάνουν μόνο προκαρυωτικούς αντιπροσώπους. Η θέση που τονίζεται με κόκκινο χρώμα είναι η υποθετική ρίζα του δένδρου, που αντιπροσωπεύει τον καθολικό πρόγονο όλων των κυττάρων.



Nicole Eijs

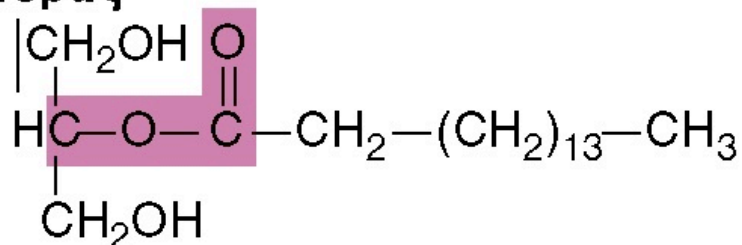
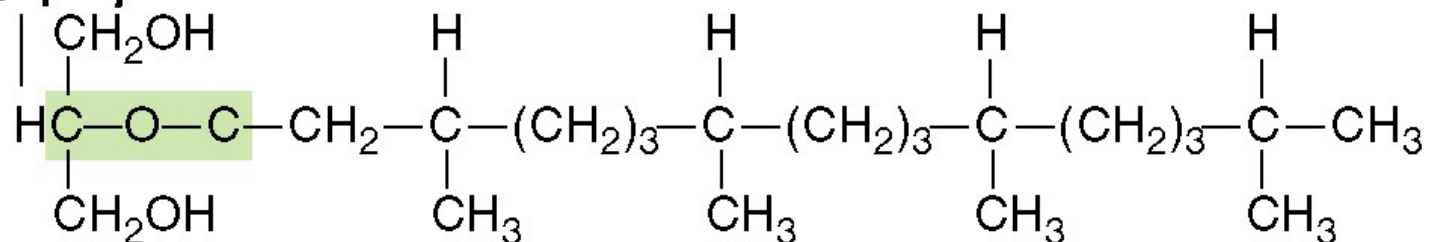
(a)




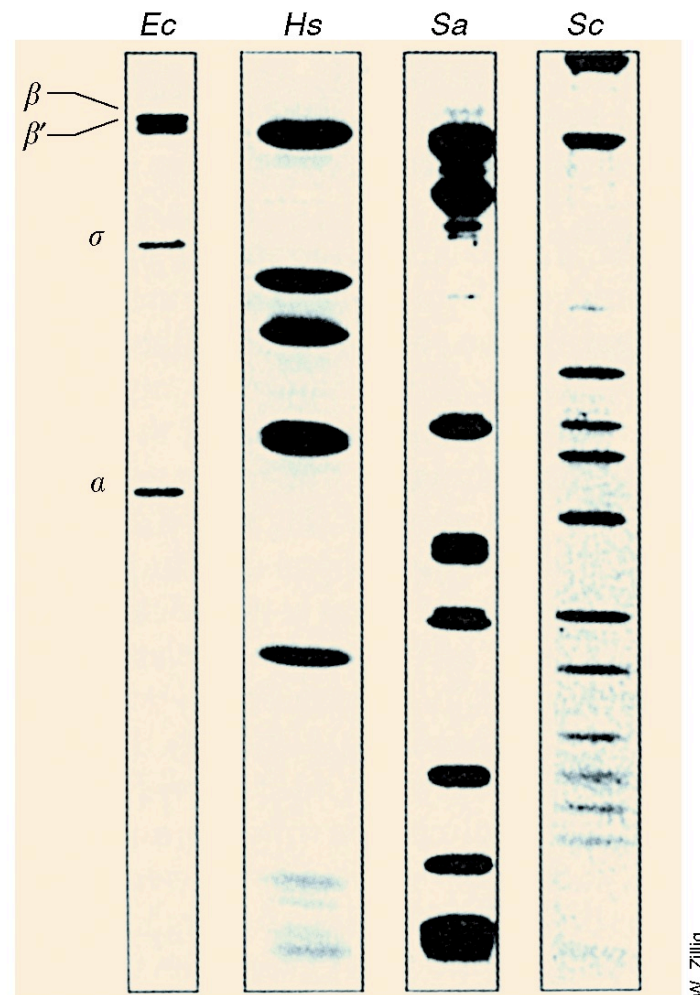
Nicole Eijs

(β)

Εικόνα 11.14 Ταυτοποίηση κυττάρων «Κοραρχαιωτικών» με φυλογενετικές χρώσεις. (α) Μικρογράφημα αντίθεσης φάσεων μιας εμπλουτισμένης καλλιέργειας που περιέχει κύτταρα «Κοραρχαιωτικών». (β) Μικροφωτογραφία φθορισμού του ίδιου πεδίου με το (α), αλλά που έχει υποστεί επεξεργασία με φυλογενετική χρώση σχεδιασμένη με βάση μια αλληλουχία-υπογραφή (βλ. Τμήμα 11.6) από το rRNA 16S των «Κοραρχαιωτικών». Επομένως, τα δύο κύτταρα που έχουν κόκκινο χρώμα στο πεδίο αυτό είναι «Κοραρχαιωτικά».

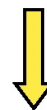
Εστέρας***Βακτήρια, Ευκάρυα*****Αιθέρας*****Αρχαία*****Εικόνα 11.15**

Λιπίδια στα *Βακτήρια*, τα *Ευκάρυα*, και τα *Αρχαία*. Στα *Βακτήρια* και τα *Ευκάρυα*, τα λιπίδια περιέχουν λιπαρά οξέα (εδώ το παλμιτικό οξύ) δεσμευμένα με εστερικούς δεσμούς στη γλυκερόλη. Στα *Αρχαία*, οι πλευρικές αλυσίδες είναι διακλαδισμένοι υδρογονάνθρακες (εδώ το φυτανύλιο, C₂₀) δεσμευμένοι με αιθερικούς δεσμούς στη γλυκερόλη. Το φυτανύλιο συντίθεται από το ισοπρένιο ( Εικόνα 4.19γ).



Εικόνα 11.16 RNA πολυμεράσες από αντιπροσώπους των τριών «χώρων»: *Ec*, *Escherichia coli* (Βακτήρια)· *Hs*, *Halobacterium salinarum* (Ευρυαρχαιωτικά, Αρχαία)· *Sa*, *Sulfolobus acidocaldarius* (Κρεναρχαιωτικά, Αρχαία)· και *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae* (Ευκάρυα). Τα απομονωμένα συστατικά των RNA πολυμερασών έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πύκνωμα πολυακρυλαμίδης. Οι μεγαλύτερες πολυπεπτιδικές υπομονάδες βρίσκονται στην κορυφή και οι μικρότερες στο κάτω μέρος. Μόνο τα μέλη των Βακτηρίων διαθέτουν την απλή RNA πολυμεράση (με τέσσερα πολυπεπτίδια).

Απομόνωση βακτηρίου από
το έντερο θερμόαιμου ζώου



Δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας



Αντίδραση κατά Gram



Αρνητικό κατά Gram



Ραβδόμορφο



Προαιρετικά αναερόβιο



Μεταβολίζει λακτόζη,
παράγοντας οξέα και
αέρια



Εκτέλεση βιοχημικών δοκιμών
(θετικά: ινδόλιο, ερυθρό του μεθυλίου, βλεννικό·
αρνητικά: κιτρικό, δοκιμή Voges-Proskauer, H₂S)

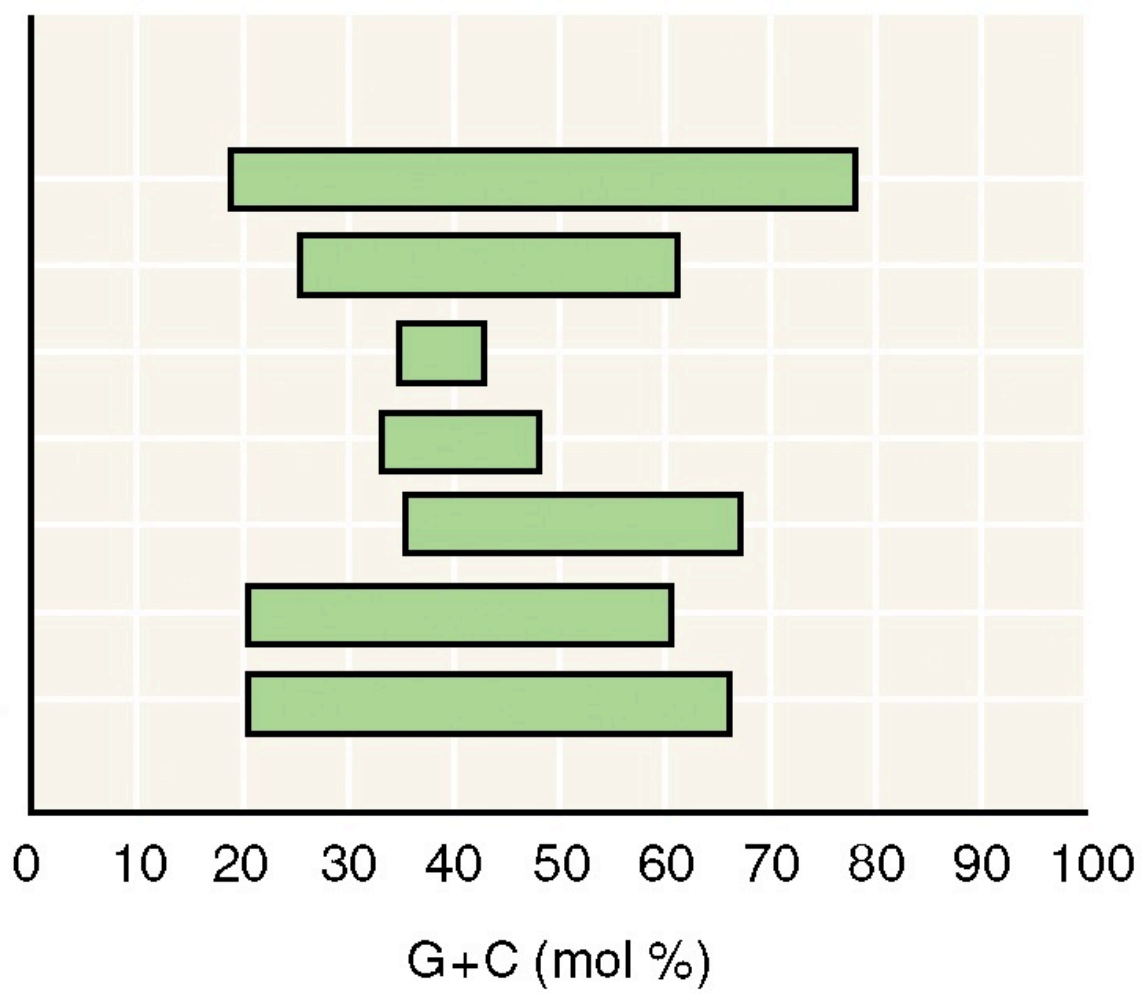


Escherichia coli

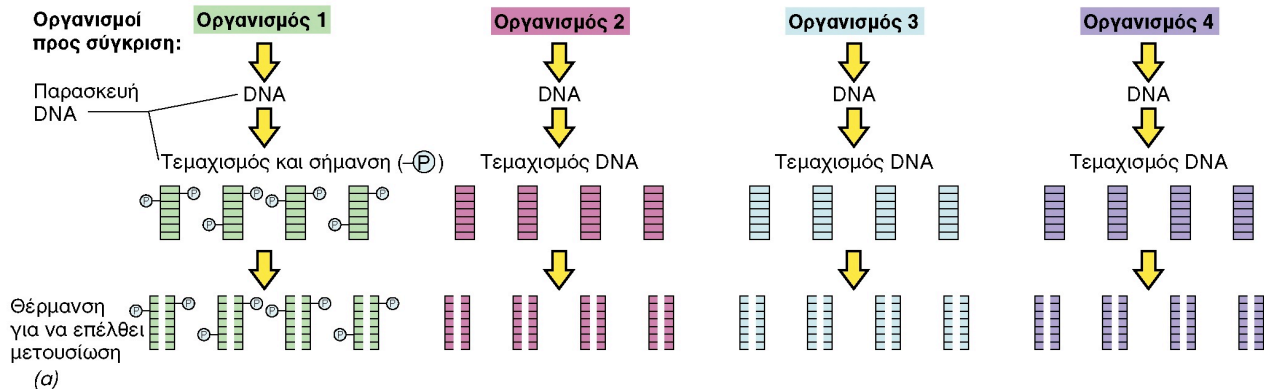
Εικόνα 11.17 Παράδειγμα των μεθόδων που θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν για την ταυτοποίηση ενός πρόσφατα απομονωμένου εντερικού βακτηρίου, με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών προσεγγίσεων (το συγκριμένο παράδειγμα δείχνει τις διεργασίες που θα χρησιμοποιούνταν για την ταυτοποίηση της *Escherichia coli*). Προσέξτε ότι για τις περισσότερες από τις αναλύσεις αυτές απαιτείται οι οργανισμοί να αναπτύσσονται σε αμιγείς καλλιέργειες και ότι χρησιμοποιούνται μόνο φαινοτυπικά κριτήρια. Μια περιγραφή για τις αντίστοιχες βιοχημικές δοκιμές παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 24 (🔗 Τμήμα 24.2, Πίνακας 24.3, και Εικόνα 24.7).

Οργανισμοί

- Προκαρυώτες
Βακτήρια
- Αρχαία*
- Ευκαρυώτες
Ζώα
- Φυτά
- Φύκη
- Μύκητες
- Πρωτόζωα

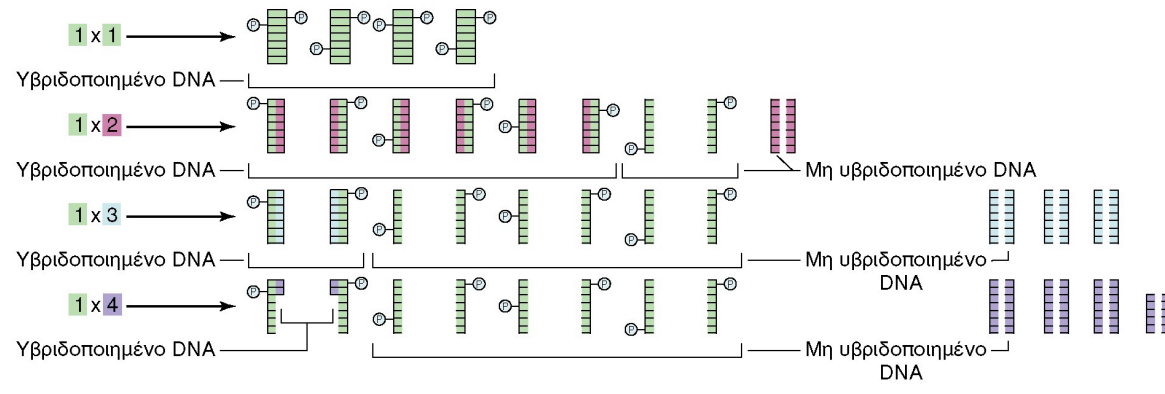


Εικόνα 11.18 Εύρος τιμών περιεκτικότητας σε βάσεις DNA για διάφορους οργανισμούς. Προσέξτε ότι το μεγαλύτερο εύρος παρατηρείται στα *Βακτήρια*.

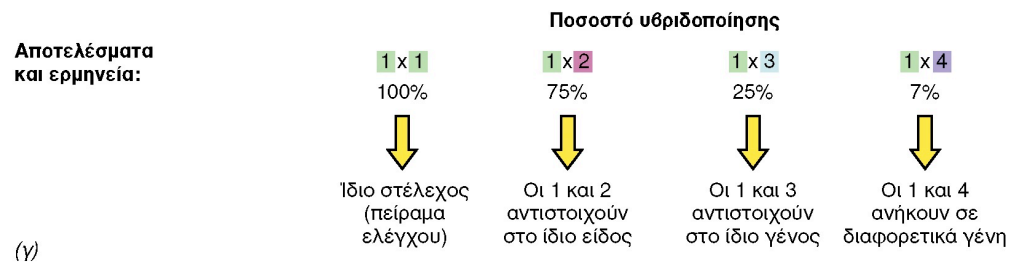


Πείραμα

υβριδοποίησης: Ανάμειξη DNA από δύο οργανισμούς – μη ιχνηθετημένο DNA προστίθεται σε περίσσεια:

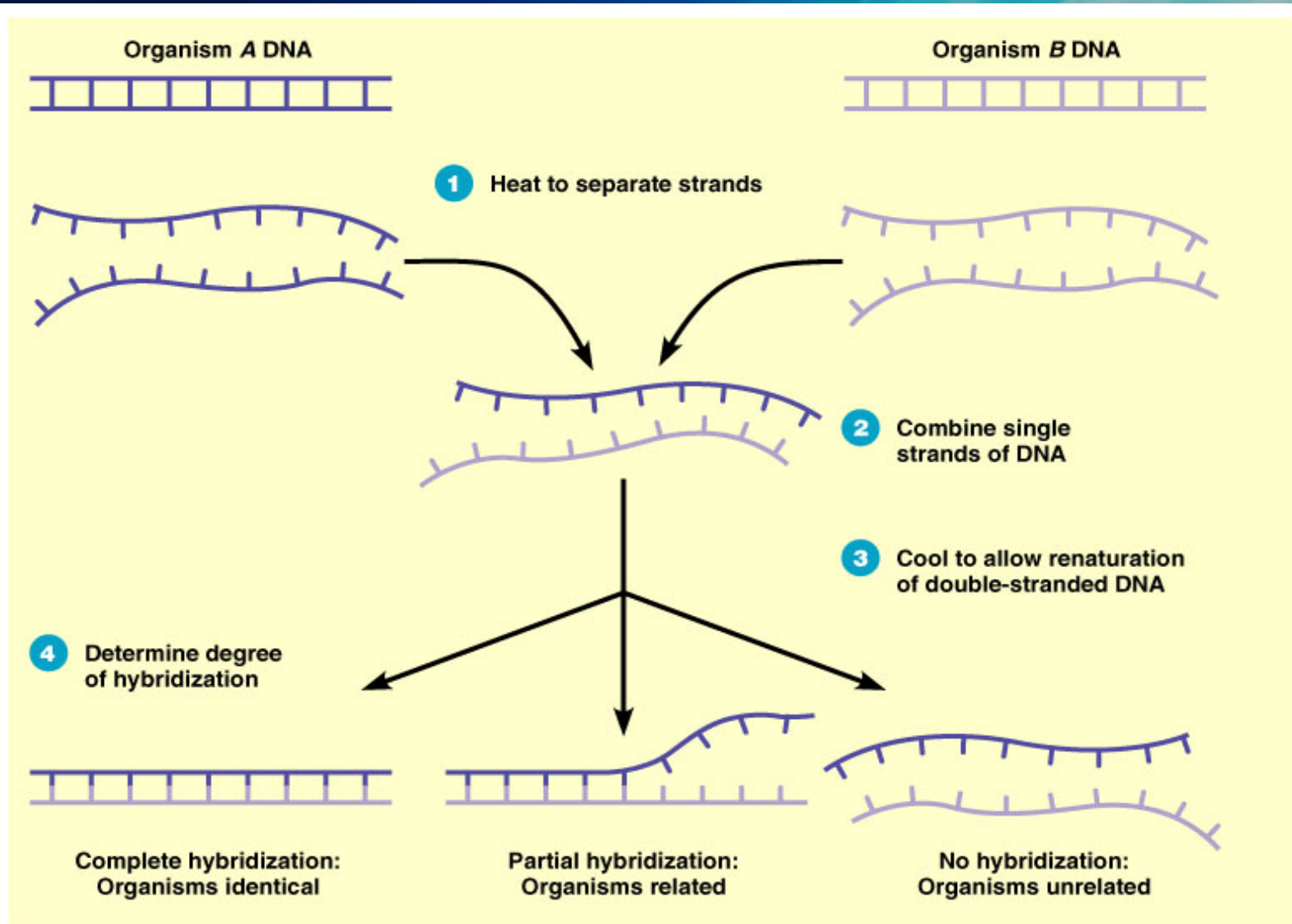


Αποτελέσματα και ερμηνεία:

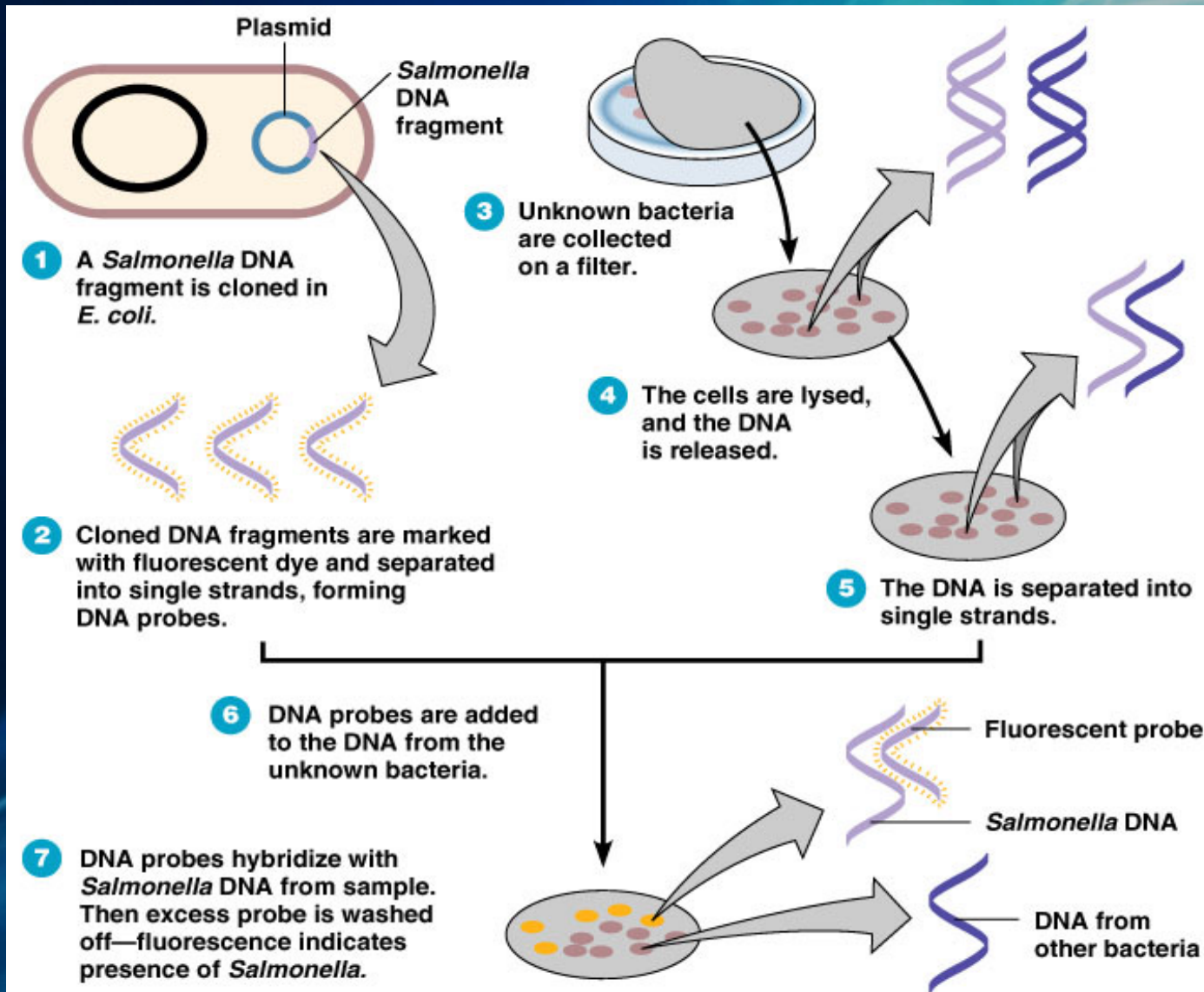


Εικόνα 11.19 Η γονιδιωματική υβριδοποίηση ως ταξινομικό εργαλείο. (α) Το DNA απομονώνεται από τους υπό έλεγχο οργανισμούς. Ένα από τα μόρια DNA ιχνηθετείται (εδώ απεικονίζεται το DNA του οργανισμού 1 σημασμένο με ραδιενεργό φωσφόρο). (β) Ένα πείραμα υβριδοποίησης στην πράξη. Όλοι οι συνδυασμοί δοκιμάζονται και σε κάθε πείραμα προστίθεται περίσσεια μη ιχνηθετημένου DNA, ώστε να αποφευχθεί η επανασύνδεση του ραδιενεργού DNA με τον εαυτό του. Μετά την υβριδοποίηση, το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται από το μη υβριδοποιημένο, και μετράται η ραδιενέργεια μόνο στο υβριδοποιημένο DNA. (γ) Αποτελέσματα. Η ραδιενέργεια στα πειράματα ελέγχου θεωρείται ως το 100 % της τιμής υβριδοποίησης.

Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων



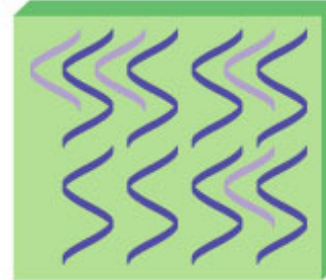
Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων: ανιχνευτές DNA



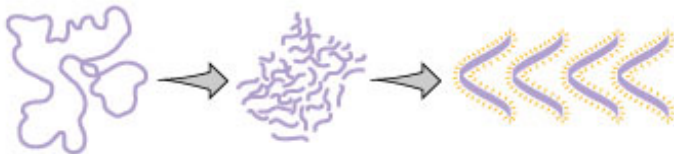
Nucleic Acid Hybridization: DNA chip



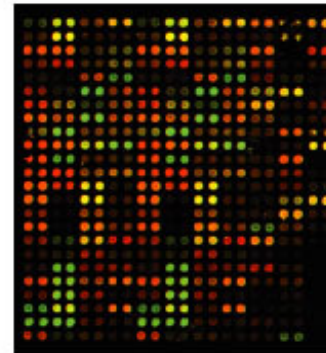
- (a)** A DNA chip can be manufactured to contain hundreds of thousands of synthetic single-stranded DNA sequences. Assume that each DNA sequence was unique to a different bacterial species.



- (c)** The unknown DNA is inserted into the chip and allowed to hybridize with the DNA on the chip.



- (b)** Unknown DNA from a patient is separated into single strands, enzymatically cut, and labeled with a fluorescent dye.



- (d)** The tagged DNA will bind only to the complementary DNA on the chip. The bound DNA will be detected by its fluorescent dye and analyzed by a computer. The red light is a gene expressed in normal cells; green is a mutated gene expressed in tumor cells; and yellow, in both cells.

TABLE 10.5

Taxonomic Criteria and Methods for Classifying and Identifying Bacteria

Criterion or Method	Used for	
	Classification	Identification
Morphological characteristics	No (yes for cyanobacteria)	Yes
Differential staining	Yes (for cell wall type)	Yes
Biochemical testing	No	Yes
Serology	No	Yes
Phage typing	No	Yes
Fatty acid profiles	No	Yes
Flow cytometry	No	Yes
DNA base composition	Yes	No
DNA fingerprinting	No	Yes
rRNA sequencing	Yes	No
PCR	Yes	Yes
Nucleic acid hybridization	Yes	Yes (DNA probes, DNA chips)

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

