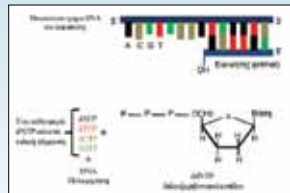


DNA sequencing methods and its application in Endodontology



G.Tzanetakis¹, E.Kontakiotis¹

The recent development of molecular biology techniques has significantly increased the knowledge of the bacterial diversity in endodontic infections. First-generation DNA sequencing methods such as Sanger sequencing have also contributed to the detection of novel microorganisms in the lower taxonomic level (species or strains). Up till now, numerous studies have used broad-range PCR, followed by cloning, and Sanger sequencing to identify the microbiota associated with endodontic infections. The Sanger approach has stood as the gold standard DNA sequencing technique over the last three decades. However, it is supported that there is a high possibility for the endodontic bacterial diversity to remain underestimated or undetectable because most of the molecular methods used so far are expected to reveal only the dominant members of the bacterial community.

Next-generation sequencing technologies have revolutionized the analysis of microbial communities in diverse environments, including the human oral cavity. Massive parallel pyrosequencing is a next-generation sequencing technology that allows for extensive sequencing of microbial communities in a high-throughput and cost-effective manner. The technology provides a large number of reads in a single run, resulting in great sampling depth and allowing detection not only of the dominant community members but also of low-abundance genera. For the above reasons, pyrosequencing is becoming one of the leading sequencing technologies for 16S rRNA-based microbial diversity analyses in Endodontic microbiology.

The present article reviews several aspects of the first and next-generation DNA sequencing technologies, including its principles, applications and the significant contribution of the pyrosequencing approach to the study of the endodontic microbiota.

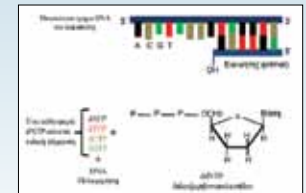
Key words: DNA sequencing, bacterial DNA, bacterial diversity, Endodontology

Odontostomatological Progress 2015, 69 (2): 250-271

1. DDS, MS, Dr.Dent

Department of Endodontics, School of Dentistry, National and Kapodistrian University of Athens, 2 Thivon Str., Goudi, 115 27 Athens

Μέθοδοι προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (sequencing) και η εφαρμογή τους στην Ενδοδοντολογία



Γ. Τζανετάκης¹, Ε. Κοντακιώτης²

Η πρόσφατη ανάπτυξη των μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας και η ευρεία εφαρμογή τους στη Μικροβιολογία των ριζικών σωλήνων έχει συντελέσει σημαντικά στη διεύρυνση της γνώσης σχετικά με τη βακτηριακή ποικιλομορφία των λοιμώξεων ενδοδοντικής αιτιολογίας. Οι μέθοδοι προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA της γενιάς, όπως η ανάλυση κατά Sanger, έχουν συνεισφέρει σημαντικά στον τομέα αυτό και συγκεκριμένα στην ανίχνευση νέων μικροβιακών ειδών ή διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους. Μέχρι σήμερα αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει στη μεθοδολογία τους την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ευρέος φάσματος, όπου μετά από κλωνοποίηση των προϊόντων της και ανάλυση των αλληλουχιών που λαμβάνονται με βάση τη μέθοδο Sanger έχουν εξασφαλίσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μικροβιακή χλωρίδα που αναπτύσσεται σε μολυσμένους ριζικούς σωλήνες. Η ανάλυση κατά Sanger εθεωρείτο ως η τεχνική αναφοράς για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για πάνω από τρεις δεκαετίες. Ωστόσο, όπως υποστηρίζεται, η πιθανότητα υποεκτίμησης της μικροβιακής χλωρίδας που αναπτύσσεται σε μολυσμένους ριζικούς σωλήνες είναι ιδιαίτερα υψηλή, καθώς οι παραπάνω τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση μέσα στην πολφική κοιλότητα. Οι τεχνικές προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA της γενιάς έχουν οδηγήσει στην εμβάθυνση της ανάλυσης των μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένης και της στοματικής κοιλότητας. Ο μαζικά παράλληλος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με βάση το πυροφωσφορικό (pyrosequencing) ανήκει στις παραπάνω τεχνικές, επιτρέποντας τη σε βάθος ανάλυση μικροβιακών πληθυσμών με ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο και με σχετικά χαμηλό κόστος. Η τεχνική εξασφαλίζει τον προσδιορισμό χιλιάδων ή και εκατομμυρίων αλληλουχιών βάσεων σε μία και μόνο μέτρηση, ανιχνεύοντας παράλληλα βακτηριακό DNA που βρίσκεται σε ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση στο δείγμα. Για τους παραπάνω λόγους η τεχνική pyrosequencing εξελίσσεται σταδιακά σε μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους ανάλυσης της μικροβιακής χλωρίδας στην Ενδοδοντολογία. Σκοπός της βιβλιογραφικής αυτής ανασκόπησης είναι να παρουσιάσει τις βασικές αρχές των μεθόδων προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA και να περιγράψει τις κύριες τεχνικές που βρίσκουν μέχρι σήμερα εφαρμογή στην Ενδοδοντολογία με στόχο την περαιτέρω και σε βάθος διερεύνηση της μικροβιακής χλωρίδας μολυσμένων ριζικών σωλήνων.

Λέξεις ευρετηρίου: προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, βακτηριακό DNA, βακτηριακή ποικιλομορφία, Ενδοδοντολογία

Οδοντοστοματολογική Πρόοδος 2015, 69 (2): 250-271

1. Ενδοδοντολόγος
2. Αναπληρωτής Καθηγητής

Κλινική Ενδοδοντίας, Οδοντιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Θηβών 2, Γουδή, 115 27 Αθήνα