

A molekuláris módszerek újabb lehetőségei

Belák Ágnes – Dr. Deák Tibor

ÖSSZEFOGLALÓ

A MÉTE MIKROBIOLÓGIAI SZAKOSZTÁLY 45 ÉVES FENNÁLLÁSÁNAK ALKALMÁBÓL RENDEZETT TUDOMÁNYOS ÜLÉSSZAKON ELHANGZOTT ELŐADÁS CÍME UTAL AZ ÖT ÉVVEL KORÁBBAN, A SZAKOSZTÁLY 40. ÉVES ÉVFORDULÓJÁN ELHANGZOTT ELŐADÁSRA, AMELY A MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK FEJLŐDÉSÉRŐL SZÓLT. AZ AKKORI ELŐADÁS ÁTTEKINTÉST NYÚJTOTT A HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREK MÓDOSÍTÁSÁIRÓL, AZ ÚJ OPTIKAI MÓDSZEREKRŐL, A BIOLUMINESZCENCIÁN, AZ ELEKTROMETRIÁN ALAPULÓ, VALAMINT AZ IMMUNOLÓGIAI ÉS A MOLEKULÁRIS MÓDSZEREKRŐL. AZ ÖT ÉVVEL KÉSŐBBI ELŐADÁS A MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK FEJLŐDÉSÉT MUTATJA BE HÁROM PÉLDÁN: A GRADIENS GÉL ELEKTROFORÉZIS, A VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ ÉS A FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ TERÜLETÉN.

INHALT

AN DER WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG ANLÄSSLICH DER 45. JAHRESTAG DER MIKROBIOLOGISCHEN SEKTION DER UNGARISCHEN WISSENSCHAFTLICHEN GESELL-

SCHAFT FÜR LEBENSMITTELINDUSTRIE PRÄSENTIERTER VORTRAG BESCHÄFTIGT SICH MIT DER NEUESTEN ENTWICKLUNG DER MOLEKULAREN METHODEN DURCH DREI BEISPIELEN: GRADIENTEN-GELELEKTROPHORESE, „REAL-TIME“-POLYMERASE-KETTENREAKTION UND FLUORESZENZ-IN SITU-HYBRIDISATION.

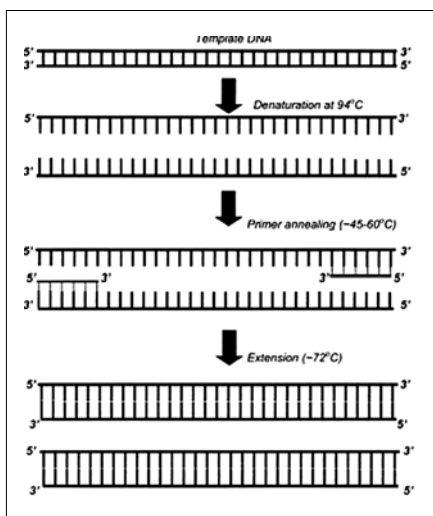
SUMMARY

THE COMMUNICATION PRESENTED AT THE SCIENTIFIC MEETING HELD ON THE 45 YEARS ANNIVERSARY OF THE MICROBIOLOGICAL SECTION OF THE HUNGARIAN SCIENTIFIC SOCIETY FOR FOODS GIVES AN UPDATE OF THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR TESTING METHODS FOR THE ASSESSMENT OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY AND SAFETY OF FOODS. IN PARTICULAR, SPECIAL ATTENTION IS GIVEN TO THE USE OF THE DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE), THE REAL-TIME AND QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR), AND THE POTENTIAL OF THE FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) TECHNIQUES. BASIC MECHANISM, ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF THESE METHODS ARE DISCUSSED.

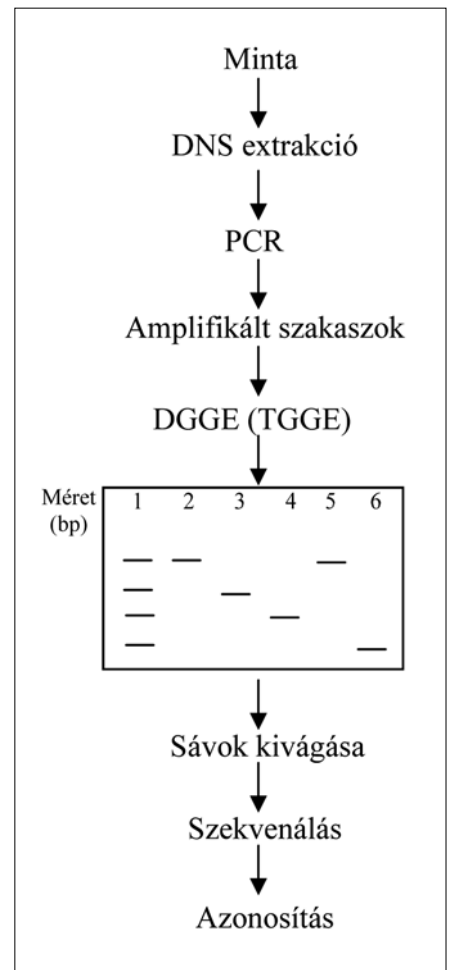
A polimeráz láncreakció (PCR) ma már széles körben elterjedt molekuláris vizsgálati módszer, amelyet mind az alapkutatásban, mind az ipari gyakorlatban alkalmaznak, így az élelmiszeriparban is. Számos előnye mellett a PCR módszernek bizonyos korlátai is vannak. A szokásos PCR technika a célgén vagy DNS-szakasz megsokszorozását (amplifikációját) a megfelelően kiválasztott oligonukleotidok (primerek) segítségével végzi, a DNS replikációt in vitro utánzó 30–40 ismétlődő reakciósorozatban, aminek eredményét általában a végtermék elektroforézisével mutatják ki (1. ábra). A folyamat során azonban szennyeződés, nem specifikus amplifikáció hamis pozitív eredményre vezet, másrészt a reakciót gátló anyagok előfordulása (ilyenek élelmiszer-mintában gyakran lehetnek), vagy a primerek önmaguk-

kal történt összekapcsolódása hamis negatív eredményt ad. Élelmiszer-mikrobiológiai szempontból különösen jelentős probléma, hogy a PCR reakció nem tesz különbséget aszerint, hogy a DNS élő vagy élettelen sejtből származott-e. Az élelmiszerben gyakran csak kis számban előforduló kórokozók kimutatása elődúsítást, tenyésztést, izolálást igényel, a DNS kivonása, tisztítása ugyancsak szükséges, ami az eljárást lassítja. A következőkben bemutatott három molekuláris módszer ezeket a problémákat segíti, részben vagy teljesen, kiküszöbölni.

A gradiens-gél elektroforézis az amplifikált DNS közvetlen kimutatását teszi lehetővé a célzott mikroorganizmus előzetes tenyésztése, izolálása nélkül. A módszer a vizsgálati mintából közvetlenül kivont, majd PCR-rel amplifikált DNS szekvenciák elválasztását végzi denaturáló gradiens gélben. Az elektroforézis kétféle, kémiai denaturáló és hőmérséklet gradiens mentén, poliakrilamid gélben megy végbe. A módszer lényege, hogy a gradiens mentén a kétszálú DNS-molekulák részlegesen denaturálódnak és mobilitásuk a gélben a szekvenciájuknak megfelelően különbözik (2. ábra). A módszer akár 1–2 bázisban eltérő molekulák szétválasztását is lehetővé teszi. Különösen alkalmas mikrobapopulációk összetételének elemzésére, mivel egyidejűleg nagyszámú minta vizsgálható. Lehetővé teszi továbbá azonos fajhoz tartozó, hasonló törzsek elkülönítését (tipizálását). A gélből kivágott sávok további vizsgálatával (pl. szekvenálással) pontos faji azonosítás végezhető. A módszert elsőként ökológiai vizsgálatokban, természeti minták mikrobaközösségei összetételének és változásának vizsgálá-

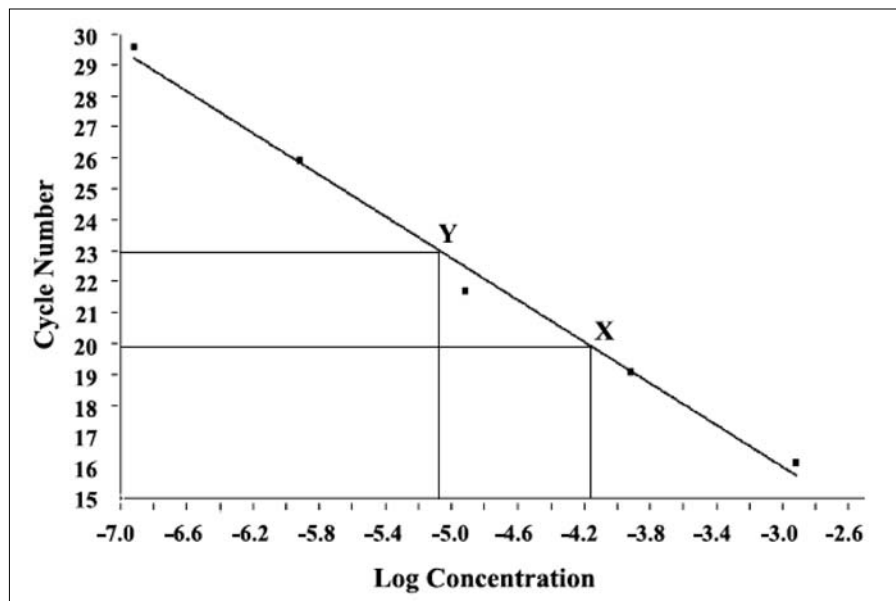


1. ábra
A PCR módszer vázlat

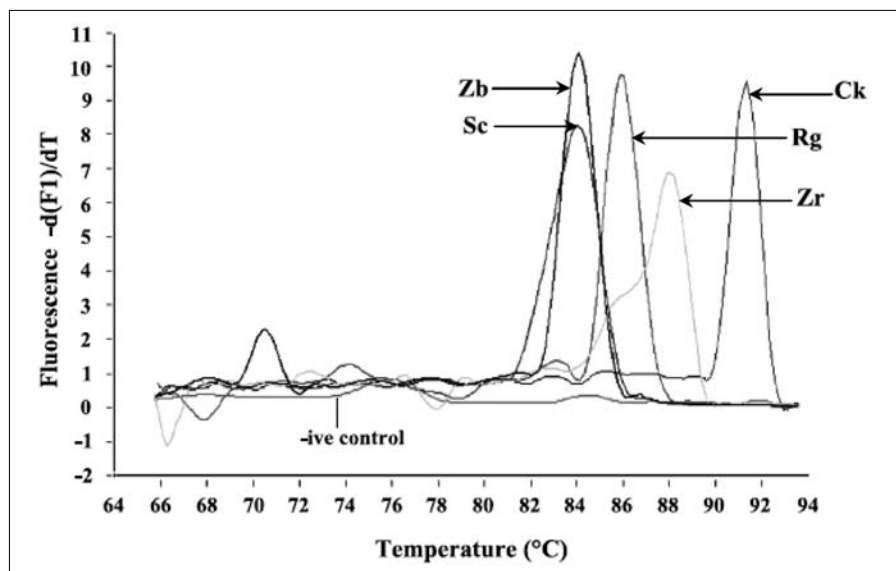


2. ábra
A PCR-DGGE/TGGE módszer vázlat

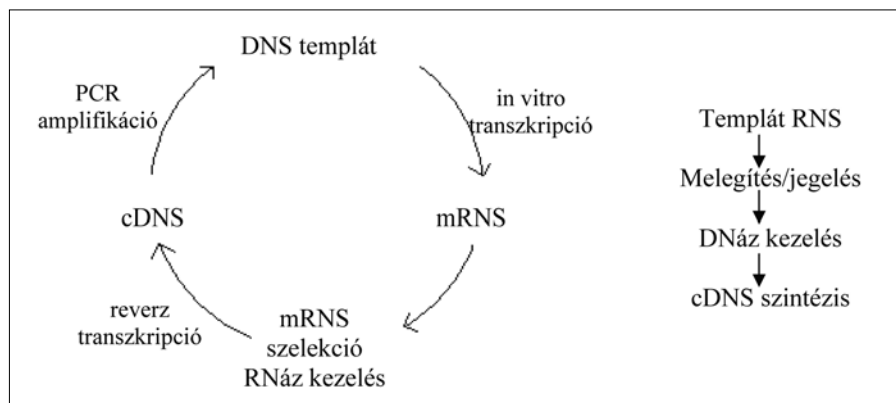
tára alkalmazták; az utóbbi években elterjedt élelmiszerek vizsgálatára, pl. tej, kenyér, bor mikrobapopulációinak tanulmányozására, mind baktériumok, mind élesztő- és penészgombák kimutatására és azonosítására.



3. ábra
Ct érték – log CFU kalibrációs görbe



4. ábra
Olvadási pont elemzés faji azonosításhoz

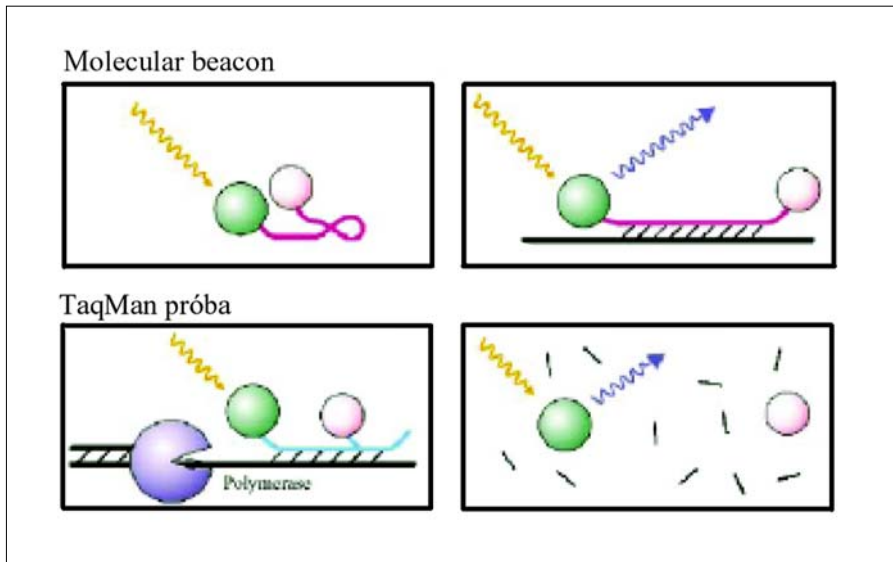


5. ábra
RT-PCR módszer vázlatja

A valós idejű polimeráz láncreakció (real-time PCR) a cél-DNS felszaporodását már a PCR ciklusok folyamán követi, nemcsak a reakciósorozat végén. Ehhez különböző fluoreszcens jelzéseket alkalmaznak, és a jel erőssége arányos a képződő DNS koncentrációjával. Amennyiben a jel küszöbértékének (un. C_t érték) elérését a PCR ciklusok számához (lényegében az időhöz) viszonyítják, a módszer a kiindulási DNS mennyiségének meghatározására is alkalmas, hiszen minél több volt a kiindulási DNS-mennyiség, a reakció annál hamarabb éri el a küszöbértéket (3. ábra). Kalibrációs görbe segítségével (log sejtszám – C_t) a valós idejű PCR mikrobaszám meghatározását is lehetővé teszi, ami különösen fontos az élelmiszer-mikrobiológiában. Az amplifikált termék további vizsgálatával, a DNS ún. olvadáspontjának meghatározásával, a módszer faji azonosítást is lehetővé tesz. A DNS fajspecifikus bá-zisszorendje szerint a denaturációs hőmérséklet (olvadáspont) különböző és a fajra jellemző (4. ábra).

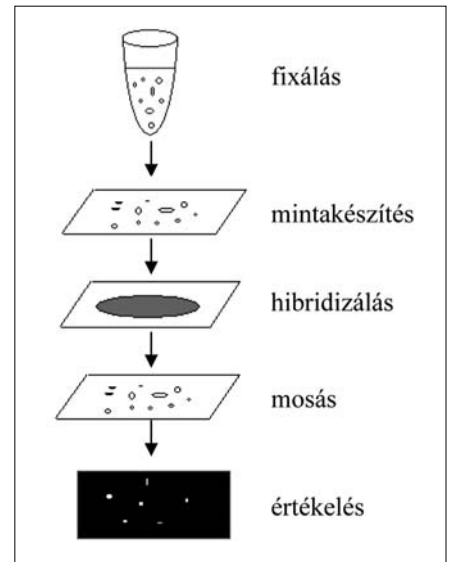
A PCR módszer továbbfejlesztése az élő és holt sejtek megkülönböztetését is lehetővé teszi. Ez a fordított átírási PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR). Mivel a DNS átírása csak élő sejtekben megy végbe, de a képződő mRNS csak rövid életidejű, holt sejtekben gyorsan lebomlik, az mRNS kimutatása alkalmas az élő sejtszám megközelítő jelzésére. Az RT-PCR lényegében egy fordított átíró enzim (reverz transzkriptáz) segítségével az mRNS-ről DNS másolatot (cDNS-t) készít; a továbbiakban már ennek a DNS-nek az amplifikációja történik (5. ábra).

A valós idejű, a kvantitatív és az RT-PCR módszerek a PCR alatechnika nagyon jelentős továbbfejlesztését jelentik, és kiterjesztik az alkalmazási lehetőségeket mind a klinikai diagnosztikában, mind az élelmiszer-mikrobiológiában. A műszergyártó cégek számos modellt fejlesztettek ki e módszerek alkalmazására. Ezek különböző fluoreszcens jelzéseket használnak. Az egyik fő típus a kétszálú DNS-hez kötődő SYBR-green festék, egy másik az ún. molekuláris jelző (molecular beacon), amelyben a fluoreszcens festékhez egy jelkioldó vegyület kapcsolódik. Amikor a PCR reakció folyamán a kioldó elkülönül a fluoreszcens festéktől, a jelzés felszabadul. Különösen érdekes az ún. TaqMan próba, amely a jelkioldót a DNS-polimeráz 5'-exonukleáz aktivitása révén választja el a fluoreszcens festéktől (6. ábra).



6. ábra

A Real Time PCR-nél alkalmazott molekuláris jelzések vázlatja



7. ábra

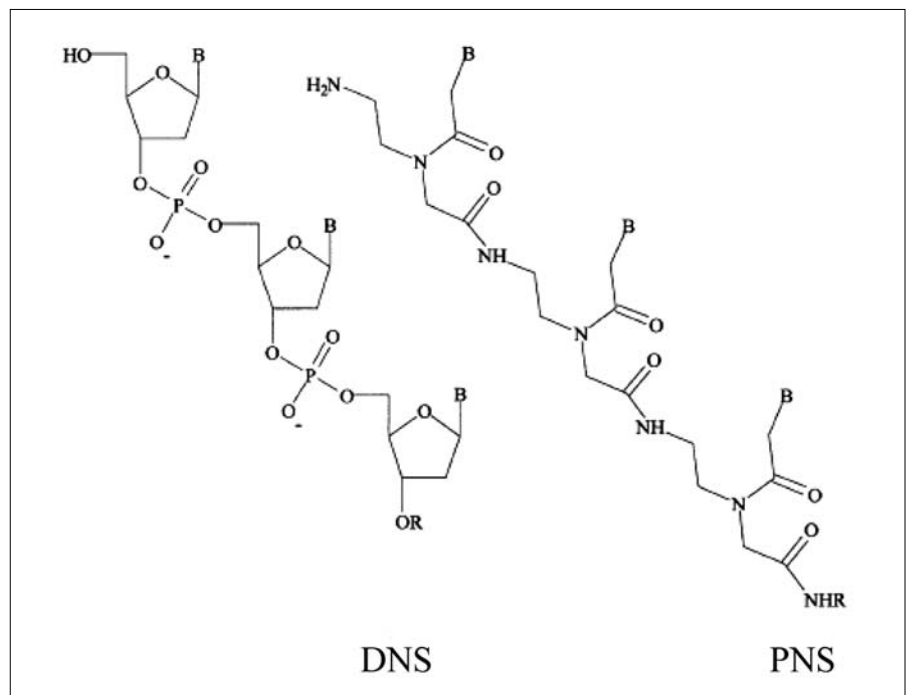
A FISH módszer folyamatábrája

A fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) a molekuláris módszer érzékenységet és specifitását köti össze a mikroorganizmusok láthatóvá tételével, előfordulásuk helyén. A FISH módszer fluoreszcens festékkel jelzett specifikus nukleinsav-probák hibridizációján alapul a helyben rögzített intakt sejtek cél-DNS szekvenciájához (7. ábra). A fluoreszcens jelzés epifluoreszcens mikroszkóppal, áramlásos citométerrel, vagy lézer szkennelvel mutatható ki.

A hagyományos DNS-próbákkal szemben egy mesterséges molekula-típus, a peptid-nukleinsav (PNS) keltette fel a figyelmet. A PNS-ben a nukleinsav-bázisok a cukor-foszfát lánc helyett poliamid-lánchoz kapcsolódnak, ami elektromosan kevésbé töltött, így nagyobb specifitást és gyorsabb, jobb hibridizációt tesz lehetővé (8. ábra). A FISH módszer széleskörű alkalmazást nyert az ökológiában, a természetes mikroba-közösségek elemzésével. Újabban kórokozó mikroorganizmusok kimutatására, sőt, faji azonosítására is kiterjesztették. A két másik módszerrel, a DGGE-TGGE, illetve a valós idejű, a kvantitatív és az RT-PCR technikákkal szemben, amelyek már a mind az élelmiszer-mikrobiológiai kutatásban, mind a rutin vizsgálatokban polgárjogot nyertek, a FISH módszer élelmiszer-vizsgálati alkalmazása inkább a jövő ígéretes lehetősége.

Irodalom

Bottari B, Ercolini D, Gatti M, Neviani E (2006) Application of FISH technology for microbiolo-



8. ábra

A DNS és a PNS kémiai szerkezete

gical analysis: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 485–494.
 Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. J. Microbiol. Methods 56: 297–314.
 Hanna S. E., Connor C. J., Wang H. H. (2005) Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologists: technologies, applications, and limitations. J. Food Sci. 70: R49–R53.
 Hierro N., Esteve-Zarzoso B, González A, Mas A, Guillamón, J. M. (2006) *Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine**. *Appl. Envir. Microbiol. 72: 7148–7155.

McKillip J. L., Drake M. (2004) Real-time nucleic acid -based detection methods for pathogenic bacteria in food. J. Food Protect. 67: 823–832.
 Stender H., Fiandaca M., Hyldig-Nielsen J. J., Coull J. (2002) PNA for rapid microbiology. J. Microbiol. Methods 48: 1–17.

Szerző: Belák Ágnes és Dr. Deák Tibor
 Budapesti Corvinus Egyetem
 Mikrobiológia és Biotechnológia
 Tanszék