

Kvantitativní stanovení bakterií mléčného kvašení (BMK) v potravinách

- 1) Stanovení počtu vybraných rodů BMK plotnovými metodami
 - 2) Kvantitativní stanovení jednotlivých kmenů BMK pomocí qPCR
-

Úloha č. 14 bude vypracovávána ve studentské a mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie mléka a tuků. Doporučená organizace práce v průběhu úlohy č. 14 je následující:

- 1) Příprava základních ředění vzorků (jak pro stanovení plotnovou metodou, tak pro stanovení pomocí qPCR)
- 2) Zahájení izolace DNA z nízkotučného jogurtu
- 3) Příprava následných ředění a stanovení vybraného rodu BMK plotnovou metodou
- 4) Kvantitativní stanovení *St. thermophilus* pomocí qPCR (mikrobiologická laboratoř)
- 5) Gelová elektroforéza

Studentům je doporučeno si před zahájením laboratoři zopakovat základní znalosti z molekulární biologie - biochemie (nukleové kyseliny, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), princip PCR a qPCR).

1. Stanovení počtů v BMK plotnovými metodami

Každý z posluchačů bude mít za úkol stanovit jeden z rodů bakterií mléčného kvašení (BMK) – *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium* v mléčném výrobku pomocí plotnové metody. **Rozpis přidělených mikroorganismů a mléčných výrobků bude vyvěšen na dveřích studentské laboratoře.**

Plotnové metody jsou vhodné pro kvantifikaci určitého druhu mikroorganismu, který se vyznačuje shodnými fyziologickými vlastnostmi (růst v určitém definovaném médium o definovaném složení, pH, red-ox potenciálu, při definované teplotě ... atd.). Příprava vzorků k mikrobiologickému rozboru se řídí druhem výrobku nebo suroviny, které jsou předmětem stanovení. Stanovní počtu vybraného druhu BMK proveďte metodou přelivu.

1.1. Navážka nebo odměření množství vzorku k rozboru

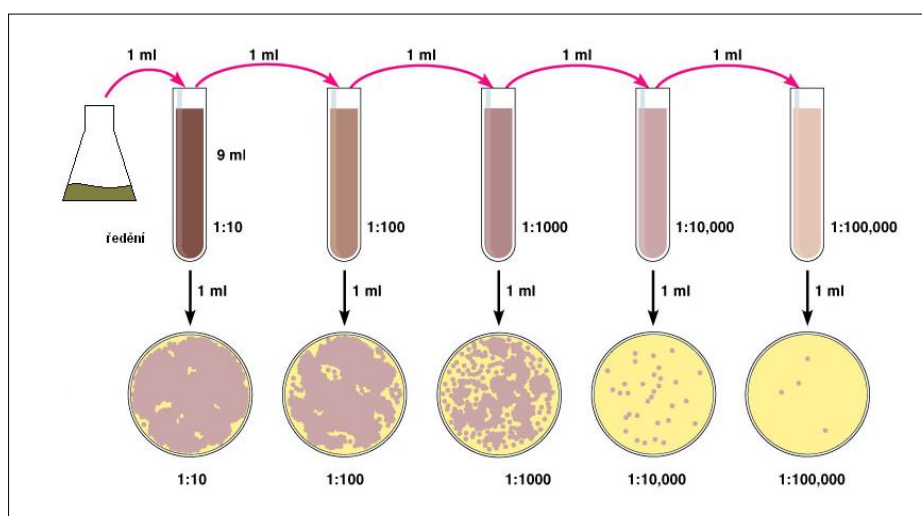
Hmotnost nebo objem vzorků odebraných k mikrobiologickému rozboru je obvykle 100 – 200 g (ml). Ze spotřebitelských balení se pro vlastní mikrobiologický rozbor odměřuje reprezentativní vzorek (např. výseč sýra nebo odpovídající počet balení): 1 – 25 g (ml) navažováním nebo pipetováním. Navážka se odebírá z různých míst vzorku tak, aby v ní byly zastoupeny všechny složky v přibližně ve stejném poměru jako v původním vzorku. Tekuté vzorky ve vzorkovnici nebo ve spotřebitelské balení se před odběrem důkladně promíchají protřepáním, krouživými pohyby nebo převrácením obalu či vzorkovnice dnem vzhůru. Během navažování nebo pipetování vzorku nesmí dojít k jeho kontaminaci (v místě otevření se obal otře roztokem 70 % obj. ethanolu).

1.2. Homogenizace vzorku

Důkladná homogenizace je jedním ze základních předpokladů získání správného výsledku při mikrobiologickém rozboru. Při homogenizaci dochází k rovnoměrnému rozptýlení přítomných mikroorganismů ve vzorku nebo jeho ředění. Postup homogenizace je závislý na charakteru vzorku. Nejjednodušší je homogenizace tekutých vzorků třepáním, které nesmí být příliš intenzivní, aby nedocházelo k napěnění vzorku. Viskózní, rosolovité a sypké vzorky se protřepávají v ředícím roztoku, který obsahuje skleněné perly. Pevné vzorky se asepticky roztírají ve sterilní třecí misce. U vzorků s vysokým obsahem tuku se provádí homogenizace při teplotě 40 – 45 °C. Pro výrobky jiné než tekuté konzistence se doporučuje použít k přípravě výchozí suspenze (tzv. základního, prvního ředění) peristaltický homogenizátor (stomacher) se sterilním plastovými sáčky. Objem sáčků homogenizátoru má být asi dvojnásobný proti objemu vzorku, který má být homogenizován. Z analyzovaného vzorku se odváží vzorek do plastového sáčku (obecně 10 g), přidá se vhodný ředící roztok v poměru 1 díl vzorku a 9 dílů ředícího roztoku předepsané teploty. Stomacherem se homogenizace provádí 1 – 2 min podle charakteru výrobku. Stomacher není vhodný pro výrobky obsahující ostré nebo nesnadno desintegrovatelné částice. Po ukončení homogenizace se ponechají velké částice sedimentovat (nejdéle 15 min), poté se přenesou potřebný objem horní vrstvy suspenze do sterilní nádoby vhodné kapacity pipetou. Je-li horní vrstva tvořena tukem, odebere se vzorek z vodné fáze.

1.3. Ředění vzorku

Jestliže se předpokládá, že vzorek obsahuje vyšší počet mikroorganismů, je třeba podle předběžně odhadnutého počtu zvolit ředění, která budou analyzována. Tekuté vzorky s nízkým počtem mikroorganismů se očkují neředěné. Vzorky viskózní a pevné je třeba ředit vždy. Výchozí (základní) ředění je definováno takto: suspenze, emulze nebo roztok, získané z naváženého nebo odměřeného množství vzorku smíchané s devítinásobným množstvím ředícího roztoku a důkladně promíchané. Jedná se tedy o I. ředění vyšetřovaného vzorku. Další ředění se připraví smísením 1 ml I. ředění s 9 ml ředícího roztoku (viz obrázek). Tímto postupem se připraví ředění, která jsou potřebná pro provedení mikrobiologického rozboru tak, aby výsledek bylo možno objektivně vyhodnotit. Jestliže se předpokládá nízký počet mikroorganismů, vzorky se neředí, případně se mikroorganismy koncentrují (např. membránovou filtrací).



1.4. Očkování suspenze, kultivace a výpočet kolonie tvořících jednotek

Metoda přelivu

Na Petriho misku se aplikuje 1 ml z vybraného vhodného ředění a suspenze se přelije vhodným kultivačním médiem (cca 20 ml) vytemperovaným na 45 °C. Směs se důkladně promíchá krouživými pohyby a nechá se zatuhnout. Petriho misky se následně přemístí do termostatu o zvolené kultivační teplotě, otočí se dnem vzhůru (kvůli případné precipitaci vody na povrch zaočkované půdy) a nechají se kultivovat po dobu 2 – 3 dny.

Metoda roztěru

Na Petriho misku se nalije vhodné kultivační médium, nechá se zatuhnout a povrch misky s médiem se nechá předsušit ve flow-boxu. Na předsušenou misku se aplikuje 100 µl z vybraného vhodného ředění a pomocí sterilní hokejky se rovnoměrně rozetře. Po dokonalém vsáknutí aplikované suspenze do média se Petriho misky následně přemístí do termostatu o zvolené kultivační teplotě, otočí se dnem vzhůru (kvůli případné precipitaci vody na povrch zaočkované půdy) a nechají se kultivovat po dobu 2 – 3 dny.

Výpočet kolonie tvořících jednotek (KTJ)

Po inkubaci se vyberou plotny vhodné k počítání: 10 - 300 kolonií na plotně (při stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů, celkový počet psychrotrofních mikroorganismů apod.) nebo 10 – 150 kolonií na plotně (specifická stanovení např. koliformní mikroorganismy), přičemž musí být splněna důležitá podmínka, že alespoň na jedné plotně je více než 10 kolonií. Celkový počet mikroorganismů N přítomných ve vzorku se počítá jako vážený průměr po sobě následujících ředění dle rovnice:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad [\text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}] \text{ či } [\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}]$$

Kde je:

- $\sum C$ součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet po sobě jdoucích ředění,
- V objem inokula v mililitrech zaočkovaného na plotny,
- n_1 počet ploten vybraných k výpočtu z prvního vybraného ředění,
- n_2 počet ploten vybraných k výpočtu z druhého vybraného ředění,
- d faktor odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění.

Dle normy ČSN EN ISO 7218 (560103) v případě aplikace 2 po sobě následujících ředění lze použít pouze jednu misku od každého ředění. Ve jmenovateli rovnice 1 se pak závorka nahrazuje koeficientem 1,1. Pokud se provádí pouze jedno ředění, tak zůstávají nutné 2 misky od ředění.

1.5. Stanovení vybraných skupin mikroorganismů pomocí plotnové metody

Pokud není uvedeno jinak, tak se jedná o stanovení metodou přelivu. Kromě ploten pro stanovení kvasinek a plísní se všechny plotny obrací před inkubací dnem vzhůru.

Lactobacillus

- médium: MRS, pH 5,2 – 5,4
- podmínky kultivace: 37 °C, 3 dny, anaerobně
- charakteristika kolonií: bílé diskovité kolonie

Streptococcus

- médium: M17 s laktosou nebo glukosou, Streptococcus agar
- podmínky kultivace: 37 °C, 3 dny, aerobně
- charakteristika kolonií: bílé diskovité kolonie

Bifidobacterium

- médium: MRS s dicloxacillinem (0,002 g.l⁻¹) a L-cysteinem (0,5 g.l⁻¹), pH 6,8
- podmínky kultivace: 37 °C, 3 dny, anaerobně (anaerostat)
- charakteristika kolonií: bílé kolonie, octový zápach

Lactococcus

- médium: M17 s laktosou nebo glukosou
- podmínky kultivace: 30 °C, 3 dny, aerobně
- charakteristika kolonií: bílé diskovité kolonie

2. Kvantitativní stanovení jednotlivých kmenů BMK pomocí qPCR

V rámci této úlohy bude mít každý posluchač za úkol stanovit počet *Streptococcus thermophilus* v nízkotučném jogurtu pomocí qPCR (absolutní kvantifikace) dle (Tabasco, Paarup, Janer, Peláez, & Requena, 2007).

2.1. Princip qPCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*, pro který jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5'-koncovým sekvencím úseku, jež má být amplifikován. Tato metoda, která zaznamenala revoluci v metodice molekulární biologie, poskytuje až 10⁶ násobné pomnožení vybraného úseku během 1 - 3 h. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují:

- 1) denuraci templátu
- 2) připojení primerů/annealing
- 3) extenzi/elongace připojených primerů DNA polymerasou.

Opakování těchto kroků vede k syntéze segmentu s konci definovanými primery, které jsou inkorporovány do nově vznikajících molekul.

Metoda kvantitativní PCR (qPCR) je technika založená na sledování průběhu PCR během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace.

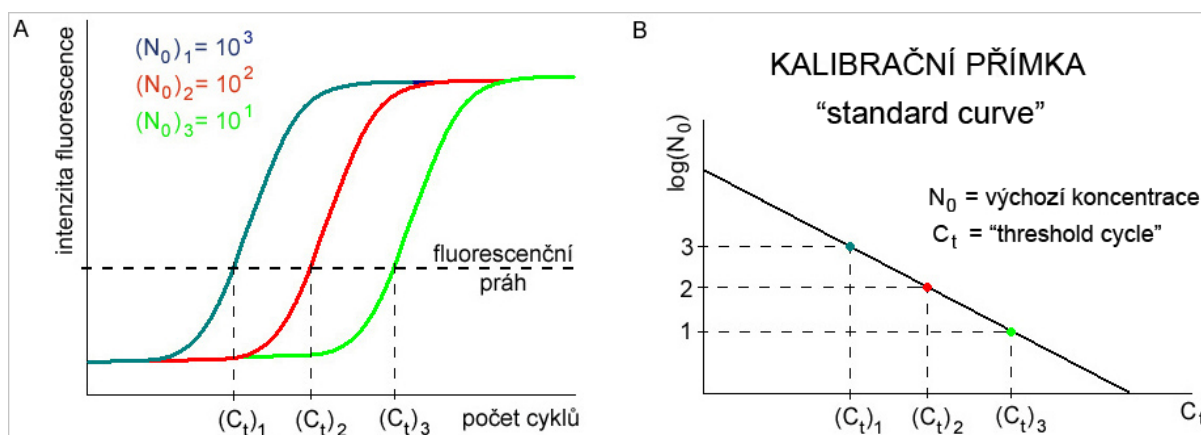
Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se provádí

prostřednictvím matematické analýzy **amplifikačních křivek** vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu.

Typická **amplifikační křivka** má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot; 2) **exponenciální fázi**, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů) a 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. **Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce.**

Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T („*threshold cycle*“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce.

Absolutní kvantifikace, která se používá např. při detekci specifických mikroorganismů, přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul. Je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky. Pokud tedy amplifikujeme vzorek o neznámé koncentraci společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci, získáme kalibrační přímkou („*standard curve*“), ze které lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku.

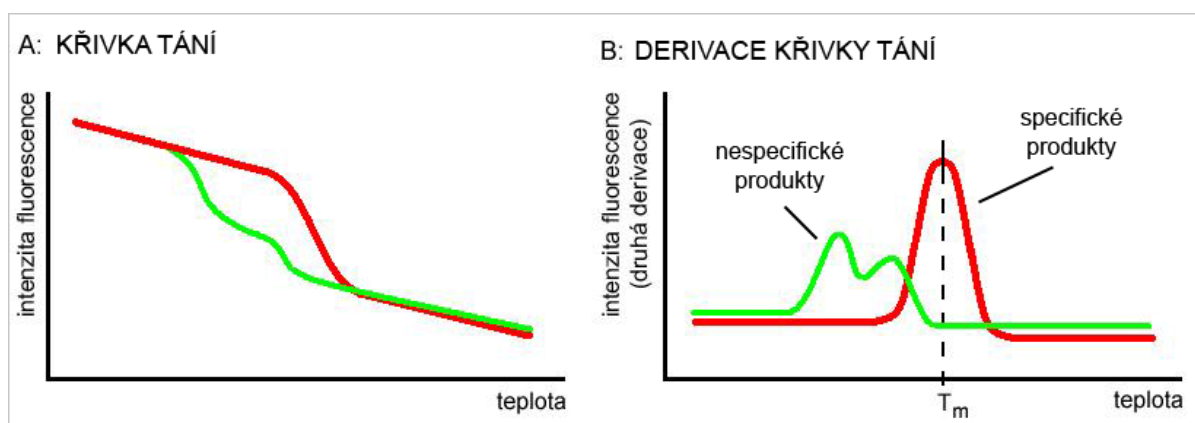


Prvními látkami používanými pro detekci akumulace produktu během qPCR reakce byla **interkalační barviva** (*ethidium bromid*, *SYBR Green I*), jejichž fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvou-řetězcovou DNA (dsDNA). Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvou-řetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze pomocí interkalačních barviv sledovat průběh amplifikace. Velkou nevýhodou interkalačních barviv je skutečnost, že detekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace (*jako jsou např. tzv. primery-dimery artefakty*), které i při velmi pečlivé optimalizaci metody velmi často vznikají. Specificita detekce je navíc dána pouze sekvencemi primerů.

Elegantní řešení eliminace nespecifických produktů nabízejí často využívané **oligonukleotidové sondy**. Jedná se o fluorescenčně značené oligonukleotidy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu a výrazně přitom zvyšují svou fluorescenční aktivitu. Jejich výhodou je vysoká specificita, jelikož **detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních** - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy.

Také analýza křivky tání je metoda, která se používá po ukončení qPCR reakce ke zjištění povahy produktů PCR a eliminaci nespecifických produktů. Jako tání DNA označujeme proces separace komplementárních řetězců dsDNA indukovaný zvyšováním teploty. Platí, že

DNA taje nejrychleji v určitém rozsahu teplot blížících se tzv. teplotě tání T_m . Tání DNA můžeme po skončení real-time PCR reakce sledovat tak, že roztok dsDNA ochladíme na teplotu nižší než je očekávaná T_m produktů, postupně ohříváme na teplotu vyšší než je očekávaná T_m a měříme přitom fluorescenci. Platí, že fluorescenční aktivita oligonukleotidové sondy nebo interkalačního barviva je přímo úměrná množství dsDNA přítomné v reakční směsi. Pokud vyneseme naměřenou intenzitu fluorescence proti příslušné teplotě, dostaneme tzv. křivku tání, která náhle strmě klesá v okolí T_m . Teplota v inflexním bodě křivky se rovná teplotě tání a lze ji snadno zjistit zderivováním křivky tání, kde se v grafu objeví jako vrchol „peaku“. Detekce nespecifických produktů při použití interkalačních barviv využívá předpokladu, že nespecifické produkty mají odlišnou (obvykle nižší) T_m než produkty specifické.



2.2. Izolace genomové DNA z nízkotučného jogurtu

K izolaci gDNA bude použit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), lytický pufr (20 mM Tris -HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 1,2 % Triton X-100), lysozyme (Sigma-Aldrich) a Proteinasa K (1,25 ml / 600 mAU/mg) dodávaná v kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

- **Příprava buněk:** Provést základní ředění vzorku – k 10 g vzorku přidat 90 g citrátového pufru. Homogenizovat 1 min na Stomacheru. Ze suspenze odebrat 1 ml do Eppendorfky a odstředit (10 000 g, 10 min, 21 °C). Odsát supernatant.
- **Příprava lytického pufru:** K 1 ml zásobnímu roztoku lytického roztoku přidat 40 mg lysozymu. Dobře promíchat pipetou.
- **Lyze buněk:** K sedimentovaným buňkám přidat nejdříve **180 µl lytického pufru s lysozymem** a inkubovat 45 min při 37 °C, poté přidat **20 µl proteinasy K** a **200 µl pufru AL** a inkubovat 30 min při 56 °C.
- **Precipitace DNA:** K lyzátu přidat **200 µl etanolu** (98 %, - 20 °C) a promíchat obracením zkumavky do dosažení homogenity. Inkubovat 5 min při 25 °C.
- **Purifikace DNA:**
 - a. Veškerý obsah zkumavky přenést do kolonky (DNeasy Mini spin column) a odstředit (6 000 g, 2 min, 4 °C).
 - b. Vyměnit/odlít sběrnou zkumavku, přidat 500 µl **AW1** pufr a odstředit (6 000 g, 2 min, 4 °C).
 - c. Vyměnit/odlít sběrnou zkumavku, přidat 500 µl **AW2** pufr a odstředit (6 000 g rpm, 2 min, 4 °C).
 - d. Vyměnit/odlít sběrnou zkumavku, odstředit (20 000 g, 1 min, 4 °C).

- **Eluce DNA:** Vyměnit sběrnou zkumavku!!!! Na střed membrány v kolonce nepipetovat 50 µl elučního pufru AE, inkubovat 2 min při 25 °C a poté odstředit (20 000 g, 1 min, 4 °C). Pro zvýšení výtěžku zopakovat eluční krok 5.

2.3. Vlastní qPCR reakce

Vedoucí úlohy připraví základní qPCR mix (H₂O, Supermix, Primery). Každý student si připraví vlastní PCR reakci odebráním 9 µl základního qPCR mixu a přidáním 1 µl izolované DNA. Poté budou všechny vzorky společně analyzovány pomocí termocycleru **CFX96TM Real-Time PCR (BioRad)**.

qPCR mix	Výrobce	V (µl)	Pozn.
H ₂ O demi sterilní	-	2	Základní qPCR mix
iQ SYBR Green Supermix	Solis BioDyne	5	
Primer : Thermfor (10 µM)	Generi Biotech	1	
Primer : Thermrev (10 µM)	Generi Biotech	1	
DNA izolovaná	QIAGEN	1	
Celkový objem		10 µl	

Použité primery ((Tabasco, et al., 2007):

Thermfor: 5'- ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG 157 – 3'

Thermrev 5'- GCAATTGCCCTTTCAAATA – 3'

Počet cyklů	Teplota (°C)	Výdrž (s)	Pozn.
1	95	10 min	Počáteční denaturace DNA
30	95	30	Denaturace
	60	20	Annealing (chlazení, přisedání primerů)
	72	20	Elongace
1	72	5 min	Konečná elongace
1	55-95	0,02 s / 0,5 °C	HRM analýza

Vlastní PCR reakce: Zkumavky se umístí do qPCR přístroje (CFX96TM Real-Time PCR (BioRad)) a zahájí se PCR předem naprogramovaná PCR reakce. Očekávané PCR produkt by měl mít velikost 157 bp (Ověření pomocí gelové horizontální elektroforézy, kap. 2.4.)

2.4. Elektroforéza, barvení a vizualizace gelu

PCR produkty (10 µl) a barevný vazebný roztok (2 µl) se promíchají a směs se vpichem nadávkuje na 1,0 % hm. agarosového gelu. PCR produkty se analyzují gelovou elektroforézou Horizont 11-14 (Gibco BRL Life technologies, USA) za podmínek: 100 V/ 1 h v 0,5x TBE pufru s přísadkou Cybr Safe. Vizualizace se provádí pomocí UV ($\lambda = 312$ nm) prohlížečím boxu (Vilber Lourmat, Francie). DNA marker (Top Bio) bude použit jako standard pro určení molekulových hmotností.

Reference:

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, 1107-1114.