Vastagbél mikrobióta összetételének és stabilitásának nyomon követése humán emésztési modellben mikrobiológiai és molekuláris biológiai módszerekkel

SZABÓ LILLA

Biológia (BSc), III. évf. , Mikrobiológia 1. tagozat, különdíj-Témavezető: dr. Juhász Ákos tudományos munkatárs

1. Bevezetés

Az *in vitro* emésztési modelleket széles körben azért alkalmazzák, hogy szimulált gasztrointesztinális körülmények között nyomon kövessék az elfogyasztott élelmiszerek strukturális változásait és a bioaktív komponensek biológiai hasznosulását. Az emésztési modellek általában csak az emésztés egy-egy kiragadott szakaszát modellezik, az adott szakasznak megfelelő mesterséges emésztőnedveket alkalmazva. Az általunk alkalmazott modell az emésztés összetett biokémiai folyamatait többlépcsős modellben szimulálja, reprodukálva a száj, gyomor, vastagbél, vékonybél eltérő fiziológiás körülményeit, így a vizsgálatok széles körére alkalmazható. Az emésztőnedveket mesterségesen állítjuk össze, és az egyes műveletek folyamatos kevertetés mellett, 37 °C hőmérsékleten végezzük el. A vastagbél szakaszban a valós viszonyokat szorosan modellező hattagú baktériumközösséget alkalmazunk két potenciálisan patogén (*Clostridium*, Bacteroides), két jótékony hatású (Bifidobacterium, Lactobacillus) és két, az ún. "kétarcú flórához" tartózó törzzsel (E. coli, Enterococcus). Vizsgálataink során az in vitro bél mikrobiota kvantitatív változásait szelektív agar lemezeken való tenyésztéssel határozzuk meg, amely azonban nem megfelelő minden esetben, ugyanis a legtöbbször a szelektív táptalajokon nem csak egy, hanem több baktérium is képes növekedni. Ezeket a baktériumokat ugyan telepmorfológia alapján el lehet különíteni, de vegyes tenyészetben alkalmazva egy-egy baktérium pontos telepszámának meghatározását nagyon megnehezíti, ha több másik baktérium is képes növekedni az adott táptalajon. A szelektív táptalajokon történő tenyésztés másik hátránya az, hogy nagyon időigényes, a lassabban növekvő anaerob baktériumok esetében akár 3-4 nap is lehet (pl. Bifidobacterium longum). A vastagbél mikrobióta modellezésére alkalmazott fermentációs rendszer szintén 3-4 napos tenyésztést igényel, és hiába monitorozzuk naponta a baktériumszám-változást, ha erről csak a folyamat végére kapunk eredményt. Tehát ha nem kívánatos változás történik a fermentorban (pl. hat baktérium közül valamelyik elpusztul), akkor annak leállítása nem lehetséges, mert a szelektív táptalajokon történő tenyésztés időigényessége miatt erről nem szerzünk időben tudomást. Ezért szükségszerűvé vált egy molekuláris biológiai módszer kifejlesztése, mely pontosan és gyorsan képes meghatározni az emésztési modellben alkalmazott hat baktérium telepszámnak változását. Munkám során ezen technika, vagyis a kvantitatív Real-Time PCR alapú baktériumtelepszám-meghatározás fejlesztésébe kapcsolódtam be az Eszterházy Károly Főiskola Egerfood Regionális Tudásközpont molekuláris biológiai laboratóriumában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az in vitro emésztési modellek felépítése

Az *in vitro* emésztési modellek alapvetően három lépésben modellezik az emberi emésztés folyamatát: az első szakasz a tápanyagok enzimatikus bontását szimulálja, majd ezt követi a felszívódás és a vastagbél mikrobiota modellezése.

Az emésztés modellezése során a leggyakrabban használt emésztőenzimek a pepszin, a tripszin, a pankreatin, a kimotripszin, a peptidáz, az α-amiláz és a lipáz. Egyes tanulmányokban olyan enzimeket használnak, melyeket emberektől gyűjtöttek be (Almaas és mtsai., 2006; Chattertona és mtsai., 2004), míg mások állati vagy növényi forrásból származó enzimkivonatokat alkalmaznak. Kitabatake és Kinekawa (1998) enzimkeverékekkel dolgozott sertés és emberi eredetű pepszint, patkány eredetű gyomornedvet, pankreász nedvet alkalmazva. Azok az emésztéses tanulmányok, amelyek egy komplex, többkomponensű élelmiszer rendszert vizsgálnak, az emésztőenzimek széles skáláját alkalmazzák (Oomen és mtsai., 2003; Versantvoort és mtsai., 2005; Xing és mtsai., 2008). Általában az *in vitro* módszerek a következőkön alapszanak: keményítőemésztés α-amilázzal, lipidemésztés lipázzal és fehérjeemésztés pepszinnel és/vagy pankreatinnal.

A felszívódás vizsgálatához leggyakrabban alkalmazott humán sejtvonalak a Caco-2, a HT29. Mindkét sejttípus humán vastagbél karcinómából származik, differenciálódásuk azonban bélhámsejtekre jellemző tulajdonságokat mutat. Újabb kutatások (Cencic és Langerholc, 2010) a daganatos sejtek helyett az immortalizált bélhámsejteket részesítik előnyben, mivel a daganatos sejtek adhéziós molekulái nem azonosak az egészséges bélhámsejtekével. Az abszorpciós és biológiai felvehetőségre vonatkozó tanulmányokban Caco-2 sejtvonalakkal általánosan egy úgynevezett inszerciós technológiát alkalmaznak (Sabboh-Jourdan és mtsai., 2011; Mahler és mtsai., 2009; Biehler és mtsai., 2011), és a vizsgálandó anyagok transzportját folyamatos mintavétellel követik nyomon.

2.2. Az emberi bélmikrobióta összetétele és szerepe

A vastagbél-mikrobióta modellezéséhez kiemelkedő fontosságú a bélmikrobióta pontos ismerete (Meyer Á., 2004). Az emberi bélmikrobióta összetétele és a gazdaszervezettel való kapcsolata alaposan tanulmányozott, de még így is számtalan kérdés megválaszolatlan. A mikrobák nemcsak az emberi szervezet számára emészthetetlen tápanyagok lebontását és átalakítását végzik el, hanem számos fontos anyagot (esszenciális aminosavak, vitaminok stb.) állítanak elő. A számos információ ellenére a bélmikrobióta szerepe még többségében ismeretlen (Sekirov és mtsai., 2010).

Az emberi széklet grammonként kb. 10¹¹⁻¹² mikroorganizmust tartalmaz, ami tízszer több, mint az emberi szervezet összes sejtjének száma (Ley és mtsai, 2006). A bélbaktériumok igen diverzek, a többségük anaerob (95%), ezért a vizsgálatuk igen nehézkes klasszikus mikrobiológiai módszerekkel (tenyésztés, egyszerű fejtések, mikroszkópos technikák). A bélmikrobióta kezdeti tanulmányozása során, csupán a bennünk élő baktériumok töredékét tudták vizsgálni. Az első tenyésztési módszeren alapuló vizsgálatok szerint az emberi bélbaktériumok száma kb. 400-500 (Mata és mtsai., 1969; Moore és Holdeman, 1974; Finegold és mtsai., 1977).

A tudomány fejlődésével azonban egyre több tenyésztéstől független technika létezik, mellyel a mikrobák vizsgálhatók, nyomon követhetők. Manapság már nem meglepő, hogy az emberi bélrendszerben talált mikrobák 80%-át nem tenyésztették ki, de ennek ellenére meghatározták különböző molekuláris biológiai módszerekkel (Eckburg és mtsai., 2005).

Jelenleg azonban a molekuláris biológiai módszerek sem adnak információt minden baktériumról, mivel a legtöbb esetben a metagenomikai technikák 10⁶ sejt/ml (vagy gramm) alatti mennyiségeket nem tudnak kimutatni, így a kisebb számban előforduló baktériumok vizsgálata mind a mai napig nehezen megoldható.

A legfontosabb és nagy számban jelen lévő mikroorganizmus-populáció a gasztrointesztinális traktuson belül a vastagbélben kolonizálódik, ahol valódi szimbiózisban a gazdával kulcsfontosságú szerepet játszik az egészség megőrzésében. Egy ideális vastagbél ökoszisztémában a potenciálisan egészségvédő hatással rendelkező mikroorganizmusok túlsúlyban vannak számban és aktivitásban a potenciálisan káros fajok felett. Ezt az állapotot "normobiózisnak" nevezzük (Roberfroid és mtsai., 2010). Ennek az ideális állapotnak a megzavarása patogénekkel vagy egyéb ártalmas faktorokkal a "diszbiózis" tünetegyütteséhez vezethet, amely egy olyan vastagbél-mikrobióta kialakulását jelenti, amelyben egy vagy több potenciálisan káros mikroba genusz vagy faj dominanciát élvez a jótékony baktériumok felett, ezzel egy betegségre hajlamosító szituációt teremtve. A prebiotikumokkal kapcsolatos kutatások eredményeiből világosan látszik, hogy a bélmikrobióta kompozíciójának és/vagy aktivitásának szelektív modifikációján keresztül erősíteni lehet a "normobiózis" állapotát. Az étrend kulcsfontosságú szerepet játszik a bélmikrobióta kompozíciójának modulációjában. Ezért nagy jelentősége és piaci szerepe van az egészséges, funkcionális élelmiszerek fejlesztésének, melyek valamilyen innovatív, egészségvédő összetevővel, például prebiotikumokkal támogatják a bélmikrobióta normális funkcióit, szelekítven stimulálva a probiotikus törzsek növekedését és/vagy aktivitását a vastagbélben.

2.3. A bélmikrobióta modellezése

A vastagbél-mikrobióta modellezése során az egy komponensű *in vitro* rendszerekben különböző szubsztrátokat inkubálnak (élelmiszer mátrixban vagy anélkül) a kiválasztott baktérium tiszta tenyészetével (Su és mtsai., 2007), több baktérium kevert tenyészetével (Fooks és mtsai., 2002) vagy székletből származó mikroflórával (Hernot és mtsai., 2009). Ezen tanulmányok célja nyomon követni a széklet mikrobiótában végbemenő változásokat a különböző szubsztrátok hatására, valamint mérni és összehasonlítani a gáztermelést és a rövid szénláncú zsírsav produkciót, mint a különböző szubsztrátok fermentációjának végtermékeit.

A komplex, több komponensű vastagbélmodellekben reprodukálják a proximális/ aszcendens, transzverz és disztális/deszcendens vastagbélszakaszokat (Gibson és mtsai., 1994; McBain és mtsai., 1997). Az ún. "SHIME" modell (simulator of the human intestinal microbial ecosystem) öt hőmérséklet és pH kontrollált edény sorozatából áll, melyek szimulálják a gyomrot, a vékonybelet és a különböző vastagbél szakaszokat. A rendszerbe komplex táptalajt adagolnak, mely tartalmazza a vizsgálni kívánt szubsztrátokat, hogy tanulmányozzák ezek fermentációját, nyomon kövessék a különböző metabolitokat, és analizálják a hatásukat az enzim aktivitásra és a mikrobióta összetételére, telepszámolással, kvantitatív PCR-al és DGGE-vel (van de Wiele és mtsai., 2004). A proximális vastagbélben végbemenő fermentáció egy még pontosabb in vitro modellje a TIM – 2 modell (TNO-intestinal model-2) (Minekus és mtsai., 1999; Venema és mtsai., 2003). Ez a rendszer belül flexibilis falú üvegedények sorozatából áll. Az üveg és a flexibilis fal közé pumpált vízzel tudják szimulálni a perisztaltikát és a hőmérsékletszabályozást, mely számítógép kontrollálta folyamat. Az edények ezen kívül fel vannak szerelve egy dialízis membránnal a lumenben, mellyel szimulálni kívánják a víz és a rövid szénláncú zsírsavak abszorpcióját.

2.4. DNS mennyiségi meghatározása PCR segítségével

A polimeráz láncreakció (PCR) nukleinsav szekvenciák sokszorozására alkalmas in vitro eljárás, amelynek segítségével kis mennyiségű DNS is kimutatható. A hagyományos PCR reakció során keletkezett termékeket általában agaróz gélelektroforézissel elválasztják, és valamilyen interkalálódó festékkel (pl. etidium-bromid, GelRed, stb.) megfestik, majd UV fényben vizsgálják különböző géldokumentációs rendszerek segítségével. Ezen technikával jól elkülöníthetők a különböző méretű DNS fragmentumok, melyek mérete pontosan meghatározható DNS molekulasúly markerek segítségével. A hagyományos PCR reakció azonban nem alkalmas a DNS pontos mennyiségi meghatározására, még abban az esetben sem, ha a PCR termékek kiértékelését nem agaróz gélelektroforézissel, hanem kapilláris elektroforézissel végezzük el. Ebben az esetben ugyan nyerhetünk bizonyos információt a felamplifikálódott DNS mennyiségéről, de ez nem teszi lehetővé a kiindulási minták pontos nukleinsav tartalmának meghatározását. Ezt csak a kvantitatív Real-Time PCR (qPCR) technika alkalmazásával lehet elvégezni, melynek működési elve megegyezik a hagyományos PCR alapelvével. Fontos eltérés azonban, hogy a képződő terméket nem a PCR reakció végén, hanem folyamatosan (valós időben) detektálják interkalálódó fluoreszcens festék (pl. SYBR Green, Eva Green) vagy specifikus próba (TaqMan, Molecular Beacon stb.) segítségével.



1. ábra: A kvantitatív Real-Time PCR interkalálódó fluoreszcens festéken alapuló működési elve (SYBR Green I festésre alapozott detektálás). Forrás: http://www.nature.com/leu/journal/v17/n6/fig_tab/2402922f1.html

Az általunk is alkalmazott interkalálódó fluoreszcens festékkel történő detektálás alapelvét az **1. ábra** mutatja. A SYBR Green I egy interkalálódó molekula, amely a PCR reakció során a dupla szálú DNS-hez kötődik. Ebben az állapotban, vagyis a kettős szálú DNS-hez kötötten a fluoreszcenciája lényegesen (kb. 2000-szer) magasabb, mint szabadon. A qPCR során minden ciklusban a lánchosszabbítási lépés végén detektálják a festék fluoreszcenciáját, melynek nagysága a PCR folyamán keletkező kettős szálú DNS mennyiségével arányosan növekszik.



2. ábra: A küszöbérték (treshold) és a Ct értékének kapcsolata. A vízszintes tengelyen a ciklusok számát ábrázoljuk, míg a függőlegesen a fluoreszcens jel erősségének logaritmusát. A Ct értéke az a ciklusszám, ahol a jel intenzitása nagyobb, mint az általunk meghatározott küszöbérték. Forrás: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml A PCR reakció során elméletileg minden ciklusban megduplázódik a kettős szálú DNS mennyisége, így a templátról keletkező DNS koncentrációjának növekedése exponenciális. A reakció kezdeti ciklusaiban a termék mennyisége nem számottevő, így a DNS koncentrációjának megfelelő fluoreszcens jel erősödése a detekciós határ alatt van. A kiindulási DNS koncentráció és a duplázódás időbeni lefutása közt rendkívül szoros az összefüggés, vagyis minél több DNS-t tartalmaz a kiindulási minta, annál hamarabb kapunk detektálható jelet. Tehát a kiindulási DNS-koncentráció függvényében a termék mennyisége és ezzel együtt a fluoreszcens jel intenzitása fokozatosan növekszik, és általában a 10-30. ciklus közt már detektálhatóan az exponenciális szakaszba lép. Ezt kihasználva ismert koncentrációjú standardok (kalibrációs sorok) alkalmazásával lehetőséget nyílik a mintáinkban jelen lévő DNS koncentrációjának meghatározására.

Az exponenciális szakaszt egy platófázis követi a 30-40. ciklus környékén. Ennek elsődleges oka a reakciókomponensek kimerülésével, illetve a PCR során keletkező pirofoszfát mennyiségének növekedése, ami egy bizonyos koncentrációt elérve gátolni kezdi a PCR reakciót **(2. ábra)**.

A fluoreszcens jel detektálási küszöbértékét Ct (Threshold Cycle) értéknek nevezzük. Ez tehát a minta kezdeti DNS-koncentrációjától függ: minél több templát DNS van jelen, annál kevesebb ciklus szükséges a detektálási limitet jelentő ciklusszám eléréséhez. Ez teszi lehetővé a mennyiségi meghatározást, melynek lényege, hogy az amplifikáció során keletkező DNS mennyisége és a PCR ciklusok száma közt lineáris összefüggés van.

2.5. DNS alapú baktériumsejtszám-meghatározás qPCR alkalmazásával

Mivel a qPCR technika segítségével meghatározható a vizsgálandó minták kiindulási DNS-koncentrációja, régóta alkalmazzák különböző minták baktérium (és egyéb mikroba) számának meghatározására. Ezek sokszor klinikai eredetűek, ebben az esetben általában a különböző patogének jelenlétének specifikus primerekkel történő kimutatása és pontos mennyiségi meghatározása a cél (Murphy és mtsai., 2013). Többek közt *Helicobacter pylori* esetében is megállapították (He és mtsai., 2002), hogy a számos mennyiségi és minőségi kimutatási módszer közül a qPCR az egyik legmegfelelőbb, mellyel a mintánkénti 10³-10⁹ baktérium mennyisége pontosan meghatározható (*ureC* génhez tervezett specifikus primerek segítségével). Az egyedi génekhez tervezett primerek mellett széles körben alkalmazzák baktériumok esetében a 16S rRNS génjéhez tervezett primereket is (Fujita és mtsai., 2002; Rintilla és mtsai., 2004; Matsuki és mtsai., 2002). A baktériumok kimutatása mellett a qPCR technikát széles körben alkalmazzák többek közt patogén gombák kimutatására is (Horváth és mtsai., 2013).

Korábban az emésztőrendszer baktérium-összetételét elsősorban szelektív táptalajon történő tenyésztéssel határozták meg (Simon és Gorbach, 1984). Manapság az emésztőrendszerben jelen lévő baktériumok mennyiségi és minőségi meghatározására is a qPCR technikát alkalmazzák a legtöbb esetben. A technika alkalmas különböző patogének székletből történő kimutatására (Fukushima és mtsai., 2003; Song és mtsai., 2004; Belanger és mtsai., 2003; Mafu és mtsai., 2009; Rinttila és mtsai., 2011). A patogén mikrobák jelenléte mellett a vastagbél komplex mikroba-összetételének vizsgálatához is általában a 16S rDNS alapú specifikus primereket alkalmaznak (Rintilla és mtsai., 2004; Matsuki és mtsai., 2002; Ott és mtsai., 2004), mivel ez a legmegfelelőbb marker taxonómiai és filogenetikai vizsgálatokra. Ezen kísérletek célja a legtöbb esetben a különböző külső és belső hatások (pl. antibiotikum kezelés, táplálkozásban történő változások, betegségek stb.) normál bélflórára gyakorolt hatásának vizsgálata. Ezen ismeretek tükrében választottuk ki az *in vitro* vastagbél modell hattagú mikrobaközössége változásának nyomon követésére a qPCR technikát 16S rDNS alapú fajspecifikus primerek alkalmazásával.

3. Célkitűzések

Munkánk kezdetekor azt a célt fogalmaztuk meg, hogy az *in vitro* vastagbél modellben alkalmazott hat baktérium (*Clostridium perfringens, Bacteroides fragilis, Bifidobacterium longum* subsp. *infantis, Lactobacillus casei, Escherichia coli* és *Enterococcus faecium*) kimutatására és pontos mennyiségi meghatározására létrehozzunk egy olyan molekuláris biológiai módszert, mely specifikusabb és gyorsabb eredményt ad, mint a szelektív táptalajokon történő tenyésztés. Ennek megvalósítása érdekében az alábbi célokat tűztük ki:

- A hat baktérium elkülönítésére alkalmas 16S rDNS alapú specifikus primerek tervezése és a PCR reakció körülményeinek optimalizálása.
- Olyan DNS izoláló módszer kidolgozása, mely a különböző baktériumokból (Gram pozitív és negatív, tiszta és kevert tenyészetek) azonos hatékonysággal képes a nukleinsav kivonására függetlenül a tenyészetek mikrobakoncentrációjától.
- A qPCR optimalizálása és a mennyiségi meghatározás kidolgozása specifikus primerek segítségével mind a hat baktérium esetében.
- A qPCR technikával történő mennyiségi meghatározás tesztelése különböző töménységű baktériumszuszpenziók alkalmazásával és a kapott eredmények összehasonlítása ugyanezen minták szélesztéssel meghatározott eredményével.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A kísérlet során alkalmazott mikroorganizmusok

A bélmikrobióta modellezése során alkalmazott baktériumtörzseket az **1. táblázat** mutatja. A baktérium transzformáció során *Escherichia coli* XL1-Blue törzset alkalmaztunk.

Baktérium törzsek	Szelektív táptalaj
Bacteroides fragilis ATCC 25285	Bile Esculin Agar (BEA)
Bifidobacterium longum DSM 20088	Bifidobacterium Agar (BIF)
Clostridium perfrigens ATCC 13124	Tryptose Suplhite Cycloserine Agar (TSC)
Enterococcus faecium NCAIM B.01181	Compass Enterococcus Agar (CEA)
Escherichia coli ATCC 25922	ChromoBio Coliform
Lactobacillus casei DSM 20011	de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS)

1. táblázat: Az in vitro emésztési modellben alkalmazott törzsek és a tenyésztésükhöz felhasznált szelektív táptalajok. A baktériumokat a következő törzsgyűjteményekből szereztük be: DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Németország; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia; NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Magyarország.

4.2. Felhasznált táptalajok és tápoldatok

A bélmikrobióta modellezése során felhasznált baktériumtörzsek fenntartásához, illetve elkülönítéséhez alkalmazott szelektív táptalajokat az **1. táblázat** mutatja be.

Bifidobacterium Agar összetétele 1 literre: 5 g kazein, 3 g pepton, 5 g kazein hidrolizátum, 3 g élesztőkivonat, 0,1 g NaCl, 1,6 g K_2 HPO₄, 0,7 g KH₂PO₄, 0,4 g NaHCO₃, 0,02 g MgSO₄, 1 ml Tween 80, 0,5 g cisztein-HCl, 7,5 g raffinóz, 0,2 g N-Acetyl-D-Glucoseamine, 3 g Na-propionát, 2 g LiCl, 0,01 g riboflavin, 0,01 g fólsav, 15 g agar.

Az *E. coli* tenyésztésére LB táptalajt/tápoldatot alkalmaztunk (10 g/l tripton, 10 g/l NaCl, 5 g/l élesztőkivonat, 20 g/l bakteriológiai agar – táptalajként)

A bélmikrobióta fermentoros tenyészetéhez anaerob alap tápoldatot alkalmaztunk (1 literre: 2 g pepton, 2 g élesztőkivonat, 0,1 g NaCl, 0,04 g K₂HPO₄, 0,04 g KH₂PO₄, 0,01 g CaCl₂•6H₂0, 0,01 g MgSO₄•7H₂0, 2 g NaHCO₃, 2 ml Tween 80, 0,05 g hemin, 10 µl vitamin K₁, 0,5 g cisztein-HCl, 0,5 g epe sók, 10 g glükóz).

4.3. Felhasznált enzimek, oldatok, pufferek, primerek és kitek

4.3.1. A DNS izoláláshoz használt nukleinsav izoláló kitek

A DNS izoláláshoz három különböző kitet alkalmaztunk: GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma), Bacterial DNA Kit (VWR) és QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

4.3.2. A DNS izoláláshoz használt egyéb vegyszerek, oldatok és anyagok

- TE puffer: 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.
- RNáz A: 10 mg/ml oldat (Thermo Scientific)
- Lizozim (Sigma): 50 mg/ml oldat 20 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA és 1,2% Triton tartalmú pufferben oldva.
- Proteináz-K (AppliChem): 20 mg/ml, desztillált vízben oldva.
- üveggyöngyök: 212-300 µm mérettartományban (Sigma).

4.3.3. Az agaróz gélelektroforézishez használt anyagok

- TBE puffer: 1 l-hez, 10,8 g Tris (pH 8); 5,5 g bórsav; 0,75 g EDTA
- Agaróz gél: 1%-os agaróz (SeaKem LE, Lonza) TBE pufferben
- GelRed nucleic acid stain: 10000x desztillált vízben oldva (Biotium)
- Loading oldat: 40 % szacharóz; 0,25 M brómfenolkék, 0,2 M EDTA; pH 8
- DNS molekulasúly markerek: BenchTop 100bp DNA Ladder (Pomega), FastRuler Middle Range DNA Ladder (Thermo Scientific)

4.3.4. A PCR és qPCR során alkalmazott enzimek és egyéb anyagok

- Nukleotidok: 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Sigma)
- **Taq polimeráz**: DreamTaq Green DNS polimeráz és a gyártó által forgalmazott puffer (Thermo Scientific)
- **qPCR polimeráz**: Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific).

4.3.5. Az in vitro emésztési modellben alkalmazott emésztőnedvek

Az *in vitro* emésztési modell kiindulási alapjául Oomen és mtsai. (2003) által kifejlesztett, majd Versantvoort és mtsai. (2005) által módosított technikát használtuk fel.

4.3.6. A PCR termékek tisztításához a következő kiteket alkalmaztuk

A PCR termékek közvetlen tisztításához a GeneJET PCR Purification Kitet (Thermo Scientific), míg a fragmentumok agaróz gélből történő visszaizolálásához a GeneJET Gel Extraction Kitet (Thermo Scientific) alkalmaztuk. Mindkét Kitet a gyártó utasításai szerint használtuk fel.

4.3.7. A PCR reakció során alkalmazott primerek

A 16S rDNS szekvenciák felamplifikálásához és a baktériumok menyiségi mehatározásához saját tervezésű fajspecifikus primereket alkalmaztunk. A primereket 5 μ M koncentrációban használtuk fel.

4.3.8. A kompetens sejt készítéséhez és transzformálásához alkalmazott kitek

Az *E. coli* XL1-Blue törzséből kompetens sejteket a Mix & Go *E. coli* Transfromation Kit & Buffer Set (Zymo Research) segítségével készítettük el. A kompetens sejtek transzformálását a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre.

4.3.9. A plazmid izolálás (minilizátum készítés) oldatai (Kovalenko és mtsai., 1994)

- Lysis puffer 5 ml-re: 3,33ml 30 % glükóz; 0,5 ml 1 M Tris (pH 8); 0,5 ml 200 mM EDTA; 0,67 ml víz; kiegészítve 2 mg/ml lizozimmel
- SDS oldat 10ml-re: 8,8 ml víz; 1 ml 10 % SDS; 0,2 ml 10 M NaOH
- High salt oldat: 3 M Na-acetát, ecetsavval pH 4,5-re állítva

4.3.10. Egyéb vegyszerek

- pH állításhoz különböző töménységű NaOH és HCl oldatok.
- hígító oldat baktérium hígítási sorok készítéséhez: 8,5 g/l NaCl, 1 g/l tripton.
- laktulóz (Sigma) prebiotikus index számításához

4.4. Alkalmazott módszerek

4.4.1. A kémiai emésztés in vitro modellezése

Az emésztőnedveket mesterségesen készítettük el a kísérletek kezdetekor a 4.3.5 pontban leírtak szerint. Az emésztési folyamatot 37 °C-on, folyamatos kevertetés mellett hajtottuk végre. 4,5 g mintához (amely lehet mesterséges szubsztrátkeverék vagy "valódi" élelmiszerminta, esetleg egyéb vizsgálandó anyag) 6 ml nyálat adunk, és öt percig mágneses keverővel kevertetjük, majd 12 ml gyomornedvet adunk hozzá. Ellenőrizzük a minta pH értékét és hőmérsékletét, majd beállítjuk a megfelelő paramétereket, és két óráig kevertetjük. Az inkubációs idő lejártával 12 ml vékonybélnedvet, 6 ml epeváladékot és 2 ml NaHCO₃ oldatot adunk hozzá. Ismét ellenőrizzük, és szükség esetén beállítottuk a minta pH értékét és hőmérsékletét, majd további két órán keresztül kevertetjük. Nagyobb mennyiségű minta vizsgálatakor a mintából és az emésztőelegyekből is arányosan többet alkalmaztunk. A kémiai emésztés modellezését a **3. ábrán** bemutatott készülék (Atlas automata szintézis rendszer) segítségével végeztük el.



3. ábra: Az *in vitro* emésztési modell első szakaszát, vagyis a kémiai emésztést a bal oldali ábrán bemutatott készülékben végeztük el. A jobb oldali ábrán pedig a Biostat A+ fermentor látható, melynek segítségével a vastagbélben lezajló folyamatokat modelleztük.

4.4.2. Az in vitro bélmikrobióta modell felépítése

A mikrobióta modellt Rodes és mtsai. (2011) alapján állítottuk össze. A mikrobák anaerob tenyésztését 600 ml térfogatban Sartorius Biostat A+ fermentorral végeztük el anaerob alap tápoldatot alkalmazva **(3. ábra)**. Naponta a tenyészetből eltávolítottunk 200 ml-t, majd a különböző vizsgálandó anyagok törzsoldatából vagy a megemésztett tápanyagból 200 ml-t a fermentorhoz adagoltuk. A tenyésztés egyéb paramétereit folyamatosan kontrolláltuk (pH 6,4; 20 rpm kevertetés; 37 °C; **4. ábra**). A 96 órás tenyésztés során a kezdeti időpontban, illetve 24, 48, 72 és 96 óránként mintát vettünk a csíraszám meghatározása céljából, melyet szelektív agar lemezeken való tenyésztéssel követtük nyomon. Az egyes baktériumok tenyésztéséhez használt szelektív táptalajokat az **1. táb-lázat** mutatja be. A baktériumok fenntartását az egyes törzseknek megfelelő optimális körülmények közt végeztük el, de a keverék tenyészeteket mindig anaerob körülmények közt 37 °C-on tenyésztettük 1–3 napig (baktériumoktól függően).



4. ábra: A fermentáció folyamatának sematikus ábrázolása.

4.4.3. Genomi DNS izolálása baktériumokból

Munkánk során három különböző baktérium genomi DNS izoláló Kitet [GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma), Bacterial DNA Kit (VWR) és QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)] is alkalmaztunk a gyártók által ajánlott protokoll szerint, illetve hagyományos fenolos extrakcióval történő izolálást is kipróbáltuk. Végül az alábbi (elsősorban a QIAamp DNA Mini Kit oldatain alapuló) kombinált módszert alkalmaztuk mind a hat baktérium esetében:

A baktériumsejteket 10 percen keresztül 5000 rpm-en centrifugálással ülepítettük, majd a felülúszót eltávolítottuk. A baktérium pellethez 180 µl 50 mg/ml lizozim tartalmú oldatot adtunk és homogenizáltuk, majd 1 órán keresztül 37 °C fokon inkubáltuk. Ezután 200 µl AL puffert és 20 µl proteináz K-t adtunk a sejtekhez, és alaposan összekevertük (vortex), majd 30 percen keresztül 56 °C-on, majd 15 percen keresztül 95 °C-on inkubáltuk. A szuszpenzióhóz 25–50 mg-nyi üveggyöngyöt adtunk, és Tissue Lyser LT (Qiagen) homogenizáló készülék segítségével 5 percen keresztül 50 Hz-n rázattuk. A mintákhoz 10 µl RN-áz A oldatot adtunk, és további 5 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A feltárt minták további tisztítását a QIAamp DNA Mini Kit protokollja szerint végeztük el. Az elúciót 2x150 µl AE pufferrel végeztük el. A DNS minták koncentrációját Nanodrop ND 100 spectrophotometer-rel végeztük el, és a mintákat -20 °C tároltuk.

4.4.4. A PCR reakció körülményei

A PCR reakciókat T100 Thermal Cycler (Biometra) berendezés alkalmazásával végeztük el. Grádiens PCR segítségével meghatároztuk az általunk alkalmazott fajspecifikus primerek optimális tapadási hőmérsékletét. A legalacsonyabb hőmérséklet 50 °C volt, a legmagasabb pedig 70 °C. A program a következő hőmérsékleteket állította be automatikusan: 50,0; 51,4 53,8; 57,5; 62,0; 65,9; 68,5; 70,0 °C. A későbbiekben a PCR reakciót a primerek optimális tapadási hőmérsékletén végeztük el minden esetben.

A reakciót az alábbiak szerint mértük össze (25 μl végtérfogatra): 2,5 μl 10x DreamTaq puffer, 1-1 μl forward és reverz primer (5 μM), 0,5 μl dNTP mix (10 mM), 0,2 μl DreamTaq polimeráz enzim (5 U/μl), 17,8 μl bidesztillált víz és 2 μl DNS templát.

4.4.5. A qPCR reakció körülményei

A Real-Time PCR kísérleteket egy Corbett RotorGene 6000 típusú készülékkel végeztük el. Egy-egy reakciót az alábbiak szerint mértünk össze (20 µl-re):

2x Lumináris Color Master Mix:10 µl

forward primer	1 ul
rovorz primor:	1 µ1
	1 μι
bidesztillalt viz:	<u>6 µ1</u>
Osszesen: 18 µl + 2 µl DNS	

A qPCR program általában 40-50 ciklusból állt az alábbiak szerint:

Előkezelés:	50 °C, 2 perc
Elődenaturálás:	95 °C, 10 perc
Denaturálás:	95 °C, 15 másodperc
Annealing:	52 °C*, 30 másodperc
Elongáció:	72 °C, 30 másodperc

*: 52 °C vagy az egyes primereknek megfelelő tapadási hőmérséklet.

4.4.6. A PCR termékek elválasztása agaróz gélelektroforézissel

A keletkezett PCR termékek elválasztáshoz agaróz gélelektorforézist alkalmaztunk. 1%-os 15 cm x 15 cm-es vagy 15 cm x 10 cm-es agaróz gélen választottuk el a fragmentumokat. A géleket 1x-es TBE pufferben futattuk 70 mV, 90 mA-en kb. 1 órán keresztül Cleaver Scientific futtatókádat alkalmazva. Az agaróz gélhez a készítés során hozzáadtunk GelRed festéket, ami a fragmentumokat láthatóvá tette. A PCR termékekből általában 10 µl-t, a markerből pedig 3 µl-t vittünk fel. A géleket BioDocAnalyze (Biometra) készülék BioDoc Analyse 2.1 géldokumentáló- és kiértékelő szoftverének segítségével elemeztük.

4.4.7. A PCR termékek klónozása, baktérium transzformáció és plazmid izolálás

A PCR termékek ligálását és transzformálást a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre. A Kitben található pJET1.2/blunt vektor térképét az **5. ábra** mutatja be.



5. ábra: A pJET1.2/blunt vektor térképe. Forrás: http://www.thermoscientificbio.com

Mivel az általunk alkalmazott DreamTaq polimeráz 3'-dA túlnyúló véget generál a PCR termékekre, és a vektorba csak tompa végű (blunt end) fragmentumok ligálhatók, ezért szükség volt a PCR termékek túlnyúló végének leemésztésére, melyet a Kitben található DNA Blunting Enzyme segítségével végeztünk el. A ligálás és a transzformálás többi lépését a gyártó utasításai szerint végeztük el. A kompetens sejteket *E. coli* XL1-Blue törzséből készítettük el a Mix & Go *E. coli* Transfromation Kit & Buffer Set (Zymo Research) protokollját követve. Az alkalmazott vektor jellegzetessége, hogy egy letális gént

102 |

tartalmaz, mely nem fejti ki hatását, ha a ligálás során a PCR termék sikeresen beépül a vektorba, ezért transzformáns telepek meghatározására általában használt kék/fehér szelekció nem szükséges ezen vektor alkalmazása esetében. A 100 μg/ml ampicillin tartalmú LB táptalajokon csupán a ténylegesen transzformáns telepek képesek növekedni.

A baktériumsejtekből alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk a plazmidokat (Kovalenko és mtsai. 1994), és a későbbiekben a plazmid szekvenáltatásához a pJET1.2 frw/ rev primereket alkalmaztuk.

4.4.8. Szekvencia elemzése, összehasonlítása

A tisztított DNS minták mennyiségét Nanodrop alkalmazásával ellenőriztük, majd megszekvenáltattuk (Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország). A nyers szekvenciaadatok elemzését a Chromas programmal végeztük el, ezután a szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisában azonosítottuk a BLAST (Altschul és mtsai., 1990) kereső algoritmussal. A 16S rDNS szekvenciák összehasonlítását ClustalW programmal (Larkin és mtsai., 2007) végeztük el.

4.4.9. Prebiotikus index számítása

A prebiotikus anyagok jótékony hatásának számszerűsítésére a prebiotikus index (PI) szolgál, melynek meghatározását Palframan és munkatársai (2003) átal ismertetett technika alapján végeztük el. A módszer négy anaerob törzs növekedésének változását veszi figyelembe, és feltételezi, hogy a prebiotikus anyag jelenlétében a *Bifidobacterium* és *Lactobacillus* növekedése nagyobb mértékű, mint a *Bacteroides* és *Clostridium* törzsek növekedése. Ebben az esetben a PI egy pozitív érték. Ha ez nem valósul meg, akkor egy negatív értéket kapunk, ami azt jelenti, hogy az adott anyag nem prebiotikus hatású. A prebiotikus indexet az alábbi egyenlet alapján kell kiszámolni:

PI = (Bif/Total) – (Bac/Total) + (Lac/Total) – (Clos/Total) Az egyenletben szerepelő jelölések a következők:

Bif: a *Bifidobacterium* csíraszáma a mintavétel/inokuláció időpontjában,

Bac: a *Bacteroides* csíraszáma a mintavétel/inokuláció időpontjában, Lac: a *Lactobacillus* csíraszáma a mintavétel/inokuláció időpontjában, Clos: a *Clostrdium* csíraszáma a mintavétel/inokuláció időpontjában, Total: a négy baktérium csíraszámának összege a mintavétel/inokuláció időpontjában.

Például ha a *Bifidobacterium* csíraszáma a mintavétel időpontjában 6,2x10⁷, az inokuláció időpontjában 3,2x10⁵, akkor a Bif értéke 6,2x10⁷/3,2x10⁵, vagyis 193,75.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A vastagbél-mikrobióta modellezése során alkalmazott baktériumok telepszámváltozásának nyomon követése szelektív táptalajon

Munkánk során a különböző élelmiszer-komponensek, illetve adalékanyagok (pl. prebiotikumok) a vastagbélben lévő mikrobákra gyakorolt hatását tanulmányoztuk, különös tekintettel a jótékony hatású, probiotikus törzsekre. Az egyes hatóanyagokat emésztetlenül vagy a korábban említett *in vitro* emésztési modellel megemésztve adtuk a vastagbél-mikrobiótát modellező rendszerünkhöz (az alkalmazott hat baktériumot az

104 |

1. táblázat mutatja be). Kísérleteink során többek közt azt vizsgáltuk, hogy ezek a hatóanyagok milyen mértékben befolyásolják a baktériumok szaporodását. A baktériumok telepszám-meghatározását az egyes mikroorganizmusnak megfelelő szelektív táptalajon végeztük el. Korábbi tapasztalataink alapján megállapítottuk, hogy a fermentáció során a baktériumok csíraszáma kb. 10⁴ és 10⁹ CFU/ml közt változik (colony forming unit, telepformáló egység), ezért a fermentorból vett mintákból ennek megfelelően készítettünk tízes léptékű hígítási sorokat 1 ml mintához 9 ml steril hígító folyadékot adva. A későbbi qPCR kalibrációs és DNS izolálási kontrollkísérleteknél a baktériumok tiszta tenyészetét is ennek megfelelően hígítottuk. A baktériumok telepszámának meghatározását a **6. ábrán** bemutatott módon hajtottuk végre.



6. ábra: Két baktérium hígítási sorának foltban oltása szelektív táptalajokra (25 μl tenyészet/folt). Balra *Lactobacillus casei* hígítási sorának foltban oltása MRS táptalajon. Jobbra *Enterococcus faecium* hígítási sorának foltban oltása CEA táptalajon.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a szelektív táptalajon történő telepszám-meghatározás nem a legoptimálisabb módszer, mivel az egyes baktériumok tenyésztési ideje három nap, vagyis a 3-4 napos fermentáció kezdetén vett mintákat csak a fermentáció végén tudtuk kiértékelni, és így az esetleges időközbeni beavatkozás (a fermentáció paramétereinek módosítása vagy akár leállítása – pl. ha egy-egy baktérium nem szaporodik megfelelően) nem lehetséges. A keverék tenyészetek szélesztése szintén felvetett egy újabb problémát: a szelektív táptalajok alkalmazása nem jelenti azt, hogy egy-egy petricsészén csak egyféle baktérium képes növekedni. Ez igaz az E. coli és a Bacteroides esetében, de bizonyos esetekben akár négy baktérium is képes növekedni egy adott táptalajon (pl. BIF). Ez azonban nem jelenti azt, hogy ezek a táptalajok nem szelektívek, hiszen telepmorfológia és telepszín alapján az egyes mikrobák jól elkülöníthetőek (7. ábra). Az MRS és CEA táptalajokon a Lactobacillus és az Enterococcus is képes növekedni, de telepmorfológia alapján megkülönböztethetőek. A TSC táptalajon csak a Clostridium képez fekete telepeket, míg a módosított, kazein tartalmú BIF táptalajon csak a Bifidobacterium képes kicsapni a kazeint. Tehát az egyes baktériumok elkülöníthetőek, de keverék tenyészetek esetében ez jelentősen megnehezíti, sőt bizonyos esetekben lehetetlenné teszi a pontos telepszám meghatározást (pl. ha a "szennyező" baktériumokból 2-3 nagyságrenddel több van, mint abból, amit vizsgálni szeretnénk;



pl. hiába különíthető el a fekete színű telepeiről a *Clostridium*, ha nő mellette több száz/ ezer fehér telep).

 7. ábra: A hat baktérium növekedése a hatféle szelektív táptalajon. A szelektív táptalajok rövidítéseit az 1. táblázat tartalmazza.
Pirossal emeltük ki a megfelelő táptalaj-baktérium kombinációkat.

5.2. A 16S RNS alapú primerek tervezése és a PCR reakció optimalizálása

Munkánk során célunk volt egy olyan baktériummennyiség-meghatározó módszer kifejlesztése, amely gyorsabb, specifikusabb és pontosabb a szelektív táptalajon történő tenyésztésnél. A baktériumok mennyiségének nyomon követésére irodalmi adatok alapján a qPCR technikát választottuk, mivel számos esetben alkalmazták hasonló célra elsősorban 16S rDNS szekvenciákhoz tervezett specifikus primerekkel (pl. székletminták; Matsuki és mtsai., 2002). Mivel a baktériumok 16S rDNS szekvenciájáról rengeteg információ található (adatbankok, tudományos cikkek stb.), széles körben alkalmazzák különböző vizsgálatokra, ezért mi is a 16S RNS alapú primerek alkalmazását tűztük ki célul.

Első lépésként azonban a laboratóriumunkban korábban alkalmazott fajspecifikus primereket teszteltük. Az általunk alkalmazott hat baktérium közül négy esetében (*E. coli, Enterococcus, Lactobacillus* és *Bifidobacterium*) találtunk qPCR-hez alkalmazható primerpárokat, de ezek nem működtek megfelelően, hiszen mindegyik primer adott terméket mindegyik baktériummal (**8. ábra**). Ezeket a primereket korábban arra használtuk, hogy a nekik megfelelő baktériumtörzseken bizonyos szekvenciarészeket azonosítsunk, és nem az volt a cél, hogy az összes többi baktériumon ne működjenek, ezért nem volt meglepő az eredmény.



 8. ábra: Korábban a laboratóriumban használt négy primerpár agaróz gélektroforetikus képe a hat baktérium esetében. 1 = Escherichia coli, 2 = Enterococcus feacium, 3 = Lactobacillus casei, 4 = Bifidobacterium longum, M = BenchTop 100bp DNA Ladder (Pomega). A baktériumnevek rövidítései: E.c.: Escherichia coli, En.f.: Enterococcus feacium, L.c.: Lactobacillus casei, B.l.: Bifidobacterium longum, C.p.: Clostridium perfringens, B.f.: Bacteroides fragilis.

Ezután olyan irodalmi adatok alapján terveztünk 16S rDNS alapú primereket, ahol ezt a rendszert a bélmikrobióta mennyiségi változásainak, illetve összetételének vizsgálatára alkalmazták (Rinttila és mtsai., 2004; Malinen *és mtsai., 2003; Matsuki és mtsai.,* 2002). Néhány primer megfelelően működött, de bizonyos esetekben egy specifikus termék helyett több aspecifikus termék keletkezett, melyet a PCR körülményeinek optimalizálásával (hőmérséklet grádiens PCR, MgCl₂ koncentráció változtatása) sem voltunk képesek kiküszöbölni (**9. ábra**).



9. ábra: Irodalmi adatok alapján tervezett *Clostridium*, illetve *Bacteroides* primerpárok hőmérséklet gradiens PCR-ének agaróz gélelektroforetikus képe. A megfelelőnek tűnő primerek esetében sem volt mind eléggé fajspecifikus. Ezért úgy döntöttünk, hogy mind a hat baktériumot megszekvenáltatjuk, és a szekvenciaadatok alapján tervezünk "saját" specifikus primereket. Minden baktériumban a riboszómális RNS gének clusterekben fordulnak elő, és minden esetben a 16S RNS-t követi a 23S RNS génje, ezután pedig az 5S RNS génje található (**10. ábra**). Ezt a felépítést kihasználva terveztünk általános primereket a 23S RNS gén elejére (reverse primer) és fajspecifikus primereket a 16S RNS előtti intergénikus részekre (forward primer). Ezen primerek segítségével felamplifikáltuk a teljes 16S RNS gént (és 3', illetve 5' irányban lévő intergénikus szakaszok egy részét).



10. ábra: Az rRNS gének általános felépítése a baktériumokban. A nyilak a 16 S RNS gén előtti intergénikus részekre, illetve a 23S RNS gén elejére tervezett primereket jelölik.

A PCR termékeket a legtöbb esetben agaróz gélben megfuttattuk, visszaizoláltuk és szekvenáltattuk. A szekvenáló cégtől kapott nyers szekvenciaadatokat Chromas programmal elemeztük, és NCBI adatbázisában azonosítottuk a BLAST kereső algoritmussal. Bizonyos esetekben a teljes gén végigszekvenálásához belső primereket is alkalmaznunk kellett, melyek szintén saját tervezésűek, és mind a hat baktériumon működtek. Az azonosított szekvenciarészeket összeillesztettük, és a végső 16S RNS gének szekvenciaadatait az **2. táblázatban** foglaltuk össze.

Baktériumok	16S RNS gén mérete	adatbanki szám*
Bacteroides fragilis ATCC 25285	1533 bp	KP326374
Bifidobacterium longum DSM 20088	1537 bp	KP326372
Clostridium perfrigens ATCC 13124	1518 bp	KP326373
Enterococcus faecium NCAIM B.01181	1548 bp	KP326370
Escherichia coli ATCC 25922	1541 bp	KP326369
Lactobacillus casei DSM 20011	1574 bp	KP326371

2. táblázat: Az in vitro emésztési modellben alkalmazott hat baktérium 16S RNS génjeinek adatai. *: az NCBI honlap alapján (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).



11. ábra: A hőmérséklet gradiens PCR eredménye négy specifikus primerpár esetében. E. c.: *Escherichia coli*, En. f.: *Enterococcus faecium*, L. c.: *Lactobacillus casei*, B. l.: *Bifidobacterium longum*. Az agaróz gélelektroforézis során Bench-Top 100 bp DNA Ladder (Pomega) molekulasúly markert alkalmaztuk.

A 16S rDNS szekvenciákat ClustalW programmal hasonlítottuk össze a leginkább eltérő részek azonosítása céljából. A 16S RNS gén tartalmaz olyan régiókat, melyek minden baktériumban nagyon hasonlóak (konzerváltak), de vannak olyan szekvenciarészek is, amelyek jelentősen eltérnek – ez utóbbi részekhez terveztünk fajspecifikus primereket.

Az új, részben saját szekvenciáink, részben az irodalmi adatok alapján tervezett primerek esetében először hőmérséklet grádiens PCR segítségével meghatároztuk az optimális tapadási hőmérsékletet. A hőmérséklet grádienst 50–70 °C-ra állítottuk be mind a hat primerpár esetében (**11. ábra**). Optimális tapadási hőmérsékletnek azt a legmagasabb értéket választottuk, ahol még jelentős mennyiségű PCR termék keletkezett a reakcióban. A fajspecifikusság vizsgálata során mind a hat primerpárt összemértük mind a hat baktériumból izolált DNS-sel, azt az eredményt várva, hogy mindegyik primerpár csak a saját DNS templátján működik, amit a **12. ábra** is igazol. Megállapíthatjuk tehát, hogy ezek a primerpárok ténylegesen alkalmasak a hat baktérium szelektív elkülönítésére.



12. ábra: A primerpárok tesztelése mind a hat baktériumon. A DNS minták és a primerek jelölése A-tól F-ig a következőképpen: A = Escherichia coli, B = Enterococcus faecium, C = Lactobacillus casei, D = Enterococcus faecium, E = Bifidobacterium longum, F = Bacteroides fragilis, M = BenchTop 100 bp DNA Ladder (Pomega)

5.3. A DNS izolálás és a qPCR körülményeinek optimalizálása

Munkánk során különböző mennyiségű (általában 10⁴-10⁹ CFU/ml) baktériumtartalmú minták telepszámának a meghatározását tűztük ki célul. Ezért egy olyan DNS izolálási módszert dolgoztunk ki, amely azonos hatékonysággal képes nukleinsav izolálására hígabb/töményebb mintákból azt is figyelembe véve, hogy az általunk alkalmazott mikrobák egy része Gram negatív, másik része Gram pozitív (ez utóbbiakból jóval nehezebb a DNS izolálása a sejtfal-szerkezetbeli eltérések miatt). Munkánk kezdetén viszonylag tömény (10⁸-10⁹ CFU/ml) baktérium tiszta tenyészetekből izoláltunk DNS-t, és három különböző Kit feltárási hatékonyságát teszteltük. Megállapítottuk, hogy a QIAamp DNA Mini Kit szolgáltatja a legtöbb nukleinsavat. Ha azonban a baktériumokból 10es léptékű hígítási sorokat készítettünk (ezzel szimulálva a "valós" minták alacsonyabb sejtszámát), és ezekből izoláltunk DNS-t, akkor önmagában ez a Kit sem volt megfelelő. Ezért úgy döntöttünk, hogy a különböző Kitek protokolljai alapján egy kombinált technikát alkalmazunk, melynek során kétféle enzimes kezelést (lizozim, proteináz K), két lépcsős hőkezelést (56 °C és 95 °C) és üveggyöngyökkel történő fizikai feltárást is alkalmaztunk a 4.4.3 fejezetben leírtak szerint.



13. ábra: A tiszta és keverék DNS minták qPCR amplifikációs képe mind a hat primerpár esetében. A = Escherichia coli, B = Enterococcus faecium, C = Lactobacillus casei, D = Bifidobacterium longum, E = Clostridium perfringens, F = Bacteroides fragilis. Az ábra jobb oldalán a "K" jelölés a keverék DNS-re utal. A legtöbb esetben a négy PCR termék amplifikációs képe egybeesik, kivéve a Bifidobacterium esetében, ahol az egyik "D" jelű minta nem adott értékelhető jelet.

A tiszta tenyészetek feltárása után azt szerettük volna igazolni, hogy azonos hatékonysággal tudunk DNS izolálni ugyanabból a baktériumból akkor is, ha mind a hat baktériumot tartalmazó keveréktenyészetet tárjuk fel. Ehhez mind a hat baktérium izolált DNS-ével és ezek 1:1 arányú keverékével qPCR reakciót mértünk össze. A keverék DNS minta minden baktériumra nézve ugyanannyi DNS-t tartalmazott, mint a hatféle baktériumból izolált "tiszta" DNS. A hatféle DNS mintát összemértük mind a hat specifikus primerpárral, és a keverék DNS minta esetében is ugyanígy jártunk el. A qPCR reakció során két ismétlésben mértük össze a reakciót, és megállapítottuk, hogy egy-egy specifikus primerpár esetében ugyanannyi mennyiségű termék képződik a tiszta és a kevert DNS minták esetében is (**13. ábra**). Ez azt jelenti, hogy a qPCR során is megfelelő specifitással működtek a szelektív primerek, és nem keletkezett melléktermék abban az esetben sem, ha a primerek target DNS-e mellett öt másik baktérium DNS-ét is tartalmazta a minta. Ezt a PCR termékek olvadási görbéjének analízise is alátámasztotta.

Miután megállapítottuk, hogy a tiszta és a keverék DNS minták esetében is ugyanolyan hatékonyan működnek a specifikus primerpárok, arra voltunk kíváncsiak, hogy ha nem DNS mintákat keverünk össze, hanem baktériumokból készítünk tiszta és keverék tenyészeteket, akkor miben módosul az eredmény. Vagyis azt szerettük volna megállapítani, hogy a baktériumok feltárása ugyanolyan hatékonyságú abban az esetben is, ha a tenyészet a vizsgálandó baktériumon kívül más baktériumokat is tartalmaz (ezzel modellezve a későbbiekben vizsgálandó valós, fermentorból származó mintákat). Mind a hat baktériumból egy-egy szuszpenziót készítettünk, majd ezekből egy olyan keveréket, amely mind a hat baktérium esetében ugyanannyi mikrobát tartalmazott, mint a neki megfelelő tiszta tenyészet. Mind a hét mintát feltártuk és qPCR segítségével (két-két ismétlésben), összehasonlítottuk a tiszta és kevert tenyészetek DNS tartalmát mindegyik baktérium esetében (**14. ábra**).



14. ábra: A tiszta és a keverék tenyészetekből izolált DNS mennyiségi meghatározása qPCR segítségével. Az azonos színek az azonos baktériumot jelölik, és egy színen belül a két sötétebb vonal a tiszta tenyészetek, míg a két világosabb vonal a keverék tenyészetek amplifikációs görbéit jelölik.

Megállapítottuk, hogy a legtöbb baktérium esetében a két-két tiszta, illetve keverék tenyészetet jelölő amplifikációs görbe szinte egybeesik, csupán a *Lactobacillus* esetében látható kismértékű eltérés. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a keverék tenyészetekből ugyanolyan hatékonysággal tudunk DNS-t izolálni és kimutatni, mint a tiszta tenyészet esetében.

5.4. Baktérium mennyiségi meghatározás kalibrációs sorok alapján

A baktérium mennyiségi meghatározás első lépéseként a qPCR érzékenységét és a kalibrációs görbe linearitását teszteltük különböző mennyiségű DNS tartalmú mintákkal. E. coli tenyészetéből kb. 109 sejt/ml baktérium szuszpenziót készítettünk, majd ebből a tömény mintából DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-ből tízes léptékű hígítási sort készítettünk TE pufferrel (egészen 107-szeres hígításig, ami kb. 100 E. coli genom ekvivalens DNS-t tartalmazott), és ezzel határoztuk meg a detektálási limitet. A qPCR reakciót két párhuzamosban végeztük el, és a kalibrációs egyenest az egyes minták átlagolt Ct értékei alapján készítettük el. Az egyenes paraméterei (R2 = 0,999, reaction efficiency = 0,977 stb.) megfeleltek elvárásainknak.

Megállapítottuk, hogy 102-109 sejt/ml-nek megfelelő DNS tartalmú minták amplifikációs görbéi alapján készített kalibrációs egyenes végig lineáris, és a mérési pontok megfelelően illeszkednek rá, bár a leghígabb minta esetében a két párhuzamos görbéje kissé eltért egymástól (az összes többi hígítás esetében az eltérés minimális). Az általunk tapasztalt eredmény egybeesik az irodalomban leközölt adatokkal (Rintilla és mtsai., 2011). Tehát a rendszer méréstartománya megfelelő a későbbiekben a baktérium hígítási sorokból (104-109 CFU/ml) izolált DNS-ek mérésére.

Bár az ismert mennyiségű baktériumból izolált DNS mintából készült hígítási sorok is alkalmasak ismeretlen töménységű baktériumminta DNS mennyiségének (és ezáltal telepszámának) meghatározására, úgy döntöttünk, hogy a baktériumokból készítünk hígítási sorokat, és ezek alapján fogjuk az ismeretlen töménységű mintákat meghatározni. Erre azért volt szükség, mert véleményünk szerint ez jobban modellezi a valós minták egymástól lényegesen eltérő sejtszámát, bár a baktérium hígítási sorok esetében sokkal több a hibalehetőség (előfordulhat, hogy különböző hatékonysággal táródik fel egy híg és egy tömény baktérium szuszpenzió), de pontosan ezeket a hibákat hagynánk figyelmen kívül abban az esetben, ha DNS hígítási sorok alapján határoznánk meg a telepszámot.

A baktériumok pontos mennyiségi meghatározásához mind a hat baktérium esetében először kalibrációs sorokat készítettünk el. A baktériumokból kb. 109 CFU/ml szuszpenziót állítottunk elő, majd hígító folyadékkal tízes léptékű hígítási sort készítettünk. Minden tagból 100-100 ml-t szelektív táptalajokra szélesztettünk az élő sejtszám meghatározása céljából, és egy-egy ml mintából DNS-t izoláltunk.

A szélesztéshez és a qPCR alapú mennyiségi meghatározáshoz kezdetben 103 és 102 CFU/ml szuszpenziót is készítettünk és feltártunk, de megállapítottuk, hogy az ennyire híg mintákból izolált DNS esetében már nem működött megfelelő hatékonysággal a qPCR reakció (bár a DNS hígítási sorok alkalmazásakor még ezek a minták is a lineáris tartományba estek). Ez azonban nem jelentett problémát a későbbiekben, mivel a valós mintáink kezdeti telepszáma kb. 104 CFU/ml, és a fermentáció során ez emelkedik vagy stagnál, de sejtszámcsökkenést nem tapasztaltunk a kísérleteink során. Az izolált DNS mintákkal qPCR reakciót hajtottunk végre, és az amplifikációs görbék alapján kalibrációs egyeneseket készítettünk el a szélesztés során kapott telepszám adatok felhasználásával. A folyamat lépéseit csupán egy baktérium (*E. coli*) esetében mutatjuk be részletesen, de mind a hat baktérium kalibrációs görbék et a **15. ábra** mutatja be.



15. ábra: *Escherichia coli* hígítási soraiból (104-109 CFU/ml) izolált DNS minták amplifikációs görbéje.

112 |

A kalibrációs görbe felvételéhez a szélesztés során kapott telepszámokat használtuk fel. Az egyes hígítási tagokhoz tehát nem egy bizonyos DNS koncentrációt rendeltünk hozzá, hanem egy telepszám/ml értéket, így a későbbiekben a kalibrációs sor alapján közvetlenül az ismeretlen minta telepszámát fogjuk megkapni. Miután minden egyes taghoz hozzárendeltük a megfelelő telepszámértékeket, szoftveresen meghatároztuk a megfelelő küszöbvonal értéket (treshold), és ez alapján a minták Ct értékét. A két párhuzamos reakció alapján határoztuk meg a kalibrációs egyenes paramétereit.

Végül a kalibrációs egyenes alapján kiszámítottuk az egyes pontokhoz tartozó telepszámértékeket (**16. ábra**). Az ábrán a "given conc" értékek jelölik a telepszámolás során kapott értékeket, vagyis azt az elméleti "baktérium koncentrációt", amely egy-egy hígítási taghoz tartozik. A "calc conc" értékek a kalibrációs egyenes egyenlete alapján kiszámolt, az adott ponthoz tartozó értékeket jelölik. A %-os eltérések bizonyos esetben nagynak tűnhetnek, de a szélesztés során is jelentős eltérés lehet azonos minta független szélesztése közt. Pl. 1x10⁸ helyett a következő alkalommal 2x10⁸ értéket határozunk meg, akkor az nem számít jelentős eltérésnek, de valójában az egyik szám duplaakkora, mint a másik (vagyis +100% eltérés). A telepszám meghatározása során ez azonban elfogadható szórásnak számit. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a kallibrációs egyenesek megfelelően pontosak, és nincs nagymértékű eltérés a molekuláris biológiai módszerrel és szélesztéssel meghatározott telepszámok közt (**17. ábra**).

No.	Colour	Name	Туре	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)	% Var
1		A9	Standard	13,08	838 000 000	855 323 522	2,1%
2		A9	Standard	13,04	838 000 000	878 533 449	4,8%
3		A8	Standard	16,72	82 100 000	76 441 530	6,9%
4		A8	Standard	16,70	82 100 000	77 275 261	5,9%
5		A7	Standard	20,21	7 230 000	7 544 207	4,3%
6		A7	Standard	20,12	7 230 000	8 044 422	11,3%
7		A6	Standard	23,82	710 000	693 490	2,3%
8		A6	Standard	23,81	710 000	697 433	1,8%
9		A5	Standard	27,15	83 300	75 842	9,0%
10		A5	Standard	27,12	83 300	77 438	7,0%
11		A4	Standard	30,74	7 790	7 033	9,7%
12		A4	Standard	30,25	7 790	9 759	25,3%

16. ábra: *Escherichia coli* hígítási soraiból (10⁴-10º CFU/ml) készített kalibrációs egyenes alapján meghatározott baktérium-telepszámok.

A többi baktérium esetében is hasonlóképp jártunk el, vagyis az adott mikroba hígítási sorából egyrészt szélesztéssel meghatároztuk a telepszámot, másrészt DNS-t izoláltunk, és a qPCR kalibrációs görbéit ezen hígítási sorok alapján készítettük el. A hígítási sorok általában 10⁴-10⁹ sejt/ml baktériumot tartalmaztak, mivel az emésztési modellben az egyes baktériumok telepszáma ebbe a tartományba esik. A hígítási sorokból történő DNS izolálást és a specifikus primerek segítségével történő kalibrációs görbék készítését mind a hat baktérium esetében elvégeztük. Mind a hat baktérium szélesztéssel és qPCR technikával kapott eredmények összehasonlítását a **17. ábra** mutatja be.



Enterococcus kalibrációs sor



Clostridium kalibrációs sor



Lactobacillus kalibrációs sor



Bifidobacterium kalibrációs sor



Bacteroides kalibrációs sor



17. ábra: A hat baktérium telepszámának meghatározása hígítási sorból szélesztéssel (kék oszlop), illetve qPCR technikával (piros oszlop) két ismétlés átlaga alapján.

A kalibrációs sorok alapján tudtuk meghatározni az ismeretlen koncentrációjú minták telepszámát, melyet *Clostridium* esetében mutatunk be részletesen. Ebben az esetben "ismeretlen" minták telepszámát szélesztéssel is meghatároztuk, melyet kontrollként használtunk a molekuláris biológiai módszer tesztelése során. Az ismeretlen mintákból is DNS-t izoláltunk, és elvégeztük a qPCR reakciót, majd a korábbi kalibrációs sorok alapján meghatároztuk a minták telepszámát, melyet összehasonlítottunk ugyanezen minták szélesztésével (**18 ábra**). A kétféle módszerrel kapott eredmény között csak kismértékű eltérés tapasztalható, vagyis a kvantitatív Real-Time PCR alapú technika al-kalmas a baktériumtenyészetek hozzávetőleges telepszámának meghatározására.





18. ábra: Ismeretlen töménységű *Clostridium* minták mennyiségi meghatározása qPCR technikával. Fent: a kalibrációs sor (10⁴-10⁹), valamint a két ismeretlen minta (I1 és I2) amplifikációs képe. Lent: A szélesztéssel és qPCR technikával meghatározott telepszámok összehasonlítása.

5.5. Valós minta baktériumszámának meghatározása prebiotikus adalékanyag hatására

Bár munkánk elsődleges célja egy olyan módszer fejlesztése volt, mely alkalmas az *in vitro* emésztési modellben alkalmazott hat baktérium pontos és gyors mennyiségi meghatározására, szeretnénk bemutatni egy példamérést is, melynek során egy valós minta prebiotikus hatását mértük ki. A prebiotikus anyagok szervezetünk számára emészthetetlenek, és a vastagbélbe jutva szelektíven serkentik az ott élő jótékony baktériumokat (az *in vitro* modell esetében az a *Lactobacillus casei*t és a *Bifidobacterium longum*ot jelenti). Vagyis a prebiotikus anyag hatására a jótékony baktériumok telepszáma nagyobb mértékben növekszik, mint a többi bélrendszerünkben elő baktériumé. Ez a hatás számszerűsíthető, neve prebiotikus index (ld. még 4.4.10).



19. ábra: A négy anaerob baktérium telepszáma a beoltást és 22 óra inkubációt követően.

Munkánk során a hattagú mikrobaközösség táptalajához 1% laktulózt adtunk, amely közismert prebiotikus anyag. Meghatároztuk a baktériumok telepszámát a beoltást követően, illetve 22 óra inkubálást követően. Kontrollként ugyanezeket a kísérleti paramétereket alkalmaztunk, de a táptalaj nem tartalmazta a prebiotikus anyagot. A prebiotikus index számításához csak az anaerob mikrobákat kell figyelembe venni (*Lactobacillus casei, Bifidobacterium longum, Clostridium perfringens* és *Bacteroides fragilis*), ezért a **19. ábrán** csak ezek telepszámváltozását tűntettük fel. A könnyebb áttekinthetőség véget az ábrán a telepszámokat a korábbiakhoz hasonlóan 10-es alapú logaritmikus értékekben adtuk meg, de a prebiotikus index számításakor nem a logaritmikus értékeket kell alkalmazni. A kontroll tápoldat prebiotikus indexe -0,58, ami azt jelenti, hogy nincs prebiotikus hatás. Ez teljesen természetes, mivel semmilyen adalékanyagot nem tartalmaz. Az 1% laktulózzal kiegészített minta prebiotikus indexe 2,58, ami azt jelenti, hogy a táptalaj tartalmaz prebiotikus anyagot. Irodalmi adatok alapján a laktulóz 24 órás prebiotikus indexe kb. 3, amit a mi 22 órás eredményünk is alátámaszt.

A későbbiekben természetesen nemcsak igazoltan prebiotikus hatású anyagok vizsgálatát fogjuk elvégezni, hanem számos egyéb anyagét is, illetve az emésztési modell segítségével kívánjuk nyomon követni az élelmiszerek prebiotikus adalékanyagainak változásait.

6. Összefoglalás

Munkánk során az *in vitro* vastagbél modellünkben alkalmazott hat baktérium mennyiségi változásainak nyomon követésére alkalmas molekuláris biológiai technikát dolgoztunk ki. Megállapítottuk, hogy a szelektív táptalajokon történő tenyésztés nem minden esetben alkalmas minden baktérium telepszámának pontos és gyors meghatározására, mivel a lassabban növekvő anaerob mikrobák esetében a tenyésztési idő három nap, és a legtöbb szelektív táptalajon egynél több baktérium is képes növekedni. Irodalmi adatok alapján a kvantitatív Real-Time PCR technikát választottuk, melynek segítségével a baktériumokból izolált DNS mennyisége alapján tudjuk meghatározni a minták baktérium-telepszámát.

A baktériumok mennyiségi meghatározásához 16S rDNS alapú primereket terveztünk irodalmi adatok alapján, de ezek nem minden esetben voltak megfelelően szelektívek az általunk alkalmazott izolátumok esetében, ezért elvégeztük mind a hat baktérium 16S RNS génjének megszekvenálását. A kapott szekvenciaadatokat elemeztük és összehasonlítottuk, majd az eltérő részekhez saját tervezésű szelektív primereket készítettünk. A PCR reakció körülményeinek optimalizálása (pl. hőmérséklet gradiens PCR technika alkalmazásával) után teszteltük a szelektivitást, és megállapítottuk, hogy az általunk készített primerpárok fajspecifikusak, és alkalmasak a hat baktérium elkülönítésére. Elvégeztük a DNS izolálás optimalizálását is, erre azért volt szükség, mert olyan módszert szerettünk volna kidolgozni, amely azonos hatékonysággal képes nukleinsav izolálására hígabb/töményebb mintákból, azt is figyelembe véve, hogy az általunk alkalmazott mikrobák egy része Gram negatív, másik része Gram pozitív. Többféle DNS izolálási technikát is alkalmaztunk, és végül egy kombinált módszert dolgoztunk ki, amelyben kétféle enzimes kezelést (lizozim, proteináz K), két lépcsős hőkezelést (56 °C és 95 °C) és üveggyöngyökkel történő fizikai feltárást is alkalmaztunk. A qPCR reakció körülményeinek követően mind a hat baktérium esetében tízes léptékű hígítási sorokat készítettünk a kalibrációs sorok felvételéhez. A későbbiekben ezek segítségével sikeresen határoztuk meg különböző koncentrációjú ismeretlen minták baktériumszámát (a kapott eredményeket a szélesztés adataival hasonlítottuk össze).

Megállapíthatjuk, hogy sikeresen dolgoztunk ki egy olyan molekuláris biológiai technikát, amely szelektívebb és gyorsabb eredményt ad a baktériumok telepszám meghatározása esetében, mint a hagyományos táptalajokon történő szélesztés. A későbbiekben ezen módszer segítségével tervezzük a különböző élelmiszer-adalékanyagok bélmikrobióta modell baktériumközösségének összetételére gyakorolt hatásának vizsgálatát.7.

7. Irodalomjegyzék

- 1. Almaas, H., Cases, A., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T. és Aabakken, L. (2006). *In vitro* digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16: 961–968.
- 2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. és Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.

- 118
- **3.** Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. és Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4583–4594.
- Belanger, S. D., Boissinot, M., Clairoux, N., Picard, F. J. és Bergeron, M. G. (2003). Rapid Detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 730–734.
- 5. **Biehler**, E., Hoffmann, L., Krause, E. és Bohn, T. (2011). Divalent minerals decrease micellarization and uptake of carotenoides and digestion products into Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 141: 1769–76.
- 6. Cencic, A. és Langerholc, T. (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology-a review. International Journal of Food Microbiology, 141, Supplement 1: S4–14.
- 7. Chattertona, D. E. W., Rassmussen Heegaard, C. W., Sorensenb, E. S. és Petersenb, T. E. (2004). *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 373–383.
- 8. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., <u>Gill, S. R., Nelson, K. E., és Relman, D. A</u>. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635–1638.
- **9. Finegold**, S. M., Sutter, V. L., Sugihara, P. T., Elder, H. A., Lehmann, S. M., és Phillips, R. L. (1977). Fecal microbial flora in seventh day adventist populations and control subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 30, 1781–1792.
- **10.** Fooks, L. J. és Gibson, G. R. (2002). *In vitro* investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 67–75.
- **11. Fujita**, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T. és Koike, M. (2002). Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*, 37: 509–516.
- **12. Fukushima**, H., Tsunomori, Y. és Ryotaro Seki, R. (2003). Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5134–5146.
- **13. Gibson**, G. R. és Wang, X. (1994). Regulatory effects of Bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 412–420.
- **14. He**, Q., Wang, J-P., Osato, M. és Lachman, L. B. (2002). Real-Time Quantitative PCR for Detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3720–3728.
- **15. Hernot**, D. C., Boileau, T. W., Bauer, L. L., Middelbos, I. S., Murphy, M. R., Swanson, K. S. és Fahey, G. C. (2009). *In vitro* fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligo-saccharides, and polydextrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1354–1361.

- **16. Horváth**, A., Pető, Z., Urbán, E., Vágvölgyi, C. és Somogyvári, F. (2013). A novel, multiplex, real-time PCR–based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria. *BMC Microbiology*, 13: 300.
- **17. Kitabatake**, N. és Kinekawa, Y. I. (1998). Digestibility of bovine milk whey protein and β-lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46: 4917–4923.
- **18.** Kovalenko, S. A., Tanaka, M. és Ozawa, T. (1994). Simple methods for preparation of plasmid DNA yielding long and acurate sequence data. *Nucleic Acid Researc*, 22: 5771–5772.
- **19.** Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. és Higgins, D. G. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- **20.** Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. és Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022–1023.
- **21. Mafu**, A. A., Pitre, M. és Sirois, S. (2009). Real-time PCR as a tool for detection of pathogenic bacteria on contaminated food contact surfaces by using a single entichment medium. *Journal of Food Protection*, 6: 1156–1354.
- **22. Mahler**, G. J., Shuler, M. L. és Glahn, R.P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20: 494–502.
- 23. Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T. és Palva A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 59-nuclease assays and dot-blot hybridization with rD-NA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149: 269–277.
- 24. Mata, L. J., Carrillo, C., és Villatoro, E. (1969). Fecal microflora in health persons in a preindustrial region. *Journal of Applied Microbiology*, 17, 596–602.
- **25. Matsuki**, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H. és Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5445–5451.
- **26. Mayer**, H. K., Amtmann, E., Philippi, E., Steinegger, G., Mayrhofer, S. és Kneifel, W. (2007). Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17: 565–573.
- **27. McBain**, A. J. és Macfarlane, G. T. (1997). Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement*, 222: 32–40.
- **28. Meyer**, Á., (2004). Bifidobacteriumok izolálása, azonosítása, fiziológiai, biokémiai és funkcionális jellemzésük (PhD. dolgozat).

- 120 |
- **29. Minekus**, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G. és Huis in't Veld, J. H. (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 108–114.
- **30. Moore**, W. E. és Holdeman, L. V. (1974). Special problems associated with the isolation and identi- fication of intestinal bacteria in fecal flora studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 27, 1450–1455.
- **31. Murphy**, J., Nolan, T. és Bustin, S.A. (2013). Real-Time Quantitative PCR, Pathogen Detection and MIQE. Mark Wilks (szerk.), PCR Detection of Microbial Pathogens: Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 943.
- 32. Oomen, A. G., Rompelberg, C. J., Bruil, M. A., Dobbe, C. J., Pereboom, D. P. és Sips, A. J. (2003). Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 281–7.
- **33. Ott**, S. J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J. és Schreiber, S. (2004). Quantification of Intestinal Bacterial Populations by Real-Time PCR with a Universal Primer Set and Minor Groove Binder Probes: a Global Approach to the Enteric Flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2566–2572.
- **34. Palframan**, R., Gibson, G. R. és Rastall, R. A. (2003), Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 281–284.
- **35. Rekha**, R., Rizvi, M. A. és Jaishree, P. (2006). Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 505–511.
- **36. Rinttila**, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L. és Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1166–1177.
- **37. Rinttila**, T., Lyra, A., Krogius-Kurikka, L. és Palva, A. (2011). Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects. *Gut Pathogens*, 3: 6.
- 38. Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M. és Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104, Supplement 2: S1–63.
- **39.** Rodes, L., Paul, A., Coussa-Charley, M., Al-Salami, H., Tomaro-Duchesneau, C., Fakhoury, M. és Prakash, S. (2011). Transit time affects the community stability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in an *in vitro* model of human colonic microbiotia. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39: 351–356.
- **40. Sabboh-Jourdan**, H., Valla, F., Epriliati, I. és Gidley, M.J. (2011). Organic acid bioavailability from banana and sweet potato using an *in vitro* digestion and Caco-2 cell modell. *European Journal of Nutrition*, 50: 31–40.

- 41. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., és Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 859–904.
- 42. Simon, G. L. és Gorbach, S. L. (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, 86: 174–193.
- **43. Song**, Y., Liu, C. és Finegold, S. M. (2004). Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6459–6465.
- **44. Su**, P., Henriksson, A. és Mitchell, H. (2007). Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures *in vitro*. *Anaerobe*, 13: 134–139.
- **45.** Xing, G. H., Yang, Y., Chan, J. K. Y., Tao, S. és Wong, M.H. (2008). Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in different food using. *Environmental Pollution*, 156: 1218–1226.
- **46.** van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., és Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 143–153.
- **47. Venema**, K., van Nuenen, M. H. M. C., van den Heuvel, E. G., Pool, W. és van der Vossen, J. M. B. M. (2003). The effect of lactulose on the composition of the intestinal microbiota and short-chain fatty acid production in human volunteers and a computercontrolled model of the proximal large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15: 94–105.
- **48.** Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M. és Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from Food. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 31–40.
- **49.** Ward, L. J. H. és Timmins, M. J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90–92.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Juhász Ákosnak, aki szakértelmével, hasznos magyarázatával, önzetlen segítségnyújtásával és mélységes türelmével hozzájárult tudományos munkám megvalósításához, dolgozatom tökélete-sítéséhez.

Továbbá hálával tartozom Mikuska Katának, Fejes Zsuzsannának és dr. Pál Károlynak a laboratóriumban nyújtott segítségért és hasznos tanácsaikért.

Köszönöm dr. Váczy Kálmán Zoltán Főigazgató Úrnak, hogy munkám során biztosított számomra minden nélkülözhetetlen feltételt, mely nélkül dolgozatom nem készülhetett volna el.

9. Mellékletek

9.1. melléklet: A hat baktérium Real-Time PCR kalibrációs sora.

Az *E. coli* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes és adatai, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.



No.	Colou	r Name	Туре	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)	% Var
1		A9	Standard	13,08	838 000 000	855 323 522	2,1%
2		A9	Standard	13,04	838 000 000	878 533 449	4,8%
3		A8	Standard	16,72	82 100 000	76 441 530	6,9%
4		A8	Standard	16,70	82 100 000	77 275 261	5,9%
5		A7	Standard	20,21	7 230 000	7 544 207	4,3%
6		A7	Standard	20,12	7 230 000	8 044 422	11,3%
7		A6	Standard	23,82	710 000	693 490	2,3%
8		A6	Standard	23,81	710 000	697 433	1,8%
9		A5	Standard	27,15	83 300	75 842	9,0%
10		A5	Standard	27,12	83 300	77 438	7,0%
11		A4	Standard	30,74	7 790	7 033	9,7%
12		A4	Standard	30,25	7 790	9 759	25,3%

Concentration

9.2. melléklet (folytatás)

A *Enterococcus* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.



9.3. melléklet (folytatás)

A *Lactobacillus* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.



9.4. melléklet (folytatás)

A *Bifidobacterium* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.



9.5. melléklet (folytatás)

A *Clostridium* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.



9.6. melléklet (folytatás)

A *Bacteroides* kalibrációs adatai. Fent: az amplifikációs görbék képe, középen: a kalibrációs egyenes, lent: a telepszámolás adatai (given conc.) és a számított értékek (calc conc.) összehasonlítása a kalibrációs egyenes alapján.

