

Génové sondy, ich príprava a použitie v potravinárskej mikrobiológii

KATARÍNA JURÍKOVÁ

Súhrn. Článok sa zaoberá problematikou mikrobiálnej diagnostiky génovými sondami, ktoré spolu s imunologickými metódami predstavujú progresívny a citlivý spôsob detekcie patogénnych mikroorganizmov. Metódou hybridizácie kolónií možno detekovať prítomnosť špecifických génov virulencie v izolovaných kmeňoch i v zmiešaných kultúrach, resp. vo vyšetrovaných vzorkách potravín. Doteraz najpoužívanější a najcitlivejší je rádioaktívny spôsob značenia sond, ale výskum sa orientuje najmä na vyvíjanie a aplikáciu metód nerádioaktívneho značenia. V súčasnosti sa metódami génového inžinierstva pripravili sondy detekujúce viaceré druhy a rody mikroorganizmov významných z hľadiska hygieny potravín. Práca podáva ich stručný prehľad a charakterizáciu.

Vývoj a aplikácia nových, rýchlych a citlivých metód detekcie patogénnych mikroorganizmov v potravinách predstavuje v súčasnosti jednu z najdôležitejších oblastí výskumu potravinárskych mikrobiológov. K nim patria najmä imunologické a molekulárno-genetické metódy. V súvislosti s rýchlym rozvojom technológie rekombinantnej DNA v sedemdesiatych rokoch techniky molekulárnej biológie začali prenikať aj do oblasti potravinárskej mikrobiológie. Genetické metódy detekcie a identifikácie mikroorganizmov majú v porovnaní s tradičnými kultivačnými postupmi niekoľko významných výhod: nakoľko sa nevyžaduje izolácia čistých kultúr, eliminujú sa časovo zdĺhavé neselektívne a selektívne pomnožovania, v dôsledku ktorých často dochádza i k strate plazmidu a s tým spojenej virulencie. Nevyžaduje sa génová expresia v laboratórnych podmienkach, nakoľko génové sondy detekujú prítomnosť špecifických sekvencií nukleotidov, t. j. génov virulencie. Súčasne možno vyšetriť veľký počet izolovaných kmeňov (30—50), avšak detekcia virulentných kmeňov sa môže uskutočniť i v zmiešaných kultúrach [1]. Použitie génových sond predstavuje progresívny a sľubný spôsob detekcie patogénnych mikroorganizmov, resp. genetických determinantov špecifických faktorov virulencie.

RNDr. Katarína Juríková, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

Génové sondy

Génová sonda predstavuje špecifický úsek nukleovej kyseliny, t. j. špecifickú sekvenciu nukleotidov, vhodne označenú, pričom na jej prípravu možno použiť dvojvláknovú alebo jednovláknovú DNA alebo jednovláknovú RNA. Genetic-kou sondou môže byť celý chromozóm, gén alebo plazmid. Chromozómové sondy sa používajú predovšetkým pri štúdiu príbuznosti bakteriálnych izolátov [2, 3]. Najpoužívanjšou metódou konštrukcie sondy je klonovanie. Prvým krokom pri príprave sondy je izolácia, purifikácia a koncentrácia DNA z čistej kultúry študovaných baktérií. Takto získaná DNA sa naštípi pomocou restriktčných endonukleáz. Kohézne konce vzniknutého inzertu umožňujú rekombináciu s ďalším, rovnakou restriktčnou endonukleázou naštiepeným úsekom DNA — plazmidom. Plazmid s inzertom po spojení DNA ligázou sa v procese transformácie stáva súčasťou genómu hostiteľa, napr. *E. coli*, z ktorej klonovaná sekvencia môže byť reisolovaná, označená a použitá ako sonda [4]. Sondy môžu byť konštruované tiež z oligonukleotidových sekvencií, ktoré sú syntetizované pomocou DNA syntetizátorov. Takéto sondy obsahujú väčšinou menej ako 40 báz a používajú sa v čoraz väčšej miere [4—7].

Rádioaktívne značenie

Aby sa mohla uskutočniť detekcia vytvorených hybridných molekúl, génové sondy musia byť vhodne označené. V poslednom období sa vyvinulo a v literatúre publikovalo pomerne veľa metód značenia nukleových kyselín. V súčasnosti najpoužívanjší spôsob je pomocou rádioizotopov, kedy izotop je in vitro inkorporovaný do molekuly nukleovej kyseliny a to metódou nick-translácie [8], značením náhodného primeru alebo transkripciou z klonovaných promótorov za použitia RNA polymerázy [9]. Na detekciu sa používa autorádiografia. Pri značení sondy metódou nick-translácie sa využíva účinok dvoch enzýmov: DNA polymerázy I a DNA-ázy. DNA polymerázu I izolovanú z *E. coli* tvorí jeden polypeptidický reťazec molekulovej hmotnosti 109 000 nesúci tri rôzne enzýmové aktivity: 5'-3'-polymerázu, 5'-3'-exonukleázu (DNA-áza) a 3'-5'-exonukleázu. DNA-áza spôsobuje jednovláknový zlom (zárez, t. j. nick), a to elimináciou nukleotidov z 5'-konca. Účinkom DNA polymerázy I dochádza ku kompletizácii nukleotidov smerom k 3'-hydroxylovému koncu. Eliminácia nukleotidov a následná adícia smerom k 3'-koncu majú za následok posun zárezu (= nick-translácia) pozdĺž DNA. Náhradou pôvodných nukleotidov za vysoko rádioaktívne je možné pripraviť ^{32}P DNA s vysokou špecifickou aktivitou (10^8 cpm. μg^{-1}), čo závisí od množstva DNA-ázy pridanej do reakcie a DNA-ázy kontaminujúcej preparát DNA polymerázy I. Koncentrácia DNA-

-ázy má byť taká, aby sa dosiahlo zabudovanie asi 30% (^{32}P) dNTP do DNA. Označené vlákna DNA majú mať dĺžku 400—800 nukleotidov [10].

Nerádioaktívne značenie

Nerádioaktívny spôsob značenia v súčasnosti predstavuje 10- až 100-násobne menej citlivý spôsob, avšak je bezpečnejší a sondy sú stabilnejšie [11]. S cieľom rutinného využitia sa vyvíja niekoľko spôsobov tohto značenia, spoločným princípom ktorých je tak ako pri rádioaktívnom značení naviazanie vhodnej molekuly markera na molekulu DNA a následná detekcia označenej molekuly. Ako prvý spôsob nerádioaktívneho označenia sondy sa použila inkorporácia biotinylovaných analógov nukleotidov do molekuly DNA a to buď chemickou modifikáciou jednovláknovej molekuly DNA s biotínhydrazidom, ktorý sa naviaže na voľný nespárovaný cytozín nahradením jeho aminoskupiny transaminačnou reakciou katalyzovanou síranom sodným [9], buď inkorporovaním komerčných biotinylovaných báz, ako sú Bio-11 dNTP (11-dUTP a 11-dCTP) do molekuly DNA nick-transláciou. Použitie biotínu na nerádioaktívne značenie je umožnené jeho schopnosťou viazať sa s vysokou afinitou ($K_{\text{dis}} = 10^{-15}$) súčasne na avidín (proteín izolovaný zo streptomycét), ktorý môže byť konjugovaný s rôznymi molekulami, napr. s alkalickou fosfatázou, pomocou ktorých je možná vizualizácia uskutočňujúca sa použitím substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indoxylfosfátu (BCIP) a farbiva Nitro Blue Tetrazolium (NBT) [12, 13].

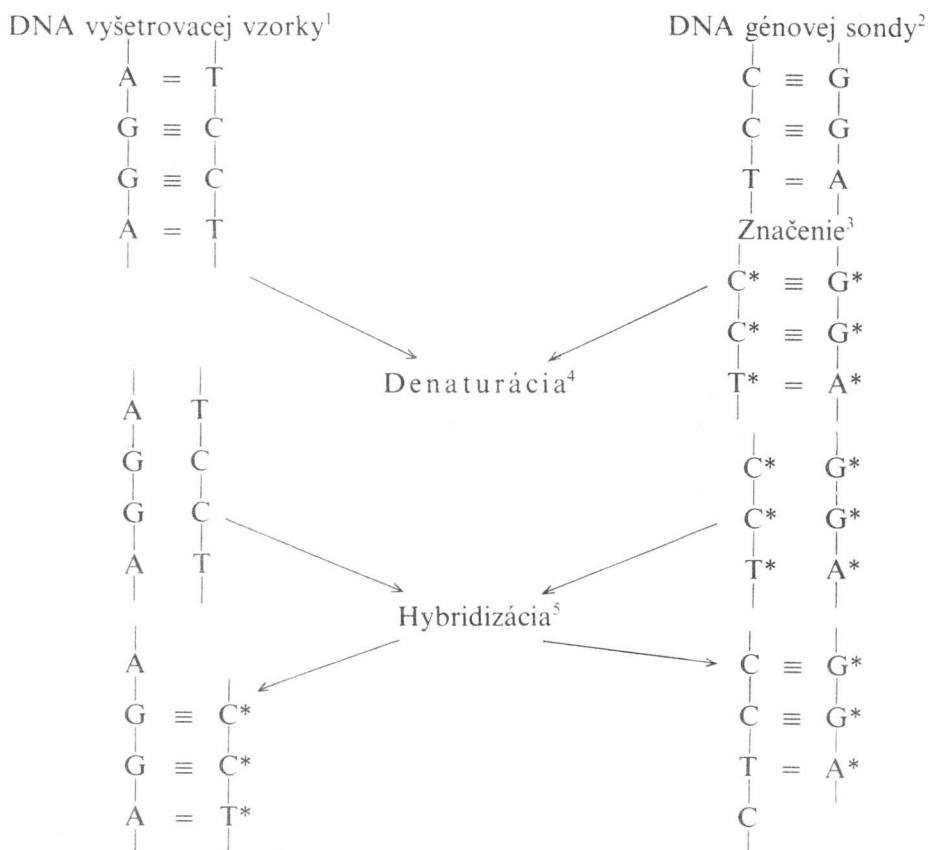
Podobne systém značenia pomocou fotobiotínu vyvinutý na značenie nukleových kyselín r. 1985, používa detekčný systém avidín-alkalická fosfáza a substrát BCIP a NBT. Fotobiotín (*N*-4-azido-2-nitrofenyl-*N*-(*N*-biotinyl-3-aminopropyl)-*N*-metyl-1,3-propándiamín) acetát je syntetický derivát biotínu, ktorý je fotoaktivovateľný na nitrén reagujúci s purínovou alebo pyrimidínovou bázou [14].

Z ďalších spôsobov nerádioaktívneho značenia možno uviesť napr. metódu kolorimetrickej vizualizácie DNA s naviazaným modifikovaným proteínom [15], imunochemické metódy [16, 17] alebo pomerne rozšírené chemiluminiscenčné spôsoby [18, 19].

Hybridizácia nukleových kyselín

Chemický princíp hybridizácie nukleových kyselín je založený na reverzibilite procesu denaturácie. Pri vyššej teplote (100 °C) alebo alkalickom pH dochádza k oddeleniu komplementárnych vlákien DNA. Po pridaní špecifického jednovláknového úseku DNA, vhodne označeného, t. j. génovej sondy, separované

komplementárne vlákna DNA za vhodných podmienok reasociujú. Vznikajúce hybridné molekuly obsahujú jedno vlákno pochádzajúce z testovaného mikroorganizmu a druhé z génovej sondy (obr. 1). DNA sondy a vlákno DNA pochádzajúce z vyšetřovaného mikroorganizmu obsahujú teda tú istú genetickú informáciu a možno konštatovať, že testovaná vzorka obsahuje gén zhodný s génom sondy. Nakoľko vzniká molekula dvojvláknovej DNA z jednovláknových DNA rôzneho pôvodu, t. j. hybrid, uvedený proces reasociácie je označovaný ako hybridizácia [20]. Charakterizácia stability vzniknutých hybridov spočíva v meraní bodu topenia (T_m). Je to teplota, pri ktorej polovica helikálnej štruktúry zanikne. T_m reasociovaných vlákien nukleovej kyseliny závisí od bázo-vého zloženia, koncentrácie monovalentných katiónov, dĺžky duplexu a koncentrácie organických denaturantov, ako sú napr. formamid alebo močovina,



Obr. 1. Princíp hybridizácie nukleových kyselín. A — adenín; Adenine, T — tymín; Thymine, C — cytozín; cytosine, G — guanín; Guanine, * — rádioizotop; Radioisotope.

Fig. 1. Nucleic acids hybridization principle. 1 — DNA of investigated sample, 2 — DNA of gene probe, 3 — Labelling, 4 — Denaturation, 5 — Hybridization.

ktoré sa používajú na zníženie hybridizačnej teploty. V rozmedzí pH 5—9 je T_m nezávislá od pH. T_m môže byť ovplyvnená tiež chybným párovaním v duplexe; na každé 1 % chybného párovania báz DNA sa pozoroval pokles T_m približne o 1 °C [21].

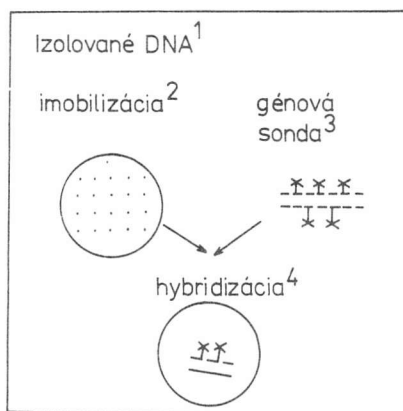
Presnosť, s ktorou sa spájajú bázy nukleotidov DNA sondy a skúmanej DNA možno ovplyvniť teplotou hybridizačnej reakcie a následnými premývaniami. Rigorózne podmienky hybridizácie umožňujú spájanie iba komplementárnych úsekov. Pri nižších teplotách novovznikajúce dvojvlákna môžu obsahovať značný podiel chybné spárovaných nukleotidov. Pri takejto nízkej rigoróznosti génová sonda môže hybridizovať s príbuznými, ale neidentickými sekvenciami, čo má za následok vznik falošne pozitívnych výsledkov [21]. Ale ak rigoróznosť podmienok je prílišná, t. j. hybridizácia alebo premývanie sa uskutočňuje pri teplote, keď aj správne spárované dvojvlákna denaturujú, vytvorené molekuly dvojvláknovej DNA môžu byť nestabilné a značná časť sondy sa nikdy nespojí s cieľovou sekvenciou skúmanej DNA. Dôsledkom je veľmi slabý signál a vznik falošne negatívnych výsledkov.

Hybridizačné experimenty s DNA imobilizovanou na nitrocelulóзовom filtri boli prvý raz publikované v rokoch 1963—1964 [22, 23] a neskôr takéto fixované nukleové kyseliny boli detekované pomocou rádioaktívnych sond [24, 25]. Ako pevné nosiče kyselín sa najčastejšie používajú nitrocelulóзовé alebo nylonové membrány. Štúdiom relatívnej hybridizačnej účinnosti systémov na nosič viazaného oligonukleotidu a nitrocelulóзы sa zistila 13—28 % retencia cieľových sekvencií na filtroch a účinnosť detekcie 8—20 % [26]. Citlivosť hybridizačného signálu možno zvýšiť desaťnásobne 2-minútovým ožiarением na nosič fixovanej DNA UV svetlom [27].

Hybridizačné metódy

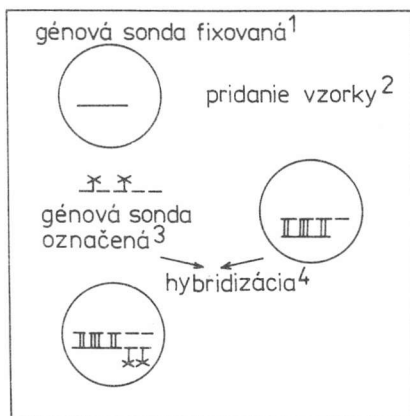
Prvé hybridizačné štúdie boli uskutočnené ako jednofázové reakcie v roztoku. V súčasnosti sa uplatňuje predovšetkým metóda dvojfázovej hybridizácie, keď skúmané nukleové kyseliny sa fixujú v jednovláknových formách na pevnom nosiči (membráne, filtri) a sú vyšetřované pomocou nukleovej kyseliny známej sekvencie, ktorá sa nachádza v roztoku. Najpoužívanéjšie aplikácie dvojfázovej hybridizácie sú takéto: „Dot-blot“ hybridizácia, sandwich, Southern, northern, hybridizácia kolónií. Pri hybridizácii „dot-blot“ [28] vyšetřované nukleové kyseliny sa priamo imobilizujú na pevný nosič ako jednotlivé body. Táto technika umožňuje kvantifikáciu imobilizovaných nukleových kyselín (obr. 2). Pri „sandwich“ hybridizácii (obr. 3) sa používajú dve identifikačné DNA sondy. Jedna z nich (známa DNA) je imobilizovaná na pevnom nosiči

a druhý fragment má funkciu značenej sondy v roztoku. Vzorka sa nachádza tiež v roztoku. Ak vzorka obsahuje sekvencie komplementárne k obidvom fragmentom DNA-sondy, dochádza k detekovateľnej tvorbe hybridov, nakoľko



Obr. 2. Dot-blot hybridizácia. Purifikované DNA sa imobilizujú na pevný nosič a komplementárne sekvencie sa detekujú pomocou génovej sondy.

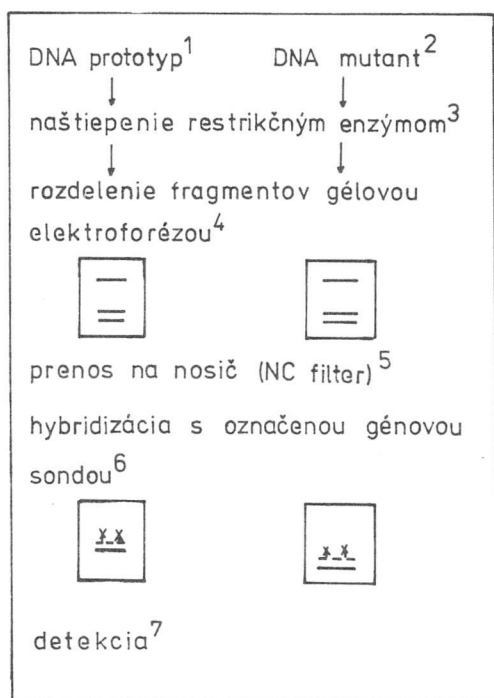
Fig. 2. Dot-blot hybridization. Purified DNA are immobilized on solid support and complementary sequences are detected by help of gene probe. 1 — Isolated DNA, 2 — Immobilization, 3 — Gene probe, 4 — Hybridization.



Obr. 3. Sandwich hybridizácia. Úsek DNA známej frekvencie sa imobilizuje na pevný nosič a druhý fragment DNA má funkciu značenej génovej sondy v roztoku, v ktorom sa nachádza i vzorka. Naviazanie sondy na filter sa uskutoční prostredníctvom komplementárnej DNA vzorky. Fig. 3. Sandwich hybridization. DNA section of known sequence is immobilized on solid support and second DNA fragment functions as labelled gene probe in solution, in which also sample is present. Linkage of the probe to filter is carried out due to complementary DNA sample. 1 — Fixed gene probe, 2 — Sample addition, 3 — Labelled gene probe, 4 — Hybridization.

naviazanie sondy na filter je umožnené iba komplementárnou DNA vzorky [29, 30).

Pri technike Southern (obr. 4) naštiepené fragmenty DNA sa najprv frakcionujú agarózovou alebo polyakrylamidovou elektroforézou, čím sa analyzuje aj ich veľkosť a prenesú sa z gélu na nitrocelulóзовý filter, ktorý sa použije na hybridizáciu. Táto technika dostala názov podľa autora, ktorý ju zaviedol [25]. Podobne hybridizácia northern umožňuje analýzu RNA prenesenej z gélu na filter [31]. Techniky prenosu umožňujú kvalitatívnu analýzu nukleových kyselín a používajú sa na mapovanie génov a ich transkriptov, detekciu sekvencií vírusov v transformovaných bunkách alebo v tkanivách [32], ako aj na diagnostické účely, keď je potrebné poznať veľkosť vzniknutých hybridov [11].

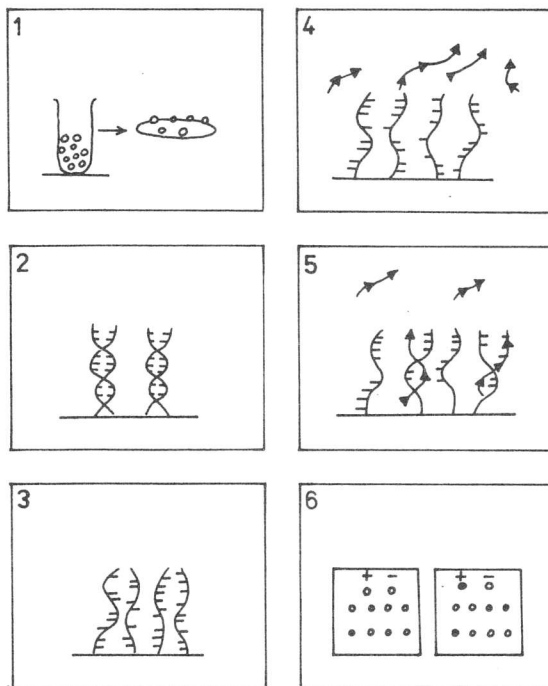


Obr. 4. Southern hybridizácia. Naštípené fragmenty DNA sa rozdelia pomocou gélovej elektroforézy a špeciálnou technikou sa prenesú z gélu na pevný nosič, ktorý sa použije na hybridizáciu s označenou génovou sondou.

Fig. 4. Split up DNA fragments are separated by help of gel electrophoresis and transferred by special technique from gel to solid support, being used for hybridization with labelled gene probe.

1 — DNA prototype, 2 — DNA mutant, 3 — splitting up by restriction enzyme, 5 — transference to support (NC filter), 6 — hybridization with labelled gene probe, 7 — detection.

Hybridizácia kolónií umožňuje vhodnú detekciu špecifickej DNA z bakteriálnych buniek, ktoré vyrastú ako kolónie na nitrocelulóзовom filtri uloženom na povrchu diagnosticko-selektívnej pôdy. Pred hybridizáciou sa uskutoční lýza buniek a alkalická denaturácia DNA s následnou imobilizáciou priamo na nitrocelulóзовom filtri [33]. Ak DNA génovej sondy bola označená rádioaktívne, detekcia vzniknutých hybridov sa uskutoční autorádiografiou [35] (obr. 5).



Obr. 5. Hybridizácia kolónií. 1 — Vyočkovanie mikroorganizmov na nitrocelulóзовý filter (NC) uložený na povrchu selektívno-diagnostickej pôdy, rast do vzniku viditeľných kolónií. 2 — Alkalická lýza bakteriálnych buniek a denaturácia DNA, v dôsledku ktorej sa vlákna DNA oddelia. 3 — Fixácia oddelených vlákien DNA na NC filter. 4 — Prevrstvenie NC filtra hybridizačným roztokom obsahujúcim označenú sondu. 5 — Hybridizácia, t. j. vytvorenie dvojvláknových molekúl obsahujúcich jedno rádioaktívne označené vlákno sondy. 6 — Vizualizácia hybridných molekúl autorádiografiou.

Fig. 5. Hybridization of colonies. 1 — Spotting of microorganisms on nitrocellulose filter (NC) placed on the surface of selective-diagnostic cultivating medium, growth till appearance of visible colonies. 2 — Alkalic lysis of bacterial cells and DNA denaturation, causing the separation of DNA strands. 3 — Fixation of separated DNA strands on NC filter. 4 — Soaking of NC filter by hybridization solution containing labelled probe. 5 — Hybridization, that is formation of double-stranded molecules containing one labelled strand of probe. 6 — Visualization of hybrid molecules by autoradiography.

DNA sondy v potravinárskej mikrobiológii

Ako bolo vyššie uvedené, hybridizácia nukleových kyselín a aplikácia génových sond zohráva významnú úlohu aj v oblasti potravinárskej mikrobiológie. Vo svete existuje niekoľko laboratórií, ktoré sa venujú výskumu v tejto oblasti a pracujú na vyvíjaní a zavádzaní DNA-DNA hybridizačných testov do rutínnej praxe. Prehľad génových sond detekujúcich baktérie, ktoré sa môžu nachádzať v potravinách, je sumarizovaný v tab. 1.

Významný úspech v tejto oblasti biotechnológií predstavuje komerčne dostupná súprava „Gene-trak“, ktorá je príkladom uplatnenia výsledkov výskumu v oblasti rekombinantnej DNA v praxi. Za použitia tohto systému možno detekovať salmonely za 48 hodín. V období prípravy DNA sondy faktory zodpovedné za virulenciu alebo gény zodpovedné za tvorbu toxínu známe neboli. Z tohto dôvodu stratégia prípravy spočívala v štúdiu chromozómových sekvencií genómu salmonely. Skonštruovala sa knižnica genómovej DNA *S. typhimurium* v plazmidovom vektore a selekcia sa uskutočnila systematickým skríningom získaných klonov hybridizáciou s genómovými DNA *E. coli* a inými druhmi mikroorganizmov. Zo získaných klonov, ktoré nehybridizovali s *E. coli* ani s ďalšími testovanými mikroorganizmami, sa vybrali dva klony hybridizujúce s každým izolátom salmonely [34]. Metóda DNA-hybridizácie detekujúca salmonely v potravinách bola v USA r. 1987 odporučená ako rýchla skrínigová Komisiou AOAC [35]. Iní autori [36] pripravili špecifickú DNA hybridizačnú sondu z 2,3 kb fragmentu LT2 chromozómu *Salmonella typhimurium*. Podarilo sa im dosiahnuť 100 % špecifitu pre rod *Salmonella*, a to pre izolované kmene i pre detekciu salmonel z potravín.

Neskôr, r. 1988 sa už faktory virulencie rodu *Salmonella* stali známe. Z genetického hľadiska bolo významné zistenie, že salmonely obsahujú veľký asi 105 kb plazmid, sérotypovo špecifický a esenciálny pre virulenciu salmonel [37].

Escherichia coli sa v potravinárskej mikrobiológii považuje za indikátorový mikroorganizmus, poukazujúci na možnú prítomnosť patogénnych enterobaktérií. Avšak asi 5—10 % kmeňov *E. coli* vyskytujúcich sa v potravinách je patogénnych. Nedostatočné poznatky o výskyte patogénnych kmeňov súvisia aj s tým, že za štandardných podmienok kultivácie často dochádza k strate plazmidu a tým aj k strate schopnosti tvorby toxínu. Biologické metódy sú náročné na čas i materiál, preto uplatnenie DNA hybridizačných techník aj v tejto oblasti predstavuje veľký prínos. Patogenita kmeňov *E. coli* súvisí s tvorbou enterotoxínov (ETEC), ale i s produkciou verotoxínov enterohemoragickými kmeňmi (EHEC), s enteroinvazívnosťou (EIEC).

Enterotoxigénna *E. coli* (ETEC) produkuje termolabilný toxín (LT) je detekovaná geneticky klonovanou sondou [38—40]. ETEC pre ST je detekovaná pomocou syntetických oligonukleotidov [5, 41]. Odlišný metodický prístup

Tabuľka 1. Prehľad génových sond detegujúcich potravinársky významné patogénne mikroorganizmy

Table 1. Survey of gene probes detecting food-important pathogenic microorganisms

Mikroorganizmus ¹	Typ sondy ²	Faktor virulencie ³
<i>Campylobacter</i> <i>C. jejuni</i>	genómová DNA ⁴ syntetická ⁵ klonovaná 1475 Bp ⁶	— proteín vonkajšej membrány (omp) ¹⁷ 46 kDA
<i>C. coli</i>	klonovaná 1845 bp ⁷	
<i>Helicobacter pylori</i>	oligonukleotidová ⁸ genómová DNA ⁴ klonovaná DNA ⁹	toxín A ¹⁸
<i>Clostridium difficile</i>	8,1 kb 4,5 kb PsT I syntetická ⁵	toxín A ¹⁸ toxinogenita ¹⁹
<i>Escherichia coli</i>	klonovaná DNA ⁹ syntetická 24 bp ¹⁰ klonovaná RNA ¹¹	termolabilný toxín ²⁰ termostabilný toxín ²⁹ termolabilný aj ²² termostabilný toxín ²¹ toxín "Shiga-like" ²³ enteroagregácia ²⁴ termostabilný toxín ²¹
<i>Legionella</i>	klonovaná DNA ⁹	
<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i>	klonovaná DNA ⁹ transkripčná RNA ¹² genómová DNA ⁴	—
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	klonovaná DNA ⁹ 500 bp klonovaná DNA ⁹ 650 bp syntetická ⁵	β -hemolyzínový gén ²⁵ listeriolysin O ²⁶ β -hemolyzínový gén ²⁵
<i>Legionella</i> <i>pneumophila</i>	klonovaná DNA ⁹ 850 bp syntetická ⁵	zosilňovač infekčnosti makro- fágov (mip) ²⁷
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	klonovaná DNA ⁹ z 23S rDNA ¹³	—
<i>Salmonella</i> spp.	klonovaná, genómová DNA ¹⁴ klonovaná DNA ⁹ 2,3 kb syntetická ⁵	—
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>		enterotoxín A (SEA) ²⁸ enterotoxín B (SEB) ²⁹ enterotoxín C (SEC) ³⁰ toxic shock syndrome toxín 1 (TSST-1) plazmid ³¹ kalciová závislosť ³² inv a ail chromozóm ³³ plazmid-HEp-2-cytotoxicita
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	klonovaná ¹⁵ klonovaná ¹⁵ klonovaná ¹⁵ syntetická ⁵ 24 bp syntetická 19 bp ¹⁶ klonovaná ¹⁵	proteíny vonkajšej membrány (yop) ³⁵

1 — Microorganism, 2 — Type of probe, 3 — Virulence factor, 4 — Genomic DNA, 5 — Synthetic, 6 — Cloned 1475 bp, 7 — Cloned 1845 bp, 8 — Oligonucleotide, 9 — Cloned DNA, 10 — Synthetic 24 bp, 11 — Cloned RNA, 12 — Transcriptional RNA, 13 — From 23S rDNA, 14 — Cloned, genomic DNA, 15 — Cloned, 16 — Synthetic 19 bp, 17 — Outer membrane proteins (omp), 18 — Toxin A, 19 — Toxinogenity, 20 — Thermolabile toxin, 21 — Thermostable toxin, 22 — Thermolabile aj, 23 — Toxin "Shiga-like", 24 — Enter aggregation, 25 — β -Hemolysin gene, 26 — Listeriolysin O, 27 — Macrophage infectivity potentiator (mip), 28 — Enterotoxin A (SEA), 29 — Enterotoxin B (SEB), 30 — enterotoxin C (SEC), 31 — Plasmid, 32 — Calcium dependence, 33 — inv and ail chromosome, 34 — Plasmid-HEp-2-cytotoxicity, 35 — *Yersinia* outer proteins (yop).

predstavuje detekcia ETEC produkujúcej ST RNA transkripčnou sondou [42]. Pomocou jednej syntetickej RNA sondy je možná simultánna detekcia ST i LT toxínových génov [43].

DNA-sondy boli pripravené aj proti niektorým ďalším potravinársky významným patogénom, resp. podmienene patogénnym druhom so zameraním predovšetkým na také mikroorganizmy, ktoré za štandardných podmienok kultivácie sú detekovateľné pomerne náročnými a zdĺhavými testami, resp. ich záchytnosť je pomerne nízka, nakoľko neexistuje optimálny postup selekcie. Pritom ide o mikroorganizmy, ktoré svojimi patogénnymi vlastnosťami môžu zohrávať rovnako významnú úlohu ako známe salmonely alebo shigely.

Napr. bežné metódy izolácie a identifikácie druhu *Listeria monocytogenes* sú náročné na laboratórnu prácu a čas. Laboratórny dôkaz a charakterizácia kmeňov vyžaduje 28 dní. Jednotlivé druhy listérií sa odlišujú hemolytickou aktivitou, redukciou dusičnanov a skvasovaním rôznych cukrov [44]. Pre epidemiologické účely je potrebná sérologická identifikácia, ako aj fagotypizácia [45]. Najbežnejšia forma listeriózy ľudí je bakteriálna meningitída, jej prenos potravinami je v literatúre dobre dokumentovaný. *Listeria* sa môže vyskytovať napr. v pasterizovanom mlieku [46] alebo syroch [47]. Mechanizmy zodpovedné za patogenézu *L. monocytogenes* nie sú úplne vyjasnené. K faktorom podieľajúcim sa na jej virulencii patria hemolyzíny [48, 49], invazívne faktory [50] a faktory umožňujúce intracelulárne prežitie a zapríčínujúce oneskorenú hypersenzitivitu. Genetickú sondu detekujúcu hemolytickú virulentnú *L. monocytogenes* tvorí β -hemolyzínový gén o veľkosti 500 báзовých párov, ktorý je špecifický pre kmene produkujúce β -hemolyzín [51]. Klonovaný a sekvenovaný bol tiež gén indukujúci oneskorenú hypersenzitivitu (DTH-18) a použil sa ako genetická sonda vzhľadom na to, že sa potvrdila vysoká korelácia prítomnosti génu DTH-18 a virulencie listérií [52].

Podobne identifikácia druhu *Pseudomonas* vyžaduje uskutočnenie časovo náročných biochemických testov a aj pri ich rýchlej identifikácii sa uplatňujú genetické hybridizačné sondy, ktoré boli skonštruované z klonovaných 23S rRNA génov *Pseudomonas aeruginosa* a použité v dot-hybridizačných technikách [53].

K dôležitým bakteriálnym enteropatogénom patrí tiež druh *Campylobacter*, najmä druh *C. jejuni* a *Helicobacter pylori*, pričom prenášačom nákazy môžu byť niektoré potraviny, ako surové mlieko, hydina, vajíčka, zmrzlina; ide prevažne o surové alebo nedostatočne tepelne opracované potraviny [54]. Hybridizácia nukleových kyselín bola aplikovaná na identifikáciu a klasifikáciu druhov *Campylobacter* za použitia rádioaktívne aj nerádioaktívne značených sond predstavujúcich genómovú DNA klinických izolátov [55, 56].

Vývoj a aplikácia génových sond sa uplatňuje aj pri detekcii virulentných yersínií. Vzhľadom na ubiquitárne vlastnosti a schopnosť rásť pri chladiarenských teplotách v mäse [57] a v mliečnych výrobkoch [58, 59], sa yersíniám začína venovať zvýšená pozornosť. Avšak nie všetky kmene zapríčínujú ochorenie. Na diferenciaciu virulentných a avirulentných kmeňov sa použil 44 megadaltonový plazmid, resp. jeho tri restriktčné fragmenty Bam HI molekulovej hmotnosti 3,8, 4,3 a 5,0 kb, ktorý kóduje invazívnosť [39]. Metóda DNA hybridizácie kolónií sa použila tiež na detekciu virulentnej *Yersinia enterocolitica* v kontaminovaných potravinách [60]. Na detekciu patogénnych kmeňov vyvolávajúcich gastroenteritídu bola pripravená aj syntetická oligonukleotidová sonda [61]. Na rozdiel od uvedených špecifických DNA-sond detekujúcich homológne sekvencie nukleových kyselín skúmaných mikroorganizmov, v poslednom období boli pripravené aj širokospektrálne sondy. Ich význam a využitie spočíva najmä pri detekcii mikroorganizmov, ktoré sa nedajú kultivačne dokázať, resp. sú neznámeho pôvodu. Ide o syntetické oligomérne sondy, detekujúce eubakteriálne nukleové kyseliny, homológne so 16 S rRNA baktérií. Dve takto pripravené sondy boli schopné detekovať nukleové kyseliny 23 fylogeneticky rôznorodých bakteriálnych druhov metódou dot-blot hybridizácie [62]. Taktiež na typizáciu kmeňov *Aeromonas* sa použila širokospektárlna sonda pripravená z 16S a 23S rRNA z *E. coli* [63].

Literatúra

1. HILL, W. E.—MADDEN, J. M.—McCARDEL, B. A.—SHAH, B. D.—JAGOW, J. A.—PAYNE, V. L.—BOUTIN, B. K., Appl. Environ. Microbiol., 45, 1983, s. 1324.
2. SCHOFIELD, P. R., Appl. Environ. Microbiol., 53, 1987, s. 2942.
3. HAZEN, T. C.—JIMENEZ, L., Microbiol. Sciences, 11, 1988, s. 340.
4. HILL, W. E.—PAYNE, W. L.—ZON, G.—MOSELEY, S. L., Appl. Environm. Microbiol., 50, 1985, s. 1187.
5. HILL, W. E.—WENTZ, B. A.—PAYNE, W. L., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 1986, s. 531.
6. CUNNIGHAM, M.—MUNDY, C. R., Nature, 326, 1987, s. 723.
7. KARCH, H.—MEYER, T., J. Clin. Microbiol., 27, 1989, a—g.
8. FEINBERG, A. P.—VOGELSTEIN, B., Analyt. Biochem., 132, 1983, s. 6.
9. REISFELD, A.—ROTHENBERG, J. M.—BAYER, B. A.—WILCHEK, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 1987, s. 519.

10. MANIATIS, T.—FRITSCH, E. F.—SAMBROOK, J.: Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor 1982.
11. PALVA, A., *Ann. Clin. Res.*, *18*, 1986, s. 327.
12. KIRRH, Y.—DANBARA, H.—KCMASE, K.—ARITA, H.—YOSHIKAWA, M., *J. Clin. Microbiol.*, *25*, 1987, s. 1962.
13. HAAS, M. J.—FLEMING, J., *Anal. Biochem.*, *168*, 1988, s. 239.
14. FORSTER, A. C.—McINNES, J. L.—SKINGLE, D. C.—SYMONS, R. H., *Nucl. Acids Res.*, *13*, 1985, s. 745.
15. RENZ, M.—KURZ, CH., *Nucl. Acids Res.*, *12*, 1984, s. 3435.
16. HOPMAN, A. H. N.—WILGANT, J.—TESSER, G. J.—van DUIJN, P., *Nucl. Acids Res.*, *14*, 1986, s. 6471.
17. HOPMAN, R. H. N.—WILGANT, J.—van DUIJN, P., *Exp. Cell. Res.*, *169*, 1987, s. 357.
18. GALLERO, L.—UMARAN, A.—GARAIZAR, J.—COLOM, K.—CISTERNA, R., *J. Microbiol. Meth.*, *11*, 1990, s. 261.
19. BECK, S.—KÖSTEE, H., *Anal. Chem.*, *62*, 1990, s. 2258.
20. NEUMAN, R., *Naturwissenschaften*, *74*, 1987, s. 125.
21. HILL, W. E.—LAMPEL, K. A., *Biotechnology*, 1990, s. 140.
22. NYGAARD, A. P.—HALL, B. D., *Biochem. Biophys. Res.*, *12*, 1963, s. 98.
23. NYGAARD, A. P.—HALL, B. D., *J. Mol. Biol.*, *9*, 1964, s. 125.
24. DENHARD, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *23*, 1966, s. 641.
25. SOUTHERN, E. M., *J. Mol. Biol.*, *98*, 1975, s. 503.
26. GINGERAS, S. T. A.—KWOH, D. Y.—DAVIS, G. R., *Nucl. Acids Res.*, *15*, 1987, s. 5373.
27. KAHNDJIAN, E. W., *Bio Technology*, *5*, 1987, s. 165.
28. CUNNINGHAM, M., *Anal. Biochem.*, *128*, 1983, s. 415.
29. PALVA, A., *Fems. Microbiol. Lett.*, *28*, 1985, s. 85.
30. RANKI, M.—PALVA, A.—VIRTANEN, M.—LAAKSONEN, M.—SÖDERLUND, H., *Gene* *21*, 1983, s. 77.
31. ALWINE, J. C.—KEMP, D. J.—STARK, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *74*, 1977, s. 5350.
32. GRÜNNSTEIN, M.—HOGNESS, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *72*, 1975, s. 3961.
33. BERMUNDER, M.—HAZEN, T. C., *Appl. Environ. Microbiol.*, *54*, 1988, s. 979.
34. FITTS, R., *Food. Technol.*, *39*, 1985, s. 95.
35. FLOWERS, R. R.—KLATT, M. J.—MOZOLA, M. A.—CURLATE, M. S.—GABIS, D. A.—SILIKER, J. H., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, *70*, 1987, s. 521.
36. OLSEN, J. E.—AABO, S.—NIELSEN, E. O.—NIELSEN, B. B., *APMS*, *99*, 1991, s. 114.
37. YOSHIKAWA, M.—SASAKAWA, C.—MAKINOS, N.—OKLDA-LETT, M. C.—SAKAI, M.—YAMADA, K.—KOMATSU, K.—KURATA, T.—SATA, T., *Microbiol. Sci.*, *5*, 1988, s. 11.
38. HILL, W., *J. Food Safety*, *3*, 1981, s. 233.
39. HILL, W. E.—PAYNE, W. L.—AULISTO, C. C. G., *Appl. Environ. Microbiol.*, *46*, 1983, s. 636.
40. HILL, W. E.—PAYNE, W. L., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, *67*, 1984, s. 801.
41. HILL, W. E.—PAYNE, W. L.—ZON, G.—MOSELEY, S. L., *Appl. Environ. Microbiol.*, *50*, 1985, s. 1187.
42. CHITYOTHIN, O.—SETHABUTR, O.—ECHEVERRIA, P.—TAYLER, D. N.—VONGST-HOGSRI, I.—THARAVANIJ, S., *J. Clin. Microbiol.*, *25*, 1987, s. 1572.
43. SAEZ-LORENS, X.—GUZMAN—VERDUZCO, L. M.—SHELTON, S.—NELSON, J. D.—KUPERSTOCH, Y. M., *J. Clin. Microbiol.*, *27*, 1989, s. 1684.
44. ROCOURT, J.—SCHRETTENBRUNNER, A.—SELIGER, H. P. R., *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, *134*, 1983, s. 56.

45. ROCOURT, J.—CATIMEL, B.—SCHRETTENBRUNNER, A., *Bacteriol. Microbiol. Hyg.*, A 259, 1985, s. 341.
46. FLEMING, D. W.—COCHI, S. L.—Mac DONALD, K. L.—BRONDUM, J.—HAYES, P. S.—PLIKAYTIS, B. D.—HOLMES, M. B.—AUDERIER, A.—BROOME, C. V.—REINHOLD, R. L., *N. Engl. J. Med.*, 312, 1985, s. 404.
47. CENTERS FOR DISEASE CONTROL, *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 34, 1985, s. 357.
48. SKALKA, B.—SMOLA, J.—ELISCHEROVÁ, K., *J. Clin. Microbiol.*, 15, 1982, s. 503.
49. GAILLARD, J. L.—BERCHE, P.—SANSONETTI, P., *Inf. Immunol.*, 52, 1977, s. 50.
50. GAILLARD, J. L.—BERCHE, P.—MOUNTER, J.—RICHARDS, S.—SANSONETTI, P., *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 138, 1987, s. 255.
51. DATTA, A. R.—WENTZ, B. A.—HILL, W. E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1987, s. 2256.
52. NOTERMANS, S.—CHAKRABORTY, T.—LEIMEISTER-WÄCHTER, M.—DUFRENE, J.—KEUVELMAN, K. J.—MAAS, H.—JANSEN, W.—WERNANS, K.—GUINEE, P., *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1989, s. 902.
53. FESTL, H.—LUDWIG, W.—SCLEIFER, K. H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1986, s. 1190.
54. BLASER, M. J., *Food Technol.*, 36, 1982, s. 89.
55. WETHERALL, B. L.—McDONALD, P. J.—JOHNSON, A. M., *J. Med. Microbiol.*, 26, 1988, s. 257.
56. CHEVIER, D.—LARZUL, P.—MEGRAUD, F.—GUESDON, J. L., *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989, s. 321.
57. SCHIELMAN, D. A., *J. Food Prot.*, 43, 1980, s. 360.
58. HUGHES, D., *J. Appl. Bacter.*, 46, 1975, s. 125.
59. SCHIEMANN, D. A.—TOMA, S., *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1978, s. 54.
60. JAGOW, J.—HILL, W. E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1986, s. 441.
61. MILLIOTIS, M. D.—GALEU, J. E.—KAPER, J. B.—MORRIS, J. G., *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989, s. 1667.
62. CHEN, K.—NEIMARK, H.—RUMORE, P.—STEIMAR, CH. R., *FEMS Microbiol. Lett.*, 57, 1989, s. 19.
63. KUIJPER, E. J.—van ALPEN, L.—LENDERS, E.—ZANEN, H. C., *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989, s. 1280.

Do redakcie došlo 15. 11. 1991

Gene probes, their preparation and application in food microbiology

Summary

Paper deals with problems of microbial diagnostics by gene probes, which together with immunological assays represent progressive and sensitive way of pathogenic microorganisms detection. By colony hybridization method, it is possible to detect the presence of specific virulent genes in isolated strains, but also in mixed cultures, or in investigated food samples, as the case may be. So far, the most employed and sensitive procedure is radioactive labelling of probes, but research activities are aimed mainly at development and application of non-radioactive labelled atoms methods. At the present time, probes detecting various species and genera of microorganisms important from the point of view of food hygiene were prepared by help of gene engineering methods. Paper presents their brief survey and characterization.

Генетические зонды, их подготовка и применение в пищевой микробиологии

Резюме

Статья занимается проблематикой микробиальной диагностики генетическими зондами, которые вместе с иммунологическими методами представляют прогрессивный и чувствительный метод детектирования патогенных микроорганизмов. Методом гибридизации колоний можно детектировать присутствие специфических генов вирулентности в изолированных штаммах, но и в смешанных культурах или в исследованных пробах пищевых продуктов. Пока более применяемым и самым чувствительным является радиоактивный метод мечения зонда, но и исследования ориентируются главным образом на разработку и применение методов нерадиоактивного мечения.

В настоящее время методами геновой инженерии были подготовлены зонды определяющие многие виды и роды микроорганизмов значимых с точки зрения гигиены пищевых продуктов. Статья дает их короткое обозрение и характеристики.