

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETER HANČIČ

**DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI SEVA *BACILLUS SUBTILIS* IN
UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI TOKSINOV**

**DETERMINATION OF GENETIC STABILITY OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN
AND DETECTION OF TOXINS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

ZAHVALA

Diplomsko nalogo sem opravljal v Krki d.d., na Oddelku za predklinične raziskave v Novem mestu pod mentorstvom prof.dr. Janka Kosa, univ.dipl.kem. in somentorice asist.dr. Andreje Plaper, univ.dipl.biolog.

Zahvaljujem se somentorici asist.dr. Andreje Plaper, univ.dipl.biolog za izvedbo eksperimentalnega dela na Oddelku za predklinične raziskave, strokovno vodenje in nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Mentorju prof.dr. Janku Kosu, univ.dipl.kem se zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge in tematsko svetovanje.

Hvala Mirandi Seničar za vsakodnevno pomoč pri laboratorijskem delu in optimizem.

Hvala tudi Kristini za večjo resolucijo pri slikovnem oblikovanju.

Zahvalil bi se staršem za vso podporo in razumevanje ter Maji, ki mi vedno stoji ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof.dr. Janka Kosa, univ.dipl.kem. in somentorice asist.dr. Andreje Plaper, univ.dipl.biolog.

Diplomantov lastnoročni podpis

VSEBINA

Seznam preglednic.....	III
Seznam slik.....	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	IV
Seznam okrajšav.....	VI
1. UVOD	1
1.1 MIKROORGANIZMI V PREBAVNEM TRAKTU.....	1
1.2 PROBIOTIKI V HUMANI MEDICINI IN VETERINI	3
1.2.1 PROBIOTIK <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	3
1.2.2 PATOGENE VRSTE RODU <i>BACILLUS</i>	5
1.3 METODE ZA DETEKCIJO ENTEROTOKSINOV	7
1.4 DOLOČANJE GENESKE STABILNOSTI	9
1.4.1 MODIFIKACIJA PCR METODE	9
1.4.2 NAKLJUČNO POMNOŽENA POLIMORFNA DNK (RAPD).....	9
1.4.3 OPTIMIZACIJA POGOJEV RAPD REAKCIJE.....	10
1.4.4 SPREMEMBE RAPD PROFILOV POMNOŽENIH ODSEKOV	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 IZOLACIJA DNK <i>B.SUBTILIS</i>	16
3.1.1 PRIPRAVA REAGENTOV	17
3.1.2 PRIPRAVA KULTURE <i>B.SUBTILIS</i> V RAZLIČNIH STOPNJAH RAZMNOŽEVANJA	18
3.1.3 IZOLACIJA BAKTERIJSKE DNK.....	18
3.1.4 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNK.....	19
3.2 DOLOČANJE GENESKE STABILNOSTI	20
3.2.1 PRIPRAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV OPH/OPQ	20
3.2.1.1 Priprava reagentov.....	21
3.2.1.2 Eksperimentalno delo	21
3.2.2 RAPD REAKCIJA Z ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI OPH/OPQ.....	21
3.2.2.1 Priprava reagentov.....	21
3.2.2.2 Eksperimentalno delo	22
3.2.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA OPTIMIZACIJO RAPD REAKCIJE.....	23

3.2.4	DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI Z OPH 6 IN OPQ 20	24
3.3	ELEKTROFOREZA RAPD PRODUKTOV.....	26
3.3.1	PRIPRAVA 1,4 % AGARozNEGA GELA	26
3.3.1.1	Priprava reagentov.....	26
3.3.1.2	Eksperimentalno delo	27
3.3.2	ELEKTROFOREZA.....	27
3.3.2.1	Priprava reagentov.....	27
3.3.2.2	Eksperimentalno delo	28
3.4	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENTEROTOKSINOV	29
3.4.1	PRIPRAVA REAGENTOV	30
3.4.2	EKSPERIMENTALNO DELO	30
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	IZOLACIJA DNK <i>B.SUBTILIS</i>	32
4.1.1	MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNK.....	32
4.1.2	ELEKTROFOREZA VZORCEV IZOLIRANE DNK.....	32
4.2.	DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI	33
4.2.1	IZBOR ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV OPH/OPQ.....	33
4.2.2	OPTIMIZACIJA RAPD REAKCIJE.....	35
4.2.3	DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI Z OPH 6 IN OPQ 20	39
4.2.3.1	Določanje homogenosti pomnoženih odsekov DNK <i>B.subtilis</i> z OPQ 20	40
4.2.3.2	Določanje homogenosti pomnoženih odsekov DNK <i>B.subtilis</i> z OPH 6	43
4.3	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENTEROTOKSINOV	45
5.	SKLEP	48
6.	PRILOGA.....	49
7.	LITERATURA.....	51

Seznam preglednic

preglednica I: Taguchijeva tabela	13
preglednica II: Kombinacije koncentracij reagentov	24
preglednica III: Meritve koncentracij izolirane DNK	32
preglednica IV: Prikaz pomnoženih odsekov z OPQ 20 v posameznih vzorcih.....	42
preglednica V: Prikaz pomnoženih odsekov z OPH 6 v posameznih vzorcih.....	44
preglednica VI: Vrednotenje aglutinacije v posameznih celicah	47

Seznam slik

slika 1: Bacitracin A	5
slika 2: Cereulid	6
slika 4: Potek izolacije.....	16
slika 5: Magnetno stojalo MagnaRack™ (www.invitrogen.com)	17
slika 6: Elektroforeza vzorcev ob različnih časovnih ciklih izolirane DNK.....	33
slika 7: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPH.....	34
slika 8: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPH.....	34
slika 9: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPQ.....	34
slika 10: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPQ.....	34
slika 11: Optimizacija OPQ 7.....	36
slika 12: Optimizacija OPQ 8.....	36
slika 13: Optimizacija OPQ 18.....	36
slika 14: Optimizacija OPQ 20.....	36
slika 15: RAPD z OPQ 7, 8, 18.....	37
slika 16: RAPD z OPQ 18.....	37
slika 17: RAPD z OPQ 20.....	37
slika 18: RAPD z OPH 5, 6, 19.....	38
slika 19: Optimizacija OPH 6.....	39
slika 20: RAPD z OPQ 20 in izolati DNK B.subtilis.....	41
slika 21: RAPD z OPH 6 in izolati DNK B.subtilis.....	43
slika 23: Rezultat BCET-RPLA testa.....	46

POVZETEK

Gastrointestinalni trakt predstavlja bariero za antigene, ki jih lahko pridobimo z mikroorganizmi ali zaužijemo s hrano. Imunofiziološka regulacija je odvisna od ravnotežja prvotne mikroflore, ki ima pozitiven učinek na zdravje, počutje in aktivnost gostitelja. Črevesno mikrofloro vključujemo v proces prebave in lokalnega imunskega odziva.

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki izboljšujejo črevesno mikrofloro in imajo ugoden učinek na gostitelja. Nekateri seve probiotika *Bacillus subtilis*, ki izloča encime in antibiotike, preučujemo v genetskih in biokemijskih raziskavah že nekaj desetletij. Uvrščamo ga v rod *Bacillus*, prav tako kot *Bacillus cereus*, ki povzroča diarejske in emetične sindrome zastrupitve s hrano z različnimi toksini.

Namen diplomske naloge je bil določiti gensko stabilnost *B.subtilis* z uporabo metode naključno pomnožene polimorfne DNK (RAPD) s petimi različnimi izolati DNK, ki smo jih izolirali ob različnih časovnih ciklih razmnoževanja. Pred začetkom izvedbe omenjene reakcije smo RAPD metodo optimizirali z dvema različnima začetnima oligonukleotidoma. Ugotovili smo, da je *B.subtilis* gensko stabilen, saj so bili RAPD profili pomnoženih odsekov med sabo homogeni.

V raziskavo smo vključili tudi ugotavljanje prisotnosti enterotoksina Hbl v *B.subtilis* z reverzno pasivno aglutinacijo z lateksom (BCET-RPLA test). Rezultat testa je bil negativen; enterotoksin Hbl, ki ga izloča *B.cereus*, ni bil prisoten v preiskovani bakteriji *B.subtilis*. Izvedba testa je bila primerna, ker je bil rezultat pozitivne kontrole vzorca *B.cereus* ustrezen.

ABSTRACT

The gastrointestinal tract functions as a barrier against antigens from microorganisms and food. The generation of immunophysiological regulation in the gut depends on the establishment of indigenous microflora which exerts a positive effect on health, well-being and performance of the host. The balance of this microbial flora greatly influences the intestinal environment.

Probiotics are living microorganisms with a positive impact on the digestive microflora. Some strains of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* has been used for genetic and biochemical studies for several decades. *Bacillus subtilis* secretes enzymes and antibiotics. It is a member

of the genus *Bacillus* as *Bacillus cereus* which causes diarrheal and emetic food-poisoning syndromes, each caused by distinct toxins.

The purpose of this study was to determinate genetic stability of *B.subtilis* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers among five DNA isolates which were isolated at different cycles of growth. Before starting RAPD the reaction was first optimised by two primers. The conclusion of our study is that *B.subtilis* is genetically stabile at different times of growth. RAPD profiles of isolates were namely homologous.

In our study we also determined presence of *Bacillus cereus* enterotoxin Hbl in *B.subtilis* with BCET-RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) Kit. The result was negative, the enterotoxin was not present in *B.subtilis*. In addition, identification of enterotoxin with BCET-RPLA Kit was suitable, as confirmed with a positive control *B.cereus*.

SEZNAM OKRAJŠAV

AP-PCR	arbitrarily primed polymerase chain reaction (modifikacija verižne reakcije s polimerazo)
BHI	Brain Heart Infusion (gojišče)
bp	bazni par
BSA	Bovine serum albumine (goveji serumski albumin)
DAF	DNA Amplification Fingerprinting (modifikacija verižne reakcije s polimerazo)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Deoksinukleotidtrifosfat
G-C	gvanin-citozin
GIT	gastrointestinalni trakt
Hbl	hemolizin BL
IL-6	interlevkin 6
J	Jaccardov koeficient podobnosti
Nhe	nehemolitični enterotoksin
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
RAPD	random amplified polymorphic DNA (naključno pomnožena polimorfna DNK)
RNK	ribonukleinska kislina
št.	Številka
TB	Terrific Broth (gojišče)
TBE	tris-boratni pufer
TE	tris-EDTA pufer

1. UVOD

1.1 MIKROORGANIZMI V PREBAVNEM TRAKTU

Osnovna funkcija gastrointestinalnega trakta je prebava in absorpcija hrane za metabolne potrebe, ki so potrebne za normalno rast in razvoj organizma. Sluznica prebavnega trakta predstavlja tudi bariero za vstop antigenov mikroorganizmov ali hrane iz črevesnega lumna v krvni obtok. Zaščitno funkcijo imajo tudi slina, želodčna kislina, peristaltika črevesja, mukus, proteolitični encimi, črevesna mikroflora in epitelčne membrane s tesnimi stiki. Ob rojstvu pride do pomembne spremembe v GIT, saj se ta preusmeri iz predelave plodovnice v prebavo mleka. V postnatalnem razvoju otroka prihaja do sinteze mukoznih proteinov in prebavnih encimov ter tvorbe črevesne mikroflore. Del normalne črevesne flore predstavlja zaščito pred patogenimi mikroorganizmi (1).

Osnovne funkcije črevesne mikroflore so:

1. Procesi fermentacije, pri katerih se tvorijo kratkoverižne kisline, kot so očetna, butanojska in propanojska. Ti metaboliti so neposreden metabolni substrat za celice sluznice, pospešujejo njihovo rast ter absorpcijo vode. Absorbirajo se tudi maščobne kisline in prispevajo k energetskega metabolizmu ter v jetrih neposredno vplivajo na tvorbo proteinov akutne faze in vnetnih mediatorjev, kot je IL-6, sodelujejo pa tudi pri procesih programirane apoptoze.

2. Rezistenca proti kolonizaciji s patogenimi bakterijami. Pomembna je tudi sposobnost za tvorbo dušikovega oksida (NO) iz arginina. NO ima baktericiden učinek v ustni votlini, je vazodilatator, poveča pretok v visceralnih organih in izboljša motiliteto črevesa.

3. Stimulacija imunskega sistema. 70 % imunskega sistema se nahaja v črevesju (gut associated lymphoid tissue, GALT). Znani pomembni učinki so: aktivacija makrofagov, vpliv na ravnovesje T1/T2 limfocitov in vpliv na izločanje sekretornih imunoglobulinov v črevesju. Sprememba prehrane, stres, poškodbe, uporaba antibiotikov, pa tudi pretirana higiena spremenijo črevesno mikrofloro. Luminalni antigeni se lahko neposredno predstavljajo črevesnemu imunskemu sistemu. Prav tako lahko bakterije ter njihovi produkti neposredno dosežejo organe izven črevesja (mehanizem bakterijske translokacije).

Mikroorganizme v GIT delimo na probiotike, ki so za normalno funkcijo črevesja nujno potrebni, in na potencialno patogene bakterije. Probiotiki so živi mikroorganizmi, predvsem bakterije, ki preživijo prehod skozi prebavila in imajo ugoden učinek na gostitelja. Probiotični mikroorganizmi tekmujejo z drugimi (tudi patogenimi) mikroorganizmi v različnih mikrookoljih črevesa: na površini črevesnih epitelnih celic, v mukoznem gelu, ki pokriva epitel, in v črevesni svetlini. Večina mikroorganizmov v črevesju odraslega je obligatornih anaerobov, medtem ko je aerobov približno tisočkrat manj. Aerobne bakterije se nahajajo predvsem proksimalno v tankem črevesu, anaerobne bakterije pa prevladujejo v distalnem delu tankega črevesa in debelem črevesu. Med aerobi prevladujejo koliformne bakterije, streptokoki in fakultativno anaerobni laktobacili. Najpogostejši anaerobi pa so *Bacteroides sp.*, *Eubacteriae* in anaerobni laktobacili, peptokoki ter bifidobakterije (2).

Izraz probiotik pomeni tudi prehransko dopolnilo ali zdravilo, ki vsebuje žive, specifične mikroorganizme v zadostnem številu, ki pripomorejo k vzdrževanju uravnotežene črevesne mikroflore (3).

Ostali učinki probiotikov v črevesju:

- razgradnja hrane in detoksifikacija ksenobiotikov
- sinteza vitaminov skupine B in K
- antagonistično delovanje napram neželjenim mikroorganizmom
- zaščita črevesne sluznice pred invazivnimi mikroorganizmi
- prispevanje k razvoju in stimulaciji gostiteljevega imunskega sistema (4)

Dodatne prednosti uporabe probiotikov:

- izboljšujejo toleranco do laktoze z encimom laktaza
- večina inhibira bakterijske in virusne patogene z izločanjem antimikrobnih snovi (kisline, antibiotiki), s kompeticijo za kolonialna mesta in hranljive snovi. To je prednost pri zdravljenju gastroenteritisa in kroničnih boleznih, ki jih povzročajo patogeni (npr. ulcerozni kolitis)
- raziskave kažejo, da nekateri inhibirajo mikroorganizme, ki izločajo karcinogene, le-ti povzročajo rak črevesja
- nekateri razgrajujejo holesterol in s svojimi metaboliti inhibirajo njegovo sintezo v jetrih (uporabno pri kardiovaskularnih boleznih)

- lahko kompetirajo z *Candido albicans* pri sindromu razdražljivega črevesa (IBS) in pri kroničnih vnetij
- raziskave kažejo, da zmanjšujejo črevesno vnetje in hipersenzibilnost, kar sicer vodi v atopični ekcem (5)

1.2 PROBIOTIKI V HUMANI MEDICINI IN VETERINI

Glavna vloga mikroflore, ki se nahaja v prebavilih prežvekovalcev, je razgradnja rastlinskih polimerov (celuloza, hemiceluloza, škrob, proteini...). S tem procesom mikroorganizmi zagotovijo hranila, ki so pomembna za gostitelja (kratkoverižne maščobne kisline, aminokisline). Pri razgradnji proteinov nastaja amoniak, ki predstavlja vir dušika za bakterijsko sintezo proteinov. Uporaba amoniaka kot vira dušika je značilno za celulolitične bakterije, ki se nahajajo in delujejo v tankem črevesju in omogočajo prežvekovalcem, da prebavijo polimere rastlinske celične stene. Endogenih encimov za razgradnjo celuloze prežvekovalci nimajo.

Črevesna mikroflora je pri ljudeh ali monogastričnih živalih zelo razširjena in raznolika ter odgovorna za razgradnjo komponent hrane, ki ni bila predhodno prebavljena v zgornjem delu prebavnega trakta. Te komponente so večinoma polimeri rastlinske celične stene, škrob in nekateri proteini. Razgradni in fermentacijski procesi so podobni kot pri prežvekovalcih, resorpcija polimerov rastlinske celične stene pa poteka v manjši meri.

Število prevladujočih anaerobnih bakterij znaša 10^{10} do 10^{11} na gram prebavljene hrane. Pri sesalcih gre večinoma za predstavnike evbakterij, arhej in evkariontov. Identificiranih je okoli 400-500 različnih bakterijskih vrst v prebavnem traktu.

1.2.1 Probiotik *Bacillus subtilis*

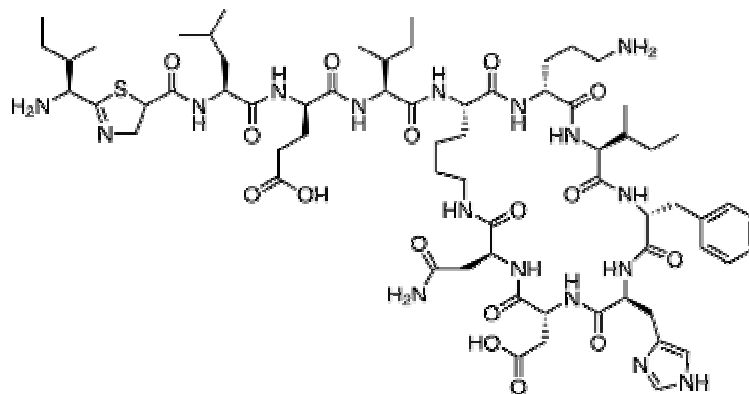
Probiotike, ki jih uporabljamo kot dodatek k živalski krmi, delimo v tri glavne skupine: mlečnokislinske bakterije, spore rodu *Bacillus* in glive kvasovke. Ena izmed vrst rodu *Bacillus* je gram pozitivna, nepatogena, sporogena bakterija *Bacillus subtilis*, ki se nahaja v zemlji. Nekateri seve te heterogene skupine so zaradi njihovih ugodnih učinkov izbrali za uporabo v prehrani pri živalih (4). Probiotik *B.subtilis* se uporablja tudi v humani medicini za

peroralno terapijo in profilakso pred GIT motnjami-diarejami, ki so lahko posledica obsežnega zdravljenja z antibiotiki. Ustrezní odmerek probiotika obnovi normalno črevesno mikrofloro (6). Probiotične seve razlikujemo od naravnih v njihovih specifičnih značilnostih z ozirom na varnost uporabe in način delovanja v prebavnem traktu.

Naravna sposobnost bakterije je sporulacija, ki omogoča preživetje pod neugodnimi zunanjimi pogoji in ohranitev lastne aktivnosti. Ko gostitelj s hrano zaužije spore *Bacillus*, se te kot vegetativne celice v manjšem obsegu razmnožijo v prebavnem traktu. Proces rasti poteka le ob prisotnosti hranil, vode in ustrezne telesne temperature (optimalna telesna temperatura je ugodna). Vpliv pH za omenjen rod bakterij še ni raziskan. Vrste *Bacillus* ne kolonizirajo prebavnega trakta, ampak postanejo del prehodne črevesne mikroflore. Kot eksogeni mikroorganizem ima velik potencial za stimulacijo lokalne črevesne imunosti. Optimizacija procesa sporulacije pri proizvodni bakterijskih sevov je ključnega pomena za kakovost probiotika.

Probiotične spore *Bacillus* se razmnožujejo v zgornjem delu prebavnega trakta, da lahko vplivajo na procese v tankem črevesju, ki so pomembni za resorpcijo hranil. Hkrati se z razmnoževanjem povečuje bakterijski metabolizem s katerim izloča metabolite v okolico. Metaboliti najverjetneje poslabšajo pogoje za razvoj patogenih mikroorganizmov (4).

V stacionarni fazi bakterije rodu *Bacillus* sintetizirajo encime (proteaze, amilaze), ki jim zagotavljajo dodaten vir hranil, in antibiotike (bacitracin), ki preprečujejo rast morebitnim tekmečem. Bacitracin je peptidni antibiotik, ki ga proizvajata *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*. Prečiščen bacitracin vsebuje najmanj 10 različnih zvutih konformacijskih oblik peptidov, ki se razlikujejo v eni ali dveh aminokislinah. Najbolj značilen izmed teh je razvejan ciklični dodekapeptid bacitracin A. Na N-terminalnem koncu linearnega pentapeptida se nahaja tiazolidinski obroč, na C-terminalnem koncu pa ciklični heptapeptid. Bacitracin A inhibira sintezo bakterijske celične stene Gram pozitivnih bakterij, vpliva tudi na funkcije membrane, delovanje nekaterih hidrolitičnih encimov in sintezo predhodnikov ubikinonov (7).



slika 1: Bacitracin A

1.2.2 Patogene vrste rodu *Bacillus*

Poznanih je tudi več vrst patogenov rodu *Bacillus*. *Bacillus anthracis* je patogen ljudem in živalim, *Bacillus cereus* je izvor zastrupitev s hrano. *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, in nekateri sevi of *B. sphaericus* so patogeni za določene insekte.

V numerični klasifikaciji, kjer so preučevali 118 lastnosti 368 vrst rodu *Bacillus*, je Priest s sod. (9) ugotovil 89-92 % podobnost med *B. thuringiensis*, *B. cereus* in *B. mycoides*. Podobnost med *B. subtilis* in *B. cereus* je bila 72 %.

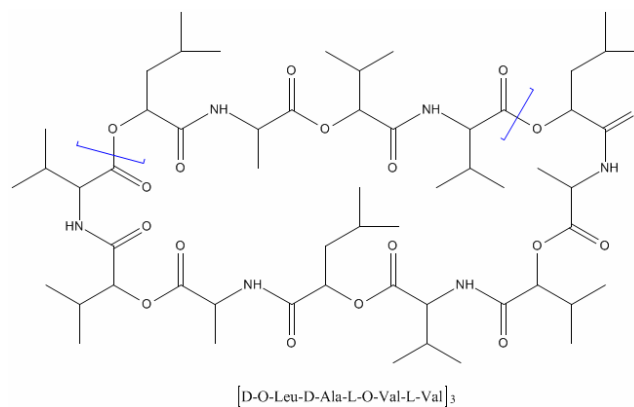
Prenos genov med vrstami *Bacillus* so raziskovali med gojenjem več različnih sevov v zemlji. Raziskave so pokazale, da imata *B. subtilis* in *B. thuringiensis* visoko sposobnost konjugacije s plazmidi. Odkrili so tudi, da ima *B. subtilis* sposobnost izražanja genov in sinteze toksinov ali njihovih komponent, ki jih je pridobil s prenosom genov drugih sorodnih vrst. Lahko izraža gene toksinov *Bordatella pertussis*, sintetizira podenote difterijskega toksina in pnevmolizina A (toksin pnevmokokov).

B. subtilis ne sintetizira lastnih toksinov, čeprav so ga povezovali z izbruhom zastrupitev s hrano. Natančni vzrok te povezave ni bil ugotovljen. *B. subtilis* in ostale sorodne vrste *B. licheniformis*, *B. pumulis*, in *B. megaterium* lahko sintetizirajo encim fosfolipazo, ki poškoduje celične membrane sesalčjih celic. Povezava z izločanjem encima in človeškimi boleznimi ni bila dokazana. Poleg fosfolipaze izločajo tudi ekstracelularni toksin subtilizin, ki mu je Gill s sod. (10) dokazal zelo majhno toksičnost. Predstavlja vzrok alergijskih reakcij ljudem, ki so mu pogosto izpostavljeni. *B. subtilis* ima nizko stopnjo patogenosti za ljudi, ne proizvaja značilne količine ekstracelularnih encimov in ne vsebuje ostalih patogenih

dejavnikov, ki bi povzročali infekcijo. Do infekcije pride le v primeru visokih koncentracij bakterije v organizmu ali ob zmanjšanem imunskem odzivu (8).

Najpogostejši vzrok infekcij je *B.cereus*, ki povzroča 2 tipa sindroma zastrupitve s hrano. Emetični sindrom nastane nekaj ur po zaužitju okužene hrane, diarejski sindrom pa 8–16 ur po zaužitju in vključuje bolečino v trebuhu ter diarejo. Oba tipa zastrupitve s hrano sta relativno blaga in pogosto ne trajata več kot 24 ur (11).

Emetični tip je posledica delovanja cikličnega termostabilnega dodekadepsipetida cereulida. Cereulid povzroča poškodbo celic in mitohondrijev, ker deluje kot kalijev ionofor. Mahler s sod. (12) ga povezuje tudi z akutno odpovedjo jeter pri ljudeh. Nedavno je Paananen s sod. (13) odkril, da inhibira delovanje naravnih celic ubijalk in s tem zavira imunski odziv.



slika 2: Cereulid

Vzrok za diarejski sindrom predstavljajo predvsem trije enterotoksini: hemolizin BL (Hbl), nehemolitični enterotoksin (Nhe) in citotoksin Cyt K (14). Najbolj raziskani je enterotoksin Hbl, ki je sestavljen iz dveh litičnih komponent L1 in L2 ter ene vezavne komponente B2 (15). Raziskave so pokazale, da je kombinacija vseh treh vzrok za lizo ovčjih eritrocitov, saj se komponenta B2 predhodno veže na površino celic, L1 in L2 pa povzročita lizo. Možen pa je tudi drugačen mehanizem; vse tri komponente se samostojno vežejo na celice in povzročijo nastanek kompleksa, ki vodi v osmotsko lizo celic (16). Enterotoksin ima hemolitično in dermonekrotično delovanje ter vpliva na prepustnost žilnega sistema (17).

Nehemolitični enterotoksin (Nhe) je bil prvič izoliran iz Hbl-negativnih sevov *B.cereus*. Sestavljen je iz treh komponent in nima hemolitične aktivnosti. Sprva so mislili, da je encim kolagenaza del Nhe, toda izkazalo se je za neresnično. Sekvencioniranje operona, ki izraža

gen za komponento NheA in NheB, je pokazalo, da obstaja nov gen, ki nosi informacijo za tretjo komponento Nhc (16).

Citotoksin CytK ima poleg nekrotičnega in hemolitičnega učinka tudi citotoksičen vpliv na črevesni epitel. Posledica tega je diarejski sindrom (18).

1.3 METODE ZA DETEKCIJO ENTEROTOKSINOV

Smernica Znanstvenega odbora za prehrano živali (Scientific Committee on Animal Nutrition, SCAN) Evropske Komisije predpisuje identifikacijo toksinov in ostalih virulentnih dejavnikov na molekularnem ter celičnem nivoju (19). Metode za ugotavljanje enterotoksinov temeljijo na encimsko-immunskih testih, citotoksičnih analizah, hemolitičnih testih na krvnem agarju in PCR reakciji.

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožujemo določen odsek na bakterijski DNK, ki nosi zapis za sintezo enterotoksinov. Odsek pomnožujemo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi *hblA1*, *hblA2*, *bceT1*, *bceT2*, *cytK1* in *cytK2*. Začetna oligonukleotida *hblA1* in *hblA2* pomnožujeta zaporedja gena *hblA*, ki nosi zapis za enterotoksin Hbl. Gen *bceT* nosi zapis za enterotoksin T (ima podobno delovanje kot Hbl), ki ga pomnožujemo z oligonukleotidi *bceT1* in *bceT2*. Za pomnoževanje gena *cytK* uporabljamo oligonukleotide *cytK1* in *cytK2*. Detekcija genov z metodo PCR potrdi, da je gen dejansko prisoten v mikroorganizmu, ne more pa določiti stopnjo njegove ekspresije. Možno je, da metoda določi modificiran gen, ki pa ni aktiven.

Citotoksična analiza na Vero celicah je trenutno najbolj uporabna metoda za ugotavljanje enterotoksinov, saj določa dejansko toksičnost sevov *B.cereus*. Glede na metodo je več kot 70 % izolatov *B.cereus* iz hrane toksičnih, zato je težko določiti kateri sevi so odgovorni za posamezen primer zastrupitve s hrano. Metoda je relativno poceni in bolj občutljiva kot encimsko-immunske metode, čas detekcije enterotoksinov je daljši kot 3 dni. *B.cereus* izloča tudi veliko nespecifičnih ekstracelularnih dejavnikov, ki so patogeni in citotoksični. Potreben je stalni nadzor nad celičnimi linijami.

Test za hemolizo na krvnem agarju je učinkovita in poceni metoda s katero ugotavljamo prisotnost bakterijskih sevov, ki izločajo Hbl. Na krvni agar (ovčji eritrociti) nacepimo bakterijski izolat in opazujemo specifičen hemolitičen obroč, ki je posledica delovanja

komponente B2. Hemoliza se ne pojavi tik ob vzorcu, ampak nekaj milimetrov dlje, kjer je koncentracija B2 manjša in omogoča vezavo s komponento L, kar povzroči hemolizo. Za uspešen rezultat je potrebna ustrezna zagotovitev optimalnih pogojev in medija.

Za encimsko-immunsko določanje enterotoksinov obstajata dva testa: BDE-VIA™ (Tecra) in RPLA-BCET (Oxoid). Becheer s sod. (20) navaja, da lahko vse tri komponente enterotoksina Hbl določimo z BCET-RPLA metodo. Meja kvantifikacije za komponento B2 je 625 ng/mL, za L1 2500 ng/mL in za komponento L2 0,6 ng/mL. Te raziskave so pokazale, da je test specifičen za komponento L2 enterotoksina Hbl, ki jo navaja tudi proizvajalec v meji kvantifikacije 1 ng/mL. Pozitivna kontrola testa, ki vsebuje komponento L2 Hbl, nima svoje hemolitične aktivnosti. Hemolizo povzroči v kombinaciji s komponento B2 in L1 (21). Test BDE-VIA™ deluje na principu Western blot analize supernatanta *B.cereus* in detektira le eno komponento nehemolitičnega enterotoksina NheA (22).

Dejstvo je, da nobeden izmed omenjenih encimsko-immunskih testov za dokazovanje enterotoksinov ni popolnoma ustrezen. BCET-RPLA odkriva enterotoksin Hbl, dejansko njegovo komponento L2, zato lahko dobimo lažno pozitiven rezultat. Bakterijski sev bi lahko izločal le L2, ki brez ostalih dveh komponent nima toksičnih učinkov. Prav tako velja za BDE-VIA™ s katero detektiramo le eno komponento enterotoksina Nhe, ki je brez ostalih dveh neaktivna. Znano je, da je izločanje le ene komponente enterotoksinov redko, saj se njihovi geni nahajajo na operonu in je razdalja med njimi kratka. Beecher s sod. (20) je navedel, da je potrebno več strožjih validacij in izboljšav teh testov preden lahko metodo zakonsko uveljavimo za splošno uporabo. Do takrat moramo biti preudarni do zaključkov, ki temeljijo na podatkih encimsko-immunskega testa.

Enterotoksin Hbl je glavni dejavnik pri diarejskem sindromu, saj povzroča največ toksičnih učinkov. Prisoten je približno pri polovici sevov *B.cereus* (21). Prednost uporabe BCET-RPLA metode za ugotavljanje prisotnosti enterotoksina Hbl je enostavna izvedba, nizka cena in rezultat dobimo v kratkem času.

1.4 DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI

1.4.1 Modifikacija PCR metode

V naravnem okolju se *Bacillus subtilis* navadno sooča z različnimi rastnimi pogoji, oksidativnim stresom in pomanjkanjem hranil. Da bi se prilagodil spremembam, je razvil sistem odziva s katerim izloča izrazito skupino proteinov (npr. oksidativno stresni proteini) in sporulira (23). Njegov kromosom je bistvena dedna zasnova, ki služi kot vir genetskih informacij, razvrstitev strukturnih in regulatornih genov pa predstavlja mesto genskega izražanja in dedovanja (24).

Z odkritjem PCR metode se je razvilo področje molekularne biologije v različnih raziskavah evolucije, klinične medicine, forenzične znanosti in odkrivanja patogenov. Sčasoma so modificirali PCR v metodo RAPD (random amplified polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrarily primed PCR) in DAF (DNA amplification fingerprinting). Vse tri metode delujejo na osnovi selektivnega podvojevanja odseka DNK z uporabo nespecifičnih začetnih oligonukleotidov. Uporabljamo jih za genetsko mapiranje, taksonomijo in filogenetske raziskave. Najpogosteje uporabljena je metoda naključno pomnožene polimorfne DNK (RAPD), saj ne potrebujemo radioaktivnih označevalcev in polakrilamidnega gela pri elektroforezi kot pri metodah AP-PCR in DAF. RAPD so na začetku uporabljali predvsem za ugotavljanje polimorfizma v raziskavah genetske raznolikosti, določevanje sorodnih vrst, izgradnjo genetskih map, identifikacijo kultivarjev, preučevanje genov, ki so odporni na insekte, in ugotavljanje spola z označevalci. Danes uporabljamo metodo tudi za genotoksične in karcinogene raziskave (25). Smernica Znanstvenega odbora za prehrano živali prav tako določa, da moramo določiti tveganje nastanka škodljivih učinkov, ki so posledica polimorfizma DNK (19). Stopnjo polimorfizma lahko določamo z ugotavljanjem genske stabilnosti s pomočjo modificirane PCR metode.

1.4.2 Naključno pomnožena polimorfna DNK (RAPD)

RAPD in sorodne metode imajo številne prednosti pred običajnimi metodami, ki temeljijo na hibridizacijski osnovi. Predhodno znanje o genomu vzorca ni potrebno. Za izvedbo potrebujemo majhno količino vzorca in pod določenimi pogoji je metoda nedestruktivna, kar uporabljamo pri rešetanju izrednih in dragocenih vzorcev. Pomnoževanje poteka le z enim

začetnim oligonukleotidom, če bi uporabljali več različnih, bi se le-ti hitro pomnoževali in profili pomnoženih odsekov bi bili nejasni. Pomembna prednost je tudi zelo visoka občutljivost metode, je relativno poceni in ne zahteva specializiranih ter dragih instrumentov. RAPD metoda je sposobna detektirati širok spekter poškodb DNK tako kot mutacije (točkovne mutacije, prerazporejanja nukleotidov). Pri kancerogenih študijah lahko sočasno detektiramo in pomnožujemo genomske spremembe brez predhodnega znanja o spremenjeni regiji DNK.

Kjub veliki koristi pri različnih načinih uporabe metode RAPD, poznamo tudi razne težave. Ena od teh je pojav lažnih pomnoževanj PCR produkta v negativni kontroli, ki ne vsebuje matrične DNK. Nekatere raziskave so pokazale slabo ponovljivost, ki je bila posledica okuženosti instrumentov in mutacij v genomski DNK. Če se profili pomnoženih odsekov iste matrične DNK ali posameznikov znotraj vrste razlikujejo med sabo, se ponovljivost rezultatov preverja s ponovitvijo RAPD reakcije z dvema različnima koncentracijama matrične DNK. Koncentraciji naj se razlikujeta vsaj za večkratnik 2. To je način s katerim preverjamo pojav lažnih in neponovljivih pomnoženih odsekov vzorca (25). Prav tako je Pellissier Scott s sod. (26) ugotovil, da lahko prihaja do pojava nestarševskih pomnoženih odsekov pri ugotavljanju starševstva, ki je sicer znano.

Največji izziv je najti vzrok za pojav razlik v profilu RAPD pomnoženih odsekov. Zato je večina primerov nepojasnjenih. Različni tipi poškodb DNK in mutacije lahko povzročijo enake profile sprememb v pomnoženih odsekih, kot so npr. spremembe v intenzivnosti odsekov, odsotnost ali prisotnost odseka. V tem primeru potrebujemo druge metode, ki določijo vrsto genotoksičnosti, kot npr. detekcija DNK vključkov in genske mutacije. Pri uporabi metode RAPD moramo upoštevati, da je primerjava podobnosti velikosti pomnoženih odsekov pokazatelj homogenosti med vzorci PCR produktov.

1.4.3 Optimizacija pogojev RAPD reakcije

Še preden postavimo zaključke o ustreznosti metode, moramo vrednotiti različne parametre, ki nanjo vplivajo. Kvaliteta izolirane DNK ima pomemben vpliv pri reakciji, ker ima pomnoževanje matrične DNK, ki je onečiščena s proteini, slabo ponovljivost. Tudi ustrezna koncentracija DNK je pomembna. Zaradi tega je možen nastanek profilov z različnimi jakostmi podvojevanja posameznih odsekov. Upoštevati moramo tudi vpliv koncentracije Mg^{2+} , dNTP in DNK polimeraze (25).

Različni strokovnjaki so ugotavljali pomen posameznih parametrov. Benter s sod. (27) je ugotovil, da z določenimi koncentracijami matrične DNK in DNK polimeraze ter ustreznim programom termičnih ciklov, lahko dobimo ponovljiv rezultat. Fraga s sod. (28) je z genom kubanske stenice preučeval vpliv posameznih koncentracij začetnega oligonukleotida, Mg^{2+} , matrične DNK in DNK polimeraze na RAPD reakcijo ter določil optimalne vrednosti reagentov. Profili pomnoženih odsekov so bili ponovljivi. Meunier s sod. (29) je dokazal, da na ponovljivost vpliva tudi blagovna znamka PCR cikličnega termostata in DNK polimeraze. Rezultati so bili ponovljivi samo na določeni aparaturi z ustrežno DNK polimerazo. Glede na Meunierjevo trditev, da na ustreznost rezultata vpliva tudi vrsta aparature, je Blixt s sod. (30) dokazal obnovljivost metode na vzorcu genoma *Yersinia enterocolitica*. Upošteval je optimalne pogoje reakcije, metodo je izvajal v drugem laboratoriju pod istimi pogoji.

V letu 1996, ko je Atienzar s sod. (25) izvajal prve raziskave z RAPD, je bil problem ponovljivosti že znan. Poleg tega so se pojavili pomnoženi odseki v negativni kontroli vzorca. PCR reagente razen DNK polimeraze so izpostavljali ultravijoličnemu sevanju, kar ni izboljšalo reakcije. Pri tem so nastali timinski dimeri DNK, ki so motili delovanje DNK polimeraze. Kljub temu so se na elektroforeznem gelu pojavili pomnoženi odseki. Ugotovili so, da so lažni odseki v negativni kontroli posledica nespecifične reakcije polimerizacije začetnih oligonukleotidov.

Na potek RAPD reakcije vpliva tudi temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov. Relativno nizka temperatura prileganja med 34 in 36 °C omogoča največje možno število mest za prileganje in posledično veliko število pomnoženih odsekov matrične DNK. Atienzar s sod. (31) navaja, da je s selektivnimi začetnimi oligonukleotidi možno doseči ustrezno ponovljivost večih pomnoženih odsekov, ki so različnih velikosti. Velik izkoristek in verodostojnost rezultatov sta odvisna tudi od drugih dejavnikov, ne le od temperature prileganja. Caetano-Annoles s sod. (32) je določil optimalno temperaturo prileganja 45-48 °C. Ostale raziskave so tudi določale višjo vrednost 48-52 °C. Glavna prednost pri tem je zmanjšanje možnosti nespecifičnega pomnoževanja odsekov DNK. Priporočeno je, da se v programu termičnih ciklov temperatura prileganja nastavi na 50 °C, če uporabljamo začetne oligonukleotide velikosti 10 bp.

Z matrično DNK primerne kakovosti, brez primesi in snovi, ki inhibirajo reakcijo, lahko detektiramo ustrezne RAPD profile odsekov. Intenziteta pomnoženih odsekov je odvisna od učinkovitosti interakcije med genomskim zaporedjem DNK in začetnim oligonukleotidom v prvih ciklih termične reakcije. Na interakcijo lahko vplivajo celične komponente pri onečiščeni DNK, še posebej na prileganje oligonukleotidov in delovanje DNK polimeraze. Koncentracija matrične DNK je tudi kritični dejavnik v vrednotenju ponovljivosti metode. Z njo zagotovimo veliko število pomnoženih odsekov in posledično boljše razlikovanje odsekov med sabo. Atienzar s sod. trdi, da za ugotavljanje ponovljivosti večinoma uporabljamo 5-20 ng genomske DNK. Gre za optimalno vrednost v območju 0,05-100 ng, ki ga navajajo ostali strokovnjaki (25). Benter s sod. (27) je ugotovil, da izolacija DNK ob različnih časih in izvajanje RAPD reakcije z isto DNK ob različnih dnevih povzroči pojav manjšega števila odsekov, ki se razlikujejo v intenziteti pomnoževanja. Poleg omenjenih dejavnikov je Khandka s sod. (33) objavil, da moramo za vsako uporabo posameznega začetnega oligonukleotida določiti njegovo optimalno koncentracijo. Z višanjem njegove koncentracije pomnožujemo več manjših odsekov matrične DNK. Če pa zmanjšamo koncentracijo oligonukleotidov, dobimo večinoma večje pomnožene odseke. Atienzar s sod. (31) pa je trdil, da lahko z različnimi začetnimi oligonukleotidi pod identičnimi optimalnimi pogoji reakcije dobimo ustrezen ponovljiv rezultat.

Relativno nizka koncentracija Mg^{2+} prepreči neželjene motnje prileganja začetnih oligonukleotidov. Raziskave so pokazale, da 3-6 mM Mg^{2+} omogoča zadostno ponovljivost metode. Prav tako je 2,5 enote DNK polimeraze v vzorcu optimalna vrednost napram nižjim koncentracijam encima. Spreminjanje koncentracije dNTP ima vpliv na lažno podvajanje odsekov v negativnih kontrolah. 0,33 mM dNTP povzroči več pomnoženih odsekov v vzorcih z matrično DNK, v negativnih kontrolah pa vpliva na zmanjšanje ali odsotnost profilov (25).

Za enostavno izvedbo optimizacije RAPD reakcije se največkrat uporablja Taguchijeva metoda. Taguchijeva metoda je razširjena pri načrtovanju razvojnih procesov v industriji, kjer poskušamo pridobiti čimveč informacij za zagotovitev optimalnih pogojev določenega procesa. Pri tem izvajamo najmanjše število možnih poskusov. Na začetku določimo dejavnike, ki najbolj vplivajo na potek procesa in nato preučujemo njihov vpliv. Spremenljivke v primeru metode RAPD so koncentracija genomske DNK, začetnega oligonukleotida, Mg^{2+} in dNTP. Vsaka ima najmanjšo (A), največjo (C) in srednjo vrednost (B) koncentracije znotraj optimalnega območja. Ker preučevanje vpliva posamezne spremenljivke zahteva 81 (3^4) RAPD reakcij, bi bili takšni poskusi zamudni in dragi.

Taguchijeva metoda določa $2k+1$ poskusov, kar pri 4 spremenljivkah ($k=4$) znaša le 9 RAPD reakcij s katerimi lahko določimo optimalne pogoje. Spremenljivke vnesemo v tabelo v kateri stolpci predstavljajo posamezno spremenljivko, vrstice pa posamezne RAPD reakcije (33).

preglednica I: Taguchijeva tabela

reakcija	1. spremenljivka	2. spremenljivka	3. spremenljivka	4. spremenljivka
1	A	A	A	A
2	A	B	B	B
3	A	C	C	C
4	B	A	B	C
5	B	B	C	C
6	B	C	A	B
7	C	A	C	B
8	C	B	A	C
9	C	C	B	A

Vrednosti spremenljivk lahko povzamemo iz raziskav Atienzarja s sod. (25), ki je določil naslednja optimalna območja pri temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov 50 °C:

- 3-6 mM Mg²⁺
- 330-440 µM dNTP
- 1-4 µM začetnih oligonukleotidov
- 1-25 ng genomske DNK

1.4.4 Spremembe RAPD profilov pomnoženih odsekov

Prisotnost poškodb DNK in mutacij znotraj zaporedja vezavnega mesta začetnega oligonukleotida lahko povzroči motnjo RAPD profila pomnoženih odsekov, ki ga primerjamo z RAPD profilom identične in nepoškodovane DNK. Več poškodb in mutacij nastane na delu DNK med dvema vezavnima mestoma, zato uporabljamo začetne oligonukleotide kratkih dolžin, velikosti 10 bp. Največji pomnoženi odseki so lahko veliki tudi do 4000 bp. Neposredni tipi DNK poškodb, ki onemogočijo delovanje DNK polimeraze, imajo večji vpliv na RAPD profil odsekov kot pa ostale točkaste mutacije. Insercije ali delecije nukleinskih baz morajo nastati v vezavnem mestu začetnega oligonukleotida, da lahko s pomočjo RAPD

profila ugotavljamo prisotnost mutacij. Moramo tudi poudariti, da so za odkrivanje sprememb v posameznih nukleotidih na vezavnih mestih potrebni striktno optimalni pogoji.

Vključek na DNK (kancerogene snovi) lahko onemogoči pomnoževanje odseka z DNK polimerazo ali povzroči razpad kompleksa z encimom, če se vključek nahaja na vezavnem mestu. V obeh primerih pomnoženega odseka ne moremo detektirati. Poznamo tudi primer, ko vključek na DNK povzroči odcepljanje encima, kar pomeni več proste DNK polimeraze in večjo intenziteto odseka v profilu. Pri točkovnih mutacijah na vezavnih mestih za začetne oligonukleotide lahko pride do pojava pomnoženega odseka. V tem primeru z delecijo ali insercijo nastane zaporedje, ki je komplementarno začetnim oligonukleotidom. Prav tako lahko točkasta mutacija spremeni zaporedje vezavnega mesta in onemogoči pomnoževanje (25). Jones s sod. (35) trdi, da polimorfni odsek nastane, če je prisotno vsaj 2 % mutirane DNK. Sicer pa je detekcija genskih prerazporeditev bolj pogosta in predstavlja glavni dejavnik sprememb RAPD profilov, kar vodi v nastanek polimorfnih odsekov.

Genske prerazporeditve in mutacije povzročajo tudi strukturne spremembe genomske DNK. Zaporedje na DNK, ki je bogato s G-C pari, lahko predstavlja močno sekundarno strukturo v obliki lasnice (hairpin loop), kar otežuje denaturacijo dvojne verige. V tem primeru pomnoževanje odseka ni popolno. Raziskave so pokazale, da lahko detektiramo mutacije, ki povzročajo stabilizacijo ali destabilizacijo sekundarnih struktur. Te se nahajajo na precej večjem območju DNK v primerjavi z velikostjo vezavnega mesta začetnega oligonukleotida.

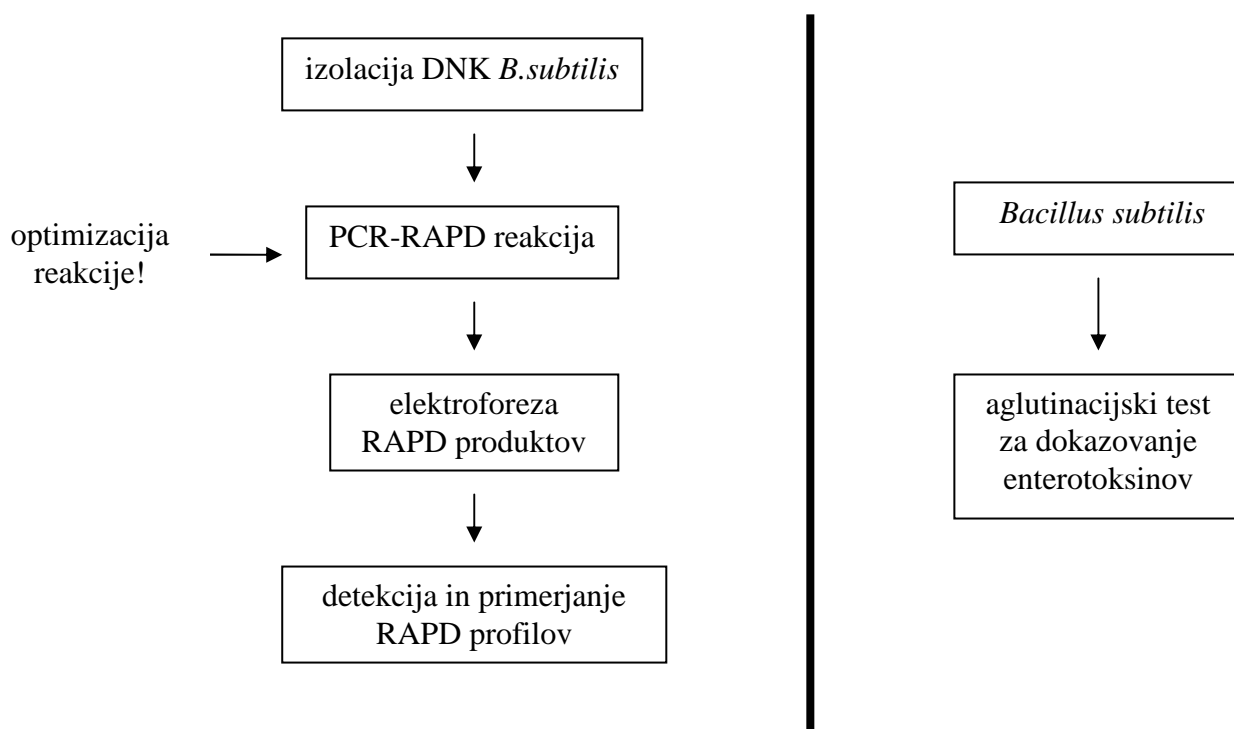
Uspešna uporaba RAPD metode za ugotavljanje DNK poškodb, genskih prerazporeditev in mutacij je povezana z dejstvom, da genotoksične poškodbe ne nastajajo slučajno. Interakcije med genotoksičnimi snovmi in genomsko DNK so znane ter njihove posledice (npr. strukturne spremembe) se pojavljajo v skoraj vseh poškodovanih celicah. Vrednotenje profila RAPD pomnoženih odsekov pri genotoksičnih študijah ni enostavno, saj je težko razlikovati med poškodbami in mutacijami DNK, ki vplivajo na spremembe v profilu. Preiskovani vzorec moramo izpostaviti različnim fizikalno-kemijskim pogojem (npr. kancerogene snovi), da primerjamo razliko v RAPD profilih s kontrolnim vzorcem (25).

2. NAMEN DELA

Namen našega dela je ugotoviti gensko stabilnost industrijskega seva *Bacillus subtilis* z modificirano PCR metodo naključno pomnožene polimorfne DNK (RAPD). Preučevali bomo prisotnost sprememb v genomu bakterije skozi več časovnih ciklov razmnoževanja.

Delo bo vključevalo izolacijo bakterijske DNK na osnovi spreminjanja naboja in vezave bioloških molekul z magnetom. DNK bomo izolirali iz bakterijskih kultur iz 5 različnih ciklov razmnoževanja–iz matične banke, po 5, 10, 15 in 20 precepitvah ter bo predstavljala matrično DNK pri RAPD reakciji. Izbrali bomo primerni začetni oligonukleotid in določili optimalne pogoje reakcije. Območja optimalnih pogojev bomo povzeli iz literature, specifično optimizacijo pa izvedli za vsak začetni oligonukleotid posebej. Homogenost profilov RAPD pomnoženih odsekov bomo primerjali med izolatom DNK, ki smo ga izolirali iz matične banke in tistimi, ki smo jih izolirali po 5, 10, 15 in 20 precepitvah.

Določali bomo tudi prisotnost enterotoksinov s kompletom reagentov na osnovi aglutinacijskega testa. Enterotoksin v vlogi antigena bo reagiral s specifičnimi protitelesi, kar bo povzročilo vidno aglutinacijo. Poleg pozitivne kontrole, ki jo vsebuje komplet reagentov, bomo test izvedli tudi na vzorcu *Bacillus cereus*, ki izloča diarejske enterotoksine. Rezultat aglutinacijskega testa bomo vrednotili po navodilu proizvajalca.

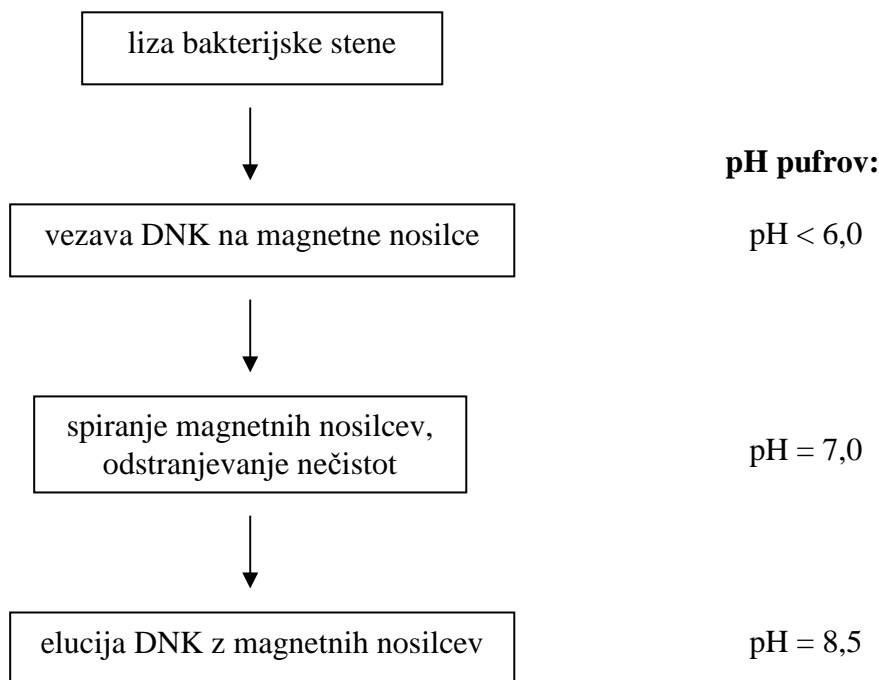


slika 3: Potek dela

3. MATERIALI IN METODE

3.1 IZOLACIJA DNK *B.SUBTILIS*

Tehnologija na osnovi spreminjanja naboja bioloških molekul (The ChargeSwitch® Technology, CST®) je novejša tehnika s katero lahko izoliramo DNK na osnovi menjave pH pogojev in z uporabo magnetov. Uporabljamo jo pri širokem spektru Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij. S spreminjanjem pH pogojev omogočimo izolacijo čiste DNK brez prisotnosti nečistot (proteini). Pri nižjih vrednosti pH (< 6,0) so magnetni nosilci pozitivno nabiti in selektivno vežejo negativno nabito DNK. Proteine in ostale nečistote odstanimo z vodno raztopino pufra za spiranje s pH 7,0. DNK eluiramo s pufrom za elucijo pH 8,5; kjer so magnetni nosilci negativno nabiti.



slika 4: Potek izolacije

Prednosti uporabljene tehnologije so: način izolacije DNK brez uporabe nevarnih kemikalij ali centrifugiranja, enostavna liza bakterijske stene s proteinazo K in lizocimom namesto uporabe mehanskih metod ter minimalna onečiščenost DNK z RNK (dodatek RNA-ze).

Magnetno stojalo (MagnaRack™) je sestavljeno iz spodnjega magnetnega dela in prenosljivega nosilca za vzorce. Nosilec vsebuje dve vrstici mest za vzorce v

mikrocentrifugirkah in se na dva načina prilega spodnjemu delu. Ena vrstica je vedno stiku z magneti, druga pa ne. Vzorce pripravljamo le v eni vrstici. Na magnetne jih postavljamo tako, da prestavimo položaj nosilca (36).



slika 5: Magnetno stojalo MagnaRack™ (www.invitrogen.com)

3.1.1 Priprava reagentov

- gojišče TB (Terrific Broth)

900 mL prečiščeni vodi smo dodali:

-bakto tripton	12 g
-bakto kvasni ekstrakt	24 g
-glicerol	4 mL

Sestavine smo raztopili in avtoklavirali. Dodali smo 100 mL 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 . Raztopino smo pripravili tako, da smo raztopili 2,31 g KH_2PO_4 in 12,54 g K_2HPO_4 v 90 mL prečiščeni vodi in dopolnili do 100 mL ter avtoklavirali 15 min pri 121°C pri tlaku 1,2 bar.

- 50 mg/mL raztopina lizocima:

-lizocim	25 mg
-dopolnimo do 0,5 mL s sterilno prečiščeno vodo	

- Reagenti v kompletu:
 - RNAza v resuspenzijskemu pufu R4, shranjujemo pri 4 °C
 - proteinaza K, shranjujemo pri 4 °C
 - ChargeSwitch® magnetni nosilci
 - ChargeSwitch® vezavni pufer
 - ChargeSwitch® pufer za lizo
 - ChargeSwitch® pufer za spiranje
 - ChargeSwitch® pufer za elucijo

3.1.2 Priprava kulture *B.subtilis* v različnih stopnjah razmnoževanja

Stanje bakterije *B.subtilis* ob različnih stopnjah razmnoževanja so predstavljale spore *B.subtilis*, ki so bile pripravljene ob različnem številu precepcev. Spore iz matične banke so bile nacepljene na sporulacijsko gojišče, ki je vsebovalo škrob, sojino moko, mlečno kislino, kalcijev karbonat, amonijev hidrogenfosfat in agar. Sledilo je 20 precepcev bakterije, po vsaki precepitvi je bakterijska kultura sporulirala. Spore so bile shranjene z dodatkom glicerola pri -70 °C. Za izolacijo DNK smo uporabili kulture, ki so bile pridobljene po 5., 10., 15. in 20. precepitvah.

Bakterijsko kulturo smo pripravili tako, da smo nacepili 10 µL kulture spor *B.subtilis* v 10 mL gojišča TB in inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo nacepili 100 µL kulture v 10 mL gojišča TB in inkubirali pri 37 °C. Po 2 h smo začeli spektrofotometrično meriti optično gostoto pri valovni dolžini 600 nm. Optimalna vrednost po določenem času je bila 3-3,5.

3.1.3 Izolacija bakterijske DNK

Pred začetkom smo vsebino raztopine RNAze A dodali resuspenzijskemu pufu in dobro premešali. Na vsebniku smo označili, da je RNAza dodana in jo shranili pri 4 °C.

5 µL sveže pripravljene raztopine lizocima smo dodali 100 µL resuspenzijskemu pufu z dodatkom RNAze za vsak vzorec. Izolacija bakterijske DNK je sestavljena iz lize bakterijske stene, vezave, spiranja in elucije DNK.

Liza bakterijske stene: pripravili smo termoblok pri 37 °C in 55 °C. 0,5 mL prekonočne bakterijske kulture *B.subtilis* smo centrifugirali 1 min pri 13000 obratih in zavrgli supernatant. Bakterijske celice *B.subtilis* smo suspendirali s 100 µL resuspenzijskega pufra z dodatkom RNA-ze in 5 µL raztopino lizocima ter jih premešali s stresalnikom. Vzorce smo inkubirali 10 min pri 37 °C. Med inkubacijo smo zmešali 500 µL pufra za lizo z 10 µL raztopine proteinaze K za vsak vzorec. Vsakemu vzorcu smo dodali 500 µL pufra za lizo z dodano raztopino proteinaze K in jih premešali tako, da smo 6-krat obrnili mikrocentrifugirko. Vzorce smo inkubirali 10 min pri 55 °C.

Vezava DNK: vsebino suspenzije magnetnih nosilcev smo premešali s stresalnikom. 40 µL suspenzije smo dodali vsakemu vzorcu in premešali z nežnimi potegi z nastavkom pipete, da nismo ustvarili zračnih mehurčkov. Vsakemu vzorcu smo dodali 300 µL vezavnega pufra in vsebino premešali z 5-6 kratkimi pulzi s stresalnikom. Vzorce smo inkubirali 1 min pri sobni temperaturi. Nato smo postavili vzorce na magnete za 1 min, oziroma dokler se niso nosilci oprijeli stene mikrocentrifugirke. Odstranili smo supernatant, ne da bi se dotikali magnetnih nosilcev.

Spiranje DNK: vzorce smo odstranili z magnetov in vsakemu dodali 1 mL pufra za spiranje. Vsebinsko smo zmešali z nežnim pipetiranjem brez tvorjenja zračnih mehurčkov. Vzorce smo postavili na magnete za 1 min in odstranili supernatant. Postopek smo ponovili.

Elucija DNK: vzorce smo odstranili z magnetov in vsakemu dodali 200 µL pufra za elucijo. Vsebinsko smo zmešali z nežnim pipetiranjem brez tvorjenja zračnih mehurčkov. Vzorce smo inkubirali 5 min pri 60 °C. Za pridobitev večjega izkoristka elucije smo na polovici inkubacije ponovno premešali vzorce. Po inkubaciji smo jih postavili na magnete in prenesli supernatant v sterilne mikrocentrifugirke. Vzorce izolirane bakterijske DNK smo shranili pri 4 °C.

3.1.4 Merjenje koncentracije izolirane DNK

Organske baze v nukleinskih kislinah imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm. Z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini lahko neposredno določimo koncentracijo, vendar le, če vzorec ni onečiščen (npr. s proteini). Čistost preverimo z merjenjem absorbance pri 230, 260 in 280 nm (37).

Reagenti, laboratorijski pribor in oprema:

- bakto tripton (Becton, Dickinson and Company)
- baktokvasni ekstrakt (Becton, Dickinson and Company)
- KH_2PO_4 (Sigma)
- K_2HPO_4 (Acros Organics)
- lizocim (Sigma)
- inkubator/stresalnik IS-170 (Kambič Laboratorijska oprema)
- komora z laminarnim pretokom zraka SMBC 183AV (Iskra PIO)
- polavtomatske pipete (Brand)
- nastavki za pipete (Brand)
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Brand)
- stresalnik (Vortex)
- spektrofotometer Lambda 25 (Perkin Elmer)
- sistem za dokumentacijo (računalniški program Lambda 25)
- parni sterilizator A500/700 (Kambič Laboratorijska oprema)
- termoblok TechneDB-3D (Techne Cambridge Ltd)

3.2 DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI

3.2.1 Priprava začetnih oligonukleotidov OPH/OPQ

Metoda naključno pomnožene polimorfne DNK (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) deluje na osnovi verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR). PCR tehnika 'in vitro' eksponentno pomnožuje majhne količine določenega odseka DNK ob prisotnosti dveh specifičnih začetnih oligonukleotidov in encima DNK polimeraze. Reakcija poteka ob različnih termičnih ciklih, ki so pogoj za denaturacijo DNK, vezavo in podaljševanje začetnih oligonukleotidov do zadostnega števila kopij za nadaljno analizo (38).

Pri metodi RAPD uporabljamo začetne oligonukleotide velikosti 10 bp in naključnega zaporedja, ki se pri nižjih temperaturah nespecifično prilegajo na matrično DNK. Ob primerni temperaturi prileganja v termičnem ciklu se začetni oligonukleotid veže na več komplementarnih mest na matrični DNK. Če so komplementarna mesta dovolj narazen, DNK

polimeraza podaljšuje oligonukleotid. Velikost pomnoženih kopij je odvisna od zaporedja na krajnih odsekih vsake kopije. Pomnožene odseke ločimo z agarozno elektroforezo, kjer ugotavljamo njihovo velikost in število. Pojavljanje prisotnih in odsotnih odsekov med dvema preiskovanima DNK kaže na prisotnost insercij in delecij nukleotidov oz. na genetsko raznolikost preiskovancev (39).

3.2.1.1 Priprava reagentov

- TE (Tris-EDTA) pufer:
 - Tris baza 60,5 mg
 - EDTA x 2 H₂O 18,5 mg
 - dopolnimo do 50 mL s prečiščeno vodo

Uravnali smo pH 7,0 s koncentrirano HCl. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

3.2.1.2 Eksperimentalno delo

Začetne oligonukleotide iz kompletov OPH in OPQ smo centrifugirali 5 min pri 5000 obratih/min pri 4 °C. Pripravili smo 100 µM raztopino začetnih oligonukleotidov tako, da smo jih raztopili v določenem volumnu sterilnega TE pufera s pH 7,0. Shranili smo jih pri -80 °C. Volumni TE pufera so omenjeni v poglavju Priloga.

3.2.2 RAPD reakcija z začetnimi oligonukleotidi OPH/OPQ

Vsak komplet OPH in OPQ je vseboval 20 začetnih oligonukleotidov. Namen je bil izbrati primerne začetne oligonukleotide za nadaljno optimizacijo reakcije.

3.2.2.1 Priprava reagentov

- 1 mg/mL goveji serumski albumin (BSA):
 - goveji serumski albumin 1 mg
 - do 1 mL dopolnimo s prečiščeno vodo

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

3.2.2.2 Eksperimentalno delo

Pred začetkom dela smo delovno površino in laboratorijski pribor temeljito očistili s 70 % etanolom in 0,5 % natrijevim hipokloritom.

Na ledu smo pripravili zmes za 21 enot reakcijskih mešanic posameznega začetnega oligonukleotida (en komplet je vseboval 20 začetnih oligonukleotidov). Vsaka enota reakcijske mešanice z volumnom 25 μL je vsebovala 2 μM začetnega oligonukleotida OPH/OPQ, 3 mM MgCl_2 , 330 μM dNTP, 25 ng izolirane DNK iz *Bacillus subtilis*, 1x PCR pufer; 2,5 μg govejega serumskega albumina in 2,5 enote DNK *Taq* polimeraze. Reakcijo pod omenjenimi pogoji smo poimenovali izhodiščna reakcija. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali:

- 52,5 μL 10 x PCR pufer
- 63 μL 25 mM MgCl_2
- 17,3 μL 10 mM dNTP
- 52,5 μL 1 mg/mL BSA
- 57,7 μL 9,09 $\mu\text{g/mL}$ DNK *B.subtilis* KBL 0/1
- dopolnili do 504 μL s sterilno prečiščeno vodo

Zmes smo razdelili po 24 μL v 20 PCR epruvet in jih označili z oznakami začetnih oligonukleotidov OPH/OPQ 1-20. Vsaki smo dodali 0,5 μL pripadajočega začetnega oligonukleotida in 0,5 μL DNK *Taq* polimeraze, ki mora biti ves čas na hladilnem stojalu pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$. PCR epruvete smo pulzno za kratek čas centrifugirali in postavili v PCR ciklični termostat.

PCR ciklični termostat smo programirali za naslednje pogoje:

- prvi cikel izvajamo pri temperaturi $95\text{ }^\circ\text{C}$ in traja 4 min
- 39 ciklov izvajamo pri temperaturah $95\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 1 min; $50\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 1 min in pri $74\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 1 min
- zadnji cikel izvajamo pri temperaturah $95\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 1 min; $50\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 1 min in pri $74\text{ }^\circ\text{C}$, ki traja 10 min

Po končani PCR reakciji smo vzorce pulzno za kratek čas centrifugirali in shranili pri $4\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Priprava vzorcev za optimizacijo RAPD reakcije

Za optimizacijo RAPD reakcije smo izbrali začetne oligonukleotide OPQ 7, 8, 18 in 20 ter OPH 6, ker so najbolj izrazito podvojevali odseke matrične DNK.

Pri pripravi vzorcev za optimizacijo smo določili naslednje spremenljivke v 25 μL reakcijski mešanici: začetni oligonukleotid OPH/OPQ s koncentracijami 1, 2 in 4 μM ; MgCl_2 s koncentracijami 3; 4,5 in 6 mM; dNTP s koncentracijami 300, 385 in 440 μM ; ter DNK *B.subtilis* z vsebnostjo 5, 12 in 25 ng. S kombiniranjem njihovih koncentracij smo določevali optimalne pogoje za PCR reakcijo.

Kombinacije različnih koncentracij v reakcijski mešanici smo predstavili z 10 reakcijami. V vsako PCR epruveto smo odpipetirali:

- 2,5 μL 10 x PCR pufra
- x μL 25 mM MgCl_2
- y μL 10 mM dNTP
- w μL začetnega oligonukleotida OPH /OPQ
- 2,5 μL 1mg/mL BSA
- z μL 9,09 $\mu\text{g/mL}$ DNK *B.subtilis* KBL 0/1 in
- dopolnili do 24,5 μL s sterilno prečiščeno vodo
- 0,5 μL DNK Taq polimeraze

Volumen x, y, w in z je odvisen od koncentracij reagentov v delovni raztopini.

preglednica II: Kombinacije koncentracij reagentov

št. reakcije	MgCl ₂ (mM)	dNTP (μM)	začetni oligonukleotid OPH/OPQ (μM)	DNK <i>B.subtilis</i> (ng)
1	3	330	1	5
2	3	385	2	12
3	3	440	4	25
4	4,5	330	2	25
5	4,5	385	4	5
6	4,5	440	1	12
7	6	330	4	12
8	6	385	1	25
9	6	440	2	5
10	3	330	2	25

PCR epruvete smo centrifugirali, postavili v PCR ciklični termostat in nastavili obstoječe pogoje izvajanja PCR reakcije.

3.2.4 Določanje genske stabilnosti z OPH 6 in OPQ 20

Gensko stabilnost seva *Bacillus subtilis* smo določevali z RAPD reakcijo z začetnima oligonukleotidoma OPH 6 in OPQ 20. Pogoje reakcije smo povzeli iz predhodnih optimizacijskih raziskav.

DNK *B.subtilis* smo izolirali iz 5 različnih časovnih ciklov razmnoževanja bakterije – iz matične banke, nato po 5, 10, 15 in 20 precepitvah, tako da smo imeli 5 različnih izolatov DNK. Koncentracija DNK *Bacillus subtilis* izoliranega iz matične banke je bila 9,09 μg/mL, po 5 precepitvah 8,30 μg/mL, po 10 precepitvah 9,36 μg/mL, po 15 precepitvah 7,99 μg /mL in po 20 precepitvah 8,03 μg/mL. RAPD reakcijo smo izvajali s posameznim začetnim oligonukleotidom na vseh izolatih DNK *B.subtilis*.

Za RAPD reakcijo z začetnim oligonukleotidom OPH 6 smo uporabili sledeče koncentracije reagentov: 3 mM MgCl₂, 385 μM dNTP, 2 μM OPH 6 in 12 ng DNK *B.subtilis*. Za RAPD reakcijo z OPQ 20 pa: 4,5 mM MgCl₂, 330 μM dNTP, 2 μM OPH 7 in 25 ng DNK *B.subtilis*. Za vsak komplet RAPD preučevanja genetske stabilnosti z posameznim začetnim oligonukleotidom smo uporabili 5 reakcijskih mešanic skupaj s slepimi vzorci. Slepí vzorec (negativna kontrola) je namesto izolata DNK vseboval enak volumen sterilne prečiščene vode.

V vsako PCR epruveto smo odpipetirali:

- 2,5 μL 10 x PCR pufra
- x μL 25 mM MgCl_2
- y μL 10 mM dNTP
- w μL začetnega oligonukleotida OPH/OPQ
- 2,5 μL 1 mg/mL BSA
- z μL pripadajočega izolata DNK *B.subtilis* in
- dopolnili do 24,5 μL s sterilno prečiščeno vodo
- 0,5 μL DNK Taq polimeraze

Volumen x, y, w in z je odvisen od koncentracij reagentov v delovni raztopini.

PCR epruvete smo centrifugirali, postavili v PCR ciklični termostat in nastavili obstoječe pogoje izvajanja PCR reakcije.

Reagenti, laboratorijski pribor in oprema:

- koncentrirana HCl
- goveji serumski albumin (BSA 98 %, For electrophoresis, Sigma)
- 5 IU/ μL DNK polimeraze AmpliTaq®gold (Applied Biosystems)
- DNK *Bacillus subtilis*
- sterilna prečiščena voda
- začetni oligonukleotid OPH/OPQ (Operon)
- GeneAmp® 10 x koncentrirani PCR Gold pufer (150 mM Tris-HCl pH 8,0 in 500 mM KCl, Applied Biosystems)
- GeneAmp® 25 mM MgCl_2 (Applied Biosystems)
- GeneAmp® 10 mM dNTP Mix z dTTP (Applied Biosystems)
- PCR epruvete (Brand)
- centrifuga Safe Lock 2 mL (Eppendorf)

3.3 ELEKTROFOREZA RAPD PRODUKTOV

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Večina bioloških molekul (aminokislina, peptidi, nukleinske kisline) nosi nabite skupine in se zato v raztopini obnaša kot anion ali kation. Pod vplivom električnega toka te molekule potujejo proti katodi ali anodi, hitrost potovanja pa je odvisna od njihovega celokupnega naboja, oblike, velikosti; kar vodi do njihove ločitve.

Za ločevanje makromolekul (nukleinske kisline, proteini) se danes uporabljata agarozni in poliakrilamidni gel. Dimenzije por v agaroznih gelih so precej večje kot tiste v poliakrilamidnih, zato se agarozna uporablja predvsem za ločevanje zelo velikih molekul, kot so npr. nukleinske kisline. Metodo izvajamo horizontalno, agarozni gel leži popolnoma potopljen v raztopino elektrolita. Vzorec nanese v žepke, še prej mu dodamo saharozo ali glicerol (večja gostota) ter eno ali več indikatorskih barvil (bromfenol modro, ksilencianol). Slednja nam olajšajo nanos vzorca, poleg tega pa služijo kot indikator položaja nukleinskih kislin določene velikosti v gelu. Z agarozno elektroforezo lahko določimo velikost nukleinske kisline, če poleg vzorca nanese na gel tudi standarde znane dolžine (40).

Prednosti uporabe horizontalne agarozne elektroforeze so:

- enostavna priprava različnih velikosti gelov
- enostavno rokovanje z geli,
- dolga življenska doba aparature
- metoda je relativno poceni (41)

3.3.1 Priprava 1,4 % agaroznega gela

3.3.1.1 Priprava reagentov

- 10 xTBE pufer (Tris-boratni pufer):
 - tris baza 108 g
 - borova kislina 55 g
 - 0,5 M EDTA pH 8 40 mL
 - do 1000 mL dopolnimo s prečiščeno vodo

Raztopino smo shranili pri 4 °C. Delovna raztopina je 1 x TBE pufer, pripravili smo jo tako, da smo koncentrirano raztopino 10 x razredčili. Shranili smo jo pri sobni temperaturi.

3.3.1.2 Eksperimentalno delo

Pripravili smo 250 mL 1,4 % (m/m) agaroznega gela. V 250 mL erlenmajerico smo zatehtali 1,75 g agaroze in jo suspendirali v 1 x TBE do skupne mase 125 g. Agarozo smo raztopili s segrevanjem in dodali sterilno prečiščeno vodo do prvotne mase. Postopek smo ponovili s paralelko in ju združili. Raztopino agaroze smo vlili v nosilec velikosti 25 x 15 cm.

3.3.2 Elektroforeza

3.3.2.1 Priprava reagentov

- 6 X nanašalni pufer za 10mL:
 - 0,25 % bromfenol modro 25 mg
 - 0,25 % ksilen cianol 25 mg
 - 40 % saharoza 4 g
 - dopolnimo do 10 mL s prečiščeno vodo

Raztopino smo shranili pri 4 °C.

- 10 mg/mL raztopina etidijevega bromida:
 - etidijev bromid 10 mg
 - do 1 mL dopolnimo s prečiščeno vodo

Raztopino smo shranili v temnem prostoru pri sobni temperaturi.

- 1 M raztopina MgSO₄:
 - MgSO₄ x 7 H₂O 24,6 g
 - do 100 mL dopolnimo s prečiščeno vodo

Raztopino smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C pri tlaku 1,2 bar.

3.3.2.2 Eksperimentalno delo

Pred začetkom priprave vzorcev smo PCR produkte pulzno za kratek čas centrifugirali. Kadičko za elektroforezo smo napolnili z 1 x TBE pufrom. Vzorce za nanos smo pripravili tako, da smo 15 μL PCR produktu dodali 3 μL 6 x nanašalnega pufra. Raztopino standarda (raztopina s standardnimi velikostmi dolžin) smo pripravili tako, da smo 0,5 μL markerju 100 bp DNA Ladder dodali 1 μL 6 x nanašalnega pufra in 4,5 μL sterilne prečiščene vode.

Vzorce in standard smo nanесли na agarozni gel. Elektroforeza je potekala pri napetosti 4,0 V/cm, čas trajanja je bil 4 h in 15 min.

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v delovno raztopino etidijevega bromida s koncentracijo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (20 μL koncentrirane raztopine smo razredčili s 400 mL prečiščene vode) za 20 min. Nato smo ga spirali 40 min v delovni raztopini 1 mM MgSO_4 (koncentrirano raztopino smo 1000 x razredčili).

Gel smo obsevali z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm.

Reagenti, laboratorijski pribor in oprema:

- agarosa (For Routine Test, Molecular Biology Tested, Sigma)
- tris baza (Trizma® base, Biotech. Performance Certified, Sigma)
- borova kislina (For Electrophoresis, Sigma)
- EDTA (EDTA-dinatrijeva sol dihidrat 98+ %, Molecular Biology Tested, Sigma)
- bromfenol modro (Electrophoresis reagent, Sigma)
- ksilencianol (Sigma)
- saharoza (For Molecular Biology, Sigma)
- etidijev bromid (Sigma)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Reagent Plus, Sigma)
- sterilna prečiščena voda
- elektronska tehtnica (Excellence Plus XP56, Mettler Toledo)
- mikrovalovna pečica (Goldstar)
- elektroforezna kadička (SubCell GT, Biorad)
- nosilec za vlivanje gela velikosti 25 x 15 cm
- glavnički za 15 žepkov

- vir napetosti za elektroforezo (Power Pac 3000, Biorad)
- UV svetilka (Gel Doc 1000, Biorad)
- sistem za dokumentacijo (računalniški program Molecular Analyst® Software)

3.4 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENTEROTOKSINOV

Komplet reagentov za ugotavljanje diarejskih enterotoksinov deluje na principu reverzne pasivne aglutinacije z lateksom (reversed passive latex agglutination, RPLA). Pri standardnih aglutinacijskih testih topna protitelesa reagirajo s specifičnimi bakterijskimi antigeni, ki so pritrjeni na določeno snov. Pri reverzni pasivni aglutinaciji z lateksom pa protitelesa, ki so vezana na lateks, reagirajo s topnim antigenom. Lateks ima pri tem le pasivno vlogo, ne sodeluje pri poteku aglutinacije. Premreževanje njegovih delcev v specifični reakciji protitelo/antigen predstavlja viden rezultat aglutinacijskega testa.

Lateks iz polistirena je senzibiliziran s kunčjim antiserumom, ki vsebuje protitelesa proti diarejskemu enterotoksinu *Bacillus cereus*. Kontrolni reagent vsebuje delce lateksa z imunske nevtralnimi globulini, ki ne povzročajo aglutinacijo z antigenom. Bakterijske vzorce (filtrat bakterijske kulture, vzorec hrane) nanesimo v dve vrstici celic in dodamo ustrezno suspenzijo lateksa v vsako celico. Če je enterotoksin *Bacillus cereus* prisoten, se tvori mrežasta struktura, kar je vzrok za aglutinacijo. Struktura se usede na dno celice in tvori difuzno plast. Če enterotoksin ni prisoten ali pa je njegova koncentracija pod mejo detekcije, mrežasta struktura ne nastane (42).

Vsebina kompleta reagentov BCET-RPLA:

- senzibilizirajoči lateks
- kontrolni lateks
- kontrolni enterotoksin
- topilo

3.4.1 Priprava reagentov

- BHI (Brain Heart Infusion):

-BHI 7,4 g

-agar 3 g

-dopolnimo do 200 mL s prečiščeno vodo

BHI smo raztopili v prečiščeni vodi in dodali agar. Tekoče gojišče smo avtoklavirali, vlili v petrijevke in pustili na sobni temperaturi, da se strdi.

3.4.2 Eksperimentalno delo

Bakterijske kulture *Bacillus subtilis* in *Bacillus cereus* smo nacepili iz trajnih zmrznjenih kultur na gojišče na BHI gojišče z agarjem in inkubirali 6-18 ur pri 32 °C v stresalniku z 250 nihajev/min. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 20 min pri 900 g.

Dodali smo 0,5 mL topila h kontrolnemu enterotoksinu in nežno premešali, da se je vsebina raztopila. Pretresli smo vsebino senzibilizirajočega lateksa, da je nastala homogena suspenzija. Mikrotitrne plošče smo obrnili tako, da je vsaka vrstica vsebovala 8 nanašalnih celic. Za vsak vzorec potrebujemo 2 vrstici. Z multikanalno pipeto smo nanесли 25 µL topila v vsako celico, razen v prvo v obeh vrsticah. Nato smo dodali 25 µL vzorca v prvo in drugo celico v obeh vrsticah. Z multikanalno pipeto smo iz druge celice prenesli 25 µL v tretjo celico, s pipetnim nastavkom premešali vsebino ter prenesli 25 µL v četrto celico v isti vrstici. Tako smo nadaljevali z razredčevanjem vzorca do predzadnje celice. Zadnja celica je vsebovala le topilo.

V vsako celico v prvi vrstici smo dodali 25 µL senzibilizirajočega lateksa. V vsako celico v drugi vrstici pa 25 µL kontrolnega lateksa. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s pokrovom in s krožnimi gibi zanihali ploščo v vodoravni legi, da smo premešali vsebino celic. Postavili smo jo na črno podlago na nevibrirajočo površino za 20-24 ur pri sobni temperaturi.

Na mikrotitrski plošči smo po opisanem postopku delali s tremi vzorci: kontrolni enterotoksin, vzorec bakterijske kulture *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*.

Reagenti, laboratorijski pribor in oprema:

- gojišče BHI – Brain Heart Infusion (Oxoid)
- agar (Becton, Dickinson and Company)
- TD951 senzibilizirajoči lateks (Oxoid)
- TD952 kontrolni lateks (Oxoid)
- TD953 kontrolni enterotosin (*B. cereus* enterotoksin, Oxoid)
- TD954 topilo (soli fosfatnega pufra z BSA, Oxoid)
- mikrotitrne plošče Cellstar TC-plate (96 celic, V-oblika, Greiner Bio One)
- multikanalna pipeta (Brand)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZOLACIJA DNK *B.SUBTILIS*

Uspešnost izolacije in kvaliteto DNK *B.subtilis* smo preverili s pomočjo spektrofotometrične analize in agarozne elektroforeze.

4.1.1 Merjenje koncentracije izolirane DNK

Koncentracijo izolirane DNK smo izmerili s spektrofotometrom Lambda 25. Z računalniškim programom smo obdelali podatke in izračunali razmerja meritev pri 230, 260 in 280 nm. Razmerje absorbanc pri 260/280 z vrednostjo nad 1,7 ponazarja čisto DNK. Razmerje z nižjo vrednostjo ponazarja onečiščenost DNK s proteini (43).

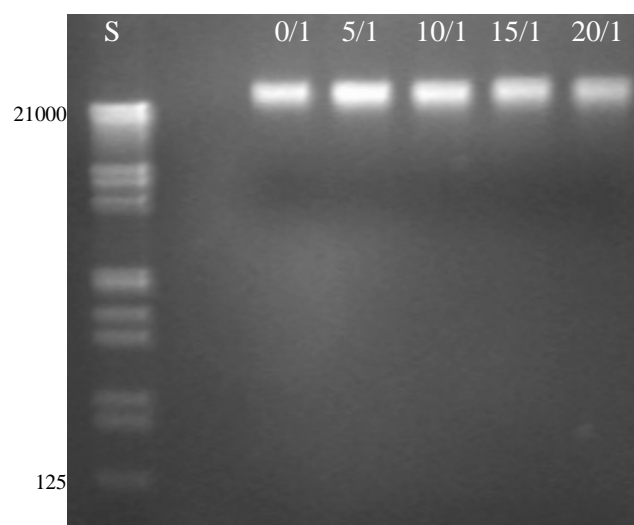
preglednica III: Meritve koncentracij izolirane DNK

vzorec*	A(260 nm)	A(280 nm)	R(260/280)	koncentracija (µg/mL)
KBL 0/1	0,18	0,09	2,05	9,09
KBL 5/1	0,17	0,08	1,94	8,30
KBL 10/1	0,19	0,10	1,95	9,36
KBL 15/1	0,16	0,08	2,03	7,99
KBL 20/1	0,16	0,08	2,02	8,03

*oznake KBL 0/1, 5/1, 10/1, 15/1, in 20/1 predstavljajo vzorce, ki so bili izolirani iz matične banke, nato po 5, 10, 15 in 20 precepitvah.

4.1.2 Elektroforeza vzorcev izolirane DNK

Ustreznost vzorcev izolirane DNK smo preverili s pomočjo agarozne elektroforeze. Vzorec za nanos smo pripravili tako, da smo 2 µL izolirani DNK dodali 1 µL 6 x nanašalnega pufra in dopolnili do 6 µL s sterilno prečiščeno vodo. Vzorec standarda smo pa pripravili tako, da smo 0,5 µL standardu λ HindIII/ EcoR1 dodali 1 µL 6 x nanašalnega pufra in dopolnili do 6 µL s sterilno prečiščeno vodo. Elektroforeza je potekala pri napetosti 10 V/cm, čas trajanja je bil 50 min.



slika 6: Elektroforeza vzorcev ob različnih časovnih ciklih izolirane DNK. Okrajšave: S-standard, 0/1-KBL 0/1, 5/1-KBL 10/1, 15/1-KBL 15/1, 20/1-KBL 20/1

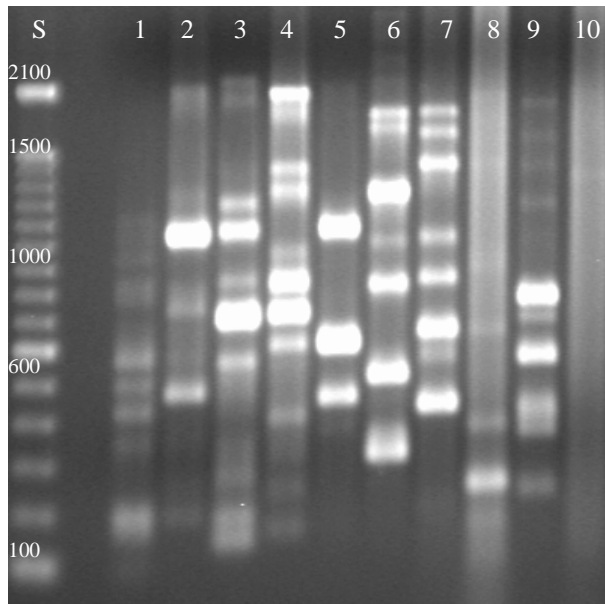
Na elektroferogramu je pri vsakem vzorcu videti le en odsek, ki predstavlja genomsko DNK (slika 6). To pomeni, da ni onečiščena z drugimi snovmi (npr. RNK). V nasprotnem primeru bi bili vidni odseki manjših dolžin.

4.2. DOLOČANJE GENSKE STABILNOSTI

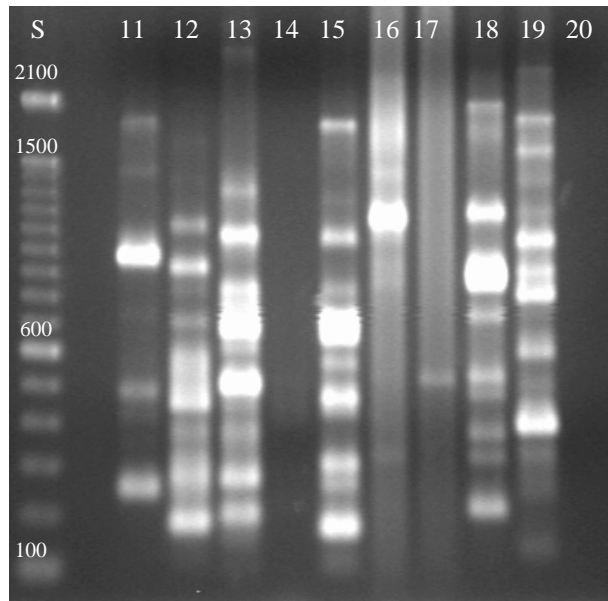
4.2.1 Izbor začetnih oligonukleotidov OPH/OPQ

Začetne oligonukleotide za RAPD reakcijo smo izbrali iz dveh kompletov OPH in OPQ, vsak je vseboval 20 začetnih oligonukleotidov. Med vsemi začetnimi oligonukleotidi smo nameravali izbrati takšne, ki bi ustrezno pomnoževali odseke matrične DNK (KBL 0/1). Odseki profila RAPD bi morali zadoščati določenim kriterijem: morajo biti jasno razvidni, ločeni med sabo in imeti primerno intenziteto. Vsako reakcijo s posameznim začetnim oligonukleotidom smo izvedli pod pogoji izhodiščne reakcije, ki smo jo povzeli iz literature (25) (2 μ M začetni oligonukleotid OPH/OPQ, 3 mM MgCl₂, 330 μ M dNTP, 25 ng izolirane DNK KBL 0/1, 1 x PCR pufer; 2,5 μ g BSA; 2,5 enote DNK polimeraze) z volumnom 25 μ L (slika 7,8,9,10).

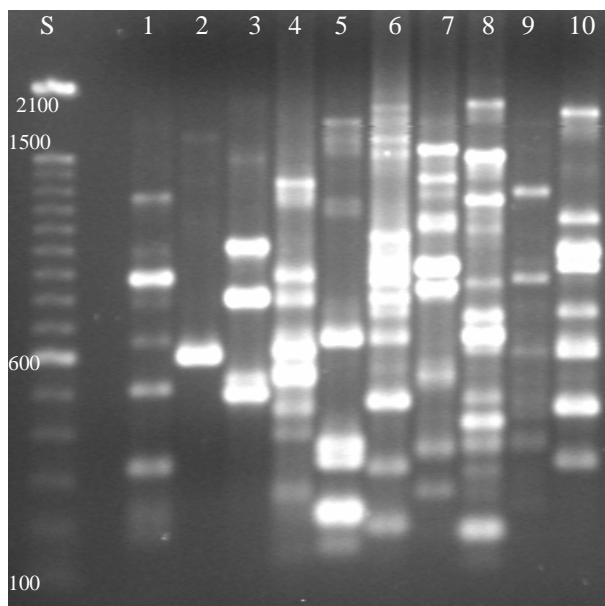
Glede na rezultate RAPD reakcije (slika 7,8,9,10) smo za nadaljnje delo izbrali začetne oligonukleotide z oznako 7, 8, 18 in 20 iz kompleta OPQ.



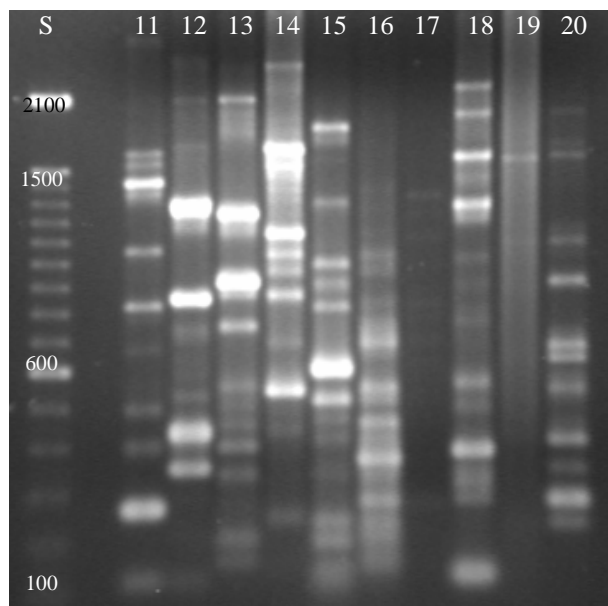
slika 7: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPH. Okrajšave: S-standard, 1-10: reakcije z OPH 1-10



slika 8: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPH. Okrajšave: S-standard, 11-20: reakcije z OPH 11-20



slika 9: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPQ. Okrajšave: S-standard, 1-10: reakcije z OPQ 1-10



slika 10: RAPD z začetnimi oligonukleotidi OPQ. Okrajšave: S-standard, 11-20: reakcije z OPQ 11-20

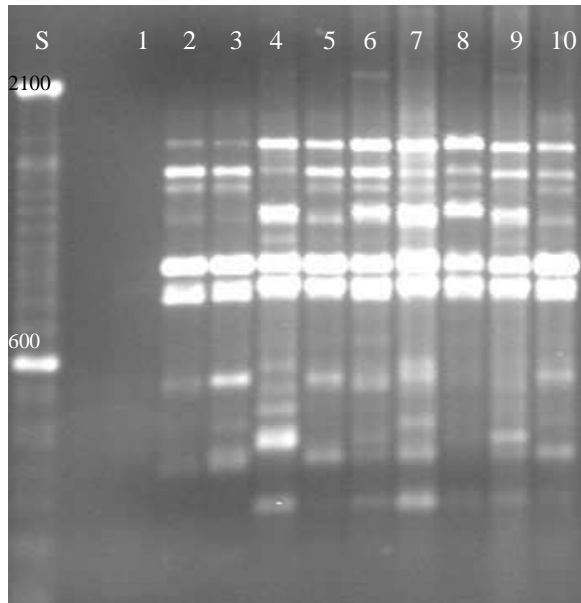
4.2.2 Optimizacija RAPD reakcije

Optimalne pogoje RAPD reakcij smo določili na osnovi Taguchijeve tabele, ki predstavlja kombinacije vsebnosti reagentov v reakciji. Ker so prisotne 4 spremenljivke reagentov (MgCl_2 , dNTP, OPH/OPQ, DNK *B.subtilis*), je bilo možnih 9 različnih kombinacij pogojev. V raziskavi smo uporabili 10 kombinacij, saj smo kot dodatno kombinacijo izbrali še pogoje izhodiščne reakcije. Z njimi smo določali optimalne pogoje s posameznimi začetnimi oligonukleotidi OPQ 7, OPQ 8, OPQ 18 in OPQ 20. V takšnem vrstnem redu smo RAPD produkte nanegli na agarozni gel in jih označili na elektroferogramu.

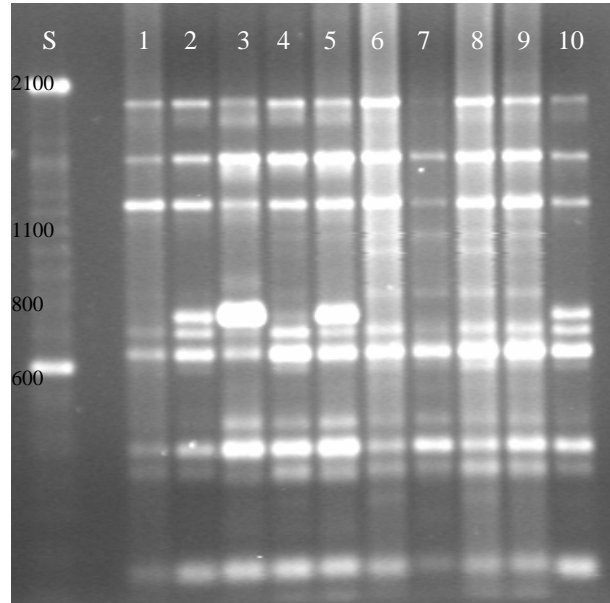
Pri izvajanju optimizacije metode RAPD z OPQ 7 smo kot najbolj optimalno izbrali reakcijo pod oznako 6 (slika 11), ki vsebuje 4,5 mM MgCl_2 , 440 μM dNTP, 1 μM OPQ 7 in 12 ng DNK *B.subtilis*. Pomnoženi odseki so imeli primerno intenziteto in bili jasno razvidni na profilu RAPD.

Kot najbolj optimalne pogoje za delo z OPQ 8 smo izbrali pogoje izhodiščne reakcije z oznako 10 (slika 12) (3 mM MgCl_2 , 330 μM dNTP, 2 μM OPQ 8 in 25 ng DNK *B.subtilis*). Specifično pomnoženi odseki so bili pod omenjenimi pogoji jasno razvidni. Pri ostalih reakcijah je bilo videti nespecifična pomnoževanja nizkih intenzivnosti z velikostjo med 800 in 1100 bp. Možen vzrok za nespecifična pomnoževanja je bila večja občutljivost OPQ 8 na spremembe v koncentracijah reagentov.

Pri optimizaciji metode z OPQ 18 smo izbrali optimalne pogoje reakcije z oznako 6 (slika 13), ki je vsebovala 4,5 mM MgCl_2 , 440 μM dNTP, 1 μM OPQ 18 in 12 ng DNK *B.subtilis*. Intenziteta pomnoženih odsekov je bila ustrezna.

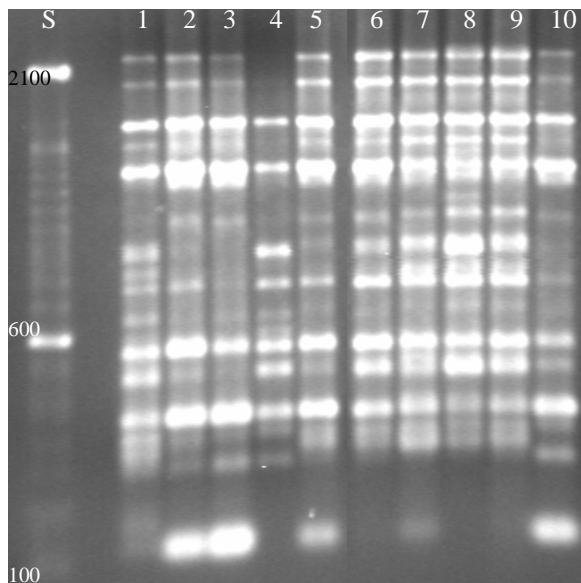


slika 11: Optimizacija OPQ 7. Okrajšave: S-standard, 1-10: zaporedna št. reakcije

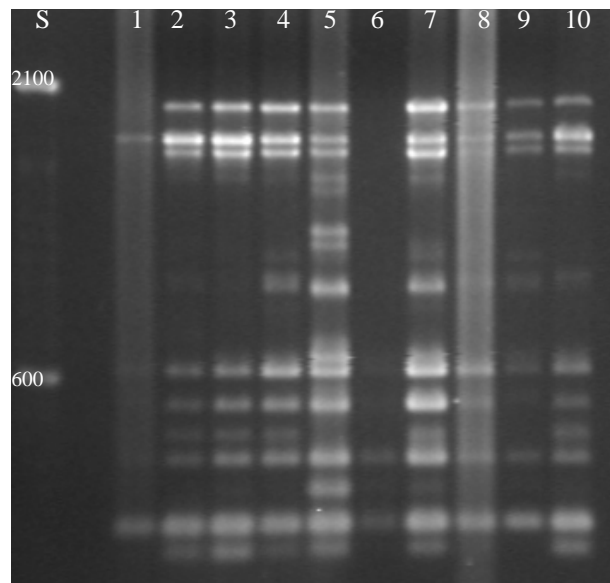


slika 12: Optimizacija OPQ 8. Okrajšave: S-standard, 1-10: zaporedna št. reakcije

Optimalne pogoje metode RAPD z OPQ 20 smo izbrali pod pogoji reakcije z oznako 4 (slika 14), ki je vsebovala 4,5 mM MgCl₂, 330 μM dNTP, 2 μM OPQ 20 in 25 ng DNK *B.subtilis*. Pomnoženi odseki so bili jasno razvidni in primerne intenzitete.



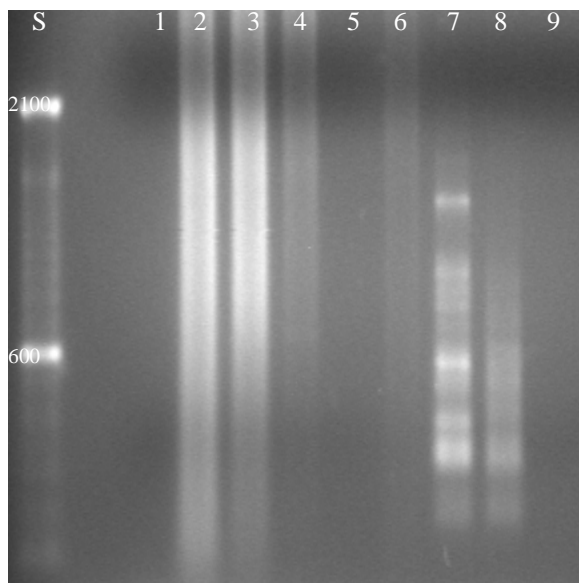
slika 13: Optimizacija OPQ 18. Okrajšave: S-standard, 1-10: zaporedna št. reakcije



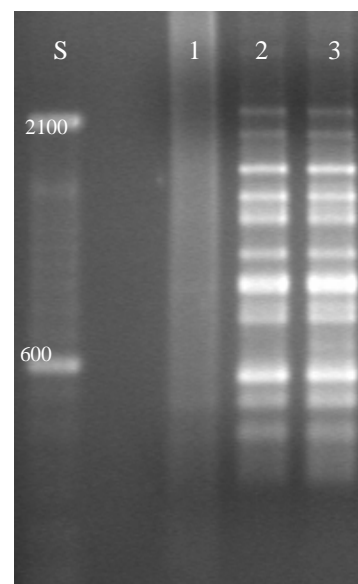
slika 14: Optimizacija OPQ 20. Okrajšave: S-standard, 1-10: zaporedna št. reakcije

Po opravljeni optimizaciji RAPD metode s posameznimi OPQ 7, 8, 18 in 20 smo preverjali ponovljivost metode. Z vsakim izbranim začetnim oligonukleotidom OPQ smo pod optimalnimi pogoji ponovili reakcijo s paralelnimi vzorci. Pri izvedbi RAPD reakcij z OPQ 7, 8 in 18 smo ugotovili neustrezno ponovljivost. Pomnoženi odseki RAPD reakcij z OPQ 7 in OPQ 8 niso zadoščali kriterijem, negativne kontrole so bile neustrezne (slika 15). Profil RAPD reakcij z OPQ 18 je bil neprimeren, paralele vzorcev niso bile primerljive med sabo (slika 16). Ponovljivost je bila ustrezna le pri reakciji z OPQ 20 (slika 17). Profil RAPD paralelnih vzorcev je bil primerljiv, specifični pomnoženi odseki so bili vidni.

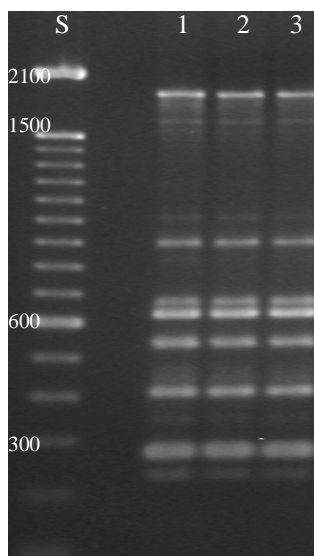
Neustrezna ponovljivost RAPD reakcije z OPQ 7 in OPQ 8 je bila prisotna tudi po več ponovitvah. Vzrok za to je bil najverjetneje vpliv koncentracijskih sprememb v reakciji.



slika 15: RAPD z OPQ 7, 8, 18. Okrajšave: S-standard; 1,2-OPQ 7; 3-neg.kontrola OPQ 7; 4,5-OPQ 8; 6-neg.kontrola OPQ 8; 7,8-OPQ 18; 9-neg.kontrola OPQ 18



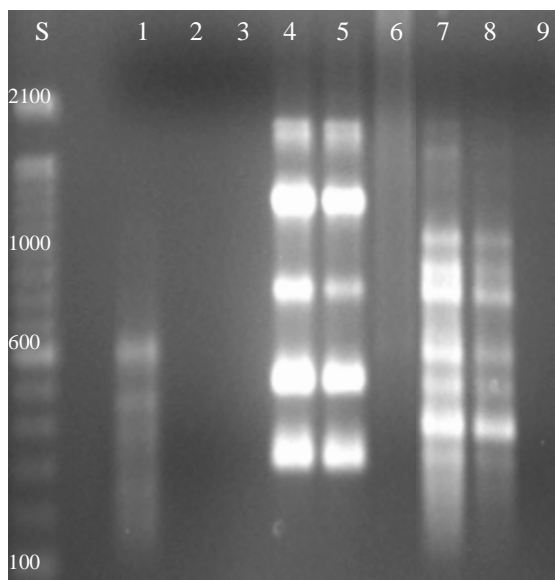
slika 16: RAPD z OPQ 18. Okrajšave: S-standard, 1-3: OPQ 18



slika 17: RAPD z OPQ 20. Okrajšave: S-standard, 1-3: OPQ 20

Izbrali smo še nekaj dodatnih začetnih oligonukleotidov iz kompleta OPH (OPH 5, 6 in 19), ki so pri reakcijah izbire začetnih oligonukleotidov (slika 7 in 8) ustrezali kriterijem (jasna razvidnost pomnoženih odsekov, primerna intenziteta). Z njimi smo izvedli RAPD izhodiščno reakcijo z več paralelnimi vzorci, še preden smo določili optimalne pogoje reakcije z omenjenimi OPH 5, 6 in 19. Na ta način lahko v primeru neustreznega rezultata pri RAPD z izhodiščno reakcijo prihranimo zalogo reagentov (10 x PCR pufer, MgCl₂, dNTP, OPH, DNK *B.subtilis*, DNK polimeraze), ki bi jih porabili pri 10 RAPD reakcijah optimizacije s posameznim OPH.

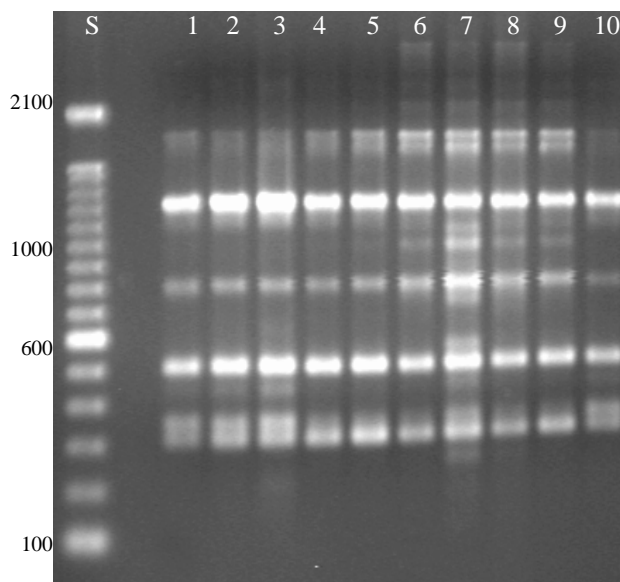
RAPD profili izhodiščnih reakcij z OPH 5 in OPH 19 so bili neustrezni (slika 18). Pri reakcijah z OPH 5 smo opazili odsotnost pomnoženih odsekov, pri reakcijah z OPH 19 pa slabo ponovljivost paralelnih vzorcev. Paraleli reakcij RAPD z OPH 6 so bili primerljivi, zato smo se odločili za nadaljnje delo z omenjenim začetnim oligonukleotidom.



slika 18: RAPD z OPH 5, 6, 19. Okrajšave:
S-standard; 1,2-OPH 5; 3-neg.kontrola OPH 5;
4,5-OPH 6; 6-neg.kontrola OPH 6; 7,8-OPH 19;
9-neg.kontrola OPH 19

Optimizacijo RAPD metode z OPH 6 smo izvedli identično kot pri določanju optimalnih pogojev z začetnimi oligonukleotidi OPQ. Med 10 RAPD reakcijami z OPH 6, ki smo jih izvedli pod različnimi pogoji, smo izbrali najbolj optimalno. Za optimalne pogoje smo izbrali

reakcijo z oznako 2, ki je vsebovala 3 mM MgCl₂, 385 μM dNTP, 2 μM OPQ 6 in 12 ng DNK *B.subtilis* (slika 19). Profil RAPD pogojev reakcije z oznako 2 ni vseboval nespecifičnih pomnoženih odsekov kot profili reakcije z oznakami 6, 7, 8 in 9. Pomnoženi odseki so bili ustrezne intenzitete.



slika 19: Optimizacija OPH 6. Okrajšave: S-standard, 1-10: zaporedna št. reakcije

Za določanje genetske stabilnosti smo izbrali začetna oligonukleotida OPQ 20 in OPH 6.

4.2.3 Določanje genske stabilnosti z OPH 6 in OPQ 20

Gensko stabilnost smo določali s primerjavo RAPD profilov DNK *B.subtilis*, ki smo jih izolirali ob različnih ciklih razmnoževanja bakterije. Homogenost velikosti pomnoženih odsekov različnih izolatov DNK znotraj istega bakterijskega seva je zadosten pokazatelj genske stabilnosti (25).

DNK *B.subtilis* smo izolirali iz kultur, ki smo jih predhodno pripravili iz spor iz matične banke z oznako KBL 0/1 in iz spor, ki smo jih pridobili po večkratnih precepitvah. Oznake bakterijskih kultur KBL 5/1, KBL 10/1, KBL 15/1 in KBL 20/1 predstavljajo bakterijske kulture gojene po 5, 10, 15 in 20 precepitvah. RAPD reakcijo smo izvajali z DNK izolati omenjenih kultur, ki so predstavljali matrično DNK začetnima oligonukleotidoma OPQ 20 in OPH 6. Pri RAPD reakcijah z OPQ 20 smo uporabili pogoje reakcije z oznako 4, pri OPH 6

pa pogoje reakcije z oznako 2. Profile RAPD s KBL 5/1, KBL 10/1, KBL 15/1 in KBL 20/1 smo predstavili v obliki dveh paralel vzorcev in negativne kontrole, profil RAPD s KBL 0/1 pa s tremi paralelami. Negativna kontrola (slepi vzorec) je vsebovala enako vsebnost sterilne prečiščene vode namesto DNK *B.subtilis*. Z njo smo preverjali nastanek nespecifične reakcije polimerizacije začetnih oligonukleotidov in pojav lažnih odsekov.

Podobnost pomnoženih odsekov znotraj RAPD profilov različnih DNK izolatov smo določali z Jaccardovim koeficientom podobnosti (J). Jaccardov koeficient predstavlja razmerje med skupnimi elementi dveh vzorcev ($|A \cap B|$) in vsoto elementov ($|A \cup B|$), ki pripadajo enemu ali drugemu vzorcu (ali obema). Če je velikost koeficienta okoli vrednosti 0, so si vzorci manj podobni. Koeficient z vrednostjo 1 pa označuje vzorce, ki so identični med sabo. Jaccardov koeficient podobnosti med vzorcema A in B lahko zapišemo kot:

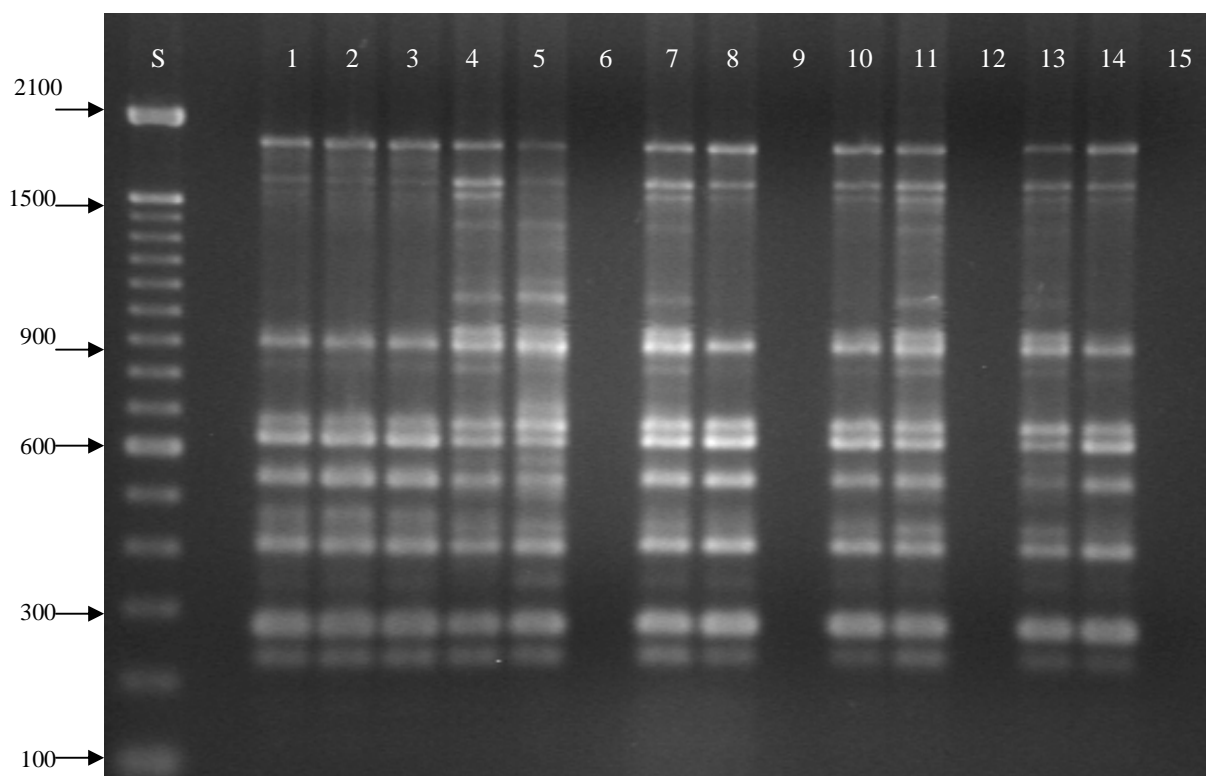
$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Vzorca A in B sta predstavljala RAPD profila določenega DNK izolata, ki sta vsebovala različno število pomnoženih odsekov. Vsak pomnoženi odsek v profilu je predstavljal element vzorca. Prisotnost posameznega elementa v vzorcu smo označili z 1, odsotnost pa z 0.

4.2.3.1 Določanje homogenosti pomnoženih odsekov DNK *B.subtilis* z OPQ 20

RAPD reakcije z OPQ 20 in različnimi izolati DNK *B.subtilis* smo izvajali pri pogojih 4,5 mM MgCl₂, 330 μM dNTP, 2 μM OPQ 20 in 25 ng DNK *B.subtilis* (slika 20). Primerljivost paralelnih vzorcev KBL 0/1 je bila ustrezna. Pri vseh ostalih vzorcih smo opazili odseke velikosti 350, 580, 700 in 1000-1400 bp z nizko intenziteto. Ti odseki so se pojavljali v eni od paralel vseh vzorcev KBL 10/1, KBL 15/1 in KBL 20/1, razen v KBL 0/1, zato smo jih ocenili kot nespecifične. Negativne kontrole so bile pri vseh posameznih RAPD profilih ustrezne, lažni odseki niso bili prisotni.

Vzrok za nespecifična pomnoževanja so bile najverjetneje tehnične napake pri pipetiranju majhnih volumnov reagentov in razdeljevanju reakcijske zmesi na paralele. Posledica tega je sprememba optimalnih pogojev prileganja začetnih oligonukleotidov, vezava na nespecifična mesta DNK in manjša intenzivnost pomnoževanja odsekov.



slika 20: RAPD z OPQ 20 in izolati DNK *B.subtilis*. Okrajšave: S-standard, 1-3: KBL 0/1; 4,5-KBL 5/1, 6-neg.kontrola KBL 5/1; 7,8-KBL 10/1, 9-neg.kontrola KBL 10/1; 10,11-KBL 15/1, 12-neg.kontrola KBL 15/1; 13,14-KBL 20/1; 15-neg.kontrola KBL 20/1

Izmed vseh paralelnih RAPD profilov posameznih izolatov smo izbrali tiste, ki so vsebovali največ skupnih specifičnih pomnoženih odsekov. To so bili vzorci izolatov KBL 0/1-nanos št.2, KBL 5/1-nanos št.4, KBL 10/1-nanos št.7, KBL 15/1-nanos št.10 in KBL 20/1-nanos št.13. Vse specifične odseke določenega DNK izolata smo označili glede na velikost in jih označili z 1, kar pomeni prisotnost odseka v RAPD profilu (preglednica IV). Število specifičnih pomnoženih odsekov v vsakem RAPD profilu je bilo 13. V preglednici IV so označeni s sivo barvo.

Na osnovi preglednice IV smo izračunali Jaccardov koeficient podobnosti med vzorci KBL 0/1, KBL 5/1, KBL 10/1, KBL 15/1 in KBL 20/1. Vzorca, ki smo ju primerjali, smo označili z oznako A in B.

$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Pri tem velja:

$|A \cap B|$ = število elementov, ki so prisotni v obeh preiskovanih vzorcih

$|A \cup B|$ = število elementov, ki so prisotni v enem ali drugem vzorcu

preglednica IV: Prikaz pomnoženih odsekov z OPQ 20 v posameznih vzorcih

Velikost odsekov	Številka nanosa DNK izolatov										
	1	2	3	4	5	7	8	10	11	13	14
220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
580	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
630	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
850	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1050	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1100	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1350	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1500	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Povprečni Jaccardov koeficient podobnosti je znašal $0,77 \pm 0,066$. Pri določanju koeficienta smo vključili tudi nespecifične pomnožene odseke, ki niso bili posledica polimorfizmov DNK, zato jih tudi ne moremo upoštevati pri določanju genske stabilnosti. Jaccardov koeficient nam predstavlja podobnost med vzorci pri katerih upoštevamo vse pomnožene odseke in ponazarja delež odsekov enakih velikostih, ki se pojavljajo pri obeh vzorcih. Nespecifični odseki se ne pojavljajo pri vseh vzorcih, zato bi bilo vrednotenje enakosti ter homogenosti teh odsekov nesmiselno pri ugotavljanju genske stabilnosti, saj bi dobili lažno negativen rezultat-sev *B.subtilis* bi bil gensko nestabilen.

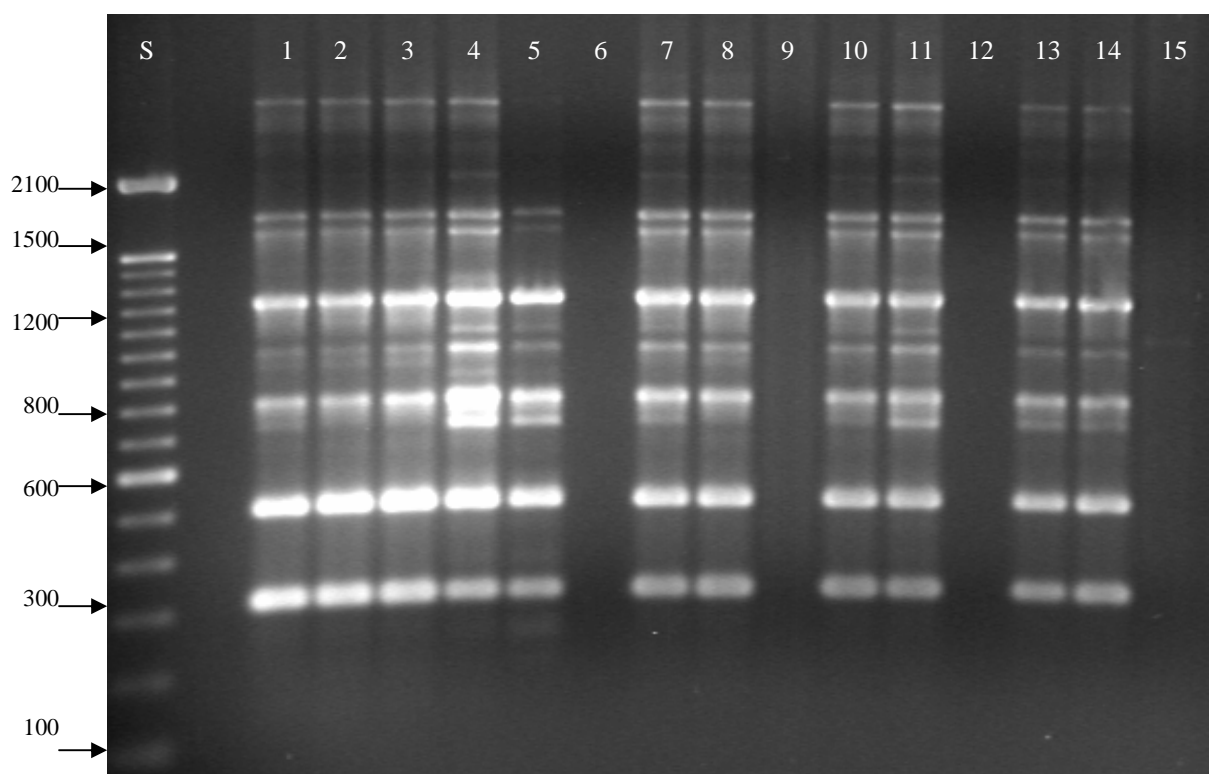
Vrednost koeficienta se je nahajala v zgornji polovici intervala 0-1, saj so RAPD profili preiskovanih DNK izolatov vsebovali večino specifičnih pomnoženih odsekov. Glede na primerjavo specifičnih odsekov iste velikosti smo lahko trdili, da so RAPD profili homogeni

med sabo. To je bil dokaz, da DNK *B.subtilis* ni vsebovala nukleotidnih poškodb, vključkov ali mutacij med različnimi cikli razmnoževanja, ki bi vplivali na profil RAPD.

4.2.3.2 Določanje homogenosti pomnoženih odsekov DNK *B.subtilis* z OPH 6

Pri določanju genske stabilnosti z metodo RAPD in začetnim oligonukleotidom OPH 6 smo uporabili naslednje pogoje optimalne reakcije: 3 mM MgCl₂, 385 μM dNTP, 2 μM OPH 6 in 12 ng DNK *B.subtilis* (slika 21). Primerljivost paralelnih vzorcev je bila pri vseh izolatih DNK ustrezna. Prisotni so bili tudi nespecifični odseki nizke intezitete velikosti 900, 950, 1100 in 2100 bp. Negativne kontrole posameznih RAPD profilov so bile ustrezne.

Za izračun Jaccardovega koeficienta smo izbrali vzorce izolatov KBL 0/1-nanos št.1, KBL 5/1-nanos št.4, KBL 10/1-nanos št.7, KBL 15/1-nanos št.11 in KBL 20/1-nanos št.13. Število specifičnih pomnoženih odsekov v vsakem RAPD profilu je bilo 9. Z njimi smo izračunali Jaccardov koeficient.



slika 21: RAPD z OPH 6 in izolati DNK *B.subtilis*. Okrajšave: S-standard, 1-3: KBL 0/1; 4,5-KBL 5/1, 6-neg.kontrola KBL 5/1; 7,8-KBL 10/1, 9-neg.kontrola KBL 10/1; 10,11-KBL 15/1, 12-neg.kontrola KBL 15/1; 13,14-KBL 20/1; 15-neg.kontrola KBL 20/1

Specifične pomnožene odseke smo označili z 1 in jih primerjali med sabo z Jaccardovim koeficientom. Pare vzorcev KBL 0/1, KBL 5/1, KBL 10/1 in KBL 20/1 smo označili z oznako A in B.

$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

preglednica V: Prikaz pomnoženih odsekov z OPH 6 v posameznih vzorcih

Velikost odsekov	Številka nanosa DNK izolatov										
	1	2	3	4	5	7	8	10	11	13	14
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
950	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2100	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
>2100	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

Povprečni koeficient podobnosti je znašal $0,74 \pm 0,063$. Prav tako kot pri določanju genske stabilnosti z OPQ 20 smo tudi v tem primeru upoštevali nespecifične odseke pri izračunu koeficienta. Iz slike 19 in preglednice V je bilo razvidno, da so RAPD profili posameznih izolatov DNK vsebovali največ specifičnih pomnoženih odsekov, ki so bili enakih velikosti. Slednje smo v preglednici V označili s sivo barvo.

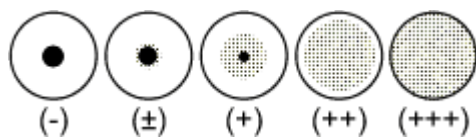
Prileganje začetnih oligonukleotidov OPQ 20 in OPH 6 na specifična mesta in pomnoževanje odsekov ni bilo občutljivo na spremembe v reakcijskih pogojih, ki so bile posledica tehničnih težav. Začetni oligonukleotid OPH 6 je najverjetneje manj občutljiv na spremembe v reakciji kot OPQ 20, saj vsebuje manj nespecifičnih pomnoženih odsekov.

Homogenost pomnoženih odsekov med različnimi izolati DNK *B.subtilis* je bila očitna, zato smo lahko potrdili, da je dedni material bakterije gensko stabilen.

4.3 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI ENTEROTOKSINOV

Test za določanje prisotnosti enterotoksinov BCET-RPLA smo izvedli s tremi vzorci. Vzorce so predstavljali kontrolni enterotoksin iz kompleta reagentov in bakterijski kulturi *B.cereus* ter *B.subtilis*. Bakterijska kultura *B.cereus* je predstavljala pozitivno kontrolo testa, saj izloča enterotoksin Hbl. *B.subtilis* je bila preiskovana bakterijska kultura.

Aglutinacijo v posameznih celicah na mikrotitrski plošči smo vrednotili glede na sledečo shemo:



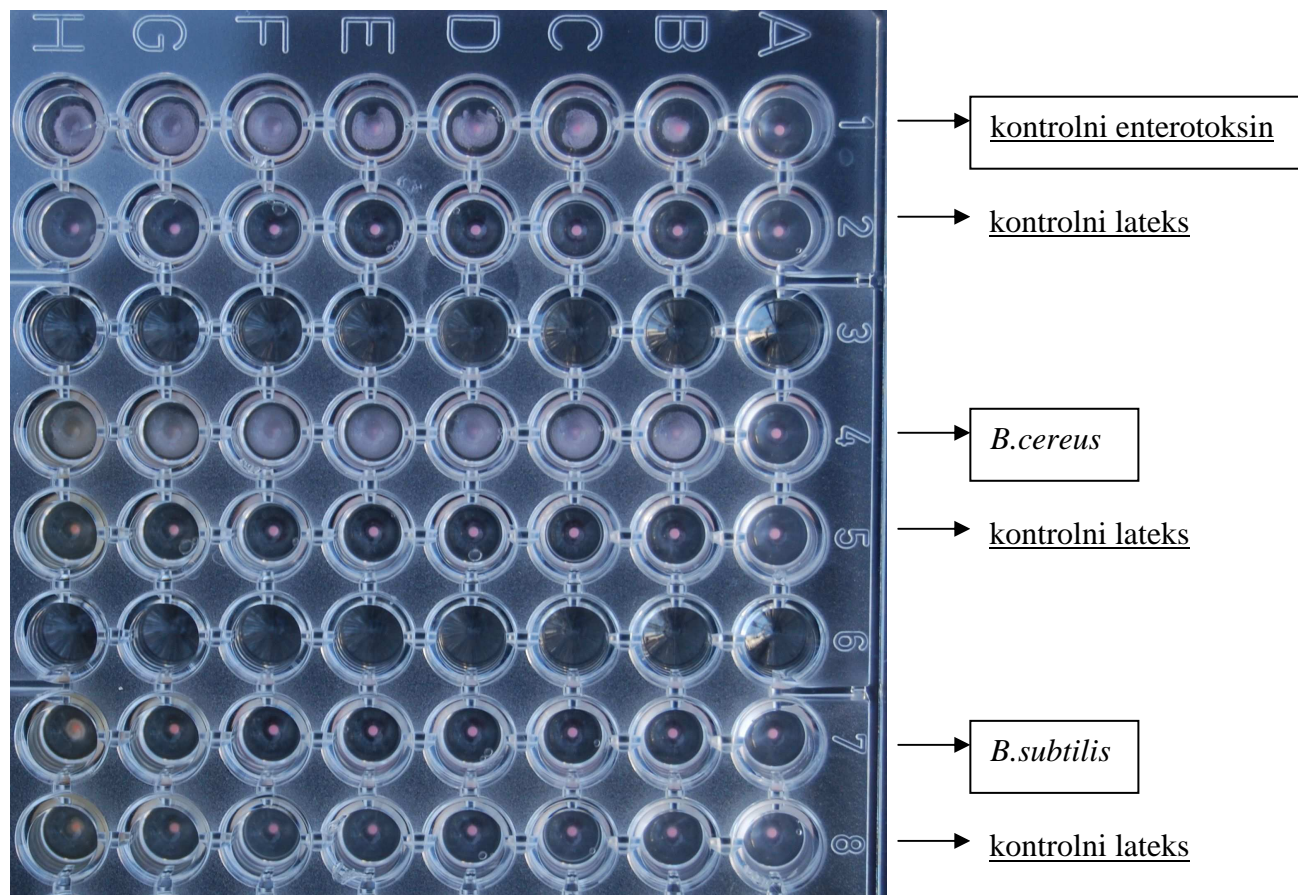
slika 22: Vrednotenje aglutinacijskega testa (42)

Rezultate aglutinacije, ki so označeni z (+) in (++) označujemo kot pozitivne in vsebujejo enterotoksin. Rezultati v celicah, ki vsebujejo kontrolni lateks morajo biti povsod negativni. Kontrolni lateks vsebuje neimunogena protitelesa in predstavlja reagenčno kontrolo. V zadnji celici vsake vrstice aglutinacija ne sme biti prisotna, ker celica vsebuje le topilo in senzibilirajoči lateks s specifičnimi protitelesi. Rezultat je v nasprotnem primeru neveljaven (42).

Rezultati aglutinacije na mikrotitrski plošči so bili pričakovani (slika 21). Aglutinacija je bila vidna pri kontrolnem enterotoksinu in bakteriji *B.cereus*. Pri slednjem je bila intenzivnejša (celice E4, D4, C4 in B4) zaradi višjih koncentracij enterotoksina v vzorcu, ki ga je izločal *B.cereus*. Preiskovani vzorec *B.subtilis* ni povzročil aglutinacije. Rezultat v celicah s preiskovanim vzorcem je bil v primerjavi s kontrolnim lateksom in kontrolnim enterotoksinom/vzorcem *B.cereus* negativen. V celici H8, ki vsebuje kontrolni lateks in vzorec *B.subtilis* je bilo videti prisotnost gojišča značilne barve.

Ustreznost testa smo potrdili z dejstvom, da smo bakterijsko kulturo *B.subtilis* pripravili in gojili v enakih pogojih kot bakterijo *B.cereus*, ki je povzročil aglutinacijo. Pogoji gojenja bakterij so bili primerni, saj smo vzorec *B.cereus* namnožili v zadostni količini, da je izločal

enterotoksine, ki smo jih lahko detektirali. Preiskovanemu vzorcu *B.subtilis* nismo določili prisotnih enterotoksinov.



slika 23: Rezultat BCET-RPLA testa.

preglednica VI: Vrednotenje aglutinacije v posameznih celicah

- vzorec kontrole enterotoksina

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	++	+++	+++	++	++	++	+	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-

- vzorec *Bacillus cereus*

	H	G	F	E	D	C	B	A
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-

- vzorec *Bacillus subtilis*

	H	G	F	E	D	C	B	A
7	+-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

5. SKLEP

Namen diplomske naloge je bil dosežen. Po predpisih, ki smo jih povzeli iz objavljenih raziskav, smo določili gensko stabilnost *B.subtilis* in ugotovili odsotnost toksinov. Pogoje optimizacije RAPD metode s posameznim začetnim oligonukleotidom smo določili z lastnimi raziskavami.

Atienzar s sod. (25) je objavil, da je slabost metode njena slaba ponovljivost, ki je posledica več dejavnikov (kakovost in vsebnost reagentov v reakcijski zmesi, pogoji izvajanja reakcije v PCR cikličnem termostatu). Pri določanju genske stabilnosti smo zasledili težave z neustreznostjo paralelnih vzorcev, ker so le-ti vsebovali različno število odsekov. Nekateri med njimi niso bili primerne intenzitete ali pa niso bili jasno razvidni. Zaradi omenjenih lastnosti jih nismo upoštevali pri vrednotenju RAPD profilov (25) in smo jih označili kot nespecifične. Vzrok za pojav nespecifičnih odsekov je najverjetneje sprememba reakcijskih koncentracij posameznih reagentov (OPH/OPQ, dNTP, Mg^{2+} , DNK), ki so posledica tehničnih težav pri razdeljevanju reakcijske zmesi. Pri tem ima pomembno vlogo tudi stopnja občutljivosti začetnega oligonukleotida na spremembo reakcijskih pogojev.

Opazili smo, da se določeni pomnoženi odseki, ki so v večini, pojavljajo pri vseh reakcijskih pogojih, s katerimi smo določali optimalne pogoje. Te odseke smo poimenovali specifične, saj so primerne intenzitete in jasno razvidni, ne glede na vpliv spremembe v reakcijski zmesi. Specifične odseke smo upoštevali pri vrednotenju homogenosti različnih izolatov DNK *B.subtilis*. S primerjavo specifičnih pomnoženih odsekov med posameznimi RAPD profili med različnimi izolati DNK *B.subtilis* smo določili homogenost, kar predstavlja gensko stabilnost bakterije.

V diplomski nalogi smo z BCET-RPLA testom ugotovili, da preiskovana bakterija *B.subtilis* ne vsebuje enterotoksina Hbl. Odsotnost enterotoksina Hbl, ki je glavni dejavnik pri diarejskem sindromu, predpisuje Smernica Znanstvenega odbora za prehrano živali (19). Če bi želeli določiti popolno odsotnost tudi ostalih virulentnih dejavnikov, bi morali izvesti raziskave, ki ugotavljajo prisotnost enterotoksina Nhe, emetičnega toksina in genov, ki izražajo omenjene toksine, kar je predmet obširnejših raziskav na tem področju.

6. PRILOGA

Tabela volumnov TE pufra pri raztapljanju začetnih oligonukleotidov

Oznaka začetnega oligonukleotida	Volumen TE pufra v μL	Oznaka začetnega oligonukleotida	Volumen TE pufra v μL
OPH-01	46,3	OPQ-01	47,7
OPH-02	50,9	OPQ-02	60,6
OPH-03	51,9	OPQ-03	55,3
OPH-04	51,6	OPQ-04	50,9
OPH-05	60,1	OPQ-05	61,6
OPH-06	51,9	OPQ-06	54,9
OPH-07	56,5	OPQ-07	57,4
OPH-08	50,9	OPQ-08	53,8
OPH-09	51,9	OPQ-09	49,9
OPH-10	55,3	OPQ-10	53,0
OPH-11	59,2	OPQ-11	57,8
OPH-12	53,0	OPQ-12	48,0
OPH-13	52,7	OPQ-13	46,3
OPH-14	50,9	OPQ-14	53,0
OPH-15	48,0	OPQ-15	48,9
OPH-16	56,5	OPQ-16	49,9
OPH-17	65,3	OPQ-17	53,0
OPH-18	49,9	OPQ-18	50,6
OPH-19	56,1	OPQ-19	60,6
OPH-20	48,0	OPQ-20	60,1

Izračuni Jaccardovega koeficienta podobnosti za RAPD reakcijo z OPQ 20

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 5/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 5/1|} = \frac{13}{18} = 0,72$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 10/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 10/1|} = \frac{13}{16} = 0,81$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{13}{14} = 0,93$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{13}{17} = 0,76$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 10/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 10/1|} = \frac{13}{18} = 0,72$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{13}{18} = 0,72$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{13}{18} = 0,72$$

$$J = \frac{|KBL\ 10/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 10/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{13}{16} = 0,81$$

$$J = \frac{|KBL\ 10/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 10/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{13}{17} = 0,76$$

$$J = \frac{|KBL\ 15/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 15/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{13}{17} = 0,76$$

$$J\ (\text{povprečje}) = 0,77 \pm 0,066$$

Izračuni Jaccardovega koeficienta podobnosti za RAPD reakcijo z OPH 6

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 5/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 5/1|} = \frac{9}{13} = 0,69$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 10/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 10/1|} = \frac{9}{12} = 0,75$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{9}{12} = 0,75$$

$$J = \frac{|KBL\ 0/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 0/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{9}{12} = 0,75$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 10/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 10/1|} = \frac{9}{13} = 0,69$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{9}{13} = 0,69$$

$$J = \frac{|KBL\ 5/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 5/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{9}{13} = 0,69$$

$$J = \frac{|KBL\ 10/1 \cap KBL\ 15/1|}{|KBL\ 10/1 \cup KBL\ 15/1|} = \frac{9}{12} = 0,75$$

$$J = \frac{|KBL\ 10/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 10/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{9}{10} = 0,90$$

$$J = \frac{|KBL\ 15/1 \cap KBL\ 20/1|}{|KBL\ 15/1 \cup KBL\ 20/1|} = \frac{9}{12} = 0,75$$

$$J\ (\text{povprečje}) = 0,74 \pm 0,063$$

7. LITERATURA

1. Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen S.: Probiotics-effects on immunity. *Am. J. Clinical Nutrition* 2001; 73: 444-450.
2. Rotovnik Kozjek N.: Probiotiki in prebiotiki v onkologiji. Dostopno na <http://www.onko-i.si/uploads/articles/1-2001-kozjek.pdf>
3. Schrezenmeir J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition, *Am. J. Clinical Nutrition* 2001; 73: 361- 364.
4. Publikacija: FEFANA booklet on Probiotics in Animal Nutrition. Dostopno na <http://www.fefana.org/Publications.aspx>
5. Gibson G.: The rise and rise of probiotics. *Biologist* 2005; 52: 95-98.
6. Green D., Wakeley P., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E., Cutting S.: Characterization of Two *Bacillus* Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65: 4288-4291
7. Konzl D., Klensl A.: The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 1997; 4: 927-937.
8. Publikacija: *Bacillus subtilis* final risk Assessment. Dostopno na <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/>
9. Priest F., Goodfellow M., Todd C.: A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 1988; 134: 1847-1882.
10. Gill M.: Bacterial toxins: A table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* 1982; 46: 86-94.

11. Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M-H., Lindbäck T., Andersson M., Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P., Märtlbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M.S., Scherer S.: Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 2005; 151: 183-197
12. Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bär W., Krähenbühl S.: Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 1142-1148.
13. Paananen A., Mikkola R., Sareneval T., Matikainen S., Hess M., Andersson M., Julkunen I., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T.: Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology* 2002; 129: 420–428.
14. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P.: Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *Journal of Bacteriology* 2006; 188: 6640–6651.
15. Prüß B., Dietrich R., Nibler B., Märtlbauer E., Scherer S.: The Hemolytic Enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65: 5436–5442
16. Lindbäck T., Fagerlund A., Rødland M.S., Granum P.E.: Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 2004; 150: 3959–3967.
17. Beecher D., Schoeni J., Lee Wong A.: Enterotoxic Activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* 1995; 63: 4423-4428.
18. Brillard J., Lereclus D.: Comparison of cytotoxin cytK promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B.cereus* food-poisoning strain. *Microbiology* 2004; 150: 2699–2270.

19. European Commission, Health & Consumer protection Directorate: Guidelines for the assessment of additives in feedstuffs, part II: Enzymes and micro-organisms. Dostopno na http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out68_en.pdf
20. Beecher D., Lee Wong A.: Identification and Analysis of the Antigens Detected by Two Commercial *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60: 4614-4616.
21. Burgess G., Horwood P.: Development of improved molecular detection methods for *Bacillus cereus* toxins. Dostopno na <http://www.rirdc.gov.au>
22. European Commission, Health & Consumer protection Directorate: Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition. Dostopno na http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out41_en.pdf
23. Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., Hecker M.: General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *Journal of Bacteriology* 1996, 178: 6571-6578.
24. Krawiec S., Riley M.: Organization of the Bacterial Chromosome. *Microbiological Reviews* 1990; 54: 502-539.
25. Atienzar F., Jha A.: The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research* 2006; 613: 76-102.
26. Pellissier Scott M., Haymes K.M., Williams S.M.: Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research* 2002; 20: 5493.
27. Benter T., Papadopoulos S., Pape M., Manns M., Poliwoda H.: Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Analytical Biochemistry* 1995; 230: 92-100.

28. Fraga J., Rodriguez J., Fuentes O., Fernandez-Calienes A., Castex M.: Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of *Cuban triatominae*. *Inst Med Trop Sao Paulo* 2005; 47: 295-300.
29. Meunier J., Grimont P.A.D.: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* 1993; 144: 373-379.
30. Blixt Y., Knutsson R., Borch E., Radstrom P.: Interlaboratory random amplified polymorphic DNA typing of *Yersinia enterocolitica* and *Y. Enterocolitica* like bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 83: 15-26.
31. Atienzar F., Evenden A., Jha A., Savva D., Depledge M.: Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Biotechniques* 2000; 28: 52-54.
32. Caetano-Anolles G.: DAF Optimization using Taguchi methods and the effect of thermal cycling parameters on DNA amplification. *BioTechniques* 1998; 25: 472-480.
33. Khandka D.K., Tuna M., Tal M., Nejidat A., Golan-Goldhirsh A.: Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis* 1997; 18: 2852-2856.
34. Cobb B.D., Clarkson J.M.: A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids research* 1994; 22: 3801-3805.
35. Jones C., Kortenkamp A.: RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: applications in mutation detection. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis* 2000; 20: 49-63.
36. Instruction manual: ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit. Dostopno na https://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/chargeswitch_minibacteria_man.pdf
37. Kuhelj B.: *Biokemija v praksi: načela in tehnike*, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003: 87.

38. Protocol online: PCR. Dostopno na http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/PCR/
39. Bardakci F.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk J Biol 2001; 25: 185-196.
40. Kuhelj B.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003: 67, 68, 89.
41. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Molecular Cloning, A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989: 6.8.
42. Oxoid: BCET-RPLA toxin detection kit. Dostopno na <http://www.oxoid.com/UK/blue/catbrowse/catbrowse.asp>
43. Yeats C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N., Yeal D.A.: Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biological Procedures Online 1998, 1: 40-47.