

XXXII. OTDK Biológia Szekció

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

OTDK-dolgozat

Szabó Lilla

Biológia

III. évfolyam

Eszterházy Károly Főiskola



Témavezető: Dr. Juhász Ákos

tudományos munkatárs

EKF-TTK, Eger 2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1 Az <i>in vitro</i> emésztési modell alkalmazása az EKF mikrobiológiai laboratóriumában.....	3
1.2 Az <i>in vitro</i> emésztési modellek felépítése	4
1.3 DNS mennyiségi meghatározása PCR segítségével	5
1.4 DNS alapú baktérium sejtszám meghatározás qPCR alkalmazásával.....	7
2. Célkitűzések	9
3. Anyagok és módszerek.....	10
3.1 A kísérlet során alkalmazott mikroorganizmusok	10
3.2 Felhasznált táptalajok és tápoldatok	10
3.3 Felhasznált enzimek, oldatok, pufferek, primerek és kitek	11
3.4 Alkalmazott módszerek	14
4. Eredmények és értékelésük	20
4.1 A vastagbél mikrobiota modellezése során alkalmazott baktériumok telepszám változásának nyomon követése szelektív táptalajon	20
4.2 A 16S RNS alapú primerek tervezése és a PCR reakció optimalizálása.....	22
4.3 A DNS izolálás és a qPCR körülményeinek optimalizálása	26
4.4 Baktérium mennyiségi meghatározás kalibrációs sorok alapján	29
5. Összefoglalás.....	35

1. Bevezetés

1.1 Az *in vitro* emésztési modell alkalmazása az EKF mikrobiológiai laboratóriumában

Az utóbbi időben számos olyan élelmiszer jelent meg a piacon, amelyekről azt állítják, hogy jótékony hatásúak szervezetünkre. Ezen állítások vizsgálatára szükséges az emberi emésztés modellezése, amely kétféle módon történhet. Az *in vivo* modellek, melyek tulajdonképpen állatkísérleteket jelentenek, adják a legpontosabb eredményt, de csak kisszámú minta lassú és költséges vizsgálatára alkalmasak. Az *in vitro* modellek laboratóriumi körülmények közt egyszerűsített formában modellezik az emberi emésztést, de az emésztés komplex folyamatát nehéz pontosan reprodukálni, ezért az *in vitro* emésztési modellek kevésbé pontosak, mint az emberi és állati etetési kísérletek. Tehát kompromisszumot kell kötni a pontosság és a könnyű kivitelezhetőség között, erre jelentenek megoldást az *in vitro* emésztési modellek nagyszámú minta gyors vizsgálata esetében.

Az *in vitro* emésztési modelleket széles körben azért alkalmazzák, hogy szimulált gasztrointesztinális körülmények között nyomonkövessék az elfogyasztott élelmiszerek strukturális változásait és a bioaktív komponensek biológiai hasznosulását. Az emésztési modellek általában csak az emésztés egy-egy kiragadott szakaszát modellezik, az adott szakasznak megfelelő mesterséges emésztőnedveket alkalmazva. Az általunk alkalmazott modell az emésztés összetett biokémiai folyamatait több lépcsős modellben szimulálja, reprodukálva a száj, gyomor, vastagbél, vékonybél eltérő fiziológiás körülményeit, így a vizsgálatok széles körére alkalmazható. Az emésztőnedveket mesterségesen állítjuk össze és az egyes műveletek folyamatos kevertetés mellett, 37 °C hőmérsékleten végezzük el. A vastagbél szakaszban, a valós viszonyokat szorosan modellező hatagú baktériumközösséget alkalmazunk, két potenciálisan patogén (*Clostridium*, *Bacteroides*), két jótékony hatású (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) és két, az ún. „kétarcú flórához” tartozó törzzsel (*E. coli*, *Enterococcus*). Vizsgálataink során az *in vitro* bél mikrobiota kvantitatív változásait szelektív agar lemezekén való tenyésztéssel határozzuk meg, amely azonban nem megfelelő minden esetben, ugyanis a legtöbbször a szelektív táptalajokon nem csak egy, hanem több baktérium is képes növekedni. Ezeket a baktériumokat ugyan telep morfológia alapján el lehet különíteni, de vegyes tenyészetben alkalmazva egy-egy baktérium pontos telepszámának meghatározását nagyon megnehezíti, ha több másik baktérium is képes növekedni az adott táptalajon. Ezért szükségszerűvé vált olyan molekuláris biológiai módszer kifejlesztése, mely pontosan és gyorsan képes meghatározni az emésztési modellben alkalmazott hat baktérium telepszámának változását. Munkám során ezen technika, vagyis a kvantitatív Real-Time PCR alapú

baktérium telepszám meghatározás fejlesztésébe kapcsolódtam be az EKF Egerfood Regionális Tudásközpont molekuláris biológiai laboratóriumában.

1.2 Az *in vitro* emésztési modellek felépítése

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

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

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

A vastagbél mikrobiota modellezéséhez kiemelkedő fontosságú a bél mikrobiota összetételének és aktivitásának pontos ismerete (Meyer Á. 2004). Az emberi szervezetben lévő mikroorganizmusok közül a legtöbb a vastagbélben található, 10^{14} baktérium jut a béltartalom minden grammjára. A bélbaktériumok a fermentációs tevékenységük következtében különböző, a szervezetre kedvező vagy káros hatású végtermékeket képezhetnek. Egy ideális vastagbél ökoszisztémában a potenciálisan egészségvédő hatással

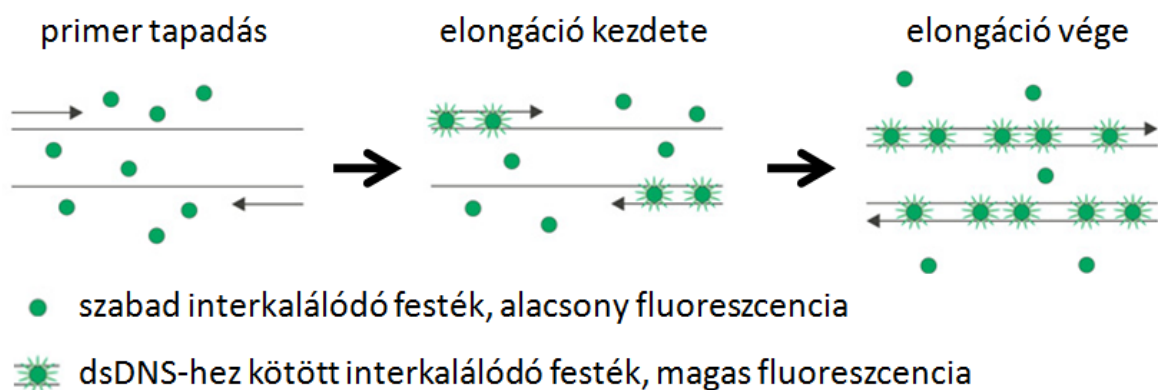
rendelkező mikroorganizmusok túlsúlyban vannak számban és aktivitásban a potenciálisan káros fajok felett, ezt az állapotot „normobiózisnak” nevezzük (Roberfroid és mtsai. 2010).

A vastagbél mikrobiota modellezése során az egy komponensű *in vitro* rendszerekben különböző szubsztrátokat inkubálnak (élelmiszer mátrixban vagy anélkül) a kiválasztott baktérium tiszta tenyészetével (Su és mtsai., 2007), több baktérium kevert tenyészetével (Fooks és mtsai., 2002) vagy székletből származó mikroflórával (Hernot és mtsai., 2009). A komplex, több komponensű vastagbél modellekben reprodukálják a proximális/aszcendens, transzverz és disztális/descendens vastagbél szakaszokat (Gibson és mtsai., 1994; McBain és mtsai., 1997). Az ún. „SHIME” modell (simulator of the human intestinal microbial ecosystem) öt hőmérséklet és pH kontrollált edény sorozatából áll, melyek szimulálják a gyomrot, a vékonybelet, és a különböző vastagbél szakaszokat. A proximális vastagbélben végbemenő fermentáció egy még pontosabb *in vitro* modellje a TIM – 2 modell (TNO-intestinal model-2) (Minekus és mtsai., 1999; Venema és mtsai., 2003). Ez a rendszer belül flexibilis falú üveg edények sorozatából áll. Az üveg és a flexibilis fal közé pumpált vízzel tudják szimulálni a perisztaltikát és a hőmérsékletszabályozást, mely számítógép kontrollált folyamat. Az edények ezen kívül fel vannak szerelve egy dialízis membránnal a lumenben, mellyel szimulálni kívánják a víz és a rövid szénláncú zsírsavak abszorpcióját.

1.3 DNS mennyiségi meghatározása PCR segítségével

A polimeráz láncreakció (PCR) nukleinsav szekvenciák sokszorozására alkalmas *in vitro* eljárás, amelynek segítségével kis mennyiségű DNS is kimutatható. A PCR analízis során, az intakt állapotú DNS szálakat hőkezeléssel denaturálják (95°C körüli hőmérsékleten), ekkor azok kettős spirálszerkezete felbomlik és egyszálúvá válik. A kezdeti denaturálás után a DNS-t három lépésből (denaturálás, annealing, elongáció) álló ciklusban sokszorozzák. A ciklus 30-40-szer ismétlődik, melynek során detektálható mennyiségű DNS képződik igen kis kópiaszámú kiindulási nukleinsav mennyiség esetében is. A denaturálás során a DNS két szála elválik egymástól, majd az ezt követő hűtés során oligonukleotid primerek kapcsolódnak az egyszálú DNS-hez. Ezen lépés általában 45-65 °C-on történik, melyet elsősorban az alkalmazott primerek olvadási hőmérséklete (melting point, T_m) határoz meg. A ciklus utolsó lépéseként 72°C-on történik a DNS láncok meghosszabbítása a DNS polimeráz enzim segítségével. Manapság általában mesterségesen módosított Hot Start DNS-polimerázokat alkalmaznak, mert használatukkal lecsökkenthető az aspecifikus melléktermékek képződése.

A hagyományos PCR során keletkezett DNS fragmentumok további vizsgálatához a terméket agaróz (ritkább esetben poliakrilamid) gélben futtatják meg és valamilyen interkalálódó festékekkel (pl. etidium-bromid, GelRed, stb.) megfestve UV fényben vizsgálják különböző géldokumentációs rendszerek segítségével. Ez az eljárás azonban nem alkalmas a DNS pontos mennyiségi meghatározására még akkor sem, ha a hagyományos gélelektroforézis helyett az érzékenyebb kapilláris elektroforézist alkalmazzák. Erre a kvantitatív Real-Time PCR (qPCR) technika alkalmas, melynek során a képződő terméket nem a PCR reakció végén, hanem folyamatosan, valós időben műszeresen detektálják interkalálódó fluoreszcens festék (pl. SYBR Green, Eva Green) vagy specifikus próba (TaqMan, Molecular Beacon, stb.) segítségével. Az általunk is alkalmazott interkalálódó fluoreszcens festékekkel történő detektálás alapelvét az **1. ábra** mutatja. A SYBR Green I interkalálódó molekula, amely a dupla szálú DNS-hez (dsDNS) kötődik az amplifikáló elegyben, melynek fluoreszcenciája kb. 2000-szer magasabb kettős szálú DNS-hez kötötten, mint szabadon. A qPCR során a festék fluoreszcenciájának detekciója minden ciklusban a lánchosszabbítási lépés végén történik és a fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán keletkező dsDNS mennyiségével arányosan növekszik. Rendkívül szoros az összefüggés a kiindulási DNS koncentráció és a sokszorozódás időbeni lefutása között, így ismert koncentrációjú standardok párhuzamos vizsgálata lehetőséget ad a mintáinkban jelenlévő DNS koncentrációjának meghatározására.



Forrás: http://www.nature.com/leu/journal/v17/n6/fig_tab/2402922f1.html

1. ábra: A kvantitatív Real-Time PCR interkalálódó fluoreszcens festéken alapuló működési elve (SYBR Green I festésre alapozott detektálás).

A PCR reakció során elméletileg minden ciklusban megduplázódik a dsDNS mennyisége, így a templárról keletkező DNS koncentrációjának növekedése exponenciális. A reakció kezdeti ciklusában a termék mennyisége nem számottevő, így a DNS koncentrációjának megfelelő

fluoreszcens jel erősödése a detekciós határ alatt van. A termék mennyisége (a kiindulási DNS koncentráció függvényében) általában a 10-30. ciklus közt már detektálhatóan az exponenciális szakaszba lép, majd a reakciókomponensek kimerülésével a reakció platófázisba kerül (30-40. ciklus).

A fluoreszcens jel detektálási küszöbértéke (CT: Threshold Cycle) attól függ, hogy mekkora volt a reakcióelegy kezdeti DNS koncentrációja, vagyis minél több templát DNS van jelen, annál kevesebb ciklus szükséges a detektálási limitet jelentő ciklusszám eléréséhez. A CT fordítottan arányos a mintában lévő DNS kópiaszámának logaritmusával. A mennyiségi meghatározás lényege, hogy a PCR-ciklusok száma és az amplifikáció során keletkező DNS szekvenciák kópiaszáma között lineáris összefüggés van.

1.4 DNS alapú baktérium sejtszám meghatározás qPCR alkalmazásával

Mivel a qPCR technika segítségével meghatározható a vizsgálandó minták kiindulási DNS koncentrációja régóta alkalmazzák különböző minták baktérium (és egyéb mikroba) számának meghatározására. Ezek sokszor klinikai eredetűek, ebben az esetben általában a különböző patogének jelenlétének specifikus primerekkel történő kimutatása és pontos mennyiségi meghatározása a cél (Murphy és mtsai., 2013). Többek közt *Helicobacter pylori* esetében is megállapították (He és mtsai., 2002), hogy a számos mennyiségi és minőségi kimutatási módszer közül a qPCR az egyik legmegfelelőbb, mellyel a mintánkénti 10^3 - 10^9 baktérium mennyisége pontosan meghatározható (*ureC* génhez tervezett specifikus primerek segítségével). Az egyedi génekhez tervezett primerek mellett széles körben alkalmazzák baktériumok esetében a 16S rRNS génjéhez tervezett primereket is (Fujita és mtsai., 2002; Rintilla és mtsai., 2004; Matsuki és mtsai., 2002). A baktériumok kimutatása mellett a qPCR technikát széles körben alkalmazzák többek közt patogén gombák kimutatására is (Horváth és mtsai., 2013).

Korábban az emésztőrendszer baktérium összetételét elsősorban szelektív táptalajon történő tenyésztéssel határozták meg (Simon és Gorbach, 1984). Bár egyre több szelektív táptalaj kapható, az emberi bélflóra mindössze 10-40%-a tenyésztethető ki ilyen módon (Langendijk és mtsai., 1995; McFarlane és Gibson, 1994; Wilson és Blitchington, 1996). Manapság az emésztőrendszerben jelenlévő baktériumok mennyiségi és minőségi meghatározására is a qPCR technikát alkalmazzák a legtöbb esetben. A technika alkalmas különböző patogének székletből történő kimutatására (Fukushima és mtsai., 2003; Song és mtsai., 2004; Belanger és mtsai., 2003; Mafu és mtsai., 2009; Rintilla és mtsai., 2011), de akár a bendő baktérium összetételének táplálkozás függő változásainak nyomon követésére is (Tajima és mtsai.,

2001). A patogén mikrobák jelenléte mellett a vastagbél komplex mikroba összetételének vizsgálatához is általában a 16S rDNS alapú specifikus primereket alkalmaznak (Rintilla és mtsai., 2004; Matsuki és mtsai., 2002; Ott és mtsai., 2004) mivel ez a legmegfelelőbb marker taxonómiai és filogenetikai vizsgálatokra. Ezen kísérletek célja a legtöbb esetben a különböző külső és belső hatások (pl. antibiotikum kezelés, táplálkozásban történő változások, betegségek, stb.) normál bélflórára gyakorolt hatásának vizsgálata.

Ezen ismeretek tükrében választottuk ki az *in vitro* vastagbél modell hattagú mikrobaközösségének változásának nyomon követésére a qPCR technikát 16S rDNS alapú fajspecifikus primerek alkalmazásával.

2. Célkitűzések

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

- A hat baktérium elkülönítésére alkalmas 16S rDNS alapú specifikus primerek tervezése és a PCR reakció körülményeinek optimalizálása.
- Olyan DNS izoláló módszer kidolgozása, mely a különböző baktériumokból (Gram pozitív és negatív, tiszta és kevert tenyészetek) azonos hatékonysággal képes a nukleinsav kivonására függetlenül a tenyészetek mikroba koncentrációjától.
- A qPCR optimalizálása és a mennyiségi meghatározás kidolgozása specifikus primerek segítségével mind a hat baktérium esetében.

3. Anyagok és módszerek

3.1 A kísérlet során alkalmazott mikroorganizmusok

A bél mikrobiota modellezése során alkalmazott baktérium törzseket az **1. táblázat** mutatja.

A baktérium transzformáció során *Escherichia coli* XL1-Blue törzset alkalmaztunk.

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

1. táblázat: Az *in vitro* emésztési modellben alkalmazott törzsek és a tenyésztésükhöz felhasznált szelektív táptalajok. *: pontos összetétel 3.2 fejezetben. A baktériumokat a következő törzsgyűjteményekből szereztük be: DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Németország; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia; NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Magyarország.

3.2 Felhasznált táptalajok és tápoldatok

A bél mikrobiota modellezése során felhasznált baktérium törzsek fenntartásához illetve elkülönítéséhez alkalmazott szelektív táptalajokat az **1. táblázat** mutatja be.

Bifidobacterium Agar összetétele 1 literre: 5 g kazein, 3 g pepton, 5 g kazein hidrolizátum, 3 g élesztőkivonat, 0,1 g NaCl, 1,6 g K₂HPO₄, 0,7 g KH₂PO₄, 0,4 g NaHCO₃, 0,02 g MgSO₄, 1 ml Tween 80, 0,5 g cisztein-HCl, 7,5 g raffinóz, 0,2 g N-Acetyl-D-Glucoseamine, 3 g Na-propionát, 2 g LiCl, 0,01 g riboflavin, 0,01 g folsav, 15 g agar.

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

A bél mikrobiota fermentoros tenyésztéséhez anaerob alap tápoldatot alkalmaztunk (1 literre: 2 g pepton, 2 g élesztőkivonat, 0,1 g NaCl, 0,04 g K₂HPO₄, 0,04 g KH₂PO₄, 0,01 g CaCl₂•6H₂O, 0,01 g MgSO₄•7H₂O, 2 g NaHCO₃, 2 ml Tween 80, 0,05 g hemin, 10 µl vitamin K₁, 0,5 g cisztein-HCl, 0,5 g epe sók, 10 g glükóz).

3.3 Felhasznált enzimek, oldatok, pufferek, primerek és kitek

3.3.1 A DNS izoláláshoz használt nukleinsav izoláló kitek

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

3.3.2 A DNS izoláláshoz használt egyéb vegyszerek, oldatok és anyagok

- **TE puffer:** 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA.
- **Fenol oldat:** PCI: fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1)
- **Kloroform oldat:** CI: kloroform-izoamilalkohol (24:1)
- **3 M Na-acetát oldat**
- **Etanol (96%)**
- **RNáz A:** 10 mg/ml oldat (Thermo Scientific)
- **Lizozim (Sigma):** 50 mg/ml oldat 20 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA és 1,2% Triton tartalmú pufferben oldva.
- **Proteináz-K (AppliChem):** 20 mg/ml, desztillált vízben oldva.
- **üveggyöngyök:** 212-300 µm mérettartományban (Sigma).

3.3.3 Az agaróz gélelektroforézishez használt anyagok

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

3.3.4 A PCR és qPCR során alkalmazott enzimek és egyéb anyagok

- **Nukleotidok:** 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Sigma)
- **Taq polimeráz:** DreamTaq Green DNS polimeráz és a gyártó által forgalmazott puffer (Thermo Scientific)
- **qPCR polimerázok:** ImmoMix (Bioline), Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific).
- **Eva Green:** 20x desztillált vízben oldva (Biotium)

3.3.5 Az *in vitro* emésztési modellben alkalmazott emésztőnedvek

Az *in vitro* emésztési modell kiindulási alapjául Oomen és mtsai. (2003) által kifejlesztett majd Versantvoort és mtsai. (2005) által módosított technikát használtuk fel. A szerves és szervetlen komponenseket tartalmazó oldatokat **2. táblázat** alapján készítjük el. Mindkét (szerves és szervetlen) oldatot 500-500 ml-re egészítjük ki desztillált vízzel, majd összeöntjük és hozzáadjuk a további komponenseket. Szükség esetén a pH állítását utólag elvégezzük (HCl/NaOH).

	nyál	gyomornedv	duodenum nedv	epeváladék
szervetlen komponensek (500 ml-re)	10 ml KCl (89,6 g/l)	15,7 ml NaCl (175,3 g/l)	40 ml NaCl (175,3 g/l)	30 ml NaCl (175,3 g/l)
	10 ml KSCN (20 g/l)	3,0 ml NaH ₂ PO ₄ (88,8 g/l)	40 ml NaHCO ₃ (84,7 g/l)	68,3 ml NaHCO ₃ (84,7 g/l)
	10 ml NaH ₂ PO ₄ (88,8 g/l)	9,2 ml KCl (89,6 g/l)	10 ml KH ₂ PO ₄ (8 g/l)	4,2 ml KCl (89,6 g/l)
	10 ml Na ₂ SO ₄ (57 g/l)	18 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22,2 g/l)	6,3 ml KCl (89,6 g/l)	150 µl HCl (37%)
	1,7 ml NaCl (175,3 g/l)	10 ml NH ₄ Cl (30,6 g/l)	10 ml MgCl ₂ (5 g/l)	
	20 ml NaHCO ₃ (84,7 g/l)	6,5 ml HCl (37%)	180 µl HCl (37%)	
szerves komponensek (500 ml-re)	8 ml urea (25 g/l)	10 ml glükuronsav (2 g/l)	4 ml urea (25 g/l)	10 ml urea (25 g/l)
		3,4 ml urea (25 g/l) 10 ml glükózamin hidroklorid (33 g/l)		
kiegészítők	290 mg alfa-amiláz	1 g BSA	9 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22,2 g/l)	10 ml CaCl ₂ ·2H ₂ O (22,2 g/l)
	15 mg húgysav	1,25 g pepszin	1 g BSA	1,8 g BSA
	25 mg mucin	3 g mucin	4,5 g pankreatin	30 g epe sók
			0,75 g lipáz	
végző pH	6,8±0,2	1,30±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

2. táblázat: Az *in vitro* emésztési modellben alkalmazott emésztőnedvek összetétele. Az összes felhasznált vegyszert és enzimet a Sigma-tól vásároltuk.

3.3.6 A PCR termékek tisztításához a következő kitéket alkalmaztuk

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

3.3.7 A PCR reakció során alkalmazott primerek

Az alkalmazott primereket a **3. táblázat** foglalja össze. A primerekből 100 µM törzsoldatot készítettünk desztillált vízben, majd a felhasználáshoz ezt tovább hígítottuk 5 µM-ra.

Primer specifitása	Primer neve	Szekvencia	Forrás
Az először alkalmazott fajspecifikus primerek:			
<i>Bifidobacterium</i> általános primer	Bif164 Bif662	5' -GGTGGTAATGCCGGATG-3' 5' -CCACCGTTACACCGGGAA-3'	Mayer és mtsai. (2007)
<i>Enterococcus faecium</i> primer	16S Ef	5' -GCTGGATCACCTCCTTTC-3' 5' -CACACAATCGTAACATCCTA-3'	Aymerich és mtsai. (2003)
<i>Escherichia coli</i> primer	ECO 1 ECO 2	5' -GACCTCGGTTTAGTTTCACAGA-3' 5' -CACACGCTGACGCTGACCA-3'	Rekha és mtsai. (2006)
<i>Lactobacillus casei</i>	casei Y2	5' -TGCCTGAGATTGACTTAA-3' 5' -CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Ward és Timmins (1999)
A 16S rDNS szekvenálásához alkalmazott primerek:			
23S rDNS elejére tervezett reverse primerek	23S Bif 23S Ent	5' -TGCCAAGGCATCCACCAT-3' 5' -GTGCCAAGGCATCCACCGTG-3'	mind saját tervezés
16S rDNS előtti intergénikus részre tervezett forward primerek	coli entero lacto bifido clostr bacter	5' -GTCTCAAGAGTGAACACG-3' 5' -GTGTAGGGCGTCTTGATTTC-3' 5' -GCGAAGTCAATTCGCTAG-3' 5' -TGAGGGCGTCTTCCTTAAG-3' 5' -AAGTCGCTTGAGGGCGAC-3' 5' -TCGACATCCTGAACAGAGC-3'	mind saját tervezés
16S belső primerek	336 frw 1511 rev	5' -ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 5' -ACGGTTACCTTGTTACGAC-3'	mind saját tervezés
Irodalmi adatok és az általunk szekvenáltatott 16S rDNS alapján tervezett primerek:			
<i>Escherichia coli</i> 16S RNS	frw rev	5' -GTTAATACCTTTGCTCATTGA-3' 5' -CTTGCCAGTATCAGATGCAGT-3'	Malinen és mtsai. (2003) ¹
<i>Enterococcus faecium</i> 16S RNS	frw rev	5' -TATTGTTAGTTGCCATCATTTC-3' 5' -CTTCGCAACTCGTTGTACTTC-3'	Rinttila és mtsai (2004) ²
<i>Lactobacillus casei</i> 16S RNS	frw rev	5' -AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 5' -CACCGCTACACATGGAG-3'	Rinttila és mtsai (2004)
<i>Bifidobacterium longum</i> 16S RNS	frw2 rev2	5' -TGATCGCATGGTCTTCTG-3' 5' -GTAACTCACTCTCGCTTG-3'	mind saját tervezés
<i>Clostridium perfringens</i> 16S RNS	frw2 rev2	5' -TAATGACGGTACCCAAGGAG-3' 5' -GAGTTTTAATCTTGCGAC-3'	Matsuki és mtsai. (2002) ¹
<i>Bacteroides fragilis</i> 16S RNS	frw2 rev2	5' -CGATAGCATAATGATTTC-3' 5' -CAGTATCAGCTGCAATTTTA-3'	Matsuki és mtsai. (2002) ³

3. táblázat: Az alkalmazott primerek szekvencia adatai. ¹: rev primer saját tervezés, ²: mindkét primer részben módosított, ³: frw primer saját tervezés.

3.3.8 *A kompetens sejt készítéshez és transzformáláshoz alkalmazott kitek*

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

3.3.9 *A plazmid izolálás (minilizátum készítés) oldatai (Kovalenko és mtsai., 1994):*

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

3.3.10 *Egyéb vegyszerek*

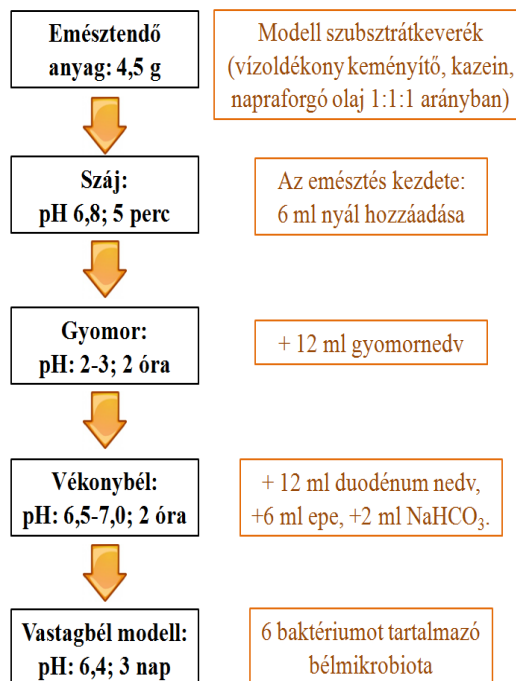
- pH állításhoz különböző töménységű NaOH és HCl oldatok.
- hígító oldat – baktérium hígítási sorok készítéséhez: 8,5 g/l NaCl, 1 g/l tripton.

3.4 Alkalmazott módszerek

3.4.1 *A kémiai emésztés in vitro modellezése*

Az emésztőnedveket mesterségesen készítettük el a kísérletek kezdetekor a 3.3.5 pontban leírtak szerint. Az emésztési folyamat 37 °C-on, folyamatos kevertetés mellett hajtottuk végre. Az emésztés folyamatát az **2. ábra** mutatja be.

4,5 g mintához (ami lehet mesterséges szubsztrátkeverék vagy „valódi” élelmiszer minta esetleg egyéb vizsgálandó anyag) 6 ml nyálát adunk és öt percig mágneses keverővel kevertetjük, majd 12 ml gyomornedvet adunk hozzá. Ellenőrizzük a minta pH értékét és hőmérsékletét majd beállítjuk a megfelelő paramétereket és két óráig kevertetjük. Az inkubációs idő lejártával 12 ml vékonybél



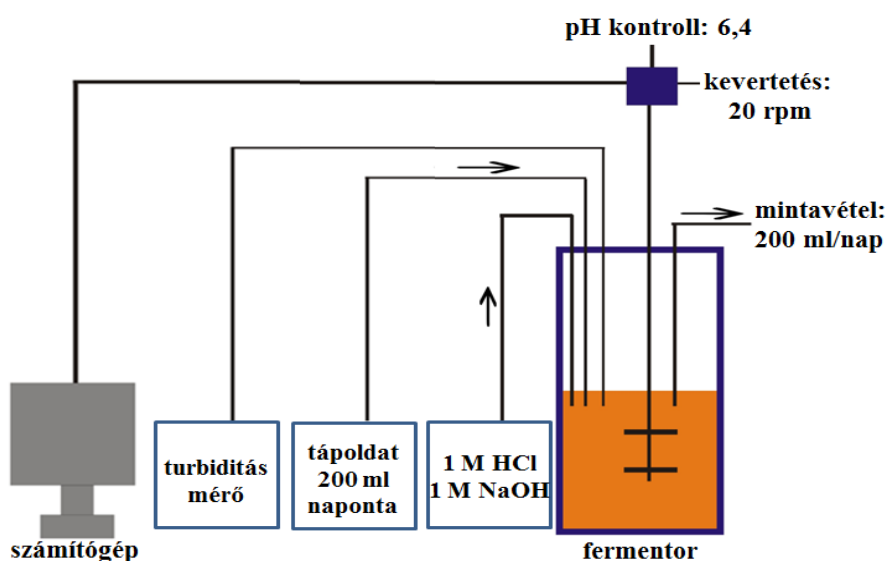
2. ábra: Az *in vitro* emésztési modell

nedvet, 6 ml epeváladékot és 2 ml NaHCO_3 oldatot adunk hozzá. Ismét ellenőrizzük és szükség esetén beállítottuk a minta pH értékét és hőmérsékletét, majd további két órán keresztül kevertetjük.

Az emésztett mintát vagy analitikai (emésztés hatékonyságának jellemzése) vagy mikrobiológiai módszerekkel (emésztett anyagok hatása az *in vitro* vastagbél modellre) vizsgáltuk tovább.

3.4.2 Az *in vitro* bél mikrobiota modell felépítése

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



3. ábra: A fermentáció folyamatának sematikus ábrázolása.

3.4.3 Genomi DNS izolálása baktériumokból

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

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

3.4.4 A PCR reakció körülményei

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

A reakciót az alábbiak szerint mértük össze (25 µl végtérfogatra):

- 2,5 µl 10x DreamTaq puffer
- 1-1 µl forward és reverz primer (5 µM)
- 0,5 µl dNTP mix (10 mM)
- 0,2 µl DreamTaq polimeráz enzim (5 U/µl)
- 17,8 µl bidesztillált víz
- Összesen: 23 µl + 2 µl DNS templát

A PCR program:

Elődenaturálás:	95 °C, 3 perc	} 35 x ismétlés
Denaturálás:	95 °C, 30 másodperc	
Annealing:	50 – 70 °C, 30 másodperc	
Elongáció:	72 °C, 30 másodperc	
Végző elongáció:	72 °C, 5 perc	

3.4.5 A qPCR reakció körülményei

A Real-Time PCR kísérleteket egy Corbett RotorGene 6000 típusú készülékkel végeztük el. A qPCR összeállítása során a többféle enzimet tartalmazó mixet is kipróbáltunk.

Egy-egy reakciót az alábbiak szerint mértünk össze (20 µl-re):

Immomix™ esetén:		Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix esetén:	
2x Immomix:	10 µl	2x Luminaris Color Master Mix:	10 µl
EvaGreen:	1 µl	forward primer:	1 µl
forward primer:	1 µl	reverz primer:	1 µl
reverz primer:	1 µl	<u>bidesztillált víz:</u>	<u>6 µl</u>
<u>bidesztillált víz:</u>	<u>5 µl</u>	Összesen: 18 µl + 2 µl DNS	
Összesen: 18 µl + 2µl DNS			

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

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

*: Előkezelést csak Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix esetében alkalmaztunk. **: 52 °C vagy az egyes primereknek megfelelő tapadási hőmérséklet.

3.4.6 A PCR termékek elválasztása agaróz gélelektroforézissel

A keletkezett PCR termékek elválasztáshoz agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. 1%-os 15 cm x 15 cm-es vagy 15 cm x 10 cm-es agaróz gélben választottuk el a fragmentumokat. A géleket 1x-es TBE pufferben futattuk 70 mV, 90 mA-en kb. 1 órán keresztül Cleaver Scientific futtatókádat alkalmazva. Az agaróz gélhez a készítés során hozzáadtunk GelRed

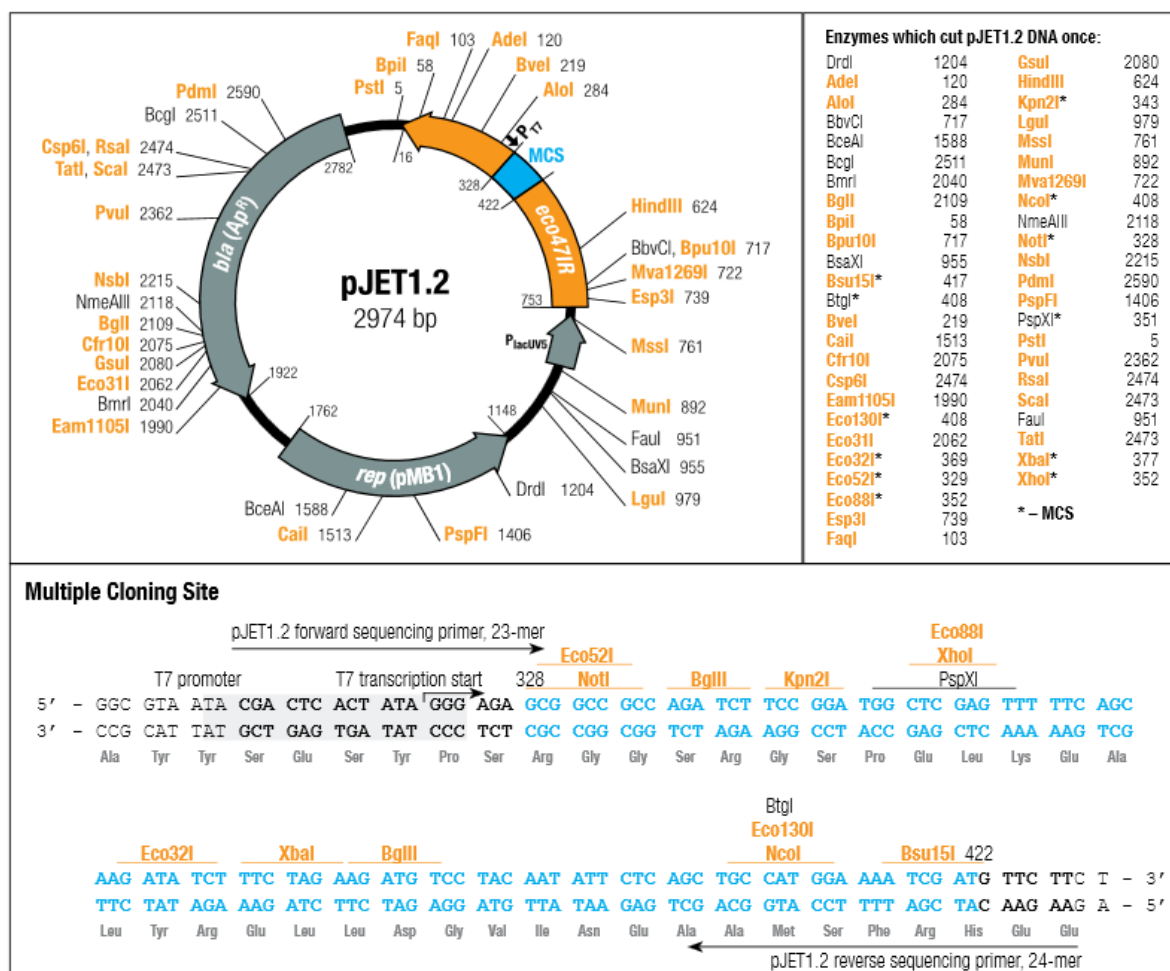
festéket, ami a fragmentumokat láthatóvá tette. A PCR termékekből általában 10 µl-t, a markerből pedig 3 µl-t vittünk fel. A géleket BioDocAnalyze (Biometra) készülék BioDoc Analyze 2.1 gëldokumentáló- és kiértékelő szoftverének segítségével elemeztük.

3.4.7 A PCR termék tisztítása

A PCR termékek közvetlen tisztításához a GeneJET PCR Purification Kit-et (Thermo Scientific), míg a fragmentumok agaróz gélből történő visszaizolálásához a GeneJET Gel Extraction Kitet alkalmaztuk (Thermo Scientific). Az eljárást a gyártó által meghatározott protokoll szerint végeztük el.

3.4.8 A PCR termékek klónozása, baktérium transzformáció és plazmid izolálás

A PCR termékek ligálását és transzformálást a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) alkalmazásával hajtottuk végre. A Kitben található pJET1.2/blunt vektor térképét a 4. ábra mutatja be.



4. ábra: A pJET1.2/blunt vektor térképe. Forrás: <http://www.thermoscientificbio.com>

Mivel az általunk alkalmazott DreamTaq polimeráz 3'-dA túlnyúló véget generál a PCR termékekre és a vektorba csak tompa végű (blunt end) fragmentumok ligálhatók, ezért szükség volt a PCR termékek túlnyúló végének leemésztésére, melyet a Kitben található DNA Blunting Enzyme segítségével végeztünk el. A ligálás és a transzformálás többi lépését a gyártó utasításai szerint végeztük el. A kompetens sejteket *E. coli* XL1-Blue törzséből készítettük el a Mix & Go *E. coli* Transfromation Kit & Buffer Set (Zymo Research) protokollját követve. Az alkalmazott vektor jellegzetessége, hogy egy letális gént tartalmaz, mely nem fejt ki hatását, ha a ligálás során a PCR termék sikeresen beépül a vektorba, ezért transzformáns telepek meghatározására általában használt kék/fehér szelekció nem szükséges ezen vektor alkalmazása esetében. A 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB táptalajokon csupán a ténylegesen transzformáns telepek képesek növekedni.

A baktérium sejtekből alkalikus lízis módszerrel tisztítottuk a plazmidokat (Kovalenko és mtsai. 1994) és a későbbiekben a plazmid szekvenálathoz a pJET1.2 frw/rev primereket alkalmaztuk.

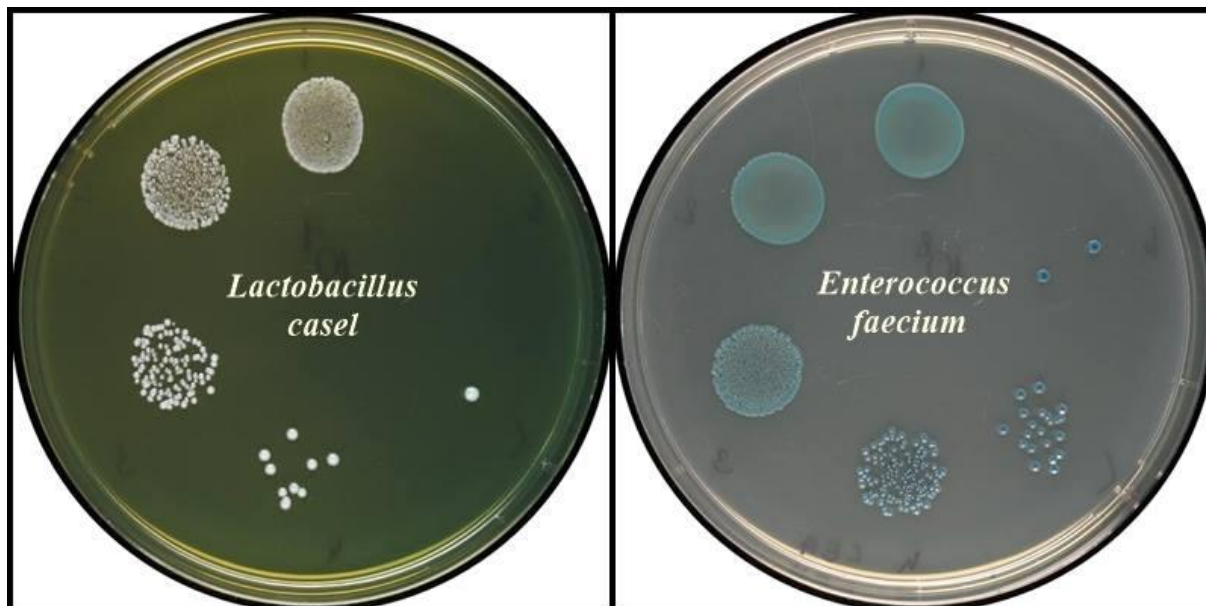
3.4.9 Szekvencia elemzése, összehasonlítása

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

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A vastagbél mikrobiota modellezése során alkalmazott baktériumok telepszám változásának nyomon követése szelektív táptalajon

Munkánk során a különböző élelmiszer komponensek illetve adalékanyagok (pl. prebiotikumok) a vastagbélben lévő mikrobákra gyakorolt hatását tanulmányoztuk, különös tekintettel a jótékony hatású, probiotikus törzsekre. Az egyes hatóanyagokat emésztetlenül vagy a korábban említett *in vitro* emésztési modellel megemésztve adtuk a vastagbél mikrobiotát modellező rendszerünkhöz (az alkalmazott hat baktériumot az **1. táblázat** mutatja be). Kísérleteink során többek közt azt vizsgáltuk, hogy ezek a hatóanyagok milyen mértékben befolyásolják a baktériumok szaporodását. A baktériumok telepszám meghatározását az egyes mikroorganizmusnak megfelelő szelektív táptalajon végeztük el. Korábbi tapasztalataink alapján megállapítottuk, hogy a fermentáció során a baktériumok csíraszama kb. 10^4 és 10^9 CFU/ml közt változik (colony forming unit, telepformáló egység), ezért a fermentorból vett mintákból ennek megfelelően készítettünk tízes léptékű hígítási sorokat 1 ml mintához 9 ml steril hígító folyadékot adva. A későbbi qPCR kalibrációs és DNS izolálási kontrol kísérleteknél a baktériumok tiszta tenyészetét is ennek megfelelően hígítottuk.



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

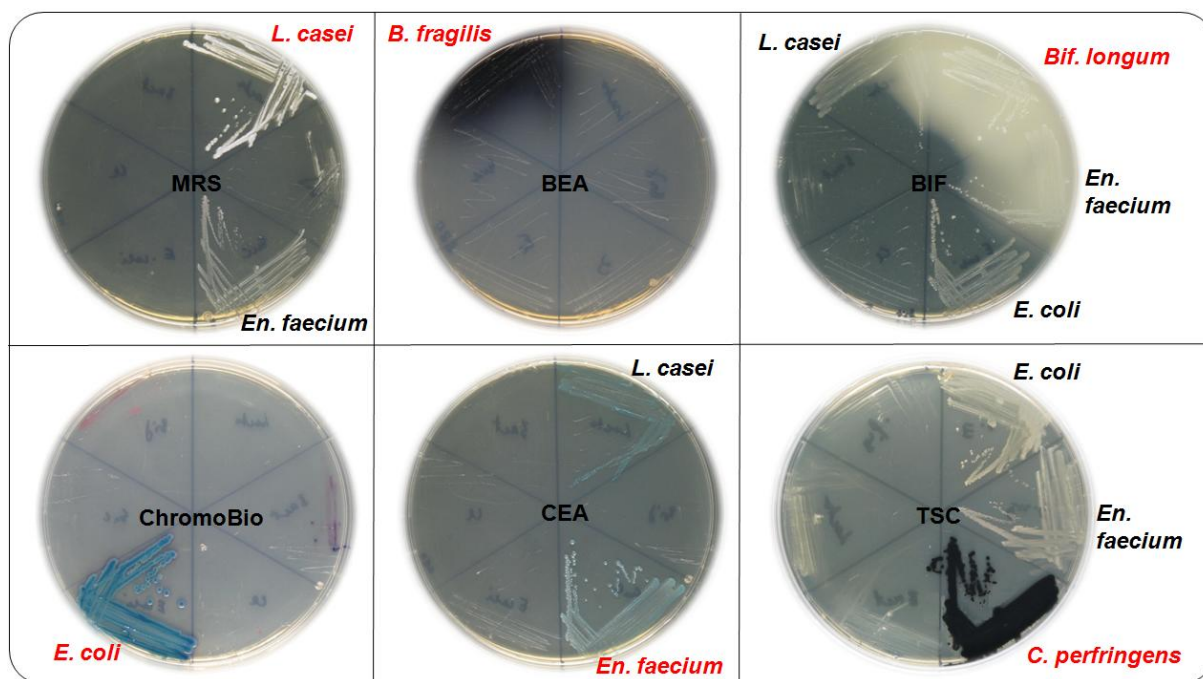
A szélesztést kétféleképp végeztük el: kevés minta vizsgálata esetében hagyományos módon, 100-100 μ l-t szélesztettünk a petricsészékre az egyes hígítási tagokból. Több minta esetében

azonban egy petricsészére hat foltban 25 µl-t pipettáztunk a hígítási tagból és a mintákat nem szélesztettük, hanem a beszáradt folt területén felnövekvő telepeket számoltuk meg az inkubációt követően (**5. ábra**). Erre azért volt szükség, mert egy fermentoros minta 6 baktérium keverékét tartalmazza, melyeket külön-külön táptalajon szélesztünk öt mintavételi időpontban és négy hígítási tag szélesztése esetében is ez 6x5x4, vagyis 120 petricsészét jelent egy minta vizsgálatánál abban az esetben, ha a szélesztést csak egy sorozatban készítjük el. Optimális esetben legalább két független szélesztést kell készíteni és négy helyett hat hígítási tagból (ami 360-ra növeli a szükséges petricsészék számát). A foltban oltásos módszerrel ez a szám jelentősen csökkenthető (120-ról 30-ra, illetve 360-ról 60-ra).

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy szelektív táptalajon történő telepszám meghatározás nem a legoptimálisabb módszer, mivel egyes baktériumok tenyésztési ideje három nap, vagyis a 3-4 napos fermentáció kezdetén vett mintákat csak a fermentáció végén tudtuk kiértékelni és így az esetleges időközbeni beavatkozás (a fermentáció paramétereinek módosítása vagy akár leállítása – pl. ha egy-egy baktérium nem szaporodik megfelelően) nem lehetséges. A keverék tenyészetek szélesztése szintén felvetett egy újabb problémát: a szelektív táptalajok alkalmazása nem jelenti azt, hogy egy-egy petricsészén csak egyféle baktérium képes növekedni. Ez igaz *E. coli* és a *Bacteroides* esetében, de bizonyos esetekben akár négy baktérium is képes növekedni egy adott táptalajon (pl. BIF, **4. táblázat**). Ez azonban nem jelenti azt, hogy ezek a táptalajok nem szelektívek, hiszen telep morfológia és telepszín alapján az egyes mikrobák jól elkülöníthetőek (**6. ábra**)

szelektív táptalajok	<i>Bacteroides</i> <i>fragilis</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i>	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i>
BEA	+	-	-	-	-	-
BIF	-	+	-	+	+	+
TSC	-	-	+	+	+	-
CEA	-	-	-	+	-	+
Coliform	-	-	-	-	+	-
MRS	-	-	-	+	-	+

4. táblázat: A hat baktérium növekedése a hatféle szelektív táptalajon. A szelektív táptalajok rövidítéseit az 1. táblázat tartalmazza. Pirossal emeltük ki a megfelelő táptalaj-baktérium kombinációkat. +: van növekedés, -: nincs növekedés.



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

Az MRS és CEA táptalajokon a *Lactobacillus* és az *Enterococcus* is képes növekedni, de telep morfológiájának alapján elkülöníthetőek. A TSC táptalajon csak a *Clostridium* képez fekete telepeket, míg a módosított, kazein tartalmú BIF táptalajon csak a *Bifidobacterium* képes kicsapni a kazeint. Tehát az egyes baktériumok elkülöníthetőek, de keverék tenyészetek esetében ez jelentősen megnehezíti, sőt bizonyos esetekben lehetetlenné teszi a pontos telepszám meghatározást (pl. ha a „szennyező” baktériumokból 2-3 nagyságrenddel több van, mint abból, amit vizsgálni szeretnénk; pl. hiába különíthető el a fekete színű telepeiről a *Clostridium*, ha nő mellette több száz/ezer fehér telep). Ezért, és a hosszú tenyésztési idő miatt a szélesztéssel történő telepszám meghatározás nem minden esetben alkalmas az *in vitro* vastagbél mikrobiota telepszám változásainak pontos és gyors nyomon követésére.

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

Munkánk során célunk volt egy olyan baktérium mennyiség meghatározó módszer kifejlesztése, ami gyorsabb, specifikusabb és pontosabb a szelektív táptalajon történő tenyésztésnél. A baktériumok mennyiségének nyomon követésére irodalmi adatok alapján a qPCR technikát választottuk, mivel számos esetben alkalmazták hasonló célra elsősorban 16S rDNS szekvenciákhoz tervezett specifikus primerekkel (pl. székletminták; Matsuki és mtsai., 2002). Mivel a baktériumok 16S rDNS szekvenciájáról rengeteg információ található

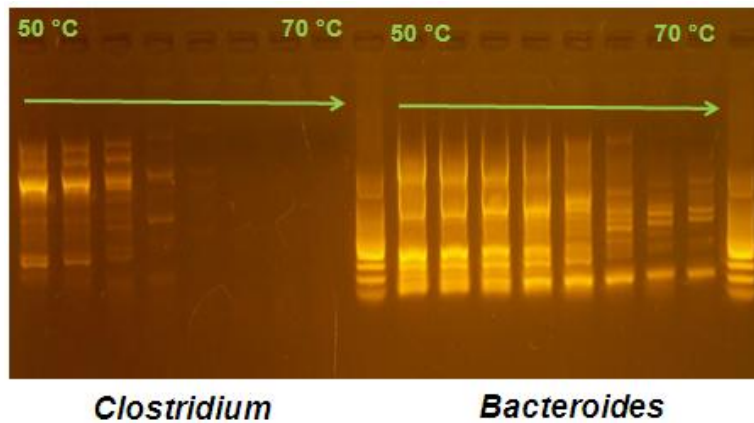
(adatbankok, tudományos cikkek, stb.) széles körben alkalmazzák különböző vizsgálatokra, ezért mi is a 16S RNS alapú primerek alkalmazását tűztük ki célul.

Első lépésként azonban a laboratóriumunkban korábban alkalmazott fajspecifikus primereket teszteltük (**3. táblázat**). Az általunk alkalmazott hat baktérium közül négy esetében (*E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* és *Bifidobacterium*) találtunk qPCR-hez alkalmazható primerpárokat, de ezek nem működtek megfelelően, hiszen mindegyik primer adott terméket mindegyik baktériummal (**7. ábra**). Ezeket a primereket korábban arra használtuk, hogy a nekik megfelelő baktérium törzseken bizonyos szekvencia részeket azonosítsunk és nem az volt a cél, hogy az összes többi baktériumon ne működjenek, ezért nem volt meglepő az eredmény.



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

Ezután olyan irodalmi adatok alapján terveztünk 16S rDNS alapú primereket, ahol ezt a rendszert a bél mikrobiota mennyiségi változásainak, illetve összetételének vizsgálatára alkalmazták (Rinttila és mtsai., 2004; Malinen és mtsai., 2003; Matsuki és mtsai., 2002). Néhány primer megfelelően működött, de bizonyos esetekben egy specifikus termék helyett több aspecifikus termék keletkezett, melyet a PCR körülményeinek optimalizálásával (hőmérséklet gradiens PCR, $MgCl_2$ koncentráció változtatása) sem voltunk képesek kiküszöbölni (**8. ábra**).



8. ábra: Irodalmi adatok alapján tervezett *Clostridium* illetve *Bacteroides* primerpárok hőmérséklet gradiens PCR-ének agaróz gélelektroforetikus képe.

A megfelelőnek tűnő primerek esetében sem volt mind eléggé fajspecifikus. Ezért úgy döntöttünk, hogy mind a hat baktériumot megszekvenáltatjuk, és a szekvencia adatok alapján tervezünk „saját” specifikus primereket. Minden baktériumban a riboszómális RNS gének clusterekben fordulnak elő, és minden esetben a 16S RNS-t követi a 23S RNS génje, ezután pedig az 5S RNS génje található (**9. ábra**). Ezt a felépítést kihasználva terveztünk általános primereket a 23S RNS gén elejére (reverse primer) és fajspecifikus primereket a 16S RNS előtti intergénikus részekre (forward primer). Ezen primerek segítségével felamplifikáltuk a teljes 16S RNS gént (és 3’ illetve 5’ irányban lévő intergénikus szakaszok egy részét). A PCR termékeket klónoztuk vagy megfelelő tisztítás után közvetlenül szekvenáltattuk.



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

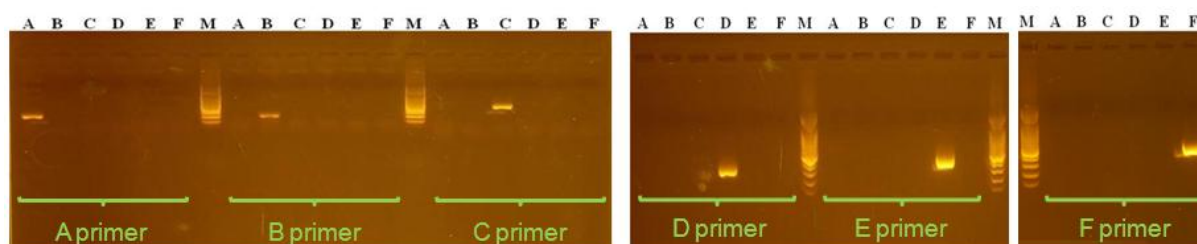
A szekvenáló cégtől kapott nyers szekvencia adatokat Chromas programmal elemeztük és NCBI adatbázisában azonosítottuk a BLAST kereső algoritmussal. Bizonyos esetekben a teljes gén végigszekvenálásához belső primereket is alkalmaznunk kellett, melyek szintén saját tervezésűek és mind a hat baktériumon működtek (**3. táblázat**). Az azonosított szekvencia részeket összeillesztettük és a végső 16S RNS gének szekvenciáit az **5. táblázatban** foglaltuk össze.

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

5. táblázat: Az *in vitro* emésztési modellben alkalmazott hat baktérium 16S RNS génjeinek adatai. *: az NCBI honlap alapján (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A dolgozat készítésének idejében ezek az adatbanki számok még nem estek át a végső bírálaton.

A 16S rDNS szekvenciákat ClustalW programmal hasonlítottuk össze a leginkább eltérő részek azonosítása céljából. A 16S RNS gén tartalmaz olyan régiókat, melyek minden baktériumban nagyon hasonlóak (konzerváltak), de vannak olyan szekvenciarszek is, amelyek jelentősen eltérnek - ez utóbbi részekhez terveztünk fajspecifikus primereket (**1. melléklet**).

Az új, részben saját szekvenciáink alapján, részben az irodalmi adatok alapján tervezett primerek esetében először hőmérséklet grádiens PCR segítségével meghatároztuk az optimális tapadási hőmérsékletet. A fajspecifikusság vizsgálata során mind a hat primerpárt összemértük mind a hat baktériumból izolált DNS-sel, azt az eredményt várva, hogy mindegyik primerpár csak a saját DNS templátján működik, amit a **10. ábra** is igazol. Megállapíthatjuk tehát, hogy ezek a primerpárok ténylegesen alkalmasak a hat baktérium szelektív elkülönítésére.



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

4.3 A DNS izolálás és a qPCR körülményeinek optimalizálása

Munkánk során különböző mennyiségű (általában 10^4 - 10^9 CFU/ml) baktérium tartalmú minták telepszámának a meghatározását tűztük ki célul. Ezért egy olyan DNS izolálási módszert dolgoztunk ki, amely azonos hatékonysággal képes nukleinsav izolálására higabb/töményebb mintákból azt is figyelembe véve, hogy az általunk alkalmazott mikrobák egy része Gram negatív másik része Gram pozitív (ez utóbbiakból jóval nehezebb a DNS izolálása a sejtfalszerkezetbeli eltérések miatt). Munkánk kezdetén viszonylag tömény (10^8 - 10^9 CFU/ml) baktérium tiszta tenyészetekből izoláltunk DNS-t és három különböző Kit feltárási hatékonyságát teszteltük. Megállapítottuk, hogy a QIAamp DNA Mini Kit szolgáltatja a legtöbb nukleinsavat. Ha azonban a baktériumokból 10-es léptékű hígítási sorokat készítettünk (ezzel szimulálva a „valós” minták alacsonyabb sejtszámát) és ezekből izoláltunk DNS-t, akkor önmagában ez a Kit sem volt megfelelő. Ezért úgy döntöttünk, hogy a különböző Kitek protokolljai alapján egy kombinált technikát alkalmazunk és ezt hasonlítottuk össze a „hagyományos” fenolos extrakcióval történő DNS izolálással. Négyféle sejtfeltárási és extrakciós módszert vetettünk össze egy-egy Gram pozitív (*Lactobacillus*) és Gram negatív baktérium (*E. coli*) esetében:

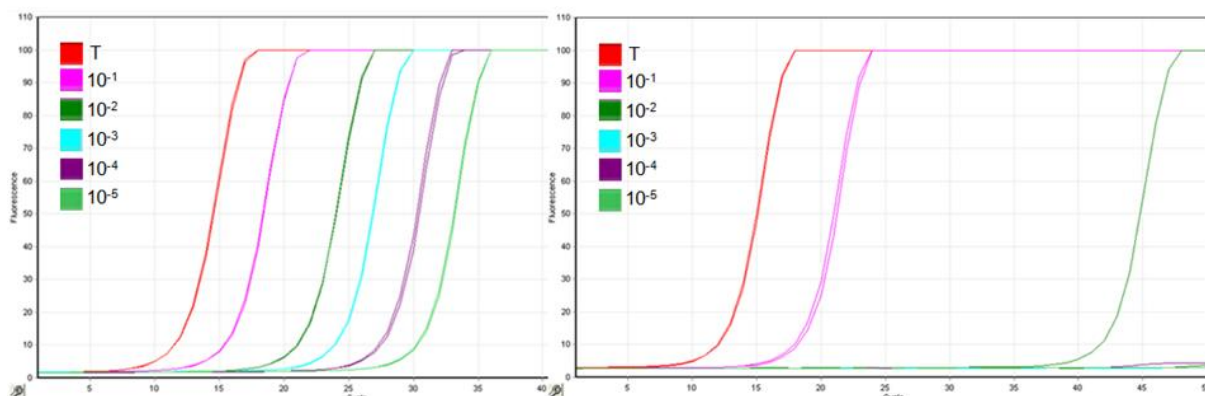
- A. verzió:** A DNS izolálást a gyártó által előírt protokoll szerint (QIAamp Kit) alkalmazásával végeztük el.
- B. verzió:** Mint A, de sejtfeltárási után egy fenolos extrakciót hajtottunk végre.
- C. verzió:** Mint A, de az enzimes kezelést követően 5 perc 50 Hz üveggyöngyös rázását végeztünk el Tissue Lyser LT homogenizáló készülékkel.
- D. verzió:** Az enzimes kezelést 5 perc üveggyöngyös homogenizálás követte, majd az oszlopos tisztítás helyett fenolos extrakciót és alkoholos kicsapást alkalmaztunk.

Az elúciót, illetve a kicsapott DNS minták feloldását is 400 µl TE pufferrel hajtottuk végre. A különböző izolálásokról nyert DNS mennyiségét nanodroppal ellenőriztük (**6. táblázat**).

Izolálási módszer:	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
A verzió	77,5 ng/µl	55,2 ng/µl
B verzió	47,5 ng/µl	34,1 ng/µl
C verzió	73,8 ng/µl	75,8 ng/µl
D verzió	247,8 ng/µl	103,7 ng/µl

6. táblázat: Nanodroppal leolmért különbözö izolálási technikával kapott DNS mennyisége egy Gram + és egy Gram – baktérium esetében.

Megállapítottuk, hogy mindkét esetben a hagyományos fenolos extrakció a leghatékonyabb, viszont a fenolos extrakció és a DNS izoláló Kit kombinálása a legkevésbé hatékony. Az *E. coli* esetében az üveggyöngyös feltárás nem növelte a DNS izolálás hatékonyságát, de a *Lactobacillus* esetében igen (épp erre számítottunk). Végül a fenolos extrakció helyett az üveggyöngyös feltárással kombinált kissé módosított QIAamp Kit protokoll mellett döntöttünk, mivel a fenolos extrakció alkalmazásakor a hígítási sorok tagjaiból izolált DNS esetében nagyobb volt a minták közti szórás, mint a QIAamp Kittel izoláltak esetében (és ez fontos tényező a qPCR kalibrálása során). A végső protokollban kétféle enzimes kezelést (lizozim, proteináz K), két lépcsős hőkezelést (56 °C és 95 °C) és üveggyöngyökkel történő fizikai feltárást is alkalmaztunk a 3.4.3 fejezetben leírtak szerint.

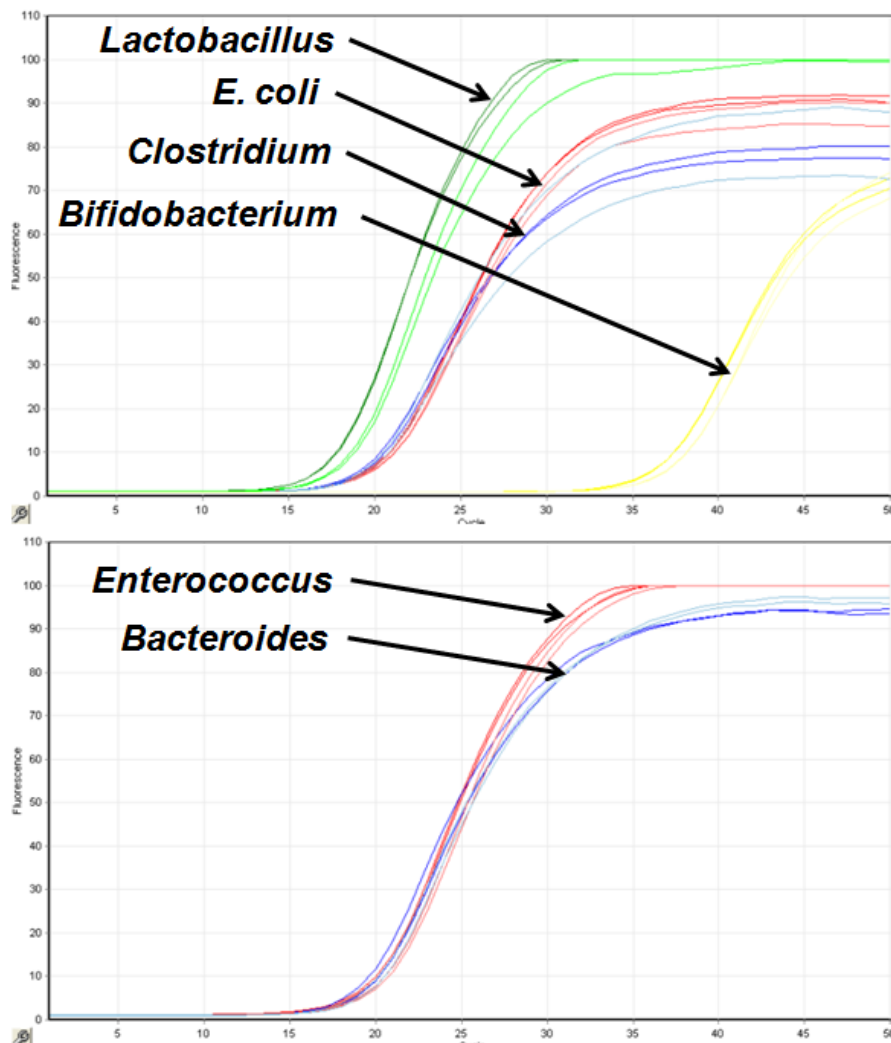


11. ábra: *Clostridium* minták hígítási sorából izolált DNS segítségével történő kétféle polimeráz enzim hatékonyságának tesztelése. Balra: Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, jobbra: ImmoMix.

A tiszta tenyészetek feltárása után azt szerettük volna igazolni, hogy azonos hatékonysággal tudunk DNS izolálni ugyanabból a baktériumból akkor is, ha mind a hat baktériumot tartalmazó keverék tenyészetet tárjuk fel. Ehhez azonban szükséges volt a megfelelő qPCR enzim kiválasztása, mert munkánk során megállapítottuk, hogy a laboratóriumunkban korábban használt qPCR enzim (ImmoMix) nem megfelelően működik minden esetben hígabb DNS minták vizsgálatakor, ezért egy új enzimet szereztünk be, mely a gyártó szerint különösen alkalmas híg DNS minták vizsgálatára (Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, a továbbiakban Luminaris Mix). A két enzim hatékonyságának összehasonlításához egy baktériumból (jelen esetben *Clostridium*) 10-es léptékű hígítási sort (tömény, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hígítások) készítettünk, majd DNS-t izoláltunk és elvégeztük a qPCR reakciót. Ha mindkét enzim azonos hatékonysággal működött volna, akkor mindkét esetben az azonos töménységű mintákhoz kb. azonos CT érték tartozott volna. Az **11. ábra** alapján

megállapíthatjuk, hogy a tömény és 10^{-1} hígítás esetében a kétféle polimeráz enzim közel azonos hatékonysággal működött, de a hígabb minták esetében az ImmoMix nem adott értékelhető jelet. Bár néhány esetben ez az enzim is hatékonyabban működött hígabb mintákon összességében megállapíthatjuk, hogy a Luminaris Mix sokkal megfelelőbb vizsgálatainkhoz, ezért a későbbiekben ezt az enzimet alkalmaztuk.

A megfelelő enzim kiválasztása után elvégeztük a tiszta és a keverék tenyészetek összehasonlítását. Mind a hat baktériumból egy-egy szuszpenziót készítettünk, majd ezekből egy olyan keveréket, amely mind a hat baktérium esetében ugyanannyi mikrobát tartalmazott, mint a neki megfelelő tiszta tenyészet. Mint a hét mintát feltártuk és qPCR segítségével (két-két ismétlésben) összehasonlítottuk a tiszta és kevert tenyészetek DNS tartalmát mindegyik baktérium esetében (12. ábra).

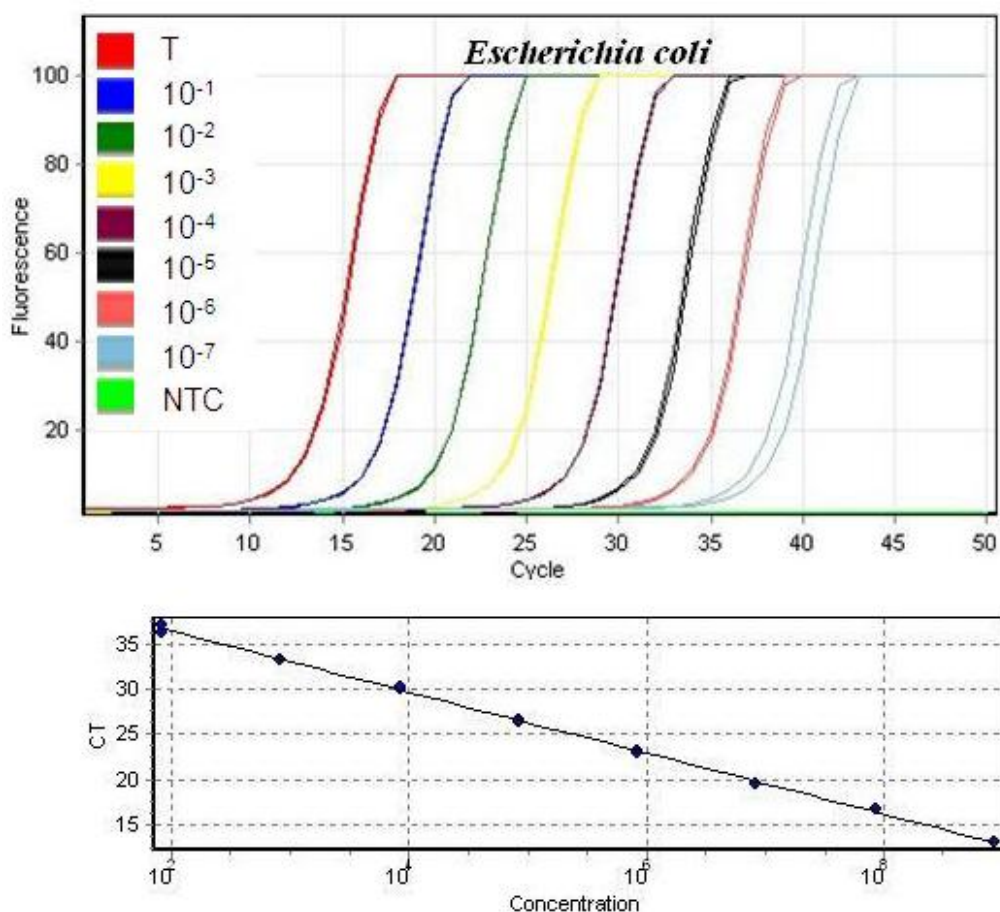


12. ábra: A tiszta és keverék tenyészetekből izolált DNS mennyiségi meghatározása qPCR segítségével. Az azonos színek az azonos baktériumot jelölik, és egy színben belül a két sötétebb vonal a tiszta tenyészetek, míg a két világosabb vonal a keverék tenyészetek amplifikációs görbéit jelölik.

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

4.4 Baktérium mennyiségi meghatározás kalibrációs sorok alapján

A baktérium mennyiségi meghatározás első lépéseként a qPCR érzékenységét és a kalibrációs görbe linearitását teszteltük különböző mennyiségű DNS tartalmú mintákkal. *E. coli* tenyészetéből kb. 10^9 sejt/ml baktérium szuszpenziót készítettünk, majd ebből a tömény mintából DNS-t izoláltunk. Az izolált DNS-ből tízes léptékű hígítási sort készítettünk TE pufferrel (egészen 10^7 -szeres hígításig, ami kb. 100 *E. coli* genom ekvivalens DNS-t tartalmazott) és ezzel határoztuk meg a detektálási limitet (13. ábra).

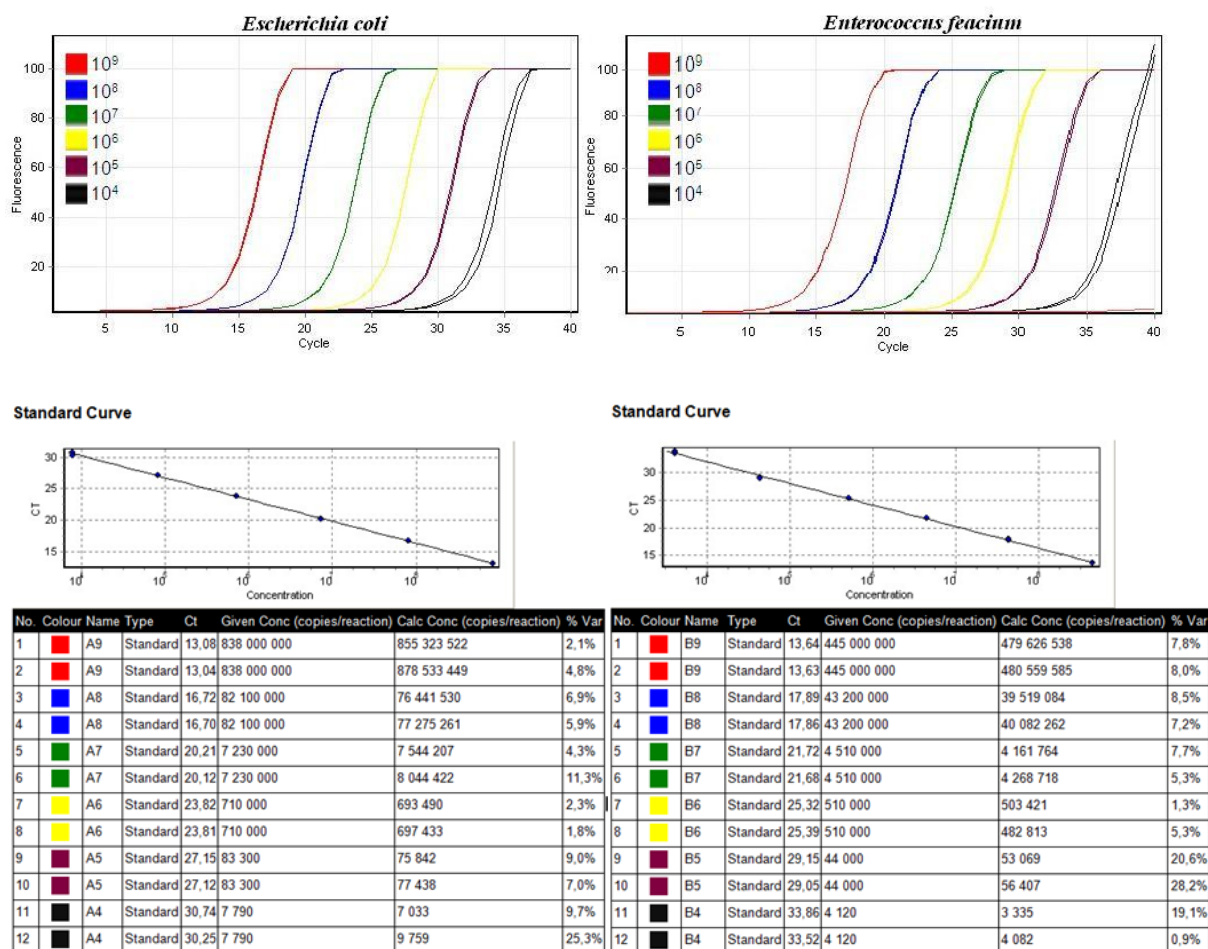


13. ábra: *E. coli* DNS hígítási sor amplifikációs görbéje és a CT értékek alapján készített kalibrációs egyenes. NTC: DNS mentes negatív kontrol.

Megállapítottuk, hogy 10^2 - 10^9 sejt/ml-nek megfelelő DNS tartalmú minták amplifikációs görbéi alapján készített kalibrációs egyenes végig lineáris és a mérési pontok megfelelően illeszkednek rá, bár a leghígabb minta esetében a két párhuzamos görbéje kissé eltért egymástól. Tehát a rendszer méréstartománya megfelelő a későbbiekben a baktérium hígítási sorokból (10^4 - 10^9 CFU/ml) izolált DNS-ek mérésére.

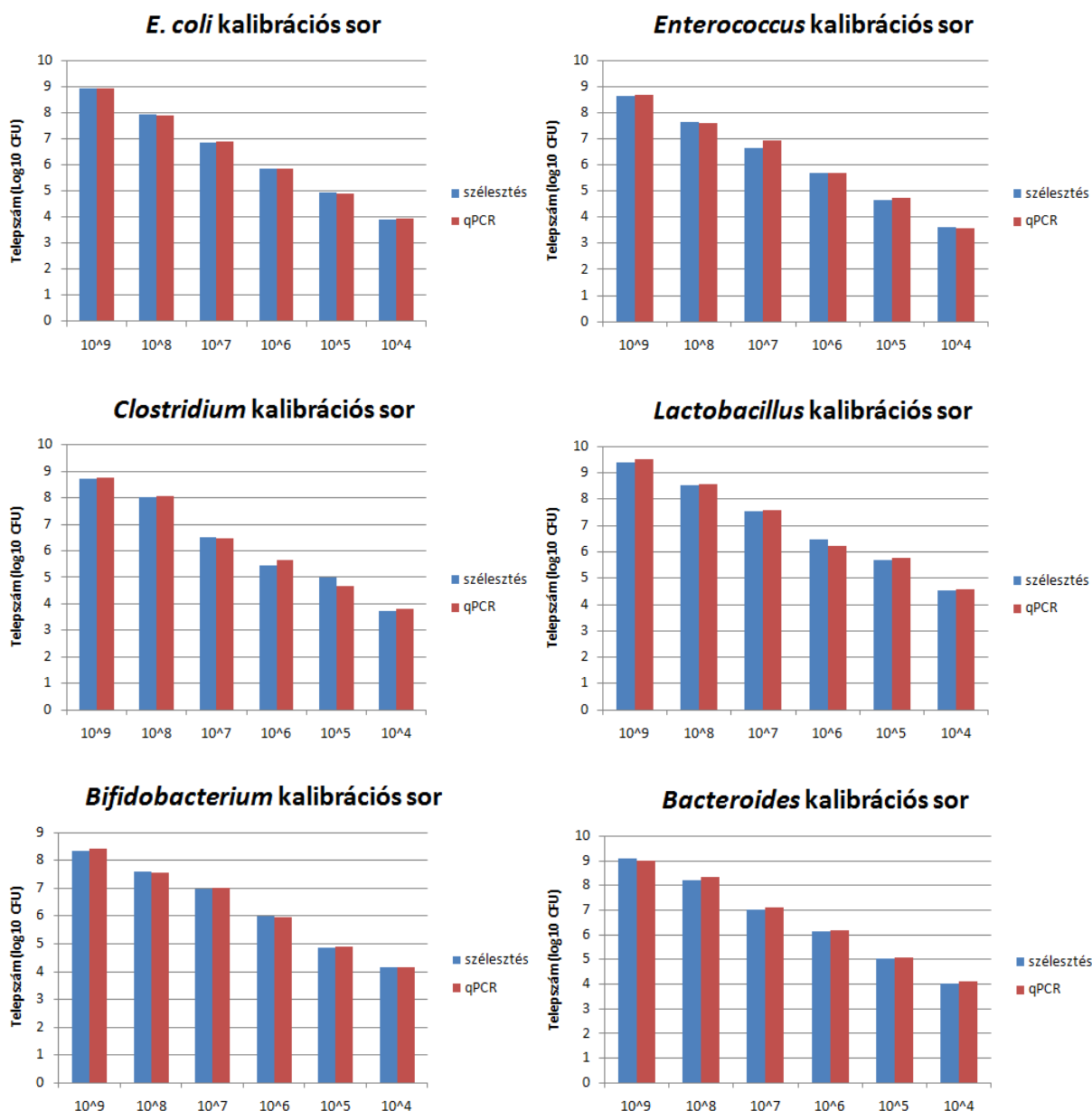
Bár az ismert mennyiségű baktériumból izolált DNS mintából készült hígítási sorok is alkalmasak ismeretlen töménységű baktérium minta DNS mennyiségének (és ezáltal telepszámának) meghatározására, úgy döntöttünk, hogy a baktériumokból készítünk hígítási sorokat és ezek alapján fogjuk az ismeretlen töménységű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

A baktériumok pontos mennyiségi meghatározásához mind a hat baktérium esetében először kalibrációs sorokat készítettünk el. A folyamat pontos lépéseit egy Gram pozitív (*Enterococcus*) illetve egy Gram negatív (*Escherichia*) baktérium esetében mutatjuk be. A baktériumokból kb. 10^9 CFU/ml szuszpenziót állítottunk elő, majd hígító folyadékkal tízes léptékű hígítási sort készítettünk. Minden tagból 100-100 μ l-t szelektív táptalajokra szélesztettünk az élő sejtszám meghatározása céljából és egy-egy ml mintából DNS-t izoláltunk. Kezdetben 10^3 és 10^2 CFU/ml szuszpenziót is készítettünk és feltártunk, de megállapítottuk, hogy az ennyire híg mintákból izolált DNS esetében már nem működött megfelelő hatékonysággal a qPCR reakció (bár a DNS hígítási sorok alkalmazásakor még ezek a minták is a lineáris tartományba estek). Ez azonban nem jelentett problémát a későbbiekben, mivel a valós mintáink kezdeti telepszáma kb. 10^4 CFU/ml, és a fermentáció során ez emelkedik vagy stagnál, de sejtszám csökkenést nem tapasztaltunk a kísérleteink során. Az izolált DNS mintákkal qPCR reakciót hajtottunk végre és az amplifikációs görbék alapján kalibrációs egyeneseket készítettünk el a szélesztés során kapott telepszám adatok felhasználásával (**14. ábra**).



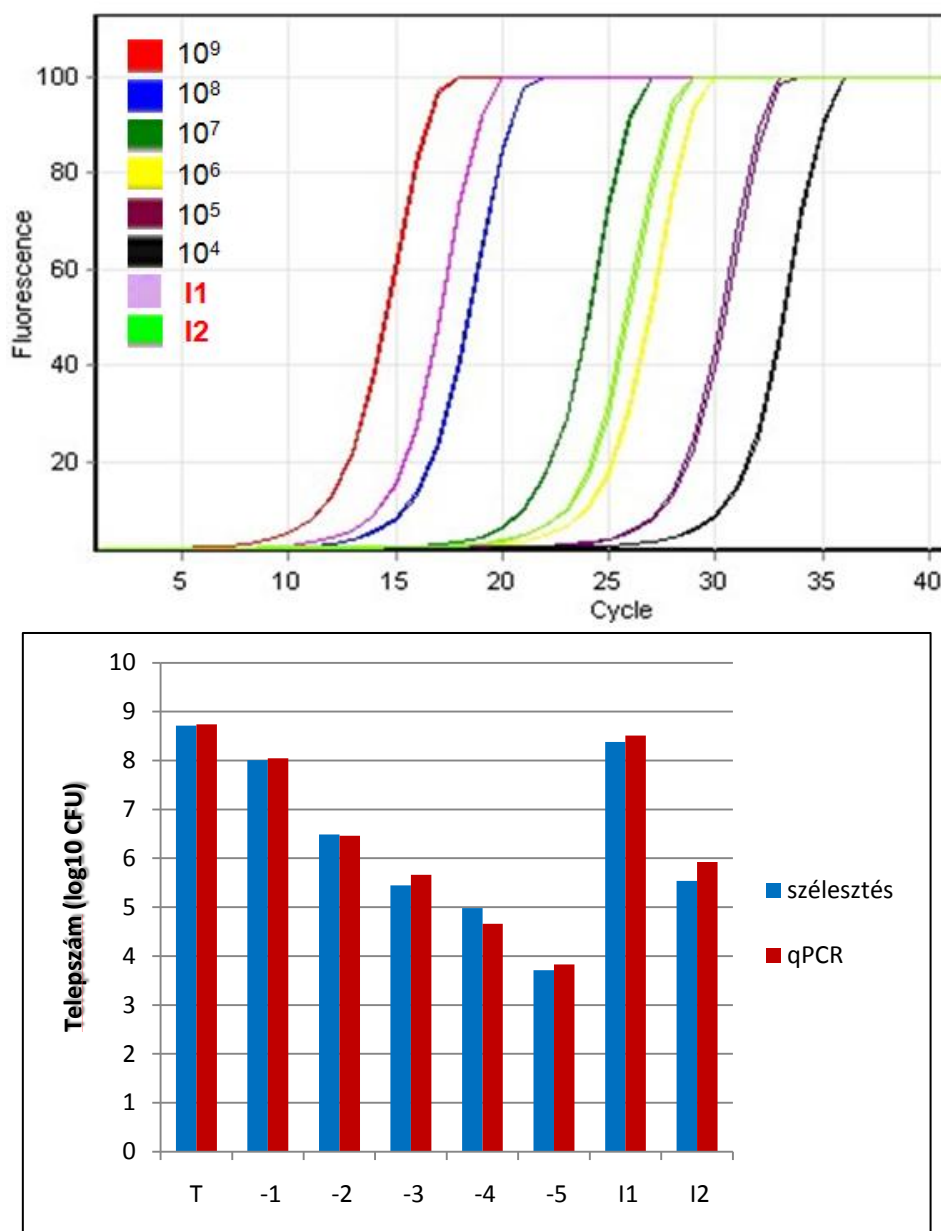
14. ábra: *Escherichia coli* (bal oldali ábrák) és *Enterococcus faecium* (jobb oldali ábrák) hígítási soraiból (10^4 - 10^9 CFU/ml) készült kalibrációs sorok adatai. Fent: Az izolált DNS minták amplifikációs görbéje. Középen: A CT értékek által szerkesztett kalibrációs görbék. Lent: A CT értékek és a kalibrációs sor alapján számított baktérium koncentráció.

A kalibrációs görbék egyenlete alapján kiszámoltuk az összes hígítási tag „molekuláris biológiai módszerrel” meghatározott telepszám értékét és összehasonlítottuk a szélesztés során kapott adatokkal (**15. ábra**). A többi négy baktérium esetében is hasonlóképp jártunk el vagyis az adott mikroba hígítási sorából egyrészt szélesztéssel meghatároztuk a telepszámot, másrészt DNS-t izoláltunk, és a qPCR kalibrációs görbéit ezen hígítási sorok alapján készítettük el. A hígítási sorok általában 10^4 - 10^9 sejt/ml baktériumot tartalmaztak, mivel az emésztési modellben az egyes baktériumok telepszáma ebbe a tartományba esik. A hígítási sorokból történő DNS izolálást, és a specifikus primerek segítségével történő kalibrációs görbék készítését mind a hat baktérium esetében elvégeztük. A további négy baktérium esetében a szélesztéssel és qPCR technikával kapott eredmények összehasonlítását a **15. ábra** mutatja be.



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

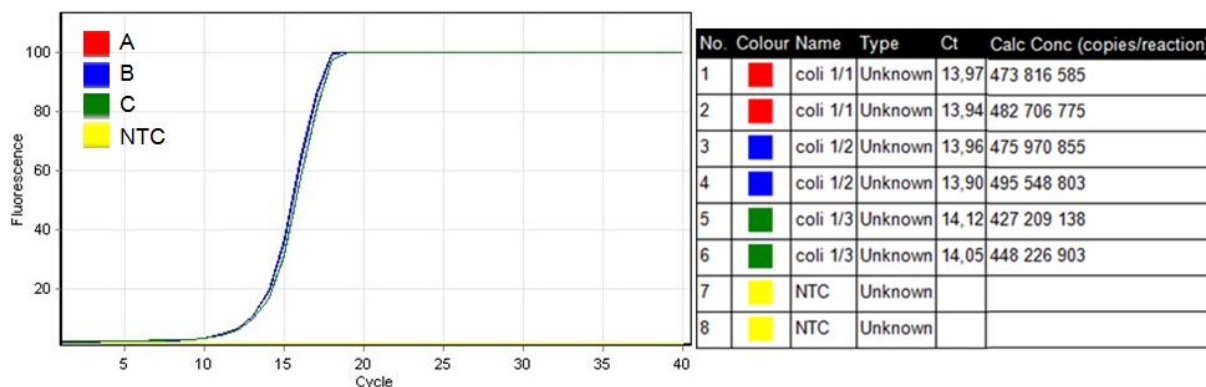
A kalibrációs sorok alapján tudtuk meghatározni az ismeretlen koncentrációjú minták telepszámát, melyet *Clostridium* esetében mutatunk be részletesen. Ebben az esetben „ismeretlen” minták telepszámát szélesztéssel is meghatároztuk, melyet kontrollként használtunk a molekuláris biológiai módszer tesztelése során. Az ismeretlen mintákból is DNS-t izoláltunk és elvégeztük a qPCR reakciót, majd a korábbi kalibrációs sorok alapján meghatároztuk a minták telepszámát, melyet összehasonlítottunk ugyanezen minták szélesztésével (**16 ábra**). A kétféle módszerrel kapott eredmény között csak kismértékű eltérés tapasztalható, vagyis a kvantitatív Real-Time PCR alapú technika alkalmas a baktérium tenyészetek hozzávetőleges telepszámának meghatározására.



16. ábra: Ismeretlen töménységű *Clostridium* minták mennyiségi meghatározása qPCR technikával. Fent: a kalibrációs sor (10^4 - 10^9) valamint a két ismeretlen minta (I1 és I2) amplifikációs képe. Lent: A szélesztéssel és qPCR technikával meghatározott telepszámok összehasonlítása.

Munkánk utolsó lépéseként a DNS izolálás és a qPCR ismételtetését teszteltük, vagyis azt, hogy az egyes minták többszöri mérésének eredményeit mennyire lehet reprodukálni. *E. coli* szuszpenziót készítettünk, majd ugyanabból a szuszpenzióból három-három ismétlésben szélesztettünk, illetve DNS-t izoláltunk. Az izolált nukleinsavakkal elvégeztük a qPCR reakciót (két-két ismétlésben) és arra számítottunk, hogy a hat amplifikációs görbe csak kismértékű eltérést mutat, amit a **17. ábra** is igazol. A korábban elkészített *E. coli* kalibrációs sor alapján meghatároztuk a három minta telepszámát és ezt összevetettük a szélesztés során kapott eredményekkel. A szélesztéssel meghatározott telepszám értékek: $4,6 \times 10^8$, $4,8 \times 10^8$ és

$4,9 \times 10^8$ (átlag: $4,76 \times 10^8$ CFU/ml), míg a qPCR technikával kapott eredmények: $4,78 \times 10^8$, $4,86 \times 10^8$ és $4,38 \times 10^8$ (átlag: $4,67 \times 10^8$ CFU/ml), vagyis a két módszerrel meghatározott baktérium mennyiség szinte teljesen megegyezik.



17. ábra: A három azonos töménységű *E. coli* szuszpenzióból (A, B és C) izolált DNS minták ismételtetésének vizsgálata és mennyiségi meghatározása. Balra: A qPCR amplifikációs görbéi. NTC: DNS mentes negatív kontrol. Jobbra: A CT értékek és a kalibrációs sor alapján számított baktérium koncentráció.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a kalibrációs soroktól függetlenül készített minták is pontosan meghatározhatók, és az azonos baktérium tartalmú minták esetében DNS izolálás hatékonysága valamint a qPCR ismételtetése is megfelelő.

5. Összefoglalás

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

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

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