

# Zastosowanie techniki mikromacierzy (czipów) DNA w badaniu bakteriologicznym produktów spożywczych

ANNA MURAWSKA, JAROSŁAW TYBURSKI, TOMASZ BUDZYŃSKI,  
JOANNA JARKIEWICZ-TRETYN\*\*, WOJCIECH DONDESKI\*, ANDRZEJ TRETYN

Zakład Biotechnologii, \*Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii  
Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń  
\*\*Bio-Chip Diagnostyka Molekularna, ul. św. Józefa 53/59, 87-100 Toruń

Murawska A., Tyburski J., Budzyński T., Jarkiewicz-Tretyn J., Donderski W., Tretyn A.

## Applying the microarray (chip) DNA technique for bacteriological examinations of foodstuffs

### Summary

Conventional methods used in bacteriological examinations of foodstuffs are time-consuming and do not always result in the correct identification of the microorganism. For this reason laboratories more and more frequently employ highly sensitive, molecular techniques. One of them is the microarray DNA method. The aim of the study was to check the use of NUTRI®-Chip (GeneScan Europe AG, Germany) for the detection of the following bacteria: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. From the 20 foodstuffs examined, the presence of *Campylobacter* was affirmed in four cases and *Listeria monocytogenes* in one case. Thanks to the existence of control spots on the chip, it was possible to avoid adulterating results. Moreover, microarray technique made it possible to obtain the results of the study in a relatively short period of time.

**Keywords:** DNA microarrays, NUTRI®-Chip, *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*

Rozwój biochemii kwasów nukleinowych umożliwił opracowanie niezwykle czułych i wysoce selektywnych metod wykrywania czynników chorobotwórczych na poziomie molekularnym. Do najnowocześniejszych z nich należą techniki makro- i mikromacierzy, potocznie zwanymi bioczypami (5). Zasada działania bioczypów polega na jakościowym i ilościowym wykrywaniu specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych. Wyizolowane z badanego organizmu mRNA (lub fragmenty genomowego DNA) w trakcie bądź po reakcji PCR poddaje się znakowaniu barwnikami fluorescencyjnymi lub radioizotopem. Uzyskane klony poddaje się hybrydyzacji do krótkich fragmentów DNA (oligonukleotydów, cDNA), tzw. sond molekularnych – unieruchomionych na mikroskopowych szkiełkach podstawowych (mikromacierze) lub na membranach z nylonu bądź PCV (makromacierze). Za pomocą odpowiednich skanerów prowadzi się odczyt danych, które ostatecznie poddawane są analizie w odpowiednim programie komputerowym (1).

Technika bioczypów znajduje coraz szersze zastosowanie w różnego rodzaju badaniach naukowych, w tym również w mikrobiologii (5). Jej zaletą jest skrócenie czasu identyfikacji patogenu i obniżenie prawdopodobieństwa popełnienia błędu (6). Już obecnie metoda ta umożliwia jednoczesne wykrywanie kilku, a w niedalekiej przyszłości kilkudziesięciu lub kilkuset gatunków lub serotypów bakterii (9).

Celem badań było określenie przydatności techniki mikromacierzy DNA do wykrywania bakterii chorobotwórczych, które są najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych człowieka.

## Material i metody

W niniejszych badaniach w celu wykrycia patogenów w produktach spożywczych wykorzystano technikę mikromacierzy DNA. Do badań zastosowano czipy firmy GeneScan Europe AG (Niemcy), które umożliwiają jednoczesną identyfikację bakterii: *Salmonella* spp., *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* oraz *Listeria monocytogenes*. Wybierając artykuły spożywcze, które zakupiono w jednym z hipermarketów, kierowano się danymi piśmiennictwa, które wskazywały najczęstsze przyczyny zatruc pokarmowych. 15 produktów badano pod kątem obecności wyłącznie jednego rodzaju bakterii. Próbkę z mięsa wołowego, mielonego mięsa wieprzowego, wędzonego łososia, mały i sera typu brie umieszczano w pożywce selektywnej dla *Listeria monocytogenes*. Próbkę ze skóry, skrzydeł (przygotowanych na grill), podrobów z kurczęcia, skrzydeł indyka oraz mielonego mięsa wieprzowego umieszczano w pożywce przeznaczonej do wzrostu *Campylobacter coli* i *C. jejuni*. Próbkę z mielonego mięsa wołowego (tataru), metki, majonezu, lodów oraz ciastek z kremem umieszczano w pożywce dla salmonelli. W pięciu produktach spożywczych badano obecność jednocześnie trzech rodzajów bakterii poprzez dodanie próbek z mielonego mięsa wołowego i wieprzowego, skrzydła z kurczęcia i indyka oraz mały do wszystkich stosowanych typów pożywek.

**Hodowla bakterii.** W celu założenia hodowli *L. monocytogenes* pobierano 10 g produktu, które umieszczano w kolbach zawierających 100 ml bulionu pół-Frasera (Merck). Próbkę inkubowano w termostacie przez 23 godz. w temp. 30°C. W celu otrzymania hodowli *C. coli* i *C. jejuni* do 50 ml bulionu CASO (Merck) z krwią baranią (BTL) i dodatkiem wybiórczym dla tego rodzaju bakterii (Merck) dodawano 5 g (lub 5 ml) badanego produktu. Kolby wstawiano do anaerostatu wraz z saszetką Anaerocult®C (Merck), aby zapewnić

atmosferę zubożoną w  $O_2$ , a wzbogaconą w  $CO_2$ . Hodowlę prowadzono w termostacie przez 43 godz. w temp. 42°C. W celu wyhodowania bakterii *Salmonella spp.* 25 g produktu umieszczano w 225 ml zbuforowanej wody peptonowej. Hodowlę prowadzono w łaźni wodnej przez 24 godz. w temp. 37°C, przy jednoczesnym wytrząsaniu. Próbkę każdego z produktów przeznaczonych do jednoczesnego badania *L. monocytogenes*, *C. coli* i *C. jejuni* oraz *Salmonella spp.* dodawano równocześnie do wszystkich trzech stosowanych typów pożywek i hodowano w wyżej opisanych warunkach.

W wyniku hodowli *L. monocytogenes* i *Campylobacter* we wszystkich próbkach obserwowano charakterystyczną zmianę barwy pożywki, świadcząca o namnożeniu się w nich bakterii. Również dodatni wynik hodowli, w postaci zmętnienia roztworu, był widoczny w każdej próbce zawierającej podłoże do wzrostu rodzaju *Salmonella*.

**Izolacja DNA.** Do próbki typu eppendorf przenoszono 1 ml uzyskanej hodowli. Izolację przeprowadzano, stosując zestaw Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology). Stężenie i czystość wyizolowanego DNA określano poprzez elektroforezę horyzontalną na 1% żelu agarozowym, wybarwionych bromkiem etydy, przy napięciu 100 V. Po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego poziom DNA oznaczano, porównując intensywność fluorescencji prążka tego kwasu nukleinowego wyizolowanego z drobnoustrojów z fluorescencją standardu DNA o znanym stężeniu.

**łańcuchowa reakcja polimerazy.** Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf), przy użyciu odczynników zestawu NUTRI<sup>®</sup>-Chip (GeneScan Europe AG). W skład jednej mieszaniny reakcyjnej wchodziło 19 µl Master-Mix NUTRI<sup>®</sup>-MP/A, 1 µl PCR Control NUTRI<sup>®</sup>-MP/A oraz DNA o stężeniu 0,1-10 ng w objętości 5 µl. Jeżeli próba wykazywała wyższe stężenie niż podane, przed użyciem rozcieńczano ją 10 mM roztworem Tris-HCl. Po inkubacji mieszaniny reakcyjnej w temp. 94°C przez 15 min. amplifikację przeprowadzano w 40 cyklach, w których denaturacja zachodziła w temp. 94°C przez 30 s., wiązanie starterów w temp. 60°C przez 60 s. i elongacja w temp. 72°C przez 80 s. Końcową elongację przeprowadzono w temp. 72°C przez 7 min.

**Hybrydyzacja.** Do wykrywania namnożonego DNA użyto odczynników i chipów DNA zawartych w komercyjnie dostępnym zestawie NUTRI<sup>®</sup>-Chip (Gene-Scan Analytics GmbH, Niemcy). 15 µl produktu PCR przenoszono do nowej próbki i dodawano 1 µl egzonukleazy oraz 4 µl buforu. Po krótkim wirowaniu próbki inkubowano przez 15 minut w temp. 37°C, a następnie przez 5 minut w temp. 80°C. Mieszaninę schładzano na lodzie. Sześć mikrolitrów roztworu przenoszono do nowej próbki, do której dodawano tę samą objętość ChipPure Hybridization Solution NUTRI/A. Próbkę denaturowano przez 5 minut w temp. 80°C, po czym na obszar mikromacierzy (oznaczonych jako HR – hybridization region) nakładano 10 µl mieszaniny. Hybrydyzację prowadzono przez 15 minut w przystawce do termocyklera typu Mastercycler gradient (Eppendorf), w temp. 60°C. Po upływie tego czasu chip płukano dwukrotnie po 5 minut roztworem ChipPure Washing Solution 1/A, a następnie wodą dejonizowaną. Powierzchnię macierzy suszono strumieniem helu.

**Znakowanie.** Znakowanie przeprowadzano w ciemności, stosując odczynniki z zestawu NUTRI<sup>®</sup>-Chip (GeneScan Europe AG). Mikrochip krótko płukano roztworem ChipPure Washing Solution 2/B, po czym na obszar HR nanoszono 15 µl ChipPure Staining Solution/A, w którego skład wchodzi fluorescencyjny barwnik Cy5. Bioczip umieszczano w wilgotnej

komorze i inkubowano 30 minut w temp. pokojowej. Następnie płukano go przez 5 minut: dwukrotnie w roztworze ChipPure Washing Solution 2/B oraz w wodzie dejonizowanej. Powierzchnię suszono strumieniem helu.

**Odczyt i analiza danych.** Odczytu biochipów dokonano przy użyciu urządzenia Biodetect 645<sup>™</sup> Reader. Program komputerowy Signalyse Software posłużył do analizy otrzymanych wyników. Oba etapy przeprowadzono w siedzibie firmy GeneScan Europe AG (Freiburg, Niemcy).

## Wyniki i omówienie

Do niedawna diagnostyka mikroorganizmów polegała przede wszystkim na oznaczaniu ich cech: biochemicznych, morfologicznych i serologicznych. Jednakże diagnostyka oparta tylko na oznaczaniu cech fenotypowych nie zawsze prowadzi do prawidłowej identyfikacji bakterii. Jest to związane, między innymi, z dużą zmiennością mikroorganizmów. Ponadto w przypadku wolno rosnących bakterii znacznym utrudnieniem jest czas oczekiwania na uzyskanie odpowiedniej liczby bakterii do dalszej analizy (10). Konwencjonalne metody oparte na testach ze swoistymi przeciwciałami lub na wrażliwości na bakteriofagi nie zawsze mogą być wykorzystane w praktyce ze względu na brak reakcji niektórych szczepów bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Salmonella*) z dostępnymi przeciwciałami diagnostycznymi czy też nieobecnością u niektórych izolatów swoistych receptorów fagowych (8). Obecnie badania nadal oparte są głównie na metodach tradycyjnych, jednakże ze względu na ich koszt, czasochłonność oraz niedokładność poszukuje się innych technik wykrywania bakterii w żywności (2). Zastosowanie technik biologii molekularnej do diagnostyki stworzyło możliwość szybkiej i jednoznacznej identyfikacji drobnoustrojów. W większości laboratoriów do diagnostyki mikroorganizmów stosuje się już gotowe zestawy (10).

Użyta metoda izolacji pozwoliła na otrzymanie oczyszczonego DNA, który nadawał się do bezpośredniego wykorzystania w dalszych etapach badań, bez konieczności jego precypitacji. Najwyższą zawartość DNA wyizolowanego z hodowli na bulionie pół-Frasera wykazała próbka pochodząca z hodowli na mielonym wieprzowym (100 ng/µl) i wołowym (50 ng/µl). Największe stężenie DNA bakterii wyhodowanych na bulionie CASO wynosiło 50 ng/µl (mięso z indyka), zaś na wodzie peptonowej – 40 ng/µl (tatar). Dla pozostałych próbek zawartość kwasu nukleinowego była niższa od 20 ng/µl.

Elektroforeza w żelu agarozowym przeprowadzona po reakcji amplifikacji pozwoliła sprawdzić obecność produktów PCR w badanych próbkach. We wszystkich przypadkach obserwowano od dwóch do pięciu fragmentów DNA tej samej wielkości.

Po etapie hybrydyzacji i znakowania dokonano odczytu chipów przy użyciu skanera fluorescencyjnego (Biodetect 645<sup>™</sup> Reader), a otrzymane wartości fluorescencji przetwarzano na dane liczbowe za pomocą programu komputerowego Signalyse Software. W tym celu na uzyskany z czytnika obraz komputerowy mikromacierzy nanoszono specjalną siatkę (ryc. 1), pozwalającą na interpretację poszczególnych sygnałów.



bacter, jednak był on zbyt słaby (średnia wartość – 575), by został uznany za wynik jednoznacznie pozytywny. W pozostałych próbkach nie występowała żadna z trzech rodzajów bakterii.

Obecnie najnowocześniejsze z metod stosowanych do identyfikacji patogenów wykorzystują technikę multipleksowego PCR. Pozwala ona na znacznie szybsze określenie gatunkowe izolowanych bakterii (bez konieczności wykonania badań biochemicznych) i różnicowanie ich od innych gatunków drobnoustrojów mikroflory towarzyszącej (7). Niewielka ilość materiału genetycznego patogenów potrzebna do przeprowadzenia reakcji amplifikacji czyni tę technikę bardzo czułą w porównaniu z tradycyjnymi metodami diagnostycznymi (4). Ponadto stosując różne jej odmiany można określić poziom zakażenia daną bakterią badanej próbki żywności (2). Ograniczenia techniki multipleks PCR polegają na konieczności optymalizacji warunków amplifikacji oraz stosowania primerów dla DNA kilku różnych gatunków bakterii. Pojawienie się na obrazie elektroforezy niespecyficznych prążków, leżących blisko pozycji kontroli pozytywnej, może spowodować zafałszowanie wyniku. Aby tego uniknąć, konieczne staje się sekwencjonowanie uzyskanych produktów PCR, które jest kosztowne i czasochłonne (9). Analiza za pomocą czipów DNA pozwala na szybszą i obciążoną znacznie mniejszym błędem interpretację wyników. W stosowanym do badań zestawie primery i pozostałe odczynniki do amplifikacji były przygotowane w postaci gotowej mieszaniny MasterMix NUTRI®-MP/A. Program przebiegu reakcji PCR podany był również w protokole, dzięki czemu można było pominąć długotrwałe dobieranie warunków amplifikacji.

Niedoskonałość tradycyjnych testów identyfikacji bakterii jest wyraźna. Oparte jedynie na badaniu cech morfologicznych uwidocznionych fenotypowo, a nie utrwalonych w genomie bakterii, utrudniają jednoznaczną wykrywalność (2). Tego typu ograniczeń pozbawiona jest metoda mikromacierzy DNA. Upowszechnienie technologii bioczypów zależeć będzie w dużym stopniu od obniżenia ich ceny. Można oczekiwać, że nastąpi to wkrótce, podobnie jak w przypadku innych zaawansowanych technik (5). Spowoduje to powszechne stosowanie techniki mikromacierzy (czipów) DNA w diagnostyce mikrobiologicznej.

W chwili prowadzenia badań koszt zestawu składającego się z 25 czipów (NUTRI®-Chip), odczynników służących do przeprowadzenia reakcji PCR (MasterMix NUTRI®-MP), hybrydizacji (ChipPure Hybridization

Tab. 1. Wartości liczbowe wyników skanowania mikromacierzy (ryc. 2), na której badano obecność *Listeria monocytogenes* w mielonym mięsie wieprzowym

Objaśnienia sygnałów	Ilość odczytanych sygnałów	Sygnał z sondy	Odchylenie standardowe	Sygnał tła	Odchylenie standardowe
Negatywna kontrola hybrydizacji	3	155	84	9	8
Kontrola znakowania	12	> 9975	1283	> 244	0
Pozytywna kontrola hybrydizacji	4	6409	1633	125	40
<i>Salmonella spp.</i>					
Kontrola amplifikacji dla <i>Salmonella spp.</i>	4	> 11 394	4216	> 212	63
<i>Campylobacter</i>					
Kontrola amplifikacji dla <i>Campylobacter</i>	4	> 6321	1132	> 210	46
<i>Listeria monocytogenes A</i>					
Kontrola amplifikacji A dla <i>Listeria monocytogenes</i>	4	> 13 249	1893	> 242	5
<i>Listeria monocytogenes B</i>					
Kontrola amplifikacji B dla <i>Listeria monocytogenes</i>	4	> 13 085	2315	> 228	32

Solution) i barwienia sond Cy5 (ChipPure Staining Solution) wyniśł około 2700 złotych. Po dodaniu kosztów pożywek i zestawów do izolacji DNA oceniamy, że koszt wykonania jednej analizy (na obecność czterech gatunków bakterii) za pomocą omawianej techniki to około 150-170 złotych. Należy jednak nadmienić, że w Polsce nie posiadaliśmy czytnika Biodetect 645™ Reader dla bioczypów, a ich odczytu dokonano nieodpłatnie w siedzibie firmy GeneScan Europe AG (Freiburg, Niemcy). Można przypuszczać, że poprzez wzrost sprzedaży oraz obniżanie kosztów produkcji czipów i ich czytników już w najbliższych latach dojdzie do szybkiego wzrostu zainteresowania stosowaniem bioczypów w badaniach bakteriologicznych.

## Piśmiennictwo

- Chizhikov V., Rasooly A., Chumakov K., Levy D. D.: Microarray analysis of microbial virulence factors. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 3258-3263.
- Cichocka A. J., Skotarczak B.: Nowe metody wykrywania *Listeria monocytogenes* w żywności. Medycyna Wet. 2002, 58, 756-759.
- Juszczak J.: Metody rozpoznawania chorób zakaźnych, [w:] Dziubek Z.: Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL, Warszawa 1996, s. 38-45.
- Kwiatek K., Różycki M., Rzeźutka A., Mizak B.: Zastosowanie reakcji PCR do wykrywania materiału genetycznego *Listeria monocytogenes* z wykorzystaniem różnego typu polimeraz DNA. Medycyna Wet. 2003, 59, 315-317.
- Leśnikowski Z. J., Paradowska E., Przepiórkiewicz M., Studzińska M., Olejniczak A.: Chipy DNA i ich zastosowania. Post. Mikrobiol. 2002, 41, 13-18.
- Odumeru J. A., Steele M., Fruhner L., Larkin C., Jiang J., Mann E., McNab W. B.: Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 944-949.
- Osek J.: Multiplex PCR dla szybkiej identyfikacji *Escherichia coli* oraz genów kodujących toksyny LTI, STII i EASTI. Medycyna Wet. 2003, 59, 501-505.
- Osek J.: Zastosowanie metody losowej amplifikacji DNA techniką PCR w typowaniu molekularnym bakterii. Medycyna Wet. 2003, 59, 10-14.
- Westin L., Carolyn M., Vollmer D., Canter D., Radtkey R., Nerenberg M., O'Connell P. O.: Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. J. Clin. Microbiol. 2001, 39, 1097-1104.
- Zakrzewska-Czerwińska J.: Sondy molekularne w diagnostyce mikrobiologicznej. Biotechnologia 2002, 4, 79-89.

Adres autora: prof. dr hab. Andrzej Tretyn, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: tran@biol.uni.torun.pl