

PRIPRAVA KVANTITATIVNE MOLEKULARNO BIOLOŠKE METODE ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA CELIC VRSTE *Salmonella enterica*

Marija TRKOV^{a)+} in Gorazd AVGUŠTIN^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. Za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., mag.

^{b)} Isti naslov, izr.prof.,dr.,mag., e-pošta: gorazd.avgustin@bfro.uni-lj.si.

⁺ Sedaj Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, Dunajska 56–58, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

Delo je prispelo 07. oktobra 2002, sprejeto 15. novembra 2002.

Received October 07, 2002, accepted November 15, 2002.

IZVLEČEK

Pripravili smo molekularno biološko metodo za hitro štetje bakterijskih celic iz vrste *Salmonella enterica*, ki temelji na kompetitivni različici verižne reakcije s polimerazo (c-PCR). Uporabili smo začetna oligonukleotida MINF in MINR-Hex, ki sta zagotavljala specifičnost metode. Notranji standard DNK smo pripravili z encimskim razrezom in lepljenjem stranskih fragmentov pomnožka gena za 16S rRNK seva *S. Agona* (U92197). Notranji standard DNK je imel isti prepoznavni mesti za začetna oligonukleotida kot tarčna DNK, bil pa je za 27 bp krajši. Pomnožke c-PCR smo ločevali s kapilarno elektroforezo in rezultate obdelali z regresijsko analizo. Z opisano metodo in 5×10^{-5} redčenim notranjim standardom smo lahko učinkovito ugotavljali število celic vrste *S. enterica* v bujonski kulturi v območju med $1,2 \times 10^4$ in 6×10^5 celic na reakcijsko mešanico. Z metodo smo v preliminarnem poskusu ugotavljali število celic seva *S. Livingstone* v bujonski kulturi in rezultate primerjali z rezultati indirektna števne metode. Rezultati opisane metode c-PCR so bili 2,9 krat višji od rezultatov indirektnega štetja kolonij, vendar je glede na številne prednosti opisana metoda kljub temu uporabna za hitro, specifično in dovolj natančno ugotavljanje števila celic vrste *S. enterica* v naravnih mikrobioloških vzorcih.

Ključne besede: mikrobiologija / bakterije / *Salmonella enterica* / molekularna genetika / metode / c-PCR / kapilarna elektroforeza

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE MOLECULAR METHOD FOR ENUMERATION OF *Salmonella enterica*

ABSTRACT

A competitive polymerase chain reaction (c-PCR) was developed for rapid enumeration of *Salmonella enterica* cells in broth culture. The primers MINF and MINR-Hex ensured the methods specificity. An internal DNA control was prepared by enzymatic restriction and subsequent ligation of the flanking regions of the amplified 16S rRNA gene of *S. Agona* (U92197) strain. The prepared internal control had the same primer specific sequences as the target DNA but was 27 bp shorter. The c-PCR products were quantified by capillary electrophoresis and the results were obtained by regression analysis. Using the described system and 5×10^{-5} times diluted internal control, a quantification of *S. enterica* cells in broth culture in the range between 1.2×10^4 and 6×10^5 per reaction mixture was made possible. The preliminary test showed that the results of the c-PCR quantification of the salmonella cells in broth culture are 2.9 times higher in comparison with the results of the indirect counting method. The authors are still convinced, however, that the method offers a rapid, specific and sufficiently accurate counting of *S. enterica* cells in natural microbiological samples.

Key words: microbiology / bacteria / *Salmonella enterica* / molecular genetics / methods / c-PCR / capillary electrophoresis

UVOD

Zamudnost tradicionalnega načina odkrivanja in ugotavljanja števila mikroorganizmov, še posebno patogenih, je najpomembnejši vzrok za razvoj in pripravo novih, vedno hitrejših in večinoma na molekularni biologiji osnovanih metod. Te lahko v nekaterih primerih le dopolnjujejo tradicionalne metode, lahko pa jih tudi popolnoma nadomestijo ali celo omogočijo preučevanja mikroorganizmov iz različnih naravnih ekosistemov, ki jih sicer *in vitro* ne znamo oz. zmoremo gojiti (Amann in sod., 1995). Pri preučevanju oz. ugotavljanju identitete patogenih mikroorganizmov je čas eden izmed pomembnejših dejavnikov, ki odločajo, katero metodo moramo uporabiti. V številnih primerih, kot npr. pri identifikaciji salmonel ali mikobakterij, potrebujemo za izvedbo celotnega postopka identifikacije še vedno preveč časa, to je več dni ali tednov. Z modernimi molekularno biološkimi metodami lahko ta čas bistveno skrajšamo. Te metode večinoma temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR – *ang. polymerase chain reaction*), ki je zelo občutljiva tehnika, vendar v običajni obliki ne omogoča natančnega ugotavljanja števila tarč (genskih elementov ali organizmov) v vzorcu. Takšne metode so posledično manj uporabne pri mikrobno ekoloških preiskavah, v katerih želimo poleg odkrivanja tarčnih mikroorganizmov preučevati tudi njihovo populacijsko dinamiko.

Za specifično odkrivanje in štetje mikroorganizmov na osnovi kratkih segmentov DNK uporabljamo v osnovi dva pristopa. V prvem pripravimo t.i. sonde, t.j. sintetične kratkoverižne molekule DNK, ki v primernih razmerah hibridizirajo s svojimi tarčami, običajno komplementarnimi sekvencami znotraj ribosomskih molekul manjše ali večje ribosomske podenote. Ker so sonde primerno označene, običajno s fluorescentnimi barvili, lahko signal po končani hibridizaciji sledimo bodisi z epifluorescentno mikroskopijo bodisi pretočno citometrijo. Žal mikroskopske preiskave hibridiziranih vzorcev zaenkrat v večini primerov še ne omogočajo avtomatizacije in je število vzorcev, ki jih lahko na tak način preučimo, za prave mikrobno ekološke raziskave premajhno (Glöckner in sod., 1996). Avtomatizacijo omogoča pretočna citometrija (Davey in Kell, 1996), vendar so pretočni citometri po eni strani zelo dragi, po drugi pa še vedno premalo občutljivi za odkrivanje vseh mikrobnih celic, še posebej iz prehransko revnih okolij (Fuchs in sod., 2000).

Drugi pristop temelji na pripravi t.i. začetnih oligonukleotidov (*ang. primer*), ki nalegajo na komplementarne sekvence v genomu tarčnega organizma in omogočijo izvedbo PCR. Zaradi narave reakcije, v kateri ti t.i. reakcijski pomnožki nastajajo na eksponenten način, lahko že majhne eksperimentalne napake povzročijo velike razlike v koncentracijah nastalih pomnožkov. Običajna oblika PCR je zato neprimerna za kvantitativno obliko preučevanja vzorcev, t.j. za ugotavljanje števila tarč v vzorcu. To omogočajo izpopolnjene različice PCR, bodisi t.i. PCR v realnem času (*ang. real time PCR*) (Nitsche in sod., 1999), ki pa zahteva posebno in drago aparaturo in tehnologijo označevanja začetnih oligonukleotidov, bodisi t.i. kompetitivna PCR (c-PCR). V c-PCR uporabljamo tekmovalne molekule, ki delujejo kot notranji standard ali interna kontrola in omogočajo kontrolo variabilnosti med reakcijami (Mahon in Lax, 1993). Tekmovalne molekule se pomnožujejo v isti reakciji in v povsem enakih razmerah kot preučevane tarče in med pomnoževanjem tekmujejo za vse sestavine reakcijske mešanice. Ker morajo biti tekmovalne molekule čim bolj podobne tarčam, imajo najpogosteje enaka prepoznavna mesta za začetne oligonukleotide in se praviloma razlikujejo le po velikosti. Tekmovalno molekulo najenostavneje pripravimo tako, da pomnožku tarčne molekule izrežemo ali dodamo kratko zaporedje nukleotidov (do 10 % dolžine tarče) (Piatak in sod., 1993; Mahon in Lax, 1993). Kvantifikacija temelji na istočasnem pomnoževanju tarčne nukleinske kisline, katere koncentracijo želimo ugotoviti in znane koncentracije notranjega standarda oz. interne kontrole (Vincent in sod., 1996). Pogoj za uspešno kvantifikacijo tarčne nukleinske kisline je čim bolj podobna oz. enaka učinkovitost pomnoževanja obeh molekul DNK. Pomnožke tarč in internih kontrol po končani c-PCR običajno analiziramo in vrednotimo z elektroforeznimi tehnikami,

bodisi običajno gelsko bodisi bolj natančno kapilarno obliko (Tepšič in Avguštin, 1999). Kapilarna elektroforeza se odlikuje s številnimi prednostmi pred klasično gelsko elektroforezo. Dobra ločljivost metode omogoča razlikovanje dveh molekul DNK, ki se med seboj razlikujeta celo po enem samem baznem paru (Lu in sod., 1994), omogoča pa tudi zelo natančno ugotavljanje koncentracij nastalih pomnožkov z neposrednim merjenjem oddajane fluorescences barvila, ki je vgrajeno v enega od uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

V prispevku opisujemo pripravo metode c-PCR, ki omogoča istočasno odkrivanje in ugotavljanje števila celic salmonel v bujonski kulturi. Pri delu smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so specifični za vrsto *Salmonella enterica* (Trkov in Avguštin, 2003), v katero sodi večina, to je nad 2500 serovarov omenjenega rodu, princip metode pa smo povzeli po Reillyu in Attwoodu (1998).

MATERIAL IN METODE

Bakterijski sev

Sev *Salmonella* Agona (U92197) (Institute of advanced studies, Kuala Lumpur, Malezija) smo gojili 16–18 ur v bujonu (Trkov, 1999) pri 37 °C. Iz bujonske kulture smo pripravili 10-kratna serijska redčenja do 10^{-7} . Iz enega mililitra vsake redčitve celic smo osamili DNK z lizo celic, kot so opisali Trkov in sod. (1999). Hkrati smo ugotavljali število mikrobnih celic v bujonski kulturi z indirektno metodo štetja kolonij (Harrigan, 1998).

Pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

V PCR smo uporabili začetna oligonukleotida MINF in MINR (Trkov in Avguštin, 2003), ki pomnožujeta del gena za 16S rRNK vrste *Salmonella enterica*. Začetni oligonukleotid MINR smo na koncu 5' označili s fluorescentnim barvilom Hex (4,5,2',4',5',7'-heksakloro-6-karboksifluorescin) (MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija). PCR smo izvedli s cikličnim termostatom GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, ZDA) v 20 µl reakcijski mešanici, sestavljeni iz 1 µl lizata bakterijskih celic, 10 % $10\times$ reakcijskega pufra, 1,9 mM $MgCl_2$, 200 µM posameznega nukleotida dCTP, dGTP, dTTP, dATP, 0,75 µM posameznega začetnega oligonukleotida MINF in MINR-Hex, 0,4 % Tweena 20 in 0,5 enote polimeraze DNK *Taq* (GoldStar, Eurogentec, Seraing, Belgium). Pomnoževanje 402 baznih parov dolgega dela gena za 16S rRNK je potekalo po shemi: začetna denaturacija DNK pri 94 °C 90 s, pomnoževanje med 30 cikli (15 s pri 94 °C, 10 s pri 60 °C, 30 s pri 72 °C) in zaključno podaljševanje pri 72 °C 4 minute.

Kompetitivna verižna reakcija s polimerazo (c-PCR)

V c-PCR smo uporabili enake sestavine in koncentracije reakcijskih mešanic kot pri postopku PCR. Spreminjali smo le koncentracije tarčne genomske DNK in notranjega standarda DNK. Razmere pomnoževanja smo spremenili tako, da smo znižali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na 58 °C, čas prileganja le-teh pa podaljšali na 15 sekund. Pomnožke c-PCR smo preliminarno pregledovali v 2 % TBE agaroznih gelih (agarozna SeaKem LE, TBE: puffer Tris-borat EDTA) pri 6 V/cm.

Ugotavljanje velikosti in količine pomnožkov c-PCR s kapilarno elektroforezo

Velikost in količino pomnožkov c-PCR, označenih s fluorokromom Hex, smo ugotavljali s kapilarno elektroforezo (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer, ZDA). Enemu µl pomnožka smo dodali 12 µl deioniziranega formamida (Gibco, BRL, ZDA) in 0,5 µl

velikostnega standarda Genescan[®]-500 (TAMRA) (Perkin Elmer, ZDA) ter mešanice denaturirali 3 minute pri 95 °C. Ohlajene vzorce smo prenesli na pripravo za avtomatsko odvzemanje vzorcev v kapilarni elektroforezi. Označeni fragmenti so med elektroforezo potovali po polimeru POP 4 (Perkin Elmer) v 47 cm dolgi kapilari pri 60 °C. Argonski laser je vzbudil fluorokrom Hex, emitirano svetlobo pa je zaznala kamera CCD. Program za analizo podatkov je intenziteto emitirane svetlobe pretvoril v električni signal in zbrane podatke podal v obliki elektroferograma.

REZULTATI IN RAZPRAVA

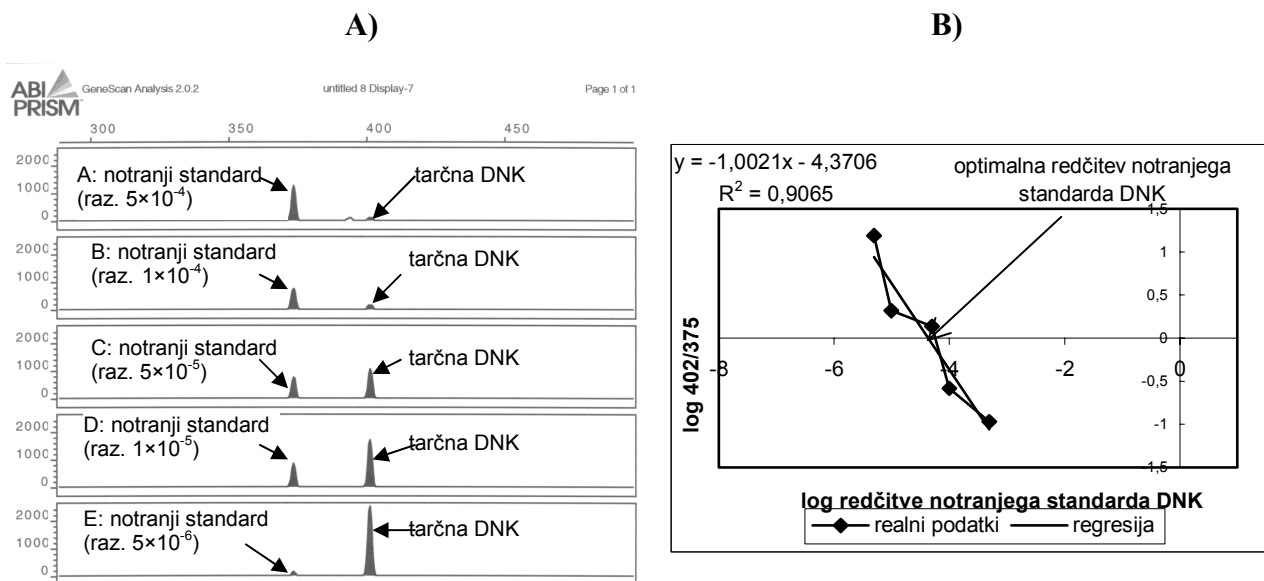
Priprava notranjega standarda DNK

Nukleotidno sekvenco 402 bazna para dolge regije gena za 16S rRNK seva *S. Agona* (U92197), ki jo lahko pomnožimo s parom začetnih oligonukleotidov MINF in MINR v PCR, smo analizirali s programskih paketom WebCutter (na spletni strani BCM Search Launcherja <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>). Pri tem smo uporabili podatke o delovanju restriksijskih encimov iz baze REBASE in za nadaljnje delo izbrali restriksijski encim *DdeI*, ki preiskovani del gena reže na mestih 229 in 256. V PCR smo nato pomnožili 402 bp dolgo regijo, združili pomnožke petih ločenih reakcij in jih očistili (High Pure PCR Product Purification Kit, Boehringer Mannheim). Z restriksijskim encimom *DdeI* (Gibco BRL, ZDA) smo nato pomnoženi del gena razrezali na tri dele, dolge 229, 27 in 146 baznih parov in jih ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Iz gela smo izrezali fragmenta DNK velikosti 229 in 146 baznih parov, ju zlepili z encimom ligazo T4 DNK po navodilih proizvajalca (Gibco BRL, ZDA) in tako dobili nov, 375 bp dolg fragment. Dva μ l ligacijske mešanice smo namnožili s PCR in pomnožek ponovno ločili v agaroznem gelu. Iz gela smo ga izrezali, očistili in ga uporabili kot notranji standard oz. interno kontrolo c-PCR. Notranji standard DNK je tako ohranil prepoznavni mesti za par začetnih oligonukleotidov MINF in MINR, od nerazrezanega, s PCR pomnoženega dela gena za 16S rRNK, pa se je razlikoval le po dolžini. Bil je za 27 baznih parov krajši.

Ugotavljanje učinkovitosti pomnoževanja notranjega standarda DNK

Notranji standard DNK lahko uporabimo v c-PCR za določanje koncentracije tarčne DNK le, če se v c-PCR obe molekuli pomnožujeta enako učinkovito. Učinkovitost pomnoževanja tarčne DNK in notranjega standarda smo ugotavljali z regresijsko analizo (Reilly in Attwood, 1998). V reakcije smo dodajali 1 μ l tarčne DNK, izolirane iz $1,2 \times 10^5$ celic seva *S. Agona* (U92197) in 1 μ l serijsko redčenega (od 10^{-3} do 10^{-6}) notranjega standarda DNK. Nastale pomnožke c-PCR smo nato ločili z agarozno (ni prikazano) in kapilarno gelsko elektroforezo (slika 1A). Po ločevanju s kapilarno gelsko elektroforezo smo ugotovili, da sta se pri redčitvi notranjega standarda DNK 5×10^{-4} do 5×10^{-6} pomnoževali obe molekuli (slika 1A). V preglednici 1 so podane površine pod posameznimi piki (vrhovi elektroferograma) pomnožkov c-PCR po ločevanju s kapilarno gelsko elektroforezo.

Logaritemske vrednosti razmerij površin vrhov obeh pomnožkov DNK in redčenega notranjega standarda smo obdelali z regresijsko analizo. Istočasno pomnoževanje tarčne DNK in notranjega standarda, redčenega od 5×10^{-4} do 5×10^{-6} , poda premico z naklonom $-1,002$ in korelacijskim koeficientom $R^2 = 0,9065$ (slika 1B). Premica seka os X pri vrednosti $-4,4$. To pomeni, da je za zaznavo $1,2 \times 10^5$ celic seva *S. Agona* (U92197) v reakciji c-PCR optimalna redčitev notranjega standarda DNK 4×10^{-5} .



Slika 1. A) elektroferogram pomnožkov c-PCR serijsko redčenega notranjega standarda DNK (A = 5×10^{-4} , B = 1×10^{-4} , C = 5×10^{-5} , D = 1×10^{-5} in E = 5×10^{-6}) in tarčne DNK, izolirane iz $1,2 \times 10^5$ celic seva *S. Agona* (U92197). B) umeritvena krivulja za določitev optimalne redčitve notranjega standarda DNK za istočasno pomnoževanje s tarčno DNK, izolirano iz $1,2 \times 10^5$ celic *S. Agona*.

Figure 1. A) electropherogram of c-PCR products serially diluted internal control DNA (A = 5×10^{-4} , B = 1×10^{-4} , C = 5×10^{-5} , D = 1×10^{-5} and E = 5×10^{-6}) and target DNA, isolated from $1,2 \times 10^5$ cells of *S. Agona* (U92197) strain. B) standard curve for the determination of optimal internal control dilution for competitive amplification with DNA, isolated from $1,2 \times 10^5$ *S. Agona* cells.

Preglednica 1. Površine pod piki pomnožkov tarčne DNK in notranjega standarda DNK (v relativnih enotah), ugotovljene s kapilarno elektroforezo

Table 1. Peak areas (in relative values) of target DNA and internal control c-PCR products as determined by the capillary electrophoresis analysis

Redčitev notranjega standarda DNK Dilutions of internal control	Površine	Pod piki elektroferograma Peak areas
	tarčna DNK (402 bp) target DNA (402 bp)	notranji standard DNK (375 bp) internal control (375 bp)
5×10^{-4}	1 558	14 557
1×10^{-4}	2 533	9 749
5×10^{-5}	11 925	8 706
1×10^{-5}	18 830	9 502
5×10^{-6}	29 487	1 893

Priprava umeritvene krivulje za odčitavanje števila bakterijskih celic iz rezultatov reakcije c-PCR

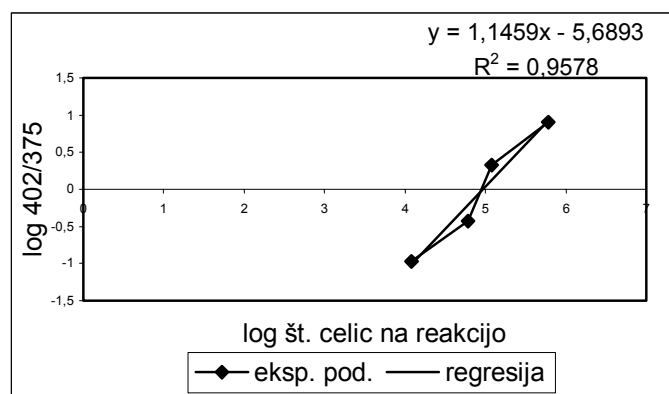
Pri pripravi umeritvene krivulje smo, zaradi lažjega redčenja in s tem zmanjšanja eksperimentalne napake, uporabili redčitev notranjega standarda DNK 5×10^{-5} . V seriji reakcij c-PCR smo tako redčen notranji standard pomnoževali skupaj z naraščajočimi koncentracijami DNK, ki smo jo osamili iz serijsko redčenih vzorcev bujonske kulture seva *S. Agona* (U92197).

Ugotovili smo, da sta se obe molekuli pomnoževali takrat, kadar smo notranjemu standardu dodali osamljeno DNK iz vzorcev, ki so vsebovali med $1,2 \times 10^4$ in 6×10^5 bakterijskih celic na reakcijsko mešanico. Pri drugih vzorcih se je pomnoževala le ena od obeh molekul (ni prikazano). Logaritemske vrednosti razmerij površin vrhov tarčne DNK in notranjega standarda ter logaritemske vrednosti števila celic preiskovanega seva, iz katerega smo DNK osamili, smo obdelali z regresijsko enačbo. Regresijska analiza istočasnega pomnoževanja 5×10^{-5} redčenega notranjega standarda DNK in omenjenih redčitev tarčne DNK (od $1,2 \times 10^4$ do 6×10^5) poda premico z naklonom 1,1459 in $R^2 = 0,9578$ (slika 2). Kvantifikacijo smo lahko izvedli v območju med $1,2 \times 10^4$ in 6×10^5 celic (DNK, izolirana iz takšnega števila celic v 1 μ l lizata).

Preglednica 2. Površine pod piki (relativne enote) pomnožkov c-PCR tarčne DNK in notranjega standarda DNK, dobljene s kapilarno elektroforezo ABI Prism 310

Table 2. Peak areas (relative values) of c-PCR products of target DNA and internal control after the analysis on capillary electrophoresis ABI Prism 310

Log. št. celic na reakcijsko mešanico Log of cell number in reaction mixture	Površine pikov Peak areas	
	tarčna DNK (402 bp) target DNA (402 bp)	notranji standard DNK (375 bp) internal control (375 bp)
5,78	31 710	3 932
5,08	16 210	7 626
4,78	3 228	8 594
4,08	1 037	9 651



Slika 2. Umeritvena krivulja za odčitavanje števila celic salmonel iz bujonske kulture v območju med $1,2 \times 10^4$ in 6×10^5 celic na reakcijsko mešanico.

Figure 2. Standard curve for quantification of salmonella cells in broth culture in range from $1,2 \times 10^4$ to 6×10^5 cells in reaction mixture.

Preliminarno ugotavljanje primernosti pripravljene metode za štetje celic salmonel v bujonski kulturi

Čisto kulturo seva *S. Livingstone* (VF) smo gojili preko noči. Nato smo pripravili 10-kratna serijska redčenja zrasle kulture. Število celic *S. Livingstone* (VF) smo ugotavljali z metodo po Harrigan (1998) s štetjem kolonij na trdnih gojiščih in ugotovili, da je bilo v 1 ml prisotnih $3,2 \times 10^9$ cfu. Genomsko DNK smo izolirali iz 1 ml različnih redčitev zrasle kulture po postopku, opisanem v poglavju Materiali in metode. V skupni c-PCR smo istočasno pomnoževali tarčno DNK, izolirano iz različnih redčitev celic salmonel (redčitve 10^{-1} – 10^{-3}) s

5×10^{-5} redčenim notranjim standardom DNK. Po kapilarni elektroforezi smo iz elektroferograma odčitali površino pod pikom namnožene tarčne DNK, izolirane iz 10^{-3} redčene bujonske kulture seva *S. Livingstone* (VF), ki je bila 29915. Površina pod pikom za notranji standard DNK je bila 29208. Iz logaritamskih vrednosti razmerij površin pod obema pikoma smo z regresijsko enačbo izračunali, da smo v c-PCR pomnoževali DNK iz $9,3 \times 10^4$ celic. Ob upoštevanju redčitev v postopku izolacije DNK smo dobljeno vrednost pomnožili s 100, kar pomeni, da smo v 1000-krat redčeni bujonski kulturi z metodo c-PCR ugotovili $9,3 \times 10^6$ celic ml⁻¹. V primerjavi z rezultatom indirektna števne metode po Harriganu (1998) smo s c-PCR odkrili 2,9× več celic v vzorcu. Razlogov za nepričakovano veliko razliko je lahko več, od napak pri sami indirektni števni metodi (ki lahko doseže tudi $\pm 90\%$, Collins in Lyne, 1995), do premajhnega števila vzorcev, ki smo jih doslej uspeli preučiti. Metoda je tudi prezahtevna za rutinsko ugotavljanje števila salmonel v čistih laboratorijskih kulturah. Vsekakor pa metoda s svojo hitrostjo in specifičnostjo omogoča odkrivanje in štetje salmonel v umetnih mešanih in naravnih mikrobnih vzorcih, podobno kot je že bilo opisano za nekatere druge vrste bakterij (Lleo in sod., 1999; Phillips in sod., 2000; Clausen in sod., 2002) in predvsem v bistveno krajšem času, kot pa to omogočajo doslej uporabljane tradicionalne mikrobiološke metode za odkrivanje salmonel (Trkov, 1999).

POVZETEK

Pripravili smo metodo kompetitivne PCR (c-PCR), ki omogoča ugotavljanje števila celic vrste *Salmonella enterica* v bujonski kulturi. Izbrali smo specifična začetna oligonukleotida, MINF in MINR-Hex, s katerima lahko v PCR pomnožimo 402 bp dolg del gena za 16S rRNK pri vseh predstavnikih vrste *S. enterica*. Za pripravo notranjega standarda DNK smo uporabili znano sekvenco gena za 16S rRNK seva *S. Agona*. Pomnožek PCR smo razrezali z restriksijsko endonukleazo *DdeI*, ki je preiskovani, 402 bp dolg del gena, razrezala na mestih 229 in 256. Bočna fragmenta smo zlepili in dobili notranji standard DNK, ki je ohranil prepoznavni mesti za začetna oligonukleotida in se je od osnovne sekvence razlikoval za 27 bp. Učinkovitost istočasnega pomnoževanja obeh molekul v c-PCR smo ugotavljali z regresijsko analizo (Reilly in Attwood, 1998). Različne redčitve notranjega standarda DNK smo v seriji reakcij pomnoževali z isto koncentracijo tarčne DNK, pomnožke c-PCR pa ločili s kapilarno elektroforezo. Logaritamske vrednosti površin pikov obeh pomnožkov in redčitev notranjega standarda DNK so dale v regresijski enačbi premico s korelacijskim koeficientom $R^2 = 0,9065$. To nakazuje skoraj enakovredno pomnoževanje tarčne DNK in notranjega standarda DNK v c-PCR. Optimalno redčitev notranjega standarda, t.j. 5×10^{-5} , smo nato v seriji reakcij pomnoževali z različnimi koncentracijami tarčne DNK, ki smo jih izolirali iz serijskih redčitev čiste kulture z znanim številom celic. Regresijska analiza logaritamskih razmerij površin pikov pomnožkov tarčne DNK in notranjega standarda, ter logaritamskih vrednosti števila celic na reakcijsko mešanico je podala premico, ki omogoča zanesljivo ugotavljanje števila celic salmonel v območju med $1,2 \times 10^4$ in 6×10^5 celic na reakcijsko mešanico. Rezultate pripravljene metode c-PCR smo primerjali z rezultati indirektnega štetja celic seva *S. Livingstone* v bujonski kulturi, pri čemer smo z metodo c-PCR ugotovili 2,9 × večje število celic na ml kulture kot z indirektno števno metodo. Kljub temu smo mnenja, da je kompetitivna PCR uporabna metoda za hitro, specifično in tudi dovolj natančno štetje celic vrste *S. enterica* v naravnih mikrobioloških vzorcih.

SUMMARY

A competitive PCR (c-PCR) method for enumeration of *Salmonella enterica* in broth culture was developed. *Salmonella* 16S rDNA specific primers MINF and MINR-Hex were used for amplification of the 402 bp long PCR product. An internal DNA control, based on the analysis of the known 16S rRNA sequence of *S. Agona* (U92197) strain, was constructed. The 402 bp PCR product of *S. Agona* (U92197) strain contains two *DdeI* sites (at 229 and 256 position). Following the digestion with *DdeI* restriction endonuclease the flanking fragments were ligated. The internal control preserved the same primer recognition sites and differed from wild type sequence only in deletion of 27 bp long fragment in the middle of the sequence. Optimal co-amplification efficiency of internal control and target DNA was determined by regression analysis. Serial dilutions of internal control DNA were co-amplified with constant concentration of target DNA, isolated from a known amount of salmonella cells. The c-PCR products were separated by capillary electrophoresis. The regression analysis of the logarithms of the peak areas of both molecules and serial internal control dilutions resulted in a regression coefficient (R^2) of 0.9065 indicating nearly equivalent amplification efficiencies of the target and internal control DNAs. Optimal dilution of internal control (5×10^{-5}) was co-amplified with different concentrations of the target DNA, which were isolated from serially diluted *S. Agona* cultures with known cell numbers. Logarithmic ratios of target DNA peak areas versus internal control peak areas against the log cell dilutions per reaction yielded a straight line, making possible the quantification of salmonella cells within the range of 1.2×10^4 to 6×10^5 cells in a reaction mixture. The developed c-PCR method was used in a preliminary test for the determination of *S. Livingstone* cells and gave results approximately 2.9 times higher than the control indirect plate counting method. We are still convinced, however, that the method is suitable for a rapid, specific and sufficiently accurate counting of *S. enterica* cells in natural microbiological samples.

ZAHVALA

Avtorja bi se rada zahvalila prof. dr. Petru Dovču z Oddelka za Zootehniko Biotehniške fakultete in njegovim sodelavcem za pomoč pri analizi vzorcev s kapilarno elektroforezo.

VIRI

- Amann, R.I./ Ludwig, W./ Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1995), 143–169.
- Clausen, G.B./ Larsen, L./ Johnsen, K./ de Liphay, J.R./ Aamand, J. Quantification of the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp strain ADP in aquifer sediment by quantitative competitive polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2002), 221–229.
- Collins, C.H./ Lyne, P.M./ Grange, J.M. Collins and Lyne's *Microbiological methods*. 7th Edition. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd, 1995, 149–163.
- Davey, H.M./ Kell, D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews*, 60(1996), 641–696.
- Fuchs, B.M./ Zubkov, M.V./ Sahn, K./ Burkill, P.H./ Amann R. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental microbiology*, 2(2000)2, 191–201.
- Glöckner, F.O./ Amann, R./ Alfreider, A./ Pernthaler, J./ Psenner, R./ Trebesius, K. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 19(1996), 403–406.
- Harrigan, W. F. *Laboratory methods in food microbiology*. 3rd Edition. San Diego, Academic Press, 1998, 52–61.
- Lleo, M.D./ Tafi, M.C./ Signoretto, C./ Dal Cero, C./ Canepari, P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1999), 345–353.

- Lu, W./ Han, D. S./ Yuan, J./ Andrieu, J. M. Multi-target PCR analysis by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *Nature*, 368(1994), 269–271.
- Mahon, J./ Lax, A. J. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the *spvR* gene. *Epidemiology and infection*, 111(1993), 455–464.
- Monteiro, L./ Hua, J./ Birac, C./ Lamouliatte, H./ Megraud, F. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *European journal of clinical microbiology and infection diseases*, 16(1997)1, 143–149.
- Nitsche, A./ Steuer, N./ Schmidt, C.A./ Landt, O./ Siegert, W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of cytomegalovirus DNA. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 45(1999), 1932–1937.
- Phillips, C.J./ Paul, E.A./ Prosser, J.I. Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(2000), 167–175.
- Piatak, M./ Luk, K. C. / Williams, B./ Lifson, D. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantification of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques*, 14(1993)1, 70–79.
- Reilly, K. / Attwood, G. T. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. *Applied and environmental microbiology*, 64(1998)3, 907–913.
- Tepšič, K./ Avguštin, G. Development of cPCR technique for detection and enumeration of *Prevotella bryantii*. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh.*, 74(1999)2, 89–98.
- Trkov, M./ Majerikova, I./ Jeršek, B./ Stefanovicova, A./ Rijpens, N./ Kuchta, T. Detection of *Salmonella* in food in 30 hours using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 16(1999), 393–399.
- Trkov, M. Molekularno biološka označitev in prepoznavanje bakterij rodu *Salmonella* v vzorcih živil. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., 1999, 140 str.
- Trkov, M./ Avguštin, G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(2003), 67–75.
- Vincent, U./ Patra, U. / Therasse, J./ Gareil, P. Quantitation of polymerase chain reaction-amplified DNA fragments by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 17(1996), 512–517.