

APPLICATION AND VERIFICATION OF PCR METHOD FOR THE DETECTION OF THE GENE ENCODING TYROSINE DECARBOXYLASE IN BACTERIA ISOLATED FROM SEMI-HARD CHEESE

ZAVEDENÍ A OVĚŘENÍ PCR METODY PRO DETEKCI GENU PRO TYROZINDEKARBOXYLÁZU U BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z POLOTVRDÝCH SÝRŮ

Kroulíková M., Komprda T.

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: kroulikova.m@seznam.cz, komprda@mendelu.cz

ABSTRACT

The PCR method for the detection of the gene encoding tyrosine decarboxylase was used in isolates of *Enterococcus spp.* from common semi-hard cheese production. PCR was performed using specific primers TD2 and TD5 targeting the tyrosine decarboxylase gene *tyrDC*. Specific primer pair TD2 and TD5 allows for the amplification of a 1133 bp fragment. *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 with tyrosine decarboxylase activity was used as the positive control. From 17 isolates of *Enterococcus spp.* tested for the detection of the tyrosine decarboxylase gene sequence, thirteen isolates were positive for the tyrosine decarboxylase gene, other four isolates were negative. Usefulness of the PCR method for the rapid detection of tyramine-producing bacteria in cheese was confirmed.

Keywords: Tyramine, *Enterococcus spp.*, tyrosine decarboxylase gene (*tyrDC*)

ABSTRAKT

Cílem této studie bylo ověřit možnost využití metody PCR pro detekci genu pro tyrozindekarboxylázu (*tyrDC*) u izolátů bakterií rodu *Enterococcus* z polotvrdých sýrů. PCR metoda je založena na použití specifických primerů TD2 a TD5 překrývajících kódující oblast genu *tyrDC*. Byla provedena amplifikace fragmentu DNA o délce cca 1133 pb pomocí primerů TD2/TD5. Lze tak detekovat potenciální producenty tyraminu ve fermentovaných potravinách. Kmen *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 s tyrozindekarboxylázovou aktivitou byl použit jako pozitivní kontrola. PCR detekce byla prováděna u 17 izolátů *Enterococcus spp.* získaných z polotvrdých sýrů z běžné výroby. Třináct izolátů bylo ověřeno jako pozitivní pro přítomnost genu *tyrDC*, ostatní čtyři izoláty byly negativní. Uvedený postup lze jednoznačně doporučit jako rychlou a spolehlivou metodu pro detekci genu *tyrDC* v mikroorganismech potenciálně tvořících tyramin, které byly izolovány z potravin.

Klíčová slova: Tyramin, *Enterococcus spp.*, gen pro tyrozindekarboxylázu (*tyrDC*)

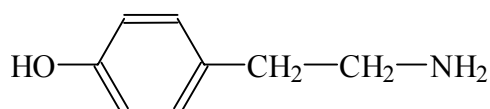
ÚVOD

Biogenní aminy (BA)

BA jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky vznikající v celé řadě běžně konzumovaných potravin a potravinových surovin nejčastěji dekarboxylací některých aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů.

Obsah biogenních aminů v různých druzích potravin je zkoumán především z hlediska jejich toxického účinku na lidský organismus. Konzumace potravin obsahující vysoké množství biogenních aminů může negativně ovlivnit zdraví lidí. Rizikové skupiny populace jsou např. alergici, pacienti konzumující léčiva s účinkem inhibitorů aminoxidáz, dále lidé trpící vysokým krevním tlakem, žaludečními vředy, astmatici a malé děti.

Mezi toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy patří tyramin (TY, p-hydroxyfenylethylamin), který se tvoří především ve fermentovaných potravinách dekarboxylací aminokyseliny tyrozinu působením bakteriální tyrozindekarboxylázy.



Tyramin

MATERIÁL A METODIKA

Příprava vzorků sýru

Analyzované vzorky sýrů eidamského typu pocházely od dvou českých výrobců (H, R). Sýry byly vyrobené o tučnosti 30 % a 45 %. Při výrobě sýrů byly použity dvě různé startovací kultury označené Y a L. Složení startovací kultury Y je následující: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Druhá startovací kultura L je složena z: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Vzorky sýrů se odebíraly v sedmi měsíčních intervalech. Při každém odběru byly odebírány od dané výroby tři vzorky – bloky 1, 2 a 3. Od každého vzorku byl analyzován okraj a střed sýru.

Izolace a kultivace mikroorganismů

Bakterie rodu *Enterococcus* izolované ze vzorků sýrů byly kultivovány na živném médiu Slanetz & Bartley (Noack, Francie) s přidavkem TTC (trifenyltetrazoliumchlorid) suplementu (Noack, Francie), který udílí koloniím červenou barvu. Misky byly inkubovány při 37°C po dobu 48 hodin. Poté narostlé kolonie byly po dvojnásobném přeočkování přes jednu kolonii kultivovány na živných půdách PCA (NOACK, Francie). Z pozitivních kolonií testovaných na tyrozindekarboxylázovou aktivitu pomocí média podle Bover-Cid a Holzapfel (1999) byla izolována DNA s následným testováním přítomnosti genu pro tyrozindekarboxylázu podle Cotton a kol. (2003).

*Izolace a příprava DNA z bakterií rodu *Enterococcus* spp.*

K izolaci DNA byla použita 24-hodinová kultura bakterií. Izolace DNA se prováděla pomocí metody fenol/chloroformové extrakce. Nejprve se buňky bakterií lýzovaly pomocí lyzačních roztoků, které obsahují lysozym (0,3 mg/ml) a pomocí detergentů (1 M Tris pufr, 0,5 M EDTA a 20 % SDS). K rozsuspendovaným buňkám se přidal roztok proteinázy K (100 µg/ml), suspenze se promíchala a vzorky se nechaly inkubovat při 55°C tři hodiny do

projasnění roztoku. Následně se provedla fenolová extrakce DNA a přesrážení 96 % ethanolem. Získaná DNA byla rozpuštěna a uchována v TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) (Sambrook and Russell, 2001).

Optimalizace PCR

PCR byla prováděna na základě metodiky popsané dle Coton a kol. (2003). Kmen *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 ověřený Cotonem a kol. (2003) na přítomnost genu pro tyrozindekarboxylázu (tyrDC), byl použit v naší práci jako pozitivní kontrola.

Při PCR reakci byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o délce 1133 pb pomocí specifických primerů TD2 (5'-ACATAGTCAACCATRTTGAA-3') a TD5 (5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3', Coton a kol., 2003) s následujícím amplifikačním programem prováděným v termocycleru MJ Mini Personal Thermal Cycler (BIO – RAD Laboratories, Inc., USA): počáteční denaturace při 95°C 5 min, 32 cyklů denaturace při 95°C 45 sec, annealing neboli připojování primerů při 56°C 45 sec, 72°C 1 min 30 sec a syntéza DNA při 72°C 5 min.

Detekce PCR produktů

Pro detekci 25 µl PCR produktů byl připraven 1,5 % agarózový gel obarvený ethidium bromidem. Pro průběh elektroforézy se používal 0,5 x TBE pufr (1 M Tris, kyselina boritá, 0,5 M EDTA) při napětí 80 V po dobu 90 min. Následně byly PCR produkty na gelu detekovány na transiluminátoru pod UV světlem a zaznamenány pomocí fotodokumentačního systému Gel imager^(TM) Ultra-Lum, Inc., USA. Jako velikostní standard byl použit 100 pb ladder (New England Biolabs, England).

PCR z bakteriální kolonie

Pro urychlení a zefektivnění této screeningové metody pro detekci mikroorganismů potenciálně produkujících tyramin byly optimalizovány podmínky pro PCR z bakteriální kolonie. Podmínky PCR reakce byly stejné jako při použití DNA matrice získané izolací z bakterií rodu *Enterococcus*, pouze s tím rozdílem, že množství použité DNA polymerázy v reakci bylo 0,5 µl. DNA matrice z bakteriální kolonie byla těsně před přidáním do reakční směsi zahřívána při 95°C po dobu 15 minut.

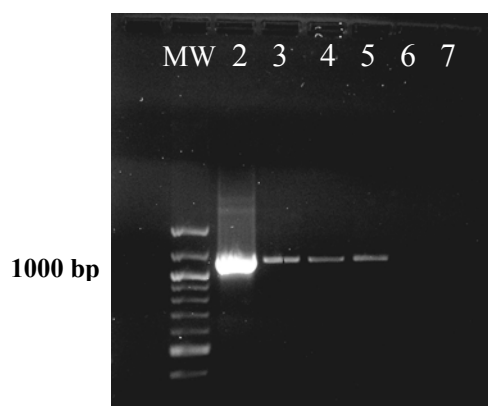
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledkem naší studie byla izolace DNA z bakterií rodu *Enterococcus* získaných z polotvrdých zrajích sýrů eidamského typu, optimalizace podmínek PCR reakce pro detekci genu pro tyrozindekarboxylázu a identifikace PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Podmínky PCR reakce byly optimalizovány pro používanou Top-Bio DNA polymerázu. Množství DNA polymerázy závisí na použitém templátu při PCR reakci. To znamená, že PCR z jedné bakteriální buňky vyžaduje množství DNA polymerázy vyšší (0,5 µl) než při PCR reakci probíhající s templátem izolované DNA (viz tabulka 1 a 2). Teplotní podmínky v průběhu amplifikace zůstaly stejné v obou případech. Pouze před PCR reakcí z bakteriální buňky byla DNA matrice denaturována při 95°C po dobu 15 minut z důvodu dostatečné lyze bakteriální buňky.

Citlivost reakce byla stanovena na 10 pg/μl DNA. Obrázek 1 ukazuje citlivost různých koncentrací vzorku DNA. Pro PCR reakci byla použita koncentrace 1 ng/μl DNA. Množství jednotlivých PCR komponent je ukázán v tabulce 1 a 2.

Hlavním cílem této studie bylo ověřit možnost využití metody PCR pro detekci genu pro tyrozindekarboxylázu u izolátů bakterie rodu *Enterococcus* získaných z polotvrdých sýrů eidamského typu.



Obrázek 1. Citlivost PCR reakce

MW – 100 bp DNA ladder, Dráha 2, 10 ng/μl DNA; Dráha 3, 1 ng/μl DNA; Dráha 4, 100 pg/μl DNA; Dráha 5, 10 pg/μl DNA; Dráha 6, 1 pg/μl DNA; Dráha 7, 100 fg/μl DNA

Tab.1 Optimalizovaná PCR směs pro izolovanou DNA

KOMPONENTY PRO PCR REAKCI	MNOŽSTVÍ JEDNOTLIVÝCH KOMPONENT V 25 μl
PCR H ₂ O	20,5 μl
10 x PCR pufr kompletní	2,5 μl
dNTP (10 mM)	0,5 μl
Primer TD2 ¹⁾ (10 pmol/μl)	0,5 μl
Primer TD5 ¹⁾ (10 pmol/μl)	0,5 μl
DNA polymeráza (5U/μl)	0,3 μl
DNA templát	0,2 μl

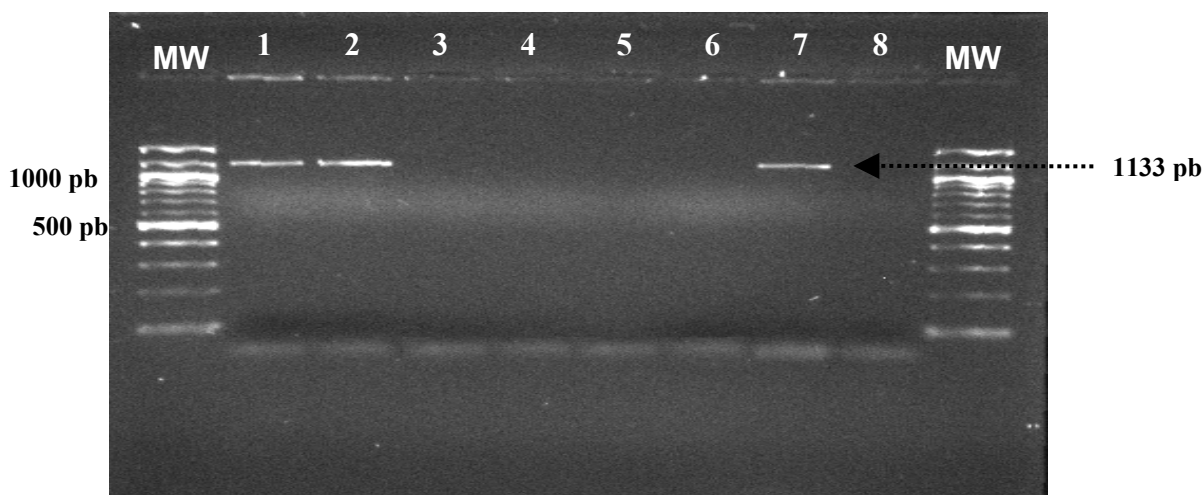
1) Coton a kol. 2003

Tab.2 Optimalizovaná PCR směs pro templát z bakteriální kolonie

KOMPONENTY PRO PCR REAKCI	MNOŽSTVÍ JEDNOTLIVÝCH KOMPONENT V 25 μ l
PCR H ₂ O	20,5 μ l
10 x PCR pufr kompletní	2,5 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
Primer TD2 ¹⁾ (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer TD5 ¹⁾ (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
DNA polymeráza (5U/ μ l)	0,5 μ l
DNA templát	Bakteriální kolonie

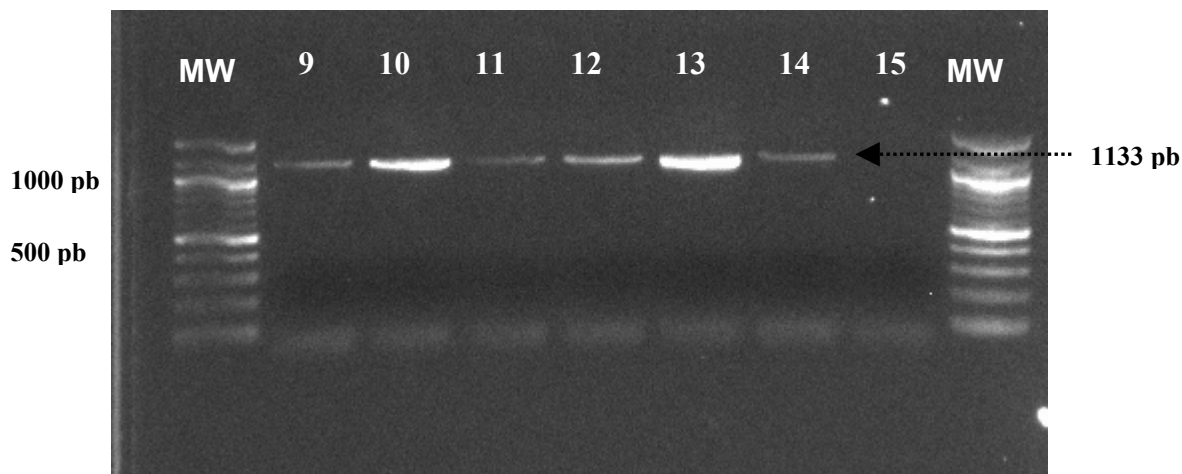
1) Coton a kol. 2003

V této práci byla využita a ověřena metoda PCR s použitím specifických primerů navrženými autory Coton a kol. (2003) pro izoláty bakterií získaných z polotvrdých zrajících sýrů. Izoláty bakterií rodu *Enterococcus* byly předchozí screeningovou metodou stanoveny jako pozitivní na dekarboxylázovou aktivitu podle autorů Bover-Cid a Holzapfel (1999). Konkrétně se jednalo o izoláty odebrané z pátého měsíce probíhajícího pokusu. Bylo ověřeno celkem 17 izolátů bakterií rodu *Enterococcus* testovaných na přítomnost genu pro tyrDC metodou PCR. Z celkového počtu izolátů, bylo 13 pozitivních na přítomnost genu tyrDC a 4 byly označeny jako negativní. Výsledky jsou uvedeny na obrázcích 2 a 3.



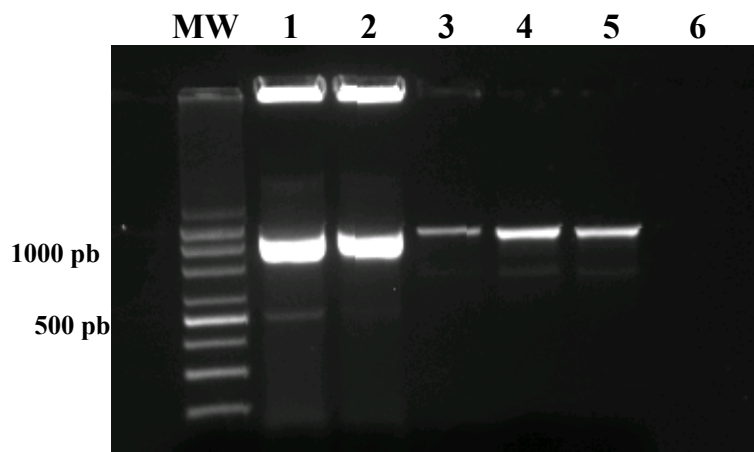
Obrázek 2.

Detekce PCR produktů pomocí gelové agaróзовé elektroforézy na 1,5 % gelu: Dráha 1 - 6 izoláty rodu *Enterococcus* ze sýru, 7 - pozitivní kontrola (*Enterococcus faecalis* CNRZ 238), 8 - negativní kontrola, MW - 100 bp DNA ladder



Obrázek 3.

Detekce PCR produktů pomocí gelové agaróзовé elektroforézy na 1,5 % gelu: Dráha **9 - 13** izoláty rodu *Enterococcus* ze sýru, **14** - pozitivní kontrola (*Enterococcus faecalis* CNRZ 238), **15** – negativní kontrola, MW - 100 bp DNA ladder



Obrázek 4.

Detekce PCR produktů pomocí gelové agaróзовé elektroforézy na 1,5 % gelu: MW - 100 bp DNA ladder, dráha **1, 2** - PCR produkty z bakteriální kolonie – rod *Enterococcus*, dráha **3 – 5** PCR produkty z izolované DNA bakterií rodu *Enterococcus*, dráha **6** - negativní kontrola

ZÁVĚR

V této práci byla prováděna detekce u 17 izolátů *Enterococcus spp.* získaných z polotvrdých sýrů z běžné výroby pomocí metody PCR. Tato metoda využívá specifického páru primerů TD2/TD5 amplifikující fragment o velikosti 1133 pb v genu pro tyrozindekarboxylázu (tyrDC). Jako pozitivní kontrola byl v naší studii použit *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 s tyrozindekarboxylázovou aktivitou. Třináct izolátů bylo ověřeno jako pozitivních pro přítomnost genu tyrDC a ostatní čtyři izoláty byly negativní.

Pro urychlení této screeningové metody byla optimalizována PCR reakce z bakteriální kolonie. Pro snadnější ověřování izolátů bakterií na přítomnost genu pro tyrDC je možné vynechat časově náročnou izolaci DNA pomocí fenol/chloroformové extrakce a přímo provést PCR reakci z bakteriální kolonie s následnou detekcí PCR produktů na agaróзовém gelu (obrázek 4).

Tato metoda sice nemůže poskytnout dostatečné informace o aktuálním obsahu BA tvořenými bakteriemi v potravinách, ale může nás upozornit na potenciální producenty BA, konkrétně tyraminu. Uvedený postup lze jednoznačně doporučit jako nenáročnou a spolehlivou metodu pro detekci genu pro tyrozindekarboxylázu u bakterií tvořících BA a mohl by se stát významnou screeningovou metodou pro potravinářské firmy zabývající se výrobou fermentovaných potravin a nápojů.

LITERATURA

Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 53, 33-41.

Coton M., Coton E., Lucas P., Lonvaud A. (2003): Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *C. divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.*, 21:125-130.

Coton E., Coton M. (2005): Multiplex PCR for colony direct of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiol. Methods.*

Komprda T. a kol. (2006): Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry* (v tisku; dostupný on-line).

Křížek M., Kalač P. (1998): Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech J.Food Sci.*, 16:151-159.

Sambrook J., Russell D.W. (2001): *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tato práce byla financována z grantu č. 22/2006 IGA MZLU v Brně.