

**MIKROBIÁLIS UJJLENYOMAT VIZSGÁLATI
MÓDSZER ALKALMAZÁSA KÖRNYEZETI MINTÁK
ANALÍZISE SORÁN**

BALÁZS MARGIT

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÉMAVEZETŐK:

DR. KISS ISTVÁN

DR. SZVETNIK ATTILA

**BAY ZOLTÁN ALKALMAZOTT KUTATÁSI KÖZHASZNÚ
NONPROFIT KFT. BIOTECHNOLÓGIAI DIVÍZIÓ (BAY–BIO)**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**



SZEGED

2018

Tartalom

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	5
3.	Irodalmi áttekintés.....	9
3.1.	Mikrobiális összetétel vizsgálatra alkalmazott ujjlenyomat technikák	9
3.2.	PCR–DGGE mintázatot befolyásoló tényezők.....	12
3.2.1.	A DNS izolálás hatékonysága	12
3.2.2.	Amplifikációs körülmények hatása a PCR–DGGE mintázatra	16
3.3.	A DNS polimerázok tulajdonságai.....	18
3.3.1.	Nehezen amplifikálható templátok.....	18
3.3.2.	Aspecifikus PCR termékek.....	18
3.3.3.	Hibás DNS átírás	19
3.3.4.	PCR inhibitorok.....	19
3.4.	DNS polimeráz enzimek.....	24
3.4.1.	Natív DNS polimeráz enzimek.....	24
3.4.2.	Módosított DNS polimeráz enzimek	29
4.	Célkitűzések	32
5.	Anyagok és módszerek.....	34
5.1.	DNS izolálási módszerek és polimeráz enzimek hatása DGGE mintázatra.....	34
5.1.1.	Talajminták.....	34
5.1.2.	DNS izolálás.....	34
5.1.3.	A 16S rRNS gén és a V3 régió amplifikálása	35
5.1.4.	DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis)	38
5.1.5.	PCR-DGGE mintázatok elemzése.....	38
5.2.	DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenysége vizsgálat.....	40
5.2.1.	Mestersége konzorcium, PCR-DGGE marker készítése	40
5.2.2.	PCR inhibitor oldatok.....	41
5.3.	PCR inhibitorok DNS polimeráz enzimet gátló és PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata	42

5.3.1.	PCR inhibíció hagyományos endpoint (végpont) PCR-rel.....	42
6.	Eredmények és értékelésük	43
6.1.	DNS izolálási módszerek hatása a PCR-DGGE mintázatra.....	43
6.2.	Polimeráz enzimek PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatása	52
6.3.	Mesterséges konzorcium és DGGE marker készítése	58
6.4.	PCR inhibitorok DNS polimeráz enzimekre gyakorolt hatása.....	63
6.4.1.	PCR gátlás vizsgálata genomiális DNS templátról történő amplifikáció során	63
6.4.2.	PCR gátlás vizsgálata mesterséges konzorciummal.....	65
6.5.	PCR inhibitorok PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatása.....	72
6.5.1.	Huminsav és talajextraktum jelenlétének hatása a PCR-DGGE mintázatra.....	72
6.5.2.	Vér és vérsérum hatása a PCR-DGGE mintázatra.....	74
6.6.	POLMIX11 alkalmazása	75
7.	Összefoglalás.....	79
8.	Summary	84
9.	Köszönetnyilvánítás	89
10.	Irodalomjegyzék.....	90

1. Rövidítések jegyzéke

16S/18S/23S/26S	riboszóma kis alegységi RNS molekulák és az azt kódoló gének
rRNS / rDNS	prokariótákban és eukariótákban
<i>amoA</i>	ammónia monooxygenáz gén A alegység
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool – fehérje aminosav sorrend, nukleinsav bázissorrend illesztésére, hasonlóságon alapuló adatbázis keresésére szolgáló program
CTAB	cetrimónium–bromid (cetyltrimethylammonium bromide)
DGGE	denaturáló gradiens gélelektroforézis
<i>dsrB</i>	disszimilatív szulfit reduktáz gén B alegység
G/C és A/T	a genom guanin citozin vagy adenin timin aránya
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> , belső átíródó köztes régió (internal transcribed spacer)
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
reverse/forward primer	amplifikáció során alkalmazott rövid DNS szakaszok, amik a célszekvencia elejét és végét jelölik
SDS	nátrium–dodecil–szulfát (sodium dodecyl sulphate)

2. Bevezetés

A XXI. századi társadalomnak az egyik és talán legnagyobb kihívása a környezet állapotának javítása. Az utóbbi évszázad ipari tevékenységei, az urbanizáció, az energiatermelés és mezőgazdaság modernizációja, mind a környezet állapotának drasztikus romlásához vezetett.

A fejlett országokban és Amerikában viszonylag gyorsan felismerték a környezetkárosodás okozta veszélyeket és programokat indítottak e kérdés megoldására. Hasonlóan, Németország, Dánia, Hollandia már a '80-as évek közepétől bevezetett a szennyezett területek felmérésével és kezelésével foglalkozó programokat, és emellett tudományosan megalapozta a szükséges jogszabályi háttérrel.

A kármentesítési programok első éveiben a munka csupán a talaj és a felszín alatti vizeket veszélyeztető, károsító szennyező források felmérésére fókuszált. Később felismerték, hogy a talaj, mint élőhely az elemkörforgalmak kulcsfontosságú helye, és ezt figyelembe véve olyan talajkezelési módszerek kutatásába és fejlesztésébe kezdtek, amelyek mindamellett hogy hatékony, költségtakarékos megoldások, ugyanakkor környezet kímélőek és a fenntartható üzemeltetést is biztosítják. Ezzel egy időben és részben ennek következményeként fejlődött önálló tudományterületté a környezetvédelmi biotechnológia.

A 80'-as évek elején a környezetvédelmi biotechnológia még meglehetősen gyerekcipőben járt. Azonban az ipari tevékenységek okozta szénhidrogén eredetű talaj- és vízszennyezések biológiai kezelésének, kármentesítésének sikerességei bizonyították a környezetbarát technológiák kiemelkedő előnyeit. A kezdeti évek során, az egyes toxikus vagy környezeti kockázatot jelentő vegyületek mikrobiális metabolizmusát vizsgáló kutatásokból született eredmények indították a biotechnológiát alkalmazó transzformációs folyamatok felvirágzását. Rövid idő alatt a környezetvédelmi biotechnológia megérett a léptéknövelésre: így a bioremediációs technológiák napjainkra potenciális kármentesítési eljárásokká váltak.

A remediációs technológiák fejlődésével a biotechnológia is robbanásszerűen fejlődött. A múlt század első kétharmadában még hagyományos, laboratóriumi tenyésztést alkalmazva izolálták az egyes vegyületek lebontására képes mikrobákat. A kutatók a 90'-es évek környékén szembesültek először azzal a problémával, hogy nem minden talajbaktérium tenyészthető¹. Szintén a '90-es években, a Norman Pace által kidolgozott módszer révén,

lehetővé vált a környezeti mintákban jelenlévő mikroorganizmusok tenyésztéstől független, molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata. Ezzel lehetőség nyílt a baktériumok tenyésztés nélküli tanulmányozására, és ez elindított egy ugrásszerű növekedést a mikrobiális diverzitás feltérképezésében².

Így az utóbbi évtizedekben a nukleinsav alapú mikrobiális összetétel vizsgáló módszereknek köszönhetően jelentősen megváltozott mind az eukarióták, mind a prokarióták diverzitásáról alkotott kép. A korábbi tenyésztésen alapuló technikák szelektivitásukból adódóan az mikroorganizmusoknak csak egy részét tették vizsgálhatóvá, egyes tudományos becslések alapján a közösségalkotó fajoknak ez csupán 0,1–1%³. A hagyományos módszerekkel nem kimutatható mikroorganizmusok nagy száma készítette a kutatókat a tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerek fejlesztésére és alkalmazására. A molekuláris biológia többek között lehetővé tette a komplex mikrobiális összetételű minták vizsgálatát is. Széles körben elterjedtek az ún. genetikai „ujjlenyomat technikák” – ilyen módszer a dolgozatban alkalmazott PCR-DGGE is –, amelyekkel gyorsan, viszonylag egyszerűen és egyedülálló részletességgel követhető a mikrobiális közösségek összetételének időbeli változása⁴. A tenyésztés független molekuláris biológiai technikák jelentős része PCR-t (polimeráz láncreakciót) alkalmaz a vizsgált génszakasz felszorzásához (amplifikálás). Napjainkra a kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS polimeráz enzimek széles választéka elérhetővé vált, viszont az egyes DNS polimeráz enzimek eltérő tulajdonságaikból adódóan eltérő hatékonysággal amplifikálnak. Ennek eredményeként eltérő minőségű vagy összetételű amplikonok keletkezhetnek. A DNS polimerázok másolási pontosságának (fidelity), másolási sebességének (processivity), inhibitor érzékenységének feltérképezése még jelenleg is kutatott terület. Az eddigi kutatási eredmények alapján azonban egyértelműen látszik, hogy a DNS polimeráz enzimek másolási képességei között jelentős eltérések mutathatóak ki. Ezért a PCR alapú vizsgálat elvárt eredménye alapvetően befolyásolja, hogy melyik enzimet célszerű alkalmazni az amplifikáció során.

A talaj egy komplex és kiemelkedő mikrobiális diverzitással rendelkező mátrix. Mikrobiális összetételének vizsgálata számos tudományterületet érint a környezetvédelemtől az agráriumon át az archeológiáig. A talajminták diverz mikroflórájából adódóan nem könnyű olyan DNS kinyerési protokollt alkalmazni, mely lehetővé teszi az eltérő sejtfalösszetétellel, eltérő egyedszámban lévő mikroorganizmusok DNS-ének teljes kinyerését még prokarióták szintjén sem. Ebből adódóan eltérő protokoll alkalmazásával eltérő mikrobiális ujjlenyomatot, PCR–DGGE mintázatot kaphatunk.

Dolgozatomban a DNS izolálás során alkalmazott módszer és az amplifikáció során alkalmazott DNS polimeráz enzimek talajminták PCR–DGGE mintázatra gyakorolt hatását vizsgáltam. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy különböző DNS izolálási módszerek (SDS mennyisége, üveggyöngy alkalmazása stb.) milyen mértékben befolyásolják a végeredményként kapott PCR–DGGE mintázatot eubaktériumok vizsgálata során. Az eredményeink alátámasztják, hogy a DNS kinyerése során alkalmazott módszer, és különösen a sejtfeltáráshoz alkalmazott módszer eltérő PCR–DGGE mintázatot eredményez. Egy erőteljesebb lízis alkalmazása, utótisztítási lépések nélkül, nagyobb mennyiségű DNS kinyerését teszi lehetővé és szélesebb diverzitás vizsgálatára ad lehetőséget. Azonban a nagyobb mennyiségű DNS töredezett és alacsony tisztaságú is – talajmátrixból eredő vegyületek is együtt extrahálódnak a DNS–el –, így az amplifikáció csak PCR inhibitor rezisztens DNS polimerázokkal alkalmazásával lehetséges.

Dolgozatom második felében tárgyalom azon kísérleteket, amelyek során arra kerestük a választ, hogy különböző DNS polimeráz enzimek alkalmazása hogyan befolyásolja eltérő eredetű talajminták esetében a kinyerhető mikrobiális ujjlenyomat mintázatokat (PCR–DGGE). Az elérhető szakirodalmi adatok alapján kiválasztott legpontosabb másolási képességgel rendelkező (legkisebb hibázást adó, *high fidelity*) DNS polimeráz enzimek (*Phusion* és *KOD* DNS polimeráz) és a mai biotechnológiai és mikrobiológiai gyakorlatban legáltalánosabban alkalmazott *Taq* DNS polimeráz enzimre vonatkozóan összehasonító vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink azt bizonyították, hogy a PCR–DGGE során alkalmazott DNS polimeráz enzimnek jelentős szerepe van a kapott mintázat minőségére, mint például a domináns fajok mennyiségére, a mintázat diverzitására és nem utolsósorban a mintázat élességére és értékelhetőségére.

A dolgozat harmadik részében bemutatott kutatási lépések során a környezeti és vérmintákban leggyakrabban előforduló inhibitorok DNS polimeráz enzimekre kifejtett hatását elemeztük (szenzibilitási tesztek), továbbá megvizsgáltuk, hogy az inhibitor komponensek jelenléte indirekt módon hogyan befolyásolja az egyes minták esetében kapott PCR–DGGE mintázatot. A kísérleti eredményeink alátámasztották, hogy az egyes DNS polimeráz enzimek eltérő inhibitor érzékenységgel rendelkeznek, ami a PCR–DGGE során kapott eredményeket is jelentősen befolyásolja. Az eredmények arra utalnak, hogy a DNS polimeráz helyes megválasztása döntően befolyásolja a kísérlet sikerességét, reprodukálhatóságát, a kapott mintázat minőségét és a vizsgált mintában kimutatható/észlelhető diverzitást.

A kísérleti eredmények alapján kidolgoztunk egy új módszertant talajmintákból történő PCR–DGGE alapú vizsgálatokra, mellyel egyrészt nagyobb diverzitás vizsgálható, másrészt a kapott mintázat szoftveresen is jobban értékelhető. A módszert sikeresen alkalmaztuk biodegradációs beavatkozás során a lebontásért felelős baktérium monitoringára, valamint a módszer segítségével sikeresen azonosítottuk kaolin minták minőségromlásáért felelős baktériumokat is.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Mikrobiális összetétel vizsgálatra alkalmazott ujjlenyomat technikák

Tenyésztés független mikrobiális összetétel vizsgálatok között számos nem–nukleinsav alapú módszer is létezik (ilyen pl. foszfolipid/zsírsvav analízis⁵), azonban a PCR felfedezése és alkalmazása óta kétségkívül a nukleinsav alapú módszerek a legelterjedtebbek. Az ujjlenyomat technikáknál, a PCR reakció során keletkező termékeket nem választjuk szét, hanem azok egészéből, valamilyen eljárás segítségével alkotunk közösségi ujjlenyomatot. Az egyes ujjlenyomat technikák közötti alapvető különbség, hogy a PCR során kapott termékek méret (hossz), vagy szekvencia heterogenitáson alapuló elválasztása történik–e. Azt, hogy egy adott mikrobiális közösség vizsgálatához mely módszer alkalmazható, természetesen a környezeti kívánt információ határozza meg, de sok esetben ez inkább a laboratórium technikai felszereltségétől függ. A teljesség kedvéért bemutatom a leggyakrabban alkalmazott DNS alapú ujjlenyomat technikák és ezen eljárásokkal készített mintázatok elvi háttérét.

ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Az ARISA a génhossz heterogenitáson LH–PCR (*Length Heterogeneity – PCR*) alapuló módszerek közé tartozik. Ezeknél az eljárásoknál a PCR során amplifikált génnek természetes hosszbeli heterogenitása alapján történik az elválasztás. Az eljárás hatásosságát befolyásolja a heterogenitás mértéke, ami az amplifikált DNS szakasztól függ. Igazán nagymértékű hosszbeli heterogenitások a rRNS géneknél gyakoriak, ilyenek a 16S és a 23S rRNS gén közötti Internal Transcribed Spacer (ITS) szakasz, amelynél a hosszbeli változatosság 143 és 1529 bp között változik⁶. A RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) és az ARISA–nak az ITS szakasz hosszbeli heterogenitáson alapuló módszer⁷. A RISA–t poliakrilamid gélen történő elválasztással, az ARISA–t kapilláris elektroforézissel végzik. Az ITS alapú vizsgálatokat azonban inkább gombák vizsgálatára alkalmazzák, mert az ITS szekvenciák nagymértékű változatosságuk miatt csak közeli csoportok, faj alatti rendszertani kategóriák filogenetikai elemzésére alkalmasak⁸.

SSCP (Single–strand Conformation Polymorphism)

Az SSCP módszer során a PCR reakcióval felszaporított DNS fragmenseket választják el egy speciális akrilamid gélen, állandó hőmérsékleten. Ezen a nagyfelbontású poliakrilamid

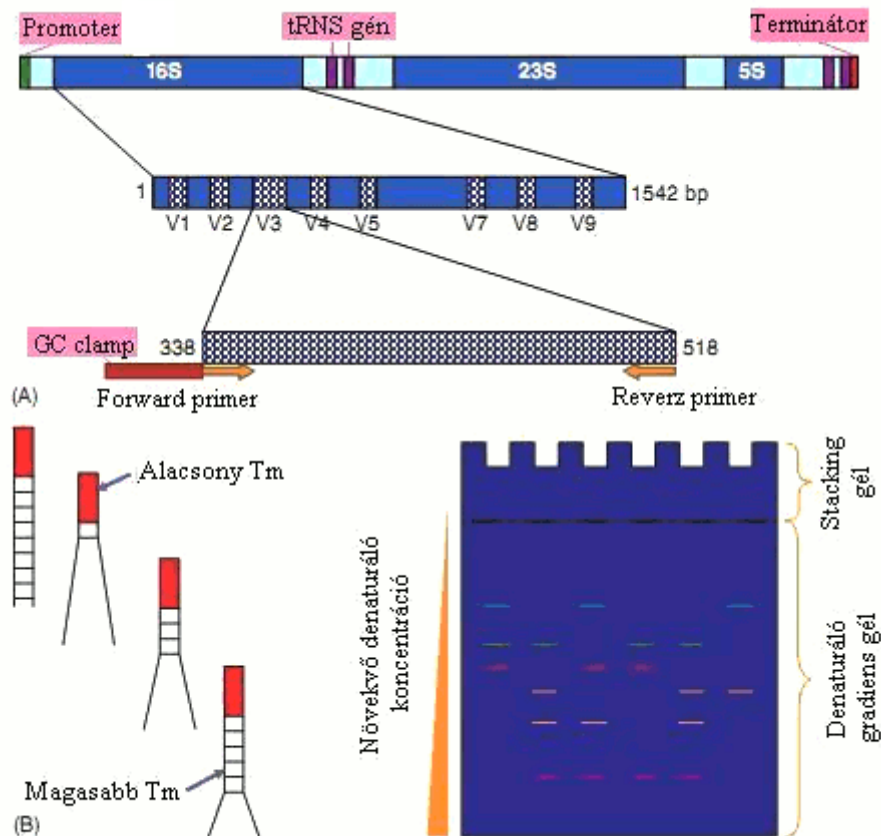
gelen az akár egymástól csak egyetlen nukleotidban eltérő fragmentek is megkülönböztethetők. A módszert eredetileg mutációk kimutatására dolgozták ki, és kevésbé volt alkalmas mikrobiális közösség vizsgálatokhoz, amíg nem sikerült az egyszálú DNS tökéletes elválasztása a PCR során létrehozott kettősszálú DNS termékekből⁹. Ezt a problémát a két primer közül az egyik primer 5'-végen történő foszforilálásával sikerült megoldani, melyet a PCR-t követően szelektíven exonukleáz segítségével el lehetett bontani. Ezt követően a módszer komplex mikrobiális közösségek vizsgálatára is alkalmassá vált¹⁰.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A restrikciós hasításon alapuló módszer (RFLP) alapja, hogy a restrikciós enzimek adott rövid DNS szekvenciákat ismernek fel, és ott hasítják a molekulát. Mikrobiális összetétel vizsgálatok során így az adott filotípusra jellemző, különböző hosszúságú szakaszok (fragmentek) jönnek létre, amelyek ezt követően gélelektroforézissel elválaszthatóak. A klasszikus RFLP helyett a mikrobiális ökológiában az utóbbi években a TRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) módszer terjedt el, ahol már a PCR során alkalmazott egyik primer fluoreszcensen jelölt, így egyik végükön (terminálisan) jelölt PCR termékek jönnek létre¹¹. A restrikciós hasítást követően csak a terminálisan jelölt fragmentet analizálják kapilláris elektroforézissel. A T-RFLP jól reprodukálható, nagy felbontóképességű és az egyik legjobbnak tartott ún. ujjlenyomat módszer.

PRC-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Szintén gyakran alkalmazott ujjlenyomat technika az ún. denaturáló gradiens gélelektroforézis. A módszert mutációk kimutatására és mikrobiális konzorciumok (eubaktériumok, archaea baktériumok, gombák) összetételének vizsgálatára alkalmazták először. Mikrobiális összetétel vizsgálat során a vizsgált génszakasz (pl. 16S rDNS) variábilis szegmensét amplifikálják két lépésben (1/A ábra), amely egy azonos méretű (maximálisan 5–600bp hosszúságú), de eltérő szekvenciájú DNS amplikont eredményez¹². A kapott fragment-populáció bizonyos korlátok között jól jellemzi az eredeti mikrobiális összetétel domináns fajait és valamennyire az egyedszámbeli sajátosságokat is. Az amplikonok elválasztása denaturáló gradienst tartalmazó poliakrilamid gélben történik az egyedi nukleotid sorrendre jellemző, eltérő denaturációs (olvadási) tulajdonságaik alapján (GC/AT arány; 1/B ábra). A poliakrilamid gélben a denaturáló közeget az urea és formamid biztosítja.



1. ábra Denaturáló gél elektroforézis (DGGE) sematikus rajza (Eubaktérium specifikus DGGE mintázat) A: A 16S rDNS V3 variábilis génszakasz amplifikálása B: szekvencia alapján történő elválasztás denaturáló gélen¹³.

Az elektroforézis során az ampikonok állandó hőmérsékleten, folyamatosan növekvő denaturáló környezetben haladnak előre, majd a szekvenciájuk által meghatározott olvadási pontjukon részlegesen denaturálódnak. A részleges denaturáció hatására a molekula mobilitása (vándorlási sebessége) jelentősen lecsökken a gélben. A teljes denaturációt egy 30–40 bázis hosszúságú guanin–citozin (G–C) gazdag szakasz (ún. GC–clamp) akadályozza meg, melyet jellemzően az amplifikáció során alkalmazott forward primer 5' vége tartalmaz. Amint a különböző szekvenciájú fragmentumok a GC/AT arányuknak megfelelően szétválasztódnak a gélben, létrejön egy egyedi, az adott tesztanyag összetételére jellemző mintázat. A PCR–DGGE során kapott fragmentek száma, helye és intenzitása információval szolgál a vizsgált közösség faji összetételéről és így lehetőséget ad különféle minták diverzitásának összehasonlítására is. A módszer egyik nagy előnye, hogy az elektroforézist követően, az egyes fragmentek az akrilamid gélből kivághatóak és szekvencia elemzésükkel a mintában lévő fajok meghatározhatóvá válnak. A módszer hátrányának tartják, hogy főként a

mintában dominánsan előforduló fajokat képes csak megjeleníteni, így előfordulhat, hogy a kis egyedszámú, de a közösség szempontjából fontos szereppel bíró fajok nem észlelhetők.

A módszert eredetileg univerzális gének (16S, 18S, 26S, ITS) amplikonjainak szétválasztására és ezzel egy ún. populáció mintázat létrehozására alkalmazták. A PCR-DGGE technikát, az utóbbi években egyre több olyan területen is alkalmazzák már, ahol a vizsgált amplikonok csoport specifikus gének, mint például *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Pseudomonas* 16S rRNS gén (szakasz?)^{14,15,16,17,18} vagy megfelelő diverzitással rendelkező funkcionális gének, mint az ammónia monoxigenáz (*AmoA*) vagy disszimilatív szulfít reduktáz (*DsrB*)^{19,20}. A csoport specifikus vagy funkcionális génekre tervezett primerek alkalmazásával, a vizsgált mikroflórában így nemcsak a gén jelenléte igazolható, hanem a populáció összetételére is következtethetünk. A csoport specifikus PCR–DGGE egy újabb virágkorát nyitotta meg a PCR–DGGE módszerek alkalmazásának, mely az utóbbi években az új-generációs szekvenálások robbanásszerű fejlődésével háttérbeszorult. Napjainkban az összetett mikroflórával rendelkező minták faji összetételének vizsgálatára kétségkívül a szekvenálás a legtöbb információt adó és legpontosabb eljárás, azonban ahol egy mikrobiális közösség részcsoportjának diverzitásvizsgálata a cél, még mindig hatékony és gyors módszer lehet a PCR–DGGE alkalmazása.

Mivel mindegyik tenyésztés független mikrobiális összetétel vizsgáló módszernél több lépéses eljárásról van szó, a vizsgálat végeredményét számos kísérleti körülmény befolyásolhatja és torzíthatja²¹.

3.2. PCR–DGGE mintázatot befolyásoló tényezők

Az ujjlenyomat mintázatot befolyásoló paraméterek vizsgálatánál elsősorban a PCR–DGGE módszer során kapott eredményekre fókuszálunk, de természetesen ezek a paraméterek hasonló torzító hatást mutatnak más, nukleinsav alapú ujjlenyomat vizsgálatok készítése során is.

3.2.1. A DNS izolálás hatékonysága

A szakirodalom bőven taglalja a DNS izolálási lépés kulcsfontosságát molekuláris biológiai mérések során. Ismert tény, hogy bizonyos baktérium-csoportokból sejtfal összetételükből adódóan nehezebben nyerhető ki a DNS, ennek eredményeként ezek a fajok az eredeti összetételhez képest alulreprezentálva jelennek meg a vizsgálat során³¹.

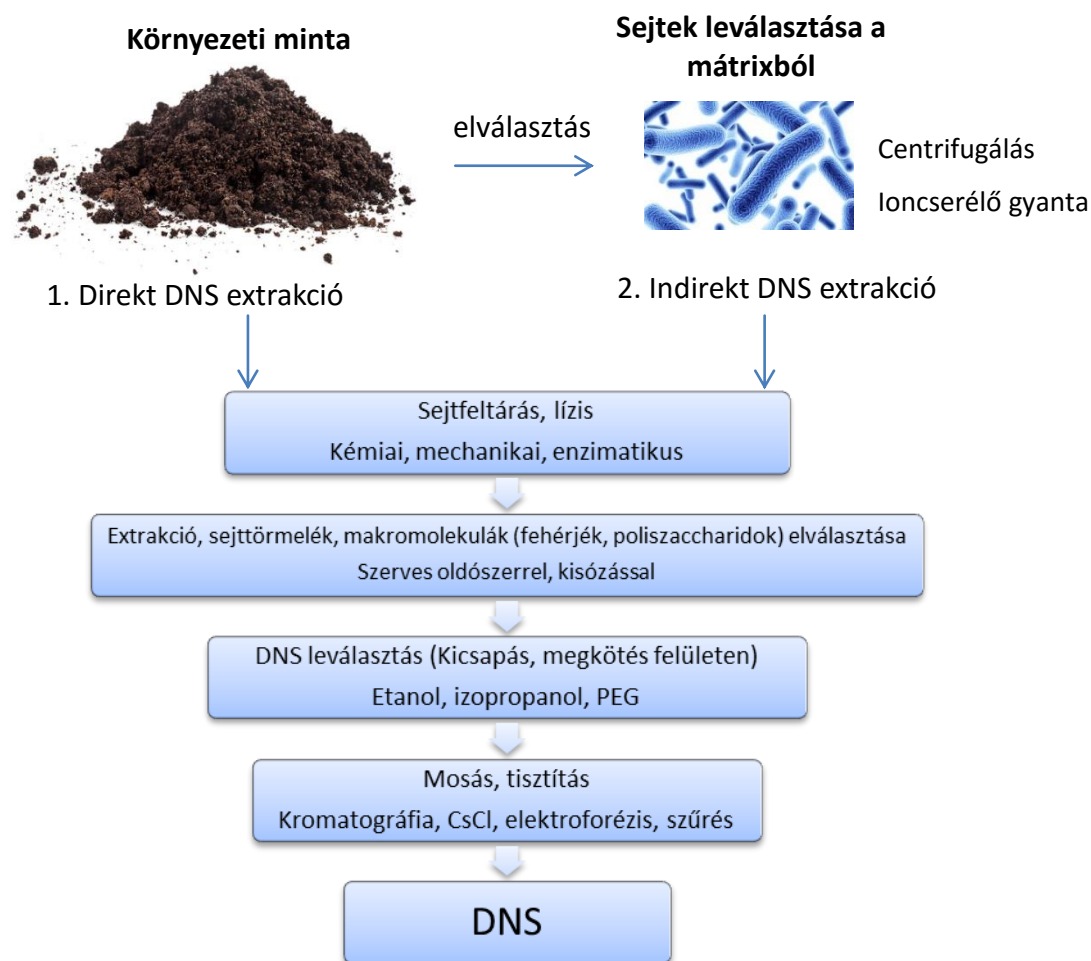
A DNS izolálás eredményét befolyásolja a sejtfeltárás (fizikai, kémiai, enzimatis) hatékonysága, a mátrix összetétele (a mátrixot alkotó anyagok nukleinsav adszorpció

tulajdonsága), a mintában lévő PCR inhibitor komponensek koextrakciója, valamint a kivonható DNS mennyisége és a degradációból, lízis során fellépő részleges töredezettségből adódó minősége²².

Az utóbbi évtizedekben folyamatosan jelennek meg a DNS izolálással kapcsolatos újabb és újabb módszerek, azonban általánosan használható, univerzális, talajból történő DNS izolálási módszert jelenleg sem ismerünk. A módszerfejlesztési irányzatok alapvetően két típusba sorolhatók:

- a. sejtfeltárás optimalizálása
- b. nagy tisztaságú DNS izolálása

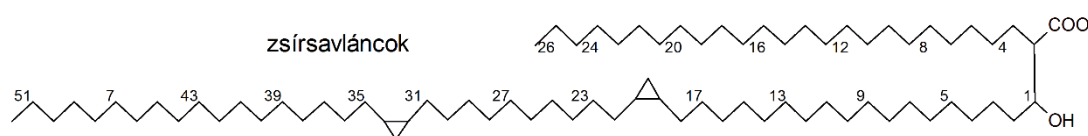
Talajmintákból történő DNS extrakciót vagy a talajjal együtt végzik (ún. direkt lízis módszer), vagy a vizsgált sejteket a feltárás előtt leválasztják a talajkolloidok felületéről (ún. indirekt módszer) (2. ábra). Mivel a talajmátrixhoz kötött sejtek előzetes leválasztása nem mindig hatékony, ezen kívül igen költséges és időigényes folyamat, a kutatók többsége elsősorban a direkt lízist alkalmazza. Bármelyik módszert választjuk is a mikrobiális konzorciumok vizsgálatánál, kritikus pont a sejtek feltárásának hatékonysága. A Gram pozitív baktériumok, gombák sejtfalának feltárásához jellemzően durva fizikai kezelést (üveggyöngyös eldörzsölés, „bead beating” stb.) alkalmaznak. Ez viszont növeli az izolált DNS töredezettségét, mely az amplifikáció során műtermékek (kimérák) keletkezéséhez vezethet. Számos egyéb fizikai, kémiai vagy enzimátikus sejtfeltérési módszer ismert, ilyenek többek között a fagyasztás–felolvasztás; ultrahangos feltérás, mikrohullámú kezelés; melegítés 60–90°C-on, kémiai lízis detergens vegyületekkel (SDS, CTAB) proteináz K jelenlétében vagy enzimátikus lízis lizozimmal, pronázzal (bakteriális eredetű aspecifikus proteináz). A módszerek hatékonysága eltérő, ami a prokarióta sejtek eltérő sejtfalának köszönhető. Ennek elkerülésére, komplex mikrobiális összetétellel rendelkező mintáknál gyakran kombinálva alkalmazzák őket a kellő mértékű feltérás érdekében.



2. ábra Direkt és indirekt módszerek talajmintából történő DNS izoláláshoz²³.

A DNS izolálási módszerek talajminták esetén eltérő mennyiségű DNS-t eredményeznek és sokszor jelentős mennyiségű szennyeződés is része a preparátumnak. A kísérő szennyező anyagok – huminsavak, vastartalmú vegyületek – a későbbi enzimatis reakciókat gátolhatják, így gyakran PCR inhibitorok is lehetnek²⁴. Emiatt szinte mindig szükséges az izolált DNS utólagos, akár több lépcsőben lezajló tisztítása. Hatékony utótisztítási lépés a DNS agaróz gélből történő visszaizolálása; ioncserés kromatográfia; a DNS szelektív kötése szilika mátrixhoz^{25,26,27,28}. Az utólagos tisztítás hibája, hogy gyakran drasztikusan csökkenti a kinyerhető DNS mennyiségét, mely a mikrobiális konzorciumban kis egyedszámban jelenlévő fajok detektálását nehezíti meg vagy teszi lehetetlenné. A fenti tényezők a kutatót komoly dilemma elé állítják, abból a szempontból, hogy melyik módszer alkalmasabb a vizsgált környezeti minta feldolgozására. Hiszen, vagy nagy mennyiségű, sokféle ún. multitemplátot hordozó, de szennyezett DNS-t kell felhasználni, vagy egy nagy tisztaságú, de a valóságnál kisebb diverzitást hordozó mintából szükséges következtetni az

eredeti populációra. További nehézséget jelent, hogy az izolált DNS minősége a különböző módszerekkel eltérő mértékben reprodukálható. A reprodukálhatóság biztosításához az utóbbi időben már DNS izoláló és tisztító kit-eket alkalmaznak, azonban a kereskedelmi forgalomban lévő kit-ek sem mutatnak azonos hatékonyságot. Ezt támasztják alá Maarit-Niemi és munkatársai által publikált eredmények is, ahol öt különböző DNS izoláló kit-et és három DNS tisztítási kombinációt hasonlítottak össze²⁹. Az egyes eljárásokkal kapott DNS templátokkal végzett PCR-DGGE analízist követően arra a következtetésre jutottak, hogy a MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit alkalmazásával tudták a legjobban értékelhető és legreprodukálhatóbb PCR-DGGE mintázatot készíteni. Gelsomino és munkatársai különböző DNS extrakciós módszerekkel izolált templátokról készített DGGE mintázatainak esetleges eltérését elemezték. A fentiekkel némileg ellentétesen 90%-ban megegyező DGGE mintázatot kaptak direkt és indirekt DNS extrakciós módszerekkel egyaránt. Ugyanakkor szerintük a legnagyobb hibaforrás az extrakció reprodukálhatóságából adódik, és a tapasztalt kisebb eltérések főként az alacsony egyedszámban jelenlévő fajokból adódnak³⁰. Käser és munkatársai szerint a legnehezebb feladat szintén a kis egyedszámban jelenlévő, lassan szaporodó és/vagy kompakt sejtfallal rendelkező mikrobákból történő DNS izolálás. Ilyen baktérium például a *Mycobacterium tuberculosis*, amelynek összetett sejtfalában a peptidoglikán vázhoz D-arabinózon és D-galaktózon keresztül mikolsavak (3. ábra) – elágazó 2-alkil-3-OH zsírsavak hosszú zsírsavláncok – kapcsolódnak. Ilyen sejtfallal rendelkeznek az aktinobaktériumok (pl. *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Corynebacterium* spp. stb). A sejtfal felbontására Käser és munkatársai egy erőteljes 4%-os SDS tartalmú lízissel kiegészített DNS extrakciós módszert alkalmaztak, amellyel sikeresen tisztítottak nagy mennyiségű *Mycobacterium* DNS-t környezeti mintákból is³¹.



3. ábra A mikolsavak szerkezete.

3.2.2. Amplifikációs körülmények hatása a PCR–DGGE mintázatra

Minden ujjenyomat technikának szükséges része a DNS amplifikáció. A DNS felsokszorozása során több hibalehetőséggel érdemes számolni, amelyek lényegesen befolyásolják a végeredményként kapott mintázatot. Lehetséges hibafaktorok:

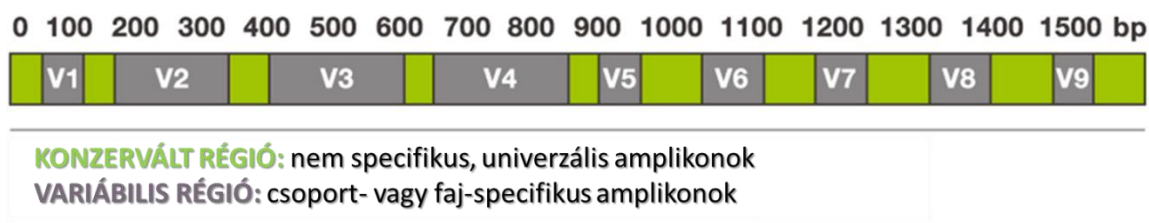
- az alkalmazott primerek szekvenciája,
- a bonyolult templát DNS összetétel,
- a PCR reakció ciklusszáma
- és a másolást végző DNS polimeráz tulajdonságai.

A PCR-DGGE mintázat eredménye nagymértékben függ a PCR során alkalmazott körülményektől³². A hibás DNS amplifikációból adódóan heteroduplex–ek, kimérák, mutációk vagy deléciók alakulhatnak ki^{33,34,35,36}. Egyes gének preferált amplifikációját okozhatja a primerek eltérő kötési energiája³⁷ vagy primer mismatch³⁸, ami végül eltérő relatív összetételhez vezet komplex mikrobiális rendszerek vizsgálatakor. További problémát okozhat a nehezen denaturálható, magas G/C tartalmú DNS templátok amplifikációja is, melynek elősegítésére DMSO-t vagy betaint alkalmaznak^{39,40}.

3.2.2.1. A primerek szekvenciájából adódó eltérések

Az egyik – talán legfontosabb – paraméter a megfelelő primerek kiválasztása, mely a vizsgálandó mikrobiális populációra jellemző terméket ad. A bakteriális összetétel vizsgálatokhoz alkalmazott rRNS-t kódoló gének konzervatív és variábilis szekvenciákat egyaránt tartalmaznak (4. ábra), mely alapján filogenetikai vizsgálatokat is végeznek. Az rRNS gének a baktériumtörzstől függően 1–15 kópiában egymás mellett találhatók meg a baktérium genomban⁴¹. A konzervált régiókra tervezett primerek segítségével a variábilis régiók amplifikálhatóak. Így az amplikonok a vizsgált minta diverzitásától függően eltérő szekvencia összetételűek lesznek és a variábilis régióból adódó diverzitás már közvetlenül felhasználható populáció összetétel vizsgálatokhoz. Az amplifikációhoz általában valamilyen univerzális (pl. eubaktériumoknál, archea baktériumnál 16S; élesztőgombák, fonalas gombáknál 26S vagy ITS), degenerált (egy vagy több helyen többféle nukleotidot tartalmazó) primereket használnak. A degeneráltság következményeként nem ugyanakkora hatékonysággal másolódik az összes potenciális templát, még a helyesen beállított

reakciókörülmények ellenére sem, és emiatt csökkenhet a maximálisan kimutatható fajok száma⁴².



4. ábra 16S rRNS gén variábilis és konzervált régiói. (<http://www.alimetrics.net>)

Környezeti minták vizsgálatakor, ha a primer nemzetség/genus (pl. *Pseudomonas* vagy *Dehalococcoides* specifikus) vagy katabolikus gén (*amoA*, *dsrB*) specifikus, a PCR természetesen kisebb valószínűséggel okoz téves ampikont, mivel a primer specifitásából adódóan kisebb diverzitású mintázatra számíthatunk, mint egy univerzális mikrobiális összetétel vizsgálatban.

3.2.2.2. A templát összetétel hatása

A környezeti mintákat rendkívüli fajgazdagság jellemzi, akár néhány ezer különböző fajból származó DNS szekvencia is jelen lehet az amplifikáció során. Ezek között nagy hasonlóság is előfordulhat, ami az ampikonok kombinálódásához vezethet (ún. heteroduplexek a heterológ szekvenciák kereszt-hibridizációjából). Így olyan műtermékek (fals ampikonok) jelenhetnek meg, amelyek nem egyedi élőlényből származó, hibás DNS kombinációt tartalmaznak.^{32,36} A heteroduplex képződés elsősorban a primer templát koncentráció csökkentésével és a PCR ciklusszám változtatásával csökkenthető.⁴³

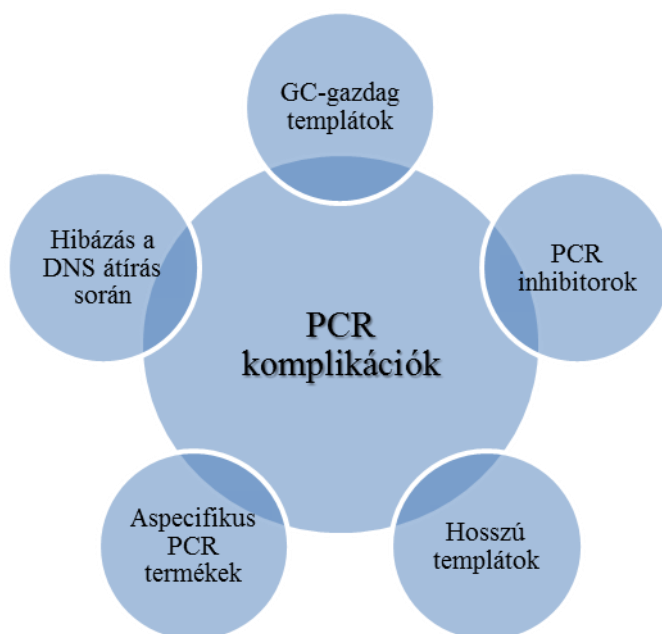
3.2.2.3. A PCR reakció ciklusszáma

A PCR során az ampikonok mennyisége csak egy bizonyos ciklusszámig arányos a kiindulási termékekkel. A másolási hatékonyság csökkenésével, nagy ciklusszám alkalmazásakor a kiindulási multitemplátban lévő mennyiség különbségek a reakció végére részben kiegyenlítődnek. Ez a torzítás eredményezi azt, hogy a domináns és az alacsony egyedszámban jelenlévő baktériumok azonos intenzitású fragmentként jelennek meg a PCR–DGGE mintázatban. A rossz hatékonysággal amplifikálódó – többnyire magas G/C tartalmú – DNS templátok pedig a végeredményben, sok esetben egyáltalán nem mutathatóak ki⁴⁴. Ez

végül ahhoz vezet, hogy nagyon komplex összetételű minták esetén is a végeredményként kapott ujjlenyomaton csak 40–45 domináns baktérium jelenik meg.

3.3. A DNS polimerázok tulajdonságai

A DNS polimerázok döntő szerepet játszanak a DNS átírásban és javításban és ebből adódóan a molekuláris biológiai módszerekben alkalmazott PCR reakciókban. A hőstabil DNS polimerázokat a molekuláris biológiai módszerek széles spektrumában alkalmazzák, viszont a kapott eredmény függ az enzim pontosságától, exonukleáz aktivitásától, átírási sebességétől, és extra nukteolid beépítő (*bunt end* vagy *overhang*) képességétől⁴⁵. A DNS szintézis során fellépő problémák (5. ábra) megoldására, különböző tulajdonsággal rendelkező DNS polimeráz enzimek alkalmazhatóak.



• 5. ábra DNS polimeráz enzimhez kapcsolódó amplifikációs hibák.

3.3.1. Nehezen amplifikálható templátok

Gyakori probléma a hosszú, magas G/C tartalmú vagy hosszú szekvenciák másolása. Szakirodalmi adatok alapján a 80% feletti G/C pár tartalom és/vagy 10kb feletti templát méret esetén az amplifikáció már nehezen valósítható meg⁴⁶.

3.3.2. Aspecifikus PCR termékek

Aspecifikus amplikonok keletkezhetnek, ha a DNS polimeráz alacsony hőmérsékleten (4–25°C) is aktív. A reakció összemérésekor a primerek alacsony hőmérsékleten (*annealing*,

azaz hibridizációs hőmérsékletük alatt) is hibridizálhatnak egy nem komplementer templáthoz, amit az alacsony hőmérsékleten aktív enzim nem specifikus termékeként amplifikál. Ennek a hibának a kiküszöbölésére fejlesztették ki az ún. „hot-start” enzimeket, melyek tartalmaznak egy hőérzékeny enzimblokkoló csoportot. Ez az enzim gátló csoport leválik magas hőmérsékleten (94–95°C), és ez által aktiválja az enzimet⁴⁷.

3.3.3. Hibás DNS átírás

A DNS polimerázok csökkent pontosságából adódóan hibás (nem megfelelő nukleotidot tartalmazó) amplikonok keletkezhetnek. A nem megfelelő nukleotid beépítés javítására egyes DNS polimerázok hibajavító rendszert (3'→5' exonukleáz domén) tartalmaznak. Ez a domén felelős a hibásan beépített nukleotid leválasztásáért, ami lehetővé teszi a komplementer bázis beépítését⁴⁵.

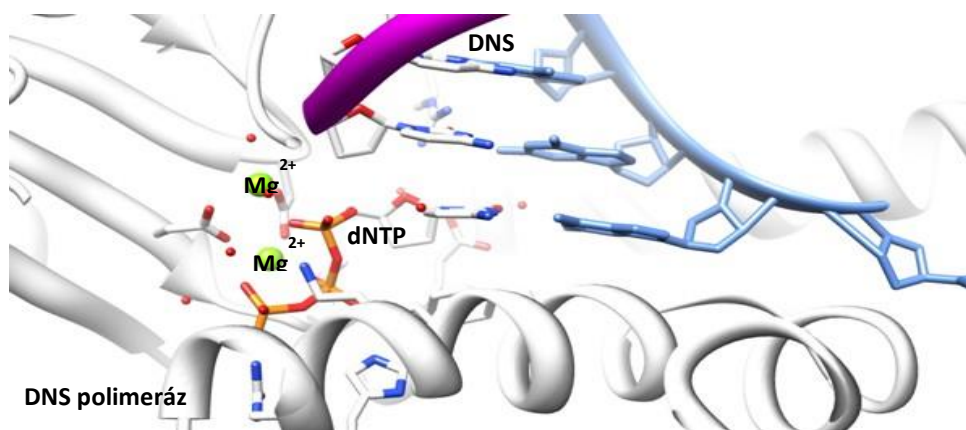
3.3.4. PCR inhibitorok

A PCR egy enzimatikus reakció és ebből adódóan érzékeny olyan anyagok jelenlétére melyek gátolják az enzim működését. Ezek az ún. PCR inhibitorok részlegesen vagy teljes mértékben gátolhatják a reakciót, ezáltal fals negatív vagy csökkent érzékenységgű reakcióhoz vezetnek. A PCR inhibitor komponensek forrása a legtöbb esetben maga a minta mátrixa, mely a minta feltárását követően együtt extrahálódik a DNS-el^{48,49,50}. A mikrobiális ujjlenyomat vizsgálatok sokszor többlépéses (nested) PCR reakciók, mely során az inhibitor komponensek a PCR minden lépésében okozhatnak interferenciát. Hatásuk meglehetősen széles spektrumú, jellemzően koncentrációfüggő⁵¹ és eltérő a PCR reakciók során⁵². Az inhibitorok jelenléte már egyféle templát esetében is problémát okozhat a reakció során, de multitemplátról történő PCR során különösképpen fals eredményekhez vezethet.^{33,53,54}

Szervetlen komponensek (kationok)

A PCR inhibitorok egy igen heterogén csoportja a kémiai anyagoknak és az egyes mátrixok akár több inhibitor komponenst is tartalmazhatnak. Szervetlen komponensek közül a legjelentősebbek a kationok (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} és Ca^{2+}). A kalciumion, mint kétértékű kation, méretéből és töltéséből adódóan lehetséges kompetitora a magnéziumionnak, mely a polimeráz enzimek kofaktora. A magnéziumion felelős egyrészt a polimeráz enzim megfelelő

konformációjának kialakításáért, másrészt a dNTP molekula α -foszfát csoportjához kötődve segíti a dNTP másik két foszfát csoportjának leválasztását (6. ábra). Ennek következménye, hogy a Mg^{2+} koncentráció jelentősen befolyásolja az enzim aktivitását és ez által a PCR reakció működését. A túl alacsony Mg^{2+} koncentráció esetén előfordul, hogy a DNS polimeráz enzim nem tudja felvenni az amplifikációhoz szükséges konformációt, ezért kevesebb termék keletkezik. De ugyancsak gondot okoz a reakció során, ha túl magas a Mg^{2+} koncentráció, ahol a megnövekedett primer-templát komplex stabilitásából adódóan nem specifikus PCR termékek vagy hibás másolások keletkeznek a nem megfelelő nukleotid (dNTP) beépítésből.



6. ábra Taq DNS polimeráz aktív centrumának szerkezete az amplifikáció során.

Mindebből látszik, hogy a Mg^{2+} ionnak kiemelt jelentősége van a DNS templát másolása során, így egy versengő ion – mint a Ca^{2+} – gyakran gátolhatja a reakció sikerességét. A Ca^{2+} elsősorban a csontokban, szövetekben található nagy mennyiségben, amellyel főként az archeológiai és igazságügyi vizsgálatok során kell számolni⁵⁵, de ugyancsak magas koncentrációban fordul elő a tejtermékekben, ami szintén gondot jelenthet élelmiszerek PCR alapú vizsgálatainál⁵⁶.

Egy összehasonlító tanulmány szerint, a polimeráz enzimek közül a Taq (Taq és AmpliTaqGold) a legérzékenyebb a Ca^{2+} mennyiségére (1. táblázat). Fontos viszont megjegyezni, hogy nem önmagában a Ca^{2+} koncentrációja határozza meg, hogy egy reakció gátolt-e. Mivel a Ca^{2+} a Mg^{2+} kompetítora, így a Ca^{2+} mellett a Mg^{2+} koncentrációjának emelésével a Ca^{2+} gátló hatása csökkenthető^{50,56}. Ez utóbbi az oka, hogy egyes tudományos publikációkban eltérő érték (0,2–3mM) található az enzim Ca^{2+} toleranciájára^{56,57,58}.

DNS polimeráz*	Ca ²⁺ koncentráció (mM) 1ng DNS templát mellett						
	0.2	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
Ampli Taq Gold	++	--	---	---	---	---	---
Expand High Fidelity	++	++	++	---	---	---	---
Hot Tub	++	++	++	++	---	---	---
Pwo	++	+-	---	---	---	---	---
$rTth$	++	++	---	---	---	---	---
Taq	++	---	---	---	---	---	---
Tfl	++	++	+-	---	---	---	---
Tli	++	++	---	---	---	---	---
$Ultma$	++	++	---	---	---	---	---

+, nem gátolja a PCR reakciót; ±, részben gátolja a PCR reakciót; –, teljesen gátolja a PCR reakciót⁵⁸

Ampli Taq Gold DNS polimeráz (*Thermus flavus*); **Expand High Fidelity** (Expand HF) két DNS polimeráz keveréke (Taq [*Thermus aquaticus*] és Pwo [*Pyrococcus woesei*]); **Hot Tub** DNS polimeráz (*Thermus ubiquitous*); **Pwo** DNS polimeráz [*Pyrococcus woesei*]; **$rTth$** DNS polimeráz (*Thermus thermophilus*); **Taq** DNS polimeráz [*Thermus aquaticus*]; **Tfl** DNS polimeráz (*Thermus flavus*); **Tli** DNS polimeráz (*Thermus litoralis*); **$Ultma$** DNS polimeráz (*Thermotoga maritima*)

1. táblázat Ca²⁺ ion amplifikáció gátló hatása különböző hőstabil DNS polimerázoknál.

Szerves komponensek

A PCR inhibitorok jelentős része szerves vegyület. E vegyületek egy része, mint a fenol, etanol, poliszacharidok, SDS, CTAB, szacharóz, az izolálás során kerülnek a DNS-t tartalmazó oldatba⁵⁹. E komponensek jelenlétének elkerülésére a legcélravezetőbb olyan DNS utótisztítási protokoll megválasztása, mellyel jelenlétük minimálisra csökkenthető. Erre manapság már bármelyik kereskedelmi forgalomból beszerezhető DNS tisztító kit alkalmas. A minta mátrixából azonban ezeken kívül még számos inhibitor komponens kerülhet a PCR reakció elegybe:

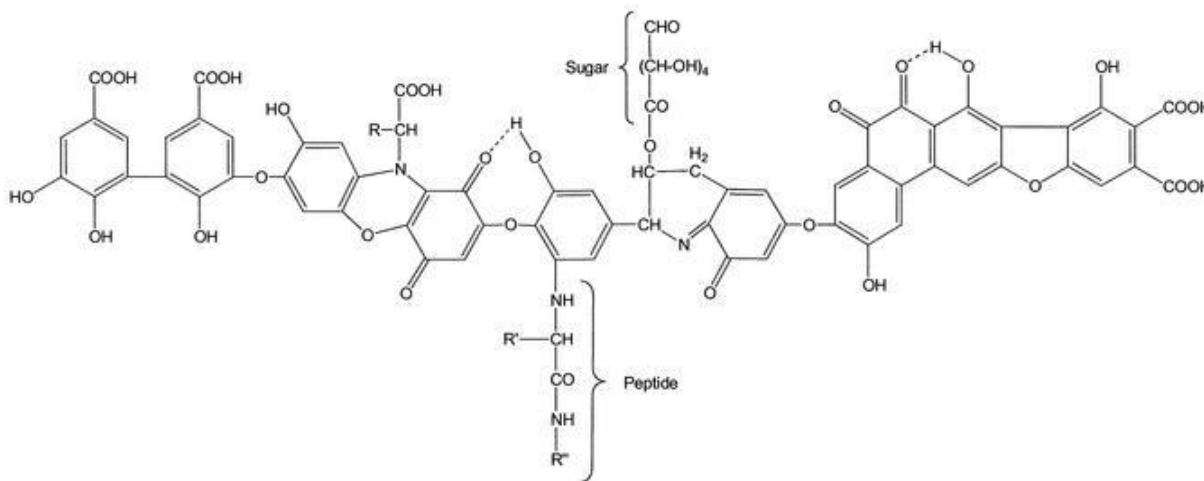
- talaj, talajvíz mintáknál elsősorban huminsavak, tanninok, polifenolok, fulvosavak^{60, 61}
- humán vér-, szövetmintáknál a mioglobin, hemoglobin, heparin, IgG, laktoferrin, proteinázok, melanin^{62, 63, 64}
- paleontológiai, archeológiai mintáknál Maillard termékek, csontalkotók, kollagén^{65, 66}
- növények, élelmiszerek esetében fenolok, poliszacharidok, pektin, proteázok^{67, 68}

Huminanyagok

A huminanyagok PCR-re gyakorolt gátló hatása kiemelten kutatott terület, mivel talajmintákból történő DNS alapú mérés szükséges mind az agrárium, bioremediációs kármentesítés, paleontológiai, archeológiai leletek, de még igazságügyi, kriminológiai vizsgálatok során is. A huminanyagok jellemzően amorf, sötét színű szerves komponensek keveréke, melyek állati és növényi maradványok kémiai/biológiai lebomlása során keletkeznek⁶⁹. Oldhatóságuk alapján a huminanyagokat három csoportba sorolják:

- (1) fulvosavak (FA), melyek gyakorlatilag savas és lúgos közegben is oldódnak,
- (2) huminsavak (HA), melyek savas közegben kicsapódnak,
- (3) és azok a komponensek, melyek a huminanyagok oldhatatlan komponensei.

A DNS izolálást jellemzően pH=7–8 kémhatású, pufferelt közegben végzik, ezért elsősorban a fulvosavak és huminsavak okozta szennyezésekkel kell számolni, de természetesen a huminanyag tartalom függ az alkalmazott DNS izolálási módszertől⁷⁰. A huminsavak nem jellemezhetőek egy egzakt molekulaszervezettel. Jellemzően aromás, heterociklusos gyűrűk és kinonok kapcsolódnak random az alifás csoportokhoz (7. ábra). Oldalláncukon poliszacharidok, peptidek és funkciós csoportok (karboxil, karbonil, fenolos, alkoholos hidroxid) találhatók, melyek alapvetően befolyásolják a huminsav kémiai tulajdonságait.



7. ábra A talajban előforduló huminsavak általános szerkezeti képlete.⁷¹

A huminsavak szerkezetükből adódóan hasonló fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkeznek, mint a nukleinsavak⁷², emiatt a DNS-t kiszoríthatják az adszorpciós helyekről a tisztítási lépések során⁷³, ami csökkenti a DNS kinyerés hatékonyságát. Ennél komolyabb problémát okoznak a PCR reakció során, mivel – főként savas körülmények között – a szabad

DNS molekulákhoz kötődve csökkentik a DNS–DNS hibridizáció hatékonyságát, vagy „csapdázva” a DNS-t, a polimeráz enzim számára teszik hozzáférhetetlenné^{24,70,74}. Funkciós csoportjaikból adódóan képesek a fémionok kelátolására, így a Mg^{2+} kötésére, melynek hiányában a polimeráz enzim inaktívvá válik⁷⁵. A klasszikus PCR-en kívül a huminanyagok jelenléte a kvantitatív PCR (qPCR) során is komoly problémákat okozhat. Elsősorban olyan qPCR során, ahol a fluoreszcens festékek (SYBR Green, Eva Green, Pico Green) interkalálódnak a reakció során keletkező kettős szálú DNS molekulákhoz, és a mért gén mennyiség a festék-DNS fluoreszcencia intenzitásával arányos. A huminanyagok közül a huminsav esetében igazolták, hogy a fluorofórfesték/DNS komplexhez képes kötődni, és mint statikus és dinamikus kioltó (quencher) molekula, a fluoreszcens jelintenzitást csökkenti⁷⁶. Ennek következményeként a qPCR során, a fluoreszcencia gátlásból adódóan, még huminsav rezisztens DNS polimeráz enzim alkalmazása mellett is fals eredményt kaphatunk. Egy talaj, típusától függően, akár 5–8 mg/g huminanyagot is tartalmazhat, amelynek közel 1%–a DNS izolálást követően is a DNS-t tartalmazó oldatban marad²⁴. Ez az adat egyértelműen tükrözi, hogy a PCR reakció során érdemes számolni a jelenlétével. Természetesen manapság már számos olyan DNS tisztítási módszer hozzáférhető, amivel nagy tisztaságú DNS állítható elő – leginkább a mágneses gyöngyös eljárások –, viszont olyan minták vizsgálatakor, amikor csak korlátozott mennyiség áll rendelkezésre (pl. archeológiai minták, igazságügyi vizsgálatok), vagy a multitemplát vizsgálatok során, ahol az alacsony egyedszámban jelenlévő mikroorganizmusok kimutatása is szükséges, nem biztos, hogy a legnagyobb tisztaságú DNS tisztítási módszer alkalmazásával a valódi összetétel reprezentálható.

Vér PCR gátló komponensei

A vér az egyik leggyakrabban vizsgált PCR inhibitor anyag. Már 0,004 v/v%-os jelenléte is teljes mértékben gátolja az *AmpliTaq* és *Taq* DNS polimerázok működését⁷⁷. Ezt a PCR gátló hatást korábbi feltételezések a hem, antikoagulánsok és EDTA Mg^{2+} kelátoló tulajdonságához kötötték. Ezt követően bizonyították, hogy több olyan molekula is található a vérben, ami a DNS-hez vagy a polimeráz enzimhez kötődve gátolja a PCR reakciót. Nem elhanyagolható gátló hatása van az immunglobulinoknak (IgG) is. Az IgG hő hatására az egyszálú DNS molekulához kötődik így gátolja a templát DNS másolását⁷⁷. Meglepő módon egyes DNS polimeráz enzimek – mint a *rTth* DNS polimeráz (*Thermus thermophilus*) – mellett nem tapasztalható gátlás. Ezt jelenleg az enzim egyedi szerkezetével magyarázzák⁷⁸.

Hasonló PCR gátló hatása van a véralvadásgátlóként alkalmazott heparinnak, ami kapcsolódhat szintén a DNS templáthoz vagy a polimeráz enzimhez^{79,80}. A véralkotók közül szintén igazolt PCR gátló hatása van a hemoglobinnak és laktoferinnek. Ezeknek a fehérjéknek a hatását egyrészt vas ionjukhoz, másrészt a molekulák DNS kompetítor hatásához kötik^{77,81,82}. A vér okozta PCR inhibíció csökkentésére egy ígéretes megoldás szérumalbumin (BSA - bovine albumin serum), betain, Chelex gyanta vagy gp32 (T4 gene 32 protein) hozzáadása a reakcióelegyhez^{39,77}.

A DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenysége eltérő. Több enzim (*Tfl*, *Tli* és *Pfu*) esetében igazolták, hogy akár 20% vért tartalmazó reakcióelegyben is képes a kívánt méretű termék amplifikálására⁵⁸. Sőt, a *Taq* polimeráz rezisztenciája is nagyságrendekkel (0,004v/v%-ról akár 20v/v%-ra) növelhető a fehérje 708-as pozíciójában lévő glutamin cseréjével⁸³. A kereskedelmi forgalomban is számos vér komponensekre rezisztens DNS polimeráz elérhető. Legjelentősebbek a KOD FX, Mighty Amp, Hemo KlenTaq, Phusion Blood II, KAPA Blood, és BIOTAQ, melyek közül a KOD FX és BIOTAQ esetében igazoltak kiemelkedő rezisztenciát (~40v/v% vér), sőt a KOD FX a BIOTAQ-kal szemben a 40v/v% vérhez még 0,05% Tween 20 hozzáadása mellett is képes a megfelelő méretű termék amplifikálására. Az összehasonlító tanulmányban a szerzők az eredmények alapján egyértelműen a KOD FX DNS polimeráz enzimet tartják a legalkalmasabbnak paraziták, patogének vérből történő azonosítására⁸⁴.

3.4. DNS polimeráz enzimek

Az előző fejezetben részletezett hatások mind hozzájárulhatnak, hogy az amplifikáció során fals negatív eredményt vagy nem megfelelő méretű amplikont kapjunk. Ezeknek a hibáknak a kiküszöbölésére ma már a kereskedelmi forgalomból számos natív enzim vagy genetikai módosítással előállított DNS polimeráz enzim beszerezhető.

3.4.1. Natív DNS polimeráz enzimek

A DNS polimeráz enzimek a DNS templát irányított szintéziséért felelős katalitikus enzimek. Az első nukleinsavakat tartalmazó szervezetek megjelenése óta – földtörténeti kutatások alapján közel 3,5–3,8 milliárd éve – tart a nukleinsavak szintéziséért felelős enzimek evolúciója a megfelelő sebességű és pontosságú genetikai információ átírásáért és továbbításáért.

A DNS polimeráz enzimek osztályozását először – közel 20 évvel ezelőtt – Ito és Braithwait írta le, akik az enzimek aminosav sorrendje alapján négy családot (A, B, C és X) különböztettek meg⁸⁵. Az utóbbi évtized nagy mennyiségű szekvencia adatainak ismeretében ezek az – elsősorban filogenetikai azonosságra épülő – csoportosítások újraértékelődtek és jelenleg hét fő DNS polimeráz enzim típust (családot) különböztetnek meg (2. táblázat).

Az „A” családhoz tartozó DNS polimerázok a legjobban feltérképezett enzimek a hét család közül. Ide tartoznak a már szinte „állatorvosi lónak” nevezhető *Escherichia coli* (*E. coli*) Klenow fragment, *Bacillus subtilis* DNS polimeráz I., *Taq* polimeráz, T7 RNS és DNS polimeráz és a Kronberg által jellemzett *E. coli* DNS polimeráz I is⁸⁶. A *Taq* polimeráz I a *Thermus aquaticus* törzs enzime, melyet talán a legtöbben alkalmaznak a világon. Először 1976-ban a Yellowstone Nemzeti Park 70°C-os forrásából izolálták⁸⁷. Mivel az enzim aktivitását megőrzi a DNS kettősszál denaturálásához szükséges hőmérsékleten is – jellemzően 94 C-on –, ennek az enzimnek felfedezése adott lehetőséget olyan reakciók kivitelezésére, melyben az ismétlődő ciklusok során (denaturáció, primer hibridizáció, extenzió) egy DNS szakasz felsokszorozható anélkül, hogy az egyes ciklusok előtt újabb és újabb enzimet kelljen adni a reakcióelegyhez. Ez alapozta meg, hogy a PCR végül rutin laboratóriumi technikává nője ki magát. A kilencvenes évek során az enzim–DNS együttes kristályos szerkezetének vizsgálatával már az enzim katalitikus részei, aktív centrumai is tanulmányozhatóvá váltak⁸⁸.

Az *E. coli* DNS polimeráz I.-hez hasonlóan a *Taq* DNS polimerázról is levágható egy aktív alegység úgy, hogy megőrizze polimeráz tulajdonságát, így jött létre a ma már csak Klenoq-ként ismert DNS polimeráz. Az enzim működésének részletesebb feltérképezése Li és munkatársai nevéhez kötődik, akik az enzim/primer/templát DNS együttes kristályos szerkezetének létrehozásával az enzim aktív konformáció változásait is azonosítani tudták⁸⁹. Az A családba tartozó DNS polimeráz enzimekben eddig hat konzervált régiót azonosítottak, melyekből kettő (A és B alegységek) a DNS átírás pontosságáért és szubsztrát specifitásért felel⁹⁰.

DNS polimeráz enzim típusok (családok)		tulajdonság	DNS polimeráz enzim	másolási sebesség kbp/perc	pontosság	hivatkozás
A	baktériumok vírusok, eukarióták	5'–3' exonukleáz egyes enzimeknél 3'–5' exonukleáz	Taq	1–4,8	$1,8 \times 10^{-4}$ – 8×10^{-6}	91
			Tfl és Tth	1,5–4	8.3 – 9.0×10^5	92
			Tbr	n.a.	n.a.	93
			Tca	1–2,3	n.a.	93
			Hot Tub	n.a.	n.a.	94
			Tma	n.a.	$7,4 \times 10^{-5}$ – $3,2 \times 10^{-}$	94
			Tne	n.a.	5	
B	γ –proteo– baktériumok eukarióták archeák vírusok	3'–5' exonukleáz	KOD	6–7,8	$2,6 \times 10^{-6}$	95
			Tli (Vent TM)	1,0	$4,5 \times 10^{-5}$ – $2,8 \times 10^{-6}$	96
			Pab (Isis TM)	0.48	$6,7 \times 10^{-6}$ – $6,6 \times 10^{-7}$	97
			Pfu	0,5–1,5	$2,2 \times 10^{-6}$ – $0,7 \times 10^{-6}$	82
			Deep Vent TM	1,4	$1,2 \times 10^{-5}$ – $2,7 \times 10^{-6}$	82
			Pwo	n.a.	n.a.	
			Tgo	1,5	$5,6 \times 10^{-6}$ – $3,5 \times 10^{-6}$	98
			Tfu	0,32	$5,3 \times 10^{-5}$ – $2,8 \times 10^{-6}$	99
			Tpe	2	$3,4 \times 10^{-6}$	100
			Tzi	0,5–1,0	2×10^{-6}	101
C	baktériumok kriptikus fágok plazmidok	3'–5' exonukleáz	Pol III			102
						103
D	Metanogén, halofil, hipertermofil archeák	3'–5' exonukleáz	Pfu–Pol D Pab–Pol D			104
						105
X	eukarióták	3'–5' exonukleáz	Pol β, λ, μ			106
Y	baktériumok eukarióták archeák	3'–5' exonukleáz	Pol IV, Pol V, Pol ι, κ			107
RT	eukarióták retrovírusok	reverz transzkriptáz telomeráz	HIV RT telomeráz			108

2. táblázat Polimeráz enzimek és csoportosításuk.¹⁰⁹

A kereskedelmi forgalomba került enzimek között főként az A és B típusú DNS polimeráz enzimek találhatók meg¹¹⁰, azonban a molekuláris biológiai módszerek egyre szélesebb körű alkalmazása újabb és újabb enzimek keresésére ösztönzi a kutatókat. Az, hogy egy adott PCR alapú módszerhez melyik a legalkalmasabb DNS polimeráz, számos tényezőtől függ:

- DNS polimeráz enzim hőstabilitása – DNS polimeráz enzim 95 C–100°C közötti élettartama,
- vizsgált minta mátrixa,
- amplikon hossza,
- a templát DNS guanin–citozin tartalma, szekvenciája¹¹¹
- ionösszetétel, dNTP koncentráció^{112,113}

egyéb adalékok, mint DMSO, formamid, BSA, etilén–glikol vagy 1,2–propán–diol alkalmazása^{114, 115, 116, 117}.

KOD DNS polimeráz enzim

A kísérleteink során egy kevésbé ismert DNS polimeráz enzimet, a *KOD* DNS polimeráz enzimet (KOD Hot Start, Novagen) alkalmaztuk.

A *KOD* DNS polimeráz enzimet a '90-es években, Japánban, a Kodakara szigeten található 102 °C-os vulkanikus hőforrásból (8. ábra- 9. ábra) izolált hipertermofil archaea *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (korábbi nevén *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1) törzsből azonosították és jellemezték először⁹⁵.



8. ábra Kodakara sziget, Japán



9. ábra Solfatara (Kodakara, Japán)

A KOD1 törzsben azonosított B családba tartozó DNS polimeráz, a *Taq* DNS polimerázhoz képest több kiemelkedő tulajdonsággal rendelkezik:

- 3'→5' exonukleáz, hibajavító aktivitás,

- magas processzivitás (>300 bázis),
- kiemelkedő másolási sebesség (106–138 bp/másodperc)

A *KOD* DNS polimeráz enzim nemcsak a *Taq* DNS polimerázzal szemben mutat kedvezőbb tulajdonságokat. A hipertermofil *Pyrococcus furiosus* ősbaktériumból származó DNS polimeráz enzimet (*Pfu*) a *Taq* polimeráznál jelentősen nagyobb hőstabilitása és hibajavító tulajdonsága miatt alkalmazzák olyan PCR reakció során, ahol fontos a pontos másolás. A *KOD* DNS polimeráz enzim rendelkezik a *Pfu* enzim számos előnyös tulajdonságával, mindemellett processzivitása és másolási sebessége is magasabb (3. táblázat). A *Pyrococcus* sp. KOD1 archaea törzsből izolált *KOD* DNS polimeráz enzim ötször nagyobb másolási sebességgel (100–130 nukleotid másodpercenként) és több mint tízszeres processzivitással rendelkezik, mint a *Pfu*, miközben mutációs gyakorisága hasonló (4. táblázat)¹¹⁸. A *Pfu* enzim hátránya, hogy másolási sebessége kisebb, mint a *Taq* polimerázé, 1–2 perc alatt amplifikál 1 kbp méretű DNS szakasz-t 72°C-on.

tulajdonságok	DNS polimeráz enzimek		
	KOD DNS polimeráz	Pfu DNS polimeráz	Taq DNS polimeráz
Eredet	ősbaktérium	ősbaktérium	baktérium
Molekula méret (kDa)	90.0	90.1	93.9
optimális hőmérséklet (°C)	75	75	75
pH optimum 75 °C-on	6.5	6.5	8.0–8.5
hőstabilitás („élettartam”)	95°C-on 12 óra; 100°C-on 3 óra	95°C-on 6 óra; 100°C-on 2.9óra	95°C-on, 1.6 óra
5'→3' exonukleáz aktivitás	nincs	nincs	van
3'→5' exonukleáz aktivitás	van	van	nincs
terminális transzferáz	–	–	+
processzivitás (nukleotid)	>300	<20	
másolási sebesség (nukleotid/másodperc)	106–138	25	61

3. táblázat DNS polimeráz enzimek tulajdonságai.

A *KOD* DNS polimeráz enzim folyamatos fejlesztésének eredménye, hogy jelenleg már két olyan módosított változata is elérhető, ami másolási pontosságában megközelíti (*KOD FX*)

vagy akár felül is múlja (KOD Plus) a *Pfu* DNS polimerázt (4. táblázat).

	Mutáció gyakoriság ($\times 10^{-5}$)
KOD Plus DNS polimeráz enzim	3.4
KOD FX DNS polimeráz enzim	13.1
<i>Pfu</i> DNS polimeráz enzim	10.6
<i>Taq</i> DNS polimeráz enzim	141.2

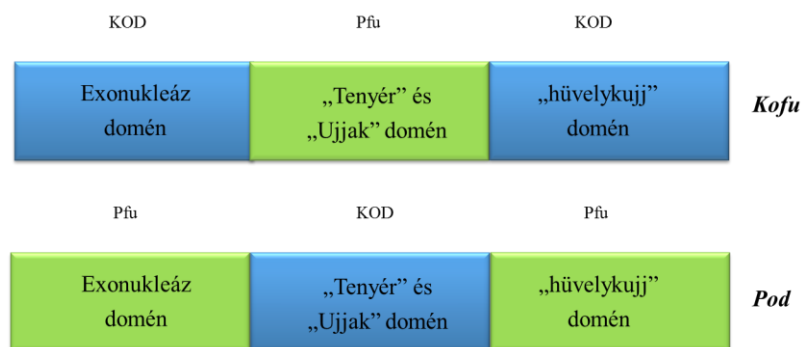
4. táblázat KOD DNS polimeráz enzimek mutációs gyakorisága.
(<http://www.toyobo-global.com>)

A KOD DNS polimeráz enzimet azért választottuk az összehasonlító vizsgálatainkhoz, mert alkalmazásával korábbi kísérleteink során sikeresen amplifikáltunk nagyméretű G/C gazdag templátokat¹¹⁹, valamint az alacsony mutációs gyakoriságából, processzivitásából és másolási sebességéből adódóan ígéretes enzimnek látszott pontosabb és gyorsabb amplifikációkhoz mikrobiális összetétel vizsgálatok során.

3.4.2. Módosított DNS polimeráz enzimek

DNS polimeráz enzimek módosításával számos, a különböző natív enzimekben jelenlévő előnyös tulajdonságok egyesíthetők. A módosítás mutációval vagy alegységek fúziójával valósítható meg. Mutációval növelhető az enzim hőstabilitása, inhibitor rezisztenciája¹⁰⁶ vagy a fehérje alegységek fúziójával az enzim pontossága, processzivitása. Egyik ilyen fúzióval előállított enzimcsoport a *kiméra DNS polimeráz enzimek*. Ezeknél a polimeráz enzimeknél különböző eredetű, polimerizáció szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező fehérje alegységeket kapcsolnak össze. Ilyen például az N-terminális végén *Tth* és C-terminális végén *Taq* alegységet tartalmazó kiméra DNS polimeráz enzim¹²⁰. A kiméra enzimek nemcsak az egyes alegységek tulajdonságaival rendelkeznek, hanem a fúziót követően a natív enzimhez képest jellemzően jobb tulajdonságokat is mutatnak. Például, a *Tth-Taq* kiméra DNS polimeráz enzim hibázási gyakorisága hatszor alacsonyabb, mint a *Tth* enzimé¹²⁰.

Másik példa a kiméra enzimre a *Pod* és *Kofu*, melyek a *Pfu* és KOD DNS polimerázok doménjeit tartalmazzák. A *Kofu* a KOD N-terminális exonukleáz és C-terminális (*thumb*) alegységeit tartalmazza, míg a „tenyér”(*palm*) „ujjak”(*finger*) domén a *Pfu* polimerázból származik (10. ábra).



10. ábra *Kofu* és *Pod* kiméra DNS polimeráz enzimek alegységei.

A *Kofu* másolási sebessége (106–138 nukleotid/másodperc) és processzivitása (<300 nukleotid) hasonló a *KOD* polimerázéhoz, míg másolási pontossága megegyezik a *Pfu*-ével ($2,0 \times 10^{-6}$). Míg a *Pod* másodpercenként 25 nukleotidot másol, processzivitása (<20 nukleotid) és hibázási gyakorisága a *KOD*-dal megegyező ($4,45 \times 10^{-6}$)¹²¹. Ez utóbbi kiméra polimerázokat a Kapa Biosystem szabadalmaztatta is 2010-ben.

Módosított DNS polimeráz enzimek egy másik jelentős csoportját alkotják a *fúziós DNS polimeráz* enzimek. A *fúziós* enzimekben a fuzionáltatott alegység elsősorban a DNS (egyszálú vagy kettős szálú) stabilizálásáért felel. Az egyik ilyen alegység az Sso7d fehérje, ami egy hipertermofil archaea baktériumnak (*Sulfolobus solfataricus*) a 7kDa méretű, kettős szálú DNS kötő fehérjéje. Ez az alegység felelős a natív enzimben a kettős szálú, genomiális DNS stabilizálásáért, ezáltal megkönnyítve a DNS polimeráz enzim működését¹²². A *Taq* és *Pfu* polimeráz enzimek esetén Wang és munkatársai igazolták először, hogy a Sso7d alegység fúziójával előállított enzimek esetében a processzivitás nagyságrendekkel növelhető (*Pfu* esetében tizenhétszerese, mint a natív enzimnek)¹²³. Hasonlóan, a *Tpa* (*Thermococcus pacificus*) és *KOD* polimeráz enzimek esetében is hasonló mértékű processzivitás növekedést tapasztaltak¹²⁴. A másik fehérje, amit szintén *fúziós* polimeráz enzimek konstrukciója során alkalmaznak, az egyszálú DNS kötésért felelős SSB (*Single Strand Binding*) fehérje. 2013-ban szabadalmaztatták az első ilyen *fúziós* DNS polimeráz enzimet, amely a *Tzi* (*Thermococcus zilligii*) DNS polimeráz enzimét és az SSB fehérjét tartalmazza¹²⁵. A *fúziós* DNS polimeráz enzimek közül eddig csak a *Phusion* (*Pfu* DNS polimeráz enzim Sso7d fehérje alegységgel) enzim került kereskedelmi forgalomba. Az enzim előnyös tulajdonságainak a kiemelkedő másolási pontosságot, specifitást és a hosszú, G/C gazdag templát másolási képességét tartják.

3.4.3. DNS polimerázok közötti eltérések és feltételezett hatása a PCR-DGGE mintázatra

A DNS polimerázok csak bizonyos pontossággal végzik a DNS másolását. A mindenképpen megjelenő hibákat (pont mutációk) egyes polimerázok képesek korrigálni (3'–5' exonukleáz tartalmazó ún. proofreading DNS polimerázok), mások nem rendelkeznek ilyen hibajavító képességgel (pl. *Taq* DNS polimeráz). Ennek eredményeképpen a másolási hibák feldúsulnak az amplikonokban, így mutáns amplikonok keletkeznek. Mivel a PCR–DGGE képes egy–két nukleotid szekvencia eltérés felbontására is, ez hamis eredmények megjelenését okozhatja a mintázatban.

A PCR–DGGE vizsgálatokhoz túlnyomó többségben a *Taq* DNS polimerázt alkalmazzák annak ellenére is, hogy számos hibajavításra képes polimeráz is hozzáférhető kereskedelmi forgalomból. Ilyen polimeráz enzimek például a *Pfu*, *Vent*, valamint a kísérleteinkben alkalmazott *KOD* és *Phusion* is, amelyek lényegesen kisebb valószínűséggel építenek be hibás nukleotidot az amplikonba. Mindebből arra következtethetünk, hogy a PCR–DGGE pontosságának növelése érdekében előnyös lenne hibajavító funkcióval rendelkező polimeráz enzimet alkalmazni, azonban ennek részletes elemzésére vonatkozólag csak kevés irodalmi adat található.

Mindezekon kívül, bizonyos szekvencia összetételű templátok a polimeráz enzimek eltérő karakteréből adódóan eltérő hatékonysággal (könnyebben vagy nehezebben) másolhatóak. A *Taq* polimeráz enzim esetében igazolt, hogy G/C gazdag templátokat a B típusú polimeráz enzimekhez képest nehezebben másolja, és nagyobb valószínűséggel alakít ki deléciós mutációkat¹²⁶. Viszont egyes szekvenciák esetében a *Taq* polimeráz alkalmazása előnyösebb. Ilyenek például bizonyos egyedi G/C gazdag szekvenciák (GGGGG és GGGGHGG¹²⁷) vagy az idei évben ismertetett TT(N)mGCCTC¹²⁸ szekvencia, melyek kifejezetten a B típusú DNS polimeráz enzimeket blokkolják.

A fentiek alapján, kísérleteinkhez a két natív DNS polimeráz enzim (*Taq* és *KOD*) mellé, az amplifikációs képességeik, inhibitor érzékenységeik és DGGE mintázatra gyakorolt hatásuk vizsgálatához és összehasonlításhoz a *Phusion* DNS polimeráz enzimet választottuk.

4. Célkitűzések

Napjainkban a PCR alapú technikák alkalmazása már elkerülhetetlen mikrobiális összetétel vizsgálatok során, mivel ez ad lehetőséget arra, hogy a klasszikus mikrobiológiával, tenyésztéses módszerrel nem vizsgálható mikroorganizmusokról és azok tulajdonságairól információt kapjunk. A kapott eredmény azonban nagymértékben függ attól, hogy milyen mintavételt, minta előkészítést és milyen mérési módszert alkalmazunk. Különösen fontos ezt figyelembe venni olyan vizsgálatok során, ahol a kísérlet végeredményét több egymást követő lépés során alkalmazott módszerek összessége határozza meg. Egy ilyen, több lépést tartalmazó módszer a mikrobiális összetétel vizsgálatokhoz gyakran alkalmazott PCR–DGGE is. A kapott PCR-DGGE mintázatot alapvetően befolyásolja a DNS kinyerésének módja (feltárás hatékonysága, DNS tisztasága, mennyisége stb.) és a DNS-ről történő amplifikáció során alkalmazott polimeráz enzim jellemzői. Komoly problémát jelent a magas G/C tartalmú templátok amplifikációja, melynek elősegítésére adalékanyagokat (pl. DMSO) alkalmaznak. Ez a probléma azonban elkerülhető lehet ún. többlet tulajdonságokkal rendelkező (magasabb processzivitással, hibajavító képességgel rendelkező stb.) DNS polimeráz enzimek alkalmazásával, melyek képesek a kis mennyiségű és G/C–gazdag DNS templátokat hatékonyabban, pontosabban másolni. E kérdéskör a szakirodalom elsősorban a polimeráz enzimek amplifikációs képességének összehasonlításában jelenik meg, azonban a genetikai „ujjlenyomat”-ra gyakorolt hatásuk még kevésbé kutatott. Ennek köszönhető, hogy a tudományos publikációkban még mindig *Taq* DNS polimeráz enzimet alkalmaznak a PCR-DGGE mintázatok készítéséhez.

A kutatási munkám elsődleges célja volt, hogy megtaláljuk azt a DNS izolálási módszert és amplifikációs körülményeket, melyekkel a PCR-DGGE vizsgálat során kapott mintázat a legnagyobb faji diverzitást és legértékeltetőbb mintázatot adja.

Mindezek alapján munkám során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. *Melyik DNS-extrakciós módszer biztosítja a legnagyobb fajgazdagság detektálását PCR-DGGE módszerrel?*

Ehhez kapcsolódva, kutatási munkám első részében vizsgáltam, hogy talajminták esetében a DNS izolálás során alkalmazott módszer milyen mértékben befolyásolja a kapott eubaktérium specifikus DGGE mintázatot? A kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szakirodalomban talajmintákból történő bakteriális DNS izolálásához leggyakrabban

alkalmazott módszerhez (MoBio PowerSoil® kit) képest a sejtfeltárás során egy erőteljesebb kémiai lízist alkalmazva kimutatható-e a kapott PCR-DGGE mintázatban eltérés a vizsgált talaj domináns baktériumtörzseire vonatkozóan?

2. *Van-e számottevő hatása az amplifikáció során alkalmazott DNS polimeráznak a kapott PCR-DGGE mintázatra és a detektált fajgazdagságra?*

A kutatási munkám második részében az amplifikációs körülmények módosításának hatását vizsgáltam PCR-DGGE vizsgálatok során, különös tekintettel arra, hogy milyen hatással van a kapott mintázatra az amplifikáció során alkalmazott DNS polimeráz enzim. Mivel a szakirodalomban a *Taq* DNS polimerázt alkalmazzák, így ehhez hasonlítottunk egy nagy pontosságú és inhibitor rezisztens fúziós DNS polimeráz (*Phusion*) és egy kevésbé ismert, de nagyméretű és C/G gazdag templátok másolására képes polimeráz enzimmel (*KOD*) kapott PCR-DGGE mintázatokat.

3. *A mintákban jelenlévő PCR inhibitorok hogyan befolyásolják a különböző DNS polimerázokat?*

A kísérletek során arra kerestük a választ, hogy a DNS polimeráz enzimek mennyire érzékenyek a leggyakrabban előforduló inhibitor komponensekre (talaj, huminsav, vér). A vizsgált enzimek közül melyik a legalkalmasabb inhibitor jelenlétében történő amplifikációra.

4. *Környezeti minták vizsgálata során melyik DNS polimerázzal lehet a legjobb PCR-DGGE mintázatot létrehozni?*
5. *PCR gátló anyagok jelenléte hogyan befolyásolja a multitempltárról készített PCR-DGGE mintázatot?*

A kísérletek segítségével arra kerestük a választ, hogy az egyes DNS polimeráz enzimek eltérő amplifikációt mutatnak-e multitemplát alkalmazása során, ami különösen fontos mikrobiális diverzitás vizsgálatok során.

5. Anyagok és módszerek

5.1. DNS izolálási módszerek és polimeráz enzimek hatása DGGE mintázatra

5.1.1. Talajminták

A DNS tisztítás DGGE mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálatához kármentesítendő területről származó, szénhidrogénnel szennyezett és szennyezést nem tartalmazó (kontroll) talajmintákat használtunk. A kísérletek során alkalmazott talajminták szénhidrogén tartalmát és összetételét az 5. és 6. táblázat tartalmazza.

Azonosító	Eredet	Talajszennyező szénhidrogén koncentrációja			
		Σ PAH mg/kg	Σ VOC mg/kg	Σ EPH mg/kg	Σ n-alkán EPH mg/kg
1.	szénhidrogénnel szennyezett talaj	819	9248	1864	890
2.	szénhidrogénnel szennyezett talaj	–	178	58	30
3.	nem szennyezett talaj	–	–	–	–

5. táblázat A kísérletek során alkalmazott talajok szénhidrogén összetétele.

	1.	2.	3.
homok m/m %	73	53	79
iszap m/m%	14	23	11
agyag m/m%	11	24	10

6. táblázat A kísérletek során alkalmazott talajok összetétele

5.1.2. DNS izolálás

A talajmintákból történő DNS izoláláshoz két kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS tisztító kit-et (1) MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit (Elisabeth Pharmacon, Czech Republic) (2) AquaGenomic™ oldat (MultiTarget Pharmaceuticals, LLC) – alkalmaztunk a gyártó utasítása szerint, valamint egy *Mycobacterium* DNS izolálásra fejlesztett módszert – Käser-módszer³¹. Ahhoz, hogy elkerüljük a pufferek különbözőségéből adódó eltéréseket, a

módszereken annyi módosítást végeztünk, hogy a DNS-t az utolsó lépésnél steril vízzel eluáltuk az oszlopról.

A Käser-módszer, melyet 2009-ben Käser és munkatársai dolgoztak ki alkalmas környezeti mintákból *Mycobacterium* DNS izolálásra.

A módszer rövid leírása: 200 mg talajmintát 300 µl steril SET pufferben (15% szacharóz, 0,05 M Tris [pH=8,5], 0,05 M EDTA) szuszpendáltunk fel. A sejtek feltárásához a mintákhoz 50 µl 100 mg/ml-es lizozim oldatot (Reanal) adtunk és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a mintákhoz 200 µl 10%-os SDS-t és 10 µl 10 mg/ml-es proteináz K-t (Fermentas) adtunk és további 1 órán át 37 °C-on, végül 5 percig 70 °C-on inkubáltuk. A feltárás hatékonyságának növelésére a mintákhoz 150 µl üveggyöngyöt adtunk, majd 8 perc vortexelés után 2 percig centrifugáltuk (12 000 g). A fehérjék eltávolítása 200 µl felülúszóból 200 µl fenol-kloroform 1:1 arányú keverékével történt. A maradék fenol eltávolítására a vizes felülúszót kloroformmal extraháltuk. A DNS kicsapása 10 µl 3M-os nátrium-acetát (pH=4,83) mellett 250 µl 96%-os etanol hozzáadásával történt -20 °C-on 20 percig. Ezután a mintákat 30 percig centrifugáltuk (12 000 g), majd a DNS-t kétszer 500 µl 70%-os etanollal mostuk, majd steril fülke alatt szárítottuk és 100 µl steril vízben vettük fel.

A DNS izolálás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a DNS mintákból 2 µl-t 1%-os agaróz gélen (1g agaróz [Calbiochem] 100 ml 1xTAE pufferben) futtatunk 1 kb Plus DNA Ladder marker (Gene Ruler) mellett 130 V-on 30 percig. A PCR reakciók elvégzéséig minden DNS mintát -20 °C-on tároltunk.

A DNS mennyiségét és tisztaságát fotometriás úton Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific) készülékkel határoztuk meg.

A PCR reakciók és inhibíciós kísérletek előtt a DNS mennyiségét Qubit 2.0 fluoriméterrel mértük, Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit-et alkalmazva a gyártó utasítása szerint.

5.1.3. A 16S rRNS gén és a V3 régió amplifikálása

A kísérletek során három DNS polimeráz enzimet (*Taq* Fermentas; *Phusion* Finnzyme; KOD Novagen) alkalmaztunk. Az egyes enzimek esetén alkalmazott reakciók

összetételét az 7. táblázatban foglaltuk össze. A 16S riboszómális RNS kódoló gént (16S rDNS) eubaktérium specifikus primerekkel (EubB (27F) és EubA (1552R) PCR reakció segítségével amplifikáltuk⁴⁴.

A DGGE mintázatok készítéséhez a „GC-clamp”-pel rendelkező 16S RNS gén V3 variábilis régióját (~200 bp hosszúságú) amplifikáltuk, ahol templátként a 16S rDNS PCR termékeket alkalmaztuk.

Alkalmazott enzim					
<i>Taq DNS polimeráz</i> enzim (Fermentas)	μl	<i>Phusion DNS</i> polimeráz enzim (Finnzyme)	μl	<i>KOD DNS polimeráz</i> enzim (Novagen)	μl
10× <i>Taq</i> puffer	3	5× <i>Phusion</i> puffer HF (F-518)	6	10× <i>Kod</i> puffer	3
2,5 mM dNTP mix	2,5	10 mM dNTP mix	0,6	2 mM dNTP mix	3
10 mM primer rev	1,5	10 mM primer rev	1,5	10 mM primer rev	0,9
10 mM primer forw	1,5	10 mM primer forw	1,5	10 mM primer forw	0,9
templát	1	templát	1	templát	0,6
<i>Taq</i> polimeráz	0,15	<i>Phusion</i> polimeráz	0,5	<i>KOD</i> polimeráz 1U/ml	0,6
25 mM MgCl ₂	2,5			25 mM MgSO ₄	1,8
16S víz	17,85	16S víz	18,9	16S víz	19,2

7. táblázat Alkalmazott PCR összetételek 30 μl reakció térfogatra

A 16S gén V3 variábilis régiójának amplifikálásához a 341F–GC és 534R primereket alkalmaztuk²¹. A PCR során alkalmazott primerek szekvenciáit a 8. táblázat tartalmazza. A reakciók során DNS polimerázokat a gyártó utasítása szerint alkalmaztuk vagy kisebb módosítással (azonos primer és enzim koncentráció mellett). Minden PCR során alkalmaztunk pozitív és negatív kontroll reakciókat.

A 16S PCR reakciókat 30 μl, a DGGE PCR reakciókat 50 μl végtérfogatban mértük össze, az amplifikálást egy PTC 200 Thermalcycler (MJ Research) készülékben végeztük a 9.–10. táblázatban szereplő programokkal. Az 1,5 kb méretű 16S rRNS gént 1%-os agaróz gélen (100 ml 1%-os TAE + 1g agaróz + 2,5 μl ethidium–bromid (10 ng/ml)), a 200 bp méretű 16S rRNS V3 gént 2%-os agaróz gélen 140 V feszültségen futtattuk, mintánként 2–2 μl-t felhasználva. A fragmentek méretének ellenőrzéséhez 1kb és 100 bp GeneRuler (Thermo Scientific) létrát használtunk. Futtatás után a gélt UV fény alatt vizsgáltuk.

primer	célgén	szekvencia (5' → 3')	annealing hőmérséklet (°C)	hivatkozás
Eub-27F Eub-1552R	eubaktérium 16S rDNS	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG ACTCCCATGGTGTGACGG	60	44
341F-GC 534R	eubaktérium 16S rDNS V3 régiója	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGC ATTACCGCGGCTGCTGG	55	21

8. táblázat PCR reakciók során alkalmazott primerek

	<i>Taq (Fermentas)</i>		<i>KOD Hot Start (Novagen)</i>		<i>Phusion (Finnzymes)</i>		Ciklus szám
	hőmérséklet °C	idő perc	hőmérséklet °C	idő perc	hőmérséklet °C	idő perc	
Elődenaturáció	94	1	95	2	98	30 mp	1
Denaturáció	94	1	95	20 mp	98	10 mp	
Hibridizáció (annealing)	55	1	55	10 mp	55	30 mp	30
Extenzió	72	1	70	40 mp	72	45 mp	
Végső extenzió	72	5	70	5	72	5 perc	1

9. táblázat 16S rDNS amplifikációs körülményei

	<i>Taq (Fermentas)</i>		<i>KOD Hot Start (Novagen)</i>		<i>Phusion (Finnzymes)</i>		Ciklus szám
	hőmérséklet °C	idő perc	hőmérséklet °C	idő perc	hőmérséklet °C	idő perc	
Elődenaturáció	94	1	95	2 perc	98	30 mp	1
Denaturáció	94	30 mp	95	20 mp	98	10 mp	
Hibridizáció (annealing)	55	30 mp	55	10 mp	55	30 mp	30
Extenzió	72	30 mp	70	10 mp	72	30 mp	
Végső extenzió	72	5	70	5	72	5	1

10. táblázat V3 régió amplifikációs körülményei

5.1.4. DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis)

A denaturáló gradiens gélelektroforézist előzetes kísérleteink alapján 30–70%-os denaturáló gradiens koncentráció mellett – ahol a 0 %-os denaturáló oldat nem tartalmaz sem ureát, sem formamidot és a 100%-os denaturáló oldat 40 v/v% formamidot és 42g/100 ml ureát tartalmaz –, 8%-os poliakrilamid gélen (37:1 akrilamid (Sigma) – biszakrilamid (Sigma) keverék 1x TAE pufferben) végeztük. A denaturáló anyagok urea (Sigma) és formamid (Molar Chemicals) volt.

Közvetlenül a gélöntés előtt 16 ml denaturáló oldathoz 6,5 µl TEMED-et (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin) (Serva Electrophoresis) és 160 µl 10%-os APS-t (ammónium-perszulfát) (Analar®) adva, 16x16 cm-es, 16 zsebes gélöntőtűt a Bio-Rad gélöntő rendszer segítségével a gyártó utasítása szerint.

50 µl DGGE PCR termékhez 10 µl 6x DNA Gel Loading Solution (Quality Biological Inc.) kevertük és a futtatáshoz minden mintából 25 µl-t vittünk fel.

A DGGE futtatást BioRad DCode Universal Mutation Detection System készülékben 60 °C-on, 150 V-on, 1x TAE pufferben 4 órán át végeztük. Elektroforézis után a gél 20 percig etídium-bromiddal (0,5 µg/ml 1x TAE pufferben) festettük, majd UV fény alatt vizsgáltuk és VisionWorks®LS 5.5.0 szoftverrel dokumentáltuk.

5.1.5. PCR-DGGE mintázatok elemzése

A DGGE mintázatok elemzését a *TotalLab* gélkiértékelő szoftverek segítségével végeztük (*TotalLab TL120 1D* és *Phoretics 1D Pro, Nonlinear Dynamics, UK*). A kiértékelés során háttérfestődés-korrektúra, lane-, illetve fragment detektálás (zaj csökkentés: 2) és mintánkénti összevetés történik.

A *TotalLab TL120 1D* program az összehasonlítás során egy mesterséges, ún. referencia sávot hoz létre, ami az adott DGGE gélben előforduló fragmentek összességéből áll.

A mintákban azonosított összes fragmentet tartalmazó bináris (1/0) adatmátrixból kiindulva a *Phoretics 1D Pro* program segítségével Dice koefficiens alapú hasonlósági mátrixot képeztünk. A mintázatok közötti hasonlóság leírására a Dice-együtthatót alkalmaztuk, segítségével a „lane”-ek közötti hasonlóság százalékos aránya fejezhető ki. A Dice együtthatót a következő képlettel számoltuk:

$$D = \frac{2 * n(A, B)}{(nA + nB)},$$

ahol $n(A,B)$ az A és B módszerrel kapott mintázatok közös része, nA és nB pedig A és B módszerrel kapott DGGE mintázatban detektált fragmentek száma, A és B az általunk alkalmazott DNS preparálási módszereket, illetve az alkalmazott DNS polimerázt jelöli.

Az egyes mintázatokról képzett hasonlósági mátrix alapján hierarchikus osztályozást végeztünk. A hierarchikus osztályozás a *Phoretics 1D Pro* programmal és a távolság-optimalizáló UPGMA csoportátlag módszerrel (*Unweighted Pair Group Method of Average*) történt. A kapott eredményeket dendrogramon ábráztuk. A függőleges tengelyen a minták azonosítóját, vízszintesen pedig az osztályok összevonásának szintjeit, a távolságmértékeket (hasonlósági mértékek) tüntettük fel.

A kapott DGGE mintázatok közötti eltéréseket Venn diagramon ábráztuk. Az alaphalmazok a különböző DNS extrakciós módszerekkel, illetve a különböző polimeráz enzimekkel készített DGGE mintázatokban detektálható fragment számok voltak.

A mikrobaközösség diverzitását Shannon féle diverzitási indexszel is vizsgáltuk, amit a következő képlettel számoltunk ki mindegyik mintázatra:

$$H' = \sum_{i=1}^s (p_i * \ln p_i),$$

ahol esetünkben a H' a Shannon féle diverzitási index, p_i az adott fragment intenzitásának

aránya egy mintázaton belül az összes fragment összintenzitásához képest, $p_i = \frac{a_i}{\sum_{i=1}^s a_i}$,

ahol a_i az i -edik fragment abszolút intenzitása, s a detektált fragmentek száma.

5.2. DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenységének vizsgálata

5.2.1. Mestersége konzorcium, PCR-DGGE marker készítése

Baktérium izolátumokból MoBio Ultraclean PCR tisztító kittel DNS-t izoláltunk a gyártó utasítása szerint. A tisztított DNS-ről 16S rDNS PCR-t végeztünk. A PCR termékekről a maradék templát DNS-t és oligót EZ-Spin Column PCR tisztító kittel (Bio Basic) leválasztottuk. Az egyedi fragmenteket pJET 2.1 blunt klónozó vektorba (Fermentas) ligáltuk a gyártó utasítása szerint. A reakcióelegy összetétele az alábbi volt:

- 10 µl 2x reakció puffer
- 1 µl pJET1.2 blunt klónozó vektor
- 1 µl PCR fragment
- 1 µl T4 DNS ligáz
- 7 µl nukleáz mentes víz

A reakcióelegyet 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten (22 °C), majd közvetlenül transzformáltuk *Escherichia coli* DH5α kémiai kompetens sejtekbe: 200 µl jégen kiolvasztott kompetens sejthez 10 µl ligálási reakcióelegyet adtunk, majd 30 perc jégen inkubálás után hűsökkoltuk, 40 másodpercig. 42 °C-on, 5 perc jégen való lehűtést követően 800 µl SOC oldattal (2% Tripton; 0,5% élesztő kivonat; 10mM MgSO₄; 10mM MgCl₂; 20mM glükóz; 10mM NaCl, 5mM KCl) egészítettük ki az elegyet, majd 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően ampicillint (100 µg/ml) tartalmazó LB (Luria-Bertani) táptalajra (10 g/l pepton, 5 g/l élesztő kivonat és 10 g/l NaCl) szélesztettük a sejteket. Az antibiotikumon felnőtt sejtekből plazmidot tisztítottunk (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit, Bio Basic). A tiszta plazmidokat, amelyek tartalmazták az adott szekvenciákat, azonos arányban összekevertük. Ezen a plazmidkeveréken DGGE-PCR-t mértünk össze, a reakció terméket pedig DGGE gélen futtatva markerként használhattuk. A plazmidokat *E. coli* kompetens sejtben, törzsgyűjteményben -80 °C-on tároltuk.

A molekuláris munkákhoz szükséges DNS oligonukleotidok elkészítését az Integrated DNA Technologies (BioScience Kft.), a DNS szekvenálásokat Micorsynth (Ausztria) cég és a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Központja (MTA SZBK) szekvenáló platformja valamint a Xenovea Kft végezték.

5.2.2. PCR inhibitor oldatok

Huminsav oldat és talajextraktum

A huminsav oldat készítéséhez standard huminsavat (H16752 Sigma) alkalmaztunk. A huminsav oldat koncentrációjának meghatározásához kalibrációs oldatot készítettünk 100–600 mg/ml-es koncentráció tartományban és 450 nm-en spektrofotometriásan (Hach–Lange DR 5000 spektrofotométer) mértük¹²⁹. A spektrofotométeres mérés bizonytalansága 3% volt.

Talaj extraktum készítéséhez 1 g virágföldet (Florimo, általános virágföld) 10 ml KLA pufferben (50 mM Tris, pH=9,5; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 2,5 mM MgCl₂ és 0,1% Tween) szuszpendáltunk és 30 percig 75 °C-on inkubáltuk, 12 000 g-n 20 percig centrifugáltuk és a felülúszót –20 °C-on tároltuk a felhasználásig⁸³.

Vér és vérszérum

Teljes vér: 5 mM EDTA (antikoaguláns) tartalmú kezeletlen vér. A vérszérumhoz a vért szobahőmérsékleten (22 °C) hagytuk 30 percig, majd a véralvadást követően 2000 g fordulaton, 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót (vérszérumot) leválasztottuk. A vér és vérszérum mintákat a felhasználásig –80 °C-on tároltuk.

5.3. PCR inhibitorok DNS polimeráz enzimet gátló és PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata

5.3.1. PCR inhibíció hagyományos endpoint (végpont) PCR-rel

Genomiális DNS templátról

A hőstabil DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenységét 16S rRNS génspecifikus PCR során vizsgáltuk. A reakciókeverék genomiális DNS-ről történő PCR során 5 ng DNS templátot tartalmazott, amit 0–0,6 µg/ml huminsav koncentráció mellett végeztünk. A PCR során a 9. táblázatban szereplő amplifikációs programokat alkalmaztuk. A PCR-t követően a termékeket 1%-os agaróz gélen futtattunk. Az a huminsav koncentráció, ahol a PCR-t követően az 1,5 kb méretű várt fragmentet kaptuk, még nem gátolta a polimeráz enzim működését.

Plazmid DNS templátról (mesterséges konzorcium)

A kísérletekhez egy mesterséges konzorciumot alkalmaztunk, melyet ismert baktériumtörzsek 16S rRNS génjét tartalmazó plazmidok 1:1 arányú keverékéből készítettünk. A plazmidkeverékről a 16S rRNS gént amplifikáltuk a 27F/Eub-1552R primerekkel, valamint a plazmid inserteket a klónozó vektor (pJET1.2/blunt) primerjeivel. A két PCR során tapasztalt reakciógátlásból határoztuk meg az inhibitorok PCR gátló koncentrációját. A huminsav PCR gátló hatását a 0–0,6 µg/ml koncentrációtartományban, a többi inhibitor (talajextraktum, vér és vérszérum) PCR gátló hatását 0–25 v/v% tartományban vizsgáltuk. A PCR során a 9. táblázatban szereplő amplifikációs programokat alkalmaztuk. A PCR-t követően 2 µl reakció terméket 1%-os agaróz gélen futtattunk.

Az inhibitorok DGGE mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálatához a 16S PCR amplikonjairól a 16S rRNS gén V3 régióját amplifikáltuk majd a reakcióterméket az 5.1.4 pontban leírt módszerrel 30–60%-os denaturáló gradinst tartalmazó, 8%-os akrilamid gélen futtattuk.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. DNS izolálási módszerek hatása a PCR-DGGE mintázatra

A talaj és talajvíz minták olyan komplex mátrixszal rendelkeznek, melyek molekuláris biológiai vizsgálata során a végeredményt számos tényező befolyásolhatja. Ilyen többek között a nukleinsav kinyerésének hatékonysága és a kapott nukleinsav minősége, melyek döntően meghatározzák a vizsgálat eredményét. Mivel a talajból, talajvizekből származó mintákat rendszerint nagy biológiai sokféleség és többféle PCR–inhibitor jelenléte jellemzi, emiatt a vizsgálatuk különösen nehéz feladatnak bizonyul. A szakirodalomban a mai napig újabb és újabb DNS izolálási eljárásokat ismertetnek, amelyek eltérő tisztaságú és mennyiségű DNS kinyerését teszik lehetővé^{130,131,132}.

Munkánk első részében azt vizsgáltuk, hogy talajminták esetén a különböző feltárással és tisztítási lépésekkel előállított bakteriális DNS–ről készített PCR-DGGE mintázatokban tapasztalható-e jelentős eltérés, továbbá próbáltuk megválaszolni azt a kérdést, hogy az egyes DNS extrakciós módszerek alkalmazása meghatározhatja-e a vizsgált populációról nyert információt.

Kísérleteinket az 5.1.1 fejezetben ismertetett, valós környezeti mintákon – kármentesítés alatt álló, két szénhidrogénnel szennyezett és egy nem szennyezett (háttér) területről származó talajmintán – végeztük. A DGGE–mintázatra gyakorolt hatás vizsgálatához három különböző DNS tisztítási módszert választottunk (5.1.2 fejezet), melyek közül kettő kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS extrakciós kit (MoBio PowerSoil® DNA kit, AquaGenomic™ Kit) volt, valamint egy a szakirodalomból származó³¹, erőteljesebb kémiai feltárást alkalmazó DNS izolálási módszer.

A MoBio PowerSoil® DNA kit egy talajmintákra optimalizált DNS extrakciós módszer, mellyel nagy tisztaságú, de jellemzően kis mennyiségű DNS izolálható. Előnye, hogy a mikrobiális diverzitás széles spektrumát képes reprezentálni és reprodukálható eredményt biztosít. Ez utóbbi előnyei miatt a szakirodalomban is jellemzően ezt a DNS tisztítási módszert alkalmazzák az általunk is vizsgált talajminták tanulmányozásához/feltáráshoz²².

A második módszer, az AquaGenomic™ Kit egy multifunkciós DNS extrakciós eljárás, mely nemcsak baktériumokból történő DNS izolálásra alkalmas, hanem állati és

növényi szövetminták analizéséhez is. Nem igényel minta előkészítést, a DNS izolálása történhet mind tiszta kultúrákból, mind környezeti mintákból (pl. talaj). Korábbi munkánk során tapasztaltuk, hogy egyes Gram-pozitív baktériumok a hagyományos DNS tisztítási módszerekkel nem tárhatóak fel, viszont e törzsekből történő DNS izoláláshoz az AquaGenomic™ Kit hatékonynak bizonyult¹³³.

A harmadik általunk használt DNS kivonási módszer alkalmas olyan mikroorganizmusokból történő DNS extrakcióra, melyek nehezen tárhatóak fel vagy a vizsgált mintában kis egyedszámban vannak jelen³¹, azonban e módszert talajminták elemzésére korábban még nem vizsgálták.

Munkánk során a talajmintákból a három különböző módszerrel DNS-t izoláltunk, majd a kapott DNS mennyiségét és minőségét NanoDrop spektrofotométer segítségével vizsgáltuk (11. táblázat). Mivel a három DNS extrakciós módszer eltérő mennyiségű talajmintából történő tisztítást javasol, ezért a könnyebb összehasonlítás végett az 1 mg talajra vonatkoztatott DNS mennyiségeket mutatjuk be.

minta sorszáma	DNS izolálás módszere	ng DNS/1mg talaj	A260/A280	A260/A230
1.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	6,17±2,54	1,66±0,02	1,65±0,03
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	42,37±12,25	1,52±0,54	0,67±0,10
	Käser-módszer	57,58±15,31	1,44±0,18	0,68±0,10
2.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	6,78±1,78	2,69±0,07	1,15±0,04
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	4,27±1,96	1,39±0,48	0,63±0,08
	Käser-módszer	20,09±7,78	1,52±0,22	0,68±0,12
3.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	3,66±0,89	1,85±0,16	1,32±0,11
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	2,78±1,02	2,04±0,65	0,87±0,14
	Käser-módszer	23,87±4,45	1,38±0,17	0,74±0,08

11. táblázat Különböző DNS extrakciós módszerekkel kinyert DNS-ek mennyisége és tisztasága.

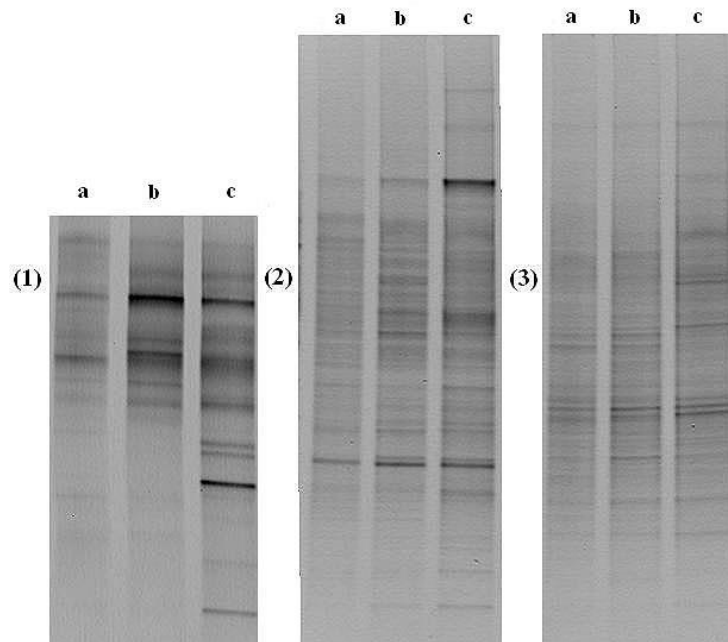
Az átlagérték számításához öt független mérésből származó adatokat használtuk

A mért adatok alapján elmondható, hogy mindhárom talajmintánál a Käsér–módszerrel tudtuk a legnagyobb mennyiségű DNS-t izolálni. Az AquaGenomic™ kit csak az 1. talajmintánál mutatott hatékonyabb DNS kinyerést, mint a Power Soil DNS extrakciós kit. A kereskedelemben kapható kit-es módszerekkel tisztított DNS-ek minősége mind a három mintánál jobb volt, mint a Käsér módszerrel, ami a kereskedelmi módszerek szilárdfázisú extrakciót alkalmazó tisztító lépéséhez köthető. A huminsavak 230nm és 320nm-en adnak jellemző fényelnyelést, így az alacsony A260/A230 érték a talajból származó huminsav szennyezésre utal.

Munkánk következő lépésében, a PCR-DGGE vizsgálattal arról próbáltunk információt kapni, hogy különböző DNS extrakciós módszerek alkalmazásánál tapasztalható-e eltérés

- a talajmintákról készített „ujjlenyomat” képen;
- a detektálható domináns baktérium törzsek diverzitásával arányos sávok számában;
- a mintázatban megjelenő sávok intenzitás eloszlásában?

A PCR-DGGE vizsgálathoz a háromféle DNS extrakciós módszerrel tisztított DNS templátokról a 16S riboszómális RNS gén V3 régióját eubaktérium specifikus primerekkel amplifikáltuk.



11. ábra DNS izolálási módszer hatása a PCR-DGGE mintázatra.

Az alkalmazott három talajminta baktériumközösségének molekuláris ujjlenyomata 8%AA–bisAA, 30–70%–os denaturáló gélen (negatív képek): a: MoBio PowerSoil® DNA Isolation kittel izolált DNS templátról b: AquaGenomic™ Microbe Protocol kittel izolált DNS templátról c: Käsér –módszerrel izolált DNS templátról.

A PCR reakcióhoz minden minta esetében azonos mennyiségű (5 ng) templát DNS-t alkalmaztunk. A gradiens gélelektroforézis után kapott mintázatokat (12. ábra) a TotalLab Phoretix 1D Pro szoftverrel értékeltük. A program segítségével meghatároztuk az egyes sáv mintázatokban kimutatható fragmentek számát. Ezt követően az egyes mintázatokban detektálható azonos és eltérő fragmentek száma alapján kiszámítottuk a három DNS extrakciós módszer alkalmazásával készített DGGE mintázatok közötti hasonlóságot (12. táblázat). Az egyes DNS extrakciós módszerek közötti hasonlóság mérésére a Dice együtthatót alkalmaztuk.

	Detektált fragmentek száma ^a			Hasonlósági index ^b		
	<i>Power Soil</i>	<i>AquaGenomic</i>	<i>Käser– módszer</i>	<i>D_{PowerSoil} AquaGenomic</i>	<i>D_{AquaGenomic} Käser– módszer</i>	<i>D_{Power Soil} Käser–módszer</i>
Talajminta						
1.	15	13	17	0,79	0,67	0,50
2.	22	28	33	0,80	0,79	0,69
3.	25	29	31	0,85	0,83	0,75

^a a DGGE mintázatokban detektált fragmentek száma;

^b a DGGE mintázatokra számolt hasonlósági index (Dice együttható)

12. táblázat A detektált fragmentek száma és a különböző DNS izolálási módszerekkel kapott DGGE mintázatok közötti hasonlóság.

Eredményeink alapján elmondható, hogy mind a három talajmintánál a Käser–módszer esetében kaptuk a legmagasabb diverzitást. A két kereskedelmi forgalomban kapható kit-tel elvégezhető módszerek közül az 1. mintánál a MoBio PowerSoil® kit-tel, míg a 2. és 3. mintánál az AquaGenomic™ kit-tel izolált DNS templátról tudtunk nagyobb diverzitást kimutatni (12. táblázat).

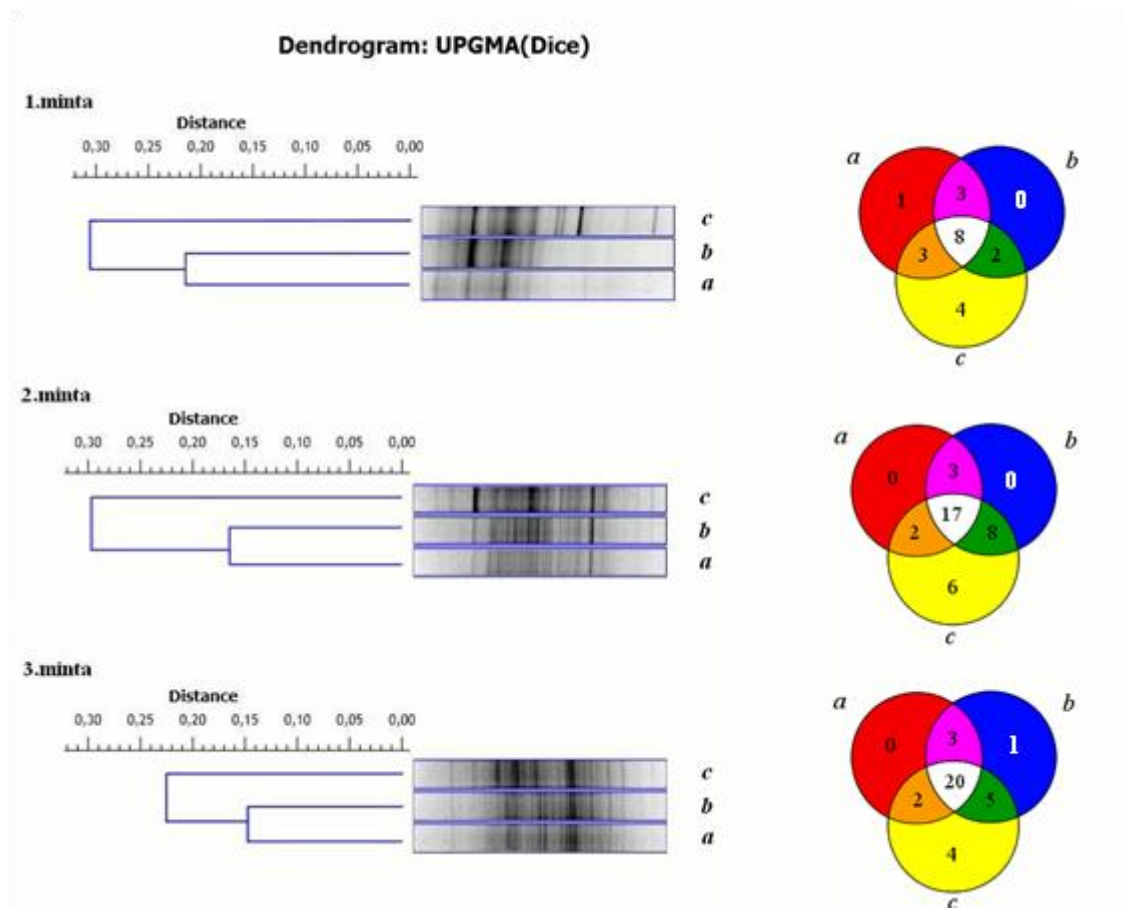
A legmagasabb Dice együttható értéket a MoBio PowerSoil® kit és AquaGenomic™ kit (0,79; 0,80 és 0,85) között tapasztaltuk (12. táblázat). Ezt követte az AquaGenomic™ és Käser–módszer közti hasonlóság (0,67; 0,79 és 0,83). A MoBio PowerSoil® kit és Käser–módszer alkalmazásával készített mintázatok között tapasztaltuk minden esetben a legnagyobb eltérést.

A Dice együtthatók meghatározásához képzett hasonlósági bináris mátrix hierarchikus osztályozásával dendrogramokat szerkesztettünk (12. ábra) és a különböző módszerekkel

kapott mintázatokban található azonos és eltérő fragmentek szemléltetéséhez Venn-diagramokat készítettünk (12. ábra).

A különböző DNS izolálási módszerekkel kapott DGGE mintázatokat összehasonlító dendrogramok és a Dice együtthatók értékei alapján elmondható, hogy a vártnak megfelelően, a két kereskedelmi forgalomban kapható DNS izoláló kit segítségével tisztított DNS-ek esetében kaptunk hasonló mintázatot.

A Venn-diagram ennél kicsit több információt hordoz. Megjelenik rajta, hogy az egyes módszerekkel kapott mintázatok milyen mértékben vannak átfedésben (azonos fragmentek száma), illetve az egyes módszerekkel kapott eredmények tartalmazznak-e olyan fragmenteket a mintázatban, melyek a másik két esetben nem jelennek meg. Ez utóbbi, főként a Käsér-módszernél kiugró: két talajmintánál (1. és 3.) négy darab és a 2. talajmintánál hat darab olyan fragmentet tudtunk kimutatni a mintázatban, mely a másik két módszernél nem jelent meg.



12. ábra Különböző DNS izolálási módszerekkel kapott DGGE mintázatokat összehasonlító dendrogramok a három talajminta esetében (Dice-együttható, UPGMA módszer) a: MoBio PowerSoil® b: AquaGenomic™ c: Käsér és munkatársai által kidolgozott módszer

Talajminta	Alkalmazott DNS izolálási módszer	H'
1.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	2,699
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	2,539
	Käser és munkatársai által kidolgozott módszer	2,820
2.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	3,089
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	3,324
	Käser és munkatársai által kidolgozott módszer	3,487
3.	MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit	3,215
	AquaGenomic™ Microbe Protocol kit	3,263
	Käser és munkatársai által kidolgozott módszer	3,427

13. táblázat Talajminták különböző DNS izolálási módszerekkel kapott diverzitás indexei

Shannon–Weaver diverzitás index (faji változatosság): $H' = - \sum_{i=1}^s (p_i \times \ln p_i)$

A mintázatok értékeléséhez Shannon–Weaver diverzitás index (H') segítségével diverzitás értékeket is számítottunk, mely a faji változatosságról ad információt a faj és az egyedszám arányának alapján (13. táblázat). A diverzitás értékek a vizsgált mintázat komplexitását tükrözik, minél nagyobb az értékük annál több elkülönülő fragment azonosítható egy mintázaton belül. Mind a három talajmintánál a legmagasabb értéket a Käser–módszerrel tisztított DNS templátról készített DGGE mintázathoz kaptuk.

Mind a három talajmintánál a Käser–módszerrel kaptuk a legnagyobb diverzitás értékeket. Ez azzal magyarázható, hogy a DNS extrakciós módszernél 4% SDS-tartalmú lízis puffert alkalmazunk, mellyel feltehetőleg nagyobb valószínűséggel tárhatóak fel a kompakt sejtfallal rendelkező Gram–pozitív és magas G/C-tartalmú baktériumok is.

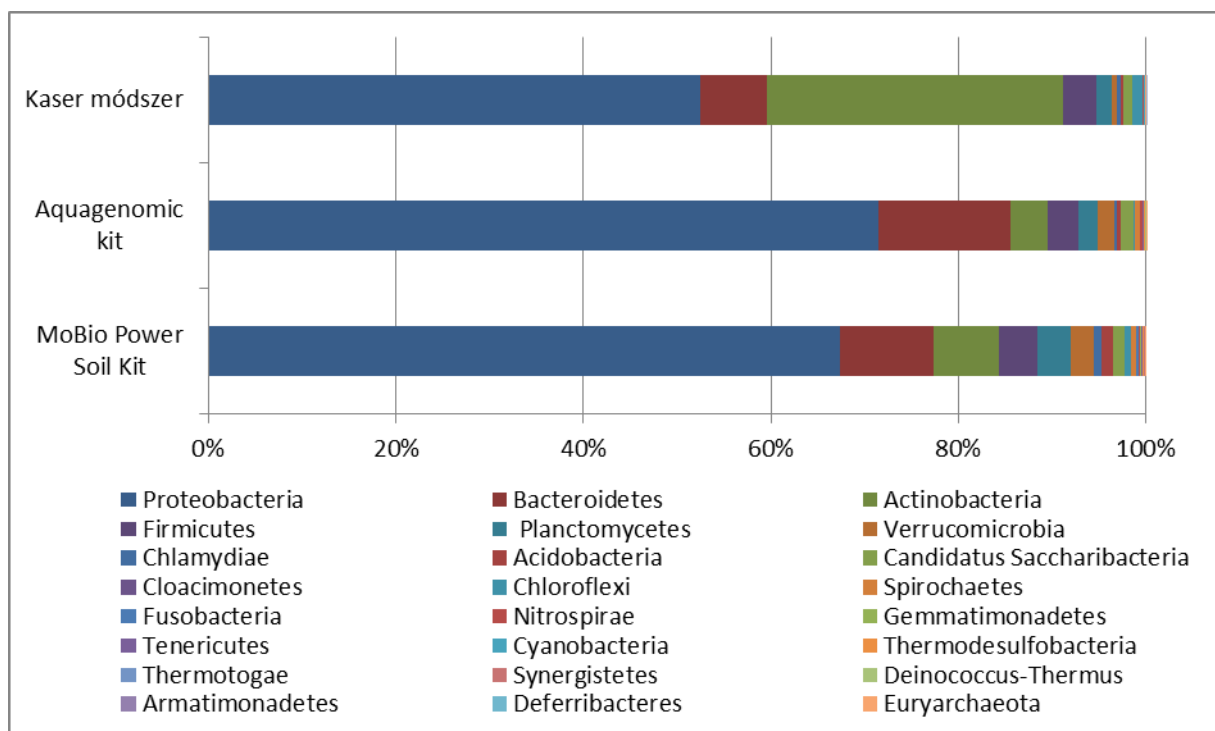
Annak megválaszolására, hogy az egyes DNS izolálási módszerek mely baktériumfajok feltárása esetén hatékonyabbak metagenom szekvenálással lehet választ kapni^{135, 134}. A háromféle eljárással készített DNS mintákról ezért szekvenálást is végeztettünk (Xenovea Kft). A vizsgált minták közül nem mindegyik DNS volt megfelelő minőségű a szekvenáláshoz:

- A MoBio PowerSoil® kittel készített DNS minták megfelelő tisztaságúak voltak a szekvenáláshoz szükséges amplikonok előállításához.

- Az 1. talajminta esetében az AquaGenomic™ és Käsér módszerrel készített DNS-hez utólagos, mágnenses gyöngyös tisztítás volt szükséges a szekvenáláshoz (13. ábra).
- A 2. talajminta esetében az AquaGenomic™ és Käsér módszerrel készített DNS-ről még az utólagos tisztítást követően sem tudtak amplifikálni.
- A 3. talajminta esetében viszont mind a három módszerrel készített DNS templátról (utólagos tisztítás nélkül) is sikerült értékelhető szekvenciákat kapni (14. ábra).

Az eltérések oka nagy valószínűséggel a DNS minták PCR inhibitor tartalma volt, ami gátolta a Xenovea Kft. által alkalmazott szekvenálási eljárást.

A metagenom szekvenálási eredmények alapján a háromféle DNS tisztítási módszernél a prokarióta doméneken belüli főbb törzsek (*phylum*-ok) mindhárom módszernél azonosak voltak, de relatív mennyiségükben eltérések figyelhetők meg. Főként a domináns *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* és *Actinobacteria* törzsek arányában tapasztaltunk jelentős eltéréseket.

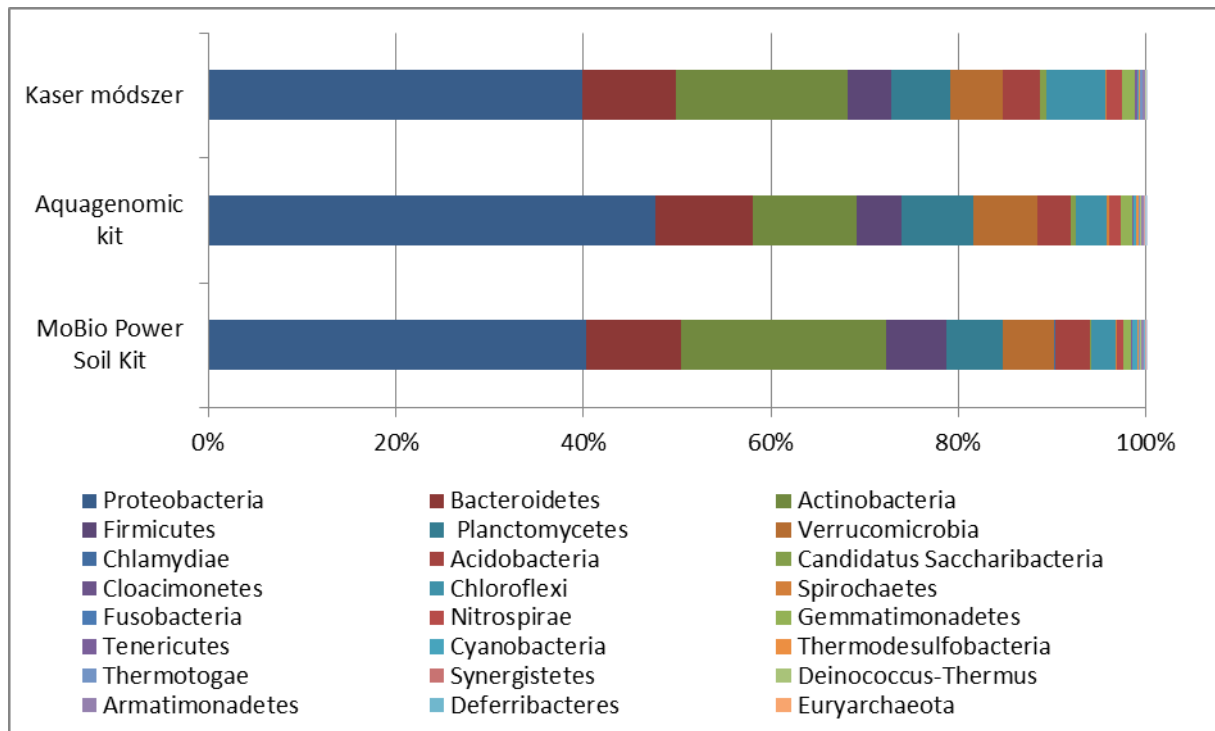


13. ábra 1. jelű talajmintából, háromféle tisztítási módszerrel készített DNS minták baktériumösszetétele. PCR inhibitorok eltávolításával.

Az 1. talajminta esetén a szekvenálási eredmények is alátámasztották, hogy a magasabb G/C-tartalmú baktériumtörzsek kimutatásában szerencsés egy erőteljesebb kémiai lízis alkalmazása. Ezeknél a mintáknál a MoBio PowerSoil® és Aquagenomic kittel készített DNS

mintákban az *Actinobacteria* baktériumok relatív mennyisége jelentősen kisebb volt (6,57% és 3,69%), mint a Käser-féle módszerrel tisztított DNS mintánál (30,77%). Az *Actinobacteria* törzsbe tartozó baktériumok – mint pl. *Mycobacterium* – kifejezetten magas (50–70%) G/C tartalmú szekvenciával rendelkező, Gram-pozitív baktériumok, melyek sejtfeltárása és amplifikálása is nehézkes^{135,136}. A szekvenálás során kapott eredmények korreláltak a PCR-DGGE mintázatokkal is, ahol a Käser módszer esetében a magasabb denaturáló koncentrációknál intenzívebb fragmentek jelentek meg, mely a másik két módszer esetében nem volt detektálható (11. ábra).

A 3. talajminta esetében – hasonlóan az 1. talajmintához – a szekvenálási eredmények alapján a különböző eljárással készített DNS minták mikrobiális összetétele azonos *phylum*-okat tartalmazott és inkább a relatív mennyiségekben kaptunk eltérő értékeket. Az eredmények alátámasztották a PCR-DGGE során kapott mintázatbeli eltéréseket.



14. ábra A 3. jelű talajmintából, háromféle tisztítási módszerrel készített DNS minták baktérium összetétele. Utólagos inhibitor eltávolítás nélkül

A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy bár mind a három talajmintánál a legmagasabb H' diverzitás értéket a Käser-módszerrel tisztított DNS templárról készített PCR-DGGE mintázatnál kaptuk, ugyanakkor ez utóbbi extrakciós módszer hátránya, hogy a kinyert DNS tisztasága alacsony, így templátként való alkalmazhatósága során számolni kell PCR inhibitorok jelenlétével.

Habár a MoBio PowerSoil® kit-ben alkalmazott „bead beating” módszer számos szerző szerint¹³⁷ az egyik leghatékonyabb sejtfeltárási eljárás, kísérleteink során mi mégis azt tapasztaltuk, hogy egy erőteljes kémiai lízis alkalmazásával – ez történik az AquaGenomic™ és Käser-módszer során – a komplex mikrobiális konzorciumok esetében tovább növelhető a kimutatható baktériumok száma, kifejezetten a magas G/C-tartalmú Gram pozitív baktériumok esetében.

A DNS izolálási módszerek közötti eltérések és azok PCR-DGGE mintázatokra gyakorolt hatása régóta kutatott terület. Egyes szerzők az üveggyöngy, lizozim és detergens (SDS vagy CTAB) együttes alkalmazását javasolják^{29,138}. Sok esetben, a feltárási hatékonyságának ellenőrzésére, külső hozzáadott baktériumot is alkalmaznak. Ez utóbbi viszont, komplex mikroflóra vizsgálatoknál – mint amilyenek a talajminták – gyakorlatilag lehetetlen²⁹.

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy a különböző DNS extrakciós módszerek alkalmazása jelentősen befolyásolja a kapott DNS mennyiségét és minőségi tulajdonságait, továbbá ezen DNS mintákról készült PCR-DGGE mintázatok jellemzőit, így a vizsgált populációról nyert információt. A DNS extrakciós módszer kiválasztását alapvetően a vizsgált minta összetétele határozza meg, ezért célszerű többféle DNS izolálási módszert is alkalmazni, ha a minta összetételének feltérképezése a cél. Abban az esetben viszont, ha a mikroflóra változására szeretnénk következtetni a kapott mintázatból, akkor minden esetben azonos DNS extrakciót kell alkalmazni.

6.2. Polimeráz enzimek PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatása

A PCR-DGGE mintázat eredménye nagymértékben függ a PCR során alkalmazott körülményektől. Hibás amplifikáció eredményeként heteroduplex-ek, kimérák, mutációk vagy deléciók alakulhatnak ki, vagy a primerek eltérő kötési energiája egyes gének preferált amplifikációját okozhatja, ami végül eltérő relatív összetételhez vezet a kapott PCR-DGGE mintázatban.

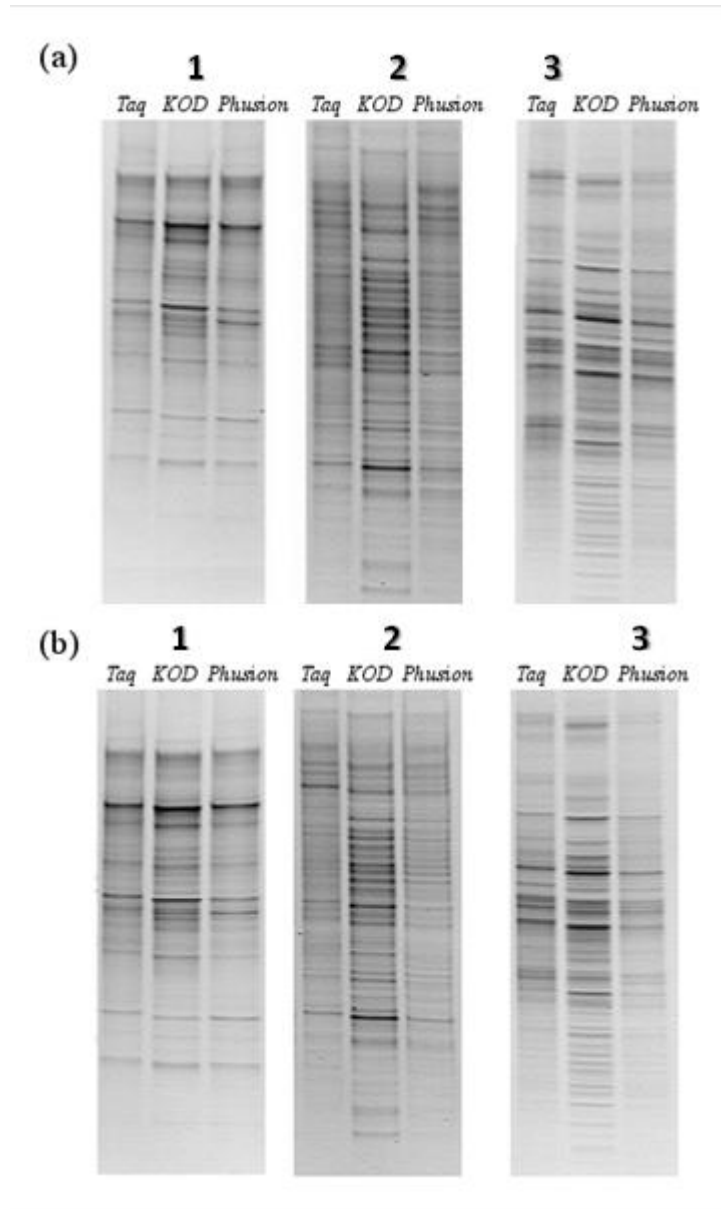
Munkánk második részében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a *Taq* DNS polimeráz enzimnél nagyobb másolási pontosságú, magasabb processzivitású és hibajavító tulajdonsággal rendelkező DNS polimeráz enzimek (*Phusion* és *KOD* DNS polimeráz enzim) alkalmazásával eltérő mintázatokat kapunk-e talajmintáról végzett PCR-DGGE analízis során.

A vizsgálatokhoz komplex mikrobiális közösséggel rendelkező talajmintákból MoBio Power Soil® kittel készített DNS templátot használtunk. Azért választottuk a MoBio PowerSoil® kit alkalmazását, mert ezzel a módszerrel tudtuk a legnagyobb tisztaságú DNS-t izolálni, és így elkerülhettük az esetleges PCR inhibitorok okozta amplifikációs különbségeket.

A különböző DNS polimeráz enzimek összehasonlításához kétféle reakcióelegyet alkalmaztunk. Egyik mind a három enzim esetén a gyártó által javasolt primer és enzim koncentrációt tartalmazta. A másik reakcióelegy alacsonyabb koncentrációjú primert és DNS polimerázt tartalmazott, mivel a *KOD* DNS polimeráznál javasolt reakcióelegy összetételében alacsonyabb az enzim (0,02 U/ μ L) és primer (0,3 mM) koncentráció, mint a *Taq* és *Phusion* esetében. E módosításnak abban volt szerepe, hogy kiküszöböljük az eltérő enzim és primer mennyiségből eredő eltéréseket.

A kétféle reakció összetétel alkalmazásával kapott PCR termékekkel készítettük a PCR-DGGE mintázatot, 30–70%-os denaturáló gradienst tartalmazó, 8%-os akrilamid gélen (15. ábra). Az elválasztást követően kapott mintázatokat a mintázatban megjelenő fragmentek száma és intenzitása alapján jellemeztük (14. táblázat). Amint a 11. ábrán látható, a három polimeráz enzim alkalmazása mellett hasonló alampintázatot kaptunk mind a három talajminta esetén, ugyanakkor a fragmentek intenzitásában és mennyiségében megfigyelhető eltérés. Még a gyártó által javasolt PCR összetétel alkalmazásával is (11/a. ábra) a *KOD* polimeráz enzim mellett tapasztaltuk a legtöbb fragmentet. Egyes mintáknál 20,6% és 41,4%–

kal több fragmentet (14. táblázat) detektáltunk a mintázatban, mint a *Phusion* és *Taq* DNS polimerázok alkalmazása mellett. A *Phusion* polimeráz enzim (a gyártó által javasolt reakció összetételénél) a három talaj közül kettőnél (1. és 3. talajminta) nagyobb diverzitású mintázatot adott, mint a *Taq* polimeráz enzim.



15. ábra DNS polimeráz enzimekkel készített DGGE mintázatok.

8%AA–bisAA, 30–70%-os denaturáló gélen **a:** a gyártó által javasolt amplifikációs körülmények alkalmazásával készült DGGE mintázatok; **b:** azonos enzim és primer koncentráció alkalmazásával készült DGGE mintázatok

A módosított amplifikációs körülmények – azonos mennyiségű enzim és primer koncentráció alkalmazása – módosították a PCR-DGGE mintázatot mind a *Taq*, mind a *Phusion* polimeráz enzimek esetében. Mindkét enzimnél kevésbé elmosódott (jobb felbontású) mintázatot kaptunk, viszont ebből adódóan egyes mintáknál változott a detektálható fragmentek száma. Különösen a *Taq* polimeráznál a módosított körülmények között a 2. talaj esetében 10%-kal több fragment jelent meg a mintázatban, mint az eredeti – gyártó utasítása szerinti – polimeráz és primer koncentráció alkalmazása mellett. Mivel a mintázatok kiértékeléséhez szoftveres elemzés végeztünk, a gélről készített kép élessége alapvetően befolyásolta a mintázatban észlelhető fragmentek számát.

Ami viszont mind a két amplifikációs körülmény mellett egyértelműen látszódott a mintázatokon, hogy a magasabb denaturáló koncentráció tartományban (>50%) a *KOD* DNS polimeráz enzim alkalmazása esetén nagyobb intenzitású mintázatot figyeltünk meg a másik két enzimmel szemben. Ebben a tartományban a magasabb G/C tartalmú – kisebb mértékben denaturálódó – szekvenciák találhatók, melyből arra következtethetünk, hogy a *KOD* polimeráz enzim ezeket a nehezebben amplifikálható templátokat hatékonyabban tudta másolni. Ezt támasztják alá a mintázatokra számított Shannon–Weaver diverzitási index értékek is (15. táblázat), melyek az összes vizsgált minta esetében a *KOD* enzim mellett adták a legmagasabb értéket, a legnagyobb faji diverzitást.

PCR körülmények	talajminta sorszáma	Detektált fragmentek száma ^a			Dice hasonlósági index ^b		
		n_T	n_K	n_{Ph}	S_{TK}	S_{KPh}	S_{PhT}
gyártó által javasolt amplifikációs körülmények	1.	26	30	25	0,571	0,655	0,634
	2.	36	45	44	0,593	0,742	0,765
	3.	34	41	29	0,667	0,657	0,717
azonos enzim, primer koncentráció alkalmazása melletti körülmények	1.	27	29	31	0,429	0,567	0,744
	2.	40	47	35	0,713	0,780	0,697
	3.	26	41	27	0,629	0,648	0,615

^a PCR-DGGE mintázatban detektált fragmentek száma;

n_T : *Taq* (Fermentas) DNS polimeráz alkalmazása mellett a PCR-DGGE mintázatban detektált fragmentek száma

n_K : *KOD* Hot Start (Novagen) DNS polimeráz alkalmazása mellett a PCR-DGGE mintázatban detektált fragmentek száma

n_{Ph} : *Phusion* (Finnzyme) DNS polimeráz alkalmazása mellett a PCR-DGGE mintázatban detektált fragmentek száma

^b PCR-DGGE mintázatok számított hasonlósági indexe; Dice együttható $S_D = \frac{2n_{AB}}{(n_A + n_B)}$

S_{TK} : hasonlóság mértéke a *Taq* és *KOD* polimeráz alkalmazásával kapott mintázatokban

S_{KPh} : hasonlóság mértéke a *KOD* és *Phusion* polimeráz alkalmazásával kapott mintázatokban

S_{PhT} : hasonlóság mértéke a *Phusion* és *Taq* polimeráz alkalmazásával kapott mintázatokban

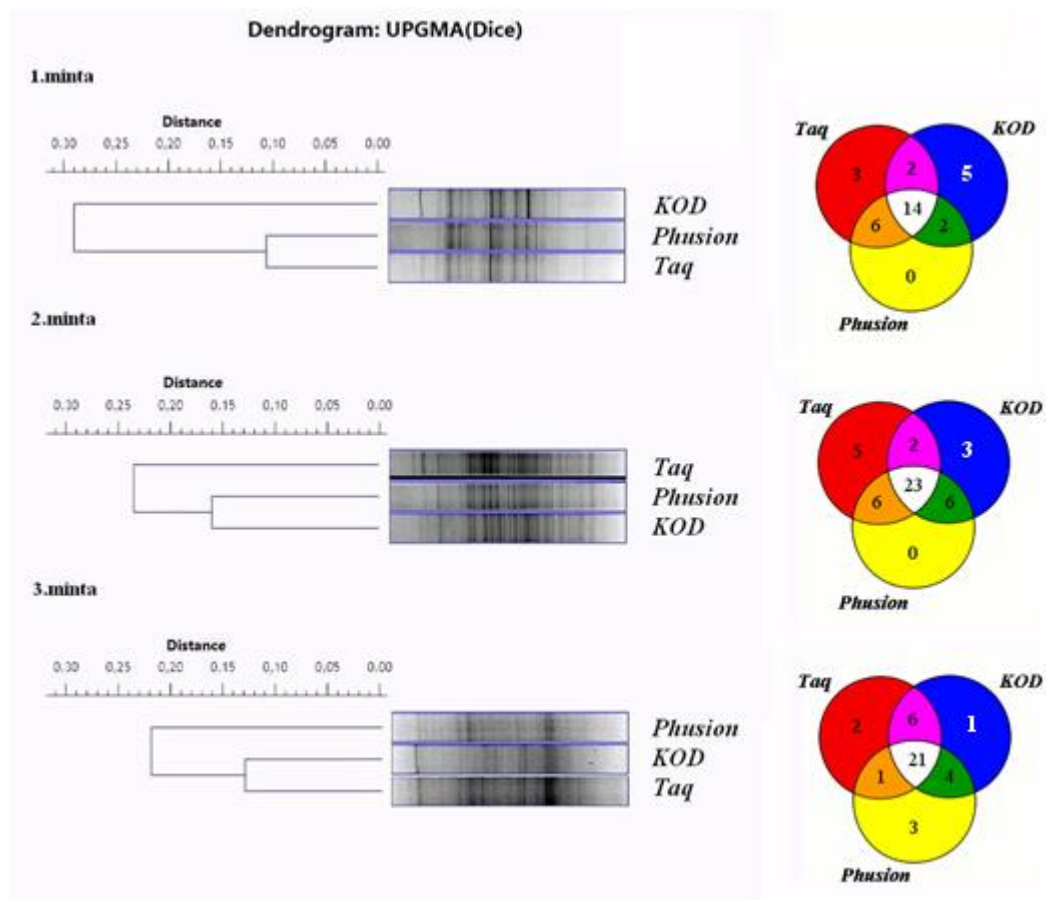
14. táblázat A DGGE mintázatokban számolt fragmentek száma és a DGGE mintázok közötti hasonlóság mértéke.

PCR körülmények	talajminta sorszáma	Shannon–Weaver index ^a		
		<i>Taq</i>	<i>KOD</i>	<i>Phusion</i>
gyártó által javasolt amplifikációs körülmények	1.	3,242	3,392	3,203
	2.	3,561	3,795	3,779
	3.	3,449	3,605	3,398
azonos enzim, primer koncentráció alkalmazásával	1.	3,276	3,326	3,431
	2.	3,668	3,844	3,554
	3.	3,344	3,688	3,399

^a Shannon–Weaver diverzitás index (faji változatosság): $H' = -\sum_{i=1}^s (p_i \times \ln p_i)$

15. táblázat DGGE mintázatokra számított diverzitás indexek.

Arra vonatkozólag, hogy az egyes enzimek milyen mértékben adnak hasonló mintázatot, a Dice hasonlósági indexből (14. táblázat) és az azok alapján készített dendrogramokból és Venn-diagramokból (16. ábra) következtethetünk.



16. ábra Különböző polimeráz enzimekkel kapott DGGE mintázatokat összehasonlító dendrogramok (Dice-együttható, UPGMA módszer) és Venn-diagram.

1: szénhidrogénnel szennyezett talajminta (Σ PAH=819; Σ VOC=9248; Σ EPH=1864); 2: szénhidrogénnel szennyezett talajminta (Σ VOC=178, Σ EPH=58); 3: nem szennyezett talajminta.

Ahogy a táblázat értékeiből és a dendrogramok alapján látható, nem lehetett kimutatni egyértelmű hasonlóságokat két-két enzim között. Az egyes mintákról készített mintázatok között megfigyelhető egy alap mintázati átfedés, ami az összes enzimmél a legnagyobb számban megjelenő azonos fragmentek: ez az 1. talajmintánál 14 db; a 2. talajmintánál 23 db és a 3. talajmintánál 21 db, de minden enzim esetében 0–5 db egyedi és 1–6 db csak két polimeráz enzim alkalmazásánál megjelenő azonos fragmentet is tapasztaltunk.

Ebben a fejezetben bemutatott kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a mikrobiális diverzitás vizsgálatoknál – mint amilyen a PCR-DGGE –, a PCR reakcióhoz alkalmazott DNS polimeráz enzim befolyásolja-e a kapott mintázatot. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a különböző DNS polimeráz enzimek felhasználása komplex

mikrobiális DNS templátról részben eltérő amplifikációhoz vezet, így az alkalmazott enzimek egyértelműen befolyásolják az amplifikáció eredményeként létrejövő mintázatot. Kétféle amplifikációs körülmény mellett is egyértelműen látszódott a PCR-DGGE mintázatokon, hogy 50% feletti denaturáló koncentráció tartományban a *KOD* DNS polimeráz enzim alkalmazásával intenzívebb mintázatot kaptunk, ami alapján arra következtethetünk, hogy a *KOD* polimeráz a magasabb G/C tartalmú, nehezebben amplifikálható templátokat hatékonyabban képes másolni.

6.3. Mesterséges konzorcium és DGGE marker készítése

A polimeráz enzimek DGGE mintázatra gyakorolt hatását környezeti mintákon végzett kísérletekkel, a kiindulási teljes mikroflóra ismerete nélkül nehéz összehasonlítani, mivel az enzimek másolási pontossága, a PCR során keletkező fals amplikonok (kimérák, deléciók), a multitemplát DNS és polimeráz enzim eltérő PCR inhibitor érzékenysége mind befolyásolja a kialakult mintázatot. Ezért egy olyan templát előállítása volt a célunk, amelyről készített DGGE mintázatban minden egyes fragment szekvenciája ismert, így a 16S rDNS V3 régiójának amplifikálása során mindig azonos mintázat várható.

A DGGE marker készítéséhez először baktérium izolátumok genomiális DNS–ét alkalmaztunk. A 16S rDNS amplikonokat UltraClean PCR tisztító kit segítségével tisztítottuk, hogy a maradék DNS templát és primer ne okozhasson fals eredményeket a második amplifikáció (16S rDNS V3 régió) során. Azonban az egyedi törzsekről készített DGGE mintázatban a vizsgált baktériumoknak csak egyharmadánál – 15 törzsből 5–nél – kaptunk egyedi fragmentet. A többi esetben kettő vagy akár hat fragment is megjelent a mintázatban. A 16S rRNS gén a baktérium genomon belül több kópiában (1 és 15 között) található meg¹³⁹¹⁴⁰. A genomon belül a 16S rDNS gének között is kimutathatóak heterogenitások, aminek oka az: (1) átmeneti mutáció, ahol a purin ($A \leftrightarrow G$) vagy a pirimidin ($C \leftrightarrow T$) kölcsönhatása miatt következik be pontmutáció a DNS–ben; (2) transzverzió, amikor egy purinbázis egy pirimidin–bázissal, vagy egy pirimidin bázis egy purin bázissal szubsztituál; vagy (3) deléció¹⁴¹. A 16S rRNS géneknél ez 0–19 nukleotid eltérést is okozhat azonos genomon belül. A 16S rRNS gén V3 régiója az egyik legkisebb heterogenitással rendelkezik a többi konzervált régióhoz képest, de már a néhány nukleotid eltérésből adódó heterogén szekvenciák is elkülönülnek a mintázatban.

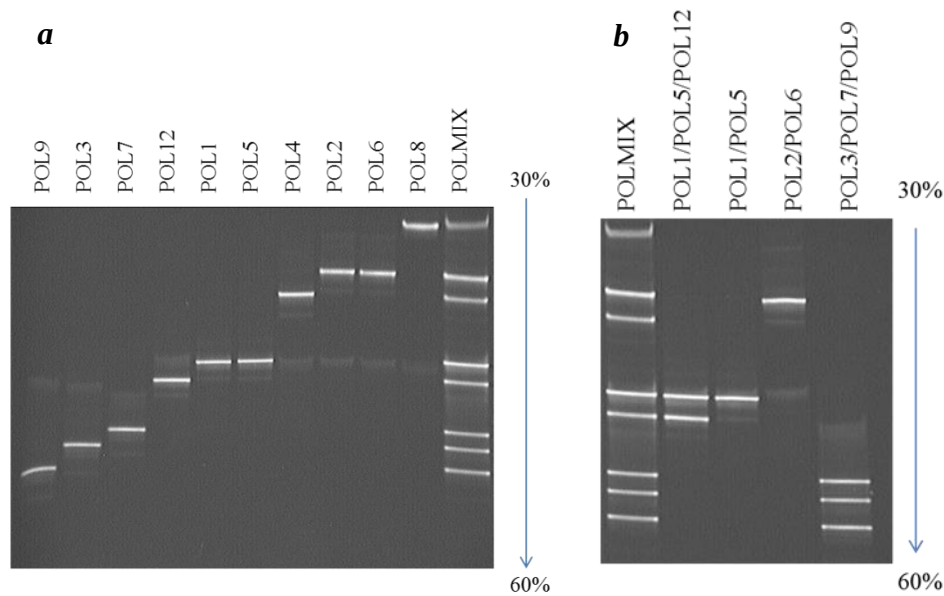
Ahhoz, hogy elkerüljük a heterogenitásból adódó több fragmentet, a genomiális DNS templát helyett a 16S rRNS gént izoláltuk, plazmidba transzformáltuk, majd ezt a plazmidot használtuk templátként.

A 36 jelöltből 13 maradt, ahol a plazmid megfelelő méretű volt és a PCR során is megfelelő méretű terméket adott. A PCR termékeket szekvenáltattuk és a plazmidokat törzsgyűjteményben archiváltuk (16. táblázat).

plazmid azonosító	a plazmidba klónozott 16S rRNS gén szekvenvencia alapján	törzsgyűjtemény azonosító
POL1	<i>Rhodferax ferrireducens</i>	2665
POL2	<i>Pseudomonas sp.</i>	2666
POL3	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	2667
POL4	<i>Variovorax paradoxus</i>	2668
POL5	<i>Methylibium petroleiphilum T29¹⁴²</i>	2669
POL6	<i>Pseudomonas veronii T1/1¹⁴³</i>	2676
POL7	<i>Ochrobactrum tritici</i>	2671
POL8	<i>Lactobacillus sp.</i>	2672
POL9	<i>Kocuria sp.</i>	2673
POL12	<i>Citrobacter sp.</i>	2675
R17	<i>Acidovorax sp.</i>	2676
R18	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	2677
R21	<i>Novosphingobium sp.</i>	2678

16. táblázat DGGE marker készítéshez alkalmazott plazmidok.

A kiválasztott 13 plazmidról a 16S rRNS gén V3 régióját amplifikáltuk, majd a termékeket 30–60%-os denaturáló gélen (8% akrilamid) futtattuk (17. ábra). A kapott mintázat alapján két-két független 16S rRNS gént tartalmazó plazmid (POL1/POL5 és POL2/POL6) esetén ugyanannál a denaturáló koncentrációnál futó fragmenteket kaptunk, ami alapján arra következtettünk, hogy a V3 régióban lévő gén szekvenciájuk megegyező. Az azonosnak látszó ampikonokat a V3 gén amplifikálását követően egy-egy arányban összekevertük és újrafuttatással ellenőriztük (17. ábra).

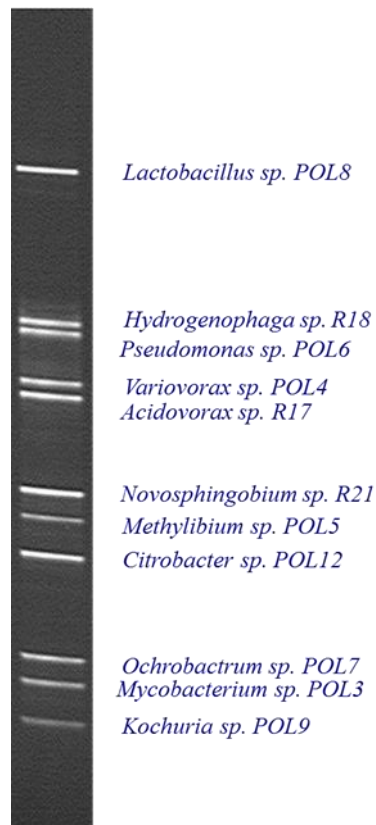


17. ábra Egyedi és kevert plazmidokról készített V3 gén DGGE mintázata.

a: egyedi plazmidok POL1–POL12; POLMIX:

POL9:POL3:POL7:POL12:POL5:POL4:POL6:POL8=1:1:1:1:1:1:1:1 arányú keverékről amplifikált V3 gén; **b:** azonos szekvenciát mutató ampliconok keverékeinek DGGE mintázata

A marker készítés során az egyik célunk az volt, hogy a készített létra a 8% akrilamid gélen, 30–60%-os denaturáló koncentráció tartományban, az adott futtatási paraméterek (5.1.4. fejezetben leírtak) mellett adjon egy állandó mintázatot, mely a teljes gradienst lefedi. Emellett, próbáltunk a létra készítése során olyan baktériumtörzseket alkalmazni, melyek rendelkeznek valamilyen különleges szénhidrogén bontó képességgel, ami indokolja alkalmazásukat a bioremediációs eljárások során. Ilyen törzs volt a *Methylibium petroleiphilum* T29 és a *Variovorax paradoxus*, melyek metil–tercier–butiléter (MTBE) bontó izolátumok és a *Pseudomonas veronii* T1/1, a *Ochrobactrum* sp. és a *Kocuria* sp., melyek a BTEX (benzol/toluol/etilbenzol/xilol) egyes komponenseinek biodegradációjára képesek és korábbi munkák során sikeresen alkalmaztuk bioaugmentációs kísérletek során. Így a létrehozott PCR-DGGE markert további munkák során e baktériumtörzsekkel végzett remediációs célú kísérletek során is alkalmazni tudtuk.



18. ábra A plazmid keverékről (POLMIX11) amplifikált DGGE marker

Az egyes szekvenciák ismeretében kiszámoltuk a markert alkotó amplikonok guanin/citozin tartalmát (GC-clamp nélkül), amely korrelált a gradiens gélen megjelenő futási hellyel.

		%G-C tartalom	amplikon hossz (bp)
1	<i>Lactobacillus sp.</i>	48,4	192
2	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	53,1	192
3	<i>Pseudomonas veronii T1/1</i>	51	192
4	<i>Variovorax paradoxus</i>	52,8	193
5	<i>Acidovorax sp.</i>	53,1	192
6	<i>Novosphingobium sp.</i>	52,4	168
7	<i>Methylibium petroleiphilum T29</i>	55,2	192
8	<i>Citrobacter sp.</i>	54,6	194
9	<i>Ochrobactrum tritici</i>	56,3	167
10	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	58,7	172
11	<i>Kocuria sp.</i>	58,7	172

Alapvetően igaz, hogy a 16S rRNS gén a nemzetségi és annál magasabb taxonómiai kategóriákba soroláshoz rendelkezik megfelelő felbontással. Másrészt, a PCR-DGGE

módszer korlátja, hogy a 16S rRNS gén variábilis régióinak maximálisan ~500 bp hosszúságú szakaszairól készíthetünk mintázatot. A 16S rRNS gén ilyen hosszúságú szakaszai sok esetben különböző baktériumfajok esetében is azonos szekvenciájúak lehetnek. Ebből adódóan, ha a kapott mintázatból kivágott fragment alapján próbálnánk azonosítani a mintában lévő baktériumot, a szekvencia több, azonos nemzetségbe (genus–ba) tartozó fajjal is adhat egyezést. Vannak viszont olyan esetek (pl. élelmiszer minőség vizsgálatok), ahol a vizsgált minta mikroflórájának PCR-DGGE mintázata alkalmas minőségi jellemzőinek igazolására¹⁴⁴.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy a 16S rRNS gént tartalmazó plazmidok alkalmazásával sikeresen elő tudtunk állítani egy kívánt szekvencia összetétellel rendelkező PCR-DGGE markert. A markert további munkáink során – hasonlóan a kereskedelmi forgalomban beszerezhető PCR-DGGE markerekhez – alkalmazni tudtuk a DGGE gél futtatás körülményeinek ellenőrzésére. Ennél még fontosabb eredmény, hogy kifejlesztettünk és alkalmaztunk egy olyan módszertani eljárást, amellyel tetszőleges szekvenciák kiválasztásával a PCR-DGGE technika alkalmassá tehető egy gyors minőségellenőrzési módszerként történő használatra.

6.4. PCR inhibitorok DNS polimeráz enzimekre gyakorolt hatása

A PCR alapú vizsgálatokat egyre szélesebb körben alkalmazzák – a módszer gyorsaságából és érzékenységéből adódóan – minőségellenőrzési, orvosi, igazságügyi diagnosztikai és környezeti minták analízise során. A PCR inhibitorok elsősorban azon vizsgálatok során okoznak problémát, ahol a vizsgálandó minta csak nagyon kis mennyiségben tartalmazza a kimutatandó célgént, ezért nem feltétlenül lehetséges a nagy tisztaságú (inhibitor mentes) templát alkalmazása. Ilyen többek között, a véráram fertőzést (bloodstream infection) okozó baktériumok kimutatása¹⁴⁵ vagy az régészeti – főként több ezer éves – maradványok archeogenetikai vizsgálata, ahol a kis mennyiségű, degradálódott DNS-ről történik az amplifikáció¹⁴⁶. Hasonlóan gyakori probléma az igazságügyi vizsgálatok során is, ahol sok esetben az analízishez rendelkezésre álló minta mennyisége is korlátolt^{49,50}.

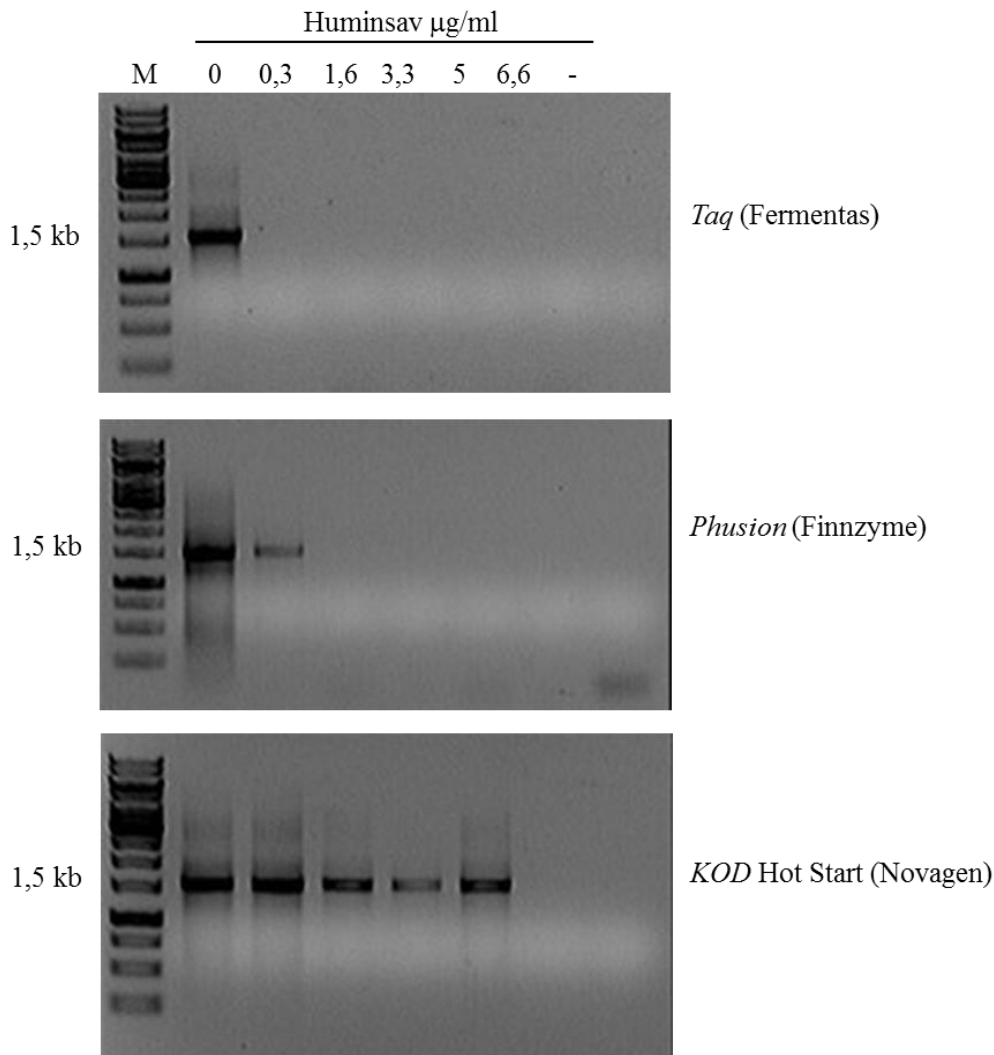
A polimeráz enzimek inhibitor tolerancia vizsgálata során a két leggyakrabban előforduló PCR inhibitort tartalmazó mátrixot, a vért és talajt alkalmaztuk. A vér esetében a PCR gátlási kísérletek során teljes vért és vérszérumot, a talaj esetében talajextraktumot és huminsavat vizsgáltuk.

6.4.1. PCR gátlás vizsgálata genomiális DNS templátról történő amplifikáció során

A huminsav egy igen gyakran előforduló szennyező komponens a DNS tisztítás során. Egyrészt a DNS-hez hasonló kémiai és fizikai tulajdonságai miatt, a DNS tisztítási lépések során hasonlóan viselkedik – és ez által együtt extrahálhatjuk – magával a DNS-sel, másrészt kémiai szerkezetéből adódóan másodlagos kötésekkel a DNS szálhoz kapcsolódhat^{55,74}. Az előző fejezetekben használt három hőstabil DNS polimeráz enzim (*Taq*, KOD, *Phusion* enzimek) esetében először talajmintákból izolált DNS mintákról végzett 16S rRNS gén amplifikálása során vizsgáltuk az enzimek huminsav érzékenységét. A PCR reakciót ismert mennyiségű, 0,0–6,6 µg/ml huminsav hozzáadásával végeztük. A huminsav PCR gátló hatását ún. végpont PCR alkalmazásával vizsgáltuk, mely során azt a legkisebb huminsav koncentrációt határoztuk meg gátló mennyiségnek, amely alkalmazása mellett a PCR-t követően az ampikon már nem detektálható az agaróz gélelektroforézis során.

A három DNS polimeráz enzim vizsgálata során igen eltérő inhibíciót tapasztaltunk (19. ábra). A *Taq* DNS polimeráz enzim működését már kevesebb, mint 0,3 µg/ml koncentrációjú huminsav gátolta. A *Phusion* DNS polimerázzal 0,3 µg/ml koncentrációjú huminsav

koncentráció mellett még kaptunk terméket, viszont a legnagyobb huminsav toleranciát (5 µg/ml, ami 16-szor nagyobb, mint a *Phusion* DNS polimeráz enzim esetében) a *KOD* DNS polimeráz enzim esetében tapasztaltuk (17. táblázat).



19. ábra Huminsav PCR gátló hatása: 5 ng DNS tartalmú PCR reakcióban, 0–6,6 µg/ml huminsav mellett, primerek: Eub–27F/Eub–1552R. Jelölések: M: 1 kb molekulatömegű marker (Fermentas); 0: pozitív kontroll; –: negatív kontroll

DNS polimeráz	PCR eredménye ^a különböző mennyiségű huminsav ^b jelenlétében (µg/ml)					
	0	0,3	1,6	3,3	5	6,6
<i>Taq</i> (Fermentas)	+	–	–	–	–	–
<i>Kod Hot Start</i> (Novagen)	+	+	+	+	±	–
<i>Phusion</i> (Finnzymes)	+	+	–	–	–	–

^a PCR eredménye: jelölések: +, erős intenzitású, megfelelő méretű termék; ±, alacsony intenzitású, megfelelő méretű termék; –, nem kaptunk detektálható terméket.

^b huminsav koncentráció (µg/ml) 5 ng DNS templát mellett

17. táblázat Huminsav PCR gátló hatása a három vizsgált DNS polimeráz enzim esetében.

6.4.2. PCR gátlás vizsgálata mesterséges konzorciummal

Az inhibitor (talajextraktum, huminsav, vér és vészérum) komponensek PCR gátló hatását a már fentebb bemutatott mesterséges konzorciummal (POLMIX11: 16S rRNS gént tartalmazó plazmid keverék (6.3. fejezet)) is vizsgáltuk. A plazmid keverék alkalmazásával nemcsak az inhibitor PCR gátló hatása, hanem az egyes inhibitor komponensek DGGE mintázatra gyakorolt hatása is könnyebben vizsgálhatóvá vált.

A PCR során a POLMIX11 plazmid keverékből templátként csak 20 pg plazmid DNS-t alkalmaztunk, szemben az előzőekben alkalmazott 5 ng genomiális DNS-sel. Az alacsonyabb plazmid DNS koncentráció azonban így is közel azonos kópiaszámú 16S rRNS génszakaszt tartalmazott (átlagos 3000 bp plazmid mérettel számolva $\sim 10^6$ db); mint az 5 ng genomiális DNS, átlagos 4 Mbp mérettel számolva $1,16 \times 10^6$ db.

A kópiaszám meghatározásához alkalmazott egyenlet:

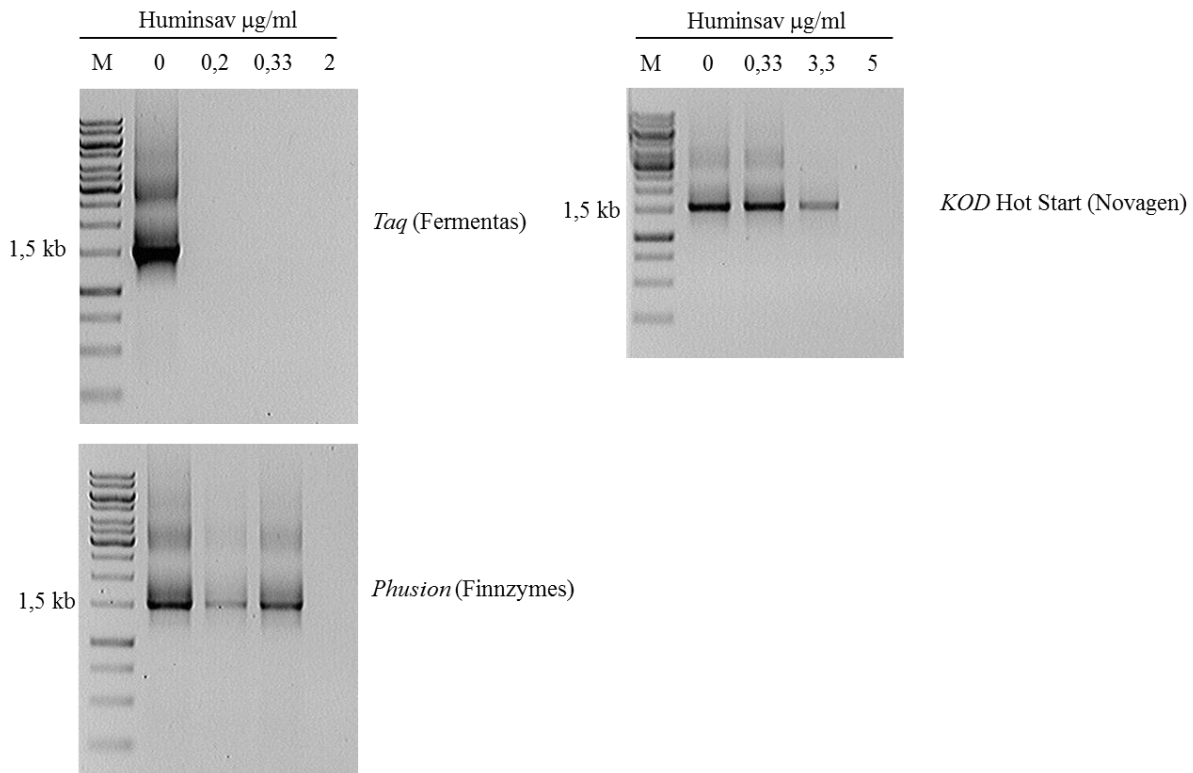
$$kópiaszám = \frac{ng\ DNS \times 6,0221 \times 10^{23} \frac{molekula}{mol}}{DNS\ hossz\ [bp] \times 660 \frac{g}{mol} \times 10^9 \frac{ng}{g}}$$

Igaz, a kópiaszám becslés komplex, többféle baktériumból származó DNS esetén csak nagyságrendileg valószínűsíthető, mivel a baktériumok kromoszómális DNS-ének mérete 0,6–9,0 Mbp tartományban van és a 16S rRNS gén kópiaszáma is egy genomon belül 1–15 között változhat¹⁴⁷.

6.4.2.1. Huminanyagok és talajkomponensek PCR gátló hatása

A PCR gátló hatást két primer párral (Eub-27F/Eub-1552R és pJET1.2 Forward/pJET1.2 Reverse) is vizsgáltuk. A PCR reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (20. ábra). Hasonlóan a genomiális DNS-ről végzett kísérletekhez, a huminsav jelenlétére legérzékenyebb DNS polimeráz enzimnek a *Taq* enzim bizonyult, amely mellett már 0,2 µg/ml huminsav gátolta a reakciót. A *Phusion* polimeráz enzim esetében azonos huminsav koncentráció mellett volt kimutatható a PCR gátló hatás (>0,33 µg/ml) a plazmid templátról, mint genomiális DNS-ről történő PCR-nél. Egyedül a *KOD* polimeráz enzim esetében tapasztaltunk eltérést, ugyanis a plazmidról végzett PCR

során 5 µg/ml huminsav mellett már nem kaptunk terméket, szemben a genomiális DNS-sel végzett PCR-rel. Az eltérés oka valószínűleg a huminsav több tényezős gátló hatásának következménye, mivel a reakciót gátolhatja az enzim aktív centrumát a kofaktor (Mg^{2+}) interkalálásával, de kötődhet magához a DNS templáthoz is és ez utóbbi a plazmid és genomiális DNS-ről történő amplifikáció során eltérő.



20. ábra Huminsav PCR gátló hatása. 20 pg plazmid DNS tartalmú PCR reakcióban, 0–5 µg/ml huminsav mellett, primerek: Eub–27F/Eub–1552R. Jelölések: M: 1 kb molekulatömegű marker (Fermentas); 0: pozitív kontroll

A huminsav PCR gátló hatása mindkét primer párral (eubaktérium és pJET1.2 primerek) végzett reakció során azonos eredményt adott (18. táblázat), és igazoltuk, hogy a vizsgált DNS polimeráz enzimek közül a *KOD* az az enzim, ami legmagasabb koncentrációban képes tolerálni a huminsav jelenlétét.

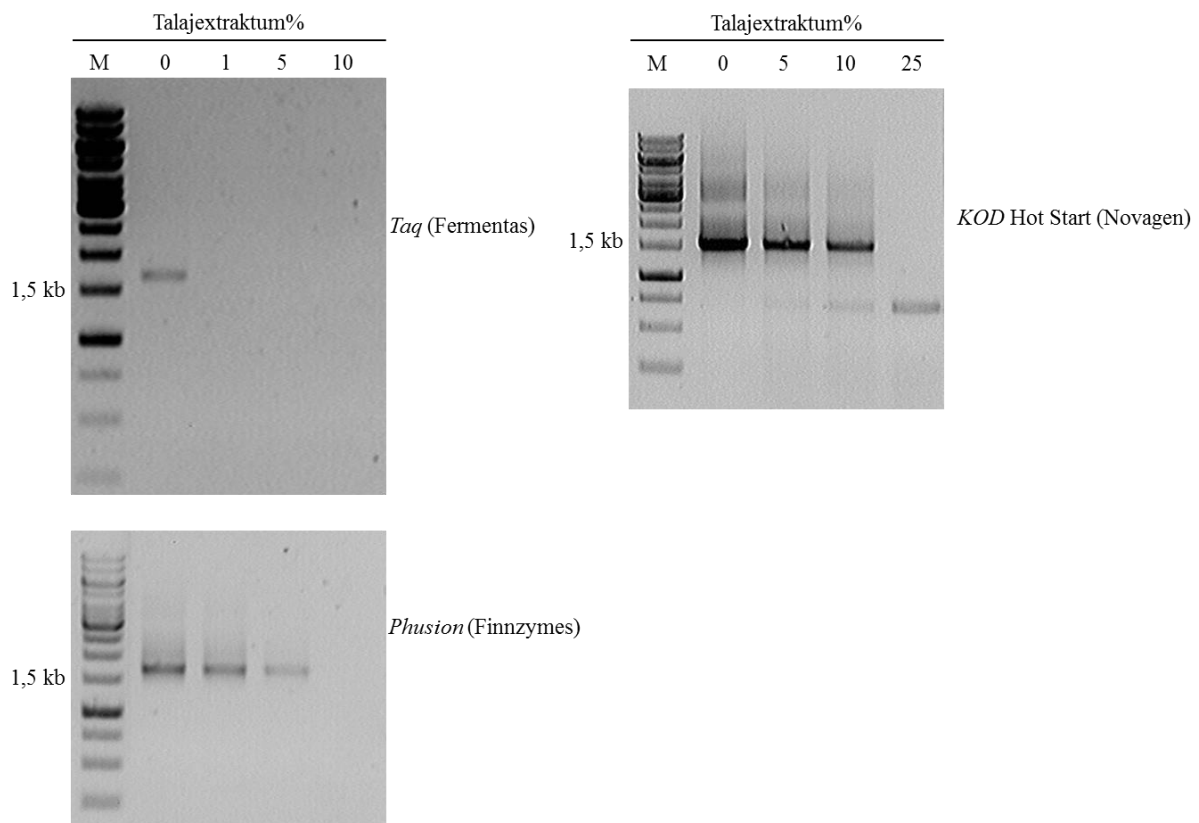
DNS polimeráz enzim	PCR eredménye ^a különböző mennyiségű huminsav ^b jelenlétében (µg/ml)					
	0	0,2	0,33	2	3,3	5
<i>Taq</i> (Fermentas)	+/+	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–
<i>Kod Hot Start</i> (Novagen)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	–/–
<i>Phusion</i> (Finnzymes)	+/+	+/+	+/+	–	–	–

^a PCR eredménye: jelölések: +/+, erős intenzitású, megfelelő méretű termék mind a két (Eub27/Eub1552 és pJET) primerrel; –/–, nem kaptunk detektálható terméket egyik primerrel sem

^b huminsav koncentráció (µg/ml) 20 pg plazmid DNS templát mellett

18. táblázat Huminsav PCR gátló hatása a három vizsgált DNS polimeráz enzim esetében.

A talaj kiemelt PCR-t gátló komponense a huminsav, de emellett tartalmaz még több olyan vegyületet (fulvosavak, huminanyagok, polifenolok, nehézfémek), amelyek szintén gátolhatják a PCR reakciót és a DNS tisztítási lépések során tökéletesen nem távolíthatóak el a DNS mellől. Ezért a tiszta huminsav mellett, talajmintából készített ún. „talajextraktum” jelenlétében is elvégeztük a kísérleteket. A talajextraktumot 1–25 v/v% mennyiségben adtuk a PCR előtt a reakciókeverékhez és a gátló hatást szintén végpont PCR segítségével mértük. Mind a három DNS polimeráz enzim esetében a huminsav jelenlétében kapott eredményekkel összhangban hasonló PCR gátló hatást tapasztaltunk. A *Taq* polimeráz enzimet már a legkisebb koncentrációjú, 1%-os talajextraktum jelenléte gátolta. A *Phusion* polimeráz enzimmél 5%-os talajextraktum mellett ugyan kisebb intenzitású, de megfelelő méretű terméket kaptunk, míg a *KOD* polimeráz enzim alkalmazásával még 10%-os talajextraktum mellett is erős intenzitású, várt méretű amplikont kaptunk (21. ábra). Hasonlóan a huminsavval végzett kísérletekhez, itt is két primer párral (eubaktérium 16S és pJET1.2 primerek) vizsgáltuk a talajextraktum PCR gátló hatását. A két PCR során azonos gátló koncentrációkat mértünk.



21. ábra Talajextraktum PCR gátló hatása. 20 pg plazmid DNS tartalmú PCR reakcióban, 0–25 v/v%-os talajextraktum mellett, primerek: Eub–27F/Eub–1552R. Jelölések: M: 1 kb molekulatömegű marker (Fermentas); 0: pozitív kontroll

A talajextraktummal és huminsavval végzett PCR gátlási vizsgálatok alapján egyértelműen igazolható volt, hogy a három vizsgált DNS polimeráz enzim közül a *KOD* a legkevésbé érzékeny a talajból származó PCR gátló vegyületek jelenlétére.

Számos tanulmány vizsgálja a kereskedelmi forgalomból beszerezhető DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenységét^{77,148,149}. Az egyes tanulmányok összehasonlíthatósága nehézkes, mert nem azonos jellegű (pl. mitokondriális vagy prokarióta DNS) és nem azonos mennyiségű (1–100 ng/reakció) templát DNS-ről, különböző méretű (jellemzően rövid: 100–600 bp) és eltérő specifitású ampikonok előállítása során vizsgálják a gátló hatást. További nehézséget jelent, hogy egyes enzimeknél a reakcióhoz alkalmazott puffer tartalmaz amplifikációt segítő adalékanyagokat – DMSO-t vagy BSA-t –, így a gátló hatás nem mutatható ki egyértelműen. Egyes kutatások a legnagyobb huminsav és talajextraktum toleranciát a *Pfu* és *Crimson Taq* enzimeknek tulajdonítják¹⁴⁹. Több enzim összehasonlítása során megállapították, hogy e két enzim százszor nagyobb huminsav koncentrációt tolerál, mint a *Phusion* enzim. Szintén kiemelkedő huminsav rezisztenciával (62,5 ng/μl) rendelkezik a *Pab-polB* (*Pyrococcus abyssi*) polimeráz enzim. A magas huminsav tolerancia mellett ennek az enzimnek számos előnyös tulajdonsága is van: mint például a *Pfu*-t megközelítő pontosság ($6,7 \times 10^{-6}$ – $6,6 \times 10^{-7}$) és extrém hőstabilitás (100 C/5 óra; 90 C/10 óra), ugyanakkor hátránya viszont a lassú másolás (0,48 kb/perc)¹⁰⁵.

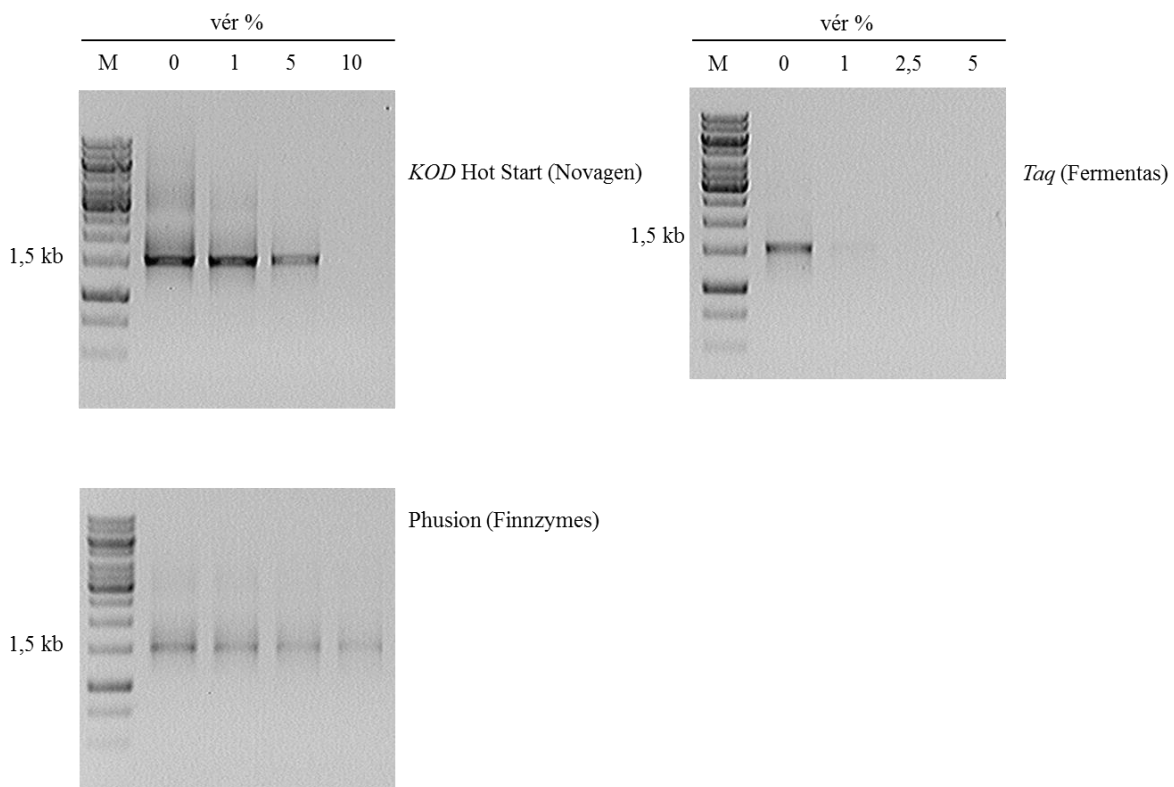
Az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben a *KOD* DNS polimeráz enzim a *Phusion*-hoz képest ugyan csak tízszer nagyobb huminsav koncentrációt tolerált, viszont ez a 3,3–5 μg/ml huminsav koncentráció még mindig felülmúlta a talajmintákból történő DNS extrakció során visszamaradó 0,7–3,3 μg/ml huminsav mennyiséget²⁴. Mindezek mellett, a *KOD* polimeráz enzim másolási sebessége 6–7,8 kb/perc, ami szemben a *Pal-polB* és *Pfu* enzimekkel sokkal gyorsabb amplifikációt tesz lehetővé.

6.4.2.2. Vér és komponenseinek PCR-gátló hatása

Vérminták vizsgálatakor is gyakori gond az inhibitor anyagok gátló hatásából adódó fals negatív vagy kis érzékenységű reakciók, viszont sok esetben – pl. mikrobiális fertőzések, genetikai betegségek kimutatása vagy igazságügyi vizsgálatok során – PCR alapú mérések vagy diagnosztikai vizsgálatok alkalmazása elkerülhetetlen. Ebből kifolyólag az utóbbi években a vérből történő analízishez számos fejlesztést végeztek mind a DNS tisztítási

módszerek, PCR-t segítő anyagok (T4 Gene 32 Protein, stb.) vagy új, inhibitor rezisztens DNS polimeráz enzimek izolálása, mesterséges konstrukciója terén. Habár a vészérum a teljes vérhez képes alacsonyabb koncentrációban tartalmaz hemet vagy hemoglobint, de tartalmaz még számos olyan peptidet (pl. IgG) vagy szervetlen iont (pl. Ca^{2+}) ami gátolja a reakció sikerességét^{56,58}.

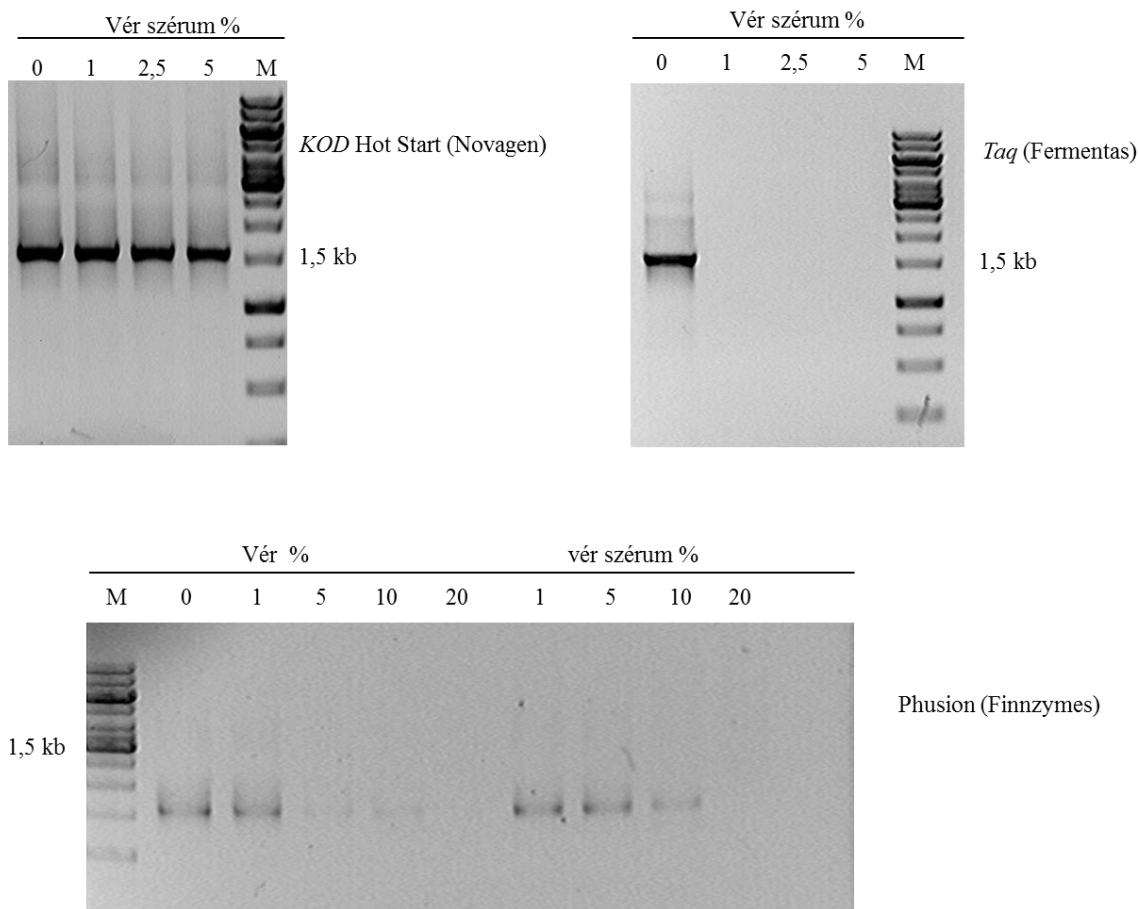
A DNS polimeráz enzimek összehasonlítása során mind a teljes vért, mind a vészérumot 1–20 v/v%-os mennyiségben adtuk a reakcióelegyhez és eubaktérium 16S és pJET1.2 primerek mellett vizsgáltuk a PCR gátló hatást (22. ábra–23. ábra).



22. ábra Teljes vér PCR gátló hatása. 20 pg plazmid DNS tartalmú PCR reakcióban, 0–10 v/v%-os teljes vér mellett, primerek: Eub–27F/Eub–1552R. Jelölések: M: 1 kb molekulatömegű marker (Fermentas); 0: pozitív kontroll

A vártak megfelelően, a *Taq* DNS polimeráz enzim volt a legérzékenyebb a gátló komponensek jelenlétére, amplifikációs képességét már 1 v/v% vér és vészérum is jelentősen gátolta. A *KOD* enzim 1–5 v/v% vér és vészérum mellett képes volt a megfelelő méretű termék amplifikálására, 5 v/v% felett már aspecifikus termékek keletkezését tapasztaltuk. A vizsgált enzimek közül a *Phusion*-nál tapasztaltuk a legkisebb érzékenységet a vér és vészérum komponensekre. Még 10 v/v%-os vér tartalom mellett is kaptunk megfelelő

méretű terméket, igaz jelentősen kisebb mennyiségben, ami a reakció gátlására utalt (23. ábra).



23. ábra Vérszérum PCR gátló hatása. 20 pg plazmid DNS tartalmú PCR reakcióban, 0–20 v/v%-os vérszérum mellett, primerek: Eub–27F/Eub–1552R. Jelölések: M: 1kb molekulatömegű marker (Fermentas); 0: pozitív kontroll

A három polimeráz enzim közül a *Phusion* az egyetlen fúziós polimeráz enzim, amely tartalmaz egy archaea eredetű Sso7d fehérje alegységet. Ez az alegység elsősorban az enzim kettős szálú DNS-hez kapcsolódását segíti, ezáltal növelve az amplifikáció sebességét, megőrizve a módosított enzim (*Pfu*) pontosságát. Egyes szerzők azonban ennek a fehérje alegységnek tulajdonítják az enzim magasabb inhibitor toleranciáját is¹²³, ezért képes tolerálni magasabb só koncentrációkat, mint a vérszérum Ca^{2+} tartalma, valamint, számos gátló anyaggal (heparin, huminsav, tanninok stb.) szemben is nagyságrendekkel magasabb toleranciát mutat, mint a *Pfu* enzim. Feltehetően a *Phusion* DNS polimeráz enzim kiemelkedő inhibitor toleranciája járult hozzá, hogy egy hasonló, extrém rezisztens DNS polimeráz enzim (*Phusion Blood*) is megtalálható a kereskedelmi forgalomban, amely akár 40 v/v% vér jelenlétében is képes az amplifikációra.

Az enzimek inhibitor érzékenységének összehasonlítása során szándékosan nem vizsgáltuk PCR segítő anyagok (BSA, DMSO stb.) hozzáadásának hatását, mivel elsődleges célunk az enzimek gátló komponensek melletti amplifikációs képességének vizsgálata volt és nem az optimális körülmények beállítása.

DNS polimeráz enzim	huminsav ($\mu\text{g/ml}$)	talajextraktum (v/v%)	vér (v/v%)	vérszérum (v/v%)
<i>Taq</i> (Fermentas)	<0,2	<1	<1	<1
<i>KOD Hot Start</i> (Novagen)	3,3	10	5	5
<i>Phusion</i> (Finnzymes)	0,3	5	10	10

19. táblázat DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenysége.

A gátlási vizsgálatok alapján egyértelműen igazolható volt, hogy a *Taq* DNS polimeráz enzim kiemelten érzékeny a gátló komponensek jelenlétére és már nagyon alacsony inhibitor (huminsav, talajextraktum, vér és vérszérum) koncentráció is gátolja az enzim működését. A *Phusion* és *KOD* DNS polimeráz enzimek eltérő érzékenységet mutatnak a talaj és vér gátló komponenseire. Míg a *Phusion* enzim kifejezetten ellenálló a vér PCR gátló hatására, addig a *KOD* enzim inkább talaj eredetű PCR inhibitorok esetében alkalmazható hatékonyabban (19. táblázat).

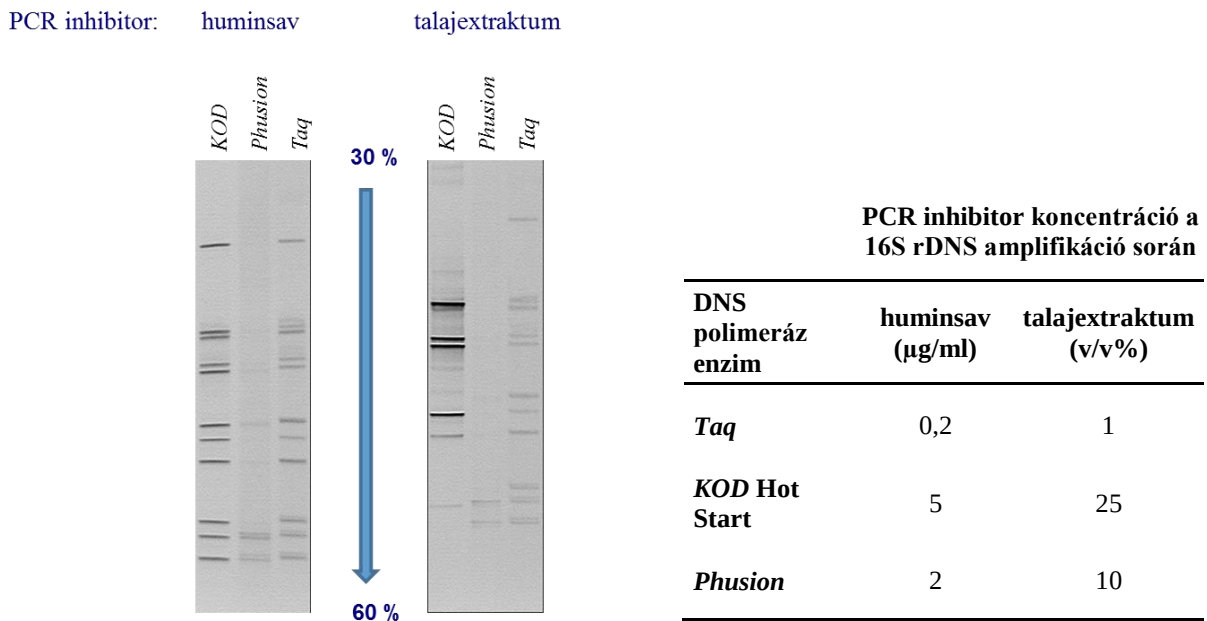
6.5. PCR inhibitorok PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatása

A PCR inhibitorok PCR-re és kvantitatív PCR-re (qPCR) gyakorolt hatásának vizsgálatára számos irodalmi hivatkozás található^{48,50,55,59,148,149}. A legtöbb tanulmány az inhibitor komponensek PCR gátló hatását (enzim vagy templát gátlását) vizsgálja, vagy egyes inhibitor makromolekulák (jellemzően aromás vegyületek) fluoreszcencia gátló/kioltó hatását. A szakirodalomban azonban kevés adat található arra vonatkozólag, hogy milyen hatása van az inhibitoroknak olyan multitemplát PCR során, ahol egyidejűleg eltérő szekvenciák amplifikációjára van szükség. A PCR inhibitorok DGGE mintázatra gyakorolt hatására vonatkozóan gyakorlatilag nem található szakirodalmi adat. Ennek feltételezhetően az is oka, hogy az ilyen DNS újjelenyomat vizsgálatok egyre inkább háttérbe szorulnak, mivel olyan vizsgálatok során, ahol a mikrobiális összetétel meghatározása a cél, az utóbbi években egyre inkább metagenom szekvenálást alkalmaznak. Másrészt a PCR inhibitorok alapvetően az amplifikációra gyakorolnak hatást, így hatásmechanizmusaikra elsősorban magából az amplifikáció sikerességéből lehet következtetni.

Az egyes inhibitorok polimeráz enzimekre és azok segítségével előállított PCR-DGGE mintázatokra gyakorolt hatását ugyanazon mesterséges templáton tanulmányoztuk (POLMIX11, 6.3 fejezet), melyen a PCR gátlási vizsgálatokat is végeztük. Azt az eubaktérium 16S PCR terméket alkalmaztuk a 16S V3 régiójának amplifikálásához templátként, ahol az inhibitor mellett már elektroforézis során nem volt detektálható mennyiségű PCR termék, de a V3 régió specifikus PCR során még kaptunk megfelelő méretű (~200 bp) amplikont. Az így készített PCR-DGGE mintázatokból kerestük arra a választ, hogy az egyes gátló komponensek milyen mintázatbeli változást okoznak.

6.5.1. Huminsav és talajextraktum jelenlétének hatása a PCR-DGGE mintázatra

A három DNS polimeráz enzim közül a *KOD*-ot a huminsav 3,3–5 µg/ml koncentrációban, a *Phusion* és *Taq* enzimeket 0-2 µg/ml huminsav gátolta. Ekkora huminsav tartalom mellett a plazmid templátról készített 16S rRNS gén amplifikálása során már nem kaptunk olyan mennyiségű terméket, amelyből 2 µl az agaróz gélelektroforézis során detektálható. Erről a PCR termékről készítettük a 16S rRNS gén V3 régiójára specifikus PCR-t (itt már további gátló komponenst nem adtunk a reakcióelegyhez), majd a kapott termékeket akrilamid gélen futtattuk a DGGE mintázatok elkészítéséhez (24. ábra).



24. ábra Különböző DNS polimeráz enzimekkel készített PCR-DGGE mintázat huminsav és talajextraktum tartalmú templátról.

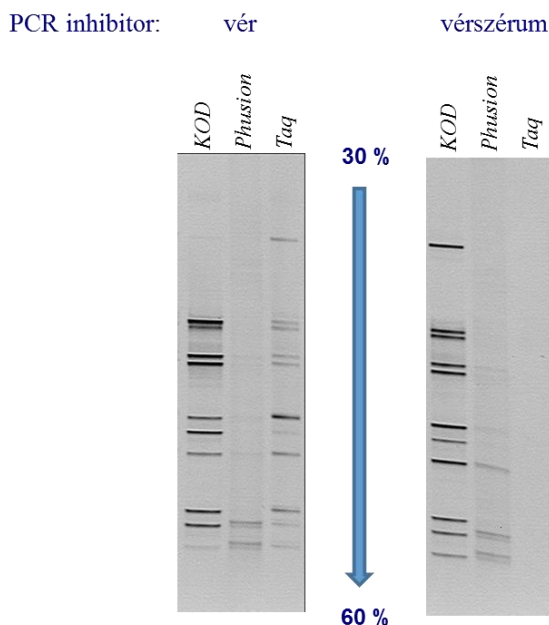
Mint ahogy a mintázatokon is látszik, a 0,2 µg/ml-es koncentrációjú huminsav mellett a *Taq* polimeráz enzim ugyan tartalmazta a várt mintázatot, de csökkent intenzitással. A mintázatban ezenkívül még megfigyelhető volt kisebb intenzitással extra fragmentek megjelenése, amit okozhatott az enzim hibázása és/vagy hibajavításának hiánya az amplifikáció során. A *Phusion* enzimnél meglepő módon, a mintázatban a fragmentek intenzitása sokkal alacsonyabb volt és egyes fragmentek hiányoztak, főként az alacsonyabb denaturáló koncentráció tartományban (DGGE gél felső része). A *KOD* DNS polimerázzal készített PCR-DGGE mintázatban az 5 ng/ml-es huminsav koncentráció még nem okozta a mintázat változását és az egyes fragmentek is azonos intenzitással jelentek meg, azaz nem tapasztaltunk templát specifikus gátlást sem.

A talajextraktum, mint inhibitor esetében a 25 v/v%-os koncentráció már jelentősen megváltoztatta a *KOD* polimerázzal készített PCR-DGGE mintázatot. Egyes fragmentek eltűntek a mintázatban és aspecifikus amplikonok is megjelentek. Érdeemes megjegyezni viszont, hogy a *KOD* enzim esetében alkalmazott 25 v/v% talajextraktum már olyan magas inhibitor tartalomnak felel meg a 16S rDNS PCR során, amely a másik két enzim működését már teljes mértékben gátolta. Továbbá, *Phusion* polimeráz enzim használatával már egyáltalán nem kaptuk vissza a várt PCR-DGGE mintázatot, szemben a *KOD* enzimmel, ahol az amplifikáció csak részben volt gátolt.

6.5.2. Vér és vörserum hatása a PCR-DGGE mintázatra

A vér és vörserum esetében a legnagyobb inhibitor rezisztenciát a *Phusion* enzim esetében mértük. Szemben a másik két polimeráz enzimmel, még 20 v/v%-os vér tartalom mellett is kaptunk kisebb mennyiségű, de megfelelő méretű amplikont. Hasonlóan a huminsavval végzett kísérletekhez, itt is azt a 16S rRNS gén amplikont alkalmaztuk a V3 régió amplifikálásához templátnak, ahol az inhibitor alkalmazása mellett már nem kaptunk agaróz gélelektroforézis során detektálható terméket.

A *Taq* polimeráz enzim esetében már az 1 v/v%-os teljes vér és vörserum koncentráció csökkent intenzitású (részben gátolt) vagy teljes mértékben gátolt amplifikációt eredményezett (25. ábra). A *Phusion* enzim esetében csak a 20 v/v%-os teljes vér és vörserum koncentráció gátolta a 16S PCR reakciót, viszont ez az inhibitor mennyiség a PCR-DGGE mintázatban már jelentős változást okozott. A várt 11 fragment közül csak 5 volt detektálható a mintázatban és azok is csak nagyon alacsony intenzitással. A *KOD* enzim esetében mind a 11 amplikon detektálható volt 10 v/v%-os vér tartalom mellett és ezek közül is csak kettőnél tapasztaltunk jelentősebb intenzitás csökkenést. 10 v/v% vörserum mellett (ami a teljes vérhez képest jelentősen alacsonyabb hem tartalommal rendelkezik) mind a 11 amplikon kimutatható volt aspecifikus termékek megjelenése nélkül.



PCR inhibitor koncentráció a 16S rDNS amplifikáció során		
DNS polimeráz enzim	teljes vér (v/v%)	vörserum (v/v%)
<i>Taq</i>	1	1
<i>KOD Hot Start</i>	10	10
<i>Phusion</i>	20	20

25. ábra Különböző DNS polimeráz enzimekkel készített PCR-DGGE mintázat vér és vörserum tartalmú templátról.

Az eredmények alapján elmondható, hogy habár a *Phusion* DNS polimeráz enzim a végpont PCR eredmények alapján magasabb koncentrációban (akár 20 v/v%) képes tolerálni a vér inhibitor komponenseit, mégis a multitemplát amplifikáció során keletkezett termékek nem adják vissza az eredeti populáció összetételét.

Az eredményeink alapján a DNS polimeráz enzimek inhibitor érzékenységének ismerete nem elegendő információ annak eldöntésére, hogy az enzim alkalmas-e PCR inhibitort tartalmazó DNS minta mikrobiális összetétel vizsgálatára. A három polimeráz enzimmel és négy PCR gátló komponenssel végzett kísérleteink során a mesterséges konzorciumról készített PCR-DGGE mintázatokban a PCR inhibitor mennyiségének növelésével a mintázatban az egyes fragmentek intenzitása nem azonos mértékben csökkent. Jellemzően a gátló komponens hatására templát preferenciális változás figyelhető meg, azaz egyes szekvenciák amplifikációja az inhibitor hatására jobban gátolt. Ez figyelhető meg a *KOD* enzim esetében talajextraktum mellett, valamint *Phusion* enzimmél mind a négy vizsgált gátló komponens mellett.

6.6. POLMIX11 alkalmazása

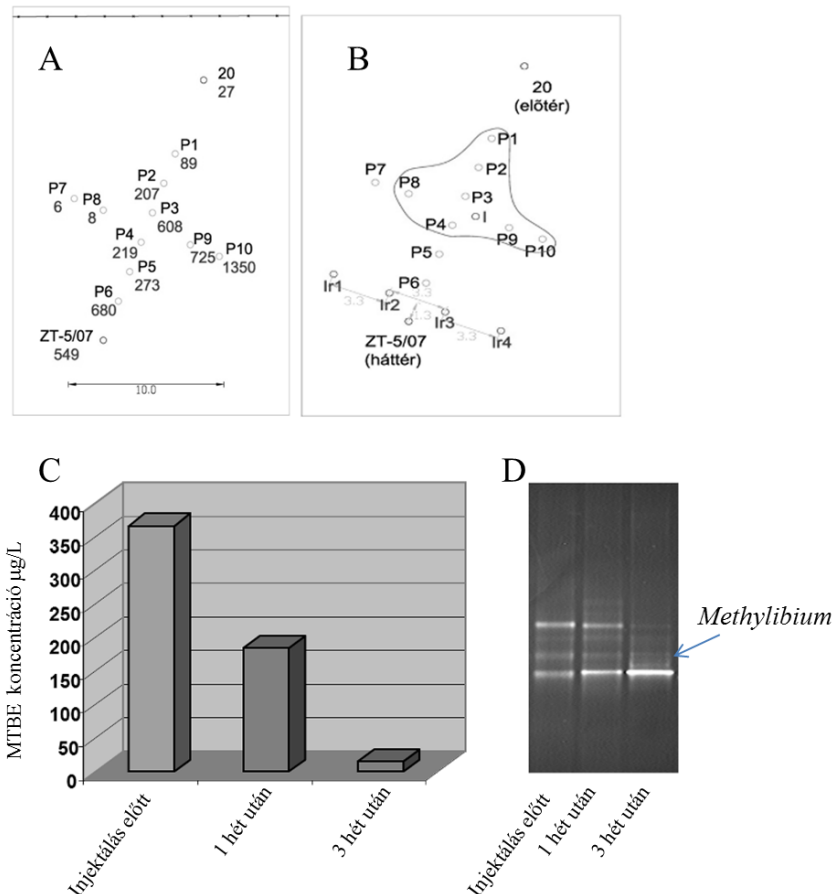
A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Nonprofit Kft. Biotechnológiai Divíziója több mint 20 éve vesz részt olyan alkalmazott kutatási feladatokban, melyben a mikrobiális összetétel, populáció időbeli változásának követése szükséges. E feladatokban nagy segítséget nyújt a PCR–DGGE módszer alkalmazása. Az utóbbi években két olyan kutatási területen (agyagásvány mikrobiális összetételének meghatározása valamint bioremediációs beavatkozások során) is alkalmazni tudtuk a *KOD* DNS polimeráz enzimmel előállított DGGE mintázatok előnyét, melyet tudományos közleményekben is megjelentettünk.

PCR–DGGE alkalmazása bioremediáció során:

A biostimulációra vagy bioaugmentációra épülő bioremediációs eljárások során a PCR–DGGE egy alkalmas technika a mikrobiális összetétel változás követésére^(150,151), vagy akár a toxikus, mérgező hatást okozó anyagok hatására a természetes mikroflórában bekövetkező változások hosszú távú követésére¹⁵¹. A PCR–DGGE módszer bizonyos feltételek mellett alkalmas a talaj vagy talajvíz szennyező komponens lebontásáért felelős mikroorganizmus folyamatos monitoringára. Egyetlen kritérium, hogy a vizsgált törzs rendelkezzen olyan egyedi szekvenciával, ami lehetővé teszi a mintázatban a háttértől, az endemikus

mikroflórától történő megkülönböztetését. A környezetbe jutott számos antropogén eredetű vegyület komoly kihívást jelent a bioremediációval történő kezelés számára, mivel csak kisszámú mikroorganizmus adaptálódott ezeknek az anyagoknak a lebontásához. Egy ilyen antropogén és biodegradációval nehezen kezelhető vegyület az MTBE (metil–tercier–butil–éter). A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Nonprofit Kft. Biotechnológiai Intézetének egyik kiemelt kutatási területe az olaj és üzemanyag eredetű vegyületek biodegradációja. Ennek a kutatási munkának a részeként sikeresen izoláltunk és jellemeztünk egy MTBE biodegradációjára képes baktériumtörzset (*Methylibium petroleiphilum* T29). Az izolátum MTBE bontó képességét laboratóriumi és terepi körülmények között is igazoltuk¹⁴². Mivel a baktérium teljes genom szekvenciáját ekkor még nem ismertük, így a kvalitatív és kvantitatív méréséhez megfelelő PCR-t nem tudtuk tervezni, a monitoring vizsgálatokhoz a PCR–DGGE módszert alkalmaztuk. A DNS izolálást AquaGenomic™ kit-el végeztük és az amplifikációhoz KOD DNS polimeráz enzimet alkalmaztunk. A KOD DNS polimeráz enzim alkalmazásával el tudtuk kerülni, a minták inhibitor tartalmából adódó PCR gátlást, így minden vizsgált minta esetében közvetlenül tudtunk a tisztított DNS templátról amplifikálni. A *Methylibium petroleiphilum* T29 16S rDNS V3 régiójának egyedi szekvenciája lehetővé tette, hogy a baktériumot mind mikrokozmosz, mind a terepi beavatkozások során a korábbiakban beállított DGGE módszerrel kövessük.

MTBE–vel szennyezett területek *in situ* terepi kármentesítéshez a konzorciumból a *Methylibium petroleiphilum* T29 baktériumot izoláltuk és egyedi kultúrából 3 m³-t injektáltunk a felszín alatti talajvízbe. A KOD DNS polimeráz enzimmal készített PCR–DGGE mintázatok a monitoring során sikeresen tudtuk alkalmazni az MTBE bontásért felelős baktérium követésére (26. ábra).



26. ábra MTBE bontó izolátum terepi tesztelése A: MTBE koncentráció (µg/L) a monitoring kutakban B: injektáló kutak (Ir1–Ir4) C: MTBE koncentrációváltozás a ZT–5/07 monitoring kútban; D: MTBE bontó baktérium (*Methylibium*) vizsgálata a beavatkozás során PCR–DGGE módszerrel

PCR–DGGE alkalmazása agyagásványok során:

Agyagásványok mikrobiális összetétel vizsgálata során szintén érdemes számolni PCR inhibícióval. Már a sejtfeltárás során, a lizált DNS adszorbeálódhat az agyagásvány felületén¹⁵². Sok esetben, már önmagában ez is teljes mértékben gátolhatja a PCR reakciót. A DNS–agyagásvány között kialakuló erős adszorpció oka az elektrosztatikus kölcsönhatások és hidrogénkötések, így gátolva az amplifikációját a feltárt DNS–nek¹⁵³. Egyrészt a DNS fragmentek szabad foszfát csoportjai közvetlenül kötést alakítanak ki az agyagásvány hidroxil csoportjaival (ligandum csere)^{154,155}. Ez a kölcsönhatás azonban szabad foszfáttal hozzáadásával visszaszorítható. Másrészt a mintában jelenlévő elektrolitok, kationok (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) a negatív töltésű agyagásványok felületén ún. elektromos kettősréteget hoznak létre, amely következtében a negatív töltésű DNS molekula elektrosztatikusan is kötődhet a

felületre. Az agyagásvány erős adszorpciós hatása azonban visszaszorítható a lízis során alkalmazott puffer megfelelő pH-jának megválasztásával¹⁵².

A kaolin egy 0,06–5,33%-os szerves anyag tartalmú alapanyag, melyben a természetesen előforduló baktériumok száma akár 10^5 sejt/g sejtszámot elérhet. Ezek a mikroorganizmusok feltehetőleg az agyagréteg képződésekor kerülnek az agyagba, és okozzák az érését követően a megfelelő plaszticitást. Természetesen a kaolin mikrobiális összetételéhez még hozzájárulhatnak a földtani események, bányászat, szállítás, a feldolgozás ipari folyamatai, valamint az állati vagy emberi kontamináció. Ebből adódóan, megfelelő feltételek esetén a baktériumok elszaporodhatnak a kaolinban raktározás vagy a szállítás során. Azonban a kereskedelmileg hasznosított kaolint vagy kaolinos keverékeket olyan szerves adalékokkal egészítik ki (szabályozóanyagok, hidraulikus olaj, gépolaj), amelyek megkönnyítik a további feldolgozási lépéseket, ugyanakkor ezek további tápanyagként szolgálhatnak a jelen lévő baktériumok számára. A baktériumok elszaporodásának hatására megváltozhat a kaolin kémiai és fizikai tulajdonsága, kellemetlen szagot, pH-, viszkozitás-, és színváltozást okozva. A megváltozott tulajdonságú kaolin már nem alkalmas a kerámiák termelésére, így az folyamatnak nagy gazdasági jelentősége van. Minderre alapozva, a hipotézisünk az volt, hogy a mikrobiális összetétel meghatározásával és annak változásának követésével következtetéseket vonhatunk le a kaolin minőségváltozására. A kaolinban domináns baktériumok azonosításához a PCR–DGGE módszert alkalmaztunk. A PCR-DGGE mintázathoz az amplikonokat KOD DNS polimeráz enzimmel készítettük. A kapott mintázatból kivágott fragmentek szekvenálásából és azonosításából sikeresen azonosítani tudtuk azokat a potenciális extracelluláris polimer termelő baktériumokat (*Acinetobacter* és *Pseudomonas*), melyek felelősek a kaolin reológiai tulajdonságainak kedvezőtlen változásáért.¹⁵⁶

7. Összefoglalás

A talajminták mikrobiális összetételének vizsgálata számos tudományterületet érint, mint például a talajmikrobiológia, paleontológia, archeológiai vizsgálatok, vagy akár az igazságügyi, kriminológiai vizsgálatok is. Munkánk során a DNS tisztítás során alkalmazott módszer és az arról készített PCR reakció során alkalmazott körülmények hatását vizsgáltuk „mikrobiális ujjlenyomat” PCR–DGGE vizsgálatok során.

A talajmintákból történő DNS kinyerés során alkalmazott módszer alapvetően befolyásolhatja a kapott PCR-DGGE mintázatot, mivel a Gram-pozitív, nehezen feltárható sejtfalösszetételű baktériumokból kisebb hatékonysággal nyerhető ki a DNS, ennek eredményeként sokszor ezek a fajok az eredeti összetételhez képest alulreprezentálva jelennek meg a vizsgálat során. A környezeti mintából kinyert DNS minőségét és mennyiségét a sejtfeltárás hatékonysága mellett befolyásolja a mátrix összetétele, a mintában lévő PCR inhibitor komponensek koextrakciója, valamint a degradációból, lízis során fellépő részleges töredezettségből adódó minősége. Az utóbbi évtizedekben folyamatosan jelennek meg újabb és újabb DNS izolálási eljárások, mivel az egyes módszerek csak a vizsgált mikroflóra egy részének vizsgálatára alkalmasak.

Talajminták vizsgálata során a DNS extrakciós módszer kiválasztását alapvetően a vizsgált minta összetétele határozza meg. A kereskedelmi forgalomból beszerezhető, talajminták vizsgálatára kifejlesztett DNS izoláló kit-ek alkalmazása nem feltétlenül alkalmas a nehezen feltárható, Gram pozitív baktériumok (mint pl. *Actinobacterium*–ok) vizsgálatára. PCR–DGGE és metagenom szekvenálás segítségével igazoltuk, hogy a *Mycobacterium* DNS izolálására kifejlesztett un. Käser–módszerrel talajmintákból nagyobb baktérium diverzitás mutatható ki, mint a talajmintákra alkalmazott, kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS tisztító kit–ekkel és főként a magasabb G/C-tartalmú baktériumok esetében. Eredményeink alapján egy erőteljesebb kémiai lízis alkalmazása, vagy többféle DNS izolálási módszer együttes alkalmazása célravezetőbb, ha a minta összetételének feltérképezése a cél.

Az eltérő feltérképezési és DNS tisztítási módszerek viszont eltérő mennyiségű és tisztaságú DNS kinyeréséhez vezetnek és a mintában maradó inhibitor komponensek a további vizsgálatok során alkalmazott DNS polimeráz enzimet gátolhatják és ennek következményeként nem teszik lehetővé környezeti minták mikrobiális összetétel vizsgálatát. Ezek a PCR gátló anyagok utótisztítási lépésekkel ugyan leválaszthatóak, viszont ebben az esetben számolni kell a DNS egy részének elvesztésével is.

A DNS polimerázok döntő szerepet játszanak a DNS másolásában és javításban és ebből adódóan a molekuláris biológiai módszerekben alkalmazott PCR reakciókban. Mivel a PCR egy gyors, specifikus és érzékeny módszer, így széles körben alkalmazzák számos tudományterületen akár a géntechnológiában vagy molekuláris diagnosztikában. A kapott eredmény azonban függ az DNS polimeráz enzim pontosságától, exonukleáz aktivitásától, átírási sebességétől, és extranukleotid beépítő képességétől vagy PCR gátló anyagokra való érzékenységtől. Gyakori hibát okoz a PCR inhibitorok jelenléte a vizsgált mintában. Az inhibitor miatt a PCR reakció részben vagy akár teljes mértékben gátlódhat. Hasonlóan gyakran kérdéses magas G/C tartalma vagy hosszú DNS fragment amplifikálása. A kereskedelmi forgalomból beszerezhető natív vagy módosított DNS polimeráz enzimek nem mindig alkalmasak az összes fellépő probléma kezelésére. E tudományterületen még mindig kutatások folynak újabb és újabb természetes DNS polimerázok vagy genetikailag módosított polimerázok felfedezésére, hogy jobb aktivitási paraméterekkel rendelkező enzimeket találjanak. A baktérium, archaea baktérium vagy eukarióta eredetű DNS polimerázok hasonló szerkezetűek, azonban jelentős mértékben különbözik a DNS másolási képességük. A felhasználási terület sokszor meg is határozza, hogy melyik polimeráz alkalmas a kívánt amplikon elkészítéséhez¹⁵⁷. Az exonukleáz, hibajavító alegység képesség kifejezetten fontos klónkönyvtár vagy mutáció kimutatása során. Ezekhez a módszerekhez a szakirodalom a *Pwo* vagy *Phusion* polimerázokat javasolja, melyek hibázási gyakorisága tízszer kisebb, mint a *Taq* DNS polimerázé. Hosszú DNS fragmentek másolásához a *KOD* DNS polimerázt javasolják, mivel processzivitása 10–15-ször nagyobb, mint a *Pfu* DNS polimerázé. G/C gazdag templátok másolására szintén a *Pfu* és a *Phusion* polimerázokat ajánlják. A PCR gátlás jellemzően a talajból, vérből, élelmiszerekből történő mikroorganizmusok kimutatása során jelent gondot. Az eddigi összehasonlító vizsgálatok kiemelkedő inhibitor rezisztenciát a *Tfl*, *Tli*, *Tth* és *Pfu* polimerázoknak tulajdonítanak. Meglepő módon a *KOD* DNS polimeráz egy kevésbé vizsgált enzim és egyetlen kiemelkedő tulajdonságának a hosszú G/C gazdag templátról történő amplifikációt tartják, holott kísérleteink alapján számos és alkalmazás szempontjából is fontos tulajdonságokkal rendelkezik.

Munkánk során három DNS polimeráz enzim hatását vizsgáltuk PCR–DGGE során, különös tekintettel arra, hogy az alkalmazott polimeráz enzim befolyásolja-e a kapott DGGE mintázatot. A szakirodalomban kevés adat található az enzimek eltérő amplifikációs képességéből adódó mintázat eltérésekre, ezért az összehasonlítást a legáltalánosabban alkalmazott *Taq* DNS polimeráz, a nagy pontosságú és inhibitor rezisztens fúziós DNS polimeráz (*Phusion*) és egy kevésbé ismert és alkalmazott *KOD* DNS polimeráz

alkalmazásával végeztük. **Eredményeink alapján elmondható, hogy a PCR–DGGE során alkalmazott DNS polimeráz befolyásolja a kapott mintázot. A legfőbb eltérések a domináns fajok mennyiségében, a mintázat diverzitásában és nem utolsó sorban a mintázat élességében, értékelhetőségében mutatható ki.**

A kísérleteink során a három DNS polimeráz enzim közül – külön inhibitor hozzáadása nélkül is – a *KOD* polimeráz esetében kaptuk a legélesebb, legjobb felbontású mintázatot, ami a mintázatok kiértékelésénél különösen fontos szempont. **A *KOD* polimeráz további előnye volt, hogy a PCR-DGGE mintázatban a magasabb denaturáló koncentráció tartományban (>50%) erősebb intenzitású mintázatot adott, mint a *Taq* és *Phusion* polimerázok.** Ebben a tartományban a magasabb G/C tartalmú – nehezebben denaturálódó – szekvenciák találhatók, így arra következtethetünk, hogy a *KOD* polimeráz enzim ezeket a nehezebben amplifikálható templátokat hatékonyabban tudja másolni.

A három polimeráz enzim inhibitor tolerancia vizsgálata során a két leggyakrabban előforduló PCR inhibitor vegyületeket tartalmazó mátrixot, a vért és talajt alkalmaztuk. A vér esetében a PCR gátlási kísérletek során teljes vért és vérsérumot, a talaj esetében talaj extraktumot és huminsavat vizsgáltuk. Az inhibitor komponensek PCR gátló hatását ún. végpont PCR segítségével mértük, mely során azt az inhibitor koncentrációt határoztuk meg gátló mennyiségnek, ahol a PCR-t követően az amplikon már nem detektálható az agaróz gélelektóforézis során.

A talaj extraktummal és huminsavval végzett PCR inhibíciós vizsgálatok alapján egyértelműen igazolható volt, hogy a három vizsgált DNS polimeráz enzim közül a *KOD* a legkevésbé érzékeny a talajból származó PCR inhibitor vegyületek jelenlétére. A *Taq* polimerázt már 0,2 µg/ml huminsav és 1% talaj extraktum gátolta. A *Phusion* polimeráznál 0,33 µg/ml huminsav és 5% talaj extraktum koncentráció felett mutatható ki a PCR gátló hatás. A *KOD* polimeráz enzim esetében ezzel szemben még 3,3–5 µg/ml huminsav és 25% talaj extraktum mellett is megfelelő méretű amplikont kaptunk.

A vér eredetű inhibitorok esetében a *Taq* DNS polimerázt már 1 v/v% vér és vérsérum is jelentősen gátolta. A *KOD* enzim 1–5 v/v% vér és vérsérum mellett volt képes a megfelelő méretű termék amplifikálására, de 5v/v% felett már aspecifikus termékek keletkezését tapasztaltuk. A *Phusion*-nél még 10% vér tartalom mellett is kaptunk megfelelő méretű terméket, igaz csökkent mennyiségben.

A polimeráz enzimek PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatását inhibitorok jelenlétében mesterséges konzorciummal végeztük. 16S rRNS gént tartalmazó plazmidok alkalmazásával

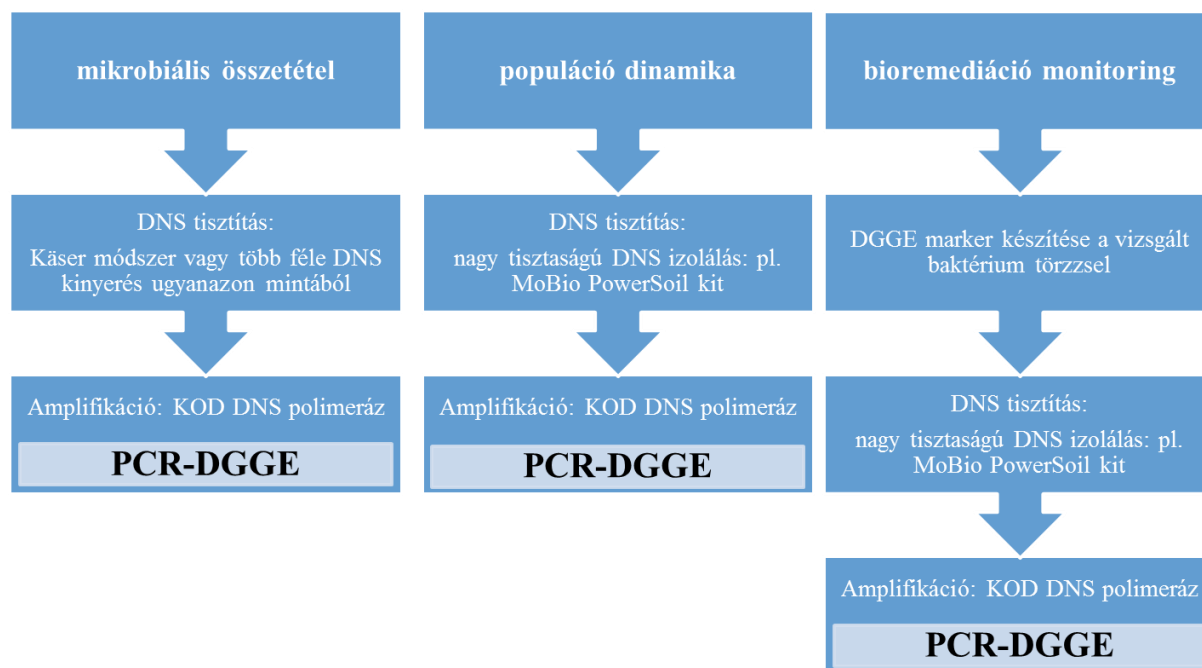
sikeresen előállítottunk egy kívánt szekvencia összetétellel rendelkező mesterséges konzorciumot, amit egyúttal markerként is alkalmazni tudtunk további munkáink során a PCR-DGGE gél futtatás körülményeinek ellenőrzésére. Az inhibitorok PCR-DGGE mintázatra gyakorolt hatását annál az inhibitor koncentrációnál végeztük, ahol a 16S PCR során már nem kaptunk agaróz gélen detektálható mennyiségű amplikont

A *Taq* polimeráznál az inhibitor komponensek hatására a PCR-DGGE mintázatok intenzitása csökkent, valamint a mintázatban megjelentek kisebb intenzitású extra fragmentek, aminek oka az enzim hibás másolása és/vagy hibajavításának hiánya az amplifikáció során. A *Phusion* enzimmél mind a négy inhibitor jelenlétében a PCR-DGGE mintázatban a fragmentek intenzitása csökkent és egyes fragmentek hiányoznak, főként az alacsonyabb denaturáló koncentráció tartományban. A *KOD* DNS polimerázzal készített PCR-DGGE mintázatban okozott legkisebb változást az inhibitorok jelenléte. A négy inhibitor közül egyedül a vér szérum esetében tapasztaltunk részleges gátlást (egyes fragmentek hiányát) a PCR-DGGE mintázatban és a fragmentek intenzitása sem csökkent úgy, mint a *Phusion* és *Taq* polimerázok esetében.

Eredményeink alapján a *KOD* enzim a leggyakrabban előforduló PCR gátló anyagokra is meglehetősen rezisztens, képes tolerálni 3,3–5 µg/ml huminsav, 1–10 v/v% talaj extraktum, 1–5 v/v% teljes vér és 1–5 v/v% vérszérum jelenlétét a DGGE mintázat jelentős változása nélkül.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy környezeti minták – mint pl. talaj – tenyésztés független mikrobiális összetétel vizsgálata során alkalmazott DNS polimeráz enzimnek kiemelkedő szerepe van. A *KOD* DNS polimeráz enzim jelentős inhibitor rezisztenciájából, magas G/C tartalmú DNS templát másolási képességéből, pontosságából és gyors másolási sebességéből adódóan egy kiemelkedő képességekkel rendelkező DNS polimeráz enzim. Meglepő módon a szakirodalomban mégis csak kevésbé alkalmazott enzim, holott amplifikációs képessége felülmúlja sok kereskedelmi forgalomból beszerezhető enzim amplifikációs képességeit.

A kísérleti eredményeink alapján összeállítottunk egy eljárás protokollt, melyet a környezeti minták PCR-DGGE vizsgálata során alkalmaztunk (27. ábra). Ezt az általunk javasolt eljárást sikeresen alkalmaztuk kaolin minták mikrobiális eredetű minőségromlásában szerepetjátszó baktériumok azonosítására, valamint kármentesítés során a *Methylibium petroleiphilum* T29 baktériummal történő in situ bioremediáció ellenőrzésére.



27. ábra környezeti minták PCR-DGGE vizsgálatához javasolt eljárásunk

8. Summary

The examination of the microbial composition of soil samples is relevant to many areas of science such as soil microbiology, paleontology, archeology and even forensic science. During our work, the effect of the applied DNA isolation method and the effect of the PCR reaction conditions in "microbial fingerprint" PCR-DGGE assays were investigated.

The method used for DNA isolation from soil samples may fundamentally influence the obtained DGGE pattern because it is difficult to isolate DNA from Gram-positive bacteria, with cell walls containing complex glycolipids, as a result of which these species appear to be underrepresented in the assay compared to the original composition. The quality and quantity of DNA isolated from an environmental sample are influenced by the efficiency of the cell lysis method, by the composition of the matrix, by the coextraction of the PCR inhibitor components and also by the extent of the degradation, which is a result of partial fragmentation during lysis. DNA isolation methods are continuously evolving for decades now, as currently available methods are capable of examining only a part of a given microflora.

In case of soil sample examination, the selection of the DNA isolation method is basically determined by the composition of the sample being tested. Commercially available DNA isolation kits for soil samples cannot necessarily be used to examine Gram-positive bacteria (such as *Actinobacterium*), due to the difficulty of cell wall destruction. Based on PCR-DGGE patterns and metagenomic sequencing results it was proven by us that by the Käser method (for mycobacterial DNA isolation) from soil samples a greater bacterial diversity can be detected compared to the commercially available DNA purification kits for soil samples, particularly in case of G/C-rich bacterial DNA. Our results showed that a more robust chemical lysis or the simultaneous use of several DNA isolation methods are more appropriate in case when mapping the composition of the sample is the goal.

However, different DNA isolation and purification methods lead to different amounts of DNA with different levels of purity, potentially contaminated with residual inhibitors from the sample that may inhibit the DNA polymerase enzyme and as a consequence hinder the examination of the microbial composition of the environmental sample. These PCR inhibitors can be removed by post-purification steps, but in this case, the loss of amount of the DNA is also expected.

DNA polymerases play a key role in DNA transcription and repair, and consequently in PCR reactions. Because PCR is a fast, specific and sensitive method it is widely used in genetics and molecular biology fields. However, the result may depend on the accuracy of the DNA polymerase enzyme, its exonuclease activity, its transcriptional rate and its extranucleotide incorporation ability or its sensitivity to PCR inhibitors. A common problem is the presence of PCR inhibitors in environmental sample. Due to the presence of the inhibitor, PCR reaction can be partially or even completely inhibited. A similar problem may arise in case of G/C-rich template amplification or in case of amplification of a longer DNA fragment. Commercially available native or modified DNA polymerase enzymes are not always suitable to overcome the occurring problems. In this area of science, there is ongoing research to discover additional natural DNA polymerases or genetically engineered polymerases to find enzymes with better activity parameters. Bacterial, archaea bacterial, or eukaryotic DNA polymerases have similar structures but differ significantly in their ability to transcribe DNA. The field of use often determines which polymerase is suitable for amplifying the desired region.¹⁵⁷ The exonuclease error correction, proofreading capability of the enzyme, is particularly important when detecting a clone library or mutation. For these methods, the literature suggests *Pwo* or *Phusion* polymerases with error rates ten times lower than that of *Taq* DNA polymerase. For amplifying long DNA fragments, *KOD* DNA polymerase is proposed because its processivity is 10 to 15 times higher than that of the *Pfu* DNA polymerase. *Pfu* and *Phusion* polymerases are also recommended for amplifying G/C-rich templates. PCR inhibition typically arises as a problem in case of microorganism detection in soil, blood, and food samples. Comparative studies have demonstrated outstanding inhibitory resistance of *Tfl*, *Tli*, *Tth* and *Pfu* polymerases. Surprisingly, *KOD* DNA polymerase is a little studied enzyme; one of its outstanding properties is the suitability to amplify long and G/C-rich templates, and based on our experiments it has many and important properties from an application standpoint.

In our work, the efficiency of three DNA polymerase enzymes was studied during PCR-DGGE, especially considering whether the used polymerase enzyme influenced the obtained DGGE pattern. In the literature there is little data on DGGE pattern variations due to the different amplification ability of the enzymes, and therefore comparison was performed using the most commonly used *Taq* DNA polymerase, a high precision and inhibitor-resistant fusion DNA polymerase (*Phusion*) and a lesser known and used *KOD* DNA polymerase. **Based on our results, the DNA polymerase has significant effect on the resulting PCR-DGGE pattern. The main differences can be found in the amount of dominant species, in the**

diversity of the pattern and, last but not least, in the sharpness and assessability of the pattern.

During our experiments with the three DNA polymerases, even without the inhibitor addition, the pattern was the sharpest with the best resolution in case of the *KOD* polymerase, which is of particular importance in the evaluation of patterns. **Another advantage of *KOD* polymerase is that it provides a sharper DGGE pattern in the higher denaturation range (> 50%), than the *Taq* and *Phusion* polymerases.** In this range, G/C-rich (less denaturated) sequences are found, so it can be concluded that ***KOD* polymerase enzyme can transcribe templates that are more difficult to amplify.**

During the inhibitor tolerance experiment of three polymerases, the two most common PCR inhibitor containing matrixes were studied, blood and soil. In case of blood, in PCR inhibition experiments whole blood and blood serum were used, in case of soil, humic acid and soil extract were investigated. The PCR inhibitory effect of inhibitor components were investigated by endpoint PCR, the inhibitory concentration was determined as the amount where the PCR amplicon is not detected during agarose gel electrophoresis.

PCR inhibitory studies in case of soil extract and humic acid showed that *KOD* was the least susceptible to soil PCR inhibitor compounds from the three of the tested DNA polymerase enzymes. *Taq* polymerase was inhibited by 0.2 µg/mL humic acid and 1% soil extract. The PCR inhibitory activity was detected for *Phusion* polymerase above 0.33 µg/mL humic acid and 5% soil extract concentration. In contrast *KOD* polymerase enzyme even in the presence of 3.3-5 µg/mL humic acid and 25% soil extract produced sufficient sized amplicons.

In case of blood originated inhibitors, *Taq* DNA polymerase was already significantly inhibited by 1 v/v% whole blood and blood serum. The *KOD* enzyme was capable of amplifying the product reaching the appropriate size by 1-5 v/v% whole blood and blood serum, but above 5 v/v% non-specific products was observed. In case of *Phusion*, at 10% whole blood content gave right sized amplicons, but in a decreased amount.

The effects of polymerase enzymes on PCR-DGGE pattern were investigated by using an artificial consortium in the presence of inhibitors. By using plasmids containing 16S rRNA gene an artificial consortium with a desired sequence composition was successfully produced, which was also suitable to be a marker for further experiments to control the conditions of the DGGE gel electrophoresis. The effect of the inhibitors on the PCR-DGGE pattern was

performed at the inhibitor concentration, where after 16S PCR, the amplicon was not detectable by agarose gel electrophoresis.

In case of the *Taq* polymerase, the presence of the inhibitor components resulted in faded DGGE pattern and some extra fragments appeared, due to faulty transcription and/or lack of error correction of the enzyme during amplification. In case of the *Phusion* enzyme in the presence of all four inhibitors, the intensity of the fragments decreased and some fragments were missing, especially in the lower denaturation concentration range. The presence of inhibitors resulted in the smallest changes in case of the *KOD* DNA polymerase DGGE pattern. Only in case of the blood serum, partial inhibition (absence of some fragments) was observed in the DGGE pattern and the fragment intensity did not decrease as it did in case of *Phusion* and *Taq* polymerases.

Based on our results, the *KOD* enzyme is highly resistant to the most common PCR inhibitors, able to tolerate 3.3-5 µg/mL humic acid, 1-10 v/v% soil extract, 1-5 v/v% whole blood and 1- 5% v/v% blood serum without significant change in DGGE pattern.

We proved that in case of environmental samples (e.g. soil) the DNA polymerase enzyme used to examine the noncultured microbial composition of the sample has a key role. *KOD* is an outstanding DNA polymerase enzyme, due to its significant inhibitor resistance, its capability to transcribe G/C-rich templates, accuracy and high transcription speed. Surprisingly, this enzyme is not commonly discussed in the literature, although its amplification ability is superior to the amplification capabilities of many commercially available enzymes.

Based on our experimental results we compiled a protocol for a PCR-DGGE assay that can be used in case of environmental samples (Figure 28). This protocol has been successfully applied to identify bacteria that causes microbial degradation of kaolin samples, and during an in situ bioremediation pilot test by *Methylibium petroleiphilum* T29 bacterium we applied successfully to monitoring remediation process.

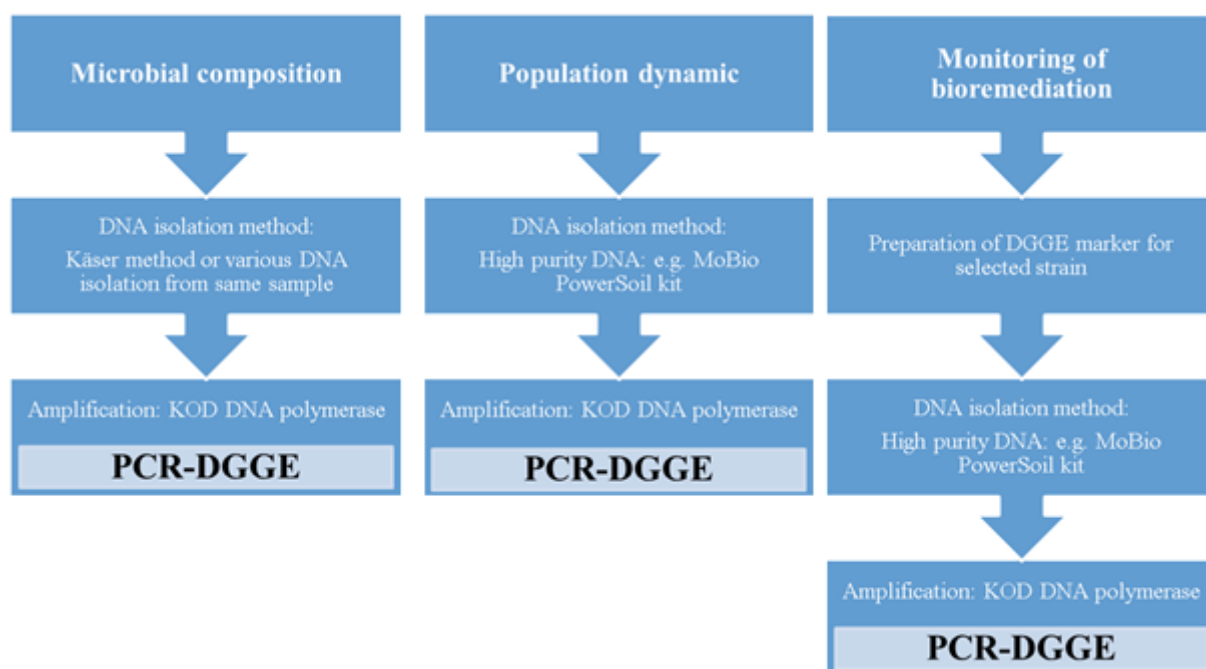


Figure 28. The proposed protocol for PCR-DGGE assay in case of environmental samples

Based on our results KOD polymerase is an excellent candidate, but the reality is:

*“Several dozen thermostable DNA polymerases are described in the literature, and probably many more exist in the research and development laboratories of biotechnology companies. So why are there so many? The answer is simple: none is perfect enough to satisfy researchers.” (Berdis, 2010)**

* Berdis AJ. DNA polymerases: Perfect enzymes for an imperfect world. Biochim Biophys Acta. 2010

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, *Dr. Szvetnik Attilának és Dr. Kiss Istvánnak*, hogy segítették munkámat és biztosították a doktori disszertációm megírásához szükséges feltételeket. Külön köszönöm *Dr. Szvetnik Attilának*, hogy a közös munkáink során megtanulhattam tőle a molekuláris biológia rejtelseit. Köszönöm segítségét, mind a kísérletek tervezése, eredmények kiértékelése, mind a tudományos publikációk elkészítésében. Köszönöm, hogy szakértelmével hozzájárult dolgozatom színvonalának emeléséhez. Köszönöm javaslatait és szakmai tanácsait és a biztató beszélgetéseket. Szeretném külön megköszönni *Dr. Kónya Zoltánnak* a támogatását, aki nélkül nem indítottam volna el a doktori eljárást. Kiemelt hálával tartozom *Dr. Rónavári Andreának*, legalább annyira a közös munkáink során nyújtott segítségéért, mint a disszertáció megírása során. Köszönöm *Dr. Rutkai Editnek, Németh Alexandrának, Vörös Andreának és Urbán Gabriellának* hogy a közös munkáink során kiemelkedő szakmai támogatásukkal segítették munkámat. Köszönöm *Dr. Tolmacsov Péternek és Dr. Kesserű Péternek*, hogy segítették a disszertációm elkészülését a mindennapi közös munkáink mellett. Köszönettel tartozok *†Prof. Mécs Imrének, Bartos Péternek és Dr. Bihari Zoltánnak*, akik segítése nélkül nem tudtam volna el ezen a pályán elindulni. És nem utolsó sorban köszönöm a Bay Zoltán Nonprofit Kft minden munkatársának támogatását, ami ha nem is közvetlenül, de hozzájárult, hogy elkészítsem a dolgozatom.

Szeretném megköszönni *barátaim és családom* támogatását, biztatását, akik mindvégig mellettem álltak és kitartóan támogattak és bátorítottak céljaim elérésében.

10. Irodalomjegyzék

- 1 Binnerup S J, Jensen D F, Thordal-Christensen H and Sorensen J Detection of viable, but non-culturable *Pseudomonas fluorescens* DF57 in soil using a microcolony technique *FEMS Microbiology Ecology* 1993, 12, 97-105.
- 2 DeLong E.F., Schmidt T.M., Pace N.R. Analysis of single cells and oligotrophic picoplankton populations using 16S ribosomal RNA sequences. In: Hatori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A. (eds.) *Recent Advances in Microbial Ecology*. Japan Scientific Societies Press, 1990, 697-701.
- 3 Amann R. I., Ludwig W. és Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 1995, 59, 143–169.
- 4 Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C. C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 2007, 69, (3), 470-479.
- 5 Frostegard A., Tunlid A., Baath E. Phospholipid Fatty Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from Two Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy Metals. *Applied Environmental Microbiology* 1993, 59(11):3605-3617
- 6 Fisher M. M., Triplett E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, (10), 4630-6
- 7 Borneman J., Triplett E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63, (7), 2647-53
- 8 Mills D. K., Fitzgerald K., Litchfield C. D., Gillevet P. M. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiological Methods* 2003, 54, (1), 57-74
- 9 Schwieger F., Tebbe C.C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, 4870-4776.

-
- 10** Peters S, Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66, 930–936
- 11** Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 2003, 10th ed. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ. 351-472.
- 12** Ercolini, D., PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 2004, 56, 297-314.
- 13** Eldor A. P.: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* 2007
- 14** Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 2003, 5, 828–841.
- 15** Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G., Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67, 5113-5121.
- 16** Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 2003, 5, 828–841.
- 17** Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63, 3327–3332.
- 18** Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, 2545–2553.
- 19** Calvo L, Vila X, Abella CA, Garcia-Gil LJ. Use of ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 63, 715–721.
- 20** Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71, 2325–2330.
- 21** Muyzer G., Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998, 73, (1), 127-41. Review.

-
- 22 Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T. M. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* 2003, 39, 183–190.
- 23 Nannipieri P., Smalla K. Nucleic Acids and Proteins in Soil. *Springer*, 2006, Heidelberg 75–94.
- 24 Tebbe C. C. és Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, 59, 2657–2665.
- 25 Kemp B. M., Monroe C. és Smith D. G. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of Archaeological Science*. 2006, 33, 1680–1689.
- 26 Jackson C. R., Harper J. P., Willoughby D., Roden E. E. és Churchill P. F. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63, 4993–4995.
- 27 Zhou J., Bruns M. A. és Tiedje J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62, 316–322.
- 28 Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. I. és Ghiorse W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, 4715–4724.
- 29 Maarit - Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindström K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods* 2001, 45, (3), 155–65.
- 30 Gelsomino A., Keijzer-Wolters A. C., Cacco G., van Elsas J. D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 1999, 38, 1–15.
- 31 Käser M., Ruf M.-T., Hauser J., Marsollier L., és Pluschke G. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75, (2), 414–418.
- 32 Lahr D.J., Katz L.A., Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation highfidelity DNA polymerase. *Biotechniques* 2009, 47, 857e866.
- 33 Wintzingerode F., Göbel U.B., Strackebrandt, E., Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis *FEMS. Microbiology Reviews* 1997, 21, 213e229.

-
- 34** Speksnijder A.G., Kowalchuk G.A., De Jong S., Kline E., Stephen J.R., Laanbroek H.J., Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67, 469e472.
- 35** Qiu X., Wu L., Huang H., McDonel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M., Zhou J., Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67, 880e887.
- 36** Kanagawa T., Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003, 96, 317e323.
- 37** Polz M.F., Cavanaugh C.M., Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, 3724e3730.
- 38** Hongoh, Y., Ohkuma, M., Kudo, T., Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology* 2003, 44 (2), 231e242.
- 39** Rees W.A., Yager T.D., Korte J., von Hippel P.H., Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* 1993, 32, 137e144.
- 40** Varadaraj K., Skinner D.M., Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G $\ddot{C}$ C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 1994, 140, 1e5.
- 41** Klappenbach J.A., Dunbar, J.M. and Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1328–1333.
- 42** Brons JK & Van Elsas JD (2008) Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2717–2727.
- 43** Thompson J. R., Marcelino L. A. és Polz M. F. (2002): Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by ‘reconditioning PCR’. *Nucleic Acids Research*. 30: 2083-2088.
- 44** Suzuki M. T. és Giovannoni S. J. (1996): Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16s rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 625-630.
- 45** Hubscher U, Spadari S, Villani G, Maga G DNA polymerases discovery, characterization and functions in cellular DNA transactions. *World Scientific Publishing Company*, Singapore 2010

-
- 46** Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry* 2008, 32, 452–457.
- 47** Primrose SB, Twyman RM Principles of gene manipulation and genomics 2006 Blackwell, Malden
- 48** Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63, 3741–3751.
- 49** Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal *Journal of Applied Microbiology* 2012, 113, 1014–1026.
- 50** Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition – a review. *Forensic Science International: Genetics*. 2012, 6, 297–305.
- 51** Demeke T., Jenkins R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 396, 1977–1990.
- 52** Kontanis E., Reed F. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors *Journal of Forensic Sciences* 2006, 51, 795–804.
- 53** Chandler D. Redefining relativity: quantitative PCR at a low template concentrations for industrial and environmental microbiology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998, 21, 128–140.
- 54** Weissensteiner T., Lanchbury J. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing *Biotechniques*. 1996, 21, 1102–1108.
- 55** Opel K, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real-time PCR. *Journal of Forensic Sciences* 2010, 55, (1), 25–33.
- 56** Bickley J, Short JK, McDowell G, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 1996, 22, 153–8.
- 57** Eilert K. D., Foran D.R. Polymerase resistance to polymerase chain reaction inhibitors in bone *Journal of Forensic Sciences* 2009, 54, (5), 1001–1007
- 58** Abu Al-Soud, W. and Rådström, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, 3748–3753.

-
- 59** Rosse L., Norskov P., Holmstorm K., Rasmussen O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assay and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* 1992, **17**, 37-45
- 60** Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, **59**, 1318–1324.
- 61** Ijzerman, M.M., Dahling, D.R. and Fout, G.S. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 1997, **63**, 145–153.
- 62** Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Lovenklev M., Löfström, C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* 2004, **26**, 133–146.
- 63** Burkardt, H.J. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2000, **38**, 87–91.
- 64** Yedidag E.N., Koffron A.J., Mueller K.H., Kaplan B., Kaufman, D.B., Fryer J.P., Stuart F.P., Abecassis M. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation* 1996, **62**, 238–242.
- 65** Pääbo S, et al. Genetic analyses from ancient DNA *Annual Review of Genetics* 2004, **38**, 645–679.
- 66** Baar C., d’Abbadie M., Vaisman A., Arana M.E., Hofreiter M., Woodgate R., Kunkel T.A., Holliger, P. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Research* 2011, **39**, e51.
- 67** Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *Journal of Virological Methods* 2006, **137**, 120–124.
- 68** Wei T., Lu G., Clover G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *Journal of Virological Methods* 2008, **151**, 132–139.
- 69** Schnitzer M. Organic matter characterisation. In Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. (eds), *Methods of Soil Analysis*, 1982, Part 2: *Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Inc. (ASA) and Soil Science Society of America, Inc. (SSSA), Madison, WI.
- 70** Steffan R.J., Goksoyr, J., Bej, A.K. and Atlas, R.M. Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, **54**, 2908–2915.

-
- 71 Stevenson F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 1994, 2nd Edn. John Wiley & Sons, New York, NY.
- 72 Harry M., Gambier B., Bourezgui Y., Garnier-Sillam E., Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analisis* 1999, 27, 439–442.
- 73 Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 2001, 18, 47–60.
- 74 Sutlovic D., Gamulin S., Definis-Gojanovic M., Gugic D., Andjelinovic S., Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis* 2008, 29, 1467e1472.
- 75 Tsai Y., Olson B.H., Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1992a, 58, 754–757.
- 76 Sidstedt M, Jansson L, Nilsson E, Noppa L, Forsman M, Rådström P, Hedman J. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 2015; 487: 30–37
- 77 Al-Soud W. A., Jönsson L. J., Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38, 345–350.
- 78 Katcher H L, Schwartz I. A distinctive property of *Tth* DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *BioTechniques* 1994;16:84–92.
- 79 Satsangi J, Jewell D P, Welsh K, Bunce M, Bell J I. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *The Lancet* 1994, 343, 1509–1510.
- 80 Izraeli S, Pfliegerer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Research* 1991;19:6051.
- 81 Fleet J C. A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutrition Reviews* 1995, 53, 226–227.
- 82 He J, Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 1995, 373, 721–724.
- 83 Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research* 2009; 37:e40

-
- 84** Miura M, Tanigawa C, Fujii Y. and Kaneko S. Comparison of six commercially-available DNA polymerases for direct PCR *The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2013, 55, 401–406
- 85** Ito J, Braithwaite D Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Research* 1991, 19, 4045–4057
- 86** Kornberg A. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 1960, 131, 1503–1508.
- 87** Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. Deoxyribonucleic-acid polymerase from extreme thermophile *Thermus-aquaticus* *Journal of Bacteriology* 1976, 127, 1550–1557.
- 88** Eom S. H., Wang J. M., Steitz T. A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* 1996, 382, 278–281.
- 89** Li Y., Korolev S., Waksman G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *The EMBO Journal* 1998, 17, 7514–7525.
- 90** Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering*. 1990, 3, 461–467.
- 91** Eckert KA, Kunkel TA High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 1990, 18, 3739–3744
- 92** Biozyme Scientific GmbH (www.biozyme.com)
- 93** Park JH, Kim JS, Kwon ST, Lee DS Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *European Journal of Biochemistry* 1993, 214, 135–140
- 94** Diaz RS, Sabino EC Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998, 31, 1239–1242
- 95** Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* Sp. Strain KOD1 and its application to PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63, 4504–4510
- 96** Cline J, Braman JC, Hogrefe HH PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 1996, 24, 3546–3555
- 97** Dietrich J, Schmitt P, Zieger M, Preve B, Rolland JL, Chaabihi H, Gueguen Y PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS Microbiology Letters* 2002, 217, 89–94

-
- 98** Bonch-Osmolovskaya E, Svetlichny V, Ankenbauer W, Schmitz- Agheguian G, Angerer B, Ebenbichler C, Laue F Thermostable nucleic acid polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. 1996, Patent EP 0834570 A1
- 99** Cambon-Bonavita MA, Schmitt P, Zieger M, Flaman JM, Lesongeur F, Raguénès G, Bindel D, Frisch N, Lakkis Z, Dupret D, Barbier G, Quéréllou J Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles* 2000, 4, 215–225
- 100** Lee JI, Kim YJ, Bae H, Cho SS, Lee J, Kwon S Biochemical properties and PCR performance of a family B DNA polymerase from hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus peptonophilus* *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, 160, 1585–1599
- 101** Griffiths K, Nayak S, Park K, Mandelman D, Modrell B, Lee J, Ng B, Gibbs MD, Bergquist PL New high fidelity polymerases from *Thermococcus* species. *Protein Expression and Purification* 2007, 52, 19–30
- 102** Kelman Z., O'Donnell M. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annual Review of Biochemistry*, 1995, 64, 171-200
- 103** Olson M. W., Dallmann H. G., McHenry C. S. Dna X complex of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. The chi psi complex functions by increasing the affinity of tau and gamma for delta to a physiologically relevant range. *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 29570-7
- 104** Henneke G, Flament D, Hubscher U, Querellou J and Raffin J.P. The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcusabyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *Journal of Molecular Biology* 2005, 350, 53–64.
- 105** Killelea T., Ralec C., Bosse A., Henneke G. PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase *Frontiers in Microbiology* 2014, 5, 195
- 106** Burgers P.M. Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* 1998; 107, 218–227
- 107** Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RP All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis *EMBO Journal* 2000, 19 (22): 6259–65
- 108** Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB Reconstitution of human telomerase with the template RNA

component hTR and the catalytic protein subunit hTRT *Nature Genetics* 1997, 17 (4): 498–502

109 Rothwell, P.J., and Waksman, G. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry* 2005, 71, 401-440.

110 Terpe, K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, 97, 10243–10254.

111 Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology* 1991, 10, 233–238

112 Ling LL, Keohavong P, Dias C, Thilly WG Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and Vent DNA polymerases. *PCR Methods and Applications* 1991, 1, 63–69.

113 Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry* 2008, 47, 5336–5353.

114 Chester N, Marshak D.R Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1993, 209, 284–290.

115 Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research* 1990, 18, 7465

116 Al-Soud WA, Rådström P Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001, 39, 485–493

117 Zhang Z, Yang X, Meng L, Liu F, Shen C, Yang W Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. *Biotechniques* 2009, 47, 775–779

118 <http://www.toyobo-global.com/> KOD-FX DNA polymerase

119 Bihari Z., Szvetnik A., Zombori Z., Blastyák A., Szabó Z., Balázs M., Kiss I., Functional analysis of long-chain n-alkane degradation in *Dietzia* sp. E1. *FEMS Microbiology Letters* 2011, 316, 100e107.

120 Ignatov K, Kramarov V, Billingham S Chimeric DNA polymerase. 2009, US Patent 20090209005 A1

121 Faurholm B, McEwan P, Bourn W, Rush G Chimeric DNA polymerases. 2012 US Patent 20120115188 A1

-
- 122** Gao YG, Su SY, Robinson H, Padmanabhan S, Lim L, McCrary BS, Wan AH. The crystal structure of the hyperthermophile chromosomal protein Sso7d bound to DNA. *Nature Structural Biology* 1998; 5, 782–786
- 123** Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, Horn PBV A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research* 2004, 32, 1197–1207
- 124** Wang F, Li S, Zhao H, Bian L, Chen L, Zhang Z, Zhong X, Ma L, Yu X Expression and characterization of the RKOD DNA polymerase in *Pichia Pastoris*. *PLOS One* 2015, 10, e0131757
- 125** Lee JE, Potter RJ, Mandelman D (2013) SSB - polymerase fusion proteins. EP Patent 1934372 B1
- 126** Arezi B., Xing W., Sorge J. A., Hogrefe H. H. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases *Analytica Biochemica* 2003, 321, 226–235.
- 127** Zhu X. J. Guanine-rich sequences inhibit proofreading DNA polymerases. *Scientific reports* 2016, 6, 28769
- 128** Sun S, Guo W, Yang JS, Qiu M, Zhu XJ, Dai ZM. TT(N)mGCCTC inhibits archaeal family B DNA polymerases. *Scientific Reports*. 2018, 8: 1990
- 129** Fein, J.B., Boily, J.-F., Güçlü, K., Kaulbach, E.,. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces *Chemical Geology* 1999, 162, 33e45.
- 130** Fatima F, Pathak N, Rastogi Verma S An improved method for soil DNA extraction to study the microbial assortment within rhizospheric region. *Molecular Biology International* 2014, ID 518960, 1–6.
- 131** Desneux J, Pourcher A-M. Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggery effluents with real-time PCR. *MicrobiologyOpen* 2014; 3, 4, 437–45.
- 132** Zielińska S., Radkowski P., Blendowska A., Ludwig-Gałęzowska A., Loś J. M., Loś M. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. *MicrobiologyOpen*. 2017 10.1002/mbo3.453
- 133** Szvetnik A, Bihari Z, Szabo Z, Kelemen O, Kiss I: Genetic manipulation tools for *Dietzia* spp., *Journal of Applied Microbiology* 2010, 109, 5, 1845-1852.
- 134** Soliman T., Yang S.-Y., Yamazaki T., & Jenke-Kodama, H Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: the influence of DNA kit selection and technician technical expertise. *PeerJ*, 2017, 5, e4178.

-
- 135** Embley, T. M., and E. Stackebrandt. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 1994, 48, 257–289.
- 136** Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007, 71, (3):495-548.
- 137** Carrigg C., Rice O., Kavanagh Collins G, O’Flaherty V DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, 77, 955
- 138** Krsek M., Wellington E.M.H., Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods* 1999, 39, 1–16.
- 139** Kembel SW, Wu M, Eisen JA, Green JL. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLOS Computational Biology* 2012, 8:e1002743.
- 140** Schmidt T.M. Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotes. In: *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, 1997, 221–229. Chapman and Hall.
- 141** Coenye T., Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequences bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters* 2003, 228, 45–49.
- 142** Szabó Z, Gyula P, Robotka H, Bató E, Gálik B, Pach P, Pekker P, Papp I, Bihari Z. Draft genome sequence of *Methylibium* sp. strain T29, a novel fuel oxygenate-degrading bacterial isolate from Hungary. *Standards in Genomic Sciences* 2015, 10, 1–10
- 143** Bartos P, Balázs M, Kiss I, Bihari, Kelemen O, Mecs I, Toxic Effect of Methyl Tert-Butyl Ether on Growth of Soil Isolate *Pseudomonas veronii* TI/I. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24, 875-878.
- 144** Nalepa B., Markiewicz L.H., PCR-DGGE markers for qualitative profiling of microbiota in raw milk and ripened cheeses. *LWT- Food Science and Technology* 2017, 84, 168–174.
- 145** Opota, O., Croxatto, A., Prod’hom, G. & Greub, G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. *Clinical Microbiology and Infection* 2015, 21, 313–322
- 146** Goodyear PD, MacLaughlin-Black, S., Mason, I.J. A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. *Biotechniques* 1994;16, 232-5
- 147** Kuspa A, Vollrath D, Cheng Y, Kaiser D: Physical mapping of the *Myxococcus xanthus* genome by random cloning in yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86: 8917-8921

-
- 148** Albers CN, Jensen A, Bælum J, Jacobsen CS. Inhibition of DNA polymerases used in Q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiology* 2013; 30: 675–681
- 149** Matheson CD, Gurney C, Esau N, Lehto R. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition* 2010, 3, 38–45
- 150** Macnaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C. Microbial population changes during bioremediation of and experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65, 3566-3574
- 151** Y. Kasai, H. Kishira, K. Syutsubo, S. Harayama Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident *Environmental Microbiology*, 2001, 3, 246-255
- 152** Young JM, Rawlence NJ, Weyrich LS, Cooper A. Limitations and recommendations for successful DNA extraction from forensic soil samples: a review. *Science and Justice* 2014, 54, (3):238–244
- 153** Yu WH, Li N, Tong DS, Zhou CH, Lin CX, Xu CY. Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: a review. *Applied Clay Science* 2013, 80, 443–452
- 154** Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Nannipieri, P., Wenderoth, D. Adsorption of pure and dirty bacterial DNA on clay minerals and their transformation frequency. *Biology and Fertility of Soils* 2007, 43, 731–739
- 155** Saeki, K., Sakai, M., 2009. The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols. *Microbes and Environments* 2009, 24, 175–179
- 156** Papp I, Balázs M, Tombácz E, Babcsán N, Kesseru P, Kiss I, Szvetnik A PCR-DGGE analysis of the bacterial composition of a kaolin slurry showing altered rheology *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2012, 28, (4): 1843-1848
- 157** Špibida M, Krawczyk B, Olszewski M, Kur J. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics* 2017, 58, (1):133–142