proLékaře.cz | 30.10.2026

Využití restrikční analýzy genu pro 16S rRNA pro ověření druhové identity významných orálních mikroorganismů
I. Viridující streptokoky

Novotná G.[1], Janata J.[1], Dušková J.[2], Janatová T.[2]

[1]Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha,
ředitelka prof. RNDr. B. Říhová, DrSc.
[2]Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN, Praha,
přednostka prof. MUDr. J. Dušková, DrSc.

Souhrn

Je navržen jednoduchý algoritmus analýzy genetického materiálu orálních streptokoků, významně zpřesňující druhovou identifikaci bakterií spjatých s destrukcí tvrdých zubních tkání. Metodika založená na analýze části genu pro 16S rRNA byla laboratorně ověřena pro druhovou identifikaci 87 izolátů orálních streptokoků a správnost výsledků potvrzena metodou absolutní, tj. stanovením DNA sekvence analyzovaného úseku. Využití navrženého postupu je univerzální a analýzu lze rozšířit i o další klinicky významné mikroorganismy ústní dutiny, např. o slizniční bakterie spjaté s onemocněním parodontu. Navržená finančně nenáročná metodika umožňuje jednoznačnou druhovou identifikaci i pro biochemicky obtížně rozlišitelné druhy. Spolehlivě např. odliší streptokoky uvnitř skupiny mutans.

Klíčová slova: orální streptokoky - *S. mutans* - *S. sobrinus* - DNA techniky

Novotná G., Janata J., Dušková J., Janatová T.:
Application of Restriction Analysis of the Gene for 16S rRNA for Verification of Species Identity in Important Oral Microorganisms
I. Viridans Streptococci

Summary: The authors proposed an algorithm for the analysis of genetic material of oral streptococci, giving significantly more precision to generic identification of bacteria associated with destruction of hard dental tissues. The method based on analysis of parts of the gene for 16S rRNA was verified in laboratory for generic identification of 87 isolates of oral streptococci and correctness of the results was confirmed by the "absolute" method, i.e. by DNA sequencing of the analyzed segment. The proposed procedure can be used in general and the analysis can be extended to other clinically important microorganisms of oral cavity, e.g. bacteria of mucosa associated with the periodontium diseases. The proposed financially modest method makes an unequivocal generic identification possible even for genera, which are difficult to differentiate by biochemical methods. For example it safely differentiates streptococci within the S. mutans group.

Key words: oral streptococci - *S. mutans* - *S. sobrinus* - DNA techniques

Čes. Stomat., roč. 105, 2005, č. 6, s. 170–174.

ÚVOD

Sekvence 16S rDNA kódující ribonukleovou kyselinu malé ribozomální podjednotky je vysoce konzervovaná v celé prokaryotické říši. Stupeň variability vybraných úseků je přitom dostačující jak pro jednoznačnou mezidruhovou identifikaci, tak pro stanovení vzájemné příbuznosti taxonů [4, 5]. Tato sekvence proto slouží jako standard pro určení a popis bakteriálních druhů i pro jejich uspořádání do vyšších taxonů. Přímé využití metody DNA sekvenování pro rutinní druhovou identifikaci je limitováno její finanční náročností. Na druhé straně metody analyzující sekvenci DNA pomocí restrikčních endonukleáz, tj. enzymů rozpoznávajících specifická zásahová místa, jsou mnohonásobně levnější a cenově srovnatelné s biochemickými identifikačními testy. Díky prudkému rozvoji sekvenčních technologií je sekvence 16S rDNA volně přístupná v databázích pro drtivou většinu doposud popsaných bakteriálních druhů [1, 2]. To umožňuje racionální návrh systému pro rozlišení libovolně definovaných cílových skupin mikroorganismů restrikční analýzou části

proLékaře.cz | 30.10.2026

sekvence 16S rDNA. Správně vytvořený algoritmus analýzy umožní spolehlivé odlišení i vysoce příbuzných druhů, kdy mohou metody biochemické nebo imunochemické selhat [8]. Každý druh, jehož 16S rDNA je známa, dává totiž v optimálně navrženém systému zcela distinktní a navíc předem předpokladatelný výsledek analýzy.

Cílem práce bylo navrhnout metodiku druhové identifikace významných skupin mikroorganismů ústní dutiny pomocí restrikční analýzy 16S rDNA. V této části je prezentován postup pro identifikaci viridujících streptokoků se zvláštním důrazem na streptokoky skupiny mutans i výsledky ověřování systému. V navazující části bude prezentován analogický algoritmus pro určení taxonomicky značně diverzifikovaných mikroorganismů sliznice ústní dutiny významných pro vznik onemocnění parodontu [7].

VÝBĚR TESTOVANÉHO ÚSEKU

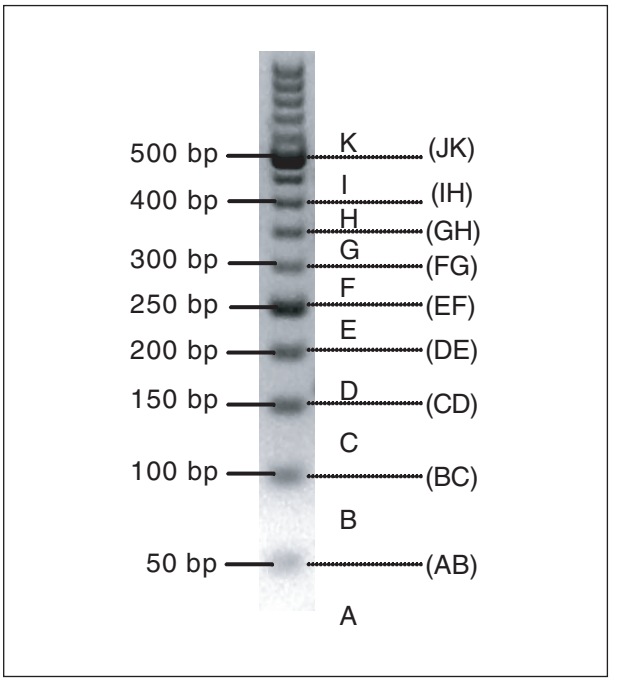
Úsek genu 16S rRNA pro restrikční analýzu byl volen tak, aby variabilní oblast, umožňující druhové rozlišení, byla ohraničena oblastmi konzervovanými. To zaručuje univerzální použitelnost i pro druhy taxonomicky značně vzdálené. Dvojice oligonukleotidů (PCR primery), navržená podle hraničních konzervovaných úseků, tak umožňuje amplifikaci jimi vymezeného úseku genu 16S rDNA pro široké spektrum mikroorganismů. Navrhli a testovali jsme několik kombinací univerzálních PCR primerů. Z hlediska robustnosti metody se jako nejvhodnější ukázal pár primerů 16U1F (5'-GTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3') a 16SCR1 (5'-CTGCTGGCACGTAGTTA-3') ohraničující nejvariabilnější část 16S rDNA na 5' konci genu. Také délka PCR produktu (534 párů bazí) je pro restrikční analýzu příhodná.

VÝVOJ TESTOVACÍHO ALGORITMU

Výběr enzymů a schéma postupu bylo navrženo na základě publikovaných sekvencí typových kmenů cílových mikroorganismů *Streptococcus mutans* NCTC 10449 a *Streptococcus sobrinus* NCTC 12279 (RDB přístupové číslo S000015410 a S000000263) a dalších druhů orálních streptokoků [9]. Parametry pro výběr vhodné kombinace enzymů byly následující:

1. enzym štěpí alespoň jednou ve sledované sekvenci u většiny testovaných druhů,
2. produkty štěpení jsou alespoň v jednom případě odlišné od produktů restrikcí dalších sledovaných druhů,
3. produkty jsou při separaci na agarózovém gelu dobře rozlišitelné, tj. velikost srovnávaných produktů by se neměla lišit o méně než 25 párů bazí, nejmenší pozorovatelný produkt je fragment přesahující 50 párů bazí,
4. dostupnost a nízká cena enzymu.

Těmto podmínkám odpovídaly tyto restrikční endonukleázy: *Alu*I, *Mnl*I, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I, *Mfe*I, *Mlu*I, *Mbo*I. Analýza sekvencí, výběr enzymů a sestavení pracovního schématu bylo provedeno pomocí programů Windows 32 EditSeq 4.03, DNASTAR, Windows 32 MegAlign 4.03, DNASTAR a Clone Manager for Windows, ver. 4.01, Scientific and Education Software.

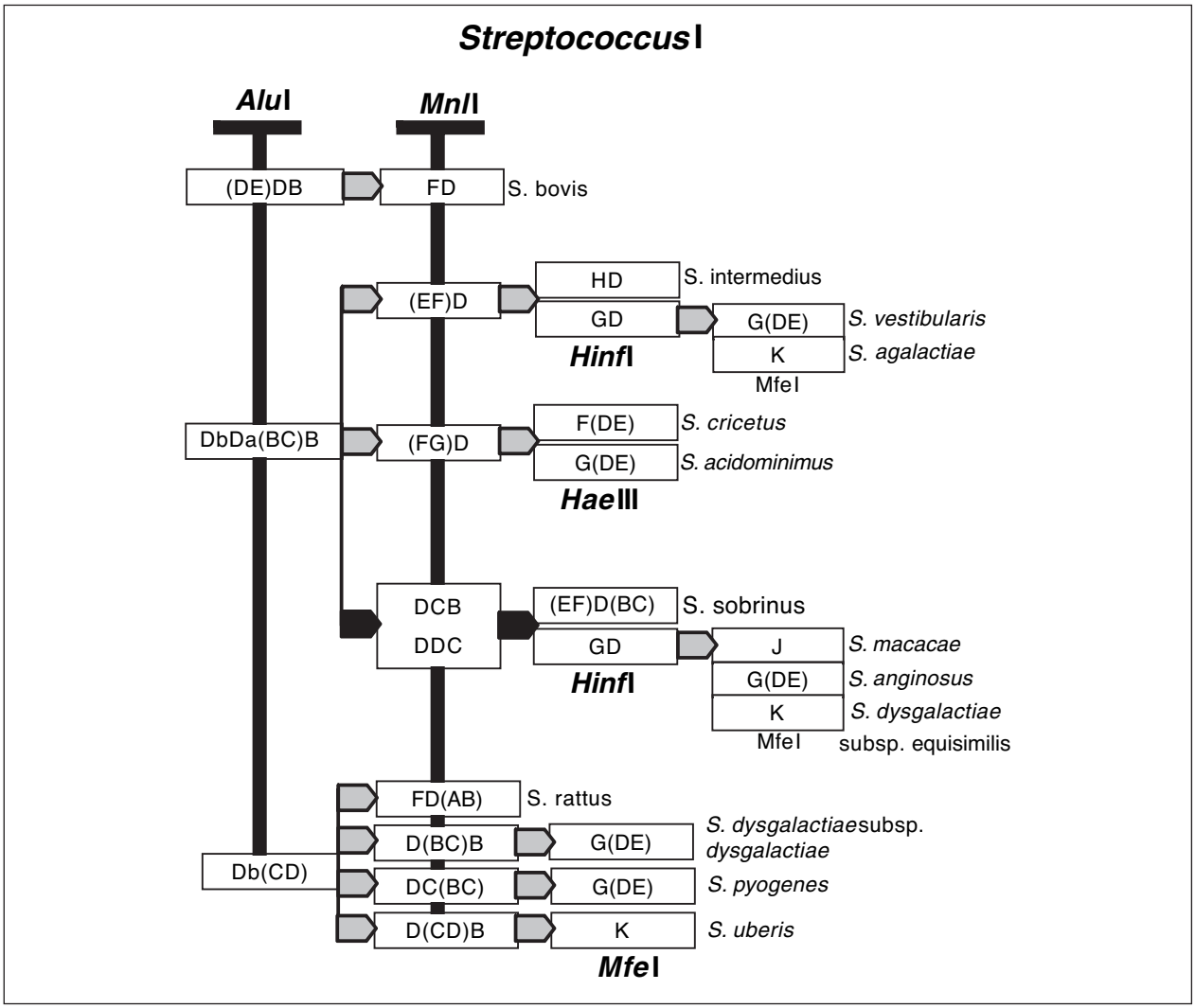


Obr. 1. Označení polí vymezených fragmenty standardu pro charakterizaci produktů restrikční analýzy.
Fig. 1. Marking the fields demarcated by fragments of the standard for characterizing the products of restriction analysis.

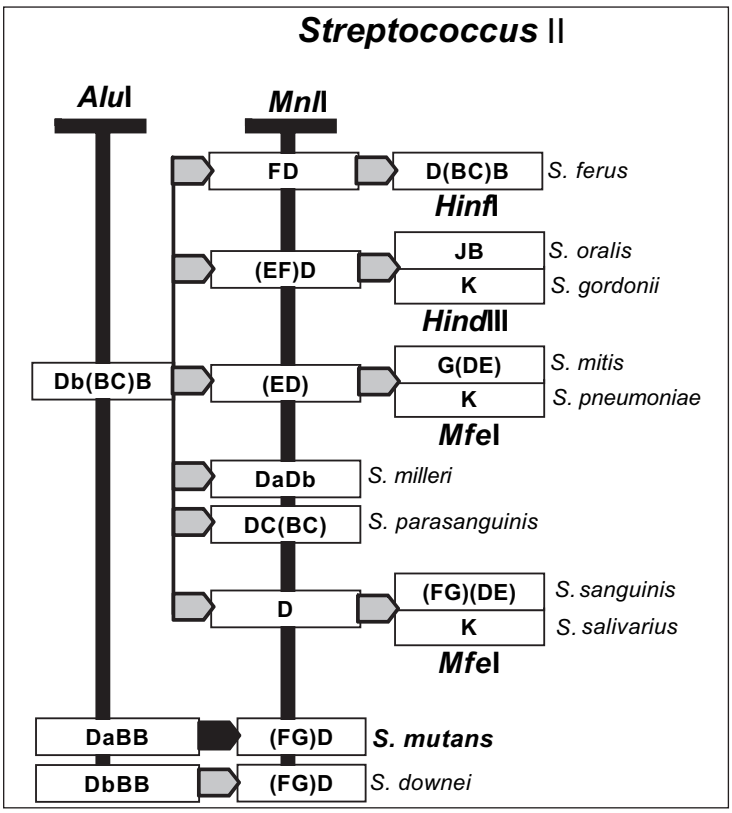
Pro lepší orientaci ve velikostech štěpených fragmentů byla jednotlivá pole vymezená polohou fragmentů DNA markeru (obr. 1) (Molecular Weight Marker XIII, 50 base pair ladder, ROCHE) a označena velkými písmeny. Fragmenty pohybující se na hranici dvou intervalů byly označeny kódy obou intervalů v závorce. Interval D je pro účel identifikace viridujících streptokoků rozdělen na dva oddíly označené malými písmeny, aby bylo možno odlišit DNA fragmenty s podobnou, avšak rozlišitelnou velikostí: 187 párů bazí = Db a 160 párů bazí = Da.

Navržený systém umožňuje rozlišení 25 zástupců viridujících streptokoků i některých dalších významných zástupců rodu *Streptococcus*. Obrázek 2 sumarizuje navržený postup restrikční analýzy. Je z něj patrno, že pro jednoznačné určení všech uvažovaných druhů jsou potřebné restrikce 2-4 enzymů. První dvě štěpení PCR produktů enzymy *Alu*I a *Mnl*I jsou společná pro analýzu všech druhů. Jimi lze většinu kmenů

proLékaře.cz | 30.10.2026

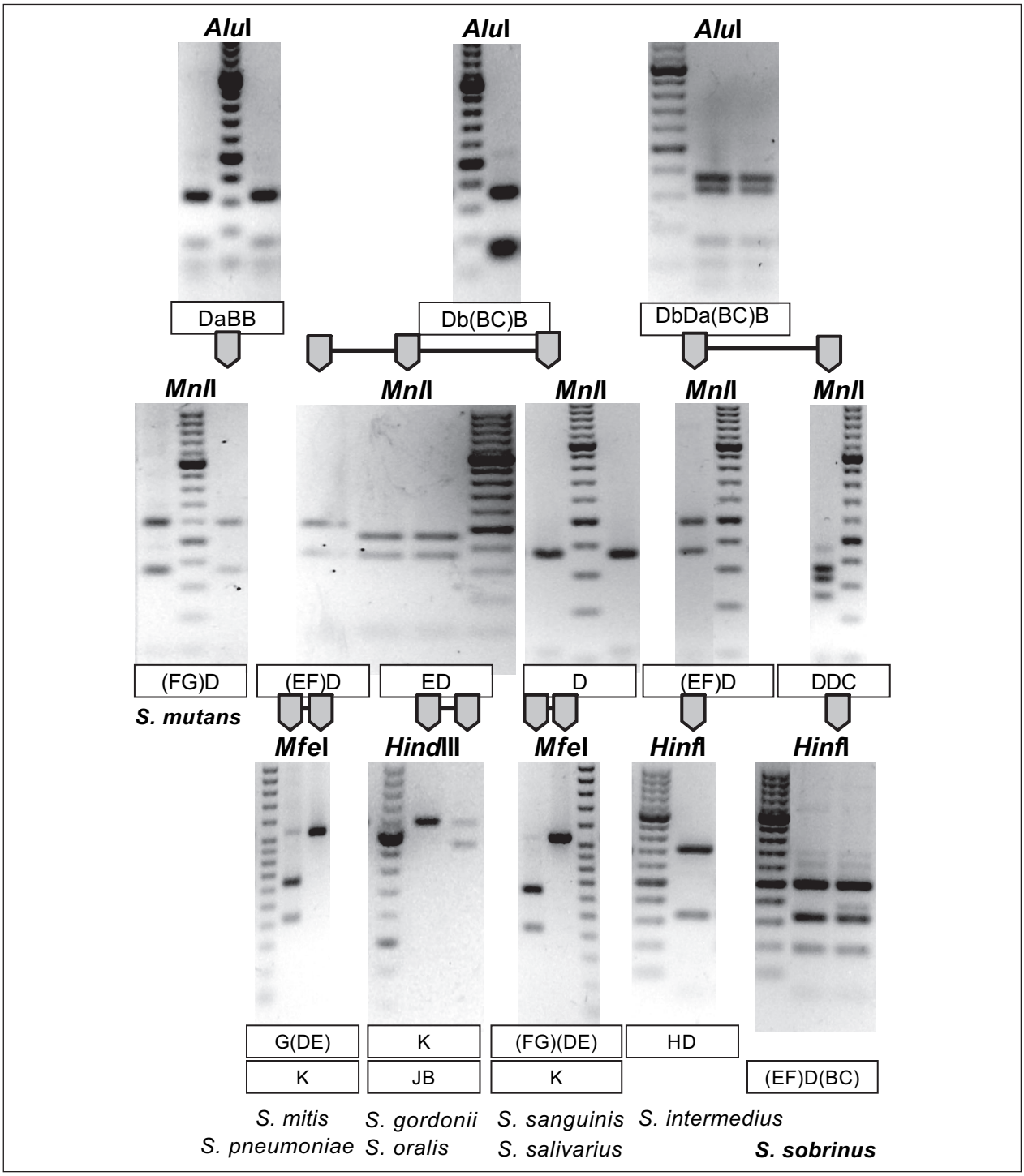


Obr. 2a. Schéma algoritmu pro druhovou identifikaci viridujících streptokoků pomocí restrikční analýzy části genu pro 16S rRNA.
Fig. 2a. The diagram of algorithms for generic identification of viridans streptococci by means of restriction analysis of the part of the gene for 16S rRNA.



Obr. 2b. Schéma algoritmu pro duhovou identifikaci viridujících streptokoků pomocí restrikční analýzy části genu pro 16S rRNA.
Fig. 2b. The diagram of algorithms for generic identification of viridans streptococci by means of restriction analysis of the part of the gene for 16S rRNA.

proLékaře.cz | 30.10.2026



Obr. 3. Ukázka postupu restrikční analýzy podle navrženého algoritmu.
Fig. 3. An illustration of the procedure of restriction analysis according to proposed algorithm.

zařadit do menších skupin většinou blízce příbuzných druhů a některé druhy i zcela identifikovat. Výsledek této společné části identifikace určuje případný následný postup analýzy dalším jedním či dvěma enzymy. To je dostačující pro rozlišení všech uvedených druhů.

Příklad postupu analýzy objasňuje obr. 2. Pokud restrikce PCR produktu enzymem *Alu*I poskytne trojici fragmentů o velikostech spadajících do polí DE (cca 200 párů bazí), D (150-200 pb) a B (50-100 pb) a enzym *Mnl*I dává dva fragmenty o velikosti F (250-300 pb) a D (150-200 pb), lze přímo určit druh jako *S. bovis*. Pokud však souběžná analýza enzymem *Mnl*I poskytne dvojici fragmentů o velikosti EF (cca 250 pb) a D (150-200 pb), nelze rozlišit mezi druhy *S. intermedius, S. vestibularis* a *S. agalactiae*. Jednoznačnou identifikaci druhů umožní následná analýza pomocí *Hinf*I (pro *S. intermedius*), případně pomocí *Hinf*I a *Mfe*I (pro zbylé dva druhy).

proLékaře.cz | 30.10.2026

OVĚŘENÍ NAVRŽENÉ METODIKY

Navržená metodika byla použita pro zařazení 87 izolátů orálních streptokoků, zčásti biochemicky charakterizovaných jako skupina „mutans“, část z nich nebyla úmyslně předběžně testována. Izoláty pocházely od 17 osob z osmi rodin, které byly zařazeny do studie sledující přenos kariogenních streptokoků v rodině do úst dítěte [3, 6]. Uvedená dvojice použitých primerů 16U1F a 16SCR1 je relativně nezávislá na kvalitě i množství DNA. Ve všech případech poskytla PCR dostatek amplifikovaného materiálu pro následnou genetickou analýzu. Restrikční analýzou bylo ve zmíněném souboru izolátů identifikováno celkem 9 druhů streptokoků: 34krát *S. mutans*, 14krát *S. sobrinus*, 11krát *S. sanguinis,* 7krát *S. intermedius,* 6krát *S. gordonii* a *S. anginosus,* 4krát *S. salivarius,* a *S. mitis* a jednou *S. oralis*. Postup restrikční analýzy a její výsledky pro všechny identifikované druhy jsou shrnuty na obr. 3. Genetická identifikace většinou odpovídala biochemickému přiřazení co se týká skupin, uvnitř skupin však docházelo k přesunům, v několika případech došlo k přesunům mezi skupinami mitis a mutans. Výsledky získané restrikční analýzou byly potvrzeny metodou absolutní, tj. DNA sekvenováním pro všechny klony druhů *S. mutans* a *S. sobrinus* i pro vybrané zástupce všech ostatních identifikovaných druhů. Ve všech případech byly výsledky potvrzeny.

ZÁVĚR

Byl navržen algoritmus postupu pro jednoznačnou druhovou identifikaci streptokoků. Tato metodika byla úspěšně ověřena na 87 izolátech orálních streptokoků. Restrikční analýza sice nemůže poskytnout množství informací jako DNA sekvenování, avšak vhodně navržený systém dokáže bezpečně odlišit téměř jakékoliv předem definované bakteriální druhy, včetně taxonomicky blízkých. Ekonomicky je metodika velmi příznivá a může proto posloužit jako dostatečně citlivý postup při ověřování identity druhů určených předběžně jiným způsobem, ať už biochemickými nebo genetickými metodami založenými na specifických sondách.

LITERATURA

1. **Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L.:** GeneBank. Nucleic Acids Res., roč. 31, 2003, s. 23-27.
2. **Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M., Tiedje, J. M.:** The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res., roč. 31, 2003, s. 442-443.
3. **Dušková, J.:** Molekulární epidemiologie a patogenita streptokoků skupiny mutans. Závěrečná zpráva o řešení grantu NK/6243-3, 2002.
4. **Gutell, R. R., Larsen, N., Woese, C. R.:** Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiol. Rev., roč. 58, 1994, s. 10-26.
5. **Kiratisin, P., Li, L., Murray, P. R., Fischer, S. H.:** Indentification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., roč. 22, 2003, s. 628-631.
6. **Krátký, M., Jelínková, J., Janata, J.:** Identification of oral streptococci. in Martin, D. R., Tagg, J. R. (ed.) Streptococci and streptococcal diaseases: Entering the new millenium, 2000, s. 301-304.
7. **Novotná, G., Janata, J., Dušková, J.:** Využití restrikční analýzy genu pro 16S rRNA pro ověření druhové identity významných orálních mikroorganismů. II. Mikroorganismy sliznice dutiny ústní. Čes. Stomat., roč. 104, 2004.
8. **Sato, T., Hu, J. P., Ohki, K., Yemaura, M., Waqshio, J., Matsuyama, J., Takahashi, N.:** Identification of mutans streptococci by restriction fragment lenght pomymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. Oral Microbiol. Immunol., roč. 18, 2003, s. 323-326.
9. **Whiley, R. A., Beighton, D.:** Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol., roč. 13, 1998, s. 195-216.

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru VÚS-VFN reg. č. 00002377901.

Mgr. Gabriela Novotná
Mikrobiologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
140 00 Praha 4