

PRAKTIKUM č. 25

DIAGNOSTIKA PATOGENNÍCH BAKTERIÍ

Identifikace patogenních kmenů
E. coli pomocí PCR amplifikace

Diagnostika EIEC

- EIEC = enteroinvazivní *E. coli*
- způsobují těžká průjemová onemocnění
- obsahují virulenční plazmid
- diagnostika založena na důkazu přítomnosti genů virulenčního plazmidu (konkrétně – *cjrB*)
- pozitivní kontrola - gen na chromozomu *E. coli tonB*

Nasazení PCR reakce (1)

- Podle tabulky v protokolu připravíme 2x master mix (A,B)
- A) s primery TonBUEC a TonBLEC
- B) s primery TonBU2 a TonBL
- Master mix A rozpipetujeme do 6 označených zkumavek (aliquot 13 μ l)
- Master mix B rozpipetujeme po 6 označených zkumavek (aliquot 13 μ l)

Nasazení PCR reakce (2)

- Do jednotlivých zkumavek přidáme 2 μ l DNA izolovaných s různých kmenů *E. coli* (1 pozitivní kontrola (+), 1 negativní kontrola (-), vzorky A-D)
- Obsah zkumavek promícháme, zcentrifugujeme a vložíme do amplifikátoru
- Spustíme program A: 60 PATOGEN
- Amplifikace trvá cca 75minut

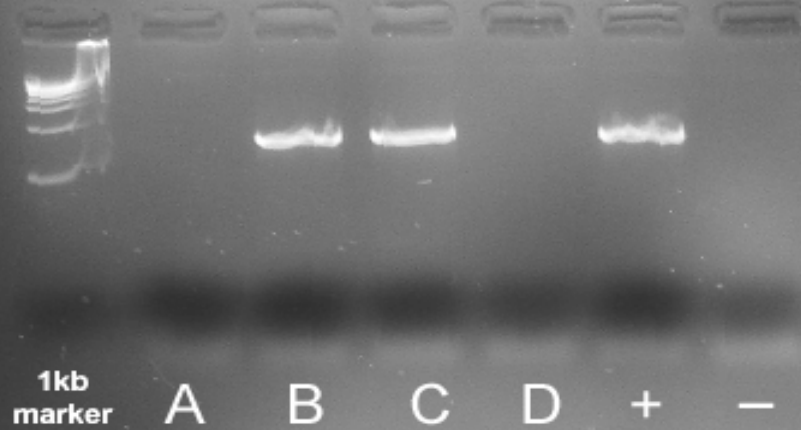
Příprava 1% agarózového gelu

- 0,6 g agarózy smícháme se 60 ml TAE pufru a rozvaříme v mikrovlnné troubě po dobu 90 sekund
- Necháme zchladit na cca 50 °C a přidáme 5 µl Ethidium bromidu (POZOR TOXICKÝ – pracujeme v rukavicích)
- Poté nalijeme do elektroforetické vany, vložíme hřebínky a necháme zatuhnout

Nanášení vzorků

- Gel vložíme do elektroforetického aparátu a vyjmeme hřebínky
- Vyjmutím hřebínku vznikají v gelu jamky, do kterých se nanáší vzorky
- Do 1. jamky nanese DNA marker (t.j. žebříček DNA fragmentů o známé délce - NEB 1kb)
- K 15 μ l v každé zkumavce přidáme 4 μ l nanášecího pufru a nanese do příslušné jamky
- Přiklopíme aparát a aplikujeme napětí 130 V po dobu 20-30 minut

Detekce *cjrB*



Detekce *tonB*

