

# Molekulárně biologické metody v mikrobiologii

Mgr. Martina Sittová  
Jaro 2014

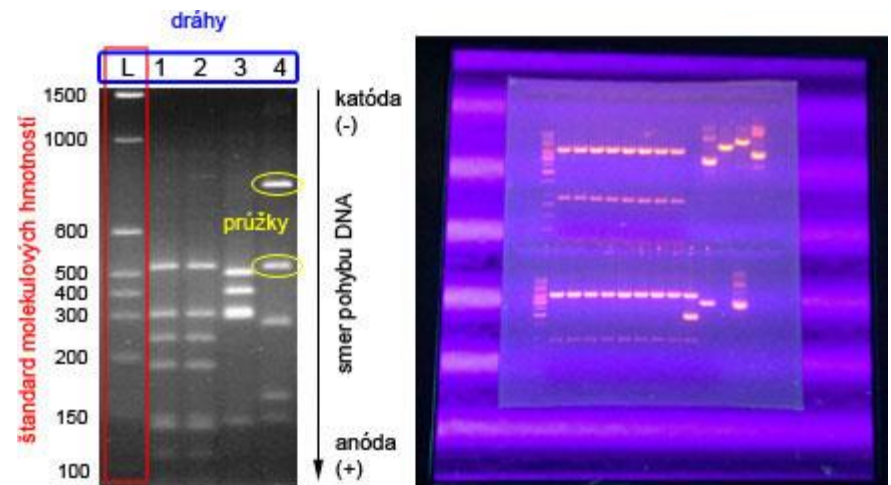
# Harmonogram

- 1. den – Izolace DNA
- 2. den – Měření koncentrace DNA spektrofotometricky, real-time PCR
- 3. den – Elektroforéza

# Molekulární biologická diagnostika



VZ.



Obr. Schéma elektroforetickej separácie (vľavo) a gél pod UV svetlom (vpravo)

# Metody molekulární biologické diagnostiky

- Přímá diagnostika
- Detekce části buněčné struktury - NK
- Metodika - využívá komplementarity vláken NK a je založena na procesu hybridizace NK
- Objev metody PCR - metoda pro zvýšení citlivosti a specificity stanovení
- V klinické praxi již přes 20 let

# Klinické aplikace metod molekulární mikrobiologické diagnostiky - výhody metody

# Klinické aplikace metod molekulární mikrobiologické diagnostiky - výhody metody

- **Kultivačně nezávislé** - detekce a identifikace nekultivovatelných a obtížně kultivovatelných, usmrcených a poškozených mikroorganismů (*M.tbc.*, chlamydie, borelie, viry)
- **Vysoká citlivost** (HCV, HBV, gonokoky, *M.tbc*)
- **Rychlá detekce** (*M.tbc*, meningitidy, sepse,..)
- Možnost vyšetřit jakékoliv klinické vzorky i bez ohledu na transportní podmínky
- Možnost kvantitativního provedení (HCV, HIV, HBV, CMV)

# Klinické aplikace metod molekulární mikrobiologické diagnostiky – limity metody

- **Problém standardizace metod**

- rozdílné přístupy laboratoří v in-house technikách
- Použití standardizovaných komerčních kitů (CE-IVD)

- **Klinická interpretace**

- Někteří klinici metodu stále neznají a neumí používat
- metody jsou ve stadiu získávání poznatků k interpretaci výsledků
- nové vlastnosti metod (citlivost, nezávislost na kultivaci), mění pohled na infekci některými patogeny - borelie, „mrtvé patogeny“,....
- Často není interpretační rámec např. pro vysokou citlivost metody

- **Cena** - při nesprávné indikaci vysoká

- **Nízká informovanost kliniků**

– neznalost přínosu metody nebo až přehnaná očekávání „poškození dobré pověsti“ těchto nových metod

# Vhodný klinický materiál

- Tělní tekutiny – periferní krev, likvor, BAL, slzy, sputum, sérum, plazma, sperma, moč
- Tkáně, biopsie kůže, výtěry a stěry, vzorky z katetrů, implantátů
- Nesrážlivá krev v roztoku EDTA



# Odběr vzorku a transport do laboratoře

- Zvýšené riziko kontaminace
- Správný odběr vzorku
- Není třeba zachovat organismy životaschopné
- Rozlišovat vzorky pro detekci DNA a detekci RNA
- Cílené vyšetřování konkrétních mikroorganismů

## Žádanka o laboratorní vyšetření PCR virových hepatitid

# Žádanka k vyšetření (Laboratorní diagnostické programy pro samoplátce)

**Pacient:**

Rodné číslo:

Příjmení:

Jméno:

Kód pojišťovny:

Dg.

**Odesílatel: přesná adresa, IČZ, odbor**  
*Bez uvedení nelze vyšetřit*

PCR Chlamydia trachomatis	PCR Chlamydia trachomatis	850,-
PCR Mycoplasma sp.	PCR Mycoplasma sp.	850,-
PCR Ureaplasma sp.	PCR Ureaplasma sp.	850,-
PCR Neisseria gonorrhoeae	PCR Neisseria gonorrhoeae	850,-
PCR Trichomonas vaginalis	PCR Trichomonas vaginalis	850,-

**Datum odběru:**

**Formát výsledku:**

- pozitivní +
- negativní -
- nevýšetřeno 0

**Požadovaná vyšetření:**

**Léčba:**

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| RNA HCV - kvalita <input type="checkbox"/>   | interferon <input type="checkbox"/> |
| RNA HCV - kvantita <input type="checkbox"/>  | ribavirin <input type="checkbox"/>  |
| HCV genotyp <input type="checkbox"/>         | žádná <input type="checkbox"/>      |
| Polymorfismus IL28b <input type="checkbox"/> |                                     |
| <hr/>  |                                     |
| DNA HBV - kvalita <input type="checkbox"/>   | lamivudin <input type="checkbox"/>  |
| DNA HBV - kvantita <input type="checkbox"/>  | adefovir <input type="checkbox"/>   |
| HBV genotyp <input type="checkbox"/>         | entecavir <input type="checkbox"/>  |
| <u>Mutant HBV:</u>                           | interferon <input type="checkbox"/> |
| PreCore <input type="checkbox"/>             | jiná <input type="checkbox"/>       |
| Lékové rezistence <input type="checkbox"/>   | žádná <input type="checkbox"/>      |
| <hr/>  |                                     |
| RNA HGV - kvalita <input type="checkbox"/>   |                                     |

**Výsledek posledního vyšetření: (z jiných laboratoří)**

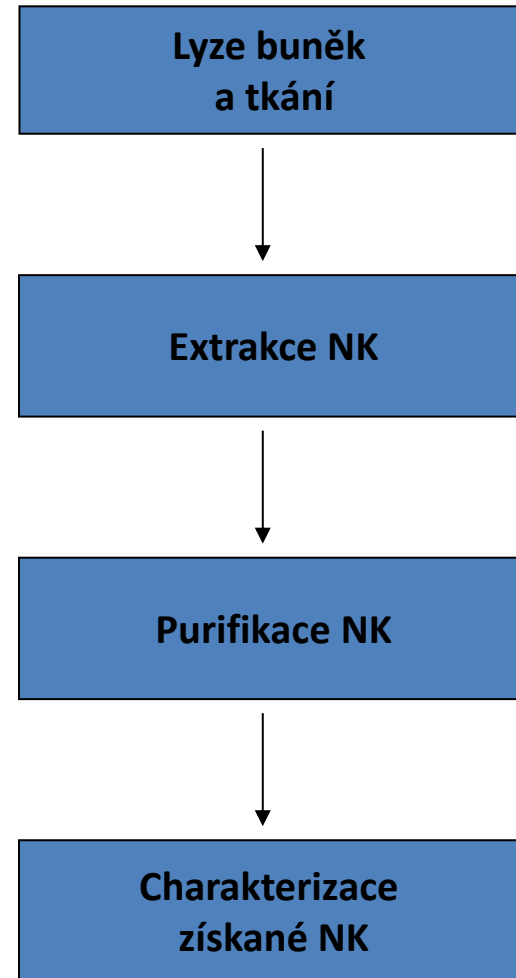
**Laboratoř molekulární biologie (PCR), tel.: 485 313 005**

<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Morbilli (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Parotitis (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Enterovirus (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Cytomegalovirus (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Epstein-Barrové virus (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Varicella zoster (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Hepatitis B virus (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Hepatitis C virus (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Herpes simplex 1, 2 (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Herpes simplex, Varicella zoster (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Respirační infekce virové (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Influenza - typizace (RNA)</li> <li><input type="radio"/> Gastroenteritidy virové (RNA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Borrelia burgdorferi sensu lato (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Chlamydia trachomatis (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Mycobacterium tuberculosis (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Bordetella pertussis, parapertussis (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Respirační infekce bakteriální (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Meningitidy bakteriální (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Lidské papilomaviry (DNA)</li> <li><input type="radio"/> Urogenitální infekce (DNA)</li> </ul>
---	---

# Izolace nukleových kyselin

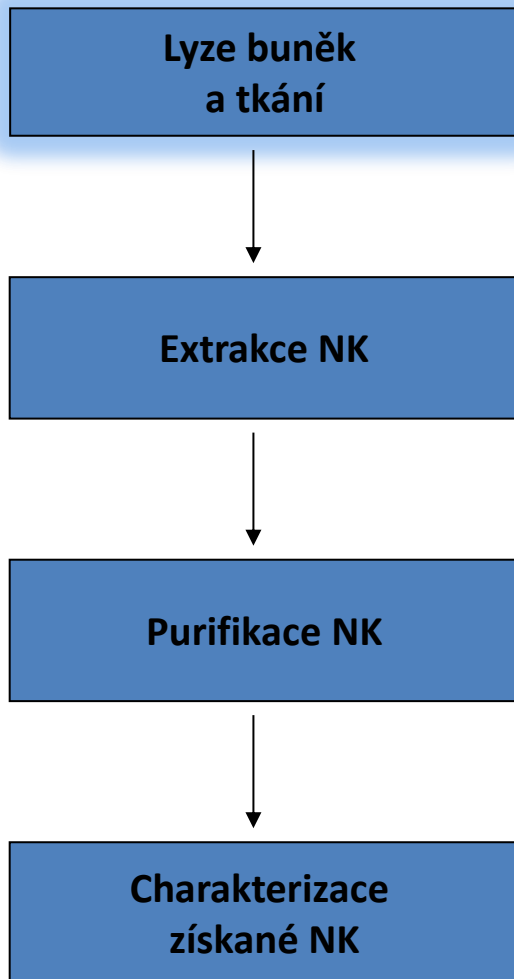
# Izolace nukleových kyselin (NK)

## Obecný postup izolace



# Lyze buněk a tkání

## Uvolnění vnitřního obsahu buněk



- **Biologická lyze**  
především využití degradačních enzymů (lysozym, **proteináza K**, celuláza...)
- **Chemická lyze**  
využití detergentů (např. laurylsíran sodný), chelatačních činidel (např. EDTA), **guanidiových solí**
- **Fyzikální lyze**  
použití varu, mražení, sonikace, drcení

**Většinou kombinace více přístupů**

# Stav materiálu po lyzi buněk

Lyze buněk  
a tkání

Komplexní směs

DNA, RNA, lipidů, proteinů,  
sacharidů, uhlovodíků  
a dalších nízkomolekulárních látek

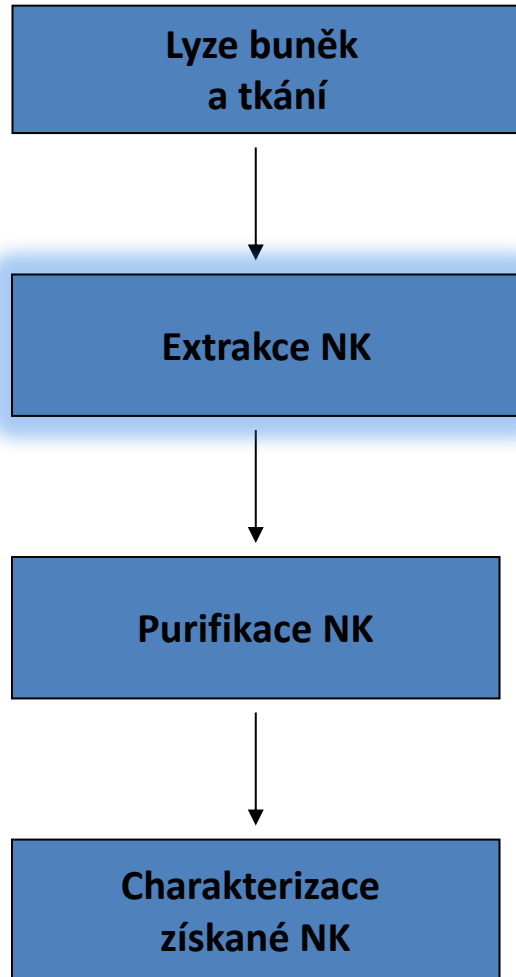
Extrakce NK

Purifikace NK

Další postup:  
oddělit DNA, případně RNA  
od ostatních složek směsi

Charakterizace  
získané NK

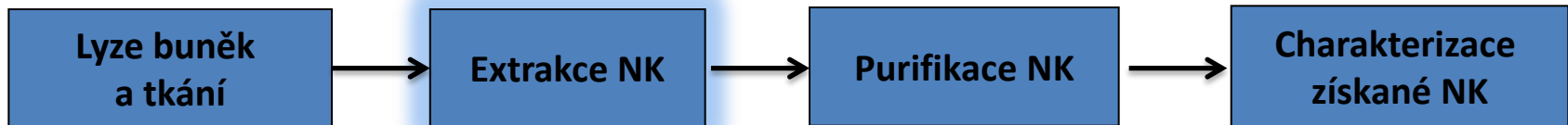
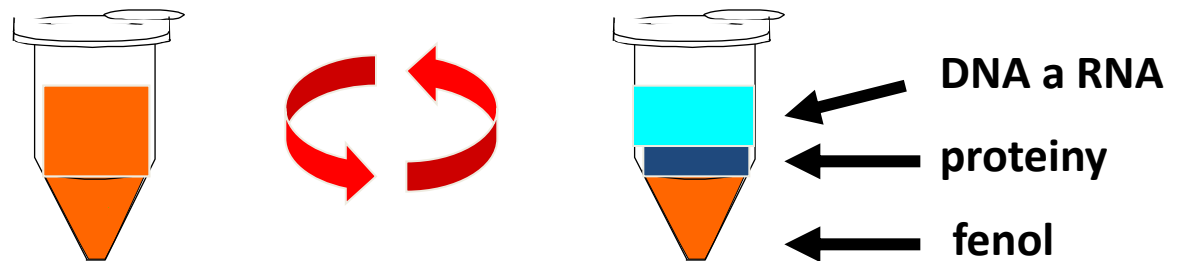
# Extrakce nukleových kyselin



- Extrakce je čistící a dělicí operace, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze - rozpouštědla.

# Extrakce směsí fenol-chloroform

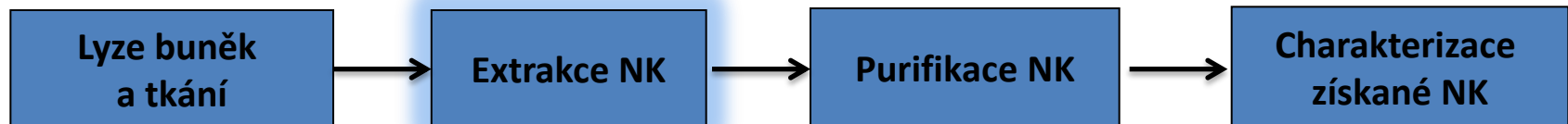
- Separace proteinů a NK založená na lehké vodné denaturaci proteinů na rozhraní těžší organické fáze
- V praxi se už nepoužívá





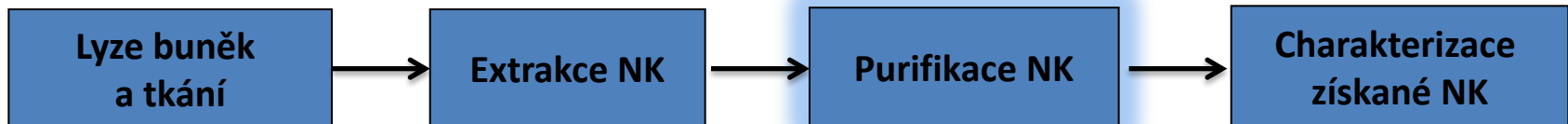
# Další metody extrakce NK

- Alkalická denaturace – použití na oddělení plazmidů od chromozomové DNA

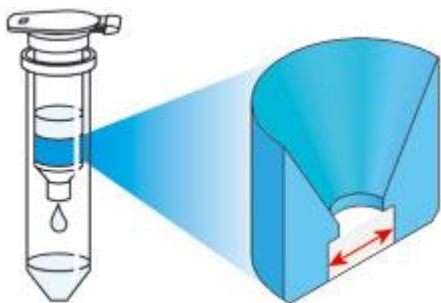


# Purifikace NK precipitací

- Srážení (precipitace), jedna ze základních metod izolace a koncentrace biologických makromolekul.
- Do roztoku, obsahujícího požadovanou makromolekulu, se přidá určité množství precipitačního činidla (síran amonný, **ethanol**, aceton apod.); makromolekulární sloučenina se vysráží, aniž obvykle dojde k denaturaci.
- Může se proto následně znovu rozpustit a použít ve své nativní, biologicky aktivní podobě.



# Precipitovaná nukleová kyselina

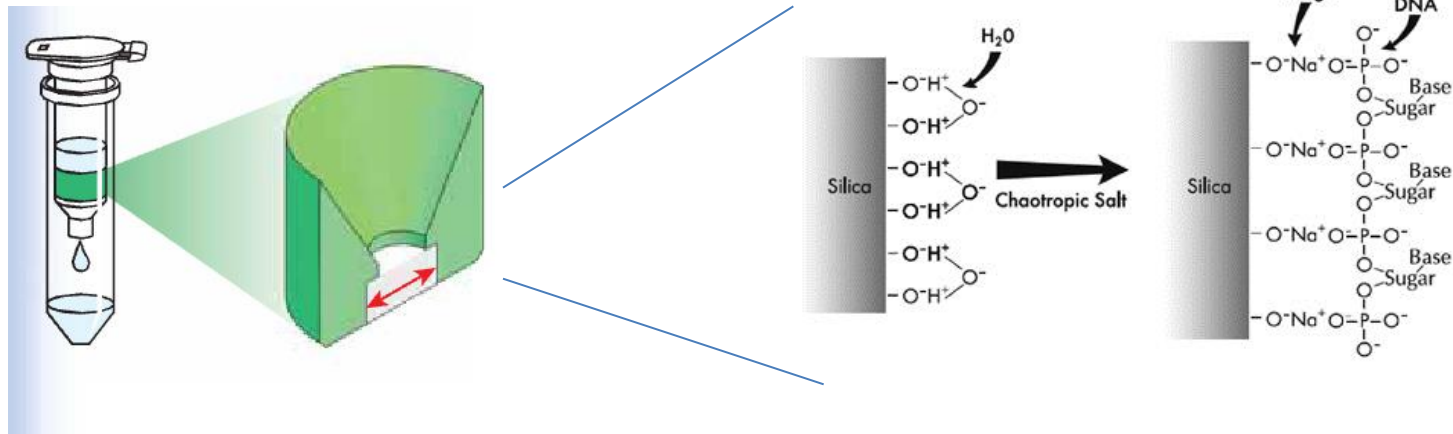


Izolace DNA vazbou na  
křemíkovou membránu

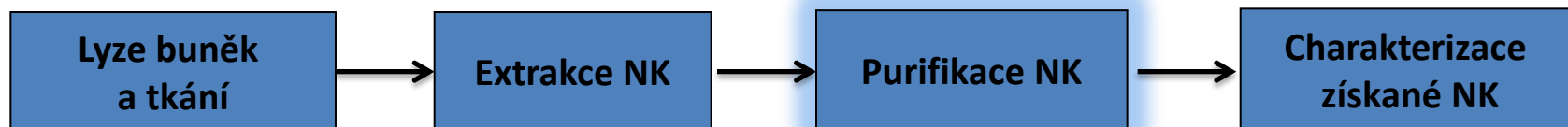


Izolace pomocí  
magnetických kuliček

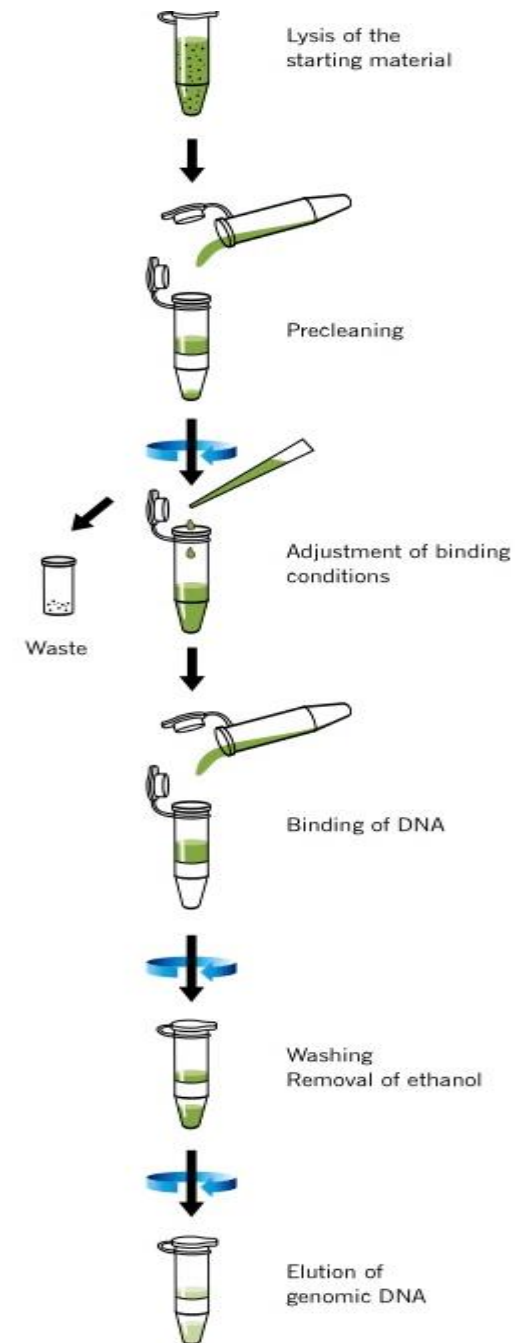
# Izolace NK vazbou na křemíkovou membránu (silikát)



- Komerční izolační soupravy
- NK se zachytává na kolonkách na vrstvě SiO<sub>2</sub>, je proplachována a čistá NK je pak uvolněna elucí do roztoku o nízké iontové síle.



# Izolace NK vazbou na silikát



# Izolace pomocí magnetických kuliček

- vazba NK na magnetické kuličky pokryté specifickými anti-NK protilátkami nebo jinými materiály vázajícími NK
- Kuličky jsou propláchnuty v proplachovacích roztocích s využitím magnetu a NK je eluována specifickými roztoky.

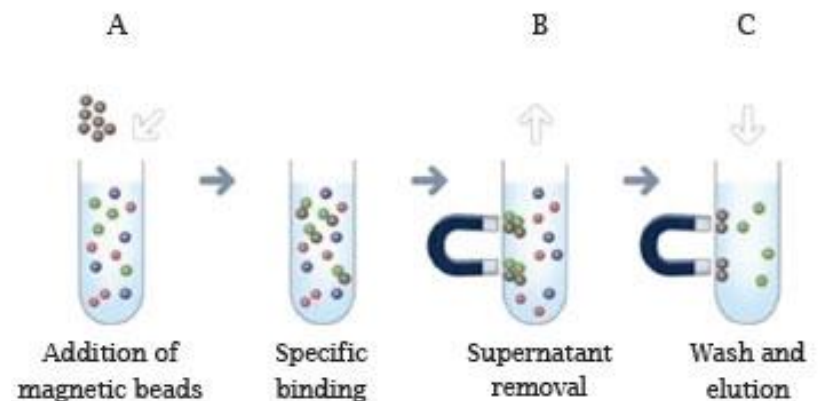


Figure 1: The basic principle of viral isolation by magnetic beads.

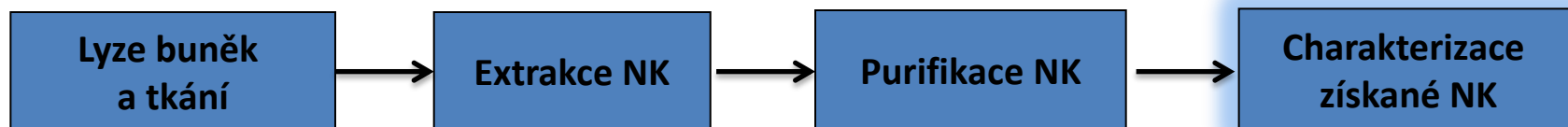
# Charakterizace izolátu NK

- Důležitou charakteristikou izolované NK je:

čistota

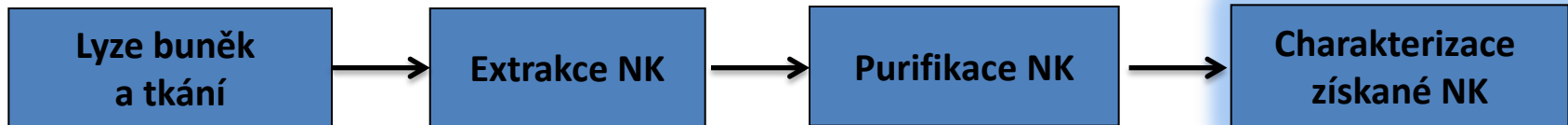


koncentrace



# Charakterizace NK spektrofotometrií

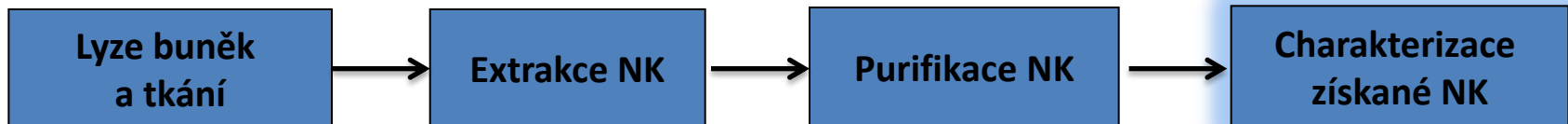
- **Spektrofotometrie** je stanovování vlastností vzorku, např. Koncentrace určité látky v roztoku, na základě pohlcování světla v různých vlnových spektrech.
- NK absorbují UV záření s maximem v oblasti 260 nm
- Proteiny mají maximum absorbance při 280 nm





# Stanovení koncentrace NK spektrofotometrií

- roztok dvouřetězcové DNA o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  má absorbanci 1
  - $A_{260} = 1,0$ 
    - dsDNA  $\sim 50 \mu\text{g/ml}$
    - ssDNA  $\sim 33 \mu\text{g/ml}$
    - ssRNA  $\sim 40 \mu\text{g/ml}$
- Závislost absorbance na koncentraci je lineární při  $A_{260} = 0,1$  až  $0,3$

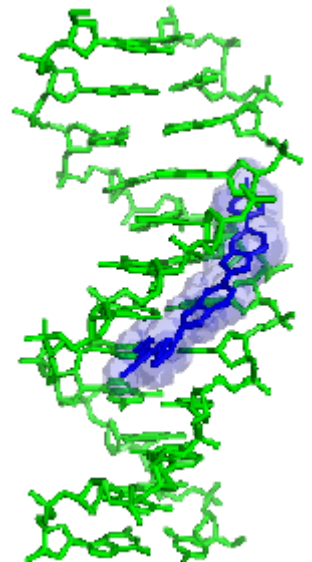


# Čistota NK

- Stupeň čistoty NK stanovujeme z poměru absorbance při 260 a 280 nm.
  - $A_{260/280}$  = od 1,8 do 2,0 (blíž 1,8) = OK!
- $< 1,8$  = kontaminace proteiny
- $> 1,8$  = kontaminace RNA
  - $A_{260/230} > 2,0$
- $< 2,0$  = kontaminace látkami, které jsou součástí izolačních souprav (absorbance při 230 nm)

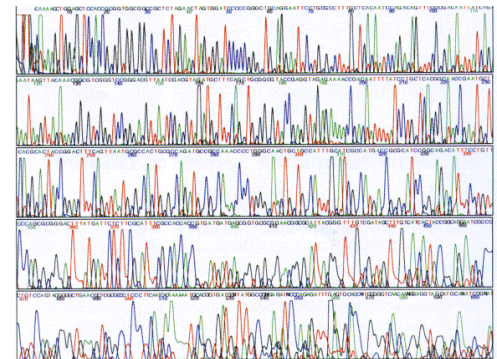
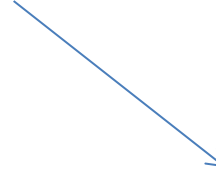
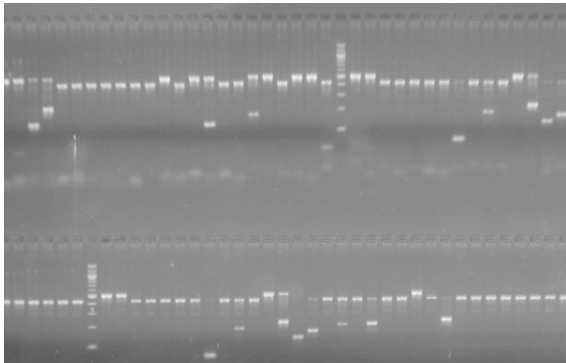
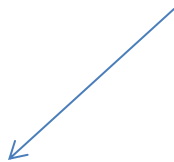
# Charakterizace NK fluorimetrií

- K měření nižších koncentrací NK než lze spektrofotometricky
- Obarvení fluorescenčním barvivem (Hoechst nebo ethidium bromid)
- Měření intenzity fluorescence barviva spektrofluorometrem



# Výsledek izolace

- Čistá DNA nebo RNA o požadované koncentraci



Gratuluji, právě jste zvládli jeden z  
nejdůležitějších kroků v molekulární  
biologii

Izolaci nukleových kyselin

