

Molekulárně biologické metody v mikrobiologii

Mgr. Martina Sittová
Jaro 2018

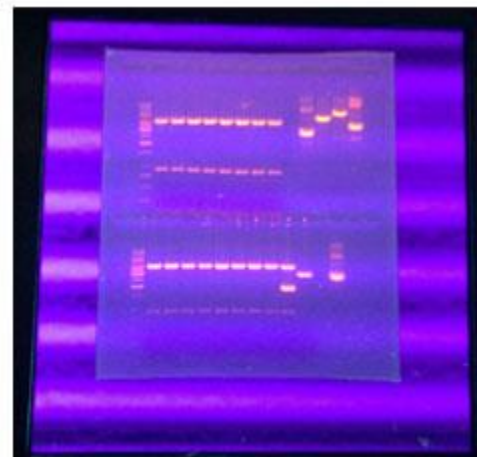
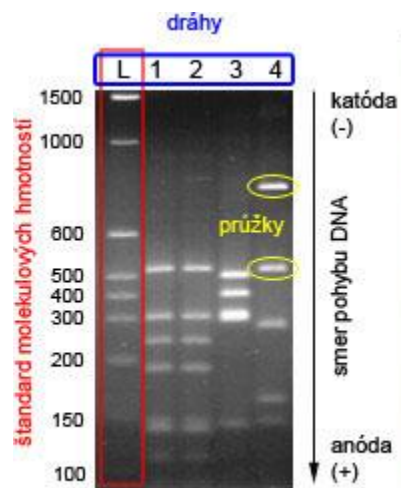
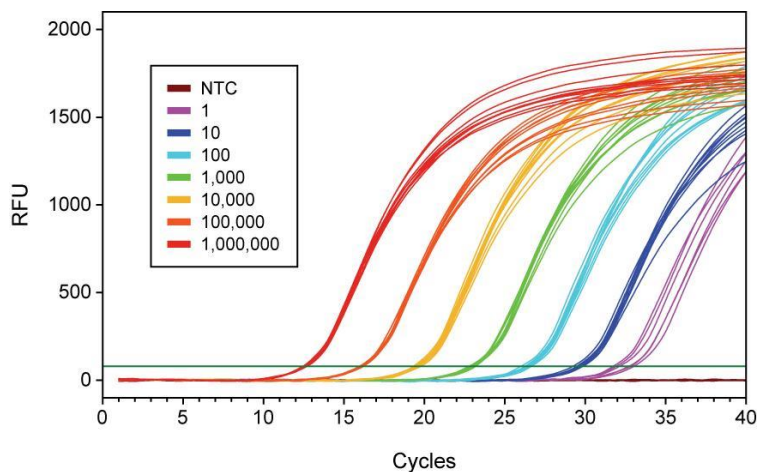
Harmonogram

- 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 – nukleové kyseliny (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:

Kód pojišťovny:

Jméno:

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
RNA HCV - kvantita
HCV genotyp
Polymorfismus IL28b

interferon
ribavirin
žádná

DNA HBV - kvalita
DNA HBV - kvantita
HBV genotyp
Mutanty HBV:
PreCore
Lékové rezistence

lamivudin
adefovir
entecavir
interferon
jiná
žádná

RNA HGV - kvalita

Výsledek posledního vyšetření: (z jiných laboratoří)

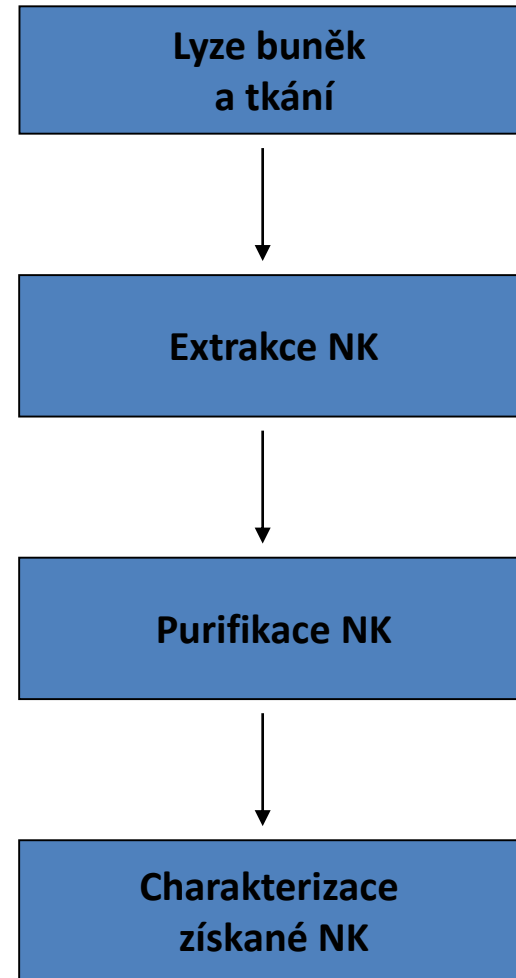
Laboratoř molekulární biologie (PCR), tel.: 485 313 005

- Morbilli (RNA)
- Parotitis (RNA)
- Enterovirus (RNA)
- Cytomegalovirus (DNA)
- Epstein-Barrové virus (DNA)
- Varicella zoster (DNA)
- Hepatitis B virus (DNA)
- Hepatitis C virus (RNA)
- Herpes simplex 1, 2 (DNA)
- Herpes simplex, Varicella zoster (DNA)
- Respirační infekce virové (RNA)
- Influenza - typizace (RNA)
- Gastroenteritidy virové (RNA)
- Borrelia burgdorferi sensu lato (DNA)
- Chlamydia trachomatis (DNA)
- Mycobacterium tuberculosis (DNA)
- Bordetella pertussis, parapertussis (DNA)
- Respirační infekce bakteriální (DNA)
- Meningitidy bakteriální (DNA)
- Lidské papilomaviry (DNA)
- Urogenitální infekce (DNA)

Izolace nukleových kyselin

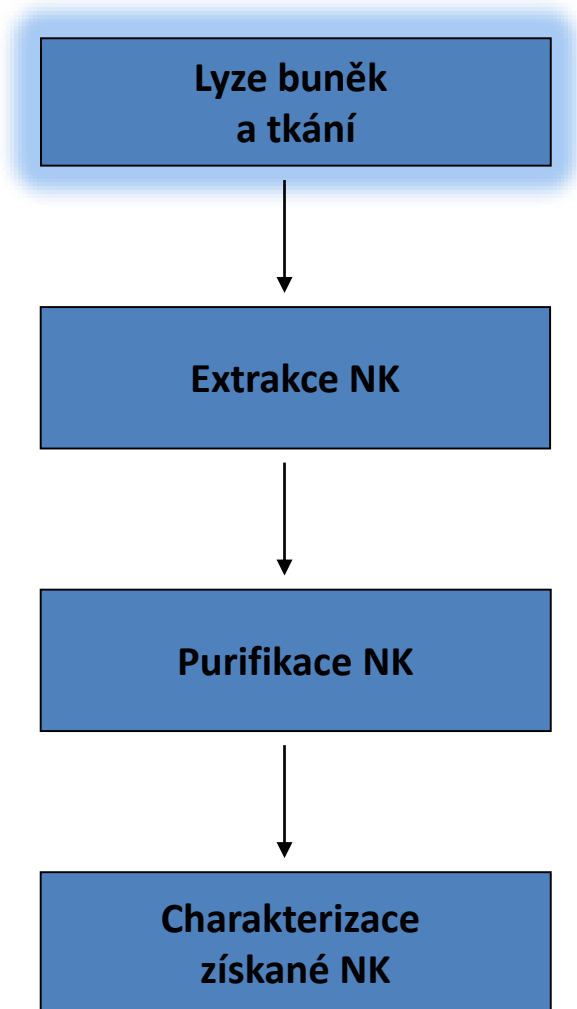
Izolace nukleových kyselin (NK)

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



Extrakce NK



Purifikace NK



Charakterizace
získané NK

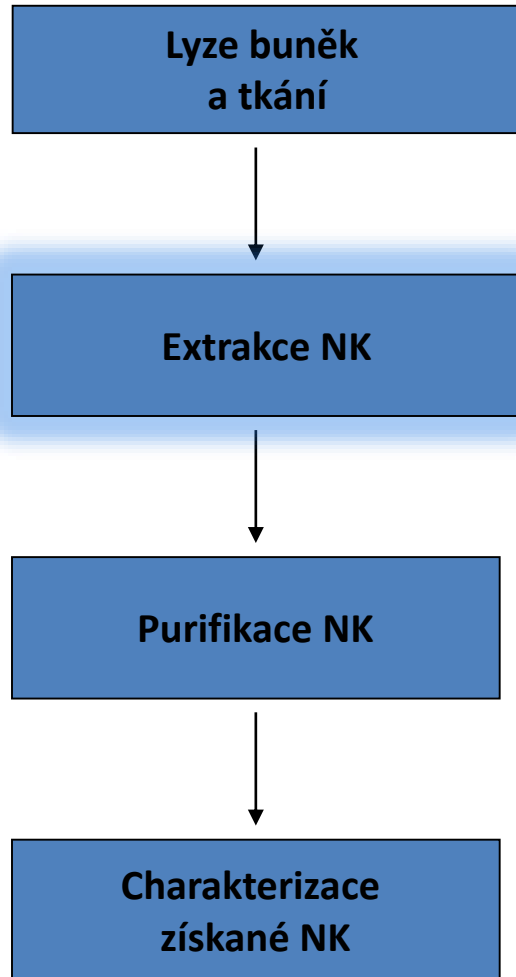
Komplexní směs

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

Další postup:

oddělit DNA, případně RNA
od ostatních složek směsi

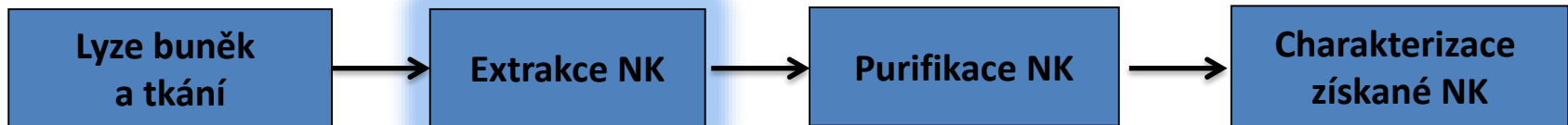
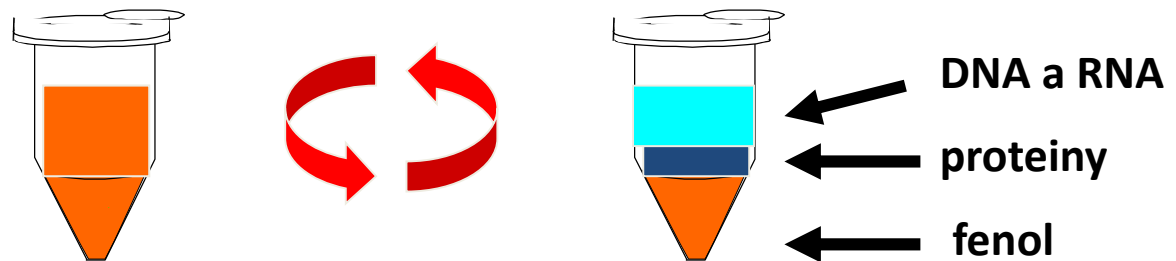
Extrakce nukleových kyselin



- 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

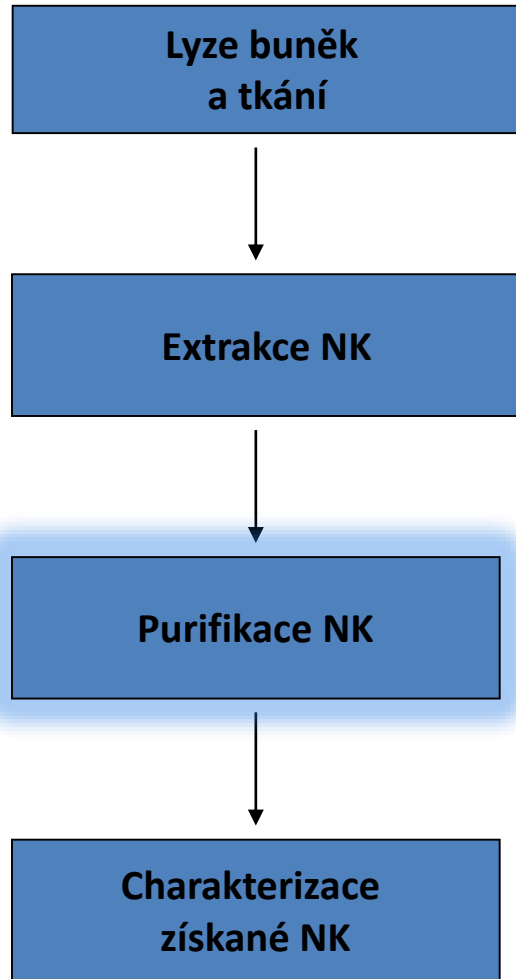


Další způsoby extrakce NK

- **Detergent cetyltrimetylamonium bromid, CTAB**
- Odstranění kontaminant polysacharidového charakteru (houby, rostliny, některé bakterie)
- S nukleovými kyselinami tvoří nerozpustný komplex

- **Guanidium thiokyanát**
- Denaturuje vše kromě nukleových kyselin
- V jeho přítomnosti se DNA váže na oxid křemičitý – chromatografická kolona

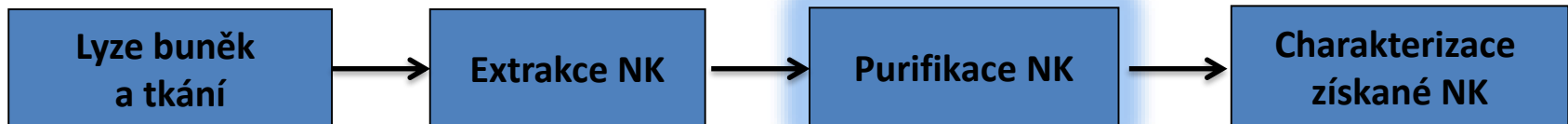
Purifikace nukleových kyselin



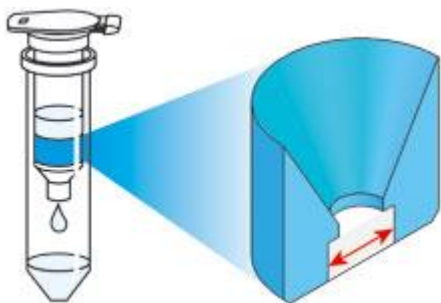
- Srážení (precipitace), jedna ze základních metod izolace a koncentrace biologických makromolekul.
- Zhuštění DNA nebo RNA

Purifikace NK precipitací

- 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.



Izolace NK v diagnostické laboratoři

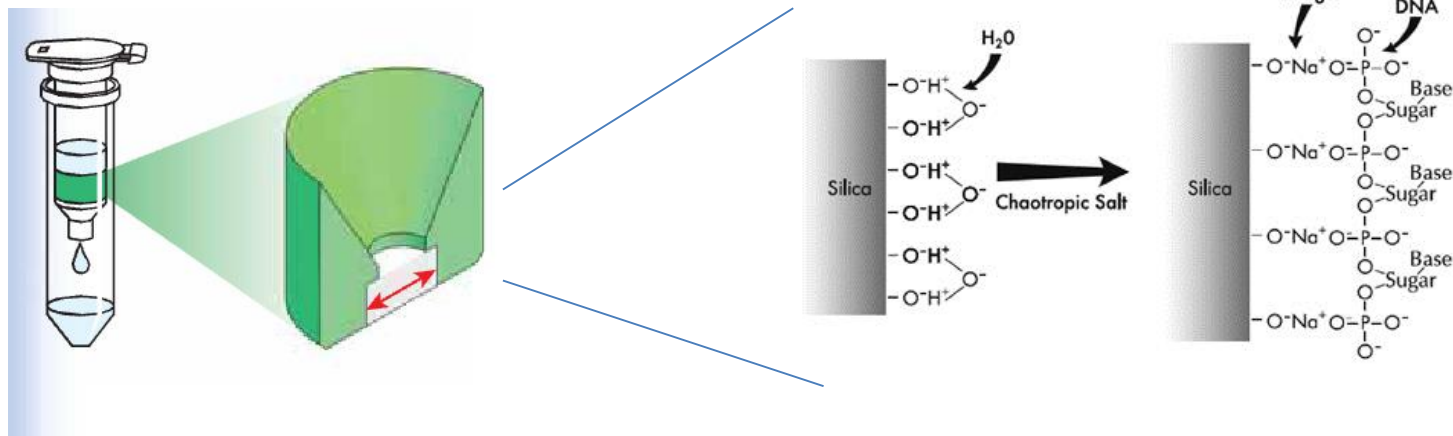


Izolace DNA vazbou na křemíkovou membránu

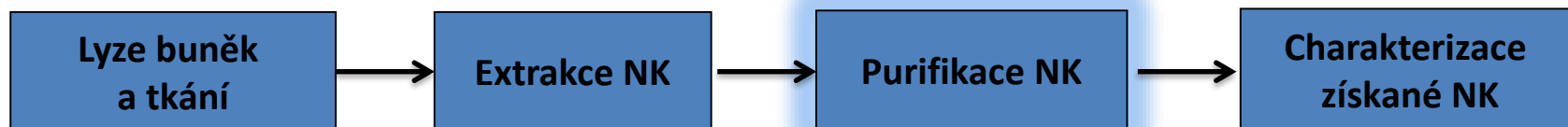


Izolace pomocí magnetických kuliček

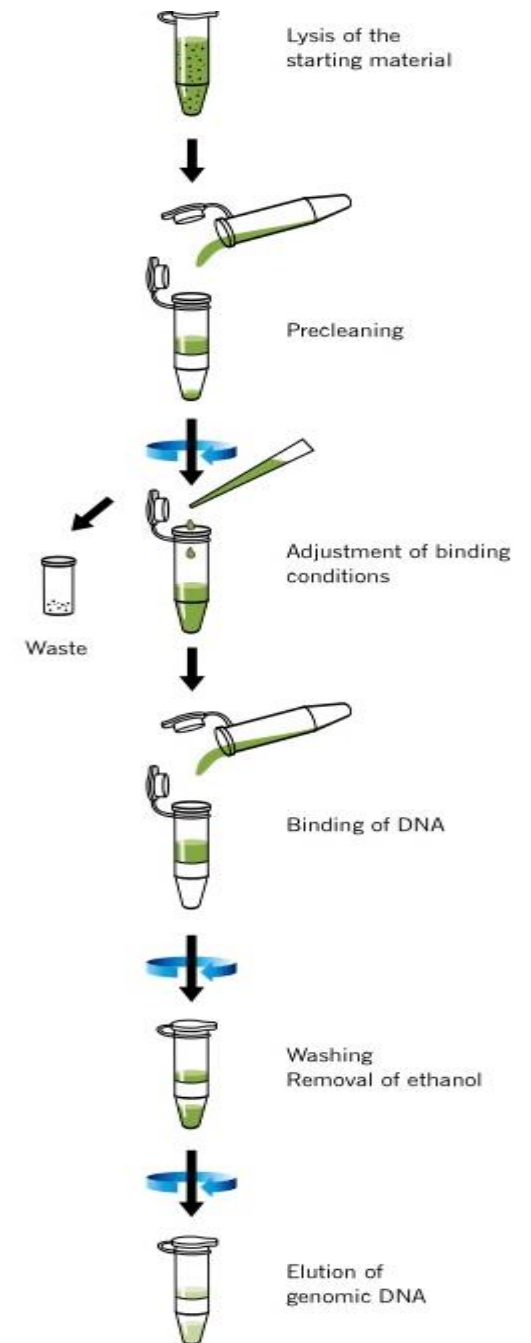
Izolace NK vazbou na křemíkovou membránu (silikát)



- Komerční izolační soupravy
- NK se zachytává na kolonkách na vrstvě SiO₂, 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.

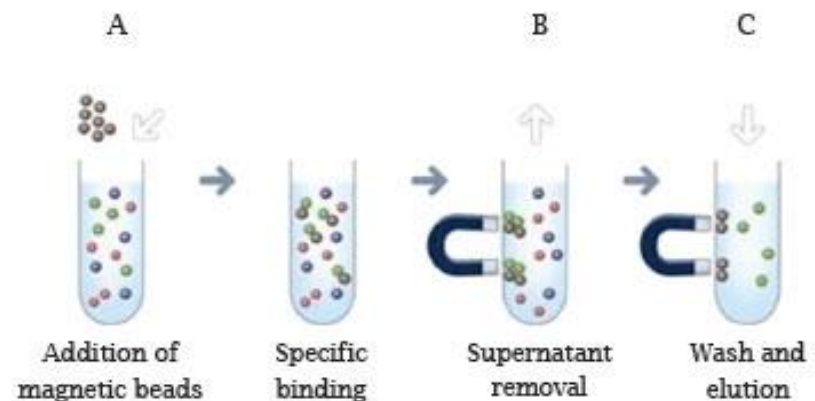


Figure 1: The basic principle of viral isolation by magnetic beads.

Eluovaná DNA/RNA



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

Izolaci nukleových kyselin



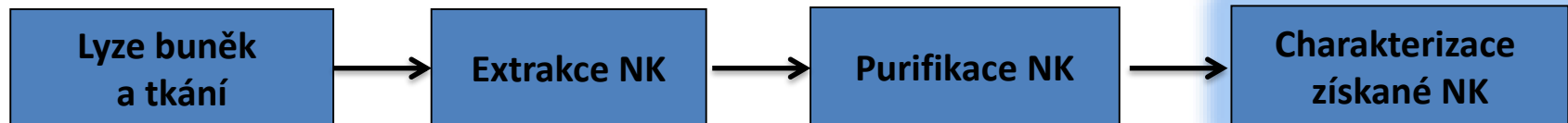
Charakterizace izolátu nukleových kyselin (NK)

- Důležitou charakteristikou izolované NK je:

čistota

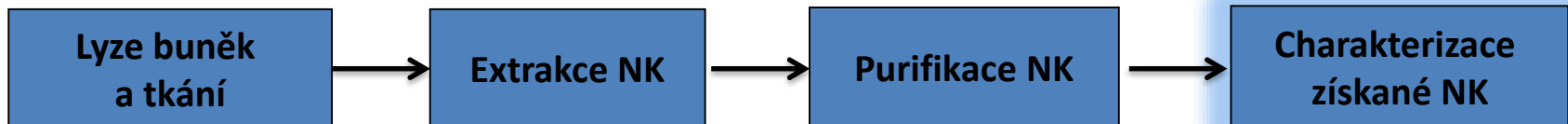


koncentrace



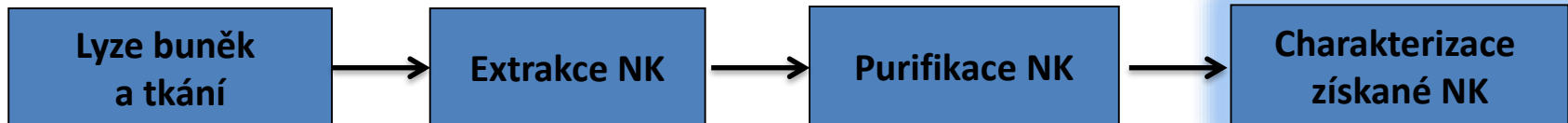
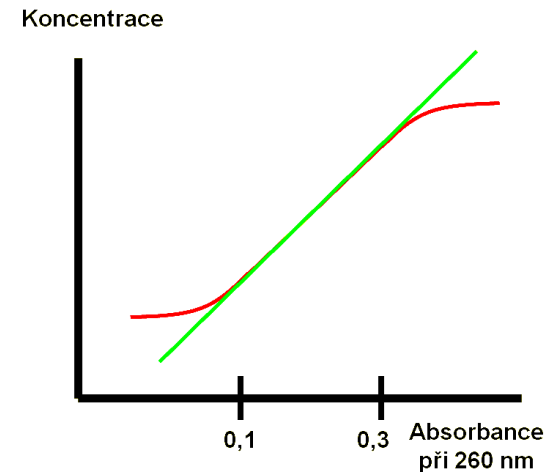
Charakterizace NK spektrofotometrií

- **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



Koncentrace NK

- roztok dvouřetězcové DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ má absorbanci
 - $A_{260} = 1,0$
 - 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 $0,3$

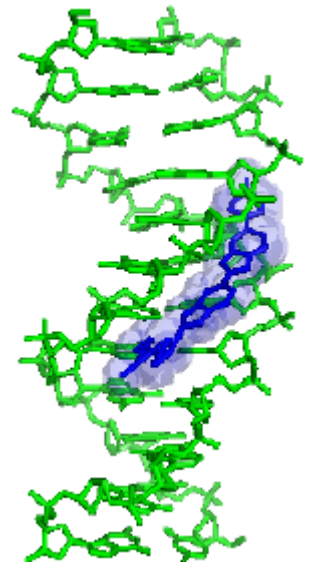


Čistota NK

- 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

