

## ***Detekce virové genomové DNA viru metodou kvantitativní PCR a izolace plazmidu*** **(cvičení č. 6)**

### Úvodní slovo

Cytomegalovirus (CMV) je rod virů patřící do čeledi *Herpesviridae*. Nejčastějšími hostiteli jsou buňky primátů a lidské. Za jméno (z řeckého cyto-, "buňka", a megaló-, "velký") vděčí své schopnosti zvětšovat hostitelské buňky. Lidský cytomegalovirus (HHV-5) je příčinou závažných infekčních komplikací (mononukleóza, zápal plic) především u imunokompromitovaných pacientů (např. pacientů s hematologickou malignitou, AIDS či pacientů po transplantaci krvetvorných buněk). Genom cytomegaloviru tvoří nesegmentovaná dsDNA o délce cca. 200 kb.

Pro detekci CMV byla vyvinuta řada diagnostických metod. Laboratorně se cytomegalovirus diagnostikuje mikroskopickým (histologickým) průkazem infikovaných buněk v bioptickém materiálu nebo v moči, kultivací (z moči) nebo průkazem vzestupu sérových specifických protilátek IgA, IgM a IgG proti antigenům CMV. V současnosti mají největší přínos molekulárně-biologické diagnostické metody, kvalitativní end point PCR a zejména kvantitativní PCR. Tato metoda umožňuje stanovit velikost virové nálože a její výhodou je i univerzálnost pro všechny typy vzorků (stačí velmi malé množství templátové DNA).

Principem kvantitativní PCR je sledování kumulace amplikonu v reálném čase pomocí interkalačních barviv nebo specifických DNA sond značených fluorescenčními barvivy. Nevyžaduje tedy žádnou post-PCR detekci, výsledek je hodnotitelný přímo ze záznamu o průběhu reakce. Odpadá tak mimo jiné možnost kontaminace vzorků amplikony z předchozích reakcí, což je častým problémem u metod, kdy detekce amplikonů probíhá po ukončení PCR na elektroforéze. Pro izolaci DNA z klinických vzorků, která předchází vlastní PCR, jsou rutinně využívány komerční soupravy, založené většinou na separaci DNA na kolonkách.

Paralelně bude izolována plazmidová DNA. Plazmid je malá, často kružnicová, molekula DNA, kterou nacházíme převážně u bakterií a archeí. Replikace probíhá nezávisle na chromozomu a přenáší se mezidruhově. Pro hostitelskou buňku nejsou nezbytné, ale často přináší nějakou konkurenční výhodu, např. rezistenci k antibiotiku/ům (R-plazmidy), produkci toxinů (koliciny – Col-plazmidy). Jsou často využívány pro genovou manipulaci v laboratořích. Přenáší se transformací (příjem DNA z prostředí) nebo transdukcí pomocí pilů (F-plazmidy). Izolovaná plazmidová DNA je rutinně analyzována pomocí agaróзовé gelové elektroforézy (ELFO), kde vidíme i poměr jednotlivých konformací (u kružnicové molekuly) nebo jediný produkt (linearizovaný plazmid).

### Doplňkové informace

Ve cvičení použijeme již purifikovanou DNA z klinického materiálu z laboratoře genetiky Fakultní nemocnice u sv. Anny. Izolovanou DNA pak analyzujeme metodou polymerázové řetězové reakce v modifikaci kvantitativní PCR.

Souprava pro kvantitativní PCR od firmy Genetrac, se kterou budete ve cvičení pracovat, obsahuje kromě sady primerů specifických pro konkrétní gen v genomu cytomegaloviru i TaqMan sondy umožňující detekci produktů PCR v reálném čase. Souprava je určena pro kvalitativní i kvantitativní stanovení. Na základě získaných hodnot prahového cyklu Ct je tak možné odhadnout množství genomů cytomegaloviru, které byly na počátku přítomny ve vzorku.

Pro izolaci plazmidů použijeme komerční soupravu GeneJET Plasmid Miniprep Kit od firmy Thermo Scientific. Funguje na stejném principu jako kit z minulého cvičení, ale zároveň využívá výrazně vyšší stability plazmidové DNA oproti gDNA. Buněčná stěna není zcela degradována, pouze narušena. Její zbytky spolu s genomovou DNA jsou odstraněny centrifugací. Plazmidová DNA, která zůstává v supernatantu, je přečištěna na křemičitých kolonkách.

#### Cíl cvičení

- Provést detekci a pokusit se i o kvantifikaci cytomegalovirového genomu pomocí kvantitativní PCR.
- Izolovat plazmid z *E. coli* a prokázat jeho čistotu spektrofotometricky a pomocí elektroforézy.

#### Seznam přístrojů

- qPCR termocykler
- stojánky na zkumavky a zkumavky (1,5 ml a 0,2 ml)
- termoblok
- centrifuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 14 000 rpm (21 000 g)
- pikofuga na 1,5 ml mikrozkušavky s otáčkami do 6 000 rpm
- sada pipet o objemech 2, 20, 200 a 1000  $\mu$ l
- stopky

#### Vlastní pracovní postup

Detekci kvantitativní PCR provedeme dle protokolu od výrobce detekčního kitu Cytomegalovirus DNA Quantification Kit (Genetrac). Plazmidy budeme izolovat GeneJET Plasmid Miniprep kitem podle modifikovaného protokolu.

#### **Namíchání reakce pro kvantitativní PCR (doplňte chybějící hodnoty dle protokolu výrobce)**

Všechny kroky je možno provádět při laboratorní teplotě

- 1) Nechejte rozpustit MasterMix po dobu asi 5 minut a poté promíchejte několikerým, ale opatrným převrácením zkumavky.
- 2) Rozpipetujte MasterMix po .....  $\mu$ l do PCR zkumavek.
- 3) Přidejte po .....  $\mu$ l izolované DNA.
- 4) Do samostatné zkumavky přidejte .....  $\mu$ l pozitivní kontroly.
- 5) Výsledný objem reakčních směsí je .....  $\mu$ l.
- 6) Uzavřete PCR zkumavky, krátce zcentrifugujte veškerou tekutinu ke dnu, vložte do termocyklu a proveďte amplifikaci.

## Amplifikace

Program pro amplifikaci doplňte dle návodu výrobce:

Proces	Teplota (°C)	Čas (s)
Opracování UDG		
Aktivace reakce		
<b>PCR</b>	opakovat .....x	
Denaturace		
Annealing		
Polymerace		

## Vyhodnocení

	Kanál FAM/Sybr	Kanál JOE/HEX	Výsledek
Pozitivní kontrola	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
Negativní kontrola	NE	ANO	NEGATIVNÍ
Vzorek	ANO	ANO	POZITIVNÍ
	ANO	NE	POZITIVNÍ
	NE	ANO	NEGATIVNÍ
	NE	NE	NEHODNOTITELNÝ

K protokolu doložte záznam z kvantitativní PCR a vypracujte tabulku s výsledky pro jednotlivé izoláty. Postupujte dle popisu vyučujícího.

Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

**Marmur, J. 1961:** A procedure for isolation of DNA from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208-218. Jedná se o první článek, ve kterém jsou popsány základní principy izolace DNA.

**Sambrook, J. a Russell, D. 2001:** Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Persing (2011):** Molecular Microbiology – second edition, ASM Press, Washington, D.C.

**Boeckh, M., Huang, M., Ferrenberg, J., et al. 2004:** Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 1142–1148.

<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-diagnostika-cmv-infekce-u-nemocnych-s-hematologickou-malignitou-473072>

**Manuál společnosti Genetrac** (Česká republika).

Kontrolní otázky a příklady

- 1) Jakou hmotnost má lineární genom cytomegaloviru, u něhož bylo zjištěno celkem 200 000 párů nukleotidů? Průměrná molekulová hmotnost jednoho bp je 650.
- 2) Kolik molekul genomové DNA cytomegaloviru by bylo obsaženo v 1 µg DNA?
- 3) Jak dlouhá je genomová DNA cytomegaloviru? Připomeňme si, že vzdálenost mezi dvěma páry bazí je 0,34 nm.
- 4) Popište základní princip kvalitativního a kvantitativního stanovení genotypu pomocí kvantitativní PCR