

PCR v mikrobiologii (J11)



- Autor prezentace: Ondřej Zahradníček
- Praktika z lékařské mikrobiologie (VLLM0421c)
- Kontakt
- 777 031 969 zahradnicek@fnusa.cz
- ICQ 242-234-100



Pro zopakování

- **Cílem mikrobiologických metod** je zpravidla detekce patogena, popř. určení jeho citlivosti na antimikrobiální látky.
- **Patogena určujeme**
 - **Přímými metodami**
 - detekce celého mikroba (jako morfologické či fyziologické jednotky)
 - detekce jeho části (antigenů, DNA)
 - detekce jeho produktu (například toxinu)
 - **Nepřímými metodami:** detekce protilátek



Přehled metod – opakování

- **Přímé metody** (*práce se vzorkem či kmenem*)
 - Mikroskopie (nativní preparát, barvení...)
 - Kultivace (na tekutých i pevných půdách)
 - Biochemické a podobné identifikační metody
 - Průkaz antigenu (pomocí protilátky)
 - Pokus na zvířeti (izolace, průkaz toxicity)
 - **Průkaz nukleové kyseliny**
- **Nepřímé metody**
 - Průkaz protilátek (pomocí antigenu)



Průkaz nukleové kyseliny

- **Metody bez amplifikace** (genetické sondy). Jsou méně citlivé, to je někdy i výhoda
- **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** velmi citlivá, stačí i jedna molekula DNA. Lze ovšem uměle citlivost snížit.
- **Ligázová řetězová reakce (LCR)** je velmi podobná (ale zavedla ji jiná firma)
- **Průkaz virové RNA** je možný pomocí upravené PCR



Důležité upozornění

- Nehodláme studenty učit principiální otázky týkající se molekulárních metod. K tomu jsou určeny jiné předměty
- Naším cílem je seznámit studenty s přehledem využitelnosti těchto metod v lékařské mikrobiologii.
- Jedince s hlubším zájmem o tuto problematiku ve 3. – 5. ročníku rád přivítá as. Filip Růžička ve volitelném předmětu VSMB081



Základní schéma reakce PCR

- **V první fázi** je nutno získat izolovanou DNA. Proces je poměrně složitý.
- **V druhé fázi** probíhá vlastní amplifikace (pokud vzorek obsahuje úsek DNA odpovídající příslušnému primeru)
- **Ve třetí fázi** probíhá detekce produktu amplifikace
 - Gelovou elektroforézou nebo
 - Metodou ELISA (**≠ serologická ELISA!!!**)



Použití metod průkazu DNA (RNA) v klinické mikrobiologii

- Tyto metody používáme zpravidla tam, kde mikroskopický a kulturační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný
- Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné ubikvitárně. Pro svou velkou citlivost by ruče vyčlenily kdejakou molekulu přilétlou z vnějšího prostředí
- Metody nejsou ani neúčinné, jak si někdo myslí, ani samospasitelné, jak si myslí pro změnu jiní



Úkol 1: Izolace DNA

- Prohlédněte si videoklip „Izolace DNA“

Úkol 2 Amplifikace specifických úseků DNA původce lymeské borreliózy metodou PCR

- Prohlédněte si videoklip



Postup izolace DNA pro PCR

Ke **500 μ l materiálu** (pokud je objem materiálu menší, je nutno doplnit do 500 μ l fyziologickým roztokem) přidat **25 μ l SARKOSYL**, inkubovat při 56 °C/15 min., v průběhu inkubace občas vortexovat.

Přidat **1,0 ml roztoku G1**, vortexovat, inkubovat při 65°C/10 min, vzorek zchladit na RT.*

Přidat **50 μ l SILICA**, obrácením promíchat (10 min.).**Centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml roztoku G2**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml 80% Etanolu**, vortexovat, centrifugovat při 6 000 g/30 sec., supernatant slít.

Přidat **1 ml Acetonu**, vortexovat, centrifugovat 6 000 g/60 sec., supernatant ihned **opatrně** slít.

Pelet vysušit (max. 2 min.) v otevřené zkumavce.

Přidat **50 μ l roztoku TE** (předehřátého na 56 °C), dobře protřepat.

Eluovat DNA při 56 °C/10 min., krátce vortexovat nebo protřepat.

Centrifugace 10 000- 14 000 g/2 min./RT.

Čirý roztok DNA odebrat ihned po centrifugaci do sterilní mikrozkušavky



Proč je důležitá interní kontrola

- Velmi běžným jevem je, že dochází k tzv. inhibici reakce. Inhibice reakce je dána přítomností různých interferujících látek (např. talek z rukavic)
- Proto by měla být pro detekci vždy použita směs, obsahující kromě vzorku a jemu příslušných primerů ještě kontrolní DNA + primery. Pozitivita IC je dokladem, že nedošlo k inhibici reakce
- Ovšem pozor: IC může být negativní u vysoce pozitivních vzorků (prohraje v kompletici o nukleotidy).



Možné výsledky PCR

Následující možnosti platí bez ohledu na způsob detekce (gelovou elektroforézou nebo ELISou)

- **Pozitivní výsledek** vzorku svědčí o pozitivitě vzorku. Přitom výsledek IC je zpravidla také pozitivní, ale u silně pozitivních případů nemusí být.
- **Negativní výsledek** vzorku při **pozitivním výsledku IC** = negativní výsledek reakce
- **Vzorek i IC negativní** = inhibice reakce

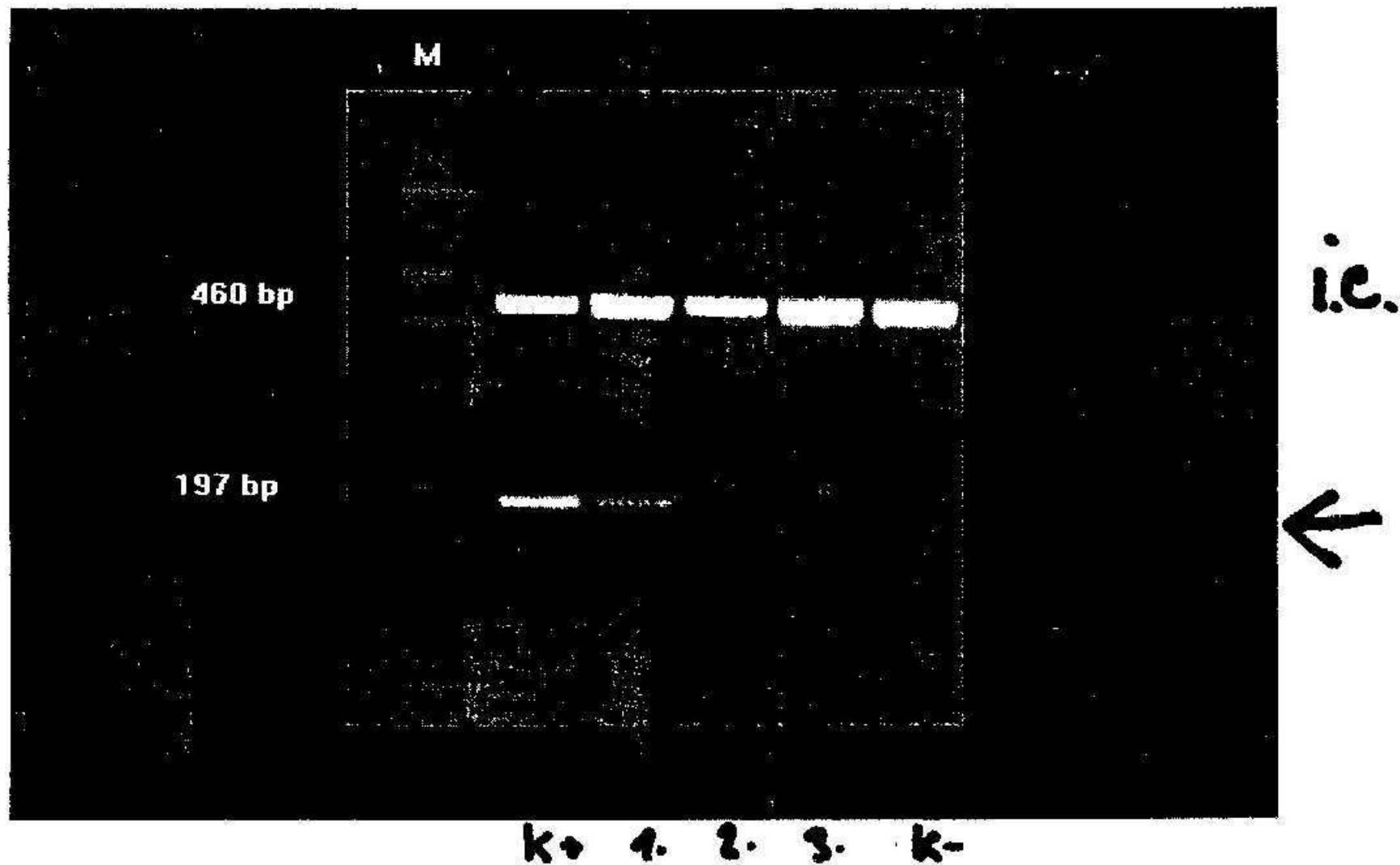


Úkol 3: Detekce výsledků PCR pomocí gelové elektroforézy

- **Gelová elektroforéza** je jednou z možností detekce produktu PCR
- Produkty **putují gelem** od katody směrem k anodě a jsou zviditelněny pomocí UV-transluminátoru
- Každý vzorek obsahuje také **interní kontrolu (IC)**
- Kromě vzorků je použit také **žebríček (ladder)** jako měřítko



Ukázka gelu (3 vzorky, pozitivní a negativní kontrola, ladder) – Ú3





Ú4: Porovnání výsledků dvou reakcí: průkaz protilátek a PCR

- V řadě případů nelze spoléhat jen na výsledek jediné reakce. Pro interpretaci potřebujeme **kombinaci výsledků** různých reakcí.
- V daném případě máme k dispozici výsledek **PCR** a výsledek reakce **ELISA**
- Musíme mít na paměti, že PCR je přímý průkaz, ELISA k průkazu protilátek je průkaz nepřímý se vším všudy



Úkol 5: Průkaz produktu PCR metodou ELISA

- V praktiku J10 jste se učili o využití metody ELISA k průkazu antigenů a protilátek
- ELISA k průkazu protilátek byla také použita jako součást předchozího úkolu
- Zde však nejde o sérologické použití této reakce, ale o **ELISA-detekci produktu PCR**. Proto i zde máme vedle důlku vzorku také důlek patřící IC.



Úkol 5 – pokračování

- Za **pozitivní** se považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Konkrétní způsob výpočtu je uveden na listu s hodnotami absorbancí



Hezký
den!