

Pátráme po mikrobech  
Díl XI.

**Průkaz nukleové kyseliny**

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)

ICQ 242-234-100

# Co už umíme

- Umíme používat **mikroskopii, kultivaci a biochemickou identifikaci**
- Víme, jak diagnosticky využít reakci antigenu s protilátkou, a víme, čím se liší **precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích, komplementfixace, neutralizace a reakce se značenými složkami**
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod a antimikrobiálních látek** a umíme otestovat účinnost těchto postupů

# Pohádka

- Když Lipold, syn rolníka z Křídlovic, zemřel léta páně 1184, jeho smrt provázela spousta dohadů. Byly to opravdu souchotiny, na co umřel? Mezi lidem se říkalo, že jeho bratr Děpold mu záviděl, že jeho díl pole je lepší a má lepší přístup ke slunci.
- Teprve za více než osm století se ukáže pravda: Lipoldovou smrtí opravdu nebyl vinen Děpold, ale *Mycobacterium tuberculosis*

## Poučení z naší pohádky

- Průkaz nukleové kyseliny je **velmi citlivá a přesná metoda** – někdy tak citlivá, že se její citlivost musí uměle omezit, aby nebyly zachyceny náhodné komponenty
- Zajímavostí je, že **mikrobiální DNA lze zachytit i v kosterních pozůstatcích stovky let starých**
- Tyto metody používáme zejména tam, kde **jiné přímé metody jsou obtížně proveditelné či málo spolehlivé**

# 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 (antigenu, 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 kultivační průkaz je obtížný nebo není vůbec možný
- Nehodí se příliš pro běžné patogeny přítomné ubikvitárně. Pro svou velkou citlivost by ruče vyčenichaly 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  $\mu$ l materiálu** (pokud je objem materiálu menší, je nutno doplnit do 500  $\mu$ l fyziologickým roztokem) přidat **25  $\mu$ l SARKOSYLu**, 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  $\mu$ 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  $\mu$ l roztoku TE** (předehřátého na 56 °C), dobře protřepat.

Eiuovat 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. talem 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 kompetici o nukleotidy). To ale nevadí, pozitivní reakce totiž nemůže být inhibována

## Možné výsledky PCR

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

- **Pozitivní výsledek** vzorku svědčí o pozitivě 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

# Přehled interpretace

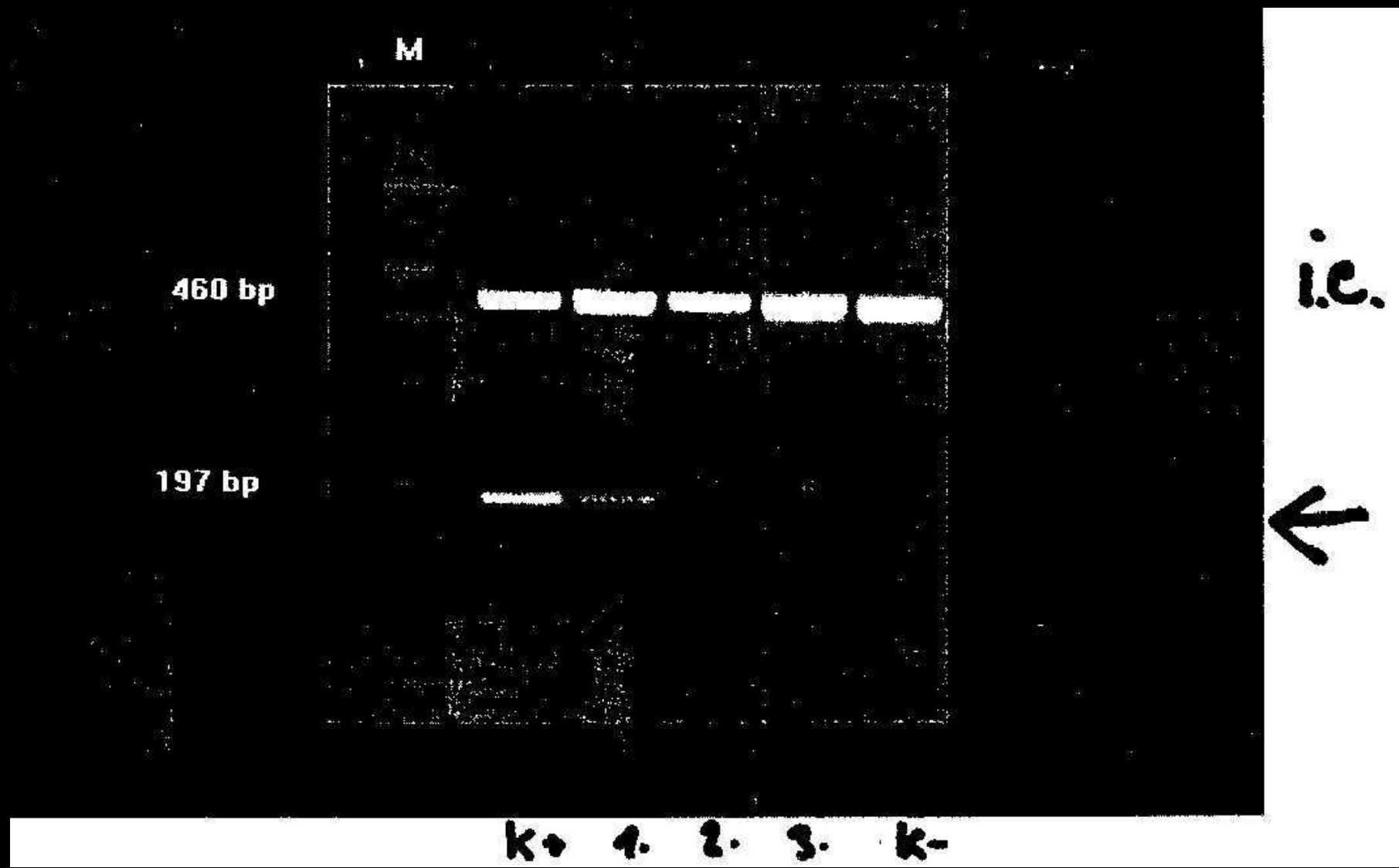
Vlastní reakce	Interní kontrola	Interpretace
negativní	pozitivní	negativní
negativní	negativní	inhibice reakce
pozitivní	pozitivní	pozitivní
pozitivní	negativní	(vysoce) pozitivní

## 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 žebříček (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

- Jinak ale technický postup odečítání reakce ELISA (blank, kontroly apod.) je stejný jako u ELISA reakce serologické
- Za **pozitivní** se považují hodnoty vyšší než referenčně daný tzv. „cut off“
- Konkrétní způsob výpočtu je uveden na listu s hodnotami absorbancí

# Hezký den!

[www.roche.com/pages/facets/1/chlamyde.htm](http://www.roche.com/pages/facets/1/chlamyde.htm)

