

Úloha č. 4

Izolace DNA z klíštěte, detekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí RealTime PCR, nested PCR

ÚVOD

Lymeská borelióza je u nás poměrně rozšířené onemocnění, jehož původcem bývá v našich podmínkách nejčastěji spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, případně další příbuzné druhy – *Borrelia afzelii* či *Borrelia garinii*. Tyto bakterie jsou přenášeny krevsajícími členovci, především klíšťaty, ale i např. komáry, ovády či bzučivkami. Hostiteli se pak stávají mnohá zvířata včetně člověka, u kterých může dojít k manifestaci onemocnění. Tato choroba se vyznačuje dosti variabilním průběhem a příznaky. Dle závažnosti příznaků se dělí do několika stádií, přičemž v konečné fázi může dojít až k trvalému poškození pohybového či nervového systému, v ojedinělých případech s fatálními důsledky. Není-li v rané fázi nemoci přítomen její jediný specifický projev – „migrující červená skvrna“ (chybí až u 30 % pacientů), může být chybně považována za běžné chřipkové onemocnění (celková slabost, bolest kloubů, zvýšená teplota). Z těchto důvodů a vzhledem ke stále narůstajícímu počtu nemocných je kladen stále větší důraz na správnou diagnostiku této choroby a její včasný záchyt.

V tomto ohledu nachází velké uplatnění moderní metoda molekulární biologie jakou je RealTime PCR, která významně napomáhá při průkazu tohoto onemocnění již v počátečních stádiích. Tato metoda vyniká svou vysokou specifitou a senzitivitou, což jsou z hlediska diagnostiky důležité faktory. Pomocí RealTime PCR lze detekovat doslova jednotlivé bakterie, hranice citlivosti se pohybuje okolo 5 borrelií ve vzorku. Navíc samotná PCR i detekce probíhají v rámci jednoho procesu a v reálném čase, což významně usnadňuje a urychluje celou analýzu. Další nespornou výhodou je oproti ostatním metodám možnost kvantifikace patogenu ve vzorku, což přispívá ke stanovení závažnosti infekce.

V metodě RealTime PCR jsou využívány dva primery a sonda se značkou, která po ozáření světlem o určité vlnové délce emituje záření o vlnové délce, která je specifická pro danou značku. Dokonce při vhodném nastavení metody RealTime PCR může být senzitivita vyšší než u metody nested PCR. Záleží zejména na vhodném návrhu a nastavení metodiky, dále pak na použití vhodných chemikálií a přesných termocyklerů pro RealTime PCR. Při metodice RealTime PCR lze sledovat nárůst namnožené DNA v každém dalším amplifikačním cyklu.

Kvalitativní vyhodnocení – v PCR směsi každého vzorku jsou přítomny specifické primery a sondy jednoznačně detekující DNA borrelií. Je-li dostupný vhodný templát, dochází během PCR reakce k cyklickému nasedání a uvolňování primerů a fluorescenčně značených sond. S narůstajícím počtem amplikonů roste také množství dostupných sond a tím také i intenzita fluorescence. V průběhu analýzy, resp. na jejím konci, můžeme sledovat průběh amplifikační křivky (závislost míry fluorescence na počtu proběhnutých cyklů). U pozitivních vzorků dochází v momentě dostatečného namnožení amplikonu k přechodu amplifikační křivky do exponenciální fáze (obvykle

25.–35. cyklus). U negativních vzorků nedochází k žádné amplifikaci, tj. křivka má rovný průběh na úrovni fluorescenčního pozadí.

Kvantitativní vyhodnocení - platí, že čím více DNA je na počátku amplifikace, tím dříve dochází k přechodu do exponenciální fáze. Díky této skutečnosti je možné přesně určit koncentraci vyšetřovaného vzorku (absolutní kvantifikace). Analýzou koncentrační řady tj. vzorků o známých koncentracích vstupní DNA, můžeme v programu přístroje vytvořit standardní křivku z tzv. „crossing points“, což jsou body označující cyklus (C_p), ve kterém dochází k přechodu do exponenciální fáze amplifikace. Po analýze vzorku o neznámé koncentraci je označen „crossing point“, hodnota automaticky dosazena do standardní křivky a odečtena přesná koncentrace vzorku.

U vzorků pozitivních na přítomnost borrelií bude provedena nested PCR reakce, při níž bude amplifikován specifický úsek DNA borrelií, který poslouží jako templát pro sekvenační reakci. Slabě pozitivní vzorky, u kterých nedojde k dostatečné amplifikaci, budou dále postoupeny 2. nested PCR, která zajistí optimální namnožení fragmentů.

I. Izolace DNA z klíštěte

Materiál: izolační kit, pipety, centrifuga, vodní lázeň, mikrozkušavky o objemu 2 ml, popisovače, klíště.

Obsah kitu:

Izolační kit UltraClean Blood Spin DNA (MoBio)

- roztok B1 – lyzační
- roztok B2 – precipitační
- roztok B3 – promývací
- roztok B4 – promývací
- roztok B5 – eluční
- mikrozkušavky o objemu 2 ml
- kolonky ve 2 ml mikrozkušavkách
- proteináza K

Upozornění

Při práci vždy používejte rukavice. Veškerý materiál v laboratoři nutno považovat jako potenciálně infekční. Vyhněte se kontaktu reagensů s kůží. V případě kontaktu potřísněné místo omyjte důkladně vodou. Vyvarujte se požití součástí kitu. Reagencie označené jako hořlavé musejí být drženy v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene nebo ohně.

Postup izolace DNA:

Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

1. Do připravené mikrozkušavky **napipetujte 200 µl roztoku B1, 10 µl proteinázy K a 20 µl IC DNA (kontrolní)**.
Klíště dejte do připravené mikrozkušavky, pomocí sterilní injekční jehly klíště rozcupujte o stěnu zkumavky, uzavřete zkumavku a jemně zvortexujte.
2. Mikrozkušavky vložte do vodní lázně vytemperované na 65°C a inkubujte 20 min. Zkumavku po inkubaci silně vortexujte a krátce stočte.
3. K lyzátu **přidejte 200 µl roztoku B2**. Zvortexujte a zcentrifugujte.
4. Přeneste veškerý obsah mikrozkušavky do kolonky.
5. Centrifugujte 1 min při 13 000 x g.
6. Přendejte kolonku do nové mikrozkušavky.
7. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B3**.
8. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
9. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.

10. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B4.**
11. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g .
12. Vyjměte kolonku z mikrozumavky, obsah mikrozumavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
13. Znovu centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g.
14. **Opatrně vyjměte kolonku a přeneste ji do nové mikrozumavky, aniž byste se dotkli roztoku B4 na dně původní mikrozumavky.**
15. **Roztok B5 inkubujte asi 5 minut na vodní lázni při 65°C. Do středu kolonky nepipetujte 50 µl roztoku B5 předeřátého na 65°C.**
16. Centrifugujte 1 min při 13 000 x g.
17. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozumavky. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

II. Detekce Borrelia burgdorferi sensu lato pomocí RealTime PCR

PRACOVNÍ POSTUP

Materiál: mastermix pro RealTime PCR (primery, fluorescenční sondy, interní kontrola, Taq polymeráza), vzorek izolované DNA z klíštěte, PCR destička, přístroj RealTime PCR – Light Cycler 480 II (Roche).

Příprava mixu:

Do příslušné jamky PCR destičky napipetujte 15 µl mastermixu + 5 µl vzorku DNA, přelete fólií, zcentrifugujte a vložte do RealTime systému Light Cycler 480 II, v přístroji bude nastaven PCR protokol pro detekci borrelií a poté spuštěna analýza.

Protokol amplifikace:

		95°C – 15 s
1x 95°C – 10 min	45x	55°C – 20 s - odečtový režim (acquisition mode on)
		72°C – 25 s

Výsledek analýzy RealTime PCR bude odečítán v kanálech 510 (vnitřní kontrola) a 660 (borrelie). Pro zhodnocení výsledků bude využit programový modul pro absolutní kvantifikaci. Pozitivní výsledek je charakterizován vzestupem fluorescenčního signálu v daném odečtovém kanálu, zatímco číselné hodnoty Cp udávají kvantitu pozitivního výsledku.

III. nested PCR – 1. krok

PRACOVNÍ POSTUP

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozukavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery, PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (25 µl/vzorek):

*KAPA mix.....	12,5 µl
B03 primer.....	0,5 µl
B04 primer.....	0,5 µl
PCR voda.....	6,5 µl
<hr/>	
*DNA.....	5,0 µl

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), stabilizátory.

*DNA – izolát z klíštěte

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozukavky vložte do termocykleru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

		95°C – 15 s (denaturace)
1x	95°C – 2,5 min	30x 56°C – 15 s (annealing)
		72°C – 20 s (extenze)
		10°C hold

Gelová elektroforéza:

Po PCR naneste 10 µl amplifikátu na připravený 1,5% agarózový gel. Vanu připojte ke zdroji elektrického napětí a nechte proběhnout elektroforézu cca 40 minut při konstantním napětí 80 V. Poté vyjměte gel z elektroforetické vany a vložte jej do transiluminátoru k vyhodnocení. U slabě pozitivních vzorků proveďte druhý krok nested PCR.

IV. nested PCR – 2. krok (slabě pozitivní vzorky)

Materiál: pipety, špičky, popisovače, mikrozukmavky (0,2 µl), termocykler, reagentie pro PCR – KAPA mix, primery, PCR voda, DNA.

Reakční směs pro PCR (25 µl/vzorek):

*KAPA mix.....	12,5 µl
B01 primer.....	0,5 µl
B02 primer.....	0,5 µl
PCR voda.....	10,5 µl
<hr/>	
*DNA.....	1,0 µl

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix – obsahuje HotStart DNA polymerázu, PCR pufr, dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), stabilizátory.

*DNA – jsou použity PCR produkty po 1. kroku nested PCR

Amplifikace fragmentů:

- Mikrozukmavky vložte do termocykléru. Amplifikace bude probíhat dle následujícího programu:

		95°C – 15 s (denaturace)
1x 95°C – 2,5 min	30x	60°C – 15 s (annealing)
		72°C – 20 s (extenze)
		10°C hold