

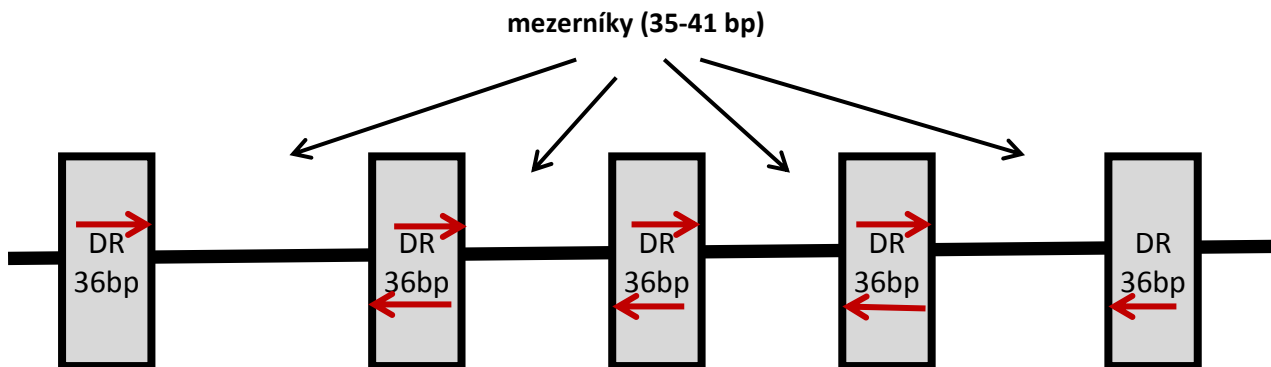
Spoligotypizace *Mycobacterium tuberculosis* komplex

(výukový materiál)

Tento materiál je určený k demonstraci detekčního systému na bázi tzv. „spoligotypizace, kterým je možno odlišit zástupce bakteriálního komplexu *Mycobacterium tuberculosis*.

Popis metody

Metoda označovaná jako spoligotypizace (angl. spoligotyping = spacer oligotyping) je založena na DNA polymorfismu v chromozomálním lokusu, který je charakteristický přítomností konzervativních přímých repeticí a označuje se jako DR (direct repeat) oblast. Přímé repetice mají délku 36bp a jsou přerušovány DNA mezerníky (spacers) o variabilní délce 35-41bp.



Při srovnávání DR oblastí několika kmenů, bylo pozorováno, že pořadí mezerníků je téměř stejné u všech kmenů, ale může dojít k jejich delecí nebo inzercí. Metodou spoligotypizace pak může být detekována přítomnost nebo nepřítomnost jednotlivých 43 mezerníků.

Pro účely spoligotypizace je na nylonovou membránu kovalentně navázáno všech 43 oligonukleotidů v paralelních řadách. Každý z takto imobilizovaných oligonukleotidů představuje jedinečnou sekvenci mezerníku, který je součástí DR oblasti u *M. tuberculosis*. Celkem 37 oligonukleotidů je odvozeno od sekvencí mezerníků přítomných v typizačním kmenu *M. tuberculosis* H37Rv a zbylých šest sekvencí oligonukleotidů je odvozeno od mezerníků vakcinačního kmene *M. bovis* BCG.

Oblast DR je amplifikována pomocí PCR. Použité primery jsou odvozeny od sekvence DR a umožňují amplifikaci mezerníku mezi dvěma cílovými DR. Reverz primer je značený biotinem, takže všechny výsledné syntetizované reverzní řetězce jsou pak rovněž značeny biotinem. Tepelně denaturované PCR produkty jsou hybridizovány k oligonukleotidům na membráně a výsledné produkty detekovány chemiluminiscencí. Přítomnost specifické cílové sekvence (mezerníku) se na výsledném autoradiografickém filmu projeví jako signál ve tvaru černého čtverce. Jednotlivé kmeny se pak vyznačují charakteristickým seskupením čtverců, které představují DNA sekvence mezerníku.

Ty pak mohou být vyhodnoceny pomocí softwaru, např. Gel Compare (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Protože se jedná o techniku založenou na PCR, jsou k analýze zapotřebí pouze malá množství DNA. Z tohoto důvodu je vhodná zvláště pro analýzu pomalu rostoucích druhů mykobakterií. Umožňuje také srovnání kmenů, které po uskladnění už nejsou schopny další kultivace. To může mít nenahraditelný význam např. v případě relapsů, kdy je třeba porovnat nové kmeny od pacienta, jehož dřívější izoláty jsou již nekultivovatelné.

Charakteristika profilů

Vzorové profily jsou uloženy v doprovodném souboru EXCEL

- 1) Typizační kmen *M. tuberculosis* H37Rv nemá mezerníky č. 19,20 a 33, 34, 35, 36
- 2) Pro kmeny *M. tuberculosis* je charakteristické, že nemají mezerníky č. 33, 34, 35 a 36
- 3) Pro kmeny *M. africanum* je charakteristické, že nemají mezerník č. 39
- 4) Pro kmeny *M. bovis* je charakteristické, že nemají mezerníky č. 39, 40, 41, 42 a 43
- 5) Pro kmeny *M. bovis* subsp. *caprae* je charakteristické, kromě chybějících mezerníků č. 39,40, 41, 42 a 43 (to je řadí mezi *M. bovis*) nemají většinu mezerníků v oblasti č. 1 až 16
- 6) Pozor na řadu atypických profilů u několika dalších poddruhů

Úkol

Na níže uvedených záznamech vyhodnoťte, o jaký druh mykobakterie se jedná

Záznam č. 1

Pozor, v tomto záznamu jsou pouze spoty č. 1 až 38! Spoty č. 39 až 43 jsou prázdné.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Záznam č. 2

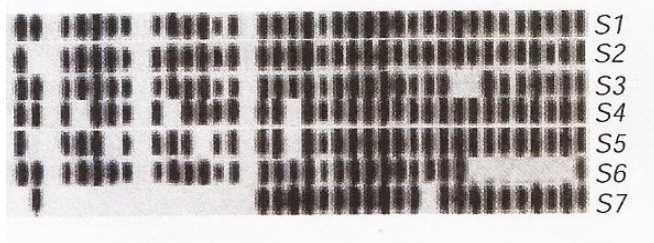
Spoligo	Spacer Number																																																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43							
Type																																																		
C1	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
C2																	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C3	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C4	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C5	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C6	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C7																	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C8	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C9	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C10	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C11	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Záznam č. 3

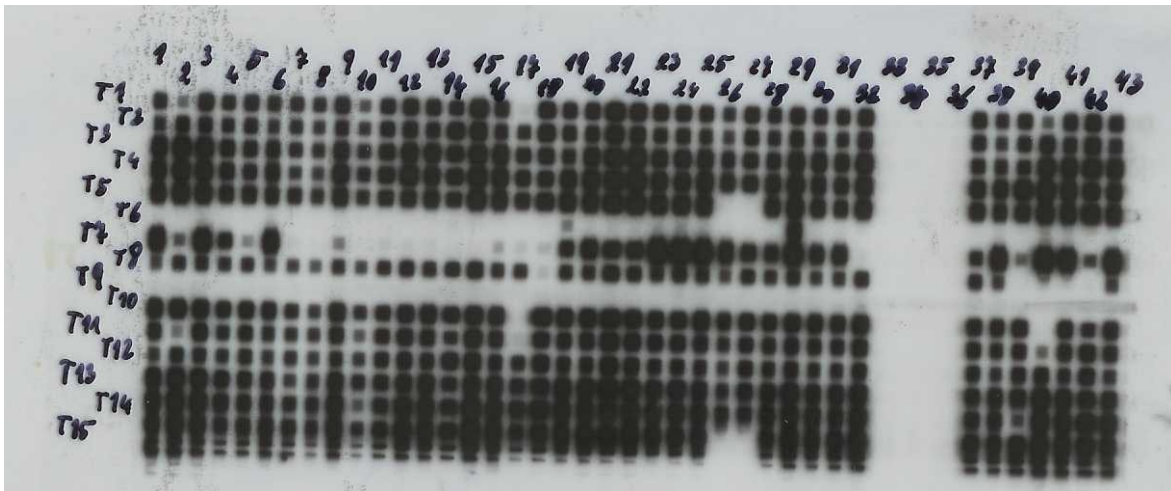
Spacer Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43										
22	■	■	■	■																																																	
104	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
105	■	■	■	■																																																	
108																																																					
109																																																					
118	■	■	■	■																																																	
119	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
5	■	■	■	■																																																	
135	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
136																																																					
138																																																					
139	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
140	■	■	■	■																																																	
141	■	■	■	■																																																	
142	■	■	■	■																																																	
143	■	■	■	■																																																	
145	■	■	■	■																																																	
146	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
155	■	■	■	■																																																	
156	■	■	■	■																																																	
157	■	■	■	■																																																	
188																																																					
189	■	■	■	■																																																	
190	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
191	■	■	■	■																																																	
192	■	■	■	■																																																	
193	■	■	■	■																																																	
194	■	■																																																			

Záznam č. 4

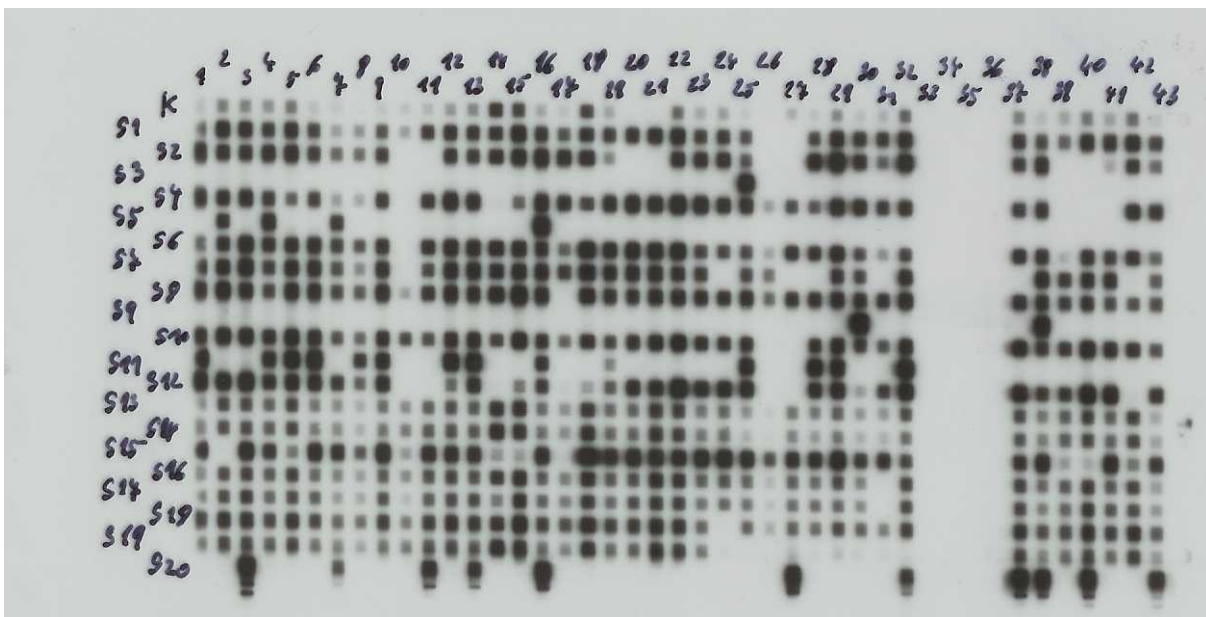
Pozor, v tomto záznamu jsou pouze spoty č. 1 až 38! Spoty č. 39 až 43 jsou prázdné.



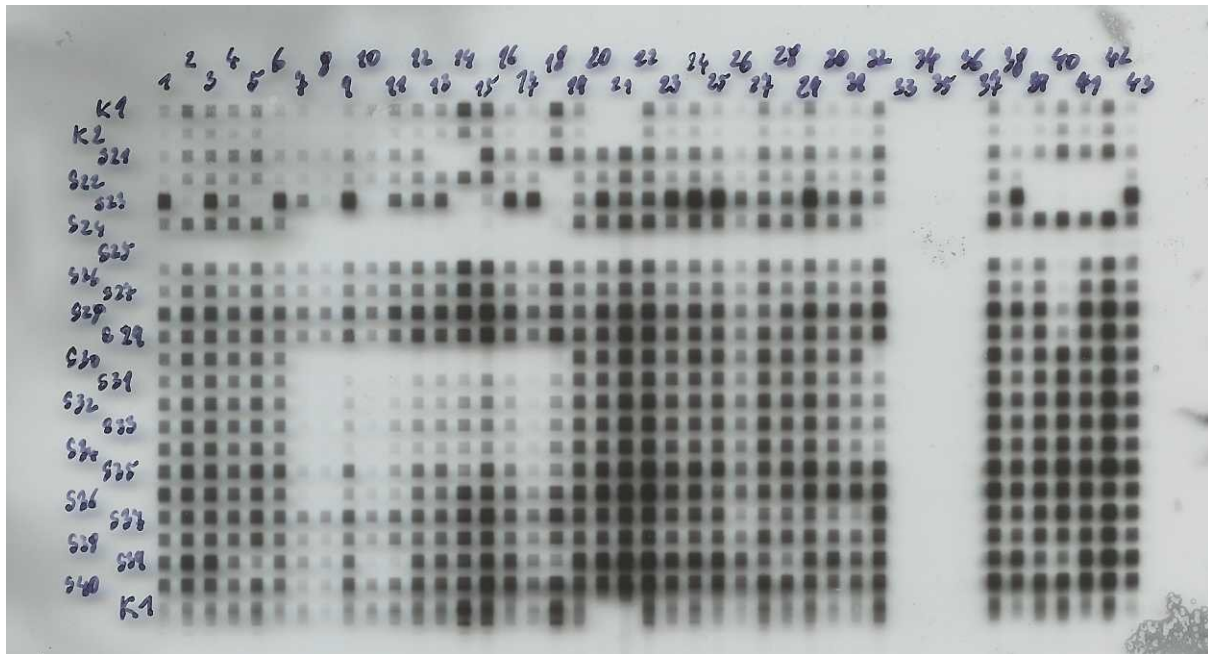
Záznam č. 5



Záznam č. 6



Záznam č. 7



Záznam č. 8

Tady jsou k dispozici jen schémata

Druh/mezerník č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43						
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv																																																	
1																																																	
2																																																	
3																																																	
4																																																	
5																																																	