

CVIČENÍ II.

IZOLACE DNA, DETEKCE GENŮ METODOU PCR, STANOVENÍ PŘÍBUZNOSTI IZOLÁTŮ METODOU ERIC PCR

Bakterie řadíme mezi prokaryotické organizmy, které nesou genetickou informaci v organele zvané nukleoid (bakteriální chromozóm). Nukleoid není ohraničen membránou, nachází se volně v cytoplazmě a je tvořen jedním kruhovým chromozómem složeným z dvouřetězcové DNA. Kromě genetické informace nesené na chromozómu se mohou v bakteriální buňce vyskytovat extrachromozomální, autonomně se replikující elementy plazmidy. Jedná se o malé kruhové dvouřetězcové molekuly DNA nesoucí genetickou informaci, která není podstatná pro existenci bakterie, ale může jí za určitých podmínek dodávat výhody (např. geny kódující rezistenci k antimikrobiálním látkám, těžkým kovům, geny pro produkci toxinů, genů virulence atd.).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založená na principu replikace nukleových kyselin, která umožňuje mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro*. Samotný amplifikovaný úsek DNA je ohraničen tzv. primery, což jsou chemicky syntetizované oligonukleotidy o délce 18 – 25 nukleotidů. Primery se komplementárně vážou ke koncům amplifikovaného úseku a od přisedlých primerů dochází k syntéze DNA. Metodu zavedl Kary Mullis v roce 1983 a byl za ni v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou. Při této metodě dochází k cyklickému střídání tří fází: 1) teplotní denaturace dvouřetězcové DNA, 2) annealing (nasedání) primerů na oddělené řetězce DNA a 3) syntéza nových řetězců DNA pomocí *Taq*-DNA-polymerázy (elongace primerů). K vlastní syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě (dovnitř vymezeného úseku). Samotná amplifikace úseku DNA vyžaduje přítomnost reakčních komponent, které zahrnují: 1) templátovou nukleovou kyselinu (DNA), 2) stavební kameny DNA – nukleotidy (dNTP), 3) termostabilní *Taq*-DNA-polymerázu, která spojuje jednotlivé nukleotidy na principu komplementarity podle sekvence nukleotidů v templátové vlákne do nového souvislého řetězce, 4) primery, 5) reakční pufr s obsahem Mg^{2+} iontů, 6) vodu a případně další látky. K vlastní syntéze PCR produktu dochází v přístroji, termocycleru, který umožňuje rychlou cyklickou změnu teploty v naprogramovaných časových intervalech.

16S ribozomální RNA (16S rRNA) je 1500 bp dlouhá sekvence prokaryotické podjednotky 30S ribozomu. Gen kódující tento úsek je přítomen u všech bakterií, v průběhu evoluce dochází ke změnám sekvence genu, čehož se využívá při identifikaci bakterií (každý bakteriální druh má svou charakteristickou sekvenci 16S rRNA). Zároveň tento gen obsahuje oblasti, které se mění velmi pomalu a gen slouží ke stanovení evoluční příbuznosti vyšších taxonomických jednotek bakterií.

Pro určení klonální příbuznosti mezi izoláty stejného druhu využíváme genotypizační metody. Ty jsou založené buď na vzniku DNA paternů (pomocí restričních enzymů endonukleáz nebo amplifikací úseků genomu, nebo kombinací obou přístupů), na sekvenci DNA nebo na DNA hybridizaci.

Metoda ERIC-PCR se řadí mezi amplifikační metody, při které jsou zmnoženy úseky DNA tzv. enterobakteriální repetitivní intergenové konsensy (ERIC, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Tyto sekvence jsou dlouhé 124 - 127 párů bází a u enterobakterií se vyskytují v mnoha kopiích. Na základě odlišností v genomu izolátů, vzniká tzv. fingerprint (profil fragmentů různých délek), který je rozdílný u nepříbuzných izolátů.

Reference:

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005): Základy buněčné biologie. Espero Publishing. 645 s.

- Janda J. M., Abbott S. L.** 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9): 2761–2764.
- Lipps G.** (2008): Plasmids: current research and future trends. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 263 s.
- Rosypal S.** (2006): Úvod do molekulární biologie. Díl první. Vstup do molekulární biologie - Molekulární biologie prokaryotické buňky. Brno. 289 s.
- Snustad D. P., Simmons M. J.** (2009): Genetika. MUNI Press, Brno. 894 s.
- Šmarda J., Doškař J., Koptíková J., Pantůček R., Růžičková V.** (2005): Metody molekulární biologie. MUNI Press, Brno. 188 s.
- Yıldırım I. H., Yıldırım S. C., Koçak N., J.** Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *Microbiol Infect Dis.* 2011;1(1):42-46.

ÚLOHA 1: Izolace bakteriální DNA (metoda teplotní lýze)

Postup:

- 1) Pro každý testovaný izolát popíšeme dvě eppendorf zkumavky o objemu 1,5 ml.
- 2) Do jedné popsané zkumavky napipetujeme 250 µl sterilní destilované vody, druhou zkumavku necháme prázdnou.
- 3) Kličkou nabereme 3 - 4 kolonie bakteriální kultury z Petriho misky, resuspendujeme ji v 250 µl sterilní destilované vody a zvortexujeme.
- 4) Eppendorf zkumavku zavřeme zámečkem a vložíme do termobloku vyhřátého na 100 °C na 10 minut.
- 5) Po zchladnutí zámeček sejmeme a eppendorfy odstředíme 13 000 rpm po dobu 2 minut (zkumavky v centrifuze musí být vyváženy).
- 6) Opatrně odpipetujeme 200 µl supernatantu, který obsahuje DNA, do nachystané prázdné eppendorf zkumavky. Pracujeme tak, abychom nerozvířili pelet, jinak je potřeba opakovat centrifugaci. Izolovanou DNA skladujeme při -20 °C.

ÚLOHA 2: Detekce genů metodou PCR a stanovení příbuznosti izolátů metodou ERIC PCR

Postup:

- 1) Necháme rozmrznout všechny komponenty potřebné na PCR (MasterMix, PCR voda, primery, testovaná DNA), po rozmrznutí komponenty krátce zvortexujeme a stočíme v centrifuze (zkumavky musí být vyváženy).
- 2) Připravíme PCR směs podle rozpisu uvedeného v Tabulce 1. Nejdříve namícháme reakční směs (MasterMix, PCR voda a primery) pro všechny vzorky dohromady. Množství jednotlivých komponent se vypočítá pro aktuální počet vzorků a připočteme množství pro čtyři vzorky navíc (pro pozitivní kontrolu, negativní kontrolu a objemovou rezervu). Reakční směs zvortexujeme a krátce odstředíme v centrifuze (zkumavky musí být vyváženy).
- 3) Popíšeme si PCR zkumavky a následně do nich rozpipetujeme PCR směs (možno jednou špičkou) po 12 µl. Následně do jednotlivých zkumavek s reakční směsí přidáme testovanou DNA - nejdříve vzorky, potom pozitivní kontrolu. Do negativní kontroly se DNA nepřidává.
- 4) Zkumavky přemístíme do termocycleru a pustíme příslušný PCR program.

Tabulka 1: Rozpis PCR směsi na jeden vzorek.

komponenta	objem [μ l]
MasterMix	6,25
PCR H ₂ O	4,75
Primer Fw (10 μ M)	0,5
Primer Rv (10 μ M)	0,5
DNA	1

- **PCR detekce *Escherichia coli* – průkaz genu *uidA***

K ověření identifikace izolátu do druhu *E. coli* slouží simplexní PCR na průkaz genu *uidA*.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Amplikon [bp]	kontrola
<i>uidA</i>	uidA fw [1077]	GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG	508	ST131
	uidA rv [1078]	GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT		

Program pro gen *uidA*:

1. 94 °C 10 min
2. 94 °C 30 s
3. 64,5 °C 30 s
4. 68 °C 3 min
5. krok 2 – 4 opakovat 28 \times
6. 72 °C 10 min
7. 10 °C/ ∞

Pozn.: Pro vizualizaci PCR produktů metodou gelové elektroforézy použijeme 1,5 % agarózový gel a elektroforézu pustíme na 120 V po dobu 25 minut (viz elektroforéza PCR produktů).

- **Detekce genu pro širokospektrou beta-laktamázu CTX-M**

Reakce slouží k průkazu genu pro nejrozšířenější skupinu širokospektrých beta-laktamáz, a to CTX-M. Tuto reakci připravíme do dvakrát většího objemu (25 μ l), z důvodu následného sekvenování PCR produktu.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Amplikon [bp]	kontrola
<i>bla_{CTX-M}</i>	PANCTX-M.F [31]	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	554	CTX-M-1
	PANCTX-M.R [32]	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		

Program pro gen *bla_{CTX-M}*:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 45 s
3. 55 °C 45 s
4. 72 °C 1 min
5. krok 2 – 4 opakovat 30 \times
6. 72 °C 10 min
7. 10 °C/ ∞

Pozn.: Pro vizualizaci PCR produktů metodou gelové elektroforézy použijeme 1,5 % agarózový gel a elektroforézu pustíme na 120 V po dobu 25 minut (viz elektroforéza PCR produktů).

- **Detekce genu pro 16S rRNA (druhá identifikace pomocí sekvenace)**

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Amplikon (bp)	kontrola
16S rRNA	EU 16S rRNA/R [408]	AGAGTTTGATCITGGCTCAG	1500	Jakákoliv DNA
	EU 16S rRNA/F [409]	ACGGITACCTTGTTACGACTT		

Program pro gen 16S rRNA:

1. 94 °C 3 min
2. 94 °C 50 s
3. 50 °C 50 s
4. 72 °C 2 min
5. krok 2 – 4 opakovat 30×
6. 72 °C 10 min
7. 10 °C/∞

Pozn.: Pro vizualizaci PCR produktů metodou gelové elektroforézy použijeme 1,5 % agarózový gel a elektroforézu pustíme na 120 V po dobu 25 minut (viz elektroforéza PCR produktů).

- **Stanovení příbuznosti izolátů metodou ERIC PCR**

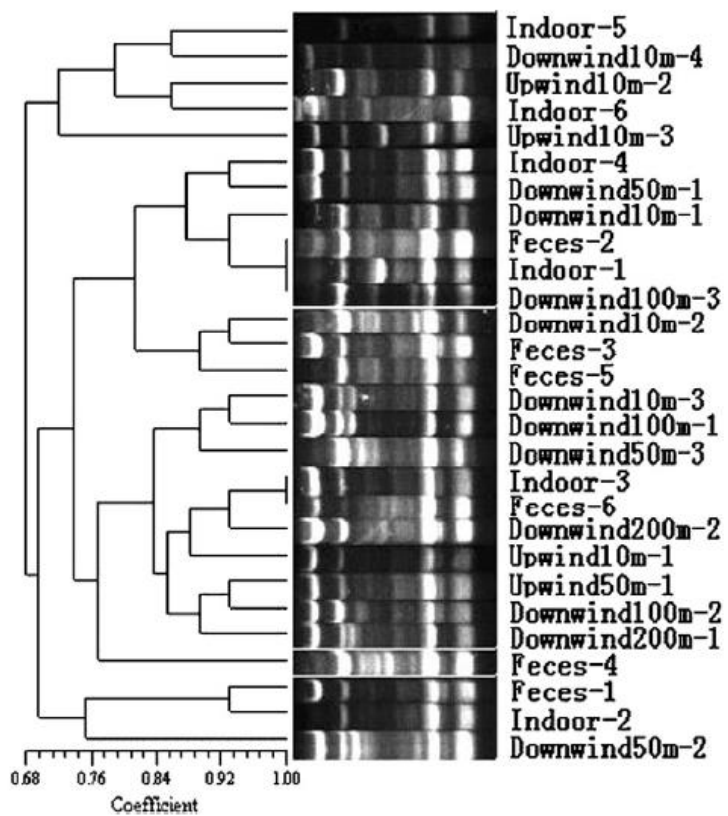
Název primeru	Sekvence
ERIC 1R [424]	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
ERIC 2F [425]	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

Program pro ERIC PCR (program trvá cca 7 hodin):

1. 95 °C 5 min
2. 94 °C 1 min
3. 42 °C 1 min
4. 65 °C 8 min
5. krok 2 – 4 opakovat 35×
6. 65 °C 16 min
7. 10 °C/∞

Pozn.: Pro vizualizaci PCR produktů metodou gelové elektroforézy použijeme 1,5 % agarózový gel a elektroforézu pustíme na 120 V po dobu 1-1,5 hodiny (viz elektroforéza PCR produktů).

Příklad vyhodnoceného výsledku ERIC PCR srovnávající izoláty *Escherichia coli* izolované z různých typů vzorků ve stejné budově sloužící k chovu prasat.



Reference: YUAN, W., T.J. CHAI a Z.M. MIAO. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Science of The Total Environment*. 2010, 408(6), 1446-1450.