

7. Sběr krevsajících členovců v terénu a izolace DNA

Úvod

Lymeská borelióza je u nás poměrně rozšířené onemocnění, jehož původcem, v našich podmínkách, bývá 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 Real Time PCR, která významně napomáhá při průkazu tohoto onemocnění již v počátečních stádiích. Tato metoda vyniká svou vysokou specifičností a senzitivitou, což jsou z hlediska diagnostiky důležité faktory. Pomocí Real Time PCR lze detekovat doslova jednotlivé bakterie, hranice citlivosti se pohybuje okolo 5 borélií ve vzorku. Navíc samotná PCR i detekce probíhají v rámci jednoho procesu a v reálném čase, to významně usnadňuje a urychluje celou analýzu. Další nespornou výhodou, oproti ostatním metodám, je možnost kvantifikace patogenu ve vzorku, a tím přispět ke stanovení závažnosti infekce.

V rámci cvičení bude navíc u pozitivních vzorků analýza doplněna o detailní určení genomové sekvence patogenu, což umožní jeho přesné druhové zařazení. Bude tak možné porovnat výskyt jednotlivých druhů v daném regionu.

Sběr klíšťat

Na vhodné lokalitě přilehlého příměstského parku Pisárky provádějí studenti sběr klíšťat samostatně. Klíšťata budou sbírána tzv. vlajkováním, kdy se pomocí flanelové vlajky (flanelová látka se středně dlouhým vlasem o velikosti 0,5 x 1m upevněná na dřevěné tyči) bude smýkat po vhodném porostu (nízká vegetace). Klíšťata přichycená na vlajce budou pinzetou přenesena do zkumavky s několika stébly trávy pro udržení dostatečné vlhkosti. Zkumavky s klíšťaty budou poté uchovávány při pokojové teplotě mimo dosah slunce.

Při sběru je nutné mít vhodnou (uzavřenou) obuv a dlouhé kalhoty, aby se zabránilo případnému styku klíštěte s kůží.

Izolace DNA z klíštěte

Materiál:

klíště

Izolační kit UltraClean Blood Spin DNA (MoBio)

- proteináza K
- roztok B1 – lyzační
- roztok B2 – ethanol
- roztok B3 – promývací
- roztok B4 – promývací
- roztok B5 – eluční
- kolonky ve 2 ml mikrozskumavkách
- mikrozskumavky o objemu 2 ml

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 mikrozskumavky **napipetujte 200 µl roztoku B1, 15 µl proteinázy K a 20 µl IC DNA (kontrolní).**

Klíště dejte do připravené mikrozskumavky, pomocí sterilní injekční jehly klíště rozcupujte o stěnu zkumavky, uzavřete zkumavku a jemně zvortexujte.

2. Mikrozkušavky vložíme do termotřepačky (Biosan) vytemperované na 65°C. Nastavte třepání na 700 rpm a inkubujte 15 min. Zkušavku 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 mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky 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 mikrozkušavky, aniž byste se dotkli roztoku B4 na dně původní mikrozkušavky**.
15. **Roztok B5 inkubujte asi 5 minut na vodní lázni (termotřepačce) 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 mikrozkušavky. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.