8. Real Time PCR detekce a kvantifikace borélií v krevsajících členovcích

Úvod

Zásadní průlom PCR diagnostických metod nastal se zavedením metody tzv. RealTime PCR, která umožňuje sledovat přibývání DNA během amplifikace v "reálném čase". 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. Mohlo by se zdát, že vzhledem k využití pouze dvou primerů při metodice RealTime PCR, stejně jako u klasické PCR, může dojít ke snížení senzitivity metody, ale opak je pravdou. Při vhodném nastavení metody RealTime PCR může být senzitivita dokonce vyšší než u metody nested PCR. Záleží zejména na vhodném návrhu a nastavení metodiky, dále pak na použití vhodných chemikálií a přesných termocyklérů 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 borélií. 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 (Cp), 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. Tento model absolutní kvantifikace bude pouze teoreticky demonstrován.

Materiál:

vzorek izolované DNA z klíštěte

- primery a sondy
- Taq DNA polymeráza
- Interní kontrola
- Pozitivní kontrola

Příprava mixu:

Připravte mastermix smícháním primerů a sond s Taq DNA polymerázou. Do skleněné kapiláry napipetujte 15 µl mastermixu + 5 µl vzorku DNA, uzavřete víčkem, stočte a vložte do Real Time systému Light Cycler 2.0, v přístroji nastaven PCR protokol a poté spusťte analýzu.

Protokol amplifikace:

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

Výsledek analýzy real-time PCR odečítejte v kanálech 530 (vnitřní kontrola) a 705 (borrelie). Pro zhodnocení vašich výsledků využijte programový modul pro absolutní kvantifikaci. Pozitivní výsledek je charakterizován vzestupem fluorescenčního signálu v daném odečtovém kanálu, zatímco číselné hodnoty Cp udávají kvantitu pozitivního výsledku. Hodnota „Score“ musí být vyšší než 4.5.