

Molekuláris biológiai vizsgálatok

Készítette:

Dr. Polgár Beáta

Dr. Schneider György

2015

Tartalomjegyzék

Általános bevezető

1. Hibridizációs módszerek

Szilárd fázisú hibridizáció

- 1.1. Southern blot
- 1.2. Northern blot
- 1.3. Telephibridizáció
- 1.4. Fluoreszcens In Situ Hibridizáció (FISH)
- 1.5. Miroarray (DNA chip)
- 1.6. Line probe assay (LiPA)

2. Amplifikációs módszerek

- 2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)
- 2.2. Kvantitatív Real Time PCR (qRT-PCR)
- 2.3. Arbitrary Primed PCR (AP-PCR)

3. Epidemiológiai tesztek

- 3.1.1. Restrikciós Fragment Lánc Polimorfizmus (RFLP)
- 3.1.2. Pulzálatott Mezejű Gélelektroforézis (PFGE)
- 3.1.3. Ribotipizálás
- 3.2. Plazmid profil vizsgálat
- 3.3. PCR alapú módszerek
 - 3.3.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
 - 3.3.2. Antibiotikumrezisztencia gének detektálása
 - 3.3.3. Virulencia gének detektálása
- 3.4. Szekvenciaszintű analízisek
 - 3.4.1. Multilókusz Szekvencia Tipizálás (MLST)
 - 3.4.2. Antibiotikumrezisztencia gének analízise

Mikroorganizmusok identifikálása

- Célja:**
- a vélt patogén kóroktani jelentőségének tisztázása
 - megfelelő terápia kiválasztása
 - környezetre való veszélyesség megállapítása
 - kezelőorvos tájékoztatása a fentiekről

Identifikációs módszerek

Fenotipizálás

- Festés
- Tenyésztés
- Biokémia
- Szerológia

Genotipizálás

- Molekuláris mikrobiológia

Alapelv: Egyedi, *species specificus* nukleotid szekvenciák azonosítása

Jellemzők:

1. Nagy érzékenység (szenzitivitás)
2. Nagy specificitás
3. Reprodukálható
4. Nem függ a celluláris funkcióktól / protein expressziótól
5. Gyorsabb, pontosabb identifikálás
6. Automatizálható
7. Kevesebb kontamináció
8. Relatív drága

Alkalmazásuk különösen akkor indokolt, ha a tradicionális identifikációs módszerek eredményessége nem megfelelő

A mikrobák genomjának vizsgálata

1. A vizsgálatokhoz általában részlegesen vagy teljesen tisztított nukleinsav vagy szintetikus poli-/oligonukleotid szükséges
2. A nukleinsavak forrása lehet:

Nukleinsav típusa	Forrása
Totál DNS/RNS	vizsgálandó minta vagy teljes mikroba
Plazmid DNS	baktérium és gomba
mRNS	teljes sejt
rRNS	teljes sejt vagy mikroszóma frakció
bakteriofág DNS	baktérium vagy sejt-lizátum
virális DNS és RNS	izolált vírus és vírus-szerű részecskék

3. A nagy méretű DNS-t (pl. kromoszóma) a különböző mechanikai hatásokkal szemben védeni kell (pl. sejtek lízise agaróz gélben)
4. Tisztított DNS/RNS védelem az endonuleázokkal szemben

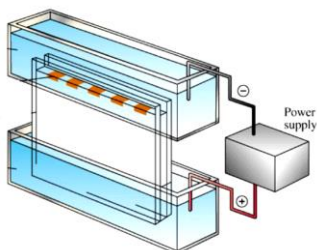
Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel

Target: - ismeretlen mikroba *celluláris DNS/RNS* molekulája

Alkalmazás: - patogének azonosítása

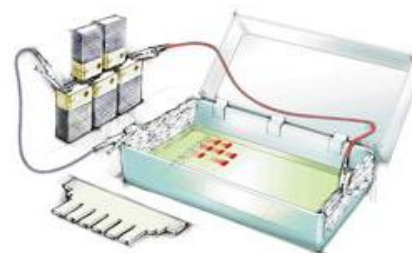
Alapelv: - nukleinsavak méret szerinti elválasztása *50kbp*-ig

Horizontális



1. Gél: poliakrilamid
2. Előny: jobb felbontóképesség
3. Hátrány:
 - lassabb
 - drágább
 - technikailag nehezebb
 - akrilamid mérgező

Vertikális



1. Gél: agaróz
2. Előny:
 - gyors
 - olcsó
 - egyszerű
3. Hátrány: rosszabb felbontóképesség

Molekuláris mikrobiológiai technikák:

1. Hibridizációs módszerek

2. Amplifikációs módszerek

3. Epidemiológiai tesztek

1. Hibridizációs módszerek

Alkalmazás: Mikroba-specifikus **DNS** vagy **RNS** kimutatása

Formái:

- A. Szilárd fázisú hibridizáció**
- B. Folyékony fázisú hibridizáció**

Alapelv: rövid, ismert szekvenciájú „próbát” hibridizálunk a vizsgálandó (denaturált) DNS-hez vagy RNS-hez. A próba kötődése jelzi a keresett nukleinsav szakasz (célgén) jelenlétét.

Próba: a kimutatandó szekvenciával komplementer, 15-20 bázis hosszúságú, egyszálú, jelölt oligo- vagy polinukleotid szekvencia, amely nagy valószínűséggel csak a vizsgált mikroba célgénjével hibridizál.

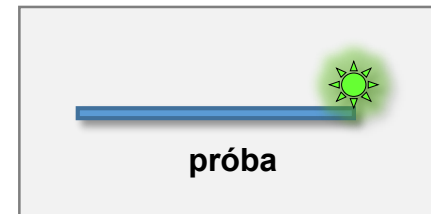
Próbák jelölési módjai:

1. Radioaktív próbák:

- ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S izotóp

2. Nem radioaktív (hideg) próbák:

- biotin-avidin
- digoxigenin
- fluoreszcens molekula
- kemilumineszcens
- indirekt immunológiai jelölés
- peptid-nukleinsav próba (PNS): jobb áthatolóképesség



Előnyük: kisebb környezetterhelés, nincs szükség költséges laboratóriumra és speciálisan képzett szakemberekre.

Szilárd fázisú hibridizáció fajtái:

1.1. Southern blot

1.2. Northern blot

1.3. Telephibridizáció

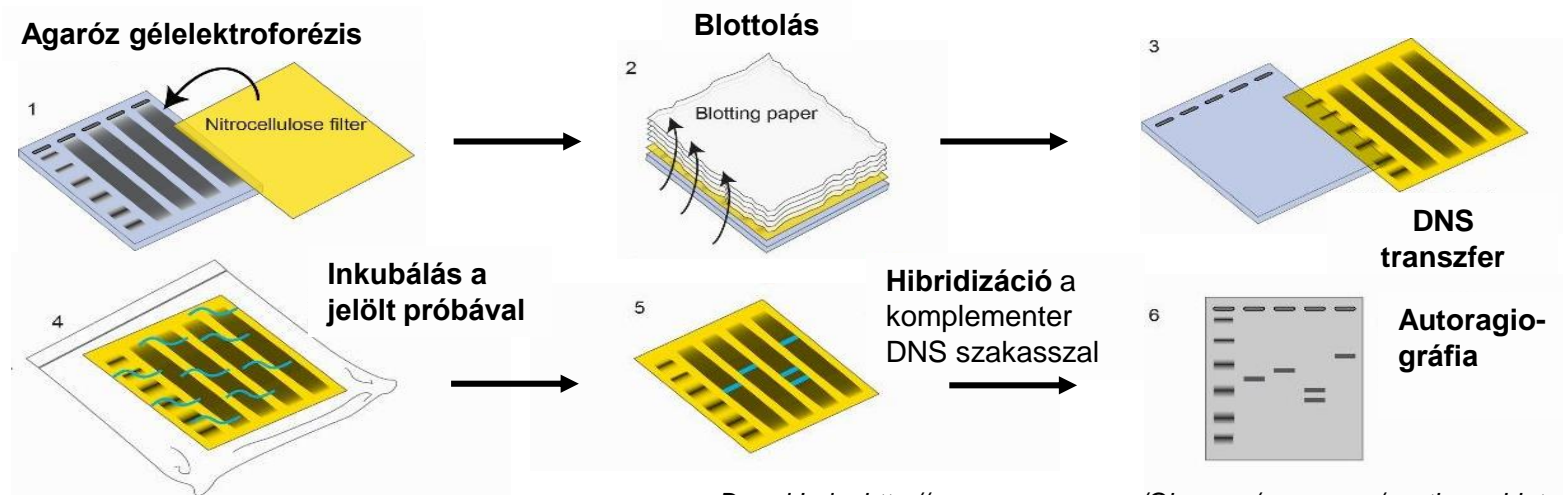
1.4. FISH

1.5. CHIP

1.6. LiPA

1.1. Southern blot

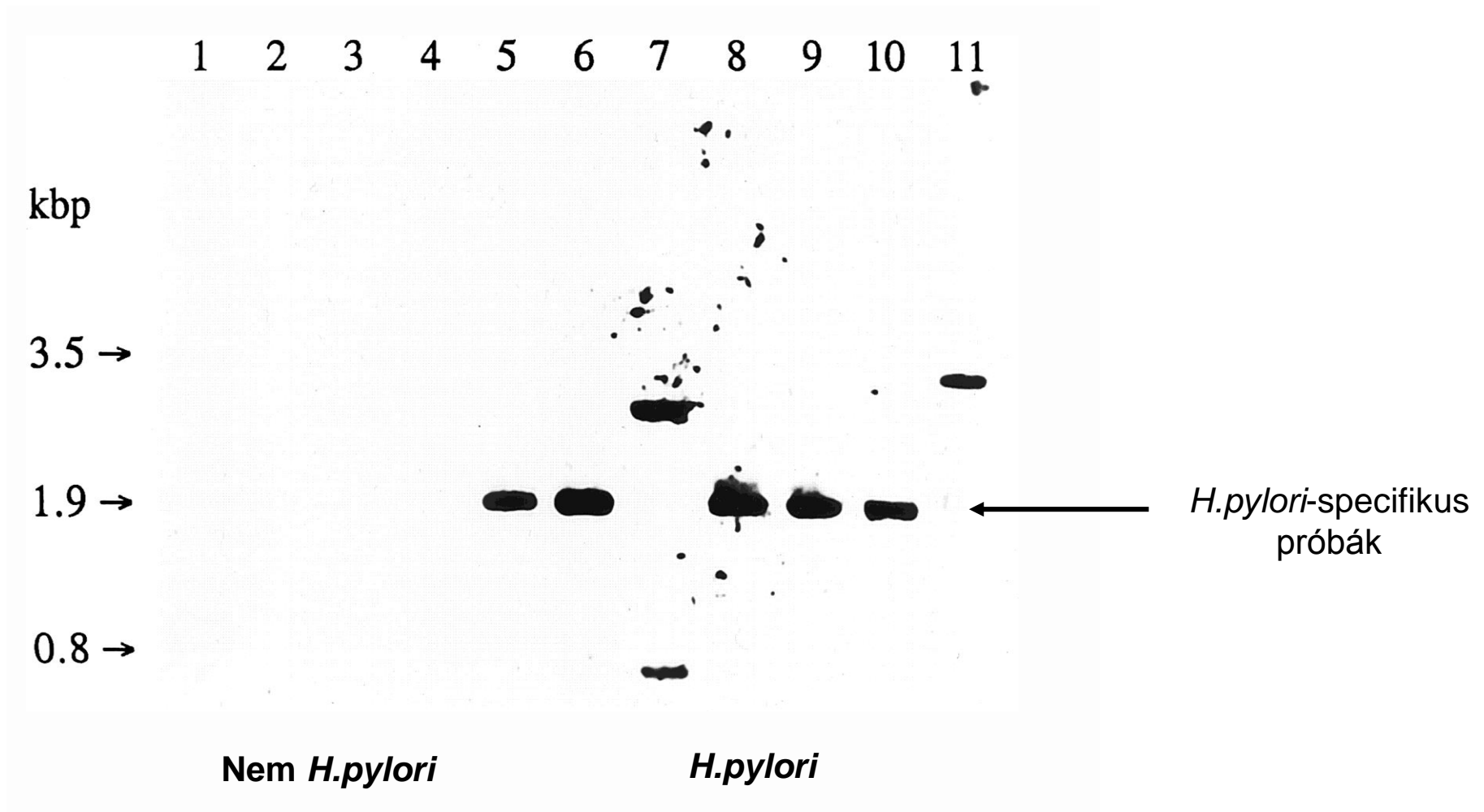
- Target:** - ismeretlen mikroba **celluláris DNS** molekulája
- Alkalmazás:** - patogének azonosítása
- Hátrány:** - drága és kisebb a szenzitivitása, mint a PCR-nak



Darryl Leja, http://www.genome.gov/Glossary/resources/southern_blot.pdf

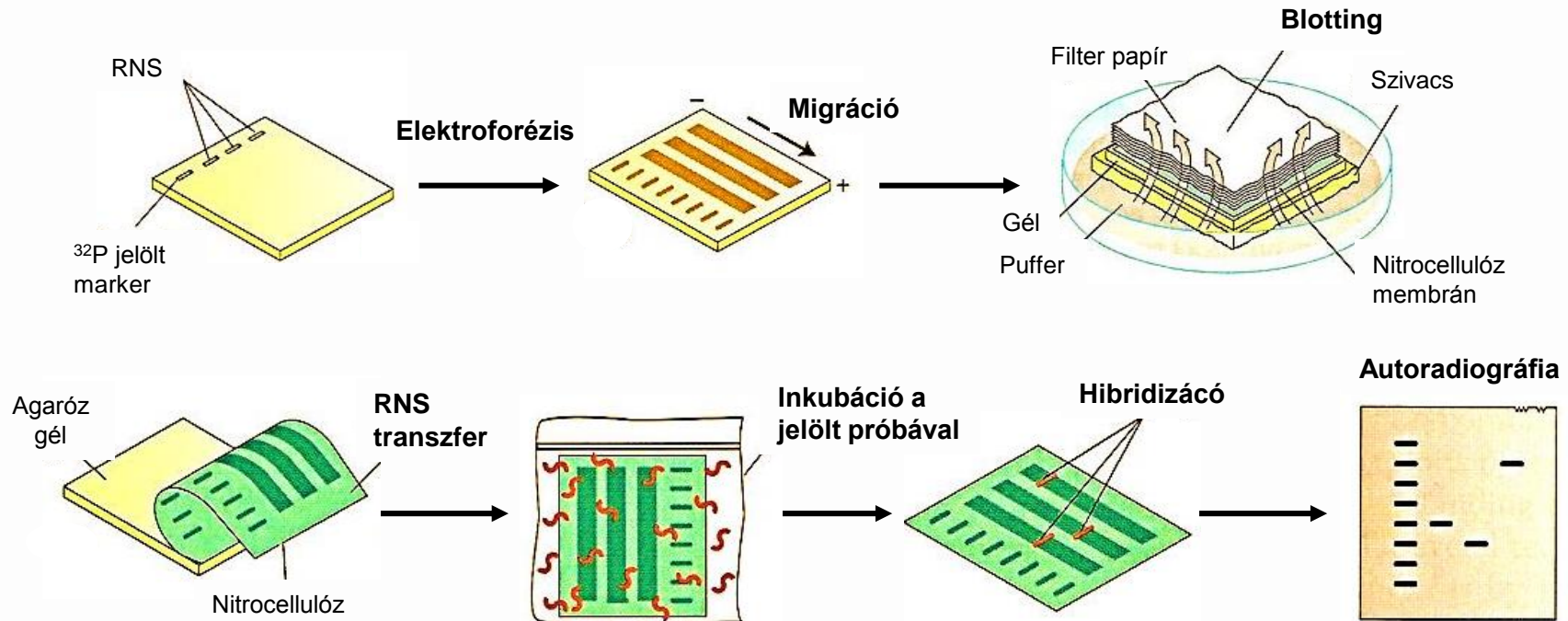
- (1) A DNS-t **restrikciós endonukleázzal** hasítják, majd **agaróz gélen** elválasztják.
(2) A lúggal denaturált DNS-t átviszik nitrocellulóz vagy nylon membránra (**transzfer**),
(3) melyhez hőkezeléssel rögzítik. (4) Hozzáadják a jelölt próbát, majd a **hibridizációt**
követően (5) kimutatják a pozitív (keresett gént tartalmazó) DNS sávot (6).

H. pylori specifikus Southern blot különböző baktérium törzsekből izolált DNS felhasználásával (autoradiográfia)



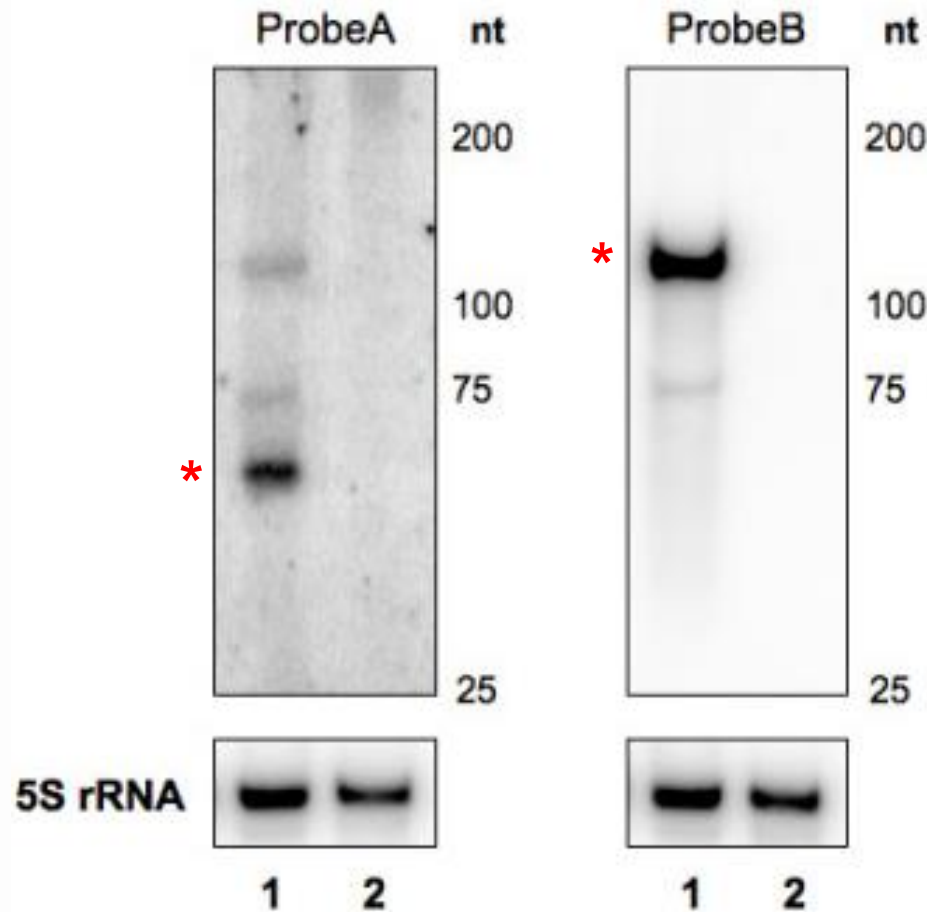
1.2. Northern blot

Target: - ismeretlen mikroba **RNS (mRNS)** molekulája
Alkalmazás: - génextpressziós vizsgálatok



Wikimedia Commons, <http://commons.wikimedia.org/wiki/>

Northern blot különböző *Francisella tularensis* törzsekből izolált RNS felhasználásával (autoradiográfia)



1. Vad törzsek: van hibridizáció *
2. Mutáns törzsek: nincs hibridizáció

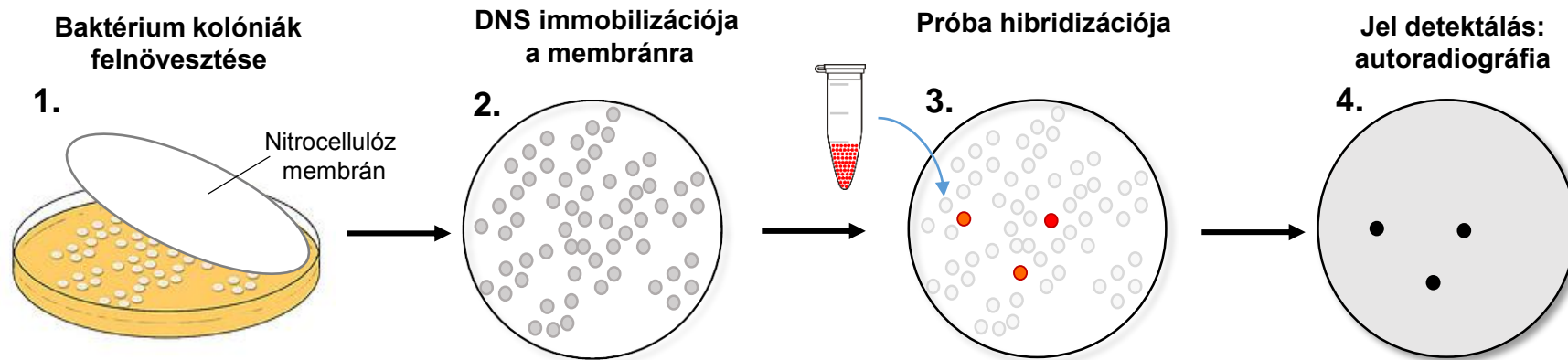
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/625/figure/F2>

1.3. Telephibridizáció

Alapelv: - A mikroorganizmusok **közvetlen** azonosítása **hibridizációval**

Előny: - nem igényel előzetes DNS tisztítást

Hátrány: - nem elég érzékeny, sokszor a baktérium elődúsítása szükséges



(1) A vizsgálandó mintából **szilárd táptalajon** kifejlődött **baktérium telepeket** nitrocellulóz vagy nylon-membránra visszük át. (2) Lúggal (> pH12) és hőkezeléssel feltárjuk a baktériumot, majd a kiszabadult **DNS-t membránhoz rögzítjük**. (3) A DNS-t denaturáljuk, majd hozzáadjuk a megfelelően jelölt **próbát**. (4) A **hibridizációt** követően a kapott jelet detektáljuk.

1.4. Fluoreszcens In Situ Hibridizáció (FISH)

Target:

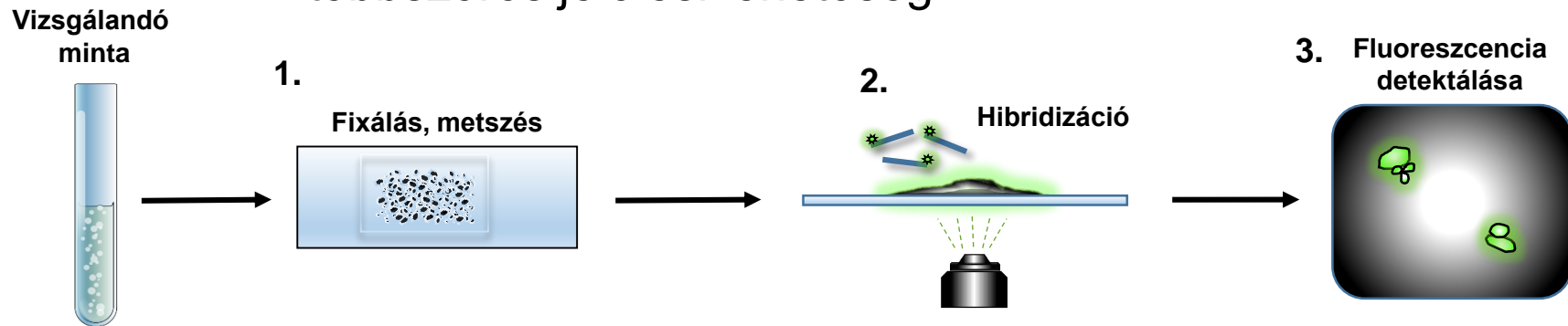
- patogén **DNS/RNS**

Alkalmazás:

- mikróbák *in situ* identifikálása **fluoreszcensen** jelölt próbákkal

Előnye:

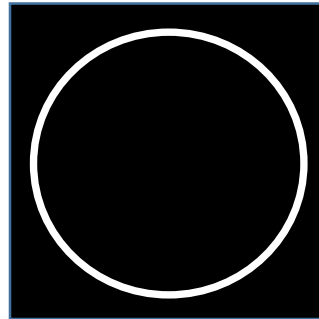
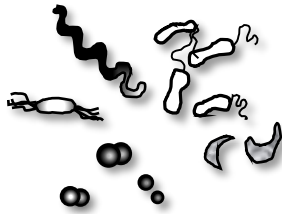
- nem igényel sejtfeltárást vagy előzetes nukleinsav tisztítást
- a nukleinsav lokalizációjának *in situ* vizsgálata
- a blott alapú technikáknál jobb szenzitivitás és specificitás
- többszörös jelölési lehetőség



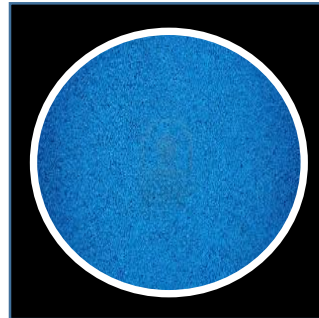
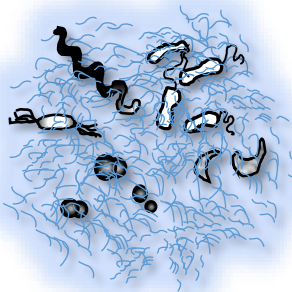
A módszer lényege hogy a (1) fluoreszcensen jelölt, fajspecifikus oligonukleotid próbát **tárgylemezre fixált** baktériumokkal reagáltatjuk. (2) **Hibridizációs** termosztátba helyezve a próba csak az adott faj nukleinsavához fog specifikusan kötődni, így a felesleges próba lemosása után a sejtek (3) adott színű **fluoreszcenciát** mutatnak.

Mikroszkóp

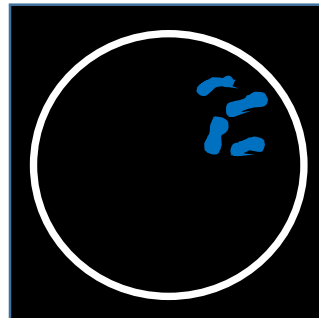
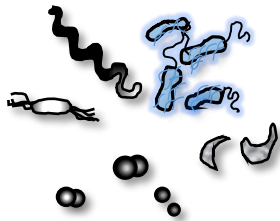
Fixálás, permeabilizálás



Jelölt próba hozzáadása

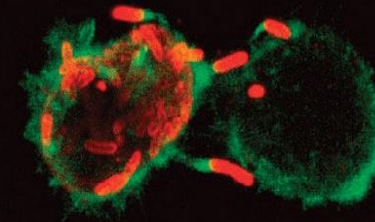


Mosás, detektálás



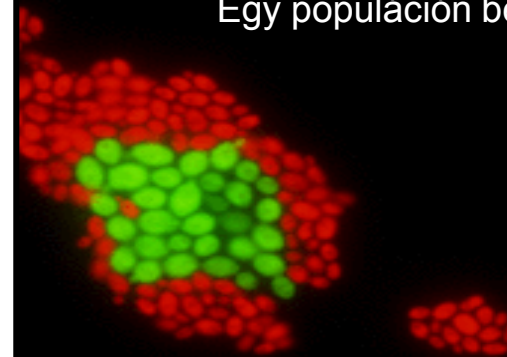
Fluoreszcens szignál

Egy sejtben belül



http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/fig_tab/nrmicro1092_F2.htm

Egy populáción belül



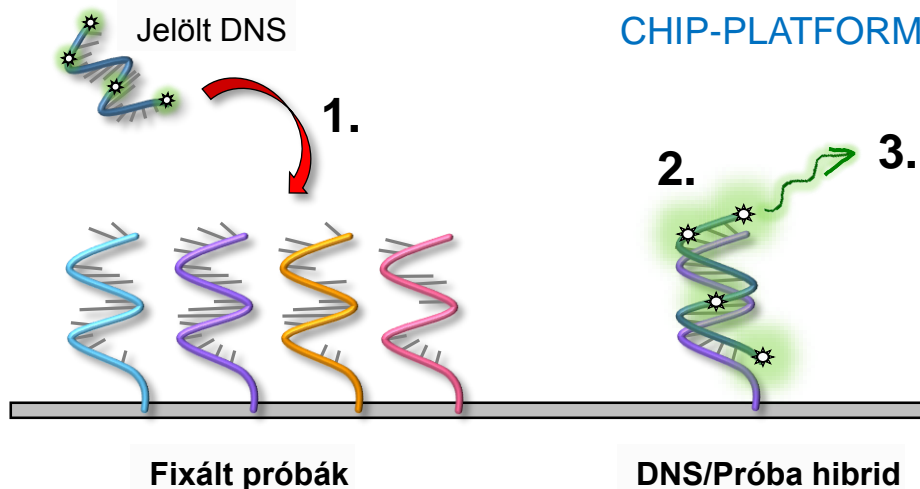
<http://www.advandx.com/products/pna-fish/candida/>

1.5. DNS microarray (CHIP)

Alapelv: *Fluoreszcensen* jelölt mikrobiális **DNS/cDNS** molekulák üveg vagy műanyag *szilárd hordozóra* kötött próbákhoz való hibridizációját méri.

Alkalmazás:

- több száz/ezer gén egyidejű vizsgálata
- egyes baktériumtörzsek genetikai eltéréseinek vizsgálata
- **komparatív microarray:** kvantitatív génexpressziós analízis

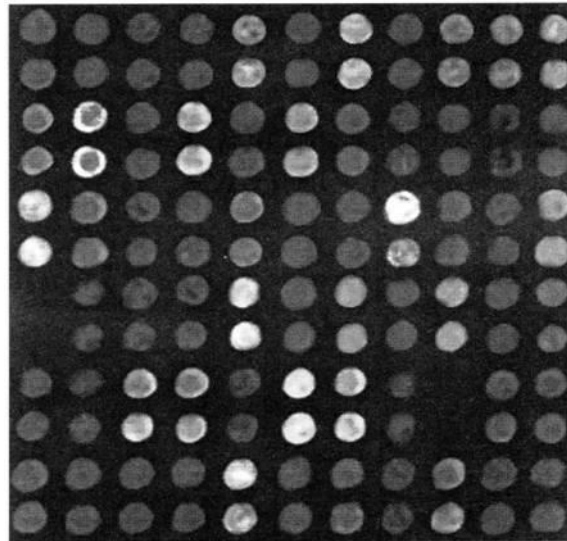


(1) A vizsgálandó, fluoreszcensen jelölt, DNS vagy cDNS a CHIP-re kötött (jelöletlen) próbákhoz hibridizál.

(2) A kialakult, kettős szálú DNS/DNS vagy DNS/cDNS hibridek gerjesztés hatására fluoreszkálnak

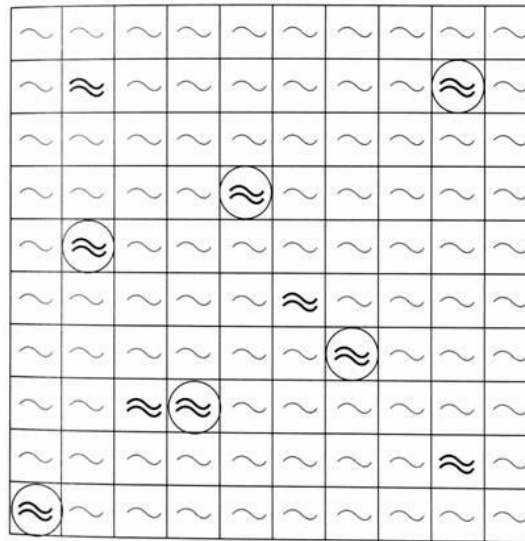
(3) A jel fluoreszcens detektorral (CHIP szkener) mérhető.

DNS-DNS HIBRIDIZÁCIÓ

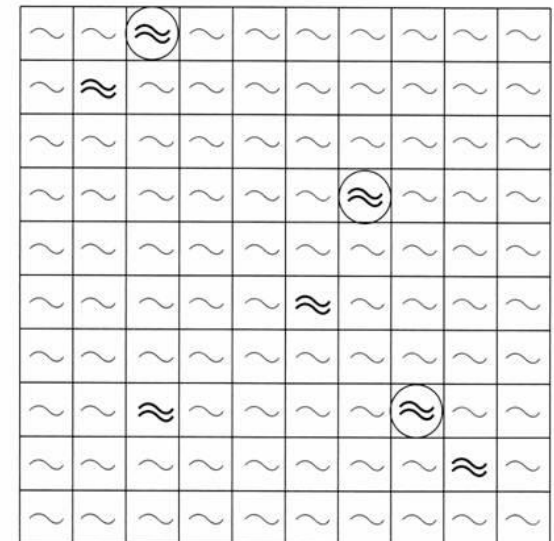


Genetikai különbségek vizsgálata

DNS-cDNS HIBRIDIZÁCIÓ



Tenyésztés „A”



Tenyésztés „B”

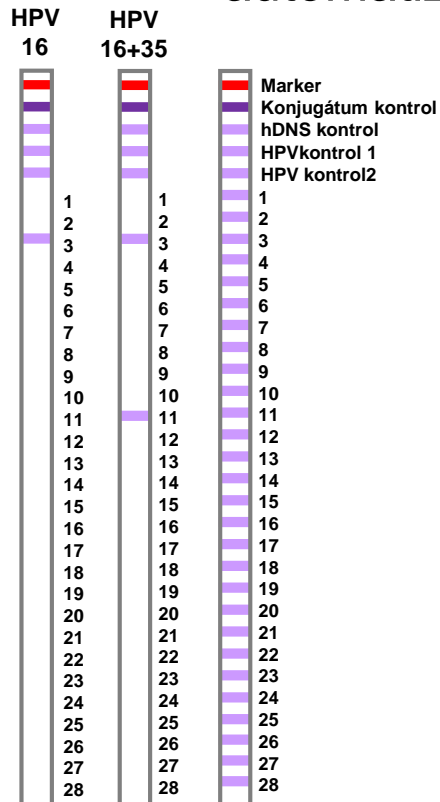


Komparatív microarray:
génexpresszó összehasonlítása
(aktív gének fluoreszkálnak)

1.6. Line Probe Assay (LiPA)

Alapelv: Mikrobák különböző **genotípusának** vagy **allélvariánsainak** azonosítása hibridizációval, szekvencia-specifikus **próba-sor** segítségével.

Előny: - egy mintában egyszerre több genetikai variáns is vizsgálható
- automatizálható



Módszer lépései:

1. DNS/RNS izolálása
2. RNS: reverz transzkripció → cDNS szintézis
3. Célszakasz amplifikációja PCR-ral
4. Ismételt PCR biotinnal jelölt primerrel (nested PCR)
5. Biotinnal jelölt termék denaturálása (egyszálúsítás)
6. Egyszálúsított termék hibridizációja a 10-20 próbát tartalmazó membrán-csíkkal
7. Mosás (nem kötött termék eltávolítása)
8. Inkubálás streptavidin-ALP-vel (biotinhoz köt)
9. Mosás
10. **Előhívás: lila színű csík** keletkezik ott, ahol hibrid van

2. Amplifikációs módszerek

2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

1. *Nukleinsav molekulák* specifikus (*target*) régióinak amplifikálása
2. A legtöbb PCR targetje a **DNS** - stabilabb, mint az RNS
3. A reakció egy **ciklikusan működő termosztátban** zajlik le, mely a PCR reakció egyes lépéseihez szükséges optimális hőmérsékletet biztosítja



Reakcióhoz szükséges anyagok:

1. DNS templát
2. Primer-pár
3. *Taq polymerase* enzim
4. dNTP
5. Mg^{2+}
6. Puffer

Kópia szám

2^n

n= ciklusok száma

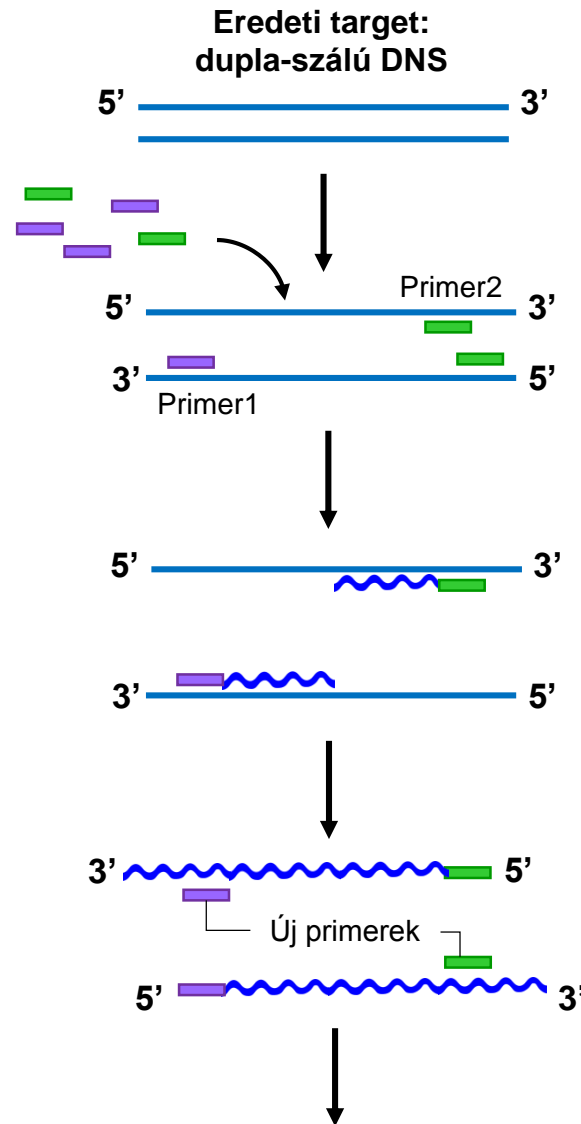
PCR ciklusok lépései:

1. Denaturáció

2. Annealing

3. Szintézis

1. Denaturáció...



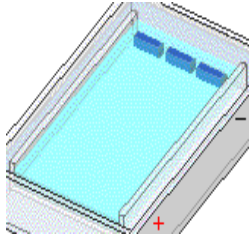
*Templát: kettős szálú DNS, amely a célgént tartalmazza.
Denaturálás (93-96°C)*

Gén-specifikus primer párok hibridizációja mindkét szálhoz

A primer meghosszabbítása (DNS szintézis) mindkét templát szálon

Ismételt denaturálás, annealing és DNS szintézis

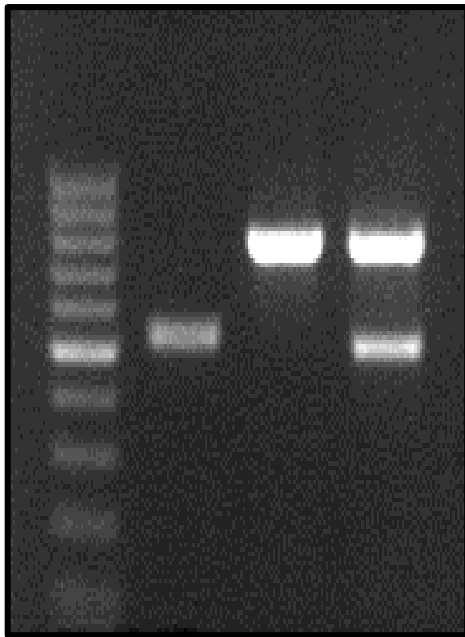
Kiértékelés:



Agaróz gél-elektroforézis:

Az *amplicon* mérete megfelel-e a vártnak?

Multiplex PCR



Előnyök:

1. Gyors, specifikus és érzékeny
2. Megbízható
3. Nem tenyésztethető / elpusztult mikrobák detektálása
4. Több gén együttes vizsgálata egyszerre, különböző primer párokkal = *multiplex PCR*

Hátrányok:

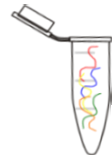
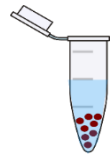
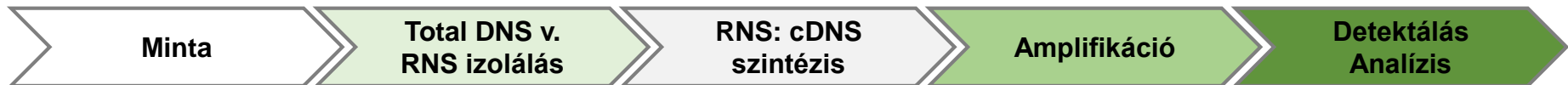
1. Fals + reakció: kontamináció
2. Fals – reakció: inhibitorok jelenléte
3. Speciális személyi/tárgyi feltételek
4. Mennyiségi mérésre nem alkalmas

2.2. Kvantitatív Real time PCR

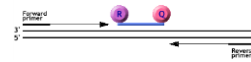
Target: - **DNS, RNA/cDNS**

Alapelv: - **Computer-vezérelt PCR + fluoreszcens detektor**
az amplifikált DNS szálak közé interkalálódó festék/jelölt próba
menyisége valós időben mérhető

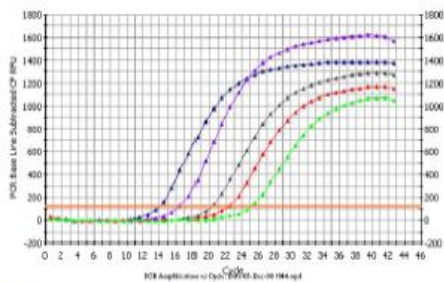
Detektálás: - Interkalálódó festék (SYBRgreen, EVAgreen...stb.)
- Próbák: TaqMan, Molecular beacon, FRET..stb.



1. Polymerization.



http://www.cfgenotherapy.org.uk/research/article/Assay_Development



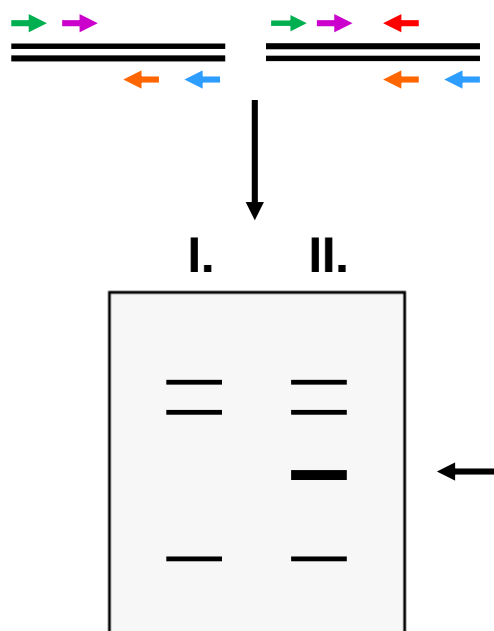
▲ 10⁶ cfu/mL ▲ 10⁵ cfu/mL ▲ 10⁴ cfu/mL
▲ 10³ cfu/mL ▲ 10² cfu/mL

RT-PCR alkalmazása:

1. Génexpressziós vizsgálatok
2. RNS szekvencia analízis
3. Kórokozók mennyiségi kimutatása

2.3. Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR v. RAPD)

Alapelv: *Rövid, random szekvenciájú* (nem meghatározott génszakaszokra specifikus) *primerek* alkalmazása, melyek a **target DNS** molekula különböző pontjaira kötődhet be, így több, keletkezik (**genomiális fingerprinting**). A kapott különböző hosszúságú termék mintázat egyedi és mikroba specifikus.



Kiértékelés:

1. A kapott *csík-mintázat (profil)* jellemzése
2. Az amplikonok *méretének és számának* meghatározása

Előny:

- ismeretlen szekvencia estén is használható

Hátrány:

- nehéz standardizálni
- optimalizálás szükséges

3. EPIDEMIOLOGIAI TESZTEK



Epidemiológia:

A betegségek elterjedésének statisztikai vizsgálatával foglalkozó tudományág.

Epidemiológiai vizsgálatok céljai:

- Meghatározó baktérium specierek, klónok elterjedésének nyomon követése időben és térben.
- A fertőzés módjának és útjának nyomon követése.
- Fokozott virulenciájú vagy multirezisztens (MDR) klónok azonosítása.

Járványok esetében különösen indokolt.

Molekuláris epidemiológiai módszerek alapfeltételei:

- Stabil marker jelenléte (tipizálhatóság)

Az alkalmazott módszerek DNS, RNS alapúak, melyek közül a legfontosabbak:

Restrikciós enzimes analízisek (REA)

- Restrikciós Fragment Lánc Polymorfizmus (RFLP)
- Pulzáttatott Mező Gél Elektroforézis (PFGE)
- Ribotipizálás

Plazmid profil vizsgálat

PCR alapú módszerek

- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
- Antibiotikumrezisztencia gének detektálása
- Virulencia gének detektálása

Szekvenálás

- Antibiotikumrezisztencia gének
- Multi Lókuszos Szekvenancia Tipizálás (MLST)

3.1. Restrikciós enzimes analízisek (REA)

3.1.1. Restrikciós Fragment Lánc Polimorfizmus (RFLP)

Célja:

A kórokozó izolátumok közti variabilitás meghatározása és az ez alapján történő csoportosításuk.

Alapja:

A cél genom/gén, a szekvenciavariabilitásból adódóan más-más helyeken hasítható ugyanazzal a restrikciós enzimmel az eltérő izolátumokban.

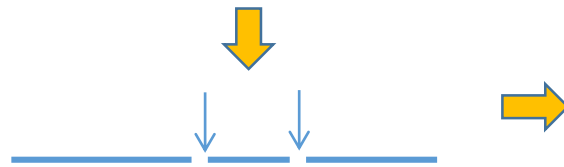
Kivitelezés:

A kérdéses gén kiterjesztése PCR-rel, konzervatív részt felismerő primerekkel. A kapott termék emésztése restrikciós endonukleázzal. A hasítási mintázatok összehasonlítása agaróz gélelektroforézissel.

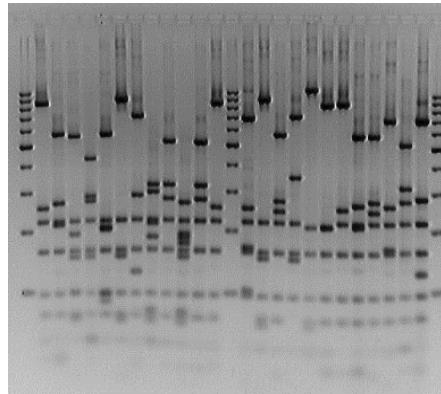
Példa:

Campylobacter jejuni izolátumok közti rokonsági fok megállapítása flagellin A gén variabilitást detektáló *flaA*-RFLP-vel.

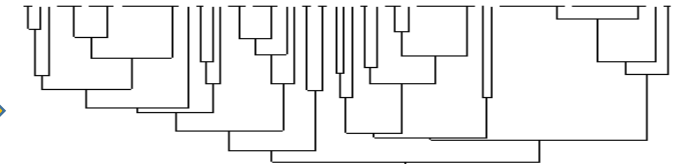
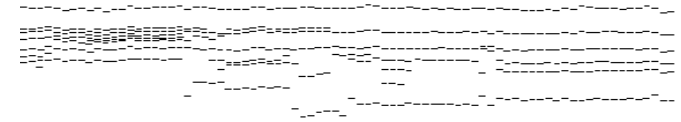
1. Célszekvencia kiterjesztése



2. Emésztés *DdeI* restrikciós endonukleázzal



3. Gél elektroforézis



4. A gélmintázat alapján a rokonsági fok megállapítása

Előnyök:

- Viszonylag könnyen kivitelezhető
- Érzékeny

Hátrányok:

- Nincsenek bevett standardok (enzim, stb.)
- Eltérő metilációs aktivitás okozhat eltéréseket a fragmentek hosszában

3.1.2. Pulzáltatott Mezejű Gélelektroforézis (PFGE)

Célja:

A vizsgált izolátumok közti rokonsági fok megállapítása.

Alapja:

A vizsgált izolátumok teljes genomjainak összehasonlító analízise adott restriktív enzimmel történő hasítási mintázata alapján.

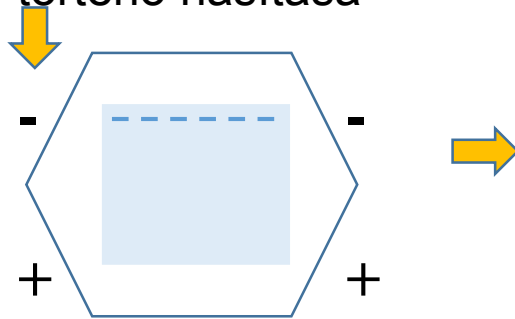
Kivitelezés:

Nagy tisztaságú kromoszómális DNS izolálása. A DNS emésztése a genomban viszonylag kevés felismerő hellyel rendelkező ún. ritkán hasító restriktív enzimmel. Az emésztett minta megfuttatása speciális gélfuttató rendszerben.

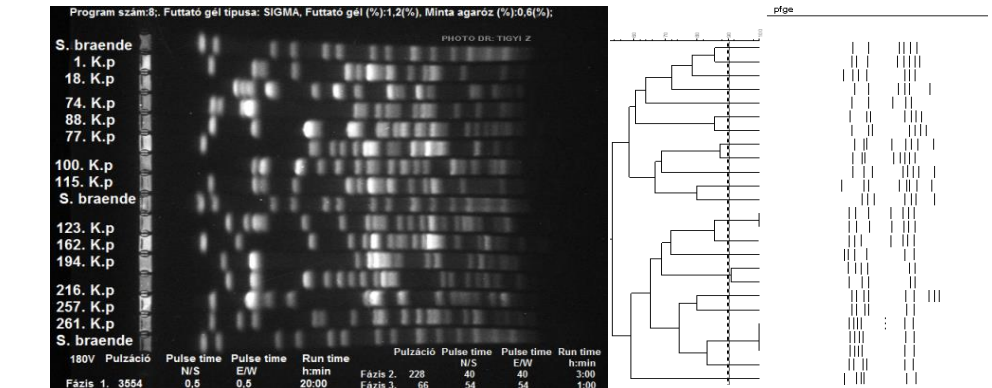
Példa:

Klebsiella pneumoniae izolátumok közti rokonsági fok megállapítása teljes genom restriktíós mintázat alapján.

1. Baktériumsejtek feltárása, DNS kivonása, majd *Xba*I restriktíós endonukleázzal történő hasítása



2. DNS fragmentek elválasztása változó irányú és intenzitású elektromos mezőben



3. Az egyes minták hasítási mintázatának összehasonlítása, szoftveres kiértékelése

Előnye:

- Teljes genomszintű változások, és átrendeződések nyomon követhetők

Hátrányok:

- Időigényes
- Drága infrastruktúra

3.1.3. Ribotipizálás

Célja:

Organizmusok identifikálása és az eltérő izolátumok közti rokonság megállapítása.

Alapja:

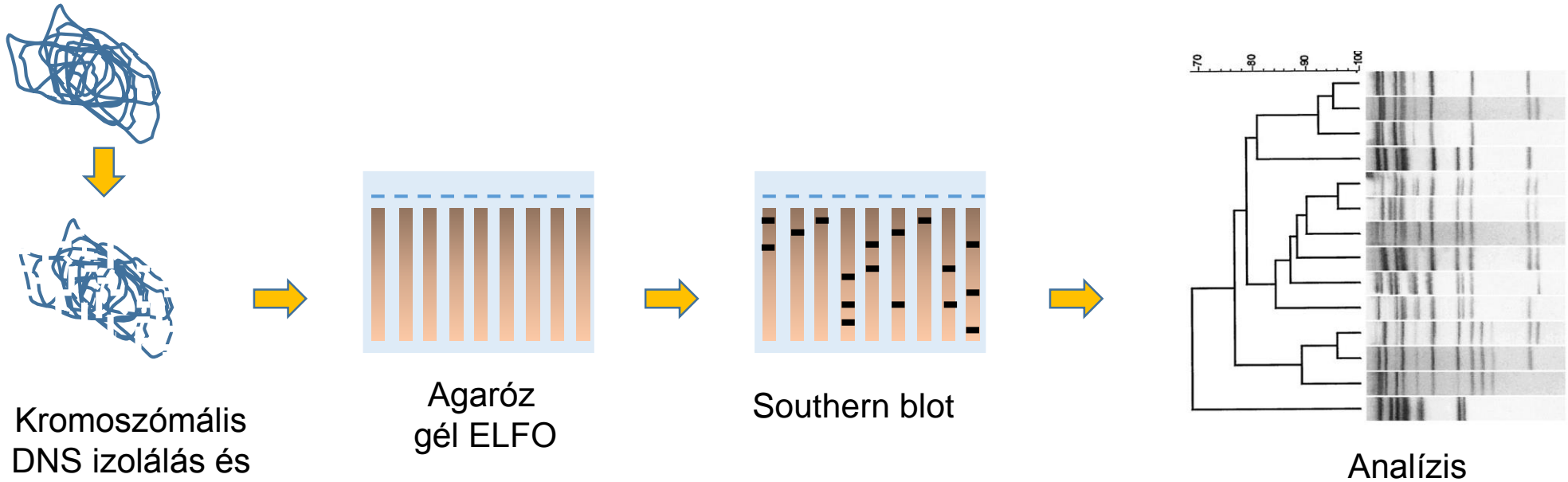
Az egyes organizmusok kromoszómájának endonukleázos hasítási alapmintázatán (RFLP) túl a rRNS gének eltérő fragmentekhez való kötődése is diagnosztikus információval bír.

Kivitelezés:

A minta DNS-t restriktációs endonukleázzal hasítjuk, gélelektroforézissel elválasztjuk, majd riboszómális RNS génre specifikus próbával hibridizáltatjuk ([Southern blot](#)). A kapott eredményeket adatbanki adatokkal vetjük össze.

Példa:

Salmonella enterica serotype Enteritidis törzsek ribotipizálása.



Előnye:

- Jó felbontású

Hátránya:

- Időigényes

3.2. Plazmid profil vizsgálat

Célja:

A izolátumokban található plazmidok számának és méretének meghatározása, összehasonlítása.

Alapja:

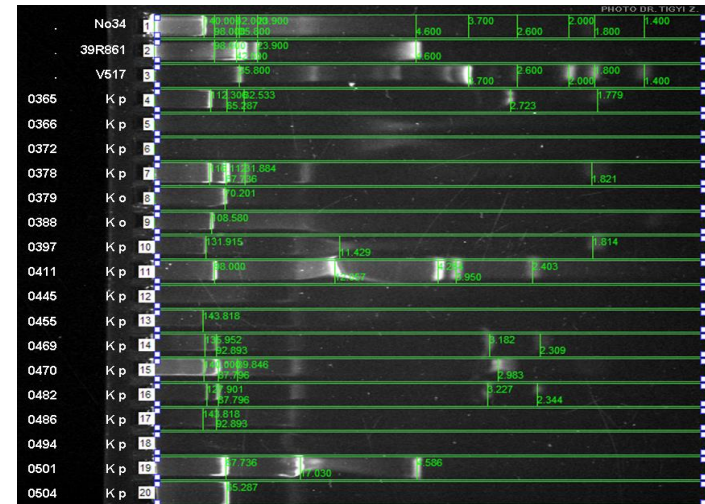
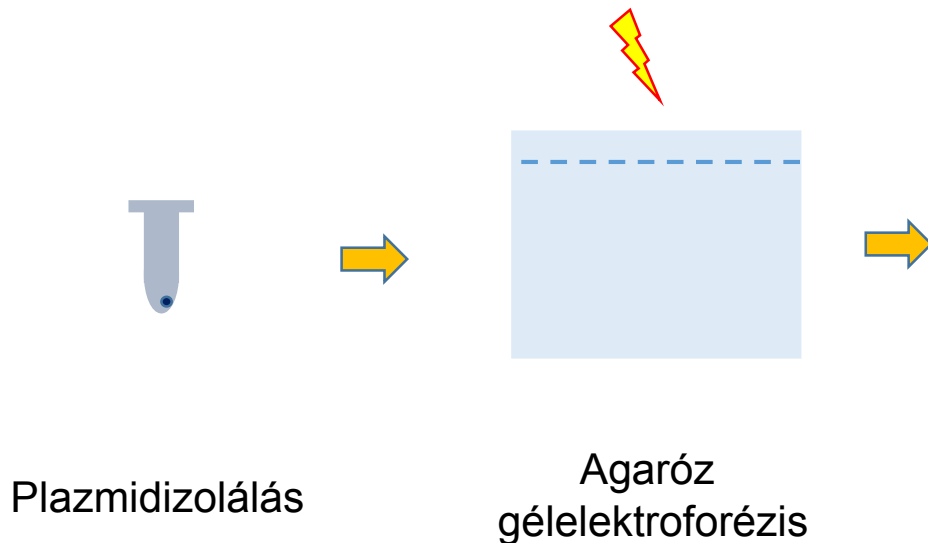
Egyes antibiotikumrezisztencia és virulencia gének extrakromoszómális elemeken, plazmidokon kódoltak. A plazmidok mérete döntően 2-150 kb-ig terjed és méretük sok esetben jellemző, ezáltal indikatív epidemiológiai fontosságú.

Kivitelezés:

A vizsgált törzsekből plazmidizolálást végzünk, majd a mintákat gélelektroforézissel elválasztjuk és értékeljük. Szükség esetén a plazmidok tovább vizsgálhatók endonukleázos emésztéssel (RFLP), hibridizálással (Southern blot) vagy PCR-rel.

Példa:

Klebsiella pneumoniae izolátumok plazmid profiljának feltérképezése. Az ESBL gének előfordulása igen gyakran plazmidhoz kötött. Az egyes plazmidok mérete jellemző lehet.



Plazmid profiljuk alapján az egyes betegektől származó *K. pneumoniae* izolátumok heterogének

Előnye:

- Olcsó
- Egyszerű

Hátránya:

- Részinformációt nyújt

3.3. PCR alapú módszerek

3.3.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Példa:

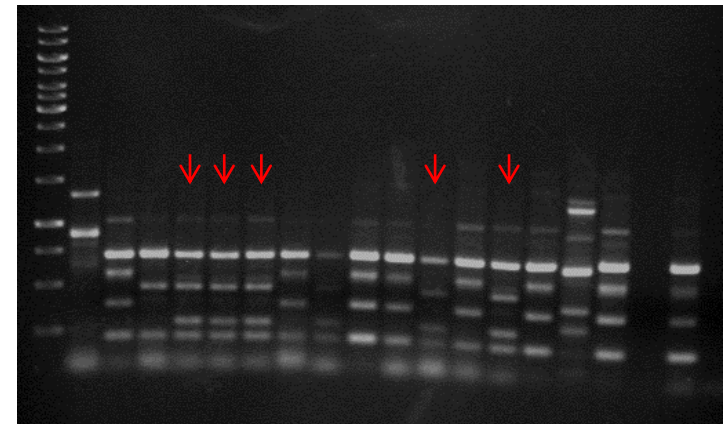
Klebsiella pneumoniae izolátumok egymástól való elkülönítése.



Izolátumok



PCR, majd
agaróz gél ELFO



Analízis: a piros nyíllal jelölt klónok eltérő kórházi osztályokról származnak, de RAPD alapján rokonságot mutatnak

Előnye:

- Nem kíván előzetes szekvencia ismeretet
- Egyszerű mintakezelés

Hátránya:

- Már pontmutáció is jelentősen befolyásolhatja az eredményt

3.3.2. Antibiotikum rezisztencia gének detektálása

Célja:

Ismert szekvenciával rendelkező rezisztenciagének jelenlétének kimutatása.

Alapja:

Sok esetben az antibiotikum rezisztencia, rezisztenciagénhez kötött.

Kivitelezés:

PCR

Előnye:

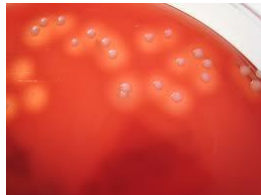
- Gyors
- Egyszerű mintakezelés

Hátránya:

- A gén jelenléte nem feltétlenül jelenti annak fenotípusos megnyilvánulását

Példa:

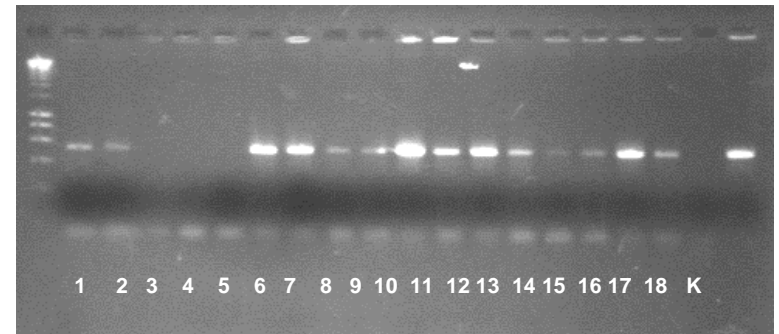
Meticillin rezisztenciáért felelős *mecA* gén jelenlétének kimutatása *Staphylococcus aureus* izolátumkból.



Kolónia felszedés,
felfőzés



PCR



A tesztelt 18 betegizolátumok *S. aureus* közül
14 hordozza a *mecA* gént

Előnye:

- Gyors
- Egyszerű mintakezelés

Hátránya:

- A gén jelenléte nem feltétlenül jelenti annak fenotípusos megnyilvánulását

3.3.3 Virulenciagének detektálása

Célja:

Egy izolátum virulencia potenciáljának megítélése, illetve több izolátum virulencia potenciáljának genotípus alapú összehasonlítása.

Alapja:

A patogenitásban és virulenciában szerepet játszó faktorok kromoszómán vagy plazmidon kódoltak, melyek PCR-rel kimutathatók.

Kivitelezés:

PCR, legtöbbször Multiplex-PCR (1 reakcióban több primer pár található)
Leggyakrabban vizsgált faktorok: adhezinek, toxinok.

Előnye:

- Gyors
- Egyszerű mintakezelés

Hátránya:

- A gén jelenléte nem feltétlenül jelenti annak fenotípusos megnyilvánulását

Példa:

Három darab *E. coli* izolátum vizsgálata toxin-, és adhezin gének jelenlétére Multiplex-PCR rendszerben.

Vizsgált gének:

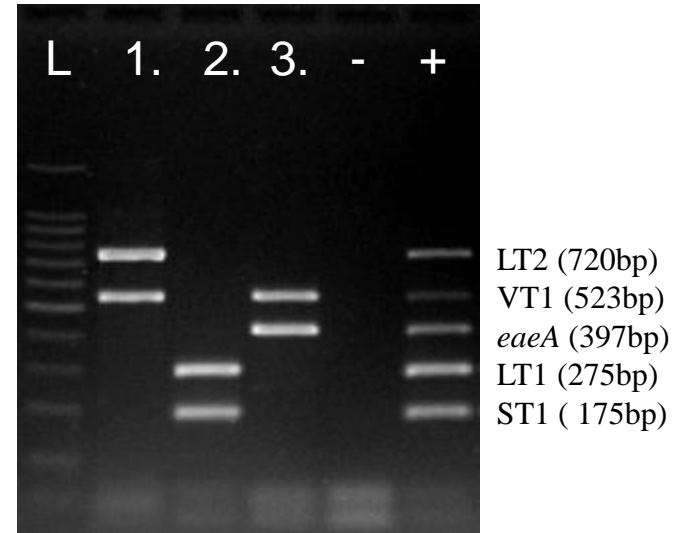
LT1: hő-labilis toxin 1

LT2: hő-labilis toxin 2

ST1: hő-stabil toxin 1

VT1: verotoxin 1

eaeA: kolonizációs faktor



Az 5 vizsgált génből 2-2 van jelen a három *E. coli* izolátumban eltérő kombinációban

Előnye:

- Gyors
- Egyszerű mintakezelés

Hátránya:

- A gén jelenléte nem feltétlenül jelenti annak fenotípusos megnyilvánulását

3.4. Szekvenciaszintű analízisek

3.4.1. Multi Lókuszos Szekvencia Tipizálás (MLST)

Célja:

Izolátumok, törzsek fajon belüli elkülönítése.

Alapja:

Az izolátumok elkülönítését a genom több, rövidebb lókuszaról származó szekvencia adatára alapozza.

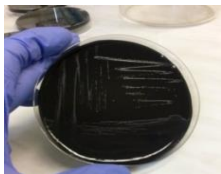
Kivitelezés:

A nagymértékű konzervativizmussal, de mégis részlegesen variábilis szekvencia részekkel rendelkező anyagcsere funkciókért felelős gének (háztartási gének), 400-500 bp hosszú szakaszait felerősítjük, majd megszekvenáljuk. A kapott allélok szekvencia adatait egymással és az adatbanki adatokkal vetjük össze.

Példa:

Campylobacter jejuni izolátumok rokonsági fokának háztartási gén alapú meghatározása.

	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	unca	ST
ATCC 49350	63	223	179	251	304	262	166	1840
ATCC 49351	63	223	179	251	304	262	166	1840
RM2095	63	223	180	253	305	263	168	1841
RM2096	63	223	181	254	306	264	167	1842
RM3782	63	224	181	252	306	264	169	1843
SSI 5384	63	223	182	251	306	265	170	1844
CCUG 18266	63	223	179	251	304	262	166	1840
269.97	63	164	183	188	27	266	18	1845



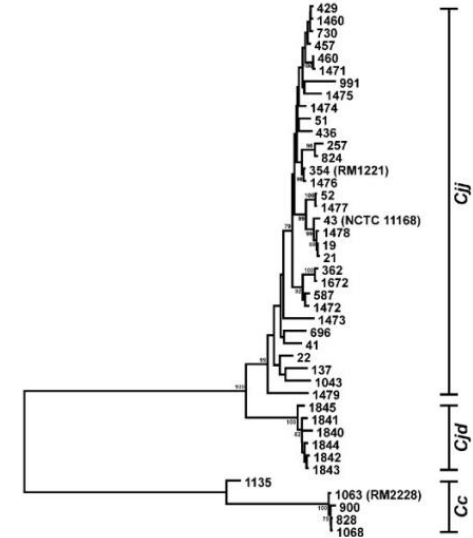
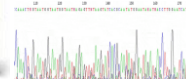
Izolátum



7 db konkrét háztartási gén kieroősítése PCR-rel



Szekvenálás



Az izolátumok rokonsági fokát dendrogram ábrázolja 7db háztartási gén szekvencia analízise alapján

Előnye:

- Pontos
- A genom több szakaszáról vet össze információt

Hátránya:

- Költségigényes berendezés és reagensek

3.4.2. Antibiotikumrezisztencia gének szekvencia szintű analízise



Célja:

Rezisztenciagének szekvenciaszintű összehasonlító vizsgálata és epidemiológiájuk feltárása.

Alapja:

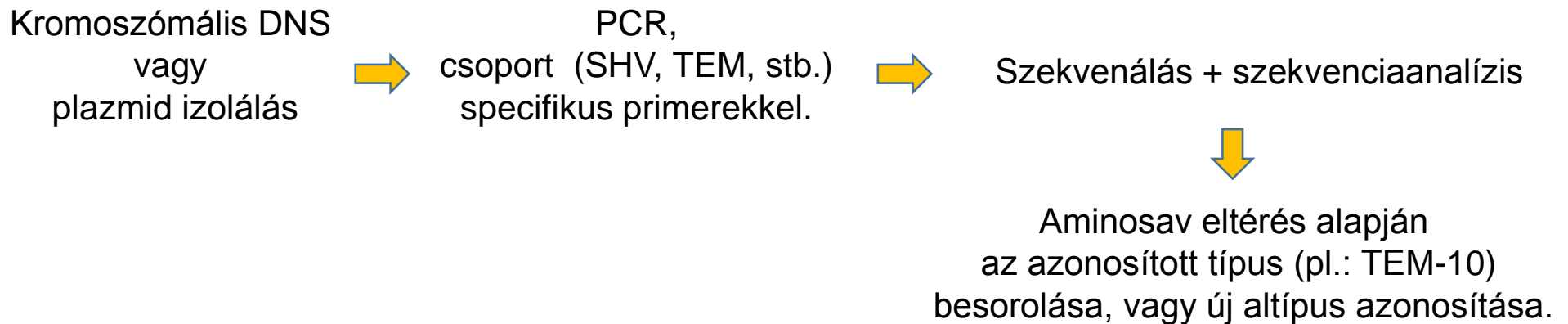
Az egyes rezisztenciagének nagymértékű szekvencia-polimorfizmust mutatnak, így azok kategorizálása, és epidemiológiai vizsgálata szekvenciájuk ismeretében valósítható meg.

Kivitelezés:

A variábilis régiót tartalmazó kérdéses rezisztenciagént PCR-rel felamplifikáljuk, majd a kapott -általában 400-800 bp hosszú- terméket két irányból megszekvenáljuk. A gének kategorizálása nukleotid eltérések alapján történik.

Példa:

Béta-laktamáz kódozó gének molekuláris epidemiológiájának feltárása. Az egyes rezisztenciagének kórházi jelenlétének monitorozása.



Előnye:

- Szekvenciaszintű információ ad

Hátránya:

- Költséges háttér infrastruktúra