

# Metagenomika

## Úvod

Petra Vídeňská, Ph.D.

# Hodnocení:

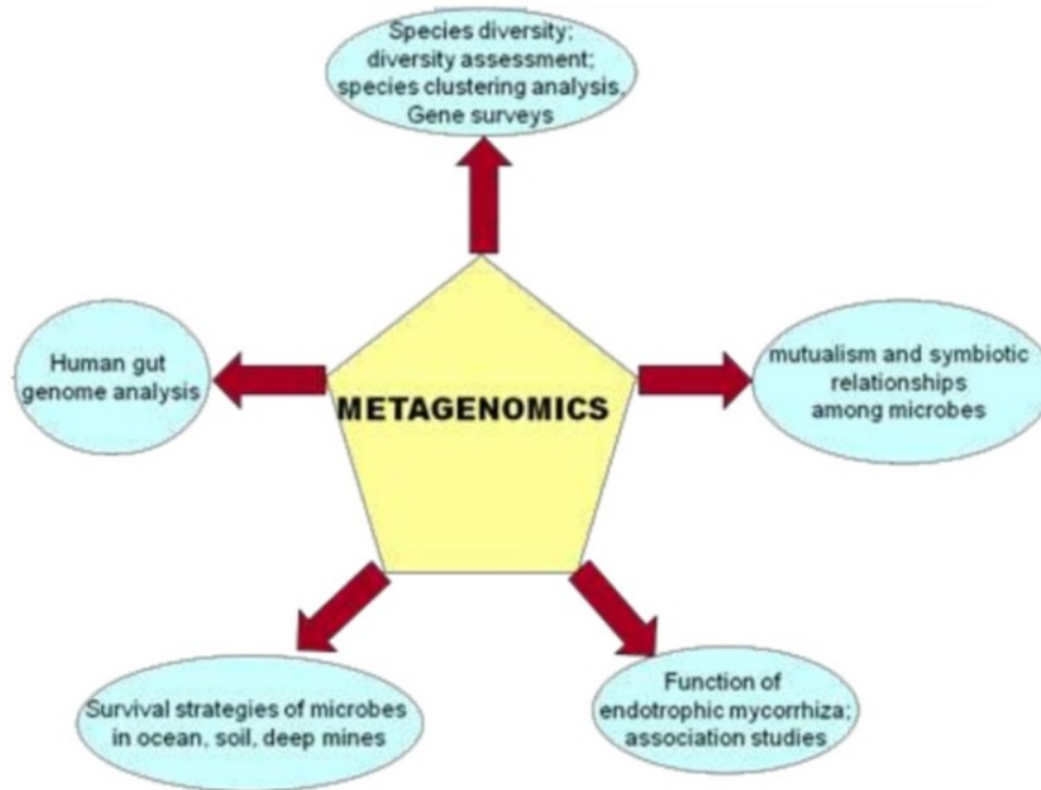
- Aktivita při hodinách
- Prezentace – na základě článku
- Ústní zkouška

# Osnova přednášek:

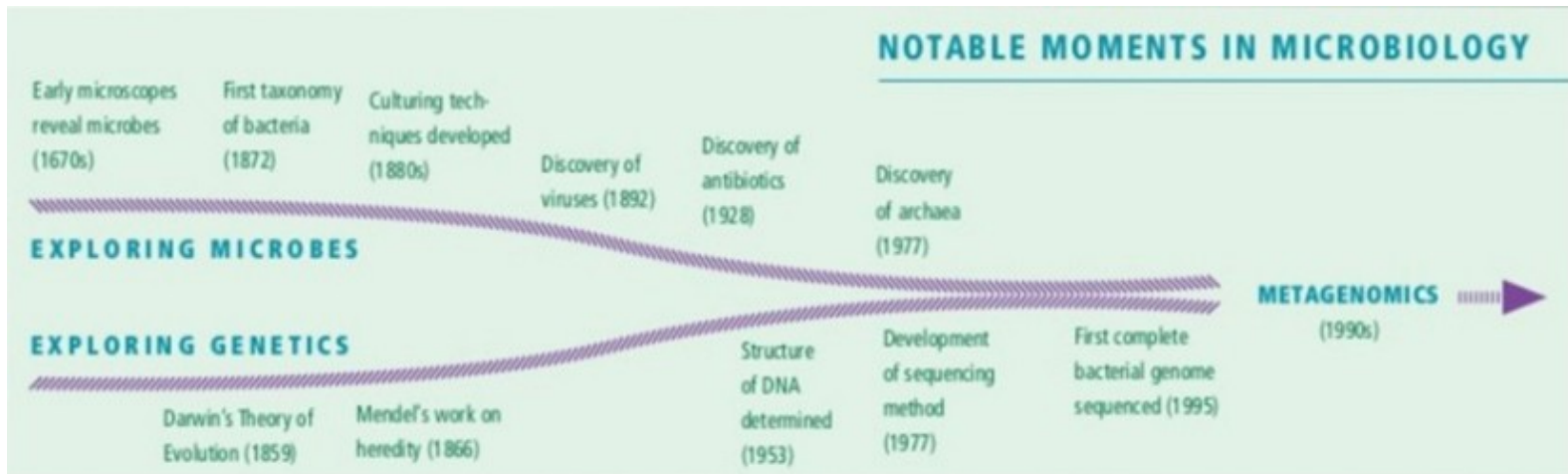
datum	téma
22.2.2016	Úvod do metagenomiky
29.2.2016	Sekvenování druhé generace, principy 454, Illumina, Ion Torrent
7.3.2016	Principy Minion, PacBio, prohlídka laboratoří
14.3.2016	Odběry vzorků, izolace, příprava knihoven 16S
21.3.2016	Celometagenomové sekvenování, sekvenace eukaryot a virů
28.3.2016	Státní svátek
4.4.2016	Vyhodnocování sekvenací
11.4.2016	Střevní mikroflóra I
18.4.2016	Střevní mikroflóra II
25.4.2016	Mikroflóra vody a půdy
2.5.2016	Metatranskriptomika
9.5.2016	Prezentace
16.5.2016	Prezentace + ústní zkouška

# Úvod

- Na světě je cca  $4-6 \times 10^{30}$  prokaryot
- Více než 99,9 bakterií je nekultivovatelných
- V databázi více než 1 mil. genů
- Nové přístupy – objev nových genů – enzymy, látky
  - ATB
  - Léčiva
  - Degradují kontaminanty v prostředí

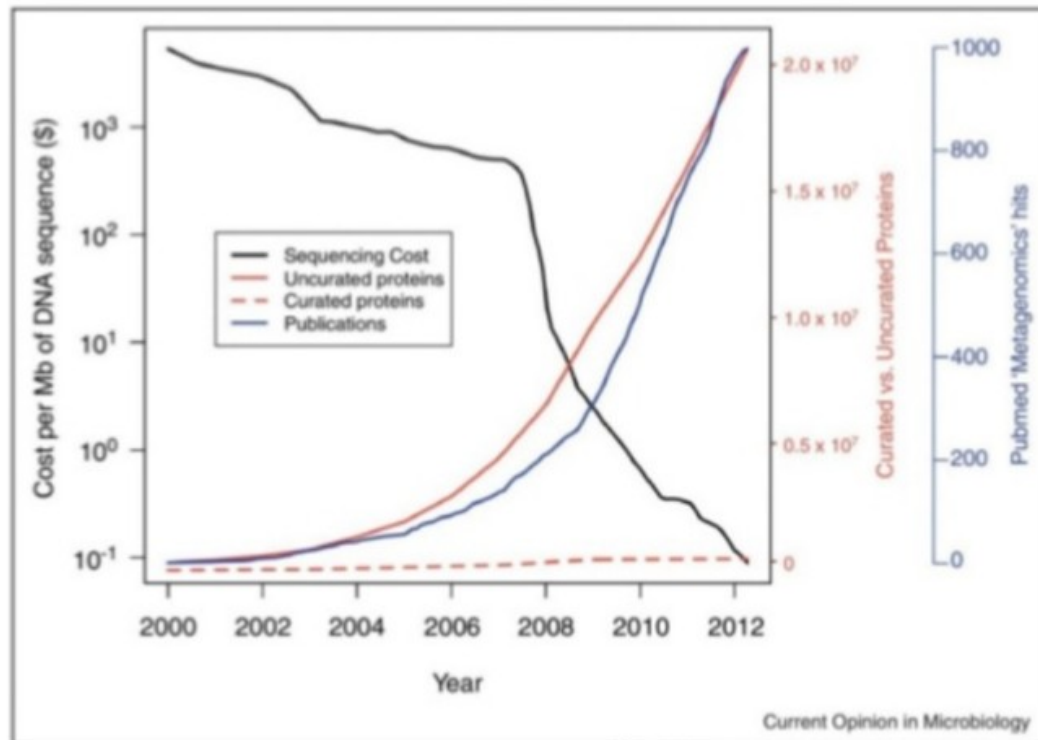


# Historie



Source: *US Division of Earth & Life Studies of the National Academies*  
<http://dels-old.nas.edu/metagenomics/overview.shtml>

## Impact of Technology on Metagenomics



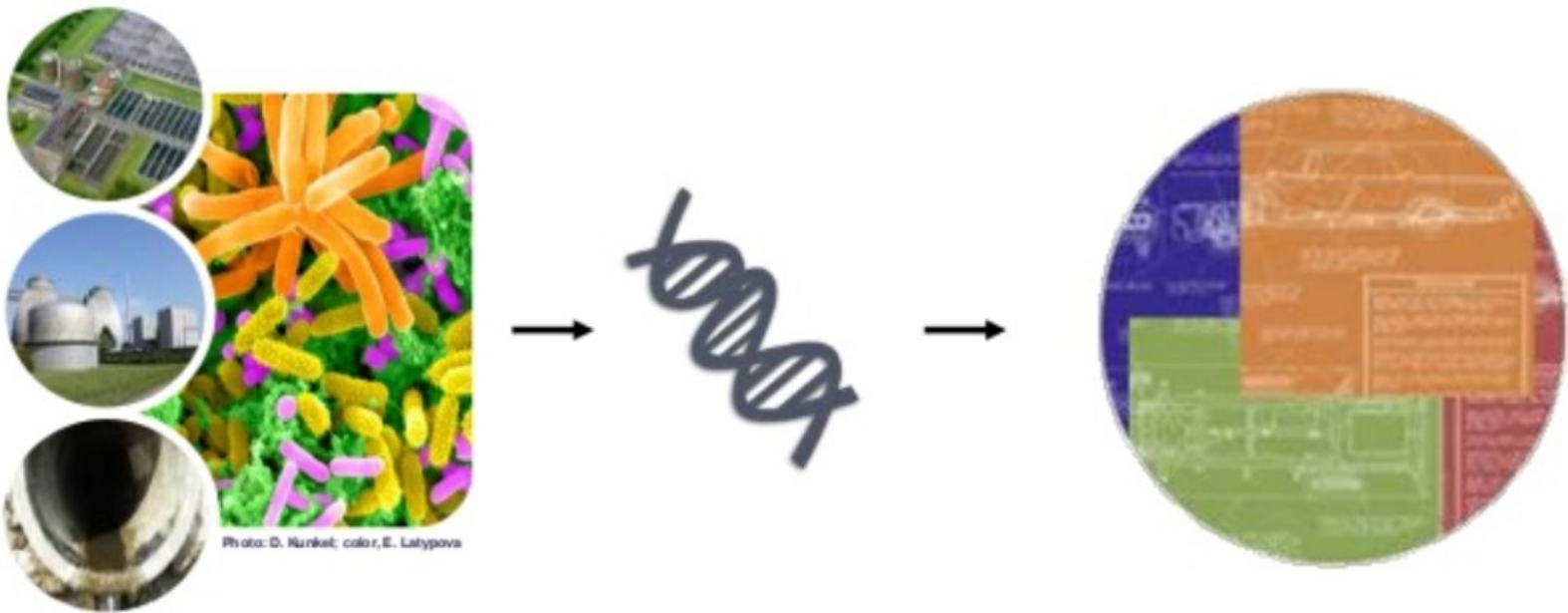
Source: Temperton, Current Opinion in Microbiology, 2012

# Definice metagenomiky

- Metagenomika je definována jako věda zabývající se biologickou diverzitou. Je založena na analýze genomů příbuzných, ale ne zcela identických mikrobiálních populací za použití genetických a molekulárních technik. Celkové metagenomické studie umožňují porozumět dynamice mikrobiálního společenství a zahrnují analýzy nukleotidových sekvencí, struktury, regulace a funkce (Handelsman a kol., 1998).

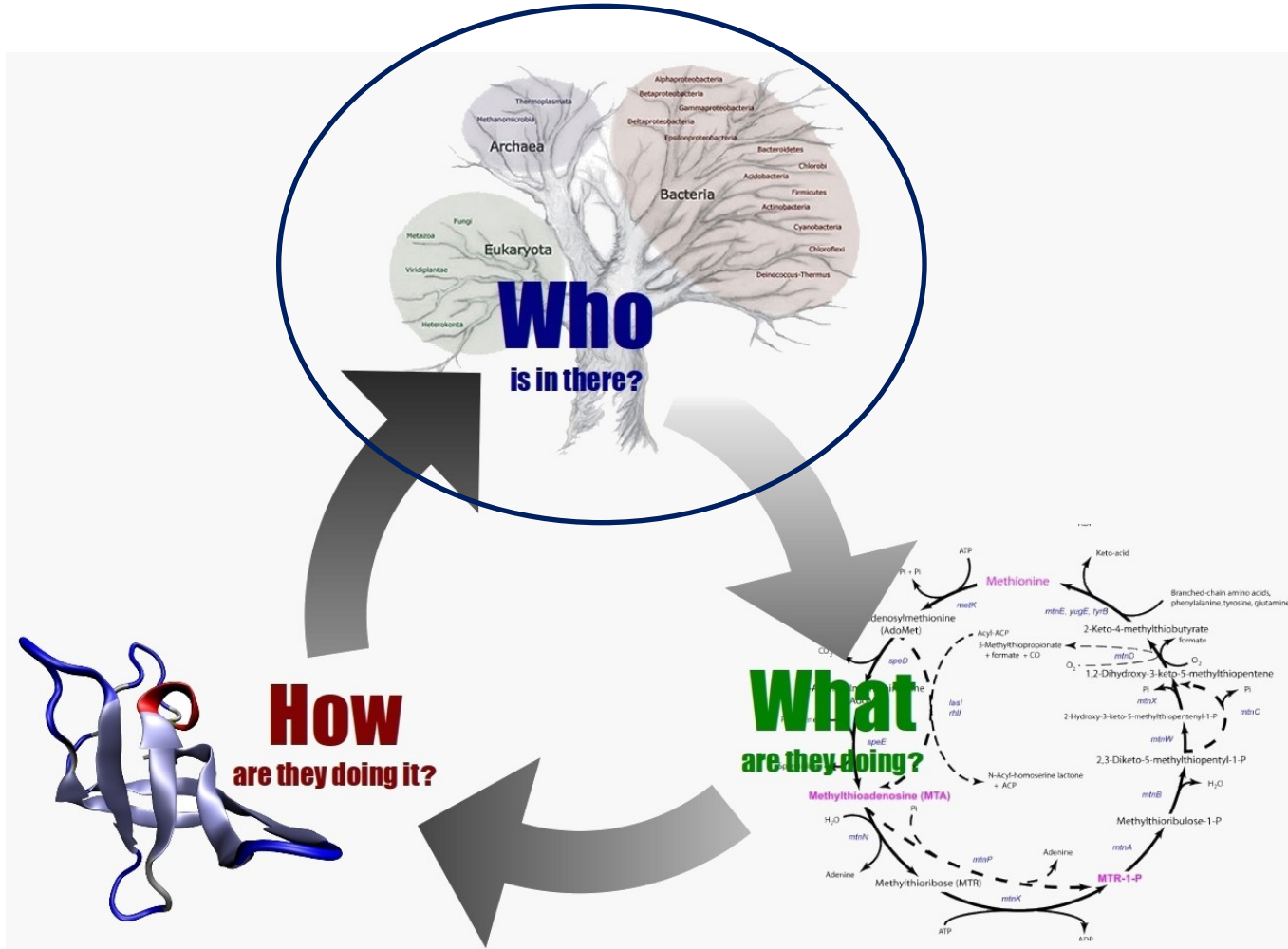


# Metagenomika

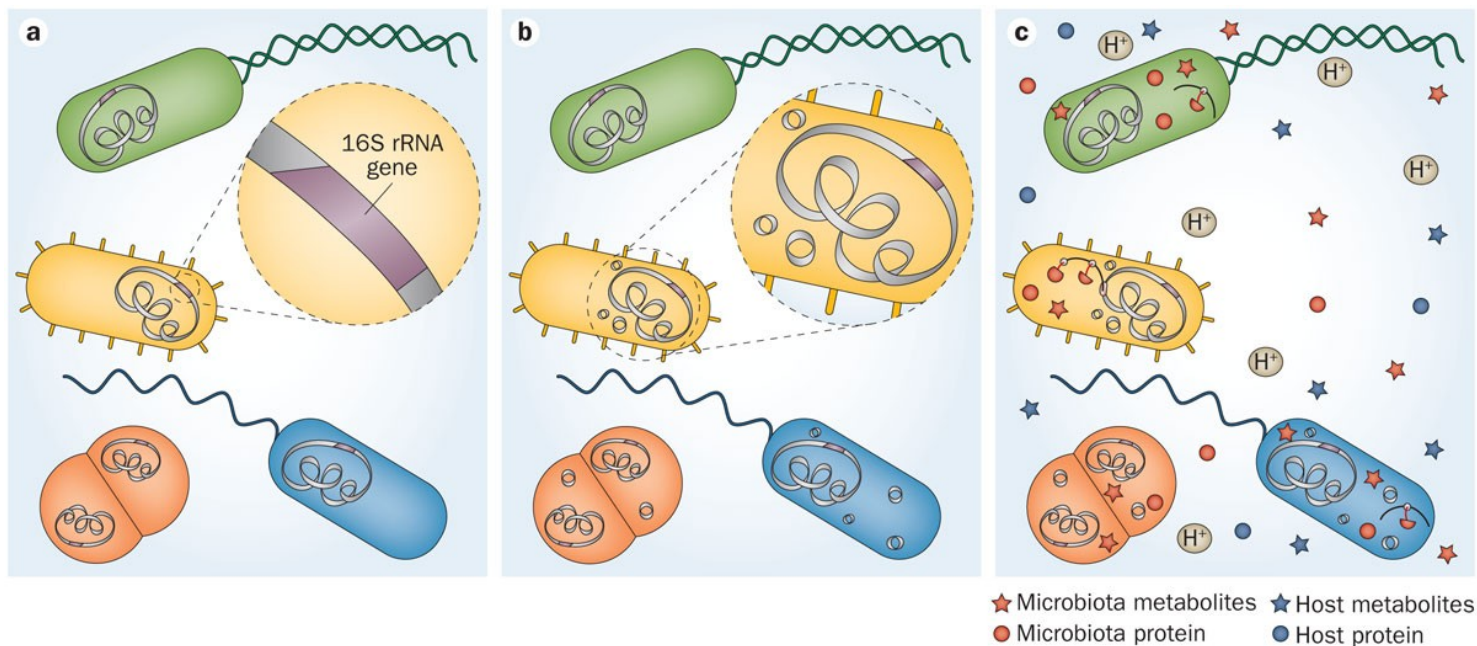


**Meta**genome = Parts list of the community

# Metagenomika



# Microbiota a člověk



Nature Reviews | **Urology**

Whiteside, S. A. *et al.* (2015) The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection  
*Nat. Rev. Urol.* doi:10.1038/nrurol.2014.361



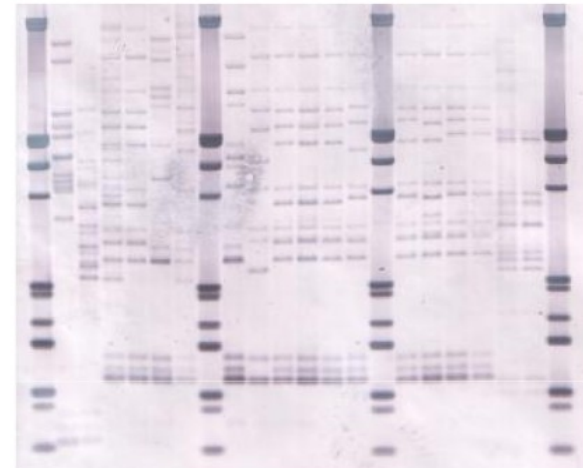
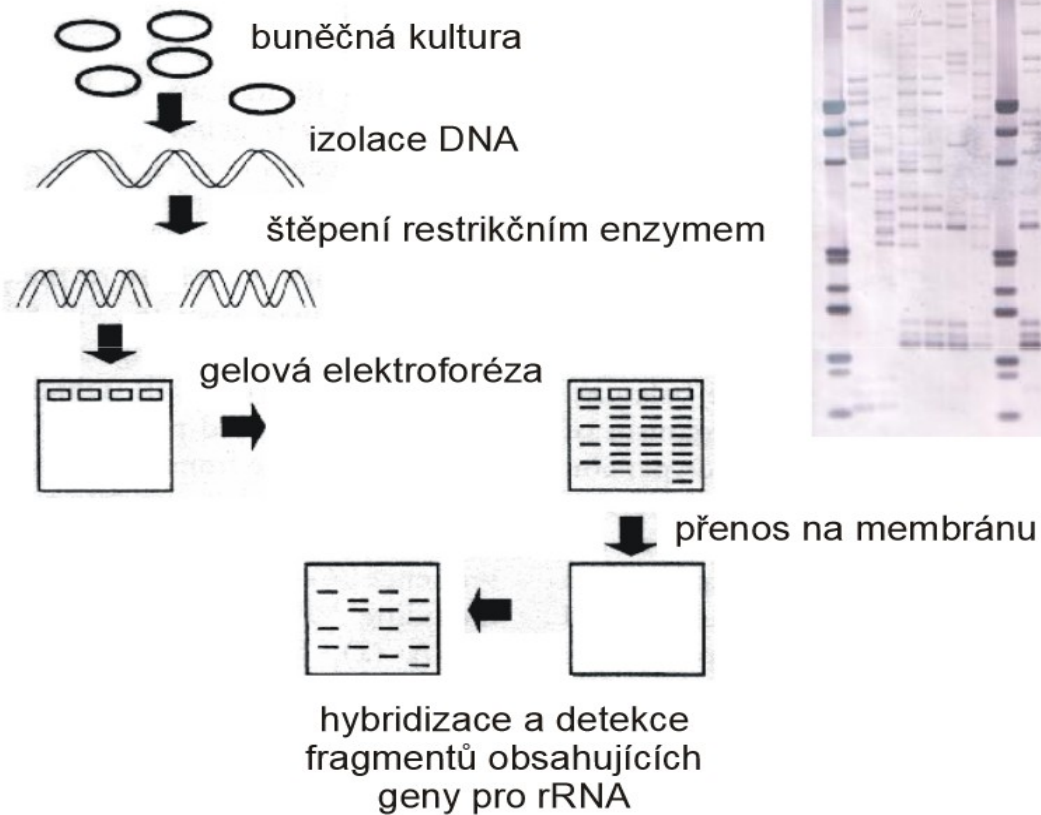
Research centre  
for toxic compounds  
in the environment

# Výzkum mikroflóry - minulost

- Izolace čistých kultur, biochemické reakce („fenotyp“ bakterie, různé podmínky)
- Fingerprintové metody (RFLP, rep PCR, ribotypizace, DGGE)
- Identifikace pomocí sond (dot-blot hybridizace, FISH)

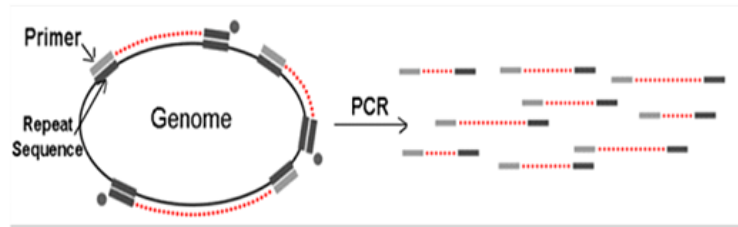
# Ribotypizace

## manuální ribotypizace

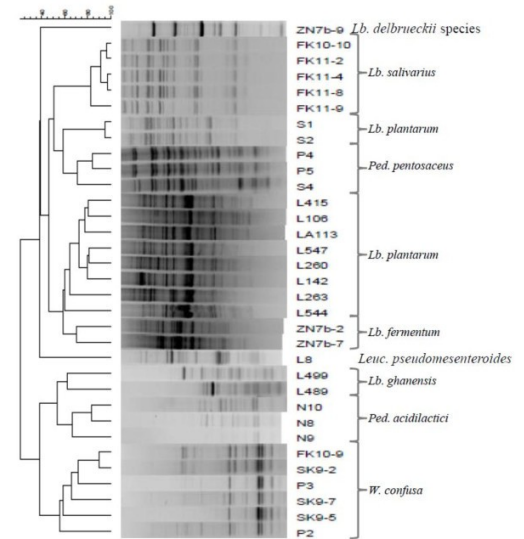


# Rep PCR

**Step 1** rep-PCR primers bind to many specific repetitive sequences interspersed throughout the genome. Multiple Fragments of various lengths are amplified.

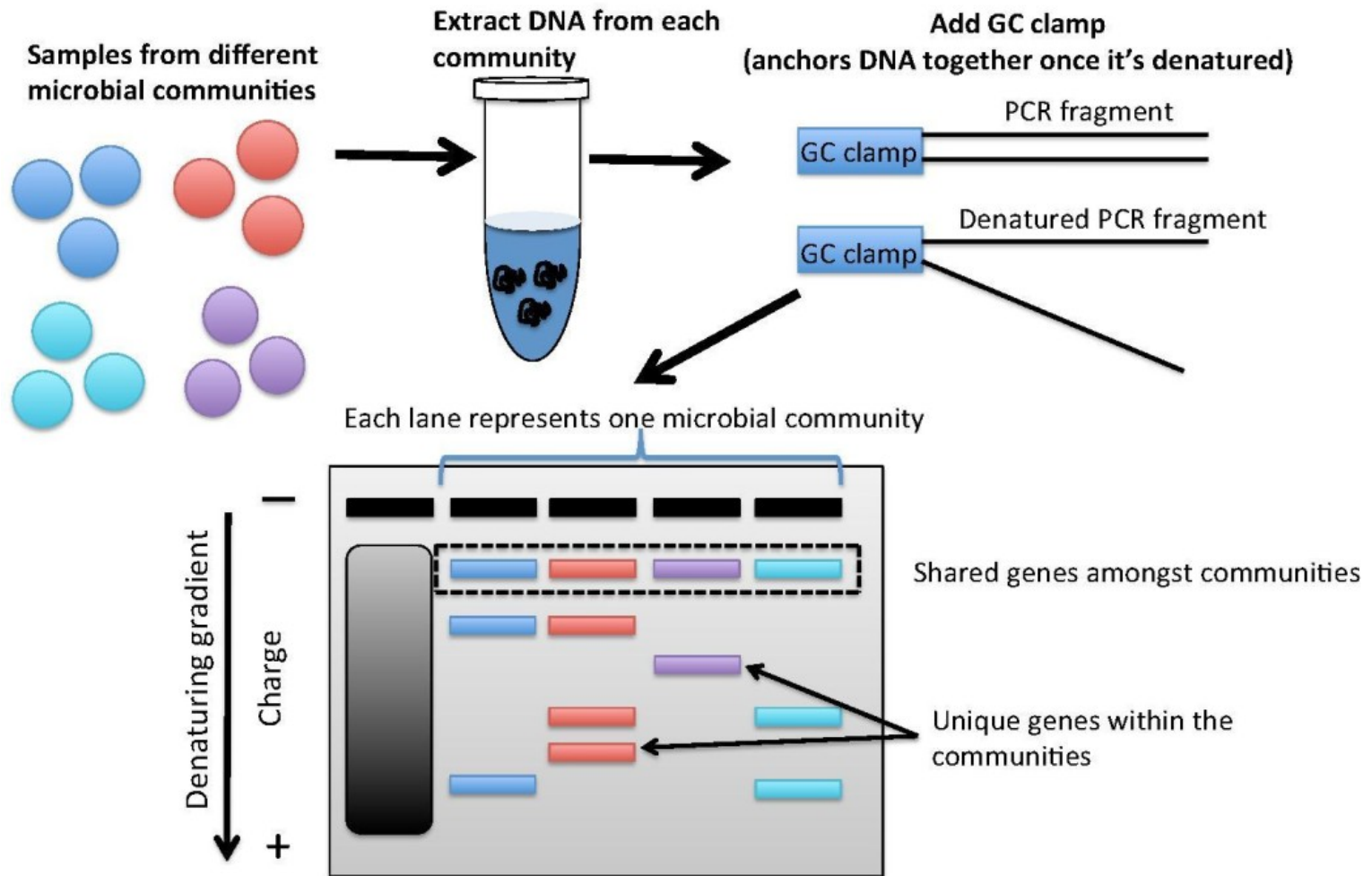


**Step 2** Fragments can be separated by size and charge. A unique rep-PCR fingerprint profile is created containing multiple bands of varying sizes and intensities.



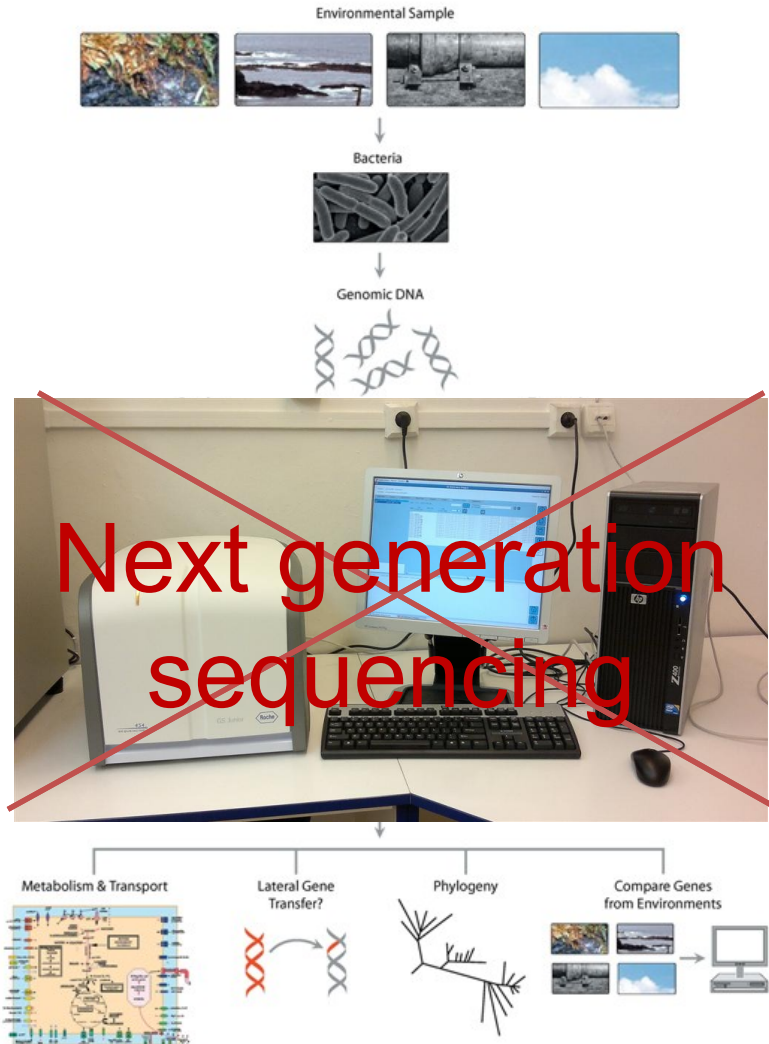
# DGGE

## DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis





# Metagenomika - sekvenace

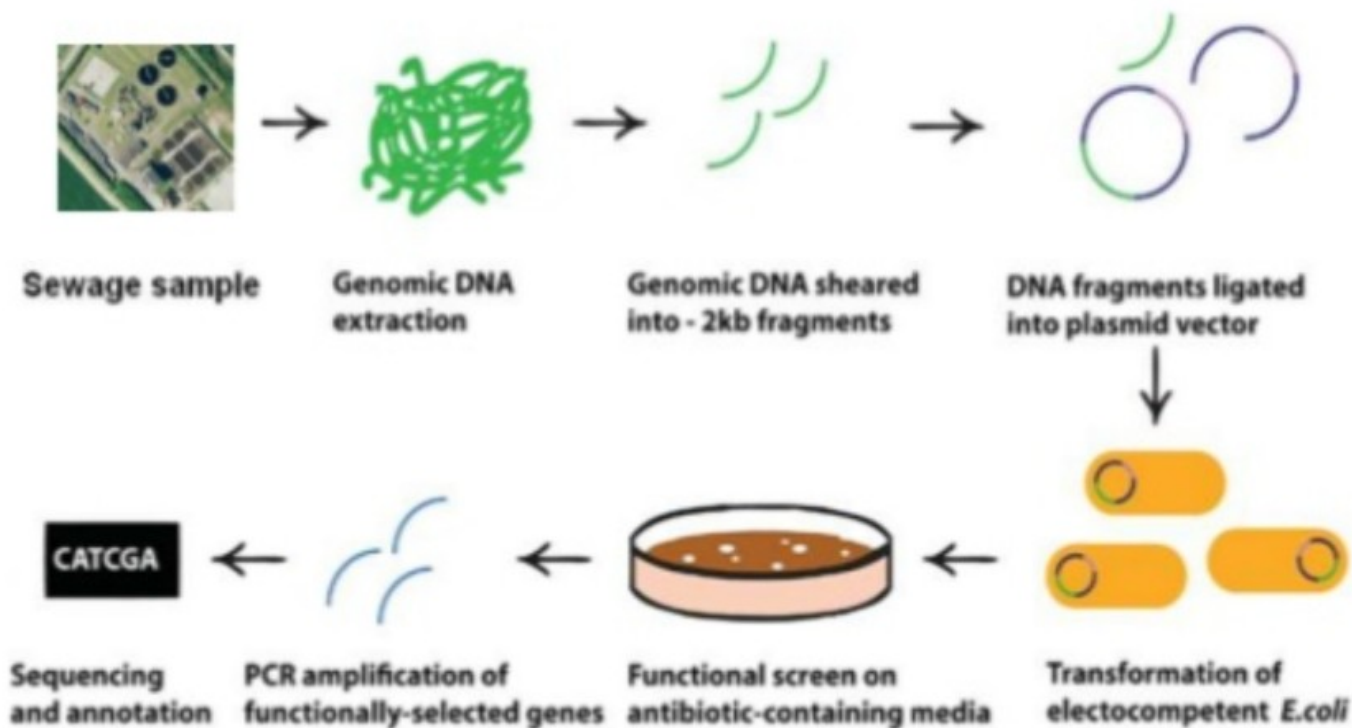


- Dva hlavní přístupy
  - Targeted sequencing  
Sekvenování specifických genů (16S rRNA) a seskupení vzniklých sekvencí do fylogenetického vztahu
  - Metagenomové sekvenování  
Náhodně sekvenované úseky DNA (nebo RNA) a porovnání vzniklých sekvencí v NCBI databázi na základně podobnosti s referenční sekvencí.



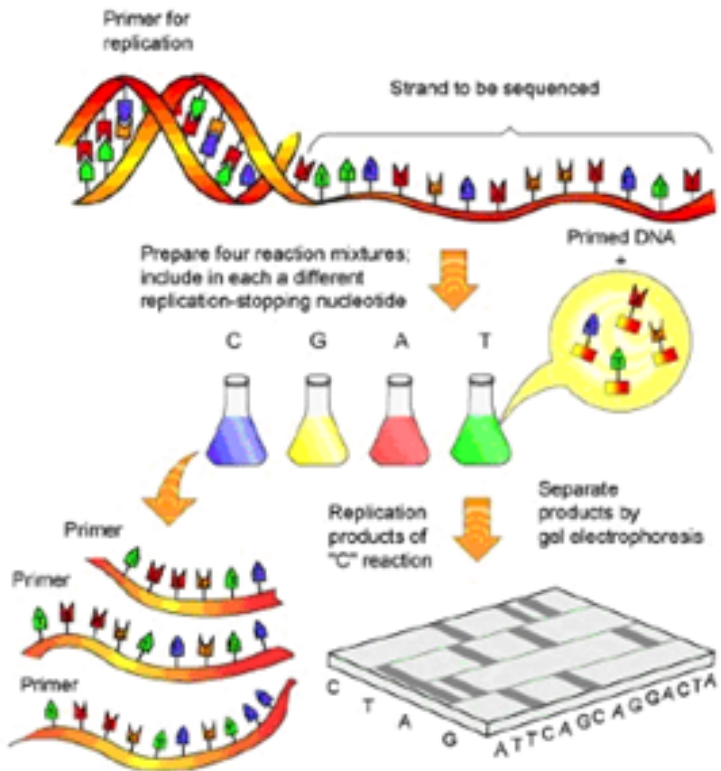
# Hunting novel antibiotic resistance genes

## Functional metagenomics

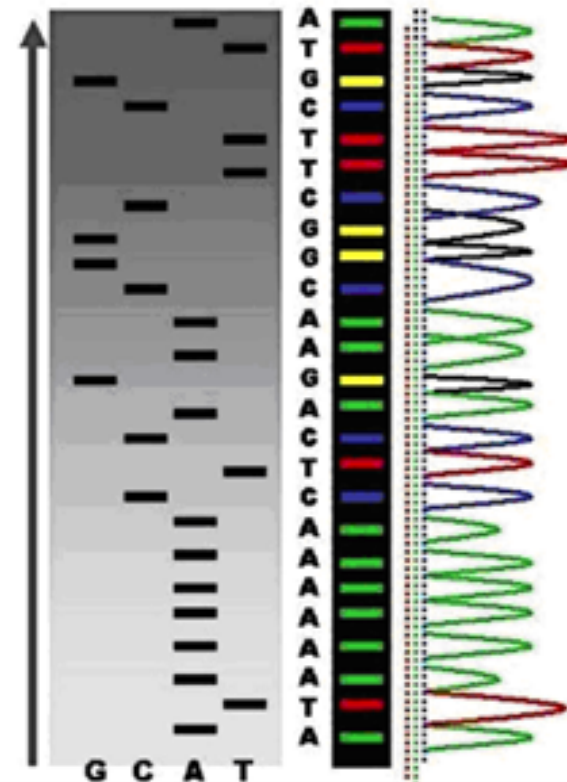


# Sangerovo sekvenování

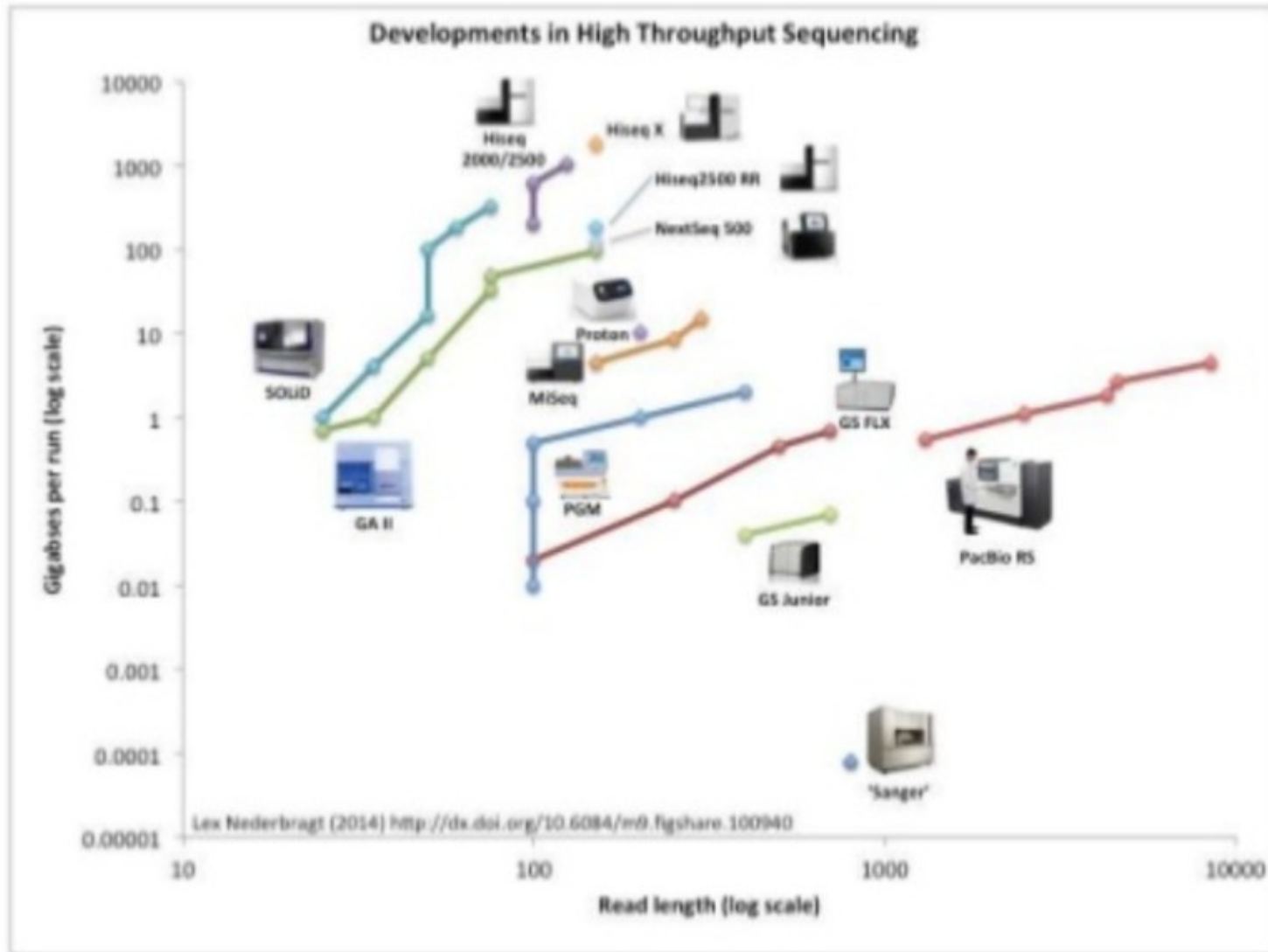
## Sequencing by capillary electrophoresis



Fred Sanger+Applied Biosystems



# Sekvenování nové generace



Newest Illumina HiSeq X 10 > 1 Tb of sequence data