

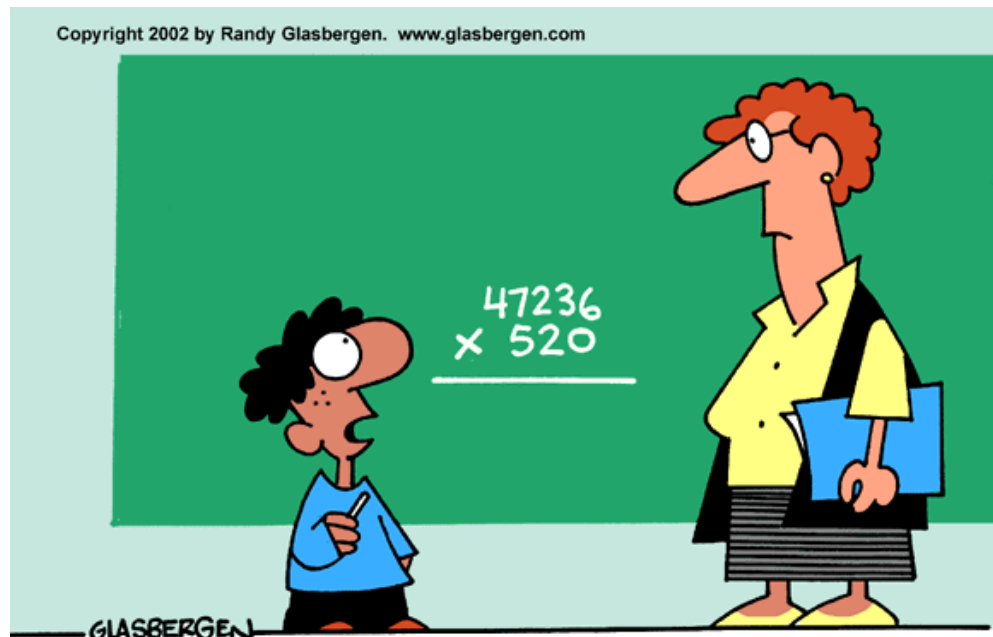
Metagenomika

Úvod

Petra Vídeňská, Ph.D.

Hodnocení:

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

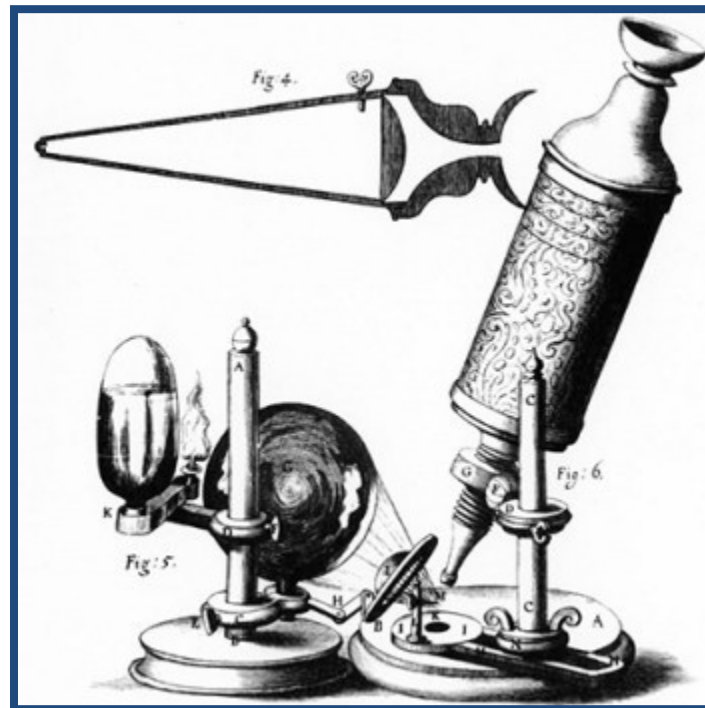


"AREN'T THERE ENOUGH PROBLEMS IN THE WORLD ALREADY?"

Osnova přednášek:

Datum	Téma
20.2.2018	Úvod do metagenomiky
27.2.2018	Střevní mikrobiom
6.3.2018	Sekvenování druhé generace, principy 454, Illumina, Ion Torrent
13.3.2018	Principy Minion, PacBio, prohlídka laboratoří
20.3.2018	Odběry vzorků, izolace, příprava knihoven 16S rRNA
27.3.2018	Celometagenomové sekvenování, sekvenace eukaryot a virů
3.4.2018	Vyhodnocování sekvenací
10.4.2018	Metatranskriptomika, Metabolomika
17.4.2018	Mikrobiom vody a půdy, Metagenomika v klinické praxi
24.4.2018	Prezentace
1.5.2018	Svátek
8.5.2018	Svátek
16.5.2018	Prezentace, ústní zkouška

Historie



První pozorování mikroorganismů

Hippocrates –
epidemiologické
pozorování

1676
Antonio van Leeuwenhoek
První pozorování mikroorganismů



<https://americangallery20th.files.wordpress.com/2012/09/antonie-von-leeuwenhoek.jpg>



<http://sukirgenk.dvrlists.com/van-leeuwenhoek-first-microscope.html>

Objevení původců chorob

Hippocrates –
epidemiologické
pozorování

Jenner – vakc
(plané neštý

Pasteur – par
vakcíny

Listeur – antiseptise v
chirurgii

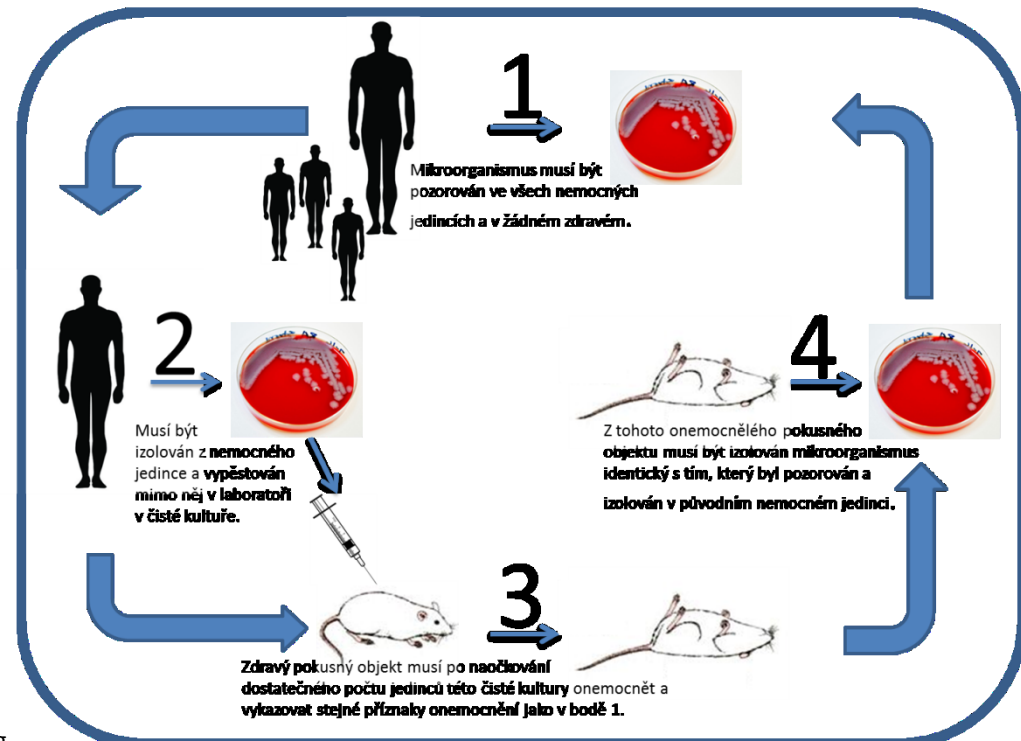
1676

Antonio van Leewenhoek
První pozorování
mikroorganismů

1843-1910

Robert Koch

Vypracování Kochových postulátů



Objev domény Archea

Hippocrates –
epidemiologické
pozorování

Jenner – vakr
(plané neštř)

Pasteur – par
vaccíny

Listeur – antisept
chirurgii

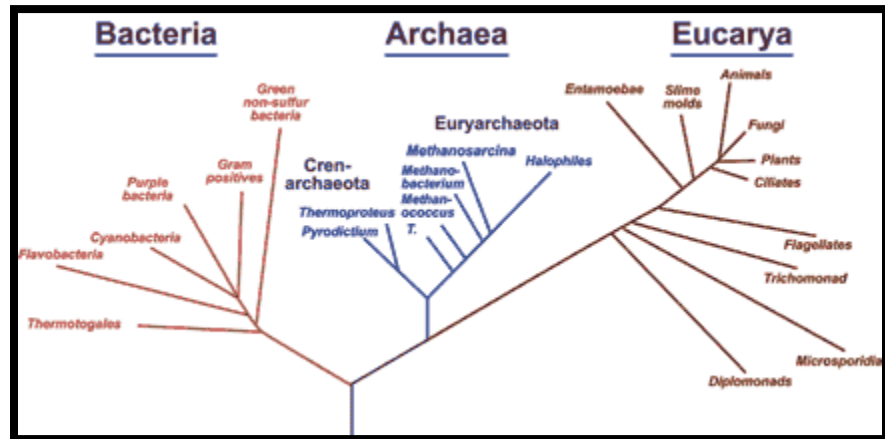
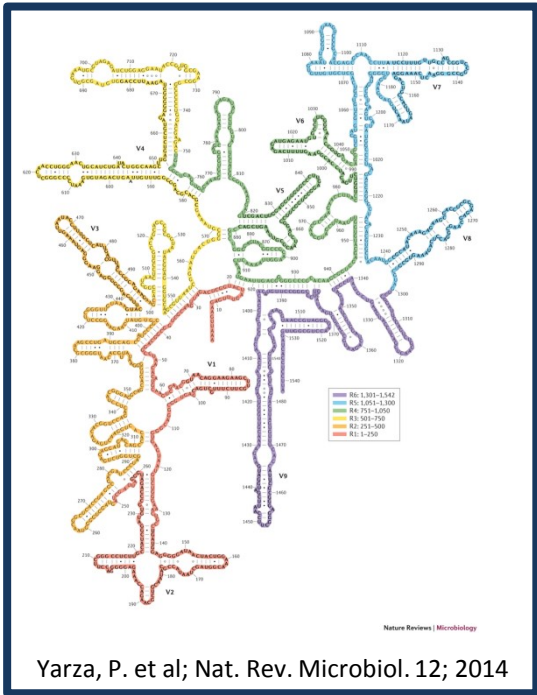
Watson a Crick –
struktura DNA

Sanger – sekvenace
DNA

1676
Antonio van Leewenhoek
První pozorování
mikroorganismů

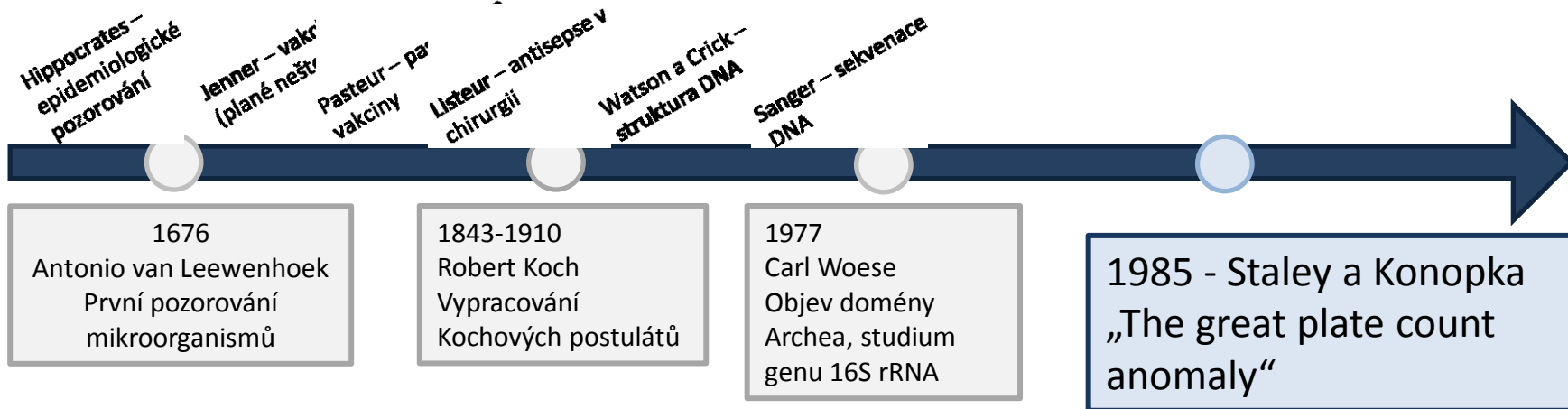
1843-1910
Robert Koch
Vypracování
Kochových postulátů

1977 - Carl Woese
Objev domény Archea, studium
genů 16S rRNA



V 80. letech – 12 kmenů bakterií, každý s kultivovatelným reprezentantem
Nyní: více než 100 kmenů, 2/3 bez kultivovatelného reprezentanta

Nekultivovatelné mikroorganismy



Ann. Rev. Microbiol. 1985, 39:321-46
Copyright © 1985 by Annual Reviews Inc. All rights reserved

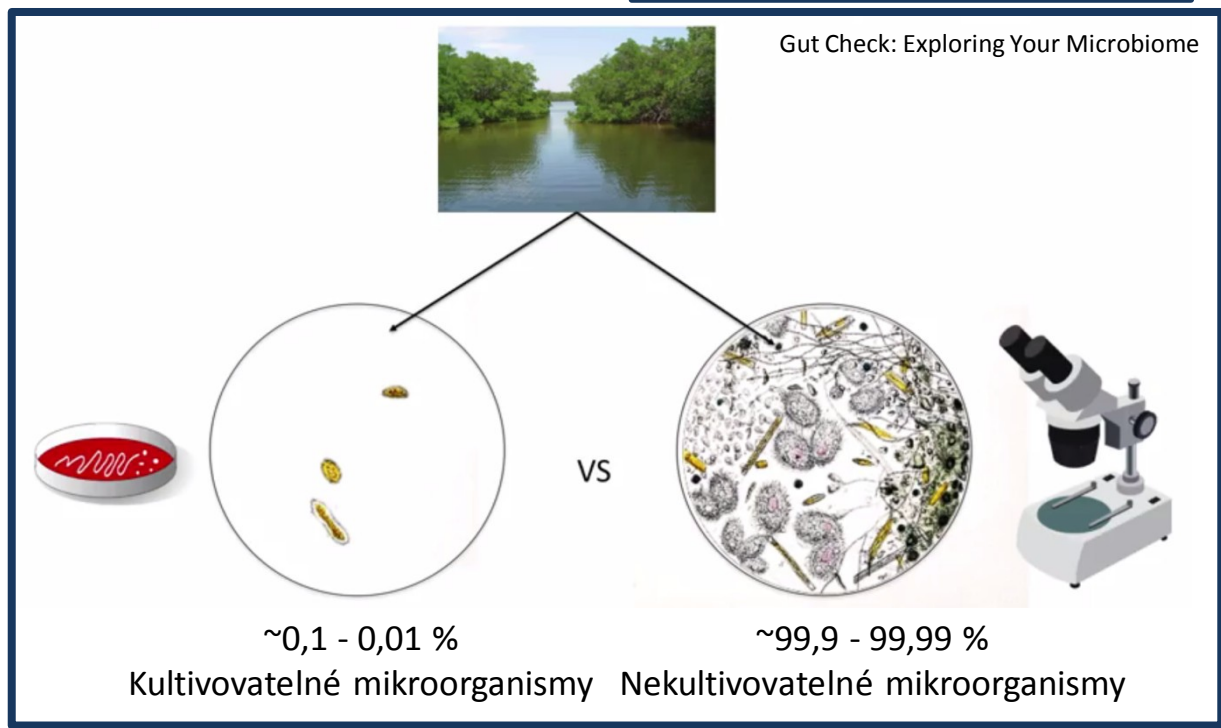
MEASUREMENT OF IN SITU ACTIVITIES OF NONPHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS IN AQUATIC AND TERRESTRIAL HABITATS

James T. Staley
Department of Microbiology and Immunology, University of Washington, Seattle, Washington 98195

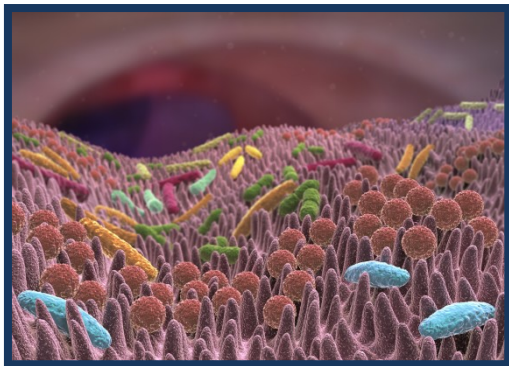
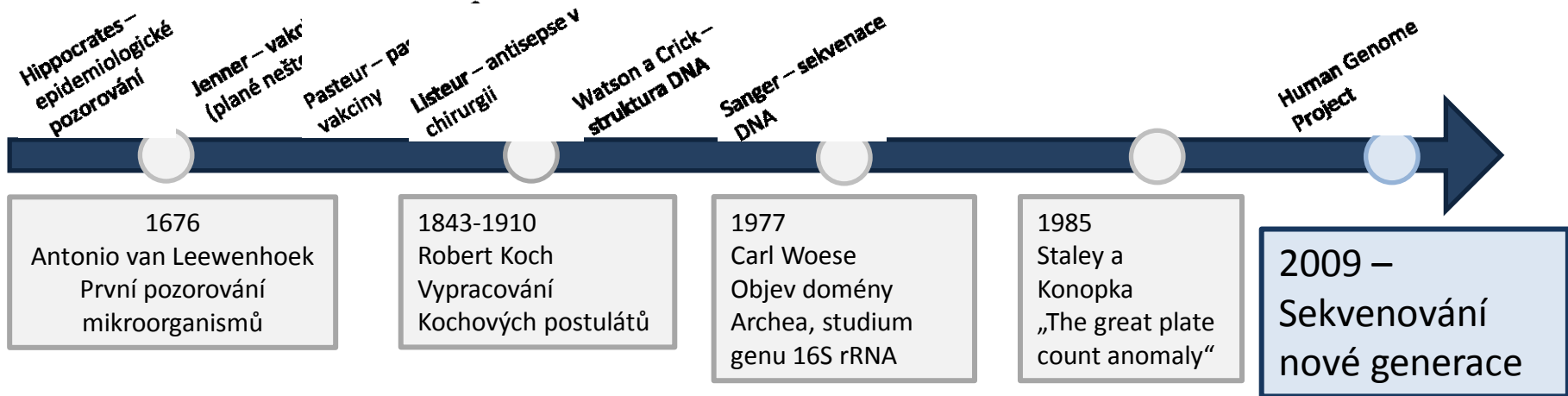
Allan Konopka
Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907

CONTENTS

INTRODUCTION	321
AUTECOLOGY	322
<i>Techniques Used in Assessment of Autecological Activity</i>	323
<i>Applications of Techniques Used in Assessment of Autecological Activity</i>	324
SYNECOLOGY	329
<i>Problems in Interpreting the Measurement</i>	329
<i>Radiosotopic Methods</i>	332
<i>Measurement of Cell Division</i>	341
<i>Comparisons Between Methods</i>	343



Nové technologie



Miliony až miliardy sekvencí najednou



Možnost studia i nekultivovatelných mikroorganismů

Mikrobiom = soubor mikroorganismů

Mikroorganismus – jednobuněčný organismus pozorovatelný pouze pod mikroskopem

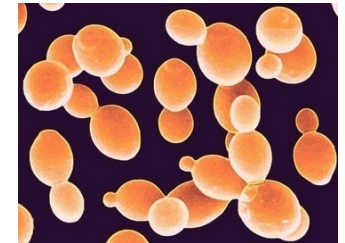
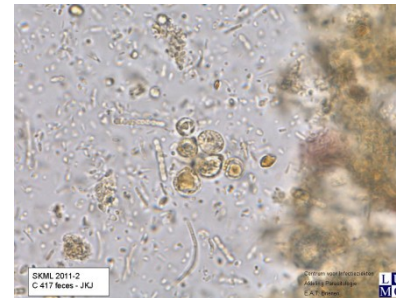
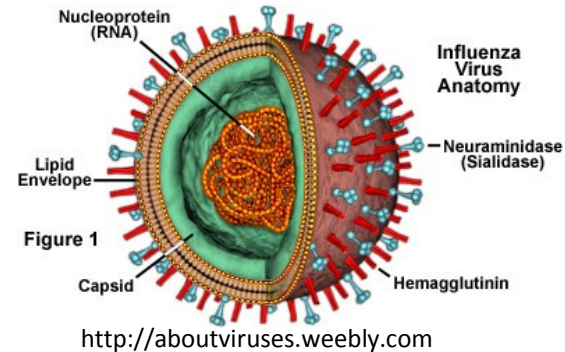
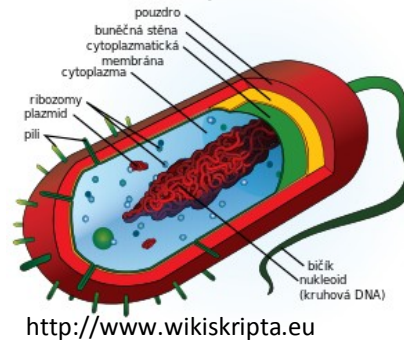
– **Bakterie**

– Viry

– Plísně

– Kvasinky

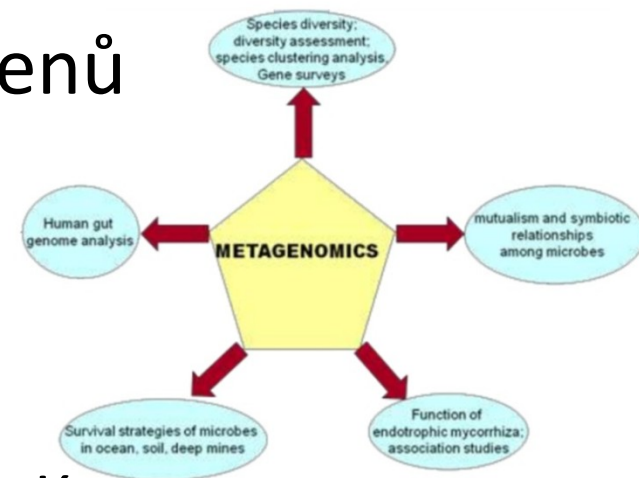
– Řasy a prvoci



Patogenní bakterie – bakterie způsobující onemocnění

Výzkum bakterií

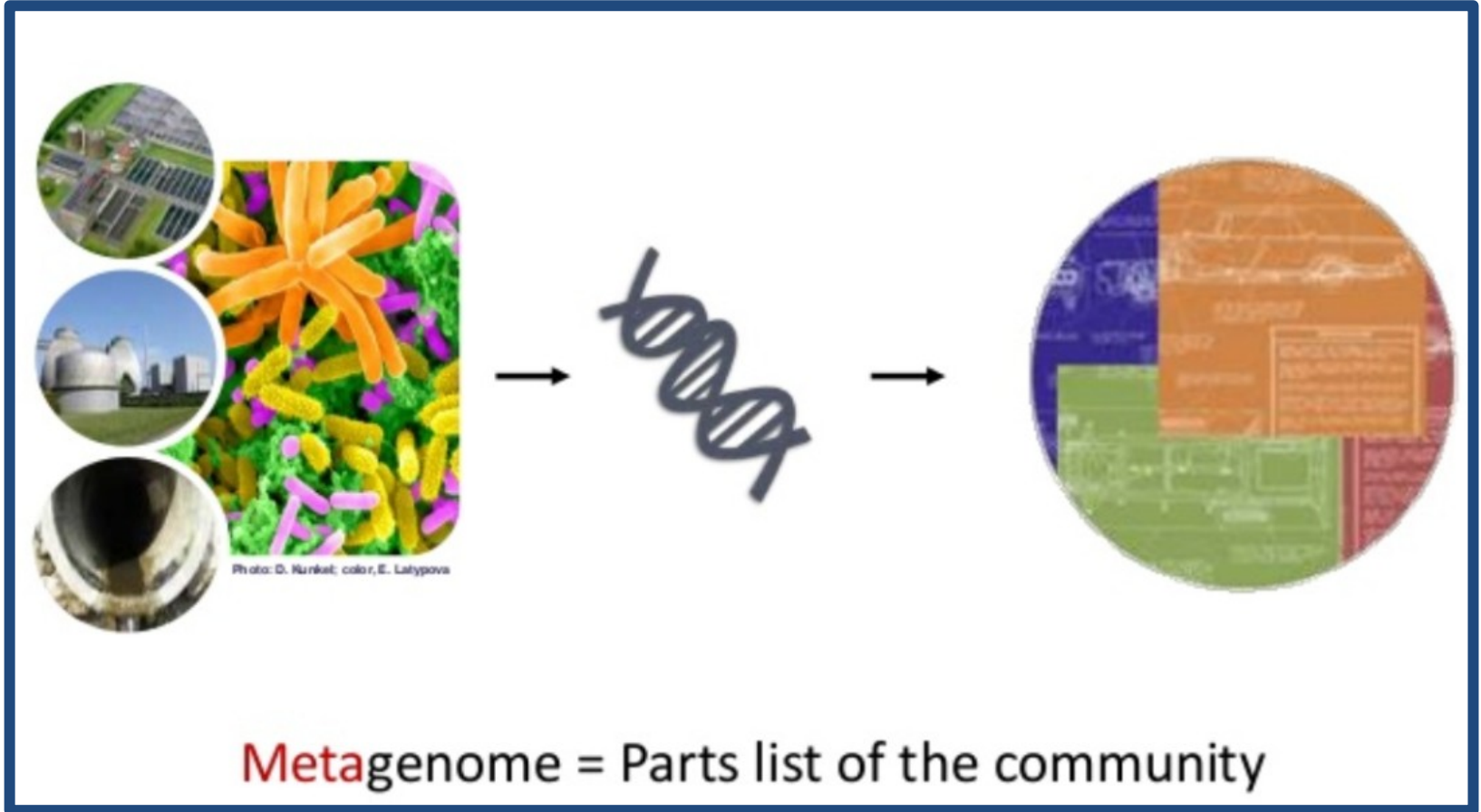
- Na světě je cca $4-6 \times 10^{30}$ prokaryot
- Více než 99,9 bakterií je nekultivovatelných
- V databázi více než 1 mil. genů
- Nové přístupy – objev nových genů
 - ATB
 - Enzymy
 - Léčiva
 - Degradují kontaminanty v prostředí



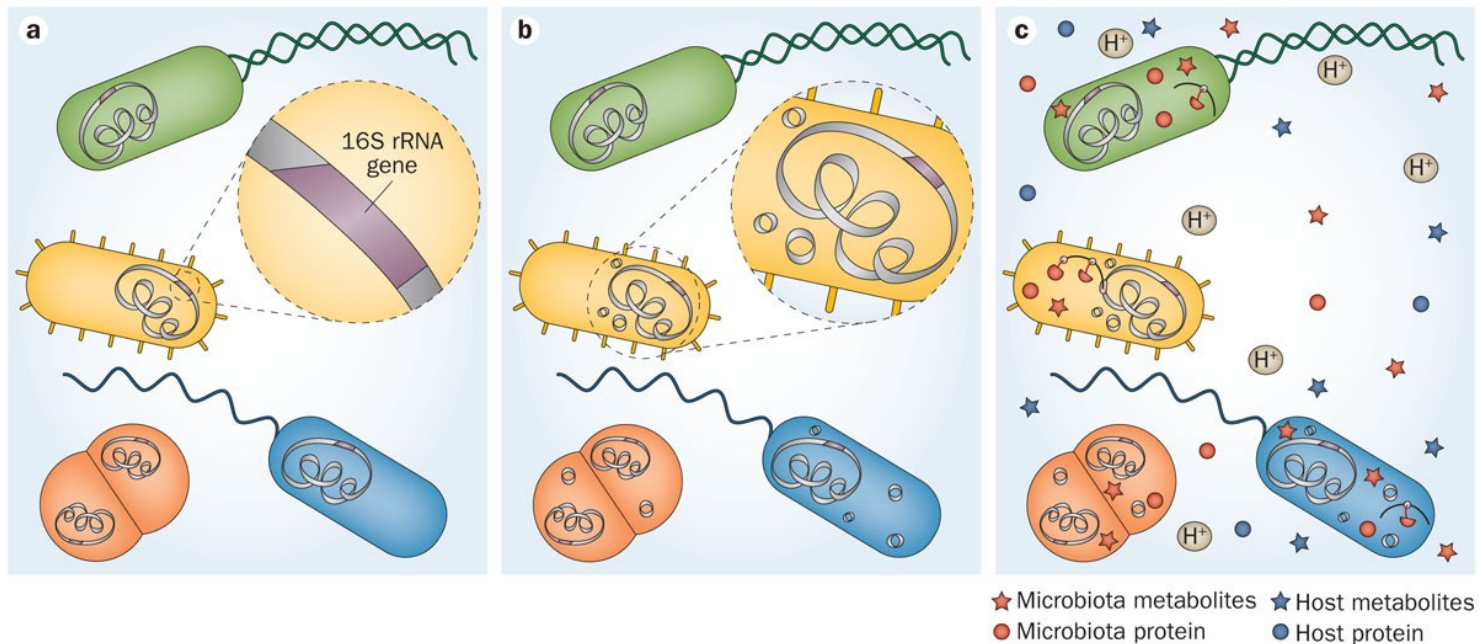
Definice metagenomiky

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



Mikrobiom 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

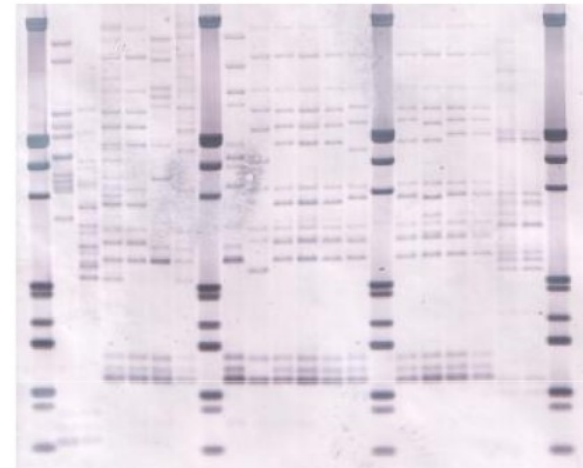
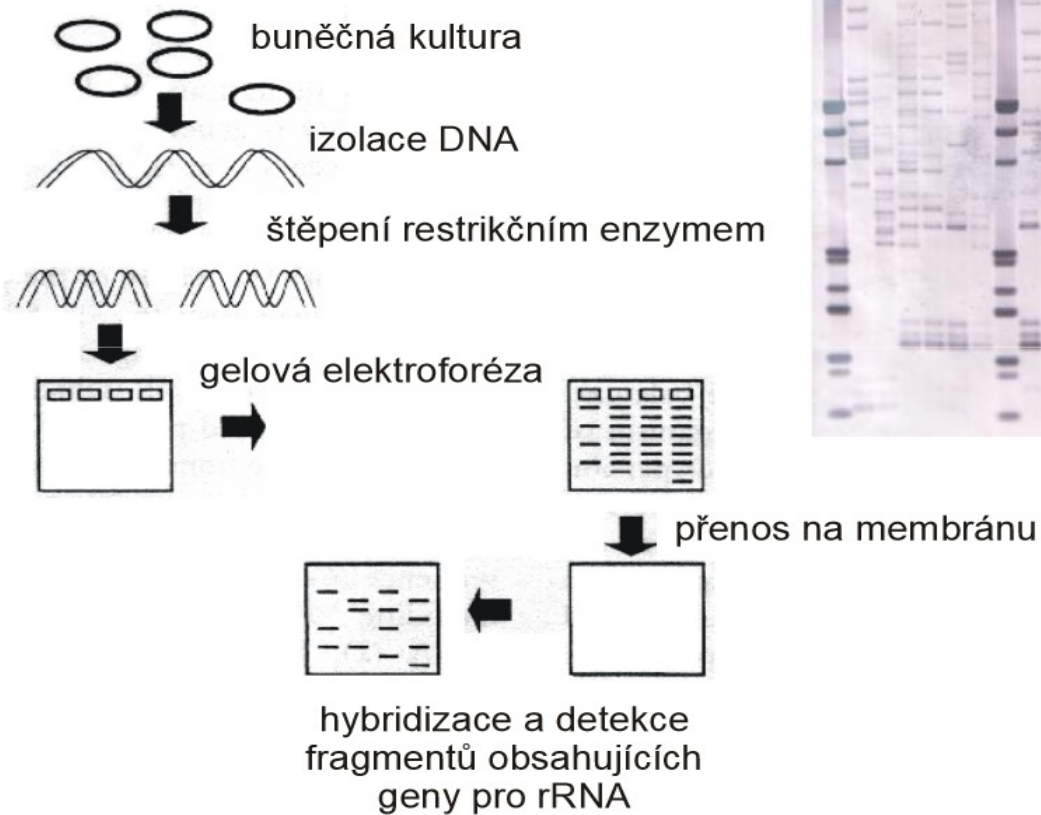
Výzkum mikrobiomu- minulost

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

**Molekulární
techniky – i
nekultivovatelné
mikroorganismy!**

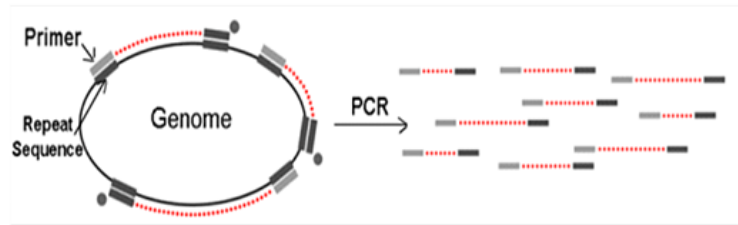
Ribotypizace

manuální ribotypizace

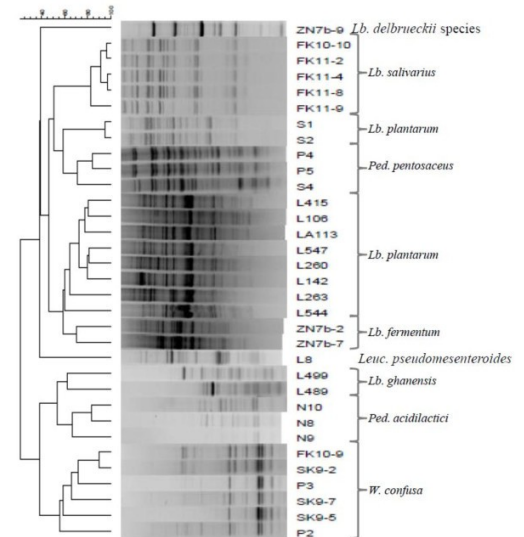
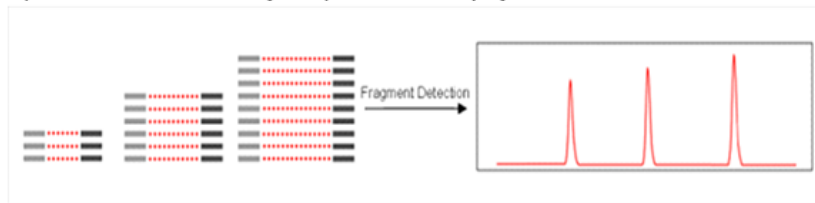


Rep PCR

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

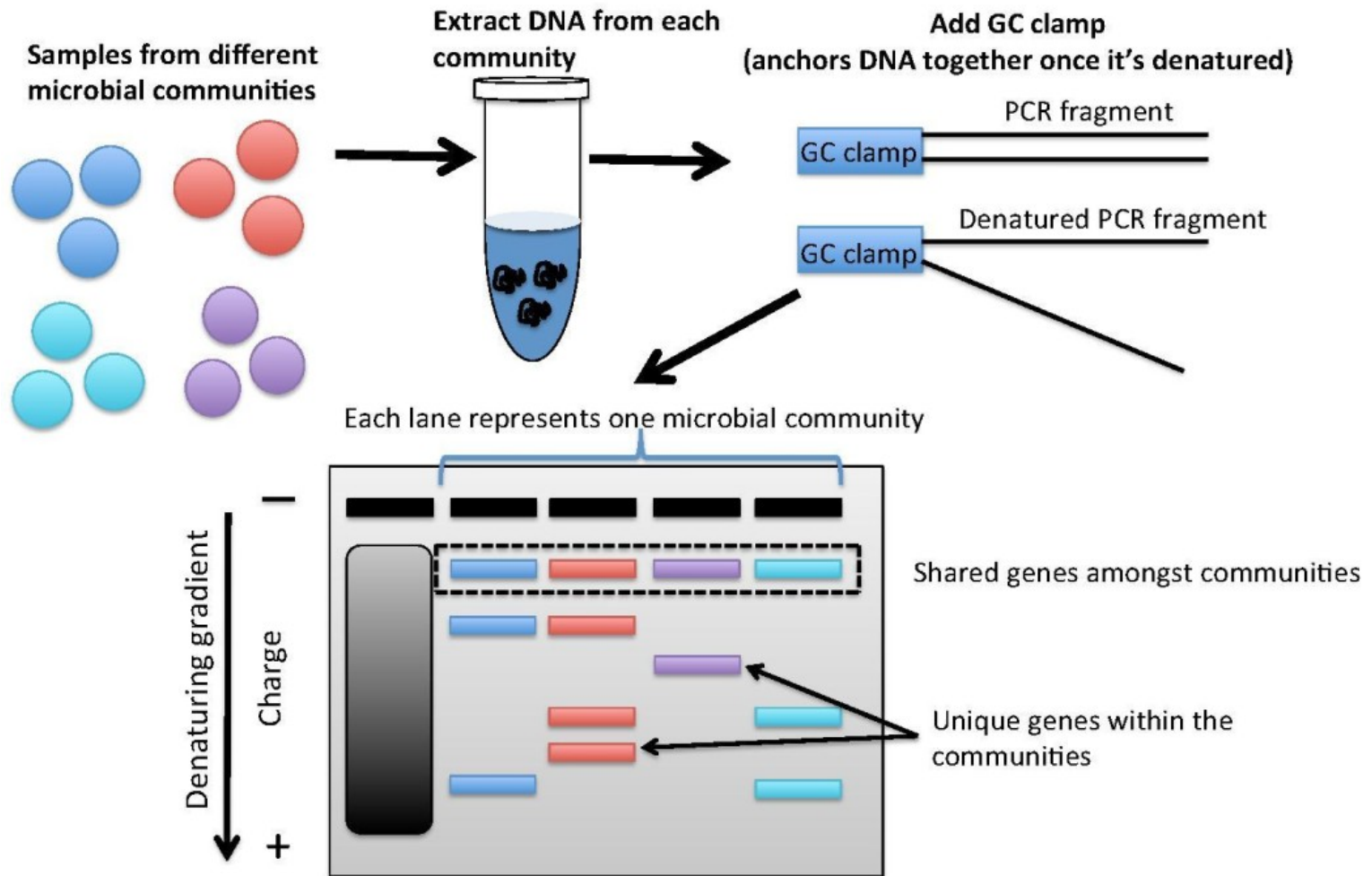


Step 2 Fragments can be separated by size and charge. A unique rep-PCR fingerprint profile is created containing multiple bands of varying sizes and intensities.



DGGE

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



Metagenomika - sekvenace

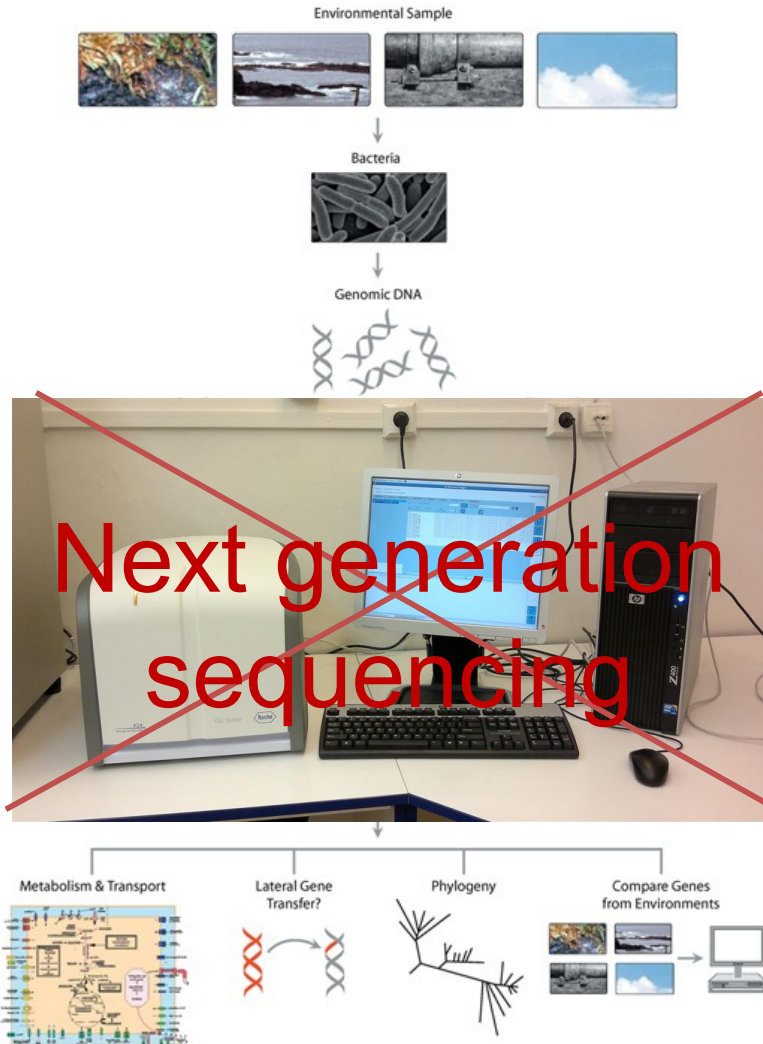
Dva hlavní přístupy

– Cílené sekvenování

Sekvenování specifických genů (16S rRNA) a seskupení vzniklých sekvencí do fylogenetického vztahu

– (Celo)Metagenomové sekvenování

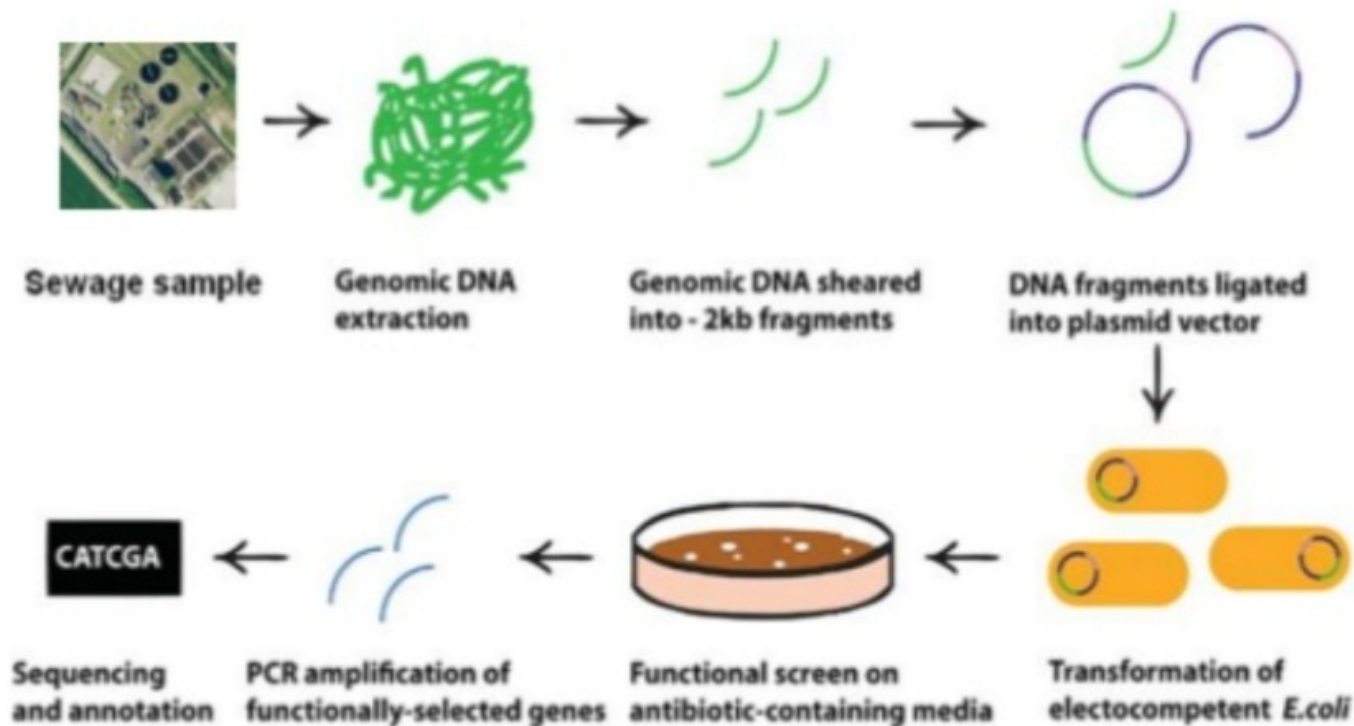
Náhodně sekvenované úseky DNA (nebo RNA) a porovnání vzniklých sekvencí v NCBI databázi na základně podobnosti s referenční sekvencí.



Funkční metagenomika

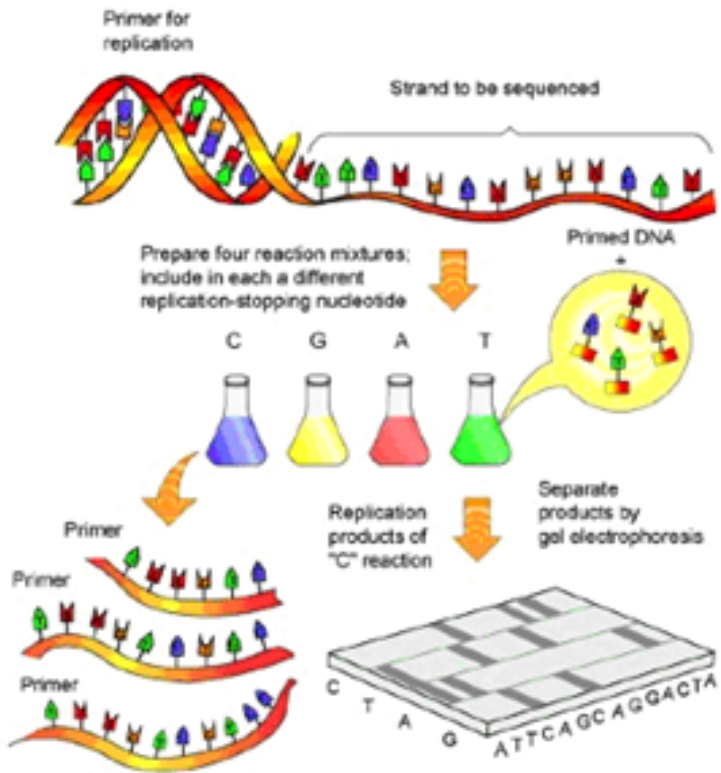
Hunting novel antibiotic resistance genes

Functional metagenomics

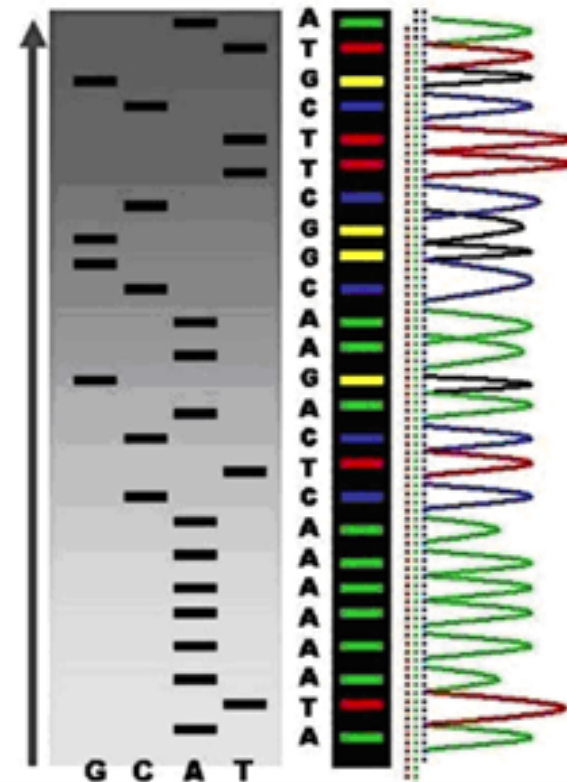


Sangerovo sekvenování

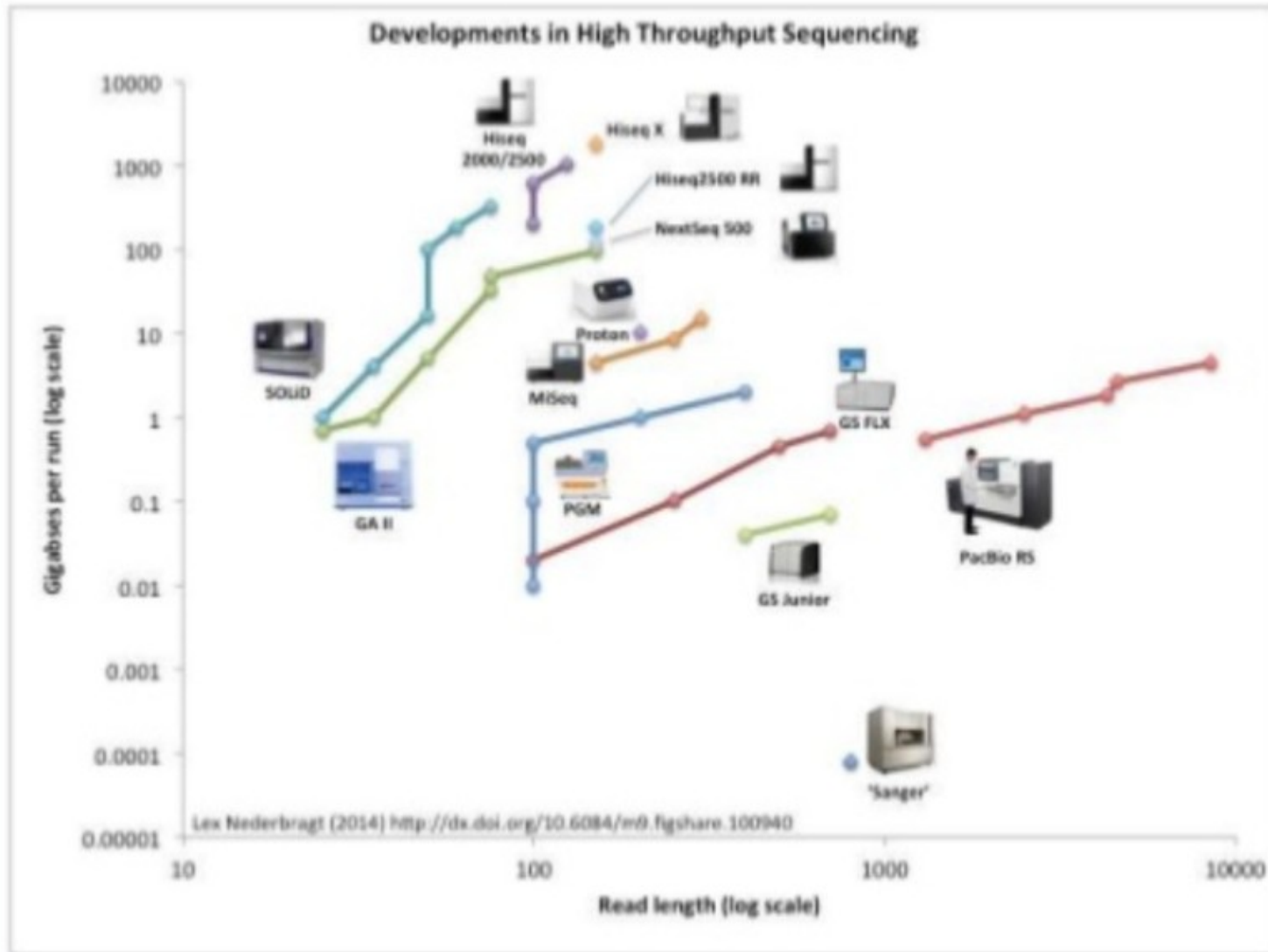
Sequencing by capillary electrophoresis



Fred Sanger+Applied Biosystems



Sekvenování nové generace



Newest Illumina HiSeq X 10 > 1 Tb of sequence data