

Metagenomika

Nový obor

Metagenomika:

- aplikace genomiky na nekultivovatelné mikroorganismy
- (Genomika: vědní oblast molekulární biologie zabývající se molekulární organizací a strukturou genomu)

Nekultivovatelných mikroorganismů

- Je většina (99%) a
- jsou potenciálním zdrojem průmyslově využitelných enzymů
- Geny kódující tyto enzymy můžeme klonovat, aniž bychom kultivovali organismus

Z určitého vzorku

- půda, gastrointestinální trakt, žaludek přežvýkavců, mraveniště termitů, vzorky sedimentů, mořská voda, nafta, potraviny, bioreaktory
- můžeme izolovat DNA (bez kultivace buněk) a tu analyzovat

Metagenom

- Izolované genomy (DNA) všech organismů
- v určitém vzorku prostředí
- v určité době

Postupy metagenomové analýzy

- Izolace DNA ze vzorků prostředí a její štěpení nukleázami
- Klonování DNA ve vhodném vektoru (plasmidy, kosmidy, BAC vektory)
- Transformace do *E. coli* a konstrukce **metagenomové banky (knihovny)**
- Sekvenční analýza klonů
- Vyhledávání v databázích – *in silico* analýza
- Funkční analýza klonů

Knihovna metagenomová

- Soubor klonovaných fragmentů připravených štěpením DNA izolované z určitého vzorku prostředí v určité době

Konstrukce a skríníng metagenomové knihovny

- Obr.

Rozlišení

- Metabolicky aktivní a neaktivní populace buněk
- S využitím radioisotopové metody SIP

Metoda DNA-SIP (stable isotope probing)

- Pro testování DNA s využitím stabilního izotopu (DNA-SIP)
- se používá pro identifikaci mikroorganismů, které využívají určitý zdroj uhlíku a živin a zabudovávají je do buněčné biomasy
- Umožňuje studovat metabolismus komunit v nejrůznějších prostředích (půda, voda)

DNA-SIP

- Po inkubaci polymikrobního vzorku prostředí se sloučeninou značenou stabilním isotopem (C^{13})
- se extrahuje nukleová kyselina
- a ta je podrobena ultracentrifugaci v hustotním gradientu CsCl, následné frakcionaci a separaci nukleových kyselin různých hustot (tj. z fyziologicky aktivních a neaktivních buněk).
- Značená a neznačená DNA se použije pro další molekulární charakterizaci characterization (fingerprinting, micročipy, klonování, metagenomová analýzy).

Značená a neznačená DNA

- se použije pro další molekulární charakterizaci (metagenomová analýza aj.)

K nabohacení genomové DNA lze využít

- Metodou amplifikace celého genomu s využitím Phi29 DNA polymeráza
- Jedná se o mnohočetnou amplifikaci s vytěsňováním řetězce

