

Sekvenační metody

Metody

Fenotypové:

Biotypizace

Serotypizace (aglutinace, precipitace)

Fagotypizace

Genotypové:

Analýza (restrikční) plazmidové DNA

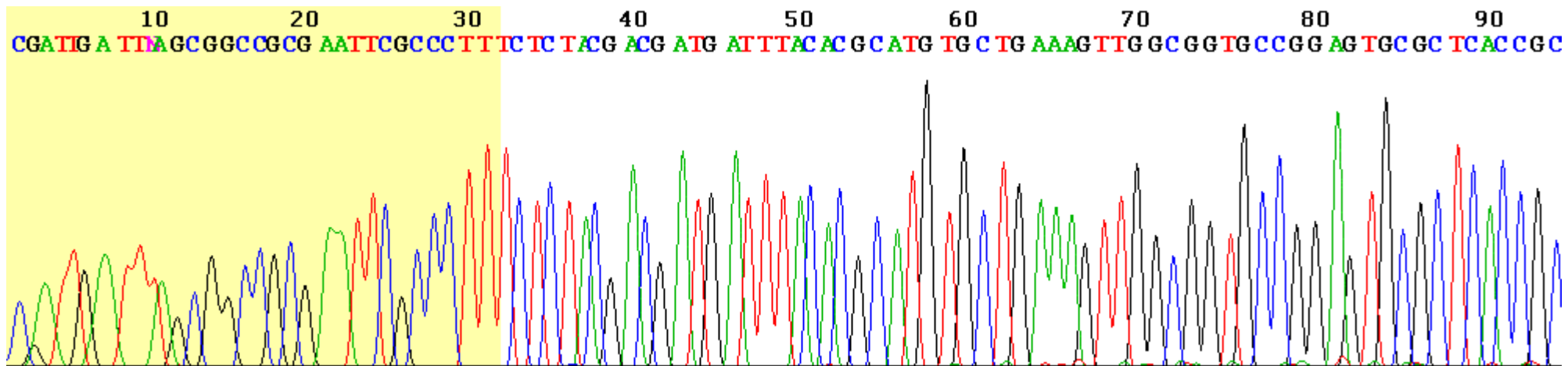
Restrikční analýza genomové DNA, hybridizace, ribotypitace

PFGE, PCR

Sekvenování DNA

Co je sekvenování DNA?

- **Sekvenování** je laboratorní metoda používaná k určení přesného pořadí nukleotidů (základních stavebních bloků) v molekule DNA. Nukleotidy jsou reprezentovány čtyřmi písmeny (A, T, C, G u DNA), která dohromady tvoří genetickou informaci organismu.

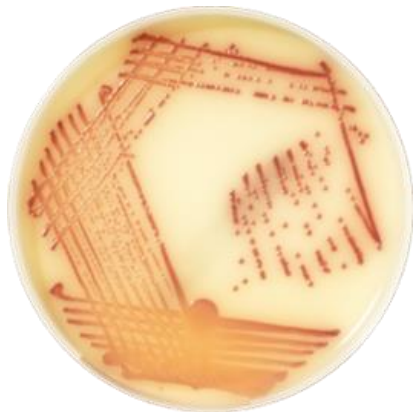


Co předchází vlastnímu sekvenování?



Celogenomové sekvenování (WGS)

- Sekvenuje celý genom organismu a poskytuje kompletní genetické informace
- vhodné pro identifikaci mutací, variací a struktury genomu



16S/18S rRNA sekvenování

- Zaměřuje se pouze na gen 16S/18S rRNA pro studium a identifikaci bakteriálních druhů
- Nejčastěji se používá pro identifikaci a taxonomickou klasifikaci bakteriálních komunit v prostředí



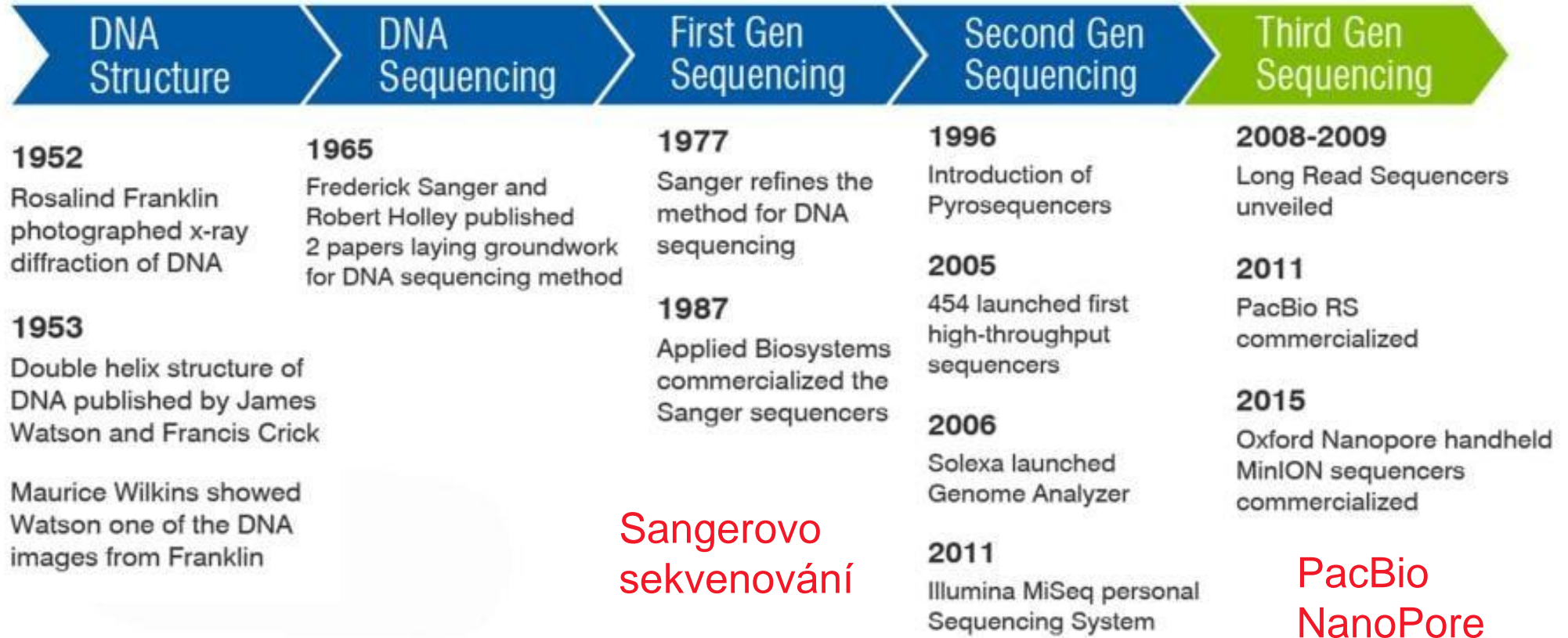
Shotgun metagenomové sekvenování

- Náhodně sekvenuje fragmenty DNA z celého genomu (nebo metagenomu), což umožňuje analýzu komplexních komunit všech organismů ve vzorku
- Používá se pro sekvenování komplexních vzorků, jako je například stolice, půda...(metagenomika), nebo pro detailní analýzu genomu jednotlivých organismů

Vývoj sekvenačních metod

- **Klasické sekvenování kapilární elektroforézou**
 - vyžaduje velký počet kopií vstupního materiálu DNA jako templát pro přípravu jednořetězců
- **Sekvenování nové generace**
 - jako templát slouží jediná molekula, která je amplifikována pro získání dostatečného signálu, produkuje **krátká** čtení
- **Sekvenování třetí generace**
 - jako templát slouží jediná molekula nevyužívá amplifikaci pro zvýšení signálu, produkuje **dlouhá** čtení

History of DNA Sequencing



Sangerovo
sekvenování

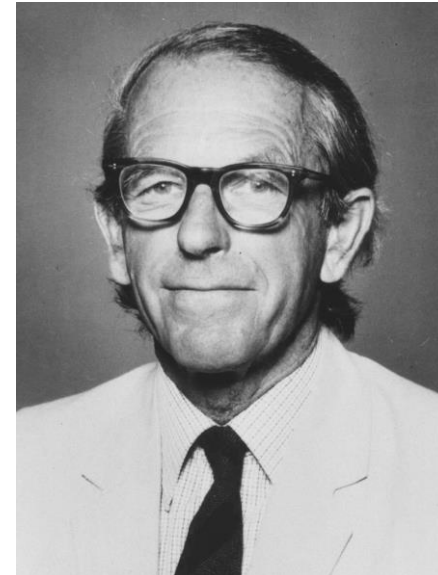
454 (pyrosekvenování)
SOLiD
IonTorrent
Illumina

PacBio
NanoPore

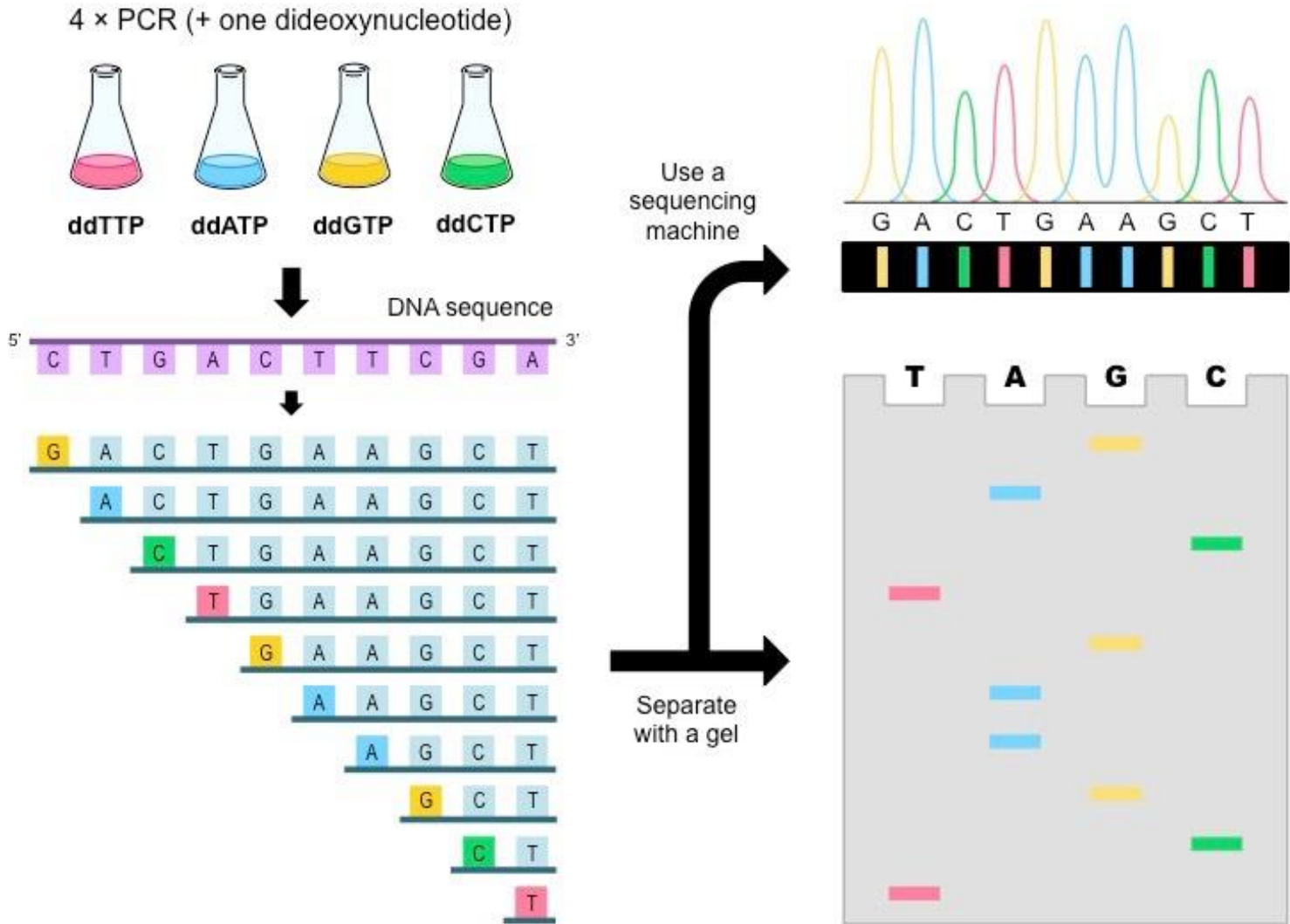
Sangerovo sekvenování

– 1970s – Sangerovo sekvenování (první generace)

- **Frederick Sanger** v roce 1977 vyvinul techniku sekvenování DNA
- Tato metoda využívala modifikované nukleotidy, které „zastavují“ proces syntézy DNA v určitých bodech, což umožňuje určit pořadí jednotlivých nukleotidů.
- **Nobelova cena za chemii (1958) – amino acid sequence of insulin**
- **Nobelova cena za chemii(1980) – dideoxy method of DNA sequencing**

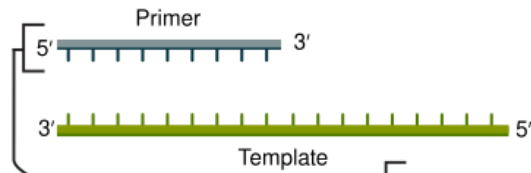


Sangerovo sekvenování



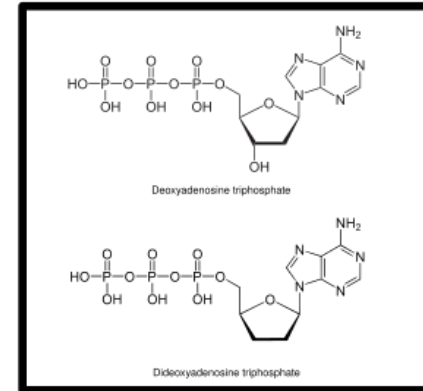
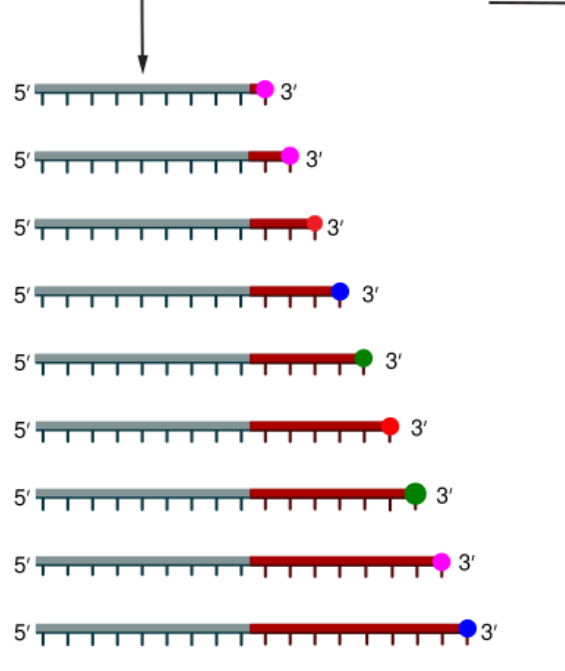
① Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)

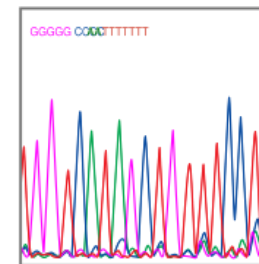
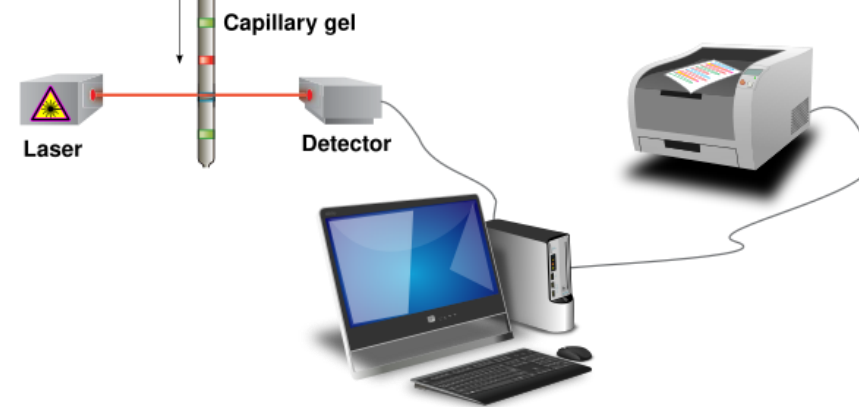


- ddNTPs
- ddTTP ●
- ddCTP ●
- ddATP ●
- ddGTP ●

② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



Chromatograph

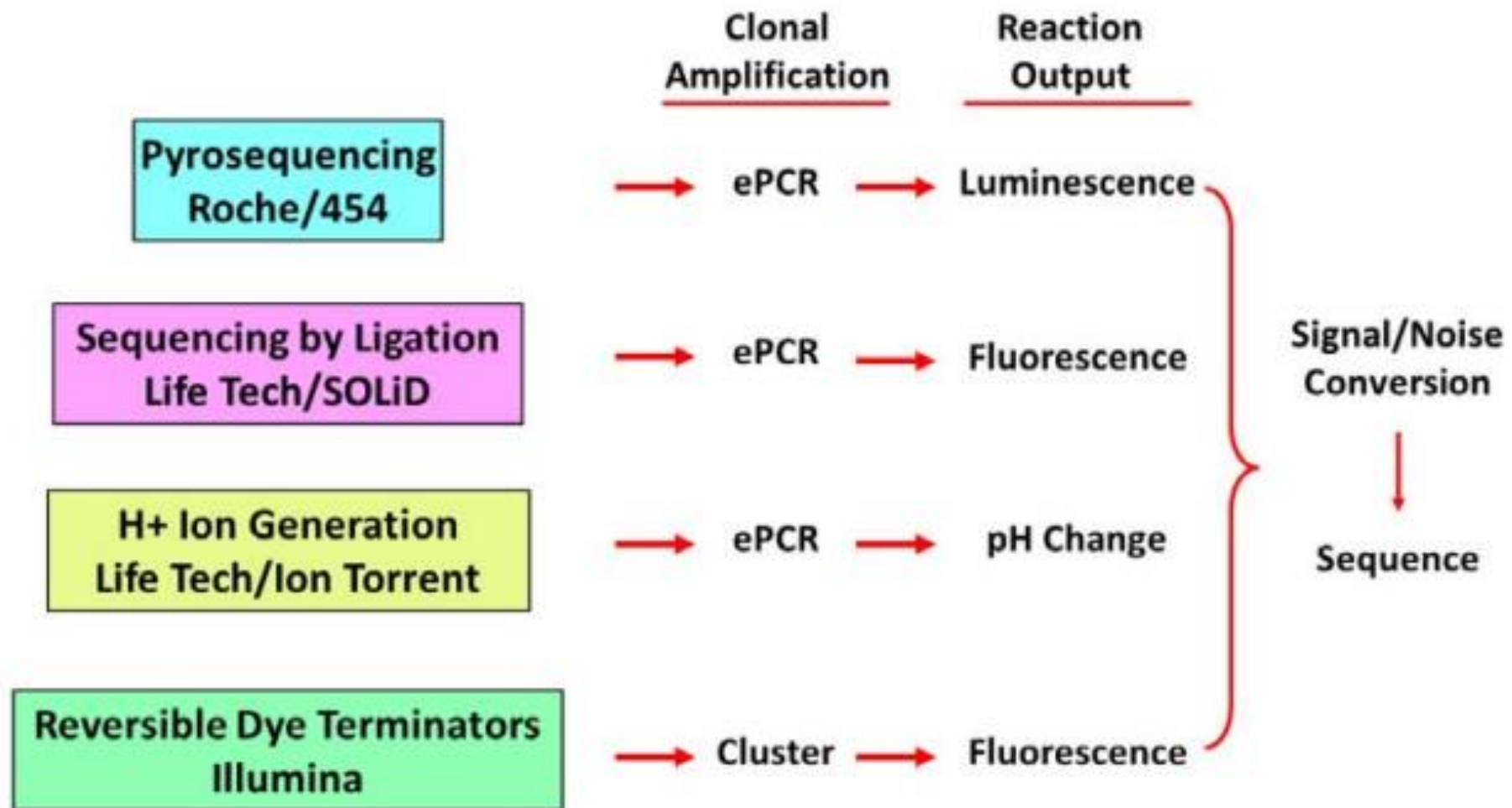
④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis

1990s – Projekt lidského genomu

- **Projekt lidského genomu**, který se zaměřil na sekvenování celého lidského genomu (asi 3 miliardy párů bází). Tento projekt trval přibližně 13 let a byl dokončen v roce 2003. Používalo se především Sangerovo sekvenování.
- Dokončení projektu znamenalo obrovský průlom v oblasti genetiky, otevřelo dveře pro studium genetiky nemocí a personalizovanou medicínu.

2000s – Sekvenování druhé generace (NGS, Next-generation sequencing)

- **Next-generation sequencing (NGS)** metody, které umožnily paralelní sekvenování tisíců až milionů fragmentů DNA najednou. NGS dramaticky zrychlilo proces a snížilo náklady.
- Jako templát slouží jediná molekula, která je amplifikována pro získání dostatečného signálu, produkuje **krátká** čtení



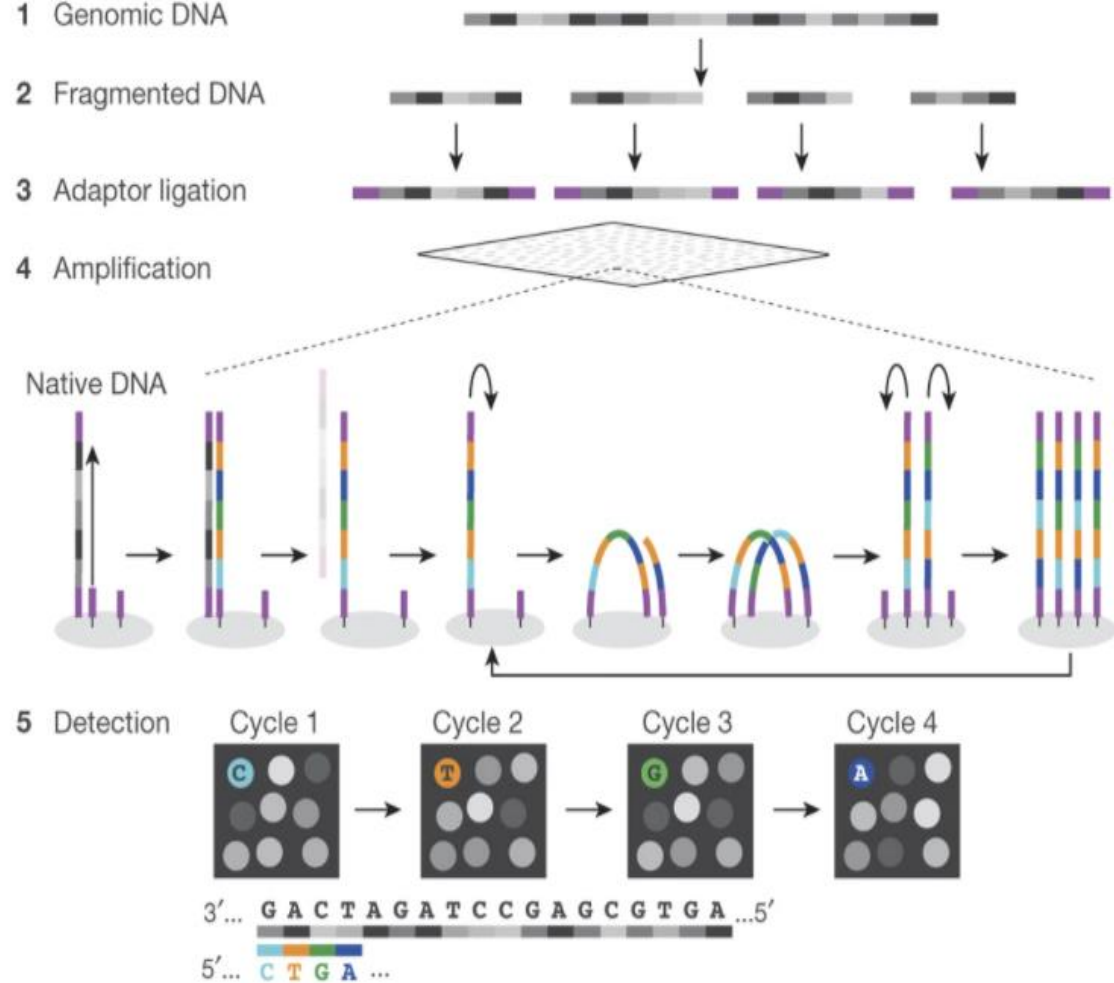
Illumina

- **Illumina** je jednou z nejvýznamnějších technologií v oblasti NGS
Umožňuje sekvenovat velké množství vzorků DNA mnohem rychleji a levněji, což se využívá ve výzkumu, diagnostice a studiu různých organismů.
- Sekvenování syntézou na čipu (flow cell), které využívá strategii reverzibilních terminátorů



Illumina

A (Illumina sequencing)





iSeq 100



MiniSeq



MiSeq Series



NextSeq 550 Series



NextSeq 1000 & 2000



NovaSeq 6000 Series



NovaSeq X Series



2010s – Sekvenování třetí generace

- Třetí generace se zaměřuje na sekvenování delších fragmentů DNA a umožňuje číst delší úseky bez nutnosti rozřezání DNA na krátké kousky.
- Jako templát slouží jediná molekula. Nevyužívá amplifikace za účelem zvýšení signálu, produkuje dlouhá čtení
- Potřeba malého množství vzorku
- Bez rizika kontaminace
- Analýza poškozených NK (archaické, muzejní, forenzní)

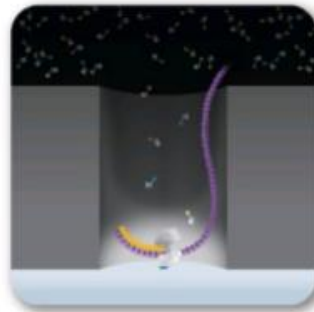
PacBio (Pacific Biosciences) - SMRT

- Kružnicové kontinuální sekvenování
- SMRT templát obsahuje dvouřetězcovou oblast (inzert) na obou koncích uzavřenou jednořetězcovými vlásenkovými smyčkami

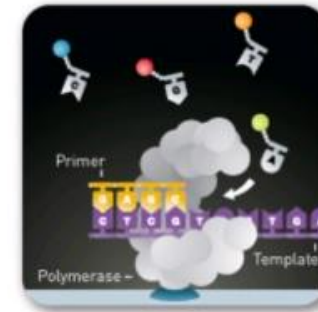
SMRT® Cells



Zero-Mode Waveguides



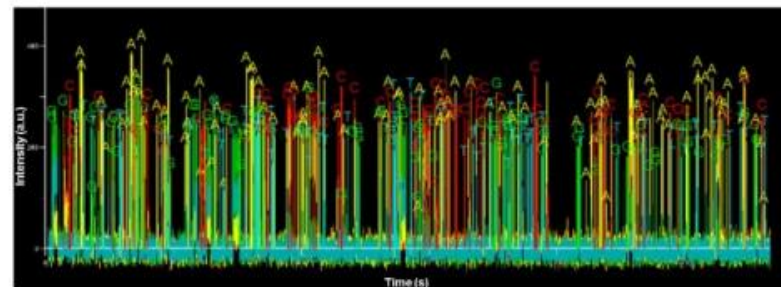
Phospholinked Nucleotides



PacBio® RS II

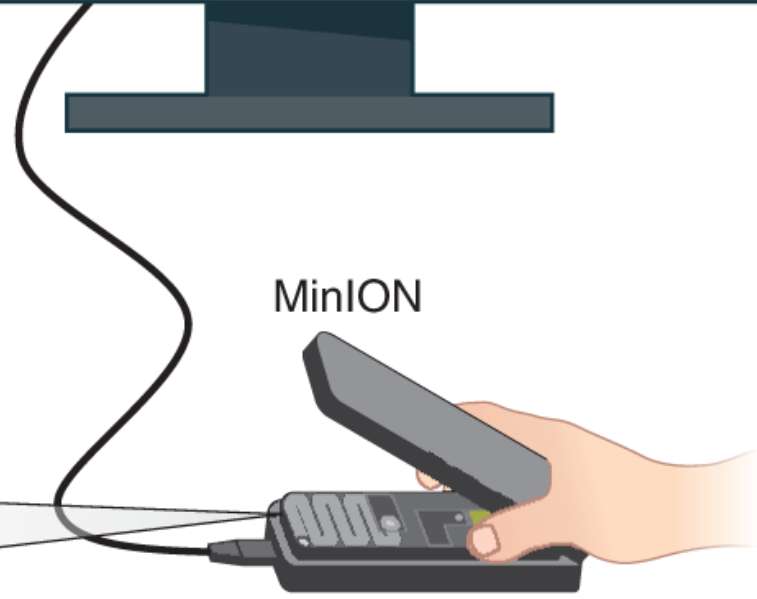
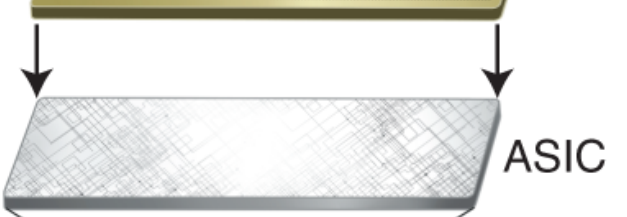
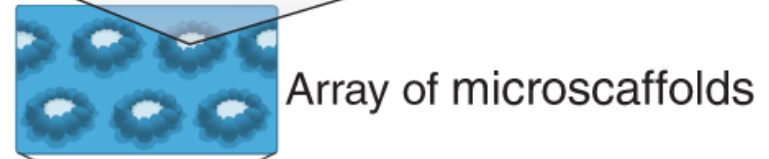
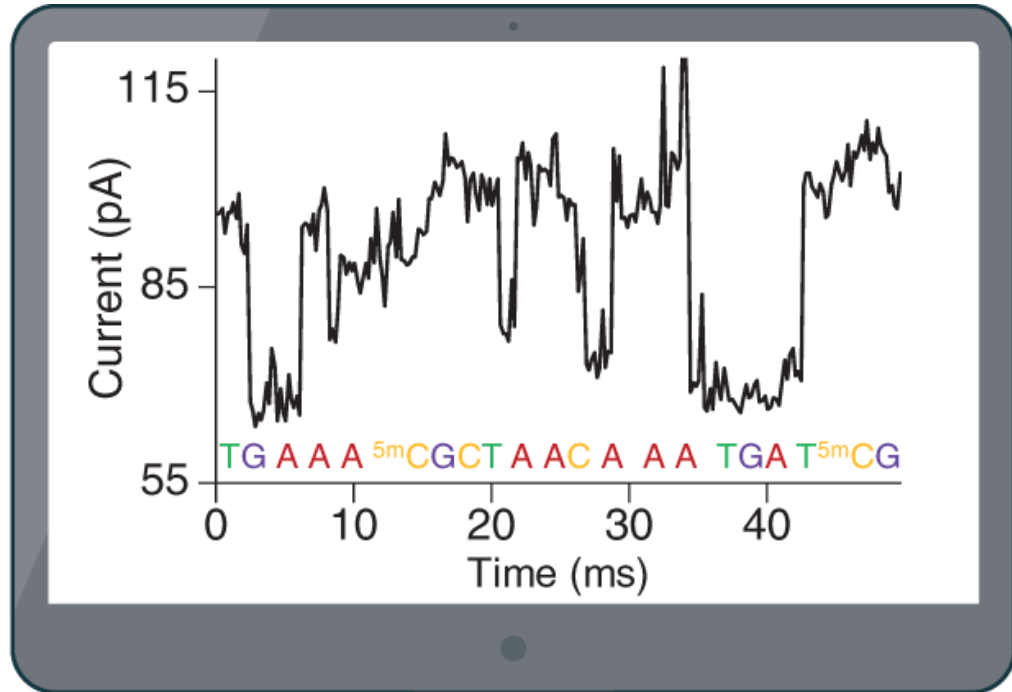
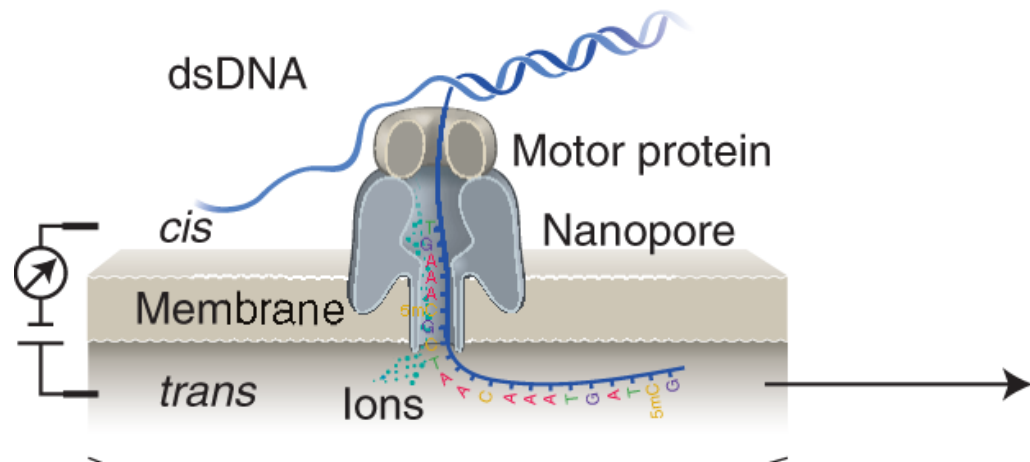


Trace



Nanopore

- Využívá měření elektrického potenciálu přes membránu
- Elektricky odolná polymerní membrána (syntetická lipidová dvouvrstva) s transmembránovým porózním proteinem
- Nanopore je ponořený ve vodivém roztoku
- Průchod bází na sekvenovaném řetězci přerušuje proud, který je specifický podle procházející báze



SEQUENCE

Nanopore devices perform DNA/RNA sequencing directly and in real time.
The technology is scalable from miniature devices to high-throughput installations.

Which device is best for you?



SmidgION



Flongle



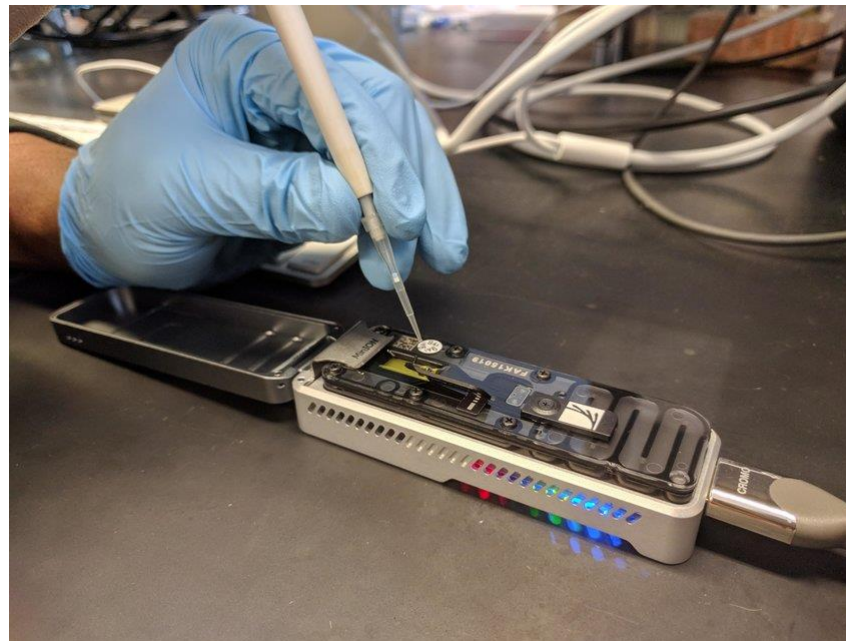
MinION



GridION



PromethION



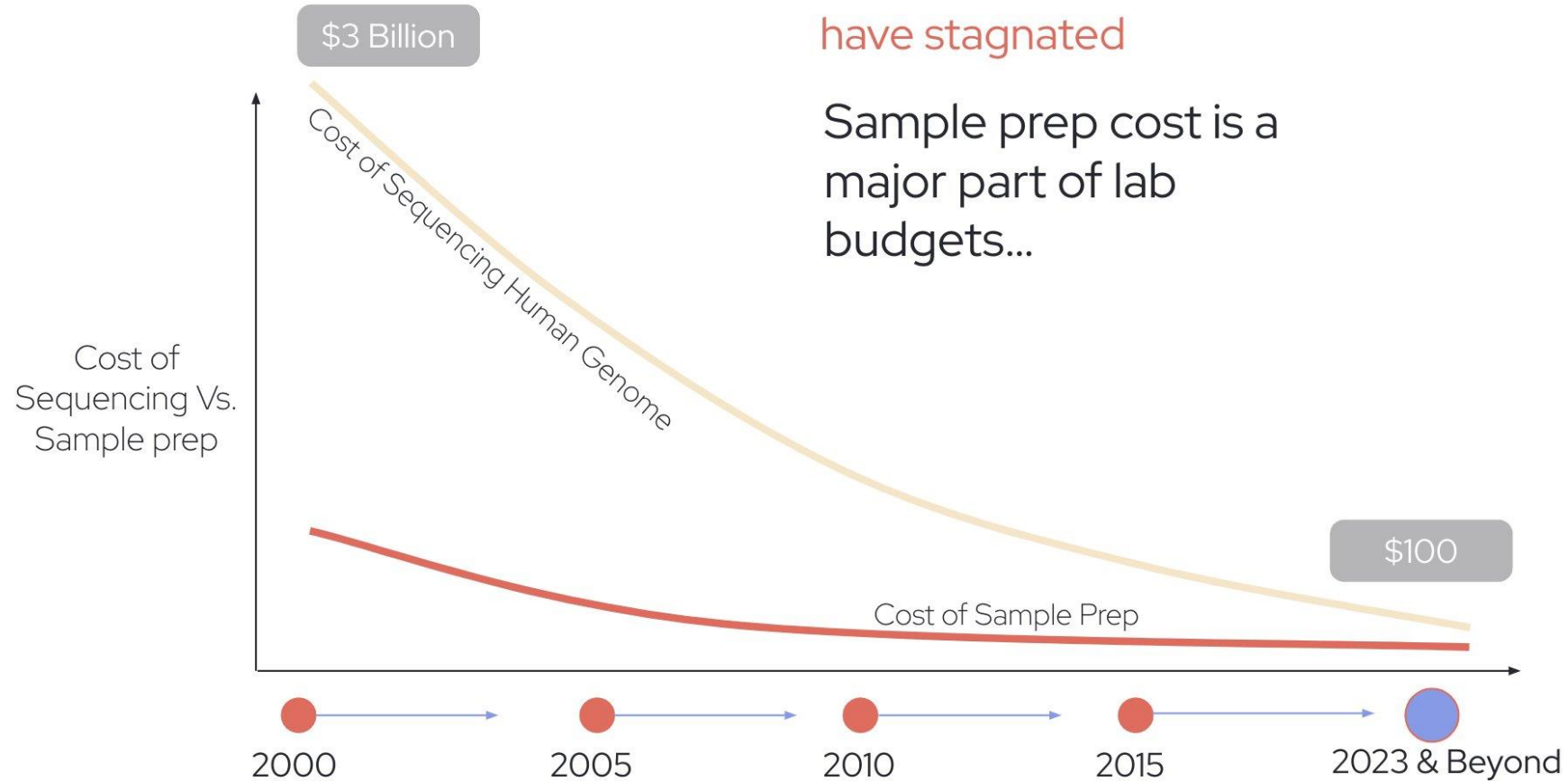
Metoda	Princip	Délka čtení	Přesnost	Množství získaných dat
Sanger	Terminace řetězce pomocí dideoxynukleotidů	Krátká (500-1000bp)	Vysoká (> 99,9%)	Nízký (jeden fragment)
Pyrosekvenování	Detekce pyrofosfátů při inkorporaci nukleotidů	Střední (300-500bp)	Střední	Střední
SOLiD	Ligace oligonukleotidů	Krátká (50-75bp)	Vysoká (> 99,9%)	Vysoký (100 GB/run)
Ion Torrent	Detekce změn pH při inkorporaci nukleotidů	Střední (200-400bp)	Vysoká (~99%)	Vysoký (GB/run)
Illumina	Reverzibilní terminace nukleotidů	Krátká-střední (150-300bp)	Velmi vysoká (> 99,9%)	Velmi vysoký (až TB/run)
PacBio (SMRT)	Detekce fluorescence při inkorporaci nukleotidů	Velmi dlouhá (10-60kbp)	Střední až vysoká (99 %)	Vysoký
MinION	Detekce změn proudu při průchodu DNA nanoporem	Velmi dlouhá (až > 100kbp)	Střední (~90–98 %)	Střední

Shrnutí sekvenačních generací

- **První generace** (Sangerovo sekvenování)
 - + velmi přesné, krátké fragmenty, levné (pro krátké sekvence)
 - nevhodné pro velké genomy – nákladné, časově náročné
- **Druhá generace** (Next-generation sequencing, NGS)
 - + rychlé, relativně levné, rychlé výnosy
 - relativně krátké fragmenty
- **Třetí generace** (Oxford Nanopore)
 - + přesnost při skládání genomu (delší fragmenty)
 - vyšší náklady, nižší přesnost než druhá generace

DNA sequencing costs are plummeting...but sample prep costs have stagnated

Sample prep cost is a major part of lab budgets...



Zpracování surových dat

Kontrola kvality (QC) dat

• **Nástroje:** Např. **FastQC**, **MultiQC**.

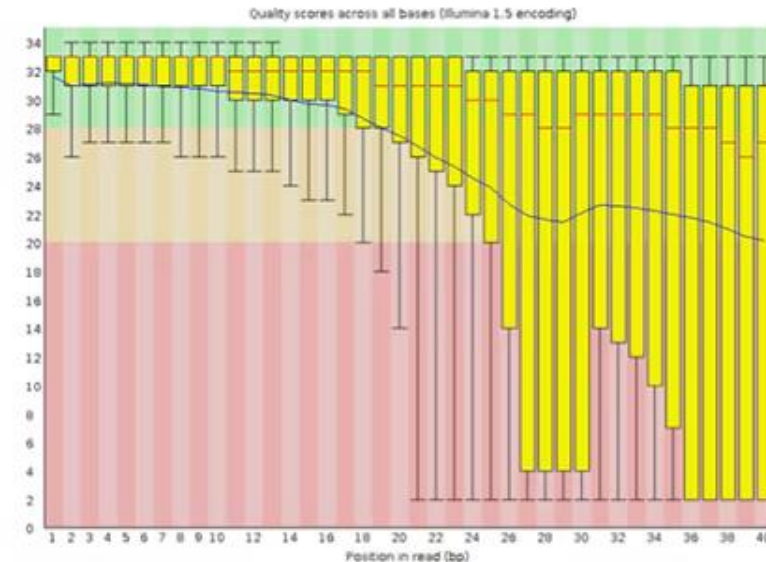
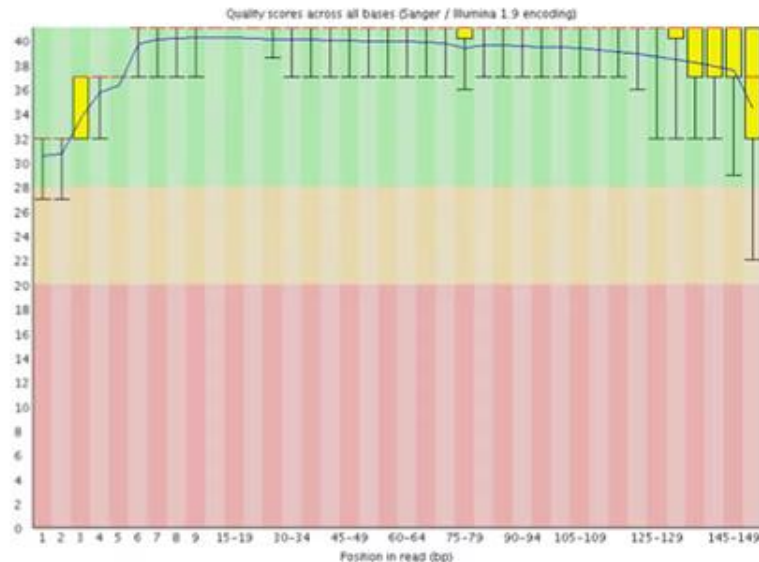
• **Účel:** Posouzení kvality surových sekvenačních dat, které obvykle přicházejí ve formátu FASTQ. Zde se hodnotí aspekty jako:

- Kvalita bází (Phred skóre).
- Přítomnost adaptérů, kontaminace a artefaktů.
- Distribuce délek čtení.

• **Výstup:** Kvalitativní hodnocení, které určuje, zda data potřebují další předzpracování (např. ořezání nekvalitních čtení).

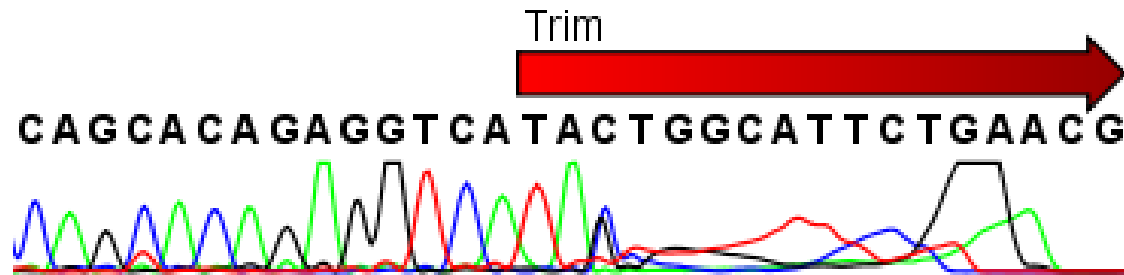


FastQC: Per base sequence quality
Good data **Bad data**



Ořezávání a filtrování

- **Nástroje:** Trimmomatic, Cutadapt.
- **Účel:** Odstranění nekvalitních bází na začátku nebo konci čtení, odstranění adaptérů nebo krátkých fragmentů.
- **Výstup:** Čistá čtení připravená k dalším analýzám.



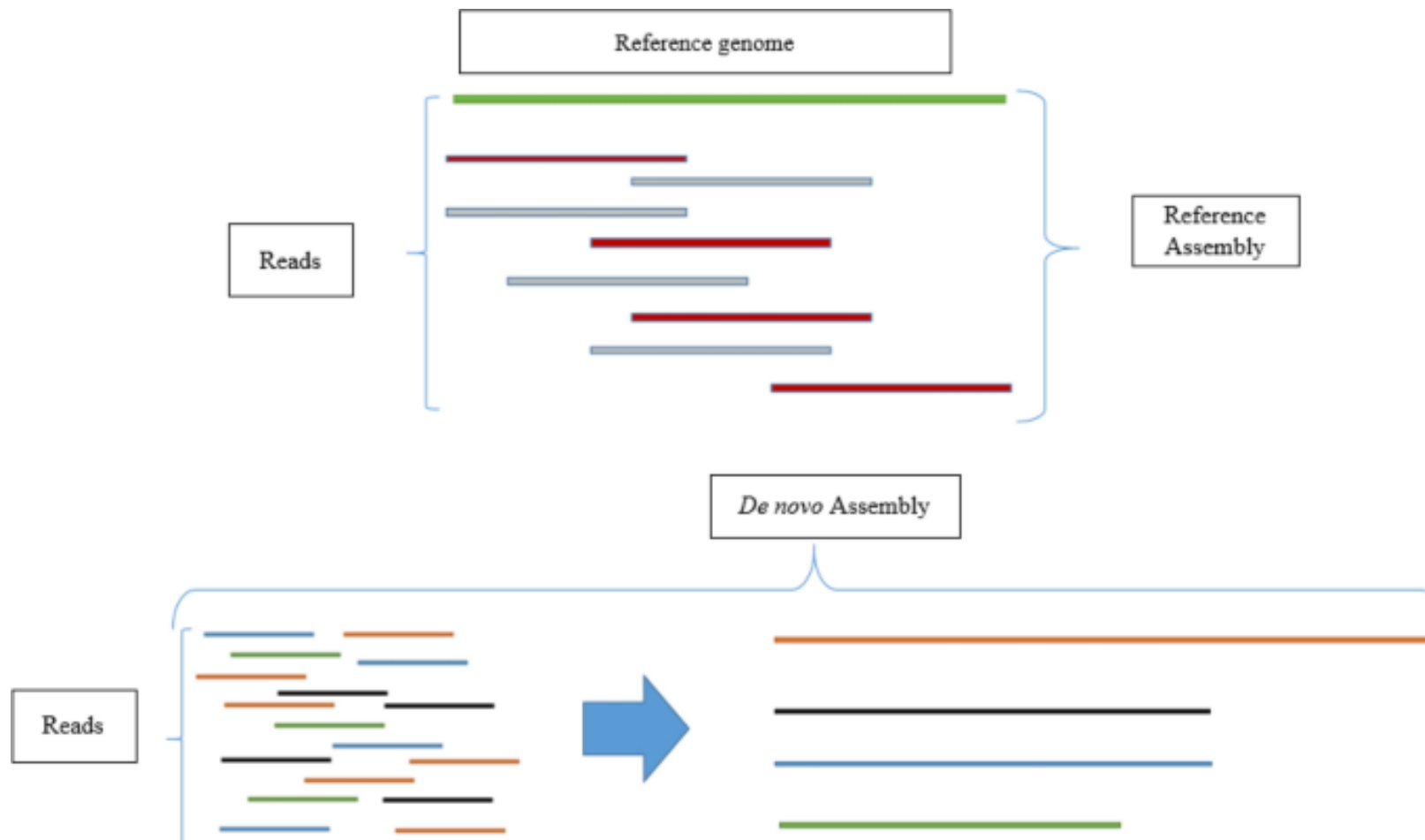
Zarovnání sekvencí

•Mapování na referenční genom

- **Nástroje:** **BWA, Bowtie2**
- **Účel:** Zarovnání sekvenovaných čtení na referenční genom (např. u celogenomového sekvenování). Toto je klíčový krok pro identifikaci toho, kam jednotlivé sekvence patří v genomu.
- **Výstup:** Soubor BAM/SAM, který obsahuje zarovnané čtení a jejich polohu v genomu.

•Sestavení de novo

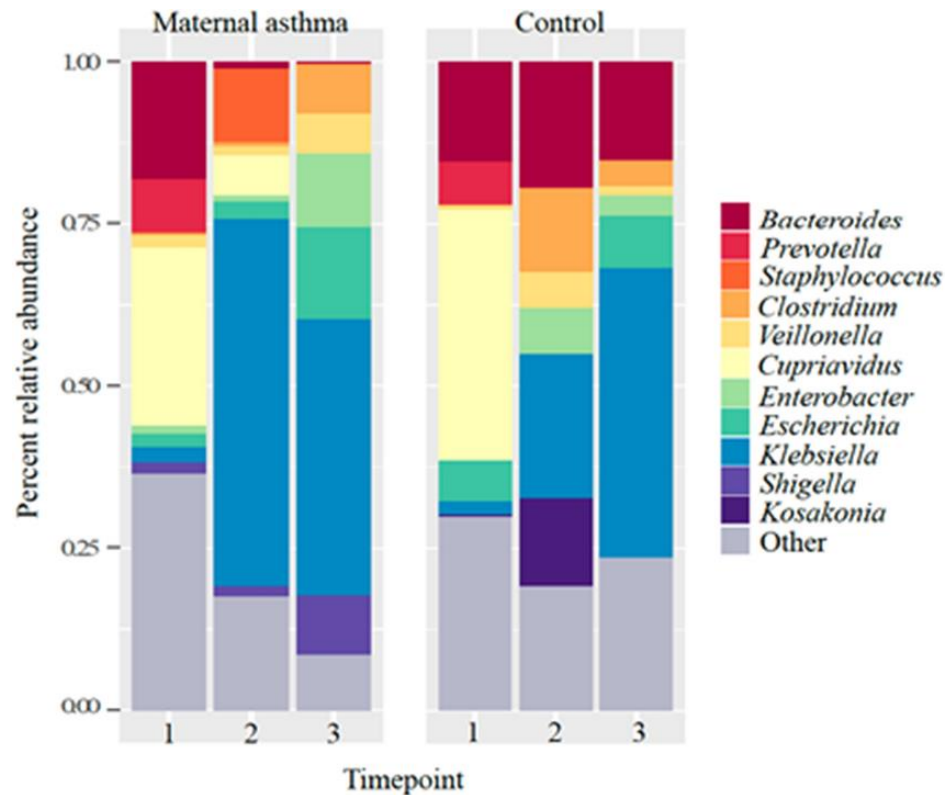
- **Nástroje:** **SPAdes, Velvet, Canu** (pro PacBio/MinION).
- **Účel:** Pokud není k dispozici referenční genom, sestaví se genom „de novo“ z přítomných dat. Tento proces kombinuje čtení a vytváří konsensus sekvence.
- **Výstup:** Kontigy nebo scaffolds (delší úseky sestavených sekvencí).



Metagenomická analýza

Klasifikace mikroorganismů

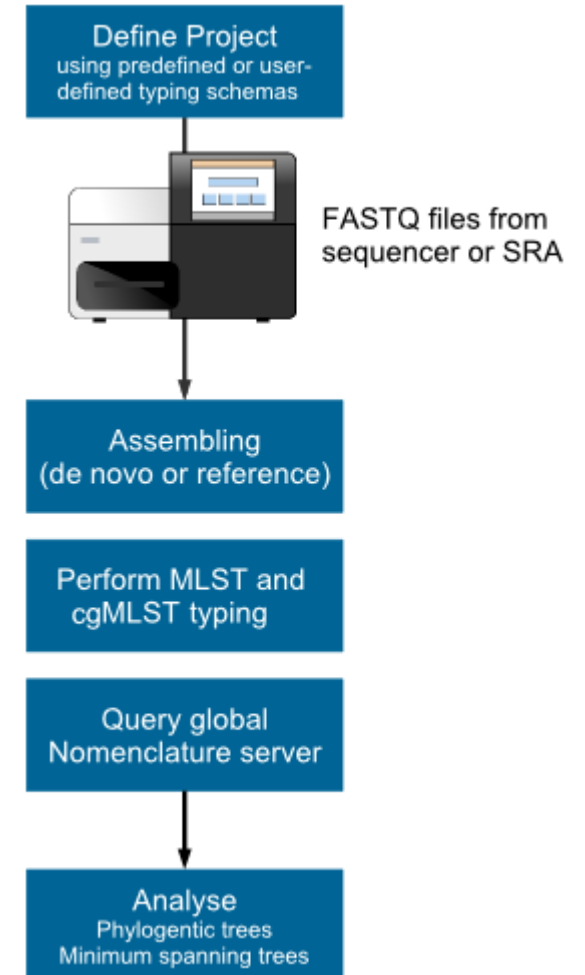
- **Nástroje:** Kraken2, MetaPhlan, QIIME, Mothur (pro 16S rRNA sekvenování).
- **Účel:** Identifikace mikroorganismů v metagenomických vzorcích pomocí porovnávání sekvencí s databázemi mikroorganismů nebo markerových genů (např. 16S rRNA).
- **Výstup:** Taxonomické složení vzorku (zastoupení bakterií, archeí, virů apod.).

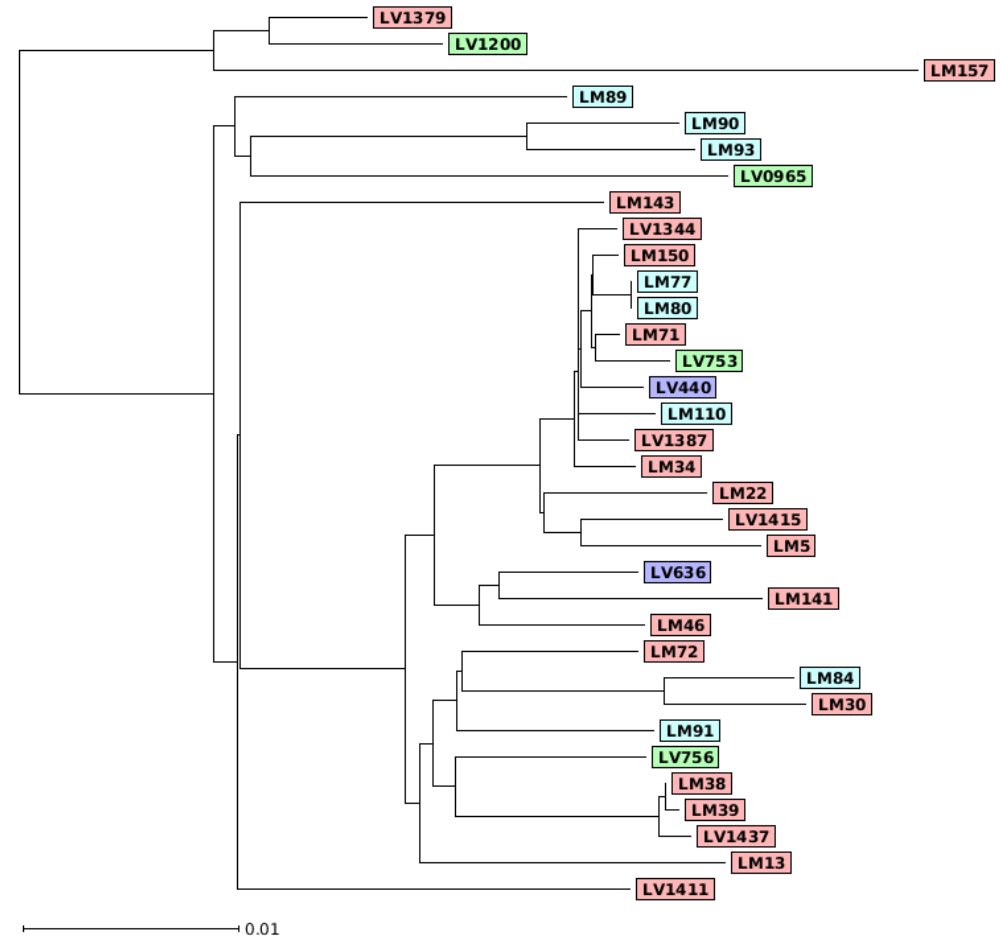
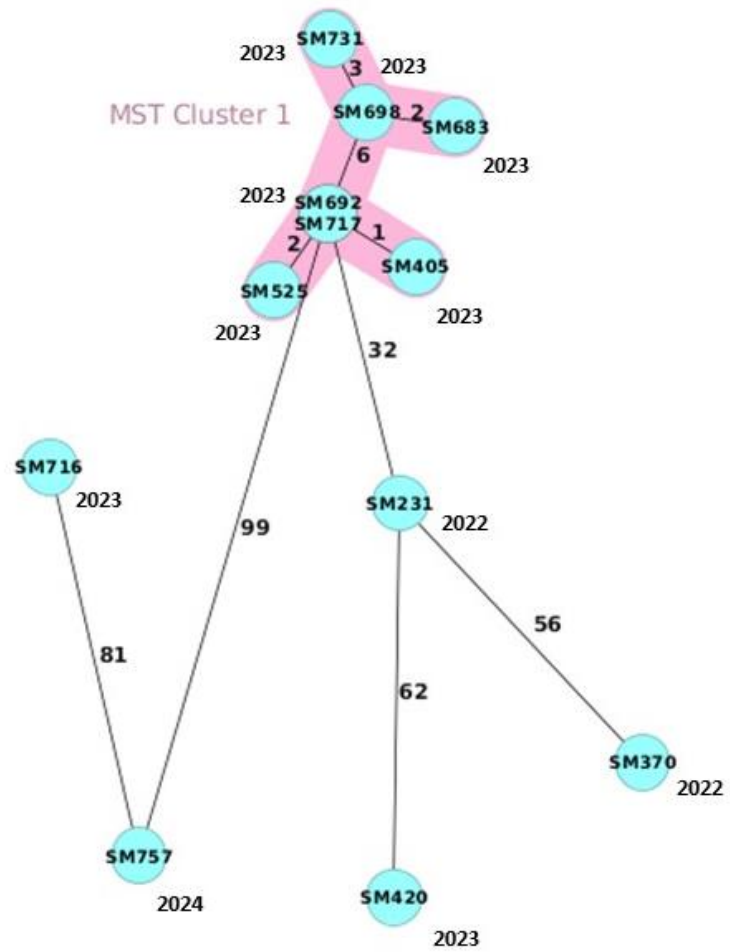


Ridom SeqSphere+



- Automatizovaná analýza dat
- Trimování, assemblování, porovnání s databází
- Geny rezistence, virulence, cgMLST
- Typizace – MLST, *spa typizace* ...





Comparison Table created: Apr 10, 2024 9:03 AM (v8.5.1_(2022-11))
 Projects: Listeria (Listeria monocytogenes)
 L. monocytogenes cgMLST Complex Type / Clustering Distance: 10
 Ridom SeqSphere+ NJ tree for 34 Samples based on 1701 columns, pairwise ignoring missing values, % columns difference
 Distance based on columns from L. monocytogenes cgMLST (1701)

- Potraviny
- Prostředí
- Zvíře
- Člověk

Praktické využití

Analýza střevního mikrobiomu

- **Personalizovaná výživa na základě mikrobiomu:** Znalost složení mikrobiomu může pomoci terapeutovi navrhnout dietu, která podpoří růst prospěšných bakterií nebo sníží populace nežádoucích mikroorganismů.
- **Mikrobiom a metabolismus:** Některé bakterie ve střevě ovlivňují metabolismus tuků, cukrů a jiných živin. Sekvenační analýza může ukázat, jak různé druhy mikroorganismů ovlivňují energetickou rovnováhu těla, což je důležité při řešení problémů jako je obezita, inzulinová rezistence či diabetes.
- **Vliv různých typů stravy:** Sekvenační studie ukázaly, že vegetariánská nebo veganská strava podporuje růst některých mikrobiálních skupin v porovnání se stravou s vysokým obsahem masa. Díky těmto informacím může terapeut doporučit vhodnou stravu pro konkrétní klienty, například pro podporu hubnutí, zlepšení trávení nebo snížení zánětlivých procesů.

Mediterranean diet



Faecalibacterium spp. ↑
Roseburia spp. ↑
Collinsella spp. ↓
Ruminococcus spp. ↓

↑ Secondary bile acids
 ↑ SCFA fermentation pathway
 ↑ Dietary fibre degradation, pectin degradation, mannan degradation pathway
 ↑ SCFA production

High-fibre diet



Prevotella spp. ↑
Bifidobacterium spp. ↑
Lactobacillus spp. ↑
Faecalibacterium spp. ↑

↑ Lipid profile
 ↓ Colon transit time
 ↓ Inflammatory markers
 ↑ SCFA production

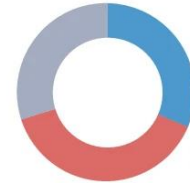
Plant-based diet



Prevotella spp. ↑
Bifidobacterium spp. ↑
Lactobacillus spp. ↑
Bacteroides spp. ↑
Akkermansia spp. ↑

↑ Polyphenols and, thus, antimicrobial property against pathogens
 ↑ SCFA production

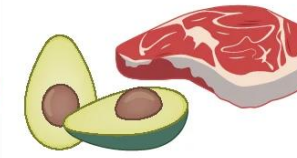
High-protein diet



Bacteroides spp. ↑
Bacillus spp. ↑
Clostridium spp. ↑
Propionibacterium spp. ↑
Fusobacterium spp. ↑

↑ Short peptides, free amino acids
 ↑ SCFA, BCFA production, indoles, phenolic compounds

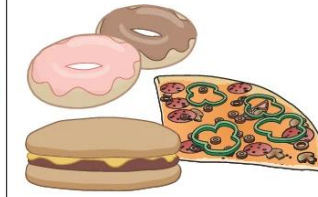
Ketogenic diet



Bifidobacterium spp. ↓
 Actinobacteria ↓
 Firmicutes ↓
Bacteroides spp. ↑

↑ β-Hydroxybutyrate ketone levels
 ↓ Intestinal T_H17 cells
 ↓ SCFA production

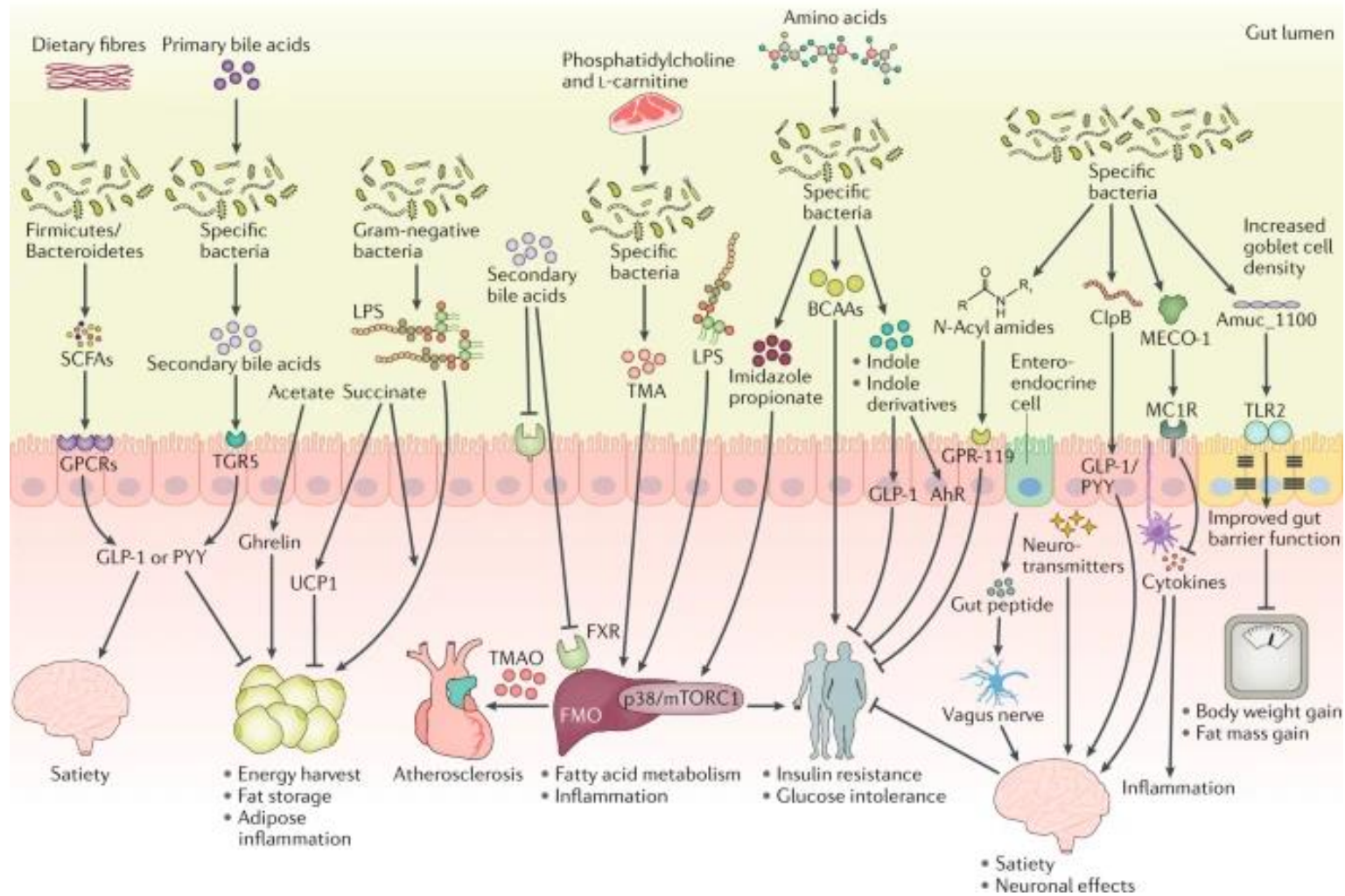
Western diet

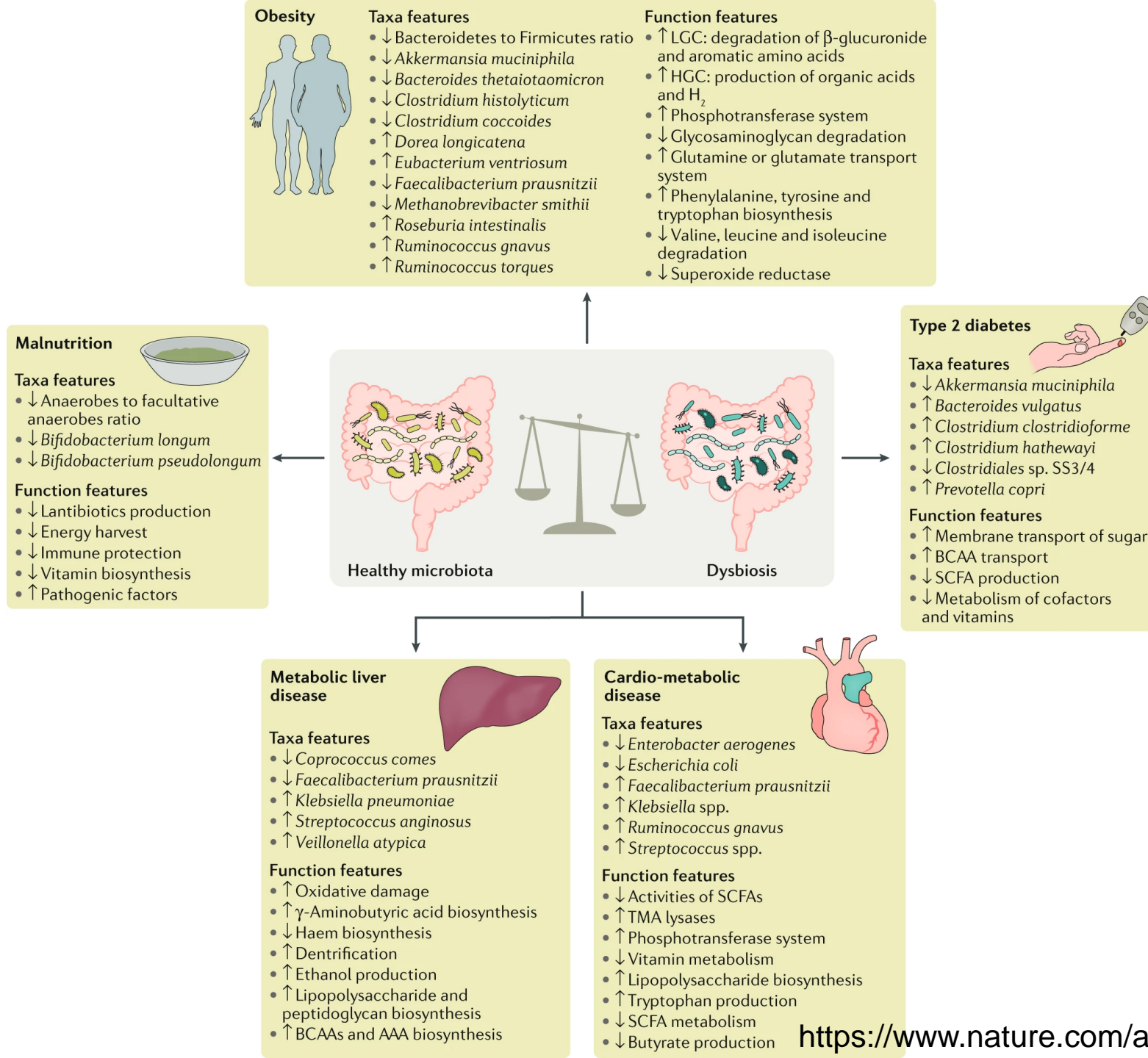


Bacteroides spp. ↑
Bilophila spp. ↑
Alistipes spp. ↑
Blautia spp. ↑
Ruminococcus spp. ↑

↓ SCFA production
 ↓ Secondary bile acid production
 ↑ Endotoxins
 ↑ TMA, TMAO
 ↑ Chronic inflammation
 ↑ Increased oxidative stress
 ↑ Immune dysregulation
 ↑ Risk of metabolic disorders

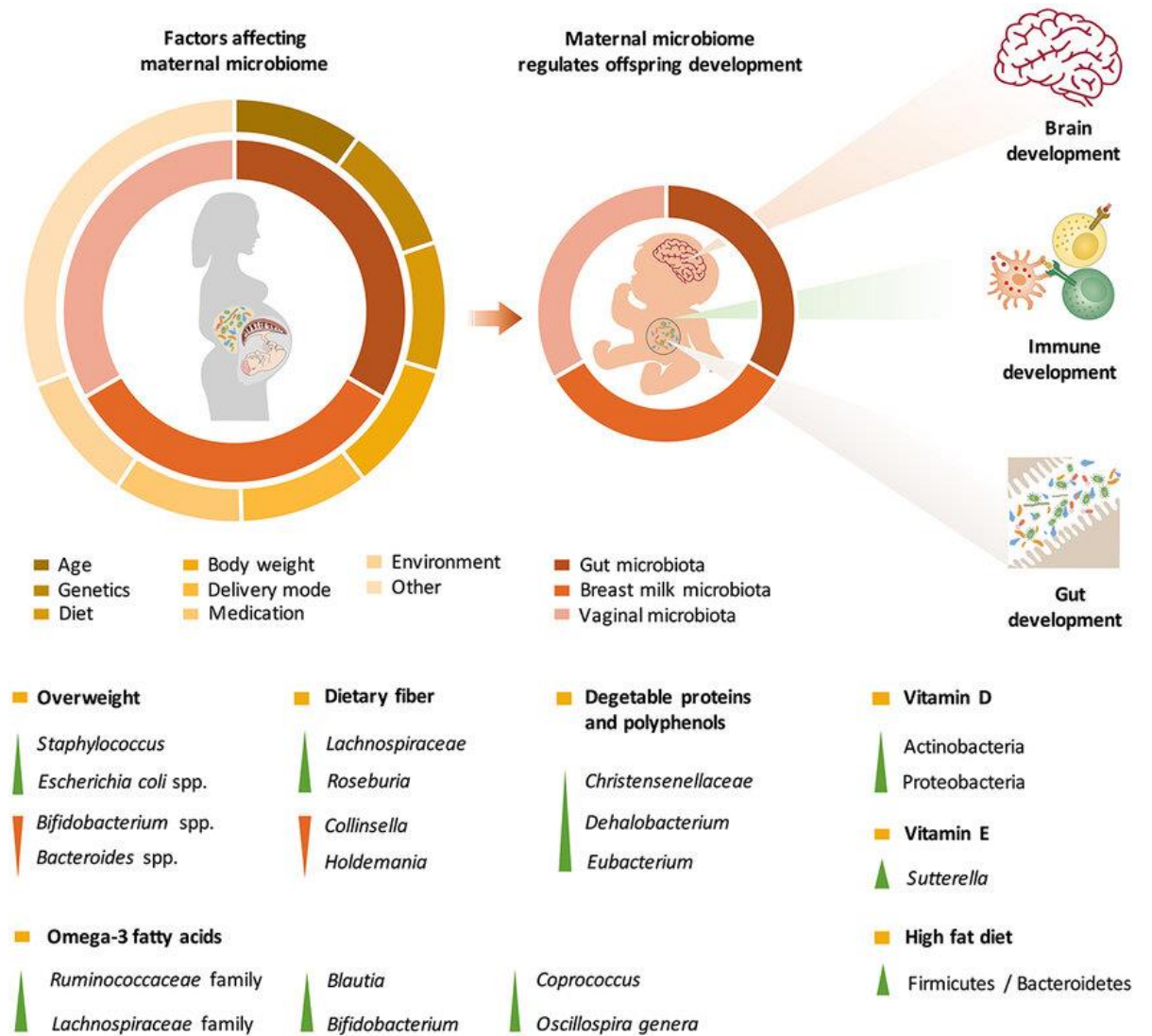






Dieta u kojících matek

- Strava matky ovlivňuje mikrobiom mateřského mléka
- Mikrobiom mateřského mléka ovlivňuje střevní mikrobiom dítěte
- Střevní mikrobiom dítěte ovlivňuje jeho metabolismus a imunitu



Mikrobiom a imunitní systém

Střevní mikrobiom hraje zásadní roli v regulaci imunitního systému. Dysbióza může vést k zánětlivým onemocněním, autoimunitním reakcím či zvýšené náchylnosti k infekcím.

•**Imunomodulační diety:** Sekvenování mikrobiomu může odhalit mikrobiální nerovnováhu, která přispívá k zánětlivým onemocněním. Na základě těchto informací může terapeut doporučit změny ve stravě, které sníží zánět a podpoří zdraví imunitního systému, například přidáním potravin bohatých na omega-3 mastné kyseliny či polyfenoly.

IBD

Crohnova choroba

Ulcerózní kolitida,

Revmatoidní artritida

Rakovina (*Fusobacterium nucleatum*)



Příklad využití sekvenačních metod v mikrobiologii potravin v praxi

Bezpečnost potravin a výživa: Sekvenování může být použito k analýze mikrobiálního profilu potravin a určení přítomnosti významných skupin organismů. Terapeut tak může být lépe informován o bezpečnosti potravin, které doporučuje, zejména pro rizikové skupiny, jako jsou těhotné ženy, děti, senioři nebo lidé s oslabenou imunitou.

Sekvenční metody mohou být použity k šetření epidemií infekčních onemocnění (genom), nebo např. ke studiu mikrobiální kontaminace v potravinách (metagenom) nebo doplňcích stravy.

