

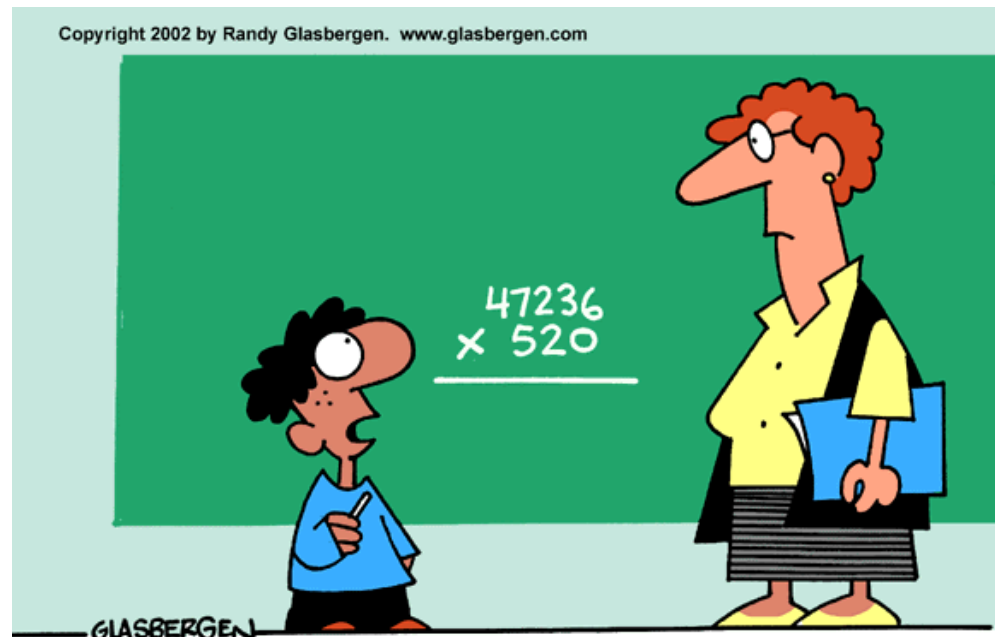
Metagenomika

Úvod

Petra Vídeňská, Ph.D.

Hodnocení:

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

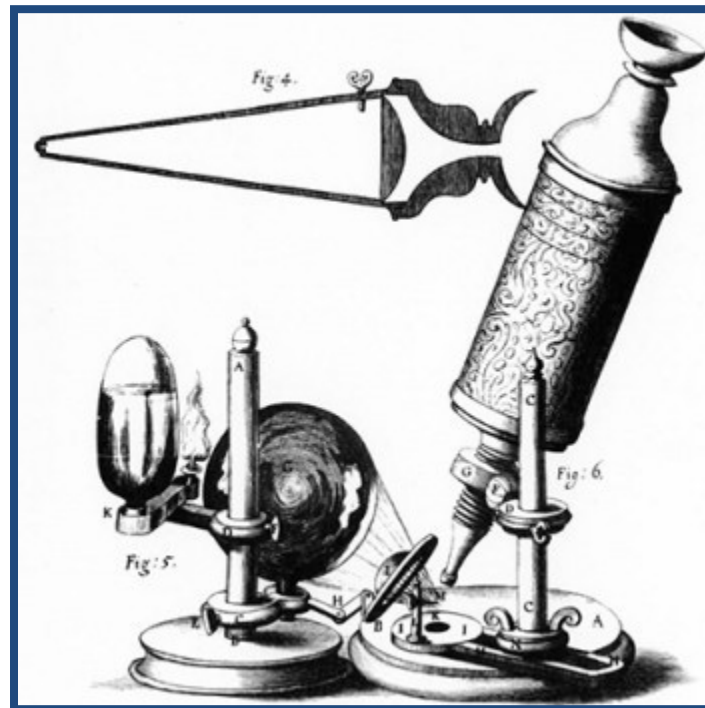


"AREN'T THERE ENOUGH PROBLEMS IN THE WORLD ALREADY?"

Osnova přednášek:

Datum	Téma
17.2.2020	Úvod do metagenomiky
24.2.2020	Sekvenování druhé generace, principy 454, Illumina, Ion Torrent
2.3.2020	Principy Minion, PacBio, prohlídka laboratoří
9.3.2020	Odběry vzorků, izolace, příprava knihoven 16S rRNA
16.3.2020	Celometagenomové sekvenování, sekvenace eukaryot a virů
23.3.2020	Vyhodnocování sekvenací
30.3.2020	Metatranskriptomika, Metabolomika
6.4.2020	Mikrobiom vody a půdy, Metagenomika v klinické praxi
13.4.2020	Střevní mikrobiom
20.4.2020	Pozvání odborníci
27.4.2020	Pozvání odborníci
4.5.2020	Prezentace
11.5.2020	Prezentace
18.5.2020	Ústní zkouška

Historie



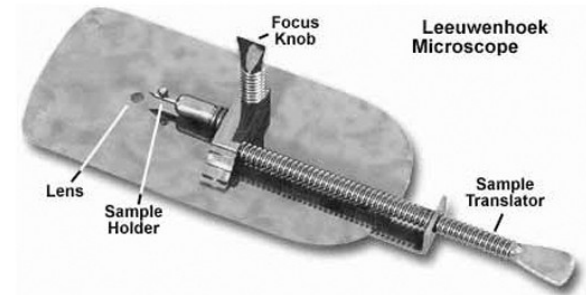
První pozorování mikroorganismů

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 – vř
(plané ne)

Pasteur –
vakcíny

Lister – antiseptika v
chirurgii

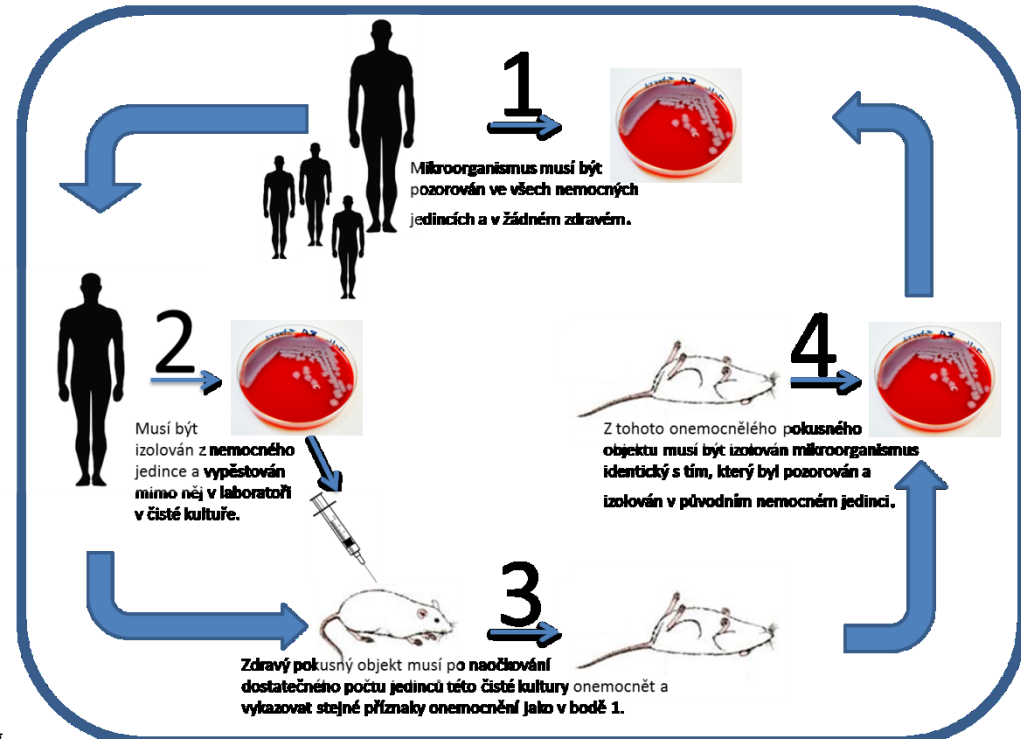
1676

Antonio van Leewenhoek
První pozorování
mikroorganismů

1843-1910

Robert Koch

Vypracování Kochových postulátů



Objev domény Archea

Hippocrates –
epidemiologické
pozorování

Jenner – vř
(plané ne)

Pasteur –
vakcíny

Listeur – antisepr
chirurgii

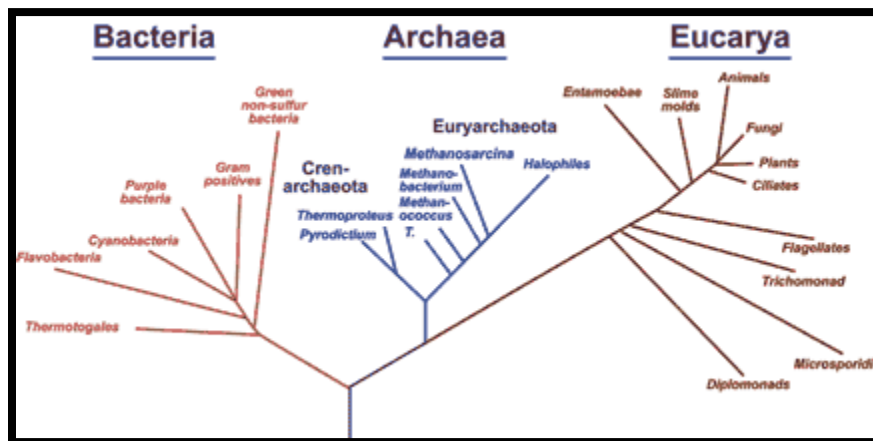
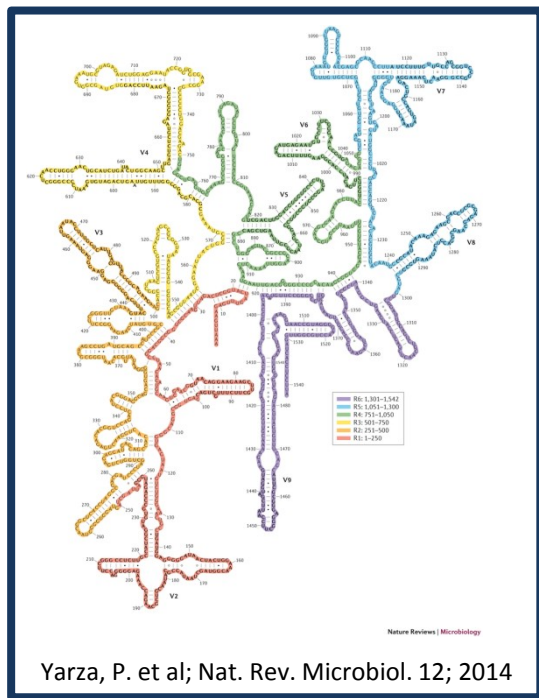
Watson a Crick
struktura DN

Sanger – sekvenace
DNA

1676
Antonio van Leewenhoek
První pozorování
mikroorganismů

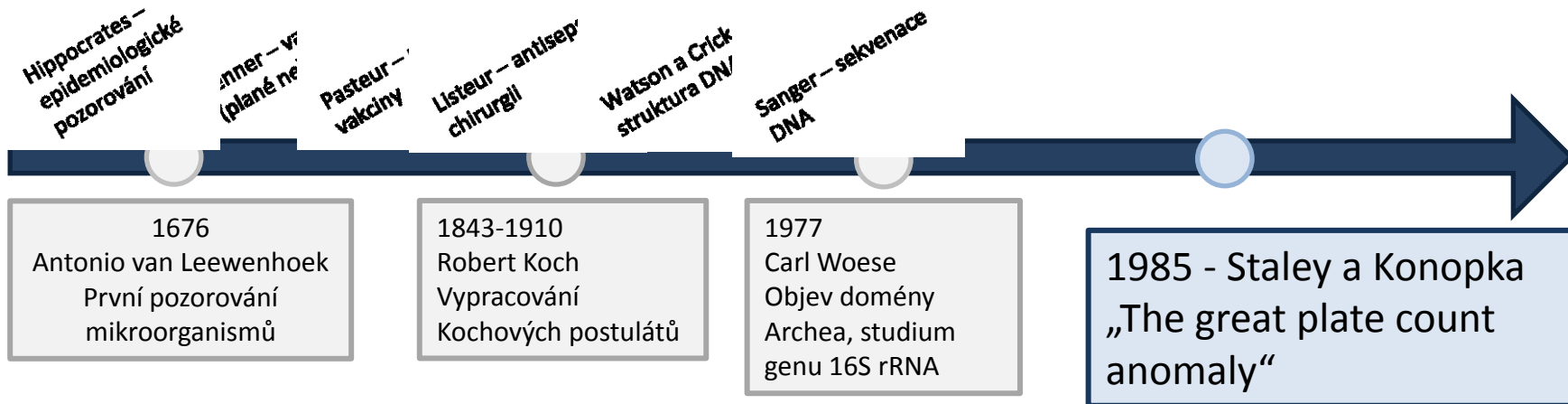
1843-1910
Robert Koch
Vypracování
Kochových postulátů

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

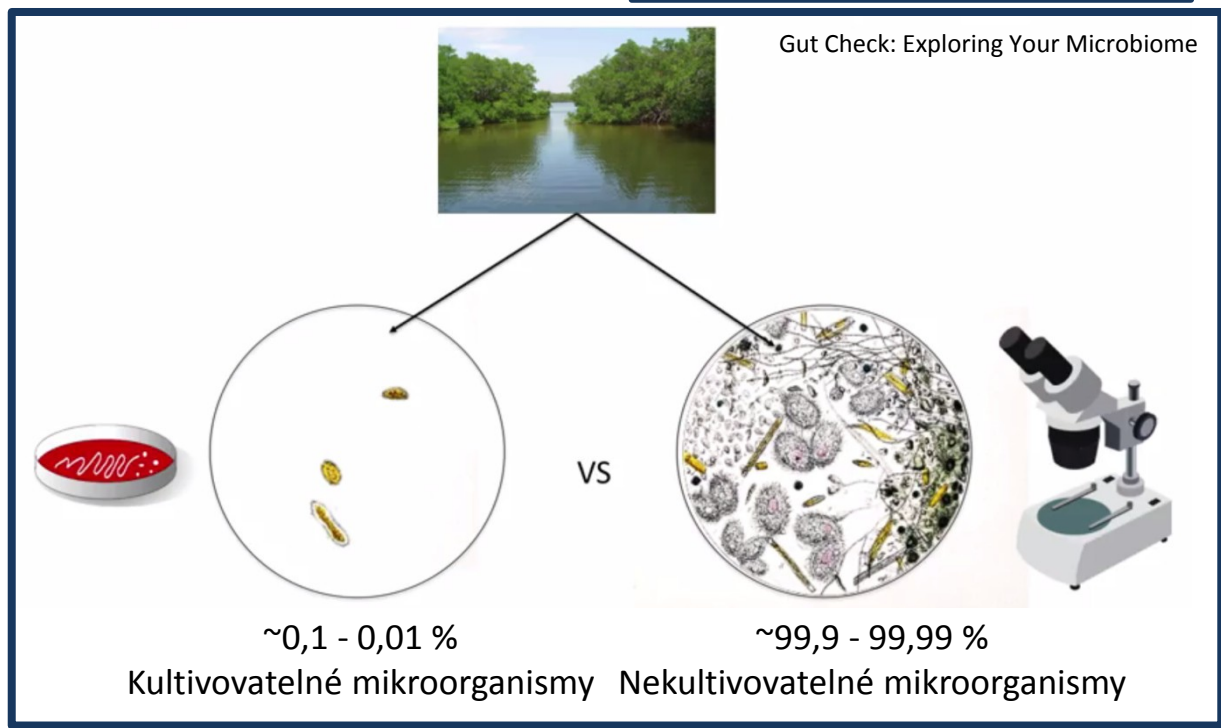
MEASUREMENT OF IN SITU ACTIVITIES OF NONPHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS IN AQUATIC AND TERRESTRIAL HABITATS

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

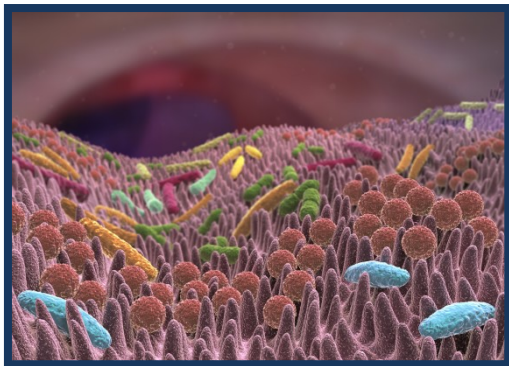
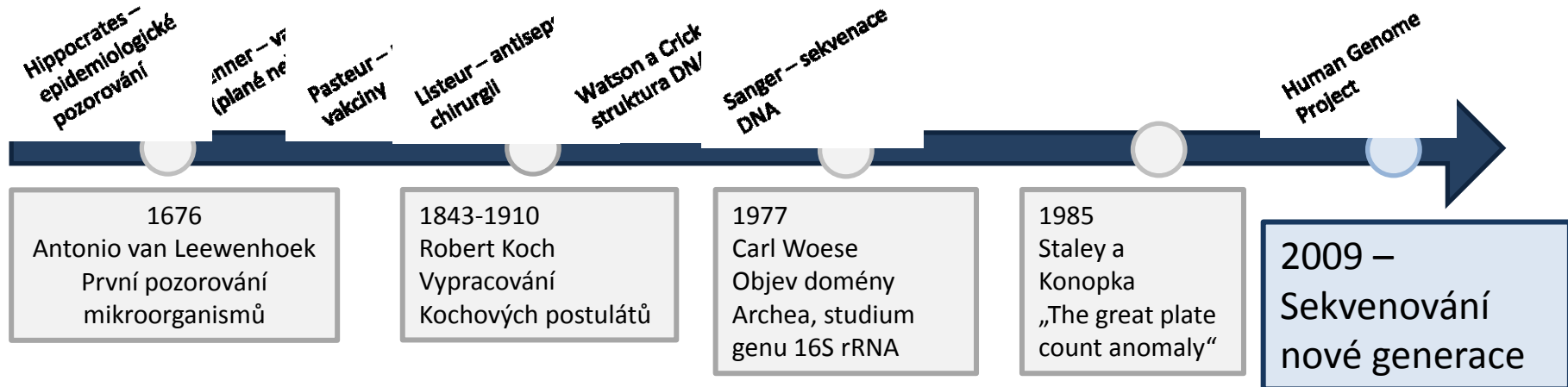
CONTENTS

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>Radioisotopic Methods</i>	332
<i>Measurement of Cell Division</i>	341
<i>Comparisons Between Methods</i>	343

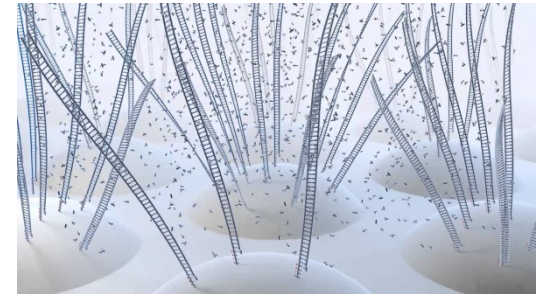


Ann. Rev. Microbiol. 1985.39:321-46. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Masaryk University on 09/13/16. For personal use only.

Nové technologie



Milióny až miliardy sekvencí najednou



Možnost studia i nekultivovatelných mikroorganismů

Mikrobiom = soubor mikroorganismů

Mikroorganismus – jednobuněčný organismus pozorovatelný pouze pod mikroskopem

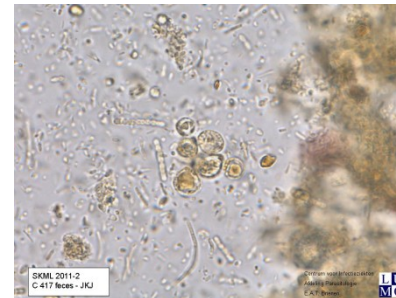
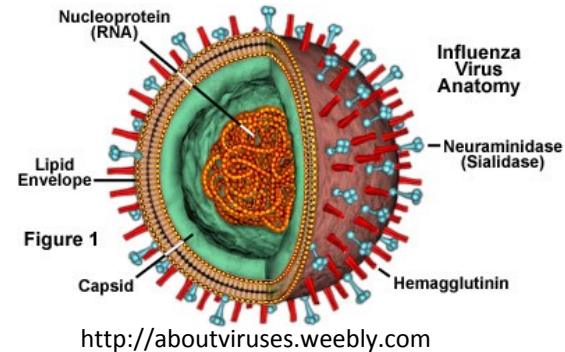
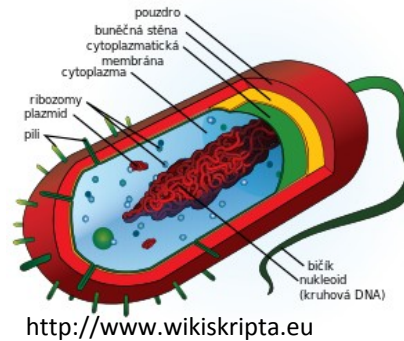
– **Bakterie**

– Viry

– Plísně

– Kvasinky

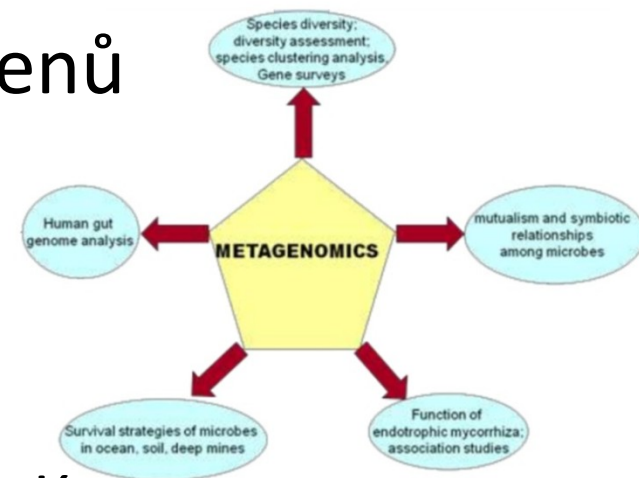
– Řasy a prvoci



Patogenní bakterie – bakterie způsobující onemocnění

Výzkum bakterií

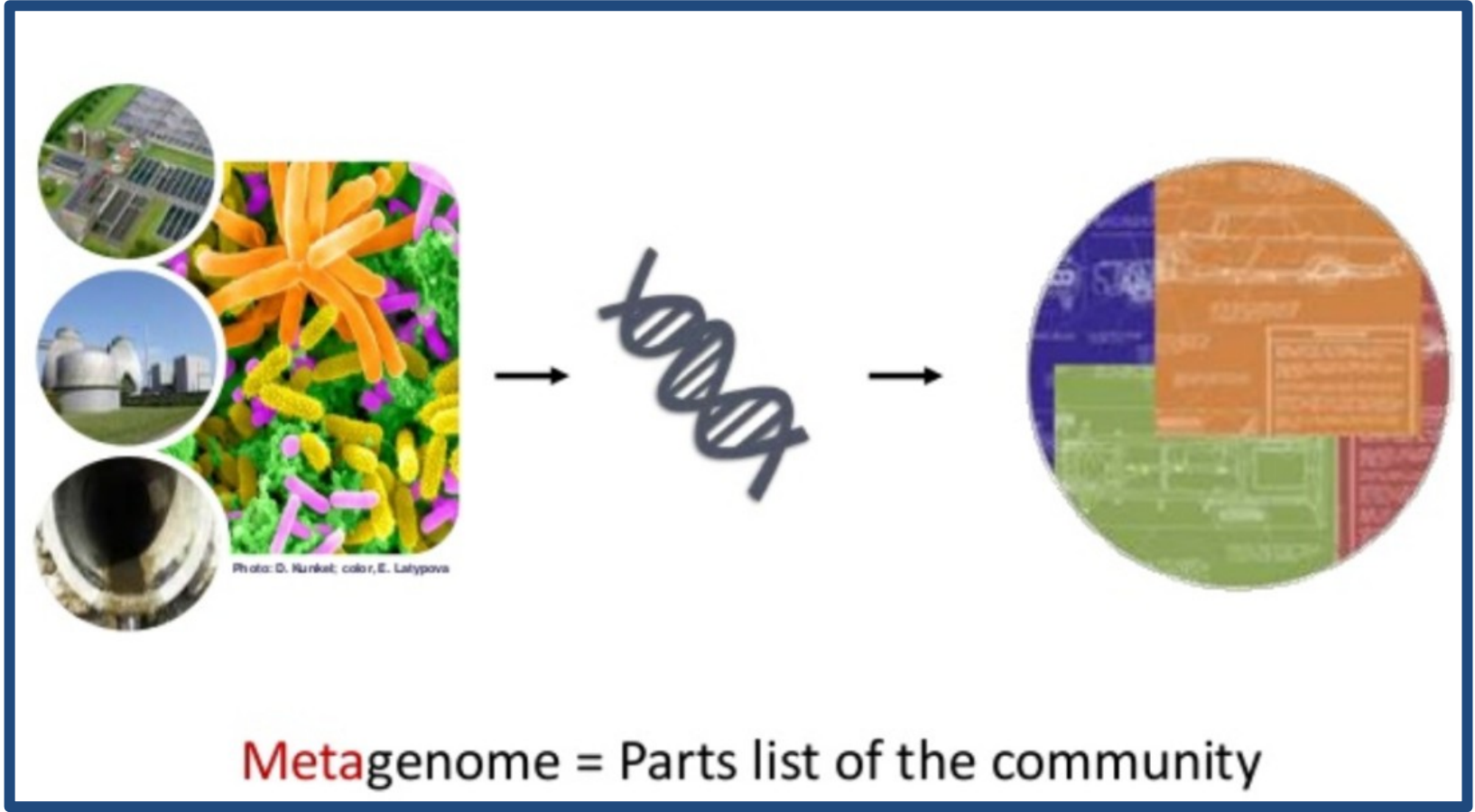
- Na světě je cca $4-6 \times 10^{30}$ prokaryot
- Více než 99,9 bakterií je nekultivovatelných
- V databázi více než 1 mil. genů
- Nové přístupy – objev nových genů
 - ATB
 - Enzymy
 - Léčiva
 - Degradují kontaminanty v prostředí



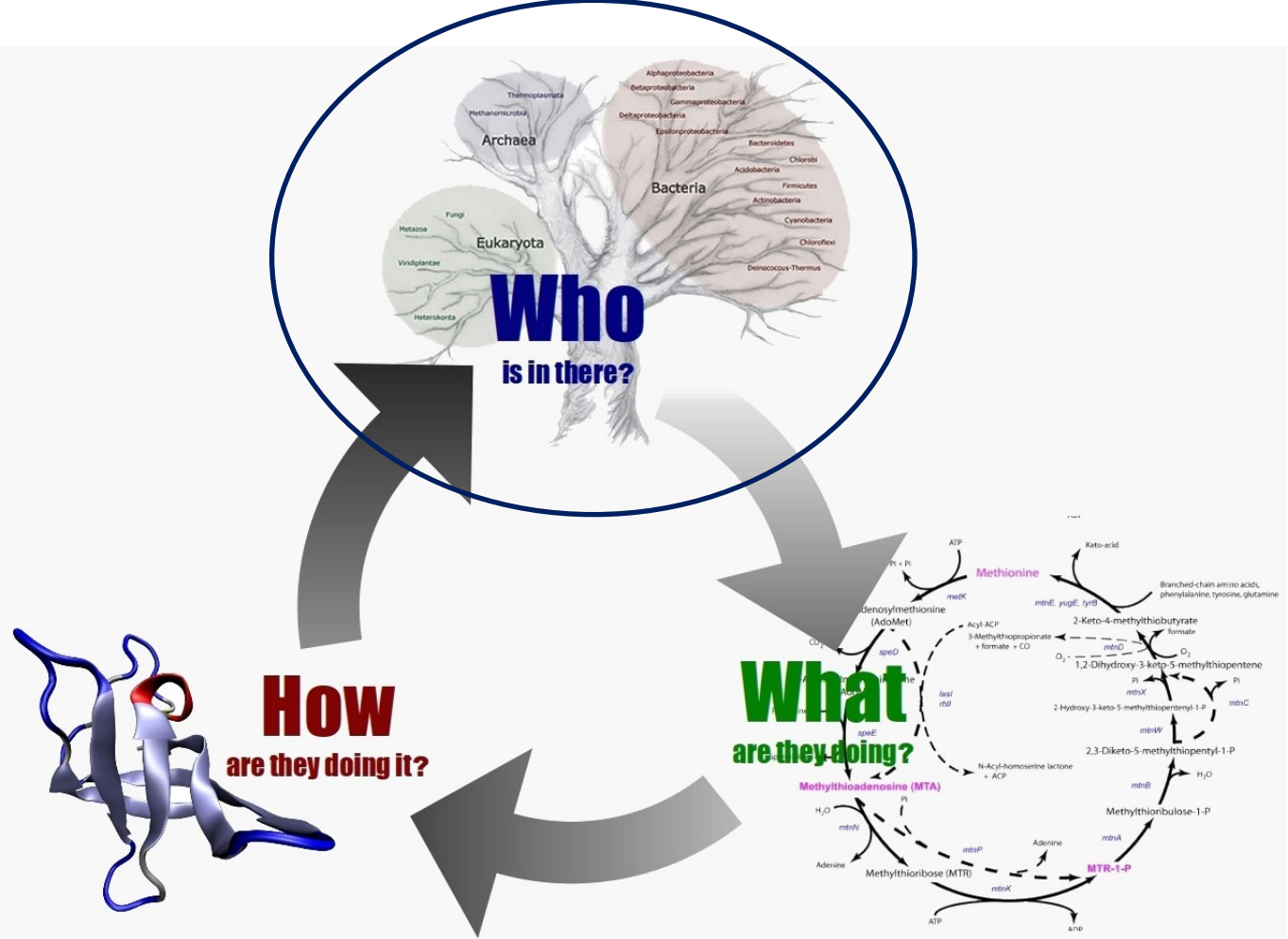
Definice metagenomiky

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).

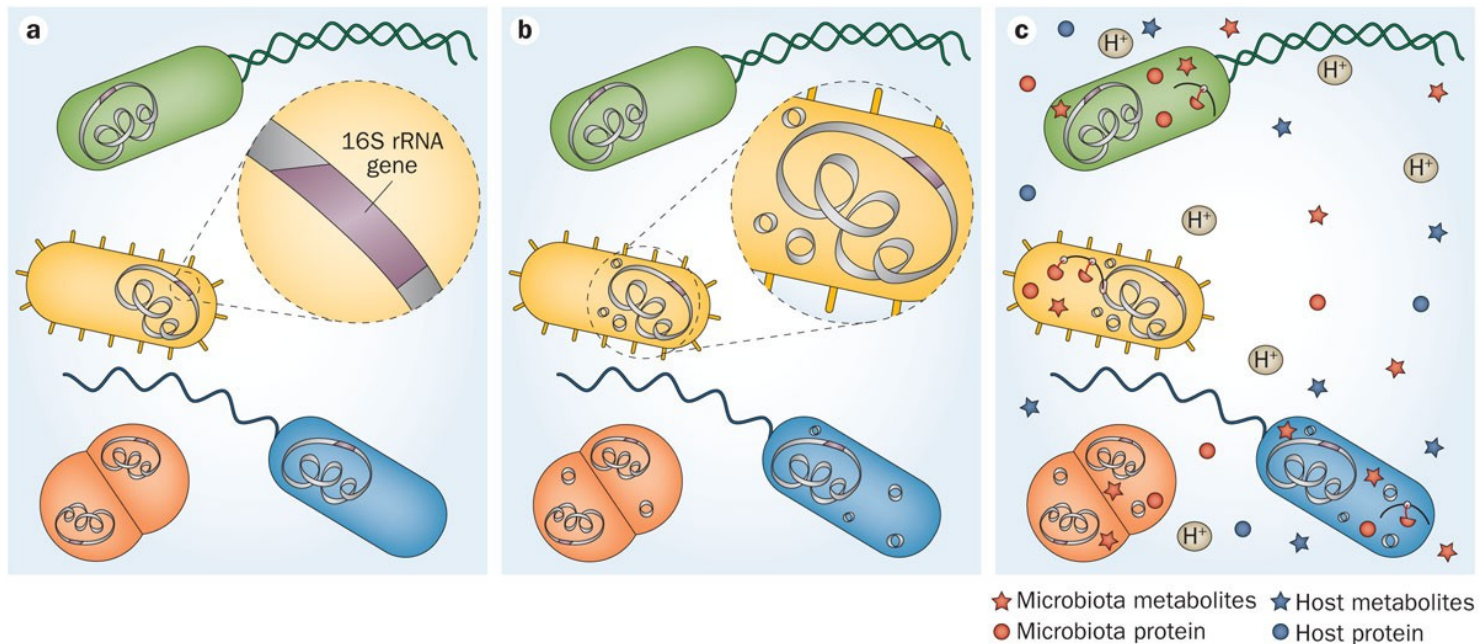
Metagenomika



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

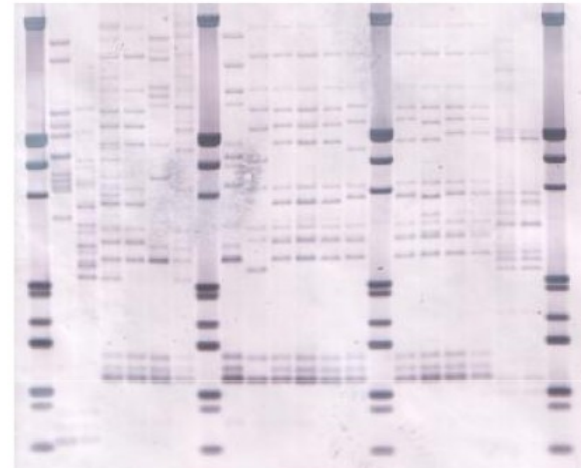
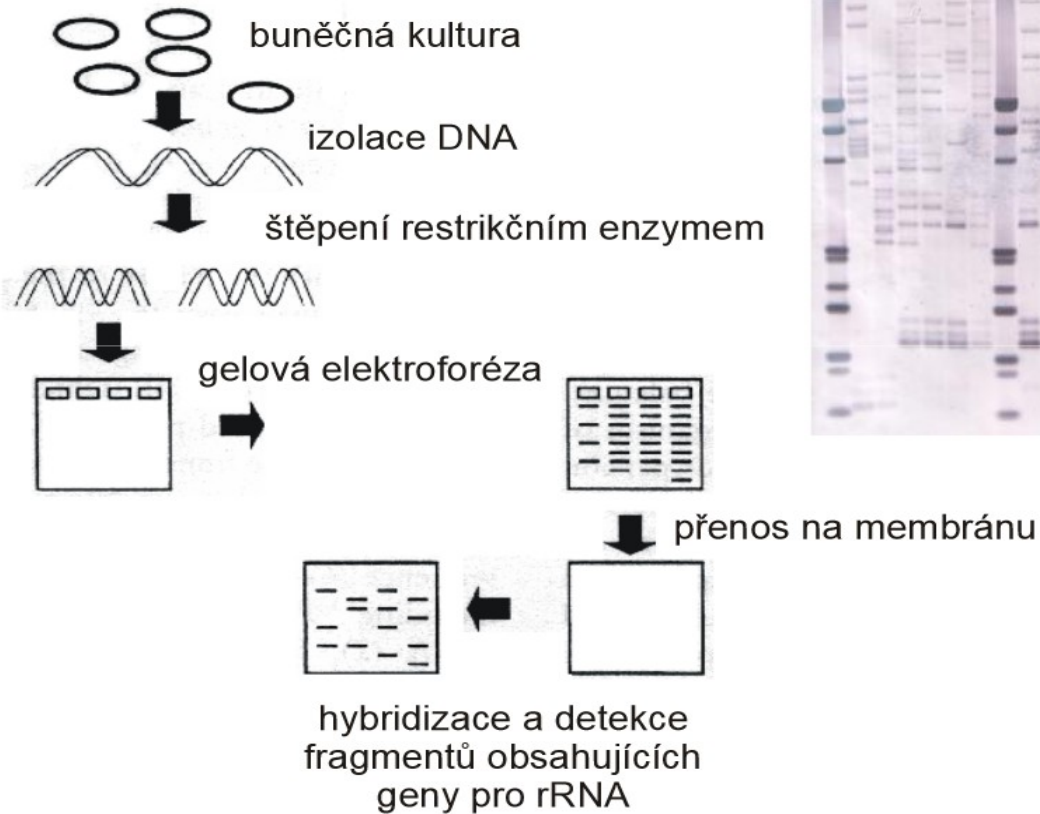
Výzkum mikrobiomu- minulost

- 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!**

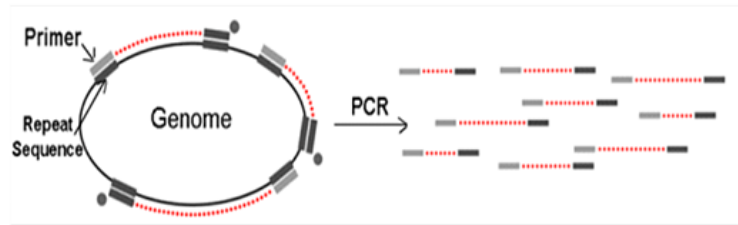
Ribotypizace

manuální ribotypizace

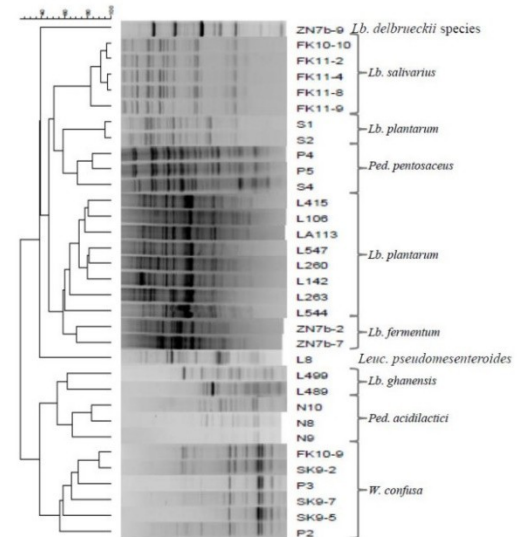
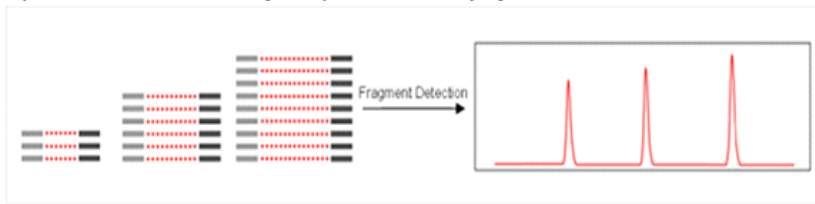


Rep PCR

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

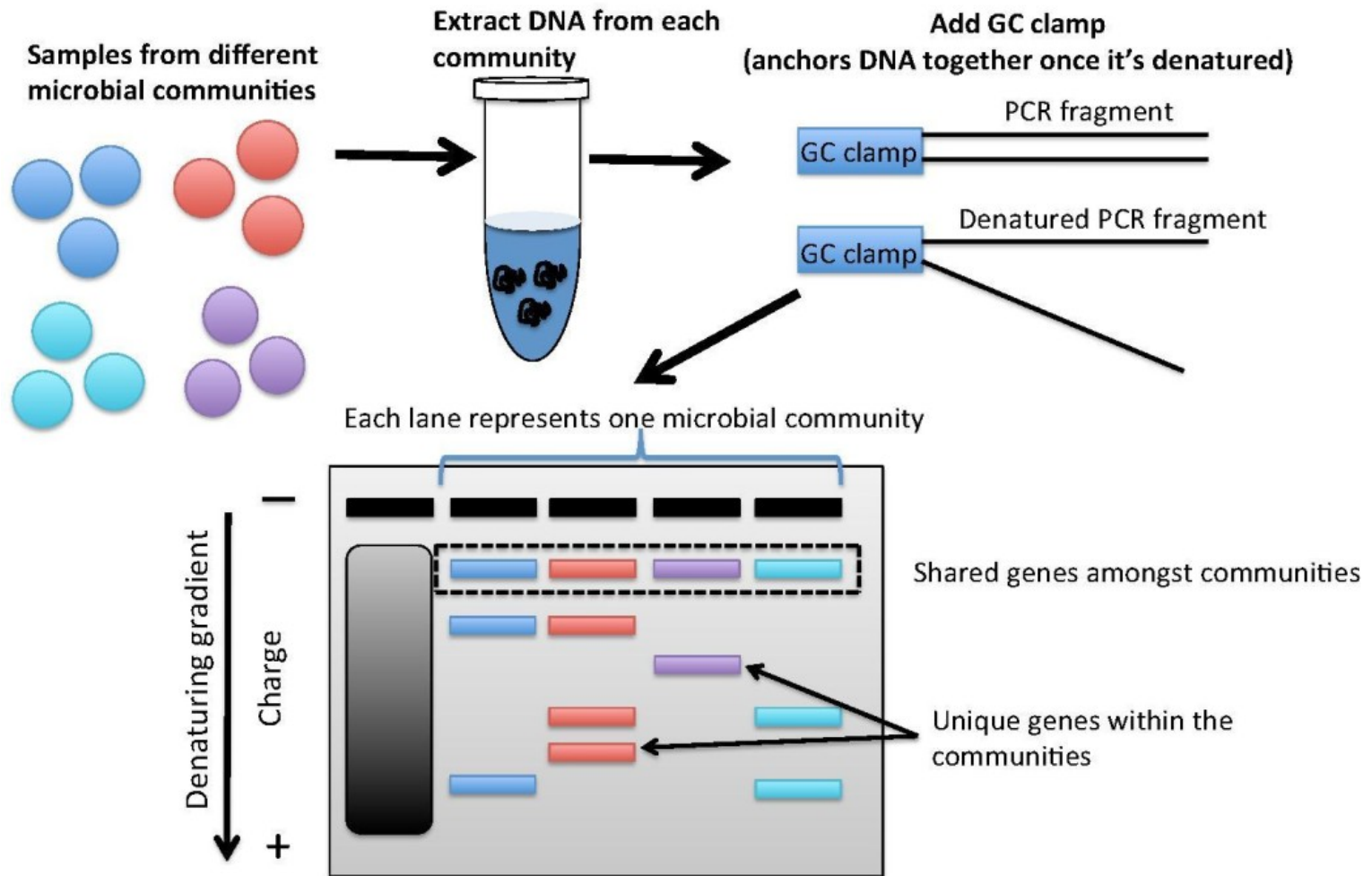


Step 2 Fragments can be separated by size and charge. A unique rep-PCR fingerprint profile is created containing multiple bands of varying sizes and intensities.



DGGE

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



Metagenomika - sekvenace

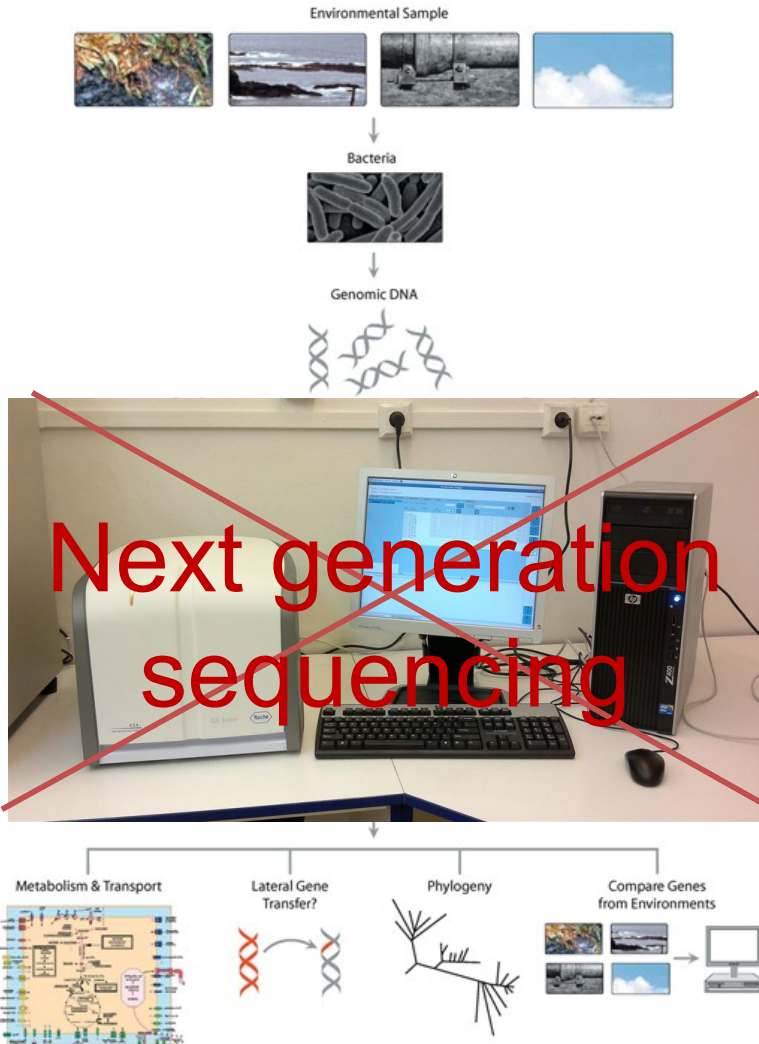
Dva hlavní přístupy

– Cílené sekvenování

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

– (Celo)Metagenomové sekvenování

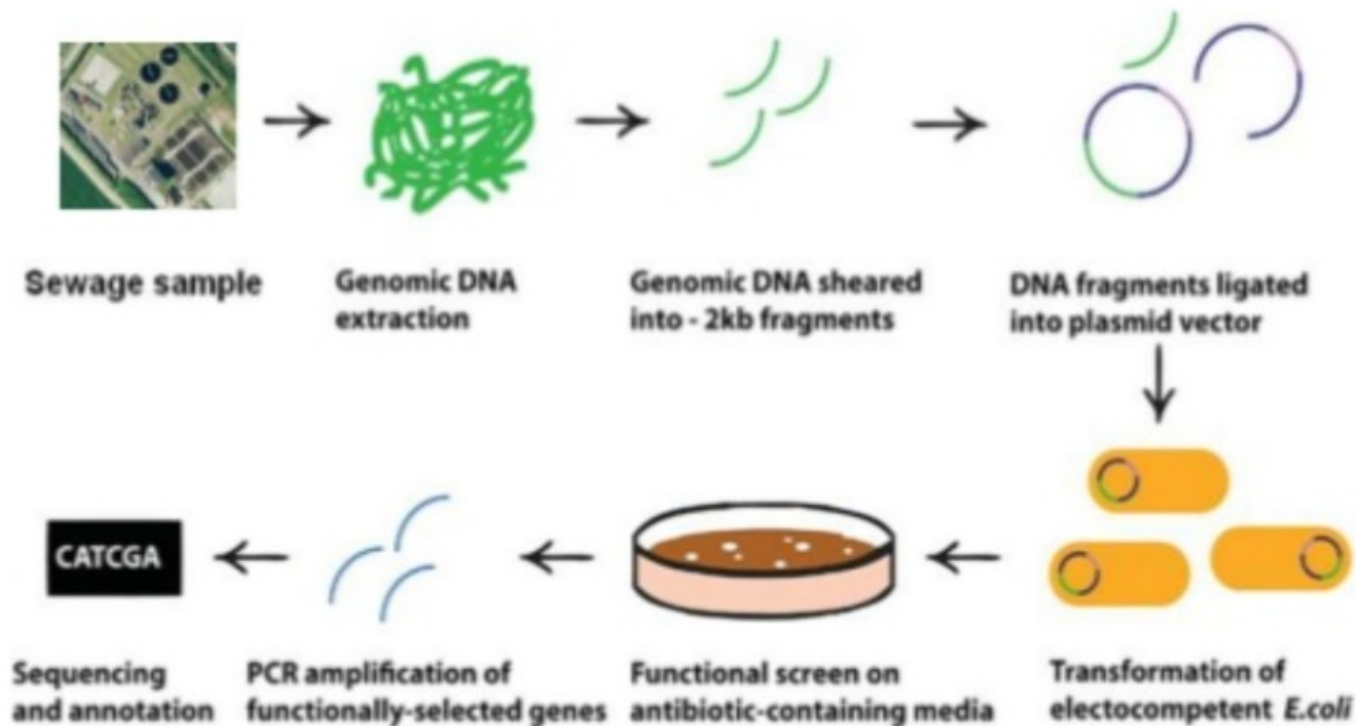
Náhodně sekvenované úseky DNA (nebo RNA) a porovnání vzniklých sekvencí v NCBI databázi na základně podobnosti s referenční sekvencí.



Funkční metagenomika

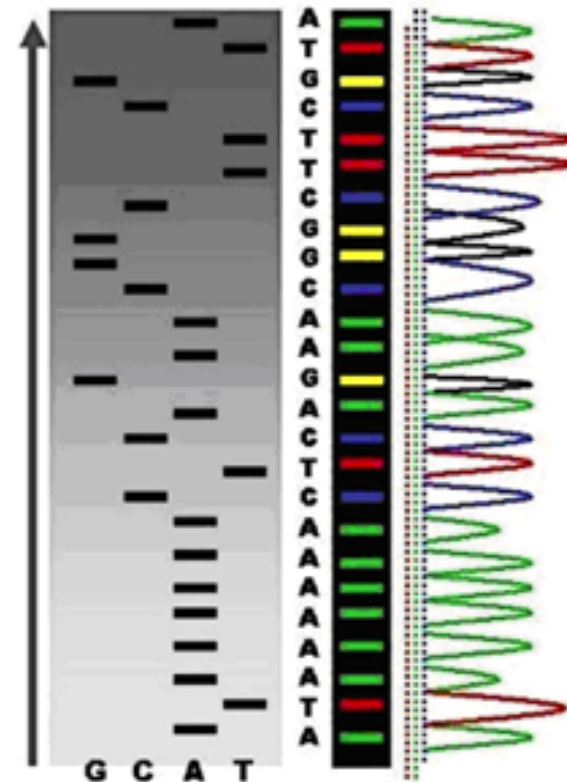
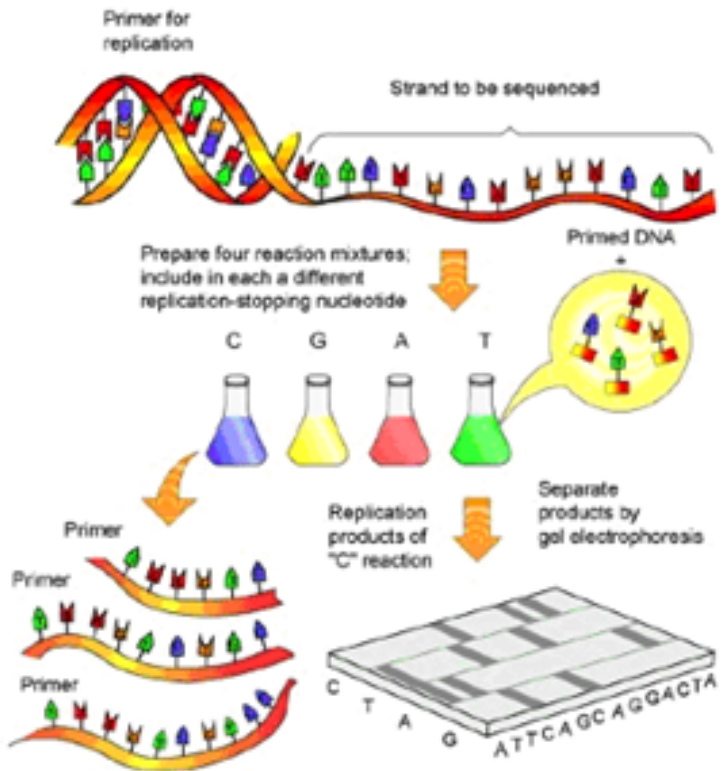
Hunting novel antibiotic resistance genes

Functional metagenomics



Sangerovo sekvenování

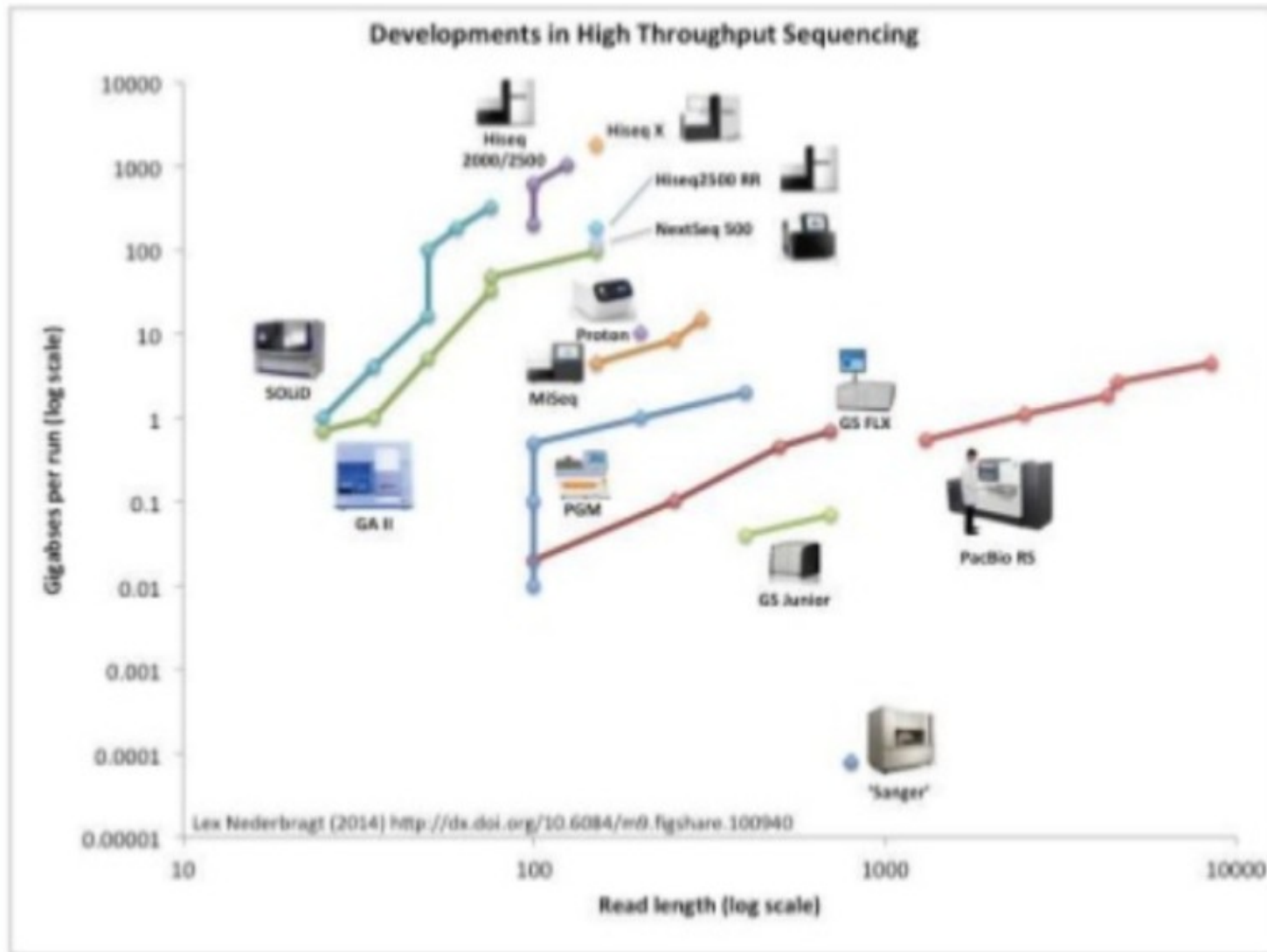
Sequencing by capillary electrophoresis



Fred Sanger+Applied Biosystems

Read sequences as
containing labeled strands

Sekvenování nové generace



Newest Illumina HiSeq X 10 > 1 Tb of sequene data