



Analiza i klasyfikacja grzybów z wykorzystaniem ITS

Nowy protokół do analizy ITS.

Mikrobiom to grzybowa komponenta mikrobiomu i wbrew pozorom odgrywająca ważną rolę w wielu procesach biologicznych, chociażby w kontekście symbiozy, dekompozycji czy także progresji niektórych chorób. Głębsze poznanie tych procesów i występujących zależności może zostać osiągnięte dzięki dokładniejszemu zrozumieniu udziału poszczególnych komponentów tej „układanki”. Aby umożliwić naukowcom eksplorację tego tematu, Illumina przygotowała dedykowane narzędzie, którego głównym założeniem jest szybka i prosta identyfikacja bioty grzybów w próbkach reprezentujących różne środowiska (np. pobranych ze śliny, skóry, gleby, wody czy kału) bez konieczności prowadzenia hodowli komórkowych.

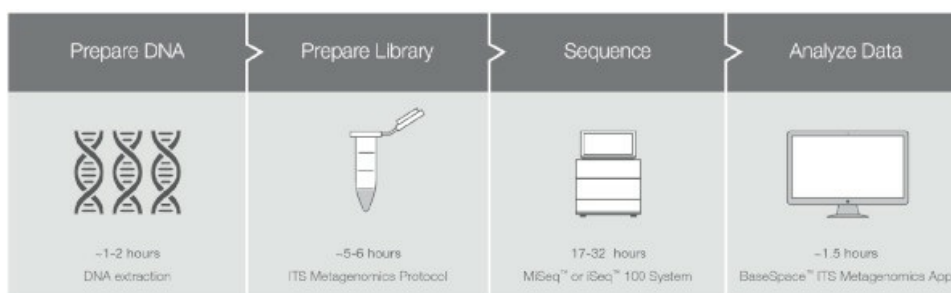


Figure 2: Fungal metagenomics sequencing with the ITS Metagenomics Workflow—The ITS Metagenomics Workflow is part of an integrated NGS workflow that includes library preparation of the ITS1 amplicon, robust Illumina sequencing, and user-friendly data analysis is with the BaseSpace[™] ITS Metagenomics App.

Kluczowe elementy tego rozwiązania to :

- Amplifikacja regionów ITS.

Regiony amplifikowane w przedstawianej procedurze zlokalizowane są w obrębie sekwencji hiperzmiennych ITS1 (pomiędzy genami 18S oraz 5.8S rRNA). Zaletą tego rozwiązania jest duża elastyczność w kwestii stosowania primerów. Jak dokładnie to działa? Po pierwsze użytkownicy mogą wykorzystać sekwencje specyficzne dla starterów zaprezentowane w protokole lub/oraz, na podstawie własnego doświadczenia lub w oparciu o informacje z publikacji zastosować primery o innych sekwencjach np. komplementarnych nie tylko z ITS1 ale także ITS2. Jedynym warunkiem jest zaprojektowanie oligonukleotydów w taki sposób, aby sekwencja specyficzna starterów została dodatkowo wzbogacona o uniwersalne sekwencje adapterowe umożliwiające przeprowadzenie dalszych etapów procedury. W tym układzie syntezę oligonukleotydów należy zamówić we własnym zakresie (u dostawcy oferującego takie usługi) W przypadku starterów testowanych przez Illuminę, informacje o sekwencjach specyficznych oraz adapterowych można znaleźć w przewodniku.

- Inkorporacja indeksów pozwalających na multipleksację.

Kolejną zaletą tego narzędzia jest minimalistyczne podejście do kompletowania i inwestowania w dodatkowe urządzenia i odczytniki. Etap indeksowania bibliotek oparty jest o reakcję PCR, do której potrzebujemy standardowych komponentów(mix PCR) oraz indeksów z serii Nextera XT v2 lub Nextera Cd Indexes. Umożliwiają one kombinację odpowiednio do 384 lub do 96 próbek w jednym sekwencjonowaniu. W efekcie otrzymujemy podwójnie zindeksowane biblioteki (z indeksami i5 oraz i7) co, po pierwsze, gwarantuje właściwą demultipleksację, a po drugie, przyczynia się do redukcji kosztów przeprowadzanej analizy w przeliczeniu na jedną próbkę.

- Sekwencjonowanie.

Odpowiednią skalę rozdzielczości tego typu procedury zapewnia zoptymalizowana konfiguracja sekwenatora z odczytnikami generującymi odczyty o wymaganej długości . Może to być np. sekwenator iSeq lub MiSeq, z zestawem do sekwencjonowania 2 x150 cykli. Rekomendowana liczba odczytów mieści się w zakresie od 15 tysięcy do 100 tysięcy w przeliczeniu na jedną próbkę, co stanowi główną determinantę maksymalnej liczby prób dla danego sekwenatora podczas jednej reakcji sekwencjonowania.

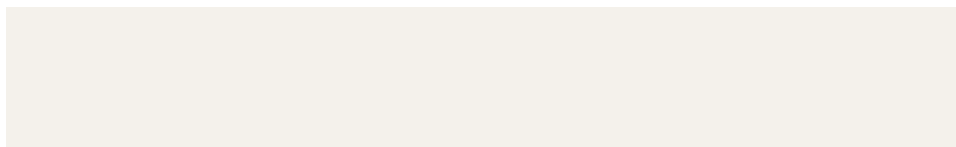
- Analiza z wykorzystaniem dedykowanej aplikacji.

BaseSpace ITS Metagenomics App to oprogramowanie eliminujące potrzebę zagłębiania się w skomplikowane narzędzia bioinformatyczne. Istotą analizy jest przyrównanie otrzymanych odczytów po sekwencjonowaniu do bazy referencyjnej UNITE. Klasyfikacja i kompozycja poszczególnych gatunków przedstawiana jest w postaci różnego rodzaju wykresów czy dendrogramów. Wszystko po to, aby analiza metagenomiczna była prosta i szybka, a przedstawiane wyniki czytelne.

Więcej informacji :

<https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/its-metagenomics-app-note-1270-2018-001-web.pdf>

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/experiment-design/index-adapters-pooling-guide-1000000041074-05.pdf



Adres:

Analityk Genetyka sp. z o.o. sp.k.
Żwirki i Wigury 101
02-089 Warszawa

tel.: +48 22 552 67 16

fax: +48 22 552 67 30

tel. aplikacje: +48 22 299 50 30

www.analitykgenetyka.pl

biuro@analitykgenetyka.pl