

Raport de Activitate

In cadrul proiectului FDI „Centru Zonal de Referință pentru Analiza Metagenomica” (MetaGen@Tm/CNFIS-FDI-2022-0423) au fost realizate următoarele activități (expuse în ordinea regăsită în aplicație la Rezultate/Indicatori).

R1.A.1. Ghid de proceduri de secvențiere 16S bazata pe tehnologia Nanopore

A fost implementat protocolul de lucru pentru secvențierea 16S folosind kitul de secvențiere SQK-16S024 și secvențiatorul Minion MK1C. Acest kit folosește cantități mici de ADN (10ng) și realizează amplificarea preliminară (cu primeri 16S care conțin etichete 5' ce facilitează atașarea adaptorilor de secvențiere) urmata de secvențierea întregii gene 16S. Fluxul de lucru adoptat pentru analiza datele este EPI2ME 16S-BLAST.

Mențiuni:

- În pregătirea acestui protocol, au fost explorate mai multe metode de purificare a ADN bacterian.
- A fost optimizată metoda de spălare a celulelor folosite (Flow Cell Wash Kit, EXP-WSH004), ceea ce a permis reutilizarea acestora (sub condiția existenței a cel puțin 800 de pori funcționali)

R1.A.2. Set de minim 24 de amestecuri bacteriene complexe analizate prin secvențiere 16S Nanopore

A fost folosit kitul de secvențiere 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) care permite analiza în paralel a 24 de amestecuri bacteriene complexe. Au fost folosite probe de fecale de origine umană și animală (canină) recoltate folosind tuburi dedicate DNA/RNA Shield-Fecal Collection (Biozyme). Rezultatele acestor experimente de secvențiere sunt stocate pe calculatoare de la sediul Laboratorului de Diagnostic Biochimic și Molecular (LDBM) și al Catedrei de Biochimie.

Mențiuni:

- pentru optimizarea procedurilor de secvențiere au fost folosite standarde microbiene intestinale și microbiene comunitare
- a fost optimizată procedura de purificare a ADN din probe fecale folosind ZR BashingBead Lysis Tubes și ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit.

Un nou set de probe de fecale urmează a fi analizat în cadrul sesiunii de training programată pentru 29.11.2022.

R1.A.3. Ghid de proceduri de secvențiere metagenomică

1) A fost implementat protocolul de lucru pentru secvențierea ADN bacterian folosind kitul de secvențiere SQK-LRK001 (variantea *cold-chain free* a kitului SQK-RAD004) și aparatul MK1C. Kitul permite analiza ADN bacterian pornind de la cantități de minim 400ng de ADN. Prepararea librăriilor se face în 10 minute urmând un protocol în două etape, folosind o transposază pentru clivarea aleatorie și etichetarea fragmentelor generate, de care, într-o etapă ulterioară, sunt atașați adaptorii de secvențiere rapidă.

2). A fost optimizat și implementat protocolul de lucru pentru secvențierea ADN bacterian folosind kitul de secvențiere SQK-RAD004 și aparatul Minion MK1C. Procedura se bazează pe clivarea transposazică aleatorie și etichetarea fragmentelor generate, urmata de atașarea adaptorilor de secvențiere rapidă.

MetaGenTm_2022

In ambele situații, fluxul de lucru pentru a analiza datele este EPI2ME WIMP (What's In My Pot) versiunea v2021.11.26 ce permite analiza in timp real si agregarea citirilor la nivel de specie conform taxonomiei NCBI. Pentru citirile fără o atribuire fiabilă la sunt utilizate ranguri superioare ale arborelui taxonomic. Dacă nicio poziționare nu este suficient de fiabilă, secvența este etichetată ca "Neclasificată".

Mențiuni:

- Sunt in curs de optimizare protocoale de secvențiere rapida a ADN bacterian extras din urina si sputa, folosind o etapa intermediara de amplificare genomică folosind kituri Qiagen REPLI-g.
- Analiza ARM (Antimicrobial Resistance) (versiunea v2022.08.16-15679) ce permite detectarea genelor (plasmidiale sau genomice) de rezistenta la antimicrobiene este o extensie EPI2ME WIMP si a fost implementat implicit. Nicio gena de rezistenta nu a fost identificata pana in prezent.

R1.A4. Set de minim 12 amestecuri bacteriene complexe analizate

Au fost folosit kitul de secvențiere Field Sequencing si Rapid Sequencing pentru analiza a 12 amestecuri bacteriene complexe. Au fost folosite probe de fecale de origine umana si animala (canina) recoltate folosind tuburi DNA/RNA Shield-Fecal Collection (Biozyme). Rezultatele acestor experimente de secvențiere sunt stocate pe calculatoare de la sediul Laboratorului de Diagnostic Biochimic si Molecular (LDBM) si al Catedrei de Biochimie.

Mențiuni:

- Este in curs de finalizare optimizarea procedurile de multiplexare folosind Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004)
- Au fost comandate celule si kituri ce vor permite trecerea la o noua chimie de secvențiere R14, care permite o acuratețe îmbunătățită a secvențierii de peste 99% (Q20+).

R1.A5. Materiale de curs accesibile in format printat si format digital

Trainingul de 16S sequencing (<https://www.umft.ro/event/training-gratuit-tehnica-16s-nanopore/>) a fost programat pentru 29 noiembrie 2022; au fost înscriși 9 participanți, după cum urmează: trei de la Facultatea de Medicina Dentara, doi de la Clinica de Oncologie Oncohelp, un participant de la Universitatea de vest, un participant de la Spitalul Clinic de Urgenta pentru Copii Louis Turcanu, doi studenți anul 3 MG din cadrul UMFVBT.

Au fost pregătite materiale care detaliază

- prezentarea importantei analizei metagenomice in context clinic (comparativ cu alte metode de identificare bacteriana) – material powerpoint
- procedurile de recoltare de probe biologice in vederea secvențierii 16S,
- purificarea ADN bacterian
- cuantificarea si caracterizarea ADN bacterian (HS dsDNA Assay kit optimizat pentru cuantificare fluorometrica Qubit)
- prepararea librăriilor de secvențiere 16S in condiții de multiplexare
- amorsarea celulelor de secvențiere R9.4.1 folosind Flow cell Priming Kit
- încărcarea librăriilor pe celule de secvențiere (R9.4.1)
- programarea si lansarea programului de secvențiere 16S pe MK1C
- încărcarea rezultatelor brute (fastq) si analiza rezultatelor folosind suita EPI2ME 16S-BLAST.