



RAPORT DE IMPLEMENTARE

Cod final de înregistrare proiect: CNFIS-FDI-2023-F-0355

Denumire instituție: Universitatea de Medicină și Farmacie ”Victor Babeș” din Timișoara

Titlu proiect: Analiza bioinformatică metagenomică integrată a datelor de secvențiere

Nanopore generate utilizând chimia Q20+

Domeniu vizat: 6. Dezvoltarea capacității instituționale pentru cercetare în universități

Bugetul aprobat: 194.500 LEI

Raport tehnic (cuantificarea rezultatelor și gradul de atingere a indicatorilor asumați)

În vederea atingerii obiectivelor asumate în proiect, au fost întreprinse următoarele activități:

R1.A.1. Ghid de proceduri de secvențiere metagenomică folosind platforma Nanopore și chimia Q20+ cu aplicații pe amestecuri complexe.

1. Au fost folosite și optimizate mai multe metode de purificare a ADN bacterian din probe biologice de origine umană și animală.
2. A fost implementat protocolul de lucru pentru secvențierea metagenomică folosind kitul de secvențiere rapidă V14-gDNA SQK-RAD114 de la Oxford Nanopore. Acest kit permite secvențierea integrală a genomului bacterian pornind de la cantități de 100ng de ADN purificat. 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 etapa ulterioară, sunt atașați adaptorii de secvențiere rapidă. Fluxul analitic bioinformatic utilizat subsecvent este EPI2ME WHIMP sau MEGANE6.
3. Acest protocol a fost optimizat și utilizat pentru celulele MinION R10.4.1 (FLO-MIN114) care conțin o matrice de senzori integrați într-un circuit integrat specific aplicației (ASIC) și nanoporii R10 cu cap dublu de citire utili pentru experimentele în care este necesară o precizie ridicată a consensului (peste 99%).
4. 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).



5. Au fost folosite secvențiatoarele Minion MK1C și MK1B. În vederea utilizării MK1B, am instalat și funcționalizat pe computerul desktop dedicat acestui tip de analiza suitele MinKNOW (folosită în controlul propriu-zis a secvențierii, basecall și demultiplexarea eșantioanelor codificate cu coduri de bare), EPI2ME (platforma cloud cu aplicații în clasificarea taxonomică) dar și EPI2ME labs, cu următoarele workflows:

- wf-basecalling - permite analiza primară a datelor sub forma fluxurilor de lucru Nextflow
- wf-alignment - permite procesul de cartografiere a secvențelor pornind de la un genom de referință și generarea statisticii primare. De asemenea, poate fi folosit pentru analiza abundenței speciilor prezente în eșantion analizat.
- wf-metagenomics include software-urile KRAKEN2 și MiniMap care permit clasificarea taxonomică a secvențelor metagenomice.
- wf-bacterial-genomes folosit pentru asamblarea și anotarea genomului bacterian.

În plus, am instalat suita analitică wf-transcriptomes care permite asamblarea transcripturilor rezultate din citirile ADNc sau direct a ARN. Acest flux de lucru ne va oferi, pe viitor, capacitatea de a analiza expresia diferențială a genelor în celule procariote și eucariote. Toate aceste suite bioinformatică au fost instalate, respectiv operaționalizate, iar ghidul de proceduri analitice folosind tehnologia Nanopore pentru analiza amestecurilor complexe a fost pus la dispoziție accesând link-ul: https://www.umft.ro/ro/metagentm-2-0_2023/

R1.A2. Ghid de proceduri bioinformatică de analiza a amestecurilor complexe folosind suitele UNIFRAC și MEGANE6.

Procedurile bioinformatică de analiză comparativă a amestecurilor bacteriene complexe folosind aceste suite au fost grupate în două documente încărcate pe https://www.umft.ro/ro/metagentm-2-0_2023/.

R2.A1. Set de minim 24 de probe biologice complexe analizate prin secvențiere metagenomică folosind chimia Q20+.

Au fost analizate mai multe tipuri de probe biologice (fecale, sputa, izolate bacteriene) de origine umană și animală (suine).



Au fost folosite mai multe kituri de extracție pentru optimizarea (cantitativă și calitativă) a purificării ADN bacterian și diminuarea cantității de ADN eucariot (uman sau animal) în amestecul final supus secvențierii.

1. Pentru probele de fecale (recoltate în recipiente dedicate DNA/RNA Shield-Fecal Collection) am folosit kitul de secvențiere rapidă V14-gDNA SQK-RAD114 optimizat pentru chimia Q20+, în conjuncție cu kitul de Native Barcoding Kit 24 V14 care permite etichetarea în vederea analizei în paralel a 24 de amestecuri bacteriene complexe. Au fost folosite probe de fecale de origine umană și animală (suină, canină). Rezultatele acestor experimente de secvențiere au fost analizate folosind suitele Epi2Me WHIMP, EPI2ME ARMA și Megane6; au fost identificate speciile bacteriene componente ale microbiomului fiecărei probe în parte (date cantitative și calitative la nivel de specie) precum și genele de rezistență la antibioterapie. Datele în format primar demultiplexat și analiza finală taxonomică și ARG sunt stocate la sediul Catedrei de Biochimie-UMFVBT.

2. Pentru probele de izolat bacterian *Vibrio alginolyticus*, am folosit o metodă de purificare ce presupune utilizarea ZR BashingBead Lysis Tubes și ZymoBIOMICS DNA Miniprep. Secvențierea propriu-zisă a fost efectuată folosind kitul de secvențiere rapidă V14-gDNA SQK-RAD114 optimizat pentru chimia Q20+. Rezultatele experimentelor de secvențiere au fost prelucrate folosind suita EPI2MELABS wf-metagenomics WHIMP pentru identificarea eventualilor contaminanți și EPI2ME LABS wf-bacterial-genomes pentru reconstrucția genomului bacterian. Toate datele de secvențiere primară și de analiză metagenomică sunt stocate la sediul Catedrei de Biochimie.

3. Au fost testate mai multe metode de purificare ADN a probelor de spută în vederea analizei metagenomice, urmărind îmbogățirea fizică în ADN bacterian, fie îmbogățirea rezultatelor de secvențiere în citiri metagenomice. Secvențierea propriu-zisă a fost efectuată folosind kitul de secvențiere rapidă V14-gDNA SQK-RAD114 optimizat pentru chimia Q20+.

Rezultatele acestor experimente au fost analizate folosind suitele Epi2Me WHIMP, EPI2ME ARMA, UNIFRAC și Megane6; au fost identificate speciile bacteriene componente ale microbiomului fiecărei probe în parte (date cantitative și calitative la nivel de specie), precum și genele de rezistență la antibioterapie. Datele în format primar demultiplexat și analiza finală taxonomică și ARG sunt stocate pe calculatoare de la sediul Catedrei de Biochimie.