



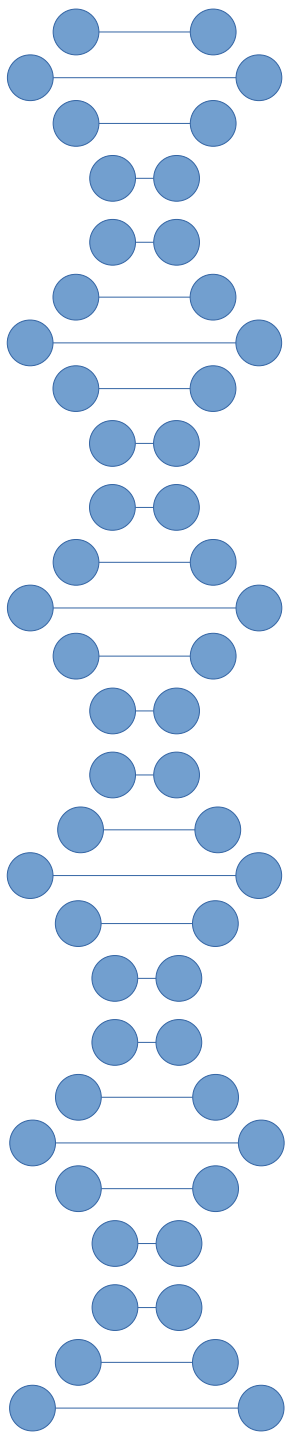
Основные принципы метагеномного анализа

Полев Дмитрий Евгеньевич, к.б.н.
ст.н.с., руков. группы метагеномных исследований,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им.
Пастера

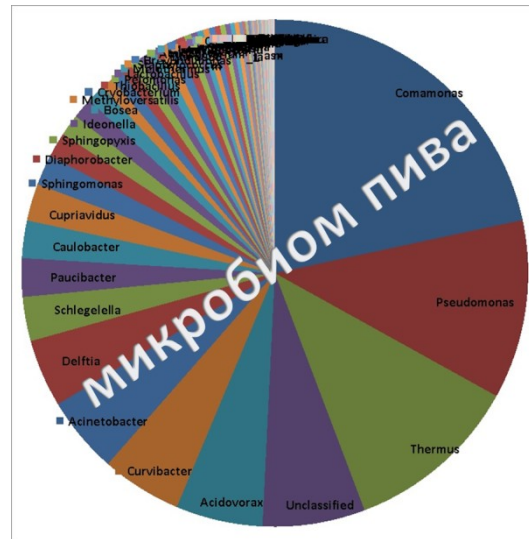
06.09.2023



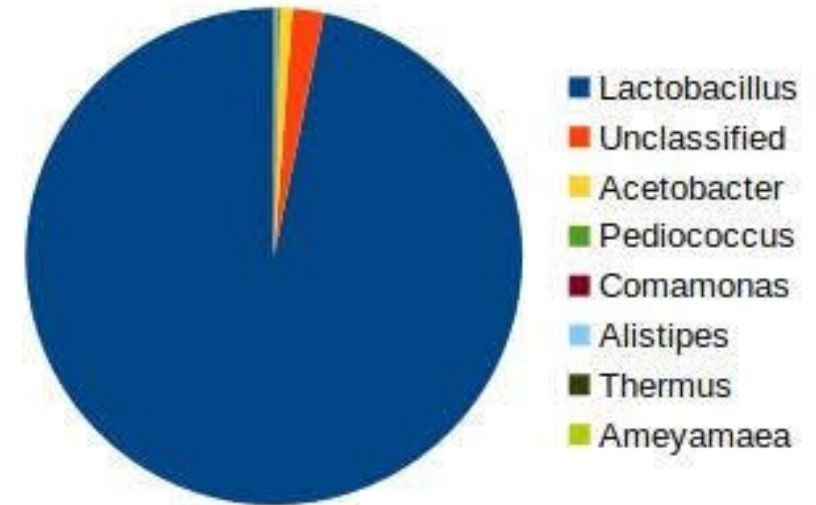
Метабаркодирование	Секвенирование переменных участков гена (16S/18S рРНК) с использованием праймеров к его консервативным участкам	<p>Относительно дешёвый, достаточно отработанный метод. Можно применять на системах с короткими прочтениями.</p> <p>Показывает только микробный профиль. Ограничен по разрешающей способности (максимум до вида), требует отдельного анализа прокариот и эукариот, не показывает вирусы и бактериофаги, не показывает функциональный профиль микробиоты</p>
Полногеномное метагеномное секвенирование	Секвенирование всей ДНК в образце	<p>Показывает все организмы, содержащие ДНК, включая вирусы. Позволяет изучать функциональный потенциал микробиоты.</p> <p>Относительно дорого, предпочтительно иметь длинные прочтения, не позволяет анализировать РНК-содержащие вирусы</p>
Секвенирование метатранскриптома	Секвенирование всей РНК в образце	<p>Позволяет обнаружить любые организмы и вирусы по РНК. Показывает функциональный профиль микробиоты в момент времени.</p> <p>Относительно дорого, предпочтительно иметь длинные прочтения</p>



Микробиомы могут быть самые разные



Кислое пиво, роды



Всегда относительные количества?

Планирование – основа любого эксперимента



CENSORED!!!

Серьёзный научный журнал



CENSORED!!!

Развлекательный журнал



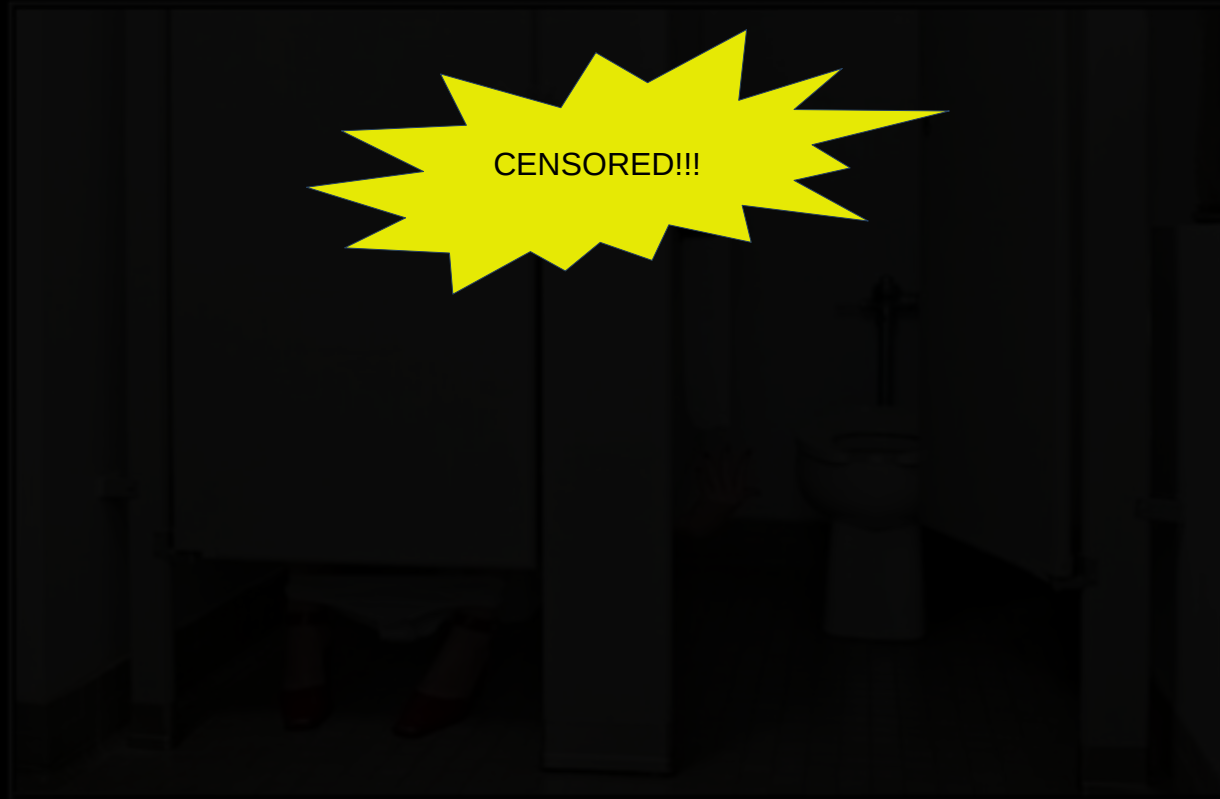
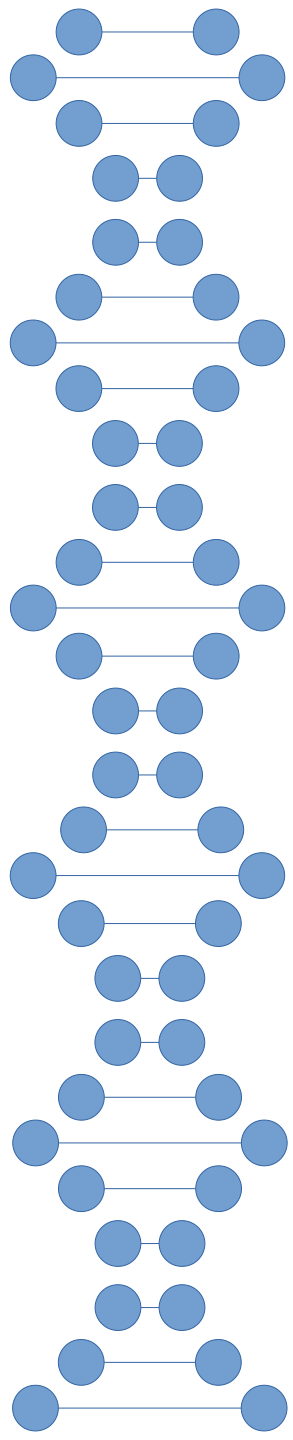
Планирование – основа любого эксперимента



CENSORED!

Серьёзный научный журнал

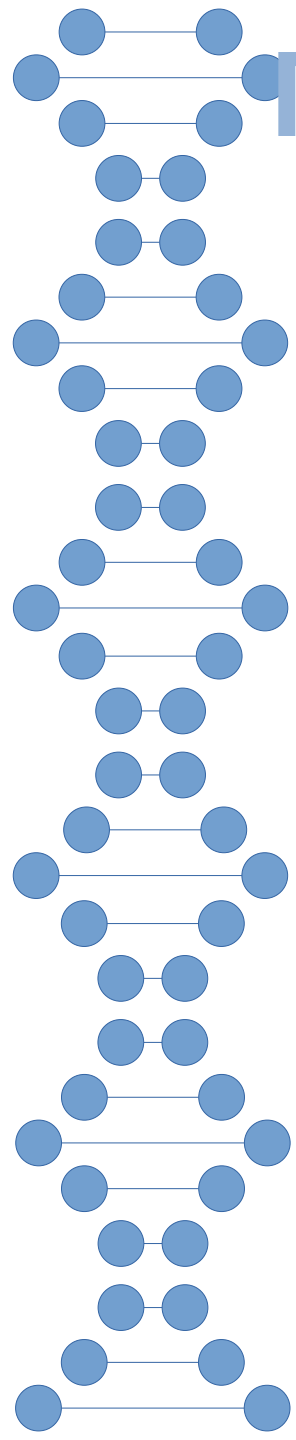
- Поставить цели и задачи
- Подобрать объект и группы для исследования, продумать контроли
- Продумать методы анализа данных
- Продумать и отработать «на берегу» методы сбора, консервации и транспортировки материала
- Подобрать и отработать методы выделения ДНК/РНК
- Подобрать и отработать методы приготовления библиотек и секвенирования



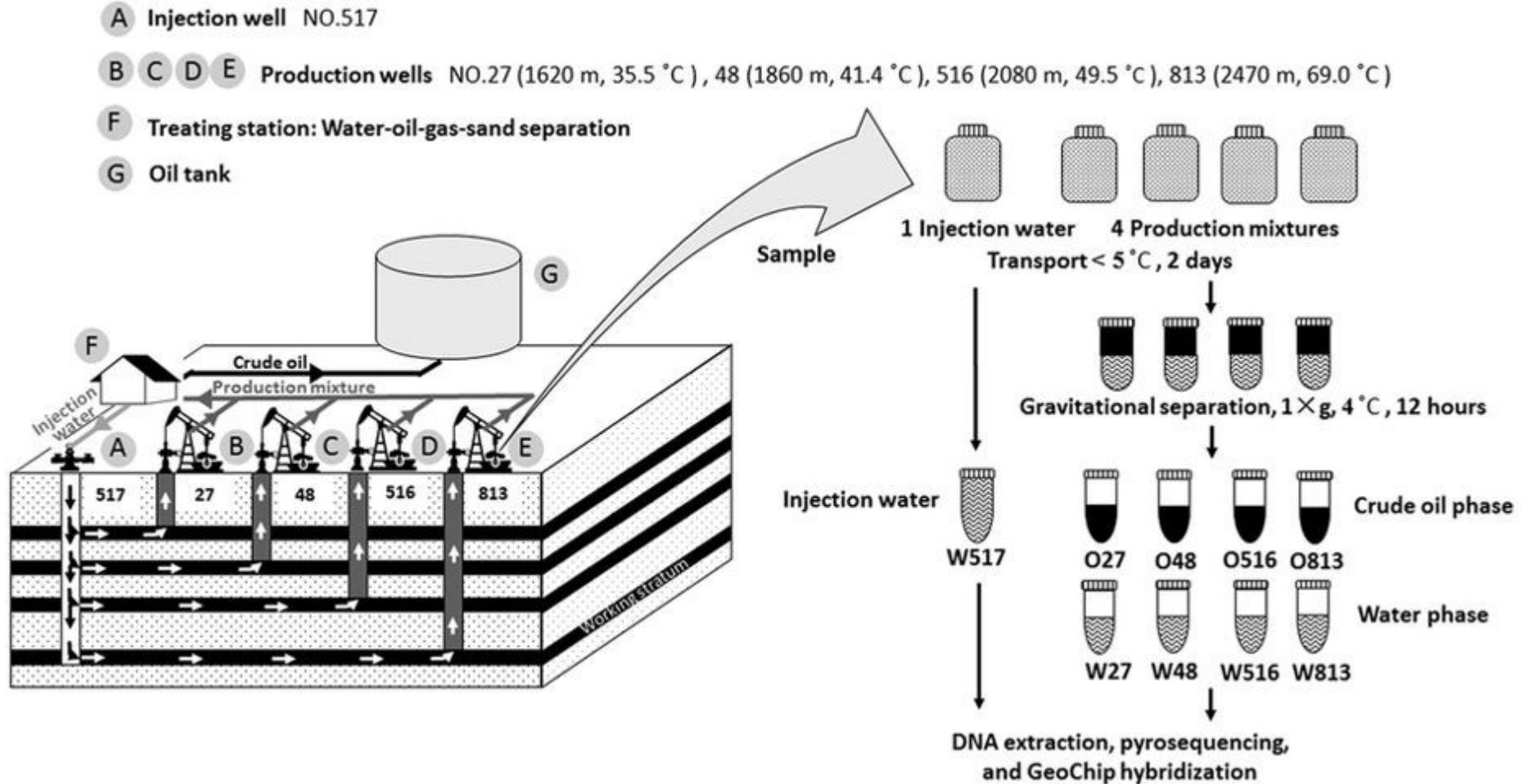
Прежде, чем приступить к реализации
проекта
убедись в наличии ресурсов

Репрезентативность в основе всего





Проблема сбора, транспортировки и хранения материала

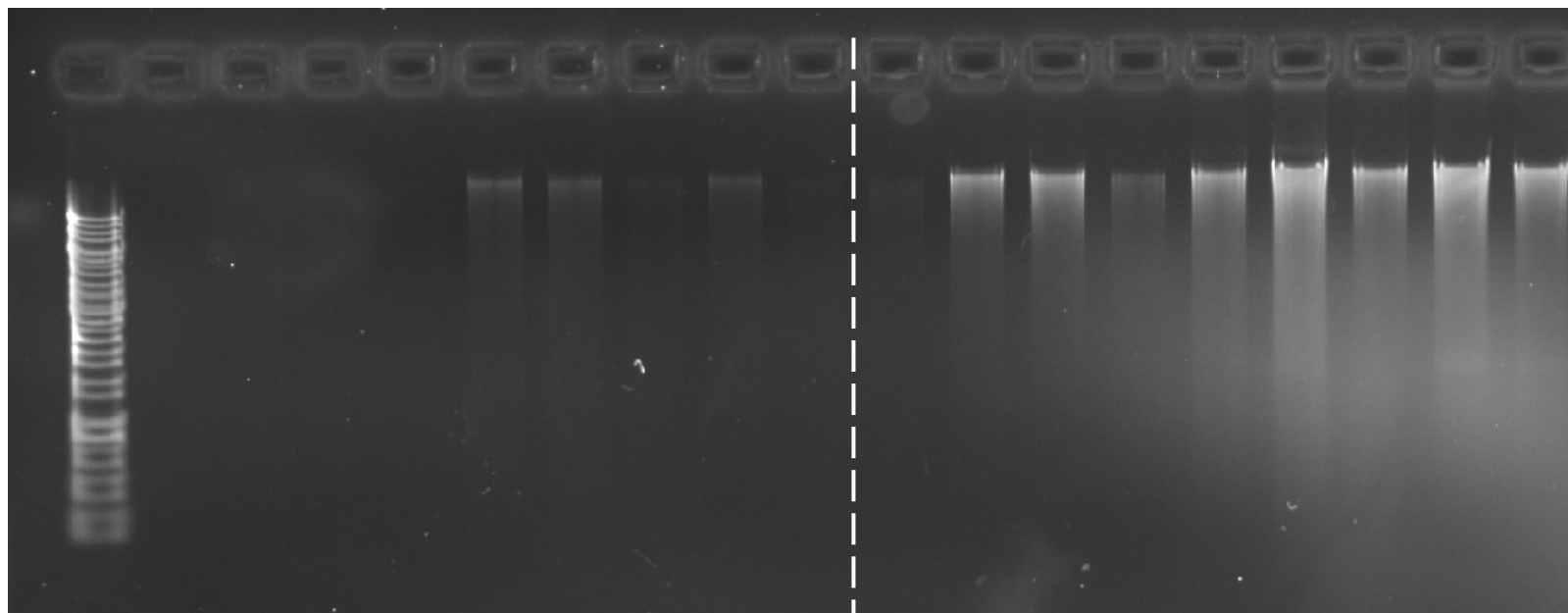


Scientific Reports **volume5**, Article number: 16057 (2015) <https://doi.org/10.1038/srep16057>

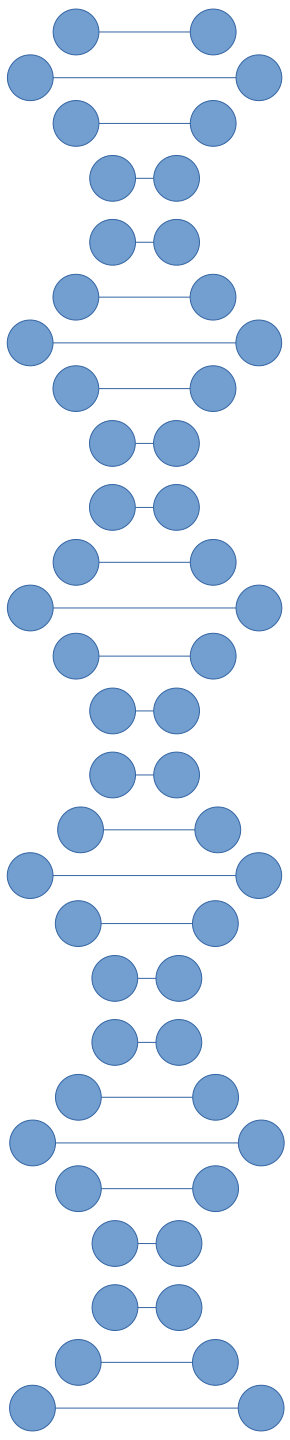
Проблема выделения НК

Метод выделения 1

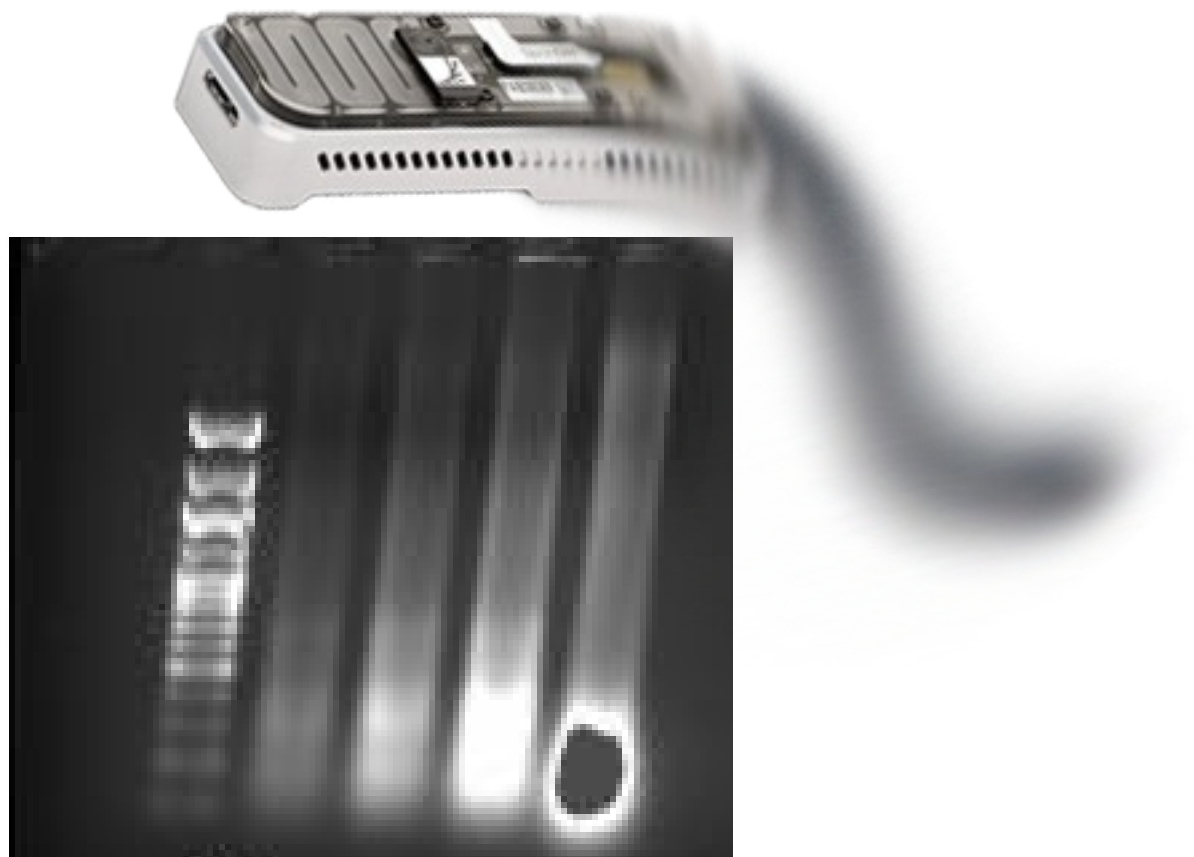
Метод выделения 2



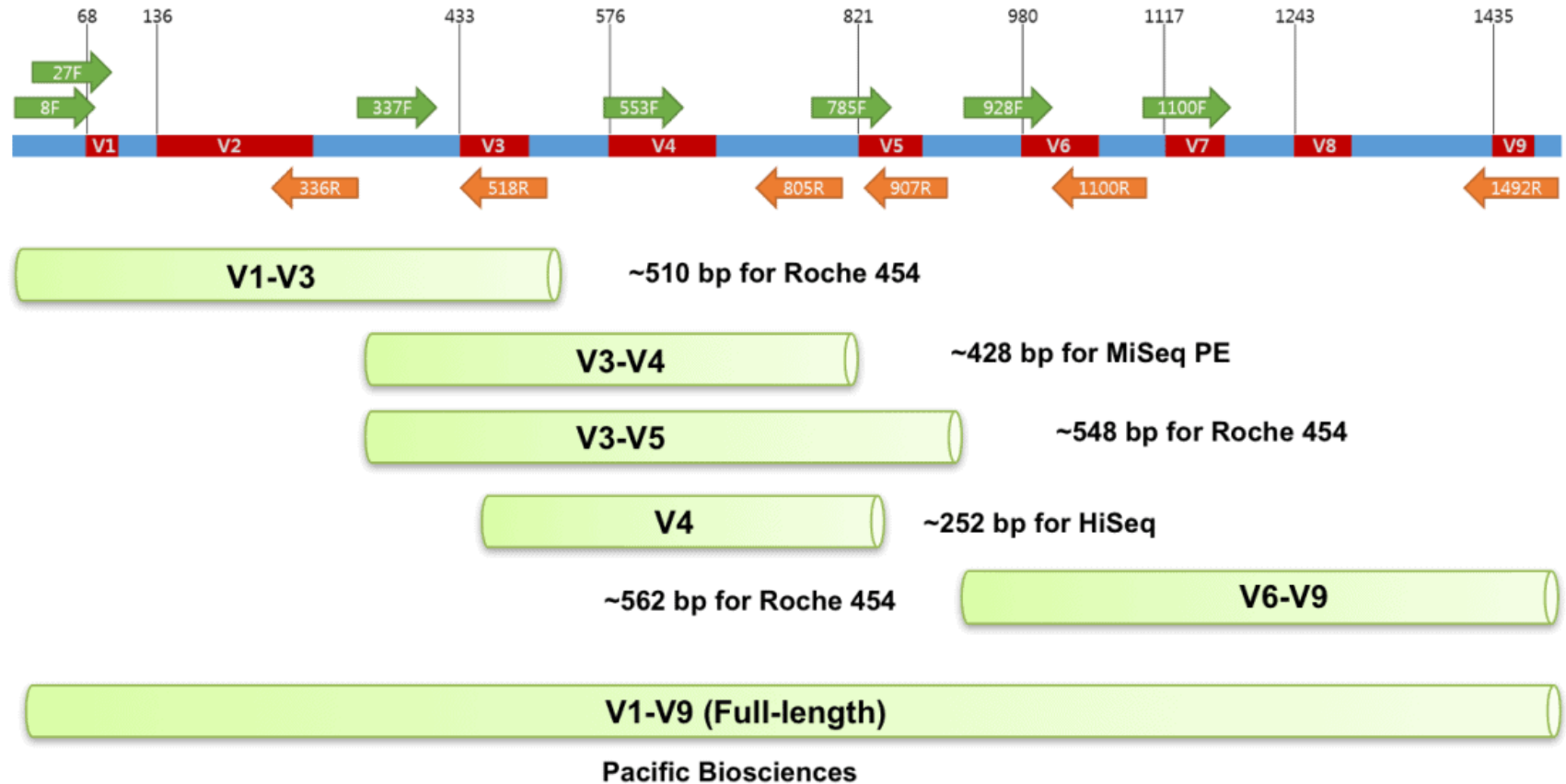
Проблема качества препарата НК



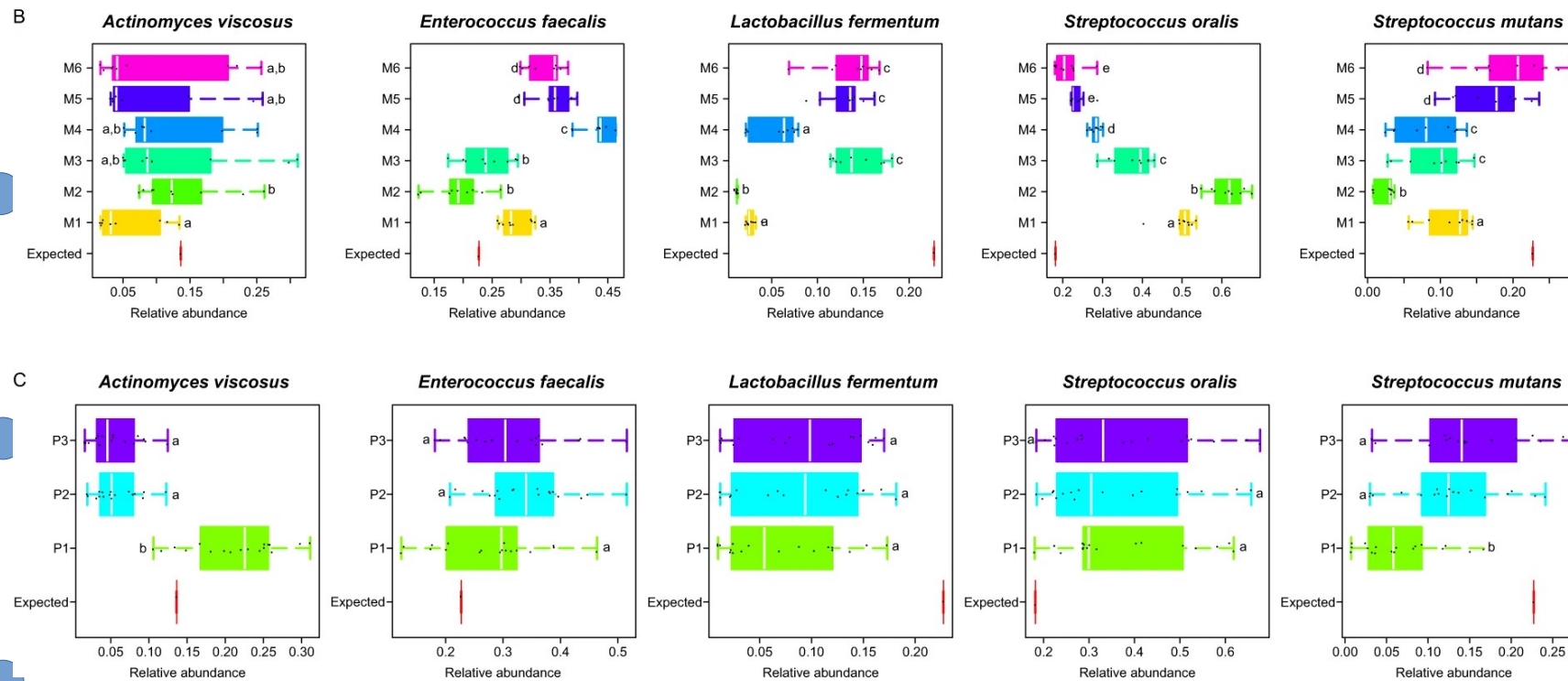
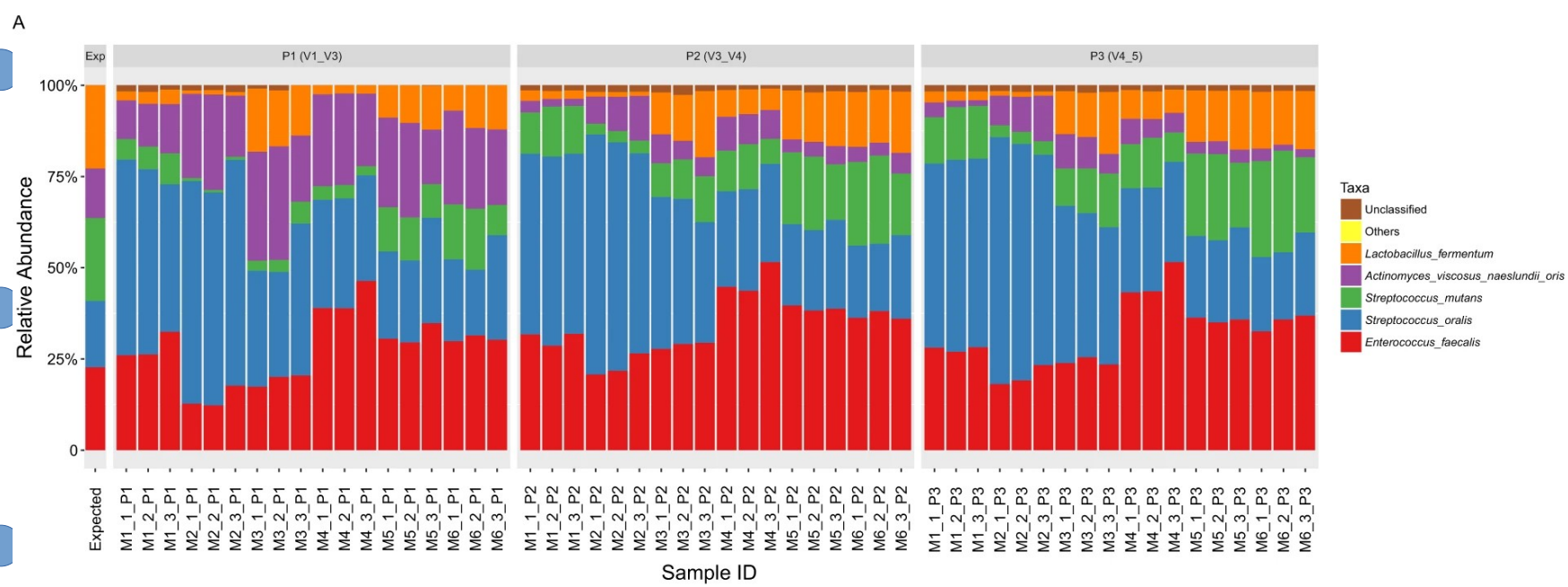
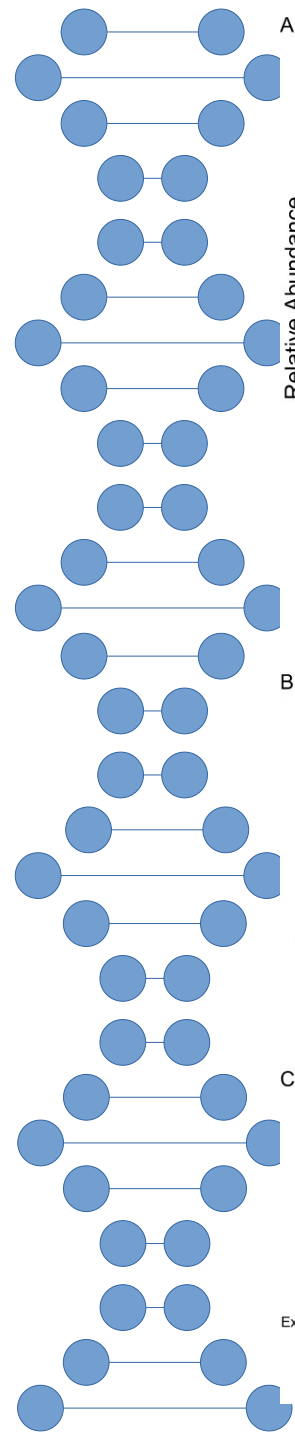
Сбор
Транспортировка
Хранение
Выделение

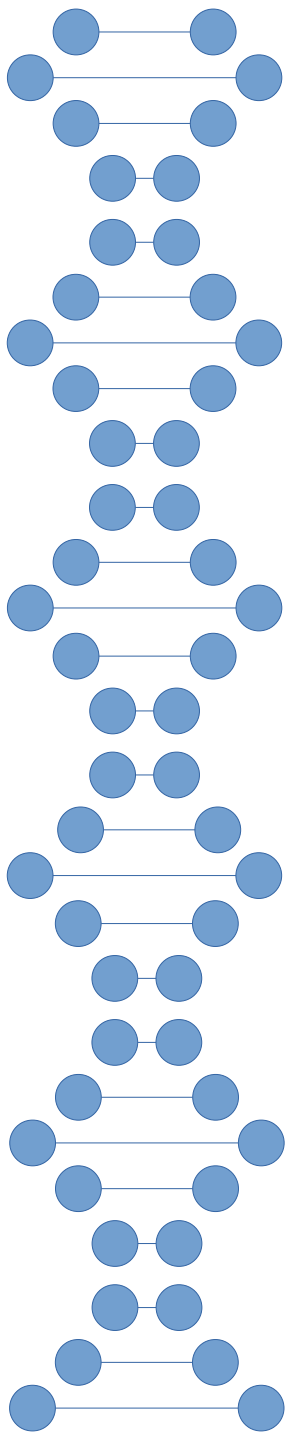


Выбор праймеров для 16S рРНК



<https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>





Проблема неравномерной амплификации

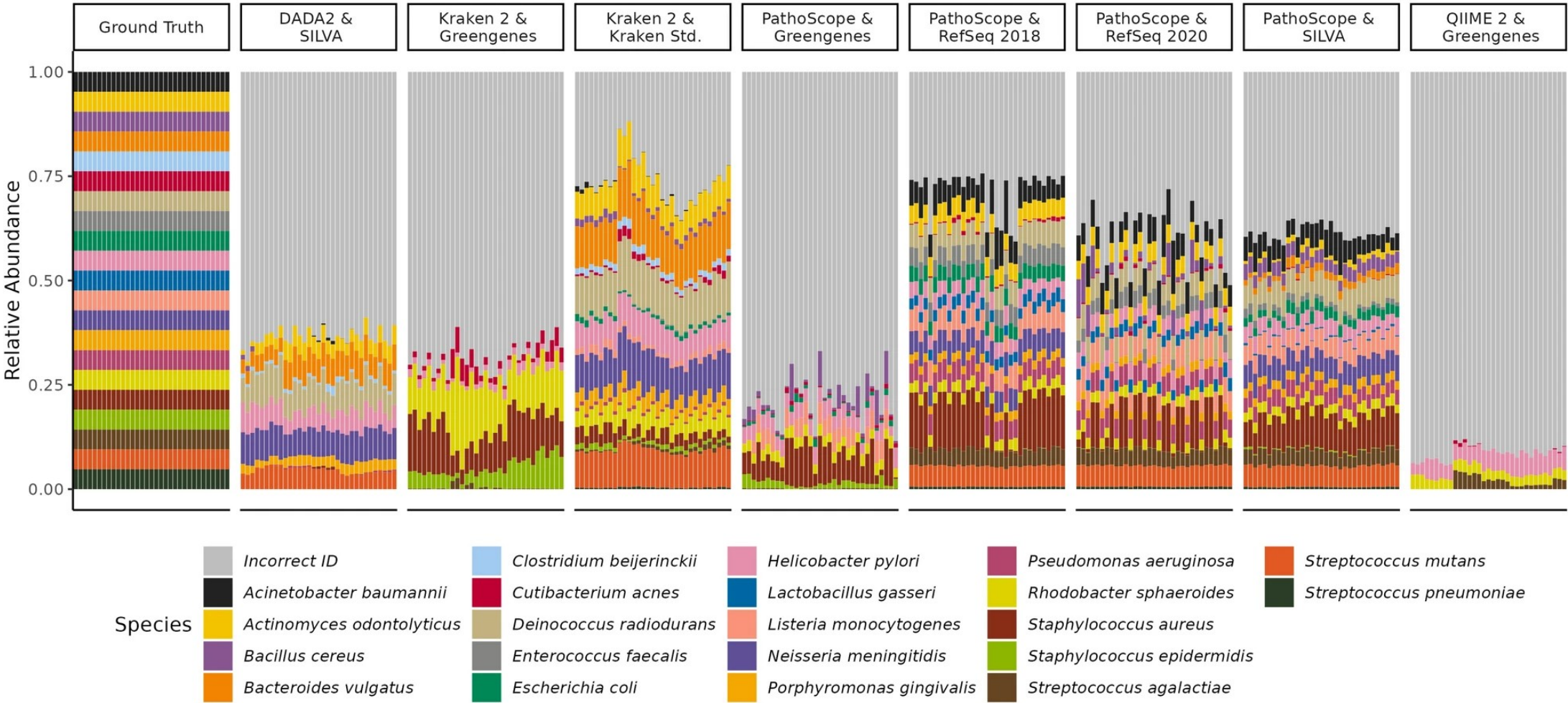
	$^{\wedge}5$	$^{\wedge}8$	$^{\wedge}15$
2	32	256	32768
1,95	28,2	209	22414
1,9	24,7	170	15181
1,85	21,7	137	10176

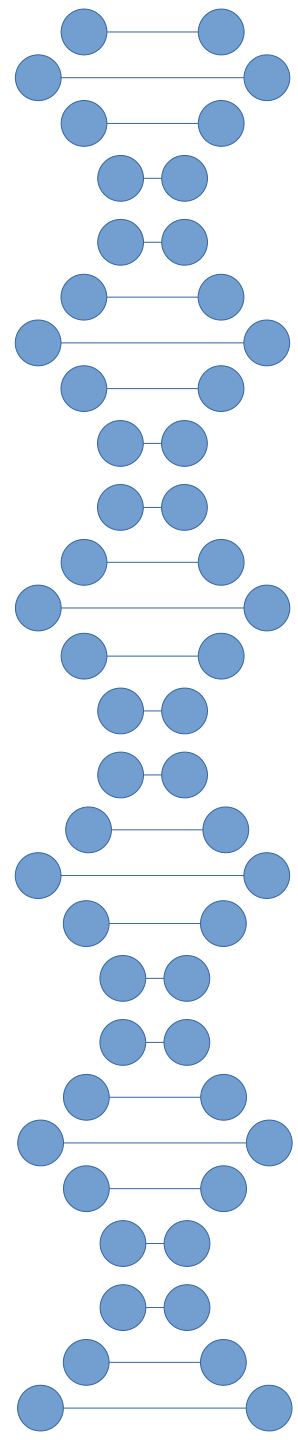
малопредставленные таксоны могут теряться!

Проблема методов обработки данных

Stacked bar plot of identified species

Kozich et al. (2013) samples





Расходимся?