CIRCLES
CITY TOUR - HELSINKI

Raportti EUC169

Wellmicro Srl – NGS Lab:
Barbara Santacroce, Dr, Biologist
Andrea Marcante, Dr, Biotechnologist
Antonella Padella, PhD, Biotechnologist
Alena Velichevskaia, Dr, Biologist

Wellmicro Srl – NGS Analysis:
Elisa Viciani, PhD, Molecular Biologist

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.

Johdanto

Kasvit, eläimet ja ihmiset elävät yhteiseloa satojen miljardien mikrobien kanssa. Tätä mikro-organismien populaatiota, joka elää elävissä olennoissa ja niiden ympärillä kutsutaan mikrobiomiksi. Se koostuu bakteereista, viruksista, sienistä, levistä ja alkueläimistä., Mikrobien geneettistä materiaalia eli DNA:ta käytetään mikrobiomin koostumuksen ja toiminnan analysoimiseen.

Tähän tieteelliseen haasteeseen voidaan nyt vastata viimeaikaisten molekyylibiologisten läpimurtojen ansiosta.

Kertoakseen mikrobiomin tärkeydestä ihmisille, terveydellemme ja koko ruokajärjestelmälle CIRCLES-hanke on osallistanut kansalaisia mukaan mikrobiomien kartoitustyöhön useassa Euroopan maassa "City Tours" kampanjan avulla.

Materiaali ja menetelmät

Uuden sukupolven (NGS) sekvensointi

DNA uutettiin ja puhdistettiin käyttämällä DNeasy PowerSoil Pro -reagenssisarjaa (Qiagen); DNA määrän arvioitiin käyttämällä QIAxpert System -laitetta. NGS-kirjastot valmistettiin S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-211 alukesarjan avulla Illumina-protokollan mukaisesti. Nextera XT -reagenssisarjaa käytettiin 16S-rRNA-geenin V3-V4-alueen monistamiseen. Kirjastot laimennettiin 4 nM:iin, denaturoitiin ja laimennettiin 5 pM:iin ennen 20 % PhiX:n lisäämistä. Näytteet sekvensointiin MiSeq-alustalla, Illumina MiSeq V2 2 x 250 bp (paired-end). Kontaminoivien mikro-organismien havainnoimiseksi negatiiviset kontrollit (ei näyttettä) käsiteltiin samanaikaisesti koenäytteiden kanssa.

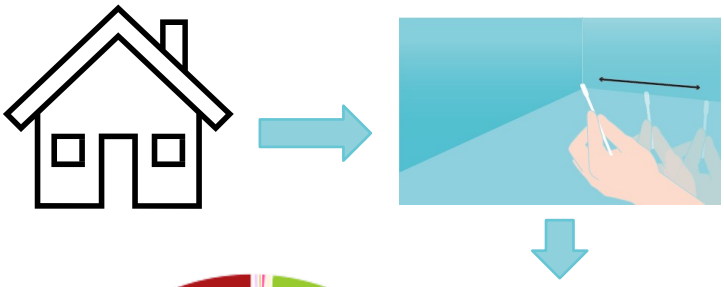
Tietojen analysointi

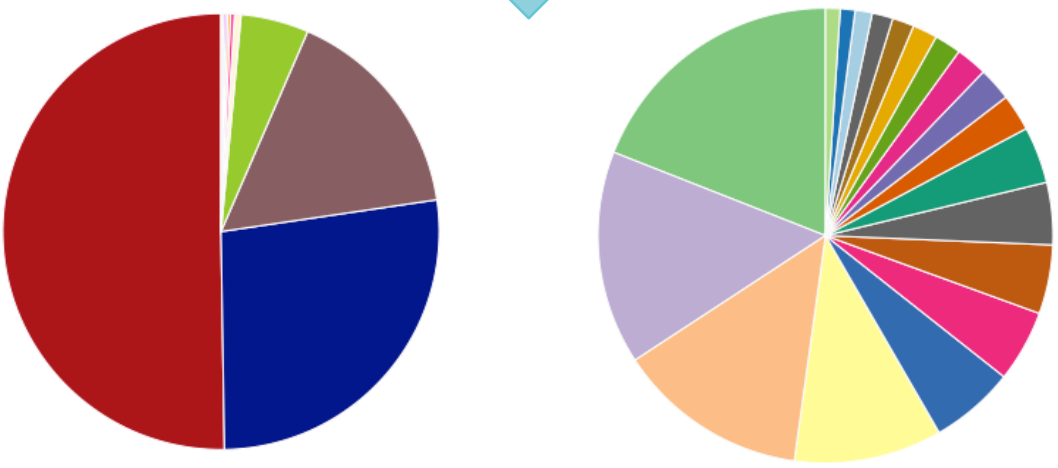
Sekvenssit analysoitiin QIIME22-versiolla (2020.6). DADA23-laajennusta (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) käytettiin taustan ja kimeerien poistamiseen sekä ASV:ien (Amplicon Sequence Variants) luomiseen. Laatusuodatus ja klusterointi tehtiin VSEARCH4:llä. Taksonominen luokittelu suoritettiin SILVA-tietokannan versiolla 132. Analyysit suoritettiin käyttämällä R-versiota 4.0.3 ja Rstudio v1.4.1103 R-kirjastojen phyloseq5,6, ggplot27, tidyverse, tidyr, ape, ggpubr ja dplyr kanssa. Negatiivisissa prosessikontrolleissa olevat ympäristön epäpuhtaudet suljettiin pois käyttämällä decontam8 R-kirjastoa.

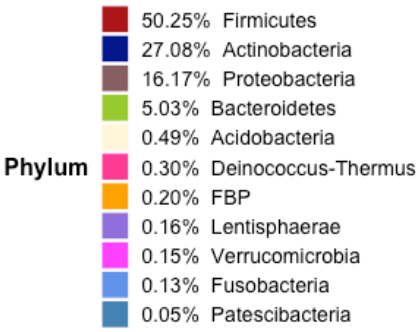
This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.

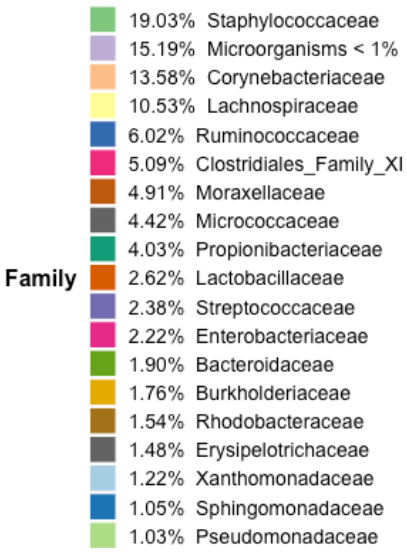
Tulokset

Alla on näytteessä tunnistettujen bakteeriryhmien suhteellinen runsaus (%) pääjakson (vasemmalla) ja heimon (oikealla) taksonomisella tasolla:









Tämä asiakirja näyttää analysoidun näytteen bakteerikoostumuksen ilmaistuna prosentteina suhteellisesta runsaudesta (%) pääjakso (Phylum) ja heimo (Family) taksonomisilla tasoilla (katso lisätietoja kohdasta Materiaalit ja menetelmät). Ensimmäinen muodostaa yleisen luokituksen helpompaa lukemista varten (vähemmän ryhmiä), kun taas heimo mahdollistaa yksityiskohtaisemman arvioinnin (enemmän ryhmiä). Nämä kaksi taksonomista tasoa ovat tietyn tilan kaksi eri havainnointitasoa.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.

Johtopäätökset

Tuloksia ei ole tarkoitettu tutkimukseksi taudinaiheuttajista tai mikrobiologisesta kontaminaatiosta, eivätkä ne raportoi minkäänlaista tulkintaa tiedoista, vaan ne ovat vain tiedotus- ja valistustarkoituksiin.

Jos olet saanut tämän raportin, se tarkoittaa, että olet osallistunut aloitteeseemme ja tästä kiitämme sinua kutsumalla sinut seuraamaan meitä verkkosivuilamme ja sosiaalisen median kanavissamme! Helsingin kartoitusprojektin täydelliset tulokset julkaistaneen tieteellisessä julkaisussa (anonyymit ja aggregoidut tiedot).

Viitteet

1. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1–e1 (2013).
2. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology 2019 37:8* **37**, 852–857 (2019).
3. Hall, M. & Beiko, R. G. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1849 113–129 (Humana Press Inc., 2018).
4. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, e2584 (2016).
5. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**, e61217 (2013).
6. Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* **5**, 1492 (2016).
7. Wickham, Hadley. *Ggplot2 : elegant graphics for data analysis*. (Springer, 2009).
8. Davis, N. M., Proctor, Di. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **6**, 226 (2018).
9. CRAN - Package vegan. https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html.
10. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).

Circles

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.