

KUZEY BİYOTEKNOLOJİ

Yeni Nesil Dizileme Hizmetleri -Biyoinformatik Analiz Hizmetleri-Oligonükleotid Sentezi Hizmetleri



METABARKODLAMA ANALİZ RAPORU



Projelendirme

Proje Yürütücüsü	
Proje Konusu	
Kurumsal Bilgi	
Örneklem Tipi	Su örnekleri
Örneklem Büyüklüğü	
Analiz	16S V3-V4 Gen Bölgesi Amplikon Dizileme
Sistem	İllumina Miseq

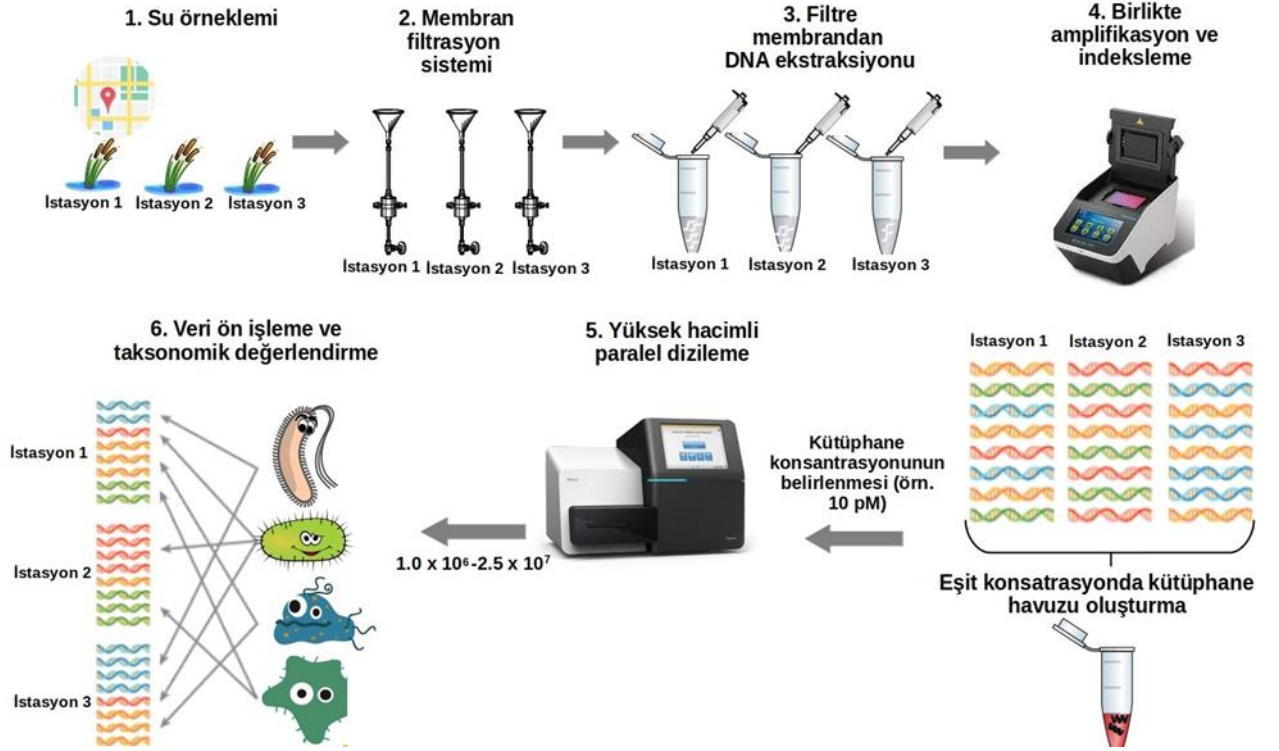


Deneysel Aşama

Total DNA izolasyonu: 50 mM TE çözeltisi içerisinde krayo tüplerde saklanan filtreler steril makas yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra bu krayo tüpler yaklaşık 30 dk boyunca vortekslenmiş, sonrasında filtre parçaları uzaklaştırılmış, kalan TE çözeltisi 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine eşit olarak dağıtılmış ve tekrar santrifüj edilerek tek bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Bu havuz durumunu kazanan ve tüm olası mikrobiyal hücreleri içerecek olan bu karışım tüpüdür. Total DNA bu 100 µl hacme sahip hücre süspansiyonundan PowerWater DNA izolasyon kiti ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kalite/Kantite tayini: DNA konsantrasyonları Qubit çift-zincirli DNA HS Assay kiti kullanılarak Qubit 4.0 florometre ile ölçülmüş ve daha sonra -20 °C'de saklanmıştır.

16S V3-V4 ampikon dizileme: 16S rRNA genlerinin V3-V4 hiper-değişken bölgesinin Bacteria-Archaea özgü evrensel oligonükleotidler kullanılarak PCR ile ampikon inşaları yapılmıştır. Bu kapsamda kullanılacak primerler ise PCR1_F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' ve PCR1_R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' olup bu primerlere F ve R adaptör dizileri eklenecektir. Bu primer çifti yaklaşık olarak 468 bç (433 ila 482 bç arasında değişkenlik sergilemektedir) uzunluğunda bir bölgenin çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır. Kütüphane hazırlık aşamasında saflaştırma ve indeks primerler ile PCR işlemleri her bir örnek için gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kütüphaneler eşit konsantrasyonlarda birleştirilerek dizileme öncesi son konsantrasyonu 10 pM olarak ayarlanmıştır. Birleştirilmiş bu kütüphane Illumina Miseq platformunda, 2 x 251 bç kimyası (V2- 500 Nano flow cell) kullanılarak ileri ve geri yönlü okumalar (pair-end) olacak şekilde okunmuştur.



Şekil 1. Çevresel su örneği biyoçeşitliliğinin incelenmesinde laboratuvar iş akışı



Veri Analiz Aşaması

Biyoinformatik analizler: Dizilerin kalite skorlarının kontrol edilmesi amacıyla FastQC v0.11.5 kullanılmıştır. FastQC profiline dayalı olarak ham dizi okumalarından adaptörler ve kalitesiz okumaları/dizileri çıkarmak için Trimmomatic-0.33 programı kullanılmıştır (Bolger ve ark. 2014). Bu aşamadan sonraki biyoinformatik analizler çoğu QIIME2 (Bolyen ve ark. 2019) pipeline ile gerçekleştirilmiştir. Kimerik dizilerin uzaklaştırılması QIIME2 içerisinde yer alan DADA2 eklentisi (Callahan ve ark. 2016) ile yapılmıştır. Sonrasında Moleküler Operasyonel Taksonomik Birimler (MOTUs) QIIME2 içerisinde yer alan VSEARCH (Rognes ve ark. 2016) kullanılarak belirlenmiştir. Alfa ve beta çeşitlilik analizleri (Shannon, Bray-Curtis, Jaccard, Simpson gibi indexler) QIIME2 pipeline kullanılarak hesaplanmıştır. Bu MOTUlerin taksonomik statüleri OTUs GreenGenes veritabanı referans alınarak %97 benzerlik oranına göre oluşturulmuştur.

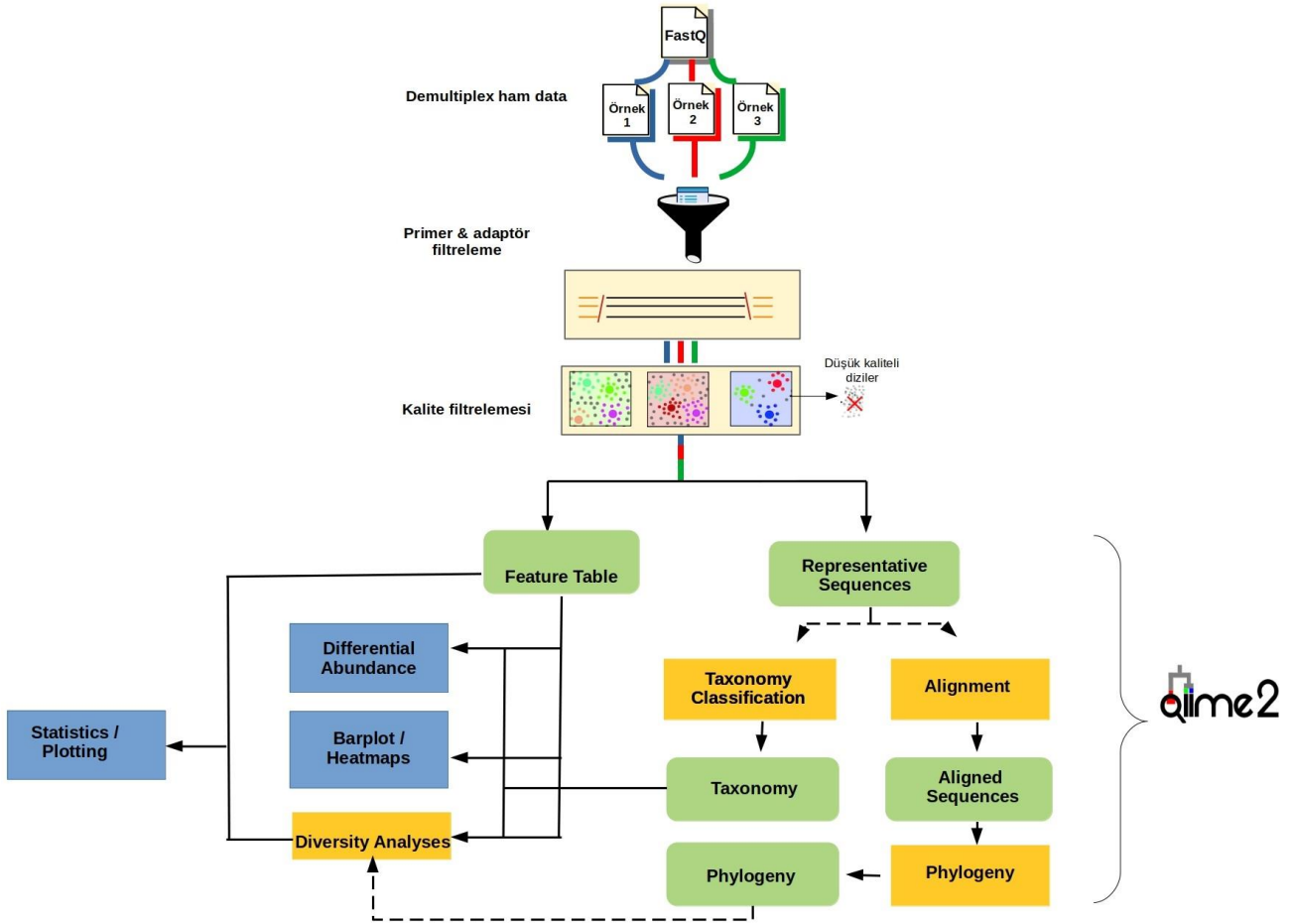


BULGULAR

***Aşağıda gösterilen tüm grafikler Qiime2 platformunda bulunan örnek görseller olup, etik açıdan herhangi bir projenin analiz sonuçları paylaşılmamıştır.**

****Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve sonuçların yorumlanması, proje yürütücüsünün isteği doğrultusunda ekibimizdeki yetkin kişiler tarafından gerçekleştirilecektir.**

*****Analiz sonucu elde edilen diğer veriler excel tablosu şeklinde proje yürütücüsü ile paylaşılacaktır.**



Şekil 2. Biyoinformatik iş akışı



1. Laboratuvar Sonuçları

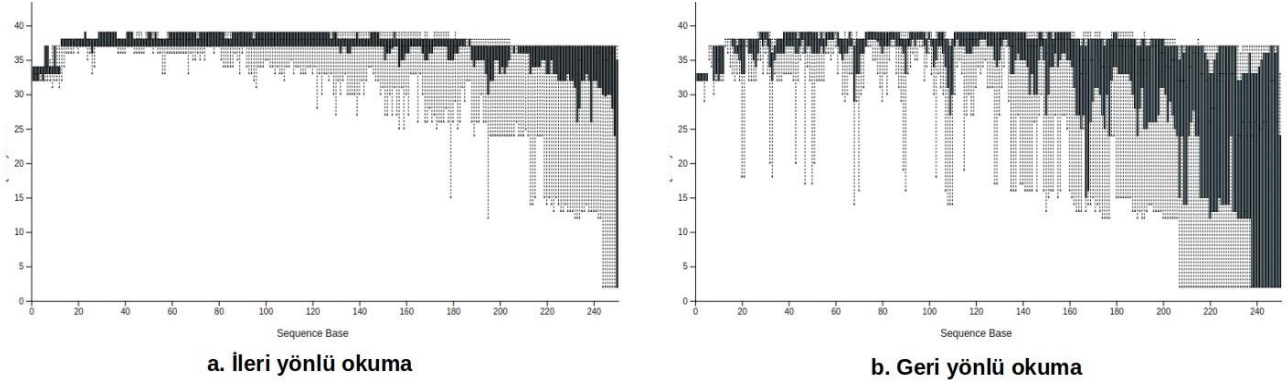
DNA izolatlarının Qubit 4.0 ölçüm sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları

Örneklem	260/280 oranı	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.84	60.52
2	1.89	72.15
3	1.75	70.03

2. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Analiz sonucu okumaların her iki yönlü başarıyla elde edildiği ve kalite skorlarının Q30-Q40 değerleri aralığında olduğu gözlenmiştir (Şekil 3). Dizileme sonucu elde edilen okumalar her bir örnek için ileri ve geri yönlü olmak üzere ortalama 89.000 okuma elde edilmiştir.

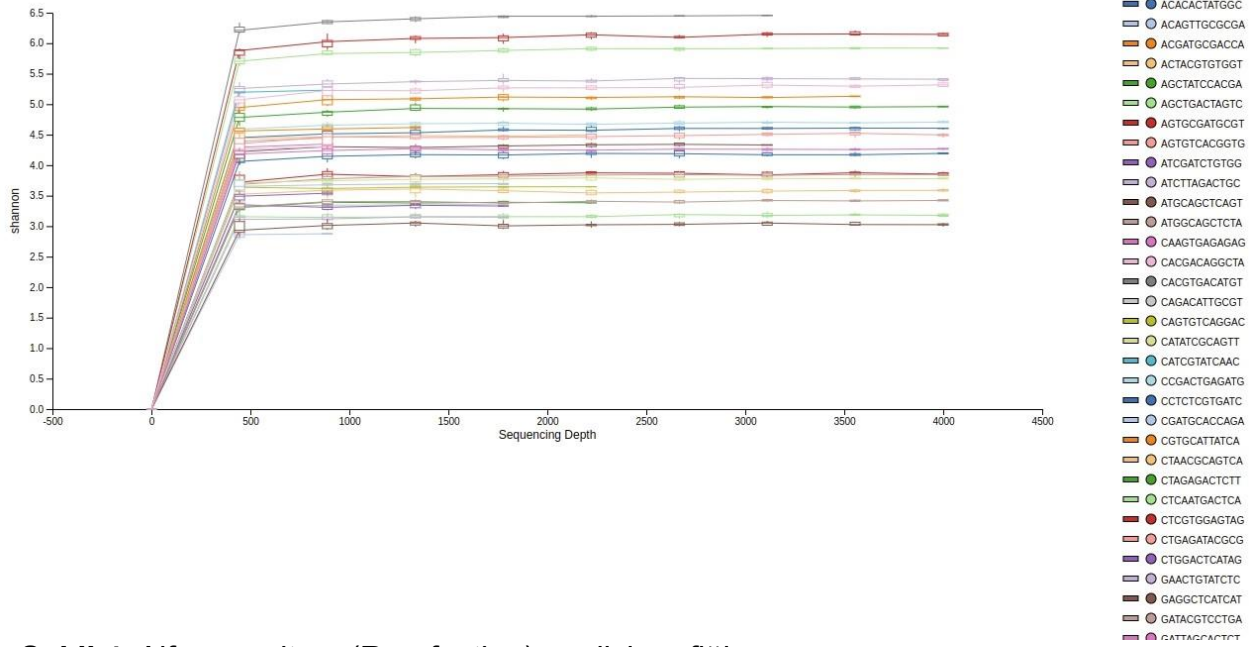


Şekil 3. İleri (a) ve geri (b) yönlü okumaların FastQC programı ile kalite kontrol grafikleri. Her iki yönde de okumaların çoğunlukla kalite skor aralıkları Q30-Q40 aralığındadır.



3. Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları

3.1 Alfa Seyreltme (Rarefaction) Analizi

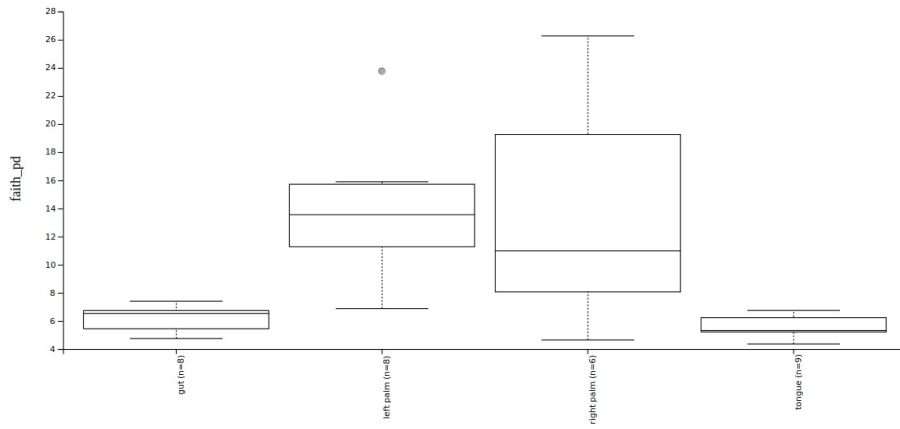


Şekil 4. Alfa seyreltme (Rarefaction) analizi grafiği



3.2 Çeşitlilik Analizleri

3.2.1 Alfa Çeşitlilik



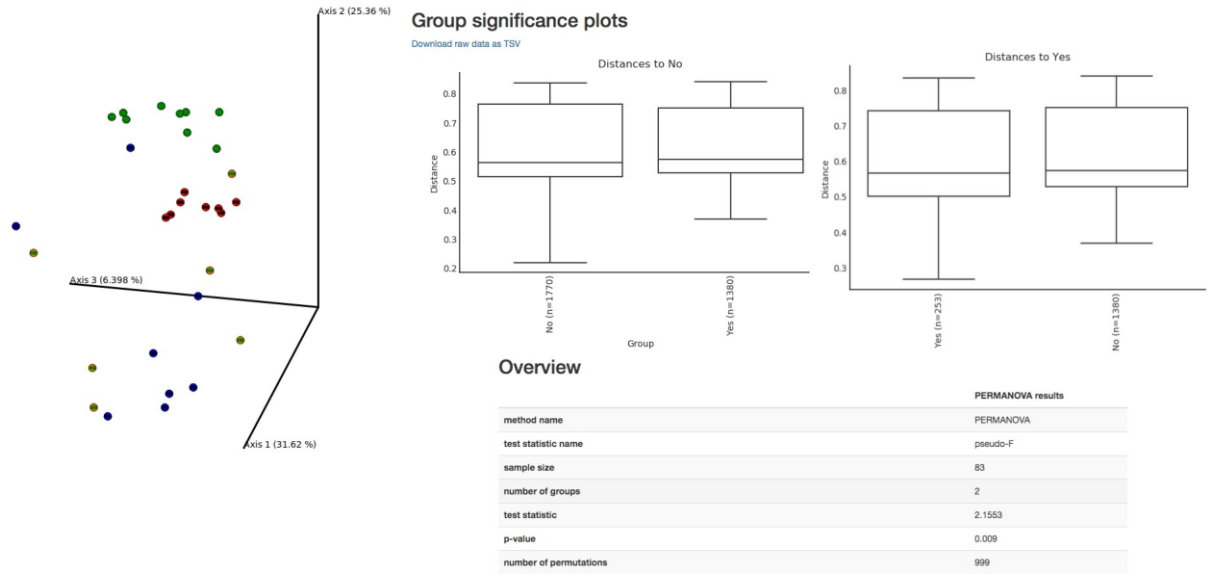
Kruskal-Wallis (pairwise)

		H	p-value	q-value
Group 1	Group 2			
gut (n=8)	left palm (n=8)	9.926471	0.001629	0.004888
	right palm (n=6)	4.266667	0.038867	0.058301
	tongue (n=9)	1.120370	0.289839	0.347806
left palm (n=8)	right palm (n=6)	0.150000	0.698535	0.698535
	tongue (n=9)	12.000000	0.000532	0.003192
right palm (n=6)	tongue (n=9)	5.013889	0.025145	0.050290

Şekil 5. Alfa çeşitlilik analizinin grafiksel ve istatistiksel gösterimi.



3.2.2 Beta Çeşitlilik

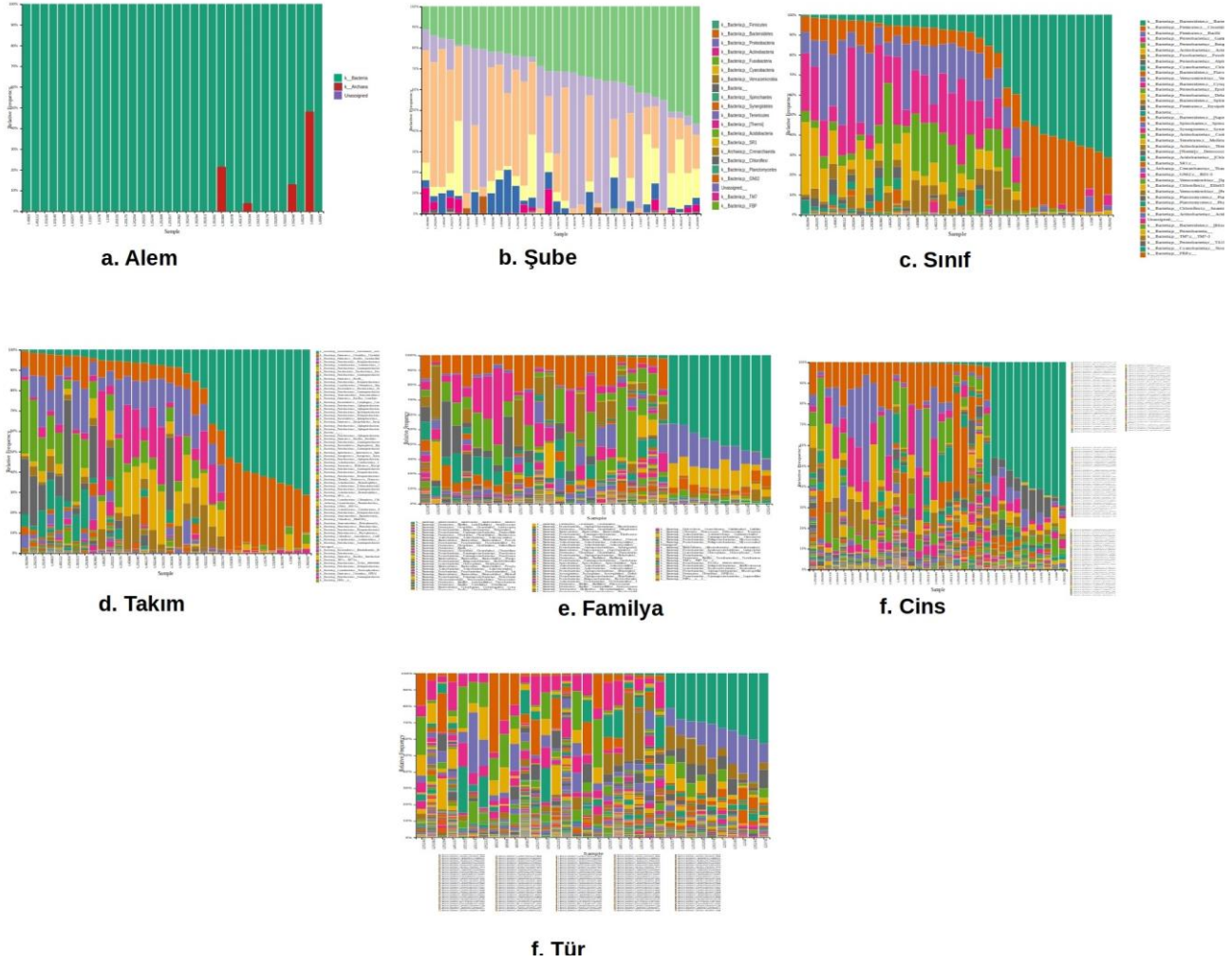


Şekil 6. PERMANOVA ile beta çeşitlilik analizinin grafiksel ve istatistiksel gösterimi.



3.2 Taksonomik Analiz Sonuçları

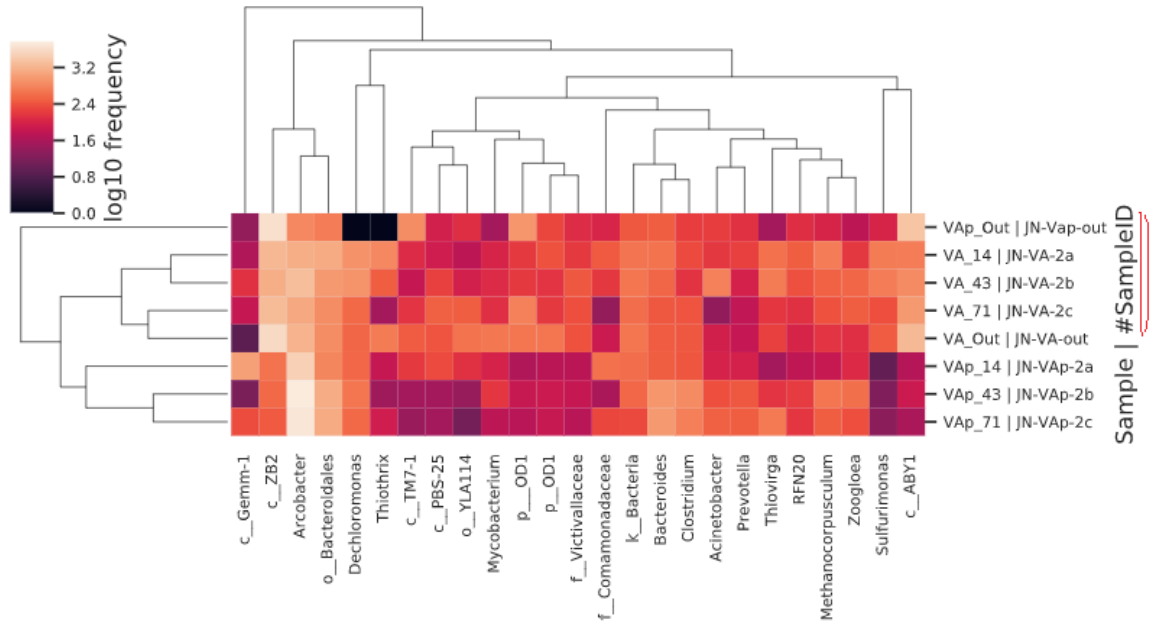
Proje sonucu elde edilen tüm taksonomik analiz sonuçları Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. Tüm taksonomik analiz sonuçlarının görselleştirilmesi.



3.3 Filogeni



Şekil 8. Heatmap ile üretilen filogenetik ağaç



Referanslar

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.