

Abstrakt

V této diplomové práci bylo testováno použití sekvenátoru MinION (Oxford Nanopore) na vzorcích připravených tak, aby simulovaly infekční vzorky. Testovaný postup má simulovat práci se vzorkem s neznámým patogenem, proto byl také vybrán metagenomický přístup.

Byly testovány tři kity: Rapid Barcoding Sequencing, PCR Barcoding a Premium whole genome amplification, které se lišily v délce a náročnosti přípravy a způsobu amplifikace nukleových kyselin. Pro testování bylo vybráno celkem osm virů s různými délkami a různým typem genomu (5,6 – 152 kb, ss/ds RNA, dsDNA), ze kterých bylo připraveno 10 vzorků simulující různé infekce (respirační, gastrointestinálního traktu a moči) a jeden vzorek obsahoval pouze vodu, jako negativní kontrolu. Před přípravou vzorků kity od firmy Oxford Nanopore byly vzorky ošetřeny DNázou a RNázou, virová RNA byla náhodně přepsána do DNA a u některých vzorků byla provedena amplifikace k dosažení větší koncentrace nukleových kyselin.

Přípravou Rapid Barcoding Sequencing kit byly detekovány všechny použité viry s největším počtem virových čtení, celkem 4403, o délce 100-250 nt a s dobrým pokrytím virového genomu. PCR Barcoding kitem bylo detekováno pět z osmi virů a počet identifikovaných virových čtení s délkou 100-200 nt výrazně poklesl. Pomocí Premium whole genome amplification kitu bylo detekováno nejméně virů (tři z osmi) s nejdelšími čteními (až 7500 nt), které však obsahovaly jen krátké virové fragmenty opakující se ve dlouhé sekvenci.

V identifikaci patogenů v simulovaných infekčních vzorcích byl nejúspěšnější Rapid Barcoding Sequencing kit.

Klíčová slova: sekvenování nové generace, Oxford Nanopore, MinION, klinická virologie, neznámý patogen, metagenomické sekvenování