

Θαλάσσια Μικροβιολογία

Τμήμα Ωκεανογραφίας και Θαλάσσιων Βιοεπιστημών

Διδάσκουσα: Μεζίτη Αλεξάνδρα

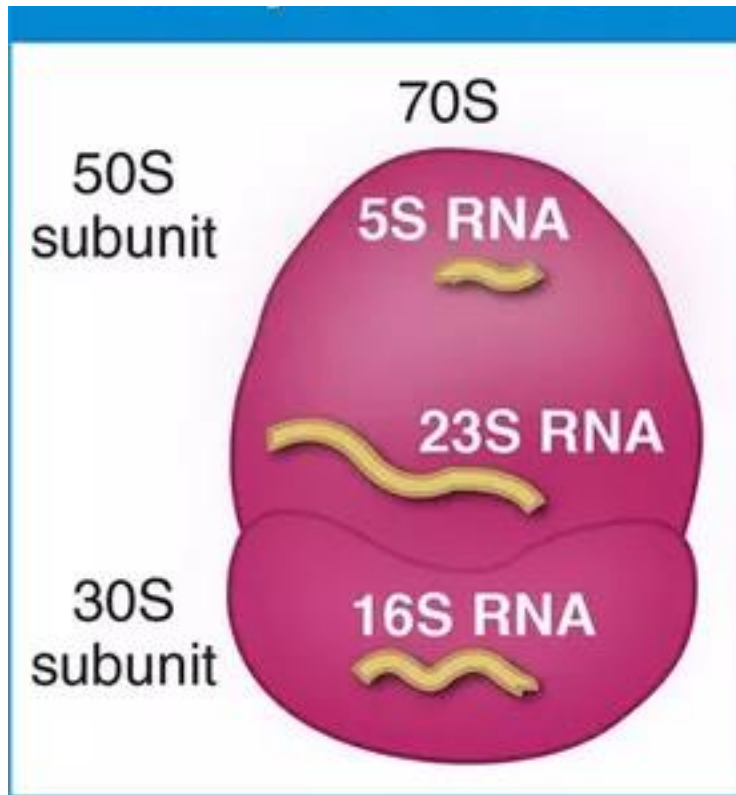
Εργαστήριο 6: Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης

29/04/2025

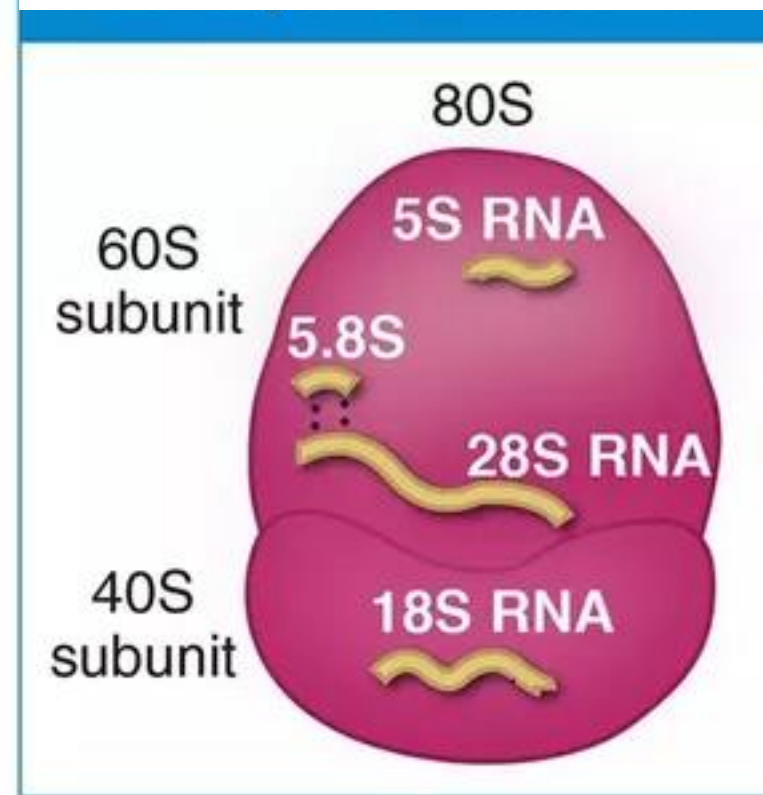
Το ριβόσωμα

Τα εργοστάσια παραγωγής πρωτεϊνών των κυττάρων

Προκαρυωτικό ριβόσωμα

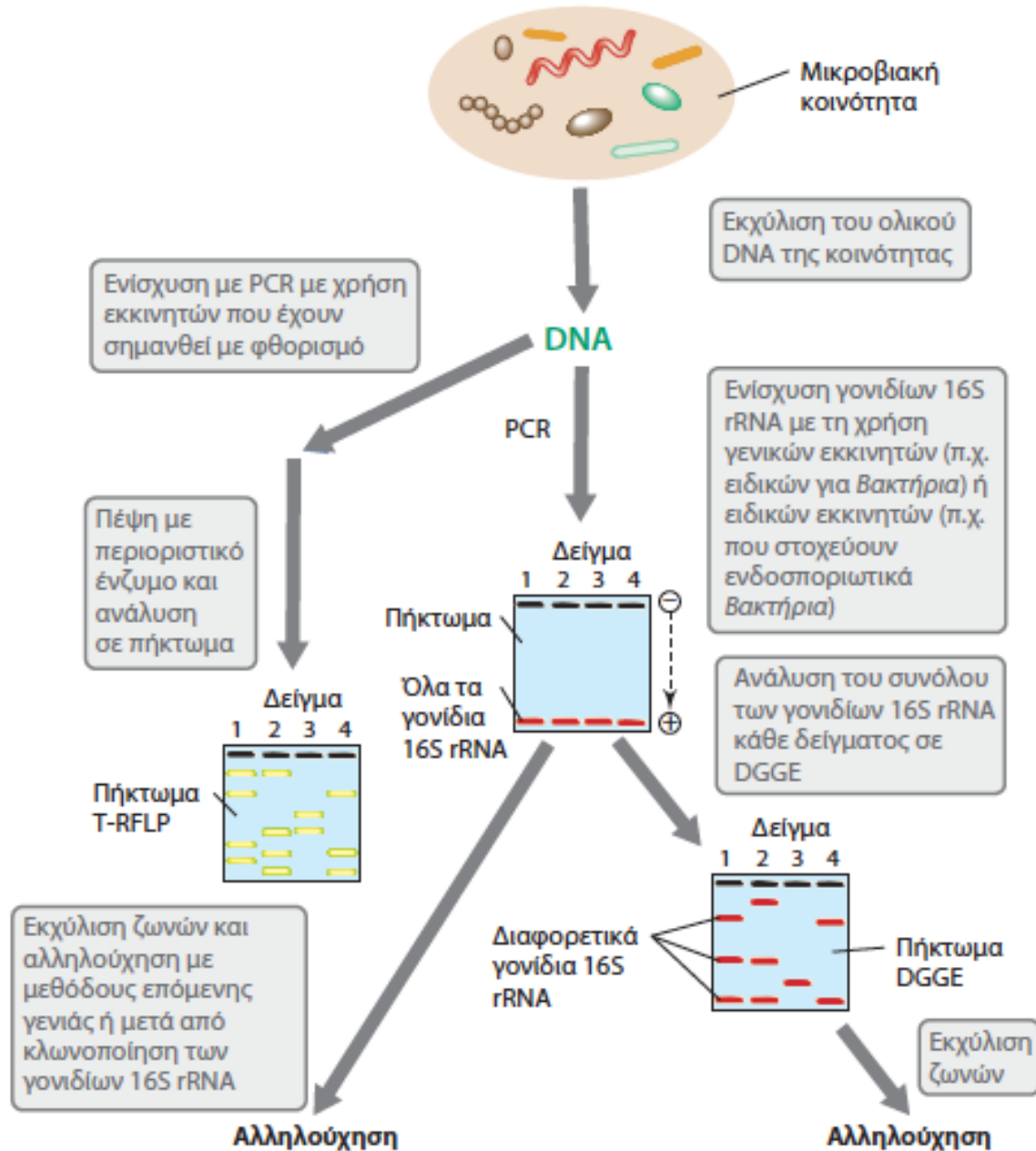


Ευκαρυωτικό ριβόσωμα



Εικόνα 1: Διαφορές των Προκαρυωτικών
Και Ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων

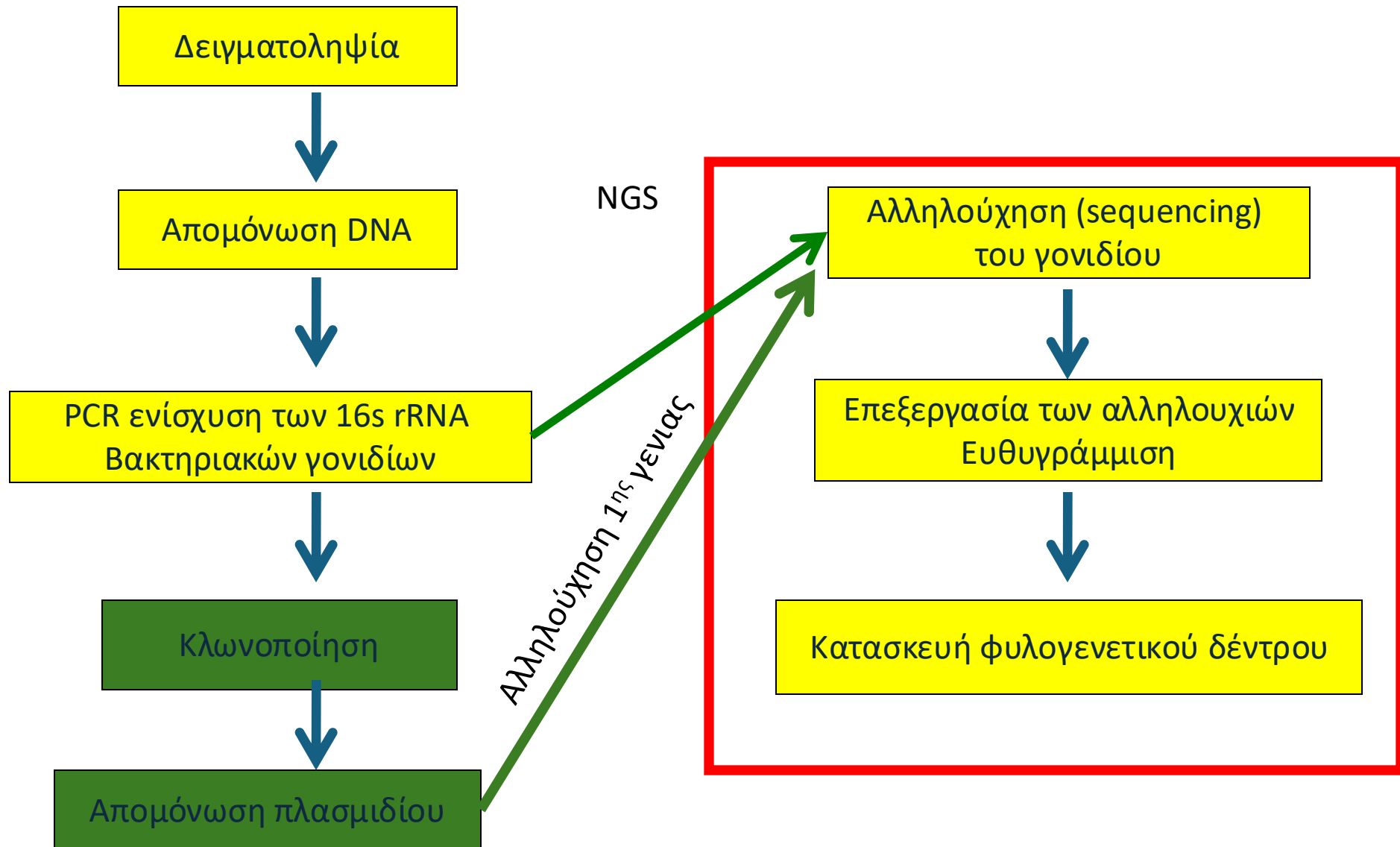
Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων



Εικόνα 18.13 (Brock, Biology of Microorganisms)

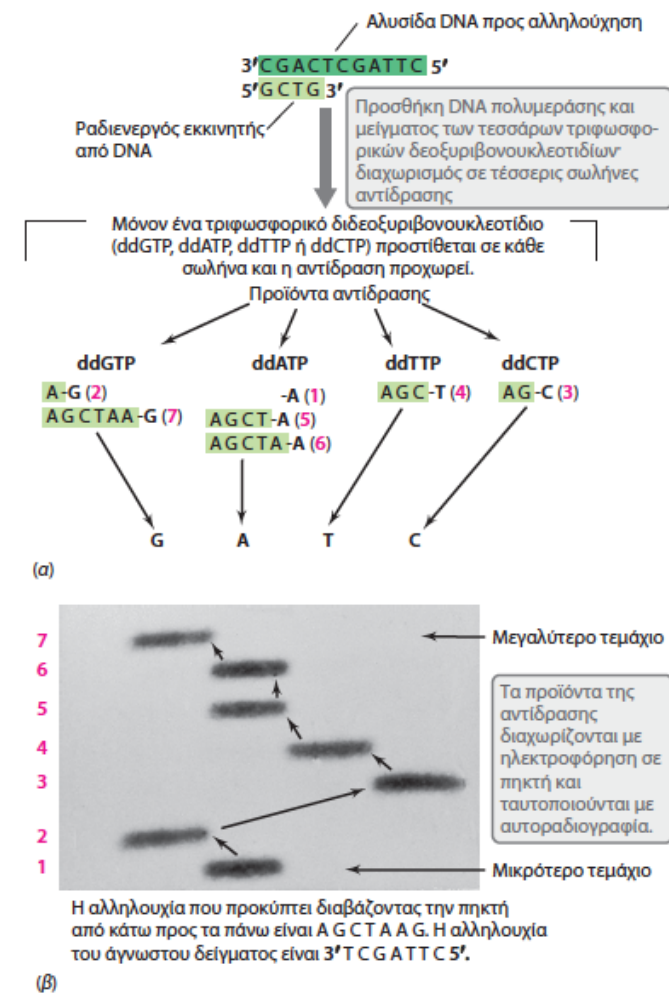
Βήματα στην ανάλυση της βιοποικιλότητας βάσει των παραλλαγών ενός γονιδίου

Μεθοδολογία

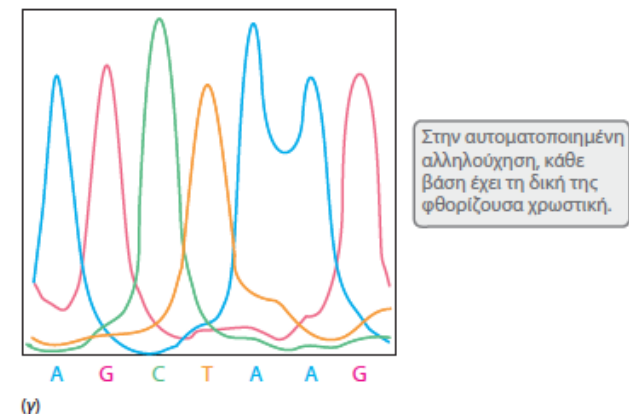


Αλληλούχηση 1ης γενιας-μέθοδος Sanger

- Μήκος >1000 bp
- Αριθμός αλληλουχιών/ δείγμα ~ αριθμός κλώνων → 100-200/δείγμα
- Απόλυτα εξαρτημένο από τη δουλειά στο εργαστήριο και τη συλλογή κλώνων



Εικόνα 6.2 Αλληλούχηση του DNA με τη μέθοδο Sanger. (α) Παρατηρήστε ότι πρέπει να πραγματοποιηθούν τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, μία για κάθε διδεοξυνουκλεοτίδιο. Επειδή οι αντιδράσεις γίνονται *in vitro*, ο εκκινητής για τη σύνθεση του DNA μπορεί να είναι DNA. (β) Τμήμα πηκτής που περιέχει τα προϊόντα της αντίδρασης του (α). (γ) Αποτελέσματα αλληλούχησης του ίδιου DNA όπως φαίνεται στα (α) και (β), αλλά έπειτα από χρήση αυτόματης συσκευής αλληλούχησης και φθορίζοντων ιχνηθετών. Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται βάσει μεγέθους μέσα σε μια τριχοειδή στήλη, και κάθε φθορίζον διδεοξυριβονουκλεοτίδιο ανιχνεύεται από έναν ανιχνευτή λείζερ.



Αλληλούχηση

2ης γενιάς-πυροαλληλούχηση

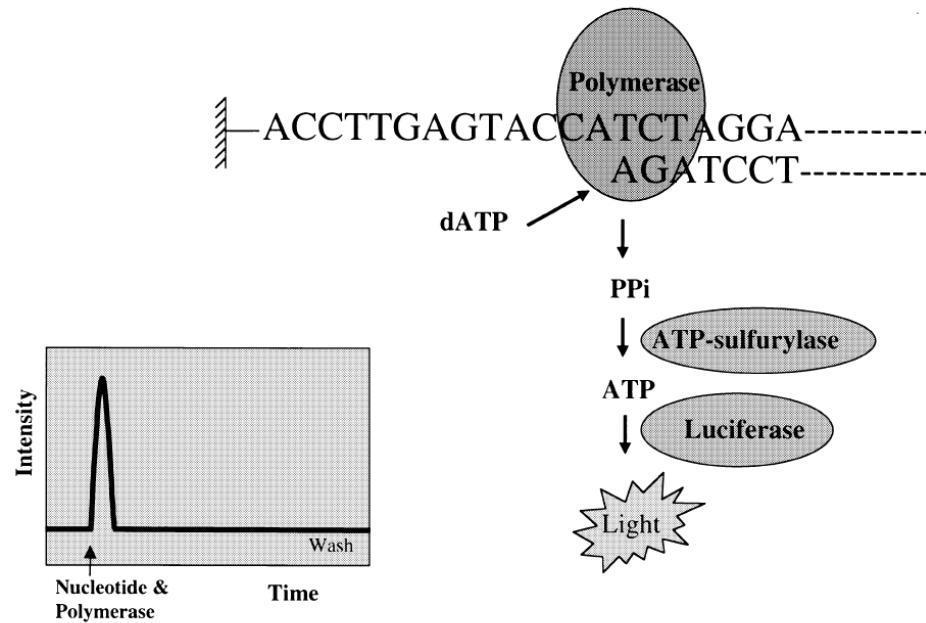
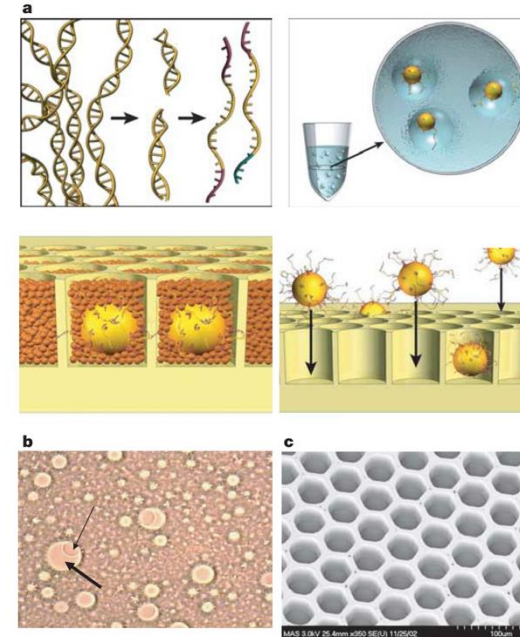


Figure 2 Schematic representation of the progress of the enzyme reaction in solid-phase pyrosequencing. The four different nucleotides are added stepwise to the immobilized primed DNA template and the incorporation event is followed using the enzyme ATP sulfurylase and luciferase. After each nucleotide addition, a washing step is performed to allow iterative addition.

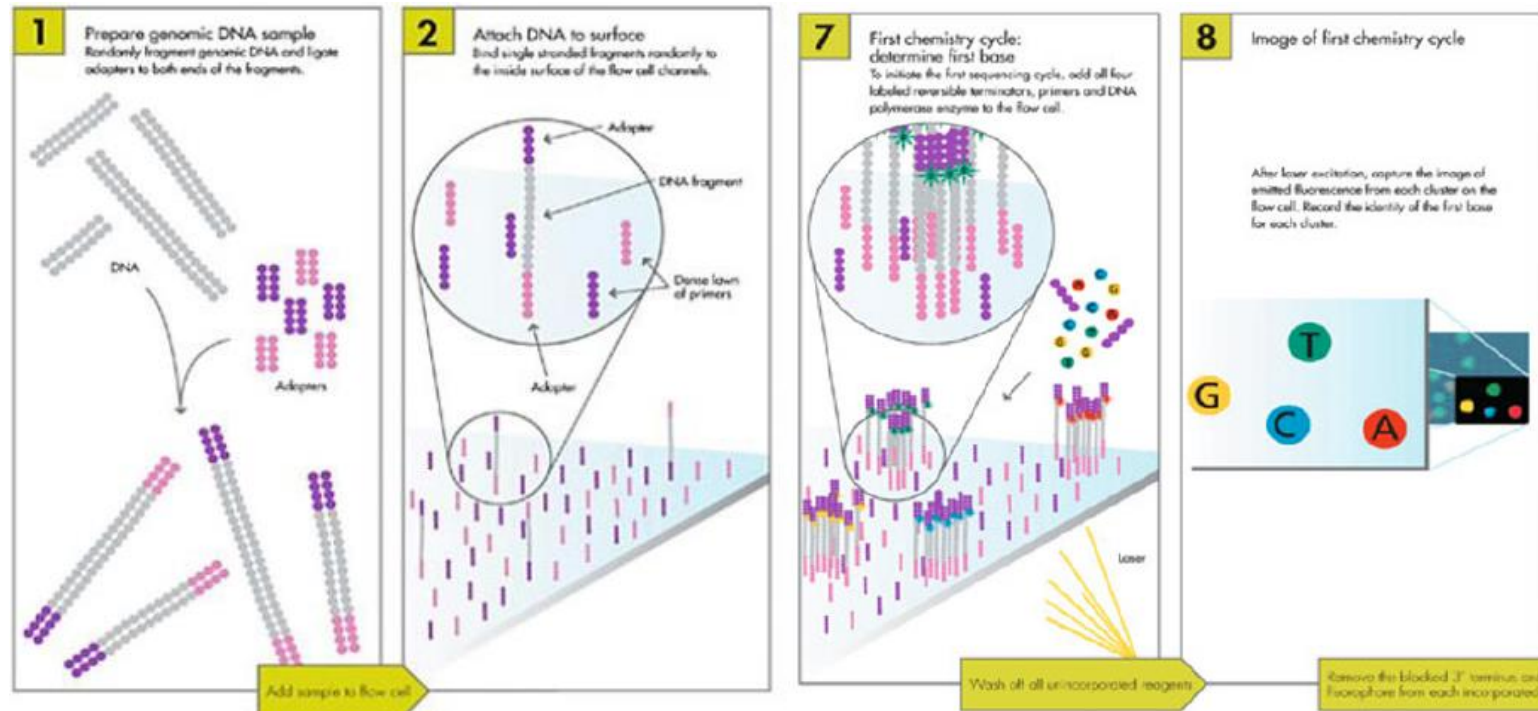
Ronaghi, Genome 2001



Margulies et al., Nature 2005

- Μήκος ~400 bp
- Αριθμός αλληλουχιών/ δείγμα → >1000/δείγμα

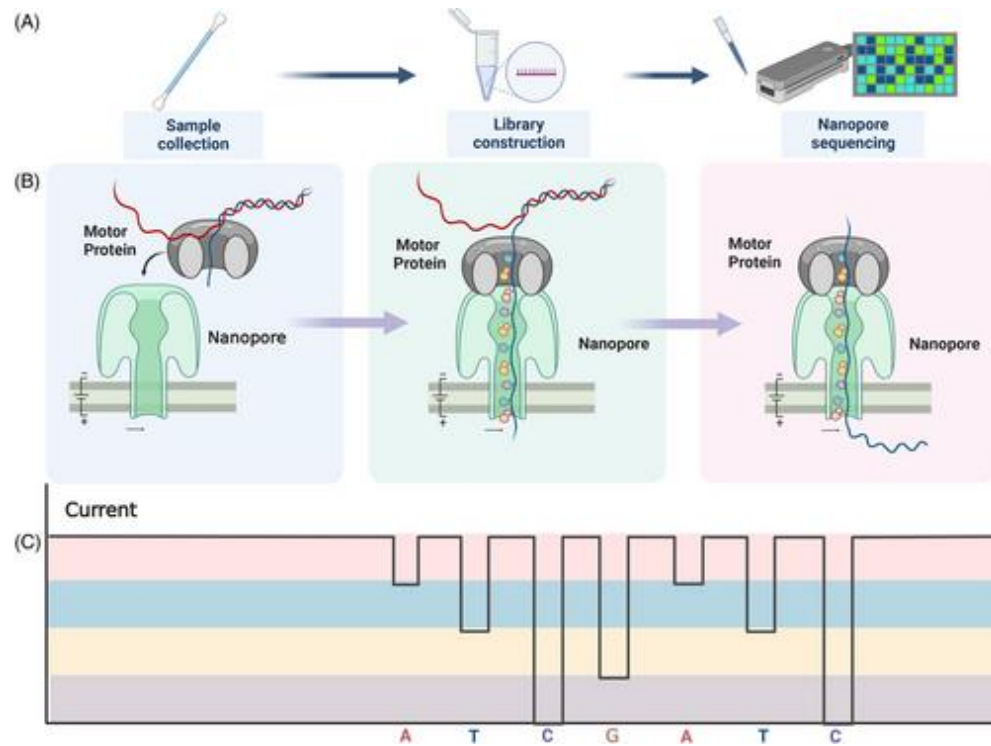
Αλληλούχηση 3ης γενιας-illumina



Zhou et al. 2010

- Μήκος ~75 bp (τώρα πια 2x250)
- Αριθμός αλληλουχιών/ δείγμα → >50.000/δείγμα

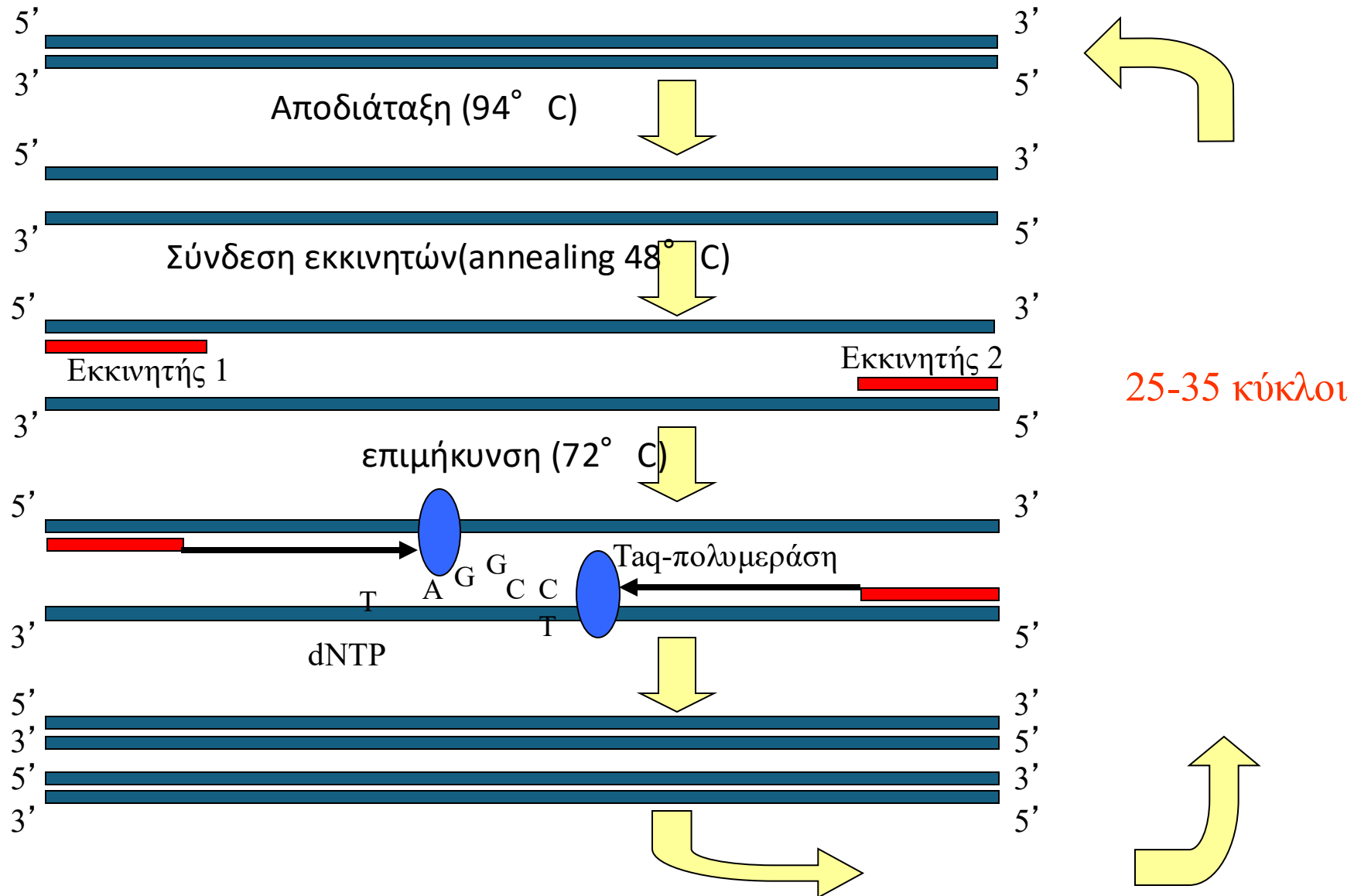
Αλληλούχηση 4ης γενιάς ??? –oxford nanopore



- Μήκος 1600 bp
- Αριθμός αλληλουχιών/ δείγμα $\rightarrow >50.000/\text{δείγμα}$

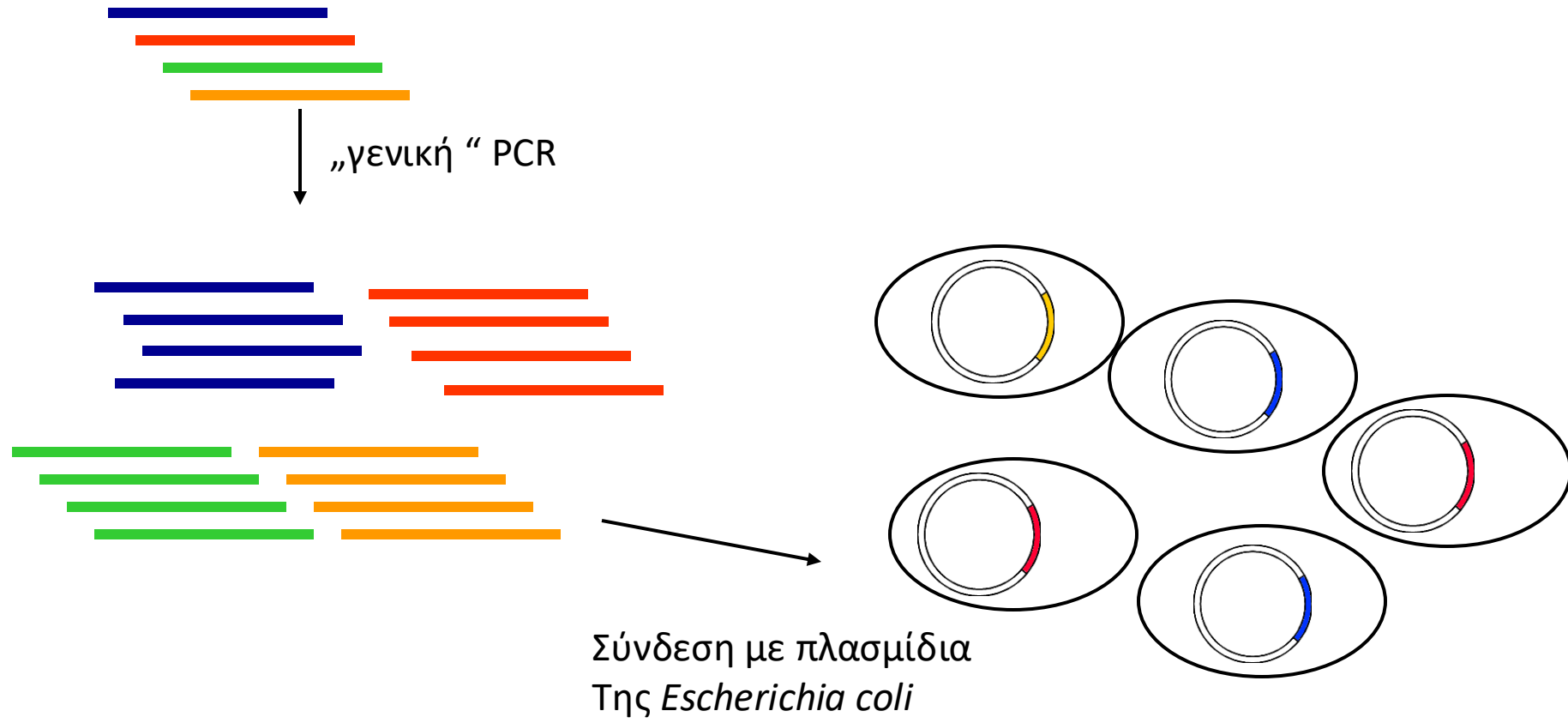
Zheng et al. 2022

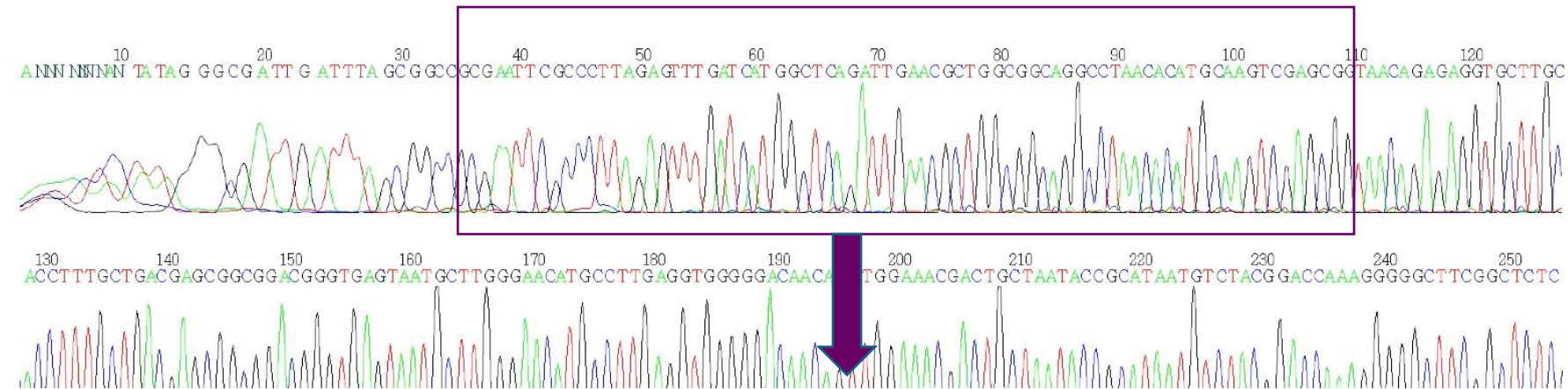
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Polymerase chain reaction (PCR)



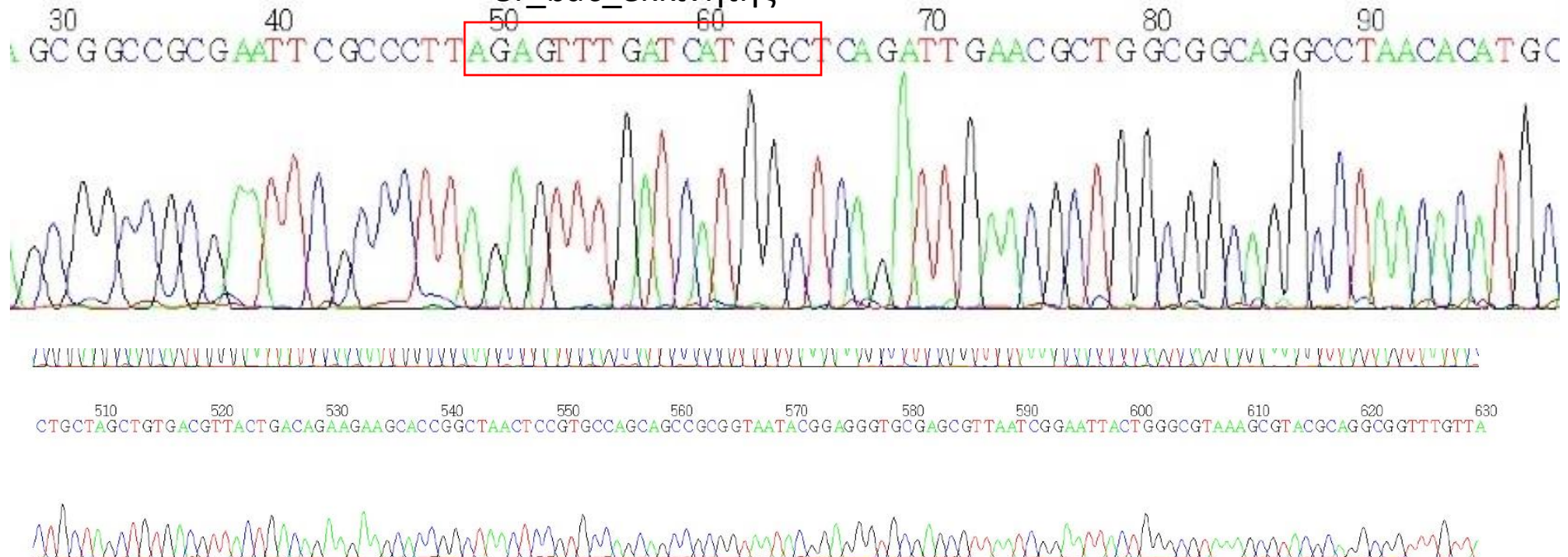
Κλωνοποίηση

Περιβαλλοντικό δείγμα





8f_bac_εκκλινητής



>NF13_16S rRNA gene

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAGGTGCTTGCACC
TTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAA
TACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGCACTCTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGT
TAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT**AGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTC**
ATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGTCTACTAGAAGCTCGGAGCC
TCGGTTCTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTAC
CAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACGGAG
GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGTGCTGCG
AACCTGCGAAGGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGCGTATCAGAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCT
CCAGAAGTAGATAGTCTAACCCCTCGGGAGGACGTTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

>Otu00001|6774

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACCGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGATGACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTAAAGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGTCTACG
GACCAAACGGGGCTTAGGCTCCGGCGCAAGGAGAGGGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAA
GGCAACGATATTTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAACAACAGAAGACACAGGCTAACTC
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTT
GTTAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATAGTCATTTTAGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGAGGGG
AGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGGAGCATCAGTGGCGGAGGCGACTCCCTGGCCAAA
GACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACT
AGCTGTTTGTGACTTTAAGTCGTGAGTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
TACACTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCCTTAAGTTGGGCA
CTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCATTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTCGTAGTCCGG
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGATGCAAAAGAAGTAGTTAGTCTGACCTTTCGGGAGGACGAT
TACCACTTGTGTTTCATGACTGGGGTG

Επεξεργασία αλληλουχιών

- Ανάλυση όλων των αλληλουχιών και ομαδοποίηση σε επίπεδο ομοιότητας >97% σε Operational Taxonomic Units (OTUs)
- Το 97% θεωρείται για το 16S και το 18S το επίπεδο ομοιότητας για μικροοργανισμούς που ανήκουν στο ίδιο είδος.
- Πίνακας αποτελεσμάτων

	Δείγμα 1	Δείγμα2	Είδος
OTU1	5	15	;;;
OTU2	22	3	
OTU3	4	36	

Ποιοι είναι όμως αυτοί οι μικροοργανισμοί;

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

The screenshot shows the NCBI BLAST website in a web browser. The browser's address bar displays the URL `https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi`. The page features the NIH logo and the text "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information" at the top. A "Log in" button is located in the top right corner. Below the header, the "BLAST" logo is followed by navigation links: "Home", "Recent Results", "Saved Strategies", and "Help".

The main content area is titled "Basic Local Alignment Search Tool". It includes a description: "BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance." A "Learn more" link is provided. To the right, a "NEWS" sidebar announces "BLAST+ 2.15.0 is here!" with details about new features and a release date of "Tue, 28 Nov 2023". A link to "More BLAST news..." is also present.

Under the "Web BLAST" section, there are three main options:

- Nucleotide BLAST**: nucleotide ► nucleotide (represented by a DNA double helix icon).
- blastx**: translated nucleotide ► protein (represented by a blue arrow icon).
- tblastn**: protein ► translated nucleotide (represented by a blue arrow icon).
- Protein BLAST**: protein ► protein (represented by a protein ribbon icon).

At the bottom, the "BLAST Genomes" section features a search input field with the placeholder text "Enter organism common name, scientific name, or tax id" and a "Search" button. Below the input field, there are links for "Human", "Mouse", "Rat", and "Microbes".

Επιλογή: nucleotide blast
Database: others (nr etc.)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ? Clear

Query subrange ?

From

To

Or, upload file

Browse... No file selected. ?

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search ?

☐ Align two or more sequences ?

Choose Search Set

Database

☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Betacoronavirus ☐ Experimental databases

Core nucleotide database (core_nt) ?

Organism

Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested ☐ exclude [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown ?

Exclude

Optional

☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to

Optional

☐ Sequences from type material

Entrez Query

Optional

Enter an Entrez query to limit search ?

[YouTube](#) [Create custom database](#)

Feedback

Αντιγραφή της αλληλουχίας

[← Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary](#) ▾

❓ [How to read this report?](#)

📺 [BLAST Help Videos](#)

↶ [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title	Otu00001
RID	0W8VU9PJ016 Search expires on 04-28 20:30 pm Download All ▾
Program	BLASTN ❓ Citation ▾
Database	core_nt See details ▾
Query ID	lcl Query_3925751
Description	Otu00001
Molecule type	dna
Query Length	1453
Other reports	Distance tree of results MSA viewer ❓

Filter Results

Organism only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ [Add organism](#)

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

[Filter](#)

[Reset](#)

Descriptions

[Graphic Summary](#)

[Alignments](#)

[Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments

[Download](#) ▾

[Select columns](#) ▾

Show ❓

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24	Alteromonas sp. M7...	2553	2553	100%	0.0	98.36%	1455	FM992713.1
☒	Alteromonas australica strain H 17, complete genome	Alteromonas australica	2542	11949	100%	0.0	98.22%	4308833	CP008849.1

Nucleotide Nucleotide ▾ Search

Advanced

Help

GenBank ▾

Send to: ▾

Change region shown ▾

Customize view ▾

Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24

GenBank: FM992713.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ▾

LOCUS FM992713 1455 bp DNA linear BCT 20-SEP-2011
DEFINITION Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24.
ACCESSION FM992713
VERSION FM992713.1

KEYWORDS .
SOURCE Alteromonas sp. M71_D24
ORGANISM [Alteromonas sp. M71_D24](#)
Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria;
Alteromonadales; Alteromonadaceae; Alteromonas/Salinimonas group;
Alteromonas.

REFERENCE 1
AUTHORS Gartner,A., Blumel,M., Wiese,J. and Imhoff,J.F.
TITLE Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern
Mediterranean deep sea
JOURNAL Antonie Van Leeuwenhoek 100 (3), 421-435 (2011)
PUBMED [21671195](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1455)
AUTHORS Gaertner,A.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-NOV-2008) to the INSDC. Gaertner A., RD3/ Marine
Microbiology, Ifm-geomar, Duesternbrooker Weg 20, Kiel, 24105,
GERMANY

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1455
/organism="Alteromonas sp. M71_D24"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="M71_D24"
/isolation_source="sediment"
/db_xref="taxon:[592840](#)"
/geo_loc_name="Greece:Eastern Mediterranean Sea"
/identified_by="Andrea Gaertner"
/PCR_primers="fwd_name: 27f, fwd_seq:

Analyze this sequence ▴

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information ▴

PubMed

Taxonomy

LinkOut to external resources ▴

SILVA SSU Database

[SILVA]

Recent activity ▴

[Turn Off](#) [Clear](#)

📄 Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene,
isolate M71_D24 Nucleotide

[See more...](#)

 An official website of the United States government [Here's how you know](#) ✓



National Library of Medicine

National Center for Biotechnology Information

ameziti

Nucleotide

Nucleotide

Search

Advanced

Help

FASTA

Send to:

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Related information

PubMed

Taxonomy

LinkOut to external resources

SILVA SSU Database

Recent activity

Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24

Nucleotide

See more...

Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24

GenBank: FM992713.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>FM992713.1 Alteromonas sp. M71_D24 partial 16S rRNA gene, isolate M71_D24
ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGATGAC
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGC
TAATACCGCATAATGTCTACGGACCAACGGGGCTTAGGCTCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAGATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACA
CTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAAGTTGTGAGGAAAAG
TTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAACAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTA
AGCTAGATGTGAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATAGTCATTTAGAAGTGGCAGACTAGAGTCTTGGAGA
GGGGAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGAC
TCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACACCGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTTTGTGACTTTAAGTCGTGAGTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGT
AGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAAATGAATTTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACACTTGACATGCTGAGAAGTTTCCAGAG
ATGGATTGGTGCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCCTTAAGTTGGGCACTCTAAGGAG
ACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCAATCATGAGCCCTTACGTGTAGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCATTACAGAGGGAAGCGAGACAGTATGTGGAGCGGACCCCTTAAAGAATGTC
GTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGAATAC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGCGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGATGCAAAAGAAGT
AGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACTTTGTGTTTCATGACTGGGGTG

FOLLOW NCBI



GLOBAL
CORE
BIODATA
RESOURCE



Home SILVAngs **Browser** Search ACT Download Documentation Projects Contact

Database **SSU r138.2**

Show **Cart**

Taxonomy **SILVA**

Cart: 0

Show

Clear

Download

SILVA ▶ Bacteria ▶ Pseudomonadota ▶ Gammaproteobacteria ▶ Enterobacterales ▶ Alteromonadaceae ▶ Alteromonas ▶ FM992713

Enterobacterales

(26)

Aeromonadaceae
Alteromonadaceae ▶
Budviciaceae
Celerinatantimonadaceae
Colwelliaceae
Enterobacteriaceae
Erwiniaceae
Gallaecimonadaceae
Hafniaceae
Idiomarinaceae
Incertae Sedis
JI49D030
Kangiellaceae
MB19
Morganellaceae
Moritellaceae
Orbaceae
Pasteurellaceae

Alteromonadaceae

(23)

Aestuariibacter
Agaribacter
Aliiglaciecola
Alishewanella
Alkalimonas
Alteromonas ▶
Arsukibacterium
Bowmanella
Catenovulum
Echinimonas
Gayadomonas
Glaciecola
Incertae Sedis
Lacimicrobium
Marisediminitallea
Neiella
Neptunicella
Ningiiella

Alteromonas

(6691)

(1/670) **next** ▶

marine metagenome
marine metagenome
marine metagenome
marine metagenome
marine metagenome
marine metagenome
marine metagenome
marine bacterium MC27
gamma proteobacterium HTC034
gamma proteobacterium HTC036

FM992713

Accession Nr **FM992713**

Description **Alteromonas sp.
M71_D24 partial 16S
rRNA gene, isolate
M71_D24**

Regions **1**

Length **1455**

Quality

Sequence

Alignment

Pintail

Links

[Details ▶](#)

[Link to EBI/ENA ▶](#)

[this page \(permalink\)](#)

Από τις σελίδες της Genbank και της SILVA μπορούμε να βρούμε

1. Αν η αλληλουχία προέρχεται από μικροοργανισμό που έχει απομονωθεί ή από απομόνωση DNA από το περιβάλλον
2. Την περιοχή απομόνωσης (νερό, έδαφος, άλλος οργανισμός κ.α.)
3. Την Ταξινομική
4. Στοιχεία για τη δημοσίευση (αν υπάρχει)