

Pro:

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

www.resetheus.org

Od:

[REDACTED]
[REDACTED]

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Oddělení genomiky a bioinformatiky

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

Datová schránka: 5h4n xm4

V Praze dne 17. 3. 2021

Dobrý den,

odpovídáme na vaše otázky ze dne 12. 3. 2021 ohledně sekvenování SARS-CoV-2.

1) Z čeho byla virová RNA vyextrahována?

- očištěné virové částice SARS-CoV-2 zbavené veškerých příměsí získaných centrifugací (jaký byl hustotní gradient a existuje EM fotografie virové monokultury?)
- vzorek přímo odebraný od pacienta - od jednoho nebo více pacientů
- vzorek po provedené RT-PCR
- jiný zdroj - jaký?

Naše sekvenační laboratoř není vybavena pro práci s infekčním materiálem. Jako vstupní materiál jsme od Národní referenční laboratoře pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění SZÚ dostali cDNA získanou pomocí reverzní transkripce gRNA, která byla izolována standardními postupy z nasofaryngeálních výtěrů.

2) Byla vždy před sekvenací ověřena délka kompletního virového genomu gelovou elektroforézou?

- Pokud ano, s jakým výsledkem počtu bází?
- Pokud ne, jak je možné tvrdit, že byl sestaven kompletní řetězec genomu viru, který se vyskytuje v daném vzorku?

Ne, dodaná jednovláknová cDNA neumožňuje takovou analýzu. Dodaná cDNA byla standardním postupem připravena k sekvenci. V této konkrétní analýze jsme použili sadu Swift Normalase Amplicon SARS-CoV-2 NGS Panels od firmy Swift biosciences a následovně sekvenovali na platformě Illumina. Míru kompletnosti dodané cDNA jsme určili ze sekvenačních dat bioinformaticky a to mapováním čtení na referenční genomovou sekvenci.

3) Z jakého množství sekvencí o jaké délce (jakých délkách) bází byl Vámi sestaven kompletní genom viru SARS-CoV-2 (uved'te pro jednotlivé varianty)?

Celkově jsme v tomto experimentu osekvenovali 95 milionů párových čtení o délce 2 x 150 nukleotidů. V průměru to je 1 milion párových čtení na vzorek, tzn. že u průměrného vzorku byla každá pozice virového genomu přečtena zhruba 10 000x.

4) Bylo nutné doplnit chybějící části genomu pomocí softwarového výpočtu? Pokud ano, jakého procenta z celkové délky genomu se to týkalo a v jakých délkách (v jakém počtu bází) se jednotlivé mezery vyskytovaly?

Ne, nepřečtené části zůstávají ve výsledné sekvenci označené jako N. Protože z principu metody amplikonového sekvenování nelze přečíst několik nukleotidů na začátku genomu a několik na jeho konci, je většina vzorků přečtena z 99,8%. Vzorky, u kterých se z jakéhokoliv důvodu nepodařilo přečíst více než 95% genomu, byly z následných analýz vyřazeny.

S pozdravem,

██████████
██████████