

Метагеномные исследования

Работа с биоматериалом

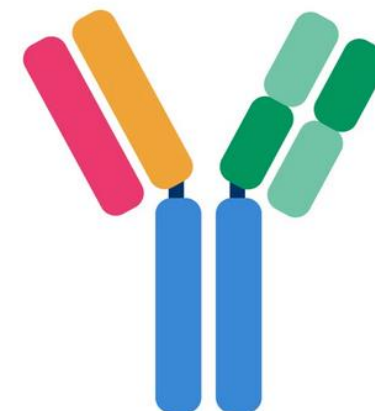
История открытий

XVII в. - Микроскопия

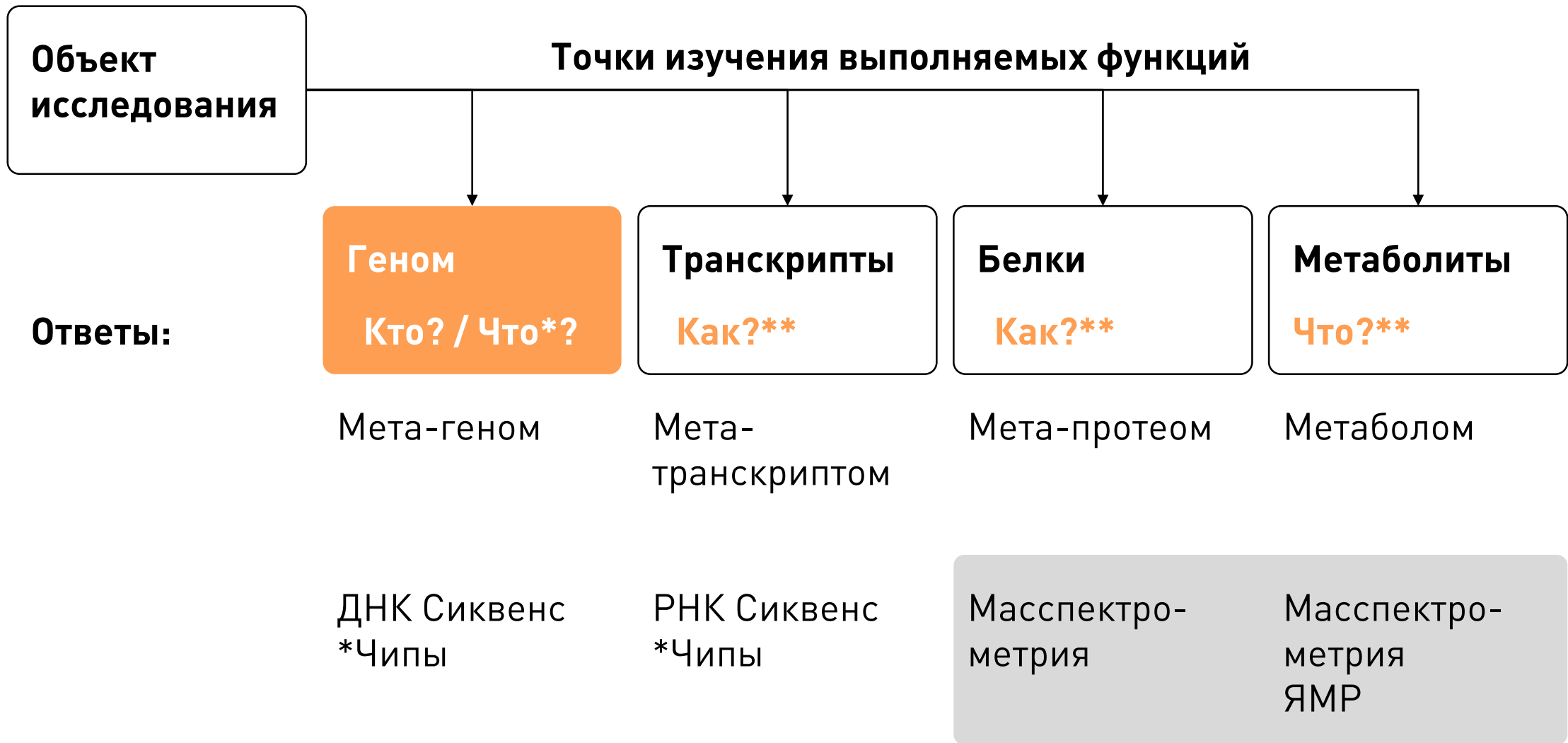
XIX в. - Микробиологические
методы

Секрет успеха –
ненаправленность методов

Омиксы – новая революция



Омиксы– выбор технологии от цели проекта



Допустим мы ничего не знаем о изучаемой нише: Что делаем?

1. Кто живет?

Обработка
большой выборки
по ампликонному
пайплайну
и метаданным

Если шаги 2 и 3
уже сделаны, то по
шагу 1 можно
сказать намного
больше чем только
«Кто»

2. Что делает?

Ненаправленный
метаболом

Выделение
ассоциированного
вида
+ культивация
с субстратами

3. Как он это делает?

Метагеном
Метатранскриптом
Метапротеом

Выделенная культура:
Геном
Транскриптом
Протеом

Что такое ампликонное секвенирование?

Ампликонное секвенирование

16S - бактерии
ITS – грибы
18S - простейшие

На самом деле любой
подходящий
ампликон

Изучение бактерий по 16S рРНК

16S rRNA genes



В зависимости от цели, мишени
и платформы для секвенса:

- Отдельные регионы 16S / полный ген
- Транскрипт рибосом
- RMA seq

Ключевые шаги

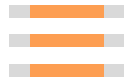
Сбор биобанка



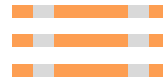
Выделение ДНК



Наработка
ампликона



Баркодирование



Пулирование

x N



Сиквенс



Праймирование



Естественный отбор в пробирке или зачем стабилизировать образцы микробиоты?

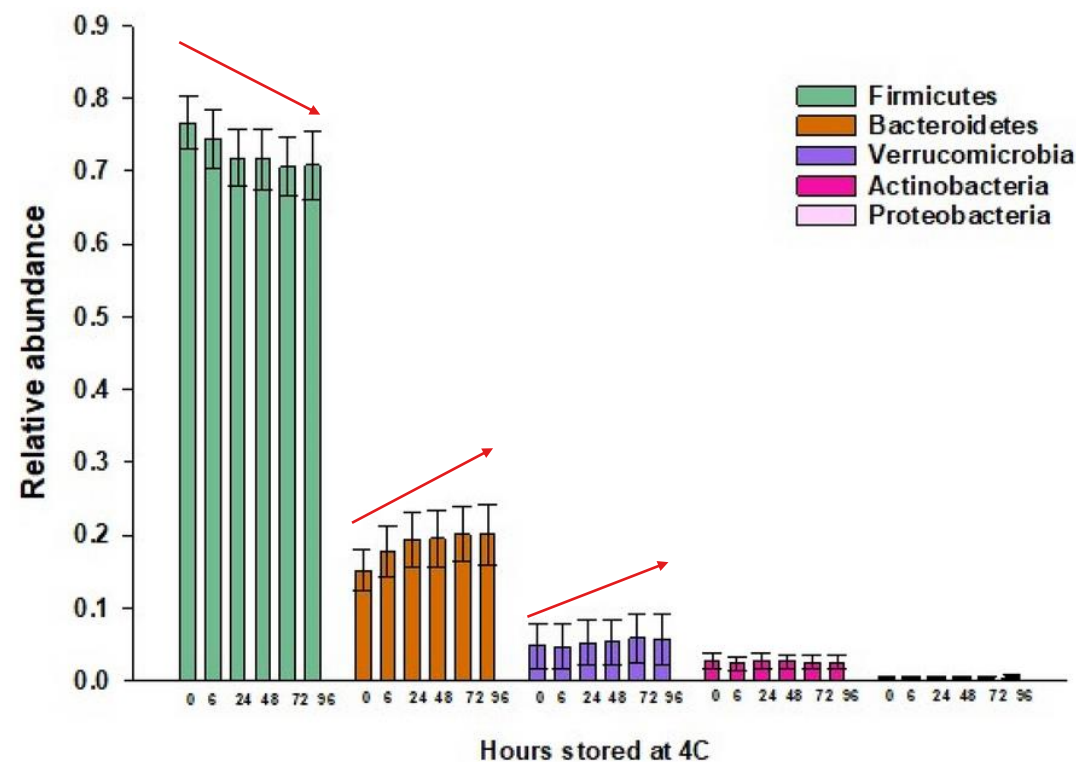
Микробиом – это динамичное живое микробное сообщество, приспособившееся под определенные физиологические условия.

Если перенести образец микробиоты в другие условия, начинают расти те бактерии, которым эти условия подходят больше чем остальным.

Как следствие – в течение транспортировки образца в лабораторию микробный состав меняется. Доминируют приспособленные, не приспособленные исчезают.

Holzhausen EA et al. Assessing the impact of storage time on the stability of stool microbiota richness, diversity, and composition. Gut Pathog. 2021

Изменение пропорций бактерий



Изменение микробного сообщества без стабилизации в течение 96 часов с момента взятия образца при 4°C. Оценка на уровне типов бактерий, методом секвенирования гена 16S рПНК.

Самые сильные изменения произошли в первые 6-24 часа. Количество Firmicutes заметно снизилось, а Bacteroides и Verrucomicrobiota повысилось.

«Стабилизируем на коленке» или зачем разрабатывают транспортные среды?

Для предотвращения изменения микробного состава, используют разные «домашние» подходы. Самый популярный – это замораживание образцов.

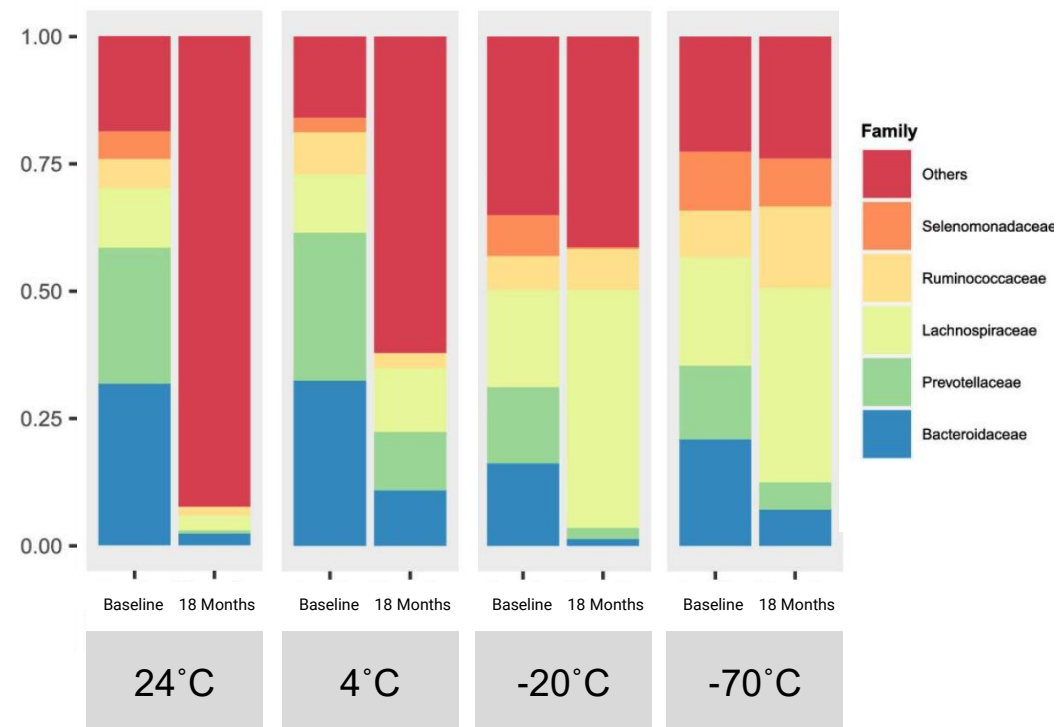
Однако во время длительного хранения, даже при глубокой заморозке, результаты секвенирования отличаются от свежего образца.**

Для решения проблемы необходимо использовать специализированные транспортные среды.

* Kim JH et al. Long-term taxonomic and functional stability of the gut microbiome from human fecal samples. Sci Rep. 2023

** Zouiouich S et al. Stability of the fecal and oral microbiome over two years at -80°C for multiple collection methods. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2023

Изменение пропорций бактерий



Изменение микробного сообщества во время хранения в биобанке при разных температурах. Оценка на уровне семейств бактерий, методом секвенирования гена 16S рРНК.

Во всех показанных условиях микробный состав сильно изменился, даже при температуре -70 градусов.*

Транспортная среда Nobias

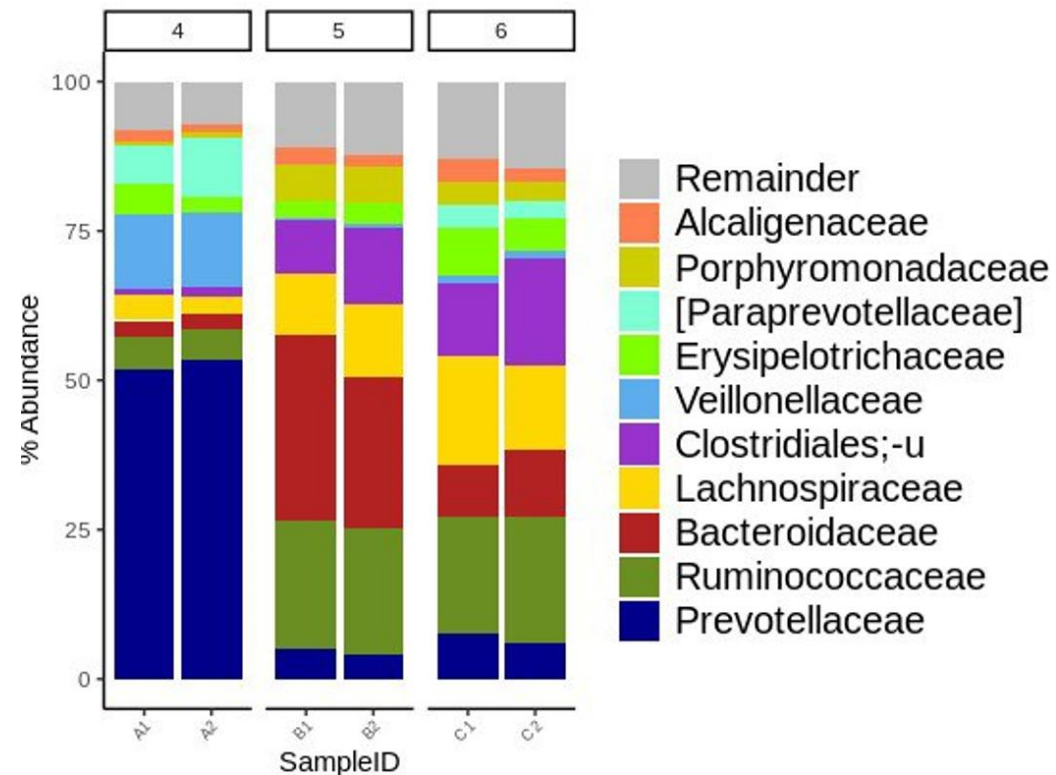
Чем выше альфа-разнообразие (α -D),
тем больше бактерий доминируют
в образце и тем сложнее стабилизировать микробиом

Результаты стабилизации представлены
на примере трех образцов с разным
альфа-разнообразием. Разброс определяемого
относительного количества для разных таксонов
сопоставим с технической ошибкой метода.

Выводы

Транспортная среда Nobias Technologies надежно
стабилизирует микробное сообщество

Стабилизация микробиоты



Сравнение состава образцов микробиоты, стабилизированных в
транспортной среде Nobias, до и после хранения в течение месяца
при температуре 24°C.

Буквами обозначены образцы: А - α -D = 4; В - α -D = 5; С - α -D = 6.

Цифрами обозначены временные точки: 1 – неделя с момента
взятия, 2 – месяц с момента взятия.

Сравнение с аналогами.

Результаты эксперимента

На рисунке представлено β -разнообразие – это одна из основных метрик определения различий между образцами. Чем дальше точки друг от друга, тем сильнее различия в микробном составе

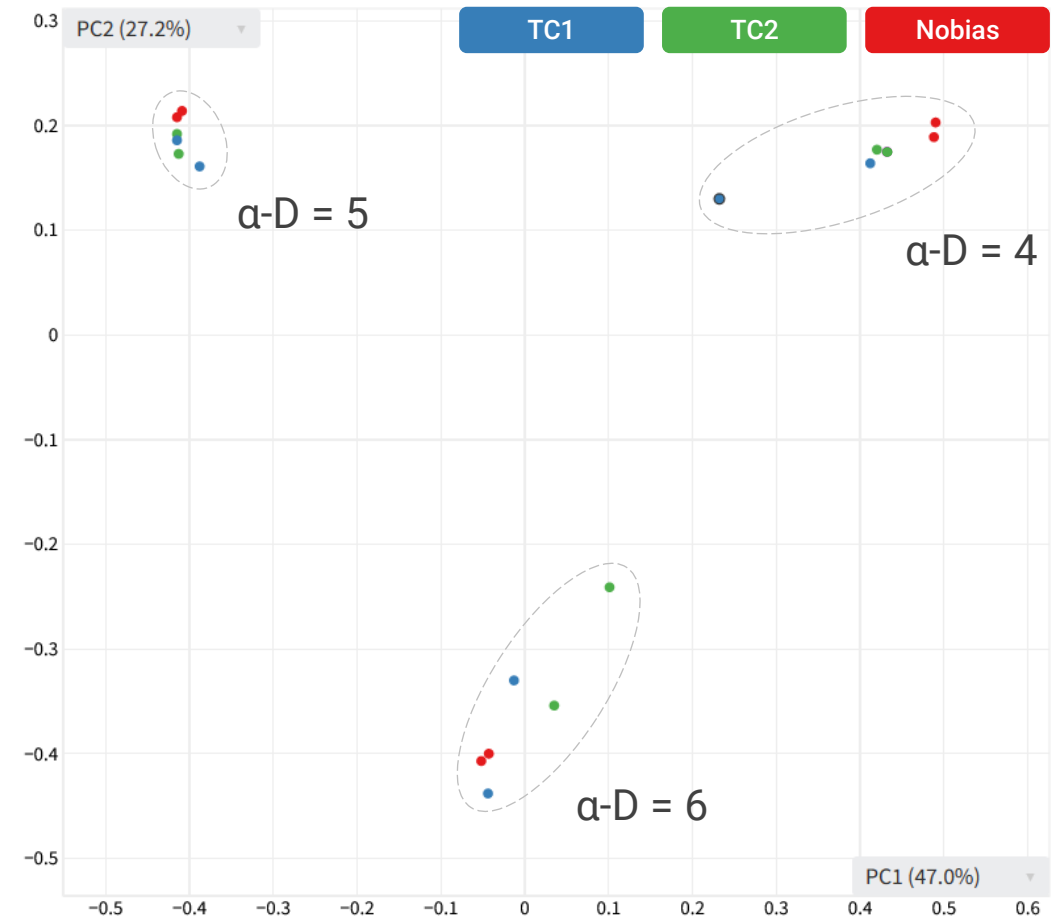
Транспортные среды

- TC1 - Транспортная среда для клинических ПЦР анализов на патогены
- TC2 - Зарубежный аналог для взятия образцов микробиоты кишечника
- Nobias Technologies

Выводы

- TC1 не пригодна для метагеномных исследований
- При $\alpha\text{-D} < 6$ транспортные среды для микробиома работают одинаково
- При $\alpha\text{-D} = 6$, среда Nobias показала наименьший разброс

Наборы работают по разному



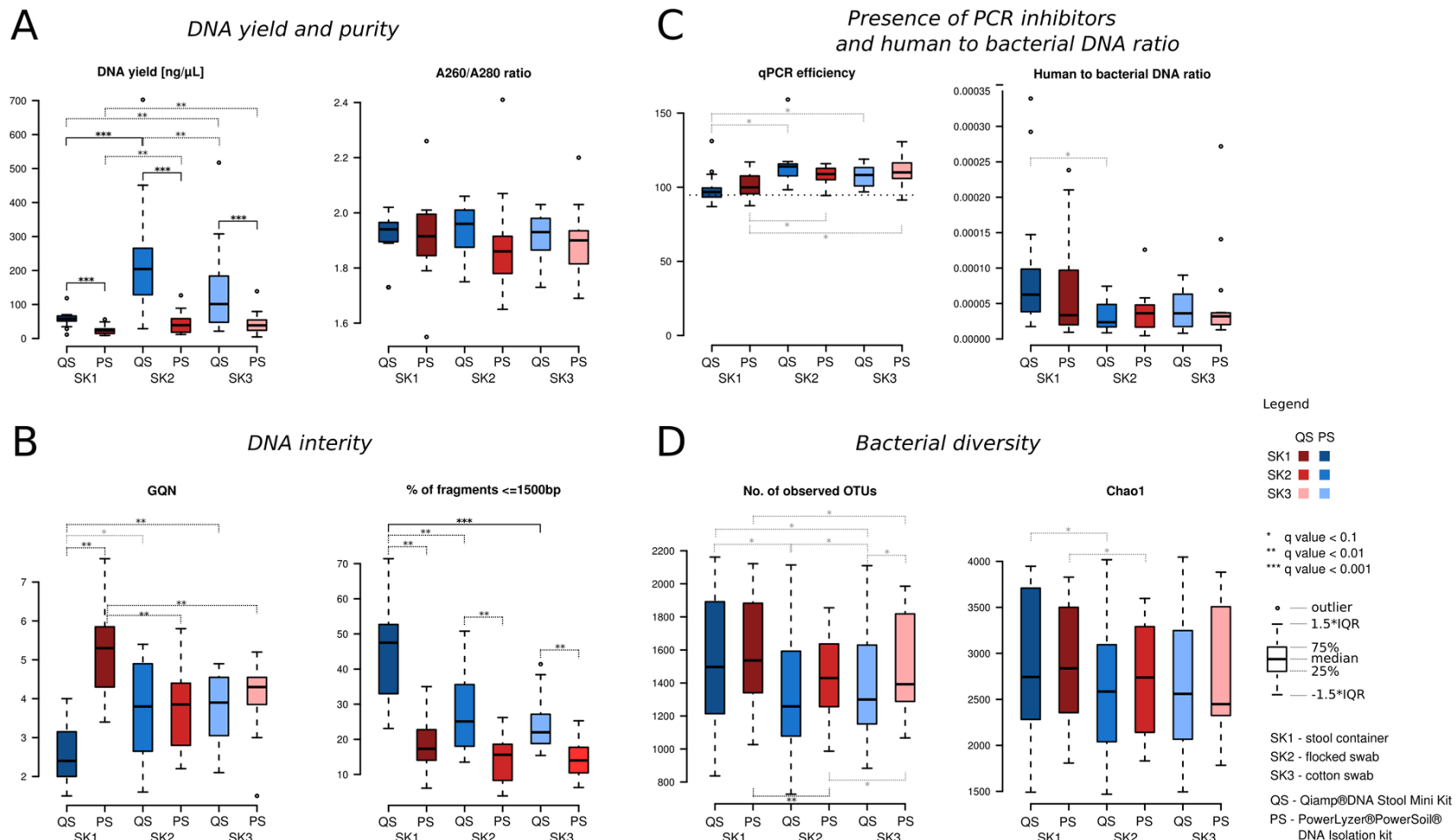
В каждом овале образцы микробиоты от одного добровольца, стабилизированные разными транспортными средами и проанализированные на 7 и 30 дни хранения. Транспортные среды отличаются цветом

От биоматериала до ДНК

Наборы работают по разному

Стадия бидбинга – обязательно для работы с микробиомом

Освобождение ингибиторов – желательно, но в зависимости от материала



Контроль качества ДНК от Nobias

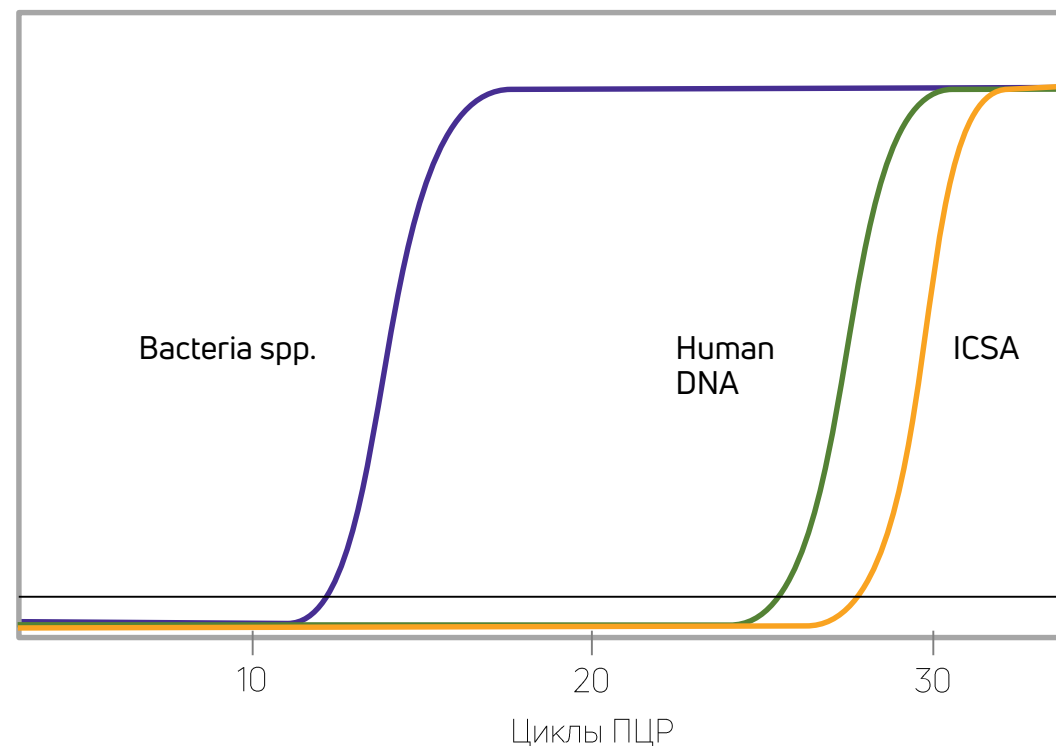


Оцениваем следующие параметры:

- Концентрация копий 16S*
- Содержание ингибиторов ПЦР
- Балластная ДНК
- Фрагментация ДНК**

* В итоге – можно нормировать количество бактерий на объём образца или хотя бы на объём выделенной ДНК

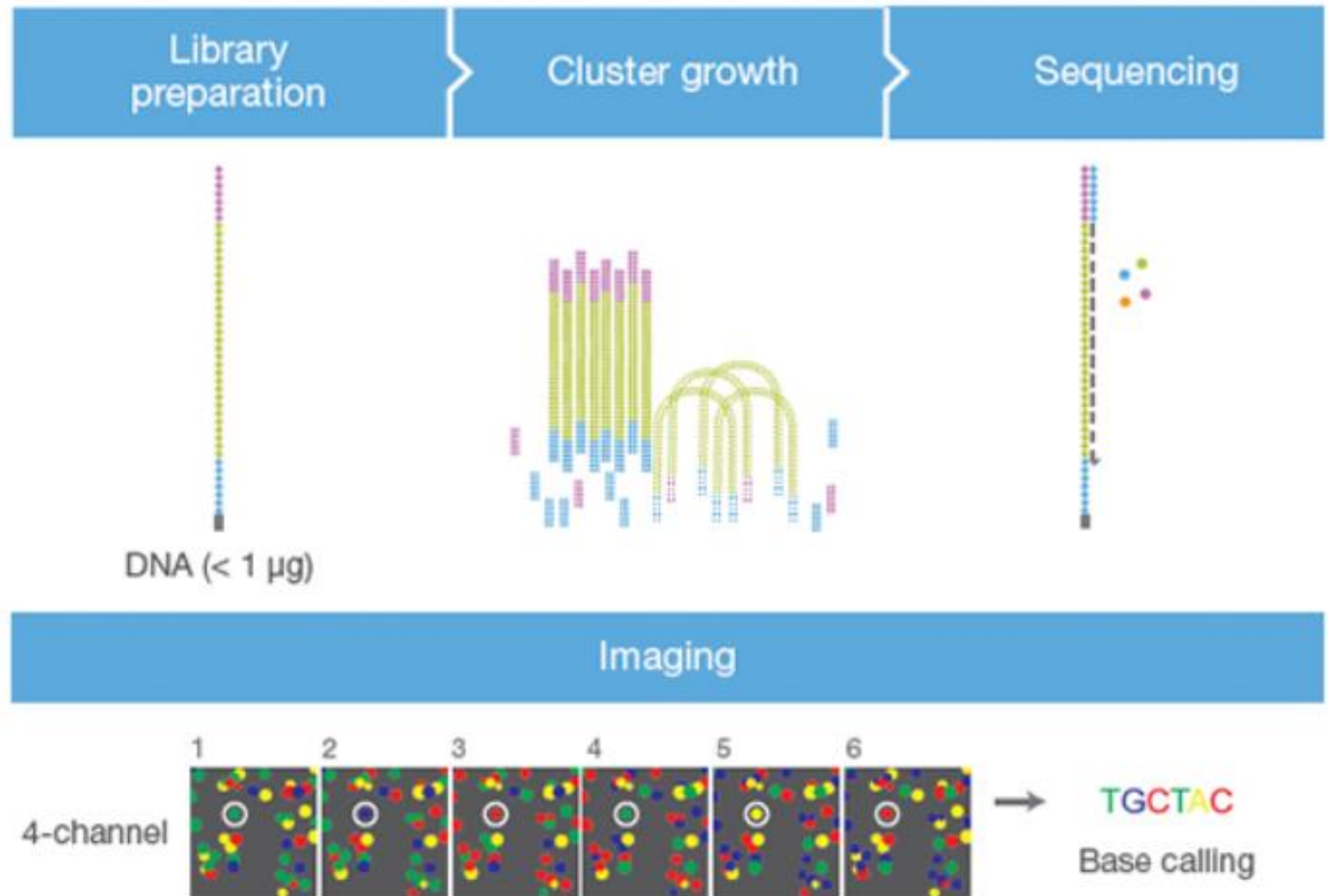
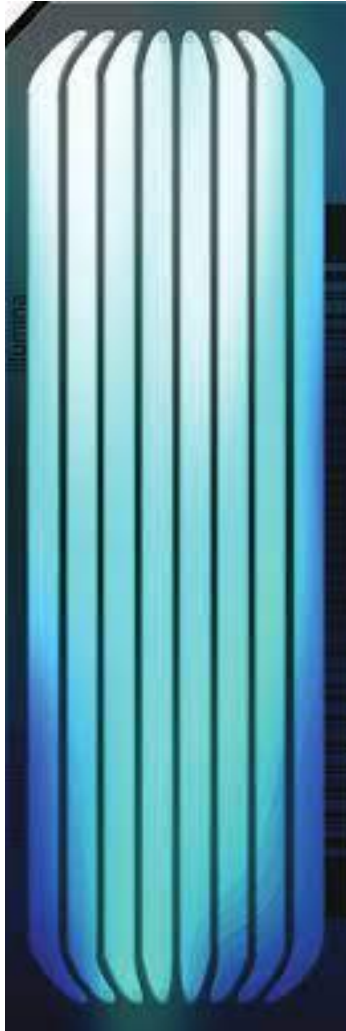
** На перспективу - при дальнейшей ПЦР по выделению ампликона



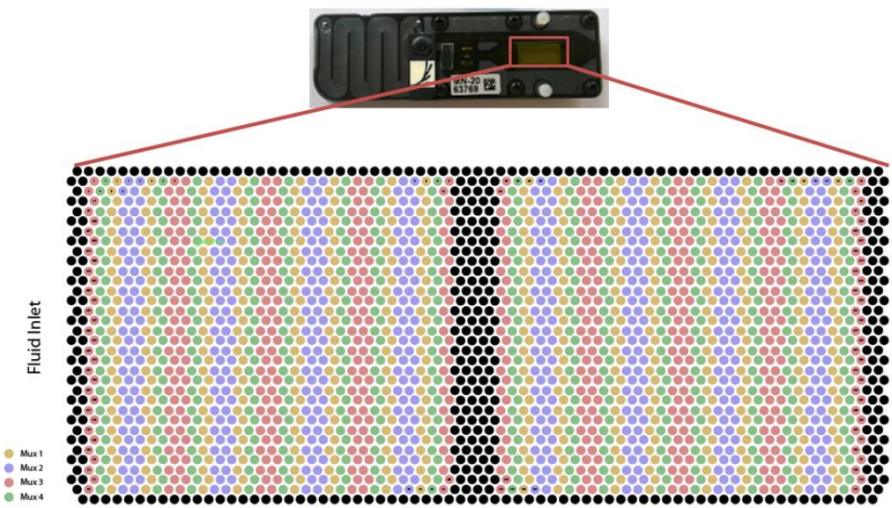
Визуализация работы qPCR QC kit на одном образце

Выделили ДНК, класс!
Выбираем платформу для сиквенса

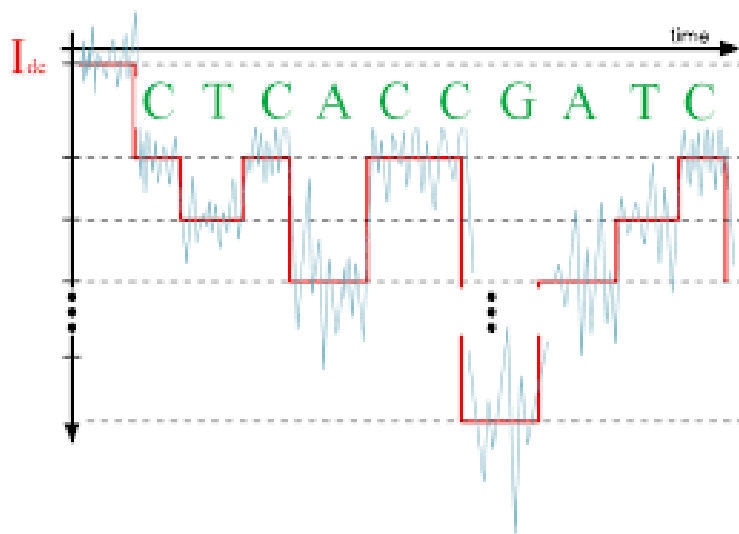
Секвенирование синтезом: illumina, BGI, Thermofisher



Nanopore sequencing



512 sequencing channels → each channel sequences multiple molecules




The nanopore processes the length of **DNA or RNA** presented to it. The user can control fragment length through the library preparation protocol utilised. (e.g. >2 Mb DNA has been recorded¹.)

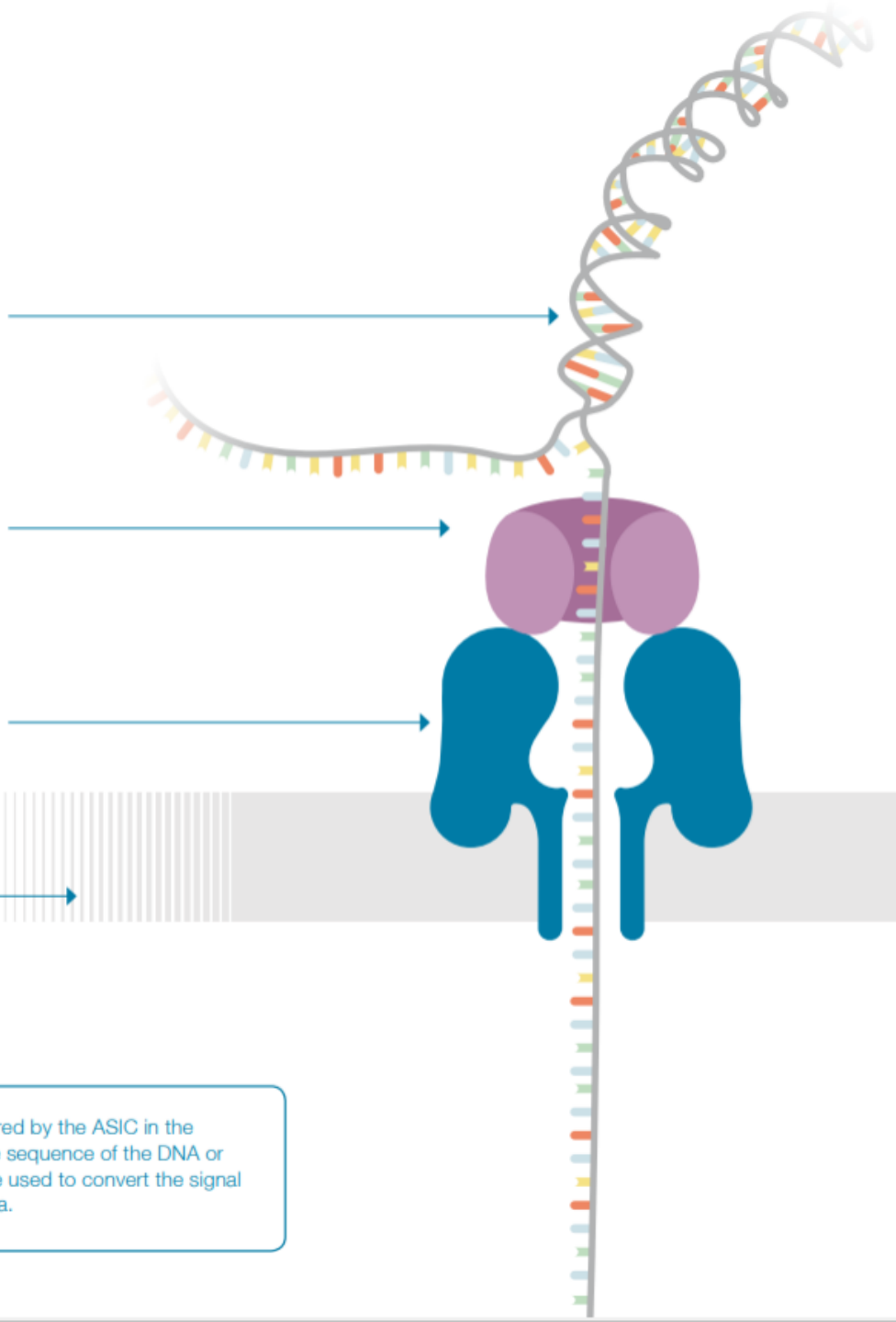
An **enzyme motor** controls the translocation of the DNA or RNA strand through the nanopore. Once the DNA or RNA has passed through, the motor protein detaches and the nanopore is ready to accept the next fragment.

Nanopore reader
DNA or RNA fragments pass through a nano-scale hole. The fluctuations in current during translocation are used to determine the DNA or RNA sequence.

An electrically resistant **membrane** means all current must pass through the nanopore, ensuring a clean signal.



The **nanopore signal**, captured by the ASIC in the device, is characteristic of the sequence of the DNA or RNA fragment. Algorithms are used to convert the signal into basecalled sequence data.



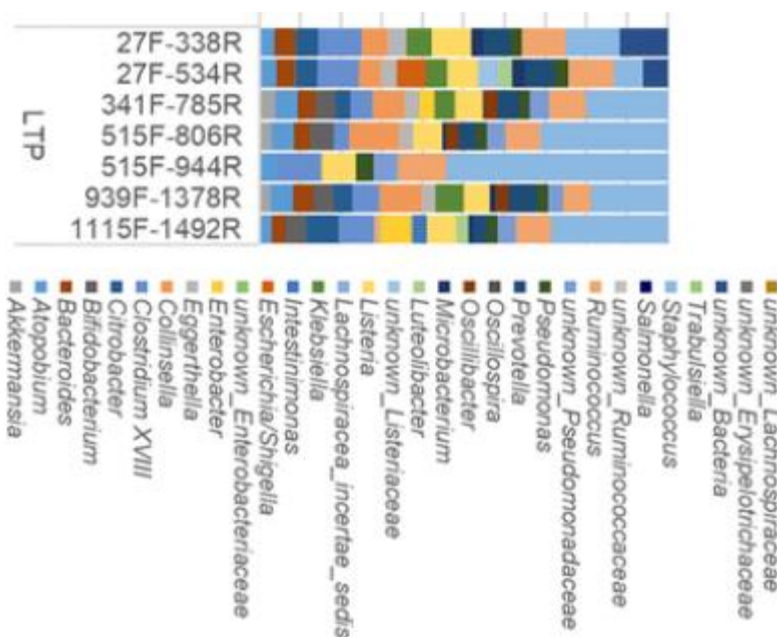
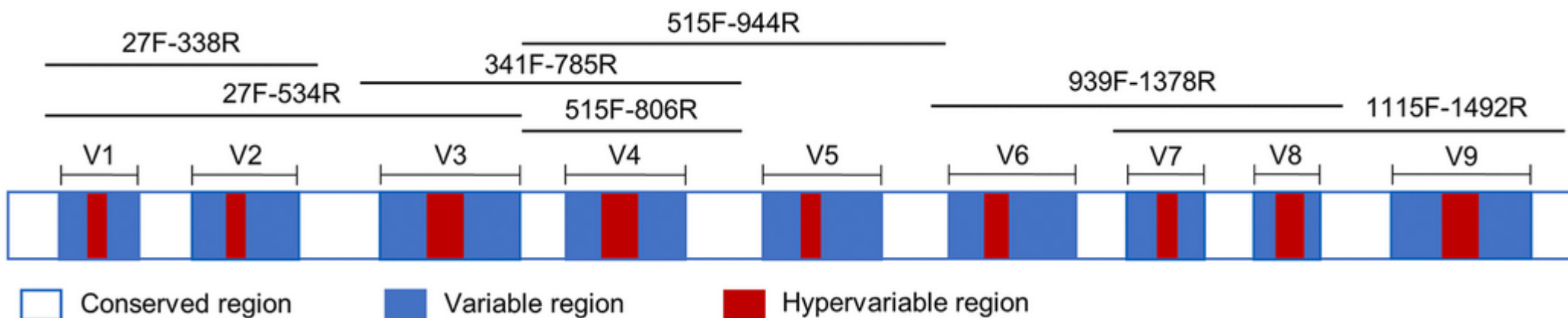
Принципиально разные технологии, но если кратко, то:

Сиквенс синтезом – **Меньше** длинна, **меньше** ошибок

Nanopore – **Больше** длинна, **больше** ошибок

1:1 кажется, а так ли это?

От ДНК до ампликона

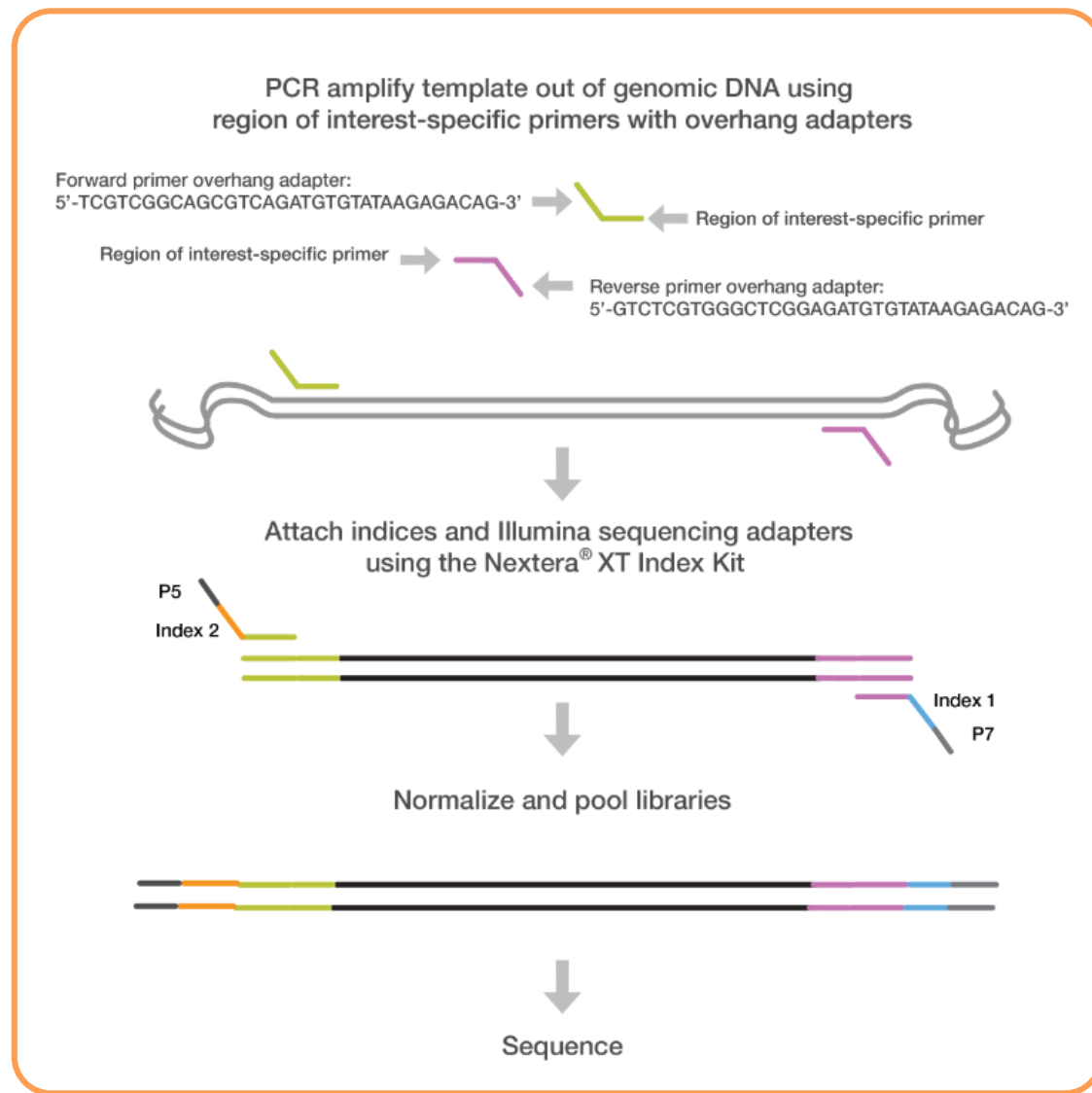
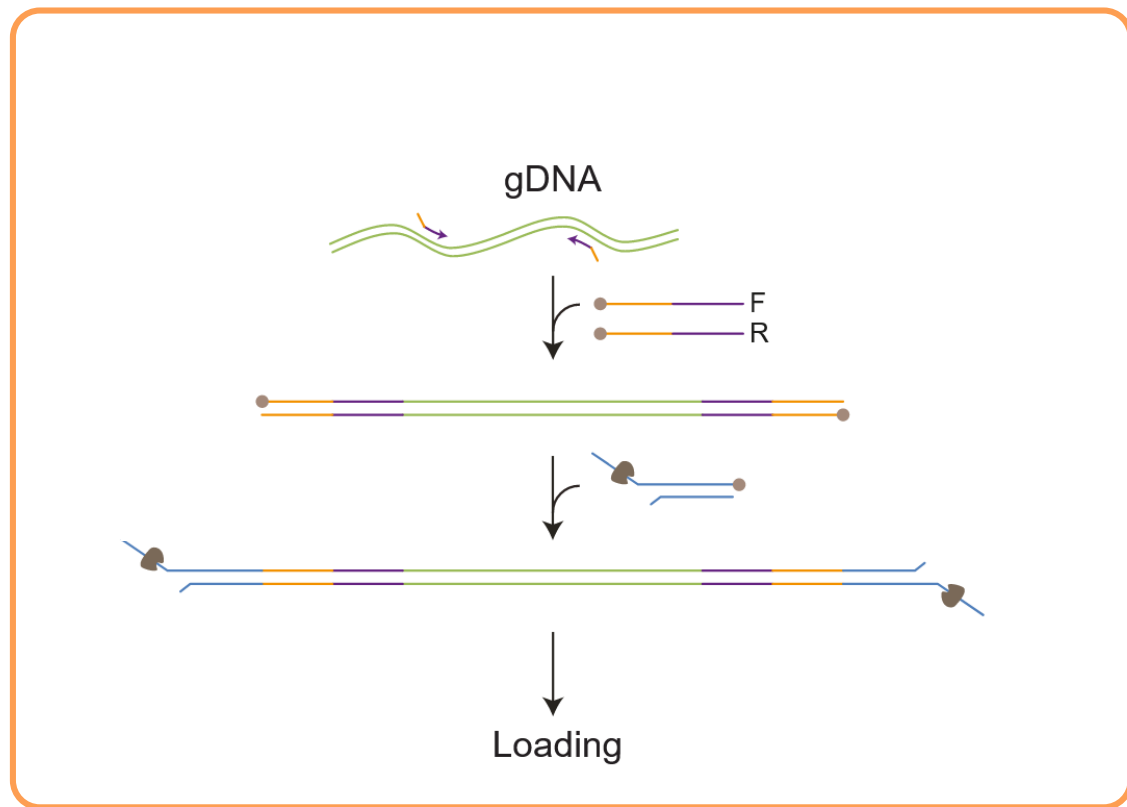
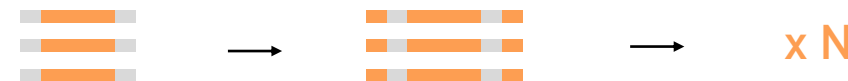


Длинные риды
=
Полный ген 16S
=
Всегда работаем на
уровне вида

Короткие риды
=
Можем работать с
фрагментированной
ДНК

Подготовка ампликонов для сиквенса

- Этап мечения каждого образца молекулярными баркодами, что бы можно было пулировать партию образцов для загрузки в секвенатор.



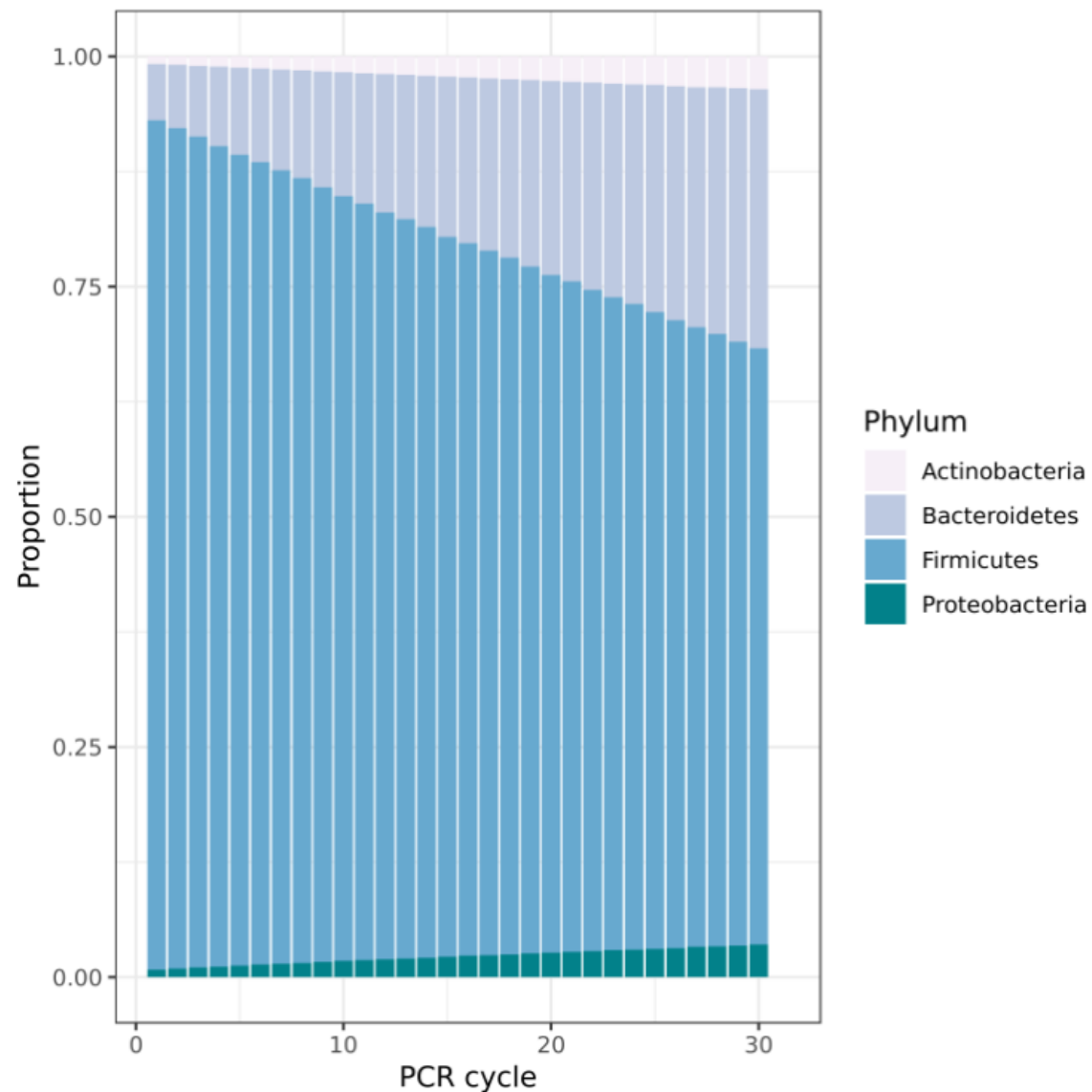
Какие бывают на этом этапе погрешности/ошибки
Посмотрим

От ДНК до ампликона – PCR bias

Смещение концентраций
в процессе ПЦР

В результате разной
эффективности отжига
праймеров на стадии
ПЦР, результаты могут
искажаться

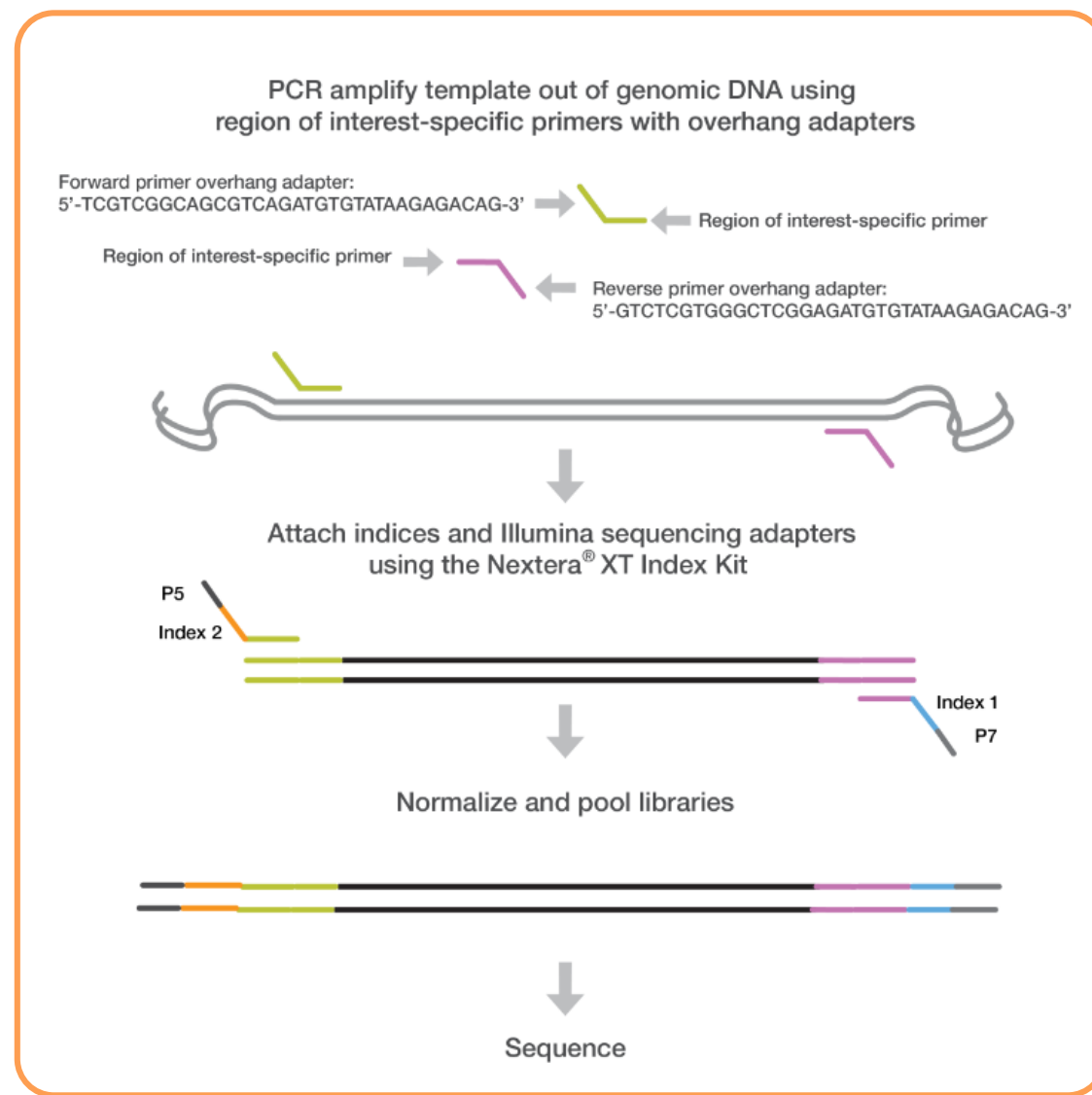
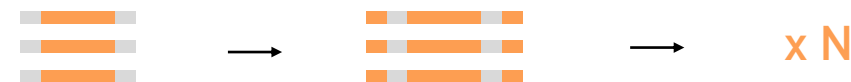
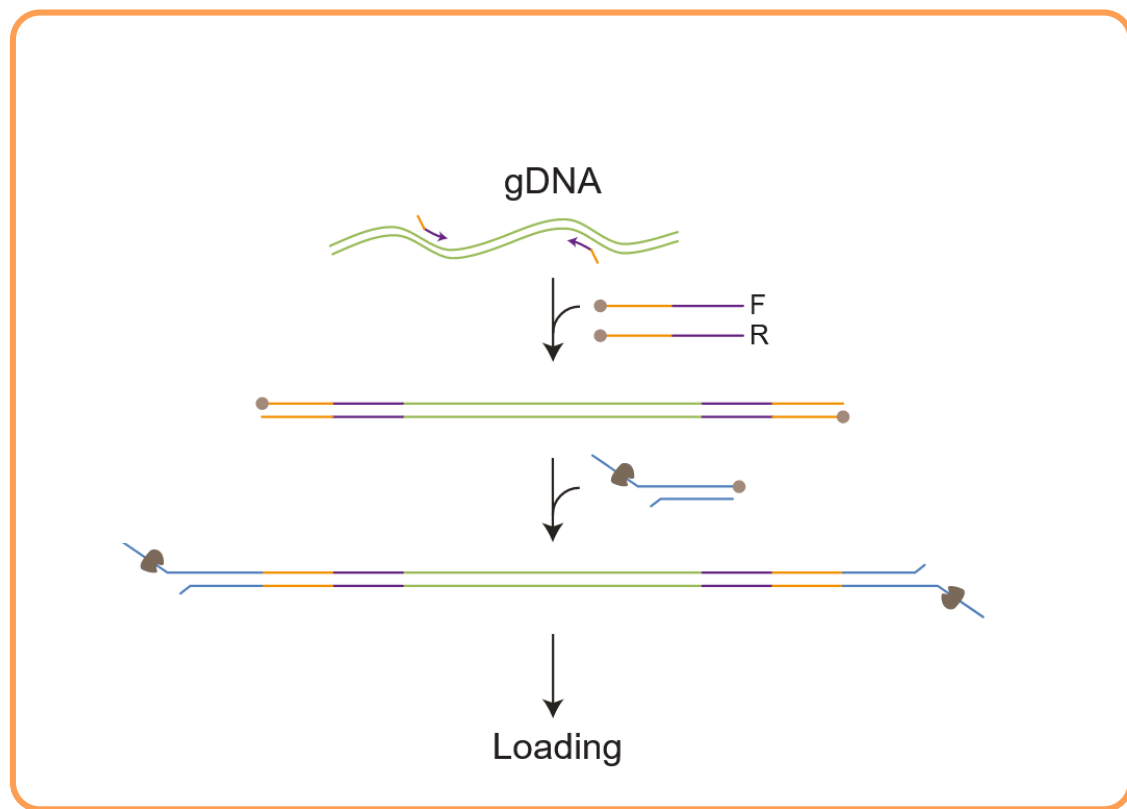
Желательно
использовать
концентрированную ДНК,
что бы минимизировать
количество циклов ПЦР



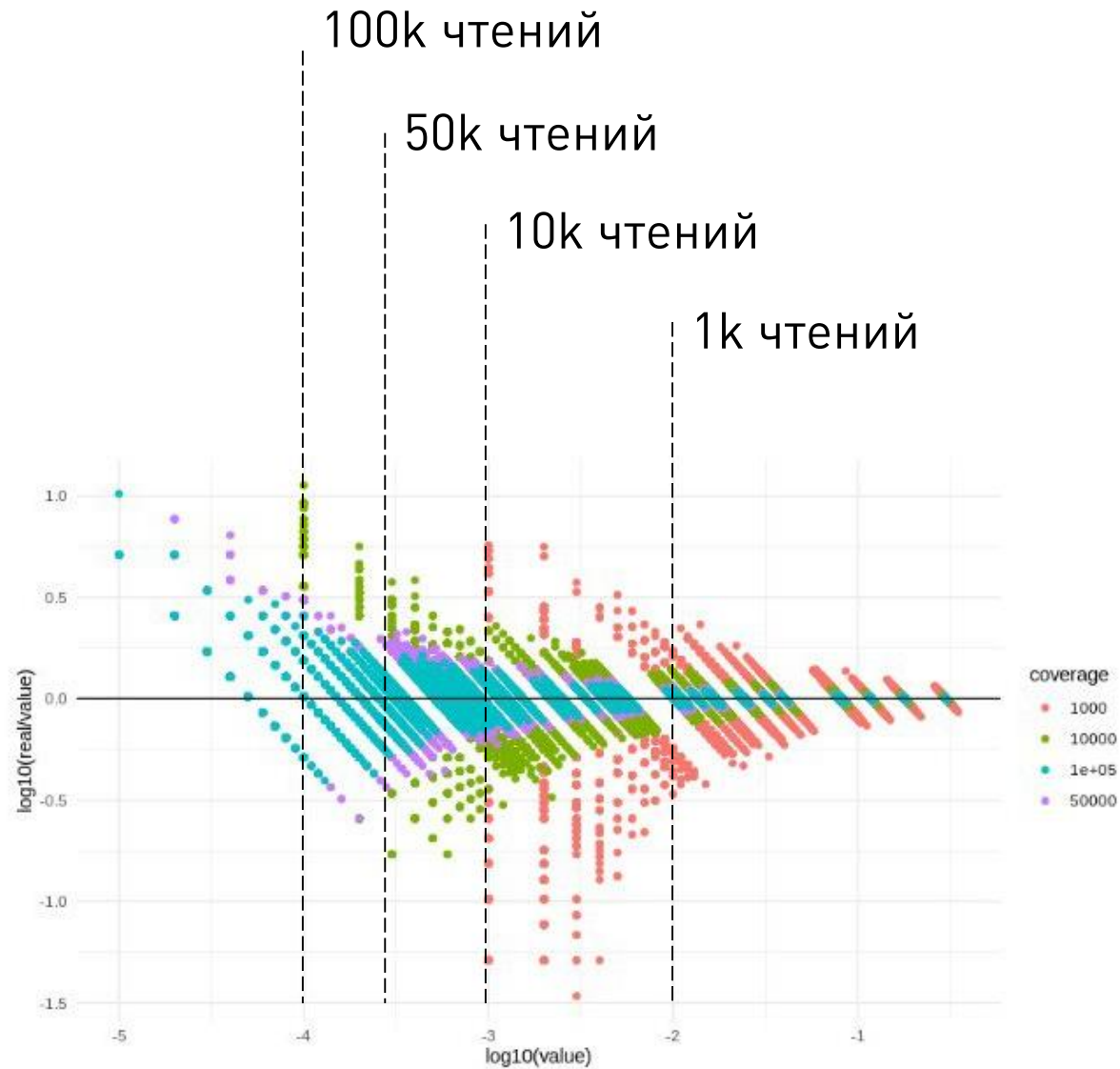
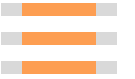
Нет стандартизации

Узкие места:

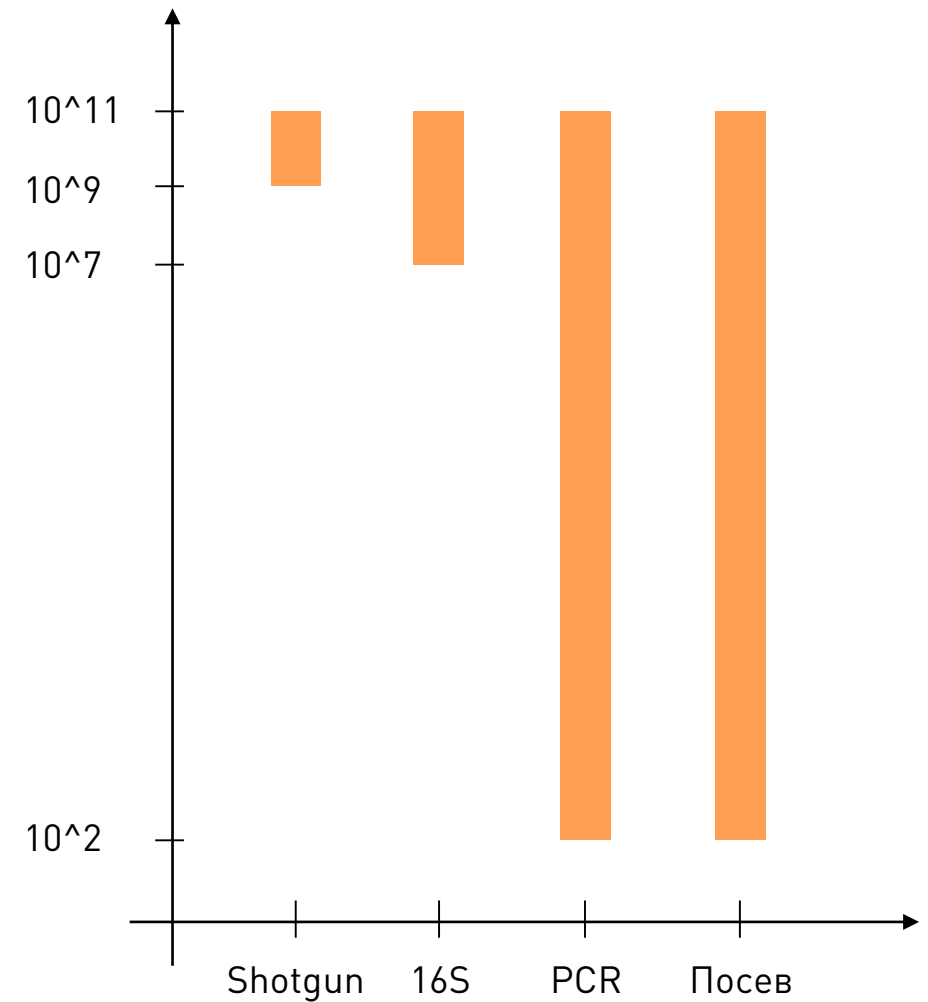
1. Неспецифические продукты
2. Оценка количества образца для сиквенса.



Аналитические характеристики – что это?



Давайте сравним методы



Ключевые шаги

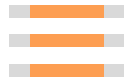
Сбор биобанка



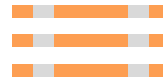
Выделение ДНК



Наработка
ампликона



Баркодирование



Пулирование

x N



Сиквенс



Праймирование



Дата сет для дальнейшего анализа

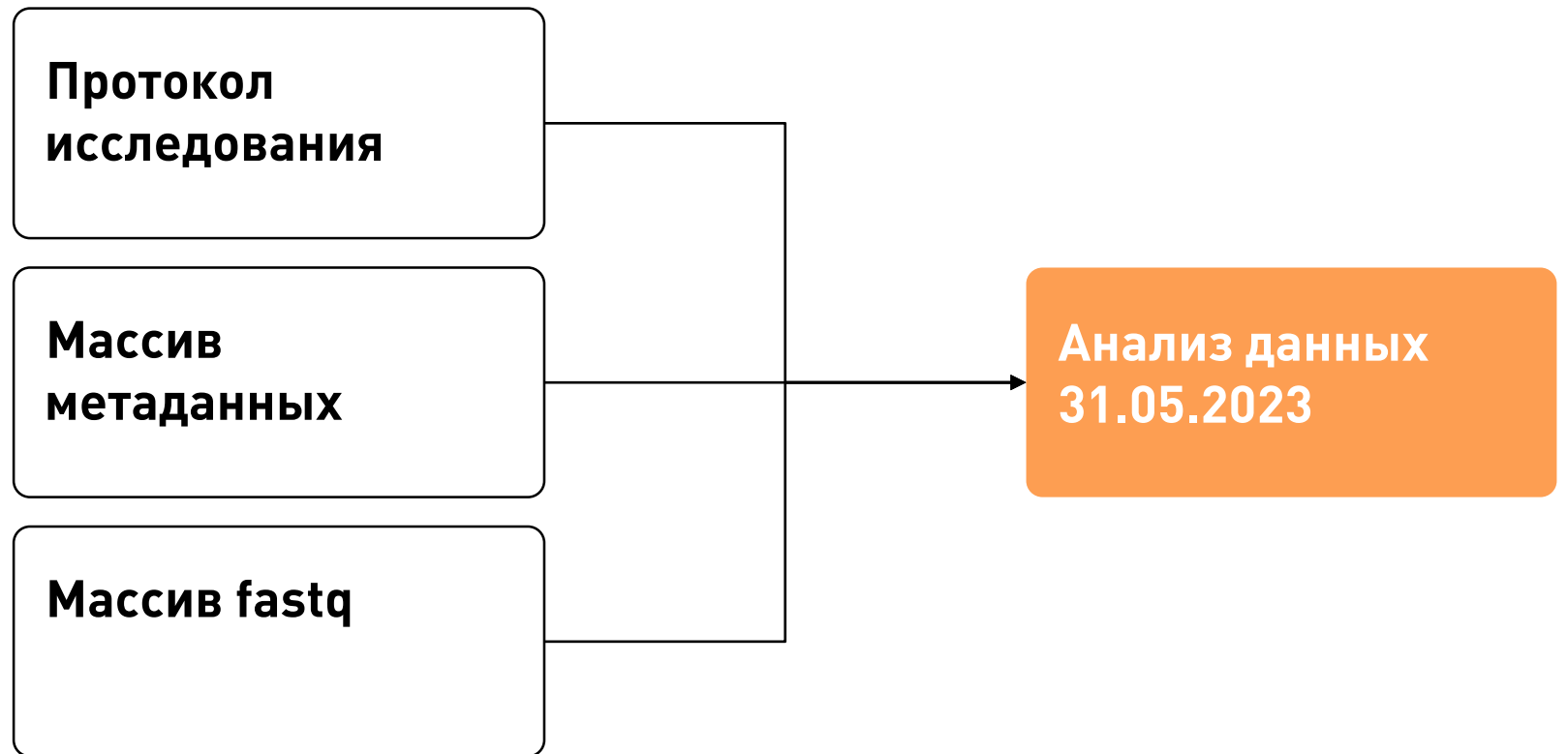
Чем чище будут собраны данные – тем лучше будут результаты их анализа

Требования:

Гармонизация проверки
гипотезы и всего проекта

Полнота сбора и контроль
качества данных

Стандартный
лабораторный
протокол



Summary

1. Сиквенс 16S – отлично подходит для проведения больших экологических и клинических исследований
2. Секвенирование на нанопорах – всегда определяет до вида, в такого рода проектах – это важно.
3. Технологии слабо стандартизированы, но нужно хотя бы делать одинаково в рамках одного проекта.

Необходимо работать над стандартизацией лабораторных протоколов!

Что мы и делаем.

Мы разрабатываем линейку реагентов для стандартизации и контроля качества метагеномных исследований на платформе Nanopore.

Взятие и хранение образцов

+ Наборы для взятия и стабилизации микробиоты кишечника, слюны и мазка.

Выделение ДНК

+ Выделение микробиоты с бидбингом и стадией очистки от ингибиторов
+ ПЦР для контроля качества преаналитики

Подготовка библиотек

+ Нарботка амликона полного гена 16S рРНК
- Баркодирование библиотеки на 96 образцов
- Праймирование библиотеки

Спасибо

Кошечкин С.И.