

Выделение микробных нуклеиновых кислот для метагеномного анализа микробиома

Алексей Жигулин, ООО «Силекс», info@sileks.com

11 июня 2023 года

Предлагаемая статья предназначена для исследователя, рассматривающего необходимость анализа представленности разных организмов в конкретном образце. Задача данной статьи – дать общее понимание связанное с метагеномным анализом и обозначить ключевые моменты, которые важно принимать во внимание.

Определимся с терминами.

Метагеномный анализ

Позволяет определить видовое разнообразие исследуемого образца без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов.

Микробиом

Набор геномов всех микроорганизмов, обнаруженных в какой-либо среде.

Микробиота

Набор геномов всех микроорганизмов, обнаруженных в конкретном участке или области исследуемого объекта.

Краткое вступление

Исторически, область исследований микробиомов появилась из исследования микробиомов окружающей среды (микробная экология) и предоставляет междисциплинарную платформу для многих областей, например, сельское хозяйство, пищевая наука, биотехнология, биоэкономика, математика (информатика, статистика, моделирование), патология растений и особенно медицина. Новая область стала разрабатывать новые и важные концепции для описания взаимодействий носителя-хозяина с микробным сообществом. Возникли такие теории как теория Holobiont* или концепция метаорганизма**.

*Под теорией Holobiont понимается теория эволюции гологенома, рассматривающего отдельное животное, растения, другие многоклеточные организмы, как сообщество или «голобионт», то есть, хозяин плюс все его симбиотические микробы.

**Концепция метаорганизма рассматривает организм как сообщество взаимодействующих биологических сущностей.

Кроме того, в отношении микробиома активно развивались принципы коэволюции, совместимости и взаимовлияния друг на друга различных микроорганизмов, реакции микроорганизмов на стресс и т.п..

Stegen et al. (Stegen JC, Bottos EM, Jansson JK.. A unified conceptual framework for prediction and control of microbiomes. Curr Opin Microbiol. 2018;44:20–7) предлагают единую концептуальную структуру для прогнозирования и контроля микробиомов. В понимании микроорганизмов произошел фундаментальный сдвиг парадигмы, и в настоящее время признано, что все эукариоты являются метаорганизмом и должны рассматриваться вместе с их микробиотой как неразделимой функциональной единицей.

Микробиом или микробиота

Люди, растения и другие животные имеют микробиомы, включающие бактерии, археи, грибы, протисты и вирусы. Микробиомы являются индивидуальными для каждого организма и отличаются в конкретных микробиомах между одними и теми же родственными организмами. Также может быть много вариаций в микробиоме конкретного объекта, организма или индивидуума. У людей есть ряд специфических и отдельных микробиом. Например, кожа, легкие и желудочно-кишечный тракт имеют собственные микробиомы. Комбинация этих микробиомов делает уникальный общий микробиом для каждого человека.

Термины «микробиом» и «микробиота» иногда используются взаимозаменяемо. Но нужно помнить, что эти два термина имеют тонкие различия.

Микробиом ссылается на сбор геномов из всех микроорганизмов в окружающей среде (как правило, без упоминания конкретной локации).

Микробиота, с другой стороны, обычно относится к микроорганизмам, которые находятся в специфическом месте. Микробиота может ссылаться на все микроорганизмы. Это означает, что существуют локализованные различия в микробиоте каждого человека, в зависимости от того, откуда в организме собирается микробиота.

На самом деле, кишечная микробиота индивидуума может радикально отличаться от микробиоты кожи, поэтому всегда нужно уточнять, откуда взята микробиота.

Исследования микробиома человека

Число исследований и публикаций посвященных микробиоме человека растут с каждым днем.

Регулярно проводятся множество различных типов анализа микробиомов, включая анализ микробиома кожи, кишечника, легких, других мест организма.

Мы рекомендуем посмотреть несколько ссылок для представления о том, сколько организаций вовлечены в работу в этом направлении:

1. The Integrative Human Microbiome Project
<https://www.nature.com/articles/s41586-019-1238-8>
2. The Human Microbiome Project: Extending the definition of what constitutes a human
<https://www.genome.gov/27549400/the-human-microbiome-project-extending-the-definition-of-what-constitutes-a-human>
3. An Introduction to the Microbiome: Challenges and Resolutions for Research
<https://www.fiosgenomics.com/wp-content/uploads/2022/02/White-paper-microbiome-web-1-13.pdf>

Для людей различные микробиомы могут оказать влияние на заболевание. Фактически, микробиомы могут широко влиять минимум на четыре различных области для людей: питание, иммунитет, поведение и заболевание. Например, полезная микробиота в кишечнике может помочь переваривать пищу, а вредная микробиота может нанести ущерб, вызывая различные желудочно-кишечные заболевания.

Конечно, микробиомы есть не только у людей. Исследование микробиома растений может повысить урожайность, используя преимущества микроорганизмов и их генов, которые уже ассоциированы с данным растением.

Выделение микробных нуклеиновых кислот микробиома

При выделении микробных нуклеиновых кислот стоит задача минимизировать количество хозяйской эукариотической нуклеиновой кислоты в получаемом препарате. Это связано с большим размером эукариотического генома, который в среднем в 1000 раз больше генома бактерий. При такой разнице в размере геномов вопрос о чувствительности методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования с использованием чипов становится актуальным.

Для «улучшения» соотношения нуклеиновых кислот микробиома к хозяйским эукариотическим нуклеиновым кислотам были разработаны различные методы и подходы.

Приводим некоторые из таких методов.

1. Фильтрация и отделение клеток по размеру. Для такого подхода необходимо использовать центрифуги и/или фильтры. Достаточно трудоемкая, но в некоторых случаях, особенно, если это касается вирусов, эффективная процедура.
2. Использование антител для выделения конкретных микробных клеток. Дорогая процедура со всеми проблемами, связанными с иммунологическими анализами. Высокая эффективность в отношении конкретных клеток при высокой стоимости.
3. Использование нуклеотидного зонда для выделения последовательностей нуклеиновых кислот конкретных микробных клеток. Дорогая процедура со всеми проблемами, связанными со специфичностью гибридизации. Высокая эффективность в отношении конкретных клеток при высокой стоимости.
4. Селективный лизис эукариотических клеток с последующим разрушением хозяйской эукариотической нуклеиновой кислоты. В настоящее время этот метод используется в большинстве случаев из-за его доступности. Позволяет увеличить соотношении микробных нуклеиновых кислот по отношению к эукариотическим от 100 до 100.000 раз в зависимости от используемого набора и типа пробы.

Метод выделения нуклеиновых кислот микробиома определяется задачей и типом пробы. Для проб, в которых клетки доступны для избирательного воздействия, можно применять методы по выбору. К сожалению, некоторые типы проб исключают такой выбор. Так, выделение из образцов почвы и растений часто требует разрушения всех содержащихся в пробе клеток «жесткими» способами с использованием гомогенизаторов (glass tissue homogenizer и т.п.). Последующий анализ всех выделенных геномов возможен только методами ПЦР или метагеномного секвенирования.

Выделение нуклеиновых кислот микробиома методом селективного лизиса эукариотических клеток хозяина

Метагеномное секвенирование является многообещающим подходом для выявления и характеристики организмов и их функциональных характеристик при сложных полимикробных инфекциях. Но метагеномные анализы часто осложняются большим количеством человеческой нуклеиновой кислоты, что сильно занижает долю выявляемого микробного генома. Кроме того, многие микробы, особенно в дыхательных образцах (например, в образцах мокроты человека), могут продуцировать большое количество внеклеточной нуклеиновой кислоты, происходящей либо из биопленки, либо из мертвых клеток. Это вносит дополнительные искажения в результаты анализа.

Для корректного выполнения метагеномного анализа встает ряд проблем, которые исследователь должен четко понимать и быть готовым к взвешенной интерпретации получаемых результатов.

Селективное разрушение эукариотических клеток

Исследователи и фирмы производящие наборы используют разные подходы для селективного разрушения эукариотических клеток. Микробные клетки и вирусы должны остаться не поврежденными. На практике часть микробных клеток разрушается вместе с эукариотическими клетками. Поэтому, выбрав для использования конкретный набор или метод очень важно убедиться, что клетки, являющиеся целью обнаружения, не разрушаются в процессе селективного разрушения эукариотических клеток.

Живые или мертвые микробные клетки

Основным подходом в обогащении пробы нуклеиновой кислотой микробиома является обработка образца, в котором эукариотические клетки хозяина тем или иным способом уже разрушены, нуклеазами (ДНКазой, бензаназой, другими подобными ферментами). Нуклеазы разрушают нуклеиновую кислоту эукариотических клеток, тем самым значительно снижая нагрузку на последующий анализ. Но... при этом возникает проблема, о которой необходимо знать и принимать во внимание.

При обработке нуклеазами разрушается не только нуклеиновая кислота разрушенных эукариотических клеток включая внеклеточную микробную нуклеиновую кислоту, но и микробные клетки, которые оказались поврежденными, частично разрушенными и имеющие повреждения в мембране. Такие микробные клетки можно считать либо мертвыми, либо «частично» живыми.

В результате обработки образца нуклеазой удаляются следы эукариотических клеток плюс мертвых и частично разрушенных микробных клеток. Профиль микробиома меняется.

Исследователь самостоятельно должен принять решение, какой метагеномный профиль он хочет получать.

- Соотношение эукариотического и внеклеточного генома к геному всей выявляемой микробиомы
- Максимально полный профиль геномов всех присутствующих нехозяинских организмов
- Профиль только живых нехозяинских организмов
- Профиль вирусов и вирусоподобных организмов

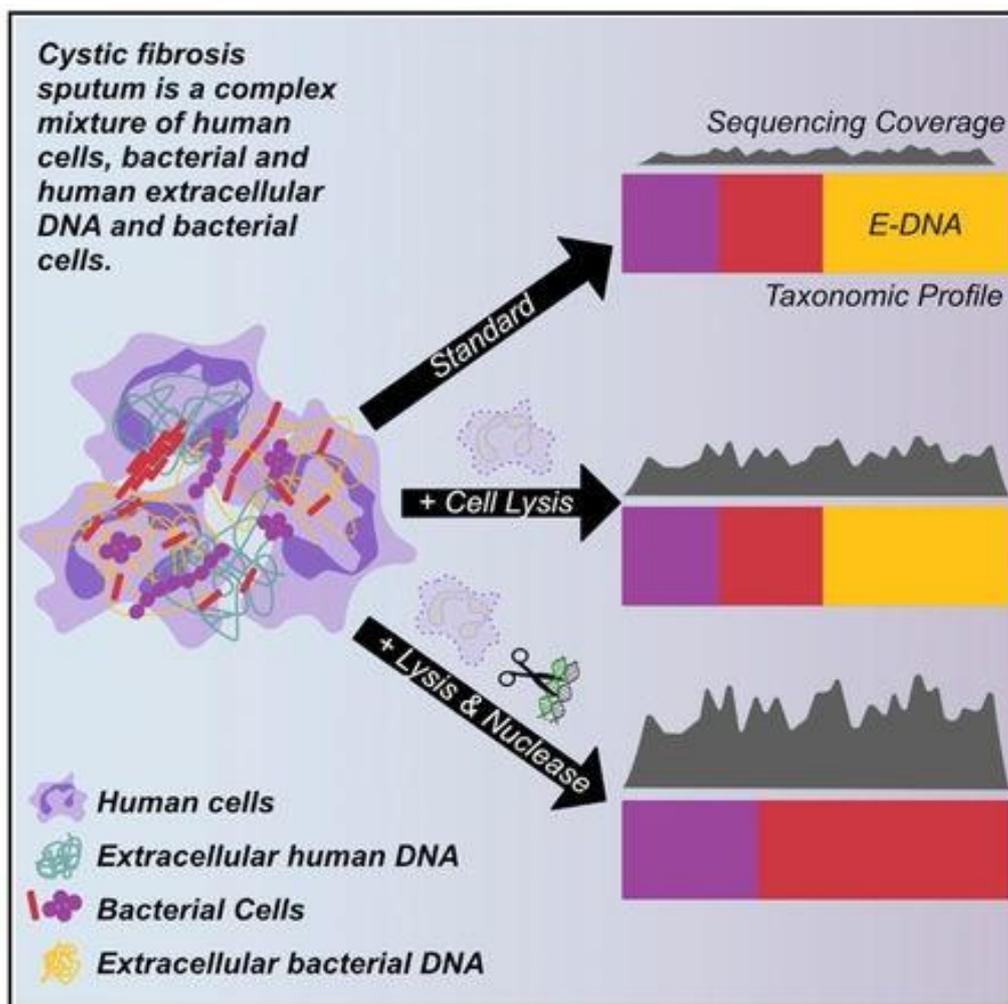
Обоснования выбора того или иного решения должно быть сделано исходя из исследовательской задачи и последующих действий на основе полученных результатов.

Микробные клетки в забираемом образце ведут себя по-разному. Их состояние и выживаемость в пробе зависит от целого ряда факторов, например, таких, как локальное происхождение образца, способ забора образца и его последующего хранения, состава образца, содержащихся в образце других клеток и их состояния и т.д.. Данные о соотношении живых и мертвых микробных клеток в образцах разнятся в зависимости от источника образцов, но большая часть исследователей сходятся на том, что в образце присутствует около 10-30% живых микробных клеток в зависимости от их вида. Относятся ли «выжившие» клетки к тем, которые интересуют исследователя, решает только сам исследователь. В некоторых случаях информация о профиле всех микробных клеток и их количестве может приводить к неверным выводам. Иногда требуется информация только о активных живых клетках, чтобы корректно оценить их вклад в сложившееся сообщество.

В литературе можно найти статьи, обосновывающие оба подхода к изучению микробиома исходя из конкретной задачи.

Так, например, в приводимой ниже работе авторы описывают метод одновременного истощения ДНК из интактных человеческих клеток и внеклеточной ДНК (человека и бактерий) в мокроте, используя селективный

лизис эукариотических клеток с последующим расщеплением эндонуклеазой. Он показывает, что этот метод увеличивает глубину микробного секвенирования и, как следствие, количество обнаруженных таксонов и охват отдельных генов, участвующих в устойчивости к антибиотикам. Но при этом снижается выявление отдельных микроорганизмов. Подход авторов показывает важность контроля выделения ДНК из микроорганизмов, содержащихся в образце для изучения хронической инфекции дыхательных путей у людей с муковисцидозом.



Maria T. Nelson, Christopher E. Pope, Robyn L. Marsh, Daniel J. Wolter, Eli J. Weiss, Kyle R. Hager, Anh T. Vo, Mitchell J. Brittnacher, Matthew C. Radey, Hillary S. Hayden, Alexander Eng, Samuel I. Miller, Elhanan Borenstein, and Lucas R. Hoffman, Human and Extracellular DNA Depletion for Metagenomic Analysis of Complex Clinical Infection Samples Yields Optimized Viable Microbiome Profiles, *Cell Rep.* 2019 February 19; 26(8): 2227–2240.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.091.

Наши рекомендации

Перед тем, как использовать тот или иной метод для анализа микробиома в пробе, определитесь, какой конечный профиль нужен для принятия решения по полученному результату.

На первых этапах используйте контрольные культуры микроорганизмов, чей профиль важен для определения, чтобы убедиться, что выбранный метод или применяемый набор позволяет получать желаемый результат.

Используйте стандартный способ получения пробы, ее транспортировки и хранения.