

Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника

О.Л. Кардымон^{1,2}, А.В. Кудрявцева^{1,2}

¹ Лаборатория постгеномных исследований, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

² Отделение патологической анатомии, Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation

O.L. Kardymon^{1,2}, A.V. Kudryavtseva^{1,2}

¹ Laboratory of post-genomic studies, Engelgardt institute of molecular biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Department of pathological anatomy, National medical research radiological center, Ministry of healthcare Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Цель обзора. Анализ существующих молекулярно-генетических методов для исследования видового разнообразия и количественного анализа микробиома кишечника.

Основные положения. Нарушения в микробиоценозе кишечника играют ведущую роль в возникновении большого количества патологий инфекционного и неинфекционного характера. Мониторинг видового разнообразия, количественного соотношения различных видов и штаммов микроорганизмов в норме и при различных патологических состояниях необходим для последующей разработки подходов к восстановлению микробиоценоза с помощью микробной терапии.

Aim of review. To analyse existing molecular genetic methods for investigation of specific variety and the quantitative analysis of intestinal microbiome.

Summary. Intestinal microbiome disorders play the leading role in development of many diseases of infectious and noninfectious origin. Monitoring of specific type, quantitative ratio of different types and strains of microorganisms in healthy people and at various diseases is essential for to develop strategy for microbiome restitution by microbial therapy.

Modern molecular genetic methods of microbial investigation combined to the established methods of classical microbiology give the chance not only to identify microorganism species and even a strain, but also to

Кудрявцева Анна Викторовна — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией постгеномных исследований ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава РФ. Контактная информация: rhizamoeba@mail.ru. 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

Kudryavtseva Anna V. — Cand. Sci (Biol), head of the laboratory of post-genomic studies, Federal government-financed institution «Engelgardt institute of molecular biology», Russian Academy of Sciences, research associate of pathological anatomy department, National medical research radiological center, Ministry of healthcare of the Russian Federation. Contact information: rhizamoeba@mail.ru. 119991, Moscow, Vavilova str., 32

Кардымон Ольга Леонидовна — младший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, младший научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава РФ. Контактная информация: olgakardymon@gmail.com, 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

Kardymon Olga L. — junior research associate, laboratory of post-genomic studies, Federal government-financed institution «Engelgardt institute of molecular biology», Russian Academy of Sciences; junior research associate, pathological anatomy department, National medical research radiological center, Ministry of healthcare of the Russian Federation. Contact information: olgakardymon@gmail.com, 119991, Moscow, Vavilova str., 32

Received 12.06.16

Поступила 12.06.16

Современные молекулярно-генетические методы изучения микробиома в совокупности с уже имеющимися в классической микробиологии, дают возможность не только идентифицировать микроорганизмы до вида и даже штамма, но и расшифровывать их геномы, оценивать устойчивость к антибиотикам и выявлять ее причины на генетическом уровне, оценивать специфические свойства отдельных микробных штаммов, что позволит определять возможность и успешность их применения в клинических условиях и многое другое. Между тем для точной видовой идентификации микроорганизмов на сегодняшний день все чаще применяют сочетание стандартных микробиологических методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, помогающими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул ДНК или РНК (некоторые вирусы).

Заключение. В молекулярной биологии имеется арсенал методов для исследования микробиома кишечника с целью применения этих знаний в клинической практике. Однако существуют также методы, которые позволяют получать интересные научные данные, но пока не используются для обнаружения и терапии различных патологий. Постепенно результаты исследовательских работ транслируются в клиническую практику и становятся стандартом для диагностики и основой для разработки новых способов лечения.

Ключевые слова: микробиом кишечника, ПЦР, FISH, флуоресцентная гибридизация *in situ*, NGS, real-time PCR, секвенирование, 16S рРНК, масс-спектрометрия микробных маркеров (MSMM).

Для цитирования: Кардымон О.Л., Кудрявцева А.В. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2016;26(4):4-13

Огромное значение в эффективности функционирования кишечника принадлежит микроорганизмам [1, 2]. Особенности питания, качество воды, воздействие лекарственных средств, особенно антибиотиков, приводит к нарушениям микробиоценоза, что влечет за собой изменения во всем организме. Таким образом, в настоящее время сформировалось представление о ведущей роли нарушений микробиоценоза человека в возникновении большого количества патологий инфекционного и неинфекционного характера.

Для того чтобы детально исследовать механизмы таких нарушений и создавать способы контроля над ними, требуется проводить мониторинг видового разнообразия, количественного соотношения различных видов и штаммов микроорганизмов в норме и при различных патологических состояниях [3–5]. Эти данные в случае возникновения дисбиотических нарушений помогут разработать подходы к восстановлению микробиоце-

decipher their genomes, to estimate antibiotic resistance and to establish its mechanism at genetic level, to estimate specific properties of specific microbial strain that will allow to define potential and efficacy of their clinical application etc. Meanwhile, today, to distinguish species and strains of microorganisms at DNAs or RNA level, standard culture and visual method are combined to molecular biology and genetics methods even more frequently.

Conclusion. In molecular biology there is a stash of methods for intestinal microbial studying that can be implied in clinical practice. However there are also promising scientific methods, yet not applicable for disease diagnostics. Results of scientific activity is gradually translated into clinical practice and become the standard for diagnosis and a basis for development of new treatment methods.

Key words: intestinal microbiome, PCR, FISH, fluorescent hybridization *in situ*, NGS, real-time PCR, sequencing, 16S rRNA, mass spectrometry of microbiome markers (MSMM).

For citation: Kardymon O.L., Kudryavtseva A.V. Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation. Ross z gastroenterol gepatol koloproktol 2016;26(4):4-13

ноза с использованием микробной терапии — введения в организм отдельных видов микроорганизмов или их консорциумов в зависимости от типа патологии.

Однако каждый человек уникален, это касается и микробиоценоза кишечника. То есть отдельным вопросом для исследователей является поиск общих закономерностей и динамики микрофлоры кишечника и варибельности индивидуальных изменений. Таким образом, потенциально некоторые препараты можно назначать практически всем пациентам, а другие следует разрабатывать под определенную группу людей или даже оптимизировать под каждого отдельного человека.

Указанный подход, получивший название персонифицированной (персонализированной) медицины, активно развивается и заключается в индивидуализации способов терапии в том числе дисбиотических состояний. Персонификация в этой области крайне важна, поскольку к настоящему времени накоплен ряд данных о негативных явле-

ниях при использовании промышленных пробиотиков, показана недолговременность эффекта, т. е. зачастую пробиотические штаммы находятся в желудочно-кишечном тракте человека недолго. Это может происходить из-за того, что штаммы оказываются «чужими» для иммунной системы организма, а также не могут адаптироваться к собственному микробиоценозу и быстро вытесняются другими микроорганизмами. Понимание закономерностей взаимодействия человека и населяющей его микрофлоры поможет существенно продвинуться в разработке новых подходов к терапии и профилактике многих заболеваний.

Изучение микробиоты традиционно проводят с использованием большого арсенала микробиологических методов, однако существует несколько недостатков и ограничений, которые не дают возможность ответить на все интересующие исследователей вопросы [6–8]. Поэтому с развитием новейших технологий все большее место занимают молекулярно-генетические методы, которые, в совокупности с уже имеющимися в классической микробиологии, позволяют:

- идентифицировать микроорганизмы до вида и даже штамма или показать, что микроорганизм является новым для науки;
- идентифицировать некультивируемые виды микроорганизмов;
- выявлять патогенные микроорганизмы;
- расшифровывать геномы микроорганизмов;
- идентифицировать различные вирусы и расшифровывать их геномы;
- оценивать устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и выявлять ее причины на генетическом уровне;
- проводить оценку экспрессии генов (степень их активности) в норме и при различных патологических состояниях;
- осуществлять количественную оценку представленности тех или иных видов в сообществе;
- расшифровывать структуру сообществ микроорганизмов;
- выполнять мониторинг состояния сообществ во времени, быстро идентифицировать нарушения структуры микробиоценоза;
- проследить микроэволюцию микроорганизмов;
- изучать индивидуальные особенности взаимодействия организма с компонентами собственной микробиоты;
- оценивать специфические свойства отдельных микробных штаммов, что позволит определять возможность и успешность их применения в клинической практике.

Методы видовой идентификации микроорганизмов

Сообщества микроорганизмов, обитающих в кишечнике, представляют собой уникальную

экосистему, для понимания функционирования которой необходимо прежде всего идентифицировать видовой состав [9, 10]. Как правило, речь идет о микроскопических организмах, которых невозможно увидеть невооруженным глазом и уверенно классифицировать до вида. Более того, существуют различные штаммы одних и тех же видов (например, бактерий), которые могут существенно отличаться по своим биологическим характеристикам, например патогенности, устойчивости к антибиотикам.

Ранее, перед тем как использовать те или иные методы видовой идентификации, необходимо было применять различные способы культивирования, чтобы увеличить численность организмов. Некоторые наиболее массово представленные виды можно исследовать и в исходном образце без предварительного обогащающего культивирования, в частности при помощи методов микроскопии. Однако данные, полученные таким способом, довольно ограничены. Более того, не все виды могут успешно культивироваться в лабораторных условиях, даже при применении различного набора сред с питательными веществами. Это означает, что при малой численности у конкретного пациента их практически невозможно обнаружить с использованием стандартных микробиологических методов [11].

Все основные виды полимеров клетки, а также некоторые их объединения (например, гликопротеиды) могут быть использованы для видовой идентификации и оценки экологической роли микроорганизмов в кишечнике. Наибольшее распространение получил анализ нуклеотидной последовательности микроорганизмов. Молекулы ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) организованы в виде длинных цепей, полимеров, в которых чередуются гены (участки, кодирующие белки или другие продукты), а также не кодирующие участки. Последние могут нести определенную функциональную нагрузку, например выполнять регуляторную роль. Нуклеотиды в генах расположены не в случайном порядке, каждые три нуклеотида в определенной комбинации (триплет) кодируют известную аминокислоту.

Процесс передачи информации в клетке от гена к белковому продукту осуществляется следующим образом. На матрице ДНК с гена считывается молекула РНК (транскрипция), далее в ходе трансляции при помощи рибосом происходит синтез белковой молекулы на матрице РНК. У прокариотических микроорганизмов, к которым относятся главным образом бактерии, трансляция пространственно не отделена от транскрипции и может наблюдаться еще до завершения синтеза РНК ферментом РНК-полимеразой. Прокариотические матричные РНК часто содержат несколько независимых генов в одной длинной цепочке, т. е. являются полицистронными.

Зная последовательность нуклеотидов в гене, можно методами биоинформатики моделировать продукты этого гена, их свойства, а также сравнивать микроорганизмы между собой.

Таким образом, видовую идентификацию возможно проводить на различных уровнях и различными методами. Но не во всех случаях можно сделать однозначный вывод. Среди основных методов видовой идентификации выделяют следующие:

- дифференциальное культивирование на средах с различными добавками;
- световая микроскопия;
- электронная микроскопия;
- молекулярно-генетические методы;
- окрашивание специфическими пробами с последующим микроскопированием (FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*);
- методы на основе рестрикционного анализа;
- методы на основе анализа повторяющихся последовательностей генома;
- секвенирование генома или отдельных генов, в том числе высокопроизводительное секвенирование (NGS — Next Generation Sequencing);
- **полимеразная цепная реакция (ПЦР).**

Учитывая все перечисленные сложности, для видовой идентификации на современном уровне развития науки все чаще применяют сочетание методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, позволяющими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул нуклеиновых кислот.

Методы, основанные на флуоресцентной гибридизации *in situ*

Флуоресцентная гибридизация *in situ* позволяет идентифицировать, установить местонахождение и подсчитать единичные микробные клетки, а также их кластеры [12, 13]. Метод основан на том, что клетки гибридизуются с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными специфическим участкам гена 16S рибосомальной РНК (рРНК), после чего исследуются под микроскопом. Можно выбрать зонды, которые будут гибридизоваться со всеми группами бактерий, что может потребоваться для подсчета количества последних на единицу объема. А можно подбирать зонды таким образом, чтобы они были специфичны для какого-то конкретного таксона. Однако с помощью FISH бактерии не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным систематическим группировкам.

Для выбора зондов требуется анализировать базы данных, в которых содержатся нуклеотидные последовательности различных микроорганизмов, но существуют трудности в их подборе для некультивируемых микроорганизмов.

Для FISH важно тщательно подбирать зонды, позволяющие детектировать целевые группы с минимальным включением ложных положительных результатов, более того, эффективность гибридизации варьирует в различных таксонах, что может привести к систематической ошибке в оценке структуры сообщества. Для увеличения точности и чувствительности метода используют модификации метода, такие как CARD-FISH или RING-FISH.

Полимеразная цепная реакция

Это наиболее востребованный метод в биологических и медицинских лабораториях, без которого сложно представить современную молекулярную биологию, генетику и клиническую диагностику. ПЦР позволяет значительно увеличить количество определенных фрагментов ДНК в биологическом материале (амплификация ДНК). Данный метод широко используется в биологической и медицинской практике, в том числе для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, клонирования генов, оценки экспрессии генов и многих других целей.

Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка молекулы ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*), что необходимо из-за сложности в детекции единичных молекул ДНК. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и лишь в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. С помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В стандартных условиях длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований [14]. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при конкретных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать более 20 тысяч пар нуклеотидов (long range PCR).

Для проведения ПЦР в простейшем случае необходимы следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который планируется амплифицировать;
- два праймера — прямой и обратный, которые представляют короткие олигонуклеотиды, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК;
- термостабильная ДНК-полимераза — фермент, необходимый для полимеризации ДНК; полимеразы для использования в ПЦР должны сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому применяют ферменты, выделенные из бактерий — термофилов, обитателей экстремальных местонахождений с очень высокой температурой. Наиболее распространенная полимеразы выделена из бактерии *Thermus aquaticus* — *Taq*-полимераза;

- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) — мономеры, из которых будет строиться растущая цепочка ДНК;

- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;

- буферный раствор, обеспечивающий требуемые параметры pH, ионную силу раствора, содержащий соли и бычий сывороточный альбумин.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок. Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют минеральное масло либо используют амплификатор с подогревающейся крышкой, в этом случае испарения практически не происходит.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18–30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двухцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка. После гибридизации матрицы с праймером (отжиг) последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы. Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления комплекса праймер–матрица. В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–35 (до 50) циклов, каждый из которых состоит из трех стадий: денатурации, отжига праймеров и элонгации. Сначала двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 95°C на 15 секунд, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Как правило, перед первым циклом проводят длительную денатурацию реакционной смеси в течение 5–10 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

Затем температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей — стадия отжига праймеров. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно соответствует температуре их плавления. Время стадии отжига — примерно 30 секунд, параллельно с отжигом праймеров полимеразы начинают достраивать нуклеотиды по принципу комплементарности на цепочку. Поэтому иногда подбирают праймеры с температурой плавления выше 60°C и проводят отжиг и элонгацию одновременно, при температуре 60–72°C.

В процессе элонгации полимеразы начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль нее,

синтезируя новую цепь. Температура элонгации зависит от типа полимеразы, как правило, это 72°C, а время — от типа полимеразы и от длины амплифицируемого фрагмента (обычно около 0,5–3 минут). После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, при этом достраиваются все одноцепочечные фрагменты (7–10 минут).

Детекцию продуктов ПЦР можно осуществлять либо при помощи электрофореза, либо с использованием флуоресцентных красителей. Они специфически связываются с ДНК и позволяют проводить детекцию или в конце, или даже в процессе реакции (ПЦР в режиме реального времени) без необходимости открывать пробирку со смесью.

Применение. Помимо того, что метод ПЦР выступает в качестве вспомогательного для большинства молекулярно-генетических исследований, основной областью его применения для видовой идентификации микроорганизмов является возможность качественного анализа присутствия того или иного вида в исследуемом образце. Это становится возможным благодаря выбору праймеров, которые специфичны только к ДНК конкретного вида и не могут отжигаться на другие виды, либо же ПЦР-продукт будет иметь слишком большую длину, поэтому реакция амплификации также протекать не сможет.

ПЦР в режиме реального времени

Это количественная ПЦР (англ. real-time PCR, qPCR, qRT-PCR) — лабораторный метод, основанный на стандартной полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК [14]. Главное отличие от типичной ПЦР состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного определения используют два подхода — применение флуоресцентных красителей, интеркалирующих в двухцепочечные молекулы ДНК (например, SYBR Green, EVA Green), и модифицированных олигонуклеотидов (ДНК-зонды, Taqman® probe, Beacon® probe), которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором.

Процедура очень похожа на классическую ПЦР, т.е. присутствуют все стадии реакции — денатурация, отжиг праймеров и элонгация, но детекция ПЦР-продукта происходит по мере его накопления. Флуоресценция усиливается с каждым новым циклом. Таким образом, график ее накопления говорит о первоначальном количестве интересующей молекулы в образце.

На начальных этапах флуоресценция слабая, так как продукта еще не очень много, поэтому

ее трудно отличить от фона. По мере накопления продукта сигнал растет сначала экспоненциально, а затем выходит на плато. Выход на плато объясняется нехваткой того или иного компонента реакции — могут закончиться праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, зонды. Если продукта реакции накопилось слишком много, то лимитирующим фактором может стать фермент. Стоит отметить, что в стандартной реакции ПЦР в реальном времени все образцы выйдут на плато и достигнут примерно одного уровня сигнала. Таким образом, конечная точка ничего не скажет о начальном количестве исследуемого образца. С другой стороны, в экспоненциальной фазе можно проследить отличия в скорости роста продукта. Различия в начальном количестве молекул влияют на количество циклов, необходимых для поднятия уровня флуоресценции выше уровня шума.

Для количественного анализа, как правило, используется пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК. Он основан на определении значения C_t (порогового цикла), когда уровень флуоресценции достигает одинаковой во всех пробирках пороговой величины, которая задается пользователем или автоматически программным обеспечением. Иными словами, C_t -величина — это точка пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии (рис. 1). Однако данный параметр может зависеть от многих случайных факторов, например чувствительности детектора, качества фильтра и др. Поэтому начальное количество интересующего продукта точно измерить нельзя. Для решения указанной проблемы существуют методы нормировки.

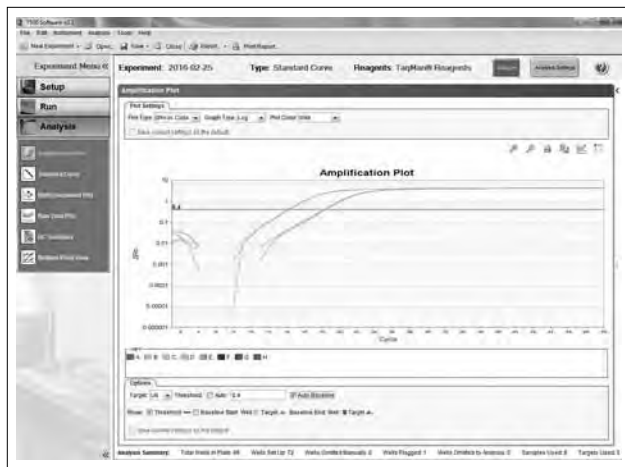


Рис. 1. Пример программного обеспечения для анализа данных ПЦР в режиме реального времени. Показаны две группы кривых в трех технических повторностях. Изображен график зависимости уровня флуоресценции от цикла амплификации Fig. 1. Software sample for the real-time PCR analysis. Two groups of curves are presented in three technical sequences. The plot of fluorescence level to amplification cycle is presented

Применение. Метод ПЦР в режиме реального времени позволяет получать количественные данные, при помощи которых можно определять уровень экспрессии маркерных генов различных микроорганизмов, свидетельствующий о нарушениях процессов нормального функционирования очистных сооружений. Можно идентифицировать количественное содержание микроорганизмов определенного вида к общей биомассе.

Пример 1. Необходимо выявить наличие определенного бактериофага или бактерии (например, патогенный штамм *E. coli*).

Исследование проводят по следующей схеме:

- 1) отбор проб фекалий;
- 2) выделение ДНК;
- 3) выбор и заказ синтеза специфических праймеров, комплементарных маркерным генам конкретных видов бактерий или вирусов, присутствие которых мы хотим проверить;

4) проведение ПЦР с детекцией методом электрофореза в агарозном геле либо с детекцией в режиме реального времени;

5) обработка данных. В случае положительного сигнала (наличия продукта амплификации) делается вывод о том, что бактериофаг/штамм бактерии присутствует у пациента. Однако требуется уделить особое внимание контролям. Должен быть положительный контроль амплификации (ДНК данных организмов) и отрицательный контроль (отсутствие какой-либо ДНК). Положительный контроль позволяет избежать ложноотрицательных результатов, а отрицательный контроль — ложноположительных.

Примечание: если требуется идентифицировать РНК-содержащий вирус, то сначала следует выделить РНК, а затем провести реакцию обратной транскрипции, в ходе которой молекулы РНК будут преобразованы в молекулы комплементарной ДНК.

Пример 2. Необходимо провести количественную оценку присутствия патогенной бактерии в процессе приема антибиотиков или пробиотиков в нескольких временных точках.

Исследование проводят по следующей схеме:

- 1) отбор проб фекалий до приема препарата, а также в нескольких временных отрезках, например через 3, 7, 10 и 14 дней;

2) выделение ДНК;

3) выбор и заказ синтеза специфических праймеров, комплементарных конкретным видам бактерий, а также синтез праймеров для оценки общего количества бактерий (праймеры известны по литературным источникам и комплементарны ДНК практически всех бактерий в кишечнике);

4) проведение ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Для каждого образца одновременно проводят две реакции — с праймерами для целевого вида бактерий, изменение количества которого мы хотим оценить, а также с прай-

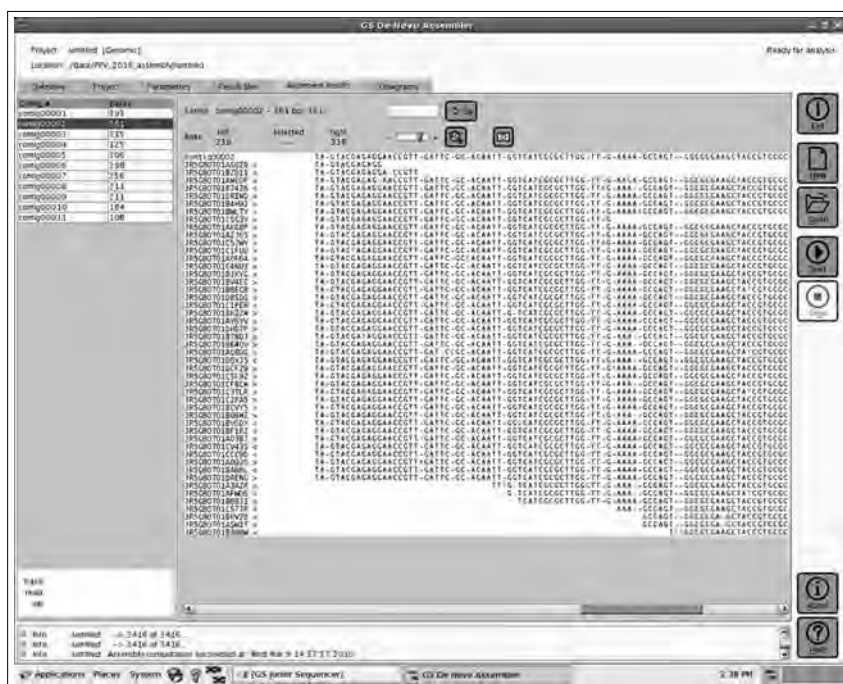


Рис. 2. Пример анализа данных прибора для высокопроизводительного секвенирования. Каждый фрагмент прочитан многократно и проведено выравнивание фрагментов относительно друг друга — сборка *de novo*
Fig. 2. Sample of high-performance sequencing device data analysis. Each fragment was read repeatedly and aligned in relation to each other: *de novo* assembly

мерами, показывающими общее количество бактерий в образце;

5) обработка данных. Сравнивают разницу в пороговых циклах (dCt) между указанными двумя реакциями в пределах каждой пробы, а затем сопоставляют пробы между собой. Если значение dCt увеличивается по сравнению с первым образцом, взятым до начала приема препарата, значит процентное соотношение интересующего нас вида бактерии в кишечнике уменьшается и ее вытесняют другие виды.

Секвенирование

Если метод ПЦР дает возможность идентифицировать вид микроорганизма только когда уже известна последовательность его генетического кода настолько хорошо, чтобы подобрать специфические праймеры, то методы секвенирования позволяют расшифровывать новые последовательности. В частности, современные методы секвенирования помогают расшифровывать новые геномы и идентифицировать новые виды микроорганизмов.

Секвенирование по Сэнгеру

За разработку метода секвенирования в 1980 г. авторами была получена Нобелевская премия и до сих пор этот метод с незначительными изменениями используется в рутинной биологической и медицинской практике. В послед-

ние десятилетия он претерпел существенные модификации, касающиеся в основном способа детекции и производительности приборов. Однако использование секвенирования по Сэнгеру все-таки ограничивается количеством прочтений, которое можно получить с одного запуска прибора, а также его стоимостью. В настоящее время данный метод чаще всего применяется в биологии и медицине для секвенирования ПЦР-продуктов. Были разработаны новые подходы, открывшие возможности геномного, транскриптомного и метагеномного анализа.

Секвенирование нового поколения

Главным отличием является высокая производительность метода. Его преимущество: можно многократно «прочитать» каждую молекулу ДНК, что существенно повышает точность идентификации генетических изменений (рис. 2).

Кроме того, метод позволяет за один запуск прибора собрать несколько геномов бактерий, если ДНК выделена из чистых культур, или определить практически весь видовой состав, населяющий то или иное местообитание [15]. Существуют различные приложения, для которых используется секвенирование нового поколения, и в зависимости от задачи модифицируются первые шаги, предшествующие самому процессу секвенирования, так называемая пробоподготовка.

Процесс технологически разделяется на два основных этапа — пробоподготовка и секвенирование. Финальным этапом пробоподготовки является получение «библиотек» — фрагментов ДНК, имеющих с двух сторон адаптеры. Адаптеры представляют собой последовательности, комплементарные олигонуклеотидам, иммобилизованным на поверхности стекла или в специальных бусинках и обеспечивающим клональную амплификацию молекул «библиотеки». Это требуется для того, чтобы можно было в ходе секвенирования детектировать не слабый сигнал от единичной молекулы, а многократно усиленный от кластера идентичных молекул. Помимо этого, адаптеры могут содержать короткие участки, работающие в качестве баркодов, т. е. обеспечивающие возможность мультиплексирования — одновременного секвенирования большого количества образцов. Разделение прочтений для различных образ-

цов осуществляется в ходе биоинформатической обработки данных секвенирования.

После приготовления «библиотеки» и ее клональной амплификации наступает процесс секвенирования на приборе. Основным отличием приборов разных производителей является метод детекции. Процесс секвенирования напоминает реакцию ПЦР, только при каждом добавлении нуклеотида в растущую комплементарную цепочку происходит детекция, чтобы определить, какой именно нуклеотид находится в данном положении. В приборах компании «Illumina» в процессе секвенирования в каждом раунде добавляют все четыре нуклеотида, однако каждый из них имеет различную флуоресцентную метку. Прибор по длине волны определяет, какой нуклеотид находится в определенной позиции. В каждом раунде присоединяется лишь один нуклеотид.

В других системах детекции нуклеотиды подаются последовательно, по одному типу за цикл, и в случае включения нуклеотида в растущую комплементарную цепь выделяется либо протон, либо квант света. Зная, что на определенном раунде в систему подавался аденин и был получен сигнал от системы детекции, например выделились протоны, можно заключить, что в комплементарной цепочке располагался тимин. Если друг за другом расположены несколько одинаковых нуклеотидов, то сигнал усиливается пропорционально количеству нуклеотидов.

Исследование видового разнообразия можно выполнять по двум различным схемам. В одном случае проводится только секвенирование участка гена 16S рибосомальной РНК, в другом — всей ДНК, которая выделяется из местообитания.

Определение структуры микробиоценоза на основе секвенирования гена 16S рибосомальной РНК

Наиболее распространенный способ анализа видового разнообразия бактерий основан на секвенировании гена 16S рРНК [16]. Этот ген очень удобен тем, что некоторые его участки обладают высокой консервативностью, что позволяет подобрать универсальные праймеры, а некоторые, наоборот, настолько переменчивы, что делают возможной идентификацию различных таксономических единиц. Таким образом, используя последовательности гена 16S рРНК, можно проводить оценку биоразнообразия, а также выполнять построения филогенетических деревьев, отражающих эволюционные связи.

Применение универсальных праймеров позволяет амплифицировать последовательности только бактериальной ДНК, в случае необходимости аналогичных исследований для эукариотических организмов используется ген 18S рРНК. После

получения ПЦР-продуктов к ним присоединяют адаптеры, содержащие последовательности, позволяющие отличать один образец от другого, и проводят секвенирование. Затем последовательность выравнивают и классифицируют. Можно оценить, насколько обширно представлены различные роды бактерий, т.е. насколько велико биоразнообразие в данном образце и в некоторой степени — присутствие основных систематических групп.

Метод не является количественным, однако дает возможность узнать об основных, наиболее широко представленных элементах сообщества, т.е. о его структуре. Например, при некоторых заболеваниях кишечника может наблюдаться уменьшение разнообразия микробиоты. Можно также проводить сравнения микробиоты в группах здоровых людей и лиц с определенным заболеванием или оценивать динамику изменения состава микробиоты в процессе лечения.

Определение структуры микробиоценоза на основе полногеномного анализа секвенирования

Для полногеномного анализа используется тотальная ДНК — вся ДНК, присутствующая в пробе. Длина прочтений выбирается исходя из возможностей и задач: чем длиннее прочтение, тем выше точность видовой идентификации и стоимость исследования. Такие данные можно использовать для создания списка видов, населяющих местообитание, причем точность классификации должна быть выше, чем при использовании метода на основе секвенирования гена 16S рРНК. Рассматриваемый метод более корректно отражает количество тех или иных видов бактерий. Можно идентифицировать определенные последовательности, отвечающие, например, за устойчивость к антибиотикам, или другие признаки. При обработке данных можно в качестве референсов использовать известные последовательности микроорганизмов и на них картировать полученные в результате секвенирования прочтения. Можно применять программы-ассемблеры, осуществляющие сборку коротких прочтений в более длинные фрагменты, и затем проводить функциональный анализ.

Определение структуры микробиоценоза методом масс-спектрометрии микробных маркеров (MSM)

Метод основан на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стероидов). Его преимущество заключается в возможности работать не только с чистыми культурами микроорганизмов, но и исследовать непосредственно клинические пробы без предварительного культивирования. После процедуры химической экс-

тракции высших жирных кислот из исследуемого образца их разделяют на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализируют состав в динамическом режиме на масс-спектрометре. Хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и компьютером с установленным программным обеспечением для анализа и обработки данных, что дает возможность провести весь анализ с пробоподготовкой и расчетом результатов за 3 часа. Полученные показатели позволяют оценить концентрации микробных маркеров и реконструировать состав сообщества.

Метод МСММ позволяет определять маркеры десятков микроорганизмов из разных групп (бактерии, грибы, вирусы) одновременно в одном анализе, обладает высокой чувствительностью (0,01 нг/мл маркера) и специфичностью [17, 18].

Заключение

Таким образом, в молекулярной биологии имеется арсенал методов, позволяющих расшифровывать структуру микробных сообществ, идентифицировать определенные виды бактерий, проводить количественную оценку обилия тех или иных микроорганизмов в сообществе, секвенировать геномы новых видов и штаммов и многое другое.

Существуют также молекулярно-генетические методы, с использованием которых можно получать интересные научные данные, которые, однако, пока не находят широкого применения в клинической практике. Одним из таких методов является одномолекулярное секвенирование, позво-

ляющее получать длинные прочтения единичных молекул ДНК без ее предварительной амплификации. Метод в настоящее время довольно дорогой, но при этом позволяет существенно улучшить результаты секвенирования геномов прокариотических организмов, а также оценить, какие модификации имеются у нуклеотидов, что может быть ключом к пониманию регуляции экспрессии генов.

Помимо этого, есть пласт исследований, посвященных изучению транскриптома бактерий, а также изменениям экспрессии отдельных генов. Для таких исследований требуется выделить бактериальную РНК и затем провести реакцию обратной транскрипции, чтобы синтезировать ДНК по матрице РНК. После этого в зависимости от задачи необходимо либо приготовить «библиотеки» для высокопроизводительного секвенирования (транскриптомный анализ), либо провести ПЦР в режиме реального времени (анализ экспрессии генов). Это позволяет исследователю получать количественную информацию о содержании различных РНК в клетке и соответственно судить об уровне экспрессии генов. Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с обратной транскрипцией, проводя эти реакции последовательно в одной пробирке для измерения малых количеств матричной РНК.

Научные работы постепенно транслируются в клиническую практику и становятся стандартом для диагностики и основой для разработки новых способов лечения.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, грант 14-15-01083.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Список литературы/References

1. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014; 509(7500):357-60.
2. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varna Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505(7484):559-63. doi: 10.1038/nature12820.
3. Quince C., Ijaz U.Z., Loman N., Eren A.M., Saulnier D., Russell J., Haig S.J., Calus S.T., Quick J., Barclay A., Bertz M., Blaut M., Hansen R., McGrogan P., Russell R.K., Edwards C.A., Gerasimidis K. Extensive modulation of the fecal metagenome in children with Crohn's disease during exclusive enteral nutrition. *Am J Gastroenterol* 2015; 110(12):1718-29.
4. Song H., Yoo Y., Hwang J., Na Y.C., Kim H.S. Faecalibacterium prausnitzii subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137(3):852-60.
5. Labbé A., Ganopoulos J.G., Martoni C.J., Prakash S., Jones M.L. Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS One* 2014; 9(12): e115175.
6. Sankar S.A., Lagier J.C., Pontarotti P., Raoult D., Fournier P.E. Syst Appl Microbiol 2015; 38(4):276-86.
7. Takami H., Taniguchi T., Moriya Y., Kuwahara T., Kanehisa M., Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics* 2012; 13:699.
8. Louis S., Tappu R.M., Damms-Machado A., Huson D.H., Bischoff S.C. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149564.
9. Wang W.L., Xu S.Y., Ren Z.G., Tao L., Jiang J.W., Zheng S.S. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol* 2015; 21(3):803-14.
10. Dantas G., Sommer M.O., Degnan P.H., Goodman A.L. Experimental approaches for defining functional roles of microbes in the human gut. *Annu Rev Microbiol* 2013; 67:459-75.
11. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G.,

- Jimenez G., Maraninchi M., Trape J.F., Koonin E.V., La Scola B., Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 2012; 12:1185-93.
12. Costabile A., Santarelli S., Claus S.P., Sanderson J., Hudspith B.N., Brostoff J., Ward J.L., Lovegrove A., Shevry P.R., Jones H.E., Whitley A.M., Gibson G.R. Effect of breadmaking process on in vitro gut microbiota parameters in irritable bowel syndrome. *PLoS One* 2014; 9(10): e111225.
 13. Bruzzese E., Callegari M.L., Raia V., Viscovo S., Scotto R., Ferrari S., Morelli L., Buccigrossi V.Lo., Vecchio A., Ruberto E., Guarino A. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *Lactobacillus GG*: a randomised clinical trial. *PLoS One* 2014; 9(2): e87796.
 14. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д., Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени». 3-е изд. / Под общей ред. Д.В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011:223. [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D., Rebrikov D.V. Real-time PCR. 3rd ed. / general ed.: D. V. Rebrikov. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2011:223].
 15. Next-generation sequencing: Current technologies and applications / Ed. Jianping Xu. Caister Academic Press, 2014. <http://www.horizonpress.com/hsp/pdf/flyer/nextgenseq.pdf>.
 16. Rodriguez C., Taminiau B., Brévers B., Avesani V., Van Broeck J., Leroux A., Gallot M., Bruwier A., Amory H., Delmée M., Daube G. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at hospital admission. *BMC Microbiol* 2015; 15:181.
 17. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Курчавов В.А., Бойко Н.Б., Розатина Е.Л. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами. *Эксп клин гастроэнтерол* 2003; 4:59-67. [Osipov G.A., Parfenov A.I., Verkhovtseva N.V., Ruchkina I.N., Kurchavov V.A., Boyko N.B., Rogatina Ye.L. Clinical value of intestinal microflora investigation by culture, biochemical and chromat-mass-spectrometry methods. *Eksp klin gastroenterol* 2003; 4:59-67].
 18. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. / Химический анализ в медицинской диагностике. М.: Наука, 2010:293-368. [Osipov G.A. Chromato-mass-spectrometry analysis of microorganisms and their communities in clinical assays at infections and dysbioses. / Chemical analysis in medical diagnosis. M.: Science, 2010:293-368].