

Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н. И. Пирогова

Геномный центр трансляционной медицины

Московская школа на Юго-Западе №1543

**Сравнение методов экстракции
ДНК в рамках изучения связи состава
микробиома кишечника мышей и
протекания воспалительных
заболеваний кишечника (ВЗК)**

Ульяна Сергеевна

Палёнова

Научные руководители:

Анна Олеговна Шмитко

Анна Александровна

Кузнецова

Москва 2025

Оглавление

Введение и литературный обзор	3
Болезнь Крона и язвенный колит	3
Опасность и лечение ВЗК	3
Патогенез и причины возникновения ВЗК	3
Слизистый слой кишечника, микробиом	5
Использование животной модели для изучения ВЗК	6
16S секвенирование	7
Цели и задачи	8
Цели:	8
Задачи:	9
Материалы и методы	10
1) Выделение ДНК	10
Протокол экстракции ДНК набора NucleoSpin® DNA Stool	11
Протокол экстракции ДНК набора SKYamp Stool DNA	13
2) Подготовка библиотек	16
3) Циркуляризация библиотек	23
4) Секвенирование	24
5) Биоинформатический анализ	24
Результаты и обсуждение	26
1) Выделение ДНК	26
2) Подготовка библиотек	31
3) Циркуляризация	36
4) Биоинформатический анализ	37
Выводы	47
Благодарности	47
Список литературы	48

Введение и литературный обзор

Болезнь Крона и язвенный колит

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа аутоиммунных заболеваний, характеризующихся воспалением тонкой и толстой кишки [1]. Среди них обычно выделяют два основных заболевания: неспецифический язвенный колит (НЯК), при котором воспаление происходит в области толстой и прямой кишки, и болезнь Крона, при которой воспалены различные органы желудочно-кишечного тракта [2]. ВЗК проявляется в следующих симптомах – диарея, боль в животе и (для НЯК) анальное кровотечение [3].

Опасность и лечение ВЗК

На 2020 год около 0,2% населения Европы страдало от этого заболевания [7]. Терапия ВЗК в основном заключается в принятии противовоспалительных препаратов, таких как аminosалицилаты, кортикостероиды, анти-TNF-препараты, препараты против интерлейкинов и др [8]. Примерно четверть пациентов с болезнью Крона в течение жизни нуждаются в хирургическом вмешательстве из-за осложнений (перфорации, стриктуры, абсцессы) [9]. Например, иногда при ВЗК частичная или тотальная колэктомия является практически единственным выходом для больного [18].

Патогенез и причины возникновения ВЗК

Причины возникновения ВЗК до сих пор полностью не изучены, хотя нам известен патогенез болезни (см. рис. 1). На

данный момент считается, что на возникновение ВЗК влияет сочетание некоторых средовых факторов (например курение, злоупотребление алкоголем) и генетических факторов (например мутации в гене NOD2, IBD5) [6].

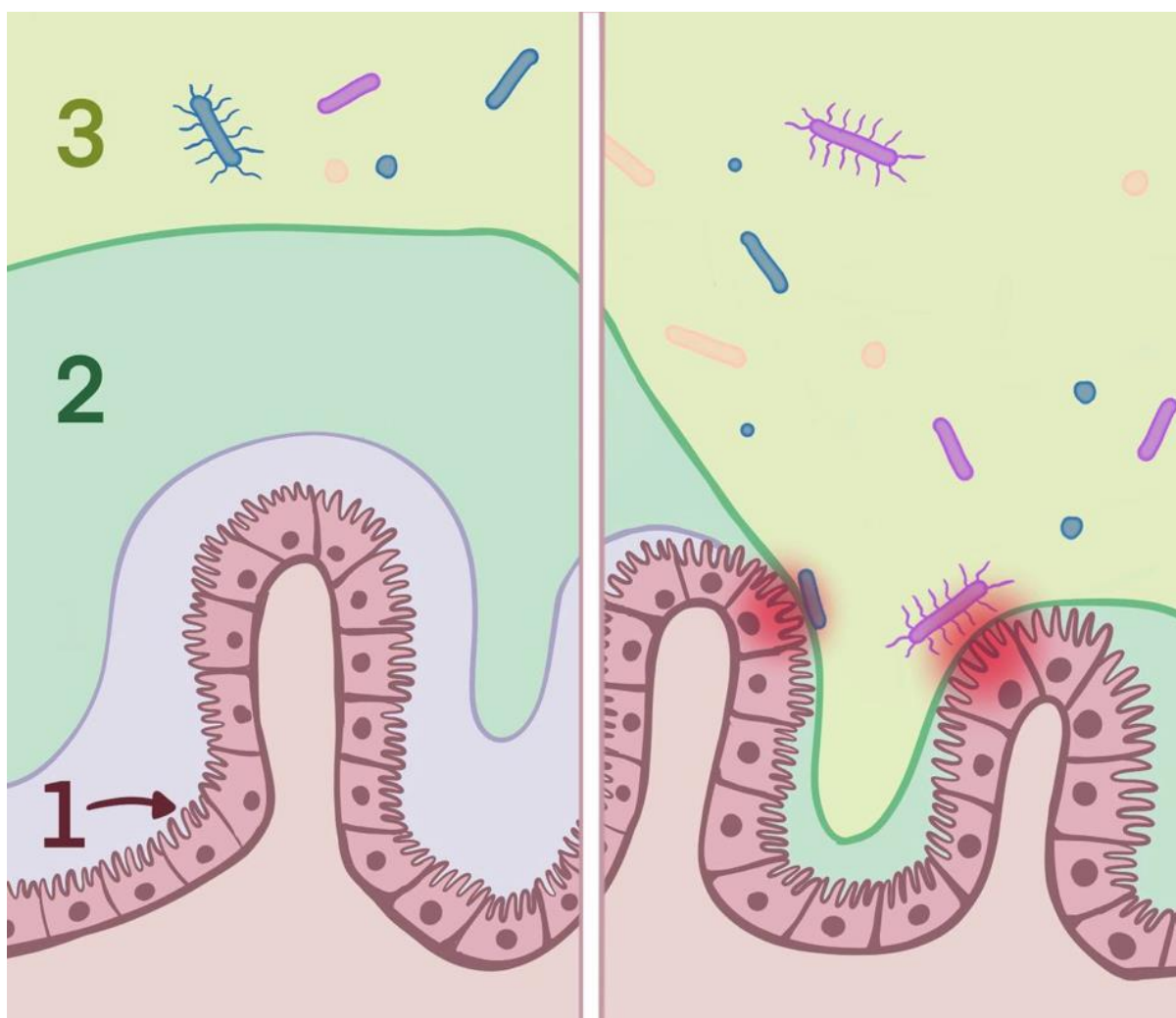


Рис. 1 Слизистый слой дистального отдела толстого кишечника.

1 – эпителий толстой кишки, 2 – плотный внутренний слизистый слой, 3 – рыхлый внешний слизистый слой с микробиотой. При НЯК (правая часть рисунка) из-за истончения внутреннего слизистого слоя микробиота контактирует с клетками эпителия, вызывая иммунный ответ: у места воспаления собираются Т-хелперы, нейтрофилы, макрофаги [4]. Макрофаги моноцитарного происхождения первые попадают в клетки кишечника и секретируют

провоспалительные факторы (например IL1, IL6, IL8, TNF), запуская воспалительные процессы [5].

Дисбактериоз способствует прогрессированию заболевания, но сейчас не совсем ясно, является ли он причиной или следствием возникновения ВЗК [10]. В некоторых исследованиях было замечено, что при развитии ВЗК наблюдается изменение состава микробиоты с уменьшением количества бактерий группы Firmicutes и Bascteroidetes [6].

Слизистый слой кишечника, микробиом

Слизистый слой кишечника состоит из двух слоев: плотного внутреннего и рыхлого внешнего. Бактерии в основном локализуются во внешнем слое (рис. 1). В толстом кишечнике концентрация бактерий достигает 10^{11} - 10^{12} клеток на грамм содержимого, в то время как в тонком кишечнике эти цифры значительно ниже [12]. При ВЗК внутренний слизистый слой кишечника истончается, из-за чего бактерии внешнего слизистого слоя контактируют с эпителиальными клетками кишечника, вызывая иммунный ответ организма и, соответственно, воспаление (рис. 1). В норме в микробиоме кишечника человека преобладают два таксона бактерий – Bacteroidetes и Firmicutes [6]. Помимо них в слизистом слое присутствуют и другие таксоны, например: Akkermansia, Lactobacillus, Bifidobacterium [6]. Кишечная микробиота играет важнейшую роль для организма, например, она участвует в синтезе витаминов группы В и витамина К; ферментирует непереваренные пищевые волокна, образуя короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA), обладающие противовоспалительным действием (бутират, ацетат, пропионат и др.); участвует в выработке антимикробных пептидов и иммуноглобулина А; участвует в метаболизме липидов; влияет на выработку некоторых гормонов и нейромедиаторов (н.п серотонин, кортизол, GABA) [21].

Использование животной модели для изучения ВЗК

Исследование микробиома кишечника человека очень важно для получения данных о патогенезе ВЗК. К сожалению, рассматривать протекание заболевания на человеке не всегда возможно и недостаточно эффективно. Поэтому удобно использовать в качестве модели развития ВЗК мышей, на примере которых можно рассмотреть картину патологии целиком с учетом возможных компенсаторных механизмов [13]. В качестве такой модели можно использовать мышей, нокаутных по гену муцина 2 (MUC2) – белок муцин 2 является основным компонентом внутреннего слизистого слоя толстой кишки, разграничивающего клетки эпителия и микробиом во внешнем слизистом слое кишечника. У мышей с нокаутом по гену MUC2 сильно истончен слизистый слой кишечника, из-за чего микробиом контактирует с эпителиальными клетками кишечника, вызывая иммунный ответ и запуская воспалительные процессы в кишечнике, что и позволяет использовать их в качестве модели для изучения ВЗК.

В рамках этого проекта мы разрабатывали методику выделения ДНК из различных биоматериалов и обработки информации о микробиомном составе кишечника на примере здоровых мышей, которую в будущем планируем применить и для нокаутных по гену MUC2 мышей, чтобы сравнить качественный и количественный состав их микробиомов.

Выбор биоматериала для изучения микробиоты кишечника

Исследователи в некоторых других статьях приходили к выводам, что использование фекалий в качестве биоматериала наиболее эффективно для выделения ДНК, так как на выходе получается минимальное количество митохондриальной ДНК из самих клеток кишечника [19]. Однако выделение ДНК из фекалий дает не такие точные результаты, как выделение ДНК из слизистого слоя кишечника непосредственно, так как некоторые бактерии с меньшей вероятностью попадают в состав фекалий [20]. Более того, при выделении микробиоты таким методом исследователи зачастую упускают из вида часть таксонов бактерий, ведь видовой состав сообществ в разных

отделах кишечника может различаться. В основном при изучении микробиомного состава кишечника исследователи пользуются в качестве биоматериала для выделения ДНК именно фекалиями. Если у человека получить смыв или биопсии кишечника относительно просто, то на мышах проводить такие процедуры достаточно трудно. Более того, при использовании фекалий возможен прижизненный забор биоматериала и динамический мониторинг бактериального состава кишечника.

Секвенирование гена 16S рРНК

Для изучения микробных сообществ можно использовать несколько подходов: тотальное секвенирование (секвенирование всего метагенома); секвенирование всего гена 16S рРНК или его отдельных регионов. Первый метод, хоть и дает более точные результаты, достаточно трудоемкий и требует серьезных денежных затрат из-за большого объема данных секвенирования, поэтому исследователи чаще пользуются вторым.

Ген 16S рибосомальной РНК представлен практически у всех прокариот. Использование его в качестве генетического маркера – один из самых популярных методов изучения бактериального разнообразия по ряду причин: этот ген достаточно большой, чтобы использовать его для биоинформатической обработки данных (около 1500 п.н); этот ген присутствует у всех бактерий; этот ген содержит высококонсервативные участки, что позволяет подобрать праймеры для амплификации, а также переменные участки, по различиям в которых можно выделять разные таксоны бактерий (рис. 2) [14].

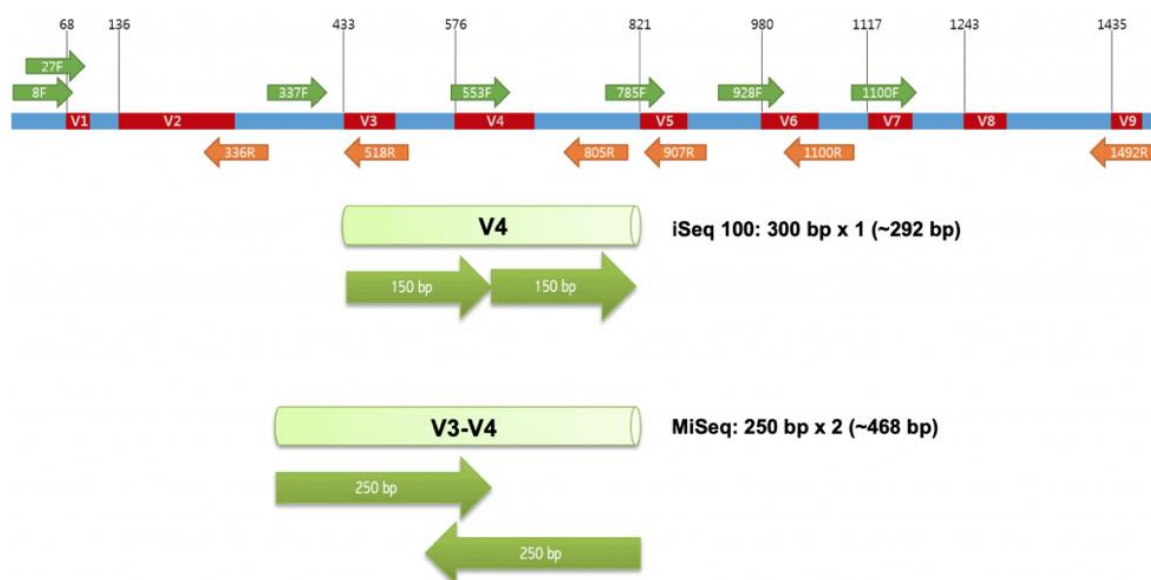


Рис. 2. Ген, кодирующий 16S рРНК; красным цветом обозначены переменные участки, синим – высококонсервативные [15]

Выбор конкретных переменных участков может повлиять на результаты [17], например, в одном из исследований микробиома кишечника человека и выяснилось, что Actinobacteria и Verrucomicrobia были представлены больше при секвенировании V3-V4 регионов, чем V1-V2 [16]. Наш выбор пал на V3V4 регионы, так как они имеют подходящую длину (около 450-500 п.н) для использованной нами технологии секвенирования (NGS), при этом они содержат достаточно пар нуклеотидов, чтобы хорошо различать роды, и иногда даже виды, бактерий. Такой подход обеспечивает оптимальное сочетание точности анализа и технической доступности.

Цели и задачи

Цели:

- 1) Сравнение двух наборов экстракции ДНК (NucleoSpin® DNA Stool и SKYamp Stool DNA).

- 2) Валидация праймеров на V3-V4 регионы гена 16S рРНК.
- 3) Определение наиболее подходящего биоматериала для изучения микробиома слизистого слоя кишечника мышей.

Задачи:

Сравнение наборов экстракции:

- 1) Выделить ДНК из фекалий наборами NucleoSpin® DNA Stool и SKYamp Stool DNA
- 2) ПЦР I (амплификация V3-V4 регионов ДНК)
- 3) ПЦР II (получение библиотек из ампликонов), циркуляризация.
- 4) Провести секвенирование с помощью DNA nanoball технологии.
- 5) Провести биоинформатический анализ результатов секвенирования и сравнить результаты для разного биоматериала.

Валидация праймеров:

1. Используя праймеры на V3-V4 регионы гена 16S рРНК, получить ампликоны из образцов ДНК монокультур бактерий.
2. Оценить концентрацию ДНК в образцах с помощью флуориметра и длины ампликонов с помощью электрофореза (ЭФ) в агарозном геле для проверки качества ампликонов.

Определение наиболее подходящего биоматериала для работы с микробиомом кишечника мышей:

- 1) Выделить ДНК из разного биоматериала (фекалии, участок толстого кишечника с фекалиями, смыв кишечника).
- 2) ПЦР I (амплификация V3V4 регионов гена 16S рРНК)
- 3) ПЦР II (получение библиотек из ампликонов), циркуляризация.
- 4) Провести секвенирование с помощью DNA nanoball технологии.
- 5) Провести биоинформатический анализ результатов секвенирования и сравнить результаты для разных биоматериалов.

Материалы и методы

1) Выделение ДНК

Сравнение эффективности наборов для экстракции ДНК

Мы сравнивали результаты экстракций ДНК из мышинных фекалий двумя наборами для выделения ДНК. Образцы были получены сбором с подстила в клетках вивария РНИМУ им. Пирогова, биоматериал принадлежал разным мышам с нормальным генотипом. Сравнивали два набора для экстракции ДНК – NucleoSpin® DNA Stool и SKYAmp Stool DNA, каждый в 6 повторностях (рис. 3).

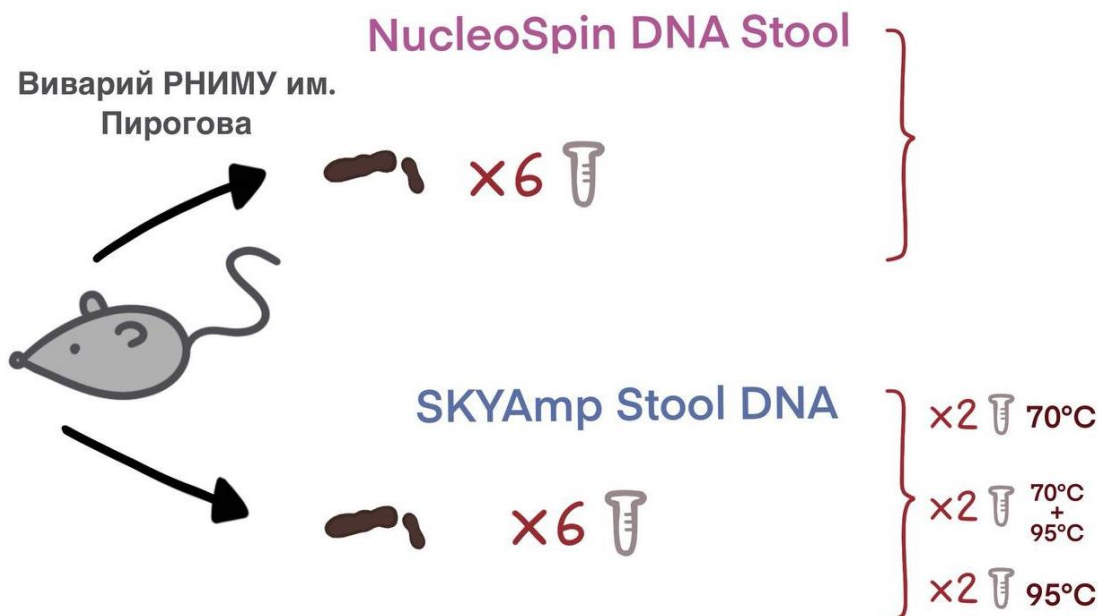


Рис. 3 Разделение биоматериала на две экспериментальные группы (оба набора для экстракции ДНК тестировали с помощью 6 образцов кала мышей из вивария РНИМУ им. Пирогова). 6 образцов (1-6 тест skygen) получали с помощью набора SKYamp Stool DNA, еще 6 образцов получали с помощью набора NucleoSpin® DNA Stool (1-6 тест nucleospin)

Ниже представлены протоколы выделения для каждого из наборов.

Протокол экстракции ДНК набора NucleoSpin® DNA Stool

1. В каждую из 6 пробирок было добавлено примерно по 60-80 мг мышинных фекалий, собранных с подстила в клетках.
2. В каждую пробирку было добавлено по 500 μ L воды (RNase free water) и 500 μ L лизис буфера (Lysis Buffer ST1). ST1 предварительно нагревали около 5 мин при температуре 70 гр. ц. Пробирки взбалтывали по 2-3 сек руками.
3. Пробирки инкубировали 5 мин при температуре 70 гр. ц. (с помощью Thermo Shaker).

4. Пробирки встряхивали на шейкере 10 мин на скорости 1800 rpm, далее 4 мин на скорости 3200 rpm (с помощью Multiplate Shaker).
5. Пробирки центрифугировали 3 мин на скорости 13000 rcf.
6. Из каждой пробирки был отобран супернатант (около 500 μ L) и перенесен в новые пробирки (по 2 μ L) в холодном штативе.
7. В каждую пробирку было добавлено по 100 μ L лизис буфера (Lysis Buffer ST2), потом пробирки вортиксировали по 5 сек.
8. Пробирки инкубировали 5 мин при температуре 2-8 гр. ц. на холодном штативе в холодном штативе.
9. Пробирки центрифугировали 3 мин на скорости 13000 rcf при температуре 17 гр. ц. (с помощью Gyrozen centrifuge).
10. Примерно 500 μ L лизата было перенесено в колонки (Inhibitor removal column), вставленные в собирательные пробирки (Collection Tube). Колонки были пронумерованы соответственно предыдущим пробиркам.
11. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf.
12. Колонки перенесли в новые собирательные пробирки (Collection Tube). В пробирки было добавлено 200 μ L связывающего буфера (Binding Buffer ST3). Колонки вортиксировали 5 сек и далее центрифугировали для осаждения капель.
13. Около 700 μ L образца из каждой колонки было перенесено в новые колонки (DNA Stool Coloumn), вставленные в собирательные пробирки (Collection Tube).
14. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf.
15. Колонки перенесли в новые пробирки, далее на каждую колонку было добавлено по 600 μ L ST3.
16. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf.
17. Колонки перенесли в новые пробирки, далее на колонки было добавлено по 550 μ L промывочного буфера (Wash Buffer
18. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf.
19. Колонки перенесли в новые пробирки, далее на колонки было добавлено по 700 μ L промывочного буфера. Колонки вортиксировали по 2 сек.
20. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf.
21. Колонки перенесли в новые пробирки, далее на колонки было добавлено по 700 μ L промывочного буфера.

22. Колонки центрифугировали 3 мин на скорости 13000 rcf. Далее их дополнительно центрифугировали 2 мин на скорости 16800 rcf для удаления остатков промывочного буфера.
23. Колонки перенесли в новые пробирки для микроцентрифуги (1,5 мл). В каждую колонку было добавлено 50 μ L воды (RNase free water).
24. Колонки инкубировали около 3 мин при комнатной температуре.
25. Колонки центрифугировали 1 мин на скорости 13000 rcf. Далее колонки выкинули, а пробирки вортексировали по 2 сек и центрифугировали для осаждения капель.

Протокол экстракции ДНК набора SKYamp Stool DNA

1. В каждую из 6 пробирок (1,5 мл с крышками) было добавлено в соответствующем порядке: 250 мг гомогенизирующих частиц (из набора), 500 μ L буфера СА, 100 μ L буфера СЦ, 15 μ L протеиназы К (в холодном штативе, перед добавлением центрифугировали для осаждения капель), 60-80 мг фекалий (с помощью пинцета).
2. Пробирки встряхивали 10 мин с помощью Multi plate shaker (3200 rpm). В это время буфер СШ помещен в холодильник для инкубации перед добавлением.
3. Пробирки центрифугировали для осаждения капель, далее фекалии гомогенизировали пестиком для гомогенизации (т.к. встряхивание недостаточно измельчило биоматериал), вортексировали (миницентрифуга) и дополнительно встряхивали 2 мин (Multi plate shaker, 3200).
4. Для инкубации при высоких температурах пробирки разделили на 3 группы (см. рис. 6): пробирки 1, 2 инкубировали 15 мин при температуре 70°C (Thermo shaker, 1500 rcf); 3, 4 инкубировали 15 мин при температуре 70 гр.ц. + 5 мин при 95 гр.ц. (для увеличения выхода ДНК за счет грамположительных бактерий, Biosan Heating/Cooling Dry Block); 5, 6 инкубировали 15 мин при температуре 95 гр.ц., вортексируя пробирки на миницентрифуге по 5 с каждые 5 мин.

5. Все пробирки вортиксовали по 15 с на миницентрифуге, далее центрифугировали 3 мин на скорости 13400 rcf (eppendorf Cenntrifuge).
6. В новые пробирки (2 мл с крышками) был отобран супернатант, предыдущие пробирки (1,5 мл) повторно центрифугировали 1 мин на скорости 13400 rcf, и было дополнительно отобрано еще около 100 μ L супернатанта. Важно очень аккуратно отбирать супернатант, чтобы к нему не попал осадок (т.к в дальнейшем они остаются на колонках после сушки и приводят к контаминации образцов. При необходимости можно использовать пипетку меньшего объема для отбора остатков супернатанта).
7. Пробирки осадили центрифугированием, в каждую было добавлено 10 μ L РНКазы, далее их вортиксовали на микроцентрифуге для перемешивания РНКазы с лизатом образцов. Пробирки повторно осадили на миницентрифуге и инкубировали 5 мин при комнатной температуре.
8. В каждую пробирку было добавлено 200 μ L буфера СШ, пробирки вортиксовали и центрифугировали для осаждения капель. Далее их инкубировали 5 мин в холодном штативе и еще около 5 мин в Biosan Heating/Cooling Dry Block при температуре 5 гр.ц.
9. Пробирки центрифугировали 3 мин на скорости 13400 rcf.
10. Супернатант (около 550 μ L) был перенесен в новые пробирки (1,5 мл с крышками). Важно было переносить супернатант аккуратно, не задевая осадок: в ином случае осадок может остаться на колонке, что приведет к загрязнению раствора ДНК.
11. В пробирки добавили 550 μ L буфера ГФА, пробирки встряхивали руками для перемешивания.
12. 700 μ L из смеси из пробирок были перенесены на спин-колонки СП2 (из набора), вставленные в собирательные пробирки (т.к объем смеси с ГФА оказался более 1000 μ L, пришлось переносить смесь на колонки в два этапа).
13. Колонки центрифугировали 30 с на скорости 13400 rcf. Колонки были перенесены на новые собирательные пробирки, на колонки добавили оставшуюся смесь из предыдущих пробирок (около 500 μ L). Колонки повторно центрифугировали 30 с на

скорости 13400 rcf, далее они были перенесены в новые собирательные пробирки.

14. На колонки было добавлено 500 μL буфера ГД, колонки центрифугировали 30 с на скорости 13400 rcf, далее они были перенесены в новые собирательные пробирки.
15. На колонки было добавлено 700 μL буфера ПВ, колонки центрифугировали 30 с на скорости 13400 rcf, далее они были перенесены в новые собирательные пробирки.
16. На колонки было добавлено 700 μL буфера ПВ, колонки центрифугировали 30 с на скорости 13400 rcf, далее они были перенесены в новые собирательные пробирки.
17. Колонки центрифугировали 2 мин на скорости 16874 rcf, далее они были перенесены в новые собирательные пробирки.
18. Т.к на колонках остался осадок (скорее всего попал туда на стадии переноса лизата), его удалили с помощью буфера ПВ и пипетки, далее на колонки было добавлено 700 μL буфера ПВ и их центрифугировали 30 с на скорости 13400 rcf и еще 2 мин на скорости 16874 rcf.
19. Далее колонки перенесли в новые пробирки (1,5 мл с крышками) и центрифугировали 3 мин на скорости 13400 rcf.
20. Полученную ДНК элюировали с помощью 50 μL буфера ТБ, далее 2 мин инкубировали при комнатной температуре с закрытой крышкой.

Контроль качества ДНК

- 1) Концентрации ДНК в образцах были измерены с помощью спектрофотометра Implen, в качестве контрольного образца использовался буфер ТБ (2 μL).
- 2) Концентрации ДНК в образцах были измерены с помощью флуориметра Qubit (Qubit dsDNA BR Assay Kit).
- 3) Для проверки целостности ДНК в образцах был проведен электрофорез в агарозном геле (125 В, 30 мин).

Сравнение различного биоматериала

Для сравнения результатов, полученных из разного биоматериала, были отобраны пробы от 6 мышей с генотипом дикого типа из вивария МГУ, мыши были обозначены как N1-N6 (рис. 4).

От каждой из мышей N1-N4 было в наличии по две пробы: кал и биопсия кишечника с калом (кал+кишка). У мышей N5 и N6 были отобраны кал, биопсия кишечника с калом и смыв с кишечника (смыв производился фосфатно-солевым буфером).

Для выделения ДНК использовался набор NucleoSpin® DNA Stool (N1-N4) и SKYamp Stool DNA (N5 и N6) по протоколам, описанным выше.

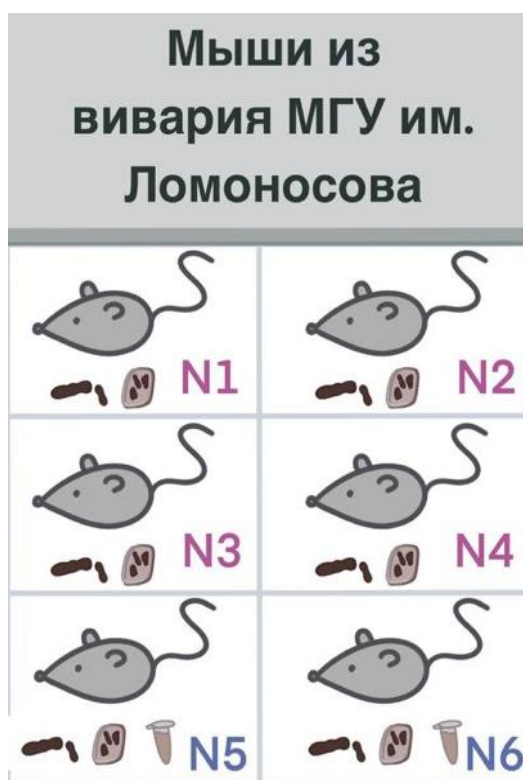


Рис. 4. ДНК из образцов мышей N1-N4 выделяли с помощью NucleoSpin® DNA Stool, из образцов мышей N5-N6 – с помощью SKYamp Stool DNA

2) Подготовка библиотек

Протокол был предварительно протестирован на трех образцах ДНК, выделенных из чистых культур бактерий, представляющих собой разные систематические группы. После первой ПЦР со

специфическими праймерами к V3V4 региону гена 16S рРНК предполагалось получение ампликона длиной около 460 п.н. без дополнительных продуктов, что проверялось с помощью гель-электрофореза. В результате второй ПЦР ожидался продукт длиной приблизительно 530 п.н.

Праймеры:

Forward 5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3'

Reverse 5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'

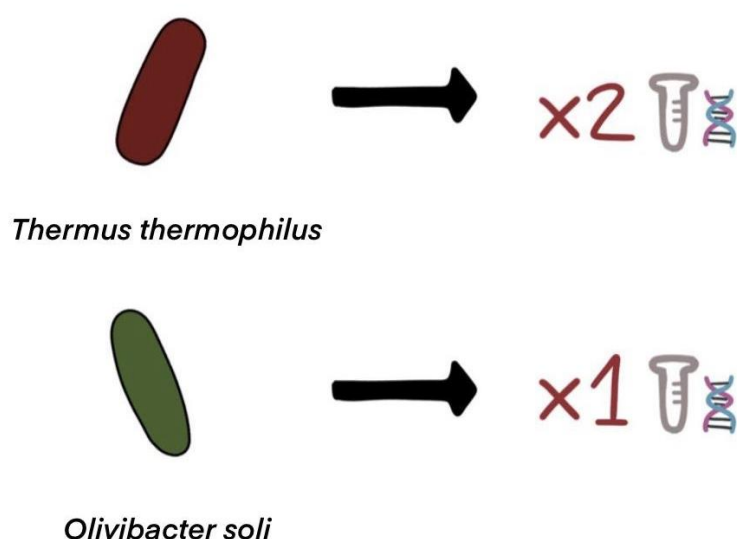


Рис. 5. Для работы использовали уже выделенную ДНК бактерий из чистых культур (использовалось два образца ДНК *Thermus thermophilus* и один образец ДНК *Olivibacter soli*)

Библиотеки для образцов из биоматериалов

В 27 стрипов была добавлена вода (mQ) и ДНК из полученных ранее образцов, так, чтобы в стрипах была равная масса ДНК на вход (около 100 нг, концентрация ДНК около 4 нг/μL; учитывались ранее измеренные конц-ии ДНК) и объем (12 μL). В один из 27 стрипов было добавлено только 12 μL воды (mQ) в качестве отрицательного

контроля. В один из 27 стрипов было добавлено только 12 μL ДНК, т.к у этого образца (5 тест skygen) самая низкая конц-ия:

Табл. 1. Красным цветом отмечены образцы, для которых не получилось удачно провести ПЦР 1 (очень низкая конц-ия ДНК)

<i>ID</i>	<i>внешний ID</i>	<i>Qubit: ng/ul</i>	<i>мкл в реакцию (100 нг)</i>	<i>mQ</i>
STK904-DNA-1	n1 кал тест	35,4	3	9
WBC089-DNA-1	n2 кал тест	43,9	2	10
VTM563-DNA-1	n3 кал тест	20,3	5	7
LUA146-DNA-1	n4 кал тест	49,9	2	10
HNS277-DNA-1	n1 кал+кишка тест	82	1	11
ACT790-DNA-1	n2 кал+кишка тест	110	1	11
YKE287-DNA-1	n3 кал+кишка тест	92	1	11
BNW068-DNA-1	n4 кал+кишка тест	60	2	10
XOM542-DNA-1	1 тест skygen	63,9	2	10
BWV493-DNA-1	2 тест skygen	48,8	2	10
PTN868-DNA-1	3 тест skygen	22,1	5	7
VSN529-DNA-1	4 тест skygen	18,6	5	7
VYL919-DNA-1	5 тест skygen	8,2	12	0
BKV930-DNA-1	6 тест skygen	78,5	2	11
SEX163-DNA-1	1 тест nucleospin	30,1	3	9
TKK882-DNA-1	2 тест nucleospin	24,9	4	8
ATY436-DNA-1	3 тест nucleospin	25,1	4	8
JOJ814-DNA-1	4 тест nucleospin	33,7	3	9
LRE274-DNA-1	5 тест nucleospin	35,4	3	9

NJE299-DNA-1	6 тест nucleospin	16,1	6	6
NRK002-DNA-1	n5 кал тест	14,1	7	5
FYL353-DNA-1	n6 кал тест	42,7	2	10
RAA244-DNA-1	n5 кал+кишка тест	122,9	1	11
WWT372-DNA-1	n6 кал+кишка тест	151,1	1	11
SNU380-DNA-1	n5 смыв кишки тест	64,3	2	10
YKH955-DNA-1	n6 смыв кишки тест	38,4	3	9
K-				12

Далее был получен микс для проведения ПЦР на 29 образцов общим объемом 376,7 μL (см. табл. 2). К каждому стрипу с разведенной ДНК и отрицательным контролем было добавлено по 13 μL смеси (по мере добавления микса для ПЦР образцы пипетировались для перемешивания ПЦР микса с ДНК).

Табл. 2 Состав реакционной смеси для ПЦР

Реагент	Сток	Концентрация в реакции	Объем стока на 1 реакцию, мкл	На 29 реакций
mQ	-	-	8,2	237,8
Tersus PCR-buf	x10	x1	2,5	72,5
dNTP	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5	14,5
pr F	10 мкМ	0,26 мкМ	0,65	18,85
pr R	10 мкМ	0,26 мкМ	0,65	18,85
Tersus enzyme	x50	x1	0,5	14,5

ДНК		100 нг	13	
-----	--	--------	----	--

Далее полученные образцы перенесли в амплификатор (biorad c100) и запустили следующую программу:

Табл. 3 Температурно-временной профиль ПЦР

<i>temperature</i>	<i>time</i>	<i>cycles</i>
95	3 min	1
95	30 sec	25
55	40 sec	
72	1 min	
72	7 min	1

II) Полученные ампликоны были очищены помощью магнитных частиц (1х отмывка).

- 1) 80% этиловый спирт был получен из 8,4 мл 96% этилового спирта и 1,6 мл воды (mQ).
- 2) К полученным ранее ампликонам с помощью многоканальной пипетки было добавлено по 25 μL магнитных частиц, смесь пропипетировали, провертиксировали и центрифугировали для осаждения капель. Далее образцы 5 мин инкубировались с закрытыми крышками при комнатной температуре для связывания ДНК с магнитными частицами.
- 3) Стрип с образцами поместили на магнитный штатив, когда раствор стал прозрачным (около 30 с) с помощью многоканальной пипетки убрали супернатант (около 48 μL).

- 4) 80% спирт налили в ванночку, оттуда его многоканальной пипеткой добавили по 180 μL в каждый стрип. Стрипы 4 раза перевернули на штативе для лучшей очистки спиртом, далее спирт убрали многоканальной пипеткой (около 190 μL).
- 5) Повторение пункта 4.
- 6) Инкубация образцов около 2 мин с открытыми крышками для высушивания спирта. В течение этих 2-х минут также убирали лишний спирт со дна пробирок и крышек с помощью пипеток.
- 7) Когда магнитные частицы стали матовыми (высохли, но еще не потрескались), их элюировали с помощью 20 μL воды (mQ). Полученную элюцию вортиксировали, центрифугировали для осаждения капель и инкубировали 5 мин при комнатной температуре на обычном штативе (не магнитном).
- 8) Стрипы поместили обратно на магнитный штатив, когда раствор стал прозрачным, многоканальной пипеткой оттуда отобрали супернатант с ДНК и поместили в новые стрипы.

III) Из полученных образцов взяли по 2 μL ДНК для измерения концентраций с помощью флуориметра Qubit (High sense dsDNA).

IV) Для II ПЦР был использован микс TransNGS Library Amplification SuperMix для амплификации библиотек для NGS. В расчете на 1 образец смешали 17 мкл mQ и 25 мкл TransNGS. Перенесли по 42 мкл разведенного микса в чистые стрипованные микропробирки и к ним добавили по 4 μL полученных в предыдущем пункте ампликонов (27 образцов). Далее в пробирки добавили по 4 μL баркодированных праймеров (см. табл. 4).

Табл. 4 Состав реакционной смеси для баркодирования

Реагент	Объем стока на 1 реакцию, мкл	На 29 реакций
mQ	17	493

Transgen mix	25	725
barcoded primers, 0,2 mM	4	
Образец	4	

Далее стрипы перенесли в амплификатор (biorad c100) и запустили следующую программу:

Табл. 5 Температурно-временной профиль ПЦР

<i>temperature</i>	<i>time</i>	<i>cycles</i>
98	3 min	1
98	30 sec	5
56	50 sec	
72	50 sec	
72	5 min	1
4	∞	∞

V) Отмывка полученных образцов проводилась так же, как в пункте II), но вместо 25 μL магнитных частиц было добавлено 50 μL (т.к объем этих образцов в 2 раза больше) и воды для элюции 35 μL вместо 20 μL .

VI) Для измерения концентраций флуориметром и ЭФ было отобрано по 2 μL образцов, оставшиеся 30 μL образцов перенесли в новые стрипы.

VII) Для проверки качества образцов (длина полученных ампликонов) был проведен электрофорез в агарозном геле (130 В, 25 мин).

3) Циркуляризация библиотек

1. Гибридизация

В ПЦР-пробирку вносили 800 нг смеси ДНК-библиотек, доводили до 38 мкл Low TE буфером, добавляли 2 мкл раствора NaCl (200 мМ) и 1 мкл Splinter-олигонуклеотида (100 мкМ). Смесь перемешивали и инкубировали в термоциклере: 95 °С – 2 мин, 65 °С – 2 мин, 40 °С – 2 мин, хранение при 4 °С.

2. Циркуляризация

После охлаждения до 4°С образцы кратковременно центрифугировали и добавляли 5 мкл 10× буфера для лигирования и 4 мкл T4 ДНК-лигазы (200 Ед/мкл). Реакцию проводили при 37 °С 1 ч. Далее добавляли 0,3 мкл Exonuclease I (20 000 Ед/мл) и 0,15 мкл Exonuclease III (100 000 Ед/мл), инкубировали при 37 °С 30 мин и останавливали реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА.

3. Очистка

К реакции добавляли 127 мкл магнитных частиц MGI, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и осаждали на магнитном штативе. Супернатант удаляли, осадок дважды промывали 500 мкл 80% этанола, сушили 5 мин и элюировали в 27 мкл mQ воды. После 10-минутной инкубации элюировали в 25 мкл mQ.

4. Контроль качества

Концентрацию циркуляризованной библиотеки определяли с помощью набора Qubit ssDNA (используя 2 мкл образца). Выход оценивали как отношение полученной одноцепочечной ДНК к исходному количеству библиотеки; нормальным считался показатель >15%.

4) Секвенирование

Полученные библиотеки секвенировали при помощи секвенатора DNBSEQ G99 (рис. 6) по технологии DNA Nanoball.

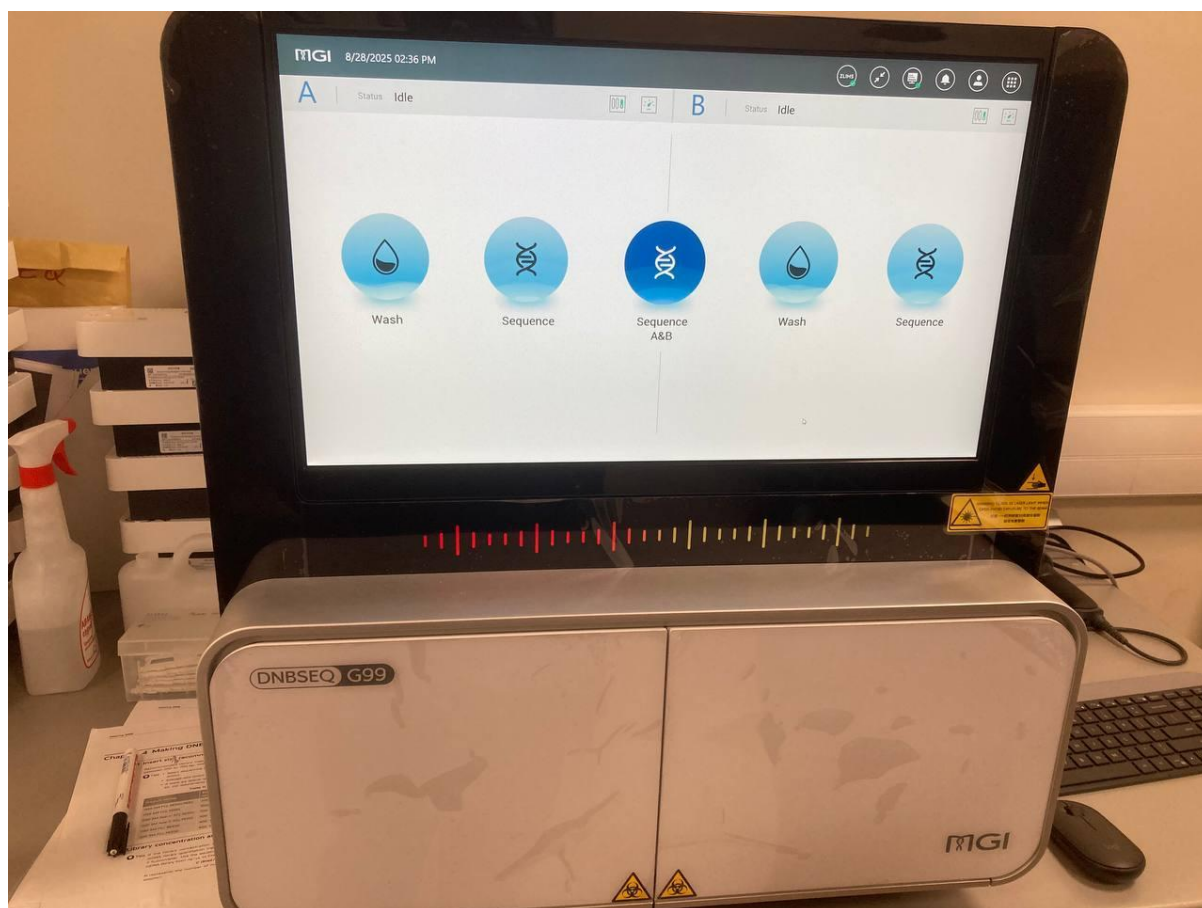


Рис. 6 Секвенатор DNBSEQ G99

5) Биоинформатический анализ

1. *Контроль качества и коррекция сырых прочтений*

Контроль качества

Для контроля качества использовался FastQC. Результаты FastQC объединяли в общий для всех образцов отчёт с помощью MultiQC. Параметры программ использовали по умолчанию.

Триммирование ридов

- 1) Для парных прочтений использовался bbduk.sh со следующими параметрами:

```
primers=primers.fa
hdist=1
minlen=50
tpe
tbo
```

- 2) Если была необходима обрезка баркодной последовательности с конца форвард-прочтения, для _1.fq.gz-файлов применялась отдельная команда триммирования с параметром ftr2=10.

2. *Получение статистик присутствия 16S прочтений в образцах*

- 1) Kraken2 + БД silva v. 138. с параметрами (пример):

```
kraken2 --db "$DB" \
--paired "$f1" "$f2" \
--threads 40 \
--use-names \
--report "${sample}_16s_report.txt" \
> "${sample}_16s_result.txt"
```

Kraken2 выдает информацию о наличии среди прочтений таксонов из базы данных silva v. 138.

3. Получение данных о таксономическом разнообразии образцов

- 1) Qiime2 – стадии denoise-paired, summarize, classify, filter-table, collapse, export.
- 2) Для улучшения точности классификации также использовались Qiime2 feature-table, БД silva 138 и greengenes, и дополнительные инструменты: rdp-classifier, blastn.

Результаты и обсуждение

1) Выделение ДНК

Полученные образцы

Табл. 6 Сводка о полученных образцах ДНК

<i>ID</i>	<i>внешний ID</i>	<i>биоматериал</i>	<i>набор для выделения</i>	<i>откуда мыши</i>
STK904-DNA-1	n1 кал тест	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
WBC089-DNA-1	n2 кал тест	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
VTM563-DNA-1	n3 кал тест	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
LUA146-DNA-1	n4 кал тест	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
HNS277-DNA-1	n1 кал+кишка тест	биопсия кишечника с калом	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова

ACT790-DNA-1	n2 кал+кишка тест	биопсия кишечника с калом	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
BNW068-DNA-1	n4 кал+кишка тест	биопсия кишечника с калом	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий МГУ им. Ломоносова
XOM542-DNA-1	1 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
BWV493-DNA-1	2 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
PTN868-DNA-1	3 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
VSN529-DNA-1	4 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
VYL919-DNA-1	5 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
BKV930-DNA-1	6 тест skygen	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий РНИМУ им. Пирогова
SEX163-DNA-1	1 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
TKK882-DNA-1	2 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
ATY436-DNA-1	3 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
JOJ814-DNA-1	4 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
LRE274-DNA-1	5 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
NJE299-DNA-1	6 тест nucleospin	кал	NucleoSpin® DNA Stool	Виварий РНИМУ им. Пирогова
NRK002-DNA-1	n5 кал тест	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им. Ломоносова
FYL353-DNA-1	n6 кал тест	кал	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им.

				Ломоносова
RAA244-DNA-1	п5 кал+кишка тест	биопсия кишечника с калом	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им. Ломоносова
WWT372-DNA-1	п6 кал+кишка тест	биопсия кишечника с калом	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им. Ломоносова
SNU380-DNA-1	п5 смыв кишки тест	смыв	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им. Ломоносова
YKH955-DNA-1	п6 смыв кишки тест	смыв	SKYamp Stool DNA	Виварий МГУ им. Ломоносова

Сравнение наборов для экстракции ДНК

Проверка эффективности набора SKYamp Stool DNA

- 1) Результаты измерения на спектрофотометре Implen и на флуориметре Qubit

Табл. 7 Оценка чистоты и концентрации выделенной ДНК

	Спектрофото метр Implen (нг/μL)	260/280	260/230	Флуорим етр Qubit (нг/μL)
1	113	2	1,7	63,9
2	86	2	1,6	48,8
3	138	2	2	22,1
4	75	2	1,7	18,6
5	59	2,1	1,5	8,22
6	352	1,9	2	78,5

2) Результаты ЭФ в агарозном геле

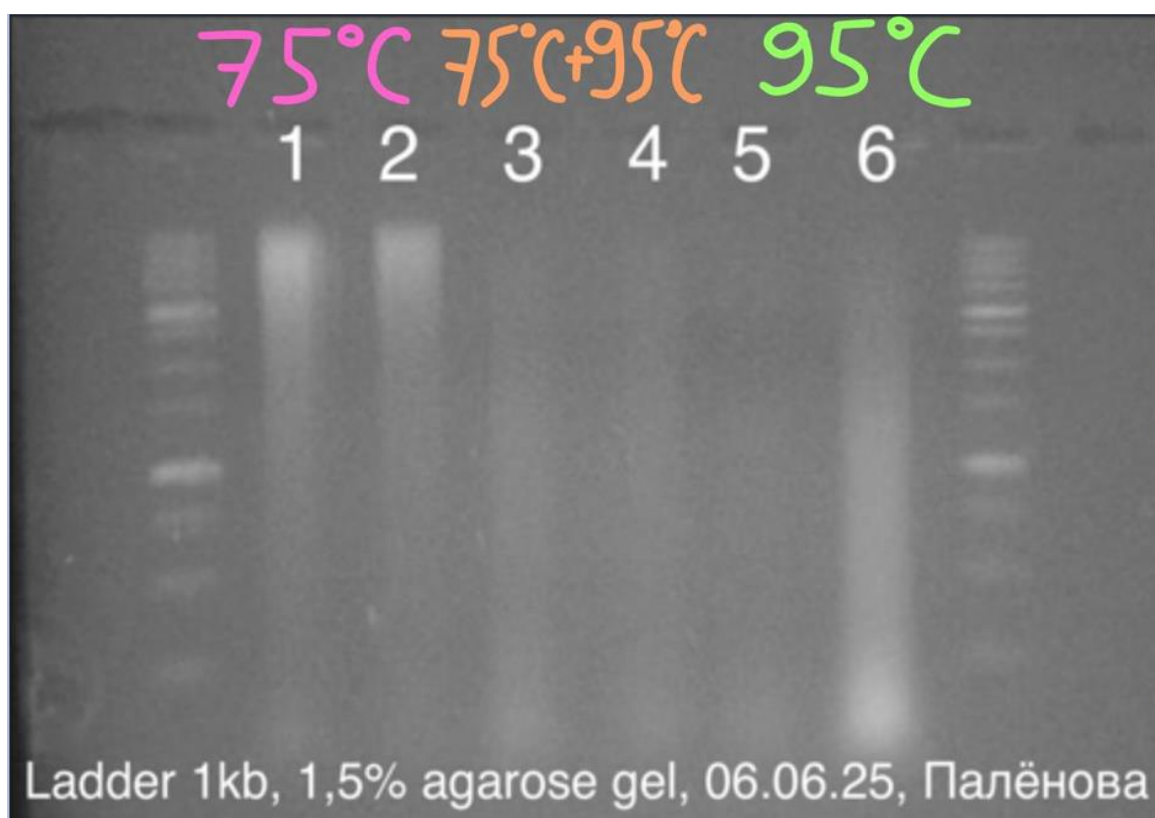


Рис. 7 Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

Набор подходит для выделения ДНК из фекалий; для инкубации лучше всего подходит 70°C, т.к при использовании температуры лизиса 95°C в обоих случаях ДНК сильно деградирует.

Проверка эффективности набора NucleoSpin® DNA Stool

- 1) Результаты измерения на флуориметре Qubit и спектрофотометре Implen

Табл. 8 Концентрации выделенной ДНК

	Флуориметр Qubit (нг/μL)	Спектрофотометр Implen (нг/μL)
1.1	30,1	32
1.2	24,9	29
2.1	25,1	28
2.2	33,7	39
3.1	35,4	52
3.2	16,1	20 (19, 6)

2) Результаты ЭФ в агарозном геле

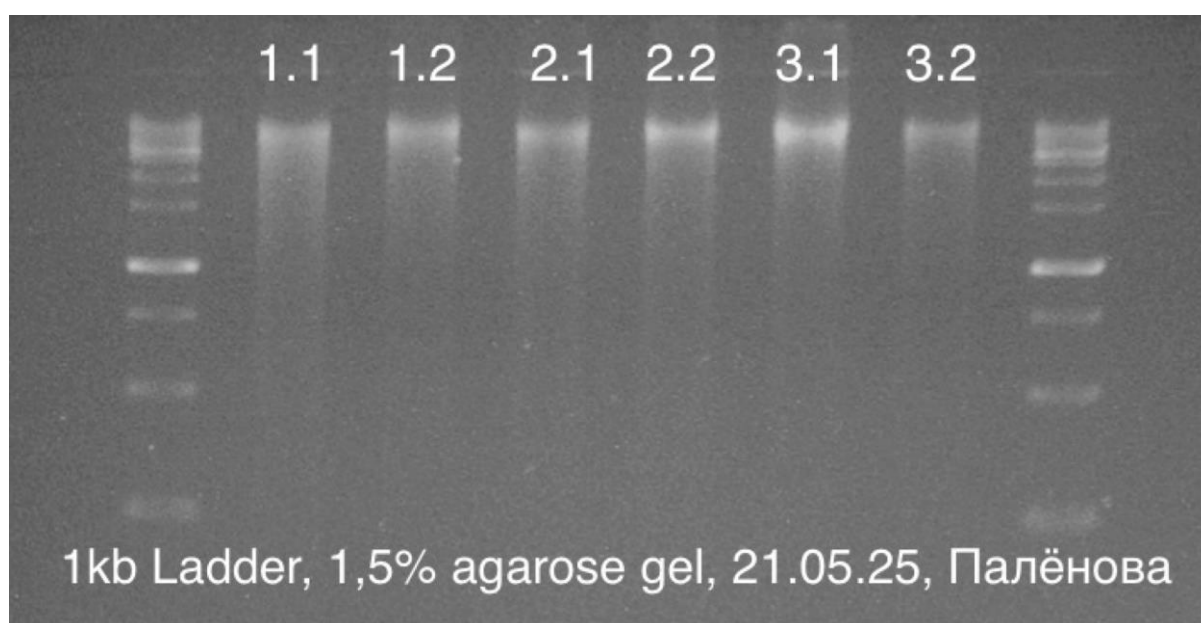


Рис. 8 Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

ДНК получилось успешно выделить у всех образцов. Набор подходит для выделения ДНК.

Результаты экстракции ДНК набором NucleoSpin® DNA Stool

1) Результаты измерения на флуориметре Qubit

Табл. 9 Концентрации выделенной ДНК

	<i>Концентрация ДНК (нг/μL)</i>
N1 кал	35,4
N2 кал	43,9
N3 кал	20,3
N4 кал	49,9
N1 киш+кал	82
N2 киш+кал	110
N3 киш+кал	92
N4 киш+кал	60

2) Результаты ЭФ в агарозном геле

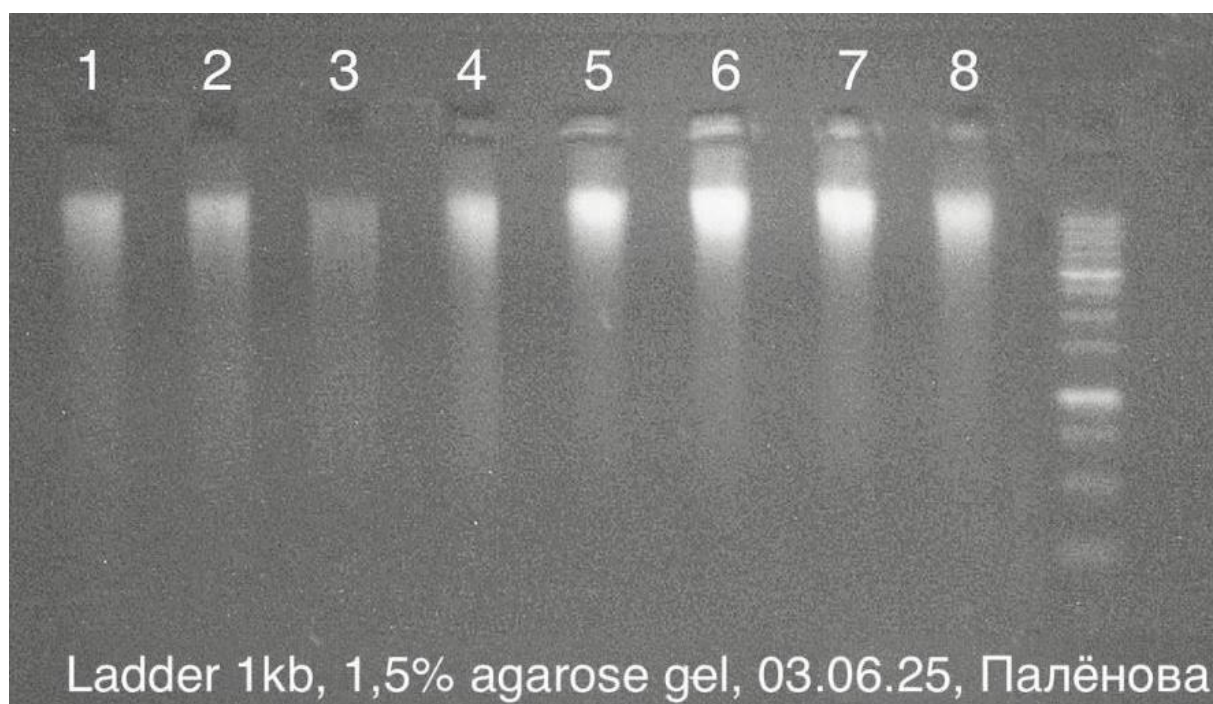


Рис. 9 Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

Из всех образцов удалось успешно выделить ДНК.

Сравнение биоматериала

Результаты экстракции ДНК набором SKYamp Stool DNA

- 1) Результаты измерения на спектрофотометре Implen и флуориметре Qubit.

Табл. 10 Оценка чистоты и концентрации выделенной ДНК

	Спектрофотометр Implen (нг/μL)	260/280	260/230	Флуориметр Qubit (нг/μL)
N5 кал	32	1,9	1,8	14,1
N5 киш+кал	215	2	2	122,9
N5 смыв	127	1,9	2	64,3
N6 кал	85	1,9	2	42,7
N6 киш+кал	246	2	2	151
N6 смыв	67	1,9	1,9	38,4

- 2) Результаты ЭФ в агарозном геле

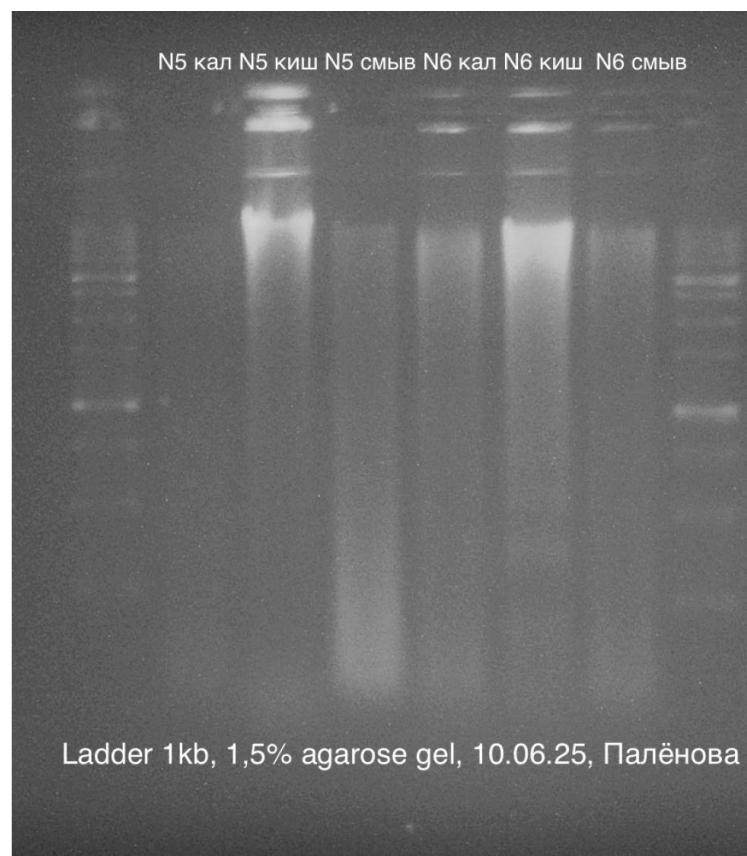


Рис. 10 Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

Больше всего ДНК удалось выделить из биопсии кишки. Степень деградации ДНК из образцов с калом и смывом примерно одинакова.

ДНК в достаточных концентрациях удалось выделить с помощью обоих наборов для экстракции. Можно сделать вывод о том, что для выделения ДНК из биоматериала подходят разные наборы для выделения ДНК на колонках с гомогенизацией.

2) Подготовка библиотек

Результаты валидации праймеров

1) Результаты измерения тестовых образцов после I и II ПЦР на флуориметре Qubit.

Табл. 11 Сравнение концентрации выделенной ДНК после I и II ПЦР

<i>ID</i>	<i>Концентрация после I ПЦР, нг/μL</i>	<i>Концентрация после II ПЦР, нг/μL</i>
T. th1	88	43,1
T. th2	112	46,2
O.S	94,6	43,9
K-	2,34	6,23

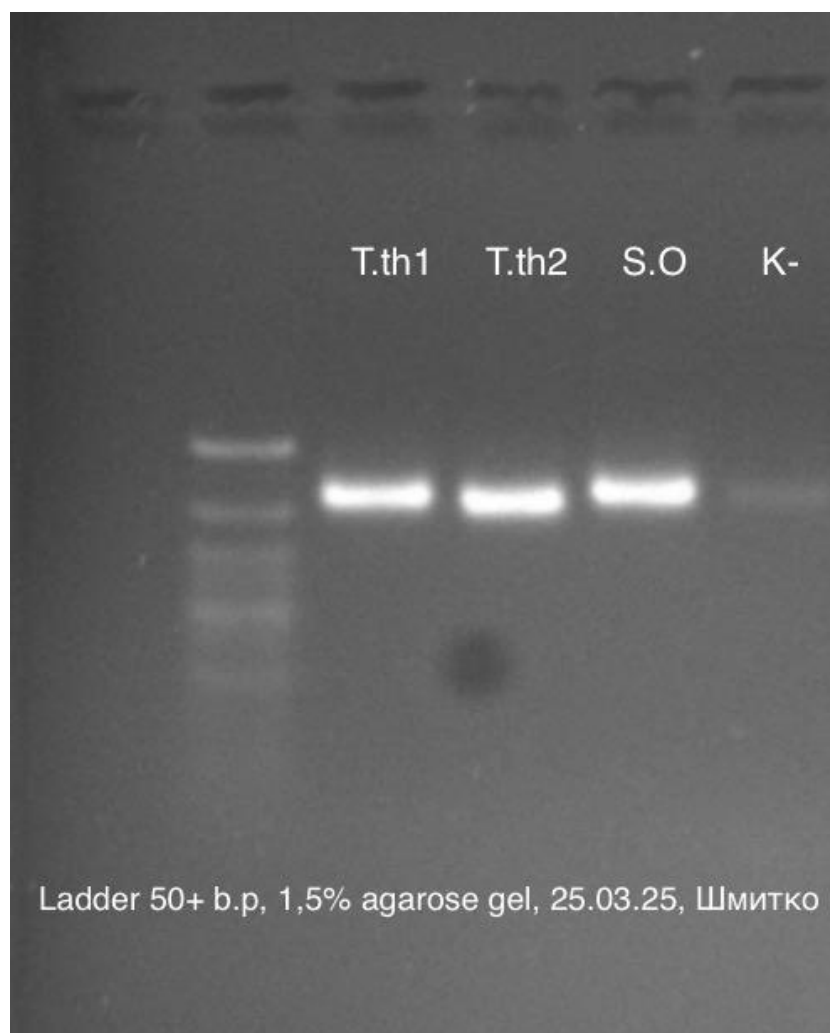
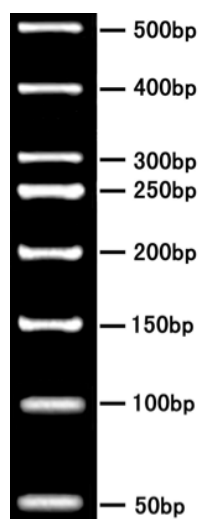


Рис. 11 *Ladder 50+ b.p* [22], **Рис. 12** Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

Таким образом мы убедились, что подобранные праймеры и протокол пробоподготовки работают.

2) Результаты измерения флуориметра Qubit образцов из биоматериалов после ПЦР I

Табл. 12 Концентрации выделенной ДНК

	<i>нг/μL</i>		<i>нг/μL</i>
1	77,6	14	80,6
2	88	15	92,7
3	88,1	16	96,3
4	82,5	17	83
5	57	18	85,6
6	72,7	19	86,7
7	0,029	20	86,5
8	92,2	21	57,1
9	80,5	22	81,6
10	86	23	73,2
11	66,8	24	90,9
12	64	25	66,4
13	2,64	26	79,4
		К-	0,0455

У всех образцов, кроме 7 и 13, концентрации оказались в пределах нормы (около 60-100 нг/μL). В 7 образце изначально была нормальная концентрация (92 нг/μL) и она не деградировала (см. рис. 5, образец 7). Возможно, ДНК случайно не была добавлена на этапе, когда мы отбирали по 100 нг ДНК. В 13 образце изначально было достаточно низкая концентрация (8,2 нг/μL, см. рис. 4 образец 5), возможно, ПЦР прошла неудачно из-за низкой концентрации ДНК, либо тоже произошла ошибка на этапе добавления ДНК.

3) Результаты измерения на флуориметре Qubit образцов из биоматериалов после ПЦР II

Табл. 13 Концентрации выделенной ДНК

	<i>нг/μL</i>		<i>нг/μL</i>
1	66,1	14	67,5
2	75,9	15	67
3	75,4	16	63,7
4	68,8	17	60,9
5	69,4	18	61,9
6	71,9	19	60,1
7	0,243	20	57
8	70,9	21	51,9
9	65,8	22	59,2
10	65,4	23	59,4
11	62,9	24	55,9
12	65,6	25	61,3
13	0,14	26	63,2
		К-	0,242

4) Результаты ЭФ в агарозном геле

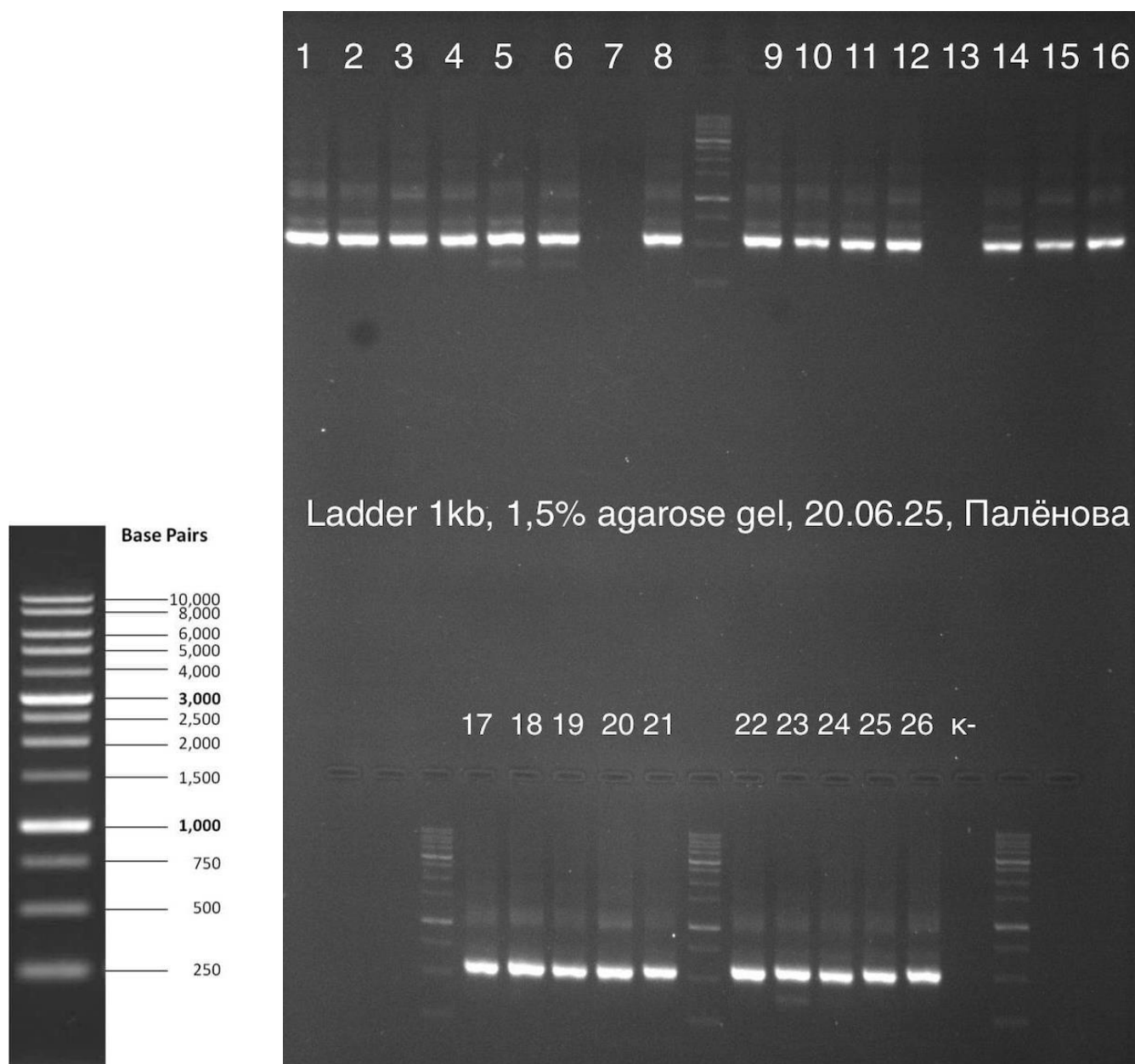


Рис. 13 *Ladder 1kb* [11], **Рис. 14** Электрофореграмма продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле

По ЭФ и измеренным концентрациям видно, что 7 и 13 библиотеки сделать не удалось. У остальных образцов нормальная концентрация и примерно одинаковая длина.

3) Циркуляризация

Табл. 14 *Результаты циркуляризации ДНК*

<i>ID стадии</i>	<i>нг на вход</i>	<i>Концентрация, нг/мкл</i>	<i>нг на выходе</i>	<i>% конверсии</i>
16s IBD 1 CIRC	800	9,00	243,00	30,4

При выполнении данного протокола циркуляризации ожидаемые данные колеблются от 12 до 40 процентов. Таким образом, мы убедились, что реакция циркуляризации проходит и полученный процент конверсии проходит контроль качества.

4) Биоинформатический анализ

Сравнение наборов NucleoSpin® DNA Stool и SKYamp Stool DNA

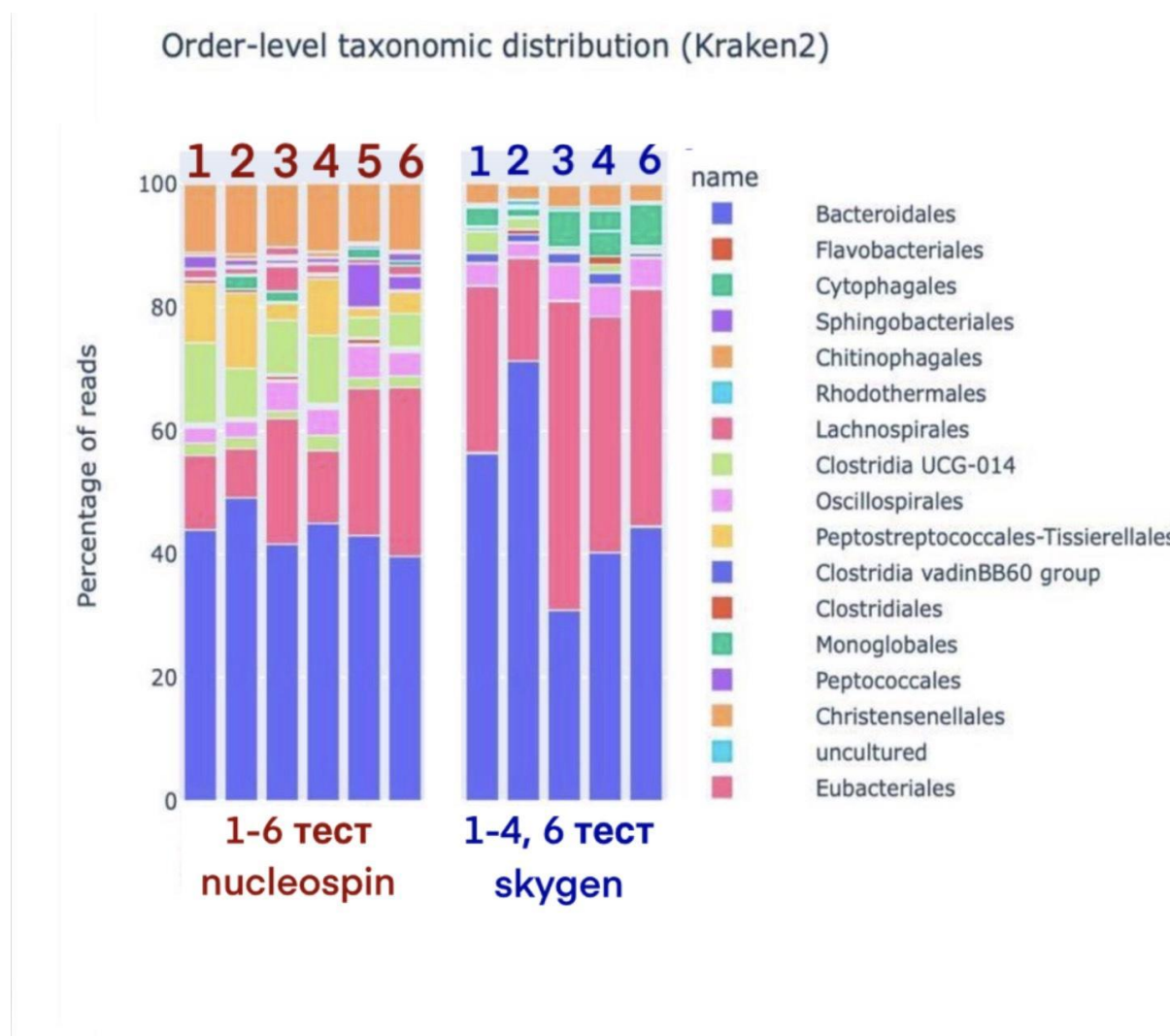


Рис. 15 Диаграмма микробиомного состава для двух групп образцов, порядки бактерий. Красным цветом обозначены названия образцов, обработанных NucleoSpin® DNA Stool, синим – SKYamp Stool DNA

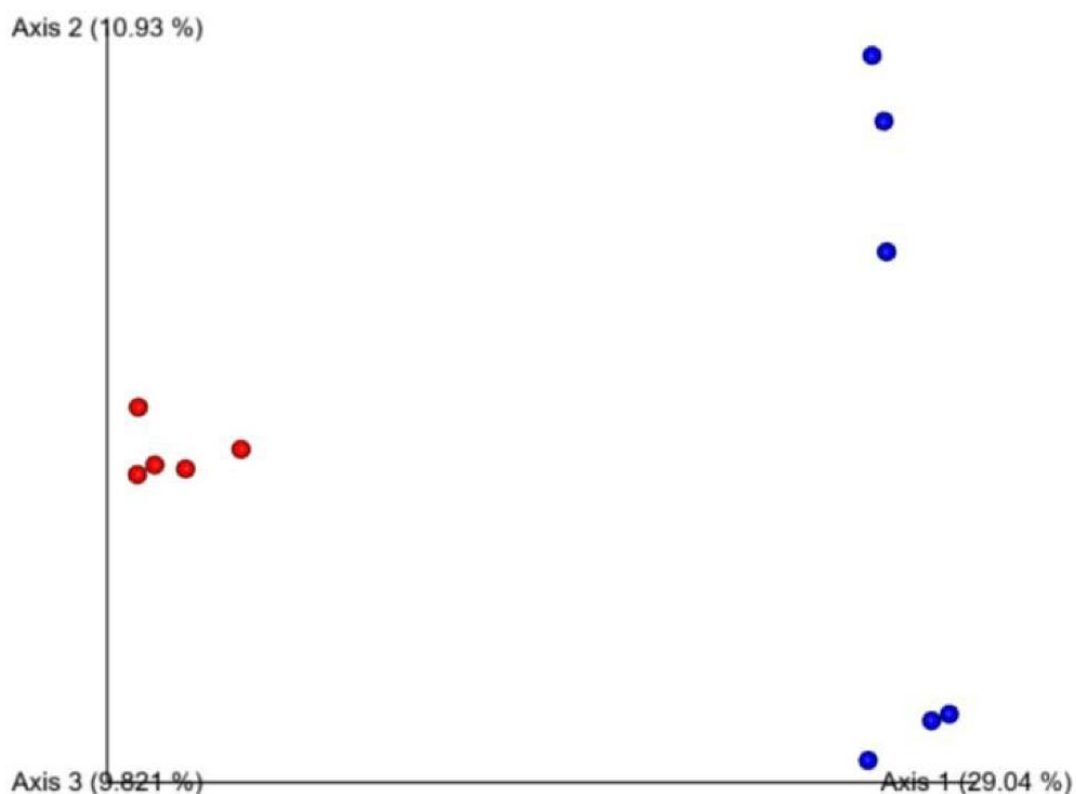


Рис. 16 График, демонстрирующий коэффициент Жаккара. Красные точки – образцы из РНИМУ, выделенные SKYamp Stool DNA; синие точки – образцы из РНИМУ, выделенные NucleoSpin® DNA Stool

Коэффициент Жаккара учитывает таксономическое богатство групп. Чем больше расстояние на графике между точками, тем сильнее они различаются в таксономическом богатстве. Этот график демонстрирует достаточно большое расстояние между кластерами образцов, выделенными разными наборами. Можно предположить, что два набора для выделения дают образцы с разным таксономическим богатством.

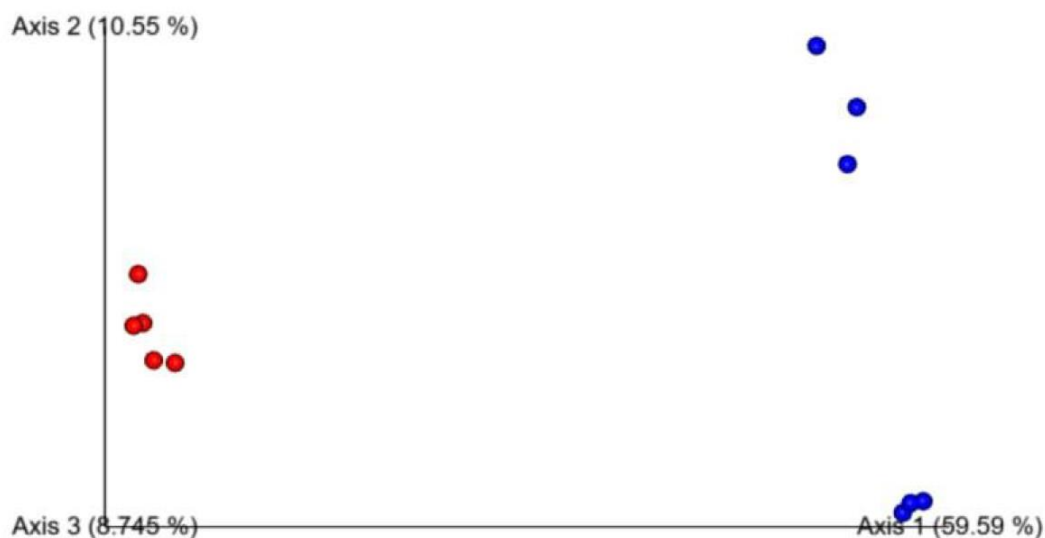


Рис. 17 График, демонстрирующий коэффициент Брея-Кертиса. Красные точки – образцы из РНИМУ, выделенные SKY Amp Stool DNA; синие точки – образцы из РНИМУ, выделенные NucleoSpin® DNA Stool

Коэффициент Брея-Кертиса учитывает таксономическое богатство и представленность таксонов среди групп. Чем больше расстояние на графике между точками, тем сильнее они различаются по этим параметрам. Этот график очень похож на график коэффициента Жаккара. Из этого можно сделать вывод о том, что набор для выделения мало влияет на представленность таксонов в конечных образцах.

Между группами образцов, выделенными разными наборами, есть статистически значимое различие ($p\text{-value} = 0,008$; PERMANOVA), оно обусловлено различием в таксономическом богатстве двух групп образцов.

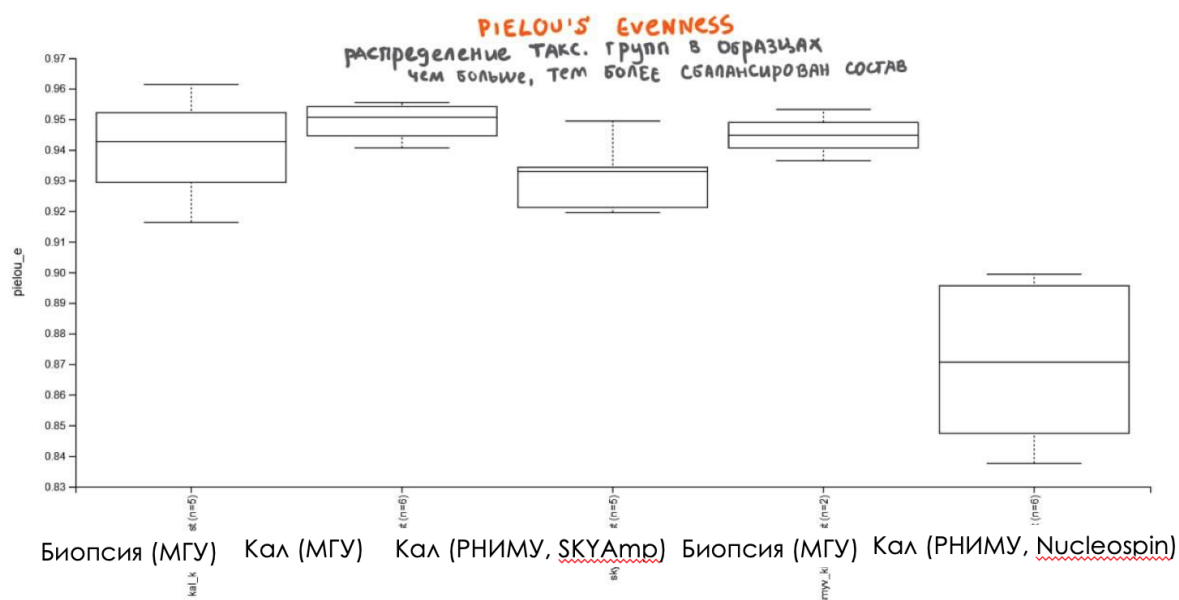


Рис. 18 Диаграмма, демонстрирующая коэффициент Пилоу (Pielou's evenness) для разных групп образцов. Ящик показывает межквартильный размах; чем он выше, тем больше в группе разброс по "равномерности" (коэффициенту Пилоу). При низкой равномерности образцы сильно различаются, доминирует несколько видов, остальные редки, при высокой же виды распространены примерно одинаково. Длина усов показывает разброс данных без учета выбросов.

Коэффициент Пилоу показывает, насколько сбалансирован состав микробиома для данной группы. По диаграмме заметно, что микробиом из образцов кала из РНИМУ, обработанных NucleoSpin® DNA Stool, менее сбалансирован, чем у остальных образцов (ящик, т.е. межквартильный размах, высокий), то есть доли представленности таксонов в нем распределены менее равномерно. Возможно, это связано с низким качеством биоматериала, из которого были получены образцы.

Сравнение трех типов биоматериала

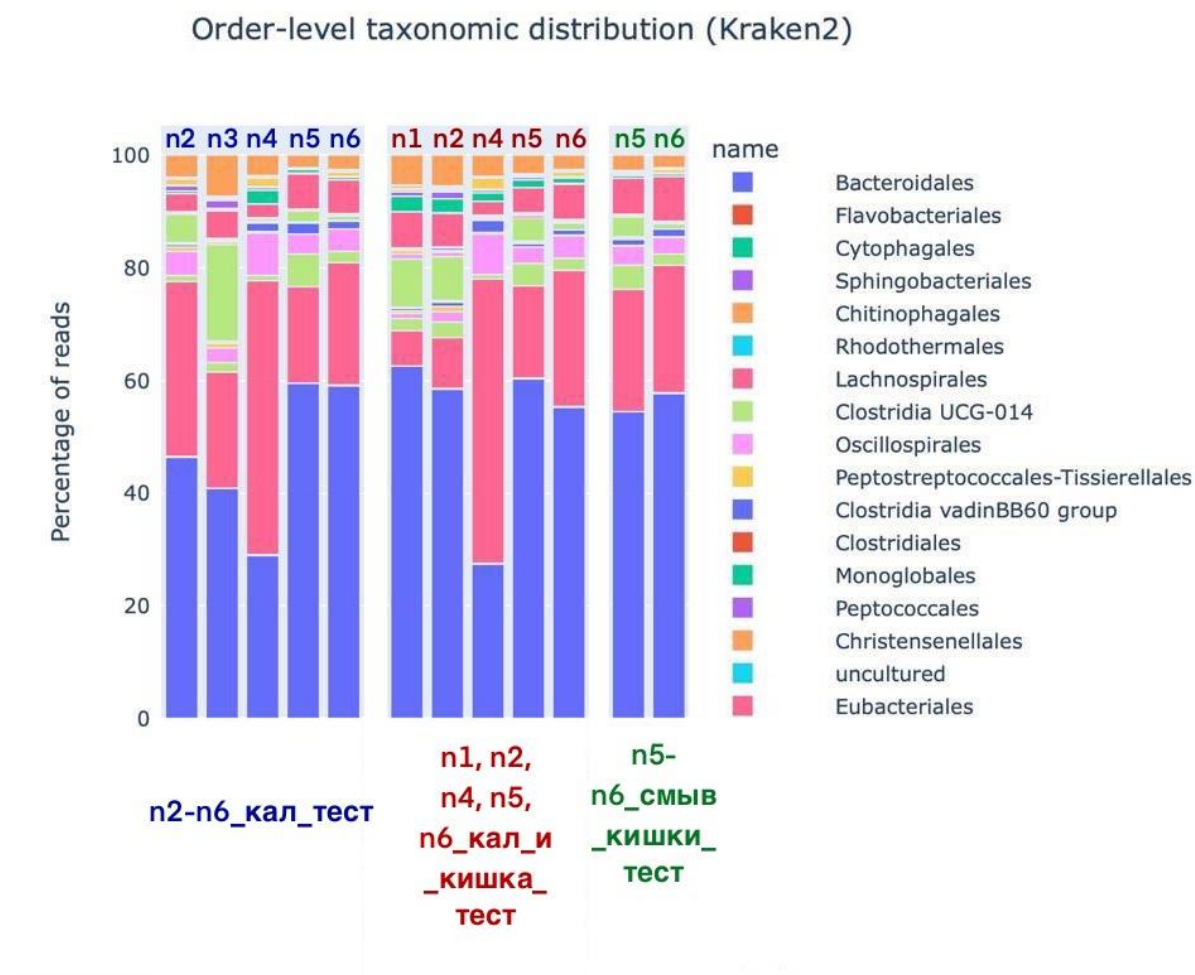


Рис. 19 Диаграмма микробиомного состава для трех групп образцов (порядки бактерий). Первые 4 столбца (синий цвет) – образцы из кала, следующие 4 (красный цвет) – из биопсии кишечника с калом, последние 2 (зеленый цвет) – смыв кишечника

Между образцами из разных биоматериалов не было обнаружено статистически значимых различий (p -value = 0,425 (кал-биопсия), 0,895 (кал-смыв), 0,358 (смыв-биопсия); PERMANOVA).

Так как из смывов получается меньше данных (по концентрации выделенной ДНК), их неудобно использовать как биоматериал для анализа микробиома. Фекалии и биопсия дают высокие концентрации ДНК, но именно фекалии использовать удобнее, так как с ними проще работать (легче гомогенизировать и т.п) и, в отличие от биопсии, с их помощью можно изучать динамику ВЗК.

Табл. 15 *Количество прочтений для всех образцов*

ID	внешний ID	Total reads
XOM542	1 тест skygen	125 516
BWV493	2 тест skygen	105 346
PTN868	3 тест skygen	111 077
VSN529	4 тест skygen	111 094
BKV930	6 тест skygen	112 538
SEX163	1 тест nucleospin	106 034
TKK882	2 тест nucleospin	156 641
ATY436	3 тест nucleospin	133 947
JOJ814	4 тест nucleospin	112 825
LRE274	5 тест nucleospin	133 507
NJE299	6 тест nucleospin	134 823
STK904	n1 кал тест	141 873
HNS277	n1 кал+кишка тест	137 897
WBC089	n2 кал тест	119 604
ACT790	n2 кал+кишка тест	131 649
VTM563	n3 кал тест	130 344
LUA146	n4 кал тест	100 750
BNW068	n4 кал+кишка тест	130 092
NRK002	n5 кал тест	137 027
RAA244	n5 кал+кишка тест	127 478
SNU380	n5 смыв кишки тест	125 039
FYL353	n6 кал тест	134 084
WWT372	n6 кал+кишка тест	124 293
YKH955	n6 смыв кишки тест	122 146

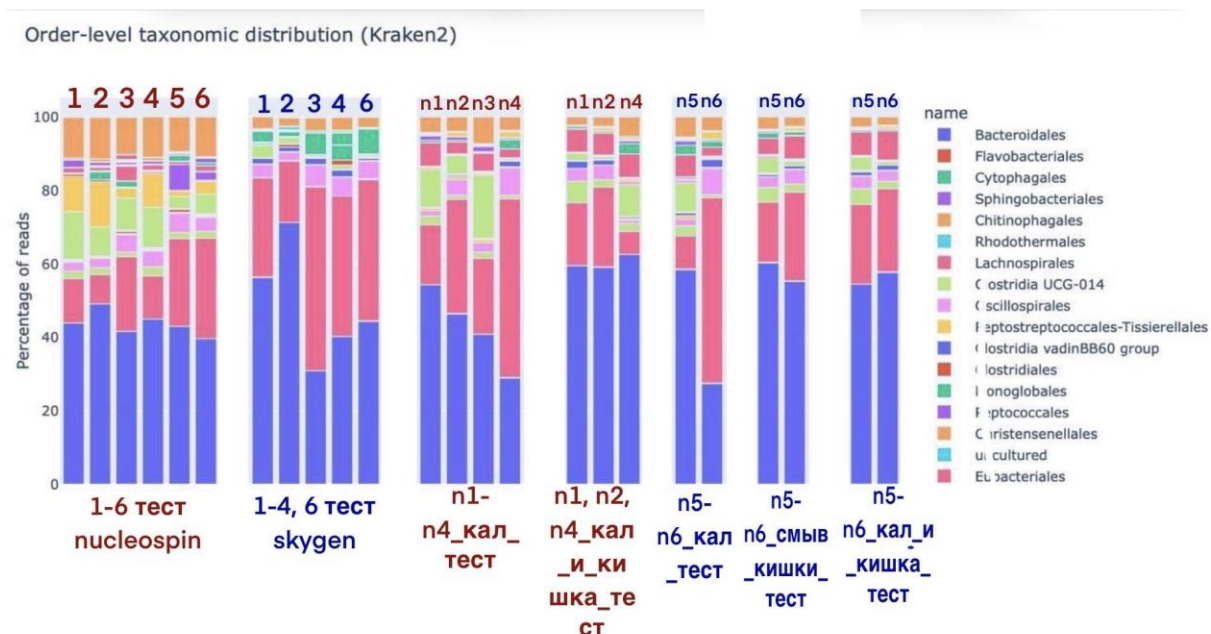


Рис. 20 Диаграмма представленности отрядов бактерий во всех образцах. Красным подписаны образцы, полученные при помощи NucleoSpin® DNA Stool, синим – SKYamp Stool DNA

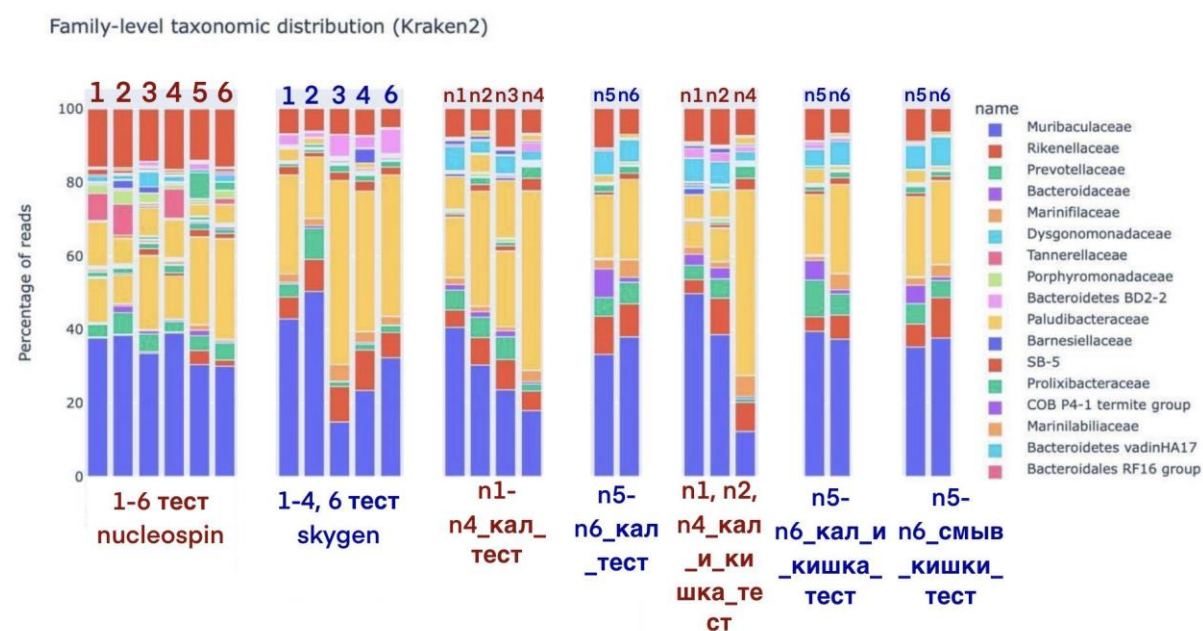


Рис. 21 Диаграмма представленности семейств бактерий в образцах. Красным подписаны образцы, полученные при помощи NucleoSpin® DNA Stool, синим – SKYamp Stool DNA

Наиболее представленными в полученных образцах оказались отряды Bacteroidales и Lachnospirales, что соответствует литературным данным о доминировании этих групп в кишечном микробиоме мышей. Bacteroidales включают грам-отрицательных облигатных анаэробов, участвующих в расщеплении сложных углеводов и формировании метаболитов, а Lachnospirales — грам-положительные анаэробы, известные как продуценты бутиратов и других короткоцепочечных жирных кислот, играющих важную роль в метаболизме хозяина и поддержании целостности эпителия кишечника.

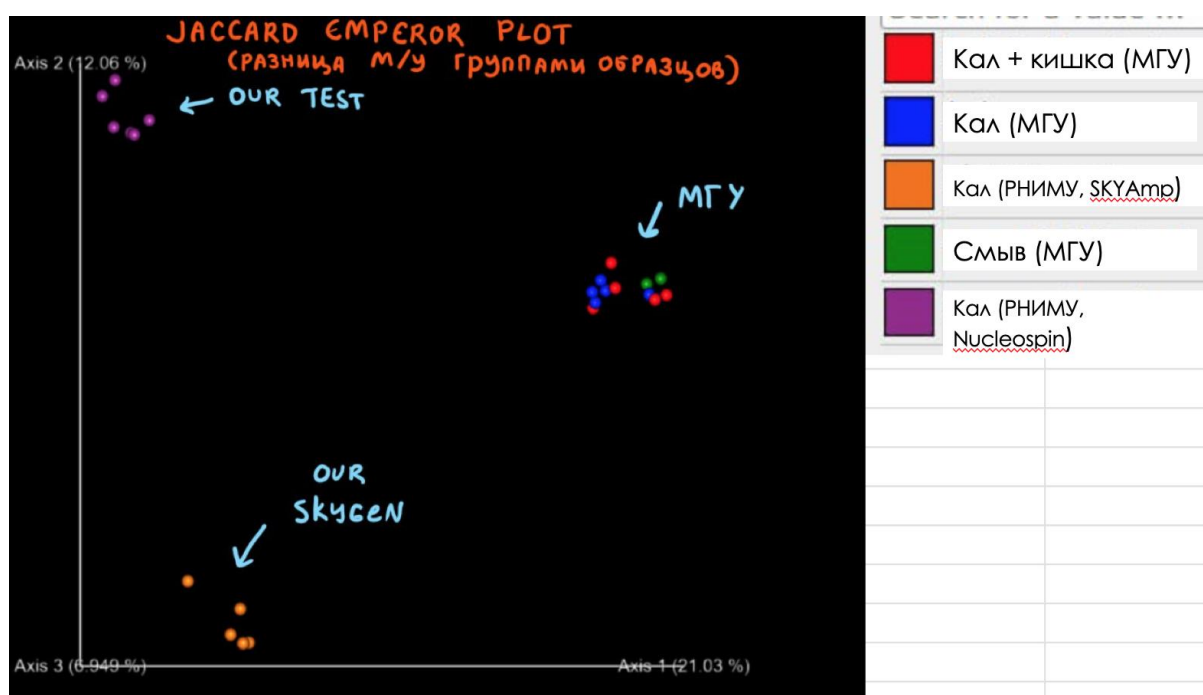


Рис. 22 График на основе коэффициента Жаккара для всех полученных образцов. Точки разных цветов соответствуют образцам определенной группы (см. легенду)

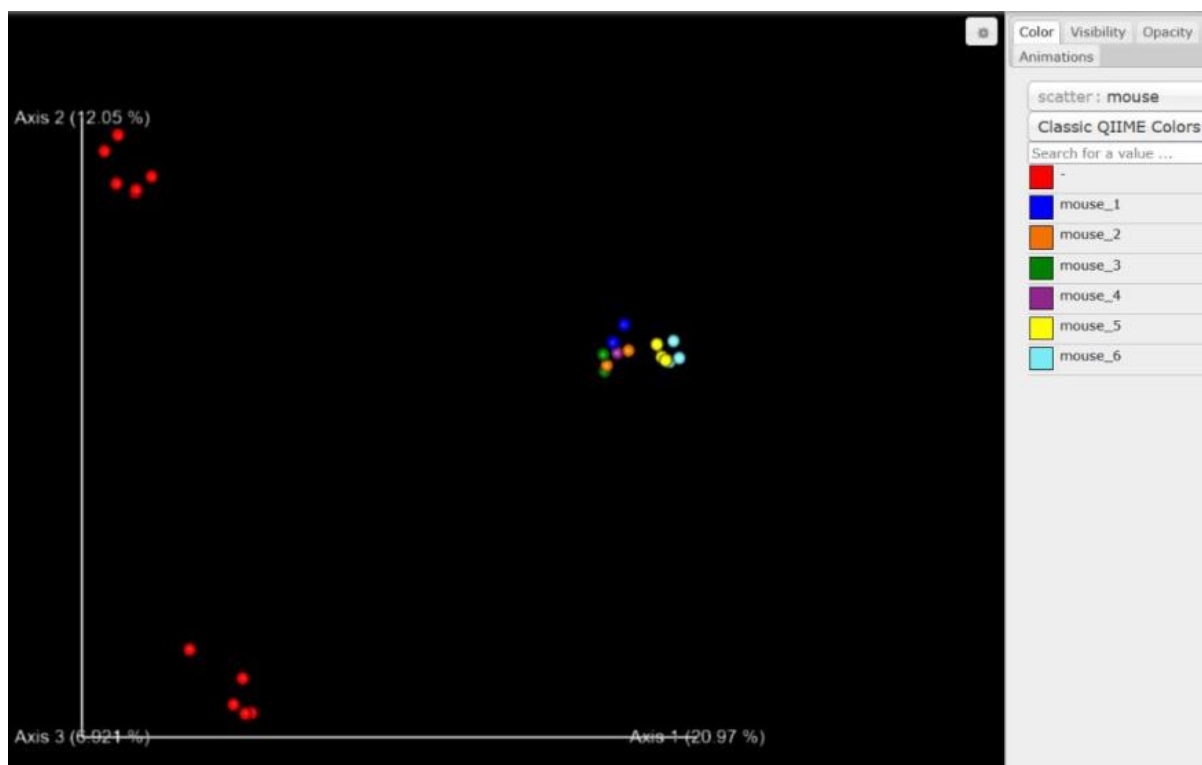


Рис. 23 График на основе коэффициента Жаккара для всех полученных образцов. Красные точки – образцы от мышей из РНИМУ, остальные 6 цветов соответствуют образцам от мышей N1-N6 из вивария МГУ (см. легенду)

По графику заметно, что все образцы разделились на кластеры, соответствующие заявленным группам. Отдельно кластеризовались образцы из кала от мышей из РНИМУ, выделенные SKY Amp Stool DNA, отдельно – образцы из кала от мышей из РНИМУ, выделенные NucleoSpin® DNA Stool, отдельно – образцы от мышей из МГУ.

Можно также заметить, что группа образцов из МГУ разделилась на два мелких и достаточно близких друг к другу кластера, состоящих из образцов от мышей N1-N4 и N5-N6 соответственно (то есть по признаку использованного набора для экстракции ДНК; см. рис. 23). Из этих графиков можно сделать вывод о том, что есть явные статистически значимые различия между микробиомами мышей из РНИМУ и мышей из МГУ (PERMANOVA, $p\text{-value} = 0,001$), а также есть мало значимые различия между группами образцов, выделенных двумя разными наборами. Тот факт, что четко кластеризовались группы образцов из РНИМУ, выделенных разными наборами, можно объяснить тем, что биоматериал для работы с каждым отдельным набором

брался в разные дни, и это может быть биоматериал от разных мышей либо разной степени свежести.

Выводы

1. Оба набора (NucleoSpin® DNA Stool и SKYamp Stool DNA) подходят для выделения ДНК из биоматериала, но не дают идентичных результатов. Выбор набора для экстракции влияет на результаты анализа микробиома, в частности на представленность различных таксонов.
2. Использованные нами праймеры на V3V4 регионы гена 16S рРНК подходят для анализа микробиома.
3. Наиболее подходящий для анализа микробиомного состава кишечника биоматериал – это кал. Он удобен в получении и работе с ним, а также подходит для исследования динамики ВЗК.

Благодарности

Я благодарю Сергея Менделевича Глаголева за организацию лабораторной практики в 2025 году, администрацию РНИМУ им. Пирогова за возможность выполнения работы и всех работников геномного центра трансляционной медицины за помощь в выполнении лабораторной работы, в особенности Дмитрия Коростина за возможность проходить практику в геномном центре, Анну Кузнецову и

Анну Шмитко за научное руководство и Жанну Репинскую за помощь в получении и обработку биоинформатических данных, а также Владимира Попова и Ксению Милутинович за предоставленные материалы для работы из вивария МГУ, и Нину Тутубалину за рецензирование работы.

Список литературы

- [1] Fakhoury M., Negrulj R., Mooranian A., Al-Salami H. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Treatments // Journal of Inflammation Research. – 2014. – Vol. 7. – P. 113-120.
- [2] Baumgart D.C., Carding S.R. Inflammatory Bowel Disease: Cause and Immunobiology // The Lancet. – 2007. – Vol. 369, No. 9573. – P. 1627-1640.
- [3] Wehkamp J., Götz M., Herrlinger K., Steurer W., Stange E.F. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's Disease and Ulcerative Colitis // Deutsches Ärzteblatt International. – 2016. – Vol. 113, No. 5. – P. 72-82.
- [4] Johansson M.E.V., Hansson G.C. Immunological Aspects of Intestinal Mucus and Mucins // Nature Reviews Immunology. – 2016. – Vol. 16, No. 10. – P. 639-649.
- [5] Nigam M., Mishra A.P., Chaturvedi A., Kumar A. Exploration of Gut Microbiome and Inflammation: A Review on Key Signalling Pathways // Cellular Signalling. – 2024. – Vol. 118. – Article No. 111140.
- [6] Jarmakiewicz-Czaja S., Zielińska M., Szymański M., Filip R. Genetic and Epigenetic Etiology of Inflammatory Bowel Disease: An Update // Genes. – 2022. – Vol. 13, No. 12. – Article No. 2388.
- [7] Zhao M., Gönczi L., Lakatos P.L., Burisch J. The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020 // Journal of Crohn's and Colitis. – 2021. – Vol. 15, No. 9. – P. 1573-1587.
- [8] Niu W., Chen Z., Li Y., Li W., Zhang Y. The Role of Enteric Dysbacteriosis and Modulation of Gut Microbiota in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease // Microbial Pathogenesis. – 2022. – Vol. 165. – Article No. 105381
- [9] Bernell O., Lapidus A., Hellers G. Risk Factors for Surgery and Postoperative Recurrence in Crohn's Disease // Annals of Surgery. – 2000. – Vol. 231, No. 1. – P. 38-45.

- [10] Buttó L.F., Haller D. Dysbiosis in Intestinal Inflammation: Cause or Consequence // International Journal of Medical Microbiology. – 2016. – Vol. 306, No. 5. – P. 302-309.
- [11] Microbe Notes. DNA Ladders (1 kb, 1 kb plus, 100 bp, 100 bp plus) and Uses [Электронный ресурс] // Microbe Notes : сайт. – Режим доступа: <https://microbenotes.com/dna-ladders/> (дата обращения: 10.04.2026).
- [12] Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Vol. 14, No. 1. – P. 20-32.
- [13] Милутинович К.С., Попов В.С. Мус2-дефицитные мыши как модель хронического воспаления // Лабораторные животные для научных исследований. – 2023. – Т. 10, № 3. – С. 118-126.
- [14] Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 45, No. 9. – P. 2761-2764.
- [15] EzBioCloud. 16S rRNA and 16S rRNA Gene [Электронный ресурс] // EzBioCloud : сайт. – Режим доступа: <https://help.ezbiocloud.net/16s-rna-and-16s-rna-gene/> (дата обращения: 10.04.2026).
- [16] Kameoka S., Motooka D., Watanabe S., Kubo R., Jung N., Midorikawa Y., Shinozaki M.O. Benchmark of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing Using Japanese Gut Microbiome Data from the V1–V2 and V3–V4 Primer Sets // BMC Genomics. – 2021. – Vol. 22, No. 1. – P. 527.
- [17] Mlčúchová N., Šlamová I., Brenerová P., Deissová T. Comparison of Sequencing Analyses Targeting the V1/V2 and V3/V4 Regions in the 16S rDNA Gene – Analysis of Bacteriome in Oral Swabs and Esophageal Tissues – 2023. – Biologické dny 2023.
- [18] Dai N., Haider M., Askari A., Segal J. Colectomy Rates in Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis // Digestive and Liver Disease. – 2023. – Vol. 55, No. 1. – P. 13-20.
- [19] Tang Q., Jin G., Wang G., Liu T., Liu X., Wang B., Cao H. Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – Article No. 151.

[20] Huse S.M., Young V.B., Ley R.E. Comparison of Brush and Biopsy Sampling Methods of the Ileal Pouch for Assessment of Mucosa-Associated Microbiota of Human Subjects // Microbiome. – 2014. – Vol. 2, No. 1. – Article No. 5.

[21] Булатова Е.М., Лобода Т.Б., Павлова Т.В., Щербаков П.Л. Кишечная микробиота: современные представления // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2009. – Т. 87, № 3. – С. 104-109.

[22] [Meberp.com](https://www.mebep.com). 50BP DNA Ladder [Электронный ресурс] // Мебер : сайт. – Режим доступа: <https://www.mebep.com/ladder-marker/dna-ladders-dna-markers/50bp-dna-ladder/> (дата обращения: 10.04.2026).

.