

участка гена 16S rRNA на платформе Illumina, была получена верная классификация до уровня вида для 97.2% записей. Процент прочтений, неверно классифицированных на уровне порядка составил 0,95%, 0,22% прочтений были неверно классифицированы на уровне семейства и 1,57% на уровне вида. Для симуляционных данных нанопорового секвенирования верная классификация до уровня вида была получена для 99.6% записей. Все неверно классифицированные прочтения относились к роду *Sphingomonas*.

Заключение. Применение комплексного подхода к

решению задачи видовой классификации бактерий по результатам секвенирования 16S rРНК позволяет не только идентифицировать известные виды бактерий, но и открывает возможности для выявления новых, ранее неизвестных организмов.

В будущем предполагается дальнейшее совершенствование программы, учет новых методологических подходов, адаптация под узкоспециализированные задачи исследований, а также разработка пользовательского графического интерфейса для удобного использования программы.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ СЛОЖНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA MISEQ

Зяцьков А.А.¹, Шафорост А.С.¹, Баранов О.Ю.², Воропаев Е.В.¹

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Национальная Академия наук Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Актуальность. Микробиом оказывает значительное влияние на поддержание состояния физиологической нормы организма человека: бактерии способствуют формированию среды организма, принимают участие в регуляции сократительной активности кишечника, синтезе витаминов, нейроактивных соединений и незаменимых аминокислот, метаболизме жиров, поддержании иммунного гомеостаза за счет поддержания гуморального иммунитета и обучения эффекторов клеточного иммунитета и т.д. Одним из методов исследования микробиома является метагеномное секвенирование с помощью высокопроизводительных секвенаторов второго и третьего поколения.

Целью настоящей работы является рассмотрение особенностей пробоподготовки образцов с низким количеством бактериальной ДНК для метагеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

Методы. Для идентификации микроорганизмов на данной платформе используются короткие фрагменты регионов V3/V4 гена 16S бактерий.

Для сообществ с высоким альфа-разнообразием и большой концентрацией бактерий (например, кишечника) процесс пробоподготовки для метагеномного секвенирования не вызывает каких-либо затруднений. В случае работы с образцами из биотопов, которые характеризуются низким разнообразием и обилием микробиоты (биоптаты желудка, образцы мочи, околоплодных вод, асцитической жидкости и др.), а также большой долей ДНК человека, использование стандартного протокола пробоподготовки приводит к существенному снижению объема получаемых данных и возможному искажению информации о структуре исследуемого микробиома.

В этом случае необходимо проводить дополнительный этап для обогащения образца за счет ПЦР-амплификации с использованием праймеров, охватывающих регионы с V1 по V9 гена 16S бактерий (таблица 1) с последующей амплификацией целевого региона (16S V3/V4).

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ПРАЙМЕРОВ И ОРИЕНТИРОВОЧНЫЙ РАЗМЕР АМПЛИКОНА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕЛЕВОЙ ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.
16S_V1-V9-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 900 п.н.
16S_V1-V9-R	CCGTCGAATCTTTRAGTTT	
16S_V3/V4-F	CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	~ 550 п.н.
16S_V3/V4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	

Основанием для проведения процедуры обогащения является низкая концентрация ДНК после экстракции и отсутствие возможности получения дополнительного количества ДНК и ее концентрирования. В результате наблюдается увеличение количества матрицы для проведения целевой ПЦР регионов V3/V4 гена 16S бактерий, что мож-

но оценить путем сравнения концентраций ампликонов после целевой ПЦР с обогащением и без него.

Выводы. Использование обогащения образцов целевыми фрагментами позволяет проводить изучение структуры микробиома биоптатов и других образцов, содержащих следовые количества ДНК бактерий.