




DigiOmica

2023-1-BG01-KA220-HED-000155777



РП 3 Колаборативно обучение по
интегрирани омикс технологии за
екологична устойчивост - DigiOmica

*Модул 7: Микробни генни транскрипти в
проби от околната среда*

- **Автори и институции**
Мария Василева и Николай Василев
Университет на Гранада
- **Образователни цели:** целта на този модул е да представи знания за
 - Екологичната транскриптомика, която свързва генетичния потенциал с микробната биогеохимична активност
 - Основните стъпки в протокола за анализ на частични транскриптоми на околната среда
 - Различните подходи и решения за преодоляване на трудностите, свързани с транскрипционната хетерогенност

➤ Резюме

мРНК на околната среда (транскриптомика на околната среда) извлича транскриптоми на микробни консорциуми, за които липсва информация за видовете гени, експресирани на ниво съобщество. Тя свързва генетичния потенциал на микроорганизмите с тяхната биогеохимична активност. Визията за използване на този подход за различни приложения в науката за околната среда на молекулярно ниво обаче, е възпрепятствана от техническите трудности при работа с мРНК, като липса на механизъм за полиаденилиране, много кратък полуживот на мРНК и липса на изобилие на молекули мРНК в общия РНК фонд на микробната клетка, което води до слаби сигнали за откриване. Разработени са протоколи за преодоляване на тези трудности и за улесняване на анализите на частични транскриптоми на околната среда. Сред обещаващите изследвания могат да се изброят извличането на специфични за съобществото последователности на функционални гени, които са от съществено значение за количествените екологични проучвания; генерирането на нови хипотези за известни микробни процеси или оценката (с помощта на геномиката на околната среда) на генетичния потенциал и моделите на активност на естествените микробни съобщества.

- **Очаквани резултати от ученето:** При завършване на този модул обучаващите се ще могат да:
 - Представят същността на мРНК на околната среда (транскриптомика на околната среда)
 - Обясняват техническите трудности при работа с мРНК
 - Познават и прилагат основните стъпки в протокола за анализ на частични транскриптоми на околната среда
 - Разбират основните обещаващи приложения на подхода за мРНК на околната среда в микробната екология
 - Прилагат добрите практики в областта на съвременното състояние на едноклетъчната транскриптомика и едноклетъчното РНК-секвениране

➤ Съдържание:

1. Въведение
2. Констатации
 - 2.1. Протокол за анализ на частични транскриптоми на околната среда
3. Алтернативи (обсъждане)
 - 3.1. Подходи за преодоляване на трудностите, свързани с транскрипционната хетерогенност
 - 3.2. Обещаващи приложения на микробните генни транскрипти в проби от околната среда
4. Решения
 - 4.1. Едноклетъчна транскриптомика с комбинаторно баркодиране
 - 4.2. Поли(А)-независимо едноклетъчно РНК-секвениране
 - 4.3. Базирано на сонда бактериално едноклетъчно РНК-секвениране
 - 4.4. Комбинаторно индексирание *in situ* за бактериално едноклетъчно РНК-секвениране
5. Литература

➤ Представяне на учебното съдържание

1. Въведение

- **Принципи на технологията за транскриптомика на околната среда**, която свързва генетичния потенциал с микробната биогеохимична активност
- **Предимства и технически трудности** на технологията
- **Възможни решения** за преодоляване на техническите проблеми

➤ Представяне на учебното съдържание

2. Констатации

2.1 Протокол за анализ на частични транскриптоми на околната среда

- **Генериране на библиотеки:** събиране на проби от околната среда и изолиране на тотална РНК, селективно отстраняване на рРНК и обогатяване с мРНК, обратна транскрипция на мРНК за генериране на популация от матрици за кДНК, чиито членове се амплифицират чрез PCR, за да се получат библиотеки от кДНК клонове на транскрипти от околната среда
- Характеризиране на библиотеките от транскрипти
- Определяне на предполагаемия таксономичен произход на транскриптите и аотирането им

➤ Представяне на учебното съдържание

3. Алтернативи

3.1 Подходи за преодоляване на трудностите, свързани с транскрипционната хетерогенност

- Профилиране на транскрипционните състояния в микробните съобщества
- Проследяване на експресията на специфични бактериални транскрипционни програми чрез техники за високопроизводително секвениране
- Изследване на изогенни бактериални популации за тяхната хетерогенност

➤ Представяне на учебното съдържание

3. Алтернативи

3.2 Обещаващи приложения на микробните генни транскрипти в проби от околната среда

- Извличане на специфични за съобществото последователности на функционални гени, важни за количествените проучвания на околната среда
- Създаване на нови хипотези за известни микробни процеси
- Оценка (с помощта на геномиката на околната среда) на генетичния потенциал и моделите на активност на естествените микробни съобщества

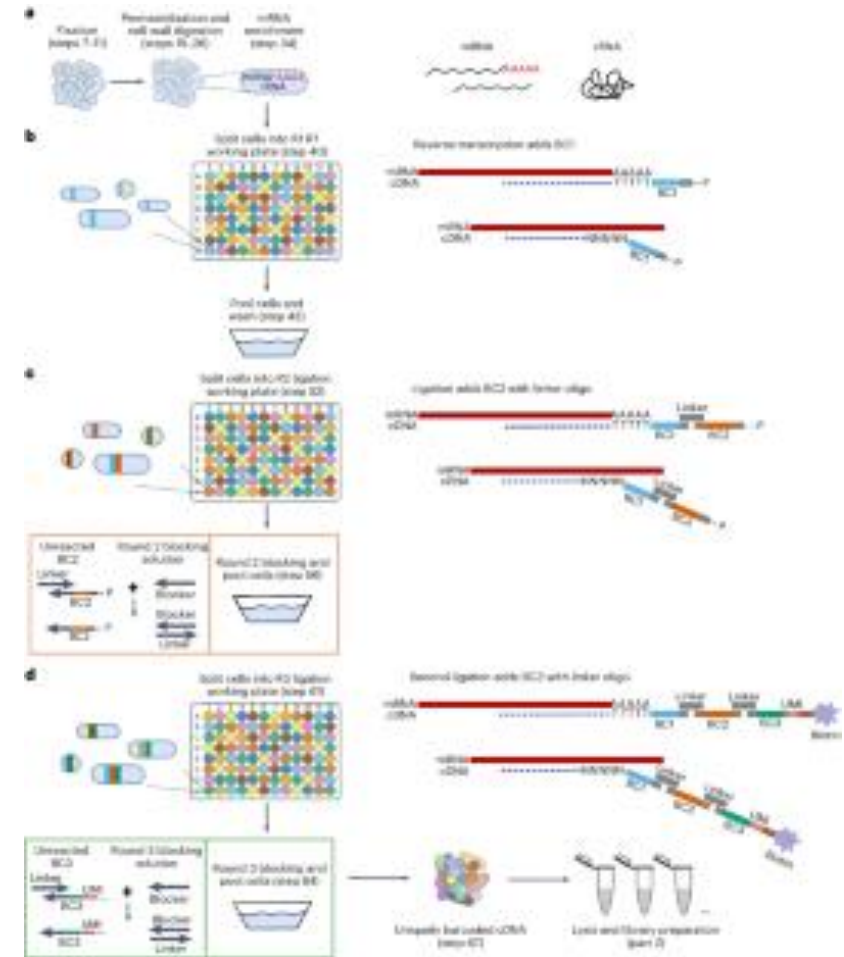
➤ Представяне на учебното съдържание

4. Решения

4.1 Едноклетъчна транскриптомика с комбинаторно баркодиране

➤ Транскриптомен анализ на отделни бактериални клетки и откриване на фенотипно различни субпопулации чрез 4 кръга на комбинаторно баркодиране

➤ Профилиране на огромно количество бактериални клетки в рамките на един лабораторен експеримент



Източник: Gaisser et al., 2024 *Nat Protoc* (2024).
<https://doi.org/10.1038/s41596-024-01007-w>

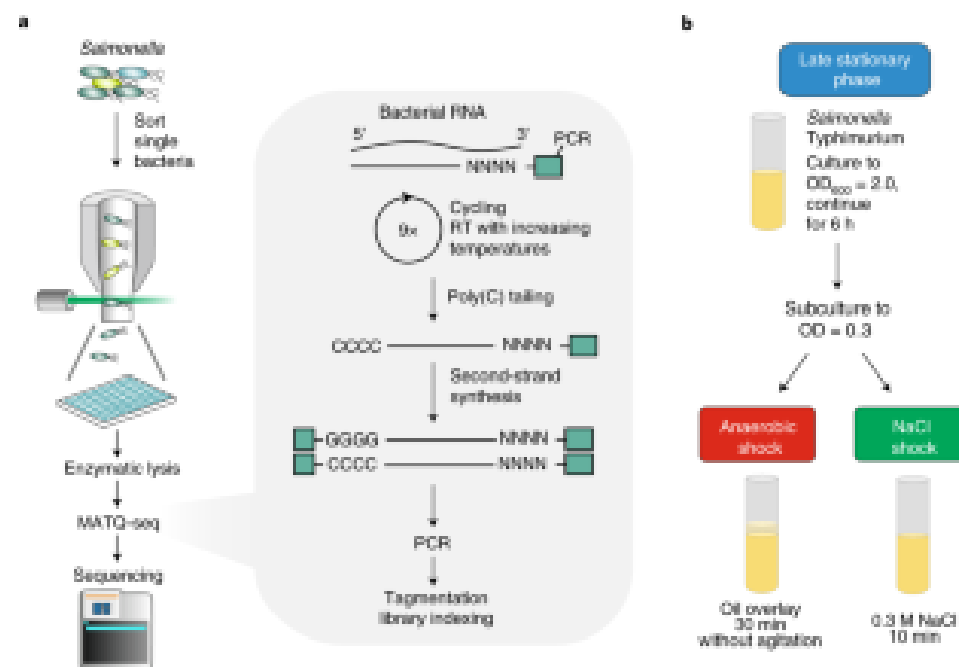
➤ Представяне на учебното съдържание

4. Решения

4.2 Поли(А)-независимо едноклетъчно РНК-секвениране

➤ Подобен поли(А)-независим протокол за едноклетъчно РНК секвениране за проследяване на моделите на генна експресия, зависими от растежа, в *Salmonella* и *Pseudomonas* във всички класове РНК и геномни области

➤ Важна референтна точка за едноклетъчно РНК секвениране на други бактериални видове, смесени микробни съобщества и взаимодействия между гостоприемник и патоген



Източник: Imdahal et al., 2020 *Nat Microbiol* 5, 1202–1206 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0774-1>

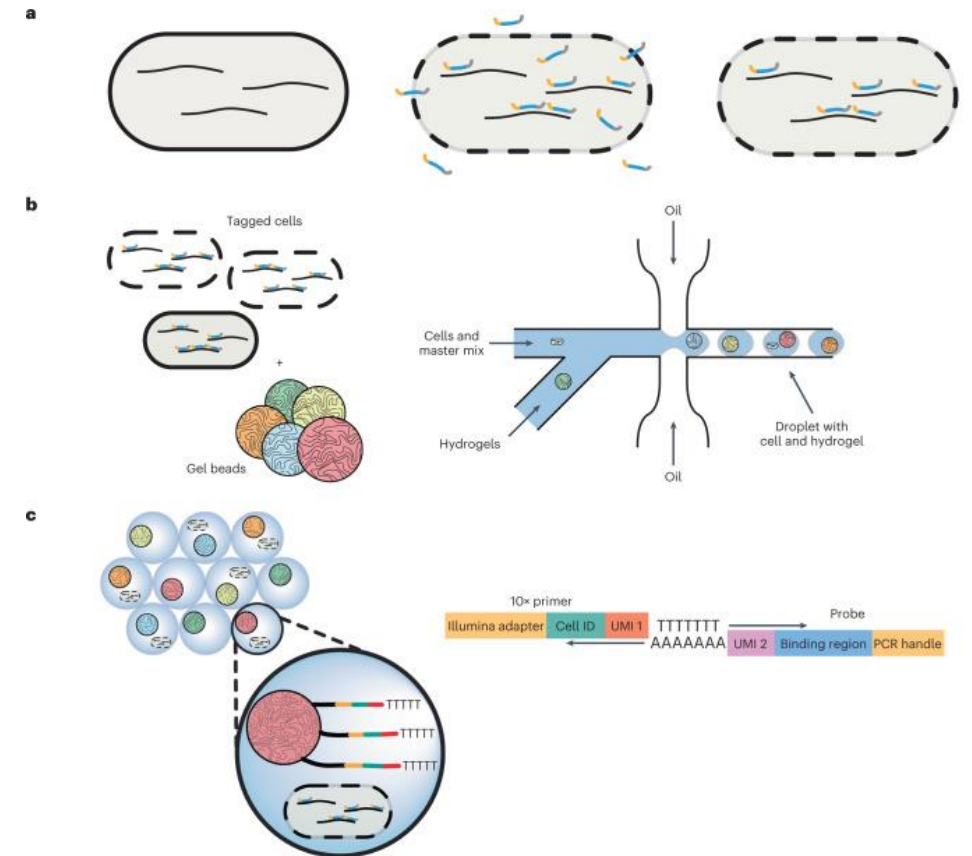
➤ Представяне на учебното съдържание

4. Решения

4.3 Базирано на сонда бактериално едноклетъчно РНК-секвениране

➤ Базирано на сонди бактериално секвениране (ProVas-seq) с използване на библиотеки от ДНК сонди и търговска микрофлуидна платформа за провеждане на бактериално едноклетъчно РНК секвениране

➤ Прилагането на подхода към *Clostridium perfringens* разкри хетерогенна експресия на бактериалния токсин, която може да повлияе на патогенността на бактерията



Източник: McNulty et al., 2023 *Nat Microbiol* 8, 934–945 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01348-4>

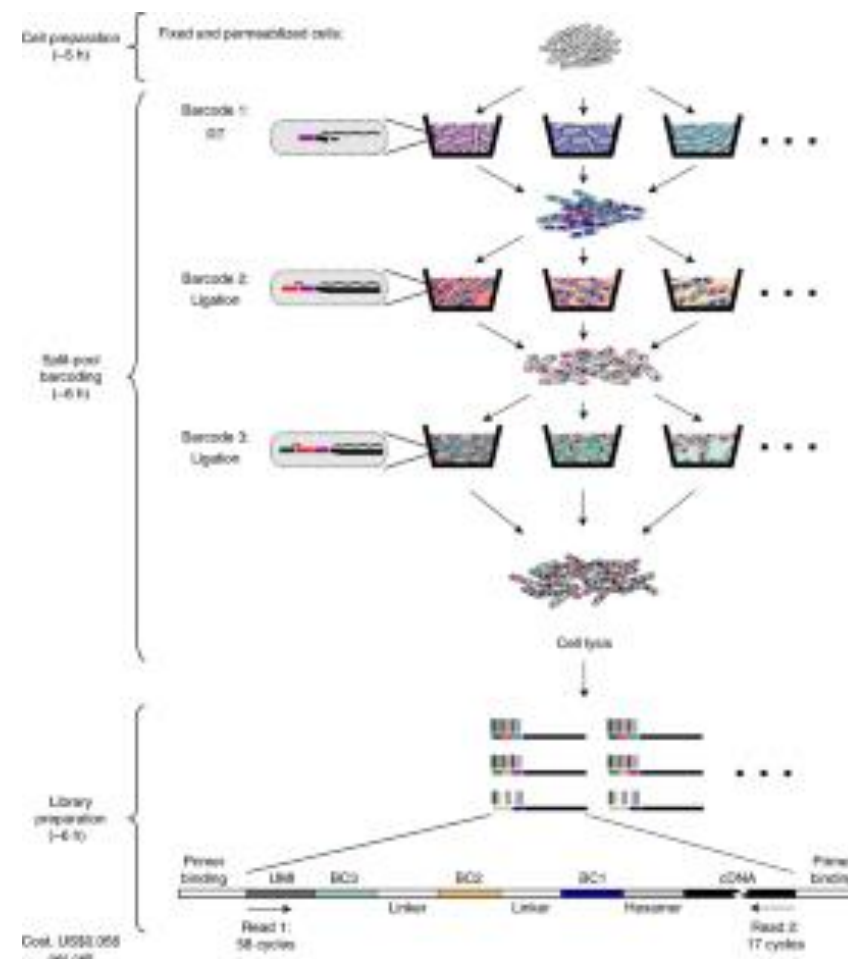
➤ Представяне на учебното съдържание

4. Решения

4.4 Комбинаторно индексирание *in situ* за бактериално едноклетъчно РНК-секвениране

➤ Прокариотно профилиране на експресията чрез маркиране на РНК *in situ* и секвениране (PETRI-seq), което позволява надеждно разграничаване на клетъчните състояния, съответстващи на различни фази на растеж

➤ Прилагане на подхода за определяне на състоянията на отделните клетки и тяхната динамика в сложни микробни съобщества



Източник: Blattman et al., 2020 *Nat Microbiol* 5, 1192–1201 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0729-6>

➤ Представяне на учебното съдържание

7. Литература

- Poretsky R.S, N. Bano, A. Buchan, G. LeCleur, J. Kleikemper, M. Pickering, W.M. Pate, M.A. Moran, J.T. Hollibaugh. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2005 71(7):4121-6. doi: 10.1128/AEM.71.7.4121-4126.2005.
- Gaisser, K.D., Skloss, S.N., Brettner, L.M. et al. High-throughput single-cell transcriptomics of bacteria using combinatorial barcoding. *Nat Protoc* (2024). <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01007-w>
- Imdahl, F., Vafadarnejad, E., Homberger, C. et al. Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria. *Nat Microbiol* **5**, 1202–1206 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0774-1>
- McNulty, R., Sritharan, D., Pahng, S.H. et al. Probe-based bacterial single-cell RNA sequencing predicts toxin regulation. *Nat Microbiol* **8**, 934–945 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01348-4>
- Blattman, S.B., Jiang, W., Oikonomou, P. et al. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by in situ combinatorial indexing. *Nat Microbiol* **5**, 1192–1201 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0729-6>

ERASMUS+



Обогатява живота, разширява кръгозора

Финансирано от Европейския съюз. Изразените възгледи и мнения обаче принадлежат изцяло на техния(ите) автор(и) и не отразяват непременно възгледите и мненията на Европейския съюз или на Европейската изпълнителна агенция за образование и култура (EACEA). За тях не носи отговорност нито Европейският съюз, нито EACEA.