



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Karolina Titaitytė

**Hidrogelinių mikrokapsulių pritaikymas nukleorūgščių analizei iš
pavienių fiksuotų bakterijų**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Žana Kapustina

Darbas atliktas

UAB Droplet Genomics

Hidrogelinių mikrokapsulių pritaikymas nukleorūgščių analizei iš pavienių fiksuotų bakterijų

Magistro baigiamasis darbas atliktas UAB „Droplet Genomics“ įmonėje.

Karolina Titaitytė



(parašas)

Darbo vadovė:

Dr. Žana Kapustina

Leista gintis:



(parašas)

Įrašo data:

2025-05-27

SANTRUMPOS

bp – bazių pora
DTT – ditioneitolis
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
FACS – fluorescencijos aktyvuotas ląstelių rūšiavimas (angl. *fluorescence-activated cell sorting*)
gDNR – genominė deoksiribonukleorūgštis
GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. *green fluorescent protein*)
KT – kambario temperatūra
LB – Luria-Bertani
LCM – lazerinio fiksavimo mikrodisekcija (angl. *laser capture microdissection*)
MDA – daugybinio nustūmimo reakcija (angl. *multiple displacement amplification*)
NKS – naujos kartos sekoskaita
NR – nukleorūgštys
OT – optinis tankis
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas
PDMS – polidimetilsiloksanas
PEG – polietilenglikolis
PFA – paraformaldehidas
PGR – polimerazinė grandininė reakcija
PPK – pusiau pralaidžios kapsulės
RFU – santykinės fluorescencijos vienetas
Rnazė – ribonukleazė
SDS – dodecilsulfatas
SSC – fiziologinio ir natrio citrato tirpalas
TBE – buferinis tirpalas, kuriame yra Tris bazės, boro rūgšties ir EDTA mišinys
TKS – trečios kartos sekoskaita
UV – ultravioletiniai spinduliai

IVADAS

Biosferos stabilumas ir funkcionalumas didele dalimi priklauso nuo mikroorganizmų populiacijų heterogeniškumo. Ši biologinė įvairovė atlieka svarbų vaidmenį palaikant ne tik pačių mikrobus bendrųjų pusiausvyrą, bet ir sudėtingų biologinių sistemų išlikimą bei vystymąsi. Didžiulė mikroorganizmų įvairovė dar nėra ištirta, tačiau žinoma, kad mikroorganizmai gyvena kiekviename Žemės kampelyje ir tikriausiai už jos ribų (Achtman ir Wagner, 2008). Įvairovės analizė yra vienas iš pagrindinių darbų siekiant suprasti natūralių ekosistemų funkcionavimą ir jų vaidmenį aplinkoje. Mikroorganizmų identifikavimas juos izoliuojant ir klasifikuojant yra klasikinis įvairovės tyrimo būdas jau daugiau nei šimtmetį. Atliekant kultivavimą galima suprasti rūšies vaidmenį populiacijoje, kuri yra sisteminės genominės visumos dalis (Van Rossum ir kt., 2020). Nepaisant nesutarimų dėl tos pačios rūšies fenotipinių variacijų, tokio tipo metodai buvo iš esmės svarbūs mikrobus taksonomijoje (Casadevall ir Pirofski, 2000). Visgi, atsiradus pažangiems molekuliniams įrankiams ir didelio našumo sekoskaitos technologijoms, atsivėrė galimybės greičiau ir tiksliau tirti mikroorganizmų įvairovę bei jų evoliucinius tarpusavio ryšius.

Sparti sekoskaitos technologijų pažanga ir tinkamų bei efektyvių bioinformatikos įrankių ir programinės įrangos sukūrimas sukėlė revoliuciją mikrobiologijoje, siekiant apibūdinti mikrobus bendruomenes, kurias sunku kultivuoti laboratorinėmis sąlygomis. Kelių mikroorganizmų viso genomo sekoskaita bei metagenominiai tyrimai paskatino didelės apimties duomenų bazių, skirtų mikrobus bendrųjų analizei, kūrimą. Tuo pačiu atsirado ir lyginamosios genomikos metodai, leidžiantys efektyviai apibūdinti mikroorganizmų įvairovę, funkcijas bei evoliucinius ryšius.

Norint sėkmingai taikyti molekulinius mikroorganizmų charakterizavimo metodus, reikalingi veiksmingi mėginių paėmimo, laikymo ir fiksavimo protokolai, kuriais siekiama išsaugoti surinktuose mėginiuose esančios genetinės medžiagos integralumą ir kiekį. Nepaisant mokslinės bendruomenės pastangų kurti ir tobulinti nukleorūgščių gryninimo metodus įvairiems mėginių tipams, informacijos apie fiksavimo medžiagų poveikį ir laikymo sąlygas, kuriomis siekiama išsaugoti aplinkos mėginių genetinės medžiagos vientisumą, vis dar yra nedaug. Idealiu atveju genetinė medžiaga turėtų būti išgaunama nedelsiant po mėginio paėmimo. Fiksavimo protokolų sukūrimas leidžia užtikrinti, kad net ir atokiose vietovėse surinkti mėginiai būtų saugiai transportuojami į laboratorijas su tinkama nukleorūgščių gryninimo infrastruktūra, nepažeidžiant metagenomo ir metatranskriptomą. Netinkami mėginių fiksavimo ir laikymo metodai gali sukelti DNR ir RNR degradaciją, todėl gali būti daromos klaidingos išvados apie mikrobus bendruomenės struktūrą ir atsirasti sunkumai siekiant nustatyti retas rūšis. Norint tiksliai manipuluoti ląstelėmis ir tirti biologiją vienos ląstelės skiriamąją gebą, labai reikia kurti naujus analitinius metodus, pasižyminčius dideliu jautrumu ir našumu.

Atsižvelgiant į iššūkius, susijusius su mikroorganizmų genetinės medžiagos išsaugojimu ir pavienių ląstelių tyrimų metodų tobulinimu, šiame darbe buvo analizuotos pavienių, fiksuotų bakterijų nukleorūgštys, naudojant pusiau pralaidžias kapsules. Tokia metodologija atveria galimybę išsamiai tirti mikroorganizmų heterogeniškumą, taip prisidedant prie gilesnio mikrobų bendrijų struktūros ir funkcijų supratimo vienos ląstelės lygmeniu.

Darbo tikslas:

Pritaikyti hidrogelines mikrokapsules nukleorūgščių analizei iš pavienių fiksuotų bakterijų.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti fiksuotų *Escherichia coli* MG1655, *Escherichia coli* DH5α GFP⁺ ir *Bacillus subtilis* 168 ląstelių izoliavimą į selektyviai pralaidžias mikrokapsules;
2. Parinkti su mikrokapsulėmis suderinamas lizės sąlygas fiksuotoms *E. coli* bei *B. subtilis* ląstelėms.
3. Taikant fluorescencinę mikroskopiją, įvertinti atskirų genų ir viso genomo padauginimo efektyvumą fiksuotų ir nefiksuotų bakterinių ląstelių mėginiuose;
4. Palyginti fiksuotų ir nefiksuotų bakterinių ląstelių nukleorūgščių kokybę, taikant naujos kartos sekoskaitą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nukleorūgščių analizė

Nukleorūgštys (NR) yra vienos iš pagrindinių gyvybės molekulių, plačiai paplitusios visose gyvūnų, augalų ir mikroorganizmų ląstelėse. Jos atlieka lemiamą vaidmenį augimui, genetikai ir kintamumui (Bové, 1993). NR analizė yra svarbi alternatyva tradiciniam kultivuojamų mikroorganizmų identifikavimui. Šis metodas informaciją apie rūšį pateikia per kelias valandas, kai kultivavimas gali užtrukti iki kelių dienų ar net savaičių (De Bruin & Birnboim, 2016). Po to, kai Watsonas ir Krikas 1953 m. pasiūlė DNR dvigubos spiralės struktūrą, prasidėjo spartus NR analizės metodų vystymasis, reikšmingai paspartinęs molekulinės biologijos pažangą (Watson & Crick, 1953). Per ateinančius dešimtmečius buvo sukurti NR amplifikacijos metodai, pvz., NR sekos pagrindu atliekama amplifikacija (Compton, 1991), ligazės grandininė reakcija (Wu & Wallace, 1989), transkripcijos sukelta amplifikacija (Kwoh ir kt., 1989), šakotosios DNR (Urdea, 1994) ir grandinės išstūmimo amplifikacija (Walker ir kt., 1992).

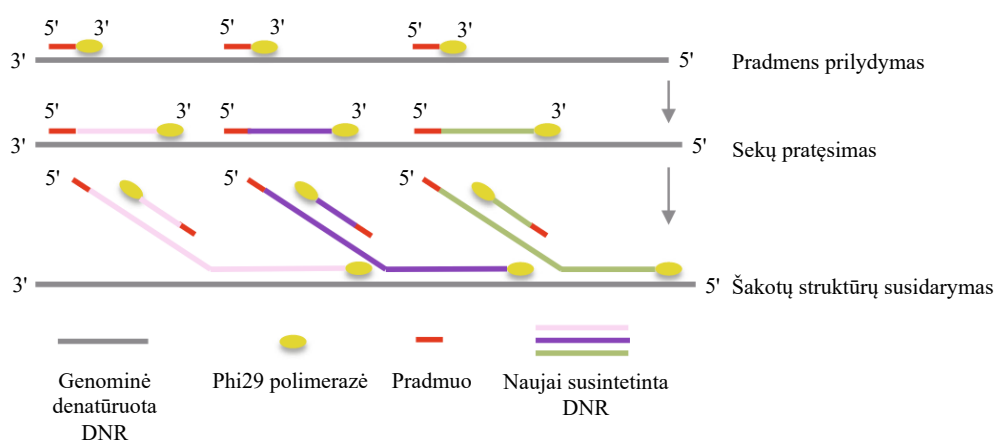
Nukleorūgščių aptikimo technologiją apima daugybė etapų, pvz., mėginio apdorojimas, NR išskyrimas, amplifikacija ir produkto aptikimas (Kricka, 1999). Pirmiausia ląstelės yra suardomos ir išskiriamos NR, kad būtų pašalinti trukdantys komponentai, tokie kaip baltymai, lipidai ir lizės reagentai (Griffiths & Chacon-Cortes, 2014). NR paruošimas iš sunkiai lizuojamų bakterijų gali būti mažai efektyvus, palyginti su lengvai lizuojamomis bakterijomis. Mėginiai surinkti iš aplinkos gali būti atsparesni lizės sąlygoms, todėl dažnai reikia optimizuoti procesą konkrečiam tyriamajam mėginiui (Shen, 2023b). Buvo aprašyti įvairūs bakterijų lizės protokolai, įskaitant cheminius (De Bruin ir kt., 2019), fermentinius (Calandra & Cole, 1980) ir mechaninius metodus (Vandeventer ir kt., 2011) arba jų kombinavimą (Yim & Rubens, 1997). Vis dėlto, itin didelis pH, chaotropinės druskos, organiniai tirpikliai arba plovikliai, gali trukdyti vėlesnei NR amplifikacijai, jei šių cheminių medžiagų negalima pašalinti (Atshan ir kt., 2012; Chomczynski & Rymaszewski, 2006; Eckert & Kunkel, 1990; Sung ir kt., 2003).

Išskyrimo ir gryninimo metodai naudojami siekiant užtikrinti, kad pagausinimui būtų prieinama aukštos kokybės, nepažeista (nedegradavus) DNR arba RNR (Chandler, 2013). Yra du pagrindiniai metodai, kuriais galima išskirti ir išgryninti NR: organinė ekstrakcija (pvz., fenolio-chloroformo ekstrakcija) ir silicio dioksido surišimo metodai (Chandler, 2013). Fenolio ir chloroformo ekstrakcijos atveju ląstelės iš pradžių lizuojamos chaotropine druska (guanidinio tiocianatu) ir plovikliu, o tada pridedamas fenolio ir chloroformo mišinys baltymams išskirti. NR nusodinamos iš vandeninės fazės alkoholiu (Chomczynski & Sacchi, 2006; Chomzynski, 1987). Boom ir kt. sukurtas silicio dioksido jungimosi metodas remiasi NR jungimusi prie silicio dioksido, esant druskai. Silicio dioksidu surišta NR atskiriama nuo ląstelių nuosėdų, po to nuplaunama ir

eliuojama į mažai druskos turintį tirpalą. Silicio dioksido jungimosi metodai leidžia gauti labai gryną NR, kurioje beveik nėra teršiančių baltymų, įskaitant nukleazes ir slopinančias medžiagas (Boom ir kt., 1990).

NR amplifikacija PGR metodu sukėlė revoliuciją biologiniuose ir mediciniuose tyrimuose, taip pat ir diagnostinėje medicinoje, o dauguma molekulinės diagnostikos tyrimų dabar remiasi tam tikra PGR forma (Chandler, 2013). Reakcija pagrįsta termiškai stabilių DNR polimerazės fermentų naudojimu DNR sekai nukopijuoti, pratęsiant prie viengrandės DNR taikinio prijungtus pradmenis. Tikslinės DNR kopijų sintezę lemia pasikartojantys ciklai, kurių metu dvigrandė DNR denatūruojama naudojant pakaitinimą, o tuomet prijungiamas ir pratęsiamas pradmuo. Šiuo metodu galima pagausinti branduolio, mitochondrijų ir citozolinę DNR, taip pat informacinę, ribosominę ir keletą nekoduojančių RNR (Shen, 2023a). Vienas iš didžiausių PGR privalumų yra tas, kad amplifikaciją galima atlikti esant mažoms DNR koncentracijoms. Vis dėlto, didelis reakcijos tyrimų jautrumas reiškia, kad nedideli pašalinės tikslinės DNR kiekiai gali lemti klaidingai teigiamus rezultatus (Remillard ir kt., 2013). Kokybiniams tyrimams su vienu molekulinio taikiniu (pvz., infekcinių ligų tyrimams) į kiekvieną tyrimo ciklą turėtų būti įtrauktos teigiamos ir neigiamos kontrolės. Šios kontrolės užtikrina, kad pradmenys veikia tinkamai bei leidžia stebėti užterštumo atvejus (Chandler, 2013). Neapdoroti preparatai, kuriuose ląstelės lizuojamos detergentais, gali būti naudojami kai kurioms molekulinėms procedūroms, tačiau dažnai netinka amplifikacijos procedūroms dėl esančių slopiklių. PGR inhibitoriai įprastai veikia tiesiogiai sąveikaudami su DNR arba termostabilioms DNR polimerazėms ir blokuoja fermento aktyvumą. DNR polimerazės turi kofaktorių, kurie taip pat gali būti kaip slopinimo taikiny. Magnis yra labai svarbus kofaktorius, o junginiai, kurie mažina Mg^{2+} prieinamumą arba trukdo Mg^{2+} prisijungimui prie DNR polimerazės, gali slopinti PGR (Chandler, 2013). Dar viena, taip pat dažnai naudojama, yra daugybinė nustūmimo reakcija (angl. *multiple displacement amplification*, MDA). Nuo pat išradimo 2002 m. (Dean ir kt., 2002), MDA yra plačiausiai naudojamas gDNR padauginimo metodas dėl daugybės privalumų: a) ilgų, persidengiančių amplikonų, kurie gerai tinka genomo sekos nustatymui ir vėlesniam *de novo* surinkimui; b) didelio phi29 polimerazės tikslumo ir c) paprastos reakcijos sąrankos, kuri sumažina klaidų, užterštumo riziką (Lasken & Stockwell, 2007; Sabina & Leamon, 2015; Woyke ir kt., 2009). Ilgų DNR fragmentų sintezei izoterminėmis sąlygomis naudojami atsitiktiniai heksameriniai pradmenys ir phi29 DNR polimerazė (Blanco ir kt., 1989; Yilmaz ir Singh, 2012). Phi29 DNR polimerazė gali išstumti pasroviui esančią 5'-galų DNR grandinę, kad pratęstų augančią 3'-galinę grandinę (Chen ir kt., 2014) bei reakcijos produktus naudoti kaip matricą naujų pradmens pratęsimo reakcijų inicijavimui taip formuojant šakotas DNR struktūras (**1.1. pav.**). Vis dėlto, šis metodas turi savų apribojimų, tokių kaip pašalinės DNR amplifikavimas, chimėrų susidarymas ir galimi šališkumai, dažniausiai susiję su polinkiu efektyviau amplifikuoti žemo GC sąstato genomo regionus

(Lasken ir Stockwell, 2007). Mokslo bendruomenė aktyviai ieško būdų šiems trikdžiams pašalinti tobulinant phi29 savybes ir/ar optimizuojant reakcijos sąlygas. Pavyzdžiui, Stepanauskas ir kt. sukūrė naują MDA paremtą WGA-X metodą, kuriame naudojo termiškai stabilesnę mutantinę phi29 polimerazę. *De novo* genomo surinkimo iš atskirų viruso dalelių, kurios buvo amplifikuotos naudojant WGA-X, sėkmės rodiklis buvo 9 kartus didesnis, palyginti su MDA. Taikant WGA-X atskiroms nekultivuotoms aplinkos mikroorganizmų ląstelėms, buvo patvirtintas geresnis genomo atkūrimas, ypač dirvožemio mikrobiomo, kuriame dominavo didelio GC kiekio genomai. Tai yra dar viena perspektyvi strategija, skirta pagerinti vienos ląstelės genomo atkūrimą (Stepanauskas ir kt., 2017).



1.1 pav. Daugybinių nustūmimo reakcijos mechanizmas. Adaptuota iš Y. Xu & Zhao, 2018.

1.1.1. Mikrobu genomika

Mikrobu genomika yra esminė molekulinės mikrobiologijos šaka, nagrinėjanti bakterijų, virusų, archėjų, grybų ir pirmuonių genetinę medžiagą (Das & Dash, 2018). Naudojant pažangius sekos nustatymo ir bioinformatikos metodus yra analizuojamas nukleotidų išsidėstymas DNR grandinėje ir genų, atsakingų už įvairius biologinius procesus, identifikavimas bei apibūdinimas (Koonin ir kt., 2021). Analizės metu siekiama ištirti pagrindinius mechanizmus, reguliuojančius mikrobu fiziologiją, metabolizmą, virulentiškumą ir prisitaikymą prie įvairių aplinkos sąlygų (Djordjevic ir kt., 2024).

Viso genomo surinkimo procese reikia įvertinti sekoskaitos duomenų kokybę, bendrą GC kiekį, pasikartojimų gausumą ar skaitymo dubliavimą (angl. *duplication*) (Ekblom ir Wolf, 2014). Genomo seka taip pat turi būti anotauta su fiziologiškai svarbiomis detalėmis ir atliekamas kompiuterinis prognozavimas (angl. *computational prediction*), tRNA sekų nustatymas arba genetinis apibūdinimas, koduojančių ir nekoduojančių regionų vietų nustatymas. Nežinomų arba nemodelinių organizmų genomų sekos lyginamos su baltymus koduojančių sekų arba transkriptų duomenų bazėmis.

Mikrobų genomų tyrinėjimui gali būti pasitelkti metodai pateikti **1.1 lentelėje**. Dažnai analizės tipai yra derinami, siekiant išsamiai suprasti mikrobų bendrijų struktūrą, funkciją ir dinamiką skirtingose aplinkose (Sikkander ir kt., 2025). Metagenomika leidžia tyrėjams įvertinti mikroorganizmų įvairovę bendruomenėje, identifikuojant ir apibūdinant mikroorganizmų genetinę medžiagą jų nekultivuojant. Tai lėmė naujų rūšių atradimą ir mikrobų įvairovės įvertinimą įvairiose ekosistemose (Sikkander ir kt., 2025). Numatoma, kad ateityje genomikos pažanga bus sutelkta į vienos ląstelės analizę. Tai leis tirti atskiras mikrobų ląsteles, siekiant atskleisti funkcinį nevienalytiškumą bei retas populiacijas sudėtingose bendruomenėse (Hosokawa ir Nishikawa, 2023).

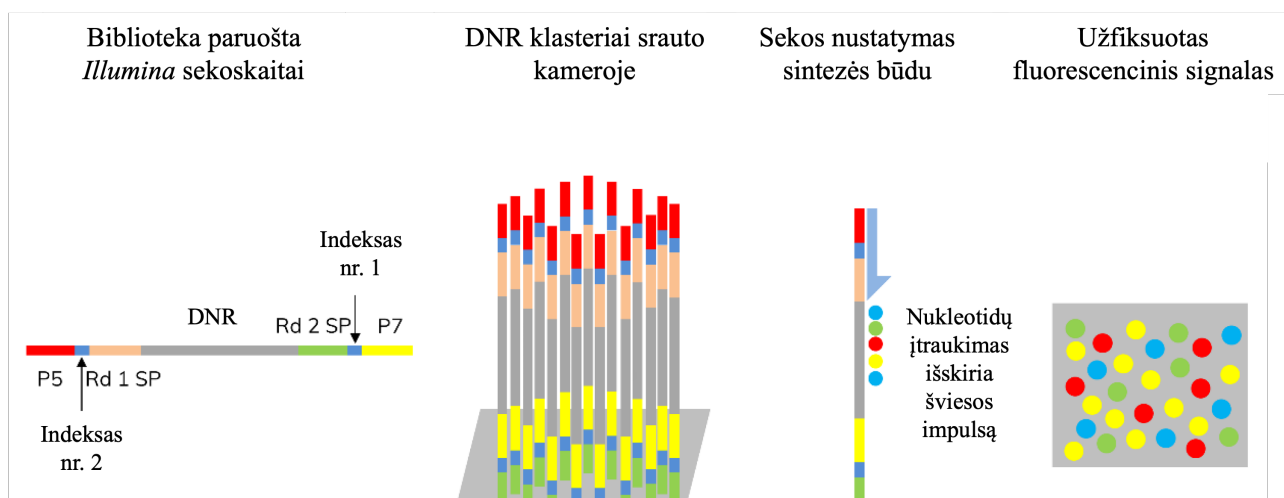
1.1 lentelė. Mikrobų genomų analizės metodai ir pritaikymas. Lentelė sudaryta remiantis Sikkander ir kt., (2025) bei Kumar ir kt., (2021) straipsniais.

Mėginio ir analizės tipas	Metodai	Pritaikymas	Trūkumai
16S rRNR genų arba kitų filogenetinių žymenų sekoskaita	Tikslinio geno amplifikacija ir sekoskaita	Taksonominis mikrobų bendruomenės profiliavimas	Nepateikia informacijos apie metabolinį aktyvumą ar funkcinius genus; ribotas taksonominis tikslumas (ypač tarp artimų rūšių); gali būti šališka dėl pradmenų pasirinkimo
Genomo analizė iš kultivuotų izoliatų	Visos genomo sekoskaitos metodai (pvz., šaudyklinė sekoskaita)	Genų anotavimas, funkcijų prognozė, reguliavimo tyrimai; fenotipo-genotipo sąsajų analizė	Reikalingas kultivavimas; kultivavimo sąlygos gali paveikti genomo stabilumą (genų praradimas); neatspindi aplinkos ar bendruomenės įvairovės
Metagenomika	Visos DNR, išskirtos iš aplinkos mėginio, sekoskaita	Visos mikrobų bendruomenės genetinės medžiagos analizė; funkcijų prognozė; naujų genų ir metabolinių kelių atradimas	Sudėtingas analizės procesas; inhibitoriai mėginyje; dideli duomenų kiekiai; artimų rūšių atskyrimui reikalinga aukštos raiškos arba ilgų skaitymų sekoskaita

1.1.2. Metagenomika

Metagenomika tiria mikroorganizmų genetinę medžiagą tiesiogiai iš aplinkos mėginių, pvz., dirvožemio, vandens ar žmogaus mikrobiomo (Jurasz ir kt., 2021). Apskaičiuota, kad net 99 % gamtoje esančių mikrobų yra nekultivuojami turimais metodais (Vartoukian, 2016). Metagenominė analizė leidžia aptikti žinomus ir nežinomus mikroorganizmus be būtinybės juos auginti in vitro ir suteikia įžvalgų apie patogeno ir šeimininko sąveiką, epidemiologiją, ekologiją ir organizmų, aptinkamų įvairiose ekosistemose, evoliuciją (Jurasz ir kt., 2021).

Viena iš dviejų metagenomikos kryptų yra pagrįsta filogenetinių žymenų genų tyrimais: 16S rRNR prokariotams, 18S rRNR eukariotams, vidinių transkribuotų tarpiklių (angl. *internal transcribed spacer*, ITS) sekos grybams ir funkciniais genais (azoto fiksacija, celiulazės ir kt.). Antroji kryptis yra netikslinė, kurios metu tiriamė suminę DNR, neišskiriant jokių specifinių regionų. Pradėjus naudoti naujos kartos sekoskaitos (NKS) technologijas, atsirado galimybė atlikti sekoskaitomis grindžiamus metagenominius tyrimus ir analizę. Tai suteikė galimybę atlikti didelio našumo sekoskaitą, kurios metu lygiagrečiai aptinkami trumpi DNR fragmentai (150–1000 bp) (Gouda ir kt., 2024; Hassan ir kt., 2023b). Sekoskaita gali būti atliekama viso genomo analizės kontekste, o mėginio praturtinimo metodai leidžia atlikti egzomo, tikslios srities, RNR ar metilinimo tyrimus. Skirtingų platformų NKS chemija skiriasi. Pavyzdžiui, *Illumina* didelio masto sekvenavimui taiko fluorescencija grįstą sekos nustatymą DNR grandinės sintezės metu. DNR fragmentai, turintys priliguotus adapterius, imobilizuojami srauto kameroje. Ten kiekvienas DNR fragmentas izotermiškai amplifikuojamas, sukuriant milijonus DNR klasterių. Klasteriai dalyvauja pradžios pradžios reakcijoje esant fluorescenciškai žymėtiems nukleotidams, kurie į grandinę įterpiami ir detektuojami po vieną. DNR sintezės ir fluorescencijos detekcijos ciklą skaičius lemia nuskaitymų ilgi (1.2 pav.) (Gouda ir kt., 2024; Hassan ir kt., 2023b).



1.2 pav. Illumina sekvenavimas sintezės būdu. DNR fragmentai imobilizuojami srauto kameroje. Kai nukleotidai įtraukiami į DNR grandinę, jie išskiria šviesos impulsus, kuriuos užfiksuoja sekoskaitos aparatas ir išveda iš kiekvieno klasterio nuskaitytas bazes kartu su kiekvienos bazės kokybės rodikliais. Adaptuota iš Hassan ir kt. (2023)

Nepaisant neabejotinų NKS technologijų privalumų, lėmusių jų plačią taikymo sritį, ši metodika turi tam tikrų apribojimų. Dėl trumpų skaitymo ilgių bei būtinybės naudoti PGR amplifikaciją, buvo pradėtos plėtoti trečiosios kartos sekoskaitos (TKS) technologijos. Nuo pirmojo prototipo TKS palaipsniui tobulino savo chemines savybes, pagerindama tiek skaitymo ilgį, tiek bazių priskyrimo tikslumą. Nepaisant to, NKS technologijos tikslesnės ir plačiau taikomos dėl gerai ištobulintų protokolų, aukšto duomenų tikslumo bei ekonomiško našumo.

Vis dėlto, metagenomika neapima nei tikslinių organizmų išskyrimo, nei turtinimo. Metagenomika iš esmės yra netikslinis metodas, o mikrobų bendruomenių, kuriose įdomi (-os) funkcija (-os) yra reta, sekvenavimas gali būti gana brangus. Tai reiškia, kad susijusios išlaidos vis tiek gali būti pernelyg didelės, norint reguliariai apdoroti didelį mėginių skaičių, ypač jei numatoma, kad taikinio gausa bus palyginti nedidelė (pvz., $<0,001\%$ visos bendruomenės) (Lindner ir kt., 2024). Iš aplinkos mėginio išskirtoje metagenominėje DNR gali būti net 10^4 – 10^5 unikalių mikroorganizmų. Dėl tokios didžiulės mikrobų populiacijos įvairovės, net dalinis genomo surinkimas yra gana sudėtingas (Tanver ir kt., 2019). Kitas svarbus metagenomikos apribojimas, kuris vis dėlto yra bendras su kitais nuo kultivavimo nepriklausomais metodais, įskaitant PGR, yra tas, kad jis negali lengvai atskirti gyvų ir negyvų ląstelių arba plikos DNR. Šis klausimas buvo plačiai aptartas literatūroje ir yra būdų, kaip selektyviai supresuoti negyvų ląstelių arba nuogos DNR amplifikavimą (pvz., naudojant propidžio monoazidą arba apdorojant mėginį DNaze), tačiau paprastai reikia atlikti papildomus veiksmus ir protokolo optimizavimą dominančiai mėginio matricai (Lindner ir kt., 2024). Taip pat, gryninant DNR pasimeta sąsajos tarp ląstelės genomo ir toje pačioje ląstelėje buvusios nechromosominės DNR. Dėl šios priežasties pastaraisiais metais tyrėjai vis daugiau dėmesio skiria vienos ląstelės metagenomikos metodui, kai tiriamos atskiros ląstelės, siekiant analizuoti biologines detales (Tanver ir kt., 2019).

1.2. Pavienių ląstelių analizė

Dėl metagenomikos trūkumų vienos ląstelės genomo sekos nustatymas tampa galingu papildomu metodu. Ši nauja technologija leidžia išskirti sudėtingas mikrobų bendruomenes į atskiras bakterijų ląsteles, todėl galima lygiagrečiai atlikti didelio našumo genetinės medžiagos sekos nustatymą iš tūkstančių pavienių bakterijų ląstelių. Biologinėse sistemose koegzistuoja nevienalytės ląstelės, pasižyminčios skirtingomis morfologinėmis savybėmis ir fenotipiniais profiliais, todėl bendras ląstelių populiacijos tyrimas negali atspindėti atskirų ląstelių elgsenos (Chen & Yang, 2022). Pagrindinis pavienių ląstelių metodo pranašumas yra tas, kad jis gali lengvai susieti medžiagų apykaitos funkcijas su konkrečiomis rūšimis. Taip pat, yra galimybė sukurti aukštos kokybės genomą rūšims, kurių gausa yra maža ir įprastai būtų prarasta naudojant metagenominės sekos nustatymo metodą (Y. Xu & Zhao, 2018).

Vienos ląstelės genomo sekos nustatymo žingsniai apima: ląstelių izoliavimą vieną nuo kitos, DNR išskyrimą, dominančio geno pagausinimą arba MDA viso genomo padauginimui, bibliotekos konstravimą, sekos nustatymą ir duomenų analizę. Atsižvelgiant į tai, kad bakterijų ląstelėje DNR kiekis įprastai yra matuojamas femtogramais, o didelio našumo sekos nustatymui reikia daugiau DNR medžiagos, viso genomo amplifikacija neretai yra esminis vienos ląstelės genomikos žingsnis.

1.2.1. Pavienių ląstelių izoliavimo metodai

Prieš pradėdant vienos ląstelės analizę, būtina ją fiziškai izoliuoti iš ląstelių mišinio. Priklausomai nuo laboratorijos galimybių ir ląstelių tipo yra parenkamas vienas iš toliau aprašytų metodų.

Fluorescencijos aktyvuotas ląstelių rūšiavimas (FACS) - tai specializuotas srauto citometrijos tipas su rūšiavimo pajėgumu. Šis metodas skirtas apibūdinti ir apibrėžti skirtingus ląstelių tipus heterogeninėje ląstelių populiacijoje remiantis dydžiu, granuliuotumu ir fluorescencija. FACS leidžia vienu metu atlikti kiekybinę ir kokybinę pavienių ląstelių daugiaparametrinę analizę (Gross ir kt., 2015). Prieš atskyrimą pagaminama ląstelių suspensija ir tikslinės ląstelės pažymimos fluorescenciniais zondais. Kai ląstelių suspensija teka per citometrą, kiekviena ląstelė veikiama lazeriu, kuris leidžia fluorescencijos detektoriams identifikuoti ląsteles pagal pasirinktas charakteristikas. Iš pradžių FACS buvo plačiai naudojamas išskirti labai grynas ląstelių populiacijas, tačiau Schulz ir kt., aprašė, kad šį metodą galima pritaikyti ir pavienių ląstelių rūšiavimui (Schulz ir kt., 2012). Vis dėlto, nors FACS yra plačiai naudojamas tiek moksliniuose, tiek klinikiniuose tyrimuose, metodas turi ir keletą ribojančių trūkumų. Pirma, FACS reikalingas didžiulis pradinis ląstelių skaičius (daugiau nei 10 000) suspensijoje, todėl nėra galimybės atskirti pavienių ląstelių iš mažo pradinio ląstelių kiekio. Antra, greitas prietaiso srautas gali pakenkti rūšiuojamų ląstelių gyvybingumui (Hu ir kt., 2016).

Lazerinio fiksavimo mikrodisekcija (LCM) yra pažangi technologija, skirta išskirti grynas ląstelių populiacijas arba pavienes ląsteles iš daugiausia kietų audinių mėginių mikroskopo stiklėlyje (Emmert-Buck ir kt., 1996). Pagrindinis LCM principas prasideda dominančių ląstelių vizualizavimu per invertuotą mikroskopą. Tada perduodamas fiksuotos padėties trumpalaikis ir sufokusuotas lazerio impulsas, kad ištirtų plona skaidri termoplastinė plėvelė ant dangtelio virš tikslinių ląstelių. Plėvelė išsilydo ir susilieja su pasirinktomis apatinėmis ląstelėmis. Kai plėvelė pašalinama, tikslinės ląstelės lieka surištos su plėvele, o likęs audinys paliekamas. Galiausiai ląsteles galima perkelti į mėgintuvėlį, kuriame bus atliekama tolimesnė analizė (Kummari ir kt., 2015). LCM metodai gali būti taikomi histologiniams ir augalų mėginiams, gyvoms ląstelėms ir ląstelių kultūroms, teismo medicinos preparatams, formalinu fiksuotiems parafinuotiems (FFPE) arba šviežiai šaldytiems audiniams, taip pat dažytiems arba nedažytiems audiniams („Laser Capture Microdissection“, 2015). Kadangi prieš

analizę audiniai dažnai būna fiksuoti, LCM pagrįsti metodai turi pranašumą dėl galimybės analizuoti mėginius be kontakto ir toksiško pavojaus žmogui. Kiti LCM privalumai yra greitis, tikslumas ir universalumas. Mažos galios lazerio sukurta plėvelė ir šiluma neturi įtakos DNR, RNR ar baltymų vientisumui. Vis dėlto, mažiausias 7,5 μm lazerio taško dydis riboja vienos ląstelės arba tarpląstelinės mikrodisekcijos tikslumą. Mažas ląsteles gali būti sunku išskirti, neužteršiant gretimų ląstelių fragmentų („Laser Capture Microdissection“, 2015). Nors LCM plačiai taikoma žmogaus ar gyvūnų audinių tyrimuose, mikroorganizmams ji taikoma rečiau.

Rankinis ląstelių rinkimas / mikromanipuliacija yra paprastas, patogus ir efektyvus pavienių ląstelių izoliavimo būdas. Panašiai kaip LCM, rankiniai ląstelių rinkimo mikromanipulatoriai taip pat susideda iš invertuoto mikroskopo, sujungto su mikropipetėmis, kurios juda motorizuotomis mechaninėmis pakopomis. Kiekviena atskira ląstelė gali būti stebima ir nufotografuojama mikroskopu prieš pasirenkant ją perkelti tolimesniai analizei. Dėl mažo našumo, labai didelių darbo jėgos poreikių, didelio potencialo mechaniniams pažeidimams ir didelio ląstelių identifikavimo klaidų lygio mikromanipuliacijos metodas nesuteikia didelio masto pritaikymo ir tolesnio komercializavimo galimybių (Yasen ir kt., 2020).

Lašeliais paremtos mikroskysčių technologijos tikslas yra generuoti diskrečius skysčių kiekius nesimaišančiose fazėse ir jais manipuluoti. Pavyzdžiui, generuoti aliejaus vandenyje (A/V) arba vandens aliejuje (V/A) lašelius. Ši technologija pasižymi keliais privalumais, įskaitant didelę mažų skysčių tūrių (10^{-9} – 10^{-18} L) ir lašelių charakteristikų kontrolę, galimybę atlikti didelio našumo eksperimentus (Teh ir kt., 2008). Per pastaruosius du dešimtmečius (McClain ir kt., 2003; Wheeler ir kt., 2003) ši technologija buvo naudojama analizuojant nanometrų ir mikrometrų dydžio mėginius, tokius kaip molekulės, dalelės, virusai, ląstelės, egzomosos. Ląstelių dažnis išsklaidytoje fazėje atitinka Puasono pasiskirstymą (Collins ir kt., 2015), todėl tik dalyje sukurtų mikrolašelių bus viena ląstelė, palyginti su tuščių mikrolašelių ir lašelių, kuriuose yra dvi ar daugiau ląstelių, populiacijomis. Šis metodas sulaukė didelio susidomėjimo, nes ląstelių biologinių tyrimų dėmesys buvo perkeltas nuo ląstelių populiacijų tyrimo prie eksperimentų su vienos ląstelės skiriamąja geba (Matuła ir kt., 2020). Lašelių stabilizavimas emulsikliais veiksmingai apsaugo nuo kryžminio užteršimo. Integruojant molekulinės analizės metodus, tokius kaip PGR (D. Xu ir kt., 2023), RNR sekos nustatymą (Žilionis ir kt., 2017) ir proteomiką (Zhu ir kt., 2018), lašelių pagrindu veikianti mikroskysčių sistema gali sukurti veiksmingą molekulinio profiliavimo ir diagnostikos platformą. Ši platforma integruoja operacijas nuo ląstelių atskyrimo iki genų ekspresijos analizės. Išsamūs tyrimų duomenys gali būti panaudojami ląstelių heterogeniškumo ir ligų mechanizmų tyrimams (Sart ir kt., 2022; Zhao ir kt., 2017; Zhu ir kt., 2018). Vis dėlto, naudojant skysčių lašelius kaip vienos ląstelės kapsuliavimą mikrobinių ląstelių DNR sekos nustatymo taikymams kyla iššūkių. Kai susidaro lašelis, jo turinį galima tik atskiesti, o ne visiškai pakeisti, o tai riboja lankstumą tolesniuose apdorojimo

etapuose, pvz., norint pašalinti nereikalingas medžiagas. Be to, lizės, amplifikacijos ir barkodavimo reagentai kiekviename etape turi būti suderinami, o tai riboja jų pasirinkimą. Reagento pridėjimas prie ląselių yra praktiškai sudėtingas ir reikalauja mokymų, kaip atlikti pažangias ląselių manipuliacijas, tokias kaip pakartotinis įpurškimas, pikoinjekcija arba ląselių sujungimas (Ling ir kt., 2025).

1.2.2. Pusiau pralaidžios kapsulės

Mikroskysčių ląselių apribojimus inovatyviai apėjo pusiau pralaidžių kapsulių technologija (PPK). Kapsulės yra struktūros, susidarančios emulguojant du nesimaišančius polimerų tirpalus ląseliuose. Kai susidaro vandeninga dviejų fazių sistema, vienas polimeras yra ląselio periferijoje. Ląselių pokytį į PPK struktūrą lemia tolimesniame etape apvalkale vykstantis reakcijos tipas. Praktikoje dažniausiai naudojami: kryžminis susiejimas (angl. *crosslinking*), joninis (Choi ir kt., 2007; Workman ir kt., 2007; Ahmed ir Stokke, 2021), fotopolimerizacinis (Zhao ir kt., 2016; Mohamed ir kt., 2019) ir termiškai reaguojantis tipas (Tiemeijer ir kt., 2021; Zhang ir kt., 2021). Įprastai reakcija atliekama vienu iš dviejų būdų: kryžminio susiejimo ant lusto ir mėgintuvėlyje (Mohamed ir kt., 2019).

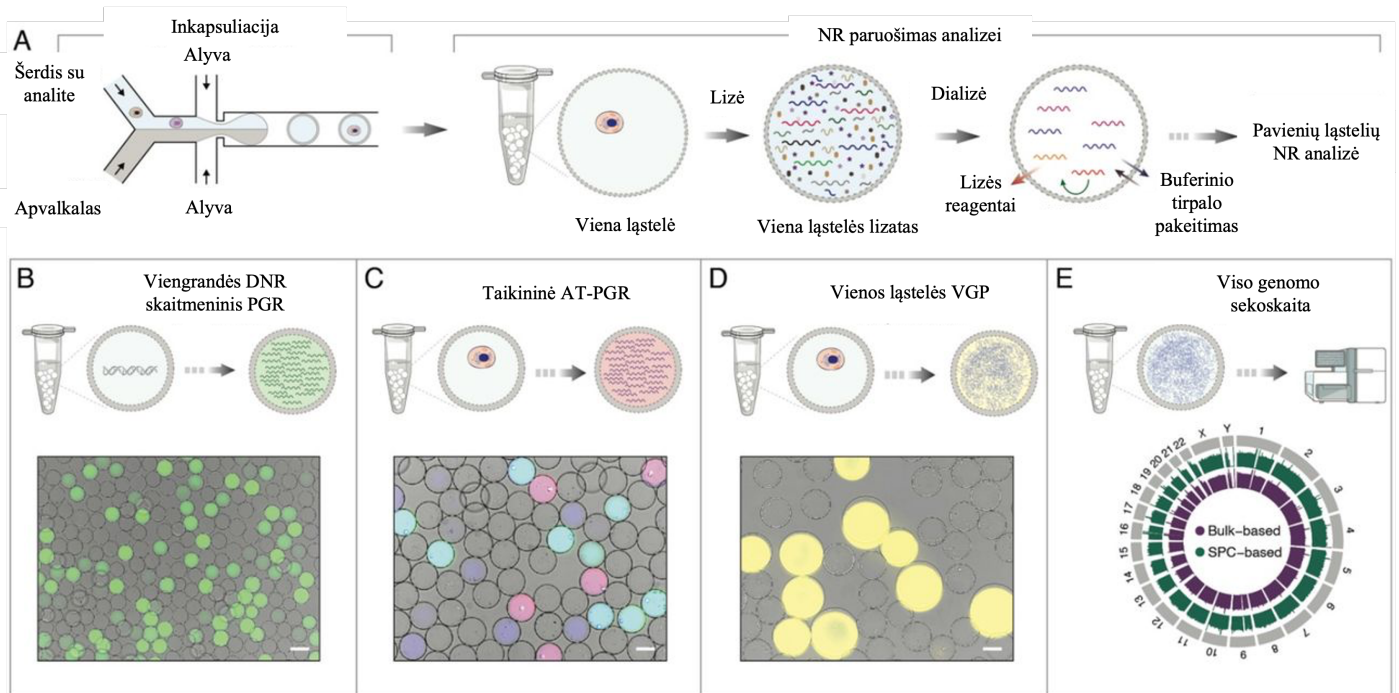
Cheminė apvalkalo sudėtis gali būti parinkta taip, kad būtų selektyviai pralaidi mažoms molekulėms, įskaitant baltymus, druskų jonus, mažus metabolitus, nukleotidus ir oligonukleotidus. Taip pat, kartu selektyviai sulaikytų didesnes makromolekules, tokias kaip kDNR, gDNR ar iRNR (Leonaviciene & Mazutis, 2022). Kapsulės apvalkalo pagrindą gali sudaryti sintetiniai polimerai, tokie kaip polietilenglikolis (PEG) (Leonaviciene ir kt., 2020) arba natūralūs polimerai, tokie kaip želatina (Leonaviciene & Mazutis, 2022). Želatinos pagrindu pagaminti apvalkalai leidžia kontroliuojamai išlaisvinti jų turinį švelniai apdorojant fermentais, tačiau tai apriboja eksperimentus, pavyzdžiui, ląselių lizę, kuriai naudojamos proteinazės (Leonaviciene & Mazutis, 2022). Ir atvirkščiai, PEG pagrindu pagamintos PPK yra stabilios esant platesniam sąlygų spektrui, tačiau jų turinio išlaisvinimui reikalingas mechaninis arba šarminis apdorojimas, naikinantis ląsteles (Leonaviciene ir kt., 2020).

PPK, panašiai kaip porėti hidrogelio rutuliukai (Jo & Lee, 2020), suteikia galimybę vykdyti daugiapakopę reakcijas aukštu našumu, nes reikiamus tyrimo reagentus galima pridėti arba pašalinti paprastu buferio keitimu (**1.3 pav.**). Tačiau, priešingai nei hidrogelio rutuliukai, kai kapsuliuotos ląstelės arba jų genetinė medžiaga yra įsipainiojusi į hidrogelio tinklą, PPK viską laiko skystoje šerdyje, apgaubtoje stabilium hidrogelinium apvalkalu. Dėl šios priežasties kapsulės šerdyje esančios ląstelės ir biomolekulės nepatiria sterinių kliūčių, kaip į gelio fazę įterptos biomolekulės (Amsden, 1998; Johnston & Deen, 1999), todėl galima tikėtis aukštesnio biocheminių reakcijų ir molekulinų sąveikų efektyvumo. Taip pat, viena iš išskirtinių PPK savybių yra ir jų atsparumas. Kapsulės atlaiko

įprastas laboratorines operacijas, įskaitant pipetavimą, centrifugavimą, daugybę užšaldymo-atšildymo ciklų ir aukštą temperatūrą (pvz., 98 °C). Kapsulių apvalkalas yra mechaniškai ir chemiškai atsparus, o prireikus išgryninti viduje esantį mėginį, kapsulių apvalkalą galima suskaidyti fermentinių reakcijų pagalba (fermento pasirinkimas priklauso nuo apvalkalo polimero cheminės sudėties). Kitas palankus PPK bruožas yra jų gebėjimas išlaikyti ilgesnius nei 300 bp DNR fragmentus, tuo pačiu leidžiant tyrimo reagentams ir baltymams pasklisti (Leonaviciene & Mazutis, 2022).

Atsižvelgiant į selektyvų nukleino rūgščių sulaikymą (>300 bp) ir pralaidumą baltymams (<200 kDa), PPK gali būti naudingos įvairiems biocheminiams ir ląsteliniams tyrimams (Baronas ir kt., 2025). Šerdyje galima efektyviai izoliuoti ir išlaikyti žinduolių, bakterijų ląsteles bei atlikti daugiapakopės reakcijas, reikalingas nukleino rūgščių gryninimui, amplifikacijai ir skaitmeninei analizei (Leonaviciene & Mazutis, 2022). Šios savybės išplečia genominių tyrimų, kuriuos galima atlikti su pavienėmis ląstelėmis ir gyvomis ląstelių kultūromis, spektrą ir suteikia universalią technologinę platformą, kuri gali leisti lygiagretinti tyrimus, kuriuos iki šiol buvo sunku ir brangu atlikti dideliu našumu. Be to, šis naujas metodas įveikia daug pastangų reikalaujančius manipuliavimo lašeliais būdus ir padidina vienos ląstelės genomo analizės našumą (Ling ir kt., 2025). Nors manipuliuojant lašeliais taip pat galima atlikti daugiapakopės procedūras, tačiau tai sudėtingas ir specifinių instrumentų reikalaujantis procesas. Darbas su jau suformuotomis kapsulėmis yra paprastas ir nereikalauja specialios įrangos.

Be nukleino rūgščių analizės, PPK technologija palaiko ląstelių augimą ir taip įveikia didelį lašelių mikroskysčių apribojimą (Baronas ir kt., 2025). Lašelis yra visiškai izoliuotas nuo aplinkos, todėl greitai išsenka maisto medžiagų kiekis, o besikaupiantys toksinai ir metabolitai sudaro nepalankią aplinką augimui. Tuo tarpu kapsulėse maistinių medžiagų ir metabolitų difuzija dėl selektyvaus apvalkalo pralaidumo vyksta nuolatos. Mikroorganizmai, tokie kaip bakterijos ir mielės, kapsulėse gali būti veiksmingai išplėsti į izogenines mikrokolonijas ir toliau analizuojami. Įdomu tai, kad besidalijančioms ląstelėms užpildant visą kapsulės tūrį ir toliau plečiantis, korpuso elastingumas palaiko kapsulės vientisumą, leidžiantį jam išsipūsti daugiau nei 2 kartus (Baronas ir kt., 2025). Vienintelis apribojimas ląstelėms kapsulėse yra fizinis tūris.



1.3 pav. NR analizės galimybės naudojant PPK technologiją. A) Pavienių ląstelių NR tyrimų strategija naudojant PPK. Pirmiausia pavienės dominančios analizės izoliuojamos į PPK naudojant didelio našumo mikroskysčių technologiją. Tolimesni etapai atliekami įprastame laboratoriniame mėgintuvėlyje, apdorojant visas PPK vienu metu. B) Vienos DNR molekulės amplifikacija ir analizė skaitmeninės PGR metodu (dažymo dažai: SYBR Green I). C) Daugiafunkcinė vienos ląstelės RT-PGR, nukreipta į transkriptus, koduojančius CD45, su YAP ir β -aktiną. Ląstelės, ekspresuojančios ir CD45, ir ACTB, yra žydros, YAP ir ACTB – rožinės, o vien ACTB – mėlynos spalvos. D) Žmogaus limfoblastų ląstelių (K-562) vieno genomo amplifikacija phi29 DNR polimeraze ir dažymas SYTO dažais (geltonais). PPK, kuriuose yra pavieniai amplifikuoti genomi, atrodo didesni dėl pabrėžimo. E) PPK inkapsuliuotų limfoblastų ląstelių viso genomo sekoskaitos žemėlapis. Mastelio juostos, 50 μ m. Adaptuota iš Baronas ir kt. (2025)

1.3. Mėginių fiksavimas

Ląstelėje vykstančių procesų supratimas yra svarbus žingsnis daugelyje ląstelių biologijos ir medicinos aspektų (Hobro & Smith, 2017). Nors idealu būtų gauti informaciją apie biomolekulių sudėtį ir pasiskirstymą iš gyvų ląstelių matavimų realiu laiku, yra labai nedaug metodų, kuriais būtų galima tai pasiekti. Ląstelių arba audinių fiksavimo tikslas yra išlaikyti mėginius kuo panašesnius į pirminę gyvą būseną, kad būtų galima patikimai atlikti tolimesnę analizę. Tai ypač aktualu klinikinėje aplinkoje, kur per gydytojo vizitą arba chirurginės procedūros metu paimami ląstelių mėginiai, kurie vėliau siunčiami į kitą vietą. Ląstelių mėginių tiekimas audinių bankuose taip pat reikalauja veiksmingo mėginių fiksavimo, nes tarp mėginių paėmimo ir analizės gali praeiti mėnesiai ar metai. Fiksuoti mėginiai turėtų atlaikyti sekančius analizės etapus, išsaugoti nepakitusią ląstelių morfologiją, biocheminę būklę ir vienodą ląstelių skaičių (Hopwood, 1985). Norint parinkti perspektyvius fiksavimo metodus buvo atlikta daugybė tyrimų, skirtų įvertinti skirtingų metodų veiksmingumą fiksuojant įvairias ląsteles ar audinius (Suthipintawong ir kt., 1996; Hoetelmans ir kt., 2001; Moloney

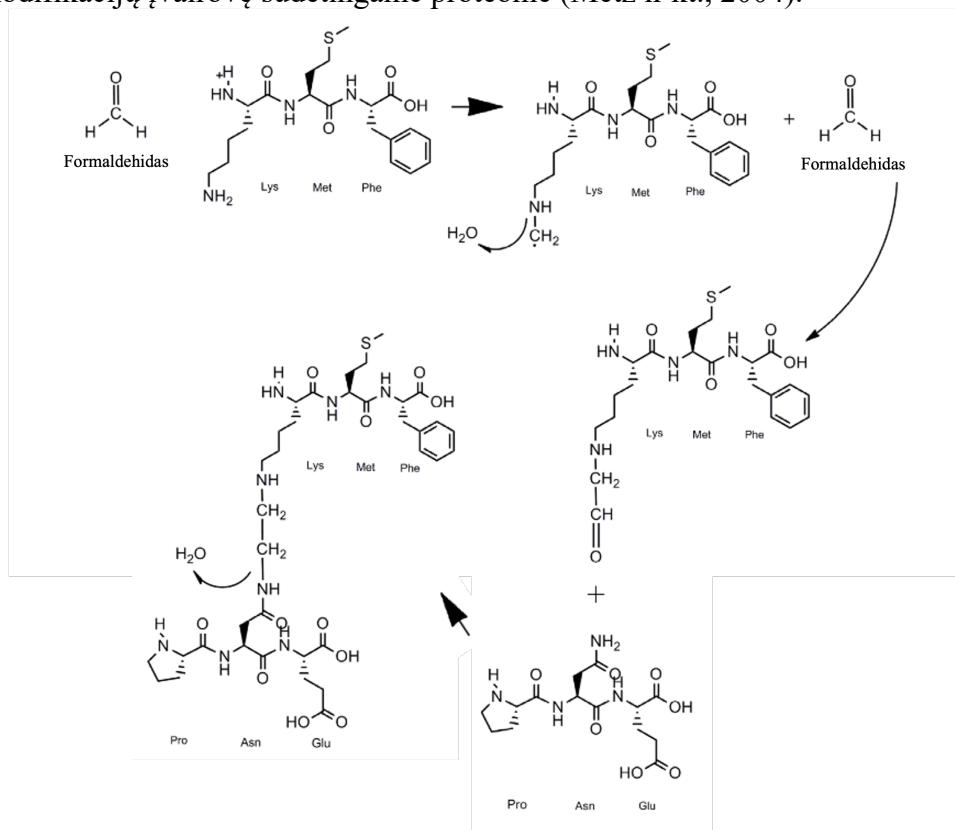
ir kt., 2004; Vekemans ir kt., 2004; Celie ir kt., 2005; St-Laurent ir kt., 2006; Meade ir kt., 2010). Deja, daugiausia tyrimų buvo skirti gyvūnų, žmonių ląstelėms ar audiniams. Buvo įrodyta, kad įvairių ląstelių tipų fiksavimui tinka aldehidai ir alkoholiai, pradedant žmogaus kraujo ląstelėmis ir baigiant bakterijomis (Morel ir kt., 1971, Shapiro, 2002), tačiau jie taip pat turi keletą trūkumų, susijusių su tolimesne ląstelių analize (Günther ir kt., 2008). Vis dėlto, norint praplėsi žinias apie mikrobu įvairovę, ekologiją ir evoliuciją svarbu ištirti ir prokariotinių ląstelių fiksavimo galimybes, kurios leistų pagerinti genominių tyrimų patikimumą ir atkuriamumą (Bharti ir Grimm, 2021).

Fiksavimo būdus pagal veikimo tipą galima suskirstyti į dvi grupes: kovalentiškai surišančią (angl. *additive*) ir denatūruojančią (St-Laurent ir kt. 2006). Kovalentiškai surišančiuose tirpaluose yra įvairių aldehidų, įskaitant formaldehidą, paraformaldehidą, glutaraldehidą ir kt., kurie gali sukurti kryžminius susiuvimus tarp baltymų ir nukleorūgščių (Dapson, 2007). Šiuo metodu galima išsaugoti natūralią baltymų struktūrą, t.y. antrines ir tretines struktūras (Meade ir kt. 2010). Denatūruojančios fiksacijos metu baltymai yra išsodinami ir taip sumažinamas jų tirpumas ir (arba) sutrikdoma hidrofobinė sąveika. Tretinė baltymų struktūra modifikuojama bei inaktyvuojami fermentai (St-Laurent ir kt., 2006). Išsodinimui dažniausiai naudojami alkoholiai, tokie kaip metanolis ir etanolis. Vis dėlto, praktikoje alkoholiai yra rečiau naudojami, nes dėl dehidratacijos sukelia rimtą ląstelių susitraukimą. Kiti denatūruojantys chemikalai, tokie kaip acetonas ir acto rūgštis, paprastai yra derinami su alkoholiais, kad pagerintų fiksavimo efektyvumą (Moloney ir kt., 2004). Mėginių laikymas žemoje temperatūroje, įskaitant užšaldymą, taip pat yra plačiai taikomas mėginių fiksavimui, nes tokiomis sąlygomis sumažėja bendras mikrobu metabolizmas ir fermentų aktyvumas.

1.3.1. Kovalentiškai surišanti fiksacija naudojant aldehidus

Aldehidai yra plačiai naudojami reagentai biochemijos, biomedicinos ir farmacijos srityse. Pavyzdžiui, formaldehidas naudojamas toksinams ir virusams inaktyvuoti, kad būtų galima gaminti vakcinas nuo tokių ligų kaip difterija, stabligė, hepatitas A, juodligė ir kt. (Leppla ir kt., 2002; Levine ir kt., s.a.; Mordin ir kt., 1996). Formaldehido fiksavimo pranašumas yra tas, kad fiksuoti audiniai gali būti laikomi kambario temperatūroje dešimtmečius, nesijaudinant dėl degradacijos (O'Rourke & Padula, 2016). XX a. viduryje buvo atlikti išsamūs formaldehido reakcijos su aminorūgščių ir jų darinių mišiniais tyrimai, siekiant nustatyti, kurios aminorūgštys gali reaguoti kryžmiškai (Fraenkel-Conrat & Olcott, 1948a, 1948b). Įrodyta, kad formaldehidas pirmiausia reaguoja su aminorūgščių amino ir tiolio grupėmis ir sudaro metilolio darinius. Pirminių amino grupių atveju metilolio grupės iš dalies kondensuojasi iki imino, dar vadinamo Šifo baze (**1.4 pav**). Vėliau iminas gali susijungti su glutamino, asparagino, triptofano, histidino, arginino, cisteino ir tirozino liekanomis (Kelly ir kt., 1977). Conrat ir kt. pažymėjo, kad 70 °C temperatūroje formaldehidas taip pat reaguos su guanidilo grupėmis, sudarydamas metileno grupes, o tai sutapo su Middlebrook ir Phillips išvadomis 1942 m.

tyrime (Middlebrook & Phillips, 1942). Jie taip pat nustatė, kad 70 °C temperatūroje formaldehidas gali kondensuotis su tioliu, redukuotu iš disulfidinės grupės, sudarydamas metileno kryžminį ryšį (Middlebrook & Phillips, 1942). Šių reakcijų analizė nebuvo dar kartą atlikta iki 2004 m., kai Metz ir kt. (Metz ir kt., 2004) nusprendė pakartoti šį darbą naudodami masės spektrometriją reakcijos produktų analizei. Tyrimų išvados labai glaudžiai siejosi su Conrat ir kt. (Fraenkel-Conrat & Olcott, 1948b) ir kartu sudarė tvirtą pagrindą suprasti galimų nuo sekos priklausomų cheminių baltymų modifikacijų įvairovę sudėtingame proteome (Metz ir kt., 2004).



1.4 pav. Baltymų kryžminis susiuvimas formaldehido indukuotais metileno tilteliais.

Formaldehidas pirmiausia kovalentiškai prisijungia prie pirminio lizino amino grupės kondensacijos reakcijos būdu. Susidariusi aminometilolio grupė vėliau prisijungia prie kitos laisvos formaldehido molekulės, sukurdamą atvirą reaktyviąją deguonies grupę. Šiame pavyzdyje ji toliau kondensuojasi su laisva asparagino pirmine amido grupe, sudarydama stabilų metileno kryžminę jungtį. Taip pat pranešama, kad antrasis kondensacijos etapas vyksta su arginino, glutamino, histidino, triptofano ir tirozino šoninėmis grandinėmis. Adaptuota iš Rourke ir kt. (2016)

Nors fiksavimas aldehidais puikiai tinka norint sukurti stabilų mėginį, tai sukelia problemų atkuriant bet kurią iš fiksuotų molekulių. Fiksuotos DNR kokybė yra prastesnė, tiek dėl pačios DNR molekulės fragmentacijos, tiek dėl sukulto kryžminio susiuvimo su baltymais (Campos & Gilbert, 2012). Gali būti ir kitų pažeidimų, kurie nėra lengvai pastebimi, tačiau turi įtakos NR gebėjimui tarnauti kaip matrica (angl. *template*) biocheminėse reakcijose. Dėl to atliekant tokios medžiagos genetinę analizę rekomenduojama apsiriboti santykinai trumpų, potencialiai amplifikuojamos DNR fragmentų tyrimu. Paprastai ilgas fiksacijos laikas, ypač ilgesnis nei 12–24 val., rūgštinės pH

fiksatoriai ir laikymas šiltoje aplinkoje prisideda prie DNR irimo (Shi ir kt., 2002a). Keletas tyrėjų pastebėjo, kad formaldehido pagrindu atliekamos fiksacijos temperatūra yra labai svarbi – 4 °C temperatūroje išsaugoma daugiau didelės molekulinės masės DNR nei kambario temperatūroje (Gillespie ir kt., 2002; Noguchi ir kt., 1997; Srinivasan ir kt., 2002). Literatūroje teigiama, kad sunku panaikinti fragmentacijos poveikį, todėl akcentuojamasi į kryžminių ryšių nutraukimą, kurį galima įvykdyti naudojant temperatūrinį, šarminį apdorojimą, arba abu. Shi ir kt., 2002 parodė, kad kaitinimas aukštesnėje temperatūroje esant šarminėms pH vėrtėms gali duoti didesnę aukštos kokybės genomines DNR išėigą. Stipriai šarminis tirpalas gali denatūruoti ir hidrolizuoti baltymus, dėl ko gali plyšti ląstelių ir branduolių membranos, taip pat nutrūkti formalino fiksacijos sukelti kryžminiai ryšiai (Shi ir kt., 2002a). Be to, Coombs ir kt. atliko tyrimą, kad kaitinimas 90–99 °C temperatūroje termocikleryje, mikrobangų krosnelėje ir paprastas virinimas 0,5 % Tween-20, Tris-EDTA, Chelex-100 tirpale žymiai padidino NR ekstrakcijos efektyvumą (Shi ir kt., 2002a). DNR išskyrimas iš formalinu fiksuoto, parafinu įlieto audinio taip pat buvo atliktas naudojant proteinazę K ir SDS kaip pagrindinius reagentus (Goelz ir kt., 1985; Shi ir kt., 2002b).

Vis dėlto, šių žinių nepakanka, kad būtų galima numatyti visas galimas baltymų modifikacijas, kurias sukelia aldehydai. Be to, modifikacijų susidarymui įtaką daro įvairūs veiksniai, tokie kaip konkrečios kryžminio ryšio reakcijos greitis, kiekvienos reaktyvios aminorūgšties padėtis ir vietinė aplinka baltyme, pH, reakcijos tirpale esantys komponentai ir reagentų koncentracija (Fraenkel-Conrat & Olcott, 1948a, 1948b).

1.3.2. Denatūruojanti fiksacija naudojant organinius tirpiklius

Organiniai tirpikliai, tokie kaip metanolis, acetonas ir etanolis, fiksuoja ląsteles baltymų dehidratacijos ir nusodinimo būdu. Tirpale esantis alkoholis sukelia baltymų denatūraciją, nes pašalina vandenį iš laisvųjų karboksilo, hidroksilo, amino, amido ir imino grupių (Howat & Wilson, 2014). Organiniai tirpikliai prieš naudojimą yra atšaldomi, o fiksavimas vykdomas žemoje (-20 °C) temperatūroje. Dehidratacijos efektą galima panaikinti vienu paprastu rehidratacijos etapu, pavyzdžiui, plaunant PBS buferiniu trpalu.

Įrodyta, kad šie junginiai NR kiekį ląstelėse fiksuoja efektyviau nei aldehydų pagrindu pagaminti fiksatoriai (Gillespie ir kt., 2002; Noguchi ir kt., 1997; Srinivasan ir kt., 2002). Vis dėlto, dehidratacijos procesas gali neigiamai paveikti ląstelės membranos vientisumą, sukelti citoplazminių organelių ar branduolio turinio praradimą, taip pat pažeisti ląstelės struktūrinius komponentus, tokius kaip mikrovamzdeliai (Hoetelmans ir kt., 2001). Dėl šių galimų pažeidimų fiksavimo metodo pasirinkimas turėtų būti grindžiamas planuojamos tolesnės analizės tikslais ir reikalavimais.

Organiniai tirpikliai taip pat inicijuoja permeabilizacijos procesą, kurio metu iš ląstelės membranos pašalinami lipidai. Permeabilizacija – tai procesas, kurio metu ląstelės membrana tampa

labiau pralaidi ir didesnės molekulės, kurios įprastai nepatektų pro nepažeistą membraną, gali prasiskverbti į citoplazmą ir pasiekti viduląstelinius taikinius (Jamur & Oliver, 2010). Taikant aldehidais pagrįstus fiksavimo metodus, permeabilizacija dažniausiai atliekama kaip antrasis etapas, sekantis po fiksacijos. Mokslinėje literatūroje pateikiami duomenys rodo, kad toks dviejų etapų kombinavimas – pavyzdžiui, paraformaldehido fiksacija, po kurios atliekama metanolio pagrindu vykdoma permeabilizacija – gali būti itin efektyvus būdas užtikrinti antikūnų ar dažiklių patekimą į ląstelės vidų. Toks medžiagų kombinavimas gali sumažinti ląstelės struktūrų pažeidimų riziką, lyginant su procedūromis, kuriose metanolis naudojamas kaip vienintelis fiksavimo ir permeabilizacijos agentas (Hoetelmans et al., 2001).

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Karolina Titaitytė

Magistro baigiamasis darbas

Hidrogelinių mikroapsulių pritaikymas nukleorūgščių analizei iš pavienių fiksuotų bakterijų

SANTRAUKA

Pavienių ląstelių sekoskaita yra galingas įrankis mikroorganizmų tyrimuose, nes leidžia atskleisti ląstelių heterogeniškumą, identifikuoti retas populiacijas ir analizuoti genų raišką individualiu lygmeniu. Pusiaus pralaidžių kapsulių technologija suteikia galimybę atlikti pavienių ląstelių nukleorūgščių analizei reikalingas daugiapakopės reakcijas aukštu našumu. Idealiu atveju informacija apie biomolekulių sudėtį ir pasiskirstymą iš gyvų ląstelių matavimų turėtų būti gaunama realiu laiku, bet yra nedaug metodų, kuriais būtų galima tai pasiekti. Nors mokslininkai nemažai fokusuojasi į fiksavimo protokolų kūrimą, duomenų apie fiksavimo medžiagų poveikį ir laikymo sąlygas mikrobų bendruomenėms vis dar yra nedaug.

Nukleorūgščių prieinamumas yra pagrindinis kriterijus siekiant gauti geros kokybės sekoskaitos duomenis, todėl šiame darbe buvo išbandytos įvairios ląstelių suardymo sąlygos. Atliekant fiksavimą paraformaldehidu yra suformuojami kryžminiai susiuvimai tarp baltymų ir kitų biomolekulių, dėl ko ląstelės apvalkalai tampa standesni ir mažiau pralaidūs lizės reagentams. Optimizavus fiksuotų bakterijų lizę kalio šarmu, buvo išsikeltos dvi sekoskaitos kryptys: viso genomo ir tikslinių AmpR ir 16S rRNR genų. Išanalizavus sekoskaitos duomenis nustatyta, kad išgautos genetinės informacijos pavienių ląstelių lygiu kokybė fiksuotuose mėginiuose yra sumažėjusi. Analizėje atsispindėjo nuskaitymų skaičiaus skirtumai tarp fiksuotų ir nefiksuotų bakterijų, o referentinio genomo padengimas skyrėsi eilėmis. Siekiant sudaryti sąlygas jautriems pavienių fiksuotų ląstelių tyrimams ateityje, reikėtų atlikti lizės, DNR taisymo ir kryžminių ryšių suardymo optimizavimą.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Karolina Titaitytė

Master's thesis

**Application of Hydrogel Microcapsules for Nucleic Acid Analysis from Fixed Single
Bacterial Cells**

ABSTRACT

Single-cell sequencing is a powerful tool in microbiological research, as it enables the exploration of cellular heterogeneity, the identification of rare populations, and the analysis of gene expression at the individual cell level. The technology of semi-permeable capsules allows for high-throughput, multi-step reactions necessary for single-cell nucleic acid analysis. Ideally, information about biomolecular composition and distribution would be obtained from live-cell measurements in real time; however, few methods currently exist to achieve this. Although considerable scientific effort has been devoted to developing fixation protocols, data on the effects of fixatives and storage conditions on microbial communities remain limited.

The accessibility of nucleic acids is a key criterion for obtaining high-quality sequencing data. For this reason, various cell lysis conditions were tested in this study. Fixation with paraformaldehyde leads to the formation of cross-links between proteins and other biomolecules, resulting in a stiffer and less permeable cell envelope that hampers lysis reagent efficiency. Following optimization of the lysis conditions for fixed bacteria using potassium hydroxide, two sequencing approaches were pursued: whole-genome sequencing and targeted sequencing of *AmpR* and 16S rRNA genes. Analysis of the sequencing data revealed that the quality of genetic information retrieved from fixed samples at the single-cell level was reduced. Significant differences in the number of reads between fixed and unfixed bacterial samples were observed, and reference genome coverage differed by orders of magnitude. To enable sensitive analysis of fixed single cells in future applications, further optimization of lysis protocols, DNA repair strategies, and cross-link reversal techniques is required.