



原核转录、宏转录、互作转录组

演讲人：罗鑫 百迈客产品应用工程师

演讲时间：20241107

目录

目录
CONTENT



原核转录组



宏转录组



互作转录组

目录

目录
CONTENT



原核转录组



宏转录组



互作转录组

原核转录组测序

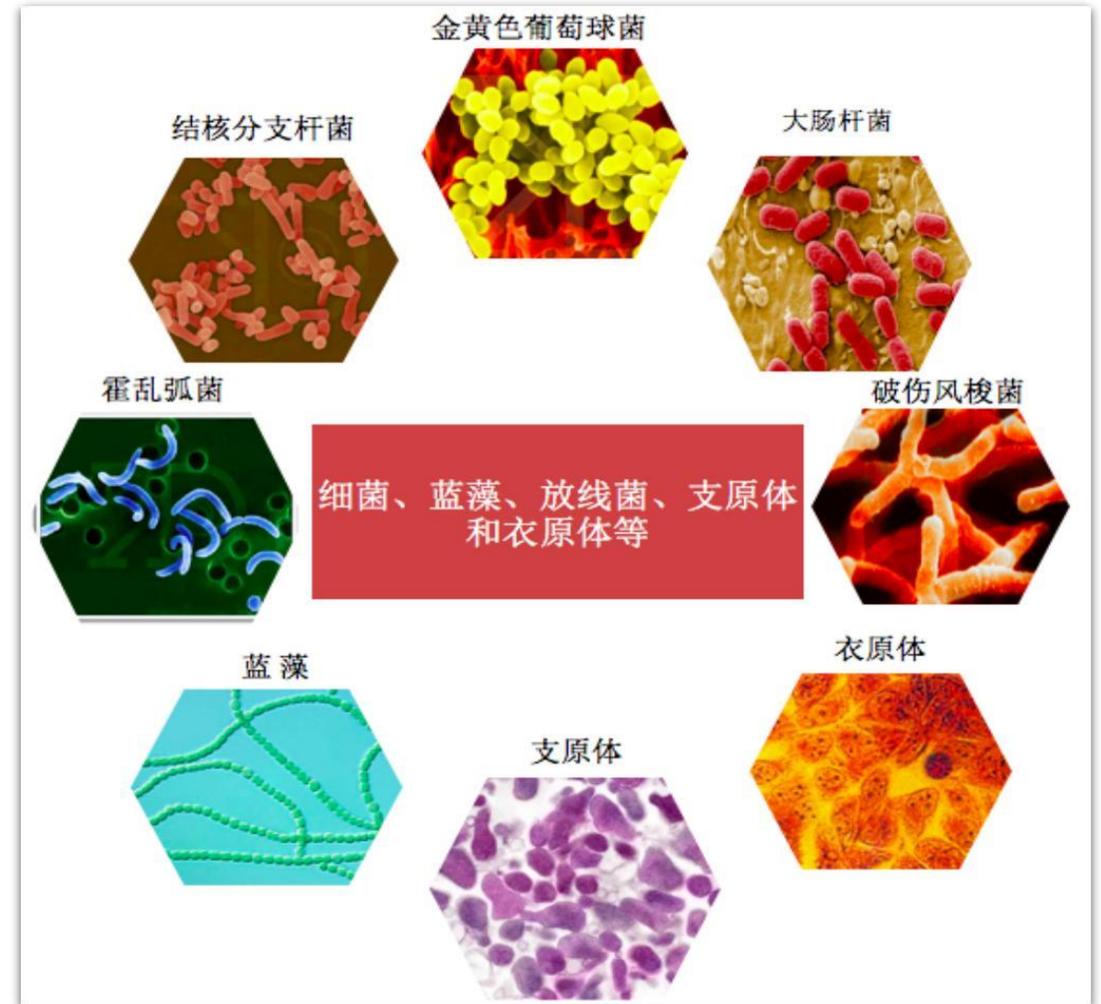
原核转录组学是从RNA水平研究基因表达的情况。研究

内容包括：

1. **细菌**在不同时空条件下的基因表达变化——阐述宿主、环境对基因表达的影响、细菌致病机制等——
mRNA

2. 揭示基因组结构信息——发现新基因，基因表达原件，优化基因组结构

3. 深入挖掘sRNA的信息——进一步为基因网络调控的研究提供有力支持——
sRNA



原核转录组测序项目设计

- 如何取样
- 基因表达具有时空特异性

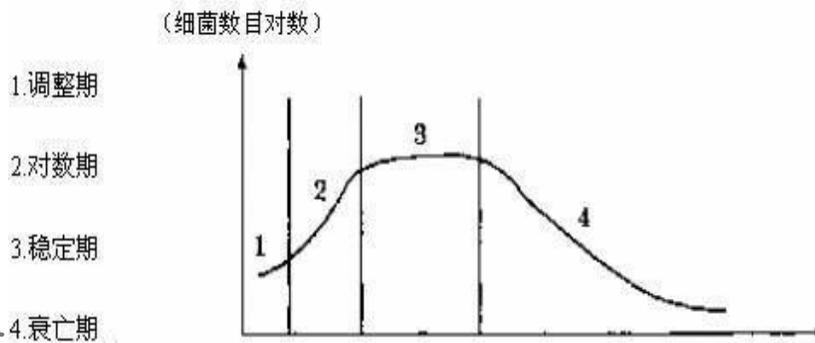
◆ 选材 { 时间序列 (不同生长阶段)
环境变化 (不同培养条件或胁迫处理)
野生型与突变株 }

◆ 分组 实验组 vs 对照组

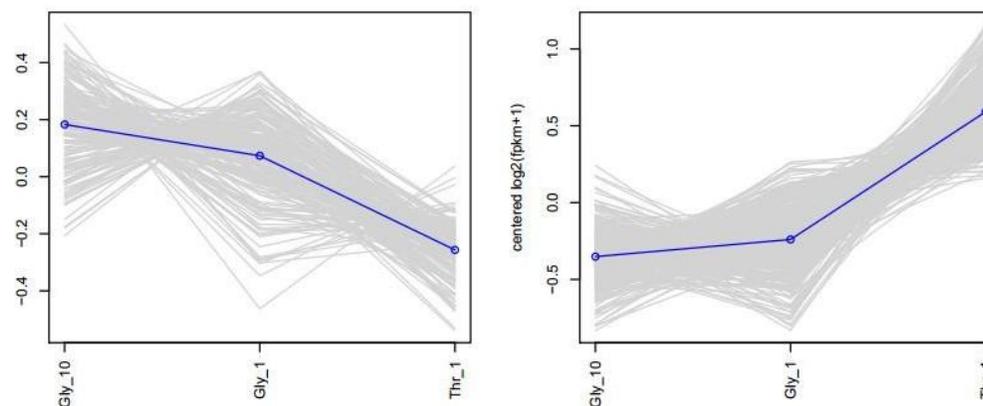
◆ 取样 { 新鲜样本、避免RNA酶污染
随机性、一致性、遗传背景相同性 }

注意事项:

- 1、同批次培养的样品足量, 留备份
- 2、菌体用液氮速冻保存或抽提 qPCR
- 3、抽提RNA时低温, 无RNA酶, 一气呵成



不同生长时期基因表达情况不一样



同一基因在不同样本中的表达情况不一样

原核转录组测序项目常见问题

Q1. 原核生物的rRNA去除效率是不是都可以达到90%以上？纯细菌接单原核关于去除rrna承诺客户？

A1: (1) 原核生物的rRNA去除效率取决于rRNA remove中探针的匹配率，商业化的探针虽然是广谱性的，但是针对一些特殊的原核生物的rRNA的去除效率并不高，因此如果是一些没有经过试剂盒验证的原核生物，无法保证rRNA的去除效率。(2) 使用 **RiboCop rRNA Depletion Kit for Mixed Bacterial Samples (lexogen, USA)** 去除rRNA

6、关于原核转录组试剂盒说明:

现在的原核转录组试剂盒是非 Illumina 官方试剂盒，rRNA 去除率有所改善，但是依然存在个别细菌的原核转录组结果中含有较高比例 rRNA 的风险。针对此问题，我们做出以下政策:

- ①rRNA 去除比例正常，结果正常交付;
- ②rRNA 存在比例略高 (30%-80%)，我们给客户补测到足够有效数据量 (保证有效数据 2Gb 以上)，

不增加补测费用;

- ③rRNA 存在比例很高 (>80%)，我们只核收客户相应的实验费用 (600);
- ④客户预付款超过 80%，安排开展实验。

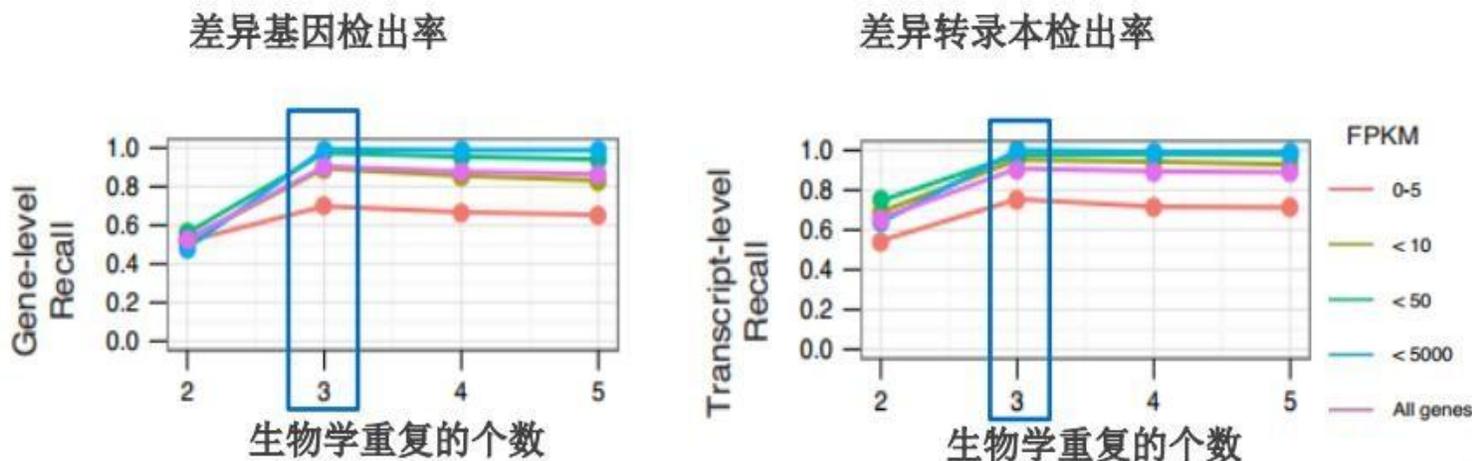
原核转录组测序项目常见问题

Q2. 转录组测序一定要设置生物学重复吗，设置几个？如果样品间差异不大还需要设置吗？

A2: (1) 生物学重复是生物实验所必须的，一般应该**重复3次以上**，样本数量越多对于统计筛选越有利。

2生物学重复的作用主要有以下3项：a. 检验生物学实验操作的可重复性；b. 评估差异表达基因的可靠性；c. 辅助异常样品的筛查。

3 无生物学重复或重复个数不足最低要求3个，需要提示发文章拒稿相关风险，客户接受并自愿承担风险，可以接单（但不推荐这样做）



Nature Biotechnology (2016) 17:13, DOI

原核转录组测序项目常见问题

Q3. 原核转录组细菌必须要有参考基因组，为什么原核物种只能做有参转录组分析？

A3: 由于原核生物的基因组中存在大量基因重叠区域、操纵子及多顺反子，如果按照无参转录组分析策略进行组装的话，难度较大，组装结果存在较大风险。

Q4. 原核藻类（蓝藻）、支原体、衣原体是否考虑接单？

A4: (1) 原核藻类不做，因为很难分离到纯藻（除非客户送的就是纯的蓝藻）；
(2) 支原体衣原体不做，因为样本RNA含量少，目前很难抽提到合格的RNA

Q5. 原核-原核互作转录组是否考虑接单？

A5: 目前暂不考虑接单

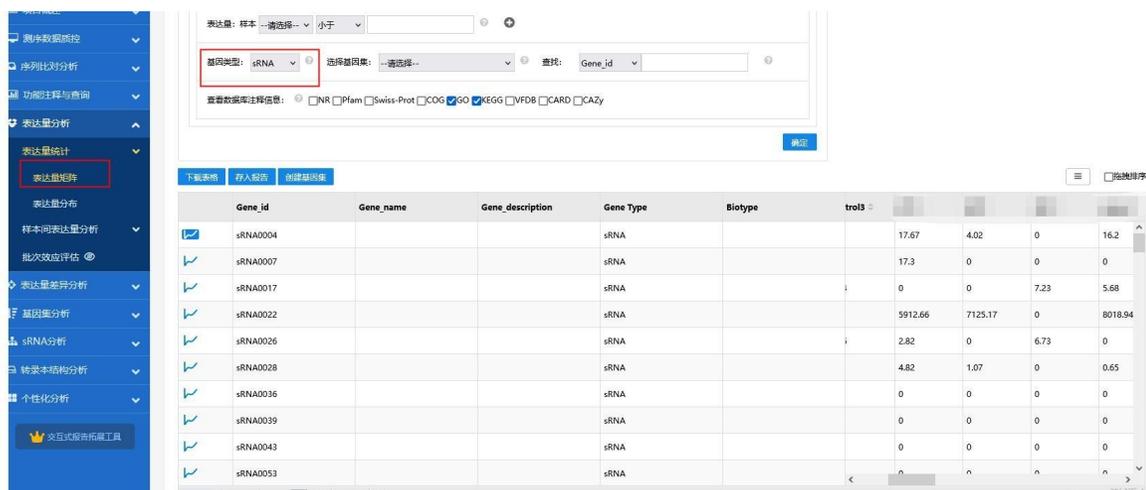
原核转录组测序项目常见问题

Q6. 原核转录分析有sRNA分析？是怎么开展的？

A6: (1) 实验--将 mRNA 随机断裂成 200bp 左右的小片段（注意：并未进行小片段RNA长度的筛选）

(2) 分析--根据当前主流的原核转录组分析软件Rockhopper

(<http://cs.wellesley.edu/~btjaden/Rockhopper/>) 获得sRNA预测结果，预测依据主要是碱基测序覆盖度信息，平台也会同步给出sRNA在每个样本的表达量



Gene_id	Gene_name	Gene_description	Gene Type	Biotype	ctrl3				
sRNA0004			sRNA		17.67	4.02	0	16.2	
sRNA0007			sRNA		17.3	0	0	0	
sRNA0017			sRNA		0	0	7.23	5.68	
sRNA0022			sRNA		5912.66	7125.17	0	8018.94	
sRNA0026			sRNA		2.82	0	6.73	0	
sRNA0028			sRNA		4.82	1.07	0	0.65	
sRNA0036			sRNA		0	0	0	0	
sRNA0039			sRNA		0	0	0	0	
sRNA0043			sRNA		0	0	0	0	
sRNA0053			sRNA						

适用客户：

1. 重点关注mRNA，顺带分析下sRNA的客户；

1如客户重点且只关注sRNA，需要构建sRNA文库来测序和分析（有公司做法是会单独富集30-300nt小片段单独建库 就是专门建小RNA文库的）

原核转录组测序项目常见问题

Q7. 原核转录接单注意事项？

✓ (1) 活化的单菌（必须是纯细菌），请务必送菌体沉淀，不接收菌液或平板；液氮速冻，-80℃保存，干冰寄送；

✓ (2) 对于病原微生物，尽量建议老师送抽提好的 RNA 样品。如果是送菌体，需提前和技术人员确认，如可检测（一二类病原菌不接单，三类灭活了接单），灭活方法：需要 75%乙醇浸泡过夜（-80℃），过夜后解冻离心去掉乙醇，可以直接干冰寄送，同时在送样单上进行备注

✓ (3) 务必做菌种鉴定，确保客户送的每个样本都是纯细菌不存在其他菌污染。

✓ (4) 生物学重复个数 ≥ 3 个，不足的需做风险提示

✓ (5) 细菌必须有参考基因组，没有的可以考虑自测个扫描图/完成图，或选择近缘物种

✓ (6) 同一项目的样本不接受批次开展，理论上会有批次效应；如先开展的和补送的补送

不是同一批次培养取样的，批次效应就更大些。如果表型数据显示有显著变化基本组学结果也会有

7 风险提示样本去 rRNA 效率和相关承诺（承诺针对的是纯的细菌样本不符合要求的样本不承诺）

8 样本避免反复冻融



原核转录组测序项目常见问题

Q7. 原核转录接单注意事项？

- ✓ (1) 活化的单菌（必须是纯细菌），请务必送菌体沉淀，不接收菌液或平板；液氮速冻，-80℃保存，干冰寄送；
 - ✓ (2) 对于病原微生物，尽量建议老师送抽提好的 RNA 样品。如果是送菌体，需提前和技术人员确认，如可检测（一二类病原菌不接单，三类灭活了接单），灭活方法：需要 75%乙醇浸泡过夜（-80℃），过夜后解冻离心去掉乙醇，可以直接干冰寄送，同时在送样单上进行备注
 - ✓ (3) 务必做菌种鉴定，确保客户送的每个样本都是纯细菌不存在其他菌污染。
 - ✓ (4) 生物学重复个数 ≥ 3 个，不足的需做风险提示
 - ✓ (5) 细菌必须有参考基因组，没有的可以考虑自测个扫描图/完成图，或选择近缘物种
 - ✓ (6) 同一项目的样本不接受批次开展，理论上会有批次效应；如先开展的和补送的补送的不是同一批次培养取样的，批次效应就更大些。如果表型数据显示有显著变化基本组学结果也会有风险提示样本去rRNA效率和相关承诺（承诺针对的是纯的细菌样本 不符合要求的样本不承诺）
- 样本避免反复冻融

目录

目录
CONTENT



原核转录组



宏转录组

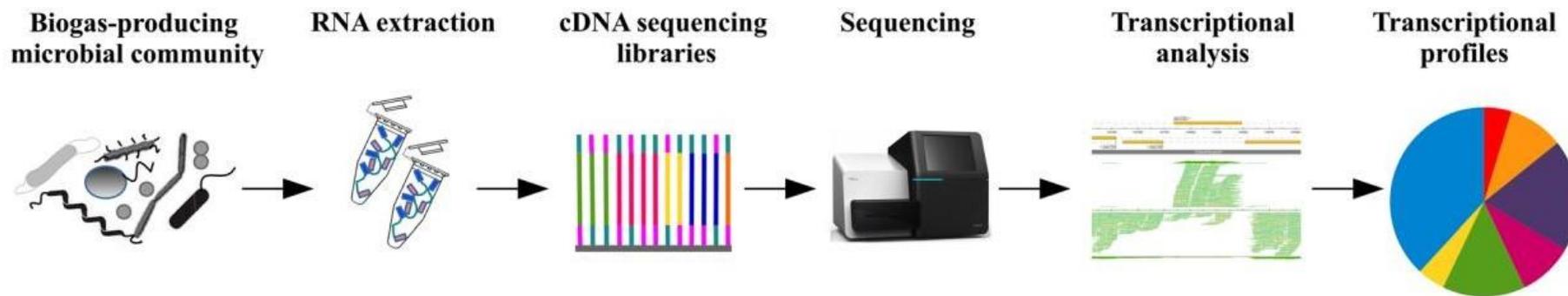


互作转录组

宏转录组学（Metatranscriptomics）

宏转录组学作为一项前沿技术，用于探索不同生态系统中微生物群落在特定时间内的基因表达和功能活性，从而揭示它们对当前环境的代谢反应。

这种技术不仅具有宏基因组技术的全部优点，可以检测环境中的**活性微生物**，对**活性转录本**以及**活性功能**进行研究，还可以比较不同环境下的**差异表达基因**和**差异功能途径**。



宏转录组常见问题

Q1. 宏转录组rRNA如何去除？和签单相关承诺？

A1: (1) 使用 **RiboCop rRNA Depletion Kit for Mixed Bacterial Samples** 去除rRNA试剂盒（是按照细菌的探针做的），只去除细菌的rRNA

5、关于宏转录组试剂盒说明:

现在的宏转录组试剂盒是非 Illumina 官方试剂盒，rRNA 去除率有所改善，但是依然存在个别细菌的原核转录组结果中含有较高比例 rRNA 的风险。针对此问题，我们做出以下政策:

- ①rRNA 去除比例正常，结果正常交付;
- ②rRNA 存在比例略高 (30%-80%)，我们给客户补测到足够有效数据量 (保证有效数据 5Gb/10Gb 以上)，不增加补测费用;
- ③rRNA 存在比例很高 (>80%)，我们只核收客户相应的实验费用 (600);
- ④客户预付款超过 80%，安排开展实验。

宏转录组常见问题

Q2. 宏转录组适用的样本类型和瓶颈？

A:

1. 宏转录组项目的瓶颈在于 **RNA** 的提取，目前实验室常见且抽提成功率相对较高的的宏转录组样本类型有**土壤、淤泥、发酵物、粪便、内容物等**。
2. **RNA**的抽提结果跟客户样本有很大关系，通常会出现色素污染、降解、得率低等情况。即便同种类型的样品也会因为采集来源不同造成不同的抽提结果。通常需要反复尝试。
3. 非上述成功率较高的样本建议先选择几个样本试抽提（可考虑每个组选择1个样本）
4. 注意：宏转录组适用的是混菌体系的样本，如果客户的样本是已知的菌比如几个菌混合的样本不建议接单，不符合宏转录组接单的样本类型，如果是混菌，菌体很多且客户不知是什么菌的可以考虑接单

宏转录组常见问题

Q3. 宏转录接单注意事项？

- ✓ (1) 依据送样指导准备样本（无菌无酶操作）+寄送样本（液氮速冻，-80°C保存，干冰寄送），提高RNA抽提成功率；目前实验室常见且抽提成功率相对较高的的宏转录组样本类型有**土壤、淤泥、发酵物、粪便、内容物等**。
- ✓ (2) 生物学重复个数 ≥ 3 个，不足的需做风险提示；样本避免反复冻融
- ✓ (3) 风险提示样本去rRNA效率和相关承诺
- ✓ (4) 同一项目的样本不接受批次开展，理论上会有批次效应；
- ✓ (5) 高宿主占比样本风险样本——动植物组织 比如植物根茎叶等；动物组织等 风险提示到位
- ✓ (6) 建库方式只接受去rRNA建库方式，其他建库方式不接单
- ✓ (7) 来源于宿主的样本，需要进行宿主基因组剔除工作，因此宿主必须有参考基因组 比如人粪便样本需要剔除人的宿主基因组信息

目录

目录
CONTENT



原核转录组



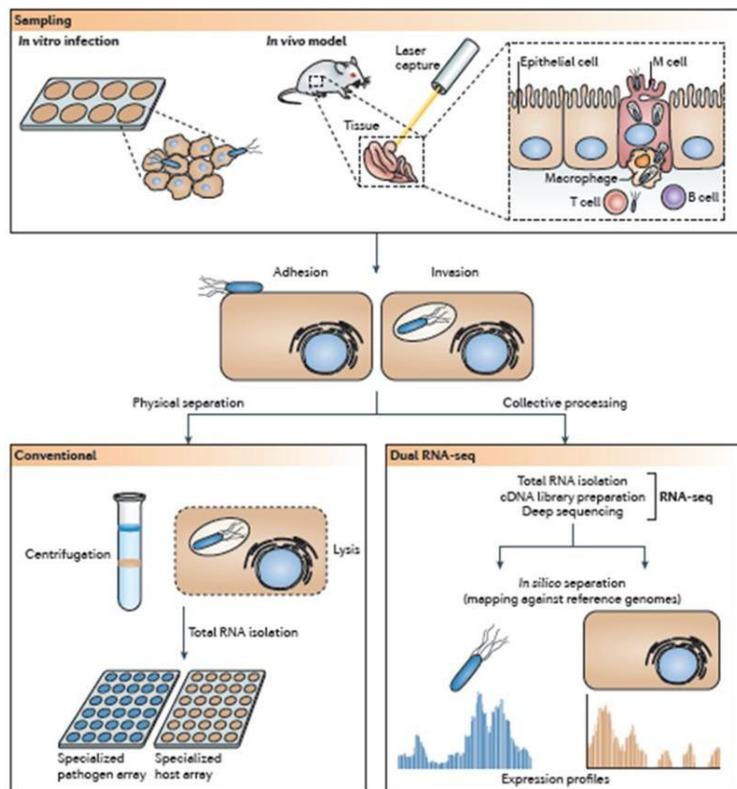
宏转录组



互作转录组

互作转录组

通过转录组测序，比较**寄（内）生菌**与**寄主**或者**病原菌**与**宿主**在互作状态下的转录表达，得到病原菌相关的分子响应机制或寄主中响应的通路变化，揭示宿主抗病机理或者寄主致病分子机制。



传统研究方式

互作转录组

互作转录组与传统研究方式相比**优势**：

- 可同时研究**两种**或更多的物种；
- **无需分离**，排除分离带来的影响；
- 成本降低，只构建**一个文库**，**同时分析两个物种**。

互作转录组

真原互作转录组	真原互作转录组(真-原)
真原互作转录组	真原互作转录组(真核)
真原互作转录组	真原互作转录组(原核)

依据研究目的不同，总结出以下**三种送样方案**：

1. 只关注宿主组的基因变化---- 真原互作转录组(真-原)+真原互作转录组(真核)

病原菌侵染后宿主的生理变化：送样2个组--感染互作组、未处理宿主（宿主对照组）

2. 只关注病原菌的基因变化----真原互作转录组(真-原)+真原互作转录组(原核)

病原菌侵染后自身的生理变化：送样2个组--感染互作组、未处理病原菌（细菌对照组）

3. 同时关注宿主和病原菌的基因变化--真原互作转录组(真-原)+真原互作转录组(真核)+真原互作转录组(原核)

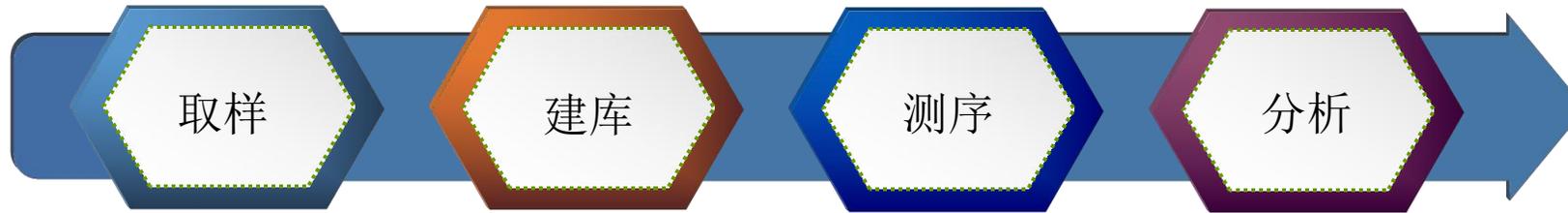
病原菌致病 / 宿主抗病机理：送样3个组--感染互作组、未处理宿主（宿主对照组）、纯培养病原菌

4. 关注宿主抗病机制--- 转录组-互作转录组

送样2个组--易感品系感染组、抗病品系感染组

互作转录组方案设计

互作转录组项目设计要点：



- 取样：取样部位及时期；各物种比例的确定与提高等；
(尽可能不要引入周边未感染的、健康的组织，精准采集感染部位；)
- 建库：去核糖体RNA试剂盒的选择(同时去除真核和原核的去rRNA试剂盒)；
- 测序：测序量大小的确定；(互作组至少10G数据量)
- 分析：参考基因组问题。



精准采集感染部位
(病灶部位)

互作转录组注意事项

Q1. 互作转录接单注意事项?

1. 只接收2个物种的互作，真-真 真-原互作，最好2个都要有参考基因组

2. 真-真互作

- ✓ 两物种至少一个有参考基因组，另外一个没有参考基因组的开展真核无参。若两物种都无参，不接单。
- ✓ 建库方式都是polyA富集。
- ✓ 测序数据量--互作组至少10G，真核对照至少6G

1. 真-原互作

- ✓ 两物种原核必须有参考基因组，真核没有参考基因组的开展真核无参。若两物种都无参，不接单。
- ✓ 互作组和对照组建库方式都是去rRNA试剂盒建库（同时去除真核和原核的去rRNA试剂盒）。
- ✓ 测序数据量--互作组至少10G 真核对照至少6G 原核对照组至少3G
- ✓ 风险提示：真核宿主基因组比原核大，互作结果中大部分是真核的基因组信息
提高入侵物种占比--延长侵染时间（取样）、加大测序深度（测序）



谢谢观看

“ 北京百迈客生物科技
科技有限公司 ”

科技服务

群体遗传学
基因组学
单细胞组学
表观遗传学
转录组学
微生物组学
质谱检测
生物云平台

基因分析平台

公共数据库
文献数据库
工具集
文献解读
智能制造

智能制造

百创S1000
百创DG1000
PCR试剂盒
DNA提取试剂盒
RNA提取试剂盒



北京百迈客生物科技有限公司
地址：北京市顺义区南法信
府前街12号顺捷大厦A座6层
邮箱：tech@biomarker.com.cn
电话：400-600-3186