

УДК 547.262.099:612.398

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2023.4.4 EDN: DAGRTE

**ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК ПОСЛЕ НАСЫЩАЮЩЕГО ТРАНСПОЗОННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ ПОИСКА ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ *E. COLI***© Шаталова Р.О.<sup>2</sup>, Захарова М.В.<sup>1</sup>, Колосова Е.С.<sup>2</sup>, Позднякова-Филатова И.Ю.<sup>1</sup>,  
Тарлачков С.В.<sup>1</sup>, Нагорных М.О.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пуцзино, 142290 Россия<sup>2</sup>АНО ВО Научно-технологический университет "Сириус", Сочи, 354349 Россия*Резюме***Цель.** Отработка условий проведения транспозонного мутагенеза и получения библиотек для дальнейшего полногеномного анализа на антибиотикоустойчивых мутантах *E. coli*.**Методика.** Клоны *E. coli*, устойчивые к хинолоновым антибиотикам (налидиксовая кислота и ципрофлоксацин) были отобраны при помощи селекции *in vitro* на соответствующих антибиотиках. Анализ мутаций в генах, обеспечивающих устойчивость к хинолоновым антибиотикам был проведен при помощи ПЦР-анализа, секвенирования и программы VectorNTI. Построение кривых роста для антибиотикорезистентных клонов *E. coli*, а также определение МИК проводили с использованием налидиксовой кислоты и ципрофлоксацина. Транспозонный мутагенез и приготовление библиотек клонов было проведено по оптимизированной методике для бактерий *E. coli*.**Результаты.** При помощи селекции *in vitro*, были отобраны клоны *E. coli*, устойчивые к хинолоновым антибиотикам. Мутации, обеспечивающие устойчивость к хинолоновым антибиотикам, были проанализированы и картированы при помощи секвенирования по методу Сэнгер. Был проведен сравнительный анализ (построение кривых роста, определение МИК) устойчивых клонов, содержащих разные мутации и их комбинации. На отобранных клонах были подобраны оптимальные условия проведения транспозонного мутагенеза и получения препаратов библиотек геномных ДНК, подходящих для дальнейшего полногеномного анализа.**Заключение.** В настоящей работе были оптимизированы способы проведения транспозонного мутагенеза и получения библиотек для геномного анализа его результатов на антибиотикоустойчивых формах *E. coli*. Качество получаемых таким способом библиотек удовлетворяет требованиям для проведения полногеномного изучения функциональной роли генов *E. coli* с применением метода Tn-seq.**Ключевые слова:** транспозонный мутагенез, резистентность к антибиотикам, геномные библиотеки**PREPARATION OF GENOMIC LIBRARIES AFTER SATURATING TRANSPOSON MUTAGENESIS TO SEARCH FOR GENES AFFECTING THE FITNESS COST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA *E. COLI***Shatalova R.O.<sup>2</sup>, Zakharova M.V.<sup>1</sup>, Kolosova E.S.<sup>2</sup>, Pozdnyakova-Filatova I.Y.<sup>1</sup>,  
Tarlachkov S.V.<sup>1</sup>, Nagornyykh M.O.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia<sup>2</sup>Sirius University of Science and Technology, Sirius, 354349, Sochi, Russia*Abstract***Objectives.** Development of conditions for carrying out transposon mutagenesis and obtaining libraries for further genome-wide analysis on antibiotic-resistant *E. coli* mutants.**Methods.** *E. coli* resistant mutants to quinolone antibiotics (nalidixic acid and ciprofloxacin) were selected using *in vitro* selection on the appropriate antibiotics. Analysis of mutations in genes conferring resistance to quinolone antibiotics was carried out using PCR analysis, sequencing and the VectorNTI program. Construction of growth curves for antibiotic-resistant *E. coli* clones, as well as determination of

MICs, were carried out using nalidixic acid and ciprofloxacin. Transposon mutagenesis and preparation of clone libraries was carried out using an optimized procedure for *E. coli* bacteria.

**Results.** Using *in vitro* selection, *E. coli* resistant clones to quinolone antibiotics were selected. Mutations conferring resistance to quinolone antibiotics were analyzed and mapped using Sanger sequencing. A comparative analysis (construction of growth curves, determination of MIC) of resistant clones containing different mutations and their combinations was carried out. Using selected clones, optimal conditions were selected for carrying out saturating transposon mutagenesis and obtaining genomic DNA library preparations suitable for further genome-wide analysis.

**Conclusion.** As a result of this work, methods for conducting transposon mutagenesis and obtaining libraries for genomic analysis of its results on antibiotic-resistant forms of *E. coli* were optimized. The quality of the libraries obtained in this way meets the requirements for conducting a genome-wide study of the functional role of *E. coli* genes using the Tn-seq method.

*Keywords:* transposon mutagenesis, antibiotic resistance, genomic libraries

## Введение

Проблема возникновения антибиотикоустойчивости у основных бактериальных патогенов остается острой в настоящее время во всем мире [2, 6]. Текущая пандемия усугубила кризис широкого применения антибиотиков в клиниках на фоне осложнений бактериальными инфекциями. Все это ведет к снижению качества жизни больных и, в конечном итоге, к росту смертности от бактериальных инфекций. Для борьбы с этой проблемой существует целый ряд стратегий – от поиска новых антибиотиков до альтернативных антимикробных терапий [1]. Один из способов продлить эффективное использование текущих антибиотиков в клинической практике – это поиск новых мишеней, действие на которые бы усиливало их активность против бактериальных патогенов. Наиболее современным из подходов по поиску подобных мишеней является комбинация насыщающего транспозонного мутагенеза с последующим полногеномным секвенированием (Tn-seq) для определения частоты встройки транспозона в то или иное место бактериального генома [11]. Транспозоны – это мобильные генетические элементы, которые в природе способны перемещаться из одного расположения в геноме в другое. Благодаря тому, что транспозоны удивительно разнообразны по молекулярному составу, они обеспечивают модуляцию экспрессии генов, а также пластичность и эволюцию геномов [9]. В настоящее время транспозоны являются эффективным молекулярным инструментом для исследований функции отдельных генов бактерий, дрожжей и других микроорганизмов. Эффективный, но простой мутагенез *in vitro* теперь позволяет проводить мутационный анализ антибиотикоустойчивых микроорганизмов, а также выявлять гены, которые имеют важное значение для вирулентности различных патогенов [4]. Такой полногеномный анализ транспозонных вставок после насыщающего мутагенеза является мощным современным инструментом функциональной геномики для оценки важности каждого гена в рамках целого генома бактерии [10]. Благодаря достижениям в области технологий секвенирования ДНК, все последовательности геномов бактерий могут быть определены достаточно просто. Однако, нам все еще нужны инструменты, чтобы уметь связывать генетическую информацию с соответствующими фенотипами, включая фенотипы вирулентных форм, а также устойчивых к антибиотикам фенотипов. Комбинация транспозонного мутагенеза с методами полногеномного секвенирования, а также дальнейший биоинформационный анализ позволяют получить всестороннюю фенотипическую оценку сотен тысяч мутантов одновременно [4, 10]. В методе Tn-seq библиотека мутантов после проведения транспозонного мутагенеза подвергается селекции при определенных условиях либо сам мутагенез уже проводится на отобранных бактериальных клонах, содержащих мутации, дающие, например, устойчивость к определенному классу антибиотиков. Далее вставки транспозонов специфически амплифицируют и секвенируют методами полногеномного секвенирования. Относительная частота транспозонной вставки, на отобранных во время селекции мутантах говорит о вкладе каждого гена в фитнес бактерии. Таким образом, при помощи этого подхода можно идентифицировать большинство, если не все, гены в бактериальном геноме, которые вносят вклад в жизнеспособность бактерии при определенных интересующих условиях. Например, гены, необходимые для устойчивости к системам защиты хозяина при бактериальных инфекциях или устойчивости к действию антибиотиков [11, 12].

Целью данной работы была отработка условий получения геномных библиотек после проведения транспозонного мутагенеза на бактериальных мутантах *E. coli*, устойчивых к антибиотикам. Для этого мы провели *in vitro* селекцию клонов *E. coli*, устойчивых к хинолоновым антибиотикам, которые содержат клинически релевантные мутации. Оптимизировали условия проведения

транспозонного мутагенеза для бактерии *E. coli*. Получили препараты геномных библиотек, пригодные для дальнейшего геномного анализа с применением методов полногеномного секвенирования и биоинформатики.

## Методика

Селекция *in vitro* мутантов *E. coli*, устойчивых к хинолоновым антибиотикам. Отбор мутантов *E. coli* штамма MG1655, устойчивых к хинолоновым антибиотикам, проводили на чашках Петри, содержащих агаризованную питательную среду LB (1,5% агара) с налидиксовой кислотой (20 мкг/мл) или ципрофлоксацином (0,1 мкг/мл) соответственно. На одну чашку высевали  $2-4 \times 10^8$  клеток (0,1-0,2 мл культуры). Для дальнейшего картирования мутаций, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, отбирали 24 индивидуальных колонии, которые далее анализировали секвенированием. Очистку колоний проводили рассевом штрихом на чашки с той же селективной средой через несколько пассажей.

Секвенирование генов, мутации в которых обеспечивают устойчивость к хинолоновым антибиотикам. Фрагменты ДНК амплифицировали ПЦР со специфических праймеров (табл. 1) с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB) по протоколу производителя. В качестве матрицы для ПЦР использовался бактериальный лизат отобранных клонов, содержащий геномную ДНК. Для этого аликвоту бактериальной биомассы ресуспендировали в воде и прогревали при 95°C в течение 5 минут. Далее этот фрагмент был обработан реагентом для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT (Thermo). После этого очищенный препарат ДНК фрагментов секвенировали по Сэнгеру. Секвенирование по Сэнгеру проводилось на приборе AB3500, с использованием коммерческого набора для секвенирования BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems). Полученные результаты реакций секвенирования анализировали при помощи пакета программ Vector NTI. В качестве референсных были использованы нуклеотидные последовательности соответствующих генов из баз данных Uniprot и NCBI.

Таблица 1. Праймеры для амплификации генов, кодирующие субъединицы ДНК-гиразы (*gyrA*, *gyrB*) и топоизомеразы IV (*parC*, *parE*), мутации в которых приводят к устойчивости к хинолоновым антибиотикам

<i>gyrA</i> f	CGAGTATATCAGGCATTGGATGTG
<i>gyrA</i> r	CCTAATACGACAAAAGCCCAGAC
<i>gyrB</i> f	CAGTGCTGAACACGTTATAGACATG
<i>gyrB</i> r	CCTACAAAATCATGAAAATTCAATAC
<i>parC</i> f	CAGCAAAGAGTTGTATATCAAGG
<i>parC</i> r	GCGTATTGTTAATCGCAACGCATG
<i>parE</i> f	CAGGCGGTGGCGTACTACGCTTC
<i>parE</i> r	GATTCTATCGTGATGATTGAGC

Построение кривых роста и определение МИК (минимальная ингибирующая концентрация). Для отобранных клонов, устойчивых к ципрофлоксацину и налидиксовой кислоте измеряли кривые роста и определяли МИК. В качестве инокулята использовали 2 мкл ночной культуры, конечная концентрация клеток в ночной культуре составила  $8 \times 10^8$  КОЕ/мл. Клетки культивировали в 24х-луночном планшете (Greiner Bio-One, Австрия) в 1 мл среды LB (Lysogeny broth) на планшетном спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Германия) при следующих параметрах: температура культивирования 37°C, перемешивание 100 оборотов в минуту, длина волны, при которой проводили измерение оптической плотности – 600 нм, время культивирования – 12 ч. Каждый образец измеряли в 2-х биологических повторах. Далее сравнивали паттерны кривых роста. МИК определяли методом последовательных разведений среды LB, содержащей соответствующий антибиотик. Далее вносили инокулят (2 мкл ночной культуры бактерий), после инкубации в течение 12-14 ч. определяли МИК в лунках планшета, где рост бактериальной культуры отсутствовал. Подтверждая это результатом отсутствия роста на чашках с агаризованной средой LB без антибиотика.

Транспозонный мутагенез и приготовление геномных библиотек. Транспозонный мутагенез осуществляли при помощи конъюгации со штаммом-донором, содержащим плазмиду с транспозонным элементом, что приводило к образованию пула бактерий, насыщенного мутациями. В качестве донорного, использовали штамм *E. coli* MFDpir, содержащий плазмиду с

транспозонным элементом pSC189 (также обеспечивает устойчивость к канамицину и ампициллину). Этот штамм является ауксотрофом по 2,6-диаминопимелиновой кислоте (DAP), добавка которой в питательную среду необходима для его роста. Так, MFD<sub>pr</sub>-pSC189 растили в присутствии 0,3 мМ DAP (стоковый раствор 0,1М в 1н HCl). Штамм реципиент (отобранные клоны *E. coli* MG1655) растили в присутствии селективирующего антибиотика. Далее ночные культуры штамма-донора и штамма-реципиента были промыты при помощи свежей культуральной средой для отмывки от антибиотиков, на которых росли культуры ночью. После отмывки смешивали культуру штамма-донора и штамма-реципиента в соотношении 1:2 и растирали на чашки Петри для инкубации при 30°C в течение 2-х часов. По окончании инкубации, бактериальные клетки собирали шпателем и ресуспендировали в среде LB без DAP для обратной селекции, направленной против клеток штамма-донора. После инкубации в LB делали разведение клеток и осуществляли селекцию на чашках с агаризованной средой в присутствии канамицина без DAP. Выделение суммарной геномной ДНК осуществляли при помощи доступных коммерческих наборов. Образцы библиотек геномной ДНК хранили на -70°C для последующего анализа.

## Результаты исследования и их обсуждение

Развитие генетики во многом было связано с изучением генетического аппарата бактерий, а также определением функций и регуляции отдельных генов. Полногеномное секвенирование и связанные с ним методологии значительно ускорили изучение генетики микроорганизмов. Однако выявление функций отдельных генов и их значения для физиологии бактерий остается проблемой до сих пор. Традиционный транспозонный мутагенез представляет собой метод по идентификации вклада отдельных генов в фенотипические характеристики конкретного микроорганизма. Его использование в сочетании с подходами полногеномного секвенирования (Tn-seq) может точно выявить гены, ответственные за определенные физиологические функции в тех или иных условиях существования бактерий [10]. Такой подход применим для выяснения роли сразу многих генов в различных аспектах жизнедеятельности и приспособляемости бактерий, в том числе переходе в вирулентное состояние, а также во время приобретения устойчивости к антибиотикам. Основой этого мощного методологического подхода является получение геномных библиотек, пригодных для дальнейшего геномного анализа.

По последним данным *E. coli* является бактериальным патогеном, являющимся одним из лидеров по причине смертности среди населения [2]. Использование антибиотиков, относящихся к лактамам привело к возникновению штаммов устойчивых к их действию. По этой причине, в последнее время в клинике часто используются антибиотики, относящиеся к другим классам, в том числе хинолоновые производные. Устойчивость ко многим антибиотикам часто обеспечивается точечными мутациями в определенных генах, которые кодируют белковые мишени для этих антибиотиков [14]. Так, действие хинолонов основано на ингибировании двух бактериальных топоизомераз: ДНК-гиразы (топоизомеразы II) и топоизомеразы IV. Топоизомеразы – это ферменты, отвечающие за расплетение ДНК в таких ключевых биологических процессах как репликация и транскрипция, где необходимо снятие состояния сверхспирализации молекул ДНК. Два основных фермента этого класса состоят из двух разных субъединиц и кодируются четырьмя генами (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*). Основные клинически значимые мутации, обеспечивающие значительную устойчивость к хинолоновым антибиотикам, локализуются в двух генах – *gyrA* и *parC*. Эти мутации обычно возникают в определенных местах внутри генов, которые обуславливают устойчивость к хинолонам, так называемом хинолоновом кармане продуктов этих генов. Для генов *gyrA* и *parC* это в основном нуклеотидные последовательности, кодирующие 83-87 аминокислоты [7, 13].

Для проведения *in vitro* селекции устойчивых клонов *E. coli* были выбраны два хинолоновых антибиотика – налидиксовая кислота и ципрофлоксацин. Налидиксовая кислота представляет собой синтетический хинолон и оказывает местное антибактериальное действие за счет ингибирования ДНК-гиразы, тем самым подавляя синтез ДНК во время репликации бактерий дозозависимым образом. Этот антибиотик активен в отношении большинства грамотрицательных микроорганизмов, вызывающих инфекции мочевыводящих путей. Ципрофлоксацин является фторхинолоновым антибиотиком второго поколения, который широко используется в терапии бактериальных инфекций мочевыводящих путей и дыхательных путей легкой и средней степени тяжести [7, 13].

Селекция проводилась с использованием штамма *E. coli* MG1655, который выращивали в жидкой питательной среде LB при 37°C в течение 12 ч. Далее для отбора мутантов, устойчивых к хинолоновым антибиотикам, использовали свежую бактериальную культуру, а также чашки с агаризованной средой LB (1,5% агара), содержащие налидиксовую кислоту (20 мкг/мл) и

ципрофлоксацин (0,1 мкг/мл) соответственно. На одну чашку высевали  $2-4 \times 10^8$  клеток (0,1–0,2 мл культуры). Для последующего анализа мутаций, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, отбирали по 12 индивидуальных колоний. Очистку колоний проводили расеевом штрихом на чашки с той же селективной средой (Рис. 1А, 1Б). Так, полученные клоны были очищены при помощи нескольких пересевов на чашки с соответствующими антибиотиками. Далее клоны анализировали при помощи ПЦР и секвенирования последовательностей ДНК генов, кодирующих субъединицы ферментов-мишеней для хинолоновых антибиотиков.



Рис.1. Селекция и ПЦР-скрининг *in vitro* мутантов *E. coli*, устойчивых к хинолоновым антибиотикам: чашка Петри с первичными клонами, устойчивыми к налидиксовой кислоте (А) и эти же клоны, после нескольких пассажей на агаризованной среде, содержащей налидиксовую кислоту (Б). Амплификация ДНК-фрагментов, соответствующих генам (на иллюстрации *gyrA*), мутации в которых обеспечивают устойчивость бактерий к хинолоновым антибиотикам (В)

Известно, что основной вклад в устойчивость к хинолоновым антибиотикам вносят точечные мутации в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, кодирующих субъединицы ДНК-гиразы (топоизомераза II) и топоизомеразы IV [7, 13]. Эти данные подтверждаются результатами скрининга отобранных нами клонов, устойчивых к налидиксовой кислоте и ципрофлоксацину с обнаруженными одиночными и двойными мутациями. Для подтверждения точечных мутаций в генах, которые обеспечивают устойчивость к исследуемым антибиотикам, проводили секвенирование последовательностей ПЦР-фрагментов, соответствующих этим генам. Фрагменты ДНК амплифицировали ПЦР со специфических праймеров (табл. 1), где в качестве матрицы использовали геномную ДНК из бактерий устойчивых клонов (рис. 1В). Далее фрагменты ДНК секвенировали и анализировали результаты относительно референсных последовательностей из базы данных Uniprot. Интересно, что в отобранных клонах мутации были обнаружены только в нуклеотидной последовательности гена *gyrA* и соответствующей ей аминокислотной последовательности ДНК-гиразы (*GyrA*), полученных в ходе секвенсных реакций (рис. 2).

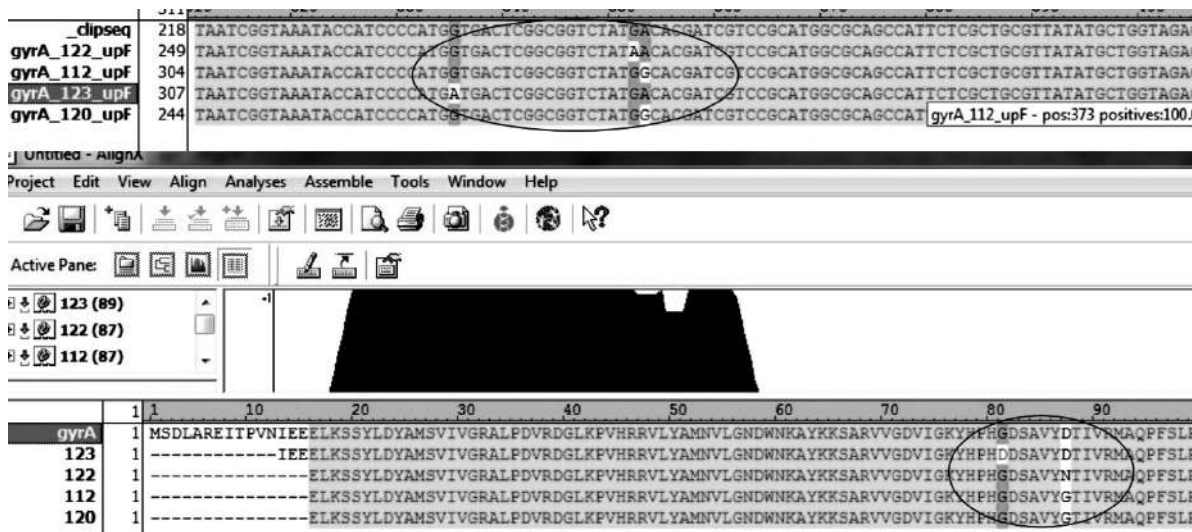


Рис. 2. Анализ последовательностей ДНК гена, кодирующего субъединицу ДНК-гиразы (*gyrA*) и поиск мутаций (позиции аминокислот 81 и 87), которые обеспечивают устойчивость к хинолоновым антибиотикам

Выявленные мутации были картированы и внесены в таблицу. Большая часть устойчивых бактериальных клонов содержали единичные аминокислотные замены в районе хинолонового кармана ДНК-гиразы, однако, были обнаружены несколько клонов с двойными заменами аминокислот, которые были приобретены бактериями под воздействием ципрофлоксацина (табл. 2).

Таблица 2. Суммарная таблица по анализу клонов, устойчивых к хинолоновым антибиотикам (налидиксовая кислота – *n* и ципрофлоксацин – *c*). Среди клонов, отобранных при селекции на ципрофлоксацине, есть несколько с двойными мутациями в гене *gyrA*, полученные при селекции на ципрофлоксацине.

Мутация <i>gyrA</i>	Мутация <i>gyrB</i>	Мутация <i>parC</i>	Мутация <i>parE</i>	Номер клона
D87V	-	-	-	1c, 6n
D87N	-	-	-	2c, 4n, 22c, 12n
D87G	-	-	-	6c, 10c, 11c, 15c, 17n, 19n, 12c, 20n, 7n, 13n, 5n
D87Y	-	-	-	24c
G81D	-	-	-	23c
D83G / G816A	-	-	-	8c, 7c, 9c
D87G / N818H	-	-	-	3c, 5c

Для всех полученных антибиотикоустойчивых клонов были построены кривые роста и посчитаны минимальные ингибирующие концентрации (МИК). Так, для отобранных 12 устойчивых к ципрофлоксацину клонов, МИК ципрофлоксацина для всех тестируемых вариантов составила 1,6 мкг/мл, различий в паттерне кривых роста при концентрации антибиотика 0,5 мкг/мл отмечено не было (рис. 3А). Схожие результаты были получены для 12 устойчивых к налидиксовой кислоте клонов. МИК налидиксовой кислоты для всех тестируемых вариантов составила >640 мкг/мл, но различий в характере кривых роста при концентрации антибиотика 20 мкг/мл обнаружено не было. Это может указывать на то, что, по-видимому, мутации в остальных генах встречаются реже и дают дополнительную устойчивость к хинолоновым антибиотикам, которая будет отражаться в отличиях кривых роста и МИК для таких клонов.

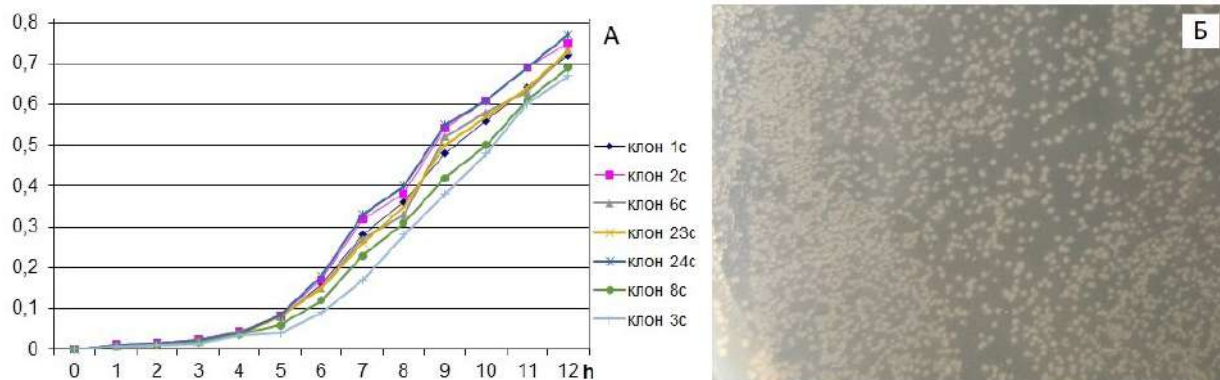


Рис. 3. Анализ кривых роста клонов, устойчивых к ципрофлоксацину при концентрации антибиотика 0,5 мкг/мл (А). Типичный результат оптимальной плотности высева бактериальной культуры на агаризованную среду LB после проведения транспозонного мутагенеза для получения библиотек, пригодных для дальнейшего геномного анализа (Б)

Для проведения транспозонного мутагенеза и оптимизации условий получения библиотек бактериальных клеток с хорошей представленностью были взяты несколько клонов, устойчивых к хинолоновым антибиотикам, как с одиночными, так и с двойными мутациями в гене *gyrA*. Выбранные клоны выступали в качестве штамма-реципиента, для проведения конъюгации с штаммом-донором, содержащим плазмиду с транспозонным элементом, что приводило к образованию пула, насыщенного мутациями. В качестве донорного, использовали штамм *E. coli* MFDpr1, который является ауксотрофом по 2,6-диаминопимелиновой кислоте (DAP) и содержит плазмиду с транспозонным элементом pSC189. После смешивания двух объемов культур штамма-



реципиента и штамма-донора, полученную смесь растирали на чашки Петри для инкубации при 30°C в течение 2-х ч. После инкубации, бактериальные клетки аккуратно собирали шпателем и ресуспендировали в питательной среде LB без добавки DAP для обратной селекции, чтобы убрать штамм-донор из клеточной массы. После инкубации в питательной среде делали разведение клеток и осуществляли селекцию на чашках с агаризованной питательной средой LB в присутствии канамицина без DAP. На рис. 3Б приведена типичная чашка Петри с результатами финальной селекции после конъюгации штамма-донора и штамма-реципиента, которая отражает примерную плотность колоний на агаризованной питательной среде для сбора оптимальных библиотек. Как правило, таких чашек должно быть значительное количество (несколько десятков на один эксперимент по конъюгации) для полноты библиотеки, получаемой в результате транспозонного мутагенеза. С полученных чашек собирали биомассу и далее выделяли суммарную геномную ДНК при помощи коммерческих наборов. Необходимое условие дальнейшей успешной подготовки амплификационных библиотек для полногеномного секвенирования – это приемлемое количество ДНК (от 1 мкг и более), а также качество препарата с соотношением ОП 260: ОП 280 – не менее 1,8. Представленность же библиотеки определяется количеством собранных клонов, с оптимальным количеством от 100 000 до 500 000 колоний. Образцы суммарной геномной ДНК можно хранить несколько месяцев на -70°C до последующего анализа с помощью подходов полногеномного секвенирования (NGS). Такой протокол базируется на ранее представленных методах проведения Tn-seq и является оптимизацией по количеству сбора колоний для библиотеки, а также количеству препарата геномной ДНК для приготовления амплификационных геномных библиотек [11]. В частности, он подходит для проведения транспозонного мутагенеза и дальнейшего полногеномного анализа его результатов на бактерии *E. coli*, по аналогии с ранее представленными протоколами для грамотрицательных бактерий [8, 3].

## Выводы

Одним из перспективных подходов в борьбе с проблемой распространения устойчивости к антибиотикам является поиск новых белковых мишеней для создания химических ингибиторов, которые бы усиливали действие антибиотиков, которые сейчас применяются в клинике [5]. На начальном этапе такого поиска применяется современный комплексный подход, комбинирующий транспозонный мутагенез и геномный анализ (Tn-seq). Этот способ позволяет определить гены, которые вносят вклад в жизнеспособность антибиотикоустойчивых бактерий. В настоящей работе нами была проведена селекция *in vitro* для получения мутантных форм *E. coli*, устойчивых к двум хинолоновым антибиотикам (налидиксовая кислота и ципрофлоксацин). Так, были отобраны клоны, содержащие клинически значимые мутации в генах, продукты которых являются мишенями для действия хинолоновых антибиотиков. На отобранных клонах, устойчивых к хинолоновым антибиотикам была оптимизирована методика проведения транспозонного мутагенеза и получения геномных библиотек на бактерии *E. coli*. В результате были выделены образцы суммарной геномной ДНК для дальнейшего полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа полученных данных. Таким же способом можно готовить геномные библиотеки для любых экспериментальных работ по определению функций широкого круга генов *E. coli*, где используется метод Tn-seq.

## Литература (references)

1. Aminov R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future // *Frontiers in Microbiology* – 2010. – V.8(1). – P. 134.
2. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. – 2022. – V.399(10325). – P. 629-655.
3. Basta DW, Bergkessel M, Newman DK. Identification of Fitness Determinants during Energy-Limited Growth Arrest in *Pseudomonas aeruginosa* // *mBio* – 2017. – V.8(6). - e01170-17.
4. Cain AK, Barquist L, Goodman AL, Paulsen IT, Parkhill J, van Opijnen T. A decade of advances in transposon-insertion sequencing // *Nature Reviews Genetics*. – 2020. – V.21(9). – P. 526-540.
5. Chawla M, Verma J, Gupta R, Das B. Antibiotic Potentiators Against Multidrug-Resistant Bacteria: Discovery, Development, and Clinical Relevance // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V.13. – P. 887251.
6. Darby EM et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – 21(5). – P. 280-295.

7. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2015. – V.54(1). – P. 12-31.
8. Kazi MI, Schargel RD, Boll JM. Generating Transposon Insertion Libraries in Gram-Negative Bacteria for High-Throughput Sequencing // *Journal of Visualized Experiments*. – 2020. – V.161:10.3791/61612.
9. Nina V. Fedoroff Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution // *Science*. – 2012. – V.338. – P. 758-767.
10. van Opijnen T, Bodi KL, Camilli A. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms // *Nat Methods*. – 2009. – V.6(10). – P. 767-772.
11. Rasouly A. et al. Analysing the fitness cost of antibiotic resistance to identify targets for combination antimicrobials // *Nat Microbiology*. – 2021. – V.6(11). – P. 1410-1423.
12. Roux D. et al. Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection // *Science Translational Medicine*. – 2015. – V.7(297):297ra114.
13. Tang K, Zhao H. Quinolone Antibiotics: Resistance and Therapy // *Infection and Drug Resistance*. – 2023. – V.16. – P. 811-820.
14. Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wiczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. Antibiotic Resistance in Bacteria - A Review // *Antibiotics (Basel)*. – 2022. – V.11(8). – P. 1079.

### Информация об авторах

*Шаталова Римма Олеговна* – младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов НЦТМ, АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус». E-mail: shatalova.ro@talantiuspeh.ru

*Захарова Марина Викторовна* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. E-mail: zemskovam@mail.ru

*Колосова Елена Сергеевна* – старший специалист лаборатории генетики микроорганизмов НЦТМ, АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус». E-mail: kolosova.es@talantiuspeh.ru

*Позднякова-Филатова Ирина Юрьевна* – младший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. E-mail: irafilatova24@gmail.com

*Тарлачков Сергей Владимирович* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. E-mail: sergey@tarlachkov.ru

*Нагорных Максим Олегович* – заведующий лабораторией генетики микроорганизмов НЦТМ, АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус». E-mail: nagornyh.mo@talantiuspeh.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF----193021X0001).

Поступила 01.12.2023

Принята к печати 15.12.2023