УДК 619:577.2.0

DOI: 10.53083/1996-4277-2025-253-11-58-62

М.А. Корюков, В.С. Черепушкина, А.М. Панихина, Е.А. Храпов, В.Н. Афонюшкин

M.A. Koryukov, V.S. Cherepushkina, A.M. Panikhina, E.A. Khrapov, V.N. Afonyushkin

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА КОЛИЦИНОТИПОВ *E.COLI*

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX ASSAY TECHNIQUE OF *E. COLI* COLICINOTYPES

Ключевые слова: *E.coli, колицины, колибактериоз, антагонизм, микробиоценоз, секвенирование, мультиплексная ПЦР, праймеры, микробиом.*

Внутривидовые антагонистические взаимоотношения *E.coli*, путем продукции бактериоцинов – колицинов, являются ключевым фактором, определяющим динамику микробиальных сообществ. Предположительно, риски возникновения коли-инфекции могут зависеть от разнообразия колицинотипов *E.coli* в организме животного. Большое количество штаммов *E.coli* в составе кишечного микробиоценоза не может быть изучено методами традиционной микробиологии. Целью исследования была разработка методики анализа разнообразия колицинотипов *E.coli* методом высокопроизводительного секвенирования. С использованием биоинформационного анализа была проведена кластеризация генов колицинов, выявлены консервативные участки генов колицинов, формирующих кластеры. Дизайн праймеров для ПЦР и высокопроизводительного секвенирования проводили с использованием ПО NGS-PrimerPlex. На основе выявленных нуклеотидных последовательностей была разработана система из 17 пар праймеров, обеспечивающая проведение мультиплексных ПЦР реакций на наличие широкого спектра генов колицинов, маркеров вирулентности FliC, PapF, FimH и высокополиморфного локуса генома GND, обеспечивающая эффективный анализ биоразнообразия *E.coli*, с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования. Предложенная система праймеров была аппробирована для мультилокусного секвенирования отдельных штаммов *E.coli.* Для аппробации методики изоляты кишечной палочки выделены из сердца, паренхиматозных органов от птиц и свиней (11 изолятов). Часть из 11 штаммов *E.coli*, выделенных от с.-х. птицы и свиней, были успешно идентифицированы по повышенной представленности генов соответствующих колицинов. Всего были выявлены колицины M, Ib, B, V и 2 аллельных варианта GND. Данный методический подход обеспечивает возможности изучения микробиоценозов *E.coli*, включая их биоразнообразие, эпизоотическую значимость генотипов и кооперативный антагонизм.

Keywords: *Escherichia coli* (*E. coli*), *colicins, colibacillosis, antagonism, microbiocenosis, sequencing, multiplex PCR, primers, microbiome.*

Intraspecific antagonistic relationships of *E. coli* by producing bacteriocins - colicins are the key factor determining the dynamics of microbial communities. Presumably, the risks of coli infection may depend on the diversity of *E. coli* colicinotypes in the animal body. A large number of *E. coli* strains in the intestinal microbiocenosis cannot be studied by conventional microbiology methods. The research goal was to develop a technique for analyzing the diversity of *E. coli* colicinotypes by using high-throughput sequencing. By using bioinformatics analysis, clustering of colicin genes was carried out, and conservative regions of colicin genes forming clusters were identified. The primers for PCR and high-throughput sequencing were designed with the NGS-PrimerPlex software. Based on the identified nucleotide sequences, a system of 17 primer pairs was developed to perform multiplex PCR reactions for the presence of a wide range of colicin genes, virulence markers FliC, PapF, FimH and the highly polymorphic locus of the GND genome providing an effective analysis of E. coli biodiversity using high-throughput sequencing technologies. The proposed primer system was tested for multilocus sequencing of individual *E. coli* strains. To test the technique, isolates of *E. coli* were taken from the heart and parenchymatous organs of birds and pigs (11 isolates). Some of the 11 *E. coli* strains isolated from poultry and pigs were successfully identified by increased representation of the corresponding colicin genes. In total, colicins M, Ib, B, V and 2 allelic variants of GND were identified. This methodological approach provides the opportunity to study *E. coli* microbiocenoses including their biodiversity, epizootic significance of genotypes and cooperative antagonism.

Корюков Максим Александрович, мл. науч. сотр., Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация, e-mail: mkoryukov@gmail.com.
Черепушкина Виктория Сергеевна, аспирант, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: vicky88@bk.ru.
Панихина Анна Мария, студент, Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Российская Федерация, e-mail: annamaria20072004@gmail.com.
Храпов Евгений Александрович, мл. науч. сотр., лаборатория фармакогеномики, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: Khrap80@gmail.com.
Афонюшкин Василий Николаевич, к.б.н., зав. сектором молекулярной биологии, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: lisocim@mail.ru.

Koryukov Maksim Aleksandrovich, Junior Researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: mkoryukov@gmail.com.
Cherepushkina Viktoriya Sergeevna, post-graduate student, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: vicky88@bk.ru.
Panikhina Anna Mariya, student, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: annamaria20072004@gmail.com.
Khrapov Evgeniy Aleksandrovich, Junior Researcher, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: Khrap80@gmail.com.
Afonyushkin Vasiliy Nikolaevich, Cand. Bio. Sci., Head, Molecular Biology Sector, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: lisocim@mail.ru.

Введение

Заболевания, вызванные кишечной палочкой, широко распространены как у животных, так и у человека [1, 2]. Существует множество высокопатогенных форм кишечной палочки – энтеропатогенная *Escherichia coli* (EPEC), энтеротоксигенная *E. coli* (ETEC), энтероинвазивная *E. coli* (EIEC), энтероагрегативная (EAEC) и энтерогеморрагическая (EHEC) [3] . Далеко не всегда наличие в составе кишечного микробиоценоза штамма кишечной палочки, обладающей генами патогенности, приводит к развитию инфекционного процесса [4]. Антагонистические взаимоотношения путем продукции антибиотиков (бактериоцинов) являются ключевым фактором, определяющим динамику микробиальных сообществ [5-10]. Колицин-продуцирующие бактерии защищены от собственных колицинов колицин-иммунным белком, и это является основой разделения на колицинотипы E1 (ColE1)-E9 (ColE9) [11]. Недостаточная изученность этих процессов на уровне микробиоценоза усложняет разработку целевых стратегий контроля и терапии инфекций [12]. Существующие методы микробиомного анализа универсальны, но дороги, а ПЦР тестирование отдельных изолятов ограничивает изучение взаимодействия штаммов на уровне микробиоценоза за счет ограничений возможностей мультиплексирования.

Цель исследования – разработка методики анализа разнообразия колицинотипов *E.coli* методом высокопроизводительного секвенирования.

Для достижения цели были поставлены **задачи:** разработать структуры праймеров для мультиплексного анализа и методику подготовки библиотек; провести секвенирование и проанализировать представленность генов изолятов E.coli в составе чистых культур и микробиоценозов.

Объекты и методы

Дизайн праймеров для ПЦР и высокопроизводительного секвенирования проводили с использованием ПО NGS-PrimerPlex [13].

Изоляты кишечной палочки, выделенные из сердца, паренхиматозных органов от птиц и свиней (11 изолятов), использовали для выделения ДНК (общепринятым методом). Выделение ДНК проводили фенол-хлороформенным методом с использованием в качестве лизирующего раствора RCAM1 (производство ИХБФМ СО РАН).

Библиотеки ампликонов готовили путем амплификации на приборе T100 (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) по следующей программе: активация модифицированной полимеразы – 3 мин. при 95°С, затем 28 циклов: денатурация при 95°С – 30 с, отжиг праймеров при 56°С – 30 с и элонгация 72°С – 1 мин. Далее в реакционную смесь добавляли 5 мкМ индексирующие праймеры и проводили 4 цикла по 1 мин.: 95°С – 60°С – 72°С. Реакцию амплификации проводили в 40 мкл смеси, включающей 65 мМ Трис-HCl pH 8,9; 24 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% Твин-20; 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМ дНТФ, 3 мкМ праймеры на регион V4, ДНК и 1-2 е.а. Taq-полимеразы (ИХБФМ СО РАН). Аликвоты амплификационных смесей по 30 мкл наносили на 8%-ный полиакриламидный гель и проводили гель-электрофорез. Электрофореграмму документировали при помощи транс-иллюминатора (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США). Целевые участки в области 400-450 нт вырезали из геля и выделяли из них ДНК. Секвенирование библиотеки осуществляли на платформе Illumina MiniSeq с использованием набора MiniSeq Mid Output Reagent Kit в лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

Экспериментальная часть, результаты и их обсуждение

Для дизайна праймеров на колицины, которые не кластеризовались по результатам филогенетического анализа, использовали случайный участок соответствующего гена колицина. Также вручную анализировали последовательности на наличие участков с низким уровнем гомологии внутри потенциального ампликона и с высокой гомологией снаружи. В результате исследований удалось разработать праймеры, распознающие ряд генов колицинов, которые входят в один мультиплекс: colD_colB_v1 5’tcgtgtggccgtcaaca-3’ 5’ccagaataatccggcgaataattc-3’; col C 5’gaacactatccgggcaatttgtt-3’5’cgggttttgcttaattgttccc-3’; colA_colS4 5’atgctcaggatatggcaaataaactg-3’ 5’aggactccacctccagcatcag-3’; colY 5’ggtggtatgcatggaaatagtgga-3’ 5’aggattcatttttctcgcagcaatc-3’: coliA 5’agcggaagagaaaagaaacagg-3’ 5’ttttcttccctttagcctgcc-3’; *colB* 5’gctgaagagaaaagaaaaagggat-3’5’cttaatctgtttcccttgagatacа-3’; *colE1* 5’aactatcaccaagagccaatgat-3’5’agttatatcagcatttatccggttaat-3’; *colN* 5’gggataagcttggcgagtatctt-3’ 5’tcatctttggatttgctaacacttta-3’; *colM* 5’ctatttatggggtaatggcgctga-3’ 5’gtggcatgtgtgaactttgtagaaa-3’; *cka_cfa_cta*; 5’cgaaagctgaactggcgaag-3’ 5’tagttttttctgaacgtcacgc-3’; *cka* 5’agtactccgcagttgaaaatgaa-3’5’caaccatagtatcaacagcatctt-3’; *cta* 5’agtctattacttatgatgagtgggcc-3’ 5’gagtgacaaataaaggcttccagt-3’; *colE2_E9* 5’cgacaggctaaagctgttcagg-3’ 5’gccatttgccacattctgtg-3’.

Дополнительно разработали структуры праймеров специфичные в отношении генов, ассоциирующихся с факторами вирулентности: *fimH* 5’cataatttgccgttaatcccagact-3’5’-aataccgcgtcgttttcacct-3’; *papF* 5’-gcagaacgagcacataaggac-3’5’-gctttcgcttcgtccagaatc-3’; *fliC* 5’-gaaggatgacgcagcgggt-3’ 5’-tgttgttgatttcggacagcg-3’.

Высокополиморфный ген 6-фосфоглюконат дегидрогеназы *gnd* [14] был мишенью для праймеров gnd 5’-gtcaaagcaacagatyggyg-3’5’-ggyttrtcggcaarcacrtcttc-3’

Предложенная система праймеров была апробирована для мультилокусного секвенирования индивидуальных штаммов *E.coli*. Часть из 11 штаммов *E.coli* (72,7%) были успешно идентифицированы по повышенной представленности генов соответствующих колицинов. Всего были выявлены колицины M, Ib, B, V и 2 аллельных варианта GND. Остальные штаммы не обладали анализируемыми генами, очевидно, ввиду большего разнообразия колицинотипов *E.coli*. Штаммы *E.coli* (от кур) 338, 341 содержали ген колицина B, штаммы *E.coli* (от кур) 330, 342, 322, ген колицина V, штаммы 325, 333, 339 (от кур) характеризовались наличием генов колицинов M/Ib.

Заключение

Современный алгоритм разработки мультиплексных ПЦР-систем, в сочетании с точной идентификацией ампликонов методом высокопроизводительного секвенирования, позволил

разработать систему из 17 пар праймеров для выявления наличия широкого спектра генов колицинов, маркеров вирулентности FliC, PapF, FimH и высокополиморфного локуса генома GND, что обеспечивает возможности изучения микробиоценозов *E.coli*, включая их биоразнообразие эпизоотическую значимость генотипов и кооперативный антагонизм.

Библиографический список

1. Ильина, Н. А. E.coli как условно-патогенные бактерии кишечника человека / Н. А. Ильина, Е. А. Карпеева, И. Т. Гусева. – Текст: непосредственный // Современные наукоемкие технологии. – 2008. – № 9. – С. 27.

2. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., et al. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *47 Suppl 1*, 3–30. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015.

3. Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews. Microbiology*, *2* (2), 123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818.

4. Braz, V. S., Melchior, K., & Moreira, C. G. (2020). *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 548492. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492.

5. Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in Escherichia coli populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal*, *5* (1), 71–81. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.90.

6. Bose, T., Venkatesh, K. V., Mande, S. S. (2017). Computational Analysis of Host-Pathogen Protein Interactions between Humans and Different Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 128. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00128.

7. Lu, F. M., Chak, K. F. (1996). Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cells harboring the Col plasmid. *Molecular & General Genetics: MGG*, *251* (4), 407–411. https://doi.org/10.1007/BF02172368.

8. Nedialkova, L. P., Denzler, R., Koeppel, M. B., et al. (2014). Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of Salmonella serovar Typhimurium and E. coli in enterobacterial blooms. *PLoS Pathogens*, *10* (1), e1003844. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003844.

9. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., et al. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, *130* (5), 797–810. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049.

10. Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., et al. (2006). Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, *188* (7), 2726–2729. https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006.

11. Kleanthous, C., Kühlmann, U. C., Pommer, A. J., et al. (1999). Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nature Structural Biology*, *6* (3), 243–252. https://doi.org/10.1038/6683.

12. Kirkup, B. C., Riley, M. A. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature*, *428* (6981), 412–414. https://doi.org/10.1038/nature02429.

13. Kechin, A., Borobova, V., Boyarskikh, U., et al. (2020). NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. *PLoS Computational Biology*, *16* (12), e1008468. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008468.

14. Cookson, A., Biggs, P., Marshall, J., et al. (2017). Culture independent analysis using gnd as a target gene to assess Escherichia coli diversity and community structure. *Scientific Reports*. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-00890-6.

References

1. Ilina, N. A. E. coli kak uslovno-patogennye bakterii kishechnika cheloveka / N. A. Ilina, E. A. Karpeeva, I. T. Guseva // Sovremennye naukoemkie tekhnologii. – 2008. – No. 9. – S. 27.

2. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., et al. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *47 Suppl 1*, 3–30. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015.

3. Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews. Microbiology*, *2* (2), 123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818.

4. Braz, V. S., Melchior, K., & Moreira, C. G. (2020). *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 548492. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492.

5. Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in Escherichia coli populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal*, *5* (1), 71–81. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.90.

6. Bose, T., Venkatesh, K. V., Mande, S. S. (2017). Computational Analysis of Host-Pathogen Protein Interactions between Humans and Different Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 128. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00128.

7. Lu, F. M., Chak, K. F. (1996). Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cells harboring the Col plasmid. *Molecular & General Genetics: MGG*, *251* (4), 407–411. https://doi.org/10.1007/BF02172368.

8. Nedialkova, L. P., Denzler, R., Koeppel, M. B., et al. (2014). Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of Salmonella serovar Typhimurium and E. coli in enterobacterial blooms. *PLoS Pathogens*, *10* (1), e1003844. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003844.

9. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., et al. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, *130* (5), 797–810. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049.

10. Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., et al. (2006). Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, *188* (7), 2726–2729. https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006.

11. Kleanthous, C., Kühlmann, U. C., Pommer, A. J., et al. (1999). Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nature Structural Biology*, *6* (3), 243–252. https://doi.org/10.1038/6683.

12. Kirkup, B. C., Riley, M. A. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature*, *428* (6981), 412–414. https://doi.org/10.1038/nature02429.

13. Kechin, A., Borobova, V., Boyarskikh, U., et al. (2020). NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. *PLoS Computational Biology*, *16* (12), e1008468. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008468.

14. Cookson, A., Biggs, P., Marshall, J., et al. (2017). Culture independent analysis using gnd as a target gene to assess Escherichia coli diversity and community structure. *Scientific Reports*. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-00890-6.

Работа выполнена при поддержке фонда РНФ в рамках работ по гранту №24-26-00238 "Изучение роли биоразнообразия кишечных микробиоценозов E.coli в развитии инфекционного процесса у Gallus gallus". Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300671-8.