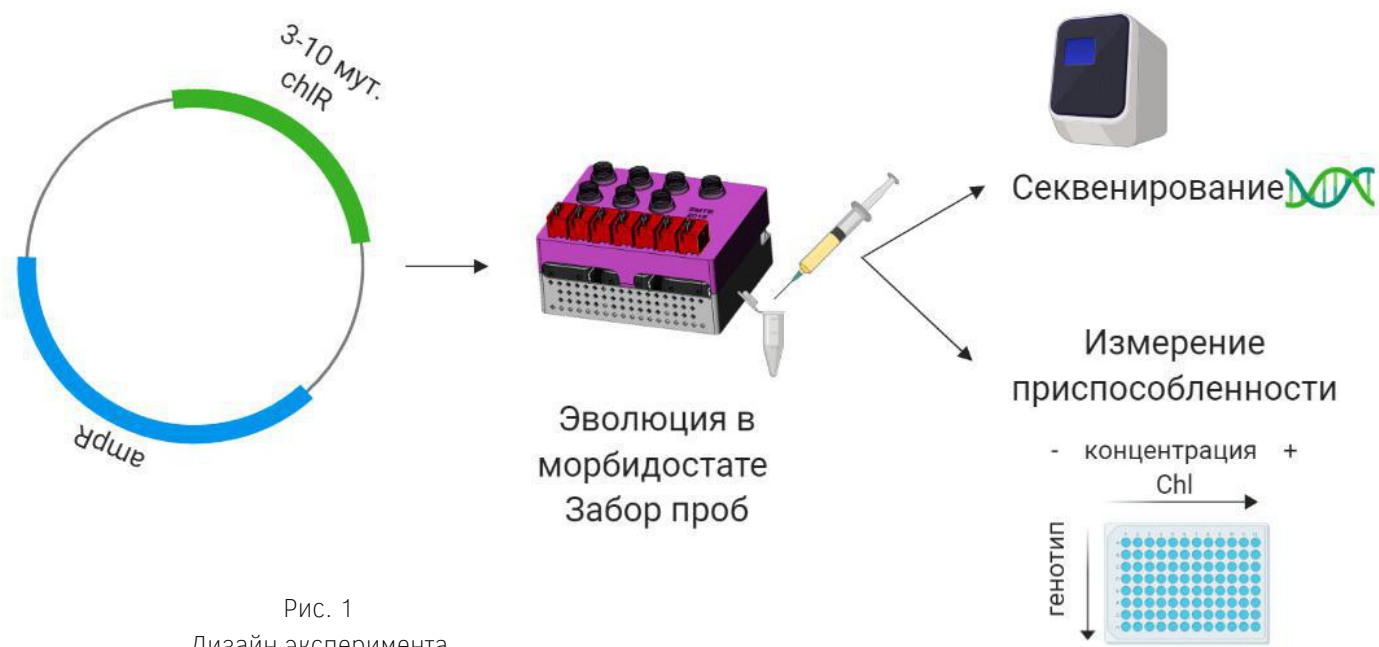


Введение

В последние десятилетия изучение процессов адаптации в реальном времени значительно усовершенствовалось. Однако их существенным ограничением является постоянное сокращение питательных ресурсов, что ведет к замедлению репликации бактерий. Таким образом уменьшается количество мутаций, доступных для селекции. Чтобы устранить эту проблему, мы использовали морбидостат. В качестве организмов мы выбрали бактерий с мутациями в последовательности гена устойчивости к антибиотику. Это может помочь составить представление об адапционных путях, появляющихся в процессе эволюции.

Дизайн эксперимента



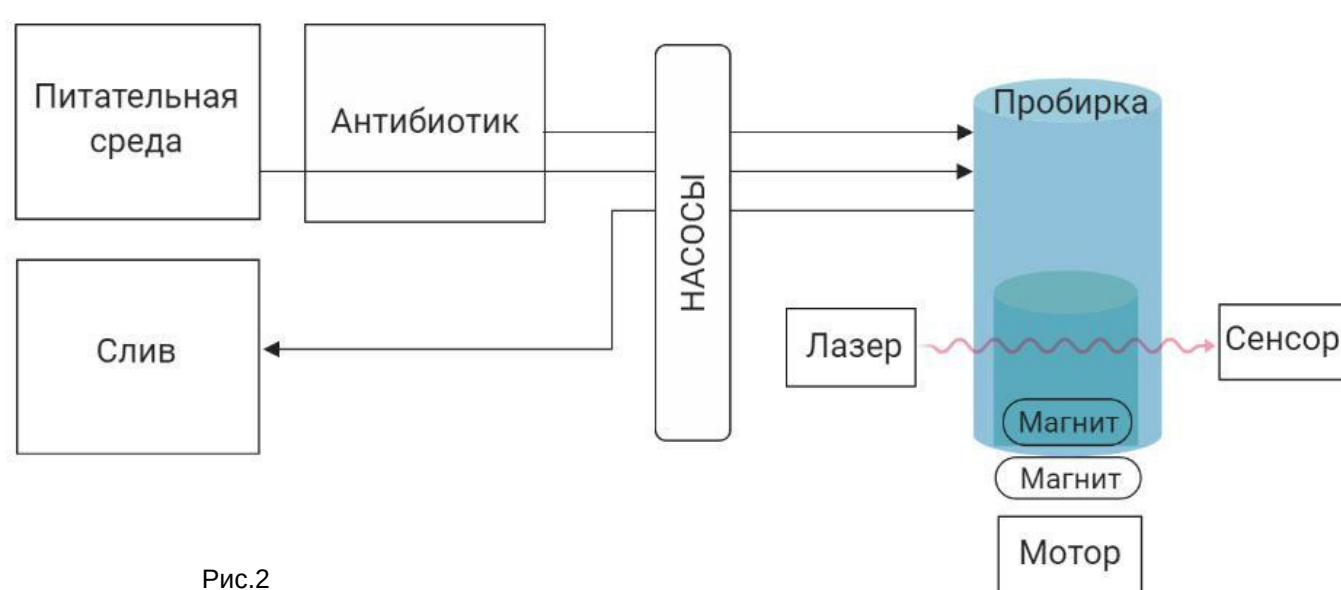
В эксперименте мы использовали библиотеку плазмид с мутантными вариантами гена резистентности к хлорамфениколу. Данные плазмиды так же содержали рабочий ген устойчивости к ампициллину. После трансформации бактерий данной библиотекой были отобраны клоны со сломанным геном ChIR, из которых были выбраны 6 мутантов для дальнейшей эволюции.

В морбидостате концентрация антибиотика повышалась постепенно в зависимости от темпа роста бактерий. Это подвергло бактерии селекции и давало эволюционное преимущество наиболее приспособленным.

Два дня подряд в одно и то же время мы брали образцы из каждой пробирки для дальнейшего анализа. Ген ChIR был амплифицирован и отсеквенирован. Чтобы установить количество, тип и расположение мутаций, мы сравнили полученные последовательности с изначальными.

Определение приспособленности в эксперименте способность мутанта расти в среде с определённым количеством антибиотика. Экспериментальное измерение приспособленности осуществлялось путём помещения мутантов из различных популяций в различные среды с возрастающим содержанием антибиотика.

Методы



Морбидостат регулирует концентрацию антибиотиков в питательной среде, основываясь на оптической плотности среды. Оптическая плотность (OD) измеряется с помощью лазеров и детекторов. Антибиотики и питательная среда периодически закачивается в пробирки, а избыточная жидкость откачивается в емкость для отходов с помощью насосов. Среда внутри пробирки автоматически перемешивается при помощи магнитов. Прибор контролируется Raspberry Pi.

Литература:

- 1) Toprak E, Veres A, Yildiz S, et al. Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. Nat Protoc. 2013;8(3):555-567. doi:10.1038/nprot.nprot.2013.021
- 2) Toprak E, Veres A, Michel JB, Chait R, Hartl DL, Kishony R. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nat Genet. 2011;44(1):101-105. Published 2011 Dec 18. doi:10.1038/ng.1034

Результаты

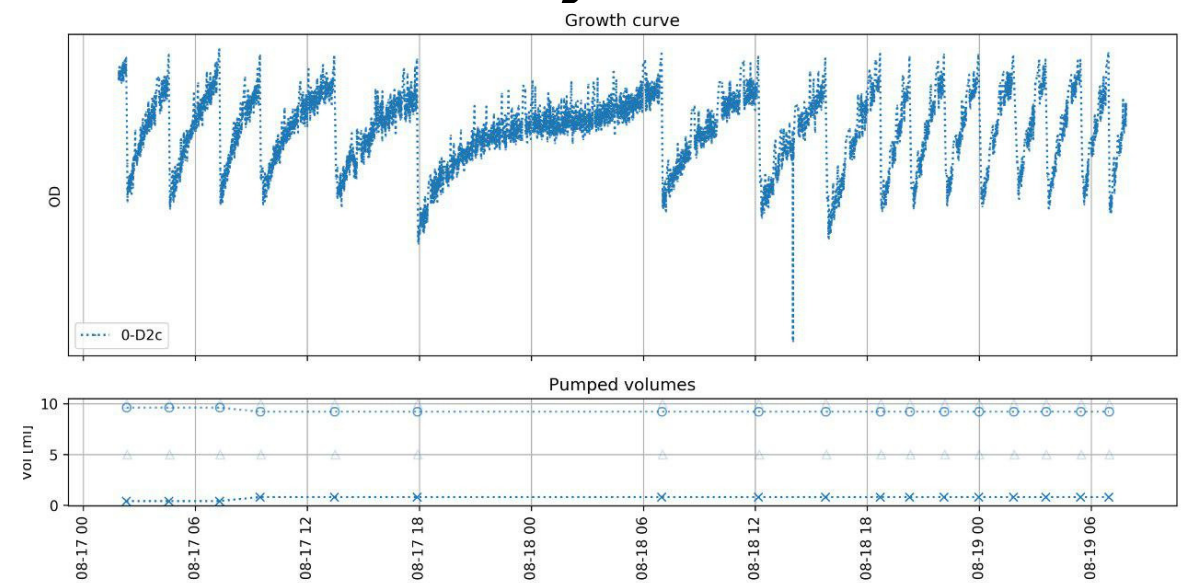


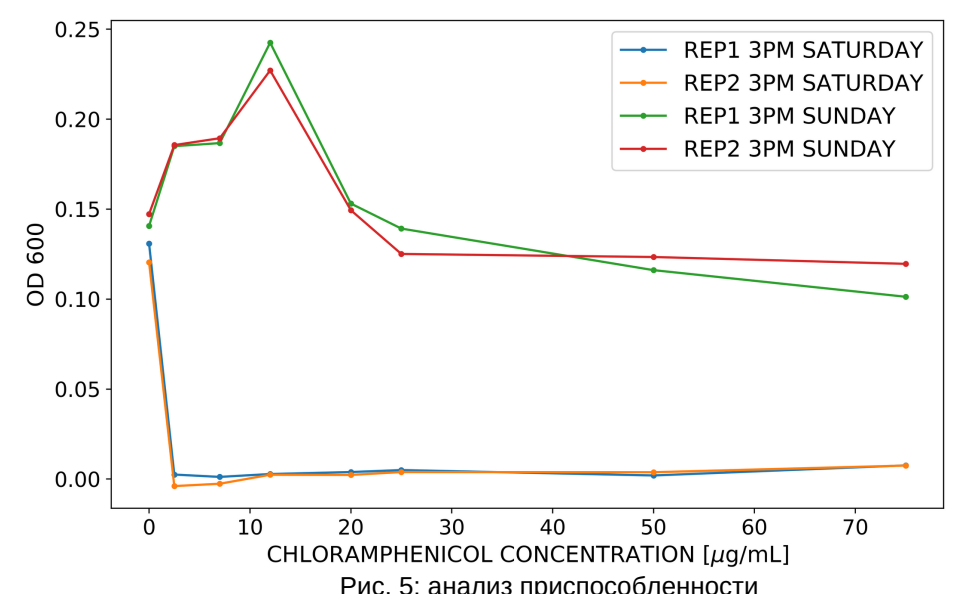
Рис. 3: на данном графике мы видим, как при увеличении концентрации антибиотика темп роста бактерий замедляется. По истечению некоторого времени популяция приобретает устойчивость к данной концентрации антибиотика и переходит к экспоненциальному росту.



Рис. 4
Результаты секвенирования

Данные секвенирования не выявили приобретённых мутаций в гене резистентности за исключением одной популяции: изначально плазида имела мутацию в старт-кодоне и нонсенс-кодоне в середине, но после одного дня экспозиции в морбидостате мы обнаружили вставку нуклеотида, которая привела к образованию нового старт-кодона, однако стоп-кодон в середине последовательности не был исправлен.

В первый день бактерии не показали резистентность к антибиотику (оранжевая и голубая линия), но на следующий день мы наблюдали повышение оптической плотности, что свидетельствует о повышении приспособленности (зелёная и красная линии). Тем не менее, мы имеем более высокие оптические плотности на 12 мкг/мл, чем на концентрации антибиотика 0 мкг/мл для бактерий 2-го дня, что показывает, что наш метод не лишён технических недочётов.



Обсуждение

Несмотря на то, что все популяции адаптировались к хлорамфениколу, только в одной из них произошла мутация непосредственно в плазмиде. Возможно, мутации в остальных популяциях произошли не в интересующей нас плазмиде, а, например, в одной из других плазмид или в хромосомной ДНК бактерий. Другое возможное объяснение заключается в том, что в каждой клетке присутствует несколько копий данной плазмиды. Изменения в одной или нескольких из них могут дать значительное эволюционное преимущество, но не быть замеченным при секвенировании методом Сенгера.

Результаты, полученные из анализа измерения приспособленности, также могут быть подвергнуты сомнению. В лунках, содержащих большее количество антибиотика, наблюдалась повышенная оптическая плотность по сравнению с лунками с меньшим его количеством. (см. Рисунок ...). Возможным объяснением является различное соотношение мертвых и живых клеток при инокуляции. Поскольку мы измерили оптическую плотность культур в лунках без маркировки мертвых клеток, невозможно определить, сколько клеток было жизнеспособно в начале эксперимента.

Выводы

- 1) Некоторые популяции приобрели резистентность, обусловленную мутациями вне гена chIR.
- 2) Для выяснения механизма адаптации необходимо полногеномное секвенирование.
- 3) Возможна оптимизация морбидостата:
 - автоматизация регуляции концентрации антибиотика в пробирках. Измерение объема затраченной среды и антибиотика с последующей подачей сигнала о необходимости замены среды;
 - обособить насосы от основного корпуса морбидостата;
 - обеспечить просматриваемость пробирок, создав окошко в боковой стене корпуса.

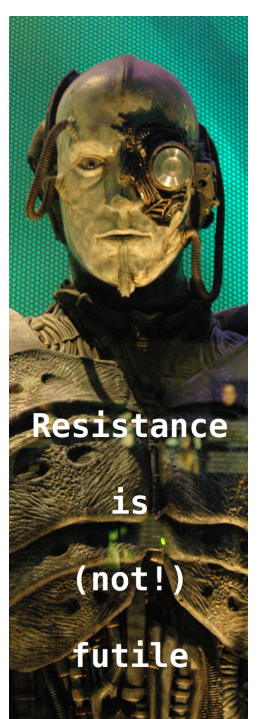


Рис. 6
Мем