

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-182-191

УДК 578.347:579.25

Г.Ю. Фисунов<sup>1</sup>, Т.А. Семашко<sup>1</sup>, Д.В. Евсютина<sup>1</sup>, Е.А. Цой<sup>1</sup>, Д.Р. Харрасов<sup>1</sup>, К.С. Гумаюнова<sup>2</sup>,  
И.В. Тучков<sup>2</sup>, К.А. Никифоров<sup>2</sup>, Д.А. Рыбальченко<sup>2</sup>, В.В. Кутырев<sup>2</sup>, В.М. Говорун<sup>1</sup>

### Синтез генома бактериофага N4

<sup>1</sup>ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины», Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФКВН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В настоящее время бактериофаги рассматриваются как альтернатива антибиотикам для профилактики и терапии инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, в частности холеры. **Цель** работы – продемонстрировать метод получения синтетического бактериофага, специфически активного в отношении *Vibrio cholerae*. В качестве объекта выбран вибриофаг N4. **Материалы и методы.** Последовательность генома вибриофага N4 (38,5 тыс. п.о.) взята из базы данных NCBI GenBank. Последовательность генома была разбита на генные блоки (1500–2000 п.о.). Генные блоки, в свою очередь, разбиты на олигонуклеотиды. Разбиение последовательности проводилось с помощью разработанного нами программного обеспечения BAC-browser. Олигонуклеотиды были химически синтезированы. Из них собраны генные блоки. Затем из полученных генных блоков синтезирован полный геном вибриофага N4. Сборка синтетического генома проходила в два этапа. На первом этапе получены кассеты генных блоков по 5–7 штук размером от 7 до 10,5 тыс. п.о. с помощью гомологичной рекомбинации в дрожжах. Затем полученные кассеты амплифицированы и использованы для сборки *in vitro* с помощью 5'-3'-экзонуклеазы и термостабильной ДНК-полимеразы. Полученный препарат использовался для электропорации клеток *V. cholerae*. **Результаты и обсуждение.** Синтетический геном вибриофага N4 был доставлен с помощью электропорации в штамм *V. cholerae* M818 O1 биовар Эль Тор. В результате наблюдалось образование литических бляшек на газоне *V. cholerae*. Разработанный нами спектр технологий: программное обеспечение для дизайна сборок, ферменты и буферы для синтеза генных блоков и их сшивки методом гомологичной рекомбинации *in vitro*, метод получения сборок крупного размера в дрожжах – можно использовать для получения искусственных бактериофагов с рациональным дизайном генома.

**Ключевые слова:** холера, бактериофаг, синтез генома.

Корреспондирующий автор: Фисунов Глеб Юрьевич, e-mail: g.fisunov@sysbiomed.ru.

Для цитирования: Фисунов Г.Ю., Семашко Т.А., Евсютина Д.В., Цой Е.А., Харрасов Д.Р., Гумаюнова К.С., Тучков И.В., Никифоров К.А., Рыбальченко Д.А., Кутырев В.В., Говорун В.М. Синтез генома бактериофага N4. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 1:182–191. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-182-191  
Поступила 29.12.2023. Отправлена на доработку 11.03.2024. Принята к публ. 21.03.2024.

G.Yu. Fisunov<sup>1</sup>, T.A. Semashko<sup>1</sup>, D.V. Evsyutina<sup>1</sup>, E.A. Tsoy<sup>1</sup>, D.R. Kharrasov<sup>1</sup>, K.S. Gumayunova<sup>2</sup>,  
I.V. Tuchkov<sup>2</sup>, K.A. Nikiforov<sup>2</sup>, D.A. Rybal'chenko<sup>2</sup>, V.V. Kutyrav<sup>2</sup>, V.M. Govorun<sup>1</sup>

### Synthesis of the Genome of Bacteriophage N4

<sup>1</sup>Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Abstract.** At present, bacteriophages are considered as an alternative to antibiotics in prevention and treatment of bacterial infections, in particular cholera. **The aim** of the work was to demonstrate a method to obtain synthetic bacteriophage against *Vibrio cholerae*. Bacteriophage N4 was selected as a subject for the study. **Materials and methods.** The genome sequence of bacteriophage N4 (38.5 kb) was taken from the NCBI GenBank database. The sequence was divided into gene blocks of 1500–2000 bp. The gene blocks, in turn, were split into oligonucleotides. Sequence partitioning was carried out using the BAC-browser software that we have developed. Oligonucleotides were chemically synthesized; gene blocks were assembled from them. After that, the complete genome of bacteriophage N4 was synthesized from the obtained gene blocks. The assembly of the synthetic genome took place in two stages. At the first stage, gene block cassettes of 5–7 pieces with sizes ranging from 7 to 10.5 thousand bp were generated via homologous recombination in yeast. The resulting cassettes were then amplified and used for *in vitro* assembly using 5'-3' exonuclease and thermostable DNA polymerase. The resulting preparation was used for electroporation of *V. cholerae* cells. **Results and discussion.** The synthetic genome of bacteriophage N4 was delivered into the *V. cholerae* strain M818 O1 biovar El Tor using electroporation. As a result, the formation of lytic plaques on the lawn of *V. cholerae* was observed. The range of technologies we have developed: software for assembly design, enzymes and buffers for the synthesis of gene blocks and their cross-linking by homologous recombination *in vitro*, the method for producing large-sized assemblies in yeast can be used to obtain artificial bacteriophages with a rational genome design.

**Key words:** cholera, bacteriophage, genome synthesis.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The work was funded on the instructions of the Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Well-being within the framework of the theme "Creation of artificial cell systems" (registration No. 1022040800170-3-1.6.23).

**Acknowledgements:** The authors express their gratitude to the staff of the laboratory of multi-omics research at the Research Institute of Systems Biology and Medicine: A.S. Speranskaya, A.V. Lukina-Gronskaya, E.V. Korneenko, I.K. Chudinova, O.V. Fedorov for their assistance in sequencing and oligonucleotide synthesis; A.V. Letarov – for help in analyzing the structure of terminal repeats.

**Corresponding author:** Gleb Yu. Fisunov, e-mail: g.fisunov@sysbiomed.ru.

**Citation:** Fisunov G.Yu., Semashko T.A., Evsyutina D.V., Tsoy E.A., Kharrasov D.R., Gumayunova K.S., Tuchkov I.V., Nikiforov K.A., Rybal'chenko D.A., Kutyrev V.V., Govorun V.M. Synthesis of the Genome of Bacteriophage N4. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 1:182–191. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-182-191

Received 29.12.2023. Revised 11.03.2024. Accepted 21.03.2024.

Fisunov G.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6302-8305>  
Semashko T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5389-2776>  
Evsyutina D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8428-5362>  
Tsoy E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0021-3957>  
Kharrasov D.R., ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1616-2848>  
Gumayunova K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1341-3037>

Tuchkov I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0712-8659>  
Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>  
Rybal'chenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>  
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>  
Govorun V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0837-8764>

Холера является особо опасной инфекцией, остается серьезной проблемой здравоохранения во многих странах, что обусловлено высоким риском завоза возбудителя в любую страну мира [1]. Угроза возникновения эпидемии требует разработки мер профилактики и терапии. Бактериофаги могут служить альтернативой антибиотикам, как в плане профилактики, так и терапии инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, в том числе *Vibrio cholerae*. Преимуществами бактериофагов по сравнению с антибиотиками являются отсутствие системных побочных эффектов, связанных с неизбирательным подавлением микробиоты человека, а также преодоление множественной лекарственной устойчивости бактерий. К настоящему времени предложены подходы по использованию вибриофагов, выделенных из природной среды, для профилактики и терапии инфекции, вызываемой *V. cholerae* [2, 3].

История получения бактериофагов с синтетическим геномом насчитывает к настоящему времени порядка двадцати лет. В 2003 г. впервые был синтезирован геном бактериофага φX174 размером 5386 пар оснований (п.о.) [4]. Современный уровень технологий позволяет относительно быстро синтезировать последовательности ДНК, соответствующие среднему размеру геномов бактериофагов (5–50 тыс. п.о.), и доставлять их в клетку для получения фаговых частиц [5, 6]. Использование технологий синтетических бактериофагов позволяет придавать им желаемые свойства, в частности управлять специфичностью и спектром хозяев и создавать системы ухода от защитных механизмов хозяина.

К настоящему времени секвенировано значительное количество геномов бактериофагов, выделенных из бактерий рода *Vibrio*. В базе данных ENA (European Nucleotide Archive, раздел Phages) содержится 73 полных генома вибриофагов, размеры которых варьируют от 5 до более чем 100 тыс. п.о. Однако для применения в качестве средства профилактики и лечения подходят только облигатно литические бактериофаги. Среди вибриофагов с геномами «малого» размерного класса (5–7 тыс. п.о.) нам не удалось обнаружить таковых. Кроме того, все представленные в базе данных ENA вибриофаги с геномами «малого» размерного класса несут гомологи хотя бы одного из холерных токсинов. Поэтому вибриофаги с геномами «малого» размерного класса были исключены из

рассмотрения. Среди вибриофагов «среднего» размерного класса нами выбран такой, геном которого, по нашей оценке, был качественно отсекален.

Мы разработали технологическую цепочку для получения синтетической ДНК крупного размера, в которой осуществлено импортозамещение основных критических компонентов: программное обеспечение (ПО) для дизайна сборок и олигонуклеотидов, ферментов и буферов, методов получения сборок крупного размера *in vitro* и в клетках дрожжей.

**Цель работы** – продемонстрировать метод получения синтетического бактериофага, специфически активного в отношении *V. cholerae*.

Для демонстрации работоспособности разработанной нами технологической цепочки был проведен синтез генома вибриофага N4 размером 38,5 тыс. п.о. Последовательность генома вибриофага N4 [7] взята из базы данных NCBI GenBank. ДНК соответствующей последовательности синтезирована химико-ферментативным способом и доставлена в клетки *V. cholerae* методом электропорации.

## Материалы и методы

### Дизайн сборки генома бактериофага N4.

Разбиение генома вибриофага N4 на синтетические олигонуклеотиды и фрагменты для дальнейшей иерархической сборки осуществлялось в автоматическом режиме с помощью ПО VAS-browser [5] с дополнительно разработанным в нем модулем для синтетической биологии [8]. (Программу можно скачать по ссылке <https://sysbiomed.ru/upload/VAS-browser-2.1.zip> или на странице лаборатории системного анализа микроорганизмов НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора [раздел «Разработанное программное обеспечение»]: <https://sysbiomed.ru/laboratories/laboratoriya-sistemnogo-analiza-mikroorganizmov/>.)

**Синтез олигонуклеотидов.** Синтез олигонуклеотидов осуществлялся на приборе Dr. Oligo 768XLc (BioLytic, США) с использованием синтетических планшетов Biosomma емкостью 2 нмоль на лунку. В качестве носителя использовалось пористое стекло с порами размером 1000 Å с универсальным линкером Glen UnySupport 1000 (N-Метил-сукцинимидо[3,4-b]-7-оксабицикло[2.2.1]гептан-6-(4,4'-диметокситритилокси)-5-сукциноил

алкиламино-CPG). В качестве мономеров использовались четыре классических защищенных ДНК-фосфорамидита: Bz-dA, Bz-dC, iso-Bu-dG и dT (каталожные номера LK2003, LK2004, LK2002, LK2001; LGC Biosearch, КНР).

Цикл синтеза включал в себя стадии снятия защиты (2·60 мкл 3 % трихлоруксусной кислоты в дихлорэтаноле), присоединения (2 раза по 30 экв. избытка в пересчете на 0,05М в MeCN раствора фосфорамидитов), кэпирования (Cap Mix A: [80 % ТГФ, 10 % пропионового ангидрида, 10 % пиридина] Cap Mix B: [90 % ТГФ, 10 % 1-метилимидазола]) и окисления (0,02М I<sub>2</sub> в ТГФ/пиридин/вода [70:20:10]).

Последняя ДМТ-защита снималась вручную и смыв анализировался на предмет оптической плотности. Аммонолиз производился сухим аммиаком под давлением. Затем готовые олигонуклеотиды смывались с носителя дистиллированной водой объемом 150 мкл и смывы собирались в планшеты на 384 лунки. Концентрации определяли по оптической плотности на длинах волн 260/280 нм. Чистота была охарактеризована методом гель-электрофореза (18 % ПААГ, бромистый этидий) и выборочно – методом МАЛДИ (Brucker Ultraflex, матрица – гидроксипиколиновая кислота).

**Сборка генных блоков.** Олигонуклеотиды пулировались с помощью автоматической платформы Тесан Evo. Выравнивание по концентрациям не проводилось. 2 мкл олигонуклеотидного пула переносилось в 50 мкл реакции полимеразной цепной сборки [8]. Буфер для сборки включал 50 мМ КСl, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 5 мМ спермидин, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 0,1 % Тритон X-100, 100 мкг/мл БСА, модифицированная ДНК-полимераза Pfu (2 ед. активности). Температурный цикл: 96 °С – 15 с; 57 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин; 20 циклов. Далее 2 мкл продукта сборки переносилось в 50 мкл реакционной смеси для амплификации. Буфер для амплификации включал 50 мМ КСl, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 0,1 % Тритон X-100, 100 мкг/мл БСА, модифицированная ДНК-полимераза Pfu (2 ед. активности).

**Гомологичная рекомбинация *in vitro*.** Реакция гомологичной рекомбинации *in vitro* проводилась в буфере, содержащем 67 мМ глицина, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ АТФ, 1 мМ ДТТ, 0,2 мМ каждого дНТФ, 1 мкл препарата экзонуклеазы из фага лямбда (Exo), модифицированная ДНК-полимераза Pfu (2 ед. активности), рН 9,3. Смесь инкубировалась при 40 °С 5 мин, затем при 55 °С 2 ч.

**Сборка крупных фрагментов ДНК в клетках *Saccharomyces cerevisiae*.** Трансформация *S. cerevisiae* осуществлялась по методу [9] с изменениями. Вектор pRS426 линейризовался и нарабатывался с помощью ПЦР. Смесь из линейризованного вектора pRS426 и линейных фрагментов для вставки использовалась для трансформации химически компетентных клеток *S. cerevisiae* BY4741. Клетки выращивали в среде YPD сутки. Затем культуру разбавляли в

50 раз средой YPD и подращивали до оптической плотности OD<sub>600</sub> 0,5. К осадку клеток *S. cerevisiae* добавляли 240 мкл 50 % PEG-4000, 18 мкл 2М ацетата лития и до 50 мкл смеси ДНК. Клетки инкубировали при 42 °С 20 мин. Затем клетки осаждали и высеивали на чашки с селективной средой без урацила (CM –URA) и инкубировали при 30 °С трое суток.

Крупные колонии высевали на жидкую среду без урацила (CM –URA) и инкубировали на качалке при 30 °С сутки. Затем клетки осаждали центрифугированием 5000 gcf 5 мин. Осадок промывали 1 мл 100 мМ Трис рН 8,5. Клетки осаждали и ресуспендировали в буфере для лизиса клеточной стенки: 1 мл 10 мМ Трис рН 7,5, 2 мкл бета-меркаптоэтанола, 2 мкл препарата зимолиазы. Клетки инкубировали 1 час при 37 °С. Клетки осаждали центрифугированием 5000 gcf 5 мин. Осадок ресуспендировали в буфере для лизиса: 400 мкл 10 мМ Трис рН 7,5 и 100 мкл 10 % SDS. Клетки инкубировали 20 мин при 65 °С. Затем добавляли 300 мкл 9М ацетата аммония и инкубировали 30 мин на льду. Образцы центрифугировали при 16000 gcf 5 мин. Супернатант отбирали и добавляли 750 мкл хлороформа. Образцы центрифугировали при 16000 gcf 5 мин. Верхнюю фазу отбирали и добавляли равный объем смеси изопропанола и 0,1 % 3М ацетата аммония. Образцы инкубировали на –80 °С 30 мин. Образцы центрифугировали при 16000 gcf 15 мин. Осадки промывали 80 % этанолом и растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Собранную вставку амплифицировали ПЦР с модифицированной ДНК-полимеразой Pfu.

**Сборка полного генома вибриофага N4 гомологичной рекомбинацией *in vitro*.** Фрагменты генома вибриофага N4 сшивались методом гомологичной рекомбинации *in vitro*. Фрагменты смешивались между собой эквимолярно, по 700 нг в реакцию. Амплификация продукта сшивки проводилась с использованием набора WGA Display («ДНК-дисплей», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Кратко: к 1,5 мкл смеси после реакции гомологичной рекомбинации *in vitro* добавляли 10 мкл 2,5x Master mix и 2 мкл SD-полимеразы. Реакцию проводили по программе: 92 °С – 2 мин, затем 6 циклов 92 °С – 40 с, 30 °С – 2 мин, 68 °С – 5 мин, затем 18 циклов 92 °С – 30 с, 62 °С – 1,5 мин, 68 °С – 5 мин, затем инкубация 68 °С – 5 мин.

**Трансформация и культивирование *V. cholerae*.** Трансформацию *V. cholerae* проводили как описано в [10] с изменениями. Клетки ночной культуры *V. cholerae* O1 M818 биовара Эль Тор засеивались в 3 мл среды LB и культивировались при 37 °С в условиях интенсивной аэрации до достижения оптической плотности 0,7–0,8. Культура отмывалась 4 раза по 800 мкл 2 мМ раствором CaCl<sub>2</sub> и ресуспендировалась в 50 мкл 0,5 М раствора сахарозы. Для трансформации использовался 1 мкл образца фаговой ДНК. Электропорация проводилась на приборе Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, США) при 2,5 кВ, 25 мкФ, 200 Ом. После электропорации к суспензии клеток

добавляли 300 мкл среды SOC и переносили в пробирку на 1,5 мл. Культуру инкубировали 1,5 ч на качалке при 37 °С и 200 об/мин.

После этого проводили определение наличия успешно собравшихся вирионных частиц по методу Грациа. Для этого в пробирки с 0,7 % питательным агаром, расплавленным на водяной бане и остуженным до температуры 45 °С, добавляли культуру *V. cholerae* O1 M818 после электропорации. Содержимое пробирок перемешивали и выливали вторым слоем в чашки Петри с 1,5 % агаром. После застывания среды чашки с посевом инкубировали при 37 °С 18–24 ч [11].

После получения зон просветления каждую негативную колонию (бляшку) вырезали из агара и эмульгировали в 0,1–0,3 мл бульона Хоттингера. К полученному материалу добавляли 0,5 мл компетентной бульонной бактериальной культуры, чувствительной к фагу. Содержимое пробирок перемешивали и выливали вторым слоем в чашки Петри с 1,5 % агаром. После застывания среды чашки с посевом инкубировали при 37 °С 18–24 ч. Данная методика позволила сохранить максимально возможное количество фагового материала для последующего пассажа на компетентной культуре *V. cholerae* M818 O1 биовара Эль Тор.

**Секвенирование содержимого бляшки.** Агар, содержащий частицы вирионов в зоне просветления на газоне *V. cholerae* M818, эмульгировали в бульоне Хоттингера, центрифугировали, выдерживали 30 мин с хлороформом в соотношении 1:10. Затем отбирали надосадочную жидкость. ДНК осаждали добавлением 1 объема изопропанола и 10 % объема 3М ацетата натрия (рН 5,2). Выделенный препарат подвергли полногеномной амплификации с использованием набора WGA Display («ДНК-дисплей», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Секвенирование проводилось на приборе MGI DNBSEQ G-400 с набором PE150 (парноконцевые прочтения по 150 нт). Библиотеку для секвенирования приготавливали в соответствии с протоколом производителя. В результате получено 18 726 492 качественных прочтения (88,73 % от общего числа). Таксономическая классификация прочтений проводилась с помощью Kraken2. Затем проводилась *de novo* сборка контигов. После этого контиги, классифицированные Kraken2 как относящиеся к вибриофагу N4, картировались на референсный геном.

## Результаты и обсуждение

**Разбиение генома вибриофага N4 на олигонуклеотиды.** Размер опубликованного генома вибриофага N4 [7] составляет 38497 п.о. Для синтеза была выбрана последовательность генома этого вибриофага, так как для него показана широкая специфичность к *V. cholerae* биовара Эль Тор, а его геномная последовательность качественно проаннотирована. Вибриофаг N4 относится к группе T7-подобных бак-

териофагов. Как было показано ранее, репликация геномной ДНК (гДНК) T7-подобных бактериофагов протекает как минимум на начальных стадиях в линейной форме [12]. Вилка репликации движется от одного края гДНК к другому. При репликации важную роль играют терминальные повторы на концах линейной гДНК фага. Анализ частот встречаемости к-меров в геноме вибриофага N4 выявил наличие зон повторов в начале и в конце опубликованной последовательности вида СТАТСАТСААГА. В результате получено два варианта дизайна синтетического генома вибриофага N4: непосредственно как он опубликован и с добавлением участка размером 300 п.о. с повторами с конца геномной последовательности в ее начало. Таким образом, во втором варианте зона повторов была продублирована в начале и в конце гДНК. В дальнейшем эффективность репликации (т.е. число бляшек и способность расти в следующих пассажах) второго варианта оказалась существенно выше.

Разбиение целевой последовательности на генные блоки и олигонуклеотиды является одним из ключевых шагов в процессе синтеза ДНК. В настоящей работе для данной цели разработано программное обеспечение в виде дополнительного модуля к программе VAS-browser [13], созданной нами ранее. Алгоритм разбиения работает иерархически. Вначале происходит разбиение последовательности на генные блоки – фрагменты ДНК, перекрывающиеся по краям и удобные для ферментативного синтеза *in vitro*. Затем происходит разбиение генных блоков на олигонуклеотиды. Алгоритм позволяет вводить бреши между перекрывающимися олигонуклеотидами. Введение брешей, с одной стороны, позволяет экономить на синтезе олигонуклеотидов. С другой стороны, за счет брешей можно обходить участки, мало пригодные для высокоспецифичного отжига олигонуклеотидов.

Дизайн зон отжига олигонуклеотидов происходит с использованием алгоритма термодинамического выравнивания, т.е. значение dG образования дуплекса для всех зон отжига подбирается максимально близким друг к другу. Такой подход позволяет эффективно отсекал неспецифические дуплексы в сложной смеси из нескольких десятков олигонуклеотидов с помощью подбора температуры плавления. Дизайн праймеров для амплификации и клонирования генных блоков происходит автоматически. В настоящей работе использовано разбиение на генные блоки по 1500–2000 п.о. и олигонуклеотиды со средней длиной порядка 60 нуклеотидов (длина перекрывающихся концов  $24 \pm 5$  нт, размер бреши – до 10 нт). Средняя длина блока в 1500 п.о. выбрана для удобства секвенирования по Сэнгеру. В целом такой размер является средним для генного блока. Аналогичная длина генного блока (1400 п.о.) была применена при синтезе искусственного минимального генома микоплазмы [14]. Платформа Codex BioXP использует генные блоки размером 350–1800 п.о. [15]. В результате геном вибриофага

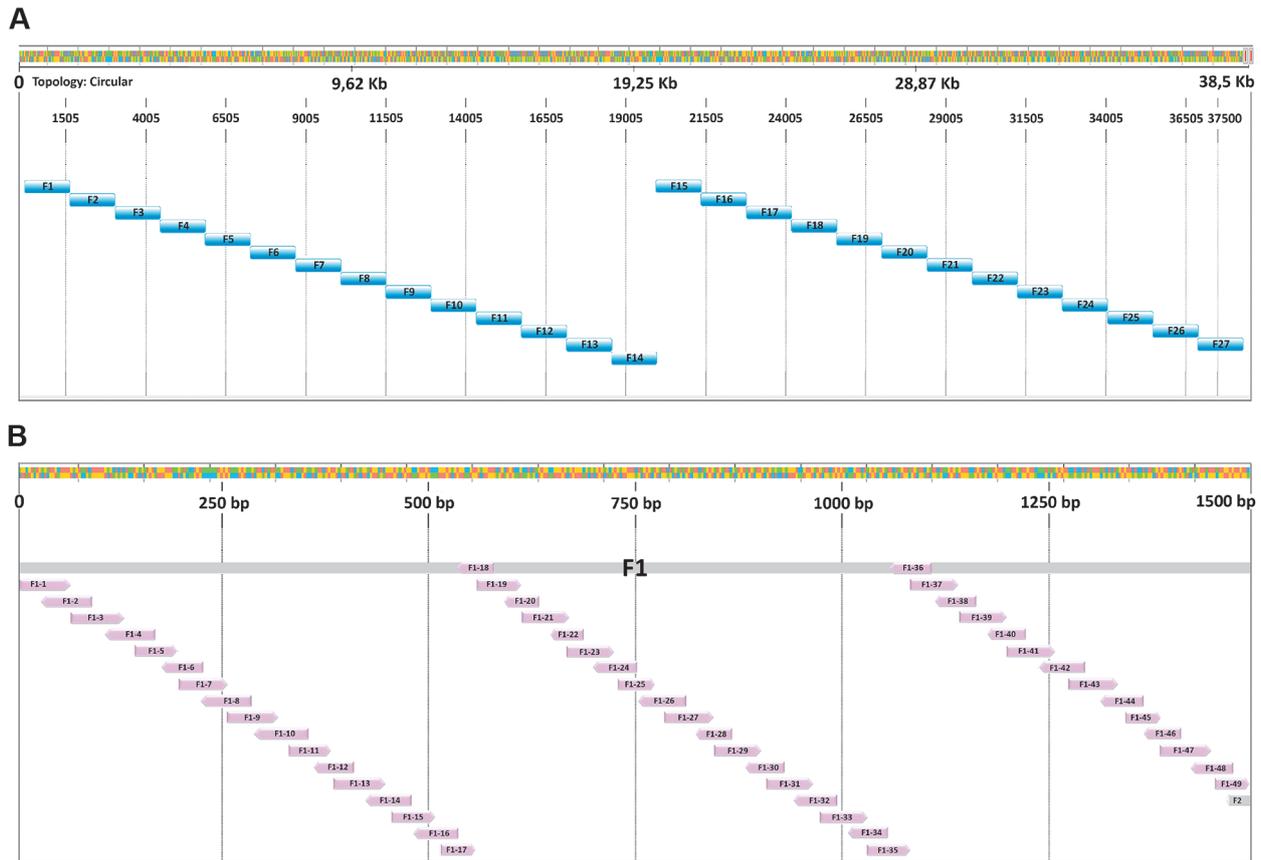


Рис. 1. Дизайн генных блоков для синтетической сборки вибриофага N4. Референсный геном бактериофага визуализирован на верхней полосе:

A – 27 перекрывающихся генных блоков, визуализированных голубыми прямоугольниками, каждый из которых собирается из синтетических олигонуклеотидов; B – разбивка на олигонуклеотиды одного из генных блоков (первого): олигонуклеотиды визуализированы розовыми стрелками; генный блок – серым прямоугольником

Fig. 1. The design of gene blocks for synthetic assemblage of N4 vibriophage genome; reference genome is shown on the upper lane: A – 27 overlapping gene blocks shown as blue rectangles, each is assembled from the synthetic oligonucleotides; B – the design of oligonucleotides for gene blocks (block 1 as an example): oligonucleotides are shown as magenta arrows; gene block is shown as gray rectangle

N4 был разбит на 27 генных блоков (рис. 1). Всего для синтеза полного генома вибриофага N4 использовалось 1308 олигонуклеотидов. Количество олигонуклеотидов в одном блоке варьировалось от 42 до 74 (в среднем 48 шт).

**Синтез генных блоков** проводился методом полимеразной цепной сборки [8]. Для этого синтетические олигонуклеотиды для каждого генного блока объединялись в один пул. Для пулирования олигонуклеотидов было разработано программное обеспечение, дополняющее ПО Tecan Evo. Созданное ПО позволяет сконструировать скрипт для пулирования олигонуклеотидов автоматически в графическом интерфейсе за счет сопряжения с дизайном олигонуклеотидов в VAS-browser.

Для полимеразной цепной сборки нами в НИИ СБМ создан фермент – модифицированная ДНК-полимераза из *Purococcus furiosus*, отличающаяся повышенной процессивностью и точностью [8]. Полимеразная цепная сборка проходила в два этапа: 1) пул олигонуклеотидов достраивался с использованием высокоточной ДНК-полимеразы без добавления праймеров; 2) достроенный пул ис-

пользовался в качестве матрицы для амплификации целевого продукта с праймерами. Полученные генные блоки (рис. 2, A, B) клонировались по одному в вектор pTZ57 с помощью гомологичной рекомбинации *in vitro*. Зона гомологии с вектором составляла 20 п.о. и вносилась в генные блоки с помощью праймеров на этапе амплификации. Линейная плазмида pTZ57 нарабатывалась с помощью ПЦР. Зоны гомологии были стандартизированы для всех блоков и автоматически закладывались в праймеры для каждого генного блока на этапе разбиения. Плазмиды, содержащие вставку генного блока, секвенировались по Сэнгеру с фланкирующих праймеров M13F и M13R для поиска корректных сборок.

**Сборка фрагментов ДНК по 7–10 тыс. п.о. в дрожжах.** Сборка крупных фрагментов генома вибриофага N4 проводилась с помощью гомологичной рекомбинации в клетках *S. cerevisiae* BY4741 [16]. Корректно собранные на предыдущем этапе генные блоки амплифицировались с соответствующих плазмид. Затем генные блоки пулировались по 5–7 штук и использовались для трансформации *S. cerevisiae* вместе с линейным вектором pRS426. Линейаризация

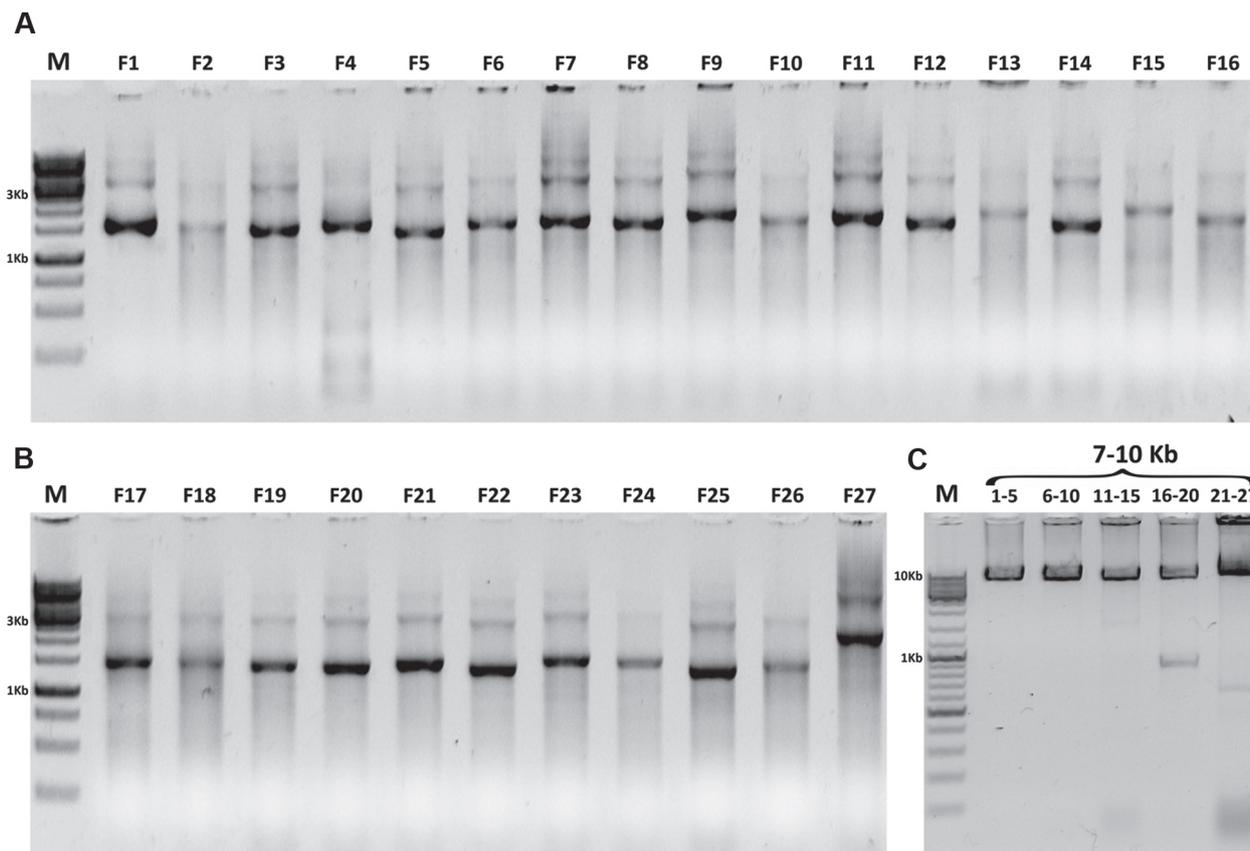


Рис. 2. Синтезированные фрагменты генома вибриофага N4:

A, B – генные блоки, собранные из синтетических олигонуклеотидов. Маркер GeneRuller 1Kb (Thermo Fisher); C – крупные фрагменты генома вибриофага N4 (7–10 тыс. п.о.), собранные из генных блоков. Маркер GeneRuller Mix (Thermo Fisher)

Fig. 2. Agarose electrophoresis of the synthesized gene blocks 1–27 of synthetic vibriophage N4 genome:

A, B – gene blocks assembled from synthetic oligonucleotides. Marker GeneRuller 1Kb (Thermo Fisher); C – second-order gene blocks of 7–10 Kb.p. assembled from 1500 b.p. gene blocks. Marker GeneRuller Mix (Thermo Fisher)

и наработка вектора pRS426 проводились с помощью ПЦР. Зоны гомологии были стандартизованы как для pTZ57, так и для pRS426. В результате получены блоки размером от 7 до 10 тыс. п.о. (рис. 2, C). Полученные генные сборки верифицировались с помощью нанопорового секвенирования.

**Сборка полноразмерной гДНК вибриофага N4 *in vitro*.** Одним из принципов, положенных нами в основу дизайна фаговых геномов, является принцип конструктора, дающий возможность оперативного изменения части синтетического бактериофагового генома, например кодирующие аппарат распознавания и прикрепления к хозяину. Для реализации этого принципа был разработан метод сборки крупных фрагментов ДНК с помощью гомологичной рекомбинации *in vitro*. Полученные блоки объединены с помощью созданной нами системы гомологичной рекомбинации *in vitro* и амплифицированы с помощью мезофильной SD-полимеразы (рис. 3, A).

Принцип сборки гомологичной рекомбинации *in vitro* основан на получении липких концов путем частичного гидролиза дцДНК экзонуклеазой (5'-3' или 3'-5'). Полученные липкие концы могут гибридизоваться друг с другом при наличии гомологии. Затем бреши могут репарироваться с помощью

ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы *in vitro* или *in vivo*. Первый вариант такого метода был предложен D.G. Gibson *et al.* в ходе получения первого синтетического генома бактерии *Mycoplasma mycoides* [16]. Метод Гибсона предполагает использование трех ферментов: 5'-3'-экзонуклеазы фага лямбда, высокоточной термофильной ДНК-полимеразы и термофильной ДНК-лигазы (Taq-лигазы). Метод Гибсона сейчас коммерциализован компанией NEB в виде набора NEBuilder. К настоящему времени предложен ряд вариаций метода: TEDA [17], SENAX [18] и др. Было предложено использовать другие экзонуклеазы, в том числе с 3'-5'-активностью, а также отказаться от использования ДНК-лигазы и ДНК-полимеразной активностей. В этом случае починка брешей осуществляется непосредственно в клетках-реципиентах генетической конструкции.

В работе мы применили вариацию метода гомологичной рекомбинации *in vitro* с использованием ферментов и реакционных буферов, производимых в НИИ СБМ: 5'-3'-экзонуклеазы из фага λ (Exo) и высокоточной ДНК-полимеразы (модифицированная Pfu-полимераза).

**Трансформация клеток *V. cholerae* синтетической геномной ДНК вибриофага N4.** Для транс-

формации использовался штамм *V. cholerae* M818 O1 биовара Эль Тор (выделен в Балаково в 1970 г). Он относится к типичным штаммам биовара Эль Тор, вызвавшим текущую (седьмую) пандемию холеры. Штамм M818 несет генетические маркеры типичного Эль Тор: гены холерного токсина *ctxAB3* и токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpAEltor*. Штамм выбран в качестве модельного, так как относится к типичным, в соответствии со специфичностью тестируемых фаговых конструкций. Кроме того, данный штамм не содержит фага N4 или ему подобных и лишен большинства известных антифаговых систем [19]. В силу этого фаговая конструкция не может быть элиминирована из-за проявления свойства поверхностного исключения. У штаммов биовара Эль Тор отсутствует CRISPR-Cas-система, что исключает возможность разрушения фаговой конструкции этим путем. Синтетическая геномная ДНК вибриофага N4 была доставлена в клетки *V. cholerae* M818 O1 биовара Эль Тор с помощью электропорации. После чего определяли наличие успешно собранных вирионных частиц по методу Грация. В результате наблюдалось образование зон просветления (литических бляшек, рис. 3, В–Н). Полученные вирионные частицы сохраняли литические свойства в двух последовательных пассажах на компетентной культуре *V. cholerae* M818 O1 биовара Эль Тор.

**Секвенирование содержимого литической бляшки.** Содержимое одной из литических бляшек было подвергнуто высокопроизводительному секвенированию на приборе DNBSEQ G-400.

Полученные прочтения анализировались как метагеномный образец. Прочтения классифицировались с помощью программного обеспечения Kraken2 [20] (рис. 4, А, В). В результате в образце 42 % пришлось на ДНК человека (*Haplorhini*), 32 % – *V. cholerae*, 13 % – *Acinetobacter baumannii*, 2 % – *Staphylococcus sciurii*, 0,8 % – на вирусы. Из 0,8 % вирусных прочтений 99 % пришлось на вибриофаг N4. Средняя глубина секвенирования геномов вибриофага N4 и *V. cholerae* составила 1075 и 434 прочтения на нуклеотид соответственно. Далее прочтения, относящиеся к вибриофагу N4, были использованы для сборки *de novo*. В результате референсный геном вибриофага N4 был покрыт на 78,7 % (рис. 4, С). При картировании прочтений на полную последовательность генома вибриофага N4 без предварительной сборки покрытие составило 86,3 %. Мы предполагаем, что пробелы в покрытии являются следствием особенностей пробоподготовки и секвенирования образца. В частности, это может быть следствием неравномерности полногеномной амплификации, а также недостаточности глубины покрытия.

Геномы бактериофагов можно разделить на несколько размерных классов: геномы «малого» размера – порядка 5–7 тыс. п.о., геномы «среднего» размера – 30–40 тыс. п.о. и геномы «большого» размера – 100–200 тыс. п.о. (согласно базе данных ENA). К бактериофагам с геномом «малого» размера относится такой классический объект синтетической биологии, как фХ174 [4]. Синтез таких геномов наиболее прост, так как весь геном умещается в одну сборку

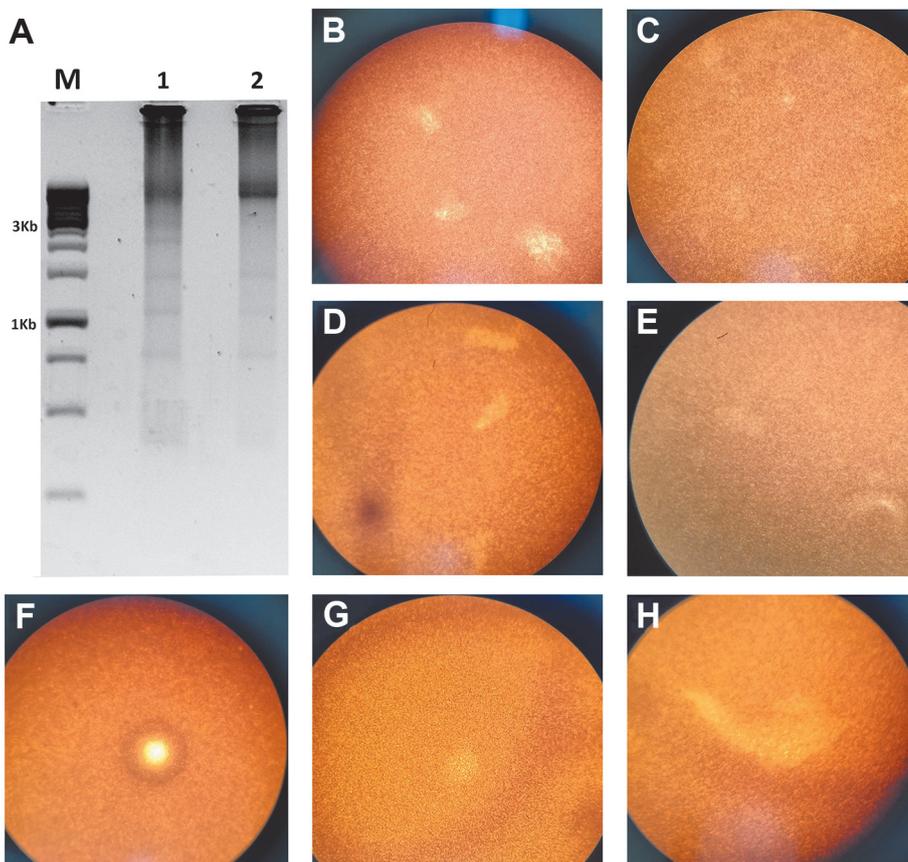


Рис. 3. Литический эффект синтетического вибриофага N4 на клетки *V. cholerae*:

А – полногеномная амплификация фаговой ДНК после шивки с помощью системы *in vitro* гомологичной рекомбинации. Маркер GeneRuler 1Kb (Thermo Fisher); В – Н – литические бляшки, на газоне *V. cholerae*, наблюдаемые после трансформации клеток синтетической фаговой ДНК

Fig. 3. Lytic effect of synthetic vibriophage N4 on *V. cholerae* cells:

А – whole genome amplification after *in vitro* homologous recombination assembly of synthetic N4 bacteriophage genome; В – Н – lytic plaques on a lawn of *V. cholerae*, observed after transformation of cells with synthetic phage DNA

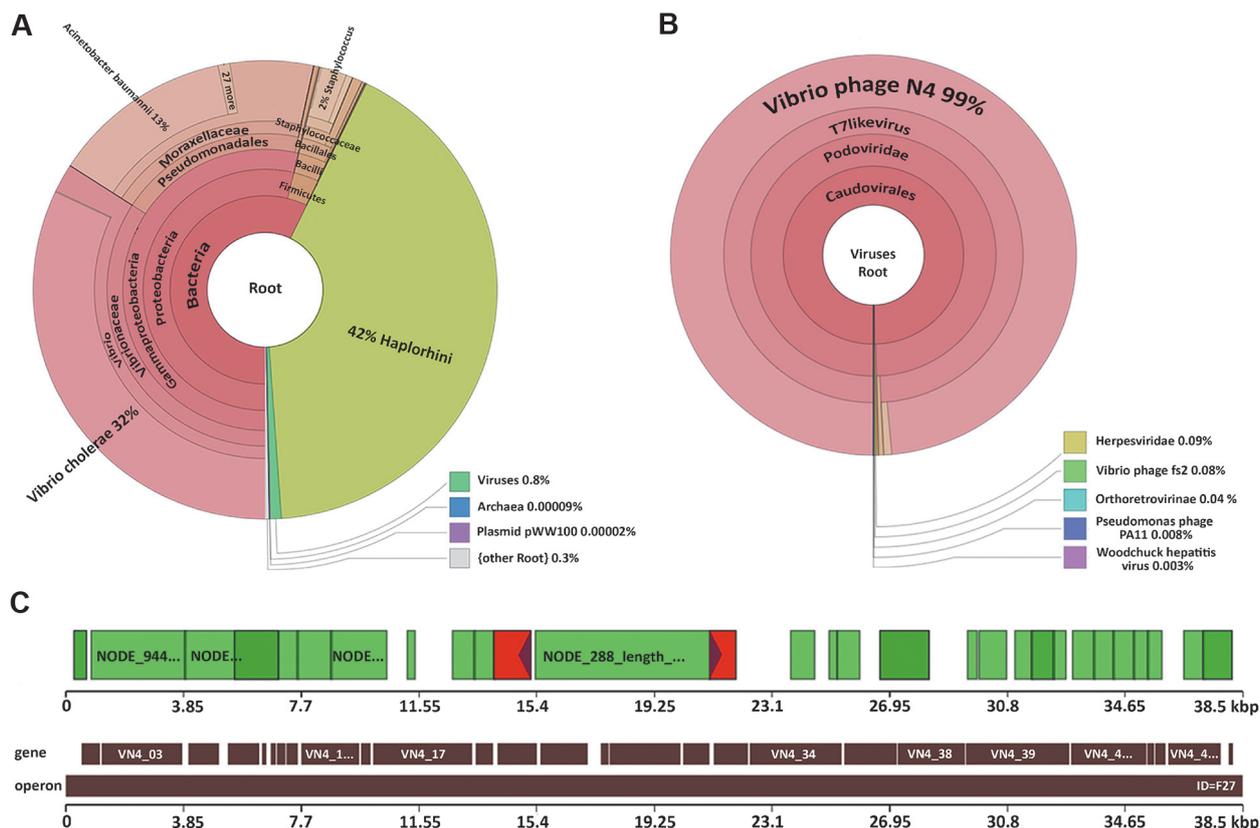


Рис. 4. Секвенирование содержимого литической бляшки: *A* – классификация прочтений в образце бляшки с помощью программного обеспечения Kraken2; *B* – классификация прочтений, интерпретированных на предыдущем этапе как вирусные (группа Viruses 0,8 %); *C* – покрытие прочтениями вибриофага N4 референсной последовательности его генома: зеленым и красным показано покрытие; коричневым – аннотация геномной последовательности

Fig. 4. Sequencing of the contents of the lytic plaque: *A* – classification of the reads from the lytic plaque sample using Kraken2 software; *B* – classification of reads interpreted at the previous stage as viral (Viruses 0.8% group); *C* – coverage of the genome reference sequence by vibriophage N4 reads from the sample: green and red colors show coverage; brown color – genomic sequence annotation

из нескольких генных блоков (3–5 шт.). Сборка такого размера может осуществляться из генных блоков непосредственно ПЦР, минуя стадии клонирования в вектор и секвенирования вставок [4]. Правильные последовательности отбираются затем естественным отбором после доставки в клетки хозяина, т.е. сборки с ошибками, в отличие от корректных сборок, реплицируются менее эффективно или вообще не реплицируются. Такой подход также позволяет избежать токсичности фаговых последовательностей для клеток, реплицирующих векторы с промежуточными сборками, например *Escherichia coli*. К настоящему времени получен ряд синтетических бактериофагов с геномами «малого» размерного класса [21, 22]. Геном вибриофага N4, синтезированный в рамках настоящей работы, относится к «среднему» размерному классу. Это требует промежуточного клонирования и верификации собираемой последовательности, а также технологии сборки, клонирования и хранения последовательностей более крупного размера.

Получение синтетических бактериофагов не сводится к получению их синтетических геномов по опубликованным данным или компьютерному предсказанию. Не менее важен метод «оживления» полученной конструкции в клетке. В связи с этим

проблемой для «оживления» вибриофага N4 стала структура его ориджина репликации. Репликация T7-подобных фагов, к которым относится вибриофаг N4, происходит в линейной форме, по крайней мере на ранних этапах инфекционного процесса [12]. Первоначальная версия синтетического генома повторяла опубликованную последовательность [7]. После доставки такой ДНК в клетки *V. cholerae* наблюдались редкие события образования литических бляшек, при дальнейшем пересеве наблюдалось образование только одной бляшки в одном из пересевов (т.е. фаг не пересевался). В предполагаемом ориджине репликации нами обнаружены повторы вида СТАТКАТСААГА. Далее дополнительная область размером 300 п.о. с конца опубликованной последовательности, содержащая обнаруженные повторы, была добавлена к предполагаемому ориджину репликации в ее начало. Такая мера позволила провести два пересева синтетического вибриофага. Мы предполагаем, что дальнейшая доработка структуры ориджина репликации может существенно улучшить стабильность получаемого вибриофага. Таким образом, можно заключить, что предлагаемый нами метод может быть использован для получения синтетических вибриофагов.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Финансирование.** Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» (регистрационный номер 1022040800170-3-1.6.23).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории мультиомиксных исследований НИИ СБМ А.С. Сперанской, А.В. Лукиной-Гронской, Е.В. Корнеевко, И.К. Чудинову, О.В. Фёдорову за помощь в секвенировании и олигонуклеотидном синтезе, А.В. Летарову за помощь в анализе структуры концевых повторов.

### Список литературы

1. WHO Report. Cholera – Global situation. 2023. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437>.
2. Аноприенко А.О., Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П. Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2020; 16(3):10–3.
3. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрин А.В. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(3):290–7. DOI: 10.36233/0372-9311-39.
4. Smith H.O., Hutchison C.A. 3rd, Pfannkoch C., Venter J.C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003; 100(26):15440–5. DOI: 10.1073/pnas.2237126100.
5. Lartigue C., Vashee S., Algire M.A., Chuang R.-Y., Benders G.A., Ma L., Noskov V.N., Denisova E.A., Gibson D.G., Assad-Garcia N., Alperovich N., Thomas D.W., Merryman C., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C., Glass J.I. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science*. 2009; 325(5948):1693–6. DOI: 10.1126/science.1173759.
6. Cheng L., Deng Z., Tao H., Song W., Xing B., Liu W., Kong L., Yuan S., Ma Y., Wu Y., Huang X., Peng Y., Wong N.K., Liu Y., Wang Y., Shen Y., Li J., Xiao M. Harnessing stepping-stone hosts to engineer, select, and reboot synthetic bacteriophages in one pot. *Cell Rep. Methods*. 2022; 2(5):100217. DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100217.
7. Das M., Nandy R.K., Bhowmick T.S., Yamasaki S., Ghosh A., Nair G.B., Sarkar B.L. *Vibrio cholerae* typing phage N4: genome sequence and its relatedness to T7 viral supergroup. *Intervirology*. 2012; 55(3):185–93. DOI: 10.1159/000323525.
8. Семашко Т.А., Фисун Г.Ю., Цой Е.А., Харрасов Д.Р., Чудинов И.К., Евсютина Д.В., Швелёв Г.Ю., Говорун В.М. Современные подходы к *de novo* синтезу протяженных фрагментов ДНК: сборка широкого репертуара последовательностей. *Acta Naturae*. 2024; 16(1).
9. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 1983; 153(1):163–8. DOI: 10.1128/jb.153.1.163-168.1983.
10. Gonzales M.F., Brooks T., Pukatzki S.U., Provenzano D. Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Vis. Exp.* 2013; (80):6–11. DOI: 10.3791/50684.
11. Литусов Н.В. Бактериофаги: иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: УГМА; 2012. 38 с.
12. Tamanoi F., Saito H., Richardson C.C. Physical mapping of primary and secondary origins of bacteriophage T7 DNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980; 77(5):2656–60. DOI: 10.1073/pnas.77.5.2656.
13. Garanina I.A., Fisunov G.Y., Govorun V.M. BAC-BROWSER: The tool for visualization and analysis of prokaryotic genomes. *Front. Microbiol.* 2018; 9:2827. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02827.
14. Hutchison C.A. 3rd, Chuang R.Y., Noskov V.N., Assad-Garcia N., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Gill J., Kannan K., Karas B.J., Ma L., Pelletier J.F., Qi Z.Q., Richter R.A., Strychalski E.A., Sun L., Suzuki Y., Tsvetanova B., Wise K.S., Smith H.O., Glass J.I., Merryman C., Gibson D.G., Venter J.C. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 2016; 351(6280):aad6253. DOI: 10.1126/science.aad6253.

15. BioXp™ 3200 System: User's Guide. No. 40010. P. 1–25.
16. Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Young L., Qi Z.Q., Segall-Shapiro T.H., Calvey C.H., Parmar P.P., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010; 329(5987):52–6. DOI: 10.1126/science.1190719.
17. Xia Y., Li K., Li J., Wang T., Gu L., Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gky1169.
18. Dao V.L., Chan S., Zhang J., Ngo R.K.J., Poh C.L. Single 3'-exonuclease-based multifragment DNA assembly method (SENAX). *Sci. Rep.* 2022; 12(1):4004. DOI: 10.1038/s41598-022-07878-x.
19. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Челдышова Н.Б. Анализ антифаговых систем в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНИСО*. 2023; 31(11):94–100. DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100.
20. Wood D.E., Lu J., Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019; 20(1):257. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0.
21. Liu Y., Han Y., Huang W., Duan Y., Mou L., Jiang Z., Fa P., Xie J., Diao R., Chen Y., Ye Y., Yang R., Chen J., Sun X., Li Z., Tang A., Gui Y., Cai Z. Whole-genome synthesis and characterization of viable S13-like bacteriophages. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41124.
22. Yang R., Han Y., Ye Y., Liu Y., Jiang Z., Gui Y., Cai Z. Chemical synthesis of bacteriophage G4. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27062. DOI: 10.1371/journal.pone.0027062.

### References

1. WHO Report. Cholera – Global situation. 2023. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437>.
2. Anoprienko A.O., Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P. [Creation of an experimental prophylactic drug based on cholera bacteriophages]. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2020; 16(3):10–3.
3. Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Anoprienko A.O., Romanova L.V., Tyurina A.V. [Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic bacteriophages of *Vibrio cholerae*]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2021; 98(3):290–7. DOI: 10.36233/0372-9311-39.
4. Smith H.O., Hutchison C.A. 3rd, Pfannkoch C., Venter J.C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003; 100(26):15440–5. DOI: 10.1073/pnas.2237126100.
5. Lartigue C., Vashee S., Algire M.A., Chuang R.-Y., Benders G.A., Ma L., Noskov V.N., Denisova E.A., Gibson D.G., Assad-Garcia N., Alperovich N., Thomas D.W., Merryman C., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C., Glass J.I. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science*. 2009; 325(5948):1693–6. DOI: 10.1126/science.1173759.
6. Cheng L., Deng Z., Tao H., Song W., Xing B., Liu W., Kong L., Yuan S., Ma Y., Wu Y., Huang X., Peng Y., Wong N.K., Liu Y., Wang Y., Shen Y., Li J., Xiao M. Harnessing stepping-stone hosts to engineer, select, and reboot synthetic bacteriophages in one pot. *Cell Rep. Methods*. 2022; 2(5):100217. DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100217.
7. Das M., Nandy R.K., Bhowmick T.S., Yamasaki S., Ghosh A., Nair G.B., Sarkar B.L. *Vibrio cholerae* typing phage N4: genome sequence and its relatedness to T7 viral supergroup. *Intervirology*. 2012; 55(3):185–93. DOI: 10.1159/000323525.
8. Semashko T.A., Fisunov G.Y., Tsoi E.A., Kharrasov D.R., Chudinov I.K., Evsyutina D.V., Shevelev G.Yu., Govorun V.M. [Modern approaches to *de novo* synthesis of extended DNA fragments: assembly of a wide repertoire of sequences]. *Acta Naturae*. 2024; 16(1).
9. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 1983; 153(1):163–8. DOI: 10.1128/jb.153.1.163-168.1983.
10. Gonzales M.F., Brooks T., Pukatzki S.U., Provenzano D. Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Vis. Exp.* 2013; (80):6–11. DOI: 10.3791/50684.
11. Литусов Н.В. [Bacteriophages: an Illustrated Textbook]. Yekaterinburg: Ural State Medical Academy; 2012. 38 p.
12. Tamanoi F., Saito H., Richardson C.C. Physical mapping of primary and secondary origins of bacteriophage T7 DNA replica-

- tion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980; 77(5):2656–60. DOI: 10.1073/pnas.77.5.2656.
13. Garanina I.A., Fisunov G.Y., Govorun V.M. BAC-BROWSER: The tool for visualization and analysis of prokaryotic genomes. *Front. Microbiol.* 2018; 9:2827. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02827.
14. Hutchison C.A. 3rd, Chuang R.Y., Noskov V.N., Assad-Garcia N., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Gill J., Kannan K., Karas B.J., Ma L., Pelletier J.F., Qi Z.Q., Richter R.A., Strychalski E.A., Sun L., Suzuki Y., Tsvetanova B., Wise K.S., Smith H.O., Glass J.I., Merryman C., Gibson D.G., Venter J.C. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 2016; 351(6280):aad6253. DOI: 10.1126/science.aad6253.
15. BioXp™ 3200 System: User's Guide. No. 40010. P. 1–25.
16. Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Young L., Qi Z.Q., Segall-Shapiro T.H., Calvey C.H., Parmar P.P., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010; 329(5987):52–6. DOI: 10.1126/science.1190719.
17. Xia Y., Li K., Li J., Wang T., Gu L., Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gky1169.
18. Dao V.L., Chan S., Zhang J., Ngo R.K.J., Poh C.L. Single 3'-exonuclease-based multifragment DNA assembly method (SENAX). *Sci. Rep.* 2022; 12(1):4004. DOI: 10.1038/s41598-022-07878-x.
19. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B. [Analysis of anti-phage systems in *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor strains]. *Zdorovie Náseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment – PHLE]*. 2023; 31(11):94–100. DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100.
20. Wood D.E., Lu J., Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019; 20(1):257. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0.
21. Liu Y., Han Y., Huang W., Duan Y., Mou L., Jiang Z., Fa P., Xie J., Diao R., Chen Y., Ye Y., Yang R., Chen J., Sun X., Li Z., Tang A., Gui Y., Cai Z. Whole-genome synthesis and characterization of viable S13-like bacteriophages. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41124.
22. Yang R., Han Y., Ye Y., Liu Y., Jiang Z., Gui Y., Cai Z. Chemical synthesis of bacteriophage G4. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27062. DOI: 10.1371/journal.pone.0027062.

**Authors:**

Fisunov G.Yu., Semashko T.A., Evsyutina D.V., Tsoy E.A., Kharrasov D.R., Govorun V.M. Research Institute of Systems Biology and Medicine. 18, Nauchny driveway, Moscow, 117246, Russian Federation. E-mail: info@sysbiomed.ru.

Gumayunova K.S., Tuchkov I.V., Nikiforov K.A., Rybal'chenko D.A., Kutuyev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

**Об авторах:**

Фисунов Г.Ю., Семашко Т.А., Евсютина Д.В., Цой Е.А., Харрасов Д.Р., Говорун В.М. Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Российская Федерация, 117246, Москва, Научный проезд, 18. E-mail: info@sysbiomed.ru.

Гумаюнова К.С., Тучков И.В., Никифоров К.А., Рыбальченко Д.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.