

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
Кафедра химии природных соединений
«Московская школа на Юго-Западе № 1543»

**Поиск и изучение антибиотиков,
нарушающих рост *Escherichia coli***

Т. Панова

Научный руководитель:
к.х.н. И. А. Остерман

Москва 2018

Содержание

| | |
|------------------------------|----|
| Введение..... | 3 |
| Обзор литературы..... | 5 |
| Материалы и методы..... | 16 |
| Результаты и обсуждения..... | 28 |
| Выводы..... | 32 |
| Список литературы..... | 33 |

Введение

Поиск новых антибиотиков является актуальной задачей биологии и медицины. Антибиотики – вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения, обладающие способностью подавлять рост или даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы [11]. Основными механизмами действия антибиотиков являются: нарушение бактериальной клеточной стенки; подавление синтеза белка в микробной клетке; нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны; торможение синтеза РНК. Тем самым, антибиотики обладают избирательной токсичностью – они нарушают жизненно важные функции бактерий, не оказывая влияния (или оказывая минимальное влияние) на клетки эукариот [4].

В последние годы во всем мире регистрируется значительный рост устойчивости возбудителей инфекций к антимикробным препаратам [12]. Появление резистентных к антибиотикам патогенов приводит к тому, что ежегодно возрастает смертность от лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций [11], поэтому возникает потребность в антибиотиках, резистентность к которым у бактерий еще не развилась.

Стандартный способ проверки антибактериальной активности заключается в измерении уровня ингибирования клеточного роста, но данный подход имеет несколько недостатков: во-первых, необходимы большие концентрации антибиотика, чтобы увидеть заметное снижение роста (для уверенности, в том, что это вещество обладает антибактериальной активностью), а, во-вторых, при таком способе скрининга нельзя ничего сказать о механизме действия антибиотика.

Мы работали с репортерной системой pDualrep2, которая позволяет одновременно с тестом на эффективность ингибирования клеточного роста определять механизм действия антибиотика. Данная репортерная система основана на генах двух флуоресцентных белков (красного Turbo RFP и вишневого Katushka2S). Экспрессия одного из них увеличивается в

присутствии веществ, вызывающих повреждение ДНК, экспрессия другого увеличивается в случае ингибирования работы рибосомы.

Система обеспечивает высокопроизводительный метод скрининга больших библиотек потенциальных антибиотиков *in vivo*.

Репортер для антибиотиков, используемый в данной работе, основывается на генетически модифицированном аттенуаторе триптофана *Escherichia coli* [7]. Этот аттенуатор потерял чувствительность к концентрациям триптофана из-за замены кодонов триптофана кодонами аланина. Такая система реагирует на появление антибиотика в среде (ингибирование транскрипции) экспрессией нижестоящего репортера. В системе также присутствует возможность детекции повреждения ДНК бактерии посредством активации генов SOS-ответа [7]. Увеличение чувствительности репортеров позволяет выявить более широкий диапазон ингибиторов трансляции, а также то, каким образом происходит ингибирование. Этот репортер подходит для испытаний с высокой пропускной способностью на агаровых пластинах, сводя к минимуму необходимость в пипетировании, использованию реагентов и расходных материалов.

Целью нашей работы является поиск и изучение веществ с антибиотической активностью с помощью репортерной системы pDualrep2. Основные задачи, которые нам предстоит решить: провести первичный скрининг потенциальных антибиотиков (в качестве исследуемого микроорганизма будет применяться *Escherichia coli*); посчитать их минимальную ингибирующую концентрацию.

Обзор литературы

Скрининг

Мы знаем, что для микроорганизмов характерно огромное разнообразие химических реакций, которые они могут осуществлять, и продуктов, которые они образуют. Коммерческими компаниями, в особенности производящими лекарственные препараты, ведется постоянный поиск микроорганизмов, которые могут оказаться полезными. В надежде открыть новые коммерчески важные продукты или более эффективные способы получения имеющихся продуктов собирают и культивируют микроорганизмы со всего света, из самых разных мест обитания. Очень часто это чисто эмпирическая работа в том смысле, что существенную роль в любом открытии играет случай. Проверка микроорганизмов таким путем называется скринингом. Хороший пример – это постоянный скрининг, который проводится с целью обнаружения новых антибиотиков. Первый антибиотик был открыт в 1928 г. Александром Флемингом и назван пенициллином по названию гриба *Penicillium*, который его вырабатывает. Природные антибиотики – это химические вещества, синтезируемые микроорганизмами и убивающие другие микроорганизмы или подавляющие их рост. Начиная с 1928 г. Из микроорганизмов было выделено более 5000 различных антибиотиков, включая ряд слегка различающихся по структуре и активности. Большинство из обнаруженных антибиотиков непригодно для медицинских целей, главным образом из-за их высокой токсичности. Однако представители рода *Streptomyces* оказались чрезвычайно богатым источником различных антибиотиков, включая стрептомицин.

Антибиотики используются для лечения бактериальных или грибковых заболеваний человека и домашних животных. Некоторые из них подавляют также рост раковых опухолей. По-видимому, антибиотики являются продуктами вторичного метаболизма. При систематическом скрининге всегда есть надежда найти новое «чудо-лекарство» или

микроорганизм, который известный антибиотик, но с улучшенными свойствами [11].

Методы поиска веществ с антибактериальной активностью



Микробиологические методы

Метод диффузии основан на способности антибиотических веществ диффундировать в толщу агара и вызывать задержку, торможение или подавление роста тест-микроба. Скорость диффузии растворов антибиотика в агар зависит от химической природы препарата, состава среды и ее рН. Определенное значение имеет рН буфера, в котором готовят рабочие растворы антибиотиков. В связи с этим при определении чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агар следует придерживаться следующих правил проведения опытов [3].

1. Испытание должно проводиться на средах определенного состава, так как диффузия антибиотика различна в зависимости от состава питательного агара. Большое значение при этом имеет рН среды. Так, для антибиотиков типа стрептомицина и стрептотрицина зона угнетения тест микроба увеличивается по мере повышения рН субстрата, для ауреомицина и тетраамицина она уменьшается, а для хлоромидетина – не меняется.

2. Густота посева тест-организма должна быть постоянной для каждой серии опытов.

3. Длительность контакта антибиотиков со средой перед посевом тест-организма должна быть постоянной, так как зона угнетения зависит от времени контакта антибиотика с агаром и величина ее неодинакова для различных антибиотиков. Установлено также, что между моментом посева тест-организма и моментом его прорастания проходит определенный промежуток времени, в течение которого антибиотик продолжает диффундировать в агар.

Для получения более точных количественных данных о чувствительности микробов к антибиотикам при помощи метода диффузии рекомендуется предварительная диффузия препаратов в агар в течение 20–24 часов.

4. Концентрации испытуемых и стандартных растворов антибиотика не должны быть высокими. Только для слабых концентраций антибиотика диаметр зон задержки роста пропорционален концентрации антибиотика. При концентрациях выше определенного предела диаметры зон бывают одинаковыми. Например, зоны одинаковы у 5 и 10%-ных растворов неомидина, 10 и 20%-ных растворов стрептомицина и т. д.

5. Чашки Петри, используемые для опытов, должны иметь ровное дно и один и тот же диаметр, так как толщина агарового слоя оказывает влияние на диффузию антибиотика.

В настоящее время разработаны и применяются разнообразные методы испытания антибиотиков при помощи диффузии в агаре: методы лунок, канавки, цилиндриков, блочков, дисков, таблеток [8].

Метод бумажных дисков. Этот метод был предложен Лу, Скеллом и Торнбери в 1945 г для определения активности антибиотических веществ. Заключается он в том, что стерильные диски из фильтровальной бумаги кладут на поверхность агаровой пластинки, засеянной тест-организмом. Диски смачивают точно дозированным количеством раствора антибиотика или используют диски, пропитанные антибиотиками и выпускаемые нашей промышленностью.

В стерильные чашки Петри диаметром 10 см наливают по 20 мл жидкой питательной среды с агаром. Для получения равномерного бактериального газона на поверхность агара в чашку наливают 1 мл двухмиллиардной взвеси испытуемой культуры. Жидкость распределяют по поверхности чашки равномерно. Избыток жидкости отсасывают пастеровской пипеткой, подсушивают агар или в термостате, или на рабочем столе при закрытой чашке.

На поверхность засеянного твердого агара на расстоянии 2 см от края чашки Петри и на равном расстоянии друг от друга раскладывают пинцетом по одному бумажные диски с антибиотиками. На дне чашки надписывают название антибиотика, которым пропитан диск. Чашки выдерживают при комнатной температуре в течение одного часа, после чего помещают в термостат на 16–18 часов. Для учета результатов определяют диаметр зоны задержки роста микроорганизма вокруг дисков, используя для этого миллиметровую линейку, циркуль, миллиметровую бумагу, или же специальный измеритель.

Отсутствие задержки роста микробов указывает на резистентность данного микроорганизма к данному антибиотику. Зоны, диаметр которых не превышает 15 мм, свидетельствуют о слабой чувствительности к антибиотику. Зоны от 15 до 25 мм встречаются у чувствительных микроорганизмов. Высокочувствительные микробы характеризуются зонами с диаметром более 25 мм.

Метод цилиндриков. При этом методе применяют либо алюминиевые цилиндрики диаметром около 5 мм, длиной около 10 мм, либо стеклянные, нарезанные из трубки и опаянные на пламени с обоих концов. Цилиндрики по трафарету устанавливают на застывшей поверхности агара, засеянного в чашки Петри изучаемыми микроорганизмами. Затем наливают в них различные антибиотики или разведения одного и того же антибиотика. После инкубации в термостате определяют диаметры зон отсутствия роста тестируемого микроорганизма.

Метод цилиндриков можно использовать еще и в такой модификации: в чашку Петри наливают вначале 20 мл агара. После того как агар остынет, на его поверхность наливают еще 5 мл агара, содержащие споры или вегетативные клетки тестируемого микроорганизма, и легким покачиванием распределяют его равномерно по всей поверхности первого слоя. Через один час на поверхность застывшего агара расставляют по трафарету стерильные цилиндрики, а затем вносят в них точно дозированное количество исследуемого антибиотика.

Метод канавки. В стерильные чашки Петри наливают агар и дают ему застыть в этих чашках. Из застывшего агара по диаметру чашки вырезают полоску шириной 1 см. В образовавшуюся канавку наливают расплавленный агар, содержащий определенный процент исследуемого антибиотика. Когда агар в канавке застынет, чашки Петри ставят в термостат на 3–4 час, чтобы произошла диффузия исследуемого антибиотика из канавки в окружающий его агар.

Культуру бактерий высевают на поверхность агара штрихами, перпендикулярными к канавке и пересекающими всю чашку Петри от края до края (включая канавки по диаметру чашки). Затем чашки Петри помещают в термостат для развития бактерий при оптимальной температуре на 20–24 часа.

Результаты учитывают по интенсивности роста. Устойчивые штаммы растут до самой канавки, а иногда даже и по ее поверхности. Рост чувствительных к препарату культур задерживается или прекращается на разных расстояниях от канавки в зависимости от степени чувствительности. Это расстояние можно измерить с помощью миллиметровой линейки.

Метод лунок. Агар в чашке Петри засевают тестируемым микроорганизмом. При помощи прокаленного сверла для пробок в агаре вырезают несколько лунок, в которые наливают одну-две капли расплавленного и остуженного до 45°C агара для образования дна в этой лунке. Затем в получившиеся углубления помещают различные разведения

одного антибиотика. Чашки Петри ставят в термостат на 20–24 часа. Степень чувствительности тестируемого микроорганизма к данному антибиотику определяют по ширине зоны задержки роста, выражаемой в миллиметрах или по концентрации вещества в том последнем разведении, которое еще в состоянии задерживать рост исследуемых микроорганизмов.

Метод агарового блочка. Этот метод был предложен Егоровым в 1957 году. Он заключается в следующем: в чашку Петри наливают 20–25 мл расплавленного питательного агара, пригодного для культивирования микроорганизма. Когда агар застынет, стерильным пробочным сверлом (20–22 мм) вырезают из него блочки, которые при помощи стерильного скальпеля переносят в центр других чашек по одному такому блочку на каждую другую чашку Петри. Затем чашки Петри с блочками заливают питательной средой, оптимальной для выращивания исследуемых микроорганизмов, с таким расчетом, чтобы блочек возвышался над уровнем среды на 1–1,5 мм. Когда агар застынет для удаления лишней конденсированной воды, чашки необходимо подсушить. Затем поверхность агарового блочка засевают культурой исследуемого микроорганизма. Примерно через двое-трое или более суток инкубации данной чашки Петри по радиусам агаровой пластинки в чашке подсевают штрихами данный микроорганизм. После соответствующей инкубации чашек Петри в течение 18–20 часов их просматривают.

Для определения антибиотической активности актиномицетов немного измененный способ агаровых блочков, который заключается в том, что актиномицет сразу высевают сплошным «газоном» на поверхность среды, подходящей для его нормального развития и образования антибиотического вещества. Затем из среды, на которой хорошо развивался актиномицет, вырезают агаровые блочки, и переносят их в стерильные чашки Петри, после чего заливают чашки Петри охлажденной до 65–75°C агаровой средой, благоприятной для роста исследуемых микроорганизмов. Когда агар застынет, чашки помещают на сутки в термостат, чтобы антибиотическое

вещество, которое образует актиномицет, смогло успешно продиффундировать в окружающую среду. А затем подсевают радиальными штрихами исследуемые микроорганизмы.

Метод таблеток. В 1961 году Уайтхауз предложил метод определения антибактериальных свойств веществ при помощи таблеток, которые состоят на 90 % из окислов одного или нескольких металлов: титана, циркония, гафния, тория или церия и на 10% – из целлюлозы. Для связывания таблеток вводят немного агар-агара. В таблетки при их изготовлении, добавляют антибиотик или химиотерапевтический агент. Для определения их активности таблетки накладывают на газоны исследуемых микроорганизмов в чашках Петри.

В 1962 году Бене и др. применяли метод прессования препаратов в таблетки для определения антибактериальной активности малорастворимых веществ. Такие вещества прессуются с тальком в разных соотношениях. Полученные таблетки накладывают на поверхность агара, которую засеяли изучаемыми микроорганизмами. После инкубации чашек Петри на месте наложения таблеток появляются стерильные, небольшие по размерам зоны, различающиеся по содержанию вещества в таблетке.

Метод с применением двухслойного агара для испытания антибактериальной активности антибиотиков. В чашку Петри наливают 20 мл агара (3%) картофельного, капустного или какого-либо другого, на котором хорошо растет испытуемый микроб. Это первый слой. Затем, когда агар застынет, на него наливают 5 мл другого агара (1,5%-ный), в который добавлена суспензия бактерий из расчета на 100 мл среды 1 мл бактериальной взвеси, содержащей примерно 1 млрд. бактериальных клеток (второй слой). После того, как застынет второй слой, в агаре делают пробойником колодцы, в которые наливают каплями антибиотик.

Метод определения бактериостатического действия комбинаций антибиотиков. Для изучения чувствительности бактерий к комбинациям антибиотиков пользуются методом диффузии антибиотиков в

агар. С этой целью применялись бумажные полосы, пропитанные антибиотиками и размещенные на поверхности агара под углом друг к другу. Полученные результаты изображают графически при помощи кривых, определенные типы которых выражают синергическое (эффект действия двух препаратов меньше их суммы, но больше каждого из них), суммарное или антагонистическое действие двух антибиотиков.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам при помощи фазоконтрастного микроскопа. В основе данного метода быстрого определения чувствительности бактерий к веществам с антибиотической активностью лежит принцип наблюдения живых бактерий с помощью фазоконтрастного микроскопа. Испытуемую культуру бактерий наносят в чашку Петри с 3%-ным асцит-агаром. На поверхность среды раскладывают четыре-пять кружочков фильтровальной бумаги, смоченной различными антибиотиками. Через 3–5 часов при помощи фазоконтрастного микроскопа можно определить зону подавления роста бактерий. В зоне подавления роста обнаруживаются только отдельные бактерии, в то время как за пределами ее наблюдается образование типичных микроколоний бактерий.

Методы серийных разведений позволяют количественно оценить чувствительность выделенного микроорганизма к антибактериальным средствам и определить минимальную ингибирующую концентрацию (далее – МИК) антибиотика. Методы серийных разведений основаны на прямом определении величины МИК.

Для определения величины МИК заданные концентрации веществ с антибиотической активностью вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма. После инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста изучаемого микроорганизма [9].

В зависимости от характера используемой питательной среды различают метод серийных разведений в бульоне, метод серийных разведений в агаре.

В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют также два метода серийных разведений: макро метод (в пробирке) и микро метод (величина конечного объема 0,2 мл или еще меньше).

Метод серийного разведения антибиотика в питательной среде (бульоне). Первоначально готовят основной раствор, содержащий определенную концентрацию антибиотиков в специальном растворителе. Из него готовят ряд убывающих разведений антибиотиков в пробирках с бульоном (чаще двукратные) и добавляют испытуемую культуру (обычно 10^5 – 10^6 бактериальных клеток). Контролем служит пробирка с бульоном и культурой без антибиотиков. Сроки инкубации зависят от вида микроорганизма (чаще сутки). Определяют МИК, которая соответствует концентрации препарата в последней пробирке с видимой задержкой роста (прозрачная питательная среда). Для определения минимальной бактерицидной концентрации (далее – МБК) из нескольких последних пробирок с задержкой роста делают посев петлей на сектора чашки Петри. За МБК, которая, как правило, на несколько разведений меньше МИК, принимают концентрацию препарата в последней пробирке, посев из которой не дал роста [3].

Метод серийных разведений в плотных средах во многом аналогичен методу разведений в жидких средах, но определение МБК требует более сложных манипуляций. Этот метод более чувствителен и точен, чем метод бумажных дисков. Готовят двукратные серийные разведения вещества, которое проявляет антибиотическую активность от 1:10 000 до 1:320 000, затем вносят по 1 мл каждого разведения в пробирки, содержащие по 4 мл (или 9 мл) расплавленного и охлаждённого до 45°C агара. Процедуру проводят одной пипеткой с перенесением препарата от меньшей концентрации к большей. Содержимое пробирок быстро вносят в чашки Петри, либо пробирки «скашивают» до застывания агара. Затем агар засевают исследуемой стандартизированной культурой микроорганизмов (петлёй или специальным дозатором, засевающим чашку 36 видами

различных микроорганизмов) и инкубируют 18–20 часов при температуре 37°C. Контролем служит чашка с агаром без антибиотиков. После инкубации определяют МИК по отсутствию видимых признаков роста исследуемых микроорганизмов на чашках Петри (пробирках), содержащих наименьшие концентрации антибиотика. Культура микроорганизмов считается чувствительной, если на месте посева нет роста ни одной колонии.

Химические и физико-химические методы

Химические методы используются для анализа антибиотиков очень редко. Они основаны на поглощении йода продуктами гидролиза пенициллина.

Оптические методы. Колориметрия и спектрофотометрия в видимом свете. Основным достоинством колориметрических методов определения являются их простота, скорость и сравнительно высокая точность, недостатком является их малая специфичность. Для колориметрического определения антибиотика превращают в окрашенные производные. При этом используют цветные реакции либо с самими антибиотиками, либо с продуктами их расщепления.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете. Большинству антибиотиков свойствен характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области, и поэтому определять их спектрофотометрически можно непосредственно. Недостатком является то, что определять антибиотики этим методом можно лишь в отдельно чистых образцах.

Инфракрасная спектроскопия. Этот метод является специфичным для качественного определения антибиотика. Его можно, однако, очень хорошо использовать и для количественного определения. Обычно достигается точность, равная точности спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете. Можно производить количественный анализ как растворов, так и твёрдых веществ. При анализе веществ в растворах необходимо выбрать подходящий растворитель, который сам бы не поглощал инфракрасные лучи в данной области.

Флюорометрия. Это один из наиболее чувствительных методов определения антибиотиков, приближающийся по своей чувствительности к биологическим методам. Главной областью его применения являются тетрациклиновые антибиотики, которые сами по себе флюоресцируют жёлтым светом в умеренной щелочной среде; однако обычно измеряется синяя флюоресценция их продуктов разложения (в щелочной среде). Антибиотики, которые сами по себе не флюоресцируют и не образуют флюоресцирующих продуктов разложения, можно тем не менее определять флюорометрически путём соединения с подходящим флюоресцирующим веществом и выделения подходящего дополнительного соединения.

Оптическое вращение. Поляриметрические методы дают очень надёжные результаты применительно к концентратам оптически активных антибиотиков, если только они не слишком сильно окрашены. Вследствие удобства работы они получили очень широкое применение как обычные методы контроля, в особенности при выделении стрептомицина. Для определения антибиотиков в культуральной жидкости они непригодны, поскольку в этих случаях они малочувствительны.

Полярография. Антибиотики, содержащие в своей молекуле восстанавливающиеся группы (например, нитрогруппы, кетогруппы, примыкающие к одной или более двойной связи, альдегидные группы, карбоксильные группы, примыкающие к двойным связям) либо имеющие хиноподобную структуру, могут быть восстановлены на ртутном капельном электроде и могут поэтому определяться полярографически.

Кроме того, существуют и другие методы определения активности антибиотика, например: радиоактивные изотопы в анализе антибиотиков, кондуктометрия и амперметрическое (полярометрическое) титрование (последние два метода используются крайне редко) [8].

Материалы и методы

Бактериальные среды:

Среда LB (это богатая среда для роста бактерий, бывает и жидкой, и твердой. В работе мы использовали, в основном, твердую среду).

Состав:

5г/л дрожжевого экстракта

10г/л хлорида натрия

10г/л триптона

Способ приготовления твердой питательной среды (на 100 мл):

Сухую смесь LB (2,5 г) смешивали с 1,5% агара (1,5 г).

Получившуюся смесь растворяли в 100 мл дистиллированной воды.

Получившийся раствор проходил стерилизацию в автоклаве.

Полученную смесь разливали по чашкам Петри.

Бактерии:

Клетки *Escherichia coli* BW25113 (дикий тип).

Клетки *Escherichia coli* BW25113 K-12 (штамм, у которого удален белок TolC (штамм dTolC)).

В ходе данного эксперимента были использованы бактерии *Escherichia coli* BW25113 K-12 (штамм dTolC – штамм, у которого удален ген белка TolC). Штамм dTolC более чувствителен к антибиотикам, чем дикий тип бактерии *Escherichia coli*. Белок TolC – канал на внешней мембране грамотрицательных бактерий, он служит внешней частью для нескольких помп множественной лекарственной устойчивости.

Помпа множественной лекарственной устойчивости кишечной палочки *Escherichia coli* состоит из трех основных компонентов: белка внутренней клеточной мембраны AcrB, который за счет мембранного потенциала может перемещать вещества через внутреннюю мембрану адаптерного белка AcrA, связывающего транспортер AcrB с каналом на внешней мембране TolC (Рис. 1). Точный механизм работы помпы остается

недостаточно изученным, однако известно, что вещество, которое помпа должна выбросить за пределы клетки, попадает на внутреннюю мембрану, где его ждет транспортер AcrB, связывается с активным центром помпы и затем за счет энергии встречного движения протона выкачивается за пределы наружной мембраны бактерии [5].

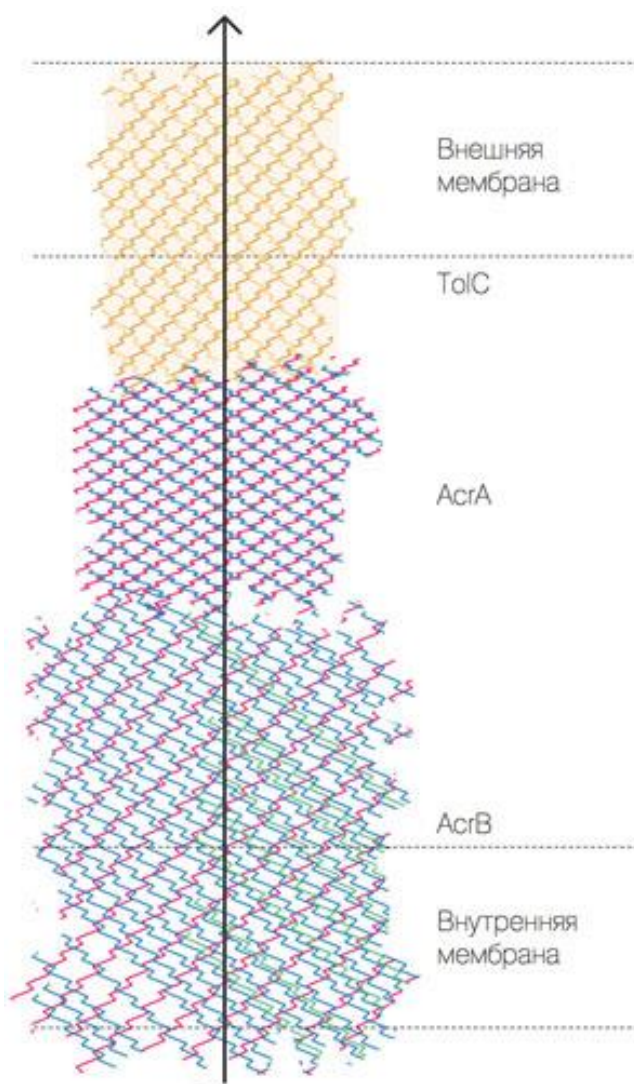


Рис. 1. Помпа множественной лекарственной устойчивости кишечной палочки *Escherichia coli* – AcrAB-TolC [5]

Анализ делеционного мутанта (то есть кишечной палочки без белка TolC) показал, что его резистентность снизилась на два порядка и стала неотличима от резистентности грамположительных бактерий и нерезистентных грамотрицательных бактерий.

Плазмиды:

Чтобы наблюдать действие антибиотика на бактерию мы использовали плазмиду с репортерной системой (pDualrep2). В репортерной системе можно выделить две части. Первая состоит из промотора гена позднего SOS-ответа *SulA* и прикрепленного к нему с С-конца RFP (Red Fluorescent Protein). Если в клетку попадает антибиотик, повреждающий ДНК, то экспрессия гена *SulA* повышается, что можно увидеть на снимках флуоресценции с помощью систем визуализации геля (Рис. 2).

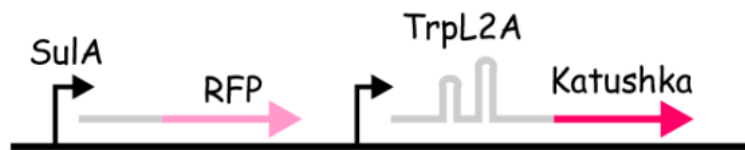


Рис. 2. Схема используемой репортерной системы [7]

Вторая часть используемой нами репортерной системы во многом аналогична встречающемуся в природе триптофановому оперону *Escherichia coli*, регулируемому таким же механизмом аттенюации. В начале оперона находится короткая последовательность нуклеотидов, кодирующая два идущих подряд кодона триптофана. При большой концентрации триптофана в клетке рибосома быстро считывает этот участок гена, в результате чего молекула РНК образует вторичную структуру (шпильку), которая блокирует дальнейшую трансляцию (Рис. 3).

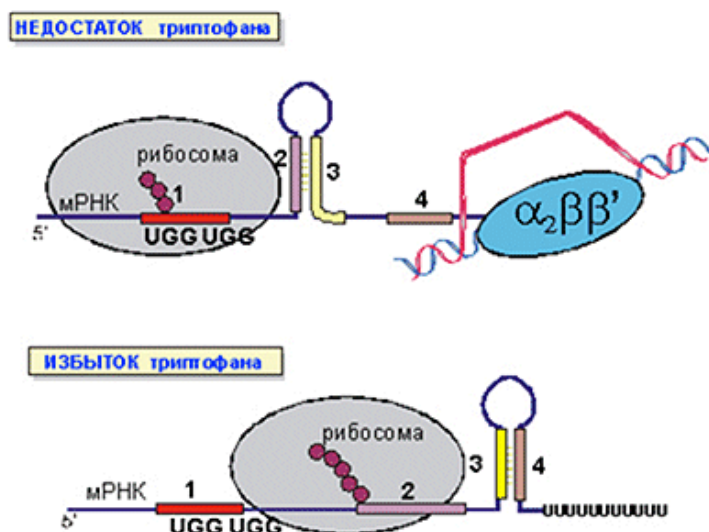


Рис. 3. Работа триптофанового оперона (*trpL*) [7]

При малой концентрации триптофана рибосома останавливается на этих двух последовательностях в связи с недостатком нужных аминокислот-тРНК. В таком случае образуется шпилька, которая не мешает считыванию гена [6].

Аналогично триптофановому оперону в нашем штамме существует система, которая по-разному реагирует на замедление транскрипции. Для того, чтобы скорость синтеза не зависела от процессов, происходящих в клетке, а только от наличия или отсутствия антибиотика в среде, два кодона триптофана были заменены двумя кодонами аланина, скорость трансляции которых рибосомой всегда превышает скорость образования вторичной структуры, ингибирующей трансляцию. Эта модифицированная последовательность лидерного пептида *trpL* была помещена перед началом гена *Katushka2S* (флуоресцентный белок).

Так что при наличии в среде антибиотика, замедляющего трансляцию, шпилька не будет образовываться и экспрессия гена *Katushka2S* пройдет успешно, что будет заметно на флуоресцентной фотографии (Рис. 4).

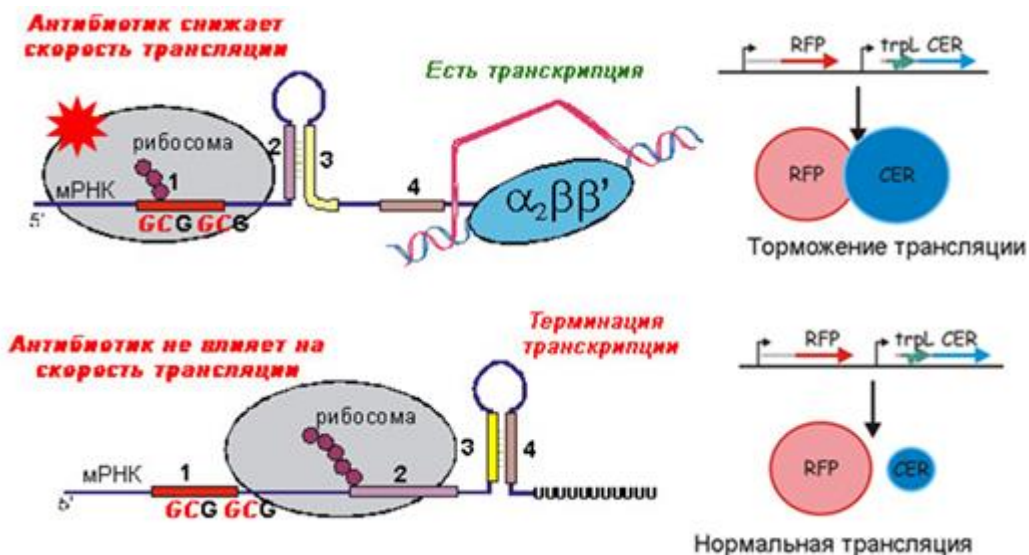


Рис. 4. Схема работы репортера, детектирующего присутствие веществ, замедляющих трансляцию [7]

Плазмида *pDualrep2* содержит следующие части: ориджин репликации, способный поддерживать стабильное число копий плазмиды в

клетке, например, CloDF13, ColE1, p15a, селективный маркер для отбора клеток, содержащих плазмиду, например, ген бета-лактамазы, аминогликозид фосфотрансферазы, гены флюоресцентных белков с различными спектрами флюоресценции, такие как RFP и Katushka2S (Рис. 5).

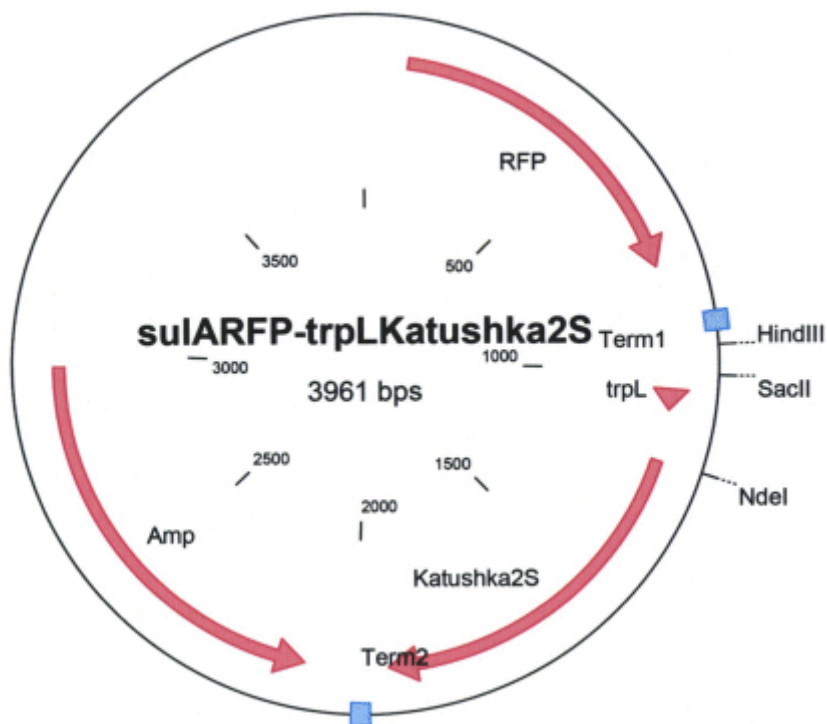


Рис. 5. Схема плазмиды pDualrep2 [7]

При этом необходимо отметить, что порядок расположения участков плазмиды не имеет принципиального значения, важно только, чтобы перед геном флюоресцентного белка Katushka2S находится аттенюатор триптофанового оперона, а перед геном флюоресцентного белка RFP поставлен промотор гена *sulA Escherichia coli*.

Полученная плаزمида позволяет вдвое сократить трудоемкость, время и стоимость скрининга, поскольку можно одновременно идентифицировать как антибиотики, ингибирующие биосинтез белка, так и вызывающие SOS-ответ.

Поскольку RFP флюоресцирует в красном диапазоне 584/607 нм, а Katushka2S в дальне-красном 588/633 нм, для наглядности экспериментальные картинки, полученные с помощью системы,

документирующей флюоресценцию, мы окрашивали в псевдоцвета -RFP в зеленый, Katushka2S в красный.

Манипуляции с бактериями:

Трансформация (способ помещения плазмиды (pDualrep2) в клетку бактерии – метод теплового шока):

Размораживали 100 мкл компетентных клеток (использовали клетки BW25113 *Escherichia coli* K-12, у которого удален белок TolC (dTolC), за счет этого клетки более чувствительны к антибиотикам, так как в них не работает эффлюкс-система TolC).

Добавляли 1 мкл плазмиды.

Инкубировали во льду в течение 20 минут.

Помещали в термостат, нагретый до 42°C, на 45 секунд.

Клетки помещали в лед на 60 секунд.

Добавляли четыре объема среды LB (жидкой) и полученную смесь ставили в термостат на 30-40 минут при 37°C для фенотипической экспрессии.

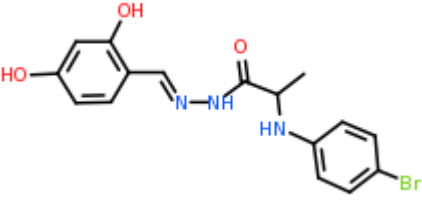
Втирали в чашку Петри с твердой средой LB и с антибиотиком (ампицилином) с помощью стеклянного шпателя Дригальского.

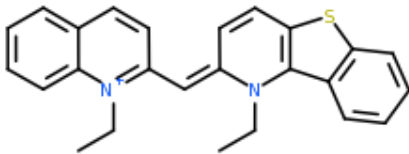
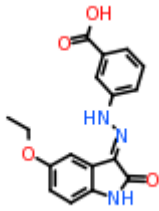
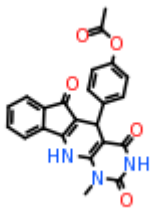
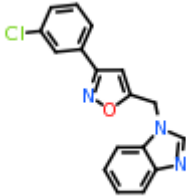
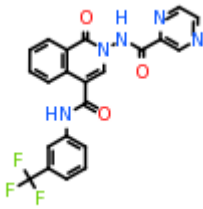
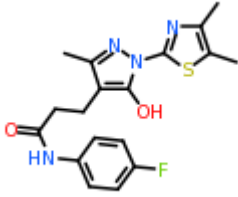
Получение антибиотиков:

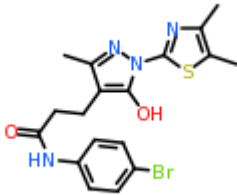
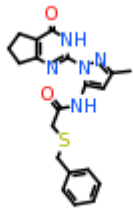
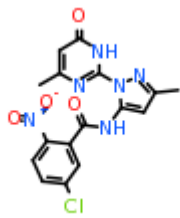
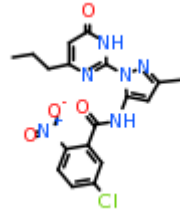
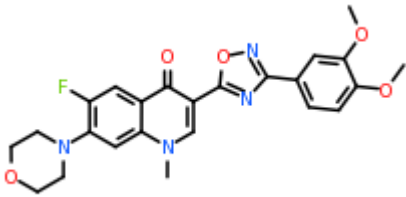
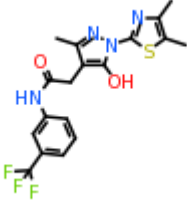
Наиболее интересные образцы потенциальных антибиотиков (Табл. 1).

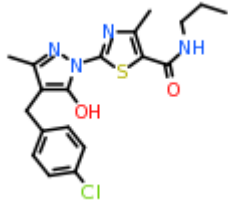
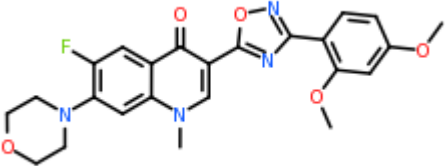
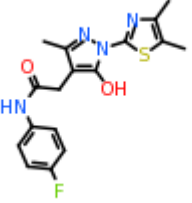
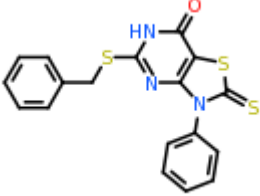
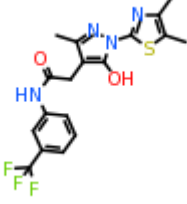
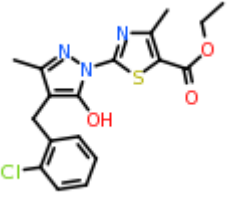
Таблица 1

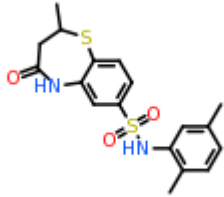
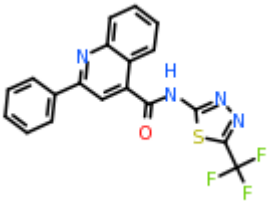
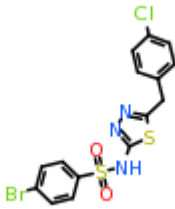
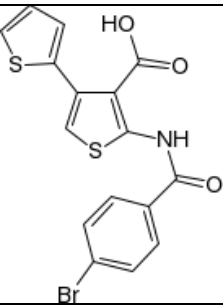
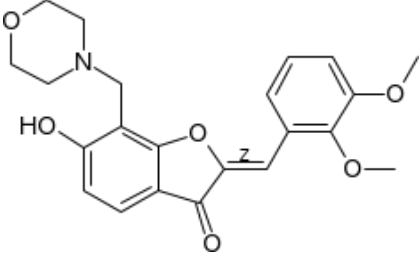
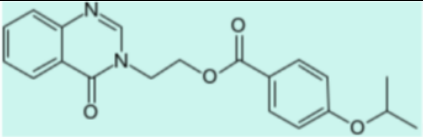
Вещества с антибактериальной активностью

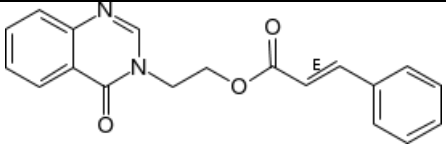
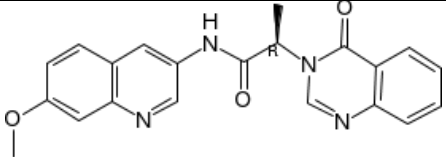
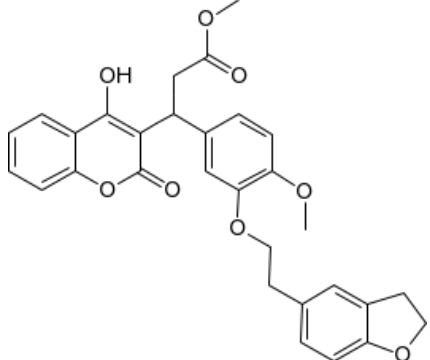
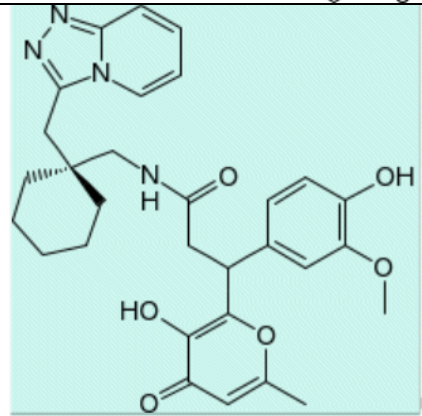
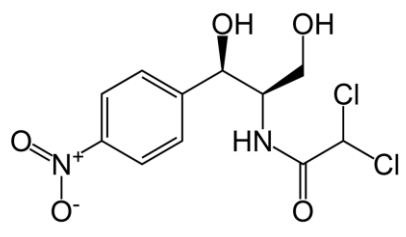
| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|---|-------|-------|-------------------------|--|------------------------|-----------|
| 1 | 001_1 | С3 | 3284-0674 |  | $C_{16}H_{16}BrN_3O_3$ | 378.23 |

| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|---|-------|-------|-------------------------|--|-------------------------|-----------|
| 2 | 001_1 | C8 | 7165-0589 |  | $C_{25}H_{23}N_2S$ | 383.54 |
| 3 | 001_1 | F4 | 4420-0443 |  | $C_{17}H_{15}N_3O_4$ | 325.33 |
| 4 | 001_1 | F7 | 6484-0144 |  | $C_{23}H_{17}N_3O_5$ | 415.41 |
| 5 | 001_1 | F12 | 8020-4020 |  | $C_{17}H_{12}ClN_3O$ | 309.76 |
| 6 | 001_1 | H12 | C125-0840 |  | $C_{22}H_{14}F_3N_5O_3$ | 453.38 |
| 7 | 002_1 | A7 | D475-2788 |  | $C_{18}H_{19}FN_4O_2S$ | 374.44 |

| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|----|-------|-------|-------------------------|--|--------------------------|-----------|
| 8 | 002_1 | B7 | D475-2799 |  | $C_{18}H_{19}BrN_4O_2S$ | 435.35 |
| 9 | 002_1 | B11 | F269-0696 |  | $C_{20}H_{21}N_5O_2S$ | 395.49 |
| 10 | 002_1 | D10 | F269-0060 |  | $C_{16}H_{13}ClN_6O_4$ | 388.77 |
| 11 | 002_1 | E10 | F269-0279 |  | $C_{18}H_{17}ClN_6O_4$ | 416.83 |
| 12 | 002_1 | E11 | F418-0203 |  | $C_{24}H_{23}FN_4O_5$ | 466.47 |
| 13 | 002_1 | F5 | D475-0392 |  | $C_{18}H_{17}F_3N_4O_2S$ | 410.42 |

| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|----|-------|-------|-------------------------|--|--------------------------|-----------|
| 14 | 002_1 | F6 | D475-2097 |  | $C_{19}H_{21}ClN_4O_2S$ | 404.92 |
| 15 | 002_1 | F11 | F418-0205 |  | $C_{24}H_{23}FN_4O_5$ | 466.47 |
| 16 | 002_1 | G5 | D475-0394 |  | $C_{17}H_{17}FN_4O_2S$ | 360.41 |
| 17 | 002_1 | G9 | F092-0369 |  | $C_{18}H_{13}N_3OS_3$ | 383.52 |
| 18 | 002_1 | H5 | D475-0395 |  | $C_{18}H_{17}F_3N_4O_2S$ | 410.42 |
| 19 | 002_1 | H6 | D475-2195 |  | $C_{18}H_{18}ClN_3O_3S$ | 391.88 |

| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|----|-------|-------|-------------------------|--|-----------------------------|-----------|
| 20 | 003_1 | C1 | G008-1537 |  | $C_{18}H_{20}N_2O_3S_2$ | 376.5 |
| 21 | 004_1 | A5 | Y030-7032 |  | $C_{19}H_{11}F_3N_4OS$ | 400.38 |
| 22 | 004_1 | G4 | Y030-6952 |  | $C_{15}H_{11}BrClN_3O_2S_2$ | 444.76 |
| 23 | 1A | B6 | STOCK1S-88700 |  | $C_{16}H_{10}BrNO_3S_2$ | 408.28 |
| 24 | 1A | H7 | STOCK1N-55723 |  | $C_{22}H_{23}NO_6$ | 397.43 |
| 25 | 2A | C10 | STOCK1N-74394 |  | $C_{20}H_{20}N_2O_4$ | 352.39 |

| № | Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|----|-------|-------|-------------------------|--|--------------------------|-----------|
| 26 | 2A | C11 | STOCK1N-74249 |  | $C_{19}H_{16}N_2O_3$ | 320.35 |
| 27 | 2A | F2 | STOCK1N-82257 |  | $C_{21}H_{18}N_4O_3$ | 374.40 |
| 28 | 2A | F10 | STOCK1N-86948 |  | $C_{30}H_{28}O_8$ | 516.55 |
| 29 | 2A | G12 | STOCK1N-94187 |  | $C_{30}H_{34}N_4O_6$ | 546.62 |
| 30 | | | Хлорамфеникол |  | $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ | 323.13 |

Нахождение минимальной ингибирующей концентрации:

Для этого использовали: две стерильные плашки, на 96 веществ каждая (на каждое из веществ требуется по шесть лунок), автоматическая пипетка со съемными носиками, жидкая среда LB, бактерий *Escherichia coli* (штамм – dTollC, устойчивый к канамицину), антибиотик (канамицин), 29 отобранных ранее в ходе эксперимента веществ, хлорамфеникол.

Процесс нахождения минимальной ингибирующей концентрации:

В каждую лунку, наносим по 200 мкл жидкой среды LB с антибиотиком (канамицином), а в первую лунку – 400 мкл жидкой среды LB с антибиотиком (канамицином). Затем, добавляем в первую лунку – 4 мкл вещества, которое ранее проявило довольно сильную антибиотическую активность. Таким образом, в первой лунке концентрация антибиотика оказывается равной отношению 1:100. После этого, пипетируем полученный нами раствор в первой лунке, перемешиваем его. Затем, набираем этот раствор в пипетку и переносим 200 мкл раствора в следующую лунку. Во второй лунке концентрация этого вещества становится 1:200, в третьей лунке – 1:400, в четвертой лунке – 1:800, в пятой лунке – 1:1600. И так далее, до шестой лунки (концентрация – 1:3200). Кроме 29 веществ есть контроль: первый – нет вещества с антибиотической активностью, есть бактерии, есть канамицин; второй – нет вещества с антибиотической активностью, нет бактерий и есть канамицин; третий – вместо вещества с антибиотической активностью, добавляем хлорамфеникол, есть бактерии, и есть канамицин.

После этого, оставляем две плашки на 18 часов при 37С° и перемешивали со скоростью 200 об/мин.

Затем, с помощью специального аппарата (ридер VICTOR™) измеряем спектр поглощения при длине волны 590 нм (мутность) в каждой лунке и находим ее коэффициент. Вычисляем минимальную ингибирующую концентрацию.

Результаты и обсуждения

В ходе эксперимента мы проверяли несколько сотен веществ, с возможной антибиотической активностью, на наличие этой самой активности. Полученные вещества взвешивали и растворяли в органическом растворителе (диметилсульфоксиде) в отношении 1:50 (по массе). После этого, растворы этих веществ подготовленные для скрининга, мы наносили на большие (240×240 мм) чашки Петри, с твердой питательной средой LB, антибиотиком (ампицилином) и бактериальным газоном (штамм *Escherichia coli* – dTollC). Штамм *Escherichia coli* – dTollC был получен путем трансформации.

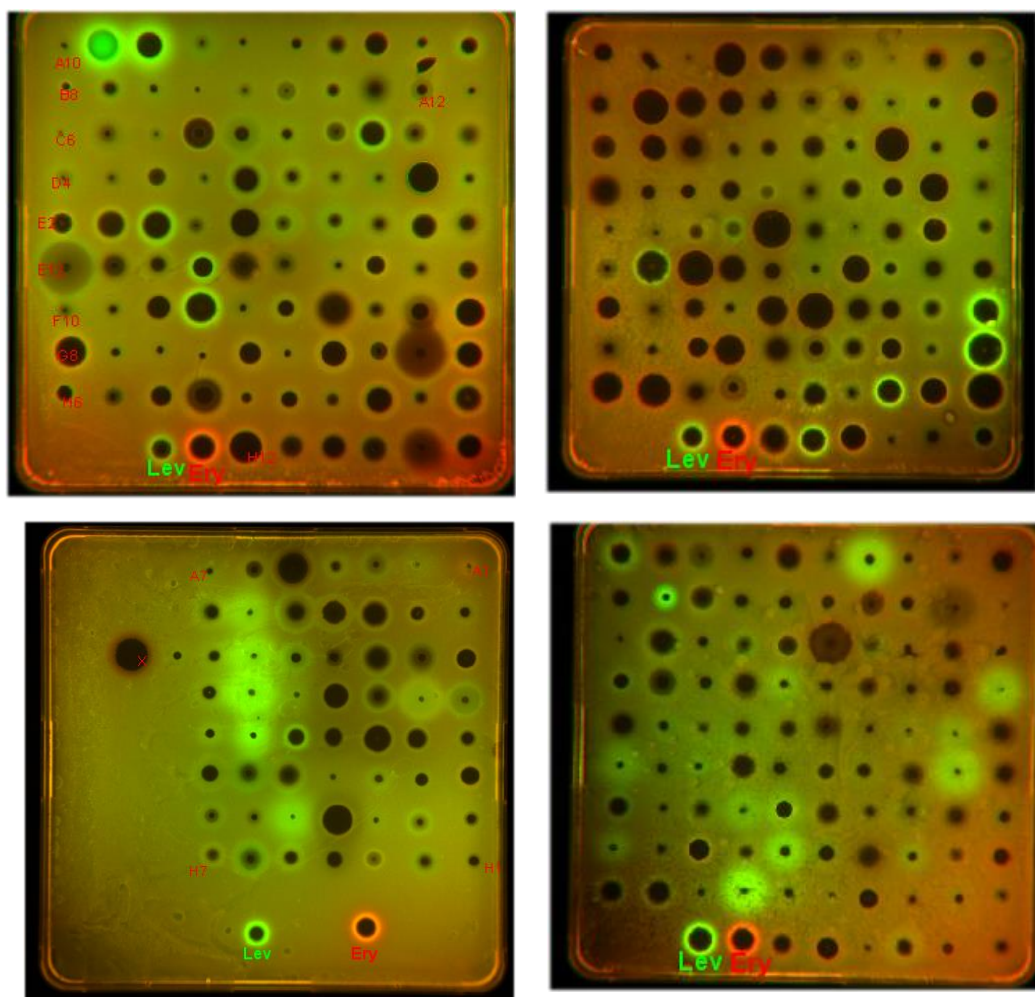


Рис. 6. Экспрессия флуоресцентных белков, после нанесения разных антибиотиков на репортерный штамм (Lev – левофлоксацин, Ery – эритромицин)

Проводили скрининг и смотрели, какие из веществ или культуральных жидкостей проявляют наибольшую антибиотическую активность (смотрели на диаметр зоны ингибирования вокруг лунки на бактериальном газоне) (Рис. 6). В ходе эксперимента было выявлено двадцать девять веществ с наибольшей антибиотической активностью.

Далее находили минимальную ингибирующую концентрацию 29 веществ, которые проявили наибольшую антибактериальную активность (Табл. 2).

Таблица 2

МИК для веществ с антибактериальной активностью

| № | Чашка | Лунка | МИК (мкг/мл)* | Идентификационный номер |
|----|-------|-------|---------------|-------------------------|
| 1 | 001_1 | C3 | 6,67 | 3284-0674 |
| 2 | 001_1 | C8 | 0,08 | 7165-0589 |
| 3 | 001_1 | F4 | 3,33 | 4420-0443 |
| 4 | 001_1 | F7 | >6,67 | 6484-0144 |
| 5 | 001_1 | F12 | >6,67 | 8020-4020 |
| 6 | 001_1 | H12 | 0,83 | C125-0840 |
| 7 | 002_1 | A7 | 1,67 | D475-2788 |
| 8 | 002_1 | B7 | 0,08 | D475-2799 |
| 9 | 002_1 | B11 | 0,08 | F269-0696 |
| 10 | 002_1 | D10 | 0,04 | F269-0060 |
| 11 | 002_1 | E10 | <0,02 | F269-0279 |
| 12 | 002_1 | E11 | >6,67 | F418-0203 |
| 13 | 002_1 | F5 | 0,08 | D475-0392 |
| 14 | 002_1 | F6 | 1,67 | D475-2097 |
| 15 | 002_1 | F11 | 0,08 | F418-0205 |
| 16 | 002_1 | G5 | 1,67 | D475-0394 |
| 17 | 002_1 | G9 | <0,02 | F092-0369 |
| 18 | 002_1 | H5 | 0,83 | D475-0395 |

| № | Чашка | Лунка | МИК (мкг/мл)* | Идентификационный номер |
|----|----------|----------|---------------|-------------------------|
| 19 | 002_1 | H6 | 0,33 | D475-2195 |
| 20 | 003_1 | C1 | 6,67 | G008-1537 |
| 21 | 004_1 | A5 | 0,08 | Y030-7032 |
| 22 | 004_1 | G4 | 0,08 | Y030-6952 |
| 23 | 1A | B6 | 0,08 | STOCK1S-88700 |
| 24 | 1A | H7 | 0,17 | STOCK1N-55723 |
| 25 | 2A | C10 | 1,67 | STOCK1N-74394 |
| 26 | 2A | C11 | >6,67 | STOCK1N-74249 |
| 27 | 2A | F2 | >6,67 | STOCK1N-82257 |
| 28 | 2A | F10 | <0,02 | STOCK1N-86948 |
| 29 | 2A | G12 | 0,08 | STOCK1N-94187 |
| 30 | Контроль | Контроль | 0,17 | Хлорамфеникол |

* МИК «>6,67» – показывает, что среда заросла бактериями во всех концентрациях и что для подавления роста бактерий нужна большая концентрация данного вещества.

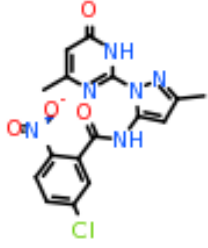
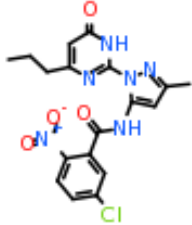
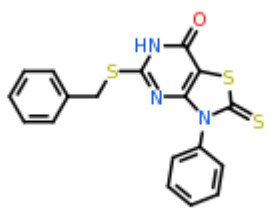
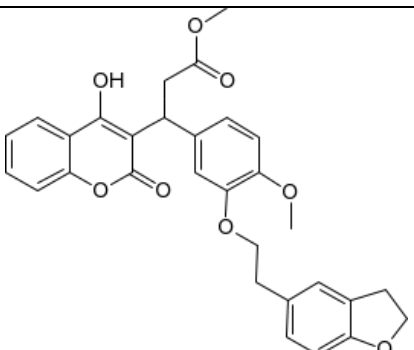
Нахождение минимальной ингибирующей концентрации веществ: в две стерильные плашки (каждая на 96 веществ) наливали по 200 мкл жидкой среды LB с канамицином, и со штаммом *Escherichia coli* – dToIC, устойчивым к канамицину, затем в эти лунки с питательной средой и бактериями помещали 29 веществ, которые проявили антибиотическую активность, эти вещества находились в шести различных концентрациях: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 и 1:3200. Разницы в концентрациях добивались, набирая в первую лунку 400 мл жидкой питательной средой LB, а во все последующие лунки помещали по 200 мл среды в каждую. Затем в первую лунку добавляли 4 мл вещества с антибиотической активностью и пипетировали. После чего, из первой лунки во вторую переносили 200 мл жидкой питательной среды LB с антибиотиком, минимальную ингибирующую концентрацию которого ищем. В первой плашке было 14 веществ и два контроля – одна лунка без бактерий и без антибиотика, а другая – без антибиотика, но с бактериями. Во второй плашке было

15 веществ и Ст (хлорамфеникол). Концентрации для всех исследуемых веществ были одинаковыми.

Согласно полученным данным вещества: ID – F269-0060, F269-0279, F092-0369 и STOCK1N-86948 проявляют наибольшую антибактериальную активность (Табл. 3).

Таблица 3

Вещества – потенциальные антибиотики

| Чашка | Лунка | Идентификационный номер | Структура | Формула | Масса, Да |
|-------|-------|-------------------------|--|------------------------|-----------|
| 002_1 | D10 | F269-0060 |  | $C_{16}H_{13}ClN_6O_4$ | 388.77 |
| 002_1 | E10 | F269-0279 |  | $C_{18}H_{17}ClN_6O_4$ | 416.83 |
| 002_1 | G9 | F092-0369 |  | $C_{18}H_{13}N_3OS_3$ | 383.52 |
| 2A | F10 | STOCK1N-86948 |  | $C_{30}H_{28}O_8$ | 516.55 |

Выводы

1. В ходе эксперимента с использованием репортерной системы были обнаружены новые соединения с ярко выраженной антибактериальной активностью.

2. Для всех этих веществ была найдена минимальная ингибирующая концентрация, и у тринадцати (ID: 7165-0589, D475-2799, F269-0696, F269-0060, F269-0279, D475-0392, F418-0205, F092-0369, Y030-7032, Y030-6952, STOCK1S-88700, STOCK1N-86948, STOCK1N-94187) МИК оказалась ниже, чем МИК антибиотика хлорамфеникола, который использовался в качестве контроля (см. Табл. 2).

Список литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К., Джонсон А., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уолтер П. Основы молекулярной биологии клетки. М., БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 768 с., илл.
2. Головлев Е.Л. Реакция бактериальных клеток на холодовой шок на уровне динамики хромосомы, транскрипции и трансляции. Микробиология, 2003. т. 72, № 1, с. 5–13
3. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. СПб., Наука, 1995. 601 с.
4. Лопухов Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2000. т. 2, № 3, с. 96–106 .
5. Назаров П.А. Человечество может выиграть войну против бактерий, Коммерсантъ Наука, № 5, 2017
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Пособие для студентов биологических факультетов и учащихся специализированных старших классов гимназий. М., МЦНМО, 2002, 248 с., 68 илл.
7. Остерман И. А., Новая система для широкомасштабного анализа сайтов инициации и реинициации трансляции *Escherichia coli*: Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук: 02.00.10. М., 2012, 110 с.
8. Талонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. М., Легкая и пищевая промышленность, 1981, 240 с.
9. Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н., Самуйленко А.Я., Гаврилов В.А. Биотехнология: учебник /под ред. Воронина Е.С. СПб., Гиорд, 2005, 792 с.
10. Rodriguez H. Role of a solvent-exposed aromatic cluster in the folding of *Escherichia coli* CspA. Protein Science. 2000. v. 9, p. 1993–2000.

11. Taylor D., Green N., Stout C. Biological Science 1 and 2. Cambridge University Press, 1997. 992 p.

12. Semchyshyn H. Hydrogen peroxide-induced response in *E.coli* and *S.cerevisiae*: different stages of the flow of the genetic information. Central European Journal of Biology, 2009. v. 4, p. 142–153

13. Yamanaka K. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. Molecular Microbiology, 1998. v. 27, p. 247–255