

СЕКЦИЯ «ХИМИЯ»

ПОДСЕКЦИЯ «НАУКИ О ЖИВОМ»

Исследование образования G-квадруплексов методом изменения флуоресценции

Ажибек Д.М.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия
E-mail: duke_azhibek@mail.ru*

Теломерные концы хромосом эукариот богаты гуанином и могут образовывать G-квадруплексы. Образование G-квадруплексов ингибирует теломеразу [1], которая активна в большинстве раковых опухолей. Известно, что некоторые низкомолекулярные соединения стабилизируют G-квадруплексы [2].

Целью данной работы было изучение возможности применения метода измерения изменения флуоресценции при образовании G-квадруплексов и для детекции взаимодействия G-квадруплексов и органических веществ.

Были синтезированы олигонуклеотиды с различными первичными структурами и флуоресцентной меткой на 5'-конце. В качестве флуоресцентной метки использовали карбоксифлуоресцеин. G-квадруплексы получали обработкой 1 М KCl неструктурированных олигонуклеотидов и выделяли с помощью электрофоретического разделения в неденатурирующем геле.

Сравнивали флуоресценцию неструктурированных олигонуклеотидов и выделенных G-квадруплексов. А также определяли изменение флуоресценции неструктурированных олигонуклеотидов при титровании с KCl. Выделенные G-квадруплексы титровали различными органическими соединениями. На основании полученных данных делали выводы о взаимодействии.

Литература

1. Dinshaw J. Patell, Anh Tuan Phan, Vitaly Kuryavyi. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics // Nucleic Acids Research, 2007. P.1-27.
2. David M., Marie-Paule T. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands // Org.Biol.Chem., 2008. Vol. 6. P.627-636.

ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК ДРОЖЖЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В БИОЦИДНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Аронбаев Сергей Дмитриевич

магистрант II года обучения

Самаркандский Государственный Университет имени А.Навои, факультет

естественных наук, Самарканд, Узбекистан

E.-mail: diron51@mail.ru

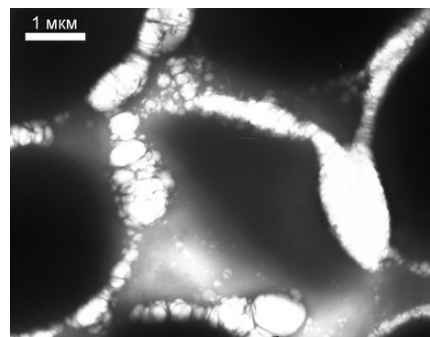
В последнее время в различных отраслях пищевой и фармацевтической промышленности широко применяются биологически активные добавки (БАД), предназначенные для улучшения качества продуктов и фармпрепаратов. К таким БАДам можно отнести широкую группу энтеросорбентов, применяемые для выведения из организма тяжелых металлов, радионуклидов, токсинов. Учитывая биосорбционные и аккумулирующие свойства многих микроорганизмов, в том числе и пивоваренных дрожжей *S. cerevisiae*, исследователи все чаще обращаются к ним с целью использования их в качестве природных энтеросорбентов. При этом создание технологий модификации клеточных стенок дрожжей, которые содержат полисахариды, включающих карбонильные, тиольные и аминогруппы, наночастицами благородных металлов, обладающих в микроконцентрациях биоцидным действием, является весьма актуальным.

Нами изучена возможность получения наночастиц серебра в процессе биосорбции ионов Ag^+ из разбавленных растворов клеточными стенками дрожжей *S. cerevisiae*.

Процедура исследования заключалась в следующем: навеску дрожжей отмывали от культуральной среды бидистиллированной водой на холоду, гомогенизировали в течение 5 минут. Полученную массу подвергали ферментативному гидролизу с использованием целлюлозолитических препаратов при $45^{\circ}C$ в течение 24 часов. К навескам дрожжей весом по 200 мг добавляли по 1 мл субстрата, содержащего 10 мл воды, 1 мл 10^{-3} М $AgNO_3$ и 0,3 мл 25% раствора аммиака. Смесь выдерживали в термостате при $36^{\circ}C$ в течение ночи и наносили на формваровые сеточки для электронной микроскопии. Образцы препаратов по 20 мкл с помощью пипеточного микродозатора наносили на пленку типа «Парафильм» и сверху накладывали сеточку формваровой пленкой вниз. Подготовленные образцы помещали в чашку Петри и высушивали в отключенном вакуумном шкафу. Препараты подвергали электронной микроскопии. В качестве электронного микроскопа использовали просвечивающий электронный микроскоп фирмы «Jeol» (Япония) с ускоряющим напряжением 60 кВ. Частицы серебра, являющиеся контрастирующим агентом, давали затемнение на микрофотографии.

На микрофотографии показаны четкие границы частиц серебра, интеркаллированных в клеточную стенку. Это объясняется тем, что образующиеся наночастицы серебра защищены от агрегации (слипания) окружающими их молекулами полисахаридов. Размеры частиц серебра колеблются от 20-25 нм до 55-75 нм.

Таким образом, установлено, что фрагменты клеточных оболочек дрожжей, с последующей их обработкой гидролитическими препаратами, позволяют получать наноразмерные частицы серебра, так как в результате гидролиза усиливается восстанавливающая способность за счет увеличения концентрации концевых карбонильных групп углеводов. Кроме того, происходит стабилизация наночастиц молекулами биополимеров клеточной стенки, предохраняющих частицы серебра от агрегации. Проведенные исследования открывают перспективу для получения препаратов на основе автолизатов осадочных пивоваренных дрожжей, содержащих наночастицы серебра в биоцидных концентрациях.



Изучение состава липидов и содержания металлов в мышечной ткани рыб реки Кичера (Северобайкальский район республики Бурятия)

Базарсадуева Сэлмэг Владимировна¹

аспирант

Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия

e-mail: bselmeg@gmail.com

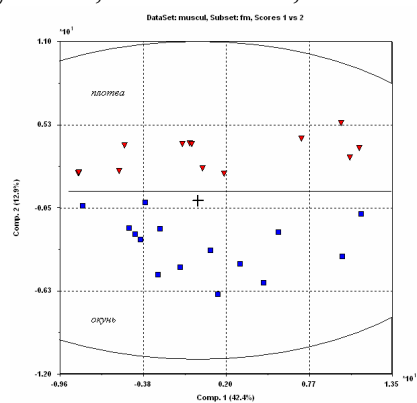
Химическое загрязнение окружающей среды играет важную роль в биологическом круговороте, поэтому биомониторинг качества природной среды приобретает в последнее время особое значение. В этом плане первоочередной интерес представляют тяжелые металлы, поскольку они принимают активное участие в биохимическом цикле и в избыточных количествах подавляют процессы метаболизма. Токсичность металлов определяется в основном их способностью образовывать в организмах комплексные соединения и принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях, приводящих к изменению валентности металла. В результате этих процессов в тканях гидробионтов нарушается функционирование биологически активных веществ, повышается способность микроэлементов преодолевать биологические барьеры, возникают другие явления, ухудшающие жизнеспособность гидробионтов. Именно это свойство тяжелых металлов и определило необходимость организации глобальной службы мониторинга уровня их содержания в природных средах биосферы Земли.

Липиды играют важную роль в метаболических процессах водных организмов и являются основным источником энергии для роста и воспроизводства гидробионтов. Установлено, что состав липидов, в том числе состав жирных кислот, является одной из наиболее важных характеристик, отражающих здоровье популяции в различных условиях обитания. Таким образом, работа, направленная на изучение состава липидов рыб реки Кичера является актуальной.

В целях изучения жирнокислотного состава и содержания тяжелых металлов в мышечной ткани во время экспедиционных работ отобрана мышечная ткань рыб: плотвы, окуни и щуки.

Было найдено:

- наибольшее количество Zn, Mn, Pb и Cd содержится в мышцах плотвы;
- наибольшее количество Co содержится в мышцах окуня;
- наибольшее количество Hg содержится в мышцах щуки;
- содержание Cd в мышцах щуки меньше предела обнаружения, т.е. меньше 0,0028 мг/л;
- сравнение содержания тяжелых металлов с ПДК для пищевых продуктов показало, что их содержание не превышает допустимые нормы;
- сравнение содержания тяжелых металлов в печени с ПДК для пищевых продуктов показало, что содержание свинца превышало нормативные данные в печени окуня;
- содержание остальных металлов не превышает ПДК;
- метод принципиальных компонент показал, что мышечная ткань плотвы и окуня имеет различный жирнокислотный состав. Всего обнаружено 26 жирных кислот.



¹ Автор выражает признательность научному руководителю профессору, д.х.н. Раднаевой Л.Д.

Загрязнение атмосферы соединениями металлов в техногенных зонах

Большакова Е. В., Синцова Ю. Н.¹

Студентки 5 курса химического факультета

Вятский государственный гуманитарный университет, г. Киров, Россия

E-mail: science @ vshu. kirov. ru.

В сентябре 2006 года в Кировской области начал действовать завод по уничтожению химического оружия (ОУХО). Строительство и введение в рабочий режим такого объекта увеличивает эмиссию загрязняющих веществ в природный комплекс. Список химических загрязнителей, поступавших в атмосферу от местных предприятий, с введением в строй ОУХО увеличивается на 42 наименования. Среди загрязнителей имеются и соединения тяжелых металлов (меди и никеля). По нашему мнению наилучшим способом контроля загрязнения атмосферы является использование биологических индикаторов – аккумуляторов атмосферных выпадений. К таким биологическим объектам относятся мхи, причем для Кировской области наиболее удобным видом – аккумулятора является *Pleurozium Sreberi*, который является самым распространенным в области видом мха. Экспериментальные работы по определению содержания меди и никеля в образцах мха *Pleurozium Sreberi* были начаты в июле 2006 г. за три месяца до начала работы предприятия. Это позволило оценить величину концентрации меди и никеля в образцах мха до начала эксплуатации ОУХО. В качестве фоновой территории были выбраны лесные массивы в 60 км на запад от объекта. Повторный эксперимент проведен летом 2008 г. после двухлетней работы объекта. Методика эксперимента заключалась в следующем. Пробы мха отбирались на территории зоны влияния (10 точек, в соответствии с сеткой пробоотбора системы экологического мониторинга) и на фоновой территории (3 точки). Воздушно-сухой мох озолялся сухим методом. В солянокислых вытяжках из золы фотоколориметрическим методом определялись медь с диэтилдитиокарбаматом натрия и никель с диметилглиоксимом. Полученные результаты статистически обрабатывались. Данные по определению меди и никеля в образцах мха приведены в таблице.

№ точки	Содержание металлов, мг/кг воздушно-сухого мха			
	2006г.		2008г.	
	Cu	Ni	Cu	Ni
28	38,7± 4	5,3±0,3	57,5±1	6,8±0,08
4	26,1±3	9,2±0,4	43,5±4	11,0±0,1
17	67,2±2	9,0±0,3	62,5±2	10,7±0,1
18	93,3±6	10,6±0,4	89,8±4	12,4±0,1
19	69,3±4	9,8±0,2	67,8±5	11,5±0,1
9	17,6±0,3	10,1±0,5	42,4±3	11,9±0,2
13	18,9±1	6,2±0,3	33,2±2	7,7±0,08
47	16,7±1	7,4±0,1	39,8±2	8,7±0,3
65	14±1	4,2±0,3	32,0±2	5,6±0,1
112	6,7±0,6	1,7±0,2	14,7±1,5	2,6±0,2
Фон	3,4 ± 0,02		0,11± 0,006	

Как показывают данные табл., на территории зоны влияния до начала работы ОУХО концентрация меди и никеля в *Pleurozium Sreberi* была на порядок выше фоновой. При сравнении данных разных лет видно, что в 2008 г. в большинстве точек наблюдается увеличение концентрации меди в 1,5 - 2,4 раза и никеля на 20 - 30%.

Таким образом, проведенная работа показала, что в процессе работы ОУХО увеличивается загрязнение окружающей среды соединениями меди и никеля.

¹ Авторы выражают признательность к.т.н. доценту Тимонюк В.М. за помощь в подготовке тезисов.

Особенности регуляции в системе рестрикции-модификации SsoII²

Буренина О.Ю.^{1,*}, Бабаян Т.А.^{1,**}, Федотова Е.А.^{2,*}

Студент¹, аспирант²

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: alunit@inbox.ru

Регуляция экспрессии генов играет чрезвычайно важную роль при функционировании систем рестрикции-модификации (Р-М), но на сегодняшний день крайне мало известно о возможных механизмах реализации этого процесса. Система SsoII состоит из двух ферментов – ДНК-метилтрансферазы (МТаза) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР). Отличительная особенность этой системы - сопряженная регуляция экспрессии генов ЭР и МТаза, транскрибирующихся дивергентно. Известно, что метилтрансфераза SsoII (M.SsoII) не только ингибирует свой собственный синтез, но и активирует синтез эндонуклеазы рестрикции (R.SsoII) [1]. Однако механизм регуляции транскрипции в данной системе не выяснен.

Согласно проведенному нами анализу последовательностей ДНК родственных систем Р-М участок связывания M.SsoII в промоторной области генов перекрывается с точкой инициации транскрипции гена SsoIIM. Таким образом, МТаза может ингибировать экспрессию собственного гена, физически блокируя доступ РНК-полимеразы к его точке инициации. Вместе с тем, МТаза, вероятно, находится в удобном положении для взаимодействия с $\sigma 70$ субъединицей РНК-полимеразы *E. coli* и может тем самым активировать транскрипцию гена ЭР.

В нашей работе изучено связывание РНК-полимеразы *E. coli* в отсутствие и в присутствии M.SsoII с фрагментами промоторной области генов системы Р-М SsoII различной длины. Установлено, что M.SsoII, связываясь с регуляторным участком, действительно препятствует комплексообразованию РНК-полимеразы с промоторной областью собственного гена. В результате происходит увеличение относительного количества молекул РНК-полимеразы, доступных для связывания с промоторной областью гена ЭР. Установлено, что РНК-полимераза и МТаза не могут одновременно взаимодействовать с фрагментом ДНК, содержащим межгенную область системы Р-М SsoII, с образованием тройного комплекса, формирование которого должно было бы наблюдаться в случае контактов МТаза с $\sigma 70$ субъединицей РНК-полимеразы. Анализ длины РНК-транскриптов, синтезирующихся с промоторов генов ЭР и МТаза SsoII, показал, что точка инициации транскрипции гена МТаза совпадает с предложенной нами теоретической схемой, а точка инициации транскрипции гена ЭР расположена на значительном расстоянии от предсказанной теоретически. Используя более длинный фрагмент ДНК, содержащий межгенную область и участки начала обоих генов, мы показали, что возможно одновременное взаимодействие РНК-полимеразы с промоторной областью гена ЭР и M.SsoII со своим регуляторным участком.

1. Karyagina A., Shilov I., Tashlitskii V., Khoudoun M., Vasil'ev S., Lau P.C.K., Nikolskaya I. // Nucl. Acids Res. 1997. V.25. P.2114-2120.

² Авторы благодарят Проценко А.С., Захарову М.В. и Солонина А.С. (ИБФМ РАН) за предоставленные препараты белков. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-00545).

**Исследование N-концевой области σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы *E.coli*
методом делеционного мутагенеза.**

Валуев-Эллистон Владимир Треворович

Студент

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

химический факультет, Москва, Россия

E-mail: gansfaust@mail.ru

Транскрипция – синтез РНК на матрице ДНК - осуществляется ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой (РНКП). Специфичность узнавания РНК-полимеразой сигнала инициации транскрипции у прокариот и, в частности, у *E.coli* обеспечивает сигма-субъединица. Основным сигма-фактором в *E.coli*, участвующим в транскрипции большинства генов на стадии экспоненциального роста клеток, является субъединица σ^{70} . В ее структуре выделяют ряд функциональных доменов (районы 1-4). Несмотря на интенсивные исследования, роль каждого из этих доменов до конца не выяснена [1].

В настоящей работе для изучения функциональной значимости N-концевой области σ^{70} -субъединицы (района 1) получен набор мутантных вариантов белка, имеющих делеции следующих участков: 1-73 (мутант D1), 1-100 (D2), 74-100 (D4), 74-125 (D5), 101-125 (D6). Для этого были сконструированы векторные ДНК для экспрессии мутантных субъединиц в виде белков, слитых с белковым модулем интеин + хитинсвязывающий домен, который предназначен для аффинного выделения составного белка на хитинсодержащей смоле с последующим отщеплением целевого белка уже без каких-либо технологических «довесков» (система ИМРАСТ). Все мутантные белки были выделены, и их свойства изучены в системах *in vitro* (формирование специфических комплексов с промотором и транскрипция). Показано, что мутантные варианты РНК-полимеразы, реконструированные с участием всех полученных сигма-субъединиц, сохраняют способность узнавать промоторную ДНК и иницировать транскрипцию, хотя и с различной эффективностью. Например, для мутанта D1 уровень транскрипции близок к природному, а для D2 снижен в 10 раз. Следует отметить, что наблюдаемые различия в свойствах мутантных сигма-субъединиц проявляются наиболее ярко в системе конвергентной транскрипции. Результаты проведенных экспериментов подтверждают полученные ранее в лаборатории данные о влиянии района 1.1 на стадию перехода из закрытого комплекса РНКП-ДНК в открытый, а также позволяют предположить, что N-концевая область сигма-субъединицы влияет на специфичность узнавания РНК-полимеразой того или иного промотора, что согласуется с последними данными литературы [2].

Литература

1. Bowers CW, McCracken A, Dombroski AJ. (2000) Effects of amino acid substitutions at conserved and acidic residues within region 1.1 of *Escherichia coli* sigma(70) // *Journal of Bacteriology*, №182(1), p. 221-224.
2. Hook-Barnard IG, Hinton DM. (2009) The promoter spacer influences transcription initiation via sigma70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, №106(3), p. 737-742.

**3-(10'-Фенотиазинил)пропан-1-сульфонат - уникальный усилитель
хемилюминесцентного сигнала, образующегося в процессе окисления люминола в
присутствии пероксидазы сои**
Вдовенко М.М., Сахаров И.Ю.

аспирантка

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия
E-mail: marina_vdovenko@mail.ru*

Иммуноферментный метод анализа (ИФА) в настоящее время является одним из самых распространенных аналитических методов анализа и используется в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, а также для контроля за состоянием окружающей среды. Это объясняется высокой аффинностью и уникальной специфичностью иммунохимической реакции между антигеном и антителом, а также высокой чувствительностью детекции ферментной метки. Наиболее чувствительным является хемилюминесцентный метод детекции, при котором в качестве субстрата выступает люминол.

В настоящее время при изготовлении иммуноферментных тест-систем в качестве фермента-метки используют коммерчески доступный катионный изофермент с пероксидазы хрена (ПХ-с). Так как его каталитическая активность в отношении люминола крайне низка, в субстратную смесь вводятся дополнительные соединения, называемые «усилителями». Недостатком реакции усиленной хемилюминесценции является нестабильность регистрируемого аналитического сигнала во времени.

В отличие от ПХ-с анионная пероксидаза сои (ПС) продуцирует стабильный хемилюминесцентный сигнал. Хотя замена ПХ-с на ПС в качестве ферментного маркера в ИФА для определения IgG мыши позволила повысить чувствительность и расширить рабочий диапазон анализа, все же величины интенсивности хемилюминесценции, продуцируемые в присутствии ПС, ниже, чем интенсивности, характерные для ПХ-с. Более того, применение усилителей ПХ-с практически не влияет на хемилюминесценцию, индуцируемую ПС. В этой связи встает вопрос о поиске усилителей для ПС, которые смогли бы увеличить интенсивность люминесцентного сигнала, при этом сохранив его стабильным во времени.

В данной работе было показано, что натриевая соль 3-(10'-фенотиазинил)-пропан-1-сульфоната (ФТПС) является первым найденным усилителем хемилюминесцентного сигнала, продуцируемого ПС при ферментативном окислении люминола пероксидом водорода. При оптимальных условиях реакции, которые были обнаружены при варьировании pH и концентрации трис-буфера, а также концентраций люминола, пероксида водорода и ФТПС, усиливающий эффект ФТПС достигал более чем 170 раз. Также продемонстрировано, что введение в реакционную среду 4-морфолинопиридина (МП) приводило к дополнительному усилению хемилюминесценции. Новая система усилителей (ФТПС+ МП) не влияла на стабильность аналитического сигнала, а также понижает значение предела обнаружения ПС. Преимущества новой системы усиления были продемонстрированы в ИФА с хемилюминесцентной детекцией для определения тиреоглобулина человека.

Применение поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения антибиотиков в молоке и мёде

Гасилова Н. В.

студент

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: aurore-polaire@yandex.ru

В ветеринарии широко применяются различные антибактериальные препараты с целью лечения и профилактики инфекционных заболеваний у животных. Подобные антибиотики, накапливаясь в мышечных тканях животных, в молоке, а в случае пчёл – в мёде, делают данные продукты питания потенциально опасными для здоровья человека. Такие часто используемые препараты, как ампициллин, тетрациклин, стрептомицин, способны вызывать различные аллергические реакции, а хлорамфеникол – даже развитие пластической анемии. К тому же присутствие антибиотиков увеличивает вероятность появления в продуктах питания штаммов опасных бактерий, резистентных к действию данных препаратов, что в будущем может затруднить борьбу с этими микроорганизмами.

Для контроля содержания антибактериальных препаратов в продуктах питания необходимо применение высокочувствительных методов, способных выявить низкие концентрации анализируемых веществ (менее 100 нг/мл). К таким методам относится поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА), характеризующийся не только высокой чувствительностью, но и быстротой проведения анализа.

В настоящей работе были разработаны методики поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) для определения ампициллина, хлорамфеникола, стрептомицина и тетрациклина. Были синтезированы производные анализируемых соединений, используемые в качестве иммунореагентов, подобраны пары антиген-антитело, оптимальные для проведения ПФИА каждого из соединений. Определены аналитические характеристики методики для всех аналитов. Так, предел обнаружения для ампициллина в дистиллированной воде составил 7 нг/мл, а для хлорамфеникола – 10 нг/мл, при этом ПДК, установленные для данного вещества в России составляют по 10 нг/мл.

Молоко и мёд являются очень трудными объектами для анализа, так как имеют сложный состав. Поэтому перед проведением анализов в этих продуктах необходимо осуществлять их тщательную пробоподготовку для максимального уменьшения влияния матрицы на чувствительность анализа. В настоящей работе были предложены методики пробоподготовки молока и мёда для последующего проведения ПФИА с учетом химической природы каждого из анализируемых антибиотиков. По результатам проведения тестов на открытие для этих лекарственных препаратов была оценена эффективность выбранных способов пробоподготовки и разработанные методики были апробированы на реальных образцах мёда и молока.

Влияние рН и природы субстрата на стереоселективность пенициллинацилазы³

Година А.Ф.,¹ Гуранда Д.Ф.²

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

E-mail: alexeitgodina@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ, г. Москва, Россия

Исследовано влияние рН, природы и структуры субстратов на эффективность и стереоселективность реакций ацильного переноса и гидролиза, катализируемых бактериальными пенициллинацилазами в водной среде[1]. В качестве ацильных доноров использовали амиды и эфиры производных фенилуксусной кислоты, в том числе, R- и S-миндальной кислоты, фенилглицина. Найдено, что наибольшее влияние на эффективность и стереоселективность ацильного переноса на первичные аминосоединения оказывает природа и пространственная структура ацильной части донора (наблюдаемый эффект достигает 1-2 порядка величин нуклеофильной реакционной способности и стереоселективности). Природа и структура уходящей группы ацильного донора в значительной степени влияет на эффективность ацильного переноса, однако в меньшей степени влияет на стереоселективность превращения (наблюдаемый эффект достигает 100% величины стереоселективности).

рН-зависимость кинетических параметров реакции гидролиза фенилацетильных производных аминов и аминспиртов имеет типичный колоколообразный вид с максимумом в нейтральной области рН. Найдено, что рН-зависимость стереоселективности гидролиза определяется в значительной степени молекулярным объемом уходящей группы. Например, в случае гидролиза фенилацильного производного фенилглицинола стереоселективность ПА из *Alcaligenes* достигает значение 300 и рН-профиль имеет колоколообразную зависимость с максимумом при рН=7-8. С другой стороны, при гидролизе фенилацильного производного 2-аминобутанола энантиоселективность составляет всего 4-5 в исследуемом интервале рН.

Полученные результаты позволяют оптимизировать биокаталитические превращения на основе реакций, катализируемых ПА в водной среде для хирального синтеза и расщепления энантиомеров аминсоединений

[1] Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2004, 15, 2901-2906.

³ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-08-00696а)

Наночастицы полиэлектrolитных комплексов, содержащие ДНК аптамерный ингибитор тромбина

Горященко Александр Сергеевич

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: ASGoryash@yandex.ru

Введение

В последние годы в науке сформировалось и интенсивно развивается новое направление – создание целого класса лекарственных средств, основанных на ДНК. Он включает в себя плазмиды, содержащие те или иные гены, бессмысловые олигонуклеотиды, ДНКзимы и аптамеры.

Аптамеры – это небольшие одно- или двуцепочечные молекулы ДНК, способные специфически взаимодействовать с белками. В отличие от антител, аптамеры не вызывают иммунного ответа, при этом специфичность их действия не уступает специфичности антител. Однако, нуклеотидная природа делает аптамеры уязвимыми для действия нуклеаз. Показано, что время полного выведения аптамерного ингибитора тромбина GS522 из организма составляет около 8 минут. Чтобы этого избежать, необходимо пролонгировать действие аптамеров путем использования систем доставки. При всем многообразии систем доставки лекарственных средств на основе ДНК предложено достаточно небольшое количество систем доставки и пролонгирования действия аптамеров.

Целью данной работы является получение и характеристика *in vitro* наночастиц полиэлектrolитных комплексов ДНК-аптамерного ингибитора тромбина с хитозаном и протамином, которые могли бы служить системой доставки.

Методы

Получены комплексы аптамерного ингибитора тромбина с протамином, хитозаном и модельным поликатионом поли(N-этил)винилпиридином при различных зарядовых соотношениях аптамер-поликатион. Размеры и дзета-потенциалы полученных частиц измерены на зета-сайзере. Оценка эффективности включения аптамера в частицы осуществлялась двумя методами: с помощью радиоактивной метки и спектрофотометрически. Влияние аптамера на характеристическое время образования фибринового сгустка в буфере, имитирующем рН и солевой состав человеческой крови, определяли на коагулометре.

Результаты

Данные о влиянии аптамера на характеристическое время образования фибринового сгустка позволили определить константу ингибирования аптамером реакции между тромбином и фибриногеном, которая оказалась равной 70 нМ. Из зависимости дзета-потенциала полученных частиц с протамином и поли(N-этил)винилпиридином от соотношения зарядов видно, что эффективность взаимодействия и доступность положительных зарядов для протамин и поли(N-этил)винилпиридина одинаковы. Эффективность взаимодействия и доступность зарядов протамин оказались одинаковыми как в буфере с рН 7.4, так и в буфере, где воспроизведены как рН, так и солевой состав крови. Полученные частицы имеют нанометровые размеры. Включение аптамерного ингибитора в наночастицы составляет 40-70% в зависимости от условий их получения. Полученные полиэлектrolитные комплексы могут служить системой доставки ДНК-аптамерного ингибитора тромбина.

Изучение процесса деметилирования ДНК в эукариотической клетке

Громенко Елена Владимировна

студент

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия E-mail: lenagromenko@yandex.ru

Метилирование ДНК играет важную роль в жизнедеятельности многих живых организмов. Метилирование влияет на ДНК-белковые взаимодействия, благодаря чему принимает участие в структурной и функциональной организации генома. Оно вовлечено в такие фундаментальные процессы, как регуляция экспрессии генов и поддержание целостности генома. У млекопитающих метилирование ДНК осуществляется в пятом положении цитозина, причем модификации могут подвергаться только те дезоксицитидиновые остатки, которые образуют динуклеотиды 5'-CpG. Для каждого типа клеток характерен специфичный паттерн метилирования ДНК, который поддерживается неизменным благодаря работе ДНК-метилтрансфераз.

В клетках также существует процесс, обратный метилированию – деметилирование ДНК. Оно наблюдается во время гаметогенеза и сразу после оплодотворения, а также во всех неопластических клетках.

В то время как процесс метилирования относительно хорошо изучен, механизмы деметилирования ДНК до сих пор неясны. Были предложены 3 механизма активного деметилирования: удаление метильной группы в цитозиновом кольце, вырезание метилированного основания и вырезание всего модифицированного нуклеотида. Однако данные противоречивы и плохо воспроизводимы, кроме того нет оптимального метода детектирования деметилирующей активности.

В задачи нашей работы входило изучение механизмов деметилирования ДНК и поиск участников этого процесса.

На первом этапе был разработан достаточно простой и доступный метод, позволяющий детектировать деметилирующую активность *in vitro*. Метод заключается в том, что метилированный олигодезоксирибонуклеотид после взаимодействия с ядерным экстрактом клеток обрабатывается бисульфитом натрия. В результате реакции остатки цитидина подвергаются дезаминированию, при этом остатки 5-метилцитидина сохраняются неизменными. Проводимая далее реакция удлинения праймера, в которой вместо дезоксигуанозина используют дидезоксигуанозин, должна останавливаться на первом остатке комплементарного ему 5'-метилцитидина. Если в результате обработки ядерным экстрактом клеток произошло деметилирование остатков 5'-метилцитидина, то реакция удлинения праймера должна идти до конца комплементарной цепи.

В ходе работы выяснилось, что в контрольных экспериментах без бисульфитной реакции также происходило некоторое удлинение праймера, что может свидетельствовать о протекании процесса дезаминирования остатков 5'-метилцитидина. Дезаминирование остатков 5'-метилцитидина, согласно одному из предложенных механизмов деметилирования, может являться первой стадией процесса.

На втором этапе исследовалось влияние различных компонентов на степень деметилирования олигодезоксирибонуклеотида. В частности было обнаружено, что в присутствии АТФ и GTP деметилирование протекает более эффективно. Этот факт указывает на то, что процесс деметилирования энергозатратный и многоступенчатый. Присутствие SAM наоборот уменьшает степень деметилирования, что может свидетельствовать о наличии равновесия между процессом метилирования и деметилирования. Неожиданным результатом оказалось уменьшение деметилирующей активности в присутствии синефунгина, ингибитора ДНК метилтрансфераз.

Сравнение ингибирующей активности 15-звенного и 31-звенного ДНК-аптамера к тромбину

Завьялова Е.Г.

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

химический факультет, Москва, Россия

E-mail: zlenka2006@rambler.ru

Тромбин – сериновая протеиназа, ключевой фермент системы сворачивания крови животных. В организме концентрация и активность этого фермента определяется тонким балансом между действием прокоагулянтов и антикоагулянтов. Неудивительно, что именно тромбин оказался первой протеиназой, для которой получены ДНК-аптамеры — олигонуклеотиды, отобранные методом SELEX из множества случайных последовательностей и обладающие специфичностью к своей мишени. Несомненное преимущество аптамеров состоит в существовании автоматического метода синтеза, а также в низкой иммуногенности олигонуклеотидов, что определяет интерес к их использованию в медицине для терапии и диагностики.

В данной работе проведено сравнительное исследование ингибирующего эффекта нескольких ДНК-аптамеров тромбина. В качестве модельных структур были выбраны 15-звенный (15-ТВА) и 31-звенный (31-ТВА) аптамеры. Предполагаемая структура 31-ТВА состоит из 15-ТВА и фланкирующей его дуплексной последовательности. Для определения ингибирующего эффекта аптамеров использована система, имитирующая плазму крови человека: тромбин, фибриноген, сывороточный альбумин в физиологических концентрациях, а также солевой буфер, близкий таковому для плазмы крови. За активностью тромбина следили по образованию фибриновых нитей турбидиметрическим методом.

На основе уравнений Михаэлиса-Ментен, модифицированных для случая конкурентного ингибирования, были рассчитаны константы ингибирования данных аптамеров: для 15-ТВА $K_i = 58$ нМ и для 31-ТВА $K_i = 0,4$ нМ, что говорит о высоком ингибирующем потенциале 31-ТВА.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-01244-а и Роснауки 02.512.11.2242.

Фитохимический анализ травы душицы обыкновенной (*Herba Origanum vulgare*)

Иванова Татьяна Евгеньевна, Станишевская Ирина Евгеньевна

студент, старший преподаватель

Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В.

Ломоносова (МИТХТ), Москва, Россия

E-mail: irina.irina@inbox.ru

В настоящее время проблема фальсифицированных лекарственных средств во всём мире становится всё более серьёзной. Химический анализ – решающий фактор при определении подлинности, чистоты и доброкачественности лекарственного растительного сырья. Цель настоящей работы — химический анализ и контроль качества травы душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.).

Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) – многолетнее травянистое растение семейства яснотковых (Lamiaceae). Трава душицы содержит эфирное масло, определяющее ее применение, дубильные вещества, флавоноиды. В составе эфирного масла определены 87 компонентов, основными из которых являются: фенолы (от 35 до 66%), карвакрол (1,0- 70%), тимол (от 2,0 до 50,3%), цимол (до 17,5%) и фенолэфир; би- и трициклические сесквитерпены – от 7,1% до 16,5%, свободные спирты – от 12,8 до 15,4%, геранил-ацетат – от 2,6 до 5,0% [Станкявичене и др., 1980; Kokkini S. et al., 1997]. Траву душицы применяют в научной медицине отдельно и в смеси с другими растениями для повышения аппетита, улучшения пищеварения, при заболеваниях печени, при острых и хронических бронхитах. Экстракт травы душицы входит в состав комплексного препарата «Уролесан», оказывающего спазмолитическое действие [Пустырский И.Н. и др., 2000].

Определение содержания эфирного масла и дубильных веществ в траве душицы и влажности сырья производили с использованием общепринятых методов [ГФ, 1990]. Качественное определение содержания ароматических соединений (тимола, карвакрола) в эфирном масле, флавоноидов в экстракте душицы проводили методом ТСХ [Ковалев В.Н. и др., 2004] с использованием пластин "Сорбфил СТХ – 1А" и «Силуфол». Для проведения исследований использовались образцы травы душицы обыкновенной, выращенной в условиях Московской области, 2007 года сбора.

Согласно ГФ XI (1990) основным показателем качества сырья душицы является содержание эфирного масла: трава душицы должна содержать не менее 0,1%, а измельченное сырье – не менее 0,08% эфирного масла. Влажность сырья при этом не должна быть больше 13%. Содержание эфирного масла в 10 исследуемых образцах варьировало от 0,17 до 0,59%, влажность сырья – от 2,7 до 4,7%.

В результате качественного анализа установлено содержание в траве душицы дубильных веществ с преобладанием конденсированной группы, флавоновых и флавоноловых гликозидов, а в эфирном масле - ароматических соединений (тимол, Rf 0,73).

1. Станкявичене Н.А., Юкнявичене Г.К., Моркунас А.В. Качественная и количественная характеристика эфирных масел у душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), культивируемой в ботаническом саду АН Литовской ССР. // Актуальные вопросы изучения и использования эфиромасличных растений.- Симферополь, 1980. -С.252-253.
2. Kokkini S., Korousou R., Dartioti A., Krigas N., Janaras T. Autumn essential oils of Greec oregano. *Phytochemistry* (Oxford), 1997,44 (5): 883-886.
3. Пустырский И.Н., Прохоров В.Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений.- Москва-Минск: Книжный дом, Махаон, 2000.- С.128-130.
4. Государственная Фармакопея СССР. 11-е изд., М. - 1990.- Вып.2.- 400 с.
5. Практикум по фармакогнозии. Под ред. Ковалева В.Н., Харьков. - 2004.-510с.

Спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия гидрофильных цианиновых красителей с сывороточными альбуминами

Кашин А.С.

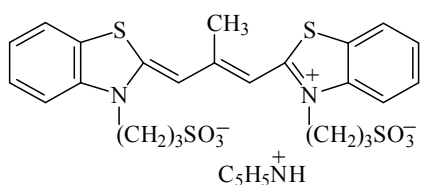
Студент

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,

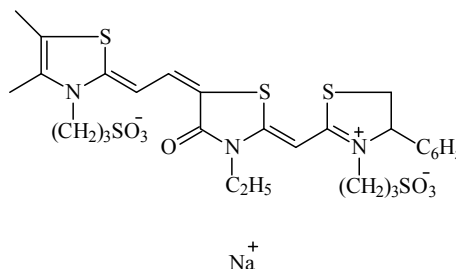
Высший химический колледж РАН, Москва, Россия

E-mail: kashin89@yandex.ru

Изучение нековалентных взаимодействий полиметиновых (цианиновых) красителей с биомакромолекулами является актуальной научной задачей как с точки зрения исследования межмолекулярных взаимодействий в биосистемах, так и для разработки новых эффективных красителей-зондов для биомолекул. Ранее было установлено, что анионные полиметиновые красители эффективно взаимодействуют с сывороточным альбумином. При этом ряд *мезо*-замещенных анионных карбоцианинов с сульфогруппами демонстрирует резкий рост флуоресценции [1]. Однако один из таких красителей, 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаин, рекомендованный в качестве зонда для сывороточного альбумина человека [2, 3], оказался неэффективным для альбуминов других животных [4]. Следовательно, поиск эффективных спектрально-флуоресцентных зондов для различных альбуминов остается по-прежнему актуальным. С этой целью в настоящей работе спектрально-флуоресцентными методами изучено взаимодействие двух анионных цианиновых красителей, **K1** (*мезо*-замещенного) и **K2**, с сывороточными альбуминами человека и быка.



K1



K2

В ходе проведенного исследования показано, что краситель **K1** взаимодействует с сывороточными альбуминами человека и быка с высокими константами связывания. При этом наблюдается резкий рост интенсивности флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции красителя возрастает от 0.0064 в водном растворе до ~ 0.25 – 0.75 в комплексе с альбумином (в зависимости от условий), константы связывания с альбуминами порядка 10^5 M^{-1} . Это позволяет использовать данный краситель в качестве спектрально-флуоресцентного зонда на сывороточные альбумины. Также показано, что краситель **K2** взаимодействует с сывороточным альбумином человека с константами связывания порядка 10^5 M^{-1} .

Литература

1. Tatikolov A.S., Costa S.M.B. // Biophys. Chem. 2004. V. 107. No. 1. P. 33.
2. Панова И.Г., Татиколов А.С. // Докл. АН. 2005. Т. 402. № 5. С. 709.
3. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T., Tatikolov A.S. // Anal. Biochem. 2007. V. 361. P. 183.
4. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Levin P.P., Tatikolov A.S. // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2008. V. 151. P. 676.

**Разработка высокорелаксивных контрастных МРТ-агентов
на основе металлокомплексов тиакаликс[4]арена⁴
Кононова А.В., Бурилова Е.А., Зиятдинова А.Б., Солодов А.Н.⁵**

*Студент Химического института им. А.М.Бутлерова
Казанский государственный университет, Казань, Россия
E-mail: kononovaanna@mail.ru*

Одним из наиболее точных и экспрессных методов современной медицинской диагностики является магнитно-резонансная томография (МРТ). Однако контрастность МРТ-изображений, получаемых без применения специальных парамагнитных веществ, изменяющих времена релаксации протонов в ткани (контрастных агентов, КА) недостаточна. Низкая релаксационная эффективность коммерческих КА (до $5000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) вынуждает вводить их в организм в достаточно больших количествах. Применение высокорелаксивных КА (теоретически предельные значения релаксационной эффективности - до $120000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) позволит использовать растворы с пониженным содержанием КА, что существенно снизит токсическую нагрузку на организм пациента. В связи с этим актуальной представляется разработка новых КА, обладающих повышенной релаксационной эффективностью.

подавляющее большинство используемых в настоящее время КА представляют собой координационные соединения гадолиния(III) с полиаминополикарбоксилатами. Одним из перспективных способов повышения релаксивности является использование в составе комплексов дифильных соединений, способных к нековалентному самоагрегированию в результате множественных гидрофобных взаимодействий между алкильными заместителями. Перспективными в этом плане представляются полиотопные лиганды на каликсареновой платформе. В данной работе исследована возможность создания высокорелаксивных металлокомплексов на основе различных конфигурационных изомеров тетракарбоновой *n*-трет-бутилтиакаликс[4]ареновой кислоты с парамагнитными ионами Gd(III) и Mn(II). Получение КА на основе природных микроэлементов, в том числе Mn(II), представляет особый интерес, поскольку демонстрирует возможность замены высокотоксичного и дорогостоящего гадолиния на ионы металлов, входящие в биохимические циклы живых организмов.

Повышения релаксивности липофильных парамагнитных комплексов можно добиться включением их в агрегаты мицелл, везикул или липосом, моделирующих биомембраны. Поэтому исследование состояния парамагнитных металлокомплексов проводили в водных растворах мицеллообразующих неионных поверхностно-активных веществ. Основным методом исследования – протонная ядерная магнитная релаксация (Minispec, Bruker, 20 МГц, 298К). Для моделирования поведения металлокомплексов *in vivo* исследовали влияние добавок солей щелочных и щелочноземельных металлов, бычьего сывороточного альбумина, конкурентных лигандов на магнитно-релаксационные параметры систем в физиологической области pH.

В результате установлены условия получения металлокомплексов с чрезвычайно высокими значениями релаксационной эффективности (свыше $100000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), в 20-30 раз превышающими аналогичный параметр коммерческих препаратов.

Полученные результаты будут полезны при разработке новых высокорелаксивных контрастных МРТ-агентов.

⁴ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ 06-03-32063 и программы Минобразования и науки РФ "Развитие научного потенциала высшей школы на 2006-2008 г.г." (РНП 2.1.1.4794).

⁵ Авторы благодарят проф. Амирова Р.Р. за помощь в подготовке тезисов, доц. Стойкова И.И. и проф. Антипина И.С. за предоставление образцов тиакаликс[4]аренов.

Использование гистонового промотора для увеличения экспрессии целевых белков, продуцируемых грибом *Penicillium verruculosum*

Короткова О.Г

Соискатель

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

E-mail: littletempo@yandex.ru

Повышение уровня секреции целевых белков является одной из основных задач при получении промышленных штаммов продуцентов. Существует большое количество методов повышения уровня секреции как микробиологические, так и генно-инженерные. Одним из способов решения этой задачи может являться применение системы экспрессии с использованием гистоновых промоторов. Такая система экспрессии обладает рядом преимуществ, одним из которых является увеличение экспрессии целевого белка без изменения состава других белков в секреторируемом комплексе.

Для увеличения эффективности гидролиза целлюлозосодержащих субстратов нами был успешно трансформирован ген β - глюкозидазы *Aspergillus niger* под контролем гомологичного промотора гена гистона H 4.1 гриба *Penicillium verruculosum*. Уровень экспрессии секреторируемого целевого белка оценивался по наличию полосы β -глюкозидазы на белковом гель- электрофорезе культуральной жидкости и измерению активности по п-НФ- β - D- глюкопиранозиду и целлобиозе. С помощью хроматографического разделения был определен количественный компонентный состав целлюлазного комплекса. Полученные данные свидетельствуют об увеличении экспрессии целевого белка в 2,5 раза, при этом собственный целлюлазный комплекс полностью сохранился. Удельная активность гетерологичной β - глюкозидазы не изменилась.

Таким образом, нами была показана возможность использования гистоновых промоторов для увеличения экспрессии целевых белков в рекомбинантном штамме гриба *Penicillium verruculosum*. Был получен штамм-продуцент гетерологичной бета-глюкозидазы, обладающий повышенной осаживающей способностью.

Литература

1. Belshaw, N.J., Haigh, N.P., Fish, N.M., Archer, D.B., Alcocer, M.J.C. (2002) Use of a histone H4 promotor to drive the expression of homologous and heterologous protein by *Penicillium funiculosum* // Applied Microbiology and Biotechnology, №60, p. 455-460.
2. Ehiger, A., Denison, S.H., May, G.S. (1990) Sequence, organization and expression of the core histone genes of *Aspergillus nidulans* // Molecular and general genetics, №222, p.416-424.
3. Cziferszky, A., Seiboth, B., Kubicek, C. (2003) The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1 // Fungal Genetics and Biology, №40, p. 166-175.
4. Bohlmann et al, Recombinant penicillium funiculosum for homologous and heterologous protein production // US Patent Application Publication, US 2005/0227357 A1.
5. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. МГУ, 1995, с. 224.
6. Березин И.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П. Исследование возможностей кинетического спектрофотометрического метода определения глюкозы. Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1631-1636.

ПЛАЗМИНОГЕН-АКТИВАТОРНЫЕ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОРТЕЛИЗИНА (РЕКОМБИНАНТНОЙ СТАФИЛОКИНАЗЫ)

Крамор Р.В.¹ Мухаметова Л.И.¹, Маркин С.С.², Жукова А.В.², Айсина Р.Б.¹,
Смирнова Е.Г.³, Остроумова Л.Ю.³

Студент

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ²ММА им. И.М. Сеченова, ³ООО
«СупраГен», Москва, Россия.
velekar@mail.ru

Введение. Стафилокиназа (СТА) - фибрин-специфичный активатор плазминогена является эффективным тромболитическим агентом для терапии тромбозов. СТА не прямой активатор плазминогена (Pg). СТА образует с плазминогеном неактивный комплекс Pg-СТА, превращающийся в активный плазмин (Pm)-СТА, который активирует избыток плазменного Pg в плазмин. В настоящее время в России разработано несколько вариантов отечественной рекомбинантной стафилокиназы (СТА или ФОРТЕЛИЗИНА).

Цель работ - Сравнительное исследование Pg-активаторных и фибринолитических свойств ФОРТЕЛИЗИНА (17 kDa) и SakSTAR (15,5 kDa; коммерческий препарат стафилокиназы).

Методы исследования. Кинетику образования стехиометрических комплексов плазмин (Pm)-СТА и Pm-SakSTAR и активацию Pg каталитическими концентрациями исследуемых СТА и SakSTAR регистрировали по скорости гидролиза специфического субстрата плазмينا. Динамику лизиса фибриновых сгустков в буфере и плазменных сгустков в плазме человека под действием СТА измеряли по уменьшению высоты столба сгустков с помощью катетометра при 37°.

Результаты. Показано, что скорость активации Pg каталитическими концентрациями СТА в отсутствие фибрин-мономера (FM) низка и увеличивается с ростом концентрации FM до максимального значения при [FM] = 60 нМ. Это подтверждает, что по фибрин-специфичности ФОРТЕЛИЗИН идентичен SakSTAR, однако его удельная Pg-активаторная активность значительно выше коммерческого препарата. Изучено взаимодействие эквимоллярных концентраций Pg с обоими активаторами. Обнаружено, что кинетика образования активаторных комплексов Pm-СТА и Pm-SakSTAR и их максимальные удельные активности идентичны. Методом электрофореза выявлено, что, в отличие от Pm-SakSTAR, в ходе образования эквимоллярного комплекса Pm-СТА происходит протеолитическое отщепление короткого пептида с N-конца СТА. Проведено сравнительное исследование кинетики лизиса фибриновых сгустков, погруженных в буфер (pH 7,4), и плазменных сгустков, погруженных в плазму крови человека, под действием двух активаторов. Показано, что новый отечественный препарат ФОРТЕЛИЗИН имеет такую же тромболитическую активность, как и SakSTAR.

Заключение. На основании полученных результатов сделано предположение, о том, что повышенная плазминоген-активаторная активность СТА связана с наличием N-концевого пептида, содержащего 6 остатков His, который удаляется в ходе фибринолиза. Отечественная рекомбинантная СТА (ФОРТЕЛИЗИН) полностью идентична коммерческой SakSTAR по фибрин-специфичности и тромболитической эффективности.

Определение фторхинолонов методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа
Куприянова Н. А.

студент

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: kuprianovan@mail.ru

Фторхинолоны – бактерицидные синтетические препараты, фторированные производные различных хинолонов. Эти антибиотики широкого спектра действия ингибируют ключевой фермент бактериальной клетки, ответственный за синтез ДНК. Фторхинолоны подавляют активность А-субъединицы бактериальной ДНК-гиразы. Этот фермент обеспечивает раскручивание суперспиралей ДНК, необходимое для её репликации. Подавление активности ДНК-гиразы смертельно для клеток.

В настоящее время фторхинолоны активно используются в ветеринарии. Накапливаясь в организме животного и затем попадая в продукты питания, эти препараты могут вызывать аллергические реакции у человека, например, сыпь, зуд и даже ангионевротический отек. Содержание даже малых количеств антибиотиков ряда хинолонов в таких продуктах как, например, молоко могут представлять угрозу для беременных и кормящих матерей, а так же для людей, подверженных аллергической реакции.

Поэтому важно контролировать содержание фторхинолонов в продуктах питания, в частности в молоке и куриных яйцах. При этом необходимо выявлять низкие концентрации этого вещества (менее 100 нг/мл или 100 мкг/кг). Для количественной и качественной оценки содержания препаратов в продуктах питания, была разработана методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА). ПФИА характеризуется высокой чувствительностью, простотой и быстротой проведения анализа.

В настоящей работе были разработаны методики ПФИА для группоспецифического определения следующих антибиотиков: норфлоксацина, клинофлоксацина, марбофлоксацина, данофлоксацина, ципрофлоксацина, флюомехина и энрофлоксацина. Были синтезированы необходимые для анализа иммунореагенты, подобраны соответствующие пары антиген-антитело. Определены аналитические характеристики методики. Также предложены способы пробоподготовки молока и яиц для дальнейшего проведения ПФИА фторхинолонов в этих объектах. Проведены тесты на открытие, по результатам которых была определена эффективность методики. Разработанная методика была применена для анализа реальных образцов молока и яиц.

Комплексообразование ионов меди(II) с некоторыми бета-лактамами антибиотиками

Лапшин С. В.

аспирант кафедры неорганической и аналитической химии

Тверской государственной университет, Тверь, Россия

E-mail: sogar@mail.ru

Медь относят к так называемым «биометаллам», так как она входит в состав некоторых металлоферментов, необходимых для нормального протекания биохимических процессов. В связи с этим в полной мере возникает вопрос об исследовании возможности взаимодействия ионов Cu^{2+} с лекарственными веществами, тем более что медь(II) известна как активный комплексообразователь. Среди лекарственных веществ значительный интерес как потенциальные биолиганды представляют бета-лактамы антибиотики (пенициллины и цефалоспорины), которые применяются часто и в относительно больших количествах. Из литературных данных следует, что наилучшими лигандными свойствами обладают те бета-лактамы антибиотики, молекулы которых содержат аминокгруппу.

В настоящей работе было исследовано комплексообразование ионов меди(II) с такими широко используемыми в России препаратами как ампициллин (Amp), амоксициллин (Amx), бензилпенициллин (Bzp), карбенициллин (Carb), цефалексин (Cpx), цефазолин (Czl). При добавлении к раствору цефазолина раствора, содержащего ионы меди(II), выпадает осадок. В других случаях образуются гомогенные растворы.

Было проведено рН-метрическое титрование антибиотиков в присутствии нитрата меди(II) на фоне 0.1M раствора нитрата калия при 20°C 0.05M раствором NaOH и 0.05M HNO_3 . Соотношение Cu(II):L в титруемом растворе составляло 1:5, что позволяло учесть возможность образования полилигандных комплексов.

Математическая обработка рН-метрических данных была проведена с использованием специализированной программы расчета химических равновесий New DALSFEK (КСМ Soft, 2000 г.).

Были сняты спектры исследуемых растворов в видимой области. Гипсохромный сдвиг полосы поглощения акваионов меди(II) свидетельствует о координации лигандов сильного поля.

Можно сделать вывод о том, что анионы антибиотиков координируются через аминокгруппу или азот бета-лактамы группы. В щелочной среде медь(II) связывает комплексы состава CuL и Cu(OH)L анионы Amp^- , Amx^- , Cpx^- т.е. антибиотиков содержащих аминокгруппу, в кислой среде эти комплексы разрушаются, т.к. антибиотики переходят в форму цвиттер-ионов. Не содержащие аминокгруппы анионы Bzp^- и Carb^{2-} , напротив, образуют комплексы с Cu(II) в слабокислой среде. В щелочной среде эти комплексы разрушаются, в осадок выпадает Cu(OH)_2 . Полученные значения констант образования приведены в таблице.

Константы образования и спектральные характеристики комплексов меди(II) с анионами антибиотиков

L	CuL	Cu(OH)L	$\lambda_{\text{max}} \text{ нм } (\epsilon_{\text{max}} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})$
Amp	5.1 ± 0.1	13.9 ± 0.1	601.5 (24.0)
Amx	4.2 ± 0.2	13.3 ± 0.1	732.2 (4.3)
Bzp	3.23 ± 0.02		636.2 (4.6)
Carb	3.40 ± 0.02		706.8 (6.61)
Cpx	3.99 ± 0.04	12.6 ± 0.1	728.9 (4.92)

Изучение взаимодействия компонента теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces Serevisiae* белка Est3 с ДНК-квадруplexами.

Логвина Н.А.

Аспирант.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: BakaldinaNatalie@mail.ru

Белок Est3 является компонентом теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Теломераза необходима для поддержания стабильности генома, поскольку решает проблему недорепликации концов ДНК, добавляя G-богатые теломерные ДНК повторы на концах хромосом. Делеция гена белка Est3 приводит к прогрессирующему укорочению теломер в ряду поколений, приводящему к сенесценсу и гибели клетки. Дрожжи, у которых удален ген *est3*, способны прожить всего лишь около 80 поколений¹. Предполагается, что белок Est3 играет важную роль в регуляции активности теломеразы, однако его функция до сих пор неизвестна.

Ранее было показано, что Est3 способен специфично связываться с олигонуклеотидами, содержащими теломерные повторы, а эффективность связывания зависит от присутствия GTP или GDP².

Согласно одной из распространенных гипотез, G-богатые теломерные 3'-концы хромосом образуют G-квадруplexы. В данной работе с помощью EMSA показано, что Est3 способен связываться именно с ДНК-квадруplexами, образованными теломерными повторами дрожжей *S. cerevisiae*. Добавление GTP приводит к более эффективному связыванию, в то время как GDP ингибирует взаимодействие. Более детально взаимодействие Est3 с G-квадруplexами было изучено методом DMS-пробинга, позволившим зафиксировать изменения в структуре квадруplexа, вызванные взаимодействием с Est3. Взаимосвязь между ГТФазной активностью Est3 и способностью связываться с G-квадруplexами подтверждается результатами экспериментов с использованием негидролизуемого аналога ГТФ, а так же с мутантным белком D86A Est3, не способным гидролизовать ГТФ.

Способность Est3 связываться с G-квадруplexами в зависимости от гидролиза ГТФ может иметь значение для регуляции теломеразной активности *in vivo* благодаря изменению взаимодействию с теломерными повторами на концах хромосом.

Литература

1. Morris DK, Lundblad V. (1997) Programmed translational frameshifting in a gene required for yeast telomere replication. // *Curr Biol.* 7(12):969-76.
2. Sharanov YS, Zvereva MI, Dontsova OA. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes // *FEBS Lett.* 580(19):4683-90.

ЯМР структура С- домена белка фактора терминации трансляции человека eRF-1 в растворе

*Манцызов Алексей Борисович^{†1}, Иванова Елена Владимировна², Берри Бирдсалл³,
Фролова Людмила Юрьевна², Польшаков Владимир Иванович¹*

†Аспирант третьего года

¹ *Центр магнитной томографии и спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова*

² *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

³ *Национальный институт медицинских исследований, Лондон, Великобритания*

E-mail: mants@inbox.ru

Фактор терминации трансляции первого класса eRF1 играет ключевую роль на стадии окончания биосинтеза полипептидной цепи рибосомами эукариотических организмов. Структура белка построена из трех доменов, связанных друг с другом гибкими линкерами. N-терминальный и центральный домены eRF1 участвуют соответственно в узнавании стоп-кодона мРНК и гидролизе сложноэфирной связи между синтезированным полипептидом и тРНК. С-домен участвует в регуляции процесса терминации трансляции. Установлено, например, что взаимодействие С-домена eRF1 с фактором терминации трансляции второго класса eRF3 приводит к конформационным изменениям в претерминационном рибонуклеопротеиновом комплексе и способствует быстрому освобождению продукта трансляции.

Структура полноразмерного белка eRF1 полученная ранее методом рентгеновской кристаллографии [1], имеет невысокое разрешение (~2.8 Å) и содержит обширные неразрешенные участки в области подвижных фрагментов структуры С-домена, соответствующих аминокислотным остаткам 329-372 и 414-437.

В настоящей работе с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса получена структура высокого разрешения С-домена фактора терминации трансляции eRF1 человека в растворе. Обнаружены новые структурные элементы в области, ранее не разрешенной в кристаллической структуре. Семейство из 24 рассчитанных структур депонировано в базу данных Protein Data Bank (код 2KF1).

Литература

1. Song, H., et al., The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-- mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell*, 2000. **100**(3): p. 311-21.

Studies the antioxidant activity of endemic Kazakhstan plants through ferric ion reduction method

Mashentseva A.A.

Ph.D. student, master of chemistry sciences⁶

The L.N.Gumilev Eurasian national university, Astana, Kazakhstan

E-mail: shilka_2005@mail.ru

The role of free radicals in human life has been the subject of extensive studies in relation to oxidative stress and cellular signaling. It is accepted that at high concentrations of free radicals are hazardous, whereas at moderate concentrations, they play an important role as regulatory mediators in signaling processes [1]. In order to study the dynamics of oxidation and also antioxidation, it is essential to generate free radicals at a controlled and constant rate for specific duration and at specific site.

The most abundant antioxidants are polyphenols. As antioxidants, polyphenols may protect cell constituents against oxidative damage and, therefore, limit the risk of various degenerative diseases associated to oxidative stress [2]. Many literature reports showed a simple relationship between the content of phenolic compounds and the antioxidant capacity of plant extracts. The antioxidant potency of polyphenols may be evaluated *in vitro* by measuring their ability to trap free radicals and reduce other chemicals.

The aim of the research presented in this paper is to investigate the antioxidant activity of the some extracts of plants grown in Kazakhstani-soil, such as, *Fungus betulinus*, *Crataegus sauguinea pall.*, *Gemmae Betulae*, *Populus balsamifera L.* using simple *o*-phenanthroline colour method, based on reduction of ferric ions.

Several concentrations ranging from 0,25-5,0 mg/ml for the investigated extracts were tested for their antioxidant activity (AOA). Table 1 shows the AOA in ascorbic acid equivalent (ACE) of investigated extracts. The tests were carried out in triplicate for all the experiments. Each value represents means \pm SD.

Table 1. Antioxidant activity of some endemic Kazakhstan plants

Extract	0,25	1,0	2,0	4,0	5,0
<i>Fungus betulinus</i>	0,23 \pm 0,03	0,88 \pm 0,11	1,76 \pm 0,31	3,52 \pm 1,26	4,35 \pm 1,90
<i>Crataegus sauguinea pall.</i>	0,43 \pm 0,004	1,62 \pm 0,12	3,23 \pm 0,26	6,43 \pm 0,54	8,03 \pm 0,68
<i>Gemmae Betulae</i>	0,45 \pm 0,02	1,67 \pm 0,11	3,34 \pm 0,2	6,63 \pm 0,41	8,28 \pm 0,52
<i>Populus balsamifera L.</i>	0,55 \pm 0,03	2,07 \pm 0,16	4,14 \pm 0,32	8,25 \pm 0,66	10,31 \pm 0,8

Ortho- substituted phenolic compounds may exert pro-oxidant effects by interacting with iron. According to using assay the *o*-phenanthroline forms the colored pink complexes with Fe²⁺, which get disrupted in the presence of chelating agents [3].

The ethanolic extracts of investigated plants interfered with the formation of ferrous- *o*-phenanthroline complex, thereby suggesting that the extracts has metal chelating activity.

1. Saint-Cricq de Gaulejac N. et al. (1999) Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods// Agricultural Food Chemistry.№ 47. P. 425-431
2. Scalbert A. et al. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of Diseases//Food science and nutrition. №45(4) P.287-306.
3. Aswatha Ram H.N. et al. (2008) In vitro free radical scavenging potential of methanol extract of entire plant of *Phyllanthus Reticulatus* Poir// Pharmacologyonline. .№2.P. 440-451.

⁶ The author sincerely thanks Professor T.S.Seitembetov (ENU) and Professor V.V.Polyakov (NKSU) for generous support for these studies

2-аминопурин-содержащие ДНК как инструмент для изучения ДНК-метилтрансферазы SssI

Минеро Г.Х.А.С. Черепанова Н.А.
Громова Е.С.

*студент 4 курса, аспирант 2 з/о, д.х.н., профессор
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия
E-mail: antonio.msu@mail.ru*

Метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами (МТазы), использующими в качестве донора метильной группы S-аденозил-L-метионин (AdoMet), который в процессе реакции превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин (AdoHcy). Уникальность прокариотической C5-цитозин-МТазы SssI состоит в том, что она узнает и метилирует CpG-участок в ДНК, как и МТазы млекопитающих, и может служить моделью этих более сложных ферментов. Механизм метилирования сложен: вначале фермент связывается с ДНК и с AdoMet, затем метилируемое основание выводится («выпетливается») из состава двойной спирали ДНК, далее следует перенос метильной группы.

Целью данной работы явилось изучение роли 6-оксогруппы остатков гуанина во взаимодействии M.SssI с ДНК, а также исследование «выпетливания» цитозина-мишени в комплексе M.SssI с ДНК с помощью 2-аминопурин-содержащей ДНК.

В качестве субстратов были использованы 30-звенные полуметилированные ДНК-дуплексы, содержащие 2-аминопурин (AP). AP является аналогом гуанина, у которого отсутствует 6-оксогруппа. AP вводили в CpG-участок вместо остатков C или G, а также во фланкирующие нуклеотидные последовательности рядом с участком или в стороне от него. Изучено плавление этих субстратов путем измерения зависимости интенсивности флуоресценции комплексов AP-ДНК с красителем SYBR GreenI от температуры. Замена остатка G на AP приводила к снижению температуры плавления ДНК-дуплекса на 3-4 °C относительно немодифицированной ДНК.

Методом «торможения» в геле были получены изотермы связывания и рассчитаны константы диссоциации (K_d) комплексов M.SssI-(AP-ДНК)-AdoHcy. Наименее прочный комплекс образовывался с ДНК, содержащий AP вместо остатка гуанина в CpG-участке: константа диссоциации увеличивалась в 44 раза (K_d 1430±80 нМ) по сравнению с немодифицированным ДНК-субстратом (K_d 32,4±3,2 нМ). При наличии AP в других позициях влияние на связывание было более слабым (K_d увеличивалась в 4 раза), либо не наблюдалось.

Методом флуоресценции были изучены комплексы M.SssI-(AP-ДНК)-AdoMet. AP является флуорофором ($\lambda_{\text{возб.}}$ 330 нм, $\lambda_{\text{исп.}}$ 370 нм), флуоресценция которого потушена в двойной спирали и резко возрастает при выведении его за пределы ДНК. Значительное разгорание флуоресценции наблюдали только для комплекса M.SssI с ДНК-дуплексом, содержащим AP в позиции цитозина-мишени. Далее были оценены каталитические константы переноса метильных групп на AP-ДНК с использованием радиоактивно-меченного кофактора [$^3\text{H-CH}_3$]-AdoMet. Ухудшение метилирования в 52 раза наблюдалось для субстрата, содержащего AP вместо остатка гуанина в CpG-участке.

Таким образом, M.SssI в процессе метилирования выводит метилируемый цитозин из состава двойной спирали. Из данных по связыванию и метилированию AP-ДНК следует, что 6-оксогруппа остатка гуанина в CpG-участке очень важна для образования продуктивного комплекса на стадии связывания фермента с ДНК.

**Разработка способа наноструктурирования 5-карбонитрил-1Н-пиразол-4-фенилов –
новых потенциальных эндогенных химических регуляторов развития высших
растений**

Момотов Е.В.

Студент 2 курса химического факультета

Астраханский Государственный Университет, Астрахань, Россия

E-mail: zhan_90@inbox.ru

Новый материал – наноструктурированные 5-карбонитрил-1Н-пиразол-4-фенилы на основе полиакрила. Вещество является потенциальным эндогенным химическим регулятором этилена высших растений. Получен по новым технологиям, ранее нигде не применявшийся. На рынке перечень соединений, подобного типа, сильно ограничен и представлен в основном релизом и диметипином. Эти препараты обладают хорошей активностью, однако они ограниченно растворимы в воде. Предлагаемые нами новые регуляторы развития высших растений на основе полиакрила будут обладать хорошей растворимостью в воде, проявлять заявляемую активность по отношению к культурным растениям и тем самым сокращать сроки созревания плодов, что позволяет в несколько раз повысить эффективность и сократить сроки механизированного сбора урожая. Предлагаемые нами продукты обладают потенциальной возможностью свободного перемещения по растению, не повреждая незрелые плоды и не вызывая опадения цветов. Настоящая научная разработка находится на стадии экспериментальных образцов. Технология получения продукта проста и не требует специального или дорогостоящего оборудования.

Комплексообразование ампициллина, амоксициллина и цефалексина с ионами алюминия(III), галлия(III) и индия(III)

Мясникова Е.Н.

Магистрант кафедры неорганической и аналитической химии

Тверской государственной университет, Тверь, Россия

E-mail: v260766@rambler.ru

Известно, что анионы бета-лактамовых антибиотиков, содержащих аминогруппы, способны образовывать устойчивые комплексы с катионами *d*-элементов. К числу таких антибиотиков относятся широко используемые в России препараты ампициллин, амоксициллин и цефалексин. В отношении катионов *p*-элементов лигандные свойства этих антибиотиков практически не исследованы.

В данной работе рН-метрическим методом впервые исследовано комплексообразование анионов ампициллина (Amp^-), амоксициллина (Axp^-) и цефалексина (Cpx^-) с ионами Ga^{3+} и In^{3+} , а также уточнены ранее полученные данные о комплексообразовании с ионами Al^{3+} .

Кислые растворы (начальное значение $\text{pH} < 3$), содержащие нитрат металла и антибиотик в мольном соотношении $\text{M:L} = 1:3$ на фоне 0.1 M KNO_3 , титровали стандартным раствором NaOH при 25°C . В тех же условиях были определены константы гидролиза ионов Al^{3+} , Ga^{3+} и In^{3+} , необходимые для корректного анализа результатов. Расчет констант гидролиза (K) и констант образования комплексов (β) выполнен в программе New DALSFЕK (<http://sinisha.chat.ru>). Полученные результаты приведены в таблицах. Во всех исследованных системах образуются высокоустойчивые комплексы. Этот эффект представляет интерес для бионеорганической химии антибиотиков, разработки новых методов анализа антибиотиков, а в случае малотоксичного алюминия – и для разработки новых антимикробных лекарственных препаратов.

Константы гидролиза

Катион	$\lg K_1$	$\lg(K_1 \cdot K_2)$	$\lg(K_1 \cdot K_2 \cdot K_3)$
Al^{3+}	-5.0 ± 0.1	-9.8 ± 0.1	-14.5 ± 0.1
Ga^{3+}	-3.3 ± 0.1	-6.9 ± 0.1	-10.4 ± 0.1
In^{3+}	-3.9 ± 0.1	-8.5 ± 0.1	-12.3 ± 0.1

Константы образования комплексов

L	$\lg\beta(\text{AlL})$	$\lg\beta(\text{AlL}_2)$	$\lg\beta(\text{GaL})$	$\lg\beta(\text{GaL}_2)$	$\lg\beta(\text{InL})$	$\lg\beta(\text{InL}_2)$
Amp^-	5.5 ± 0.1	9.4 ± 0.1	6.55 ± 0.06	12.0 ± 0.2	5.99 ± 0.08	11.9 ± 0.1
Axp^-	6.1 ± 0.1	11.2 ± 0.1	6.9 ± 0.1	13.7 ± 0.1	6.73 ± 0.07	12.7 ± 0.1
Cpx^-	5.8 ± 0.1	9.2 ± 0.2	6.7 ± 0.1	12.5 ± 0.1	6.53 ± 0.06	11.8 ± 0.2

***Изучение функциональной роли модификации нуклеотида m²G1835
23S рибосомной РНК Escherichia coli.***

Остерман Илья Андреевич

студент

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,

Химический факультет Москва, Россия

osterman@yandex.ru

Основа жизнедеятельности клетки – синтез белков, который осуществляется на рибонуклеопротеидных частицах, называемых рибосомами. Рибосома должна обеспечить правильное расположение аминокислотных остатков в первичной структуре белка, иначе может нарушиться его структура и функция. Кроме четырех стандартных нуклеотидов, составляющих молекулы РНК, в рРНК бактерии *Escherichia coli* встречаются необычные модифицированные нуклеотиды. Синтез модифицированных нуклеотидов осуществляются специальными ферментами, и клетка поддерживает целую систему, направленную на их внедрение в рибосому.

Нашей задачей было изучить роль модификации нуклеотида m²G1835 23S рРНК, метилированного по экзоциклической аминогруппе (N²). Данный нуклеотид расположен в небольшом углублении на поверхности большой субчастицы. Не имея прямого контакта с малой субчастицей, m²G1835 находится посередине между межсубъединичными мостиками В2а и В2с, в центре пересечения четырех спиралей 67, 68, 69 и 71. Основываясь на специфическом расположении данного нуклеотида близко к межсубъединичным мостикам, мы сделали предположение о том, что отсутствие метилирования G1835 может повлиять на способность субчастиц к ассоциации.

Экспериментально было показано, отсутствие метилирования приводит к снижению устойчивости комплекса 70S рибосомы и повышению ΔН ассоциации субчастиц. Можно сделать вывод, что данная модификация играет существенную роль в процессе ассоциации субчастиц.

Помимо влияния на ассоциацию субчастиц, метилирование нуклеотида m²G1835 играет важную роль в регуляции биосинтеза основного структурного белка бактериального жгутика – флагеллина. Большинство штаммов *Escherichia coli* – подвижны и могут быстро перемещаться в жидкой среде по направлению к аттрактантам (например, питательным веществам) и от репеллентов (например, токсинов). Эта способность обеспечена наличием у данных организмов специального органа движения – бактериального жгутика, сборку и функционирование которого обеспечивает более 50 генов. Подвижность и хемотаксис *E.coli* сильно зависят от окружающей среды, различные внешние факторы, такие как присутствие d-глюкозы, повышенное осмотическое давление, повышенная температура, высокая концентрация спиртов, а так же присутствие ингибиторов гираз, оказывают влияние на сборку жгутика. Для клетки крайне важным является правильно воспринять внешний сигнал и адекватно на него отреагировать, поэтому система биосинтеза жгутика имеет сложную и точную систему регуляции. Нами было показано, что в процессе этой регуляции важную роль играет метилирование нуклеотида m²G1835, так как штаммы, не имеющие этой модификации, неверно воспринимают внешние сигналы. Связано это с тем, что рибосомы лишенные метилирования нуклеотида m²G1835 перестают правильно регулировать трансляцию генов, связанных с биосинтезом флагеллина.

Создание мономерного красного флуоресцентного белка для мультифотонной микроскопии

Петкевич К.Д.^{1,2}, Верхуша В.В.², Варфоломеев С.Д.¹

Аспирант, профессор, профессор

¹*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Медицинский колледж имени А. Эйнштейна, Нью Йорк, США*

kriatkev@aecom.yu.edu

Флуоресцентные белки являются хорошим инструментом для визуализации внутриклеточных структур, живых клеток и целых организмов. Вдобавок к зеленому флуоресцентному белку и его производным в последние годы были клонированны мономерные красные флуоресцентные белки. Красные флуоресцентные белки особенно полезны для визуализации тканей, так как свет с большей длиной волны меньше рассеивается и уровень автофлуоресценции ниже в красной области. Однако, применение красных флуоресцентных белков для мультифотонной микроскопии является проблематичным, так как их флуоресценция очень слабо возбуждается современными инфракрасными лазерами, такими как Ti-Sapphire лазер, применяемыми в мультифотонной микроскопии. В связи с этим для мультифотонной микроскопии желательно иметь флуоресцентный белок с наибольшей длиной волны эмиссии (порядка 600-650 нм) и наибольшей разницей между длинами волн эмиссии и возбуждения флуоресценции, то есть с большим так называемым Стоксовым сдвигом.

Целью данной работы является разработка красного флуоресцентного белка с большими Стоксовым сдвигом и улучшенными яркостью, флостабильностью и рН-устойчивостью. В качестве исходного материала нами был взят ген одного из самых ярких и флостабильных флуоресцентных белков mKate, с максимумами возбуждения на 588 нм и эмиссии флуоресценции на 635 нм. С помощью ПЦР проводился случайный мутагенез гена mKate. Затем ПЦР-продукты клонировались в бактериальный вектор pBAD-HisB с арабинозным промотором и экспрессировались в бактериальном штамме LMG194. Полученные библиотеки мутантов сортировались на поточном цитофлуорометре MoFlo. Собирались только бактериальные клетки с яркой красной флуоресценцией возбуждаемой линией 407 нм криптонового лазера. При этом собираемые клетки не флуоресцировали при облучении никакими другими лазерами цитофлуорометра. Из каждой библиотеки собиралось несколько тысяч клеток с максимальной яркостью, которые высевались на чашки Петри для синтеза целевого белка. Вторичная селекция клонов проводилась с использованием флуоресцентного стереомикроскопа Leica-MZ16F. Самые яркие колонии нужного фенотипа переносились на штрихи для отбора самых флостабильных клонов и дальнейшего измерения их спектров флуоресценции с использованием присоединённого к стереомикроскопу спектрометра Graic QDI202. Из отобранных клонов выделялась ДНК, которая секвенировалась и использовалась для следующих раундов молекулярной эволюции.

В результате был найден мутантный белок, названный LSS-mKate, с пиками возбуждения и эмиссии флуоресценции на 452 нм и 607 нм, соответственно. Рекомбинантный очищенный LSS-mKate обладает рН-стабильностью с наблюдаемой pK_a величиной равной 6,5. Молярный коэффициент поглощения для LSS-mKate равен $21900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, и квантовый выход белка составляет 0,21. С помощью полунативного белкового электрофореза была показана мономерность LSS-mKate.

Основываясь на приведенных выше характеристиках, LSS-mKate может быть успешно применен для визуализации в красном диапазоне спектра структур в животных клетках и тканях с помощью мультифотонной микроскопии.

Изучение свойств рекомбинантной каталитической субъединицы теломеразного комплекса дрожжей *Hansenula polymorpha*.

Петрова О.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

alpinolen@mail.ru

Теломераза - сложный рибонуклеопротеидный комплекс, основными компонентами которого являются матричная РНК и белок - теломеразная обратная транскриптаза. Этот фермент компенсирует укорочение хромосом, которое имеет место в результате проблемы концевой недорепликации и обеспечивает сохранность генетического материала. В основе цикла работы теломеразы лежит реакция обратной транскрипции, которая осуществляется по РНК-матрице. Известно, что нарушение регуляции теломеразы имеет непосредственное отношение к возникновению раковых опухолей. Кроме того, теломераза участвует в процессе клеточного старения (сенесценса), апоптоза и дифференциации клеток, поэтому исследования, направленные на изучение структуры и функций теломераз, являются чрезвычайно актуальными на сегодняшний день.

Данная работа посвящена исследованию функциональной активности обратной транскриптазы теломеразы термотолерантных дрожжей *Hansenula Polymorpha*. Основной проблемой в исследовании белковых компонентов теломеразного комплекса является их нестабильность и, как следствие, невозможность выделения. Известно, что белки термостабильных организмов обычно более структурированы, чем их нетермостабильные аналоги. В связи с этим в качестве объекта исследования нами были выбраны термотолерантные дрожжи *Hansenula Polymorpha*. В рамках данной работы была выделена и очищена каталитическая субъединица теломеразы дрожжей *Hansenula Polymorpha*. Каталитическая субъединица теломеразы этих дрожжей оказалась более стабильной и растворимой, что позволяет провести исследования ее функциональных свойств.

С целью проверки активности в системе *in vitro* были проведены эксперименты с РНК-ДНК дуплексом, моделирующим взаимодействие матричного участка теломеразной РНК с теломер-подобной ДНК. Реакции проводились в присутствии ионов различных металлов. Впервые была детектирована теломеразная активность *in vitro* в системе, собранной из очищенных компонентов.

Получена теломеразная обратная транскриптаза с заменой аспарагиновой кислоты на аланин в активном центре. По литературным данным, эта мутация в значительной степени снижает полимеризующую активность белка, что позволяет использовать его в качестве отрицательного контроля при тестировании активности каталитической субъединицы теломеразы *in vitro*.

Получение и свойства наночастиц «каталаза-полиэлектролит» для доставки в клетки

Попов М.В.¹, Углова С.В.¹, Батракова Е.В.²,

Бронич Т.К.², Кабанов А.В.² Клячко Н.Л.¹

Студент 5-го курса

¹*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия*

²*Медицинский центр университета Небраски, Небраска, Омаха, США*

E-mail: mikp@list.ru

Каталаза – фермент из класса оксидоредуктаз, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода, наряду с супероксиддисмутазой и глутатионпероксидазой, является одним из главных компонентов антиоксидантной системы организма человека и животных. Эти ферменты могут быть использованы для снижения токсичного действия активных форм кислорода (АФК), избыточная выработка которых сопровождается многими нейродегенеративными заболеваниями. На *in vitro* модели болезни Паркинсона было показано, что каталаза снижает токсичное воздействие АФК на нервные клетки [1]. Но при попадании в организм молекулы фермента могут инактивироваться под воздействием различных факторов. Существует множество подходов для создания систем доставки ферментов в клетки при использовании их в лекарственных препаратах. Это, например, инкапсулирование их в микроэмульсиях [2] или создание белок-полимерных комплексов [3].

В настоящей работе в качестве подхода для получения стабильных препаратов каталазы было предложено ее конъюгирование с блок-сополимерами полиэлектролитов. Синтезированные частицы были охарактеризованы различными способами. Титрование аминокрупп белка с помощью тринитросульфобензойной кислоты показало эффективность сшивки фермента с молекулами полимера. Размер полученных наночастиц исследовали методом динамического светорассеяния. В зависимости от использованных сшивающих агентов и условий проведения реакции его величина варьировалась от 20 до 35 нм. Было показано, что фермент в конъюгатах практически полностью сохраняет свою исходную активность. Были обнаружены существенные различия в стабильности препаратов при использовании различных сшивающих агентов и условий проведения реакции, причины обсуждаются.

Полученные частицы могут быть потенциальными носителями стабилизированных ферментов-антиоксидантов для подавления нежелательных окислительных процессов в поврежденных клетках головного мозга.

Литература

1. R.A. Gonzalez-Polo et al (2004) Neuroprotection against MPP+ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. *Cell Biol. Int.* 28, 373-380.
2. N.L. Klyachko et al (2003) Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems. *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.* 8, 179-186.
3. E.V. Batrakova et al (2007) A macrophage – nanozyme delivery system for Parkinson's disease. *Bioconjugate Chem.* 18, 1498-1506.

Амфифильные производные β -циклодекстрина как носители лекарственных препаратов

Попов Дмитрий Витальевич⁷

аспирант

Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия

E-mail: staply@gmail.com

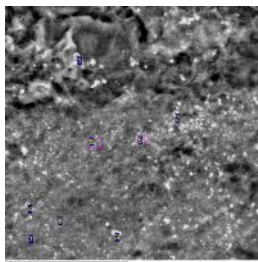
Использование лекарственных препаратов предполагает разработку соответствующих лекарственных форм для оптимизации ожидаемого терапевтического эффекта и снижения риска побочных воздействий. Как правило, дозы препаратов, эффективные при лечении вирусных, инфекционных заболеваний одновременно оказывают негативное влияние на организм человека. Это касается, в том числе, и нового противотуберкулезного препарата 4-тиоурендоиминопиридиний перхлората, разработанного в ИрИХ им. А.Е. Фаворского.

Благодаря способности к включению различных молекул в гидрофобную полость и транспортным свойствам амфифильных структур, циклодекстрины могут быть использованы для получения новых супрамолекулярных ансамблей, таких, как микро- и наночастицы. Однако строение природных циклодекстринов затрудняет их взаимодействие с биологическими мембранами. Для преодоления этого целесообразна модификация для увеличения амфифильных свойств циклодекстринов. Способность амфифильных производных β - и γ -циклодекстринов к формированию наночастиц с использованием методов наноосаждения и испарения растворителя из эмульсии была показана в различных работах.

Цель данной работы - синтез, изучение новых амфифильных β -циклодекстринов и оценка их способности к нанокапсулированию противотуберкулезного препарата 4-тиоурендоиминопиридиний перхлората (перхлозон).

В настоящей работе синтезированы частично замещенные амфифильные β -циклодекстрины, модифицированные ацильными остатками жирных кислот (миристиновой и стеариновой). Реакции ацилирования β -циклодекстрина проводились различными способами – в присутствии акцептора хлороводорода (пиридин), и без акцептора (в ДМФА).

Средняя степень замещения β -циклодекстрина (по данным элементного анализа) в среде пиридина составила для миристиновой и стеариновой кислоты 1,6 и 1,8 соответственно, а в среде ДМФА – 1,3 и 1,1 соответственно. В ИК-спектрах полученных производных присутствует сигнал карбонильной группы при 1735 см^{-1} , характерный для сложноэфирной связи.



В ПМР-спектре амфифильных циклодекстринов появляется интенсивный сигнал $-\text{CH}_2-$ групп (1,28 м.д.), сигналы при 2,32, 1,54, 1,19 м.д. соответствуют неэквивалентным метиленовым фрагментам вблизи сложноэфирной группы, сигнал 0,9 м.д. относится к метильному фрагменту на конце цепи.

Нанокапсулы были приготовлены по методике сферической кристаллизации, разработанной Фесси и модифицированной М. Скиба. Микроскопическое исследование нанокапсул было выполнено с предварительным выпариванием раствора и фиксацией нанокапсул в матрице Synperonic. На фотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа (см. рис.) отчетливо видны скопления образований размером около 50-150 нм.

Эффективность загрузки нанокапсул была оценена с помощью кондуктометрии и составляла, как минимум, 42 %.

⁷ Автор выражает признательность научному руководителю профессору, д.х.н. Раднаевой Л.Д.

**Способ оценки результатов ИФА для подбора питания для домашних животных
Прокопцева О.С.¹, Кондаков С.Э.², Розенштейн М.А.³**

¹Сотрудник, кандидат биологических наук, ²сотрудник, кандидат химических наук,
³сотрудник

¹ООО «Иммуновет», ²Химический факультет Московского Государственного
Университета им. М.В. Ломоносова, ³ImmunoHealth Sciences L.L.C. (USA)
immunovet@gmail.com

Для количественной оценки содержания специфических антител в пробе необходимо иметь два клона моноклональных антител (АТ), специфических к разным последовательностям иммуноглобулинов. В случае домашних животных количественное измерение содержания специфических АТ часто становится невозможным вследствие того, что моноклональных АТ для них коммерчески недоступны, или доступен только один клон моноклональных АТ. В то же время, различные виды аллергии всё сильнее распространяются у домашних животных, в особенности среди собак и лошадей. Поэтому существует необходимость разработки способа оценки результатов качественного ИФА.

Предлагается способ оценки результатов качественного ИФА с использованием поликлональных анти-IgG АТ для диагностики IgG-зависимой аллергии. После проведения анализа с использованием стандартного метода ИФА результаты ранжируют по оптической плотности. Вычисляют ОП_{мин}, которая равна среднему от 10% минимальных показателей в ранжированном списке. Анализ считается действительным, если $0,125 \leq \text{ОП}_{\text{мин}} \leq 0,25$. Остальные значения оптических плотностей пересчитываются по формуле: $\text{ЗН}\% = \text{ОП} / \text{ОП}_{\text{мин}} * 100$. $\text{ЗН} \leq 130\%$ считаются отрицательными, норма. $\text{ЗН} \geq 150\%$ - положительные, контакт испытуемого с этими аллергенами следует исключить. $130\% \leq \text{ЗН} \leq 150\%$ считаются условно положительными.

Проводился качественный ИФА с использованием поликлональных анти-IgG АТ на 42 основных продукта питания для 26 собак с подозрениями на пищевую аллергию. Результаты обрабатывались описанным выше образом. Положительная реакция была выявлена на некоторые продукты для всех собак, причем количество продуктов с выявленной положительной реакцией было от 1 до 17 для особей. Положительная реакция среди тестируемых продуктов чаще всего была выявлена для таких продуктов, как: подсолнечника (77% собак), пшеницы (73%), креветок (65%), ржи (58%), картофеля (50%), кукурузы (50%). Ни у одной испытуемой собаки не было выявлено положительной реакции на гречку, яичный желток, скумбрию, окуня морского. Эти продукты могут быть рекомендованы при составлении гипоаллергенной диеты для собак.

Окончательную интерпретацию результатов анализа и назначение гипоаллергенной диеты осуществляет ветеринарный врач с учётом клинических признаков и анамнеза животного.

Иммуносупрессоры и индукторы интерферона на основе госсипола

Режепов К.Ж., Зияев Х.Л.

Научный сотрудник – кандидат химических наук

Институт биоорганической химии имени академика Садыкова А.С. АН РУз.

100125. Ташкент, Узбекистан, ул. Мирзо Улугбека 83.

E-mail: rcuralus@mail.ru

Исследования последних лет показывают необходимость принципиально новых подходов к лечению инфекционных патологий. Одним из таких подходов является интерферонизация организма путём введения в него индукторов интерферона, которые, воздействуя на разные клетки, в первую очередь на иммунокомпетентные, заставляют их вырабатывать собственный эндогенный интерферон. Сейчас уже доказано существование прямых и обратных связей между интерфероновой, иммунной и нейроэндокринной системами, которые в целом и составляют общую систему биологической защиты организма.

Одними из первых индукторов интерферона и иммуносупрессоров растительного происхождения, описанными в литературе, были госсипол и его производные.

Спектр биологической активности производных госсипола объясняется тем, что они способны индуцировать высокие титры альфа- и гамма-интерферонов в разных популяциях клеток.

Стратегия применения того или иного препарата определяется, в частности тем, в каком органе накапливается наибольшее количество интерферона. Большинство индукторов интерферона вызывают образование значительных количеств интерферона в печени. Лишь немногие способны индуцировать интерферон в кишечнике. Именно таким индуктором оказался один из препаратов, синтезированный на основе госсипола – Рагосин, оказался эффективным при лечении гепатитов В, С и Д. Получено регистрационное удостоверение МЗ РУз №07/481/2 от 30 октября 2007г. на этот препарат.

В настоящее время в практику здравоохранения внедрен препарат антигерпетического действия «Мазь мегосина» - для которого показана высокая интерферониндуцирующая активность. На препарат получено регистрационное удостоверение МЗ РУз №08/118/1 от 24.03.2003.

Была проделана большая работа по получению производных госсипола с N – поливинилпирролидоном, обладающих хорошей растворимостью в воде. Одним из таких производных является комплекс Рагосина с N – поливинилпирролидоном, названный Гозалидоном, оказавшийся эффективным при лечении хламидиоза. На препарат уже получено регистрационное удостоверение МЗ РУз №08/09/1 от 24.02.2008г.

Для комплекса Мегосина N – поливинилпирролидоном - Рометина, показана высокая противовирусная эффективность широкого спектра (гепатит, грипп). Изучение Рометина продолжается.

В практику здравоохранения внедрён батриден и его полимеров под названием «Мебавином» – применяемый в качестве иммуносупрессора при аллотрансплантации почек, при лечении хронического гломерулонефрита и при некоторых аутоиммунных заболеваниях.

Индукторы интерферона растительного происхождения.

Режепов К.Ж., Зияев Х.Л.

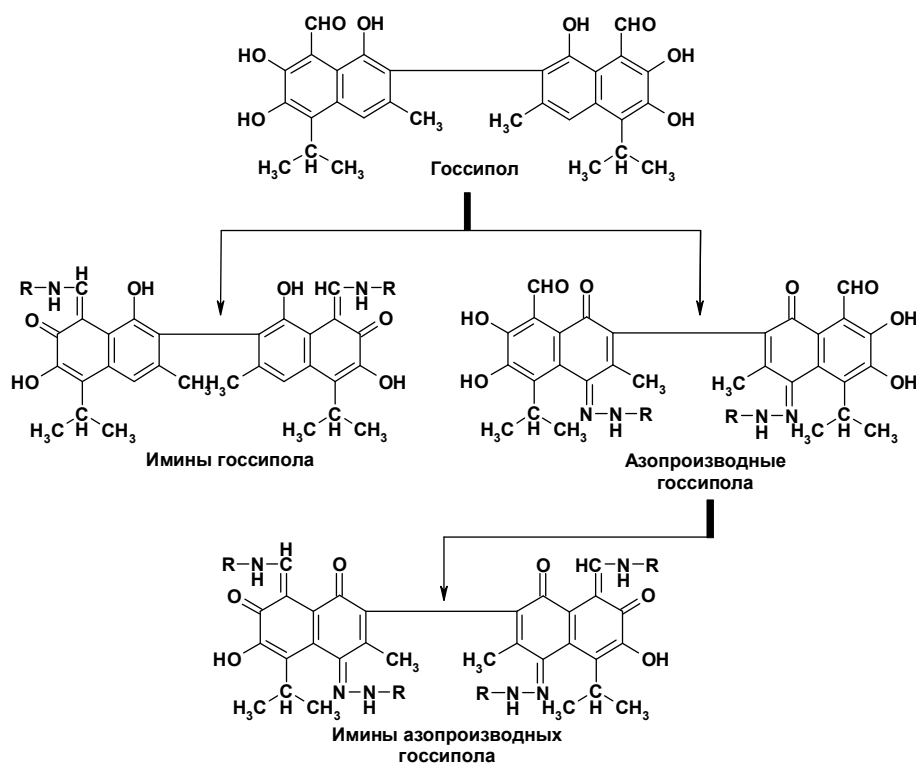
Научный сотрудник – кандидат химических наук

Институт биоорганической химии имени академика Садыкова А.С. АН РУз.

100125 Ташкент, ул. Мирзо Улугбека 83, Факс 998(71)1627063.

E-mail: rcuralus@mail.ru

Первым индуктором интерферона растительного происхождения, описанным в литературе, был госсипол – специфический пигмент растений сем. Malvaceae. Уникальная структура госсипола позволяет получать на его основе многочисленные производные, существующие в различных таутомерных формах.



Исследована интерферониндуцирующая активность алкил-, арил-, гетерил-замещённых госсипола и выявлены соединения, индуцирующие высокие титры α - β - и γ -интерферона в организме. Изучены структурно-функциональный анализ имино- и азопроизводных госсипола и фармакокинетика этих соединений.

Изучены комплексы производных госсипола с N-поливинилпирролидоном, большим преимуществом которых является не только высокая интерферониндуцирующая активность, но и высокая биодоступность, меньшая токсичность и высокая эффективность.

Среди них обнаружены соединения, ингибирующие вирус иммунодефицита человека в лейкоцитах, гепатопротекторы, иммуномодуляторы и вещества эффективные при вирусе гриппа птиц.

В настоящее время в практику здравоохранения внедрены индукторы интерферона для профилактики и лечения гепатитов В,С,Д препараты антигепатического и антихламидийного действия.

Создание и изучение свойств FRET-конструкции на основе двух красных флуоресцирующих белков

Русанов А.Л.

аспирант

МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

alex_rusanov@rambler.ru

Нами была поставлена цель получения FRET-пары из двух красных флуоресцирующих белков, связанных линкером, содержащим сайт расщепления для каспазы-3. В качестве донора был выбран белок TagRFP (максимум возбуждения – 554 нм, максимум эмиссии - 582 нм, квантовый выход флуоресценции 0,48), в качестве акцептора – KFP (максимум возбуждения – 580 нм, максимум эмиссии - 600 нм, квантовый выход флуоресценции < 0,001).

Для изучения свойств данной конструкции был получен прокариотический вектор, содержащий ген TagRFP-23-KFP. Трансформация клеток *E.Coli* штамма BL21-DE3 данным вектором приводит к экспрессии целевой конструкции. После разрушения клеток, очистка препарата осуществлялась с помощью гель-фильтрации. При этом были также оценены размеры частиц полученной конструкции (приблизительно 250 кДа).

Данные экспериментов по динамическому светорассеянию свидетельствуют о наличии одной фракции, молекулярная масса которой составляет около 210 кДа.

Денатурирующий электрофорез в ПАА геле свидетельствует о наличии двух основных полос, соответствующих молекулярным массам в 20 и 35 кДа. Что подтверждает наличие конструкции TagRFP-23-KFP, а отсутствие полосы 55 кДа свидетельствует о полном созревании белков.

Таким образом, выделенная конструкция представляет собой тетрамер.

Были изучены спектры поглощения и эмиссии флуоресценции полученной конструкции. Максимум поглощения TagRFP-23-KFP равен 559 нм, что является промежуточным значением между максимумами поглощения индивидуальных TagRFP (554 нм) и KFP (568 нм). При изучении спектров эмиссии флуоресценции, также наблюдается сдвиг максимума эмиссии TagRFP-23-KFP в более длинноволновую область (589 нм), по сравнению с индивидуальным TagRFP (582 нм).

С помощью экспериментов по измерению времён жизни флуоресценции полученной конструкции, показано наличие двух различных компонент ($\tau_1 = 0,9$ нс и $\tau_2 = 2,4$ нс, при этом вклад этих компонент приблизительно одинаков), в то время как время жизни флуоресценции индивидуального TagRFP характеризуется одной компонентой ($\tau = 2,4$ нс). Данные результаты говорят о наличии индуктивно-резонансного переноса энергии в выделенной конструкции.

Оценка отношения квантовых выходов TagRFP в составе конструкции и в виде индивидуального белка, показывает, что квантовый выход TagRFP уменьшается приблизительно в два раза, в случае TagRFP-23-KFP.

Была также проведена трансфекция эукариотических клеток HEK293 Phoenix плазмидой, содержащей ген TagRFP-23-KFP. С помощью флуоресцентной микроскопии показана эффективность трансфекции и экспрессии исследуемой конструкции в клетках.

Комплексообразование ампициллина, амоксициллина и цефалексина с ионами хрома(III)

Самуйлова И. С.

Аспирант кафедры неорганической и аналитической химии
Тверской государственной университет, Тверь, Россия

E-mail: bioinorg@tversu.ru

Известно, что некоторые бета-лактамы способны образовывать устойчивые комплексы с катионами металлов, прежде всего *d*-элементов. Исследование металлокомплексов антибиотиков является теоретической основой для разработки новых методов их качественного и количественного определения в различных объектах и создания новых антимикробных лекарственных средств. Наилучшими лигандными свойствами обладают антибиотики, молекулы которых содержат аминогруппу. К их числу относятся широко используемые в медицинской практике препараты ампициллин (HAm^p), амоксициллин (HAm^x) и цефалексин (HCp^x). Ранее было исследовано их комплексообразование с Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) и Ag(I).

В данной работе впервые исследовано взаимодействие HAm^p, HAm^x и HCp^x с ионами Cr³⁺. Исследование проведено в слабокислой среде. При введении антибиотика в раствор нитрата хрома на фоне ацетатного буферного раствора (pH 4.76) визуально наблюдается постепенное изменение окраски от серо-синей до красно-фиолетовой. В спектре наблюдается гипсохромный сдвиг полос поглощения и усиление их интенсивности, следовательно, молекулы воды в координационной сфере [Cr(H₂O)₆]³⁺ замещаются на лиганды более сильного поля, т.е. аминогруппы анионов Am^{p-}, Am^{x-}, Cp^{x-}. Полоса 425 нм смещается до 402 нм для комплекса Am^p, до 412 нм для комплекса Am^x, для комплекса Cp^x полоса перекрывается полосой поглощения антибиотика. Полоса 580 нм (7,7 л·моль⁻¹·см⁻¹) смещается до 560 нм (17,57 л·моль⁻¹·см⁻¹) для комплекса Am^p, до 565 нм (24,07 л·моль⁻¹·см⁻¹) для комплекса Am^x и до 570 нм (20,6 л·моль⁻¹·см⁻¹) для комплекса Cp^x.

Комплексы Cr(III) кинетически инертны, поэтому время установления равновесия значительно и составляет около 2 часов при Cr(III):L=1:4 и около 5 часов Cr(III):L=1:1. Методом молярных отношений лиганда по изменению оптической плотности раствора на волне 565 нм при времени взаимодействия 5 часов было установлено, что все исследованные антибиотики образуют комплексы состава CrL₂.

Ускорить установление равновесия можно за счет повышения температуры смеси. Однако антибиотики склонны к гидролизу, который также ускоряется с повышением температуры. Эксперименты показали, что оптимальной температурой реакции является 45°C. При этом оптическая плотность достигает максимального значения за 30 минут и в дальнейшем не изменяется в течение 2 часов. Более высокая температура приводит к разрушению антибиотика, оптическая плотность раствора начинает падать.

В комплексах предполагается тридентатная координация лигандов через атом N аминогруппы, карбонильный атом O амидной группы и атом O карбоксилатной группы.

Попытки получить комплексы хрома(III) с ампициллином, амоксициллином и цефалексином в слабощелочной среде (0,1M Na₂B₄O₇, pH=9.2) не увенчались успехом. Происходило выпадение осадка гидроокиси хрома серо-зеленого цвета.

Анализ молочной продукции на содержание микроэлементов

Седухина Евгения Петровна

Студентка 5 курса

Тверской государственной университет, химический факультет, Тверь, Россия

E-mail: Seduhina@mail.ru

Пищевая ценность молока отражает полноту полезных его качеств. Среди всех пищевых продуктов молоко — самый полноценный, наиболее сбалансированный по незаменимым веществам продукт, рекомендуемый для питания людей всех возрастных категорий. В нем содержатся все необходимые человеку элементы в виде соединений. Однако существуют группы людей которым противопоказано употребление цельного молока, поэтому в их рацион питания рекомендуется вводить другую молочную продукцию.

В молочной продукции микроэлементы связаны с белками и оболочками жировых шариков. Их содержание зависит от рациона кормления, стадии лактации, состояния здоровья животных и в сумме составляет около 800 мкг на 100 г молока, или около 0,1% всех минеральных веществ. Микроэлементы влияют на пищевую ценность и качество молока и молочных продуктов.

Микроэлементы могут попадать в молоко дополнительно после дойки (из воды, оборудования, тары и т.д.). Тогда они отрицательно влияют на качество молочных продуктов. Так повышенное содержание меди и железа приводит к появлению в молоке окисленного привкуса, ускоряет процессы прогоркания. Увеличенное количество в молоке свинца, кадмия, ртути может представлять угрозу для здоровья человека.

Для исследования содержания тяжелых металлов в твороге использовалась продукция Максатихинского молокозавода, приобретенной в розничной торговле г. Твери зимой 2009 года. Наш выбор творога, как объекта исследования на содержание тяжелых металлов, основан на том, что наибольшая концентрация этих металлов наблюдается в концентратах молочного белка – казеиногене, которым как раз и богат творог.

Результаты исследования приведены в таблице.

Таблица

Содержание микроэлементов в твороге

	Zn	Cu	Pb	Cd	Hg
Содержание металлов в пробе мг/кг	6.9	0.3	-	0.01	0.02
ПДК, мг/кг	40	5.0	0.3	0.3	0.02

Из таблицы следует, что содержание тяжелых металлов в твороге Максатихинского молокозавода не превышает уровня ПДК. Это может быть связано с тем, что кормовой рацион коров в период зимнего стойлового содержания удовлетворяет необходимым требованиям.

1. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. —3-е изд., перераб. и доп.- СПб: ГИОРД, 2004 - 320с.
2. Крусъ Г.Н. и др. Технология молока и молочных продуктов./Г. Н. Крусъ, А. Г. Храмцов; Под ред. А. М. Шальгиной.— М.: КолосС, 2005 -445с.
3. Крусъ Г.Н., Шальгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов./ Под общей редакцией А. М. Шальгиной.— М.: Колос, 2000 — 368 с.

Химический состав эфирного масла *ARTEMISIA GMELINII* WEB. ET STECHM.

Соктоева Т.Э.¹

Аспирант химического факультета

Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

E-mail: stuyana85@mail.ru

В настоящей работе приводятся данные по химическому составу эфирного масла *Artemisia gmelinii* Web. et Stechm, перспективного для медицины вида полыни.

Химический состав эфирного масла данного вида полыни, произрастающей в Бурятии, не изучен. В литературе имеются данные по химическому составу эфирного масла полыни Гмелина, собранной в некоторых регионах Сибири [1] и Монголии [2]. Ханина и др. среди исследованных образцов, собранных на Алтае, в Красноярском крае и Томской области выделили два хемотипа. К первому они отнесли образец с большим количеством хризантилацетата, ко второму - образцы со следующими константными компонентами: *n*-цимол, 1,8-цинеол, γ -терпинен, камфора, изоборнеол, пинокарвон, борнеол, терпинеол-4, α -терпинеол, борнилацетат, спатчуленол и окись кариофиллена [1].

Материал для анализа был собран во второй и третьей декадах июля и августа 2007-2008 г.г., в Бурятии (Селенгинский район), Иркутской области (п. Култук, о. Ольхон, Приморский хребет) и в Монголии (Булганский аймак), в фазу цветения. Образцом для исследования стала надземная часть растения. Эфирное масло получали перегонкой с водяным паром из воздушно-сухого сырья [3]. Эфирное масло исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Agilent Packard HP 6890 N с квадрупольным масс-спектрометром (HP MSD 5973) в качестве детектора так, как описано в [4].

Эфирное масло, полученное из надземной части растения, представляет собой маслянистую прозрачную жидкость, с характерным запахом. В эфирном масле обнаружено свыше 70 соединений, из них идентифицировано 60 соединений. Доминирующими компонентами исследованных нами образцов эфирного масла являются 1,8-цинеол (21-37%), камфора (10-30%), борнеол (5-18%), терпинеол-4 (5-8%). Сравнение полученных данных с ранее опубликованными сведениями о составе различных образцов масла *Artemisia gmelinii* Web. et Stechm. [1,2] показывает, что наблюдается сходство между полученными данными и составами эфирных масел образцов, собранных на Алтае, в Красноярском крае, Томской области [1] и Монголии [2]. Исследованные образцы эфирных масел относятся ко второму хемотипу с преобладанием в составе масла камфоры и 1,8-цинеола.

Литература

1. Ханина М.А., Серых Е.А., Покровский Л.М., Ткачев А.В. Результаты химического исследования *Artemisia gmelinii* Web. et Stechm. Флоры Сибири // Химия растительного сырья. 2000. №3. С. 77-84.
2. Shatar S. Chemical investigation of essential oil from Mongolian flora. Ulaan-Baatar, 1998. 166 p.
3. Государственная Фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье МЗ СССР. 11-е изд. М., 1990. 400 с.
4. Жигжитжапова С.В., Рабжаева А.Н., Звонцов И.В., Раднаева Л.Д. Химический состав эфирного масла тимьяна байкальского *Thymus baicalensis* Serg., произрастающего в Забайкалье // Химия растительного сырья. 2008. №1. С. 73-76.

¹Автор выражает признательность профессору, д.х.н. Раднаевой Л.Д. и старшему преподавателю, к.б.н. Жигжитжаповой С.В. за помощь в подготовке тезисов.

Иммунохроматографический экспресс-метод определения простат-специфического антигена в сыворотке крови человека
Ступникова Т.В.

Студентка 5-го курса

*Химический факультет Московского государственного университета имени
М.В.Ломоносова*

tatyana.stupnikova@gmail.com

Разработан полуколичественный иммунохроматографический экспресс-метод определения содержания в крови простат-специфического антигена (ПСА). ПСА является маркером онкологических заболеваний, поэтому важно следить за тем, чтобы его содержание в крови не превышало 4 нг/мл. В основе предложенного метода лежит взаимодействие определяемого антигена со специфическими антителами, в качестве визуальной метки образующегося иммунокомплекса используют наночастицы золота. Принцип действия иммунохроматографического теста состоит в следующем: исследуемый образец наносится на конец тест-полоски и движется по ней под действием капиллярных сил. При этом в начале образуется комплекс меченых золотом антител с исследуемым анализом. При достижении образцом аналитической зоны мембраны образовавшийся иммунокомплекс на наночастицах золота связывается с иммобилизованными специфическими антителами и образуется окрашенная полоса, интенсивность которой пропорциональна концентрации исследуемого анализа. Несвязавшиеся реагенты связываются со вторичными антителами, иммобилизованными на мембране в виде контрольной полосы. Наличие окраски в контрольной зоне свидетельствует о работоспособности теста.

Разработанная тест-полоска состоит из 4-х видов различных мембран, совмещенных таким образом, чтобы обеспечивать непрерывный поток жидкости под действием капиллярных сил. Первая, на которую наносят образец исследуемой жидкости, должна обладать хорошей фильтрующей способностью. Далее идет стекловолоконная мембрана с нанесенным на нее конъюгатом золота с антителами. Затем следует нитроцеллюлозная аналитическая мембрана, где сорбированы специфические антитела к определяемому антигену и вторичные антитела. В другом конце тест-полоски расположена впитывающая мембрана, благодаря чему максимальное количество жидкости проходит через аналитическую область.

В работе получены наночастицы золота различного размера (15, 25 и 40 нм), определены оптимальные размеры частиц, концентрации антител для конъюгации с частицами золота, концентрации конъюгата. Были изучены различные способы компоновки мембран и условия проведения анализа, подобраны оптимальные концентрации антител, наносимых на мембрану, составы реакционного буфера и буфера для разведения антител.

Данный метод прост в использовании, не требует дополнительных приборов для визуализации результатов, время анализа не превышает 5 минут, все необходимые для анализа реагенты уже присутствуют в системе, требуется лишь нанести анализируемый образец. Проведен сравнительный анализ определения концентрации ПСА в реальных сыворотках данным методом и методом иммуноферментного анализа.

Изучение химического состава лекарственных растений Якутии

Суханова Л.В., Чирикова Н.К.

Студент, старший преподаватель биолого-географического факультета
Якутский Государственный Университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия

E-mail: lusuvl@mail.ru

Флора Якутии является возможным источником полноценного сырья биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения. В настоящее время спрос учреждений здравоохранения на растительное сырье полностью не удовлетворяется, в силу различных объективных причин. Одной из причин является не изученность специфических особенностей лекарственных растений, которые обусловлены своеобразием условий региона. Это, прежде всего, особенности биохимического состава и фармакологических свойств местных растений. Большой интерес представляют те растения, которые не вошли в Государственную фармакопею, но широко используемые в народной медицине. Целью данной работы было качественное и количественное определение БАВ в *Artemisia vulgaris* L., *Artemisia jacutica* Drob., *Potentilla bifurca* L., *Potentilla anserine* L., *Geranium pretense* L., *Scutellaria scordiifolia* Fisch. ex Schrank, *Astragalus danicus* L.

Методом классического титрования были определены окисляемые фенольные соединения (перманганатометрия), органические кислоты (алкалиметрия). Количественное определение водорастворимых полисахаридов, дубильных веществ, тритерпеновых соединений и хлорофилла производилось спектрофотометрией.

Таблица 1. Результаты количественного определения содержания БАВ в лекарственном растительном сырье

БАВ	Art.Jac.	Art.Vulg.	Pot.Bif.	Pot.Ans.	Ast.Dan.	Scu.Sco.	Ger.Pre.
Окисляемые фенольные соединения, %	8,6 ± 1,6	9,2 ± 1,8	19,1 ± 2,0	14,6 ± 0,5	4,6 ± 0,5	6,2 ± 0,5	13,9 ± 0,5
Органические кислоты, %	0,057 ± 0,006	0,039 ± 0,003	0,026 ± 0,002	0,0056 ± 0,02	0,037 ± 0,007	0,024 ± 0,004	0,028 ± 0,004
Водорастворимые полисахариды, %	2,20 ± 0,04	4,59 ± 8,3	7,04 ± 8,7	7,80 ± 2,2	4,01 ± 0,7	7,89 ± 11,5	11,67 ± 2,3
Тритерпеновые сапонины, %	0,34	0,43	0,15	0,070	0,048	0,34	0,423
Хлорофилл (C _a), %	13,06 ± 0,01	10,69 ± 0,6	15,04 ± 0,01	17,88 ± 0,01	6,08 ± 0,01	14,52 ± 0,01	9,47 ± 0,01
Хлорофилл (C _b), %	8,65 ± 0,07	7,64 ± 0,02	8,06 ± 0,09	8,52 ± 0,07	3,33 ± 0,01	7,30 ± 0,02	6,62 ± 0,05

По данным количественного анализа содержание окисляемых фенольных соединений больше у *Potentilla bifurca* L., органических кислот у *Artemisia jacutica* Drob., водорастворимых полисахаридов у *Geranium pretense* L., тритерпеновых сапонинов у *Astragalus danicus* L., хлорофилла (C_a) у *Potentilla anserine* L., хлорофилла (C_b) у *Artemisia jacutica* Drob.

Определение теломеразной активности в суммарной крови здорового человека

Сысоев Василий Олегович

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: sisoev11@yandex.ru

При каждом делении эукариотической клетки концы ее хромосом – теломеры – укорачиваются. Предполагается, что это ограничивает срок жизни клеток в культуре. В клетках, делящихся неограниченно, активен компенсирующий укорочение теломер фермент – теломераза. Известно, что активность теломеразы наблюдается в имеющих неограниченный потенциал деления раковых клетках в 80-90% случаев, а в большинстве соматических клеток человека она не обнаруживается. Известно, что лейкоциты человека обладают слабой теломеразной активностью, при этом в большинстве работ теломеразную активность клеток крови измеряют на клеточных линиях или в выделенных из крови отдельных популяциях клеток. Многие авторы предлагают использовать активность теломеразы в образцах тканей опухолей как маркер при диагностике рака.

Целью данной работы было определить, могут ли являться источником активности клетки крови, присутствующие в опухолевых тканях, поскольку при анализе тканевых образцов не проводится фракционирование по типам клеток. Была проанализирована серия образцов, содержащих разное количество суммарного экстракта крови здорового человека. Концентрация белка, определенная методом Брэдфорд, соответствовала экстрактам опухолевых препаратов, взятых у больных раком шейки матки, в которых ранее была обнаружена теломеразная активность. При анализе образцов крови без фракционирования по типам клеток теломеразная активность не детектируется.

Изучение свойств ферментов в пленках, полученных по методу послойного нанесения полиэлектролитов с использованием поликатионов линейной и нелинейной топологии⁸

Торгонская А. А.

Студент

Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: htarhonskaya@gmail.com

Среди методов создания биосенсоров весьма многообещающим является метод послойного нанесения полиэлектролитов. Этот метод позволяет получать наноструктурированные пленки на поверхностях сенсоров любого размера, что перспективно с точки зрения миниатюризации сенсорных элементов. Очевидно, что пространственная организация полиэлектролитов оказывает значительное влияние на свойства ферментов, включенных в пленки полимера.

В последнее время все больший интерес исследователей привлекают полимеры нелинейной топологии. Отличие в строении макромолекул затрагивает целый ряд свойств полимеров, например, реологических, кислотно-основных и др. Сравнительно недавно были разработаны методы синтеза полиэлектролитов нелинейной топологии, так называемых полимерных звезд, щеток, с узким молекулярно-массовым распределением, т.е. макромолекулы определенной структуры с известным и одинаковым количеством лучей и их степенью полимеризации.

С целью изучения влияния пространственной организации полиэлектролитов на свойства включенных в них ферментов в рамках данной работы было исследовано включение тирозиназы и холиноксидазы в пленки, полученные по методу послойного нанесения полиэлектролитов с использованием полимеров линейной и нелинейной топологии. В качестве нелинейных полиэлектролитов рассматривались поликатионные звезды, представляющие собой ядро с отходящими от него лучами (полимерными цепями поли(N,N-триметиламмонийэтилметакрилат) иодида). Сравнение проводилось с пленками линейного аналога, представляющего собой луч полимерной звезды, и с пленками полидиметилдиаллиламмоний хлорида (ПДДА), наиболее широко применяемого поликатиона в методе послойного нанесения полиэлектролитов. Показано, что нелинейная топология поликатионных звезд приводит к увеличению активности сенсорных элементов на 50-60%.

Была изучена стабильность пленок полимерных звезд, а также определены кинетические характеристики тирозиназы и холиноксидазы (K_m , V_m) в пленках по фенолу и холину соответственно. Сравнение кинетических параметров с характеристиками ферментов в пленках ПДДА показало, что поликатионные звезды не вызывают значительного изменения эффективной константы Михаэлиса.

⁸ Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ № 3130 и ОФИ-РФФИ 08-08-12081.

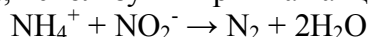
Запуск и оптимизация процесса DEAMOX⁹

Трухина А.И., Гладченко М.А.¹⁰

аспирант 2 г.о. Химического факультета МГУ; старший научный сотрудник, к.т.н.
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический
факультет, кафедра Химической Энзимологии, Москва, Россия
e-mail: Asya_Trukhina@mail.ru

Проблема защиты окружающей среды от влияния высокоинтенсивных технологий – одна из важнейших задач современного общества. Присутствие в водных системах азотных загрязнений оказывает токсическое воздействие не только на водные организмы, но и на здоровье людей. Так присутствие в воде нитратов является причиной возникновения некоторых смертельных заболеваний у младенцев. В этой ситуации разработка технологий эффективной очистки промышленных стоков от азотных загрязнений весьма актуальна на сегодняшний день. Внедрение новых биологических методов является весьма перспективным для решения этой задачи.

В конце 80-х годов XX века была показана возможность микробного анаэробного окисления аммония, получившая название анаммокс-процесс (ANAMMOX - ANaerobic AMMonia OXidation). В этом процессе аммоний в присутствии анаммокс бактерий окисляется до молекулярного азота, используя нитрит как акцептор электронов.



По сравнению с традиционным нитри-денитрифицирующим способом удаления азотных загрязнений, для анаммокс-процесса не требуется высокие энергозатраты для поддержания постоянной концентрации кислорода (нитрификация), а также дополнительный донор электронов (денитрификация), что делает его экономически более выгодным. С другой стороны для протекания процесса необходим нитрит, который, как правило, отсутствует в исходных сточных водах. В связи с этим большинство анаммокс-технологий (ANAMMOX, SHARON, CANON, OLAND и др), включают дополнительную сложноконтролируемую стадию для получения нитрита, токсичного уже при концентрации 100 мг N/л для анаммокс бактерий.

Исследования, проводимые в нашей лаборатории в области анаэробного окисления аммония, привели к разработке технологии DEAMOX (DENitriFying AMmonia Oxidation), включающей генерацию нитрита из нитрата. Данный доклад представляет результаты получения 2-х видов активных биокатализаторов для DEAMOX процесса и последующей оптимизации последнего. Для стадии получения нитрита (денитритации) использовались два различных донора электронов – неорганический - сульфид (Sulphide-DEAMOX процесс) и органический - ацетат (Organics-DEAMOX процесс).

После успешного получения активных биокатализаторов, обе модификации DEAMOX процесса были оптимизированы в отношении значений pH, концентрации бикарбоната и температуры.

⁹ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных при финансовой поддержке компанией Biothane Systems International (Нидерланды).

¹⁰ Авторы выражает признательность профессору, д.х.н. Калюжному С.В. за помощь в подготовке тезисов.

Выбор оптимальных условий экстракции изохинолиновых алкалоидов из культуры тканей стефании гладкой (*Stephania glabra* (Roxb.) Miers.)

Убушцева В.А., Алхимова Я.В.

студент, студент

Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова (МИТХТ), Россия, Москва, пр. Вернадского, 86.

patent287@inbox.ru

Распространенность заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем требует поиска все новых лекарственных средств, обладающих значительным эффектом и широким спектром действия. Стефаглабрина сульфат относится к фитопрепаратам, получаемым только из растительного сырья. Основой его служит изохинолиновый алкалоид стефарин, источником которого является субтропическое растение - стефания гладкая (*Stephania glabra* (Roxb.) Miers.) [1]. Во ВНИИ лекарственных и ароматических растений разработан метод получения стефаглабрина сульфата из культуры ткани стефании гладкой [2].

Объектом исследований служила биомасса стефании гладкой, выращенная в лаборатории биотехнологии ВИЛАР [3]. Влажность сырья определяли общепринятым методом [4]. Количественное определение суммы алкалоидов в пересчете на стефарин в культуре тканей стефании включает три этапа: экстракция алкалоидов, разделение суммы алкалоидов с помощью ТСХ, элюирование этиловым спиртом [5]. Цель работы – оптимизировать первый этап определения алкалоидов в культуре тканей стефании гладкой.

Для выявления наиболее продуктивного метода экстракции в качестве альтернативы настаиванию (мацерации) проводили экстракцию кипячением с обратным холодильником в течение 4 и 6 часов, а также извлекали действующие вещества из биомассы стефании методом мацерации в течение 20 часов. Так мы могли установить влияние на выход алкалоидов времени и способа экстракции. По каждому варианту опыт проводили в пяти повторениях.

Среднее значение влажности образцов биомассы стефании составило 8,03 %, что соответствует требованиям НТД, предъявляемым к качеству сырья (не более 10%) [3].

Наилучший результат показал метод мацерации в течение 20 часов - 0,308, что на 29% превышает показатели в контрольном варианте. В контрольном методе экстракции содержание действующих веществ в (%) равно 0,236. В методе экстракции с обратным холодильником 4 и 6 часов выход суммы изохинолиновых алкалоидов меньше по сравнению с контролем, 0,234 и 0,216% соответственно. Анализируя результаты, можно отметить, что на выход действующих веществ влияет время и способ экстракции.

Таким образом, нами был выявлен оптимальный способ экстракции алкалоидов из клеточной культуры ткани стефании гладкой.

Работа выполнена под руководством в.н.с. ВИЛАР к.фарм.н. Цыбулько Н.С.

Литература

1. Кузнецов Ю.Б., Арзамасцев Е.В., Крепкова Л.В., Бортникова В.В. Фармакологические свойства стефаглабрина сульфата // Химия, технология, медицина. Труды ВИЛАР.-М.,2003.-Т.XVI С.227-230.
2. Попов Ю.Г. и др. Лабораторный регламент на производство стефаглабрина сульфата из культуры ткани стефании гладкой №39-12-115 от 15.12.89
3. Лабораторный регламент на производство сухой биомассы культуры клеток стефании гладкой, № ЛР-17-90 – 1990.
4. Государственная Фармакопея СССР. 11-е изд., М. - 1990.- Вып.2.- 400 с.
5. Давыденков В.Н., Тареева Н.В., Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т. Количественное определение стефарина в культуре ткани стефании гладкой // Хим-фарм. журнал, №3, 1988, с. 326-328.

Исследование реакции гидролиза циклического димера гуанозинмонофосфата фосфодиэстеразой

Хренова Мария Григорьевна
Аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия

E-mail: wasabiko13@gmail.com

В настоящем докладе обсуждается механизм гидролиза циклического димера гуанозинмонофосфата (c-di-GMP) фосфодиэстеразой (PDE-A) (Рис. 1). Циклический димер гуанозинмонофосфата – вторичный мессенджер, играющий важную роль в процессе адаптации бактерий и возможности их выживания при смене условий окружающей среды.

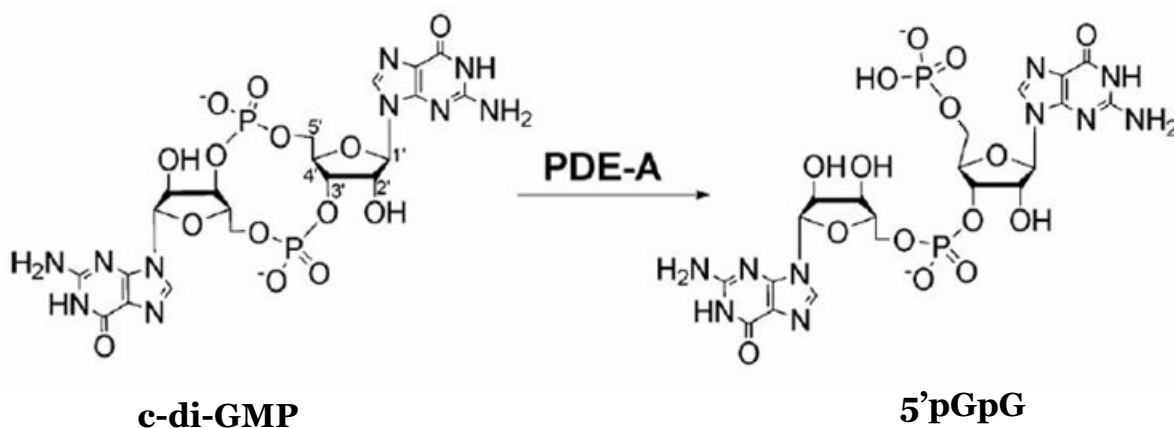


Рис.1. Схема гидролиза циклического димера гуанозинмонофосфата.

Мы применяем комбинированный метод квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) для моделирования механизма реакции. Согласно данному подходу расчет энергий в квантовой подсистеме проводится по компьютерным программам квантовой химии, а в молекулярно-механической подсистеме – с использованием поля потенциалов эффективных фрагментов. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производится на основании анализа доступных трехмерных атомарных моделей белков, содержащихся в базе данных белковых структур (PDB). Для практических расчетов к КМ-подсистеме относится субстрат, атомы магния и ближайшие аминокислотные остатки. Из кинетических данных по влиянию точечных мутаций на скорость гидролиза c-di-GMP известны ключевые аминокислотные остатки. Исследовано влияние точечных мутаций периферийных аминокислотных остатков на конформацию белка.

Гидролиз сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она

карбоксиэстеразами печени свиньи

Шестеренко Е.А., Демиденко А.В., Семенюшина Е.А.

аспирантка, студентка, сотрудница

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,

Одесса, Украина

e-mail: ashesterenko@gmail.com

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1) млекопитающих – сериновые гидролазы широкого спектра действия, катализирующие гидролиз эфирной и амидной связей в молекулах структурно отличных соединений, в том числе лекарственных препаратов, обладают широкой субстратной специфичностью и высокой стереоселективностью, благодаря чему являются перспективными катализаторами стереоселективного гидролиза и синтеза.

Цель данной работы – исследование гидролиза сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она выделенным частично очищенным препаратом карбоксилэстераз печени свиньи (КЭПС).

Микросомальную фракцию (МФ) выделяли методом низкоскоростной седиментации (10000 g) в присутствии ионов Ca^{2+} ; замена солиобилизации МФ дезоксихолатом Na на экстракцию 0,1 моль/дм³ раствором пирофосфата Na с последующим фракционированием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (45-70 % насыщения) позволила повысить выход по белку и эстеразную активность препарата КЭПС в 10,9 и 3,9 раз, соответственно, в сравнении известными методами Kato R.; Nilsson O. and Dallner G. Показано, что экстракция осадка (фракция 0-45 % -ного насыщения) привела к увеличению суммарной эстеразной активности препарата на 26 %, составившую 148,7 мкмоль α -нафтола/мг белка·мин.

Изучение фракционного состава методом SDS-электрофореза в 10 %-ном ПААГ показало наличие 26 белковых фракций, которые можно объединить в 4 зоны. 1 и 2-я зоны (R_f 0,92-0,51; М.м.14,4 \pm 3,0 - 41,7 \pm 4,5 кДа) представлены балластными белками и продуктами деградации, белки наиболее выраженной 3-й зоны (R_f 0,45-0,23) с М.м. 52,5 \pm 5,8 – 69,3 \pm 7,6 кДа (43,1 %) могут соответствовать субъединицам α , β , γ молекулы карбоксилэстеразы. 4-я зона (R_f 0,22-0,10; М.м. 82,2 \pm 10,0 – 300,0 \pm 36,0) представлена продуктами агрегации молекул КЭПС и балластных белков.

Методом нативного электрофореза в ПААГ показано, что 11 белковых фракций (73 % общего белка) ферментного препарата обладают выраженной эстеразной активностью.

Доказательством природы выделенного фермента является выявленное полное ингибирование эстеразной активности (0,25 ед) селективным ингибитором КЭПС ди-(*n*-нитрофенил)фосфатом (180,2 мкмоль/дм³).

Выделенный препарат КЭПС в разработанных условиях (рН 8,0, t 37 °С, τ 2,5 час) катализировал гидролиз сложных эфиров: 3-метил- (I), 3-этил- (II), 3-пентил- (III), 3-гексил- (IV), 3-гептилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (V), с образованием в качестве конечного продукта 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, структура которого подтверждена комплексом физико-химических методов: ТСХ, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии.

Гидролитическая активность КЭПС в отношении сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она отличается; так, степень трансформации соединений III, IV, V составила 53, 2 %, 48,1 % и 46,1 %, соответственно, в то время как I и II гидролизуются в этих же условиях на 38,3 % и 44,0 %, что свидетельствует о большей специфичности карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи к исследованным субстратам с длиной углеродной цепи (C_5 - C_7) ацильного фрагмента.

Способ разделения фенольных соединений с помощью иммобилизованной тирозиназы *Agaricus bisporus*

Шестеренко Ю.А.

аспирантка

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Одесса, Украина, e-mail: shesterenko@mail.ru

Разработан новый способ разделения фенольных соединений, основанный на способности тирозиназы (ТИР), фермента класса оксидоредуктаз, катализировать селективное окисление производных фенола и 1,2-диоксибензола, не подвергая биоконверсии производные 1,3- и 1,4-диоксибензола, а также нитрофенолы.

Однако применение ТИР ограничено высокой стоимостью коммерческих препаратов, нестабильностью, однократностью применения, поэтому целесообразно получение частично очищенных иммобилизованных ферментных препаратов.

Из грибов *Agaricus bisporus* была выделена ТИР с выходом белка 0,67 мг/г грибов, содержанием ионов меди 0,19 % и удельной активностью 500 ед/(мг белка·мин).

Препарат ТИР был иммобилизован в поли-N-винилкапролактаме (концентрация ПВК 7 %, t 40 °С). В качестве гранулообразователя использовали производные 1,3- и 1,4-диоксибензола и нитрофенолы, не трансформирующиеся в присутствии фермента, при этом образуют водородные связи с карбонильными группами ПВК (ИК-спектроскопия), что приводит к созданию прочных, стабильных гранул.

О наличии взаимодействия ТИР с носителем свидетельствует изменение характеристической вязкости. Иммобилизация фермента осуществляется как за счет образования водородных связей между карбонильными группами ПВК и гидроксильными группами аминокислотных остатков, так и благодаря механическому включению фермента в сетку полимера, стабилизированного добавлением не окисляемого производного фенола.

Известно, что фенолы, не являющиеся субстратами ТИР, оказывают на фермент ингибирующее действие, что приводит к значительному увеличению количества фермента, необходимого для окисления субстратов тирозиназы.

Установлено, что иммобилизация фермента в ПВК частично защищает его от ингибирующего влияния производных 1,3- и 1,4-диоксибензола и нитрофенолов, что способствует увеличению активности в 2-3 раза по сравнению со свободным ферментом.

Следствием иммобилизации также явилось повышение устойчивости препарата ТИР к неблагоприятному воздействию высоких температур, о чем свидетельствует уменьшение константы термоинактивации: $k_{ин}$: для свободной и иммобилизованной формы составляют $1,87 \cdot 10^{-2}$ и $0,58 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$, соответственно.

Показано, что полученный биокатализатор осуществлял селективное окисление производных фенола и 1,2-диоксибензола ($0,5-10 \text{ ммоль/дм}^3$) с количественной степенью биоконверсии в присутствии производных 1,3- и 1,4-диоксибензола, а также нитрофенолов ($35-56 \text{ ммоль/дм}^3$) на протяжении 4-х циклов в реакторе периодического действия.

В процессе окисления фенолов, катализируемого ТИР, образуются растворимые темно-окрашенные олигомеры (М.м. 300-600 Да), для их удаления используют дорогостоящие полимеры природного и синтетического происхождения, однако их применение в ряде случаев не позволяет полностью удалить продукты реакции.

Нами был разработан эффективный способ элиминации продуктов биоконверсии с применением неорганических коагулянтов: алюмокалиевых, алюмоаммонийных и железоаммонийных квасцов, причем концентрации коагулянтов, необходимые для удаления продуктов трансформации фенола с использованием иммобилизованного фермента, снижаются по сравнению с таковыми для свободной ТИР, что, по-видимому, связано с частичным накоплением продуктов окисления фенола в гранулах биокатализатора.

**Изучение новых свойств белка Est3 теломеразного комплекса дрожжей
*Saccharomyces cerevisiae***

Шубернецкая О.С., Василькова Д.П.

студентка, студентка

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,

Химический факультет, Россия

E-mail: olgasb_21@yahoo.com

Теломераза является РНК-белковым комплексом, который способен удлинять 3'-концевые участки хромосом путем последовательного добавления теломерных повторов. В состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, кроме каталитической субъединицы и теломеразной РНК, входит ряд регуляторных белков. Один из них – белок Est3, который, хотя и не влияет на эффективность работы теломеразы *in vitro*, необходим для удлинения теломер *in vivo*. Однако в настоящее время о функциях данного белка известно мало. В данной работе была охарактеризована каталитическая активность белка Est3 теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Существуют две формы белка Est3 – короткая и длинная, последняя получается в результате запрограммированного сдвига рамки и является функционально активной. [1] Именно, длинная форма белка Est3 с дополнительными 6 гистидинами и фрагментом белка S на N-конце была экспрессирована в клетках *E.coli*. Затем белок был выделен путем иммобилизации на Ni-NTA агарозе. В качестве контроля использовали белок с заменой D86A, которая ранее была характеризована отсутствием функциональной активности.

Было показано методом спектроскопического определения окрашенного комплекса фосфата с солью молибдена и малахитового зеленого [2], что белок Est3 способен гидролизовать ГТФ и АТФ, причем более выражена ГТФ-азная активность. Каталитическая активность отсутствовала у Est3 D86A. В присутствии физиологической концентрации ионов Mg^{2+} увеличилась скорость гидролиза ГТФ белком Est3. Возможно, Mg^{2+} входит в состав активного центра белка. В присутствии ГДФ, ГТФ и негидролизуемого аналога ГТФ были выявлены изменения в спектре КД белка Est3. Это свидетельствует об имеющих место конформационных изменениях при связывании с различными кофакторами.

Ранее было показано, что Est3 способен связываться с олигонуклеотидами, образующими G-квадруплексы, которые имитируют структуру теломер и расплетать ДНК/РНК-гетеродуплексы [3]. В данной работе было оценено влияние связывания олигонуклеотидов на скорость гидролиза ГТФ белком Est3. Оказалось, что при связывании с олигонуклеотидами, формирующими G-квадруплексную структуру, наблюдается уменьшение скорости гидролиза, чего не происходит в присутствии неспецифического А/Т-богатого олигонуклеотида. Полученные данные поддерживают предположение о том, что белок Est3 является одним из двух белков системы аналогичной системе TRP1-Pot1 человека, которая связывается с ДНК теломер, делает их доступными для дальнейшей работы теломеразного комплекса и обеспечивает процессивность теломеразы.

1. Morris DK, Lundblad V. (1997) Programmed translational frameshifting in a gene required for yeast telomere replication. // *Curr Biol.* 7(12):969-76.

2. H. Van Belle. (1970) New and sensitive reaction for automatic determination of inorganic phosphate and its application to serum. // *Anal. Biochem.* 33 :132–142

3. Sharanov YS, Zvereva MI, Dontsova OA. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* telomerase subunit Est3p binds DNA and RNA and stimulates unwinding of RNA/DNA heteroduplexes // *FEBS Lett.* 580(19):4683-90.

**Пенициллинацилаза из *A.faecalis*: клонирование и экспрессия в *E.coli*,
свойства рекомбинантного фермента**

Ясная А.С.¹, Березин А.И.², Панин Н.В.³

Младший научный сотрудник

Институт Биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия

2Химический факультет и 3Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский

Государственный Университет имени М.В.Ломоносова,

Москва, Россия

E-mail: anna.yasnaya@gmail.com

Пенициллинацилаза G (ЕС 3.5.1.11, пенициллинамидаза, пенициллинамидогидролаза, ПА) – фермент, относящийся к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз. Катализирует реакцию гидролиза бензилпенициллина до 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). ПА из различных источников широко используются в фармацевтической промышленности для производства 6-АПК и 7-аминодезацетоксицефалоспоровой кислот (7-АДЦК) - ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов. Широкая субстратная специфичность и стереоселективность предоставляют возможность использования ПА в тонком органическом синтезе для получения энантиомеров α -, β -, γ -аминокислот, для высокоэффективного хемо- и стереоселективного ацилирования аминокосоединений в водной среде и получения энантиомеров аминов, аминоспиртов, аминонитрилов, хиральных сульфгидрильных соединений.

Наиболее широко на практике применяется ПА из *E.coli*, однако данный фермент обладает рядом недостатков: невысокой температурной стабильностью, низкими каталитическими характеристиками по отношению к некоторым субстратам и недостаточного широким рН-оптимумом. Этих недостатков лишен фермент из бактерий *Alcaligenes faecalis*.

В данной работе был клонирован ген ПА из *A.faecalis*, определена его нуклеотидная последовательность, подтверждена патентная чистота клонированного гена, создан штамм-продуцент рекомбинантного фермента с исходным сигнальным пептидом. Выход фермента в активной и растворимой форме составил до 1000 е.а./л. Также в работе были изучены кинетические свойства фермента по цветному субстрату NIPAB, термостабильность в диапазоне от 51 до 57°C и кинетика ацилирования 3-фенилпропиламина при рН 10. Показано, что кинетические характеристики рекомбинантного фермента по цветному субстрату совпадают с литературными данными. Изучение термостабильности фермента показало, что в данном диапазоне температур зависимость остаточной активности от времени описывается в соответствии с кинетикой первого порядка. Наблюдаемые константы инактивации первого порядка не зависят от концентрации фермента, что свидетельствует об истинно мономолекулярном механизме инактивации. Показано, что зависимость константы инактивации от температуры описывается в рамках ТАК. Исходя из этой теории были определены активационные параметры.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов «У.М.Н.И.К.» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Ясная А.С., Панин Н.В.).