

**Оптимизация выделения активного вещества из культуральной жидкости штамма *Actinoplanes* sp.49252.**

**Научный руководитель – Остерман Илья Андреевич**

***Точилкина Мария Сергеевна***

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: mtoch@mail.ru*

В настоящее время всё чаще патогенные бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам. Становится сложнее вылечивать многие бактериальные инфекции, такие как, пневмония, гонорея, туберкулёз, поскольку их возбудители становятся невосприимчивыми к применяемым лекарствам. Если эта тенденция продолжится, то в ближайшем будущем самые обычные инфекции будут представлять серьёзную угрозу жизни людей. [3] По оценкам экспертов к 2050 году уровень смертности от бактериальных инфекций вырастет в 14 раз (по данным 2016 г.)- до 10 млн человек в год. [2] На основе вышесказанного можно утверждать, что резистентность к антибиотикам является глобальной проблемой. Одним из методов борьбы с которой является поиск и разработка новых антибактериальных препаратов.

Продуцентами многих антибиотиков являются бактерии. Одним из способов поиска новых веществ является проверка на антибактериальную активность культуральных жидкостей. Для данной задачи был разработан метод первичного скрининга на репортёрном штамме *E.coli*, содержащий плазмиду pDualrep2. В плазмиде закодирована конструкция, позволяющая выявить один из механизмов действия активного вещества: ингибирование трансляции или повреждение ДНК. При ингибировании трансляции клетки *E.coli*, растущие в сублетальной концентрации антибиотика, синтезируют флуоресцентный белок *Katushka2S*. При повреждении ДНК происходит синтез флуоресцентного белка *TurboRFP*, закодированного под промотором гена SOS-ответа *sulA*. [1] В ходе такого скрининга была обнаружена культуральная жидкость *Actinoplanes* sp. 49252, индуцирующая транскрипционную часть репортёрной конструкции.

Для обнаруженной культуральной жидкости был разработан протокол очистки. Для первичной очистки применялась обращённо-фазовая хроматография. Элюция проводилась ступенчато, ацетонитрилом в возрастающих концентрациях. Наибольшая антибактериальная активность наблюдалась в 50% фракции ацетонитрила, которая использовалась для дальнейшей очистки. Органическая фаза была отделена от водной и экстрагирована в хлороформ. Проведение трансляции в бесклеточной системе с очищенной культуральной жидкостью подтвердило выявленный с помощью репортёра механизм действия - ингибирование трансляции.

С помощью метода масс-спектрометрии установлена молекулярная масса исследуемой молекулы ( $M=379$ ) и рассчитана брутто-формула  $C_{23}H_{25}NO_4$ . На основе этих данных предположена гидрофобность вещества, что подтверждается наличием антибактериальной активности у фракции культуральной жидкости, экстрагированной в хлороформ. Также методом ЯМР была частично установлена структурная формула.

**Источники и литература**

- 1) Osterman, I.A. et al. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7481–7489 (2016)
- 2) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations The Review On Antimicrobial Resistance Chaired By Jim O'Neill May 2016.
- 3) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

### Иллюстрации

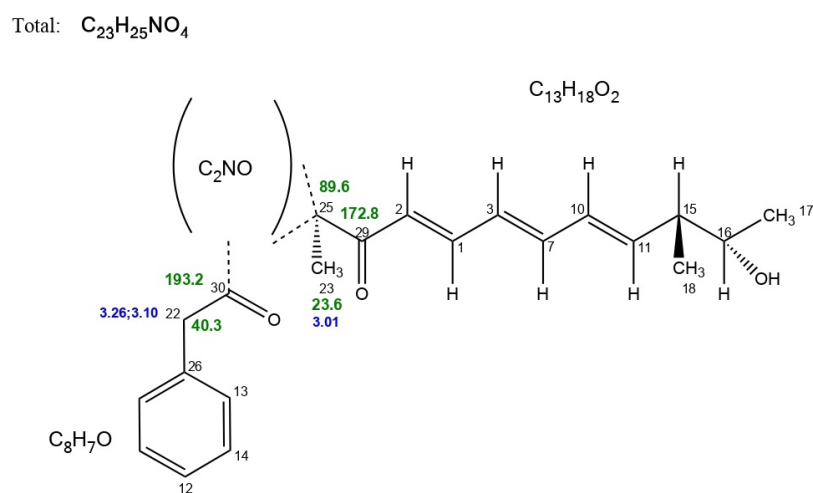


Рис. 1. Предполагаемая структурная формула