

УДК 577.29,615.281.9,579.61

МЕТОД АНАЛИЗА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ЭКСПРЕССИИ КОДИРУЮЩИХ ИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 2025 г. Е. Н. Графская^{1,*}, Д. Д. Харлампиева¹, П. А. Бобровский^{1,2},
М. Ю. Серебренникова^{1,2}, В. Н. Лазарев^{1,2}, В. А. Манувера^{1,2}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: grafskayacath@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 28.08.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Предложена система тестирования новых потенциальных антимикробных пептидов (АМП), основанная на экспрессии кодирующих их рекомбинантных генов в клетках *Escherichia coli*. Такой подход имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием химически синтезированных пептидов, при этом оба подхода эффективно дополняют друг друга. Используемый метод не налагает ограничений на размер АМП, позволяет проводить массовый скрининг мутантных плазмидных библиотек, имеет меньшую стоимость по сравнению с использованием синтетических пептидов. Суть метода заключается в трансформации модельной грамотрицательной бактерии *E. coli* плазмидами, несущими в себе рекомбинантный ген, кодирующий АМП, под контролем индуцибельного промотора. После индукции транскрипции бактерии синтезируют АМП, что приводит их к гибели. Детекцию роста бактерий проводят либо путем измерения оптической плотности жидкой культуры, выращиваемой в микропланшете, либо путем капельного посева серийных разведений культуры на агаризованную питательную среду.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, *Escherichia coli*, тест-система, плазмиды

DOI: 10.31857/S0555109925010038 **EDN:** CZLYIY

Широкое распространение устойчивости к антибиотикам среди патогенных бактерий представляет серьезную угрозу и сильно снижает эффективность антибактериальной терапии [1–2]. В настоящее время антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются как потенциальная замена или дополнение к антибиотикам [3–5]. Хотя известно множество АМП [6–7], их поиск продолжается из-за потребности в безопасных и низкотоксичных антибактериальных веществах с разнообразными свойствами [8–9]. Полностью удовлетворяющие всем требованиям АМП пока не найдены, поэтому исследования продолжаются [10, 11].

Существует два основных подхода к обнаружению новых АМП. Первый заключается в анализе природных источников, таких как яды,

слизистые покровы, соки растений и т.п. [12, 13]. В этих источниках находят пептиды, обладающие противомикробными свойствами, и анализируют их. Причем, в последние два десятилетия в связи с развитием геномики и транскриптомики, чаще всего ищут не сами пептиды, а последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют. Второй подход стал возможен благодаря развитию биоинформатики и вычислительной биологии. Он состоит в *in silico* разработке АМП *de novo* [14–16]. Оба подхода требуют экспериментального подтверждения свойств пептидов, полученных на основе отобранных аминокислотных последовательностей. Самым очевидным способом такой проверки является химический синтез пептидов с последующим их тестированием. Однако этот способ имеет

существенные ограничения. Главными из них являются ограничения на длину синтетического пептида [17], низкая производительность и высокая стоимость. Использование синтетических пептидов оправдано, когда требуется изучить свойства небольшого числа АМП с длиной не более 20–30 аминокислотных остатков. Однако, как показывает практика, часто из изначально отобранных аминокислотных последовательностей лишь немногие соответствуют пептидам с антимикробными свойствами [18]. Таким образом, имеется потребность в простом скрининговом методе, позволяющем отсеять пептиды, заведомо не имеющие заметных антимикробных свойств. Мы предлагаем такой метод, основанный на экспрессии рекомбинантных генов, кодирующих АМП, в клетках бактерий. В нашем варианте используется условно-патогенная грамотрицательная бактерия *Escherichia coli*, но подобная система на аналогичных принципах может быть построена и для грамположительных бактерий, например *Bacillus subtilis*.

Суть метода скрининга потенциальных АМП заключается в том, что бактериальные клетки трансформируются плазмидами, несущими ген, кодирующий АМП, под контролем индуцибельного промотора. Первоначальный рост клеток осуществляется в отсутствие индуктора транскрипции и токсичность АМП не проявляется. После индукции экспрессии, АМП начинают синтезироваться в клетках и за счет наличия введенного в кодирующий участок ДНК последовательности, соответствующий сигнальному пептиду, транслоцируются в периплазматическое пространство. В случае если рекомбинантный пептид токсичен для клеток бактерий, их рост подавляется. Подавление роста детектируется либо путем измерения оптической плотности жидкой бактериальной культуры, выращиваемой в лунках микропланшета, либо путем капельного посева серийных разведений культуры на поверхность агаризованной среды.

Для проверки работоспособности предлагаемого метода тестирования АМП мы отобрали пять известных антимикробных пептидов. Три из них: мелиттин [19], цекропин [20] и апидацин [21] хорошо описаны в литературных источниках. Два оставшихся пептида — Nm-AMP2 и Nm-AMP4 мы обнаружили ранее при системном анализе генома, транскриптома и протеома медицинской пиявки [22]. С их использованием мы показали, что методика функциональна и может быть использована при поиске АМП. Кроме проверки антибактериальных свойств отдельных пептидов она позволяет быстро анализировать плазмидные библиотеки, несущие большое количество вариантов генов АМП.

Цель работы — создание метода высокопроизводительного первичного отбора новых АМП с помощью экспрессии кодирующих их рекомбинантных генов в клетках бактерии *Escherichia coli*.

МЕТОДИКА

Растворы и бактериальные среды. Бактериальная среда LB: триптон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 10 г/л. Среда LB с пониженным содержанием NaCl: триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л. Агаризованная среда LB: триптон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 5 г/л, агар — 1.5% (вес/об.).

Клетки и штаммы. При конструировании рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* Top 10 (*F-mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 nupG recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻*) (“Invitrogen”, США). При анализе антимикробной активности использовался штамм *E. coli* BL21-gold (DE3): *E. coli* B *F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA* (“Novagen”, США).

Антимикробные пептиды. Последовательности, кодирующие антимикробные пептиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Конструирование экспрессионных плазмид. В качестве реципиентного вектора была выбрана плаزمида pET-min-kan, сконструированная ранее на основе коммерческой плазмиды pET-22b, в которой участок, кодирующий сигнальный пептид, заменен полилинкером, а ген устойчивости к ампициллину — геном устойчивости к канамицину (неопубликованные данные). Фрагменты ДНК, кодирующие АМП мелиттин (Mel), цекропин (Cecr), апидацин (Apid), а также пептиды медицинской пиявки NmAmp2 и NmAmp4, получали методом циклической достройки специфических олигонуклеотидов (табл. 2, № 1–12). Для синтеза фрагмента ДНК соответствующие олигонуклеотиды смешивались до конечной концентрации каждого из них 10 мкМ. Смесь использовалась для достройки полноразмерного фрагмента с помощью ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 1× реакционный GC-буфер, 0.2 мМ каждого из dNTP, 2% (об.) ДМСО, 0.5 ед. полимеразы. Смесь подвергали циклической смене температуры на подобии того, как это происходит при ПЦР, по программе: 98°C 10 с, 60°C — 10 с, 72°C — 15 с, всего 15 циклов. Для получения экспрессионных плазмид очищенный с помощью препаративного электрофореза фрагмент ДНК, кодирующий пептиды, вводился в сайт множественного клонирования плазмиды pET-min-kan. Для этого фрагменты ДНК, кодирующие пептиды, и исходный плазмидный вектор pET-min-kan обрабатывали рестрицирующими эндонуклеазами NdeI и XhoI. После очистки ПЦР-фрагмент и вектор смешивали в молярном отношении 10 : 1 и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы (“Thermo Fisher Scientific”). Продуктами реакции трансформировали клетки *E. coli* Top10, которые высевали на чашки Петри с ага-

Таблица 1. Последовательности, кодирующие антимикробные пептиды, используемые в работе

Пептид	Последовательность	Идентификатор в базе данных UniProt	Идентификатор в базе данных АМП DBAASP
Мелиттин	ATGGGCATTGGCGCGGTGCTGAAAGTGCTG ACCACCGGCCTGCCGGCGCTGATTAGCTGG ATTAACGCAAACGCCAGCAGTGA	P01501	DBAASPR_806
Цекропин	ATGAGCTGGCTGAGCAAAACCGCGAAAAAAC TGGAAAACAGCGCGAAAAAACGCATTAGCGA AGGCATTGCGATTGCGATTACAGGGCGGCC GCGCTGA	P14661	DBAASPR_569
Апидацин	ATGGGCAACAACCGCCCGGTGTATATTCCG CAGCCGCGCCCGCCGCATCCGCGCTTGTGA	P35581	DBAASPR_1160
Нм-AMP2	ATGGAAAACGCTGGCGCCGCCTGATTTTA ACTATTTTGA	—	DBAASPS_20171
Нм-AMP4	ATGTTTATTCTGTATGGCCTGATTCGCTTTG GCCGCCTGCTGCGCAAATGA	—	DBAASPS_20173

ризованной средой LB, содержащей селективный антибиотик канамицин в концентрации 50 мкг/мл. Выросшие колонии анализировали методом ПЦР бактериальной суспензии с использованием олигонуклеотидов T7 и T7t (“Novagen”, США). Колонии, содержащие плазмиды со вставкой, пересеивали в жидкую среду LB с селективным антибиотиком, после чего из культуры выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса. Соответствие структуры полученных плазмид ожидаемой подтверждали путем секвенирования по методу Сэнгера с использованием капиллярного секвенатора AbiPrism 3500xl (“Applied Biosystems”, США). На следующем этапе плазмиды pET-min-kan-(пептид) использовались в качестве донорных плазмид для сборки векторов, в которых пептиды были слиты с сигнальной последовательностью pеIВ для направленной экспрессии пептида в периплазму. Конструирование проводили на основе плазмиды pET-22(b) и использовали метод неполного полимеразного удлинения праймера (PIPE) [23]. Для этого с помощью ПЦР проводили полноразмерную амплификацию плазмиды pET-22(b) с использованием олигонуклеотидов PETPIPE-2N и 22b Rp (табл. 2). Фрагменты ДНК, кодирующие АМП, амплифицировали с использованием специфичных праймеров (табл. 2, № 15–24). С целью избавления от матричной ДНК ампликоны были очищены с помощью электрофореза в агарозном геле. Амплифицированную плазмиду и один из фрагментов ДНК, кодирующих АМП, смешивали в молярном соотношении примерно 1 : 5. Полученной смесью напрямую трансформировали клетки *E. coli* Top 10 и рассеивали на агаризованную среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина.

Выросшие колонии анализировали на наличие рекомбинантной вставки в плазидах путем ПЦР с использованием олигонуклеотидов T7 и T7t (“Novagen”, США). Клоны, содержащие плазмиды со вставкой нужного размера, пересеивали в жидкую среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина, подращивали и выделяли из полученной биомассы плазмидную ДНК. Валидацию структуры рекомбинантных плазмид проводили путем секвенирования целевого участка.

Тест на антимикробную активность с использованием жидкой питательной среды. Тест антимикробной активности по конечной точке роста. Клетки *E. coli* BL21-gold (DE3) трансформировали плазидами серии pET-min-kan и pET-22(b), кодирующими АМП Mel, HmAmp2, HmAmp4, Secr, Aripd и высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB (ампициллин 150 мкг/мл, глюкоза 0.5 г/л для плазмид серии pET-22(b) и канамицин 50 мкг/мл, глюкоза 0.5 г/л для плазмид серии pET-min-kan). Чашки инкубировали при 30°C в течение 17–18 ч. Единичные колонии отбирали наконечником автоматической пипетки и переносили в лунки 96-луночного плоскостонного планшета (“Eppendorf”, Германия), содержащие 200 мкл LB с пониженным содержанием NaCl и соответствующий антибиотик, а также глюкозу 0.5 г/л, и тщательно суспендировали. Для каждого образца переносили по шесть колоний. Клеточные суспензии инкубировали в течение 45 мин при 30°C в термостате TC-1/80 (“СПУ”, Россия). Затем готовили серию десятикратных разведений полученной суспензии клеток. 100 мкл бактериальной суспензии (разведение 10⁵ раз) смешивали со 100 мкл среды LB с пониженным содержанием NaCl, не содержа-

Таблица 2. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе

№	Название	Последовательность
1	mel_R	ATACTCGAGTCACTGCTGGCGTTTGC GTTTAATCCAGCTAATCAGCGCCGGCA GGCCGGTGGTC
2	apid_R	ATACTCGAGTCACAAGCGCGGATGCGGCGGGCGCGGCTGCGGAATATAC
3	cecr_R	ATACTCGAGTCAGCGCGGGCCGCCCTGAATCGCAATCGCAATGC
4	HM4-R	ATACTCGAGTCATTTGCGCAGCAGGCGGCCAAAGCGAATCAGGCC
5	HM2_R	ATACTCGAGTCAAAAATAGTTAAAAATCAGGCGGCGCC
6	mel_F1	TATCATATGGGCATTGGCGCGGTGCTGAAAGTGCTGACCACCGGCCTGCCGG CGCTGA
7	apid_F	TATCATATGGGCAACAACCGCCCGGTGTATATTCCGCAGCCGCGCCC
8	cecr_F1	TATCATATGAGCTGGCTGAGCAAAACCGCGAAAAAACTGGAAAAC
9	cecr_F2	AGCGCGAAAAACGCATTAGCGAAGGCATTGCGATTGCGATTCC
10	cecr_R1	ATATCAGCGCGGGCCGCCCTGAATCGCAATCGCAATGC
11	HM4_F	TATCATATGTTTATTCTGTATGGCCTGATTGCTTTGGCCGCC
12	HM2-F	TATCATATGGAAAAACGCTGGCGCCGCCTGATTTTT
13	PEPIPE-2N	CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATC
14	22b Rp	CATGGCCATCGCCGGCTGGG
15	mel 22F	CCGGCGATGGCCATGGGCATTGGCGCGGTGCTGAAAG
16	mel 22wohisR	GTGGTGGTGCTCGAGTCACTGCTGGCGTTTGC GTTTAATC
17	amp2 22F	CCGGCGATGGCCATGGAAAAACGCTGGCGCCG
18	amp2 22R	GGTGGTGGTGCTCGAGAAAATAGTTAAAAATCAGG
19	amp4Fp	CCGGCGATGGCCATGTTTATTCTGTATGGCCTGATTC
20	amp4Rp	GTGGTGGTGCTCGAGTCATTTGCGCAGCAGGCGGCCA
21	apidoFp	CCGGCGATGGCCATGGGCAACAACCGCCCGGTGTATATTCCG
22	apidoRp	GTGGTGGTGCTCGAGTCACAAGCGCGGATGCGGCGGGCGCGGCTG
23	cecroFp	CCGGCGATGGCCATGAGCTGGCTGAGCAAAACCG
24	cecroRp	GTGGTGGTGCTCGAGTCAGCGCGGGCCGCCCTGAATC
25	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
26	T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

щую ИПТГ или с ИПТГ в концентрации 0.2 мМ. Переносили клетки в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в термостате в течение ночи. Затем измеряли оптическую плотность культуры при длине волны 570 нм (OP_{570}) с использованием планшетного фотометра Multiscan Ascent (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Тестирование антимикробной активности по кинетике роста бактериальной культуры. Единичную колонию клеток *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированных плазмидами pET-22(b), кодирующими АМП Mel, HmAmp2, HmAmp4, Secr, Apid, переносили в 200 мкл среды LB с соответствующим антибиотиком и тщательно суспендировали. Для каждого образца брали по две разные колонии. Планшет помещали в термошейкер (MB100-2A, ALLSHENG, КНР) и инкубировали 1 ч при температуре 37°C и скорости вращения 600 об./мин. Далее пересевали клетки в новый 96-луночный плоскодонный планшет в двух вариантах: в среду LB без индуктора транскрипции, и содержащую ИПТГ в концентрации 0.1 мМ. Для каждого клона делали серию из четырех десятикратных разведений как в среде с индуктором, так и в среде без него. Таким образом, для каждого клона готовилась серия разведений в 10, 100, 1000, 10000 раз. Конечный объем культуры в каждой лунке планшета составлял 200 мкл. Для контроля стерильности использовали несколько лунок с чистой средой. Планшет помещали в термошейкер и инкубировали при температуре 37°C и скорости вращения 600 об./мин. Каждый час проводили измерение оптической плотности культуры в планшете при длине волны 570 нм (OP_{570}) с использованием планшетного фотометра Multiscan Ascent. Всего проводили семь измерений (с одного до семи часов культивирования).

Тест на антимикробную активность с использованием агаризованной питательной среды. Для выполнения теста подращивали культуру и готовили серию из пяти десятикратных разведений, также как это было описано выше. Таким образом, в данном случае для каждого клона готовилась серия разведений в 10, 100, 1000, 10000 и 100000 раз. Для каждого разведения каждого клона каплю объемом 10 мкл переносили на поверхность агаризованной среды и дожидались полного впитывания и высыхания капли (примерно 20 мин при комнатной температуре). Параллельно для всех образцов использовали чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 150 мкг/мл ампициллина без индуктора транскрипции и содержащую ИПТГ в концентрации 0.1 мМ. После этого чашки инкубировали 22 ч при температуре 37°C, вслед за этим визуально оценивали рост клеток или его отсутствие. Фотографирование чашек Петри производили с помощью специализированной системы фотодокументирования Scan 1200 (“Interscience”, Франция).

Статистическая обработка. Для проведения статистического анализа при сравнении исследуемых групп, применяли непараметрический критерий Манна–Уитни с использованием языка программирования Python (версия 3.12) (“Python Software Foundation”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время активно исследуются антимикробные пептиды и разработано множество методов их тестирования. Наиболее распространены три метода: дискотиффузионный, метод разведений в жидкой питательной среде и метод разведений в агаре [24]. Все они служат для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и требуют для реализации наличия синтетических тестируемых АМП.

В настоящей работе разработан метод скрининга потенциальных антимикробных пептидов, который основан на трансформации бактериальных клеток *E. coli* плазмидами, несущими ген АМП под контролем индуцибельного промотора. На первом этапе проводится тестирование роста бактерий, несущих плазмиды, кодирующие АМП, в жидкой среде по конечной точке роста (24 ч). Результаты приведены на рис. 1. На рис. 1а показаны значения оптической плотности бактериальных культур, трансформированных плазмидами на основе pET-min-kan. Кодируемые ими АМП не имеют сигнального пептида и не могут транслоцироваться в периплазму с помощью транслоказы. На рис. 1б показаны значения оптической плотности бактериальных культур, трансформированных плазмидами на основе pET-22(b). Кодируемые ими АМП имеют сигнальный пептид *pelB* и могут переноситься в периплазматическое пространство. В обоих случаях наблюдается подавление роста бактериальной культуры при сравнении с контрольными образцами. В случае АМП без сигнальных пептидов происходит лишь частичное подавление роста. При экспрессии АМП с сигнальными пептидами наблюдалось полное отсутствие роста культуры в трех случаях из пяти, и в дальнейших экспериментах была использована именно эта система экспрессии.

На втором этапе были получены кривые роста культур по значениям OP_{570} , измеряемым каждый час. Поскольку в предыдущем эксперименте АМП с сигнальными пептидами показали большую эффективность, то определение кривых роста выполняли с использованием культур, трансформированных плазмидами на базе pET-22(b). Результаты приведены на рис. 2. Во всех случаях наблюдалось подавление роста бактериальных культур. В случае HmAmp2 и HmAmp4 OP_{570} имела максимум в точке 3 ч, а затем происходило снижение плотности.

В качестве альтернативного измерению оптической плотности метода детекции использовали

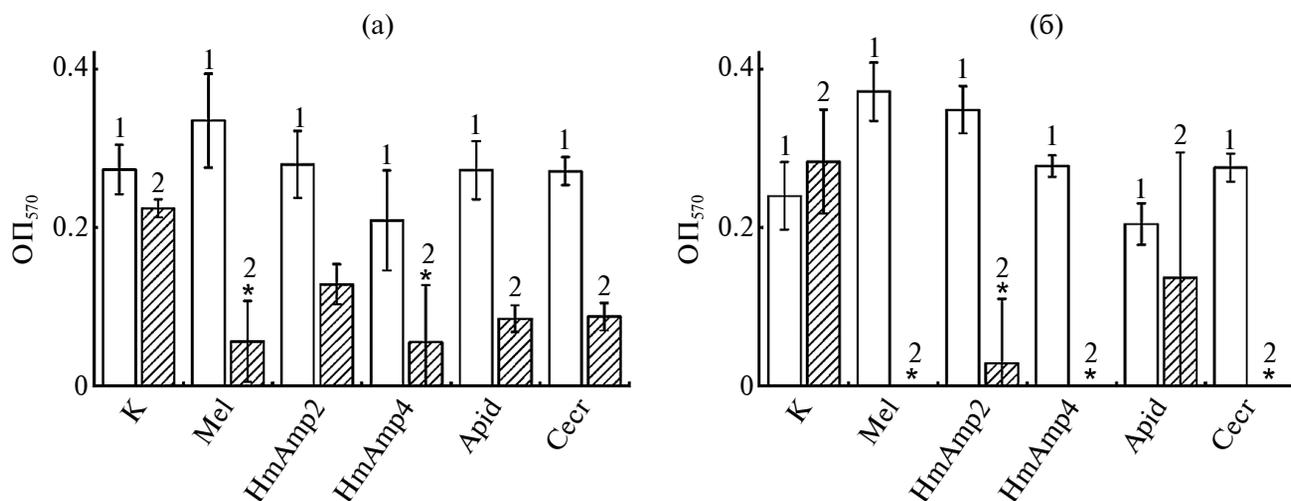


Рис. 1. Оптические плотности культур клеток *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированных экспрессионными плазмидами, кодирующими АМП, через 24 ч инкубации. Плазмиды кодируют АМП без сигнального пептида (а), плазмиды кодируют АМП с сигнальным пептидом relB (б). К — контрольные клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные реципиентными плазмидами без кодирующей АМП вставки; Mel, Secr, Apid, HmAmp2 и HmAmp4 — клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой, кодирующей мелиттин, цекропин, апидацин, HmAmp2 и HmAmp4 соответственно; 1 — LB, среда без индуктора транскрипции; 2 — LB + ИПТГ, среда LB с 0.1 мМ индуктора ИПТГ.

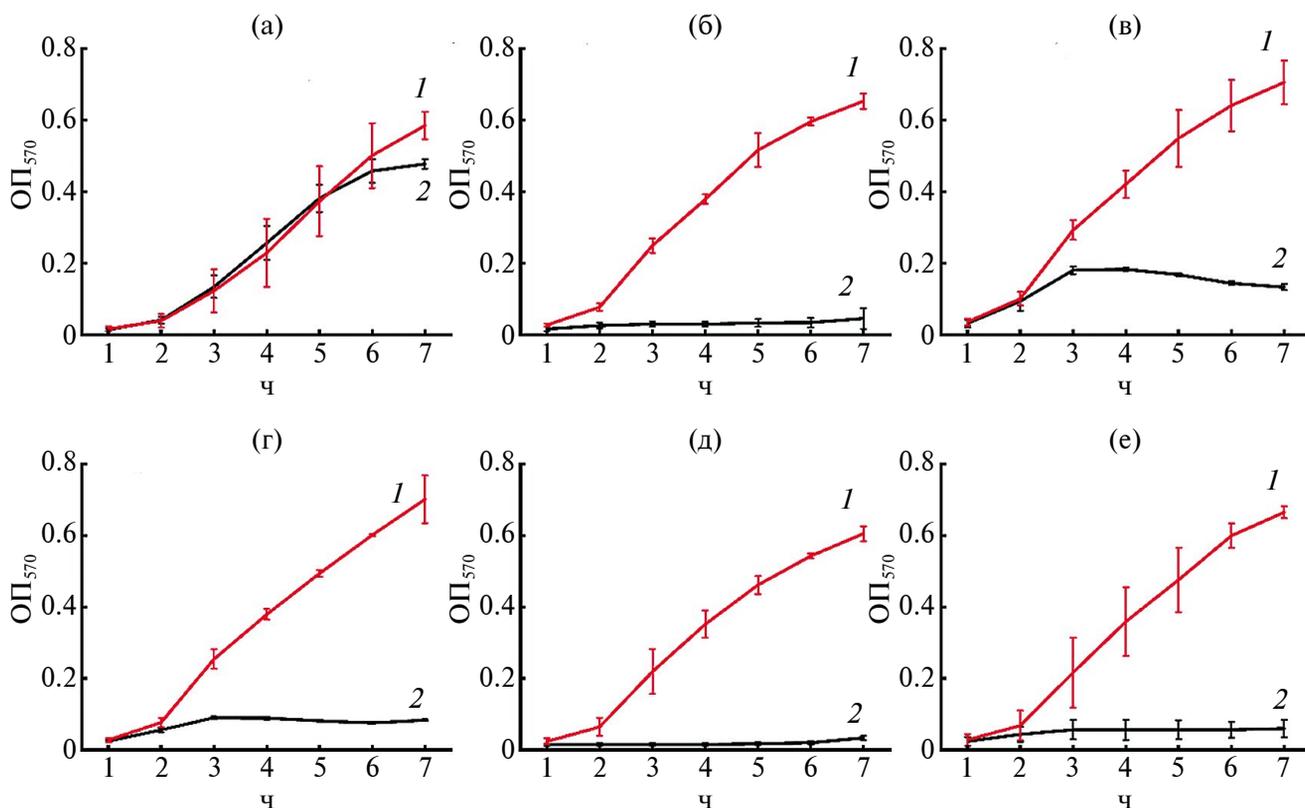


Рис. 2. Кривые роста культур *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированных экспрессионными плазмидами, кодирующими АМП с сигнальным пептидом relB. а — контрольные клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой pET-22(б); Mel (в), Secr (г), Apid (д) и HmAmp4 (е) — клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой, кодирующей слитые с сигнальным пептидом мелиттин, цекропин, апидацин, HmAmp2 и HmAmp4 соответственно. 1 — LB без индуктора транскрипции; 2 — LB + ИПТГ, среда с 0.1 мМ индуктора ИПТГ.

капельный высев серийных разведений бактериальных культур на поверхность агаризованной среды. Использовались культуры, несущие гены АМП с сигнальным пептидом. На рис. 3 показан вид выросших на агаризованной среде бактерий при капельном посеве. При оценке количества бактерий можно условно выделить пять уровней: вся поверхность покрыта равномерным слоем бактерий, в слое бактерий имеются небольшие промежутки, колонии перекрываются, имеются отдельно расположенные колонии, колонии отсутствуют. Результаты двух экспериментальных повторов приведены в табл. 3. В случае индукции транскрипции рекомбинантных генов четко выявляется снижение количества бактерий в культурах, экспрессирующих АМП.

Отличие использованной в настоящей работе методики от общепринятых в том, что не требуется получение самих пептидов. Клетки бактерий синтезируют их сами, и при синтезе активных соединений наблюдается супрессия роста культуры. Такой подход имеет ряд преимуществ, описанных выше. Главное из них — предложенный способ позволяет проводить массированный скрининг АМП и отбор наиболее активных пептидов. В то же время, описанный метод не может быть альтернативой тестам с использованием синтетических пептидов, так как не представляется возможным определить уровень синтеза и накопления АМП бактериями. Усиление или ослабление ингибирования роста культуры может объясняться как свойствами самих исследуемых последовательностей, так и разницей в уровне

экспрессии АМП клетками. Таким образом, метод не позволяет ни точно сравнить относительный антимикробный потенциал изучаемых пептидов, ни определить какие-либо количественные характеристики, например МИК или среднюю летальную дозу (LD_{50}). С другой стороны, при тестировании большого количества потенциальных АМП основная часть из них, чаще всего, либо не имеет активности, либо их активность мала. Таким образом, предлагается использовать описываемый метод для первичного отбора тех АМП, которые заведомо проявляют бактерицидные свойства. Далее небольшая часть отобранных последовательностей, которые показали антимикробный эффект, могут быть синтезированы *in vitro* для детального исследования их свойств и потенциала. Подобное сочетание методов тестирования может значительно упростить и ускорить поиск новых АМП, особенно при работе с мутантными плазмидными библиотеками.

Неопределенность в уровне экспрессии АМП не позволяет сколько-нибудь строго провести сравнение активности разных АМП. Однако можно наблюдать некоторые различия, особенно при использовании измерения кинетики роста жидких культур. В работе были использованы в качестве модельных пять АМП, различных по природе и механизму действия. Выбранные антимикробные пептиды — мелиттин, цекропин, апидацин, HmAmp2 и HmAmp4 — имеют широкий спектр действия против различных бактерий. Мелиттин, выделенный из яда медоносной пчелы

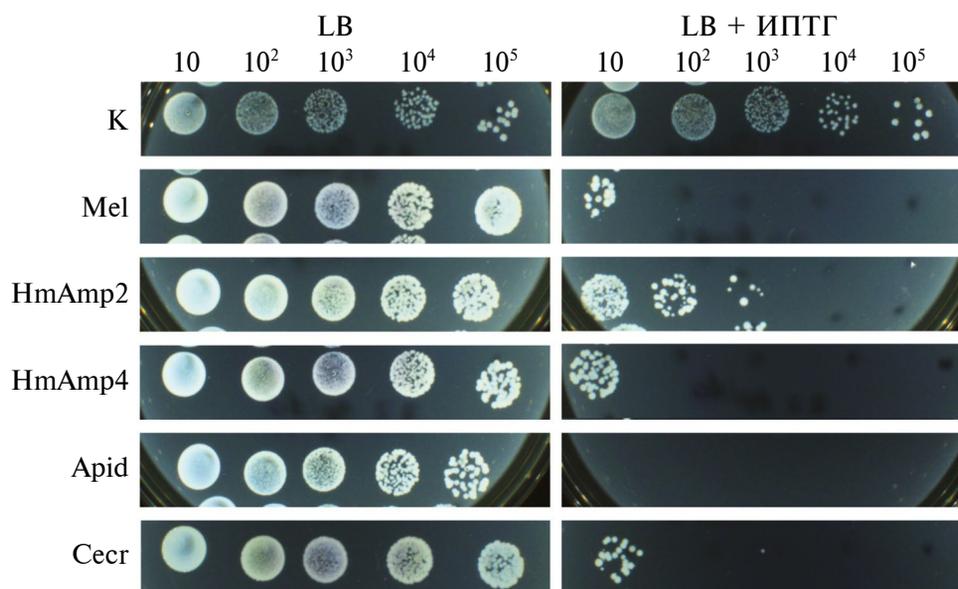


Рис. 3. Фотографии чашек Петри после капельного посева серийных разведений ($10-10^5$) бактериальных культур и инкубации 16 ч при 37°C . К — контрольные клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой pET-22(b); Mel, Cецr, Apid, HmAmp2 и HmAmp4 — клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой, кодирующей слитые с сигнальным пептидом *relB* мелиттин, цекропин, апидацин, HmAmp2 и HmAmp4 соответственно, LB — среда без индуктора транскрипции; LB + ИПТГ — среда с 0.1 мМ индуктора ИПТГ. Сверху приведена шкала разведения бактериальных культур.

Таблица 3. Результаты оценки роста бактерий на чашках Петри после капельного высева серийных разведений бактериальных культур и инкубации 16 ч при 37°C

Клетки <i>E. coli</i>	LB, разведение					LB + ИПТГ, разведение				
	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
К	4	3	2	1	1	3	3	2	1	1
	4	4	3	2	1	4	4	3	2	1
Mel	4	4	3	2	3	1	0	0	0	0
	4	4	3	2	1	1	0	0	0	0
Cecr	4	4	3	3	2	1	0	0	0	0
	4	4	3	2	1	1	0	0	0	0
Apid	4	3	3	2	1	0	0	0	0	0
	4	4	3	2	2	0	0	0	0	0
HmAmp2	4	4	3	2	2	2	1	1	0	0
	4	4	3	2	1	3	2	1	0	0
HmAmp4	4	3	3	2	1	1	0	0	0	0
	4	3	3	2	1	1	0	0	0	0

Примечание: приведен численный рейтинг для двух повторов эксперимента: 0 – колонии отсутствуют, 1 – имеются отдельно расположенные колонии, 2 – колонии перекрываются, 3 – в слое бактерий имеются небольшие промежутки, 4 – вся поверхность покрыта равномерным слоем бактерий; К – контрольные клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой pET-22(b). Mel, Cецr, Apid, HmAmp2 и HmAmp4 – клетки *E. coli* BL21-gold (DE3), трансформированные плазмидой, кодирующей слитые с сигнальным пептидом *relB* мелиттин, цекропин, апидацин, HmAmp2 и HmAmp4 соответственно.

Apis mellifera, эффективен против ряда бактерий, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*. Однако гемолитичность и цитотоксичность ограничивают его применение на практике [19]. Апидацин, также обнаруженный у медоносных пчел, обладает бактерицидным действием, как против грамотрицательных, так и против грамположительных бактерий [21]. Цекропин, найденный у насекомых, проявляет активность против бактерий, грибов и вирусов. Другие два пептида, HmAmp2 и HmAmp4, были обнаружены в медицинской пиявке и также обладают эффективной антимикробной активностью [22]. Необходимо отметить, что при использовании разных способов детекции результаты сходятся. Во всех случаях наибольший эффект дает мелиттин, а наименьший – HmAmp2. Наиболее информативен кинетический тест, но он и наиболее трудоемкий. При измерении кривых роста можно наблюдать, что в случае HmAmp2 и HmAmp4 максимум наблюдался в точке, соответствующей 3 ч инкубации. В остальных случаях максимума на кривых не наблюдалось. Конечно, делать на основании этого строгие выводы невозможно, однако все же это позволяет выдвинуть первичную гипотезу о том, что механизм действия HmAmp2 и HmAmp4 отличен от механизма действия трех остальных пептидов. Подобные предположения могут быть в дальнейшем проверены с помощью более строгих тестов.

Недостатком оценки роста культуры по изменению ОП является то, что этот способ очень чувствителен к оседанию клеток, их агрегации и т.п. Кроме того, он не показывает, происходит ли гибель клеток или просто наблюдается снижение скорости их роста. И тут архаичный метод высева капель на агаризованную среду имеет свои преимущества. Он гораздо менее чувствителен к агрегации клеток, так как рост бактерий с индукцией экспрессии генов АМП происходит на твердой поверхности, когда каждая клетка уже заняла свое место. Также в случае выбранных пептидов можно заключить, что происходит именно гибель клеток, а не простое замедление роста, так как на поверхности среды наблюдаются колонии, число которых сокращается, а размер – нет.

Предложенный способ тестирования активности АМП может служить хорошим дополнением к методам, использующим синтетические пептиды. Его можно использовать в качестве первичного фильтра для отсева неактивных пептидов для снижения количества анализируемых с помощью более трудоемких методов потенциальных АМП.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят центр коллективного пользования “Геномика, протеомика, метаболомика” ФНЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

(<http://rscrm.org/?p=2806>) за возможность использования оборудования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (соглашение № 23-15-00084), <https://rscf.ru/project/23-15-00084/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muteeb G., Rehman M.T., Shahwan M., Aatif M. // *Pharmaceuticals*. 2023. V. 16. № 11. P. 1615. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>
2. Salam Md.A., Al-Amin Md.Y., Salam M.T., Pawar J.S., Akhter N., Rabaan A.A., Alqumber M.A.A. // *Healthcare*. 2023. V. 11. № 13. P. 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
3. Mba I.E., Nweze E.I. // *Yale J. Biol. Med.* 2022. V. 95. № 4. P. 445–463.
4. Moretta A., Scieuzo C., Petrone A.M., Salvia R., Manniello M.D., Franco A. et al. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 668632. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>
5. Browne K., Chakraborty S., Chen R., Willcox M.D., Black D.S., Walsh W.R., Kumar N. // *IJMS*. 2020. V. 21. № 19. P. 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
6. Kumar P., Kizhakkedathu J., Straus S. // *Biomolecules*. 2018. V. 8. № 1. P. 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
7. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
8. Galzitskaya O.V. // *IJMS*. 2023. V. 24. № 11. P. 9451. <https://doi.org/10.3390/ijms24119451>
9. Agüero-Chapin G., Antunes A., Marrero-Ponce Y. // *Antibiotics*. 2023. V. 12. № 6. P. 1011. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061011>
10. Yan J., Cai J., Zhang B., Wang Y., Wong D.F., Siu S.W.I. // *Antibiotics*. 2022. V. 11. № 10. P. 1451. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101451>
11. Bakare O.O., Gokul A., Niekerk L.-A., Aina O., Abiona A., Barker A.M., et al. // *IJMS*. 2023. V. 24. № 14. P. 11864. <https://doi.org/10.3390/ijms241411864>
12. Bin Hafeez A., Jiang X., Bergen P.J., Zhu Y. // *IJMS*. 2021. V. 22. № 21. P. 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
13. Dini I., De Biasi M.-G., Mancusi A. // *Antibiotics*. 2022. V. 11. № 11. P. 1483. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111483>
14. Cardoso M.H., Orozco R.Q., Rezende S.B., Rodrigues G., Oshiro K.G.N., Cândido E.S., Franco O.L. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 3097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03097>
15. Yoshida M., Hinkley T., Tsuda S., Abul-Haija Y.M., McBurney R.T., Kulikov V. et al. // *Chem*. 2018. V. 4. № 3. P. 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.01.005>
16. Aronica P.G.A., Reid L.M., Desai N., Li J., Fox S.J., Yadahalli S. et al. // *J. Chem. Inf. Model.* 2021. V. 61. № 7. P. 3172–3196. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00175>
17. Merrifield R.B., Stewart J.Morrow., Jernberg Nils. // *Anal. Chem.* 1966. V. 38. № 13. P. 1905–1914. <https://doi.org/10.1021/ac50155a057>
18. Bello-Madruga R., Torrent Burgas M. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2024. V. 23. P. 972–981. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.02.008>
19. Zhang H.-Q., Sun C., Xu N., Liu W. // *Front. Immunol.* 2024. V. 15. P. 1326033. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1326033>
20. Steiner H., Hultmark D., Engström Å., Bennich H., Boman H.G. // *Nature*. 1981. V. 292. № 5820. P. 246–248. <https://doi.org/10.1038/292246a0>
21. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. // *The EMBO Journal*. 1989. V. 8. № 8. P. 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
22. Grafkskaia E.N., Pavlova E.R., Latsis I.A., Malakhova M.V., Ivchenkov D.V., Bashkirov P.V., et al. // *Materials & Design*. 2022. V. 224. P. 111364. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111364>
23. Klock H.E., Lesley S.A. High Throughput Protein Expression and Purification. / Ed. S.A. Doyle. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. V. 498. P. 91–103. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_6
24. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3. № 2. P. 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Method for Analyzing the Antimicrobial Activity of Peptides via *Escherichia coli* Expression System

E. N. Grafskaya^{a, *}, D. D. Kharlampieva^a, P. A. Bobrovsky^{a, b}, M. Y. Serebrennikova^{a, b},
V. N. Lazarev^{a, b}, and V. A. Manuvera^{a, b}

^aLopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency,
Moscow, 119435 Russia

^bFederal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Moscow Institute of Physics and Technology
(National Research University)", Dolgoprudny, 141701 Russia

*e-mail: grafskayacath@gmail.com

The test system for an assay of new potential antimicrobial peptides (AMP) based on the expression of recombinant AMP-encoding genes in *Escherichia coli* cells has been proposed. This method has a number of advantages over the use of chemically synthesized peptides and both approaches effectively complement each other. Our approach does not impose limitations on the AMP size, facilitates high-throughput screening of mutant plasmid libraries, and has lower cost and complexity compared to the use of synthetic peptides. The core of our methodology involves transformation of the model gram-negative bacterium *E. coli* with plasmids carrying a recombinant AMP-encoding gene regulated by an inducible promoter. Following transcription induction, bacteria synthesize the AMP, which ultimately leads to cell death. The assessment of bacterial growth is carried out either by measuring the optical density of a bacterial culture grown in liquid media in a microplate or by drip seeding of serial culture dilutions on an agar-based nutrient medium.

Keywords: antimicrobial peptides, *Escherichia coli*, test system, plasmid