

Поиск продуцентов новых полипептидных антибиотиков среди штаммов *Bacillus* методом генетического типирования

О. Н. Рева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины

Бактерии рода *Bacillus* синтезируют различные активные вещества олигопептидной природы с широким спектром биологической активности. В их числе регуляторные пептиды, выполняющие у бактерий рода *Bacillus* функции медиаторов кворум-чувствительности, а также многочисленные полипептидные антибиотики, такие как сурфактин, фенгицин, микосубтилин и др. Уникальным для всех этих пептидов является то, что они синтезируются без участия рибосом с помощью многофункциональных белковых комплексов, называемых нерибосомальными пептидными синтетазами (НРПС).

Молекулы НРПС состоят из функциональных блоков, контролирующих активацию аминокислот, элонгацию полипептидной цепи и химическое модифицирование аминокислотных субъединиц. Модульная структура НРПС в точности соответствует структуре их генов. Гены НРПС объединены в функциональные опероны, контролирующие синтез определенного полипептида. В геноме микроорганизма может быть несколько таких оперонов, кодирующих разные НРПС. Отдельные гены НРПС, длина которых может достигать 15 000 нуклеотидных пар, состоят из повторяющихся модулей. Все модули имеют одинаковую структуру. Консервативные мотивы, отвечающие за стандартные процессы аделирования и тиолирования аминокислот, чередуются с переменными локусами, распознающими определенный субстрат. По структуре гена НРПС можно точно предугадать состав конечного олигопептида. Для генов НРПС характерна значительная переменность на уровне отдельных штаммов. Предположительно, структурные модули генов НРПС могут передаваться горизонтально между микроорганизмами, хотя механизм обмена

модулями пока неизвестен. Также на сегодняшний день совершенно неясно, насколько сильно природные популяции микроорганизмов могут отличаться по репертуару НРПС. Можно предположить, что большая часть биологически активных полипептидов, в том числе ценные для медицины антибиотики и биорегуляторы, все еще неизвестны науке.

В нашей лаборатории был разработан метод генетического типирования бактерий рода *Bacillus* методом ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на консервативные участки генов НРПС. Поскольку целевые сиквенсы неоднократно повторяются в генах НРПС, в результате ПЦР амплифицируются полиморфные фрагменты ДНК. Для визуализации результатов ПЦР проводили электрофорез в 1%-м агарозном геле. Для анализа отобрали 50 коллекционных штаммов-антагонистов, относящихся к видам *B. subtilis* spp. *subtilis*, *B. subtilis* spp. *spizizenii* и *B. amyloliquefaciens*. Генетическое типирование показал, что виды и подвиды *Bacillus* неоднородны по набору НРПС. Штаммы, относящиеся к одному таксону, распределялись по нескольким клонам с характерными наборами полос продуктов ПЦР. Амплифицированные фрагменты генов НРПС были клонированы в клетки *E. coli* XLBluescript, а затем сиквенированы. Определение аминокислотных сиквенсов проводился в базе данных NCBI методом pBlast. Амплифицированные фрагменты ДНК принадлежали как к известным генам НРПС из *Bacillus*, так и, вероятно, к генам новых, еще неизвестных антибиотиков. Таким образом, предложенный метод позволяет быстро определять среди природных изолятов такие штаммы *Bacillus*, которые отличаются по составу генов НРПС в хромосоме и могут быть продуцентами новых биологически активных олигопептидов.