



УДК 519.999

Особенности разделения биологически активных компонентов пчелиной огневки методом эксклюзионной ионообменной хроматографии и гель-электрофореза

Пурыгин П.П., Срибная О.С.

Самарский государственный университет, Самара

Буряк А.К.

Институт физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН, Москва

Аннотация

В данной работе рассматривается процесс разделения антибактериальных компонентов гемолимфы личинок *Galleria mellonella* (пчелиной огневки) методами эксклюзионной ионообменной хроматографии и гель-электрофореза.

Показано, что полученные в результате разделения белковые фракции обладают антибактериальной активностью; обнаружено присутствие нового антибактериального пептида и найдена его масса.

Ключевые слова: гель-хроматография, разделение пептидов, гель-электрофорез.

In the given work process of separation of antibacterial components of a hemolymph of larvae *Galleria mellonella* by methods of an ion-exchange chromatography and gel-electrophoresis is surveyed.

It is shown, that the fractions received as a result of separation possess antibacterial activity; presence of a new antibacterial peptide is revealed and his mass is found.

Key words: gel-chromatography, division peptides, gel-electrophoreses.

Введение

Широко распространённое использование антибиотиков приводит к быстрому развитию патогенных бактерий, устойчивых к классическим антимикробным препаратам. В связи с этим в последние годы интенсивно изучаются более эффективные антибактериальные средства. Особый интерес представляют антимикробные пептиды, обнаруженные как компоненты неспецифичных врождённых механизмов борьбы с инфекциями у людей, животных и насекомых.

Антимикробные пептиды широко распространены в мире растений и животных. Они выполняют, в качестве составляющих естественной системы защиты [1], контрольную функцию в росте микроорганизмов. Антибактериальные пептиды образуются в различных клеточных типах, в частности, в таких защитных клетках как макрофаги или нейтрофилы, а также в эпителиальных клетках млекопитающих,

насекомых, амфибий и даже растений [1,2]. При инфекции антимикробные пептиды очень быстро активизируются и составляют, как эффективная система защиты, первый защитный барьер против множества незваных гостей: бактерий, грибов, простозоев, вирусов и нематод [3]. В частности, беспозвоночные, в противоположность позвоночным, никакой дополнительной адаптивной иммунной системой не располагают, и тогда антимикробные пептиды берут ключевую функцию в иммунной защите. Экспрессия антимикробных пептидов может происходить как конститутивно, чтобы таким образом служить в качестве предупредительной защиты против инфекций, так и индуцироваться бактериями и соответственно их продуктами (например, липополисахаридами) [4-6].

Антимикробные пептиды могут не только убивать микроорганизмы, а они также обладают способностью к клеточной пролиферации [7], к внутриклеточному матричному производству, и способностью оказывать влияние на излечение ран [4,6,8], ангиогенез [9] и клеточный иммунный ответ [10-12].

С целью поиска нового природного антибактериального пептида как компонента естественной иммунной защиты, объектом нашего исследования стали личинки большой восковой моли *Galleria Mellonella* из семейства огневков (*Pyrallidae*, *Lepidoptera*).

Эксперимент

Материалы и методы исследования. Для проведения эксклюзионной хроматографии колонку (15*0,7см) заполняли катионообменным сефадексом CM-50 и уравнивали цитрат-фосфатным буфером сначала с pH 7.2, затем pH 5.1 (0.15 M). Буферные растворы готовили по методике, представленной в [13]. Элюирование осуществляли, создавая градиент концентрации цитрат-фосфатного буфера (pH 5.1) 0.15 M – 1 M. Детекцию проводили на спектрофотометре ЛОМО СФ-46 при длинах волн 280 и 260 нм. Определение количественное содержания белка проводили по методу Варбурга и Кристиана [14].

В качестве тестового микроорганизма применяли суточный инокулят *E.coli*, выращенный на среде следующего состава: (г/л) пептон – 5 г; глюкоза – 10 г; NaCl – 4.68 г; KCl – 1.49 г; NH₄Cl – 1.07 г; CaCl₂ – 0.44 г; трисгидроксиметиламинометан – 6 г (pH 7.0); K₂HPO₄ – 1.55 г; MgSO₄ – 5 г.

Гель-электрофорез осуществляли в щелочной боратной буферной системе (pH 9.2) в 7.5% полиакриламидном геле, используя реактивы, камеру фирмы «Reanal» и универсальный источник питания УИП-1. В верхний буфер добавляли бромтимоловый синий (маркерный краситель). Первые 30 минут электрофорез проводили при силе тока 100 мА, затем следующие 30 минут при 200 мА. Электрофореграммы окрашивали 0.5% амидочерным В в течение 7 мин и отмывали от избытка красителя 7% уксусной кислотой в течение 29 дней, меняя кислоту каждые 5 дней.

Масс-спектрометрическое исследование проводили на масс-спектрометре MALDI TOF Ultraflex фирмы Bruker Daltonics (азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса до 20 Гц).

Личинки большой восковой моли *Galleria Mellonella* выращивали в лабораторных условиях в ИТЭБ РАН, г. Пущино. Средний вес личинок – 100±20 мг, длина личинок 1.5±0.3 см. Гемолимфу личинок получали, протыкая иглой верхнюю часть брюшка и надавливая на брюшную полость. В собранную гемолимфу помещали кристаллик тиомочевина, используемый в качестве протеазного

ингибитора. К гемолимфе, выделенной из первой партии личинок *Galleria Mellonella*, добавили 0.7 мл 0.15 М цитрат-фосфатного буфера (рН 5.1 ± 0.02). Далее к 2 мл полученных растворов гемолимф добавили 10 мкл твина, а к гемолимфе, выделенной из второй партии личинок *Galleria Mellonella*, добавили 6 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.2 ± 0.02).

Эксклюзионную катионообменную хроматографию осуществляли, нанося на колонку 2 мл раствора гемолимфы личинок первой партии и собирая фракции по по 2.5 мл. У каждой из 14 полученных фракции измерили оптическую плотность при 280 и 260 нм. По результатам данных измерений, определяли концентрацию белка во фракциях. Полученные данные представили в виде хроматограммы (рис.1).

С целью проведения микробиологического тестирования отобрали 6 фракций гемолимфы личинок первой партии с концентрацией белка, превышающей 0,3 мг/мл. Тестирование проводили следующим образом. Бумажные диски $d = 0.6$ см (8 дисков для каждого образца) пропитывали анализируемыми фракциями и помещали на свежие посевы во влажном состоянии. Перед посевом бактерий диски стерилизовали с помощью УФ – бактерицидных ламп. Антибактериальная активность определялась по размерам зон ограниченного роста *E.coli* (наличие единичных точечных колоний или отсутствие колоний) вокруг дисков, пропитанных фракциями гемолимфы. В качестве образцов сравнения для фракций гемолимфы иммунизированных личинок первой партии использовали диски, пропитанные 0.15 М цитрат-фосфатным буфером (рН 5.1), а для раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии – диски, пропитанные 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.2). Посев проводился в микробиологическом боксе на чашки Петри по методу, представленному в [15]. Чашки Петри помещали в термостат на двое суток при 37°C. Результаты обрабатывали методами математической статистики [16]. Из 6 фракций гемолимфы личинок первой 4 фракции (№3, №4, №7 и №8) проявили наибольшую антибактериальную активность. Данные фракции далее были исследованы электрофоретически.

Для проведения электрофореза раствора гемолимфы личинок второй партии, 0.5 мл раствора отцентрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, осадок отбросили и использовали только супернатант. В каждую электрофоретическую ячейку помещали сверху на гель по 0,5 мл пробы, полученной смешением 0.5 мл каждого исследуемого раствора белка с 0,5 мл 40 % раствора сахарозы. Из полученных электрофореграмм вырезали фрагменты геля размером $3 * 4$ мм, содержащие анализируемый белок, и растирали их в гомогенизаторе. Белки из измельченного геля экстрагировали дистиллированной водой (1.5 мл) в течение суток при 40° С. После окончания экстракции гель удаляли центрифугированием. Полученные растворы белков анализировали методом масс-спектрометрии MALDI TOF. В качестве матрицы использовали раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в изопропанолe концентрацией 10мг/мл. Раствор матрицы (0.5-2 мкл) наносили на специальную подложку, затем после испарения растворителя матрицы сверху наносили анализируемый раствор белка. Интервал детектируемых масс составлял 4000-100000 Да. Использовался режим детектирования положительных ионов.

Обсуждение результатов

Продолжая дальнейшую работу по выделению новых антибактериальных пептидов из природных источников, представляется перспективным использование

гемолимфы личинок *Galleria Mellonella*, не подвергавшихся иммунизации, в качестве нового объекта исследования [17]. Исследование антибактериальной активности показало, что гемолимфа личинок *Galleria Mellonella* обладает антибактериальной активностью, что обнаруживалось по достоверному увеличению ширины зон задержки роста *E.coli* по сравнению с контрольными фильтрами, пропитанными буферным раствором, не содержащим бактерицидных компонентов (табл.1).

Таблица 1. **Исследование антибактериальной активности гемолимфы**

Проба	Зона ограничения роста, мм	Зона отсутствия роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Гемолимфа личинок	7.80 ± 0.18	6.70 ± 0.10	$P < 0,01$
0,1 М фосфатный буфер pH $7,2 \pm 0.02$	$5,0 \pm 0,80$		

Из табл. 1 видно, что гемолимфа проявляет антибактериальную активность, поскольку содержит антимикробные компоненты.

С целью выделения антибактериальных факторов гемолимфы личинок *Galleria Mellonella*, следует провести биохимическое разделение раствора гемолимфы методом эксклюзионной ионообменной хроматографии. При выборе метода разделения нужно учесть, что при разделении макромолекул обычно используют модифицированные природные полимеры, которые по ионообменной емкости и другим свойствам обычно более пригодны для этой цели, чем искусственные смолы. Поскольку белки амфотерны и имеют большое число зарядов, часто сгруппированных в виде скоплений, с ними можно обращаться как с катионами или анионами, выбрав значение pH для их ионообменного разделения на одну или несколько единиц выше или ниже изоионной точки или величины pI. В повторяющихся циклах связывания и элюирования используется изменение pH, приводящее к исчезновению ионных групп, т. е. карбоксильных или аминогрупп на молекулах белка или частицах ионообменника. Элюирование можно осуществлять также путем замещения одного иона другим. В связи с этим целесообразно использовать производное декстрана – карбоксиметилсефадекс, который представляет собой катионообменник с pK около 3,5. Для карбоксиметилсефадекса рабочий диапазон pH анионного элюирующего буфера – от 6 до 10. Ионная сила влияет на связывание ионов и, следовательно, на емкость ионообменника. Рекомендуется применять буферы с относительно высокой ионной силой (около 0,1 М), однако их концентрация должна быть несколько ниже, чем та, которая необходима для элюирования нужных ионов. Разделение проводят при pH выше 4. Сорбция происходит эффективно, если pH разделения ниже изоэлектрической точки белка и выше 4. Элюирование осуществляют путем повышения pH или ионной силы.

В соответствии с данными особенностями в нашем случае были подобраны следующие условия разделения: применяли цитрат-фосфатный анионный буфер с ионной силой 0,15 М, сорбция происходила при pH 5,1, элюирование осуществлялось при pH 7,2, при этом повышалась ионная сила подвижной фазы.

Также к особенностям ионообменного процесса на макропористых неподвижных фазах относится то, что наиболее высокомолекулярная фракция элюируется первой вместе с объемом растворителя, заключенного между набухшими гранулами геля и элюирование компонентов белковой смеси происходит в порядке уменьшения их молекулярного веса. А скорость движения белков в

колонке определяется молекулярным весом, формой и химическим строением молекул. В данном случае скорость элюции составила 0,5 мл/мин. В процессе ионообменной хроматографии гемолимфа личинок разделилась на высокомолекулярную (молекулярная масса выше 200 000 Да) и средномолекулярную фракции (молекулярная масса ниже 200 000 Да) и слабо выраженную низкомолекулярную фракцию. Объем выхода высокомолекулярной фракции составил 2,5 мл, а средномолекулярной 8 мл. По-видимому, большая часть белковых компонентов гемолимфы личинок *Galleria Mellonella* обладает средномолекулярным весом. Данные хроматографического анализа представлены на рис. 1.

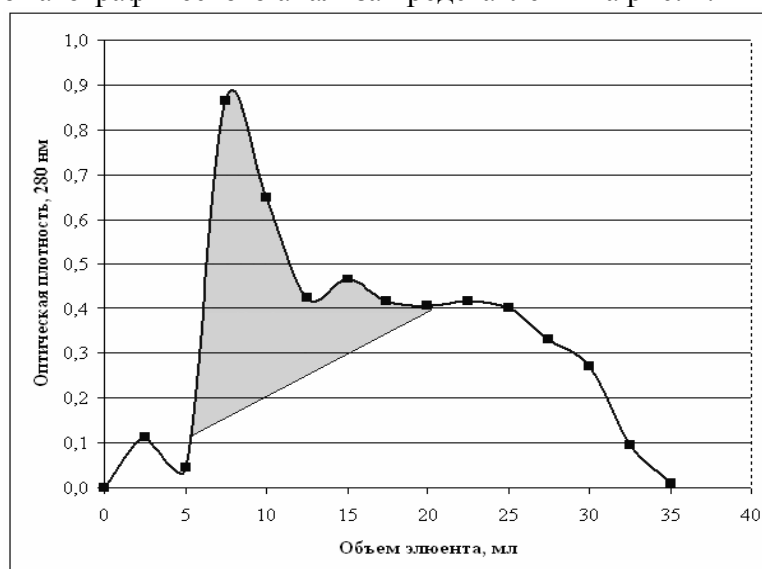


Рис. 1. Ионообменная хроматография раствора гемолимфы личинок *Galleria mellonella* на колонке с сефадексом CM-50 (15x0.7 см).
Заштрихованы фракции №3, №4, №5, №6, №7, №8

С помощью методики Варбурга и Кристиана, проведен расчет количественного содержания белков в каждой из 14 фракций, полученных методом ионообменной хроматографии раствора гемолимфы *Galleria Mellonella*.

Результаты расчета представлены в табл.2.

Таблица 2. Содержание белка во фракциях

Номер фракции	Концентрация белка (мг/мл)
	Фракции из гемолимфы личинок
1	0,06644
2	0,01962
3	0,71071
4	0,52414
5	0,32584
6	0,36431
7	0,33241
8	0,32153
9	0,32937
10	0,31831
11	0,21966
12	0,1411
13	0,0469
14	0,04001

Общее количество полученных белков	3,76035
------------------------------------	---------

Чтобы исследовать наличие антибактериальной активности у фракций гемолимфы личинок провели микробиологическое тестирование. В результате получили достоверные расширения зон задержки роста бактерии *E.coli* в присутствии белковых фракций гемолимфы личинок № 3, 4, 5, 6, 7, 8 (табл.3). Установили, что фракция №3, обладающая наибольшей концентрацией белка, и фракция №8, содержащая наименьшее количество белка, проявляют самую высокую антибактериальную активность (Табл. 3). Выявили, что фракции №4 и №7, также обладают антибактериальной активностью (Табл. 3).

Таблица 3. Исследование антибактериальной активности фракций гемолимфы

№ фракции	Зона отсутствия роста (мм)	Зона ограниченного роста (мм)	Достоверность различий (к контролю)
3	$7,25 \pm 0.07$	$12,00 \pm 0.43$	$P < 0,01$
4	$6,38 \pm 0.20$	$10,94 \pm 0.15$	$P < 0,01$
5	$6,50 \pm 0.00$	-----	$P < 0,01$
6	$6,00 \pm 0.00$	$7,42 \pm 0.26$	$P < 0,01$
7	$6,00 \pm 0.00$	$9,00 \pm 0.28$	$P < 0,01$
8	$6,83 \pm 0.11$	$10,50 \pm 0.72$	$P < 0,01$
0,15 М цитрат-фосфатный буфер pH $5,1 \pm 0,02$	$6,00 \pm 0.00$	$6,86 \pm 0.15$	

Анализ полученных данных показывает, что в гемолимфе содержались вещества, проявляющие антибактериальные свойства.

С целью изучения биологически активных белков и очистки антибактериальных компонентов провели гель-электрофорез растворы гемолимфы личинок второй партии и четырех фракций гемолимфы (№3, №4, №7, №8) первой партии, обладающих по результатам микробиологического тестирования наибольшей антибактериальной активностью (рис.2,3,4).

По-видимому, гемолимфа личинок *Galleria Mellonella* содержала 7 белковых компонентов, различающихся по электрофоретической подвижности, поскольку на электрофореграммах растворов гемолимфы личинок второй партии видны области 7 белковых полос (рис.2). На электрофореграммах фракций №3, №4, №7, №8, полученных из гемолимфы личинок, выявлено 4, 5, 5 и 2 индивидуальных белковых компонентов соответственно (рис.3,4).



Рис.2. Электрофореграммы растворов гемолимфы личинок

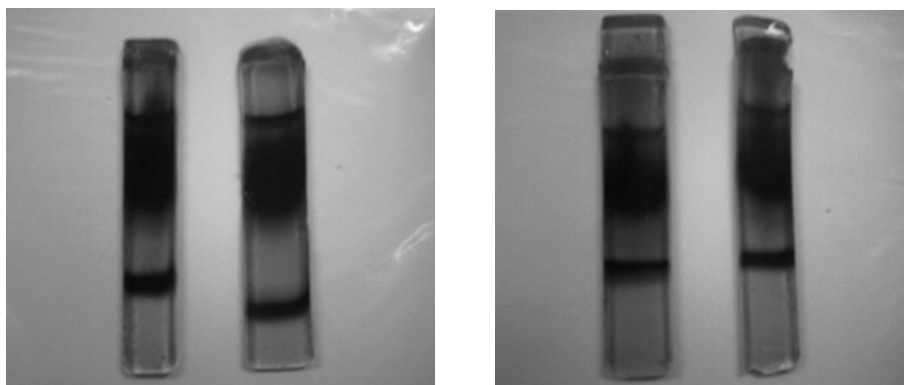


Рис. 3. Электрофореграммы фракций №3 и №4 гемолимфы личинок соответственно

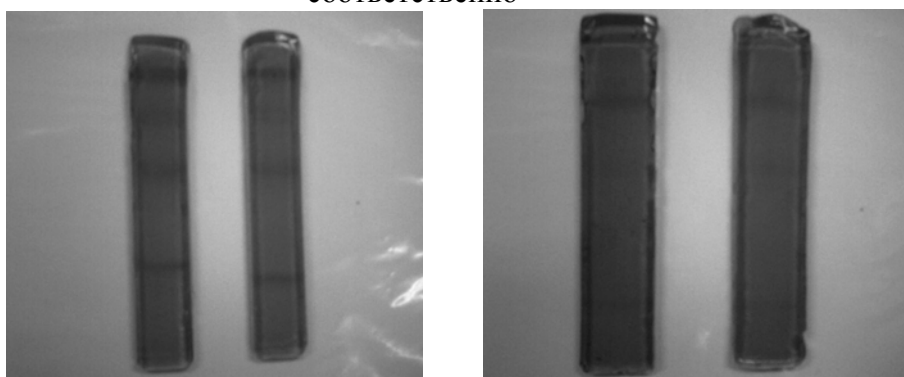


Рис. 4. Электрофореграммы фракций №7 и №8 гемолимфы личинок соответственно

После проведения избирательного экстрагирования разделенных электрофорезом белков из геля полученные растворы белков исследовали методом масс-спектрометрии MALDI TOF.

Масс-спектр второго белка (рис.5) с электрофореграммы фракции № 3 гемолимфы личинок (рис.3) позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5628 Да. Данный белок является антибактериальным, поскольку достоверно увеличивает зоны задержки роста *E.coli* (табл.3).

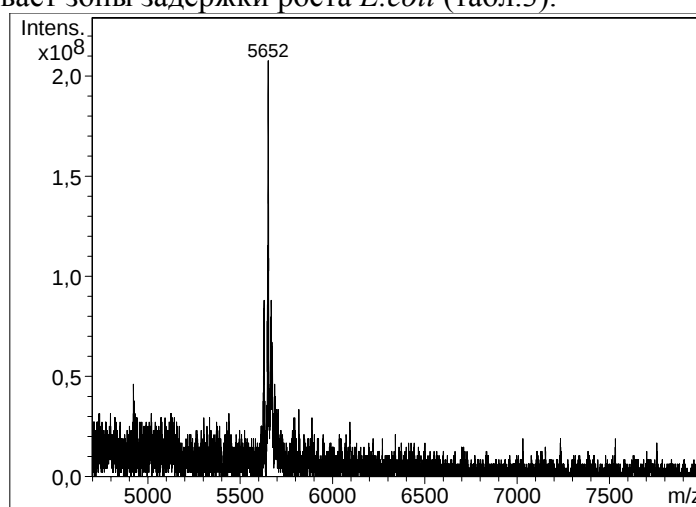


Рис.5. Масс-спектр второго белка фракции № 3 гемолимфы личинок

Масс-спектр третьего белка (Рис.6) с электрофореграммы фракции № 3 гемолимфы личинок (рис.3) позволил оценить его молекулярную массу, которая

составила 5626 Да. Антибактериальные свойства белка подтверждаются достоверным увеличением зоны задержки роста *E.coli* (табл.3) в его присутствии.

Масс-спектр второго белка (рис.7) с электрофореграммы фракции № 4 гемолимфы личинок (рис.3) показал наличие двух белковых компонентов с молекулярными массами 3231 Да и 5628 Да соответственно. Антибактериальные свойства указанных белков подтверждаются достоверным увеличением зоны задержки роста *E.coli* (табл.3) в их присутствии.

Масс-спектрометрический анализ остальных белков фракции не позволил их идентифицировать методом MALDI TOF, так как получались сложные спектры.

На масс-спектре белка фракции № 6 пик молекулярного иона представлен в виде $[M+Na]^+$. Это характерно для метода MALDI TOF, поскольку при его использовании пик молекулярного иона образован в виде $[M]^+$, либо в виде $[M+Na]^+$.

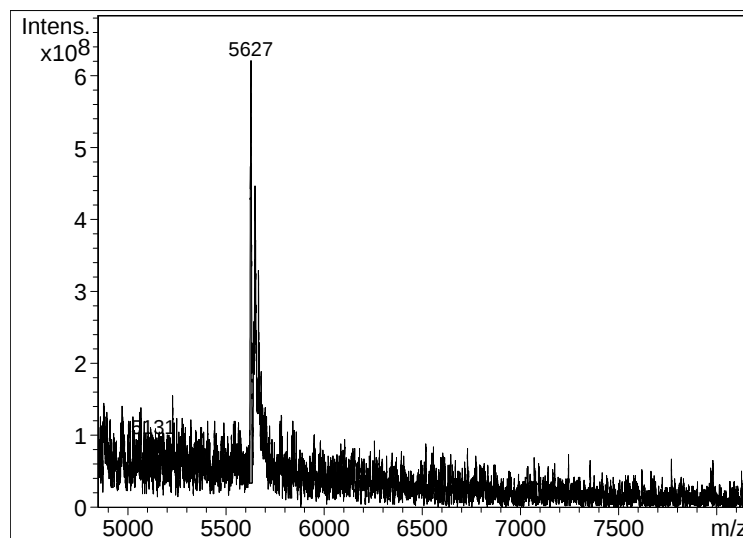


Рис.6. Масс-спектр третьего белка фракции № 3 гемолимфы личинок

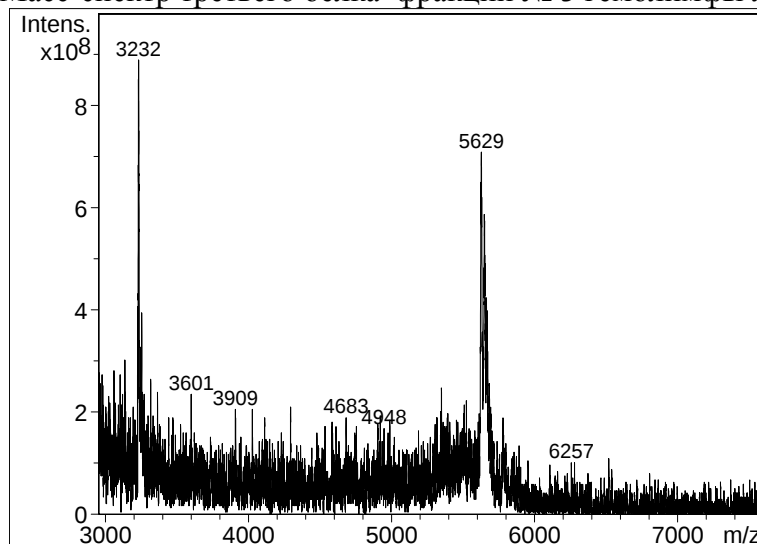


Рис.7. Масс-спектр второго белка фракции № 4 гемолимфы личинок

Микробиологическое тестирование растворов белка, экстрагированных из геля, подтверждает их антибактериальные свойства (табл. 4).

Таблица 3. Исследование антибактериальных свойств растворов белка из гемолимфы личинок *Galleria mellonella*, содержащих пептид с молекулярной массой 5627 Да

Проба	Зона отсутствия роста (мм)	Зона ограниченного роста (мм)	Достоверность различий (к контролю)
Фракция №3 (2-й белок)	6,00 ± 0,00	7,77 ± 0,10	P < 0,01*
Фракция №3 (3-й белок)	6,00 ± 0,00	8,96 ± 0,14	P < 0,01*
Фракция №4 (2-й белок)	6,80 ± 0,15	8,13 ± 0,12	P < 0,01*
Стандарт	6,00 ± 0,00	6,92 ± 0,80	

Изучение биологически активных компонентов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* методом масс-спектрометрии MALDI TOF выявило присутствие антибактериального пептида с молекулярной массой 5627 Да в составе гемолимфы. По-видимому, данный пептид содержится в гемолимфе личинок *Galleria Mellonella* постоянно, а иммунизация насекомого суспензией бактерий *Pseudomonas aeruginosa* лишь увеличивает его содержание [17].

Заключение

С учетом особенностей разделения макромолекул подобраны условия, предполагающие проведение процесса разделения антибактериальных компонентов гемолимфы личинок *Galleria mellonella* методами эксклюзионной ионообменной хроматографии и гель-электрофореза.

Обнаружено присутствие нового антибактериального пептида и найдена его масса.

Таким образом, на основании полученных результатов и данных из научных публикаций представляется возможным использование выделенного биологически активного белкового компонента для дальнейшей разработки на его основе антибактериальных лекарственных препаратов в условиях крупномасштабного биотехнологического производства.

Список литературы

1. Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // Annu.Rev.Immunol. 1995. №13. P. 61-92.
2. Schroder, J. M. Epithelial peptide antibiotics // Biochem.Pharmacol. 1999. №57. P. 121-134.
3. Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // Immunol.Rev. 2004. №198. P. 169-184.
4. Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M., and Bernfield, M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1994. №91. P.11035-11039.
5. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M. A peptide antibiotic from human skin // Nature. 1997. № 387. P. 861.

6. Stolzenberg, E. D., Anderson, G. M., Ackermann, M. R., Whitlock, R. H., and Zasloff, M. Epithelial antibiotic induced in states of disease // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1997. №94. P. 8686-8690.
7. Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Selsted, M. E., and Reid, T. W. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts // J.Cell Physiol.1993. №155. P.408-413.
8. Schroder, J. M. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements // Cell Mol.Life Sci.1999. №56. P.32-46.
9. Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Sellke, F., Carmeliet, P., and Simons, M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis // Nat.Med. 2000. №6. P. 49-55.
10. Huang, H. J., Ross, C. R., and Blecha, F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide // J.Leukoc.Biol. 1997. № 61. P.624-629.
11. Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 // Science. 1999. №286. P. 525-528.
12. Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J. J. (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity // Cell Mol.Life Sci. 2001. №58. P. 978-989.
13. Древаль, В.И. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии / В.И. Древаль, С. А Тумаков, - Куйбышев: Изд-во Куйбышевский университет, 1981 – С. 73.
14. Досон, Р. Справочник биохимика/ Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот/ под ред. К. Джонса. – М.: Мир, 1991. – С. 544.
15. Трещанина, Н.А. Лабораторный практикум по микробиологии / Н.А. Трещанина, – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. Ч.3. – С.38
16. Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: теоретические основы и практикум / Ю.П. Фролов, – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. – С.265.
17. Пурыгин, П.П. Выделение антибактериальных компонентов из гемолимфы личинок *Galleria mellonella* / П.П. Пурыгин, О.С. Срибная, Н.А. Кленова, [и др.] // Вестник СамГУ, 2007. – №9/1 (57). – С.270-286.

Пурыгин Петр Петрович - зав. кафедрой органической химии СамГУ, д.х.н., профессор, тел. 8(846)3345459, Самарский государственный университет

Срибная Олеся Сергеевна - аспирант Самарский государственный университет, Самара

Буряк Алексей Константинович – д.х.н., зав. кафедрой физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХ РАН, 8(495)3301929, Москва,

Purygin Peter P. – head of department of organic chemistry SSU, Doctor of Chemistry, professor, Samara state university, Samara, Russia, E-mail: ppurygin2002@mail.ru

Sribnaya Olesya S. - postgraduate student Samara state university, Samara, Russia, E-mail: elektromodel@mail.ru

Buryak Alexey K. - Doctor of Chemistry, head of department of physical-chemical bases of chromatography and chromato-mass-spectrometry Institute of physical chemistry Russian Academy of Science, Moscow, Russia, E-mail: AKBuryak@ipc.rccci.ru