

П. П. Пурьгин, О. С. Срибная, А. К. Буряк

## АНАЛИЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАКЦИЙ ГЕМОЛИМФЫ ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA*

Самарский государственный университет, Самара, Россия

В работе исследована антибактериальная активность гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*. С помощью ионообменной хроматографии и гель-электрофореза из гемолимфы выделены белковые фракции с антибактериальной активностью. Масс-спектрометрический анализ фракций показал присутствие пептида с массой 5627 Да. По-видимому, данный пептид и определяет антибактериальную активность гемолимфы. Полученные данные позволяют обосновать целесообразность применения препаратов, полученных из личинок *Galleria mellonella*, в медицине, гомеопатии и терапевтической практике.

**Ключевые слова:** иммунитет насекомого, *Galleria mellonella*, MALDI пептидов, гель-электрофорез

Насекомые устойчивы к болезнетворным микробным инфекциям.

Уникальным представителем мира насекомых является большая восковая моль *Galleria mellonella* из семейства огневки. В 1980 г. в гемолимфе иммунизированных личинок *Galleria mellonella* обнаружены 4 неспецифических бактериолизина, представляющих собой основные белки, обладающие лизоцим- и цекропинподобной активностью [1]. Позже были выделены и биохимически охарактеризованы 2 индуцированных антимикробных пептида из гемолимфы личинок *Galleria mellonella*, иммунизированных клетками *Escherichia coli* D31 и *Micrococcus luteus* (1:1) [2].

В настоящей работе представлены результаты выделения неизвестных белковых компонентов, обладающих антибактериальной активностью, из гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*, и проведен анализ этих компонентов методом масс-спектрометрии MALDI TOF.

### Материалы и методы

Для ионообменной хроматографии использовали колонку (15 · 0,7 см), заполненную сефадексом СМ-50. Подготовку колонки осуществляли, промывая ее цитрат-фосфатным буфером сначала с pH 7,2, затем pH 5,1 (0,15 М). Буферные растворы готовили согласно [3]. Элюирование осуществляли, используя градиент концентрации цитрат-фосфатного буфера (pH 5,1) 0,15 – 1 М. Для этой цели 2 сосуда последовательно соединяли между собой посредством сифона. Первый из них присоединялся непосредственно к колонке и играл роль смесителя. Второй служил резервуаром для элюента. Оба сосуда сообщались с атмосферой и имели одинаковую площадь поперечного сечения. Прикапывая раствор из резервуара, состав элюента изменяли в режиме линейного градиента концентраций от концентрации раствора в смесителе до его концентрации в резервуаре.

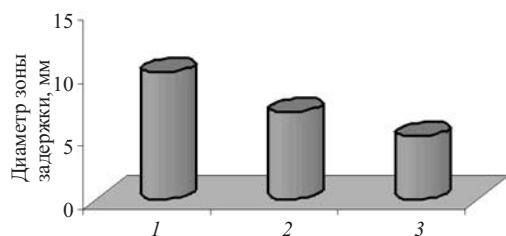
Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре ЛОМО СФ-46. Количественное определение содержания белка во всех фракциях, собранных с колонки, проводили по методу Варбурга и Кристиана [4].

В качестве тестового микроорганизма использовался суточный инокулят *E.coli* М-17, выращенный на среде следующего состава: (г/л) пептон — 5 г; глюкоза — 10 г; NaCl — 4,68 г; KCl — 1,49 г; NH<sub>4</sub>Cl — 1,07 г; CaCl<sub>2</sub> — 0,44 г; трисгидроксиметиламинометан — 6 г (pH 7,0); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,55 г; MgSO<sub>4</sub> — 5 г.

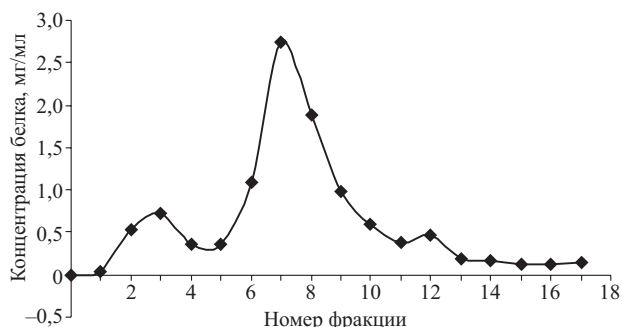
Электрофорез проводили в 7,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной боратной буферной системе (pH 9,2). Для электрофореза использовали реактивы, камеру фирмы “Reanal” и универсальный источник питания УИП-1. В качестве маркерного красителя в верхний буфер добавлен бромтимоловый синий. Первые 30 мин электрофорез проводили при силе тока 100 мА, затем следующие 30 мин при 200 мА. Электрофореграммы окрашивали 0,5 % амидочерным В в течение 7 мин и отмывали от избытка красителя 7 % уксусной кислотой в течение 28 дней, меняя кислоту каждые 4 дня.

Масс-спектрометрический анализ 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* росли на естественном корме, состоящим из перги, прополиса, меда и воска. Иммунизировали личинок из 2 партий. Количество личинок первой партии — 28, второй — 96. Отбирали целых, подвижных особей, находившихся в стадии развития, предшествующей окукливанию. Средний вес личинок составил 100 ± 20 мг, длина личинок 1,5 ± 0,3 см. Каждой личинке была произведена инъекция 5 мкл 1000-кратно разведенной суспензии обработанных нагреванием бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Далее личинки в



**Рис. 1.** Антибактериальная активность гемолимфы: 1 — зона ограничения роста, 2 — зона отсутствия роста, 3 — диаметр диска стандарта сравнения.



**Рис. 2.** Содержание белка во фракциях гемолимфы личинок *Galleria Mellonella*.

течение 48 ч выдерживали в термостате при температуре 28 °С.

Гемолимфу личинок получали, протыкая иглой верхнюю часть брюшка и надавливая на брюшную полость. В собранную гемолимфу помещали кристаллик тиомочевины, используемый в качестве протеазного ингибитора.

Чтобы приготовить гемолимфу личинок первой партии (1,3 мл) к фракционированию, к ней добавляли 0,7 мл 0,15 М цитрат-фосфатного буфера (рН 5,1). В 2 мл полученного раствора гемолимфы добавляли 10 мкл твина и наносили на колонку.

Чтобы приготовить гемолимфу личинок второй партии к фракционированию, к ней добавляли 6 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2). Полученный раствор хранили при температуре – 18 °С.

Ионообменную хроматографию гемолимфы личинок первой партии проводили на колонке, заполненной сефадексом СМ-50. С катионообменной колонки собрали 17 фракций по 2,5 мл. У каждой фракции измерили оптическую плотность при 280 и 260 нм. Полученные данные представили в виде хроматограммы (рис. 2).

Для проведения микробиологического тестирования отбирали 5 фракций гемолимфы личинок первой партии, обладающих концентрацией белка, превышающей 0,7 мг/мл.

Бумажные диски  $d = 0,6$  см (8 дисков для каждого образца) пропитывали анализируемыми фракциями и помещали на свежие посеы во влажном состоянии. Перед посевом бактерий диски стерилизовали с помощью УФ-бактерицидных ламп. Антибактериальная активность определялась по размерам зон ограниченно-

го 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 [6]. Чашки Петри помещали в термостат на 2 сут при 37 °С. Результаты обрабатывали методами математической статистики [7].

По результатам микробиологического тестирования из 5 фракций гемолимфы личинок первой партии для электрофореза были выбраны 2 фракции (№№ 3 и 6), обладающие наибольшей антибактериальной активностью.

Для проведения электрофореза раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии, 0,5 мл ее раствора центрифугировали при 3000 об/мин, осадок отбросили и использовали только центрифугат.

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.

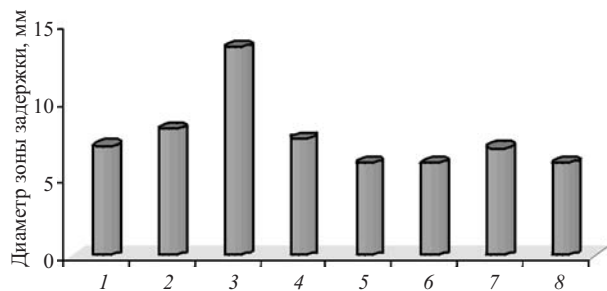
Для каждой фракции гемолимфы личинок первой партии получали по 2 электрофореграммы, а для раствора гемолимфы личинок второй партии по 3 электрофореграммы.

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 1 сут при 40 °С. После окончания экстракции гель удаляли центрифугированием.

Полученные растворы белков анализировали методом масс-спектрометрии MALDI TOF. Чтобы определить уровень шумов, проводили холостой опыт. Для этого повторяли описанную выше процедуру экстракции для фрагмента геля, не содержащего белка. В качестве матрицы использовали раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в изопропанол с концентрацией 10 мг/мл.

**Средние значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных исследуемыми растворами белка из гемолимфы личинок *Galleria mellonella***

Проба	Зона ограничения роста, мм	Зона отсутствия роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Гемолимфа иммунизированных личинок (белок 1)	8,14 ± 0,18*	6,00 ± 0,00	$P < 0,01^*$
Фракция № 6	8,13 ± 0,15*	6,50 ± 0,10	$P < 0,01^*$
Стандарт	6,02 ± 0,80	6,00 ± 0,00	



**Рис. 3.** Антибактериальная активность фракций гемолимфы. Фракция № 3: 1 — первая зона, 2 — зона мелких колоний в виде кольца, 3 — вторая зона; фракция № 6 — 4; фракция № 7 — 5; фракция № 8 — 6; фракция № 9 — 7; стандарт — 8.

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 – 100 000 Да. Использовался режим детектирования положительных ионов.

#### Результаты и их обсуждение

При росте бактерий *E.coli* на питательной среде вокруг фильтров, пропитанных гемолимфой, наблюдали зону отсутствия роста (отсутствие колоний) и зону ограниченного роста (наличие единичных точечных колоний). Исследование антибактериальной активности показало, что гемолимфа иммунизированных личинок обладает выраженной антибактериальной активностью, что обнаруживается по достоверному увеличению ширины зон задержки роста *E.coli* по сравнению с контрольными фильтрами, пропитанными буферным раствором, не содержащим бактерицидных компонентов (рис. 1).

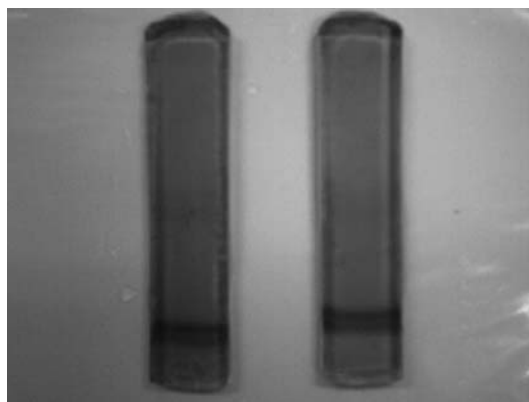
С целью выделения и очистки антибактериальных компонентов была проведена ионообменная хроматография гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*. В процессе ионообменной хроматографии произошло разделение гемолимфы на 3 белковые фракции: высокомолекулярную (молекулярная масса выше 200 000 Да), среднемолекулярную (молекулярная масса ниже 200 000 Да) и низкомолекулярную.

Данные хроматографического анализа представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что большая часть белковых компонентов гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* обладает среднемолекулярным весом. Низкомолекулярная фракция имела незначительную концентрацию белка и не была исследована.

Были получены достоверные расширения зон задержки роста *E.coli* в белковых фракциях гемолимфы № 3, 6, 9 (рис. 3). На основании этого сделано предположение о наличии в данных фракциях компонентов, обладающих бактериостатическим действием.

По результатам микробиологического тестирования установили, что фракция № 3, обладающая наименьшей концентрацией белка из выбранных фракций,



**Рис. 4.** Электрофореграммы фракции № 3.

имеет высокую антибактериальную активность. Данная фракция при микробиологическом тестировании давала 3 четко различающиеся концентрические зоны: зону полного отсутствия роста (1), зону мелких колоний (уменьшение скорости роста), зону единичных, но более крупных колоний (3). Вероятно, наличие нескольких зон связано с многокомпонентностью данной фракции.

Было выявлено, что 2 фракции гемолимфы (№№ 7 и 8), имеющие самые высокие концентрации белка, не обладают антибактериальной активностью.

С целью анализа биологически активных белков и очистки антибактериальных компонентов провели гель-электрофорез раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии и 2 фракций гемолимфы иммунизированных личинок (№№ 3 и 6) первой партии, обладающих по результатам микробиологического тестирования наибольшей антибактериальной активностью (рис. 4 – 6).

На электрофореграммах фракции № 3 отчетливо видны 2 белковые полосы, следовательно, данная фракция содержала 2 белковых компонента.

На электрофореграммах фракции № 6 видна 1 белковая полоса, следовательно, данная фракция содержала 1 белковый компонент (рис. 7).

На электрофореграммах раствора гемолимфы иммунизированных личинок второй партии видны области 5 белковых полос: первые 3 белковые полосы выражены слабо, 2 следующие — ярко.

После избирательной элюции разделенных электрофорезом белков из геля полученные растворы белков анализировали методом MALDI TOF (рис. 7, 8).

Масс-спектр белка 1 (рис. 6) с электрофореграммы гемолимфы иммунизированных личинок позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5626 Да. Данный белок является антибактериальным, поскольку достоверно увеличивает зоны задержки роста *E.coli* (табл. 1).

Масс-спектр белка фракции № 6 позволил оценить его молекулярную массу, которая составила 5627 Да. Антибактериальные свойства белка подтверждаются достоверным увеличением зоны задержки роста *E.coli* (табл. 1) в его присутствии.

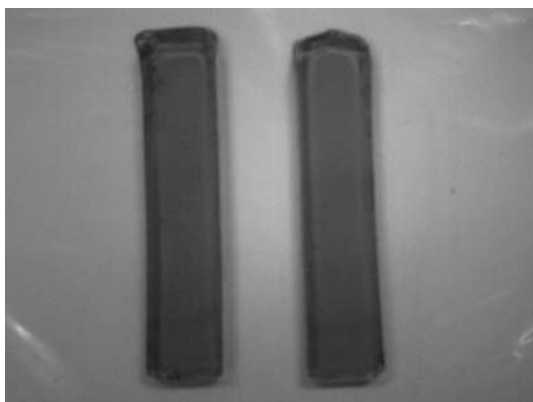


Рис. 5. Электрофореграммы фракции № 6.

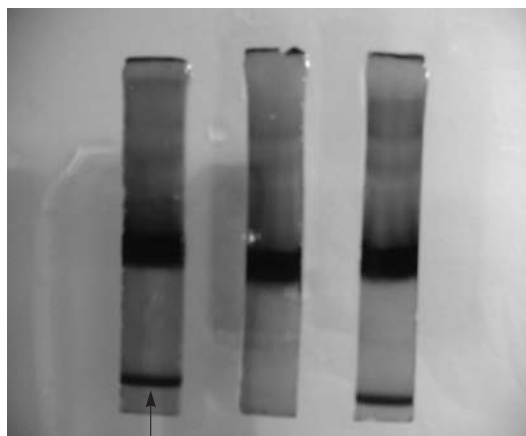


Рис. 6. Электрофореграммы раствора гемолимфы иммунизированных личинок.

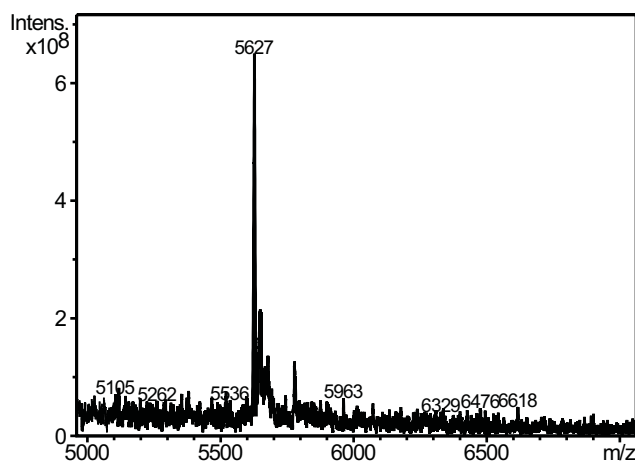


Рис. 7. Масс-спектр белка 1 гемолимфы иммунизированных личинок.

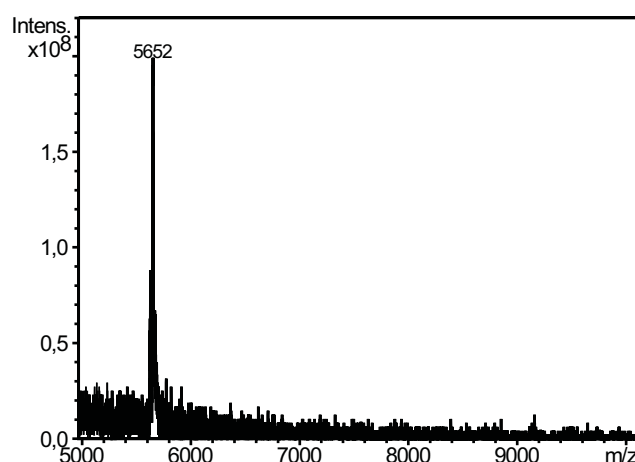


Рис. 8. Масс-спектр белка фракции № 6.

Масс-спектрометрический анализ фракции № 6 и белков гемолимфы иммунизированных личинок выявил единую природу антибактериальных белковых компонентов из гемолимфы иммунизированных личинок, полученных разными способами.

Масс-спектрометрический анализ 2 белков фракции № 3 не позволил их идентифицировать методом MALDI TOF, так как получился сложный спектр. Предполагается применить другие методы для уточнения, поскольку использование только масс-спектрометрических данных не достаточно.

Микробиологическое тестирование растворов белка, экстрагированных из геля, подтверждает их антибактериальные свойства (табл. 1).

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  $[M + Na]^+$ .

Таким образом, получены достоверные значения расширения зон задержки роста *E.coli* в гемолимфе иммунизированных личинок *Galleria mellonella* и ее

белковых фракциях. На основании чего сделано предположение о наличии в данных объектах компонентов, обладающих бактериостатическим действием.

Установлено, что в процессе ионообменной хроматографии произошло разделение гемолимфы на 3 белковые фракции: высокомолекулярную, средномолекулярную и низкомолекулярную. Показано, что большая часть белковых компонентов гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* обладает средномолекулярным весом. Масс-спектрометрический анализ позволил обнаружить в гемолимфе иммунизированных личинок *Galleria mellonella* новый антибактериальный пептид. Методом MALDI TOF установлена молекулярная масса данного пептида — 5627 Да. В работе были обнаружены и выделены белковые компоненты, обладающие значительной антибактериальной активностью, и которые в дальнейшем могут быть использованы для лечения бактериальных инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. J. Jarosz, *Biol. Zbl.*, **98**, 459 – 471 (1979).

2. P. Mak, D. Chmiel, G. J. Gacek, *J. Acta Biochim. Polonica*, No. 4, 1191 – 1195 (2001).
3. В. И. Древаль, С. А. Тумаков, *Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии*, Изд-во Куйбышевский университет, Куйбышев (1981), с. 73.
4. Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, *Справочник биохимика*, Мир, Москва (1991), с. 544.
5. J. M. Stephens, *Can. J. Microbiol.*, No. 8, 597 – 602 (1962).
6. Н. А. Трещанина, *Лабораторный практикум по микробиологии*, Изд-во СамГУ, Ч. 3., Самара (1997), с. 38.
7. Ю. П. Фролов, *Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: теоретические основы и практикум*, Изд-во СамГУ, Самара (1997), с. 265.

Поступила 02.06.08

## ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HEMOLYMPH FRACTIONS FROM IMMUNIZED *GALLERIA MELLONELLA* LARVAE

P. P. Purygin, O. S. Sribnaya, and A. K. Buryak

Samara State University, Samara, Russia

The antibacterial activity of hemolymph fractions isolated *Galleria mellonella* larvae has been studied. Protein fractions possessing antibacterial activity were obtained using ion-exchange chromatography and gel electrophoresis techniques. MALDI-TOF mass-spectrometric analysis of these fractions showed the presence of a peptide with a molecular mass of 5627 Da, which probably accounts for the antibacterial activity of the hemolymph. The obtained data confirm the expediency of using *Galleria mellonella* larvae hemolymph preparations (including homeopathic drugs) in medicine.

**Key words:** insect immunity, *Galleria mellonella*, MALDI of peptides, gel-elektroforez.