

9. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М., Мир, 1989. 399 с.
10. Лопаткин А.А. Теоретические основы физической адсорбции. М.: Изд-во Моск. ун-та. 1983. 344 с.
11. Katz E.D., Ogan K., Scott R.P.W. Distribution of a solute between two phases: The basic theory and its application to the prediction of chromatographic retention // J.Chromatogr., 1986. V.352. P.67-90.
12. Dolgonosov A.M. Calculation of adsorption energy and Henry law constant for nonpolar molecules on a nonpolar uniform adsorbent // J. Phys. Chem. B. 1998. V.102, No.24. P.4715-4730.
13. Долгоносов А.М. Энергия и площадь молекул, адсорбированных на однородном адсорбенте // Доклады РАН. 1998. т.358, №3. с.355-359.
14. Долгоносов А.М. Модель неоднородного электронного газа и теория обобщенных зарядов для описания межатомных сил и адсорбции. М.: Книжный дом ЛИБРОКОМ. 2009. 176 с.

Долгоносов Анатолий Михайлович —
д.х.н., вед. научный сотрудник, лаб.
сорбционных методов, ГЕОХИ РАН, Москва

Dolgonosov Anatoly M. — Dr.Sc.Chem.,
Lead. research sci., Lab. of sorption methods,
GEOKHI RAS, Moscow, e-mail:
amdolgo@mail.ru

УДК 519.999

Хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое исследование пептидов большой восковой моли

Пурыгин П.П., Срибная О.С., Кленова Н.А.

Самарский государственный университет, Самара

Буряк А.К., Парамонов С.А.

Институт физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН, Москва

Литвинова Е.Г.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино

Серебрякова М.В.

Институт физико-химической медицины РАМН, Москва

Поступила в редакцию 12.01.2010 г.

Аннотация

В работе изучено изменение пептидного состава гемолимфы *Galleria mellonella*, вызванного иммунизацией микроорганизмами, методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Установлено, что в результате иммунного ответа появляется множество новых пептидных компонентов, не описанных ранее для данного организма. В составе гемолимфы гусениц идентифицированы также известные антимикробные пептиды. В антибактериально активных фракциях изученных гемолимф обнаружены неизученные пептиды, представляющие интерес для исследований, направленных на изучение иммунного ответа и врожденного иммунитета у насекомых.

Ключевые слова: *Galleria mellonella*, масс-спектрометрия пептидов, иммунитет насекомых

We studied the change in peptide composition of haemolymph *Galleria mellonella*, induced immunization microorganisms, methods of liquid chromatography and mass spectrometry. Established that as a result of the immune response there is a lot of new peptide components that were not previously described for this organism. In the hemolymph of caterpillars were identified as known antimicrobial peptides. In the antibacterial activity of the fractions studied hemolymph detected unstudied peptides of interest for studies aimed at studying the immune response and innate immunity in insects.

Keywords: *Galleria mellonella*, MALDI TOF peptides, immunity of insects

Введение

В настоящее время остро стоит вопрос устойчивости патогенных бактерий к классическим антибиотикам. Поиск более эффективных антибактериальных средств является актуальной задачей современной химии, биологии и медицины [1-3]. Особый интерес представляют антимикробные пептиды, обнаруженные как компоненты неспецифичных врождённых механизмов борьбы с инфекциями у людей, животных и насекомых [4-6]. Решение одной из наиболее актуальных задач протеомного анализа (пептидомики): идентификации интересующих пептидов среди многообразия белков клетки – возможно лишь при использовании совокупности физико-химических методов. Поиск пептидов осуществляется путем разделения смеси на фракции с целью выделения пептидных продуктов в чистом или обогащенном виде для масс-спектрометрического анализа, в результате которого устанавливается молекулярная масса пептидных продуктов. Совпадение найденной массы с массой интересующего пептида является достаточным доказательством того, что данный пептид синтезируется в организме. [7]. Возможность использования хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, как и в исследовании пептидов с известной структурой, так и при обнаружении ранее не описанных, существенно облегчает их поиск в сложных смесях, поскольку позволяет проводить фракционирование целенаправленно и значительно сокращает продолжительность и трудоёмкость протеомного анализа [8-9]. В связи с этим представляет интерес исследование хроматографически полученных пептидных фракций с использованием масс-спектрометрии матрично-активационной лазерной десорбции / ионизации.

Целью данной работы являлось: применение совокупности хроматографических и масс-спектрометрических методов для изучения природных биологически-активных пептидов большой восковой моли и идентификации новых пептидных продуктов, индуцированных в ответ на микробную инфекцию.

Эксперимент

Реактивы: ацетонитрил (фирмы Aldrich (США) с чистотой (HPLC-gradient grad) для градиентного элюирования ВЭЖХ, с минимальным количеством примесей в ацетонитриле, что подтверждено газовой хроматографией 99,9% (Minimum assay (G.C.) 99,9%)); ТФУ (трифторуксусная кислота фирмы Alfa Aesar (Германия) с чистотой 99%); тридистиллированная вода, дополнительно очищенная методами Sub Boiling или на фильтрах Millipore (Milli-P QG, Waters); 2,5-дигидроксibenзойная и α -циано-4-гидроксикоричная кислоты (фирмы Bruker Daltoniks (Германия), 10 мг/мл.

Оборудование: жидкостный хроматограф Agilent 1200 Series фирмы Agilent Technologies (США), диодно-матричный детектор Agilent 1200 Series Diode Array and Multiple Wavelength (DAD), детектор флуоресценции Agilent 1200 Series (FLD); Систему кондиционировали 30 минут. Детектирование DAD (длины волн 210, 220, 224, 280 нм) и FLD (285 нм – возбуждение, 345 нм – эмиссия). Спектр регистрировали в диапазоне 190 – 400 нм. MALDI-времяпролетный масс-спектрометр Ultraflex II Bruker фирмы Bruker Daltoniks (Германия).

Пробоподготовка: Личинки иммунизировали суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*, вводя в брюшную полость каждой особи по 5 мкл двукратно разведенной в физиологическом растворе суспензии (всего 32 особи). Далее личинки выдерживали в термостате при 28 °С на естественном корме. Спустя 24 часа из 16 выживших личинок получили гемолимфу, растворяя её в равном объеме антикоагулянта, содержащего 0,04 М цитратный буфер pH 4,5, 0,186 М хлорид натрия, 0,017 М ЭДТА и 0,002 М тиомочевину. Затем центрифугировали при 700 g 10 минут и отбирали супернатант. Контрольную группу из 16 личинок выдерживали в термостате при 28 °С и получили гемолимфу таким же образом. К полученным и в том и другом случае образцам добавили по 5 мкл тритона X-100. Хроматографировали образцы всех полученных гемолимф и собирали фракции в режиме On Line. Объем петли составлял 20 μ л.

Образцы MALDI готовили на мишенях AnchorChip с размером лунок 600 мкм в тонком слое α -циано-4-гидроксикоричной кислоты или 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, используемых в качестве матрицы. Раствор матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в изопропанолe концентрацией 10мг/мл) наносили на мишень в количестве 0,5-2 мкл, затем после испарения растворителя матрицы сверху наносили анализируемый раствор белка. Также на мишени смешивали по 10 мкл образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20 % ацетонитриле в воде с 0,5 % ТХУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Колонка для жидкостной хроматографии: размеры колонки Zorbax Eclipse XDB-C18 (длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм), фирма Agilent Technologies (США), диаметр частицы 5 μ м, диаметр поры 80 А, температура колонки 25 °С. Подвижная фаза: А – 0,1 % ТФУ (v/v) (pH=2), В – ацетонитрил, С – 0,07% ТФУ(pH=3), скорость потока 0,7 мл/мин; программа градиента: 0-20 мин. – 7-100% В, 20-30 мин. – 100% В, 30-35 мин. – 100-7% В. Свободный объем колонки определяли, используя нитрит натрия.

Масс-спектрометрия: система ввода off-line, постколоночное смешивание с матрицей. Источник: азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса до 20 Гц. Энергия ионизации 110 кДж.

Массовый анализатор: линейный и рефлекторный режим, разрешение (чувствительность 10^{-15} моль) и массовый диапазон 0-250 кДа.

Антимикробный тест. В качестве тестового микроорганизма использовался суточный инокулят *E.coli* и *Bacillus cereus*. 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 ограниченного роста *E.coli*, *Bacillus cereus* (наличие единичных точечных колоний или отсутствие колоний) вокруг дисков, пропитанных фракциями гемолимфы. Посев проводился в микробиологическом боксе на чашки Петри по методу, представленному в [10]. Чашки Петри помещали в термостат на сутки при 37°C. Результаты обрабатывали методами математической статистики [11].

Обсуждение результатов

Обоснование выбора реагентов и методов исследования

В качестве неподвижной фазы был выбран пористый сорбент Zorbax Eclipse XDB-C18, специально разработанный для хроматографического разделения смесей соединений при средних значениях рН (2-9) и имеющий хроматографически однородную и полностью гидрофобную поверхность.

Для более эффективного обнаружения пептидов в элюате применяли многоканальное детектирование и сканирование спектра в диапазоне 190 – 400 нм, так как максимум поглощения пептидной связи наблюдается при 190 нм, а при 400 нм имеют максимум поглощения гемоцианины. Следует отметить, что использование диодно-матричного детектора в сочетании с детектором флуоресценции является неразрушающим методом анализа, что очень важно при работе с биохимическими объектами.

Образцы гемолимф содержали неионный детергент тритон X-100 как солюбилизирующий агент. Солюбилизирующие химические агенты разворачивают белковую глобулу с сохранением индивидуальной для каждого белка последовательности аминокислотных остатков. Процедура солюбилизации унифицирует структурное состояние белка, предотвращает образование агрегатов и пептидных олигомеров, устраняет межбелковые гидрофобные взаимодействия. Данный детергент не несёт заряда и поэтому не смещает изоэлектрическую точку белков.

Хроматография и масс-спектрометрия

С целью наиболее полного исследования состава гемолимфы фракционирование проводили многократно в заданных условиях градиента, каждый раз отбирая фракции в соответствии с изучаемым параметром. Хроматографическое разделение компонентов образцов супернатантов после обработки ТХУ гемолимф контрольной группы личинок и группы личинок, иммунизированных *E. coli* и *Bacillus cereus* представлено на обзорных хроматограммах (Рис. 1).

Анализ трехмерных изображений позволил выявить изменение состава гемолимфы, вызванное возникновением иммунного ответа. По результатам сравнительного исследования сигналов можно предположить (предвидеть) возникновение сигналов новых веществ пептидной природы или усиление (исчезновение) сигналов, характерных для гемолимфы контрольной группы гусениц в диапазоне времени 5-11 минут. Различия присутствуют также во временном диапазоне 1,7-5 минут, в котором элюируются слабоудерживаемые компоненты. Для оценивания степени вклада составляющих раствора антикоагулянта (цитрат-анион, ЭДТА, тиомочевина) в интенсивность сигналов данного диапазона провели хроматографирование 5 мкл образца антикоагулянта. Здесь также следует отметить, что мертвое время колонки, измеренное в установленных условиях градиента

ацетонитрила, составило $1,8 \pm 0,5$ мин. Таким образом, можно предположить, что высокая оптическая плотность в данном диапазоне обусловлена совокупностью факторов: присутствием составляющих антикоагулянта (время удерживания 1,8;2,1); наличием в составе образца гемолимфы низкомолекулярных компонентов, имеющих максимумы поглощения 210-240 нм; присутствием в данном диапазоне соединений пептидной природы, связанным с прохождением хроматографического процесса по эксклюзионному механизму на макропористом сорбенте с размером пор 80 Å, что подтверждается сигналами соединений с временами удерживания, соответствующими элюированию неудерживаемых компонентов, а также характерным для белков и пептидов видом спектра и масс-спектрометрическим анализом (Рис.1 и Табл.2).

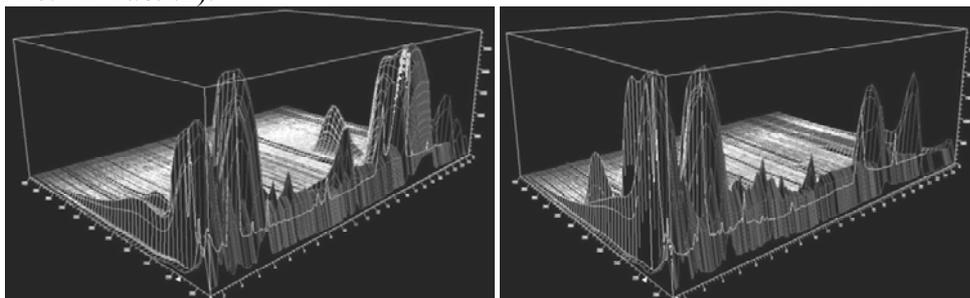


Рис. 1. а) Трехмерная хроматограмма супернатанта гемолимфы контрольной группы личинок. б) Трехмерная хроматограмма супернатанта гемолимфы группы иммунизированных личинок. Ось X-время удерживания, мин; ось Y-длина волны, нм; ось Z- степень поглощения, mAU

Исходя из общих представлений о хроматографировании сложной смеси пептидов и данных сравнительного анализа, мы предположили, что интересующие нас антибактериально активные пептиды будут элюироваться при градиенте ацетонитрила 15-60%, вследствие этого нами были отобраны фракции поминутно в диапазоне 5-11 мин (Рис.2) при разделении образцов гемолимф иммунизированных и неиммунизированных личинок. Далее полученные фракции были сконцентрированы и протестированы на наличие антибактериальной активности по отношению к грамотрицательной бактерии *E. coli* и грамположительной бактерии *Bacillus cereus*. Результаты представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что гемолимфа гусениц обладает собственной антибактериальной активностью против грамположительных бактерий (фракция 4) и слабовыраженной антибактериальной активностью против грамотрицательных бактерий (фракции 1,4,5). Иммунизация приводит к экспрессии антимикробных пептидов, присутствующих во фракции 2 гемолимфы иммунизированных личинок, обладающей высокой активностью против *Bacillus cereus* (соответствующая фракция гемолимфы неиммунизированных личинок вообще не проявляла активности), в то же время фракция 4 гемолимфы иммунизированных личинок содержит меньшее количество компонентов антибактериально действующих против *Bacillus cereus*, чем соответствующая фракция гемолимфы неиммунизированных личинок. Также в результате индукции антимикробных пептидов увеличилась антибактериальная активность против *E. coli* у фракции 1 и образовалась новая группа антимикробных компонентов, содержащихся во фракции 2. Таким образом, обработка бактериями приводит к изменению состава гемолимфы: появлению новых антибактериальных компонентов во фракциях, увеличению или уменьшению количества присутствующих ранее антимикробных компонентов. По-видимому, содержащиеся

в гемолимфе неиммунизированных гусениц антибактериальные компоненты не носят специфического характера.

Таблица 1. Значения зон задержки роста *Bacillus cereus* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после ВЭЖХ супернатанта гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*

Проба	Зона ограничения роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Фракция 2 (6-7 мин)	14,4 ± 3,3	P < 0,01
Фракция 4 (8-9 мин)	7,8 ± 0,9	P < 0,01

Значения зон задержки роста *Bacillus cereus* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после ВЭЖХ супернатанта гемолимфы личинок

Проба	Зона ограничения роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Фракция 4 (8-9 мин)	10,8 ± 1,9	P < 0,01

Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после ВЭЖХ супернатанта гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*

Проба	Зона ограничения роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Фракция 1 (5-6 мин)	10,1 ± 0,1	P < 0,01
Фракция 2 (6-7 мин)	9,5 ± 0,1	P < 0,01

Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после ВЭЖХ супернатанта гемолимфы личинок

Проба	Зона ограничения роста, мм	Достоверность различий (к контролю)
Фракция 1 (5-6 мин)	7,3 ± 0,4	P < 0,01
Фракция 4 (8-9 мин)	7,0 ± 0,5	P < 0,01
Фракция 5 (9-10 мин)	7,83 ± 1,1	P < 0,01

Дополнительно было получено 14 фракций при разделении образца гемолимфы иммунизированных личинок. Фракции 3 (RT=2,8), 4 (RT=2,9-3), 6 (RT=5,8), 7 (RT=6,4-6,6), 8 (RT=8,9) проанализированы масс-спектрометрически (Табл.2). Обнаружено, что в данных фракциях содержится смесь пептидов. Фракции 3 и 4 с близкими временами удерживания, характеризующими слабоудерживаемые компоненты, содержат по 8 пептидов, из которых 7 идентичны. По «отпечаткам пальцев» возможно идентифицировать в составе данных фракций следующие компоненты: пептиды с массами 3035 Да (фрагмент Proline-rich antimicrobial peptide 2), 4031 Да (фрагмент регулятора транскрипции ДНК fork-head DNA-binding domain SGF1/FKH homolog), 4929 Да (Proline-rich antimicrobial peptide 2) [12,13], 5380 Да (фрагмент Inducible serine protease inhibitor 1). На масс-спектре представлены их молекулярные ионы в протонированном и катионизированном состоянии (4064 Да). Остальные пептиды, содержащиеся во фракциях 3 и 4, не описаны ранее для данных гусениц.

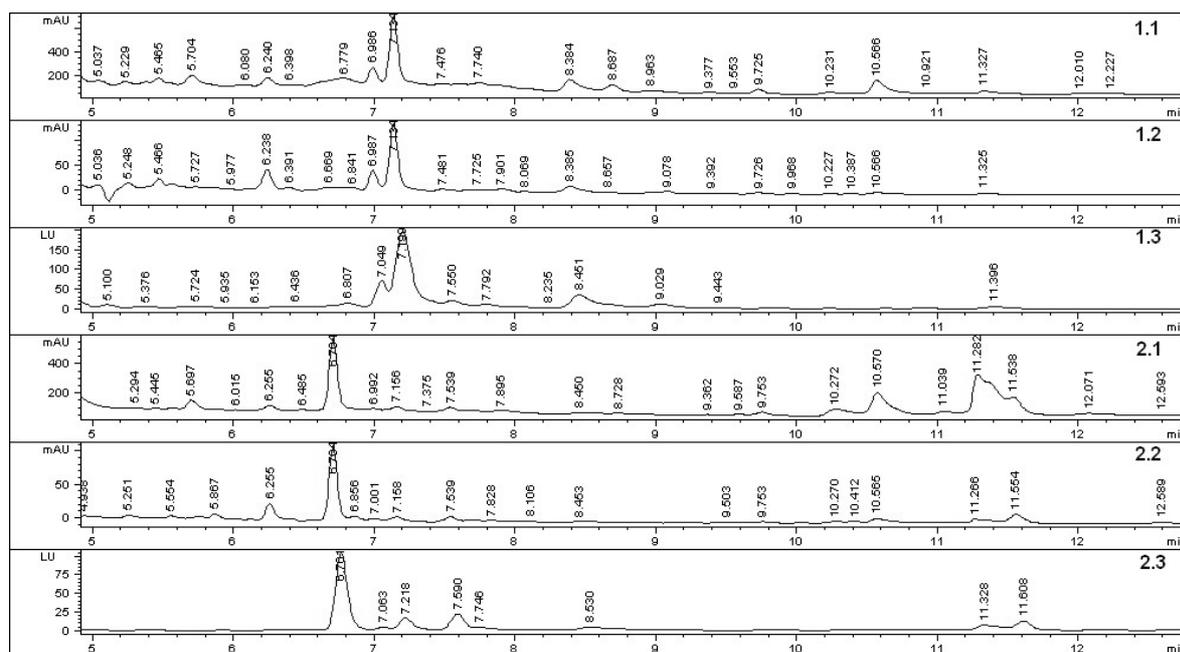


Рис. 2. Сравнение хроматограмм гемолимфы иммунизированных и контрольных гусениц. Ось X-время удерживания, мин; ось Y- степень поглощения, mAU; интенсивность света (флуоресценции), LU. Хроматограмма гемолимфы иммунизированных гусениц: 1.1-1.3 (1.1 – сигнал 224 нм, 1.2 – сигнал 280 нм, 1.3 – сигнал детектора флуоресценции). Хроматограмма гемолимфы контрольных гусениц: 2.1-2.3 (2.1 – сигнал 224 нм, 2.2 – сигнал 280 нм, 2.3 – сигнал детектора флуоресценции)

Согласно таблице 1 фракции 6, 7, 8 могут содержать антимикробные компоненты, поскольку времена удерживания отобранных компонентов входят во временные диапазоны, компоненты которых были протестированы микробиологически и являются наиболее интенсивными сигналами в данном диапазоне. По-видимому, во фракции 6 могут содержаться пептидные компоненты, активные против *E. coli*, во фракции 7 – против *E. coli* и *Bacillus cereus*, во фракции 8 – против *Bacillus cereus*. Масс-спектрометрический анализ данных фракций показал, что фракция 6 содержит 10 мажорных пептидных компонентов, из которых, по-видимому, только один описан в литературе - 4773 Да (фрагмент Flavin-binding storage protein 4770 Да), фракция 8 – 4 пептида, из которых известен пептид 6980 Да (Anionic antimicrobial peptide 2), для которого наблюдается двузарядный катион анионного пептида (6980 Да) с отношением m/z 3491 (Табл.2).

Фракция 7 представляет наибольший интерес, т. к. не содержит известных пептидов и может проявлять активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. В связи с этим произведено хроматографирование фракции 7 (RT=6,4-6,6) и отобрано 7 фракций. (Рис.3). Для данной фракции использовали более растянутый градиент: 0-20 мин – 15-50 % В, 20-23 мин – 50-80 % В. Отобранные фракции были масс-спектрометрически проанализированы и в результате такого анализа в полученных фракциях 4 (RT=7,6-7,7) и 7 (RT=20,6-21,1) обнаружены неизвестные для данного организма пептиды 6484 Да и 3613, 5036, 4234, 18095 Да, соответственно. Для остальных фракций масс-спектрометрический анализ не позволил получить масс-спектры.

Для сравнения проведено хроматографирование фракции 14 (RT=19,6). – отобрано 6 фракций. Фракции 2(RT=2,2-2,4), 5(RT=16,5-16,9), 6(RT=20,4-20,5),

полученные из фракции 14, проанализированы масс-спектрометрическим методом. Среди проанализированных компонентов не обнаружено известных.

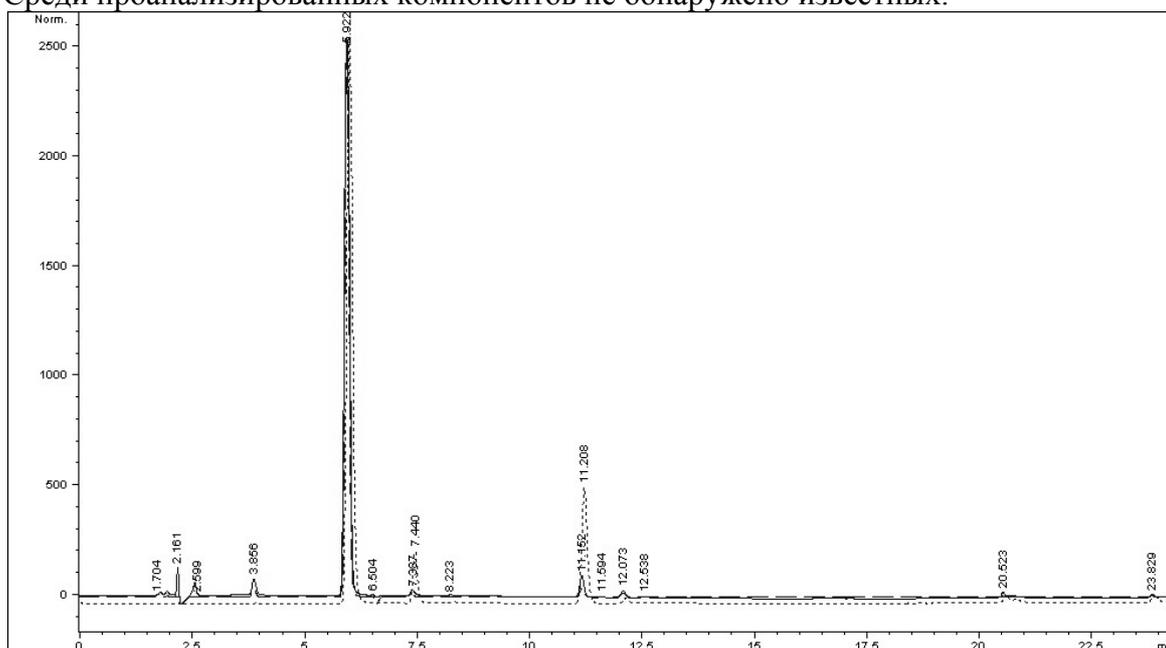


Рис. 3. Хроматограмма, полученная хроматографированием фракции 7 (RT=6.2-6.8). Ось X-время удерживания, мин; ось Y- степень поглощения, mAU; интенсивность света (флуоресценции), LU. Сплошная линия – сигнал 224 нм, прерывистая линия – сигнал 280 нм, пунктирная линия– сигнал детектора флуоресценции

После проведения многостадийного хроматографирования обнаружено, что все полученные фракции содержали смесь пептидов. Такое хроматографическое поведение может быть обусловлено рядом факторов: близкими адсорбционными характеристиками биомолекул и степенью их гидрофобности, химическим сродством к другим молекулам, образованием пептидных ассоциатов, а также вкладом межмолекулярного взаимодействия малых и больших пептидов. Следующие особенности макромолекул могут также оказывать существенное влияние на протекание хроматографического процесса: лабильность, обусловленная третичной структурой; полиэлектролитный характер, приводящий к многоточечному контакту при ионных взаимодействиях; наличие центров сорбции и чередования гидрофильных и гидрофобных участков на поверхности биополимеров; вероятность денатурации в результате воздействия элюента или сжатия под высоким давлением, приводящей к увеличению объема макромолекулы и доступности гидрофобных участков и как следствию – многоточечной сорбции. Учитывая данные обстоятельства, а также сложный состав исходного субстрата необходимо стремиться к улучшению разделения путем уменьшения скорости элюции для увеличения времени установления равновесия обмена между фазами.

К особенностям хроматографии можно также отнести несоответствие сигналов оптической плотности фракций элюата и содержания пептидов в указанных фракциях. В связи с этим в составе гемолимфы можно предполагать наличие низкомолекулярных соединений, обеспечивающих жизнедеятельность гусениц: минеральные соединения, питательные вещества, гормоны, моносахариды и дисахариды, нуклеотиды и нуклеозиды аминокислоты, жирные кислоты. По-

видимому, данные соединения также хроматографируются в заданных условиях и вносят вклад в степень поглощения элюата.

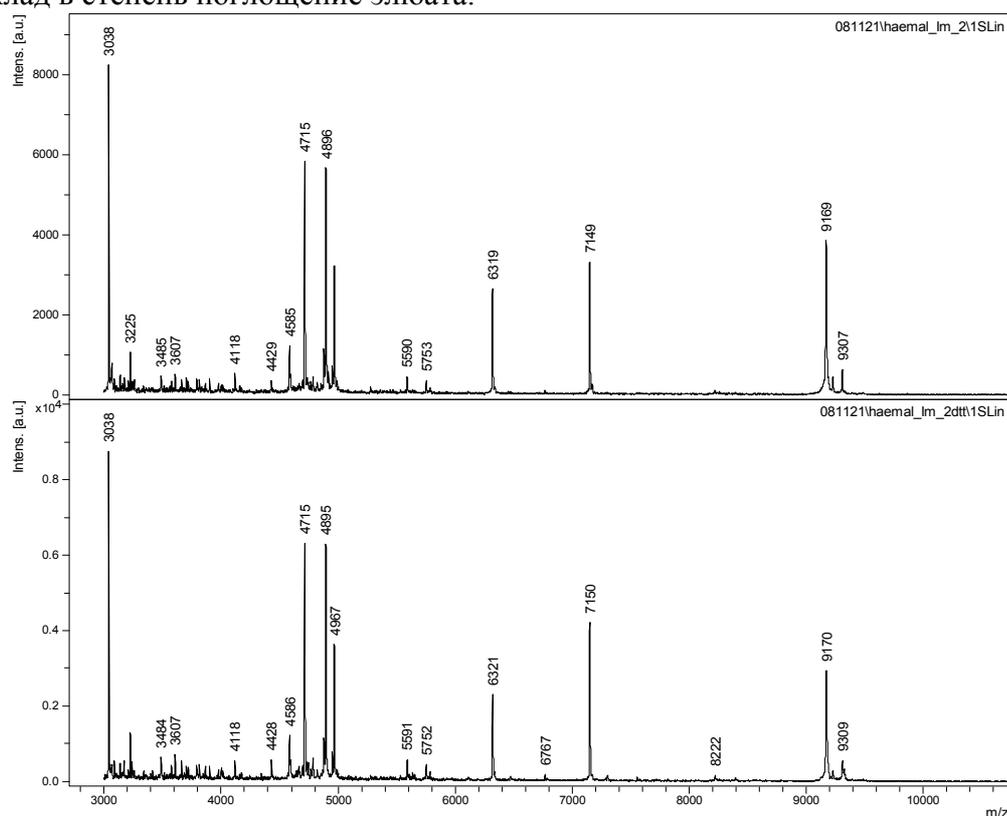


Рис. 4. Фракция 2 гемолимфы иммунизированных личинок.
Масс-спектры получены в линейном режиме

Для дальнейшего сравнительного масс-спектрометрического исследования компонентов гемолимфы гусениц дополнительно были отобраны в процессе хроматографирования фракции в диапазонах времени: 6,3-9,9 (2), 10,0-12,5 (3) – в случае гемолимфы иммунизированных гусениц, и 6,7-7,1 (5); 7,7-8,1 (6); 11,4-11,9 (7) – случае гемолимфы контрольной группы гусениц. Согласно данным микробиологического тестирования фракции 2 и 6 могут содержать антимикробные компоненты, активные против грамположительных и грамотрицательных бактерий (Табл.2).

На масс-спектре фракции 2 (Рис.4) представлен спектр пептидов с диапазоном масс 1-10 кДа. Из описанных ранее можно выделить лишь пептиды с массами 1651 Да (фрагмент Secorpin-D-like peptide), 2133 Да (фрагмент Aroliporphorin-3) 2934, 3035 Да (фрагменты Proline-rich antimicrobial peptide 1), 4714 Да (*Galleria defensin*) [12].

Фракция 3 (Рис.5) содержит меньшее количество пептидов, из них известен 6978 Да (Anionic antimicrobial peptide 2, представлен с двухзарядным катионом 3490 Да), 4714 Да (*Galleria defensin*), 7915 (M+Na) (*Galiomicin* 7892 Да). Остальные пептиды данной фракции не идентифицированы для данного организма.

Таблица 2. Качественный анализ пептидов в полученных фракциях

	RT, мин (№)	Массы, Да	RT, мин (№)	Массы, Да	RT, мин (№)	Массы, Да	
	1	2	3	4	5	6	
Контрольная группа личинок	5-6 (1)	4535, 4822, 6986					
	6-7 (2)				6,7-7,1 (5)	1211, 1361, 1545, 1610, 1650, 1771, 1843, 2000, 2255, 2421, 2558, 2704, 2722, 3158, 3267, 3430, 3612, 4585, 5144, 5445, 5774, 6319, 9169	
	7-8 (3)	3248, 3575, 4134, 4599, 4823, 4901, 5735, 6121, 6328, 8299, 9615, 9181, 9319, 9498				7,7-8,1 (6)	1062, 1211, 1651, 1892, 1993, 2027, 2128, 2448, 2565, 2634, 2704, 2764, 3065, 3245, 4439, 4593, 4665, 4894, 4962, 6319, 9170
	8-9 (4)	1891, 2026, 2275, 2298, 2421, 2750, 3102, 3402, 3531, 4432, 4456, 4822, 4691, 4740, 4846, 4890, 5003, 5362, 5799, 7159, 9175, 9332					
	9-10 (5)	2275, 3498, 32253, 3614, 3844, 4017, 4166, 4444, 4521, 4650, 4823, 9082, 12230, 12551					
						11,4-11,9 (7)	6011, 9037, 10701, 18099

Сравнение фракций соответствующих временных диапазонов показало наличие одинаковых пептидов с массами 1651, 1892, 2557, 4895, 4966, 6318, 9168 Да (с двухзарядным катионом 4584Да) – фракции 2 – 5, 6 и 6978 Да – фракции 3 – 7 (Рис.6). По-видимому, данные пептидные компоненты постоянно присутствуют в гемолимфе гусениц. Здесь следует отметить, что у интересующих нас фракций 2 и 6 с вероятной антимикробной активностью имеется 6 общих пептидов, которые, возможно, и обуславливают естественную иммунную защиту насекомых. До настоящего времени большинство работ в области иммунологии насекомых посвящено индукции иммунного ответа с использованием различных бактерий, а гемолимфа необработанных насекомых считается неактивной и не исследуется [14].

Таблица 2. (продолжение)

	1	2	3	4	5	6
Группа иммунизированных личинок			2,8 (3)	2186, 2466, 2626, 2874, 4372, 4930, 5381, 5583, 5795		
			2,9- 3 (4)	2186, 2692, 2896, 4064, 4372, 4930, 5381, 5795		
	5-6 (1)	1235, 1618, 1642, 1795, 1822, 2077, 2322, 2559, 2715, 2936, 3037, 4825, 4979, 9179, 9323	5,8 (6)	2160, 2376, 2900, 3259, 3485, 4774, 5871, 6321		
	6-7 (2)		6,4- 6,6 (7)	1795, 2124, 2229, 2473, 2716, 2883, 3170, 3227, 3795, 4588, 5003, 5328, 6768	6,3-9,9 (2)	1240, 1455, 1535, 1597, 1620, 1718, 1797, 1824, 1893, 2076, 2134, 2212, 2270, 2465, 2558, 2712, 2748, 2879, 2934. 3036, 3225, 3485, 3607, 3118, 4429, 4585, 4715, 4896, 4967, 5590, 5753, 6319, 7149, 9169, 9307
	7-8 (3)	2211,4537, 4822, 6324, 6644, 7156, 9175, 9498, 9815.				
	8-9 (4)	1891, 2749, 3141, 4004,4454, 4792, 4996, 5598, 5762, 7157, 7505, 14028	8,9 (8)	3492, 6981		
	9-10 (5)					
					10,0-12,5 (3)	3490, 3234, 4714, 5231, 6978, 7915, 11879, 23906

В то же время, за исключением указанных компонентов, данные фракции характеризуются различным пептидным профилем, что, вероятно, указывает на то, что данная иммунизация личинок, по-видимому, сильно изменяет пептидный состав гемолимфы, вызывая индукцию множества новых пептидных компонентов. Также можно предполагать постоянное, не зависящее от иммунизации, присутствие антимикробного Anionic antimicrobial peptide 2 в гемолимфе гусениц.

Дополнительно проводили обработку данных образцов дитиотреитолом. Как видно из масс-спектров (Рис.4-6), восстановления дисульфидных связей биомолекул во фракциях не произошло, это свидетельствует либо об их отсутствии, либо о наличии такой конформации пептидов, которая затрудняет данную реакцию, либо о

том, что пептиды уже находились в восстановленном состоянии, благодаря добавлению хаотропных агентов.

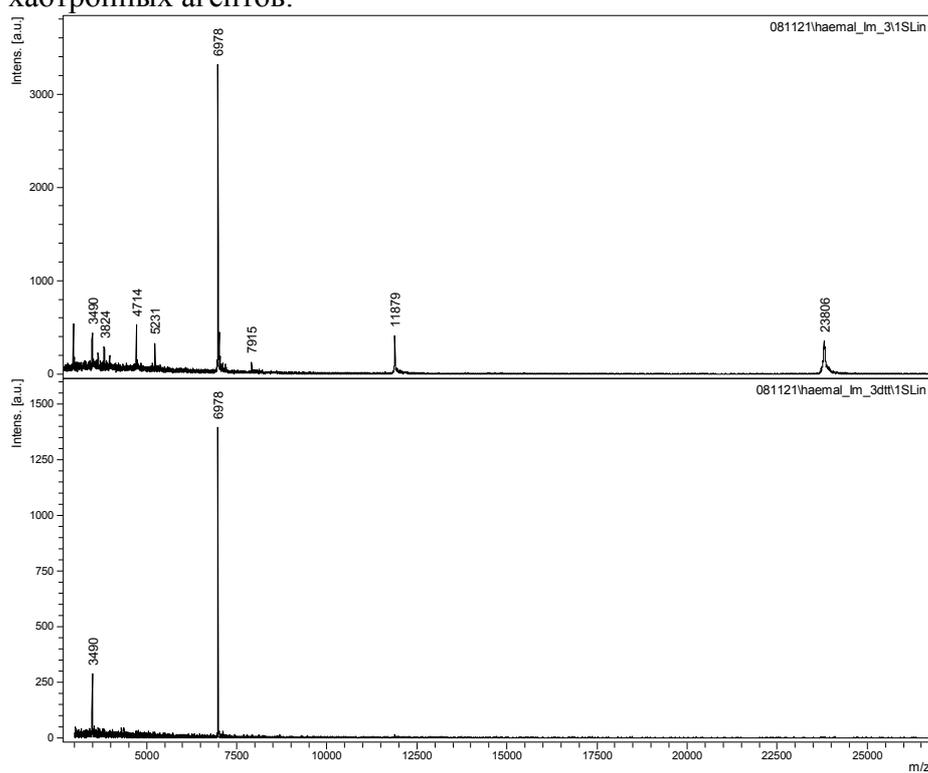


Рис. 5. Фракция 3 гемолимфы иммунизированных личинок. Масс-спектры получены в линейном режиме

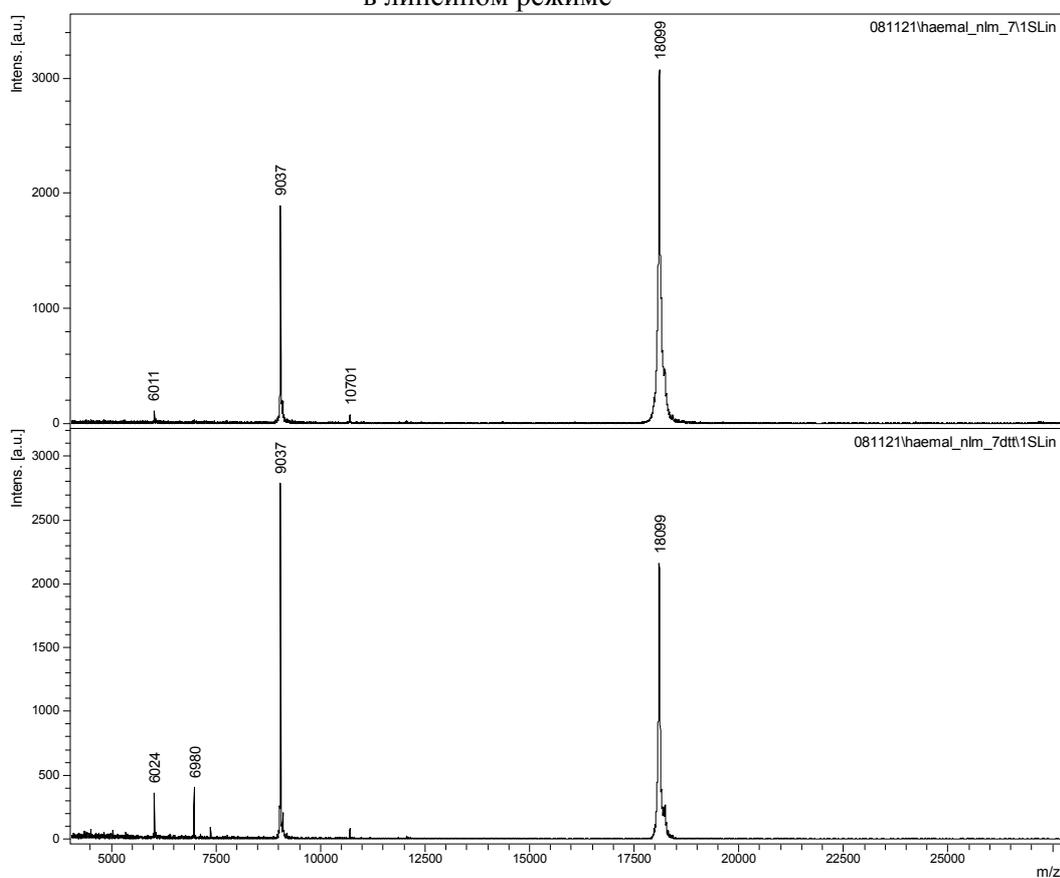


Рис. 6. Фракция 7 гемолимфы неиммунизированных личинок

Заключение

Проведено изучение изменения пептидного состава, вызванного иммунизацией микроорганизмами, методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Показано, что в результате иммунного ответа появляется множество новых пептидных компонентов, не описанных ранее для данного организма. Кроме того, в составе гемолимфы иммунизированной гусениц идентифицировано 5 известных пептидов или их фрагментов, а в составе контрольной группы гусениц обнаружено присутствие двух известных пептидов антибактериальной природы, хотя ранее предполагался иной механизм их образования. Общим для исследованных гемолимф является наличие 8 одинаковых пептидов, из которых 7 не изучено. По результатам антимикробного теста выявлено, что фракции гемолимфы контрольных гусениц также антимикробно активны, однако в меньшей степени, чем фракции гемолимфы иммунизированных личинок. Возможно, 7 данных компонентов и образуют естественный барьер иммунной защиты данной гусеницы.

В результате исследования сложных природных смесей пептидов обнаружено, что хроматографирование в заданных условиях проходит не только по классическому механизму, но и по эксклюзионному так как после многостадийного хроматографирования фракции содержат смесь пептидных компонентов, что подтверждается хроматографическими и масс-спектрометрическими данными. Особенностью хроматографирования этих смесей является наличие веществ непептидной природы в составе гемолимфы, которые обуславливают оптическую плотность элюата.

Таким образом, в составе изученных гемолимф обнаружены пептиды, не описанные ранее в литературе и представляющие интерес для исследований, направленных на изучение специфичности иммунного ответа, а также наличия врожденного иммунитета у насекомых.

Список литературы

1. Schroder, J. M. Epithelial peptide antibiotics // *Biochem.Pharmacol.* 1999. №57. P. 121-134.
2. Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // *Immunol.Rev.* 2004. №198. P. 169-184.
3. Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu.Rev.Immunol.* 1995. №13. P. 61-92.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Tauger, S., Webb, D., Siuzdak, G. Peptide and protein analysis with mass spectrometry // *Spectroscopy.* 2002. № 16. P. 15-28.
8. Schoneich, C., Kwok, S.K., Wilson, G.S. Separation and analysis of peptides and proteins // *Anal. Chem.* 1993. № 65. P.67 - 84.

9. Geng, M., Ji, J., Regnier, F. E. Signature – peptide approach to detecting proteins in complex mixtures. // J. of Chromatogr. 2000. №. 870. P. 295-313.
10. Трещанина, Н.А. Лабораторный практикум по микробиологии / Н.А. Трещанина, – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. Ч.3. С.38
11. Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: теоретические основы и практикум / Ю.П. Фролов. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. С.265.
12. Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East P. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology Rev* 2008. №38. P. 201–212.
13. Mak, P. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella* / P. Mak, D. Chmiel, G. J. Gacek // *J. Acta Biochimica Polonica*. 2001. №4. P. 1191-1195.
14. Lamberty, M. Isolation from the lepidopteran *heliotia vireskins* of a novel insect defensin with potent antifungal activity / M. Lamberty, S.Ales, S. Uttenweiler-Joseph [et al] / *J. of biological chemistry*. 1998. V. 274. №14. P. 9320-9326.

Пурьгин Петр Петрович – зав. кафедрой органической химии СамГУ, профессор, Самарский государственный университет, доктор химических наук, (тел.) 8(846)3345459

Срибная Олеся Сергеевна – аспирантка Самарский государственный университет, Самара

Клёнова Наталья Анатольевна – к.б.н., кафедра биохимии, профессор, Самарский Государственный университет

Литвинова Елена Геннадьевна – лаборатория метаболической биохимии, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, кандидат биологических наук

Парамонов Сергей Александрович – аспирант, Институт физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН

Буряк Алексей Константинович – д.х.н., зав. кафедрой физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХ РАН, Институт физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН, доктор химических наук

Серебрякова Марина Васильевна – к.х.н., лаборатория протеомного анализа, Институт физико-химической медицины РАМН,

Purygin Peter P. – department chairman, department of organic chemistry SSU, professor, (phone member 8 (846) 3345459), Samara state university of Chemistry

Sribnaya Olesya S. – postgraduate student, Samara state university, elektromodel@mail.ru

Klenow Natalia A. – candidate of biological sciences Department of Biochemistry, Professor, Samara State University

Litvinova Elena G. – candidate of biological science, Laboratory of metabolic biochemistry, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,

Paramonov Sergey A. – postgraduate student Institute of physical chemistry and electrochemistry named after Frumkin Russian Academy of Science

Buryak Alexey K. – Doctor of Chemistry, department chairman, department of physical-chemical bases of chromatography and chromatomass-spectrometry Institute of physical chemistry Russian Academy of Science, Institute of physical chemistry and electrochemistry named after Frumkin Russian Academy of Science

Serebryakova Marina V. – candidate of chemical sciences, Laboratory of Proteomic Analysis, Institute of Physical and Chemical Medicine RAMS