

УДК 519.999

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДНОГО СОСТАВА АНТИБАКТЕРИАЛЬНО АКТИВНЫХ ФРАКЦИИ МЕТОДАМИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А.К. Буряк¹, О.С. Срибная^{2*}, П.П. Пурыгин²

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4

²Самарский государственный университет; 443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1; тел.: 8(846)3345459; факс: 8(846)3345417; эл. почта: elektromodel@mail.ru

Из гемолимфы гусениц *Galleria mellonella* хроматографически выделены и масс-спектрометрически изучены фракции, содержащие антимикробные пептиды. В составе антибактериально активных фракций обнаружены пептиды, не описанные ранее в литературе и представляющие интерес для исследований, направленных на изучение специфичности иммунного ответа насекомых, а также для задач пептидомимики в целом.

Ключевые слова: антибактериальные пептиды, масс-спектрометрия, ВЭЖХ.

ВВЕДЕНИЕ. Защитные пептиды - ключевые факторы врождённого иммунитета против бактерий и грибов как у позвоночных животных, так и у беспозвоночных. У насекомых, которые испытывают недостаток в адаптивной иммунной системе, антибактериальные пептиды играют ключевую роль в борьбе против вторжения болезнетворных микроорганизмов. Они синтезируются в ответ на микробную инфекцию или в зараженной ране тела, главным образом, в жировом теле насекомого (функциональный эквивалент печени млекопитающих) и в определенных клетках гемолимфы, затем быстро выпускаются в гемолимфу, где они действуют синергитически против микроорганизмов [1-3]. Из большого количества антибактериальных пептидов эукариотического происхождения в настоящее время идентифицировано приблизительно 890, из них более чем 180 описаны у насекомых [4].

Пептиды, проявляющие антибактериальную активность, являются, как правило, амфифильными, катионными молекулами с массой около 5 кДа. На основании аминокислотных последовательностей и структурных особенностей они разделены на три широких класса: линейные α -спиральные пептиды, не содержащие остатков цистеина, например цекропины; пептиды, структура которых стабилизирована дисульфидными мостиками (цистеин-стабилизированные пептиды), например, дефензины; пептиды со сверхпредставлением пролина и/или глициновых остатков [5]. Наиболее известные антибактериальные пептиды действуют на клеточную мембрану микробов, порождая её проницаемость или даже мембранный распад из-за порообразующего механизма действия поверхностного слоя пептидов [5-7]. Однако, богатые пролином пептиды, по-видимому, имеют в качестве мишени белок, и не проявляют мембранной активности [8, 9], в то время как редкие анионные антибактериальные пептиды убивают бактериальные клетки, вызывая цитоплазматическое осаждение белка и внутриклеточную объемную флокуляцию [10-12]. Известны также пептиды,

* - адресат для переписки

воздействующие на важные внутриклеточные процессы, например, ДНК и синтез белка или надлежащее сворачивание недавно синтезируемых белков [5-9]. Определенные антибактериальные пептиды демонстрируют антираковую активность, например, цекропины насекомого [13, 14] и магайнины из кожи лягушки [15, 16]. В ближайшем будущем антибактериальные пептиды могут стать альтернативой, используемым в настоящее время антибиотикам. Преимущества антибактериальных пептидов: селективность, быстрое действие, широкий антибактериальный спектр и отсутствие развития сопротивления [6, 17].

Большое количество антибактериальных пептидов обнаружено у насекомых. В *Drosophila melanogaster* были идентифицированы гены 20 антибактериальных пептидов и их пептидные продукты были сгруппированы в семь семей: аттацины, цекропины, дефензины, диптерицины, дрозомидины, дрозидины и мечниковин [2]. Цекропины, дефензины, дрозомидины, дрозидины и мечниковин были выделены из *Drosophila melanogaster* с иммунным ответом и соответствующие гены были клонированы. Хотя *Drosophila melanogaster* в настоящее время один из наиболее полно и подробно охарактеризованных организмов с точки зрения исследования врожденного иммунитета насекомого, первые индуцированные антибактериальные пептиды насекомых – цекропины, были выделены и охарактеризованы из оспоренных бактериями куколок чешуекрылого насекомого гигантской моли *Hyalophora cecropia* [18]. С тех пор пептиды с антибактериальной деятельностью были очищены и описаны во многих других разновидностях насекомых, принадлежащих различным видам: чешуекрылые, двукрылые, жесткокрылые, гименоптера, гемиптера, трихоптера и одоната [1].

В работах [19-25] чешуекрылое насекомое – большая восковая моль *Galleria mellonella* - была использована в качестве модельного организма для изучения врожденного иммунного механизма, а также для патогенных испытаний с различными микроорганизмами: с волокнистыми грибами *Aspergillus fumigatus* [19], *Aspergillus flavus* [20], дрожжами *Candida albicans* [21-23], *Cryptococcus neoformans* [24] и бактериями [25]. Это объясняется тем, что данная разновидность насекомого производит уникальный репертуар антибактериальных пептидов с перекрыванием структурных особенностей.

В настоящее время охарактеризованы пять индуцированных *G. mellonella* пептидов с антибактериальной активностью, гены трех из них клонированы. Kim и соавт. [26] описали цекропин-подобный пептид, гомологичный цекропину A *H. cecropia*. Lee и соавт. [27] охарактеризовали дефензин-подобный пептид, названный *Galleria* дефензин. О клонировании и экспрессии противогрибкового пептида *G. mellonella*, галлеримицина сообщено в работе [28]. Антибактериальный пептид цекропин D, гомологичный пептиду тутового шелкопряда *Bombyx mori* и богатый пролином пептид уникальной аминокислотной последовательности был очищен Мак и соавт. [29], хотя спектр антибактериальной активности данных пептидов не был определен.

Целью работы является обнаружение новых, не описанных ранее пептидных компонентов в антибактериально активных фракциях, полученных из гемолимфы личинок *G. mellonella*, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*.

МЕТОДИКА.

Иммунизация. Личинки большой восковой моли *G. mellonella* разделили на 2 группы. Личинок 1 группы иммунизировали, вводя в брюшную полость по 5 мкл двукратно разведенной в физиологическом растворе суспензии *E. coli* и *Bacillus cereus*. Личинки 2 группы иммунизировали, вводя в брюшную полость по 5 мкл двукратно разведенной в физиологическом растворе суспензии *E. coli*. Далее личинки выдерживали в термостате на естественном корме.

Пробоподготовка гемолимфы. После 24 часов инкубации в термостате при 28°C у активных иммунизированных особей *G. mellonella* пипеткой собирали гемолимфу. Затем полученную гемолимфу растворяли 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.

Гель-фильтрация. Гель-хроматографию проводили на колонке (38,5×1,5 см), заполненной сефадексом G-25 и уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером pH 6,86. На колонку наносили 0,5 мл супернатанта, полученного после центрифугирования в течение 15 минут при 3000 g подкисленного до pH 3,5 трихлоруксусной кислотой образца раствора гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli*. Элюцию осуществляли 0,05 М фосфатным буфером pH 6,86, содержащим на каждые 100 мл по 10 мкл тритона X-100. С колонки собирали 23 фракции по 3,5 мл. В каждой фракции определяли содержание белка по методу Лоури.

Ионообменная хроматография. Катионообменную хроматографию проводили на колонке (16×0,8 см), заполненной сефадексом KM-50 и уравновешенной 0,1 М ацетатом аммония pH 7,6, содержащим на каждые 100 мл по 10 мкл тритона X-100. На колонку наносили 220 мкл раствора гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*, содержащей 10 мкл тритона X-100. Элюцию проводили сначала 32 мл стартового 0,1 М ацетата аммония pH 7,6, содержащего тритон X-100, собирали 10 фракций по 3 мл и 1 фракцию, содержащую 2 мл элюата; затем элюирование осуществляли 24 мл 0,2 М ацетатом аммония pH 5,1, отбирали 8 фракций по 3 мл; далее проводили градиентное элюирование, используя 30 мл элюента с градиентом концентрации ацетата аммония pH 5,1 0,2-1 М, с колонки отбирали 15 фракций по 2 мл. У всех полученных фракций было измерено поглощение при 210 и 220 нм, а также определено содержание белка по методу Лоури.

Антимикробный тест. 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; NH₄Cl – 1,07 г; CaCl₂ – 0,44 г; трисгидроксиметиламинометан – 6 г (pH 7,0); K₂HPO₄ – 1,55 г; MgSO₄ – 5 г.

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 использовали диски, пропитанные 0,1 М ацетатным буфером (pH 7,6), 0,2 М ацетатным буфером (pH 5,1), 1 М ацетатным буфером (pH 5,1). Посев проводили в микробиологическом боксе на чашки Петри по методу, представленному в [11]. Чашки Петри помещали в термостат на двое суток при 37°C. Результаты обрабатывали методами математической статистики [12].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent Series 1200 на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6×150 мм, 5 мкм, 80 Å). Эффективность колонки по паспорту составляла не менее 13 000 т.т.

В качестве подвижной фазы использовали 0,07% трифторуксусную кислоту (А) - ацетонитрил (В) и проводили градиентное элюирование. Для приготовления подвижных фаз для ОФ ВЭЖХ использовали ацетонитрил "Для ВЭЖХ, профильтрованный через мембрану 0,5 микрон", А200=0,02 е.о.п. (Aldrich); трифторуксусную кислоту (99%, Alfa Aesar). Дистиллированную воду дополнительно очищали методом Sub Boiling. Условия градиентного элюирования: 0-20 мин. – 7-100% В. Расход элюента – 700 мкл/мин. Проводили многоканальное детектирование, используя диодно-матричный детектор (длины волн 210, 220, 224, 280 нм) и флуорометрический детектор (285 нм – возбуждение, 345 нм – эмиссия). Хроматографировали фракции 2, 11, 8, 9, 14 и собирали фракции в режиме онлайн. Объем петли составлял 20 мкл.

ПЕПТИДЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ГУСЕНИЦ

Технология AnchorChip. 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. Технология AnchorChip – это мишени MALDI, содержащие гидрофильные пятна для образцов точно заданного размера (400 или 600 мкм) в строго определенных позициях, окруженные гидрофобным покрытием. Такое устройство планшетов позволяет готовить образцы на маленьких, точно определенных площадях из очень маленьких объемов, например, 3 мкл. Главные достоинства технологии AnchorChip – это 10-100-кратное увеличение чувствительности, 30% повышение скорости идентификации “отпечатков” пептидных масс, 100% увеличение скорости сбора спектров.

Масс-спектрометрия. Масс-спектры получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II Bruker (азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса до 20 Гц) при использовании программного обеспечения для сбора масс-спектров Flex Control 1.1. Масс-спектры были получены в режиме положительных ионов как в линейном режиме, так и с использованием рефлектрона.

В качестве матрицы использовали раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в изопропанолe с концентрацией 10 мг/мл. Раствор матрицы (0,5-2 мкл) наносили на мишень, затем после испарения растворителя матрицы сверху наносили анализируемый раствор белка.

В качестве матрицы также использовали раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (“Aldrich”, 10 мг×мл⁻¹ в 20% ацетонитриле в воде с 0,5% ТХУ). На мишени смешивали по 10 мкл образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, полученную смесь высушивали на воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Спустя 24 часа после иммунизации 32 личинок суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus* было обнаружено, что после инъекции выжило 16 личинок. По-видимому, данные особи сумели выжить благодаря индукции большого количества антимикробных пептидов в ответ на микробную инфекцию.

Иммунизация личинок суспензией *E. coli* не была столь эффективной, поскольку из 22 гусениц погибло всего 7 личинок. Для проверки этого предположения провели гель-хроматографию супернатанта, полученного после центрифугирования подкисленного трихлоруксусной кислотой образца раствора гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli*, которая позволила получить две белковые фракции. Данные представлены в виде хроматограммы (рис. 1).

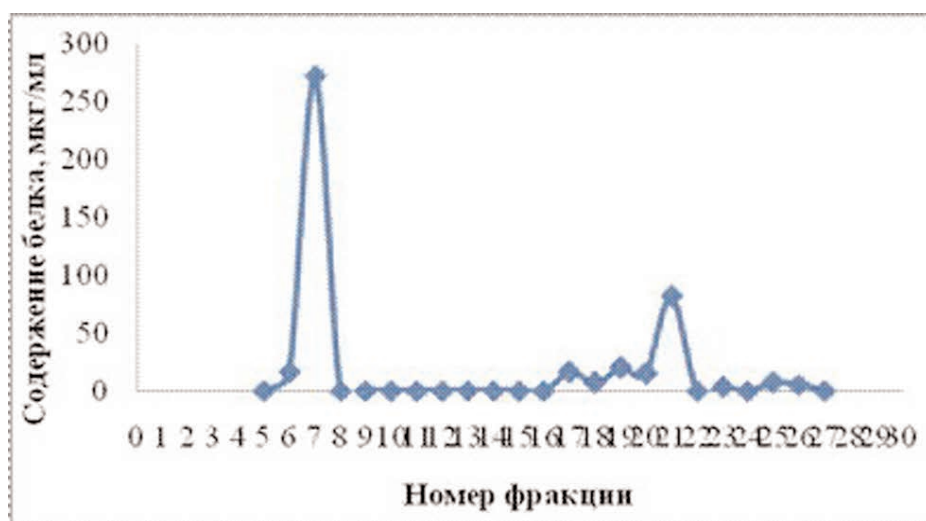


Рисунок 1.

Гель-хроматография супернатанта, полученного из образца раствора гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* на колонке с сефадексом G-50.

Две фракции, содержащие белки, не проявили антибактериальной активности. Чтобы оценить эффективность иммунизации (приобретенного иммунитета) у личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus*, а также наличие антимикробных компонентов и их качественный состав провели катионнообменную хроматографию, используя три буферные системы и градиентное элюирование. Данные представлены в виде хроматограммы (рис. 2).

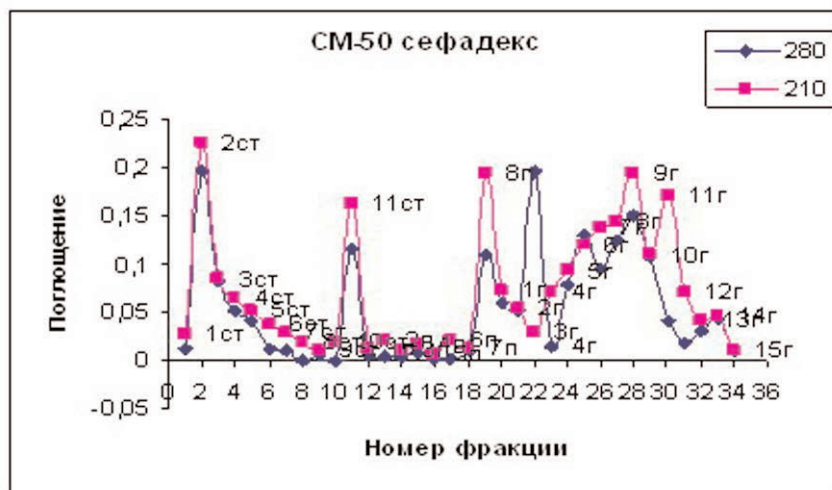


Рисунок 2.

Катионообменная хроматография раствора гемолимфы личинок, иммунизированных суспензией *E. coli* и *Bacillus cereus* на колонке с сефадексом CM-50.

Из всех полученных фракций только лишь фракции 2, 11 стартового 0,1 М буфера pH 7,6; 8 фракция 0,2 М ацетатного буфера pH 5,1 достоверно ограничивали зоны задержки роста *E. coli*, а фракция 14, полученная после градиентного элюирования, достоверно ограничивала зоны задержки роста *Bacillus cereus* (табл. 1, 2).

Таблица 1. Значения зон задержки роста *E. coli* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после катионообменной хроматографии.

| Проба | Зона ограничения роста, мм | Достоверность различий (к контролю) |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Фракция 2 | $8,06 \pm 0,50$ | $p < 0,01$ |
| Фракция 11 | $8,47 \pm 0,60$ | $p < 0,01$ |
| 0,1 М ацетатный буфер pH 7,6 | $6,56 \pm 0,32$ | $p < 0,01$ |
| Фракция 8 | $8,13 \pm 0,86$ | $p < 0,01$ |
| 0,2 М ацетатный буфер pH 5,1 | $6,19 \pm 0,13$ | $p < 0,01$ |

Таблица 2. Значения зон задержки роста *Bacillus cereus* на плотной среде вокруг дисков, пропитанных фракциями, полученными после катионообменной хроматографии.

| Проба | Зона ограничения роста, мм | Достоверность различий (к контролю) |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Фракция 14 | $14,56 \pm 1,59$ | $p < 0,01$ |
| 1 М ацетатный буфер pH 5,1 | $12,75 \pm 0,47$ | $p < 0,01$ |

ПЕПТИДЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ГУСЕНИЦ

Для дальнейшего исследования антибактериально активные фракции 2, 11, 8, 14, полученные после катионообменной хроматографии упаривали на Concentrator 5301 Eppendorf в условиях вакуума, ротации.

Преимущество метода МАЛДИ состоит в возможности анализа сложных смесей биологически активных компонентов без предварительного разделения. Масс-спектрометрия сконцентрированных фракций 2, 11, 8, 14 показала наличие в их составе мажорных белковых компонентов, часть которых, по-видимому, и обуславливает антибактериальную активность. Частично пептидный состав данных фракций совпадает, что, вероятно, вызвано кластеризацией пептидов в процессе ионообменной хроматографии. В тоже время для фракций характерно присутствие четко различающихся пептидных масс, являющихся новыми среди всех известных белков данного организма (табл. 3). Из всех полученных масс в литературе описаны пептиды: 6980 Да – анионный антимикробный пептид 2 из *Galleria mellonella* (содержащийся во 2, 11, 8), 4927 Да – богатый пролином антимикробный пептид 2 (содержащийся во 14), 5379 Да – фрагмент индуцированного ингибитора сериновой протеазы из *Galleria mellonella*, 14027 Да – лизоцим (1,4- β -N-ацетилмурамидаза) (содержащийся в 14). Из таблицы 3 видно, что пептид массой 4715 Да присутствует во фракциях 2, 11, 8 (из литературы известен дефензин из *Galleria mellonella* с близкой массой 4720 Да), поэтому возможно, что данный пептид является гомологом известного. Все остальные пептиды или фрагменты белков являются не описанными ранее в литературе и представляют интерес для поиска новых антимикробных пептидов для данного организма и для задач протеомики (пептидомики) в целом.

Таблица 3. Масс-спектрометрическое сравнение основных масс пептидов, содержащихся в активных фракциях, полученных после катионообменной колонки.

| Проба | Пептидные массы, Да | |
|------------|---|--|
| | Диапазон масс 1000–4500 Да | Диапазон масс 4500–20000 Да |
| Фракция 2 | 1337,1450,1551,1589,1651,1689, 1823, 1945,2057,2126,2668,3528,3740,3744,3840 | 4715, 4896,4969, 6025, 6980,7151, 9039, 9171, 10886,11882,14030,18101, 23810 |
| Фракция 11 | 1823 | 4715, 5441, 6024, 6319, 6980,7151, 8183, 9038, 9940,10704, 10886,11881,14028,18101, 23788 |
| Фракция 8 | | 4715, 4896,4969, 6319, 6980,7151, 8605, 9173 |
| Фракция 14 | 1471,1723,1732, 1883, 1866,2012,2223,2616,2895,3035,3342,3980, 4127,4301,4370, | 4927,5061,5379,5589,5792, 6947,8212,8242, 8602, 9170, 11163,14706 |

С целью разделения и изучения хроматографического поведения биологически активных фракций проводили их анализ методом ВЭЖХ. К сконцентрированной фракции 2 добавляли 10 мкл 0,07% трифторуксусной кислоты, объём вводимой пробы составлял 20 мкл (рис. 3). (№1-7). К сконцентрированной фракции 11 добавляли 20 мкл 0,07% трифторуксусной кислоты, объём вводимой пробы составлял 20 мкл (рис. 4). (№1-8). Сконцентрированную фракцию 8 растворяли в 40 мкл 0,07% трифторуксусной кислоты, объём вводимой пробы составлял 20 мкл (рис. 5). (№1-10). Фракцию 14 хроматографировали без концентрирования, объём вводимой пробы составлял 20 мкл (рис. 6). (№1,2-4,5).

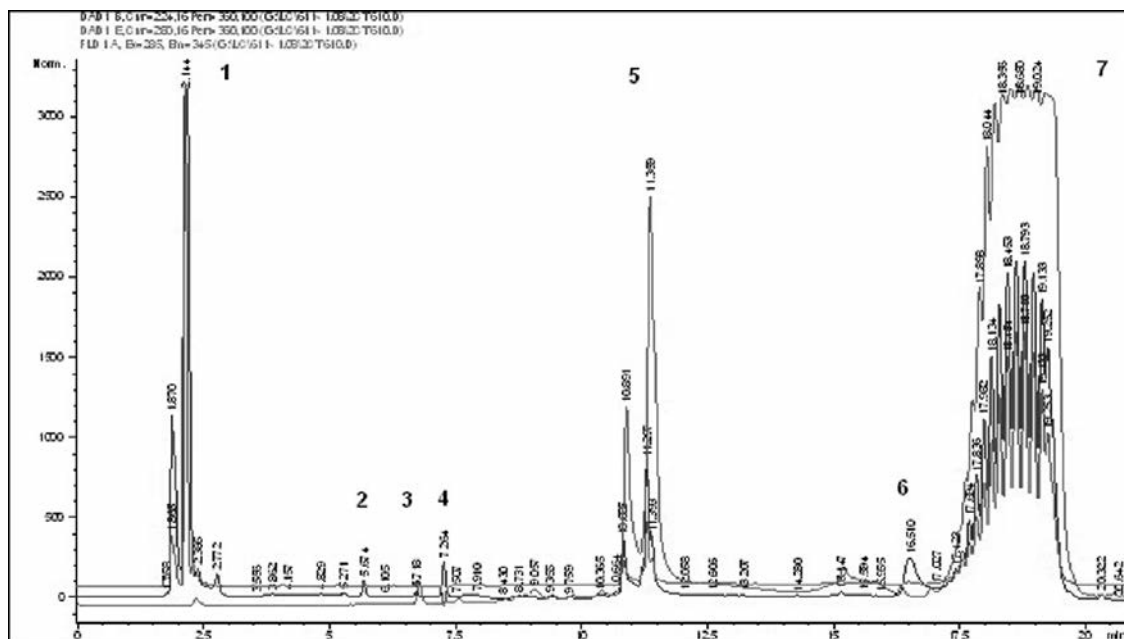


Рисунок 3.
Хроматограмма фракции 2.

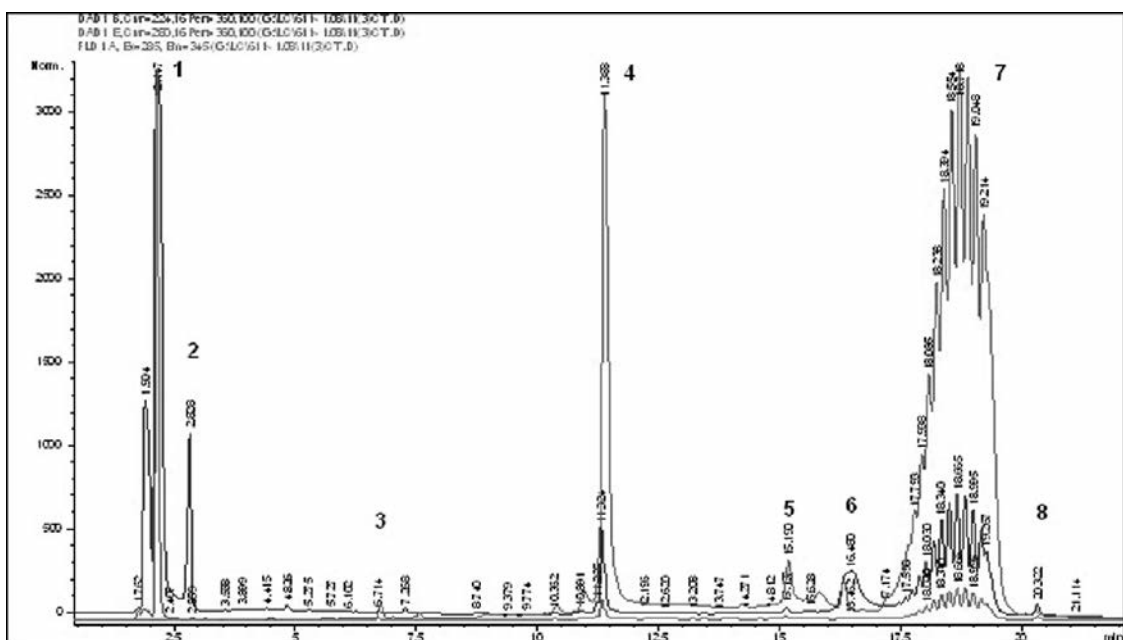


Рисунок 4.
Хроматограмма фракции 11.

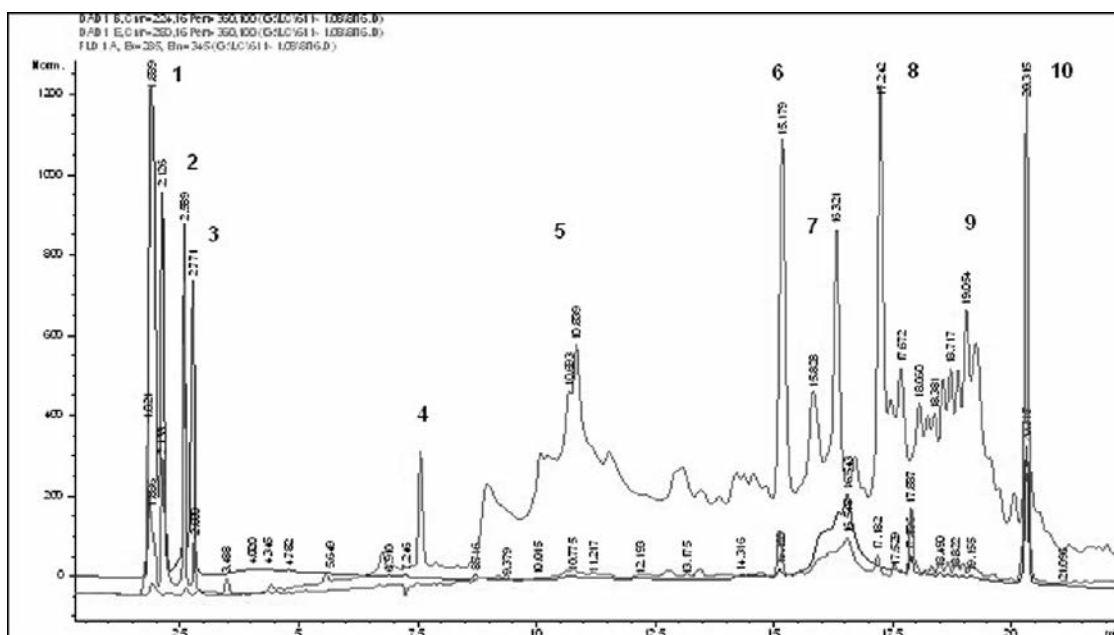


Рисунок 5.
Хроматограмма фракции 8.

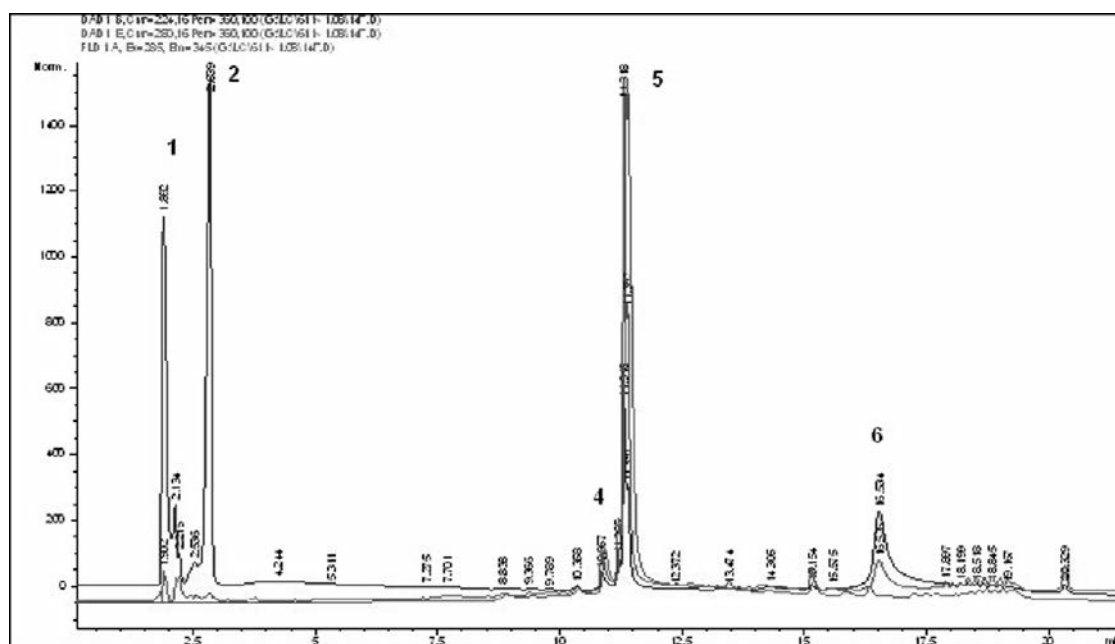


Рисунок 6.
Хроматограмма фракции 14.

Поскольку катионообменную хроматографию проводили в присутствии солилизирующего агента, в составе биологически активных фракций содержался тритон X-100. Его применение способствовало устранению межбелковых гидрофобных взаимодействий, предотвращало образование агрегатов и пептидных олигомеров. Однако по результатам масс-спектрометрического сравнения данных фракций, показавших наличие пептидов с одинаковыми массами в разных фракциях, можно предположить, что в нашем случае использование

соллюбилизирующего агента было малоэффективным. Более того, наблюдалось мешающее влияние тритона при проведении ВЭЖХ (рис. 3-6). На каждой хроматограмме присутствовала область расположения пиков (время удерживания (RT) – 17,5-19,5 мин), характеризующая элюирование детергента, который является полимером, имеющим молекулярно-массовое распределение. Оптическая плотность элюата в данном диапазоне достаточно велика, вследствие этого возможно экранирование сигналов интересующих нас пептидов в процессе хроматографии.

Обсудим особенности хроматографии антибактериально активных фракций гемолимфы. При всех имеющихся различиях в хроматограммах фракций (2,11,8,14), эти хроматограммы можно считать “примерно совпадающими”. Действительно, каждая из хроматограмм характеризуется наличием трех областей расположения хроматографических пиков, которые условно можно обозначить как гидрофильная (RT < 5 мин), нейтральная (RT от 5 до 10 мин) и липофильная (RT > 10 мин). Времена удерживания анализируемых компонентов в указанных областях частично перекрываются. Данная особенность полностью согласуется с результатами масс-спектрометрии: в составе анализируемых фракций содержатся одинаковые или близкие по свойствам и молекулярным массам белковые компоненты, которые, по-видимому, при одинаковых условиях хроматографирования будут разделяться подобным образом. В то же время фракции не полностью идентичны, о чем свидетельствует наличие различных масс в масс-спектрах (табл. 3) и различных минорных пиков на хроматограммах (рис. 3-6).

Схожесть масс-спектров и хроматограмм, по-видимому, является результатом низкой эффективности колоночной катионообменной гель-проникающей хроматографии при разделении пептидных соединений столь близких по своим свойствам; большинство масс в масс-спектрах фракций идентичны из-за того, что антибактериальное действие, вероятно, обусловлено комплексом пептидных компонентов, действующими синергетически.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Для изучения иммунного ответа личинок *Galleria mellonella* проведена иммунизация микроорганизмами *E. coli* и *Bacillus cereus*. Показано, что в ответ на микробную инфекцию насекомое индуцировало большое количество пептидов. Хроматографически выделены и изучены фракции, содержащие антимикробные пептиды.

В полученных из гемолимфы антибактериально активных фракциях обнаружен спектр пептидных масс. Среди них присутствуют пептиды, не описанные ранее в литературе и представляющие интерес для протеомных исследований, а также являющиеся перспективными в связи с поиском новых антибактериально действующих агентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hetru C., Hoffmann D., Bulet P. (1998) in: Molecular mechanisms of immune responses in insects (Brey P.T., Hultmark D., eds) Chapman & Hall, London, pp. 40–66.
2. Irving P., Troxler L., Hetru C. (2004) CR Biol., **327**, 557–570.
3. Tzou P., De Gregorio E., Lemaitre B. (2002) Curr Opin Microbiol., **5**, 102–110.
4. www.bbcm.univ.trieste.it/_tossi/pag1.htm.
5. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.-L., Hoffmann D. (1999) Dev. Comp. Immunol., **23**, 329–344.
6. Matsuzaki K. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1462**, 1–10.
7. Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003) Pharmacol. Rev., **55**, 27–55.
8. Casteels P. (1998) in: Molecular mechanisms of immune responses in insects (Brey P.T., Hultmark D., eds) Chapman & Hall, London, pp. 92–110.
9. Otvos Jr L. (2002) Cell Mol. Life Sci., **59**, 1138–1150.
10. Brogden K.A., Ackermann M., McCray Jr P.B., Tack B.F. (2003) Int. J. Antimicrob. Agents, **22**, 465–478.

ПЕПТИДЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ГУСЕНИЦ

11. *Broden K.A., De Lucca A.J., Bland J., Elliott S.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 412–418.
12. *Lai R., Liu H., Hui Lee W., Zhang Y.* (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 796–805.
13. *Chen H.M., Wang W., Smith D., Chan S.C.* (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 171–180.
14. *Moore A.J., Devine D.A., Bibby M.C.* (1994) *Pept. Res.*, **7**, 265–274.
15. *Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3792–3798.
16. *Papo N., Shai Y.* (2005) *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 784–790.
17. *Boman H.G.* (2003) *J. Intern. Med.*, **254**, 197–215.
18. *Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H., Boman H.G.* (1981) *Nature*, **292**, 246–254.
19. *Reeves E.P., Messina C.G.M., Doyle S., Kavanagh K.* (2004) *Mycopathologia*, **158**, 73–82.
20. *Leger R.J.St., Screen S.E., Shams-Pirzadeh B.* (2000) *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 320–324.
21. *Brennan M., Thomas D.Y., Whiteway M., Kavanagh K.* (2002) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **34**, 153–157.
22. *Cotter G., Doyle S., Kavanagh K.* (2000) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **27**, 163–169.
23. *Dunphy G.B., Oberholzer U., Whiteway M., Zakarian R.J., Boomer I.* (2003) *Can. J. Microbiol.*, **49**, 514–524.
24. *Mylonakis E., Moreno R., El Khoury J.B., Idnurm A., Heitman J., Calderwood S.B., et al.* (2005) *Infect. Immun.*, **73**, 3842–3850.
25. *Kavanagh K., Reeves E.P.* (2004) *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 101–112.
26. *Kim C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., et al.* (2004) *Mol. Cells*, **17**, 262–269.
27. *Lee Y.S., Yun E.K., Jang W.S., Kim I., Lee J.H., Park S.Y., et al.* (2004) *Insect. Mol. Biol.*, **13**, 65–72.
28. *Schuhmann B., Seitz V., Vilcinskis A., Podsiadlowski L.* (2003) *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **53**, 125–133.
29. *Mak P., Chmiel D., Gacek G.J.* (2001) *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 1191–1195.

Поступила: 22. 04. 2009.

STUDYING PEPTIDES OF ANTIBACTERIAL FRACTIONS METHODS OF THE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

A.K. Byruak¹, O.S. Sribnaya², P.P. Purygin²

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and electrochemistry, Leninskii prosp., 31, bld. 4, Moscow, 119991 Russia

²Samara State University, Samara, ul. Acad. Pavlova, 1, 443011 Russia; tel.: 8 (846) 3345459; fax: 8 (846) 3345417; e-mail: elektromodel@mail.ru

The fractions containing antimicrobial peptides have been purified from a haemolymph of caterpillars *Galleria mellonella* by chromatographic methods and studied by mass spectrometry.

Key words: antibacterial peptides, mass-spectrometry, HPLC.