

**ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. ПАВЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ИНСТИТУТ ОПТИКИ АТМОСФЕРЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ООО "ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
И ТЕХНОЛОГИЙ"**

**ФИЗИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА.  
ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ,  
ТЕОРИЯ, ПРАКТИКА**



**Том 2**

**СБОРНИК СТАТЕЙ  
ПЯТОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
"ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И  
ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ"**

**14-15 ноября 2013 года, Санкт-Петербург, Россия**

**Научные редакторы А.П. Кудинов, Б.В. Крылов**

**Санкт-Петербург  
Издательство Политехнического университета  
2013**

### Литература

1. Junqueira L.C., Bignolas G., Brentani R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. // *Histochem J.* 1979. V. 11(4). P. 447-55.
2. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. // *J Endocrinol.* 2007. V. 195(3). P. 439-50.
3. Weber K.T., Sun Y., Tyagi S.C., Cleutjens J.P. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994. V. 26(3). P. 279-292.

Соболева А.В., Колобов А.А., Гришина Т.В.

### ОЦЕНКА СПЕКТРА АНТИМИКРОБНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8PA-3

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия  
Soboleva A.V., Kolobov A.A., Grishina T.V.

### CHARACTERIZATION OF RANGE ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM PROBIOTIC STAIN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8PA-3

Saint-Petersburg State University, faculty of Biology and Soil Sciences, department of Biochemistry, Saint-Petersburg, Russian Federation

Профилактика и терапия заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами, является одной из важнейших задач современной медицины.

Микроорганизмы, колонизирующие кожные покровы и открытые полости тела здорового человека и не наносящие при этом вреда, получили название микробиоты или нормальной микрофлоры. Пробиотические бактерии, например, бактерии рода *Lactobacillus*, заселяют организм новорожденного ребёнка в раннем постнатальном периоде, формируя нормальную микрофлору, вступающую в сложные (симбиотические, антагонистические и др.) взаимоотношения с другими микроорганизмами. Микробиота обеспечивает устойчивость макроорганизма к заселению сапрофитной и условно-патогенной, а также транзитной микрофлорой, подавляя, главным образом размножение патогенных микроорганизмов. Межмикробный антагонизм осуществляется в частности с помощью продукции различных антагонистически активных веществ, таких как органические кислоты, перекись водорода, мурамидазы и бактериоцины.

В настоящее время в силу практически постоянного воздействия неблагоприятных факторов и инфекционных заболеваний нарушаются хрупкие

симбиотические взаимоотношения внутри микробных сообществ человека, что приводит к дестабилизации равновесия между макроорганизмом и его микробиотой. Применение при терапии инфекционных заболеваний антибиотиков приводит к многочисленным побочным действиям, негативно сказывающимся на балансе симбиотических бактерий в организме человека. В этой связи бактериоцины – специфические антимикробные вещества бактериального происхождения, вызывают интерес к использованию в лечебных целях [1,2].

Бактериоцины – антибактериальные вещества белковой природы, продуцируемые бактериями и подавляющие жизнедеятельность других микроорганизмов. Способностью к синтезу бактериоцинов обладают как грамположительные так и грамотрицательные бактерии. Большинство бактериоцинов, продуцируемых грамотрицательными бактериями, имеют сравнительно узкий спектр действия по сравнению с антибиотиками, и являются активными против штаммов того же или филогенетически родственных видов. Однако бактериоцины грамположительных бактерий, особенно молочнокислых бактерий, обладают широким спектром антимикробного действия [3]. Бактериоцины, продуцируемые культурой *L. plantarum*, получившие название плантарицины, являются низкомолекулярными (с  $M_r < 10$  кДа) катионными термостабильными пептидами, сохраняющими свою активность в широком диапазоне значений pH от 3 до 9 [5]. Основной механизм антимикробного действия плантарицинов – нарушение целостности цитоплазматической мембраны путём порообразования, что ведёт к нерегулируемому выходу из клетки ионов калия, аминокислот, и других низкомолекулярных веществ и, следовательно, к гибели клетки-мишени [4]. Бактериоцины рассматриваются исследователями в качестве потенциальных антимикробных лекарственных веществ и консервантов, подавляющих рост и развитие патогенных и условно патогенных бактерий и дрожжевых грибов.

С помощью секвенирования ДНК промышленного пробиотического штамма *L. plantarum* 8PA-3 было показано наличие локуса, предположительно, отвечающего за синтез двух бактериоцинов – плантарицинов EF и NC8 [11]. Из приведенных выше данных можно сделать предположение, что штамм *L. plantarum* 8PA-3 возможно является продуцентом плантарицинов.

В свете вышеизложенного целью данной работы стало: подбор штамма лактобактерий, проявляющих наивысшую антагонистическую активность в отношении большинства тест-культур, выделение и характеристика фракций бактериоциноподобных пептидов, обладающих антимикробной активностью.

Научно-исследовательская работа выполнялась в рамках гранта НИР СПбГУ Ф-№0.37.123.2011 "Морфофизиологические и биохимические аспекты антимикробного воздействия бактериоцинов" в лаборатории внутриклеточной регуляции кафедры биохимии биолого-почвенного факультета СПбГУ и совместно с сотрудниками лаборатории электронной микроскопии и

спектрископии в ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. Руководитель гранта – профессор, д.б.н. Рыбальченко О. В.

Было показано, что штамм *L. plantarum* 8PA-3 проявляет наивысшую антагонистическую активность в отношении большинства тест-культур, что послужило основанием для выбора данной культуры лактобактерий для дальнейшей работы и выделения бактериоциноподобных пептидов. Культура *L. plantarum* 8PA-3 была любезно предоставлена нам ст. преп., к.б.н. Орловой О.Г.

Клеточную культуру выращивали в жидкой питательной среде для лактобактерий MRS в течение 48 ч при температуре 37°C. Далее было проведено экстрагирование пептидов по модифицированному методу Мкртчана Х. [7]. Все процедуры экстракции проводили при температуре 4°C. К клеточной культуре добавили ледяную уксусную кислоту до конечной концентрации 5%, затем центрифугировали при 10000g в течение 10 мин на центрифуге Avanti J30-I (Beckman Coulter, США). Надосадочную жидкость собирали и проводили преципитацию полученного супернатанта раствором 70% сульфата аммония в течение ночи. Затем полученный преципитат центрифугировали при 10000g в течение 10 мин. Полученный осадок перерастворили в растворе 5% уксусной кислоты.

Супернатант и перерастворённый осадок подвергали ультрафильтрации через фильтры из регенерированной целлюлозы «Millipore ultrafiltration membranes», NMWL 10 кДа и 1кДа, («Amicon», США) и обессоливали на тех же фильтрах путём пропускания через камеру для фильтрации избыточного объёма раствора 5% уксусной кислоты. В ходе экстракции раствором 5% уксусной кислоты были получены 4 пробы: концентрат осадка и супернатанта с молекулярной массой более 10 кДа, концентрат осадка и супернатанта с молекулярной массой в диапазоне от 1 до 10 кДа. Пробы высушивали при температуре -4°C в вакуумном концентраторе CentriVar («Labconco», США).

Спектр катионных пептидов по подвижности и заряду оценивали методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой буферной системе в присутствии мочевины [8]. Было показано, что белковые фракции, обладающие молекулярной массой 1-10 кДа, демонстрируют электрофоретическую подвижность схожую с лизоцимом. Чистоту полученных препаратов и приблизительную молекулярную массу пептидов оценивали при помощи электрофореза в 16% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) [9]. Электрофоретическое разделение фракций, содержащих низкомолекулярные белки и пептиды в диапазоне Мг от 1 до 10 кДа, показало превалирование белков с молекулярной массой 2, 2,8 и 9 кДа. В пробах из концентратов осадка и супернатанта наблюдался высокий «белковый» фон компонентов питательной среды для лактобактерий.

Для выявления антимикробной активности пептидов использовали метод радиальной диффузии в геле [6]. Антимикробную активность определяли против грамотрицательной бактерии *E. coli* и грамположительной бактерии *L. monocytogenes*. Активность показали пробы, содержащие белки с молекулярной массой от 1-10 кДа, и препарат из концентрата супернатанта с молекулярной

массой более 10 кДа. Было показано, что выделенные пептиды, продуцируемые штаммом *L. plantarum* 8PA-3, обладают антимикробной активностью как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, что говорит о широком спектре их действия. Более выраженная активность концентрата супернатанта по сравнению с осадком обусловлена вероятно тем, что преципитация антимикробных пептидов раствором 70% сульфата аммония прошла не до конца.

Для оценки спектра выделенных белков и пептидов и их дальнейшего фракционирования использовали метод обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пробы, приготовленные из концентратов супернатанта и осадка, наносили на аналитическую колонку ВЭЖХ Discovery HS C18 4,6x250 мм, 5 мкм, 300 Å (Supelco, США) (А: 0.1% ТФУ в воде, В: ацетонитрил; градиент В от 5% до 60% за 60 мин, скорость потока 1 мл/мин). Детекцию проводили при длинах волн 215 нм, 225 нм и 280 нм. Наличие большого количества примесей не позволило получить хорошие результаты, по которым можно было бы сделать выводы о спектре выделенных пептидов. Для отделения минорной фракции антимикробных пептидов от мажорных компонентов - ингредиентов питательной среды, было предпринято предварительное фракционирование проб методом твердофазной экстракции на картридже Sep-Pak Plus, C18 (Waters, США). Разделение проб проводили в ступенчатом градиенте концентрации растворов ацетонитрила: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 95%.

Для анализа результатов хроматографического фракционирования осуществляли электрофоретическое разделение полученных проб в полиакриламидных гелях как в присутствии ДДС-Na, так и в кислой буферной системе в присутствии мочевины.

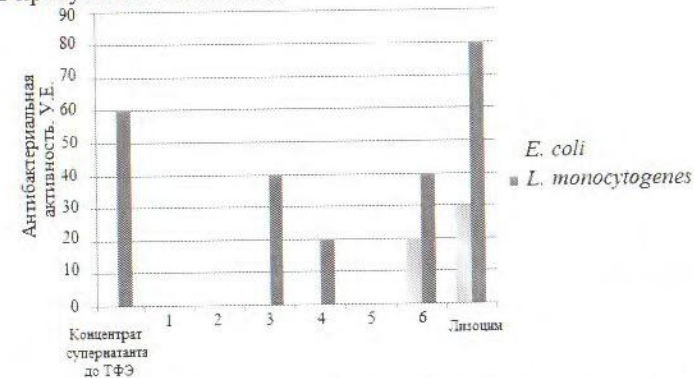


Рис. 1. Результаты антимикробного теста по методу радиальной диффузии белковых фракций концентрата супернатанта с молекулярной массой 1-10 кДа до и после твердофазной экстракции. 1-6 – белковые фракции, элюированные % ацетонитрила: 10, 20, 30, 40, 50 и 95%, соответственно

Было показано, что наибольший выход белковых фракций наблюдался при концентрациях раствора ацетонитрила 10%, 20%, 30% и 40%. В пробах

присутствовал высокий белковый фон, было отмечено доминирование ряда полипептидов с молекулярной массой 9 кДа.

С помощью антимикробного теста по методу радиальной диффузии, в котором использовались пробы, прошедшие твердофазную экстракцию, было показано сохранение активности белковых фракций против *E. coli* и *L. monocytogenes* (см. рис. 1) О степени антимикробной активности фракций белков и пептидов судили по диаметру прозрачных зон (зоны ингибирования роста микроорганизмов), сравнивая их со стандартным образцом (яичным лизоцимом). Для количественной оценки антибиотического действия измеряли диаметр зоны ингибирования роста тестовых культур вокруг лунок, принимая за 1 единицу 0,1 мм за исключением диаметра лунки.

Исходя из того, что выделенная пептидная фракция обладает электрофоретической подвижностью схожей с лизоцимом, включает низкомолекулярные пептиды, демонстрирует большую антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий, можно сделать предположение, что в полученных пробах содержатся пептиды, принадлежащие к бактериоцинам.

Для подбора оптимальных условий выделения бактериоциноподобных пептидов из культуры *L. plantarum* 8PA-3 было проведено экстрагирование пептидов по методу Тодорова С. Д. [10]. Суточную культуру *L. plantarum* 8PA-3, выращивали в питательной среде для лактобактерий MRS. Далее проводили процедуры экстракции при температуре 4°C. К клеточной культуре добавили ледяную уксусную кислоту до конечной концентрации 5% и центрифугировали при 6000g в течение 15 мин на центрифуге Avanti J30-I. Надосадочную жидкость отбирали для последующей ультрафильтрации. К клеточному осадку добавляли раствор 5% уксусной кислоты. Клетки разрушали в гомогенизаторе стекло-тефлон в растворе 5% уксусной кислоты и центрифугировали при 10395g в течение 30 мин, клеточный экстракт отбирали для последующей ультрафильтрации.

Супернатант и клеточный экстракт подвергали ультрафильтрации через фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 10 кДа. Надмембранный концентрат собирали для анализа спектра антимикробных пептидов. Далее ультрафильтрат уже концентрировали на фильтре из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 1 кДа. Полученные пробы - концентрат супернатанта и клеточного экстракта с молекулярной массой более 10 кДа, концентрат супернатанта и клеточного экстракта с молекулярной массой в диапазоне от 1 до 10 кДа - высушивали в вакуумном концентраторе.

После чего проводили электрофоретическое разделение проб в двух системах – электрофорез в кислой буферной системе с присутствием мочевины и электрофорез в денатурирующих условиях с присутствием ДДС-Na. Результаты показали, что пептиды с молекулярной массой 1-10 кДа, демонстрировали электрофоретическую подвижность схожую с лизоцимом. Кроме того, было показано превалирование белков с молекулярной массой 8 и 9 кДа.

Антимикробная активность полученных проб определяли против грамотрицательной бактерии *E. coli*, грамположительных бактерий *L. monocytogenes* и *St. epidermidis*, низшего гриба *C. albicans*. Наиболее выраженной активностью показали пробы, содержащие белки из концентрата супернатанта молекулярной массой от 1-10 кДа. Полученные пептиды обладали антимикробной активностью как в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и против низших грибов, что показало их широкий спектр действия. В то же время клеточный экстракт имел низкую антимикробную активность. Это, вероятно, можно объяснить теорией синтеза бактериоцинов, как неактивных форм – пребактериоцинов, и последующей их экскреции в среду в виде активных форм.

Низкомолекулярные пептиды фракционировали на картридже Sep-Pak Plus, C18. Разделение проб проводили в ступенчатом градиенте концентрации растворов ацетонитрила: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 95%. Для анализа результатов хроматографического разделения проводили электрофорезы в ПААГ в присутствии ДДС-Na и электрофорез в кислой буферной системе в присутствии мочевины. Определили, что наибольший выход белковых фракций наблюдался при концентрациях раствора ацетонитрила 10%, 20%, 30% и 40%, а также превалирования белков с молекулярной массой 7, 8, 9 и 10 кДа. Далее антимикробную активность полученных фракций определяли по методу радиальной диффузии в геле.

Для фракционирования группы низкомолекулярных полипептидов, обладающих антимикробной активностью использовали метод ОФ ВЭЖХ. Разделение проводили на аналитической колонке Discovery Bio Wide Pore C18, 10 мкм, 300 Å, 10x250 мм (Supelco, США) (А: 0.1% ТФУ в воде, В: ацетонитрил, градиент от 5% до 65% за 60 мин, скорость потока 5 мл/мин). Детекция велась при длинах волн 260 нм, 225 нм и 280 нм. Наличие большого количества компонентов питательной среды для лактобактерий не позволило получить хорошие результаты. Для дальнейшего фракционирования были отобраны пробы, обладающие наибольшей антимикробной активностью.

Повторное фракционирование проб на обращённо-фазовой колонке Discovery HS C18 4,6x250 мм, 5 мкм, 300 Å (Supelco, США) (А: 0.1% ТФУ в воде, В: ацетонитрил, градиент от 5% до 60% за 60 мин, скорость потока 1 мл/мин) позволило получить несколько фракций, обладающих антимикробной активностью.

Хромато-масс-спектрометрический анализ фракции, обладающей наибольшей антимикробной активностью был проведён в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Анализ производили на приборе LC/MS Agilent Technologies (LC-1260, MS-6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF), использовали колонку ZORBAX SB-C18, 5 мкм x 150 x 0.5 мм, скорость потока 20 мкл/мин. Разделение проводили в градиенте ацетонитрила от 0 до 50% за 25 минут. Детекция велась при длине волны 280 нм. В процессе хромато-масс-спектрометрического анализа было показано наличие множества однозаряженных компонентов белковой

низкомолекулярной матрицы (масса/заряд 300-750), входящей в состав питательной среды MRS, а также присутствие относительно высокомолекулярных пептидов (см. рис. 2). Таким образом, в исследуемой пробе было установлено присутствие пептидов с молекулярной массой: 2946,7 Да; 3784,2 Да; 3883,9 Да; 3896,2 Да; 3900,0 Да; 4611,1 Да; 5454,9 Да и 6280,4 Да. Однако ни одна из выше перечисленных молекулярных масс не соответствует имеющимся данным по плантарицинам EF и NC8 [12,13].

В результате проведенной научной работы и полученных данных можно сделать вывод, что штамм *L. plantarum* 8PA-3 является продуцентом антимикробных пептидов широкого спектра действия, обладающих электрофоретической подвижностью, сходной с таковой лизоцима, и относительно малыми молекулярными массами.

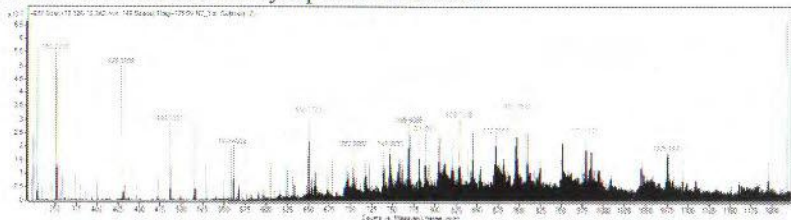


Рис. 2 Интегрированный MS спектр с 18 по 19 минуты (после вычитания бланка (с 1 по 2 минуту)), диапазон масса/заряд 350-1200

Отсутствие в активных фракциях пептидов с молекулярными массами, сходными с массами предсказанных бактерицинов (плантарицинов E, F, NC8α и NC8β), может быть объяснено их модификацией или частичной деградацией в процессе выделения. Описанные выше способы выделения бактерициноподобных пептидов достаточно трудоемки и требуют больших затрат времени, что должно (и может) быть оптимизировано. Результатом оптимизации времени эксперимента может стать меньшая деградация предсказанных бактерицинов и, как следствие, их прямое определение.

#### Литература

1. Алешкин В.А., Афанасьев С.С. Дисбактериоз кишечника: пути решения проблемы. Опыт применения биологического комплекса полибактерин. М. – 2006. – 42 стр.
2. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. М. Издательство «Триада». – 2007. – 64 стр.
3. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. Л. Издательство «Медицина». – 1966. – 204 с.
4. Drider D., Fimland G., Hécharde Y., McMullen L.M., Prevost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – Vol. 70. №2. – p. 564–582.
5. Jiménez-Díaz R., Rios-Sánchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L., Piard J.C. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59. №5. – p. 1416-1424.

6. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. // J. Immun. Meth. – 1991. Vol. – 137. – p. 167-173.
7. Mkrtychyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., Limaki H.K. Purification, characterisation and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – Vol. 35. – p. 255-260.
8. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. // Arch. Biochem. Bioph. – 1969. – Vol. 130, 2. – p. 337-346.
9. Schägger H., von Jagow G. Tricine – sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. // Anal. Bioch. – 1987. – Vol. 166. – p. 368-379.
10. Todorov S.D., Vaz-Velho M., Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricin st31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* st31. // Braz J Microbiol. – 2004. – Vol. 35. – p. 157-160.
11. Tsapciva A., Duplik N., Suvorov A. Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. // Benef. Microbes. – 2011. – Vol. 2, 4. – p. 255-261.
12. Fimland N., Rogne P., Fimland G., Nissen-Meyer J., Kristiansen P.E. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. // Biochim Biophys Acta. – 2008. – Vol. 1784. – p. 1711-1719.
13. Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Díaz R. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. №1. – p. 383-389.

Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

#### ЭКСПОРТ ГЛУТАТИОНА И ЭКСПРЕССИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ГЕНОВ В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,  
Пермь, Россия

Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

#### EXPORT OF GLUTATHIONE AND ANTIOXIDANT GENES EXPRESSION IN STARVATION CONDITIONS IN BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,  
Perm, Russia

Реферат: Показаны главные особенности экспорта глутатиона и экспрессии антиоксидантных генов при голодании по источникам углерода и азота у бактерий *E. coli*. Ключевые слова: *E. coli*, голодание, экспорт глутатиона, антиоксидантные гены.

Abstract: Article represents main features of glutathione export and antioxidant genes expression under carbon and nitrogen starvation in *E. coli* cultures.

Key words: *E. coli*, starvation, export glutathione, antioxidant genes.