

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА  
СТАБИЛЬНОГО ДЕФЕНСИН-ПОДОБНОГО  
ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПЕПТИДА  
ИЗ СЕМЯН *Trigonella foenum-graecum*  
(ПАЖИТНИКА)**

© 2015 Р. Оздепалли, Л. Гурупрасад\*

Хайдарабадский Университет, химический факультет, Хайдарабад,  
500046, Индия; электронная почта: lgpsc@uohyd.ernet.in

Поступила в редакцию 04.08.14

После доработки 27.10.14

Новый дефенсин-подобный противогрибковый пептид (Tf-AFP) с молекулярным весом 10,3 кДа был выделен из семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник) с использованием методов осаждения сульфатом аммония, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, гидрофобной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой (RP-HPLC). Молекулярный вес очищенного пептида, определенный методом масс-спектрометрического анализа, оказался равным 10321,5 Да. Данный пептид проявлял высокое структурное сходство с растительными белками дефенсинами и другими противогрибковыми белками, обнаруженными при проведении поиска в базах данных. Двумерный электрофорез в ПААГ выявил  $pI = 8,8$  и отсутствие изоформ. Полученный пептид Tf-AFP ингибировал рост различных видов грибов, таких как *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* и *Rhizoctonia solani*. Противогрибковая активность подавлялась в присутствии 50 мМ NaCl. Методом кругового дихроизма было показано, что белок богат элементами  $\beta$ -складчатой структуры и отличается высокой стабильностью в широком диапазоне температур. Интересно, что восстановление дисульфидных связей и денатурация химическими агентами не приводила к значительным изменениям вторичной структуры белка, что было подтверждено методами кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** хроматографический метод, дефенсин-подобный противогрибковый пептид, MALDI-TOF-MS, биохимические и биофизические исследования, *Trigonella foenum-graecum*.

Растения вырабатывают большой набор антимикробных соединений для своей защиты от воздействия патогенов. Антимикробные пептиды представляют собой небольшие, преимущественно основные, богатые остатками цистеина пептиды размером 2–11 кДа, которые классифицируются в различные группы на основе их третичной структуры [1]. Антимикробные белки являются ключевыми компонентами врожденного иммунитета, представляющими древний защитный механизм, обнаруживаемый в разно-

образных организмах. Экспрессия генов, кодирующих эти белки, предоставляет потенциальную возможность для разработки препаратов для защиты урожая сельскохозяйственных растений. Исследования, направленные на разработку новых антимикробных препаратов, обеспечивают определение новых кандидатных генов с целью усиления устойчивости растений к болезням.

Огромное количество белков, различающихся по структуре и функциям, вырабатывается растениями для защиты от патогенов грибов. Это дефенсины; белки PR-1; (1,3) $\beta$ -глюканазы; циклофилин-подобный белок; белки, инактивирующие рибосому; белки, богатые остатками глицина и гистидина; киллерные белки (киллерные токсины); тауматин-подобные белки; ингибиторы протеаз; белки, переносящие липиды (LTPs); хитиназы; хитин-связывающие белки и др. Эти белки получили свои названия в связи с механизмом их действия, особенностями структуры или сходства с известным «типом»

Принятые сокращения: Tf-AFP – дефенсин-подобный противогрибковый пептид из семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник), ПААГ – полиакриламидный гель, RP-HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография с обратной фазой, КД – круговой дихроизм, MALDI-TOF-MS – матрикс-ассоциированная лазерная десорбция-ионизация – времяпролетная масс-спектрометрия (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry), ТФУ – трифторуксусная кислота, ДТТ – дитиотрейтол, GuHCl – гуанидин хлорид.

\* Адресат для корреспонденции.

белка [2]. Среди них дефенсины и дефенсин-подобные белки представляют уникальное семейство антимикробных белков, характерное и для животных, и для растений.

Дефенсины и дефенсин-подобные растительные белки присутствуют в относительно больших количествах в тканях семян и защищают семена от почвенных грибов, тем самым повышая выживаемость проростков. Эти белки также были обнаружены и в других тканях растений. Дефенсины растений и дефенсин-подобные белки демонстрируют разнообразие биологической активности *in vitro*: противогрибковую, антибактериальную, инсектицидную, антипролиферативную, ингибирование ферментов, блокирование ионных каналов и биосинтез белка [3]. Способ действия растительных дефенсинов широко изучался, однако молекулярный механизм их действия до сих пор не выяснен. Принято считать, что они вступают во взаимодействие с определенными сфинголипидами плазматической мембраны грибов и внедряются в фосфолипидный бислой мембраны, что вызывает пермеабиллизацию и дестабилизацию мембраны. Для некоторых членов этого семейства белков было показано, что они проникают через мембрану в цитоплазму и взаимодействуют с внутриклеточными мишенями [4].

Пажитник является годичной травой, принадлежащей к семейству Fabaceae. Было показано, что его семена улучшают состояние при диабете, проявляют антиоксидантные свойства и контролируют уровень холестерина в крови [5]. В связи с экономической выгодой применения противогрибковых белков и пептидов в борьбе с грибковыми инфекциями, способными привести к массовому поражению сельскохозяйственных культур, целью настоящей работы являлись очистка и характеристика нового противогрибкового пептида из семян *Trigonella foenum-graecum* (пажитник) и определение группы противогрибковых белков, к которым он принадлежит.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Семена пажитника были приобретены в местных условиях. В работе использовали хроматографические материалы и реактивы для проведения двумерного электрофореза в ПААГ («GE Healthcare», Великобритания), колонку Luna C18 HPLC («Phenomenex»), маркеры молекулярного веса для SDS-ПААГ-электрофореза («Fermentas», Германия; «Genetix», Индия), блок для ультрафильтрации и мембраны с исключением 3 кДа («Millipore», Индия), остальные

реактивы аналитической чистоты и отвечающие требованиям HPLC («Sigma-Aldrich», США).

**Выделение и очистка противогрибкового пептида (Tf-AFP) из *T. foenum-graecum*.** Семена *T. foenum-graecum* (100 г), свободные от шелухи, были измельчены, и мука была обезжирена промывкой гексаном с последующей промывкой четырьмя частями (w/v) смеси хлороформа и этанола (в соотношении 2 : 1) в течение 2 ч. Обезжиренную муку экстрагировали 25 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 6,5), содержащим 50 мМ NaCl, 4 мМ ЭДТА и 0,01%-ный азид натрия, в соотношении 1 : 10 (w/v) в течение 36 ч при 4°. Гомогенат фильтровали через муслиновую ткань, фильтрат центрифугировали при 17 226 g в течение 20 мин при 4°. Полученный супернатант был обозначен как грубый экстракт. Образец грубого экстракта сперва осаждали добавлением сульфата аммония до 20%-ного насыщения. Образовавшийся супернатант доводили до насыщения сульфатом аммония при концентрации 70%. После центрифугирования при 17 226 g в течение 30 мин при 4° супернатант удаляли, осадок собирали и растворяли в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,2), диализовали против этого буфера с несколькими сменами буфера, используя диализные мембраны со значением исключающего веса 3,5 кДа (Spectra/Por6), и наносили на предварительно уравновешенную 20 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 6,2) ХК 16/20 СМ-сефарозу для проведения быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography, АКТА Prime Plus, «GE Healthcare Life Sciences», Швеция). После элюции несвязывавшихся белков адсорбированные белки были элюированы линейным градиентом NaCl (0–1 М) в том же буфере при постоянной скорости элюции 0,4 мл/мин. Поглощенные измеряли при 280 нм. Фракцию связавшихся белков (СМ2), демонстрировавших противогрибковую активность, объединяли, подвергали диализу против 25 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 6,5) при 4° в течение ночи и концентрировали в блоке для ультрафильтрации с использованием мембраны с исключающей массой 3 кДа. Далее эту фракцию подвергали гель-фильтрации на колонке ХК 16/100 с сефадексом G-50, предварительно уравновешенной 25 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 6,5). Фракции (объемом 3 мл), относящиеся к пикам белков, объединяли при постоянной скорости 0,3 мл/мин, фракции (S3), демонстрирующие противогрибковую активность, объединяли, концентрировали и диализовали против 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), содержавшего 1 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и затем наносили на гидрофобную колонку ХК 16/20 с октил-сефарозой

CL-4B, предварительно уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили градиентом буфера и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,0 (10 мл 50 мМ буфера, 70 мл 50–15 мМ буфера). Фракции по 5 мл собирали при постоянной скорости 0,5 мл/мин. Фракции с высокой противогрибковой активностью (P1) подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой (RP-HPLC – reverse-phase high performance liquid chromatography) на колонке C18 («Phenomenex», США; 10 × 250 мм, частицы 5 мкм, поры 100 Å), используя систему HPLC («Shimadzu», Япония). Колонка предварительно была уравновешена 0,1%-ной (v/v) трифторуксусной кислотой (ТФУ), затем элюция проводилась линейным градиентом ацетонитрила (0–30%-ным в течение 20 мин, 30–50%-ным в течение 40 мин, 50–70%-ным в течение 20 мин, 70–100%-ным в течение 1 мин) в 0,1%-ной ТФУ при постоянной скорости 2 мл/мин. Контроль элюции осуществляли измерением поглощения при 220 нм, пиковые фракции собирали вручную и диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 6,5) с несколькими сменами буфера и затем использовали для проведения различных определений.

**Определение белка, SDS-ПААГ и двумерный электрофорез (2D-PAGE).** Концентрацию белка в образце определяли с помощью связывания с красителем [6], используя БСА в качестве стандарта. SDS-PAGE (15%-ный акриламид, 4%-ный метиленбисакриламид) был выполнен по методу Лэммли [7]. Полосы белков окрашивали 0,1%-ным раствором Coomassie Brilliant Blue R-250 или серебром [8]. Для определения значения *pI* очищенный препарат Tf-AFP был подвергнут изоэлектрическому фокусированию в системе Ettan IPGphor 3 с полосками IPG, pH 3–10 («GE Healthcare», США). Регидратационный буфер включал 7 М мочевины, 2 М тиомочевину, 4%-ный (w/v) 3-[3-холамидопропил(диметиламмоний)]-1-пропансульфонат (CHAPS), 1 М DTT, 1%-ный бромфеноловый голубой и 0,05%-ный (v/v) IPG-буфер 3–10 («GE Healthcare», США). Условия изоэлектрофокусирования были следующими: 300 V – 40 мин, затем градиент напряжения вплоть до 1000 V – 27 мин, градиент до значения 5000 V – 80 мин и 5000 V – 15 мин при 20°. Полоски IPG уравновешивались в течение 15 мин в буфере, содержащем 1 М Tris-HCl (pH 8,8), 6 М мочевины, 30% (v/v) глицерина и 2% SDS (w/v) [9]. Разделение во втором направлении осуществлялось в ПААГ того же состава [7].

**Определение молекулярного веса с помощью масс-спектрометрии.** MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) проводилась на спектрометре Autoflex III Mass Spectrometer («Bruker Daltonics»,

Германия). Спектры регистрировались в режиме «positive-ion linear mode of operation» с ускоряющим напряжением 20 кВ, напряжением между решеткой и катодом вакуумной трубки 86%, временем отсрочки 200 нс. Образцы подготавливали путем смешивания равных объемов 0,1%-ной ТФУ, ацетонитрила (1 : 1) и раствора белка. 2 мкл полученного образца смешивали с 2 мкл свежеприготовленного матрикса  $\alpha$ -циано-4-гидроксициннамовой кислоты (CHCA) в 50% ацетонитрила и 1% ТФУ (1 : 1), 1 мкл наносился в целевую ячейку.

**Протеомный анализ: переваривание в геле и MALDI-TOF-MS-анализ.** Переваривание образцов в геле и MALDI-TOF-MS-анализ был выполнен на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer (Bruker Autoflex III Smartbeam, «Bruker Daltonics», Германия) по методу, описанному в работе Шевченко с соавт. [10]. Окрашенные Coomassie R-250 полоски геля после проведения SDS-электрофореза вырезали вручную из трех воспроизводимых гелей. Вырезанные кусочки геля отмывали от краски пятью порциями 50%-ного ацетонитрила объемом 100 мкл в 25 мМ бикарбонате аммония ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). После этого кусочки геля обрабатывали 10 мМ DTT в 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и инкубировали при 56° в течение 1 ч. Затем обрабатывали 55 мМ иодоацетамидом в 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  в течение 45 мин при комнатной температуре ( $25 \pm 2^\circ$ ), промывали 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и ацетонитрилом, высушивали в вакуумном концентраторе и регидрировали в 20 мкл 25 мМ раствора  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , содержащего 12,5 нг/мкл трипсина (Sequencing Grade, «Promega», США). Полученную смесь инкубировали во льду в течение 10 мин и для переваривания выдерживали в течение ночи при 37°. После переваривания осуществляли краткое вращение в течение 10 мин, супернатант собирали в свежие пробирки «Eppendorf» (США). Кусочки геля экстрагировали 50 мкл 1%-ной ТФУ и ацетонитрила (1 : 1) в течение 15 мин с частым вращением на вортексе. Супернатанты объединяли и высушивали на скоростном вакуумном концентраторе и перерастворяли в 5 мкл смеси ацетонитрила и 1%-ной ТФУ (1 : 1). Аликвоты (2 мкл) полученного образца смешивали с 2 мкл свежеприготовленного CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)-матрикса в 50%-ном ацетонитриле и 1%-ной ТФУ (1 : 1), 1 мкл наносился в целевую ячейку. Образцы были проанализированы с использованием MALDI-TOF/TOF масс-спектрометра при следующих параметрах: массы родительских ионов были измерены в режиме отражение/отсроченная экстракция с ускоряющим напряжением 20 кВ, напряжением на решетке 86%. Обработка данных производилась с

использованием программного пакета Flex Analysis.

Идентификацию белков осуществляли с помощью поиска по базам данных (PMF) с использованием программы MASCOT ([www.matrix-science.com](http://www.matrix-science.com)) на программном пакете Biotoools Software («Bruker Daltonics», США). Поиск сходства значений масс был приложен к существующим наборам переваренных белков и информации по последовательностям, размещенным в базах данных NCBI и SwissProt. Была выбрана таксономическая категория Viridiplantae (зеленые растения) и следующие параметры поиска: фиксированная модификация карбамидометила (C), переменная модификация окисления (M), фермент – трипсин, заряд пептида  $1^{+1}$ , моноизотопное и пропущенное расщепление –1. Согласно анализу вероятности MASCOT ( $P < 0,05$ ) только значительные совпадения были взяты для идентификации белков.

#### Определение противогрибковой активности.

Противогрибковую активность определяли на чашках Петри, содержащих ~20 мл картофельного декстрозного агара. Для проведения определения кусочек агара, содержавшего фронтальный мицелий тестируемых грибов, помещали в центр чашки. Чашки инкубировали в течение 6 ч при  $24^{\circ}$  в присутствии *Rhizoctonia solani*. В случае *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani* чашки инкубировали в течение суток для инициации роста грибов. После короткого периода инкубации стерильные бумажные диски (3 ММ, Whatman, «GE Healthcare Life Sciences», Швеция) размещали на расстоянии 0,5 см вокруг фронтального мицелия. Затем добавляли различные концентрации белка Tf-AFP на каждый бумажный диск. Чашки инкубировали при  $24^{\circ}$  ~36–48 ч до того момента, когда растущий мицелий полностью охватил периферические диски, содержавшие контрольный буфер (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,5), и сформировал полумесяц ингибирования вокруг диска, содержавшего эффективную концентрацию противогрибкового агента. Эффект ионной силы на противогрибковую активность определяли добавлением 50 мМ NaCl в образец белка Tf-AFP.

**КД-спектроскопия.** Измерение кругового дихроизма осуществляли на спектрополяриметре Jasco J-810, снабженном температурным контроллером Peltier и термостатируемым держателем кювет с термостатируемой баней. Спектры кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете (Far-UV CD) в диапазоне длин волн 190–260 нм регистрировались в кварцевой кювете (1 см) при концентрации белка 5 мкМ. Каждый КД-спектр являлся суммой трех сканирований при скорости сканирования 50 нм/мин,

ширине щели 1 нм, временем ответа 1 с и наклона данных 0,5 нм. Эффект температуры на конформационную стабильность белка Tf-AFP определяли путем измерения КД-спектров при  $20$ – $100^{\circ}$ . КД-спектры подвергали коррекции с учетом фона. Анализ вторичной структуры был осуществлен с помощью программного пакета CDNN.

**Измерение спектров флуоресценции.** Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Fluogomax-4 при ширине полосы 3 нм для монохроматоров возбуждения и эмиссии. Спектры эмиссии растворов белка в 10 мМ фосфатном буфере (pH 6,5) регистрировали при  $25^{\circ}$  в диапазоне 310–400 нм при условии значения поглощения не менее 0,1 при 280 нм после возбуждения при 280 нм. Температура в кювете составляла  $25^{\circ}$ . Для контроля использовались реакционные смеси, не содержавшие белок. Для измерения тушения флуоресценции готовили раствор белка с поглощением менее 0,1 на 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,5), содержавшем DTT (конечная концентрация – 10 мМ) или без него. Для получения образца денатурированного Tf-AFP белок инкубировали с 6 М GuHCl в течение ночи при комнатной температуре. Интенсивность флуоресценции регистрировали с прогрессивным добавлением небольших аликвот концентрированного 5 М раствора тушителя (акриламид или иодид калия), каждый раз после 2 мин (для обеспечения уравнивания). В каждом случае конечная концентрация тушителя была равной 0,3 М. Концентрированный раствор иодида калия содержал 0,2 мМ тиосульфата натрия для предотвращения образования трииодида ( $I_3^-$ ). Т.к. акриламид поглощает при 280 нм, эффект внутреннего фильтра (inner filter effect) был скорректирован с использованием уравнения:

$$F_{\text{corr}} = 10^{A/2} F,$$

где  $A$  – возрастание поглощения в центре кюветы после добавления акриламида. Нет необходимости вносить коррекцию в связи с иодидом калия, т.к. он не вносит вклад в поглощение образца при длине возбуждения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение и очистка Tf-AFP.** Подробное исследование антимикробных белков из определенного источника может обеспечить получение важной информации, касающейся аспектов выработки их стратегии успеха в ходе эволюции, и может помочь в разработке стратегии для осу-

шествования контроля над заболеваниями растений. У *Arabidopsis thaliana* имеется по крайней мере 13 вероятных генов растительных дефенсинов, кодирующих 11 различных дефенсин-подобных белков. Два дополнительных гена, по-видимому, кодируют белки, содержащие растительный дефенсиновый домен [11]. В предыдущей работе было показано, что в некоторых протестированных растительных образцах присутствуют многочисленные антимикробные белки, и что, возможно, существует синергизм действия различных белков с антимикробным действием [12]. Мы попытались получить подробную информацию касательно целого набора противогрибковых белков, используемых растениями в их защите от возможных атак со стороны патогенов, присутствующих в окружающей среде.

В настоящей работе проведена очистка противогрибкового пептида, названного Tf-AFP, с

использованием осаждения сульфатом аммония, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, гидрофобной хроматографии и высокоэффективной хроматографии с обратной фазой (RP-HPLC). Процедура очистки, использованная нами, проста и эффективна для отделения противогрибкового пептида от других биоактивных белков, включая ингибиторы протеаз и лектины. Осажденная сульфатом аммония (20–70%) растворимая белковая фракция из грубого экстракта муки, полученной из семян *T. foenum-graecum*, была подвергнута хроматографии на ионообменной колонке (СМ-сефароза), уравновешенной 20 мМ фосфатным буфером (рН 6,2). В этих условиях большинство белков было элюировано уравновешивающим буфером (пик СМ1). Фракции, элюированные солевым буфером (пик СМ2), показывали противогрибковую активность (рис. 1, а). Tf-AFP за-

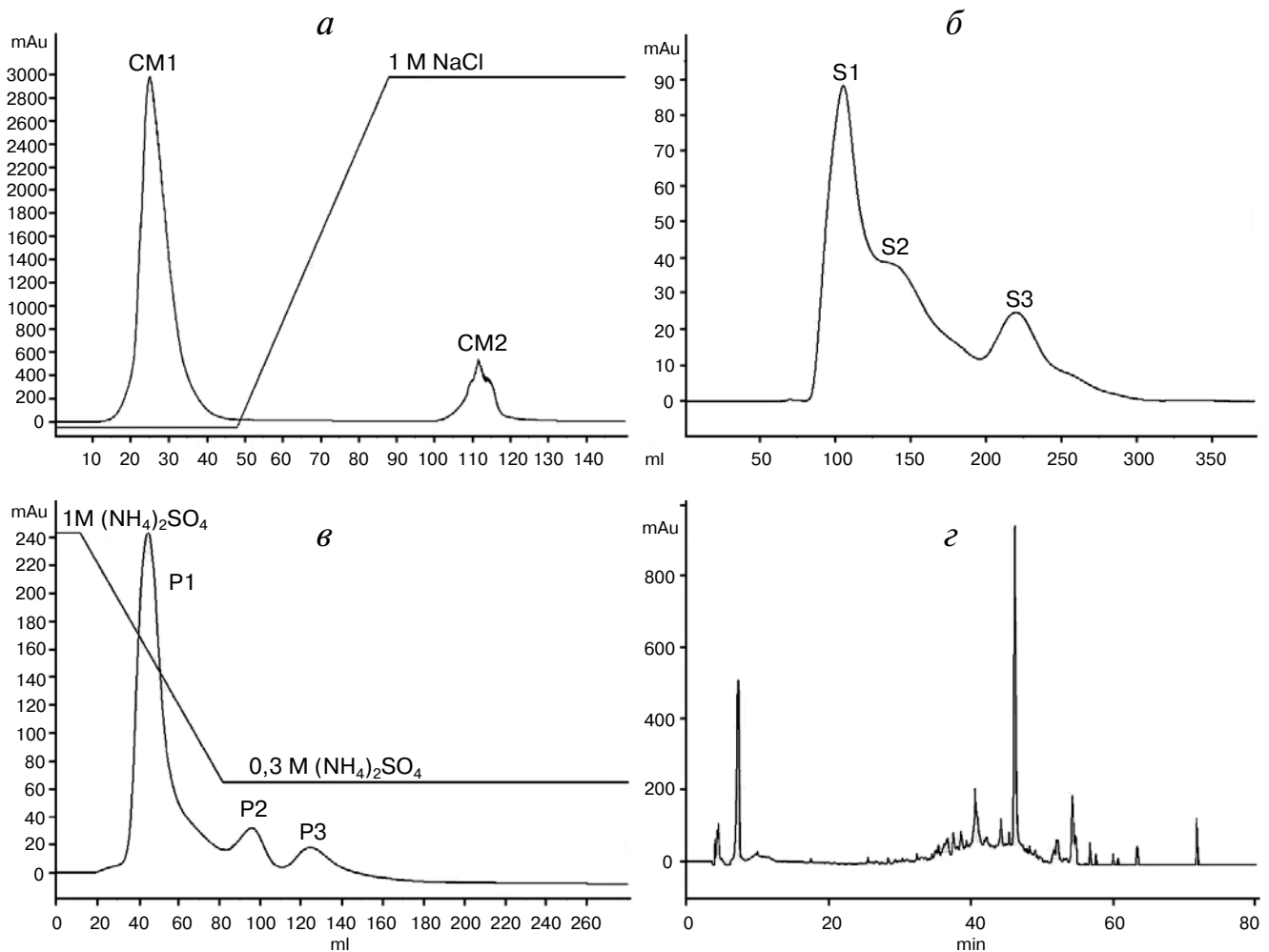


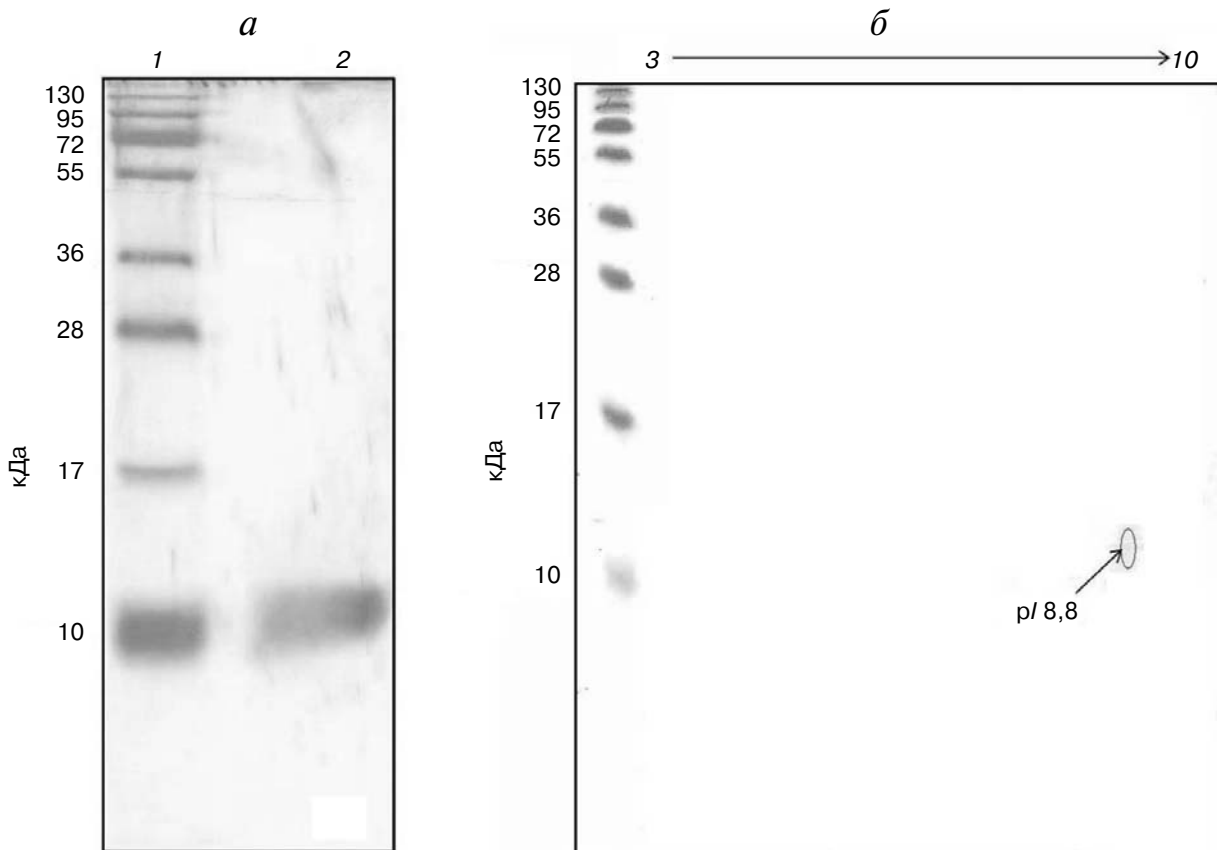
Рис. 1. Профили элюции экстрактов семян пажитника, полученные методами ионообменной хроматографии (а), гель-фильтрации (б), хроматографии на октил-сефарозе CL-4В (в) и RP-HPLC (г)

держивался на ионообменной смоле, как и многие противогрибковые белки из других источников [13]. Фракции пика СМ2 были объединены и подвергнуты диализу против 25 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 6,5). Затем они были разделены методом гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-50 на три пика S1, S2 и S3 (рис. 1, б). Противогрибковая активность была наивысшей у самой маленькой фракции S3. Далее фракции пика S3 были объединены, сконцентрированы и разделены на гидрофобной колонке с октил-Сефарозой CL-4В (рис. 1, в). Фракция P1 показала наивысшую противогрибковую активность в сравнении с пиками P2 и P3. Эта фракция была очищена с помощью RP-HPLC. Противогрибковый пептид был элюирован 43%-ным ацетонитрилом и назван Tf-AFP (рис. 1, г). Выход Tf-AFP составил 3,5 мг из исходных 100 г семян (табл. 1). Таким образом, выход очищенного пептида Tf-AFP равен 0,1% от общего белка семян. В случае хрена противогрибковые белки (Rs-AFPs) составляют только 0,5% от общего

**Таблица 1.** Очистка препарата Tf-AFP из 100 г высушенных семян

Стадия очистки	Общий белок, мг	Выход, %
Грубый экстракт	3600	100
Осаждение сульфатом аммония	2320	64,5
Ионообменная хроматография	303	8,4
Гель-фильтрация	10,9	0,30
Гидрофобная хроматография	5,8	0,16
RP-HPLC	3,5	0,10

количества растворимого белка семян. Этого количества белка достаточно для подавления роста грибов в почве [14].

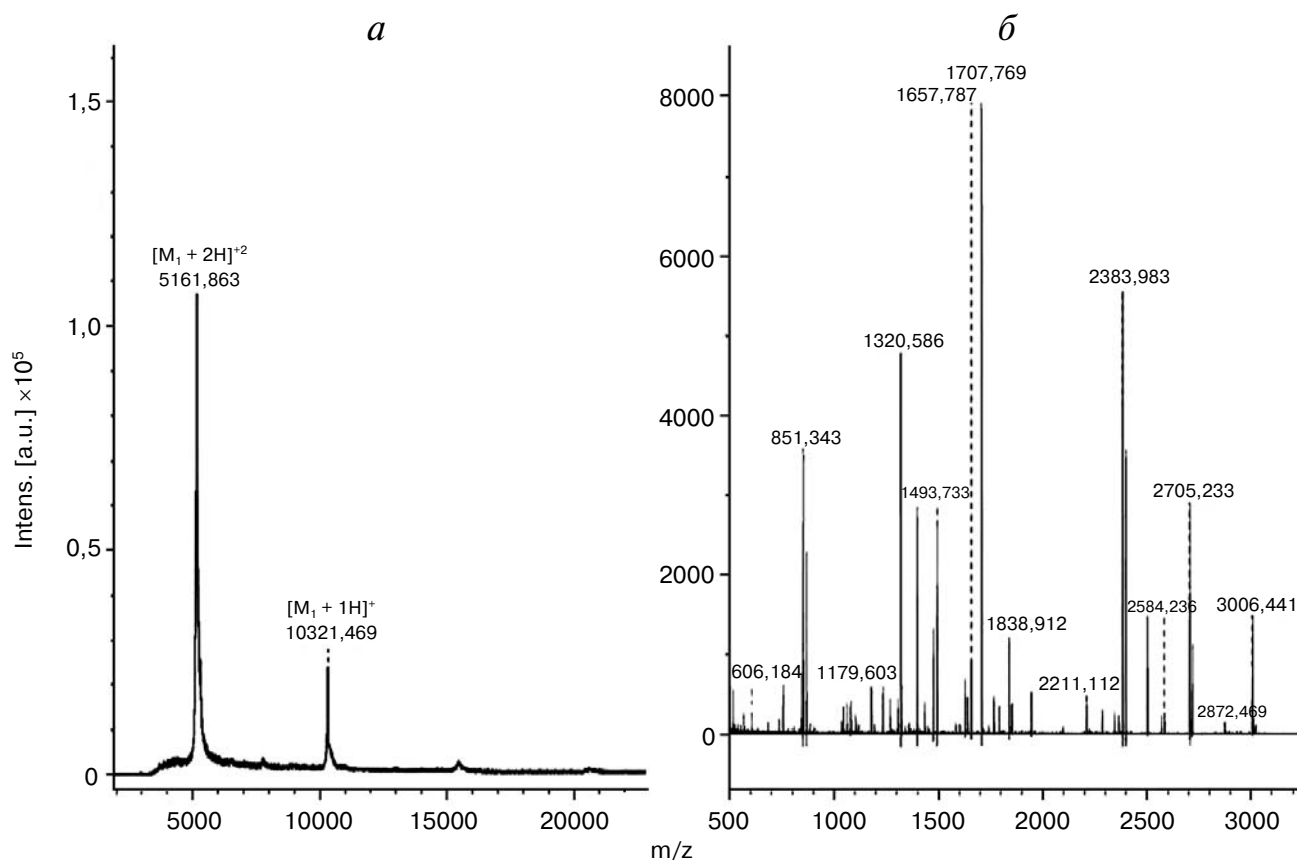


**Рис. 2.** а – Электрофорез Tf-AFP в SDS-ПААГ: 1 – маркеры молекулярного веса, 2 – Tf-AFP, очищенный с помощью RP-HPLC; б – окрашенный Кумасси гель после двумерного электрофореза – белок Tf-AFP, очищенный с помощью RP-HPLC. Изоэлектрофокусирование проводилось на полосках IPG с линейным градиентом рН 3–10

**Определение коэффициента экстинкции, молекулярной массы и значения изоэлектрической точки  $pI$ .** Молекулярная масса полученного противогрибкового пептида Tf-AFP была определена с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и методом масс-спектрометрии. Очищенный препарат Tf-AFP после RP-HPLC показывал одну полосу в SDS-ПААГ (рис. 2, а) с молекулярным весом  $\sim 10$  кДа, что соответствует результатам масс-спектрометрии, показывающей молекулярную массу для единично заряженного молекулярного иона  $[M + 1H]^+$  10321,5 Да и дважды заряженного молекулярного иона  $[M + 2H]^{+2}$  5161,9 Да (рис. 3, а). Изоэлектрическая точка ( $pI$ ) пептида была определена равной 8,8, основываясь на результатах изоэлектрического фокусирования в линейном диапазоне рН 3–10 при проведении двумерного электрофореза (рис. 2, б). Было показано, что новый пептид обладает основными свойствами и не содержит изоформ. Коэффициент экстинкции белка Tf-AFP в 1%-ном водном растворе при 280 нм был равен  $46,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Эти результаты очень на-

поминают сообщавшиеся ранее данные по противогрибковым белкам [15, 16].

**MALDI-TOF-MS-анализ.** Фингерпринтинг пептидной массы (PMF – peptide mass fingerprinting) полос очищенного Tf-AFP в геле после проведения одномерного электрофореза в SDS-ПААГ был получен методом MALDI-TOF-MS с использованием R-циано-4-гидроксициннамовой кислоты в качестве матрикса. Спектр MALDI-TOF-MS был получен после переваривания белка трипсином прямо в геле и показан на рис. 3, б. Более того, анализ с помощью программного пакета MASCOT в нерезервированной базе данных NCBIнг выявил высокое сходство с дефенсинами, предшественником противогрибкового белка, предполагаемым предшественником дефенсина 1,5. Наблюдаемая моноизотопная масса переваренных трипсином пептидов, полученная с использованием MALDI-TOF-MS, и их положение относительно совпадающих белковых последовательностей представлены в табл. 2. Совпавшие пептиды Tf-AFP покрыли 58% дефенсина (*Trigonella foenum-grae-*



**Рис. 3.** а – Определение молекулярного веса Tf-AFP с помощью MALDI-TOF-MS; б – MALDI-TOF-MS-спектры пептидов, образуемых при обработке Tf-AFP трипсином

*cum*, gi31324677) со значением счета 85, 48% от предшественника противогрибкового белка (*Medicago sativa*, gi11762086), вероятного предшественника дефенсина 1,5 (*Medicago sativa*,

gi56267921) и 48% от дефенсина (*Medicago truncatula*, gi37362318) со значением счета 53. Полученный белок Tf-AFP продемонстрировал большее значение *pI* в сравнении с ранее полученными

**Таблица 2.** Сводная информация по совпавшим пептидам Tf-AFP по данным MALDI-TOF-MS-анализа

Название белка (источник, код доступа)	Теоретическое значение <i>pI</i>	Счет	Пептид масса, Да	Положение	Совпавшие пептиды
Дефенсин ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> , 31324677)	8,1	85	754,32 755,35 868,37 1269,59 1627,62 1946,8 2364,0	66–70 53–59 60–65 29–38 39–52 37–52 39–59	CWCTK EHAVSGR CRDDFR TCENLADKYR GPCFSGCDTHCTTK YRGPCFSGCDTHCTTK GPCFSGCDTHCTTKENAVSGR
Предшественник противогрибкового белка ( <i>Medicago sativa</i> , 11762086)	8,1	53	754,32 868,37 1269,59 1627,62 1946,81	66–70 60–65 29–38 39–52 37–52	CWCTK CRDDFR TCENLADKYR GPCFSGCDTHCTTK YRGPCFSGCDTHCTTK
Предшественник вероятного дефенсина 1,5 ( <i>Medicago sativa</i> , 56267921)	8,1	53	754,32 868,37 1269,59 1627,62 1946,80	66–70 60–65 29–3 39–52 37–52	CWCTK CRDDFR TCENLADKYR GPCFSGCDTHCTTK YRGPCFSGCDTHCTTK
Дефенсин ( <i>Medicago truncatula</i> , 37362318)	8,09	53	754,32 868,37 1269,59 1627,62 1946,81	66–70 60–65 29–38 39–52 37–52	CWCTK CRDDFR TCENLADKYR GPCFSGCDTHCTTK YRGPCFSGCDTHCTTK

**Таблица 3.** Обзор параметров, полученных с помощью уравнений Штерна–Волмера и тушения акриламидом и иодидом внутренней флуоресценции Tf-AFP из семян *T. foenum-graecum*

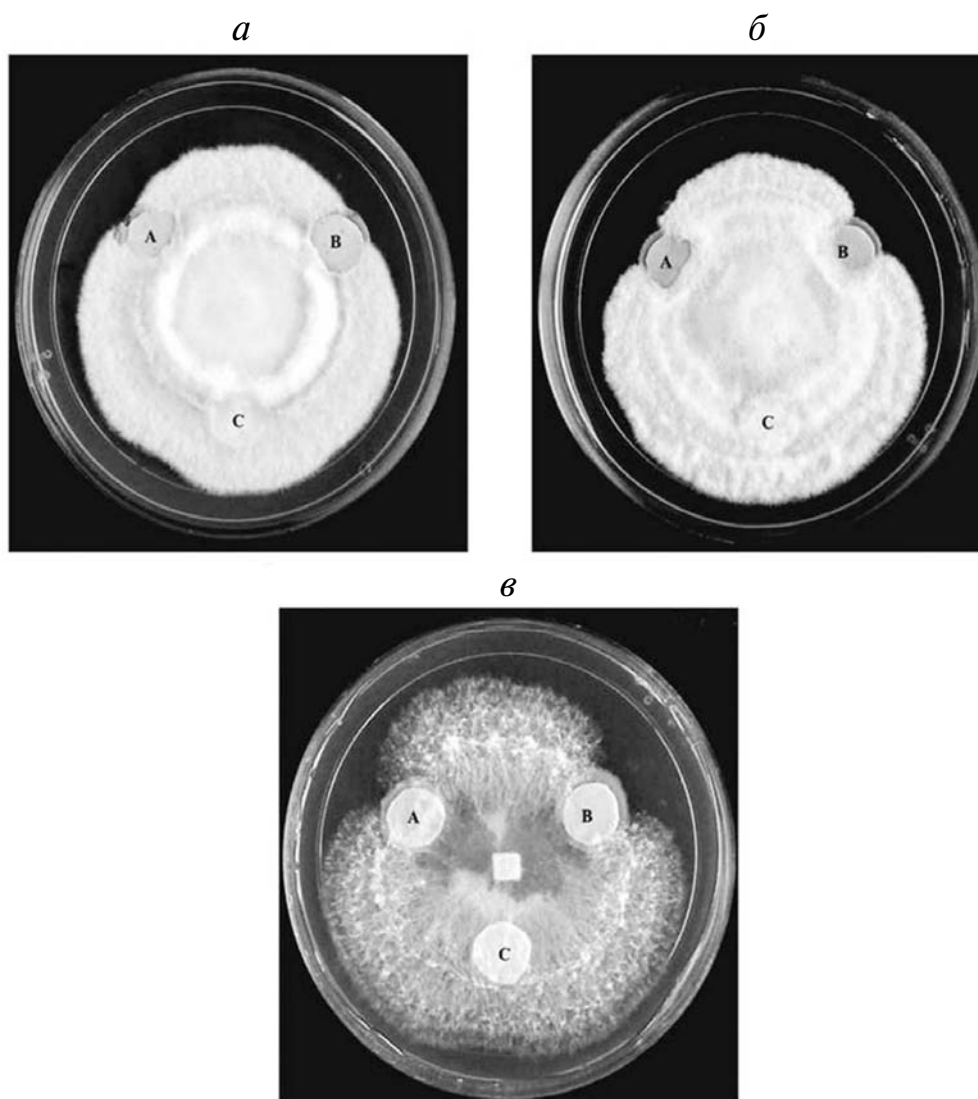
Образец	Тушитель	Тушение, %	$K_{sv}$ , $M^{-1}$	$f_a$	$K_a$ , $M^{-1}$
Нативный Tf-AFP	акриламид	64,8	6,30	0,83	5,91
+10 мМ DTT	»	65,8	6,70	0,85	5,97
+ 6 М GuHCl	»	61,5	6,79	0,92	6,23
Нативный Tf-AFP	иодид	51,0	3,41	0,66	5,70
+10 мМ DTT	»	57,2	4,49	0,71	6,89
+ 6 М GuHCl	»	61,5	5,26	0,74	11,3



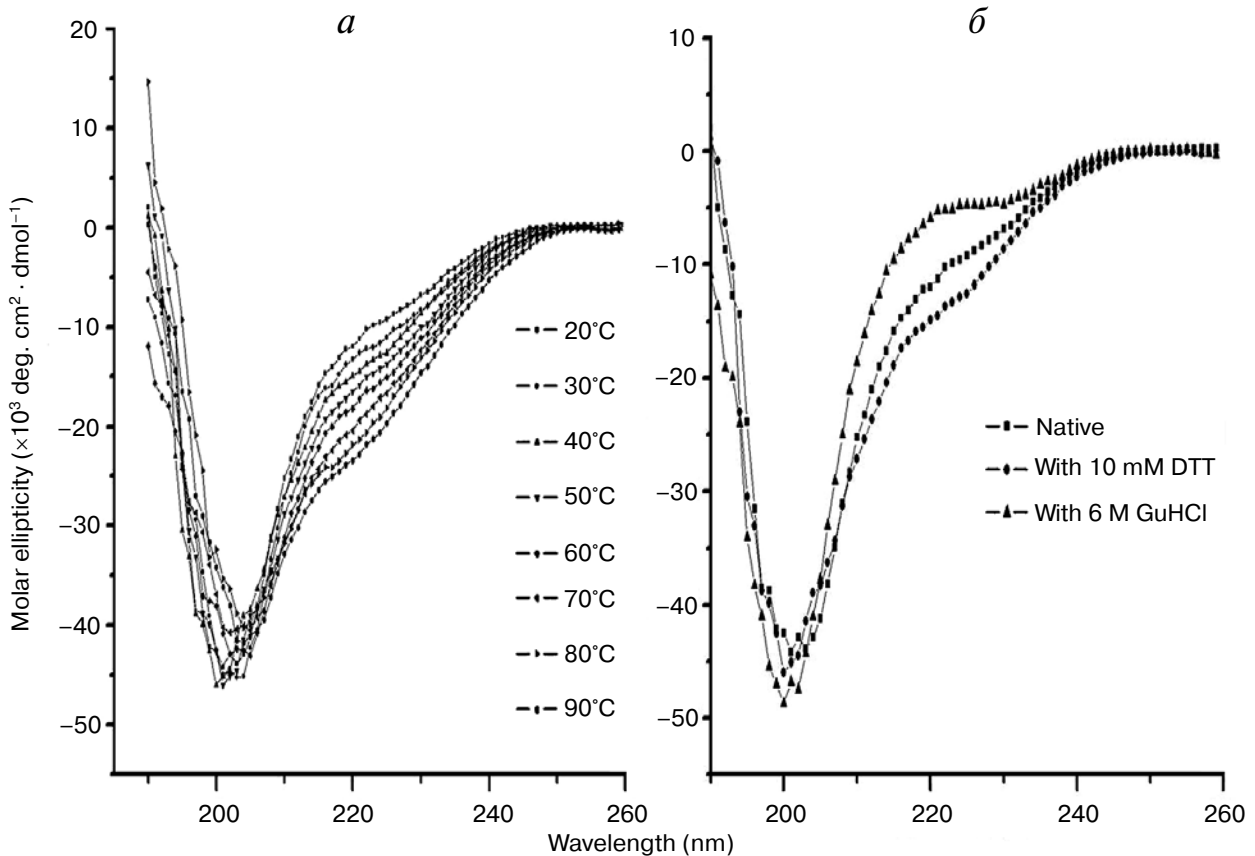
данными касательно дефенсинов из этого источника, показывая высокий положительный заряд Tf-AFP. Возросший положительный заряд усиливает противогрибковую активность дефенсинов в семенах хрена [17].

**Противогрибковая активность Tf-AFP.** Повышенная экспрессия дефенсина из японского хрена васаби (WT1) в рисе, картофеле и орхидее приводит к их повышенной сопротивляемости против *Magnaporthe grisea*, *Erwinia carotovora* и *Botrytis cinerea* [18]. Дефенсин TvD1 из дикого бобового растения *Tephrosia villosa* показывал противогрибковые свойства и активность против насекомых при экспрессии в трансгенных

растениях табака. Аналогично горчичный дефенсин усиливал сопротивляемость трансгенных растений табака и арахиса к некоторым грибковым патогенам [19]. Противогрибковые белки, такие как растительные дефенсины, также применяются в медицине в качестве противогрибковых препаратов [20]. Противогрибковая активность изолированного белка Tf-AFP показана на рис. 4. Видно, что пептид показывает сильную противогрибковую активность в отношении *Fusarium oxysporum* (рис. 4, а), *Fusarium solani* (рис. 4, б) и *Rhizoctonia solani* (рис. 4, в). Противогрибковая активность Tf-AFP значительно снижалась при добавлении 50 мМ NaCl в



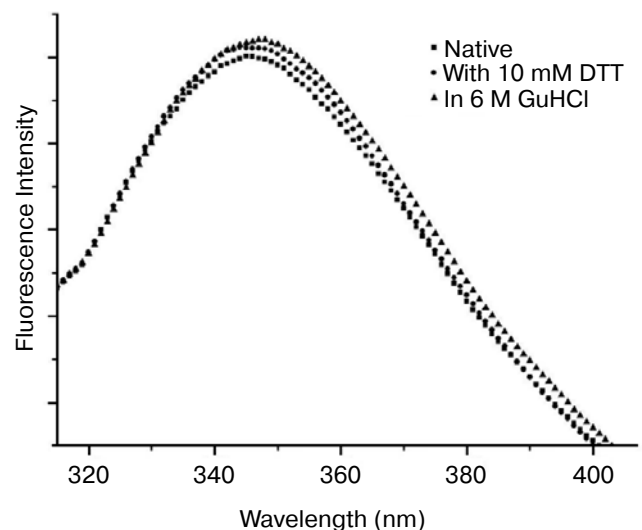
**Рис. 4.** Ингибиторная активность очищенного противогрибкового пептида в отношении роста мицелия *Fusarium oxysporum* (а), *Fusarium solani* (б) и *Rhizoctonia solani* (в). Были исследованы следующие образцы: А – 25 мкг Tf-AFP в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 6,5), В – 50 мкг Tf-AFP в том же буфере, С – только буфер



**Рис. 5.** *a* – КД-сканирование Tf-AFP в дальнем ультрафиолете в диапазоне температур 22–90°. Образцы инкубировали при соответствующей температуре в течение 10 мин, после этого производили их сканирование; *б* – КД-сканирование в дальнем ультрафиолете нативного, восстановленного и денатурированного Tf-AFP

буфер для проведения определения активности. Этот феномен также наблюдался в случае других видов дефенсинов. По-видимому, высокая ионная сила нарушает взаимодействие положительно заряженного дефенсина с отрицательно заряженной поверхностью микробов, вызывая потерю его противогрибковой активности [21]. Tf-AFP также не демонстрировал способность ингибировать трипсин и химотрипсин, как и другие противогрибковые белки.

**Анализ вторичной структуры.** Для анализа вторичной структуры и конформационной стабильности Tf-AFP при различных значениях температур 20–100° был использован метод кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете (диапазон длин волн 190–260 нм) (рис. 5, *a*). Структура Rs-AFP1 в растворе была определена с помощью ядерного магнитного резонанса. Было показано образование компактной глобулярной структуры, состоящей из трех антипараллельных  $\beta$ -складчатых структур и одной  $\alpha$ -спирали, которая стабилизируется структурным мотивом,

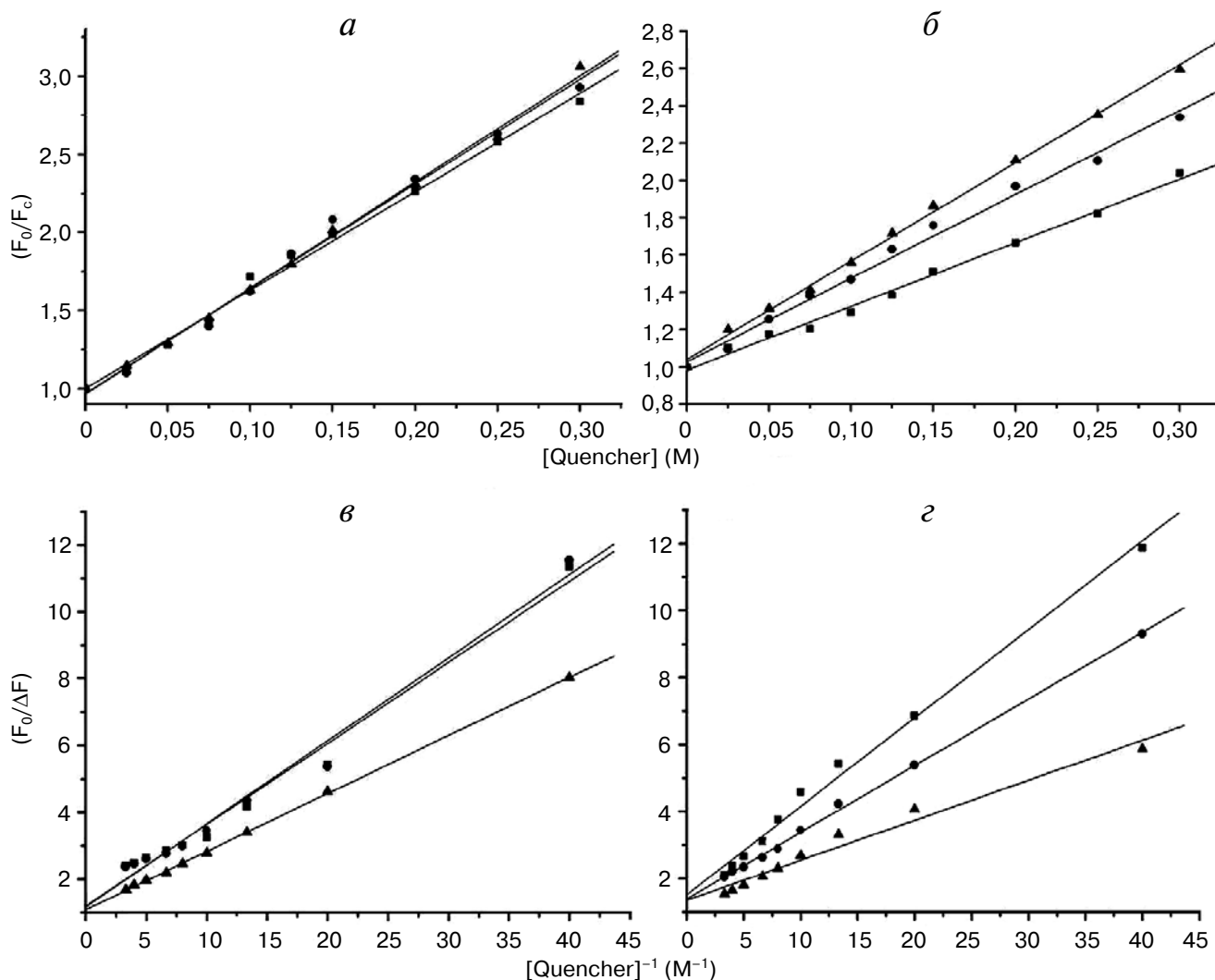


**Рис. 6.** Спектры флуоресценции Tf-AFP в нативном состоянии, после восстановления 10 mM DTT или денатурации 6 M GuHCl

образованным дисульфидными мостиками [22]. Сходные результаты были получены и для Tf-AFP, для которого было показано высокое содержание антипараллельных  $\beta$ -складчатых структур (42%), низкое содержание  $\alpha$ -спирали (27%),  $\beta$ -поворота (24%) и неупорядоченной структуры (7%). Спектр КД показал положительную полосу при 190 нм, относящуюся к образованию антипараллельной  $\beta$ -складчатой структуры. КД при возрастании температуры от 20 до 90° продемонстрировал термостабильность структуры Tf-AFP. Tf-AFP удерживал свернутую структуру полипептидного остова без значительных изменений в спектре КД вплоть до 90°. В дефенсинах растений наблюдается образование четырех ди-

сульфидных мостиков восемью остатками цистеина, которые, вероятно, играют важную роль в стабилизации структуры белка [23]. Однако восстановление дисульфидных мостиков в молекуле Tf-AFP не приводило к заметным изменениям в спектре КД. Таким образом, было показано, что Tf-AFP обладает необычной устойчивостью к действию восстанавливающего агента DTT (10 мМ), а также денатурирующего агента GuHCl (6 М) (рис. 5, б).

**Исследование флуоресценции.** Внутренняя флуоресценция белков является ценным свойством для изучения конформационных и структурных изменений, происходящих в белке в различных условиях [24]. Спектры флуоресценции



**Рис. 7.** Графики Штерна–Волмера тушения флуоресценции Tf-AFP акриламидом (а) и иодид-ионом (б). Модифицированные графики Штерна–Волмера тушения флуоресценции Tf-AFP акриламидом (в) и иодид-ионом (г). Использованы символы: квадраты – нативный белок, кружки – после восстановления 10 мМ DTT, треугольники – после денатурации 6 М GuHCl

белка в нативном и восстановленном состояниях и в присутствии денатурирующего агента представлены на рис. 6. Положение  $\lambda_{\max}$  при 345 нм в спектре эмиссии флуоресценции белка Tf-AFP в нативном, свободном от денатурирующих веществ растворе (рН 6,5) означает, что остатки тирозина в молекуле белка расположены в относительно гидрофобном микроокружении. Не было обнаружено сдвига  $\lambda_{\max}$  при восстановлении белка 10 мМ DTT, и обычный сдвиг в красную область наблюдался в присутствии 6 М GuHCl. Эти результаты показывают, что разрушение дисульфидных связей и химическая денатурация не приводят к значительным изменениям в эмиссии остатка тирозина и, следовательно, в структуре белка.

Были выполнены эксперименты на нативном, восстановленном и денатурированном Tf-AFP в присутствии различных концентраций акриламида (нейтральный тушитель) и иодида (ионный тушитель). Внутренняя флуоресценция белка при всех условиях гасилась обоими тушителями без каких-либо изменений  $\lambda_{\max}$ . Степени тушения, которые были достигнуты в каждом случае при концентрации тушителя 0,3 М, представлены в табл. 3. Акриламид был более эффективен (тушение сигнала на 64,8%), чем ионный тушитель иодид (51,0% тушения), что указывает на расположение остатков тирозина в относительно гидрофобной среде.

Данные тушения были проанализированы с использованием уравнения Штерна–Волмера (1) и модифицированного уравнения Штерна–Волмера (2) [25]:

$$F_o/F_c = 1 + K_{sv} [Q], \quad (1)$$

$$F_{oc}/\Delta F = (f_a)^{-1} + (K_a f_a)^{-1} [Q]^{-1}, \quad (2)$$

где  $F_o$  и  $F_c$  – интенсивность флуоресценции с поправкой на разведение в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно,  $[Q]$  – концентрация тушителя,  $K_{sv}$  – константа тушения Штерна–Волмера для данного тушителя,  $f_a$  относится к доле общей флуоресценции, которая доступна для тушителя,  $K_a$  – соответствующая константа тушения. Угол наклона графиков Штерна–Волмера дал значения  $K_{sv}$  (1), в то время как наклон модифицированных графиков Штерна–Волмера дал значение  $(K_a f_a)^{-1}$ , а их ордината – значение  $1/f_a$  (2). Полученные значения приведены в табл. 3. Профили тушения акриламидом и ионом иодида, полученные для нативного, восстановленного и денатурированного состояния, показывают линейную зависимость от концентрации тушителя. Графики Штерна–Волмера, полученные в присутствии двух тушителей, показаны на рис. 7, а, б; модифицированные графики Штерна–Волмера для обоих тушителей показаны на рис. 7, в, г. Были отмечены небольшие изменения констант тушения  $K_{sv}$ ,  $K_a$  и доли общей флуоресценции, которая доступна тушителю ( $f_a$ ) в восстанавливающих и денатурирующих условиях. Эти результаты, которые находятся в соответствии с данными КД-спектров, продемонстрировали отсутствие конформационных изменений при воздействии DTT или GuHCl в растворе.

Р. Оддепалли выражает благодарность Департаменту научных и промышленных исследований (Нью-Дели, Правительство Индии) за предоставленную стажировку. Л. Гурупрасад благодарит Комитет по университетским грантам (Нью-Дели, Правительство Индии) за финансовую поддержку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., Osborn, R.W., and Nielson, K. (1997) Antimicrobial peptides from plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **16**, 297–323.
2. Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal Proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2883–2894.
3. Carvalho, A.O., and Gomesa, V.M. (2009) Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties, *Peptides*, **30**, 1007–1020.
4. van der Weerden, N.L., Hancock, R.E., and Anderson, M.A. (2010) Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process, *J. Biol. Chem.*, **285**, 37513–37520.
5. Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P., and Smith, M. (2003) Therapeutic applications of fenugreek, *Altern. Med. Rev.*, **8**, 20–27.
6. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
7. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
8. Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, **8**, 93–99.
9. Oddepally, R., Sriram, G., and Guruprasad, L. (2013) Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds, *Phytochemistry*, **96**, 26–36.
10. Shevchenko, A., Wilm, A., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.*, **68**, 850–858.

11. Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2002) Plant defensins, *Planta*, **216**, 193–202.
12. Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Maas, C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco, *Plant J.*, **8**, 97–109.
13. Wang, H.X., and Ng, T.B. (2007) An antifungal peptide from red lentil seeds, *Peptides*, **28**, 547–552.
14. Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Leuven, F.V., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense, *Plant Cell*, **7**, 573–588.
15. Wang, H., and Ng, T.B. (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*, *Peptides*, **25**, 1–5.
16. Fujimura, M., Minami, Y., Watanabe, K., and Tadera, K. (2003) Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1636–1642.
17. Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds, *J. Biol. Chem.*, **267**, 15301–15309.
18. Lay, F.T., and Anderson, M.A. (2005) Defensins – components of the innate immune system in plants, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **6**, 85–101.
19. Anuradha, T.S., Divya, K., Jami, S.K., and Kirti, P.B. (2008) Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens, *Plant Cell Rep.*, **27**, 1777–1786.
20. Thevissen, K., Kristensen, H.H., Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Francois, I.E.J.A. (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins, *Drug Discov. Today*, **12**, 966–971.
21. Rivillas-Acevedo, L.A., and Soriano-Garcia, M. (2007) Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds, *J. Agricult. Food Chem.*, **55**, 10156–10161.
22. Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., and Borremans, F. (1998) Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by 1H NMR, *J. Mol. Biol.*, **279**, 257–270.
23. Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., and Craik, D.J. (2003) The three-dimensional solution structure of NaD1, a floral defensin from *Nicotiana alata* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP, *J. Mol. Biol.*, **325**, 175–188.
24. Eftink, M.R., and Ghiron, C.A. (1981) Fluorescence quenching studies with proteins, *Anal. Biochem.*, **114**, 199–227.
25. Lehrer, S.S. (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion, *Biochemistry*, **10**, 3254–3263.

**ISOLATION, PURIFICATION,  
AND CHARACTERIZATION OF A STABLE  
DEFENSIN-LIKE ANTIFUNGAL PEPTIDE  
FROM *Trigonella foenum-graecum* (FENUGREEK)  
SEEDS**

**R. Oddepally, L. Guruprasad\***

*University of Hyderabad, School of Chemistry,  
Hyderabad 500046, India; E-mail: lgpsc@uohyd.ernet.in*

Received August 4, 2014

Revision received October 27, 2014

A novel defensin-like antifungal peptide (Tf-AFP) with molecular mass of 10.3 kDa was isolated from seeds of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) by ammonium sulfate precipitation, cation-exchange, gel-filtration, and hydrophobic chromatography, and RP-HPLC. Mass spectroscopy analysis revealed the intact mass of purified antifungal peptide as 10321.5 Da and high similarity to plant defensins and other antifungal proteins in database search. 2D-PAGE showed pI value to be 8.8 and absence of isoforms. The isolated peptide Tf-AFP inhibited growth of fungal species such as *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, and *Rhizoctonia solani*. The antifungal activity was inhibited in the presence of 50 mM NaCl. Circular dichroism analyses demonstrated that the protein is rich in beta-sheet structure and highly stable over a wide range of temperatures. Surprisingly, reduction of disulfide bridges and chemical denaturation did not produce considerable changes in secondary structure as judged by circular dichroism as well as fluorescence spectroscopy.

*Key words:* chromatographic method, defensin-like antifungal peptide, MALDI-TOF-MS, biochemical and biophysical studies, *Trigonella foenum-graecum*