

На правах рукописи

ФЕДОТКИНА (СРИБНАЯ) ОЛЕСЯ СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К РАЗДЕЛЕНИЮ
И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕПТИДНЫХ ПРОДУКТОВ
С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов – 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Самарский государственный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
заслуженный деятель
науки и техники РФ
Пурыгин Петр Петрович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Буланова Анджела Владимировна

доктор химических наук, профессор
Штыков Сергей Николаевич

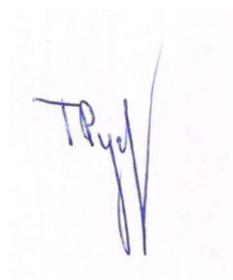
Ведущая организация: Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «23» декабря 2010 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.243.07 при Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, Саратов, ул. Астраханская 83, Саратовский государственный университет, корпус 1, Институт химии.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

Автореферат разослан «___» ноября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, доцент



Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: В связи с резким ростом числа новых органических соединений пептидной природы, полученных при секвенировании, проблема установления взаимосвязи между физико-химическими свойствами этих пептидов и их структурой является одной из наиболее актуальных в жидкостной хроматографии. Наиболее информативными в этом плане являются современные варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ, с применением матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации МАЛДИ и масс-селективного детектирования, особенно в тандемном варианте. В настоящее время теория сорбции и разделения органических, а тем более биоорганических, соединений находится практически в стадии разработки, что требует детального изучения адсорбционных свойств большого числа таких соединений, в частности, пептидов. Физико-химическое обоснование процессов в системе сорбат-сорбент-элюент в основном носит описательный характер. В связи с этим такие исследования важны, поскольку накопление физико-химических данных по удерживанию в условиях ВЭЖХ позволяет создавать модели физико-химического поведения соединений и обосновывать оптимальные условия разделения сложных смесей данным методом, а в сочетании с масс-спектроскопией – проводить идентификацию компонентов сложных смесей пептидов.

Пептидные продукты, получаемые на основе иммунных реакций насекомых, могут проявлять разнообразную биологическую активность и могут стать основой для разработки новых фармакологических средств. Врождённая иммунная система восковой моли (*Galleria mellonella*, *GM*) производит множество пептидов для защиты от болезнетворных микробов. Из *GM* выделили ряд пептидов бактерицидного и противогрибкового действия. Перспективным является использование *GM* в качестве модельной системы при изучении биосинтеза антибактериальных пептидных продуктов, благодаря ее доступности и законодательной урегулированности этической стороны исследований. Такое биопроиз-

водство требует комплексного подхода к исследованию пептидных продуктов, сочетающего физико-химические методы разделения и идентификации.

Физико-химической основой хромато-масс-спектрометрического метода является возможность совместно использовать результаты хроматографических и масс-спектрометрических исследований. При разработке физико-химических основ разделения какого-либо класса соединений проводят определение термодинамических характеристик адсорбции, таких как величины удерживания – $\ln k$, изменение свободной энергии Гиббса – ΔG , изменение энтальпии – ΔH , изменение энтропии – ΔS , отражающих связь между структурой молекул и их физико-химическими свойствами (ван-дер-Ваальсов объём, липофильность, поляризуемость, дипольный момент). Использование разных вариантов ВЭЖХ для таких исследований позволяет устанавливать закономерности удерживания пептидных продуктов и на их основе разделять смеси и идентифицировать отдельные компоненты смесей, оценивать молекулярные массы исследуемых молекул, отделять соли и низкомолекулярные компоненты. Применение метода МАЛДИ-МС/МС позволяет получать информацию о массовых числах, фрагментации пептидных молекул, определять структурные особенности и, таким образом, быстро и эффективно устанавливать аминокислотные последовательности пептидов, используя два подхода к интерпретации масс-спектров: поиск по базам данных и *de novo* секвенирование (установление аминокислотной последовательности).

Цель и задачи исследований:

Целью работы являлось установление закономерностей хроматографического удерживания антимикробных пептидов *GM*, полученных с помощью иммунных реакций, в условиях метода ВЭЖХ и выбор оптимальных условий разделения и идентификации, с использованием хромато-масс-спектрометрии.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Определить физико-химические характеристики удерживания исследуемых пептидов (фактора удерживания, разности дифференциальных мольных энер-

гий Гиббса). Оценить соответствие хроматографического поведения пептидов закономерностям двух наиболее надежных подходов к описанию их удерживания в условиях градиентной обращённо-фазовой (ОФ) ВЭЖХ.

2. Определить условия проведения иммунизации *GM* для получения пептидных смесей с высоким содержанием антибактериальных пептидов.

3. Разработать методологию хроматографического разделения смесей индуцированных пептидов, используя разные режимы и сорбенты; подобрать параметры хроматографического разделения.

4. Масс-спектрометрически идентифицировать антимикробные пептиды. Изучить фрагментацию антибактериальных пептидов методом МАЛДИ-МС/МС.

5. На основании данных хроматографического и масс-спектрометрического исследования разных пептидных смесей разработать методику определения их состава.

6. Провести антибактериальное тестирование, выявить активные пептиды среди всех полученных фракций и разработать способ идентификации охарактеризованных пептидных продуктов, не предполагающий обязательного проведения антимикробного теста.

Научная новизна:

1. Получены термодинамические характеристики адсорбции антимикробных пептидов, описывающие их разделение в условиях ОФ и катионообменной ВЭЖХ. По результатам сопоставления реальных и расчетных времен удерживания для ряда антибактериальных пептидов проведена их хроматографическая идентификация, в том числе на основании физико-химических характеристик адсорбции и корреляций, связывающих структуру пептидов с удерживанием.

2. Определены условия проведения иммунизации *GM* и получения пептидных смесей с высоким содержанием антибактериальных пептидов.

3. Изучено несколько хроматографических режимов при исследовании пептидных продуктов на трех различных сорбентах и подобраны оптимальные условия разделения сложных смесей пептидов. Впервые проведена ВЭЖХ пептидных продуктов *GM* на сильном катионите.

4. На основе МС/МС масс-спектров изученных пептидных продуктов идентифицированы как известные антимикробные пептиды, так и не описанные ранее в литературе. Масс-спектрометрически установлена аминокислотная последовательность впервые обнаруженных антимикробных пептидов.

5. Сочетание хроматографических и масс-спектрометрических данных позволило подробно изучить состав различных пептидных смесей, прошедших разную пробоподготовку. Показано, что в пептидной смеси, полученной без иммунизации, содержатся три известных антимикробных пептида, а в пептидных смесях, полученных после обработки 1.1-диметилгидразином (НДМГ) и его производным, бактериями *B. cereus*, детектированы все известные антимикробные пептиды *GM* и ряд не описанных ранее.

Практическая значимость работы:

Хроматографическое выделение антибактериальных пептидных продуктов может являться альтернативой многостадийному пептидному синтезу, а совершенствование данных процессов и разработка стандартизированных методик могут стать основой для их препаративного и промышленного выделения при создании лекарственных средств.

Изучение действия токсичных компонентов ракетного топлива (НДМГ) на биологические организмы является важной практической задачей. Использование для таких испытаний модельного организма *GM* может внести существенный вклад в понимание механизмов токсического действия и в разработку средств повышения безопасности ракетно-космической деятельности.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Физико-химические характеристики удерживания пептидов в условиях ОФ и катионообменной ВЭЖХ (фактор удерживания k , $\ln k$ и дифференциальные мольные энергии Гиббса и их разности ΔG). Результаты сопоставления экспериментальных и расчетных времен удерживания.

2. Способы хроматографического разделения смеси природных пептидов с антибактериальной активностью с использованием различных вариантов ВЭЖХ: катионообменного и обращенно-фазового.

3. Результаты идентификации аминокислотных последовательностей антимикробных пептидов, полученные на основе исследования МС/МС масс-спектров. Результаты *de novo* секвенирования для ряда пептидов в составе антибактериальных фракций.

4. Результаты комплексного исследования пептидных смесей методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии МАЛДИ-МС/МС, полученные на основе использования хроматографической информации, характеристик удерживания и установленных физико-химических закономерностей, для увеличения достоверности идентификации пептидов.

Апробация работы: Результаты исследований докладывались на IV Всероссийской конференции-школе «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Москва, 2010), на Всероссийской научно-практической конференции «Хроматография – народному хозяйству» (Дзержинск, 2010), на XIII Всероссийском симпозиуме «Актуальные проблемы теории адсорбции, пористости и адсорбционной селективности» (Москва, 2009), на Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия» (Москва, 2008).

Публикации: По результатам исследования опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 8 тезисов докладов.

Структура и объем работы: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы из 246 наименований, материал изложен на 199 страницах машинописного текста, включает 78 рисунков и 29 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследований, сформулирована цель работы и отражена ее практическая значимость. Обоснована необходимость сочетания физико-химических методов, в первую очередь, ВЭЖХ и МАЛДИ-МС при исследовании пептидов.

Глава 1. Обзор литературы. Проанализированы возможности хроматографических и масс-спектрометрических методов при изучении антимикроб-

ных пептидов. Рассмотрено применение методов ВЭЖХ для получения физико-химических характеристик адсорбции, установления закономерностей удерживания, а также выделения, очистки и идентификации пептидов. Из обзора работ по применению метода МАЛДИ-МС следует, что его использование для детектирования и идентификации пептидов эффективно и надежно. Проанализированы преимущества масс-спектрометрии МАЛДИ-МС/МС пептидов.

По итогам обзора литературы выбрано основное направление исследований: изучение хроматографического поведения антимикробных пептидов на различных сорбентах, получение термодинамических характеристик адсорбции рассматриваемых пептидов, поиск физико-химических закономерностей разделения и масс-спектрометрическое изучение пептидных продуктов.

Глава 2. Экспериментальная часть. В качестве объекта исследования выступали антибактериальные пептиды личинок *GM*, антибактериальные пептиды природного (низин) и синтетического происхождения (аналог цекропина В) (табл. 1).

В работе использовали следующие приборы: жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и программой обработки данных ChemStation Rus версия А.10.02; масс-спектрометры с времяпролётными масс-анализаторами и ионизацией МАЛДИ серии Ultraflex фирмы Bruker (Германия), оснащенные УФ лазерами: азотным с рабочей длиной волны 337 нм и неодимовым (Nd) – 355 нм и программным обеспечением flexControl и flexAnalysis.

Хроматографическое разделение проводили на колонках: Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4.6 мм, 5 мкм, 80 Å и Zorbax SCX-300 150×4.6 мм, 5 мкм, 250 Å (Agilent Technologies, США). Детектирование осуществляли при 210, 214, 280 нм. Условия хроматографирования приведены в таблицах 2 (представлены только наиболее эффективные режимы) и 3.

Образцы для проведения МАЛДИ готовили на мишенях типа Anchor Chip с размером лунок 600 мкм. В работе использовали матрицы: α-циано-4-гидроксикоричную кислоту и 2.5-дигидрооксибензойную кислоту (Bruker).

Гидролиз пептидов проводили при помощи трипсина (Promega) в течение 18 ч при 37 °С, полученные растворы исследовали масс-спектрометрически.

Таблица 1. Объекты исследования – антибактериальные пептиды.

Название пептида (английское/русское) и номер	Аминокислотная последовательность (однобуквенный код ^{***})	Масса, Д	N*	pI**
1) Proline-rich antimicrobial peptide 1 Пролин-содержащий антимикробный пептид 1	DIQIP- GIKKPTHRDIIPNWNPNVRTQP WQRFGGNKS	4320	37	10.99
2) Lebocin-like anionic peptide 1 Лебоцин анионный пептид 1	EADEPLWLYKGDNIERAPT- TADHPILPSIIDDVKLDPNRRYA	4816	42	4.51
3) Defensin (Galiomicin) 1 Дефензин	DTLIGSCVWGATNYTSDCNAECK RRGYKGGHCGSFLNVNCWCE	4715	43	7.25
4) Proline-rich antimicrobial peptide 2 Пролин-содержащий антимикробный пептид 2	EIRLPEPFRFPSPTVPKPIDID- PILPHPWSPRQTYPIIARRS	4929	42	9.97
5) Cecropin-D-like peptide Подобный цекропину D пептид	ENFFKEIERAGQRIRDAISAAP AVETLAQAQKIIKGGD	4253	39	6.45
6) Anionic antimicrobial peptide 2 Анионный антимикробный пептид 2	ETESTPDYLK- NIQQQLEEYTKNFNTQVQNAF DSDKIKSEVNNFIESLGKILN- TEKKEAPK	6975	60	4.80
7) Defensin-like peptide Подобный дефензину пептид	DKLIGSCVWGATNYTSDCNAE- CKRRGYKGGHCGSFWNVNCWCEE	4949	44	7.46
8) Cecropin-B-analog Аналог цекропина B	WKVFKKIEKIGRNIRNGIVKAG -PLIAVLGEAKAL	3728	34	11.02
9) Nisin from <i>Lactococcus lactis</i> Низин из <i>Lactococcus lactis</i>	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMK -TATCCSIHVS	3354	33	9.31
10) Lysozyme Лизоцим	KTFTRCLELVQALRRQGFDEAKLRDWWCLVENE SRGR TDIVGKPNKNGSRDYGLFQINDKYWCSN TSKAGKDCNITCSQLLTDDITVASKCAKKVYKR HNFMAWY-GWRNHCQNKPLPDISK	14027	121	9.53
11) 27 kDa hemolymph protein precursor Белок гемолимфы 27 кД	DTLKAQCKKNGAEDKAQDVENAANK- FVECVKGLFDFSTIKKEIEDAKPNGALDEVF- GKYCAKSPQLKTCIHTLTTSATPCLEASV- REQVGPINNGADQLIDFICYKDGDRIAL- FIAEGGPECFQEKSEGIRA- CAEKLKNNVGSVEAAQSLTLVEQCGKYDEL- TACIIKSLEECSTPTPGNMAESLFRFVRKGSPCN- KAAPLKN	23764	219	5.3
12) Apolipophorin-3 Аполипофорин-3	DASTPLQDLEKHAAEFQKTFSEQ- NAFTNSKDTKEFN TALKEGSDSVLQQLNA- LASSLQKALNDANGKAKEALEQTRTNLER- TAEELRRAPDVERQAGALRDLQTAVQATV- QETQKLAKTVGANLEETNKKLAQIK- SAYDDFVKQAQEVQKLLHEAASKQ	18075	186	8.59

*N – число аминокислотных остатков в пептиде, **pI – изоэлектрическая точка, ***Каждой аминокислоте в соответствии с международной классификацией присваивается определенная латинская буква для сокращения.

Масс-спектры получены в режиме регистрации положительных ионов, как в линейном режиме, так и с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс $[MH]^+$ в режиме рефлектрона составляла 0.007 %,

точность измеренных средних масс в линейном режиме составляла 0.05-0.1 %, точность измеренных масс фрагментов в режиме МС/МС составляла 1-2 Д.

Таблица 2. Условия хроматографирования на Zorbax Eclipse XDB-C18.

Элюенты	Режим градиентного элюирования	Скорость элюента, термостат колонки	Объем вводимой пробы, диапазон сбора фракций
0.04 % ТФУ (А) в воде-ацетонитрил (В)	2) 5-80 % В – 0-30 мин, 80-100% – 30-32 мин.	0.5 мл/мин 25 °С	20 мкл, 1-30 мин по 1 мин.
0.04 % ТФУ в воде (А)-0.04 % ТФУ в ацетонитриле (В)	3) 5-80 % В – 0-30 мин, 80-100% – 30-32 мин.	0.5 мл/мин 25 °С	60 мкл, 3-9 мин по 3 мин, 9-21,5 мин по 30 сек, 21,5-30,5 мин по 3 мин.
0.04 % ТФУ в воде (А)-0.04 % ТФУ в ацетонитриле (В)	4) 10 % В – 0-10 мин, 10-80% В – 10-50 мин.	0.5 мл/мин 40 °С	100 мкл, 10-50 мин по 1 мин.
0.04 % ТФУ в воде (А)-0.04 % ТФУ в ацетонитриле (В)	5) 10 % В – 0-5 мин, 10-80% В – 5-45 мин.	0.5 мл/мин 25 °С	25 мкл, 5-45 мин по пикам.

Таблица 3. Условия хроматографирования на Zorbax SCX-300

Элюенты	Режим градиентного элюирования	Скорость элюента, термостат колонки	Объем вводимой пробы, диапазон сбора фракций
0.1 % ТФУ в воде (А)-0.04 % ТФУ в ацетонитриле (В), 2 М NH ₄ Cl (С)	7) 95 % А, 5 % В – 0-10 мин, 5-75 % В, 0-25 % С – 10-30 мин.	0.5 мл/мин 40 °С	500 мкл, 3-10 мин по 3,5 мин, с 10-30 мин по 1 мин.
0.1 % ТФУ в воде (А)-0.04 % ТФУ в ацетонитриле (В), 2 М NH ₄ CH ₃ COO (С)	8) 95 % А, 5 % В – 0-10 мин, 5-75% В, 0-25 % С – 10-30 мин.	0.5 мл/мин 40 °С	25 мкл, 5-10 по 5 мин, с 10-30 мин по 2 мин.

*ТФУ – трифторуксусная кислота

Идентификацию пептидов осуществляли при помощи программного пакета Mascot. Поиск проводили по данным МС/МС спектров в базе данных NCBI среди белков всех организмов без указания типа гидролиза или с указанием на трипсин. При помощи программы Biotoools 3.0 (опция *rapid de novo sequencing* – быстрое определение аминокислотной последовательности) сделана разметка спектров по возможным аминокислотным последовательностям.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

3.1. Оценка эффективности пробоподготовки. Для индукции биосинтеза антимикробных пептидов проведена иммунизация гусениц *GM* бактериями *E. coli*, *Bacillus cereus* и их сочетанием, а также НДМГ и его гидразоном с ацетоном. Проведена пробоподготовка пептидных продуктов иммунной гемолимфы для дальнейшего хроматографического разделения с использованием твердофазной экстракции и колоночной гель-хроматографии. Показано, что примене-

ние данных методов позволяет значительно упростить и улучшить вид хроматограммы, однако практически не влияет на содержание пептидов во фракциях.

Установлено, что для количественного выделения антимикробных пептидов необходимо: иммунизировать не менее 50 гусениц *GM*, использовать при этом концентрацию бактерий не выше 10^6 КОЕ, вводить каждой особи не более 0.5-1 мкл данной суспензии, либо иммунизировать веществами, вызывающими иммунный ответ, в нашем случае НДМГ и его производным в концентрации 0.01 %, также вводя каждой особи не более 0.5-1 мкл данного раствора; собирать гемолимфу, применяя ингибитор меланизации, ингибитор протеаз или метанол, проводить осаждение белков органическими растворителями, доводя их концентрацию до 80 %.

3.2. Сравнение различных методов хроматографирования пептидов и выбор оптимальных хроматографических условий.

Сравнительное исследование пептидных фракций гусеницы *GM* методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выполнено разделение пептидных продуктов методом ОФ ВЭЖХ. Проведено варьирование хроматографических параметров: скорости и состава подвижной фазы, температуры колонки, протяженности градиента, времени изократической промывки перед началом градиента. Реализованы 6 режимов градиентного элюирования.

Проведено сравнение хроматограмм, полученных в одинаковых условиях, для различных образцов пептидных смесей (рис. 1). Наблюдается усложнение хроматографических профилей в ряду пептидных смесей, полученных без иммунизации, после иммунизации *E.coli*, после иммунизации *E.coli* и *B.cereus*, за счет увеличения интенсивности сигналов и появления новых пиков. Особенно сложный характер хроматограммы в последнем случае, по-видимому, обусловлен использованием сочетания двух бактерий, вызывающих развитие более интенсивного иммунного ответа, синтез новых соединений и деструктивные процессы.

В результате исследований подобраны оптимальные условия разделения и пробоподготовки антибактериальных пептидов методом ОФ ВЭЖХ (рис. 2).

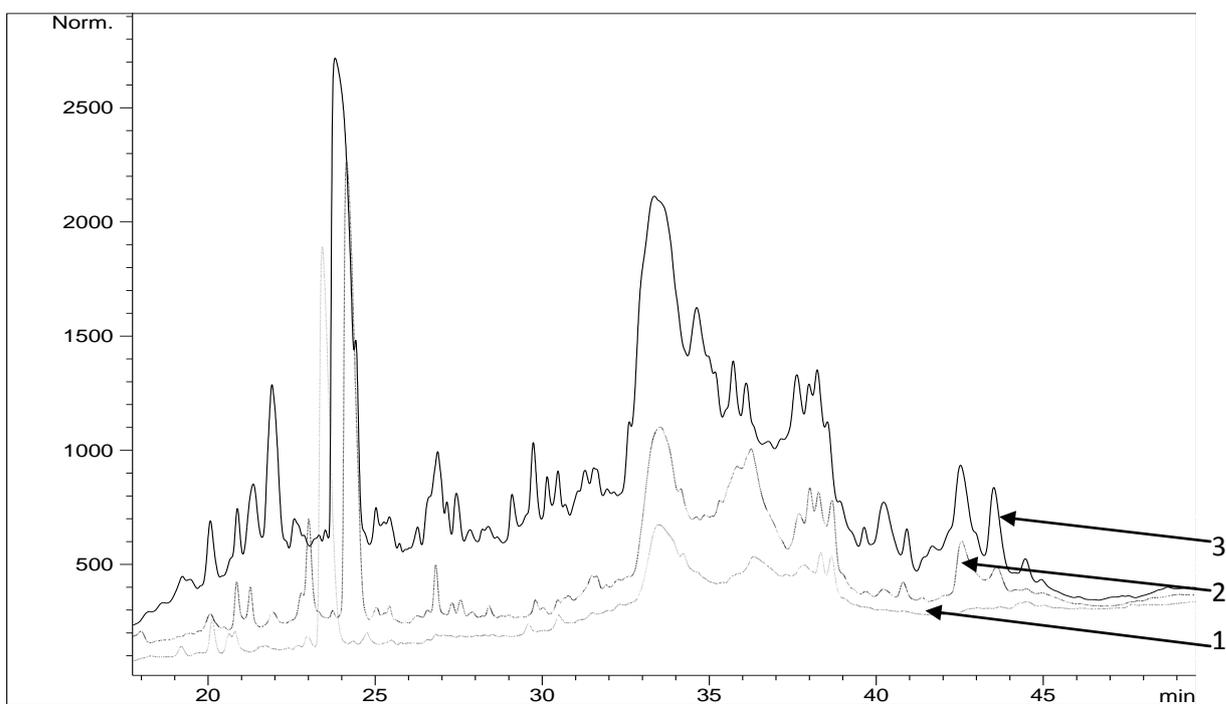


Рис. 1. Сравнение хроматографических профилей трех образцов пептидных смесей: 1 – без иммунизации, 2 – иммунизация *E.coli*, 3 – иммунизация *B.cereus* и *E.coli*. Режим градиентного элюирования № 4. Детектирование при 210 нм.

Установлено, что антимикробные пептиды, являющиеся объектами исследования элюируются в условиях хроматографического режима № 2 (25 °С) в диапазоне концентраций ацетонитрила 35-55 %, в условиях хроматографического режима № 4 (40 °С) в диапазоне концентраций ацетонитрила 40-80 %, в условиях хроматографического режима № 5 (25 °С) в диапазоне концентраций ацетонитрила 45-75 %. Столь большие различия в элюирующих концентрациях ацетонитрила между хроматографическими режимами № 2 и 4, 5 обусловлены присутствием в ацетонитриле в двух последних случаях ТФУ (см. табл. 2), которая является ион-парным агентом и способствует постоянному рН в течение всего разделения. Различия в элюирующей концентрации ацетонитрила в случае градиентов № 4 и № 5 не столь велики и, по-видимому, связаны с изменением температуры.

Полученные хроматографические данные были сопоставлены с результатами, полученными на основе двух подходов к описанию закономерностей хроматографического разделения пептидов в градиентной ОФ ВЭЖХ и предсказанию их времен удерживания. Это аддитивная модель SSRCalc, основанная на

предположении, что разделение пептидов реализуется через адсорбционное взаимодействие всей аминокислотной цепочки с поверхностью твердой фазы, и модель BioLCCC, которая представляет собой макромолекулярный подход, основанный на концепции критической хроматографии биомолекул. Результаты представлены в таблице 4.

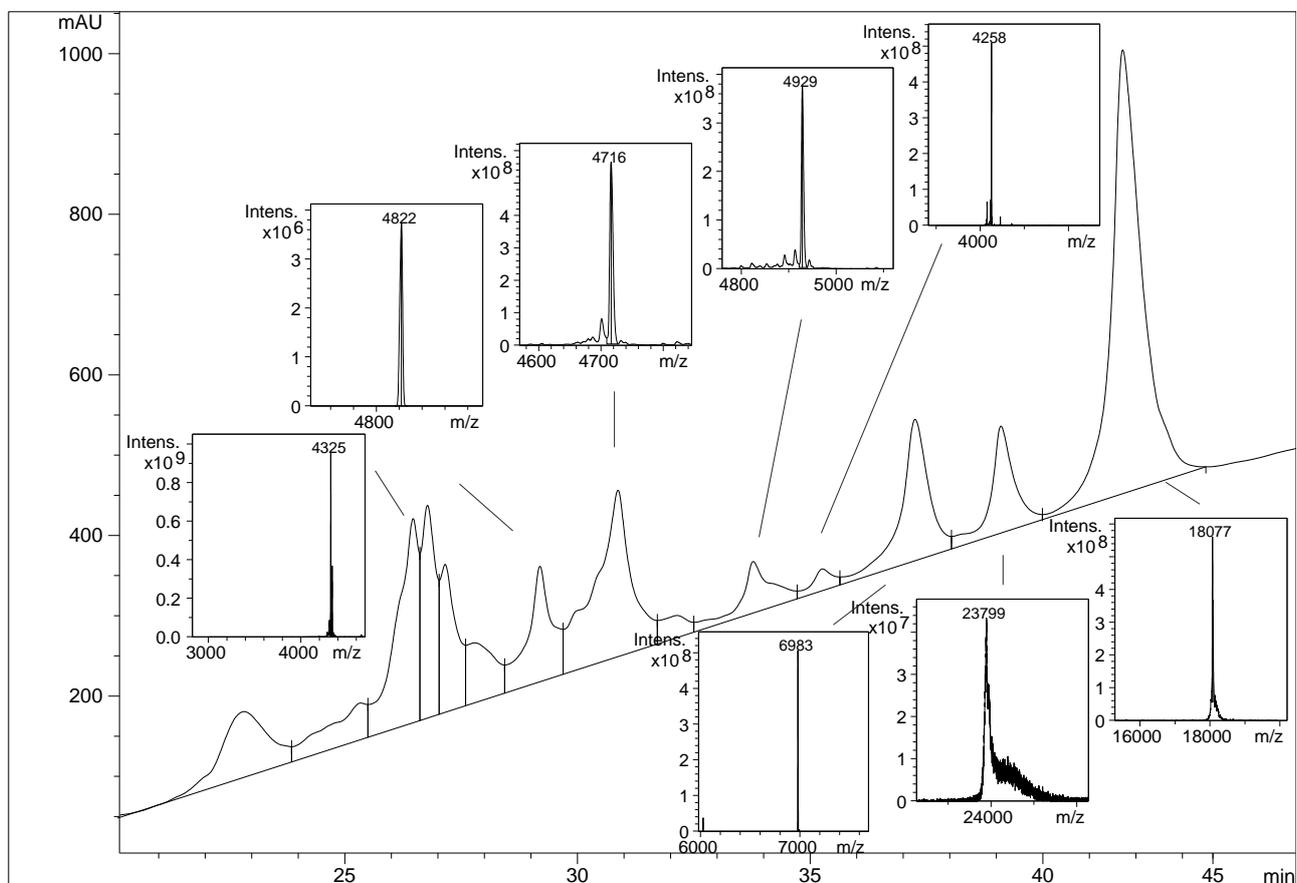


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ антибактериальных пептидов. Режим градиентного элюирования № 5. Детектирование при 214 нм. Иммунизация *B.cereus*. Хроматографированию данного образца предшествовала твердофазная экстракция. Картридж Sep-Pak (Waters) уравнивали водным раствором 0.05 % ТФУ, содержащим 10 % ацетонитрила. После нанесения пептидсодержащего раствора картридж промывали 5 мл уравнивающего раствора, затем элюировали пептиды 1.5 мл 0.05 % водного раствора ТФУ, содержащим 50 % ацетонитрила.

Модель хроматографии в критических условиях для хроматографического режима № 2 наиболее адекватно описывает сорбционное поведение пептидов № 5, 6, а аддитивная модель – пептидов № 1, 2, 3, 5, 6.

Разделение для хроматографического режима № 4 не подчиняется закономерностям описанных моделей, за исключением пептида № 1. По-видимому, это происходит из-за повышенной температуры (40 °С), которая изменяет адсорбционное равновесие и не позволяет реализовать критический режим.

Модель хроматографии в критических условиях для хроматографического режима № 5 наиболее реально описывает сорбционное поведение пептидов № 1, 2, 4, а аддитивная модель – пептидов № 8, 1, 2, 4. Для данной системы разделения в отличие от системы разделения № 2 неадекватно описаны моделями пептиды № 3, 5, 6.

Таблица 4. Разделение пептидов в хроматографическом режиме № 5.

Номер пептида	t_R , мин	t_R , мин BioLCCC	t_R , мин SSRCalc	k	$\delta(\Delta G)$, Дж/моль
9	31.2	24.3	22.5	11.48	стандарт
8	31.4	28.3	30.5	11.56	-20
1	26.4	25.8	26.5	9.56	450
2	29.2	28.7	28.5	10.68	180
3	30.9	26.6	25.5	11.36	25
4	33.7	29.1	31.1	12.2	-190
5	35.2	26.2	30.6	13.08	-320
6	37.2	25.2	30.1	13.88	-470
12	41.7	24.5	33.4	15.68	-770

Полученные данные выступают в качестве одной из физико-химических характеристик разделения антимикробных пептидов, т.к. существуют группы пептидов, для которых удается добиться адекватного описания хроматографического поведения. Внутри этих групп возможно предсказание величин удерживания для целей идентификации.

Для того чтобы количественно оценить содержание пептидов во фракциях проведена калибровка колонки антибактериальным пептидом низином. Так, в образце на рис. 3 содержание пептидов находится в пределах 1-10 мкг. Изучены формы пиков для данного стандарта и установлена концентрация пептида, при которой пик перестает быть регистрируемым. Для низина пороговое значение чувствительности при 214 нм составляет 0.6 мкг.

Катионообменное ВЭЖХ исследование пептидов GM. Для проведения катионообменной ВЭЖХ условия разделения были подобраны таким образом, чтобы сначала реализовалось изократическое разделение и одновременная промывка от несорбирующихся (нейтральных и анионных) компонентов, а затем произошло элюирование одновременными градиентами соли и органиче-

ского растворителя. В эксперименте использовали две соли (хлорид и ацетат аммония); соответствующие профили элюирования были проанализированы, сопоставлены и найдены хроматографические отличия.

Выявлено, что известные антимикробные пептиды присутствуют во фракциях, собранных ближе к концу градиента, и начинают элюироваться с катионообменной колонки при концентрации соли выше 0.3 моль/л и после достижения 50 % концентрации ацетонитрила (рис. 3).

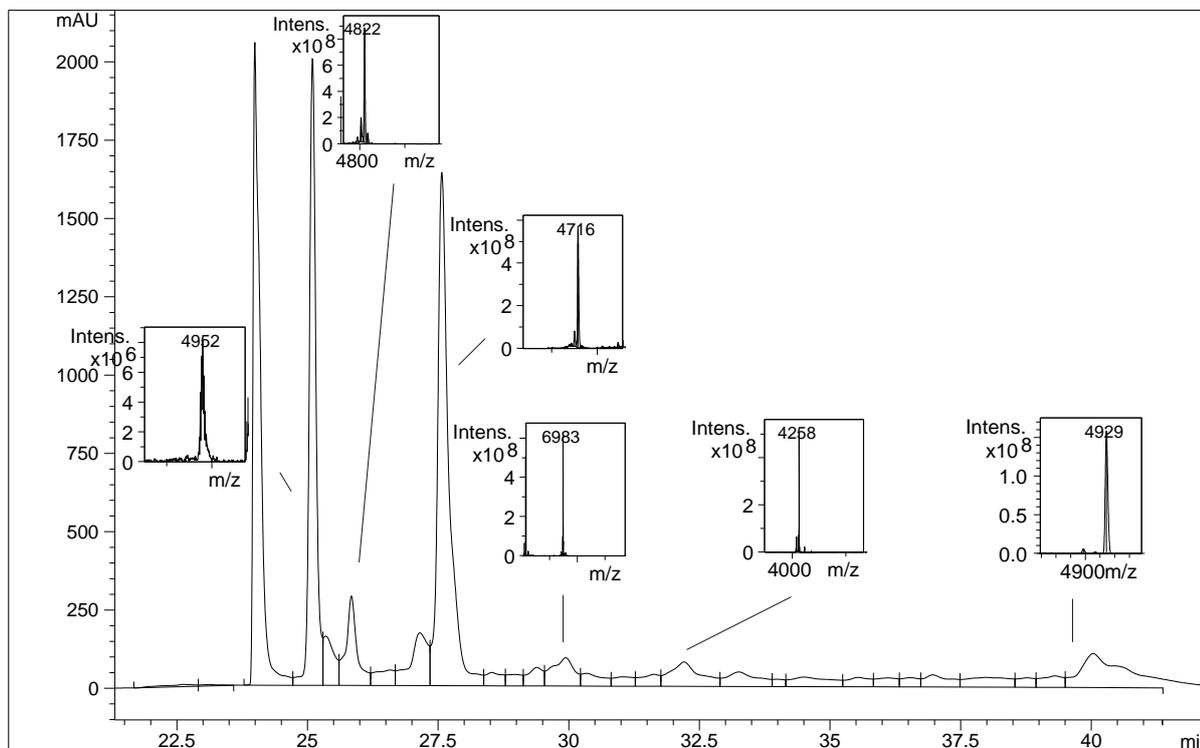


Рис. 3. Катионообменная ВЭЖХ пептидных продуктов. Режим градиентного элюирования № 8. Детектирование при 280 нм. Иммунизация *B.cereus*. Хроматографированию образца предшествовала твердофазная экстракция, условия проведения которой те же, что и у образца на рис. 2.

В таблице 5 представлены рассчитанные факторы удерживания k и мольные дифференциальные энергии Гиббса относительно выбранного стандарта (пептид № 3), характеризующие процесс разделения на сильном катионите.

Как видно из таблицы 5, все известные антимикробные пептиды при рН 2, соответствующему элюенту 0.1 % ТФУ, который был использован для уравновешивания и начальной промывки, являются многозарядными катионами, однако порядок элюирования определяется не только ионными взаимодействиями заряженных частиц. По-видимому, имеют место также дисперсионные и спе-

цифические взаимодействия исследуемых пептидов с ароматическими сульфокислотами, привитыми к силикагельной матрице, которые также влияют на порядок выхода пептидов с колонки.

Таблица 5. Физико-химическая характеристика разделения в условиях хроматографического режима № 7.

Номер пептида	Масса, Д	t _R , мин	k	δ(ΔG), Дж/моль	E280	z
Не описанные ранее пептиды	4897, 4970	20.5	5.8	1240	+	-
4	4929	22.7	6.6	885	6970	7
5 (21-36)*	1651	24.6	7.2	675	-	2
2	4820	24.9	7.3	650	8250	6
Не описанный ранее пептид	3480	27.0	8	390	-	-
7	4949	29.7	8.9	105	19990	6
6	6980	29.9	9	80	2560	8
3	4715	30.9	9.3	стандарт	14300	5
Moricin-like peptide B	1599	31.3	9.4	-25	-	4
5 (1-17)*	2078	31.7	9.6	-75	-	4
1 (1-26)*	3035	33.3	10.1	-225	5690	5
1	4320	35.9	10.9	-410	11380	7
Не описанные ранее пептиды	6320, 9170	36.8	11.2	-475	+	-

E280 – известный из литературы коэффициент экстинкции при 280 нм, z – заряд пептида при pH 2. Знак «-» означает, что данных о заряде и поглощении нет. Знак «+» означает, что поглощение при 280 нм наблюдается экспериментально. * При интерпретации масс-спектров пептидную цепь размечают по номерам аминокислотных остатков.

Физико-химические характеристики удерживания, используемые для построения корреляций со свойствами исследуемых пептидов. Для того чтобы более надежно идентифицировать исследуемые пептиды предлагается сопоставить порядок элюирования в ОФ ВЭЖХ с мерой их гидрофобности, которая может выражаться разными способами. В работе использована величина логарифма относительной гидрофобности log P, рассчитанная для исследуемых пептидов с помощью модели SSRCalc.

Так, для процесса разделения пептидов с номерами 1, 2, 8, 4, 5, 6, 10, 11, 12 (табл. 1) в режиме градиентного элюирования № 5 наблюдается линейная зависимость (рис. 4) логарифма фактора удерживания от рассчитанного логарифма относительной гидрофобности, log P, которую можно описать следующим уравнением $y=0.962x+0.592$. Следовательно, используя это уравнение и логарифм относительной гидрофобности log P, можно предсказывать времена удерживания пептидов в данных хроматографических условиях.

Однако, для пептидов № 9 и 3 наблюдаются отклонения от линейной зависимости, по-видимому, из-за того, что они имеют в первичной структуре 2 и 3 дисульфидные связи, которые влияют на их взаимодействие с неполярной поверхностью силикагеля С18, в то время как остальные исследуемые пептиды не содержат дисульфидных связей.

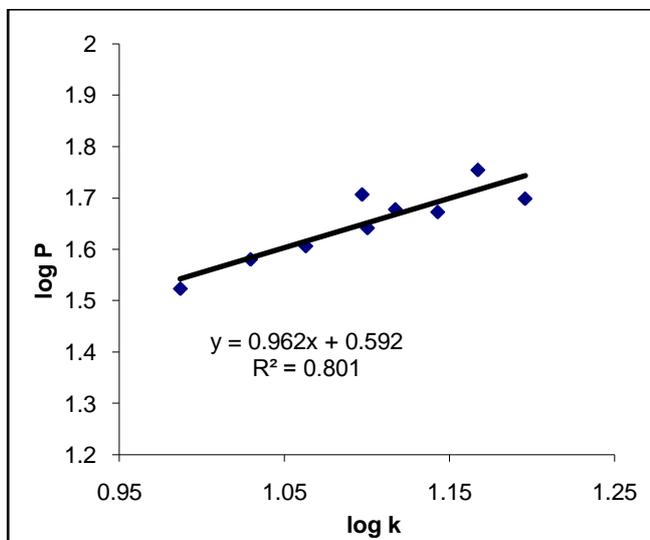


Рис. 4. Зависимость логарифма фактора удерживания от рассчитанного логарифма относительной гидрофобности для процесса разделения пептидов с № 1, 2, 8, 4, 5, 6, 10, 11, 12 (табл. 1).

3.3. Сравнительное масс-спектрометрическое исследование и идентификация пептидов.

Изучение пептидного состава фракций после ОФ ВЭЖХ. Масс-спектрометрическое изучение фракций после ОФ ВЭЖХ позволило оценить, как прошла иммунизация и пробоподготовка, узнать состав антибактериально активных фракций и предположить, чем обусловлено биологическое действие: известными антимикробными пептидами или ранее неизвестными. В результате работы пептидный состав гемолимфы неиммунизированных личинок, а также личинок, обработанных различными иммунизирующими агентами, полностью охарактеризован в диапазоне масс 5-30 кД. Наряду с известными антимикробными пептидами (табл. 1), выявленными в каждом варианте иммунизации, обнаружено много новых пептидов, не представленных в базах данных и свидетельствующих о том, что на сегодняшний день организм *GM*, по-прежнему, представляет большой теоретический и практический интерес как источник пептидных продуктов с антибактериальными свойствами. Среди не описанных ранее пептидных продуктов можно выделить индуцированные пеп-

тиды с массами 3480, 4898, 4970, 6320, 9170 Д, проявляющие антибактериальные свойства. Установлено, что в гемолимфе неиммунизированных личинок также содержатся некоторые из изученных антимикробных пептидов, в частности пептиды № 2, 3, 6, 5. До начала наших работ в неиммунизированных гусеницах антимикробные пептидные продукты не обнаруживали.

Образование большого числа неизученных пептидов с массами преимущественно до 3 кД, а также фрагментов от известных антимикробных пептидов в случае иммунизации *Bacillus cereus*, может быть связано с протеазными механизмами защиты этой бактерии от разрушения или с экспрессией пептидов именно такого состава в результате иммунного ответа.

В случае иммунизации высокими концентрациями НДМГ и его гидразона наряду с индукцией антимикробных пептидов, также наблюдали большое число неизученных пептидов с массами преимущественно до 3 кД, по-видимому, образовавшихся в результате окислительно-восстановительной деструкции для случая НДМГ и иммунного ответа в случае его производного.

В результате проведенных экспериментов отмечена тенденция увеличения числа и разнообразия пептидных продуктов с увеличением концентрации иммунизирующего агента, от преимущественного преобладания известных антимикробных пептидов до «обогащения» множеством новых пептидов.

Изучение пептидного состава фракций после катионообменной ВЭЖХ. Масс-спектрометрическое исследование пептидов после катионообменной ВЭЖХ затруднено из-за высокого содержания солей. Однако после проведения перекристаллизации образца на мишени и использования двух матриц для МАЛДИ-МС были получены масс-спектры, позволившие оценить прохождение процесса катионообменной хроматографии и описать состав полученных фракций. В условиях режима градиентного элюирования № 7 идентифицированы известные антибактериальные пептиды, а также новые пептиды с антибактериальными свойствами, представленные в таблице 6. Кроме представленных на рис. 3 известных антибактериальных пептидов, в условиях режима градиентного элюирования № 8 был детектирован ряд не описанных ранее пептидов, про-

являющих антибактериальные свойства, среди них пептиды с массами 3480, 4898, 4970 Д.

Идентификация антибактериальных пептидов по базам данных. С помощью поисковой машины Mascot для каждого пептида оценена вероятность случайного совпадения экспериментальных масс фрагментов из МС/МС масс-спектров с рассчитанными теоретическими значениями, аннотированными в базах данных. В результате на основе 130 исследованных МС/МС спектров установлено, что 14 пептидов относятся к организму *GM*, имеют индекс достоверности выше порогового значения и рассматриваются как точные идентификации, см. таблицу 6.

Таблица 6. Фрагменты известных антимикробных пептидов, идентифицированные в работе.

Номер пептида	Аминокислотная последовательность найденного фрагмента Масса, Д	Индекс достоверности (Score)
5	AAPAVETLAQAQKIK 1651	99
	ENFFKEIERAGQRIRDAIISAAPAVET 3030	88
	ENFFKEIERAGQR 1623	34
	ENFFKEIERAGQRIRDA2078	62
12	SAYDDFVKQAQEVQKKLH 2133	77
1	DIQIPGIKKPTHRDIIPNWNPNVR 2933	53
	DIQIPGIKKPTHRDIIPNWNPNVRT 3035	69
4	FRFPSPTVPKPIDIDP 1825	31
Moricin-like peptide B	STAHDIISQFKPKK 1599	70
6	FDSDKIKSEVNNFIESLKGILNTEKKEAPK 3420	120
2	ADHPILPSIIDDVKLDPNRRYA 2517	39
	TTADHPILPSIIDDVKLDPNRRYA 2719	29

Гидролиз антибактериальных пептидов и масс-спектрометрическое изучение продуктов гидролиза. Поскольку изучаемые антибактериальные пептиды – это крупные молекулы, для которых при проведении МС/МС исследования возникают трудности, связанные с длиной молекул, то для увеличения достоверности их идентификации проведен гидролиз трипсином и получены МС/МС масс-спектры для продуктов гидролиза.

В результате триптического гидролиза пептидов во фракциях и последующего изучения его продуктов и поиска по базам данных (табл. 7) удалось идентифицировать фрагменты пептидов № 4, 2, 5, 6, 11, 12.

Таблица 7. Гидролиз антибактериальных пептидов и его продукты.

Номер пептида. Аминокислотная последовательность. Индекс достоверности (Score)	Масса, Д. Аминокислотная последовательность продукта гидролиза
2 <i>EADEPLWLYK</i> -GDNIER- <i>APTTADHPILPSIIDDVK</i> -LDPNRRYA 184	1262 <i>EADEPLWLYK</i> 1133 <i>ADEPLWLYK</i> 1902 <i>APTTADHPILPSIIDDVK</i>
5 ENFFKEIERAGQR- <i>IRDAIISAAPAVETLAQAQK</i> -IKGGD 164	2065 <i>IRDAIISAAPAVETLAQAQK</i>
4 EIR- <i>LPEPFRFPSPTVPKPIDIDPILPHPWSPR</i> -QTYPIARRS 159	757 <i>LPEPFR</i> 1610 <i>LPEPFRFPSPTVPK</i> 871 <i>FPSPTVPK</i> 1751 <i>PIDIDPILPHPWSPR</i> 1198 <i>PILPHPWSPR</i> 1028 <i>RFPSPTVPK</i>
6 <i>ETESTPDYLKNIQQQLEEYTKNFNTQVQNAFDSDKIKSEVNNFIESLG</i> <i>K-ILNTEKKEAPK</i> 422	1181 <i>ETESTPDYLK</i> 1392 <i>NIQQQLEEYTK</i> 1626 <i>NFNTQVQNAFDSDK</i> 1867 <i>NFNTQVQNAFDSDKIK</i> 1576 <i>IKSEVNNFIESLGK</i> 1335 <i>SEVNNFIESLGK</i>
12 <i>DASTPLQDLEK</i> -HAAEFQK- <i>TFSEQLNAFTNSK</i> -DTK- <i>EFNTALKEGSDSVLQQLNALASSLQK</i> -ALNDANGK- <i>AKEALEQTR</i> - TNLER- <i>TAEELRR</i> -AHPDVERQAGALR- <i>DRLQTA VQATVQETQK</i> -LAK- <i>TVGANLEETNKK</i> -LAPQIK- <i>SAYDDFVK</i> -QAQEVQKKLHEAASKQ 18075 171	1215 <i>DASTPLQDLEK</i> 1485 <i>TFSEQLNAFTNSK</i> 821 <i>EFNTALK</i> 1987 <i>EGSDSVLQQLNALASSLQK</i> 1044 <i>AKEALEQTR</i> 873 <i>TAEELRR</i> 1814 <i>DRLQTA VQATVQETQK</i> 1543 <i>LQTA VQATVQETQK</i> 1302 <i>TVGANLEETNKK</i> 943 <i>SAYDDFVK</i>

Физико-химическая характеристика пептидов на основе масс-спектрометрических данных. MS/MS спектры. Масс-спектрометрия позволяет получать информацию о массовых числах молекулярных ионов пептидов. Спектры MS/MS очень характеристичны и позволяют идентифицировать пептиды. Таким образом, информация о молекулярной массе, времени удерживания и MS/MS масс-спектр однозначно характеризуют биомолекулу и позволяют при изменении условий пробоподготовки и разделения идентифицировать пептиды с высокой надежностью.

Фрагментация пептида № 2 имеет характерные особенности, заключающиеся в преимущественном разрыве пептидной связи между тремя парами аминокислот DH, DD, DP (D – аспарагиновая кислота, H – гистидин, P – пролин). По-видимому, именно здесь локализован отрицательный заряд, в силу чего протонирование этих участков первичной структуры облегчено.

[Abs. Int. * 1000]

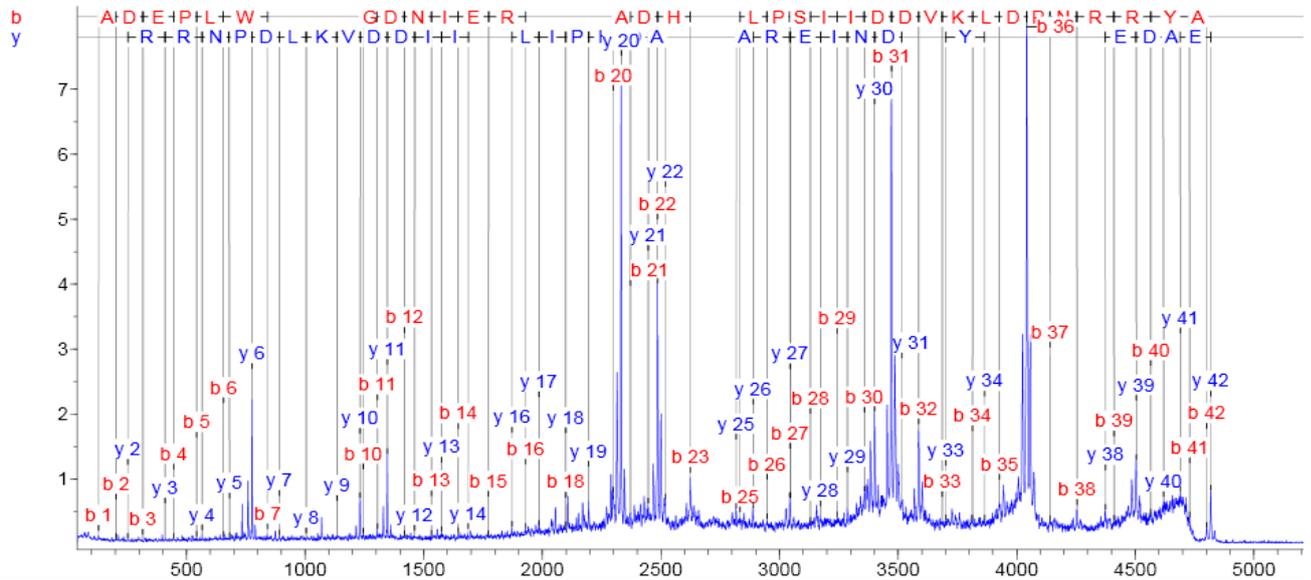


Рис. 5. MS/MS спектр фрагментации пептида № 2.

В составе антимикробных фракций пептидных продуктов присутствуют два не описанных ранее пептида 4897 и 4967 Д, различающиеся конечным фрагментом 72 Д, MS/MS спектр фрагментации которых (рис. 6) имеет сходство с фрагментацией пептида № 2. Также ярко выражены три разрыва пептидной связи, по-видимому, обусловленные аспарагиновыми и глутаминовыми кислотами. Можно предполагать, что эти пептиды имеют анионный характер. Однако разрывы локализованы в иных положениях первичной структуры, чем у пептида № 2 и, следовательно, данные пептиды не являются его производными.

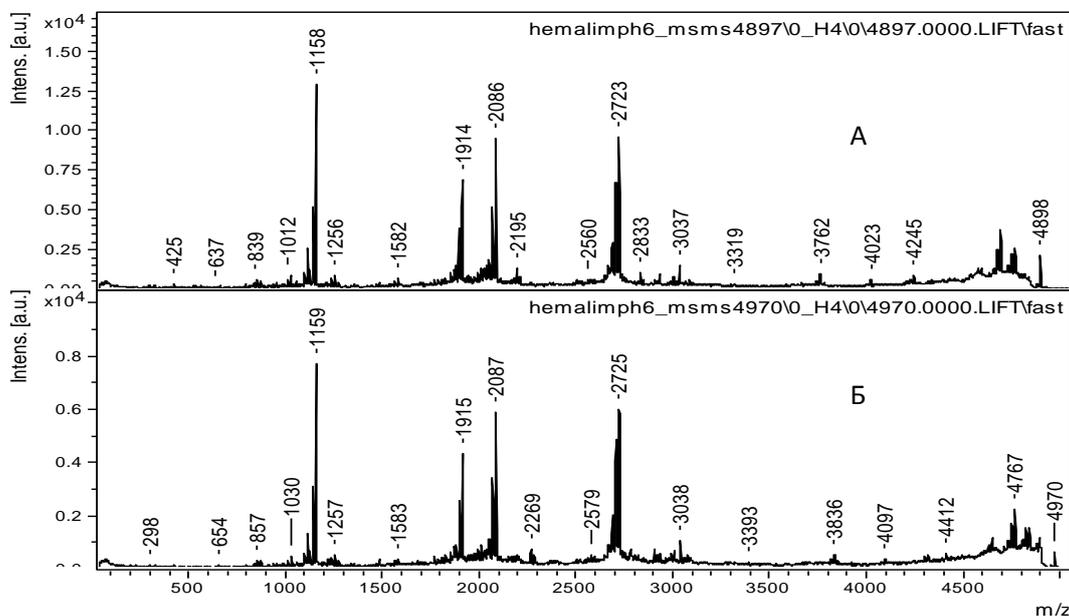


Рис. 6. MS/MS спектры фрагментации не описанных ранее индуцированных пептидов 4897 (А) и 4967 (Б) Д.

Применение алгоритмов секвенирования *de novo* для идентификации пептидов *GM*. Применение алгоритмов секвенирования *de novo* для масс-спектров МС/МС требует равномерного разбиения по ионам. Однако это не всегда возможно, поскольку первичные структуры пептидов и способность к протонированию аминокислот различны. Результаты определения аминокислотной последовательности по фрагментным ионам представлены в таблице 8. На рисунке 7 представлен масс-спектр пептида 1359 Д и его предполагаемая аминокислотная последовательность RRGNDNFRLDP.

Для увеличения достоверности идентификации каждая полученная аминокислотная последовательность была протестирована на соответствие экспериментального и рассчитанного с помощью модели SSRCalc времени удерживания согласно критерию из работы¹. Найденные корреляции экспериментальных и теоретических времен удерживания свидетельствуют о потенциальной возможности пептидов описанного состава удерживаться на сорбенте в соответствии со своей относительной гидрофобностью, что соответствует определенному экспериментально времени удерживания.

Таблица 8. Предполагаемые аминокислотной последовательности новых пептидов в составе антибактериальных фракций, полученные на основе МС/МС масс-спектров.

№	Масса, Д	Аминокислотная последовательность (однобуквенный код)
1	1106	PTDERLGYR
2	1211	CAELEKWWF
3	1233	RELESTLETR
4	1241	GLSVAQGRDALPG
5	1359	RRGNDNFRLDP
6	1523	WRSPSNPYPYKK
7	1783	KHESESEFLSESTQF
8	1591	HPTVVAYYCPMYF
9	1928	RMNYAASPFP SAHPHFV
10	1947	LYYKKKYKSNYHPNT
11	2107	DWPTTHTWLFHGKTWPP
12	2185	KAPETESGAAGGGSHSCVRSPLS
13	2340	GGASGHFNPDYDYSYPNSPKWP
15	2559	CMSMWMCGKSSRIRYMMIAH
16	2563	DHWWSLRVNEGCVRSKDLEHP
18	3255	PGAYYMMKAEMSVTYTACDEAKNYKRFS
21	4047	RHALASLKDYTGTKNHETHDKSKGCWWWSVVCYL

¹ Тарасова А.И., Зубарев Р.А., Голобородько А.А., Горшков А.В., Горшков М.В. Идентификация пептидов по хромато-масс-спектрометрическим данным с использованием расчета времен удерживания // Масс-спектрометрия, 2008. – Т. 5 (№. 1). – С. 7-22.

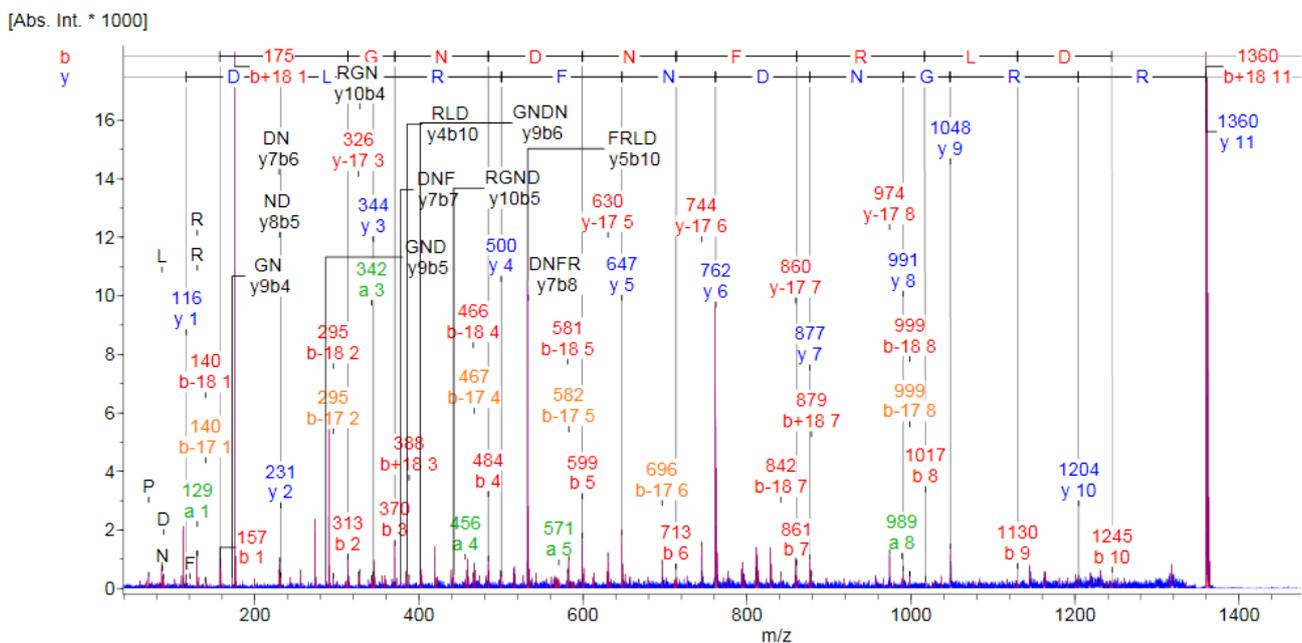


Рис. 7. Пример масс-спектрометрического секвенирования *de novo* пептида с массой 1359 Д.

3.4. Сочетание хроматографической и масс-спектрометрической идентификации. Для хроматографического режима № 2 обнаружены удовлетворительные корреляции экспериментальных и расчетных времен удерживания для пептидов № 3, 5, 6, 12 (табл. 1), а также для новых пептидов № 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 21 (табл. 8) с предложенными в работе аминокислотными последовательностями (SSRCalc) (рис. 8).

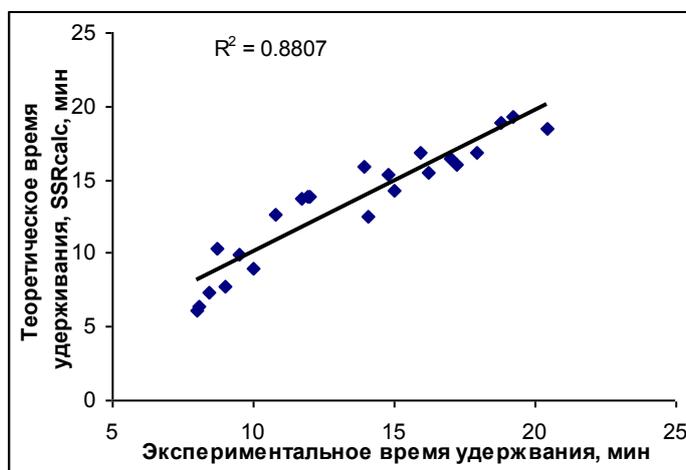


Рис. 8. Корреляции экспериментальных и рассчитанных по модели SSRCalc времен удерживания известных и не описанных ранее пептидов № 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 21 (табл. 8) для хроматографического режима № 2.

При разделении в условиях режима № 5, хроматографическое поведение пептидов № 5, 6, напротив, описывается неточно, однако для других антибактериальных пептидов наблюдаются хорошие корреляции экспериментальных и

расчетных времен удерживания (табл. 4). Такие зависимости получены для пептидов № 8, 1, 4, 2, 10 (SSRCalc) и для пептидов № 8, 1, 4, 2 (BioLCCC).

Важной характеристикой, подтверждающей достоверность масс-спектрометрической идентификации не описанных ранее пептидов, является наличие зависимости порядка элюирования от гидрофобности, рассчитанной для полученных последовательностей аминокислот. Для процесса разделения пептидов с номерами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 18 (табл. 8) в режиме градиентного элюирования № 3, получена корреляционная зависимость $y = 1.7959x - 0.2683$ (рис. 9) логарифма фактора удерживания от рассчитанного с помощью модели SSRCalc логарифма относительной гидрофобности, $\log P$.

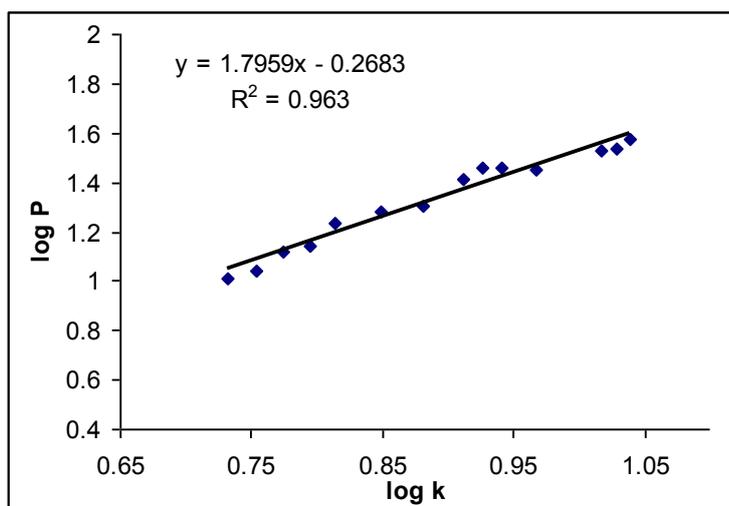


Рис. 9. Зависимость логарифма фактора удерживания от рассчитанного логарифма относительной гидрофобности для аминокислотных последовательностей, не описанных ранее пептидов № 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 18 (табл. 8), идентифицированных в работе.

Порядок элюирования антибактериальных пептидов с используемого в работе сорбента был сопоставлен с порядком элюирования данных пептидов с сорбента Supelcosil LC-18, который известен из литературы². Для антимикробных пептидов № 1, 2, 3, 4, 5, 6 (из табл. 1) получены высокие корреляции для соответствия порядков элюирования. Различие в удерживании на данных сорбентах наблюдается для пептида № 12. На сорбенте Supelcosil LC-18 указанный пептид удерживается слабее, чем пептиды № 5, 6. По-видимому, это связано с тем, что пептид является многозарядным ($z = 27$) в кислой среде, и поэтому на процесс его элюирования влияют полярные и ионные взаимодействия. Сорбент Zorbax XDB-C18 имеет полностью гидрофобную поверхность и поэтому удерживает

² Cytrynska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Suder P., Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph // *Peptides Rev.* 2007. – V. 285. – P. 533–546.

живание пептида № 12 в большей степени определяется дисперсионными взаимодействиями. При хроматографировании антимикробных пептидов, осуществленном в указанной работе, не удалось разделить пептиды № 3, 4, 7. В нашей работе в условиях 40-минутных градиентов (режимы № 4, 5) такое разделение достигнуто, что позволяет увеличить надежность их идентификации.

Выводы:

1. Определены физико-химические характеристики удерживания исследуемых антибактериальных пептидов (фактор удерживания, разности дифференциальных мольных энергий Гиббса). Показано, что для ряда антибактериальных пептидов наблюдается удовлетворительная корреляция между расчетными и экспериментальными временами удерживания.
2. Определены условия проведения иммунизации *GM* и получения пептидных смесей с высоким содержанием антибактериальных пептидов. Твердофазная экстракция с использованием картриджа Sep-Pak C18.
3. Подобраны условия разделения антибактериальных пептидов при разных хроматографических режимах с использованием различных сорбентов. Показано, что антибактериальные пептиды следует разделять на катионообменных и обращенно-фазовых силикагелевых сорбентах.
4. Проведена идентификация антимикробных пептидов методом масс-спектрометрии МАЛДИ-МС/МС. Идентифицированы 20 известных антимикробных пептидов и 22 не описанных ранее, для которых установлены аминокислотные последовательности.
5. Установленные физико-химические закономерности хроматографического разделения и масс-спектрометрическая идентификация пептидных продуктов разных пептидных смесей позволили охарактеризовать пептидный состав, детектировать появление не известных ранее пептидных компонентов (94 пептида), установить постоянно присутствующие в гемолимфе *GM* пептиды (5 пептидов) и выявить пептиды, индукция которых не зависит от варианта иммунизации (7 пептидов).

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

1. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Особенности разделения биологически активных компонентов пчелиной огневки методом эксклюзионной ионообменной хроматографии и гель-электрофореза // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т.6.(Вып. 6) – С.893-902.
2. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Сравнение результатов исследования гемолимфы иммунизированных и неиммунизированных личинок *Galleria mellonella* // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55.(Вып. 6) – С. 713-726.
3. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Анализ и антибактериальная активность фракций гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* // Хим.-фарм. журнал. – 2010. – Т. 44.(№ 1.) – С. 51-55.
4. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Изучение пептидного состава антибактериально активных фракции методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56 (Вып. 3) – С. 387-396.
5. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К., Литвинова Е.Г., Клёнова Н.А. Сравнительное исследование пептидов фракций гемолимфы *Galleria mellonella* // Биохимия. – 2010. – Т. 75 (Вып. 9) – С. 1305-1313.
6. Срибная О.С., Буряк А.К., Серебрякова М.В. Применение тандемной масс-спектрометрии для идентификации антибактериальных пептидов гусеницы *Galleria mellonella* // III Всероссийская конференция «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». – Москва, 2009. – С. 76.
7. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Применение ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией для поиска и идентификации новых антибактериальных пептидов // Всероссийская конференция с международным участием «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии». – Самара, 2009. – С. 198.
8. Срибная О.С. Создание модели биологически активного пептида на основе антибактериальных и противогрибковых пептидов *Galleria mellonella* // Всероссийская заочная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы естественных наук». – Тамбов, 2009. – С. 52-56.
9. Срибная О.С., Буряк А.К., Серебрякова М.В. Разделение, идентификация и секвенирование *de novo* пептидов гусеницы большой восковой моли с использованием ВЭЖХ и масс-спектрометрии МАЛДИ-ТОФ-ТОФ // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». – Казань, 2009. – С. 299.
10. Срибная О.С. Твердофазный синтез модельного тетрапептида как структурного элемента антимикробных пептидов *Galleria mellonella* // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». – Казань, 2009. – С. 309.
11. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Многомерное разделение смеси природных биологически-активных пептидов на фракции на сорбенте с пористой структурой // XIII Всероссийский симпозиум «Актуальные проблемы теории адсорбции, пористости и адсорбционной селективности». – Москва, 2009 – С.69.
12. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. Масс-спектрометрический анализ фракций гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* // Всероссийский симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия». – Москва, 2008 – С. 73.
13. Срибная О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К., Серебрякова М.В. Применение ВЭЖХ для разделения пептидных продуктов с антибактериальными свойствами // Всероссийская научно-практическая конференция «Хроматография – народному хозяйству». – Дзержинск, 2010. – С. 57.