

## МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 615.322+547.963.61.001.6

М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

## РАЗНООБРАЗИЕ ЛЕКТИНОВЫХ СИСТЕМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Приведены результаты исследования лектиновых систем производственных штаммов лактобацилл и бифидобактерий кишечника человека. Лектиновые системы представлены как поверхностноклеточные и внеклеточные; солюбилизованные в мягких и жестких условиях; твердофазные флуоресцентные и хемилюминесцентные; анионные/кислые, околонейтральные и катионные/щелочные; маскированные/энкапсулированные экзополимерными веществами небелковой природы и неэнкапсулированные; род/вид/штамм/консорциум-типизуемые; связывающие синтетические полимерные гликоконъюгаты.

**Ключевые слова:** лектиновые системы, пробиотические бактерии, лактобациллы, бифидобактерии, синтетические гликополимеры

## DIVERSITY OF PROBIOTIC BACTERIAL LECTIN SYSTEMS

M.V. Lakhtin, V.M. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.A. Alioshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow

Lectin systems of industrial strains of probiotic bacteria of human origin were investigated. Lectin systems were observed as cell surface and extracellular; solubilized in mild and firm conditions; solid phased fluorescent and chemiluminescent; anionic/acidic, neutral and cationic/alkaline; masked/blocked/encapsulated with exopolymeric substances of non-protein origin (localized together) and non-encapsulated; genus/strain/consortia-specific and typing; specific to soluble artificial polymeric polyvalent glycoconjugates imitating exposed clusters of mucin-type glycans and possessing exposed multiple carbohydrate residues such as GalNAc- $\alpha$ - or Man- $\alpha$ - as side short branches of polyacrylamide linear chain). Results indicate prospects of glycoconjugates-binding lectin systems in glycobiology, molecular glycomedicine and bio(nano)glycotechnology.

**Key words:** lectin systems, probiotic microorganisms, lactobacilli, bifidobacteria, artificial glycolymers

Развитие технологий на основе пробиотических бактерий (ПБ) с учетом их высокомолекулярных метаболических продуктов узнавания и сигналинга являются важной составляющей стратегических перспектив медицинской биотехнологии и медицинской микробиологии [1, 3, 7]. Одним из таких новых метаболических перспективных продуктов ПБ являются лектины – белки, способные распознавать гликоконъюгаты (ГК). Лектины широко распространены в природе на всех уровнях организации живого, участвуют в сигналинге, являются находят разнообразное применение в гликобиологии, гликомедицине и гликобиотехнологии [8, 10, 11, 16, 17]. Среди них лектины ПБ (ЛПБ) мало изучены, характеризуются большим потенциалом использования [2, 7, 12–15]. В свою очередь, лектиновые системы (ЛС) вообще и, ЛС ПБ, в частности, остаются наименее исследованными.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать с помощью набора ГК разнообразие ЛС промышленных штаммов ПБ.

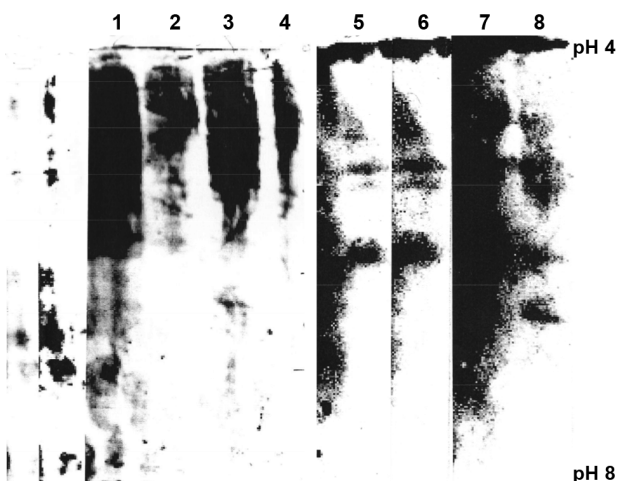
## МЕТОДЫ

Препараты белков и ЛПБ готовили и ЛС идентифицировали, как описано ранее [4–6, 9, 12]. Концентрированные в фосфатно-солевом буфере (ФСБ РН

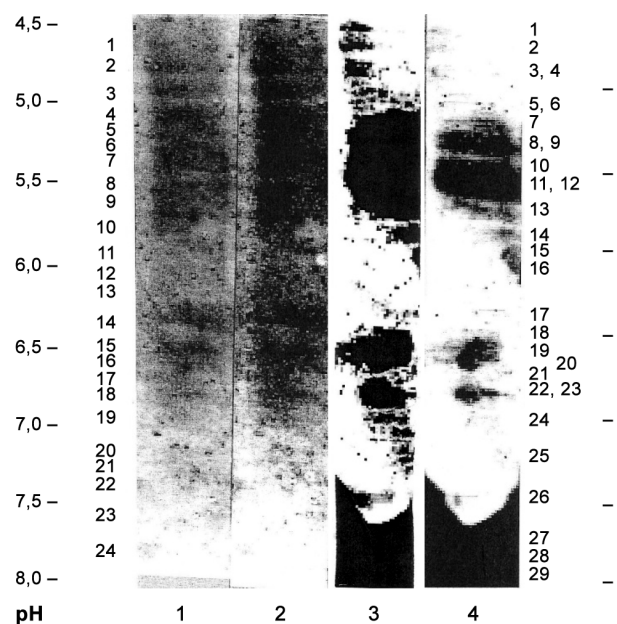
7.2–7.4) высокомолекулярные (более 27 кД) образцы в 1% твине-80 наносили на целлюлозные аппликаторы на пластине полиакриламидного геля (ПААГ). Разделенные изоэлектрофокусированием в пластине ПААГ (ИЭФ-ПААГ) в градиентах рН в интервале рН 4–8 (в присутствии 7–8 М мочевины и 5% (вес/объем) сахарозы, при температуре 8–10 °С, в условиях низковольтного электрофореза [600–700 В], в течение ночи [16–18 ч]) и электрооблотированные на мембрану белки проявляли флуоресцентным красителем SYPRO Ruby protein stain (Bio-RaD Lab.) или ГК-ПАА-биотином ([www.lectinity.com](http://www.lectinity.com)) – 5 мкг/мл ГК в ФСБ в течение 16–24 ч при 4 °С в полипропиленовом корыте при мягком встряхивании блотта на качалке. Связавшийся с блотом биотин проявляли стрептавидин-пероксидазой, а связавшуюся пероксидазу – хемилюминесцентным субстратом. Флуоресценцию (Фл, возбуждение Фл при 365 или 254 нм) и хемилюминесценцию (Хл) регистрировали в режиме живого изображения (режиме реального времени) в темной камере системы (Dark Room) Bio-Chemi System (UVP, Calif.). Использовали светофильтры Bromide Ethidium и Coomassie. Анализ цифровых фотографий проводили с использованием пакета программ LabWorks 4.0. Для выявления максимального числа компонентов ЛС проводили компьютерную реконструкцию/редактирование фотографий.

# РЕЗУЛЬТАТЫ

Белковый состав ПБ различался у лактобацилл и бифидобактерий (рис. 1, 2), а картины Фл частично отражали штаммотипирование (рис. 1 – левая часть). Поверхностноклеточные белки пробиотика Ацилакт и составляющих его штаммов представлены в подавляющем большинстве кислыми белками (треки 1–4 на рис. 1). Некоторые из поверхностноклеточных



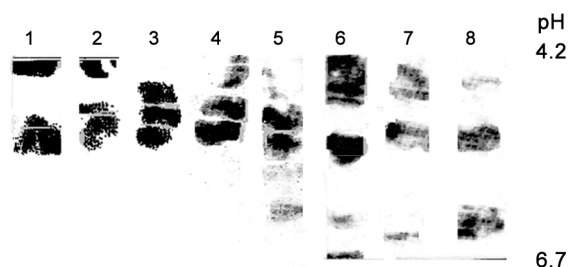
**Рис. 1.** Белки поверхности *Lactobacillus acidophilus* (пробиотика Ацилакт и составляющих его штаммов), проявленные флюоресцентным красителем SYPRO Ruby protein blot stain (Bio-Rad Lab.), возбуждение Фл при 365 нм, регистрация Фл с использованием светофильтра Bromide Ethidium (треки 1–4) или светофильтра Coomassie (треки 5–8). 1–3, 5–8 – белки, десорбированные посредством 1–3 М LiCl; 4 – верхний белковый слой (десорбция 0.2 М NaCl до десорбции с использованием LiCl); 1, 4, 5, 6 – Ацилакт; 2, 7 – штамм 100<sub>ав</sub>; 3, 8 – штамм NK1; слева – белки культуральной жидкости штамма K<sub>3</sub>III<sub>24</sub> (два трека с минимальным и максимальным набором).



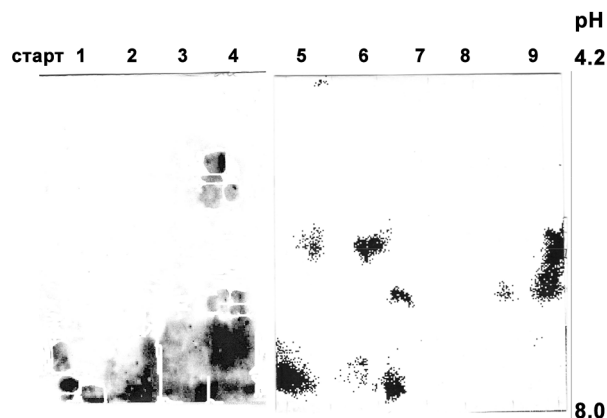
**Рис. 2.** Белки культуральной жидкости *B. longum* spp. *adolescentis* MC-42. Фильтр Coomassie (треки 1 и 2) или Ethidium Bromide (треки 3 и 4). В треках 2 и 3 усилены/реконструированы минорные белки треков 1 и 4. Белки 27–29 маскированы экзополимерными веществами.

белков лактобацилл организованы в высокомолекулярные распределенные в белковые блоки сильно флюоресцирующие ансамбли (треки 5–8 на рис. 1 справа). Белки бифидобактерий в щелочной области маскированы экзополимерными веществами (рис. 2).

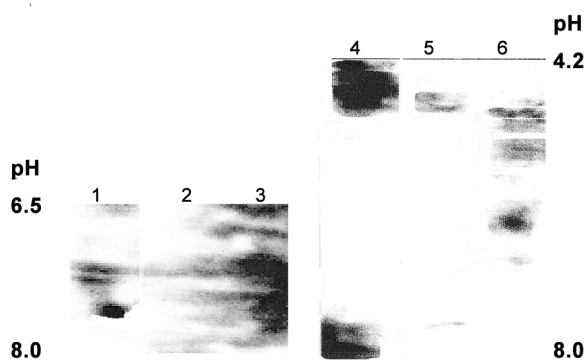
На рис. 3–5 показаны примеры ЛС (поверхностноклеточных и внеклеточных, солюбилизированных в мягких и жестких условиях, твердофазных хемилюминесцентных, связывающих синтетические полимерные ПАА-ГК с экспонированными остатками GalNAc-альфа-или Man-альфа-) лактобацилл и бифидобактерий. Поверхностноклеточные ЛС проявляли сходство с внеклеточными (рис. 4). ЛС (сильно кислые, слабо кислые, околонеутральные и щелочные) значительно лучше типировали штаммы и консорциум штаммов (рис. 3, 5) по сравнению с установленным белковым массивом (рис. 1). По данным Хл число выявляемых компонентов ЛС возрастало, а их выраженность и дискретность улучшались при предварительной/дополнительной обработке ЛС детергентом в условиях кипячения (рис. 5).



**Рис. 3.** Штамм-специфические системы кислых лектинов лактобацилл и бифидобактерий в градиенте pH 4–7 (проявление лектинов на блоках ГК-биотином и стрептавидин-пероксидазой с последующим добавлением хемилюминесцентного субстрата пероксидазы). 1, 2 – бифидобактерии (*Bifidobacterium longum* spp. *adolescentis* MC-42; *B. gallinarum* ГБ); 3–8 – лактобациллы (3, 6 – *Lactobacillus helveticus* 100<sub>ав</sub>; 5, 8 – *L. helveticus* NK1; 4, 7 – Ацилакт [*L. helveticus* NK1 + *L. helveticus* 100<sub>ав</sub> + *L. casei* K<sub>3</sub>III<sub>24</sub>]); 1–5 – Man-альфа-ПАА-биотин; 6–8 – GalNAc-альфа-ПАА-биотин. Реконструированные паттерны, отражающие максимальное число системных лектиновых компонентов.



**Рис. 4.** Щелочные/катионные и околонеутральные системы лектинов бифидобактерий и лактобацилл в градиенте pH 5–8. 1, 2, 5, 6 – бифидобактерии; 3, 4, 7–9 – лактобациллы; 1–4 – GalNAc-альфа-ПАА-биотин; 5–9 – Man-альфа-ПАА-биотин; 3, 4, 7–9 – лектины, десорбированные посредством LiCl. Реконструированные паттерны, отражающие максимальное число системных лектиновых компонентов.



**Рис. 5.** Системы лектинов лактобацилл в градиенте pH 6.5–8.0 (слева) и pH 4.0–8.0 (справа). ИЭФ в ПААГ в 8 М мочевиной суммарного препарата высокомолекулярных белков (более 27 кД) лактобацилл после их кипячения в додецилсульфате натрия с 2-меркаптоэтанолом. 1, 4 – Ацилакт; 2, 5 – *Lactobacillus helveticus* 100<sub>ш</sub>; 3, 6 – *L. helveticus* NK1; слева – GalNAc-альфа-ПАА-биотин; справа – Man-альфа-ПАА-биотин.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты указывают на разнообразие ЛС ПБ, возможность их использования для штаммотипирования, перспективы использования муцинсвязывающих и маннан-связывающих и связывающих аналоги ГК ЛС ПБ вместо ПБ или вместе с ними.

### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В. (ред.) Микробиоценозы и здоровье человека. – М.: Династия, 2015, 548 с.
2. Aleshkin VA, Afanasiev SS, Karaulov AV (eds) (2015). Microbiocenoses and human health [Mikrobiotsenoz i zdorovye tcheloveka], 107-172.
3. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В., Шендеров Б.А. Лектины, адгезины и лектиноподобные вещества лактобацилл и бифидобактерий // Вестник РАМН. – 2006. – № 1. – С. 28–34.
4. Lakhtin VM, Lakhtin MV, Alioshkin VA, Afanasiev SS (2006). Lectins, adhesions and lectin like substances of lactobacilli and bifidobacteria [Lektini, adgesini i lektinopodobniye veshstva laktobatsill i bifidobakteriy]. *Vestnik RAMN*, 1, 28-34.
5. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Поспелова В.В., Лахтин М.В., Ворopaева Е.А., Черепанова Ю.В., Агапова Ю.В. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего // Вестник РАМН. – 2008. – № 2. – С. 33–44.
6. Lakhtin VM, Afanasiev SS, Alioshkin VA, Nesvizhskiy YV, Pospelova VV, Lakhtin MV, Voropayeva EA, Cherepanova YV, Agapova YV (2008). Strategical aspects of constructing probiotics in future [Strategicheskiye aspekti konstruirivaniya probiotikov budushevo]. *Vestnik RAMN*, 2, 33-44.
7. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Гликоконъюгаты-распознающие системы бактериальных культур // Ключевые аспекты научной деятельности – 2014. Биологические науки: Материалы X Междунар. научно-практич. конф. «Ключевые

аспекты научной деятельности. Сер. «Биологические науки» (7-15 янв. 2014, Przemyśl, Польша). Том 16. – С. 17–21.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Alioshkin VA (2014). Glycoconjugates-recognizing systems of bacterial cultures (in Russian) [Glikokonjugaty-raspoznajushhie sistemi bakterial'nyh kul'tur]. *Kljuchevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti – 2014. Biologicheskie nauki: Materialy X Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Kljuchevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti. Ser. Biologicheskie nauki»* (7-15 janv. 2014, Przemyśl, Pol'sha), 16, 17-21.

5. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Дот-блотовый анализ гликоконъюгаты-связывающих лектиновых препаратов, изолированных из бактериальных культур // Ключевые вопросы научной деятельности – 2014. Биологические науки: Материалы X Междунар. научно-практич. конф. (7-15 янв. 2014, Przemyśl, Польша). – Т. 16. – С. 23–27.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Aleshkin VA (2014). Dot blot analysis of glycoconjugates-binding lectin preparations isolated from bacterial cultures (in Russian) [Dot-blotovyj analiz glikokonjugaty-svjazyvajushhih lektinovyh preparatov, izolirovannyh iz bakterial'nyh kul'tur]. *Materialy X Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Kljuchevye aspekty nauchnoj dejatel'nosti. Ser. «Biologicheskie nauki»* (7-15 janv. 2014, Przemyśl, Pol'sha), vol. 16, 23-27.

6. Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Новые гликоконъюгаты-распознающие системы в культуральных жидкостях перспективных пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл // Наука и образование без границ – 2013: Материалы IX Междунар. научно-практич. конф. (7-15 дек. 2013, Przemyśl, Польша). – Т. 37. – С. 64–68.

Lakhtin MV, Afanasiev SS, Lakhtin VM, Aleshkin VA (2013). New Glycoconjugates-recognizing Systems in Cultural Fluids of Perspective Probiotic Strains of Bifidobacteria and Lactobacilli [Novye glikokonjugaty-raspoznajushhie sistemi v kul'tural'nyh zhidkostyah perspektivnyh probioticheskikh shtamov bifidobakterij i laktobacill ]. *Nauka i obrazovanie bez granic – 2013: Materialy IX Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. (7-15 dek. 2013, Przemyśl, Pol'sha)*, vol. 37, 64-68.

7. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма // Вестник РАМН. – 2010. – № 2. – С. 3–8.

Lakhtin MV, Aleshkin VA, Lakhtin VM, Nesvizhsky YV, Afanasiev SS, Pospelova VV (2010). The Role of lectins of probiotic microorganisms in sustaining the macroorganism [Rol lektinov probioticheskikh mikroorganizmov d zhizneobespetchenii makroorganizma]. *Vestnik RAMN*, 2, 3-8.

8. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Алешкин А.В. Лектины и ферменты в биологии и медицине. – М.: Династия, 2010. – 496 с.

Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin VA, Afanasiev SS, Aleshkin AV (2010). Lectins and enzymes in biology and medicine [Lektiny i fermenty v biologii i meditsine], 496.

9. Способ получения лектинов, обладающих противокандидной активностью: Патент 2486241 Российская Федерация, МПК C12N1/20 / Лахтин М.В.,

Лактин В.М., Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Кулакова Ю.В.; Заявитель и патентообладатель Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (RU). – 2012112390/10, заявл. 02.04.2012; опубл. 27.06.2013 Бюл. № 18 – 8 с.

Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Aleshkin VA, Afanasiev SS, Kulakova YV (2013). Way of receiving the lektin possessing protivokandidny activity [Sposob polucheniya lektinov obladayushih protivokandidnoy aktivnostyu]: Patent 2486241 Rossiyskaya Federatsiya, MPK C12N1/20; Applicant and patent holder Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (RU). 2012112390/10, appl. 02.04.2012; publ. 27.06.2013, Bul. N 18, 8 p.

10. Gabius HJ (2008). Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochem Soc Trans.*, 36, 1491-1496.

11. Imberty A (2013). Bacterial Lectins and Adhesins: Structures, Ligands and Functions. *Synthesis and Biological Applications of Glycoconjugates*, 3-11.

12. Lakhtin M, Lakhtin V, Aleshkin A, Bajrakova A, Afanasiev S, Aleshkin V (2012). Lectin systems imitating

probiotics: potential for biotechnology and medical microbiology. *Probiotics* 2012, 417-432.

13. Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Afanasiev SS, Aleshkin VA (2013). Differences and similarities between new probiotic bifidobacterial and lactobacillus lectin systems interacting to glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, 30, 375-376.

14. Lakhtin MV, Lakhtin VM, Aleshkin AV, Afanasiev SS, Aleshkin VA (2013). Functional similarities and differences between new lectin systems in human organism: protein hormone and probiotic bacterial. *Glycoconjugate J.*, 30, 370.

15. Lakhtin M, Lakhtin V, Alyoshkin V, Afanasyev S (2011). Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily. *Beneficial Microbes*, 2 (2), 155-165.

16. Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V (2011). Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*, 17 (6), 452-455.

17. Schnaar RL (2015). Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist, 135: 609-615.

#### Сведения об авторах Information about the authors

**Лактин Михаил Владимирович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

**Lakhtin Mikhail Vladimirovich** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (125212, Moscow, ul. Admirala Makarova, 10; tel.: (495) 708-02-62; e-mail: info@gabrich.com)

**Лактин Владимир Михайлович** – доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

**Lakhtin Vladimir Mikhailovich** – Doctor of Biological Sciences, Chief Research Officer of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

**Афанасьев Станислав Степанович** – Заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (e-mail: afanasievss409.4@bk.ru)

**Afanasyev Stanislav Stepanovich** – Honored Scientist of the Russian Federation, Professor, Doctor of Medical Science, Deputy Director of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (e-mail: afanasievss409.4@bk.ru)

**Алешкин Владимир Андрианович** – Заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

**Aleshkin Vladimir Andrianovich** – Honored Scientist of the Russian Federation, Professor, Doctor of Biological Sciences, Director of Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology