

Srovnání tří metod stanovení lysozymu v hemolymfě hmyzu

Pavel HYRŠL & Veronika Mandátová

Ústav experimentální biologie, Oddělení živočišné fyziologie a imunologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita, Kotlářská 2, Brno 61137, Česká republika

e-mail: hyrsl@mail.muni.cz



Úvod:

Lysozym je součástí humorální složky přirozené imunity hmyzu stejně tak jako jiných bezobratlých a obratlovců. Řadíme ho mezi antibakteriální proteiny hemolymfy, které se nacházejí běžně v hemolymfě (fenoloxidázy ve formě profenoloxidáz, lysozym, lektiny, hemolin, aglutininy). Jejich další část je exprimována pouze v případě infekce (baktericidní peptidy).

Lysozym náleží ke skupině heterogenních enzymů, která zahrnuje asi 20 příbuzných enzymů, označovaných jako N-acetylmuramylhydrolázy – E.C.3.2.1.17. U hmyzu jsou známy tři nepatrně se lišící alelické varianty cecropia enzymu (izolovaný z *Hyalophora cecropia*) a lysozym *Bombyx mori* (Yu et al. 2002). Lysozym je velmi konzervativní molekula o relativní molekulové hmotnosti 14,5 kDa, kterou tvoří 129 aminokyselin (Vodrážka 1992).

Lysozym katalyzuje hydrolyzu polysacharidových řetězců ze střídajících se N-acetylglukozaminových jednotek a zbytku N-acetylmuramové kyseliny, které dodávají tuhost buněčným stěnám bakterií. Působí pouze na G⁺ bakterie, protože mají odlišnou stavbu buněčné stěny než G⁻ bakterie (lytický, baktericidní faktor pro G⁺ bakterie, bakteriostatický faktor pro G⁻ bakterie) (Morishima et al. 1994).

U hmyzu se vyskytuje ve všech tkáních. Jeho aktivita (koncentrace) v hemolymfě stoupá po injikaci antigenu i po poranění až 10x (Wiesner & Götz 1993, Kanost et al. 1990).

Cílem práce bylo porovnat tři metody stanovení lysozymu v hmyzí hemolymfě.

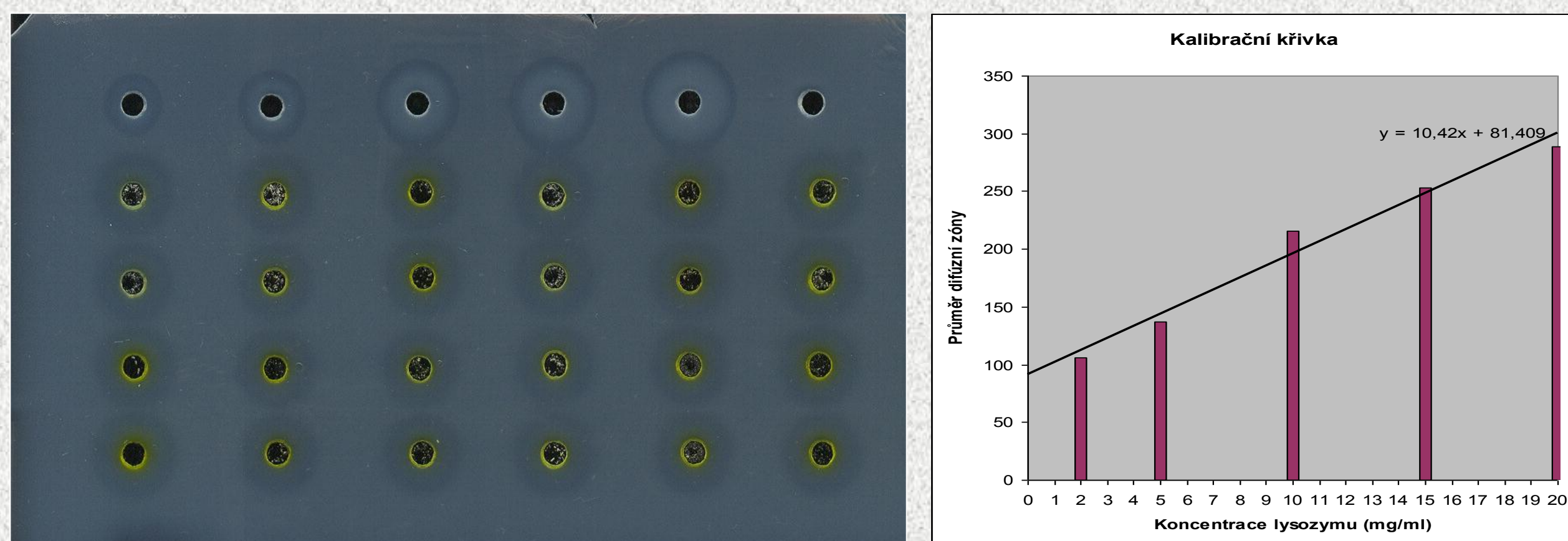
Materiál metody:

Pro srovnání tří uvedených metod byl použit kalibrační roztok lysozymu (E.C.3.2.1.17, Sigma) o koncentraci 2, 5, 10, 15 a 20 mg/ml. Dále byla použita hemolymfa bource morušového (*Bombyx mori*) a zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Všechny metody využívají *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*, CCM 169), který patří k nejcitlivějším mikroorganismům rozpouštěným tímto enzymem (Powning & Davison 1973).

1. Radiální difúze v agaróze:

Množství lysozymu lze stanovit radiální difúzí v agaróze podle Hyršl & Marek (1999).

Agaróza (Lachema) byla povařena v Brit.-Robinsonově pufru (pH 7,0) společně s *M. luteus* a nalita na skleněné plotny 18 x 8,5 cm. Do vysekaných jamek bylo nanášeno 5 µl neředěné hemolymfy nebo kalibračního roztoku. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce za laboratorní teploty 24 hodin. Velikost difúzní zóny je přímo úměrná velikosti bakteriolytické aktivity hemolymfy. Průměr difúzní zóny byl odečítán měřítkem IDP – SEVAC. Množství lysozymu ve vzorku bylo přepočítáno podle kalibrační křivky na mg/ml hemolymfy.



Obr.: Agarózový gel s vysekanými jamkami a difúzními zónami (vlevo). Horní řada obsahuje vzorky kalibračního roztoku lysozymu o koncentraci 2, 5, 10, 20 a 25 mg/ml. Další čtyři řady jsou vzorky hemolymfy *B. mori*. Kalibrační přímka (vpravo) a její rovnice, podle které se vypočítají výsledné hodnoty obsahu lysozymu ve vzorcích.

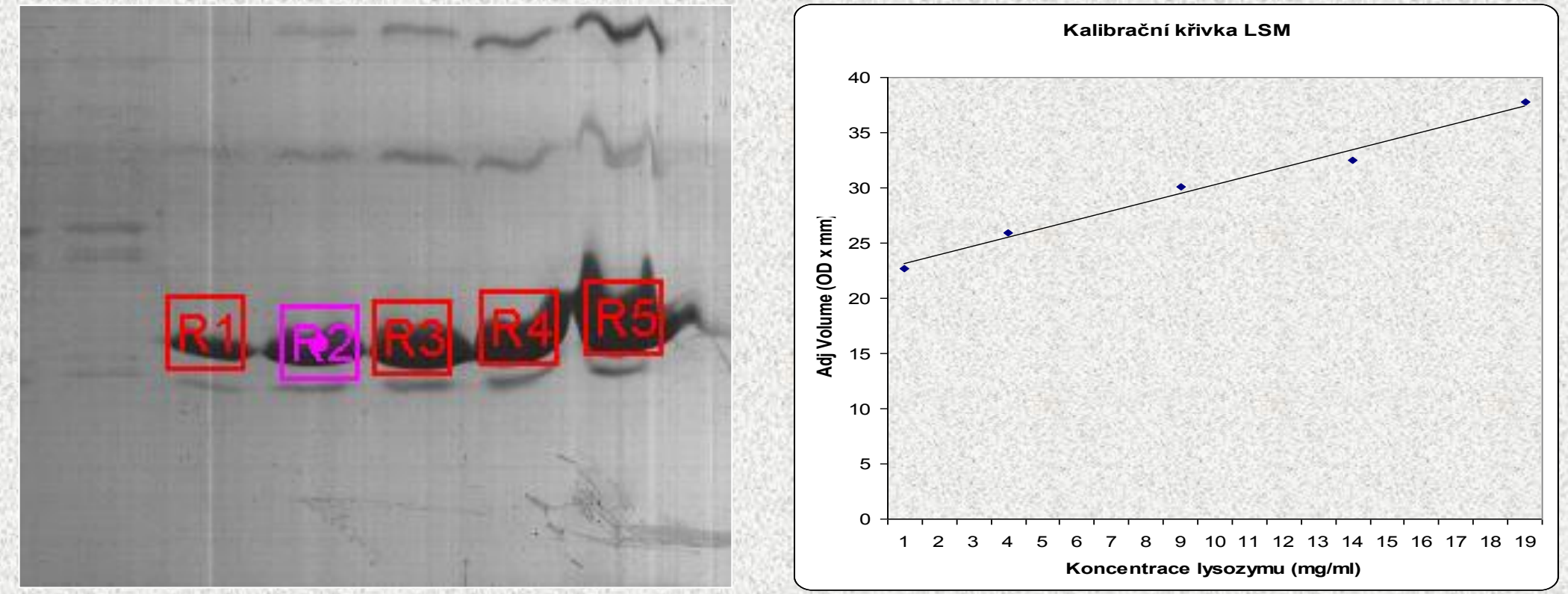
2. Elektroforéza SDS-PAGGE

Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gradient gel electrophoresis - metoda podle Laemmliho (1970) modifikovaná podle Hyršl & Šimek (2005).

Polyakrylamidové gely vznikají kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N',N'-metylenbisakrylamidu. SDS (Sodium dodecylsulfát) se váže shodně na všechny bílkoviny v poměru 1,4 g / 1g bílkoviny a předává jim silný záporný náboj, vlastní náboj je poté zanedbatelný.

Byl použit 5 % koncentrační gel a separační gel 14 x 10,5 cm s gradientem 7,5 – 20,0 %. Vertikální elektroforéza SE 600 (Hofer Scientific Instruments) probíhala v prostředí running buffer, pH 8,3, v automatickém dvoukrokovém režimu 7 - 8 hodin. Dělení proteinů probíhalo paralelně ve dvou gelech, každý z nich pro 15 vzorků, jedním vzorkem byl vždy standard (SDS-PAGE Molecular Weight Standard Broad Range, Bio-Rad, No. 161-0317).

Gely byly barveny stříbrem podle Kirkeby et al. (1993). K vyhodnocení elektroforetogramů byl použit videodensitometr GS-670 a software Molecular Analyst (Bio-Rad) verze 1.1.1. Kalibrační křivka byla sestavena na základě množství (kvantitativní) analýzy detekovaných frakcí, molekulová hmotnost 14,5 kDa byla ověřena porovnáním se standardem molekulových hmotností.



Label	Area mm ²	Volume (OD x mm)	Mean	OD Maximum	OD Minimum	OD Adj	Volume (OD x mm)
R1	15,23	60,90	22,68	0,37	0,83	0,15	22,68
R2	17,40	60,90	23,91	0,43	0,82	0,17	25,91
R3	20,21	60,90	30,10	0,49	0,84	0,18	30,10
R4	21,79	60,90	32,46	0,53	0,84	0,16	32,46
R5	25,37	60,90	37,79	0,62	0,81	0,12	37,79

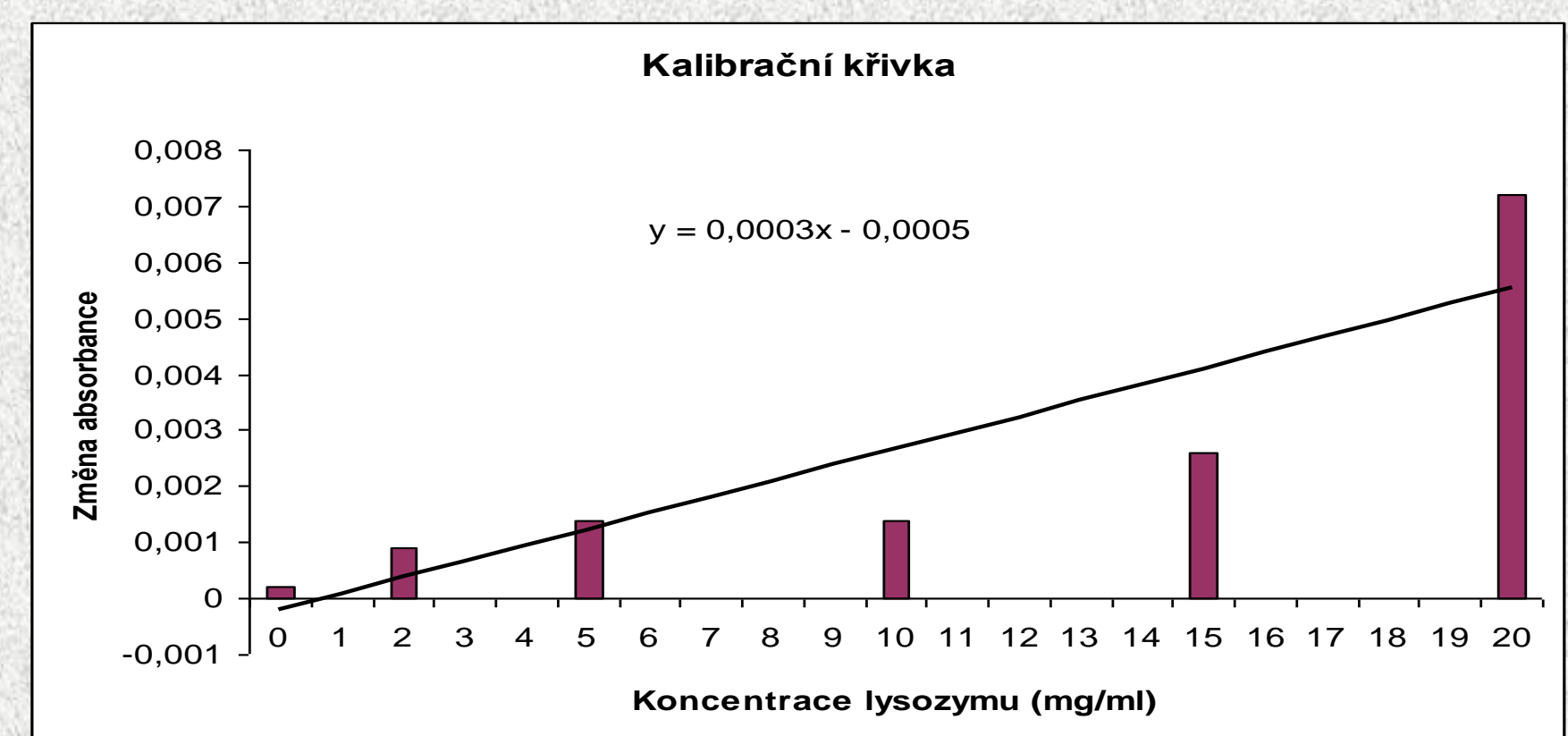
Obr.: Vlevo nahoře akrylamidový gel s frakcemi lysozymu R1 - R5 (2 - 20 µl/ml), vpravo kalibrační křivka lysozymu sestavená podle tabulky (dole) na základě programu Volume Analysis.

3. Turbidimetrická metoda - spektrofotometrie

Metoda podle Parry et al. (1965), která stanovuje aktivitu lysozymu jako pokles absorbance vzorku obsahujícího lysozym v 20 minut povařené suspenzi *M. luteus*.

Absorbance vzorku (kontroly) byla měřena při laboratorní teplotě a vlnové délce 530 nm v 1 ml bakteriální suspenze (0,2 mg/ml Brit.-Robinsonova pufru o pH 7,0). Absorbance byla měřena ihned po přidání kalibračního roztoku (25 µl) nebo hemolymfy (2, 5, 10, 15 nebo 20 µl) a po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě. Byl zaznamenán pokles absorbance způsobený bakteriolytickou aktivitou lysozymu.

Množství lysozymu ve vzorcích bylo přepočítáno podle kalibrační křivky na mg/ml hemolymfy.



Obr.: Kalibrační křivka určená na základě měření změny absorbance po deseti minutách působení lysozymu o různé koncentraci na suspenzi *M. luteus*.

Tabulka výsledků:

Druh hmyzu	Množství lysozymu v mg / ml hemolymfy
<i>B. mori</i> samice V. instar	6-10
<i>B. mori</i> samci V. instar	8-12
<i>B. mori</i> samice kukly	10-14
<i>B. mori</i> samci kukly	12-18
<i>G. mellonella</i> larva	4-8
<i>G. mellonella</i> kukla	1-2

Tab.: Množství lysozymu v hemolymfě vybraných zástupců hmyzu (n = 10).

Diskuze:

Nejpřesnější hodnoty koncentrace lysozymu pro vzorky hemolymfy pocházejí hlavně z metody radiální difúze v agaróze, i když byly většinou potvrzené i dalšími metodami. Elektroforetické stanovení lysozymu je časově velmi náročné a dochází při něm k přebarvení ostatních proteinových frakcí. Využití elektroforézy pouze za účelem stanovení je tedy velmi neekonomické, i když vhodné jako potvrzení jeho přítomnosti ve vzorku. Turbidimetrická metoda se nejeví jako spolehlivá, protože změna absorbance není jednoznačně úměrná koncentraci lysozymu (viz. kalibrační křivka), a proto množství lysozymu v hemolymfě přepočítané podle kalibrační křivky není tak přesné jako u zbylých dvou metod. Ačkoliv má tato metoda využití např. při stanovení množství lysozymu v tkáních a tělních tekutinách ryb (Ellis 1990), nám se u hmyzu neosvědčila.

Závěr:

Nejlépe se osvědčila metoda radiální difúze v agaróze, protože je velmi rychlá, levná, citlivá a použitelná nejen pro vzorky hmyzí hemolymfy a tkání, ale i pro jiné vzorky obsahující lysozym.

Literatura:

Ellis A.E.: Techniques in Fish Immunology, 12: 101-103, 1990.
Hyršl P. & Marek M.: Biological Bulletin of Poznaň., vol. 36, no. 2, s. 103-110, 1999.
Hyršl P. & Šimek V.: Biologia, 60 (2), 207-213, 2005.
Kanost M. R., Kawooya J. K., Law J. H., Ryan R. O., Van Heusden M. C. and Ziegler R.: Advances in Insect Physiology, 22: 299-396, 1990.
Kirkeby S., Moe D. and Bog-Hansen T.C.: Electrophoresis, 14: 51-55, 1993.
Laemmli U.K.: Nature 227: 680-685, 1970.
Morishima I., Horiba T. and Yamano Y.: Comp. Biochem. Physiol. 108A: 311-314, 1994.
Parry R. M., Chandau R. C. and Shahani R. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119: 384-386, 1965.
Powning R. F. & Davidson J.: Comp. Biochem. Physiol. 45B: 669-681, 1973.
Vodrážka Z.: Academia, 1992.
Wiesner & Götz: J.Insect Physiol. 39 (10): 865-876, 1993.
Yu K. H., Kim K. N., Lee J. H., Lee H. S., Kim S. H., Cho K. Y., Nam M. H. and Lee I. H.: Dev. Comp. Immunol. 26: 707-713, 2002.