

# Исследование количественного и качественного состава низкомолекулярных веществ белково-пептидной природы из личинок *Tenebrio molitor* до и после холодной акклимации

Д.В. Третьяк, А.К. Гулевский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Study of Quantitative and Qualitative Composition of Low-Molecular Protein-Peptide Compounds of *Tenebrio molitor* Larvae before and after Cold Acclimation

D.V. Tretyak, A.K. Gulevsky

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Холодоустойчивые биологические виды способны приспосабливаться к низким температурам благодаря молекулярным механизмам адаптации, которые они приобрели в процессе эволюции, в частности, синтезу и аккумуляции специфических белков (антифризные белки, белки-нуклеаторы) и низкомолекулярных криозащитных веществ (сахара, полиолы). Также известно, что процесс адаптации биообъектов к низким температурам связан со структурными модификациями белков и качественными изменениями белкового спектра. Наряду с этим вызывает интерес исследования пептидного профиля холодоустойчивых организмов при холодной адаптации, поскольку пептиды могут выступать не только как продукты метаболизма белков, но и как регуляторные биомолекулы, изменяющие качественный профиль синтезируемых белков, а также – как антифризные молекулы.

Цель работы – исследование белково-пептидного состава супернатантов из личинок *Tenebrio molitor* до и после холодной акклимации.

В работе использовали неакклимированных и акклимированных при 5...7°C в течение 3-х недель личинок *T. molitor*. Для получения белков и пептидов личинок гомогенизировали в 0,6% растворе NaCl на 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением ингибитора сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1800g. Надосадочную жидкость центрифугировали в течение 60 мин при 100 000g. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда. Количественную и качественную оценку белково-пептидного состава супернатантов из личинок *T. molitor* проводили с помощью метода гель-проникающей хроматографии с использованием колонки, заполненной поливиниловым гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40. Фракции идентифицировали при длине волны 280 нм.

Установлено, что наибольшее количество пептидных фракций имеют супернатанты из неакклимированных личинок *T. molitor*. Показано, что у холодоакклимированных личинок *T. molitor* наблюдаются низкомолекулярные пептидные фракции с м. м. от (540 ± 20) до (2255 ± 85) Да, а у неакклимированных особей отмечается значительное количество высокомолекулярных пептидов с м. м. от (4675 ± 225) до (6595 ± 550) Да. Состав белково-пептидных веществ супернатантов из акклимированных к холоду и неакклимированных личинок отличается, в частности, после холодной акклимации *T. molitor* отмечается уменьшение количества пептидов с м. м. (2255 ± 85) и (1525 ± 115) Да в 8 и в 2,3 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в процессе холодной адаптации происходит количественное и качественное изменение спектра белково-пептидных веществ, что может быть одним из механизмов естественной адаптации личинок *T. molitor* к охлаждению.

Cold-tolerant biological species are able to adapt to low temperatures due to the molecular adaptation mechanisms, which they have acquired in the course of evolution, in particular the synthesis and accumulation of specific proteins (antifreeze proteins, ice-nucleating proteins) and low-molecular cryoprotective substances (sugars, polyols). It is also known that the biological object adaptation to low temperatures is related to the qualitative changes in protein spectrum. In addition, it is of interest to study the peptide profile of cold-tolerant organisms during cold adaptation, as the peptides can act not only as the products of protein metabolism, but also as regulatory biomolecules, changing the qualitative composition of the synthesized proteins as well as to act as antifreeze molecules. The aim of the research was to investigate the protein-peptide composition of supernatants derived from *Tenebrio molitor* larvae before and after cold acclimation.

The studies were carried out in non-acclimated and acclimated at 5...7°C for 3 weeks *T. molitor* larvae. To isolate the proteins and peptides, the larvae were homogenized in 0.6% NaCl in 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4 supplemented with serine protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenates were centrifuged for 10 min at 1,800g. The supernatant was centrifuged for 60 min at 100,000g. The protein concentration was determined by the Bradford method. The quantitative and qualitative analysis of protein-peptide composition of supernatants of *T. molitor* larvae was performed using the gel-permeation chromatography in the column filled with polyvinyl gel TSK-Gel Toyopearl HW-40. The fractions were identified at a wavelength of 280 nm.

The supernatants from non-acclimated *T. molitor* larvae were established to have the largest number of peptide fractions. It was shown that cold-acclimated *T. molitor* larvae had the low-molecular peptide fractions with the molecular weights from 540 ± 20 to 2,255 ± 85 Da, and non-acclimated insects had high-molecular peptides with the molecular weights from 4,675 ± 225 to 6,595 ± 550 Da. The protein-peptide compositions of supernatants from cold-acclimated and non-acclimated larvae differed quantitatively, in particular, the number of peptides with the molecular weights of 2,255 ± 85 and 1,525 ± 115 Da decreased by 8 and 2.3 times after cold acclimation of *T. molitor*.

Thus, as a result of the performed studies it has been found that during cold adaptation the quantitative and qualitative changes in the spectrum of protein-peptide compounds which may be one of the mechanisms of the natural adaptation of *T. molitor* larvae to cooling occurred.

