

# Charakterystyka rozdziałów w żelu poliakrylamidowym białek szczepów *Ascosphaera apis*\*<sup>1)</sup>

PAWEŁ CHORBIŃSKI, TADEUSZ STEFANIAK\*

Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

\*Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy i Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Chorbiński P., Stefaniak T.

## SDS-PAGE protein patterns of *Ascosphaera apis* strains

### Summary

*Ascosphaera apis* is the agent that causes chalkbrood (CB) disease in honeybees and is mostly isolated from mummified honeybee larvae (*Apis mellifera* L.). The aim of the study was to characterize the protein patterns of 24 strains of *Ascosphaera apis* isolated from Polish apiaries using the sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis method (SDS-PAGE). All strains of *A. apis* were cultivated for 8 days on an SDA-YE base with 0.1% chloramphenicol added and were maintained at 25°C. Mycelium was taken from every single culture, frozen at -20°C and kept for protein extraction. Four different methods of protein extraction and their usefulness for SDS-PAGE were compared.

While using SDS-PAGE, three protein patterns were detected among the tested strains. Pattern type I consisted of proteins 17, 24-25, 27, 31, 41, 45-47, 60 kDa; while type II – 17, 31, 41, 60 kDa, and type III – 17, 27, 31 and 57-58 kDa molecular mass. It is suggested that SDS-PAGE of soluble proteins could be a useful method to distinguish and identify differences between the strains of *Ascosphaera apis*.

**Keywords:** *Ascosphaera apis*, SDS-PAGE

*Ascosphaera apis* jest typowym pasożytem przystosowanym do rozwoju w organizmie czerwia pszczelego. Za najważniejsze czynniki warunkujące jego zjadliwość uważa się jego aktywność chitynolityczną i proteolityczną. Grzyb ten wytwarza wiele enzymów typu sacharoz, lipaz i proteaz, dzięki którym może przełamywać bariery anatomiczne ciała larwy i wnikać do hemocelu przez ścianę przewodu pokarmowego lub nawet oskórek. Dzięki wytwarzaniu fosfatazy kwaśnej i zasadowej, aryamidazy cysteinowej i walinowej,  $\beta$ -galaktozydazy i N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazy przenika aktywnie ścianę jelita i rozwija się w jamie ciała czerwia pszczelego (2, 5). Szczególną rolę odgrywa wytwarzanie N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazy, która pełni u *A. apis* funkcję chitynolityczną (grzyb ten nie wytwarza chitynazy). Dzięki temu enzymowi grzyb wrasta do hemocelu, gdzie znajduje dogodne warunki rozwoju, ze względu na skład i pH hemolimfy czerwia, a następnie wyrasta na powierzchnię ciała larwy i wytwarza owocniki (1).

W dostępnym piśmiennictwie nie napotkano informacji o wykonanych badaniach nad rozdziałem białek u grzybów z rodzaju *Ascosphaera*. W badaniach

nad *Beauveria brongniartii* (13) na podstawie analizy białek w SDS-PAGE stwierdzono wysoki poziom zmienności wzorów rozdziału rozpuszczalnych białek między szczepami. Nie wykazano jednak istnienia zależności pomiędzy określonym typem wzorów *Beauveria brongniartii*, a ich zjadliwością wobec larw *Melolontha melolontha*. W czasie naturalnego zakażenia entomopatogennym grzybem *Beauveria bassiana* (16) stwierdzono blokowanie humoralnej reakcji odpornościowej jamy ciała u larw *Galleria mellonella*. Natomiast w warunkach doświadczalnych iniekcja blastospor wzbudzała wydzielanie do hemolimfy enzymów i białek bakteriolitycznych, głównie lizozymu i cekropin. W przypadku grzybów *Drechmeria coniospora*, patogennych dla płaźniców *Panagrellus redivivus*, znaczącą rolę w adherencji strzępek grzyba w stosunku do tkanek gospodarza odgrywają białka powierzchniowe o masie 8-80 kD (9).

W badaniach (4) nad szczepami *Malassezia pachydermatis* izolowanych ze skóry lub uszu psów stwierdzono znaczne różnice w składzie i koncentracji licznych frakcji białkowych (występujących w zakresie 15-145,7 kD). Nie wykazano jednak zależności między obecnością określonych frakcji lub wzorem rozdziału a klinicznym przebiegiem infekcji. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad 46 izolatami *Micro-*

\*: Praca wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez KBN nr 5 PO6K 027 19.

*sporum canis*, gdzie występowała duża zmienność w obrazie białek (o masie 18-116 kD), ale nie znaleziono związków pomiędzy typem wzorów białek a przebiegiem dermatomykozy u kotów. Potwierdzono natomiast przydatność metody rozdziału białek w żelu poliakrylamidowym do wykrywania różnic między szczepami (12, 15).

Celem badań była ocena wzorów rozdziału białek szczepów *Ascosphaera apis*, wyizolowanych z przypadków terenowych grzybicy otorbielakowej przy użyciu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

### Material i metody

Materiał do badań stanowiły 24 szczepy *Ascosphaera apis* wyizolowanych z terenowych przypadków grzybicy otorbielakowej pochodzących z pasiek z terenu Polski oraz dodatkowo dwa szczepy (N2 i N4) z terenu Niemiec (otrzymane dzięki uprzejmości dr Benedykta Polaczka z Freie Universität w Berlinie) (tab. 1).

Wszystkie szczepy uzyskano przez posiew rozdrobnionych zamartych larw pszczelich (tzw. mumii) wykazujących kliniczne objawy grzybicy otorbielakowej według metodyki podanej przez Glińskiego i wsp. (7). Po uzyskaniu wzrostu i wyizolowaniu kultur grzybowych badane szczepy identyfikowano, posługując się ogólnie przyjętymi metodami makro- i mikroskopowymi. Do badań przeznaczano szczepy wytwarzające zarodniki (askospory), u których w czasie hodowli i przesiewów nie wykazano występowania pleomorfizmu grzybni.

Materiał do oznaczeń stanowiły 8-dniowe hodowle wym. szczepów *Ascosphaera apis*, prowadzone na podłożu Sabourauda (SDA-YE) (BioMérieux, Francja – z 0,2% dodatkiem wyciągu drożdżowego i 0,1% chloramfenikolu) w temp. 25°C. Z każdej hodowli pobierano jałowo część powietrzną grzybni i ugniatano dokładnie w skalowanej próbówce typu eppendorf. Zebrany materiał zamrażano i przechowywano do dalszych badań w –20°C.

Po rozmrożeniu prób, stosownie do objętości zebranego mycelium, dodawano od 500 do 1000 µl płynu zawieszającego tak, aby zachować porównywalną koncentrację grzybni w próbkach do rozdziału.

**Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).** Zastosowano cztery sposoby solubilizacji białek membranowych w celu ich przygotowania do rozdziału w SDS-PAGE:

1. Do badanego mycelium dodawano od 500 do 1000 µl (jak wyżej opisano) PBS o pH 7,2 zawierającego 2% Tritonu X-100. Następnie prowadzono sześciokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbek. W trakcie rozmrażania próbki rozcierano bagietką szklaną. Następnie próbki wirowano przy 10 000 × g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Supernatant wytrącano acetonem w –20°C i płukano 2 × zimnym acetonem. Uzyskany osad suszono i dodawano 50-100 µl buforu do próbek zawierającego 6% SDS i mieszano przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy 10 000 × g, oddzielano supernatant i przechowywano do użycia w –20°C.

2. Do badanego mycelium dodawano 2% roztworu Tritonu X-114. Mieszaninę umieszczano w łaźni lodowej i mie-

Tab. 1. Pochodzenie szczepów *Ascosphaera apis* izolowanych z rodzin pszczelich

Numer szczepu	Miejsce pochodzenia	Numer szczepu	Miejsce pochodzenia
A1	Siechnice	A52	Wrocław
A2	Wysoka	A58	Bronowice
A4	Puławy	A62	Szramowo nr 20
A17	Tarnobrzeg	A63	Szramowo nr 3
A27	Wrocław	A64	Szramowo nr 10
A35	Kąty Wrocławskie	A66	Kuligi nr 3
A37	Trzebnica	A69	Wrocław
A40	Czastary	A70	Magnice nr 9
A45	Częstochowa	A71	Magnice nr 10
A46	Bolków	A72	Wrocław
A48	Magnice nr 11	A77	Wrocław
A49	Magnice nr 15	N1	Berlin
A50	Magnice nr 13	N4	Berlin

szano przez 2 godziny, co 10 minut rozcierając materiał bagietką szklaną przez 2 minuty. Następnie zawieszinę umieszczano na 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut przy 10 000 × g również w temperaturze pokojowej. Frakcję wodną i frakcję tritonową oddzielano, mieszano z 7 częściami acetonu o temperaturze –20°C i inkubowano również w temperaturze –20°C przez noc. Próbkę wirowano przy 10 000 × g, a uzyskany osad płukano 3-krotnie, suszono i zawieszano w buforze do próbek zawierającym 3% SDS i przechowywano do użycia w –20°C.

3. Procedurę prowadzono jak w pkt. 2., stosując 5% Triton X-114.

4. Do badanego mycelium dodawano do próbek bufor zawierający 6% SDS-PAGE. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny, co ok. 10 minut rozcierając bagietką szklaną przez 2 minuty. Następnie próbkę wirowano przez 10 minut przy 10 000 × g w temperaturze pokojowej, supernatant odciążano i przechowywano w –20°C.

Próbki uzyskane opisanymi czterema metodami rozmrażano, gotowano przez 5 minut i wirowano przez 10 min. przy 10 000 × g w temperaturze pokojowej. Supernatant наносzono do dołków startowych w objętości 5, 10, 15 i 20 µl (żel startowy 5%, żel rozdzielający 7,5%, proporcja akrylamidu do bisakrylamidu 30 : 0,8). Rozdział prowadzono wg Laemmli (11) w komorze MiniProtean II (Bio-rad), przy stałym napięciu 100 V. Jako standard masy zastosowano preparat LMW firmy Pharmacia. Żele barwiono błękitem Coomassie i oceniano jakość rozdziałów.

Zadowolającą jakością rozdziału białek: brak artefaktów i obecność zogniskowanych frakcji białkowych, uzyskano jedynie w próbkach preparowanych według czwartej procedury, którą zastosowano do rozdzielania badanych szczepów *Ascosphaera apis*.

Do opisu stężenia poszczególnych frakcji białkowych posłużono się czteropunktową skalą: silna +++, średnia ++, słaba +, bardzo słaba ± (tab. 2).

## Wyniki i omówienie

Próby solubilizacji białek powierzchniowych grzybni przy użyciu Tritonu X-100 i Tritonu X-114 nie przyniosły zadowalających efektów – uzyskano stosunkowo niskie stężenie białek, a ponadto w większości uzyskanych próbek występowały artefakty, utrudniające interpretację rozdziałów. Jedynie zastosowanie intensywnego rozczierania próbek w środowisku 6% sodowego siarczanu dodecylu (SDS) pozwoliło uzyskać wyraźnie wyższe niż w poprzednich procedurach stężenie białka, znacznie rzadziej obserwowano także artefakty (prawdopodobnie są to białka lub ich kompleksy z cukrowcami nie rozpuszczające się w środowisku SDS-PAGE).

W rozdziale elektroforetycznym 26 szczepów *Ascosphaera apis* w SDS-PAGE przygotowanych wg 4. procedury wykazano występowanie następujących typów wzorów białek.

**Typ I.** Reprezentowany przez szczepy: N2, A2, A4, A17, A27, A46, A49, A63, A64, A66, A70, A71, A77. Wspólnymi cechami szczepów była obecność dwóch silnych frakcji (+++) o masie 17 kD i 60 kD, dwóch średnich frakcji (++) o masie 24-25 kD i 45-47 kD, dwóch słabych frakcji (+) o masie 41 kD, 31 kD oraz pojedynczej, bardzo słabej frakcji (±) o masie 27 kD (ryc. 1, tab. 2). Kilka szczepów (N2, A2, A63, A64, A77) posiadało dodatkowo słabe frakcje (+) o masie 80 kD, ok.100 kD i jedną o bardzo wysokiej masie (ok. 200 kD), natomiast u szczepów A4 i A46 nie stwierdzono frakcji o masie 24-25 kD.

**Typ II.** Reprezentowany przez szczepy: A37, A40, A45, A48. Wspólnymi cechami szczepów była obecność dwóch silnych frakcji (+++) o masie 17 kD i 60 kD, dwóch słabo zogniskowanych frakcji średnich (++) o masie ok. 31 kD i 41 kD oraz obecność silnie wybarwionego tła wysokobiałkowego zlokalizowanego poniżej 17 kD (ryc. 1, tab. 2). Szczep A37 posiadał dodatkowo słabe frakcje o masie 22 kD, 25 kD i 27 kD, a szczep A48 posiadał dodatkowo słabe frakcje o masie 22 kD i 25 kD.

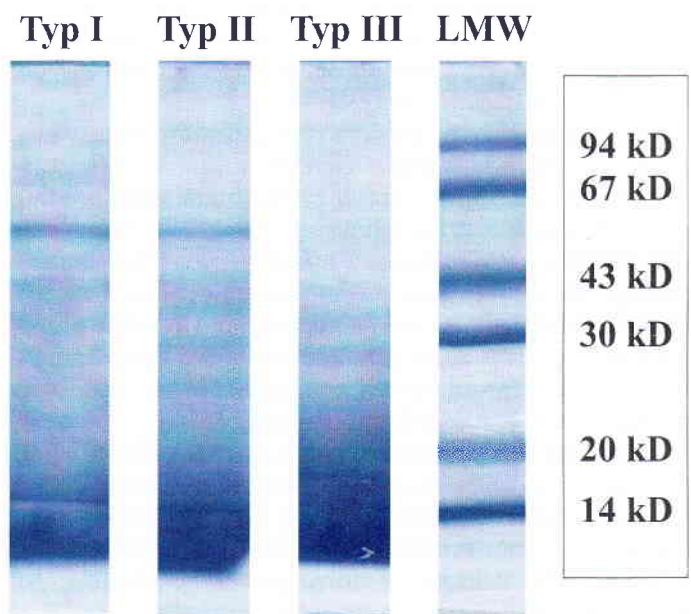
**Typ III.** Reprezentowany przez szczepy: N4, A1, A35, A50, A58, A62, A69, A72. Wspólnymi cechami szczepów była obecność jednej silnej frakcji (+++) o masie 17 kD, i trzech słabych frakcji (+) o masie 27 kD, 31 kD i 57-58 kD (ryc. 1, tab. 2). Szczepy A1 i A35 posiadały dodatkowo słabą (+) frakcję o masie 41 kD, a szczep N4 posiadał dodatkowo słabą frakcję (+) o masie 80 kD.

Nie udało się uzyskać widocznych frakcji białkowych przy rozdziale szczepu A52, natomiast pole rozdziału było silnie zabarwione.

U wszystkich szczepów *Ascosphaera apis* zakwalifikowanych do wymienionych trzech typów rozdziału w SDS-PAGE stwierdzono obecność silnej frakcji białkowej o masie 17 kD, a także znacznie słabszej frakcji o masie 31 kD, której koncentracja była wyraźnie wyższa w szczepach typu II niż w pozostałych typach.

Tab. 2. Charakterystyka rozdziałów białek szczepów *Ascosphaera apis* (SDS-PAGE)

Masa frakcji (kD)	Typ I	Typ II	Typ III
60	+++	+++	-
57-58	-	-	+
45-47	++	-	-
41	+	++	-
31	+	++	+
27	+	-	+
24-25	++	-	-
17	+++	+++	+++
0-17	-	+++ (silne tło)	-



Ryc. 1. Obraz rozdziału białek szczepów *Ascosphaera apis* w SDS-PAGE

Objaśnienie: LMW – standard masy

Warto też zwrócić uwagę na występującą w szczepach typu I i II silną frakcję o masie 60 kD. W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na informacje dotyczące rozdziałów białek u *Ascosphaera apis*. Większość dostępnych opracowań wykorzystujących technikę SDS-PAGE dotyczy grzybic u ludzi, ze szczególnym zwróceniem uwagi na alergię wywoływane przez grzyby lub szpitalnych przypadków grzybic narządowych. Interesujące są badania Jeavonsa i wsp. (10), w których opisano białko o masie 61 kD u grzybów *Penicillium manferi*. Prawdopodobnie odpowiada ono za blokowanie enzymu – katalazy, którego obecność stwierdzano u czerwiu pszczelego. W badaniach nad szczepami *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* i *A. ochraceus* wykazano obecność dwóch frakcji: jedną o masie 20 kD i drugą o masie 70 kD, natomiast u *Aspergillus flavus* tylko jedną silną frakcję o masie 44 kD (14).

Przeprowadzone badania rozdziałów w SDS-PAGE izolowanych na terenie Polski szczepów *Ascosphaera*

*apis* wykazały różnice w ich układzie białek i pozwoliły na wyodrębnienie trzech typów ich wzorów. Dwa szczepy pochodzące z terenu Niemiec nie różniły się od szczepów krajowych, ale różniły się między sobą i zostały zakwalifikowane do typów I i III. Wszystkie szczepy pochodziły z rodzin o znacznym nasileniu grzybicy otorbielakowej, tzn. na jednej stronie plastra z czerwiem występowało powyżej 5 zamaryłych larw (mumii). Pięć spośród badanych szczepów pochodziło z jednej pasieki, z różnych rodzin i stwierdzono w niej występowanie wszystkich trzech typów wzorów: typ I – szczepy A49, A70 i A71, typ II – A48 i typ III – A50. Natomiast z pasieki z okolic Szramowa na trzy badane szczepy dwa zaliczono do typu I (A63 i A64), a jeden do typu III (A62).

Dla sześciu spośród 26 badanych szczepów *A. apis* potwierdzono 100% przynależność gatunkową z użyciem technik PCR. Dotyczyło to szczepów nr A46, A50, A58, A69, A70 i A71 (3). Są to szczepy, dla których stwierdzono przynależność do typu I i III. Występowanie trzech typów rozdziału białek u szczepów *Ascosphaera apis* nasuwa pytanie, czy wynika to z różnic między szczepami, czy też jest następstwem interakcji pasożyt-żywiciel i przystosowania grzyba do rozwoju w organizmie żywiciela, jakim jest czerw pszczeli. Do najważniejszych czynników zapobiegających zakażeniu przez *Ascosphaera apis* uważa się pierwszą linię obrony, czyli okrywą ciała, struktury przewodu pokarmowego (m.in. tworzenie błon perytroficznych) i układu oddechowego. Po przełamaniu tych barier organizm czerwia likwiduje zakażenie przez inkapsulację strzępek i tworzenie guzków. Niestety, ani aktywność lityczna hemolimfy typu lizozymu, ani indukowalne czynniki humoralne hemolimfy (apidy-cyny i abycyna) nie niszczą askospor i mycelium *Ascosphaera apis* (6).

Do przełamania barier obronnych i kolonizacji ciała czerwia *A. apis* wykorzystuje szereg enzymów, w tym wspomnianą już N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazę oraz powoduje obniżanie poziomu glukozy i trehalozy w hemolimfie czerwia (8). Jednak w przypadku badanych szczepów *A. apis* nie wykazano zależności pomiędzy ich profilem enzymatycznym (wg API-ZYM) a przynależnością do uzyskanego typu I, II, III (2).

Zastosowana w badaniach technika elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) jest przydatna do charakterystyki i różnicowania szczepów *Ascosphaera apis* oraz pozwala na potwierdzenie ich przynależności gatunkowej.

### Piśmiennictwo

1. Bamford S., Heath L. A. F.: The effect of temperature and pH on the germination of spores of the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. J. Apic. Res. 1989, 28, 36-40.
2. Chorbiński P.: Aktywność enzymatyczna szczepów otorbielaka pszczelego (*Ascosphaera apis*). Medycyna Wet. w druku.
3. Chorbiński P.: Identyfikacja szczepów otorbielaka pszczelego (*Ascosphaera apis*) przy użyciu rybosomalnego DNA. Medycyna Wet. w druku.

4. Coutinho S. D. A., Souza T., Paula C. R., de Souza T.: Protein profiles of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs. Mycopathologia 1997, 139, 129-135.
5. Gilliam M., Lorenz B. J.: Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*, an entomopathogenic fungus of the honey bee, *Apis mellifera*. Apidologie 1993, 24, 19-13.
6. Gliński Z., Jarosz J.: Immunobiologia pszczoły miodnej, Wyd. AR, Lublin 1995.
7. Gliński Z., Wołski T., Chmielewski M.: Badania „in vitro” nad aktywnością przeciwgrzybiczą wyciągów arcydziegla lekarskiego (*Archangelica officinalis Hoffm.*) w stosunku do *Ascosphaera apis*. Medycyna Wet. 1988, 44, 552-556.
8. Gochbauer T. A., Margetts V. J.: Properties of honeybee larvae killed by chalkbrood disease. J. Apic. Res. 1979, 18, 212-216.
9. Jansson H. B., Friman E.: Infection-related surface proteins on conidia of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. Mycolog. Res. 1999, 103, 249-256.
10. Jeavons L., Hamilton A. J., Vanittanakom N., Ungpakorn R., Evans E. G. V., Sirisanthamma T., Hay R. J.: Identification and purification of specific *Penicillium manfredi* antigens and their recognition by human immune sera. J. Clin. Microb. 1998, 36, 949-954.
11. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970, 227, 680-685.
12. Mancianti F., Papini R., Sozzi S.: Electrophoretic patterns of secreted proteins from *Microsporium canis* isolates. J. Mycol. Med. 1994, 4, 209-212.
13. Reineke A., Zebitz C. P. W.: Protein and isoenzyme patterns among isolates of *Beauveria brongniartii* with different virulence to European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.). J. Appl. Entomol. 1996, 120, 307-315.
14. Singh A., Dharam P., Singh A. B., Prakash D.: Sensitization to different species of *Aspergillus* in bakery worker and general atopic population. Asian Pac. J. Allergy Immun. 1998, 16, 5-15.
15. Sparkes A. H., Stokes C. R., Gruffydd-Jones T. J.: SDS-PAGE separation of dermatophyte antigens, and western immunoblotting in feline dermatophytosis. Mycopathologia 1994, 128, 91-98.
16. Vilcinskas A., Matha V.: Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). Europ. J. Entomol. 1997, 94, 461-472.

Adres autora: dr Paweł Chorbiński, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

**MCLELLAN G. J., CAPPELLO R., MAYHEW I. G., ELKS R., LYBAERT P., WATTÉ C., BEDFORD P. G. C.: Obserwacje kliniczne i zmiany pośmiertne u angielskich cocker spanieli z pierwotnym niedoborem metabolicznym witaminy E i zanikiem pigmentu w nabłonku siatkówki. (Clinical and pathological observations in English cocker spaniels with primary metabolic vitamin E deficiency and retinal pigment epithelial dystrophy). Vet. Rec. 153, 287-292, 2003 (10)**

Zanik pigmentu w komórkach siatkówki (RPED) wystąpił 15 zwierząt z niedoborem witaminy E. U 11 psów wystąpiły zaburzenia neurologiczne, takie jak: ataksja, zaburzenie odruchów rdzeniowych, osłabienie mięśni. Parametry biochemiczne plazmy krwi z wyjątkiem 2 psów były w normie. Nie występowały różnice w średnim wieku psów z objawami neurologicznymi i psów chorych bez tych objawów. Nie występowały też istotne różnice w średnim stężeniu witaminy E w plazmie krwi chorych psów. U psów z objawami neurologicznymi poziom witaminy E w plazmie wynosił  $0,97 \pm 0,55$  ng/ml, a u psów bez objawów neurologicznych  $1,01 \pm 0,69$  ng/ml. Badanie histopatologiczne wykazało u jednego psa zwrodnienie neuronów z wyraźną dystrofią aksonalną i u jednego psa – z ostrą lipofuseynozą.