

Лектин, специфічний до N-ацетилнейрамінової кислоти, з червоної водорості *Gracilaria canaliculata* Sonder та його антибактеріальна активність

Ле Дін Хунг, Во Ті Дьє Транг

Інститут технологічних досліджень і застосування Нхаранга,

В'єтнамська академія науки і техніки,

вул. Вунг Вуонг, 2, Натранг, В'єтнам

ledinhhungims@yahoo.co.uk

vtrang47@gmail.com

Надійшла до редакції 11.11.2020. Після доопрацювання 26.01.2021. Підписана до друку 11.02.2021.

Опублікована 29.06.2021

Реферат. Наведено результати вивчення лектину, виділеного з морської червоної водорості *Gracilaria canaliculata* (GCL). Процедура ізоляції лектину полягала у поєднанні водної екстракції та осадження з використанням етанолу, а також методів іонообмінної та фільтраційної хроматографії. Лектин дав одну смужку з молекулярною масою 22000 Да як в умовах невідновлення, так і відновлення SDS-PAGE, що вказує на те, що GCL є мономірним білком. Гемаглютинація GCL була стабільною при рН 3–10, температурі до 60 °С; на неї не впливали ні наявність ЕДТА, ні додавання двовалентних катіонів. Лектин GCL мав високу спорідненість до N-ацетилнейрамінової кислоти завдяки взаємодії з ацетамідогрупою в екваторіальному положенні C2 цих залишків цукру. Це свідчить про те, що GCL є специфічним для N-ацетилнейрамінової кислоти. Крім того, GCL пригнічував ріст патогенних бактерій людини та креветок, *Staphylococcus aureus* та *Vibrio alginolyticus*, хоча це не впливало на ріст *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio parahaemolyticus* та *V. harveyi*. *Gracilaria canaliculata* може стати перспективним джерелом цінних лектинів для використання в якості антибактеріальних засобів.

Ключові слова: антибактеріальна активність, специфічність зв'язування вуглеводів, *Gracilaria canaliculata*, лектин, червона водорість

© Ле Дін Хунг, Во Ті Дьє Транг, 2021

Вступ

Лектини – це білки (або глікопротеїни), які специфічно та зворотно зв'язуються з вуглеводами, що призводить до аглютинації клітин або осадження полісахаридів та глікокон'югатів. Лектини повсюдно поширені в біосфері, різноманітні за структурою та біологічними функціями, що в основному залежить від організмів, що їх продукують. Вивчення властивостей лектинів щодо вуглеводного зв'язування надзвичайно важливе не тільки для з'ясування їх біологічної ролі, але й можливого застосування як вуглеводних зондів або ліків (Sharon, Lis, 2003).

Нещодавно деякі лектини, виділені з еукаріотичних морських водоростей, привернули увагу вчених як потенційні джерела нових речовин з противірусною (BIL, SARS-CoV та віруси грипу) та протипухлинною активністю (O'Keefe et al., 2010; Sato et al., 2011a, b, 2015; Hirayama et al., 2016; Mu et al., 2017; Chaves et al., 2018a; Barre et al., 2019, 2020; Hung, Trinh, 2020; Sohrab et al., 2020). Це обумовлено їхньою здатністю зв'язувати вуглеводні структури, присутні на глікопротеїновій оболонці вірусу або на поверхнях ракових клітин, блокуючи потрапляння вірусів у клітини-господарі або інгібуючи ріст ракових клітин. Таким чином, лектини морських водоростей можуть стати новим джерелом противірусних та протипухлинних сполук для використання у медичній практиці.

N-ацетилнейрамінові кислоти – це група сполук, що знаходяться переважно на невідновлюваному кінці олігосахаридних ланцюгів на глікопротеїнах та гліколіпідах, відіграючи важливу роль у хімічному та біологічному різноманітті глікокон'югатів. Специфічна для типу клітин експресія глікозилтрансфераз, особливо сіалілтрансфераз (Van den Eijnden, Joziase, 1993), призводить до специфічних моделей сіалілювання олігосахаридів, які можна розглядати як ключові детермінанти у складі клітин. Вражаючи відмінності були виявлені в моделях сіалоглікозилювання у клітинах під час розвитку, активації, старіння та онкогенезу (Schauer et al., 1995). Специфічні лектини N-ацетилнейрамінової кислоти можуть застосовуватися як специфічні зонди для дослідження ролі вуглеводів клітинної поверхні під час розвитку, диференціації та злоякісної трансформації клітин, як це показано для інших типів рецепторів цукру. Ці лектини можуть бути використані як потужні засоби для очищення, характеристики, вивчення розподілу та локалізації багатьох біомолекул, що містять N-ацетилнейрамінову кислоту (Sharon, Lis, 1989; Zeng, Gabius, 1992).

В даній статті розглядається специфічність зв'язування N-ацетилнейрамінової кислоти та антибактеріальна активність нового лектину, виділеного з червоної водорості *Gracilaria canaliculata*. Встановлена можливість застосування лектину (ів) з морських водоростей.

Матеріали та методи

Матеріалом для роботи слугували таломи червоної водорості *Gracilaria canaliculata* (Sonder, 1871), зібрані в провінції Нінтуань (В'єтнам) у квітні 2018 р. Зразки були доставлені до лабораторії, де зберігалися при 20 °С. В роботі використовували попередньо упаковані колонки Sephacryl S-200 (1,6 × 60 см) та швидкоплинну іонообмінну хроматографічну колонку DEAE Sepharose (1,6 × 20 см) від GE Healthcare (Швеція). Кров тварин отримували з Інституту вакцин (Натранг, В'єтнам). Моносахариди (D-ксилоза, D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза, N-ацетил-D-глюкозамін, N-ацетил-D-маннозамін, N-ацетил-D-галактозамін) та глікопротеїди (трансферин, фетуїн, свинячий тиреоглобулін та муцин свинячого шлунку, тип III) придбані у Sigma Chemical Co. Маннан дріжджів, N-ацетил-нейрамінова кислота отримані від Nakarai Chemical Co.

Екстракція та очищення лектину. Зразки водоростей подрібнювали до порошкоподібного стану, екстрагували 4-кратним об'ємом 20% холодного етанолу і витримували при 4 °С протягом 18 год при періодичному перемішуванні. Суміш центрифугували при 6000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Супернатант збирали та досліджували на гемаглютинаційну активність. До супернатанту додавали абсолютний холодний етанол (-20 °С) для досягнення кінцевої концентрації 83%, суміш витримували при 4 °С протягом ночі. Осад збирали центрифугуванням при 6000 об./хв. протягом 20 хв при 4 °С. Гранулу тричі промивали холодним абсолютним етанолом (-20 °С), центрифугували при 6000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С і ретельно діалізували проти 20 мМ карбонатного буфера (рН 9,0). Недіалізуючу фракцію наносили на швидкоплинну іонообмінну хроматографічну колонку DEAE Sepharose (1,6 × 20 см), збалансовану вищезазначеним буфером. Незв'язані білки та пігменти елюювали буфером зі швидкістю потоку 10,0 мл · хв⁻¹ доти, поки стоки колонки не показали поглинання менше 0,002 при 280 нм, лектин елюювали 0,5 М NaCl у 20 мМ карбонатному буфері, рН 9,0; активні фракції об'єднували, концентрували ультрафільтрацією і діалізували проти 50 мМ фосфатного буфера, що містив 150 мМ NaCl (рН 7,0). Концентрат піддавали гель-фільтрації на колонці Sephacryl S-200 (1,6 × 60 см), збалансованій 50 мМ фосфатним буфером, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,0). Колонку елюювали тим же буфером зі швидкістю потоку 0,8 мл · хв⁻¹ і збирали активні фракції. Елюат контролювали при 280 нм на предмет поглинання білка та активності гемаглютинації за допомогою еритроцитів кроликів, оброблених трипсином. Активні фракції об'єднували і піддавали подальшому аналізу.

Приготування 2%-ї суспензії нативних або оброблених ферментами еритроцитів. Кожен зразок крові промивали 3-5 разів 50 об'ємами 150 мМ NaCl. Після промивання готували 2%-ну суспензію еритроцитів (об./об.) у

20 мМ фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,2), і використовували як природні еритроцити. Оброблені трипсином або папаїном еритроцити готували наступним чином. Одну десяту об'єму 0,5% (мас./об.) розчину трипсину або папаїну додавали до 2%-ої суспензії еритроцитів, потім суміш інкубували при 37 °С протягом 60 хв. Після інкубації еритроцити промивали 3–5 разів сольовим розчином і готували 2%-ну суспензію (об/об) оброблених трипсином або папаїном еритроцитів, як зазначено вище (Hogi et al., 1986).

Аналіз гемаглютинації проводили методом мікротитрування на 96-лунковій V-пластині мікротитру (Hogi et al., 1986). Спочатку готували 25 мкл кількості послідовних двократних розведень досліджуваного розчину в 20 мМ фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,2), на мікропланшетному V-планшеті. У кожну лунку додавали 25 мкл 2%-ої суспензії еритроцитів, суміш обережно струшували та інкубували при кімнатній температурі протягом 2 год. Позитивний результат свідчив про утворення рівномірного шару коагулянту над поверхнею лунки. З іншого боку, на негативний результат випробування вказувало утворення дискретної «кнопки» на дні лунки. Активність гемаглютинації виражалася як титр, зворотній найвищому дворазовому розведенню, при якому спостерігали позитивну гемаглютинацію.

Тест на інгібування гемаглютинації проводили за допомогою 2%-ої (об./об.) суспензії оброблених трипсином еритроцитів кроликів (Hogi et al., 1986). Всі досліджувані інгібітори розчиняли у 150 мМ NaCl при початковій його концентрації 100 мМ для моносахаридів та 2000 мкг/мл для глікопротеїдів. Спочатку готували розчин об'ємом 25 мкл послідовно дворазовим розведенням цукру або глікопротеїну в 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,2). У кожну лунку додавали рівний об'єм розчину лектину (4 дози аглютинації), приготованого в 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,2), планшет обережно перемішували, витримували при кімнатній температурі протягом 1 год. Нарешті, 25 мкл 2%-ї суспензії оброблених трипсином еритроцитів кроликів додавали до кожної лунки, планшет обережно струшували та інкубували додатково 1 год. Інгібування спостерігали макроскопічно, а інгібуючу активність виражали як найнижчу концентрацію цукру або глікопротеїну, при якій було досягнуто повне інгібування гемаглютинації.

Вплив температури, рН та іонів металів на активність гемаглютинації. Для вивчення впливу температури на активність гемаглютинації кожен розчин лектину нагрівали за різних температур (30–100 °С) протягом 30 хв, потім негайно охолоджували на льоду. Для вивчення впливу рН на активність гемаглютинації кожний розчин лектину діалізували при 4 °С протягом ночі на 100 мл буферів

концентрацією 50 мМ при рН 3–10, а потім діалізували на 150 мМ розчину NaCl. Були використані наступні буфери: ацетатний буфер для рН 3–5, фосфатний буфер для рН 6–7, і *трис*-HCl буфер для рН 8–10. Для вивчення впливу двовалентних катіонів на активність гемаглютинації розчин лектину діалізували при 4 °С протягом ночі на 100 мл EDTA концентрацією 50 мМ з подальшим діалізом на 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,5). Активність гемаглютинації визначали за відсутності або присутності CaCl₂. Активність гемаглютинації визначали за допомогою оброблених трипсином еритроцитів кроликів (Hori et al., 1986).

Вміст білка визначали за методом Lowry et al. (1951), використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт. Поглинання при 280 нм також використовували для оцінки вмісту білка в хроматографії.

Молекулярну масу очищеного лектину визначали за допомогою електрофорезу додецилсульфатом натрію в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Зразки для SDS-PAGE денатурували при 100 °С протягом 5 хв з 2%-ним 2-меркаптоетанолом або без нього, потім електрофорували з використанням 10%-го гелю (Laemmli, 1970). Після електрофорезу гель фарбували Coomassie Brilliant Blue R-250 для білків.

Антибактеріальна активність. Її визначали за допомогою процедури розведення розчину лектину за методом Charungchitrak et al. (2011). Дію лектину випробовували на трьох видах патогенних бактерій морських креветок (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* та *V. Parahaemolyticus*) і трьох видах патогенних бактерій людини (*E. cloacae*, *E. coli* та *S. Aureus*). Бактерії вирощували на стерилізованому середовищі, що містить поживний бульйон і дріжджовий солодовий відвар, та інкубували протягом ночі в шейкері при 37 °С. Концентрацію бактерій у клітинах визначали шляхом вимірювання каламутності суспензії при 600 нм і перетворювали на колонієутворюючі одиниці (10⁵–10⁶ КУО/мл) за допомогою калібрувальної кривої. GCL (скорочення від *G. canaliculata* lectin) готували в різних дозах у фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (PBS). До кожного розведення додавали суспензію бактерій (OD₆₀₀ = 0,47) у середовищі, суміші обережно струшували та інкубували при 37 °С протягом 24 год. Після інкубації каламутність реакційних розчинів вимірювали при 600 нм як індекс росту бактерій. Фосфатний буферний розчин замість GCL як негативний контроль досліджували за схемою, описаною вище. Інгібуючу активність GCL щодо бактерій також визначали у присутності N-ацетилнейрамінової кислоти. GCL (200 мкг/мл) попередньо обробляли N-ацетилнейраміновою кислотою (100 мМ) протягом 2 год, суміш досліджували так, як описано вище. Експерименти проводились у трьох повторностях.

Статистичний аналіз. Усі результати були підтверджені трьома незалежними експериментами. Статистика представлена як середнє значення \pm SEM. Статистичну значимість аналізували за допомогою односторонньої ANOVA з подальшим пост-хок-тестом Тукі. Відмінності вважали суттєвими, коли $P < 0,05$. Значення IC50 розраховані за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism, версія 5.00.

Результати та обговорення

Екстракція та очищення лектину. Сирий екстракт *G. canaliculata* сильно аглютинував еритроцити кроликів, овець та курей, оброблені трипсином та папаїном (табл. 1). Ці результати узгоджуються з іншими даними переважно щодо еритроцитів тварин про їх аглютинацію екстрактами лектину морських водоростей (Hori et al., 1990; Freitas et al., 1997; Hung et al., 2009, 2012). З етанолового екстракту, після 83%-го випадання холодного етанолу та діалізу, осад давав один активний пік в іонообмінній хроматографії на швидкоплинній колонці DEAE Sepharose (рис. 1, *a*).

Таблиця 1. Активність гемаглютинації сирого екстракту з *Gracilaria canaliculata*

Титр гемаглютинації з еритроцитами								
кролика			вівці			курки		
N ^a	T ^b	P ^c	N	T	P	N	T	P
d	128	1024	-	512	512	-	128	128

N^a – нативні еритроцити; T^b – оброблені трипсином еритроцити; P^c – оброблені папаїном еритроцити; “d” – відсутність гемаглютинації.

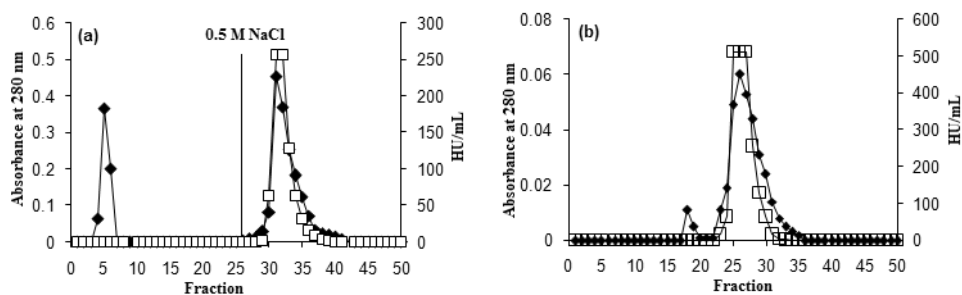


Рис. 1: *a* – іонообмінна хроматографія фракції осаду, отриманого з неочищеного екстракту *Gracilaria canaliculata* на швидкоплинній колонці DEAE Sepharose; *b* – гелева хроматографія на колонці Sephacryl S-200 активного піку, отриманого за допомогою іонообмінної хроматографії. Фракції збирали та вимірювали при поглинанні 280 нм (—◆—) щодо білка та активності гемаглютинації (—□—) з обробленими трипсином еритроцитами кролика. HU – одиниця гемаглютинації

Активний пік далі розділяли на два піки в гель-хроматографії на колонці Sephacryl S-200. Перший пік (I) не виявляв активності гемаглютинації, тоді як другий пік (II) виявляв сильну активність (рис. 1, б). Таким чином, очищений лектин позначався як GCL. Результати очищення наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Результати очищення лектину з *Gracilaria canaliculata*

Етап екстракції та очищення	Загальний білок, мг	Загальна активність*, HU	Питома активність, HU мг ⁻¹	Вихід, %
Екстракція	156,9	58880	375,3	100
Осадження етанолом	23,0	46080	2003,4	78,3
Іонний обмін	8,6	17536	2039,0	29,8
Гелева фільтрація	7,0	14336	2048,0	24,3

* Загальна активність виражається як титр, помножений на об'єм.

Визначення молекулярної маси. Молекулярна маса GCL становила 22000 Da як у відновлюваних, так і невідновлюваних SDS-PAGE умовах (рис. 2), що вказує на те, що GCL є мономерним білком. Подібні результати приведені щодо лектинів, які продукують представники роду *Gracilaria* Greville, таких як Granin-BP із *G. bursa pastoris* (Okamoto et al., 1990), GCL із *G. cornea* (Lima et al., 2005) та GOL із *G. ornata* (Leite et al., 2005), всі вони були мономерними білками.

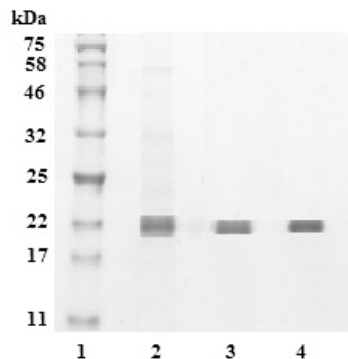


Рис. 2. SDS-PAGE електрофорез GCL, виділеного із червоної водорості *Gracilaria canaliculata*. SDS-PAGE проводили з використанням 10%-го поліакриламідного гелю. Білкові смужки фарбували реагентом Coomassie Brilliant blue R-250. Доріжка 1, суміш еталонних білків; доріжка 2, активні фракції, отримані в результаті іонообмінної хроматографії; доріжка 3, активні фракції, отримані в результаті гель-фільтрації в невідновлюваному стані; доріжка 4, активні фракції, отримані при гель-фільтрації у відновлювальному стані β-меркаптоетанолом

Вплив температури, рН та іонів металів на активність гемаглютинації. Активність гемаглютинації GCL була стабільною при нагріванні протягом 30 хв при 60 °С, коли зберігалася 100% його гемаглютинаційної активності; якщо температура інкубації перевищувала 60 °С, ця активність поступово знижувалася. Активність гемаглютинації GCL була стабільною в широкому діапазоні рН 3–10 і на неї не впливала ні присутність ЕДТА, ні додавання двовалентних катіонів, що вказує на те, що лектин не потребує металу для біологічної активності. Повідомлялося про термостабільну та незалежну від металів діяльність гемаглютинації для багатьох лектинів з морських водоростей (Hori et al., 1990; Freitas et al., 1997; Hung et al., 2009, 2012, 2015).

Тест на інгібування гемаглютинації. Активність гемаглютинації GCL не пригнічувалась моносахаридами (D-глюкозою, D-маннозою, D-галактозою, D-ксилозою, N-ацети-D-маннозаміном) та глікопротеїнами – трансферином, фетуїном та дріжджовими маннанами (табл. 3), але сильно інгібувалася N-ацетилнейраміновою кислотою, N-ацетил-D-галактозаміном та N-ацетил-D-глюкозаміном, що містять ацетамідогрупи при екваторіальному C2-положенні цих цукрів. При цьому активність гемаглютинації не пригнічувалась N-ацетил-D-маннозаміном, що має ацетамідо-групу при осьовому положенні C2 залишку цукру (рис. 3).

Стосовно глікопротеїнів слід зазначити, що активність гемаглютинації GCL не пригнічувалась трансферином, що містить лише складні N-глікани, та фетуїном, що містить як N-глікани складного типу, так і O-глікани. Дріжджовий маннан, що містить N-глікани з високим вмістом манози з (α 1–6)-зв'язком у своїй основі та (α 1–3)-зв'язком у бічних ланцюгах, не виявляв жодної інгібуючої активності навіть при концентрації 2 мг/мл, що вказує на те, що GCL не міг розпізнати (α 1–6) та (α 1–3)-пов'язані залишки манози у структурах маннану дріжджів. Свинячий тиреоглобулін інгібував активність гемаглютинації GCL (рис. 3). Цей глікопротеїн містить олігосахариди двох типів – високоманозного (одиниця А-типу; Tsuji et al., 1981) і складного (одиниця В-типу; Yamamoto et al., 1981). Серед одиниць типу В основні N-глікани містять щонайменше 9 різних структур, що складаються з моно- та дисіальованих (α 1–6)-фукозильованих дво-, трикутних структур, що закінчуються або (α 2–3), або (α 2–6)-пов'язаними залишками N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc), тому GCL може розпізнавати розірвані або (α 2–3), або (α 2–6)-зв'язані залишки N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc) у структурах свинячого тиреоглобуліну.

Найсильнішим інгібітором гемаглютинуючої активності GCL виявився муцин свинячого шлунку, що містить O-глікани. Структурна мінливість O-зв'язаних гліканів базується на залишку ядра GalNAc α 1-, який може бути додатково заміщений (α 2–6) кінцевими залишками N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc) (див. рис. 3) (Wopereis et al.,

Таблиця 3. Тест на інгібування гемаглютинації лектину з *Gracilaria canaliculata* (GCL)

Речовина	МІК*
Цукри, мМ	
D-галактоза	–
N-ацетил-D-галактозамін	12,5
D-глюкоза	–
N-ацетил-D-глюкозамін	25,0
D-манноза	–
N-ацетил-D-маннозамін	–
N-ацетилнейрамінова кислота	6,25
D-ксилоза	–
Глікопротеїни, мкг/мл	
Трансферин	–
Фетуїн	–
Маннан дріжджів	–
Свинячий тиреоглобулін	15,6
Муцин свинячого шлунку	0,49

*МІК – мінімальна інгібуюча концентрація; «–» – відсутність інгібування при 100 мМ для моносахаридів та 2000 мкг/мл для глікопротеїдів.

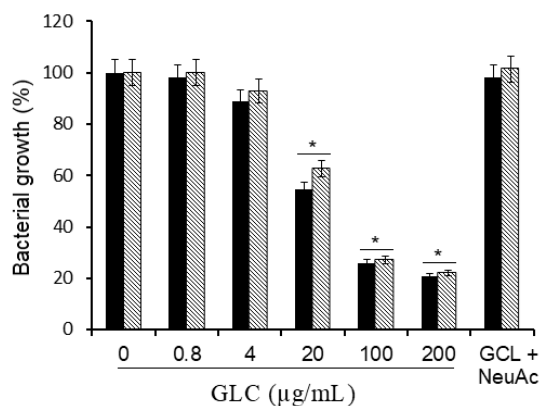


Рис. 4. Вплив GCL на розмноження бактерій. Бактерії обробляли різними дозами GCL. GCL + N-ацетилнейрамінова кислота (NeuAc) – бактерії обробляли сумішшю GCL та NeuAc. Зростання бактерій (%) вимірювали при 600 нм. Золотистий стафілокок (■) та *Vibrio alginolyticus* (▨). Середнє значення ± SEM ($n = 3$). * $P < 0,05$ для бактерій, оброблених GCL, порівнювали з контролем при 0 мкг/мл GCL

GCL виявляв антибактеріальну дію в залежності від дози зі значеннями IC50 *S. aureus* ($66,4 \pm 3,2$ мкг/мл) та *V. alginolyticus* ($72,7 \pm 3,4$ мкг/мл). Активність пригнічення росту GCL щодо *S. aureus* та *V. alginolyticus* була втрачена у присутності N-ацетилнейрамінової кислоти, яка була найсильнішим інгібітором гемаглютинації з GCL. Результати свідчать про те, що *S. aureus* та *V. alginolyticus* мають O-гліканову структуру (структури) типу NeuAc/GalNAc на клітинній поверхні, яка може відповідати як рецептор(и) для GCL. Повідомлялося про видоспецифічну антибактеріальну активність для лектинів червоних водоростей *Eucheuma serra*, *Galaxaura marginata* (Liao et al., 2003), *Eucheuma denticulatum* (Hung et al., 2015), *Gracilaria fisheri* (Boonsri et al., 2017) та *Meristiella echinocarpa* (Chaves et al., 2018b). Інформація щодо водоростевих лектинів допоможе з'ясувати механізм зараження морських патогенів і захистити риб та молюсків від зараження.

Лектини, специфічні для N-ацетилнейрамінової кислоти, знайдені у вірусів (віруси грипу, параміксовіруси та коронавіруси) (Schultze et al., 1991; Suzuki, 2005), бактерій (*Escherichia coli* та *Helicobacter pylori*) (Hanisch et al., 1993; Unemo et al., 2005), безхребетних і хребетних тварин (Iwanaga, Lee, 2005), рослин (Mandal, Mandal, 1990) та різних джерел організму (Lehmann et al., 2006). Однак біологічна роль специфічних лектинів N-ацетилнейрамінової кислоти все ще залишається невідомою, тому необхідні детальні дослідження для аналізу взаємодії лектинів, що зв'язують N-ацетилнейрамінову кислоту, з їх контррецепторами, а також для з'ясування отриманих сигналів, що контролюють їхню функцію.

Висновки

Лектин *Gracilaria canaliculata* пригнічує ріст патогенних бактерій людини та морських організмів, *Staphylococcus aureus* та *Vibrio alginolyticus* залежно від дози. Одержано нові відомості стосовно властивостей лектину *G. canaliculata*, включаючи молекулярну масу, мономерну форму, профіль інгібування гемаглютинації та стабільність у широкому діапазоні рН та температури. GCL специфічний для N-ацетилнейрамінової кислоти, отже ймовірно, він може мати також інші корисні властивості. Це дослідження свідчить про те, що дана водорість може бути не тільки потенційно корисною як аналітичний інструмент при вивченні біологічних функцій сіалоглікокон'югатів, але й стати об'єктом дослідження для пошуку нових лікарських засобів.

Це дослідження було підтримане В'єтнамським національним фондом розвитку науки і техніки (NAFOSTED), грант № 106-YS.06-2015.16

Список літератури

- Barre A., Simplicien M., Benoist H., Van Damme ElsJM., Rougé P. 2019. Mannose-specific lectins from marine algae: Diverse structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. *Mar. Drugs*. 17(8): 440. <https://doi.org/10.3390/md17080440>
- Barre A., Van Damme ElsJM., Simplicien M., Benoist H., Rougé P. 2020. Man-Specific, GalNAc/T/Tn-Specific and Neu5Ac-Specific Seaweed Lectins as Glycan Probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronavirus. *Mar. Drugs*. 18(11): 1–543. <https://doi.org/10.3390/md18110543>
- Boonsri N., Rudtanatip T., Withyachumnarnkul B., Wongprasert K. 2017. Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *J. Appl. Phycol.* 29(3): 1597–1608.
- Charungchittrak S., Petsom A., Sangvanich P., Karnchanatat A. 2011. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chem.* 126(3): 1025–1032.
- Chaves R.P., da Silva S.R., Neto L.G.N., Carneiro R.F., da Silva A.L.C., Sampaio A.H. 2018a. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 107: 1320–1329.
- Chaves R.N., da Silva S.R., da Silva J.P.F.A., Carneiro R.F., de Sousa B.L., Abreu J.O., Carvalho F.C.T., Rocha C.R.C., Farias W.R.L., de Sousa O.V., Silva A.L.C., Sampaio A.H., Nagano C.S. 2018b. *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family. *J. Appl. Phycol.* 30: 2629–2638. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1473-7>
- Freitas A.L.P., Teixeira D.I.A., Costa F.H.F., Farias W.R.L., Lobato A.S.C., Sampaio A.H. 1997. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. *J. Appl. Phycol.* 9: 495–501.
- Hanisch F.G., Hacker J., Schrotten H. 1993. Specificity of S fimbriae on recombinant *Escherichia coli*: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2-3)Gal and NeuAc alpha (2-8)NeuAc. *Infect. Immun.* 61(5): 2108–2115.
- Hirayama M., Shibata H., Imamura K., Sakaguchi T., Hori K. 2016. High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high-affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. *Mar. Biotechnol.* 18(1): 144–160
- Hori K., Miyazawa K., Fusetani N., Hashimoto K., Ito K. 1986. Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 873: 228–236.
- Hori K., Miyazawa K., Ito K. 1990. Some common properties of lectins from marine algae. *Hydrobiologia.* 204/205: 561–566.
- Hung L.D., Trinh P.T.H. 2020. Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. *J. Nat. Med.* 75(1): 223–231. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01455-0>
- Hung L.D., Hori K., Nang H.Q. 2009. Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *J. Appl. Phycol.* 21: 89–97.

- Hung L.D., Ly B.M., Trang V.T.D., Ngoc N.T.D., Hoa L.T., Trinh P.T.H. 2012. A new screening for hemagglutinins from Vietnamese marine macroalgae. *J. Appl. Phycol.* 24: 227–235.
- Hung L.D., Hirayama M., Ly B.M., Hori K. 2015. Purification, primary structure, and biological activity of high-mannose N-glycan-specific lectin from the cultivated. *Eucheuma denticulatum*. *J. Appl. Phycol.* 27: 1657–1669.
- Iwanaga S., Lee B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 128–150.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–685.
- Leite Y.F.M.M., Silva L.M.C.M., Amorim R.C.N., Freire E.A., Jorge D.M.M., Grangeiro T.B. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta.* 1724(1–2): 137–145.
- Lehmann F., Tiralongo E., Tiralongo J. 2006. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1331–1354.
- Liao W.R., Lin J.Y., Shieh W.Y., Jeng W.L., Huang R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 433–439.
- Lima M.E.P., Carneiro M.E., Nascimento A.E., Grangeiro T.B., Holanda M.L., Amorim R.C.N. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Agric. Food Chem.* 53: 6414–6419.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Mandal C., Mandal C. 1990. Sialic acid binding lectins. *Experientia.* 46: 433–441.
- Mu J., Hirayama M., Sato Y., Morimoto K., Hori K. 2017. A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renschii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. *Mar. Drugs.* 15(8): 255. <https://doi.org/10.3390/md15080255>
- Okamoto R., Hori K., Miyazawa K., Ito K. 1990. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. *Experientia.* 46(9): 975–977.
- O’Keefe B.R., Giomarelli B., Barnard D.L., Shenoy S.R., Chan P.K.S., McMahon J.B. 2010. Broad-spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein Griffithsin against emerging viruses of the family *Coronaviridae*. *J. Virol.* 84(5): 2511–2521.
- Sato Y., Morimoto K., Hirayama M., Hori K. 2011a. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 405(2): 291–296.
- Sato Y., Hirayama M., Morimoto K., Yamamoto N., Okuyama S., Hori K. 2011b. High mannose-binding lectin with preference for the cluster of α 1–2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. *J. Biol. Chem.* 286(22): 19446–19458.
- Sato Y., Morimoto K., Kubo T., Sakaguchi T., Nishizono A., Hirayama M., Hori K. 2015. Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. *Mar. Drugs.* 13(6): 3454–3465.

- Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., Shaw L. 1995. In: *Biology of the Sialic Acids*. Boston, MA: Springer. Pp. 7–67.
- Schultze B., Gross H.J., Brossmer R., Herrler G. 1991. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* 65(11): 6232–6237.
- Sharon N., Lis L. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 246(4927): 227–234.
- Sharon N., Lis H. 2003. In: *Lectins*. 2nd ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 450 p.
- Sohrab S.S., Suhail M., Kamal M.A., Ahmad F., Azhar E.I. 2020. The emergence of human pathogenic Coronaviruses: Lectins as antivirals for SARS-CoV-2. *Curr. Pharm. Des.* 26(41): 5286–5292. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200821120409>
- Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza: Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3): 399–408.
- Tsuji T., Yamamoto K., Irimura T., Osawa T. 1981. Structure of carbohydrate unit A of porcine thyroglobulin. *J. Biochem.* 195(3): 691–699.
- Unemo M., Aspholm-Hurtig M., Ilver D., Bergstrom J., Boren T., Danielsson D., Susann T. 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J. Biol Chem.* 280(15): 15390–15397.
- Van den Eijnden D.H., Joziassse D.H. 1993. Enzymes associated with glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 711–721.
- Wopereis S., Lefeber D.J., Morava E., Wevers R.A. 2006. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A Review. *Clin. Chem.* 52(4): 574–600.
- Yamamoto K., Tsuji T., Irimura T., Osawa T. 1981. The structure of carbohydrate unit B of porcine thyroglobulin. *J. Biochem.* 195(3): 701–713.
- Zeng F.Y., Gabius H.J. 1992. Sialic Acid-Binding Proteins: Characterization, Biological Function and Application. *Z. Naturforsch. C.* 47(9–10): 641–653.

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Le Dinh Hung, Vo Thi Dieu Trang. 2021. **N-acetylneuraminic acid specific lectin and antibacterial activity from the red alga *Gracilaria canaliculata* Sonder.** *Algologia.* 31(2): 126–140

Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
2, HungVuong Street, Nhatrang City, Vietnam

A new lectin from the marine red alga *Gracilaria canaliculata* (GCL) was isolated by a combination of aqueous ethanol extraction, ethanol precipitation, ion exchange and filtration chromatography. Lectin gave a single band with molecular mass of 22,000 Da in both non-reducing and reducing SDS-PAGE conditions, indicating that GCL is a monomeric protein. The

hemagglutination activities of GCL were stable over a wide range of pH from 3 to 10, temperature up to 60 °C and not affected by either the presence of EDTA or addition of divalent cations. Lectin GCL had high affinity for N-acetylneuraminic acid through interacting with the acetamido group at equatorial C2 position of these sugar residues, suggesting that GCL is specific for N-acetylneuraminic acid. Furthermore, GCL inhibited the growth of human and shrimp pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio alginolyticus*, although it did not affect the growth of *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi*. The red alga *G. canaliculata* may promise to be a source of valuable lectins for application as antibacterial agents.

Key words: antibacterial activity, carbohydrate binding specificity, *Gracilaria canaliculata*, lectin, red alga