



Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов

Котенева Е.А.[✉], Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 355035, Ставрополь, Россия

Введение. Исследование белкового состава возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* позволяет выявлять как общие видовые характеристики, так и индивидуальные особенности штаммов, различающихся по фенотипическим свойствам, проявляющимся в основном в вегетативной форме и имеющим важное значение для вирулентности, иммуногенности и способности адаптироваться к разным условиям вегетирования.

Цель работы — на группе штаммов *B. anthracis*, имеющих разный плазмидный состав и вирулентность, апробировать разные способы экстракции тотального протеома из вегетативных клеток бацилл.

Результаты. Показано, что скорость спорообразования значительно варьирует между отдельными штаммами *B. anthracis* и может оказать существенное влияние на эффективность экстракции и состав белкового комплекса. Предварительная обработка лизоцимом, влияющим на клеточную оболочку, способствует более полному лизису клеток, а ультрамикрочентрифужная фильтрация обеспечивает полную специфическую стерильность полученных образцов.

Заключение. Разработана схема подготовки культур *B. anthracis*, позволяющая получать культуру в вегетативной фазе жизненного цикла и эффективно экстрагировать белки в сочетании с надежным обеззараживанием образцов.

Ключевые слова: протеом; сибирская язва; *Bacillus anthracis*; спорообразование; MALDI-TOF/TOF MS; 2D-гель-электрофорез; вегетативная форма; методы экстракции белков.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Калинин А.В., Родионов И.С., Абрамович А.В., Щербакова В.Ю. Особенности получения белкового комплекса вегетативных культур *Bacillus anthracis* для протеомного картирования штаммов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(4): 331–338.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-.5>

Поступила 20.03.2020
Принята в печать 27.06.2020

Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains

Elena A. Koteneva[✉], Olga I. Tsygankova, Aleksander V. Kalinin, Ivan S. Rodionov, Alena V. Abramovich, Victoriya Yu. Shcherbakova

Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia

Introduction. The study of the protein composition of the causative agent of anthrax — *Bacillus anthracis*, allows you to identify both general species and individual characteristics of strains that differ in phenotypic properties, manifested mainly in the vegetative form and which are important for virulence, immunogenicity and the ability to adapt to different vegetation conditions.

Purpose of the work. In the group of anthrax microbe strains having different plasmid composition and virulence, different methods of extraction of the total proteome from vegetative bacillus cells have been tested.

Results. In the course of the work, it was shown that the rate of spore formation varies significantly between individual strains of the anthrax microbe and can have a significant impact on the efficiency of extraction and the composition of the protein complex. Preliminary treatment with lysozyme, which affects the cell membrane,

promotes a more complete lysis of cells, and ultramicrocentrifuge filtration provides complete specific sterility of the obtained samples.

Conclusion. A culture preparation scheme was developed for *B. anthracis*, which allows one to obtain a culture in the vegetative phase of the life cycle and to efficiently extract proteins in combination with reliable disinfection of samples.

Keywords: *proteome; anthrax; Bacillus anthracis; spore formation; MALDI-TOF/TOF MS; 2D-gel electrophoresis; vegetative form; protein extraction methods.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Kalinin A.V., Rodionov I.S., Abramovich A.V., Shcherbakova V.Yu. [Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains]. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(4): 331–338. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-5>

Received 20 March 2020

Accepted 27 June 2020

Введение

Изучение протеома патогенных микроорганизмов является актуальной задачей, т.к. позволяет не только выявить основные и вспомогательные факторы вирулентности, но и объективно оценить их продукцию в конкретных условиях культивирования в лабораторных условиях или при естественной циркуляции в организме животных и человека и во внешней среде. Исследование белкового состава возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* позволяет определить как общие видовые характеристики, так и индивидуальные особенности штаммов, различающихся по фенотипическим свойствам, проявляющимся в основном в вегетативной форме и имеющим важное значение для вирулентности, иммуногенности и способности адаптироваться к разным условиям вегетирования.

Для объективной оценки особенностей протеомов штаммов *B. anthracis* необходимо, чтобы источником выделения белкового комплекса являлась чистая культура с однородной по основным фенотипическим признакам популяцией. Не менее важным условием качественной пробоподготовки является нахождение культуры в одной морфофункциональной фазе, т.к. при работе с возбудителем сибирской язвы формирование спор влечет изменение белкового состава культур, что может приводить к некорректным результатам сравнительного анализа белковых комплексов штаммов, различающихся по скорости спорообразования. Так, около половины проб вегетативных культур представителей группы *Bacillus cereus* при исследовании масс-спектрометрическим методом имеют пики, характерные для спектров споровых форм [1, 2]. Непосредственно метод лизиса культуры должен быть эффективным по отношению к культурам, имеющим особенности состава и строения поверхностных клеточных структур, для наиболее полного извлечения белков и предусматривать их защиту от деградации, в том числе под действием собственных протеаз.

Полученный на конечном этапе материал должен включать весь спектр белков, присущих микроорганизму в конкретных условиях, в концентрации, достаточной для проведения протеомных исследований, и не содержать жизнеспособных клеток микроорганизмов.

Цель работы — разработка алгоритма получения и эффективной экстракции белкового комплекса вегетативных культур *B. anthracis*, отвечающего требованиям режима работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ, 228/8, Sterne 34F2, 55, СТИ-ПР, 71/12, Ихтиман, вирулентные штаммы 140 П, 228, 1265, 1(СО) и 81/1, а также их культуральные варианты ΔСТИ, СТИ-П, ΔSterne 34F2, 228/8-П, 228/4, 1(СО)-5-1, 1(СО)-16, 1(СО)-23, 1(СО)-24, которые различались по генетическим характеристикам (все варианты плазмидного состава, различные MLVA- и SNP-генотипы) и по фенотипическим признакам: культурально-морфологическим свойствам, токсинопродукции, ферментативной активности, условиям формирования капсулы, вирулентности, чувствительности к специфическим сибиреязвенным бактериофагам.

В качестве питательных сред использовали LB-бульон и LB-агар (по Ленноксу), а при необходимости добавляли кровь (5%), сыворотку крови (10%), глицерин (4%).

Спорообразование контролировали визуально в мазках, окрашенных по Ребигеру, приготовленных из культур на различных этапах культивирования. Подсчитывали долю бациллярных клеток, содержащих формирующиеся споры, и отмечали наличие внеклеточно расположенных спор.

Процесс пробоподготовки включал предварительную обработку клеток лизоцимом, разрушающим клеточную стенку, в конечной концентрации

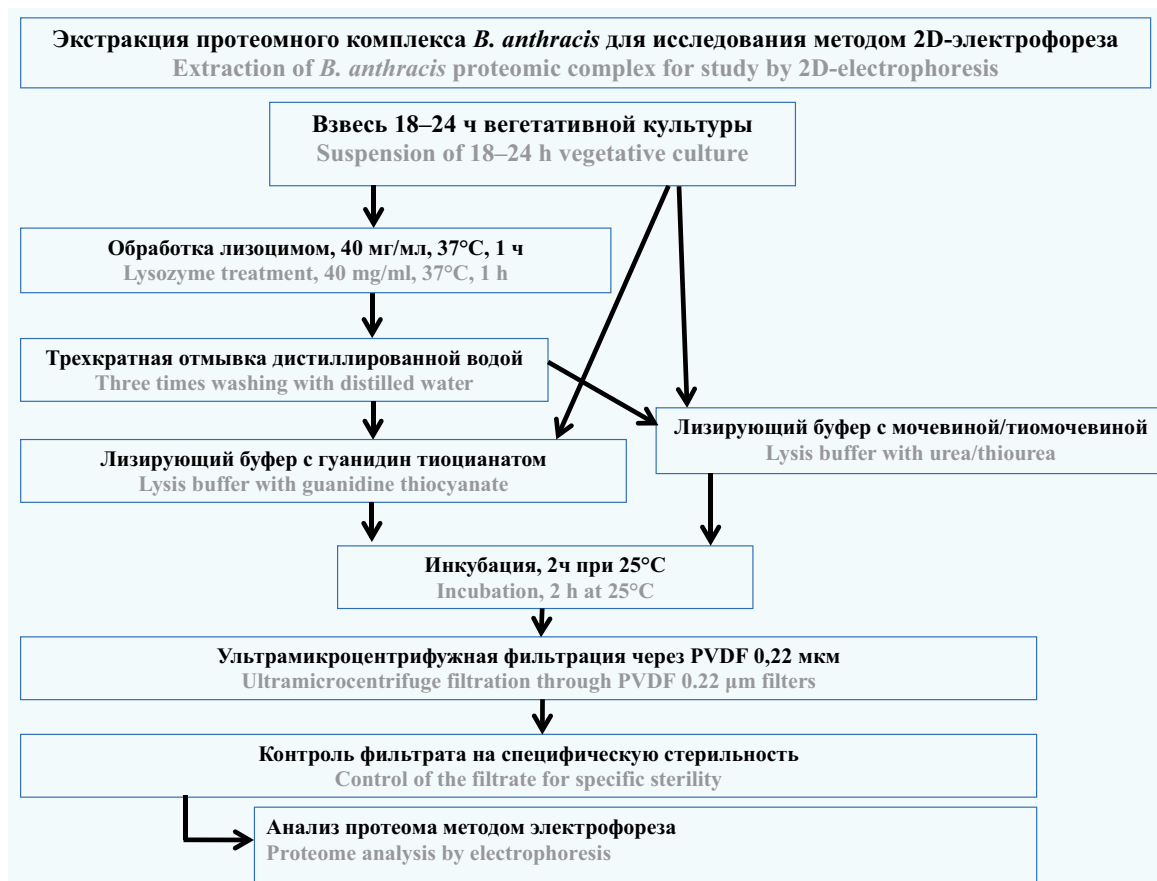


Рис. 1. Схема опыта по подбору оптимальных условий экстракции тотального протеома штаммов *B. anthracis*.

Fig. 1. An experimental design for selecting optimal extraction conditions for a total proteome of *B. anthracis* strains.

40 мг/мл с инкубацией 1 ч при 37°C. Далее образцы дважды отмывали в 40 мМ растворе основного Трис-буфера от лизоцима и клеточного дебриса. Экстракцию тотального протеома проводили параллельно для каждого образца в 2 лизирующих буферах: 8 М мочевины/2 М тиомочевина и 6 М гуанидина тиоцианат. Для предотвращения деградации экстрагируемых белков в лизирующий буфер вносили ингибиторы бактериальных протеаз в концентрации 1 мкг/мл. Обеззараживание проб проводили методом ультрамикрочентрифужной фильтрации лизата через фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм. Специфическую стерильность полученного материала подтверждали отрицательными результатами посева на LB-агар.

Характер воздействия лизирующих буферов оценивали визуально по состоянию культуры в окрашенных мазках на различных этапах подготовки материала. Сравнительную оценку полноты экстракции белкового комплекса из бациллярных клеток осуществляли по количеству и интенсивности белковых полос, полученных при одномерном электрофоретическом разделении образцов на автоматической системе капиллярного электрофореза «Experion» («Bio-Rad») с использованием набора «Experion Pro260 Analysis Kit» («Bio-Rad») после

предварительной очистки образцов набором «Ready Prep 2-D Cleanup Kit» («Bio-Rad»).

Двумерный электрофорез проводили с использованием комплекта оборудования для протеомных исследований («Bio-Rad») и специализированного программного обеспечения «Quantity One 1-D analysis software» и «PDQuest 2-D analysis software». Концентрацию образцов перед проведением 1-го направления измеряли на флюориметре «Qubit» и параллельно методом Бредфорда. Изоэлектрофокусировку проводили с использованием стрипов «ReadyStrip IPG strips» pH 3–10, 7 см, загружая образцы из расчета 10–15 мкг белка на 300 мкл регидратационного буфера. Уравновешивание стрипов осуществляли в буфере с 6 М мочевиной в два этапа: с 2% дитиотреитолом и 2,5% йодацетамидом по 15 мин. Второе направление проводили в камере «Mini Protean» с охлаждением 10°C в 12% ПААГ в течение ~1,5 ч. Готовые гели окрашивали серебром с использованием набора «Silver Stain Plus».

За основу взяли методику, описанную в работах [3–6], с авторскими модификациями, включающими предварительную обработку культуры лизоцимом, а также различные варианты состава лизирующих буферов. Посев вегетативной культуры для дальнейшего исследования протеомными методами

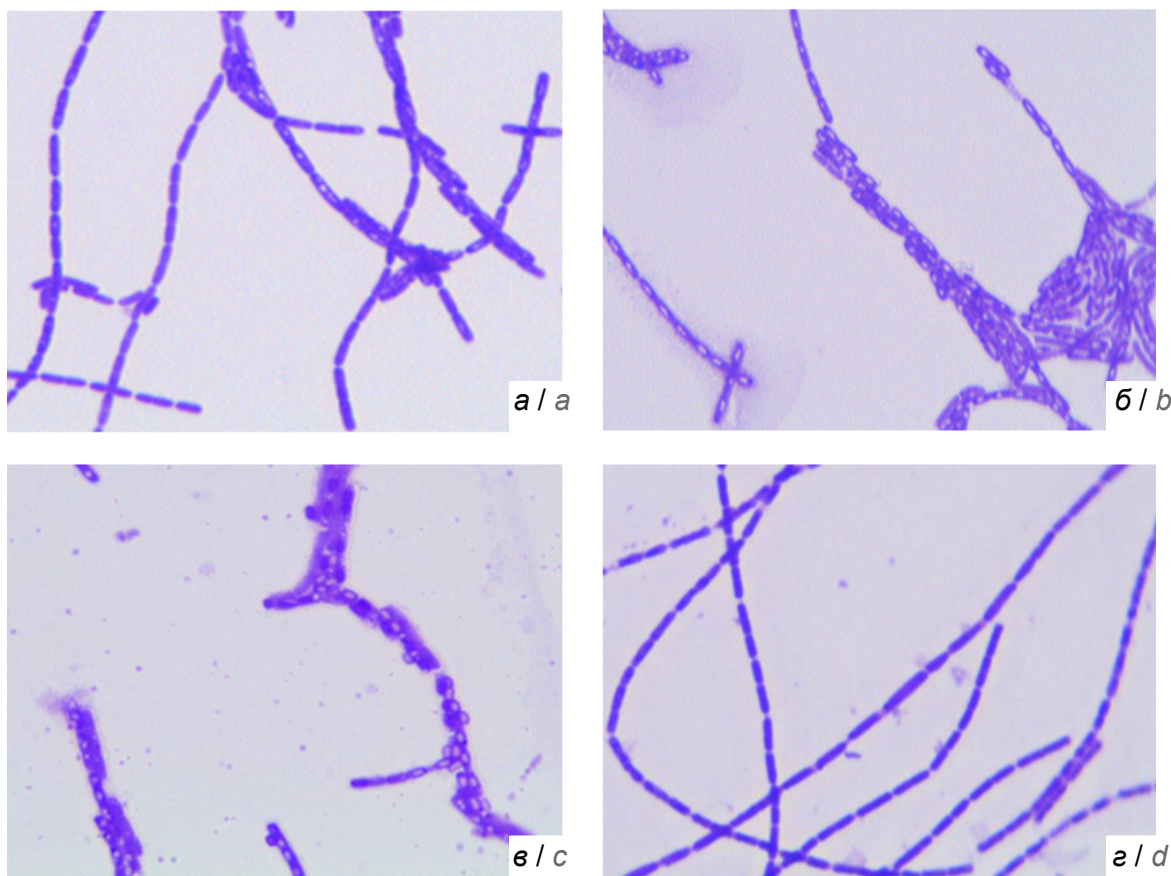


Рис. 2. Различия в спорообразовании на LB-агаре 20-часовых культур штаммов *B. anthracis* Δ Sterne (а), Sterne 34F2 (б) и Δ СТИ (в), а также 6-часовой культуры штамма Sterne (д).

Окраска методом Ребигера, ув. 500.

Fig. 2. Differences in spore formation on LB agar of 20-hour cultures of *B. anthracis* Δ Sterne strains (a), Sterne 34F2 (b) and Δ STI (c), as well as a 6-hour culture of Sterne strain (d).

Coloring with the Rebiger method, $\times 500$.

проводили в несколько этапов, чтобы минимизировать образование спор: первоначальный посев на LB-агар (20 ч) для отбора изолированных колоний и пересева в LB-бульон (18 ч) с последующим пересевом на LB-агар (18 ч). Схема опыта представлена на **рис. 1**.

Результаты

На мазках, приготовленных из культуры на последнем этапе, выявили значительные различия скорости спорообразования изученных культур. Так, у штаммов *B. anthracis* 55, СТИ, СТИ-II, СТИ-ПР, 228/8-II, 228/4, Δ Sterne, 140-II, 1265, 81/1, 228/8, Ихтиман, 71/12, 1(CO), 1(CO)-5-1 наблюдали 2–30% бактериальных клеток, содержащих споры на различных этапах формирования (**рис. 2, а**). В то же время у штаммов Sterne 34F2 и Δ СТИ достаточно сформированные споры наблюдались в 82–88% бактериальных клеток, а у штамма Δ СТИ они располагались свободно вне бацилл (**рис. 2, б, в**).

На следующем этапе работы попытались добиться отсутствия спор в культурах путем добавления в LB-агар добавок, тормозящих процесс спо-

рообразования — глицерина, дефибрированной крови и инактивированной сыворотки крови, а также путем изменения сроков инкубирования культур. Для этого были выбраны штаммы *B. anthracis* 55, Sterne 34F2, Δ СТИ с различной скоростью спорообразования. Использовали жидкую и плотные питательные среды на основе LB-бульона: LB-бульон, LB-агар, LB-агар с добавлением 5% дефибрированной крови, LB-агар с добавлением 4% глицерина. Споры засевали в LB-бульон и оставляли на 6 ч при 37°C, после чего культуру пересевали в новую порцию LB-бульона и помещали на 18 ч при 37°C. На следующий день 18-часовую бульонную культуру высевали пипеткой на плотные питательные среды и распределяли по всей поверхности шпателем, инкубировали 6 ч при 37°C. После этого из культуры готовили взвесь и оставляли при –20°C на ночь. На всех этапах пересевов и приготовления взвеси готовили мазки для контроля спорообразования. При таких сроках выращивания в окрашенных мазках ни у одного из штаммов на всех средах споры не обнаруживались (**рис. 2, г**). Учитывая, что культура предназначена для исследования особенно-

стей протеомного комплекса различных штаммов, а также возможность экстракции белков крови или сыворотки при смывании культуры с поверхности среды, которые в дальнейшем могут искажать картину белкового спектра культур, получаемую методом 2D-электрофореза, вероятно, предпочтительнее использовать на последнем этапе пересевов культур LB-агар без добавок.

При использовании метода 2D-электрофореза важным фактором эффективной подготовки материала является полнота извлечения белкового комплекса из бациллярных клеток. Для разрушения бактериальных клеток и экстракции внутриклеточного белкового комплекса использовали лизирующие буферы, содержащие хаотропные вещества (гуанидина тиоцианат, мочевины, тиомочевина), разрушающие мембранные структуры, поверхностно активные вещества, способствующие максимальному извлечению белков, восстановитель, способный восстанавливать структуру белковых молекул, нарушенную денатурирующим действием хаотроп-

ных веществ, и коктейль ингибиторов протеаз, предотвращающий деградацию белков под действием внутриклеточных протеаз. Далее в работе использовали взвеси 20-часовых культур авирулентных штаммов *B. anthracis* СТИ, 228/8, Sterne 34F2, 55, СТИ-ПР, 71/12, Ихтиман, вирулентных — 140 П, 228, 1265, 1(CO) и 81/1, а также их культуральных вариантов ΔСТИ, СТИ-П, ΔSterne 34F2, 228/8-П, 228/4, 1(CO)-5-1, 1(CO)-16, 1(CO)-23 и 1(CO)-24.

Культуры всех штаммов после обработки лизоцимом образовывали конгломераты слабоокрашенных бациллярных клеток в виде комочков, за исключением штаммов *B. anthracis* 1(CO)-23 и 1(CO)-24, которые сохраняли длинные цепочки. Результаты микроскопии мазков на различных этапах выявили некоторые особенности у отдельных штаммов. Исходная 20-часовая культура штамма *B. anthracis* ΔСТИ содержала уже вполне сформировавшиеся споры, в том числе расположенные внеклеточно, и практически полностью лизировалась при всех вариантах обработки лизирующими буферами в

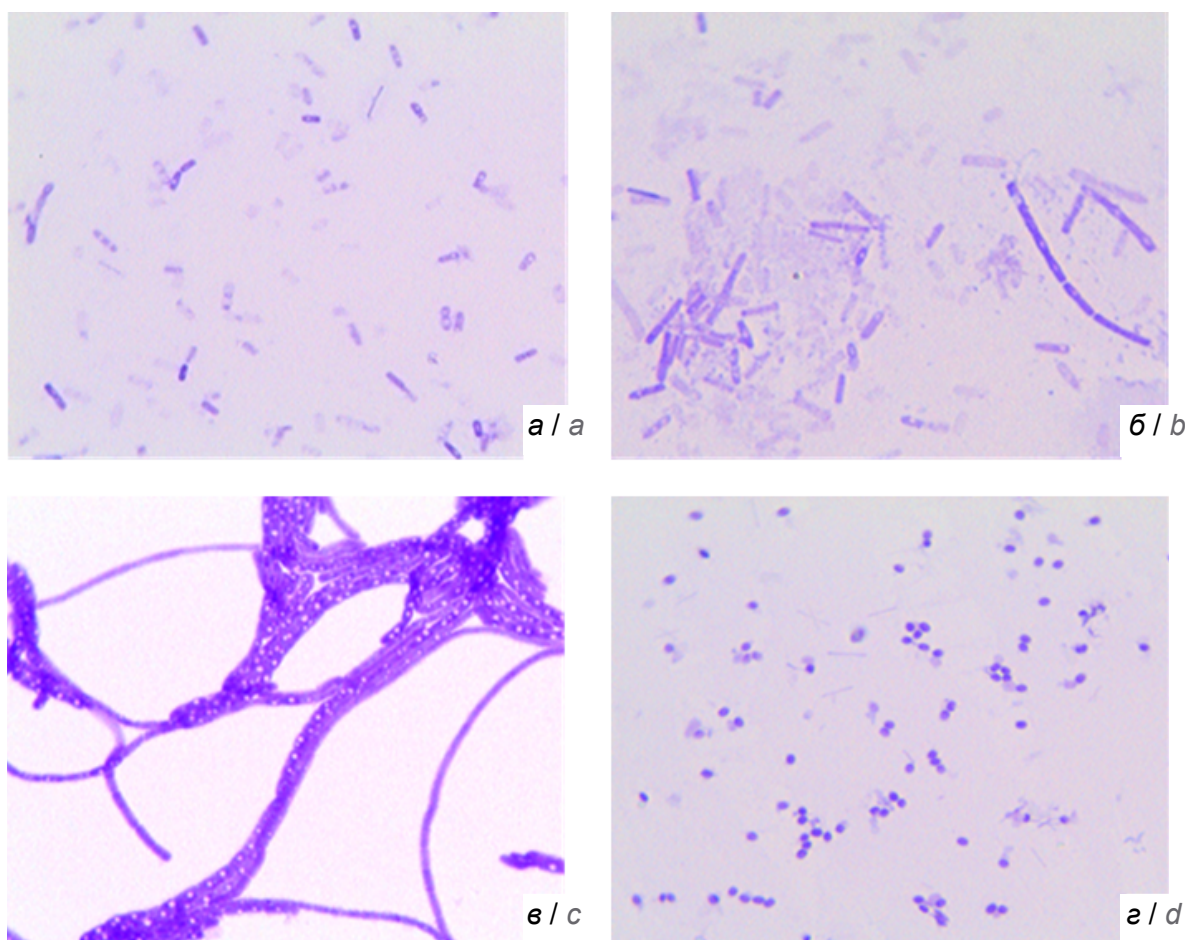


Рис. 3. Микрофотографии осадка бактериальных клеток штаммов *B. anthracis* после последовательной обработки лизоцимом и лизирующим буфером с 6 М гуанидина тиоцианатом: а — 1(CO); б — 1(CO)-5-1; в — 1(CO)-24; г — ΔСТИ. Окраска методом Ребигера, ув. 500.

Fig. 3. Microphotographs of the sediment of bacterial cells of *B. anthracis* strains after sequential treatment with lysozyme and lysis buffer with 6 M guanidine thiocyanate: а — 1(CO); б — 1(CO)-5-1; в — 1(CO)-24; г — ΔСТИ. Coloring with the Rebiger method, ×500.

сочетании с лизоцимом, в результате чего в мазках наблюдались свободно лежащие споры и детрит бактериальных клеток (рис. 3, з).

После воздействия лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидина тиоцианата, на нативные (не обработанные лизоцимом) взвеси бацилл в мазках наблюдали характерные для штаммов *B. anthracis* цепочки клеток, окраска которых была менее интенсивной и неравномерной по сравнению с исходной культурой. Наименьшие изменения претерпевали штаммы *B. anthracis* 1(CO)-23 и 1(CO)-24.

При обработке бактериальных взвесей лизирующим раствором с 8 М мочевиной/2 М тиомочевинной видимые изменения культур были минимальными — окраска клеток становилась несколько слабее, а у штаммов 1(CO)-23 и 1(CO)-24 она практически не менялась. Бациллы штамма 1(CO)-5-1 располагались в окружении вещества, аналогично по окраске капсульному.

Воздействие лизирующих растворов на бациллы, предварительно обработанные лизоцимом, приводило у большинства изученных штаммов к образованию бактериального детрита и слабоокрашенных «теней» бактериальных клеток (рис. 3, а, б), штаммы 55, 71/12 сохраняли цепочки, в которых клетки прокрашивались значительно слабее нативной культуры, культура штамма 1(CO)-24 визуально практически не менялась (рис. 3, в).

При оценке результатов экстракции белкового комплекса вегетативных культур *B. anthracis* наиболее эффективным методом оказывался лизис буфером, содержащим 6 М гуанидина тиоцианат, после предварительной обработки лизоцимом.

Наибольшее количество белковых фракций выявляли в материале классического по фенотипическим свойствам и плазмидному составу вирулентного штамма *B. anthracis* 1(CO). На электрофореграмме у него наблюдалось наибольшее количество полос, особенно в области 25–75 кД. Штамм *B. anthracis* 1(CO)-5-1, имеющий полный набор плазмид и обладающий способностью формировать капсулу на обычных питательных средах, в том числе LB-агаре, в атмосфере воздуха, несмотря на наличие выраженного слоя капсульного вещества, демонстрировал большое количество белковых полос, которые были несколько менее интенсивно выражены, в отличие от исходного штамма *B. anthracis* 1(CO). У остальных штаммов в области 50–75 кД наблюдалось меньшее количество полос, особенно у изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 1(CO): 1(CO)-16 (нарушение прорастания спор при повышенном содержании CO₂), 1(CO)-23 (бесплазмидный) и 1(CO)-24 (отсутствие плазмиды pXO1). Следует отметить, что указанные культуральные варианты штамма 1(CO) были выделены по признаку фагорезистентности к специфическим сибиреязвенным бактериофагам. Меньшее количество

белковых фракций штамма 1(CO) наблюдалось при обработке этим же лизирующим буфером нативной культуры: отмечалось некоторое (незначительное) снижение на электрофореграмме количества и интенсивности линий, соответствующих белкам с молекулярной массой 50–75 кД.

Экстракция белкового комплекса бацилл при воздействии лизирующего буфера, содержащего 8 М мочевины/2 М тиомочевину, была менее эффективной именно в области белков с молекулярной массой более 50 кД; лизирующий эффект, как и в предыдущем случае, был более выражен при предварительной обработке культуры лизоцимом.

Описанные различия в эффективности экстракции бациллярных белков двумя лизирующими буферами с различными составами с предварительной обработкой культуры лизоцимом и в ее отсутствие продемонстрированы на примере типичного вирулентного штамма *B. anthracis* 1(CO) (рис. 4).

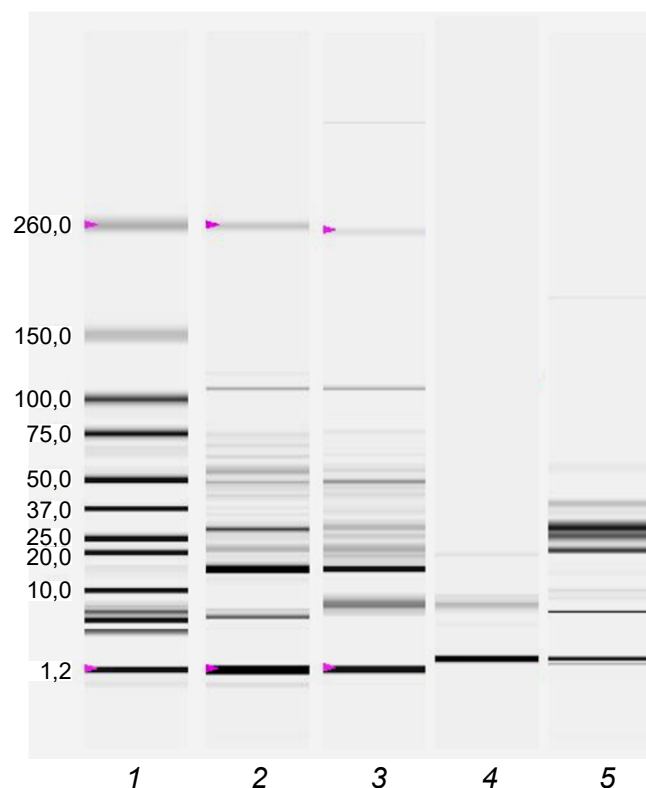


Рис. 4. Разделение белков штамма *B. anthracis* 1(CO), выделенных лизисом культуры: 2 — раствором с гуанидина тиоцианатом после обработки лизоцимом; 3 — тем же раствором без обработки лизоцимом; 4 — раствором с мочевиной/тиомочевинной после обработки лизоцимом; 5 — тем же раствором без обработки лизоцимом. 1 — маркер молекулярных масс белков.

Fig. 4. The separation of proteins of the strain *B. anthracis* 1(CO), isolated by culture lysis: 2 — a solution with guanidine thiocyanate after treatment with lysozyme; 3 — the same solution without treatment with lysozyme; 4 — a solution with urea/thiourea after treatment with lysozyme; 5 — the same solution without treatment with lysozyme. 1 — marker of molecular masses of proteins.

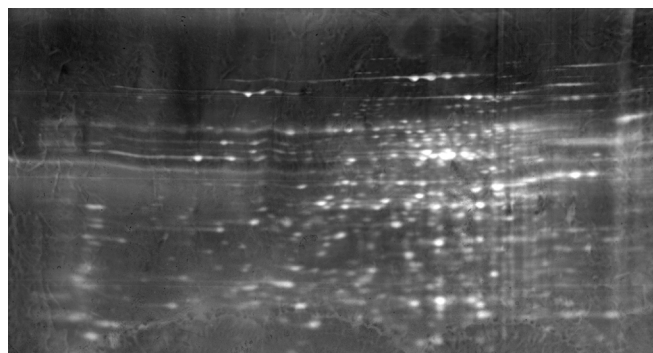


Рис. 5. Картина разделения белков штамма *B. anthracis* СТИ методом 2D-электрофореза.

Экстракция белкового комплекса проводилась из взвеси 20-часовой культуры *B. anthracis* СТИ, предварительно обработанной лизоцимом, в лизирующем буфере с 6 М гуанидина тиоцианатом.

Fig. 5. Protein separation pattern of *B. anthracis* STI strain by 2D electrophoresis.

The protein complex was extracted from a suspension of a 20-hour culture of *B. anthracis* STI, pretreated with lysozyme in lysis buffer with 6 M guanidine thiocyanate.

Поскольку разрешающая способность капиллярного электрофореза недостаточно высока, этот метод может служить только для предварительной оценки образцов, полученных с применением различных схем подготовки культуры и получения лизатов. На конечном этапе оценку эффективности экстракции белков вакцинного штамма СТИ с невысокой скоростью спорообразования (13% при выращивании на LB-агаре в течение 20 ч) проводили методом 2D-электрофореза. На 2D-электрофореграмме (рис. 5) зарегистрирован широкий набор белков, различающихся по значениям изоэлектрических точек (1-е направление) и величине молекулярных масс (2-е направление). Полученное разделение белков позволяет проводить их выделение и идентификацию методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии после их экстракции из геля, очистки и трипсинолиза.

Обсуждение

Скорость спорообразования у штаммов *B. anthracis* значительно различается, что является значимым фактором при соблюдении стандартных условий получения вегетативной культуры для протеомного картирования штаммов возбудителя сибирской язвы методом 2D-электрофореза в сочетании с методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии.

Анализ результатов различных методов экстракции тотального белкового комплекса выявил влияние индивидуальных свойств штаммов *B. anthracis* на эффективность различных способов пробоподготовки. Так, культура штамма ΔСТИ практически полностью лизировалась под действием лизоцима, в то время как культурам штаммов *B. anthracis* 1(CO) и 1(CO)-5-1 для деструкции бактериальных

клеток требовалось сочетанное действие лизоцима и лизирующих растворов, содержащих хаотропные вещества. Большую чувствительность штамма *B. anthracis* ΔСТИ, вероятно, можно объяснить особой физиологической фазой культуры — естественным лизисом бацилл, завершающим процесс спорообразования. Практически не измененный по сравнению с контролем (свежеприготовленная бактериальная взвесь) вид культур после обработки лизирующими растворами подтверждает данные о том, что хаотропные вещества вызывают деградационные процессы, затрагивающие почти все клеточные структуры. Однако клеточная стенка в основном сохраняет свою целостность, ультраструктуру и ригидность, что обуславливает поддержание исходной морфологии клетки. В этих случаях, несмотря на визуальную целостность клеток, на электрофореграммах наблюдались интенсивные полосы, соответствующие белкам с различной молекулярной массой, хотя и в несколько меньшем количестве, чем при сочетанном воздействии лизоцима и гуанидина тиоцианата.

Предварительная обработка культуры лизоцимом с последующей ее обработкой раствором, содержащим мочевины/тиомочевину, напротив, уменьшала количество белковых фракций на электрофореграмме, чему мы не смогли найти объяснение. Меньшая эффективность экстракции внутриклеточных белков у штамма 1(CO)-24 испытанными методами, возможно, объясняется особенностями поверхностных структур клеток, т.к. данный штамм (вариант) был выделен из популяции исходного штамма 1(CO) по признаку резистентности к сибирезавязному бактериофагу BA-9 и у него отсутствует плазида рХО1.

Меньшее количество полос на электрофореграмме вряд ли можно объяснить отсутствием продукции части белков, синтез которых детерминруется указанной плазмидой, т.к. бесплазмидный штамм ΔСТИ был представлен на электрофореграмме в этих же условиях значительно большим количеством белковых фракций.

Заключение

Протеомное картирование штаммов *B. anthracis* является, безусловно, аналитическим методом их изучения для выявления индивидуальных особенностей и их корреляции с патогенными свойствами или важными для жизнеобеспечения физиологическими механизмами и сравнительного анализа синтеза определенных белков в конкретных условиях. Исходя из этого, ввиду трудоемкости и затратности указанных исследований получение материала для дальнейшего анализа методом 2D-электрофореза должно проводиться с учетом индивидуальных особенностей штаммов, в том числе скорости спорообразования и чувствительности

к действию определенных лизирующих смесей, с подбором оптимальных питательных сред и сроков предварительного культивирования культуры, а также оптимальной схемы экстракции белков. Самым эффективным способом лизиса вегетативной культуры с целью получения наиболее полного комплекса белков является применение лизирующего буфера, содержащего 6 М гуанидина тиоцианата, с предварительной обработкой лизоцимом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Castanha E.R., Fox A., Fox K.F. Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of «intact» small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2006; 67(2): 230-40. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.024>
2. Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmeler M., Siegbrecht E., Grunow R., et al. Identification of *Bacillus anthracis*

by using matrix-assisted laser desorption ionization — time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22): 7229-42.

DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.00857-09>

3. Mottaz-Brewer H., Norbeck A., Adkins J., Manes N., Ansong C., Shi L., et al. Optimization of proteomic sample preparation procedures for comprehensive protein characterization of pathogenic systems. *J. Biomol. Tech.* 2008; 19(5): 285-95.
4. Chitlaru T., Shafferman A. Proteomic studies of *Bacillus anthracis*. *Future Microbiol.* 2009; 4(8): 983-98. DOI: <http://doi.org/10.2217/fmb.09.73>
5. Gao Z., Wang Z., Zhang K., Li Y., Zhang T., Wang D., et al. Experimental validation of *Bacillus anthracis* A16R proteogenomics. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14608. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep14608>
6. Rajoria S., Sabna S., Babele P., Kumar R.B., Kamboj D.V., Kumar S., et al. Elucidation of protein biomarkers for verification of selected biological warfare agents using tandem mass spectrometry. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 2205. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-020-59156-3>

Информация об авторах:

Котенева Елена Анатольевна — к.б.н., зав. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>.

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Цыганкова Ольга Ивановна — д.м.н., врач-бактериолог лаб. бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>.

Калинин Александр Васильевич — биолог лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>.

Родионов Иван Сергеевич — м.н.с. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

Абрамович Елена Владимировна — м.н.с. лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

ЩербакOVA Виктория Юрьевна — лаборант-исследователь лаб. постгеномных технологий ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 355035, Ставрополь, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Elena A. Koteneva — PhD. (Biol.), Head, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-1594>.

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Olga I. Tsygankova — D. Sci. (Med.), bacteriologist, Brucellosis laboratory, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7940-9460>.

Aleksander V. Kalinin — biologist, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2678-2624>.

Ivan S. Rodionov — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0049-7411>.

Alena V. Abramovich — junior researcher, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8852-4332>.

Victoriya Yu. Shcherbakova — assistant, Laboratory of postgenomic investigations, Stavropol Research Antiplague Institute, 355035, Stavropol, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2982-4877>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.