

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОГО ПРОТЕОМА СПОР
*BACILLUS ANTHRACIS*Е.А. Котенева^{1,2*}, О.И. Цыганкова¹, А.В. Калинин¹, В.Ю. Щербакова¹, И.С. Родионов¹, В.В. Сердюков¹, А.В. Абрамович¹¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15;
*e-mail: postgenom_stv@mail.ru²Северо-Кавказский федеральный университет, 355009, Ставрополь, ул. Пушкина, 1

Разработан метод получения тотального протеома спор *Bacillus anthracis*, сочетающий эффективную экстракцию белков с надежным обеззараживанием образцов. В работе использовали 7 штаммов *B. anthracis*: 4 бесплазмидных, 3 диплазмидных, один из которых с атипичным капсулообразованием в атмосфере воздуха. Апробированы схемы выделения тотального протеома спор с применением различных лизирующих растворов в присутствии ингибиторов бактериальных протеаз с включением этапов обработки спор трихлоруксусной кислотой и механической дезинтеграции и при их исключении. Оценку качества и полноты экстракции тотального протеома образцов спор оценивали методом одномерного и 2D-электрофореза. Обработка спор трихлоруксусной кислотой повышает надежность обеззараживания материала и уменьшает потери конечного продукта. Механическая дезинтеграция после обработки спор лизирующими растворами увеличивает полноту экстракции белков спор в широком диапазоне молекулярных масс и облегчает процесс стерилизующей фильтрации. Заключительная фильтрация лизата через PVDF-фильтр с размером пор 0.22 мкм обеспечивает дополнительное обеззараживание проб без снижения их качества. Таким образом, использование предложенной схемы пробоподготовки позволяет получать полноценные белковые экстракты спор штаммов *B. anthracis*, пригодные для сравнительного анализа протеома и поиска возможной взаимосвязи с особенностями фенотипических свойств, а также механизмов, обеспечивающих сохранение возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды, включая почву.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; протеом спор; экстракция протеомного комплекса; лизирующие растворы; дезинтеграция; 2D-гель-электрофорез

DOI: 10.18097/BMCRM00154

ВВЕДЕНИЕ

Споры *B. anthracis* – важная морфофункциональная форма существования возбудителя сибирской язвы. Основное патогенное воздействие, фатальное для чувствительных к этой инфекции организмов, осуществляется непосредственно вегетативной формой бацилл, и в этот же период происходит бурное размножение возбудителя. Тем не менее, способность к образованию спор у патогенных микробов является залогом их сохранения в межэпизоотический период [1]. Химический состав и строение оболочек спор играет важную роль в устойчивости к губительному воздействию факторов внешней среды, чувствительности к герминантам в различных условиях, в том числе в организме теплокровных животных, иммуногенности непосредственно спор [2]. Поиск и валидация белковых маркеров споровой формы сибиреязвенного микроба имеет большое значение для разработки систем раннего обнаружения патогена и организации противодействия актам биотерроризма [3]. Развитие современных методов, связанных с тотальным протеомным картированием на основе комплексного применения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тандемной времяпролетной масс-спектрометрии, позволило идентифицировать белки, которые ранее не ассоциировались со споровой формой сибиреязвенных бацилл [4]. Споры возбудителя сибирской язвы обладают особой устойчивостью к физическим

и химическим факторам, что во многом определяется особенностями состава и строения их оболочек [5]. Это затрудняет получение экстракта спор в концентрации, достаточной для дальнейшего протеомного анализа. В работе [6] показано влияние скорости спорообразования у штаммов *B. anthracis* с разным комплексом биологических свойств на эффективность экстракции тотального протеома вегетативных клеток бацилл. Также важным условием качественной пробоподготовки образцов является нахождение культуры в одной морфофункциональной фазе, так как и спорообразование, и герминация спор влияют на изменение белкового состава исследуемых штаммов *B. anthracis*.

Целью работы была разработка метода эффективного лизиса споровой формы *B. anthracis* и экстракции клеточных белков в сочетании с надежным обеззараживанием лизатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 7 штаммов *B. anthracis*: (а) диплазмидные вирулентные штаммы: 1284, выделенный из пельменей (Омск, 2010 г.); 81/1, выделенный в 1969 г. в Ставропольском крае из материала от больного; 1(CO)-S, образующий капсулу на обычных питательных средах в атмосфере воздуха; (б) 4 бесплазмидных варианта штаммов *B. anthracis*: ΔСТИ, ΔSterne, 228/4, 1(CO)-23. Штаммы *B. anthracis* были получены из лаборатории «Коллекция



Таблица 1. Лизирующие буферы, используемые для экстракции тотального протеома из споровой взвеси *B. anthracis*.

№ п/п	Реактив	Конечная концентрация в растворе	Количество на 100 мл раствора
1	Трис основной	40 мМ	0.4846 г
2	DTT	10 мМ	0.15425 г
3	Triton X-100	2%	2 мл
4	Глицерин	10%	10 мл
5*	Коктейль ингибиторов бактериальных протеаз	1 мкг/мл	6 мкл
6	Гуанидина хлорид	6 М	70.856 г
7	Мочевина	8 М	48.048 г
8	Тиомочевина	2 М	15.224 г

Примечание. Компоненты 1-5 использовали при приготовлении обоих буферов, п. 6 используется при приготовлении лизирующего буфера с 6 М гуанидин хлоридом, п.п. 7 и 8 – лизирующего буфера с 8 М мочевиной/2 М тиомочевинной. * Коктейль ингибиторов бактериальных протеаз добавляли непосредственно перед началом работы. pH лизирующего буфера с мочевиной/тиомочевинной составлял 8.5-9.0. pH лизирующего буфера с гуанидин тиоцианатом – 7.5-8.0.

патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института.

В работе были использованы питательные среды: LB broth («VWR Life Science Amresco», США), tryptic soy broth («Liofilchem», Италия), microbiology agar («Sigma», США); реактивы: L-histidine («VWR Life Science AMRESCO», США), TWEEN-80, pure («AppliChem», Германия), trifluoroacetic acid spectroscopy grade, ultrapure («AppliChem» Германия), мочевины, ultra pure grade, («VWR Life Science AMRESCO», США), Acetonitrile, HPLC-gradient grade («AppliChem», Германия), α-цианогидроксикоричная кислота (CHCA) («Bruker Daltonics», Германия), трихлоруксусная кислота (ТХУ, «AppliChem», Германия), ингибитор бактериальных протеаз («VWR Life Science AMRESCO» США), Трис основной, ultra pure grade, («VWR Life Science AMRESCO», США), тиомочевина ultra pure grade, («VWR Life Science AMRESCO», США), гуанидин гидрохлорид, molecular biology grade, («Sigma», США); DTT molecular biology grade, («AppliChem», Германия), глицерин чистый для анализа, ГОСТ 6259-75 (Россия).

Работу с образцами спор штаммов *B. anthracis* проводили с соблюдением требований СП 1.3.3.118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Споры выращивали в течение 7 суток на среде Гладстона-Филдса с контролем полноты спорообразования, смывали стерильной дистиллированной водой (ДВ) при достижении спорообразования 95%. При необходимости проводили отмывку спор ДВ от бациллярного дебриса. Эффективность воздействия таких химических реагентов, как ТХУ и лизирующие растворы, а также физических факторов (механическая дезинтеграция) на споры штаммов *B. anthracis* в процессе экстракции протеома оценивали как инструментальными методами, описанными ниже, так и визуально по внешнему виду спор в мазках, окрашенных методом Ребигера.

Пробоподготовку проводили несколькими вариантами, включавшими обработку нативной споровой взвеси или предварительно подвергнутой воздействию 20% ТХУ при -20 °С в течение 24 ч лизирующими буферами, содержащими 6 М гуанидин хлорид или 8 М мочевины/2 М тиомочевину с последующей дезинтеграцией с использованием циркониевых шариков (или без этого этапа) (рис. 1). Для предотвращения деградации экстрагируемых белков в

лизирующий буфер вносили ингибиторы бактериальных протеаз (табл. 1).

На конечном этапе осуществляли дополнительное обеззараживание образцов и удаление клеточного дебриса при помощи ультрамикрочентрифужной стерилизующей фильтрации лизата через PVDF-фильтр («Merk/Millipore», Германия) с размером пор 0.22 мкм под контролем на специфическую стерильность методом посева на питательные среды и постановкой биопроб. Для этого полученные фильтраты штаммов *B. anthracis* нейтрализовали [7], и использовали для посевов и заражения животных. Посевы производили по 0.1 мл пробы на 5 чашек Петри с LB-агаром (по Ленноксу), которые инкубировали при 37°С в течение 5 суток с ежедневным просмотром на наличие специфического роста.

Для подтверждения надежности обеззараживания биологическим методом белым беспородным мышам массой 20±1 г (5 животных на каждую пробу) вводили по 0.5 мл пробы подкожно на внутренней поверхности бедра, после чего наблюдали за ними в течение 10 суток. В случае гибели животных проводили их вскрытие с просмотром окрашенных мазков-отпечатков и посевом на питательные среды. Положительным контролем служили взвеси необработанных спор соответствующей концентрации в нейтрализующем бульоне, отрицательным контролем – стерильный нейтрализующий бульон. Механическую дезинтеграцию образцов проводили с использованием прибора Mini-BeadBeater 16 («Biospek», США) и расходных материалов к нему. Сравнительную оценку полноты экстракции тотального протеома из спорных клеток осуществляли по количеству, интенсивности и четкости разделения белковых полос, полученных при одномерном электрофоретическом разделении образцов на автоматической системе капиллярного электрофореза Experion («Bio-Rad», США) 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 («Bio-Rad»). Концентрацию белка в образцах перед проведением электрофореза в первом направлении измеряли на флюориметре Qubit («Thermo Fischer», США) и параллельно методом Бредфорда с

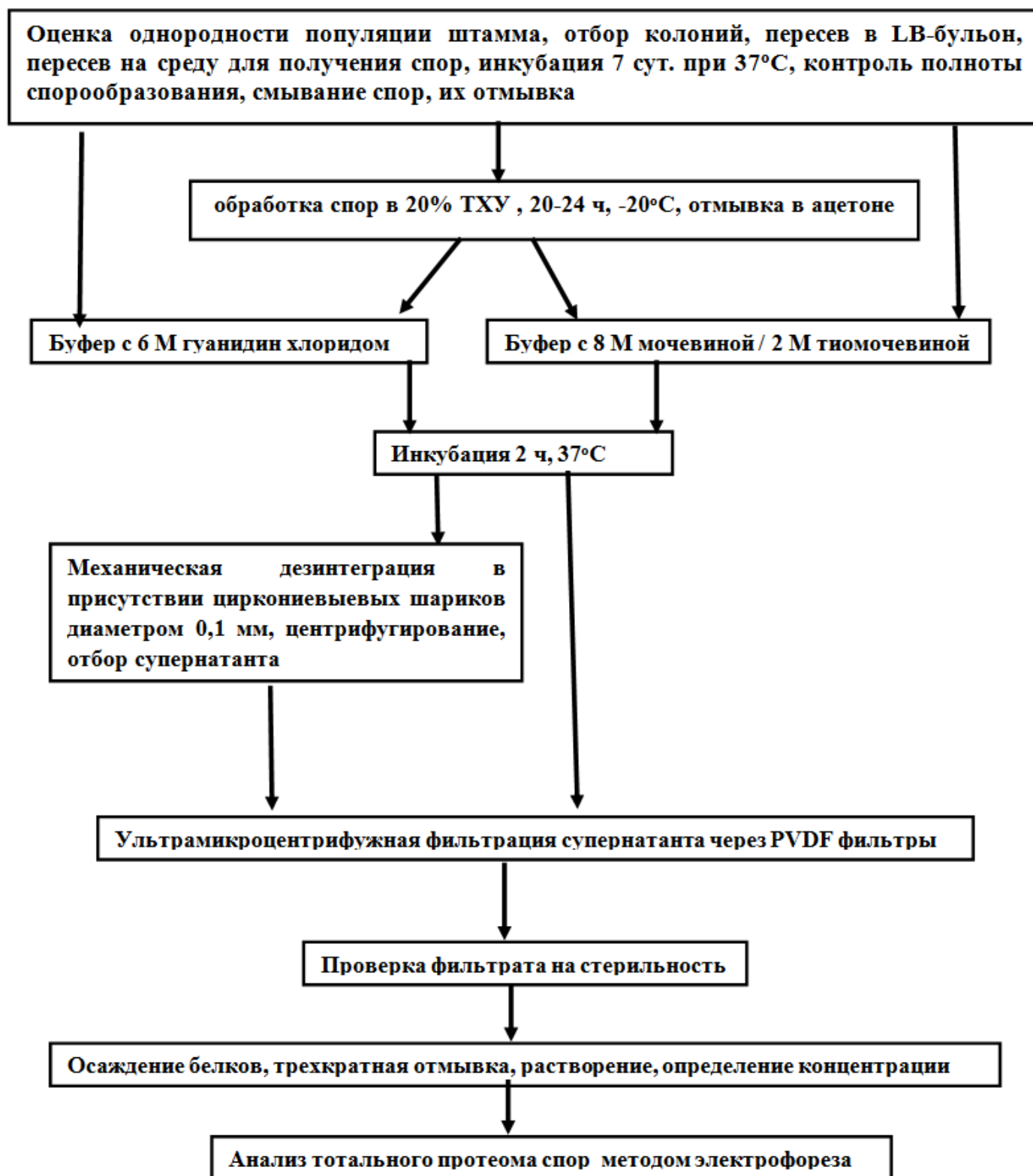


Рисунок 1. Схема исследований по разработке алгоритма экстракции тотального протеома спор *B. anthracis*.

использованием спектрофотометра Smart Spec Plus («Bio-Rad»). Изоэлектрофокусировку проводили в приборе Protean IEF Cell с применением полосок «ReadyStrip IPG strips» 7 см, pH 4-7, («Bio-Rad»), загружая образцы из расчета 10-15 мкг белка на 0.25 мл регидратационного буфера, который готовили согласно рекомендациям производителя стрипов (ReadyStrip IPG strips instruction manual, cat #163-2099). Стрипы уравнивали в буфере с 6 М мочевиной в два

этапа: с 2% дитиотреитолом и 2.5% йодацетамидом по 15 мин. Электрофорез во втором направлении проводили в камере Mini Protean («Bio-Rad») в 12% ПААГ в течение ~1.5 ч. Готовые гели окрашивали набором Pierce™ Zinc Reversible Stain Kit («Thermo Fischer»). Изображения окрашенных гелей визуализировали при помощи системы Densitometr GS-800 («Bio-Rad»).

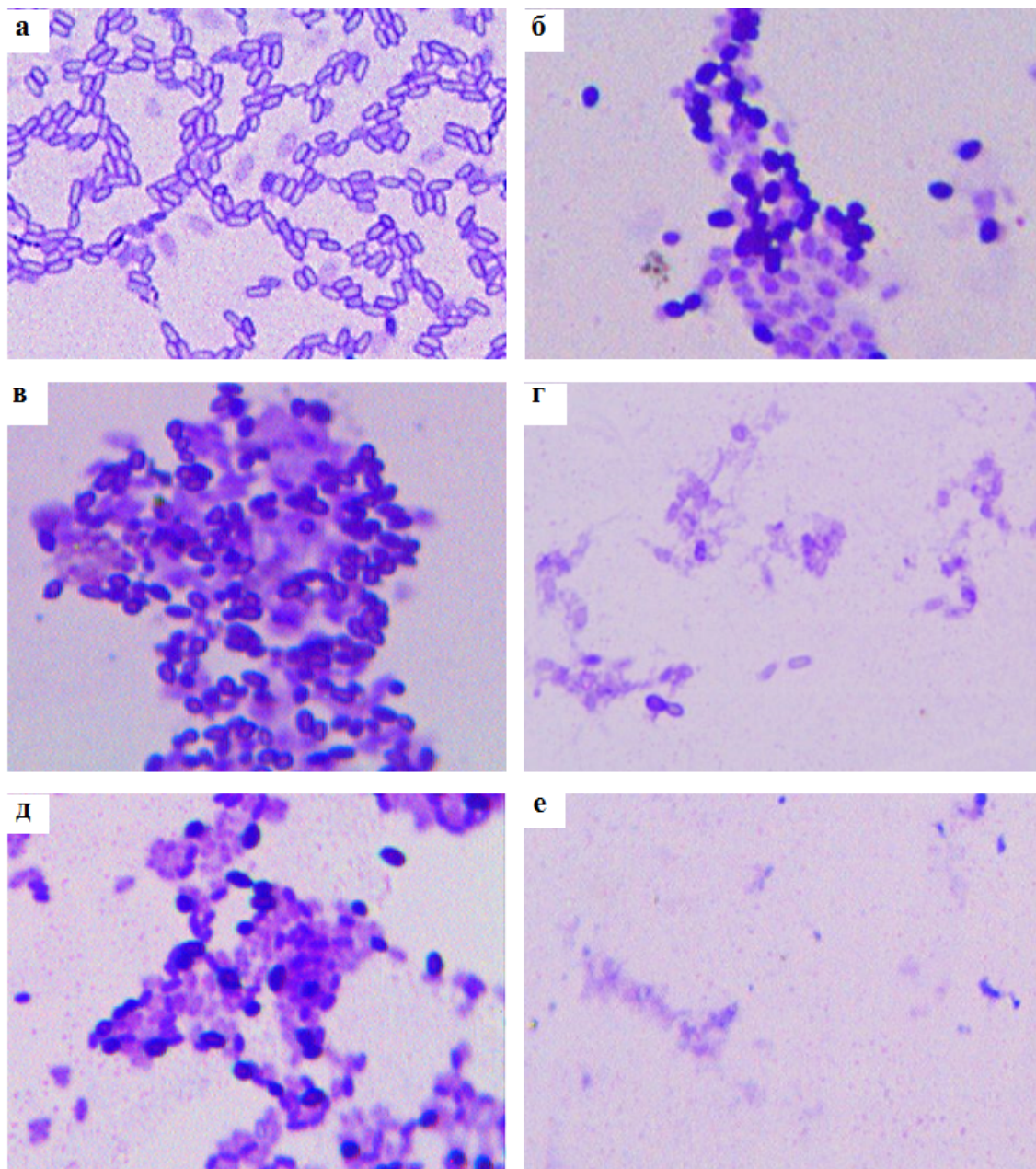


Рисунок 2. Динамика изменений внешнего вида спор штамма *B. anthracis* 1(CO)-23 в процессе получения протеомного комплекса: а – после смывания и отмывки; б – после обработки ТХУ; в – после обработки лизирующим буфером с мочевиной; г – после дополнительной механической дезинтеграции; д – после обработки лизирующим раствором с гуанидином хлоридом; е – после дополнительной механической дезинтеграции. Окраска методом Ребигера. Увеличение 100х5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работу проводили со взвесями с концентрацией 1×10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Убедившись, что взвесь спор не содержит вегетативной культуры и дебриса, образец центрифугировали, к осадку добавляли 0.5 мл 20 % ТХУ и аккуратно перемешивали пипетированием. После этого образец на 24 ч выдерживали при -20°C . Далее пробы размораживали на воздухе и центрифугировали при 16000 g 10 мин. К осадку добавляли 500 мкл охлажденного ацетона, ресуспендировали осадок пипетированием и центрифугировали при 16000 g 10 мин. Процедуру отмывки повторяли еще раз. После обработки спор 20% ТХУ они приобретали способность интенсивно прокрашиваться, выглядели более округлыми и теряли четкость контуров (рис. 2 б) в отличие от спор, не обработанных ТХУ (рис. 2 а).

Далее образцы спор инкубировали в течение 2 ч при 37°C в одном из лизирующих буферов, содержащих 6 М гуанидин хлорид или 8 М мочевины/2 М тиомочевину в присутствии коктейля ингибиторов бактериальных протеаз. Обработка обоими лизирующими буферами мало влияла на внешний вид спор в мазках у всех штаммов (рис. 2 в и д) по сравнению с предыдущим этапом.

После инкубации в одном из лизирующих буферов, часть образцов подвергали механической дезинтеграции в присутствии циркониевых шариков в следующем режиме: 2 цикла по 3 мин. Для предотвращения нагревания образцов между циклами дезинтеграции их помещали на 30 с в ванночку со льдом. Далее пробирки с образцами центрифугировали 5 мин при 24000 g. Из осадка делали мазки (рис. 2 г и е). На представленных парных фотографиях из осадка материала до этапа механической

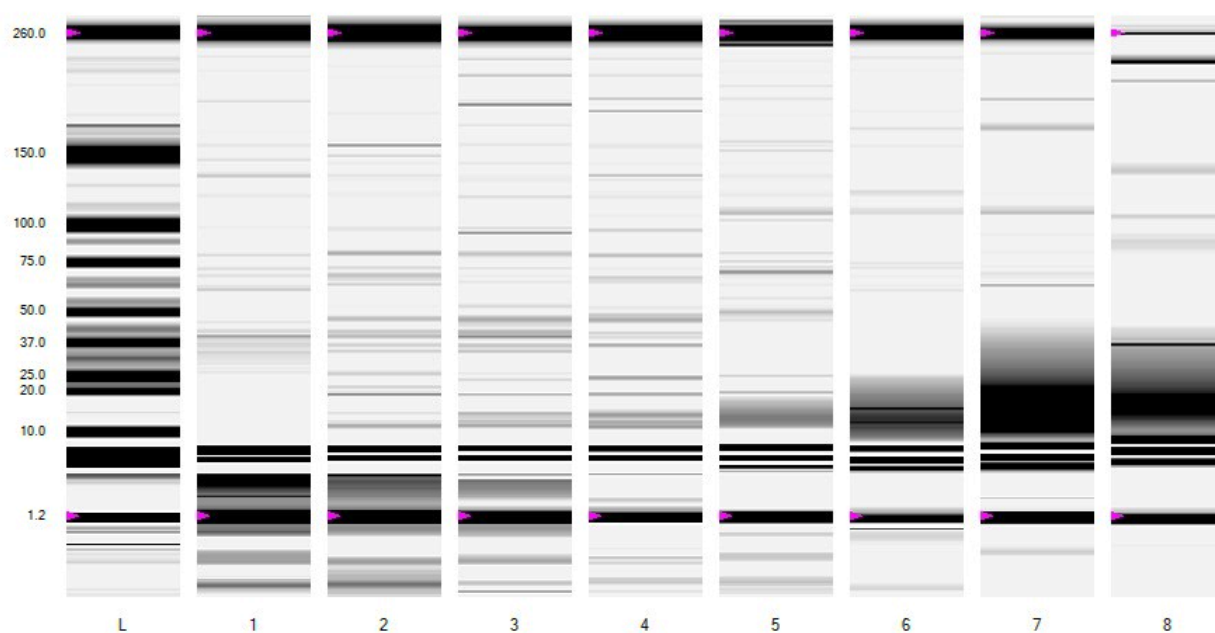


Рисунок 3. Электрофореграмма белковых экстрактов, полученных с применением механической дезинтеграции и без нее.

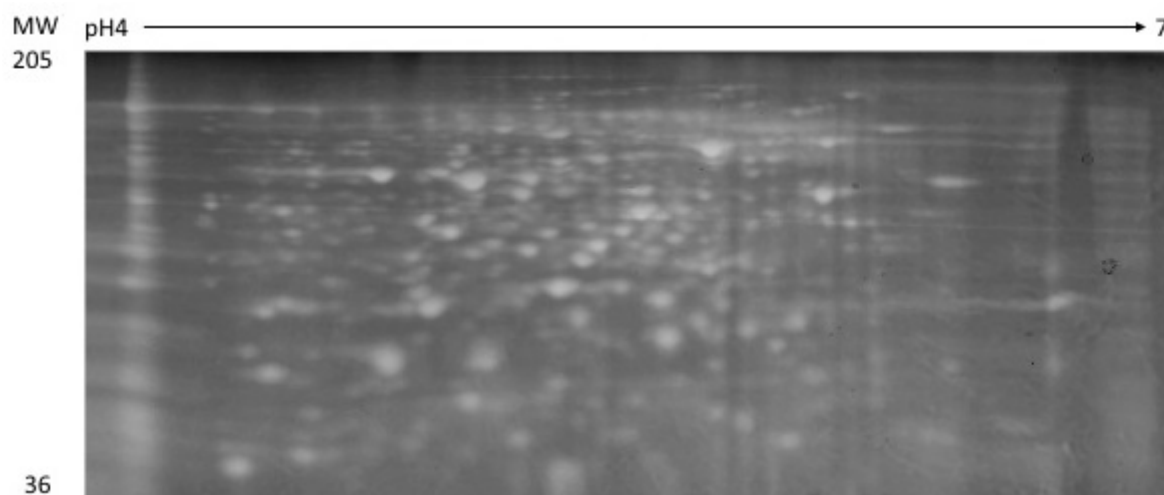


Рисунок 4. 2D электрофореграмма экстрактов тотального протеома спор штамма *B. anthracis* 1(CO)-23, окраска цинком. Стрип pH 4-7.

дезинтеграции спор штамма *B. anthracis* 1(CO)-23 и после указанной процедуры можно отметить практически полное исчезновение интенсивно окрашенных структурированных спор (особенно после обработки лизирующим буфером с 6 М гуанидин хлоридом) при наличии лишь аморфного дебриса, что может свидетельствовать о более интенсивном воздействии на споры в процессе экстракции их протеома.

На следующем этапе проводили обеззараживание проб методом ультрамикроцентрифужной фильтрации лизата через PVDF-фильтр с размером пор 0.22 мкм. Следует отметить, что образцы, не подвергшиеся обработке ТХУ и механической дезинтеграции, фильтровались с большим трудом, формируя на микрофильтре плотный осадок, затрудняющий прохождение жидкости через поры, вследствие чего приходилось дважды менять фильтрующую насадку. Кроме того, полученный после фильтрации объем образца был примерно в 2 раза меньше (0.15-0.20 мл), чем у образцов, подвергшихся обработке ТХУ и дезинтеграции.

Проверка на специфическую стерильность методом посева на питательные среды и постановкой биопробы

материала, полученного на конечном этапе, не выявила жизнеспособной культуры *B. anthracis*, что позволяет использовать этот метод при проведении протеомного анализа споровой формы штаммов сибиреязвенного микроба.

Для проверки влияния процедуры механической дезинтеграции на эффективность экстракции белкового комплекса спор *B. anthracis* проводили сравнительную оценку качества полученных экстрактов штаммов *B. anthracis* 1284 и ΔSterne, полученных под воздействием двух лизирующих буферов с применением механической дезинтеграции и без нее по количеству и интенсивности белковых полос, полученных при одномерном электрофоретическом разделении белков с использованием автоматической системы капиллярного электрофореза Experion («Bio-Rad») и набора Experion Pro260 Analysis Kit («Bio-Rad») после их предварительной очистки набором Ready Prep 2-D Cleanup Kit («Bio-Rad») (рис. 3.).

Сравнительный анализ результатов различных вариантов получения белковых комплексов двух штаммов *B. anthracis*

ΔSterne и 1284 четко продемонстрировал преимущество проб, полученных с применением механической дезинтеграции после их обработки лизирующими буферными растворами. Они имели более богатый белковый спектр, распределенный по всему диапазону детектируемых молекулярных масс, в то время как образцы, не подвергшиеся дезинтеграции, имели на всем протяжении спектра меньшее количество экстрагированных белков вне зависимости от используемого буфера.

Метод капиллярного электрофореза удобен для ориентировочной сравнительной оценки качества белковых экстрактов, полученных при применении различных схем их приготовления, но не обладает достаточной разрешающей способностью для разделения до отдельных белков, что необходимо для их дальнейшей идентификации методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии после их экстракции из геля, очистки и трипсинолиза. В связи с этим на конечном этапе был проведен 2D-электрофорез белкового экстракта спор штамма *B. anthracis* 1(CO)-23, полученного с применением механической дезинтеграции. На рисунке 4 представлено распределение белков, различающихся по значениям изоэлектрических точек (горизонтальное направление) и величине молекулярных масс (вертикальное направление) при использовании полосок с иммобилизованным инградиентом pH (4-7).

При анализе белковых экстрактов образцов спор штаммов *B. anthracis* 1(CO)-23 (рис. 4) в диапазоне pH 4-7 было выявлено около 350 белковых пятен, молекулярная масса которых варьировала в диапазоне 36-205 кДа.

Одна из первых работ, посвященных исследованию протеома спор сибиреязвенного микроба [8], не содержит четко прописанной процедуры экстракции тотального протеома спор *B. anthracis* и их обеззараживания. В ней имеется только ссылка на более раннюю работу [9], в которой описано обеззараживание спор (причем, не *B. anthracis*, а непатогенных *Bacillus subtilis*) путем их кратковременного прогревания в буфере SDS-PAGE. В другой работе [10] анализ белков спор проводили с использованием авирулентного (вакцинного) штамма *B. anthracis* Sterne методом френч-пресса и об отсутствии спор в исследуемом образце судили по результатам микроскопии, однако данный метод (микроскопия) для оценки эффективности обеззараживания недостаточно объективен и надежен. Более близкая к описываемой нами методика предложена в работе [11], авторы которой использовали для деструкции спор ультразвуковую дезинтеграцию с последующей фильтрацией образца через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм и/или 0.22 мкм и обязательным проведением контроля образцов на специфическую стерильность. Поскольку проведенная нами апробация метода ультразвуковой дезинтеграции на выборке штаммов сибиреязвенного микроба с разной вирулентностью, включая атипичные, дала отрицательные результаты (образцы забивали фильтры, в посевах на специфическую стерильность наблюдался рост культуры), от применения ультразвуковой дезинтеграции пришлось отказаться. В дальнейшем для извлечения тотального протеома были апробированы методы, описанные в работе [12]. Её авторы провели сравнение экстракции спорных белков с применением ТХУ и механической дезинтеграции. Результаты работы свидетельствуют о преимуществе кислотной экстракции перед механической дезинтеграцией, так как этот метод более прост и позволяет получить большее

количество спорных белков. В ряде ранних работ [13,14] мы нашли сведения о том, что при длительном воздействии ТХУ на споры бацилл увеличивается проницаемость спорной оболочки к действию химических веществ. Мы также наблюдали данный эффект при микроскопии препаратов обработанных спор – они теряли четкость контуров, выглядели менее структурированными. В то же время в перечисленных публикациях приводятся данные о том, что воздействие ТХУ замедляет способность спор к прорастанию, но не лишает их жизнеспособности [15]. С учетом этих данных, при разработке метода обеззараживания спор сибиреязвенного микроба для проведения протеомных исследований, мы использовали комбинацию длительной (24 ч) обработки 20% раствором ТХУ с механической дезинтеграцией спор и ультрафильтрацией конечного образца, что привело к стабильно отрицательным результатам контроля на специфическую стерильность бактериологическим и биологическим методами, а также увеличивало количество белков, выявляемых методом электрофореза в экстрактах, и уменьшало потери конечного продукта. Выполнение этапа механической дезинтеграции после обработки спор лизирующими растворами позволило повысить полноту экстракции протеома спор (расширить спектр экстрагируемых белков в широком диапазоне молекулярных масс) и облегчить процесс стерилизующей фильтрации, уменьшив потери образца. Использование предложенной схемы пробоподготовки позволяет получать полноценные белковые экстракты спор штаммов *B. anthracis*, пригодные для сравнительного анализа протеома и поиска корреляции с фенотипическими свойствами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г. № 2010/63/ес.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено по теме научно-исследовательской работы в рамках выполнения отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021-2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории российской федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schuch, R., & Fischetti, V.A. (2009) The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PloS one*, 4(8), e6532. DOI: 10.1371/journal.pone.0006532
2. Stewart, G.C. (2015) The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 79(4), 437–457. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15
3. Chenau, J., Fenaille, F., Caro, V., Haustant, M., Diancourt, L., Klee, S.R., Junot, C., Ezan, E., Goossens, P.L., Becher, F. (2014) Identification and

validation of specific markers of *Bacillus anthracis* spores by proteomics and genomics approaches. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, **13**(3), 716–732. DOI: 10.1074/mcp.M113.032946

4. Chen, Y., Barat, B., Ray, W.K., Helm, R.F., Melville, S.B., & Popham, D.L. (2019) Membrane Proteomes and Ion Transporters in *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* Dormant and Germinating Spores. *Journal of bacteriology*, **201**(6), e00662-18. DOI: 10.1128/JB.00662-18

5. Driks A. (2009) The *Bacillus anthracis* spore. *Molecular aspects of medicine*, **30**(6), 368–373. DOI: 10.1016/j.mam.2009.08.001

6. Koteneva, E.A., Tsygankova, O.I., Kalinin, A.V., Rodionov, I.S., Abramovich A.V., Shcherbakova, V.Yu. (2019) Features of obtaining the protein complex of vegetative cultures *Bacillus anthracis* for proteomic mapping of strains. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, **4**: 311–338. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-5

7. Lasch, P., Nattermann, H., Erhard, M., Stämmler, M., Grunow, R., Bannert, N., Appel, B., Naumann, D. (2008) MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Analytical chemistry*, **80**(6), 2026–2034. DOI: 10.1021/ac701822j

8. Lai, E. M., Phadke, N.D., Kachman, M.T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J.A., Maddock, J.R., Driks, A. (2003) Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology*, **185**(4), 1443–1454. DOI: 10.1128/JB.185.4.1443-1454.2003

9. Bauer, T., Little, S., Stöver, A.G., & Driks, A. (1999) Functional regions of the *Bacillus subtilis* spore coat morphogenetic protein CotE. *Journal of bacteriology*, **181**(22), 7043–7051. DOI: 10.1128/JB.181.22.7043-7051.1999

10. Steichen, C., Chen, P., Kearney, J.F., Turnbough, C.L., Jr (2003) Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of bacteriology*, **185**(6), 1903–1910. DOI: 10.1128/JB.185.6.1903-1910.2003

11. Redmond, C., Baillie, L., Hibbs, S., Moir, A., Moir, A. (2004) Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology (Reading, England)*, **150**(Pt 2), 355–363. DOI: 10.1099/mic.0.26681-0

12. Deatherage Kaiser, B. L., Wunschel, D. S., Sydor, M. A., Warner, M. G., Wahl, K. L., & Hutchison, J. R. (2015). Improved proteomic analysis following trichloroacetic acid extraction of *Bacillus anthracis* spore proteins. *Journal of microbiological methods*, **118**, 18–24. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.08.008

13. Sydor, M.A., Warner, M.G., Wahl, K.L., Hutchison, J.R. (2015) Improved proteomic analysis following trichloroacetic acid extraction of *Bacillus anthracis* spore proteins. *Journal of microbiological methods*, **118**, 18–24. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.08.008

14. Shibata, H., Murakami, H., Tani, I. (1980). Delayed germination of *Bacillus cereus* T spores after treatment with trichloroacetic acid and their reactivation by heating. *Microbiology and immunology*, **24**(4), 291–298. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1980.tb02832.x

15. Report on the Potential Exposure to Anthrax Centers for Disease Control and Prevention (2014) https://www.cdc.gov/labs/pdf/Final_Anthrax_Report.pdf

Поступила: 30.07.2021
 После доработки: 14.10.2021
 Принята к публикации: 30.11.2021

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE EXTRACTION OF THE TOTAL PROTEOME OF BACILLUS ANTHRACIS SPORES

E.A. Koteneva^{1,2*}, O.I. Tsygankova¹, A.V. Kalinin¹, V.Yu. Shcherbakova¹, I.S. Rodionov¹, V.V. Serdyukov¹, A.V. Abramovich¹

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, 13-15, Sovetskaya str., Stavropol, 355035 Russia

²North Caucasus Federal University", Stavropol, 355009 Russia; *e-mail: postgenom_stv@mail.ru

We have developed a method for obtaining the total proteome of *Bacillus anthracis* spores, which combines efficient protein extraction with reliable disinfection of samples. We used 7 strains of *B. anthracis*: 4 plasmid-free, 3 diplasmid, one of which with an atypical type of capsule formation in air. The schemes for isolating the total spore proteome were tested using various lysis solutions in the presence of bacterial protease inhibitors, with the inclusion of the stages of treatment of spores with trichloroacetic acid and mechanical disintegration and with their exclusion. The quality and completeness of the extraction of the total proteome of the spores of the samples was assessed in one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) electrophoresis. Treatment of spores with trichloroacetic acid increased the reliability of material disinfection and reduces the loss of the final product. Mechanical disintegration after treatment of spores with lysing solutions increases the completeness of extraction of spore proteins in a wide range of molecular weights and facilitated the process of sterilizing filtration. Final filtration of the lysate through a PVDF filter with a pore size of 0.22 µm provided additional decontamination of samples without reducing their quality. Thus, the use of the proposed sample preparation scheme makes it possible to obtain complete protein extracts of spores of *B. anthracis* strains, suitable for comparative analysis of the proteome and search for a possible correlation with the features phenotypic properties and mechanisms that ensure the preservation of the pathogen anthrax in environmental objects, including soil

Key words: *Bacillus anthracis*; spore proteome; extraction of the proteomic complex; lysis solutions; disintegration; 2D-gel electrophoresis

FUNDING

The study was carried out on the topic of research work as part of the implementation of the Rospotrebnadzor Sectoral Research Program for the period 2021–2025. “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases”.

Received: 30.07.2021, revised: 14.10.2021, accepted: 30.11.2021