

## Первый опыт применения метода прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. gonorrhoeae*

А. А. Кубанова В. М. Говорун Е. Н. Ильина В. А. Верещагин Н. В. Фриго Т. А. Припутневич

***Прямое белковое профилирование с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии - один из методов протеомной характеристики микроорганизмов, рассматривается в качестве альтернативного подхода для быстрой идентификации и внутривидовой классификации патогенных микроорганизмов. Данный подход был впервые использован для исследования популяции *N. gonorrhoeae*. Нами была отработана простая методика масс-спектрометрического профилирования бактериальных белков, получены профили для 120 клинических и контрольного (ATCC 49226) штаммов *N. gonorrhoeae*, что позволило продемонстрировать незначительную гетерогенность регистрируемых для гонококка белковых масс-спектров и выделить в исследованной группе штаммов три протеомных типа. Эти предварительные результаты позволили сделать вывод о потенциальной возможности использования прямого белкового профилирования с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой идентификации и внутривидовой классификации *N. gonorrhoeae*. Представленный подход выгодно отличается высокой чувствительностью метода, скоростью анализа (простая пробоподготовка и высокая скорость измерения), низкой стоимостью используемых реактивов и материалов.***

Традиционные методы лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), как в России, так и за рубежом базируются на методах классической микробиологии (микроскопия, культуральное исследование с последующей видовой идентификацией микроорганизма), методах серологической диагностики (в частности, иммуноферментном анализе). Однако эти методы имеют ряд недостатков, к числу которых относится большая длительность и трудоемкость проведения анализа, необходимость специальной подготовки персонала, а также высокая цена и нестабильность качества диагностических наборов.

В настоящее время в России и за рубежом активно развиваются новые подходы к диагностике инфекционных заболеваний, использующие достижения и методы протеомики - области современной биологии, занимающейся инвентаризацией белков живых организмов, изучением их экспрессии и взаимодействия в клетке в различных физиологических состояниях. В частности, использование знаний о геноме и протеоме микроорганизма в совокупности с высокопроизводительным аналитическим инструментом протеомики - масс-спектрометрическим анализом белков - предоставляет возможность альтернативного подхода к решению задач молекулярной диагностики инфекционных заболеваний и преодолению обозначенных выше

ограничений классических методов.

Масс-спектрометрия - физический метод измерения массы ионов исследуемого вещества и их относительных количеств в смесях, использующий разделение ионов разных масс в вакууме под действием электрических и магнитных полей. Возможность получения специфичных для конкретного вида микроорганизма масс-спектров белков дает основание для использования данного метода для быстрой дискриминации возбудителя заболевания в микробном сообществе и, возможно, его внутривидовой классификации, что впервые было принципиально показано еще в 1975 г. [1].

Однако реализация этого принципа становится возможной только в последние годы и связана с появлением в арсенале масс-спектрометрии «мягкого» способа ионизации молекул исследуемого вещества [2, 3]. Использование матричной лазерной десорбционной ионизации в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass-Spectrometry, MALDI-TOF MS) обеспечило настоящий прорыв в анализе сложных биологических молекул, в частности, тяжелых, труднолетучих молекул нуклеиновых кислот и белков.

Метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование), т.е. без фракционирования и очистки отдельных белков, и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [4].

Особенностями и вместе с тем преимуществами такого подхода являются высокая чувствительность, скорость анализа (несложная пробоподготовка и высокая скорость измерения) и низкая стоимость используемых реактивов и материалов.

Однако несмотря на широкие потенциальные возможности использования этого подхода для идентификации и типирования микроорганизмов, оптимальная процедура прямого белкового профилирования применительно к бактериальным патогенам, вызывающим ИППП, до настоящего момента не выработана: описаны процедуры пробоподготовки, использующие различные MALDI матрицы, обсуждаются факторы, влияющие на качественный состав спектров, воспроизводимость, остается открытым вопрос об алгоритме анализа и сравнения масс-спектров для типирования микроорганизмов.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности применения прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой идентификации и типирования *Neisseria gonorrhoeae*.

## **Материал и методы**

Материалом для исследования служили свежие культуры штаммов гонококка, полученные по стандартной методике, выделенные от 120 больных неосложненной гонореей из 4 региональных центров Российской Федерации (Мурманска, Иркутска, Архангельска и Санкт-Петербурга), а также контрольный штамм *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. В качестве референтного микроорганизма с хорошо охарактеризованным протеомом использовали

*Escherichia coli* (лабораторный штамм DH5a).

Одиночные колонии *N. gonorrhoeae* диаметром 1-1,5 мм (5-10 мг) снимали одноразовой петлей с поверхности агара и помещали в пробирки 0,5 мл (Eppendorf, Германия), в которые затем добавляли 50 мкл смеси, содержащей 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Осторожно суспендировали бактериальные клетки в течение 1-2 мин. Полученные суспензии центрифугировали 1 мин при 14 000 об/мин. Супернатант использовали в качестве исследуемого образца для проведения масс-спектрометрического анализа. Подготовленные таким образом белковые экстракты вносили в лунки стального планшета для MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, «Bruker Daltonics», Германия) в объеме 1 мкл (каждый образец - в трех параллелях). Планшет подсушивали на воздухе в течение 3 мин (до визуального высыхания образцов), после чего на образцы белковых экстрактов наслаивали по 2 мкл насыщенного раствора матрицы -  $\alpha$ -CHCA («Bruker Daltonics», Германия) в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Планшет с содержимым высушивали на воздухе до образования кристаллов (5 мин). В качестве контрольного образца, а также в качестве внешнего калибратора использовался экстракт штамма *E. coli* DH5a.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия). Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  от 2000 до 20 000. Внутреннюю калибровку указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (500 импульсов лазера). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11).

При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы - массам целых (не фрагментированных) белков. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/Tr EMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.expasy.org/srs5/>). При вводе параметра «Молекулярный вес» использовали экспериментальное значение массы, изменяемое с точностью  $\pm 1$  Да. В случае неудачи проводили повторный поиск со значением массы, соответствующим утрате N-концевого метионина, учитывая возможность посттрансляционной модификации белков. Так как геном *N. gonorrhoeae* в настоящий момент аннотирован не полностью, производили также поиск по известным белкам более охарактеризованного близкородственного вида - *Neisseria meningitidis*.

## **Результаты и обсуждение**

Отработана методика обработки бактериальной культуры для получения воспроизводимых и максимально насыщенных масс-спектров (30-40 пиков) с использованием лабораторного штамма *E. coli* DH5a (подробнее в разделе «Материал и методы»). Технически процедура пробоподготовки предельно проста: небольшое количество образца бактериальной культуры с чашки Петри (одна колония) суспендируется в экстрагирующем растворе и затем центрифугируется в течение 1 мин. После чего образец наносится на планшет для масс-спектрометрии, где смешивается с матрицей (органической кислотой), образующей при высыхании на воздухе кристаллы: происходит сокристаллизация - молекулы бактериальных белков оказываются включенными в толщу кристаллов матрицы, что обеспечивает их дальнейшую ионизацию и масс-спектрометрический анализ. В рамках стандартизации и упрощения методики нами были подобраны условия, позволяющие проводить масс-спектрометрический анализ интересующих нас микроорганизмов в автоматическом режиме.

Преимуществами методики являются высокая чувствительность (достаточно 10<sup>9</sup> клеток возбудителя - одна колония на чашке Петри), быстрая и простая пробоподготовка (10-15 мин/образец), высокая скорость измерения (1 мин/образец), возможность автоматизации и роботизации всех стадий исследования, сравнительно низкая стоимость используемых реактивов материалов.

Полученная методика была впервые апплицирована для исследования *N. gonorrhoeae*: получения белковых профилей, изучения их внутривидовых вариаций и оценки возможности использования данного подхода для идентификации и типирования возбудителя гонореи. Вначале нами был получен воспроизводимый масс-спектр для контрольного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (рис. 1

), включающий около 25 пиков в заданном диапазоне масс. При интерпретации спектра 10 пиков были соотнесены с рибосомальными белками бактерии.

Далее были исследованы 120 штаммов *N. gonorrhoeae*, полученных от больных гонореей из различных регионов Российской Федерации. Проведен сравнительный анализ полученных масс-спектров и пик-листов, который выявил лишь два пика со значениями  $m/z$ , равными 4473 и 8165 (у контрольного штамма *N. gonorrhoeae* и большинства клинических штаммов), которые меняют эти значения у ряда штаммов на 4487 и 8147 соответственно (рис. 2

). По результатам поиска в базе данных они соотносятся с рибосомальными белками RL36 и RL31 соответственно. Полученные результаты позволили выделить 3 протеомных типа (протеотипов) гонококка. Регистрируемые варианты изменения масс белков *N. gonorrhoeae* приведены в таблице

. Подавляющее большинство - 90 (75%) из 120 проанализированных штаммов относились к типу 1 ( $m/z$  4473/8165), соответствующему контрольному штамму *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Остальные распределились следующим образом: 18 (15%) штаммов были отнесены к типу 2 ( $m/z$  4487/8165) и 12 (10%)

штаммов - к типу 3 (m/z 4487/8147). Географических особенностей распределения протеотипов не обнаружено.

Таким образом, описанная методика позволила использовать данный подход для получения воспроизводимых белковых профилей *N. gonorrhoeae* и показать незначительные внутривидовые вариации белковых профилей гонококка. Обнаруженный при анализе достаточно большой выборки штаммов низкий уровень гетерогенности белковых *N. gonorrhoeae*, обеспечиваемый консервативностью основных мажорных белков микроорганизма, свидетельствует о возможности и целесообразности использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой идентификации и внутривидовой классификации гонококка.

В дальнейшем представляется необходимым сравнение белковых профилей гонококка и близкородственных видов (*N. meningitidis*, *N. flavescens* и др.) для подтверждения специфичности анализируемого масс-спектра. Развитие методов экстракции белковых фракций непосредственно из биологического материала дает надежду на возможность использования белкового профилирования для прямой идентификации некоторых возбудителей без стадии культивирования на питательных средах.

### **Литература**

1. Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1975; 47: 219-225.
2. Krishnamurthy T., Ross P.L., Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10: 883-888.
3. Despeyroux D., Phillipotts R., Watts P. Electrospray mass spectrometry for detection and characterization of purified cricket paralysis virus (CrPV). *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10: 937-941.
4. Ben L.M., van Baar. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 193-219.

Поступила 17.04.06