

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ВНУТРИВИДОВЫХ ШТАММОВ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ НА ПРИМЕРЕ *Bacillus subtilis*

Айбатова И. С. (лаборант-исследователь ООО «НПО ТН-Биотех»)

Научный руководитель – научный секретарь ООО «НПО ТН-Биотех» Ибрагимов А. М.

Введение

Основной проблемой биотехнологических предприятий является ограниченная разрешающая способность традиционных методов исследования, используемых для идентификации микроорганизмов и создания библиотек штаммов. Разные штаммы одного вида могут обладать кардинально различающимися производственными характеристиками, что не позволяет надежно контролировать чистоту и стабильность промышленно ценных культур. В качестве решения данной проблемы предложен метод идентификации микроорганизмов на приборе MALDI-TOF MS. Этот метод является быстрым, точным и дешевым инструментом для рутинного мониторинга производственных штаммов.

Основная часть

С открытием метода MALDI-TOF MS в 1980-х годах стал возможен анализ рибосомальных белков, на которые не влияют условия культивирования изолятов, благодаря чему они являются своеобразным «отпечатком пальца» бактерий. На протяжении более 50 лет идентификация бактерий и грибов осуществлялась в основном с помощью микроскопии и анализа метаболических признаков с использованием профилей биохимических реакций. Внедрение в последние годы метода MALDI-TOF MS в лабораторную практику позволило использовать его как совершенно новый подход к определению видовой и родовой принадлежности [1]. Благодаря детекции ионов в процессе масс-спектрометрии определяют два параметра: отношение массы ионов к их заряду (m/z) и количество частиц с конкретной величиной m/z . Графически представленную зависимость этих двух величин называют масс-спектром. В MALDI-TOF-MS для видовой идентификации регистрируют различные ионы белков. Чаще всего (но не всегда) они однозарядные, поэтому для MALDI-TOF-MS величину m/z приближенно считают равной молекулярной массе белка. Масс-спектр является непрерывной зависимостью на определенном интервале, но в процессе видовой идентификации обычно используют иную характеристику – масс-спектро-профиль (МСП). Это набор дискретных величин, характеризующих отдельные пики. Собственно, процесс видовой идентификации в MALDI-TOF-масс-спектрометрии представляет собой сравнение по определенному математическому алгоритму оригинального масс-спектро-профиля, полученного из культуры неизвестного микроорганизма, с типовыми масс-спектро-профилями, полученными из культур идентифицированных коллекционных штаммов [2]. Процесс пробоподготовки включает в себя лизис клеток и кокристаллизацию на подложке лизированного материала с веществом-матрицей, функция которой заключается в содействии перехода молекул лизата в газовую фазу и их ионизации. Подложку затем помещают в MALDI-TOF MS, в котором под воздействием импульсов лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом происходят его десорбция и ионизация. Образовавшиеся ионы разделяются в электрическом поле и детектируются, а их масса анализируется с помощью программного обеспечения Biotyper 2.0 [3]. Для оценки влияния условий культивирования на морфологию и протеомные характеристики исследуемых микроорганизмов был проведен посев штаммов *Bacillus subtilis* В-12523 и В-2918 на питательные среды различного состава: мясо-пептонный агар (МПА) и среду Сабуру. В результате культивирования было установлено, что оба штамма проявляют фенотипическую пластичность: наблюдалось изменение морфологии колоний и клеток в зависимости от используемой питательной среды. Данное обстоятельство существенно

затрудняло первичную идентификацию штаммов традиционными микробиологическими методами. Дальнейший анализ с применением метода MALDI-TOF MS показал, что, в отличие от морфологических признаков, белковые профили исследуемых культур являются стабильными видеспецифичными маркерами. Характерные пики на масс-спектро-профиле однозначно соответствовали конкретному штамму (B-12523 или B-2918) и не зависели от состава питательной среды, на которой выращивались бактерии.

Вывод

Эксперимент с двумя штаммами *Bacillus subtilis* наглядно продемонстрировал преимущества MALDI-TOF MS. Было установлено, что, несмотря на сильную фенотипическую пластичность при смене питательной среды, которая затрудняла идентификацию классическими методами, протеомные профили штаммов оставались строго постоянными. Внедрение метода MALDI-TOF MS в практику биотехнологических предприятий является высокоэффективным решением проблемы контроля производственных штаммов. Метод обеспечивает надежную идентификацию на уровне видов и штаммов независимо от внешних условий культивирования, сочетая в себе скорость, точность и экономическую доступность для рутинного мониторинга, что делает его востребованным на рынке промышленных и научных предприятий.

Литература

1. Mechanisms of microorganisms adaptation to different habitat condition: Proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation, Irkutsk, Baikal February 28 – March 6, 2022. Irkutsk, Irkutsk State University Publ., 2022, 291 p.
2. Петров П. П. Применение масс-спектрометрии в изучении клеточных стенок аспергиллов // Mechanisms of microorganisms adaptation to different habitat condition : proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation, Irkutsk, Baikal, February 28 – March 6, 2022. – Irkutsk : Irkutsk State University Publ., 2022. – С. 50-55.
3. Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям местообитания: материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. – Иркутск : Издательство Иркутского государственного университета, 2022. – 291.