

## ПРОТЕОМИКА

©Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV

Ю.А. Беснятых<sup>1\*</sup>, О.А. Маничева<sup>2</sup>, А.В. Смоляков<sup>1,3</sup>, М.З. Догондзе<sup>2</sup>, В.Ю. Журавлев<sup>2</sup>,  
Е.А. Шитиков<sup>1</sup>, Е.Н. Ильина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,  
119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а; эл. почта: JuliaBespyatykh@gmail.com

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт Фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

С использованием безметочного LC-MS/MS подхода проведено сравнительное протеомное профилирование *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, культивированного на двух разных питательных средах: Левенштейна-Йенсена и Миддлбрук 7H11. Показано, что результаты, получаемые на двух средах, обладают высокой сходимостью. Достоверное различие выявлено в представленности лишь для одного белка – фумаратредуктазы FrdB, представленность которой была выше в клетках микобактерий, культивированных на среде Левенштейна-Йенсена. Анализ корреляции биологических повторов выявил наибольшую сходимость на среде Миддлбрук 7H11. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что использование среды Миддлбрук 7H11 наиболее целесообразно в лабораторных условиях.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулёз, протеомика, белки, условия культивирования

**DOI:** 10.18097/PBMC20176304334

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулёз, вызванный *Mycobacterium tuberculosis*, является одной из наиболее значимых проблем здравоохранения в мире. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) Россия относится к 20 странам мира с наибольшим распространением данной инфекции. В настоящее время можно говорить о наметившейся тенденции к снижению заболеваемости, которая, однако, продолжает оставаться на достаточно высоком уровне. Только за 2016 год в стране было выявлено около 100 тысяч вновь заболевших [1].

В последние годы становится очевидно, что для реализации успешной стратегии борьбы с туберкулёзом необходимо системное исследование организации *M. tuberculosis* на молекулярном уровне с привлечением различных “омиксных” технологий. При этом геномная информация является неким шаблоном клетки, напрямую или косвенно кодирующим все остальные молекулы. Реализация данной информации происходит через синтез РНК (транскриптом) и белков (протеом). И если транскриптом является первым, очень динамичным, функциональным шагом, то протеом отражает сумму всех процессов, происходящих в клетке. При этом встаёт вопрос о возможности сопоставления протеомных данных, получаемых в различных проектах (лабораториях), ввиду их потенциальной зависимости от применяемых условий культивирования, в частности, использования различных питательных сред.

Для ряда бактерий показано, что условия культивирования и состав среды могут сильно влиять

на их физиологию. Так, использование в питательной среде в качестве источника углерода вместо глюкозы ацетата сказывается на протеомном профиле *Escherichia coli* [2]. Для *Trichoderma reesei* показаны различия в представленности 29 секретируемых и 36 внутриклеточных белков при использовании в среде лактозы вместо ксилозы. При этом изменения наблюдались не только в белках метаболизма углерода, но и в белках ответа на стресс [3].

Согласно постановлению ВОЗ и Приказу Минздрава РФ №109 от 21 марта 2003 г., в России, как и в большинстве других стран мира, для выявления и последующего анализа возбудителя туберкулёза используют бактериологические методы. В качестве питательных сред рекомендованы среды Левенштейна-Йенсена и Финна-2 [1, 4]. Данные среды являются многокомпонентными и включают гомогенат целых яиц [5], что делает их сложными и трудоёмкими для приготовления, особенно в условиях немедицинских лабораторий. В связи с этим для лабораторных исследований в настоящее время в качестве неселективных питательных сред широко используют жидкие и плотные среды Миддлбрука [4]. Агар Миддлбрук 7H10 – это среда, разработанная в 1947 году. Она обогащена олеиновой кислотой, альбумином и каталазой, предохраняющими микобактерии от воздействия токсичных веществ и способствующих их росту [6]. Одной из модификаций основного агара (7H10) является агар Миддлбрук 7H11, содержащий дополнительно панкреатический гидролизат казеина. Агар Миддлбрук 7H11 стимулирует рост требовательных к питательной среде и устойчивых к лекарственным препаратам штаммов *M. tuberculosis*,

которые плохо растут (или вообще не растут) на агаре Миддлбрук 7Н10 или на других широко используемых средах [7]. Таким образом, данная среда хорошо подходит для культивирования *M. tuberculosis* в условиях *in vitro* и позволяет получать данные по чувствительности к антибиотикам, сопоставимые с результатами, полученными на среде Левенштейна-Йенсена [8-10]. Однако в ряде работ показано, что культуральные свойства микобактерий зависят от состава питательной среды [11, 12]. В частности, после инокуляции микобактерий на чашку со средой Миддлбрук 7Н11 видимые колонии появляются значительно раньше, чем на чашке со средой Левенштейна-Йенсена [13].

В данной работе мы провели сравнительное протеомное профилирование бактериальной массы лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, накопленной на двух разных питательных средах: Левенштейна-Йенсена и Миддлбрук 7Н11.

## МЕТОДИКА

### Культивирование *M. tuberculosis*

Культивирование лабораторного штамма H37Rv проводили на среде Левенштейна-Йенсена ("Becton, Dickinson and Company", США), рекомендованной ВОЗ, и на твердой питательной среде Миддлбрук 7Н11 ("Becton, Dickinson and Company") с добавкой OADC ("Becton, Dickinson and Company") при 35°C 14-16 дней до плотности  $2 \times 10^8$  клеток в мл. На каждой среде штамм H37Rv культивировали в трёх биологических повторах.

Клетки микобактерий отмывали от питательной среды добавлением фосфатно-солевого буфера, содержащего Трис-HCl, 2% тритон X-100 (pH 7,5-8) с последующим центрифугированием 15 мин при 4500 g [14].

### Экстракция белка из клеток микобактерий

Для экстракции белка к полученному осадку клеточной культуры добавляли 10 мкл 100 мМ Трис-HCl pH 7,6 и 5 мкл лизоцима (1 мг/мл; "BioChemica", Великобритания), инкубировали 30 мин при 4°C. Дополнительно добавляли 55 мкл 100 мМ Трис-HCl pH 7,6 и 1 мкл смеси ингибиторов протеаз ("GE Healthcare", Великобритания). Клетки разрушали на гомогенизаторе Bead Beater ("MPBio", США) с использованием 0,5 мм кремний-циркониевых шариков. Затем к суспензии добавляли 20 мкл 20% натрия додецилсульфат ("Sigma Aldrich", США), 10 мкл 1 М ДТТ ("Sigma Aldrich"); инкубировали 30 мин при 60°C и центрифугировали при 16000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и использовали для дальнейшего анализа [15].

Концентрацию белка в белковых экстрактах определяли по методу Bradford [16] с использованием Bradford Protein Assay Kit ("Bio Rad", США).

### Триптическое расщепление белков

Белки фракционировали с помощью одномерного гель-электрофореза (7,5%, 7 см полиакриламидные гели)

в денатурирующих условиях по методу Laemmli [17]. Далее проводили гидролиз белков трипсином в геле согласно методике [18]. Полученные пептиды подвергали очистке с помощью колонок C18 Sep-Pak ("Waters", США). Пептиды элюировали 700 мл раствора, содержащего 75% ацетонитрил и 0,01% трифторуксусную кислоту. Полученные элюаты полностью высушивали на вакуумной сушке SpeedVac ("Thermo Scientific", США) и растворяли в минимальном объеме (20 мкл) раствора, содержащего 5% ацетонитрил и 0,1% муравьиную кислоту [15, 19].

### Масс-спектрометрический анализ

Разделение пептидов осуществляли на хроматографической системе Ultimate 3000 RSLCnano ("Thermo Scientific"). Пептиды разделяли на колонке Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм × 150 мм, 2 мкм размер частиц) ("Thermo Scientific") в градиенте подвижной фазы А (0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, pH 2,66) и подвижной фазы Б (0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, ацетонитрил) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Перед аналитическим разделением пептиды наносили на обогащающую колонку Accalaim μ-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм) ("Thermo Scientific") при скорости потока 20 мкл/мин в течение 3,7 мин в изократическом режиме подвижной фазы В (2% ацетонитрил, 0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, pH 2,63). Разделение проводили в линейном градиенте от 2% до 37% подвижной фазы Б в течение 45 мин, далее промывали колонку при 90% подвижной фазы Б в течение 8 мин и уравнивали в начальных условиях градиента при 2% подвижной фазы Б в течение 15 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном орбитальном масс-спектрометре Orbitrap Fusion ("Thermo Scientific") в режиме положительной ионизации в источнике NSI ("Thermo Scientific"). Температура осушающего газа (азот) составляла 280°C, напряжение на эмиттере – 2,1 кВ. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400 *m/z* до 1200 *m/z*, тандемное сканирование фрагментных ионов от нижней границы 110 *m/z* до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100 *m/z*. Для тандемного сканирования учитывали только ионы в пределах от  $z = 2+$  до  $z = 6+$  по зарядному состоянию. Максимальное число разрешённых для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 было установлено, как не более 20. Максимальное время интеграции для прекурсорных ионов составило не более 50 мс, для фрагментных ионов не более 110 мс.

Идентификацию пептидов проводили с использованием программного пакета Mascot v2.5.1 ("Matrix Science", Великобритания). Для проведения количественного анализа использовали программу Progenesis LC-MS ("Nonlinear Dynamics", США).

Протеомные данные масс-спектрометрического анализа размещены в репозитории PRIDE совместно с ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) под идентификационным номером PXD002542.

## Биоинформатическая обработка данных

Локализацию идентифицированных белков *M. tuberculosis* устанавливали согласно базе данных PSORTdb (<http://db.psort.org/browse/genome?id=13549>). Аннотацию по генной онтологии (Gene Ontology, GO) загружали из базы данных Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Функциональную аннотацию *M. tuberculosis* H37Rv получали из базы данных TubercuList v 2.6 (<http://tuberculist.epfl.ch/>).

Для оценки дифференциальной экспрессии белков использовался уровень значимости  $p < 0,05$ . Для статистического анализа использовали двусторонний тест Стьюдента для независимых выборок. Значение  $p$ -value было скорректировано с учетом множественного тестирования, используя метод Бенджамини-Хохберга [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования служил лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, геном которого был отсекален ещё в 1998 году и который максимально часто используют в системных работах по изучению особенностей микобактерий туберкулёза. Для проведения сравнительного анализа были выбраны две плотные питательные среды, используемые в настоящее время для культивирования микобактерий. Первая – яичная среда Левенштейна-Йенсена, рекомендованная ВОЗ в качестве стандартной среды для первичного выращивания микобактерий туберкулёза и определения их устойчивости к химиопрепаратам (О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации. – N 109. – Минздрав РФ, 21.03.2003). Вторая – неселективная среда Миддлбрук 7H11, широко используемая в лабораторной практике [4]

(табл. 1). При этом стоит отметить, что яичная среда Левенштейна-Йенсена отличается большим содержанием белка, лецитина и витаминов группы В, однако выразить это в абсолютных концентрациях невозможно, так как добавляемый по рецептуре приготовления гомогенат куриных яиц не стандартизован. В свою очередь, среда Миддлбрука 7H11 является полностью унифицированной.

*M. tuberculosis* H37Rv культивировали на плотных питательных средах до плотности  $2 \times 10^8$  клеток в мл, что соответствует поздней логарифмической фазе роста [21]. Также на данной стадии плотность клеток оптимальна для получения белка, в количестве, достаточном для проведения протеомных исследований [19, 22]. Для белкового профилирования был использован безметочный LC-MS/MS подход, который предназначен для идентификации и количественного анализа максимально возможного числа белков бактерий, что позволяет проводить сравнение на уровне тотального протеома.

В результате LC-MS/MS экспериментов накоплено 1440658 MS/MS спектров, которые соответствуют 20538 уникальным пептидам (доля ложноположительных идентификаций  $< 5\%$ ). Согласно данным протеомного анализа в общей сложности было идентифицировано 2230 белков штамма H37Rv. Из них для культуры, выделенной со среды Левенштейна-Йенсена, идентифицировано 2226 белков, а со среды Миддлбрук 7H11 – 2196 белков. При этом выявлено 2192 общих белка и обнаружены пулы белков, которые встречались исключительно в культуре *M. tuberculosis* H37Rv, выросшей на среде Левенштейна-Йенсена ( $n=34$ ) (табл. 2) и на среде Миддлбрук 7H11 ( $n=4$ ) (табл. 3). Отдельно стоит отметить 3-фосфатидилтрансферазу (Rv1822), выявленную только в культуре, выросшей

Таблица 1. Сравнительный состав питательных сред Левенштейна-Йенсена и Миддлбрук 7H11

Левенштейна-Йенсена, г/л	Миддлбрук 7H11, г/л
Магния сульфат 0,24	Магния сульфат 0,05
	Натрия сульфат 1,5
	Аммония сульфат 0,5
Калия дигидрофосфат 2,4	Калия дигидрофосфат 1,5
	Натрия гидрофосфат 1,5
Магния цитрат 0,6	Железа аммонийного цитрат 0,04
L-аспарагин 3,6	L-глутаминовая кислота 0,5
	Пиридоксин 0,001
	Биотин 0,0005
Глицерин 12 мл/600мл	Глицерин 2,5 мл
	Ферментативный гидролизат казеина 1,0
Малахитовый зелёный 0,4	Малахитовый зелёный 0,001
Картофельная мука 30,0	Агар-агар 15,0
Конечное значение pH (при 25°C) $7,0 \pm 0,2$	Конечное значение pH (при 25°C) $6,6 \pm 0,2$
Добавки	
мл/на 600 мл среды	г/на 500 мл среды
яичная эмульсия 1000	Натрия хлорид 0,425
	Олеиновая кислота 0,025
	Каталаза 0,002
	Глюкоза 1,0
	Бычий альбумин (фракция V) 2,5

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ *M. TUBERCULOSIS*

Таблица 2. Белки, идентифицированные исключительно в культуре *M. tuberculosis* H37Rv, выросшей на среде Левенштейна-Йенсена

Белок	Аннотация согласно TubercuList	COG категория	Локализация
Клеточная стенка и клеточные процессы			
Rv0835	липопротеин LpqQ	-	цитоплазма
Rv1008	дезоксирибонуклеаза TatD	COG0084L	цитоплазма
Rv1362c	мембранный белок	-	не известна
Rv2387	гипотетический белок	COG3329R	цитоплазматическая мембрана
Rv3483c	гипотетический белок	-	не известна
Rv3694c	трансмембранный белок	COG1300S	цитоплазматическая мембрана
Rv3880c	белок EspL, ассоциированный с системой секреции ESX-1	-	не известна
Промежуточный метаболизм и дыхание			
Rv0032	8-амино-7-оксоноаноатсинтаза	COG0156H	цитоплазма
Rv0319	пирролидон-карбоксилатная пептидаза	COG2039O	цитоплазма
Rv0865	белок биосинтеза молибдоптерина	COG0521H	не известна
Rv1059	гипотетический белок	COG3804S	цитоплазма
Rv1333	гидролаза	COG3191EQ	цитоплазматическая мембрана
Rv1377c	трансфераза	COG2227H	цитоплазма
Rv2409c	гипотетический белок	COG1305E	цитоплазма
Rv2604c	глутамин амидотрансфераза SnoP	COG0311H	цитоплазма
Rv2786c	бифункциональная рибофлавинкиназа / FMN аденилаттрансфераза	COG0196H	цитоплазма
Rv2857c	дегидрогеназа короткой цепи/ редуктаза	COG1028IQR	цитоплазма
Rv2899c	белок FdhD	COG1526C	цитоплазма
Rv3529c	гипотетический белок	-	цитоплазма
Rv3538	дегидрогеназа	COG2030I	не известна
Липидный метаболизм			
Rv0975c	ацил-КоА-дегидрогеназа FadE13	COG1960I	цитоплазма
Rv1822	CDP-диацилглицерол-глицерол-3-фосфат 3-фосфатидилтрансфераза	COG0558I	цитоплазматическая мембрана
Rv3252c	трансмембранная алкан 1-монооксигеназа AlkB	COG3239I	цитоплазматическая мембрана
Регуляторные белки			
Rv0181c	гипотетический белок	COG1741R	не известна
Rv0474	регулятор транскрипции НТН-типа	COG1396K	цитоплазма
Rv1828	регулятор транскрипции НТН-типа	COG0789K	цитоплазма
Консервативно гипотетические белки			
Rv0250c	гипотетический белок	-	цитоплазма
Rv0358	гипотетический белок	-	цитоплазматическая мембрана
Rv1929c	гипотетический белок	-	цитоплазматическая мембрана
Rv2901c	гипотетический белок	-	цитоплазма
Инсерционные элементы и фаги			
Rv3191c	транспозаза	COG2826L	цитоплазма
Белки семейства PE/PPE			
Rv3873	белок PPE68 семейства PPE	COG5651N	цитоплазматическая мембрана
Вирулентность, детоксификация, адаптация			
Rv3757c	глицин бетаин / карнитин / холин / L-пролин ABC транспортер пермеаза ProW	COG1174E	цитоплазматическая мембрана

Таблица 3. Белки, идентифицированные исключительно в культуре *M. tuberculosis* H37Rv, выросшей на среде Миддлбрук 7H11

Белок	Аннотация согласно TubercuList	COG категория	Локализация
Клеточная стенка и клеточные процессы			
Rv0531	мембранный белок	-	цитоплазматическая мембрана
Rv1315	UDP-N-ацетилглюкозамин 1-карбоксивинилтрансфераза	COG0766M	цитоплазма
Промежуточный метаболизм и дыхание			
Rv2001	гипотетический белок	COG3884I	цитоплазма
Информационные пути			
Rv3585	белок репарации RadA	COG1066O	цитоплазма

на среде Левенштейна-Йенсена. Данный фермент участвует в синтезе фосфатидилинозитола [23] из глицерина, содержание которого значительно выше в среде Левенштейна-Йенсена (табл. 1). Фосфатидилинозитол является важным компонентом цитоплазматической мембраны микобактерий, который, по-видимому, участвует в Sec-зависимом транспорте веществ [24].

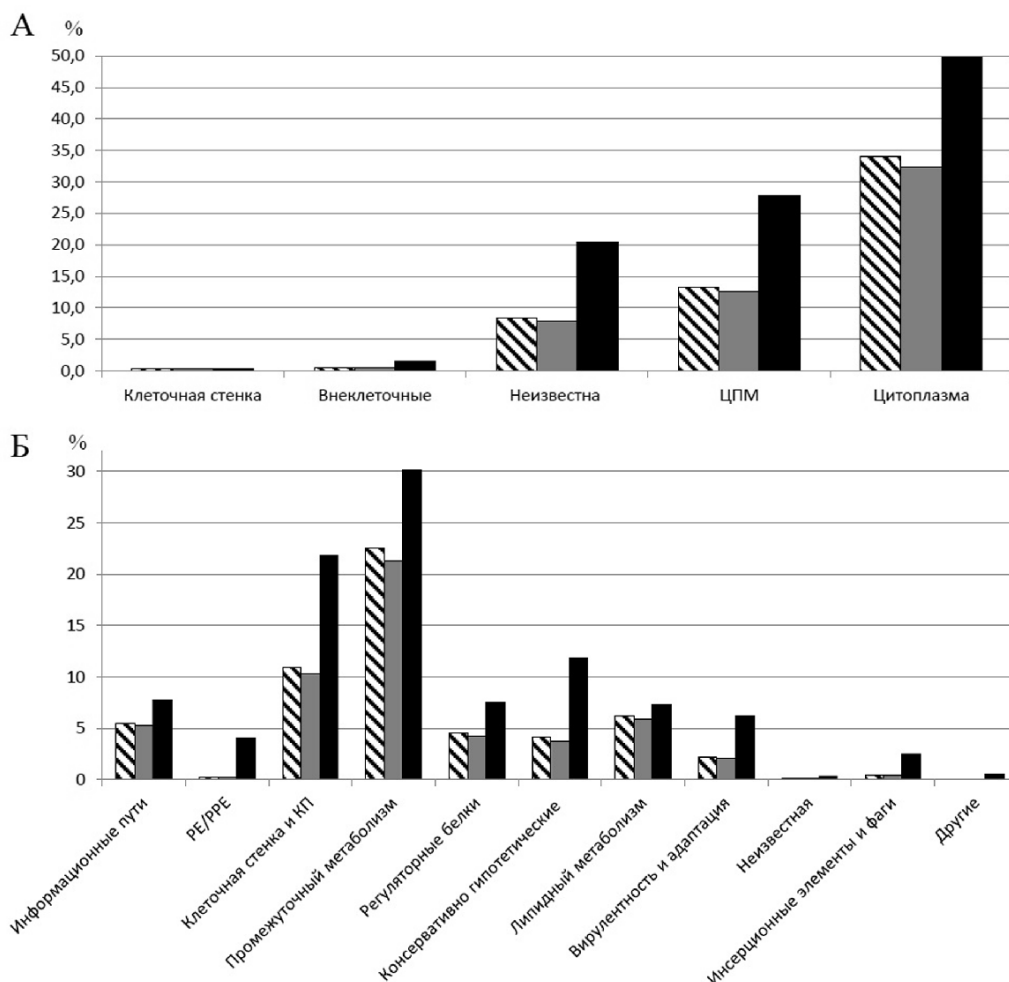
Дополнительно для анализа сходимости результатов, полученных на двух питательных средах, был проведен корреляционный анализ биологических повторов и распределения белков, согласно локализации и функциональным категориям.

Биологические повторы штаммов, культивированных на агаре Миддлбрук 7H11 (усреднённая корреляция = 0,987, среднеквадратическое отклонение = 0,009), проявляли более высокую корреляцию по сравнению со штаммами, выращиваемыми на среде Левенштейна-Йенсена (усреднённая корреляция = 0,79, среднеквадратическое отклонение = 0,062). Предположительно, это связано с тем, что данная среда является более

сбалансированной по химическому составу, что позволяет добиться максимальной синхронизации культур, в отличие от сложной яичной среды Левенштейна-Йенсена.

Идентифицированным белкам была приписана клеточная локализация, согласно PSORTdb v 3.0 (рисунок, А). Как видно из рисунка, мы детектируем белки из всех компартментов клетки. Стоит отметить, что выявлены все 12 белков клеточной стенки. Данные белки являются сильно гидрофобными, и их наличие свидетельствует о том, что используемый в данной работе метод протеомного анализа обеспечивает надежную идентификацию протеома *M. tuberculosis*.

На следующем этапе для сравнимых образцов был проведён анализ распределения белков по функциональным категориям, согласно TubercuList v 2.6 (рис. Б). Низкий процент идентификации белков семейства PE/PPE (ProGlu (PE)/ProProGlu (PPE)), инсерционных элементов и фагов обусловлен отсутствием в них триптических сайтов и согласуется с проведёнными ранее исследованиями [19, 22, 25, 26].



**Рисунок.** Функциональное распределение идентифицированных белков. Белки, идентифицированные для штамма H37Rv, культивированного на среде Левенштейна-Йенсена (чёрно-белые полосы столбец), на среде Миддлбрук 7H11 (серый столбец) и все аннотированные, согласно базе данных, (чёрный столбец) были распределены: А. в соответствии с их локализацией по данным PSORTdb v 3.0 (<http://db.psорт.org/>); Б. по функциональным категориям в соответствии с TubercuList v 2.6 (<http://tuberculist.epfl.ch>). ЦПМ - цитоплазматическая мембрана, КП - клеточные процессы.

Полученные данные свидетельствуют о равномерном распределении по всем категориям и локализации белков штаммов, культивированных на обеих питательных средах. Всё это позволяет заключить, что состав питательной среды не оказывает существенного влияния на качественный состав белков микобактерий.

Принимая во внимание, что состав питательной среды может влиять не только на качественный состав белков, но и на их количественную представленность [3, 27, 28], нами проведен сравнительный количественный анализ 2000 белков микобактерий, культивируемых на разных питательных средах. При этом достоверные различия были получены только для одного белка, фумаратредуктазы (Rv1553/FrdB) ( $p < 0,05$ ). Представленность этого фермента была в 10 раз выше в клетках микобактерий, культивируемых на среде Левенштейна-Йенсена. Фумаратредуктаза (EC:1.3.5.4) является одним из ферментов цикла трикарбоновых кислот и осуществляет обратимое восстановление фумарата до сукцината. В катаболических процессах фермент задействован в акцептировании электронов, что ведёт к запасанию АТФ в клетке. Таким образом, можно сделать предположение, что на среде Левенштейна-Йенсена микобактерии нуждаются в большей энергии, что обеспечивается за счёт увеличенного синтеза фумаратредуктазы.

Дополнительно мы проанализировали различия в системе метаболизма биотина, являющегося одним из основных факторов роста бактерий. Содержание витамина в двух анализируемых средах различно, в связи с чем мы ожидали увидеть изменения на уровне количественной протеомики. Так в среде Левенштейна-Йенсена, в состав которой входит яичная эмульсия, содержание биотина значительно выше, чем в агаре Миддлбрук. При этом глюкоза, содержание которой в неселективном агаре выше, выступает в качестве субстрата для биосинтеза биотина *de novo* [29]. Следовательно, бактерии, культивируемые на среде Левенштейна-Йенсена, могут использовать экзогенный биотин, который будет ингибировать транскрипцию генов соответствующего оперона. В свою очередь, бактерии, растущие на среде Миддлбрук, напротив, будут активно синтезировать биотин. Согласно полученным данным, белки биотинового оперона (Rv1589/BioB, Rv1570/BioD, Rv1569/BioF1, Rv0032/BioF2) и его репрессор (Rv3279c/BirA) были выявлены в обеих группах микобактерий. При этом в клетках, выросших на среде Левенштейна-Йенсена, представленность Rv3279c/BirA была выше, а белков оперона, напротив, ниже, чем в клетках на среде Миддлбрук. Однако эти различия в представленности являются статистически незначимыми. Таким образом, можно сделать предположение, что состав питательной среды влияет на синтез биотина, но несущественно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной работе проведено протеомное профилирование лабораторного штамма *M. tuberculosis*

H37Rv, культивированного на двух разных плотных питательных средах: Левенштейна-Йенсена и Миддлбрук 7H11. Показано отсутствие достоверно значимого влияния состава питательной среды на протеомный профиль микроорганизма. Однако в ходе корреляционного анализа биологических повторов было установлено, что их сходимость значительно выше для штамма, выросшего на среде Миддлбрук 7H11. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что хотя агар Миддлбрук 7H11 не является средой, рекомендованной ВОЗ, его использование наиболее целесообразно в лабораторных условиях для получения максимально синхронизированных культур.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н., профессору РАН, заведующему лабораторией системной биологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Згоде Виктору Гавриловичу, за проведение масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрические данные получены с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека" Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01412).

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO (2016) Global Tuberculosis Report, **13**, 13-14, ISBN 978 92 4 156539 4.
2. Treitz C., Enjalbert B., Portais J.-C., Lelisse F., Tholey A. (2016) Proteomics, **16**, 2742-2746.
3. Jun H., Guangye H., Daiwen C. (2013) Proteomics, **89**, 191-201.
4. Воробьев А.А., Быков А.С. (2003) Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. - М.: МИА, 346-403.
5. Dorset M. (1903) Science, **17**, 374.
6. Dubos R., Middlebrook G. (1947) Am. Rev. Tuberc., **56**, 334-345.
7. Cohn M.L., Waggoner R.F., McClatchy J.K. (1968) Am. Rev. Respir. Dis. **98**, 295-296.
8. Abuali M.M., Katariwala R., LaBombardi V.J. (2012) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **31**(5), 835-839.
9. Hall L., Jude K.P., Clark S.L., Wengenack N.L. (2011) J. Vis. Exp., **52**, pii: 3094.
10. Hall L., Jude K.P., Clark S.L., Dionne K., Merson R., Boyer A. (2012) J. Clin. Microbiol., **50**(11), 3732-3734.
11. Faburay A.K., Mendy F.S., Otu J.K., Faal-Jawara T.I., Gehre F., Secka O. (2016) Int. J. Mycobacteriol., **5**, Suppl 1:S169, DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.019
12. Joloba M.L., Johnson J.L., Feng P.J., Bozeman L., Goldberg S.V., Morgan K., Gitta P., Boom H.W., Heilig C.M., Mayanja-Kizza H., Eisenach K.D. (2014) Tuberculosis (Edinb.), **94**, 311-316.
13. Макарова М.В., Левченко Т.Н., Фрейман Г.Е. (2009) Журн. микробиол., **3**, 7-10.
14. Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Zimny-Arndt U., Raupach B. (1999) Mol. Microbiol., **33**(6), 1103-1117.

15. Беснятых Ю.А. (2016) Геномная и протеомная характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis* кластера Beijing B0/W148. Дисс. канд. наук. НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва.
16. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
17. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**(5259), 680-685.
18. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. (2006) Nat. Protoc., **1**(6), 2856-2860.
19. Bespyatykh J., Shitikov E., Butenko I., Altukhov I., Alexeev D., Mokrousov I., Dogonadze M., Zhuravlev V., Yablonsky P., Ilina E. (2016) Sci Rep., **6**, 28985. DOI:10.1038/srep28985
20. Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) J. Royal Statistic. Society, Series B (Methodological), **57**, 289-300.
21. Маничева О.А., Догонадзе М.З., Мельникова Н.Н., Соловьева Н.С., Змазнова А.Е., Вишневецкий Б.И. (2015) МедАльянс, **1**, 86.
22. Беснятых Ю.А., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. (2017) Acta Naturae, **9**, 16-26.
23. Шлегель Г. (1987) Общая микробиология. М: "Мир", 436-447.
24. Rigel N.W., Braunstein M. (2008) Mol. Microbiol., **69**(2), 291-302.
25. Schubert O.T., Mouritsen J., Ludwig C., Rost H.L., Rosenberger G. (2013) Cell Host Microbe., **13**(5), 602-612.
26. de Keijzer J., de Haas P.E., de Ru A.H., van Veelen P.A., van Soolingen D. (2014) Mol. Cell Proteomics, **13**(10), 2632-2645.
27. Lu X., Sun J., Nimtz M., Wissing J., Zeng A-P., Rinas U. (2010) Microb. Cell, **9**(23), DOI: 10.1186/1475-2859-9-23
28. Caglar M.U., Houser J.R., Barnhart C.S., Boutz D.R., Carroll S.M., Dasgupta A., Lenoir W.F., Smith B.L., Sridhara V., Sydykova D.K., Vander Wood D., Marx C.J., Marcotte E.M., Barrick J.E., Wilke C.O. (2017) Sci. Rep., **7**, 45303. DOI: 10.1038/srep45303.
29. Наумова Е.С. (1984) Образование биотина различными группами микроорганизмов и некоторые аспекты его регуляции. Дисс. канд. наук. МГУ им. Ломоносова, Москва.

Поступила: 23. 06. 2017.  
Принята к печати: 30. 06. 2017.

## INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE PROTEOMIC PROFILE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV

J.A. Bespyatykh<sup>1</sup>, O.A. Manicheva<sup>2</sup>, A.V. Smolyakov<sup>1,3</sup>, M.Z. Dogonadze<sup>2</sup>, V.Yu. Zhuravlev<sup>2</sup>, E.A. Shitikov<sup>1</sup>, E.N. Ilina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine,  
1a Malaya Pirogovskaya, Moscow, 119435 Russia; e-mail: JuliaBespyatykh@gmail.com

<sup>2</sup>Research Institute of Phtisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

Comparative proteomic profiling of *M. tuberculosis* H37Rv strains cultured on two different nutrient media, Levenstein-Jensen and Middlebrook 7H11, was performed using a label-free LC-MS/MS approach. It was shown that results obtained from two media possessed high convergence. The only difference was observed in the representation of fumarate reductase FrdB, its abundance was higher in the mycobacterial cells cultured on Levenstein-Jensen medium. The correlation analysis of biological repeats revealed the high convergence of the results obtained from Middlebrook 7H11 medium. Thus, we can conclude that the use of the Middlebrook 7H11 medium is most appropriate in the scientific laboratory.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, proteomics, proteins, cultivation conditions