

Т.А.Полунина, Ю.С.Варшавская, С.П.Заднова, Я.М.Краснов

**ПРИМЕНЕНИЕ 2D-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «БЕЛКОВЫХ ПОРТРЕТОВ» ЛИЗАТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель работы:** применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций. **Материалы и методы.** «Белковые портреты» получали на модели нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор М-888 и штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °С. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий образец лизата штамма *E. coli*. SDS-PAGE-электрофорез проводили классическим методом Laemmli, в основу постановки 2D-электрофореза положены метод O'Farrell и рекомендации производителя. Для визуализации белков электрофореграммы окрашивали Кумасси синим G-250 или нитратом серебра. Концентрацию белка измеряли методом Бредфорда. Образцы клеточных лизатов очищали от небелковых примесей с помощью набора ReadyPrep 2-D Cleanup Kit. **Результаты и выводы.** Описан высокоэффективный комплексный метод разделения смеси белков, включающий этап приготовления образцов бактериальных культур в результате разрушения клеток ультразвуком в лизирующем буфере, их очистку и дальнейший анализ в одном направлении по заряду в градиенте pH, в другом направлении – по молекулярной массе методом SDS-PAGE-электрофореза. После окрашивания 2D-гели анализировали с помощью программного обеспечения Dymension мультифункциональной системы гель-документирования Syngene. Использование для ИЭФ стрипов с иммобилизованным градиентом pH заданного диапазона, коммерческих наборов реактивов и полиакриламидных гелей больших размеров позволило оптимизировать условия проведения 2D-электрофореза, сократить время, увеличить точность и воспроизводимость анализа. На модели лизатов нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор М-888 и штамма *Y. pestis* EV, выращенного при 28 и 37 °С, с помощью 2D-электрофореза получены «белковые портреты» изучаемых штаммов, показана высокая эффективность метода и возможность его использования для изучения динамики экспрессии генов возбудителей особо опасных инфекций.

**Ключевые слова:** 2D-электрофорез, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Полунина Татьяна Алексеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru

Т.А. Polunina, Yu.S. Varshavskaya, S.P. Zadnova, Ya.M. Krasnov

**Application of 2-D Electrophoresis for the Construction of “Protein Profiles” of Bacterial Cultures Lysates of Particularly Dangerous Infections Agents**

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study is to deploy 2-D electrophoresis for the construction of lysate “protein profiles” of bacterial cultures of particularly dangerous infections. **Materials and methods.** “Protein profiles” are obtained on the model of non-toxigenic *V. cholerae* biovar El Tor M-888 strain and *Y. pestis* EV NIEG strain, cultivated at 28 and 37 °C. Commercial sample of *E. coli* strain lysate serves as comparator (reference) product. SDS-PAGE-electrophoresis is carried out following classical Laemmli approach. 2D-electrophoresis is based on O'Farrell technique and manufacturer's recommendations. For protein visualization, staining of electrophoregrams with coomassie blue G-250 and silver nitrate is used. Protein concentration (load) is evaluated with the help of Bradford protein assay. Cell lysate samples are purged of non-protein impurities applying Ready Prep 2-D Cleanup Kit. **Results and conclusions.** Described is a highly effective complex method of protein mixture separation, which assumes preparation of bacterial culture probes where cells are fractured under ultrasonic exposure in the lysing buffer, then purified and analyzed either in reference to the charge in pH gradient, or – to molecular mass in SDS-PAGE-electrophoresis. After the staining 2-D gels are assayed by means of “Dymension” software product, installed on the platform of multi-functional gel documentation system “Syngene”. Utilization of stripes with immobilized pH gradient of a preset range, commercial reagent kits, and large-sized polyacrylamide gels has allowed for optimization of the conditions for performing 2D-electrophoresis, reduction of the time elapsed, and improvement of accuracy and reproducibility. On the model of non-toxigenic *V. cholerae* biovar El Tor M-888 strain and *Y. pestis* EV NIEG strain, cultivated at 28 and 37 °C, applying 2D-electrophoresis, obtained are the protein “profiles” of the investigated strains, demonstrated is high efficacy of the method and possibility of its deployment for studies of gene expression dynamics as regards agents of particularly dangerous infections.

**Key words:** 2D-electrophoresis, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Tatiana A. Polunina, e-mail: rusrapi@microbe.ru

Citation: Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. Application of 2-D Electrophoresis for the Construction of “Protein Profiles” of Bacterial Cultures Lysates of Particularly Dangerous Infections Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:97–101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101

Развитие протеомики обусловлено использованием основных протеомных технологий, таких как SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide

gel electrophoresis) и двумерный (2D – two dimensional) гель-электрофорез, лазерная захватывающая микродиссекция, комбинация методов 2D-электрофореза и

времяпролетной масс-спектрометрии (фингерпринтинг), хромато-масс-спектрометрия, а также микро-чиповые и биосенсорные технологии.

Объектами протеомных исследований часто являются культуры клеток или ткани, которые представляют собой сложные смеси белков. Одномерный электрофорез не способен фракционировать смеси, содержащие более 100 белков, поэтому он не пригоден для полноценного анализа клеточных лизатов или других биологических жидкостей. Для решения этой проблемы используют 2D-электрофорез, который представляет собой высокоэффективный комплексный метод разделения смеси белков в одном направлении по заряду в соответствии с градиентом pH, – изоэлектрофокусирование (ИЭФ), в другом направлении – согласно их молекулярной массе с помощью SDS-PAGE электрофореза. В результате компьютерного анализа 2D-гелей с помощью системы гель-документирования осуществляют сопоставление, поиск одинаковых белковых зон, калибровку, подсчет и сравнение белковых пятен по интенсивности, молекулярной массе (MW) и изоточке (pI – isoelectric point). Это первый шаг к получению объективного изображения распределения общего количества фракционированных белков – «белкового портрета» изучаемого объекта. Полученные данные обрабатываются и передаются в автоматические системы для дальнейшего анализа пятен. Для построения протеомных карт исследуемое пятно вырезают, подвергают ферментативному гидролизу и идентифицируют с помощью масс-спектрометрического анализа.

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» ведутся интенсивные молекулярно-генетические исследования механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств возбудителей чумы и холеры. Большой интерес представляет возможность получения протеомных карт исследуемых штаммов, позволяющих анализировать на белковом уровне изменения функциональной активности различных генов в результате воздействия факторов окружающей среды.

Целью работы является применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций.

### Материалы и методы

Для получения двумерных гелей в работе использовали лизаты нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор M-888 и штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C, в качестве препарата сравнения – коммерческий препарат лизата штамма *E. coli* с концентрацией белка 1,35 мг/мл из набора для изофокусирования «2-D Starter Kit» (Bio-Rad, US).

SDS-PAGE электрофорез проводили классическим методом Laemmli [7], в основу постановки 2DE

положен метод O'Farrel, а также рекомендации фирмы производителя [3, 8, 9]. Для визуализации белков электрофореграммы окрашивали Кумасси синим G-250 [2] или нитратом серебра [10].

Образцы клеточных лизатов возбудителей чумы и холеры получали из бактериальных культур, засеянных в пробирки с элективной питательной средой и инкубированных в оптимальном режиме для данного вида. Лизирующий буфер (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % CHAPS, 0,5 % Triton X-100, 20 mM Tris-base, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 65 mM DTT, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA или 5 mM PMSF) добавляли к осадкам клеток в соотношении 1 мл на 100 мг мокрого осадка клеток. После добавления буфера клетки ресуспендировали и обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе Bioruptor UCD-200 (Diagenode, США) циклом озвучивания 30 с ON, 30 с OFF в течение 10 мин при частоте 60 кГц в ледяной бане (рекомендации производителя). После обработки ультразвуком образцы оставляли в лизирующем буфере на 2 ч при комнатной температуре, периодически взбалтывая на вортексе. Затем образцы центрифугировали (Mini Spin Eppendorf, Германия) при 13 тыс. об/мин в течение 10 мин, супернатант собирали в чистые микропробирки и контролировали на специфическую стерильность согласно инструкции [1].

Концентрацию белка в пробах измеряли методом Бредфорда [4] в пластиковых прозрачных УФ-кюветах с длиной оптического пути 10 мм и объемом 800 мкл на сканирующем спектрофотометре Biowave II (Biochrom, UK) при длине волны 595 нм.

Образцы клеточных лизатов очищали от небелковых примесей с помощью набора ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, US).

2D-электрофореграммы анализировали с помощью ПО Dymension multifункциональной системы гель-документирования Syngene (G:BOX Chemi XT4, UK).

### Результаты и обсуждение

До настоящего времени 2D-электрофорез остается одним из основных методов пробоподготовки в протеомике, позволяющим одновременно разделять и анализировать значительное количество белков исследуемого образца. Метод широко используется в исследованиях зарубежными авторами, однако в отечественной литературе применение метода для изучения белкового состава штаммов возбудителей особо опасных инфекций представлено недостаточно.

Условия проведения 2D-электрофореза отрабатывали на коммерческом образце лизата штамма *E. coli*. Первым этапом проведения 2D-электрофореза является ИЭФ-разделение белков в градиенте pH за счет их различий в pI, зависящей от аминокислотного состава белка. Градиент pH создается специальными амфотерными веществами – амфолитами, обладающими хорошей электропроводимостью и бу-

ферной емкостью. Вначале для ИЭФ мы использовали стеклянные трубочки, заполненные гелем. Однако метод имеет существенные недостатки, связанные с длительностью и трудоемкостью этапа получения цилиндрических гелей. Кроме того, амфолиты в стеклянных трубочках находятся в свободном состоянии, поэтому создаваемый ими в электрическом поле градиент pH был нестабилен. Это значительно снижало точность и воспроизводимость анализа. Эту проблему удалось решить при использовании для ИЭФ коммерческих IPG (immobilized pH gradient) стрипов (BioRad, US) с иммобилизованным градиентом pH, при котором группы с кислотными и щелочными свойствами закреплены на геле.

Нанесение образцов на стрипы проводили одновременно с регидратацией в буфере (8 M Urea, 2 % CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 % Ampholytes pH 3–10, 0,001 % Bromphenol blue) на платформе Protean IEF Cell при 20 °C и 50 мкА в течение 12 ч. Во время регидратации стрипы заливали парафиновым маслом для предотвращения высыхания геля, кристаллизации мочевины и окисления белков кислородом воздуха.

ИЭФ стрипов проводили в режиме: 20 °C, 250 V – 30 мин, 10000 V – 2 ч (линейное изменение напряжения), 10000 V (быстрое изменение напряжения) – до набора 43000 вольт-часов (Vh), затем стрипы оставляли при 1000 V.

Для проведения второго направления разделения белков по молекулярной массе стрипы уравнивали по 10 мин в буфере I (6 M Urea, 2 % SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 20 % glycerol, 2 % DTT) и буфере II (6 M Urea, 2 % SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 20 % glycerol, 2,5 % iodoacetamide). В результате под действием анионного детергента SDS белки приобретали отрицательный заряд. Затем стрип помещали на пластину полиакриламидного геля и фиксировали расплавленной агарозой. SDS-PAGE электрофорез проводили в режиме: 100 V – 1,5 ч, 300 V – до конца прохождения красителя.

Для проявления белковых пятен применяют техники окрашивания раствором Кумасси синего, нитратом серебра или флуоресцентными красителями. Однако Кумасси выявляет белки только в достаточно большой концентрации, так при окрашивании Кумасси R-250 пятно должно содержать не < 10 мкг белка. На порядок более высокой чувствительностью обладает краситель Кумасси G-250. Окрашивание нитратом серебра позволяет выявлять содержание белка в пятне менее 1 нг. Недостатком метода является его чувствительность к температуре, что приводит к низкой воспроизводимости результатов по сравнению с другими методами [2]. При необходимости для повышения точности анализа белки можно окрашивать не одним красителем, например, Кумасси и нитратом серебра, или использовать флуоресцентные красители.

После окрашивания 2D-электрофореграмм лизата штамма *E. coli* раствором Кумасси синего

G-250 или нитратом серебра их анализировали с помощью программного обеспечения системы геледокументирования Syngene. Для получения калибровочных 2D-гелей был проведен 2D-электрофорез маркеров молекулярной массы белков 14,4–116,0 кДа (PageRuler™ Fermentas) и стандартных маркеров белков для 2D-электрофореза с молекулярной массой 17,5–76,0 кДа и pI 4,5–8,5 (Bio-Rad, US) на стрипах длиной 17 см с линейным градиентом pH 3–10 и 4–7, относительно которых автоматически проводили дальнейший обсчет MW и pI всех полученных гелей.

Результаты компьютерного анализа лизата штамма *E. coli* представлены в виде отчета, который содержит название образца, изображение геля и таблицу результатов, включающую информацию об общем количестве выявленных пятен (361), их порядковый номер, а также характеристику каждого пятна по MW и pI.

Таким образом, на модели лизата штамма *E. coli* отработаны оптимальные условия проведения 2D-электрофореза и получен «белковый портрет» фракционирования общего количества белков кишечной палочки в зоне градиента pH 4–7.

На следующем этапе 2D-электрофорез был применен для получения «белковых портретов» лизатов нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор M-888 и штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C. Следует отметить, что для успешного проведения 2D-электрофореза очень важным является этап пробоподготовки. Здесь необходимо стремиться к максимальной экстракции белков из образцов и поддержанию их в растворенном состоянии. Этим требованиям отвечают лизаты бактериальных культур, для приготовления которых клетки разрушают механически, применяя процедуру «замораживание-оттаивание», обрабатывают ультразвуком или продавливают через френч-пресс, а также подвергают солюбилизации лизирующими растворами. В качестве солюбилизирующих химических агентов чаще всего используют мочевины и тиомочевину, детергенты CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate), NP-40 (nonidet P-40), Тритон X-100, которые разрушают водородные и гидрофобные связи в белках и способствуют разворачиванию белковой глобулы с сохранением индивидуальной для каждого белка последовательности аминокислотных остатков. Возможные нежелательные окислительные модификации белков устраняются добавлением к образцам восстанавливающих агентов, таких как дитиотреитол (ДТТ) или дитиозритрол (ДТЕ). Восстановители разрывают дисульфидные связи белков, предотвращая образование пептидных олигомеров и межбелковых взаимодействий. Использование в составе солюбилизирующих растворов ингибиторов протеаз, например PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), необходимо для предотвращения протеолитической деградации белков, которая приводит к появлению дополнительных полос на геле и снижению количества белка в основном



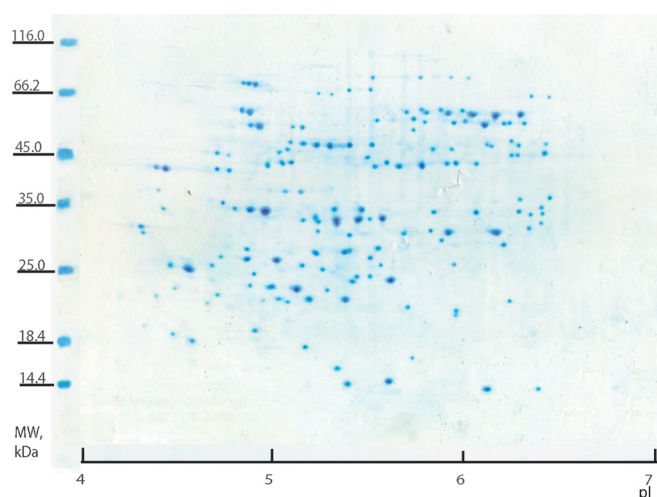


Рис. 1. 2D-гель лизата штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор 888 Ctx<sup>-</sup>, ИЭФ на стрипе 17 см с диапазоном pH 4–7 и белковой нагрузкой ~ 400 мкг, окраска Кумасси синим G-250

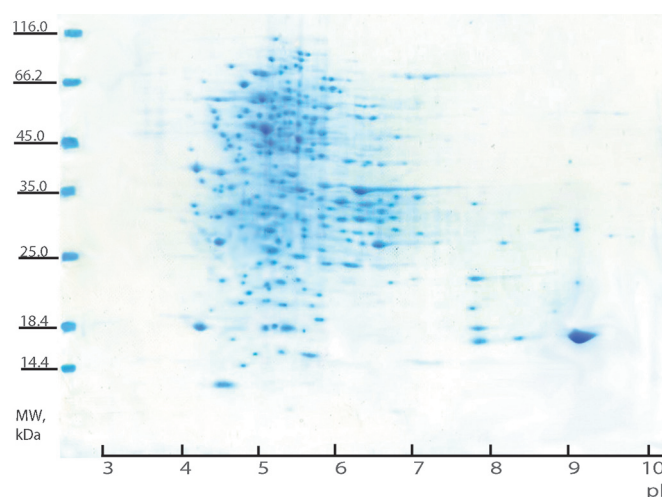


Рис. 2. 2D-гель лизата штамма *Y. pestis* EV, выращенного при 37 °С, ИЭФ на стрипе 17 см с диапазоном pH 3–10 и белковой нагрузкой ~ 400 мкг, окраска Кумасси синим G-250

пятне. Кроме того, клеточные экстракты белков могут содержать примеси солей, фосфолипидов и полисахаридов, которые могут модифицировать белки, а также нуклеиновые кислоты, способные связываться с белками и увеличивать вязкость исследуемых растворов. Протокол получения клеточных лизатов возбудителей чумы и холеры приведен выше.

При анализе 2D-гелей возбудителей чумы и холеры было показано, что белки лизатов штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор фракционируются в пределах градиента pH 4–7 (рис. 1), а штамма *Y. pestis* EV распределяются в пределах градиента pH 3–10 неоднородно, образуя скопление пятен в зоне pH 4–7 (рис. 2), что соответствует литературным данным [5, 6]. Такие условия проведения 2D-электрофореза штаммов N16961 (Бангладеш) и C3294 (Бразилия) использованы при получении референс карты белков *V. cholerae* биовара Эль Тор на стрипах длиной 18 см в диапазоне pH 4–7 [6], а при изучении различий в экспрессии генов протеома *Y. pestis* штамма KIMS D27 при выращивании его в различных температурных условиях и концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в культуральной среде 2D-электрофорез проводили на стрипах 24 см с нелинейным градиентом pH 3–10 [5]. Поэтому для достижения наибольшего разрешения белковых пятен ИЭФ лизатов штаммов *E. coli* и *V. cholerae* биовара Эль Тор проводили на стрипах длиной 17 см с диапазоном pH 4–7, а лизатов штамма *Y. pestis* EV, выращенного при 28 и 37 °С – на стрипах этого размера с диапазоном pH 3–10 и 4–7. Кроме того, для определения зоны фракционирования белков предварительно ИЭФ всех образцов проводили на стрипах длиной 7 см с градиентом pH 3–10.

При компьютерном анализе 2D-гелей лизатов нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор выявлено 286 белковых пятен, штамма *Y. pestis* EV (28 и 37 °С) – 206 и 269 соответственно, а при исследовании лизатов этих культур одномерным электрофорезом детектировано не более 40 белковых полос. При сравнении 2D-гелей лизатов штамма *Y. pestis*

EV, выращенного при различных температурных режимах, отчет представлен изображением наложения двух гелей, где главный образец (лизат 37 °С культуры) показан пурпурным цветом, наложенный образец (лизат 28 °С культуры) – зеленым, а перекрывающиеся пятна – серым. Кроме того, контуры совпадающих пятен обозначены синим цветом, несовпадающих – голубым, а центры соответствующих пятен соединены красными линиями. Таблица результатов включает названия образцов, количество совпадающих пятен, порядковый номер строки, порядковый номер пятна, относительную интенсивность совпадающих пятен по сравнению с главным образцом (рис. 3).

Таким образом, в результате исследования отработаны условия проведения 2D-электрофореза, показано, что использование для ИЭФ стрипов с иммобилизованным градиентом pH заданного диапазона (вместо стеклянных трубочек с гелем), коммерческих наборов реактивов и полиакриламидных гелей больших размеров (16×18 см) позволило оптимизировать условия проведения 2D-электрофореза, сократить время, увеличить точность и воспроизводимость анализа. На модели лизатов нетоксигенного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор M-888 и штамма *Y. pestis* EV, выращенного при 28 и 37 °С с помощью 2D-электрофореза получены «белковые портреты» изучаемых штаммов. Подтверждена высокая эффективность метода и возможность его использования для изучения динамики экспрессии генов возбудителей особо опасных инфекций.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.
2. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.
3. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A., Gonzales A.D.,

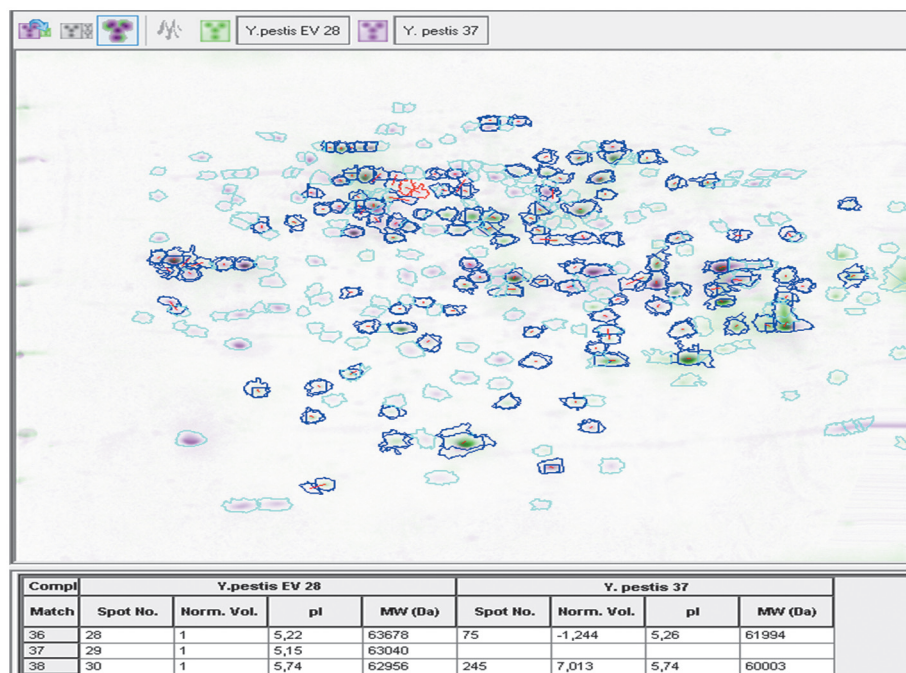


Рис. 3. Отчет компьютерного анализа сравнения 2D-гелей лизатов штамма *Y. pestis* EV, выращенного при различных температурных режимах

Corzett C.H., Chang B.C., Fitch J.P., McCutchen-Maloney S.L. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol.* 2005; 187(23):8172–80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.

4. Coelho A., Santos E.O., Faria M.L., Carvalho D.P., Soares M.R., Kruger W.M., Bisch P.M. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics*. 2004; 4:1491–504. DOI: 10.1002/pmic.200300685.

5. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

6. O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(10):4007–21.

7. Swain M., Ross N.W. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1995; 16:948–51. DOI: 10.1002/elps.11501601159.

## References

1. Osterman L.A. [Methods of Protein and Nucleic Acid Assaying: Electrophoresis and Ultra-Centrifugation]. M.: Nauka; 1981. 288 p.
2. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.
3. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A., Gonzales A.D., Corzett C.H., Chang B.C., Fitch J.P., McCutchen-Maloney S.L. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol.* 2005; 187(23):8172–80.

DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.

4. Coelho A., Santos E.O., Faria M.L., Carvalho D.P., Soares M.R., Kruger W.M., Bisch P.M. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics*. 2004; 4:1491–504. DOI: 10.1002/pmic.200300685.

5. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

6. O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(10):4007–21.

7. Swain M., Ross N.W. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1995; 16:948–51. DOI: 10.1002/elps.11501601159.

## Authors:

Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Полунина Т.А., Варшавская Ю.С., Заднова С.П., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 17.06.16.