

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

ПРИМЕНЕНИЕ 2D-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ФРАКЦИЙ ЭКЗОПРОТЕИНОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ХОЛЕРЫ

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

Цель работы. Применение 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов, а также идентификации и сравнения активности экспрессии биомаркеров основных факторов патогенности возбудителей чумы и холеры. **Материалы и методы.** 2D-гели фракций экзопротеинов получали на модели штаммов *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻, а также *Y. pestis* EV НИИЭГ. В качестве биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры использовали капсульный антиген F1 и холерный токсин. **Результаты и выводы.** При исследовании холерного токсина 2D-электрофорезом на IPG стрипах с градиентом pH 3–10 антиген разделялся на ряд белковых пятен, два из которых близки к параметрам домена A1 (MW 20,309 кДа и pI 6,51) и мономера субъединицы B (MW 11,091 кДа и pI 7,68). При сравнении белкового спектра фракций экзопротеинов штаммов *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ обнаружены пятна с аналогичными параметрами, за исключением штамма *V. cholerae* M888 Ctx⁻. При анализе 2D-гелей образцов капсульного антигена и фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV было отмечено, что белковые пятна, соответствующие параметрам субъединичной формы и димеру антигена, присутствуют в образце 37 °C культуры. В образце 28 °C культуры присутствует субъединица F1 в значительно меньшей концентрации. На модели токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻, штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ показана высокая эффективность 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов этих культур, а также идентификации и сравнения экспрессии биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры.

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

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

T.A.Polunina, S.P.Zadnova, Ya.M.Krasnov

2D-Electrophoresis in Protein Spectrum Construction for Exoprotein Fractions of Plague and Cholera Agents

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to apply 2D-electrophoresis for imaging protein spectrum of exoprotein fractions, as well as identification and comparison of biomarker expression of the key pathogenicity factors in plague and cholera agents. **Materials and methods.** 2D gels of exoprotein fractions were obtained on the model of *Vibrio cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888Ctx⁺ and Ctx⁻ strains, and also *Y. pestis* EV NIEG strain. Capsular antigen F1 and cholera toxin were used as biomarkers of major exoproteins of plague and cholera agents. **Results and conclusions.** While studying cholera toxin through 2D-electrophoresis on IPG strips with pH 3–10 gradient, the antigen fell into a number of protein spots, two of which were close to A1 domain parameters (MW 20.309 kDa and pI 6.51) and B-subunit monomer (MW 11.091 kDa and pI 7.68). Comparative protein spectrum analysis of the exoprotein fractions of *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ and Ctx⁻ has revealed the spots with similar parameters, excluding the strain *V. cholerae* M888 Ctx⁻. Investigation of 2D gels of capsular antigen and exoprotein fractions of *Y. pestis* EV strain has demonstrated that protein spots corresponding to the parameters of the subunit form and diameter of the antigen are present in 37 °C culture patterns. 28 °C culture sample contains F1 subunit in a far lesser concentrations. On the model of toxigenic *V. cholerae* Inaba 569B strain, isogenic system of *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ and Ctx⁻ strains, and *Y. pestis* EV NIEG strain, high efficiency of 2D-electrophoresis in protein spectrum construction for exoprotein fractions of the cultures, as well as identification and comparison of biomarker expression of major exoproteins of plague and cholera agents is established.

Key words: 2D-electrophoresis, exoproteins, *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., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. 2D-Electrophoresis in Protein Spectrum Construction for Exoprotein Fractions of Plague and Cholera Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 2:40–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-40-44

Экзопротеины бактериальных культур, секретируемые во внешнюю среду, играют важную роль в жизнедеятельности таких патогенов как *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*, т.к. участвуют в построении капсулы, выполняют защитную функцию, а также взаимодействуют с макроорганизмами.

Эпидемические штаммы *V. cholerae* продуци-

руют во внешнюю среду значительное количество экзопротеинов, относящихся к факторам патогенности, которые способствуют колонизации возбудителя в тонком кишечнике, развитию острого воспалительного процесса и диареи. Способность заселять тонкий кишечник обусловлена продукцией холерным вибрионом адгезивных молекул,

включающих токсинкорегулируемые пили, а также маннозофукорезистентные и маннозочувствительные гемагглютинины-адгезины. После адгезии начинается интенсивная продукция холерного токсина (СТ) – одного из ключевых факторов патогенности. СТ состоит из субъединицы А, отвечающей за токсическую активность всей молекулы, и В субъединиц, которые обеспечивают связывание токсина с клеточными рецепторами энтероцитов (ганглиозидами Gm1), а также несут антигенные детерминанты. Цитопатогенный эффект СТ усиливается продукцией эндотоксина и действием различных ферментов [3].

Циркуляция *Y. pestis* в природных очагах обеспечивается целым рядом факторов патогенности, одним из которых является способность возбудителя при температуре 37 °С формировать капсулу, образованную капсульным антигеном F1. На продукцию F1 влияет не только температура, но также pH и состав питательной среды. При температуре 37 °С толщина капсульной оболочки может в несколько раз превосходить толщину самой бактериальной клетки, однако использование высокочувствительных методов позволило также обнаружить капсулу на поверхности клеток чумного микроба, выращенных при 28 °С [1]. Использование сканирующей электронной микроскопии [17] показало, что капсула представляет собой аморфное вещество ячеистой структуры или внеклеточный фибриллярный матрикс, непрочный связанный с микробной клеткой. Отмечено, что 30–50 % синтезируемого антигена легко переходит в среду культивирования [8]. Это позволило выделять капсульный антиген также из культуральной жидкости, увеличив выход и качество конечного продукта по сравнению с классической методикой получения F1 из ацетонвысушенных клеток по E.E.Baker *et al.* [9], и получать препарат, лишенный компонентов клеточной стенки и протоплазмы, с молекулярным весом (MW) до 2,0 МДа и субъединицей 13,5–17,7 кДа и изоточкой pI 4,3–4,8 [2, 6, 8, 12].

Высокая вариабельность геномов возбудителей чумы и холеры, возможность существования в различных экосистемах определяет необходимость поиска и совершенствования методов выявления изменений компонентного состава белков в результате фенотипической адаптации патогенов к условиям окружающей среды.

2D-электрофорез, обеспечивая одновременно первичный анализ и максимальное разделение денатурированных белков образца по заряду и молекулярной массе, является одним из базовых методов пробоподготовки в интенсивно развивающихся направлениях протеомного анализа, позволяющего выявлять, идентифицировать и регистрировать уровень экспрессии белков. В связи с этим, актуальным является использование метода для изучения белкового спектра фракций экзопротеинов бактериальных культур, в том числе штаммов возбудителей особо

опасных инфекций.

Целью работы является применение 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов, а также идентификации и сравнения активности экспрессии биомаркеров основных факторов патогенности возбудителей чумы и холеры.

Материалы и методы

2D-гели фракций экзопротеинов получали на модели токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻, а также штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов).

Культуру клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали в бульоне LB (pH 7,2–7,4) при 28 и 37 °С в течение 48 ч. Культуру клеток штамма *V. cholerae* Inaba 569B выращивали в бульоне LB (pH 7,2–7,4) при 30 °С с аэрацией в течение 18 ч. Культуры клеток штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ выращивали согласно описанной методике [13].

Из бульонной культуры бактериальные клетки удаляли центрифугированием при 8000 об./мин в течение 20 мин при 4 °С (центрифуга Awel MF 20-R). Фракцию экзопротеинов осаждали из культуральной жидкости добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10 % и инкубацией на льду в течение 30 мин. Осадок дважды промывали холодным ацетоном и подсушивали на воздухе. Осадок растворяли в 10 мл холодного 10 mM Трис-HCl буфера (pH 8–5), затем процедуру осаждения повторяли. Агрегированные белки подсушивали на воздухе и растворяли в буфере для SDS или 2D-электрофореза.

В качестве биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры использовали лиофилизированные препараты капсульного антигена F1 (любезно предоставленного д.б.н. Т.М.Тараненко) [6] и холерного токсина (MW ~85,000 кДа, pI 6,6, «Sigma»).

Концентрацию белка в пробах измеряли по методу М.М.Бредфорда на сканирующем спектрофотометре Biowave II (Biochrom, UK) при длине волны 595 нм [11].

SDS-PAGE электрофорез проводили классическим методом W.K.Laemmli [15], 2D-электрофорез по методике, описанной ранее [5].

2D-гели анализировали с помощью программного обеспечения (ПО) Dymension мультифункциональной системы гель-документирования Syngene (G:BOX Chemi XT4, UK). При сравнении 2D-гелей путем наложения их изображений контуры совпадающих пятен обозначены синим цветом, а несовпадающих – голубым. Результаты компьютерного анализа содержат информацию об общем количестве выявленных и совпадающих пятен образцов, их порядковый номер, а также характеристику каждого пятна по интенсивности, MW и pI.

Результаты и обсуждение

В настоящее время известно, что СТ представляет собою олигомерный белок (MW 82,000–85,620 кДа и pI 6,6–7,0), состоящий из двух субъединиц. Субъединица А, обладающая токсичностью и каталитической активностью (MW 27,215–30,000 кДа; pI 6,1), имеет два домена А1 (MW 21,817–24,000 кДа) и А2 (MW 5,398–5,700 кДа), соединенных дисульфидной связью. В-субъединица, несущая рецепторную функцию (MW 53,000–58,387 кДа; pI 7,8), представляет собой нековалентно ассоциированный комплекс из пяти мономеров с MW 10,500–14,000 кДа каждая [10, 14, 16, 18].

Под действием таких денатурирующих агентов, как мочевины, 2-меркаптоэтанол, детергенты SDS и CHAPS, холерный токсин подвергался различной степени диссоциации в зависимости от времени инкубации и температуры. Так, предварительная экспозиция в регидратационном буфере (8 M Urea, 2 % CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 % Ampholytes pH 3–10, 0,001 % Bromphenol blue) в течение 2 ч и анализ SDS-PAGE электрофорезом без кипячения позволили обнаружить полосы с MW 28,000 и 55,000 кДа, соответствующие субъединицам А и В. Только после кипячения в течение 3 мин в нативном буфере без SDS, а также в буфере для образцов с SDS (31,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % glycerol, 1 % SDS, 0,005 % Bromophenol Blue) антиген максимально диссоциировал до домена А1 и мономера В1, образуя две полосы с MW 21,000 и 11,000 кДа соответственно.

Капсульный антиген F1, выделенный из центрифугата бульонной культуры штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ методом одноэтапной гель-хроматографии на биогеле А-50m, представляет собой монокомпонентную белковую систему без полисахаридных примесей [2, 6].

В отличие от СТ, применение только денатурирующих агентов (мочевины, 2-меркаптоэтанол, детергентов SDS и CHAPS) не приводило к изменению нативной конформации белковой макромолекулы капсульного антигена. Прогревание образца F1 при 100 °C в течение 3 мин вызывало диссоциацию антигена до отдельных белковых субъединиц с MW ~17,000 кДа, его охлаждение до комнатной температуры уже через 1 ч позволило зарегистрировать процесс реассоциации субъединиц с образованием

олигомеров с различной MW. Процедура термообработки в течение 3 мин в буфере для образцов с SDS приводила к необратимой диссоциации до субъединиц. Эффекта торможения реассоциации на стадии субъединицы удалось также достигнуть при добавлении к образцам F1 сразу после кипячения раствора SDS до конечной концентрации 0,5 %. Это объясняется способностью SDS связываться с солюбилизованными белками, что приводит к увеличению их отрицательного заряда и вызывает отталкивание друг от друга, блокируя процесс агрегации [4, 7].

Таким образом, наибольшей силой денатурирующего воздействия на нативную структуру белковых макромолекул СТ и F1 обладает процедура термообработки при 100 °C не менее 3 мин, приводящая к полному распаду антигенов до составляющих субъединиц. Структурной особенностью капсульного антигена является способность субъединиц спонтанно агрегировать при восстановлении физиологических условий с образованием набора олигомеров. Ранее замечено, что при тепловом разворачивании белковой полимерной структуры F1 происходит формирование термодинамически устойчивых тетрамеров, которые при охлаждении распадаются до субъединиц, способных к последующей реассоциации с сохранением серологической активности. Это позволило предположить, что полимерная структура F1 имеет специфический механизм приспособления к изменениям окружающей среды. Возможно, здесь имеет место эволюционно обусловленный способ сохранения функционально активных структурных единиц, несущих информацию о макромолекуле антигена [19].

При исследовании СТ 2D-электрофорезом на IPG-стрипах с градиентом pH 3–10 антиген разделялся на ряд белковых пятен, два из которых близки, по литературным данным, к параметрам домена А1 (MW 20,309 кДа и pI 6,51) и мономера субъединицы В (MW 11,091 кДа и pI 7,68). При сравнении белкового спектра фракций экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569В и изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ обнаружены пятна с аналогичными параметрами, за исключением штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁻ (рис. 1, 2).

При анализе 2D-гелей фракций экзопротеинов штаммов *V. cholerae* Inaba 569В, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ было выявлено в среднем 334, 597

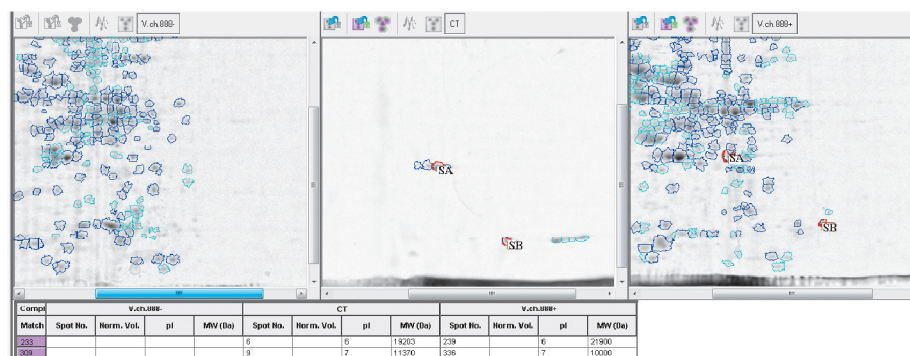


Рис. 1. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 3–10

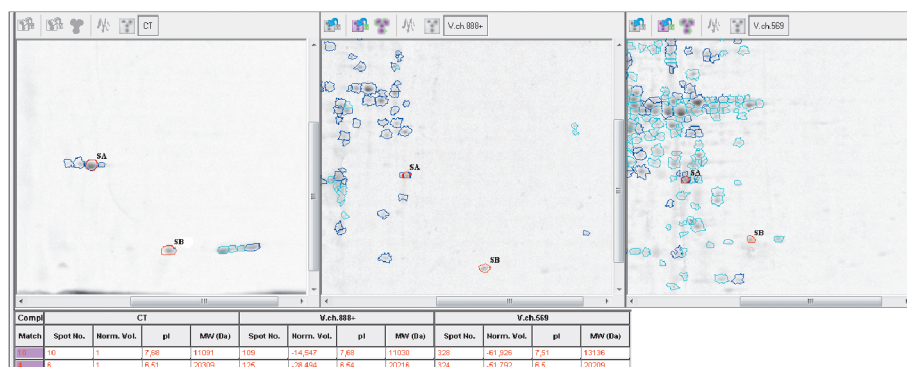


Рис. 2. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B и штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 3–10

и 466 белковых пятен соответственно. Сравнение электрофореграмм штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻ показало 260 совпадающих пятен, среди которых повышение интенсивности окрашивания в 2 и более раза отмечалось у 52 белковых пятен токсигенного и 64 атоксигенного штамма.

Исследование капсульного антигена чумного микроба 2D-электрофорезом в диапазоне pH 3–10 показало, что под влиянием денатурирующих условий происходит диссоциация агрегированной формы F1 с образованием субъединичной формы антигена и набора олигомеров с различными молекулярными массами. Отмечено, что при фракционировании капсульного антигена имеется ряд белковых пятен с pI 4,06–4,45 и MW 16,500–17,200 и 34,100–34,400 кДа, что соответствует, по литературным данным, субъединице и димеру антигена. Для достижения наибольшего разрешения белковых пятен в зоне фракционирования F1 мы провели исследование также на стрипах с диапазоном pH 4–7. При анализе электрофореграмм образцов капсульного антигена и фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ отмечено, что белковые пятна, соответствующие параметрам субъединичной формы и димеру антигена, присутствуют в образце 37 °C культуры. Во фракции экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 °C, присутствует субъединица F1 в значительно меньшей концентрации (рис. 3).

При анализе 2D-гелей фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C, на стрипах с градиентом pH 4–7 было детектировано соответственно 323 и 578 белковых пятен. Среди 254 совпадающих пятен повышение интенсивности окрашивания в 2 и более раза отмечалось у 116 в образце 28 °C культуры и 16 в образце штам-

ма, выращенного при 37 °C. Кроме того, в образце 37 °C культуры отмечено повышение интенсивности окрашивания в 3,8 раз белкового пятна с параметрами субъединичной формы F1, что коррелирует с увеличением биосинтеза капсульного антигена при данной температуре.

Таким образом, компьютерный анализ с помощью ПО Dymension системы гель-документирования Syngene полученных 2D-гелей образцов антигенов ХТ и капсульного антигена F1, фракций экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx⁺ и Ctx⁻, а также штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного в различных условиях, дает возможность получения белкового спектра этих культур, идентификацию и сравнение экспрессии биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры.

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

Авторы выражают благодарность лаборанту-исследователю Котовой Н.В. за практическую помощь при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5(3):201–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-3-201-218.
2. Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храменкова Т.А., Кравцов А.Л., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Подборонова Н.А., Ключева С.И., Шмелькова Т.П. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения. *Биотехнология*. 2005; 5:41–3.
3. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология холеры. Саратов; 1995. 69 с.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеи-

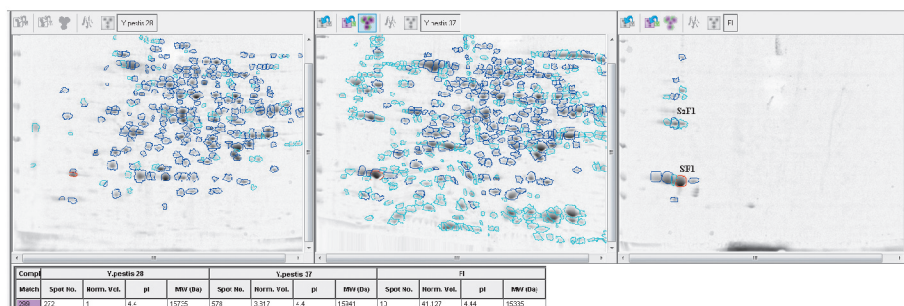


Рис. 3. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C, на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 4–7

новых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.

5. Полунина Т.А., Варшавская Ю.С., Заднова С.П., Краснов Я.М. Применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

6. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одно-этапной фильтрации. В кн.: Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. Саратов; 1983. С. 37–41.

7. Шуколюков С.А. Нативный электрофорез в протеомике клетки: BN- и CN-PAGE. *Цитология*. 2011; 53(2):159–65.

8. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L., Friedlander A.M. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun.* 1996; 64(6):2180–7.

9. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

10. Bharati K., Ganguly N.K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:179–87.

11. 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.

12. 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.

13. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* 1986; 30:1075–83.

14. Gill D.M. The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry*. 1976; 15:1242–8.

15. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:80–5.

16. Mekalanos J.J. Production and purification of cholera toxin. *Methods Enzymol.* 1988; 165:169–75.

17. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the F1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(9):3381–5. DOI: 10.1128/JB.01840-07.

18. Spanglert B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(4):622–47.

19. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed. Sci.* 1990; 1(4):391–6.

References

1. Kadnikova L.A., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Capsular antigen of plague microbe]. *Infektsiya i Immunitet*. 2015; 5(3):201–18. DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2015-3-201-218>.

2. Kireev M.N., Taranenko T.M., Khranchenkova T.A., Kravtsov A.L., Guseva N.P., Polunina T.A., Podboronova N.A., Klyueva S.I., Shmel'kova

T.P. [Structural-functional properties of capsular antigen F1 preparations during the storage process]. *Biotechnologiya*. 2005; 5:41–3.

3. Naumov A.V., Ledvanov M.Yu., Drozdov I.G. [Cholera Immunology]. Saratov; 1995. 69 p.

4. Osterman L.A. [Methods of Investigation of Proteins and Nucleic Acids: Electrophoresis and Ultracentrifugation (Practice Guidelines)]. M.: "Nauka"; 1981. 288 p.

5. Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. [Application of 2D-electrophoresis for the construction of "protein profiles" of bacterial cultures lysates of particularly dangerous infections agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

6. Serdobintsev L.N., Taranenko T.M., Verenkov M.S., Naumov A.V. [Production of capsular antigen using single-stage gel filtration]. In: [Problems of Prophylaxis of Natural-Focal Infections]. Saratov; 1983. P. 37–41.

7. Shukolyukov S.A. [Native electrophoresis in cell proteomics: BN- and SN-PAGE]. *Isitologiya*. 2011; 53(2):159–65.

8. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L., Friedlander A.M. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun.* 1996; 64(6):2180–7.

9. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

10. Bharati K., Ganguly N.K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:179–87.

11. 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.

12. 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.

13. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* 1986; 30:1075–83.

14. Gill D.M. The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry*. 1976; 15:1242–8.

15. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:80–5.

16. Mekalanos J.J. Production and purification of cholera toxin. *Methods Enzymol.* 1988; 165:169–75.

17. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the F1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(9):3381–5. DOI: 10.1128/JB.01840-07.

18. Spanglert B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(4):622–47.

19. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed. Sci.* 1990; 1(4):391–6.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 20.06.16.