

## АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ К УСЛОВИЯМ СРЕДЫ: ОСОБЕННОСТИ РЕОРГАНИЗАЦИИ ПРОТЕОМА У *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII PG8* ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ

© 2011 г. В. М. Чернов, О. А. Чернова, Е. С. Медведева, М. Н. Давыдова

Представлено академиком И.А. Тарчевским 04.02.2011 г.

Поступило 04.02.2011 г.

*Acholeplasma laidlawii* (класс Mollicutes) – “вездесущая” (*ubiquitous*) микоплазма. Эта бактерия, обнаруживаемая в почвах, сточных водах и тканях высших эукариот, является основным контаминацией клеточных культур, а также возбудителем фитомикоплазмозов [1]. Контроль микоплазменных инфекций представляет серьезную проблему, решение которой связывают с выяснением молекулярно-генетических основ адаптации микоплазм к условиям среды, определяющей широкую распространенность бактерии в природе и проявление патогенности [2–4].

Широкое распространение *A. laidlawii* предполагает успешную адаптацию микоплазмы к стрессовым условиям, связанным с изменением температуры, исчерпанием питательных веществ и источников энергии, воздействием АФК и некоторым другим. Протеомное профилирование бактериальных клеток, образующихся в стрессовых условиях, позволяет выявлять белки, участвующие в механизмах выживания микроорганизмов в неблагоприятных условиях [5, 6]. Поиск соответствующих белков бактерий представляет значительный интерес как для выявления молекулярных основ адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям, так и для разработки способов контроля патогенов [7].

Расшифровка генома *A. laidlawii* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>] определила возможность проведения протеомного анализа клеток *A. laidlawii* [8]. Однако в отношении исследований стресс-реактивных белков микоплазмы сделаны лишь первые шаги [3]. Задачей данной работы явился протеомный анализ клеток *A. laidlawii PG8*, подвергнутых длительному воздействию неблагоприятных факторов (низкая температура среды, голодание, замена источника энергии), в результате решения которой впервые идентифицированы белки, вовлеченные в адаптацию бактерии к соответствующим стрессовым условиям.

В работе использован штамм *A. laidlawii PG8*, полученный из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Москва). Клетки микоплазмы выращивали при 37°C в жидкой питательной среде Эдварда с модификациями [3] и исследовали в оптимальных и стрессовых условиях, характерных для среды обитания бактерии: при длительном воздействии низкой температуры, голодании, а также замене основного источника энергии (глюкозы) на трегалозу, являющуюся у микроорганизмов стрессовым метаболитом.

В случае длительного воздействия низкой температуры клетки *A. laidlawii PG8* культивировали при температуре 8°C [9]. Культивирование *A. laidlawii PG8* в условиях изменения субстрата проводили при 37°C в жидкой питательной среде Эдварда при добавлении трегалозы вместо глюкозы. Культивирование клеток в условиях ограничения субстрата (голодание) проводили, как описано ранее [2]. Клетки культуры *A. laidlawii PG8*, выращенной в оптимальных условиях – на полноценной питательной среде Эдварда при 37°C, составили контрольные образцы, а в стрессовых условиях – опытные.

Клетки осаждали центрифугированием 12000 об/мин при 4°C в течение 20 мин. Осадок дважды отмывали буфером (150 mM NaCl, 50 mM трикс, 2 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, pH 7.4), затем один раз в том же буфере с добавлением ингибитора протеаз PMSF (“Fluka”, Германия). Все процедуры проводили при 4°C.

Белки разделяли с помощью 2ДЕ, окрашивали серебром, а также флуоресцентными красителями CyDye-DIGE Cy3 и CyDye-DIGE Cy5 (“Amersham”) для выявления дифференциальной экспрессии [3]. Сканирование гелей проводили на Typhoon Trio Scanner (“Amersham Bioscience”) при интенсивности красного и зеленого лазеров 600 nm. Полученные данные анализировали с помощью программы Phoretix 2D Advanced v6.01 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Великобритания). Белки идентифицировали с помощью масс-