

УДК: 616.932:579.843.1Vibrio-07

ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

В.Г. Германчук, А.Н. Спицын, Д.В. Уткин

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

Определен масс-спектр холерного токсина с помощью времяпролетной MALDI масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS), выявлены специфические пики масс-спектров, изучена возможность его определения в объектах окружающей среды (водопроводной воде).

Ключевые слова: токсины, холерный токсин, масс-спектр, MALDI-TOF MS.

APPLICATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR DEFINITION OF CHOLERA TOXIN

V.G. Germanchuk, A.N. Spitsyn, D.V. Utkin

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

The mass spectrum of cholera toxin is defined by MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry), specific peaks of mass spectra are revealed, the possibility of its definition in the environments (tap water) is studied.

Key words: toxins, cholera toxin, mass spectrum, MALDI-TOF MS.

В настоящее время угроза возникновения чрезвычайных ситуаций различного характера является актуальной проблемой для всех государств мирового сообщества, не исключая и Российскую Федерацию. Сохраняется потенциальная опасность применения патогенных биологических агентов в качестве агентов биотерроризма [2].

Существующая потенциальная угроза применения биологических токсинов, в том числе и при актах биотерроризма, диктует необходимость иметь средства экспрессной индикации биологических токсинов. Такие биологические токсины как ботулинический, рицин, холерный, столбнячный, стафилококковый входят в перечень агентов, выявляемых в лабораториях специализированных противочумных бригад [3].

Времяпролетная MALDI масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является новой технологией в лабораторной диагностике инфекционных болезней, позволяющей проводить идентификацию микроорганизмов, определять таксономическое положение неизвестных возбудителей и представляет альтернативу традиционным методам их определения. Данный метод включает прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции лизата микробной клетки («прямое белковое профилирование»), предметом которого служат преимущественно рибосомальные белки, являющиеся консервативными в пределах вида микроорганизма.

Наряду с этим, MALDI-TOF MS использовалась для идентификации биологических токсинов: ботулинического нейротоксина, столбнячного токсина, стафилококкового энтеротоксина [1] и шигатоксина *E. coli* O157 [4]. Для выявления холерного токсина по имеющимся литературным данным, этот метод не использовался.

Цель работы – определение масс-спектра холерного токсина с помощью MALDI-TOF MS и возможности его определения в объектах окружающей среды (водопроводной воде).

В работе использовали коммерческий препарат холерного токсина – «Cholera toxin from *Vibrio cholerae*» (Sigma-Aldrich, USA).

В качестве матрицы для MALDI-TOF-анализа использовали 10 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Bruker, Германия) в 50 % растворе ацетонитрила и 2,5 % растворе трифторуксусной кислоты. Сбор спектров проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия) в диапазоне масса/заряд 2000 – 20000 Да.

На основании полученных данных выделены маркеры (спектральные пики с определенным значением m/z), соответствующие коммерческому препарату холерного токсина (значения m/z 2899 $\pm$ 1, 3868 $\pm$ 1, 5803 $\pm$ 4, 7738 $\pm$ 6, 11603 $\pm$ 7).

Спектральный пик с m/z , равным 11603 $\pm$ 7, предположительно, соответствовал мономеру В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой ~11,6 кДа [5].

Для оценки индикации токсинов в объектах окружающей среды использовали водопроводную воду контаминированную коммерческим препаратом холерного токсина и определяли масс-спектр

исследуемого образца.

Спектральные пики с определенным значением m/z , соответствующие водопроводной воде контаминированной коммерческим препаратом холерного токсина (значения m/z 2899±1, 3868±1, 5803±4, 7739±6, 11605±7), совпадали с пиками полученными при исследовании чистого холерного токсина (наиболее характерны спектральные пики 3868±1, 5803±4, 11603±7).

Метод MALDI-TOF MS позволил определить наличие холерного токсина в водопроводной воде в концентрации 0,1-0,01 мкг/мл (для сравнения индикаторный иммунохроматографический элемент дает положительную реакцию при нанесении образца, содержащего холерный токсин в концентрации не менее 1 мкг/мл).

Таким образом, в результате проведенного исследования определен масс-спектр холерного токсина с помощью MALDI-TOF MS, выявлены специфические пики масс-спектров, установлена возможность определения холерного токсина в водопроводной воде. При наработке базы данных по токсинам биологического происхождения, возможно использование данного метода для индикации токсинов в объектах окружающей среды.

Литература

1. Дубровский Я. А., Подольская Е.П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор) // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 21-35.
2. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И., Нетесов С.В. и др. Биологическая безопасность. – Москва: Медицина, 2006. – 304 с.
3. Регламент (стандарт) функционирования специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) при ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера. Утв. приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 330 от 22.11.2007 г.
4. Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved α -Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2010. – Vol. – 2010. – P. 11.
5. Jonathan P. Williams, Daniel C. Smith, Brian N. Green, Brian D. Marsden, Keith R. Jennings, Lynne M. Roberts, James H. Scrivens. Gas Phase Characterization of the Noncovalent Quaternary Structure of Cholera Toxin and the Cholera Toxin B Subunit Pentamer // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 90, № 9. – P. 3246-3254.

Ответственный автор

Германчук Валерий Геннадьевич – сотрудник ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «микроб» Роспотребнадзора. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru