

БЛАНК ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ ЧЕРЕЗ ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНА» С ДОСТАВКОЙ
В ПРЕДЕЛАХ РФ

Извещение	Форма № ПД-4 ОАО «Издательство «Медицина» (наименование получателя платежа) ИНН 7709437273 р/с 40702810438120106547 в ОАО Сбербанк России, г. Москва_ кор./сч. 30101810400000000225 БИК 044525225 Подписка на журнал: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ (на полугодие)
	Кассир

на 2015 год	
на 2-е полугодие	

Куда:	
(почтовый индекс)	(адрес)

Кому:	
(фамилия, инициалы)	

Тел.	E-mail:
------	---------

Стоимость: 2620 (руб.), включая НДС 10%	Подпись
---	---------

Извещение	Форма № ПД-4 ОАО «Издательство «Медицина» (наименование получателя платежа) ИНН 7709437273 р/с 40702810438120106547 в ОАО Сбербанк России, г. Москва_ кор./сч. 30101810400000000225 БИК 044525225 Подписка на журнал: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ (на полугодие)
	Кассир

на 2015 год	
на 2-е полугодие	

Куда:	
(почтовый индекс)	(адрес)

Кому:	
(фамилия, инициалы)	

Тел.	E-mail:
------	---------

Стоимость: 2620 (руб.), включая НДС 10%	Подпись
---	---------

Бланк заявки

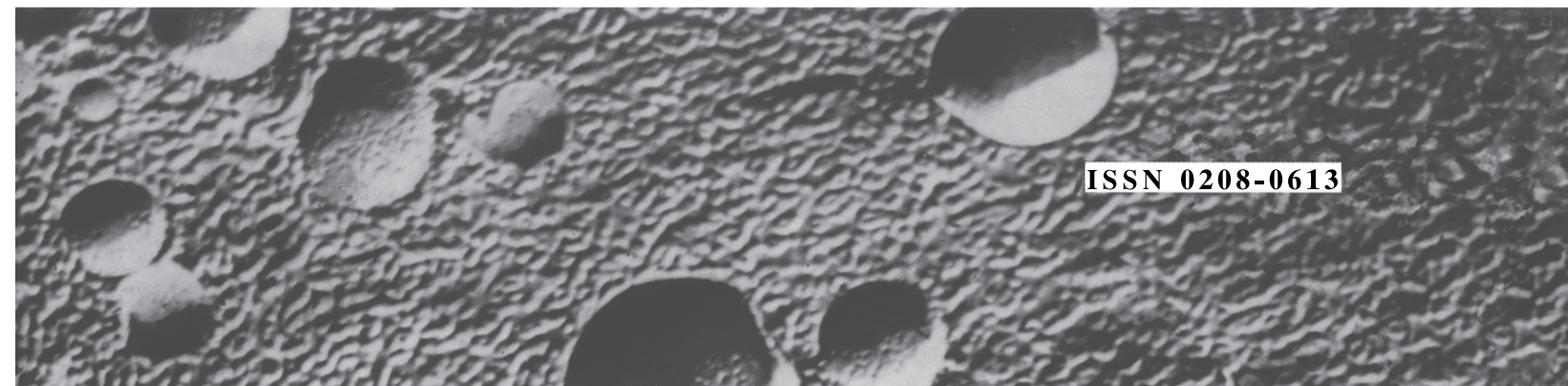
Куда:	
(почтовый индекс)	(адрес)

Кому:	
(фамилия, инициалы)	

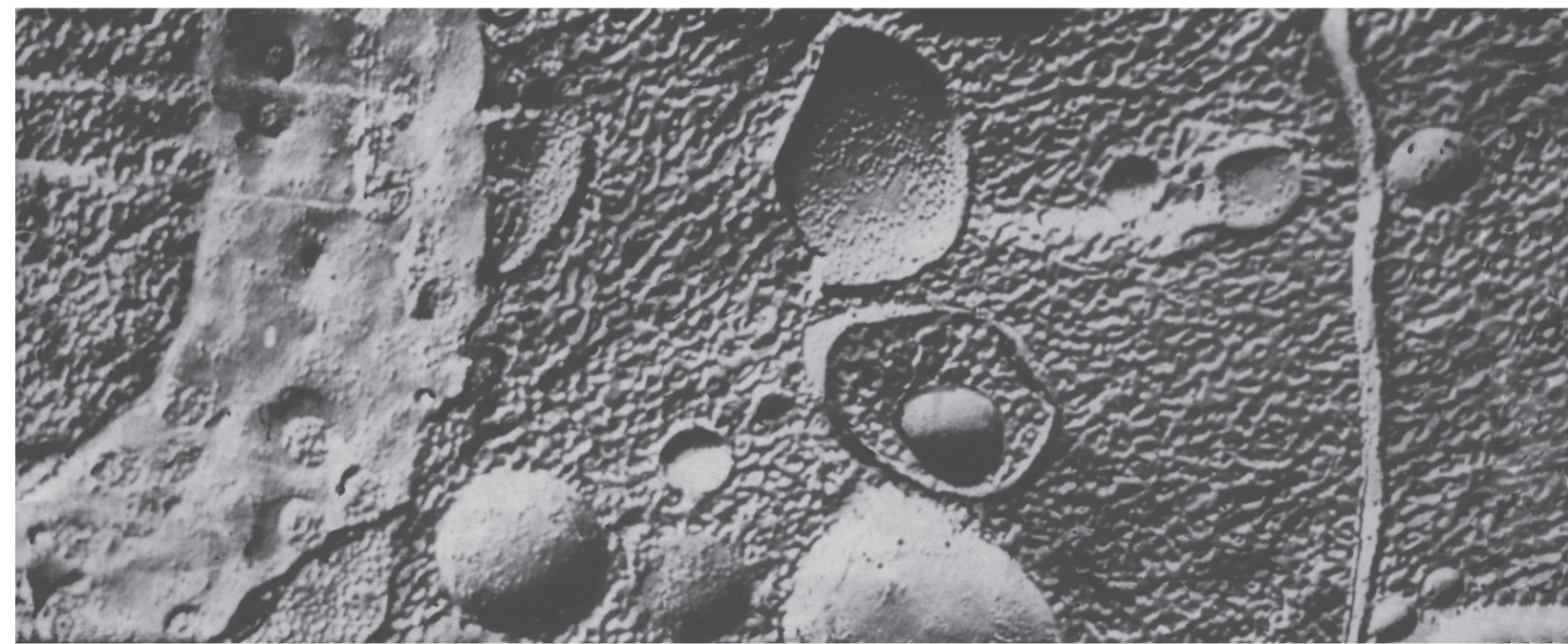
Квитанцию можно оплатить в любом отделении Сбербанка РФ. Разборчивым почерком впишите в квитанцию и бланк заявки свои личные данные: Ф.И.О. получателя, электронный адрес, контактный телефон. Подтвердите оплату по факсу +7 495 678 80 95 или по электронной почте **e-mail: info@idm.msk.ru**, выслав копию оплаченной квитанции и заполненный бланк заявки.

В случае возникновения вопросов, касающихся Вашей подписки, позвоните нам по тел. +7 495 678 65 62 . Мы ответим на все Ваши вопросы.

Примечание. Срок подтверждения Вами оплаты – строго до 15 июня 2015 г.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ



ISSN 0208-0613



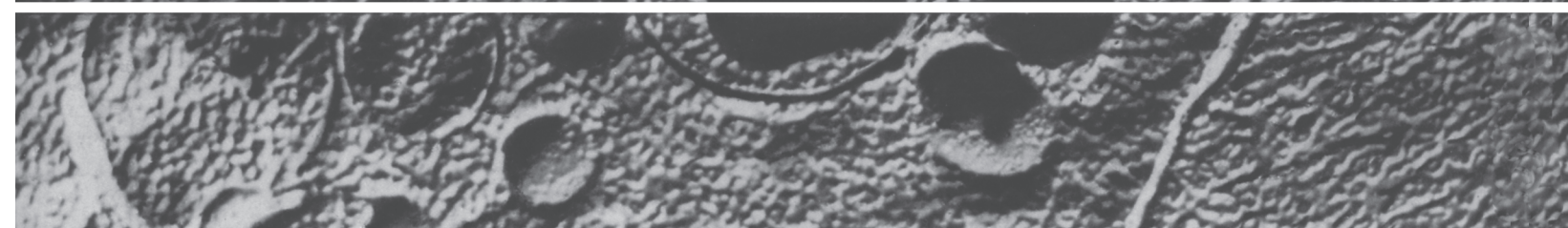
9 770208 061004

2 2015

МОСКВА МЕДИЦИНА

Том 33

Vol. 33



секретируемых и трансмембранных белков Sec 61-транслоконов, солюбилизированных в дигитонине, показало, что мембранный белок находится в комплексе с прилежащим участком бислоя мембраны, который, как полагают, кэпирован по гидрофобному краю дигитонином [30]. Возможно, что аналогичным образом происходит солюбилизация SMS1 сапонином.

Таким образом, метод сапониновой экстракции может быть использован в исследованиях экспрессии SMS1 в тканях человека, и, возможно, как метод получения экстракта ткани для определения сфингомиелинсинтазной энзиматической активности.

Работа выполнена при частичной поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-00487), Программой Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и Программой поддержки ведущих научных школ.

Сведения об авторах:

Институт молекулярной генетики РАН

Сударкина Ольга Юрьевна – канд. биол. наук, научн. сотр. отдела молекулярных основ генетики человека; e-mail: sudarolg@img.ras.ru

Дергунова Людмила Васильевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела молекулярных основ генетики человека, e-mail: lvdergunova@mail.ru

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Tafesse F.G., Ternes P., Holthuis J.C. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(40): 29421–5.
2. Ullman M.D., Radin N.S. The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 1974; 249(5): 1506–12.
3. Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J.F., Holthuis J.C. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 2004; 23(1): 33–44.
4. Yamaoka S., Miyaji M., Kitano T., Umehara H., Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(18): 18688–93.
5. Holthuis J.C., Luberto C. Tales and mysteries of the enigmatic sphingomyelin synthase family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 688: 72–85.
6. Holthuis J.C., Pomorski T., Raggars R.J., Sprong H., Van Meer G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol. Rev.* 2001; 81(4): 1689–723.
7. Taniguchi M., Okazaki T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1841(5): 692–703.
8. Hsiao J.H., Fu Y., Hill A.F., Halliday G.M., Kim W.S. Elevation in sphingomyelin synthase activity is associated with increases in amyloid-beta peptide generation. *PLoS One.* 2013; 8(8): e74016.
9. Qureshi A., Subathra M., Grey A., Schey K., Del Poeta M., Luberto C. Role of sphingomyelin synthase in controlling the antimicrobial activity of neutrophils against *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One.* 2010; 5(12): e15587.
10. Ding T., Li Z., Hailemariam T., Mukherjee S., Maxfield F.R., Wu M.P. et al. SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J. Lipid Res.* 2008; 49(2): 376–85.
11. Separovic D., Semaan L., Tarca A.L., Awad Maitah M.Y., Hanada K., Bielawski J. et al. Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp. Cell Res.* 2008; 314(8): 1860–8.
12. Guillén N., Navarro M.A., Surra J.C., Arnal C., Fernández-Juan M., Cebrián-Pérez J.A. et al. Cloning, characterization, expression and comparative analysis of pig Golgi membrane sphingomyelin synthase 1. *Gene.* 2007; 388(1–2): 117–24.
13. Burns T.A., Subathra M., Signorelli P., Choi Y., Yang X., Wang Y. et al. Sphingomyelin synthase 1 activity is regulated by the BCR-ABL oncogene. *J. Lipid Res.* 2013; 54(3): 794–805.
14. Vladychenskaya I.P., Dergunova L.V., Limborska S.A. In vitro and

- in silico analysis of the predicted human MOB gene encoding a phylogenetically conserved transmembrane protein. *Biomol. Eng.* 2002; 18: 263–8.
15. Vladychenskaya I.P., Dergunova L.V., Dmitrieva V.G., Limborska S.A. Human gene MOB: structure specification and aspects of transcriptional activity. *Gene.* 2004; 338: 257–65.
 16. Rozhkova A.V., Dmitrieva V.G., Zhapparova O.N., Sudarkina O.Y., Nadezhdina E.S., Limborska S.A. et al. Human sphingomyelin synthase 1 gene (SMS1): organization, multiple mRNA splice variants and expression in adult tissues. *Gene.* 2011; 481(2): 65–75.
 17. Dergunova L., Rozhkova A., Sudarkina O., Limborska S. The use of alternative polyadenylation in the tissue-specific regulation of human SMS1 gene expression. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40: 6685–90.
 18. Simpson R.J. Homogenization of mammalian tissue. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010; 2010(7):cpdb.prot5455.
 19. Wessel D., Flügge U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analyt. Biochem.* 1984; 138(1): 141–3.
 20. Gallagher S.R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2012; Chapter 10: Unit 10.2A.
 21. Weissman A.M. Solubilization of lymphocytes. *Curr. Protoc. Immunol.* 2003; Chap. 8: Unit 8.1A.
 22. Bonifacino J.S., Dell’Angelica E.C., Springer T.A. Immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001; Chapt. 8:Unit 8.3.
 23. Abcam, Western blotting - a beginner’s guide. Available at: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>
 24. Ngoka L.C. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci.* 2008; 6: 30.
 25. Wassler M., Jonasson I., Persson R., Fries E. Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes. Release of secretory proteins. *Biochem. J.* 1987; 247(2): 407–15.
 26. Tate C.G. Practical considerations of *membrane protein instability during purification and crystallisation*. *Meth. Mol. Biol.* 2010; 601: 187–203.
 27. Wittig I., Braun H.P., Schägger H. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 2006; 1(1): 418–28.
 28. Koiv A., Rinken A., Järvi J. Fluidity of detergent micelles plays an important role in muscarinic receptor solubilization. *J. Biosci.* 1990; 15(3): 149–52.
 29. Zweig A., Siegel M.I., Egan R.W., Clark M.A., Shorr R.G., West R.E. Jr. Characterization of a digitonin-solubilized bovine brain H3 histamine receptor coupled to a guanine nucleotide-binding protein. *J. Neurochem.* 1992; 59(5): 1661–6.
 30. Ménétret J.F., Hegde R.S., Aguiar M., Gygi S.P., Park E., Rapoport T.A. et al. Single copies of Sec61 and TRAP associate with a non-translating mammalian ribosome. *Structure.* 2008; 16(7): 1126–37.

Поступила 31.07.14

Received 31.07.14

PREPARATION OF HUMAN TISSUE

PROTEIN EXTRACTS ENRICHED WITH THE

SPHINGOMYELIN SYNTHASE 1

O. Yu. Sudarkina, L. V. Dergunova

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) catalyzes sphingomyelin biosynthesis in eukaryotic cells. We previously studied the structure of the human SGMS1 gene, which encodes the enzyme and its numerous transcripts. The tissue-specific expression of the transcripts was also described. Analysis of the SMS1 protein expression in human tissues using immunoblotting of tissue extracts prepared in the RIPA (Radio Immuno-Precipitation Assay) buffer revealed a weak signal in renal cortex, testis, lung, and no signal in placenta and lymphatic node. In this work, a new method of preparation of the tissue protein extracts enriched with SMS1 was suggested. The method based on the consecutive extraction with a buffer containing 0.05 and 1 mg/ml of the Quillaja saponaria saponin allowed SMS1 to be detected in all tissues tested. The SMS1 content in the saponin extract of kidney cortex is about 12-fold higher compared to the RIPA extraction procedure.

Key words: *sphingomyelin synthase 1, saponin, immunoblotting.*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

2·2015

Том 33

Квартальный
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, А. П. АНИСИМОВ, В. А. ГВОЗДЕВ,
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ, А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, A.V. KARLYSHEV (UK),
Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ,
V.L. MOTIN (USA), Н. Ф. МЯСОЕДОВ, С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ,
Г. Б. СМЕРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,
В. З. ТАРАНТУЛ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), А. А. ПРОЗОРОВ (Москва),
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемых в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также, как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В.* MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии 3
- Калинина О.В., Дмитриев А.В.* Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита .. 9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Хоменков В.Г., Скоблов М.Ю., Короленькова Л.И., Киселев Ф.Л.* Клонирование альтернативных изоформ каталитической субъединицы теломеразы человека (hTERT) 14
- Романова Ю.М., Мулабаев Н.С., Толордава Э.Р., Серегин А.В., Серегин И.В., Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Левина Г.А., Бархатова О.И., Гамова Н.А., Гончарова С.А., Диденко Л.В., Раковская И.В.* Микробные сообщества на мочевых камнях 20
- Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В.* Мультилокусное секвенирование штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости 26
- Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Чернядьев А.В., Коньшев И.В., Литвинец С.Г., Оводов Ю.С.* Иммунохимическая активность Б-антигена *Yersinia pseudotuberculosis* 32

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Сударкина О.Ю., Дергунова Л.В.* Получение белкового экстракта тканей человека, обогащенного сфингомиелинсинтазой 38

CONTENTS

REVIEWS

- Afanas'ev M.V., Mironova L.V., Balakhonov S.V.* MALDI-ToF MS Analysis for *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, and *Francisella tularensis* Identification 3
- Kalinina O.V., Dmitriev A.V.* Genome Organization and Life Cycle of the Hepatitis C Virus 9

EXPERIMENTAL WORKS

- Khomenkov V.G., Skoblov M.Yu., Korolenkova L.I., Kiselev F.L.* Cloning of Alternative Isoforms of the Catalytic Subunit of the Human Telomerase (hTERT) 14
- Romanova Yu.M., Mulabaev N.S., Tolordava E.R., Seregin A.V., Seregin I.V., Alexeeva N.V., Stepanova T.V., Levina G.A., Barhatova O.I., Gamova N.A., Goncharova S.A., Didenko L.V., Rakovskaya I.V.* Microbial Communities on Kidney Stones 20
- Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Goldapel E.G., Balakhonov S.V.* Multilocus Sequence-typing of *Vibrio Cholerae* Strains with Various Epidemic Importance 26
- Byvalov A.A., Dudina L.G., Chernyad'ev A.V., Konyshchev I.V., Litvinets S.G., Ovodov Yu.S.* Immunochemical Activity of *Yersinia pseudotuberculosis* B-Antigen 32

METHODS OF RESEARCH

- Sudarkina O.Yu., Dergunova L.V.* Preparation of Human Tissue Protein Extracts Enriched with the Sphingomyelin Synthase 1 38

Индекс 71452

для индивидуальных подписчиков

Индекс 72152

для предприятий и организаций

ISSN 0208-0613. Молекул. генетика, микробиология и вирусология, 2015. № 2. 1–40.

Почтовый адрес редакции:

Москва, 109029

115088, ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14

ОАО «Издательство "Медицина"»

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: 8 495 678-63-95

e-mail: molgenetika@idm.msk.ru, molgenetika@yandex.ru

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-495-678-64-84

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Корректор В. С. Смирнова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сдано в набор 11.02.15
Подписано в печать 31.03.15
Формат 60 × 88%
Печать офсетная. Печ. л. 5,00
Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50
Заказ 251

ЛР №010215 от 29.04.97 г.

www.medlit.ru

Отпечатано в типографии ООО "Подольская Периодика",
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В.

MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, ХОЛЕРЫ И ТУЛЯРЕМИИ

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск

В представленном обзоре рассматриваются общие вопросы методологии новой технологии в лабораторной диагностике инфекций – MALDI-ToF MS-анализа (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия), а также ряд частных вопросов, касающихся использования данной технологии в идентификации и типировании возбудителей особо опасных инфекций – чумы, холеры и туляремии. Обсуждается проблема пробоподготовки образцов к исследованию и обеспечение биологической безопасности.

Ключевые слова: MALDI-ToF MS-анализ; MALDI-ToF MS-идентификация; *Yersinia pestis*; *Vibrio cholera*; *Francisella tularensis*.

Общие сведения о MALDI-ToF масс-спектрометрии

Одним из наиболее активно развивающихся в последние годы направлений в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний является технология MALDI-ToF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением) [1]. В основе метода MALDI-ToF лежит процедура мягкой ионизации исследуемого материала (аналита), позволяющая в присутствии особого вещества, так называемой матрицы, под воздействием лазера ионизировать биологические макромолекулы (пептиды, белки, ДНК, олигонуклеотиды, липополисахариды и сахара) без их фрагментации и деструкции. Матрица – вещество кислой природы, которое, будучи сокристаллизованным с аналитом, при воздействии лазерного импульса обеспечивает передачу энергии лазера молекулам исследуемого объекта, ионизируя их и переводя в газовую фазу [2]. В качестве матриц используются вещества как сложной органической, так и неорганической природы [3, 4]. Наиболее широко применяется α -циано-4-гидроксикоричная кислота (англ. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA), синяпиновая кислота (англ. sinapinic acid; SA), феруловая кислота (ferulic acid; FA) и дигидробензойная кислота (англ. 2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB) [5, 6].

После десорбции преимущественно однозарядные ионизированные молекулы ускоряются в электрическом поле, попадают в разделительную часть прибора (представляющую собой трубу, в полости которой поддерживается вакуум), по прохождении которой ионы достигают детектора. Скорость движения и, соответственно, время прохождения расстояния от точки ионизации до детектора, обратно пропорционально массе ионов. Зная длину пути перемещения иона от ионизатора до детектора, а также время этого перемещения, можно вычислить скорость движения иона и, на основании ее значения, рассчитать массу частиц, присутствующих в анализе, а также генерировать спектр, характеризующий качественный состав исследуемого объекта.

Одной из основных областей применения MALDI-ToF MS-анализа в биологии и медицине традиционно считалась клиническая и биологическая химия, в которой данный метод использовался для качественной и количественной детекции биомолекул различной природы в клиническом материале: сыворотке крови, моче, слюне, цереброспинальной жидкости, слезах, фрагментах тканей [7].

Для исследования микроорганизмов MALDI-ToF MS впервые был применен достаточно давно, в середине 70-х годов прошлого века [8], однако активное внедрение этого метода в практику лабораторной диагностики началось в последнее десятилетие. Во многом это было связано с совершенствованием приборной базы, накоплением фактического материала о возможностях технологии масс-спектрометрического анализа для идентификации и углубленной характеристики микроорганизмов.

Идентификация микроорганизмов с использованием MALDI-ToF MS осуществляется путем сравнения белкового спектра исследуемого штамма с базовой коллекцией спектров референсных микроорганизмов известных видов. На основании степени соответствия спектров определяется принадлежность исследуемого микроорганизма к определенному виду (роду) [9]. Кроме того, существует алгоритм идентификации, при котором значения масс ионов в полученном спектре неизвестного микроорганизма сравниваются с массами белков, аннотированных в протеомных базах данных и/или предсказанных на основании нуклеотидных последовательностей геномов [10, 11].

В процессе экспериментальных исследований установлено, что большая часть пиков спектра, особенно в диапазоне от 4 до 15 кД, соответствует белкам. Среди них преобладают интактные или прошедшие посттрансляционную модификацию рибосомальные белки – до половины пиков, представленных в спектре. Так же достаточно стабильно в спектре детектируются белки холодового шока и ДНК-связывающие белки [12–14].

Процедура выполнения MALDI-ToF MS-анализа достаточно проста и не требует большого количества времени и специальных навыков персонала. Для исследования необходима чистая культура микроорганизма (единичная изолированная колония), забранная в экспоненциальной фазе роста. Далее возможно нанесение на специальную металлическую подложку – мишень либо чистой культуры без дополнительной обработки, либо экстракта, полученного после предварительной обработки суспензии исследуемой культуры физическими или химическими методами [15–17]. В последние годы разрабатывается ряд подходов, позволяющих проводить прямую идентификацию возбудителя в некоторых видах клинического материала, таких как моча, цереброспинальная жидкость, кровь [18–20].