



УДК 579.84:577.112'114'314.6:57.083.3

О РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*Ермак И. М., Фролова Г. М., Соловьева Т. Ф.,  
Оводов Ю. С.Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток

Показано, что в клеточной стенке псевдотуберкулезного микроба присутствуют две формы липополисахарид-белкового комплекса с разными плавучими плотностями — 1,43 и 1,40 г/см<sup>3</sup>. Эти формы имеют одинаковый качественный моносахаридный, жирнокислотный и полипептидный состав, но различаются длиной O-специфической цепи. Различия в плотностях обусловлены разным содержанием основных компонентов комплекса. Обе формы содержат родственные антигенные детерминанты, но имеют некоторые различия в антигенной структуре. Показана способность двух форм образовывать гибридную форму с плавучей плотностью 1,41 г/см<sup>3</sup>.

Одним из составных компонентов внешней мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий являются липополисахариды (ЛПС). Специфически взаимодействуя с белками мембраны, ЛПС образуют липополисахарид-белковые комплексы (ЛПБ-комплексы), которые выполняют важную роль в организации и функционировании внешней мембраны микробной клетки. Они также являются эндотоксинами и O-антигенами грамотрицательных бактерий [1]. Характерная особенность ЛПС, осложняющая их изучение, — физическая [2] и структурная [3, 4] гетерогенность таких биополимеров, вызванная различными факторами.

Ранее нами была показана гетерогенность ЛПБ-комплекса из *Yersinia pseudotuberculosis*, вызванная образованием высокомолекулярных полидисперсных агрегатов в водных растворах [5]. В настоящей работе подробно изучен гетерогенности ЛПБ-комплекса из *Y. pseudotuberculosis*.

Как известно, для извлечения эндотоксического комплекса из клеток грамотрицательных бактерий используют экстракцию раствором трихлоруксусной кислоты [6]. Этот метод был применен нами для получения ЛПБ-комплекса из псевдотуберкулезного микроба. Наряду с обычным способом обработки полученного экстракта, включающим в себя диализ против воды и лиофилизацию (способ 1), была использована модификация, согласно которой диализ экстрактов проводился против 0,15 М хлористого натрия, а стадия лиофилизации была исключена (способ 2). Эта модификация была предпринята потому, что низкая ионная сила растворов и лиофилизация оказывают существенное влияние на молекулярно-массовое распределение ЛПБ-комплекса [5]. Дальнейшая очистка комплекса от сопутствующих примесей проводилась с помощью гель-хроматографии на сефарозе 2В [7]. Полученные в результате комплексы показали определенные различия при исследовании их методом изоплотностного центрифугирования.

При центрифугировании в градиенте хлористого цезия ЛПБ-комплекс, выделенный по способу 1 и обозначенный нами как комплекс А, концентрировался в зоне градиента с плавучей плотностью 1,41 г/см<sup>3</sup> (рис. 1). При этом наблюдалась его дополнительная очистка в результате отделения белка с плотностью 1,34 г/см<sup>3</sup>, характерной для мембранных белков [8], и полисахарида с плотностью 1,48 г/см<sup>3</sup>. Последний по моносахаридному

Сокращения: ЛПС — липополисахарид; ЛПБ-комплекс — липополисахарид-белковый комплекс; КДО — 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота; Раг — 3,6-дидезокси-D-глюкоза (паратоза); Нер — гентоза; Миr — оксимиристиновая кислота; Лаи — лауриновая кислота.

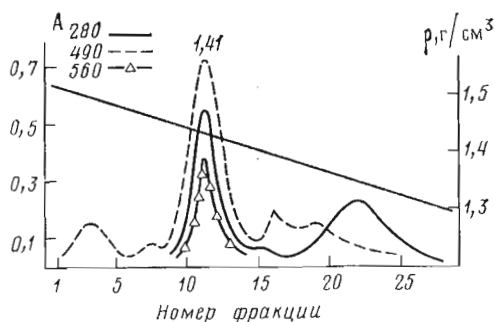


Рис. 1. Центрифугирование ЛПБ-комплекса, полученного по способу 1, в градиенте хлористого цезия. Условия см. в «Экспер. части»

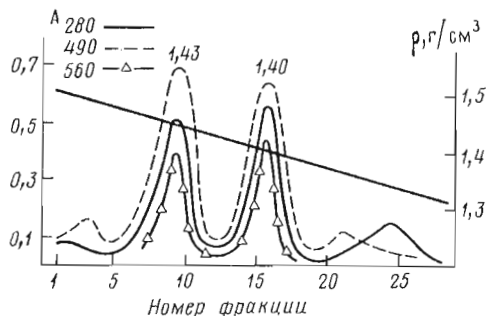


Рис. 2. Центрифугирование в градиенте хлористого цезия нелиофилизованного комплекса, полученного по способу 2. Условия см. в «Экспер. части»

составу и плотности был идентичен О-специфическому полисахариду, полученному при мягком кислотном гидролизе ЛПС из псевдотуберкулезного микроба серовара 1В. Эта полисахаридная фракция, по-видимому, либо является продуктом частичной деструкции ЛПС в процессе выделения, либо присутствует в клетке наряду с ЛПС. Наличие свободных гаптенных в клетках энтеробактерий было показано неоднократно [9]. Тот факт, что гаптены не отделяются от ЛПБ-комплекса в процессе хроматографии на сефарозе 2В, но могут быть отделены при центрифугировании в хлористом цезии, вероятно, объясняется их способностью образовывать агрегаты с комплексом, которые разрушаются под действием высокой ионной силы растворов. Примеси, отделяющиеся от комплекса А при изоплотностном центрифугировании, составляют 30–40% (рис. 1). Способность ЛПС образовывать смешанные агрегаты с макромолекулами разной природы хорошо известна [10].

При изоплотностном центрифугировании ЛПБ-комплекса, выделенного по способу 2, в градиенте хлористого цезия обнаружены две фракции ЛПБ-комплекса с плотностью 1,40 и 1,43 г/см<sup>3</sup>, обозначенные нами как комплексы В и С соответственно (рис. 2). Количество примесей, отделяемых в этих условиях от комплексов, незначительно (рис. 2). Повторное центрифугирование комплексов В и С подтверждает наличие в данном штамме псевдотуберкулезного микроба двух форм ЛПБ-комплекса, различающихся по плотности. Однако после диализа смеси комплексов В и С против воды и лиофилизации в градиенте хлористого цезия наблюдается образование лишь одной зоны с плотностью 1,41 г/см<sup>3</sup>. По-видимому, в этих условиях происходит гибридизация двух форм ЛПБ-комплекса с образованием комплекса с промежуточной плотностью. В пользу этого предположения свидетельствует отмеченная Рудбахом [10] склонность к спонтанной гибридизации двух разных ЛПС в водном растворе в отсутствие диссоциирующих агентов. В связи с этим комплекс А, выделенный по способу 1, можно рассматривать как гибридную форму комплексов В и С.

## Физико-химические характеристики ЛПБ-комплексов

ЛПБ-комплекс	$\rho$ , г/см <sup>3</sup>	$M_{W_0} \cdot 10^{-6}$	$s_{20, w} \cdot 10^{13}$
А	1,41	1,3	26
В	1,43	1,1	20
С	1,40	1,8	32

Таблица 2

## Характеристика ЛПБ-комплексов

ЛПБ-комплексы	Содержание, %				Состав		
	моносахариды	белок	жирные кислоты	KDO	жирные кислоты	моносахариды	Fuc/Нер, моль/моль
А	55,1	29,3	4,0	3,9	Mir, Lau	Fuc, Man, Gal, KDO, Нер, GlcNAc	—
В	52,5	19,0	3,4	3,3	То же	То же	4,3
С	48,2	39,3	4,8	3,6	»	»	2,7

Ранее две формы ЛПС, различающиеся по плотности и химическому составу, были выделены из *E. coli* [11]. Их фракционирование достигалось гель-хроматографией на сефарозе 4В. Нам не удалось добиться хорошего разделения ЛПБ-комплексов В и С с помощью гель-хроматографии, по-видимому, из-за сравнительно небольшого различия их молекулярных масс: определенные методом равновесного ультрацентрифугирования, они составляют  $1,1 \cdot 10^6$  и  $1,8 \cdot 10^6$  соответственно (табл. 1).

Сравнительное изучение комплексов В и С показало, что они имеют одинаковый качественный жирнокислотный и моносахаридный состав, характерный для ЛПС псевдотуберкулезного микроба серовара 1В [12, 13] (табл. 2). Однако количественное содержание основных моносахаридов, определенное методом ГЖХ, различно. Так, мольное отношение фукозы к гелтозе, характеризующее соотношение О-специфической цепи и кора, для комплексов В и С составляет 4,3 и 2,7 соответственно. Это указывает на различную длину О-специфической цепи, а следовательно, и разное относительное содержание полисахарида и липида в комплексах В и С (табл. 2). Белковый состав двух форм ЛПБ-комплекса также идентичен и представлен, по данным электрофореза в полиакриламидном геле [7], двумя полипептидами с молекулярными массами 18 000 и 40 000. Но, как видно из табл. 2, относительное содержание белка в них заметно различается при практически одинаковом общем содержании углеводов.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что комплексы различаются относительным содержанием полисахарида, белка и липида и это обуславливает их разную плавучую плотность. Подобное различие в плотности, вызванное разным содержанием белка, наблюдали также для ЛПС *E. coli* [8].

Было проведено иммунохимическое изучение комплексов В и С. Комплексы иммуногенны для кроликов: при внутривенном введении были получены антисыворотки с одинаковыми титрами антител (титры в реакции непрямой геммагглютинации 1 : 51 000) [14].

Результаты иммуноэлектрофореза и двойной диффузии (рис. 3) указывают на антигенную гомогенность двух форм ЛПБ-комплекса и на идентичность всех распознаваемых детерминант (рис. 3а). Однако данные ингибирования (рис. 4) свидетельствуют о некоторых различиях в их антигенной структуре. Была исследована способность комплексов ингибировать реакцию связывания комплекса В, меченного <sup>125</sup>I, со специфическими антителами. Метку вводили в белковую составляющую комплекса. Методами гель-хроматографии на сефарозе 2В, иммуноэлектрофореза и изоплотного центрифугирования в градиенте CsCl показано, что 90%

метки связано с комплексом В. Обе формы ЛПБ-комплекса ингибируют реакцию связывания, что подтверждает присутствие общих детерминантных групп. Но различный наклон кривых ингибирования и разная ингибирующая активность (50% ингибирования достигается в присутствии 500 нг комплекса В и 250 нг комплекса С) указывают на некоторые различия в их антигенной структуре, природа которых в настоящее время выясняется.

Таким образом, в клеточной стенке псевдотуберкулезного микроба серовара 1В обнаружены две формы ЛПБ-комплекса, различающиеся по химическому составу и плотности. Обе формы содержат идентичные антигенные детерминанты, но имеют различия в антигенной структуре. При определенных условиях выделения (низкая ионная сила и лиофилизация) природная гетерогенность может маскироваться вследствие образования гибридной формы комплекса. В этих условиях наблюдается дополнительная его агрегация с компонентами внешней мембраны.

### Экспериментальная часть

ГЖХ выполняли на приборе Pye Unicam, модель 104, с пламенно-ионизационным детектором. Для моносахаридов использовали колонку с 3% QF-I на Gas-Chrom Q (100–200 меш, 170–225° С, 5°/мин); для жирных кислот — 10% SE-30 на Gas-Chrom Q (100–200 меш, 175–230° С, 5°/мин). Радиоактивность измеряли на гамма-автомате НРГ 603 (Tesla, ЧССР).

Опыты по скорости и равновесной седиментации проводили на аналитической центрифуге 3130 (МОМ, ВНР) со шлирен-оптикой при 20° С, используя ячейку капиллярного типа, при концентрации полимера 0,2–1,0 мг/мл. Скорость вращения ротора 12 000 об/мин. Средневесовые молекулярные массы комплексов определяли методом равновесной седиментации при скорости вращения ротора 4000 об/мин с использованием шестиканальной ячейки. Плотность растворов и парциальный удельный объем определяли пикнометрически.

Общее содержание моносахаридов определяли фенол-сернокислотным методом [15], белка — по методу Лоури [16], 2-кето-3-дезоксикетонной кислоты — по методу [17]. Количественное содержание отдельных моносахаридов определяли с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов, жирных кислот — с помощью ГЖХ в виде метиловых эфиров [12], полипептидный состав анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [7] в присутствии додецилсульфата натрия.

Псевдотуберкулезный микроб серологического варианта 1В, штамм 598, выделенный от больного, культивировали на синтетической среде, как описано ранее [7].

*Выделение ЛПБК. Способ 1.* Высушенную микробную массу (50 г) экстрагировали 5% раствором трихлоруксусной кислоты (500 мл) 4 раза по методу Буавена [6]. Полученные экстракты диализовали против воды и лиофилизовали. Выход 1,1%. Эндотоксин очищали от сопутствующих примесей гель-хроматографией на колонке (3×40 см) с сефарозой 2В, как описано ранее [7]. Выход комплекса 37% от загрузки.

*Способ 2.* Экстракты эндотоксина, полученные как описано выше, диализовали против 0,03 М трис-НСl-буфера, рН 8, содержащего 0,15 М NaCl, и концентрировали с помощью ультрафильтрации. 10 мл раствора эндотоксина (100 мг) наносили на колонку с сефарозой 2В (3×40 см) и элюировали этим же буфером. Фракции, выходящие со свободным объемом колонки и содержащие полисахарид, белок и КДО, объединяли и принимали за ЛПБ-комплекс.

*Выделение О-специфического полисахарида.* ЛПС (1,22 г), полученный по методу Вестфала [18], нагревали 3 ч в 1% растворе уксусной кислоты при 100° С. Осадок липида и оставшийся ЛПС удаляли центрифугированием при 105 000g. Супернатант обрабатывали хлороформом для удаления свободных липидов и лиофилизовали. Продукт наносили на колонку (3×65 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,4. Выход 80 мг (6%).

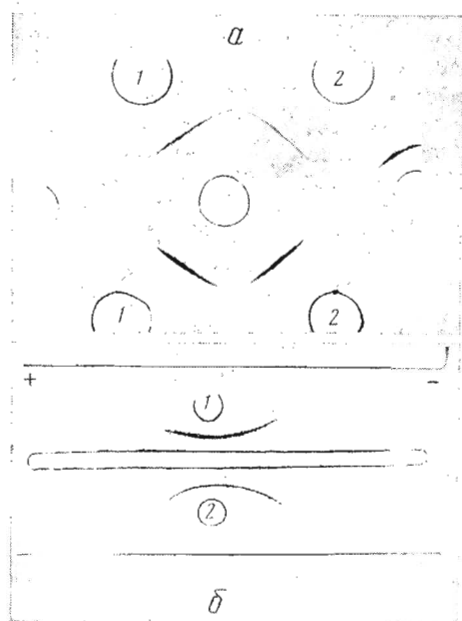


Рис. 3

Рис. 3. Двойная диффузия в 1,5% агаре, 3% ПЭГ (а) и иммуноэлектрофорез в 1,5% агарозе, 3% ПЭГ (б). 1 — ЛПБ-комплекс В, 2 — ЛПБ-комплекс С; IgG-фракция антисыворотки против комплекса В. Условия см. в «Экспер. части»

Рис. 4. Ингибирование реакции связывания ЛПБ-комплекса В, меченного  $^{125}\text{I}$ , со специфическими антителами в присутствии ЛПБ-комплексов В (1) и С (2). Точки показывают среднее четырех измерений  $\pm$  стандартное отклонение

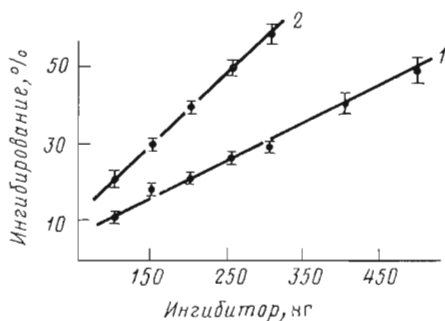


Рис. 4

**Центрифугирование в градиенте хлористого цезия.** ЛПБ-комплекс, полученный по способу 1 (1 мг), растворяли в 10 мл раствора CsCl со средней плотностью 1,41 г/см<sup>3</sup>. ЛПБ-комплекс, полученный по способу 2 (1 мг/мл), добавляли к 9 мл раствора CsCl со средней плотностью 1,42 г/см<sup>3</sup>. О-специфический полисахарид (1 мг) растворяли в 10 мл раствора CsCl со средней плотностью 1,41 г/см<sup>3</sup>. Центрифугирование проводили в роторе Ti-50 на центрифуге К-32 при 56 000 об/мин в течение 72 ч при 20° С. После центрифугирования фракции объемом 0,35 мл объединяли, диализовали против воды, лиофилизовали. Выход комплекса А — 60%, комплекса В — 40%, комплекса С — 40%. Плотность растворов CsCl рассчитывали на основании показателя преломления, определенного на рефрактометре РФ-4.

**Иммунологические методы.** Антисыворотку к комплексу В получали путем трехкратной внутривенной иммунизации кроликов возрастающими дозами антигена (20, 30, 50 мкг) с интервалом 3—4 сут. IgG-фракцию получали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (Reanal) [19]. Двойную диффузию проводили в 1,5% агаре (Difco) и 3% полиэтиленгликоле (Serva, M<sub>r</sub> 6000), иммунофорез — в 1,5% агарозе (Chemarol) и 3% полиэтиленгликоле в 0,025 М веропаловом буфере, рН 8,6, при 8 В/см в течение 1,5 ч.

**Введение  $^{125}\text{I}$ -метки в белковую составляющую ЛПБ-комплекса.** К 0,5 мл раствора ЛПБ-комплекса В (1 мг) до лиофилизации (см. выше) в 0,03 М трис-НСI-буфере, рН 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, добавляли 0,1 мл хлорамина Т (1 мг, Serva) в 0,4 М боратном буфере, рН 7,5, и 0,1 мл Na<sup>125</sup>I (1 мКи, «Изотоп») в том же буфере. Интенсивно перемешивали 7 мин и наносили на колонку (1,5×30 см) с биогелем Р-60 в трис-НСI-буфере, рН 8,0, для удаления свободной метки. Удельная радиоактивность полученного препарата  $3 \cdot 10^6$  имп/мин-мг.

В ингибировании реакции связывания комплекса В, меченного  $^{125}\text{I}$ , со специфическими антителами использовали IgG-фракцию в разведении, при котором связывается 50% внесенной метки. К 0,1 мл IgG-фракции (в разведении 1:250) добавляли увеличивающееся количество комплекса В и С (100—1000 нг) в буфере в окончательном объеме 0,3 мл. После инкубирования в течение 2 ч при 37° С добавляли 0,1 мл комплекса В, меченного  $^{125}\text{I}$  (500 имп/4 с). Инкубировали 2 ч при 37° С, затем 16 ч при

4° С. Осаждали 0,4 мл 72% раствора сульфата аммония и определяли радиоактивность преципитата. Неспецифическое осаждение комплекса В, меченного <sup>125</sup>I, сульфатом аммония в отсутствие антител составляет 5–7%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nowotny A. *Bacteriol. Rev.*, 1969, v. 33, № 1, p. 72–98.
2. Shands J. W. *Microbial Toxins*. N. Y.—L.: Acad. Press, 1971, v. 6, p. 127–143.
3. Ryan J. M., Conrad H. E. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, v. 162, № 2, p. 530–535.
4. Munford R. S., Hall C. L., Rick P. D. *J. Bacteriol.*, 1980, v. 144, № 2, p. 630–640.
5. Ермак И. М., Васильев Б. К., Гладких Р. В., Недашковская Г. М., Шеховцова М. Ф., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. *Химия природ. соедин.*, 1982, № 3, с. 384–388.
6. Babin A., Mesrobian L. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1933, v. 113, № 21/24, p. 490–492.
7. Solov'eva T. F., Jermak I. M., Bondarenko O. D., Frolova G. M., Ovodov Yu. S. *Microbios*, 1979, v. 25, № 101–102, p. 133–144.
8. Betz S. J., Morrison D. C. *J. Immunol.*, 1977, v. 119, № 4, p. 1475–1481.
9. Goldman R. C., White D., Orskov F., Orskov I., Rick P. D., Lewis M. S., Bhattacharjee A. K., Leive L. *J. Bacteriol.*, 1982, v. 151, p. 1210–1221.
10. Morrison D. C., Rudbach J. A. In: *Contemporary topics in molecular immunology*/ Eds Inman P., Mandy W. J. N. Y.—L.: Plenum Press, 1981, v. 8, p. 187–217.
11. Goodman M. G., Morrison D. C., Weigle W. O. *J. Immunol.*, 1977, v. 118, № 5, p. 1852–1857.
12. Krasikova I. N., Gorbach V. I., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 89, № 1, p. 287–289.
13. Tomshich S. V., Gorshkova R. P., Elkin Yu. N., Ovodov Yu. S. *J. Biochem.*, 1976, v. 65, № 1, p. 193–196.
14. Фролова Г. М., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. *Журн. микробиол.*, 1980, № 8, с. 118–119.
15. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. *Analyt. Chem.*, 1956, v. 28, № 2, p. 350–356.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
17. Burtseva T. I., Glebko L. I., Ovodov Yu. S. *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 64, № 1, p. 1–4.
18. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. *Z. Naturforsch.*, 1952, v. 7b, № 1, p. 148–155.
19. Fahey J. L., McCoy P. F., Goulian M. *J. Clin. Invest.*, 1958, v. 37, p. 272–275.

Поступила в редакцию  
20.XII.1984  
После доработки  
20.III.1985

#### ON VARIOUS FORMS OF LIPOPOLYSACCHARIDE-PROTEIN COMPLEX FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

ЕРМАК И. М., ФРОЛОВА Г. М., СОЛОВЬЕВА Т. Ф., ОВODOV Ю. С.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science  
Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Two forms of lipopolysaccharide-protein complex with buoyant densities of 1,43 and 1,40 g/cm<sup>3</sup> were found in the *Yersinia pseudotuberculosis* cell wall. These forms have the similar monosaccharide, fatty acid and polypeptide compositions, but differ in the length of O-specific chains. The differences in density are stipulated by the different contents of the main components of the complex. Both forms contain the related antigenic determinants but have some differences in the antigenic structure. The ability of the two forms to produce a hybrid form with the intermediate density of 1,41 g/cm<sup>3</sup> has been shown.