



УДК 579.841.93.083.3:577.113.5

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА  
БРУЦЕЛЛ (poly-B)

Тьвов В. Л., Плужникова Г. Н., Данина Е. Б.,  
Шапков А. С.\*, Аскерова С. А., Маликов В. Е.,  
Драновская Е. А., Дмитриев В. А.

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР, Москва;

\*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

Из клеток вирулентного штамма *Brucella melitensis* 16М выделен циклический (1→2)-β-D-глюкан, строение которого доказано данными кислотного гидролиза, анализом методом метилирования и спектроскопией <sup>13</sup>C-ЯМР. Циклоглюкан образует с демилцеллированной формой липополисахарида *B. melitensis* 16М устойчивый комплекс, идентичный, по данным иммунодиффузии, описанному в литературе диагностическому полисахаридному антигену бруцелл (poly-B).

Диагностика бруцеллеза остается до настоящего времени важной проблемой, несмотря на широкое применение для ее решения различных серологических методов. Иммунохимические исследования углеводсодержащих антигенов бруцелл, осуществленные различными авторами без привлечения сведений о химическом составе и строении этих антигенов, привели к накоплению противоречивых данных о существовании таких антигенов, как «нативный гаптен» и «полисахаридный антиген» бруцелл, получивший название poly-B-антиген, и их взаимосвязи с липополисахаридом (ЛПС) [1]. Кроме того, утвердилось мнение, что эти антигены существуют не только как таковые, но и образуют ковалентно связанные комплексы с белковыми антигенами бруцелл [2].

Поскольку эти противоречия не могли быть разрешены без привлечения сведений о структуре названных антигенов, мы предприняли систематическое химическое изучение антигенов бруцелл. Ранее мы установили строение O-специфических полисахаридных цепей ЛПС *Brucella melitensis* 565 и *B. abortus* 19-ВА [3]. В настоящей работе мы приводим данные о химическом строении полисахаридного poly-B-антигена, который в последнее время применяется при диагностике бруцеллеза животных серологическим методом [4].

Poly-B-антиген был выделен по описанной методике [5] автоклавированием клеток вирулентного штамма *B. melitensis* 16М в воде с последующим ступенчатым осаждением спиртом. В результате первого осаждения тремя объемами спирта получен препарат 1, а после второго осаждения надосадочного раствора двумя объемами спирта — препарат 2, выходы которых составили 7 и 10% от веса сухих клеток соответственно. Изучение препаратов методом двойной иммунодиффузии по Оухтерлони в агарозном геле, содержащем 10% хлористого натрия [6], с сывороткой коров, зараженных клетками *B. abortus* 54, показало, что препарат 1 дает две дуги преципитации, из которых малоподвижная соответствовала ЛПС, а быстроидущая — антигену poly-B. В случае препарата 2 наблюдалась только одна дуга преципитации, соответствующая poly-B-антигену. Полученные результаты иммунодиффузии полностью совпадали с литературными данными работы [5]. Проверка препарата 2 методом радиальной иммунодиффузии в реакции с сыворотками зараженных и вакцинированных коров показала, что кольцо преципитации poly-B-антигена образуется только в случае больных животных. Таким образом, по методу получения

и серологическим свойствам препарат 2 представлял собой серологически однородный poly-B-антиген.

При гель-хроматографии на колонке с сефарозой 4В в воде препарат 2 был разделен на два компонента. Первый из них элюировался со свободным объемом колонки и представлял собой ЛПС: при изучении данного образца методом иммунодиффузии наряду с полосой преципитации ЛПС была обнаружена слабая полоса, соответствующая poly-B-антигену. Второй компонент элюировался с полным объемом колонки и представлял собой неизвестный полисахарид (реакция с фенолом и серной кислотой). Методом иммунодиффузии в нем также обнаруживалась слабая полоса poly-B-антигена. Промежуточная фракция содержала незначительное количество поли- и олигонуклеотидов (сильное поглощение при 250—270 нм и обнаружение рибозы и 2-дезоксиприбызы в гидролизате 1 М соляной кислотой) и далее не исследовалась.

Повторная хроматография полученных фракций на колонке с сефарозой 4В показала, что из первой высокомолекулярной фракции отделилось некоторое количество низкомолекулярного компонента, а из второй — некоторое количество ЛПС. В результате двух хроматографий на сефарозе 4В из 100 мг препарата 2 было получено 10 мг ЛПС и 75 мг неизвестного полисахарида, причем обе фракции при последующей хроматографии оказались гомогенными и утратили серологическую специфичность, свойственную poly-B-антигену по данным иммунодиффузии.

На основании приведенных выше данных можно было предположить, что poly-B-антиген не является индивидуальным полимером, а представляет собой комплекс, включающий как ЛПС высокомолекулярной фракции, так и неизвестный полисахарид из низкомолекулярной фракции. Действительно, прямое сравнение спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР вещества высокомолекулярной фракции и образца ЛПС из штамма *V. melitensis* 565, строение O-специфического полисахарида которого было нами установлено ранее [3], показало их идентичность и окончательно доказало, что высокомолекулярным компонентом poly-B-антигена является S-ЛПС.

Для структурного исследования полисахарида, входящего в состав низкомолекулярной фракции, он был дополнительно очищен от несущественных примесей олигонуклеотидов пропусканием через колонку с DEAE-Toyorearl 650. Главный компонент, составляющий 92% от веса нанесенного на колонку вещества и выходящий с колонки при элюировании водой, был затем подвергнут хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-50(S). Полученный полисахарид был гомогенным, по данным ВЭЖХ на колонке с TSK-гелем G-2000 SW, и его молекулярная масса не превышала 5 кДа при сравнении с декстрапами фирмы Pharmacia.

В гидролизате полученного полисахарида методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов была идентифицирована только глюкоза, которая полностью окислялась *D*-глюкозооксидазой. При исследовании полученного глюкана методом метилирования с хроматомасс-спектрометрическим анализом частично метилированных сахаров в виде ацетатов полиолов была идентифицирована только 3,4,6-три-*O*-метилглюкоза.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР глюкана содержал шесть сигналов единичной интегральной интенсивности, причем в отличие от хорошо разрешенных, но несколько уширенных резонансных линий с химическими сдвигами 61,60; 69,63; 76,34 и 77,15 м.д. в аномерной области спектра присутствовал набор очень близко расположенных сигналов (единичной суммарной интенсивности) с максимумом при 102,86 м.д., а в области спектра, соответствующей замещенным атомам углерода, были обнаружены три резонансные линии при 82,44; 83,08 и 83,29 м.д. (суммарная интегральная интенсивность равна 1).

Анализ литературных данных, касающихся  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии (1→2)-глюканов, показал, что спектральные характеристики выделенного нами препарата и циклического (1→2)-β-*D*-глюкана, строение которого недавно окончательно выяснено [7], полностью совпадают. Наличие чрезвычайно характерного набора резонансных линий в области аномерных и замещенных атомов углерода обоих спектров однозначно свидетельство-

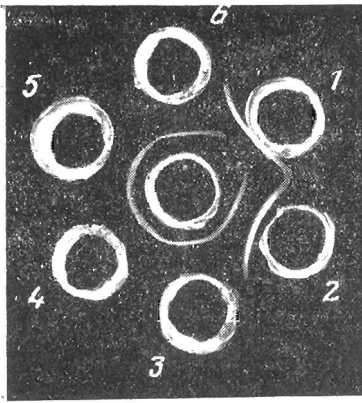


Рис. 1

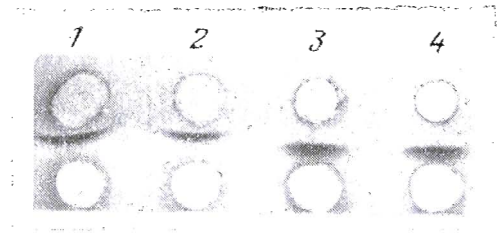


Рис. 2

Рис. 1. Реакция двойной иммунодиффузии в 1% агарозе (0,05 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 10\%$  NaCl, pH 8,5) с сывороткой коров, зараженных вирулентной культурой *B. abortus* 54 (в центре). В лунки 1–5 ввели ЛПС *B. melitensis* 16М (100 мкг/мл), а также циклоглюкан в количестве 0 (1), 3 (2), 100 (3), 1000 мкг/мл (4). Образцы 2–5 перед введением в лунки нагревали 1 ч при 120°С в запаянных ампулах. 6 – антиген poly-B

Рис. 2. Реакция двойной иммунодиффузии в 1% агарозе (0,05 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 10\%$  NaCl, pH 8,5) с сывороткой коров, зараженных вирулентной культурой *B. abortus* 54 (нижний ряд лунок). Верхние лунки соответствуют ЛПС (100 мкг/мл) в отсутствие (1) и в присутствии 0,02 (2) и 0,25% (3) дезоксихолата натрия. 4 – антиген poly-B. Образцы 2, 3 перед введением в лунки нагревали 15 мин при 65°С

вало, что глюкозосодержащим компонентом так называемого poly-B-антигена является циклический (1→2)-β-D-глюкан\*.

Принимая во внимание тот факт, что основными компонентами poly-B-антигена являются S-ЛПС и циклический (1→2)-β-D-глюкан, каждый из которых в отдельности не преципитирует в условиях реакции Оухтерлони с образованием характерической полосы poly-B-антигена, естественно было предположить, что их смешение может привести к реконструкции poly-B-антигена. Изучение с помощью метода иммунодиффузии смесей ЛПС и циклоглюкана при их различных соотношениях показало отсутствие искомой полосы преципитации. Однако полоса преципитации poly-B появлялась после нагревания смесей при 120°С в течение 30 мин в запаянной ампуле (сравнение с заведомым образцом осадка 2, полученного по методу [5]). Полоса преципитации poly-B-антигена наблюдалась при соотношении ЛПС – циклоглюкан 1: 0,03–10, однако только при соотношении ЛПС – циклоглюкан 1: 0,12–0,25 обеспечивалось полное исчезновение полосы, соответствующей ЛПС (рис. 1).

Из приведенных выше данных следовало, что poly-B-антиген представляет собой комплекс S-ЛПС и циклического (1→2)-β-D-глюкана, который может образоваться лишь в результате предварительного демцеллирования исходного ЛПС при нагревании последнего в присутствии циклоглюкана. Циклоглюкан при этом играет, по-видимому, роль стабилизатора демцеллированной формы ЛПС. Действительно, при изучении методом иммунодиффузии образца ЛПС, нагретого при 120°С в течение 30 мин, оказалось, что полоса преципитации, характерная для мцеллированной формы ЛПС, исчезает и появляется полоса, соответствующая poly-B-антигену (см. рис. 1). Повторное проведение реакции иммунодиффузии с тем же образцом ЛПС через 2 сут показало, что ЛПС вновь полностью перешел в мцеллированную форму, т. е. соответствующая полоса преципитации обнаруживалась вблизи лунки с антигеном (преципитационная картина реконструированных образцов poly-B-антигена не изменялась в течение

\* Наличие в слабополярной области спектра <sup>13</sup>C-ЯМР, соответствующей резонансу аномерных и замещенных атомов углерода, наборов близко расположенных сигналов (см. выше) однозначно доказывало гетерогенность выделенного глюкана по количеству остатков D-глюкозы в полицикле. Действительно, по данным ВЭЖХ на колонке Zorbax-NH<sub>2</sub> в водном ацетонитриле, образец глюкана содержал по меньшей мере семь компонентов.

проведения данного исследования). Таким образом, из приведенных выше данных следует заключение, что присутствие циклоглюкана делает процесс демицеллирования ЛПС при нагревании необратимым.

Вывод о том, что циклоглюкан выступает в роли стабилизатора демицеллированной формы ЛПС, подтверждается экспериментами по изучению методом иммунодиффузии образцов ЛПС, предварительно нагретых с различными количествами дезоксихолата натрия ( $65^{\circ}\text{C}$ , 15 мин). При повышении концентрации дезоксихолата натрия полоса преципитации ЛПС смещается от лунки с антигеном к лунке с антисывороткой, и при концентрации детергента 0,25% наблюдается полная идентичность полос, соответствующих poly-B-антигену и ЛПС, демицеллированного с помощью дезоксихолата натрия (рис. 2). Необходимо отметить, что дезоксихолат натрия в данном случае выполняет функцию демицеллирующего агента, причем степень демицеллирования ЛПС возрастает с повышением концентрации детергента (ясно, что подвижность полосы преципитации, соответствующей ЛПС, определяется степенью мицеллообразования). В случае циклоглюкана можно предположить, что стабилизация демицеллированной формы ЛПС, возникающей в процессе нагревания растворов ЛПС, протекает за счет комплексообразования с участием липидного компонента ЛПС. Склонность к образованию комплексов вдедрения для циклических  $(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-}$ глюканов отмечалась ранее [7].

Многочисленными исследованиями, проведенными в течение последних двух десятилетий, установлено, что ЛПС *B. melitensis* и *B. abortus* при экстракции водным фенолом по Вестфалю [8] оказываются в фенольной фазе. Естественно было предположить, что циклоглюкан при этом может быть выделен из водной фазы экстракта. Действительно, из водного слоя при экстракции сухих бактериальных клеток *B. melitensis* 16М с помощью ионообменной хроматографии с последующей гель-хроматографией, как описано выше, был выделен циклический  $(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-}$ глюкан,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр которого полностью совпал со спектром циклоглюкана, полученного из препарата 2 (см. выше). Его выход составил 9% от веса сухих клеток, а выход ЛПС из фенольного слоя — 6,3% (последний был выделен из сырого экстракта гель-хроматографией на колодке с сефарозой 4В).

Эксперименты по реконструированию poly-B-антигена нагреванием смесей ЛПС и циклоглюкана, как описано выше, показали, что и в этом случае наблюдается образование преципитата в области, характерной для poly-B-антигена.

Таким образом, показано, что в составе паружной мембраны клеток вирулентного штамма *B. melitensis* 16М присутствуют два углеводсодержащих компонента — O-специфический ЛПС и неиммуногенный циклический  $(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-}$ глюкан. Эти компоненты способны образовывать антигенный комплекс, получивший название poly-B.

### Экспериментальная часть

Выращивание бактериальных клеток и получение сухой клеточной массы *B. melitensis* 16М проводили как описано в предыдущем сообщении [3].

**Серологические методы.** Серологические свойства антигенов изучали в реакции двойной иммунодиффузии по Оухтерлони с использованием 0,05 М боратного буфера (рН 8,6), содержащего 10% хлористого натрия [6], а также в реакции радиальной иммунодиффузии по Манчии [4]. В обеих реакциях использовались сыворотки, полученные от крупного рогатого скота после вакцинации и экспериментального заражения. Несколько групп телок (от 10 до 30 голов 5–6- или 16–17-месячного возраста) иммунизировали полными дозами (80 млрд. микробных клеток) вакцин из штамма *B. abortus* 19 и сыворотки получали на 15, 30 и 45-е сут после иммунизации. Экспериментальное заражение проводили конъюнктивально вирулентным штаммом *B. abortus* 54 в дозе 14,5–16,5 млн. микробных клеток. В реакции радиальной иммунодиффузии с poly-B-антигеном сыворотки вакцинированных животных были отрицательны во все сроки исследования, тогда как сыворотки крови всех экспериментально зараженных животных становились положительными в реакции радиальной иммунодиффузии на 45-е сут после заражения. При бактериологическом исследовании плодов и органов зараженных животных культуры вирулентного штамма *B. abortus* 54 были выделены в 100% случаев.

*Общие методы.* Описание общих методов приведено в предыдущем сообщении [3]. Выделение и очистку ЛПС, а также анализ методом метилирования осуществляли как описано в предыдущем сообщении [3].

*Хроматографические методы.* Ионнообменную хроматографию проводили на колонке (2×10 см) с DEAE-Toyosorb 650 (Toyo Soda, Япония) в воде. Гель-хроматография была выполнена на колонке (1,6×90 см) с Fractogel TSK HW-50 (S) (Merck, ФРГ) в 0,01 М уксусной кислоте при скорости элюирования 18 мл/ч. ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа фирмы Gilson на колонке (0,4×25 см) с Zorbax-NH<sub>2</sub> в водном ацетонитриле при скорости элюирования 1 мл/мин, как описано в работе [7]. Вещества обнаруживали с помощью проточного спектрофотометра (206 и 254 нм) или проточного рефрактометра.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Moreno E., Speth S. L., Jones L. M., Berman D. T. // *Infect. Immun.* 1981. V. 31. № 1. P. 214–222.
2. Perera V. Y., Winter A. J., Ganem B. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1984. V. 21. № 1. P. 263–266.
3. Львов В. Л., Маликов В. Е., Шашков А. С., Драновская Е. А., Дмитриев В. А. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. № 7. С. 963–969.
4. Dias R., Caratea P., Jones L. M., Moriyon I. // *J. Clin. Microbiol.* 1979. V. 10. № 1. P. 37–41.
5. Dias R., Toyos J., Salvo M. D., Pardo M. L. // *Ann. Rech. Vet.* 1981. V. 12. № 1. P. 35–39.
6. Jones L. M., Berman D. T., Moreno E., Dcyoe B. L., Cilsdorf M. J., Huber J. D., Nicoletti P. // *J. Clin. Microbiol.* 1980. V. 12. № 6. P. 753–760.
7. Amemura A. // *Mem. Inst. Sci. Ind. Res. Osaka Univ.* 1985. V. 42. P. 69–79.
8. Westphal O., Jann K. // *Meth. Carbohydr. Chem.* V. 5. N. Y.—L.: Acad. Press, 1965. P. 88–91.

Поступила в редакцию  
20.III.1987

#### MOLECULAR NATURE OF THE POLYSACCHARIDE B ANTIGEN FROM BRUCELLA (poly-B)

L'VOV V. L., PLUZHNIKOVA G. N., LAPINA E. B., SHASHKOV A. S\*,  
ASKEROVA S. A., MALIKOV V. E., DRANOVSKAYA E. A., DMITRIEV B. A.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;*

\* *N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of  
Sciences of the USSR, Moscow*

Cyclic (1→2)-β-D-glucan was isolated from killed cells of pathogenic *Brucella melitensis* 16M. Its structure was deduced mainly from the acid hydrolysis, methylation analysis and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy data. The cycloglucan and demicellated lipopolysaccharide of *B. melitensis* 16M form a stable complex identical, by immunodiffusion test, to the earlier described polysaccharide B antigen.