



УДК 577.112'314.6.083+616.097.612.017

КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ИЕРСИНИНА — ОСНОВНОГО БЕЛКА ВНЕШНЕЙ
МЕМБРАНЫ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБА

Новикова О. Д., Фролова Г. М., Вакорина Т. И.,
Таранкова З. А., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф.,
Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

С помощью спектроскопии КД, флуоресценции и иммуноферментного анализа изучены изменения пространственной организации и антигенной структуры персинина, порина из внешней мембраны псевдотуберкулезного микроба, в различных денатурирующих условиях (растворах детергентов при различных температурах и низких значениях pH). Показано, что вторичная структура персинина достаточно стабильна, содержание отдельных ее элементов зависит от специфического взаимодействия белок — денатурирующий агент. Процесс денатурации персинина, как и других олигомерных мембранных белков, проходит в две стадии: диссоциация олигомеров и денатурация мономеров. На первой стадии на уровне четвертичной структуры наблюдались достаточно глубокие изменения в пространственной организации белка, сопровождающиеся потерей конформационных детерминант. Показано, что перестройка третичной структуры мономеров под действием температуры в меньшей степени отражается на изменении антигенной активности персинина.

Ранее нами было показано [1], что основным белком внешней мембраны псевдотуберкулезного микроба *Yersinia pseudotuberculosis* является полипептид с M 37,6 кДа, названный нами иерсинином. Этот белок принадлежит к классу термозависимых порообразующих белков грамотрицательных бактерий, ассоциированных с пептидогликаном (ПГ) [2]. Олигомерная форма персинина, являющаяся тримером (M 105–120 кДа), обладает способностью встраиваться в бислойную липидную мембрану (БЛМ) с образованием пор [3], размер и электрические характеристики которых типичны для поринов других энтеробактерий.

Известно, что порины микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, например *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* [4], в нативной мембране существуют в виде олигомеров, преимущественно тримеров. Олигомеры поринов отличаются повышенной устойчивостью к денатурирующему действию органических растворителей, хаотропных ионов, а также к действию протеолитических ферментов [2]. В растворах SDS изолированные порины сохраняют тримерную структуру до определенной, так называемой критической температуры [2]. Нагревание тримеров в растворах SDS до температуры выше критической приводит к образованию денатурированных мономеров, отличающихся повышенной чувствительностью к протеолиту [5].

По данным многих авторов [6, 7], порины, выделенные из клеток и очищенные различными способами, содержат некоторое количество липополисахарида (ЛПС). Отделение ЛПС сопровождается денатурацией белка [7] и, по мнению некоторых исследователей [2], приводит к потере биологической активности, в частности порообразующих свойств.

Согласно вышесказанному, изолированные порины представляют собой функционально активные ЛПС-белковые комплексы. Информация о третичной и четвертичной структуре белка в составе этих комплексов

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, ПГ — пептидогликан, ЛПС — липополисахарид, БЛМ — бислойная липидная мембрана, ИФА — иммуноферментный анализ.

практически отсутствует в литературе. Весьма ограничены сведения и об изменениях вторичной структуры изолированных поринов под влиянием денатурирующих добавок [8]. Подобные исследования интересны не только в плане изучения процессов денатурации белков этого класса, но и для того, чтобы определить, насколько такая система, представляющая собой комплекс основных компонентов наружной бактериальной мембраны, стабильна вне связи с последней. Кроме того, поскольку порины как видоспецифические антигены привлекают все большее внимание исследователей в качестве перспективных препаратов для иммунодиагностики и вакцинопрофилактики, данные о взаимосвязи между пространственной структурой белка и антигенной активностью помогут правильно оценить возможности практического использования различных молекулярных форм белка.

Настоящая работа посвящена исследованию изменений конформации и антигенной структуры порина из псевдотуберкулезного микроба в растворах ионного (SDS) и неионного (β -октилглюкозид) детергентов в зависимости от температуры и при низких значениях pH.

Порины грамотрицательных бактерий во внешней мембране прочно ассоциированы с ПГ. Комплекс ПГ — белок может быть разрушен только с помощью детергентов при нагревании выше 70° С либо в присутствии высоких концентраций NaCl [2]. В зависимости от способа выделения изолированные порины могут существовать в мономерной или олигомерной молекулярных формах. Ранее было показано [1, 3], что в растворах SDS иерсинии может существовать в трех различных молекулярных формах: олигомер (тример), мономер и денатурированный мономер с кажущимися молекулярными массами 105—120, 33,5 и 40 кДа соответственно. Первые две, тример и мономер с M 33,5 кДа, являются термолabile формами белка, т. е. изменяющими свою электрофоретическую подвижность после нагревания выше критической температуры.

Иерсинии в олигомерной [6] и мономерной [9] формах получали с использованием известных методик (см. «Экспериментальную часть»). Препараты иерсинина были гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS и содержали 65—70% белка и не более 5% моносахаридов.

Критической температурой для иерсинина являются 50° С [10], а при нагревании в растворах SDS при 70—100° С в течение 5 мин обе формы белка переходят в денатурированный мономер (M 40 кДа).

Для решения поставленной задачи (изучение конформационной стабильности иерсинина) представляло интерес охарактеризовать особенности пространственной организации всех вышеуказанных форм белка, а также проанализировать изменения их антигенной активности, т. е. способности связываться со специфическими антителами. Для изучения конформационных изменений различных молекулярных форм иерсинина в растворах были выбраны методы ИФА, спектроскопии кругового дихроизма (КД) и собственной флуоресценции, что позволило выявить влияние денатурирующих условий (различного типа детергентов, повышенной температуры и низких значений pH) на вторичную структуру изолированного белка, а также проследить изменение антигенной структуры иерсинина в связи с изменением четвертичной (третичной) структуры полипептидной цепи белка.

Известно, что антисыворотки к целым клеткам бактерий семейства *Enterobacteriaceae* содержат антитела к порообразующим белкам [11]. Это означает, что на поверхности микробной клетки часть эпитопов принадлежит поринам. Действительно, в результате ингибирования тест-системы псевдотуберкулезный микроб — антисыворотка к поверхностным белкам обнаружено, что как комплекс ПГ — белок, так и изолированный тример порина ингибируют эту тест-систему; полнота ингибирования составляет 40 и 30% соответственно. Эти результаты свидетельствуют о том, что как в составе комплекса с ПГ, так и в изолированном виде тример иерсинина сохраняет нативные эпитопы, присущие ему в интактной мембране. Наблюдаемый низкий уровень ингибирования обусловлен при-

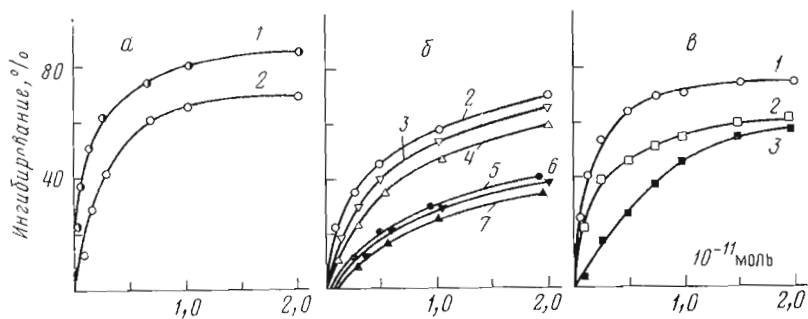


Рис. 1. Иммуноферментный анализ: *a*, *б* – ингибирование реакции связывания комплекса ПГ–белок с антисывороткой к поверхностным белкам псевдотуберкулезного микроба комплексом ПГ–белок (1), образцами тримера мерицина в присутствии 0,1% SDS (2, 5), 0,2% додецилмальтозида (3, 6), 0,2% октилглюкозида (4, 7), взятыми непосредственно (2–4) или после нагревания в соответствующем детергенте при 90° С в течение 10 мин (5–7). В качестве антигена сравнения использовали комплекс ПГ–белок, предварительно выдержанный в 0,1% SDS, сенсибилизационная доза 2 мкг/мл (*a*) или комплекс ПГ–белок (10 мкг/мл) в буфере В (*б*); *в* – ингибирование реакции связывания комплекса ПГ–белок с антисывороткой к олигомерной форме мерицина. Ингибиторы: тример (1), мономер (2) и денатурированный мономер (3)

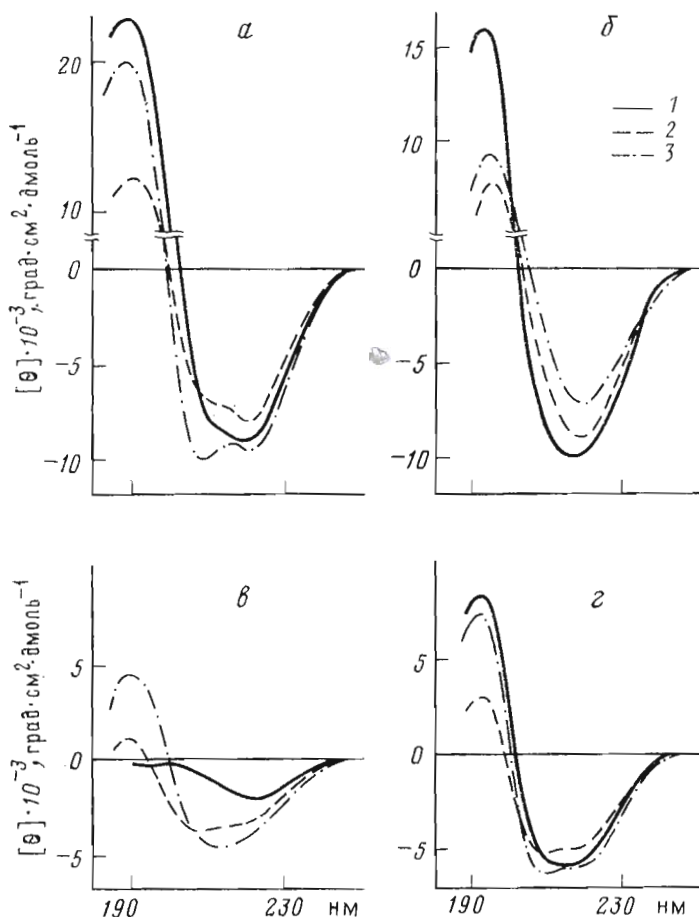


Рис. 2. Спектры КД тримера мерицина в присутствии 0,1% SDS (*a*), 0,2% октилглюкозида (*б*) и 0,13 М НСООН (*в*), мономера мерицина в присутствии 0,1% SDS (*г*). Спектры сняты при 24 (1), 90 (2) и 24° С после предварительного нагрева при 90° С (3)

Характеристика нативного и денатурированного персинина в присутствии различных добавок

Добавки	Препарат персинина	Флуоресценция. $\lambda_{\text{макс}}$ (нм) при $\lambda_{\text{возб}}$ (нм)		КД. Содержание элементов, %			
		280	296	α -спираль	β -структура	β -изгиб	неупорядоченная структура
0,1% SDS	Тример до нагревания	322	328	23	42	14	21
	Мономер до нагревания	327	328	12	48	21	19
	Тример и мономер после нагревания	315	337,4	32	34	14	20
0,2% Октилглюкозид	Тример до нагревания	326	331,5	4	48	23	25
	Мономер после нагревания	331,5	337,2	2	51	23	24
0,13 М HCOOH, pH 2,0, или CF ₃ COOH, pH 1,0	Тример до нагревания	321,0	329	0	54	32	14
	Мономер после нагревания	-	-	4	60	23	14
	Мономер в присутствии 0,1% SDS	307	337				

сутствием на поверхности микробной клетки других антигенов помимо порцинов.

Для повышения чувствительности тест-системы в качестве антигена сравнения был выбран комплекс ПГ-белок. Как видно из результатов ингибирования этой тест-системы (рис. 1а), основная часть антигенных детерминант комплекса ПГ-белок и изолированного тримера персинина идентична. Полученные результаты дают возможность с помощью выбранной тест-системы (ПГ-белок — антиыворотка к поверхностным белкам) проследить за изменением нативной конформации персинина в различных денатурирующих условиях.

Известно, что вторичная структура порина из *E. coli* в липидной мембране [12] характеризуется повышенным содержанием β -структуры ($80 \pm 5\%$) и практически отсутствием α -спирали (не более 4%). При изучении конформационных изменений олигомерной формы персинина указалное выше соотношение элементов вторичной структуры можно рассматривать как своеобразную «точку отсчета», так как можно предположить, что пространственная организация белка в искусственном бислое максимально приближена к таковой в нативной мембране.

При исследовании спектров КД изолированного тримера персинина в растворе было обнаружено, что сигналы наблюдаются только в далекой УФ-области, характеризующей вторичную структуру белка. Отсутствие для персинина явления кругового дихроизма в ближней УФ-области (250—300 нм) может быть следствием увеличения симметризации окружения ароматических аминокислотных остатков, связанного с уменьшением жесткости третичной структуры белка при переходе от мембранно-связанного состояния в растворенное.

В спектре КД белка, растворенного в 0,1% SDS, наблюдаются две полосы, отрицательная при 220 нм и интенсивная положительная при 190 нм (рис. 2а), что указывает на присутствие значительного количества участков с β -структурой и на достаточно высокое содержание α -спиральных участков [13] в полипептидной цепи персинина в этих условиях. После нагрева раствора белка до 80—90° С и последующего охлаждения его до 24° С, т. е. при переходе тримера в денатурированный мономер, в спектре КД появляется новая отрицательная полоса при 208 нм и наблюдается небольшое увеличение эллиптичности при 220 нм. Данные расчета содержания элементов вторичной структуры по методу Проппингера [14] (таблица) свидетельствуют об увеличении в таком образце доли α -спирали до 30% за счет уменьшения содержания β -структур. В 0,2% растворе октил-

гликозида вторичная структура тримера иерсинина ближе к структуре порина в липидной мембране, принятой нами за «точку отсчета»: в спектре КД наблюдается положительная полоса при 195 нм и отрицательная при 216 нм, что характерно для β -структурированных белков [13].

При нагревании иерсинина в присутствии октилглюкозида не обнаружено существенных изменений в содержании регулярной вторичной структуры белка, о чем свидетельствуют спектры КД (рис. 2б) и данные, приведенные в таблице. По данным Маркович-Хоусли и Гаравито [8], нагревание порина из *E. coli* в 1% октилглюкозиде приводило к конформационным изменениям, подобным тем, которые наблюдались при температурной денатурации порина в присутствии SDS с тем лишь отличием, что изменения под действием октилглюкозида были обратимы. Обнаруженные различия в поведении поринов из *E. coli* [8] и *Y. pseudotuberculosis* объясняются, по нашему мнению, различием в используемых концентрациях детергента. 1% раствор октилглюкозида обнаруживал сильное поглощение в области 190 нм, что не позволяло использовать его для получения спектра КД белка, пригодного для расчета по методу Провинчера [14].

Спектр КД тримера иерсинина в 0,13 М HCOOH (pH 2,0) (рис. 2а) отличен от таковых в присутствии детергентов. Нагревание белка в этих условиях приводит к существенным изменениям в спектре КД: увеличивается эллиптичность обеих полос спектра (отрицательной при 215 нм и положительной при 192 нм). Расчеты показывают (таблица), что содержание β -структуры в полипептидной цепи порина при низких значениях pH несколько больше, чем содержание этого типа регулярной структуры в растворах детергентов при pH, близком к нейтральному. Эти данные свидетельствуют о том, что даже такие жесткие денатурирующие условия (pH 2,0) не вызывают разворачивания полипептидной цепи порина. Резкое возрастание доли неупорядоченной структуры наблюдалось для иерсинина только в 6 М гуанидингидрохлориде после нагревания при температуре выше 70° С (данные не приведены).

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. В различных денатурирующих условиях вторичная структура иерсинина достаточно стабильна. После нагревания выше критической температуры она также сохраняется, однако становятся более заметными различия в содержании упорядоченных структур (α -спирали и β -структуры) в зависимости от природы присутствующего в растворе детергента. Температурная денатурация в растворах SDS (в интервале концентраций 0,1–1,0%) приводит к необратимым изменениям в конформации белка. Денатурированный мономер порина отличается от исходного тримера большим содержанием α -спирали в полипептидной цепи белка. При низких концентрациях октилглюкозида (0,2%) вторичная структура иерсинина стабильна даже при нагревании. В связи с этим октилглюкозид в концентрации 0,1–0,2% представляется нам наиболее подходящим детергентом для растворения поринов при исследовании их свойств.

Нагревание в кислых условиях также не приводит к каким-либо существенным изменениям в соотношении элементов вторичной структуры. Очевидно, на этом уровне структура поринов отличается повышенной устойчивостью: молекула белка в растворе, по-видимому, способна стабилизироваться приобретенным определенной конформации, мало зависящей от природы денатурирующего воздействия.

Для выяснения влияния денатурирующих добавок на третичную структуру иерсинина мы сравнили спектры флуоресценции белка в присутствии различных детергентов и при низких значениях pH. Как видно из таблицы, в спектре белка, прогретого в присутствии октилглюкозида, наблюдается длинноволновый сдвиг максимума суммарной флуоресценции остатков тирозина и триптофана на 5 нм ($\lambda_{6336} = 280$ нм). В присутствии же SDS для спектра денатурированного мономера иерсинина характерен коротковолновый сдвиг — спектр белка после нагревания в этом случае имеет максимум эмиссии при 315 нм. Маркович-Хоусли и Гаравито [8] в спектре флуоресценции прогретого в присутствии 1% SDS по-

рина из *E. coli* наблюдали еще большее смещение максимума эмиссии — до 307 нм. Такое же смещение было обнаружено нами в спектре иерсинина в растворе CF_3COOH (рН 1,0) в присутствии 0,1% SDS, причем без детергента эффекта не наблюдалось.

Известно [15], что максимум спектра суммарной флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}=280$ нм) денатурированных белков может смещаться в сторону эмиссии тирозина вследствие увеличения расстояния между остатками тирозина и триптофана и в связи с этим уменьшения или прекращения передачи энергии возбуждения от тирозина к триптофану. Однако квантовый выход флуоресценции * остатков триптофана в иерсинине в растворе CF_3COOH не изменяется при добавлении SDS. Таким образом, наблюдаемое смещение максимума суммарной флуоресценции белка к 307 нм обусловлено, по-видимому, увеличением (приблизительно в 2,5 раза) флуоресценции остатков тирозина, вызванным изменениями в структуре белка в результате специфического действия SDS.

Согласно таблице, при возбуждении только остатков триптофана ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) полосы флуоресценции в спектре иерсинина после нагревания в присутствии детергентов обоих типов имеют близкие значения максимумов ($\lambda_{\text{макс}}=337$ нм). Такой же максимум флуоресценции триптофана наблюдается и в спектре иерсинина, растворенного в CF_3COOH в присутствии 0,1% SDS. Таким образом, во всех исследуемых денатурирующих условиях максимумы спектра флуоресценции триптофана не сдвигаются далее 337 нм в область длинных волн. В связи с этим такое значение максимума в спектре иерсинина при $\lambda_{\text{возб}}=296$ нм можно рассматривать как признак денатурированного мономера. В таком случае, однако, требует объяснения положение максимумов в спектрах флуоресценции остатков триптофана ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм), полученных для иерсинина в тримерной форме при рН 1,0–2,0 и для непрогретого мономера в присутствии SDS (таблица). Очевидно, по отношению к третичной структуре температура является более существенным денатурирующим фактором, нежели присутствие кислоты или детергента в растворе. Тем не менее совокупное действие SDS и кислоты приводит к такой же степени денатурации белка, как и при нагревании.

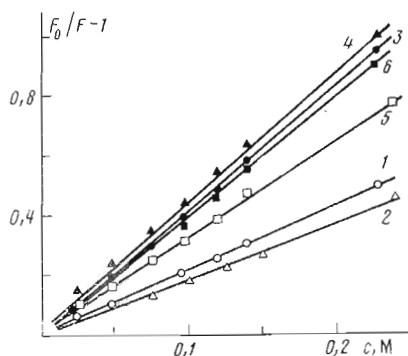
Определение количества ароматических остатков по УФ-спектрам вторых производных, выполненное по методу [16], показало, что в молекуле иерсинина содержатся два остатка триптофана. Графики тушения флуоресценции остатков триптофана нейтральным тушителем акриламидом в присутствии SDS и октилглюкозида в координатах Штерна — Фольмера [17] представляют собой прямые (рис. 3). Это позволяет говорить о том, что в растворах тримера иерсинина в присутствии детергентов обоих типов оба остатка триптофана одинаково доступны тушителю. Однако константы Штерна — Фольмера несколько различаются.

Так, в присутствии октилглюкозида значение константы тушения ($K_{\text{твш}}=1,75 \text{ M}^{-1}$), чем в растворе SDS ($K_{\text{твш}}=2,17 \text{ M}^{-1}$). При температурной денатурации в присутствии как SDS, так и октилглюкозида значение $K_{\text{твш}}$ увеличивается приблизительно в 2 раза. Поскольку относительный квантовый выход остатков триптофана при этом не изменяется, это позволяет предположить, что в присутствии октилглюкозида остатки триптофана более погружены в белковую глобулу, нежели в растворе SDS. При тепловой денатурации остатки триптофана становятся более доступны тушителю независимо от типа присутствующего в растворе детергента. Очевидно, температура в данном случае является определяющим фактором.

Данные по тушению флуоресценции подтверждаются результатами ИФА, представленными на рис. 16. В качестве антигена сравнения был выбран комплекс ПГ—белок, суспендированный в фосфатном буфере. Различия в ингибирующей активности тримера иерсинина в присутствии полного и неионных детергентов незначительны. Наряду с SDS и октилглюкозидом был использован неионный детергент додецилмальтозид в кон-

* Относительный квантовый выход флуоресценции остатков триптофана определяли как отношение площадей полос флуоресценции.

Рис. 3. Графики тушения флуоресценции акриламидом в координатах Штерна — Фольмера; тример иерсинина в присутствии 0,1% SDS (1) и 0,2% октилглюкозида (2); то же после нагревания при 90°С в течение 10 мин (3, 4); мономер иерсинина до (5) и после (6) нагревания в присутствии 0,1% SDS. F_0 и F — интенсивность флуоресценции без тушителя и в присутствии тушителя; c — молярная концентрация тушителя



центрации 0,2%. Денатурация тримера под действием температуры сопровождается потерей части эпитопов. Ингибирующая активность денатурированного мономера существенно уменьшается (почти в 2 раза) и не зависит от детергента.

Таким образом, при денатурации иерсинина обнаружены глубокие изменения в пространственной организации олигомеров белка, определяющие антигенную активность иерсинина. Иммунохимическая идентичность, а также одинаковая степень экспонирования остатков триптофана в среде растворителя, обнаруженная для денатурированных мономеров, полученных в результате нагревания в присутствии различных детергентов, позволяет предполагать, что в структуре белка при этом впе зависимости от типа детергента происходят изменения одного порядка.

На примере некоторых мембранных белков, таких, как порин из *E. coli* [8] и бактериородопсин из пурпурной мембраны [18], показано, что температурную денатурацию олигомеров можно представить как диссоциацию тримера с последующим переходом мономера в денатурированную форму. Мы попытались определить, на каком из этапов этого процесса происходят наибольшие изменения в конформации и антигенной структуре белка. Как видно из рис. 2а и таблицы, спектр КД мономера иерсинина близок к спектру КД тримера, при нагревании мономера наблюдаются те же самые изменения во вторичной структуре белка, что и в случае температурной денатурации тримера. Очевидно, при диссоциации тримера на уровне вторичной структуры иерсинина происходят минимальные изменения.

Однако, как показали данные иммунохимического анализа (рис. 1а), диссоциация тримера иерсинина приводит к существенному уменьшению полноты ингибирования (на 20%), что свидетельствует о потере части эпитопов. С помощью тушения флуоресценции остатков триптофана обнаружено, что $K_{\text{тин}}$ иерсинина при переходе в мономерную форму значительно увеличивается: от 2,17 до 3,2 M^{-1} . Денатурация под действием температуры приводит к дальнейшему увеличению $K_{\text{тин}}$ до 4,05 M^{-1} , что свидетельствует о еще большем экспонировании остатков триптофана в среду растворителя. Интересно, что вторая стадия денатурации тримера белка (переход мономер → денатурированный мономер) не вызывает качественных изменений в антигенной структуре иерсинина. Как видно из рис. 1а, полнота ингибирования мономером и денатурированным мономером иерсинина тест-системы комплекс ПГ-белок — антисыворотка к олигомерной форме иерсинина остается постоянной (60%). Таким образом, при температурной денатурации наблюдается только уменьшение ингибирующей активности белка.

Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом. Очевидно, диссоциация тримера иерсинина сопровождается потерей «топографических» детерминант, присущих олигомерной форме белка, которые формируются на уровне четвертичной структуры. В случае мо-

номерной формы белка выявляется только один тип термостабильных детерминант, не связанных с третичной структурой мономера. Денатурированный мономер, полученный при нагревании в растворе SDS, отличается от мономера иерсинина, полученного в результате диссоциации тримера, количественным содержанием этих детерминантных групп.

Анализ совокупности полученных данных позволяет сделать следующие выводы. В результате воздействия используемых денатурирующих агентов происходят различные по глубине изменения вторичной и четвертичной структур изолированного пориша. При этом в содержании регулярной вторичной структуры белка не происходит радикальных изменений. Сохраняется характерное соотношение элементов вторичной структуры белка: 60–80% обоих типов β -структуры и до 4% α -спирали. Только полный детергент SDS специфически воздействует на вторичную структуру иерсинина: увеличивается содержание α -спирали.

На более высоком уровне организации структуры обнаружены заметные изменения, вызванные диссоциацией олигомера иерсинина. Они приводят к потере молекулой белка «конформационных» детерминант, экспонированных на поверхности микробной клетки. Последующие изменения в структуре мономеров происходят при нагревании при температуре выше критической, однако эта перестройка в меньшей степени отражается на изменении антигенной структуры белка.

Подобный характер денатурации недавно обнаружен при изучении температурной денатурации бактерпородопсина [18]: показано, что изменения в организации молекулы белка происходят главным образом на уровне третичной структуры при минимальных нарушениях на уровне вторичной. Очевидно, это является отличительной особенностью мембранных белков по сравнению с водорастворимыми.

Экспериментальная часть

Выделение и очистка иерсинина. Иерсинин выделяли при диссоциации комплекса ПГ–белок, полученного из *Y. pseudotuberculosis* IB-серовара, штамм 598, согласно работе [1]. Олигомер белка получали при диссоциации комплекса ПГ–белок при 37°С в 0,03 М трис-HCl-буфере, pH 8,0 (буфер А), содержащем 0,5 М NaCl и 1% SDS [6]. Для получения мономера иерсинина свежевыделенный экстракт, содержащий олигомер белка, выдерживали в течение ночи при 37°С в буфере А в присутствии 0,3% SDS и 25 мМ EDTA [9]. Гель-хроматографию иерсинина проводили на колонке (2,6×50 см) с сефакрылом S-200 (Pharmacia, Швеция), уравновешенным буфером А, содержащим 0,3% SDS (для олигомерной формы) и буфером А, содержащим 0,3% SDS и 5 мМ EDTA (для мономерной формы). Полученные фракции анализировали спектрофотометрически при 280 нм и с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS [19]. Фракции, содержащие иерсинин в олигомерной и мономерной формах, объединяли, диализовали против сменяемого 50% этанола для удаления SDS [20], затем против сменяемой дистиллированной H₂O и лиофилизовали.

Моносахариды определяли стандартным методом [21]. Для определения белка использовали модифицированный метод Лоури в присутствии 2% SDS [22].

Иммунохимические методы. Антисыворотку к псевдотуберкулезному микробу получали иммунизацией кроликов взвесью убитых формалином бактерий по следующей схеме: 1 мл взвеси (10⁹ клеток/мл) в присутствии полного адъюванта Фрейнда вводили подкожно и под коленную чашечку. Повторную иммунизацию проводили через месяц. Антисыворотку к поверхностным белкам получали исчерпывающей адсорбцией антисыворотки к микроорганизму липополисахаридом по методике [23]. Полноту истощения контролировали реакцией непрямой гемагглютинации. Антисыворотку к олигомерной форме иерсинина получали по аналогичной схеме, используя для первой иммунизации концентрацию антигена 2 мг/мл, для повторной — 1 мг/мл.

При постановке ИФА применяли непрямой вариант метода, используя в качестве видовых антител коммерческие иммуоферментные конъюгаты производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва).

Результаты реакции учитывали на сканирующем спектрофотометре Multiscan (Финляндия) при 492 нм, применяя в качестве хромогена 0,04% раствор *o*-фенилендиамина.

Сенсибилизацию планшетов проводили: 1) взвесью убитых бактериальных клеток (10^7 клеток/мл) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl (буфер Б) при 4° С в течение ночи; 2) комплексом ПГ-белок (2 мкг/мл) и олигомерной формой нерсинина (20 мкг/мл), предварительно выдержанными в 0,1% SDS, в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,0, при 37° С в течение 2 ч; 3) комплексом ПГ-белок (10 мкг/мл) в буфере Б при 37° С в течение 2 ч.

В качестве ингибиторов использовали комплекс ПГ-белок и различные формы нерсинина в количестве от 1 нг до 5 мкг. При определении влияния температуры на антигенную активность нерсинина использовали образцы белка до и после нагревания при 90° С в течение 10 мин.

Спектральные методы. Растворы различных молекулярных форм нерсинина готовили в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2, с добавлением 0,1% SDS (Serva, ФРГ), 0,2% октилглюкозида* или 0,2% додецилмальтозида* (для ИФА). Для регистрирования спектров КД и флуоресценции иорина при низких значениях pH белок растворяли в 0,13 М HCOOH или в разбавленной CF₃COOH (pH 1,0).

Спектры УФ регистрировали в кварцевых кюветах (1 см) на спектрофотометре Cary 219 (Varian, США). Концентрацию нерсинина определяли спектрофотометрически по $A_{276}^{1\%} = 12,7$.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-500A с процессором DP-501 N (Jasco, Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см для ароматической области, 1 и 0,1 мм — для пептидной области, концентрация нерсинина 1; 0,1 и 1 мг/мл соответственно. Кюветы термостатировали с точностью $\pm 0,05^\circ$ С. Температурное изменение объема раствора белка в кювете учитывали при расчетах эллиптичности. Прибор калибровали по 0,06% водному раствору *d*-камфора-10-сульфоната аммония (Katayama Chemical, Япония); отношение эллиптичности полос при 192 и 290 нм составляло 2,5. В пептидной области эллиптичность полос рассчитывали на средний аминокислотный остаток с M 110 Да: $[Q] = Q \cdot S \cdot 110 / c \cdot l \cdot 10$ (град·см²/дмоль), где S — чувствительность прибора; c — концентрация нерсинина в мг/мл. Спектры КД растворов нерсинина регистрировали при 20 и 90° С, а также после охлаждения прогретого образца до 24° С. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали по методу Провинчера [14].

Корректированные по роданину В (Wako Pure Chemical Industries, Япония) спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре Hitachi 850 (Япония) в стандартных кварцевых кюветах (1 см), ширина щелей возбуждения и эмиссии 6 нм, линии возбуждения 280 и 296 нм. Для тушения спектров флуоресценции использовали водный раствор 2,5 М дважды перекристаллизованного акриламида (Reanal, Венгрия). Константу тушения флуоресценции Штерна — Фольмера (K) рассчитывали по формуле

$$K = (F_0/F - F) / c_m,$$

где F_0 и F — интенсивность флуоресценции без тушителя и в присутствии тушителя; c_m — молярная концентрация тушителя [17]. Спектры флуоресценции растворов нерсинина регистрировали при 24° С до и после нагревания образцов при 90° С в течение 10 мин.

* β -Октилглюкозид и додецилмальтозид синтезированы и очищены С. Г. Полопиком (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новикова О. Д., Зыкова Т. А., Ядыкина Г. М., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 714-723.
2. Lugtenberg B., Van Apphen L. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 737. № 1. P. 51-115.
3. Луцацкая Г. Н., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 12. С. 1219-1224.
4. Palva E. T., Randall L. L. // J. Bacteriol. 1978. V. 133. № 1. P. 279-286.
5. Rosenbusch J. P. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 10. P. 8019-8029.
6. Reithmeier R. A. F., Bragg P. D. // FEBS Lett. 1974. V. 44. № 2. P. 195-198.
7. Roque W. J., Coughlin R. T., McGroarty E. J. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 9. P. 4003-4010.
8. Markovič-Housley Z., Caravito R. M. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 869. № 2. P. 158-170.
9. Weckesser J., Zalman L. S., Nikaido H. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. № 1. P. 199-205.
10. Новикова О. Д., Набуллин А. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Химия природ. соедин. 1983. № 3. С. 359-366.
11. Kuusi M., Nurminen M., Saxon H., Valtonen M., Makela P. H. // Infect. and Immun. 1979. V. 25. № 3. P. 857-862.
12. Vogel H., Jahnig F. // J. Mol. Biol. 1986. V. 190. № 1. P. 191-199.
13. Jirgensons B. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 434. № 1. P. 58-68.
14. Provencher C. W., Glöcker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33-37.
15. Arntfield S. D., Ismond M. A. H., Murray E. D. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1987. V. 29. № 1. P. 9-20.
16. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438-444.
17. Eftink M., Ghiron C. A. // Analyt. Biochem. 1981. V. 114. № 1. P. 199-227.
18. Brouillette C. G., Muccio D. D., Finney T. K. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 9. P. 7431-7438.
19. Ogita Z., Markert C. L. // Analyt. Biochem. 1979. V. 99. № 2. P. 233-241.
20. Weber K., Kuter D. J. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 12. P. 1644-1657.
21. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350-356.
22. Kashyar M. L., Hynd B. A., Robinson K. J. // J. Lipid. Res. 1980. V. 21. № 4. P. 481-484.
23. Natarajan M., Udhayakumar V., Krishnarajuk K., Muthukkaruppan Yr. // Comp. Immun. Microbiol. Infect: Dis. 1985. V. 8. № 1. P. 9-16.

Поступила в редакцию
19.VII.1988
После доработки
21.XI.1988

CONFORMATIONAL STABILITY AND IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES
OF YERSININ, THE MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN
OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

NOVIKOVA O. D., FROLOVA G. M., VAKORINA T. I., TARANKOVA Z. A.,
GLAZUNOV V. P., SOLOV'YEVA T. F., OVODOV Yu. S.

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

Using spectroscopic methods (circular dichroism and intrinsic protein fluorescence) and immunoenzymic assay, changes in the spatial and antigenic structure of yersinin, porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*, were studied in solutions of ionic and non-ionic detergents at various temperatures and low pH values. Yersinin was shown to retain its secondary structure under various denaturation conditions, the content of regular structural patterns depending on specific action of the denaturation agent. Process of yersinin denaturation similarly to other membrane proteins appears to occur via two structural transitions: dissociation of oligomers and denaturation of monomers. At the first stage changes of quaternary structure accompanied by the loss of so called conformational determinants were observed. Temperature-dependent changes of monomers' tertiary structure affect antigenic activity of yersinin in a smaller degree.