



УДК 579.84.083.3

© 1990 г.

Г. А. Набережных, Т. Ф. Соловьева, Ю. С. Оводов

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ  
О-АНТИГЕНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*  
и *PSEUDOMONAS FLUORESCENS****Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР, Владивосток*

Исследовано взаимодействие О-специфических полисахаридов, ЛПС и ЛПБК из *Yersinia pseudotuberculosis* и *Pseudomonas fluorescens* с Fab-фрагментами антител, специфичных к углеводному компоненту О-антигенов. Определены константы ассоциации и число мест связывания для Fab-фрагментов в О-антигенах. Показано, что связывающая активность ЛПС и ЛПБК в значительной степени определяется концентрациями этих антигенов в растворе. Для О-специфических полисахаридов взаимодействие с Fab-фрагментами не зависит от концентрации антигенов. На основании анализа данных связывания установлено, что ЛПС и ЛПБК (в расчете на содержание полисахаридного компонента) связывают меньше антител, чем О-полисахарид, и только 10—15% углеводных детерминант О-антигенов доступны для взаимодействия с антителами.

Липополисахариды, составные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, играют важную роль в формировании иммунного ответа животных и человека при их инфицировании этими микроорганизмами. Иммунологическая специфичность ЛПС определяется детерминантами, находящимися в полисахаридной части этих антигенов.

Известно, что в бактериальной мембране ЛПС прочно и специфически связаны с белками, которые способны модифицировать иммунологические свойства ЛПС [1].

Выделенные из клеток ЛПС и комплексы ЛПС с белками (ЛПБК) образуют в водных растворах крупные макромолекулярные агрегаты, на поверхности которых локализуются О-специфические цепи [2]. Сближенность углеводных цепей в агрегатах ЛПС может в значительной степени изменить способность О-антигенов связываться со специфическими антителами по сравнению с изолированным О-полисахаридом. Так, установлено, что включение гликолипидных гаптенов в липосомы приводит к значительному уменьшению их серологической активности [3]. Изучение таких ассоциированных систем представляет большой интерес для понимания механизмов взаимодействия бактериальной клетки с рецепторами иммунокомпетентных клеток и антителами в процессе иммунного ответа.

В данной работе исследовано взаимодействие антител, специфичных к углеводным детерминантам О-антигенов, с ЛПС, ЛПБК и О-специфическими полисахаридами из двух видов бактерий, принадлежащих к разным семействам.

ЛПС и ЛПБК из *Yersinia pseudotuberculosis* (ЛПС-I, ЛПБК-I) [4, 5] и *Pseudomonas fluorescens* (ЛПС-II, ЛПБК-II) [6, 7] были выделены, очищены и охарактеризованы как описано ранее. О-Специфические полисахариды (ПС-I и ПС-II) получены мягким кислотным гидролизом соответствующих ЛПС с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50. Ранее установлено, что ПС-I состоит из разветвленных пентасахаридных [4], а ПС-II — из линейных трисахаридных повторяющихся звеньев [6].

Сокращения: ЛПС — липополисахарид, ЛПБК — липополисахарид-белковый комплекс, ЗФР — забуференный физиологический раствор.

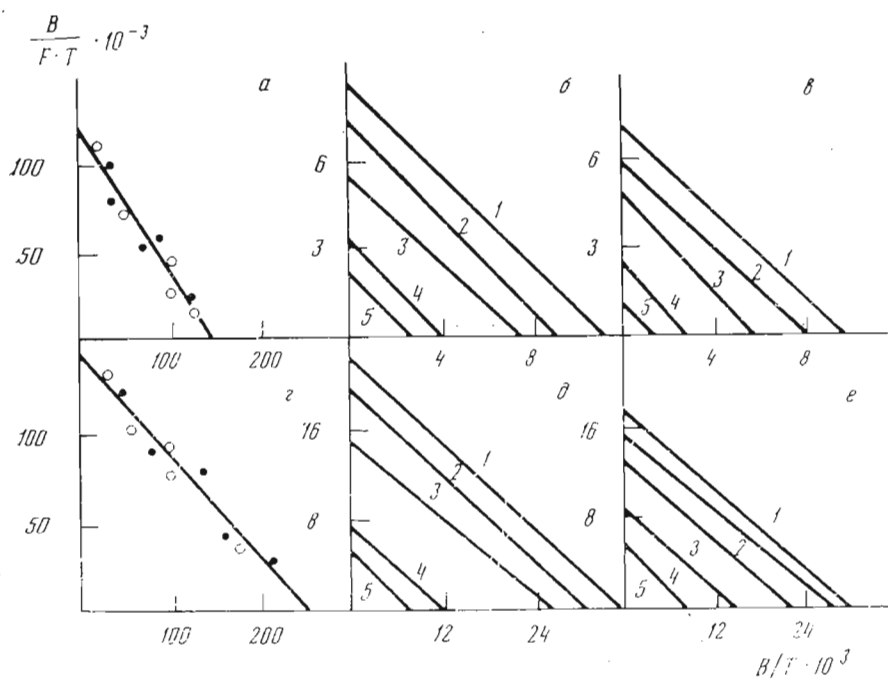


Рис. 1. Связывание ПС-I, II; ЛПС-I, II; ЛПБК-I, II с одновалентными Fab-фрагментами антител. Концентрации антигенов: а — ПС-I 0,01 (○), 0,05 (●); б — ЛПС-I 0,02 (1), 0,1 (2), 0,25 (3), 0,5 (4), 1,0 (5) мг/мл. ПС-II (2), ЛПБК-I (3), ЛПС-II (4), ЛПБК-II (5) вводили в реакцию связывания в тех же концентрациях. В — внесенный  $^{125}\text{I}$ Fab, моль; F — свободный  $^{125}\text{I}$ Fab, моль; T — количество внесенного антигена, выраженное в молях повторяющегося звена полисахаридного компонента

Результаты иммуноферментного анализа и двойной иммунодиффузии указывают на высокую серологическую активность полученных антигенов. Для количественной оценки активности O-антигенов исследовали связывание ПС, ЛПС и ЛПБК со специфическими антителами, выделенными с помощью иммуносорбента — ПС-сефарозы 4В. Ранее нами было показано [7], что взаимодействие ПС-II из ЛПС *P. fluorescens* с поливалентными антителами носит кооперативный характер, что затрудняет определение параметров реакции связывания — констант ассоциации ( $K_a$ ) и количества мест связывания на молекуле антигена. Чтобы упростить определение этих параметров, в реакцию с O-антигенами вводили моновалентные Fab-фрагменты специфических антител.

В эксперименте использовали наиболее аффинную и гомогенную по аффинности фракцию Fab-фрагментов, полученную иммуносорбционной хроматографией. Введение радиоактивной метки  $^{125}\text{I}$  в Fab-фрагменты позволило работать в области достаточно низких концентраций антигенов и увеличило точность определения связанных с антигеном и свободных Fab-фрагментов.

Реакцию связывания ПС, ЛПС, ЛПБК с  $^{125}\text{I}$ -мечеными Fab-фрагментами проводили при нескольких концентрациях антигенов, которые титровали Fab-фрагментами. Данные по связыванию, представленные в виде графиков Скэтчарда, дают линейные зависимости (рис. 1).

Как видно из рис. 1, экспериментальные точки, найденные при изучении взаимодействия ПС в разных концентрациях с Fab-фрагментами, попадают на одну прямую. В то же время точки, полученные при титровании ЛПС и ЛПБК, имеющих разные концентрации, образуют ряд параллельных прямых. Нужно отметить, что прямые связывания, полученные для всех O-антигенов, имеют в среднем одинаковый наклон. Из этих данных следует, что константы ассоциации ( $K_a$ ) антител с ПС, ЛПС и ЛПБК одинаковы для исследуемых антигенов и величины  $K_a$  в среднем равны  $0,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

Из графика Скэтчарда определены точки полного насыщения детерми-

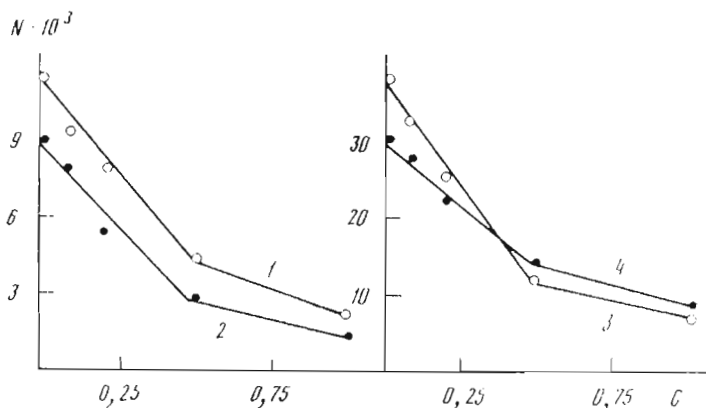


Рис. 2. Зависимость количества связанных Fab-фрагментов от концентрации ЛПС-I (1), ЛПБК-I (2), ЛПС-II (3), ЛПБК-II (4).  $N$  — количество Fab (моль), приходящееся на повторяющееся звено полисахаридного компонента в комплексе антиген — антитело;  $C$  — концентрации антигенов в мг/мл

нант антигенов антителами и рассчитано количество молей Fab-фрагментов, приходящееся на одно повторяющееся звено в О-полисахаридном фрагменте антигенов. Анализ данных связывания показывает, что число связанных молекул Fab-фрагментов не зависит от концентрации ПС в растворе, но в значительной степени определяется концентрациями ЛПС и ЛПБК (рис. 1, 2).

Очевидно, это связано с тем, что ЛПС и ЛПБК в отличие от О-полисахаридов в водных растворах образуют агрегаты молекул ЛПС, размеры, форма и свойства которых зависят от концентрации вещества в растворе [8]. Связывающая активность ЛПС и ЛПБК уменьшается с увеличением концентрации антигена до определенного значения концентрации, после которого она практически не изменяется (рис. 2).

Для ЛПС и ЛПБК из обоих видов бактерий эта концентрация в среднем равна 0,5—0,7 мг/мл. Следовательно, наиболее сильная концентрационная зависимость антигенной активности ЛПС и ЛПБК лежит в области низких концентраций.

Как показано ранее [8], увеличение концентрации ЛПС и ЛПБК сопровождается возрастанием молекулярной массы и размеров агрегатов. Следовательно, укрупнение частиц О-антигенов приводит к уменьшению количества связанных антител и соответственно числа углеводных детерминант, доступных для связывания с антителами. Это может быть вызвано увеличением плотности упаковки углеводных цепей на поверхности агрегатов вследствие изменения формы частиц или экранированием части углеводных цепей. В настоящее время не представляется возможным объяснить механизм этого явления на молекулярном уровне, так как данных о поведении ЛПС и ЛПБК в растворе при низких концентрациях недостаточно.

Таким образом, антигенная активность ЛПС и ЛПБК, особенно в физиологически важной области низких концентраций, сильно варьирует в зависимости от физических характеристик образуемых ими агрегатов.

Полученные экспериментальные данные позволяют сравнить связывающую активность О-полисахарида в составе ЛПС и ЛПБК и в изолированном виде. Так, в точке максимального связывания ПС-I, соответствующей пересечению графика Скэтчарда с осью абсцисс (рис. 1а), 0,14 моль Fab-фрагментов приходится на 1 моль повторяющегося звена ПС-I. Как показано нами ранее [7], ПС-II в точке насыщения детерминант может связать несколько больше Fab-фрагментов — 0,25 моль на повторяющееся звено. Вероятно, отличие связывающей активности полисахаридов может определяться различной конформацией и размерами разветвленных и линейных полисахаридов в растворе [9].

Как показано выше, антигенная активность ЛПС и ЛПБК зависит от концентрации антигенов, поэтому максимальное количество связанных Fab-фрагментов было установлено экстраполяцией к нулевой концентрации графика, выражающего зависимость  $N$  от  $C$  (см. рис. 2). Для ЛПС-I и ЛПБК-I количество связанных Fab-фрагментов составляет 0,012 и 0,009 моль на повторяющееся звено, а для ЛПС-II и ЛПБК-II — 0,04 и 0,03 моль соответственно (рис. 2). Довольно низкая связывающая активность ЛПС и ЛПБК (10—15% от активности ПС) может объясняться действием разных факторов. Так, агрегация молекул ЛПС в водных растворах вызывает сближение полисахаридных цепей и, как следствие, снижение их подвижности, уменьшение доступности отдельных участков для связывания с большими молекулами антител и, возможно, изменение конформации. Действительно, исследование ЛПС и ПС из псевдотуберкулезного микроба методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии обнаруживает значительно более низкую подвижность углеводных цепей в ЛПС по сравнению с ПС [10]. Однако различий в химических сдвигах аномерных атомов углерода в этих спектрах не обнаружено, что может свидетельствовать об отсутствии конформационных различий в углеводных цепях [10]. Важная роль сегментной подвижности полимерной цепи и углевод-углеводных взаимодействий в проявлении антигенной активности отмечалась при исследовании белковых антигенов [11] и гликолипидных гаптанов в липосомах [3].

Анализ ЛПС и ЛПБК из обоих видов бактерий с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии детергента свидетельствует, что молекулы антигенов гетерогенны по длине полисахаридных цепей. По-видимому, в составе агрегата длинные цепи могут экранировать короткие и, кроме того, взаимодействие длинных и коротких O-цепей с антителами может быть неидентичным. По литературным данным, упаковка агрегатов O-антигенов действительно зависит от длины O-цепей и степени гетерогенности молекул по длине цепи. Так, ЛПС из *E. coli*, состоящие из молекул с длинными и короткими цепями, образуют более плотно упакованные агрегаты, чем ЛПС, имеющие только короткие цепи. ЛПС с длинными цепями имеют другой тип упаковки [2]. Влияние такого рода гетерогенности на серологическую активность O-антигенов требует дальнейших исследований.

Все вышеназванные факторы, определяющие активность антигенов, зависят от химической структуры полисахарида, и их вклад неодинаков для ЛПС из разных бактерий. Действительно, O-антигены псевдомонады в среднем в 3 раза более активны, чем ЛПС и ЛПБК псевдотуберкулезного микроба. Это различие выше, чем для изолированных ПС, и, следовательно, может свидетельствовать о большем количестве доступных углеводных детерминант в O-антигенах из псевдомонады.

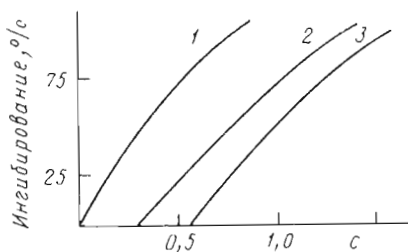
Различие в связывающей активности между ЛПС и ЛПБК хотя и выражено гораздо меньше, чем между ними и ПС, но все же наблюдается. ЛПС из обоих видов бактерий связывают в среднем на 25% больше Fab-фрагментов по сравнению с ЛПБК. Это, возможно, отражает влияние белкового компонента на упаковку O-цепей ЛПС в агрегате и/или различия в степени гетерогенности молекул ЛПС по длине цепи.

Сравнительное изучение активности O-антигенов также проведено методом ингибирования реакции связывания [ $^{125}\text{I}$ ]ПС со специфическими антителами (рис. 3).

Установлено, что антигены проявляют разную ингибирующую активность (50% ингибирование достигается в присутствии 0,25; 0,75; 1,0 мкг ПС-I, ЛПС-I, ЛПБК-I соответственно). Аналогичные результаты получены с O-антигенами псевдомонады. Выявленные закономерности согласуются с данными прямого связывания ПС, ЛПС и ЛПБК с Fab-фрагментами.

Таким образом, сравнительное изучение O-антигенов двух бактерий показало, что связывающая активность O-специфических полисахаридов в изолированном состоянии и в составе ЛПС и ЛПБК (эндотоксинов) в значительной степени изменяется. Связывающая активность ЛПС и

Рис. 3. Ингибирование антигенами ПС-I (1), ЛПС-I (2), ЛПБК-I (3) реакции связывания  $^{125}\text{I}$ ПС-I с антителами.  $c$  — количество ингибитора, выраженное в микрограммах полисахаридного компонента



ЛПБК в области низких концентраций сильно зависит от физических характеристик их агрегатов и, следовательно, может меняться под действием факторов окружающей среды.

### Экспериментальная часть

Бактериальная культура *P. fluorescens*, штамм 361, получена из коллекции Института микробиологии АН СССР (Минск), *Y. pseudotuberculosis* (IV-подсервар, штамм 596) выделен от больного. Культуры выращивали как описано в работах [5, 6].

Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-50 ( $2 \times 100$  см) и G-100 ( $1,5 \times 60$  см) в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5; на колонках с сефакрилом S-300 ( $0,5 \times 30$  см) в фосфатном буфере (0,02 М, pH 7,4), содержащем 0,15 М NaCl (ЗФР), на колонках с сефарозой 2В в трис-НСI-буфере (0,03 М, pH 8).

Анализ аминсахаров проводили на автоматическом анализаторе аминокислот LKB-Biosal 3201 (Швеция). ГЖХ выполнена на приборе Pye Unicam-104 (Англия) на стеклянных колонках ( $0,4 \times 150$  см) с 3% QF1 в программе температур 175—225° С для ацетилированных полиолов.

Радиоактивность определяли на счетчике Yamma-Trac (Tracor Analytic, США). Общее количество моносахаридов устанавливали фенол-серноокислотным методом [12], белка — по Лоури [13].

**Выделение ЛПС, ЛПБК и специфического полисахарида.** Сухие бактериальные клетки экстрагировали 45% водным фенолом по методу [1], водный и фенольный слои разделяли центрифугированием и отдельно диализовали против воды, нуклеиновые кислоты отделяли 3-кратным центрифугированием при 105 000g (3 ч при 4° С). Выход ЛПС составил 1,2% на сухие клетки.

Сухую микробную массу экстрагировали 5% трихлоруксусной кислотой по стандартной методике [1]. ЛПБК очищали ультрафильтрацией и гель-хроматографией на колонке с сефарозой 2В. Выход ЛПБК составил 1%.

ЛПС (200 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (100 мл, 100° С, 2,5 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 из супернатанта выделили O-специфический полисахарид (ПС) (60 мг) и олигосахаридную фракцию кора (65 мг), которая в дальнейшем не исследовалась. ПС дополнительно очищали от примеси ЛПС гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-100.

**Введение иодной метки в полисахарид.** 10 мг ПС растворяли в 1 мл ЗФР, добавляли 30 мг цианборгидрида натрия и 40 мг тирамина и инкубировали 12 сут при 20° С. ПС отделяли от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-50. Выход тираминированного полисахарида составил 7 мг. Иодирование полисахарида проводили с помощью хлорамина Т по методу [14]. Удельная радиоактивность составила  $6 \cdot 10^5$  имп/мин на 1 мкг.

**Получение антисыворотки к ЛПБК.** Кроликов иммунизировали 4 раза с интервалом 6 сут внутривенным введением 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 мг ЛПБК (0,05% раствор в ЗФР). Кровь брали через 6 сут после последней иммунизации. Титры антисыворотки в иммунодиффузии составили 1 : 32.

Фракцию IgG получали из антисыворотки к ЛПБК, используя осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию на сефадексе А-50 [14]. Гомогенность IgG устанавливали иммунодиффузией в агаре [14].

**Получение иммуносорбентов и выделение антител.** 20 мг ПС растворяли

в 2 мл воды, добавляли 50 мг этилендиамина и 60 мг цианборгидрида натрия, выдерживали 12 сут при 20° С. ПС выделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50 с выходом 15 мг. Аминированный полисахарид растворяли в 3 мл 0,2 М NaHCO<sub>3</sub> (рН 8,5), добавляли к 5 мл сефарозы 4В, активированной бромцианом, и смесь встряхивали 16 ч при 4° С. Для блокирования оставшихся активных групп сорбент обрабатывали 1М этаноламинном в 0,2 М NaHCO<sub>3</sub>, отмывали ЗФР. Количество связавшегося полисахарида составило 30% от введенного в реакцию.

На колонку с 5 мл иммуносорбента наносили 50 мг IgG в 4 мл ЗФР при 4° С, выдерживали 2 ч, отмывали от неспецифически связавшихся белков ЗФР, затем 1 М NaCl. Полноту отмывания контролировали измерением поглощения при 280 нм. Низкоаффинные антитела элюировали 0,1 М натрий-ацетатным буфером (рН 4), антитела средней аффинности — тем же ацетатным буфером, содержащим 20% ацетонитрила. Высокоаффинные антитела элюировали 0,2 М глициновым буфером (рН 2,3). Фракции антител диализовали, концентрировали ультрафильтрацией до 2 мг/мл. Гомогенность и специфичность антител определяли иммунодиффузией и иммуноэлектрофорезом [14].

*Ингибирование реакции связывания [<sup>125</sup>I]ПС с антителами.* 50 мкл раствора ингибитора (ЛПС, ЛПБК, ПС) в различных концентрациях, 10 мкл раствора антител и 150 мкл ЗФР, содержащего 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), выдерживали 2 ч при 37° С. Затем добавляли 50 мкл раствора [<sup>125</sup>I]ПС (60 000 имп/мин) и смесь инкубировали 16 ч при 37° С. Иммунные комплексы осаждали 200 мкл 24% раствора полиэтиленгликоля 6000, смесь инкубировали 30 мин, осадки отделяли центрифугированием, промывали 200 мкл ЗФР, содержащего БСА, и радиоактивность осадков считали на счетчике. Неспецифическое связывание определяли с нормальным IgG.

*Получение и иодирование Fab-фрагментов антител.* Fab-фрагменты получали, используя метод протеолиза антител папаином в присутствии цистеина [14]. Из гидролизата Fab-фрагменты выделяли аффинной хроматографией на протейн-А-сефарозе 4В по методу [15]. Гомогенность Fab определяли гель-хроматографией на сефакриле S-300 и гель-электрофорезом в додецилсульфате натрия.

Иодирование Fab-фрагментов проводили с помощью хлорамина Т [14]. Свободный иод отделяли гель-хроматографией на сефадексе G-25 в ЗФР. Удельная активность [<sup>125</sup>I]Fab-фрагментов составила 3·10<sup>6</sup> имп/мин на 1 нмоль. Молекулярную массу [Fab]фрагментов считали равной 50 кДа [16]. Количество активных [<sup>125</sup>I]Fab-фрагментов определяли из кривых насыщения меченых Fab избытком ЛПС.

*Определение параметров связывания ЛПС и ЛПБК с Fab-фрагментами.* Содержание фукозы в ЛПС-I, ЛПБК-I устанавливали ГЖХ, содержание фукозамина в ЛПС-II, ЛПБК-II — аминокислотным анализом. Из полученных величин рассчитывали содержание полисахаридной части O-антигенов, выражая его в количестве молей повторяющегося звена.

Постоянные количества ПС, ЛПС, ЛПБК (2—200 мкг, 2,8—112 нмоль, в расчете на повторяющееся звено, в 50 мкл ЗФР) смешивали с различными количествами [<sup>125</sup>I]Fab-фрагментов (0,2—1,2 нмоль в 100 мкл ЗФР) (рис. 1). Общий объем доводили до 200 мкл ЗФР и смесь инкубировали 24 ч при 4° С.

Для разделения свободного и связанного [<sup>125</sup>I]Fab использовали гель-хроматографию на сефакриле S-300 в ЗФР (рН 7,4). Для уменьшения сорбции колонки были предварительно обработаны нормальным кроличьим IgG. В качестве контроля использовали [<sup>125</sup>I]Fab-фрагменты нормального IgG. Количество свободного и связанного [<sup>125</sup>I]Fab определяли по площади пиков, а концентрацию свободного Fab — как разницу между концентрациями внесенного и связанного Fab-фрагмента. По данным связывания строили графики Скэтчарда (рис. 1). Линия регрессии была проведена по методу наименьших квадратов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helander I. M. // Enterobacterial surfase antigens / Ed. Korhonen T. K. N. Y.: Elsevier, 1985. P. 93—274.
2. Peterson A. A., Haug A., McGroarty E. J. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 1. P. 116—122.
3. Endo T., Nojima S., Inoe K. // J. Biochem. 1982. V. 92. № 6. P. 1883—1890.
4. Tomshich S. V., Gorshkova R. P., Elkin Yu. N., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 65. № 1. P. 193—196.
5. Solov'eva T. F., Yermak I. M., Bondarenko O. D., Frolova G. M., Ovodov Yu. S. // Mikrobios. 1979. V. 25. № 101—102. P. 133—144.
6. Хоменко В. А., Набережных Г. А., Исаков В. В., Соловьева Т. Ф., Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1641—1648.
7. Соловьева Т. Ф., Набережных Г. А., Мазур А. К., Хоменко В. А., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 265—271.
8. Ермак И. М., Дроздов А. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 1. С. 52—59.
9. Vock K., Josephson S., Bundle D. R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1982. № 1. P. 59—70.
10. Красикова И. Н., Исаков В. В., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 419—420.
11. Tainer I. A., Gertzoff E. D., Paterson Y. // Ann. Rev. Immunol. 1985. V. 3. P. 501—535.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 1. P. 350—354.
13. Lowry O. H., Rosenbrouch N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
14. Methods in immunology / Eds Garvey J. S., Cremer N. E., Sussdorf D. H. London, Amsterdam: Benjamin W. A. Inc. 1977. P. 218—312.
15. Rousseaux J., Rousseaux-Prevost R., Bazin H. // J. Immunol. Meth. 1983. V. 64. № 1. P. 141—146.
16. Поляк Р. // Иммуноглобулины / Ред. Литмен Г., Гуд Р. М.: Мир, 1981. С. 10—57.

Поступила в редакцию  
26.VI.1989

После доработки  
5.X.1989

G. A. NABEREZHNYKH, T. F. SOLOV'eva, Yu. S. OVODOV

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CARBOHYDRATE EPITOPES  
OF O-ANTIGENS FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*  
AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

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

Interactions of O-specific polysaccharides, LPS and LPS-protein complex with specific antibodies isolated on a polysaccharide-substituted immunoadsorbent gel and monovalent Fab-fragments of the antibodies were investigated. The association constants and quantity of Fab-fragments bound to these antigens were established. The interaction of the LPS and LPS-protein complexes was shown to depend considerably on concentration of antigens, and only 10—15% of carbohydrate determinants are accessible for binding with antibodies.