



УДК 547.458.1+542.952

© 1992 г. А. Я. Черняк, А. Б. Левинский,
Ю. Я. Тендетник*, Н. Ю. Кочетков, В. И. Покровский*

МОНО- И ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЛИКОКОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ О-АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ САЛЬМОНЕЛЛ И ИХ СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;
* Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва*

Сополимеризацией акриламида с аллил-, 2-акриламидоэтил- и *n*-акриламидофенилгликозидами ди- и трисахаридов, отвечающих группоспецифическим О-антигеным детерминантам сальмонелл (0:2, 0:3, 0:4 и 0:9), получены моно- и полидетерминантные синтетические антигены. Серологическая специфичность полученных гликоконъюгатов сополимерного типа изучена методом иммуноферментного анализа (ИФА) с монорецепторными сыворотками.

Теоретический и практический интерес может представлять соединение в одной полимерной молекуле разных антигенных детерминант, типичных для близко родственных (а возможно, и для отдаленных в таксономическом отношении) микроорганизмов. С теоретической точки зрения объединение различных детерминант в одном модельном соединении может оказаться полезным для изучения влияния присутствия антител одной специфичности на связывание антител другой специфичности с комплементарными участками бактериального антигена [1, 2]. Возможное практическое приложение таких полидетерминантных антигенов связано с решением задач диагностики инфекционных заболеваний. В ряде случаев для принятия эффективных мер лечения вполне достаточно выяснить, к какому роду микроорганизмов относится возбудитель инфекционного заболевания, не конкретизируя серотип, серогруппу и т. д. Так, например, для предварительной оценки сывороток (скрининга), взятых у заболевших сальмонеллезом людей или иных контингентов населения, а также сывороток животных, весьма целесообразно использование поливалентных антигенов. В СССР уже довольно давно с этой целью применяют коммерческий поливалентный (комплексный) эритроцитарный сальмонеллезный диагностикум на основе липополисахаридов (ЛПС) серогрупп А, В, С₁, С₂, D и E [3] производства Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Г. Габричевского. Однако использование ЛПС для приготовления диагностических препаратов связано с определенными недостатками: 1) ЛПС, как правило, экстрагируют из глубинной (погруженной) культуры, и, как следствие этого, полученный препарат является смесью молекул ЛПС, различающихся содержанием О-полисахаридного компонента, включая и недостроенные молекулы ЛПС, несущие только олигосахарид кора [4]; 2) в зависимости от примененных методов экстракции и очистки препарат ЛПС может содержать большее или меньшее количест-

Сокращения: Абе — абеквоза (3,6-дидезокси-*D*-ксило-гексопираноза), Пар — паратоза (3,6-дидезокси-*D*-рибо-гексопираноза), Тув — тивелоза (3,6-дидезокси-*D*-арабино-гексопираноза), РПГА — реакция пассивной гемагглютинации, ТЕМЕД — *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин, ЛПС — липополисахарид, ИФА — иммуноферментный анализ.

во других макромолекулярных компонентов бактерии, таких, как белки внешней мембраны и нуклеиновая кислота [5]. Поэтому сальмонеллезные комплексные эритроцитарные диагностикумы на основе ЛПС недостаточно специфичны.

Альтернативой применению ЛПС при конструировании подобных диагностических препаратов, по нашему мнению, может быть использование химически точно охарактеризованных синтетических O-антигенных детерминант основных серологических групп сальмонелл (детерминанты 0:2, 0:3, 0:4, 0:9 и т.д.). Ранее мы показали, что высокомолекулярные неогликоконъюгаты, полученные на основе отдельных синтетических O-антигенных детерминант методом сополимеризации с акриламидом [6, 7], обладают моноспецифичностью в серологических реакциях [8] и могут быть с успехом использованы в иммунохимических исследованиях и в качестве диагностических препаратов [9—11].

Очевидно, что принцип сополимеризации открывает возможность объединить в молекуле неогликоконъюгата одновременно несколько синтетических O-детерминант. Подобные полидетерминантные гликоконъюгаты могут оказаться полезными (при условии их эффективного функционирования в серологических реакциях) для скрининга сывороток в эпидемиологических и особенно клинических исследованиях.

В настоящей работе описано получение полидетерминантных искусственных антигенов сальмонелл и изучение их иммунохимических характеристик методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Синтез дисахаридов (в виде гликозидов с непределным агликоном — аллилным или 2-акриламидоэтильным), представляющих собой группоспецифические O-антигенные детерминанты (0:2, 0:4 и 0:9) сальмонелл серологических групп A, B и D₁, описан нами ранее: 2-акриламидоэтил-3-O-(α -паратозил)- α -D-маннопиранозид [12], 2-акриламидоэтил- и аллил-3-O-(α -абеквозил)- α -D-маннопиранозид [12, 13], аллил-3-O-(α -тивелозил)- α -D-маннопиранозид [12]. Для получения трисахарида Man(β 1 \rightarrow 4)Rha(α 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow) (отвечающего O-антигенной детерминанте 0:3 сальмонелл серологической группы E) в форме гликозида, способного к сополимеризации, синтезированный нами ранее защищенный гликозид *n*-нитрофенил-2,4,6-три-O-ацетил-3-O-[4-O-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-маннопиранозил) - 2,3-ди-O-ацетил- α -L-рамнопиранозил]- β -D-галактопиранозид [14] был каталитически восстановлен над оксидом платины и затем подвергнут N-ацилированию акрилоилхлоридом в присутствии K₂CO₃ и O-дезацетилированию действием метилата натрия.

Ранее мы показали, что неогликоконъюгаты, полученные сополимеризацией одного из перечисленных выше углеводных мономеров с акриламидом, и содержащие ~30% углеводов, обладают хорошей серологической активностью при использовании их в качестве сенсбилизирующих антигенов в методе ИФА [8, 9]. Для достижения такого содержания углеводов в неогликоконъюгате аллилгликозид дисахарида и акриламид следует вводить в полимеризацию в весовом соотношении ~2:1, а 2-акриламидоэтил-(или *n*-акриламидофенил)гликозид олигосахарида и акриламид — в мольном соотношении 1:7. Из этих соображений и подбиралось соотношение углеводных мономеров и акриламида при получении полидетерминантных неогликоконъюгатов (см. «Экспериментальную часть»).

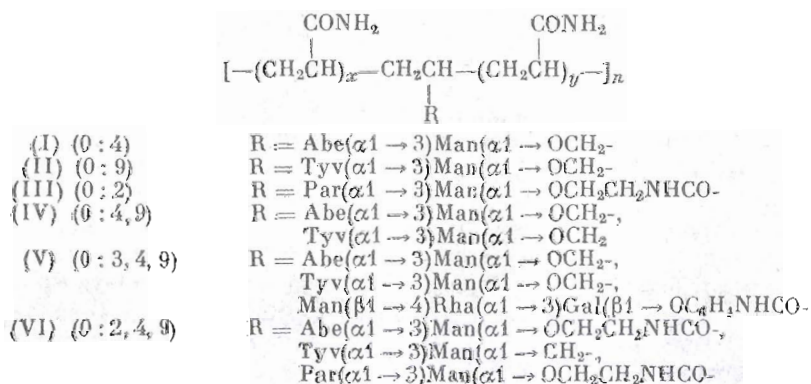
Сополимеризацию проводили как описано ранее [6, 7, 13] в водном растворе в присутствии персульфата аммония и TEMED, иницирующих радикальную реакцию. Выделение полимеров из реакционной смеси осуществляли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 или на TSK-65 при элюировании пиридин-ацетатным буфером, pH 4,1. При гель-фильтрации на сефадексе G-50 полимерная фракция выходила со свободным объемом, тогда как на геле TSK-65 наблюдалось удерживание сополимеров до объема 70—77 мл, что соответствовало молекулярной массе 100—250 кДа (объем

Поведение гликоконъюгатов сополимерного типа и стандартов при гель-фильтрации на TSK-65

Полимер	Объем удерживания, мл	Полимер	Объем удерживания, мл
Декстран Т-2000	55	Сополимер I	69
» Т-500	65	» II	69
» Т-250	69	» III	71
» Т-40	81	» IV	75
PEG-40	80	» V	77
PEG-6	98	» VI	71

удерживания сополимеров I—IV и стандартов — декстранов Т-2000, Т-500, Т-250, Т-40 и полиэтиленгликолей PEG-40 и PEG-6 приведены в табл. 1). Эта оценка молекулярной массы сополимеров I—VI была подтверждена данными ультрафильтрации через мембраны Дайафло (Amicon, США) — полимеры свободно проходили через мембрану XM-300 и полностью задерживались мембраной XM-100.

Структура моно- и полиспецифических неогликоконъюгатов сополимерного типа на основе синтетических O-антигенных детерминант сальмонелл может быть выражена формулой



При сравнении данных спектров ¹³C-ЯМР исходных углеводных мономеров и полученных из них сополимеров I—VI видно, что сигналы соответствующих C-атомов углеводных остатков в обоих случаях совпадают (табл. 2). Это свидетельствует о сохранении структуры углеводных детерминант в ходе сополимеризации. Из данных спектров ¹³C-ЯМР помимо соотношения углеводных компонентов (например, абеквозы, тивелозы и маннозы в сополимере IV) можно оценить относительное содержание замещенных (-CH₂CHR-, R — углеводсодержащий заместитель) и незамещенных [-CH₂CH(CONH₂)-] фрагментов полимерной цепи путем сравнения интегральных интенсивностей соответствующих сигналов, учитывая при этом допущения, принимаемые при интегрировании сигналов в спектрах ¹³C-ЯМР [15]. Для интегрирования могут быть использованы сигналы, принадлежащие углеводным остаткам (например, C-6 остатка маннозы), и сумма сигналов метиновых (CH-, 42—43 м.д.) или метиленовых (CH₂-, 34—37 м.д.) групп полиакриламидной цепи. Так, из данных интегрирования для полимера IV следует, что на каждые 9 акриламидных остатков полимерной цепи приходится в среднем один остаток углеводного мономера. Теоретически при таком составе в сополимере IV содержится 17,1% маннозы, что хорошо согласуется с результатами кислотного гид-

Удельное вращение и данные спектров ^{13}C -ЯМР олигосахаридных детерминант и сополимеров*

Олигосахариды и сополимеры	$[\alpha]_D^{20}$, град (с 1, вода)	Моносахаридное звено	Химические сдвиги (δ , м.д.)									
			C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCH ₂	CH ₂ N	CH	CH ₂
Abe ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Man ($\alpha 1 \rightarrow \text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)	+131	Abe Man	101,4 100,6	64,7 71,3	34,2 79,6	69,5 67,2	67,9 74,1	16,5 62,0	69,3	-	-	-
Abe ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Man ($\alpha 1 \rightarrow \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOSCH}=\text{CH}_2$ **)	-	Abe Man	102,8 102,1	65,6 72,3	36,4 81,7	70,3 68,2	67,9 75,2	17,0 63,1	67,6	40,7	-	-
Tuv ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Man ($\alpha 1 \rightarrow \text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)	+108	Tuv Man	102,2 100,2	68,6 71,1	34,7 79,3	68,2 67,4	71,3 74,2	17,9 62,1	69,3	-	-	-
Par ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Man ($\alpha 1 \rightarrow \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOSCH}=\text{CH}_2$ **)	+89,5	Par Man	101,8 101,4	69,3 71,8	37,2 81,1	72,0 67,7	70,4 74,9	17,8 62,8	67,3	40,4	-	-
Сополимер I	+40	Abe Man	101,3 100,9	64,8 71,5	34,3 79,5	69,6 67,4	68,0 74,4	16,8 62,2	70,6	-	42,8-43,5	35,2-37,2
» II	+32	Tuv Man	102,2 100,6	68,2 71,3	34,8 79,1	68,7 67,5	71,3 74,5	18,2 62,3	-	-	42,6-43,5	35,3-37,0
» III	+33	Par Man	100,9 100,6	68,3 71,0	37,1 79,8	71,3 67,3	70,3 74,2	17,8 62,2	67,0	40,1	42,7-43,5	35,3-37,0
» IV	+38	Abe Tuv Man	101,4 102,3 100,9	64,8 71,0 64,5	34,3 34,7 79,6	67,4	74,4	16,8 18,2 62,2	-	-	42,7-43,5	35,1-37,3
» V	-	Abe Tuv Rha Gal Man	101,4 101,9 103,2 103,2 100,9	64,5 71,0 64,7	33,8 34,3 81,2 73,9	80,5	76,3 79,3	16,5 17,9 17,9 61,6 61,6	-	-	42,4-43,0	34,5-38,9
» VI	-	Abe Tuv Par Man	101,5 102,1 100,6 100,6	64,7	34,1 34,5 79,7	74,1	16,6 17,9 17,7 62,0	67,3	39,9-40,0	42,5-43,3	34,9-37,2	

* Спектры сняты для растворов в D₂O; для сополимеров IV-VI данные спектров приведены частично.** Спектр снят для раствора в CD₃OD.

Оценка специфичности синтетических антигенов и ЛПС в ИФА

Иммунные сыворотки против факторов	Показатели экстинкции субстратного раствора в ИФА при взаимодействии иммунных сывороток * с антигенами **									
	0 : 2	0 : 3	0 : 4	0 : 9	0 : 3, 4, 9	0 : 3, 4, 9	ЛПС А (0 : 1, 2, 12)	ЛПС В ₁ (0 : 3, 10)	ЛПС В ₂ (0 : 3, 4, 12)	ЛПС D ₁ (0 : 1, 9, 12)
0 : 2	1,87	0,22	0,12	0,17	0,18	0,20	2,0	0,28	0,37	0,28
0 : 3, 15	0,25	1,64	0,15	0,13	0,21	1,46	0,27	2,0	0,38	0,23
0 : 4	0,14	0,17	1,78	0,18	1,43	1,22	0,23	0,18	1,91	0,27
0 : 9	0,21	0,25	0,18	1,84	1,57	1,17	0,31	0,24	0,33	2,0
0 : 1	0,21	0,27	0,25	0,28	0,031	0,025	1,22	0,41	1,31	0,82
0 : 12	0,17	0,32	0,20	0,20	0,26	0,37	1,47	0,62	1,23	1,27
Контроль 1	0,08	0,06	0,09	0,09	0,09	0,12	0,11	0,09	0,12	0,14
Контроль 2	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03

* Рабочее разведение сывороток 10⁻⁴.

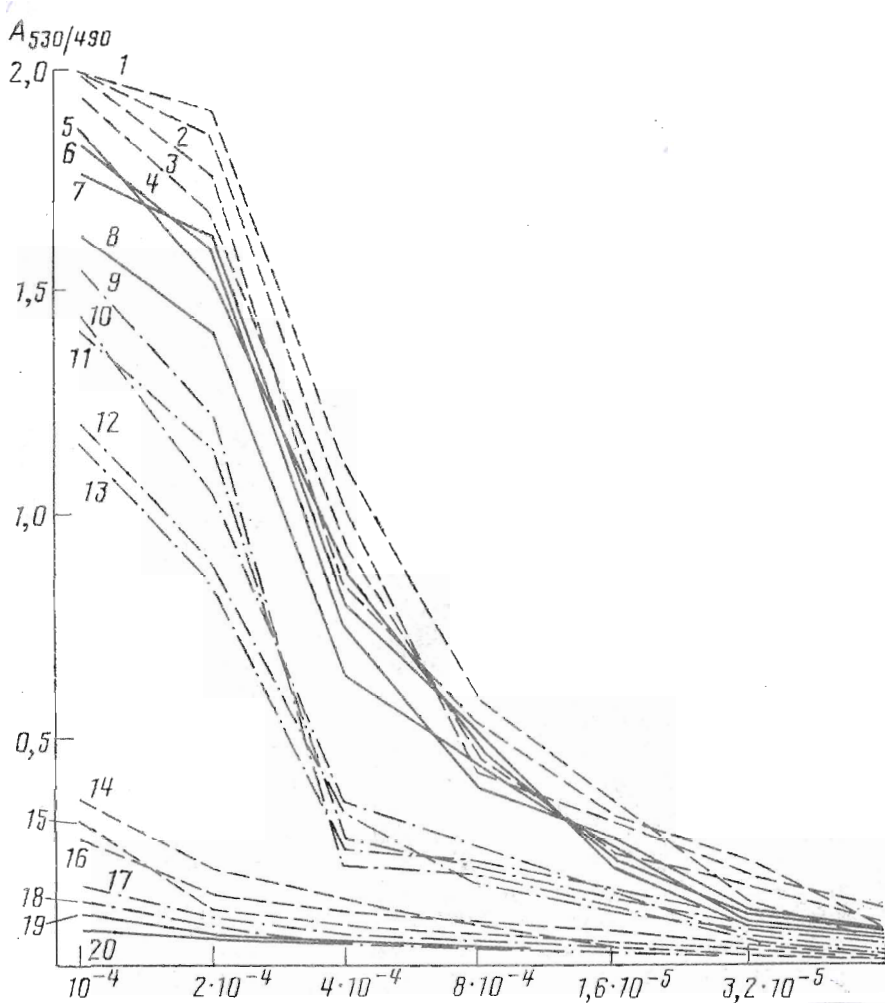
** Синтетические антигены и ЛПС, которыми были сенсibilизированы думки планшетов для ИФА.

ролиза (16,6% маннозы). Наконец, экспериментально наблюдаемая величина удельного оптического вращения ($[\alpha]_D^{20} + 38^\circ$) хорошо согласуется с рассчитанным значением ($+36^\circ$) для данного содержания (30%) оптически активных компонентов $\text{Abe}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow$ и $\text{Tuv}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow$ в соотношении 1 : 1.

Изучение серологической специфичности моно- и полидетерминантных олигосахарид-полиакриламидных конъюгатов проводили методом ИФА. Данные о специфичности синтетических антигенов I—V в сравнении с ЛПС сальмонелл представлены в табл. 3, из которой следует, что монодетерминантные антигены I—III активно реагировали лишь с гомологичными монорецепторными сыворотками, тогда как ЛПС серогрупп А, В и D₁ перекрестно взаимодействовали с сыворотками против O-факторов 1 и 12. С этими же антигенами была отмечена положительная, хотя и менее выраженная, реакция ЛПС серогруппы E. Полидетерминантные синтетические антигены IV (0 : 4, 9) и V (0 : 3, 4, 9) дали существенное повышение показателя поглощения при взаимодействии с адсорбированными сыворотками против O-факторов 4 и 9, или 3, 4 и 9 соответственно, но практически не реагировали с антителами против O-факторов 1 и 12.

На рисунке приведены результаты определения серологической активности моно- и полидетерминантных синтетических антигенов, а также ЛПС сальмонелл различных серогрупп в реакции с гомологичными антителами. Видно, что моноспецифические синтетические антигены и ЛПС обладали высокой активностью и реагировали с адсорбированными иммунными сыворотками, разведенными в сотни тысяч раз, что на 2 порядка превосходило активность некоторых из этих же препаратов (ЛПС) в РИГА с коммерческими диагностикумами. Уменьшение активности в ИФА полидетерминантных синтетических антигенов в 2—4 раза по сравнению с монодетерминантными антигенами и ЛПС тех же серогрупп обусловлено снижением удельного содержания каждой отдельной детерминанты при общем содержании углеводов ~36%.

Таким образом, продемонстрирована строгая специфичность моно- и полидетерминантных синтетических антигенов сополимерного типа, проявляющих серологическую активность только с сыворотками против им-



Серологическая активность моно- (—) и полидетерминантных (---) синтетических антигенов, а также ЛПС сальмонелл (— · —) в реакции (ИФА) с гомо- и гетерологичными антителами: 1 — ЛПС D, (0:9,12) — анти 0:9; 2 — ЛПС E, (0:3,10) — анти 0:3,15; 3 — ЛПС A (0:2,12) — анти 0:2; 4 — ЛПС B (0:4,12) — анти 0:4; 5 — сополимер III (0:2) — анти 0:2; 6 — сополимер II (0:9) — анти 0:9; 7 — сополимер I (0:4) — анти 0:4; 8 — сополимер 0:3 — анти 0:3,15; 9 — сополимер IV (0:4,9) — анти 0:9; 10 — сополимер V (0:3,4,9) — анти 0:3,15; 11 — сополимер IV (0:4,9) — анти 0:4; 12 — сополимер V (0:3,4,9) — анти 0:4; 13 — сополимер V (0:3,4,9) — анти 0:9; 14 — ЛПС B (0:4,12) — анти 0:2; 15 — ЛПС A (0:2,12) — анти 0:9; 16 — ЛПС D, (0:9,12) — анти 0:2; 17 — сополимер V (0:3,4,9) — анти 0:2; 18 — сополимер IV (0:4,9) — анти 0:2; 19 — сополимер I (0:4) — анти 0:9; 20 — сополимер II (0:9) — анти 0:2

мунодоминантных O-факторов соответствующих серогрупп сальмонелл. Особый интерес, на наш взгляд, представляют полидетерминантные (комплексные) синтетические сальмонеллезные антигены, которые могут быть использованы для предварительного исследования сывороток больных кишечными инфекциями вместо коммерческих поливалентных диагностикумов, обладающих недостаточной специфичностью [16, 17]. Объединение только двух детерминант (0:4 и 0:9) в составе подобного антигена позволяет идентифицировать 75% возбудителей сальмонеллезов, а вклю-

чение еще одной детерминанты (0:3) дает препарат для идентификации 80% возбудителей (частота выделения возбудителей сальмонеллеза определенных серологических групп у человека приведена для европейского региона [18]). Представляется целесообразным использование описанных синтетических препаратов не только в ИФА, но и в других более простых серологических тестах, основанных на феномене агглютинации (РПГА, латекс-агглютинация и т. д.).

Экспериментальная часть

Бактериальные штаммы, липополисахариды (ЛПС) и монорецепторные сыворотки. Штаммы бактерий *Salmonella typhi* 0901 (0: (1), 9, 12, серогруппа D), *S. paratyphi* A (0: 1, 2, 12, серогруппа A), *S. anatum* (0: 3, 10, серогруппа E), *S. typhimurium* (0: 1, 4, 12, серогруппа B) (все в S-форме) были получены из Международного центра по сальмонеллам (Институт Пастера, Париж) в ампулах в лиофилизированном состоянии. Выращивание бактериальной культуры проводили как описано ранее [11]. ЛПС выделяли из сухих бактериальных клеток водно-фенольным методом и освобождали от РНК ультрацентрифугированием при 105 000 g или гель-фильтрацией на сефарозе 4В [19].

В качестве монорецепторных сывороток использовали кроличьи адсорбированные сыворотки (анти-2, анти-3,15, анти-4 и анти-9), специально приготовленные в Ленинградском институте вакцин и сывороток МЗ СССР. Полученные серии сывороток титровали в РПГА с коммерческими антигенными сальмонеллезными эритроцитарными диагностикумами (серогруппа А — О-факторы 1,2,12, серогруппа Е — О-факторы 3,10, серогруппа В — О-факторы 4,12 и серогруппа D — О-факторы 9,12). Для дальнейших экспериментов отбирали те серии сывороток, которые давали положительный результат в РПГА в разведении не менее чем 1:400—1:800.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Применяли вариант непрямого сэндвича [9]. Твердофазным носителем служили пластмассовые планшеты фирмы Dynatech (Швейцария) типа 129М (В). Планшеты сенсibilizировали синтетическими антигенами (1 мкг/мл) или ЛПС (2 мкг/мл). После инкубации с антигеном (1 ч при 37° С или 20 ч при 4° С) планшеты отмывали и во все лунки вносили по 0,1 мл разбавляющего раствора (0,1 М раствор трис-буфера, рН 7,4, содержащего 0,05% Твина-20, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,02% мертиолята) и выдерживали 15—20 мин при комнатной температуре. После этого в первые лунки каждого ряда, сенсibilizированного соответствующим антигеном, добавляли нужную иммунную сыворотку в разведении 10⁻⁴ и титровали с 2-кратным интервалом. Планшеты с разлитыми сыворотками инкубировали в течение 1,5 ч при 37° С и отмывали. Затем в каждую лунку вносили по 0,1 мл конъюгата, который представлял собой IgG-фракцию меченных пероксидазой хрена свиных антител против IgG кролика (Сметарол, ЧСФР), инкубировали 1 ч при 37° С, отмывали и вносили по 0,1 мл субстратного раствора на основе орто-фенилендиамина. После 15—20-минутной экспозиции при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением серной кислоты (4 н.). Результаты учитывали с помощью двулучевого фотометра Dynatech (Швейцария) при длине волны 530/490 нм. Первым контролем служили лунки, сенсibilizированные всеми видами использованных антигенов (по две лунки на каждый антиген), но без добавления иммунных сывороток. Вторым контролем служили две лунки без антигенов и сывороток. Положительным результатом считали такой показатель поглощения, который не менее чем в 2 раза превышал аналогичный показатель первого контроля.

n-Акриламидофенил-3-О - [4-О - (β-D-маннопиранозил) - α-L-рамнопи-

ранозил]- β -D-галактопиранозид. 750 мг (0,76 ммоль) *n*-нитрофенил-2,4,6-три-*O*-ацетил-3-*O* - [4-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил - β -D-маннопиранозил)-2,3-ди-*O*-ацетил- α -L-рамнопиранозил]- β -D-галактопиранозид [14] растворяли при нагревании (65° С) в смеси 100 мл этилацетата и 50 мл метанола, добавляли 100 мг PtO₂, приготовленной по Адамсу, и гидрировали при атмосферном давлении. По данным ТСХ (хлороформ — ацетон, 8 : 2) через 1 ч произошло полное превращение исходного (*R*_f 0,58) в соответствующий аминофенилгликозид (положительная реакция с нингидрином) с *R*_f 0,26. Катализатор отделяли фильтрованием через слой Celite-545, фильтрат упаривали, получили 720 мг (99%) аминофенилгликозида защищенного трисахарида.

К раствору 670 мг (0,70 ммоль) аминофенилгликозида нонаацетата трисахарида в 30 мл смеси этилацетат — абс. бензол (2 : 1) добавляли 825 мг (6 ммоль) K₂CO₃ и затем, при охлаждении (вода со льдом) и интенсивном перемешивании, добавляли по каплям в течение 15 мин раствор 150 мкл (1,85 ммоль) акрилоилхлорида в 3 мл абс. бензола. Реакционную смесь перемешивали при 20° С. По данным ТСХ (хлороформ — ацетон, 3 : 1), через 24 ч в смеси обнаружили только продукт реакции с *R*_f 0,5. Полученный после фильтрования и упаривания остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя градиентом ацетона (0—25%) в хлороформе, а затем кристаллизовали остаток из этанола при нагревании (60° С). Выделили 420 мг (59%) *n*-акриламидофенил-2,4,6 - три-*O*-ацетил-3-*O*-[4-*O*-(2,3,4,6 - тетра-*O*-ацетил- β -D-маннопиранозил)-2,3-ди - *O*-ацетил- α -L - рамнопиранозил]- β -D - галактопиранозид, т. пл. 218—221° С, $[\alpha]_D^{20}$ -26,5° (с 2, CHCl₃).

К раствору 164 мг (0,162 ммоль) акриламидофенилгликозида нонаацетата трисахарида в 2 мл абс. метанола добавляли 0,05 мл 1 М раствора метилата натрия, смесь выдерживали 2 ч при 20° С и нейтрализовали катионитом КУ-2 (H⁺). Смолу отделяли фильтрованием и промывали метанолом (25 мл), объединенный фильтрат упаривали. Получили 97 мг (93%) *n*-акриламидофенил-3-*O*-[4-*O*-(β -D-маннопиранозил)- α -L-рамнопиранозил]- β -D-галактопиранозид (в виде аморфного порошка), однородного по данным хроматографии на бумаге (Filtrak FN 11, ГДР), *R*_{Gal} 2,1 (бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3), $[\alpha]_D^{20}$ - 55° (с 1, водн. MeOH).

Сополимеризация углеводовных мономеров с акриламидом. Раствор 50 мг (0,143 ммоль) аллилгликозида дисахарида (или смеси равных весовых частей аллилгликозидов разных дисахаридов) и 25 мг (0,35 ммоль) акриламида («ultragrade» LKB, Швеция) (или 0,1 ммоль акриламидэтил (или акриламидофенил) гликозида и 0,7 ммоль акриламида) в 1 мл дистиллированной воды дезаэрировали 10—15 мин в вакууме водоструйного насоса. Затем к смеси при перемешивании добавляли 2 мкл TEMED и 1 мг персульфата аммония и продолжали перемешивание 12 ч при 20° С. Загустевшую смесь разбавляли 1 мл 0,2/0,1 М пиридин-ацетатного буфера, pH 4,1, и хроматографировали на колонке (2×35 см) с сефадексом G-50 (V₀ 16 мл), элюируя тем же буфером со скоростью 14 мл/ч и собирая фракции по 3,5 мл. Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра Кнауер (ФРГ), для анализа фракций на содержание углеводов использовали углеводный анализатор или реакцию с фенол-серной кислотой. Фракции, содержащие высокомолекулярный гликоконъюгат, объединяли, концентрировали и рехроматографировали на колонке (1,6×60 см) с TSK-65 в том же буфере (результаты хроматографии приведены в табл. 1). После лиофилизации выделенные сополимеры сушили в вакууме над P₂O₅.

Для анализа углеводного состава сополимеры подвергали гидролизу 0,05 М H₂SO₄ (100° С, 30 мин — для определения содержания 3,6-дидезоксисахаров) и гидролизу 0,5 М H₂SO₄ (100° С, 2 ч — для определения со-

держания гексов). Моносахаридный анализ проводили на углеводном анализаторе Technicon (США) с использованием колонки (0,6×25 см), заполненной анионитом DA×4 (Dugrum, США) в 0,5 М боратном буфере, рН 9,0, при 55° С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macario A. J. L., de Macario E. C. // *Monoclonal Antibodies Against Bacteria*. Vol. I / Eds Macario A. J. L., de Macario E. C. Orlando: Acad. Press, 1985. P. XVII-XXX.
2. Nowinski R. C., Tam M. R., Goldstein L. C., Stong L., Kuo C.-C., Corey L., Stamm W. E., Hansfield H. H., Knapp J. S., Holmes K. K. // *Science*. 1983. V. 219. № 4585. P. 637-644.
3. Субботина Ю. Л., Пищик Г. И., Левкина М. Т. // *Журн. микробиол.* 1970. № 3. С. 19-23.
4. Hitchcock P. J., Brown T. M. // *J. Bacteriol.* 1983. V. 154. P. 269-277.
5. Lindberg A. A., Holme T. // *Acta pathol. microbiol. scand. Sect. B*. 1972. V. 80. P. 751-758.
6. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М. Сополимер 3-О-[4-О-(β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-β-аллил-D-галактопиранозид с акриламидом, обладающий серологической специфичностью О-фактора 3 бактерий рода *Сальмонелла*, относящихся к серологической группе Е: А. с. 879970 СССР // *Б. И.* 1982. № 26. С. 316.
7. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Тендетник Ю. Я. // *Докл. АН СССР*. 1982. Т. 263. № 5. С. 1277-1280.
8. Покровский В. И., Трегуб А. В., Тендетник Ю. Я., Покровский В. И., Кочетков Н. К., Черняк А. Я., Левинский А. Б. // *Иммунология*. 1986. № 1. С. 46-50.
9. Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М., Покровский В. И., Грудкова М., Мали И., Черняк А. Я., Левинский А. Б., Кочетков Н. К. // *Иммунология*. 1987. № 1. С. 80-82.
10. Tendetnik Yu. Ya., Pokrovskii V. I., Chernyuk A. Ya., Levinskii A. B., Kochetkov N. K. // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. № 6. P. 622-630.
11. Tendetnik Yu. Ya., Pokrovsky V. I., Chernyuk A. Ya., Levinsky A. B., Kochetkov N. K. // *FEMS Microbiol. Immunol.* 1991. V. 76. P. 93-98.
12. Черняк А. Я., Левинский А. Б., Кочетков Н. К. // *Внорган. химия*. 1988. Т. 14. № 8. С. 1047-1058.
13. Chernyuk A. Ya., Levinsky A. B., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 128. P. 269-282.
14. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Тендетник Ю. Я. // *Внорган. химия*. 1979. Т. 5. № 2. С. 217-227.
15. Levy G. C., Gordon C. L. // *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*. N. Y.: Wiley - Intersci., 1972.
16. Тендетник Ю. Я., Ющук Н. Д., Туманов Ф. А., Трушина В. В. // *Журн. микробиол.* 1975. № 4. С. 105-110.
17. Покровский В. И., Тендетник Ю. Я., Покровский В. В., Черняк А. Я., Левинский А. Б. // *Журн. микробиол.* 1984. № 11. С. 69-72.
18. *Salmonella Surveillance. Reports Received from Centres Participating in the WHO Programme*. 1974.
19. Westphal O., Jann K. // *Methods Carbohydr. Chem.* Vol. V / Ed. Whistler R. L. N. Y.: Acad. Press, 1965. P. 83-91.

Поступила в редакцию
18.X.1991

A. YA. CHERNYAK, A. B. LEVINSKY, YU. YA. TENDETNIK *,
N. K. KOCHETKOV, V. I. POKROVSKY *

MONO- AND POLYSPECIFIC GLYCOCONJUGATES PREPARED FROM SYNTHETIC *SALMONELLA* O-ANTIGENIC DETERMINANTS AND SEROLOGICAL CHARACTERISATION THEREOF

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;
* Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Mono- and polydeterminant synthetic antigens have been prepared via copolymerisation of acrylamide with allyl-, 2-acrylamidoethyl, and *p*-acrylamidophenyl glycosides of di- and trisaccharides representative of the group-specific *Salmonella* O-antigenic determinants (0:2, 0:3, 0:4, and 0:9). Serological specificity of the glycoconjugates obtained has been studied in enzyme immunoassay (EIA) using monoclonal antisera.