БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 10 * 1993

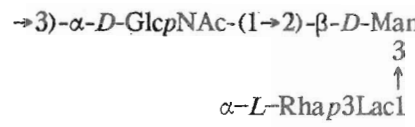
УДК 577.114.5:543.422.23:579.843.1

© 1993 Е. Л. Назаренко, В. А. Зубков, А. С. Шашков*, Ю. А. Книрель*, Н. А. Командрова, Р. П. Горшкова, Ю. С. Оводов

СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Vibrio fluvialis*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;
** Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва*

О-Специфический полисахарид *Vibrio fluvialis*, штамм AQ-0002B, построен из пентасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих остатки *D*-маннозы, 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы, *D*-галактуроновой кислоты и 3-О-[(*R*)-1′-карбоксиэтил]-*L*-рамнозы (рамнолактиновой кислоты, Rha3Lac). На основании данных метилирования, HF-сольволиза, распада по Смиту, ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, включая гомо- и гетероядерную корреляционную спектроскопию, а также ЯЭО в различных вариантах, установлена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:



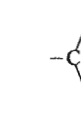
Настоящая работа продолжает структурное исследование О-антигенов *Vibrio fluvialis* [1, 2] и посвящена установлению строения О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида (ЛПС) штамма AQ-0002B, выделенного от больного гастроэнтеритом.

ЛПС получен из бактериальных клеток экстракцией водным фенолом и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой. ЛПС обладает специфической активностью в реакции непрямой гемагглютинации (титр антител 1:4096) и дает одну полосу преципитации при иммунодиффузии в агаре. Полисахарид, полученный при мягком кислотном расщеплении ЛПС ($[\alpha]_D^{20}$ + 101,5°), по серологической активности и специфичности аналогичен исходному полимеру.

При кислотном гидролизе полисахарида методами БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы манноза, глюкозамин, галактозамин. Кроме того, с помощью ионообменной хроматографии на анионите Durrum DA×4 идентифицированы два кислых компонента — галактуроновая кислота и 3-О-[(*R*)-1′-карбоксиэтил]-*L*-рамноза (рамнолактиловая кислота). Ранее этот редкий сахар был обнаружен в составе О-специфических полисахаридов *Shigella dysenteriae*, тип *5* [3], и *E. coli* 0:58 [4] и был синтезирован алкилированием *L*-рамнозы [5]. В настоящей работе этот моносахарид выделен препаративной ВЭЖХ, и его идентификация с помощью данных ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, хроматографических характеристик, а также величины удельного оптического вращения приведена ранее [6]. Остальные моносахариды выделены в индивидуальном виде

Таблица 1

Данные ^{13}C-ЯМР-спектров полисахарида и олигосахаридов (δ, м.д.)*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1′	C2′	C3′
	О-специфический полисахарид								
→3*D*Glc*p*NAcα1→	98,7	53,7	80,2	71,8	72,6	61,7			
→2,3*D*Man*p*β1→	101,4	71,5	81,7	67,5	78,1	62,6			
→4*D*Gal*p*NAcα1→	100,7	51,7	70,8	75,9	72,3	62,7			
→4*D*Gal*p*Aα1→	102,2	70,3	70,4	81,7	73,1	176,2			
*L*Rha*p*3Lacα1→	98,3	69,6	80,0	72,3	69,9	18,0	77,5	20,3	176,2
	олигосахарид II								
*D*Glc*p*NAcα1→	98,9	55,5	71,8	71,0	73,0	62,5			
→2*D*Man*p*β1→	101,7	78,0	75,0	68,9	76,4	62,5			
→4*D*Gal*p*NAcα1→	100,4	51,3	69,0	75,9	71,5	61,4			
→4*D*Gal*p*Aα1→	93,7	69,5	69,7	80,4	71,8	174,1			
→4*D*Gal*p*Aβ1→	97,8	72,9	73,5	79,7	75,2	174,1			
	олигосахарид III								
*D*Glc*p*NAcα1→	98,0	55,2	71,3	70,8	72,9	62,2			
→2,3*D*Man*p*β1→	101,3	71,3	78,6	67,0	77,8	62,5			
→4*D*Gal*p*NAcα1→	100,1	51,3	70,0	75,7	71,9	62,6			
*L*Rha*p*3Lacα1→	97,8	68,8	80,0	72,0	69,4	17,9	77,1	20,3	176,2
			61,3	82,3	72,9				

* Сигналы N-ацетильных групп: CH_3 в области 23—24 м. д., C=O в области 174—176 м.д.

с помощью препаративной БХ и электрофореза, и на основании величин удельного оптического вращения установлено, что все они имеют *D*-конфигурацию.

^{13}C-ЯМР-спектр О-специфического полисахарида указывает на регулярный характер и пентасахаридный размер его повторяющегося звена (табл. 1, рис. 1). В спектре присутствуют сигналы пяти аномерных атомов углерода при 102,2, 101,4, 100,7, 98,7 и 98,3 м.д., метильной группы 6-дезоксисахара при 18,0 м.д., двух сигналов О-1′-карбоксиэтильной группы: CH_3 (C2′) при 20,3 м.д. и CH (C1′) при 77,5 м.д., двух N-ацетильных групп гексозаминов (CH_3 при 23,5 и 23,8 м.д.), двух C-2-атомов аминосахаров при 51,7 и 53,7 м.д., трех C-6-атомов гексоз при 61,7, 62,6 и 62,7 м.д., 18 вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 67—82 м.д. и четырех C=O-групп при 174,7, 175,3 и 176,2 (двойной интенсивности) м.д. Очевидно, что два карбонильных сигнала принадлежат N-ацетильным группам аминосахаров, один — COOH-группе галактуроновой кислоты и один — карбоксилу рамнолактиновой кислоты.

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{C,H}$, определенные из ^{13}C-ЯМР-спектра, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, сравнительно велики (около 170 Гц) для сигналов 102,2, 100,7, 98,7 и 98,3 м.д., которые принадлежат, таким образом, α-связанным моносахаридным остаткам. Относительно небольшая константа (порядка 160 Гц) для сигнала 101,4 м.д.

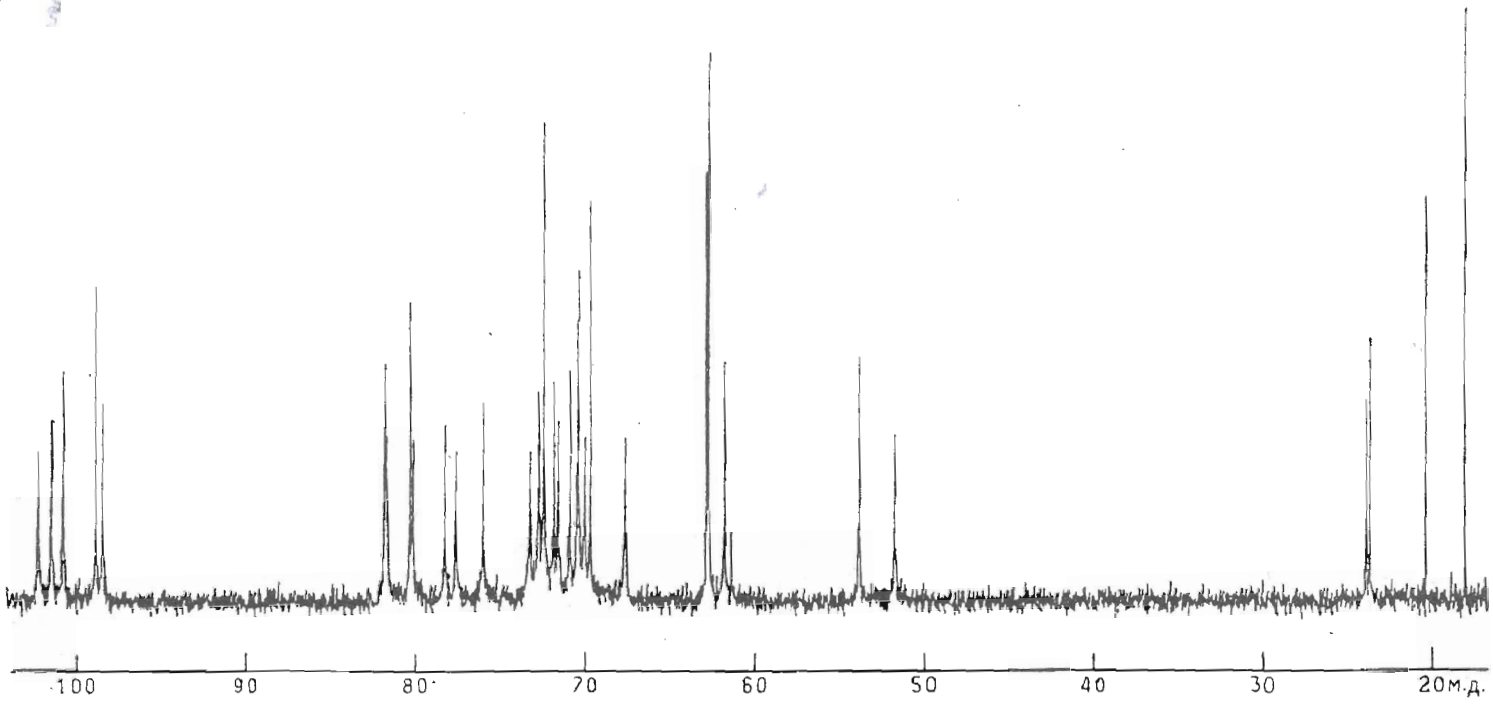


Рис. 1. ^{13}C-ЯМР-спектр полисахарида (область резонанса C=O-групп не приведена)

Таблица 2

Данные ^{1}H-ЯМР-спектра олигосахарида I (δ, м.д.)

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
*D*Glc*p*NAcα1→	H1	5,11	д	$J_{1,2}$ 4,0
	H2	3,92	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,77	т	$J_{3,4}$ 11,0
	H4	3,48	т	$J_{4,5}$ 9,0
→2*D*Man*p*α1→F	H1	5,87	дд	$J_{1,2}$ 2,5
				$J_{1,F}$ 50,0
	H2	4,10	дд	$J_{2,3}$ 2,0
	H3	3,99	ддд	$J_{3,4}$ 10,5
	H4	3,86	т	$J_{4,5}$ 9,0

свидетельствует о β-конфигурации соответствующего моносахарида [7]. Величины КССВ свидетельствуют также о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц [8]).

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде частично установлен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [9] полисахарида методом ГЖХ-МС в виде ацетатов полиолов идентифицированы 4,6-ди-О-метилманноза, 2-дезокси-2-(N-метил)ацетамидо-4,6-ди-О-метилгексоза и 2-дезокси-2-(N-метил)ацетамидо-3,6-ди-О-метилгексоза. При этом производные частично метилированных кислых сахаров не обнаружены. Таким образом, остаток маннозы находится в точке разветвления и замещен в положения 2 и 3, один остаток гексозамина замещен в положение 3, другой — в положение 4.

С целью получения олигосахаридных фрагментов полисахарид был подвергнут сольволизу безводным фтористым водородом, в результате которого получены два олигосахаридных продукта (ОС-I и ОС-II), выделенные гель-хроматографией с последующей очисткой ВЭЖХ.

В гидролизате ОС-I с помощью БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы манноза и глюкозамин. В дальнейшем для установления строения ОС-I использована ^{1}H-ЯМР-спектроскопия. В аномерной области ^{1}H-ЯМР-спектра ОС-I присутствуют сигналы двух протонов при 5,11 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 4,0 Гц) и 5,87 м.д. (дублет дублетов, $J_{1,2}$ 2,5 Гц). Следовательно, ОС-I представляет собой дисахарид, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина и маннозы. Необычным в спектре этого дисахарида был сигнал аномерного протона остатка маннозы, находящегося на восстанавливающем конце. Этот сигнал имеет химический сдвиг 5,87 м.д. и представляет собой дублет дублетов с малой константой 2,5 Гц и большой константой 50 Гц, что характерно для H1 α-гликозилфторидов (ср. с данными [10] для олигозил-(1 → 3)-α-маннопиранозилфторида: δ 5,59 м.д., $J_{1,2}$ 1,8 Гц, $J_{1,F}$ 48 Гц).

Полная расшифровка спектра ОС-I проведена с помощью гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [11] (табл. 2). Тип связи между моносахаридами определен в эксперименте с ЯЭО при облучении аномерного протона остатка глюкозамина. В одномерном разностном спектре наблюдаются только сигналы H2 глюкозамина и H2 маннозы, что свидетельствует о наличии 1,2-связи между моносахаридами. В то же время отсутствие ЯЭО на H-1 остатка маннозы указывает на их одинаковую (в данном случае D) абсолютную конфигурацию [12]. Кроме того, величина КССВ аномерного протона остатка глюкозамина (4,0 Гц)

Таблица 3

Данные ^{1}H-ЯМР-спектра ацетата восстановленного олигосахарида II (δ, м.д.)

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
*D*Glc*p*NAcα1→	H1	5,29	д	$J_{1,2}$ 4,0
	H2	4,34	ддд	$J_{2,3}$ 10,0
	NH_2	6,28	д	$J_{NH,2}$ 9,0
	H3	5,34	дд	$J_{3,4}$ 9,0
	H4	5,22	т	$J_{4,5}$ 10,0
→2*D*Man*p*β1→	H1	4,78	с	
	H2	4,35	д	$J_{2,3}$ 2,5
	H3	5,05	дд	$J_{3,4}$ 10,0
	H4	5,39	т	$J_{4,5}$ 10,5
→4*D*Gal*p*NAcα1→	H1	5,11	д	$J_{1,2}$ 4,0
	H2	4,53	ддд	$J_{2,3}$ 9,0
	NH_2	6,14	д	$J_{NH,2}$ 10,0
	H3	5,16	дд	$J_{3,4}$ 3,5
	H4	4,31	д	$J_{4,5}$ 1,5
→4*D*Gal*p*ol	H1A	4,51	дд	$J_{1A,B}$ 3,5
	H1B	4,01	дд	$J_{1B,2}$ 7,0
	H2	5,47	м	$J_{2,3}$ 6,5
	H3	5,24	дд	$J_{3,4}$ 3,5
	H4	4,05	дд	$J_{4,5}$ 3,0
	H5	5,32	дд	$J_{5,6B}$ 7,0
	H6A	4,59	дд	$J_{6A,B}$ 3,0
	H6B	4,15	дд	$J_{6B,5}$ 7,0

свидетельствует об α-конфигурации гликозидной связи между моносахаридами. Следовательно, ОС-I имеет следующее строение:

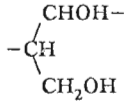
α-*D*-Glc*p*NAc-(1→2)-α-Man*p*-(1→*F*

Более высокая устойчивость ОС-I в водном растворе по сравнению с описанным ранее олигозил-(1 → 3)-α-маннопиранозилфторидом, который полностью гидролизовался в соответствующий свободный олигосахарид за 2 ч при 20° С [10], очевидно, связана с замещением остатка α-маннопиранозилфторида в положение 2 (ранее отмечалась высокая устойчивость к гидролизу олигозил-(1 → 2)-α-глюкопиранозидов и -α-галактопиранозидов [13, 14]).

В аномерной области ^{13}C-ЯМР-спектра ОС-II наблюдаются пять сигналов атомов углерода, два из которых, CI-α и CI-β, принадлежат моносахаридному остатку, находящемуся на восстанавливающем конце (табл. 1). В области сильного поля отсутствуют сигналы дезоксигрупп, а в слабом поле исчез один сигнал карбонильного атома углерода. Этот факт однозначно свидетельствует о том, что в результате HF-сольволиза произошло отщепление остатка рамнолактиловой кислоты от полисахаридной цепи, а образовавшийся ОС-II представляет собой тетрасахарид. Для установления строения ОС-II был восстановлен по карбоксильной группе и восстанавливающему концу и ацетилирован.

Таблица 4

Данные ^{1}H-ЯМР-спектра олигосахарида III (δ, м.д.)

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
*D*Glc*p*NAcα1→	H1	5,03	д	$J_{1,2}$ 3,5
	H2	3,83	дд	$J_{2,3}$ 9,5
	H3	3,87	т	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,61	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	4,17	м	
→2,3*D*Man*p*β1→	H1	4,87	ус	$J_{1,2}$ < 2
	H2	4,48	уд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3,4	3,71—3,78	м	
	H5	3,41	м	$J_{5,6}$ 3,0
	H6A	3,96	дд	$J_{6A,B}$ 12,5
	H6B	3,81	дд	$J_{5,6B}$ 5,5
→4*D*Gal*p*NAcα1→	H1	4,91	д	$J_{1,2}$ 3,5
	H2	4,18	дд	$J_{2,3}$ 10,0
	H3	3,99	дд	$J_{3,4}$ 3,0
	H4	4,23	уд	$J_{4,5}$ < 2
	H5	4,07	удд	$J_{5,6}$ 5,0
	H6A	3,78	дд	$J_{6A,B}$ 13,0
	H6B	3,70	дд	$J_{5,6B}$ 6,6
*L*Rha*p*3Lacα1→	H1	4,95	д	$J_{1,2}$ 2,0
	H2	3,95	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,47	дд	$J_{3,4}$ 10,0
	H4	3,53	т	$J_{4,5}$ 10,0
	H5	3,98	дк	$J_{5,6}$ 6,0
	H6	1,22	к	
	H2′	4,31	к	$J_{2',3'}$ 6,0
	H3′	1,41	д	
	H5	4,13	д	$J_{4,5}$ 2,0
	H4	4,01*		
	H3,3′	3,85*		

* Данные ^{1}H/^{13}C-гетероядерного COSY-спектра.

^{1}H-ЯМР-спектр полного ацетата был частично расшифрован с помощью гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте (табл. 3). При этом исходя из положения химических сдвигов протонов и величин КССВ установлено, что на невосстанавливающем конце олигосахарида находится остаток N-ацетил-α-глюкозамина, а на восстанавливающем — замещенный в положение 4 остаток дульцита, образовавшийся при восстановлении остатка галактуроновой кислоты; остаток маннозы имеет β-конфигурацию и замещен в положение 2, а остаток N-ацетилгалактозамина присоединен α-гликозидной связью и замещен в положение 4. Таким образом, с учетом структуры ОС-I последовательность моносахаридных остатков в ОС-II должна быть такой:

α-*D*-Glc*p*NAc-(1→2)-β-*D*-Man*p*-(1→4)-α-*D*-Gal*p*NAc-(1→4)-*D*-Gal

Для подтверждения данной структуры проведен компьютерный расчет ^{13}C-ЯМР-спектра ОС-II по методу [15]. При этом расчетные химические сдвиги

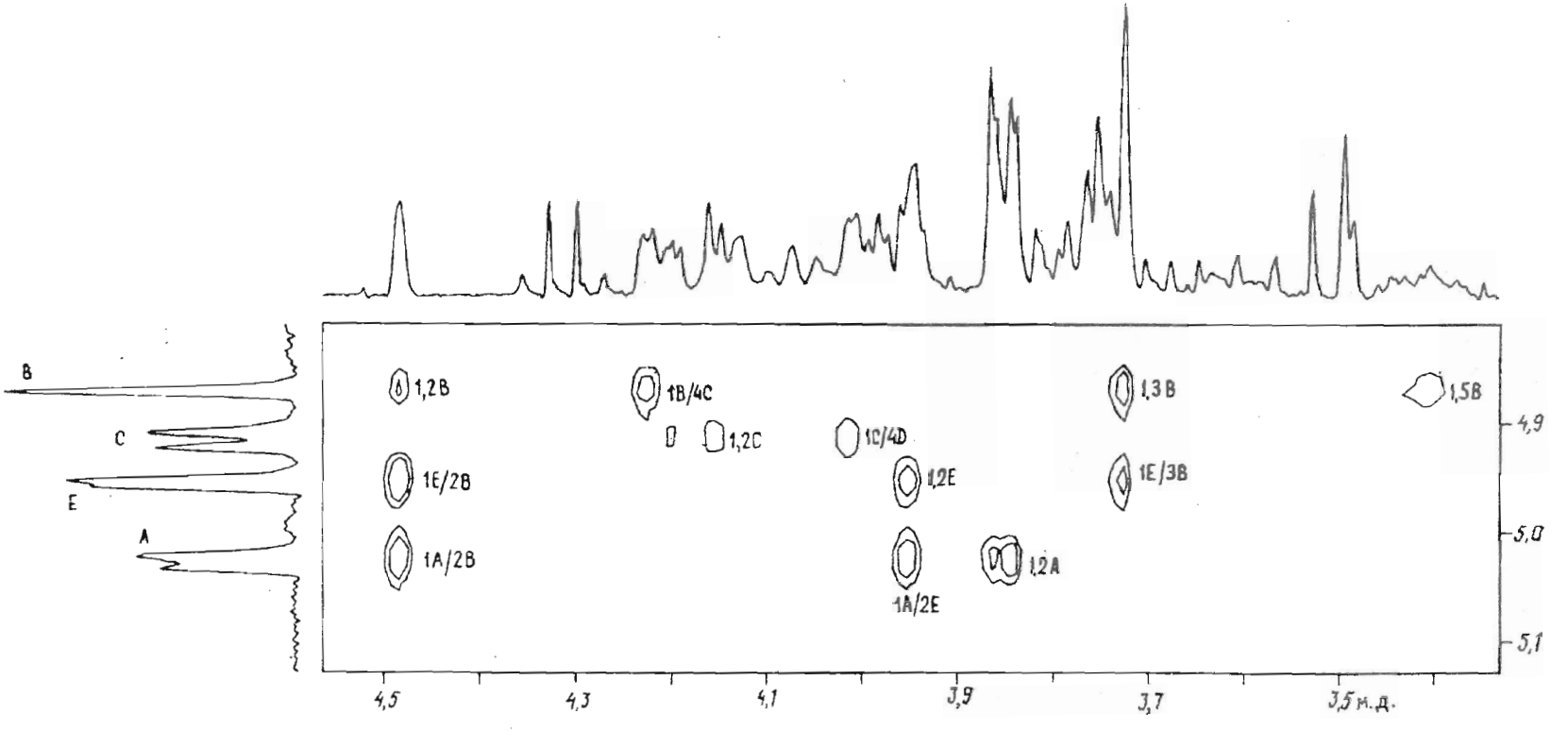


Рис. 2. ROESY-спектр олигосахарида III. Буквами обозначены моносахаридные остатки в соответствии с формулой, цифры указывают номер протона в остатке

оказались близкими к экспериментальным (сумма квадратичных отклонений химических сдвигов углеродных атомов составила 1,8).

Так как, по данным анализа КССВ $^1J_{C1, H1}$ (см. выше), только один моносахарид в полисахариде имеет β-конфигурацию, остатки галактуроновой и рамнолактиловой кислот присоединены α-гликозидными связями. Таким образом, принимая во внимание тот факт, что, по данным метилирования, остаток маннозы замещен в положения 2 и 3, можно утверждать, что возможны только два варианта строения повторяющегося звена полисахаридной цепи:

I:
→3)-α-*D*-Glc*p*NAc-(1→2)-β-*D*-Man*p*-(1→4)-α-*D*-Gal*p*NAc-(1→4)-α-*D*-Gal*p*A-(1→
3
↑
α-*L*-Rha*p*3Lac1

II: →3)-β-*D*-Man*p*-(1→4)-α-*D*-Gal*p*NAc-(1→4)-α-*D*-Gal*p*A-(1→
3
↑
1-α-*D*-Glc*p*NAc-(3←1)-α-*L*-Rha*p*3Lac

С учетом абсолютной конфигурации моносахаридов и эффектов гликозилирования [16] для структуры I характерен более сильнопольный (98 м. д.) сигнал аномерного атома углерода остатка рамнолактиловой кислоты, чем в случае структуры II (102 м. д.), что и наблюдается в экспериментальном спектре полисахарида (табл. 1).

Для подтверждения структуры I был проведен распад полисахарида по Смиту, в результате которого была получена смесь двух олигосахаридов. По данным ^{13}C-ЯМР-спектра этой смеси, на восстанавливающем конце одного из олигосахаридов находится тетроновая кислота, образовавшаяся при окислении *D*-галактуроновой кислоты, на конце другого — ее γ-лактон. В результате слабого подщелачивания смеси удалось добиться раскрытия лактона и образования одного олигосахарида (ОС-III).

В ^{13}C-ЯМР-спектре ОС-III присутствуют сигналы четырех аномерных атомов углерода при 101,3, 100,1, 98,0 и 97,8 м.д., двух метильных групп рамнолактиловой кислоты (С6 при 17,9 и С2′ при 20,3 м.д.), двух N-ацетильных групп гексозаминов (CH_3 при 23,4 и 23,5 м.д.), двух С-2-атомов аминосахаров при 51,3 и 55,2 м.д., трех С-6-атомов гексоз в области 61—62 м.д., сигнал С1′ рамнолактиловой кислоты при 77,1 м.д., 14 вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 67—82 м.д. и трех углеродных атомов тетроновой кислоты при 61,3, 72,9 и 82,3 м.д. (сигналы в области резонанса С=О-групп не наблюдались из-за их низкой интенсивности) (табл. 1). Таким образом, ОС-III построен из остатков двух гексозаминов, маннозы и рамнолактиловой кислоты; на восстанавливающем конце тетрасахарида локализован остаток тетроновой кислоты, образовавшийся в результате окисления *D*-галактуроновой кислоты. Смещение на 1,5 м.д. в слабое поле сигнала С-2 остатка глюкозамина в спектре ОС-III по сравнению со спектром исходного полисахарида однозначно указывает на локализацию этого остатка на невосстанавливающем конце олигосахарида (отсутствие замещения по С-3). Такое положение остатка глюкозамина возможно только в случае структуры I нативного полисахарида; в случае структуры II замещение по С-3 сохраняется.

^{1}H-ЯМР-спектр ОС-III полностью расшифрован с помощью двумерной спектроскопии TOCSY [17] и серии экспериментов с гомоядерным двойным резонансом в разностном варианте (табл. 4). Данные ^{1}H-ЯМР-спектроскопии полностью соответствуют результатам первичного анализа ^{13}C-ЯМР-спектра. Последовательность моносахаридных остатков в олигосахариде определена в эксперименте с ЯЭО во вращающейся системе координат (ROESY) [18] (рис. 2). В спектре наблюдаются сигналы трансгликозидных контактов аномерных протонов с коль-

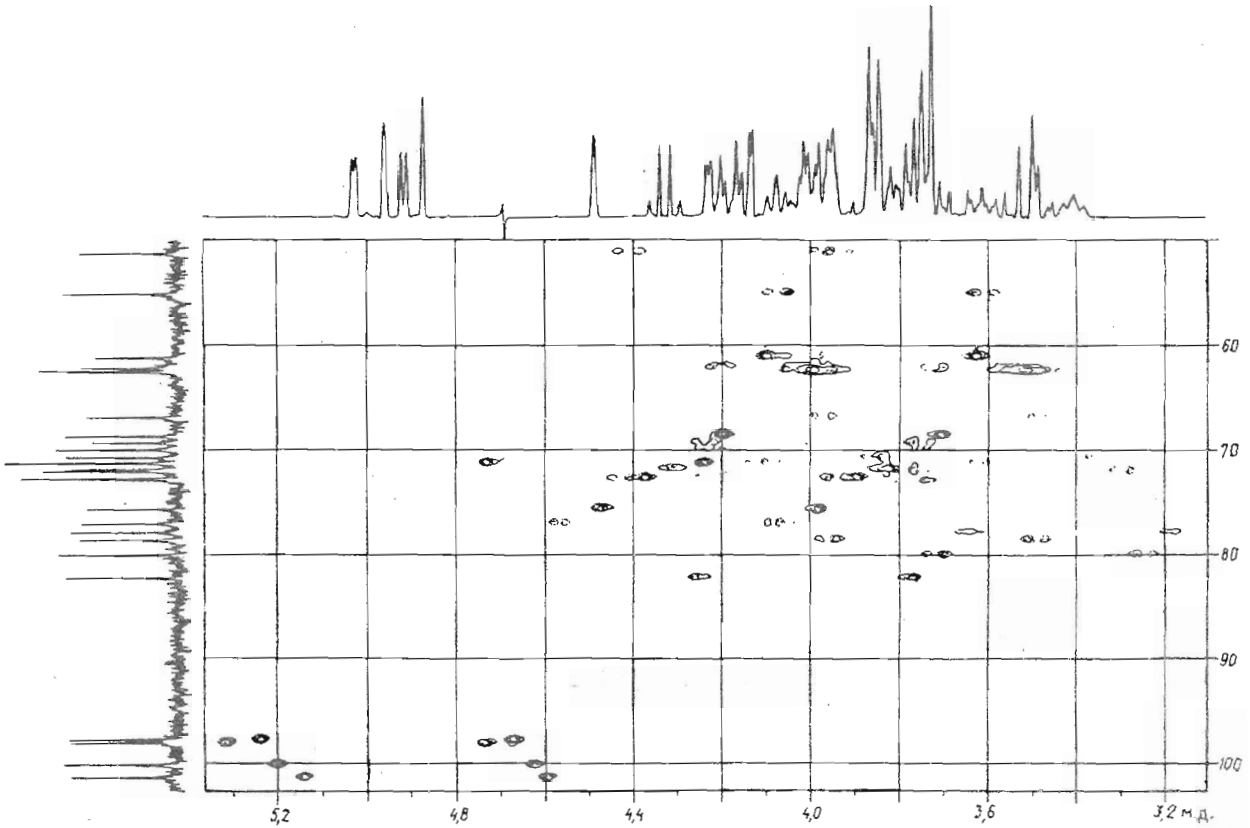
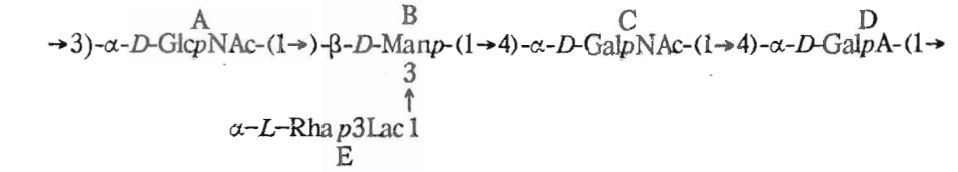


Рис. 3. $^{13}C/^{1}H$-корреляционный HMQC-спектр олигосахарида III (слабопольная часть) и соответствующие области спектров ^{13}C (слева) и ^{1}H (вверху)

цевыми протонами гликозилируемых моносахаридных остатков. Кроме того, в спектре присутствуют корреляционные сигналы аномерного протона остатка рамнолактиловой кислоты (звено E) с H-2 остатка маннозы (звено B) и H-1 N-ацетилглюкозамина (звено A) с H-2 звена E, что свидетельствует о различной абсолютной конфигурации остатка рамнолактиловой кислоты, с одной стороны, и остатков глюкозаминида и маннозы — с другой. ^{13}C-ЯМР-спектр ОС-III полностью расшифрован с помощью двумерной гетероядерной ^{13}C/^{1}H-корреляционной спектроскопии HMQC (рис. 3). Анализ α- и β-эффектов гликозилирования по методу [16] подтверждает данные ^{1}H-ЯМР-спектров ОС-III.

Таким образом, на основании всех полученных данных установлена следующая структура повторяющегося звена O-специфического полисахарида *V. fluvialis* штамма AQ-0002B:



где Rha3Lac — остаток 3-O-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-*L*-рамнозы.

Экспериментальная часть

^{1}H-ЯМР-спектры сняты на приборе WM-250 (Bruker) в D_2O при 30° C, ^{13}C-ЯМР-спектры — на приборе AM-300 (Bruker) в D_2O при 60° C с метанолом (50,15 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. ЯЭО-спектры и двумерные гомо- и гетероядерные спектры получены как описано ранее [19].

Растворы лиофилизовали или упаривали в вакууме. Оптическое вращение определяли на приборе Jasco DIP-360 в воде при 20° C. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3MM в системе растворителей *н*-бутанол — пиридин — вода, 6:4:3, при обнаружении моносахаридов щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию осуществляли на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-50 в 0,3% уксусной кислоте и на колонке (1×90 см) с сорбентом TSK HW 40(F) в воде. Ионообменную хроматографию проводили на анионообменнике DEAE TSK 650M в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,0). Кислый полисахарид элюировали 0,5 М NaCl в том же буфере. ВЭЖХ проводили на колонке (0,4×25 см) с сорбентом Silasorb SPH C_{18} (LC) в воде. Элюционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK-101 (ЧСФР). ГЖХ проводили на приборе Hewlett-Packard (модель 5890) на капиллярной колонке (0,2 мм×25 м) с фазой Ultra-1 в интервале температур 140→290° C; газ-носитель — аргон. ГЖХ-МС осуществляли на приборе Varian MAT Gnom 111 на колонке (0,3×150 см) с SE-30 на сорбенте Chromosorb W (100—120 меш), газ-носитель — гелий.

Продуцирование биомассы микроорганизма V. fluvialis (штамм AQ-0002B), полученного от S. Shinoda (Япония), и выделение ЛПС проводили как описано ранее [1].

Выделение О-специфического полисахарида. ЛПС (2 г) гидролизовали 1% уксусной кислотой (200 мл, 100° C, 3 ч), осадок липида A удаляли центрифугированием (450 мг), раствор упаривали до небольшого объема, гель-хроматографией на сефадексе G-50 выделили полисахарид (выход 32,5% от веса ЛПС) и олигосахаридную фракцию (выход 26,3% от веса ЛПС), которая в дальнейшем не исследовалась. Дальнейшую очистку полисахарида проводили ионообменной хроматографией на геле DEAE TSK 650M. Нейтральную фракцию элюировали 0,05 М трис-HCl-буфером (выход 5,3% от веса полисахарида); кислый O-специфический полисахарид элюировали 0,5 М NaCl в том же буфере (выход 72,3% от веса полисахарида), $[\alpha]^{20}_{578}$ +101,5° (*c* 0,4, вода).

Сольволиз безводным фтористым водородом. Полисахарид (30 мг) обрабатывали безводным HF (–40° С, 1 ч). Раствор выливали в холодный эфир, фильтровали, осадок растворяли в воде и хроматографировали на TSK HW 40. Полученные олигосахаридные фракции очищали ВЭЖХ. Получены ОС-I (2 мг) и ОС-II (12 мг).

Полный кислотный гидролиз. Полисахарид (2 мг) и ОС-I (1 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали и анализировали БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

Ацетилирование ОС-II. ОС-II (10 мг) растворяли в метаноле (3 мл) и метилировали эфирным раствором диазометана до устойчивой желтой окраски раствора. Метилированный по карбоксилу ОС-II восстанавливали $LiBH_4$ [13] и ацетилировали ацетангидридом в пиридине.

Распад полисахарида по Смиту. Полисахарид (70 мг) обрабатывали 0,1 М $NaIO_4$ (7 мл). Восстановленный $NaBH_4$ продукт гидролизовали 1% уксусной кислотой (100° С, 2 ч), восстанавливали $NaBH_4$, подкисляли и хроматографировали на TSK HW 40 (F). Полученную смесь олигосахаридов (50 мг) подщелачивали 1% KOH в D_2O и анализировали ЯМР-спектроскопией.

Метилирование полисахарида осуществляли по методу [9], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированный полисахарид выделяли с помощью патрона Sep Pak C_{18} (Waters), подвергали гидролизу 2 М трифторуксусной кислотой (120° С, 1 ч). Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-МС.

Выделение индивидуальных моносахаридов. Полисахарид (20 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (2 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали. Препаративной БХ и электрофорезом выделяли 2 мг *D*-маннозы, $[\alpha]_{578}^{20}$ + 22° (*с* 0,2, вода), 3 мг *D*-галактуроновой кислоты, $[\alpha]_{578}^{20}$ + 45° (*с* 0,3, вода), 2 мг глюкозамина, который обработкой 0,1 М HCl превращали в хлоргидрат, $[\alpha]_{578}^{20}$ + 70° (*с* 0,2, вода), и галактозамин, превращенный в хлоргидрат, $[\alpha]_{578}^{20}$ + 85° (*с* 0,2, вода).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Назаренко Е. Л., Горшкова Р. П., Оводов Ю. С., Шашков А. С., Книрель Ю. А.*//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1100—1106.
2. *Назаренко Е. Л., Зубков В. А., Иванова Е. П., Горшкова Р. П.*//Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 3. С. 418—421.
3. *Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L.*//Eur. J. Biochem. 1977. V. 78. N 2. P. 381—387.
4. *Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K.*//Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. N 1. P. 111—115.
5. *Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Backinovsky L. V.*//Carbohydr. Res. 1976. V. 51. N 2. P. 229—237.
6. *Назаренко Е. Л., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Иванова Е. П., Оводов Ю. С.*//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1426—1429.
7. *Bock K., Pedersen C.*//J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. N 3. P. 293—297.
8. *Cyr N., Perlin A. S.*//Can. J. Chem. 1979. V. 57. N 18. P. 2504—2511.
9. *Hakomori S.*//J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. N 1. P. 205—208.
10. *Mort A. J., Utille J.-P., Torri G., Perlin A. S.*//Carbohydr. Res. 1983. V. 121. P. 221—232.
11. *Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Pier G. B.*//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. N 23. P. 11291—11295.
12. *Lipkind G. M., Shashkov A. S., Mamyan S. S., Kochetkov N. K.*//Carbohydr. Res. 1988. V. 181. N 1. P. 1—12.
13. *Vinogradov E. V., Sidorczyk Z., Swierzko A., Rozalski A., Darva E. D., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K.*//Eur. J. Biochem. 1991. V. 197. № 1. P. 93—103.
14. *Зубков В. А., Горшкова Р. П., Назаренко Е. Л., Шашков А. С., Оводов Ю. С.*//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 831—838.

15. *Кочетков Н. К., Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шашков А. С., Липкинд Г. М.*//Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 116—125.
16. *Kochetkov N. K., Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Y. A.*//Sov. Sci. Rev. Sect. B. 1990. V. 13. N 2. P. 1—73.
17. *Braunschweiler L., Ernst R. R.*//J. Magn. Reson. 1983. V. 53. P. 521—528.
18. *Bax A., Davis D. G.*//J. Magn. Reson. 1985. V. 65. P. 355—360.
19. *Shashkov A. S., Vinogradov E. V., Daeva E. D., Knirel Y. A., Zdorovenko G. M., Gubanova N. Y., Yakovleva L. M., Zakharova I. Y.*//Carbohydr. Res. 1991. V. 212. N 2. P. 301—305.

Поступила в редакцию
13.IV.1993

E. L. Nazarenko, V. A. Zubkov, A. S. Shashkov, Yu. A. Knirel*, N. A. Komandrova, R. P. Gorshkova, Yu. S. Ovodov*

STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM *Vibrio fluvialis*

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok;
**N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

O-Specific polysaccharide of *Vibrio fluvialis*, strain AQ-0002B, is built up to pentasaccharide repeating units contained of *D*-mannose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose, *D*-galacturonic acid and 3-0-[(*R*)-1′-carboxyethyl]-*L*-rhamnose (rhamnoactylic acid, Rha3Lac) residues. On the basis of methylation studies, solvolysis with HF, Smith degradation, ^{1}H and ^{13}C NMR-spectroscopy including homo- and heteronuclear correlation spectroscopy and NOE experiments, the following structure was suggested for the polysaccharide repeating unit:

→3)-α-*D*-Glc*p*NAc-(1→2)-β-*D*-Man*p*-(1→4)-α-*D*-Gal*p*NAc-(1→4)-α-*D*-Gal*p*A-(1→
3
↑
α-*L*-Rha*p*3Lac1