



УДК 547.458.02:543.422.23

НОВЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Yersinia pseudotuberculosis

© 1998 г. И. Н. Красикова[#], С. И. Бахолдина, Т. Ф. СоловьеваТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 19.09.97 г. Принята к печати 12.11.97 г.

На примере бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* сравниваются два способа получения О-специфического полисахарида эндотоксинов грамотрицательных бактерий: гидролизом целых микробных клеток и стандартным методом с предварительным выделением соответствующего липополисахарида. Анализ изучаемых полимеров показал, что из бактериальной массы полисахарид извлекается с высоким выходом, не деградирует в процессе выделения и, по данным ¹³С-ЯМР-спектроскопии, имеет структуру, полностью идентичную структуре полисахаридной части липополисахарида. Это делает возможным использовать такой способ получения О-специфических полисахаридов для их структурного исследования.

Ключевые слова: полисахариды О-специфические; *Yersinia pseudotuberculosis*; спектроскопия ¹³С-ЯМР.

О-Специфические полисахариды, называемые также О-антигенами, являются составной частью липополисахаридов (ЛПС) – эндотоксинов грамотрицательных бактерий, одних из основных компонентов наружной мембраны [1]. Полисахариды определяют серологическую специфичность ЛПС, поэтому данные об их строении составляют химическую основу внутривидовой классификации бактерий, необходимой для эпидемиологических целей [2]. Структурные исследования О-антигенов проводятся на так называемых частично деградированных полисахаридах (ДПС), которые представляют собой продукт гидролиза ЛПС разбавленной уксусной кислотой [3]. Такой подход подразумевает предварительную экстракцию ЛПС из бактерий в свободном виде тем или иным способом. Относительно недавно был предложен простой и быстрый метод приготовления О-полисахаридов из целых клеток [4], исключающий стадию выделения ЛПС. Он включает в себя обработку влажной бактериальной массы уксусной кислотой, что, как и в случае кислотной обработки ЛПС, вызывает гидролиз кислотолабильной кетозидной связи между липидным участком молекулы эндотоксина и его углеводным фрагментом и переход последнего в растворимое состояние. Выделенные из микробной массы полисахариды имели сахарный состав, подобный определенному для полиса-

харидной фракции соответствующих ЛПС [5], и успешно использовались для хемотаксономических исследований бактерий рода *Vibrio* [6, 7].

Мы полагаем, что полученные таким способом О-полисахариды могут оказаться полезными не только для общей характеристики углеводного фрагмента эндотоксинов, но и для установления тонкой химической структуры специфических полисахаридов. Препятствием для такого рода исследований может стать потеря наиболее чувствительных к кислотному гидролизу участков молекулы, поскольку при получении О-специфического полисахарида из бактериальной массы применяется более жесткая обработка (5% уксусная кислота), чем в случае, когда для этой цели используется ЛПС (1% уксусная кислота). Степень деградирующего действия предлагаемого способа гидролиза была исследована на примере ДПС из бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* IV-серовара. Выбор этого микроорганизма в качестве объекта исследования обусловлен тем, что в составе повторяющегося звена его О-специфического полисахарида, структура которого была установлена ранее различными химическими и физико-химическими методами [8, 9], присутствует 3,6-дидезоксигексоза (паратоза), известная своей кислотолабильностью [10]. Особенности строения О-специфического полисахарида, в котором паратоза находится в фуранозидной форме и расположена в разветвлении по отношению к основной углеводной цепи, делают его еще более чувствительным к действию кислот по

[#] Автор для переписки (тел.: (4-232) 31-14-09; факс: 7(4-232) 31-40-50; e-mail: soloveva@piboc.marine.su).

Таблица 1. Аналитические данные деградированных полисахаридов, полученных гидролизом ЛПС (ДПС-Л) или целых микробных клеток (ДПС-1 и ДПС-2)*

Препарат	Выход ^{2*} , %	Содержание, %			Par/Man ^{3*} , моль/моль	Доля ВМ-фракции, %	Man/HeP ^{4*} , моль/моль
		Б	НК	МС			
ДПС-Л	0.33	2.61	5.00	51.76	0.29		4.1
ДПС-Л-ВМ	0.08	0.60	0.34	54.9	0.31	24	15.0
ДПС-1	1.99	4.20	6.04	63.6	0.48		2.8
ДПС-1-ВМ	0.60	3.60	1.03	84.1	0.51	30	12.7
ДПС-2	0.32	6.30	11.8	56.8	0.25		4.3
ДПС-2-ВМ	0.08	2.37	0.00	49.24	0.33	25	15.4

* ДПС-Л – образец, полученный из липополисахарида; ДПС-1 и ДПС-2 – полисахариды, полученные после первой и второй обработок микробных клеток 5% CH_3COOH ; Б – белок; НК – нуклеиновые кислоты; МС – моносахариды; ВМ – высокомолекулярная фракция, полученная при гель-фильтрации ДПС на колонке с сефадексом G-50.

^{2*} В расчете на сухую микробную массу.

^{3*} Степень деградации полисахаридов.

^{4*} Отношение содержания маннозы (входит в состав О-специфического полисахарида *Y. pseudotuberculosis* [8]) и гептозы (моносахарид олигосахарида кора [12]) – оценка степени полимеризации ДПС.

сравнению с другими полисахаридами. Мы провели сравнительную характеристику деградированных полисахаридов, полученных гидролизом целых клеток (ДПС), или ЛПС (ДПС-Л) [3], в свою очередь полученного экстракцией бактерий горячим водным фенолом [11], используя ДПС-Л как

соединение сравнения, а относительное содержание паратозы в изучаемых образцах (отношение Par/Man) – как степень нативности полимеров.

Для получения ДПС из микробной массы сухие бактериальные клетки, предварительно гомогенизированные в горячей воде, гидролизовали 5% уксусной кислотой [5]. После обработки гидролизата трихлоруксусной кислотой (для отделения нуклеиновых кислот) и осаждения ацетоном выход полисахаридной фракции (ДПС-1) составил 2.0% (табл. 1). Повторная обработка бактериальных клеток уксусной кислотой приводила к выделению дополнительного количества вещества (ДПС-2; 0.32%). В результате содержание 2-кето-3-дезоксиктулозоновой кислоты (Kdo), моносахарида, входящего в состав олигосахарида кора бактерий псевдотуберкулеза [12] и осуществляющего связь О-полисахарида с липидным участком молекулы ЛПС, в клетках резко уменьшалось (0.72 и 0.05% Kdo было зарегистрировано в клетках до и после обработки бактерий уксусной кислотой). Одновременно интенсивность полос характерной для ЛПС лестничноподобной структуры на SDS-ПААГ-электрофореграмме лизата клеточного остатка значительно снижалась в сравнении с лизатом целых клеток (рис. 1, а, б). Эти данные можно рассматривать как доказательство достаточно полной экстракции полисахаридного фрагмента эндотоксина из бактериальных клеток.

Следует отметить существенно более высокий (в 6 раз) выход ДПС при его выделении непосредственно из клеток в сравнении с количеством препарата, полученного классическим способом, включающим стадию предварительной экстракции ЛПС (табл. 1). Возможным объяснением этого может быть то, что при обработке целых бактерий уксусной кислотой гидролизу подвергаются

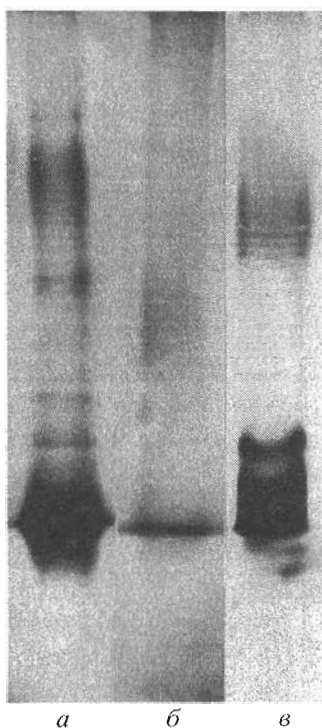


Рис. 1. Электрофорез клеточных лизатов псевдотуберкулезного микроба в полиакриламидном геле в присутствии SDS, окрашивание ионами серебра: а – необработанные клетки; б – после двукратной обработки уксусной кислотой; в – после экстракции ЛПС.

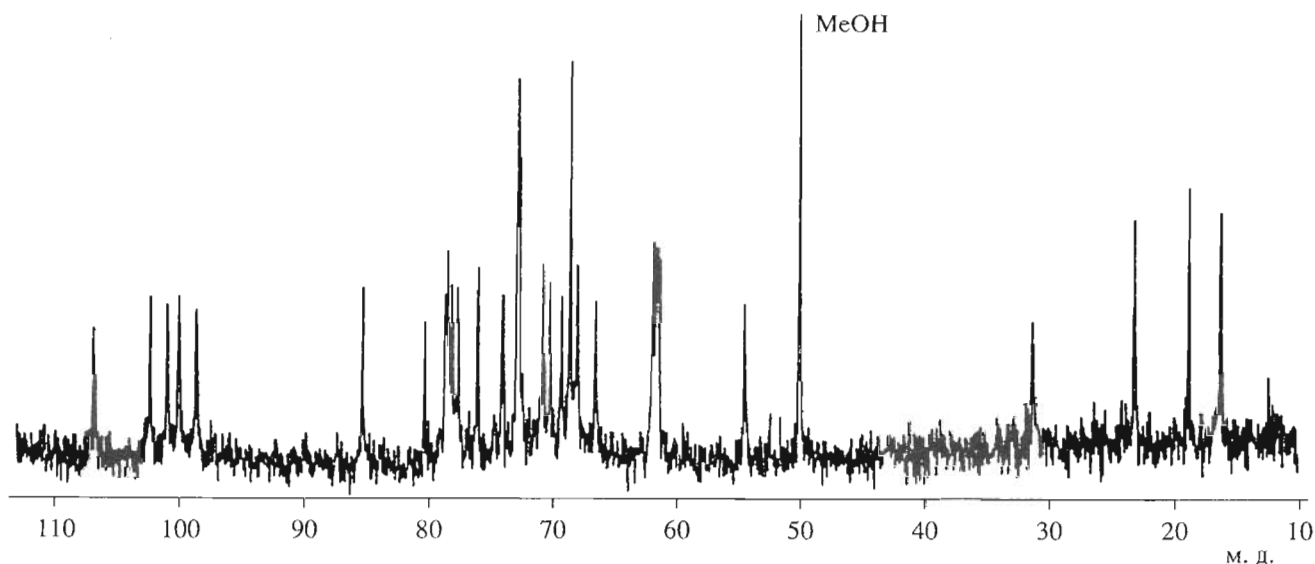


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр ДПС-1 из *Y. pseudotuberculosis* IB-серовара.

ся все ЛПС-молекулы, присутствующие в клетке. Напротив, когда О-полисахарид получают из ЛПС, источником ДПС является только часть молекул, избирательно извлекаемая той или иной системой растворителей. На неполное извлечение ЛПС из бактериальных клеток, даже после истощающей экстракции горячим водным фенолом, указывают вид электрофореграммы соответствующего клеточного лизата (рис. 1, в) и довольно высокое содержание Kdo (0.32%) в остатке клеток. Известно, что многие бактерии [13, 14], включая *Y. pseudotuberculosis* [15], наряду с достаточно гидрофильными молекулами ЛПС, которые легко извлекаются при обработке горячим водным фенолом, содержат молекулы, требующие специфических методов выделения, например использования гидрофобных систем растворителей. Действительно, последовательная обработка бактерий *Y. pseudotuberculosis* по методу Галаноса и др. [16] и Вестфалья и др. [3] увеличивала выход ЛПС (и соответствующего ДПС) [15], но он все еще был меньше, чем выход ДПС-1.

Общий анализ ДПС-1 и ДПС-2 показал присутствие в них углеводов (54–60%), белка и нуклеиновых кислот (табл. 1). 3-Гидрокситетрадекановая кислота, обязательный структурный элемент липида А псевдотуберкулезного микроба [17], в анализируемых образцах не обнаружена, что свидетельствует об отсутствии в них ЛПС. В соответствии со структурой повторяющегося звена О-специфического полисахарида бактерий *Y. pseudotuberculosis*, который представляет собой пентасахарид, состоящий из двух остатков маннозы, фукозы, паратозы и глюкозамина [8], гидролизаты всех ДПС содержали указанные моносахариды, а также галактозу, глюкозу, *L*-глице-

ро-D-манно- и *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы и Kdo, моносахаридные составляющие олигосахарида кора [12]. Моносахариды, не входящие в состав ЛПС [8, 12], обнаружены не были, что говорит о высокой специфичности используемого для получения О-полисахарида метода.

Отношение Par/Man в ДПС-1 было близким к величине, определяемой структурой О-специфического полисахарида псевдотуберкулезного микроба [8], в ДПС-2 и ДПС-Л оно было в 2 раза меньше (табл. 1). Эти данные говорят о том, что первичная обработка бактериальных клеток 5% уксусной кислотой не приводит к потере кислотлабильных участков молекулы ЛПС, в то время как ДПС-2, который выделяется из клеток после повторной обработки клеток уксусной кислотой, и ДПС-Л претерпевают существенную деградацию с потерей значительной части остатков паратозы и, возможно, других чувствительных к кислотному гидролизу элементов структуры ЛПС.

Очищенные гель-хроматографией на сефадексе G-50 высокомолекулярные фракции образцов ДПС-1, ДПС-2 и ДПС-Л представляли собой препараты, имеющие близкие степени полимеризации (12.7, 15.4 и 15.0; табл. 1). Доля высокомолекулярной фракции в общей популяции полисахаридных молекул составляла 30, 25 и 24% для ДПС-1, ДПС-2 и ДПС-Л (табл. 1).

Структура деградированного полисахарида, выделенного гидролизом бактериальных клеток, была установлена методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Как следует из рис. 2 (ср. [9]), все моносахариды, входящие в состав полисахаридного звена бактерий *Y. pseudotuberculosis*, присутствовали в ДПС-1 в эквимольных количествах. Их спектральные характеристики (табл. 2, Б) совпали с данны-

Таблица 2. Данные ^{13}C -ЯМР-спектров ДПС, полученных кислотной обработкой ЛПС (А [9]) и целых клеток (Б) бактерий *Y. pseudotuberculosis* (δ , м. д.)

Атом углерода	$\text{P}_{\text{ан}}(\beta 1 \rightarrow)$		$\rightarrow 2, 3\text{-D-Manp}(\alpha 1 \rightarrow)$		$\rightarrow 4\text{-D-Manp}(\alpha 1 \rightarrow)$		$\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(\alpha 1 \rightarrow)$		$\rightarrow 3\text{-D-GlcNAcp}(\beta 1 \rightarrow)$	
	А	В	А	В	А	В	А	В	А	В
1	107.5	106.6	98.9	98.6	101.4	100.8	100.4	100.0	102.7	102.3
2	74.1	74.0	77.9	77.3	73.0	72.3	68.9	68.2	54.6	54.3
3	31.7	30.6	78.8	78.0	71.0	70.4	79.1	78.0	80.7	79.8
4	85.6	85.1	66.8	66.1	78.5	77.7	70.5	69.8	69.6	68.6
5	68.9	68.2	73.0	72.5	73.0	72.5	68.2	67.5	76.4	75.6
6	19.1	18.3	62.2	61.9	61.9	61.5	16.5	16.0	60.9	60.9

ми ^{13}C -ЯМР-спектроскопии ДПС-Л (табл. 2, А [9]; полное отнесение сигналов описано в работе [9]), что говорит об идентичности их структур.

Таким образом, предлагаемый подход, несмотря на использование более жестких условий кислотной обработки, не приводит к существенной деградации молекулы ЛПС, что позволяет предложить его в качестве упрощенного метода, пригодного для выделения О-специфических полисахаридов также из других видов грамотрицательных бактерий. Его преимущества (менее трудоемкий процесс выделения, высокий выход ДПС) могут оказаться полезными при изучении химической структуры эндотоксинов, а также в хемотаксономических исследованиях, когда анализу подвергается большое количество образцов бактериальных культур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы определения общего содержания углеводов, белка, Кдо, нуклеиновых кислот были описаны ранее [15]. Нейтральные и аминокислоты в виде соответствующих ацетатов полиолов [15] и жирные кислоты в виде метиловых эфиров [17] анализировали с помощью газожидкостной хроматографии. SDS-ПААГ был выполнен по методу [18] в 14% полиакриламидном геле, который был окрашен серебром согласно методике [19]. Клеточные лизаты были приготовлены как описано в работе [20]. ^{13}C -ЯМР-спектры записывали на приборе Bruker WM-250, используя метанол как внутренний стандарт (δ 50.15 м. д.).

Бактериальные штаммы, культивирование бактерий и выделение О-специфического полисахарида. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* IB-серовара выращивали в аэробных условиях при комнатной температуре и pH 7.0 в среде, описанной ранее [21]. После достижения стационарной фазы роста клетки собирали центрифугированием, промывали дистиллированной водой и обрабатывали смесью хлороформ-метанол (2 : 1) [22]. Липополисахарид выделяли фенол-водной экстрак-

цией по методу Вестфала [11], О-специфический полисахарид получали обработкой ЛПС 1% уксусной кислотой [3], ДПС из бактериальных клеток был выделен методом, описанным в работе [5], с небольшими модификациями, после чего суммарный полисахаридный препарат фракционировали гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Высокомолекулярные полисахаридные фракции, соответствующие О-полисахаридам, использовали для ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lugtenberg B., van Alphen L. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 737. P. 51–115.
2. Rietschel E.Th., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., di Padova F., Schreier M., Brade H. // FASEB J. 1994. V. 80. P. 217–225.
3. Westphal O., Luderitz O. // Angew. Chem. 1954. V. 66. P. 407–417.
4. Kondo S., Hisatsune K. // Microbiol. Immunol. 1988. V. 32. P. 907–915.
5. Hisatsune K., Iguchi T., Kondo S. // System Appl. Microbiol. 1990. V. 13. P. 320–326.
6. Kondo S., Iguchi T., Hisatsune K. // J. Gen. Microbiol. 1988. V. 134. P. 1699–1705.
7. Kondo S., Hisatsune K. // Microbiol. Immunol. 1989. V. 33. P. 641–468.
8. Tomshich S.V., Gorshkova R.P., El'kin Yu.N., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 65. P. 193–199.
9. Исаков В.В., Горшкова Р.П., Томищ С.В., Оводов Ю.С. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. P. 559–562.
10. Hamerling G. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 6. P. 2856–2862.
11. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
12. Томищ С.В., Горшкова Р.П., Оводов Ю.С. // Химия природ. соединений. 1985. № 6. С. 751–755.
13. Moran A.P., Rietschel E.Th., Kosunen T.U., Zahringer U. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 618–626.
14. Helander I.M., Hurme R., Haikara A., Moran A.P. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 3348–3354.

15. Соловьева Т.Ф., Ермак И.М., Мороз С.И., Красикова И.Н., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Фролова Г.М., Иванова Е.П., Тимченко Н.Ф., Оводов Ю.С. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 492–500.
16. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 9. P. 245–249.
17. Krasikova I.N., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1978. T. 89. P. 287–289.
18. Laemmli V.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Tsai C.M., Frash C.E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
20. Hitchcock P.J., Brown T.M. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
21. Ovodov Yu.S., Gorshkova R.P., Tomshich S.V. // Immunochimistry. 1974. V. 11. P. 777–780.
22. Rothfield L., Perlman M. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 1386–1392.

A New Isolation Procedure for the O-Specific Polysaccharide from *Yersinia pseudotuberculosis*

I. N. Krasikova[#], S. I. Bakholdina, and T. F. Solov'eva

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

Using bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* as an example, two procedures for obtaining the O-specific polysaccharide of endotoxins of gram-negative bacteria were compared: the direct acidic hydrolysis of whole cells and the traditional procedure based on preliminary isolation of the corresponding lipopolysaccharide. Analysis of the resulting polysaccharides showed that the isolation from the bacterial biomass gave a high yield of the polysaccharide; the polysaccharide is not degraded; and judging from the ¹³C NMR data, its structure was completely identical to that of the corresponding product of lipopolysaccharide hydrolysis. Therefore, this procedure is useful for obtaining O-specific polysaccharides for structural studies.

Key words: polysaccharides, O-specific; *Yersinia pseudotuberculosis*, ¹³C NMR

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 31-1409; fax: +7 (4232) 31-4050; e-mail: soloveva@piboc.marine.su.