



УДК 576.8.097

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПОЛИМЕРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
BACILLUS BREVIS VAR. *G.-B.*

Езепчук Ю. В.

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

Сысуева Е. Г., Жарикова Г. Г.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Методом избирательной экстракции с последующей очисткой из клеток *R-*, *S-*, *P⁺*- и *P⁻*-вариантов, возникающих в процессе естественной изменчивости промышленного продуцента грамицидина *S Bacillus brevis* var. *G.-B.*, выделены компоненты клеточной стенки, идентичные друг другу по характеру своей антигенной специфичности. Каждый из выделенных продуктов индивидуален по физико-химическим параметрам и антигенному составу. Молекулярный вес выделенных веществ не превышает 10 000. Коэффициенты седиментации составляют: 1,0S (*R*-вариант), 1,5S (*S*-вариант), 1,6S (*P⁺*- и *P⁻*-варианты). Все выделенные компоненты обладают антибиотической активностью.

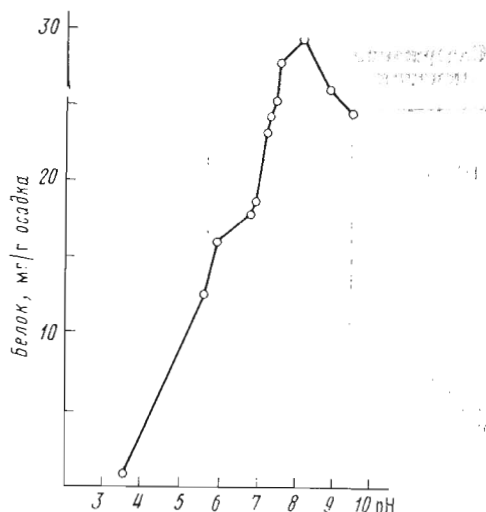
Применение методов иммунохимического анализа дало возможность установить, что четыре варианта *Bacillus brevis* имеют близкий антигенный состав [1]. Среди антигенов обнаружены общие для всех четырех вариантов, а также такие, которые свойственны только каждому варианту в отдельности. Наличие общих антигенов свидетельствует о родстве вариантов *B. brevis*; наличие же антигенов, свойственных отдельным вариантам, доказывает объективность существования каждого из этих вариантов в отдельности.

В настоящем сообщении представлены данные по выделению, очистке и характеристике антигенного компонента клеточной стенки, общего для четырех вариантов *B. brevis*.

Для избирательного выделения компонентов клеточной стенки бактерий без ее разрушения успешно используется метод экстракции щелочным раствором хлористого натрия [2]. Именно этот метод был применен для выделения антигенов клеточной стенки *B. brevis*.

Экстракты, полученные путем обработки клеток каждого из четырех вариантов *B. brevis* 0,1 н. NaOH, приготовленным на физиологическом растворе, представляют собой смесь веществ белковой и углеводной природы. Для первичного фракционирования полученных препаратов был использован метод осаждения сульфатом аммония. В каждом случае осадок, отделенный центрифугированием, растворяли в физиологическом растворе определенного pH и в течение 48 ч подвергали диализу против дистиллированной воды. Полнота растворения осадка зависела от величины pH исходного раствора. Основным критерием при установлении оптимального значения pH были количество белка, перешедшего в раствор, и антигенная активность получаемых препаратов. График зависимости содержания белка в диализованных препаратах *R*-варианта от pH исход-

Рис. 1. Влияние pH раствора на полноту растворения осадка фракции, полученной с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% насыщения (R-вариант)



ного раствора (рис. 1) показывает, что наилучшее растворение препарата происходит при pH 7,5—8,5. Наиболее четкие линии преципитации получаются при pH 6,9—8,2 (рис. 2).

В специальных опытах был проведен подбор концентрации сульфата аммония, необходимой для наиболее полного осаждения интересующих нас веществ. Испытывали концентрации сульфата аммония: 20, 40, 60, 100% насыщения. Осадок отделяли центрифугированием и обрабатывали как описано (диализ при pH 8—8,2). По мере увеличения концентрации сульфата аммония содержание азотистых, углеводных и белковых компонентов в исследуемых фракциях возрастает, достигая максимума с сульфатом аммония 100% насыщения (см. табл. 1). Результаты реакции преципитации показали, что интересующий нас антигенный компонент преобладает во фракциях, выделенных при использовании сульфата аммония 40 и 60% насыщения. На основании полученных результатов дальнейшие эксперименты по выделению из клеточных экстрактов антигенного компонента проводили при 60% насыщения.

Препарат, частично очищенный с помощью описанных приемов, был выделен из клеточных экстрактов всех четырех вариантов (см. табл. 2). Осаждение сульфатом аммония с последующим диализом дало возможность очистить препарат от балластных азотистых компонентов на 20—50%. Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле полученных препаратов с последующей специфической окраской на белок (кумасси голубым) и полисахариды (толуидиновым синим) выявляет один компонент с высокой электрофоретической подвижностью, одинаковой для всех вариантов (рис. 3). При исследовании препаратов методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

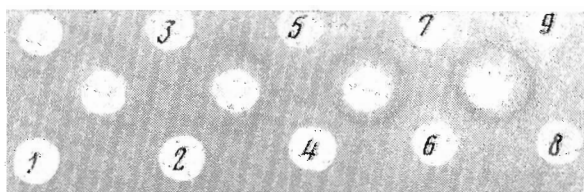


Рис. 2. Реакция преципитации с антисывороткой к R-варианту (средний ряд лунок) препаратов, выделенных из клеточного экстракта осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с последующим диализом против растворов со значениями pH 3,3 (1), 5,6 (2), 6,0 (3), 6,9 (4), 7,0 (5), 7,6 (6), 7,7 (7), 8,2 (8), 9,4 (9)

Таблица 1

Содержание белка, углеводов и общего азота во фракциях, осаждаемых сульфатом аммония при 20, 40, 60 и 100% насыщения из клеточного экстракта R-варианта *

[(NH ₄) ₂ SO ₄], %	Белок		Углеводы		Общий азот	
	Концентрация в диализованном препарате, мкг/мл	Удаление белковых примесей, %	Концентрация в диализованном препарате, мкг/мл	Удаление углеводов примесей, %	Концентрация в диализованном препарате, мкг/мл	Удаление азотистых примесей, %
20	1520,0	74,7	13,0	97,4	0,1	87,5
40	2520,0	58,0	19,7	96,1	0,4	50,0
60	3960,0	34,0	29,5	94,1	0,54	32,5
100	4086,0	32,4	65,6	86,9	0,56	30,0

* Концентрация белка в исходном экстракте — 6000 мкг/мл, углеводов — 500 мкг/мл, содержание общего азота — 0,8 мг/мл. Концентрация компонентов в диализованных препаратах приведена в пересчете на объем исходного экстракта. Аналогичные данные получены для трех других вариантов.

Таблица 2

Характеристика фракций, осаждаемых сульфатом аммония из клеточных экстрактов четырех вариантов (60% насыщение), и показатели очистки

Вариант	Белок			Углеводы			Общий азот		
	c ₁ *	c ₂	Удаление примесей, %	c ₁	c ₂	Удаление примесей, %	c ₁	c ₂	Удаление примесей, %
	мкг/мл			мкг/мл			мг/мл		
R	6000	3960	34,0	500	30	94,1	0,8	0,54	32,5
P+	10 000	8640	13,6	820	49	94,3	0,13	1,0	23,0
S	12 000	7440	38,0	1000	23	97,7	0,20	0,99	50,1
P-	13 500	11 200	17,6	850	48	94,4	0,15	0,92	38,4

* c₁ — концентрация в исходном клеточном экстракте, c₂ — концентрация после осаждения и диализа в пересчете на объем исходного клеточного экстракта.

Таблица 3

Характеристика фракций после разделения на сефадексе G-200 (R-, S-, P⁺-, P⁻-варианты)

Вариант	Белок						Углеводы							
	Нанесено на колонку	I пик		II пик		III пик		Нанесено на колонку	I пик		II пик		III пик	
		мг	%	мг	%	мг	%		мг	%	мг	%	мг	%
R	40,0	1,2	3,0	30,0	75,0	—	—	4,0	0,24	6,0	0,30	7,5	—	—
S	40,0	1,0	2,5	30,0	75,0	0,3	0,8	5,0	0,05	1,0	0,38	7,5	0,05	1,0
P ⁺	40,0	1,3	3,3	30,0	75,0	—	—	4,0	0,10	2,5	0,30	7,5	—	—
P ⁻	40,0	0,9	2,3	30,0	75,0	—	—	4,0	0,12	3,0	0,30	7,5	—	—

во всех случаях обнаруживаются два компонента с молекулярным весом соответственно 25 000 и 10 000 [3]. В реакции преципитации с гомологичными и гетерологичными антисыворотками было показано, что в исследуемых препаратах содержится 1—2 антигенных компонента, один из которых является общим для четырех вариантов (рис. 4).

Неоднородность препаратов, полученных на стадии осаждения сульфатом аммония, вызвала необходимость дальнейшего их фракционирования. С этой целью использовали метод гель-фильтрации на сефадексе G-200. Препарат после диализа и лиофилизации предварительно инкубировали 24 ч в присутствии додецилсульфата натрия (2%) при 20°. Такая обработка повышала качество разделения компонентов методом гель-фильтрации.

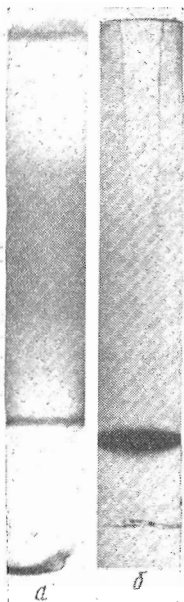


Рис. 3

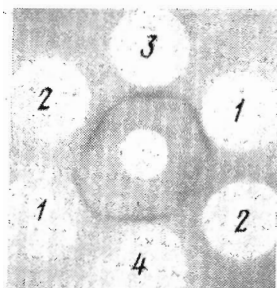


Рис. 4

Рис. 3. Диск-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле частично очищенного препарата *R*-варианта; окраска гелей кумасси голубым (*a*) и толуидиновым синим (*b*). Для *S*-, *P*⁺- и *P*⁻- вариантов получены аналогичные результаты

Рис. 4. Реакция преципитации частично очищенного препарата *R*-варианта (в центральной лунке) с гомологичной (1) и гетерологичными антисыворотками: к *S*- (2), *P*⁺- (3) и *P*⁻- (4) варианту

В результате фракционирования были выделены две фракции в случае *R*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов и три — в случае *S*-варианта (рис. 5). В первую фракцию переходит 2,5—3,0% белка, во вторую — 75%. Материал третьей фракции (*S*) содержит 0,8% количества белка, нанесенного на колонку (табл. 3).

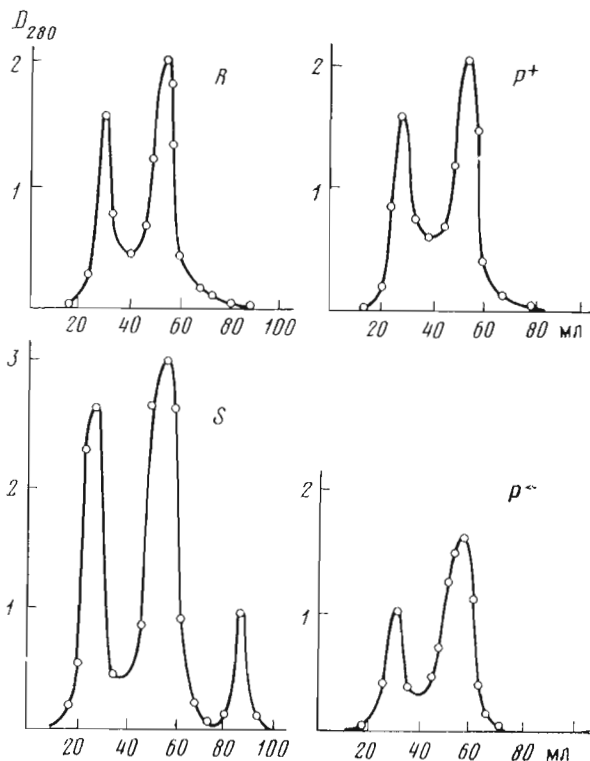


Рис. 5. Профиль элюции частично очищенных препаратов *R*-, *S*-, *P*⁺-, *P*⁻-вариантов; на сефадексе G-200 (колонка 1,5 × 40 см, трис-НСl-буфер, рН 8)

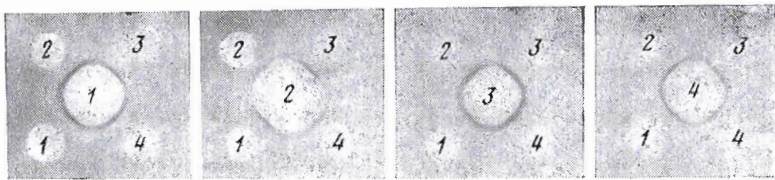


Рис. 6

Рис. 6. Реакция преципитации материала II фракции (рис. 5). Исследуемые препараты — в крайних лунках: 1—*R*, 2—*S*, 3—*P*⁺, 4—*P*⁻; антисыворотки — в центральных лунках: 1— к *R*-варианту, 2— к *S*, 3— к *P*⁺, 4— к *P*⁻

Рис. 7. Исследование материала II фракции (рис. 5, *R*-вариант) методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия



Рис. 7

Материал второй фракции каждого варианта обладает антигенной активностью и обнаруживает идентичность в системе с гомологичными и гетерологичными антисыворотками (рис. 6). Таким образом, он представляет собой общий для четырех вариантов *B. brevis* антигенный компонент.

В соответствии с разработанной схемой выделения и очистки из всех четырех вариантов были получены препараты, обладающие антигенной идентичностью.

Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле при окрашивании как кумасси голубым, так и толуидиновым синим в полученных препаратах обнаруживается единственный компонент, обладающий высокой электрофоретической подвижностью. Об однородности выделенных компонентов свидетельствуют также данные диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 7) и данные ТСХ.

Данные аналитического ультрацентрифугирования, при котором исследуемые препараты, выделенные из клеток *R*-, *S*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов, седиментируют одним симметричным пиком, также говорят об их однородности.

Выделенные из четырех вариантов *B. brevis* антигенные компоненты обладали серологической идентичностью, что позволяло надеяться и на сходство их физико-химических и биологических свойств.

Действительно, коэффициенты седиментации, рассчитанные на основании данных аналитического ультрацентрифугирования, оказались очень близкими величинами. Так, в случае *R*-варианта коэффициент седиментации составил 1,0S, *S*- — 1,5S, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов — 1,6. По данным электрофоретического анализа в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, молекулярный вес антигенных компонентов не превышает 10 000. Методом диффузии в агар с применением лунок установлено, что антигены *R*-, *S*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов обладают антибиотической активностью. По данным тонкослойной хроматографии, свободный грамицидин S в препаратах отсутствует. Следовательно, обнаруженная активность обусловлена природой выделенных препаратов.

Итак, в результате проведенных исследований разработан метод выделения из клеток *R*-, *S*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов *B. brevis* индивидуальных препаратов, идентичных по характеру своей антигенной специфичности и, следовательно, характеризующих родство вариантов, возникающих в процессе естественной изменчивости. Изучение природы выделенных антигенов составит предмет дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследований использовали четыре варианта *B. brevis* var. *G.-B.* — *R*, *S*, *P*⁺, *P*⁻. Необходимое количество биомассы накапливали на синтетической среде [4] при 40° в течение 24 ч, что соответствует концу фазы логарифмического роста. Бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин и трижды промывали дистиллированной водой при том же режиме центрифугирования. Полученную таким образом биомассу каждого варианта подвергали воздействию экстрагирующей смеси — 0,1 н. NaOH в растворе хлористого натрия (0,85%). Суспензию (1 г биомассы в 10 мл раствора) инкубировали 2 ч при 40° с постоянным перемешиванием. По окончании инкубации бактериальные клетки отделяли 20 мин от экстракта центрифугированием при 5000 об/мин и 5°.

Определение белка проводили по методу Лоури [5], углеводов — по методу Грогера [6], общего азота — с реактивом Несслера [7].

Из клеточных экстрактов (белок — 6000 мкг/мл, углеводы — 500 мкг/мл, общий азот — 0,8 мг/мл) антигенный компонент осаждали сульфатом аммония 60% насыщения при 4°. (Оптимальную концентрацию сульфата аммония устанавливали в специальном опыте, добавляя к аликвотам сульфат аммония до насыщения 20, 40, 60, 100%. Анализ препаратов, полученных после последующего диализа для *R*-варианта, приведен в табл. 1.) Осадок, сформировавшийся через 16—18 ч, отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин, растворяли в минимальном количестве физиологического раствора (рН 8,0—8,2) и подвергали диализу против дистиллированной воды до полного удаления ионов SO₄²⁻. Наличие ионов сульфата в растворе устанавливали с помощью качественной реакции с BaCl₂. Диализованный раствор лиофилизovali. Выход 60% для *R*- и *S*- и 80% — для *P*⁻ и *P*⁺-вариантов. Содержание белка ~ 0,7 мг/мг препарата.

Гель-фильтрацию на сефадексе G-200 (fine) проводили на колонке 1,5 × 40 см в 0,02 М трис-HCl-буфере (рН 8,0). На колонку наносили 40 мг препарата после диализа, лиофилизации и предынкубации в 2% додецилсульфате (24 ч, 20°). Скорость элюции 0,12 мл/мин. Элюат контролировали спектрофотометрически при 280 нм. Фракции в области максимальной адсорбции (пики I и II рис. 5) объединяли, диализовали 24 ч при 4° и лиофилизovali. Выход антигена (пик II) 85% (к нанесенному препарату); содержание белка 0,88 мг/мг (см. также табл. 3).

Иммунохимическое исследование проводили методом двойной диффузии в агаровом геле по Оухтерлонни [8]. Антисыворотки к клеткам каждого варианта *B. brevis* были получены при иммунизации кроликов убитой микробной массой [1].

Диск-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле (300 В, 5 мА/гель) в трис-глициновом буфере (рН 8,3) осуществляли по Дэвису [9]. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия осуществляли в 10% полиакриламидном геле в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 1% додецилсульфат, рН 7,0, при напряжении 300 В и силе тока 8 мА/гель. Количество наносимого белка 20—25 мкг.

Молекулярный вес антигенных компонентов определяли с помощью метода диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия [3]. В качестве маркеров использовали трансферин, бычий альбумин, депсин, рибонуклеазу. Электрофореграммы окрашивали кумасси голубым и толуидиновым синим.

Ультрацентрифугирование проводили в центрифуге Beckman при 56 000 об/мин (20°). Исследуемый материал вносили в клетку в концентрации 4 мг/мл в 0,02 М трис-HCl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,15 М NaCl. На основании данных аналитического ультрацентрифугирования рассчитывали коэффициенты седиментации антигенных компонентов [10].

ТСХ проводили на пластинках Silufol UV254 в системе пиридин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода, 10 : 3 : 15 : 12. Вещества обнаруживали нингидрином.

Для определения антибиотической активности в препаратах использовали метод диффузии в агар [11]. Тест-организм — *B. subtilis* 720.

ЛИТЕРАТУРА

1. Минина Е. Г., Полякова И. Н., Езепчук Ю. В., Жарикова Г. Г. (1975) Микробиология, 44, 1090—1093.
2. Езепчук Ю. В., Грачева А. М., Семина Н. А., Ларина Л. И. (1967) Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 8, 26—30.
3. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 224, 2456—2460.
4. Удалова Т. П., Федорова Р. И. (1965) Микробиология, 34, вып. 4, 634.
5. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. F. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
6. Groger W. K. L. (1961) Clin. chim. acta, 6, 866—873.
7. Грищенко Е. Д. (1962) Лабор. дело, 1, 36—40.
8. Ouchterlony O. (1950) Acta med. scand., 138, 76—79.
9. Davis B. L. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427.
10. Боуэн Т. (1973) Введение в ультрацентрифугирование, «Мир», М.
11. Удалова Т. П. (1963) Антибиотики, 8, 233—240.

Поступила в редакцию
30.III.1978

После доработки
4.IX.1978

ISOLATION AND PURIFICATION OF THE CELL WALL POLYMER OF *Bacillus brevis* var. *G.-B.*

EZEPCHUK Yu. V., SYSUEVA E. G., ZHARIKOVA G. G.

*N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology;
Biology Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The cell wall components of *Bacillus brevis* var. *G.-B.* (*R*, *S*, *P*⁺, *P*⁻ variants) were isolated by selective extraction followed by further purification steps. These components had the same type of antigenic specificity and were homogeneous by the physico-chemical parameters and antigenic composition. Molecular weight of isolated components did not exceed 10 000. Sedimentation coefficients of the antigenic components of *R*, *S*, *P*⁺, and *P*⁻ variants were 1.0S; 1.5 S; 1.6 S; and 1.6 S, respectively. All the isolated antigenic components possessed antibiotic activity.
