



УДК 576.8.097

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА АНТИГЕННОГО КОМПОНЕНТА, ОБЩЕГО
ДЛЯ ЧЕТЫРЕХ ВАРИАНТОВ *BACILLUS BREVIS* VAR. *G.-B.*

Сысуева Е. Г., Катруха Г. С., Наумова И. Б.,
Жарикова Г. Г.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Езепчук Ю. В.

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

Исследована химическая природа антигена, общего для *R*-, *S*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов *Bacillus brevis* var. *G.-B.*, возникающих в процессе естественной изменчивости. В составе полимеров идентифицировано 16 аминокислот и рибит. При одинаковом наборе аминокислот в полимерах, выделенных из различных вариантов, между ними имеются различия в количестве некоторых аминокислотных остатков. Различия в составе полимеров *R*-, *S*-, *P*⁺-, *P*⁻-вариантов, вероятно, результат проявления на молекулярном уровне процесса естественной изменчивости.

Как известно [1], генетические изменения, происходящие в процессе естественной изменчивости бактерий, коррелируют с изменением структуры некоторых биополимеров, составляющих клеточную стенку. У грамотрицательных бактерий таким полимером является липополисахарид, образующий в клеточной стенке с белками и липидами сложный макромолекулярный комплекс, обладающий антигенными свойствами. Данные о структурных модификациях антигенных компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий в процессе их естественной изменчивости отсутствуют. Среди антигенов грамположительных бактерий известны биополимеры полисахаридной [2, 3] и белковой природы [4]. В роли групповых антигенов выступают тейхоевые кислоты [2, 5].

В предыдущих сообщениях представлены данные о выделении и получении в гомогенном виде антигена, общего для четырех вариантов грамположительного микроорганизма *B. brevis*, обуславливающего их серологическое родство [6, 7]. Настоящее сообщение посвящено изучению природы выделенного антигена и его химического состава.

Предварительные данные о природе выделенных в индивидуальном состоянии веществ были получены на основании результатов их анализа методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. На фореграммах во всех случаях с помощью дифференциальной окраски кумасси голубым, специфическим красителем для белков и пептидов, выявлялся один компонент, который давал также положительную реакцию с толудиновым синим — специфическим красителем для полисахаридов (см. [7]). В связи с этим было сделано предположение о смешанной гликопротеиновой природе изучаемых полимеров.

О наличии полипептидного фрагмента в молекуле антигенных полимеров свидетельствуют спектры, снятые в ультрафиолетовой области.

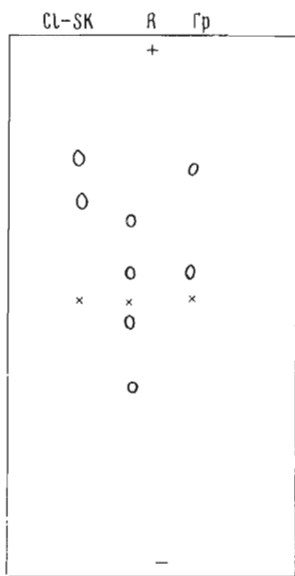
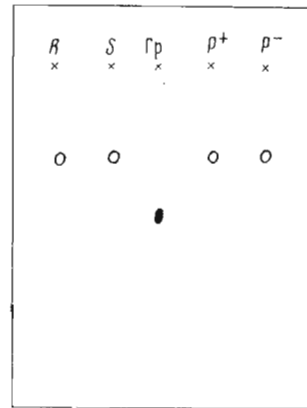


Рис. 1



Р. с. 3

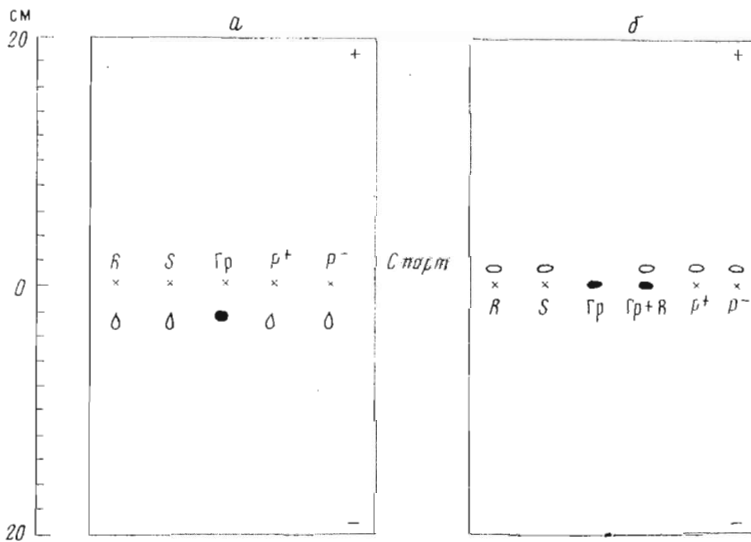


Рис. 2

Рис. 1. Анализ продуктов реакции антигена R-варианта (для остальных вариантов аналогично) с 4-хлор-3,5-динитробензолсульфатом калия (Cl-Sk) методом электрофореза на бумаге в системе «муравьиная кислота — уксусная кислота — вода», 3 : 3 : 4 + 2% твин-60 (15 В/см, 3 ч); Gr — грамицидин S

Рис. 2. Подвижность антигенов R-, S-, P⁺- и P⁻-вариантов при электрофорезе на бумаге в системах «муравьиная кислота — уксусная кислота — вода», 28 : 20 : 50 (а) и «стриптиламин — аммиак — этанол — вода», 1 : 1 : 29 : 40 (б)

Рис. 3. ТСХ антигенов R-, S-, P⁺- и P⁻-вариантов в системе «пиридин — уксусная кислота — n-бутанол — вода», 10 : 3 : 15 : 12

**Аминокислотный состав антигенных полимеров *R*-, *S*-, *P*⁺-, *P*⁻-
вариантов *B. brevis***

Аминокислота	Число аминокислотных остатков в молекуле антигенных полимеров вариантов				Аминокислота	Число аминокислотных остатков в молекуле антигенных полимеров вариантов			
	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>P</i> ⁺	<i>P</i> ⁻		<i>R</i>	<i>S</i>	<i>P</i> ⁺	<i>P</i> ⁻
Lys	2	2	2	2	Ala	4	4	4	4
His	1	1	1	1	Val	2	3	3	3
Arg	1	1	1	1	Met	1	1	1	1
Asp	5	5	4	4	Ile	1	1	1	1
Thr	2	2	2	2	Leu	3	2	3	3
Ser	2	2	2	2	Tyr	1	1	1	1
Glu	5	4	5	5	Phe	1	1	1	1
Pro	2	2	2	2	Всего	36	35	36	36
Gly	3	3	3	3					

Максимум поглощения наблюдался при длине волны 278 нм, а минимум — при 256 нм, что характерно для полипептидов, содержащих остатки ароматических аминокислот. На электрофореграммах и хроматограммах выделенные вещества обнаруживаются нингидрином, что указывает на присутствие в них свободных аминогрупп. Анализ продуктов реакции с 4-хлор-3,5-динитробензолсульфонатом калия методом электрофореза на бумаге позволил установить наличие 4 свободных аминогрупп в молекулах антигенных полимеров всех четырех вариантов (рис. 1).

В кислотных гидролизатах (5,7 н. HCl) выделенных биополимеров на аминокислотном анализаторе обнаружены аминокислоты, представленные в таблице. Все четыре варианта характеризуются одинаковым качественным составом, но различаются количеством отдельных аминокислотных остатков в молекуле. Из 16 аминокислот, обнаруженных в гидролизатах, 12 содержатся в молекуле всех полимеров в одинаковом количестве. *P*⁺- и *P*⁻-варианты не различаются по количественному составу аминокислотных остатков. Содержание 4 аминокислот варьирует: у *S*-варианта глутаминовой кислоты и лейцина на один остаток меньше, чем у трех других вариантов, у *R*-варианта — валина меньше на один остаток, у *R*- и *S*-вариантов — на один остаток больше аспарагиновой кислоты, чем у *P*⁺- и *P*⁻-вариантов. Во всех исследуемых полимерах количество остатков кислых аминокислот преобладает над основными.

Среди продуктов кислотного гидролиза антигенных полимеров в 2 н. HCl удалось идентифицировать рибит, ангидрорибит и глюкозу (в случае *S*-, *P*⁺ и *P*⁻-вариантов), в гидролизате антигенного полимера *R*-варианта — рибит и ангидрорибит. Эти данные позволяют предполагать в составе изучаемых полимеров присутствие рибиттейхоевой кислоты или полисахарида с рибитфосфатными связями.

Известно, что в серологической специфичности антигенов некоторых микроорганизмов определяющую роль играет рибит [8,9]. В связи с этим можно предположить, что антигенная идентичность исследуемых биополимеров также связана с наличием в их составе рибита. Во всяком случае присутствие глюкозы в вариантах *S*, *P*⁺, *P*⁻ не отражается на их антигенной специфичности в сравнении с антигенной специфичностью полимера, не содержащего этот моносахарид (*R*). По-видимому, глюкоза не входит в структуру антигенной детерминанты выделенного биополимера.

Полимеры *R*-, *S*-, *P*⁺- и *P*⁻-вариантов индивидуальны, имеют одинаковую подвижность при электрофорезе в различных системах, при ТСХ и не содержат примеси антибиотика (см., например, рис. 2, 3).

Среди изученных особенностей антигенных биополимеров заслуживает внимания их антибиотическая активность. С помощью метода

диффузии в агар установлено, что выделенные препараты подавляют рост тест-организма — *B. subtilis*. Активность антигенных препаратов *S*- и *P*⁻-вариантов составила 0,2—0,3, *R*- и *P*⁺-вариантов — 1 мкг/мг препарата. Обнаруженная активность невелика, однако представляет интерес, так как, очевидно, обусловлена природой выделенных веществ, а не возможной примесью свободных антибиотиков, синтезируемых *B. brevis*.

Как показано ранее [6, 7] (см. также рис. 2,3), исследуемые препараты индивидуальны. При проявлении фореграмм биоавтографическим методом [18] зона активности на газоне *B. subtilis* полностью совпадает по положению и форме с зоной вещества. Отсутствие свободного антибиотика (грамцидина *S*) в препаратах было подтверждено дополнительно в опытах с использованием диализа: в условиях, при которых грамицидин *S* (*M* 1269) удаляется через поры целлофановой мембраны, активность клеточных препаратов не меняется.

Таким образом, антибиотическая активность, проявляемая исследуемыми препаратами, очевидно, может быть полностью отнесена к антигену, общему для всех четырех вариантов *B. brevis*. Однако в настоящее время нет данных, которые позволили бы связать антибиотическую активность компонента с его химической структурой.

Экспериментальная часть

В работе использовали *R*-, *S*-, ⁺*P*⁺- и *P*⁻-варианты *B. brevis* var. *G.-B.* отечественного продуцента грамицидина *S*. Условия культивирования и методика выделения антигенных компонентов описаны в предыдущих сообщениях [6, 7].

Диск-электрофорез проводили по методу Дэвиса [10], используя триглицериновый буфер (рН 8,3). Количество белка, взятого на анализ, составляло 50 мкг. Окрашивание гелей проводили в 0,25% растворе кумаси голубого R-250 и в 0,1% растворе толуидинового синего.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Perkin-Elmer (Великобритания). Концентрация препарата 0,1 мг/мл.

Определение аминокислотного состава полимеров проводили после 24-часового гидролиза в вакууме с 5,7 н. HCl по методу Спекмана [11] на автоматическом анализаторе фирмы Hitachi Model KLA-5.

Продукты кислотного (2 н. HCl) гидролиза полимеров анализировали с помощью метода электрофореза и хроматографии на бумаге Filtrak FN-13 (ГДР). Для электрофореза использовали пиридин-ацетатный буфер (рН 5,5) при градиенте потенциала 20 В/см. Хроматографирование проводили в пиридиновой системе [12]. Для обнаружения моносахаридов и полиолов на бумаге использовали 5% аммиачный раствор AgNO₃ [13] и реактив Шиффа [14], для обнаружения моносахаридов — анилин-фталат [15].

Электрофорез на бумаге Filtrak FN-2 (ГДР) проводили в следующих системах растворителей: 1) муравьиная кислота — уксусная кислота — вода, 28 : 20 : 50 (7,5 В/см, 3 ч); 2) 2 н. уксусная кислота (17,5 В/см, 2,5 ч); 3) 30% уксусная кислота (15 В/см, 2 ч); 4) этанол — триэтиламин — аммиак — вода, 20 : 1 : 1 : 40, рН 11,8 (15 В/см, 2 ч). Электрофореграммы проявляли 0,4% раствором нингидрина в ацетоне и биоавтографическим методом.

Число свободных аминогрупп в полимерах определяли методом частичного замещения [16, 17]. Исследуемые вещества вводили в реакцию с количествами 4-хлор-3,5-динитробензолсульфоната калия, эквивалентными одной — четырьмя NH₂-группам. По числу производных, разделенных электрофорезом на бумаге, судили о числе свободных аминогрупп в исследуемых соединениях. Электрофорез проводили в системе «муравьи-

ная кислота — уксусная кислота — вода», 30 : 30 : 40 + 2% твин-60 (600 В, 15В/см, 3 ч).

ТСХ осуществляли на пластинке Silufol UV-254 (ЧССР) в системе «пиридин — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода», 10 : 3 : 15 : 12. Хроматограммы проявляли нингидрином.

Для определения антибиотической активности в препаратах использовали метод диффузии в агар [18]. Тест-организм — *B. subtilis* 720.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simmons D. A. R. (1974) *Bacteriol. Revs*, **35**, 117—148.
2. Sharpe E. M. (1970) *Int. F. Syst. Bacteriol.*, **20**, 509—518.
3. Misaki A., Seto N., Azuma I. (1974) *J. Biochem.*, **76**, 15—27.
4. Swanson J., Gotschlich E. (1973) *J. Exptl Med.*, **138**, 245—258.
5. Perkins H. R. (1970) *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 379—382.
6. Сысueva Е. Г. (1977) Тезисы «Проблемы микробиологии и вирусологии», 7-я конференция молодых ученых, Рига, с. 86—88.
7. Езепчук Ю. В., Сысueva Е. Г., Жарикова Г. Г. (1979) *Биоорганич. химия*, **5**, 340—346.
8. Gmeiner F. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **74**, 171—180.
9. Gmeiner F., Mayer H., Fromme I., Kotelko K., Zych K. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **72**, 35—40.
10. Davis B. L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
11. Speakman D. H., Stein W. H., Moore E. (1958) *Anal. Chem.*, **30**, 1190—1199.
12. Gaillard B. (1953) *Nature*, **171**, 1160.
13. Рансон С. (1960) Биохимические методы анализа растений, с. 398, Изд-во иностр. лит., М.
14. Baddiley F., Buchanan F. G., Carss B., Mathias A. P. (1956) *J. Chem. Soc.*, 4586—4589.
15. Partridge S. M. (1949) *Nature*, **164**, 443.
16. Степанов В. М., Силаев А. Б., Катруха Г. С. (1960) *Биохимия*, **25**, 749—757.
17. Катруха Г. С., Силаев А. Б., Харцхаева С. В. (1962) *Биохимия*, **27**, 549—555.
18. Удалова Т. П. (1963) *Антибиотики*, **8**, 233—240.

Поступила в редакцию
31.VII.1978

CHEMICAL NATURE OF COMMON ANTIGENIC COMPONENT OF FOUR VARIANTS OF *BACILLUS BREVIS* VAR. *G.-B.*

SYSUEVA E. G., KATRUKHA G. S., NAUMOVA I. B.,
ZHARIKOVA G. G., EZEPCHUK Yu. V.

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

The chemical nature of the common antigen of four variants of *Bacillus brevis* var. *G.-B.* has been investigated and 16 amino acids and ribitol identified in the polymers. All these polymers comprised the same set of amino acids whereas some differences between the variants were found in the content of certain amino acids. It was suggested that the differences in the polymer composition of *R-*, *S-*, *P+*, and *P-* variants are the consequence of natural changeability manifested at molecular level.