



УДК 579.84:577.112'114'314.6

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ЛИПИД А — БЕЛОК ИЗ ЭНДОТОКСИНА  
*YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Федореева Л. И., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток

При гидролизе уксусной кислотой эндотоксина *Yersinia pseudotuberculosis* был выделен комплекс липид А — белок, который содержит глюкозамин, лауриновую,  $\beta$ -оксимиристиновую кислоты и фосфор в мольном отношении 2:1,5:2,8:1,7 и аминокислоты. Компоненты комплекса — липид А и белок — прочно, но нековалентно связаны между собой и могут быть разделены после обработки детергентами с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Комплекс липид А — белок проявляет активность как с антисывороткой к исходному антигену, так и с антителами к липиду А.

Эндотоксин (полный О-антиген внешней мембраны грамотрицательных бактерий) представляет собой макромолекулярный комплекс липополисахарида (ЛПС), белка и фосфолипида [1]. Структура этого комплекса до сих пор недостаточно изучена. В литературе имеются противоречивые данные о характере связи между белком и ЛПС. Так, Алаупович [2], Ву и Хит [3] считают, что белок соединен с ЛПС через его липидный компонент (липид А) ковалентной связью. Хеннинг [4] и Моррисон [5], подтверждая наличие взаимодействия между липидом А и белком, отрицают существование ковалентной связи.

Ранее нами при исследовании белкового компонента эндотоксина *Yersinia pseudotuberculosis* было показано, что взаимодействие между липидом А и белком достаточно прочно: оно лишь частично разрушается при обработке горячим фенолом [6].

В данной работе с целью дальнейшего изучения эндотоксина был получен фрагмент липид А — белок (ЛБ) и проведено его исследование.

Для выделения фрагмента ЛБ был использован [ $^{14}\text{C}$ ]эндотоксин, полученный из меченой по углероду микробной массы и очищенный гель-фильтрацией на сефарозе 2В, как описано ранее [7]. Радиоактивная метка преимущественно (85—90%) была сосредоточена в жирных кислотах липида А. Это позволило проводить обнаружение и количественное определение липида А по радиоактивной метке.

Липид-белковый фрагмент получали гидролизом эндотоксина разбавленной уксусной кислотой и тщательно очищали от свободных липидов органическими растворителями. После очистки продукт содержал белок (30,1%) и компоненты липида А: глюкозамин (13,0%),  $\beta$ -оксимиристиновую кислоту (24,7%), лауриновую кислоту (12,0%) и фосфор (2,0%). Кроме того, во фрагменте ЛБ были обнаружены моносахариды (4,0%) и пальмитиновая кислота (6,4%), которая не входит в состав липида А из псевдотуберкулезного микроба [8].

Фрагмент ЛБ имеет отрицательный заряд и в условиях электрофореза в агарозе движется как единый комплекс к аноду. При взаимодействии с антисывороткой к исходному эндотоксину он образует одну зону precipitation, причем вся радиоактивная метка сосредоточена в этой зоне. В нативном эндотоксине этой зоны не обнаружено.

Белковый компонент имеет аминокислотный состав, характерный для мембранных белков, отличается высоким содержанием кислых и гидрофобных аминокислот и отсутствием цистеина (таблица).

По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), белковый компонент состоит из двух по-

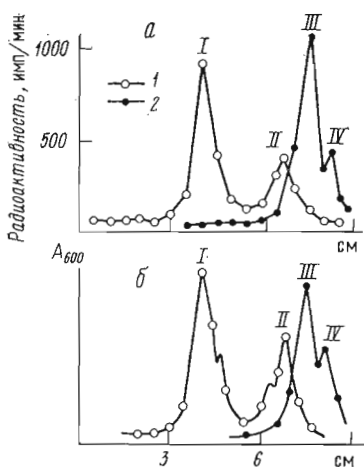


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS эндотоксина (I) и фрагмента ЛБ (2). Контроль денситометрический (а) и по радиоактивности (б). Белки соответствуют полипептидам с мол. массой:  $M_r$  40 000 (I), 14 500 (II), 12 000 (III), 8000 (IV)

липептидов с кажущейся молекулярной массой 12 000 и 8000 (рис. 1). Исходный эндотоксин имеет другой полипептидный состав. Он содержит два полипептида с кажущейся массой 40 000 и 14 500. Уменьшение кажущейся молекулярной массы полипептидов во фрагменте ЛБ по сравнению с эндотоксином может быть связано как с деградацией белкового компонента, так и с его денатурацией в процессе выделения фрагмента ЛБ. Радиоактивная метка связана с полипептидами как в эндотоксине, так и в ЛБ. Это говорит о том, что в условиях SDS-электрофореза отделения белкового компонента не происходит.

Как было указано выше, фрагмент ЛБ проявляет серологическую активность, взаимодействуя с антисывороткой к эндотоксину и образуя одну зону преципитации в реакции двойной диффузии. Кроме того, в отличие от эндотоксина фрагмент ЛБ ингибирует реакцию пассивного гемолиза с антителами к липиду А. Этот факт можно объяснить тем, что в результате деградации эндотоксина иммунодетерминантные группы липида А во фрагменте ЛБ становятся более доступными. Более того, фрагмент ЛБ реагирует с антисывороткой к липиду А в меньших концентрациях (0,4 мкг/мл), чем сам липид А (1,5 мкг/мл), полученный по известному методу [9].

Для выяснения характера связи между липидом А и белком была предпринята попытка разделить фрагмент ЛБ на отдельные компоненты. Как было показано выше, экстракция органическими растворителями не отделяет липид А от белка. Кроме того, после обработки фрагмента проназой был выделен липид А—полипептид, содержащий до 18% белка. Эти факты свидетельствуют о достаточно прочной связи между компонентами во фрагменте ЛБ.

Известно, что при действии детергентов на некоторые липид-белковые комплексы происходит замещение липида детергентом. При этом липид образует с детергентом смешанные мицеллы [10]. Нами был использован этот метод с применением в качестве детергентов тритона X-100 и SDS. Обработка тритоном X-100 в концентрации выше мицеллообразующей при-

#### Аминокислотный состав фрагмента ЛБ

Аминокислота	Содержание, мг/мг ЛБ	Содержание, % к $\Sigma$	Аминокислота	Содержание, мг/мг ЛБ	Содержание, % к $\Sigma$
Asp	0,0395	13,12	Met	Следы	Следы
Thr	0,0189	6,27	Ile	0,0106	3,52
Ser	0,0194	6,44	Leu	0,0215	7,13
Glu	0,0324	10,75	Tyr	0,0225	7,47
Pro	0,0009	0,30	Phe	0,0269	8,81
Gly	0,0230	9,62	His	0,0032	1,86
Ala	0,0262	8,69	Lys	0,0135	4,48
Cys	—	—	Arg	0,0119	3,95
Val	0,0252	7,59			

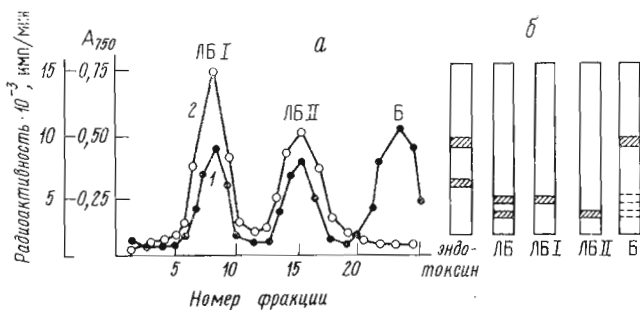


Рис. 2. Гель-фильтрация на сефадексе G-200 фрагмента ЛБ в присутствии 0,3% тритона X-100 (а). Контроль по белку по модифицированному методу Лоури (1) и по радиоактивности (2). б - электрофорез полученных фракций. Условия см. «Экспер. часть»

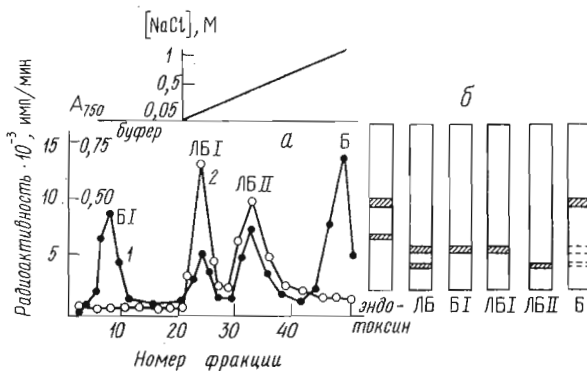


Рис. 3. Ионообменная хроматография фрагмента ЛБ на DEAE-сефарозе CL 6B в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 8,8, в присутствии 0,3% тритона X-100 (а). Контроль по белку по модифицированному методу Лоури (1) и по радиоактивности (2). б - электрофорез полученных фракций. Условия см. «Экспер. часть»

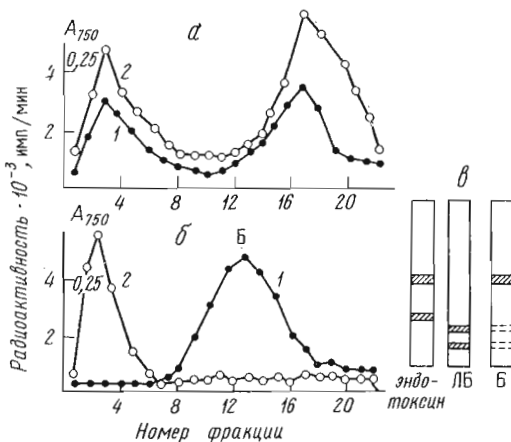


Рис. 4. Ультрацентрифугирование фрагмента ЛБ в градиенте сахарозы (10-40%) в присутствии 1% SDS (а) или 0,05% тритона X-100 (ЛБ предварительно обрабатывали 1% SDS) (б). Контроль по белку по модифицированному методу Лоури (1) и по радиоактивности (2). а - электрофорез полученных фракций

водит лишь к частичной диссоциации комплекса. Действительно, разделение белка и смешанных мицелл липида А с детергентом с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии позволяет получить в свободном виде лишь часть белка (рис. 2 и 3, фракция Б). В этих же условиях происходит и фракционирование фрагмента ЛБ, который не диссоциирует

при обработке тритоном X-100 (рис. 2 и 3, фракции ЛБ I и ЛБ II). Анализ полученных фракций ЛБ I и ЛБ II с помощью SDS-электрофореза показал, что они имеют разный полипептидный состав. Таким образом, фракционирование происходит по белковому компоненту.

Полной диссоциации комплекса ЛБ удалось добиться под действием мицеллообразующей концентрации SDS. Разделение компонентов проводили ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы в присутствии 0,05% тритона X-100, концентрация которого ниже мицеллообразующей (рис. 4б). Добавка тритона X-100 в градиент имела важное значение для фракционирования, так как ее исключение не позволяет разделить липид А и белок (рис. 4а). Именно при концентрации тритона X-100 ниже мицеллообразующей в условиях ультрацентрифугирования происходит замещение SDS на тритон X-100 [11], в результате увеличивается плотность смешанных мицелл липида А с детергентами, что позволяет разделить комплекс на составляющие его компоненты.

Свободный белок (рис. 2—4, фракция Б), по данным SDS-электрофореза, состоит из полипептида, который отличается по электрофоретической подвижности от полипептидов исходного фрагмента ЛБ. Такое изменение электрофоретической подвижности белкового компонента объясняется, вероятно, не только отделением липида А, но и денатурирующим действием тритона X-100 [12]. В пользу последнего предположения говорит тот факт, что кажущаяся молекулярная масса этого белка около 40 000, что соответствует молекулярной массе полипептида, входящего в состав эндотоксина псевдотуберкулезного микроба [7]. Действительно, кислотная обработка эндотоксина в ходе выделения фрагмента ЛБ могла вызвать изменение конформации белкового компонента, что обусловило изменение подвижности в SDS-электрофорезе. Обработка тритоном X-100 в этом случае может вызвать денатурацию белка с восстановлением электрофоретической подвижности. В белковой фракции методом газожидкостной хроматографии была обнаружена только пальмитиновая кислота, которая не является компонентом липида А.

Свободный белок и липид А, полученные диссоциацией комплекса, сохраняют серологическую активность: они взаимодействуют с антисыворотками к эндотоксину и липиду А соответственно. Надо отметить, что фрагмент ЛБ в отличие от липида А, являющегося гаптенем, оказался иммуногенным для кроликов. Была показана возможность получения антисыворотки к комплексу ЛБ. Эндотоксин, фрагмент ЛБ и его компоненты — липид А и белок реагируют с антисывороткой к ЛБ как в реакции двойной диффузии, так и в реакции пассивного гемолиза.

Таким образом, показано, что в комплексе ЛБ липид А и белок связаны прочной, но не ковалентной связью. Обнаруженное сильное липид-белковое взаимодействие между компонентами фрагмента ЛБ говорит в пользу предположения, что связь ЛПС с белком в эндотоксине осуществляется через липид А [2, 5].

### Экспериментальная часть

*Аналитические методы.* Для определения жирнокислотного состава 1 мг образца гидролизовали 1 мл 4 н. HCl в запаянных ампулах при 100° С в течение 4 ч. Гидролизаты разбавляли водой, трижды экстрагировали хлороформом. Хлороформные экстракты трижды экстрагировали водой для удаления водорастворимых компонентов и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (безв.). Жирные кислоты метилировали обработкой 2 мл эфирного раствора диазометана. Полученные метиловые эфиры кислот анализировали на хроматографе «Цвет-100» с пламенно-ионизационным детектором 10% SE-30 на газхроме Q (100—200 меш) в ингервале температур 175—210° С (5°/мин). Водный остаток упаривали и определяли аминсахара на аминокислотном анализаторе (LKB, Biosal 3201, Швеция).

Для определения аминокислотного состава 1 мг образца гидролизовали 1 мл 6 н. HCl при 110° С в запаянной ампуле в течение 24 ч. Гидролизат разбавляли водой, экстрагировали трижды хлороформом для удаления

жирных кислот и упаривали досуха. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе (LKB, Biocal 3201, Швеция).

Моносахариды, аминоксахара, фосфор определяли стандартными методами [13–15], 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (KDO) — по методу [16]. Для определения белка использовали модифицированный метод Лоури в присутствии 2% SDS [17].

Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле в присутствии SDS в трис-боратном буфере (pH 9,3; 0,1% SDS) при 120 В и 5 мА на гелевый столбик в течение 40 мин. Образцы перед нанесением растворяли в трис-боратном буфере (pH 9,3; 1% SDS), нагревали 15 мин на кипящей водяной бане [6]. Гели окрашивали кумасси бриллиантовым голубым R-250 для выявления зон белка [18]. Денситограммы окрашенных гелей снимали на двухлучевом сканере Shimadzu CS-900 при 600 нм.

Для измерения радиоактивности в геле неокрашенный столбик разрезали по горизонтали на зоны по 0,3 см, экстрагировали 0,1 мл  $H_2O$  при 37° С и считали радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе (6 г 2,5-дифенилксазола, 0,2 г 1,4-ди(5-фенил-2-оксазол)бензола, 60 г нафталина, 200 мл метанола и до 1 л диоксана). Для определения радиоактивности образцов принимали также толуольный сцинтиллятор (4 г 2,5-дифенилксазола и 0,1 г 1,4-ди(5-фенил-2-оксазол)бензола в 1 л толуола).  $^{14}C$ -Активность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-II (Чикаго, США).

*Микроорганизм* — псевдотуберкулезный микроб (IB-серovar, штамм 598) культивировали на синтетической среде, как описано ранее [19]. Для получения биомассы, меченой по углероду, культуру выращивали на среде, содержащей [ $^{14}C$ ]ацетат натрия (2 мкКи/мл), с концентрацией  $10^9$  микробных клеток в 1 мл [20].

*Экстракция и очистка эндотоксина.* Высушенную ацетоном меченую микробную массу (50 г) экстрагировали 5% трихлоруксусной кислотой (500 мл) известным методом [21]. Полученный эндотоксин подвергали гель-фильтрации на сефарозе 2В [7] с последующей лиофилизацией. В результате с выходом 200 мг получали очищенный эндотоксин. Содержание, %: белок — 19,4; нейтральные моносахариды — 26,9; аминоксахара — 7,8; KDO — 1,7; Р — 1,7.

*Выделение фрагмента ЛБ.* 200 мг эндотоксина гидролизовали 1% уксусной кислотой (20 мл) при 100° С в течение 6 ч. Суспензию оставляли на 12 ч при 4° С. Образовавшийся осадок, представляющий собой фрагмент ЛБ, отделяли центрифугированием со скоростью 12 000 об/мин в течение 20 мин, промывали трижды водой и диализовали против дистиллированной воды. Лиофилизированный комплекс ЛБ (52 мг) экстрагировали смесью  $CHCl_3 - C_2H_5OH$  (2:1) и  $CHCl_3 - C_2H_5OH - H_2O$  (10:10:3). Получали очищенный фрагмент ЛБ, выход 40 мг. Содержание, %: белок — 30,4; нейтральные моносахариды — 4,0; KDO — 0,06; Р — 2,0.

*Гель-фильтрация на сефадексе G-200.* 10 мг фрагмента ЛБ обрабатывали 2 ч 2 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (pH 8,8), содержащего 0,3% тритон X-100. Раствор наносили на колонку (1,6×40 см) с сефадексом G-200 и элюировали тем же буфером. Отбирали фракции по 1,8 мл. Тритон X-100 удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 в 40% пропаноле с последующим диализом. Получали фракции ЛБИ (2,8 мг), ЛБИИ (2,0 мг) и белок (4,1 мг).

*Ионообменная хроматография на DEAE-сефарозе CL 6В.* 10 мг фрагмента ЛБ обрабатывали 2 ч 2 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (pH 8,8), содержащего 0,3% тритон X-100. Раствор наносили на колонку (1×15 см) с DEAE-сефарозой CL 6В и элюировали линейным (либо ступенчатым) градиентом хлористого натрия (0,05→1 М) в том же буфере. Фракции собирали по 1,1 мл. Получали фракции ЛБИ (2,2 мг), ЛБИИ (1,8 мг), БI (1,1 мг), БII (2,8 мг).

*Ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы.* а) 0,5 мг фрагмента ЛБ обрабатывали 2 ч 0,3 мл 0,05 трис-НСl-буфера (pH 8,8), содержащего 3 мг SDS. Раствор помещали на дно центрифужной пробирки и сверху наслаивали сахарозный градиент 10→40%, в объеме 4 мл, приго-

товленный в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,8) содержащем 1% SDS. Ультрацентрифугирование проводили на центрифуге К-32 в горизонтальном роторе С-45 в течение 48 ч со скоростью 40 000 об/мин при 20° С. Фракции собирали по 0,2 мл.

б) 0,5 мг фрагмента ЛБ обрабатывали 2 ч 3 мг SDS в 0,3 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 8,8). Градиент сахарозы готовили в буфере, содержащем 0,05% тритон Х-100. Ультрацентрифугирование проводили в условиях, описанных в опыте а. Соотношение липида А и белка в комплексе ЛБ ~1:1.

*Ферментативное расщепление.* 2 мг фрагмента ЛБ суспендировали в 1 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 8,8), содержащего 1% SDS, и добавляли в соотношении 50:1 (по весу) раствор проназы (КФ 3.4.24.4, Serva, ФРГ), предварительно активированной при 37° С в течение 2 ч [22]. Раствор выдерживали 48 ч при 37° С. После подкисления раствора уксусной кислотой до рН 3,5 выпавший осадок отделяли центрифугированием со скоростью 12 000 об/мин в течение 20 мин, промывали трижды водой, диализовали. Выход лиофилизованного продукта 1,2 мг. Контроль ферментализации осуществляли по выходу осадка. Высоковольтный электрофорез проводили на ватмане 3 ММ в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,4) при 3000 В в течение 1 ч. Белок выявляли кумасси бриллиантовым голубым R-250, липид А — по радиоактивной метке. Обработанный проназой продукт обнаруживался в виде одной смещающейся к аноду зоны и имел большую подвижность, чем исходный ЛБ ( $E_{\text{ЛБ}}=1,4$ ).

*Иммунологические методы.* В иммунологических опытах использовали кроличью антисыворотку к эндотоксину, полученную по методу [7], и антисыворотку к липиду А, полученную, как описано ранее [23].

Серологическую активность комплекса ЛБ и его компонентов определяли в реакции двойной диффузии [24] и иммунофорезом [25] с антисывороткой к эндотоксину, а также ингибированием реакции пассивного гемолиза с антисывороткой к липиду А [26].

Антисыворотку комплекса ЛБ получали по следующей схеме: 2 мг комплекса ЛБ суспендировали в 1 мл 0,015 М NaCl, добавляли 1 мл адьюванта Фрейнда и иммунизировали внутрикожно во множество точек на спине кролика. Через месяц инъекцию повторяли, уменьшив в 2 раза концентрацию фрагмента ЛБ. Забор крови проводили через 10 сут после второй инъекции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nowotny A. *Bacteriol. Rev.*, 1969, v. 33, № 1, p. 72–98.
2. Wober W., Alaupovic P. *Eur. J. Biochem.*, 1971, v. 19, № 3, p. 357–367.
3. Wu M.-C., Heath E. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, № 9, p. 2572–2576.
4. Garten W., Hindennach I., Henning U. *Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 59, № 1, p. 215–221.
5. Betz S. J., Morrison D. C. *J. Immunol.*, 1977, v. 119, № 4, p. 1475–1481.
6. Бондаренко О. Д., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. *Химия природн. соедин.*, 1980, № 1, с. 92–97.
7. Solov'eva T. F., Yermak I. M., Bondarenko O. D., Frolova G. M., Ovodov Yu. S. *Microbios*, 1979, v. 25, № 101–102, p. 133–144.
8. Krasikova I. N., Gorbach V. I., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 89, № 1, p. 287–289.
9. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Z. *Naturforsch.*, 1952, v. 7b, p. 148–155.
10. Helenius A., Simons K. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 13, p. 2542–2547.
11. Bhakdi S. J. *Biochem. Biophys. Methods*, 1980, v. 2, № 1, p. 79–80.
12. Clarke S. *Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 670, № 2, p. 195–202.
13. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. *Analyt. Chem.*, 1956, v. 28, № 2, p. 350–356.
14. Elson L. A., Morgan W. T. J. *Biochem. J.*, 1933, v. 27, № 10, p. 1824–1828.
15. Ames B., Dubin D. T. *J. Biol. Chem.*, 1960, v. 235, № 3, p. 769–775.
16. Burtseva T. I., Glebko L. I., Ovodov Yu. S. *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 64, № 1, p. 1–4.
17. Kashyap M. L., Hynd B. A., Robinson K. J. *Lipid Res.*, 1980, v. 21, № 4, p. 481–484.
18. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971, с. 94.
19. Ovodov Yu. S., Gorshkova R. P., Tomshich S. V. *Immunochemistry*, 1971, v. 8, № 11, p. 1071–1079.
20. Соловьева Т. Ф., Федореева Л. И., Шулягьев А. Е., Оводов Ю. С. *Микробиол. ж.*, 1981, т. 43, № 5, с. 645–649.

21. *Boivin A., Mesrobian L.* Compt. Rend. Soc. Biol., 1933, v. 113, № 21/24, p. 490-492.
22. *Карелин В. П.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 4, с. 585-593.
23. *Gorbach V. I., Krasikova I. N., Lukyanov P. A., Razmaknina O. Yu., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 83-86.
24. *Harrington J. C., Fenton J. W., Pert J. N.* Immunochimistry, 1971, v. 8, № 5, p. 413-421.
25. *Össermann E. F.* J. Immunol., 1960, v. 84, № 1, p. 93-97.
26. *Kontrohr T., Peterffy K. J.* Immunol. Methods, 1976, v. 13, № 2, p. 271-277.

Поступила в редакцию  
28.III.1983  
После доработки  
15.VI.1983

## STUDIES ON LIPID A - PROTEIN COMPLEX FROM ENDOTOXIN OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

FEDOREEVA L. I., SOLOV'eva T. F., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Mild acid hydrolysis of endotoxin of *Yersinia pseudotuberculosis* afforded a lipid A - protein complex composed of amino acids and all characteristic components of lipid A: glucosamine, dodecanoic, 3-hydroxytetradecanoic acids and phosphorus in a molar ratio of 2:1,5:2,8:1,7, respectively. The protein component of the complex was shown by gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulphate to consist of two polypeptides with apparent molecular weights of 12000 and 8000. The lipid A - protein complex cross-reacted with antiserum to endotoxin and lipid A antiserum. The components of the complex, namely lipid A and a protein, are associated tightly but noncovalently and can be separated by ultracentrifugation in the sucrose density gradient after treating the complex with sodium dodecylsulphate. The resultant lipid A and the protein manifest a serological activity.