



УДК 579.84.083.3

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО
ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
С АНТИТЕЛАМИСоловьева Т. Ф., Набережных Г. А., Мазур А. К.,
Хоменко В. А., Оводов Ю. С.Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ Академии наук СССР,
Владивосток

Из липополисахарид-белкового комплекса *Pseudomonas fluorescens* мягким кислотным гидролизом и последующей гель-хроматографией углеводной части на сефадексе G-50 выделен О-специфический полисахарид. По данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, полисахарид построен из регулярно повторяющихся трисахаридных звеньев, включающих три остатка 6-дезоксигексоз, два из которых являются аминосахарами. Проведено исследование взаимодействия полисахарида со специфическими антителами и одновалентными Fab-фрагментами антител. Для выделения и фракционирования по аффинности антител и Fab-фрагментов использован иммуносорбент на основе полисахарида, связанного с сефарозой 4В. Установлено, что антитела к полисахариду ограничено гетерогенны в отношении их аффинности и их взаимодействие с полисахаридом носит кооперативный характер. На основании данных по связыванию полисахарида с Fab-фрагментами антител определены константы ассоциации этих комплексов и число мест связывания Fab-фрагментов на молекуле полисахарида. Показано, что в молекуле полисахарида одно место связывания приходится на четыре повторяющихся звена полисахарида.

О-Соматические антигены грамотрицательных бактерий представляют собой липополисахарид-белковые комплексы (ЛПБК). Серологическая специфичность этих антигенов определяется иммунодетерминантами, находящимися в полисахаридной части комплекса. Структура О-специфических полисахаридов широко изучается. Эти исследования позволяют выявить молекулярную основу серологической специфичности О-антигенов и определить строение их антигенных детерминант [1].

О-Специфические полисахариды — полимеры, состоящие из повторяющихся олигосахаридных звеньев, размеры которых в разных видах заметно различаются [1]. Установлено, что в состав их детерминант могут входить от 4 до 10 моносахаридных остатков [2, 3]. Полисахаридные детерминанты включают одно или несколько повторяющихся звеньев углеводной цепи и могут занимать в цепи полимера как концевое, так и внутреннее положения [4].

Внутренняя аффинность активных центров антител к углеводным антигенам невелика, и константа связывания имеет величину порядка 10^5 – 10^6 M^{-1} [4, 5]. Показано также, что к стрептококковым полисахаридам наряду с низкоаффинными антителами образуются антитела с высокой константой ассоциации ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$) [5].

Молекулы полисахаридов в отличие от белковых антигенов обладают большим числом повторяющихся антигенных детерминант. Это приводит к перекрыванию участков связывания с антителами и усложнению моделей, описывающих процесс взаимодействия антиген — антитело [6]. Изучение таких систем представляет большой интерес для понимания взаимодействия поливалентных антигенов с антителами, для оценки размеров и аффинности связывающих центров антител к антигенам углеводной природы.

В настоящей работе проведено определение числа антигенных детерминант О-специфического полисахарида из *Pseudomonas fluorescens* и констант ассоциации специфических антител с полисахаридом.

ЛПБК из *P. fluorescens* был выделен обработкой микробных клеток раствором трихлоруксусной кислоты. После мягкого кислотного гидролиза ЛПБК и гель-хроматографии углеводной фракции на сефадексе G-50 получен полисахарид, выходящий в свободном объеме колонки, и олигосахарид «кора». Полисахарид дополнительно очищали от примеси ЛПБК гель-хроматографией на сефадексе G-100. Гомогенность О-специфического полисахарида была подтверждена данными ультрацентрифугирования и иммунодиффузии с антисывороткой к ЛПБК. Его молекулярная масса, определенная гель-хроматографией, составляет 20 кДа.

О-Специфический полисахарид охарактеризован с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. В ^{13}C -ЯМР-спектре в области резонанса аномерных атомов углерода имеются три сигнала с химическими сдвигами 101,2; 101,4; 103,9 м. д. с равным соотношением интегральных интенсивностей. В области относительно сильного магнитного поля в спектре присутствуют три сигнала 6-дезоксигрупп: 16,0; 16,5 и 18,0 м. д. Кроме того, наблюдаются сигналы одной О-ацетильной группы (21,0; 174,6 м. д.), двух N-ацетильных групп (22,8; 23,3 и 175,4; 175,7 м. д.) и сигналы двух углеродных атомов, несущих ацетамидную группу (52,1; 55,8 м. д.). В области резонанса оксиметиленовых групп (60–63 м. д.) сигналы отсутствуют. Эти данные позволяют сделать вывод, что О-специфический полисахарид построен из регулярно повторяющихся трисахаридных звеньев, включающих три остатка 6-дезоксигексоз, два из которых являются аминосахарами.

Число мест связывания полисахаридной цепи с антителами устанавливали методом Кэбота [7], определяя молярное отношение антиген — антитело в преципитате в зоне эквивалентности. Известно, что при взаимодействии полисахаридных антигенов с антителами образуются наряду с преципитирующими также и растворимые комплексы [8]. Поэтому для определения содержания антигена в преципитате в реакцию вводили полисахарид, меченный тритием. Потеря серологической активности при введении метки в полисахарид была незначительной (15%). Скорее всего, обработка полисахарида бортритидом натрия в щелочных условиях приводит к некоторой потере ацетильных групп, которые могут входить в состав иммунодетерминантных участков [9].

При анализе состава преципитата установлено, что молярное отношение О-специфического полисахарида к антителам составляет 1:5. Считая, что оба активных центра (двухвалентные) антител связаны с детерминантами полисахарида, можно предположить, что в молекуле О-специфического полисахарида имеется 10 мест связывания с антителами.

Важным показателем процесса взаимодействия антиген — антитело является константа ассоциации (K_0). Для оценки величины K_0 проводили реакцию связывания полисахарида с антителами при различных молярных отношениях компонентов и затем устанавливали равновесные концентрации связанного и свободного антигена [10]. Антитела выделяли из IgG-фракции иммунной сыворотки с помощью иммуносорбента — полисахарида, связанного с сефарозой 4В. В ходе аффинной хроматографии при элюировании ступенчатым градиентом рН антитела были разделены на три фракции, различающиеся аффинностью к полисахариду (рис. 1).

Как видно на рис. 1, во фракции IgG иммунной сыворотки преобладают антитела со средней (фракция II, 54% от общего количества) и высокой (фракция III, 34%) аффинностью. Содержание антител с относительно низкой аффинностью невелико (12%, фракция I).

Для связывания О-специфического полисахарида использовали антитела со средней и высокой аффинностью. График в координатах Скэтчарда [6] имеет восходящую ветвь в области низких концентраций связанного антигена (рис. 2).

Искривленная форма графика Скэтчарда может свидетельствовать

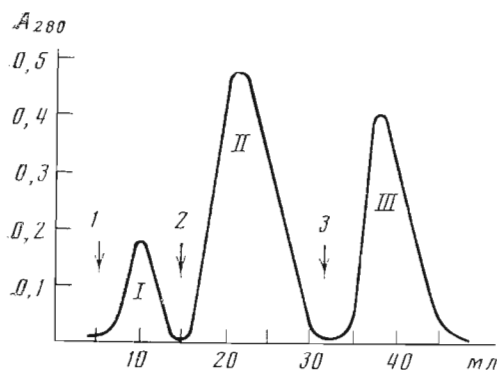


Рис. 1

Рис. 1. Аффинная хроматография IgG на сефарозе с иммобилизованным полисахаридом. Стрелками показана смена буферов: 1 — 0,2 М ацетатный буфер (pH 4,0); 2 — тот же буфер, содержащий 20% ацетонитрила; 3 — 0,2 М глициновый буфер (pH 2,3)

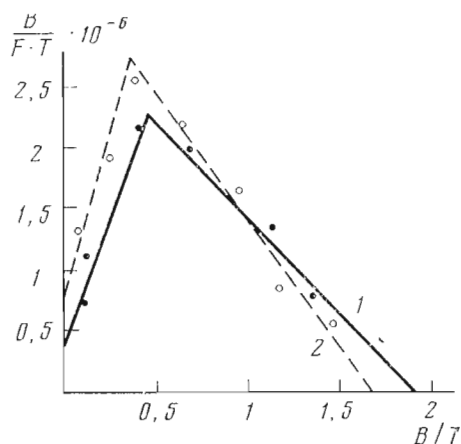


Рис. 2

Рис. 2. Связывание $[^3\text{H}]$ полисахарида с антителами средней (1) и высокой аффинности (2). В — связанный $[^3\text{H}]$ полисахарид; F — свободный $[^3\text{H}]$ полисахарид; T — введенные антитела

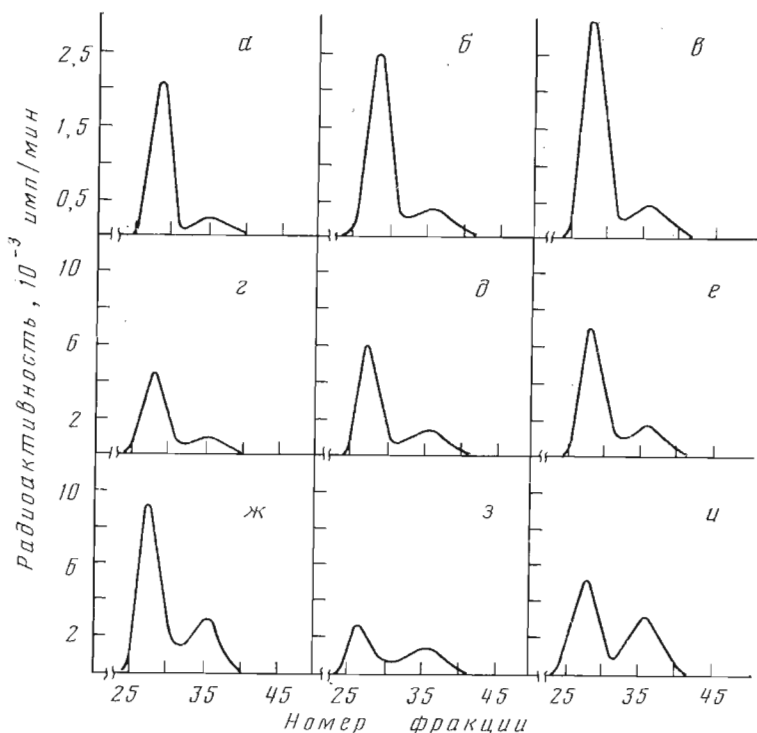


Рис. 3. Разделение комплексов Fab-фрагментов с полисахаридом и свободных Fab на колонке (30×0,7 см) с ультрагелем АсА 44 в PBS. (Скорость элюирования 4 мл/ч; объем фракций 0,6 мл). Концентрации составляли для полисахарида: а — ж — 0,8; з — 0,15; и — 0,45 мкМ, для $[^{125}\text{I}]$ Fab-фрагментов с высокой аффинностью: а — 0,8; б — 1,2; в — 1,6; г — 2,0; д — 3,0; е — 4,0; ж — 4,5; з — 2,5; и — 4,0 мкМ. Хроматограммы скорректированы на приборное уширение (см. «Экспер. часть»)

о кооперации активных центров двухвалентных антител при взаимодействии с поливалентным антигеном [11]. Поскольку в таком случае стехиометрия образующихся комплексов зависит от исходных концентраций реагентов, из полученных данных невозможно оценить собственно константу ассоциации активного центра антитела с антигеном и точное число мест связывания полисахарида. Для определения этих параметров применяли одновалентные Fab-фрагменты антител.

Fab-фрагменты были получены протеолизом антител папаином с последующим фракционированием по аффинности на иммуносорбенте. Кривая элюирования Fab-фрагментов подобна графику, полученному при аффинной хроматографии IgG (рис. 1). В реакции связывания с полисахаридом использовали Fab-фрагменты как с высокой, так и со средней аффинностью. Разделение иммунных комплексов и свободных Fab-фрагментов было проведено гель-хроматографией. Fab-фрагменты, вводимые в реакцию связывания, метили радиоактивным ^{125}I для чувствительного

обнаружения и количественного определения во фракциях, полученных при гель-хроматографии (рис. 3).

Гель-хроматограммы продуктов реакции связывания совпадали для Fab-фрагментов с различной аффинностью. Реакцию связывания проводили, добавляя переменные количества Fab-фрагментов к постоянному количеству антигена, и наоборот. Получение в обоих случаях сходных результатов говорит о достоверности экспериментальных данных.

Результаты связывания полисахарида с Fab-фрагментами, представленные в виде графика Скэтчарда, дали линейную зависимость (рис. 4).

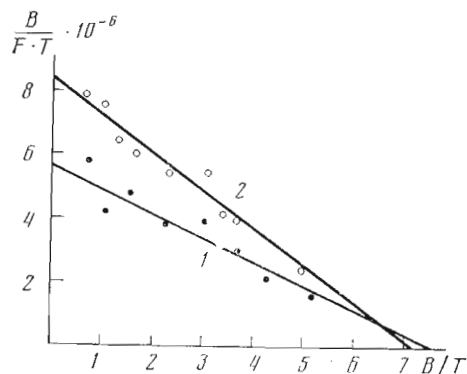


Рис. 4. Связывание полисахарида с Fab-фрагментами средней (1) и высокой аффинности (2). B — связанный ^{125}I Fab, F — свободный ^{125}I Fab; T — внесенный полисахарид

свидетельствуют о гомогенности исследуемых фракций антител в отношении аффинности [6]. По-видимому, при иммунизации ЛПБК в организме синтезируются в основном две популяции антител, различающихся по сродству к антигену. Подобное явление ограниченной гетерогенности антител по сродству к антигену наблюдалось при иммунизации кроликов стрептококковыми и пневмококковыми антигенами [12].

Величины констант ассоциации составляют $1,2 \cdot 10^6$ и $0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для Fab-фрагментов с высокой и средней аффинностью соответственно. Эти константы сравнимы с константами ассоциации, приведенными в литературе для других полисахаридов [5]. Но они на порядок выше, чем константы ассоциации антител с олигосахаридными фрагментами полисахаридов [13]. Вероятно, уменьшение сродства олигосахаридов к антителам связано с различиями в конформации олиго- и полисахаридов.

Из графика Скэтчарда была определена точка полного насыщения детерминант антигена антителами и, следовательно, количество мест связывания на молекуле антигена. В точке пересечения прямых с осью абсцисс количество молей Fab-фрагментов, связанных с 1 моль полисахарида, в среднем равно семи (рис. 4). Эта величина близка к количеству детерминантных групп, определенному методом Кэбота. Считая, что детерминанты равномерно распределены на молекуле полисахарида, можно сделать вывод, что в среднем одно место связывания приходится на четыре повторяющихся олигосахаридных звена O-специфического полисахарида.

Экспериментальная часть

Культура клеток *P. fluorescens* 361 получена из коллекции Минского института микробиологии и эпидемиологии АН БССР. Микроорганизмы выращивали в течение 48 ч при 28°C на питательном агаре. Клетки смывали дистиллированной водой, отделяли центрифугированием, промывали водой, ацетоном и сушили на воздухе.

В работе использовали папаин (Loba Chemie, Австрия), бромциан (Serva, ФРГ), хлорамин Т (Koch-Light, Англия), цистеин (Reanal, Вен-

трия), декстраны (Ferak, ФРГ), NaB^3H_4 и Na^{125}I («Изотоп», СССР), сефадексы G-25, G-50, G-100, DEAE-сефадекс A-50, АЕ-сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), ультрогель АсА 44 (LKB, Швеция). Остальные реактивы отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-50 (100×2 см) и G-100 (60×1,5 см) в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (4 мл уксусной кислоты и 10 мл пиридина на 1 л воды), на колонках с ультрогелем АсА 44 (40×1 см) в фосфатном буфере (0,02 М, pH 7,4), содержащем 0,15 М NaCl (PBS).

Радиоактивность определяли в диоксановом сцинтилляторе на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США) в образцах, содержащих тритиевую метку, и на счетчике Gamma Trac (Tracor Analytic, США) в образцах, содержащих иодную метку.

Общее количество моносахаридов определяли фенол-сернокислотным методом [14], белок — по Лоури [15].

Спектр ^{13}C -ЯМР получали для образцов, растворенных в $^2\text{H}_2\text{O}$, на приборе Bruker-Physic НХ-360 с рабочей частотой по углероду 90,55 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали метанол (50,1 м. д. относительно тетраметилсилана).

Выделение специфического полисахарида. Сухую микробную массу *P. fluorescens* экстрагировали 5% трихлоруксусной кислотой по стандартной методике [16]. ЛПБК очищали ультрафильтрацией и гель-хроматографией на колонке с сефарозой 2В в 0,03 М трис-НСl-буфере (pH 8,2). Выход ЛПБК составляет 1% на сухие клетки.

ЛПБК (200 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (100 мл, 2,5 ч, 100°С), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизовали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Получили 55 мг полисахарида, выходящего со свободным объемом колонки, и 64 мг фракция следующего за ним олигосахаридного «кора». Полисахарид (50 мг) дополнительно очищали от примеси ЛПБК гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-100. В результате получили 40 мг О-специфического полисахарида. Гомогенность полисахарида определяли ультрацентрифугированием на центрифуге MOM-3170 (Венгрия) и иммунодиффузией в агаре [17]. Молекулярную массу устанавливали гель-хроматографией на сефадексе G-100 и ультрогеле АсА 44, используя декстраны в качестве маркеров [18].

Введение тритиевой метки в полисахарид. 13 мг О-специфического полисахарида растворяли в 0,5 мл 0,01 М NaOH и добавляли 4,1 мг (100 мКи) бортригида натрия, восстанавливали в течение 24 ч. Для разложения бортригида добавляли уксусную кислоту до pH 7, упаривали, растворяли в пиридин-ацетатном буфере (pH 4,5) и отделяли полисахарид от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-50. Удельная радиоактивность [^3H] полисахарида составила $1,2 \cdot 10^8$ расп./мин на 1 мкмоль.

Получение антисыворотки к ЛПБК. Кроликов иммунизировали 4 раза с интервалом 6 сут внутривенным введением 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 мг ЛПБК (0,05% раствор в PBS). Кровь брали через 6 сут после последней иммунизации. Титры антисыворотки в иммунодиффузии составили 1:32.

Фракцию IgG получали из антисыворотки к ЛПБК, используя осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию на сефадексе А-50 [17]. Гомогенность IgG устанавливали иммунодиффузией в агаре [17].

Получение иммуносорбента и выделение антител. 20 мг полисахарида растворяли в 1 мл H_2O , активировали 75 мг бромциана при pH 11 в течение 8 мин при 10°С. Реакционную смесь добавляли к 5 мл АЕ-сефарозы 4В в 0,2 М NaHCO_3 (pH 8,5) и встряхивали 14 ч при 4°С. Для блокирования оставшихся активных групп сорбент обрабатывали 1 М этаноламином в 0,2 М NaHCO_3 , отмывали PBS. Количество связавшегося полисахарида определяли с помощью радиоактивно меченого [^3H] полисахарида. Оно составило 30% от введенного в реакцию.

На колонку с 5 мл иммуносорбента наносили 50 мг IgG в 5 мл PBS при 4°С, выдерживали 2 ч, отмывали от неспецифически связавшихся белков PBS, затем 1 М NaCl. Полноту отмывания контролировали измерением

поглощения при 280 нм. Низкоаффинные антитела элюировали 0,1 М натрийацетатным буфером (рН 4), антитела средней аффинности — тем же ацетатным буфером, содержащим 20% ацетонитрила. Высокоаффинные антитела элюировали 0,2 М глициновым буфером (рН 2,3). Фракции антител диализовали, концентрировали ультрафильтрацией до 1 мг/мл. Гомогенность и специфичность антител определяли иммунодиффузией и иммуноэлектрофорезом [17].

Определение числа мест связывания полисахарида методом Кэбота [7]. Различные количества [^3H]полисахарида (0,025–0,5 нмоль в 200 мкл PBS) смешивали с 2 нмоль (200 мкл) IgG, выделенного из антисыворотки к ЛПВК. Смесь инкубировали 48 ч при 4°С и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Преципитаты отмывали PBS (3×200 мкл) и определяли белок и количество [^3H]полисахарида (по радиоактивности). В качестве контроля использовали нормальный IgG кроликов. Молярное отношение антиген — антитело вычисляли для преципитатов зоны эквивалентности, считая молекулярную массу полисахарида равной 20 кДа, а антител равной 160 кДа [17].

Определение параметров связывания O-специфического полисахарида с антителами [10]. Увеличивающиеся количества [^3H]полисахарида (0,025–0,5 нмоль, 4000 имп./мин на 1 нмоль, в 50 мкл PBS) инкубировали с IgG (0,2 нмоль в 50 мкл PBS) 18 ч при 4°С. Затем добавляли сульфат аммония до 40% насыщения, выдерживали 30 мин при 20°С и центрифугировали со скоростью 4000 об./мин в течение 30 мин. Концентрацию связанного антигена определяли по радиоактивности в осадке, а концентрацию свободного антигена — по разнице введенного в реакцию и связанного антигена. Нормальный IgG кроликов, который использовали для контроля, связывал 5% внесенной радиоактивности. По данным связывания [^3H]полисахарида с антителами строили график Скэтчарда [6] (рис. 2).

Получение и иодирование Fab-фрагментов антител. Fab-фрагменты IgG получали, используя метод протеолиза антител папаином в присутствии цистеина [17]. Гидролизат разделяли на три фракции с помощью гель-хроматографии на ультрогеле АсА 44 в PBS (рН 7,4). Высокомолекулярная фракция соответствовала IgG, средняя — Fab- и Fc-фрагментам, третья — продуктам деградации иммуноглобулинов [19]. Среднюю фракцию наносили на иммуносорбент с целью выделения специфических Fab-фрагментов. Для элюирования Fab-фрагментов с иммуносорбента использовали те же условия, что и при выделении антител. Суммарный выход специфических Fab-фрагментов составил 2% от внесенного количества IgG. Гомогенность Fab определяли гель-хроматографией на ультрогеле АсА 44 и гель-электрофорезом в додецилсульфате натрия.

Иодирование Fab-фрагментов проводили с помощью хлорамида Т [17]. Свободный иод отделяли гель-хроматографией на сефадексе G-25 в PBS (рН 7,4). С целью отделения от неактивных Fab-фрагментов первый пик после гель-хроматографии наносили на полисахарид-сефарозу 4 В и элюировали различными буферами, как описано выше. Удельная активность [^{125}I]Fab-фрагментов составила 30 000 имп./мин на 1 нмоль. Молекулярную массу Fab-фрагментов считали равной 50 кДа [17].

Определение параметров связывания O-специфического полисахарида с Fab-фрагментами. Постоянное количество полисахарида (0,24 нмоль в 50 мкл PBS — конечная концентрация 0,8 мкМ) смешивали с различными количествами [^{125}I]Fab-фрагментов (0,24–1,3 нмоль в 200 мкл PBS) (рис. 3а — ж). Использовали также другие концентрации полисахарида: 0,15 и 0,45 мкМ (рис. 3з — и). Общий объем доводили до 300 мкл PBS и смесь инкубировали ночь при 4°С. Для разделения свободного и связанного [^{125}I]Fab использовали гель-хроматографию на ультрогеле АсА 44 в PBS (рН 7,4). Для уменьшения сорбции колонка была предварительно обработана нормальным кроличьим IgG. В качестве контроля использовали [^{125}I]Fab-фрагменты нормального IgG. Хроматограммы были скорректированы с учетом приборного уширения методом последовательных приближений [15]. Количество свободного и связанного [^{125}I]Fab определяли по площадям пиков, а концентрацию свободного Fab — как разницу между об-

щей и связанной концентрациями Fab-фрагментов. По данным связывания строили график Скэтчарда (рис. 4). Прямая на графике была проведена по методу наименьших квадратов.

Авторы статьи приносят благодарность С. П. Коваленко за любезно предоставленную культуру *Pseudomonas fluorescens* и Б. К. Васильеву за помощь в расчетах хроматограмм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Luderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaido N. In: Microbial toxins/Eds Weinbaum G., Kadis S., Ajl S. L. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 145-233.
2. Jorbeck H. J., Svensson S. B., Lindberg A. A. J. Immunol., 1979, v. 123, № 2, p. 1376-1381.
3. Carlin N. A., Lindberg A. A., Bock K., Bundle D. R. Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, № 1, p. 189-194.
4. Cisar J., Kabat E. A., Dorner M. M., Liao J. J. Exp. Med., 1975, v. 142, № 1, p. 435-459.
5. Wright J. K., Schalch W., Rodkey H. S., Braun D. G. FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 317-319.
6. Otterness J., Karush F. In: Antibody as a tool/Eds Marchalonis J. J., Warr G. W. N. Y.: John Wiley, 1982, p. 97-121.
7. Kabat E. A. In: Experimental immunochemistry/Eds Kabat E., Mayer H. Springfield: Charles C. Thomas, 1961, p. 67-68.
8. Toor M., Tanaka S., Urji T., Natsuzaki K. J. Biochem., 1981, v. 89, № 1, p. 823-827.
9. Lindberg B., Loengreen J., Romanowska E., Ruden U. Acta chem. scand., 1972, v. 26, № 2, p. 3808-3811.
10. Engel J., Schalch W. Mol. Immunol., 1980, v. 17, № 8, p. 675-680.
11. Celis E., Ridaura R., Larraide C. Immunochimistry, 1977, v. 14, № 7, p. 553-559.
12. Vray B., Hoebeke J., Zeewus R., Strosberg A. D. Immunochimistry, 1978, v. 15, № 1, p. 869-874.
13. Maeda H., Schmidt-Kessen A., Engel J., Jaton J. Biochemistry, 1977, v. 16, № 18, p. 4086-4089.
14. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. Anal. Chem., 1956, v. 28, № 1, p. 350-354.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265-275.
16. Boivin A., Mesrobianu J., Mesrobianu L. Compt. Rend. Soc. Biol., 1933, v. 114, № 30, p. 307-310.
17. Cremer N. E. In: Methods in immunology/Eds Garvey J. S., Sussdorf D. H. N. Y.: Benjamin Inc., 1977, p. 680-685.
18. Бельский Б. Г., Виленчик Л. З. В кн.: Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978, с. 189-229.
19. Rousseaux J., Rousseaux-Prevost R., Bazin H. J. Immunol. Meth., 1983, v. 64, № 1, p. 141-146.
20. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 4, p. 680-685.

Поступила в редакцию
13.VI.1985

A STUDY OF INTERACTION OF AN O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* WITH ANTIBODIES

SOLOVJEVA T. F., NABEREZHNYKH G. A., MAZUR A. K., KHOMENKO V. A.,
[OVODOV Yu. S.]

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

Mild acid hydrolysis of the lipopolysaccharide - protein complex from *Pseudomonas fluorescens* followed by separation of carbohydrate fraction on Sephadex G-50 afforded an O-specific polysaccharide. On the basis of ^{13}C -NMR spectral data the repeating unit of the polysaccharide was shown to consist of three 6-deoxyhexose residues, two of which were amino sugars. The polysaccharide interaction with specific antibodies and monovalent Fab-fragments of the antibodies, isolated on a polysaccharide-substituted immunoabsorbent gel, were investigated. The restricted affinity heterogeneity of the antibodies and cooperativity of their interaction with the polysaccharide were demonstrated. Seven binding sites per molecule of the polysaccharide and association constants of $(0.7-1.2) \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ for two fractions of the Fab-fragments were established by analysing data on the polysaccharide interaction with Fab-fragments. These findings suggest that four repeating units share one binding site.