



УДК 577.114.5.088:579.842.17

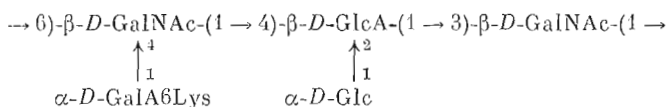
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 22*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PROTEUS HAUSERI*

Виноградов Е. В., Шашков А. С., Кнурель Ю. А.,
Гочетков Н. Е., Холодкова Е. В.,* Станиславский Е. С.*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;

* Институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Минздрава СССР, Москва

На основании анализа мопосахаридного состава и ^{13}C -ЯМР-спектров полисахарида и продуктов его частичного расщепления по Смигу и с помощью безводного фтористого водорода установлена следующая структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Proteus hauseri*:



Бактерии рода *Proteus* (Hauser, 1885) являются грамотрицательными и принадлежат к семейству энтеробактерий. Согласно определителю Берджи [2], этот род разделяется на три вида: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. typhosaciens*. В серологических классификационных схемах два первых вида объединяют под общим названием *P. hauseri* [3].

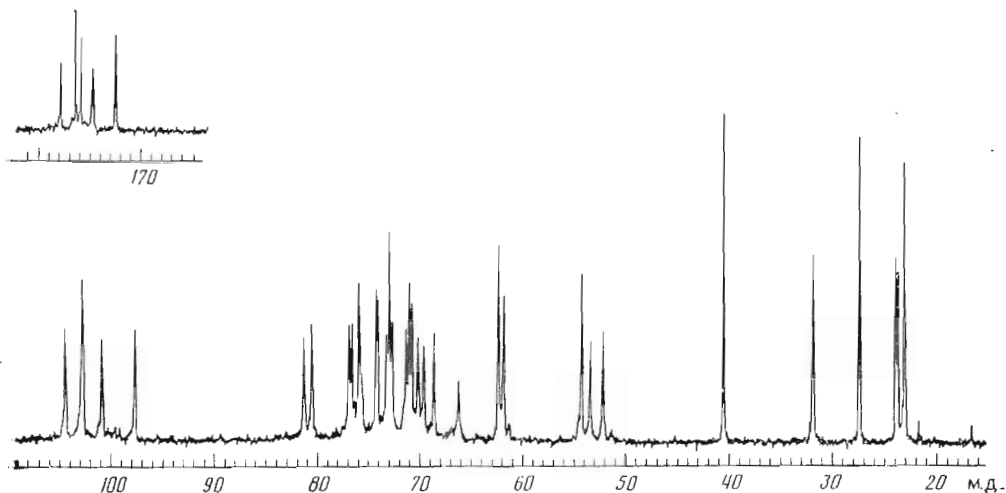
С медицинской точки зрения *Proteus* представляют большой интерес в связи с проблемой хирургических внутрибольничных инфекций. По частоте инфицирования ожоговых ран они сравнимы только с *Pseudomonas aeruginosa*, вместе с *Escherichia coli* занимают первые места при инфекциях мочевыводящих путей, являются частыми возбудителями септицемий. Терапия протейной инфекции существенно осложняется высокой резистентностью возбудителя к антибиотикам [4].

Для выяснения возможностей применения методов иммунной терапии проводится изучение поверхностных антигенов *Proteus*, в том числе О-антигенов (липополисахаридов). Эти биополимеры имеют общую структуру, характерную также и для других изученных грамотрицательных бактерий, и состоят из О-специфической полисахаридной цепи, присоединенной через олигосахарид кора к липиду А [5, 6].

Наиболее подробно изучен мопосахаридный состав липополисахаридов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* [7, 8, 5]. Среди особенностей, характерных для многих штаммов *Proteus*, следует отметить присутствие галактуроновой и глюкуроновой кислот, а также одновременное присутствие в коре *D*-глицеро- и *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы. В состав липополисахаридов часто входит *L*-лизин, который через атом N^α присоединен к карбоксильной группе галактуроновой кислоты [9]. Найдены и другие аминокислоты, такие, как аланин и 2,6-диаминошмелиновая кислота [5], а также необычный для липополисахаридов компонент рибит-1-фосфат [8, 10]. Из жирных кислот значительно преобладают миристиновая и (*R*)-3-гидроксимиристиновая кислоты [11, 12].

К настоящему времени установлена полная структура липида А R_6 -мутанта *P. mirabilis* [12], которая, по-видимому, одинакова для всех штаммов рода *Proteus*. Для олигосахаридов кора *P. mirabilis* [13] и для О-специфических полисахаридов двух штаммов этого вида [10, 14] из-

* Сообщение 21 см. [1]. GalA – галактуроновая кислота, GalA6Lys – N^α -лизино-галактуронамид.



^{13}C -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *P. hauseri*

вестна только частичная структура. По данным работы [10], повторяющееся звено полисахарида *P. mirabilis* D52 представляет собой тетрасахарид, включающий глюкозу, галактозу и два остатка N-ацетилглюкозамина, а также присоединенные фосфодиэфирными связями рибит и этаноламин. Пентасахаридное повторяющееся звено полисахарида *P. mirabilis* 1959 содержит глюкозу, два остатка N-ацетилгалактозамина, глюкуроновую кислоту и амид галактуроновой кислоты с лизином [9, 14]. Для обоих полисахаридов не были определены типы замещения некоторых моносахаридов и конфигурации гликозидных связей. Данные о строении других O-специфических полисахаридов *Proteus* отсутствуют.

В связи с необходимостью таких данных для понимания серологической и иммунологической специфичности O-антигенов нами предпринято химическое изучение полисахаридных цепей липополисахаридов *Proteus*. Настоящая работа посвящена установлению полной структуры повторяющегося звена O-специфического полисахарида *P. hauseri*.

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией 45% водным фенолом по методу [15] без разделения водной и фенольной фаз с последующим освобождением от нуклеиновых кислот и осаждением липополисахарида спиртом [15]. O-Специфический полисахарид был получен при расщеплении липополисахарида 1% уксусной кислотой и выделен гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

При электрофорезе на бумаге полисахарид двигался к аноду ($M_{\text{Gala}} \approx 35$), и, следовательно, он является кислым. Полисахарид окрашивался на электрофореграмме нингидрином в фиолетовый цвет, что свидетельствовало о наличии свободных аминогрупп.

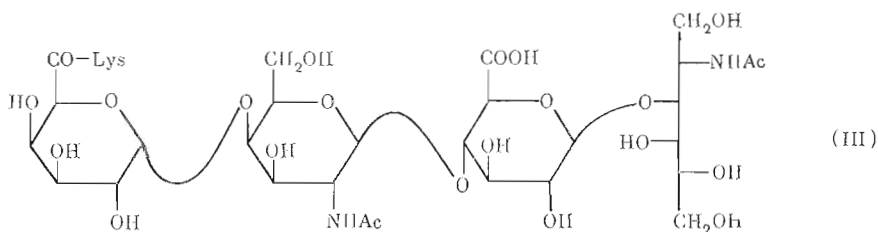
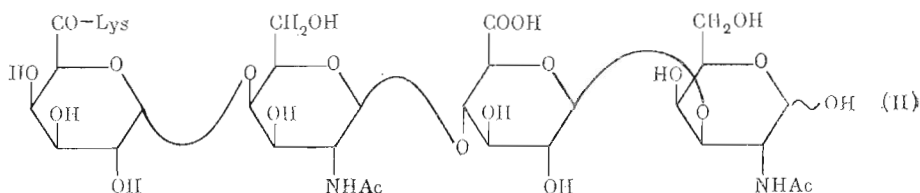
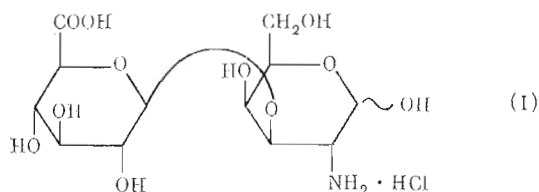
Анализ гидролизата полисахарида с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов и ГЖХ в виде ацетатов полиолов показал наличие глюкозы, галактозамина и лизина в соотношении $\sim 1:1,8:1$. При исследовании продуктов метанолиза полисахарида в виде ацетатов с помощью ГЖХ были обнаружены кроме производных указанных сахаров также метиловые эфиры метилгликозидов глюкуроновой и галактуроновой кислот. Восстановление продуктов метанолиза боргидридом лития в 50% изопропанол с последующим гидролизом привело к образованию из соответствующих урновых кислот глюкозы и галактозы. D-Конфигурация полученных гексоз, а также присутствовавшей в исходном полисахариде глюкозы была определена путем окисления D-глюкозооксидазой и D-галактозооксидазой. Абсолютные конфигурации D-галактозамина и L-лизина были определены на основании величины оптического вращения хлоргидратов этих соединений, выделенных из гидролизата полисахарида с помощью ионообменной хроматографии на катионите Chromex UA-8. Кроме этих двух аминокислотных компонентов в этом же эксперименте был выделен

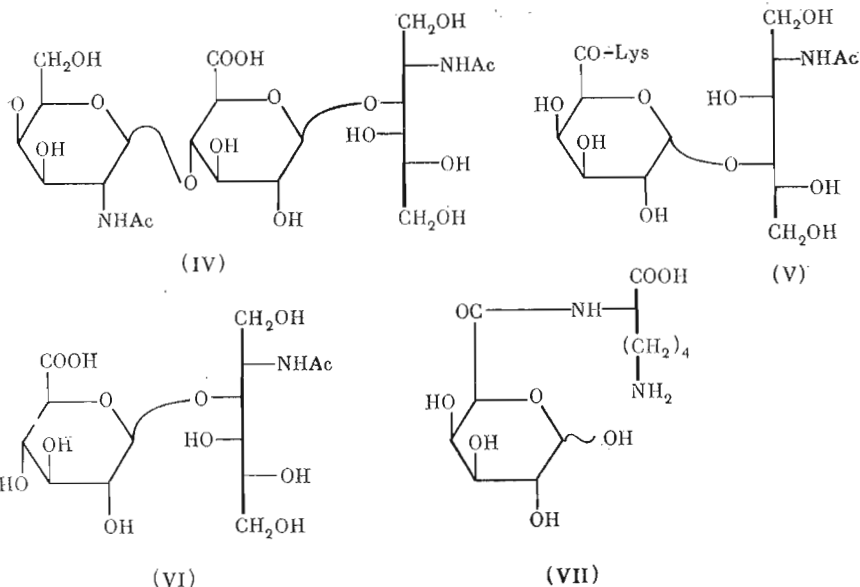
дисахарид (I), включающий глюкуроновую кислоту и галактозамин со свободной аминогруппой (см. ниже).

Результаты анализа состава полисахарида согласовывались с данными ^{13}C -ЯМР-спектра (рисунок), в котором присутствовали сигналы пяти аномерных углеродных атомов в области 97,2–103,6 м.д., двух N-ацетильных групп (CH_3 при 23,1 и 23,3 м.д.), пяти карбонильных группы в области 171,2–177,5 м.д., атомов C2–C6 лизина при 54,4; 26,8; 22,4; 31,6 и 40,0 м.д. соответственно, двух атомов C2 остатков N-ацетилгалактозамина при 51,6 и 52,9 м.д., а также 21 углеродного атома в области 61–81 м.д. Таким образом, полисахарид является регулярным и построен из пентасахаридных повторяющихся звеньев, включающих *D*-глюкозу, *D*-глюкуроновую кислоту, *D*-галактоуроновую кислоту, N-ацетил-*D*-галактозамин и *L*-лизин в соотношении 1:1:1:2:1.

С целью получения олигосахаридных фрагментов полисахарид был подвергнут сольволизу безводным фтористым водородом при -10°C и продукты были разделены гель-хроматографией на фрактогеле TSK HW 40. Главным олигосахаридным продуктом сольволиза оказался тетрасахарид (II), который был восстановлен боргидридом натрия в олигосахарид (III). Кроме того, образовались низшие олигосахариды, которые были восстановлены в смеси боргидридом натрия. Полученные в результате олигосахариды (III)–(VI) были разделены гель-хроматографией на фрактогеле TSK HW 40 и затем ионообменной хроматографией на DEAE-Trisakryl-M. Были выделены также глюкоза и амид галактуроновой кислоты и лизина (VII), дополнительно очищенный препаративной хроматографией на бумаге.

Строение амида (VII), нейтрального по данным электрофореза на бумаге, было подтверждено данными ^1H - (Экспер. часть) и ^{13}C -ЯМР-спектров (таблица). В частности, галакто-конфигурация остатка сахара в соединении (VII) следовала из констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов $J_{2,3}$ 10, $J_{3,4}$ 3,5, $J_{4,5}$ 1,5 Гц [16], а ацилирование лизина галактуроновой кислотой по N^α следовало из вызванного дезэкранирующим эффектом ацильного заместителя значительного смещения в слабое поле сигнала H_2 лизина к 4,35 м.д. по сравнению с его положением в спектре незамещенной аминокислоты при 3,70 м.д. Соединение (VII) оказалось, таким образом, идентичным амиду *D*-галактуроновой кислоты и *L*-лизина, идентифицированному ранее химическими методами в составе O-специфического полисахарида *P. mirabilis* 1959 [9].





Структура олигосахаридов (I) — (VI) была установлена на основании расшифровки их ^{13}C -ЯМР-спектров, выполненной последовательно от более простых соединений к сложным с привлечением литературных данных для модельных соединений.

Остаток галактозамина (звена В, см. ниже структуру полисахарида) в спектре дисахарида (I) (таблица) давал два набора сигналов, относящихся к α - и β -пиранозным формам (в частности, C1 α и C1 β при 90,6 и 94,2 м.д., C2 α и C2 β при 51,3 и 54,5 м.д. соответственно). Следовательно, этот моносахарид находится на восстанавливаемом конце. Этот вывод согласуется с хорошим совпадением сигналов терминального остатка глюкуроновой кислоты (звена Б) с данными для метил- β -D-глюкуронопиранозида [17], откуда следует также β -конфигурация глюкуроновой кислоты в дисахариде (I). Анализ эффектов гликозилирования, осуществленный путем сопоставления данных спектра дисахарида (I) и хлоргидрата галактозамина [48], показал, что остаток аммоносахара замещен в положение 3 и дисахарид (I) имеет приведенное строение.

Из данных спектра олигосахарида (VI) (таблица) следовало, что он является восстановленным по альдегидной группе и N-ацетилированным производным дисахарида (I). Сигналы терминального остатка глюкуроновой кислоты (звена Б) также хорошо совпадали с данными для модельного гликозида [17], а сигналы остатка полиола (звена В) были отнесены путем сравнения с данными для гликозилированных N-ацетилгалактозаминитолов [19]; их положение совпадало с замещением этого остатка в положение 3.

В спектре олигосахарида (V) присутствовали сигналы амида галактуроновой кислоты с лизином (звена Г), причем положение сигналов C2—C5 урановой кислоты хорошо совпадало с положением соответствующих сигналов α -пиранозной формы в спектре амида (VII) (таблица), и, значит, этот моносахарид присоединен α -гликозидной связью. Вторым компонентом биозида (V), так же как и в биозиде (VI), оказался N-ацетилгалактозаминитол (звено А); его замещение в положение 4 в этом олигосахариде следовало из результатов анализа спектра олигосахарида (III) (см. ниже).

Спектр олигосахарида (IV) отличался от спектра биозида (VI) появлением сигналов дополнительного остатка N-ацетилгалактозамина (звена А) и изменением положения некоторых сигналов остатка глюкуроновой кислоты (звена Б) (таблица). Из положения сигналов C1 и C2 звена А при 101,7 и 53,2 м.д. соответственно однозначно следовало, что этот остаток N-ацетилгалактозамина присоединен β -гликозидной связью [20]. Положение его сигналов хорошо совпадало с данными для метил-2-аце-

Данные ¹³C-ЯМР-спектров полисахарида, олигосахаридных фрагментов и модельных соединений * (м. д.)

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Звено А						
Полисахарид	102,0	52,9	70,9	76,4	73,7	65,6
Модифицированный полисахарид	102,1	53,0	71,4	68,5	75,4	68,5
Тетрасахарид (II)	102,2	52,8	71,0	76,5	76,0	60,8
Тетрасахарид (III)	102,1	52,9	71,2	76,6	76,3	61,4
Трисахарид (IV)	101,7	53,2	72,0	68,6	75,9	61,7
Дисахарид (V)	61,2	52,3	70,2	80,3	72,1	63,2
Метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозид [20]	103,5	53,6	72,4	69,1	76,3	62,2
Метил-4-O-метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозид [20]	103,5	54,0	72,0	79,4	76,5	61,8
Звено Б						
Полисахарид	103,6	76,8	72,1	80,7	75,3	
Модифицированный полисахарид	104,6	73,0	74,5	80,7	75,4	
Тетрасахарид (II)	104,8	73,3	74,6	80,8	76,6	
Тетрасахарид (III)	103,4	73,9	74,7	80,6	76,8	
Трисахарид (IV)	103,3	73,8	74,6	80,2	76,7	
Дисахарид (VI)	103,7	74,7	76,7	72,8	75,7	
Дисахарид (I)	104,5	74,0	76,5	72,3	75,9	
Метил-β-D-глюкуронопиранозид [17]	104,2	74,0	76,5	72,3	75,9	
Хондроитин [21]	104,3	73,8	76,5	72,3	75,6	
	105,3	73,6	74,8	81,3	77,5	
Звено В						
Полисахарид	102,0	51,6	79,8	68,0	75,3	61,8
Модифицированный полисахарид	101,8	51,8	80,7	68,5	75,4	61,8
Тетрасахарид (II)	α 91,9	49,6	78,1	69,2	71,0	62,0
	β 95,9	53,1	81,1	68,6	76,6	61,7
Тетрасахарид (III)	62,0	52,2	76,1	69,9	69,9	63,7
Трисахарид (IV)	62,0	52,0	76,2	69,9	69,9	63,6
Дисахарид (VI)	62,0	52,6	76,5	70,3	70,0	64,3
Дисахарид (I)	α 90,6	51,3	78,2	68,7	71,5	62,3
	β 94,2	54,5	80,4	68,1	76,3	62,0
Хондроитин [21]	101,9	52,1	81,0	68,8	75,9	62,2
Хлорид галактозамына [18]	α 90,6	52,7	67,8	69,7	71,9	62,9
	β 94,5	55,9	70,6	69,1	76,7	62,4
3-O-(β-D-Галактопиранозил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-D-галактитол [19]	61,2	52,0	77,0	69,9	69,8	63,5
Метил-3-O-метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид [20]	99,3	50,1	78,0	65,8	71,8	62,5
Метил-3-O-метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозид [20]	103,5	52,4	81,4	65,0	76,2	62,3
Звено Г						
Полисахарид	100,3	69,1	69,7	70,5	71,2	
Тетрасахарид (II)	100,7	69,1	69,7	70,5	71,2	
Тетрасахарид (III)	100,7	69,1	69,7	70,5	71,2	
Дисахарид (V)	100,7	68,9	69,8	70,7	71,2	
Амид (VII)	α 93,2	68,8	69,7	70,5	71,2	
	β 97,1	72,2	73,2	69,9	71,5	
Звено Д						
Полисахарид	97,2	72,0	73,6	70,3	72,6	61,4
Метил-α-D-глюкопиранозид [17]	100,3	72,5	74,2	70,6	72,7	61,7
Остаток лизина (во всех соединениях)	171,2	54,4±0,2	26,9±0,1	22,4	31,7±0,2	40,0

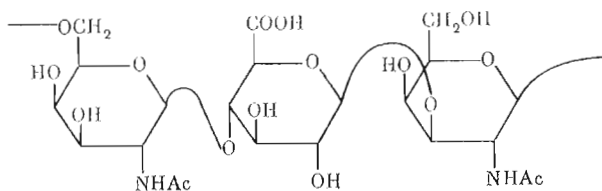
* Химические сдвиги сигналов CH₂ N-ацетильных групп аминсахаров 23,1—23,3 м. д., аминопиранозидов 22,7 м. д., карбонильных групп 176,2—179,3 м. д.

тамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозиде [20], что свидетельствует о его расположении на невозстанавливаемом конце олигосахарида (IV). Сравнение спектра олигосахарида (IV) со спектром хондроитина [21], включающего фрагмент β-D-GalNAc-(1→4)-β-D-GlcA, позволило сделать вывод о замещении остатка глюкуроновой кислоты в положение 4. Таким образом, этот олигосахарид имеет приведенное строение.

Спектр олигосахарида (III) отличался от спектра (IV) появлением сигналов терминального α-пиранозного остатка амида галактуроновой кислоты с лизином (звена Г, ср. с данными для соединения (V)) и рядом изменений в положении сигналов одного из остатков N-ацетилгалактозамина (звена А) (таблица). Анализ характера этих изменений, проведенный при сопоставлении с данными для модельных замещенных производных N-ацетил-D-галактозамина [20, 21], показал, что в тетрасахариде (III) этот моносахаридный остаток замещен в положение 4. Химические сдвиги сигналов остатков глюкуроновой кислоты (звена Б) и N-ацетилгалактозаминитола (звена В) в спектрах олигосахаридов (III) и (IV) практически совпадали, что окончательно показывало его линейную структуру.

И наконец, в спектре тетрасахарида (II) вместо присутствовавших в спектре тетрасахарида (III) сигналов N-ацетилгалактозаминитола появились сигналы α- и β-пиранозных форм находящегося на восстанавливаемом конце остатка N-ацетилгалактозамина (звена В, таблица). Спектр тетрасахарида (II) был легко расшифрован при сравнении со спектром тетрасахарида (III) и данными для метил-3-О-метил-2-ацетидамо-2-дезоксид-α- и -β-D-галактопиранозидов [20]. Таким образом, данные ¹³C-ЯМР полностью согласуются с приведенной структурой олигосахарида (II).

Далее полисахарид был подвергнут распаду по Смигу, который включал периодатное окисление, восстановление боргидридом и мягкий гидролиз 1% уксусной кислотой. В результате был получен модифицированный полисахарид, который, по данным ¹³C-ЯМР-спектра (таблица), был построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих глюкуроновую кислоту и два остатка N-ацетилгалактозамина; сигналы глюкозы и амида галактуроновой кислоты и лизина в спектре отсутствовали. Таким образом, основная цепь исходного полисахарида устойчива к окислению, а глюкоза и галактуроновая кислота находятся в боковой цепи или цепях. Последовательность моносахаридных остатков в модифицированном полисахариде следовала из структуры олигосахарида (IV), содержащего те же моносахаридные звенья А—В и являющегося, таким образом, восстановленным по альдегидной группе химическим повторяющимся звеном этого полисахарида. Относительно слабополюное положение сигнала С6 одного из остатков N-ацетилгалактозамина (звена А) в ¹³C-ЯМР-спектре полисахарида (таблица) при 68,5 м.д. может быть вызвано только α-эффектом гликозирования [22]. Следовательно, этот остаток замещен в положение 6. Химические сдвиги сигналов остатков N-ацетилгалактозамина (звеньев В и А), в частности положение сигналов С1 при 101,8 и 102,1 м.д. и С2 при 51,8 и 53,0 м.д., доказывали, что оба остатка присутствуют в β-пиранозной форме [20]. Таким образом, повторяющиеся звенья в полисахариде соединяются β-1-6-связями, модифицированный полисахарид является линейным и имеет следующее строение:



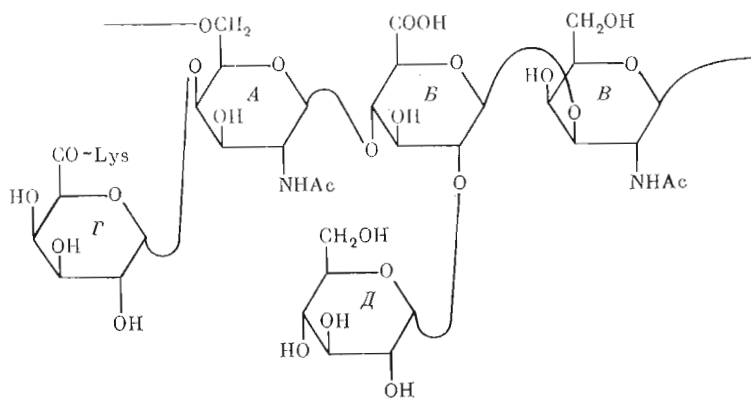
Из строения тетрасахарида (II) и модифицированного полисахарида может быть легко определено место присоединения галактуронамида (звена Г) к основной цепи в исходном полисахариде. Происходящие изменения в положении сигналов замещенного в положение 6 остатка

N-ацетилгалактозамина (звена А, таблица) находятся в соответствии с присоединением к нему этого моносахарида в положение 4. Отметим значительный γ -эффект на замещенный атом С6 N-ацетилгалактозамина от его гликозилирования в положение 4, проявляющийся в сильнополюльном смещении сигнала С6 от 68,5 м.д. в спектре модифицированного полисахарида к 65,6 м.д. в спектре исходного полисахарида.

После этого невыясненным оставалось только место присоединения и конфигурация гликозидной связи остатка глюкозы (звена Д). Сравнение спектров модифицированного и исходного полисахаридов показало, что кроме изменений положений сигналов замещенного в положение 6 остатка галактозамина произошло также смещение сигналов С1, С2 и С3 остатка глюкуроновой кислоты (звена Б) от 104,6; 73,0 и 74,5 к 103,6; 76,8 и 72,4 м.д. соответственно. По направлению и величине эти смещения соответствуют эффектам гликозилирования этого моносахарида в положение 2 [22]. Совпадение положения сигналов остатка галактуронамида (звена Г) и замещенного в положение 3 остатка N-ацетилгалактозамина (звена В) в спектрах исходного полисахарида, тетрасахарида (II) и модифицированного полисахарида подтверждает присоединение остатка глюкозы к остатку глюкуроновой кислоты.

Сравнительный анализ области резонанса аномерных углеродных атомов в спектрах олигосахаридов, исходного и модифицированного полисахаридов позволил отнести все сигналы в этой области к соответствующим моносахаридным остаткам. В частности, сигнал при 97,2 м.д. в спектре исходного полисахарида, отсутствующий во всех остальных спектрах, очевидно, относится к С1 остатка глюкозы. Как химический сдвиг этого сигнала [22], так и $J_{C,H} = 173,3$ Гц, определенная из снятого без подавления С,Н-взаимодействия спектра [23], указывали на α -конфигурацию глюкопиранозидной связи. Значения $J_{C,H} = 163-164$ Гц, определенные из того же спектра для сигналов С1 остатков глюкуроновой кислоты при 103,6 м.д. и обоих остатков N-ацетилгалактозамина при 102,0 м.д., а также константа 170,1 Гц для сигнала С1 амида галактуроновой кислоты с лизином подтверждали конфигурацию гликозидных связей этих моносахаридов, определенные независимым путем.

Таким образом, установлена полная структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида изученного штамма *Proteus hauseri*, представляющего собой линейный трисахарид с двумя моносахаридными ответвлениями:



Подчеркнем, что основным химическим методом структурного исследования полисахарида был избирательный сольволиз безводным фтористым водородом. Удачный выбор условий сольволиза дал возможность получить в одном эксперименте достаточно широкий набор моно- и олигосахаридов, необходимых для определения строения повторяющегося звена. Интересно, что наименее устойчивой к действию фтористого водорода (не считая α -гликозидной связи) оказалась β -1-6-связь между двумя остатками N-ацетилгалактозамина (звеньями А и В), которая расщеплялась значительно легче, чем β -1-4-связь между остатками N-ацетилгалактозамина

и глюкуроновой кислоты (звеньями В и Б). Хорошо известна пониженная устойчивость 1-6-связей в условиях ацетолиза [24]; аналогичное явление отмечалось другими авторами и в отношении сольволиза фтористым водородом [25]. Гликозидная связь глюкуроновой кислоты (звена Б) была полностью устойчива в применяющихся условиях сольволиза, в то время как связь галактуроамида (звена Г) в значительной степени расщеплялась. К сожалению, большое разнообразие факторов, влияющих на протекание сольволиза (различные типы замещения, конфигурации моносахаридов и гликозидных связей), не позволяет, используя данные для изученного полисахарида, сделать однозначные выводы о закономерностях в устойчивости гликозидных связей к фтористому водороду.

Как уже отмечалось, ранее для О-специфического полисахарида *P. mirabilis*, штамм 1959, была предложена частичная структура повторяющегося звена [14]. Состав и последовательность моносахаридных остатков в этом полисахариде совпадает с установленными для полисахарида изученного в настоящей работе штамма *P. hauseri*. Сопоставление ¹³С-ЯМР-спектров обоих полисахаридов показало, что они идентичны друг другу [26]. Следовательно, эти полисахариды имеют одинаковую структуру повторяющегося звена.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР сняты на приборе Bruker AM-300 в D₂O при 70°С для полисахаридов и при 30°С для олигосахаридов, внутренний стандарт — ацетон, δ_c 31,45 м.д., δ_н 2,23 м.д. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141 в воде при 20°С. Анализ аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе Bio-Cal 200, углеродный анализ — на анализаторе Technicon как описано ранее [27]. ГЖХ выполнена на приборе Pye Unicam, серия 104, модель 64, на стеклянной колонке (150×0,4 см) с 3% ECNSS-M на газхроме Q и на хроматографе ЛХМ 8МД на стеклянной капиллярной колонке (0,25 мм × 50 м), покрытой фазой OV-1, газ-носитель — азот. Хроматографию на бумаге проводили в системе пиридин — этилацетат — уксусная кислота — вода, 5:5:1:3, на бумаге Filtrak FN-15. Электрофорез на бумаге осуществляли в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 28 В/см. Вещества обнаруживали на бумаге с помощью ингибрина, щелочного нитрата серебра или бензидина после обработки хлором [28]. Гель-хроматографию проводили на колонке (70×3,7 см) с сефадексом G-50 и на колонке (80×1,6 см) с фрактогелем TSK HW 40(S) (Merck). Ионообменную хроматографию на DEAE-Trisacryl M (LKB) (колонка 20×1 см) осуществляли в 0,02 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,5, в линейном градиенте NaCl (0—1 М).

Выделение липополисахарида и полисахарида. Клетки *P. hauseri* (штамм без номера) выращивали как описано в работе [29] и высушивали ацетоном. 30 г сухих клеток перемешивали 20 мин при 65—70°С с 0,5 л воды и 0,5 л 90% фенола, охлаждали, всю смесь анализировали против проточной воды 5 сут, осадок отделяли, далее из супернатанта удаляли нуклеиновые кислоты в виде цетавлоновых солей и липополисахарид осаждали из водного раствора спиртом как описано в работе [15]; выход 7%. Липополисахарид (1 г) нагревали 3 ч в 1% растворе уксусной кислоты (150 мл) на водяной бане, осадок липида отделяли центрифугированием (1 ч при 6000 об/мин), упаривали до небольшого объема, гель-хроматографией на сефадексе G-50 выделили О-специфический полисахарид, выходящий со свободным объемом колонки; выход 25% от веса липополисахарида, [α]_D +25°С (с 4).

Определение моносахаридного состава. а) 80 мг полисахарида гидролизовали 3 М HCl (3 ч при 105°С), упаривали досуха, остаток упаривали несколько раз с водой, анализировали с помощью аминокислотного и углеродного анализаторов, а также методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов (получены как обычно). Оставшуюся часть гидролизата подвергли хроматографии на катионите Chromex UA-8 (Reanal) (колонка 25×0,6 см), при элюировании 0,33 М HCl выделили хлоридат дисахарида (I) и хлоридат D-галактозамина, [α]_D +74° (с 0,5), лит. [α]_D +82° (вода) [30]; далее колонку промывали водой и 1 М NH₄OH элюировали L-лизин, [α]_D +13° (с, 0,7, 2 М HCl), лит. [α]_D +21,5° (6 М HCl) [31]; чистоту выделенных соединений контролировали с помощью аминокислотного анализатора.

б) 5 мг полисахарида высушивали в вакууме над P_2O_5 , растворили в 2 мл 1 М НСl в метаноле, нагревали в запаянной ампуле (4 ч при $85^\circ C$), упарили, часть метанолизата ацетилювали и анализировали ГЖХ на капиллярной колонке; другую часть растворили в 50% изопропанол (1 мл), обработали избытком боргидрида лития (16 ч при $20^\circ C$), затем катионитом КУ-2, упарили, остаток упарили несколько раз с метанолом, гидролизovali 2 М НСl (1 мл, 1 ч, $100^\circ C$), упарили, анализировали на углеводном анализаторе, а также подвергали ферментативному окислению для определения абсолютных конфигураций гексоз: к 1 мл раствора, содержащего около 100 мкг глюкозы, прибавили 0,6 мг сухого препарата глюкозооксидазы (Boehringer), выдержали 16 ч при $20^\circ C$; к 0,5 мл раствора гидролизата в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 6,5, содержащего около 100 мкг галактозы, прибавили 10 мкл раствора 15 ед. акт. галактозооксидазы (Sigma) в том же буфере, выдержали 16 ч при $20^\circ C$; окисление контролировали с помощью углеводного анализатора.

Сольволиз полисахарида фтористым водородом. 100 мг высушенного над P_2O_5 полисахарида обрабатывали 10 мл безводного фтористого водорода (~ 40 мин при $-10^\circ C$), раствор охладили до $-80^\circ C$ и вылили в смесь CCl_4 , карбоната кальция и сухого льда, перемешивали 16 ч при $20^\circ C$, осадок отделили, промыли 3 раза водой, упарили органическую и водную вытяжки, объединенный сухой остаток суспендировали в 5 мл воды, центрифугировали, раствор упарили, хроматографией на фрактогеле TSK HW 40 выделили тетрасахарид (II) (31 мг), амид галактуроновой кислоты (VII) (5 мг) и глюкозу, $[\alpha]_D +42^\circ$ (с 1), лит. $[\alpha]_D +47,9^\circ$ (вода, равновесие) [32], а также смесь олигосахаридов, элюирующуюся между тетрасахаридом (II) и амидом (VII). Эту смесь восстанавливали боргидридом натрия в воде (2 ч при $20^\circ C$), нейтрализовали 4 М НСl, хроматографией на той же колонке выделили олигосахариды (III), (IV) и смесь (V) и (VI), которую разделяли ионообменной хроматографией на DEAE-Trisacryl M. Соединение (VII) дополнительно было очищено препаративной хроматографией на бумаге, R_f 0,14 $[\alpha]_D +70^\circ$ (с 0,41). Данные 1H -ЯМР-спектра соединения (VII) (δ , померами со штрихами обозначены протоны остатка лизина): 5,41 (H1 α , д, $J_{1,2}$ 3,5 Гц), 4,72 (H1 β , д, $J_{1,2}$ 7,5 Гц), 4,68 (H5 α , д, $J_{4,5}$ 1,5 Гц), 4,35 (H2', м), 4,30 (H4 α , дд, $J_{3,4}$ 3,5 Гц), 4,28 (H5 β , д, $J_{4,5}$ 1,5 Гц), 4,24 (H4 β , дд, $J_{3,4}$ 3,5 Гц), 3,95 (H3 α , дд, $J_{2,3}$ 10 Гц), 3,85 (H2 α , дд), 3,75 (H3 β , дд, $J_{2,3}$ 9,5 Гц), 3,54 (H2 β , дд), 3,01 (2H, H6', т, J 3 Гц), 1,90 (2H, H3', м), 1,70 (2H, H5', м), 1,45 (2H, H4', м). Данные 1H -ЯМР-спектра свободного лизина (δ): 3,70 (H2, т, J 25 Гц), 2,97 (H6, 2H, т, J 3 Гц), 1,85 (2H, H3, м), 1,67 (2H, H5, м), 1,42 (2H, H4, м).

Распад по Смитчу. 70 мг полисахарида растворили в 2 мл 0,2 М раствора периодата натрия в воде, выдержали 24 ч при $20^\circ C$ в темноте, прибавили 0,2 мл этиленгликоля, через 20 мин прибавили избыток боргидрида натрия, выдержали 2 ч, нейтрализовали 2 М НСl, хроматографией на фрактогеле TSK HW 40 выделили окисленный полисахарид, гидролизovali его 1% уксусной кислотой 8 ч на кипящей водяной бане, упарили, гель-хроматографией на фрактогеле TSK HW 40 выделили модифицированный полисахарид (40 мг), элюирующийся со свободным объемом колонки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Кочарова П. А., Виноградов Е. В., Парамонов П. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 88–96.
2. Penner J. L. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/Ed. N. R. Krieg. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. V. 1. P. 491–494.
3. Larsson P. // Meth. Microbiol. 1984. V. 14. P. 187–214.
4. Крейнин Л. С. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1985. № 5. С. 19–25.
5. Wilkinson S. G. // Surface carbohydrates of procaryotic cell/Ed. I. W. Sutherland. N. Y.: Acad. Press, 1977. P. 97–176.
6. Dmitriev B. A., Hinton N. A., Lowe R. L., Jones J. K. N. // Can. J. Microbiol. 1971. V. 17. № 11. P. 1385–1394.

7. Sidorczyk Z., Kaca W., Kotelko K. // Bull. Acad. pol. sci. Ser. sci. biol. 1975. V. 23. № 9. P. 603-609.
8. Gmeiner J., Mayer H., Fromme I., Kotelko K., Zych K. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 72. № 1. P. 35-40.
9. Gromska W., Mayer H. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 2. P. 391-399.
10. Gmeiner J. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 74. № 1. P. 171-180.
11. Sidorczyk Z., Rozalski A., Deka M., Kotelko K. // Arch. immunol. et ther. exp. 1978. V. 26. № 3. P. 239-243.
12. Sidorczyk Z., Zahringen U., Reitschel E. T. A. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 137. № 1. P. 15-22.
13. Radziewska-Lebrecht J., Feige U., Jensen M., Kotelko K., Freibolin H., Mayer H. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 31-38.
14. Kaca W., Kotelko K. // Arch. immunol. et ther. exp. 1983. V. 31. № 6. P. 905-914.
15. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Н. К. Кочетков. М.: Мнр, 1967. С. 325-332.
16. Allona C., Haasnoot C. A. G. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417-429.
17. Gorin P. A. J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 8. P. 1212-1223.
18. Yamaoka N., Usui T., Sugiyama H., Seto S. // Chem. Pharm. Bull. 1974. V. 22. № 9. P. 2196-2200.
19. Shashkov A. S., Arbatsky N. P., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1979. V. 72. P. 218-221.
20. Деревицкая В. А., Шапков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 410-421.
21. Bociek S. M., Darke A. H., Welti D., Rees D. A. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 109. № 2. P. 447-456.
22. Шапков А. С., Чижов О. С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437-496.
23. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. P. 293-297.
24. Aspinall G. O. // The polysaccharides/Ed. G. O. Aspinall. N. Y.: Acad. Press, 1982. V. 1. P. 64-66.
25. Mort A. // J. Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. Meet. 1981. V. 181. CARB-49.
26. Kaca W., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kotelko K. Arch. immunol. et ther. exp., in press.
27. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 66. № 3. P. 559-566.
28. Reindel F., Hoppe W. // Chem. Ber. 1954. B. 87. S. 1103-1107.
29. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Maskilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 106. № 2. P. 643-651.
30. Gottschalk A., Graham E. R. B. // Biochim. et biophys. acta. 1959. V. 34. № 2. P. 380-391.
31. Beil. 4(4), 2719.
32. Hesse O. // Ann. 1893. B. 277. S. 302.

Поступила в редакцию
8.IX.1986.

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 22. THE STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *PROTEUS HAUSERI* LIPOPOLYSACCHARIDE

VINOGRADOV E. V., SHASHKOV A. S., KNIREL Y. A., KOCHETKOV N. K.,
KHOLODKOVA E. V.*, STANISLAVSKY E. S.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

**I. I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Health Ministry
of the USSR, Moscow*

The following structure of the repeating unit of the *Proteus hauseri* O-specific polysaccharide was established on the basis of monosaccharide composition and ¹³C NMR data of the polysaccharide and products of its Smith degradation and partial cleavage with hydrogen fluoride:

