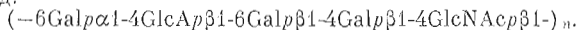




УДК 577.114.5:543.422.23:579.842.15.083.3

**АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA* *.
СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
SHIGELLA BOYDII, ТИП 14****Львов В. Л., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н.,
Лазина Е. Б., Шапков А. С.*, Дмитриев Б. А.***Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР, Москва;*** Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

При мягкой кислотной деградации антигенного липополисахарида *Shigella boydii*, тип 14, получен О-специфический полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкуроновой кислоты, 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и *D*-галактозы в соотношении 1 : 1 : 3. На основании данных анализа методом метилирования, частичного кислотного гидролиза и результатов полной расшифровки спектра ¹³C-ЯМР полисахарида установлено строение его повторяющегося звена, которое представляет собой линейный пентасахарид:



Предложен прием, позволяющий определить характер замещения остатков урновых кислот в полисахаридной цепи методом хроматомасс-спектрометрии ацетатов частично метилированных метиловых эфиров альдоновых кислот. Обсуждаются серологические свойства липополисахарида *Sh. boydii*, тип 14, и его модифицированных производных.

В соответствии с международной классификацией бактерий род *Shigella* состоит из четырех групп — А, В, С и D [2]. Самая большая из них группа С (*Sh. boydii*) включает в себя 15 серологически различающихся типов, группа А (*Sh. dysenteriae*) — 10 серотипов, группа В (*Sh. flexneri*) — 5 и группа D (*Sh. sonnei*) — 2.

Серологические различия между типами бактерий рода *Shigella* обусловлены химическим строением специфических полисахаридных цепей их соматических антигенов, которые по своей химической природе являются липополисахаридами (ЛПС). К настоящему времени полная химическая структура специфических полисахаридов шигелл установлена для бактерий группы А [3], В [4] и D [5], а также для серотипов 2 [6], 4 [7], 6 [8], 7 [1], 8 [9] и 12 [10] группы С.

Настоящая работа продолжает начатое нами ранее [1] систематическое изучение строения специфических полисахаридов группы *Sh. boydii* и содержит данные о структуре специфической цепи ЛПС *Sh. boydii*, тип 14. ЛПС выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом при нагревании по методике, отличающейся от стандартной. В отличие от метода Вестфала [11], который включает двукратную экстракцию сухих клеток водным фенолом, центрифугирование экстракта для отделения водной фазы с последующим ее диализом и удалением нуклеиновых кислот в виде солей с цетавлоном, мы проводили однократную экстракцию в течение 25–30 мин, исключили стадию разделения водного и фенольного слоев и подвергали диализу суммарный экстракт. Полученный после отделения клеточного материала опалесцирующий раствор был подкислен 50% водным раствором трихлоруксусной кислоты до рН 2,6–2,8 при охлаждении до 5–10°С и образовавшийся осадок был отделен центрифугированием при 15 000 *g* с охлаждением до 4°С. Супернатант после нейтрализации был подвергнут диализу. Полученный таким образом препарат ЛПС содержал не более 2–3% нуклеиновых кислот, и его выход составил 5,7%, что на 15–20% выше

* Предыдущее сообщение см. [1].

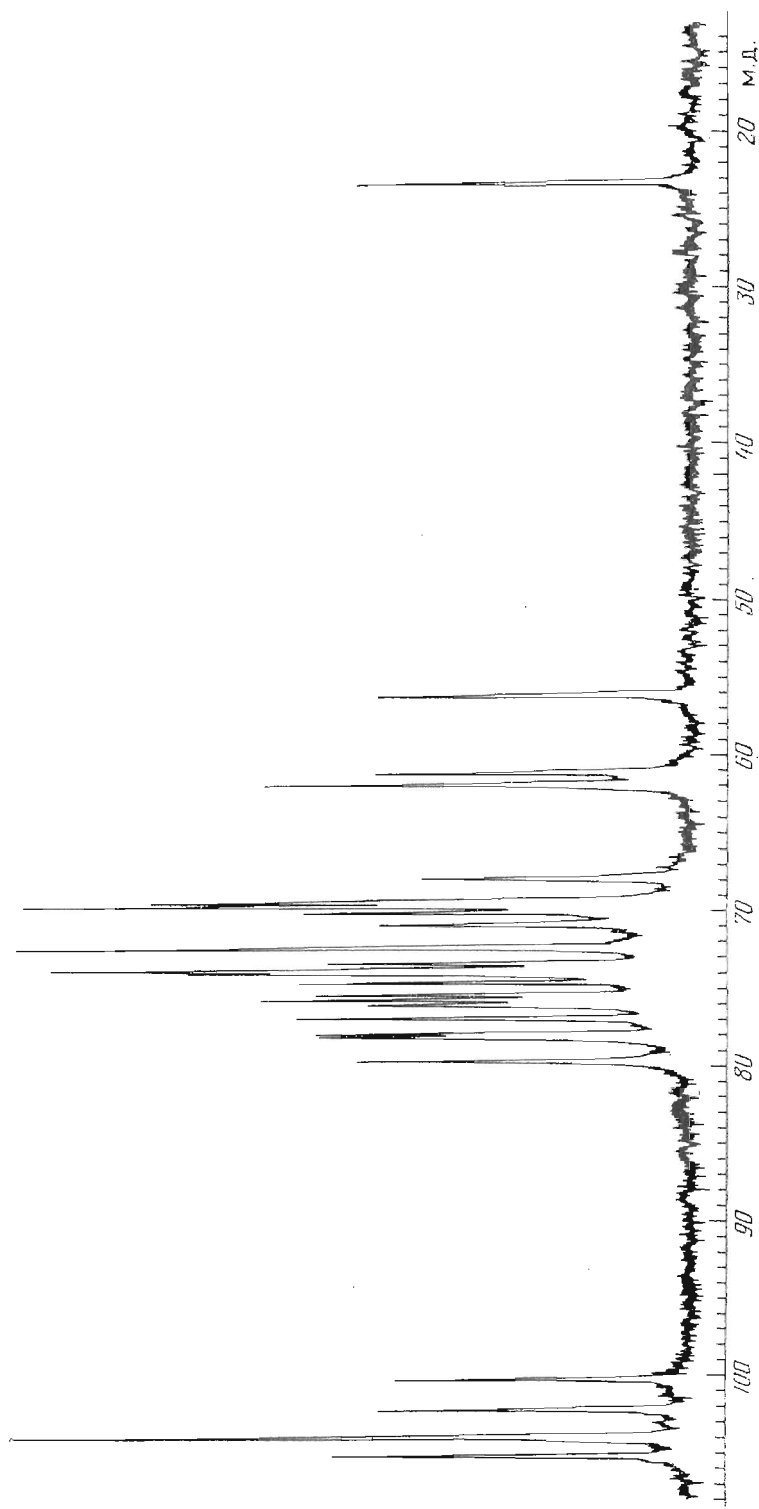


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида ПС1 *Sh. boydii*, тип 14 (в слабом поле спектра имелись сигналы С-О-групп: δ 173,8 и 175,5 м.д.)

Химические сдвиги (δ , м. д.) в спектрах ^{13}C -ЯМР олигосахаридов (II)–(IV) и полисахаридов

Соединения	Остаток моносахарида	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Ссылка	
Дисахарид (II)	GlcAp β 1-6Galp β *	103,75 97,7	74,1 73,1	76,6 73,9	72,75 70,0	76,4 75,0	175,2 70,55		
	GlcAp β -OMe Rhap β 1-6Galp α , β	104,3 97,8	73,8 73,1	76,8 74,2	72,3 70,0	75,6 76,3	174,4 69,5	[17] [18]	
Трисахарид (III)	GlcAp β 1-6Galp β 1-4Galp β α	103,8 105,4 97,6 93,5	74,1 72,5 73,3 69,8	76,6 73,8 74,3 71,0	72,8 69,6 78,4 79,5	77,6 74,8 75,3 70,7	175,4 70,8 61,7 61,9		
	Galp β 1-4Galp α , β	-4-Galp α	93,2	69,7	70,6	79,2	70,5	61,6	[19]
		-4Galp β	97,3	73,1	74,1	78,1	75,1	61,4	[19]
Тетрасахарид (IV)	GlcAp β 1-6Galp β 1-4Galp β 1-4-GlcNAc α p β α	103,8 105,1 103,8 105,7 101,4	73,7 72,2 72,4 57,0 54,6	75,3 73,7 73,9 74,6 70,2	77,9 69,5 78,0 79,9 80,2	76,8 74,5 75,4 75,7 71,2	175,3 70,7 61,7 61,4 61,2		
	Galp β 1-4GlcNAc α p α , β	-4GlcNAc α p β	96,2	57,6	74,9	79,9	76,1	61,3	[20]
		-4GlcNAc α p α	91,6	55,1	70,6	80,1	71,5	61,3	[20]
	Полисахарид ПС1	(-4GlcAp β 1-6Galp β 1-4Galp β 1-4GlcNAc α p β 1-6Galp α 1-) n	103,8 105,1 103,8 102,1 100,1	73,7 72,2 72,2 56,0 69,3	75,3 73,7 73,8 74,5 69,5	77,9 69,5 78,0 79,6 70,0	76,8 74,5 75,9 75,6 69,5	175,1 70,7 61,7 61,0 67,7	
		Специфический полисахарид <i>Sh. boydii</i> , тип 8	-6Galp α 1-	93,6	70,4	69,5	71,2	70,4	69,3
-4GlcAp β 1-			103,8	74,7	75,9	77,4	76,7	174,9	[9]

* Сигналы α -серии имеют низкую интенсивность.

по сравнению со стандартной методикой [11] (по данным УФ-спектра, оба ЛПС содержали одинаковые количества примеси нуклеиновых кислот). Необходимо также отметить, что ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры специфических полисахаридов (см. ниже), полученных из ЛПС, выделение которых проводили по стандартной и модифицированной методике, оказались идентичными.

Для выделения специфического полисахарида раствор ЛПС в 1% уксусной кислоте (2–3 мг/мл) нагревали 1,5–2 ч при 100° С, выпавший осадок липида отделяли центрифугированием, а супернатант хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. В результате был получен высокомолекулярный полисахарид (ПС1) с выходом 22–25% от веса ЛПС и олигосахаридная фракция, которая далее не исследовалась. ПС1 ($[\alpha]_D^{+53}$ (с 2,5; вода), по данным электрофореза на бумаге, оказался кислым с $E_{\text{GAL}} 0,3$. В его ИК-спектре имелись полосы поглощения ацетамидной (1650 и 1570 cm^{-1}) и карбоксильной (1740 cm^{-1}) групп. В спектре ^1H -ЯМР ПС1 присутствовали сигналы пяти аномерных протонов с δ 4,49; 4,50; 4,57; 4,68 м.д. (все с $J_{1,2}$ 7,5 Гц) и 5,41 м.д. ($J_{1,2}$ 3 Гц). В сильном поле спектра имелся трехпротонный синглет при 2,05 м.д., соответствующий CH_3CO -группе.

В спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 1, таблица) присутствовали 27 хорошо разрешенных сигналов; из них три сигнала с удвоенными интегральными интенсивностями и один сигнал, соответствующий трем атомам углерода. О наличии в составе полисахарида ацетамидной группы свидетельствовали резонансные линии при 23,15 и 175,5 м.д., а также сигнал при 56,0 м.д. атома углерода, несущего данную группу. Сигнал при 173,8 м.д. соответствовал атому углерода карбоксильной группы. Аномерная об-

часть спектра содержала четыре сигнала с химическими сдвигами 100,1; 102,4; 103,8 и 105,4 м.д. (сигнал при 103,8 м.д. с удвоенной интегральной интенсивностью) и константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) $J_{H_1-C_1}$ 173,3 Гц для сигнала при 100,1 м.д. и $J_{H_1-C_1}$ 162–163 Гц для остальных сигналов. Из приведенных данных следовало, что в состав повторяющегося звена ПС1 входят пять моносахаридных остатков, один из которых, исходя из значения КССВ, имеет в полисахаридной цепи α -конфигурацию гликозидной связи, а четыре других — β -конфигурацию [12]. Величины КССВ для слабополярных сигналов аномерной области спектра свидетельствовали о пиранозной форме всех моносахаридных компонентов полисахарида (КССВ для фуранозидов имеют значения в области 173–175 Гц). Следовательно, два сигнала единичной интегральной интенсивности при 61,0 и 61,65 м.д. относятся к атомам углерода незамещенных оксиметильных групп пиранозных остатков.

Методом ионообменной хроматографии (углеводный анализатор Technicon) в составе ПС1 были идентифицированы глюкоза и галактоза в соотношении 1:8,5. Аналогичный результат был получен при исследовании гидролизата ПС1 с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Деаминирование гидролизата азотистой кислотой с последующим превращением полученных производных в ацетаты полиолов и их анализ методом ГЖХ [13] показал наличие полных ацетатов сорбита, дульцита и 2,5-ангидроманнита в соотношении 1:10:3,5. 2-Амино-2-дезоксиглюкоза, из которой при деаминировании образовалась 2,5-ангидроманноза, была также идентифицирована с помощью аминокислотного анализатора, и ее количество составило 17,8% (гидролиз 4 М HCl, 100° С, 16 ч). В гидролизате восстановленного по карбоксильным группам [14] ПС1 (ПС2) с использованием ГЖХ после деаминирования и превращения в ацетаты полиолов были обнаружены глюкоза, галактоза и 2-амино-2-дезоксиглюкоза в соотношении 1,1:3:1.

Из приведенных выше данных следовало, что повторяющимся звеном полисахарида является пентасахарид, построенный из остатков глюкуроновой кислоты, 2-ацетида-2-дезоксиглюкозы и трех остатков галактозы.

Для определения абсолютной конфигурации идентифицированных моносахаридов гидролизат ПС1 (2 М HCl, 100° С, 3 ч) после упаривания был обработан 0,5 М раствором триэтиламина в 50% водном метаноле с целью превращения глюкуронолактона в кислоту, которая была выделена ионообменной хроматографией на колонке с анионитом и далее очищена гелевой хроматографией на колонке с TSK HW-40(S). Аналогично с использованием катионита КУ-2 (H⁺) был получен хлоргидрат 2-амино-2-дезоксиглюкозы. Выделение галактозы было проведено препаративной хроматографией на бумаге. По данным измерения значений оптического вращения выделенных таким образом моносахаридов они были отнесены к *D*-ряду.

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был установлен методом метилирования с последующей идентификацией образующихся производных частично метилированных моносахаридов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. В метанолизате метилированного по Хакомори [15] ПС1 после ацетилирования в качестве единственного аминокислотного компонента был обнаружен метил-4-О-ацетил-3,6-ди-О-метил-2-(*N*-метил)ацетида-2-деокси- α,β -*D*-глюкопиранозид, характер фрагментации которого под электронным ударом соответствовал описанному ранее [16]. При гидролизе метилированного ПС1 с последующим превращением в ацетаты частично метилированных полиолов были идентифицированы 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилдульцит и 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилдульцит в соотношении 1:2 (времена удерживания 2,16 и 2,81; здесь и далее относительно 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбита). Для выяснения характера замещения остатка *D*-глюкуроновой кислоты анализу методом метилирования был подвергнут ПС1, восстановленный по карбоксильным группам бордейтеридом натрия [14]. При этом в смеси частично метилированных

ацетатов полиолов наряду с идентифицированными ранее производными *D*-галактозы был обнаружен 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метилсорбит (время удерживания 2,26) в количестве, эквивалентном 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метилдальцитолу. Масс-спектр ацетата частично метилированного сорбита однозначно доказывал характер распределения в нем заместителей и наличие двух атомов дейтерия при C6, что подтверждало происхождение данного производного из остатка *D*-глюкуроновой кислоты.

Для упрощения анализа частично метилированных производных уроновых кислот нами предложен следующий прием. Смесь частично

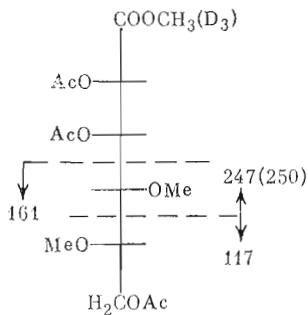


Рис. 2. Фрагментация под электронным ударом метилового эфира 2,3,6-три-*O*-ацетил-4,5-ди-*O*-метил-*L*-гулоновой кислоты (I)

использовании вместо метанола тридейтерометанола, однозначно доказывает взаимное расположение карбметокси-, метокси- и ацетоксигрупп в производном (I).

Из приведенных выше данных следовало, что полисахарид является линейным и построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, в состав которых входят 4-*O*-замещенные остатки 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, *D*-галактозы и *D*-глюкуроновой кислоты, а также два 6-*O*-замещенных остатка *D*-галактозы. Результаты анализа методом метилирования соответствовали данным первичного анализ ¹³C-ЯМР-спектра ПС1. В частности, стало очевидным, что два сигнала единичной интегральной интенсивности при 61,0 и 61,65 м.д. принадлежали атомам C6 4-*O*-замещенных остатков *D*-галактозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы.

Для расщепления ПС1 на олигосахаридные фрагменты с целью выяснения последовательности моносахаридов в цепи был выбран частичный кислотный гидролиз.

Изучение гидролизата ПС1 (0,25 М HCl, 100° С, 1 ч) с помощью электрофореза на бумаге показало, что наряду с небольшим количеством *D*-глюкуроновой кислоты образуются четыре кислых олигосахаридов (олигосахариды (II)–(V)) с подвижностями 0,8; 0,65; 0,53 и 0,45 относительно *D*-глюкуроновой кислоты. Проведение гидролиза более концентрированной кислотой (0,5 М HCl, 100° С) привело к частичному *N*-дезацетилированию и, как следствие, к появлению зон нингидринположительных соединений (нейтральных и основных) при электрофорезе на бумаге. Ионообменная хроматография гидролизата на колонке с дауэксом 1×8 (OAc⁻) в линейном градиенте концентрации уксусной кислоты (0→10%) позволила выделить каждый из олигосахаридов в индивидуальном состоянии (по данным электрофореза на бумаге). Аналогичный результат был достигнут при гель-хроматографии смеси кислых олигосахаридов на колонке с TSK HW40(S), но при существенном сокращении времени разделения (от 2 сут до 5–6 ч).

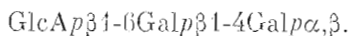
В гидролизате наиболее подвижного олигосахаридов (II) наряду с некоторым количеством исходного соединения были обнаружены *D*-галакто-

за и *D*-глюкуроновая кислота (данные электрофореза и хроматографии на бумаге и ионообменной хроматографии в боратном буфере). *D*-Галактоза исчезала из гидролизата олигосахарида (II) после его обработки боргидридом натрия. Из этих данных следовало, что дисахарид (II) представляет собой (*D*-глюкопиранозилуруновая кислота)-*D*-галактозу.

В спектре ¹H-ЯМР дисахарида (II) с помощью двойного гомоядерного резонанса были идентифицированы сигналы протонов остатка *D*-глюкуроновой кислоты, из анализа расщепления и значений КССВ для которых следовало подтверждение относительной конфигурации данного остатка. Эти же данные позволили установить, что остаток *D*-глюкуроновой кислоты присоединен в дисахариде (II) β-гликозидной связью. В спектре ¹³C-ЯМР дисахарида (II) наряду с шестью резонансными линиями, принадлежащими остатку β-*D*-глюкуроновой кислоты (таблица), присутствовали две серии сигналов, которые относились к замещенному остатку α,β-*D*-галактопиранозы. Отсутствие в спектре олигосахарида (II) резонансных линий в области 61–62 м.д., характерной для незамещенных оксиметильных групп гексапиранозидных остатков, однозначно доказало наличие β1→6-связи между остатками *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-галактозы. Таким образом, дисахарид (II) представлял собой 6-О-(β-*D*-глюкопиранозилуруновая кислота)-α,β-*D*-галактопиранозу.

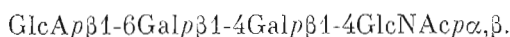
Аналогичным образом было установлено строение олигосахарида (III) ($E_{\text{ГЛСЛ}} 0,65$). В его гидролизате была обнаружена *D*-глюкуроновая кислота (наряду с некоторым количеством дисахарида (II)) и *D*-галактоза, количество которой в гидролизате уменьшилось наполовину после предварительной обработки соединения (III) боргидридом натрия. Отсюда следовало, что продукт (III) представляет собой трисахарид, построенный из остатка *D*-глюкуроновой кислоты и двух остатков *D*-галактозы.

Анализ спектра ¹³C-ЯМР трисахарида (III) показал, что положение резонансных линий, относящихся к атомам углерода незамещенного остатка *D*-глюкуроновой кислоты (таблица), остается неизменным, что доказывает расположение этого остатка на невозстанавливаемом конце трисахарида (III). Аномерная область спектра наряду с сигналом атома C1 остатка *D*-глюкуроновой кислоты (103,8 м.д.) содержала сигнал при 105,4 м.д., относящийся, судя по химическому сдвигу и величине КССВ (см. первичный анализ спектра ПС1), к атому C1 6-О-замещенного остатка β-*D*-галактопиранозы, полное отнесение сигналов которого было проведено с использованием литературных данных для соответствующего модельного соединения (см. таблицу). Наличие в спектре трисахарида (III) двух сигналов единичной суммарной интенсивности при 61,7 и 61,9 м.д., несомненно принадлежащих незамещенным оксиметильным группам остатка α,β-*D*-галактозы, расположенного на восстанавливаемом конце трисахарида (III), доказывало, что данный остаток замещен в положении 4 (см. данные анализа методом метилирования). Полное отнесение сигналов атомов углерода 4-О-замещенного остатка α,β-*D*-галактозы, ставшее возможным после идентификации резонансных линий остатков β-*D*-глюкуроновой кислоты и 6-О-замещенного остатка β-*D*-галактопиранозы, было проведено с использованием литературных данных для соответствующего модельного соединения (см. таблицу). Из приведенных выше данных следовало, что трисахарид (III) имеет строение



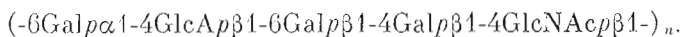
Установление структуры олигосахарида (IV) ($E_{\text{ГЛСЛ}} 0,53$, $[\alpha]_D +37,8^\circ$) было проведено сходным образом. Анализ моносахаридного состава олигосахарида (IV) методом ГЛХ в виде ацетатов полиолов после дезаминирования его гидролизата [13] показал, что он наряду с *D*-глюкуроновой кислотой (данные электрофореза и хроматографии на бумаге) содержит *D*-галактозу и 2-амино-2-дезоксип-*D*-глюкозу в соотношении 1,8:1. Сопоставление результатов ионообменной хроматографии (с помощью ампинокислотного анализатора) гидролизата олигомера (IV) и продукта его восстановления боргидридом натрия позволило установить, что на восстанавливаемом конце олигосахарида (IV) расположен остаток 2-ацет-

амидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы. Это подтверждалось наличием в спектре ^{13}C -ЯМР продукта (IV) двух сигналов единичной суммарной интенсивности при 54,6 и 57,0 м.д., соответствующих атому С2 восстанавливающего остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид- α,β -*D*-глюкозы. β -Конфигурация остатка 4-О-замещенной *D*-галактопиранозы следовала из анализа положения и КССВ резонансной линии, соответствующей атому С1 данного остатка (δ 103,8 м.д., $J_{\text{С1-Н1}}$ 162,3 Гц). Полная расшифровка спектра ^{13}C -ЯМР тетрасахарида (IV) была проведена с использованием спектральных данных для соответствующего модельного соединения (см. таблицу). Таким образом, приведенные выше данные позволяют приписать тетрасахариду (IV) следующее строение:



Олигосахаридная фракция (V) с электрофоретической подвижностью E_{GlcA} 0,45, по данным спектра ^{13}C -ЯМР, представляла собой смесь пентасахаридов и далее не исследовалась.

Из результатов установления строения олигосахаридных фрагментов полисахарида (II)–(IV) с учетом данных анализа ПС1 методом метилирования вытекал очевидный вывод о том, что третий остаток *D*-галактопиранозы (не входящий в состав исследованных олигосахаридов) присоединяется в полисахаридной цепи в положение 4 остатка β -*D*-глюкуроновой кислоты и в свою очередь замещен в положении 6 остатком 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозы. Принимая во внимание тот факт, что из пяти моносахаридных остатков только один имеет α -конфигурацию гликозидной связи, необходимо сделать вывод, что это именно данный остаток 6-О-замещенной *D*-галактопиранозы. Таким образом, повторяющееся звено полисахарида *Sh. boydii*, тип 14, имеет следующее строение:

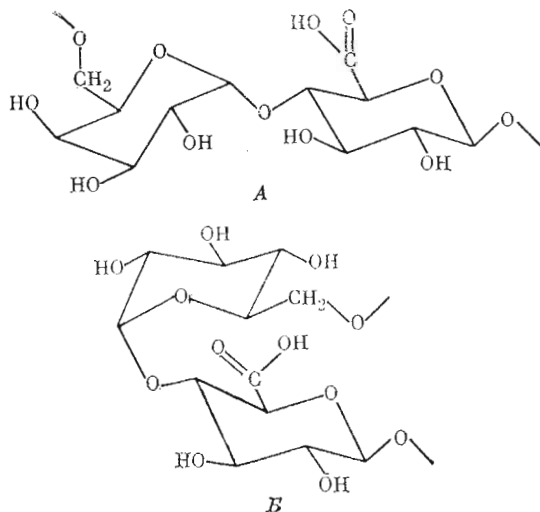


Полная расшифровка ^{13}C -ЯМР-спектров олигосахаридов (II)–(IV) позволила провести отнесение всех сигналов в спектре ПС1, что дало возможность получить независимое подтверждение строения повторяющегося звена полисахарида. Для расшифровки были использованы литературные спектральные данные для модельных соединений (см. таблицу), с помощью которых удалось отнести все резонансные линии, соответствующие 4-О-замещенному остатку β -*D*-глюкопиранозидуроновой кислоты и 6-О-замещенному остатку α -*D*-галактопиранозы.

Обращает на себя внимание необычное положение резонанса оксиметильной группы 6-О-замещенного остатка β -*D*-галактопиранозы в ^{13}C -ЯМР-спектре ПС1 (67,7 м.д.). Такой химический сдвиг характерен для атома С6 остатка гексапиранозы, замещенной α -*D*-сахаром [21], тогда как в случае β -*D*-заместителя данный сигнал обычно расположен в области 69–70 м.д. [21]. Однако восстановление ПС1 по карбоксильным группам приводит к исчезновению в спектре ^{13}C -ЯМР полученного полимера ПС2 сигнала при 67,7 м.д. и появлению нового сигнала при 69,8 м.д. Этот факт указывает на то, что в полисахаридной цепи дисахаридный фрагмент $-6\text{Galpr}\alpha 1\text{-4GlcAp}\beta$ имеет не линейную конформацию А, а замкнутую конформацию В, реализующуюся за счет поворота остатка α -*D*-галактопиранозы вокруг своей гликозидальной связи на $\varphi \leq 90^\circ$. Иными словами, в преимущественной или среднестатистической конформации атомы С6 остатков *D*-глюкуроновой кислоты и 6-О-замещенной α -*D*-галактопиранозы расположены в непосредственной близости*.

Метилирование нативного полисахарида по НООС-группам остатков

* Съемка спектра ПС1 при рН 10 не изменяет положения сигнала при 67,7 м. д., что свидетельствует о незначительной роли водородных связей в стабилизации конформации.



D-глюкуроновой кислоты не изменяет ситуации — триплетный сигнал атома С6 остатка α -*D*-галактопиранозы остается в «необычной» области. Таким образом, причина смещения данного сигнала в «нормальную» область при восстановлении ПС1 по HOOC-группам заключается, по-видимому, в появлении новых протон-протонных взаимодействий (протоны при С6 остатков α -*D*-галактозы и появившихся остатков β -*D*-глюкозы).

Нами было предпринято также сопоставление серологических характеристик ЛПС и некоторых его модифицированных производных с использованием метода торможения реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) (22) с кроличьей антисывороткой к сухим клеткам *Sh. boydii*, тип 14.

Эритроциты барана, сенсibilизированные ЛПС, агглютинировали до разведения антисыворотки 1/6400. Для опытов по торможению было выбрано разведение 1/1600. Торможение РПГА ЛПС наблюдали в концентрациях до 0,035—0,017 мг/мл. Щелочной ЛПС, полученный при обработке нативного препарата водным раствором щелочи (0,5 М NaOH, 56° С, 0,5 ч), тормозил РПГА слабее (0,16—0,08 мг/мл), очевидно, за счет существенно меньшей способности к мицеллообразованию. Метилловый эфир щелочной ЛПС и восстановленный по карбоксильным группам щелочной ЛПС оказались чрезвычайно слабыми ингибиторами и тормозили РПГА одинаково — в концентрациях до 2,5—1,25 мг/мл. В еще более высоких концентрациях реагировал ПС1 — 5,0—2,5 мг/мл, что связано, по-видимому, с его невысокой молекулярной массой (15—20 тыс. по данным гель-хроматографии на колонке с TSK-HW 50(S) с использованием в качестве стандартов соответствующих декстранов).

Из приведенных данных следует заключить, что *D*-глюкуроновая кислота — иммунодоминантный моносахарид О-специфической полисахаридной цепи ЛПС *Sh. boydii*, тип 14, так как именно этот сахар затрагивает описанные модификации полимерной цепи щелочного ЛПС. Естественно также предположить, что положение данного моносахаридного остатка в месте поворота (излома) полисахаридной цепи обеспечивает возможность проявления его иммунодоминантных свойств.

Экспериментальная часть

Электрофорез на бумаге проводили в 0,25 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5, при 7 В/см в течение 100 мин; хроматографию на бумаге Filtrak FN-11 — в системе бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Зоны обнаруживали нилгидрином и щелочным нитратом серебра (реагент А) с последующим нагреванием над паром в случае олиго- и полисахаридов. Гель-хроматографию осуществляли на колонках (3,7×80; 2,5×90 см) с сефадексом G-50 и TSK HW-40(S) в 0,05 М уксусной кислоте. Выходные кривые гель-хроматографии были получены с помощью УФ-детектора (206 нм) и реакции с фенолом и серной кислотой. ГРХ проводили на приборе Pye Unicam, модель 104, используя стеклянную колонку (0,4×150 см), наполненную 3% ECNSS-M на Gas-Chrom (100—200 меш). Для ГРХ-масс-спектрометрии использовали прибор

Varian MAT Слот 111. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР были сняты на приборе Bruker WM 250 при 80°C в D_2O . При съемке ^{13}C -ЯМР-спектров в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (8 50,14 м. д. от ТМС). ИК-спектры сняты на приборе UR-20 в таблетке с KBr. Упаривание проводили в вакууме при температуре ниже 40°C .

Антисыворотку к сухим клеткам *Sh. boydii*, тип 14, получали иммунизацией кроликов в ушную вену сухими бактериальными клетками, суспензированными в стерильном физиологическом растворе. Суспензию (10^{10} клеток/мл) вводили еженедельно в течение 1,5 мес. Кровь брали из ушной вены, полученную сыворотку хранили при -20°C .

Выделение специфического полисахарида. 30 г сухих бактериальных клеток *Sh. boydii*, тип 14, экстрагировали 30 мин при 68°C в 1 л 45% водного фенола, диализовали против проточной воды, фильтровали, упаривали до 500 мл и раствор при $5-10^\circ\text{C}$ подкисляли 50% трихлоруксусной кислотой до pH 2,6–2,8. Выпавший осадок нуклеиновых кислот отделяли центрифугированием при $15\,000g$ (4°C), а супернатант нейтрализовали 10% NaOH на холоду, подвергали диализу против дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход лиополисахарида составил 1,7 г (5,7%). Раствор ЛПС в 300 мл 1% уксусной кислоты нагревали 2 ч при 100°C , отщепившийся липид А отделяли центрифугированием при $105\,000g$ в течение 3 ч, а супернатант после концентрирования лиофилизировали и хроматографировали на сефадексе G-50. Получили 420 мг ПС1, выходящего с удерживаемым объемом колонки.

Для восстановления ПС1 по НООС-группам раствор полимера в сухом диметилсульфоксиде (5–7 мг/мл) обрабатывали эфирным раствором диэтомстана до появления устойчивой желтой окраски и после упаривания эфира хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Полученный таким образом метиловый эфир полисахарида был восстановлен NaBH_4 при pH 7–7,5 [14] и очищен на колонке сефадексом G-50. Выход ПС2 составил 95%.

Определение моносахаридного состава. а) По 2 мг ПС1 и ПС2 гидролизовали 2 М HCl в течение 3 ч при 100°C , упаривали и нейтральные сахара одновременно с аминсахарами идентифицировали методом ГЖХ после дезаминирования как описано ранее [13]. б) Полисахарид (100 мг) гидролизовали 3 ч при 100°C в 50 мл 2 М HCl, упаривали и обрабатывали 0,5 ч 0,5 М раствором триэтиламина в 50% водном MeOH, затем гидролизат последовательно пропускали через колонку с катионитом КУ-2 (H^+ -форма) и анионитом AG-1×8 (CH_3COO -форма), элюируя аминсахарами 0,5 М HCl, а урсную кислоту — 10% уксусной кислотой. Галактоза была выделена препаративной хроматографией на бумаге. Получены D-галактоза с $[\alpha]_D^{20} + 80^\circ$ (с 0,3; вода), хлоргидрат D-глюкозамина с $[\alpha]_D^{20} + 64^\circ$ (с 0,25; вода), D-глюкуроновая кислота с $[\alpha]_D^{20} + 82,2^\circ$ (с 0,1; 0,05 М NaOH).

Анализ полисахарида методом метилирования. 25 мг высушенного над P_2O_5 полисахарида метилировали по методу Хакомори [15]. Через 16 ч после добавления иодистого метила прозрачный раствор разбавляли небольшим количеством воды и отдували избыток иодистого метила током азота. Полученный раствор хроматографировали на сефадексе G-50. Высокомолекулярную фракцию лиофилизировали. Выход 24 мг. Метилированный полисахарид разделяли на две части. Первую часть подвергали метанолизу (1 М HCl в MeOH, 100°C , 20 ч) с последующим выделением на колонке с катионитом КУ-2 (H^+ -форма). Метилглюкозиды нейтральных сахаров элюировали 35 мл 50% водного метанола, а метилглюкозиды аминсахаров — 5% раствором аммиака в 50% водном метаноле, щелочной элюат упаривали досуха, сушили в эксикаторе и ацетилировали 2 ч при 100°C в пиридине уксусным ангидридом, а затем исследовали методом хроматомасс-спектрометрии.

Вторую часть метилированного полисахарида нагревали 2 ч при 100°C с 2 мл 85% муравьиной кислоты, упаривали, остаток нагревали 16 ч при 100°C с 2 мл 0,25 М HCl и упаривали. Гидролизат восстанавливали NaBH_4 (4 ч), обессоливали катионитом КУ-2 (H^+ -форма), H_2BO_3 удаляли упариванием с метанолом, остаток ацетилировали (30 мин при 100°C) и исследовали методом хроматомасс-спектрометрии. Затем эту смесь разделяли на две части: первую часть нагревали 16 ч при 100°C в 1 М HCl в метаноле, остаток после упаривания и ацетилирования исследовали методом хроматомасс-спектрометрии. Вторую часть смеси ацетатов частично метилированных поллюлов обрабатывали 1 М HCl в дейтерометаноле в тех же условиях и далее после ацетилирования исследовали методом хроматомасс-спектрометрии.

Частичный кислотный гидролиз полисахарида. 130 мг полисахарида нагревали 1 ч в 50 мл 0,25 М HCl при 100°C . Гидролизат упаривали до небольшого объема и наносили на колонку ($20 \times 0,8$ см) с анионитом AG 1×8 (OAc⁻-форма). Нейтральные компоненты элюировали 50 мл воды, а затем в линейном градиенте концентрации (0→10%) уксусной кислоты были выделены олигосахариды (II) — (V) с подвижностями E_{RGL} 0,8; 0,65; 0,53 и 0,45. Выход дисахарида (II) ($[\alpha]_D^{20} + 41,3^\circ$; с 0,25; вода), трисахарида (III) ($[\alpha]_D^{20} + 21,6^\circ$; с 0,3), тетрасахарида (IV) ($[\alpha]_D^{20} + 37,8^\circ$; с 0,5; вода) составил 4,2; 8,6 и 13,2 мг соответственно. Олигосахариды (II) и (III) восстановили NaBH_4 , и после обычной обработки гидролизовали 2 М HCl 3 ч при 100°C , упаривали и исследовали методом ГЖХ в виде ацетатов поллюлов. Олигосахарид (IV) (0,81 мг) растворяли в 2 мл 0,3 М NaOH и разделяли на две равные части. Первую часть обрабатывали 16 ч 12 мг NaBH_4 , прибавляли 3 мл 5% уксусной кислоты и упаривали, а вторую часть обрабатывали 3 мл 5% уксусной кислоты, прибавляли 12 мг NaBH_4 , и использовали в качестве контроля. Оба образца гидролизовали 4 М HCl 16 ч при 100°C , упаривали и исследовали с помощью аминокислотного анализатора BC-200.

1. Львов В. Л., Шашков А. С., Дмитриев В. А. // Биоорган. химия, 1987. Т. 13. № 2. С. 223-233.
2. Ewing W. H., Carpenter P. // Int. S. Syst. Bacteriol. 1966. V. 16. P. 145-159.
3. Дмитриев В. А., Кочетков И. К. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. № 3. С. 765-768.
4. Lindberg B., Lönnngren S., Ruden U., Simmons D. A. R. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 32. № 1. P. 15-18.
5. Kenne L., Lindberg B., Petersson K. // Carbohydr. Res. 1980. V. 78. № 1. P. 119-126.
6. Lvov B. L., Dashunin V. M., Ramos E. L., Shashkov A. S., Dmitriev V. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1983. V. 124. № 1. P. 141-149.
7. Львов В. Л., Тохтамышева И. В., Дмитриев В. А., Кочетков И. К., Гофман И. Л. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 1. С. 1842-1850.
8. Dmitriev V. A., Vackinowsky L. V., Lvov V. L., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Khomenko N. A. // Carbohydr. Res. 1975. V. 41. № 1. P. 329.
9. Львов В. Л., Тохтамышева И. В., Шашков А. С., Дмитриев В. А., Кочетков И. К. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 60-73.
10. Львов В. Л., Лапина Е. Б., Плужникова Г. Н., Беляя О. В., Шашков А. С., Дмитриев В. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1240-1248.
11. Wcisral O., Jani K. // Methods Carbohydr. Chemistry. V. 5. / Eds Whistler R. L., BeMiller J. M. N. Y. - L.: Acad. Press, 1965. P. 88-91.
12. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. V. 2. № 3. P. 293-297.
13. Дмитриев В. А., Бакиновский Л. В., Львов В. Л., Книрель Ю. А., Кочетков И. К., Хоменко И. А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 5. С. 1168-1172.
14. Дмитриев В. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков И. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 10. С. 2335-2338.
15. Копрод Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276-275.
16. Дмитриев В. А., Книрель Ю. А., Шеремер О. К., Кочетков И. К., Гофман И. Л. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 9. С. 1219-1225.
17. Corin P. A. Z., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 8. P. 1212-1223.
18. Бакиновский Л. В., Балаи Н. Ф., Шашков А. С., Кочетков И. К. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 3. С. 464-466.
19. Messer M., Trifonoff E., Sterk W., Collins J. G., Bradburn L. H. // Carbohydr. Res. 1980. V. 83. № 2. P. 327-334.
20. Nunes H. A., Barket R. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 3. P. 489-495.
21. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1984. V. 42. P. 193-225.
22. Иммунологические методы / Ред. Фримель Х. М.: Мир, 1979. С. 113-115.

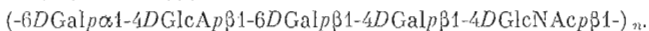
Поступила в редакцию
28.XI.1986

**BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDES. THE STRUCTURE
OF THE POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *SHIGELLA BOYDII*
TYPE 14 LIPOPOLYSACCHARIDE**

L'VOV V. L., YAKOVLEV A. P., PLUZHNIKOVA G. N., LAPINA E. B.,
SHASHKOV A. S.*, DMITRIEV V. A.

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical
Sciences of the USSR; * N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A specific acidic polysaccharide has been isolated from the *Shigella boydii* type 14 antigenic lipopolysaccharide after mild hydrolysis followed by chromatography on Sephadex G-50. The polysaccharide consists of the *D*-glucuronic acid, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose and *D*-galactose residues in the ratio 1:1:3. From the results of methylation analysis and partial acid hydrolysis, the structure of the repeating unit of the specific polysaccharide was deduced as follows:



The ¹³C NMR spectra of native and carboxyl-reduced polysaccharides, as well as of oligosaccharides produced by partial acid hydrolysis fully confirmed the proposed structure. The approach was suggested to determine the type of substitution of uronic acid moieties in polysaccharide chain by use of chromato-mass-spectrometry of acetylated methyl esters of partially methylated aldonic acids. Serological characteristics of *Sh. boydii* LPS type 14 and its modified derivatives are discussed.