



УДК 579.842.23'112.7'314.6

© 1990 г.

Т. Ф. Соловьева, С. И. Бахолдина, И. М. Ермак,
В. А. Хоменко, Л. И. Федорьева, О. Д. Поникова,
Г. М. Фролова, Г. Н. Духацкая, Ю. С. Оводов

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА ЭНДОТОКСИНА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР, Владивосток

Показано, что в состав эндотоксина из *Yersinia pseudotuberculosis* входят два полипептида с молекулярной массой 40 и 14,5 кДа (по данным SDS-ПААГ-электрофореза) в отношении 4 : 1 (по весу). При обработке эндотоксина 0,25% дезоксихолатом натрия при 37° С с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-200 выделен в индивидуальном состоянии белок 40 кДа. При прямом сравнении полученного белка с олигомерной формой иерсинина (порина из наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба) методами SDS-ПААГ-электрофореза, скоростной седиментации, реконструкции в бислойной липидной мембране, химического и иммунохимического анализа установлена их идентичность. Обнаружено, что после обработки эндотоксина дезоксихолатом натрия сохраняются комплексы молекул ЛПС и белка.

Комплексы липополисахаридов с белками (ЛПБК), выделяемые из грамотрицательных бактерий, известны под названием «эндотоксины» [1]. Если липополисахаридный компонент эндотоксина исследуется чрезвычайно активно на протяжении уже нескольких десятилетий, то изучению белкового компонента посвящено сравнительно немного работ. Особое внимание исследователей привлекают вопросы, касающиеся вклада белка в биологическую активность эндотоксинов [2, 3], природы связи между белком и ЛПС [4], собственных биологических свойств белкового компонента [5, 6].

Принципиален также вопрос о том, какие именно белки наружной мембраны входят в состав ЛПБК. Недавно из нескольких видов энтеробактерий был выделен сравнительно непрочный комплекс, R-ЛПС-белок, частично диссоциирующий на компоненты в процессе экстракции, в состав которого входит лишь один белок [7]. Близкое подобие ряда физико-химических характеристик белка из этих комплексов и порина из *E. coli* позволило авторам сделать заключение об их идентичности. Однако молекулярная организация белков в составе комплексов из энтеробактерий установлена не была [7].

Как известно, в эндотоксине белковый компонент прочно связан с ЛПС и представляет собой сложную (до 12 полипептидов) смесь белков [8]. К тому же белковый состав эндотоксина может усложняться примесными белками, не связанными с ЛПС в наружной мембране. Поэтому исследование белкового компонента ЛПБК тормозятся рядом методических трудностей, связанных с выделением его из эндотоксина и последующим фракционированием на составляющие полипептиды.

Данная работа посвящена выделению, характеристике и выяснению молекулярной организации белкового компонента эндотоксина из псевдо-

Сокращения: ЛПС — липополисахарид, ЛПБК — липополисахарид-белковый комплекс, БЛМ — бислойная липидная мембрана, КДО — 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота, SDS — додецилсульфат натрия, SDS-ПААГ-электрофорез — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS.

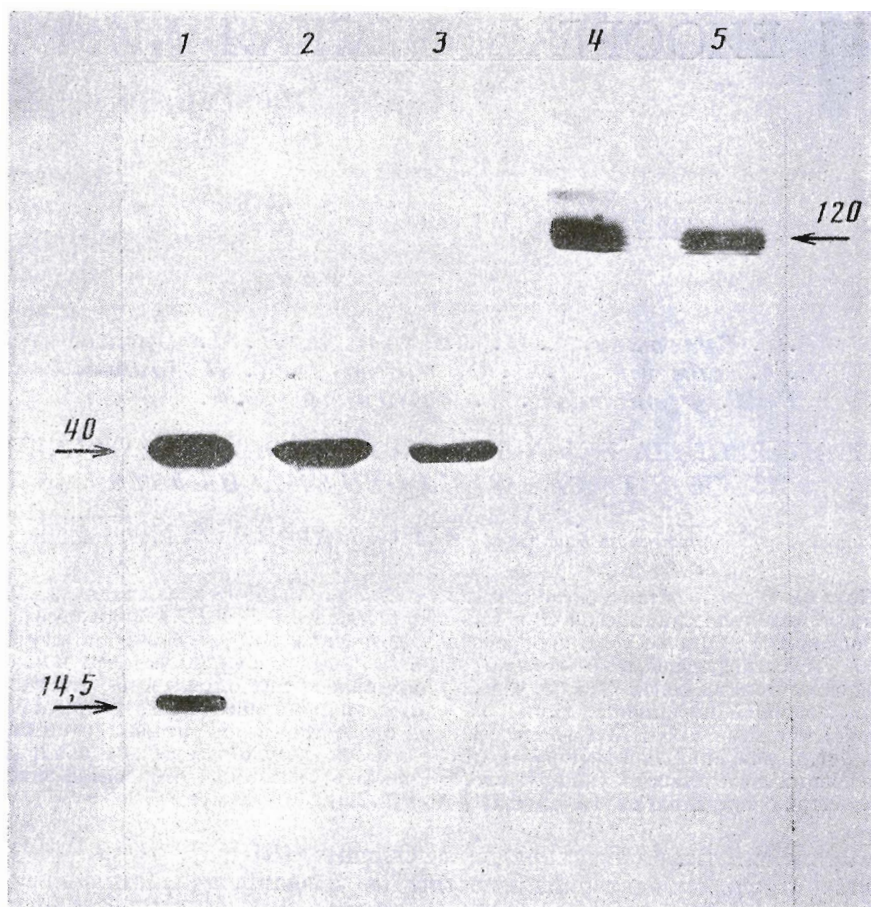


Рис. 1. SDS-ПААГ-электрофорез эндотоксина (1), белка 40 кДа (пик I рис. 2а) из ЛПБК (2, 4), олигомера псевдоперсинина (3, 5). Образцы 1—3 прогреты в течение 5 мин при 100°С, 4—5 — в течение 2 ч при 37°С. Показано положение маркерных белков и их молекулярная масса (кДа). Проявление кумасси G-250

туберкулезного микроба, а также решению методических вопросов, связанных с разделением компонентов ЛПБК.

Ранее нами было показано, что культивирование *Y. pseudotuberculosis* при низкой температуре приводит к уменьшению числа белков в наружной мембране этого микроорганизма [11]. Поэтому для выделения эндотоксина использовали клетки псевдотуберкулезного микроба, выращенные при 4°С. Эндотоксин был экстрагирован из клеток *Y. pseudotuberculosis* раствором трихлоруксусной кислоты по методу Буавена [9] и очищен хроматографией на сефарозе 2В [10]. Он содержит моносахариды (36%), белок (21%), КДО (6%). При равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия эндотоксин собирается в одной зоне с плотностью 1,41 г/см³ и, таким образом, представляет собой комплекс ЛПС и белка.

Полученный эндотоксин, по данным SDS-ПААГ-электрофореза, содержит два полипептида с молекулярными массами 40 и 14,5 кДа в отношении 4 : 1 (по весу) (рис. 1).

Для разделения ЛПБК на компоненты был использован подход, который обычно применяется для выделения белков из мембранных липид-белковых комплексов [12]. В этом случае комплекс обрабатывают детергентом в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования, что вызывает диссоциацию комплекса и образование смешанных мицелл: липид — детергент и белок — детергент, которые затем фракционируют [12].

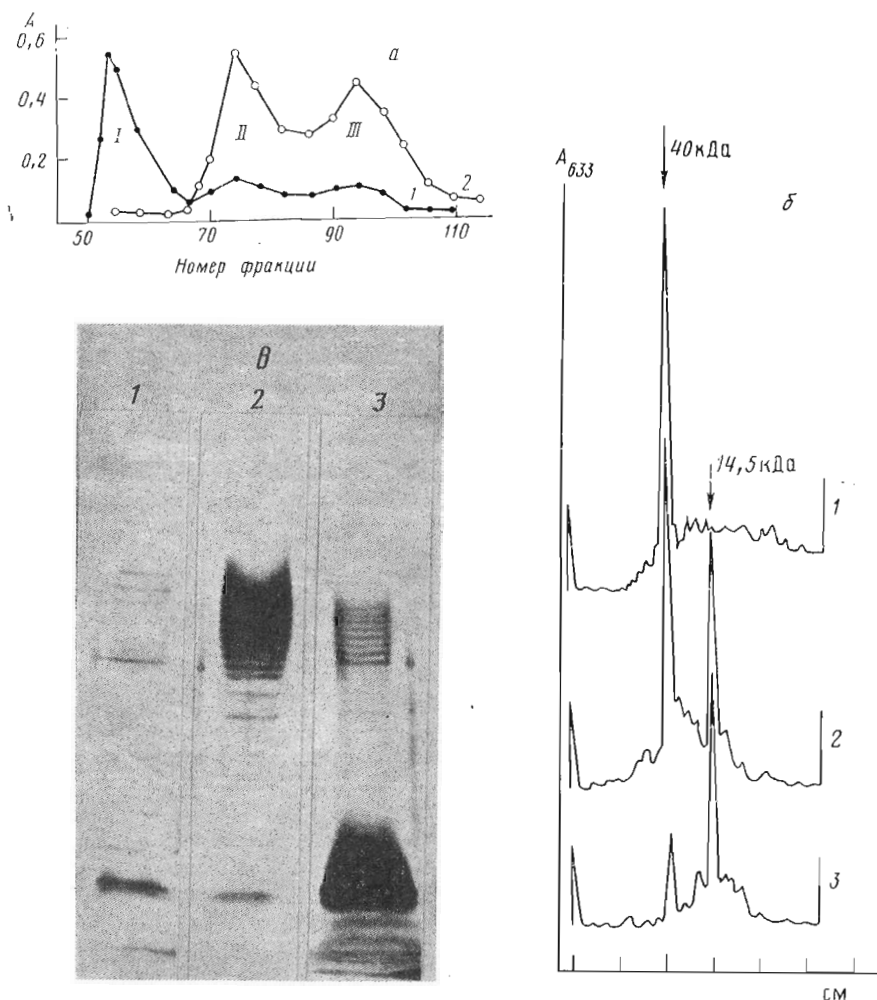


Рис. 2. Гель-хроматография на сефадексе G-200 эндотоксина в присутствии 0,25% дезоксихолата натрия. *a* — анализ фракций на белок (I) и КДО (II). Анализ SDS-ПААГ-электрофорезом полученных фракций: *б* — денситограмма гелей, окрашенных кумасси G-250; *в* — окрашивание ионами серебра. Пик I (I), пик II (2), пик III (3). Для электрофореза были взяты фракции, соответствующие максимумам пиков (I—III)

ЛПБК выдерживали в растворе 0,25% дезоксихолата натрия при 37° С в течение ночи и затем фракционировали на сефадексе G-200 в присутствии детергента.

Часть белка 40 кДа (46%) выходит сразу за свободным объемом колонки пиком I (рис. 2*a, б*). Оставшееся количество белкового компонента ЛПБК элюируется с колонки вместе с ЛПС в последующих двух пиках, которые различаются по содержанию белка и количественному белковому составу (рис. 2*a, б*). Так, во втором пике преобладает белок 40 кДа, в третьем — белок 14,5 кДа. Соотношение белков 40 и 14,5 кДа для пиков II и III составляет 1,9 и 0,6 (по весу) соответственно; общее содержание белка во втором выше, чем в третьем (рис. 2*б*).

Наряду с фракционированием белка в этих условиях происходит разделение липополисахаридного компонента по длине O-специфической полисахаридной цепи (рис. 2*a, в*). Судя по мольному отношению маннозы к гептозе, моносахаридов, входящих в O-специфический полисахарид и кор ЛПС, средняя длина O-цепи во втором пике составляет 16, а в третьем — 2 повторяющихся пентасахаридных звена.

Такое поведение ЛПС в данных условиях не является неожиданным, оно было описано ранее [13]. Более того, свободный ЛПС, выделенный из псевдотуберкулезного микроба, после обработки 0,25% дезоксихола-

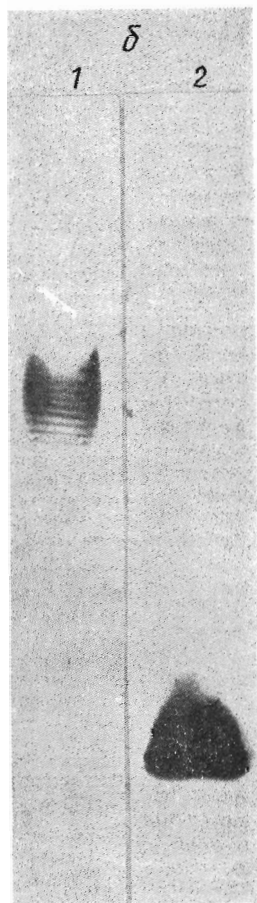
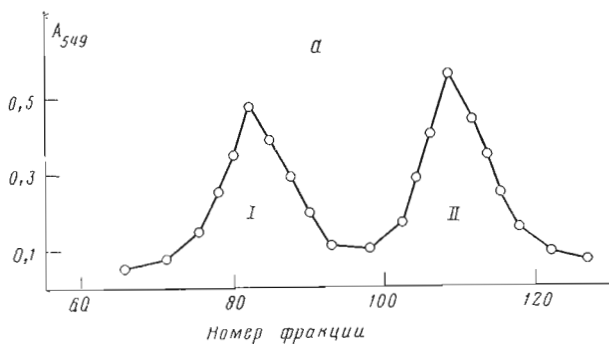


Рис. 3. Гель-хроматография ЛПС на сефадексе G-200 в присутствии 0,25% дезоксихолата натрия. Фракции анализировали на KDO (а) и SDS-ПААГ-электрофорезом: 1 — фракция, соответствующая максимуму пика I, 2 — пика II; окрашивание ионами серебра (б)

том натрия также был разделен на сефадексе G-200 на два пика, различающихся по числу повторяющихся олигосахаридных звеньев (рис. 3а, б) (16 и 2 звена, согласно анализу). При сравнении результатов гель-хроматографии с помощью SDS-ПААГ-электрофореза были обнаружены различия в составе фракций свободного ЛПС и ЛПС-компонента эндотоксина (рис. 2в, 3б). Для свободного ЛПС наблюдается четкое фракционирование по длине О-полисахаридной цепи. При разделении эндотоксина во фракции молекул ЛПС с длинными О-цепями попадает часть молекул с укороченной О-цепью, и наоборот. Наблюдаемые различия, вероятно, объясняются наличием прочной связи между ЛПС и белком: белок «удерживает» ЛПС в составе комплекса и «препятствует» его фракционированию. Подтверждением может служить то, что в пике I (рис. 2а) наряду с белком 40 кДа присутствует в небольшом количестве (до 10%, исходя из содержания KDO) ЛПС, большая часть которого, по данным SDS-ПААГ-электрофореза, имеет короткую О-цепь (рис. 2в).

Таким образом, даже после обработки эндотоксина дезоксихолатом натрия, по-видимому, сохраняются комплексы молекул ЛПС и белка.

Выделенный из эндотоксина белок 40 кДа по молекулярной массе, определенной SDS-ПААГ-электрофорезом, совпадает с белком-поринном, иерсинином, полученным ранее из внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* [14]. Эксперименты по реконструкции этого белка в БЛМ показали наличие у него порообразующей активности, аналогичной активности иерсинина (рис. 4). Дальнейшее сравнение этих белков проводили с помощью химического анализа. Оба белка имеют близкий аминокислотный состав (таблица) и в качестве N-концевой аминокислоты аланин. Эти белки в денатурированном состоянии расщеплялись трипсином на 9 полипептидов каждый. Пептидные карты сравниваемых белков подобны (рис. 5),

а N-концевой анализ триптического гидролизата в обоих случаях показал одинаковый набор аминокислот (Ala, Glu, Lys, Pro, Arg, Gly, Asp, Ile, Phe). Вышеприведенные данные доказывают идентичность белка 40 кДа из эндотоксина и иерсинина.

Известно, что иерсинин, как и порины других бактерий, в нативной мембране находится в виде тримеров [14]. Чтобы определить молекулярную организацию белка 40 кДа из эндотоксина, было проведено прямое сравнение его с тримером иерсинина несколькими методами.

Оба белка при электрофорезе в SDS-ПААГ без предварительного кипячения образцов давали идентичную картину: в области 120 кДа были обнаружены 3—4 близко расположенные полосы (рис. 1). Недавно аналогичные электрофореграммы были получены для тримера порина из *E. coli* [15]. Наблюдаемая множественность полос на фореграммах, как полагают, вызвана присутствием в белках-поринах связанного ЛПС [15]. Кроме того, при обработке ЛПБК сшивающим агентом диметилсуберимидатом с последующим SDS-ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях (образец ЛПБК после «сшивки» прогревали 5 мин при 100° С) обнаружена полипептидная зона в области 120 кДа.

Сравниваемые белки показали также аналогичное поведение при скоростной седиментации. При варьировании скорости центрифугирования от 20 000 до 50 000 об/мин и концентрации белка от 0,1 до 0,6 мг/мл наблюдается одна полоса, что свидетельствует о гомогенности выделенного белка 40 кДа. Он имеет константу седиментации 7,2S. Слабовыраженная зависимость коэффициента седиментации от концентрации и ее линейный характер (рис. 6, 1) указывают на отсутствие ассоциации между молекулами белка и позволяют предполагать глобулярную организацию

его в растворе [16, 17]. Тример иерсинина имеет близкое значение константы седиментации и аналогичный характер ее концентрационной зависимости (рис. 6, 2).

Ранее нами показано, что иерсинин из псевдотуберкулезного микроба содержит два типа детерминантных групп: термолabileльные, присущие тримерной форме белка и формирующиеся на уровне четвертичной структуры (составные детерминанты), и термостабильные, не связанные с третичной структурой иерсинина [18]. В денатурированной форме иерсинина присутствует только последний тип детерминант. Для выяснения молекулярной организации порина из эндотоксина была изучена его способность связываться с антителами к иерсинину. Как видно из результатов ингибирования реакции связывания тримера иерсинина с гомологичной антисывороткой (рис. 7a), эндотоксин имеет полную антигенную

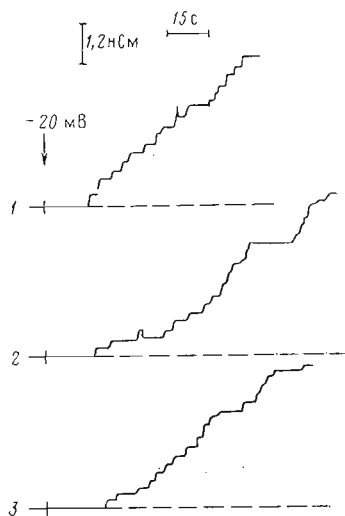


Рис. 4. Флуктуация тока через БЛМ в присутствии 0,1 мкг/мл олигомера иерсинина (1), белка 40 кДа из ЛПБК (2) и ЛПБК (3)

Аминокислотный состав белка 40 кДа, белка из ЛПБК и иерсинина

Аминокислота	Количество аминокислотных остатков	
	белок 40 кДа	иерсинин [14]
Asp	46	47
Thr	17	20
Ser	31	27
Glu	22	36
Pro	12	13
Gly	58	45
Ala	38	29
Val	23	18
Met	2	4
Ile	15	15
Leu	22	25
Tyr	16	16
Phe	16	18
Lys	21	20
His	4	4
Arg	10	12
Trp	2	2
Cys	—	—
Всего	355	355

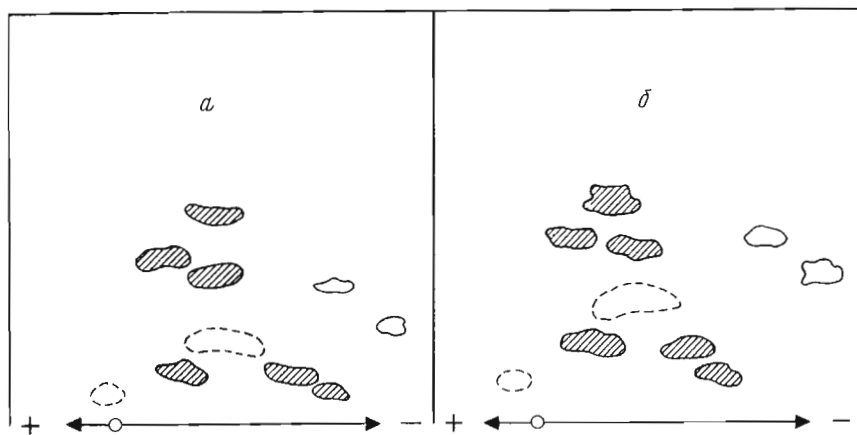


Рис. 5. Пептидные карты продуктов триптического гидролиза иерсинина (а) и белка 40 кДа из ЛПБК (б) (условия см. «Экспер. часть»)

идентичность с иерсинином, т. е. содержит как составные, так и термостабильные эпитопы. Олигомерная структура белка из ЛПБК подтверждена также результатами ингибирования реакции связывания тримера иерсинина с антителами к составным эпитопам белка (антисыворотка к тримеру иерсинина, истощенная денатурированными иерсинином) (рис. 7б).

Эксперименты по реконструкции в БЛМ порина из ЛПБК и олигомерной формы иерсинина показали наличие идентичных проводящих пор в обоих случаях (рис. 4). ЛПБК так же, как и изолированный порин, обладает порообразующей активностью. Как видно из рис. 4, флуктуации тока, вызванные ЛПБК, аналогичны флуктуациям тока через БЛМ

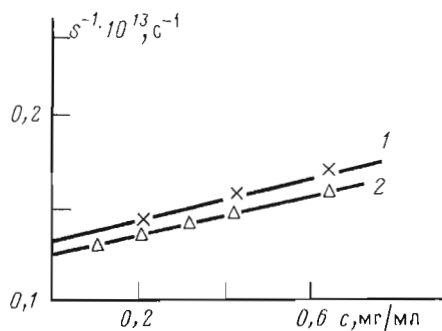


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость константы седиментации от концентрации в буфере с 0,25% SDS для белка 40 кДа из ЛПБК (1) и олигомера иерсинина (2)

Рис. 7. Ингибирование реакции связывания иерсинина с гомологичной антисывороткой I (а) и антисывороткой II (б) (см. «Экспер. часть») олигомером иерсинина (1), ЛПБК (2), денатурированной формой иерсинина (3), белком 40 кДа из ЛПБК (4), ЛПС (5)

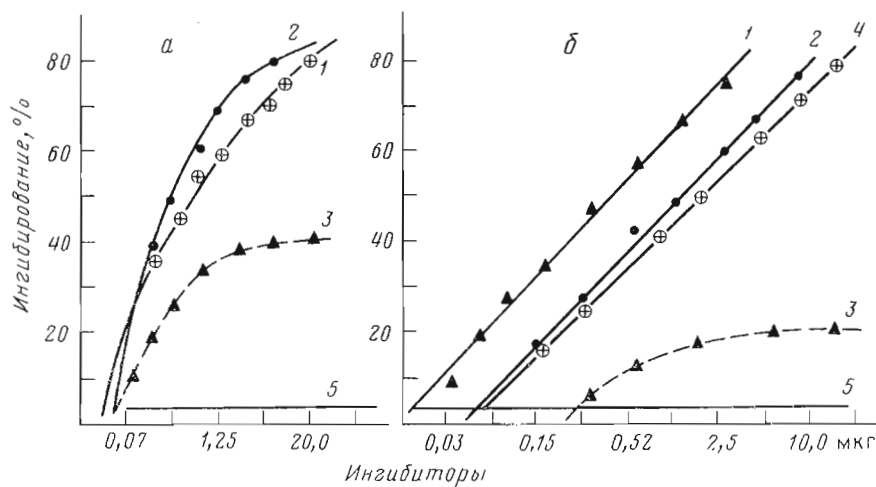


Рис. 7

в присутствии белка 40 кДа из ЛПБК. Следовательно, порообразующая активность эндотоксина обусловлена белком 40 кДа. При реконструкции ЛПБК в БЛМ на фоне изменений тока, характерных для поринов, наблюдаются флуктуации тока, которые могут быть обусловлены другими компонентами комплекса. Следует отметить, что ЛПС в отличие от ЛПБК в тех же концентрациях разрушает липидный бислои. Следовательно, белок модифицирует свойства связанного с ним ЛПС, изменяет характер взаимодействия последнего с бислоем и, как можно полагать, с мембранами животных клеток *in vivo*. Это свойство белка, а также сохранение иерсинином в составе ЛПБК своей функциональной активности, вероятно, может иметь важное биологическое значение.

Таким образом, в состав эндотоксина из псевдотуберкулезного микроба входит основной белок наружной мембраны (иерсинин), являющийся порином, по крайней мере половина которого находится в олигомерной форме.

Экспериментальная часть

Газожидкостную хроматографию моносахаридов, превращенных в ацетаты полиолов, проводили на хроматографе Pye Unicam-104 (Англия) с двойной системой колонок (3% QF-1 на Gas-Chrom G, 100—120 мин, 175—225° С, 5°/мин). Опыты по скоростной седиментации осуществляли на аналитической центрифуге УЦА-60 (СКБ АН СССР) с ультрафиолетовой системой автоматической регистрации при 20° С. Для определения коэффициентов седиментации использовали растворы с концентрацией белка 0,15—0,6 мг/мл в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 7,3) с 0,25% SDS, EDTA.

Скорость вращения ротора варьировали от 20 000 до 50 000 об/мин. Константы седиментации находили экстраполяцией на бесконечное разбавление при скорости седиментации 45 000 об/мин.

Общее содержание нейтральных моносахаридов определяли фенолсернокислотным методом [19], используя в качестве стандарта *D*-глюкозу, концентрацию белка — методом Лоури [20], нуклеиновые кислоты — методом [21], КДО — по методу [22].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-ПААГ-электрофорез) проводили согласно Лэммли [23]. Фракции ЛПС и ЛПБК с колонки смешивали 1 : 1 (по объему) с буфером для образцов и перед нанесением на пластинку кипятили 2 мин. Присутствие в буфере для образцов β -меркаптоэтанола не влияло на вид электрофореграммы. ЛПС, разделенные в геле, окрашивали ионами серебра по методу [24], белки — раствором кумасси G-250 в 3,5% хлорной кислоте [25]. Для определения молекулярной массы полипептидов использовали набор белков-маркеров SDS — 6 Н (Sigma, США). Окрашенные на белок гели сканировали на лазерном денситометре 2202 (ЛКВ, Швеция) при 633 нм. Соотношение белков 40 и 14,5 кДа определяли по площадям соответствующих пиков на денситограмме и допускали, что оба белка на единицу веса связывают одинаковое количество красителя.

Для определения аминокислотного состава образцы иерсинина (2,5—3,0 нмоль) гидролизovali при 110° С в ампулах, заполненных азотом, в 5,7 н. НСl (50 мкл) в течение 24, 48, 72 ч. Анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Количество серина и треонина определяли путем экстраполяции соответствующей кривой к нулевому времени. Содержание триптофана определяли по методу [26]. N-Концевой аминокислотный анализ выполняли согласно работе [27].

Микроорганизм *Y. pseudotuberculosis* 598 (серовар IV) выращивали в течение 18 ч при 4° С как описано нами ранее [11].

Выделение ЛПБК и ЛПС. Высушенную ацетоном микробную массу обрабатывали 5% трихлоруксусной кислотой по методу Буавена [9]. Полученный эндотоксин очищали от сопутствующих примесей гель-фильтрацией на сефарозе 2 В [10]. ЛПС экстрагировали из микробной массы 45% водным фенолом по методу Вестфалья [28] и очищали от нуклеиновых

кислот обработкой рибонуклеазой [29]. Иерсинии в олигомерной форме получали по методике [30].

Гель-хроматографию ЛПС и ЛПБК проводили при 37° С на колонке (2,6 × 66 см) с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl, 0,25% дезоксихолат натрия, 1 мМ EDTA и 0,02% NaN₃. Перед нанесением на колонку образцы ЛПС (40 мг) и ЛПБК (72 мг) выдерживали в течение ночи при 37° С в 3 мл того же буфера. Фракционирование проводили со скоростью 0,3 мл/мин (объем фракции 2,2 мл). Свободный объем колонки, определенный с помощью голубого декстрана (2 кДа, Pharmacia, Швеция), был равен 110 мл.

Триптический гидролиз. Образцы иерсинина и белка 40 кДа из эндотоксина (1 мг) растворяли в 0,01 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,6), добавляли 20 мкг трипсина (Sprofa, ЧСФР) в 20 мкл того же буфера и выдерживали 3 ч при 37° С. Затем добавляли еще 20 мкг трипсина и инкубировали при той же температуре еще 5 ч. Смесь (100—200 мкг) наносили на целлюлозную пластинку размером 20 × 20 см (N 5716, Merck, ФРГ). Электрофорез проводили в буфере с рН 1,9 (уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 8 : 20 : 200) при напряжении 1000 В в течение 50 мин. В направлении, перпендикулярном направлению электрофореза, осуществляли восходящую хроматографию в системе *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 60 : 40 : 12 : 48) в течение 6 ч. Пептиды проявляли 3% раствором нингидрина в ацетоне.

Обработка ЛПБК диметилсуберимидатом. К ЛПБК (1 мг/мл) в 0,05 М боратном буфере, рН 8,9, содержащем 0,1% SDS, добавляли сухой диметилсуберимидат до конечной концентрации 50 мМ. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 ч при энергичном перемешивании. Избыточное количество имидоэфира по окончании реакции разрушали добавлением этилендиамина до конечной концентрации 0,1 М. Полученный образец анализировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза.

Эксперименты с БЛМ. Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали из 0,5% раствора 1-олеилглицерина в *n*-гептане на отверстиях тефлонового стаканчика (0,25 мм) по методу Мюллера. Водная фаза содержала 0,1 М NaCl, 10⁻³ М трис-НСl-буфер (рН 8,0) и ЛПБК и белок 40 кДа из ЛПБК. Заданные концентрации веществ рассчитывали по белку, определенному по Лоури. Измерение тока через БЛМ проводили в режиме фиксации потенциала на мембране на установке и по методике, описанной в работе [14].

Иммунохимические методы. Антисыворотку I к олигомерной форме иерсинина получали иммунизацией кроликов по схеме [18], используя для первой иммунизации концентрацию антигена 2 мг/мл, для повторной — 1 мг/мл. Антисыворотку II к составным эпитопам получали исчерпывающей адсорбцией антисыворотки I ЛПС (обработанным щелочью) и денатурированной формой иерсинина. Полноту истощения контролировали иммуноферментным анализом (ИФА).

При постановке ИФА применяли непрямой вариант метода, используя в качестве видовых антител коммерческие иммуноферментные конъюгаты (Москва). Результаты реакции учитывали на сканирующем спектрофотометре Multiscan (Финляндия) при 492 нм, применяя в качестве хромогена 0,04% раствор *o*-фенилендиамина.

Сенсибилизацию планшетов проводили олигомерной формой иерсинина (1,25 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, рН 9,0, при 37° С в течение 2 ч или при 4° С в течение 18 ч).

В качестве ингибиторов использовали олигомерную и денатурированную формы иерсинина, ЛПС, эндотоксин и белок 40 кДа, выделенный из эндотоксина в количестве 100 нг — 25 мкг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaara M., Nikaido H. // Handbook of endotoxin / Ed. Proctor R. A. Amsterdam, New York, Oxford, 1984. V. 1. P. 1—45.
2. Станиславский Е. С. Бактериальные структуры и их антигенность. М.: Медицина. 1971. С. 161—162, 198.

3. Kurtz R. S., Berman D. T. // *Infection and Immunity*, 1986. V. 54. № 3. P. 728—734.
4. Barbas J. A., Vazquez D., Rodriguez-Tebar A. // *FEBS Lett.* 1985. V. 193. № 2. P. 289—293.
5. Johns M. A., Sipe I. D., Melton L. B., Cabe W. R. // *Infection and Immunity*. 1988. V. 56. № 6. P. 1593—1601.
6. Bjornson B. A., Agura E., Harvey J. M., Johns M., Andrews R. G., Cabe W. R. // *Infection and Immunity*. 1988. V. 56. № 6. P. 1602—1607.
7. Strittmatter W., Galanos C. // *Microbial Pathogenesis*. 1987. V. 2. P. 29—36.
8. Goldman R. C., White D., Leive L. // *J. Immunol.* 1981. V. 127. № 4. P. 1290—1294.
9. Boivin A., Mesrobian L. // *C. r. Soc. biol.* 1933. V. 113. № 21/24. P. 490—492.
10. Solovjeva T. F., Yermak I. M., Bondarenko O. D., Frolova G. M., Ovodov Yu. S. // *Microbios*. 1979. V. 25. № 101—102. P. 133—144.
11. Соловьева Т. Ф., Ермак И. М., Мороз С. И., Красикова И. П., Новикова О. Д., Хоменко В. А., Фролова Г. М., Иванова Е. П., Тимченко Н. Ф., Оводов Ю. С. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. № 5. С. 492—500.
12. Helenius A., Simons K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1975. V. 415. № 1. P. 29—79.
13. Peterson A. A., Groarty E. J. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. № 2. P. 738—745.
14. Лихачуква Г. Н., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биол. мембраны*. 1985. Т. 2. № 12. С. 1219—1224.
15. Roscoe W. J., Coughlin R. T., Groarty E. J. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 9. P. 4003—4010.
16. Barclay A. B., Eason R. // *Biochim. and biophys. acta*. 1972. V. 269. № 1. P. 37.
17. Кантор У., Шиммель П. *Биофизическая химия*. Т. 2. М.: Мир, 1984. С. 248.
18. Новикова О. Д., Фролова Г. М., Вакорина Т. И., Таранкова З. А., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биоорг. химия*. 1989. Т. 15. № 6. С. 763—772.
19. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // *Analyt. Chem.* 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
21. Спири А. С. // *Биохимия*. 1958. Т. 28. № 5. С. 656—662.
22. Burtseva T. I., Glebko L. I., Ovodov Yu. S. // *Anal. Biochem.* 1975. V. 64. № 1. P. 1—4.
23. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
24. Hitchcock P. I., Brown T. M. // *J. Bacteriol.* 1983. V. 154. № 1. P. 269—277.
25. Гааль Э., Медьешу Г., Верейкен Л. *Электрофорез в разделении биологических макромолекул*. М.: Мир, 1982. С. 157.
26. Ichikawa T., Terada H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. № 2. P. 438—444.
27. Gray R. // *Methods in Enzymology* / Ed. Hirs C. H. W. New York, London: Acad. Press, 1967. V. 11. P. 138—151.
28. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // *Z. Naturforsch.* 1952. B. 7b. № 1. S. 142—155.
29. Helander I. M. // *Enterobacterial surface antigens; methods for molecular characterisation* / Eds Korhonen T. K., Dawes E. A., Mäkälä P. H. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1985. P. 269—270.
30. Nurminen M. // *Enterobacterial surface antigens; methods for molecular characterisation* / Eds Korhonen T. K., Dawes E. A., Mäkälä P. H. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1985. P. 297—299.

Поступила в редакцию
1.VII.1989

После доработки
18.I.1990

T. F. SOLOV'YEVA, S. I. BAKHOLDINA, I. M. YERMAK, V. A. KHOMENKO,
L. I. FEDOREYEVA, O. D. NOVIKOVA, G. M. FROLOVA, G. N. LIKHATSKAYA,
Yu. S. OVODOV

THE PROTEIN MOIETY OF ENDOTOXIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*: GENERAL CHARACTERIZATION

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

The protein moiety of endotoxin from *Yersinia pseudotuberculosis* was found to consist of two polypeptides with apparent molecular masses 40 and 14,5 kDa (4 : 1 w/w). The major protein (40 kDa) was isolated from the endotoxin pretreated with sodium deoxycholate by gel chromatography on the Sephadex G-200 column. Comparative study of this protein and oligomeric form of porin from the outer membrane of *Y. pseudotuberculosis* using SDS — PAGE, velocity sedimentation, lipid bilayer experiments, chemical and serological analyses revealed their identity. The deoxycholate treatment of the endotoxin does not affect complexes of the major protein and LPS.