



УДК 577.114.5 : 543.422.23 : 579.842.15.083.3

© 1991 г.

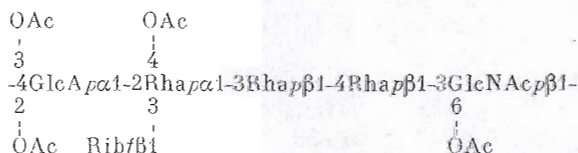
В. Л. Львов, А. П. Яковлев, А. С. Шапков*,
Б. А. Дмитриев

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA*. СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA BOYDII*, ТИП 11*

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва;

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

При мягкой кислотной деградации липополисахарида *Shigella boydii*, тип 11, получен О-специфический полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкуроновой кислоты, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, *D*-рибозы и *L*-рамнозы в соотношении 1 : 1 : 1 : 3. На основании данных анализа методом метилирования, частичного кислотного гидролиза и результатов полной расшифровки спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида установлено строение его повторяющегося звена, которое представляет собой разветвленный гексасахарид:



Локализация большого количества О-ацетильных групп, нестехиометрически замещающих остатки *D*-глюкуроновой кислоты, *L*-рамнозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, проведена с помощью метода спектрометрии ^{13}C -ЯМР.

Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий, располагаясь на поверхности внешней клеточной мембраны, является носителем различных биологических свойств. В частности, полисахаридный компонент ЛПС играет основную роль в активации комплемента по альтернативному пути, специфическом взаимодействии с бактериофагами и проявлении О-антигенных свойств каждого конкретного микроорганизма.

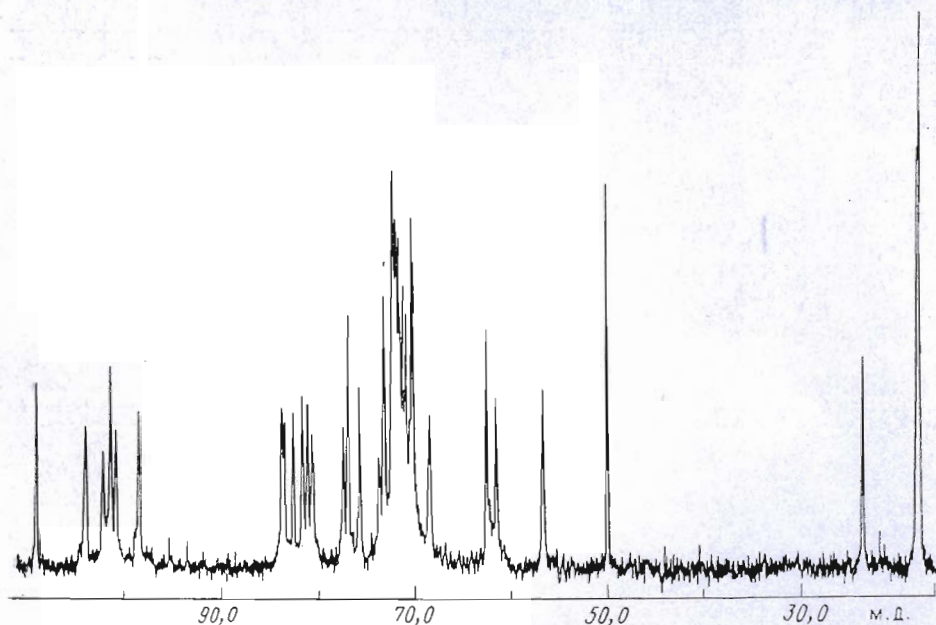
Настоящая работа является продолжением систематического изучения строения О-специфических полисахаридов рода *Shigella* и содержит данные о структуре специфической цепи ЛПС *Sh. boydii*, тип 11.

ЛПС выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией 45% водным фенолом и далее очищен по методике, описанной нами ранее [1, 2]; выход ЛПС составил 6,2%.

Для выделения О-специфического полисахарида раствор ЛПС в 1% уксусной кислоте (2—3 мг/мл) нагревали 2 ч при 100°С, выпавший осадок липида А отделяли центрифугированием, а супернатант после концентрирования хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. В результате с выходом 25—27% был получен высокомолекулярный полисахарид (ПС1), а также олиго- и моносахаридная фракции, которые далее не исследовались. По данным электрофореза на бумаге в пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5 ПС1 был кислым, $E_{\text{GlcA}} = 0,20$.

В гидролизате ПС1 (2 н. HCl, 100°С, 3 ч) методом электрофореза на бумаге был обнаружен кислый компонент с $E_{\text{GlcA}} = 1,0$, а также галактоза с $E_{\text{GlcA}} = 1,0$, который с помощью аминокислотного анализатора был идентифицирован как 2-амино-2-дезоксиглюкоза. Ее количествен-

* Предыдущее сообщение см. [1].



Спектр ^{13}C -ЯМР О-деацетилированного полисахарида (ПС2) (в слабом поле спектра имеются сигналы $\text{C}=\text{O}$ -групп при 175,1 и 175,4 м. д.)

ное содержание было определено с помощью аминокислотного анализатора после кислотного гидролиза ПС1 (4 н. HCl , 100°C , 16 ч) и составило 12,5%.

При дезаминировании гидролизата ПС1 азотистой кислотой [3] с последующим восстановлением NaBH_4 и ацетилированием методом ГЖХ-масс-спектрометрии были идентифицированы ацетаты рамнита, рибита, 2,5-ангидроманинита и сорбита в соотношении 2,7 : 1,0 : 1,0 : 0,1. Для идентификации урановой кислоты ПС1 был восстановлен по карбоксильным группам [4] и далее подвергнут моносахаридному анализу как описано для ПС1. При этом было обнаружено существенное возрастание количества ацетата сорбита, и соотношение приведенных выше ацетатов полиолов стало равным 3,1 : 1,0 : 1,0 : 0,9. Из этих данных следовало, что в состав повторяющегося звена ПС1 входит остаток глюкуроновой кислоты.

По данным измерения значений оптического вращения, глюкуроновая кислота и глюкозамин, выделенные из гидролизата ПС1 ионообменной хроматографией, были отнесены к *D*-ряду. Абсолютная конфигурация *D*-рибозы и *L*-рамнозы, выделенных препаративной ВХ из того же гидролизата, определена методом ГЖХ после их перевода в ацетаты (*S*)-октил-2-гликозидов [5].

^{13}C -ЯМР-спектр ПС1 наряду с рядом сигналов одинаковой интегральной интенсивности, содержал серию минорных сигналов, обусловленных наличием нестехиометрических количеств О-ацетильных групп, о чем свидетельствовало присутствие сигналов при 21,4—21,9 м. д., характерных для метильных групп О-ацетатов.

^{13}C -ЯМР-спектр О-деацетилированного полисахарида (ПС2), полученного при обработке ПС1 раствором триэтиламина при pH 9,5, не содержал резонансных линий в области 21—22 м. д. и соответствовал полностью регулярной структуре полисахарида, построенного из повторяющихся гексасахаридных звеньев. В области резонанса аномерных атомов углерода присутствовало шесть сигналов единичной интегральной интенсивности (см. рисунок и табл. 1) при общем количестве сигналов в спектре — 37. Из анализа спектра ПС2 также следовало, что его повторяющееся звено содержит три остатка 6-дезокситексозы (сигналы CH_3 -групп при 17,7; 17,8 и 17,9 м. д.) и остаток аминсахара (сигнал $\text{C}-\text{NH}$ при 56,7 м. д.), аминогруппа которого ацетилирована (сигналы CH_3CO -группы при 23,5 и 175,4 м. д.). Анализ ^{13}C -ЯМР-спектра ПС2, снятого

Химические сдвиги в спектрах ^{13}C -ЯМР олигосахаридов и полисахаридов

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
OC1	GlcA α 1-	99,1	72,2	73,7	72,8	72,5	174,5
	-2Rha α 1-	100,8	78,0	70,8	73,3	70,5	17,7
	-3Rha α	95,1	72,0	79,0	72,7	69,7	17,9
	β	94,6	*	81,6	*	*	*
OC2	GlcA α 1-	99,1	72,2	73,7	72,8	72,5	
	-2Rha α 1-	101,1	78,0	70,6	73,3	70,6	17,8
	-3Rha β 1-	101,4	71,8	81,8	72,5	73,2	17,9
	-4Rha α	94,9	71,5	70,1	84,0	68,0	17,9
	β	*	*	*	83,6	71,9	17,9
PC3	-4GlcA α 1-	98,6	72,3	72,5	80,4	71,0	
	-2Rha α 1-	100,8	77,3	70,4	73,4	70,4	17,8
	-3Rha β 1-	101,5	71,9	81,8	72,5	73,1	17,8
	-4Rha β 1-	102,1	72,3	74,0	83,8	71,5	17,9
	-3GlcNAc β 1-	104,0	56,9	82,7	68,7	77,1	62,8
PC2	-4GlcA α 1-	98,5	72,0	72,4	80,7	71,0	
	-2,3Rha α 1-	100,9	77,6	81,2	73,4	70,4	17,7
	-3Rha β 1-	101,5	71,8	81,7	72,4	73,2	17,8
	-4Rha β 1-	102,3	72,0	73,8	83,8	71,3	17,9
	-3GlcNAc β 1-	104,0	56,7	82,7	68,6	77,0	62,6
	Rib β 1-	109,2	75,8	70,2	83,6	61,7	

* Сигналы β -серии имели малую интенсивность.

в условиях сохранения спин-спинового взаимодействия атомов углерода с протонами (GD-спектр), позволил также сделать вывод, что сигнал с химическим сдвигом 109,2 м. д. принадлежит атому C1 остатка фуранозы с β -конфигурацией гликозидной связи [6], т. е. остатку β -D-рибозы. Три из остальных пяти сигналов в области резонанса аномерных атомов углеродов, судя по значениям констант спин-спинового взаимодействия (KCCB) $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ (161—163 Гц), принадлежащих сигналам при 101,5; 108,3 и 104,0 м. д., относятся к остаткам пираноз с β -конфигурацией гликозидного центра, а два других (при 98,5 и 100,9 м. д. с KCCB, равной 173,3 Гц) — к остаткам пираноз с α -конфигурацией [7]. Наличие в спектре сигналов при 62,0 и 62,5 м. д. (триплеты в GD-спектре), характерных для назамещенных гидросиметильных групп остатков гексопираноз и пентафураноз, указывало на то, что остатки 2-ацетида-2-дезоксид-D-глюкозы и D-рибофуранозы не замещены по C6 и C5 соответственно.

Таким образом, из приведенных данных следовало, что повторяющимся звеном PC1 является гексасахарид, построенный из остатков D-глюкуроновой кислоты, 2-ацетида-2-дезоксид-D-глюкозы, D-рибозы и L-рамнозы.

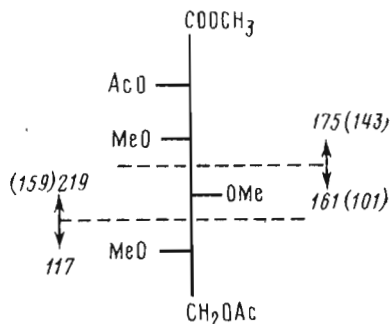
Характер замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был установлен на основании данных анализа PC2 методом метилирования. Метилированный по Хакомори [8] PC2 был подвергнут гидролизу, восстановлению NaBH_4 , метанолизу и ацетилированию. При этом методом ГЖХ-масс-спектрометрии были идентифицированы 1,4-ди-O-ацетил-2,3,5-три-O-метилрибит, 1,4,5-три-O-ацетил-2,3-O-метилрамнит, 1,3,5-три-O-ацетил-2,4-ди-O-метилрамнит, 1,2,3,5-тетра-O-ацетил-4-O-метилрамнит, метиловый эфир 1,4,5-три-O-ацетил-4,6-ди-O-метил-L-гулоновой кислоты (производное, образовавшееся из частично метилированной D-глюкуроновой кислоты) и 1,3,5-три-O-ацетил-2-дезоксид-4,6-ди-O-метил-2-(N-метил)ацетамидосорбит в эквимолекулярных количествах. Из этих данных следовало, что полисахарид разветвлен, причем на концах разветвлений расположены остатки D-рибофуранозы; а в узлах — остатки 2,3-ди-O-замещенной L-рамнопиранозы; кроме того, повторяющееся звено PC1 содержит 3-O-замещенные остатки L-рамнопиранозы и 2-ацетида-

2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы, а также 4-О-замещенные остатки *L*-рамнопиранозы и *D*-глюкопиранурановой кислоты.

Для выяснения размера боковой цепи и места присоединения остатка β -*D*-рибофуранозы ПС2 был подвергнут избирательному расщеплению по фуранозидным связям (0,01 М (COOH)₂, 1 ч, 100 °С). В предварительных экспериментах было показано, что в этих условиях отщепляется рибоза и не происходит заметной деполимеризации полисахарида (данные БХ, ГЖХ и гель-хроматографии на колонке с TSK-50(S)). Модифицированный таким образом полисахарид (ПС3) был выделен с помощью гель-хроматографии на колонке с TSK-50(S). Из анализа его ¹³C-ЯМР-спектра следовало, что отщепилось 80—85% *D*-рибофуранозы (уменьшение интенсивности сигнала 109,2 м. д., соответствующего С1 остатка *D*-рибофуранозы). При изучении ПС3 методом метилирования установлено, что из смеси полученных частично метилированных ацетатов полиолов практически исчез 1,4-ди-О-ацетил-2,3,5-три-О-метилрибит, а вместо 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-4-О-метилрамнита появился 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамнит. Из этих данных следовало, что терминальный остаток β -*D*-рибофуранозы непосредственно присоединяется в положение 3 остатка *L*-рамнопиранозы, расположенной в узле разветвления, и что данный остаток *L*-рамнопиранозы замещен в основной полисахаридной цепи в положение 2. Этот вывод также подтверждается сравнительным анализом ¹³C-ЯМР-спектров ПС2 и ПС3 (см. ниже).

Для определения последовательности оставшихся моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был использован метод частичного кислотного гидролиза. Выбор такого подхода основан на том, что ПС1 содержал, с одной стороны, трудногидролизуемые связи остатков *D*-глюкуроновой кислоты, а с другой — лабильные *L*-рамнозидные связи. Это позволяло надеяться на получение в результате частичного гидролиза набора кислых олигосахаридов с остатком урановой кислоты на невосстанавливаемом конце. Изучение гидролизата ПС2 (0,05 М CF₃COOH, 100° С, 4 ч) с помощью электрофореза на бумаге показало, что основными отрицательно заряженными компонентами являются олигосахариды ОС1, ОС2 и ОС3 с $E_{\text{ГЛС}} = 0,65; 0,45$ и $0,25$ соответственно. Кислые олигосахариды были выделены ионообменной хроматографией на колонке с дауэксом 1 × 8 (ацетатная форма) и далее очищены на колонке с TSK-HW 40(S). Основными компонентами нейтральной фракции являлись *D*-рибоза и *L*-рамноза наряду с небольшими количествами нейтральных олигосахаридов, которые далее не исследовались.

В гидролизате ОС1 были идентифицированы *D*-глюкуроновая кислота и *L*-рамноза. При анализе методом метилирования ОС1, предварительно восстановленного NaBH₄, с последующим гидролизом и дериватизацией по описанному выше способу были идентифицированы 3-О-ацетил-1,2,4,5-тетра-О-метилрамнит, 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамнит



и метиловый эфир 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4-три-О-метил-*L*-гулоновой кислоты, фрагментация которого под электронным ударом представлена на схеме.

Кроме указанных на схеме в спектре присутствует также серия пиков с m/z 305, 263 и 231, обусловленная элиминированием MeOH и CH₂O от

Параметры спектров ^1H -ЯМР олигосахаридов ОС1 и ОС2 (δ , м. д., КССВ, Гц) *

Остаток	H1 ($J_{1,2}$)	H2 ($J_{2,3}$)	H3 ($J_{3,4}$)	H4 ($J_{4,5}$)	H5 ($J_{5,6}$)	H6
ОС1						
GlcA α 1-	5,03д (3,6)	3,59дд (9,5)	3,79т (9,5)	3,58т (9,5)	4,56д	
-2Rha α 1-	5,15д (1,6)	4,09дд (3,4)	3,95дд (9,5)	3,53т (9,5)	3,85дк (6,0)	1,30д
-3Rha α -	5,08д (1,8)	4,00дд (3,4)	3,86дд (9,5)	3,52т (9,5)	3,88дк (6,1)	1,27д
β	4,86д (1,1)	3,94дд (3,5)	3,66дд (9,2)	3,47т (9,2)	3,42дк (6,1)	1,28д
ОС2						
GlcA α 1-	5,03д (3,7)	3,59дд (9,8)	3,78дд (9,4)	3,56дд (9,8)	4,52д	
-2Rha α 1-	5,13д (1,8)	4,09дд (3,5)	3,95дд (9,7)	3,52т (9,7)	3,84дк (6,2)	1,30д
-3Rha β 1-	4,72ус (1)	4,11дд (3,1)	3,67дд (9,5)	3,45-3,53м		1,27д (6,3) **
-4Rha α	5,10д (2,0)	3,97дд (3,3)	3,89дд (9,4)	3,56т (9,4)	3,92дк (6,4)	1,32д
β	4,85д (1,2)	3,98дд (3,5)	3,69дд (9,1)	3,45-3,53м		1,29 (6,3) **

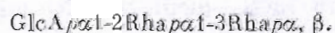
* д — дублет, т — триплет, к — квартет, ус — уширенный синглет, м — мультиплет.
 ** $J_{5,6}$.

Таблица 3

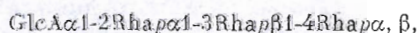
Наблюдаемые ЯЭО (от 3 до 7% в разностных спектрах ЯЭО, где 100% — сигнал облучаемого протона) для ОС2: GlcA α 1-2Rha α 1-3Rha β 1-4Rha α , β

Предоблучаемый протон	H2 (A)	H2 (B)	H2 (C)	H3 (C)	H5 (C)	H4 (D)
H1 (A)	+	+				
H1 (B)		+		+		
H1 (C)			+	+	+	+

$[M + 1]^+$ ($m/z = 337$). Из этих данных следует, что ОС1 — линейный трисахарид, на восстанавливающем конце которого расположен остаток *D*-глюкуроновой кислоты, присоединенный в положение 2 остатка *L*-рамнозы, а на восстанавливающем — 3-О-замещенный остаток *L*-рамнозы. Конфигурация гликозидных связей в ОС1 была установлена методом ^1H -ЯМР-спектроскопии с использованием модифицированной методики селективного гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [9] и подтверждена данными GД-спектра. Параметры полностью расшифрованного ^1H -ЯМР-спектра ОС1 приведены в табл. 2. Таким образом, установлено, что ОС1 имеет следующее строение:



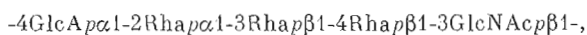
Строение ОС2 было установлено на основании данных ^1H -ЯМР-спектроскопии с учетом данных о строении ОС1. Полное отнесение сигналов в спектре ОС2 было проведено по методике, использованной в случае ОС1 (см. табл. 2). Последовательность и характер замещения моносахаридных остатков в ОС2 были установлены с помощью экспериментов с ядерным эффектом Оверхаузера (табл. 3). Таким образом, строение ОС2 может быть представлено следующим образом:



т. е. отличие ОС2 от ОС1 заключается в появлении в ОС2 восстанавливающего остатка 4-О-замещенной *L*-рамнозы. Строение три- и тетрасахаридов подтвердила полная расшифровка их ^{13}C -ЯМР-спектров, исходя из литературных спектральных данных для соответствующих моносахаридов и эффектов гликозилирования для них [10].

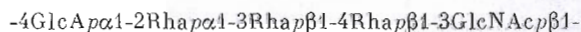
В гидролизате ОСЗ (2 н. HCl, 100° С, 3 ч) были идентифицированы *D*-глюкуроновая кислота, *L*-рамноза и глюкозамин. При анализе гидролизата ОСЗ (4 н. HCl, 100° С, 16 ч), предварительно восстановленного действием NaBH₄, с помощью аминокислотного анализатора идентифицированы глюкозаминитол и глюкозамин в соотношении 1 : 5. Согласно этим данным, ОСЗ представляет собой, по-видимому, смесь двух пентасахаридов с *L*-рамнозой и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозой на восстанавливающих концах. Анализ данных метилирования ПСЗ и характеристики ОСЗ показывал, что 3-О-замещенный глюкозамин расположен в линейной цепи полисахарида. Анализ ¹³С-ЯМР-спектра ПС2 (ПСЗ) позволил определить конфигурацию гликозидной связи этого остатка. Наличие сигнала 56,7 м. д., принадлежащего атому С2 остатка глюкозамина, однозначно указывает на β-конфигурацию его гликозидного центра [11].

Из анализа GD-спектра ПС2 (см. выше) следовало, что только β-конфигурация гликозидной связи 4-О-замещенного остатка *L*-рамнозы соответствует общему балансу α- и β-связанных моносахаридных остатков в полисахаридной цепи. Таким образом, строение повторяющегося звена ПСЗ может быть представлено следующим образом:



Только приведенное выше расположение моносахаридных остатков, конфигурация их гликозидных связей и характер замещения позволяют сделать однозначное отнесение сигналов в ¹³С-ЯМР-спектре ПСЗ, что и было выполнено с использованием результатов полного отнесения сигналов в спектрах ОС1 и ОС2, а также литературных данных для замещенных остатков 2-ацетимидо-2-дезоксид-β-*G*-глюкопиранозы и *D*-глюкуроновой кислоты с учетом эффектов гликозилирования [10] (см. табл. 1).

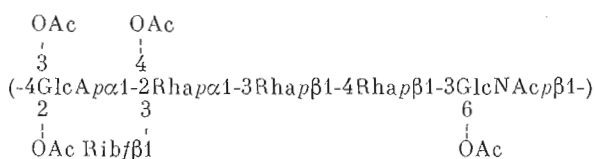
Анализ изменений в спектре ПС2 по сравнению со спектром ¹³С-ЯМР ПСЗ подтвердил замещение по С3 остатка α-*L*-рамнопиранозы остатком β-*D*-рибофуранозы, что было показано ранее сравнительным анализом ПС2 и ПСЗ методом метилирования. Из приведенных выше данных следовало, что повторяющееся звено дезацетилированного ПС2 имеет строение



При анализе ¹³С-ЯМР-спектра ПС2 обращает на себя внимание необычно высокополюсный сдвиг сигнала, соответствующего атому С5 остатка β-*D*-рибофуранозы, — 62,0 м. д., который обычно расположен в области 63—64 м. д. [6]. Исходя из предположения, что наблюдаемый эффект может быть связан с наличием в непосредственной близости от остатка β-*D*-рибофуранозы карбоксильной группы остатка *D*-глюкуроновой кислоты, был снят ¹³С-ЯМР-спектр восстановленного по СООН-группам полисахарида. Анализ области незамещенных оксиметильных групп спектра показал, что все три сигнала остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, *D*-рибозы и *D*-глюкозы (из *D*-глюкуроновой кислоты) находятся в интервале 62,5—62,7 м. д., т. е. существенного слабощольного смещения сигнала С5 остатка β-*D*-рибофуранозы не произошло. Одной из причин аномального положения данного сигнала может быть наличие в разветвленном полисахариде (1 → 2)-гликозидной связи, что предполагает резкий излом полисахаридной цепи в непосредственной близости от остатка β-*D*-рибофуранозида.

При анализе ¹³С-ЯМР-спектра нативного полисахарида ПС1 указывалось на неоднозначный характер О-ацетилирования. Характер локализации О-ацетильных групп в ПС1 был определен из сопоставления ¹³С-ЯМР-спектров ПС1 и ПС2. В области резонанса аномерных атомов углерода спектра ПС1 присутствовал сигнал при 103,1 м. д., соответствующий атому С1 остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозы, который обнаруживался в спектре ПС2 при 104,0 м. д., а остальные сиг-

налы в аномерной области этого спектра сохранили свое первоначальное местоположение. Такое смещение сигнала С1 не могло быть объяснено замещением в самом остатке 2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкопиранозы, так как его сигналы С4 и С6 не смещались в спектре ПС1 по сравнению с ПС2. Оно могло быть следствием О-ацетилирования по С3 в остатке α -D-глюкуроновой кислоты, замещенной по С4 остатком аминсахара. Смещение в сильное поле сигнала С4 остатка уроновой кислоты (от 80,7 м. д. в спектре ПС2 к 79,5 м. д. в ПС1) подтверждает это предположение. Появление в спектре ПС1 сигнала при 95,1 м. д. (50% от интенсивности сигнала 98,5 м. д. в том же спектре) свидетельствовало о том, что около трети остатков α -D-глюкуроновой кислоты О-ацетилировано и по гидроксилу при С2. Примерно 20% остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкозы также О-ацетилировано по гидроксилу при С6 (наличие сигнала при 63,7 м. д. и ослабление сигнала при 62,5 м. д. по сравнению с сигналом при 62,0 м. д.). Возможно наличие небольшого количества (10%) 4-О-ацетилированных остатков α -L-рамнозы (появление в спектре ПС1 слабого сигнала С1 остатка β -D-рибофуранозы со сдвигом 110,3 м. д. наряду с основными интенсивными сигналами при 109,2 м. д.). Таким образом, из всех приведенных выше данных следует, что повторяющееся звено О-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип II, имеет строение



В заключение можно отметить, что О-специфический полисахарид *Sh. boydii*, тип 11, как и все изученные нами ранее О-специфические полисахариды подгруппы *Sh. boydii*, представляет собой гексозаминогликан, содержащий в повторяющемся звене остаток уроновой кислоты. Однако впервые обнаружен полисахарид, построенный из гексахаридных повторяющихся звеньев. По предварительным данным, еще несколько О-специфических полисахаридов *Sh. boydii*, строение которых пока не установлено, имеют гексасахаридную природу. Необходимо также отметить, что, по литературным данным, лишь два штамма из подгруппы *Sh. boydii* имеют серологический перекрест — типы 11 и 10 [12]. В будущем, установив первичную структуру повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 10, мы предполагаем установить, обусловлено ли наличие перекрестной реакции общими элементами структур О-специфических полисахаридов данных микроорганизмов.

Экспериментальная часть

Электрофорез на бумаге проводили в 0,25 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5, при 27 В/см в течение 100 мин; хроматографию на бумаге Filtrak FN11 — в системах бутанол — пиридин — вода, 6:4:3 (А) и метилэтилкетон — уксусная кислота — вода (насыщенная борной кислотой), 9:1:1 (Б). Зоны обнаруживали нингидрином, щелочным нитратом серебра с последующим нагреванием над паром в случае олиго- и полисахаридов, а также анилинфталатом. Гель-хроматографию осуществляли на колонках (2,6 × 30 см) с сефадексом G-50; (1,5 × 75 см) и (1,6 × 80 см) с фрактогелями TSK HW-40(S) и TSK HW-50(S) соответственно в 0,05 М уксусной кислоте. Выходные кривые гель-хроматографии были получены с помощью УФ-детектора (206 нм).

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР были сняты на приборе Bruker AM-300 при 40° С. При съемке ^{13}C -ЯМР-спектров в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ 50,14 м. д. от ТМС). Отнесение ключевых сигналов в спектрах ^1H -ЯМР выполнено с применением методики селективного гомоядерного резонанса в разностном варианте, а величины ЯЭО изме-

рены по методике [13] и рассчитаны в процентах как отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и предоблучаемого протонов в разностном спектре.

Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141. ГЖХ проводили на приборе Pye Unikat, модель 104, используя стеклянную колонку ($0,4 \times 150$ см), наполненную 3% ECNSS-M на Gas-Chrom Q (100—200 меш), а также на приборе Hewlett-Packard, модель 5890, с использованием стеклянной капиллярной колонки (25 м) Ultra 1. Анализ проводили в интервале температур от 150 до 250° С на программе 10°/мин. ГЖХ-масс-спектрометрию выполняли на приборе Finnigan с использованием колонки Ultra 1. Концентрирование водных растворов осуществляли на роторном испарителе при 40° С.

Серологическая активность ЛПС была установлена с использованием метода торможения реакции пассивной гемагглютинации [14] с кроличьей антисывороткой к сухим клеткам *Sh. boydii*, тип 11.

Выделение специфического полисахарида. 30 г сухих бактериальных клеток *Sh. boydii*, тип 11, экстрагировали 30 мин при 68° С в 1 л 45% водного фенола, диализат концентрировали до 500 мл и подкисляли уксусной кислотой до pH 2,8—3. Выпавший осадок нуклеиновых кислот отделяли центрифугированием при 15 000 об/мин (4° С), а супернатант нейтрализовали NaHCO_3 , диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Выход липополисахарида составил 2 г (6,6%). Раствор ЛПС в 300 мл 1% уксусной кислоты нагревали 2 ч при 100° С, отщепившийся липид А отделяли центрифугированием, а супернатант после концентрирования хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Получили 530 мг ПС1, выходящего с удерживаемым объемом колонки.

Получение ПС2 и его восстановление. 150 мг ПС1 растворяли в 50 мл воды, прибавляли 2—3 капли триэтиламина (pH 9,5) и выдерживали 16 ч при 20° С. Раствор обрабатывали КУ-2 (H^+ -форма), упаривали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Получили 135 мг дезацетилированного полисахарида ПС2.

Раствор полимера в сухом диметилсульфоксиде (5 мг/мл) обрабатывали эфирным раствором диазометана до появления устойчивой желтой окраски и после отгонки эфира хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, затем концентрировали и лиофилизовали. Полученный метиловый эфир полисахарида восстанавливали действием NaBH_4 при pH 7—7,5 (добавление борной кислоты) при 0° С в течение 4 ч, раствор подщелачивали до pH 10,5 и после прибавления еще NaBH_4 выдерживали 16 ч. Реакционную смесь нейтрализовали 4 М HCl , хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, упаривали и лиофилизовали. Выход составил 95% от ПС2.

Определение моносахаридного состава. а) Порции по 1,5 мг ПС1 и восстановленного ПС2 гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой 3 ч при 100° С, упаривали и нейтральные сахара идентифицировали методом БХ в системах А и Б, а также, после дезаминирования азотистой кислотой, идентифицировали методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов. 1,5 мг ПС1 гидролизовали 16 ч 4 М HCl при 100° С и исследовали с помощью аминокислотного анализатора. б) 100 мг ПС1 гидролизовали 3 ч в 20 мл 2 М CF_3COOH при 100° С, упаривали досуха, обрабатывали 30 мин 0,5 М раствором триэтиламина в 50% водном метаноле и пропускали через колонку с КУ-2 (H^+ -форма). Нейтральные сахара и уроновую кислоту элюировали водой, а аминосахар — 0,5 М HCl . Водный элюат упаривали и пропускали через колонку с анионитом AG 1 $\times$ 8 (CH_3COO^- -форма), элюируя нейтральные сахара водой, а уроновую кислоту — 10% уксусной кислотой. Затем из водного элюата препаративной бумажной хроматографией в системе А выделяли рамнозу и рибозу. Получены D-глюкуроновая кислота с $[\alpha]_D^{20} +83,1^\circ$ (с 0,15; 0,05 М NaOH) и хлоргидрат D-глюкозамина с $[\alpha]_D^{20} +62,1$ (с 0,31; вода). Навески рамнозы и рибозы растворяли в 0,6 мл (S)-(+)-октанола-2, прибавляли 1—2 капли CF_3COOH , нагревали 15 ч в ампуле при 100° С, упаривали, ацетилировали и анали-

зировали методом ГЖХ в сравнении с заведомыми образцами *L*-рамнозы и *D*-рибозы.

Получение ПСЗ. 120 мг ПС2 нагревали 1 ч при 100° С в 40 мл 0,01 М щавелевой кислоты. Гидролизат упаривали до небольшого объема и хроматографировали на колонке с TSK-HW50(S). Выход ПСЗ составил 85 мг.

Анализ методом метилирования. Навески по 10 мг ПС2 и ПСЗ, высушенные над P_2O_5 , метилировали по методу Хакомори. Через 16 ч после добавления иодистого метила прозрачный раствор разбавляли водой (1 : 1) и удаляли избыток иодистого метила током азота. Полученный раствор хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 и лиофилизовали. Затем образцы гидролизовали 2 М CF_3COOH в течение 1,5 ч при 125° С в запаянной ампуле. Гидролизаты упаривали и обрабатывали $NaBH_4$, а через 16 ч нейтрализовали 2 М HCl , упаривали с водой и толуолом. Остаток растворяли в 15 мл абсолютного метанола, прибавляли при охлаждении 1,35 мл хлористого ацетила, нагревали 2 ч при 100° С, упаривали, остаток ацетилировали и полученные частично метилированные ацетаты полиолов исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Получение олигосахаридов ОС1, ОС2 и ОСЗ. 130 мг и ПС2 нагревали при 100° С 3,5 ч в 45 мл 0,05 М CF_3COOH . Гидролизат концентрировали и пропускали через колонку с анионитом AG 1 × 8 (CH_3COO^- -форма). Нейтральную фракцию элюировали 30 мл воды, а компоненты, содержащие уроную кислоту, — 100 мл 10% уксусной кислоты. Кислотную фракцию после упаривания хроматографировали на колонке с TSK-HW40(S), собирая фракции по 2 мл и анализируя их методом электрофореза на бумаге. Фракции с одинаковой подвижностью объединяли, упаривали и лиофилизовали. Выход олигосахаридов ОС1, ОС2 и ОСЗ составил 18,3; 14,6 и 8,5 мг соответственно. Олигосахариды ОС1 и ОС2 гидролизовали 2 М CF_3COOH при 100° С в течение 3 ч, восстанавливали действием $NaBH_4$, ацетилировали и исследовали методом ГЖХ. Олигосахарид ОСЗ растворяли в 2 мл 0,3 М $NaOH$ и делили на две равные части. Первую часть обрабатывали 16 ч 13 мг $NaBH_4$, прибавляли 3 мл 5% уксусной кислоты и упаривали, а вторую часть обрабатывали 3 мл 5% уксусной кислоты, прибавляли 13 мг $NaBH_4$, упаривали и использовали в качестве контроля. Оба образца гидролизовали 16 ч при 100° С 4 М HCl , упаривали и исследовали с помощью аминокислотного анализатора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Львов В. Л., Яковлев А. П., Плужникова Г. Н., Лапина Е. Б., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1256—1265.
2. Кульшин В. А., Яковлев А. П., Аваева С. Н., Дмитриев Б. А. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1987. Т. 5. С. 44—46.
3. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 66. P. 559—566.
4. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 10. С. 2335—2338.
5. Hofmann P., Jann B., Jann K. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 261—271.
6. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27—65.
7. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276—277.
8. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1974. V. 2. № 3. P. 293—297.
9. Altona C., Hassnoot C. A. G. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 417—429.
10. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59—74.
11. Шашков А. С., Есмигулеев А. Ю., Деревницкая В. А. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495—1506.
12. Dmitriev B. A., Backinovsky L. B., Kochetkov N. K., Khomenko N. A. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 34. P. 513—517.
13. Wagner G., Wutrich C. // J. Magn. Resonance. 1979. V. 33. № 3. P. 675—680.
14. Иммунологические методы / Ред. Фримель Х. М.: М.: Мир, 1979. С. 113—115.

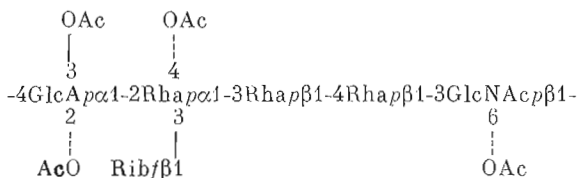
Поступила в редакцию
26.IV.1990

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF *SHIGELLA*. THE STRUCTURE
OF THE POLYSACCHARIDE CHAIN OF *SHIGELLA BOYDII*, TYPE 11,
LIPOPOLYSACCHARIDE

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

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

On mild acid degradation of the *Shigella boydii*, type 11, lipopolysaccharide, the corresponding O-specific polysaccharide composed of *D*-glucuronic acid, 2-acetylamino-2-deoxy-*D*-glucose, *D*-ribose and *L*-rhamnose residues in the ratio 1 : 1 : 1 : 3 was obtained. Methylation, partial acid hydrolysis and ^{13}C -NMR spectral data for the polysaccharide led to the structure of the oligosaccharide repeating unit as a branched hexasaccharide:



Numerous O-acetyl groups attached non-stoichiometrically to the residues of *D*-glucuronic acid, *L*-rhamnose and 2-acetylamino-2-deoxy-*D*-glucose were located with the use of ^{13}C -NMR spectroscopy.