



УДК 576.097.1

СТРУКТУРА ДЕТЕРМИНАНТНОЙ ГРУППЫ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО
ПОЛИСАХАРИДА *E. COLI* O20:K84:H34(145)

Васильев В. Н., Захарова И. Я.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев

При серологических реакциях с олигосахаридами, полученными из О-специфических боковых цепей деградированного полисахарида *E. coli* O20 : K84 : H34 (145) (дисахарид, тетрасахарид, гексасахарид, состоящие из эквимольных количеств рибозы и галактозы), выяснено, что детерминантной группой О-специфической боковой цепи является тетрасахарид. Химическими и физическими методами установлена структура дисахарида ($D\text{-Gal}\alpha 1\text{-}2\text{-}D\text{-Rib}$), тетрасахарида (детерминантной группы) ($D\text{-Gal}\alpha 1\text{-}2\text{-}D\text{-Rib}\beta 1\text{-}4\text{-}D\text{-Gal}\alpha 1\text{-}2\text{-}D\text{-Rib}$) и доказано, что О-специфическая боковая цепь деградированного полисахарида *E. coli* O20 : K84 : H34 (145) линейна и ее химически повторяющейся единицей является дисахаридное звено: $\text{---}4\text{-}D\text{-Gal}\alpha 1\text{-}2\text{-}D\text{-Rib}\beta 1\text{---}$.

В полисахаридной части липополисахаридов грамотрицательных бактерий различают базисную (core) часть, которая имеет примерно одинаковый моносахаридный состав для различных липополисахаридов, и О-специфическую (О-специфические боковые цепи), от моносахаридного состава и структуры которых зависит О-серологическая специфичность бактериальной клетки.

Полисахаридная часть липополисахаридов четырех штаммов *E. coli* серогруппы O20 состоит из 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты, *L*-глицеро-*D*-манногептозы, глюкозы, глюкозамина и значительных количеств (~ 50% всех обнаруженных моносахаридов) рибозы и галактозы. Рибоза и галактоза входят в состав О-специфических боковых цепей этих липополисахаридов [1].

О-Специфические боковые цепи такого состава неизвестны среди изученных до настоящего времени серогрупп *Escherichia* [2]. Что же касается семейства *Enterobacteriaceae*, то подобные О-специфические боковые цепи описаны только в липополисахаридах T-1 мутантных форм *Salmonella* [3] и у бактерий рода *Klebsiella* серогруппы O4 [4]. Рибоза обнаружена в составе липополисахаридов *Salmonella* групп 28, 28a [5], 52 и 56 [6], шероховатых R-форм [7], в O114 антигене *E. coli* [2].

Нам проведено изучение О-специфической боковой цепи липополисахарида одного из четырех штаммов *E. coli* серогруппы O20 — *E. coli* O20 : K84 : H34 (145). Из клеток этого штамма выделен гомогенный [8] деградированный полисахарид с *M* 5500. При периодатном окислении и восстановлении этого полисахарида, О-специфические цепи которого состоят из *D*-рибозы и *D*-галактозы [9], показано, что рибоза не разрушается периодатом, а галактоза окисляется с образованием эквимольного

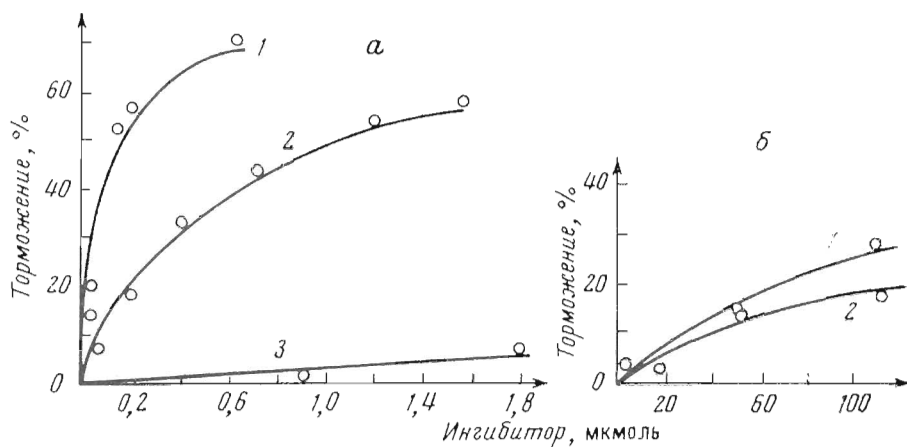


Рис. 1

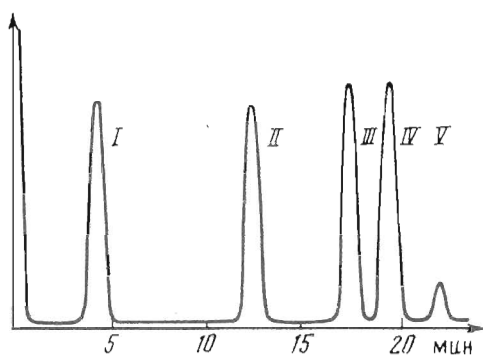


Рис. 2

Рис. 1. Реакция торможения преципитации полисахарида *E. coli* 145 гомологичной О-антисывороткой. а — торможение реакции гексасахаридом (1), тетрасахаридом (2), дисахаридом (3); б — торможение реакции рибозой (1), галактозой (2)

Рис. 2. Газожидкостная хроматограмма ацетатов метилированных полиолов, полученных из тетрасахарида

количества трейта [10]. Для изучения структуры О-специфической боковой цепи были выделены ее фрагменты: дисахарид, тетрасахарид, гексалили октасахарид (далее в тексте как гексасахарид) и более высокомолекулярный олигосахарид [11].

Необходимо было серологическими методами доказать, что эти фрагменты О-специфической боковой цепи обладают серологической активностью. Для этого были поставлены реакции торможения преципитации олигосахаридами (ди-, тетра- и гексасахаридом) и составляющими их моносахаридами между полисахаридом *E. coli* 145 и гомологичной О-антисывороткой. Выяснилось, что все использованные олигосахариды серологически активны и их серологическая активность зависит от числа моносахаридных остатков, входящих в состав олигосахаридов (рис. 1). Так, для проявления одинаковой серологической активности при реакции торможения преципитации необходимо дисахарида 1,10 мкмоль, тетрасахарида — 0,09 мкмоль, гексасахарид — 0,019 мкмоль. Это дало возможность предположить, что тетрасахарид является тем фрагментом, который представляет собой детерминантную группу О-специфической боковой цепи.

Дисахарид, тетрасахарид и гексасахарид состояли из эквимольных количеств рибозы и галактозы.

Последовательность моносахаридов в дисахариде (Gal → Rib) определяли хроматографией (система В) продуктов полного кислотного гидролиза восстановленного дисахаридов.

Ранее было показано [10], что при периодатном окислении деградированного полисахарида *E. coli* 145 рибоза не окисляется; значит, связь галактозы с рибозой в дисахариде может быть либо 1 → 2, либо 1 → 3.

Таблица 1

Масс-спектрометрический анализ ацетатов метилированных полиолов, полученных из тетрасахарида

Пики	Молярное соотношение	Массовые числа первичных фрагментов						Метилированные производные	
		45	89	117	161	189	205		233
I	0,83	+	+		+		+		1,3,4,5-Ме ₄ -рибит
II	0,80	+			+	+			3,5-Ме ₂ -рибит
III	1,00	+		+	+		+		2,3,4,6-Ме ₄ -дульцит
IV	1,00	+		+	+			+	2,3,6-Ме ₃ -дульцит

Таблица 2

Масс-спектрометрический анализ ацетатов метилированных полиолов, полученных из деградированного полисахарида *E. coli* O20 : K84 : H34(145)

Пики	Молярное соотношение	Массовые числа первичных фрагментов					Метилированные производные
		45	117	161	189	233	
II	0,82	+		+	+		3,5-Ме ₂ -рибит
IV	1,00	+	+	+		+	2,3,6-Ме ₃ -дульцит

В первом случае этот олигосахарид будет устойчив к действию щелочей и не будет давать окраску при реакции с хлористым трифенилтетразолием [12], во втором случае результаты этих реакций будут иными. Экспериментальные данные показали, что дисахарид устойчив к действию 0,2 М раствора Ва(ОН)₂ и не дает окраски с хлористым трифенилтетразолием. Следовательно, при С₍₂₎ рибозы имеется заместитель. Последовательность моносахаридов и способ связи между ними были окончательно определены при масс-спектрометрическом анализе метилированного дисахаридов [13, 14]. Фрагменты с *m/e* 175, 219, 235 показали, что последовательность моносахаридных единиц: галактоза → рибоза, а фрагменты с *m/e* 305, 380 свидетельствуют о том, что способ связи между ними 1 → 2. Значит, структуру дисахаридов можно представить так:



Следующим этапом в изучении структуры О-специфической боковой цепи было изучение структуры тетрасахарида. Для определения формы моносахаридных остатков и типа их связи в цепи тетрасахарида проводили восстановление и метилирование тетрасахарида. Метилированный тетрасахарид подвергали формолизу и гидролизу с последующим восстановлением боргидридом натрия, ацетилизацией и изучением полученных продуктов с помощью ГЖХ (рис. 2) и хроматомасс-спектрометрического анализа [15] (табл. 1). Компонент V оказался веществом неуглеводной природы, далее не изучался. Данные хроматомасс-спектрометрического анализа согласуются с результатами периодатного окисления тетрасахарида (идентифицированы рибоза, трент, глицерин). Таким образом, тетрасахарид линейен и имеет на восстанавливаемом конце остаток рибозы. Для определения порядка расположения моносахаридных звеньев проводили изучение кинетики кислотного гидролиза тетрасахарида (рис. 3). Из полученных результатов видно, что кислотолабильность гликозидных связей тетрасахарида различна. В первые 10 мин гидролиза тетрасахарид распадается на дисахарид, который по своей хроматографической подвиж-

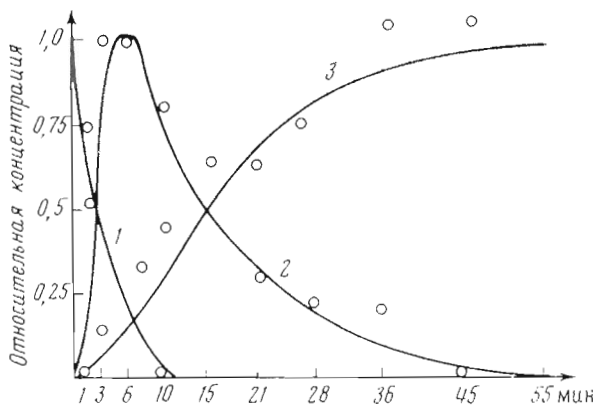


Рис. 3. Динамика частичного кислотного гидролиза тетрасахарида: 1 — тетрасахарид, 2 — дисахарид, 3 — моносахариды

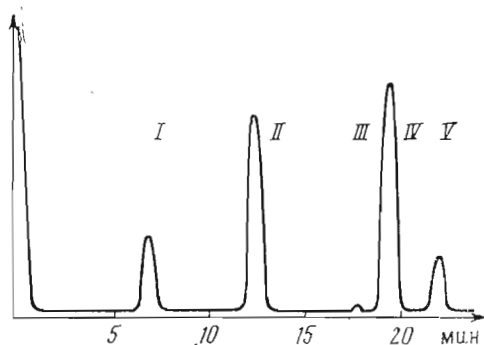
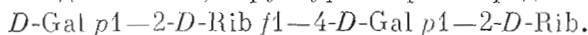


Рис. 4. Газожидкостная хроматограмма ацетатов метилированных полиолов, полученных из деградированного полисахарида *E. coli* 145.

ности соответствует изученному выше дисахариду, и моносахариды. Образующийся во время гидролиза дисахарид более кислотоустойчив, чем тетрасахарид. Следовательно, структура тетрасахарида —



При частичном кислотном гидролизе из тетрасахарида образуется дисахарид, из гексасахарида — тетрасахарид и дисахарид, а из олигосахарида с более высокой степенью полимеризации — гексасахарид, тетрасахарид и дисахарид. Образовавшиеся олигосахариды по своей хроматографической подвижности соответствуют олигосахаридам, полученным при частичном кислотном гидролизе из *O*-специфических боковых цепей деградированного полисахарида *E. coli* 145. Можно предположить, что дисахаридное звено, описанное выше, является повторяющейся единицей в цепи изучаемого полисахарида.

Результаты окисления деградированного полисахарида *E. coli* 145 и тетрасахарида, а также результаты изучения структуры тетрасахарида указывают на то, что *O*-специфическая боковая цепь имеет линейную структуру. Об этом свидетельствуют и данные хроматомасс-спектрометрического анализа частично метилированных ацетатов полиолов, полученных из деградированного полисахарида *E. coli* 145 (рис. 4, табл. 2). Компоненты I и V, не являющиеся производными метилированных сахаров, далее не изучались. Компоненты II и IV были идентифицированы как производные 3,5-ди-*O*-метилрибита, 2,3,6-три-*O*-метилдальдита соответ-

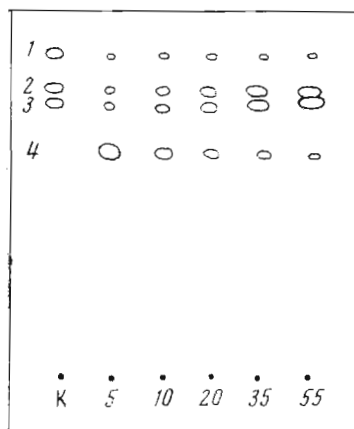


Рис. 5

Рис. 5. Схема хроматограммы (система Б) частичного кислотного гидролиза окисленного и восстановленного деградированного полисахарида *E. coli* 145 во времени (распад по Смиту). Проявитель — периодатбензидиновый реактив. К — контроль, 1 — глицерин, 2 — трент, 3 — рибоза, 4 — вещество X. 5, 10, 20, 35, 55 — время гидролиза, мин

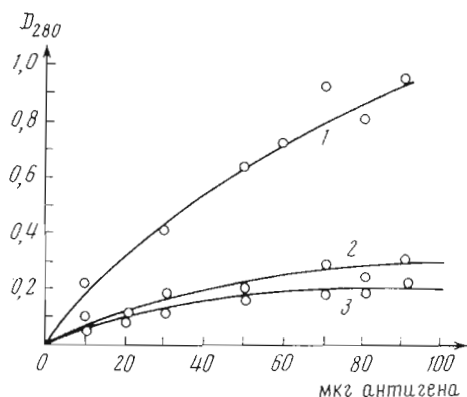


Рис. 6

Рис. 6. Количественная преципитация: 1 — O-антиген и O-антисыворотка *E. coli* 145; 2 — O-антиген *E. coli* 145 и O-антисыворотка *Klebsiella* 04; 3 — O-антиген *Klebsiella* 04 и O-антисыворотка *E. coli* 145

ственно. Компонент III масс-спектрометрически не анализировался, а по времени удерживания он соответствует 2,3,4,6-тетра-O-метилдальцитозу. Следовательно, O-специфическая боковая цепь не имеет разветвления.

Для доказательства того, что повторяющейся единицей O-специфической боковой цепи является дисахаридное звено, проводили распад по Смиту [16, 17] окисленного и восстановленного деградированного полисахарида *E. coli* 145. Кроме рибозы, трента и глицерина в продуктах деградации обнаружено вещество X, распадающееся в ходе гидролиза на рибозу и трент (рис. 5). Вещество X было выделено препаративно. После его гидролиза и разделения рибозы и трента электрофорезом установлено, что молярное соотношение рибозы и трента 1 : 1. Следовательно, это вещество — 2-O-рибозилтрент.

После определения оптической активности ($[\alpha]_D^{20}$) дисахарида (+104,6°), тетрасахарида (+88,4°), гексасахарида (+112,8°) необходимо было решить вопрос о конфигурации рибозидной и галактозидной связи. Сопоставление вычисленных по правилу Кляйна [18] величин удельного вращения для аномеров дисахарида (α -аномер +110°, β -аномер -10,9°) и тетрасахарида по рибозидной связи (α -аномер +157°, β -аномер +102°) с экспериментальными значениями говорит об α -конфигурации галактозидной связи в первом случае и β -конфигурации рибозидной связи — во втором. При частичном кислотном гидролизе деградированного полисахарида *E. coli* 145 в 0,05 н. H₂SO₄ при 80° в первые 3 ч его оптическая активность возрастает, при этом в гидролизате идентифицируются в основном дисахарид, тетрасахарид, гексасахарид и более высокомолекулярные фрагменты. Так как кислотный гидролиз проходит по рибозидным связям, возрастание оптической активности гидролизата объясняется разрушением β -связей, которые вносят отрицательный вклад в величину оптической активности деградированного полисахарида.

Таким образом, доказано, что O-специфическая боковая цепь деградированного полисахарида *E. coli* 020 : K84 : H34 (145) состоит из химически повторяющейся единицы —4-D-Galp α 1—2-D-Rib β 1—.

Галактоза и рибоза, обнаруженные в липополисахариде *S. friedenau* TI [3], находятся в двух независимых полисахаридных цепях. Одна цепь состоит из рибофуранозидных остатков: —2-*D*-Ribfβ1—, вторая — из галактофуранозидных остатков: —6-*D*-Galβ1—3-*D*-Galβ1— —3-*D*-Galβ1— [19,20].

O-Антиген *Klebsiella* 04 также содержит в составе боковой цепи галактозу и рибозу. Единица цепи этого O-антигена подобна изученной нами [21].

При постановке реакций количественной преципитации (рис. 6) показано, что O-антигены *E. coli* 145 и *Klebsiella* 04 осаждают примерно одинаковое количество антител из гетерологичных O-антисывороток (рис. 6, 2, 3), т. е. обладают очень близким серологическим сродством, которое основывается на их структурном подобии. O-Антигены *E. coli* 145 осаждают большее количество антител (рис. 6, 1), следовательно, есть и какие-то различия между O-антигенами *E. coli* 145 и *Klebsiella* 04, которые, возможно, определяются различием в структурах базисных частей сравниваемых липополисахаридов. Антиген *S. friedenau* TI не осаждается антителами O-антисыворотки *E. coli* 145 и *Klebsiella* 04, что объясняется различием в структурах специфических частей антигенов.

На основании проведенных исследований доказана структура O-специфической боковой цепи деградированного полисахарида *E. coli* 145 и показана тесная взаимосвязь между серологическими свойствами антигенов и структурой их специфических частей.

Экспериментальная часть

Полный и частичный кислотный гидролиз осуществляли соответственно 1 и 0,05 н. H₂SO₄ при 100°. Время в каждом случае определяли экспериментально. Щелочную деструкцию дисахарида проводили в 0,2 М растворе Ba(OH)₂ при 20° в течение 72 ч. Для обессоливания применяли смолы дауэкс 50W × 8 (H⁺), дауэкс 1 × 8 (HCO₃⁻).

Для разделения продуктов гидролиза использовали восходящую БХ в системах: бутанол—пиридин—вода, 3 : 2 : 1,5 (А), пропанол—этилацетат—вода, 7 : 1 : 2 (Б). Восстанавливающие и невосстанавливающие вещества на хроматограммах открывали соответственно кислым фталатом анилина [22] и перйодатбензидиновым реактивом [23]. Количественное определение галактозы проводили антроновым методом [24], рибозы — ординовым [25], трейт определяли после окисления йодной кислотой по формальдегиду [26]. Калибровочный график для определения трейта был построен по эритриту. Эритрит также служил контролем при БХ, так как его хроматографическая подвижность очень мало отличается от хроматографической подвижности трейта. Концентрацию олигосахаридов определяли по калибровочному графику, построенному для эквимольной смеси рибозы и галактозы.

Перйодатное окисление тетрасахарида проводили общепринятым методом [27] с последующим восстановлением продуктов окисления боргидридом натрия [16, 17]. Борат удаляли в виде метилового эфира. Трейт и рибозу разделяли электрофорезом на бумаге в 0,1 н. NaOH [28] при градиенте напряжения 30 В/см в течение 2 ч. Удельное вращение олигосахаридов определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США).

Метилирование проводили по методике Хакомори [29]. Метилированный полисахарид подвергали формолизу (85%-ная муравьиная кислота, 1 ч, 100°) и гидролизу (0,25 н. H₂SO₄, 12 ч, 100°) с последующим восстановлением NaBH₄ и ацетилированием в смеси уксусного ангидрида и пиридина (1 : 1) при 100° в течение 1 ч. ГЖХ продуктов осуществляли на газовом хроматографе «Pye-Unikam 104», модель 64 с пламенно-ионизационным детектором на стальной колонке (0,5 × 150 см) с 3% SE-30 диатомит СQ

100—200 меш. Режим хроматографии: 160°—10 мин, 5° в 1 мин до 220°, 220° — 5 мин.

При хроматомасс-спектрометрии ацетатов метилированных полиолов пользовались прибором «Varian MAT III Gnom» (США) в максимуме каждого пика.

О-антисыворотку к кипяченой культуре *E. coli* 145 получали по методу Эрскова [30]. После определения точки эквивалентной преципитации проводили торможение реакции преципитации моно- и олигосахаридами. К 0,5 мл антисыворотки прибавляли ингибиторы с определенными концентрациями в 0,5 мл физиологического раствора, тщательно перемешивали и оставляли на 2 ч при 37°. Затем прибавляли антиген в концентрации, установленной ранее, и оставляли на 48 ч в холодильнике. Осадки дважды промывали физиологическим раствором и растворяли в 4 мл 0,1 н. NaOH. Торможение (%) определяли как отношение оптических плотностей растворов при торможении и в точке эквивалентности.

Все работы по метилированию и хроматомасс-спектрометрическому анализу были проведены в Институте органической химии АН СССР. Мы выражаем большую благодарность за внимание и помощь в работе чл.-кор. АН СССР Н. К. Кочеткову, д-рам хим. наук В. А. Деревицкой, О. С. Чижову, канд. хим. наук Б. А. Дмитриеву, а также за предоставленные культуры *E. coli* 020 : К84 : П34 д-ру мед. наук И. В. Голубевой (НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова, Москва), *Klebsiela* 04 — (д-ру В. Ниммиху (Институт медицинской микробиологии и эпидемиологии Ростокского университета, ГДР) и *S. friedenau* T1 — д-ру И. Шлоссгардт (Государственный сывороточный институт, Берлин, ГДР).

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарова И. Я., Коваленко Е. О. (1972) Микробиол. ж., 34, 3, 316.
2. Orskov F., Orskov I., Jann B., Jann K., Müller-Seitz E., Westphal O. (1967) Acta pathol. et microbiol. scand., 71, 339.
3. Wheat R. W., Berst M., Ruschmann E., Lüderitz O., Westphal O. (1967) J. Bacteriol., 94, 1366.
4. Nimmich W. (1970) Z. Immunitätsforsch., Allerg. und Klin., Immunol., 139, 347.
5. Kauffmann F., Lüderitz O., Stierlin H., Westphal O. (1960) Zbl. Bakteriол., Parasitenk. Infektionskrankh. und Hyg. Abt. 1, Orig., 178, 442.
6. Kauffmann F., Jann B., Krüger L., Lüderitz O., Westphal O. (1962) Zbl. Bakteriол., Parasitenk. Infektionskrankh. und Hyg. Abt. 1, Orig., 186, 509.
7. Lüderitz O., Galanos C., Risse H. J., Ruschmann E., Schlecht S., Schmidt G., Schulte-Holthausen H., Wheat R., Westphal O., Schlosshardt J. (1966) Ann. N. Y. Acad. Sci., 133, 349.
8. Воцелко С. В., Коваленко Е. О., Захарова И. Я., Кипико Я. Г. (1972) Микробиол. ж., 34, 4, 473.
9. Захарова И. Я., Васильев В. М. (1974) Микробиол. ж., 36, 2, 163.
10. Васильев В. М., Захарова И. Я. (1974) Микробиол. ж., 36, 4, 468.
11. Васильев В. М., Захарова И. Я. (1973) Микробиол. ж., 35, 3, 370.
12. Avigad G., Zelikson R., Hestrin S. (1961) Biochem. J., 80, 57.
13. Heyns K., Grützmacher H. F., Scharmann H., Müller D. (1966) Chem. Forsch., 5, 448.
14. Головкина Л. С. (1967) Канд. дис. Масс-спектроскопическое исследование некоторых производных многоатомных спиртов. М.
15. Björndal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) Carbohydr. Res., 5, 433.
16. Hamilton J. K., Smith F. (1956) J. Amer. Chem. Soc., 78, 5907.
17. Goldstein I. J., Hamilton J. K., Montgomery R., Smith F. (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 6469.
18. Klyne W. (1950) Biochem. J., 47, 4, xly.
19. Berst M., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lüderitz O., Svensson S., Westphal O. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 353.
20. Berst M., Lüderitz O., Westphal O. (1971) Eur. J. Biochem., 18, 361.
21. Björndal H., Lindberg B., Lönngreen J., Nilsson K., Nimmich W. (1972) Acta chem. scand., 26, 1269.
22. Partridge S. M. (1949) Nature, 164, 443.
23. Gordon H. T., Thornburg W., Werum L. N. (1956) Anal. Chem., 28, 849.
24. Dreywood R. (1946) Industr. Chem. Eng. (Anal. ed.), 18, 499.
25. Мейбаум В. В. (1945) Биохимия, 10, 353.

26. Методы химии углеводов (1967) с. 67, «Мир», М.
27. Методы химии углеводов (1967) с. 62, 468, «Мир», М.
28. Frahn J. L., Mills J. A. (1962) In Foster A. B. Methods Carbohydr. Chem., 1, 53
29. Nakomori S. (1964) J. Biochem., 55, 205.
30. Orskov F., Orskov I., Rees T. A., Sahub K. (1960) Acta pathol. et microbiol. scand., 48, 48.

Поступила в редакцию
30.VI.1975

THE STRUCTURE OF DETERMINANT GROUP IN O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE *E. COLI* 020:K84:H34 (145)

VASILIEV, V. N., ZAKHAROVA I. Ya.

*D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of the Ukr.SSR, Kiev*

Serological reactions of di-, tetra- and hexasaccharides which are composed of equimolar amounts of ribose and galactose and produced from O-specific side-chains of degraded polysaccharide *E. coli* 020 : K84 : H34 (145) have revealed that the tetrasaccharide serves as a determinant group of O-specific side-chain. By means of chemical and physical methods the structure has been determined for disaccharide (*D*-Galp α 1—2-*D*-Rib) and tetrasaccharide (a determinant group) (*D*-Galp α 1—2-*D*-Rib) β 1—4-*D*-Galp α 1—2-*D*-Rib). O-Specific side-chain of degraded polysaccharide *E. coli* 020 : K84 : H34 (145) has been shown to have a linear character and to consist of iterated disaccharide unit —4-*D*-Galp α 1—2-*D*-Rib) β 1.
