



УДК 579.842.23;577.115;543.544

БЫСТРЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДА А ИЗ БАКТЕРИЙ *Yersinia pseudotuberculosis*

© 1999 г. И. Н. Красикова[#], С. И. Бахолдина, Т. Ф. СоловьеваТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 12.08.98 г.

Принята к печати 29.10.98 г.

На примере бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, серовара IV изучена возможность получения свободного липида А (ЛА) гидролизом целых микробных клеток, минуя стадию выделения липополисахарида (ЛПС). Показано, что ЛА может быть выделен прямой экстракцией органическими растворителями бактериальной массы, предварительно обработанной 10% уксусной (LA_{AcOH}) и 1 М HCl (LA_{HCl}). Полного извлечения ЛА удастся добиться только под действием сильных гидролизующих агентов. В зависимости от условий обработки ЛА выделяется в виде ди- (LA_{AcOH}) или монофосфорил- (LA_{HCl}) производного. На основании проведенных исследований делается вывод, что в клетках псевдотуберкулезного микроба существуют две формы ЛА (и, следовательно, две формы ЛПС), с разной силой удерживающиеся в наружной мембране.

Ключевые слова: липид А; липополисахарид; жирные кислоты; *Yersinia pseudotuberculosis*.

Липид А (ЛА) – ковалентно связанный компонент липополисахаридов (ЛПС), O-антигенов и эндотоксинов грамотрицательных бактерий, с помощью которого ЛПС удерживаются в наружной мембране клеток. Он играет важную роль в сохранении стабильности наружной мембраны и обладает разнообразными видами биологической активности [1–3]. Введение ЛА экспериментальным животным способствует индукции неспецифической устойчивости макроорганизма к вирусной и бактериальной инфекции, ЛА вызывает образование лимфокинов, усиливает фагоцитоз, обладает адъювантной и митогенной активностью. Однако использованию ЛА как неспецифического иммуностимулятора или адъюванта при создании вакцин для иммунизации человека и животных препятствуют присущие ему эндотоксические свойства, такие как пирогенность, токсичность, локальная реакция Шварцмана, а также способность вызывать лейкопению и необратимый эндотоксический шок. Систематические исследования, посвященные выявлению структурных особенностей, необходимых для проявления ЛА определенных биологических реакций, показали, что его “вредные” и “полезные” функции могут быть, по крайней мере частично, разделены [4]. Это делает возможным создание на его основе новых лекарственных препаратов, в которых баланс между эндотоксическими и иммунос-

тимулирующими свойствами смещен в сторону последних.

Одной из главных проблем в создании такого рода соединений является отсутствие специфических неструктивных методов получения ЛА в свободном виде. В принципе существуют два источника его выделения: липополисахариды и так называемые R-гликолипиды. R_g-гликолипиды – дефектные ЛПС, состоящие из ЛА и двух остатков 2-кето-3-дезоксидо-октулозоновой кислоты (Kdo), продуцируются мутантными штаммами бактерий R(rough)-формы. Они имеют высокую степень гидрофобности и извлекаются системами, содержащими водный фенол, хлороформ, петролейный эфир в различных соотношениях [5, 6]. Благодаря мягким условиям выделения (процесс ведется при комнатной температуре), ЛА, полученный таким способом, представляет собой наиболее подходящий объект для структурных исследований и изучения биологической активности. Однако метод имеет ограниченное применение, поскольку не все микроорганизмы способны продуцировать колонии R-формы. К тому же, как оказалось впоследствии, бактерии R- и S(smooth)-формы синтезируют различающиеся по структуре и свойствам молекулы ЛА и самого ЛПС [7]. Поэтому основная масса исследований проводится на препаратах, полученных из ЛПС, что требует предварительной экстракции последних из бактериальных клеток. Обычно для этого используют фенолсодержащие системы [8]. Фенол, будучи слабой кислотой (pK_a 10 [9]), при 70°C,

[#] Автор для переписки (e-mail: innakras@piboc.marine.su.; тел.: (4232) 311409; факс: 7(4232) 314050).



ТСХ образцов ЛА из *Y. pseudotuberculosis* в системе хлороформ–метанол–вода–25% аммиак, 40 : 25 : 4 : 2. Обнаружение пятен осуществляли сжиганием в парах серной кислоты. ЛА_{ЛПС} (1), ЛА_{АсОН} (2), ЛА_{НСІ} (3).

температуре, необходимой для получения гомогенной суспензии бактериальных клеток, гидролизует не только кетозидную связь, соединяющую липид А и полисахаридный фрагмент ЛПС, но и кислотолабильные связи внутри молекулы ЛА, о чем свидетельствует присутствие свободных жирных кислот и неорганического фосфата в липидных препаратах [10]. Кроме того, часть ЛПС, иногда значительная, не извлекается полностью даже после нескольких экстракций разными системами растворителей [11]. Это является причиной низкого выхода ЛПС и ЛА и приводит к искажению информации о их структуре.

Более перспективной представляется возможность прямой экстракции ЛА из бактериальных клеток. Обычным способом получения ЛА является мягкая кислотная обработка ЛПС, которая избирательно гидролизует связь Kdo–GlcN, соединяющую коровый и липидный фрагменты мо-

лекулы эндотоксина. Разрушив эту связь подходящим гидролизующим агентом, можно перевести ЛА в свободное состояние, после чего он может быть извлечен из остатка клеток органическими растворителями. Впервые такой подход применили Камьо с сотр., которым удалось выделить ЛА из бактериальной массы *Selenomonas ruminantium*, предварительно обработанной трихлоруксусной кислотой, экстракцией смесью хлороформ–метанол [12]. Галовэй и Раецц использовали гидролиз бактериальных клеток 0.2 М НСІ с последующей экстракцией органическими растворителями, чтобы определить содержание и скорость синтеза ЛА в мутантах *Escherichia coli* [13]. В этом случае ЛА претерпевал существенную деградацию и был выделен в виде так называемого монофосфорил-ЛА, который лишен гликозидного фосфата.

Нами разработана упрощенная схема получения липида А из *Yersinia pseudotuberculosis* серовара ІВ, которая позволяет выделять как монофосфорил-ЛА, так и его более нативную форму, содержащую обе фосфатные группы (дифосфорил-ЛА). В эксперименте использовали обезжиренные бактерии, для чего клетки обрабатывали смесью хлороформ–метанол, широко используемым липидным экстрактантом [14]. Затем проводили гидролиз последовательно разбавленной уксусной кислотой, 0.1 М и 1 М НСІ. Деградированный полисахарид отделяли центрифугированием, свободный липид А извлекали из органической фазы после экстракции гидролизованных клеток смесью хлороформ–метанол. За полнотой извлечения следили по количеству 3-гидрокситетрадекановой кислоты (ЗОН14:0), специфического для ЛА из *Y. pseudotuberculosis* компонента [15], в гидролизатах клеток до и после выделения ЛА.

Первичная обработка бактерий уксусной кислотой давала 0.14% (от веса исходной микробной массы, табл. 1) вещества, которое было обозначено как ЛА_{АсОН}. Повторный гидролиз уксусной кислотой увеличивал выход ЛА_{АсОН} до 0.21%, но

Таблица 1. Содержание 3-гидрокситетрадекановой кислоты и выход липида А из бактерий *Y. pseudotuberculosis*

Характеристика образцов	Содержание ЗОН14:0* и выход липида А, в процентах к сухому весу бактерий				
	Микробная масса до и после обработки				
	Исходная	АсОН-1 ^{2*}	АсОН-2 ^{2*}	НСІ-0.1 М ^{2*}	НСІ-1 М ^{2*}
ЗОН14:0	0.39	0.20	0.18	0.16	0.09
Выход ЛА	—	0.14	0.07	0.006	0.43

* ЗОН14:0 – 3-гидрокситетрадекановая кислота.

^{2*} АсОН-1 – микробная масса после первой обработки уксусной кислотой; АсОН-2 – микробная масса после второй обработки уксусной кислотой; НСІ-0.1 М – микробная масса после обработки 0.1 М НСІ; НСІ-1 М – микробная масса после обработки 1 М НСІ.

содержание ЗОН14:0-кислоты в клетках оставалось высоким. Поэтому бактерии были обработаны другим стандартным в химии ЛПС гидролизующим агентом, 0.1 М HCl [16]. Незначительное количество ЛА, полученного таким способом (0.006%), побудило нас применить более жесткий гидролиз с 1 М HCl, также иногда использующийся для выделения ЛА из ЛПС [17]. На этой стадии было выделено 0.43% ЛА (ЛА_{HCl}), что в сумме с ЛА_{AcOH} составило 0.64%. Это значительно больше, чем в случае, когда для получения ЛА из *Y. pseudotuberculosis* использовали классический вариант, включающий стадию выделения ЛПС (ЛА_{ЛПС}, 0.25% [15]). Отсутствие ЗОН14:0-кислоты в гидролизате клеток, обработанных 1 М HCl (табл. 1), указывает на высокую степень извлечения ЛА.

Образцы ЛА были анализированы с помощью ТСХ. Как следует из рисунка, они проявляют заметную гетерогенность и значительно различаются по хроматографической подвижности. ЛА_{AcOH} и ЛА_{ЛПС} имели идентичные ТСХ профили (рисунок, полосы 1, 2, соответственно). ЛА_{HCl} состоит из компонентов, имеющих более высокую подвижность (рисунок, полоса 3). При обработке пластинок молибдатом аммония все пятна имели характерное для фосфорсодержащих соединений окрашивание. В то же время ни одно из пятен не окрашивалось при обработке пластинок нингидрином, что свидетельствует об отсутствии веществ со свободными аминогруппами, в том числе фосфатидилэтанолamina, основного фосфолипидного компонента псевдотуберкулезного микроба [18].

Химический анализ изучаемых соединений показал, что они содержат структурные элементы, характерные для ЛА *Y. pseudotuberculosis* [15]: фосфор, глюкозамин и жирные кислоты (ЖК). Основными жирными кислотами были додекановая (12:0) и 3-гидрокситетрадекановая (табл. 2). Гидролизаты всех бактерий содержали также 2-тетрадеценую кислоту. Она была идентифицирована как *транс*-2-тетрадеценная (14:1(*t*2)), поскольку фрагмент с *m/z* 87, характерный для такого рода соединений [19], был одним из основных пиков в ее масс-спектре. Присутствие в гидролизатах кислоты 14:1(2), которая является продуктом дегидратации эфиров 3-ацилоксиалкановых кислот в условиях щелочного гидролиза [20], свидетельствует о том, что определенная часть остатков ЗОН14:0-кислоты должна существовать в виде 3-ацилоксипроизводного, что соответствует опубликованным ранее данным о структуре ЛА из *Y. pseudotuberculosis*, согласно которым додекановая кислота ацилирует остатки 3-гидрокситетрадекановой кислоты, присоединенной сложноэфирной связью [21]. Гексадекановая (16:0), гексадеценная (16:1(*c*9)), метилциклогексадекановая (циклопропановая) 17:0(*c*у), и, в мень-

Таблица 2. Жирнокислотный состав образцов ЛА из *Y. pseudotuberculosis*

Жирные кислоты	Содержание жирных кислот, в процентах к сумме жирных кислот		
	ЛА _{ЛПС}	ЛА _{AcOH}	ЛА _{HCl}
12 : 0	9.3	7.8	4.2
14 : 1(2)	9.8	7.6	6.7
ЗОН14 : 0*	51.8	66.5	71.3
ΣЗОН14 : 0 ^{2*}	61.6	73.7	78.0
ΣЖК ЛА	70.9	81.5	82.3
ΣЖК ФЛ ^{3*}	н. о. ^{4*}	15.0	6.8

* ЗОН14 : 0 – 3-гидрокситетрадекановая кислота.

^{2*} В этом ряду величина, характеризующая количество 3-гидрокситетрадекановой кислоты в образцах липида А, включает кислоту 14 : 1(2), которая является продуктом дегидратации кислоты ЗОН14 : 0 в условиях щелочного гидролиза [20].

^{3*} ЖК ФЛ означает суммарное содержание жирных кислот, входящих в состав свободных липидов клетки (14 : 0, 16 : 0, 16 : 1(*c*9), 17 : 0(*c*у), 18 : 0, 18 : 1(*c*9) и 18 : 1(*c*11)).

^{4*} н. о. – не определяли.

шей степени, октадеценная (*цис*-вакценовая, 18:1(*c*11)), также обнаруженные в гидролизатах липида А, по-видимому принадлежат свободным липидам клетки. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что содержание этих кислот уменьшается, в то время как количество ЖК липида А увеличивается в ряду ЛА_{AcOH} → ЛА_{HCl}.

Особенности строения ЛА из *Y. pseudotuberculosis*, в частности присутствие ЖК со сложноэфирным типом связи и остатков фосфорной кислоты, делают его чувствительным к действию гидролизующих агентов. Поэтому существенным является вопрос нативности полученных препаратов. Чтобы оценить степень их дегградации в процессе выделения, были определены количество фосфора и ЖК (в расчете на два остатка глюкозамина [22]), а также степень ацилирования ЗОН14:0-кислоты (мольное отношение додекановой и 3-гидрокситетрадекановой кислот [23]), которые являются важными характеристиками нативности ЛА (табл. 3). Для сравнения приводятся аналитические данные ЛА_{ЛПС} и степень ацилирования остатков гидроксикислоты в необработанных бактериях.

Как и ожидалось, состав ЛА заметно изменялся с изменением условий гидролиза. В ЛА_{AcOH} зарегистрировано наибольшее количество фосфора и максимальная степень ацилирования ЗОН14:0-кислоты, которая была сопоставима со степенью ацилирования этой кислоты в нативных бактериях. Напротив, низкий уровень фосфора был заре-

Таблица 3. Характеристика образцов липида А из *Y. pseudotuberculosis*

Препарат	Аналитические данные липида А (мкмоль)					
	P	GlcN	12 : 0*	ЗОН14 : 0*	ΣЖК ^{2*}	Степ. ацил. ^{3*}
ЛА _{AcOH}	2.3	2.0	0.4	4.0	4.3	10.7
ЛА _{HCl}	1.04	2.0	0.3	4.4	4.7	6.4
ЛА _{ЛПС}	1.8	2.0	0.7	3.9	4.6	15.2
Исходная М. М. ^{4*}						6.5

* 12 : 0 и ЗОН14 : 0 – додекановая и 3-гидрокситетрадекановая кислоты, соответственно.

^{2*} ΣЖК – сумма жирных кислот.

^{3*} Степень ацилирования 3-гидрокситетрадекановой кислоты, которая определяется как мольное отношение 12 : 0- и ЗОН14 : 0- (=100%) кислот [23].

^{4*} М. М. – микробная масса.

гистрирован в ЛА_{HCl}. Резкое уменьшение количества фосфора в ЛА_{HCl}, которое сопровождается изменением его хроматографической подвижности (в сравнении с ЛА_{AcOH}, рисунок, полосы 2, 3), предполагает потерю одной фосфатной группы, по-видимому гликозидной (фосфатный остаток в положении 1 восстанавливающего конца ЛА весьма кислотолабилен и полностью отщепляется при обработке 0.1 М HCl при 100°C в течение 10 мин [24]).

Интересно, что большая часть ЛА извлекается только после довольно жесткой обработки бактерий 1 М HCl. Этот факт легко объяснить, если принять во внимание, что ЛПС находятся в тесном взаимодействии с белками наружной мембраны клеток [25], которое осуществляется через липидный фрагмент молекулы эндотоксина [26]. Силы, удерживающие О-антигенные комплексы в клеточной стенке различных бактерий, сильно различаются. Вобер и Алаупович постулировали присутствие ковалентной связи в составе комплекса ЛА–белок из *Serratia marcescens* 08, поскольку его полная диссоциация наблюдалась только после обработки кислотой [9]. С другой стороны, известны микроорганизмы, продуцирующие ЛПС в культуральную жидкость, что указывает на слабое взаимодействие ЛПС с клеточной стенкой [27]. Показано также, что не все молекулы ЛПС участвуют в образовании комплекса с белком [28].

В клетках псевдотуберкулезного микроба белок находится в тесном, хотя и не ковалентном взаимодействии с ЛПС [29]. Тот факт, что несмотря на полный разрыв кетозидной связи между липидным и полисахаридным фрагментами ЛПС (практически весь О-специфический полисахарид, присутствующий в клетках, отделяется уже после первой обработки клеток уксусной кислотой [30]), лишь часть ЛА *Y. pseudotuberculosis* переходит в свободное состояние, свидетельствует

о том, что в клетках этого микроорганизма существуют две популяции молекул липида А (ЛПС), которые с разной силой удерживаются в мембране. Одни из них достаточно легко извлекаются как в виде ЛПС при фенол-водной экстракции бактерий, так и в виде свободного ЛА после уксуснокислотного гидролиза целых клеток, и по-видимому не образуют прочного комплекса с белком. Другая (большая) часть молекул ЛА изучаемого штамма, для выделения которой необходимо использовать жесткие условия гидролиза, образует значительно более прочную связь с белками наружной мембраны. Характер взаимодействия ЛА с белком в таких комплексах устанавливается.

Таким образом, последовательным гидролизом бактериальной массы *Y. pseudotuberculosis* разбавленной AcOH и 1 М HCl можно выделить как дифосфорил-ЛА (ЛА_{AcOH}) с максимальной для этого штамма бактерий степенью ацилирования, так и его монофосфорильное производное (ЛА_{HCl}). Преимуществом предлагаемого подхода является то, что с его помощью извлекается практически весь ЛА, присутствующий в клетках, что значительно повышает его выход. Учитывая значение, которое приобретает монофосфорил-ЛА как потенциальное терапевтическое средство в иммунопрофилактике различных бактериальных и вирусных инфекций [31], метод может получить широкое распространение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы определения общего содержания углеводов, белка, нуклеиновых кислот и фосфора были описаны предварительно [32, 33]. Для получения аминсахаров в свободном виде образцы ЛА гидролизovali 6 М HCl (100°C, 6 ч). Количественный анализ глюкозамина в препаратах ЛА осуществляли спектрофотометрически реакцией

с 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой [34]. Жирные кислоты получали гидролизом 4 М NaOH (100°C, 6 ч) и анализировали в виде метиловых эфиров с помощью ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии, используя в качестве внутреннего стандарта пентадекановую кислоту. ГЖХ выполняли на газожидкостном хроматографе Shimadzu IC-9A (Япония) с использованием пламенно-ионизационного детектора, капиллярных колонок (Supelcowax, 30 м × 0.25 мм) и компьютерной обработки данных (Chromatorac CR-3A). Температура колонки 210°C, испарителя и детектора – 240°C, газ-носитель гелий (40 мл/мин). ГЖХ-МС осуществляли на хромато-масс-спектрометре LKB-9000S (Швеция), используя колонки с 5% SE-30. ТСХ проводили на пластинках Сорбфил (5–17 мкм, Краснодар, Россия) в системах гексан-эфир-уксусная кислота, 7 : 3 : 0.1 (для свободных жирных кислот); хлороформ-метанол-вода-25% аммиак, 40 : 25 : 4 : 2 (для препаратов ЛА); бутанол-этанол-вода-25% аммиак, 4 : 4 : 1 : 1 (для свободных аминсахаров). Обнаружение пятен осуществляли сжиганием в парах серной кислоты, нингидрином (свободная аминогруппа) и молибдатным реактивом (органический фосфор). Все данные, представленные в работе, – результаты трех или более независимых экспериментов; диапазон экспериментальных ошибок не превышал 5%.

Бактериальные штаммы, культивирование бактерий и выделение липида А. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* серовара IV выращивали в аэробных условиях при комнатной температуре и рН 7.0 в среде, описанной предварительно [35]. Обезжиренные бактериальные клетки получали двукратной обработкой высушенной на воздухе микробной массы (10 г) смесью хлороформ-метанол (2 : 1, 150 мл) [14]. Перед гидролизом сухие бактерии увлажняли, гидролиз проводили 10% уксусной кислотой (100 мл) 1.5 ч при 100°C, обработку 0.1 М и 1 М HCl (по 200 мл каждой) – 30 мин при 100°C. Свободный ЛА извлекали экстракцией бактериальных клеток, предварительно осажденных центрифугированием (4000 об/мин) смесью хлороформ-метанол (2 : 1, 150 мл, 100°C, 30 мин). Хлороформные экстракты, содержащие ЛА, упаривали, сухой остаток растворяли в минимальном объеме хлороформа, ЛА осаждали 5-кратным объемом ацетона на холоду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кириель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 166–181.
2. Moran A.P. // J. Toxicol. – Toxin Revs. 1995. V. 14. P. 47–83.
3. Alving C.R. // Immunobiology. 1993. V. 187. P. 430–446.
4. Takada H., Kotani S. // Crit. Rev. Microbiol. 1989. V. 16. P. 477–523.
5. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 9. P. 245–249.
6. Brade H., Galanos C. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. P. 233–237.
7. Jiao B., Freudenberg M., Galanos C. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 180. P. 515–518.
8. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
9. Wober W., Alaupovic P. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 19. P. 340–356.
10. Wang Y., Cole R.B. // J. Mass Spectrom. 1996. V. 31. P. 138–149.
11. Darveau R.P., Hancock R.E.W. // J. Bacteriol. 1983. V. 155. P. 831–838.
12. Kamio Y., Kim K.C., Takahashi H. // J. Biochem. 1971. V. 70. P. 187–191.
13. Galloway S.M., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6394–6402.
14. Rothfield L., Perlman M. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 1386–1392.
15. Krasikova I.N., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 89. P. 287–289.
16. Qureshi N., Cotter R.J., Takayama K. // J. Microbiol. Methods. 1986. V. 5. P. 65–77.
17. Westphal O., Luderitz O. // Angew. Chem. 1954. V. 66. P. 407–417.
18. Красикова И.Н., Соловьева Т.Ф., Хотимченко С.В., Оводов Ю.С. // Химия природн. соедин. 1991. № 4. С. 579–580.
19. Rooney S.A., Goldfine H., Sweley C.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 270. P. 289–295.
20. Wollenweber H.-W., Rietschel E.Th. // J. Microbiol. Meth. 1990. V. 11. P. 195–211.
21. Krasikova I.N., Luk'yanov P.A., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Experientia. 1982. V. 40. P. 709–710.
22. Krasikova I.N., Gorbach V.I., Isakov V.V., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. P. 349–351.
23. Wollenweber H.-W., Schlecht S., Luderitz O., Rietschel E.Th. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 103. P. 167–171.
24. Lebbar S., Karibian D., Deprum C., Caroff M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 31881–31884.
25. Lugtenberg B., van Alphen L. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 237. P. 51–115.
26. Hitchcock P.J., Morrison D.C. // Handbook of Endotoxin / Ed. R.A. Proctor. Amsterdam; Oxford: Elsevier, 1984. P. 339–375.
27. Anderson A. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. P. 31–35.
28. Strittmatter W., Galanos C. // Microb. Pathogen. 1987. V. 2. P. 29–36.
29. Федореева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 1994. Т. 10. С. 93–99.

30. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. // Биоорганич. химия. 1998. V. 24. С. 549–553.
31. Rudbach G.A., Keegan D.C., Sowell C.G. // J. End. Res. 1995. V. 2. P. 301–310.
32. Соловьева Т.Ф., Ермак И.М., Мороз С.И., Красикова И.Н., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Фролова Г.М., Иванова Е.П., Тимченко Н.Ф., Оводов Ю.С. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 492–500.
33. Krasikova I.N., Khotimchenko S.V., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1257. P. 118–124.
34. Galambos J.T., Shapira R. // Anal. Biochem. 1966. V. 15. P. 334–340.
35. Ovodov Yu.S., Gorshkova R.P., Tomshich S.V. // Immunochimistry. 1974. V. 11. P. 777–780.

A Rapid Method for the Preparation of Lipid A from *Yersinia pseudotuberculosis*

I. N. Krasikova[#], S. I. Bakholdina, and T. F. Solov'eva

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022, Russia*

The possibility of preparing the lipid A (LA) from *Yersinia pseudotuberculosis* Serovar IB by the hydrolysis of whole cells instead of the preliminary isolation of lipopolysaccharide (LPS) was demonstrated. Direct extraction with an organic solvent of the bacterial mass preliminarily treated with 10% acetic acid or 1 M HCl was shown to result in a di- (LA_{AcOH}) or monophosphoryl derivative (LA_{HCl}), respectively. These were completely extractable only after treatment with strong hydrolyzing agents. We concluded that two forms of LA (and LPS) exist in the pseudotuberculosis bacterium which differ in the stability of their bonding to the bacterial outer membrane.

Key words: lipid A, lipopolysaccharide, fatty acids, Yersinia pseudotuberculosis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 31-1409; fax: +7 (4232) 31-4050; e-mail: innakras@piboc.marine.su.