

Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, И.А.Кузьмиченко, З.Л.Девдариани, С.П.Заднова, А.В.Степанов, М.Н.Киреев

## НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Предложено два варианта нового метода, оптимизирующего условия получения и очистки ЛПС из штаммов *Y. pestis*, а также позволяющего исключить применение ядовитых и трудноудаляемых реактивов, упростить и удешевить методику, рационально утилизировать отходы производства. Метод включает предварительную водно-солевую экстракцию бактерий для удаления легкорастворимых веществ с последующим разрушением их ультразвуком в лизирующем буфере (0,1 М Трис-НСl, pH 8,0; 10 ммоль ЭДТА, 1 % Тритон X-100). Для депротеинизации неочищенного эндотоксина в первом случае используется коммерческая протеиназа К (Sigma), а во втором – ферментный комплекс протеовибрин, выделенный из отхода производства вакцины холерной бивалентной химической. Для очистки ЛПС от нуклеиновых кислот введена процедура подкисления образца ледяной уксусной кислотой до pH 3,2–3,4. Варианты способа позволяют улучшить качество препаратов ЛПС относительно метода-прототипа и получать эндотоксин возбудителя чумы, практически не отличающийся по физико-химической характеристике, гомогенности, иммунохимической активности и специфичности от антигена, полученного классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, липополисахарид, протеовибрин.

T.A.Polunina, N.P.Guseva, I.A.Kuz'michenko, Z.L.Devdariani, S.P.Zadnova, A.V.Stepanov, M.N.Kireev

## New Method of Plague Agent Lipopolysaccharide Obtaining

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Put forward are two alternatives of a new method for optimization of conditions of LPS obtaining and purification from *Y. pestis* strains; as well as for avoiding application of poisonous and hard-to-remove reagents; for simplification and cost-cutting of the technique; and for rationalization of production waste management. This method involves preliminary salt-water extraction of bacteria, for elimination of easy-dissolving substances, with the subsequent fracturing using ultrasound in lysing buffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 10 mmol of EDTA, 1 % Triton X-100). The first alternative for deproteinization of non-purified endotoxin is the commercial preparation of proteinase K (Sigma), the second one – an enzyme complex – proteovibrin, isolated from waste material accumulated in the process of cholera chemical bivalent vaccine production. Apart from this, introduced has been a phase of sample acidification by applying glacial acetic acid up to pH 3,2–3,4 to decontaminate LPS from nucleic acids. These two variations of the method provide for enhancement of LPS preparation quality as compared to prototype method, and for obtainment of plague agent endotoxin that is hardly distinguishable in physical-chemical properties, homogeneity, immunochemical activity and specificity from the antigen, manufactured by means of water-phenol extraction following Westphal O. technique.

*Key words:* *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, proteovibrin.

Липополисахарид (ЛПС) *Yersinia pestis*, благодаря своим мощным иммуномодулирующим свойствам, рассматривается как один из перспективных антигенов для создания диагностических и профилактических препаратов. Для выяснения биологических функций, химической структуры и серологической активности необходимо иметь очищенные препараты ЛПС, для чего разработаны и широко используются несколько различных методов и их модификаций, однако все они не лишены недостатков.

Известны способы получения ЛПС грамотрицательных бактерий трихлор-уксусной кислотой, водно-бутанольной и водно-эфирной смесью [2]. Для выделения R-формы ЛПС, к которой относится ЛПС чумного микроба, предложен метод экстракции смесью фенола-хлороформа-петролейного эфира по Galanos [9].

Наибольшую популярность имеет водно-фенольный способ получения ЛПС по O. Westphal

[11], основанный на обработке микробной массы горячей водно-фенольной смесью. Модификациями этого метода является очистка препарата с помощью неионного детергента Тритон X-114 [3], а также удаление нуклеиновых кислот осаждением уксусной кислотой [4]. Однако способы экстракции ЛПС с использованием фенола и других органических веществ в разных вариантах относятся к жестким химическим методам выделения эндотоксина и приводят к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его нативную структуру и биологические свойства. Кроме того, фенол является летучим, агрессивным, ядовитым для человека и экологически вредным веществом.

Также применяются щадящие способы получения ЛПС, к которым относится метод R.P.Darveau [7], где клетки разрушают механически продавливанием через French-press, а ЛПС очищают от примесей обработкой панкреатическими нуклеазами,

проназой, ЭДТА и SDS. В другом методе предложено разрушение бактерий путем кипячения в лизирующем буфере с SDS и меркаптоэтанолом с последующей депротеинизацией материала протеиназой К [10]. Использование детергента SDS в обоих методах существенно усложняет процедуру получения ЛПС, т.к. SDS является трудноудаляемой примесью, снижающей качество получаемых препаратов.

Более простым в исполнении является способ выделения ЛПС кишечной палочки, при котором после лизиса клеток в буфере, содержащем ЭДТА, фенилметил-сульфонилхлорид (ФМСФ) и Тритон X-100, осветленный экстракт депротеинизировали протеиназой К [1]. Однако этот метод не предусматривает очистку от нуклеиновых кислот. Таким образом, отмеченные недостатки служат основанием для поиска новых методов выделения и очистки специфических полисахаридов.

Целью работы явилась разработка оптимального метода получения ЛПС чумного микроба, основанного на упрощении процедуры его выделения и сокращении количества этапов очистки антигена с использованием щадящей обработки материала протеолитическими ферментами разного происхождения.

### Материалы и методы

Препараты ЛПС получали из лиофилизированных клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при 28 °С и обеззараженных 0,5 % формалином в течение 12–18 ч по технологии, изложенной в производственном регламенте 01898109-04-04 на «Имуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные».

При выделении ЛПС использовали протеолитические ферменты – коммерческую протеиназу К (Proteinase K, «Sigma», США) и ферментный комплекс холерного вибриона протеовибрин [7].

Определение химического состава проводили общепринятыми методами: суммарные углеводы – по Дюбуа с тимолом и серной кислотой, белки – по Лоури, нуклеиновые кислоты – по Спирину.

Электрофорез в PAGE-SDS проводили по методу W.K.Laemmli [10]. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 10–20 мкл препарата. Для характеристики препаратов в отношении белковых примесей гели обрабатывали Кумасси голубым, для выявления полисахаридов – азотнокислым серебром.

Обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) проводили при комнатной температуре с использованием градиентной системы Breeze на колонке Symmetry 300™ C 18 (5 мкм; 4,6×150 мм; «Waters», США). Для получения хроматографических данных при 254 нм использовали УФ-детектор, скорость элюции – 1 мл/мин.

Имунохимическую активность полученных препаратов изучали в реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони (РИД) и твердофазным иммуноферментным методом (ТИФА). Для постановки

РИД использовали поликлональные чумные агглютинирующие лошадиные сыворотки (РосНИПЧИ «Микроб») и экспериментальные серии моноклональных IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °С, выделенные из асцитической жидкости линейных мышей BALB/c, которые далее метили пероксидазой хрена и использовали в ТИФА. Специфичность препаратов ЛПС чумного микроба определяли с экспериментальными мышинными сыворотками, полученными к штаммам других видов: *Yersinia pseudotuberculosis* Ia; *Francisella tularensis holarctica*; *Escherichia coli* 5198/99; *Salmonella typhimurium* 20.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В качестве прототипа нами был использован достаточно эффективный и простой способ экстракции эндотоксина из кишечной палочки [1]. При попытке применить этот способ на модели возбудителя чумы был получен препарат ЛПС, содержащий большое количество белка и нуклеиновых кислот. Кроме того, использование ингибитора протеаз ФМСФ негативно влияло на внесенный протеолитический фермент, однако отдельные этапы этого метода были включены в дальнейшую разработку.

Предварительно проводили водносолевою экстракцию бактерий для удаления легкорастворимых веществ в течение 18 ч при 4 °С. После центрифугирования осадок суспензировали в лизирующем буфере (0,1 М Трис-НСl, рН 8,0; 10 ммоль ЭДТА, 1 % Тритон X-100) из расчета 5 мл на 1 г влажных клеток. В отличие от описанных выше методов деструкцию клеток проводили обработкой суспензии ультразвуком в дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте излучения 44 кГц и максимальной мощности 5 раз по 1 мин с интервалом 1 мин. После центрифугирования при 16 тыс. об/мин в течение 50 мин при 4 °С к экстракту добавляли протеиназу К до конечной концентрации 80 мкг/мл и инкубировали 60 мин при 56 °С. Очистку ЛПС от нуклеиновых кислот проводили путем подкисления (под контролем рН-метра) полученного образца ледяной уксусной кислотой до рН 3,2–3,4 и центрифугирования при 6 тыс. об/мин в течение 30 мин. ЛПС выделяли путем добавления центрифугата по каплям к 8 объемам охлажденного до 0 °С 96 % этилового спирта, осадок отделяли центрифугированием. От низкомолекулярных примесей ЛПС освобождали с помощью диализа осадка против дистиллированной воды в течение 18–20 ч, затем препараты лиофилизировали.

В предлагаемой процедуре на этапе депротеинизации неочищенного эндотоксина нами установлена возможность замены коммерческой протеиназы К на ферментный комплекс протеовибрин, обладающий высокой протеолитической активностью. Протеовибрин получен из отхода производства

оральной холерной вакцины – ультрафильтрата детоксицированной культуральной жидкости производственного штамма М-41 серовара Огава холерного вибриона при концентрировании О-антигенсодержащего компонента вакцины на ультрафильтрационном аппарате марки УВА-ПС-20-1040.

Лиофилизированный протеовибрин представляет собой хорошо растворимый в воде сыпучий порошок темно-коричневого цвета с содержанием белка (55±7) %. В протеовибрине присутствуют протеолитические ферменты, гидролизующие белки в диапазоне рН 5,6–8,5, с активностью 8.000–20.000 усл. ед. на 1 мг белка.

Предварительно для дозирования протеовибрина определяли его протеолитическую активность параллельно с коммерческой протеиназой К методом титрования на плотной тест-среде с 10 % обезжиренного молока, рН 7,6±0,2 [5]. Анализ трех серий протеовибрина показал, что его активность в 2 раза ниже, чем у протеиназы К. В соответствии с этим протеовибрин добавляли до конечной концентрации в образце 160 мкг/мл и инкубировали при 37 °С, рН 8,0 в течение 18 ч. В остальном этапы этого варианта выделения ЛПС аналогичны описанному выше.

В результате были получены и охарактеризованы препараты ЛПС (по 3 серии каждого), выделенные двумя вариантами предлагаемого способа: с использованием протеиназы К (ЛПС<sub>1</sub>) и ферментного комплекса протеовибрина (ЛПС<sub>2</sub>), а также методом экстракции ЛПС [1], послужившим прототипом (ЛПС<sub>3</sub>). Для сравнения был взят препарат ЛПС возбудителя чумы, полученный классической водно-фенольной экстракцией по О. Westphal (ЛПС<sup>W</sup>).

Все серии препаратов ЛПС, выделенных разными методами, представляли собой хлопья белого цвета, хорошо растворимые в воде и 0,9 % растворе NaCl.

Проведенный сравнительный химический анализ препаратов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup> показал сходные характеристики по проценту выхода образцов от сухого веса клеток (3,9±0,2), однако по другим параметрам имелось значительное различие. Так, об-

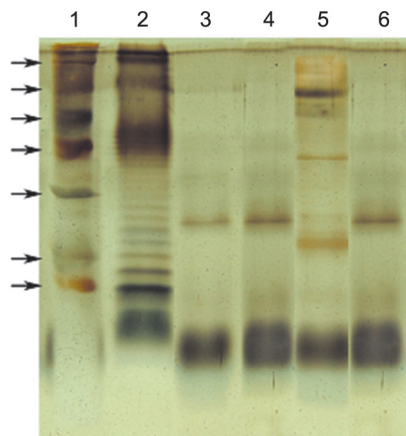


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ЛПС в 12,5 % ПААГ  
Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4 кДа; 2 – ЛПС *E. coli* 055:B5 (S-форма ЛПС, Sigma, США.); 3 – ЛПС<sub>1</sub>; 4 – ЛПС<sub>2</sub>; 5 – ЛПС<sub>3</sub>; 6 – ЛПС<sup>W</sup>. Окраска азотнокислым серебром

разец ЛПС<sub>3</sub> содержал повышенное количество белка (8,4±0,2) и нуклеиновых кислот (3,2±0,1), препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> по проценту содержания белка, углеводов и нуклеиновых кислот имели близкие цифры, которые составляли 1,2±0,4; 38,9±0,2 и 0,3±0,1 соответственно.

Электрофоретическое исследование в PAGE-SDS показало, что препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup> представлены типичной R-формой, имеют ряд идентичных полос, однако в препарате ЛПС<sub>3</sub> отмечается дополнительная полоса, соответствующая маркеру с молекулярной массой 66,2 кДа, которая окрашивалась на белок Кумасси голубым (рис. 1).

Сравнительный анализ хроматограмм образцов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup>, полученных методом ОФ ВЭЖХ, показал, что профили элюции исследованных антигенов относительно идентичны. Отмечается один основной пик высокой амплитуды на 1,2–1,5 мин, который был собран и исследован электрофоретически. Было показано, что во всех случаях в этом пике содержался полисахарид. В препарате ЛПС<sub>3</sub> отмечается два дополнительных пика малой амплитуды на 1,2 и 2,0 мин (рис. 2).

Анализ иммунологической активности показал, что препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> в реакции иммунодиффузии с поликлональными чумными агглюти-

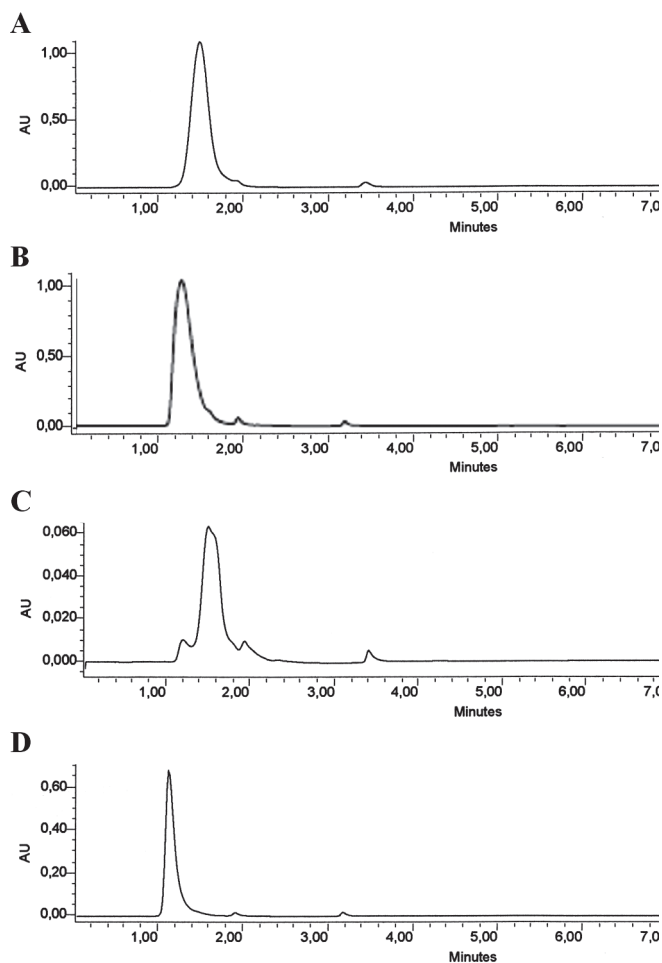


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ-анализ патогенов *Y. pestis* EV при 254 нм  
Профили элюции: А – ЛПС<sub>1</sub>; В – ЛПС<sub>2</sub>; С – ЛПС<sub>3</sub>; D – ЛПС<sup>W</sup>



нирующими лошадиными сыворотками и моноклональными IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °C давали одну четкую совмещаемую линию преципитации в концентрации 1 мг/мл, что говорит об их серологической гомогенности. Образцы ЛПС<sub>3</sub> в РИД давали более слабую размытую линию преципитации, частично совмещаемую с линиями других образцов. Сравнительное тестирование препаратов ЛПС в ТИФА показало, что иммунологическая активность препаратов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> в 3 раза выше, чем у ЛПС<sub>3</sub> (0,96±0,02) и составляет 0,32±0,03; 0,36±0,15 и (0,26±0,05) мкг/мл соответственно. Специфичность препаратов эндотоксина подтверждена отрицательной реакцией с сыворотками к штаммам других видов.

Таким образом, предложен оптимизированный метод получения и технологичная схема очистки ЛПС чумного микроба, позволяющие исключить использование ядовитых и трудноудаляемых реактивов, упростить и удешевить методику, рационально утилизировать отходы производства. Варианты способа позволяют улучшить качество препаратов ЛПС относительно метода-прототипа и получать эндотоксин возбудителя чумы, практически не отличающийся по физико-химической характеристике, гомогенности, иммунохимической активности и специфичности от антигена, полученного классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Способ получения липополисахаридов. Патент РФ 2237719, опубл. 10.10.2004.
2. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка; 1982. 192 с.
3. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов. Патент РФ 2051969, опубл. 10.01.1996.
4. Махнева З.К., Вишневская Т.А., Прохоренко И.Р. Влияние метода выделения на выход и состав липополисахаридов из фотосинтезирующих бактерий. *Прикладная биохим. и микробиол.* 1996; 32(4):444–7.
5. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. *Пробл. особо опасных инф.* 2002; 1(83):148–53.
6. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Червякова Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В. Способ получения питательной основы и питательная среда для куль-

тивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ 2360962, опубл. 10.07.2009.

7. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8.
8. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9:245–9.
9. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
10. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154:269–77.
11. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Uber die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch. Teil B.* 1952; 7:148–55.

#### References

1. Burygin G.L., Matora L.Yu., Shchegolev S.Yu. [Method of lipopolysaccharide production]. RF Patent 2237719. 10.10.2014.
2. Zakharova I.Ya., Kosenko L.V. [Methods of Microbial Lipopolysaccharide Investigations]. Kiev: Naukova Dumka; 1982. 192 p.
3. Markov E.Yu., Nikolaev V.B. [Method of bacterial lipopolysaccharide production]. RF Patent 2051969. 10.01.1996.
4. Makhneva Z.K., Vishnivetskaya T.A., Prokhorenko I.R. [Impact of the methods applied on the yield and composition of lipopolysaccharides isolated from photosynthetic bacteria]. *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiol.* 1996; 32(4):444–7.
5. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Kireev M.N., Belyakova N.I., Klokov O.D. [Test-media for identification of twnase, protease and phospholipase activity in cholera chemical vaccine and its components]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2002; 1(83):148–53.
6. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., Solodovnikov N.S., Chervyakova N.S., Nizhegorodtsev S.A., Antonycheva M.V. [Method of nutrient base and nutrient media manufacturing for cultivating microorganisms belonging to *Yersinia* and *Vibrio* species]. RF Patent 2360962.
7. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8.
8. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9:245–9.
9. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
10. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154:269–77.
11. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Uber die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch. Teil B.* 1952; 7:148–55.

#### Authors:

Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Stepanov A.V., Kireev M.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 26.09.13.