

Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, М.Н.Киреев, Т.М.Тараненко, З.Л.Девдариани, С.П.Заднова,
Е.М.Кузнецова, А.В.Степанов, С.Н.Клюева, Т.Л.Захарова

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ЧУМНОГО МИКРОБА, ВЫДЕЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

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

Проведено сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств ЛПС чумного микроба, выделенного разными методами, и деградированного ПС. Установлено, что препараты ЛПС *Y. pestis* EV 28 °С, выделенные водно-фенольной экстракцией по Вестфалю (ЛПС^W) и ферментативным методом по Darveau (ЛПС^D), являются типичными R-гликолипидами с молекулярной массой (8,1±3,2) кДа. Все серии ЛПС^W, ЛПС^D и деградированного ПС хорошо растворимы в воде и 0,9 % растворе NaCl, гомогенны, характеризуются достаточной степенью чистоты. Кроме того, показано, что ПС является наиболее перспективным фрагментом молекулы ЛПС при конструировании чумных иммунодиагностических препаратов, т.к., обладая меньшей цитотоксичностью, сохраняет идентичность химического состава и иммунохимическую специфичность эндотоксина.

Ключевые слова: липополисахарид, деградированный полисахарид, *Yersinia pestis*.

T.A.Polunina, N.P.Guseva, M.N.Kireev, T.M.Taranenko, Z.L.Devdariani, S.P.Zadnova, E.M.Kuznetsova,
A.V.Stepanov, S.N.Klyueva, T.L.Zakharova

Comparative Study of Some Physical-Chemical and Immunochemical Properties of Plague Microbe Lipopolysaccharide Preparations Obtained with the Help of Different Techniques

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out is the comparative study of some physical-chemical and immunechemical properties of plague microbe lipopolysaccharide, extracted with the help of different techniques and dehydrated by polysaccharide. Determined is the fact that lipopolysaccharide preparations of *Y. pestis* EV 28 °C, isolated by means of aqueous-phenol extraction according to Westphal (LPS^W) and fermentation method according to Darveau (LPS^D), are typical R-glycolipids with molar mass equal to (8,1±3,2) kDa. All series of LPS^W, LPS^D, and degraded polysaccharide (PS) are easily soluble in water and in 0,9 % NaCl solution. They are homogenous and characterized by an adequate degree of purity. Aside from that, it is demonstrated that potentially PS is the most productive molecule fragment of LPS for the construction of plague immunodiagnostic preparation, since despite its decreased cytotoxicity PS retains identity of chemical composition and immunechemical specificity of endotoxin.

Key words: lipopolysaccharide, degraded polysaccharide, *Yersinia pestis*.

Создание высокоэффективных диагностических препаратов, особенно для идентификации атипичных штаммов возбудителя чумы, остается актуальной проблемой для отечественного здравоохранения.

Липополисахарид (ЛПС), являющийся основным компонентом клеточной стенки бактерий и мощным модулятором иммунной реактивности макроорганизма, нашел широкое применение в диагностике многих инфекционных заболеваний.

Отличительной особенностью ЛПС *Yersinia pestis* является его принадлежность к R-хемотипу, т.к. он построен по типу гликолипида, лишённого O-специфических антигенных цепей, присутствующих в ЛПС большинства грамотрицательных бактерий. Установлено, что наличие у возбудителя чумы шероховатой формы ЛПС объясняется тем, что кластер генов O-антигена не функционирует в результате нескольких мутаций [14]. Синтез ЛПС у чумного микроба конститутивен, однако строение и биологические свойства эндотоксина существенно зависят от температуры выращивания и способов выделения [3, 4, 12]. Биологические свойства молекулы ЛПС определяются различными его структурными фраг-

ментами, так за токсичность и пирогенность отвечает липид А, а иммунохимическая специфичность зависит от структуры полисахаридной части, представленной 8 сахарами, так называемого core-региона [2, 7]. Имеются данные о наличии у полисахарида (ПС) кора *Y. pestis* видо- и родоспецифических детерминантов [9].

Цель работы состояла в сравнительном изучении некоторых физико-химических и иммунохимических свойств ЛПС чумного микроба, полученного разными методами, и деградированного ПС как одного из его диагностически значимых фрагментов.

Материалы и методы

Для получения ЛПС были использованы два метода: классическая водно-фенольная экстракция по O.Westphal (ЛПС^W) [15] и ферментативный метод R.P.Darveau (ЛПС^D) [10] в нашей модификации. Последняя заключалась в том, что процедура прохождения клеточной суспензии дважды под давлением через френч-пресс, с целью разрушения клеток, была заменена обработкой суспензии ультразвуком

в дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте излучения 44 кГц и максимальной мощности 3 раза по 5 мин с интервалами 1 мин.

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

Выделение деградированного полисахарида (ПС) из ЛПС проводили путем мягкого гидролиза в 1 % уксусной кислоте при 100 °С в течение 1 ч [13]. Осадок липида А отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. Полисахаридсодержащий супернатант фракционировали на сефадексе G-50 в пиридин-ацетатном буфере (рН 4,5) и лиофилизировали.

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

Электрофорез SDS-PAGE проводили по методу Laemmli в трис-глициновом буфере (рН 8,3) на приборе «Mini protean II» фирмы «Bio Rad» (США), используя 4 % концентрирующий и 13 % разделяющий гели. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 10–20 мкг. Для выявления полисахаридов гели проявляли азотно-кислым серебром с помощью набора реактивов фирмы «Bio-Rad Silver Stain» (США). Для характеристики препаратов в отношении белковых примесей гели после электрофореза обрабатывали Кумасси ярко синим R-250 (Диаэм, Германия). В результате белки окрашивались в голубой цвет, а полисахариды – в желтый.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (40×3 см) с TSK гелем HW-50, в качестве элюирующего раствора использовали фосфатный буфер М/150 с 0,1 М NaCl, рН 7,2. Колонку предварительно калибровали метчиками молекулярных масс из набора «Dalton Standards MS-II» (Serva).

Обращенно-фазовую жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) проводили при комнатной температуре с использованием градиентной системы Breeze («Waters», США). Для анализа образцов ЛПС^W, ЛПС^D и ПС, растворенных в деионизованной воде, использовали колонку Symmetry 300TM C 18 (5 мкм; 4,6×150 мм; фирмы «Waters») и градиент концентрации ацетонитрила (10–25 %) в растворе 0,14 М ацетата аммония. Для получения хроматографических данных при длине волны 254 нм использовали УФ-детектор, скорость элюции – 1 мл/мин.

Определение моносахаридного состава в гидролизатах полученных препаратов проводили с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GL-2010 («Shimadzu», Япония), используя капиллярную колонку Equity-1. Сигналы детектора

регистрировали с помощью самописца в виде пиков на хроматограмме, площадь которых пропорциональна количеству вещества. Идентификацию моносахаридов осуществляли по времени удерживания, ориентируясь на время удерживания известных стандартных моносахаридов (глюкозы, маннозы, ксилозы, галактозы, глюкозамина).

Иммунохимическую активность полученных препаратов изучали в реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони (РИД) и твердофазным иммуноферментным анализом (ТИФА). Для постановки РИД использовали чумные агглютинирующие лошадиные сыворотки (РосНИПЧИ «Микроб»); экспериментальные серии моноклональных IgG к ЛПС *Y. pestis EV* 28 °С, выделенные из асцита линейных мышей BALB/c, которые далее метили пероксидазой хрена методом Nakane [5] и использовали в ТИФА с антимишиным конъюгатом. Специфичность препаратов ЛПС и ПС чумного микроба определяли с экспериментальными мышиными сыворотками, полученными к гетерологичным штаммам: *Yersinia pseudotuberculosis* Ia; *Francisella tularensis holarctica*; *Escherichia coli* 5198/99; *Salmonella typhimurium* 20.

Цитотоксическое действие препаратов ЛПС^W, ЛПС^D и ПС на лейкоциты крови нелинейных белых мышей определяли с помощью теста с трипановым синим [6] в 96-луночных пластиковых планшетах. Для этого к 100 мкл клеточной суспензии лейкоцитов добавляли 100 мкл образца в концентрации 3,0, 1,5, 0,75 мг/мл, смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 и 60 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9 % раствор NaCl. Цитотоксическое действие исследуемых антигенов определяли по проценту поврежденных (окрашенных) лейкоцитов.

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

Результаты и обсуждение

ЛПС возбудителя чумы представляет собой липополисахаридные макромолекулы с молекулярной массой около 5 кДа [10, 12], состоящие из двух ковалентно связанных частей, различающихся по структуре и биологической роли. К ним относятся: липид А, обуславливающий токсические свойства и выступающий в роли якоря, прикрепляющего ЛПС к клеточной стенке, и присоединенный к липиду А полисахарид кора, отрицательно заряженные группы которого связывают двухвалентные катионы, что важно для обеспечения целостности и стабильности наружной мембраны. Углеводная и липидная области ЛПС связаны кислотолabile гликозидной связью 2-кето-3-дезоксид-октоновой кислоты (КДО) и могут быть отделены друг от друга после мягкого кислотного гидролиза (деградации) ЛПС.

Известно, что биологическая активность ЛПС зависит от метода выделения препарата. Большинство современных работ отечественных авторов [1, 3, 4, 8,

Химический состав препаратов ЛПС и ПС

Метод выделения антигена	Выход препарата (% от сухого веса клеток или ЛПС)	Химический состав, %		
		Белок	Углеводы	НК
ЛПС по Вестфалу	4,2±0,5	0,89±0,01	38,9±0,2	–
ЛПС по Darveau	2,9±0,6	2,0±0,03	29,2±0,9	0,32±0,05
ПС по Muller-Seitz	7,2±0,8	0,89±0,01	36,2±0,4	0,21±0,03

Примечание. «–» – не выявлено.

9, 12] выполнено на препаратах ЛПС *Y. pestis*, полученных классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal [15], методом C. Galanos [11] или по R.P. Darveau [10].

Нами были получены препараты ЛПС, выделенные по O. Westphal и R.P. Darveau, а также деградированного ПС (по 3 серии каждого), которые представляли собой хлопья белого цвета, хорошо растворимые в воде и 0,9 % растворе NaCl.

Проведенный сравнительный химический анализ препаратов ЛПС^W и ЛПС^D показал различия по выходу препарата, содержанию белка и общих углеводов в пользу метода Вестфали. Поэтому в дальнейшем для получения деградированного ПС мы использовали препараты ЛПС^W. Результаты сравнительного исследования химического состава полученных препаратов ЛПС и ПС представлены в таблице.

При электрофоретическом исследовании в SDS-PAGE установлено, что все препараты ЛПС^W и ЛПС^D не окрашивались на белок Кумасси ярко синим и были представлены типичной R-формой ЛПС в отличие от коммерческого препарата S-формы ЛПС *E. coli* 055:B5 (Sigma, США). Молекулярная масса исследованных ЛПС составила (8,1±3,2) кДа, что было подтверждено результатами гель-фильтрации на TSK геле HW-50. Препараты деградированного ПС также не окрашивались на белок и были представлены полосой с молекулярной массой около 5 кДа (рис. 1).

Изучение моносахаридного состава в гидролизатах препаратов ЛПС^W, ЛПС^D и ПС методом ГЖХ по относительному времени удерживания в сравнении с известными стандартами выявило наличие значимых пиков глюкозы и галактозы во всех образцах.

Сравнительный анализ хроматограмм образцов

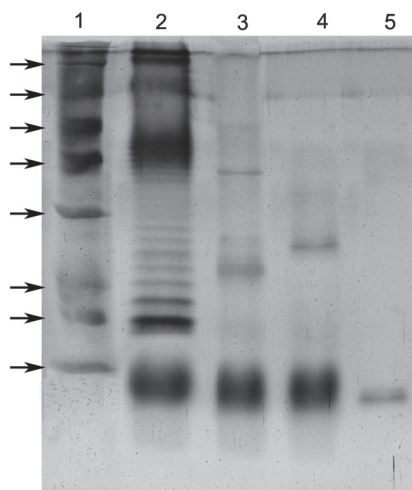


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ЛПС в 13 % SDS-PAGE: 1 – маркеры молекулярной массы 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4; 11,0 кДа («Fermentas», США); 2 – ЛПС *E. coli* 055:B5 (S-форма ЛПС, Sigma, США.); 3 – ЛПС^D; 4 – ЛПС^W; 5 – ПС. Окраска азотно-кислым серебром

ЛПС^W, ЛПС^D и ПС методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детекцией при длинах волн 254 нм (рис. 2) показал, что профили элюции исследованных антигенов относительно идентичны. Отмечается один основной пик высокой амплитуды на 1,2–2,0 мин, который был собран и исследован электрофоретически. Было также установлено, что во всех случаях в этом пике содержится полисахарид.

Анализ иммунохимической активности показал, что все серии препаратов ЛПС^W, ЛПС^D и деградированного ПС в реакции иммунодиффузии с поликлональными чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками и моноклональными IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °C давали одну четкую линию precipitation, что говорит об их серологической гомогенности. При тестировании в ТИФА с моноклональными IgG активность всех образцов ЛПС^W, ЛПС^D и ПС находилась практически на одном уровне и составляла (0,26±0,05); (0,38±0,06) и (0,40±0,09) мкг/мл соответственно. Специфичность полученных препаратов подтверждена отрицательной реакцией с мышиными сыворотками, полученными к гетерологичным штаммам: *Yersinia pseudotuberculosis*

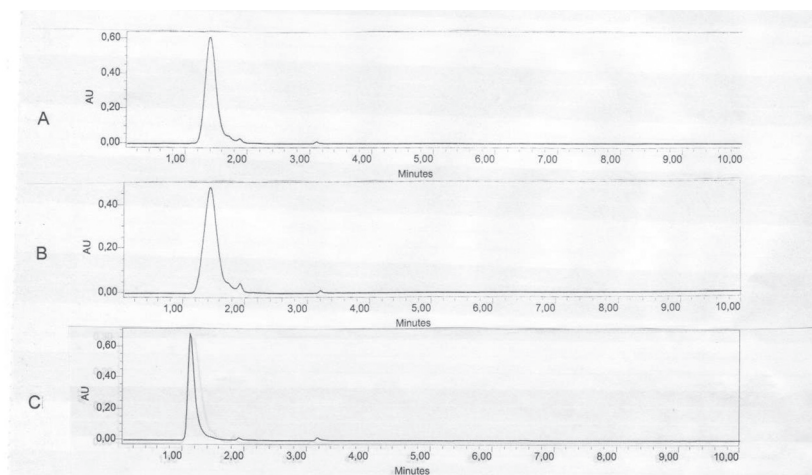


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ – анализ антигенов *Y. pestis* EV при 254 нм: А – ЛПС^W, В – ЛПС^D, С – ПС

Ia, *Francisella tularensis holarctica*, *Escherichia coli* 5198/99, *Salmonella typhimurium* 20.

Цитотоксическое действие исследуемых антигенов *Y. pestis* EV 28 °C на лейкоцитах крови нелинейных белых мышей с помощью теста с трипановым синим выявило снижение этого эффекта при инкубации с образцами деградированного ПС.

Таким образом, результаты исследования показали, что препараты ЛПС *Y. pestis* EV 28 °C, выделенные водно-фенольной экстракцией по O. Westphal и ферментативным методом по R.P. Darveau, являются типичными R-гликолипидами с молекулярной массой (8,1±3,20) кДа. Все серии ЛПС^W, ЛПС^D и деградированного ПС хорошо растворимы в воде и 0,9 % растворе NaCl, гомогенны, характеризуются достаточной степенью чистоты. Сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств выделенных препаратов ЛПС чумного микроба показало преимущество водно-фенольной экстракции, а полученный при этом ПС является наиболее перспективным фрагментом молекулы ЛПС при конструировании чумных иммуноглобулиновых диагностических препаратов, т.к., обладая меньшей цитотоксичностью, сохраняет по ряду показателей идентичность химического состава и иммунохимическую специфичность эндотоксина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беспалова И.А., Пустовалов В.Л., Львов В.Л., Вернер И.К., Васильева Г.И. Получение и некоторые свойства модифицированного производного липополисахарида *Yersinia pestis*. Биотехнол. 1995; 9–10:31–4.
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы. Пробл. особо опасных инф. 2007; 3(93):49–51.
3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. и др. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis*. Биохимия. 2008; 73(2):37–46.
4. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и 37 °C. Биотехнология. 2003; 3:20–4.
5. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
6. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск: Беларусь; 1979. С. 20–3.
7. Сварваль А.В., Ценева Г.Я., Шендерович О.А. Липополисахарид иерсиний и его биологическая активность. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:100–4.
8. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001; 4:53–8.
9. Федорова В.А., Девдариани З.Л. Изучение антигенных

детерминантов липополисахарида *Y. pestis* с помощью моноклональных антител. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1998; 3:22–6.

10. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 1983; 155(2):831–8.
11. Galanos C., Luderitz O., Westphal O.A. New method for the extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 1969; 9:245–9.
12. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44:1731–43.
13. Muller-Seitz E., Jann B., Jann K. Degradation studies on the lipopolysaccharide from *E. coli* 071:K:H12. Separation and investigation of O-specific and core polysaccharides. FEBS Letters. 1968; 1(5):311–4.
14. Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Mol. Microbiol. 2000; 37(2):316–30.
15. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol. Wasser. Z. Naturforsch. Teil B. 1952; 7:148–55.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Беспалова И.А., Пустовалов В.Л., Львов В.Л., Вернер И.К., Васильева Г.И. [Method for acquisition and some properties of the modified *Yersinia pestis* lipopolysaccharide derivative]. Biotechnologia. 1995; 9–10:3–4.
 2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. [The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; (93):49–51.
 3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. et al. [Structural diversity and endotoxin activity of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide]. Biokhimiya. 2008; 73(2):37–46.
 4. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. [Comparative assay of the protein spectrum that can be found in lipopolysaccharide preparations of *Yersinia pestis*, cultivated at 28 and 37 °C]. Biotechnologia. 2003; 3:20–4.
 5. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. [Theory and Practice as Related to Enzyme-Linked Immunoassay]. М.; 1991. 288 p.
 6. Новиков Д.К., Новикова В.И. [Cell-Bond Techniques of Immunodiagnosics]. Minsk; 1979. P. 20–3.
 7. Сварваль А.В., Ценева Г.Я., Шендерович О.А. [*Yersinia* lipopolysaccharide and its biological activity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:100–4.
 8. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В. [Preparation complexes of plague microbe "mice" toxin with modified forms of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide and lipopolysaccharides of other bacteria]. Biotechnologia. 2001; 4:53–8.
 9. Федорова В.А., Девдариани З.Л. [Studies of *Y. pestis* lipopolysaccharide epitopes using monoclonal antibodies]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 1998; 3:22–6.
- Authors:**
Polunina T.A., Guseva N.P., Kireev M.N., Taranenko T.M., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Kuznetsova E.M., Stepanov A.V., Klyueva S.N., Zakharova T.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 29.11.11.