



УДК 579.841.93.083.3:577.114.5

СОМАТИЧЕСКИЕ АНТИГЕНЫ РОДА *BRUCELLA*.
СТРОЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *BRUCELLA MELITENSIS*

Львов В. Л., Маликов В. Е., Шашков А. С. *,
Драновская Е. А., Дмитриев Б. А.

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР, Москва;

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

Установлено строение полисахаридной цепи липополисахаридного соматического антигена высоковирулентного штамма *Brucella melitensis* 565, являющегося представителем наиболее патогенного для человека вида бруцелл. При экстракции убитых клеток *B. melitensis* водным фенолом липополисахарид (ЛПС) переходит в фенольный слой, после диализа которого антиген выделяют хроматографией на колонке с сефарозой 4В. При мягкой кислотной деградации ЛПС наряду с липидом образуется О-специфический гомополисахарид, построенный из остатков 4,6-дидезокси-4-формамидо-D-маннопирозы, соединенных α -(1→2)-связями. Строение полисахарида установлено главным образом с помощью спектроскопии ЯМР и анализа методом метилирования. Данные ЯМР-спектроскопического исследования О-антигенного полисахарида, выделенного из коммерческого вакцинного штамма *B. abortus* 19-ВА, показали его полную идентичность с полисахаридом из *B. melitensis* 565.

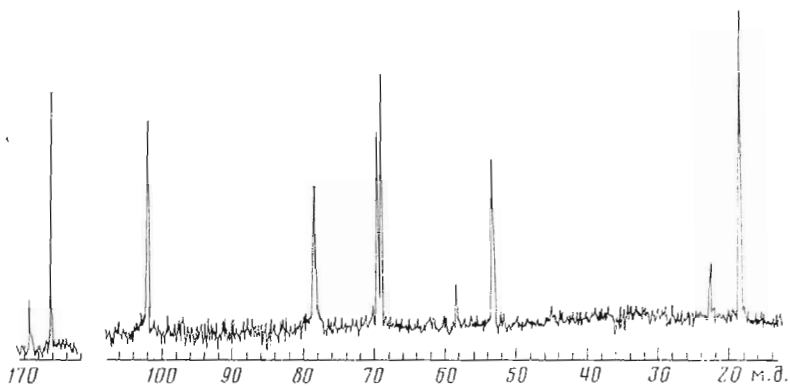
Бруцеллез — зоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Brucella*. Несмотря на значительные успехи в борьбе с бруцеллезом, в ряде регионов отмечается стабилизация и даже рост заболеваемости у людей, проживающих в районах с развитым животноводством [1]. Бруцеллы представляют собой бескапсульные, неподвижные, неспорообразующие грамотрицательные коккобациллы, являющиеся факультативными внутриклеточными паразитами [2].

В соответствии с принятой классификацией род *Brucella* разделяется на шесть видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*), каждый из которых в свою очередь подразделяется на биотипы в зависимости от их дифференциальных признаков [3]. Однако широкая циркуляция бруцелл среди животных, выделение культур от нетипированных хозяев и диких животных, а также существование атипичных разновидностей бруцелл превращают проблему таксономии этих микроорганизмов в одну из важных проблем инфекционной микробиологии. В настоящее время для отнесения возбудителей к роду *Brucella* с помощью иммунохимических методов используют антигены белковой и липополисахаридной природы [4].

Изучение иммуногенеза при бруцеллезе, выявление факторов патогенности и серологического родства бруцелл с другими возбудителями, а также получение высокоспецифических диагностических и протективных препаратов невозможно без знания химического строения антигенов наружной мембраны бруцелл. Имеющаяся по этому вопросу литература немногочисленна и противоречива.

Цель настоящей работы, которой мы начинаем систематическое изучение соматических антигенов бактерий рода *Brucella*, — установление химического строения О-специфической полисахаридной цепи ЛПС из вирулентного штамма *B. melitensis* 565 и вакцинного штамма *B. abortus* 19-ВА.

ЛПС был выделен экстракцией сухих убитых бактериальных клеток *B. melitensis* 565 горячим водным 45% фенолом [5] с последующим отделением фенольного слоя центрифугированием и диализом. Препарат, полученный после отделения нерастворимого осадка и лиофилизации, был



Спектр ^{13}C -ЯМР O-специфического полисахарида *B. melitensis*

подвергнут гель-хроматографии на колонке с сефарозой 4 В в 0,01 М аммоний-бикарбонатном буфере. Элюирующийся с удерживаемым объемом колонки ЛПС был практически свободен от примесей белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Его выход составил 1,5% от веса сухих бактериальных клеток.

Аналогичным образом с выходом 1,8% был выделен ЛПС из вакцинного штамма *B. abortus* 19-ВА.

Изучение серологической активности ЛПС проводили с использованием реакции иммунодиффузии в геле [6] и реакции кольцепреципитации [7]. В реакции иммунодиффузии в геле оба ЛПС реагировали как с бруцеллезной поливалентной сывороткой, так и с гомологичными кроличьими антисыворотками, образуя при этом две линии преципитации. Изученные препараты ЛПС *B. melitensis* 565 и *B. abortus* 19-ВА были идентичны по данным реакции иммунодиффузии с использованием обеих антисывороток независимо от видовой принадлежности и вирулентности культур.

Результаты реакции иммунодиффузии в геле были подтверждены данными реакции кольцепреципитации: титры ЛПС *B. melitensis* 565 и *B. abortus* 19-ВА (начальная концентрация ЛПС 1 мг/мл) с антисывороткой против ЛПС *B. melitensis* 565 составили 1:128 000, тогда как с поливалентной сывороткой сравниваемые ЛПС реагировали в титре 1:64 000.

Для полного расщепления кислотолабильных связей между липидной и полисахаридной частью ЛПС *B. melitensis* 565 потребовалось продолжительное нагревание (100°C , 5 ч) с 1% уксусной кислотой, тогда как в случае ЛПС энтеробактерий (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* и др.) достаточно короткого (1–2 ч) гидролиза. Полисахаридный компонент ЛПС (ПС) был выделен гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 после отделения нерастворимого липида А центрифугированием. Выход нейтрального, по данным электрофореза на бумаге, ПС, $[\alpha]_D +21^\circ$ (с 1, вода), составил 26% веса исходного ЛПС.

Традиционный подход к определению моносахаридного состава полисахаридов, заключающийся в кислотном гидролизе полимера и изучении продуктов его расщепления с использованием ионообменной или газожидкостной хроматографии, в данном случае оказался неэффективным. Гидролиз ПС (0,5 н. HCl, 100°C , 0,5–4 ч) не сопровождался существенной деполимеризацией, что следовало из данных гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-50, тогда как применение более жестких условий гидролиза (2 н. HCl) приводило к значительному осмолению реакционной смеси. В связи с этим дальнейшее изучение ПС было проведено с использованием ЯМР-спектроскопии.

Спектр ^1H -ЯМР нативного полисахарида содержал сигналы одного аномерного протона при 5,21 м. д. (синглет, $J_{1,2}$ 0,5 Гц), трех протонов С-метильной группы 6-дезоксигексозы при 1,23 м. д. (дублет, $J_{5,6}$ 6 Гц) и пяти протонов в области 3,36–4,25 м. д. Необходимо отметить также наличие в слабopольной части спектра синглетного сигнала одного протона при

Химические сдвиги (δ , м. д.) спектров ^{13}C -ЯМР
исходного и модифицированных полисахаридов

Атом углерода	ПС	ПС _м	N-Ацетилиро- ванный ПС _м
C1	101,7	101,7	101,7
C2	78,2	77,9	78,3
C3	69,4 *	67,7 *	69,6 *
C4	53,2	55,7	54,4
C5	68,85 *	67,2 *	69,2 *
C6	18,1	18,1	18,0
CНО	166,1		
СОСН ₃			23,3; 175,75

* Отнесение может быть обратным.

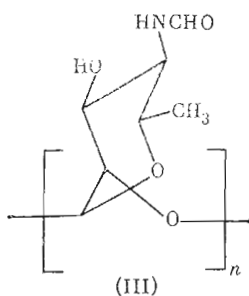
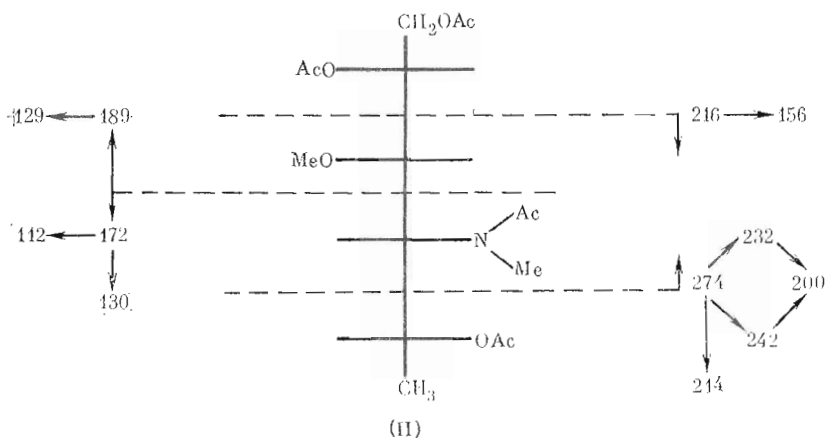
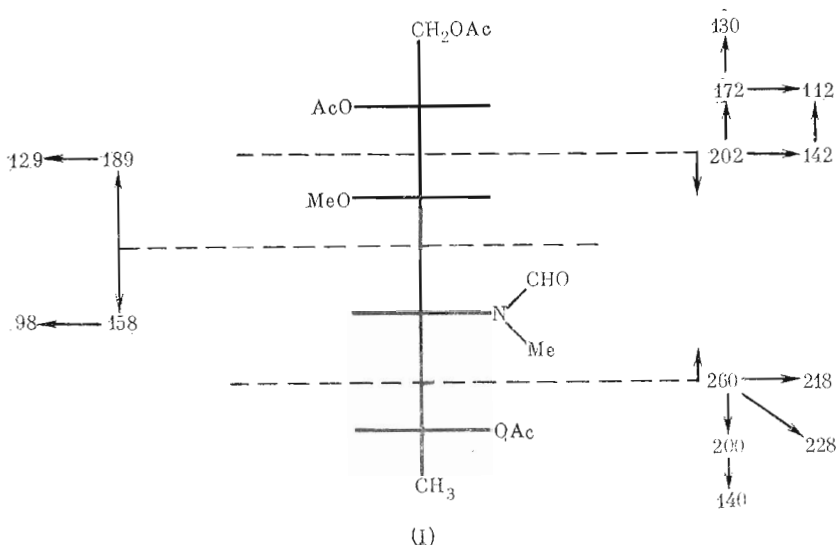
8,26 м. д. В спектре ^{13}C -ЯМР (рисунок, таблица) присутствовали сигналы аномерного углерода (101,7 м. д.), атома углерода, несущего аминогруппу (53,2 м. д.), С-метильной группы остатка 6-дезоксигексозы (18,1 м. д.), а также сигналы трех вторичных атомов углерода при 78,2; 69,4 и 68,85 м. д.; низкопольный сигнал при 166,1 м. д. соответствовал, очевидно, карбонильной группе N-ацилирующего остатка. Из приведенных выше данных следовало, что ПС является регулярным гомополимером, построенным из остатков N-ацилированной аминодидезоксигексозы.

Отсутствие в спектре ^{13}C -ЯМР сигналов в области 103–110 и 82–86 м. д., характерных для C-1 и C-4 остатков альдофураноз, указывало на пиранозную форму моносахаридного компонента ПС [8]. Высокое значение константы спин-спинового взаимодействия (J_{CH} 173 Гц) для сигнала аномерного углерода (определено из спектра ^{13}C -ЯМР, снятого без подавления углерод-протонного взаимодействия) однозначно указывало на α -конфигурацию гликозидной связи пиранозного остатка [9]. Снятый без подавления углерод-протонного взаимодействия спектр ^{13}C -ЯМР ПС содержал в карбонильной области дублет при 166,1 м. д. с J_{CH} 197 Гц, наличие которого доказывало, что аминогруппа пиранозного остатка ацилирована муравьиной кислотой. Данные спектра ^1H -ЯМР (синглет при 8,26 м. д.) также подтверждали этот вывод.

Наличие небольшого числа циклических протонов в принципе позволяло провести их отнесение методом двойного гомоядерного резонанса и тем самым определить относительную конфигурацию моносахаридного компонента ПС. Однако в случае нативного ПС вследствие существенного перекрытия мультиплетных сигналов циклических протонов этого сделать не удалось и отнесение было проведено на модифицированном полисахариде (см. ниже).

Как указывалось выше, относительно мягкая кислотная обработка ПС (0,5 л. HCl, 100° С, 4 ч) не приводит к существенной деградации полимера. Выделенный в результате такой обработки модифицированный полисахарид (ПС_м), $[\alpha]_D^{+38}$ (с 1, вода), обнаруживал, по данным электрофореза на бумаге, сильные основные свойства (E_{GlcN} 0,9) и проявлялся нингидрином. Отсутствие в ^{13}C - и ^1H -ЯМР-спектрах ПС_м сигналов N-формильного остатка однозначно указывало на полное деформелирование исходного ПС. Все сигналы в ^1H -ЯМР-спектре ПС_м удалось отнести с использованием метода двойного гомоядерного резонанса. Определение констант спин-спинового взаимодействия vicинальных протонов позволило приписать аминодидезоксигексозе *манно*-конфигурацию ($J_{2,3}$ 4,5; $J_{3,4}$ 10; $J_{4,5}$ 10; $J_{5,6}$ 6,5 Гц).

Нативный ПС и N-ацелированный образец ПС_м были подвергнуты метилированию по методу Хакомори [10]. Полностью метилированные полимеры после очистки гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 были обработаны жидким фтористым водородом [11] при 20° С в течение 3–4 ч. Моносахаридные продукты сольволиза обычным способом [12] превращали в ацетаты полиолов и далее исследовали методом хромато-масс-спектрометрии. При этом в качестве практически единственных компонентов были идентифицированы 1, 2, 5-три-О-ацетил-4, 6-дедеокси-3-О-



метил-4-(N-метилформамидо) гексит (I) и 1, 2, 5-три-О-ацетил-4, 6-дидезокси-3-О-метил-4-(N-метил-ацетиамидо)гексит (II) соответственно. Из этих данных следовало, что ПС построен из остатков 4,6-дидезокси-4-(N-формамидо)- α -маннопиранозы, соединенных (1 \rightarrow 2)-связями (III).

Недавно гомополимер сходного строения, построенный из 2-О-связанных остатков 4-амино-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозы, N-ацилированной 3-дезоксиглицеро-тетроновой кислоты, был выделен из О-антигенного ЛПС *Vibrio cholerae* [13]. Сооставление спектров ^{13}C -ЯМР N-деацелированного образца полисахарида из холерного вибриона и ПС_м показало их полную идентичность. Совпадение значений величин оптического враще-

ния этих полисахаридов позволило сделать вывод о *D*-конфигурации моносахаридных остатков, входящих в состав О-специфического полисахарида *B. melitensis* 565.

Таким образом, согласно приведенным выше данным, О-специфические полисахаридные цепи ЛПС *B. melitensis* 565 построены из 2-О-связанных 4,6-дидезокси-4-формаидо- α -*D*-маннопиранозидных остатков. Анализ ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров О-специфического полисахарида, выделенного описанным выше способом из коммерческого вакцинного штамма *B. abortus*, показал их полную тождественность со спектрами ЛПС из штамма *B. melitensis* 565, серологически родственного штамму *B. abortus* 19-ВА.

К моменту завершения настоящей работы появилось сообщение об установлении первичной структуры О-специфических полисахаридов из *Yersinia enterocolitica* 0:9 и перекрестно реагирующего микроорганизма *B. abortus* [14]. По всем химическим и спектральным характеристикам они оказались идентичны О-специфическим полисахаридам из *B. melitensis* и *B. abortus* 19-ВА. Таким образом, в настоящее время можно считать доказанным, что наличие перекрестных серологических реакций *B. melitensis*, *B. abortus* с *Y. enterocolitica* и *V. cholerae* обусловлено присутствием в составе О-специфических гомополисахаридных цепей ЛПС общего структурного элемента — 4-амино-4,6-дидезокси- α -*D*-маннопиранозы.

Результаты нашей работы позволяют по-новому интерпретировать ряд полученных ранее данных других авторов. Так, считалось, что в состав О-специфической полисахаридной цепи ЛПС *B. melitensis* входят остатки маннозы, глюкозы и хиновозамина [15], поскольку эти сахара удавалось обнаружить в гидролизатах ЛПС и ЛПС. Ранее мы неоднократно отмечали, что традиционное использование данных кислотного гидролиза, не подтвержденных результатами исследования спектральными методами, может привести к ошибочному или полностью неправильному выводу о составе полисахарида [16, 17]. Описанный в настоящей работе случай — очередное подтверждение этого факта. Действительно, в условиях кислотного гидролиза ЛПС претерпевает *N*-деформилирование и превращается в устойчивый к деполимеризации поликатионит, а в гидролизате обнаруживаются только минорные компоненты, входящие в состав олигосахаридного кора, присоединенного к полисахариду. Перечисленные выше сахара действительно были обнаружены нами в очень малых количествах.

Экспериментальная часть

Получение бактериальных клеток. Выращенные на матрацах микробные клетки *B. melitensis* 565 и *B. abortus* 19-ВА [18] смывали физиологическим раствором и далее обрабатывали ацетоном на холоду. Промытый эфиром «ацетоновый порошок» окончательно высушивали в вакуумном эксикаторе. Выход сухой бактериальной массы со 100 засеянных матрацев составил 30–40 г.

Серологические методы. Серологические свойства ЛПС изучали в реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони [6] и в реакции кольцепреципитации [7]. Для иммунодиффузии использовали 1% агар Noble (Difco) в медианал-вероналовом буфере, рН 8,3. Бруцеллезную поливалентную сыворотку получали от кроликов весом 3–3,5 кг, зараженных однократно внутривенно вирулентными культурами *B. melitensis* 565 и *B. abortus* 146 в дозе $2 \cdot 10^9$ микробных клеток в 1 мл физиологического раствора. Кровь брали через 20 сут после инъекции. Полученная таким образом сыворотка имела в реакции Райта титр 1 : 12 800.

Гомологичную кроличью антисыворотку получали путем четырехкратного внутривенного введения ЛПС *B. melitensis* 565 в дозе 1 мг/мл с интервалом 7 сут. Кроликов обескровливали через 8–10 сут после последней иммунизации. Сыворотка к ЛПС в реакции Райта имела титр 1 : 6400, а в реакции пассивной гемагглютинации — 1 : 51 200.

Общие методы. Электрофорез на бумаге проводили в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5, при 27 В/см в течение 90 мин. Полисахариды

проявляли щелочным нитратом серебра с последующим нагреванием над паром. Гель-хроматографию на колонке с сефарозой 4В (3×64 см) проводили в 0,01 М аммоний-бикарбонатном буфере, гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-50 (3,7×80 см) — в пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5. Выходные кривые гель-хроматографии были построены с помощью углеводного анализатора Technicon SC-2. ГЖХ осуществляли на приборе Pye-Uniscam, модель 104, используя стеклянную колонку (0,4×150 см), содержащую OV-1 на Gas-Chrom Q (100–200 меш). Для ГЖХ-масс-спектроскопии использовали прибор Varian-MAT GNOM 111. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin—Elmer, модель 141. ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры полисахаридов были сняты на приборе Bruker WM-250 при 80° С. При съемке ¹³C-ЯМР-спектров в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ 50,14 м. д.). Упаривание проводили в вакууме при температуре ниже 40° С.

Выделение липополисахаридов и получение полисахаридов. Суспензию 20 г сухих бактериальных клеток *B. melitensis* 565 в смеси 350 мл 90% фенола и 350 мл воды перемешивали 15 мин при 68° С. Охлажденный до 5–10° С экстракт центрифугировали 1 ч при 6000g. Фенольный слой отделяли, вновь экстрагировали 350 мл воды как описано выше, диализовали против проточной, затем против дистиллированной воды. Супернатант после отделения нерастворимого осадка лиофилизировали; выход сырого экстракта 535 мг. Раствор 235 мг сухого остатка в минимальном объеме 0,01 М аммоний-бикарбонатного буфера наносили на колонку с сефарозой 4В и элюировали тем же буфером со скоростью 0,8 мл/мин, собирая фракции по 5 мл. Фракции, выходящие с удерживаемым объемом колонки и содержащие ЛПС, объединяли и лиофилизировали. Аналогичной очистке подвергали вторую порцию сырого экстракта (300 мг). Общий выход ЛПС составил 240 мг. Поглощение раствора ЛПС в воде (5 мг/мл) при 260 нм практически отсутствовало, что указывало на очень незначительную примесь пуклеиновых кислот.

Раствор 200 мг ЛПС в 150 мл 1% уксусной кислоты нагревали 5 ч при 100° С, выпавший осадок липида отделяли в течение 1 ч центрифугированием при 20 000 g, супернатант лиофилизировали. Раствор осадка в минимальном количестве пиридин-ацетатного буфера наносили на колонку с сефадексом G-50, колонку промывали тем же буфером при скорости подачи буфера 2 мл/мин. Фракции, элюирующиеся с удерживаемым объемом колонки, лиофилизировали и с выходом 20–25% получили ПС, $[\alpha]_D^{+21}$ (с 1, вода).

30 мг ПС растворили в 15 мл 0,5 н. HCl, через 4 ч нагревания при 100° С раствор нейтрализовали 10% водным NaOH и лиофилизировали. Остаток очищали гель-хроматографией на колонке с G-50, используя в качестве элюента воду; полученный таким образом водный раствор ПС_н лиофилизировали в присутствии 1–2 капель 4 н. HCl; выход ПС_н составил 85–90%.

N-Ацетилирование ПС_н проводили в метаноле при 5–10° С действием уксусного ангидрида, поддерживая значение рН 6,5 прибавлением 10% водного NaHCO₃ в течение 2,5 ч. N-Ацетилирование протекает практически полностью с количественным выходом.

Анализ методом метилирования. 5–7 мг ПС или N-ацетилированного ПС_н метилировали по методу Хакомори [10]. Через 16 ч выдерживания с CН₃I прозрачный раствор разбавляли небольшим количеством воды и отдували избыток CН₃I слабым током инертного газа. Полученный раствор хроматографировали на колонке (1,7×30 см) с сефадексом G-50, соответствующие фракции объединяли и лиофилизировали. Выход метилированного полимера составил 85–90%.

К образцу (3–5 мг) метилированного полисахарида, высушенному в вакууме как описано выше и помещенному в прибор для сольволиза, добавляли 3 мл HF, перегнанного над СоF₃, и полученный раствор полимера перемешивали 3–4 ч при 20° С. Фтористый водород отгоняли в вакууме, остаток обрабатывали 5% водной уксусной кислотой и упаривали. К раствору остатка в 2 мл воды прибавляли несколько капель 10% рас-

твора NaHCO_3 и затем 50 мг NaOH . Смесь выдерживали 16 ч, обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+) и удаляли борщюю кислоту упариванием с метанолом. Остаток нагревали с 0,5 мл пиридина и 0,5 мл уксусного ангидрида 30 мин при 100°C и после упаривания исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aslanyan R. G.* In: Zoonoses Control (UNEP). М., 1982, v. 2, p. 70–81.
2. *Вершилова П. А.* Бруцеллез. Сб.: М.: Медицина, 1972, с. 52.
3. *Вершилова П. А., Чернышева М. Н., Князева Э. Н.* Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина, 1974.
4. *Драновская Е. А.* Биологические свойства брудем и получение диагностического и профилактического антигена. Докт. дис. М., 1976.
5. *Westphal O., Jann K.* In: Methods in carbohydrate chemistry. N. Y.—L.: Acad. Press, 1965, v. 5, p. 88–91.
6. *Ouchterlony O.* Acta pathol. et microbiol. scand., 1958, v. 25, p. 186–191.
7. *Бойд У.* Основы иммунологии. М.: Мир, 1969, с. 317.
8. *Шашков А. С., Чижов О. С.* Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–496.
9. *Bock K., Pedersen C. J.* Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1974, v. 2, p. 293–297.
10. *Conrad H. E.* In: Methods in carbohydrate chemistry. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. 6, p. 361–364.
11. *Mort A. J., Lamport D. T. A.* Anal. Biochem., 1977, v. 82, p. 289–309.
12. *Jansson P.-E., Kenne L., Liendgren H., Lindberg B., Lönngren J.* Chem. Commun Univ. Stockholm, 1976, p. 8.
13. *Kenne L., Lindberg B., Unger P., Gustafsson B., Holme T.* Carbohydr. Res., 1982, v. 100, p. 341–349.
14. *Caroff M., Bundle D. R., Perry M. B.* Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, p. 195–200.
15. *Moreno E., Speth S. L., Jones L. M., Berman D. T.* Infect. Immun., 1981, v. 31, p. 214–222.
16. *Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 60–73.
17. *L'vov V. L., Dashunin V. M., Dmitriev B. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K.* Carbohydr. Res., 1983, v. 124, p. 141–149.
18. Лабораторные методы диагностики бруцеллеза. М.: 1968, с. 4–5.

Поступила в редакцию
27.XII.1984

BRUCELLA SOMATIC ANTIGENS. THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *BRUCELLA MELITENSIS* LIPOPOLYSACCHARIDE

L'VGV V. L., MALIKOV V. E., SHASHKOV A. S. *,
DRANOVSKAYA E. A., DMITRIEV B. A.

*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*

The phenol-phase soluble antigenic lipopolysaccharide was isolated from *Brucella melitensis*, strain 565, by the routine phenol/water procedure followed by chromatography on Sepharose 4B. After mild acid hydrolysis and chromatography on Sephadex G-50, the lipopolysaccharide yielded a linear O-specific polysaccharide built up from 1,2-linked 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyl units. The structure of the polysaccharide was deduced mainly from the nuclear magnetic resonance and methylation analyses. The phenol-soluble lipopolysaccharide, isolated from commercial vaccine strain *B. abortus* 19-BA, on mild hydrolysis afforded material, ^{13}C and ^1H -NMR spectra of which were identical to those of the O-specific polysaccharide from *B. melitensis* 565.