



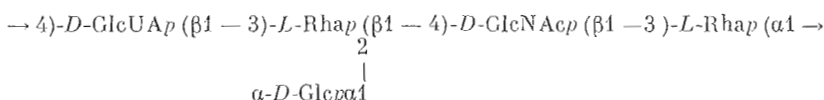
УДК 547.458.02+577.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 10 *. СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA BOYDII* ТИП 4

*Львов В. Л., Тохтмышева Н. В., Дмитриев Б. А.,
Кочетков Н. К., Гофман И. Л.*

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

При кислотном расщеплении антигенного липополисахарида *Shigella boydii* тип 4 с последующим разделением углеводной фракции на сефадексе G-50 получен специфический полисахарид, построенный из остатков *L*-рамнозы, *D*-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты в соотношении 2:1:1:1. На основании данных метилирования, избирательного расщепления по Смитчу, частичного кислотного гидролиза и окисления ацетилированного полисахарида хромовым ангидридом установлено строение повторяющегося звена специфического полисахарида *Shigella boydii* тип 4, которое является разветвленным пентасахаридом



Обсуждаются серологические свойства липополисахарида и специфического полисахарида *Shigella boydii* тип 4.

В соответствии с международной классификацией бактерий род *Shigella* состоит из четырех подгрупп — А, В, С и D [2]. Самая большая из них подгруппа С (*Sh. boydii*) включает в себя 15 серологически различных типов, тогда как подгруппа А (*Sh. dysenteriae*) — 10 серотипов, подгруппа В (*Sh. flexneri*) — 5 и подгруппа D (*Sh. sonnei*) — 2.

Серологические различия между типами бактерий рода *Shigella* обуславливаются различным химическим строением специфических полисахаридных цепей их соматических антигенов, которые по своей химической природе являются липополисахаридами. К настоящему времени полное химическое строение специфических полисахаридов шигелл изучено для бактерий подгруппы А [3], В [4] и D [5]. Данные о специфических полисахаридах бактерий подгруппы *Sh. boydii* ограничиваются только сведениями об их моносахаридном составе [6] и структурой для серотипа 6 [7].

Настоящей работой мы продолжаем начатое нами ранее [6, 7] систематическое изучение строения специфических полисахаридов подгруппы *Sh. boydii* и приводим данные о структуре специфической цепи липополисахарида *Sh. boydii* тип 4. Липополисахарид (ЛПС) был выделен из су-

* Сообщение 9 см. [1].

хих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом при нагревании по стандартной методике [8], включающей в себя отделение сопутствующих нуклеиновых кислот в виде солей с цетаволоном. Выделенный ЛПС был активен в реакции пассивной гемагглютинации с гомологичной антисывороткой и, следовательно, являлся типоспецифическим соматическим антигеном. ЛПС расщепляли нагреванием с разбавленной CH_3COOH , отделяли нерастворимый осадок липида центрифугированием, а супернатант хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. В результате был получен высокомолекулярный полисахарид, элюируемый с удерживаемым объемом колонки, и олигосахаридная фракция. Полисахарид ингибировал реакцию пассивной гемагглютинации, тогда как олигосахаридная фракция была серологически неактивна и далее не исследовалась.

Полисахарид имел $[\alpha]_D +27,5^\circ$ (c 1,0, вода) и, по данным электрофореза на бумаге, был кислым (E_{GlcUA} 0,3). В его ИК-спектре имелись полосы поглощения ацетамидной ($1650, 1570 \text{ см}^{-1}$) и карбоксильной (1740 см^{-1}) групп. В спектре ПМР полисахарида присутствовали сигналы протонов двух С-метильных групп (δ 1,27 м.д., 6 Н), одной N-ацетильной группы (δ 2,0 м.д., 3 Н) и пяти аномерных протонов (δ 4,65–4,72 м.д., 1 Н; 4,85 м.д., 4 Н).

Из приведенных физических характеристик следовало, что повторяющееся звено полисахарида построено из пяти моносахаридов, среди которых, по-видимому, имеются N-ацетиламиносахар, две 6-дезоксигексозы и уроновая кислота.

Для определения моносахаридного состава полисахарид был подвергнут кислотному гидролизу (2 н. HCl , 100°C , 3 ч), и в гидролизате с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов, хроматографии и электрофореза на бумаге были обнаружены рамноза, глюкоза, глюкозамин и уроновая кислота. Последняя была выделена из гидролизата полисахарида с помощью электрофореза на бумаге и превращена в триметилсилильное производное, которое было восстановлено LiAlH_4 в эфире. В качестве продукта восстановления после снятия силильной защиты была идентифицирована глюкоза; следовательно, в состав полисахарида входит глюкуроновая кислота.

В гидролизате содержался также кислый дисахарид (I) с $E_{\text{GlcUA}} = -0,87$, при гидролизе которого высвобождались рамноза и уроновая кислота, т. е. дисахарид не содержал какого-либо нового компонента. Для доказательства строения дисахарид (I) его силилировали и восстанавливали LiAlH_4 . В гидролизате восстановленного дисахариды были идентифицированы глюкоза и рамноза в эквимолярном соотношении. При окислении восстановленного дисахариды водным раствором брома разрушался остаток рамнозы, расположенный на восстанавливаемом конце. Из приведенных данных следовало, что дисахарид (I) является глюкурозилрамнозой.

Количественное определение сахаров в полисахариде показало, что он содержит 33% рамнозы, 18,7% глюкуроновой кислоты и 18,5% глюкозамина. Количество глюкозы в полисахариде было определено относительно глюкозамина и рамнозы методом ГЖХ после дезаминирования гидролизата действием HNO_2 с последующим восстановлением и ацетилированием [9]. Данные ГЖХ-анализа показали, что глюкоза, рамноза и глюкозамин входят в состав полисахарида в соотношении 1:1,8:1. Нестехиометрическое содержание рамнозы в гидролизате полисахарида объясняется удерживанием этого моносахарида уроновой кислотой в составе дисахарид (I).

Абсолютная конфигурация обнаруженных сахаров была определена следующим образом: L-рамноза и хлоргидрат D-глюкозамина были выделены из гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге и идентифицированы по величине оптического вращения; D-конфигурация глюкозы следовала из положительной реакции с D-глюкозо-

Идентификация частично метилированных сахаров

Метод обработки метилированного полисахарида	Соединение	Характеристические фрагменты в масс-спектре, <i>m/e</i>
Кислотный гидролиз, восстановление NaBH_4 , ацетилирование	1,3,5- Ac_3 -2,4- Me_2 -рамнит	233, 201, 173, 131, 117 (ср. [11])
	1,5- Ac_2 -2,3,4,6- Me_4 -сорбит	205, 161, 145, 129, 117 (ср. [11])
	1,2,3,5- Ac_4 -4- Me -рамнит	261, 201, 159, 131 (ср. [11])
Метанолиз, ацетилирование	Метил-2-(<i>N</i> -метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкопиранозид	260, 228, 196, 186, 142, 129, 117 (ср. [12])
Восстановление LiAlH_4 , кислотный гидролиз, восстановление NaBH_4 , ацетилирование	1,5- Ac_2 -2,3,4,6- Me_4 -сорбит	См. выше
	1,2,3,5- Ac_4 -4- Me -рамнит	См. выше
	1,4,5,6- Ac_4 -2,3- Me_2 -сорбит	261, 201, 161, 159, 127, 117 (ср. [11])

оксидазой, проведенной непосредственно на гидролизате полисахарида; *D*-конфигурация глюкуроновой кислоты была определена после восстановления триметилсилилового производного последней действием LiAlH_4 и идентификацией полученной *D*-глюкозы с помощью *D*-глюкозооксидазы.

Таким образом, из совокупности приведенных выше данных следовало, что полисахарид построен из остатков *L*-рамнозы, *D*-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы и *D*-глюкуроновой кислоты в соотношении 2:1:1:1, т. е. из повторяющихся пентасахаридных звеньев.

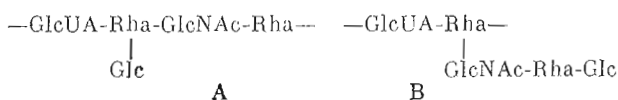
Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде был определен методом метилирования с последующей идентификацией образовавшихся частично метилированных сахаров с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. Для этой цепи полисахарид метилировали по Хакомори [10] и в зависимости от природы определяемых частично метилированных сахаров анализировали тремя различными способами. Нейтральные сахара идентифицировали в виде ацетатов поллюлов, полученных после кислотного гидролиза, восстановления NaBH_4 и ацетилирования. Метилированный амниосахар идентифицировали в виде соответствующего метилгликозида после метанолиза и ацетилирования. Уроновую кислоту идентифицировали в виде ацетата сорбита, образующегося дополнительно после восстановления метилированного полисахарида действием LiAlH_4 . Результаты анализа полисахарида методом метилирования приведены в таблице.

Из приведенных в таблице данных следовало, что полисахарид является разветвленным и на конце разветвления находится остаток глюкозы, а в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положении 2 и 3. Другой остаток рамнозы замещен в положение 3, а остатки *N*-ацетилглюкозамина и уроновой кислоты замещены в положение 4. Необходимо отметить, что из гидролизата восстановленного LiAlH_4 метилированного полисахарида исчез 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4-ди-*O*-метилрамнит. Этот факт указывает на то, что в нативном полисахариде остаток *N*-ацетилглюкозамина присоединен к монозамещенному остатку рамнозы, поскольку гексозаминидная связь *N*-(метил)-этиламиносахара, образующегося из *N*-(метил)-ацетильного производного, устойчива к гидролитическому расщеплению [13]. Следовательно, остаток глюкуроновой кислоты связан с остатком рамнозы, находящимся в узле разветвления полисахаридной цепи.

Окончательно вопрос о последовательности моносахаридов в полисахаридной цепи был решен на основании установления структуры фрагментов, полученных при избирательном расщеплении полисахарида по Смитчу и частичном кислотном гидролизе.

Расщепление по Смитсу привело к образованию единственного олигосахарид (II) с R_{Rha} 0,64 (система А), который был выделен хроматографией на колошке с сефадексом G-15. В гидролизате олигосахарид (II) методами хроматографии и электрофореза на бумаге были идентифицированы рамноза, N-ацетилглюкозамин и эритроновая кислота. Количественное определение с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов показало, что рамноза и N-ацетилглюкозамин входят в состав олигосахарид (II) в соотношении 2:1.

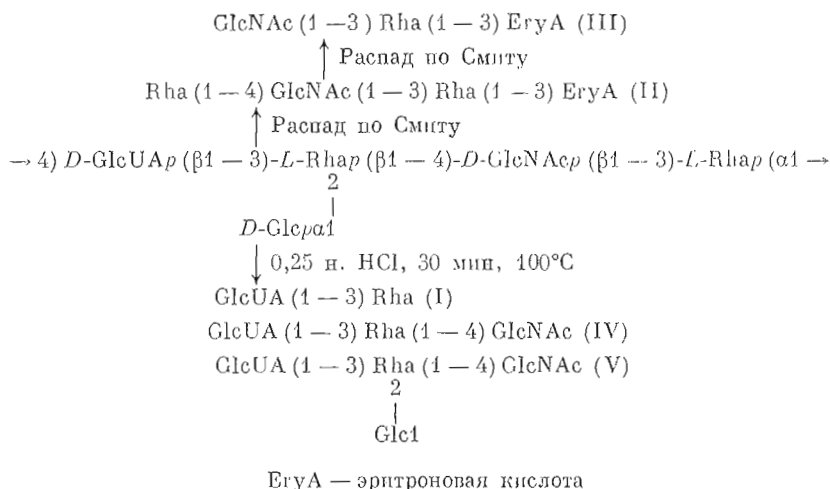
Из совокупности приведенных выше данных следовало, что повторяющемуся звену полисахарида можно приписать одну из следующих структур:



Для того чтобы сделать выбор между альтернативными структурами, олигосахарид (II) был подвергнут повторному распаду по Смитсу и полученный олигосахарид (III) с R_{Rha} 0,89 (система А) был выделен с помощью хроматографии на сефадексе G-15. В гидролизате олигосахарид (III) были идентифицированы рамноза и глюкозамин в соотношении 1:1, т. е. окислению подвергся один остаток рамнозы. Таким образом, олигосахарид (II) имеет структуру с терминальным остатком рамнозы, приведенную на схеме, и, следовательно, главная полисахаридная цепь включает остатки глюкуроновой кислоты, двух рамноз и N-ацетилглюкозамина, а в ответвлении находится только остаток глюкозы (структура А).

Для подтверждения последовательности моносахаридных остатков в олигосахариде (III) последний был вновь окислен периодатом натрия. Исчезновение остатка N-ацетилглюкозамина доказывало, что именно он находился на невозстанавливаемом конце олигосахарид (III).

Однако из результатов установления строения олигосахаридных фрагментов, полученных при распаде по Смитсу, невозможно было сделать вывода о характере присоединения терминального остатка глюкозы к остатку рамнозы, который находится в узле разветвления полисахаридной цепи. Ответ на этот вопрос был получен при изучении олигосахаридов, образующихся при частичном гидролизе полисахарида. Из гидролизата полисахарида (0,25 н. HCl, 100°С, 30 мин) с помощью препаративной хроматографии на бумаге были выделены три индивидуальных олигосахаридов, моносахаридный состав которых определяли после их полного кислотного гидролиза, а восстанавливающий конец — окислением бромом. Из полученных результатов следовало, что наиболее подвижный продукт с R_{GlcUA} 0,54 является дисахаридом (I). Следующий по подвижности олигосахарид (R_{GlcUA} 0,46), содержащий эквивалентные количества рамнозы, глюкозамина и глюкуроновой кислоты, представлял собой трисахарид (IV) с остатком N-ацетилглюкозамина на восстанавливаемом конце. И наконец, менее подвижный олигосахарид (V) с R_{GlcUA} 0,32 содержал рамнозу, N-ацетилглюкозамин, глюкуроновую кислоту и глюкозу, причем на восстанавливаемом конце также находился остаток N-ацетилглюкозамина. Структуры полученных олигосахаридов (I), (IV) и (V) приведены на схеме. Выделенные олигосахариды содержат остаток рамнозы, являющийся местом разветвления полисахаридной цепи, и, следовательно, тип замещения этого остатка в олигосахарид (I) и (IV) соответствует типу замещения в главной полисахаридной цепи. Поскольку такое замещение может быть только в положение 2 или 3, то выбор между этими возможностями легко осуществляется с помощью окисления трисахарид (IV) периодатом натрия. В результате такого окисления оказалось, что остаток рамнозы не разрушается и, следовательно, в главной цепи полисахарида он замещен в положение 3, а боковая цепь



присоединена в положение 2. Этот же вывод был подтвержден результатом периодатного окисления метилгликозида, полученного мягким метаболизмом дисахарида (I).

Последний вопрос, который предстояло решить при установлении строения специфического полисахарида *Sh. boydii* тип 4, состоял в определении конфигураций гликозидных связей. Для решения этого вопроса мы использовали метод окисления хромовым ангидридом [14, 15], в основе которого лежит тот факт, что ацетилированные тексопиранозиды легко окисляются в случае β -конфигурации и не окисляются в случае α -конфигурации. Полисахарид этерифицировали по карбоксильным группам остатков глюконовой кислоты действием диазометана в диметилсульфоксиде [16] и далее ацетилировали по известной методике [15]. Окисление ацетилированного полисахарида хромовым ангидридом показало, что при 40°C за 15 мин полностью окисляется остаток N-ацетилглюкозамы и на 50% снижается содержание рамнозы, тогда как глюкоза окислению не подвергается. Тот же результат получен при продолжительности окисления 45 и 90 мин. Таким образом, из полученных данных следовало, что один из остатков рамнозы и остаток глюкозы имеют α -конфигурацию гликозидных связей, а другой остаток рамнозы и N-ацетилглюкозамин присоединены β -гликозидной связью. Для определения конфигурации глюкуроновой связи окислению хромовым ангидридом был подвергнут ацетат восстановленного по карбоксильным группам полисахарида [16]. Из полученных результатов следовало, что остаток глюкозы, образующийся после восстановления, полностью окисляется за 45 мин и, таким образом, остаток глюконовой кислоты присоединен в полисахариде β -гликозидной связью. Для решения вопроса о конфигурации рамнозидных связей окислению хромовым ангидридом были подвергнуты ацетаты олигосахаридов (II) и (III), и из полученных результатов следовало, что остаток рамнозы, присоединенный к глюконовой кислоте, не окисляется и, значит, присоединен α -рамнозидной связью. Выводы о конфигурациях гликозидных связей в специфическом полисахариде *Sh. boydii* тип 4 полностью подтверждаются данными ^{13}C -ЯМР-спектра, полная интерпретация которого будет опубликована отдельно. Таким образом, совокупность всех приведенных выше данных доказывает структуру повторяющегося звена специфического полисахарида, приведенную на схеме.

Результаты настоящей работы показывают, что соматический антиген *Sh. boydii* тип 4 является ЛПС с кислой O-специфической полисахаридной цепью. Существование кислых ЛПС было обнаружено нами ранее при исследовании строения специфических ЛПС бактерий группы *Sh. dysen-*

teriae [3], некоторых *E. coli* [17, 18] и *Sh. newcastle* [19]. Во всех без исключения случаях кислые ЛПС были термолабильными антигенами в отличие от классических термостабильных нейтральных антигенов. Результаты серологического исследования ЛПС и полисахарида из *Sh. boydii* тип 4 также показали, что выделенный нами антиген лабилен и эта лабильность связана с кислой химической природой его полисахаридной цепи.

Результаты настоящей работы могут послужить основой для определения строения полисахаридной цепи антигена *E. coli* 053, который, как известно, серологически близок изученному нами типу *Sh. boydii* 4.

Экспериментальная часть

ГЖХ выполняли на приборе «Pye Unicam 104», модель 64, с пламенно-ионизационным детектором и интегратором «Vidar Autolab 6300» (Англия) с использованием стеклянной колонки (0,4×90 см) с 3% ECNSS-M на Gas-Chrom Q, 100–120 меш (колонка А) и стальной колонки (0,6×150 см) с 3% SE-30 на диатомите CQ (колонка В). Хроматомаксиметрию выполняли на приборе «Varian MAT Gnom-111» с использованием тех же фаз. Анализ аминокислот проводили на автоматическом анализаторе аминокислот BC-200 (Bioscal — LKB) на колонке с катионитом хромекс UA-8 (0,9×27 см) в 0,35 М натрий-дигидрофосфатном буфере, pH 5,28, при 65° С, анализ нейтральных сахаров — на анализаторе углеводов «Technicon SC-2» в 0,5 М боратном буфере, pH 9. Хроматографию проводили на бумаге FN-11 в системах *n*-бутанол — пиридин — вода, 6:4:3 (система А), и этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18:3:1:4 (система В), а электрофорез — в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (27 В/см). Количественное определение рамнозы и глюкуроновой кислоты проводили с цистенном и карбазолом соответственно, по известным методикам [20, 21]. Оптическое вращение определяли на автоматическом поляриметре «Perkin-Elmer 141». Спектр ПМР снимали на приборе «Varian XL-100» в D₂O при 90° С, ИК-спектр — на приборе «UR-2» в таблетке с KBr. Растворы упаривали в вакууме при 40° С. Серологические тесты осуществляли по методике [22].

Выделение специфического полисахарида. Сухие клетки *Sh. boydii* тип 4 экстрагировали 45% фенолом при 65° С, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном и ЛПС переосаждали спиртом по стандартной методике [9], выход ЛПС составил 1,2% в расчете на сухие клетки, титр антисыворотки в реакции пассивной гемагглютинации 25 600. ЛПС (500 мг) нагревали 1,5 ч с 50 мл 1% CH₃COOH при 100° С, осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизovali и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50; получали 150 мг полисахарида, выходящего с удерживаемым объемом колонки, $[\alpha]_D^{25} + 27,5^\circ$ (с 1; вода). Полисахарид ингибировал реакцию пассивной гемагглютинации в дозе 12 мкг/мл антисывороткой к живой культуре.

Определение мономерного состава полисахарида. Нейтральные сахара определяли в гидролизате полисахарида (2 н. HCl, 3 ч, 100° С) с помощью анализатора углеводов, аминокислот — в гидролизате полисахарида (4 н. HCl, 3 ч, 100° С) с помощью анализатора аминокислот. Одновременное определение аминокислот и нейтральных сахаров выполнено методом ГЖХ после деминерализации гидролизата полисахарида как описано ранее [22]. Полисахарид (30 мг) гидролизovali 2 н. HCl (15 мл) 2 ч при 100° С; упаривали и выделяли моносахариды препаративной хроматографией на бумаге Ватман 3 ММ в системе А; получены: *L*-рамноза с $[\alpha]_D^{25} - 8,8^\circ$ (с 0,25; вода) (лит. данные [25] — 9,1°), хлоргидрат *D*-глюкозамина с $[\alpha]_D^{25} + 75,6^\circ$ (лит. данные [26] + 72°), глюкоза, *D*-конфигурация которой была доказана с помощью *D*-глюкозооксидазы.

Глюкуроновую кислоту выделяли с помощью препаративного элект-

рофореза на бумаге. Глюкуроновую кислоту (0,5 мг) силилировали смесью 1 мл пиридина, 0,2 мл гексаметилдисилазана, 0,1 мл триметилхлорсилана, 30 мин при 20° С, упаривали, добавляли 5 мл абс. эфира, 20 мг LiAlH₄ и кипятили 3 ч. Смесью разлагали этилацетатом и упаривали, остаток обрабатывали 5 мл воды, фильтровали, деионизировали катионом КУ-2 (H⁺-форма) и упаривали. Полученную D-глюкозу идентифицировали по реакции с D-глюкозооксидазой.

Анализ полисахарида методом метилирования. Высушенный при 60° С над P₂O₅ полисахарид (10 мг) метилировали по стандартной методике [11]. Метилированный полисахарид разделили на три части. Первую часть подвергали формолизу (85% HCOOH, 2 ч, 100° С) с последующим гидролизом (0,25 н. HCl, 15 ч, 100° С), восстановлением NaBH₄ и ацетилированием Ac₂O в пиридине. Вторую часть нагревали 20 ч с 1 мл 1 н. HCl в абс. метаноле при 100° С, упаривали досуха, растворяли в 50% метаноле и пропускали через колонку с КУ-2 (H⁺-форма). Метилгликозиды нейтральных моносахаридов элюировали 30 мл 50% метанола, метилгликозиды аминсахаров — 5% раствором аммиака в 50% метаноле, элюаты упаривали и ацетилировали. Третью порцию восстанавливали 20 мг LiAlH₄ в 15 мл эфира (кипячение, 12 ч) с последующим формолизом, гидролизом, восстановлением и ацетилированием, как описано выше. Полученные из трех порций метилированного полисахарида производные идентифицировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии; результаты приведены в таблице.

Распад полисахарида по Смигу. Полисахарид (120 мг) окисляли 5 мл 0,1 М раствора периодата натрия 72 ч при 20° С в темноте, прибавляли 200 мг натрийборгидрида и выдерживали 4 ч, подкисляли уксусной кислотой и деионизировали на колонке с сефадексом G-50 (4×80 см). Полученный окисленный полисахарид гидролизовали 20 ч 20 мл 0,5 н. HCl при 20° С, гидролизат упаривали и остаток хроматографировали на колонке с сефадексом G-15 (1,5×90 см); получено 20 мг олигосахаридов (II). Олигосахарид (II) окисляли 2 мл 0,1 М раствора NaIO₄, восстанавливали NaBH₄, деионизировали катионитом КУ-2 (H⁺-форма), гидролизовали 20 ч 5 мл 0,5 н. HCl при 20° С и хроматографировали на колонке с сефадексом G-15; получено 8 мг олигосахаридов (III).

Частичный гидролиз полисахарида. Полисахарид (30 мг) нагревали 30 мин с 3 мл 0,25 н. HCl при 100° С, лиофилизовали, растворяли в воде и пропускали через колонку с дауэксом 1×8 (CH₃COO⁻-форма). Колонку промывали 50 мл воды, затем элюировали кислые компоненты 50 мл 15% CH₃COOH, элюат упаривали и после препаративной хроматографии на бумаге Ватман 3ММ в системе Б выделяли индивидуальные олигосахариды (I), (IV) и (V) в количестве 2,4; 1,3 и 0,7 мг соответственно.

Гидролиз дисахаридов (I) (2 н. HCl, 3 ч, 100° С) привел к глюкуроновой кислоте и рамнозе; трисахаридов (IV) — к глюкуроновой кислоте, рамнозе и глюкозамину; тетрасахаридов (V) — к глюкуроновой кислоте, рамнозе, глюкозамину и глюкозе.

Высушенный дисахарид (I) (0,5 мг) выдерживали 16 ч при 20° С с 1 мл 1% HCl в абс. метаноле, раствор упаривали при 20° С, остаток исследовали методом электрофореза и хроматографии на бумаге (система Б). Полученный продукт нейтрален, не проявляется реактивом на восстанавливающие сахара, но может быть обнаружен при появлении NaIO₄/AgNO₃/OH⁻. Аликвоту (1 мл), содержащую половину полученного таким образом метилгликозида метилового эфира биоуроновой кислоты, обрабатывали 72 ч в темноте 1 мл 0,2 М раствора NaIO₄, к раствору прибавляли 50 мг NaBH₄, а через 2 ч в качестве внутреннего стандарта раствор 0,1 мг маннозы в 0,1 мл воды. Смесью затем обрабатывали катионитом КУ-2 (H⁺-форма), упаривали, остаток упаривали с метанолом, гидролизовали и анализировали с помощью углеводного анализатора. Параллельная аликовота продукта была обработана аналогичным образом, за

исключением того что она не была подвергнута периодатному окислению. Окисление трисахарида (IV) проводили аналогично.

Определение конфигурации гликозидных связей. Полисахарид (10 мг) этерифицировали диазометаном в диметилсульфоксиде [16] и ацетилировали [15]. Полученный ацетат высушивали в вакууме при 50°C, растворяли в 1 мл лед. CH₃COOH и делили пополам. К аликвоте раствора (500 мкл) прибавляли 50 мкл уксусного ангидрида и 50 мг CrO₃. Смесь нагревали 45 мин при 40°C в ультразвуковой бане, разбавляли 2 мл воды, добавляли 3 мл раствора 30 мкг пентаацетата маннозы в уксусной кислоте (внутренний стандарт) и экстрагировали хлороформом (2×3 мл). Экстракт промывали водой (3×2 мл), ушаривали, остаток гидролизовали 2 н. HCl (100°C, 3 ч) и анализировали. Вторую половину раствора обрабатывали аналогичным образом, но без добавления окислителя и использовали для сравнения. В аналогичных условиях проводили окисление ацетатов олигосахаридов (II) и (III) и их последующий анализ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Б. А., Дашуни В. М., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1979) Биоорг. химия, 5, 77-81.
2. Ewing W. H., Carpenter P. (1966) Int. J. Syst. Bacteriol., 16, 145-159.
3. Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. (1979) Докл. АН СССР, 245, 765-768.
4. Lindberg B., Lönngren J., Ruden U., Simmons D. A. R. (1973) Eur. J. Biochem., 32, 15-18.
5. Kenne L., Lindberg B., Petersson K. (1980) Carbohydr. Res., 78, 119-126.
6. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Kochetkov N. K. (1973) Eur. J. Biochem., 34, 513-518.
7. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., L'vov V. L., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Khomenko N. A. (1975) Carbohydr. Res., 41, 329.
8. Westphal O., Jann K. (1965) in: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., BeMiller J. M., eds), vol. 5, pp. 88-91, Acad. Press, New York - London.
9. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Львов В. Л., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Хоменко Н. А. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 5, 1168-1172.
10. Conrad H. E. (1972) in: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., BeMiller J. M., eds), vol. 6, pp. 361-364, Acad. Press, New York - London.
11. Bjordal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) Carbohydr. Res., 5, 433.
12. Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 1219-1225.
13. Дмитриев Б. А., Львов В. Л., Гофман И. Л., Кочетков Н. К. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 7, 1613-1619.
14. Angyal S. J., James K. (1970) Carbohydr. Res., 12, 124-131.
15. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) Carbohydr. Res., 26, 661-666.
16. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2335-2338.
17. Dmitriev B. A., L'vov V. L., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. (1976) Eur. J. Biochem., 64, 491-498.
18. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. (1977) Eur. J. Biochem., 79, 111-115.
19. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Sheremet O. K., Shaskov A. S., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1979) Eur. J. Biochem., 98, 309-316.
20. Dishe Z., Shettles L. B. (1948) J. Biol. Chem., 175, 595.
21. Dishe Z. (1947) J. Biol. Chem., 167, 189.
22. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 559-566.

Поступила в редакцию
28.III.1980

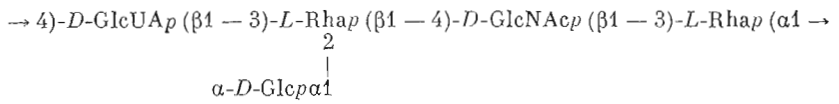
BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDES. X. THE STRUCTURE OF POLYSACCHARIDE CHAIN OF *SHIGELLA BOYDII* TYPE 4 LIPOPOLYSACCHARIDE

L'VOV V. L., TOCHTAMYSHEVA N. V., DMITRIEV B. A.,
KOCHETKOV N. K., HOFMAN I. L.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Acidic hydrolysis of the antigenic lipopolysaccharide from *Shigella boydii* type 4 followed by separation of the carbohydrate fraction on a Sephadex G-50 column afforded a specific polysaccharide composed of *L*-rhamnose, *D*-glucose, 2-acetamido-2-deoxy-

D-glucose, and *D*-glucuronic acid residues in 2 : 1 : 1 : 1 ratio. From the results of methylation analysis, Smith degradation, partial acid hydrolysis, and acetylated polysaccharide oxidation with chromium trioxide, the structure of the repeating unit of the specific polysaccharide was deduced as:



Serological properties of *Shigella boydii* type 4 lipopolysaccharide and specific polysaccharide are discussed.