

О.С. Броварская, С. Войчук, Л.Д. Варбанец

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ФЛАГЕЛЛИНОВ *Ralstonia solanacearum*

*Из восьми штаммов *Ralstonia solanacearum*, выделенных из различных коллекций, получены препараты флагеллинов. Их химическая идентификация показала присутствие белка (55-92%), углеводов (7-25%), а также в незначительных количествах нуклеиновых кислот (от 0.5 до 3.3%) в зависимости от исследуемого штамма. Аминокислотный состав представлен 17 аминокислотами, преобладающими из которых были дикарбоновые (глутаминовая и аспарагиновая) кислоты, а также аланин, лейцин и лизин. Кислые аминокислоты составляют до 20% всех аминокислот флагеллина. Пролин, тирозин, фенилаланин, гистидин, аргинин присутствуют в незначительном количестве (1-6%). Триптофан вообще не выявлен, а метионин и цистеин практически во всех препаратах флагеллинов отсутствовали. У двух штаммов *R. solanacearum* 5712 и 8089 были выявлены следующие моносахариды: рамноза (20.1 и 79.9% соответственно) и глюкоза (73.9 и 14.6% соответственно). В препарате флагеллина *R. solanacearum* 5712 обнаружена также ксилоза (6.0%). Во флагеллинах других штаммов идентифицировать моносахариды данным методом нам не удалось, что, вероятно, обусловлено присутствием в их составе уникальных моносахаридов, отсутствовавших в стандарте, который был использован нами для анализа. Электрофорезом в полиакриламидном геле показано, что исследованные нами препараты флагеллинов различных штаммов *R. solanacearum* являются гетерогенными и представлены несколькими линиями с различными молекулярными массами от 14 400 до 94 000 Да. Результаты серологических исследований позволяют предположить наличие в составе препаратов жгутиковых флагеллинов антигенных детерминант углеводной природы, идентичных эпитопам ЛПС некоторых штаммов *R. solanacearum*. Как показали исследования, аналогично ЛПС, флагеллины *R. solanacearum* не могут быть использованы в качестве общих антигенов представителей этого вида.*

*Ключевые слова: *Ralstonia solanacearum*, препараты флагеллинов, химическая идентификация, серологическая активность.*

**Ralstonia solanacearum* является одним из основных фитопатогенных микроорганизмов, который вызывает увядание более чем 200 видов растений, в основном семейства пасленовых (картофель, томаты, перец, табак, бананы и др.) в широком географическом диапазоне [12]. Возбудитель проникает через корни, повреждения в растениях, размножается внутри чувствительного хозяина и распространяется в нем при помощи жгутиков [25]. Представители *R. solanacearum* содержат на своей поверхности один или несколько жгутиков, которые могут быть либо полярными, либо латеральными. Кроме того, что жгутики ответственны за подвижность бактерий, они могут принимать участие в различных биологических процессах: в формировании биопленки, экспорте белков, адгезии, во взаимодействии микробной клетки с другими организмами.*

Структура жгутиков (флагелл) практически для большинства бактерий подобна [11] и состоит из трех хорошо различаемых подструктур: базального тела, выполняющего роль встроенного в клеточную стенку ротора мотора, филамента, основным структурным компонентом которого (95%) является белок флагеллин, и крюка, являющегося соединительным элементом между базальным телом и филаментом. Известно [7, 19], что флагеллины могут быть факторами вирулентности, участвовать в модуляции системы врожденного иммунитета благодаря наличию на клетках иммунной системы специфического рецептора TLR-5, относящегося к системе толл-подобных рецепторов, могут проявлять радиозащитное действие при системном и местном облучении [4, 5]. В последние несколько лет интерес к изучению флагеллина возрос также в связи с тем, что он используется как адъювант при создании вакцин для стимуляции гуморального и клеточного иммунитета людей. Поскольку *R. solanacearum* являются фитопатогенами, то нам интересны такие свойства флагеллина как способность выполнять роль лигандов при взаимодействии с растительными клетками, проявлять Н-антигенную активность бактериальной клетки, на основе которой проводят серотипирование штаммов. Поскольку ранее [27] нами на основании структур О-специфических полисахаридов (ОПС) липополисахаридов исследуемые штаммы *R. solanacearum* были разделены на пять серогрупп, у нас возникла идея проверить, может ли флагеллин выполнять роль общего антигена для всех представителей *R. solanacearum*. Основанием для такого предположения послужило то, что флагеллины известны как эволюционно консервативная группа белков. Поэтому целью данной работы было изолировать флагеллины из жгутиков *R. solanacearum*, химически охарактеризовать и изучить их серологическую активность.

Материалы и методы. В работе были исследованы штаммы *R. solanacearum* из коллекций: Ново Зеландской (ICMP 5712, типовой штамм, 8089, 7954, 758), Вьетнама (ТХ₁, ТS₃) и Украины (4, 526). Исследуемые микроорганизмы выращивали на жидкой синтетической среде N [26] и клетки собирали в экспоненциальной фазе роста. Осаждение бактериальных клеток осуществляли центрифугированием в течение 30 мин при 3000 g. Для получения препарата жгутиков бактериальные клетки отмывали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), осаждали центрифугированием и суспендировали в 40 мл ЗФР. Суспензию клеток перемешивали блендером в течение 10 мин при комнатной температуре при рН 2.0. Полученную суспензию центрифугировали дважды по 30 мин при 3000 g, после этого рН супернатанта доводили до 7.2. При сильном перемешивании медленно добавляли сульфат аммония, чтобы достичь 2/3 насыщения (2.67 М). Смесь выдерживали в течение ночи при +4°C, а затем центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин при +4°C. Осадок, который содержал полимеризованный флагеллин, растворяли в 5 мл дистиллированной воды, а потом переносили в диализные трубки. Диализ проводили против проточной воды в течение 2 час, затем против дистиллированной воды в течение 18 час при +4°C. Препарат лиофилизировали [2,6].

Количество углеводов определяли методом Dubois [8]. Содержание

нуклеиновых кислот оценивали по методу Спирина [20], белков - Лоури с использованием реактива Фолина [15].

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2N HCl (5 ч, 100°C). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [1] на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890/5973N, колонка DB-225mS (30м×0.25 мм×0.025мкм), газ-носитель – гелий, поток через колонку – 1 мл/мин. Температура испарителя - 250°C, интерфейса - 280°C, термостата - 220°C (режим изотермический). Пробу вводили с делением потока 1:100. Моносахариды идентифицировали, сравнивая время удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов со стандартом, а также используя компьютерную базу данных ChemStation. Количественные соотношения отдельных моносахаридов выражали в % от общей суммы площадей пиков.

Аминокислотный состав определяли после гидролиза препарата в 6N растворе HCl при 105°C, 24 ч в запаянных ампулах, упаривали досуха, 3 раза промывали дистиллированной водой и анализировали на аминокислотном анализаторе Biotronic LS 2000 (Германия).

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в системе додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) согласно методу Laemmli [14]. При проведении ДСН-ПААГ электрофореза препараты флагеллинов растворяли в буфере для образцов (0.05 M Tris-HCl буфер, pH 6.8, который содержал 2% SDS, 10% сахарозы, 0.01% бромфенолового синего), кипятили 5 мин при 100°C, после чего 20 мкл наносили на гели. Электрофорез проводили в 5% акриламидном концентрирующем и 12% акриламидном разделяющем гелях при силе тока в 12 mA и 25 mA соответственно. Исследуемые препараты флагеллинов идентифицировали после окраски гелей азотно-кислым серебром согласно метода Tsai [23].

Н-антисыворотки получали к клеткам исследуемых штаммов *R. solanacearum* согласно описанной методике [21]. Культуру пересеивали трижды в пробирки на скошенный картофельный агар (КА), культивировали при 28-30°C. 24-часовые культуры смывали с поверхности КА физиологическим раствором. Титр клеток в рабочей суспензии составлял 2 млрд/мл. В качестве консерванта в суспензию добавляли формалин в количестве 0.05%. Приготовленные антигены хранились в холодильнике при температуре +4°C в течение месяца. Для иммунизации были отобраны здоровые кролики, первоначальный вес которых равен 2.5-3.0 кг. Применялась схема комбинированного введения антигенов: половина доз Н-антигенов вводилась внутривенно в краевую вену уха животного, другая часть дозы – подкожно в бедро кролика. Интервал между инъекциями составлял 3 – 4 дня. Если учесть, что титр клеток в используемых суспензиях равнялся 2 млрд/мл физиологического раствора, то общее количество введенных животному клеток бактерий в течение всего цикла гипериммунизации составляло 25 млрд/мл. Через 7 дней после последней инъекции производился забор крови из вены уха в количестве 20-30 мл для получения Н-антисывороток. В качестве консерванта в полученные Н-сыворотки добавляли борную кислоту в количестве 0.05%. Сыворотки хранили в холодильнике при +4°C. Титр сывороток определяли реакцией коагуляционной преципитации.

Антигенную активность ЛПС исследовали методом двойной иммуно-диффузии в агаре по Оухтерлони [18]

При электронно-микроскопических исследованиях образцы препаратов наносили на медные сеточки (Sigma, США) с пленкой-подложкой из формвара (Serva, Германия), выдерживали 1 мин, отмывали дистиллированной водой, после чего проводили негативное контрастирование 2%-м водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, выдерживали 30 с, отбирали раствор фильтровальной бумагой и высушивали. Анализ сеточек осуществляли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM1400 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 10 000-30 000.

Подвижность бактерий оценивали после инокуляции *R. solanacearum* в содержащую 0.8% агара среду и последующей инкубацией в течение 24-72 ч при +30°C (периодически измеряли также диаметр зон распространения). В качестве инокулята использовали 24-часовые культуры бактерий, выращенные на плотной среде с картофельным агаром.

Результаты и их обсуждение. Поскольку флагеллины составляют до 95% нити жгутика, прежде чем выделять белки, нам надо было удостовериться, что все исследуемые культуры *R. solanacearum* содержат жгутики. Предварительные исследования по определению наличия или отсутствия жгутиков были проведены нами путем высева культуры на полужидкий агар (0.8%) методом укола в чашках Петри. Показано, что различные штаммы *R. solanacearum* характеризовались различной подвижностью: штамм 8202, внесенный в такую среду, оставался в точке инокуляции (рис.1), в то время как остальные исследуемые штаммы через 72 ч инкубации образовывали зоны распространения в среде от 15 до 50 мм. Электронно-микроскопические исследования клеток *R. solanacearum*, выращенных на синтетической среде N, подтвердили эти результаты и показали наличие у них жгутиков (рис.2), в то время как в клетках штамма 8202 жгутики при электронной микроскопии не были выявлены. Нами установлено, что число жгутиков у бактерий может изменяться в зависимости от длительности культивирования и состава питательной среды. Так, наибольшее число клеток *R. solanacearum*, имеющих жгутики, на-

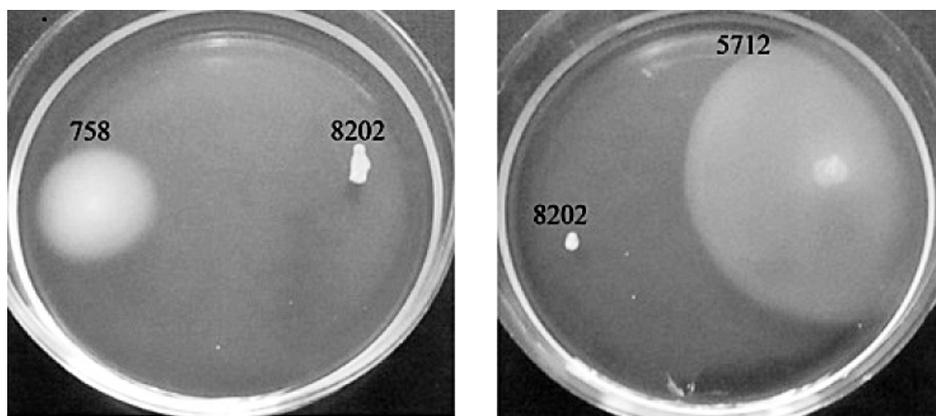


Рис.1. Подвижность бактерий *R. solanacearum* 8202; 758; 5712, посев уколом (72 ч роста)

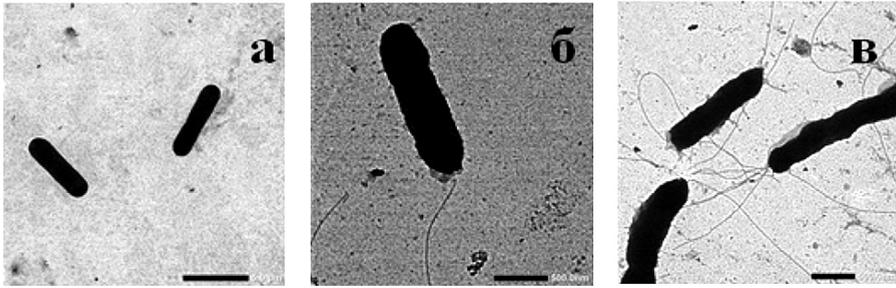


Рис.2. Бактерия *R. solanacearum*: штамм 8202 без жгутика (а), штаммы 7954 (б), 5712 (в) – со жгутиками

блюдали при выращивании бактерий на синтетической среде N при +18°C в течение 44 ч. При увеличении времени культивирования до 72 ч число особей со жгутиками уменьшалось. Более раннее появление жгутиков (24 ч) наблюдалось при выращивании культур на мясо-пептонном агаре. Поскольку наибольшее количество жгутиков наблюдали при выращивании исследуемых культур *R. solanacearum* на жидкой синтетической среде N в экспоненциальной фазе роста клеток, в дальнейшей работе по выделению жгутиков соблюдали эти условия.

Поскольку нас интересовал флагеллин жгутиков, были использованы методы выделения, которые включали культивирование клеток *R. solanacearum*, получение жгутиков, основанное на механическом отделении флагелл (что было показано электронной микроскопией (рис. 3)), очистку флагеллина деполимеризацией и реполимеризацией флагелл путем изменения значений pH с последующим центрифугированием и осаждением супернатанта, содержащего белок, сернокислым аммонием с последующим диализом и лиофилизацией. Это широко используемые в мировой литературе методы выделения и очистки флагеллинов [3].

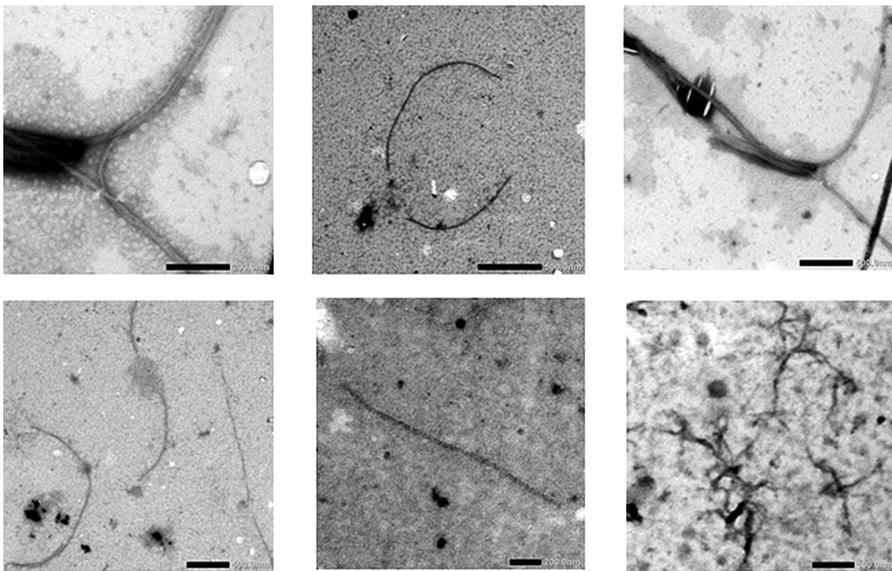


Рис. 3. Электронно-микроскопическая фотография жгутиков *R. solanacearum*. Масштабная линейка – 200-500 нм

Таблица 1

Химический состав флагеллина *R. solanacearum*

Штаммы	Белок	Углеводы	Нуклеиновые кислоты
	% к сухому весу препарата		
5712	80.5	17.3	2.2
8089	92.5	7.0	0.5
7954	90.3	7.7	2.0
758	71.5	25.0	3.5
4	76.5	23.0	0.5
526	55	42.9	3.3
ТХ ₁	81	17.1	1.9
ТС ₃	84.3	14.9	0.8

При химической идентификации препаратов флагеллинов показано (табл.1), что они состоят из белка (55-92%), углеводов (7-25%), а также в незначительных количествах обнаружены нуклеиновые кислоты (от 0.5 до 3.3%). Известно [16], что флагеллины построены из четырех структурных доменов: терминальные спиральные D0 (включающий С- и N-концы) и D1, локализованные внутри нити, а также D2 и D3 домены, которые находятся на ее поверхности. Изучение первичной структуры флагеллинов из различных видов бактерий свидетельствует о высокой степени гомологии аминокислотных последовательностей их D0 и D1 доменов – 80 и 60% гомологии соответственно и всего 20% гомологии в центральном домене. Предполагают, что по степени гомологии можно судить об эволюционном родстве различных видов бактерий. Изучение аминокислотного состава препаратов флагеллинов *R. solanacearum* (табл.2) свидетельствует

Таблица 2

Аминокислотный состав флагеллина *R. solanacearum*

Амино-кислоты	Штаммы							
	4	526	758	5712	8089	7954	ТХ ₁	ТС ₃
	% к сухому весу препарата							
Asx	8.9	10.8	12.1	13.0	15.1	13.5	13.2	12.3
Thr	5.4	6.4	6.5	6.7	6.2	6.8	7.0	5.9
Ser	5.2	9,8	8.1	5.6	6.8	4.6	6.5	5.7
Glx	13.8	14.1	14.0	13.3	12.8	13.6	12.7	15.6
Pro	4.6	2,.	0.9	2.5	2.3	3.7	3.8	3.1
Glu	6.4	7.8	6.4	5.5	7.2	5.9	6.8	7.0
Ala	10.9	12.3	11.7	9.6	13.1	5.9	8.5	8.8
Cys	-	-	-	-	0.8	-	-	1.7
Val	7.1	4.7	7.5	5.9	8.7	6.1	5.2	5.4
Met	-	-	0.3	0.1	0.2	-	-	0.3
Ile	5.0	7.5	6.2	5.2	3.7	3.6	4.0	5.7
Leu	8.8	10.6	9.9	9.3	9.3	8.8	8.2	9.3
Tyr	4.3	0.6	1.2	2.1	3.3	4.4	3.1	2.2
Phe	5.4	1.7	3.9	4.4	3.9	6.8	3.9	3.2
His	0.8	1.2	3.1	3.1	2.5	1.9	6.5	2.1
Lys	8.7	8.0	7.8	7.4	3.4	11.3	8.8	7.8
Arg	4.7	1.9	0.4	6.3	0.7	3.1	1.8	3.9

о том, что до 50% от общего количества аминокислот приходится на долю дикарбоновых (глутаминовая и аспарагиновая) кислот, а также аланина, лейцина и лизина. Кислые аминокислоты составляют до 20% всех аминокислот флагеллина. Пролин, тирозин, фенилаланин, гистидин, аргинин присутствуют в незначительном количестве (1-6%). Триптофан во всех препаратах флагеллинов не выявлен, что соответствует данным литературы [28]. Поскольку серосодержащие аминокислоты метионин и цистеин также практически не были обнаружены, это может свидетельствовать об отсутствии во флагеллине дисульфидных связей.

Из литературных данных известно [2], что флагеллины более чем 20 видов бактерий различных таксономических групп гликозилированы. Гликозилированию подвергается переменный средний домен молекулы флагеллина, что влияет на его антигенные свойства. Большинство эубактерий, у которых флагеллин гликозилирован, активно взаимодействуют с различными макроорганизмами, предполагая, что посттрансляционная модификация представляет один из путей адаптации бактерии, которая вступает во взаимодействие с эукариотическим организмом.

Поскольку в препаратах флагеллинов *R. solanacearum* обнаружено от 7 до 25% углеводов (в зависимости от штамма), нами был исследован их моносахаридный состав. У двух штаммов 5712 и 8089 были выявлены следующие моносахариды: рамноза (20.1 и 79.9% соответственно) и глюкоза (73.9 и 14.6% соответственно). В препарате флагеллина *R. solanacearum* 5712 обнаружена также ксилоза (6.0%) (табл. 3). Как нами установлено ранее [13], рамноза и ксилоза являются компонентами O-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов *R. solanacearum* шт. 5712. Во флагеллинах других штаммов идентифицировать моносахариды данным методом нам не удалось, что, вероятно, обусловлено присутствием в их составе уникальных моносахаридов, отсутствовавших в стандарте, который был использован нами для анализа.

Таблица 3

Моносахаридный состав препаратов флагеллинов *R. solanacearum*

Моносахариды	Штаммы					
	5712	8089	7954	4	ТХ ₁	ТS ₃
	в % к общей сумме площадей пиков					
Рамноза	20.1	79.9	-	-	-	-
Ксилоза	6.0	-	-	-	-	-
Глюкоза	73.9	14.6	-	-	-	-
X ₁	-	5.5	-	-	-	-
X ₂	-	-	6.4	-	-	-
X ₃	-	-	9.0	4.4	4.1	-
X ₄	-	-	68.7	22.4	52.8	100
Манноза	-	-	5.8	-	-	-
X ₅	-	-	10.0	-	16.9	-
X6	-	-	-	19.7	-	-
X7	-	-	-	34.0	-	-
X8	-	-	-	2,0	-	-

Электрофорезом в полиакриламидном геле показано, что исследованные нами препараты флагеллинов различных штаммов *R. solanacearum* являются гетерогенными и представлены несколькими линиями с разными молекулярными массами от 14 400 до 94 000 Да (рис. 4). Такая гетерогенность может быть обусловлена либо различной степенью гликозилирования флагеллина, либо присутствием в одном жгутике не одного, а нескольких флагеллинов, о чем сообщают исследователи [2].

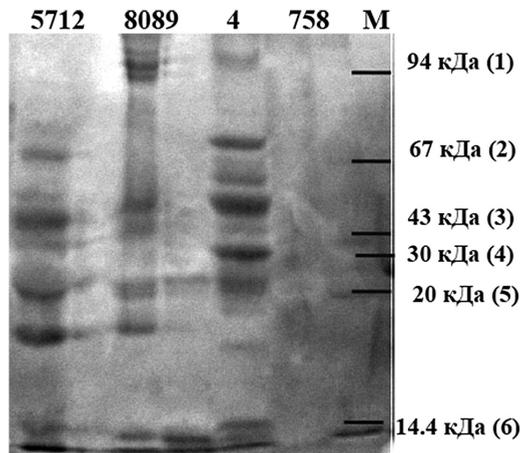


Рис.4. ДСН-ПААГ электрофорез препаратов флагеллинов *R. solanacearum* штаммов: 5712, 8089, 4, 758

Примечание: М-маркеры молекулярных масс: фосфорилаза b (1), бычий сывороточный альбумин (2), овальбумин (3), карбоангидраза (4), ингибитор трипсина сои (5), α -лактальбумин (6)

В литературе [22] содержатся сведения о широком спектре молекулярных масс флагеллинов, которые варьируют от 25 до 69 кДа и выше в зависимости от штамма бактерии.

Исследователи [17] считают, что терминальные консервативные домены флагеллина ответственны за общие для всех флагеллинов полимеризационные свойства, в то время как вариабельный домен, образованный центральной частью полипептидной цепи и локализованный на поверхности жгутика, является ответственным за его Н-антигенную специфичность. Для ее изучения нами были получены Н-антисыворотки к культурам *R. solanacearum*: 5712 (типовому), 7954, 758, 526. В качестве антигенов использовали флагеллины, а также ЛПС, выделенные нами ранее [10] из восьми исследуемых штаммов.

В реакции кольцепреципитации был определен титр исследуемых антисывороток по отношению к флагеллинам, который составлял от 1:20000 до 1:80000 в зависимости от штамма. В реакциях двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони было установлено, что исследуемые флагеллины *R. solanacearum* в гомологичной системе проявляли активность антигена. Интересно отметить, что антитела в Н-антисыворотках к *R. solanacearum* штаммов 7954 и 526 узнают кроме гомологичного антитела также флагеллины обоих штаммов, а также штамма 5712. Эти результаты могут указывать на то, что флагеллины *R. solanacearum* 5712, 7954

и 526 имеют общие антигенные детерминанты, и, по всей видимости, исследуемые штаммы являются представителями одной Н-серогруппы. Н-антисыворотка типового штамма 5712, кроме гомологичного флагеллина, взаимодействует с флагеллинами штаммов 7954 и 4. Н-антисыворотка к штамму 758 не взаимодействовала ни с одним из исследуемых флагеллинов, что может свидетельствовать об отсутствии у них общих антигенных детерминант (рис.5). Полученные результаты указывают на серологическую вариабельность препаратов флагеллинов.

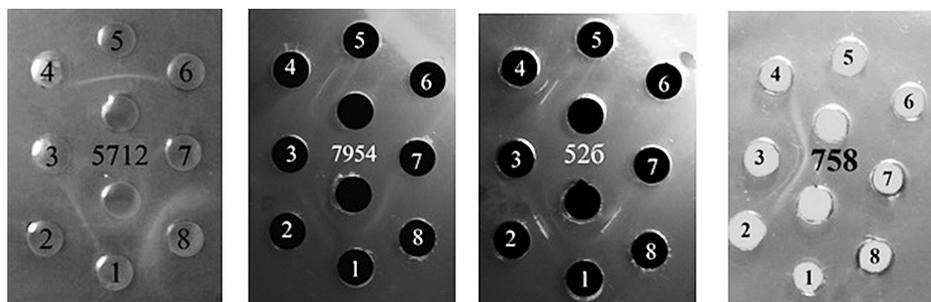


Рис. 5. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре Н-антисывороток *R. solanacearum* 5712, 7954, 526, 758 с флагеллинами, изолированными из штаммов 8089 (1), 7954 (2), 758 (3), 526, 4 (5), TX₁ (6), TS₃ (7), 5712 (8)

Результаты по Н-серотипированию отличаются от полученных нами ранее [9] данных по серотипированию исследуемых штаммов на основе О-антигенности их ЛПС. Было выделено 4 серогруппы, две из которых были образованы двумя парами штаммов: 4 и 526, а также 758 и 7954, две другие были представлены только одними штаммами – TX₁ и TS₃ соответственно. Антигенная структура штамма 7954 объединяет в себе антигенные эпитопы штаммов 4 и 526, однако отсутствие кросс-реактивности не позволяло объединить их в одну серогруппу. В связи с этим нами были проведены исследования по кросс-реактивности Н-антисывороток с ЛПС, изолированными из исследуемых штаммов *R. solanacearum* (рис. 6). Показано, что ЛПС, изолированный из штамма TS₃, реагировал с антисыворотками к флагеллинам штаммов 7954 и 526. Это может свидетельствовать о том, что в ЛПС штамма TS₃ присутствует эпитоп, аналогичный

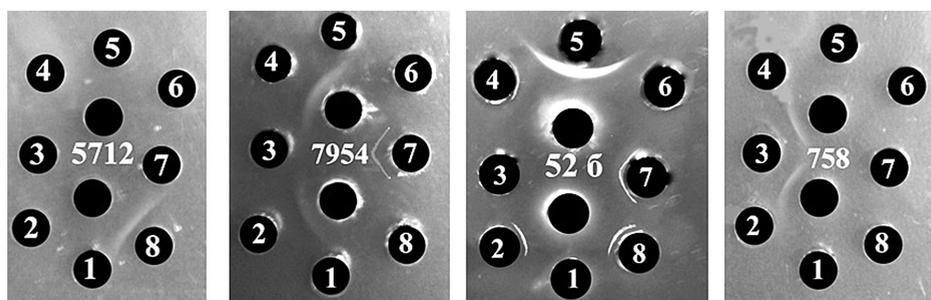


Рис. 6. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре Н-антисывороток *R. solanacearum* 5712, 7954, 526, 758 с липополисахаридами, изолированными из штаммов 8089 (1), 7954 (2), 758 (3), 526, 4 (5), TX₁ (6), TS₃ (7), 5712 (8)

детерминантам Н-антисывороток штаммов 7954 и 526. Антисыворотка к флагеллину штамма 758 реагировала с гомологичным флагеллином, а также ЛПС, то есть у них присутствуют общие антигенные детерминанты. Н-антисыворотка к штамму 5712 взаимодействует с флагеллинами штаммов 5712, 7954 и 4 и только с гомологичным ЛПС. Во флагеллине 5712 и ЛПС 5712 присутствуют общие антигенные детерминанты, о чем свидетельствуют и данные по моносахаридному составу, представленному рамнозой и ксилозой [13]. Н-антисыворотка к штамму 7954 взаимодействует с флагеллинами штаммов 7954, 526 и 5712, а также с ЛПС штаммов 7954, 526 и TS₃.

Результаты серологических исследований позволяют высказать предположение о наличии в составе препаратов жгутиковых флагеллинов антигенных детерминант углеводной природы, идентичных эпитопам ЛПС некоторых штаммов *R. solanacearum*. В пользу такого предположения свидетельствуют данные, к сожалению, только одного сообщения [2] по идентификации структуры гликановых цепей флагеллина полярного жгутика *Azospirillum brasilense* Sp7, представленных полисахаридом с молекулярной массой 7.7 kDa, который имеет разветвленное тетрасахаридное повторяющееся звено, включающее остатки рамнозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина и фукозы (в качестве бокового заместителя). Авторы сообщают, что соотношения моносахаридных остатков в гликане флагеллина и O-специфическом полисахариде липополисахарида этого же штамма аналогичны. Эти данные свидетельствуют о тесном сродстве этих двух гликополимеров.

Полученные нами результаты по изучению флагеллинов *R. solanacearum* свидетельствуют о том, что, аналогично ЛПС, флагеллины не могут быть использованы в качестве общих антигенов представителей этого вида. Для того чтобы установить, имеют ли флагеллины общие антигенные детерминанты с O-специфическими полисахаридами ЛПС *R. solanacearum*, необходимы дальнейшие исследования по получению флагеллинов в гомогенном состоянии и проведении кросс-реакций как с Н-, так и О-антисыворотками.

Авторы благодарят ведущего инженера отдела фитопатогенных бактерий Н.В. Житкевич за предоставленные для исследований штаммы 526 и 4 *R. solanacearum*.

О.С. Броварська, С.І. Войчук, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА СЕРОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТІВ ФЛАГЕЛІНІВ *Ralstonia solanacearum*

Резюме

З восьми штамів *Ralstonia solanacearum*, ізольованих із різних колекцій, одержані препарати флагелінів. Їх хімічна ідентифікація показала присутність білка (55-92%), вуглеводів (7-25%), а також незначних кількостей нуклеїнових кислот (від 0.5 до 3.3%) в залежності від досліджуваного штаму. Амінокислотний склад представлений

17 амінокислотами, переважаючими з яких були дикарбонові (глутамінова та аспарагінова) кислоти, а також аланін, лейцин і лізин. Кислі амінокислоти складають до 20% від усіх амінокислот флагеліна. Пролін, тирозин, фенілаланін, гістидин, аргінін присутні в незначній кількості (1-6%). Триптофан взагалі не виявлено, а метіонін і цистеїн практично в усіх препаратах флагелінів були відсутні. У двох штамів *R. solanacearum* 5712 та 8089 ідентифіковані наступні моносахариди: рамноза (20.1 і 79.9% відповідно) і глюкоза (73.9 і 14.6% відповідно). В препараті флагеліна *R. solanacearum* 5712 виявлена також ксилоза (6.0%). У флагелінах інших штамів ідентифікувати моносахариди нам не вдалось, що, ймовірно, обумовлено присутністю в їх складі унікальних моносахаридів, відсутніх в стандарті, який був використаний нами для аналізу. Електрофорезом в поліакриламідному гелі показано, що досліджувані нами препарати флагелінів різних штамів *R. solanacearum* є гетерогенними й представлені кількома лініями з різними молекулярними масами від 14 400 до 94 000 Да. Результати серологічних досліджень дозволяють припустити наявність в складі препаратів джгутикових флагелінів антигенних детермінант вуглеводної природи, які ідентичні епітопам ЛПС деяких штамів *R. solanacearum*. Як показали дослідження, аналогічно ЛПС, флагеліни *R. solanacearum* не можуть бути використані як загальні антигени представників цього виду.

Ключові слова: *Ralstonia solanacearum*, препарати флагелінів, хімічна ідентифікація, серологічна активність.

O.S. Brovarkaya, S.I. Voychuk, LD Varbanets

*Institute of Microbiology and Virology, DK Zabolotny NASU,
Str. Academician Zabolotny, 154, Kyiv 03143, Ukraine*

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND SEROLOGICAL ACTIVITY OF *Ralstonia solanacearum* FLAGELLIN PREPARATIONS

Summary

From the eight strains of *Ralstonia solanacearum*, isolated from different collections, obtained preparations of flagellin. Their chemical identification showed the presence of protein (55-92%), carbohydrates (7-25%) and small amounts of nucleic acids (from 0.5 to 3.3%) depending on the tested strain. Amino acid composition was presented by 17 amino acids the predominant of which were dicarbonic (glutamic and aspartic) acids, as well as alanine, leucine and lysine. Acidic amino acids account up to 20% of all amino acids of flagellin. Proline, tyrosine, phenylalanine, histidine, arginine present in minor amounts (1-6%). Tryptophan was not detected at all, methionine and cysteine is practically lacking in all flagellin preparations. In flagellins of two *R. solanacearum* strains 5712 and 8089 were identified following monosaccharides: rhamnose (20.1 and 79.9% respectively) and glucose (73.9 and 14.6% respectively). In the preparation of *R. solanacearum* 5712 flagellin also found xylose (6.0%). In flagellins of others strains we could not identify these monosaccharides, which is probably due to the presence in their composition of unique sugars that did not appear in the standard, which has been used by us for analysis. Polyacrylamide gel electrophoresis shows that investigated preparations of *R. solanacearum* flagellin are heterogeneous and represented by several bands of different molecular weights of 14 400 to 94 000 Da. The results of the serological tests give a possibility to suggest the presence in the flagellins antigenic determinant of carbohydrate nature which are identical

epitopes of LPS of some *R. solanacearum* strains. Studies have shown that similar LPS, flagellin of *R. solanacearum* can not be used as common antigen of this species.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, flagellin preparations, chemical identification, serological activity.

1. Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography. *Carboh Res.* 1976; 5(3): 340-345.
2. Belyakov A.Ye, Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Yu., Matora L.Yu., Knirel Yu.A., Shchyogolev S.Yu. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Carbohydr Res.* 2012; 361: 127-132.
3. Braga C.J., Massis M.L., Alencar B.C., Rodrigues M.M., Sbrogio-Almeida M.E., Ferreira L.C. Cytotoxic T cell-adjuvant effects of three *Salmonella* enteric flagellins. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2008; 39(1):44-49.
4. Burdulia L.G. An agonistic of Toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science.* 2008; 320 (5873): 226-230.
5. Burdulia L.G. Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. *Int. J Radiat Oncol Boil Phys.* 2012; 83(1): 228-234.
6. DePamphilis M.L., Adier J. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriology.* 1971; 105(1): 384-395.
7. Duan Q., Zhou M., Zhu L., Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 2013; 53(1): P.1-8. doi: 10.1002/jobm.201100335. Epub 2012 Feb 23.
8. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal Chem.* 1956; 28 (2): 350-356.
9. Gritsay R.V., Brovarskaya O.S., Zhytkevych N.V., Varbanets L.D. [Serological characteristic of lipopolysaccharides of *Ralstonia solanacearum*.] *Mikrobiol. Z.* 2012; 74(5):16-21. Ukrainian.
10. Gritsay R.V., Brovarskaya O.S., Zhytkevych N.V., Varbanets L.D. [Monosaccharide composition of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides]. *Mikrobiol. Z.* 2013; 75(1): 28-33. Ukrainian.
11. Harshey R.M., Toguchi A. Spinning tails: homologies among bacterial flagellar. *Trends Microbiol.* 1996; 4(6): 226-231.
12. Hayward A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol.* 1991; 29:65–87.
13. Kocharova N.A., Knirel Yu.A., Varbanets L.D., Moscaenko N.V., Brovarskaya O.S., Muras V.A., Young J.M. Studies of O-specific polysaccharide chains of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharides consisting of structurally different repeating units. *Carbohydr Res.* 1993; 250: 277-285.
14. Laemmli U.K. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
15. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-275.
16. Oliveira B.H., Silva M.R., Braga C.J., Massis L.M., Ferreira L.C., Sbrogio-Almeida

- M.F., Takagi M.* Production of native flagellin from *Salmonella typhimurium* in a bio-reactor and purification by tangential ultrafiltration. Brazilian Journal of chemical engineering. 2011; 28(4): 574-584.
17. *Orive A., Pissinis D., Diaz C., Minan A., Benitez G., Rubert A., Millone D., Rumbo M., Creus A., Salvarezza R., Schilardi P.* Self-assembly of flagellin on Au(111) surfaces. Journal of colloid and interface science. 2014; 433: 86-93.
 18. *Ouchterlony O.* Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog Allergy. 1962; 6:3-15.
 19. *Smith K.D.* Toll-like receptor 5 recognized a conserved site of flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol. 2003; 4(12): 1247-1253.
 20. *Spirin A.S.* [The determination of nucleic acids]. Biochemistry (Moscow). 1958; 23(5):562-662. Russian.
 21. *Talajeva G.B.* [Antigenic characteristics of bacteria *Bacillus thuringiensis* and their application in bacteria's differentiation]. Siberian med j. 2010; 8:77-79. Russian.
 22. *Tans-Kersten J., Huang H., Allen A.* *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J Bacteriol. 2001; 183(12):3597-3605.
 23. *Tsai C. M., Frash C.E.* A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. Anal Biochem. 1982; 119:115 – 119.
 24. *Varbanets L.D., Zdorovenko G.M., Knirel Yu.A.* [Methods of lipopolysaccharides investigation]. Kiev: Naukova dumka; 2006. 237 p. Russian.
 25. *Vasse J., Frey P., Trigalet A.* Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Mol Plant-Microbe Interact. 1995; 8:241–251.
 26. *Vidaver A.* Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic pseudomonas: effect of the carbon source. Appl Microbiol. 1967; 15(16):1523-1524.
 27. *Vinarskaya N.V., Varbanets L.D.* [Chemical characterization and serological activity of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides]. Mikrobiol. Z. 2002; 64(1): 37-47. Russian.
 28. *Wilson D.R., Beveridge T.J.* Bacterial flagellar filaments and their component flegellins. Can. J Microbiol. 1993; 39: 451-472.

Отримано 12.12.2016