

Л.Б. Скоклюк, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *RAHNELLA AQUATILIS**

Дослідження ліпополісахаридів (ЛПС) восьми штамів *Rahnella aquatilis*, виділених із різних джерел, показали, що вони являють собою суміш S- та R- типів молекул, про що свідчить наявність високомолекулярної фракції O-специфічного полісахариду (O-ПС) та низькомолекулярних фракцій корового олігосахариду (OG-кору). Домінуючими моносахаридами OG-кору були глюкоза, галактоза. Особливістю ЛПС усіх досліджуваних штамів була наявність лише однієї високомолекулярної фракції O-ПС, домінуючими моносахаридами якої виявились галактоза, глюкоза, маноза, рамноза та фукоза. При визначенні жирних кислот ліпиду A домінуючими були 3-окситетрадеканова кислота (48,9–93,1 %), додеканова (2,9–12,1 %), тетрадеканова (4,1–25,3 %) та гексадеканова (2,8–15,3 %) кислоти, залежно від штаму. Наявність в ліпіді A досліджуваних штамів *R. aquatilis* тільки однієї оксикислоти – 3-окситетрадеканової, свідчить про правильність їх віднесення до представників ентеробактерій.

К л ю ч о в і с л о в а : ліпополісахариди, *Rahnella aquatilis*, структурні компоненти, моносахариди, жирні кислоти.

Інтерес дослідників до бактеріальних ліпополісахаридів (ЛПС) обумовлений їх унікальними біологічними властивостями, які є результатом специфічної хімічної структури молекули та її компонентів. ЛПС є основними компонентами зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, беруть участь в її молекулярній організації і регулюють проникність мембрани для ряду речовин. Як соматичні антигени грамнегативних бактерій, ЛПС визначають їх O-антигенну специфічність. Це використовується при виготовленні вакцин, діагностикумів, а також є основою створення внутрішньовидових класифікаційних схем мікроорганізмів, які необхідні як в імунодіагностиці, так і в таксономії. Склад і будова ЛПС, а також їх структурних компонентів є загально визнаним таксономічним критерієм у систематиці грамнегативних бактерій. Оскільки *Rahnella aquatilis* є гетерогенним видом, у систематиці якого є багато невирішених питань, метою роботи було отримати структурні компоненти молекули ЛПС: ліпід A, олігосахарид кору (OG-кору) і O-специфічний полісахарид (O-ПС) та провести їх хімічну ідентифікацію.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були вісім штамів *R. aquatilis*, виділених із різних джерел (табл. 1), які були люб'язно надані завідувачем відділу нових та маловивчених інфекційних захворювань Інституту мікробіології та імунології АМН України д.м.н. С.І. Похилом, за що висловлюємо йому щирі вдячність. Штами вирощували на синтетичному рідкому середовищі N [7], при температурі 28 °C протягом 24 год. Як джерело вуглецю використовували глюкозу в концентрації 10 мл 0,5 % водного розчину на 200 мл середовища. Після центрифугування вологі клітини висушували ацетоном (2 рази) та ефіром (1 раз).

* Робота частково профінансована грантом Ф-28.4/039 ДФФД – РФФД-2009.

© Л.Б. Скоклюк, Л.Д. Варбанець, 2010

Джерела виділення штамів *R. aquatilis*

Штами <i>R. aquatilis</i> , ЛЕПМД	Джерело виділення
95U003	випорожнення людей, хворих на діарею
95U004	-/-
95U007	-/-
95U011	ризосфера рослин
95U012	-/-
96U035	вода відкритих водойм
96U036	-/-
96U037	-/-

Примітка: ЛЕПМД – лабораторія експериментально прикладної молекулярної діагностики Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України

Екстракцію ЛПС із сухої бактеріальної маси проводили за водно-фенольним методом Вестфала і Янна [3]. Для виділення структурних компонентів проводили деградацію молекули ЛПС шляхом гідролізу 3 % оцтовою кислотою (100 °C, 4–6 год, залежно від штаму). Ліпід А, що випадав в осад, відділяли центрифугуванням (25000 g, 40 хв), а супернатант концентрували до об'єму ~ 7-8 мл і фракціонували на колонці (70,0 × 3,0 см) з сефадексом G-50, використовуючи 0,025 N піридин-ацетатний буфер, рН 4,5. В результаті гель-хроматографії вуглеводної частини деградованого ЛПС на сефадексі G-50 були отримані окремі структурні компоненти ЛПС: О-ПС (фракція I) та ОГ-кору (фракції II та III), які концентрували у вакуумі та ліофільно висушували. Профілі елюції вуглеводної частини деградованого ЛПС будували на основі визначення у фракціях вуглеводів фенол-сірчанним методом [1].

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу препаратів у 2 N розчині HCl протягом 5 год при температурі 100 °C. Обробку зразків здійснювали за методом Albersheim з співавт. [5]: після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, до проби вносили боргідрид натрію та залишали на 10 год при кімнатній температурі (в захищеному від світла місці). Нейтралізували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в Н⁺ формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом (по 1 мл), випаровуючи. До проби додавали 0,5 мл піридину (перегнаного) та 0,5 мл оцтовокислого ангідриду і гідролізували протягом 15 хв при температурі 100 °C. Висушували, додавали 2-3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували в скляних пробірках при 2500 g, 20 хв. Супернатант, який містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів, розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30m × 0,25mm × 0,25µm, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування – 250 °C, інтерфейса – 280 °C, термостата – 220 °C (режим ізотермічний). Пробу вводили з діленням потоку 1:100. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також із використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від суми площ всіх піків моносахаридів [1].

Для визначення амінокислот і аміносахаридів 1 мг сухого препарату ЛПС гідролізували в 6 N розчині HCl протягом 20 год при температурі 100 °C. Гідролізат центрифугували, нейтралізували і випаровували під вакуумом. Аналіз проводили на амінокислотному аналізаторі Biotronic LC-5001 (Німеччина) на аніонобмінній смолі BTC-2110.

Результати та їх обговорення. Для виділення окремих структурних компонентів молекули ЛПС був проведений м'який кислотний гідроліз, при якому руйнується кислотолабільний зв'язок між залишком КДО, який входить до складу олігосахариду кору, та залишком глюко-

заміну (GlcN II), який є компонентом ліпиду А. В процесі деградації ліпід А випадав в осад і був відділений центрифугуванням, а вуглеводна частина залишалась в розчині.

Відомо, що найбільш консервативною частиною молекули ЛПС є ліпід А, своєрідність жирнокислотного складу якого може бути використано як додатковий таксономічний критерій при диференціації видів. Вивчення жирнокислотного складу ліпиду А ЛПС досліджених штамів *R. aquatilis* показало наявність жирних кислот, в ланцюгу яких міститься від 12 до 20 атомів вуглецю. Домінуючими були 3-окситетрадеканова кислота (від 48,9 до 93,1 % залежно від штаму), додеканова (від 2,9 до 12,1 % залежно від штаму), тетрадеканова (від 4,1 до 25,3 % залежно від штаму) та гексадеканова (від 2,8 до 15,3 % залежно від штаму) кислоти. В складі ЛПС деяких штамів у невеликій кількості також були наявні ізопентадеканова, октадеканова та ейкодеканова кислоти (табл. 2).

Таблиця 2

**Жирнокислотний склад ліпиду А ЛПС
штамів *R. aquatilis***

Штам	Жирні кислоти (у % до загальної суми площ піків)						
	C12:0	C14:0	C15:0	3 OH-C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
95U003	6,20	22,30	-	64,30	7,20	-	-
95U004	7,50	23,20	-	63,60	5,70	-	-
95U007	12,10	23,70	-	48,90	15,30	-	-
95U011	2,90	25,30	-	58,40	10,60	2,70	-
95U012	3,20	16,60	5,20	63,90	3,70	-	7,40
96U035	4,50	24,10	-	65,60	5,80	-	-
96U036	3,50	23,60	-	68,90	4,00	-	-
96U037	-	4,10	-	93,10	2,80	-	-

Примітка: «-» - не виявлено

Оскільки відомо [6], що для ентеробактерій характерна наявність у ліпіді А тільки однієї оксикислоти – 3-окситетрадеканової, отримані нами дані є додатковим показником, який підтверджує правильність віднесення досліджуваних штамів до представників ентеробактерій.

Відомо, що препарати ЛПС завжди гетерогенні, що в першу чергу пов'язано з наявністю в S-формах бактерій молекул із різною довжиною полісахаридного ланцюга: молекул R-типу, які не містять полісахаридний ланцюг та SR-типу, де O-антиген представлений однією повторюваною ланкою. Водорозчинні продукти гідролізу ЛПС *R. aquatilis* були розділені в результаті гель-хроматографії вуглеводних частин деградованих ЛПС на колонці з сефадексом G-50. Встановлено, що нативні препарати ЛПС представляють суміш S - та R - типів молекул, про що свідчить присутність високомолекулярної фракції O-ПС (фракція 1) та низькомолекулярних фракцій олігосахариду кору (фракції 2 та 3) (рисунок).

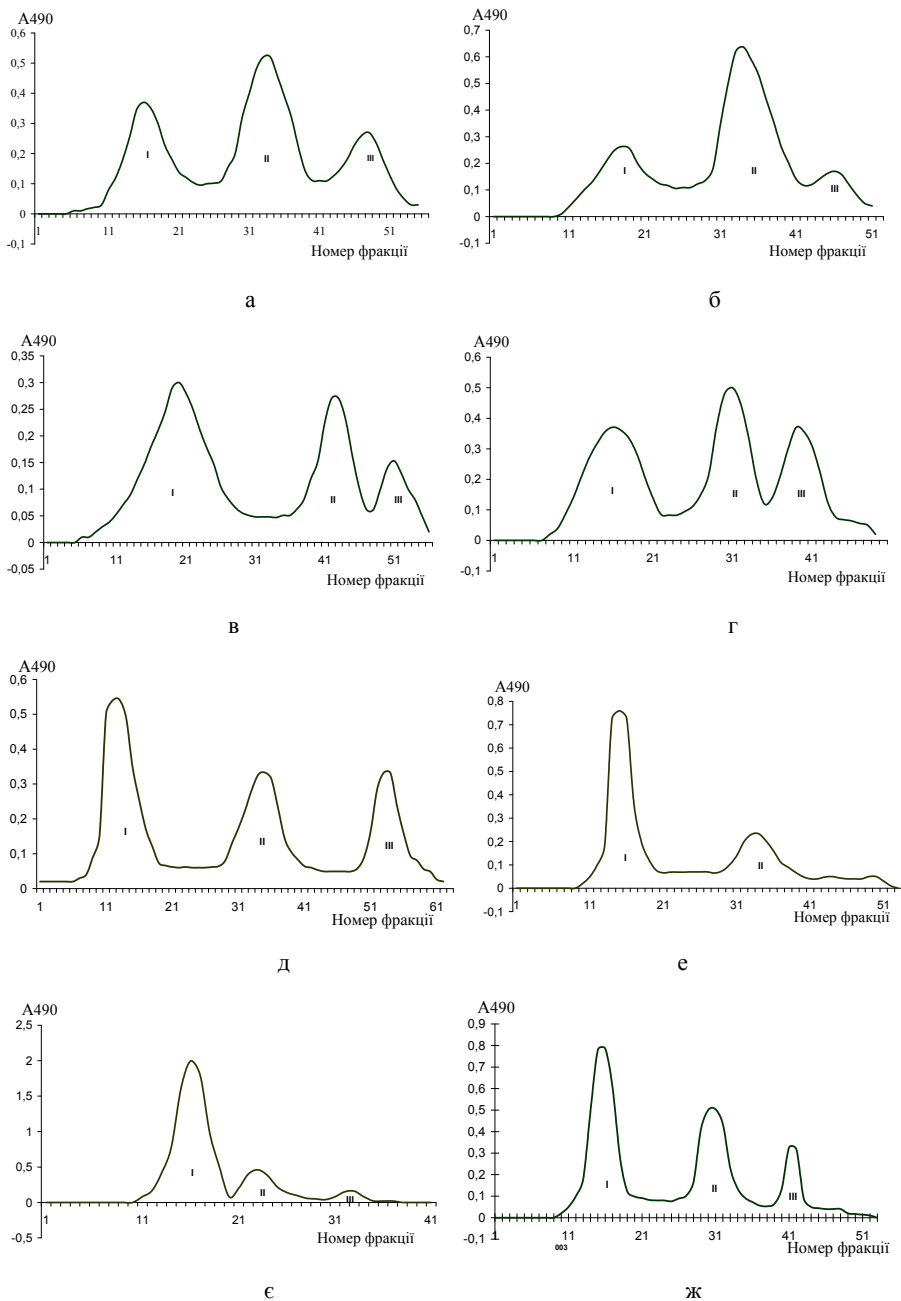


Рисунок. Профілі елюції на сефадексі G-50 вуглеводної частини

деградованої молекули ЛПС *R. aquatilis*: 96U037(а), 96U036(б), 96U035 (в), 95U012 (г), 95U011(д), 95U007 (е), 95U004 (є), 95U003 (ж); I – фракція О-ЛПС; II-III – фракції ОГ-кору.

Олігосахарид кору є більш варіабельною, порівняно з ліпідом А, частиною ЛПС. При ідентифікації моносахаридного складу встановлено, що в ОГ-корів усіх досліджуваних штаблів *R. aquatilis* наявні (залежно від штаму) глюкоза (11,4–56,0 %), галактоза (6,3–59,3 %), фукоза (0,5–13,9 %), та рибоза (0,9–56,3 %) (табл. 3). Так як вміст нуклеїнових кислот в ЛПС незначний (до 6,0 %), то можна зробити висновок про те, що рибоза є компонентом молекули ЛПС, а не наслідком забруднення нуклеїновими кислотами. Залежно від штаму рамноза (1,0–21,7 %), маноза (2,4–37,3 %) і арабіноза (0,6–5,3 %) присутні в ОГ-корів деяких штаблів. Гептози, які є характерними компонентами ОГ-корів, не були виявлені в двох штаммах *R. aquatilis* – 95U003 та 95U004.

Моносахаридний склад структурних компонентів молекули ЛПС *R. aquatilis*

Штам	Структурний компонент	Моносахариди (у % до загальної суми площ піків)							
		Rha	Fuc	Rib	Ara	Man	Gal	Glc	Hep
95U003	О-ПС	2,5	-	-	3,4	30,9	36,0	25,8	-
	ОГ-кор 1	3,4	0,5	-	-	35,4	36,6	24,0	-
	ОГ-кор 2	1,1	-	0,9	5,3	23,5	43,5	25,3	-
95U004	О-ПС	3,2	1,6	2,9	1,9	30,8	37,5	20,5	-
	ОГ-кор 1	10,8	6,8	-	-	37,3	32,8	12,3	-
	ОГ-кор 2	-	2,0	2,5	2,3	25,1	37,8	27,3	-
95U007	О-ПС	2,3	-	26,9	-	-	61,5	6,4	-
	ОГ-кор 1	21,7	1,5	21,5	1,7	10,2	6,3	37,2	2,7
	ОГ-кор 2	4,0	4,3	56,3	4,0	4,2	8,0	19,2	-
95U011	О-ПС	52,8	-	-	-	31,7	2,7	12,7	-
	ОГ-кор 1	-	7,1	-	-	-	41,6	36,7	14,6
	ОГ-кор 2	1,0	3,1	22,4	0,6	2,4	14,7	56,0	-
95U012	О-ПС	-	13,3	-	-	-	84,9	1,8	-
	ОГ-кор 1	-	13,9	2,1	-	-	59,3	19,3	5,4
	ОГ-кор 2	-	7,6	38,9	-	-	38,0	15,6	-
96U035	О-ПС	-	28,9	-	-	-	64,4	6,7	-
	ОГ-кор 1	-	12,4	6,6	2,8	-	51,1	21,6	5,6
	ОГ-кор 2	18,5	6,7	17,0	3,7	-	52,7	18,1	-
96U036	О-ПС	-	25,7	-	-	-	69,9	4,4	-
	ОГ-кор 1	-	14,1	1,77	-	-	34,1	41,9	8,2
	ОГ-кор 2	-	9,1	39,2	1,6	-	38,7	11,4	-
96U037	О-ПС	*	*	*	*	*	*	*	*
	ОГ-кор 1	*	*	*	*	*	*	*	*
	ОГ-кор 2	-	12,8	36,3	1,0	-	36,2	13,7	-

Примітка: «-» - не виявлено; «*» - не визначалось. «Rha» - рамноза, «Fuc» - фукоза, «Rib» - рибоза, «Ara» - арабіноза, «Man» - маноза, «Gal» - галактоза, «Glc» - глюкоза, «Hep» - гептоза.

Отже, отримані нами дані свідчать про гетерогенність ОГ-кору досліджуваних штамів *R. aquatilis*.

Найбільш варіабельною частиною молекули ЛПС є О-ПС, варіації у структурі яких є молекулярною основою внутрішньовидових серологічних класифікаційних схем. Особливістю усіх досліджуваних штамів *R. aquatilis*, на відміну від раніше опублікованих даних щодо інших штамів [2], була наявність лише однієї високомолекулярної фракції О-ПС, домінуючими моносахаридами якої виявились, залежно від штаму, галактоза (2,7–84,9%), глюкоза (1,8–25,8%), маноза (30,8–31,7%), рамноза (2,3–52,8%) та фукоза (1,6–28,9%).

Якщо раніше амінокислоти не вважали компонентами ЛПС, то в останні роки [4] доведено, що вони є складовими цих молекул. Амінокислоти впливають на заряд молекули ЛПС, а також вносять певний вклад в імуноспецифічність бактеріальних антигенів. Амінокислоти були виявлені нами в ЛПС лише двох штамів *R. aquatilis*: 95U003 та 95U004. Домінуючими були гліцин та глутамінова кислота (табл. 4).

Таким чином, ЛПС *R. aquatilis* побудовані за загальним для всіх грамнегативних бактерій принципом і складаються з 3-х різних структурних частин: ліпиду А, олігосахариду кору та

О-специфичного полісахариду. У вихідному пулі препаратів ЛПС наявні S- та R-типи молекул ЛПС. В ліпіді А досліджуваних штамів виявлено жирні кислоти (3-окситетрадеканова, додеканова, тетрадеканова, гексадеканова), характерні для ліпідів А типових представників родини *Enterobacteriaceae*. Встановлено відмінності як в кількісному, так і в якісному компонентному складі ОГ-корів досліджуваних штамів. Одержані нами дані свідчать про гетерогенність цієї частини макромолекули ЛПС *R. aquatilis*. Склад О-специфічних полісахаридів значною мірою відрізняється у досліджуваних штамів.

Таблиця 4

**Амінокислотний склад компонентів молекули ЛПС *R. aquatilis*
(% до сухої маси)**

Амінокислота	Штам <i>R. aquatilis</i> ЛЕПМД	
	95U003	95U004
Аспарагінова кислота	-	0,6
Треонін	-	0,3
Серин	0,2	0,3
Глютамінова кислота	0,5	1,1
Гліцин	0,4	1,3
Аланін	0,4	0,4
Валін	-	0,2
Метіонін	-	-
Диамінопімелінова кислота	-	-
Ізолейцин	-	0,2
Лейцин	0,2	0,2
Тирозин	-	-
Фенілаланін	-	-
Гістидин	0,5	0,4
Орнітин	0,2	0,1
Лізин	-	0,1
Аргінін	-	0,1

Примітка: «-» - не виявлено

Л.Б. Скоклюк, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

**ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *RAHNELLA AQUATILIS***

Резюме

Исследования липополисахаридов (ЛПС) восьми штаммов *Rahnella aquatilis*, выделенных из разных источников, показали, что они представляют собой смесь S- и R-типов молекул, о чем свидетельствует присутствие высокомолекулярной фракции О-специфического полисахарида (О-ПС) и низкомолекулярных фракций олигосахарида кора (ОГ-кора). Доминирующими моносахаридами ОГ-кора были глюкоза, галактоза. Особенностью всех исследованных штаммов было наличие только одной высокомолекулярной фракции О-ПС, доминирующими моносахаридами которой были галактоза, глюкоза, манноза, рамноза и фукоза. Жирнокислотный состав липида А был представлен 3-окситетрадекановой (48,9–93,1 %) додекановой (2,9–12,1 %), тетрадекановой (4,1–25,3 %) и гексадекановой (2,8–15,3 %) кислотами, в зависимости от штамма. Присутствие в липиде А исследованных штаммов *R. aquatilis* только одной оксикислоты – 3-окситетрадекановой, свидетельствует о правильности отнесения их к представителям энтеробактерий.

Ключевые слова: липополисахариды, *Rahnella aquatilis*, структурные компоненты, моносахариды, жирные кислоты

**CHEMICAL CHARACTERISATION OF STRUCTURAL COMPONENTS
OF *RAHNELLA AQUATILIS* LIPOPOLYSACCHARIDES**

S u m m a r y

The studies of lipopolysaccharides (LPS) of eight *Rahnella aquatilis* strains, isolated from different sources have shown that they contain both S- and R-types of molecules. This fact is evidenced by the presence of high-molecular fraction of O-specific polysaccharides (O-PS) and low-molecular fraction of core oligosaccharides. The predominant monosaccharides of core oligosaccharides were glucose, galactose. The presence of only one high-molecular fraction O-PS was a characteristic feature of all investigated strains. The predominant monosaccharides of O-PS were galactose, glucose, mannose, rhamnose and fucose. 3-hydroxytetradecanoic (48.9–93.1 %), dodecanoic (2.9–12.1 %), tetradecanoic (4.1–25.3 %) and hexadecanoic (2.8–15.3 %) acids have been obtained in lipids A of LPS depending on the strain. The presence in lipid A of *R. aquatilis* of only 3-hydroxytetradecanoic acid which is characteristic of *Enterobacteriaceae* proves the correct ascribing of the isolated strains to this family.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: lipopolysaccharides, *Rahnella aquatilis*, O-specific polysaccharides, lipids A, monosaccharides, fatty acids.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *L.B.Skoklyuk*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine: 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наукова думка, 2006. – 237 с.
2. Варбанец Л.Д., Остапчук А.Н., Похил С.И. Характеристика структурных компонентов липополисахаридов *R. aquatilis* // Микробиол. журн. – 2004. – 66, № 4. – С. 13–22.
3. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы исследования углеводов. – М.: Мир, 1975. – С. 325–333.
4. Кочарова Н.А., Сенченкова С.Н., Кондакова А.Н. L- и D- аспарагиновые кислоты: новые неуглеводные компоненты бактериальных полисахаридов // Биохимия. – 2004. – 69, № 1. – с.128–133.
5. 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 // Carbohydr. Res. – 1975. – 5, N 3. – P. 340–345.
6. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – N 71. – P. 635–700.
7. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence and phytopathogenic pseudomonas: effect of carbon source // Appl. Microbiol. – 1967. – 15, N 6. – P. 1523–1524.

Отримано 17.01.2008