

## ВЛИЯНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ НА СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI*

О.С. Броварская, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина  
e-mail: varbanets\_imv@ukr.net

**Цель.** Изучить влияние методов выделения липополисахаридов (ЛПС) *Escherichia coli* на их состав и биологическую активность. **Методы.** В работе использовали микробиологические, биохимические и серологические методы. ЛПС получали из клеток классическим методом Вестфаля (ЛПС<sub>в</sub>), Буавена (ЛПС<sub>б</sub>), а также был получен щелочной липополисахарид (ЛПС<sub>щ</sub>). **Результаты.** ЛПС<sub>в</sub>, ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>щ</sub> характеризовались различным выходом (0.33, 0.25 и 0.05% соответственно) по отношению к массе микробных клеток. Все препараты ЛПС содержали основные компоненты ЛПС: углеводы, КДО и жирные кислоты липида А. Показано, что метод Буавена и Вестфаля дает возможность выделить более высокомолекулярные, а щелочной метод экстракции – более низкомолекулярные фракции ЛПС. Основными компонентами гидрофобной части ЛПС в липиде А были 3-ОН-С<sub>14:0</sub>, С<sub>12:0</sub>, С<sub>14:0</sub>, С<sub>16:0</sub> кислоты, а полисахаридная часть ЛПС представлена глюкозой, галактозой, гептозой и одним неидентифицированным моносахаридом. ЛПС<sub>в</sub> проявлял наибольшую серологическую и токсическую активность, а ЛПС<sub>б</sub> был менее токсичен, но более пирогенен. ЛПС<sub>щ</sub> характеризовался наименьшей пирогенностью и токсичностью. **Выводы.** Метод экстракции ЛПС влияет на его состав и биологические свойства.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli* 58, липополисахарид, моносахаридный и жирно-кислотный состав, биологическая активность.

Известно [1], что важную роль во взаимодействиях хозяин-патоген как у животных, так и у растений играют липополисахариды (ЛПС) – основные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, представляющей собой уникальный асимметричный фосфолипидный бислой. Его внутренний листок состоит из глицерофосфолипидов, в то время как наружный богат липополисахаридом, который за счет липида А заякоривается во внешней мембране, взаимодействуя с ее фосфолипидами. ЛПС занимают около 75% поверхности клетки. Так, показано [2, 3], что на поверхности только одной клетки *Escherichia coli* насчитывается свыше 100 молекул ЛПС. Они взаимодействуют со встроенными в наружную мембрану интегральными мембранными белками-поринами и обеспечивают барьер проницаемости для различных классов молекул, включая детергенты, антибиотики, металлы и др. Такое устройство молекул ЛПС во внешней мембране обуславливает трудности при их выделении из бактериальных клеток, поскольку включает разрушение внутриклеточных связей, которое может, в случае применения жестких методов извлечения ЛПС, привести к их частичной деградации.

В связи с этим целью данной работы было сравнительное изучение состава и биологической активности препаратов ЛПС, выделенных из внешней мембраны *E. coli* 58 с помощью классической водно-фенольной экстракции по O. Westphal, K. Jann [4] и экстракции трихлоруксусной кислотой по Boivin [5].

**Материалы и методы.** Для получения ЛПС использовали штамм *Escherichia coli* 58, представитель серогрупп O111, выделенный из организма практически здорового пациента, проходившего профосмотр на санэпидстанции г. Харькова. В качестве посевного материала использовали культуру, выращенную на мясопептонном агаре (МПА) после инкубации при 28°C в течение 20–24 ч. Культивирование осуществляли на той же среде.

Для получения ЛПС были использованы два метода: классическая водно-фенольная экстракция по O. Westphal (ЛПС<sub>в</sub>) [4], экстракция ТХУ по Boivin (ЛПС<sub>б</sub>) [5], а также экстракция 10% NaOH (щелочной липополисахарид, ЛПС<sub>щ</sub>) бактериальной массы, оставшейся после получения ЛПС<sub>б</sub>.

Определение химического состава ЛПС проводили общепринятыми методами: суммарные углеводы – по Dubois [6], белки – по Lowry [7], нуклеиновые кислоты – по Спирину [8]. Очистку ЛПС от нуклеиновых кислот осуществляли методом ультрацентрифугирования (4 ч при 100 000g, 3 раза) [9].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-электрофорез) проводили согласно Laemmli [10] (4% концентрирующий и 12% разделяющий гель, сила тока 30 мА). Нагрузка на гелевую дорожку составляла 15 мкг. Для выявления полисахаридов гели окрашивали азотнокислым серебром согласно методу Tsai [11].

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 N HCl (5 ч, 100°C). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [9] на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent. Идентификацию моносахаридов осуществляли, сравнивая их время удерживания с таковым стандартных моносахаридов, а также используя компьютерную базу данных ChemStation. Количественные соотношения отдельных моносахаридов выражали в % от общей суммы площадей пиков.

Определение состава жирных кислот ЛПС в виде метиловых эфиров проводили с помощью хромато-масс-спектрометрической системы Agilent 6890N/5973 inert. Метилирование выполняли согласно методике [9].

Пирогенность ЛПС изучали на кроликах весом 2.0–3.5 кг путем внутривенного введения установленной минимальной пирогенной дозы ЛПС с последующей термометрией животных в течение 3 часов [9].

Токсические свойства ЛПС проверяли на беспородных мышах (20 г), сенсibilизированных D-галактозамином [12]. Растворы солянокислого D-галактозамина (15 мг на животное, по 0,2 мл) и различные количества ЛПС (от 0.02 до 800 мкг, по 0.2 мл) в физиологическом растворе вводили группам из четырех животных. Контрольной группе вводили раствор D-галактозамина в физиологическом растворе (0.2 мл). Выживаемость мышей в группах определяли в течение 48 часов. Летальную дозу LD<sub>50</sub> рассчитывали по методу Спирмена-Карбера [13]:

$$\log LD_{50} = \log X_{100} - \log Fd (\sum t - n/2)$$

$LD_{50}$  = 50% летальная доза

$\log X_{100}$  = логарифмическая доза, дающая 100% смертность

$\log Fd$  = интервал регистрации логарифма постоянный

$n$  = количество мышей на дозу

$\sum t$  = общее число умерших животных

О-антисыворотку к прогретой (2.5 ч, 100°C) культуре *E. coli* 58 получали путем четырех внутривенных инъекций возрастающими дозами суспензии микробных тел (от 500 тыс до 2 млрд. клеток/мл) с интервалом между инъекциями 5 суток. Забор крови проводили на 5 сутки после последней инъекции из вены уха в количестве 20–30 мл для получения О-антисывороток. Сыворотки хранили в холодильнике при 4°C. Титр сывороток определяли реакцией коагуляционной преципитации.

Антигенную активность полученных препаратов изучали методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони [14].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия Стьюдента и программы Microsoft Excel 2010.

**Результаты.** При выделении ЛПС из клеток *E. coli* 58 разными методами были получены препараты: ЛПС<sub>в</sub>, ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub>. Поскольку ЛПС<sub>в</sub> и ЛПС<sub>ш</sub> содержали большое количество нуклеиновых кислот (от 12.4% до 36.5% соответственно), проводили их дополнительную очистку ультрацентрифугированием. После очистки содержание нуклеиновых кислот в составе ЛПС существенно уменьшилось (табл.1). Выход ЛПС в полученных препаратах был невысоким и варьировал от 0.05% до 0.33 % в зависимости от метода получения препарата. Анализ выделенных препаратов выявил в их составе примерно равные количества углеводов (от 46.7 до 48.4 %), однако различное содержание белка (0.7–12.7%) (табл.1). Высокое содержание белка в ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub>, вероятно, может свидетельствовать о том, что при экстракции ТХУ не происходит расщепления липополисахарид-белкового комплекса. Единственный структурный элемент – 2-кето3-дезоксиктоновая кислота (КДО), который всегда присутствует в ЛПС и является своего рода маркером молекулы, выявлена в небольших количествах (от 0.03 до 0.09%). В исследуемых препаратах ЛПС содержание фосфора составляло от 1.68% (ЛПС<sub>б</sub>) до 3.84% (ЛПС<sub>ш</sub>) (табл.1)

**Таблица 1**

**Характеристика ЛПС *E. coli* 58**

Компоненты	ЛПС, выделенные из клеток <i>E. coli</i> различными методами		
	ЛПС <sub>в</sub>	ЛПС <sub>б</sub>	ЛПС <sub>ш</sub>
	% к сухому весу препарата		
Углеводы	46.7±2.3	47.2±2.0	48.4±2.4
Белок	0.7±0.03	8.8±0.4	12.7±0.6
Нуклеиновые кислоты после очистки	4.2±0.2	1.1±0.05	9.7±0.4
КДО	0.09±0.002	0.06±0.003	0.03±0.001
Общий фосфор	2.41±0.02	1.68±0.08	3.84±0.1
Выход ЛПС к весу клеток, %	0.33	0.25	0.05

Идентификация моносахаридного состава свидетельствует о том, что все исследуемые ЛПС содержали глюкозу, галактозу и гептозу, а также неидентифицированный моносахарид. Значительные различия отмечены в количественном содержании галактозы, которое варьировало от 3.9% (ЛПС<sub>ш</sub>) до 36.1% (ЛПС<sub>б</sub>). Доминирующими моносахаридами были глюкоза и галактоза (табл.2). Кроме того, в составе ЛПС<sub>в</sub> выявлена рибоза (5.4%).

**Таблица 2**  
**Моносахаридный и жирнокислотный состав ЛПС *E.coli* 58**

Моносахариды	ЛПС <sub>в</sub>	ЛПС <sub>б</sub>	ЛПС <sub>ш</sub>
	% от общей суммы площадей пиков		
X <sub>1</sub>	2.6±0.1	2.8±0.1	3.1±0.2
Рибоза	5.4±0.2	-	-
X <sub>2</sub>	-	-	2.9±0.1
Галактоза	33.9±1.1	36.1±1.8	3.9±0.2
Глюкоза	50.5±2.5	49.0±2.4	46.5±2.1
Гептоза	7.6±0.3	12.1±0.6	8.6±0.3
<b>Жирная кислота</b>			
Додекановая C <sub>12:0</sub>	-	16.8±0.8	18.6±0.9
Тридекановая C <sub>13:0</sub>	-	0.9±0.002	-
Тетрадекановая C <sub>14:0</sub>	-	18.2±0.9	21.3±1.1
3-гидрокситетрадекановая 3-ОН-C <sub>14:0</sub>	79.3±3.9	45.7±2.3	50.6±2.5
Гексадеценная C <sub>16:1</sub>	-	3.1±0.2	2.2±0.1
Гексадекановая C <sub>16:0</sub>	20.7±1.0	9.6±0.4	4.7±0.2
t-Октодекановая tC <sub>18:0</sub>	-	5.7±0.3	-
Октодекановая C <sub>18:0</sub>	-	-	2.7±0.1

Примечание. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> – неидентифицированный моносахарид

В составе липидной части ЛПС были идентифицированы жирные кислоты с длиной углеродной цепи от C<sub>12</sub> до C<sub>18</sub> (табл. 2). По жирнокислотному составу препараты ЛПС *E. coli* 58 отличались между собой. В ЛПС<sub>в</sub> выявлены две кислоты: 3-гидрокситетрадекановая (3-ОН-C<sub>14:0</sub>), доля которой составляла более 79.3% от суммы идентифицированных кислот (табл.2), и гексадекановая кислота (C<sub>16:0</sub>) – 20.7%. В составе ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub> присутствовали 3-гидрокситетрадекановая (45.7 и 50.6 % соответственно), гексадекановая (9.6 и 4.7 %), тетрадекановая (18.2 и 21.3%) и додекановая (16.8 и 18.6 %) кислоты. Кроме того, в ЛПС<sub>б</sub> в незначительных количествах были обнаружены тридекановая (C<sub>13:0</sub>) и t-октадекановая (C<sub>18:0</sub>), а в ЛПС<sub>ш</sub> – октадекановая кислоты.

Таким образом, количественный и качественный состав жирных кислот в анализируемых препаратах ЛПС зависел от способа выделения ЛПС, причем наибольшие различия наблюдались между ЛПС<sub>в</sub> и ЛПС<sub>б</sub>.

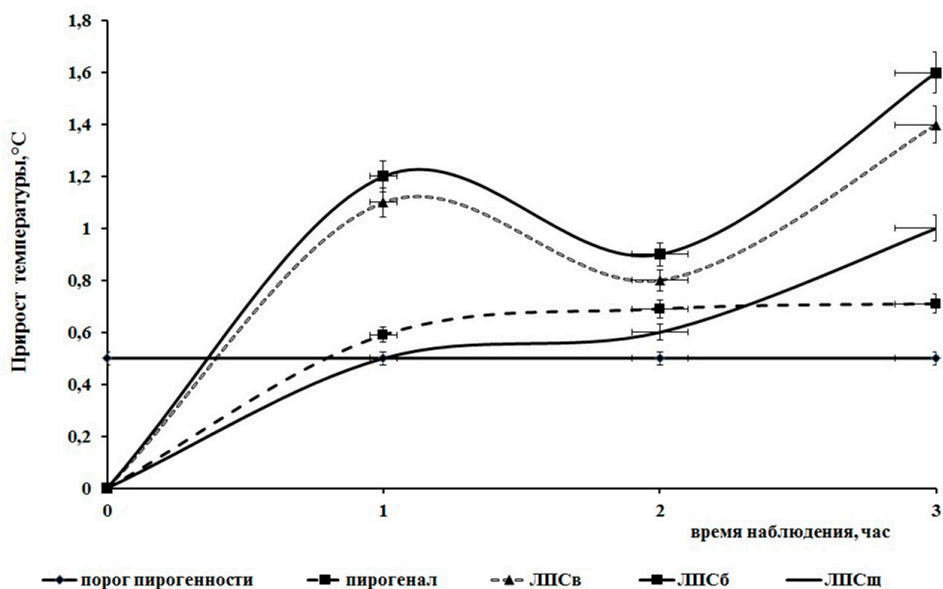
Исследуемые ЛПС проявляют различную токсичность. Так, ЛПС<sub>в</sub> имеет достаточно высокий уровень токсичности, его LD<sub>50</sub> равна 0.63 мкг/мышь, в то время как ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub> малотоксичны (табл.3): их LD<sub>50</sub> составляла 42.04 и 1131.37 мкг/мышь соответственно.

**Таблица 3**  
**Определение острой токсичности ЛПС *E. coli* 58**

ЛПС (выделены разными методами)	d, мкг ЛПС на одну мышь					LD <sub>50</sub>	
	d=0.02	d=0.2	d=2	d=20	d=200	мкг на одну мышь	мкг/кг веса
ЛПС <sub>в</sub>	0/4	2/4	2/4	4/4	4/4	0.63	31.62
	d, мкг ЛПС на одну мышь					LD <sub>50</sub>	
	d=25	d=50	d=100	d=200	d=400	мкг на одну мышь	мкг/кг веса
ЛПС <sub>б</sub>	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	42.04	2102.24
ЛПС <sub>ш</sub>	d, мкг ЛПС на одну мышь					LD <sub>50</sub>	
	d=50	d=100	d=200	d=400	d=800	мкг на одну мышь	мкг/кг веса
	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1131,37	56568,54

Примечание: 1/4 – число умерших (числитель) и общее число (знаменатель) животных при введении различных доз ЛПС

Одним из наиболее чувствительных методов оценки эндотоксичности ЛПС *in vivo* является определение пирогенности. Пирогенность изучали при внутривенном введении кроликам 0.007 нг на 1 кг массы кролика каждого из исследуемых ЛПС *E. coli* 58. ЛПС, выделенные методом Вестфали и Буавена, демонстрируют высокую пирогенную реакцию на кроликах (+1.4 и +1.6°C соответственно) (рис. 1). ЛПС<sub>ш</sub> был менее пирогенным, температура кролика поднималась медленно и только через 3 час эксперимента превышала порог пирогенности (+1,0°C) (рис.1).



**Рис.1. Пирогенная активность ЛПС *E. coli* 58**

При изучении иммунохимических свойств ЛПС в качестве антител использовали поликлональную О-антисыворотку, полученную путем иммунизации кроликов прогретой культурой *E. coli* 58. Антигенами служили ЛПС, выделенные различными методами. В реакции кольцепреципитации был определен рабочий титр О-антисыворотки, который составлял 1:80000. В реакции двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони ЛПС исследуемого штамма в гомологической системе проявил активность антигена. ЛПС<sub>в</sub> (2) показал три четкие линии преципитации, ЛПС<sub>б</sub> (1) – две, а ЛПС<sub>ш</sub> (3) – одну (рис.2). Анализ полученных данных показал наличие у ЛПС, полученных различными методами, сопоставимой антигенной активности.

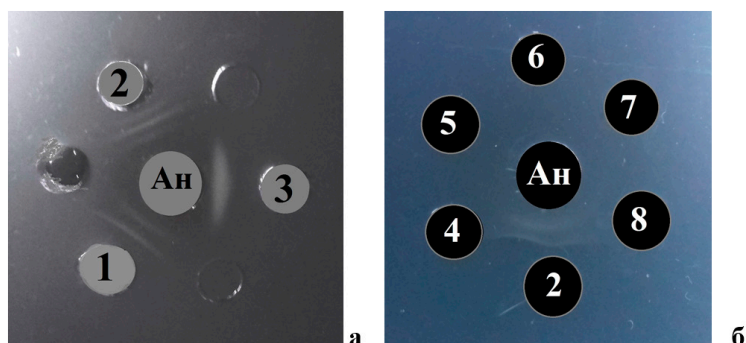


Рис. 2. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони О-антисыворотки к штамму *E. coli* 58 (An) с ЛПС штаммов *E. coli* 58 (1-ЛПС<sub>б</sub>, 2-ЛПС<sub>в</sub>, 3-ЛПС<sub>ш</sub>), ЛПС 126 (4), ЛПС 2890 (5), ЛПС М-17 (6), ЛПС 2884 (7), ЛПС L-19 (8)

В перекрестных серологических реакциях антисыворотки к *E. coli* 58 с ЛПС, выделенными из других штаммов *E. coli*, не выявлено взаимодействий, что свидетельствует об отсутствии у них общих антигенных детерминант, то есть эти штаммы являются представителями других серогрупп.

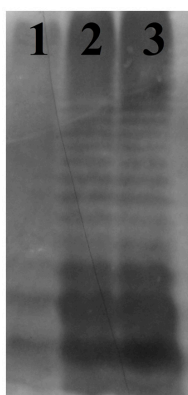


Рис.3. Электрофорез ЛПС *E. coli* 58 в полиакриламидном геле в присутствии SDS: 1-ЛПС<sub>ш</sub>, 2- ЛПС<sub>б</sub>, 3- ЛПС<sub>в</sub>



Известно [15], что природные штаммы *E. coli* синтезируют S-тип ЛПС, который в ПААГ электрофорезе идет в виде гетерогенных полос, образующих «лестницу». Данные, полученные в результате электрофоретического разделения ЛПС<sub>6</sub>, ЛПС<sub>в</sub> и ЛПС<sub>ш</sub> *E. coli* 58, наглядно демонстрируют существенные отличия в их распределении, свидетельствующие об гетерогенности по молекулярной массе этих ЛПС. В препаратах ЛПС<sub>в</sub> и ЛПС<sub>6</sub> содержались высокомолекулярные фракции длинноцепочечных и короткоцепочечных молекул (как S-, так и R-форм ЛПС) приблизительно в равном количестве (рис. 3). В ЛПС<sub>ш</sub> отсутствовали длинноцепочечные O-специфические полисахариды.

**Обсуждение.** Как известно [16], присутствующие в бактериальной клетке ЛПС характеризуются различной силой связи с компонентами мембраны, поэтому часть из них достаточно легко извлекается мягкими методами экстракции, в то время как другая – прочно удерживается в мембране и может быть извлечена только жесткими методами. При определении структур O-специфических полисахаридов большая часть исследователей предпочитает водно-фенольную экстракцию, которая является классическим методом выделения ЛПС. Вместе с тем представляет интерес выяснить, влияет ли метод выделения ЛПС на их компонентный состав и биологические свойства. В связи с этим нами был выбран общепринятый метод Вестфала, а также метод Буавена, заключающийся в экстракции ЛПС раствором трихлоруксусной кислоты, а из оставшейся после экстракции бактериальной массы был выделен щелочной ЛПС. Специфические ЛПС, выделенные различными методами, различались между собой по выходу, который у исследованных ЛПС был гораздо ниже, чем у других представителей семейства *Enterobacteriaceae* (около 5%), а также содержанием белка и нуклеиновых кислот. Содержание углеводов было практически аналогичным. Различия наблюдались и в качественном, и количественном содержании жирных кислот и моносахаридов. Наиболее очищенным, вероятно, был ЛПС<sub>в</sub>, поскольку в его составе отсутствовали нетипичные для липидов А жирные кислоты, в частности ненасыщенные.

Во всех исследованных ЛПС присутствовало незначительное содержание КДО. Низкое содержание КДО, возможно, обусловлено тем, что фосфатные группы, присоединяющиеся к ней, экранируют кислотолабильную связь между КДО и липидом А, что затрудняет гидролиз ЛПС, а следовательно, и определение содержания КДО. Кроме того, используемый для выявления КДО тиобарбитуровый метод позволяет выявить лишь те формы КДО, которые имеют незамещенные вицинальные группы. Поэтому нельзя исключить вероятность того, что ЛПС *E. coli* 58 в действительности содержит большее число молекул КДО, которые не регистрируются общепринятым методом. Как показано, содержание фосфора в исследуемых ЛПС было различным, что, вероятно, обусловлено различной степенью фосфорилирования коровых олигосахаридов и глюкозаминов липида А, которое оказывает существенное влияние на субмолекулярную организацию молекулы ЛПС в мембране.

Существует предположение, что биологическая активность ЛПС может существенно зависеть от метода выделения [17]. Учитывая, что липидный компонент определяет эндотоксические свойства ЛПС, можно предполо-

жить, что различия в составе жирных кислот ЛПС<sub>в</sub>, ЛПС<sub>б</sub>, ЛПС<sub>ш</sub> *E. coli* 58 могут влиять на их биологическую активность. Как известно, одним из классических свойств ЛПС грамотрицательных бактерий является его токсичность для лабораторных животных. Известно [18], что токсические свойства бактериальных ЛПС могут быть усилены посредством снижения порога чувствительности макроорганизма к действию ЛПС. С этой целью обычно используют вещества, обладающие иммуносупрессивным действием. Иной способ, широко применяемый в лабораторной практике, заключается в сенсбилизации животных аминасахаром D-галактозамином, что позволяет увеличить токсичность бактериальных ЛПС в сотни и тысячи раз [18].

Исследуемые ЛПС характеризовались различной токсичностью и пирогенностью. Так, ЛПС<sub>в</sub> имеет достаточно высокий уровень токсичности, в то время как ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub> оказались малотоксичными. Что касается пирогенности, то ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>в</sub> были более пирогенными, чем ЛПС<sub>ш</sub>.

Функция ЛПС состоит в том, что они являются основным антигеном клеток грамотрицательных бактерий, на основе тонких вариаций в структуре которых создаются внутривидовые серологические классификационные схемы. Исследованиями, проведенными нами, установлено наличие кросс-реакций между антисывороткой к *E. coli* 58 и ЛПС, выделенными различными методами, что свидетельствует о наличии у них общих детерминантных групп и, следовательно, одинаковой O-серологической специфичности. Отсутствие же перекрестных реакций между антисывороткой к *E. coli* 58 и ЛПС, выделенными из других штаммов, структуры O-специфических полисахаридов и принадлежность к определенной серогруппе которых установлены [19, 20], дает основание заключить, что *E. coli* 58 является представителем иной серогруппы. В настоящее время показано наличие у представителей *E. coli* 187 различных O-антигенов.

Дальнейшие исследования будут направлены на определение структур O-специфических полисахаридов ЛПС, выделенных различными методами, что позволит установить, влияет ли метод выделения на тончайшие вариации в их структурах.

Таким образом, из клеток *E. coli* 58 водно-фенольной экстракцией, экстракцией трихлоруксусной кислотой и щелочью получены соответственно ЛПС<sub>в</sub>, ЛПС<sub>б</sub> и ЛПС<sub>ш</sub>. Показано, что ЛПС характеризуются различным выходом, содержанием белка, качественным и количественным моносахаридным и жирнокислотным составом, токсичностью, пирогенностью, антигенной активностью. Так, ЛПС<sub>в</sub> проявлял наибольшую серологическую и токсическую активность, а ЛПС<sub>б</sub> – менее токсичный, но более пирогенный. ЛПС<sub>ш</sub> был наименее пирогенен и малотоксичен. Это свидетельствует о том, что метод экстракции ЛПС влияет на его состав и биологические свойства.



# ВПЛИВ МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ НА СКЛАД І БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *ESCHERICHIA COLI*

*О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець*

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

## Резюме

**Мета.** Вивчити вплив методів виділення ліпополісахаридів (ЛПС) *Escherichia coli* на їх склад і біологічну активність. **Методи.** У роботі використовували мікробіологічні, біохімічні та серологічні методи. ЛПС отримували з клітин класичним методом Вестфалю (ЛПС<sub>в</sub>), Буавена (ЛПС<sub>б</sub>), а також був отриманий лужний ліпополісахарид (ЛПС<sub>щ</sub>). **Результати.** Препарати ЛПС<sub>в</sub>, ЛПС<sub>б</sub> і ЛПС<sub>щ</sub> характеризувалися різним виходом (0.33, 0.25 і 0.05% відповідно) по відношенню до маси мікробних клітин. Всі препарати ЛПС містили основні компоненти ЛПС: вуглеводи, КДО і жирні кислоти ліпиду А. Також було показано, що метод Буавена і Вестфалю дає можливість виділяти більш високомолекулярні, а метод лужної екстракції – більш низькомолекулярні фракції ЛПС. Основними компонентами гідрофобної частини ЛПС в ліпіді А були 3-ОН-С<sub>14:0</sub>, С<sub>12:0</sub>, С<sub>14:0</sub>, С<sub>16:0</sub> кислоти, а полісахаридна частина ЛПС представлена глюкозою, галактозою і гептозою, а також одним неідентифікованим моносахаридом. ЛПС<sub>в</sub> проявляв найбільшу серологічну і токсичну активності, а ЛПС<sub>б</sub> – менш токсичний, але більш пірогенний. ЛПС<sub>щ</sub> був найменш пірогенним і малотоксичним. **Висновки.** Метод екстракції ЛПС впливає на його склад і біологічні властивості.

*Ключові слова:* *Escherichia coli* 58, ліпополісахарид, моносахаридний і жирнокислотний склад, біологічна активність.

## INFLUENCE OF ISOLATION METHODS ON COMPOSITION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF *ESHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDES

*O.S. Brovarskaya, L.D. Varbanets*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

## Summary

**The purpose** of this work was to study the influence of isolation methods on composition and biological activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS). **Methods.** Microbiological, biochemical and serological methods were used. LPS were obtained from the cells by the classic Westphal method (LPS<sub>w</sub>), Boivin (LPS<sub>b</sub>), and an alkaline lipopolysaccharide (LPS<sub>a</sub>). **Results.** LPS<sub>w</sub>, LPS<sub>b</sub> and LPS<sub>a</sub> were characterized by a different yield of 0.33, 0.25 and 0.05%, respectively, from the mass of microbial cells. All LPS preparations contained the main components of LPS: carbohydrates, KDO and fatty acids of lipid A. It was also shown that the method of Boivin and Westphal makes it possible to isolate higher molecular weight, and alkaline extraction method - lower molecular weight fractions of LPS. The main components of the hydrophobic part of the LPS in lipid A were 3-OH-C14: 0, C12: 0, C14: 0, C16: 0 acids, and the polysaccharide part of the LPS was represented by glucose, galactose and heptose, as well as by one

unidentified monosaccharide. LPS<sub>w</sub> exhibited the largest serological and toxic activity, and LPS<sub>b</sub> - less toxic, but more pyrogenic. LPS<sub>a</sub> characterized the smallest pyrogenicity and was slightly toxic. **Conclusions.** The method of extraction of LPS influences its composition and biological properties.

*Keywords:* *Escherichia coli* 58, lipopolysaccharide, monosaccharide and fatty acid composition, biological activity.

1. Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1758:1513–1522. doi:10.1016/j.bbame.2006.05.017
2. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71(1):635–700.
3. Van Amersfoort, ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:379–414.
4. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides – extraction with phenol. *Methods Carbohydr. Chem*. 1965; 5:83–91.
5. Boivin A, Mesrobian J, Mesrobian L. Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens specifics. *C.r.Soc.biol*. 1933; 113(21):490–492.
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(3):350–356.
7. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr LA., Randal RJ. Protein measurement with the Folin reagent. *J.Biol.Chem*. 1951; 193(5):265–275.
8. Spirin AS. [Spectrophotometric determination of total nucleic acids]. *Biochemistry*. 1958; 23(5):656–662. Russian.
9. Varbanets LD, Zdorovenko GM, Knirel YuA. [Methods of endotoxin investigations]. K: Naukova Dumka, 2006; 237. Russian.
10. Laemmli UK. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680–685.
11. Tsai CM, Frash CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem*. 1982; 119:115–119.
12. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem*. 1985; 148:1–5.
13. Muthannan AR. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol* 2016; 12; 5(2):85–86. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85
14. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*. 1962; 6:3–15.
15. Rezaei S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, Masjedani F, and Zarnani A. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011; 3(1):3–9.
16. Alexander C, Rietschel ET, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res*. 2001; 7:167–202.
17. Proctor RA. Handbook of endotoxin. Vol. 3. Cellular biology of endotoxin. Ed. Berry LJ. Amsterdam: Elsevier, 1985; 454.
18. Galanos C, Freudenberg MA, Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:5939–5943.

19. Zdrovenko EL, Varbanets LD, Bin Liu, Valueva OA, Wang Q, Shashkov AS, Garkavaya EG, Brovarkaya OS, Wang Lei, Knirel YuA. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Escherichia coli* L-19, a candidate for a new O-serogroup. *Microbiology (Elsevier)*. 2014; 160:2102–2107. doi:10.1099/mic.0.080804-0.
20. Varbanets LD, Zdrovenko EA, Garkavaya EG, and Brovarkaya OS Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* M-17. *Microbiology (Moscow)*. 2012; 81(3):324–331.

Отримано 7.09.2018