

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТИВНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *E. COLI* МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© О. И. Машков^{1*}, Р. Р. Гарафутдинов¹, А. Р. Мавзютов²

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.

²Башкирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, ул. Ленина, 3.

*Email: mashkov.sci@gmail.com
Тел.: +7 (347) 235 60 88.

*Липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий в малых концентрациях способны увеличивать иммунную активность макроорганизма. Предложенные на сегодняшний день способы экстракции не позволяют получать в препаративных количествах липополисахариды достаточной чистоты. Использование модификаций существующих методов значительно снижает выход конечного продукта. В данной работе предложен оптимизированный метод выделения и очистки липополисахаридов *E. coli* посредством ультразвукового дробления бактериальных клеток, фенольно-хлороформной экстракции сырой массы липополисахаридов и разделения с помощью колоночной хроматографии на полярной неподвижной фазе. При выделении липополисахаридов согласно описываемому способу не происходит отщепления липида А, что подтверждается спектроскопией ЯМР ¹H.*

Ключевые слова: липополисахариды, ЛПС, *E. coli*, жидкостная колоночная хроматография, олигосахарид, липид А.

Введение

Липополисахариды (ЛПС) – обязательный структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, биологические эффекты которого реализуются в результате лизиса бактериальных клеток, например при дисбактериозах, отличаются чрезвычайной разнонаправленностью и носят дозозависимый характер [1]. ЛПС (синоним – эндотоксины) преимущественно известны как индукторы системных воспалительных реакций (сепсис, инфекционно-токсический шок и др.) [2, 3]. Однако в последние годы все больше данных о том, что ЛПС и/или его фракции обладают выраженной иммуномодулирующей активностью и могут рассматриваться в качестве кандидатов для создания новых иммуностимулирующих лекарственных препаратов. В связи с этим получение субстанций ЛПС и/или его фракций в достаточном количестве необходимо как для изучения ЛПС-обусловленных биологических эффектов, так и для разработки новых подходов к иммунокоррекции и иммунотерапии [4, 5].

В молекулах ЛПС выделяют три структурные части: липид А (неполярный фрагмент), олигосахаридный хвост, насчитывающий от одного до восьми мономеров (полярный фрагмент), и связующий их кор (полярный фрагмент). На сегодняшний день описано несколько методов выделения ЛПС из грамотрицательных бактерий. Наиболее популярным и производительным, несмотря на свою высокую токсичность, является способ, предложенный Westphal с соотр. для широкого спектра бактерий и основанный на экстракции ЛПС горячим (65°C) фенолом [6]. Его модификацией является экстракция ЛПС посредством неионного детергента Triton X-114 после

воздействия водно-фенольным раствором на клеточную массу [7]. Позднее был предложен способ получения ЛПС из бактерий рода *Salmonella* [8], особенностью которого является применение смеси фенола, хлороформа и петролейного эфира. Для минимизации работы с ядовитыми веществами были разработаны альтернативные способы выделения ЛПС: с помощью френч-пресса [9], трихлоруксусной кислоты [10], водно-бутанольной смеси [11], смеси Triton X-114 и катионов Mg²⁺ [12], холодного этанола [13], горячей воды [14], ЭДТА, ультразвука и протеиназы К с последующим диализом [15].

Во всех приведенных работах очистка препарата ЛПС основывалась на его растворимости в воде или водно-органических смесях с последующим центрифугированием. Несмотря на то, что ультрацентрифугирование позволяет устранять большую часть контаминирующих белков, подобная процедура обычно приводит к снижению конечного выхода ЛПС, увеличивает степень загрязнения препарата нуклеиновыми кислотами [16], а также требует соответствующего оборудования. Целью нашей работы стал поиск простого, доступного способа выделения высокочистого препарата ЛПС из грамотрицательных бактерий на примере *E. coli*.

Результаты и обсуждение

Для выделения ЛПС использовалась бактериальная культура препарата «Колибактерин», которая наращивалась на жидкой питательной среде Лурия-Бертани (LB). При оптимизации условий разрушения бактериальной стенки было установлено, что для наших целей наиболее пригоден вариант разрушения клеточной стенки бактерий с помощью ультразвука.

Поскольку молекулы ЛПС состоят из гидрофобной (остатки жирных кислот) и гидрофильной части

(олигосахаридный фрагмент), а также содержат ионные группы (фосфатные и аминокислотные), мы предположили, что их очистка и разделение с помощью жидкостной хроматографии возможны на полярных неподвижных фазах с использованием сильнополярных растворителей, таких как спирты и вода. Полярность элюента увеличивали по градиенту: 200 мл смеси ацетон-этанол (70:30 об.), 400 мл абсолютного этанола (96%), 200 мл смеси этанол-вода (70:30 об.). В качестве носителя использовали силикагель со средним размером частиц (60–200 mesh). Колонку заполняли носителем из расчета 150 г силикагеля на 5 мл сырого экстракта ЛПС, который получался из 1 г сырой бактериальной массы.

С целью удаления слабополярных соединений (фенол, остатки жирных кислот) элюцию начинали со смеси ацетон-этанол, затем использовали этанол и водный этанол. Мы предположили, что ЛПС будут хорошо удерживаться сорбентом из-за наличия гидрофильных и анионных групп в молекулах. Для ускорения элюции сначала использовали добавку уксусной кислоты (до 1% об.). При элюции ЛПС с добавлением уксусной кислоты было получено две крупные фракции, условно обозначенные нами как L01 и L02. Первая представляла собой вязкую буроватую жидкость с запахом фенола. Дальнейшему анализу ее не подвергали, предположив, что она состоит из фенола и иных примесей и не содержит ЛПС. Фракция L02 была получена с момента, когда началось элюирование смесью этанол-вода. Она представляла собой белый водорастворимый порошок, который далее анализировали с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса (ПМР) (рис. 1).

В спектре ПМР данной фракции из характерных сигналов имеется только сигнал атомов водорода углеводных остатков при 4.8 м.д. Сигналы протонов гидрофобной части молекул ЛПС отсутствуют, что объясняется, видимо, расщеплением молекул ЛПС в ходе элюции в присутствии уксусной кислоты. Известно, что липид А отщепляется от молекул ЛПС при действии 1% уксусной кислоты и нагревании до 100°C в течение 1 часа [17]. Возможно, в нашем случае гидролиз протекал при комнатной температуре на силикагеле. Скорее всего, свободный липид А выходил из колонки в составе фракции L01, которую не анализировали.

Вследствие разрушения ЛПС был опробован второй вариант выделения, заключавшийся в добавлении вместо кислоты слабого органического основания – триэтиламина с целью предотвращения гидролиза. В этом случае получили три крупные фракции, обозначенные как L11, L12 и L13. Первая была внешне идентична L11 и далее не анализировалась. Твердые кристаллические фракции L12 и L13 вновь были получены с момента элюирования водным этанолом. Снятые для них спектры ПМР существенно не различались и содержали сигналы при 4.8 м.д., характерные для протонов углеводных остатков, при 3.2 м.д. – для протонов CH_2 -групп, сопряженных с полярными фрагментами и при 1.3 м.д. – для протонов углеводородных цепей жирных кислот (рис. 2). Исходя из спектров, фракции L12 и L13 были идентифицированы как липополисахариды.

При выделении липополисахаридов необходимым условием является удаление нуклеиновых кислот (НК), которые имеют близкие к ЛПС физико-химические свойства. Используемая нами методика

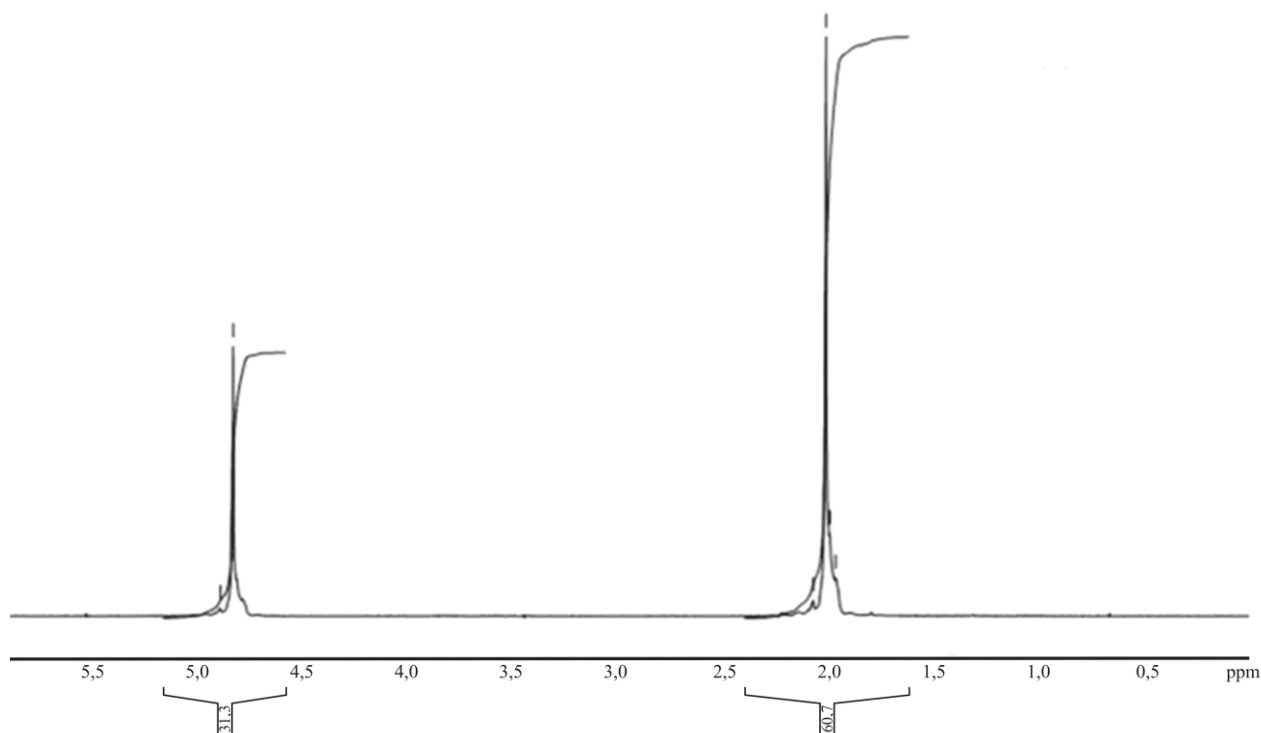


Рис. 1. ПМР-спектр образца L02 (сигнал при 2.0 м.д. соответствует примеси H_2O в D_2O).

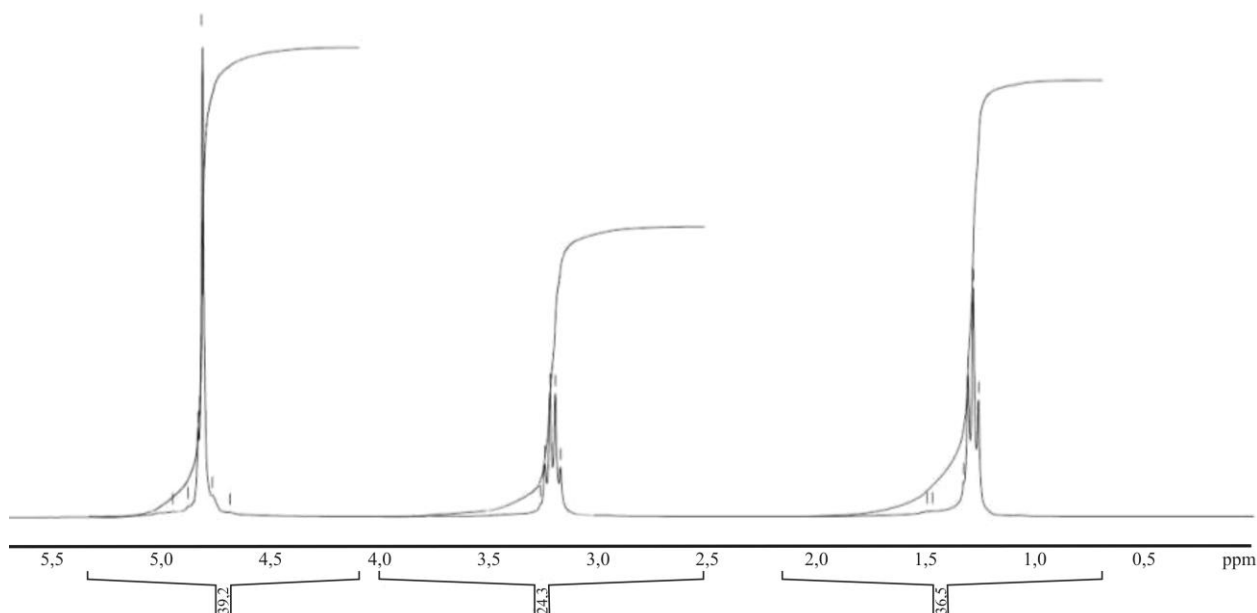


Рис. 2. ПМР-спектр образца L12.

выделения ЛПС из бактериальной массы не обеспечивает удаления примесей НК. Мы предположили, что основную часть ДНК и РНК можно отделить высаживанием этанолом, однако незначительное количество, возможно, останется в препарате. Действительно, при приливании трех объемов этилового спирта к сырому экстракту ЛПС после фенольной депротеинизации образовывалась характерная взвесь, которую отделяли центрифугированием, и полученный осадок подвергали гель-электрофорезу для доказательства его НК-природы. При окрашивании геля бромистым этидием появлялись светящиеся зоны, однозначно указывающие на наличие ДНК (не входит в гель) и РНК (рис. 3а). В то же время гель-электрофоретический анализ фракций ЛПС после колоночного разделения показал отсутствие НК во всех образцах (рис. 3б), что свидетельствует о возможности отделения ЛПС от НК в изученных условиях.

Выход субстанции ЛПС оказался равным около 2% (суммарно для фракций L12 и L13): получалось 15–25 мг сухого препарата из 1 г сырой бактериальной массы, что соответствует литературным данным о содержании ЛПС в *E. coli*. Таким образом, показана применимость колоночной хроматографии для выделения ЛПС грамотрицательных бактерий. В качестве неподвижной фазы использовали силикагель, элюцию вели в градиентном режиме путем последовательной смены смесей растворителей: ацетон-этанол-триэтиламин, этанол-триэтиламин и этанол-вода-триэтиламин. Согласно предлагаемому способу удается провести отделение ЛПС от нуклеиновых кислот. В результате возможно получение с количественным выходом субстанции чистых ЛПС *E. coli*.

Экспериментальная часть

В работе использовались следующие реактивы: агар, хлорид натрия (Helicon); триптон Васто,

дрожжевой экстракт Васто (Difco); Трис, триэтиламин (Sigma); силикагель (60–200 mesh, Macherey-Nagel); фенол, гидроксид натрия, трихлоруксусная кислота, уксусная кислота, ацетон, хлороформ, этанол (все – отечественного производства). Фенол перед использованием подвергали двукратной перегонке, растворители ацетон и хлороформ предварительно осушали над $MgSO_4$ и очищали перегонкой с дефлегматором, этанол и уксусную кислоту очищали двукратной перегонкой с дефлегматором.

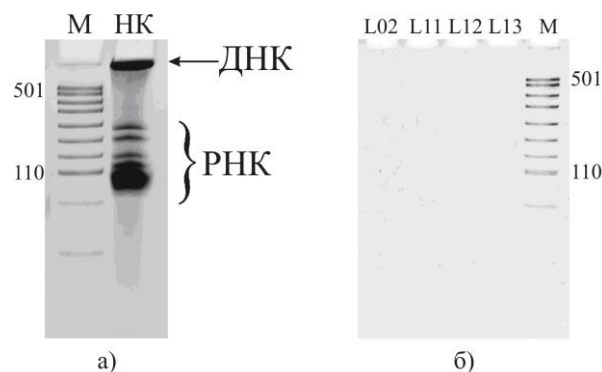


Рис. 3. Электрофореграммы: а) НК-содержащего осадка, б) фракций ЛПС после колоночного разделения (М – маркер молекулярного веса; НК – НК-содержащий осадок; L02, L11, L12, L13 – фракции ЛПС).

Экстракция ЛПС проводилась по методике [6] с незначительными изменениями.

Бактериальная культура *E. coli* M17 (препарат *Colibacterinum siccum*) выращивалась на жидкой питательной среде Лурия-Бертани (LB) при 37 °С до завершения экспоненциальной фазы роста. После отмывки клеток от культуральной жидкости проводили элиминацию легкорастворимых веществ инкубированием в 3 М NaCl в течение 1 часа при 4 °С.

Далее клеточную массу центрифугировали. Полученный осадок подвергали ультразвуковой дезинтеграции во льду в приборе Bioruptor (Diagenode) с максимальной мощностью при частоте 60 kHz в течение 15 минут по 30 сек и перерывом 30 сек.

Далее к лизату добавляли горячий (65°C) обводненный фенол (2 мл на 0.5 гр клеток) и инкубировали 20 минут при интенсивной тряске. После центрифугирования (5000 об/мин 30 мин при 4°C) отбирали верхнюю фазу и приливали начальный объем горячего фенола. Суммарно этап инкубации в феноле проводили два раза, после чего к верхней фазе приливали один объем хлороформа и инкубировали 20 минут при интенсивной тряске. После центрифугирования (5000 об/мин 30 мин при 4°C) отбирали верхнюю фазу и приливали 2 объема 96% этанола. Осаждение нуклеиновых кислот проходило 18 ч. при -20°C. Далее смесь центрифугировалась (5000 об/мин 30 мин при 4°C) и надосадочная жидкость упаривалась на роторном испарителе до минимального объема (1–2 мл), а затем на вакуумном концентраторе 5301 (Eppendorf) досуха. Полученные кристаллы растворяли в 50% этаноле.

Очистка и фракционирование ЛПС осуществлялись методом жидкостной колоночной хроматографии в стеклянной колонке [18], заполненной силикагелем (60–200 mesh, Macherey-Nagel) из расчета 150 г силикагеля на 5 мл сырого экстракта ЛПС, предварительно смоченного смесью ацетон-триэтиламин (100:1 об.). Элюцию осуществляли в градиентном режиме, увеличивая полярность элюента: 1-я порция – 200 мл смеси ацетон-этанол-триэтиламин (70:30:1 об.), 2-я порция – 400 мл смеси этанол-триэтиламин (100:1 об.), 3-я порция – 200 мл смеси этанол-вода-триэтиламин (70:30:1 об.). Для двух последних ступеней элюции собирали последовательно элюаты в отдельные виалы по 20 мл, которые затем упаривали на роторном испарителе сначала до 1 мл, а затем на вакуумном концентраторе досуха 5301 (Eppendorf). Полученные сухие препараты анализировали с помощью спектроскопии ЯМР ¹H на приборе AVANCE-400 (Bruker), в качестве растворителя использовали D₂O.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайсина Ю. Р., Ахмадуллина Ю. А., Гильманов А. Ж., Мавзютов А. Р. Эндотоксинемия и влияние микробных липополисахаридов на систему гемостаза у женщин с бактериальным вагинозом // Медицинский вестник Башкортостана. 2011. Т. 6. №3. С. 155–159.
2. Мавзютов А. Р., Бондаренко К. Р., Еникеев А. Н., Бондаренко В. М. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. №5. С. 16–21.
3. Bryant C. E., Spring D. R., Gangloff M., Gay N. J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide // Nature Reviews Microbiology. 2010. Vol. 8. No. 1. Pp. 8–14.
4. Takada H., Kotani S. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities // CDC Crit Rev Microbiol. 1989. Vol. 16. Pp. 477–523.
5. Alizadeh D., Zhang L., Brown C. E., Farrukh O., Jensen M. C., Badie B. Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy // Clinical Cancer Research. 2010. Vol. 16. No. 13. Pp. 3399–3408.
6. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Über die extraktion von bakterien mit phenol/wasser // Zeitschrift für Naturforschung B. 1952. Vol. 7. Pp. 148–155.
7. Марков Е. Ю., Николаев В. Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов: Патент РФ 2051969 // опубл. 10.01.1996.
8. Galanos C., Lüderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides // Eur. J. Biochem. 1969. Vol. 9. Pp. 245–249.
9. Darveau R. P., Hancock R. T. W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough Pseudomonas aeruginosa and Salmonella typhimurium strains // J. Bacteriol. 1983. Vol. 155. No. 2. Pp. 831–838.
10. Staub A. M. Removal of protein-Sevag method // Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965. Pp. 92–93.
11. Morrison D. C., Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from Escherichia coli O111: B4 prepared by two extraction procedures // Journal of Biological Chemistry. 1975. Vol. 250. No. 8. Pp. 2911–2919.
12. Delahooke D. M., Barclay G. R., Poxton I. R. A re-appraisal of the biological activity of bacteroides LPS // J. Med. Microbiol. 1995. Vol. 42. No. 2. Pp. 102–112.
13. Sonesson A., Jantzen E., Bryn K., Larsson L., Eng J. Chemical composition of a lipopolysaccharide from Legionella pneumophila // Arch. Microbiol. 1989. Vol. 153. No. 1. Pp. 72–78.
14. Eidhin D. N., Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from Bacteroides, Porphyromonas and Prevotella // FEMS Microbiol. Lett. 1993. Vol. 110. No. 2. Pp. 133–138.
15. Полунина Т. А., Гусева Н. П., Кузьмиченко И. А., Девдариани З. Л., Заднова С. П., Степанов А. В., Киреев М. Н. Новый способ получения липополисахарида возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2014. Вып. 3. С. 100–103.
16. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol–water and further applications of the procedure // Methods in carbohydrate chemistry. 1965. Vol. 1. Pp. 83–91.
17. Chafchaouani-Moussaoui I., Novikov A., Bhrada F., Perry M. B., Filali-Maltouf A., Caroff M. A new rapid and micro-scale hydrolysis, using triethylamine citrate, for lipopolysaccharide characterization by mass spectrometry // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2011. Vol. 25(14). Pp. 2043–2048.
18. Гарафутдинов Р. Р., Машков О. И., Мавзютов А. Р. Способ получения липополисахаридов грамотрицательных бактерий: Заявка на патент РФ №2016108563 // приоритет от 09.03.2016.

Поступила в редакцию 10.03.2017 г.

PREPARATIVE EXTRACTION OF *E. COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE BY LIQUID COLUMN CHROMATOGRAPHY

© O. I. Mashkov^{1*}, R. R. Garafutdinov¹, A. R. Mavzyutov²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, RAS
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir State Medical University
3 Lenin Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

Phone: +7 (347) 235 60 88.

**Email: mashkov.sci@gmail.com*

Lipopolysaccharides of the cell membrane of gram-negative bacteria in small concentrations are capable of increasing the resistance of the macroorganism. The proposed to date methods of extraction do not allow us to obtain lipopolysaccharides of sufficient purity in required quantities. The use of modifications of existing techniques significantly reduces the yield of the final product. In this work, the authors propose an optimized method for isolating and purifying *E. coli* lipopolysaccharides by ultrasonic crushing of bacterial cells, phenol-chloroform extraction of the crude paste of lipopolysaccharides, and separation by liquid column chromatography on a polar stationary phase. When lipopolysaccharides are isolated according to the described method, lipid A stays intact; it is confirmed by ¹H NMR spectroscopy.

Keywords: lipopolysaccharides, LPS, *E. coli*, liquid column chromatography, oligosaccharide, lipid A.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Gaisina Yu. R., Akhmadullina Yu. A., Gil'manov A. Zh., Mavzyutov A. R. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana*. 2011. Vol. 6. No. 3. Pp. 155–159.
2. Mavzyutov A. R., Bondarenko K. R., Enikeev A. N., Bondarenko V. M. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012. No. 5. Pp. 16–21.
3. Bryant C. E., Spring D. R., Gangloff M., Gay N. J. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol. 8. No. 1. Pp. 8–14.
4. Takada H., Kotani S. *CDC Crit Rev Microbiol*. 1989. Vol. 16. Pp. 477–523.
5. Alizadeh D., Zhang L., Brown C. E., Farrukh O., Jensen M. C., Badie B. *Clinical Cancer Research*. 2010. Vol. 16. No. 13. Pp. 3399–3408.
6. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1952. Vol. 7. Pp. 148–155.
7. Markov E. Yu., Nikolaev V. B. *opubl.* 10.01.1996.
8. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. *Eur. J. Biochem.* 1969. Vol. 9. Pp. 245–249.
9. Darveau R. P., Hancock R. T. W. *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 155. No. 2. Pp. 831–838.
10. Staub A. M. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 1965. Pp. 92–93.
11. Morrison D. C., Leive L. *Journal of Biological Chemistry*. 1975. Vol. 250. No. 8. Pp. 2911–2919.
12. Delahooke D. M., Barclay G. R., Poxton I. R. *J. Med. Microbiol.* 1995. Vol. 42. No. 2. Pp. 102–112.
13. Sonesson A., Jantzen E., Bryn K., Larsson L., Eng J. *Arch. Microbiol.* 1989. Vol. 153. No. 1. Pp. 72–78.
14. Eidhin D. N., Mouton C. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993. Vol. 110. No. 2. Pp. 133–138.
15. Polunina T. A., Guseva N. P., Kuz'michenko I. A., Devdariani Z. L., Zadnova S. P., Stepanov A. V., Kireev M. N. *Problemy osobno opasnykh infektsii*. 2014. No. 3. Pp. 100–103.
16. Westphal O., Jann K. *Methods in carbohydrate chemistry*. 1965. Vol. 1. Pp. 83–91.
17. Chafchaoui-Moussaoui I., Novikov A., Bhrada F., Perry M. B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011. Vol. 25(14). Pp. 2043–2048.
18. Garafutdinov R. R., Mashkov O. I., Mavzyutov A. R. *prioritet ot 09.03.2016*.

Received 10.03.2017.