**Красикова, Инна Николаевна.**

## Структура и свойства липида А - компонента липополисахаридов YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Владивосток, 1984. - 134 с. : ил.

## Заключение диссертациипо теме «Биоорганическая химия», Красикова, Инна Николаевна

Заключение

Таким образом, в основе молекулы липида А псевдотуберкулезного микроба лежит дисахарид глюкозамина с j^-I^-c вязью. Его восстанавливающий конец имеет ol -конфигурацию и содержит фосфат при CI-атоме. Поскольку гидроксильные группы при СЗ^ и Сб-атомах не-восстанавливающего конца дисахарида не замещены, можно предположить, что второй остаток фосфорной кислоты находится при С4-атоме этого остатка глюкозамина. Восстанавливающий остаток глюкозамина, судя по величинам химического сдвига CI-, С2-атомов, имеет высокую степень ацилирования, хотя, в целом, молекул, липида А ацили-рована неполностью.

Липид А псевдотуберкулезного микроба иммуногенен, его иммуно-детерминантная группа представляет собой остаток глюкозамина, аци-лированный по аминогруппе 3-окситетрадекановой кислотой.

1У. ЭКСПЕРИМЕНТМШАЯ ЧАСТЬ

I. Общие экспериментальные условия

Общее содержание нейтральных моносахаридов определяли фенол-сернокислотным методом [211], используя в качестве стандарта Бгглю-козу. Для определения белка применяли метод Лоури [212] , нуклеиновые кислоты определяли по методу [213] , фосфор - по [214], КДО - по [215]. Общее содержание жирных кислот после предварительного кислотного гидролиза определяли весовым анализом.

Количественный жирнокислотный состав устанавливали с помощью газожидкостной хроматографии (колонка А) в виде метиловых эфиров методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали декановую или пентадекановую кислоты; калибровочный коэффициент додекановой кислоты равен 1,0, 3-окситетрадекановой - 1,29.

Количественное определение гексозаминов проводили по реакции Эльсона-Моргана [216] или с помощью газожидкостной хроматографии в виде ацетатов полиолов [217] методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали D-глюкозу; калибровочный коэффициент 2-ацетамидо-2-дезокси-Б-глюкозы равен 1,1.

Количество золы определяли нагреванием образцов до постоянного веса при 600°С.

Температуры плавления определяли на столике Бойетиуса и не корректировали. Углы вращения измеряли на спектрополяриметре Рег-kin-Eimer 141 (Швеция). Инфракрасные спектры записывали на спектрометре тж-20 (Karl Zeiss, Йена, Щ5). Ультрацентрифугирование липополисахаридов проводили на центрифуге vac-6oi (1ДР). Молекулярный вес определяли парометрическим методом на Hitachi Model 115 (Япония). Для анализа аминокислот и аминосахаров использовали аминокислотный анализатор lkb Biocal 3201 (Швеция) с колонками (45 х 0,6 см), упакованными смолой Aminex А5 . Элементный анализ проводили на С, Н, N -анализаторе Perkin Elmer Model 240.

Хроматографию в тонком слое проводили на силикагеле Woeim (ФРГ) в следующих системах растворителей: А - хлороформ : метанол : 25$ водный аммиак = 65 : 35 : 5 ( v/v/v), липид А; Б - хлороформ : метанол : 25$ водный аммиак = 90 : 1,0 : I капля ( v/v), метилированный липид А; В - гексан : эфир : уксусная кислота = 70 : 30 : I (v/v/v), жирные кислоты и их метиловые эфиры; Г -бутанол : этанол : вода : 25$ водный аммиак = 5:7:4: 0,5 (v/v/v/v),деградированный липид А; Д - хлороформ : метанол = 95 : 5 (v/v), продукты адетолиза хитина. Обнаружение пятен проводили 20$ серной кислотой в метаноле нагреванием при 120°С в течение 20 мин или 0,2$ раствором нингидрина в ацетоне.

Нисходящую хроматографию на бумаге проводили, используя бумагу Hwhatman-I" u "Filtrak fn-15" (1ДР) в системе растворителей бутанол : пиридин : вода : уксусная кислота = 6 : 4 : 3 : 0,3 (v/v/v/v). Электрофорез проводили на бумаге "Fiitrak fn-15" (ГДР) в пиридин-ацетатном буфере (пиридин : уксусная кислота : вода = 2 : 4 : 1000, v/v/v, рн 4,5 ;250jb/40 см, 0,6 мА). Обнаружение пятен осуществляли щелочным раствором окиси серебра [218] или 0,2$ раствором нингидрина в ацетоне.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель б, (63-90 МКМ, ЧССР), сефадекс LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) и смолу амберлит CG-I20, тип П (200-400 меш, Н+).

Газожидкостную хроматографию проводили, используя хроматографы Pye Unicam-104 (Англия) или Цвет-100 (г. Дзержинск) с пламенно-ионизационным детектором и двойной системой стеклянных колонок (1,5 х 0,4 см). Жирные кислоты в виде метиловых эфиров анализировали на колонке А (10$ sf-зо на Gas-Chrom Q, 100-120 меш) при 150—\*£50°, 10°/мин. Хроматографию моносахаридов проводили в виде ацетатов полиолов [217] на колонках А и Б (3$ qf-i на

Gas-Chrom Q, 100-120 меш) при 175°—\*225°, 5°/мин.

Хромато-масс-спектрометрию метиловых эфиров жирных кислот проводили на приборе ъкв 9000s (Швеция), используя колонку с Ъ% se-зо на хроматоне (100-120 меш).

Спектры ^С-ЯМР получены на спектрометре Bruker-Physik wm -250 с рабочей частотой 0 = 62,9 Мщ при 30°С в условиях подавления спин-спинового взаимодействия с протонами, время задержки импульса 2 сек., ширина развертки 15 Кщ в CI)Ci3 : cd3od (2 : i) - метилированный липид А; на Bruker-Physik нх 90Е с рабочей частотой 22,6 Мщ и шириной развертки 2 Кщ в d2o (соединения 1-У1 и деградированный липид а), cdci^ (производные 3-окситетрадека-новой кислоты) и cd^cood L2-(R, s-3-ацетокситетрадеканоил) амино--2-дезокси-Б-глюкопираноза]. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (tms) или метанол ( £ + 49,6 м.д.). от

Спектры Р-ЯМР получены на спектрометре Bruker-Physik нх 90Е с рабочей частотой л> = 36,4 Мщ. В качестве внешнего стандарта использовали 85%-ю н^ро^.

2. Образцы жирных кислот

Для идентификации нормальных жирных кислот использовали наборы метиловых эфиров жирных КИСЛОТ (Applied Science Laboratori-е s, Inc.).

R, s-3-Окситетрадекановая кислота была получена в лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета, Т пл. 77-78°С [145]. д ^-Тетрадеценовая кислота была получена нагреванием r,s-3-окситетрадекановой кислоты (76 мг) со смесью пиридин : уксусный ангидрид (2 : I; 3 мл) при I00°C, I час. Реакционную смесь упаривали, растворяли в хлороформе, проводили экстракцию водой. Хлороформный слой сушили над сульфатом натрия, упаривали (71,8 мг) и метилировали диазометаном. Сухой остаток после обработки диазо-метаном загружали на колонку с силикагелем (15 см х I см) в гек-сане. Элюцию проводили в системах растворителей: гексан (20 ш); гексан : эфир, 10$ (20 мл); гексан : эфир, 20$ (20 мл). Метиловый эфир д ^-тетрадеценовой кислоты элюируется'гексаном (выход 21,2 мг). Идентификацию кислоты проводили с помощью хромато-массто спектрометрии и спектроскопии Х С-ЯМР. в,s-3-Ацетокситетрадекановая кислота была получена [219] смешиванием н, s-3-окситетрадекановой кислоты (99 мг) с 5 мл аце-тилирущего агента. Последний был получен следующим образом. К 57$ хлорной кислоте (0,63 мл) добавляли 30 мл этилацетата и 1,6 мл уксусного ангидрида. Через 30 мин. при комнатной температуре раствор охлаждали до 5°С, добавляли ещё 8,4 мл уксусного ангидрида и выдерживали при 5°С I час.

Через 5 мин. после добавления ацетилирущего агента к реакционной смеси добавляли 15 мл Н^О и 15 мл серного эфира; водный слой отделяли, раствор кислоты в эфире промывали водой (15 мл х 3), сушили над сульфатом натрия и упаривали. Выход 113,4 мг (97,7$).

Идентификацию кислоты проводили с помощью хромато-масс-спектротя метрии и спектроскопии С-ЯМР.

3. Получение производных D-глюкозамина