

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *ESCHERICHIA COLI*

Р.А. Агельдинов*, А.И. Левашова, В.С. Кохан, М.С. Нестеров

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В данном исследовании была применена процедура очистки липополисахаридов из *Escherichia coli* на основе протокола горячей фенольной экстракции. Чистоту экстрагированных липополисахаридов оценивали методом ВЭЖХ-УФ. Пирогенную активность определяли с помощью *Limulus Amebocyte Lysate*-теста и использовали для мониторинга функциональности очищенных липополисахаридов. ВЭЖХ-анализ показал высокую степень чистоты, сравнимую с коммерческим липополисахаридом. Пирогенная активность подтверждала функциональную активность очищенных липополисахаридов. Представленный протокол может быть использован для выделения липополисахаридов с высокой чистотой и функциональной активностью.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, эндотоксин, экстракция, липополисахарид, очистка

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Агельдинов Р.А., Левашова А.И., Кохан В.С., Нестеров М.С. Методические аспекты получения и характеристики липополисахаридов из клеточной культуры *Escherichia coli*. Биомедицина. 2021;17(3E):14–16. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-14-16>

Поступила 25.05.2021

Принята после доработки 25.06.2021

Опубликована 20.10.2021

METHODICAL ASPECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES OBTAINING AND CHARACTERIZATION FROM *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Ruslan A. Ageldinov*, Anna I. Levashova, Viktor S. Kokhan, Maxim S. Nesterov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

In this study, a procedure was applied to purify lipopolysaccharides from *Escherichia coli* based on a hot phenolic extraction protocol. The purity of the extracted lipopolysaccharides was assessed by HPLC-UV. Pyrogenic activity was determined using the *Limulus Amebocyte Lysate* test and used to monitor the functionality of the purified lipopolysaccharides. HPLC analysis showed a high degree of purity comparable to commercial lipopolysaccharide. Pyrogenic activity confirmed the functional activity of purified lipopolysaccharides. The presented protocol can be used to isolate lipopolysaccharides with high purity and functional activity.

Keywords: *Escherichia coli*, endotoxin, extraction, lipopolysaccharide, purification

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Ageldinov R.A., Levashova A.I., Kokhan V.S., Nesterov M.S. Methodological Aspects of Obtaining and Characterization of Lipopolysaccharides from the Cell Culture of *Escherichia coli*. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):14–16. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-14-16>

Submitted 25.05.2021

Revised 25.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Одним из важных компонентов внешней клеточной мембраны грамотрицательных микроорганизмов являются липополисахариды (ЛПС). Они применяются в моделированиях различных воспалительных патологических процессов, обладают выраженными токсикологическими характеристиками и специфичностью иммунологического действия [3]. Существует множество различных методик с использованием бактериальных ЛПС. Они играют основную роль при заболеваниях, вызванных грамотрицательными бактериями, а также широко используются в экспериментах, связанных со стимуляцией клеток. Это обеспечивает интерес к исследованиям, направленным на выделение, очистку и характеристику ЛПС, что подтверждается большим количеством разрабатываемых методов и протоколов [2].

По своей структуре все ЛПС состоят из трёх частей: липид А, основные олигосахариды и О-специфический полисахарид. Высоко консервативный липид А обуславливает эндотоксическую активность, в то время как олигосахариды обуславливают серологическую специфичность бактерий и отличаются среди видов [1].

Одним из наиболее распространённых методов выделения является экстракция горячим фенолом, благодаря высокому выходу продукта [4].

Целью исследования явилось использование модифицированного протокола горячей водно-фенольной экстракции, направленной на выделение ЛПС из клеток *Escherichia coli*, а также подтверждение чистоты и активности полученного продукта.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и условия роста

5-alpha *E. coli* выращивали в бульонной среде Лурии — Бергана при 37°C в шейке-

ре-инкубаторе в течение ночи. После чего бактерии осаждали центрифугированием и использовали для экстракции ЛПС.

Экстракция и очистка ЛПС

ЛПС экстрагировали горячим фенол-водным методом с некоторыми модификациями [4]. Бактериальные суспензии центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. Осадки дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Затем осадок ресуспендировали в 10 мл ФСБ и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин на льду. После чего к суспензии клеток в ФСБ добавляли протеинкиназу К и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующем этапе к смеси добавляли равный объём горячего 90% фенола с последующим энергичным встряхиванием при 65–70°C в течение 15 мин. Затем суспензии охлаждали и центрифугировали при 7000 g в течение 15 мин. Верхнюю фракцию супернатанта переносили и фенольную фазу повторно экстрагировали дистиллированной водой. Надосадочная жидкость после двух инкубаций в феноле упаривалась на роторном испарителе до минимального объёма. Конечный очищенный продукт ЛПС лиофилизировали и хранили при 4°C.

Разделение высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ)

ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1260 Infinity. Элюция проходила на скорости потока 0,4 мл/мин и УФ-детекции при длине волны 254 нм. Разделение проводили на колонке C18 со смесью воды и ацетонитрила в качестве подвижной фазы. В качестве стандарта использовали особо чистый ЛПС из *E. coli*.

Анализ ЛПС *Limulus Amebocyte Lysate* (ЛАЛ)-тестом

Активность ЛПС определяли ЛАЛ-тестом, согласно протоколу производителя.

Результаты исследований

Профиль пиков ЛПС, экстрагированного из *E. coli*, был проанализирован и сравнен с коммерческим стандартом. Хроматограмма экспериментального очищенного ЛПС перекрывалась с хроматограммой стандарта, что указывает на высокую чистоту продукта.

При определении эндотоксинной активности с использованием реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксином до появления жёлтого окрашивания верифицирована

функциональная активность очищенного ЛПС.

Заключение

Несмотря на то, что чистота ЛПС является важным показателем продуктивности системы выделения и очистки, функциональная активность конечного продукта также важна. В этом контексте результаты тестов на эндотоксинную активность полностью соответствуют ожиданиям по функциональной активности очищенного продукта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002;4(8):837–851. DOI: 10.1016/s1286-4579(02)01604-0.
2. Rezaei S., Amirmozaffari N., Tabarraei B., et al. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2011;3(1):3–9.
3. Rietschel E.T., Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 1992;267(2):54–61.
4. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler R.L., Wolfrom M.L., et al. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic press, 1965:83–91.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Агельдинов Руслан Андреевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Левашова Анна Игоревна, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Кохан Виктор Сергеевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Anna I. Levashova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Viktor S. Kokhan, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author