



УДК 577.112.083.3:612.017.1

ПРОСТОЙ МЕТОД ЛОКАЛИЗАЦИИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ В БЕЛКАХ С ИЗВЕСТНОЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

*Грачев М. А., Зеленин С. М., Лактионов П. П.,
Рошке В. В.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Предложен и на примере миоглобина человека проверен высокопроизводительный метод локализации антигенных детерминант в белках с известной первичной структурой. Набор фрагментов миоглобина, полученных путем частичной химической деградации по остаткам метионина, триптофана или тирозина, разделяли гель-электрофорезом и переносили на нитроцеллюлозу. Фрагменты, сохранившие антигенный участок, выявляли иммунопероксидазным методом с использованием четырех моноклональных антител. Сопоставление длин окрашиваемых фрагментов с известными положениями остатков метионина, триптофана и тирозина в полипептидной цепи позволило установить, что антигенная детерминанта для четырех исследованных моноклональных антител находится на участке Trp-14 – Met-55.

Решение многих важных задач, таких, как исследование молекулярных механизмов антигенной специфичности, создание искусственных вакцин, выявление функциональных центров вирусных и регуляторных белков, связано с проблемой локализации тех участков молекул белков, которые вовлечены во взаимодействие с антителами. К настоящему времени известно несколько подходов к решению этой проблемы.

Наиболее широкое распространение получил подход, основанный на изучении взаимодействия антител с химически модифицированным белком или его очищенными фрагментами [1, 2], однако этот подход трудоемок и требует значительных количеств высокоочищенного белка.

Смит и др. [3] предложили исследовать в системе радиоиммуноанализа растущую полипептидную цепь, химически синтезируемую твердофазным способом, не снимая ее с носителя. На каждом шаге синтеза исследуется способность полипептида конкурировать с исследуемым радиоактивно меченным белком за связывание с антителами. Очевидно, что этот подход не менее трудоемок и мало доступен для широкого круга исследователей.

Существует еще один подход, получивший распространение в связи с появлением гибридной технологии [4]. Он состоит в изучении взаимодействия антител с рядом родственных белков с известной первичной структурой и выявлении аминокислотных замен, приводящих к изменению характеристик связывания [5–9]. Таким образом принципиально создается возможность локализации антигенной детерминанты с точностью до отдельных аминокислотных остатков. Очевидно, однако, что получение широкой номенклатуры родственных белков также не легкая задача. Например, исследователям, располагавшим набором препаратов миоглобина от 12 видов млекопитающих, удалось локализовать от одного до трех аминокислотных остатков, входящих в состав различных участков связывания с моноклональными антителами [7–9].

Кроме того, имеются компьютерные модели, построенные на основе определенной корреляции между антигенностью отдельных участков молекулы белка и гидрофильностью составляющих их аминокислотных остатков [10, 11]. При помощи такой модели, например, был локализован вероятный антигенный участок белка вируса сыровоточного гепатита. Функциональная значимость этого участка была подтверждена путем

*Ограниченная деградация белка,
разделение фрагментов электрофорезом и перенос на нитроцеллюлозу*

Реакция с моноклональными антителами

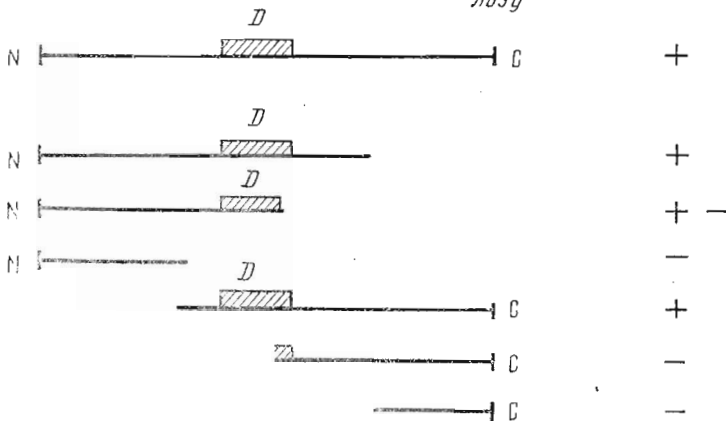


Рис. 1. Схематическое изображение принципа предлагаемого метода локализации антигенных детерминант. D — детерминанта

встречного синтеза и исследования антигенных свойств соответствующего пептида [12]. Компьютерные модели существенно сокращают объем работ по локализации детерминант, суживая круг поиска, однако предоставляемая ими информация неоднозначна и не всегда надежна.

Наконец, недавно был предложен подход, основанный на приемах геной инженерии [13]. Ген исследуемого белка подвергают расщеплению, полученный набор фрагментов клонируют в экспрессирующих векторах и исследуют антигенную активность пептидов, продуцируемых различными клонами. Располагая библиотекой таких клонов и определяя первичную структуру ДНК-вставок, можно однозначно локализовать антигенные детерминанты. Этот подход весьма интересен и перспективен, по его практическая реализация не проста; в частности, исходной предпосылкой является доступность соответствующего гена, что не всегда может быть обеспечено.

В настоящей работе мы описываем простой и высокопроизводительный метод локализации участков связывания белков с моноклональными антителами, о котором в краткой форме мы уже сообщали ранее [14]. Принцип метода показан на рис. 1. Белок подвергают деградации таким образом, чтобы на каждую его молекулу в среднем приходилось не более одного разрыва пептидной цепи. Полученный набор «одноударных» пептидов разделяют гель-электрофорезом и приготавливают отпечаток геля на нитроцеллюлозной мембране. Отпечаток окрашивают двумя методами: во-первых, амидочерным, чтобы получить представление о распределении длин всех образовавшихся пептидов и об эффективности их переноса на мембрану, и, во-вторых, иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных антител. Очевидно, что образуется два набора «одноударных» пептидов: все пептиды первого набора содержат интактный N-конец молекулы белка, а все пептиды второго — интактный C-конец. Те пептиды, которые не имеют в своем составе искомой антигенной детерминанты, не подвергнутся иммунопероксидазному окрашиванию. Анализируя распределение длин окрашенных пептидов и сравнивая его с известным расположением тех аминокислотных остатков, по которым проводилось расщепление полипептидной цепи, можно однозначно определить, между какими двумя точками расщепления расположена детерминанта.

Идея предлагаемого подхода та же, что использованная в нашей лаборатории ранее для локализации точки аффинной модификации в β -субъединице РНК-полимеразы *E. coli* [15, 16]. Подобные «статистические» подходы, как известно, уже давно широко используются при расшифров-

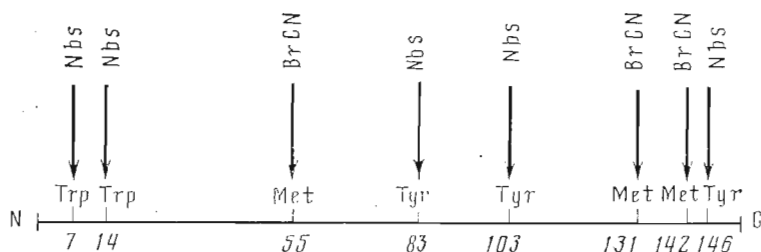


Рис. 2. Схема расположения в первичной структуре миоглобина человека аминокислотных остатков, по которым проводили химическую деградацию бромцианом (BrCN) и N-бромсукцинимидом (Nbs)

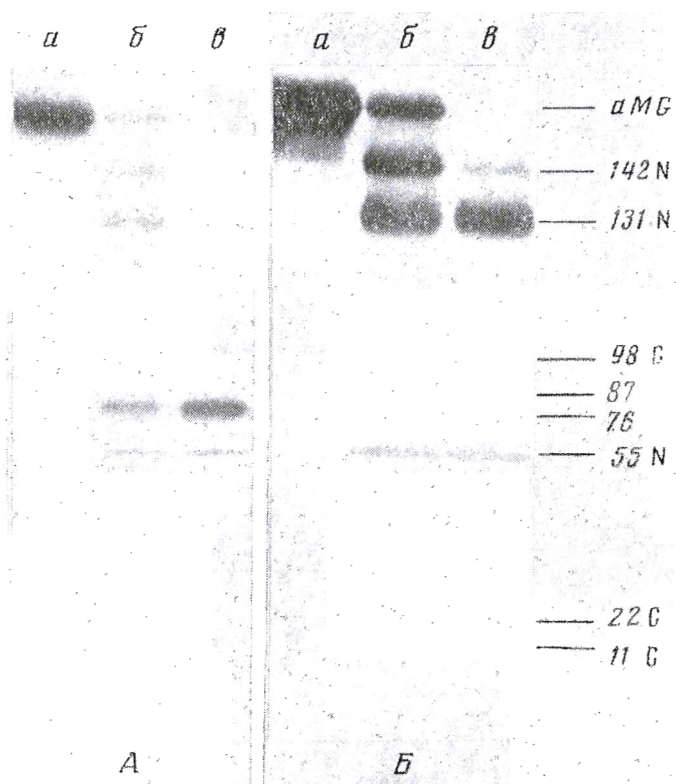


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов ограниченного расщепления апомиоглобина (aMG) бромцианом при времени реакции 1 (б) и 2 ч (в); а — заводской образец миоглобина. А — окрашивание амидочерным 10В; Б — обработка моноклональными антителами (клон 1) с последующим иммунопероксидазным окрашиванием. Справа указана длина пептидов и их положение в пептидной цепи (N- или С-конец). Стрелками отмечено положение флуоресцирующих неокрашиваемых амидочерным пептидов

ке структуры нуклеиновых кислот [17, 18]; недавно «статистический» прием (в варианте с концевой меткой) был применен для расстановки некоторых аминокислотных остатков в полипептидных цепях [19].

В наших экспериментах белком-антигеном является миоглобин человека, первичная структура которого известна [20]. Против него получали моноклональные антитела на базе двух миеломных линий: РЗ.Х63.Аg8 (клон 1) и РА1 (клоны 2–4). Для химической деградации белка использовали бромциан и N-бромсукцинимид (рис. 2).

При расщеплении апомиоглобина бромцианом на ранней стадии реакции обнаруживается 8 пептидов (рис. 3). Их локализация в полипептидной цепи однозначно устанавливается исходя из известного расположения остатков метионина в молекуле миоглобина (рис. 2). Два

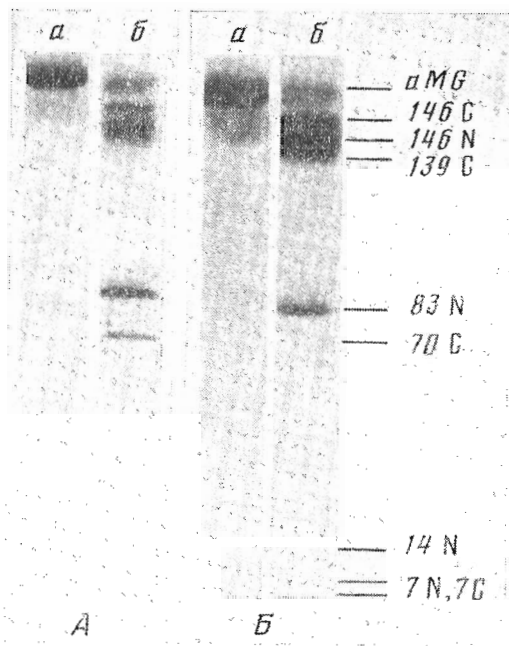


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ограниченного расщепления апомиеглобина N-бромсукцинимидом при концентрации последнего 2,5 (а) и 5 мМ (б). Пояснения см. подпись к рис. 3

фрагмента, мигрирующих вблизи нерасщепившегося миоглобина, представляют собой N-концевые пептиды, образовавшиеся в результате разрыва по остаткам Met-131 и Met-142 (пептиды 131N и 142N, рис. 3А). Соответствующие им С-концевые пептиды (22С и 11С) не окрашиваются амидочерным, однако они легко выявляются в указанных на рисунке местах по флуоресценции в виде дансильных производных. Кроме еще одной пары «одноударных» фрагментов, образующихся при расщеплении по Met-55 (55N и 98С), обнаруживаются также «двухударные» пептиды 87 и 76. На более поздних стадиях расщепления накапливаются «терминальные» фрагменты 55N, 76, 11С (рис. 3А).

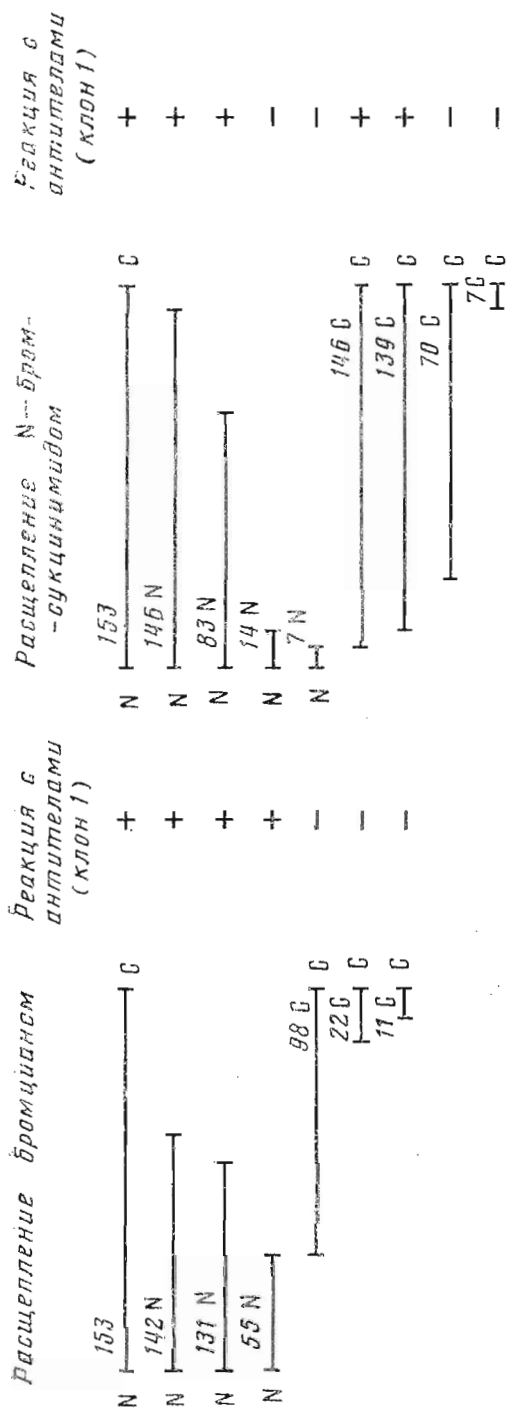
Оказалось, что способностью связываться с антителами клона 1 обладают только фрагменты 131N, 142N и 55N. При этом зона, соответствующая фрагменту 55N, окрашивается менее интенсивно, чем другие полосы (рис. 3Б).

Ограниченное расщепление апомиеглобина N-бромсукцинимидом приводит к образованию 8 «одноударных» фрагментов, обнаруживаемых по неспецифичному окрашиванию на нитроцеллюлозе (рис. 4А). Локализация этих фрагментов на первичной структуре была проведена так же, как и в случае расщепления бромцианом. Близко с перасщепившимся миоглобином мигрируют фрагменты 146С, 146N, 139С, полученные расщеплением по Tyr-146, Trp-7 и Trp-14 соответственно. Кроме того, неспецифично окрашивается еще одна пара фрагментов: 83N и 70С (рис. 4А). Короткие пептиды 14N, 7N и 7С выявляются по флуоресценции в виде производных флуоресцеина.

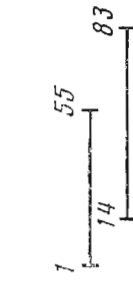
Способность реагировать с антителами клона 1 сохраняют фрагменты 146С, 146N, 139С и 83N (рис. 4Б).

Сопоставление распределения длин иммунологически активных пептидов, полученных расщеплением бромцианом и N-бромсукцинимидом, показывает, что наименьший участок, ответственный за связывание с антителами клона 1, лежит в пределах Trp-14 — Met-55 (рис. 5).

Антигенные детерминанты для других исследованных клонов антител (клоны 2—4) также были локализованы описанным методом в этом участке. Такое ограничение специфичности, по всей вероятности, обуслов-



Минимальный пептид, связывающийся с антителами: 1-55



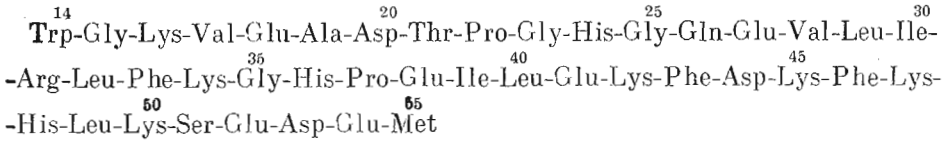
Минимальный пептид, связывающийся с антителами: 14-83

Минимальный пептид, связывающийся с антителами клона 1 по данным двух расщеплений: 14-55

Рис. 5. Схема экспериментов по локализации антигенной детерминанты для антител клона 1 с использованием ограниченного расщепления апоглобина бромцианом и N-бромсукцинимидом

лено особенностями генетического контроля иммунного ответа мышей линии BALB/c на миоглобин [9, 21, 22].

Первичная структура локализованного участка [20]:



богата гидрофильными аминокислотными остатками, наиболее часто встречающимися в составе антигенных детерминант. Интересно, что здесь локализована одна из детерминант, найденных Атасси и др. [1] для миоглобина кашалота, расположенная на участке 16—21.

Очевидно, что для более детальной локализации индивидуальных детерминант необходимо применять и другие расщепляющие реагенты — кислоты, протеиназы и т. д. Однако даже при имеющемся разрешении полученных данных было бы достаточно, например, для рационального планирования пептидного синтеза при создании «химической вакцины» [23]. Получаемую разработанным методом информацию можно дополнять оценками степени гидрофильности каждого участка первичной структуры [11] или степени экспонированности в растворитель поверхности аминокислотных остатков в третичной структуре [24].

Предлагаемый метод локализации прост в исполнении и может быть осуществлен с небольшими количествами белка (10—100 мкг). Он позволяет локализовать минимальный участок полипептидной цепи, сохраняющий способность взаимодействовать с данным антителом, независимо от того, является ли детерминанта «топографической» или «линейной». Применение метода в случае «линейной» детерминанты предпочтительнее, так как в этом случае возможна более точная локализация.

Экспериментальная часть

Миоглобин выделяли из сердечной мышцы человека, погибшего в катастрофе, по методу, описанному нами ранее [25]. Апомиоглобин получали удалением гема из миоглобина в холодном ацетоне с 0,15 н. HCl по методу [26]. Конъюгат [IgG кролика против IgG мыши—пероксидаза] готовили по методу [27]. 4-Хлор-1-нафтол синтезировали по методу [28].

Получение моноклональных антител против миоглобина человека. В двух независимых экспериментах гибридовали спленоциты гипериммунизированных мышей линии BALB/c с клетками миеломы P3.X63.Ag8 и РА1 (линия P3.X63.Ag8 получена из Института вирусологии им. Ивановского, линия РА1 любезно предоставлена М. Саармой, Институт биологической и химической физики Академии наук ЭССР). Гибридизацию проводили при помощи полиэтиленгликоля ($M_r 1000$) с последующим центрифугированием [29]. Гибридные клоны отбирали на НАТ-среде и на 14-й день проводили скрининг на наличие продуцентов антител методом пятенного иммуноанализа [30]. Гибридомы, продуцирующие специфичные антитела, дважды клонировали методом кощечных разведений и выращивали в виде асцитных опухолей в сингенных мышках. Для работы использовали асцитные жидкости.

Расщепление апомиоглобина бромцианом проводили в 70% муравьиной кислоте при концентрации апомиоглобина 1 мг/мл и бромциана 50 мМ [31]. Реакцию вели в атмосфере азота при 30°С. Отбирали аликвоты объемом 20 мкл с интервалом 1 и 2 ч от начала гидролиза и немедленно упаривали их в вакууме. Сухой остаток растворяли в 20 мкл 0,1 М триацетатного буфера, рН 8,2, содержащего 10% додецилсульфата натрия, отбирали 10 мкл и обрабатывали дансилхлоридом по методу, описанному в работе [32]. После этого дансиллированные и недансиллированные фрагменты объединяли и разделяли электрофорезом.

Расщепление апомиоглобина *N*-бромсукцинимидом проводили согласно [33]. К 20 мкл раствора белка концентрации 1 мг/мл в 0,05 М HCl добавляли 2 мкл раствора *N*-бромсукцинимид в диметилформамиде. Реакцию проводили при двух различных концентрациях *N*-бромсукцинимид в реакционной смеси (5 и 2,5 мМ) в течение 1 мин при 18° С. Реакционную смесь нейтрализовали добавлением эквивалентного объема 0,05 н. NaOH, отбирали 20 мкл и обрабатывали дихлортриазиниламинофлуоресцеином, как указано в руководстве [34]. После этого фрагменты, меченные флуоресцеином, объединяли с немечеными и разделяли электрофорезом.

Диск-электрофорез в градиенте полиакриламидного геля выполняли по методу [35]. Использовали разделяющий гель с градиентом концентрации акриламида 17,5–20% (отношение концентраций метилсубсакриламида и акриламида 1:20), содержащий 0,1% додецилсульфат натрия и 7 М мочевины. Концентрирующий гель, буферная система и буфер для образцов были такими же, как у Лэммли и др. [36].

Перенос белков из полиакриламидного геля («блоттинг») на нитроцеллюлозу с диаметром пор 0,1 мкм (VCWP 2935, Millipore) проводили 1 ч в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин и 20% метанол, при напряжении 6 В/см при 18° С [37]. Для прижатия геля к нитроцеллюлозе использовали пластины из пористого титана.

Неспецифичное окрашивание амидочерным 10 В проводили по методу [38]. Полоску нитроцеллюлозы после блоттинга помещали на 2 мин в раствор амидочерного 10В в 45% метаноле и 2% уксусной кислоте. Избыток красителя отмывали деионизованной водой в течение 1,5 мин, затем 90% метанолом, содержащим 2% уксусной кислоты, в течение 10 мин. После этого помещали нитроцеллюлозу в 10% раствор уксусной кислоты на 10–15 мин для полного обесцвечивания фона и высушивали.

Специфичное окрашивание моноклональными антителами. Полоску нитроцеллюлозы после блоттинга высушивали на воздухе и блокировали центры неспецифической сорбции 0,05 М трис-HCl–0,1 М NaCl, pH 7,5 (TBS) с 10 мг/мл овальбумина 2 ч при 37° С. Затем нитроцеллюлозу помещали в раствор моноклональных антител (разведение асцитной жидкости 1:100 в TBS с 10 мг/мл овальбумина) и инкубировали 4 ч при 18° С. После трехкратной отмывки TBS вносили раствор конъюгата [IgG кролика против IgG мыши – пероксидаза хрена] (разведение конъюгата 1:100 в TBS с 10 мг/мл овальбумина) и инкубировали еще 4 ч при 18° С. Полоску отмывали тремя сменами TBS и помещали в проявляющий раствор, содержащий 0,18 мг/мл 4-хлор-1-нафтаола и 0,03% H₂O₂ в TBS. Проявление вели 40 мин при 18° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Atassi M. Z. *Immunochemistry*, 1975, v. 12, p. 423–438.
2. Atassi M. Z. *Immunochemistry*, 1978, v. 14, p. 909–936.
3. Smith J. A., Hurrell G. R., Leach S. J. *Immunochemistry*, 1977, v. 14, p. 565–568.
4. Kohler G., Milstein C. *Nature*, 1975, v. 256, p. 495–497.
5. Hurrell J. G. R., Smith J. A., Todd P. E., Leach S. J. *Immunochemistry*, 1977, v. 14, p. 283–288.
6. East I. J., Todd P. E., Leach S. J. *Mol. Immunol.*, 1980, v. 17, p. 519–525.
7. Berzofsky J. A., Buckenmeyer G. K., Hicks G., Gurd F. R. N., Feldman R. J., Minna J. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, p. 3189–3198.
8. East I. J., Hurrell J. G. R., Todd P. E., Leach S. J. *J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, p. 3199–3202.
9. Benjamin D. C., Berzofsky J. A., East I. J., Gurd F. R. N., Hannum Ch., Leach S. J., Margoliash E., Michael J. G., Miller A., Prager E. M., Reichlin M., Sercarz E. E., Smith-Gill S. J., Todd P. E., Wilson A. C. In: *Ann. Rev. Immunol./Ed. Paul W. E. Ca.: Annual Reviews Inc.*, 1984, v. 2, p. 67–101.
10. Hopp T. P., Woods K. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, p. 3824–3828.
11. Hopp T. P., Woods K. R. *Mol. Immunol.*, 1983, v. 20, p. 483–489.
12. Prince A. M., Ikram H. Hopp T. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, p. 569–573.
13. Nunberg J. H., Rodgers G., Gilbert J. H., Snead R. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, v. 81, p. 3675–3679.
14. Grachev M. A., Laktionov P. P., Roschke V. V., Zelenin S. M. 16th Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc., Abstracts, 1984, p. 370.

15. Грачев М. А., Колочева Т. И., Мустаев А. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, № 3, с. 723-727.
16. Грачев М. А., Мустаев А. А. VI Всесоюзн. симп. «Химия белков и пептидов». Рига, Ин-т орг. синтеза АН ЛатвССР, 1983, с. 183-184.
17. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 560-564.
18. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Chestukhin A. V., Budowsky E. I. FEBS Lett., 1973, v. 33, p. 15-19.
19. Jue R. A., Doolittle R. E. Biochemistry, 1985, v. 24, p. 162-170.
20. Herrera A. R., Lehman H. Proc. Royal Soc. Lond. B. Biol. Sci., 1974, v. 186, p. 249-279.
21. Berzofsky J. A. J. Immunol., 1978, v. 120, p. 360-369.
22. Berzofsky J. A., Buckenmeyer G. K., Hicks G. J. Immunol., 1982, v. 128, p. 737-741.
23. Audibert F., Jolivet M., Arnon R., Sela M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 5042-5046.
24. Chotia C. Nature, 1974, v. 248, p. 338-340.
25. Никитин Ю. П., Грачев М. А., Лактионов П. П., Мареев Л. Э., Прессман Е. К., Рошке В. В., Парнер Г. М., Кондрачева М. Л., Бондарева З. Г., Бредихин А. А. Вопр. мед. хим., 1983, т. 29, с. 127-131.
26. Sick K., Beale D., Irvine D., Lehman H., Goodal P. T., McDangoll S. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 140, p. 231-242.
27. Nakane P. K., Kavaoi A. J. Histochem. Cytochem., 1974, v. 22, p. 1084-1091.
28. Kast H. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1911, B. 44, S. 1337.
29. Gester M. L., Margulies D. M., Scharf M. D. Somatic Cell Genet., 1977, v. 3, p. 231-236.
30. Hawkes R., Niday E., Gordon J. Anal. Biochem., 1982, v. 119, p. 142-147.
31. Dwulet F. E., Bogart R. A., Jones B. N., Lehmann L. D., Yurd F. R. N. Biochemistry, 1975, v. 4, p. 5336-5343.
32. Остерман Л. А. В кн.: Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981, с. 98.
33. Wachter E., Werhahn R. In: Peptide and Protein Sequence Analysis. Proc. 3rd Internat. Conf. Solid Phase Meth. Prot. Seq. Anal. Heidelberg, 1980, p. 21-33.
34. Иванов В. Б. В кн.: Активные красители в биологии. М.: Медицина, 1982.
35. Haskimoto F., Morigone T., Kanbayashi M., Yoshida K., Sugano H. Anal. Biochem., 1983, v. 129, p. 192-199.
36. Laemmli U. K., Favre M. J. Mol. Biol., 1973, v. 80, p. 575-599.
37. Towbin H. T., Staehelin T., Gordon J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 4350-4354.
38. Scheffner W., Weissman C. Anal. Biochem., 1973, v. 56, p. 502-514.

Поступила в редакцию
13.VI.1985.

A SIMPLE METHOD FOR THE LOCALIZATION OF ANTIGENIC DETERMINANTS IN PROTEINS OF KNOWN PRIMARY STRUCTURE

GRACHEV M. A., ZELENIN S. M., LAKTIONOV P. P., ROSCHKE V. V.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian
Division of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A simple and rapid method is proposed for the localization of antigenic determinants in proteins of known primary structure exemplified by human myoglobin. The polypeptide chain of myoglobin was cleaved with BrCN (at Met residues) or with bromosuccinimide (at Trp and Tyr residues) under conditions which on average gave less than one scission per myoglobin molecule. The «single-hit» cleavage products were separated by gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose by electroblotting. The peptides containing intact antigenic determinants were visualized by immuno-peroxidase staining with four monoclonal anti-myoglobin antibodies. Comparison of the lengths of the immuno-reactive peptides with the known positions of methionine, tryptophan and tyrosine residues suggested that the four monoclonal antibodies were bound by myoglobin over the region Trp-14 to Met-55. As compared with other methods of localization, the method proposed is much faster and takes much lesser amount of protein.