



УДК 577.112.5 : 577.112.083.3

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА ОБОЛОЧКИ X-ВИРУСА
КАРТОФЕЛЯ

I. ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БРОМЦИАНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ

*Радавский Ю. Л., Зашкин А. А., Витер С. С.,
Турова И. П., Грама Д. П.*, Бобкова А. Ф.**,
Гольдштейн М. И.**, Яркеюльг Л. В.***, Сыбер Ю. П.***,
Саарма М. Ю.****

*Отделение биоорганической химии Института органической химии
Академии наук УССР, Киев;*

** Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев;*

*** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;*

**** Институт химической и биологической физики Академии наук
ЭССР, Таллин*

Белок оболочки X-вируса картофеля расщепляли бромцианом. Выделены в гомогенном виде N- (68 аминокислотных остатков) и C-концевой (48 аминокислотных остатков) фрагменты. «Непрямым» методом иммуноферментного анализа и иммуно-электроблоттингом с использованием поли- и моноклональных антител показано, что в N-концевом участке белка оболочки X-вируса картофеля локализована по крайней мере одна антигенная детерминанта.

Изучение антигенных свойств вирусов растений интересно в двух аспектах: 1) специфические антитела к вирусам могут служить хорошим инструментом для их идентификации и иммунодиагностики; 2) с помощью антител можно исследовать топографию белков, образующих капсид. В настоящее время наиболее полно изучена антигенная структура белка оболочки вируса табачной мозаики и вируса желтой мозаики турнепса [1, 2].

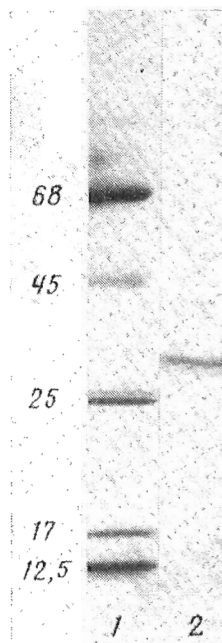
Одним из самых распространенных и наиболее изученных представителей группы потексвирусов является X-вирус картофеля (ХВК). В 1983 г. была установлена первичная структура гена белка оболочки [3].

Настоящая работа посвящена изучению антигенной структуры белка оболочки ХВК. Знание антигенной структуры этого белка даст информацию о его топографии в капсиде, что важно для установления молекулярной организации вириона. Для локализации антигенных детерминант белок расщепляли бромцианом и полученные фрагменты анализировали с помощью поли- и моноклональных антител (ПКА и МКА) к ХВК.

Анализ белка оболочки ХВК электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS показал наличие одной полосы, соответствующей белку с молекулярной массой 27 кДа (рис. 1). Молекулярная масса белка оболочки ХВК, исходя из первичной структуры гена, составляет 25 кДа [3]. Известно, что белок оболочки ХВК при проведении электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях ведет себя аномально [5]. Аномальное поведение белка связано, как отмечено в работе [6], с большим содержанием остатков серина и треонина в N-концевом участке, что приводит к меньшему связыванию с SDS и определению завышенного значения молекулярной массы белка. N-Концевой анализ показал отсутствие свободной α -NH₂-группы в исследуемом белке.

После расщепления белка бромцианом в смеси были идентифицированы следующие N-концевые аминокислотные остатки: Leu, Ile, Ala, Asp, Lys, Pro, что соответствовало последовательностям Met-X первичной

Рис. 1. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS [4] белка оболочки ХВК (2) и белков-свидетелей (1): сверху вниз — бычий сывороточный альбумин, овальбумин, химотрипсиноген, миоглобин, цитохром с; приведена молекулярная масса в килодальтонах



структуры гена белка оболочки ХВК [3]. При определении аминокислотного состава продуктов бромцианового расщепления не было выявлено метионина, но был обнаружен гомосерин, что свидетельствовало о полном расщеплении связей Met-X в белке оболочки ХВК.

Смесь бромциановых фрагментов в 20% уксусной кислоте после отделения нерастворимого материала фракционировали на сефадексе G-50. Дальнейший анализ показал, что осадок содержит два больших бромциановых фрагмента, по-видимому, склонных к агрегации в этих условиях. В результате гель-фильтрации было отмечено пять фракций пептидной природы (рис. 2); во фракции Y не было обнаружено N-концевого аминокислотного остатка.

«Непрямой» иммуоферментный анализ показал, что только фракция I дает специфическую реакцию с ПКА и МКА и, следовательно, содержит антигенные детерминанты нативного белка. Так как основная цель настоящей работы — изучение антигенной структуры белка оболочки ХВК, в дальнейшем мы исследовали именно эту фракцию. Результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS смеси бромциановых фрагментов и фракции I (рис. 3б, в) свидетельствуют, что пептидный материал неомогенен.

Для дальнейшей очистки фракцию I (рис. 2) хроматографировали на ионообменнике DEAE-Toyorearl-650 (рис. 4). По данным электрофореза в ПААГ, фракции А и Б индивидуальны (рис. 3г, д). Во фракции А в качестве N-концевой была идентифицирована аспарагиновая кислота, во фракции Б не было обнаружено свободной α -NH₂-группы. Исходя из данных о нуклеотидной последовательности гена белка оболочки ХВК [3], C-концевой бромциановый фрагмент должен иметь N-концевую аспарагиновую кислоту. Таким образом, фракция А содержит C-концевой бромциановый фрагмент белка оболочки ХВК, а фракция Б, с учетом данных об отсутствии свободной α -NH₂-группы в белке, соответствует N-концевому фрагменту. В пользу этого свидетельствует также соответствующая подвижность этих фрагментов при электрофорезе в ПААГ (рис. 3г, д) и их аминокислотный состав, который близок к аминокислотному составу этих участков полипептидной цепи белка [3]. В пептиде фракции А не обнаружен C-концевой гомосерин, что также свидетельствует о C-концевом расположении данного фрагмента в полипептидной цепи белка.

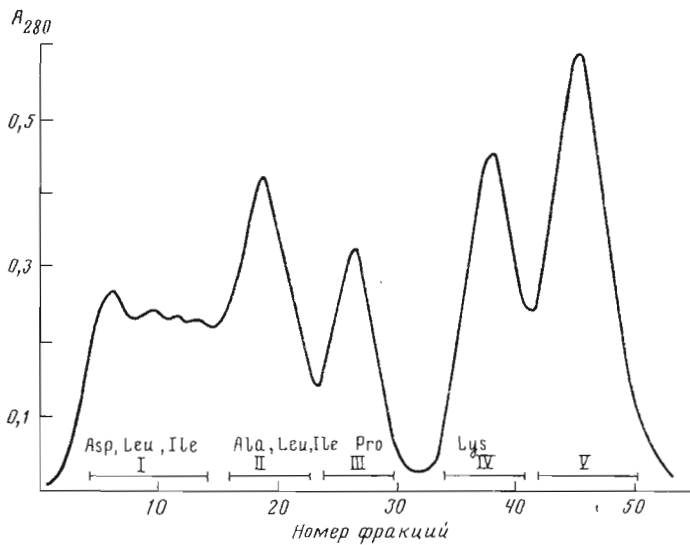


Рис. 2. Фракционирование смеси фрагментов бромцианового расщепления белка оболочки ХВК на сефадексе G-50 в 20% уксусной кислоте. Колонка 2,8×45 см, скорость элюции 30 мл/ч, объем фракций 3 мл. Представлены N-концевые аминокислотные остатки, идентифицированные в материале фракций

Иммунохимическое изучение ХВК, белка оболочки ХВК, N- и C-концевых фрагментов методом «непрямого» иммуноферментного анализа с ПКА приведено на рис. 5. Как видно из представленных результатов, N-концевой бромциановый фрагмент содержит антигенную детерминанту (детерминанты). В пользу этого свидетельствуют также данные «непрямого» метода иммуноферментного анализа с МКА 21×B4, 21×D2 и 23×A5. Все три МКА взаимодействуют с ХВК и белком оболочки ХВК. Более того, МКА 21×D2 и 23×A5 специфически взаимодействуют также с N-концевым бромциановым фрагментом и со смесью N- и C-концевых бромциановых фрагментов. МКА 21×B4 узнает белок оболочки ХВК, но не дает специфической реакции с бромциановыми фрагментами белка оболочки ХВК. Возможно, что антигенная детерминанта для МКА 21×B4 локализована на расщепленном бромцианом участке белка оболочки вируса.

Результаты «непрямого» радиоиммуноанализа подтверждают тот факт, что N-концевой бромциановый фрагмент белка оболочки ХВК узнается МКА 21×D2 и 23×A5 (таблица). Таким образом, можно утверждать, что

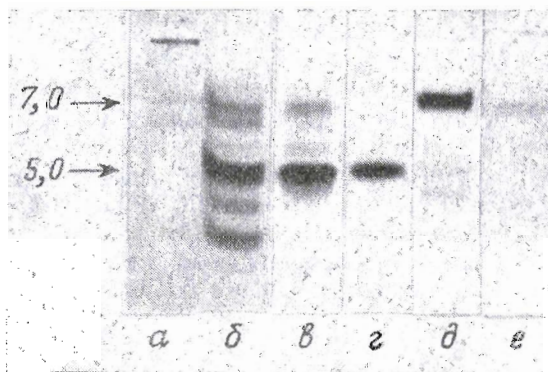


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ по методу [7] смеси белка оболочки ХВК и его бромциановых фрагментов (а), смеси бромциановых фрагментов (б), фракции I рис. 2 (в), фракции А рис. 4 (г), фракции Б рис. 4 (д), смеси белка оболочки ХВК и фракции В (е). Гели б-д окрашены кумасси R-250, для гелей а, е осуществлен иммуноблоттинг с МКА к ХВК. Молекулярная масса N- (7,0) и C-концевого фрагмента (5,0) приведена в килодальтонах

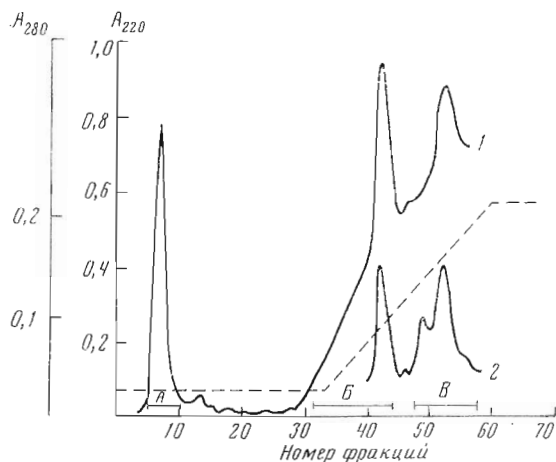


Рис. 4

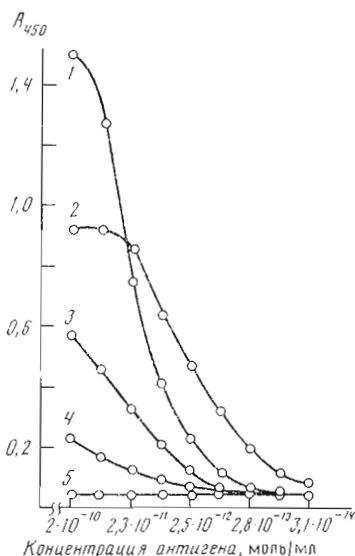


Рис. 5

Рис. 4. Хроматография фракции I рис. 2 на колонке (1,6×12 см) с DEAE-Toyopearl. Линейный градиент 0,01–0,5 М NH_4HCO_3 , pH 9,0 (пунктир), объем фракций 3 мл. Контроль по поглощению при 220 (1) и 280 нм (2). А, Б, В – полученные фракции

Рис. 5. Результаты «непрямого» иммуноферментного анализа с ПКА к ХВК X-вируса картофеля (1), белка оболочки ХВК (2), N-концевого (3) и С-концевого (4) бромциановых фрагментов; вируса табачной мозаики (5)

один или два эпитопа, узнаваемые этими МКА, локализованы в N-концевом участке белка оболочки ХВК.

Необходимо отметить, что С-концевой бромциановый фрагмент также взаимодействует с ПКА (рис. 5, таблица), но слабее, чем N-концевой фрагмент.

Для локализации антигенных детерминант мы применяли также иммуноблоттинг. В связи с тем что МКА 21×В4 специфически не взаимодействовали с бромциановыми фрагментами белка оболочки ХВК в «непрямом» иммуноферментном анализе, МКА 21×В4 не были использованы в радиоиммуноанализе и иммуноблоттинге. В иммуноблоттинге были использованы только МКА 21×D2.

Согласно данным по иммуноблоттингу бромциановой смеси и белка оболочки ХВК с МКА 21×D2 (рис. 3), три полосы с подвижностью ~7–8,5 кДа дали реакцию с антителами. Известно, что только N-концевой бромциановый фрагмент (68 аминокислотных остатков [3]) может находиться в этой зоне. Второй по величине, С-концевой бромциановый фрагмент (48 аминокислотных остатков [3]) обладает большей подвижностью (рис. 3г). При иммуноблоттинге гомогенного N-концевого бромцианового

Связывание * ХВК, белка оболочки ХВК, N- и С-концевых бромциановых фрагментов белка оболочки ХВК с МКА к ХВК методом радиоиммуноанализа
Значения приведены в имп/мин

Антитело	Антиген				
	ХВК	Белок оболочки	Смесь N- и С-концевых фрагментов	N-концевой фрагмент	С-концевой фрагмент
21×D2	3199	699	433	647	252
23×А5	3356	1106	304	863	139
ПКА к ХВК	4820	1897	454	1254	392

* Связывание антител выявляли при помощи белка А, меченного ^{125}I . В лунки плат вносили по 3,75 нКи (8000 имп/мин) белка А. Результаты радиоиммуноанализа представлены в имп/мин с вычитанием фонового значения (550 имп/мин), полученного при взаимодействии исследуемых антител к ХВК с серологически не родственными вирусами — вирусом табачной мозаики и М-вирусом картофеля.

фрагмента с МКА наблюдается специфическое окрашивание (рис. 3е). Однако в ряде случаев при проведении электрофореза фрагмент давал две или три полосы. Наличие одной и более полос при анализе этого фрагмента в ПААГ в присутствии SDS связано с обработкой материала перед нанесением на гель, а также с условиями проведения электрофореза. Так, при использовании концентрирующего геля было отмечено более одной полосы. Необычное поведение N-концевого фрагмента при электрофорезе можно объяснить аномальным связыванием с SDS за счет присутствия в этом участке полипептидной цепи белка оболочки ХВК большого числа остатков серина и треонина, что отмечалось выше. Этим же можно объяснить наличие трех полос при иммуноблоттинге всей бромциановой смеси (рис. 3а). Не исключено также, что аномальная подвижность белка и N-концевого фрагмента связана с различной степенью гликозилирования.

Данные, полученные «непрямым» иммуноферментным анализом и иммуноблоттингом с применением ПКА и МКА, свидетельствуют о наличии в N-концевом участке белка оболочки ХВК по крайней мере одной антигенной детерминанты. Этот фрагмент содержит большое число гидрофильных аминокислотных остатков. Известно, что в образовании антигенных детерминант очень часто участвуют именно гидрофильные остатки [8, 9]. Для более детальной локализации и выяснения природы антигенных детерминант в настоящее время анализируются пептиды, полученные в результате расщепления N-концевого бромцианового фрагмента трипсином.

Авторы благодарят акад. ВАСХНИЛ И. Г. Атабекова за постоянный интерес и полезные советы при выполнении данной работы.

Экспериментальная часть

В работе использованы: сефадекс G-25, сефароза 2В (Pharmacia, Швеция), полиэтиленгликоль 6000, 5-диметиламмоно-1-нафталинсульфохлорид, SDS, кумасси голубой R-250 (Serva, ФРГ), динатриевая соль EDTA (Merck, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (BSA), феилметилсульфонилфторид, 3,3'-диаминобензидин (Sigma, США), DEAE-Toyorearl-650 (Toyo Soda, Япония), нитроцеллюлозные мембраны BA-85 с диаметром пор 0,4 мкм (Schleicher und Schüll, ФРГ), твин-20 (Lawson, Великобритания), 2,2-азидо-ди-[3-этилбензотриазолин-6-сульфонат] (ABTS) (Boeinger Mannheim, ФРГ).

В работе использовали конъюгаты кроличьих антимышьяных антител и козлиных антикроличьих антител с пероксидазой из хрена (Sigma, США). Для идентификации антигенов в иммуноблоттинге применяли конъюгаты кроличьих антимышьяных антител с пероксидазой, любезно предоставленные К. Л. Шаханиной (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР).

Наработка и очистка вируса. Использовали средневирulentный штамм ХВК, аминокислотная последовательность белка оболочки которого была определена на основании данных по первичной структуре его гена [3]. Вирус размыливали в растении дурмана и для выделения использовали листья через 12 сут после заражения. Очистку вируса проводили как описано в работе [10]. Все операции по очистке ХВК проводили при 0–2°С с применением ингибитора протеиназ — феилметилсульфонилфторида в концентрации 1 мМ. После хроматографии на сефарозе 2В вирус осаждали через подушку 20% сахарозы (5 мл), осадок ресуспендировали в 2,5 М Na₂EDTA, осветляли низкоскоростным центрифугированием и использовали для получения вирусного белка.

Выделение белка оболочки ХВК. Белок выделяли солевым методом как описано в работе [11]. К очищенному вирусу добавляли хлористый литий до концентрации 2 М и замораживали при –20°С в течение 3 ч. РНК отделяли низкоскоростным центрифугированием, полученный белок дигализовали против воды до полного освобождения от солей. Для отделения агрегатов вирусного белка проводили центрифугирование при 4000 об/мин в течение 4 ч.

Диск-электрофорез белка оболочки ХВК проводили в градиенте полиакриламидного геля (10–30%) по методу [4]. Фиксацию и окраску белков осуществляли как описано в работе [12]. Электрофорез бромциановых фрагментов в ПААГ в присутствии SDS проводили по методике [7], как описано в работе [13]. Гели окрашивали кумасси R-250.

Расщепление белка оболочки ХВК бромцианом осуществляли в модификации Стирса [14], как описано ранее [15]. 50 мг белка растворяли в 2 мл 85% муравьиной кислоты, раствор разбавляли водой до 70% содержания муравьиной кислоты и к смеси добавляли 70-кратный молярный избыток бромциана (на 1 моль метионина). Смесь выдерживали 24 ч при 20°С, разбавляли 8-кратным объемом воды и лиофилизовали.

Аминокислотный состав белка и пептидов определяли после их гидролиза 5,7 н. HCl (с добавкой фенола) при 110°С в вакууме на автоматическом анализаторе анал.

нокислот Aminochoom-II (ВНР) или Biotronic LC-6000 (ФРГ). Для превращения лактона гомосерина в гомосерин пептиды обрабатывали 12 ч 2 М водным аммиаком при 37° С.

N-Концевые аминокислотные остатки идентифицировали по методу [16] в модификации [17]. Dns-Аминокислоты идентифицировали микрогепкозной хроматографией на пластинках с цолпамидом [18, 19].

Разделение пептидов. Смесь бромциановых фрагментов (50 мг) растворяли в 2 мл 20% уксусной кислоты. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием, а растворимый подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25, уравновешенном 20% уксусной кислотой (рис. 2). Липофилизованную фракцию I далее хроматографировали на DEAE-Toyopearl-650 (рис. 4).

Получение поликлональных антител против ХВК. Антисыворотку к ХВК получали в результате иммунизации кроликов очищенными препаратами ХВК. Животным вводили 1 мг вируса. Первую инъекцию проводили внутривенно, вторую и третью — с небольшими интервалами внутримышечно. При внутримышечной инъекции вирус смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Кровь брали на 7–12-е сут после последней инъекции; титр сыворотки, определенный казеальным методом, составлял 1 : 256–1 : 512.

Фракцию иммуноглобулинов выделяли из антисыворотки осаждением 10% водным раствором полиэтиленгликоля-6000. Осадок растворяли и диализовали против 0,01 М К-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1 М NaCl (PBS).

Получение моноклональных антител к ХВК. Гибридомы, секретирующие МКА и ХВК, получали путем слияния $5 \cdot 10^7$ клеток селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных очищенным ХВК, с $3 \cdot 10^7$ клеток миеломы линии РА1, используя модифицированную Исковым среду Дульбекко (Flow, Великобритания), содержащую 10% сыворотку плазды коровы и селективные компоненты ГАГ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин).

Гибридизацию клеток и клоноирование проводили по ранее описанной методике [20]. Положительные клоны идентифицировали с помощью дот-иммуноферментного метода на нитроцеллюлозных фильтрах [21]. МКА из асцитных жидкостей получали путем двукратного осаждения полиэтиленгликолем-6000. В данной работе использовали три клона: 21×В4, 21×D2 и 23×А5. Чистоту МКА определяли электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS [4]. Она составила 90%. Константы связывания МКА с ХВК были следующими: для 21×В4 — $1,5 \cdot 10^{-10}$, МКА 21×2 — $1,2 \cdot 10^{-9}$ и МКА 23×А5 — $1,9 \cdot 10^{-9}$ М [22]. Все три МКА реагировали с белком А, меченным ^{125}I (Amersham, Великобритания). Это свидетельствовало о том, что они относятся к иммуноглобулинам класса G. Изотипы IgG определяли «сэндвич»-методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антизотипических антител (Calbiochem R Brand immunochemicals, Behring Diagnostics, США). Супернатанты субклонированной гибридомы тестировали по инструкции этой фирмы. Результаты иммуноферментного анализа показали, что МКА 23×А5 и 21×D2 относятся к субклассу 2b, а МКА 21×В4 — к 2a.

Твердофазный иммуноферментный анализ («непрямой» метод). Для проведения иммуноферментного анализа использовали плиты из полистирола (Dynatech, Швейцария). Антигены (100 мкл на лунку) в концентрации 1 мкг/мл вносили в лунки плат в 0,05 М Na-бикарбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 16 ч при 4° С. Раствор антигена выливали и трижды промывали лунки PBS, содержащим 0,05% твина-20 (PBST). Затем вносили в лунки по 0,2 мл 1% БСА в PBS для блокировки неспецифической сорбции антител и инкубировали 2 ч при 20° С. После отмывки плат в лунки вносили по 0,1 мл антигена в разведении 1 : 1000 в PBST, содержащем 0,3% БСА. В иммуноферментном анализе использовали МКА 21×В4, 21×D2 и 23×А5, а также ПКА к ХВК с исходной концентрацией 18,3; 16,5; 8,4 и 57,4 мкг/мл соответственно. После инкубации плат в течение 2 ч при 37° С раствор антител выливали, плиты 5 раз промывали PBST и в лунку вносили по 0,1 мл раствора конъюгированных с пероксидазой кроличьих антимышечных антител (Sigma, США). Платы инкубировали 1 ч при 37° С, промывали, как описано выше, и в лунку вносили по 0,1 мл субстрата пероксидазы. В качестве субстрата применяли 0,005 М АВТС и 0,01% H_2O_2 в 0,05 М лимонной кислоте, pH 4,0. Оптическое поглощение гидролизованного субстрата измеряли через 15 мин при длине волны 414 нм на фотометре Titertek Multiscan (Великобритания).

В ряде случаев (см. рис. 5) применяли «непрямой» метод иммуноферментного анализа в модификации работы [23] с использованием в качестве субстрата 5-аминосалициловой кислоты.

Связывание МКА с ХВК, белком оболочки ХВК и бромциановыми фрагментами белка оболочки ХВК исследовали также радиоиммунологическим методом. Для «непрямого» радиоиммунологического анализа использовали плиты из поливинилхлорида (Titertek Flow Laboratories, Голландия). Антигены (100 мкл на лунку) в концентрации 1 мкг/мл вносили в лунки плат в 0,05 М Na-бикарбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 16 ч при 4° С. Связывание антител с антигеном проводили аналогично «непрямому» методу иммуноферментного анализа. Реакцию взаимодействия антиген — антитело определяли количественно при помощи связывания белка А меченного изотопом ^{125}I с уд. акт. 30 мКи/мг. Платы инкубировали 1 ч при 37° С, 5 раз промывали PBST и результат радиоиммуноанализа измеряли на счетчике «Рахтамма» (ЛКВ, Швеция).

Иммуноблоттинг. Белки и пептиды переносили с геля на нитроцеллюлозные мембраны в буфере, содержащем 0,025 М трис, 0,192 М глицин, 20% метанол, pH 8,3, в аппарате собственной конструкции в течение 3 ч при 10 В/см [24]. Нитроцеллю-

лозную мембрану трижды отмывали PBS и инкубировали в PBST в присутствии 3% БСА в течение 16 ч. Затем нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с МКА (разведение 1:100) в PBST, содержащем 3% БСА, в течение 2 ч при 37°С. Отмывали трижды PBST и инкубировали с кроличьими антимышными антителами, конъюгированными с пероксидазой (разведение 1:100), в PBST, содержащем 3% БСА, в течение 2 ч при 37°С. Далее проводили отмывание PBST и помещали нитроцеллюлозную мембрану в субстрат пероксидазы (25 мг 3,3'-диаминобензидаина и 1 мл 1% H₂O₂ в 100 мл PBST, pH 7,2). При комнатной температуре окраска развивалась в течение 10–20 мин. В качестве контроля в иммуноблоттинге использовали химоатрипсиноген (25 кДа), который не давал реакции с МКА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moudallal Z. Al., Briand J. P., Van Regenmortel M. H. V. // EMBO J. 1985. V. 4. № 5. P. 1231–1235.
2. Van Regenmortel M. H. V. // Immunochemistry of viruses./Eds Van Regenmortel M. H. V., Neurath A. R. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1985. P. 467–478.
3. Морозов С. Ю., Захарьев В. М., Чернов Б. К., Прасолов В. С., Козлов Ю. В., Атабеков И. Г., Скрябин К. Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 274. № 1. С. 211–215.
4. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
5. Артюкова Е. В. // Взаимоотношения вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 25–33.
6. Köpfig R. // Virology. 1972. V. 50. № 1. P. 263–266.
7. Swank R. T., Munkers K. D. // Analyt. Biochem. 1971. V. 39. № 2. P. 462–477.
8. Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F.-T., Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3403–3407.
9. Hopp T. P., Woods K. R. // Mol. Immunol. 1983. V. 20. № 5. P. 483–489.
10. Грама Д. П. // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. В. 2. С. 78–82.
11. Franki R. J. B., McLean G. D. // Austral. J. Biol. Sci. 1968. V. 21. № 6. P. 1311–1318.
12. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. 1968. V. 244. № 16. P. 4406–4410.
13. Радавский Ю. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. // Химия природн. соед. 1972. № 5. С. 683–685.
14. Steers E. Jr., Graven R. C., Anfinsen C. B., Bethune J. L. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. № 6. P. 2478–2484.
15. Серебряный С. Б., Радавский Ю. Л., Козлов Э. А. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 6. С. 1189–1193.
16. Gray W. R. // Meth. Enzymol. V. 11. N. Y.: Acad. Press, 1967. P. 469–475.
17. Виноградова Е. И., Фейзина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Погалеко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. // Биохимия. 1973. Т. 38. № 1. С. 3–21.
18. Woods K., Wang K. // Biochim. et biophys. acta. 1967. V. 133. № 2. P. 369–370.
19. Решетов П. Д., Чесухина Г. Г., Махмудов С., Пышкина А. С. // Химия природн. соед. 1971. № 1. С. 66–68.
20. Саарма М. Ю., Неуман Т. Э., Тальпсен Т. Э., Тоотс И. Э., Сийгур Э. П., Сийгур Ю. Р. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 277. № 5. С. 1267–1269.
21. Hawkes R., Niday E., Gordon J. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. № 1. P. 142–147.
22. Friquet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // J. Immunol. Methods. 1985. V. 77. № 2. P. 305–319.
23. Бобкова А. Ф., Нацвлишвили Н. М., Новиков В. К., Дзантиев Б. Б., Егоров А. М., Атабеков И. Г. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1985. Т. 1. С. 128–133.
24. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4354.

Поступила в редакцию
15.XII.1986

После доработки
29.VI.1987

ANTIGENIC STRUCTURE OF POTATO VIRUS X COAT PROTEIN.

I. IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS

OF CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS

RADAVSKY Yu. L., ZAIKIN A. A., VITER S. S., TUROVA I. P.,

GRAMA D. P.*, BOBKOVA A. F.**, GOLDSTEIN M. I.**, JÄRVEKÜLG L. V.***,

SÖBER J. P.***, SAARMA M. J.***

Department of Bioorganic Chemistry, Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;

* D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;

** Department of Virology, Moscow State University;

*** Institute of Chemical and Biological Physics, Academy of Sciences
of the Estonian SSR, Tallin

The potato virus X coat protein was cleaved by cyanogen bromide, and homogenic N-terminal (68 amino acid residues) and C-terminal (48 amino acid residues) fragments were isolated. By «indirect» ELISA and immunoblotting with the use of poly- and monoclonal antibodies, at least one antigenic site was shown to be located in the N-terminal region of the protein.