



УДК 577.112.5.083.3

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА ОБОЛОЧКИ
X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ
II. * ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННОЙ (НЫХ) ДЕТЕРМИНАНТ
В N-КОНЦЕВОМ УЧАСТКЕ БЕЛКА

*Радавский Ю. Л., Витер С. С., Турова П. П.,
Зайцева Л. С., Ярвкюльг Л. В.*, Саармя М. Ю.*,
Гребенчиков Н. И.**, Баратова Л. А.***

Институт биоорганической химии Академии наук УССР, Киев;

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

*** Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии
им. А. Н. Белозерского, МГУ*

Непрямым методом иммуоферментного анализа установлено, что два моноклональных антитела к X-вирусу картофеля взаимодействуют с одной или двумя перекрывающимися антигенными детерминантами N-концевой области белка оболочки вируса. Для взаимодействия с используемыми антителами необходим остаток лизина в позиции 19 аминокислотной последовательности белка.

Ранее нами было установлено, что N-концевой бромциановый фрагмент (68 аминокислотных остатков) белка оболочки X-вируса картофеля (ХВК) содержит одну или две антигенные детерминанты [1]. В настоящей работе представлены результаты более детальной локализации антигенной(ных) детерминант в N-концевом участке белка. В исследовании использованы два моноклональных антитела (МКА) 21×D2 и 23×A5, которые взаимодействуют с N-концевым бромциановым фрагментом [1, 2].

N-Концевой бромциановый фрагмент (В-1) содержит два остатка лизина в позиции 19 и 66 и остаток аргинина в позиции 44 (рис. 1) [3]. С целью получения пептидов, возможно включающих антигенные детерминанты, фрагмент расщепляли трипсином. Однако при анализе смеси триптических пептидов с помощью МКА не было отмечено положительной реакции (табл. 1). Это свидетельствовало о том, что один из остатков лизина либо остаток аргинина входят в антигенную детерминанту или детерминанты, которые специфичны для используемых антител. Для доказательства важности остатков лизина во фрагменте В-1 при взаимодействии с МКА проводили его модификацию цитраконовым ангидридом [4]. Цитраконилированный пептид не давал специфической реакции с МКА (табл. 1), однако при снятии цитраконовой защиты была отмечена положительная реакция. Эти данные свидетельствовали о том, что в антигенную детерминанту или детерминанты, взаимодействующие с обоими МКА, входят остатки (остаток) лизина. Так как фрагмент В-1 содержит два остатка лизина, необходимо было установить, какой из них входит в состав детерминанты для МКА 21×D2, а какой для МКА 23×A5. С этой целью белок оболочки ХВК расщепляли протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8. Гидролизат фракционировали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 2) и полученные фракции анализировали непрямым методом иммуоферментного анализа. Из всех пептидных фракций, представленных на рис. 2, только пептиды фракции 15 взаимодействовали с обоими МКА. N-Концевым анализом не было обнаружено свободной α -NH₂-группы в пептидах данной фракции. В белке

* Сообщение I см. [1].

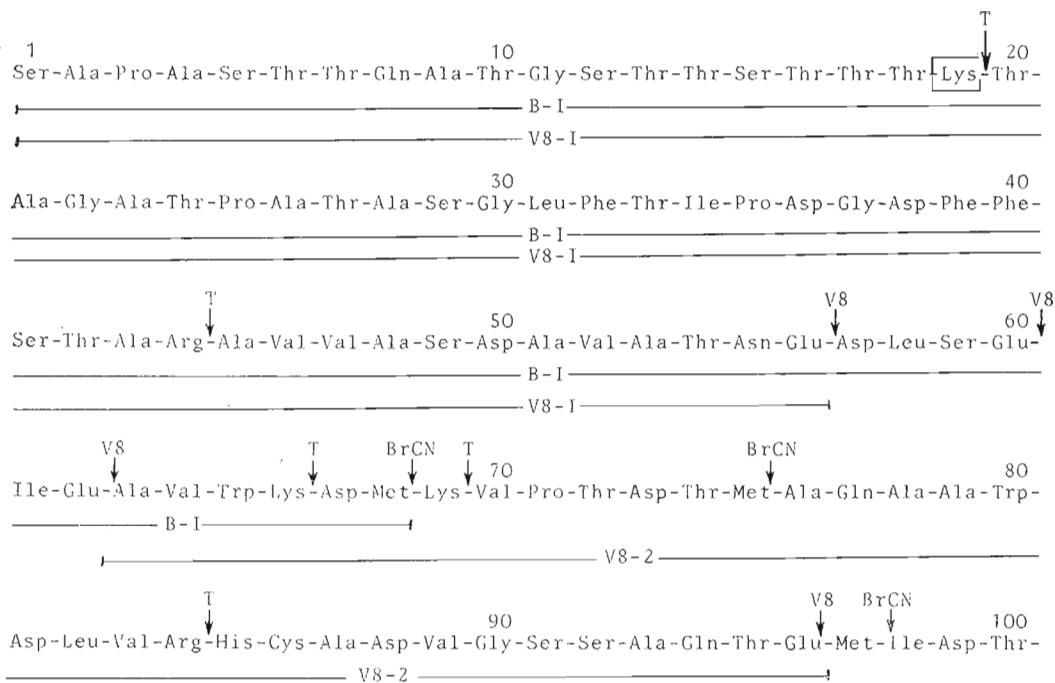


Рис. 1. Аминокислотная последовательность белка оболочки ХВК (остатки 1-100).
 Стрелками показаны атакуемые бромцианом, трипсином (Т) и протеиназой из *St. aureus* V8(V8) пептидные связи. Прямые линии отмечены выделенные пептиды.
 В рамке остаток лизина, входящий в антигенную детерминанту

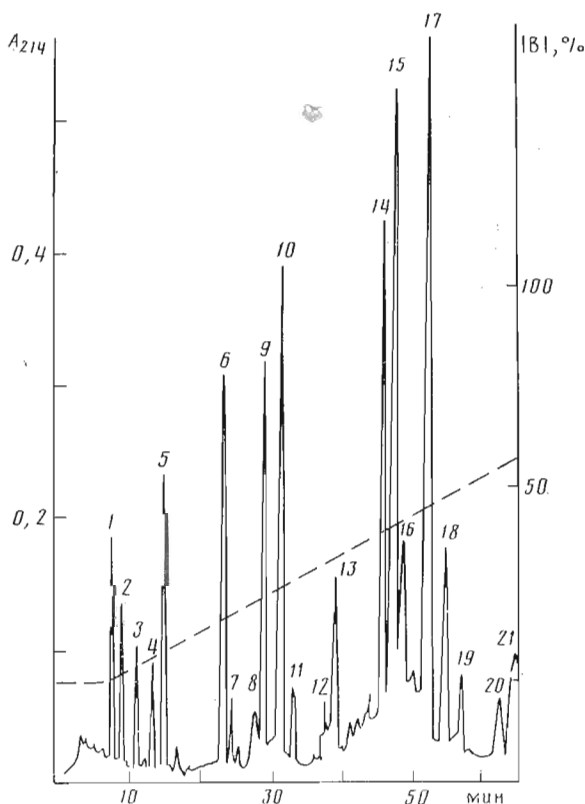


Рис. 2. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза белка оболочки ХВК протеиназой из *St. aureus* V8 с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе. Состав подвижной фазы: А - 3% изопропиловый спирт, 0,1% трифторуксусная кислота, 0,1% N-этилморфин; В - 60% изопропиловый спирт, 0,1% трифторуксусная кислота, 0,1% N-этилморфолин. Штриховая линия обозначает изменение концентрации буфера В в А

оболочки ХВК и фрагменте В-I α -NH₂-группа также не определяется [1]. Аминокислотный состав данной фракции и фрагмента В-I представлен в табл. 2. Анализируя полученные данные, можно утверждать, что фракция 15 представляет собой гомогенный N-концевой пептид (V8-1) белка оболочки ХВК, включающий 56 аминокислотных остатков (рис. 1). Результаты иммуноанализа этого пептида даны в табл. 1.

В табл. 2 приведен аминокислотный состав и N-концевой аминокислотный остаток фракции 17 (рис. 2), которая является гомогенным пептидом (V8-2) белка оболочки ХВК, входящим в последовательность 63-96 (рис. 1). В этом пептиде находится один из двух остатков лизина (Lys-66) фрагмента В-I. Пептид V8-2 не взаимодействует ни с одним из используемых МКА (табл. 1), следовательно, не входит в состав соответствующих детерминант.

Таким образом, МКА 21×D2 и 23×A5 взаимодействуют с участком полипептидной цепи белка оболочки ХВК, включающим остаток лизина в позиции 19. Можно предположить, что: а) этим МКА соответствует одна общая детерминанта; б) имеются две перекрывающиеся антигенные детерминанты, в которые входит один и тот же остаток лизина. Мы надеемся, что синтез пептидов различной длины, моделирующих этот участок полипептидной цепи белка, и их иммуноанализ с МКА 21×D2 и 23×A5 дадут возможность выбрать одно из этих предположений. По-видимому, для взаимодействия с МКА помимо положительного заряда на остатке лизина существенно также наличие большого числа гидроксиминокислотных остатков в данной последовательности (рис. 1), которые могут образовывать водородные связи в активном центре антител.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин (Millipore, США), протеиназа из *St. aureus* V8 (Miles, Англия), цитраконовый ангидрид (Fluka, Швейцария), трифторуксусная кислота, изопропиловый спирт и гуанидингидрохлорид (Pierce, США), сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция).

Ферментативный гидролиз белка протеиназой из St. aureus V8 проводили в 0,1 М N-этилморфолин-ацетатном буфере, pH 8,0, при 37°С в течение 1,5 ч. Весовое соотношение фермент — субстрат 1 : 100. После окончания гидролиза смесь лиофильно высушивали и пептиды разделяли ВЭЖХ (см. ниже).

Протеолиз грипсином осуществляли в растворе 0,2 М бикарбоната аммония, pH 8,5, при 37°С в течение 4 ч. Концентрация пептида 10 мг/мл, фермент-субстратное соотношение 1 : 50. Протеолиз останавливали подкислением раствора ледяной CH₃COOH до pH 2,0 и гидролизат лиофильно высушивали.

Цитракоилирование фрагмента В-I проводили по методу [5]. Для этого 5 мг пептида растворяли в 2 мл 0,2 М бикарбоната натрия, pH 8,3, содержащего 6 М гуанидингидрохлорид, и 5 н. NaOH доводили pH раствора до 9,4. К раствору добавляли 7,5 мкд цитраконового ангидрида (50-кратный молярный избыток на один остаток лизина) и инкубировали при перемешивании в течение 2 ч при 20°С (pH реакции поддерживали 0,1 н. NaOH около 9,2). Далее реакционную смесь наносили на колонку (1,5×20 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 0,1 М NH₄OH. Продукт, выходящий с внешним объемом, собирали и лиофильно высушивали.

Децитракоилирование фрагмента В-I вели в 30% муравьиной кислоте в течение 3 ч при 37°С.

Непрямой метод иммуноферментного анализа осуществляли как описано нами ранее [1].

ВЭЖХ в обращенной фазе. Разделение пептидов, полученных в результате протеолиза белка оболочки протеиназой из *St. aureus* V8, проводили на колонке (0,46×15 см) Ultrasphere octyl с использованием хроматографической системы (Beckman, США), модель 344 (рис. 2). Скорость элюции 0,75 мл/мин. Детектирование проводили при 214 нм.

Аминокислотный состав пептидов определяли после их гидролиза

Сравнение антигенной активности ХВК, белка оболочки и его фрагментов
непрямым методом иммуноферментного анализа *

МКА	ХВК	Белок оболочки	Триптиче- ский гидро- лизат фраг- мента В-1	Фрагмент В-1	Модифи- цирован- ный В-1	Пептид V8-1	Пептид V8-2	ВТМ
21×D2	0,55	0,47	0,04	0,43	0,05	0,52	0,04	0,02
23×A5	0,75	0,46	0,04	0,44	0,06	0,50	0,03	0,03

* Результаты представлены в единицах поглощения при длине волны 414 нм. В качестве контроля использован белок вируса табачной мозаики (ВТМ).

Таблица 2

Аминокислотный состав фрагмента В-1, пептидов V8-1 и V8-2
(фракции 15 и 17 рис. 2) белка оболочки ХВК *

Аминокислота	В-1		Фракция 15 (V8-1)		Фракция 17 (V8-2)	
	А	Б	А	Б	А	Б
Asp	6	5,5(6)	4	3,7(4)	4	3,8(4)
Thr	14	13,6(14)	14	13,6(14)	3	3,3(3)
Ser	8	7,5(8)	7	6,6(7)	2	2,0(2)
Glu	4	4,3(4)	2	2,2(2)	3	2,9(3)
Pro	3	3,4(3)	3	3,2(3)	1	0,8(1)
Gly	4	4,0(4)	4	4,1(4)	1	1,2(1)
Ala	13	12,8(13)	12	12,2(12)	6	5,9(6)
Val ^{2*}	4	3,0(3)	3	2,5(3)	4	3,2(3)
Pe	2	2,0(2)	1	1,4(1)	—	1,1(1)
Leu	2	1,5(2)	1	1,0(1)	1	0,8(1)
Tyr	—	0,2(0)	—	—	—	—
Phe	3	2,7(3)	3	2,9(3)	—	—
His	—	0,2(0)	2	—	1	0,9(1)
Lys	2	2,4(2)	1	1,0(1)	2	1,9(2)
Arg	1	0,8(1)	1	1,2(1)	1	1,1(1)
Trp ^{3*}	1	—	—	—	2	—
Cys ^{3*}	—	—	—	—	1	—
Met ^{4*}	1	1	—	—	2	1,8(2)
Всего	68	65	56	56	34	31
N-Концевой	—	—	—	—	Ala	Ala

* А — расчет по структуре гена, Б — прямое определение.

^{2*} Заниженное количество валина объясняется плохой гидролизуемостью связи Val-Val (рис. 1).

^{3*} Триптофан и цистеин не определяли.

^{4*} Определен как гомосерин.

смесью 5,7 н. HCl — 100% трифторуксусная кислота — вода в соотношении 1:1:1 [6] с добавкой 0,1% фенола при 150°С в течение 1,5 ч на анализаторе аминокислот (Biotronic LC-6000, ФРГ). Для превращения лактона гомосерина в гомосерин гидролизат обрабатывали 12 ч 2 М водным аммиаком.

N-Концевые аминокислотные остатки определяли ручной деградацией по Эдману [7]. Pth-производные аминокислот идентифицировали ВЭЖХ в изократическом варианте на колонке (0,46×25 см) Ultrasphere-ODS на жидкостном хроматографе фирмы Beckman (США), модель 344, при длине волны 269 нм. Элюент: 34% ацетонитрил — 6% тетрагидрофуран — 0,05 М ацетатный буфер, pH 5,4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радавский Ю. Л., Заикин А. А., Витер С. С., Турова И. П., Грама Д. П., Бобкова А. Ф., Гольдштейн М. Н., Ярекульг Л. В., Сыбер Ю. П., Саарма М. Ю. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 20–26.

2. Söber J., Järkekülg L., Toots I., Radavsky J., Villems R., Saarma M. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69. № 8. P. 1799–1806.
3. Морозов С. Ю., Захарьев В. М., Чернов Б. К., Прасолов В. С., Розлов Ю. В., Атабеков И. Г., Скрябин К. Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 271. № 1. С. 211–215.
4. Dixon H. B. F., Perham R. N. // Biochem. J. 1968. V. 109. № 2. P. 312–314.
5. Hospattakkar A. V. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 1. P. 318–322.
6. Tsugita A., Scheffler J. J. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 124. № 3. P. 585–588.
7. Tarr G. E. // Methods of Protein microcharacterization/Eds Shively J. E. Clifton N. Y. Humana Press Inc., 1986. P. 155–194.

Поступила в редакцию
5.XI.1988

**ANTIGENIC STRUCTURE OF THE POTATO VIRUS X COAT PROTEIN.
II. LOCALIZATION OF ANTIGENIC DETERMINANT(S)
AT THE N-TERMINUS OF THE PROTEIN**

RADAVSKY Yu. L., VITER S. S., TUROVA I. P., ZAITSEVA L. S.,
JÄRVEKÜLG L. V.*, SAARMA M. Ju.*, GREBENSHCHIKOV N. I.**, BARATOVA L. A.**

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

** Department of Molecular Genetics, Institute of Chemical Physics
and Biophysics, Academy of Sciences of the Estonian SSR, Tallinn;*

*** A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

Indirect ELISA data show that two monoclonal antibodies to potato virus X recognize one or two overlapping antigenic determinants at the NH₂-terminal region of the coat protein. Lysine-19 of the virus coat protein is required for the interaction with both monoclonal antibodies.