



УДК 577.112.083.3

© 1992 г.

Т. В. Швеи, Э. П. Козловская, А. Н. Филитов

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОТОКСИНОВ
ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
РАН, Владивосток

Получены поликлональные антитела к нейротоксину Rm-III из морской актинии *Radianthus macrodactylus*. Определены константы ингибирования гомологичными токсинами связывания Rm-III с антителами к нему. Установлено, что антигенная активность токсинов второго типа не только коррелирует со степенью гомологии, но и зависит от типа замен в аминокислотной последовательности. Расчетными методами показано, что антигенные детерминанты всех гомологов имеют идентичное расположение. Предполагается, что аминокислотные остатки в положениях 2, 11, 20, 28 и 46–48 входят в антигенные участки изученных токсинов.

Морские актинии продуцируют «длинные» полипептидные нейротоксины двух структурных типов [1], которые замедляют скорость инактивации натриевых каналов, увеличивая их время жизни в открытом состоянии [2, 3]. К первому типу относятся токсины семейства Actiniidae, ко второму — Stichodactylidae. Из анемотоксинов первого типа наиболее хорошо охарактеризованы полипептиды родов *Anemonia* [4] и *Anthopleura* [5, 6], из анемотоксинов второго типа — *Radianthus* и *Stichodactyla* [1, 7]. Токсины обоих типов состоят из 48–49 аминокислотных остатков и имеют три идентично расположенные дисульфидные связи [8]. Степень гомологии аминокислотной последовательности полипептидов первого и второго типов не превышает 40%. Различия между токсинами двух типов проявляются в суммарном заряде молекулы, способности связываться с рецептором и иммунохимическом поведении [9]. Сравнение первичной структуры АТХ I и АТХ II из *Anemonia sulcata* в сочетании с радиоиммунным анализом позволило получить информацию о локализации антигенных и рецепторных участков связывания для токсинов первого типа [10]. Иммунохимические свойства токсинов второго типа исследованы в значительно меньшей степени [7, 11].

В настоящей работе приводятся результаты по получению поликлональных антител (АТ) к нативному нейротоксину Rm-III из актинии *R. macrodactylus* [1] и их использованию в твердофазном иммуноферментном анализе с целью изучения антигенной гомологии нейротоксинов второго типа и определения аминокислотных остатков, входящих в антигенные детерминанты.

Для обнаружения антител в процессе иммунизации кроликов токсином Rm-III было выполнено несколько тестов. В реакции кольцепреципитации при концентрации IgG-фракции 1 мг/мл и Rm-III — 100 мкг/мл в течение 20 мин образовались четкие белые кольца преципитатов на границе раздела двух растворов; при последующих разведениях четкие линии получить не удалось. Иммуноферментное титрование и нейтрализационные тесты, проведенные с IgG-фракциями сывороток, показали, что значительное образование антител происходит в результате трехмесячной иммунизации (табл. 1).

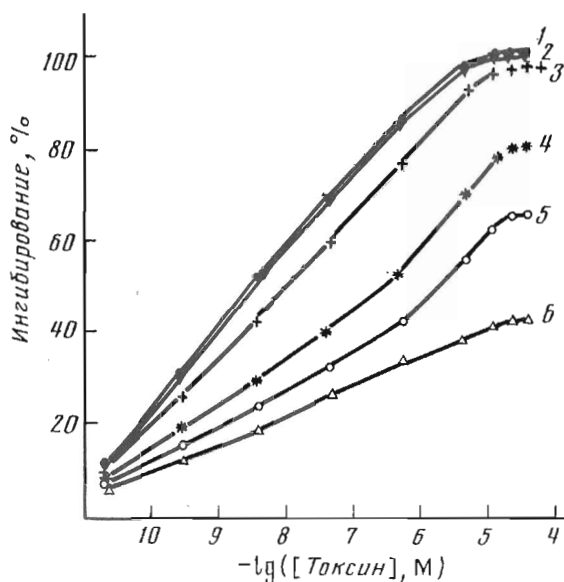


Рис. 1. Ингибирование тест-системы токсинами второго типа: Rm-III (1), Rm-IV (2), Rm-V (3), Rm-II (4), Rm-I (5), Sh-I (6)

Антитела к Rm-III, выделенные аффинной хроматографией с использованием иммуносорбента на основе токсина, связанного с сефарозой 4В, были использованы для твердофазного иммуоферментного анализа токсинов. Предварительно была подобрана тест-система: определены оптимальные концентрации Rm-III, иммобилизованного на планшете, и антител к нему при постоянном разведении конъюгата. Изменение концентрации Rm-III и антител от 0,1 до 5 мкг/мл показало, что 50% максимума оптического поглощения наблюдается при концентрации обоих компонентов 1 мкг/мл. На рис. 1 представлены кривые ингибирования гомологичными токсинами реакции связывания Rm-III с антителами к нему в подобранной тест-системе.

Нативный Rm-III связывает поликлональные антитела с I_{50} , равной $1,4 \cdot 10^{-9}$ М. Подобно Rm-III, токсины Rm-IV и Rm-V [1] имеют близкое сродство к антителам против Rm-III. Остальные токсины второго типа проявляют более низкое сродство к этим антителам (табл. 2).

В случае Rm-III – Rm-V максимальное ингибирование связывания Rm-III с антителами достигает 97–99%. Для токсинов Rm-I [12] и

Таблица 1

Оценка образования антител к токсину Rm-III в процессе иммунизации кроликов *

Исследуемый образец	Количество IgG-фракции, нейтрализующее 1 мкг Rm-III, мг	Имуноферментное титрование **		
		10	125	250
IgG { 1 мес 2 мес 3 мес	2,16±0,17	0,01	0,04	0,24
	2,0±0,053	0,05	0,08	0,28
	0,9±0,078	0,05	1,0	1,6
IgG неиммунизированных кроликов	100,0	0,04	0,04	0,05
Антитела к Rm-III	--	1,4	2,0	2,5

* Условия см. «Экспер. часть»; приведены средние значения, полученные при исследовании IgG-фракций, выделенных из сывороток трех параллельно иммунизированных кроликов.

** Приведено поглощение A_{492} при концентрации антител 10, 125 и 250 мкг/мл.

Некоторые биохимические и иммунохимические свойства токсинов второго типа

Токсины	Степень гомологии с Rm-III, % [1]	LD ₅₀ на мышах, мкг/кг	I ₅₀ *	
			мкг/мл	M
Rm-III	100	40	$(70 \pm 1,7) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,034) \cdot 10^{-9}$
Rm-IV	98	50	$(70 \pm 4,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,084) \cdot 10^{-9}$
Rm-V	96	350	$(120 \pm 8,4) \cdot 10^{-3}$	$(2,3 \pm 0,17) \cdot 10^{-8}$
Rm-II	76	1 650	$(40 \pm 1,2) \cdot 10^{-1}$	$(7,8 \pm 0,24) \cdot 10^{-7}$
Rm-I	74	3 000	20,0 ± 1,7	$(3,7 \pm 0,34) \cdot 10^{-6}$
Sh-I	88	15 000	—	—

* I₅₀ — концентрация, вызывающая 50% ингибирование. Условия реакции ингибирования см. «Экспер. часть». Приведены средние результаты, полученные из четырех параллельных опытов (каждое определение сделано дважды).

Таблица 3

Иммунохимические свойства токсинов *Radianthus* после их предварительной инкубации с антителами к Rm-III *

Токсин	Максимальное ингибирование, %		I ₅₀ гомолога/I ₅₀ Rm-III	
	до преинкубации	после преинкубации	до преинкубации	после преинкубации
Rm-III	99	99		1
Rm-IV	99	99	1	1
Rm-V	98	98	17	2
Rm-II	82	97	577	2
Rm-I	65	87	2857	10
Sh-I	40	98	—	2

* Преинкубации 18 ч (4° С) и 1,5 ч (37° С).

Rm-II [1], которые имеют меньшую степень гомологии аминокислотной последовательности с Rm-III, чем Rm-IV и Rm-V, процент максимального ингибирования значительно ниже, а в случае Sh-I из *S. helianthus* [13] составляет всего 40% (табл. 3). АТХ из *A. sulcata* [4, 10] и токсины I—IV из *Condylactis gigantea*, относящиеся к первому типу, не узнают антитела к Rm-III (результаты не приведены). Следует отметить, что мы не наблюдали строгой корреляции между степенью гомологии токсинов и их антигенной активностью (рис. 2, табл. 2). По-видимому, играет роль не только количество замен в аминокислотной последовательности полипептидов, но и их тип. Подобную картину наблюдали ранее Эйб и соавт. [15] у токсинов скорпионов.

Токсины Rm-I и Rm-II по сравнению с Rm-III имеют 16 и 19 замен аминокислотных остатков в последовательности соответственно (рис. 2). Степень гомологии этих токсинов друг относительно друга высока — 80%, но они значительно различаются по антигенным свойствам. Для достижения 50% ингибирования связывания Rm-III с антителами требуется в 5 раз большая концентрация Rm-I по сравнению с Rm-II (табл. 2). Максимальное ингибирование тест-системы в случае Rm-I составляет 65%, а в случае Rm-II — 82%. Одинаковые относительно Rm-III замены в положениях 8, 11, 16, 17, 20, 23, 24, 35, 36, 38 и 42 должны были вносить одинаковый вклад в антигенные свойства токсинов, если бы они входили в их антигенные детерминанты. По-видимому, не оказывают значительного влияния на антигенные свойства и замены в

	1	10	20	30	40																																				
Rm-I	AS	CKCDD	GP	DVRS	A	T	F	T	G	T	V	D	F	A	Y	C	N	A	G	W	E	K	C	L	A	V	Y	T	P	V	A	S	C	C	R	K	K	K			
Rm-II	GT	CKCDD	GP	DV	R	S	A	T	F	T	G	S	I	E	F	A	N	C	N	E	S	W	E	K	C	L	A	V	Y	T	P	V	A	S	C	C	R	K	K	K	
Rm-III	GN	CKCDD	E	GP	Y	V	R	T	A	P	L	T	G	Y	V	D	L	G	C	N	E	G	W	E	K	C	A	S	Y	S	P	I	A	E	C	C	R	K	K	K	
Rm-IV	GN	CKCDD	E	GP	N	V	R	T	A	P	L	T	G	Y	V	D	L	G	C	N	E	G	W	E	K	C	A	S	Y	S	P	I	A	E	C	C	R	K	K	K	
Rm-V	GN	CKCDD	E	GP	N	V	R	T	A	P	L	T	G	Y	V	D	L	G	C	N	E	G	W	D	K	C	A	S	Y	S	P	I	A	E	C	C	R	K	K		
Rp-II	AS	CKCDD	D	GP	D	V	R	S	A	T	F	T	G	T	V	D	F	W	N	C	N	E	G	W	E	K	T	A	V	Y	T	P	V	A	S	C	C	R	K	K	K
Rp-III	GN	CKCDD	E	GP	N	V	R	T	A	P	L	T	G	Y	V	D	L	G	C	N	E	G	W	E	K	C	A	S	Y	S	P	I	A	E	C	C	R	K	K	K	
Sh-I	AA	CKCDD	E	GP	D	L	R	T	A	P	L	T	G	T	V	D	L	G	S	C	N	A	G	W	E	K	C	A	S	Y	T	I	A	D	C	C	R	K	K	K	

Рис. 2. Аминокислотные последовательности нейротоксинов морских анемон: Rm-I [12], Rm-II – Rm-V [1] – *R. macrodactylus*, Rp-II [7], Rp-III [14] – *R. paumotensis*, Sh-I [13] – *S. helianthus*. В рамки взяты гомологичные последовательности

положениях 21, 22, 25, 39 и 40, индивидуальные для Rm-II. Наиболее вероятное объяснение различий в антигенных свойствах этих токсинов — замена глутаминовая кислота-28 → аланин-28 [1, 12], обуславливающая значительное уменьшение гидрофильности Rm-I по сравнению с Rm-II – Rm-V. Идентичная замена имеет место и в аминокислотной последовательности Sh-I, который проявляет еще более низкое сродство с антителами к Rm-III, чем Rm-I. В пользу выказанного предположения свидетельствует также тот факт, что у всех токсинов второго типа остаток 28 входит в β -изгиб, образованный остатками 27–30 [11, 13, 16, 17]. Ранее наличие антигенного участка в области β -поворота было установлено для α -токсинов скорпионов, которые оказывают аналогичный фармакологический эффект [18].

При анализе биологических свойств и сравнении аминокислотных последовательностей токсинов второго типа нельзя не обратить внимание на остатки в положениях 2 и 20 (рис. 2, табл. 2). Эти остатки пространственно сближены и расположены в области β -выпуклости, образованной остатками 18 и 19 у всех изученных анемонотоксинов [16]. В положении 19 все полипептиды имеют остаток глицина, которому всегда предшествует остаток треонина или серина. Однако наблюдается большая вариабельность остатков в положении, следующем за ним. Так, Rm-III – Rm-V и Rp-III из *R. paumotensis* [14], у которых в положении 20 находится остаток тирозина, а в положении 2 – аспарагина, имеют близкие антигенные свойства и проявляют высокую токсичность для мышей (табл. 2).

Токсины Rm-I и Rm-II [7] и Sh-I, имеющие в этих положениях треонин или серин, значительно отличаются по антигенным свойствам от токсинов Rm-III – Rm-V и менее токсичны для мышей (табл. 2).

Сравнение вторичных структур Rp-II и Rp-III выявило некоторые различия в их пространственной структуре: N-концевой стренд β -структуры в случае Rp-III заметно смещен относительно соседнего стренда [13, 16].

Анализ антигенных свойств гомологичных токсинов и сравнение их аминокислотных последовательностей позволяют определять наиболее вероятное расположение антигенных участков. Для определения потенциальных антигенных детерминант наиболее часто используют методы анализа гидрофильных участков белковой цепи, локализации экспониро-

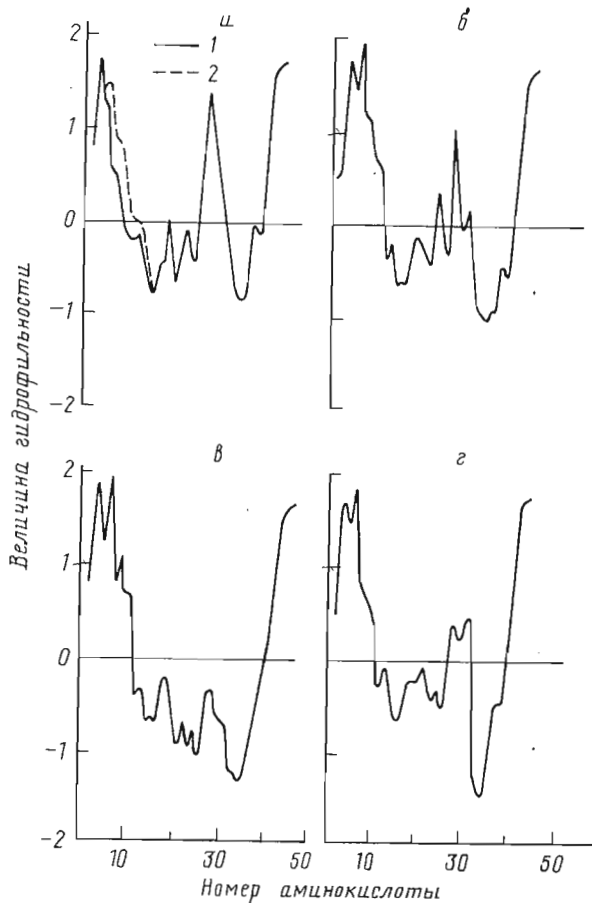


Рис. 3. Профили гидрофильности нейротоксина Rm-III и его гомологов, рассчитанные по усредненным коэффициентам гексапептидных фрагментов [19]: а – Rm-III (1) и Rm-IV – Rm-V (2) (важная с Pro-16 их профили идентичны профилю для Rm-III), б – Rm-II, в – Rm-I, г – Sh-I

ванных, подвижных участков и методы предсказания участков, содержащих β -изгибы и α -спирали [16, 19, 20].

Согласно Хоппу и Вудсу [19], для *Radianthus*-токсинов можно выделить три области повышенной гидрофильности, расположенные аналогичным образом для всех изученных полипептидов, за исключением Rm-I: N-концевую, содержащую аминокислотные остатки в положениях 4–11; C-концевую, в которую входят аминокислотные остатки в положениях 40–48, и среднюю область, включающую в себя аминокислотные остатки 26–31 (рис. 3), которая отсутствует в случае Rm-I.

Высокогомологичные токсины Rm-III – Rm-V имеют практически одинаковую картину гидрофильности аминокислотных последовательностей (рис. 3) и близкие антигенные свойства (табл. 2). В результате единственной замены тирозин-11 → аспарагин-11 у Rm-IV наблюдается незначительное повышение гидрофильности в этой области (рис. 3) и его антигенные свойства по сравнению с Rm-III практически не изменяются. В токсине Rm-V имеется аналогичная замена в положении 11, вторая замена (глутаминовая кислота-31 → аспарагиновая кислота-31) консервативна, поэтому изменение антигенных свойств Rm-V можно объяснить

либо значительным уменьшением гидрофильности на С-конце, обусловленным отсутствием лизина-48 и включением этого участка в антигенную детерминанту, либо совместным влиянием на изменение антигенных свойств замены в положении 11 и отсутствием лизина-48.

Сопоставление антигенной активности токсинов второго типа и гидрофильности их аминокислотных последовательностей позволяет с большой долей вероятности говорить об идентичном расположении антигенных детерминант в структурах всех исследованных токсинов. Можно предположить, что антигенные участки токсинов второго типа содержат остатки в положениях 2, 11, 20, 28 и 46–48 [21]. Ранее [10] было обнаружено, что в антигенную область токсинов первого типа входят остатки аспарагина-7 (или-9) и глутамина-47.

По-видимому, часть антигенных детерминант полипептидных нейротоксинов, модифицирующих воротное устройство натриевого канала, расположена в идентичных районах β -поворотов, образованных остатками 27–30 у токсинов морских анемонов и 32–35 у α -токсинов скорпионов в N- и С-концевых участках молекулы.

Для достижения полноты ингибирования была проведена преинкубация последовательных разведений антигена-конкурента с антителами к Rm-III в течение 18 ч при 4°С и 1,5 ч при 37°С. Предварительная инкубация отразилась на результатах анализа. У всех гомологов Rm-III, включая и Sh-I, величина максимального ингибирования достигала 87–99%, практически приближаясь к максимальному значению для Rm-III – Rm-V. I_{50} гомологов также приблизилась к I_{50} Rm-III (табл. 3). Сравнение результатов двух экспериментов позволяет говорить о наличии в аминокислотных последовательностях токсинов второго типа участков «быстро» узнаваемых антителами к Rm-III, и участков, на взаимодействие с которыми требуется более длительное время (по аналогии с «быстро» и «медленно» реагирующими антителами [22]), т. е. сначала антитела к Rm-III узнают область полипептидной цепи гомологов, близкую иммуногенной области Rm-III. Это можно объяснить наличием в токсинах с меньшей степенью гомологии замен, влияющих на некоторое изменение их конформации. Тот факт, что в результате более длительного взаимодействия гомологов с антителами к Rm-III значения I_{50} и максимального ингибирования становятся близкими аналогичным значениям для Rm-III, является дополнительным доказательством того, что антигенные детерминанты всех изученных токсинов второго типа тождественны.

Экспериментальная часть

В работе использовали полный адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), бычий сывороточный альбумин (Technicon, Бельгия), бромциан (Serva, ФРГ), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция). Остальные реактивы отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Анемонотоксины выделены с помощью гидрофобной хроматографии на полихrome I, последующей очистки активной фракции на Bio-Rex-70 и выделении пептидов на SP-сефадексе K-25 по методу [23]. Rm-I–Rm-V выделены из актинии *R. macrodactylus*, Sh-I – из *S. helianthus*, токсины I–IV – из *Condylactis gigantea*. Их гомогенность была доказана ВЭЖХ на колонке Zorbax C₈ (4,6×250 мм) в 27% ацетонитриле в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6,5 (при скорости 1 мл/мин), аминокислотным анализом и анализом N-концевой аминокислоты [24]. Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе Biotronic 2000 после гидролиза образцов 6 н. HCl в течение 24 ч при 108°С. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [25] и спектрофотометрически при 280 нм. Летальную дозу

(LD₅₀) определяли внутрибрюшинной инъекцией препаратов беспородным белым мышам по методу [26]. Токсин АТХ II любезно предоставлен д-ром Л. Берешем (Institute für Meereskunde, Universität Kiel, Federal Republic of Germany).

Иммунизация кроликов. Инъекции токсина в физиологическом растворе (ФР) выполнялись еженедельно внутримышечно с равными объемами полного адъюванта Фрейнда и внутривенно. За одну инъекцию внутривенно вводилось по 10 мкг Rm-III в 0,1 мл ФР. Количество токсина, вводимое внутримышечно, постепенно увеличивалось от 40 до 140 мкг/мл в 0,2 мл ФР. В результате 3-месячной иммунизации каждому из трех кроликов введено по 2,5 мг токсина. Отбор крови проводили на 7-е сут после инъекции. IgG-фракции получены 2-кратным осаждением 40% сульфатом аммония.

Реакция коацерпепитации выполнена по методу [27]. Концентрация токсина составляла 100 мкг/20 мкл, сыворотки — 20 мкл.

Нейтрализационные тесты, выполненные по методу [28], были проведены с фракциями IgG, полученными из сыворотки каждого кролика отдельно. Навески фракций IgG растворяли в 1 мл ФР и аликвоты по 0,5 мл последовательно разбавляли равным объемом ФР. К каждому разведению добавляли 1 мкг Rm-III в 0,1 мл ФР. Растворы инкубировали 1 ч при 37° С и вводили мышам. Токсин с нормальным IgG кроликов и токсин без IgG инкубировали в аналогичных условиях. Титры нейтрализации выражали в количестве мг IgG-фракции, нейтрализующей 1 мкг токсина.

Получение иммуносорбента BrCN-сефароза 4B-Rm-III и выделение антител проводили по методу [29]. Количество токсина, связавшегося с сефарозой 4B, составляло 95% от введенного в реакцию. На колонку с 5 мл иммуносорбента наносили 50 мг объединенных IgG-фракций в 5 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,15 М NaCl, при 4° С, выдерживали 2 ч, отмывали от неспецифически связавшихся белков этим буфером, затем 0,3 М NaCl, содержащим 1% Тритона X-100. Полноту отмывания контролировали измерением поглощения при 280 нм и определением белка по Лоури. Антитела элюировали 0,1 М CH₃COOH, диализовали и концентрировали, гомогенность проверяли электрофорезом в ПААГ.

При постановке *иммуноферментного анализа* использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций с 96 лунками (Dynatech, Швейцария). Применяли непрямой вариант конкурентного метода с использованием в качестве видовых антител коммерческих иммуноферментных конъюгатов производства НИИ эпидемиологии им. Гамалеи (Москва).

Иммуноферментное титрование. По 0,2 мл раствора токсина с концентрацией 4 мкг/мл в 0,01 М NaHCO₃ (буфер А) сорбировали на поверхности лунок в течение 18 ч при 4° С. Планшеты промывали 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,1% Твин-20 (буфер Б), и водой. Аналогичное отмывание проводилось после каждого этапа анализа. Пассирование планшета выполняли 0,3% раствором бычьего сывороточного альбумина в буфере Б в течение 1 ч при 37° С. После этого в лунки вносили по 0,2 мл раствора антител в буфере Б в последовательных разведениях. Планшеты инкубировали 1,5 ч при 37° С, затем в тщательно отмытые от несвязавшихся компонентов лунки добавляли по 0,2 мл конъюгата, разбавленного в 250 раз буфером Б, и планшеты инкубировали 1,5 ч при 37° С. Планшеты промывали и в лунки добавляли по 0,2 мл раствора О-фенилендиамина (0,4 мг/мл) и 0,006% H₂O₂ в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере. Через 20 мин реакцию останавливали 1 М H₂SO₄ и фиксировали поглощение на спектрофотометре Multiscan plus.

(Финляндия) при 492 нм. В качестве контроля использовали реакционную смесь без добавления токсина.

Тест-система. По 0,2 мл раствора с уменьшающейся концентрацией в буфере А сорбировали на поверхности лунок в течение 18 ч при 4° С. Планшеты промывали и пассировали как описано выше. Затем в лунки с адсорбированным токсином добавляли по 0,2 мл раствора антител в буфере Б в уменьшающейся концентрации и планшеты инкубировали 1,5 ч при 37° С. После этого анализ проводили как описано выше.

Реакция ингибирования. По 0,2 мл раствора Rm-III в буфере А с концентрацией 1 мкг/мл инкубировали в лунках в течение 18 ч при 4° С. Промывание и пассирование выполняли как описано выше. Затем в лунки вносили по 0,1 мл раствора антител с концентрацией 1 мкг/мл и 0,1 мл растворов ингибиторов в буфере Б в уменьшающихся концентрациях. Планшеты инкубировали 1,5 ч при 37° С. Дальнейший ход анализа приведен при описании иммуноферментного титрования. Расчет ингибирования (в процентах) проводили по формуле

$$\frac{A - A_1}{A} \cdot 100\%$$

где A_1 и A — поглощение (λ 492), полученное при взаимодействии иммобилизованного Rm-III с антителами в присутствии ингибитора и в его отсутствие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1489–1494.
2. Catterall W. A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1980. V. 20. P. 15–43.
3. Сорокина Э. А., Чижмаков И. В., Еляков Г. Б., Козловская Э. П., Вожжова Е. И. // Физиол. журн. 1984. Т. 30. № 5. С. 571–579.
4. Beress L. // Pure Appl. Chem. 1982. V. 54. № 10. P. 1981–1984.
5. Reiner N. S., Yasunobu C. L., Yasunobu K. T., Norton T. R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 15. P. 8690–8693.
6. Sunahara S., Muramoto K., Tenma K., Kaniya H. // Toxicol. 1987. V. 25. № 2. P. 211–214.
7. Schweitz H., Bidard J. N., Fretin C., Pauron D., Vijverberg H. P. M., Mahasneh D. M., Lazdunski M. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3554–3561.
8. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 904–907.
9. Odnokov S. E., Nabiulin A. A., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. // Pure Appl. Chem. 1983. V. 61. № 3. P. 497–500.
10. El Ayeub M., Bahraoui E. M., Granier C., Beress L., Rochat H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6755–6761.
11. Kem W. R., Parten B., Pennington M. W., Price D. A., Dunn B. M. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 8. P. 3483–3489.
12. Зыкова Т. А., Козловская Э. П. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1301–1306.
13. Kem W. R., Norton R. S. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 4. P. 1826–1834.
14. Mettrione R. M., Schweitz H., Walsh K. A. // FEBS Lett. 1987. V. 218. № 1. P. 59–62.
15. El Ayeub M., Delori P., Rochat H. // Toxicol. 1983. V. 21. № 5. P. 709–716.
16. Pease S. H. B., Kumar N. V., Schweitz H., Kallenbach N. R., Wemmer D. E. // Biochemistry. 1989. V. 38. № 5. P. 2199–2204.
17. Wemmer D. E., Kumar N. V., Mettrione R. M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N. R. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6842–6849.
18. El Ayeub M., Bahraoui E., Granier C., Rochat H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 21. P. 6671–6678.
19. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824–3828.
20. Bahraoui E., El Ayeub M., Van Reitschoten J., Rochat H., Granier C. // Mol. Immunol. 1986. V. 23. № 4. P. 357–366.
21. Shvets T. V., Kozlovskaya E. P. // 8th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Abstr. Yugoslavia. 1989. P. 46.
22. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // Mol. Immunol. 1984. V. 21. № 7. P. 673–677.

23. Зыкова Т. А. Исследование первичной структуры биологически активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*. Дис. канд. хим. наук. Владивосток: ТИВОХ, 1986.
24. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 139-151.
25. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265-275.
26. Miranda F., Kupryan C., Rochat C., Lissitzky S. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 16. P. 514-523.
27. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами. М.: Наука, 1983. С. 81-154.
28. Mohamed A. H., Darwish M. A., Hani-Ayobe M. // Toxicon. 1974. V. 12. P. 509-601.
29. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987. С. 427-432.

Поступила в редакцию
5.VI.1991

После доработки
27.IX.1991

T. V. SHVETS, E. P. KOZLOVSKAYA, A. N. FILITOV

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF NEUROTOXINS FROM SEA ANEMONE RADIANTHUS MACRODACTYLUS

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok

Polyclonal antibodies to neurotoxin Rm-III from sea anemone *Radianthus macrodactylus* have been obtained. Constants of inhibition of the Rm-III binding to its antibodies by the homologous toxins have been determined. Antigenic activity of the second type toxins is shown to depend not only on the degree of homology but also on the type of substitution in the amino acid sequence. As shown by the calculation methods, the antigenic determinants of all the homologues have similar positions. Amino acid residues at positions 2, 11, 20, 28, and 46-48 seem to be included into the antigenic sites of the toxins studied.