



УДК 576.858.097.2

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЛИКОПЕПТИДА,  
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА  
СЫВОРОТОЧНОГО ГЕПАТИТА***Карелин В. П.**Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Академии медицинских наук СССР,  
Москва*

Обработка очищенных 22-нм структур поверхностного антигена вируса гепатита (HBsAg) пропаной в присутствии додецилсульфата натрия приводила к появлению низкомолекулярных фрагментов, содержащих группоспецифическую (*a*) антигенную детерминанту. По размеру и подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле выделенный материал соответствовал глобулярным белкам с  $M < 12\,000$  и отличался от HBsAg по изоэлектрической точке и поглощению в ультрафиолетовой части спектра. Выделенный антиген инактивировался после обработки нейраминидазой. Агрегаты выделенного гликопептида были иммуногенными для морских свинок. Имунные сыворотки содержали антитела против *a*- и *y*-специфичностей HBsAg. Обсуждается возможность использования в качестве вакцин минимальных структур, несущих протективные антигенные детерминанты HBsAg.

Частицы Дейна [1] — сферические структуры диаметром 42 нм, имеющие наружную оболочку и внутренний нуклеоид, содержащий ДНК, являются, вероятно, вирионами вируса сывороточного гепатита типа В. Вирионы имеют сложную антигенную структуру. Две основные антигенные системы связаны с различными субструктурами частиц: с поверхностным антигеном (HBsAg) и внутренним нуклеоидом (HBcAg). В крови больных и доноров-носителей HBsAg накапливается в свободном состоянии в виде сферических и палочкообразных структур с диаметром 22 нм до концентраций, сравнимых с концентрациями некоторых белков нормальной плазмы человека. Эта особенность позволяет получать очищенный HBsAg из крови людей в препаративных количествах (см., например, [2]).

Структурная организация и антигенная архитектура HBsAg в свою очередь сложны. В составе очищенных структур обнаруживали 7–9 полипептидов с  $M\ 22\,000$ – $90\,000$  и ряд антигенных специфичностей: групповую *a*, главные субтипные в аллелях *y/d* и *w/r*, а также значительное количество дополнительных. Как групповая, так и главные субтипные антигенные детерминанты присутствуют во всех структурных полипептидах HBsAg, включая низкомолекулярные [3]. Главная групповая антигенная специфичность (*a*Ag) является протективной. Изучение отдельных антигенных детерминант, особенно протективных, важно не только с теоретической, но и с практической точки зрения. Большинство предлагаемых в настоящее время вакцин приготовлено из очищенных структур HBsAg, выделенных из человеческой плазмы крови (см., например, [4]). Такие субъединичные вакцины представляют собой препарат крови людей со всеми вытекающими отсюда следствиями и ограничениями. Другое серье-

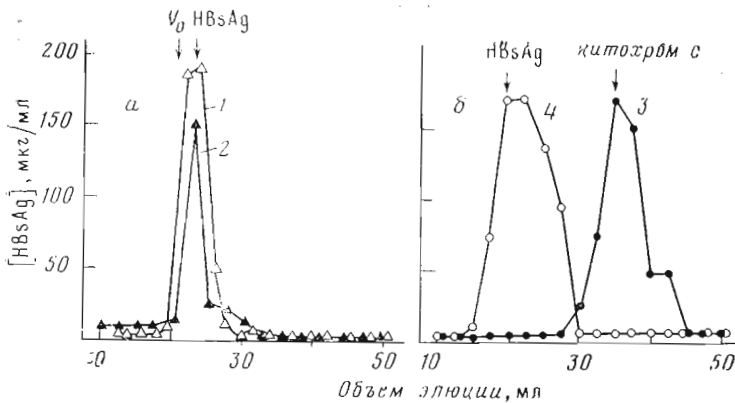


Рис. 1. Гель-фильтрация на биогелях А5м (а) и А0,5м (б) антигена НВsАg после обработок: 1—1% SDS (1 ч, 37° С); 2—1% проназой (16 ч, 37° С); 3—1% SDS и 0,1% проназой (16 ч, 37° С), фракционирование в присутствии 0,05% SDS (фракции объема элюции 30—40 мл — препарат I); 4—повторная фильтрация без SDS препарата I (фракции объема элюции 15—20 мл — препарат II). Стрелками отмечены  $V_0$  и объемы элюции маркеров (НВsАg, цитохром с)

езное препятствие — оценка наиболее ответственного качества вакцины, ее безвредности, трудная задача для вирусологов и врачей, не имеющих адекватных экспериментальных систем для обнаружения вируса. Очевидно, что использование для специфической профилактики сывороточного гепатита вакцин из минимальных иммуногенных структур, обладающих специфичностью *aAg*, более целесообразно, чем вакцин из 22-нм структур или из полипептидов НВsАg.

Выделим два подхода к решению проблемы получения моноклеточных вакцин из *aAg*: первый — анализ структуры пептида, определяющего *a*-специфичность и его последующий синтез; второй — использование методов геной инженерии для биосинтеза *aAg* в бактериальных системах [5]. Для каждого из подходов важное значение имеют данные о структуре и закономерностях организации антигенной детерминанты *a*.

Гликопептид, содержащий *aAg*, был выделен в нескольких лабораториях [6—8]. В настоящей работе представлены данные о некоторых физико-химических и иммунологических свойствах гликопептида, полученного в результате протеолитического расщепления НВsАg.

Предварительно было установлено, что инкубация НВsАg с додецилсульфатом натрия (SDS) или проназой по отдельности не изменяла объем его элюции с биогеля А5м (рис. 1, 1, 2). Обработка проназой в присутствии SDS приводила к смещению антигенной активности при гель-фильтрации на биогеле А0,5м в зону элюции цитохрома с (рис. 1, 3, объем элюции 30—40 мл, препарат I). Количество антигена во фракциях определяли методом ракетно-линейного иммуноэлектрофореза (см. ниже).

При электрофорезе в SDS-полиакриламидном геле материала, выделенного аналогичным способом из меченого [ $^{125}$ I]НВsАg, обнаруживалась одна зона радиоактивности в области геля, соответствующей глобулярным белкам с  $M < 12\,000$  (рис. 2Б).

В составе исходного НВsАg обнаруживается 6—9 полипептидов [3], из которых 3 (р70, рр 26, р22) являются основными (рис. 2А). Из рис. 2Б видно, что в использованных условиях протеолитического расщепления в зоне, соответствующей белкам с  $M > 12\,000$ , кислотонерастворимой метки не обнаруживается.

Препарат I в иммунохимических тестах вел себя как моноклеточная, гаптеноподобная структура. С ним не удавалось получить линий преципитации в реакции Оухтерлона или при ракетном иммуноэлектро-

форезе препаратов в антительном слое. Однако в тестах, основанных на реакции ингибции (радиоиммунологический анализ или ракетно-линейный иммуноэлектрофорез), материал мог быть количественно проанализирован.

При анализе препарата I ракетно-линейным иммуноэлектрофорезом с последующей автордиографией видно (рис. 3), что грани и вершины «ракет» отличались у необработанного HBsAg и обработанного антигена, где «ракеты» формировались за счет [ $^{125}$ I] HBsAg из антигенного блока.

Радиоиммунологический анализ (рис. 4) показал, что препарат I одинаково конкурирует в гомологичной (*ay*) и гетерологичной (*a*) системах; не конкурирует или слабо конкурирует по *y*-детерминанту. Содержание *y*-специфичности по отношению к *a* Ag в препарате I уменьшилось на 70–75% по сравнению с нативным HBsAg (рис. 4, I).

Если препарат I подвергали повторной гель-фильтрации на биогеле А0,5m в том же буферном растворе, не содержащем SDS, то пик антигенной активности смещался из объема элюции цитохрома *c* в нулевой объем (рис. 1, 4, объем элюции 15–20 мл, препарат II).

При электронной микроскопии препарата I не удавалось обнаружить каких-либо структур. Однако после удаления SDS в препарате II обнаруживались полиморфные структуры, имеющие склонность к агрегации (рис. 5б). При анализе аналогичных структур препарата II, выделенных из [ $^{125}$ I] HBsAg, в SDS-полиакриламидном геле (рис. 2B) получали одну зону радиоактивности в области, соответствующей неагрегированному антигену.

Агрегаты *a*Ag (препарат II) до некоторой степени восстанавливали свойства полидетерминантной антигенной структуры: образовывали линию преципитации в реакции преципитации в геле, могли быть обнаружены при ракетном иммуноэлектрофорезе. Количественные соотношения *a*- и *y*-антигенных специфичностей не отличались от таковых для неагрегированных препаратов (см. рис. 4). Агрегаты оказались иммуногенными для морских свинок и мышей. В пересчете на единицы антигенной активности, которые определяли в количественных иммунохимических тестах, иммуногенность агрегированного материала примерно соответствовала таковой для очищенных структур HBsAg. Полученные иммунные сыворотки содержали антитела против *a*- и *y*-антигенных детерминант, но в отличие от антисывороток к HBsAg не содержали антител против антигенов нормальной плазмы человека.

После прогревания в течение 5 мин при 98° С *a*Ag (препараты I и II) сохранял не менее 50% активности и по термостабильности, вероятно, существенно не отличался от HBsAg [9].

После обработки препарата II нейраминидазой холерного вибриона и вируса гриппа PR8 инактивировалось 75–85% антигенной активности в препаратах (рис. 6), что соответствует данным других авторов [6]. От упомянутых исследований наша работа отличалась тем, что использован-

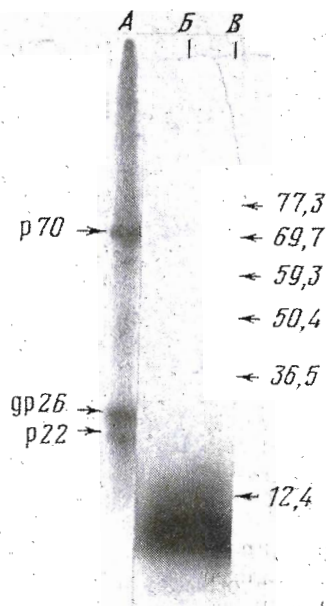


Рис. 2. Радиоавтограмма электрофореза в полиакриламидном геле выделенных при гель-фильтрации антигенных фрагментов HBsAg: А — [ $^{125}$ I] HBsAg (p70, p26, p22 — основные структурные полипептиды); В — [ $^{125}$ I] препарат I (см. рис. 1, 3); В — [ $^{125}$ I] препарат II (рис. 1, 4). Указано положение и молекулярный вес ( $M \cdot 10^{-3}$ ) маркерных белков

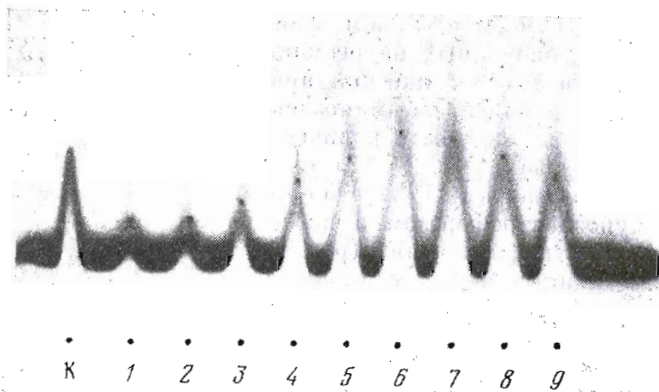


Рис. 3. Радиоавтограмма ракетно-линейного иммуноэлектрофореза нативного HBsAg, 4 мкг/мл (к) и фракций (1—9) препарата I (рис. 1, 3). Стрелкой указана фракция, соответствующая объему элюции цитохрома с

ная нейраминидаза не содержала гликозидаз иной специфичности. Это позволило высказать предположение о вероятном участии концевой нейраминовой кислоты в формировании  $\alpha$ -антигенной детерминанты выделенного гликопептида.

При изоэлектрофокусировке исследуемый антиген (препарат II) имел  $pI$  3,5—3,7 (HBsAg имеет  $pI$  4,5). Можно предполагать, что обработка HBsAg проназой увеличивает относительное содержание сахаров в гликопептидных структурах, сохраняющих антигенность. Следствием такой модификации могло быть, в частности, возрастание относительного содержания нейраминовой кислоты. Это в свою очередь должно сопровождаться увеличением суммарного отрицательного заряда анализируемых структур, что мы и наблюдаем при изоэлектрофокусировке.

Другим указанием на существенное изменение физико-химических свойств полученных структур было изменение поглощения при 280 нм. В спектре HBsAg имеется пик абсорбции при 280 нм, отчетливо выраженный на фоне абсорбции при 210 нм. Поглощение выделенного гликопептида при 280 нм по сравнению с HBsAg существенно менее выражено и неопределимо на фоне абсорбции при 210 нм.

Таким образом, выделенный гликопептид отличался от HBsAg по спектрам поглощения и изоэлектрической точке. По размерам и электрофоретической подвижности в SDS-полиакриламидном геле он соответствовал глобулярным белкам с  $M < 12\,000$ . Гликопептид содержал группоспецифическую антигенную детерминанту  $\alpha$ . Основная субтиповая специфичность у сохранилась менее чем на 30%. Антиген был устойчив к прогреванию, но инактивировался после обработки нейраминидазой. На основании полученных данных мы полагаем, что выделенный материал представляет собой гликопептид (gp12), несущий специфичность  $\alpha Ag$ .

Мы предполагаем, что в формировании антигенной детерминанты  $\alpha$  участвует полисахаридная цепь gp12 или по крайней мере концевая нейраминовая кислота. Отметим, что в нативных структурах HBsAg нейраминовая кислота может быть удалена без существенного нарушения антигенности. Очевидно, что специфичность  $\alpha Ag$  определяется пептидным кором gp12. В пользу этого, в частности, свидетельствует то, что идентичная антигенная специфичность присутствует в негликозилированном структурном полипептиде (p22) HBsAg [3]. Полисахаридная цепь в составе gp12, возможно, выполняет функции фактора, удерживающего пептидный кор в определенном конформационном состоянии. Сравнительный иммунохимический анализ  $\alpha$ -детерминанты в составе пептидного кора gp12 и p22, а также последующее определение аминокислотных последовательно-

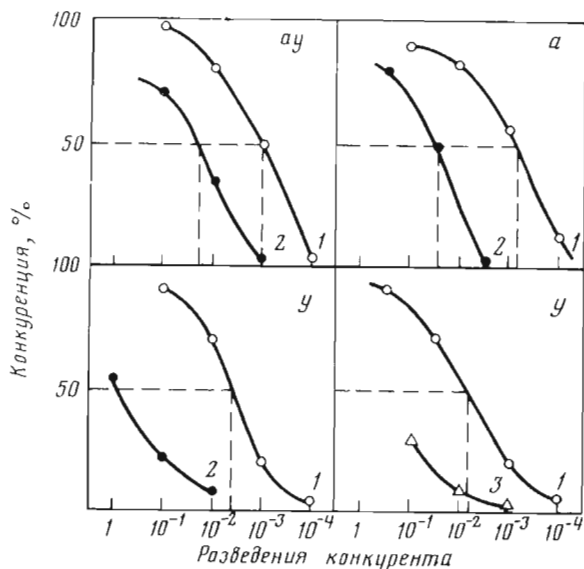


Рис. 4. Конкурентный радиоиммунологический анализ выделенного антигенного фрагмента HBsAg в гомологичных (ay, y) и гетерологичной (a) системах: ay — анти-HBs против субтипа ay (анти-HBs<sup>ay</sup>), [<sup>125</sup>I]HBsAg<sup>ay</sup>; y — анти-HBs<sup>y</sup>, [<sup>125</sup>I]HBsAg<sup>ay</sup>. a — анти-HBs<sup>ay</sup> [<sup>125</sup>I]HBsAg<sup>ad</sup>. Конкуренты: 1 — HBsAg<sup>ay</sup>; 2 — антигенный продукт протеолитического расщепления HBsAg<sup>ay</sup> (препарат I, II); 3 — HBsAg<sup>ad</sup>

стей, определяющих aAg в полипептидной цепи p22, представляется весьма перспективным для выяснения закономерностей формирования антигенной детерминанты a, которая, вероятно, является конформационной.

#### Экспериментальная часть

**Очистка HBsAg.** Исходным материалом служили плазмы доноров-носителей с содержанием HBsAg 100 мкг/мл и более. Подробно методика описана ранее [2]. Плазму дефибриновали, высаливали 10% полиэтиленгликолем-6000 (Serva, ФРГ), осаждали в ультрацентрифуге, фракционировали на колонках с биогелями А5m и А50m и центрифугировали в преформированных градиентах плотности CsCl. Содержание антигена определяли в количественных иммунохимических тестах (см. ниже) и по поглощению, принимая  $E_{280}^{1\%}$  37,9.

**Иодирование HBsAg** проводили по методу [10] в модификации, подробно описанной ранее [11]. Препарат содержал 90–95% кислоторастворимой метки с удельной радиоактивностью около  $10^8$  имп/мин на 1 мкг белка. Специфическое осаждение у различных антигенов колебалось от 45 до 85%.

**Обработка проназой.** Использовали проназу (B grade, Calbiochem, США). Из лиофилизованного препарата готовили 5% раствор, который инкубировали 2 ч при 37°С для удаления иной ферментативной активности. Протеолитическую активность оценивали по способности проназы (0,1%, 37°С, 2 ч) переводить в кислоторастворимую фракцию более 85% радиоактивности меченного <sup>125</sup>I сывороточного альбумина человека.

Препараты HBsAg обрабатывали 0,1% проназой в присутствии 1% SDS при 37°С. В предварительных опытах HBsAg инкубировали в тех же условиях с 1% проназой и 1% SDS по отдельности. Смеси после инкубации фракционировали на колонках А0,5m (в предварительных опытах — А5m), уравновешенных ТЕН-буфером (0,01 М трис-НCl, pH 7,4; 0,001 М EDTA; 0,14 М NaCl), содержащим 0,05% SDS. После гель-фильтрации фракции, содержащие антигенную активность, объединяли и вновь инкубировали при 37°С в течение ночи для самопереваривания остаточной протеолитической активности.

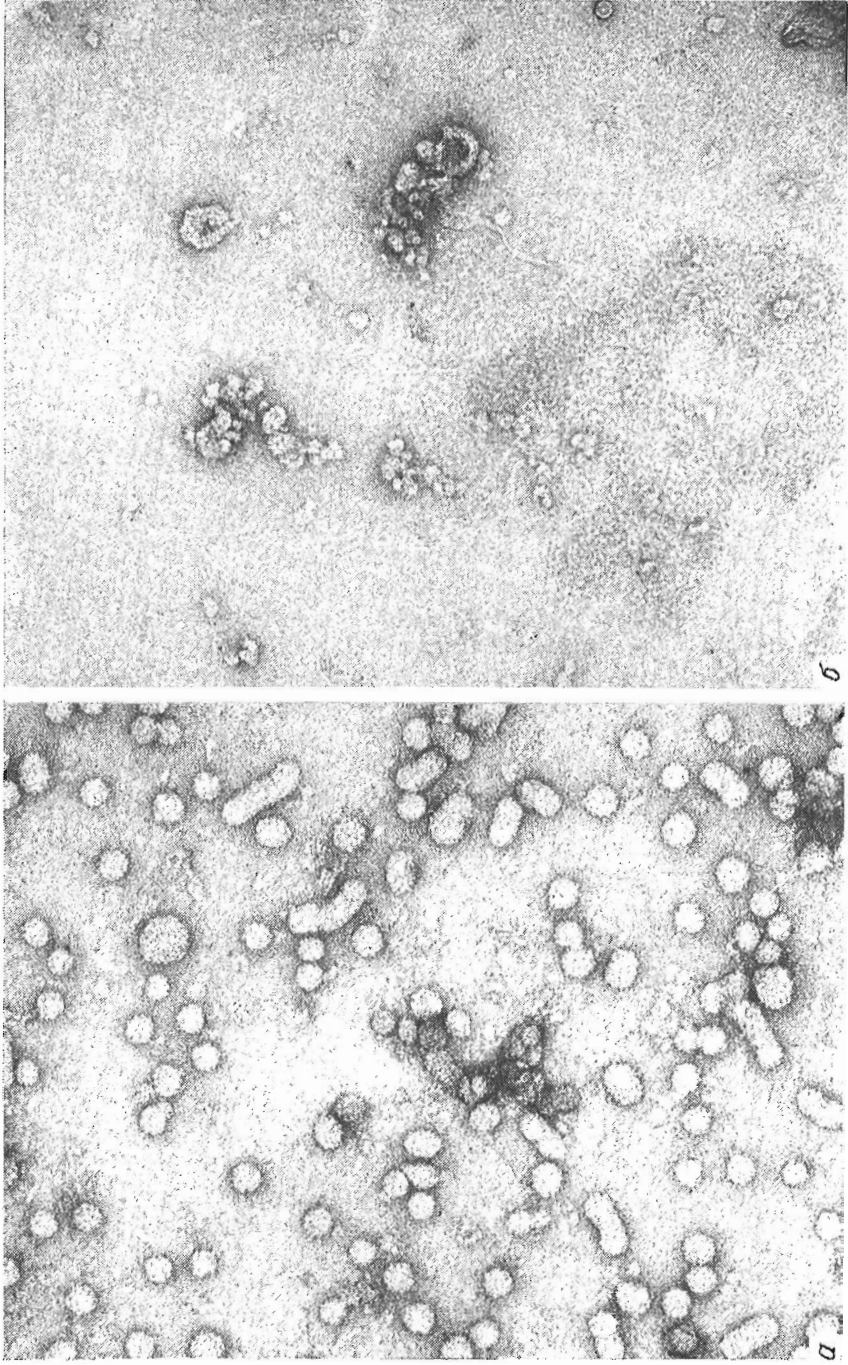


Рис. 5. Электронная микрофотография структур HBsAg (а) и препарата II (б) (см рис. 1, 4). Увеличение 150 000

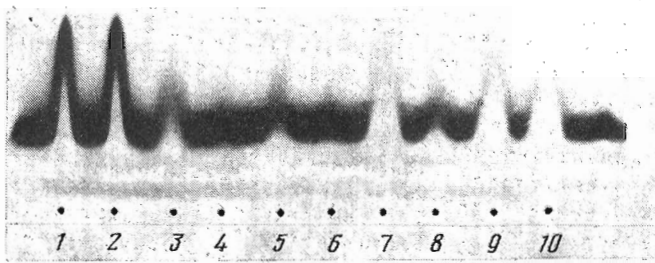


Рис. 6. Радиоавтограмма ракетно-линейного иммуноэлектрофореза нативного HBsAg, 4 мкг/мл (1, 2), препарата II (7—10) и препарата II, обработанного нейраминидазой холерного вибриона (3, 4) и вируса гриппа (5, 6). Пробы 4, 6, 8 разводили в соотношении 1:5.

*Обработка нейраминидазой.* Источником фермента служил вирус гриппа (штаммы PR8 или MRC11). Использовали также коммерческие препараты очищенной нейраминидазы из *V. cholerae* (Serva, ФРГ), активность ферментов предварительно оценивали по отщеплению нейраминовой кислоты от фетуина (Koch-Light, Англия) тиобарбитуровым методом [12]. Реакцию останавливали периодатом натрия (Merck, ФРГ), измеряли поглощение при длине волны 549 нм и определяли количество отщепившейся N-ацетилнейраминовой кислоты (AcNeu) по калибровочной кривой. Кривую строили по зависимости поглощения при 549 нм от концентрации AcNeu (Calbiochem, США).

Для обработки препаратов HBsAg и gp12 (100—500 мкг/мл) использовали количество фермента, отщепляющее 45 ммоль AcNeu за 20 ч при 37° С (в 1 мг HBsAg, 20 ммоль AcNeu [13]). Препараты инкубировали с ферментами 20—40 ч при 37° С. В случаях 40-ч инкубации через 20 ч вносили свежую порцию фермента. Реакцию проводили в 0,4 М фосфатном буфере, pH 5,9. Контролем служили препараты без фермента, которые параллельно инкубировали в том же буфере и в буфере трис-HCl, pH 7,2, содержащем 0,1 М NaCl. Реакцию останавливали охлаждением. Результаты учитывали в ракетно-линейном иммуноэлектрофорезе (см. ниже), сравнивая количество антигена в исследуемых пробах и контроле.

*Гель-фильтрация на биогелях A5m и A0,5m* (Bio-Rad, США). Для колонок с биогелем (1×50 см) определяли объемы:  $V_0$  — с концентратами вируса Сендай ( $M 7 \cdot 10^6$ ),  $V_c$  — с декстраном голубым,  $M 2 \cdot 10^6$  (Pharmacia, Швеция) и цитохромом *c*,  $M 12 \cdot 10^3$  (Serva, ФРГ),  $V_i$  — с красителем бромфеноловым синим. Гель-фильтрацию проводили с использованием установки ISCO (США): абсорбциометр тип 6, монитор UA6, коллектор PUP 1200. Скорость элюции 5 мл/ч. Объем наносимых проб 300 мкл.

*Изоэлектрофокусировка* проводилась в аналитической колонке 8100 (ЛКВ, Швеция) с использованием амфолинов (ЛКВ, Швеция) в 1% концентрации при 4° С в течение 72 ч (мощность 2 Вт). Градиенты раскапывали на 30—40 фракций, в каждой из которых определяли pH, количество HBsAg и радиоактивность в гамма-спектрометре.

*Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле* проводили совместно с Л. А. Тарасиным по методу О'Фэррелл [16]. Готовили 1,2-мм пластины с линейным градиентом концентраций полиакриламида 5—20%. Маркерами служили белки очищенного вируса Сендай ( $M 77\ 300$ , 69 700, 59 300, 50 400, 36 500), IgG (Merck, ФРГ),  $M 50\ 000$ , 20 000, цитохром *c* (Serva, ФРГ),  $M 12\ 400$ . Образцы ( $30 \cdot 10^3$  имп/мин) перед внесением в гель обрабатывали 0,1% SDS с 0,65 М дитиотрептоном в 0,165 М фосфатном буфере и прогревали 5 мин на кипящей бане. Форез проводили 16 ч при 40 В; длина пробега в разделительном геле 80—90 мм.

*Электронная микроскопия* выполнялась В. А. Григорьевым на микроскопе JEM-100 при инструментальном увеличении 50 000. Препараты контрастировались фосфорно-вольфрамовой кислотой.

*Спектрофотометрия.* Спектры снимали на спектрофотометре «Beckman», модель 25. Использовали кюветы с рабочим расстоянием 0,1 и 1 см.

*Ракетный иммуноэлектрофорез* проводили в модификации, подробно описанной ранее [11]. Использовали прибор Multiphor (LKB, Швеция). Стеклянные пластины (8,5×9,5 см) заливали 12 мл 0,75% агарозы, содержащей антисыворотку против HBsAg (анти-HBs) (для анти-HBs, принятой за стандарт в концентрации 3,7 мкл/см<sup>2</sup>). У катодного края пластин пробивали лунки для исследуемых проб объемом 5 мкл. Форез проводили в течение 16 ч в веронал-мединаловом буфере, рН 8,6, с ионной силой 0,02 при градиенте потенциала 2 В/см геля. После фореза пластины отмывали, высушивали и окрашивали кумасси R-250 (Serva, ФРГ). Ракеты измеряли от центра лунок с точностью до 1 мм. Количество антигена в исследуемых пробах определяли по калибровочной кривой, которую строили по принятому стандарту из очищенного HBsAg.

*Ракетно-линейный иммуноэлектрофорез* осуществляли в модификации, подробно описанной ранее [15]. Использовали две реакции: 1) для определения относительно больших количеств антигенов в пробах (100 нг и более), 2) для анализа малых количеств антигена (1–100 нг) с регистрацией результатов по радиоавтографии.

Для постановки первого варианта реакции у края пластины формировали антигенный блок, содержащий подобранное количество стандартного HBsAg. За антигенным блоком в чистой 0,75% агарозе пробивали лунки для исследуемых проб. Свободную часть пластины заливали агарозой, содержащей подобранную концентрацию стандартной анти-HBs. Режим фореза и обработка пластин аналогичны описанным для ракетного иммунофореза. Результаты учитывали по ракетам на линии специфического преципитата, которые измеряли с точностью до 1 мм (от лицевой преципитата). Количество антигена в исследуемых пробах определяли по калибровочной кривой, построенной по принятому стандарту из очищенного HBsAg.

Ракетно-линейный иммуноэлектрофорез с учетом результатов по радиоавтографии ставили аналогичным образом, но добавляли минимальное количество анти-HBs в антигенный гель и соответственно меньшее количество HBsAg в антигенный блок. При формировании антигенного блока использовали смесь из минимального количества немеченого HBsAg-носителя и [<sup>125</sup>I]HBsAg. После фореза отмытые и высушенные пластины накрывали рентгеновской пленкой HS-11 (ORWO, ГДР) на ночь. Пленки проявляли и результаты учитывали по автографу, как описано для ракетно-линейного иммуноэлектрофореза.

*Радиоиммунологический анализ.* Ставили конкурентный радиоиммунологический анализ с использованием метода двойных антител в оригинальной модификации, подробно описанной ранее [11]. Гомологичные и гетерологичные тест-системы готовили из [<sup>125</sup>I]HBsAg субтипов *ay* и *ad* и анти-HBs против субтипа *ay* в зоне 50% (анти-HBs-50%) осаждения использованных количеств меченых антигенов. Десятикратные разведения исследуемых проб для конкуренции готовили в объеме 50 мкл ТЕН-буфера, содержащего 0,2% бычьего сывороточного альбумина и сыворотку животных в разведении 1 : 200 того вида, который был использован для получения иммунной сыворотки. К разведениям конкурентов добавляли тест-систему: 25 мкл анти-HBs-50% и 25 мкл (30–40 тыс. имп/мл) [<sup>125</sup>I]HBsAg. Смесь инкубировали 2 ч при 46° С, добавляли антисыворотку против глобулинов того вида животных, который был использован для получения иммунной сыворотки, и вновь инкубировали 2 ч при 46° С (или ночь при 4° С). Образовавшиеся преципитаты отмывали дважды 0,14 М NaCl и дистиллированной водой, растворяли в 0,1 н. NaOH и переносили в пробирки для счетчика. Радиоактивность определяли в гамма-спектрометре и строили кривые конкуренции. Титр антигена определяли по точке 50% конкуренции в ряду разведений исследуемого образца. Все опыты



ставили в двух параллельных независимых линиях разведений. Чувствительность метода в использованной постановке была 2,5 нг конкурента в пробе (50 нг/мл).

**Иммунные сыворотки.** Антисыворотки получали на морских свинках весом 400–500 г. Животных иммунизировали в подушечки лап антигенами в полном адъюванте Фрейнда (Calbiochem, США). Использовали различные количества антигенов (10 нг, 100 нг, 1 мкг) для первой иммунизации. Через 20 сут отбирали пробы крови, в которых определяли содержание антител в радиоиммунопреципитации и в реакции преципитации в геле. Животным, в сыворотке которых обнаруживались антитела, внутримышечно вводили 50 мкг антигена повторно. На 7–12 сут после бустера животных обескровливали. Антисыворотки против HBsAg адсорбировали нормальной сывороткой человека для удаления неспецифических антител. Для получения антисыворотки против *y*-субтиповой детерминанты анти-HBs против *ay* адсорбировали концентратами HBsAg субтипа *ad*.

В работе использовали коммерческие антисыворотки Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР: кроличья антисыворотка диагностикума (анти-HBs серии № 22,53), ослиные антисыворотки против глобулинов кролика и морской свинки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M. (1970) *Lancet*, 1, 695.
2. Карелин В. П., Бабаева Е. Е., Будницкая П. З., Яданов В. М. (1978) *Вопр. вирусологии*, 5, 576–583.
3. Gold I. W. M., Shih I. W.-K., Purcell R. H., Gerin I. (1976) *J. Immunol.*, 117, 1394–1406.
4. Purcell R. H., Gerin I. P. (1975) *Amer. J. Med. Sci.*, 270, 395–399.
5. Burrell C. I., Mackay P., Greenaway P. I., Hofschneider P.-H., Murray K. (1979) *International symposium on Viral Hepatitis*, München, April 5–7, p. 12.
6. Burrell C. I., Leadbetter G., Mackay P., Marmion B. P. (1976) *J. Gen. Virol.*, 33, 41–50.
7. Neugath A. R., Strick N., Huang C. Y. (1978) *Intervirology*, 10, 265–275.
8. Карелин В. П., Бакиров Р. Д., Губенко Е. Ф. (1978) в сб.: *Вирусные гепатиты*, с. 30–33, М.
9. Flora S. (1978) *J. Immunol.*, 120, 40–45.
10. Hollinger F. B. (1975) *J. Immunol. Meth.*, 8, 65–73.
11. Губенко Е. Ф., Бабаева Е. Е., Карелин В. П. (1978) *Вопр. вирусологии*, 1, 94–100.
12. Warren J. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 1971–1975.
13. Shiraishi H., Kohama T., Shiraishi K., Ishida N. (1977) *J. Gen. Virol.*, 36, 207–210.
14. Гусев А. И. (1968) в кн.: *Иммунохимический анализ*, с. 99–109, М.
15. Бакиров Р. Д., Карелин В. П. (1979) *Вопр. вирусологии*, 2, 118–124.
16. O'Farrell P. H. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 4007–4021.

Поступила в редакцию  
18.VIII.1979

#### IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF THE GLYCOPEPTIDE ISOLATED FROM THE SERUM HEPATITIS SURFACE ANTIGEN

KARELIN V. P.

*D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

The treatment of the purified 22 nm structures of the serum hepatitis surface antigen (HBsAg) with pronase in the presence of SDS resulted in the appearance of low molecular weight fragments containing the group-specific *a* antigenic determinant. By size and mobility in SDS polyacrylamide gel-electrophoresis, the isolated material corresponds to globular proteins of  $M < 12000$  and differs from HBsAg in isoelectric point and in UV spectrum. The isolated material, in contrast to HBsAg suffers inactivation upon the neuraminidase treatment. The aggregates of the obtained glycopeptide turned out to be immunogenic for guinea pigs. The immune sera contained antibodies against *a* and *y* specificities of HBsAg. The possibility of using the minimal structures carrying protective antigenic determinants of HBsAg as a vaccine is discussed.