



ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
И ВВЕДЕНИЯ α -NH₂-КОНЦЕВОЙ МЕТКИ
В ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ЦЕПИ

Берестень С. Ф., Рубикайте Б. И., Киселев Л. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Предложен метод, позволяющий локализовать антигенные детерминанты на полипептидной цепи молекулы антигена с неизвестной первичной структурой. Молекулу антигена, предварительно модифицированную малеиновым ангидридом по N-концевым и ϵ -NH₂-группам лизиновых остатков, подвергали частичному ферментативному расщеплению, затем маркировали образовавшиеся NH₂-группы ¹²⁵I-меченым реагентом Болтона и Хантера и демалеилировали. Выявление двух наибольших по размерам меченых фрагментов, более длинный из которых связывается с моноклональным антителом, а более короткий не связывается, позволяет определить положение антигенной детерминанты на полипептидной цепи. Метод апробировали на бычьей триптофанил-тРНК-синтазе с использованием ранее полученных моноклональных антител к этому ферменту.

Определение положения антигенной детерминанты на полипептидной цепи молекулы антигена существенно при решении ряда вопросов, касающихся топографии исследуемого антигена, его эволюции, расположения функциональных центров различных белков, создания искусственных вакцин и т. д.

Существует ряд подходов по локализации антигенной детерминанты на полипептидной цепи. Один из них основан на генно-инженерных приемах [1]. Получают набор фрагментов ДНК гена антигена и клонируют их в экспрессирующих векторах. Определяя первичную структуру фрагмента ДНК клона, который экспрессирует полипептидную цепь, сохраняющую способность взаимодействовать с моноклональными антителами, и сравнивая ее с полной нуклеотидной последовательностью ДНК антигена, можно локализовать антигенную детерминанту. Недавно предложен интересный подход [2]. Полипептидную цепь известного по первичной структуре антигена подвергают статистическому расщеплению по остаткам метионина или триптофана таким образом, чтобы на молекулу приходилось не более одного разрыва. Сопоставление длин фрагментов, взаимодействующих с моноклональными антителами, с известными положениями остатков метионина или триптофана позволяет определять местоположение антигенной детерминанты. Используют также подход, основанный на изучении способности антигена после химической или протеолитической модификации к взаимодействию с моноклональным антителом [3]. Можно следить за способностью химически синтезированного пептида после каждого шага синтеза как связываться с антителами, так и конкурировать в связывании [4].

Однако описанные приемы по локализации антигенной детерминанты на полипептидной цепи требуют знания первичной структуры антигена. При неизвестной первичной структуре антигена эта задача может быть решена, если есть точка отсчета или она вводится искусственно в исследуемую полипептидную цепь. Недавно предложены способы введения N-концевой флуоресцентной [5] или радиоактивной [6] метки в полипептиды, которые позволяют определить положение некоторых аминокислотных остатков (Arg, Asp, Cys, Glu, Met, Trp, Asp-Pro, Asn-Gly) в цепи. Такой прием дает возможность определять местонахождение антигенной

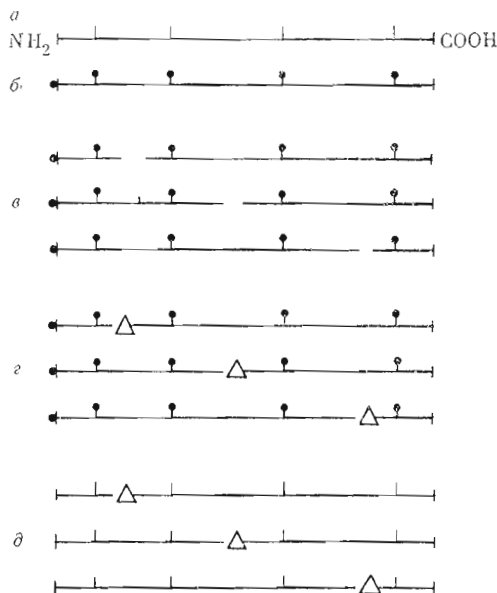


Рис. 1. Предлагаемая схема введения кольцевой NH_2 -метки для локализации антигенных детерминант: а — исходная полипептидная цепь; б — полипептидная цепь, обратимо модифицированная реагентом (обозначен точкой) по концевой NH_2 -группе и ϵ - NH_2 -группам лизиновых остатков; в — расщепление модифицированной полипептидной цепи; г — маркировка расщепленной цепи по открывшимся NH_2 -группам ^{125}I -меченым реагентом Болтона и Хантера (обозначен треугольником); д — маркированная расщепленная цепь после демодификации концевой и ϵ - NH_2 -групп

детерминанты на полипептидной цепи молекулы антигена, однако он имеет два недостатка. Введение метки в N-конец полипептидной цепи основано на отщеплении N-концевой аминокислоты после модификации (тиоацетил)тиогликолевой кислотой (TATGA) [5] или фенилизотиоцианатом (PITS) [6] с последующим введением во вновь образовавшуюся α - NH_2 -группу флуоресцентного или радиоактивного реагента, специфичного только к NH_2 -группам. Однако TATGA и PITS в свою очередь необратимо блокируют ϵ - NH_2 -группы лизиновых остатков, и, если антигенная детерминанта содержит необратимо модифицированный лизин, она может быть утрачена. Кроме того, у ряда белков, как известно, нет свободной N-концевой NH_2 -группы.

В настоящей работе с целью локализации антигенной детерминанты мы предлагаем для введения точки отсчета в полипептидную цепь метод, свободный от описанных недостатков. Принцип метода показан на рис. 1. Так же, как и в работах [5, 6], предварительно модифицируют ϵ - NH_2 -группы лизиновых остатков и α - NH_2 -группу полипептидной цепи (если она не блокирована), но используют обратимо модифицирующий агент — в данной работе малеиновый ангидрид [7]. Далее, для того чтобы ввести точку отсчета, модифицированную полипептидную цепь подвергают ограниченному расщеплению таким образом, чтобы на молекулу в среднем приходилось менее одного разрыва. При такой ситуации должен образовываться набор N- и C-концевых пептидных фрагментов различной длины. Все C-концевые фрагменты в этой смеси будут содержать немодифицированную вновь образовавшуюся α - NH_2 -группу. Так как α - NH_2 -группа остатка N-концевой аминокислоты, а также ϵ - NH_2 -группы остатков лизина в исходной полипептидной цепи были предварительно блокированы, то, используя какой-либо реагент, специфичный к NH_2 -группам, например ^{125}I -меченый реагент Болтона и Хантера (^{125}I NSHPP) [8], в данной смеси пептидов можно избирательно пометить все C-концевые фрагменты исходной полипептидной цепи. В итоге будет получен набор фрагментов

Влияние модификации ϵ -NH₂-групп лизиновых остатков триптофанил-тРНК-синтетазы на взаимодействие с моноклональными антителами (по данным реакции непрямой радиоиммуноадсорбции)

Белок, адсорбированный на планшете	Сорбция [¹²⁵ I]анти-С _L после инкубации с моноклональными антителами					
	Ам1		Ам2		Ам3	
	имп·мин ⁻¹	%	имп·мин ⁻¹	%	имп·мин ⁻¹	%
Нативный	19 200	100	5300	100	15 500	100
Модифицированный	100	0,5	0	0	1 000	6,4
Демодифицированный	18 000	93,7	100	1,8	12 500	80,6

различной длины с одинаковым С-концом. Нахождение двух наибольших по размерам фрагментов после демодификации, более длинный из которых еще связывается с моноклональным антителом, а более короткий уже не связывается, позволит определить положение антигенной детерминанты на полипептидной цепи молекулы антигена.

Итак, с одной стороны, состояние N-конца молекулы антигена (блокирование или свободное) не влияет на возможность применения предлагаемого метода. С другой стороны, использование реагента, обратимо модифицирующего ϵ -NH₂-группы лизина, позволяет после демалеилирования реактивировать антигенные детерминанты, содержащие лизин, при этом метка в N-конце фрагмента будет сохранена, так как реагент Болтона и Хантера после конъюгирования образует пептидную связь [8], которая в условиях демалеилирования сохраняется.

Предлагаемый нами принцип апробировали на триптофанил-тРНК-синтетазе из поджелудочной железы крупного рогатого скота (КФ 6.1.1.2, $M \sim 120$ кДа, α_2) с помощью набора моноклональных антител (Ам1, Ам2, Ам3) к ферменту [9]. N-Конец синтетазы блокирован [10], и, как будет показано ниже, модификация ϵ -NH₂-групп остатков лизина синтетазы сопровождается полной инактивацией детерминант для Ам1, Ам2 и в значительной степени для Ам3. Удаление блокирующего агента приводит к полной реактивации детерминант для Ам1 и Ам3, но не для Ам2.

Влияние модификации ϵ -NH₂-групп остатков лизина триптофанил-тРНК-синтетазы на взаимодействие с моноклональными антителами. Взаимодействие малеилированной формы триптофанил-тРНК-синтетазы с моноклональными антителами мы исследовали с помощью реакции непрямой радиоиммуноадсорбции. Из табл. 1 видно, что малеилированная форма фермента полностью утрачивает способность связывать Ам1, Ам2 и в значительной степени Ам3. После удаления блокирующего агента полностью реактивируется антигенная детерминанта для Ам1 и почти полностью для Ам3. Антигенная детерминанта для Ам2 практически не реактивируется, поэтому в дальнейшем Ам2 не использовали.

Однако возникает вопрос, действительно ли отсутствие у малеилированной синтетазы способности взаимодействовать с Ам1 и Ам3 обусловлено модификацией ϵ -NH₂-групп остатков лизина, или его можно объяснить тем обстоятельством, что модифицированный фермент из-за изменения заряда не может достаточно прочно связываться с поверхностью ячейки планшета и, естественно, не будет наблюдаться адсорбции ¹²⁵I-антител. В этом случае реактивация после демалеилирования будет обусловлена восстановлением способности адсорбироваться в лунках планшета. Для однозначного решения этого вопроса мы использовали реакцию торможения радиоиммуноадсорбции. Из рис. 2а видно, что малеилированная синтетаза (кривая 2) в отличие от нативной (кривая 1) не конкурирует с адсорбированной синтетазой в связывании с Ам1. В случае Ам3 (рис. 2б) малеилированная синтетаза сохраняет способность к взаимодействию с антителом, поскольку она конкурирует с адсорбированной нативной синтетазой в связывании с Ам3.

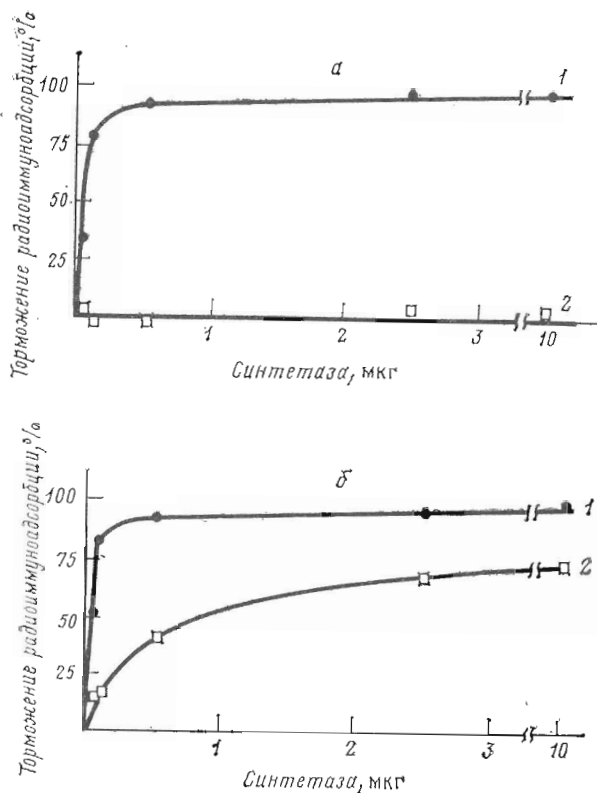


Рис. 2. Реакция торможения радиоммунноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{Am1}$ (а) и $[^{125}\text{I}]\text{Am3}$ (б) с помощью нативной (1) и маленированной триптофанил-тРНК-синтетазы (2)

Таким образом, из полученных выше результатов однозначно следует, что антигенные детерминанты для Ам1 и Ам3 инактивируются за счет модификации $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизина. Антигенная детерминанта для Ам1 — «линейного» типа, поскольку она сохраняется в денатурирующих условиях [11], поэтому ее реактивация вполне естественна. Можно теперь также считать, что эта детерминанта содержит остаток лизина(ов).

Интересен случай с детерминантой для Ам3. С одной стороны, она конформационного типа, так как не сохраняется в денатурирующих условиях, с другой — исчерпывающая модификация $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизина не вызывает полной инактивации этой детерминанты. Можно думать, что модификация лизиновых остатков не приводит к серьезным изменениям пространственной структуры участка фермента, содержащего детерминанту для Ам3. Остаток(ки) лизина может входить в нее, но не играть критической роли, как это наблюдается в случае Ам1.

Детерминанту для Ам2, также конформационного типа [11], не удается реактивировать; по-видимому, область синтетазы, где она локализована, в значительной степени меняет свою конформацию. Важно подчеркнуть, что использование обратимо модифицирующего агента позволило сохранить две антигенные детерминанты из трех для дальнейшего исследования. При необратимой модификации в лучшем случае мы имели бы возможность локализовать только детерминанту для Ам3.

Получение фрагментов триптофанил-тРНК-синтетазы, маркированных по N-концу. В качестве расщепляющего агента использовали трипсин, гидролизующий полипептидную цепь после остатков лизина и аргинина, а после модификации $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп лизиновых остатков — только после остатков аргинина [12]. Субъединица молекулы триптофанил-тРНК-синтетазы содержит 23 аргининовых остатка [10].

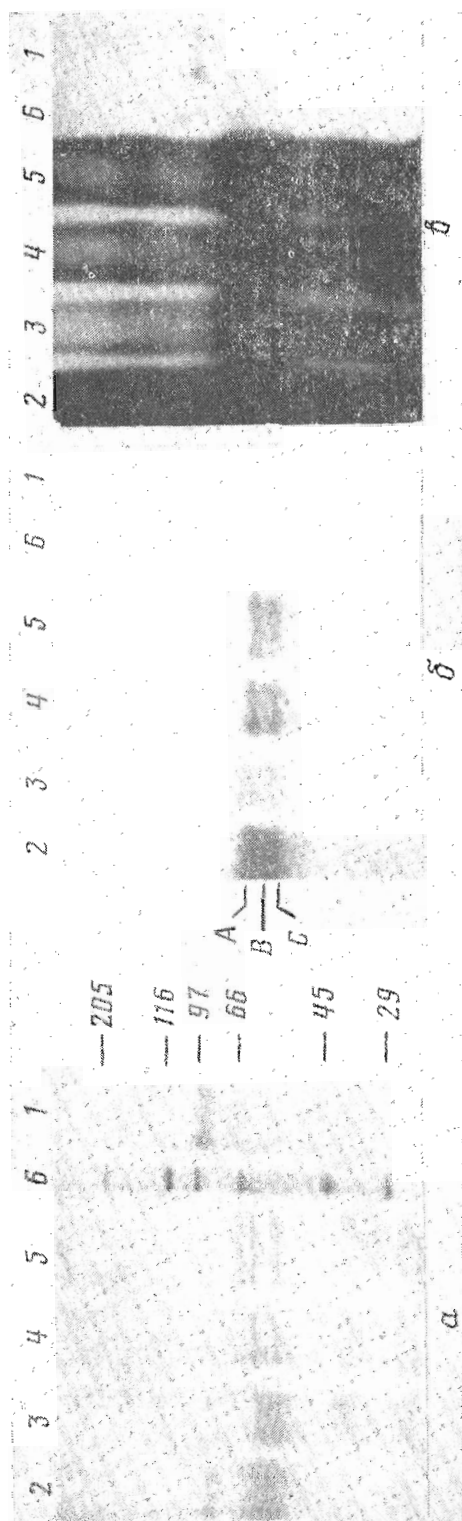


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле малакцированной триптофан-л-РНК-синтазы (1), а также продуктов ее ограниченного трипсинолиза после их копьюлирования с $[^{125}\text{I}]\text{NSHPP}$ (2-5); 6 - белки-свидетели (размеры в килодальтонах указаны справа). Трипсинолиз проведен при соотношении синтаза - трипсин 10 000 : 1 (2), 7000 : 1 (3), 3000 : 1 (4), 1000 : 1 (5). Окраска кумасси (а) и радиоавтограф после короткой (б, указано положение фрагментов А, В и С) и после длительной (в) экспозиции

На рис. 3 показано электрофоретическое разделение продуктов ограниченного протеолиза малеилированного белка после конъюгирования с [^{125}I]NSHPP. Видно, что исходный малеилированный белок (рис. 3а, дорожка 1) практически не включает ^{125}I (рис. 3б, в, дорожка 1). Это свидетельствует о полной блокировке $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизина. При соотношении синтетаза — трипсин 10 000 : 1 и 7 000 : 1 продукты протеолиза образуют диффузную окрашиваемую высокомолекулярную зону без выраженных дискретных полос, а также ряд низкомолекулярных фрагментов (рис. 3а, дорожки 2, 3). Параллельная радиоавтография выявляет три дискретных фрагмента: А, В и С.

Диффузная зона, выявляемая по окрашиванию, представляет собой, по-видимому, набор фрагментов близкой молекулярной массы, образовавшихся за счет деградации исходной полипептидной цепи как с N-, так и с C-концов. Меченые низкомолекулярные фрагменты не выявляются, так как они диффундируют из геля при использованном режиме разделения. При дальнейшем увеличении отношения трипсин — синтетаза видны по окрашиванию два фрагмента, совпадающие с мечеными фрагментами В и С (рис. 3а, б, дорожка 4). Меченый фрагмент А исчезает, вероятно, расщепляясь до В и (или) С.

Есть все основания считать, что фрагменты А, В и С возникают в результате первоначальной атаки белка трипсином. Во-первых, при наименьшем в данном эксперименте отношении трипсин — синтетаза расщеплению подвергаются главным образом два наиболее доступных места, которые приводят к появлению фрагментов В и С. При еще меньшей концентрации трипсина, когда основная масса синтетазы практически не подвергается расщеплению (рис. 4б, дорожки 1 и 2), эти фрагменты также образуются (рис. 4б, дорожка 2). При дальнейшем увеличении концентрации трипсина видно (рис. 3а, дорожка 5), что можно получить фрагмент с подвижностью, совпадающей с подвижностью фрагмента А, однако при радиоавтографии этот фрагмент не выявляется (рис. 3б, дорожка 5). Этот результат может означать, что фрагмент получен путем деградации с C-конца исходной молекулы и содержит заблокированный N-конец (рис. 1г). Появление такого фрагмента — дополнительный аргумент в пользу представления о том, что исходные меченые фрагменты возникают в результате первичных независимых разрывов.

Следует обратить внимание на то, что подвижность модифицированной малеиновым ангидридом исходной триптофанил-гРНК-синтетазы меняется. Если молекулярная масса субъединицы исходного фермента ~60 кДа, то после модификации ее кажущаяся молекулярная масса соответствует ~90 кДа (рис. 3а, дорожки 1 и 6), т. е. подвижность изменяется в 0,66 раза. Кажущиеся молекулярные массы фрагментов А, В и С, судя по подвижности белков-свидетелей, соответствуют ~72, ~65 и ~58 кДа. Предположив, что лизинные остатки распределены равномерно по полипептидной цепи, получим исходные молекулярные массы меченых фрагментов А, В и С равными ~48, ~43 и ~38 кДа соответственно.

Взаимодействие меченых фрагментов триптофанил-гРНК-синтетазы с моноклональными антителами. В табл. 2 приведены результаты по взаимодействию смеси меченых фрагментов с $M \sim 48$, ~ 43 и ~ 38 кДа после

Таблица 2

Взаимодействие с моноклональными антителами трипсиновых фрагментов малеилированной синтетазы после их конъюгирования с [^{125}I]NSHPP и демодификации (по данным реакции прямой радиоиммуноадсорбции)

Тип антител, адсорбированных на планшете	Сорбция на планшете, имп·мин ⁻¹	
	нативной синтетазы	ее фрагментов
Ам1	27 100	100
Ам2	0	0
Ам3	35 200	80

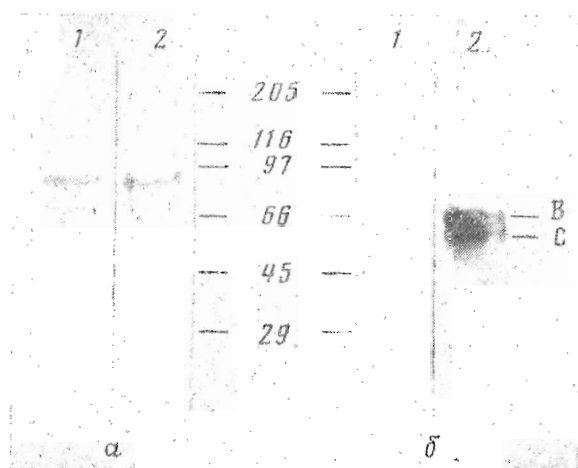


Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле малеилированной синтетазы (1) и продуктов ее ограниченного трипсинолиза (соотношение синтетаза — трипсин 50 000:1 по весу) (2) после конъюгирования с $[^{125}\text{I}]\text{NSHPP}$. Окраска кумасси (а) и радиоавтограф (б) геля. Показано положение и размеры (кДа) белков-свидетелей

демалеилирования с антителами, адсорбированными на планшете. Поскольку демодификация синтетазы не реактивирует антигенную детерминанту для Ам2, сорбция меченых фрагментов на Ам2 принята за отрицательный контроль. В качестве положительного контроля использовали сорбцию нативной синтетазы, конъюгированной с $[^{125}\text{I}]\text{NSHPP}$. Из табл. 2 видно, что меченые фрагменты практически не взаимодействуют ни с Ам1, ни с Ам3. Наибольший из меченых фрагментов, размером ~ 48 кДа, получен путем отщепления полипептида ~ 12 кДа с N-конца исходной полипептидной цепи синтетазы, и он не взаимодействует с Ам1 и Ам3. Следовательно, можно думать, что антигенные детерминанты для этих антител расположены именно в этом N-концевом фрагменте с молекулярной массой ~ 12 кДа. Незначительную сорбцию меченых фрагментов на Ам1 и Ам3 можно объяснить за счет сорбции синтетазы, не подвергающейся протеолизу, поскольку после исчерпывающей модификации синтетазы $[^{125}\text{I}]\text{NSHPP}$ конъюгирует с ней в незначительной степени (рис. 3в, дорожка 1).

Фракционирование меченых фрагментов малеилированной синтетазы на антителосорбенте с Ам3. Так как синтетаза после демодификации сохраняет способность взаимодействовать с Ам3 (табл. 1, рис. 1б), мы решили провести фракционирование трех полученных меченых высокомолекулярных фрагментов синтетазы без демодификации (рис. 3б, дорожка 3) на сорбенте, содержащем Ам3. На рис. 5 приведен результат этого опыта. Видно, что с Ам3 взаимодействует только исходная молекула малеилированной синтетазы (дорожка 2).

Таким образом, как и в предыдущем эксперименте, мы получили, что антигенная детерминанта для Ам3 расположена во фрагменте ~ 12 кДа с N-конца полипептидной цепи молекулы синтетазы.

К сожалению, нам не удалось получить статистического расщепления полипептидной цепи и уменьшить зону локализации антигенной детерминанты. Это, очевидно, связано с тем, что малеилирование мало влияет на доменную структуру триптофанил-ТРНК-синтетазы. Во-первых, трипсинолиз малеилированной синтетазы так же, как и нативной [14], идет с образованием фрагмента ~ 40 кДа с С-конца молекулы синтетазы. Во-вторых, Ам3 сохраняет способность к взаимодействию с малеилированной синтетазой, несмотря на то что антигенная детерминанта для Ам3 — конформационного типа.



Рис. 5. Фракционирование фрагментов малеилированной триптофанил-тРНК-синтетазы. Электрофорез в полиакриламидном геле малеилированной синтетазы (1) и ее триптических фрагментов, конъюгированных с $[^{125}\text{I}]\text{NSHPP}$, обладающих способностью связываться с АмЗ-сорбентом (2). Окраска кумасси (а) и радиоавтограф (б) геля. Наиболее интенсивные полосы (а) — тяжелая и легкая цепи моноклональных антител АмЗ

Химический способ частичной деградации по ряду аминокислот с целью последующего маркирования N-концов также имеет ряд недостатков. Расщепление по остаткам метионина [15], триптофана [16], аспарагиновой кислоты [17], тирозина [18], дипептида Asp-Pro [19] происходит в кислой среде, что, естественно, приведет к частичной или полной демодификации $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп лизиновых остатков. Расщепление по остаткам цистеина [20], которое осуществляется при щелочных значениях pH, также непригодно, поскольку образуется блокированный N-конец. Удобным химическим способом фрагментации может оказаться гидроксиламинолиз, приводящий к расщеплению пептидной связи Asn-Gly при щелочных значениях pH [21] с образованием открытого N-конца. Однако вероятность существования такой последовательности мала.

Ограничение в достижении статистического расщепления не является критическим, если можно получить N-концевой демодифицированный меченый фрагмент, взаимодействующий с антителом. В этом случае, используя специфическое расщепление по ряду аминокислот [15–21], можно сузить зону локализации антигенной детерминанты. На нашей модельной системе нам не удалось получить такой меченый фрагмент.

Важно еще раз подчеркнуть, что использование обратимого реагента позволило сохранить антигенную детерминанту Ам1 для дальнейших исследований. Это расширяет возможности предполагаемого метода. Второе его преимущество заключается в том, что он требует лишь микрограммовые количества исследуемого антигена.

Экспериментальная часть

Триптофанил-тРНК-синтазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота выделяли как описано [9]. Активность фермента определяли в реакции аминоацилирования тРНК^{Trp} [9].

Модификацию $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп остатков лизина триптофанил-тРНК-синтетазы вели в боратном буфере (0,2 М H_3BO_3 и 0,15 М NaCl , pH 8,7) (А), добавляя 300-кратный по отношению к лизиновым остаткам молекулы фермента мольный избыток свежевозгоняемого в вакууме малеинового ангидрида. Ангидрид добавляли порциями при 4°С в течение 1 ч, поддерживая pH реакционной смеси 5 н. NaOH в интервале 8,5–9,0 [7]. От избытка ангидрида освобождались гель-фильтрацией на колонке (1 × 45 см) с сорбентом Р-2, уравновешенным 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,7. Полученный препарат лиофилизовали. Демалеилирование $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп вели в 10% уксусной кислоте при 37°С в течение 24 ч, после чего уксусную кислоту улетучивали в вакууме.

Ограниченный протеолиз трипсином (Merck) малеилированной синтетазы (0,2–0,8 мг/мл) проводили в объеме 30–100 мкл в буфере А при 37° С в течение 20–30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100-кратного мольного избытка диизопропилфторфосфата по отношению к трипсину.

Иодирование препарата N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропionato (NSHPP, Sigma) — реагент Болтона и Хантера — проводили как описано [22]. Удельная активность [125 I]NSHPP составляла $5 \cdot 10^2$ Ки/ммоль.

Конъюгирование малеилированной синтетазы и ее фрагментов с [125 I]NSHPP проводили как описано [22] с незначительными изменениями. 10 мкл раствора [125 I]NSHPP (13 мКи) в бензоле упаривали в вакууме, добавляли 10–20 мкл раствора малеилированной синтетазы или ее фрагментов в буфере А, содержащего 2–16 мкг белка, выдерживали 30 мин при 0° С и останавливали добавлением раствора с pH 8,5, содержащего 1,8 М глицин и 0,3 М трис (1/10 от объема реакционной смеси). Ст избытка [125 I]NSHPP освобождались гель-фильтрацией на колонке (0,4×20 см) с сефадексом G-25, уравновешенным либо буфером А, либо 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,7, с 0,5% тритоном X-100, 0,5% дезоксихолатом натрия и 0,05% SDS (буфер Б). В отдельных опытах от несвязавшихся продуктов освобождались 5-кратной экстракцией бензолом.

Иодирование моноклональных антител и поликлональных кроличьих антител против легких цепей иммуноглобулинов мыши (анти- C_L) проводили по методу [23].

Антителосорбент готовили как описано [24], присоединяя моноклональные антитела к диазотированной целлюлозе.

Фракционирование фрагментов малеилированной синтетазы после ограниченного протеолиза трипсином и последующего конъюгирования с [125 I]NSHPP проводили следующим образом. 2–10 мкг синтетазы и ее фрагментов, конъюгированных с [125 I]NSHPP, инкубировали с 0,2 мл суспензии антителосорбента в 0,4 мл буфера Б в течение 1 ч при 20° С, после чего суспензию промывали 5 раз тем же буфером, отделяя осадок центрифугированием. Осадки обрабатывали 50 мкл буфера В (0,08 М трис, pH 6,8; 1% SDS; 2% β -меркаптоэтанол) в течение 2 мин при 100° С, суспензию центрифугировали, а супернатант подвергали электрофоретическому разделению.

Электрофорез малеилированной синтетазы и ее фрагментов проводили по методу Леммли [25] с градиентным 7–22% гелем. Гель после электрофореза окрашивали и отмывали при 100° С, сушили 1 ч под вакуумом, используя прибор для сушки гелей (LKB).

Радиоавтографию высушенного геля проводили с пленкой PMB («Свема») в диапазоне от 5 ч до 7 сут в зависимости от нанесенной радиоактивности.

Реакцию непрямой радиоиммуноадсорбции проводили в PBS (0,005 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, pH 7,5). Малеилированную, демодифицированную и нативную синтетазу (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл адсорбировали в лунках 96-луночного планшета (Flow Labs) в течение 16 ч при 4° С или 2–3 ч при 37° С. Затем избыток синтетазы удаляли промыванием лунок планшета 3–4 раза PBS с 10% телячьей сывороткой (PBS-S). После последней промывки лунки планшета инкубировали с 0,2 мл PBS-S 1 ч при 20° С с целью блокировки мест адсорбции. В лунки с синтетазой добавляли моноклональные антитела (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл PBS-S и инкубировали 1 ч при 20° С, промывали 4 раза PBS-S и добавляли [125 I]анти- C_L (10^5 имп/мин на лунку, уд. акт. 10^6 имп/мин/мкг) в объеме 0,1 мл PBS-S. После инкубации в течение 1 ч при 20° С несвязавшиеся [125 I]антитела удаляли и лунки промывали 6–7 раз PBS-S. Радиоактивность индивидуальной лунки определяли в γ -спектрометре CG-30 (Inter-technique).

В реакции торможения радиоиммуноадсорбции триптофанил-ТРНК-синтетазу (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл адсорбировали в лунках и блокировали оставшиеся потенциальные места адсорбции так, как описано выше. После блокировки из лунок удаляли PBS-S и добавляли в лунки

различные количества нативной и малеилированной синтетазы в 50 мкл FBS-S. Затем добавляли ^{125}I -меченые моноклональные антитела Ам1 или Ам3 ($5 \cdot 10^4$ имп/мл) на лунку, уд. акт. 10^6 имп/мл/мкг) в 50 мкл FBS-S и инкубировали 1 ч при 20°C . Отмывку лунок и определение их радиоактивности проводили как описано выше.

В реакции прямой радиоиммуноадсорбции моноклональные антитела (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл адсорбировали на планшете как описано выше. После блокировки оставшихся мест адсорбции в лунку добавляли нативную синтетазу или ее фрагменты, конъюгированные с ^{125}I NSHPP и демодифицированные, по $5 \cdot 10^5$ имп/мл в лунку. После инкубации в течение 1 ч при 20°C отмывку лунок и определение их радиоактивности проводили как описано выше.

Авторы благодарят О. О. Фаворову и Р. С. Незлина за ценные критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nunberg J. H., Rodgers G., Gilbert J. H., Snead R. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 12, p. 3675–3679.
2. Grachev M. A., Laktionov D. D., Roschke V. V., Zelenin S. H. 16th Meeting FEBS, 1984, Abstracts, p. 370.
3. Вьюрина Ю. Н., Курятов А. Б., Киселев А. В., Хорошилова Н. И., Овечкина Г. В., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И., Васильев Р. Г. Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 11, с. 1161–1169.
4. Smith J. A., Hurrell G. R., Leach S. J. Immunochemistry, 1977, v. 14, № 8, p. 565–568.
5. Jue R. A., Doolittle R. F. Biochemistry, 1985, v. 24, № 1, p. 162–170.
6. Jay D. G. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 24, p. 15572–15578.
7. Means G. E., Feeney R. E. Chemical modification of proteins. San Francisco: Holden-Day, Inc., 1971, p. 76.
8. Bolton A. E., Hunter W. M. Biochem. J., 1973, v. 133, № 2, p. 529–538.
9. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. Meth. Enzymol., 1979, v. 59, part G, p. 234–257.
10. Gros C., Lemaire G., Rapenbusch R., Labouesse B. J. Biol. Chem., 1973, v. 247, № 9, p. 2931–2943.
11. Kisselev L. L., Paley E. L., Baranov V. N., Beresten S. F., Favorova O. O., Zargarova T. A., Nurbekov M. K. In: Natural products chemistry/Eds Zalewski R. I., Skolnik J. J. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B. L., 1985, v. 20, p. 575–589.
12. Smyth D. G. Meth. Enzymol., 1967, v. 11, p. 214–231.
13. Lemaire G., Rapenbusch R., Gros C., Labouesse B. Eur. J. Biochem., 1969, v. 10, № 2, p. 336–344.
14. Prasolov V. S., Favorova O. O., Margulis G. V., Kisselev L. L. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 378, № 1, p. 92–106.
15. Gross E. Meth. Enzymol., 1967, v. 11, p. 238–256.
16. Shechet Y., Patchornik A., Burshtein Y. Biochemistry, 1976, v. 15, № 23, p. 5071–5079.
17. Tsung C. M., Fraenkel-Conrat H. Biochemistry, 1965, v. 4, № 5, p. 793–800.
18. Wilchek M., Witkop B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1967, v. 26, № 3, p. 296–299.
19. Landon M. Meth. Enzymol., 1977, v. 47, part E, p. 145–149.
20. Jacobson G. R., Schaffer M. H., Stark G. R., Vanaman T. C. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 19, p. 6583–6591.
21. Bornstein P. Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2409–2421.
22. Bolton A. E. Radioiodination techniques, 1977, Review 18. L.: The Radiochemical Centre, Amersham, p. 34–36.
23. Bale W. F., Helmkamp R. W., Izzo M. I., Contreras M. A., Spar L. L. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1966, v. 122, p. 407–414.
24. Гурвич А. Ф., Кузовлева О. Б. В кн.: Иммунохимический анализ/Ред. Зильбер Л. А. М.: Медицина, 1968, с. 54–61.
25. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.

Поступила в редакцию
16.VII.1985

LOCALIZATION OF PROTEIN ANTIGENIC DETERMINANTS USING MONOCLONAL ANTIBODIES AND N-TERMINAL LABELING OF POLYPEPTIDE CHAINS

BERESTEN S. F., RUBIKAITE B. I., KISSELEV L. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A method for localization of antigenic determinants in a polypeptide chain of unknown primary structure was proposed. A protein is modified at NH₂-terminal and ε-NH₂-groups of lysine residues with maleic anhydride and then is subjected to partial enzymatic cleavage. Newly formed NH₂-terminal groups are tagged with radioiodinated Bolton — Hunter's reagent. The labeled fragments of the antigen are then demaleylated. Comparison of the two longest labeled fragments, only one of which still binds monoclonal antibody, makes it possible to define the location of the antigenic determinant along the polypeptide chain. The method was tested on the bovine tryptophanyl-tRNA synthetase using earlier prepared monoclonal antibodies against this enzyme.