



УДК 612.017.1 : 577.112.083.3

© 1991 г.

С. М. Тертышников, В. В. Юровский, Б. Б. Иванов,
В. Б. Садовников, А. М. Алахвердиев *

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТРОПИЧЕСКОЙ МАЛЯРИИ *PLASMODIUM FALCIPARUM* С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Филиал Института биоорганической химии им М. М. Шемякина АН СССР, г. Пушкино Московской обл.;

* Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского МЗ СССР, Москва

Проведено иммунохимическое исследование некоторых поверхностных белков возбудителя тропической малярии *Plasmodium falciparum* с помощью синтетических пептидов, соответствующих предполагаемым антигенным детерминантам: (NANP)_n с молекулярной массой ~5000 Да (T1) из повторяющегося района циркумспороzoитного белка (CSP), фрагменты 34—44 (T3) и 67—75 (T8) белка p23; 1064—1071 (T2) белка p195, (AHNAAN)₂ (T5) из повторяющегося района белка SHARP, фрагменты 12—26 (T6) и 31—45 (T7) из повторяющегося региона белка p130.

Твердофазным иммуноферментным анализом, а также дот-блот-анализом обнаружено взаимодействие кроличьих антисывороток против пептидов T1, T3 и T5 с белками эритроцитарных стадий возбудителя малярии, выделенными из несинхронизированной культуры зараженных эритроцитов человека. Иммуноблоттингом показано связывание сыворотки анти-T1 с белком *M* ~ 60 кДа, анти-T5 — с белками *M* ~ 50 и ~ 70 кДа, анти-T6 и анти-T7 с рядом белков от 75 до 105 кДа. Аффинно очищенные антитела против пептидов T1 и T5 способны ингибировать рост паразитов в культуре эритроцитов *in vitro*. Активность антител анти-T1 подтверждает данные о наличии перекрестной специфичности между иммунодоминантным эпитопом CSP и антигенными детерминантами белков эритроцитарных стадий. Участки, соответствующие пептидам T3 и T5, по-видимому, экспонированы на поверхности белков p23 и SHARP и могут служить мишенями для протективных антител.

Возбудитель тропической малярии *Plasmodium falciparum* вызывает одну из самых тяжелых форм человеческой малярии и имеет сложный жизненный цикл, во время которого происходит смена двух фаз развития: полового и бесполого. Половая фаза развития проходит в организме комара-переносчика, бесполоя — в организме человека, куда возбудитель малярии попадает во время укуса комара на стадии спорозонта. Развитие возбудителя малярии в организме человека проходит в два этапа: на первом этапе попавшие в кровяное русло спорозонты в течение нескольких минут внедряются в гепатоциты, где за несколько дней развиваются в тысячи мерозоитов. На втором этапе высвобождающиеся в кровяное русло мерозоиты внедряются в красные кровяные клетки, где проходят несколько стадий развития (мерозоит, стадия кольца, стадии зрелого трофозонта и пизонта), в литературе часто объединяемые названием «эритроцитарные», или «кровяные», стадии. На каждой из этих стадий изменяются поверхностные белки паразита и инфицированного им

Использованные сокращения: Вос — трет-бутилоксикарбонил, BSA — бычий сывороточный альбумин, CSP — циркумспороzoитный белок, CRA — CSP-связанный антиген, ИФА — иммуноферментный анализ, КЛН — гемоцианин моллюска фиссуреллы, МАВН — сополимер малеинового ангидрида и винилпирролидона, NCS — N-оксисукцинимидный эфир N,N-бис(малеимидо)-6-аминокапроновой кислоты, PBS — натрий-фосфатный буфер, Pfr — пентафторфенил, TBS — натрий-трисовый буфер, SDS — додецилсульфат натрия.

Состав использованных конъюгатов и титры полученных антисывороток

Пеп- тид	Белок	Область	Последовательность (в однобуквенном ко- де аминокислот)	Носитель для		Титр антител
				имму- низаци- и	тестирование	
T1	CSP	Повторы	NANPNANPNANP	—	—	1/1000
T2	p195 (PMMSA)	1064—1071	NKKKEAEI	KLH	Овальбумин	1/100
T3	CRA	34—44, N-конец	SSKKKKNKKGSG	BSA	poly (Ala- Lys)	1/1000
T5	SHARP	C-конец, повторы	AHHAANAHHAAN	KLH	МАВП	1/50 000
T6	P130 (GBP)	Повторы, остатки 12—26	REYAADPEYRKHLE	BSA	МАВП	1/10 000
T7	P130 (GBP)	Повторы, остатки 31—45	LTNTDGVGRRNA	BSA	МАВП	1/10 000
T8	CRA	67—75, N-конец	VNKRKSKYK	KLH	МАВП	1/100

эритроцита, что делает его труднодоступным для иммунной системы хозяина.

Появление штаммов малярийного паразита, резистентных к традиционным лекарственным препаратам, а также развитие устойчивости комаров-переносчиков к инсектицидам представляют серьезную проблему в эндемичных районах, где проживает около $\frac{1}{6}$ населения земного шара. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка вакцины против малярии. Возможность вести культуру *P. falciparum* in vitro [1], развитие методов рекомбинантных ДНК [2—4] и моноклональных антител [5], а также использование рекомбинантных и синтетических пептидов, имитирующих антигенные детерминанты паразитарных белков, для изучения взаимодействия паразит — хозяин [6] позволяют внести новые подходы в решение этой проблемы. Так, в настоящее время успешно развивается и испытывается антиспороzoитная вакцина, созданная на основе повторяющейся последовательности аминокислот циркумспороzoитного белка (CSP) [7]. Однако абсолютной защиты антиспороzoитная вакцина обеспечить не может, так как эта вакцина направлена против одной стадии развития возбудителя малярии и время ее действия ограничено, поскольку спороzoит после попадания в организм человека в течение нескольких минут внедряется в клетки печени и становится недоступным для иммунной системы человека.

Другой потенциальной мишенью для протективных антител могут служить белки поверхности мерозонта и так называемые эритроцитарные поверхностные антигены, которые появляются на мембране эритроцита, инфицированного зрелым трофозоитом или шизонтом. Благодаря исследованиям последних лет стали известны белки эритроцитарных стадий *P. falciparum*, которые могли бы быть потенциальными компонентами антималярийной вакцины. К ним относятся такие белки с установленной первичной структурой, как p130 или GBP (Glicophorin-Binding Protein) [8, 9], p155 или RESA (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen) [10], p195 или PMMSA (Precursor to the Major Merozoite Surface Antigens) [11], KAHNP (Knob-Associated Histidine-Rich Protein) [12], SHARP и PfHRP (Histidine- and Alanine-Rich Proteins) [13], p23 или CRA (Circumsporozoite Protein-related Antigen) [14], и др. В настоящее время сделаны первые попытки создания синтетической вакцины, направленной против эритроцитарных стадий *P. falciparum* [15].

Наконец, не менее эффективной могла бы быть вакцина, блокирующая передачу гамет из организма человека в организм комара [16], которая позволила бы ликвидировать природные очаги половых стадий возбудителя в организме комара-переносчика.

В настоящей работе с целью поиска протективных антигенных детерминант было проведено иммунохимическое изучение взаимодействия антител к синтетическим фрагментам ряда белков *P. falciparum* с белками кровяных стадий паразита. Были использованы следующие пептиды, соответствующие предполагаемым антигенным детерминантам (таблица):

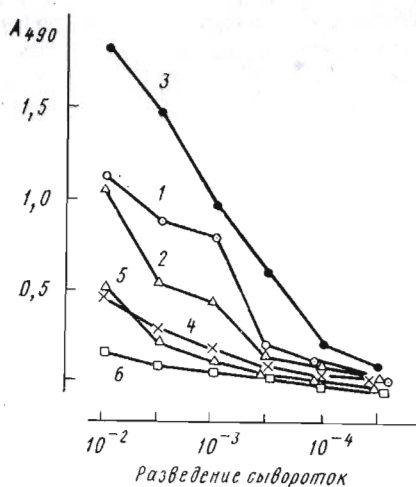


Рис. 1. Данные ИФА по связыванию сывороток анти-T1 (1), анти-T3 (2), анти-T5 (3), анти-T6 (4), анти-T7 (5) и нормальной кроличьей сыворотки (6) с белками эритроцитарных стадий *P. falciparum*

(NANP)_n с молекулярной массой ~5000 Да (T1) из повторяющегося района белка CSP, известная как антигенная детерминанта спорозойтной стадии [3, 17, 18], фрагменты 34—44 (T3) и 67—75 (T8) белка р23 и фрагмент 1064—1071 (T2) белка р195 [19—22], участок (АННААН)₂ (T5) из области повторов белка SHARP [13, 19—22], фрагменты 12—26 (T6) и 31—45 (T7) из повторяющегося региона белка р130 [9, 21, 22].

Иммунохимическое изучение белков *P. falciparum* было проведено с помощью антипептидных антител. Для иммунизации кроликов пептид T1 ($M_r \sim 5000$) использовали в свободном виде, пептиды T2, T5 и T8 — в виде конъюгатов с гемоцианином моллюска фиссуреллы, а пептиды T3, T6 и T7 конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином. Полученные кроличьи антисыворотки специфически связывались с соответствующими пептидами, как показано методом твердофазного ИФА (таблица).

Как видно из таблицы, на пептид T2 и T8 не удалось получить достаточно высокие антипептидные титры. Титр антител, полученных против пептида T1 (1 : 1000), оказался на порядок ниже титра анти-(NANP)-антител, полученных на мышах, иммунизированных пептидом (NANP)₄₀ без носителя [23], но сравним с титром анти-(NANP)-антител, полученных у кроликов (1 : 200 — 1 : 1600) на (NANP)₃₂, конъюгированный с различными носителями [24]. Сыворотки против пептидов T1, T3, T5, T6 и T7, имеющие высокий антипептидный титр, использовались нами в дальнейших экспериментах.

Методом твердофазного ИФА было исследовано взаимодействие полученных сывороток с кровяными стадиями *P. falciparum*, выделенными из несинхронизированной культуры зараженных эритроцитов человека (рис. 1). Показано, что антисыворотки против пептидов T1, T3 и T5 специфически связываются с антигенами эритроцитарных стадий. Это подтверждено дот-блот-анализом на нитроцеллюлозных фильтрах (рис. 2), позволяющим исключить возможное взаимодействие кроличьих антител, полученных на глутаральдегидные связи пептид—носитель, с паразитом, фиксированным на poly(L-Lys) с помощью глутаральдегида (см. «Экспериментальную часть»).

Идентификация белков, являющихся мишенями для антител, проводилась электрофорезом с последующим иммуноблоттингом (рис. 3). Сыворотка анти-T1 связывалась с белком с $M_r \sim 60$ кДа, сыворотка анти-T5 — с белками с $M_r \sim 50$ и 70 кДа, а сыворотки анти-T6 и анти-T7 — с рядом белков с M_r от 75 до 105 кДа. Для сывороток анти-T3 связывания с белками в иммуноблоттинге не обнаружено.

Связывание антисыворотки против (NANP)_n (T1) с белками кровяных стадий *P. falciparum* подтверждает данные об имеющейся перекрестной специфичности между иммунодоминантным эпитопом белка CSP спорозойтной стадии и антигенными детерминантами белков кровяных стадий. Имеются данные о том, что антиген бесполой кровяной стадии и CS-белок

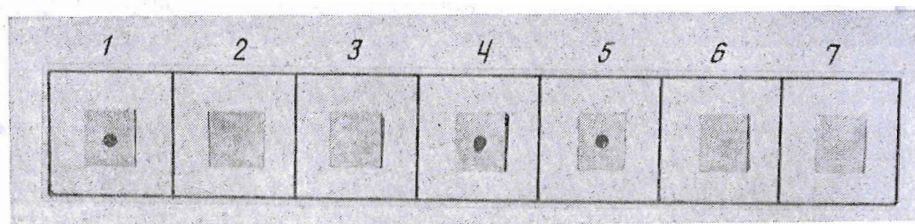


Рис. 2. Дот-блот-анализ связывания сывороток анти-T1 (1), анти-T6 (2), анти-T7 (3), анти-T3 (4), анти-T5 (5) и контрольных сывороток: нормальной кроличьей сыворотки (6) и сыворотки анти-лизоцим (7) с белками эритроцитарных стадий *P. falciparum*

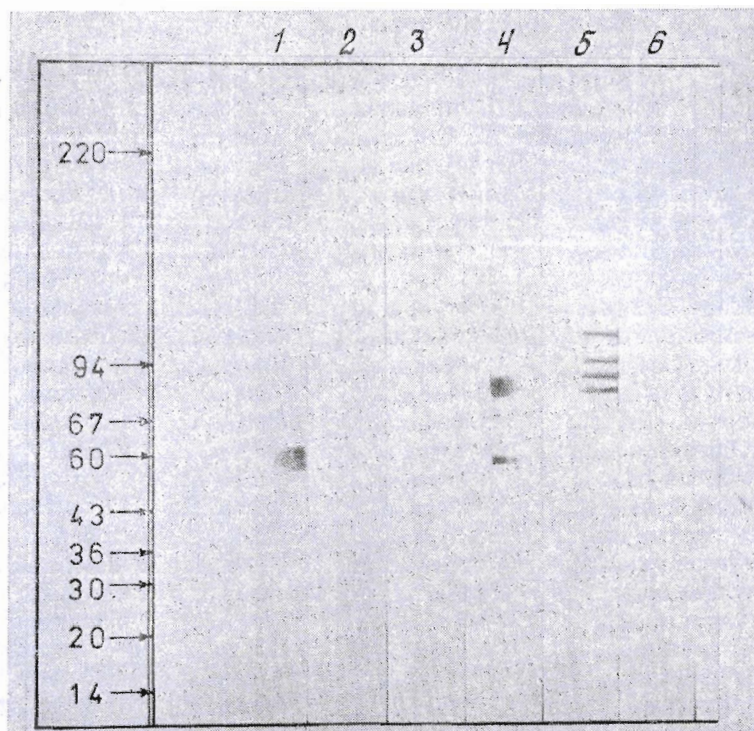


Рис. 3. Иммуноблоттинг белков эритроцитарных стадий *P. falciparum* с использованием сывороток анти-T1 (1), анти-T3 (2), анти-T5 (4), анти-T7 (5) и контрольных сывороток: сыворотки анти-лизоцим (3) и нормальной кроличьей сыворотки (6). Слева — положение белков-стандартов с указанной молекулярной массой (кДа)

реагировали с одним и тем же моноклональным антителом [25]. Этот антиген кровяной стадии содержал короткую вырожденную последовательность из четырех аминокислот, связанную с повторами CS-белка [14]. Антитела к CS-белоксвязанному антигену (CRA), иначе называемому p23, **аффинно** очищенные из человеческой сыворотки, реагировали с **поверхностью** спорозонта [26]. Однако взаимодействие антипептидных антител, полученных на фрагмент (NANP), с белками кровяных стадий ранее **обнаружено** не было. Кроме того, аффинно очищенные антитела против T1 в наших экспериментах ингибировали инвазию эритроцитов мерозоитами *in vitro*. Эти данные подтверждают предположение, что антиспорозонтный иммунитет может вызываться и поддерживаться антигенами бесполовых стадий. В наших экспериментах в иммуноблоттинге сыворотка анти-T1 связывалась с белком со значительно большей молекулярной массой, чем p23, — 60—65 кДа. Идентификация этого белка, по-видимому, потребует дополнительных исследований.

Антисыворотка против пептида T3 в твердофазном иммуноферментном анализе и дот-блот-анализе на нитроцеллюлозных фильтрах специфически

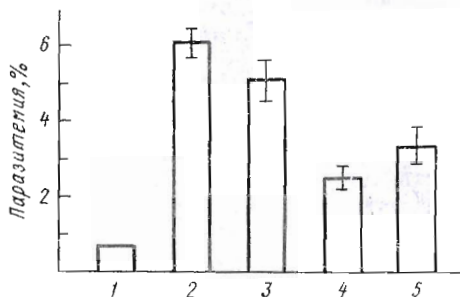
связывалась с кровяными стадиями *P. falciparum*, хотя в иммуноблоттинге мы связывания не обнаружили. Этот факт может объясняться тем, что антисыворотка узнает конформационно зависимую детерминанту, которая денатурирует при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия. Связывание антисыворотки с «нативным» паразитом в ИФА позволяет предположить, что данный фрагмент белка CRA может быть мишенью для протективных антител.

Антисыворотка против (АННААН)₂ (Т5) связывалась с бесполоыми кровяными стадиями *P. falciparum* в иммуноферментном анализе в разведении 1:10 000, а в иммуноблоттинге взаимодействовала с двумя белками с мол. массами ~50 и ~70 кДа. Белок ~50 кДа, по-видимому, соответствует белку SHARP, мол. масса которого, по данным литературы, варьирует от 30 до 50 кДа, а белок ~70 кДа соответствует родственному белку PfHRP2, мол. масса которого изменяется от 65 до 80 кДа [6]. Эти белки содержат родственные последовательности: SHARP имеет блок повторов АННААН, а PfHRP2 — АННААД, которые различаются по одной позиции [13]. Таким образом, использование в качестве антигенной детерминанты последовательности АННААН позволяет получить антитела, реагирующие как с белком SHARP, так и с белком PfHRP2. Кроме того, аффинно очищенные антитела против Т5 ингибировали рост паразита в культуре *in vitro*. Это также указывает на то, что последовательность АННААН может быть антигенной детерминантой кровяной стадии паразита.

Пептиды Т6 и Т7 являются фрагментами 50-членной аминокислотной последовательности из повторяющегося региона белка р130 (GBP) [9]. Несмотря на высокий антипептидный титр антисывороток, полученных против пептидов Т6 и Т7 (1:10 000), связывания их с кровяными стадиями паразита в иммуноферментном анализе обнаружено не было. Однако в иммуноблоттинге антисыворотки связывались с рядом белков от 75 до 105 кДа, давая идентичную картину. По данным литературы, GBP представляет собой растворимый белок с мол. массой 105—130 кДа. Считают, что GBP секретируется шизонтом и выделяется в культуральный супернатант, где и был найден в виде белков с мол. массами 84 и 110 кДа [27, 26]. По-видимому, в иммуноблоттинге антисыворотки против пептидов Т6 и Т7 связываются с белком GBP и продуктами его процессирования. То, что антисыворотки против Т6 и Т7 не связываются с «нативным» паразитом в иммуноферментном анализе, может объясняться тем, что соответствующие этим пептидам участки белка не экспонируются на его поверхности в нативной конформации, но становятся доступны для узнавания антителами после денатурации этого белка во время электрофореза. Или же антигенная детерминанта в «нативном» белке имеет конформацию, которую антипептидные антитела не узнают. Иное объяснение может быть предложено в связи с данными о местонахождении этого белка. Имеются данные, полученные с помощью электронной микроскопии, о том, что GBP локализуется на поверхности мерозонта [28]. В других работах найдены антитела против GBP, реагирующие с антигеном внутри эритроцитов [27]. Исходя из представлений, что GBP является секретируемым паразитом белком, легко объяснить полученные результаты. В иммуноблоттинге GBP становится доступным для антител после разрушения паразита в буфере и освобождения белка. В ИФА, напротив, мерозонты не разрушаются, а имеющиеся на их поверхности, но не связанные с ней молекулы GBP удаляются во время многократной отмывки суспензии паразита буфером.

Ингибирование роста паразита в культуре антипептидными антителами изучалось с помощью антител, специфичных к пептидам Т1, Т2 и Т5, которые были выделены из антисывороток аффинной хроматографией на соответствующих пептидах, иммобилизованных на Affi-Gel 10. Обнаружено, что при инкубации в течение 48 ч аффинно очищенных антител в культуре эритроцитов человека, инфицированных *P. falciparum*, антитела против Т1 и Т5 способны ингибировать рост паразитов *in vitro* (рис. 4). Антитела анти-Т1 в количестве 150 мкг/мл ингибируют рост на 57%, а ан-

Рис. 4. Ингибирование роста паразита в культуре эритроцитов человека. 1 — исходный уровень паразитемии; 2 — паразитемия после 48 ч инкубации в отсутствие препаратов (2), в присутствии нормальных иммуноглобулинов кролика (3), антител анти-T1 (4), анти-T5 (5). Концентрация антител 150 мкг/мл. Представлены данные трех параллельных проб



ти-T5 — на 42% от исходного уровня. Антитела анти-T2 не ингибировали рост паразита в культуре.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что участки белков, соответствующие пептидам T1, T3 и T5, экспонированы на поверхности белков кровяных стадий возбудителя малярии *P. falciparum* и могут служить мишенями для протективных антител. Используемые в работе подходы, основанные на получении антипептидных антител заданной специфичности и исследовании взаимодействия антител с паразитарными белками, могут оказаться полезными в изучении антигенов малярийного паразита и, следовательно, разработке диагностических средств и вакцинных антималярийных препаратов.

Авторы выражают глубокую признательность В. Т. Иванову за постановку задачи и научное руководство, Т. М. Андроновой за ряд полезных обсуждений, а также В. М. Липкину за интерес и внимание к работе.

Экспериментальная часть

Аминокислотные последовательности белков PMMSA [11], CRA [14] и фрагменты GBP [9] были проанализированы с помощью эмпирических методов нахождения вероятностных антигенных детерминант. Для синтеза были выбраны фрагменты, одновременно имеющие локальные максимумы гидрофильности (длина сегмента сканирования 6 аминокислот, шкала Хоппа — Вуддса), антигенности (шкала Веллинга), подвижности полипептидной цепи (шкала Карплюса — Шульца) и обладающие высоким потенциалом β -изгиба (шкала Чоу — Фасмана).

Синтез пептидов и конъюгатов. Пептиды T2, T3, T5, T6, T7 и T8 (аминокислотные последовательности пептидов см. в таблице) были синтезированы твердофазным методом [29] в неавтоматизированном варианте. Синтез пептидов проводили на хлорметилированном сополимере стирола и дивинилбензола Bio-beads SX-1 (Bio-Rad) с содержанием активного хлора 1,34 мэкв./г. Посадку первой аминокислоты осуществляли по методу Гизина [30] с помощью цезиевой соли. При этом стремились достичь количественного замещения хлора и при необходимости повторяли процедуру. Стартовая загрузка аминоацилполимеров составляла 1,0—1,4 мэкв./г. Для защиты боковых функций α -Вос-аминокислот использовали простые и сложные бензильные эфиры (Asp, Glu, Ser, Thr), 2,6-дихлорбензильный эфир (Tyr), 2-хлорбензилоксикарбонильную (Lys), 2,4-динитрофенильную (His), тозилую (Arg) защитные группы. Синтез проводили с использованием 3-кратного избытка симметричных ангидридов или 1-оксибензотриазоловых эфиров, приготовленных при 0° С в диметилформамиде. За полнотой прохождения конденсации следили с помощью количественного нингидринового теста [31], в случае пролина использовали пикриновый тест [32]. Конденсацию повторяли, если оставалось более 0,5% непрореагировавших аминогрупп, меньшее количество блокировали уксусным ангидридом в пиридине. Для деблокирования Вос-группы использовали 50% раствор трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Перед отщеплением от полимера со всех пептидильных полиме-

ров снимали Вос-группу, а пептидилполимеры T5 и T6 затем обрабатывали 30 мин 1% раствором тиофенола в диметилформамиде для снятия 2,4-динитрофенольной группы с гистидина. Пептиды T6, T7 и T8 отщепляли при помощи процедуры «Low-High HF» [33]. Идентификация полученных пептидов осуществлялась с помощью аминокислотного анализа, масс-спектрометрии методом FAB- и ЯМР-спектроскопии. Данные этих методов анализа подтверждали структуры синтезированных пептидов. Гомогенность пептидов контролировалась с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии.

Пептидный полимер $(\text{NANP})_n$ (T1) был получен поликонденсацией активированного эфира тетрапептида Вос-Asp-Ala-Asp-Pro-OPfp после отщепления Вос-группы. Поликонденсацию проводили в диметилформамиде при комнатной температуре в течение 30 сут.

Конъюгация пептидов с носителями: 1) конъюгаты пептидов T2, T5 и T8 с белками BSA, KLH и овальбумин были получены при помощи глутарового альдегида [34]; 2) конъюгаты пептидов T3, T6 и T7 с BSA были получены с помощью гетеробифункционального реагента MCS (N-оксисукцинимидного эфира N,N-бис(малеимидо)-6-аминокапроновой кислоты). Для этого с помощью стандартных процедур твердофазного синтеза к N-концам пептидов T3, T6 и T7 был присоединен S-ацетамидометилцистеин. Непосредственно перед конъюгацией для отщепления ацетамидометильной группы пептиды превращали в меркурированные (II) соединения, которые разрушали газообразным сероводородом для выделения пептидов со свободной сульфгидрильной группой; 3) конъюгация пептидов с МАВП. Для получения конъюгатов проводили конденсацию ангидридных групп носителя МАВП с аминогруппами пептидов в водной среде.

Подробное описание выбора вероятностных антигенных детерминант, синтеза пептидов и их конъюгатов с белками-носителями дано в сообщении [22].

Получение антисывороток. Пептид T1 (полимер) в свободном виде и конъюгаты T8-KLH, T2-KLH, T5-KLH, T3-BSA, T6-BSA и T7-BSA были использованы для иммунизации новозеландских кроликов (самок) возрастом 7—8 нед. Иммунизацию проводили подкожно с интервалом в 14 сут. Первичную иммунизацию осуществляли дозой 0,5 мг в полном адъюванте Фрейнда (Difco, США), вторую и третью — дозами 0,25 мг в неполном адъюванте Фрейнда. Через 10 сут после третьей иммунизации у кроликов брали из ушной вены кровь и выдерживали ее 2 ч при 4° С. Сыворотку получали центрифугированием при 1600 g и 4° С, разделяли на небольшие порции и хранили при -20° С.

Твердофазный иммуноферментный анализ проводили в 96-луночных панелях для микротитрования (Flow Laboratories, США). В качестве антигенного материала использовали пептиды, иммобилизованные на иных носителях, нежели применявшиеся для иммунизации, — овальбумине или МАВП (таблица). Антигенный материал в концентрации 1 мг/мл в натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 NaCl (PBS), помещали в панели для микротитрования по 50 мкл в лунку и сорбировали 16 ч при 4° С. При использовании в качестве тест-антигена конъюгатов пептид-МАВП для создания дополнительного статического заряда панель предварительно инкубировали 1 ч с 1% раствором poly(L-Lys) в PBS. Забивку остаточных мест сорбции проводили PBS, содержащим 1% BSA, 1% поливинилпирролидона, 0,05% твина-20, в течение 1 ч при 37° С. Кроличьи антисыворотки инкубировали 2 ч по 50 мкл на лунку в PBS с твином-20, содержащим 1% BSA. В качестве вторичных антител использовались козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); субстрат для пероксидазы — о-фенилендиамин; реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 н. H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность продуктов реакции при 490 нм на приборе MicroELISA Auto Reader MR580 (Dynatech, Швейцария). В качестве отрицательного контроля использовали: 1) сыворотку нормального кролика; 2) другой антиген (носитель без пептида).

При тестировании антипептидных сывороток против эритроцитарных стадий *P. falciparum* использовали модифицированный метод иммуноферментного анализа. Панели предварительно инкубировали с 1 % раствором poly(L-Lys) в PBS по 50 мкл на лунку в течение 1 ч при 20° С. После удаления раствора poly(L-Lys) наносили суспензию кровяных стадий малярийного паразита (см. ниже) в PBS (по белку 0,1—0,5 мг/мл) по 50 мкл на лунку. Через 1 ч суспензию аккуратно отсасывали пипеткой и осевших паразитов фиксировали 0,1 % раствором глутаральдегида в PBS. Лунки промывали 3 раза PBS с твином-20 и забивали остаточные места сорбции как описано выше. Остальные операции те же.

Дот-блот-анализ. Квадратики ($\sim 0,7 \times 0,7$ см) нитроцеллюлозы (0,22 мкм; Whatman, Англия) помещали для удобства работы в лунки 24-луночной панели. На сухую нитроцеллюлозу наносили суспензию кровяных стадий паразита в PBS. Остаточные места сорбции на нитроцеллюлозе забивали таким же образом, как при иммуноферментном анализе. Взаимодействие с первичными и вторичными антителами то же. В качестве субстрата для пероксидазы использовали 4-хлор-1-нафтол. Прохождение ферментативной реакции оценивали визуально, нитроцеллюлозу отмывали водой и фотографировали.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Осадок паразитов эритроцитарных стадий растворяли в буфере для образцов, содержащем 4 % додецилсульфат натрия, и использовали для электрофореза. Количество белка, наносимого на дорожку, составляло 10 мкг. Электрофорез в градиентном (7,5—15 %) полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по методу Лэммли [35] в приборе для вертикального электрофореза (LKB, Швеция).

Белки переносили на нитроцеллюлозу (0,22 мкм) с помощью прибора для электропереноса Transfor (LKB, Швеция) как описано [36]. Качество переноса определяли путем окрашивания полоски нитроцеллюлозы 0,1 % раствором амидо-черного в смеси метанол — уксусная кислота — вода (45 : 10 : 45) в течение 5 мин.

Остальные полоски инкубировали 12 ч в 0,05 М трис-буфере (pH 7,5), содержащем 0,15 М NaCl (TBS), для ренатурации белков [37]. Забивку остаточных мест сорбции на нитроцеллюлозе проводили двумя видами буферов (в разных экспериментах): 1) 2 % раствором BSA в TBS; 2) 10 % сывороткой новорожденного теленка (NCS). Затем полоски нитроцеллюлозы инкубировали 4 ч при 20° С с кроличьими антисыворотками, разведенными в соотношении 1 : 100 в TBS, содержащем (в разных экспериментах) 1 % BSA с 0,05 % твина-20 или 10 % NCS, 10 % глицерина, 2 М глюкозу, 0,05 % твина-20 (для уменьшения неспецифического связывания). Нитроцеллюлозу отмывали и добавляли вторичные антитела (козьи против иммуноглобулинов кролика), конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 500 в указанных выше буферах. После инкубации в течение 1 ч при 20° С нитроцеллюлозу отмывали и добавляли субстрат для пероксидазы — 4-хлор-1-нафтол (3 мг/мл в TBS, содержащем 20 % метанола и 0,015 % перекиси водорода). Окрашивание проводили 1 ч, затем нитроцеллюлозу отмывали водой и фотографировали.

Аффинная очистка антипептидных антител. Выделение моноспецифических антител из антисывороток проводили аффинной хроматографией на иммуносорбентах, приготовленных путем иммобилизации соответствующих пептидов на Affi-Gel 10 (Bio-Rad, США). 2,5 мл суспензии Affi-Gel 10 промывали 10 мл изопропанола на стеклянном фильтре, а затем 10 мл холодной деионизованной воды. Добавляли 2 мл раствора пептида (5 мг/мл) и перемешивали суспензию 16 ч при 4° С. Затем переносили суспензию в микроколонку (0,5 × 5 см) и уравнивали PBS. На колонку наносили 5 мл антисыворотки, полученной против соответствующего пептида и несвязавшийся материал элюировали PBS. Специфически связавшиеся антитела элюировали 1 М NaCl в PBS и концентрировали с помощью насадки CX10 (Millipore, США). Выход аффинно очищенных антител составлял в среднем 0,5 мг.

Культивирование кровяных стадий *P. falciparum*. Работу проводили

на непрерывно культивируемых (в течение 3 лет) штаммах *P. falciparum*: хлорхинувствительном штамме М-25/Заир, полученном из Женева, и хлорохинустойчивом штамме F-25, привезенном из Вьетнама. Культуры вели по модифицированному методу [1] на эритроцитах В⁺ с использованием полной питательной среды RPMI 1640 (Gibco, Англия) с добавлением 10% человеческой сыворотки АВ⁺, 5% раствора бикарбоната натрия и 10 мМ буфера HEPES. Нормальный рост культуры происходил при ежедневной смене среды. Уровень паразитемии (отношение числа инфицированных эритроцитов к общему числу эритроцитов) оценивали под световым микроскопом после окрашивания красителем Гимза.

Ингибирование роста паразитов в культуре определяли после 48 ч культивирования в присутствии аффинно очищенных антипептидных антител (в контроле — нормальных иммуноглобулинов кролика) в дозах от 15 до 150 мкг/мл. В каждый опыт брали три параллельные пробы.

Выделение паразита из культуры. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1600 g в течение 10 мин. Супернатант центрифугировали 5 мин при 12 000 g для осаждения мерозоитов, а осадок эритроцитов лизировали 10-кратным объемом 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,2, при 4° С. Затем лизат эритроцитов центрифугировали при 2500 g для отделения крупных клеточных элементов. Оставшихся в супернатанте паразитов осаждали центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин. Полученного таким образом малярийного плазмодия использовали для тестирования антипептидных антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trager W., Jensen J. B. // Science. 1976. V. 193. № 100. P. 673—675.
2. Kemp D. J., Coppel R. L., Cowman A. F., Saint R. B., Brown G. V., Anders R. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 12. P. 3787—3791.
3. Dame G. B., Williams J. L., McCutchan T. F., Weber J. L., Wirtg R. A., Hockmeyer W. T., Maloy W. L., Haynes J. D., Roberts D., Schneider I., Sanders G. S., Reddy E. P., Diggs S. L., Miller L. H. // Science. 1984. V. 225. № 4662. P. 593—599.
4. Ardeshir F., Flint J. E., Reese R. T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 2518—2522.
5. Yoshida N., Nussenzweig R. S., Potonjac P., Nussenzweig V., Aicawa M. // Science. 1980. V. 207. № 4426. P. 71—73.
6. Campbell G. H., Aley S. B., Ballou W. R., Hall T., Hockmeyer W. T., Hoffman S. L., Hollingdale M. R., Howard R. J., Lyon J. A., Nardin E. N., Nussenzweig R. Z., Nussenzweig V., Tsang V. C. W., Weber J. L., Wellems T. E., Young J. F., Zavala F. // Amer. J. Trop. Med. and Hyg. 1987. V. 37. № 4. P. 428—444.
7. Herrington D. A., Clyde D. F., Losonsky G., Cortesia M., Murphy J. R., Devis J., Bagar S., Felix A. M., Heimer E. P., Gillesen D. L., Nardin E., Nussenzweig R. Z., Nussenzweig V., Hollingdale M. R., Levin M. M. // Nature. 1987. V. 328. № 6127. P. 257—259.
8. Ravetch J. V., Kochan J., Perkins M. // Science. 1985. V. 227. № 4694. P. 1593—1597.
9. Kochan J., Perkins M., Ravetch J. V. // Cell. 1986. V. 44. № 5. P. 689—696.
10. Favaloro J. M., Coppel R. L., Corcoran L. M., Foote S. J., Brown G. V., Anders R. F., Kemp D. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 21. P. 8265—8277.
11. Holder A. A., Lokyer M. J., Odink K. G., Sandhu J. S., Riveros-Moreno V., Nicholls S. C., Hillman Y., Davey L. S., Tizard M. L. V., Schwarz R. T., Freeman R. R. // Nature. 1985. V. 317. № 6034. P. 270—273.
12. Triglia T., Stahl H. D., Grewther P. E., Scanlon D., Broun G. V. // EMBO J. 1987. V. 6. № 5. P. 1413—1419.
13. Wellems T. E., Howard R. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 16. P. 6065—6069.
14. Coppel R. L., Favaloro J. M., Grewther P. E., Burkot T. R., Bianco A. E., Stahl H. D., Kemp D. J., Anders R. F., Broun G. V. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 15. P. 5121—5125.
15. Patarrayo M. E., Amador R., Clavio P., Moreno A., Guzman F., Romero P., Tascon A., Franco A., Murillo L. A., Ponton G., Trujillo G. // Nature. 1988. V. 332. № 6160. P. 158—161.
16. Targett G. A. T., Sinden R. E. // Parasitol. Today. 1985. V. 1. № 15. P. 156—159.
17. Zavala F., Cochrane A. H., Nardin E. N., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. // J. Exp. Med. 1983. V. 157. № 6. P. 1947—1957.
18. Nussenzweig V., Nussenzweig R. S. // Cell. 1985. V. 42. № 2. P. 401—403.
19. Иванова Б. Б., Макаров Е. А., Юровский В. В., Садовников В. Б., Андропова Т. М. // Тез. докл. 8-го Всесоюз. симпозиума по химии белков и пептидов. Таллин, 1987. С. 181.

20. Юровский В. В., Тертышникова С. М., Окунева Т. О., Иванов Б. Б., Макаров Е. А., Аллахвердиев А. М. // Тез. докл. 5-й конференции молодых ученых социалистических стран по биоорганической химии. Пушкино, 1988. С. 73—74.
21. Юровский В. В., Тертышникова С. М., Иванов Б. Б. // Тез. докл. 1-го Всесоюз. иммунологического съезда. Сочи, 1989. Т. 1. С. 184.
22. Иванов Б. Б., Юровский В. В., Тертышникова С. М., Андропова Т. М., Иванов В. Т. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17.
23. Del Guidice G., Cooper J. A., Merino J., Verdini A. C., Pessi A., Tonga A. R., Engers H. D., Corradin G., Lambert P.-H. // J. Immunol. 1986. V. 137. № 9. P. 2952—2955.
24. Que J. U., Crys S. J., Ballou R., Furer E., Gross M., Young J., Wasserman G. F., Loomis L. A., Sadoff J. C. // Infect. and Immun. 1988. V. 56. № 10. P. 2645—2649.
25. Hope I. A., Hall R., Simmons D. L., Hyge J. E., Scaife J. G. // Nature. 1984. V. 308. № 5955. P. 191—194.
26. Kemp D. J., Coppel R. L., Anders R. F. // Annu. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 181—208.
27. Bianco A. E., Culvenor J. G., Coppel R. L., Crewther P. I., McIntyre P., Favalaro J. M., Broun V. V., Kemp D. J., Anders R. F. // Mol. and Biochem. Parasitol. 1987. V. 23. № 1. P. 91—102.
28. Pirson P. J., Perkins M. E. // J. Immunol. 1983. V. 134. № 3. P. 1946—1951.
29. Barani J., Merrifield R. B. // The Peptides. V. 2. N. Y.: Acad. Press, 1980. P. 3—285.
30. Gisin B. F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. № 5. P. 1477—1482.
31. Sarin V. C., Kent S. B. H., Tam G. P., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 148—157.
32. Holges R. S., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1975. V. 65. № 1. P. 241—272.
33. Tam J. P., Merrifield R. B. // The Peptides. V. 9. N. Y.: Acad. Press, 1987. P. 185—278.
34. Reichlin M. N. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. P. 159—165.
35. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
36. Otter T., King M. S., Witman G. B. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 2. P. 370—377.
37. Birk H. W., Koepsell H. // Anal. Biochem. 1987. V. 167. № 1. P. 12—22.

Поступила в редакцию
25.IV.1990

После доработки
11.IX.1990

S. M. TERTYSHNIKOVA, V. V. YUROVSKI, B. B. IVANOV, V. B. SADOVNIKOV,
A. M. ALLAKHVERDIEV *

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF SURFACE PROTEIN ANTIGENIC DETERMINANTS OF TROPICAL MALARIA PARASITE *PLASMODIUM* *FALCIPARUM* WITH THE USE OF SYNTHETIC PEPTIDES

Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Pushchino, Moscow Region;

* E. I. Marzinovski Institute of Medical Parasitology and Tropical
Medicine, Ministry of Health of the USSR, Moscow

To develop new approaches to diagnostics and therapy of malaria, we carried out immunochemical study of the surface proteins of the tropical malaria parasite *Plasmodium falciparum* with the use of synthetic peptides corresponding to the suggested antigenic determinants of the parasite proteins. Rabbit antisera raised against the synthetic peptides bound to parasite proteins as shown by ELISA and immunoblotting. Affinity purified anti-peptide antibodies inhibited, in some cases, the parasite growth in the human erythrocytes culture.