



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 578.826 : 578'112.6.083.3

© 1991 г.

*Л. А. Тарасинин*АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ БЕЛКОВ
ГЕКСОНА И ОТРОСТКА АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ТИПА 2*Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев*

Аденовирусы занимают одно из ведущих мест в этиологии заболеваний верхних дыхательных путей. Кроме того, с ними связывают развитие конъюнктивитов, пневмоний, острых гастроэнтеритов, геморрагических циститов [1]. Более половины белковой массы аденовириона составляют капсидные белки: гексон и отросток. Они участвуют в реакции вируснейтрализации, выполняют адресную и защитную функции. Гексон и отросток, как сложно организованные белки, имеют мозаичную антигенную структуру. В их составе содержатся уникальные (типоспецифические) и перекрестно-реагирующие антигенные детерминанты, топография которых не установлена. Синтетические пептиды способствуют решению этой задачи.

Известно, что концевые фрагменты многих белков обладают антигенной активностью. Это связано во многом с их поверхностной ориентацией и большей подвижностью по сравнению с другими участками полипептидной цепи [2]. В данной работе изучены антигенно-активные N- и C-концевые пептиды гексона и отростка аденовируса человека типа 2 (далее — аденовирус 2). При выборе пептидов учитывали тот факт, что N-конец полипептидной цепи гексона свободен [3], а C-конец отростка ориентирован наружу (по отношению к вирусному капсиду) [4]. Таким образом, исследовали синтетические пептиды, соответствующие участкам 1—15 полипептида гексона аденовируса 2 (Ac-Ala-Thr-Pro-Ser-Met-Met-Pro-Gln-Trp-Ser-Tyr-Met-His-Ile-Ser) (I) и участку 571—582 полипептида отростка аденовируса 2 (Thr-Asn-Ser-Tyr-Thr-Phe-Ser-Tyr-Ile-Ala-Gln-Glu) (II)*.

Пептид (I) конъюгировали с БСА с помощью водорастворимого карбодимида. Конъюгат, обозначенный К-I, содержал >10 моль пептида на 1 моль белка. Пептид (II) конъюгировали с БСА, используя глутаровый альдегид. Степень модификации составила >19 моль пептида на 1 моль БСА. Этот конъюгат обозначен К-II. После диализа конъюгаты эмульгировали в полном адьюванте Фрейнда и иммунизировали кроликов из расчета 500 мкг 4 раза с интервалом 3 нед. Кровь отбирали на 32-е, 53-и и 77-е сут после первой иммунизации**.

* Исследования по синтезу пептидов и конъюгации их с носителем выполнены сотрудниками ГКХ «Импульс» НПО «Вектор» под руководством В. В. Самукова и будут описаны в отдельной статье. По данным ВЭЖХ, содержание основного вещества в пептидах (I) и (II) составляло 96—98%, структура подтверждена данными аминокислотного анализа.

** Аналогичным образом проводили иммунизацию кроликов очищенными белками аденовируса 2.

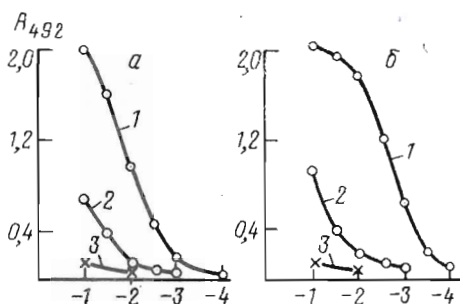


Рис. 1. Кривые связывания гипериммунных кроличьих сывороток с пептидами (I) (а) и (II) (б): 1 — сыворотки к К-I (а) и К-II (б); 2 — сыворотки к гексону (а) и отростку (б); 3 — нормальная кроличья сыворотка (а, б). По оси абсцисс 10-кратные разведения сывороток

После двух- и трехкратной иммунизации кроликов конъюгатами концевых пептидов гексона и отростка аденовируса 2 на 32-е и 53-и сут * методом ИФА обнаружили образование антител, реагирующих как с собственными конъюгатами, так и с нативными вирусными белками.

При проведении иммуноферментного анализа в лунках полистироловых планшет сорбировали конъюгаты пептидов (по 2 мкг) или вирусные белки (по 5 мкг) в 0,02 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,0. Пептиды растворяли в 0,01 М ацетате аммония, pH 7,2, и упаривали при 70–80° С непосредственно в лунках планшет. Далее проводили ИФА, как описано [5].

При сорбции в лунках планшет белка гексона аденовируса 2 титр гомологичных антител (lg) составлял 3,6–3,7, а антител к конъюгату N-концевого пептида гексона (К-I) 2,3–2,5, в то время как в системе ИФА с сорбированным К-I титр анти-(К-I)-антител был равен 3,6–4,0. Еще более важен тот факт, что и сыворотки к нативным капсидным белкам аденовируса 2 связываются с синтетическими пептидами (I) и (II), хотя и менее активно, чем соответствующие антипептидные антитела (рис. 1).

Как показали результаты ИФА (данные не приведены), сыворотки к гексонам гетерологичных вирусов — аденовируса человека типа 1 и аденовируса обезьян S-16 — связываются с синтетическим аналогом N-концевого фрагмента гексона аденовируса человека типа 2 также. Следовательно, можно предположить, что данный пептид (I) входит в состав антигенной детерминанты, обладающей перекрестной реактивностью. Этот результат согласуется с данными о наличии гомологии в N-концевой области среди гексонов разных аденовирусов [6].

Дополнительным подтверждением активности синтезированных пептидов явилось применение индуцированных ими антител (IgG) в качестве лигандов при аффинной хроматографии.

Аффинную хроматографию осуществляли согласно рекомендации [7]. Иммуносорбенты готовили на основе CNBr-активированной сефарозы 4В и очищенных IgG специфических гипериммунных сывороток **. В качестве стартового использовали 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,2–7,3, с добавлением 0,2 М NaCl, а элюции выполняли 0,1 М фосфатным буфером, pH 11,2–11,3, в присутствии 0,5 М NaCl. Фракции тестировали с помощью метода точечной иммуноферментной детекции [8] и электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия.

Антитела к К-I и К-II сорбировали из смеси вирусных белков аденовируса типа 2 *** гексоны и отростки соответственно (рис. 2). Использование 0,1 М фосфатного буфера, pH 11,2–11,3, обеспечивало эффективную элюцию и сохранение нативности (антигенности) выделяемых белков. Очевидно, подобная система будет пригодна в биотехнологических работах по получению очищенных белков аденовирусов. Сами пептиды могут послужить основой при создании тест-систем для серодиагностики аденовирусной инфекции.

В связи с выявленной антигенной активностью пептидов (I) и (II) можно предположить, что в составе капсидных белков аденовирусов

* На 77-е сут при четырехкратной иммунизации активность сывороток снижалась.

** IgG получали осаждением сульфатом аммония и/или аффинной хроматографией на белок-A-сефарозе CL4В.

*** Препарат предоставлен С. И. Бутенко (Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев). Очистку проводили согласно [9].

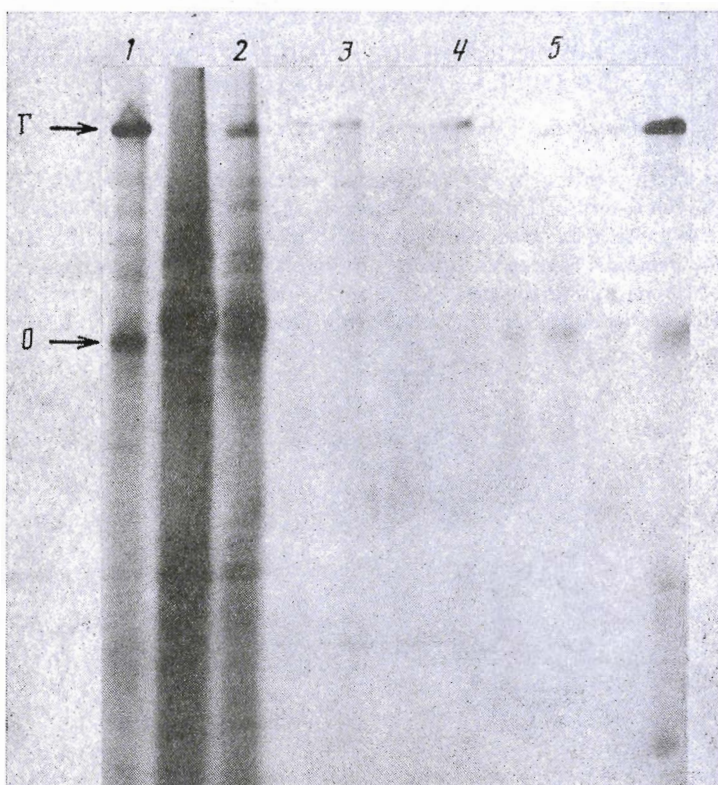


Рис. 2. Электрофоретический анализ препаратов, полученных при фракционировании белков аденовируса человека типа 2 с помощью аффинной хроматографии на сорбентах с иммуноглобулинами против конъюгатов К-I и К-II. Электрофоретический анализ выполнен в 11% ПААГ согласно Леммли. Стрелками указано положение белков гексона (Г) и отростка (О). 1 — очищенный препарат аденовируса 2; 2 — смесь белков аденовируса 2; 3, 4 — обогащенные фракции очистки на К-I-сорбенте (гексон); 5 — обогащенная фракция очистки на К-II-сорбенте (отросток)

N- и C-концевые участки формируют непрерывные (линейные) детерминанты или же являются важнейшей частью прерывистых (составных) антигенных детерминант. Дальнейшие эксперименты в этом направлении позволяют расшифровать антигенную структуру гексона и отростка — иммунодоминантных белков аденовирусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дяченко Н. С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л. Н., Ванцак Н. П., Тарасишин Л. А., Адам Е. Аденовирус, клетка, организм. Киев: Наук. думка, 1988. 232 с.
2. Van Regenmortel M. H. V. // Trends Biochem. Sci. 1986. V. 11. № 1. P. 36—39.
3. Roberts M. M., White J. L., Grutter M. G., Burnett R. M. // Science. 1986. V. 232. № 4754. P. 1148—1151.
4. Devaux C., Cailliet-Boudin M.-L., Jacrot B., Boulanger P. // Virology. 1987. V. 161. № 1. P. 121—128.
5. Тарасишин Л. А., Нетребя Н. И., Дяченко Н. С. // Врачеб. дело. 1989. № 4. С. 119—120.
6. Kinloch R., Maskay N., Mautner V. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 10. P. 6431—6436.
7. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 339—410.
8. Тарасишин Л. А. // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. 1986. № 5. С. 45—46.
9. Прешнос Б., Рассел В. Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. С. 254—269.

Поступило в редакцию
5.VI.1990

После доработки
14.II.1991

**ANTIGENIC PROPERTIES OF THE SYNTHETIC PEPTIDES OF HEXON
AND FIBER OF HUMAN ADENOVIRUS TYPE 2**

Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Peptides corresponding to the N-terminal part of the hexon of human adenovirus type 2 and to the C-terminal part of the fiber of this virus were synthesized. Conjugated with BSA these peptides induced development of antibodies binding both with the peptides and the virus proteins. Sera to the hexon and fiber bound also with the synthetic peptides. Immunosorbents containing the anti-peptide antibodies were prepared, and the hexon and fiber proteins were isolated from the adenovirus protein pool by the affinity chromatography.