



УДК 578.857.1.083.3

© 1994 Е. А. Сухачева, В. К. Новиков\*,  
С. М. Амбросова

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСА ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва:*

\* *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, кафедра вирусологии биологического факультета*

Ключевые слова: моноклональные антитела, антигенная структура, вирус штриховатой мозаики ячменя.

Получено шесть стабильных гибридных линий, продуцирующих моноклональные антитела (МА) к вирусу штриховатой мозаики ячменя (Barley stripe mosaic virus, BSMV). Для всех имеющихся МА определен подкласс и константа связывания с антигеном. Изучено взаимодействие МА с BSMV разных штаммов (V-1, Норвич, Мироновка) и показано, что исследованные штаммы BSMV серологически идентичны. На поверхности частицы BSMV тремя независимыми методами — аддитивным тестом, конкурентным ИФА, реакцией торможения латекс-агглютинации — выделены три участка связывания МА.

Вирус штриховатой мозаики ячменя (BSMV) — представитель группы *Hordeiviruses*, которая включает в себя три палочкообразных вируса с многокомпонентным геномом. Кроме BSMV в эту группу входят полулатентный вирус мятлика (*Poa semilatifolius virus*) и вирус кольцевой пятнистости лихниса (*Lychnis ringspot virus*). BSMV представляет собой палочкообразную частицу длиной 1300 Å и диаметром 190—200 Å. Находящаяся в центре вирусной частицы РНК окружена расположенными по спирали субъединицами белка оболочки (СР), молекулярная масса каждой из которых около 22 кДа, а их количество в вирусной частице около 1100 штук. При изменении внешних условий (например, при высоких значениях рН или в растворах солей  $\text{CaCl}_2$  или  $\text{LiCl}$ ) происходит диссоциация вирусной частицы на РНК и белковые субъединицы. Диссоциированный белок в зависимости от рН и ионной силы раствора образует различные белковые агрегаты (диски, парные диски, стопки дисков) вплоть до восстановления специфических вирусных структур [1]. На сегодняшний день BSMV достаточно подробно изучен с точки зрения структуры и экспрессии вирусного генома,

Использованы сокращения: МА — моноклональные антитела; BSMV — вирус штриховатой мозаики ячменя; СР — белок оболочки; ИФА — иммуноферментный анализ; ПХ — пероксидаза хрена; ПЛЛ — полиакролеиновый латекс; BSA — бычий сывороточный альбумин; PBS — фосфатно-солевой буфер (0,01 М, рН 7,2); НАТ — среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин,  $4 \cdot 10^{-7}$  М аминоптерин и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидин; НТ — среда, содержащая  $10^{-4}$  М гипоксантин и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидин.

Адрес для переписки: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Сухачевой Е. А.

Некоторые характеристики МА, взаимодействующих с BSMV, штамма V-1

Гибридома	Титр жидкости		Субкласс	$K_D, M^{-1}$
	культуральной	асцитной		
B1	$5 \cdot 10^4$	$10^7$	IgG2a	$2,84 \cdot 10^{10}$
B7	$10^3$	$10^6$	IgG2a	$1,54 \cdot 10^9$
H9	$10^4$	$10^7$	IgG1	$1,65 \cdot 10^{10}$
B5	$5 \cdot 10^2$	$10^5$	IgM	$2,35 \cdot 10^7$
B6	$10^3$	$10^5$	IgM	$4,17 \cdot 10^7$
2A11	$10^3$	$10^5$	IgG1	$4,37 \cdot 10^6$

имеется также информация о первичной структуре CP BSMV [2, 3]. В то же время антигенная структура BSMV детально не изучена.

В настоящее время один из наиболее информативных подходов к изучению антигенной структуры различных объектов — применение для этих целей моноклональных антител (МА), которые служат выкоспецифическими иммунологическими реагентами и позволяют выявлять мельчайшие детали антигенной структуры исследуемого объекта. Целый ряд работ посвящен применению МА в изучении вирусов растений, таких, как вирус табачной мозаики (Tobacco mosaic virus) [4], X-вирус картофеля (Potato virus X) [5], потивирусы [6], вирус мозаики люцерны (Alfalfa mosaic virus) [7].

Нами было получено шесть стабильных гибридомных линий, продуцирующих МА, взаимодействующие с BSMV. На этапе тестирования и отбора антителопродуцирующих клонов методом непрямого сэндвич-ИФА в качестве антигена были использованы разные штаммы BSMV (V-1, Норвич, Мироновка). Для всех МА был определен подкласс и константа связывания с антигеном ( $K_D$ ) (табл. 1). Все имеющиеся в нашем распоряжении МА специфически взаимодействовали со всеми тестированными штаммами BSMV, что позволило сделать вывод об универсальности эпитопов, к которым направлены полученные МА, для всех исследованных штаммов BSMV. Тот факт, что среди достаточно большого количества первичных гибридомных культур не удалось выявить ни одного клона, продуцирующего МА, специфичные к одному или нескольким (но не ко всем) штаммам BSMV, свидетельствует о высокой степени серологического родства данных штаммов вируса. Эти результаты подтверждают имеющуюся в литературе информацию о большом структурном сходстве белков оболочки разных штаммов BSMV и стабильности гена, кодирующего белок [8].

Следующим этапом работы стало изучение эпитопной структуры BSMV, т. е. выяснение того, являются ли участки связывания всех полученных МА полностью совпадающими, частично перекрывающимися или совершенно различными. Для ответа на этот вопрос было использовано три независимых метода: 1) аддитивный тест, который основан на количественном анализе связывания МА с антигеном в ИФА [9, 10]; 2) конкурентный ИФА; 3) реакция торможения латекс-агглютинации с BSMV.

Рассмотрим результаты, полученные каждым из трех методов.

При проведении аддитивного теста для каждой пары МА был определен индекс аддитивности, рассчитанный по формуле

$$AI = (2 \cdot A_{1+2} / (A_1 + A_2) - 1) \cdot 100\%,$$

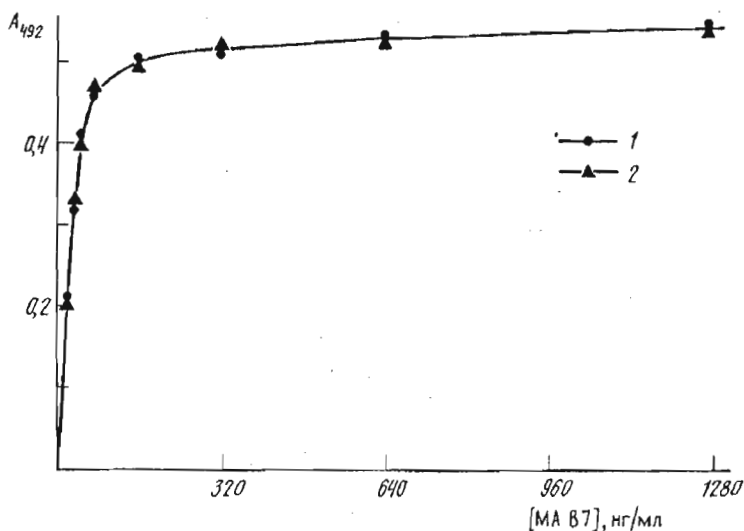


Рис. 1. Определение насыщающей концентрации МА В7 для аддитивного теста в сэндвич-ИФА с использованием разведения антивидового конъюгата, равного 1/400 (1) и 1/800 (2)

где  $AI$  — индекс аддитивности;  $A_1$ ,  $A_2$  и  $A_{1+2}$  — оптическое поглощение при взаимодействии МА1, МА2 и смеси МА1 и МА2 с антигеном в ИФА.

Если два МА конкурируют за один и тот же эпитоп, то  $A_{1+2} \rightarrow (A_1 + A_2)/2$ , тогда  $AI \rightarrow 0\%$ . Если же связывание двух МА с антигеном независимо, то  $A_{1+2} \rightarrow A_1 + A_2$ , тогда  $AI \rightarrow 100\%$ . Реально мы имеем не 0 и 100%, а промежуточные цифры; при этом считается, что если  $AI < 20\%$ , то МА конкурируют за один и тот же участок связывания, если  $AI > 60\%$ , то эпитопы двух антител не перекрываются, если же  $20\% < AI < 60\%$ , то либо антитела направлены к перекрывающимся эпитопам, либо эпитопы МА различны, но существуют пространственные ограничения на одновременное связывание двух МА с антигеном.

При проведении аддитивного теста необходимо выполнение двух условий: 1) МА1 и МА2 должны быть в количествах, достаточных для полного насыщения антигена; 2) используемый для проявления ферментативной реакции конъюгат антимышиных антител с пероксидазой хрена должен присутствовать в избытке.

Для всех МА были построены кривые насыщения и определены насыщающие концентрации (пример такой кривой для МА В7 представлен на рис. 1). Чтобы быть уверенным, что плато на графике достигается действительно за счет насыщения антигена антителами, а не вследствие исчерпания в системе конъюгата, опыт был повторен с удвоенной концентрацией конъюгата. Совпадение двух кривых свидетельствует о выполнении поставленных нами условий.

Мы определили индексы аддитивности для МА, взаимодействующих с BSMV, с помощью двух вариантов непрямого ИФА: с сорбированием BSMV непосредственно на плашку (табл. 2) и сэндвич-ИФА (табл. 3). Анализ приведенных результатов позволяет сделать некоторые выводы относительно эпитопной структуры BSMV. Во-первых, мы можем выделить МА В7, которое имеет высокие индексы аддитивности в сочетании с любыми другими МА, что позволяет сделать вывод о наличии на поверхности BSMV обособленного эпитопа для данного МА. Несовпадение данных для пары Н9—В7 в двух вариантах ИФА может быть объяснено тем, что при сорбировании BSMV непосредственно на пластик происходят некоторые изменения конформации вирусной частицы, что затрудняет одновременное присоединение МА В7 и Н9. Во-вторых, эпитопы трех МА, а именно В1, Н9 и 2А11, в той или иной степени перекрываются друг с другом. Однако МА из данной группы ведут себя по-разному в отношении МА В5,

Индексы аддитивности для МА, взаимодействующих с BSMV в ИФА  
 Антиген сорбируется непосредственно на плашку; индексы аддитивности приведены в процентах

МА	В1	В7	Н9	В5	В6	2А11
В1	2	72	9	11	70	40
В7	72	6	26	85	71	68
Н9	9	26	4	73	60	5
В5	11	85	73	5	69	53
В6	70	71	60	69	6	68
2А11	40	68	5	53	68	7

Таблица 3

Индексы аддитивности для МА, взаимодействующих с BSMV в сэндвич-ИФА

МА	В1	В7	Н9	В5	В6	2А11
В1	7	68	18	9	н.о.*	19
В7	68	2	84	85	46	87
Н9	18	84	0	80	н.о.	13
В5	9	85	80	0	»	82
В6	н.о.	46	н.о.	н.о.	0	88
2А11	19	87	13	82	88	10

\* н. о. — не определялся.

поскольку мы имеем высокие индексы аддитивности для пар В5—Н9 и В5—2А11, что говорит о несовпадении эпитопа МА В5 с эпитопами МА Н9 и 2А11, но в то же время одновременное присоединение МА В5 и В1 к вирусной частице невозможно, о чем свидетельствуют низкие индексы аддитивности для пары В5—В1. Вероятно, в данном случае мы имеем дело либо с двумя эпитопами, имеющими небольшой общий участок, который вносит существенный вклад во взаимодействие с каждым из двух рассматриваемых МА, либо с изменением конформации одного из эпитопов после присоединения МА к другому эпитопу (возможно, не перекрывающемуся с первым). И наконец, третий вывод, который можно сделать на основании анализа индексов аддитивности, — это вывод о наличии обособленного эпитопа для МА В6, по крайней мере в случае сорбирования частиц BSMV непосредственно на пластик. При постановке аддитивного теста обязательно еще раз контролируется насыщенность антигена каждым МА, для чего определяется индекс аддитивности для пары из двух одинаковых антител, который, как видно из табл. 2 и 3, не превышает 10%, так что сделанные нами выводы о взаимном расположении эпитопов вполне корректны.

Второй использованный нами метод — это конкуренция конъюгатов МА с пероксидазой хрена с немечеными МА за связывание с BSMV в сэндвич-ИФА. Были получены конъюгаты МА В1 и 2А11 с пероксидазой хрена (ПХ) и изучена конкуренция каждого из этих конъюгатов со всеми имеющимися МА. BSMV, иммобилизованный на поверхности 96-луночных планшетов, сенсibilизированных кроличьей поликлональной антисывороткой к BSMV, инкубировали в присутствии свободных МА в различных количествах, после чего без отмычки вносили в лунки конъюгат МА — ПХ до рабочего разведения. Если эпитопы, к

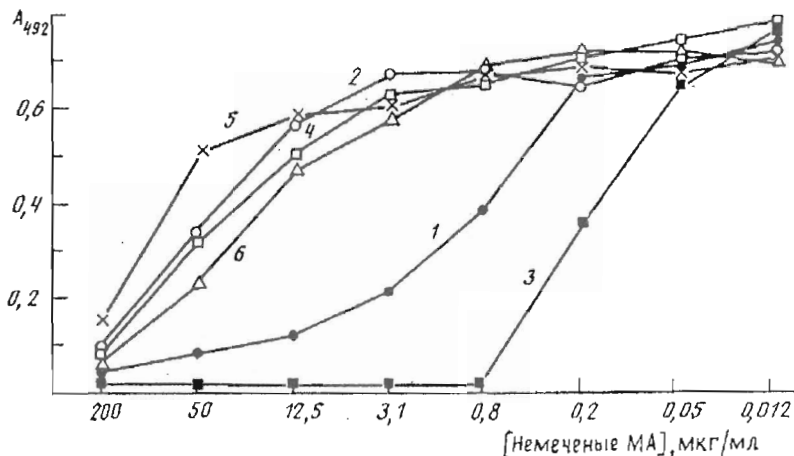


Рис. 2. Конкуренция немеченых МА с конъюгатом В1—ПХ в сэндвич-ИФА. Блокирующие антитела: В1 (1), В7 (2), Н9 (3), В5 (4), В6 (5), 2А11 (6)

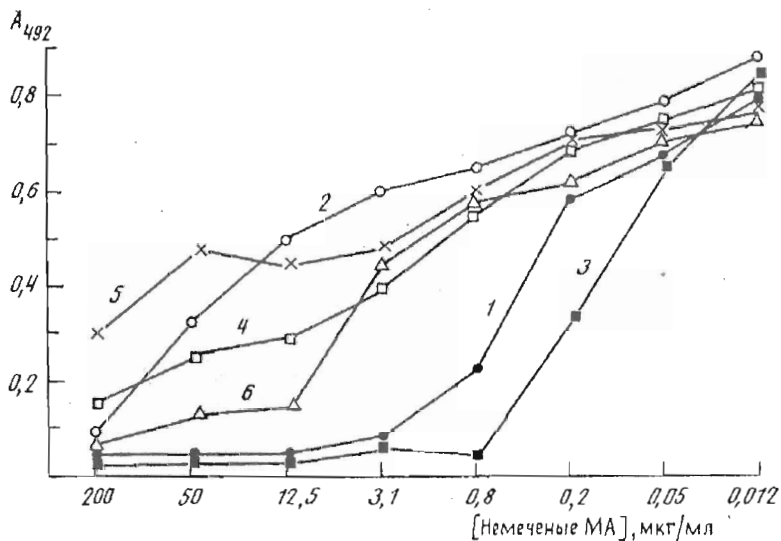


Рис. 3. Конкуренция немеченых МА с конъюгатом 2А11—ПХ в сэндвич-ИФА. Блокирующие антитела: В1 (1), В7 (2), Н9 (3), В5 (4), В6 (5), 2А11 (6)

которым направлены свободные и конъюгированные с ПХ МА, совпадают или в значительной степени перекрываются, то количество связавшегося с антигеном конъюгата резко уменьшается по мере увеличения концентрации немеченых блокирующих антител.

Наиболее показательны в этом отношении МА Н9, которые уже при концентрации 0,8 мкг/мл практически полностью блокируют присоединение к BSMV конъюгатов В1—ПХ и 2А11—ПХ (рис. 2, 3). Если же специфичность конъюгированных с ферментом и свободных МА различна, мы наблюдаем уменьшение количества связавшегося с BSMV конъюгата лишь при высоких концентрациях свободных МА (50—200 мкг/мл). При этом возникают пространственные ограничения на связывание конъюгата МА — ПХ с вирусной частицей, которая, вероятно, при таких условиях полностью покрыта блокирующими МА. Независимо

от специфичности этих МА они в значительной степени препятствуют дальнейшему взаимодействию BSMV с мечеными МА.

Анализ кривых, приведенных на рис. 2 и 3, позволяет сделать однозначный вывод о том, что МА Н9, В1 и 2А11 конкурируют между собой за связывание с BSMV. Надо отметить, что интерпретация результатов, полученных этим методом, требует учета констант связывания МА с антигеном. Так, например, МА В7, В5, В6, 2А11 ведут себя сходным образом в отношении конъюгата В1 — ПХ (рис. 2), тогда как данные других методов (аддитивный тест, реакция торможения латекс-агглютинации) позволяют выделить МА В6 и В7 как имеющие обособленные эпитопы. В то же время эпитоп МА 2А11 и, возможно, эпитоп МА В5 в большей или меньшей степени перекрываются с эпитопом МА В1, но антитела В5 и 2А11 имеют на 3—4 порядка меньшие константы связывания с BSMV, что объясняет их низкую блокирующую способность по сравнению с МА В1 и Н9. Таким образом, если мы имеем набор МА, сильно различающихся по величине  $K_a$ , то при проведении эпитопного анализа данные конкурентного ИФА следует рассматривать в совокупности с данными, полученными другими методами.

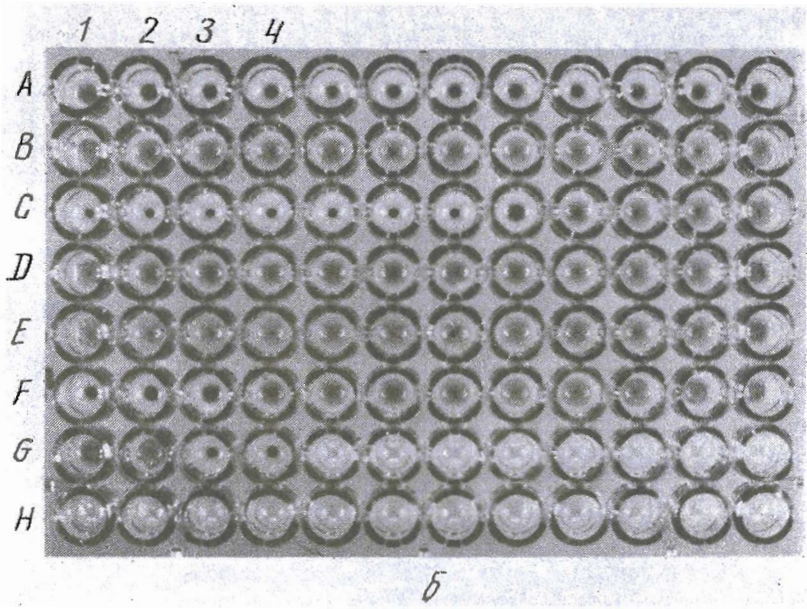
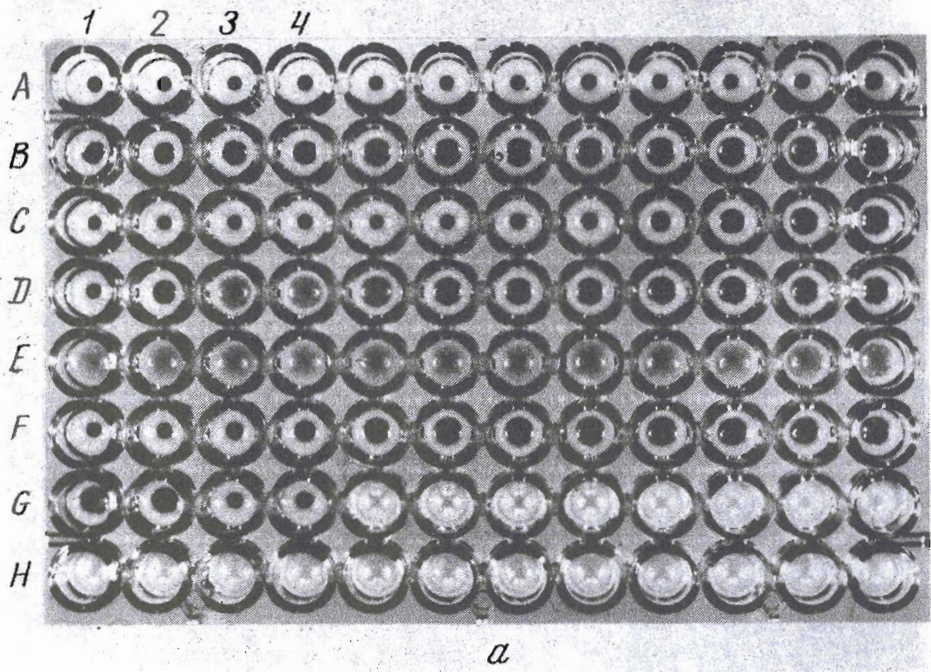
И наконец, третий использованный нами метод — это реакция торможения латекс-агглютинации свободными МА. Были получены конъюгаты МА В1, В7 и Н9 с полиакролеиновым латексом (ПАЛ), при этом нижний уровень определения BSMV для конъюгатов В1—ПАЛ и Н9—ПАЛ составил 20 нг/мл, а для конъюгата В7—ПАЛ — 40 нг/мл. Связывание конъюгированных с латексом МА В1 блокируется МА В1, Н9, В5 и 2А11, что позволяет сделать вывод о направленности указанных МА против эпитопов, в той или иной степени перекрывающихся друг с другом (рис. 4а). Здесь необходимо отметить, что блокирующее действие МА В5 проявилось лишь при использовании низких (20 нг/мл) концентраций BSMV, что связано с низкой аффинностью этих МА, а также с тем, что их слабое блокирующее действие может быть вызвано либо конформационными изменениями эпитопа МА В1, о чем мы упоминали при рассмотрении результатов аддитивного теста, либо тем, что участок связывания МА В5 перекрывается с эпитопом МА В1 в значительно меньшей мере, чем эпитопы МА Н9 и 2А11.

Результаты, полученные для конъюгатов Н9—ПАЛ и В7—ПАЛ (рис. 4б, в), доказывают, что МА Н9 перекрываются по специфичности с МА В1 и 2А11. Что же касается МА В7 (рис. 4в), то тот факт, что агглютинация конъюгата В7—ПАЛ тормозится только МА Н9, причем в достаточно высоких концентрациях, согласуется со сделанным нами выводом о наличии на поверхности BSMV обособленного эпитопа, распознаваемого только МА В7. Блокирующее действие МА Н9 в этом случае связано с пространственными ограничениями, которые возникают в случае избытка в реакционной среде высокоаффинных МА Н9 независимо от их специфичности.

Таким образом, имеющийся в нашем распоряжении набор МА позволяет выделить на поверхности BSMV по крайней мере три участка связывания антител: 1) эпитоп МА В7; 2) эпитоп МА В6; 3) район, где локализованы эпитопы МА В1, Н9, 2А11 и, возможно, эпитоп МА В5, который частично перекрывается лишь с участком связывания МА В1, тогда как связывание с вирусной частицей МА 2А11 и Н9 не влияет на взаимодействие МА В5 с BSMV.

### Экспериментальная часть

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, NT-DMEM, телячью эмбриональную сыворотку (Gibco, Англия), адъювант Фрейнда (Calbiochem, США), кроличьи поликлональные антитела к BSMV (кафедра вирусологии МГУ), кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ДАКО-Immunoglobulins, Дания), пероксидазу хрена (Boehringer-Mannheim, ФРГ), орто-фенилендиамин, пристан, Твин-20 (Sigma, США), полиэтиленгликоль-1500, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), BSA (Serva, ФРГ), белок-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), 96-луночные планшеты для иммуноанализа (Maxisorp



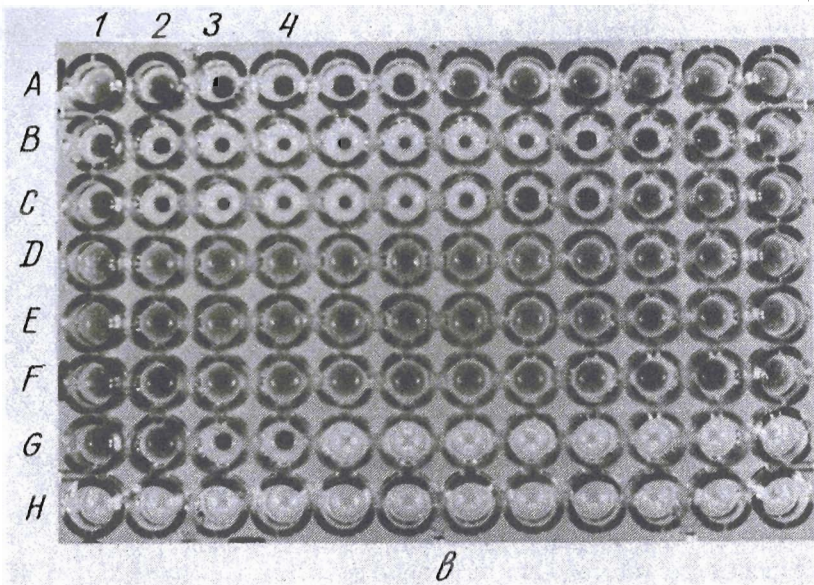


Рис. 4. Реакция торможения латекс-агглютинации конъюгатов В1—ПАЛ (а), Н9—ПАЛ (б), В7—ПАЛ (в) с BSMV. Блокирующие МА: В1 (ряд А), В7 (В), Н9 (С), В5 (D), В6 (Е), 2А11 (F). Ряд G: лунки 1 и 2 — положительный контроль в отсутствие блокирующих МА; 3 и 4 — отрицательный контроль в отсутствие BSMV. Использованы последовательные трехкратные разведения МА, начиная с концентрации 75 мкг/мл. Концентрация BSMV 20 (а), 40 (б), 200 нг/мл (в)

(Nunc, Дания), 24- и 96-луночные планшеты для культур клеток (Linbro, Flow Lab, Англия).

Накопление и выделение BSMV проводили по стандартному методу, изложенному в работе [11]. Очищенный вирус хранили в 50% глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Иммунизацию мышей линии Balb/c проводили путем 2—3-кратного внутрибрюшинного введения 30—100 мкг очищенного BSMV штамма V-1 в адьюванте Фрейнда с интервалом 2—4 нед. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда, последующие — в неполном. За 3 дня до гибридизации мышам внутрибрюшинно вводили от 100 до 500 мкг BSMV в фосфатном буфере без адьюванта.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к BSMV. Спленциты иммунной мыши сливали с миеломными клетками линии Раі с использованием в качестве сливающего агента 45% раствора полиэтиленгликоля-1500 (ПЭГ). Была использована процедура слияния, предложенная Van Deusen [12]. После обработки ПЭГ'ом и отмывки продукты слияния, суспендированные в среде НАТ-DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, равномерно распределяли по пяти 96-луночным планшетах, в которые предварительно были внесены в качестве питающих клеток макрофаги перитонеальной жидкости неиммунной мыши. Планшеты инкубировали в течение 7—10 сут при  $37^{\circ}\text{C}$  и содержании  $\text{CO}_2$  5% до появления гибридных колоний, при этом в лунках дважды меняли среду, заменяя каждый раз не более ее половины. Гибридомы тестировали на синтез специфических антител методом сэндвич-ИФА.

Гибридомы клонировали методом лимитирующего разведения. Для этого готовили суспензии клеток, содержащие 50, 500, 5000 и 50000 клеток в 15 мл среды ИТ-DMEM. К каждой суспензии добавляли по  $10^6$  питающих клеток-макрофагов и равномерно распределяли по 96-луночным планшетах. После появления клонов (14—21 сут) культуральную жидкость тестировали на наличие специфических



антител. Первичные гибридомные культуры клонировали не менее двух раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител.

*Сэндвич-ИФА.* Использовали следующую схему постановки ИФА для выявления МА, специфически взаимодействующих с BSMV.

В лунки 96-луночных планшетов последовательно вносили:

1) 50 мкл кроличьей поликлональной антисыворотки к BSMV в разведении 1/1000 в карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 18 ч при 4° С;

2) 100 мкл 1% раствора BSA в PBS, инкубировали 1 ч;

3) 50 мкл раствора BSMV в концентрации 2 мкг/мл в PBS, содержащем 0,05% Твин-20, инкубировали 1 ч;

4) 50 мкл тестируемой культуральной жидкости, инкубировали 1 ч;

5) 50 мкл кроличьих антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении в PBS, содержащем 0,05% Твин-20, инкубировали 1 ч;

6) 50 мкл субстрата, содержащего 1 мг/мл *орто*-фенилендиамина в 0,1 М цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 0,06% перекиси водорода.

Все этапы, начиная со второго, проводили при комнатной температуре. Между стадиями планшеты промывали 5—7 раз PBS, содержащем 0,05% Твин-20. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическое поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на спектрофотометре „Titertek Multiskan“ при длине волны 492 нм.

Для наработки препаративных количеств МА гибридомы в количестве  $5 \cdot 10^6$  —  $1 \cdot 10^7$  клеток вводили мышам линии Balb/c, которым за 10—14 сут до этого вводили 0,5 мл пристана. Через 10—14 сут мышей с выраженным ростом асцитной опухоли забивали и собирали асцитную жидкость. Очистку МА из асцита проводили методом двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония до 50% насыщения с последующей аффинной хроматографией на белок-А-сефарозе по методу [13].

*Характеристика МА.* Подкласс МА определяли в ИФА с использованием конъюгатов кроличьих антител против подклассов иммуноглобулинов мыши по прилагаемой фирмой-изготовителем инструкции. Константу связывания МА с BSMV определяли методом неконкурентного ИФА [14].

Для получения конъюгатов МА с пероксидазой хрена использовали метод, предложенный Nakane [15].

Полиакролеиновый латекс с диаметром частиц 1,8 мкм, полученный полимеризацией акролеина в водно-щелочной среде в присутствии красителя кристаллического фиолетового [16], был любезно предоставлен Ю. В. Лукиным.

*Получение конъюгатов МА с полиакролеиновым латексом.* В центрифужную стеклянную пробирку помещали 0,5 мл PBS, добавляли 5—20 мкл раствора МА, содержащего от 1 до 15 мкг белка, при перемешивании добавляли 125 мкл хорошо размешанной 5% суспензии ПАЛ и инкубировали 30 мин при 56° С или 2 ч при 20° С. Полученный конъюгат промывали 0,5% раствором BSA в PBS на центрифуге 3 раза по 1 мл и ресуспендировали в 4 мл 0,1% раствора BSA в PBS.

*Постановка реакции латекс-агглютинации.* В лунках 96-луночного микро-планшета с U-образными лунками готовили последовательные разведения определяемого антигена в PBS с 0,5% BSA по 25 мкл. Затем добавляли по 25 мкл 0,15% раствора латексного конъюгата в том же буфере в каждую лунку, встряхивали до образования гомогенной суспензии и оставляли на 2—3 ч при 20° С. При положительной реакции суспензия латексного конъюгата после оседания равномерно покрывала дно лунки в виде перевернутого зонтика. При отрицательной реакции конъюгат оседал в виде компактной точки или колечка с четко очерченными краями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Atabekov J. G., Novikov V. K., Kiselev N. A., Kaftanova A. S., Egorov A. M.*//Virology. 1968. V. 36. P. 620—627.
2. *Баратова Л. А., Белянова Л. П., Ходова А. М., Лукин Н. А., Доля В. В., Атабеков И. Г.*//Биол. науки. 1983. № 4. С. 23—26.
3. *Доля В. В., Аграновский А. А.*//Успехи биол. химии. 1984. Т. 25. С. 158—179.
4. *Dore I., Altschuh D., AlMoudallal Z., Van Regenmortel M. H. V.*//Mol. Immunol. 1987. V. 24. № 12. P. 1351—1358.
5. *Koenig R., Torrance L.*//J. Gen. Virol. 1986. V. 67. № 10. P. 2145—2151.
6. *Jordan R., Hammond J.*//J. Gen. Virol. 1991. V. 72. № 1. P. 25—36.
7. *Hajmorad M. R., Dietzgen R. G., Francki R. I. B.*//J. Gen. Virol. 1990. V. 71. № 12. P. 2809—2816.
8. *Бойков С. В., Новиков В. К., Кафтанова А. С., Атабеков И. Г.*//Штаммы вирусов растений. Владивосток, 1977. С. 30—35.
9. *Dan Kenett*//J. Immunol. Meth. 1988. V. 106. № 2. P. 203—209.
10. *Friquet B., Djavadi-Ohanian L., Pages J., Bussard A., Goldberg M.*//J. Immunol. Meth. 1983. V. 60. P. 351—358.
11. *Киселев Н. А., Атабеков И. Г., Кафтанова А. С., Новиков В. К.*//Биохимия. 1966. Т. 31. Вып. 4. С. 670—678.
12. *Van Deusen R. A.*//Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research/Eds N. J. Stern, H. R. Gamble. Totowa: Rowman and Allanheld Publ., 1984. P. 15—25.
13. *Eu P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R.*//Immunochemistry. 1978. V. 15. P. 429—436.
14. *Beatty J. D., Beatty G. B., Vlahos W. G.*//J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 14. P. 173—179.
15. *Nakane P. K.*//Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s/Eds R. M. Nakamura, W. R. Dito, E. S. Tucker III. N. Y.: Alan R. Liss, Inc., 1980. P. 157—169.
16. *Лукин Ю. В., Бахарев В. Н., Зашченко А. С., Воронов С. А., Зубов В. П., Грицкова И. А., Праведников А. П.*//Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 1. С. 159—161.

Поступила в редакцию  
21.VII.1993

После доработки  
10.IX.1993

*E. A. Sukhacheva, V. K. Novikov\*, S. M. Ambrosova*

EPITOPE ANALYSIS OF BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS  
BY MEANS OF MONOCLONAL ANTIBODIES

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*\* M. V. Lomonosov Moscow State University*

Key words: monoclonal antibody, epitope analysis, barley stripe mosaic virus.

Six stable hybridoma lines, producing monoclonal antibodies (MA) to barley stripe mosaic virus (BSMV) were obtained. Subtypes of all the MA and their affinity constants were determined. Interaction of the MA with BSMV of various strains (V-1, Norwich, Myronovka) in sandwich-ELISA showed that the BSMV strains used in this work were serologically identical. Three independent methods — additive ELISA, competitive ELISA and inhibition of latex agglutination — revealed three antibody-binding sites on the surface of the native BSMV.

\* Address: E. A. Sukhacheva, 117871, GSP-7, Moscow, B-437, Miklukho-Maklay st., 16/10.