

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

ЗАЙЦЕВА Лариса Сергіївна

ІМУНОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ БІЛКІВ ОБОЛОНКИ  
ДЕЯКИХ ВІРУСІВ ПОТІГРУПИ

02.00.10 - біоорганічна хімія, хімія природних та  
фізіологічно активних речовин

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук

Київ - 1994

Дисертація є рукопис

Робота виконана в лабораторії структури та функції білка  
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Науковий керівник:

Доктор біологічних наук,  
Радавський Ю. Л.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,  
Дяченко Н. С.  
кандидат хімічних наук,  
Шилін В. В.

Провідна установа:

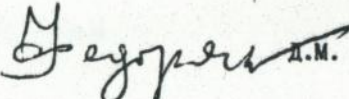
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України

Захист відбудеться "28" 10 1994 г.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.016.65.01 в Інституті  
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ( 253094, м. Київ  
вул. Мурманська, 1 ).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту  
біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Автореферат розісланий 28" 09 1994 г.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

 Д.М. ФЕДОРЯК

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00801431 (H)

ЛНБ ім. В. Стефани.  
АН України

4B-30.975

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### Актуальність.

Вивчення біологічних функцій білків - одна з важливих проблем біоорганічної хімії. Для їх розуміння суттєвим моментом є визначення структурних параметрів ділянок білка, що відповідають за його біологічні властивості. Встановлення структури білок-зв'язуючого сайту дасть змогу дублювати та маніпулювати функціонуванням білка, зокрема аналіз та синтез антигенних детермінант дозволить зрозуміти молекулярні основи антигенності.

Потівіруси - найбільша група вірусів рослин, які пошкоджують широке коло рослин із 53 родин, у тому числі сільсько-господарські культури. Зараз провадяться багаточисельні дослідження потівірусів та їх компонентів. Інтерес до них викликаний з одного боку значним впливом на економіку сільськогосподарства, а з іншого - різноманітністю структурно-функціональної організації їхніх білків і геномних нуклеїнових кислот. Знання антигенної будови білків оболонки потівірусів дає інформацію про їхню топографію в капсиді, що є важливим для встановлення молекулярної організації вірйону, вивчення білок-білкової та білок-нуклеїнової взаємодії та розуміння таких процесів, як самозбірка вірусів та вивільнення РНК від білка, а також надасть можливість удосконалити існуючі методи їх діагностики.

Антитіла, що отримані до пептидів, які відповідають антигенним детермінантам білків оболонки потівірусів можуть служити інструментом для їх ідентифікації. З метою отримання посиленої імунної відповіді на пептиди, останні кон'югують з

високомолекулярними носіями за допомогою різноманітних біфункціональних реагентів. Синтез та застосування нових біфункціональних реагентів є вельми актуальною задачею при створенні синтетичних антигенів.

Ступінь дослідженості тематики. Встановлено, що вірус-специфічні епітопи потівірусів локалізовані на N-кінцевій (29 - 95 амінокислотних залишків в залежності від вірусу) ділянці білка оболонки, що експонована на поверхні віріону (Shukla, 1989). Також відомо, що групо-специфічні епітопи розташовані на консервативній коровій ділянці білка оболонки, проте дані про місце локалізації вірус-специфічного епітопу для білка оболонки Y-вірусу картоплі (PVY) відсутні.

Для отримання імунокон'югатів зараз застосовується велика кількість біфункціональних реагентів, але відомості про використання 2-нітро-4-сульфобенілового (Nsp) ефіру адипінової кислоти з подібних метов у літературі не зустрічаються.

Мета дослідження. Метов роботи було проведення імунохімічного аналізу білків оболонки трьох штамів PVY та деяких вірусів потігрупи, локалізація та синтез епітопу білка оболонки PVY-Н, порівняння первинних структур білків оболонки потівірусів та їх характеристика з застосуванням комп'ютерних методів розрахунку, а також вивчення можливості застосування нового біфункціонального реагента в імунохімічних дослідженнях.

Задачі дослідження. Для досягнення мети роботи необхідно було вирішити такі завдання:

- виділити білки оболонки трьох штамів PVY та отримати

поліклональні антитіла (ПКА) до штамів РУУ;

-локалізувати антигенні детермінанти білка оболонки РУУ за допомогою моноклональних антитіл (МКА);

-провести імунохімічний аналіз деяких представників потівірусів;

-провести порівняння первинної структури білків оболонки потівірусів та комп'ютерний аналіз структурно-функціональних особливостей, що впливають з їхньої амінокислотної послідовності;

-вивчити можливості застосування 2-нітро-4-сульфогенілових ефірів для отримання імунокон'югатів.

Наукова новизна роботи полягає в тому, що вперше за допомогою МКА локалізований групо-специфічний епітоп потівірусів, який відповідає ділянці 198-208 поліпептидного ланцюга білка оболонки РУУ. Також вперше проведений порівняльний аналіз первинної, вторинної та антигенної структур білків оболонки вірусів потігрупи з використанням комп'ютерних програм. Показана можливість отримання імунокон'югатів з застосуванням 2-нітро-4-сульфогенілових ефірів кислот.

Практична значимість результатів. Одержані ПКА до РУУ, які можуть бути використані для імунодіагностики вірусів у посадковому матеріалі.

Розроблений засіб виділення пептиду, що являє собою групо-специфічний епітоп потівірусів. Цей пептид та синтезований аналог дадуть змогу удосконалити діагностичні тест-системи для ідентифікації потівірусів у рослинах.

2-нітро-4-сульфогеніловий ефір адипінової кислоти може знайти застосування у вакцинології для отримання депонованих білкових препаратів та синтетичних вакцин.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи були викладені та обговорені на Всесоюзному симпозиумі "Хімія білків" (Тбілісі, 1990), VIII Міжнародному конгресі по вірусології (Берлін, ФРН, 1990), Міжнародній конференції "Фундаментальні та прикладні проблеми в фітовірусології" (Ялта, 1994), IX конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії ІВОНХ НАН України (Київ, 1994)

Публікації. По темі дисертації опубліковано 7 робіт.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на стор. машинописного тексту та складається з вступу, двох розділів огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження та результатів і їх обговорення. Список використаних літературних джерел містить 190 найменувань. У дисертації 9 таблиць, 13 малюнків та 2 додатки.

Конкретний особистий внесок дисертанта. Робота цілком виконана особисто дисертантом.

Методи дослідження. Дослідження проводились на трьох штаммах РВУ: РВУ-0 (звичайний - відзначається суворими симптомами на картоплі), РВУ-Н (некротичний - викликає некроз жилок тютюну) та РВУ-С (відрізняється від решти штамів відсутністю передачі характерним вектором РВУ - *Myzus persicae* Sulz). Віруси були люб'язно надані Біологогрунтовым інститутом ДСВ РАН.

Білки оболонки РВУ-Н, РВУ-0 та РВУ-С виділяли інкубацією очищених вірусів у 2 М лісі при -20°C протягом 3 годин. РНК відокремлювали шляхом низькошвидкісного центрифугування, розчин білку діалізували проти води та ліофілізували.

Гомогенність білка оболонки перевіряли електрофорезом в ПААГ у присутності додецилсульфату натрію (ДСН) (Laemmli,

1970).

Антитіла (ПКА) до РVУ отримували імунізацією кроликів за загальноприйнятою схемою, імуноглобуліни з сироватки виділяли за методикою, що описана Ногейсі, 1956. Титр антитіл визначали імуноферментним аналізом (ІФА) (Clark, 1977).

Моноклональні антитіла (МКА) Y3C8, та Y4B1 були люб'язно надані М. Саарма (Інститут хімічної та біологічної фізики АН Естонії, м. Таллінн).

Пептид, що відповідає ділянці 198-208 білка оболонки РVУ був синтезований В. Абакумовим в Інституті біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна-Ю. А. Овчиннікова РАН.

Обмежений протеоліз трипсином РVУ-Н здійснювали за методом Shukla, 1988. Отриману суміш пептидів аналізували методом ВЕРХ у зворотній фазі.

N-кінцевий аналіз здійснювали за методом Gray, 1972.

Флуороімуноаналіз (ФІА-РЧ) проводили, як описано у роботі Sinijarv et al., 1988.

Імуноелектроблотінг здійснювали за методикою Towbin et al., 1979.

Комп'ютерний аналіз структурно-функціональних особливостей білків оболонки вірусів потигрупи, що впливають із їхньої амінокислотної послідовності, виконували з використанням програми PC Gene.

2-нітро-4-сульфобеніловий ефір адипінової кислоти був синтезований О. А. Гершковичем (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України).

Реакцію кон'югації проводили в 0,1 М бікарбонаті натрію, рН 8,5. БСА розчиняли у згаданому буфері, додавали 30-кратний молярний надлишок пептиду та Nер ефір адипінової кислоти.

Реакцію зупиняли підлужуванням реакційного середовища за допомогою 25 % аміаку. Реакційну суміш розділяли за методом гел'фільтрації на колонці з сефадексом G-25. Реакцію кон'югації за допомогою глутарового альдегіду проводили за методикою Schaaper *et al.*, 1989.

Для визначення амінокислотного складу кон'югати гідролізували у запаєних під вакуумом ампулах у розчині 5,7 н мсі при 110-112<sup>0</sup>С протягом 24 год. Амінокислотний склад визначали на автоматичному аналізаторі амінокислот ААА-339. Епітопну густина для кожного кон'югату розраховували на підставі співвідношення вмісту будь-якої амінокислоти, яка є в складі пептиду, у кон'югаті, та її вмісту у складі білка-носія.

#### ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ

##### 1. Порівняння білків оболонки трьох штамів RVU

Електрофорез у ПААГ з ДСН. Білки оболонки RVU-H, RVU-O, та RVU-C, що були виділені сольовим методом аналізували електрофорезом у 12,5% ПААГ у присутності ДСН. Результати аналізу, що наведені на мал.1, свідчать про часткове розщеплення білків оболонки під дією протеаз рослинного походження на стадії виділення вірусів. Окрім основної мажорної смуги з молекулярно масов. (М.м.) 32 кДа, яка відповідає М.м. інтактного білка оболонки RVU присутні білкові смуги з меншою М.м. На електрофореграмі білка оболонки RVU-C (мал 1-3) були присутні дві смуги у еквімолярному співвідношенні, М.м. однієї з них відповідала М.м. інтактного білка. Друга смуга з М.м. приблизно 28 кДа, певно, є коровим залишком білка

оболонки (без N- і C-кінцевих ділянок), так як відомо, що під дією протеаз рослинного походження початково відщеплюються N- (біля 30 амінокислотних залишків) та C- (біля 20 амінокислотних залишків) кінцеві ділянки, що експоновані на поверхні віріону.

Отримані результати свідчать про штамові відмінності у первинних структурах білків оболонки RVY.

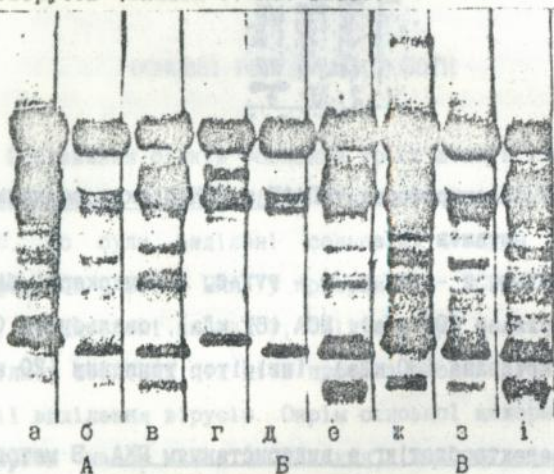


Мал. 1. Електрофорез у ПААГ з ДСН білків оболонки трьох штамів RVY.

1 - RVY-0, 2 - RVY-H, 3 - RVY-C, 4 - маркерні білки фосфорілаза (94 кДа), БСА (87 кДа), овальбумін (43 кДа), карбангідраза (30 кДа), інгібітор трипсину (20 кДа)

Імуноелектроблотінг з використанням ПКА. З метою порівняння антигенних властивостей білків оболонки штамів RVY-H, RVY-0 та RVY-C був проведений імуноелектроблотінг з ПКА. Для аналізу використовували три ПКА, котрі були отримані до цілого віріону кожного з штамів, що досліджувались. Імуноелектроблотінг показав, що інтактний білок RVY-0, а

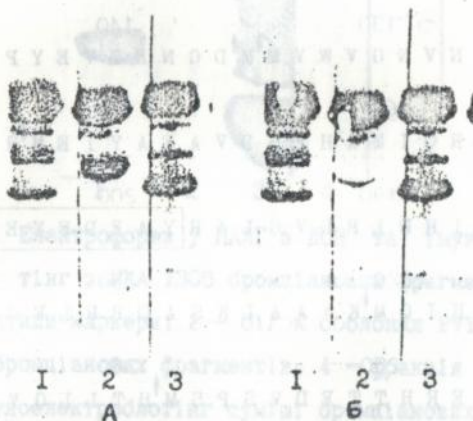
також продукти його деградації досить інтенсивно реагували з усіма антитілами (мал. 2. -а,г,ж). Аналіз РVУ-С виявив подібні результати (мал. 2. -в,е,і). Що стосується інтактного білка оболонки РVУ-Н, то він реагував з ПКА, що були отримані до кожного з штамів, тимчасом як білкова смуга з М.м. близько 30 кДа не давала реакції ні з одним із ПКА (мал. 2. - б,д,з). Цей факт свідчить про відсутність у даному білковому компоненті імунодомінантних областей. Слід відмітити наявність високоактивної імунодомінантної області в зоні поліпептидів з М.м. 12 - 14 кДа. Певно, ці поліпептиди є N- і С-кінцевими фрагментами білків оболонки, які містять штамспецифічні епітопи. Ці данні узгоджуються з результатами, що отримані для інших потівірусів (Shukla et al. 1988).



Мал. 2 Імуноелектроблотинг білків оболонки штамів РVУ з поліклональними антитілами.

А - ПКА до РVУ-О; Б - ПКА до РVУ-Н; В - ПКА до РVУ-С;  
а, г, ж - білок РVУ-О; б, д, з - білок РVУ-Н; в, е, і - білок РVУ-С

Імуноелектроблотінг з використанням МКА. Для аналізу були використані МКА УЗС6 та У4В1. Результати аналізу наведені на мал. 3. У разі використання МКА УЗС6 відмічена реакція другої білкової смуги з М.м. близько 30 кДа, котра не взаємодіяла ні з одним із ПКА, ні з МКА У4В1. Крім того, не відмічено реакції МКА УЗС6 та У4В1 з поліпептидами невеликої М.м. Цей факт свідчить про спрямованість МКА до епітопів корової частини білків оболонки штамів РVУ.



Мал. 3. Імуноелектроблотінг білків оболонки штамів РVУ з МКА

А - МКА УЗС6, Б - МКА У4В1; 1 - білок оболонки РVУ-О, 2 - білок оболонки РVУ-Н, 3 - білок оболонки РVУ-С

## 2. Локалізація епітопів РVУ-Н

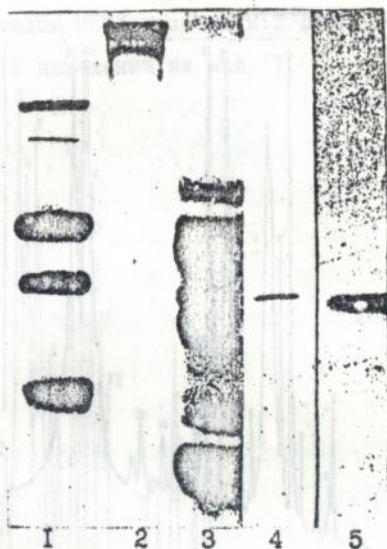
З метов локалізації антигенних детермінант білка оболонки РVУ-Н останній розщеплювали бромціаном. Місця атаки бромціаном пептидних зв'язків білка оболонки РVУ показані на мал. 4.

10 20 30  
A N D T I D A G E S S K K D A R P E Q G S I G V N P N K G K  
40 50 60  
D K D V N A G T S G T H T V P R I K A I T A K M † R M † P R S K  
70 80 90  
G A T V L H L E H L L E Y A P Q Q I D I S N T R A T Q S Q F  
100 110 120  
D T W Y E A V R M † A Y D E G E T E M † P T V M † D G L M † V W C I  
130 140 150  
E N G T S P N V N G V W V M † M † D G N E Q V E Y P L K P I V E  
160 170 180  
N A K P T L R Q I M † A H F S D V A E A Y I E M † R N K K E P Y  
190 200 210  
M † P R Y Q L I R N L R D V G L A R Y A F D F Y E V T S R T P  
220 230 240  
V R A R E A N I Q M † K A A A L K S A Q P R L F G L D G G I S  
250 260  
T Q E E N T E R H T T E D V S P S M † H T L L G V K N M

Мал. 4. Амінокислотна послідовність білка оболонки PVY  
(Shukla et al., 1988)

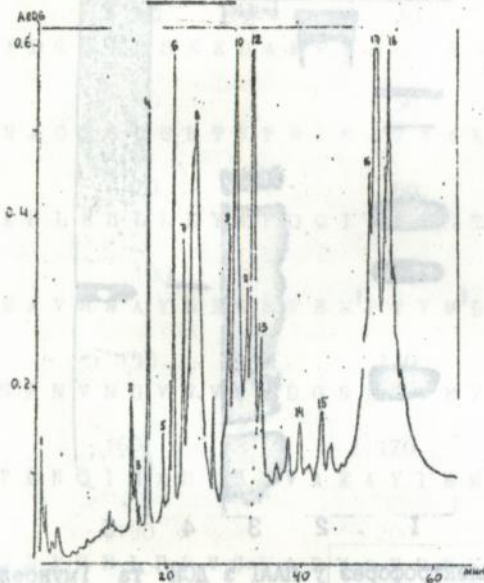
† - місце атаки пептидного зв'язку бромціаном

Суміш бромціанових пептидів аналізували електрофорезом у ПААГ з ДСН. Аналіз показав відсутність нативного білка оболонки, що свідчить про повне його розщеплення (Мал. 5). Далі суміш бромціанових пептидів досліджували методом імуно-електроблотінгу з використанням МКА УЗСВ. У результаті виявлено, що тільки один бромціановий пептид реагував з МКА (Мал. 5).



Мал. 5. Електрофорез у ПААГ з ДСН та імуоелектроблотінг з МКА УЗСВ бромціанових фрагментів РVУ-Н  
1 - пептиди-маркери; 2 - білок оболонки РVУ-Н; 3 - суміш бромціанових фрагментів; 4 - фракція 13 (Мал.5); 5 - імуоелектроблотінг суміші бромціанових фрагментів з МКА УЗСВ

Паралельно суміш бромціанових фрагментів розділяли ВЕРХ в зворотній фазі. На мал.8 показаний профіль елюції бромціанового гідролізату РVУ-Н. Наявність великої кількості пептидних фракцій зумовлена можливістю недорозщеплення окремих зв'язків Met-X. Крім того, відомо, що пептиди, отримані в результаті розщеплення бромціаном містять як С-кінцеву амінокислоту гомосерин або лактон гомосерину, що істотно впливає на їх час утримання. Особливо це стосується невеликих пептидів.



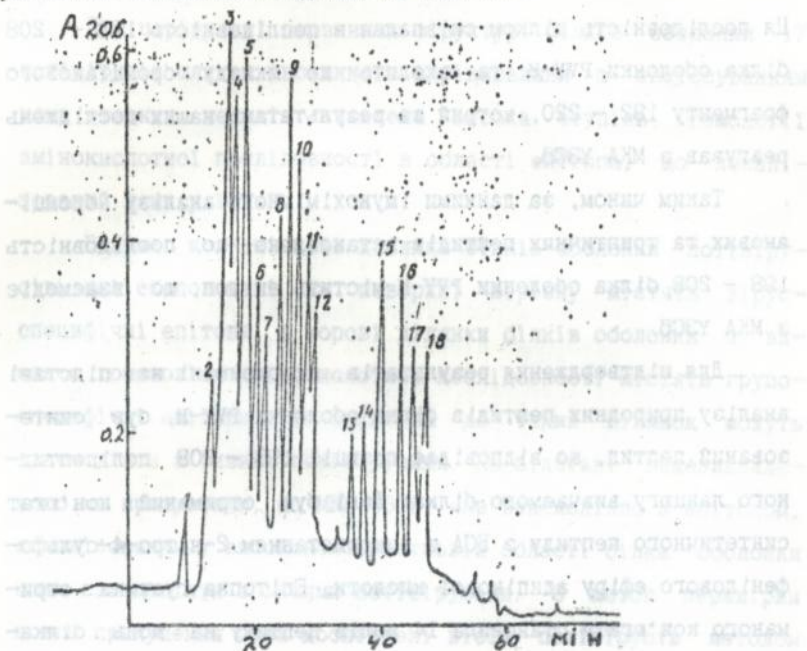
Мал. 6 Розділення бромцїанових пептидів бїлка оболонки  
PVY-Н за допомогою ВЕРХ у зворотній фазї

Колонка "LiChrosorb RP-18 " (5 мкм, 25 x 0,48 см);  
градїєнт ацетонїтрилу 2 - 50% з 0,1 % ТФО. Час роздїлення -  
80 хвїлин; швїдкїсть елюцїї - 1 мл/хв. Виявлення при довжинї  
хвїлї 220 нм

Отриманї у результатї роздїлення пептиди аналізували  
методом ФІА з розрїшенням в часї з використанням МКА УЗСВ.  
Пептиди фракцїї 13 та 16 взаємодїяли з МКА. N-кїнцевий ана-  
лїз фракцїї 13 та 16, проведений дансїлхлоридним  
методом, показав пролін як N-кїнцеву кислоту.

З метов уточнення мїсця локалїзацїї епїтопа, що взаємодїє з МКА УЗСВ PVY-Н пїддавали обмеженому протеолїзу трипси-  
ном. Сумїш пептидів, що були отриманї в результатї протеолї-

зу аналізували методом ВЕРХ у зворотній фазі. Профіль елюції триптичних пептидів наведений на мал. 7.



Мал. 7. Розділення пептидів, отриманих у результаті обмеженого протеолізу трипсином РУУ-Н за допомогою ВЕРХ у зворотній фазі

Колонка С18 (218 ТР, 5 мкм, 4,6 x 280 мм); градієнт ацетонітрилу 0 - 75% у 0,1% ТФО, час розділення - 80 хв, швидкість елюції 1 мл/хв. Визначення при довжині хвилі 220 нм.

Отримані фракції ліофілізували та досліджували методом ФІА-РЧ з використанням МКА УЗСВ. Матеріал фракцій 14 та 17 реагував з МКА. Встановлено, що фракція 14 являє собою гомогенний пептид. За допомогою автоматичного секвенатора амінокислот була визначена амінокислотна послідовність цього

пептида:

Y A R D F Y E V T S R

Ця послідовність цілком співпадає з послідовністю 198 - 208 білка оболонки RVY-Н та входить до складу бромціанового фрагменту 182 - 220, котрий за результатами наших досліджень реагував з МКА УЗСВ.

Таким чином, за даними імунохімічного аналізу бромціанових та триптичних пептидів встановлено, що послідовність 198 - 208 білка оболонки RVY-Н містить епітоп, що взаємодіє з МКА УЗСВ.

Для підтвердження результатів, що отримані на підставі аналізу природних пептидів білка оболонки RVY-Н, був синтезований пептид, що відповідає позиції 198 - 208 поліпептидного ланцюгу вивчаемого білка. Далі був отриманий кон'югат синтетичного пептиду з БСА з використанням 2-нітро-4-сульфогенілового ефіру адипінової кислоти. Епітопна густина отриманого кон'югату становила 14 моль пептиду на моль білка-носія. Аналіз синтетичного пептиду та його кон'югату з БСА методом ФІА-РЧ показав, що ні синтетичний пептид, ні його кон'югат не взаємодіяли з МКА УЗСВ. Відсутність реакції зв'язування синтетичного пептиду з МКА можна пояснити можливим глікозуванням природного пептиду по оксигрупам треоніну-206, серіну-207 або карбоксильній групі аспарагінової кислоти-201. Оскільки відомо, що вуглеводна частина глікопротеїна відіграє важливу роль у взаємодії антигена з антитілом. Таким чином, відсутність реакції синтетичного пептиду з МКА не заперечує тому, що послідовність 198 - 208 білка оболонки RVY-Н містить епітоп, що взаємодіє з МКА УЗСВ.

### 3. Порівняння антигенної структури білків оболонки деяких потівірусів

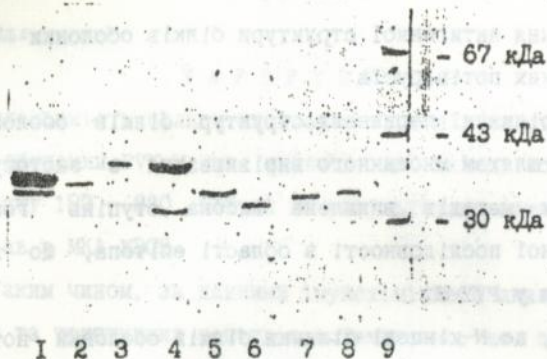
При порівнянні первинних структур білків оболонки 17 потівірусів шляхом множинного вирівнювання з застосуванням комп'ютерних методів виявлена висока ступінь гомології амінокислотної послідовності в області епітопа, що локалізований нами у RVU-Н.

Відомо, що N-кінцеві ділянки білків оболонки потівірусів, які експоновані на поверхні віріону містять вірус-специфічні епітопи, а корові ділянки білків оболонки з високою гомологією амінокислотної послідовності містять групо-специфічні епітопи, і антитіла до таких ділянок можуть взаємодіяти з іншими потівірусами. На підставі вищевикладеного ми припустили, що МКА УЗСВ, яке взаємодіяло з епітопом, локалізованим у висококонсервативній області білка оболонки може взаємодіяти з іншими потівірусами. З метов перевірки цього припущення були досліджені вісім потівірусів методом імуноелектроблотінгу з МКА УЗСВ. Білки оболонки восьми вірусів реагували з МКА (Мал. 8)

Отримані результати свідчать про те, що МКА УЗСВ спрямоване на групо-специфічний епітоп білка оболонки потівірусів. Наявність спільного епітопу для восьми потівірусів підтверджено імунохімічним аналізом з ПКА до RVU-Н.

### 4. Порівняння первинної, вторинної та антигенної структур білків оболонки 17 потівірусів

Зараз встановлена первинна структура білків оболонки 17 потівірусів. Нами був проведений порівняльний аналіз первинних структур білків оболонки 17 потівірусів шляхом попарного



Мал. 8. Імуноелектроблотінг деяких вірусів потігрупи з  
МКА ХЗСВ

1- PVY, 2- А-вірус картоплі, 3- вірус *Tradescantia albiflora*, 4- вірус мозаїки турнепсу, 5- вірус мозаїки гіпеас-  
трума, 7- вірус жовтої карликовості цибулі, 8- вірус жовтої  
мозаїки квасолі, 9 - маркерні білки

та множинного вірівнювання з використанням комп'ютерних ме-  
тодів.

Множинне вірівнювання показало, що N-кінцеві ділянки білків оболонки потівірусів значно відрізняються довжиною і характеризуються відсутністю гомологічних залишків, тоді як центральні та С-кінцеві області мають високий ступінь гомології амінокислотної послідовності, до того ж виявлено 54 ідентичних та 76 східних амінокислотних залишків у білках оболонки 17 потівірусів. Слід відмітити наступні консервативні послідовності, що характерні для білків оболонки потівірусів: P(L) M W O I E(D) N G T E P(G),  
R A R E A - - Q M K A A A, L A R Y A P D F E(R),  
A E A Y I E M R, Y M P R Y G L, P G L D G, T E R N T

Одна з виявлених консервативних ділянок (L A R Y F D F E/R) частково входить до пептиду, котрий по результатам наших досліджень містить групо-специфічний епітоп потівірусів.

При попарному вирівнюванні амінокислотних послідовностей білків оболонки 17 потівірусів знайдено високий ступінь гомології - від 49 до 87 %.

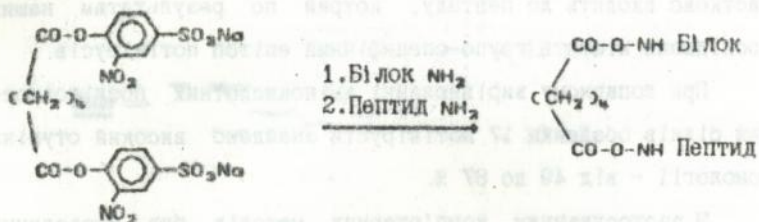
З застосуванням комп'ютерних методів був проведений розрахунок вторинних структур білків оболонки 17 потівірусів. Розрахунки показали, що переважним елементом вторинної структури білків оболонки потівірусів є  $\alpha$ -спіраль (58,8 - 32,7%) та неупорядковані витягнені ділянки ( 47,2 - 28,5%).

На підставі алгоритмів програми PC Gene нами були передбачені потенціальні антигенні детермінанти для білків оболонки 17 потівірусів. Отримані результати свідчать про високу епітопну густину на N-кінцевих ділянках білків оболонки потівірусів, що характерно взагалі для усіх паличковидних вірусів.

#### 5. Використання 2-нітро-4-сульфобенілового ефіру адипінової кислоти для отримання іммунокон'югатів

Для вирішення задачі по вивченню антигенної структури вивчаємих білків оболонки виникла необхідність синтезувати кон'югат на основі пептида та білка-носія. При цьому важливим аспектом був вибір біфункціонального зшивачого реагента. Нами був розроблений засіб отримання кон'югатів пептид-білок з застосуванням нового біфункціонального реагента 2-нітро-4-сульфобенілового ефіру адипінової кислоти.

Реакція кон'югації проходить по схемі:



З метою випробування цього реагента, два синтетичних пептида (П-1 - відповідає позиції 34 - 40 білка оболонки Х-вірусу картоплі; П-2 - відповідає позиції 198 - 208, білка оболонки РVУ) кон'югували з БСА за допомогою N-вр-ефіру адипінової кислоти. Для встановлення оптимальних умов реакцію проводили у різні інтервали часу. Для порівняння проводили кон'югацію з застосуванням глутарового альдегіду. Епітопну густину отриманих кон'югатів розраховували на підставі амінокислотного аналізу. У таблиці 1 наведена епітопна густина отриманих кон'югатів.

З таблиці видно, що після 10-хвилинного інтервалу співвідношення пептид:білок-носій не змінюється з часом. Можна стверджувати, що по ефективності 2-нітро-4-сульфофеніловий ефір адипінової кислоти не поступається широко відомому зшивачому реагенту - глутаровому альдегіду.

Таким чином, новий реагент 2-нітро-4-сульфофеніловий ефір адипінової кислоти може бути використаним для отримання кон'югатів пептид-білок в імунохімічних дослідженнях.

Таблиця 1.

Залежність складу отриманих кон'югатів від часу кон'югації

реагент	Час кон'югації	Моль пептиду П-1 на 1 моль БСА	Моль пептиду П-2 на 1 моль БСА
Нвр-ефир	5 хв.	9	8
адипінової кислоти	10 хв.	15	14
	1 ч	15	14
	24 ч	15	14
	5 хв.	7	7
Глутаровий альдегід	10 хв.	12	11
	1 ч	12	12
	24 ч	12	12

П-1 - пептид послідовності I P D G D F P,

П-2 - пептид послідовності Y A P P D Y E V T S R

### ВИСНОВКИ

1. Виділені білки оболонки трьох штамів RVY: RVY-Н, RVY-О та RVY-С.

2. Проведений порівняльний аналіз білків оболонки трьох штамів RVY з використанням ПКА, що отримані нами до кожного з штамів та МКА, що отримані до RVY-Н.

3. З використанням ЙКА локалізований групо-специфічний епітоп потівірусів, який відповідає позиції 198-208 поліпептидного ланцюга білка оболонки RVY-Н.

4. Синтезований пептид - аналог групо-специфічного епітопу потівірусів, отриманий кон'югат цього пептиду з

білком-носієм та проведеній їх імунохімічний аналіз.

5. На підставі комп'ютерних методів проведеній порівняльний аналіз первинної, вторинної та антигенної структур білків оболонки 17 потівірусів. Шляхом множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків оболонки виявлений високий ступінь гомології на ділянці, що відповідає локалізованому нами групо-специфічному епітопу.

6. Розроблений засіб отримання кон'югатів пептид-білок з використанням нового біфункціонального реагента 2-нітро-4-сульфоденілового ефіру адипінової кислоти.

#### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Антигенная характеристика капсидных белков штаммов Y-вируса картофеля / в соавт. Гнутова Р.В., Сибирякова И.И., Радавский Ю.Л. и др. // Биологические науки.-1991.-№11.-С.35 - 46.
2. Зайцева Л.С., Гершкович А.А., Радавский Ю.Л. и др. / Применение водорастворимого 2-нитро-4-сульфоденілового эфиров адипиновой кислоты для получения конъюгатов пептид-белок // Укр. биохим. ж.-1992.-№3.-С.94 - 97.
3. Радавский Ю.Л. & Зайцева Л.С., Кухарь В.П. / Бифункциональные поперечносшивающие реагенты и методы получения конъюгатов пептид-носитель // Биополимеры и клетка.-1993.-№4.-С.3 - 21.
4. Антигенная структура капсидных белков трех вирусов картофеля / в соавт. Радавский Ю.Л., Витер С.С., Сварма М.Д. и др. // Тез. Всесоюз. симпозиум химия белков.-Тбилиси.-1990.-С.147.

5. Радавский Ю.Л., Зайцева Л.С., Партешко А.В. и др. Использование водорастворимого 2-нитро-4-сульфопенилового эфира адипиновой кислоты в иммунологических исследованиях белков // Тез. Всесоюз. симпозиум химия белков.-Тбилиси.-1990.-С.148.
6. Jarvekulg L. Saarma M. Zaitseva L. et al. Localization of the group-specific epitop of potyvirus with monoclonal antibodies // Abstr. VIII-th Intern. Congress Virology.-Berlin, Germany.-1990.-P.84.
7. Radavsky Yu.L., Viter S.S., Zaitseva L.S. et al. Using monoclonal antibodies for the study of potato virus -X, -M, and -Y coat proteins // Abstr. Intern. Conference "Fundamental and Applied problems in Phytovirology".-Yalta, Ukrain.-1994.-P.12.

Dissertation has been presented for the receiving the degree of the Candidate of Sciences (Biology).  
Specialty is 02.00.10 - Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural Substances, Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine.  
Kiev, 1994.  
Y scientist works, which contain immunochemical analysis of the coat proteins of the strains potato virus-Y and some other potyvirus; method for obtaining the immunoreagents by using 2-nitro-4-sulphophenyl ester of adipinic acid are described. It has been established, that region 198-203 of coat protein YVY contains group-specific epitop of potyvirus. A new dimensional reagent for conjugation peptides with proteins has been suggested.

Л.С. Зайцева  
Ю.Л. Радавский  
А.В. Партешко  
Л.С. Зайцева  
Ю.Л. Радавский  
А.В. Партешко

Зайцева Л.С. Иммунохимический анализ белков оболочки некоторых вирусов потигруппы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ. Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Киев. 1994.

Защищается 7 научных работ, которые содержат иммунохимический анализ белков оболочки трех штаммов Y-вируса картофеля и некоторых других потивирусов, а также способ получения иммуноконъюгатов с использованием 2-нитро-4-сульфофенилового эфира адипиновой кислоты. Установлено, что участок 198-208 полипептидной цепи белка оболочки PVY содержит группоспецифичный эпитоп потивирусов. Показана возможность получения конъюгатов пептид-белок с использованием 2-нитро-4-сульфофенилового эфира адипиновой кислоты.

Zaitseva L.S. Immunochemical analysis of the coat proteins of some potyviruses.

Dissertation has been presented for the receiving the degree of the Candidate of Sciences ( Chemistry ).

Speciality is 02.00.10 - Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural Substances. Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academi of Sciences of Ukrain.

Kiev. 1994.

7 scientific works, which contain immunochemical analysis of the coat proteins of the three strains potato virus-Y and some other potyviruses; method for obtaining the immunokonjugates by using 2-nitro-4-sulfophenyl ester of adipinic acid are defended. It has been established, that region 198-208 of coat protein PVY contains group-specific epitop of potyviruses. A new bifunctional reagent for conjugation peptides with proteins has been suggested.

Ключові слова:

імунохімічний аналіз, білок оболонки, антигенна детермінанта, зшивачий реагент.

Пошукувач

Л.С. Зайцева



Специальность: Биорганическая химия (код специальности 02.00.09) - Биорганическая химия, химия природных веществ, Институт Биорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 1994.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.09 - Биорганическая химия, химия природных веществ, Институт Биорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 1994.

Диссертация 7 научных работ, которые содержат биохимические статьи о белках оболочки вируса гриппа Т-вируса человека и некоторых других ретровирусов. В одной статье описана реакция конденсации с использованием 2-нитро-4-сульфобензойного эфира адипиновой кислоты. Установлено, что участки 100-200 аминокислотной цепи белка оболочки Р22 содержат группу-специфичные сайты ретровирусов. Изложена возможность получения конъюгатов белков с использованием 2-нитро-4-сульфобензойного эфира адипиновой кислоты.

Задача 1.9. Immunological analysis of the coat proteins of some potyviruses.

Dissertation has been presented for the receiving the degree of the Candidate of Sciences ( Chemistry ).  
Speciality is 02.00.09 - Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural Substances, Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

7 scientific works, which contain biochemical articles of the coat proteins of the strain 100/50 potato virus-Y and some other potyviruses; method for obtaining the immunogen-epitope by using 2-nitro-4-sulphobenzoic ester of adipinic acid was described. It has been established, that region 100-200 of coat protein Р22 contains group-specific sites of potyviruses. A new bifunctional reagent for conjugation peptides with proteins has been suggested.

Кандидат наук.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії, НАН України, вулиця Гоголя, 1, Київ, Україна.

Відомий



I.O. Sanyal

---

Зам. 136      Формат 60x84/16.      Обл.вид.арк. I.0  
Підписано до друку 23.09.94р.      Тираж 100.

---

Поліграфічна дільниця ІТФ НАН України

152522

AB 30.975

**AB 30.975**