



УДК 616-097.642.017+577.083

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ
СТРУКТУРЫ И АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ
ТРОФОБЛАСТСПЕЦИФИЧЕСКОГО β_1 -ГЛИКОПРОТЕИНА***Мороз С. В., Глазунов В. П., Вагорина Т. И.,
Навленко А. Ф., Одинокое С. Е., Овдов Ю. С.**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Методами КД и разностной УФ-спектроскопии исследована зависимость от температуры и изменения рН пространственной структуры нативного трофобластспецифического β_1 -гликопротеина (ТСГ), его десалированного и дегликозилированного производных, а также фрагмента, полученного частичным кислотным гидролизом. В интервале 45–50°С обнаружен конформационный переход белкового компонента ТСГ, который при дальнейшем нагревании приводит к частично обратимым изменениям в третичной и вторичной структурах этого гликопротеина после охлаждения раствора до 20°С. Результаты спектральных исследований пространственной структуры белкового компонента ТСГ сопоставлены с данными об антигенной активности нативного, температурно- и рН-денатурированных, десалированного и дегликозилированного ТСГ. Сделан вывод о том, что белковый компонент ТСГ преимущественно состоит из β -структур. Предполагается, что большая часть антигенных детерминант ТСГ являются топографическими и принадлежат белковому компоненту ТСГ, только ~15% антигенной активности не связано с его пространственной структурой.

Трофобластспецифический β_1 -гликопротеин (ТСГ) [4] является наряду с α -фетопротеином [2] и раково-эмбриональным антигеном [3] одним из самых известных среди онкофетальных антигенов [4]. Однако ТСГ значительно менее изучен, чем α -фетопротеин и раково-эмбриональный антиген. Остаются совершенно неизвестными строение, многие физико-химические свойства ТСГ, локализация антигенных детерминант и связь их с пространственной структурой молекулы ТСГ. Решение этих вопросов важно для онкобиологии как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Недавно нами проведено иммунохимическое исследование ТСГ и его фрагментов [5]. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на причины гетерогенности и строения ТСГ. ТСГ, выделенный нами из ретроплацентарной крови, представляет собой сиалогликопротеин с молекулярной массой 75 кДа и содержанием углеводов 30%. Нами предварительно сообщались результаты исследования вторичной и третичной структур ТСГ спектральными методами [6].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению вторичной и третичной структур ТСГ методами кругового дихроизма (КД) и разностной УФ-спектроскопии. Кроме того, в ней приводятся сопоставление результатов спектральных исследований пространственной организации ТСГ и его производных с данными об их антигенной активности.

В спектре КД нативного ТСГ в близком ультрафиолете (350–230 нм), в области поглощения ароматических хромофоров, чувствительной к третичной структуре белков, наблюдаются четыре положительные полосы при 235, 276, 285 и 293 нм и одна отрицательная полоса при 245 нм (рис. 1), относящиеся к переходам остатков тирозина и триптофана. Наличие этих интенсивных полос указывает на высокую степень организации пространственной структуры белкового компонента ТСГ.

Принятые сокращения: ТСГ, ТСГ-НД, ТСГ-ДГ и ТСГ-ФК — трофобластспецифический β_1 -гликопротеин, его десалированное и дегликозилированные производные, а также фрагмент, полученный при ограниченном гидролизе нативного антигена соответственно.

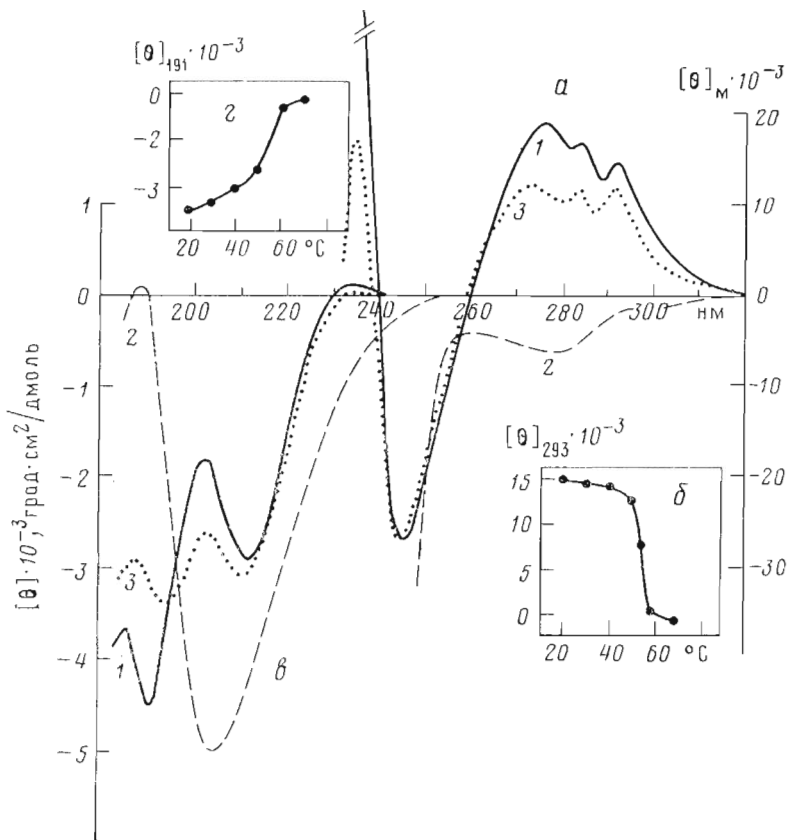


Рис. 1. Спектры КД ТСГ в 0,01 М KH_2PO_4 , pH 7,2. 1 — 20° С; 2 — 70° С; 3 — 20° С через 7 сут после 70° С. а — C 1,20 мг/мл, l 1 см; б — изменение эллиптичности полосы 293 нм от температуры; в — C 0,42 мг/мл, l 1 мм; г — изменение эллиптичности полосы 191 нм от температуры

В далеком ультрафиолете (230–185 нм), в области поглощения пептидных связей, наблюдаются две отрицательные полосы при 212 и 191 нм малой эллиптичности (рис. 1а). Хорошо известно, что спектры КД белков в пептидной области специфически чувствительны ко вторичной структуре белков. В работе [7] при исследовании спектров КД раково-эмбрионального антигена, молекула которого содержит ~60% углеводов, было показано, что при анализе спектров КД в пептидной области вкладом всей углеводной части можно пренебречь. Углеводные части ТСГ и раково-эмбрионального антигена имеют сходный состав [5, 7], поэтому при анализе спектров КД ТСГ в пептидной области вклад в спектр углеводной части также незначителен. Малая эллиптичность и необычная форма спектра КД нативного ТСГ в пептидной области не позволяют по внешнему виду спектра отнести его к какому-либо типу белков [8] на основе вторичной структуры. Формальное применение метода Провинчера [9] к анализу спектра КД для определения содержания элементов вторичной структуры белкового компонента ТСГ дает преобладающее содержание β -структуры и β -изгибов (таблица).

Полученный нами результат отличается от приведенной ранее оценки вторичной структуры ТСГ в работе [10], в которой получено большое содержание (32%) неупорядоченной структуры (см. таблицу). В работе [10] авторы использовали метод Чанга и др. [11], который в отличие от метода Провинчера [9] основан на анализе спектров КД белков в терминах теоретических опорных спектров. В работе [9] Провинчер приводит сравнительную оценку своего метода с методом Чанга и др. [11]. Так, для метода Провинчера среднее квадратичное отклонение между рассчитанными из спектров КД элементами вторичной структуры и рентгено-

Расчет элементов вторичной структуры белковых компонентов
ТСГ в %

Компонент/°С(рН)	α -Спираль	β -Структура	β -Изгиб	Неупорядоченная форма
ТСГ/20 (7,2)	—	62	33	5
ТСГ/50 (7,2)	—	59	31	10
ТСГ/70 (7,2)	8	55	29	8
ТСГ/20 (7,2) *	3	59	33	5
ТСГ/20 (7,2) ^{2*}	2	64	32	3
ТСГ/20 (7,2)	—	62	33	5
ТСГ/20 (5,1)	—	62	33	5
ТСГ/20 (3,3)	1	60	32	8
ТСГ/20 (2,5)	2	61	33	4
ТСГ/20 (2,0)	5	59	33	3
ТСГ/20 (7,2) ^{3*}	5	57	35	4
ТСГ/20 (7,2) ^{1*}	—	58	38	4
ТСГ/20 (11,0)	1	61	38	—
ТСГ/24 (7,4) ^{5*}	—	40	28	32
ТСГ-ИД (H ₂ O)	2	63	34	1
ТСГ-ФК (H ₂ O)	—	62	38	—
ТСГ-ДГ (2,0)	—	63	37	—

* Через 1 ч после инкубации при 70° С.

^{2*} Через 7 сут после инкубации при 70° С.

^{3*} Через 1 ч после нейтрализации раствора с рН 2,0.

^{4*} Через 3 сут после нейтрализации раствора с рН 2,0.

^{5*} По данным работы [10].

структурными данными составляет $\pm 5\%$ для α -спирали, $\pm 6\%$ для β -структуры, $\pm 10\%$ для β -изгибов и $\pm 11\%$ для остальных структур, включая неупорядоченную. Аналогичные отклонения для метода Чапга и др. составляют ± 8 , ± 11 , ± 11 и $\pm 16\%$ соответственно.

Из приведенного сравнения видно, что полученные в нашей работе расхождения с авторами работы [10] в количественном расчете элементов вторичной структуры ТСГ превышают абсолютные ошибки этих методов. Это может быть обусловлено тем, что авторы работы [10] анализировали лишь часть спектра КД в пептидной области (от 250 до 205 нм, как приведено в работе [10] на рис. 4) в отличие от метода Провинчера, использованного нами, где рассматривается пептидная область от 240 до 190 нм. Анализ коротковолновой части спектра КД от 205 до 190 нм — необходимое условие для получения более достоверной информации о вторичной структуре белка. Во-вторых, из приведенного в работе [10] спектра КД следует, что эллиптичность основной отрицательной полосы при 215 нм, по которой рассчитывались элементы вторичной структуры, составляет $1,8 \cdot 10^3$ град·см²/дмоль, тогда как в наших измерениях (рис. 1) ее эллиптичность равна $3,0 \cdot 10^3$ град·см²/дмоль. Причина столь большого различия в эллиптичности нам неясна. Авторы работы [10] не указывают, как они определяли концентрацию белка при расчетах эллиптичности: учитывалось ли ими содержание углеводов в ТСГ, что было сделано нами (см. «Экспериментальную часть»).

Температурные исследования спектров КД ТСГ показывают, что эллиптичность всех полос в ароматической области плавно уменьшается с повышением температуры раствора от 20 до 45° С (рис. 1а, б). В интервале температур 45–55° С наблюдается конформационный переход в третичной структуре белкового компонента ТСГ. При 60° С происходит полное нарушение нативной третичной структуры белкового компонента ТСГ. В спектре КД ТСГ при 70° С наблюдается широкая отрицательная полоса при 280 нм малой эллиптичности, которая, по-видимому, относится к дисульфидным связям в молекуле ТСГ. Охлаждение раствора ТСГ до 20° С приводит к частичному восстановлению его спектра КД. Выдерживание раствора ТСГ, инкубированного при 70° С, в течение 7 сут при 4° С приводит к восстановлению эллиптичности полос при 235, 245, 276, 285 и 293 нм до 70% от исходной.

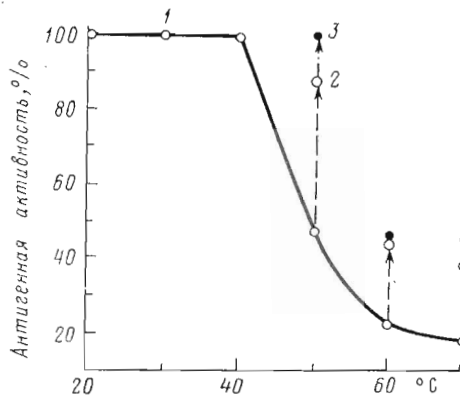


Рис. 2. Зависимость антигенной активности ТСГ от температуры предварительной инкубации раствора. 1 — 2 ч при 20° С; 2 — 2 сут при 4° С; 3 — 7 сут при 4° С после прогрева

мационными изменениями в молекуле ТСГ.

Расчет по методу Провинчера на содержание элементов вторичной структуры ТСГ в зависимости от температуры (таблица) показывает, что до конформационного перехода (от 20 до 50° С) происходит тривиальное увеличение доли неупорядоченной структуры за счет уменьшения содержания β -структуры и β -изгибов. Конформационный переход (температура раствора выше 50° С) приводит к неожиданному появлению α -спирали. Расчет для предварительно инкубированного при 70° С раствора ТСГ показывает, что содержание α -спирали после охлаждения раствора до 20° С уменьшается со временем, но не исчезает полностью. По истечении 7 сут доля α -спирали составляет 2%. Таким образом, конформационный переход в молекуле ТСГ под действием тепловой денатурации не полностью обратим.

На конформационный переход в молекуле ТСГ под действием тепловой денатурации также указывают данные, полученные из УФ-спектров тепловой пертурбации, которые характеризуют степень «экспонирования» и «погружения» остатков триптофана и тирозина (на поверхности и во внутренних частях молекулы) ТСГ. Методом анализа второй производной УФ-спектра [12] мы нашли, что в молекуле ТСГ содержится 5 остатков триптофана и 16 остатков тирозина. Анализ УФ-спектров тепловой пертурбации показывает, что в нативном ТСГ на поверхность экспонировано 35 и 46% остатков триптофана и тирозина соответственно. После инкубации при 70° С наблюдается увеличение экспонированных остатков триптофана и тирозина до 45 и 66% соответственно. Для денатурированной молекулы ТСГ в 6 М гуанидингидрохлориде, где она имеет неупорядоченную форму, по данным УФ-спектров тепловой пертурбации, экспонировано 100% остатков триптофана и 73% — тирозина.

Наряду с динамикой пространственной структуры белкового компонента ТСГ в зависимости от температуры раствора нами проводилось также изучение антигенной активности ТСГ с учетом происходящих изменений во вторичной и третичной структурах молекулы ТСГ. Определение антигенной активности проводили иммуноферментным анализом по степени связывания ТСГ со специфическими антителами.

Сопоставление данных иммуноферментного анализа (рис. 2) со спектральными показывает, что до конформационного перехода антигенная активность ТСГ не изменяется. Спустя 2 ч (время нанесения антигена на планшет) при комнатной температуре раствор ТСГ, инкубированный при 50° С (см. «Экспериментальную часть»), имеет только 50% исходной антигенной активности. После конформационного перехода (инкубация раствора при 70° С) антигенная активность ТСГ уменьшается до 20% по

Как следует из спектров КД в пептидной области (рис. 1в, г), увеличение температуры раствора ТСГ до 70° С приводит также к конформационной перестройке вторичной структуры белкового компонента ТСГ. Спустя 7 сут после прогрева полоса при 212 нм восстанавливает до 80%, а полоса при 191 нм — до 50% исходной эллиптичности.

100-кратное разведение раствора ТСГ, а также использование в качестве растворителя дистиллированной воды и фосфатного буфера не вызывали изменений в спектрах КД. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения в спектрах КД в зависимости от температуры связаны с внутримолекулярными конфор-

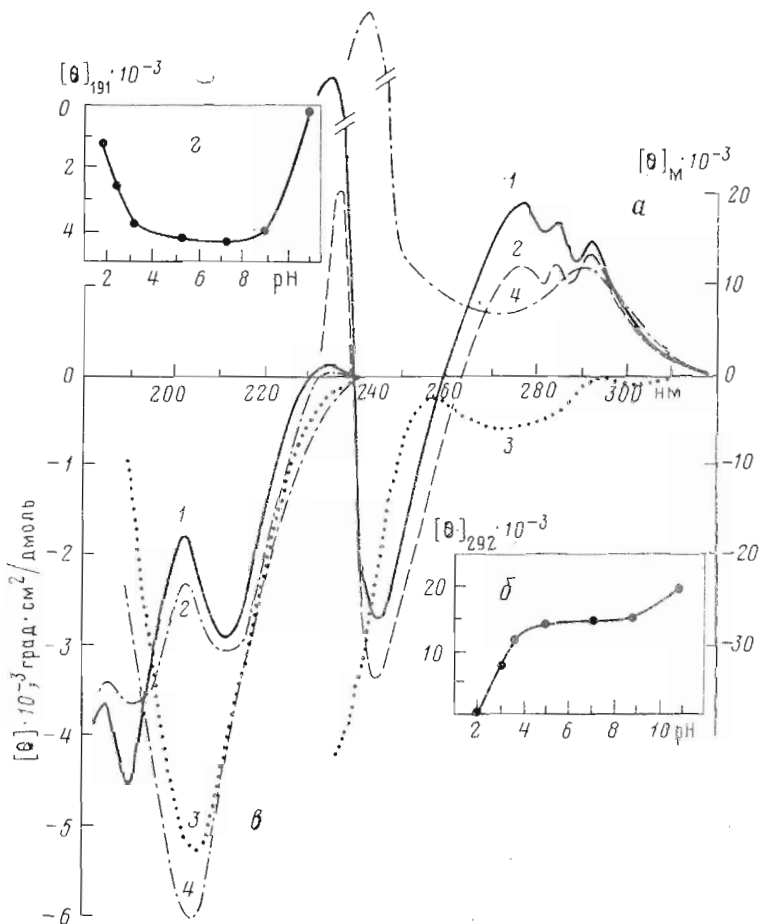


Рис. 3. Спектры КД растворов ТСГ в 0,01 М KH_2PO_4 , t 20° С, рН: 1 — 7,2; 2 — 3,5; 3 — 2,0; 4 — 12,0. а — C 1,55 мг/мл, l 1 см; б — изменение эллиптичности полосы 292 нм от рН раствора; в — C 0,33 мг/мл, l 1 мм; г — изменение эллиптичности полосы 191 нм от рН раствора

отношению к исходной. Антигенная активность восстанавливается во времени — для раствора ТСГ, инкубированного при 50° С, до 90% через 2 сут и до 100% через 7 сут после инкубации. После конформационного перехода антигенная активность ТСГ через 7 сут восстанавливается лишь до 50%. Иммунодиффузионное сравнение прогретого образца ТСГ с нативным антигеном показало их полную иммунохимическую идентичность, а электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия не обнаружил деградации молекулы ТСГ. Таким образом, снижение антигенной активности ТСГ связано с изменением пространственной структуры молекулы.

На рис. 3 приведены спектры КД растворов ТСГ в кислой и щелочной области рН. С понижением рН от 7,2 до 3,5 в ароматической области спектра КД ТСГ наблюдается плавное уменьшение эллиптичности положительных полос при 235, 276, 285 и 293 нм (рис. 3а, б). При значениях рН ниже 3,5 нативная третичная структура ТСГ разрушается. Спектр КД ТСГ при рН 2,0 подобен спектру КД ТСГ при 70° С. Наблюдается широкая отрицательная полоса при 280 нм, относящаяся, вероятно, к дисульфидным связям в молекуле ТСГ. При обратном титровании раствора ТСГ до нейтрального рН происходит восстановление спектра КД во времени. Через 3 сут полосы восстанавливаются до 90% исходной эллиптичности. Титрование раствора ТСГ до рН 11,0 вызывает незначительное изменение КД-спектра в ароматической области. Дальнейшее увеличение значения рН до 12,0, при котором происходит полная ионизация остатков

тирозина, вызывает исчезновение наблюдаемых полос, а вместо отрицательной полосы при 245 нм появляется интенсивная положительная полоса при 249 нм.

Изучение спектров КД ТСГ в ароматической области в зависимости от pH раствора показывает, что эллиптичность интенсивной отрицательной полосы при 245 нм в интервале pH 5–9 не зависит от pH среды. При pH раствора выше 10,0 наблюдается быстрое падение ее эллиптичности и при pH 11,5 она равна нулю. При pH 12,0, как отмечалось выше, вместо отрицательной полосы при 245 нм в спектре КД появляется интенсивная положительная полоса при 249 нм (рис. 3а). Такая pH-зависимость эллиптичности полосы при 245 нм позволяет отнести ее к переходам остатков тирозина в молекуле ТСГ.

В пептидной области уменьшение pH до 3,5 вызывает незначительные изменения в спектре КД ТСГ (рис. 3в, г). При дальнейшем понижении pH до 2,0 наблюдается резкое изменение контура кривой спектра КД. Вместо двух отрицательных полос при 191 и 212 нм наблюдается одна отрицательная полоса при 205 нм. Титрование раствора ТСГ до нейтрального pH восстанавливает через 3 сут эллиптичность полос при 191 и 212 нм до 80% от исходной. В щелочной области при pH 12,0 происходит нарушение вторичной структуры белкового компонента ТСГ (рис. 3в).

Антигенная активность ТСГ после обратного титрования из кислой области (pH 2,0) к нейтральному значению pH 7,0 восстанавливается по мере восстановления нативной структуры молекулы. Через 1 сут антигенная активность составляла 90%, а через 2 сут — 95% от исходной. Определение антигенной активности ТСГ иммуноферментным анализом проводили в одних стандартных условиях при pH 7,5 (см. «Экспериментальную часть»). Основная стадия иммуноферментного анализа — инкубация анализируемой пробы на планшете с адсорбированными анти-ТСГ-антигенами — занимает всего 2 ч. За это время, судя по спектрам КД, не происходит заметного обращения структуры pH-денатурированного ТСГ к нативной. Ранее [1, 5] отмечалось, что при значениях pH < 3,0 возможны частичная деградация ТСГ и появление в иммунодиффузии фрагментов с перекрестной иммунореактивностью. Иммунодиффузионное исследование pH-денатурированного ТСГ показало его полную иммунохимическую идентичность с нативным ТСГ, а электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия не обнаружил деградации молекулы антигена.

Таким образом, данные, полученные при pH-титровании ТСГ, качественно подтверждают зависимость антигенной активности от его пространственной структуры.

Для выявления связи между пространственной структурой белкового компонента ТСГ и его антигенной активностью были также исследованы спектры КД десалированного ТСГ (ТСГ-НД), фрагмента молекулы ТСГ (ТСГ-ФК), полученного кислотным гидролизом нативного антигена [5] и дегликозилированного ТСГ (ТСГ-ДГ) (рис. 4).

Для ТСГ-ДГ в спектре КД в ароматической области отсутствуют полосы, наблюдаемые в спектрах нативного антигена (рис. 4а), а в спектре КД ТСГ-ФК вообще не наблюдаются какие-либо полосы. Это свидетельствует о разрушении третичной структуры в этих образцах. Для ТСГ-ДГ это может быть связано с тем, что ввиду плохой растворимости ТСГ-ДГ при pH 7,2 спектр был снят в 4% водном растворе HCOOH, pH 2,0. Однако сравнение спектров КД ТСГ-ДГ и ТСГ при pH 2,0 в пептидной области свидетельствует о значительных различиях их вторичных структур (рис. 4б). Спектр КД ТСГ-ФК в пептидной области подобен спектру ТСГ при 70°С. Измерение антигенной активности ТСГ-ФК и ТСГ-ДГ показало, что они содержат только 10% активности нативного ТСГ.

Наличие антигенной активности в препаратах ТСГ-ФК и ТСГ-ДГ говорит о том, что небольшое количество антигенных детерминант молекулы ТСГ не зависит от ее пространственной структуры.

Для ТСГ-НД в спектре КД в ароматической области сохраняются полосы при 275, 285 и 293 нм и их эллиптичность близка к таковой в нативном ТСГ (рис. 4а). Эллиптичность полос при 235 и 245 нм, находя-

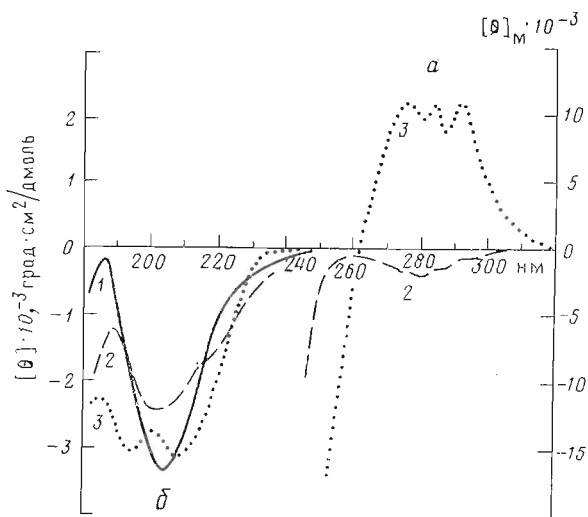


Рис. 4. Спектры КД производных ТСГ. 1 — ТСГ-ФК в H_2O ; 2 — ТСГ-ДГ в 4% водном растворе $HCOOH$; 3 — ТСГ-НД в H_2O . $a - C_{\text{ТСГ-ДГ}} 1,42 \text{ мг/мл}$; $C_{\text{ТСГ-НД}} 0,50 \text{ мг/мл}$, $l 1 \text{ см}$; $b - C_{\text{ТСГ-ФК}} 0,73 \text{ мг/мл}$, $C_{\text{ТСГ-ДГ}} 1,42 \text{ мг/мл}$, $C_{\text{ТСГ-НД}} 0,50 \text{ мг/мл}$, $l 1 \text{ мм}$

щихся на крыле пептидной полосы при 212 нм, резко уменьшилась для 235 нм и увеличилась для 245 нм из-за деформации контура полосы при 212 нм. По этой же причине они не приведены на рис. 4а. В пептидной же области спектр ТСГ-НД подобен спектру ТСГ через 7 сут после инкубации при 70°C . Однако, несмотря на имеющиеся изменения во вторичной структуре ТСГ-НД, его антигенная активность сохраняется на уровне нативного антигена.

На основании исследования ТСГ-ФК, ТСГ-ДГ, ТСГ-НД, а также данных по температурной денатурации и рН-титрованию ТСГ можно предположить, что большая часть антигенных детерминант ТСГ связана с пространственной структурой его белкового компонента и только $\sim 15\%$ антигенной активности не связано с пространственной структурой.

Экспериментальная часть

ТСГ, ТСГ-ФК, ТСГ-НД получали как описано ранее [5].

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-500 А (Jasco, Япония) в кварцевых кюветках с толщевой слой 1 мм для пептидной области спектра и 1 см для ароматической. Кювету при заданной температуре термостатировали 10–15 мин, после чего регистрировали спектр КД. Повторная регистрация спектра при этой же температуре показывала полное его совпадение с зарегистрированным первоначально. Среднее время инкубирования образца при заданной температуре составляло, таким образом, $\sim 1 \text{ ч}$. Точность термостатирования составляла $\pm 0,5^\circ$. Во избежание испарения растворителя при высоких температурах ($70\text{--}80^\circ \text{C}$) в кювету поверх исследуемого раствора заливали слой вазелинового масла. Контроль по УФ-спектрам показал, что при таком способе не наблюдалось испарения из кюветы при нагревах до 80°C . При расчетах эллиптичности учитывали изменение концентрации белка вследствие температурного изменения объема раствора. В пептидной области эллиптичность $[\theta]$ считали как эллиптичность среднего остатка, принимая молекулярную массу среднего остатка белкового компонента ТСГ равной 110 Да и содержание белка в ТСГ — 70%, в единицах град·см²/дмоль по формуле $[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} \cdot S \cdot 110 / 10 \cdot C \cdot l \cdot 0,7$, где S — чувствительность шкалы прибора, C — весовая концентрация ТСГ (мг/мл), l — длина кюветы. В ароматической области эллиптичность считали как молярную эллиптичность $[\theta]_M$ с молекулярной массой ТСГ, равной 75 кДа. Калибровку спектрополяриметра проводили по 0,06% водному раствору аммоний-*d*-камфора-10-сульфоната. Отношение интенсивностей полос при 191 и 290 нм составляло 2,05. Вводимая ошибка в спектральные измерения эллиптичности ($\pm 5\%$) для расчета элементов вторичной структуры ТСГ по методу Провинчера [9] давала средние поправки на $\pm 1\%$ для α -спирали, β -структуры и β -изгибов и на $\pm 2\%$ для неупорядоченной формы. Полученные средние поправки касаются всех расчетов, приведенных в таблице.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cary-219 (Varian, США) в кварцевых кюветках с толщиной слоя 1 см при ширине щели 1 мм. УФ-дифференциальные спектры тепловой пертурбации растворов ТСГ регистрировали в термостатируемых кюветках с притертыми тефлоновыми пробками в интервале температур 5–25° С. Точность термостатирования ±0,5° С. Расчет числа пертурбированных остатков триптофана и тирозина в молекуле ТСГ проводили с учетом изменения концентрации раствора от температуры, вызванного изменением объема раствора ТСГ в кювете измерения. В качестве стандартов использовали растворы N-ацетатов этиловых эфиров тирозина и триптофана в 6 М гуанидинхлориде.

Иммунодиффузию в агаре проводили как описано в работе [13], инкубируя пластины с гелями в течение ночи при комнатной температуре, а электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия в градиенте пористости полиакриламидного геля — как описано в сообщении [14].

Антигенную активность измеряли иммуноферментным анализом на полистирольных планшетах Dynatech (Испания). Фракцию IgG из кроличьей моноспецифической антисыворотки против ТСГ (IgG анти-ТСГ) получали как описано ранее [15]. IgG-Фракцию метили пероксидазой (Биохимреактив, г. Олайне) [16]. В лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора (10 мкг/мл) IgG анти-ТСГ в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 0,15 М NaCl, и инкубировали планшет в течение ночи при 4° С. На следующий день планшет отмывали 6 раз 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% Tween-20. Для построения калибровочной кривой в лунки вносили по 0,2 мл раствора ТСГ в отмывочном буфере, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина в разведениях 0–200 нг/мл. В остальные лунки вносили анализируемые пробы в концентрациях 50 и 100 нг/мл. Планшет инкубировали 2 ч при комнатной температуре, после чего отмывали буфером как описано выше. Во все лунки вносили по 0,2 мл раствора конъюгата в разведении 1:400 и планшет инкубировали 3 ч при комнатной температуре. После отмывки в лунки вносили по 0,2 мл субстрата (0,15% водный раствор 5-аминосалициловой кислоты, pH 6,0, +5 мкл 30% H₂O₂). Планшет инкубировали при комнатной температуре 1 ч и измеряли поглощение растворов в лунках при 449 нм на спектрофотометре Spccol-21 (Karl Zeiss, Jena, ГДР). Антигенную активность анализируемых проб определяли из калибровочной зависимости поглощения при 449 нм от концентрации ТСГ.

ТСГ-ДГ получали обработкой нативного антигена безводным фтористым водородом. Реакцию проводили в герметически закупоренном сосуде из тефлона в атмосфере аргона. К 48 мг тщательно высушенного ТСГ (3 сут в вакууме над P₂O₅) добавляли 7 мл жидкого фтористого водорода. Смесь перемешивали 1 ч при 0° С, после чего переносили в 15 мл дистиллированной воды со льдом и немедленно нейтрализовали карбонатом натрия. Смесь диализовали против дистиллированной воды при 4° С и лиофилизировали. Получали 19 мг ТСГ-ДГ. Электрофорез ТСГ-ДГ в присутствии додецилсульфата натрия в градиенте пористости полиакриламидного геля не показал деградации белкового компонента ТСГ, молекулярная масса которого составляла 49,6 кДа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татаринев Ю. С. Успехи соврем. биологии, 1983, т. 95, № 1, с. 57–64.
2. Yachnin S., Hsu R., Heinrikson R. L., Müller J. B. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 493, p. 418–428.
3. Ткачева Г. А. Мед. радиология, 1983, № 8, с. 69–74.
4. Schwartz M. K. Critical Eval. Tumor Markers Contr. Oncol., 1981, v. 7, p. 3–11.
5. Pavlenko A. F., Moroz S. V., Kuznetsov Yu. N., Ovodov Yu. S. Tumour Biology, 1985, v. 6, № 5, p. 491–501.
6. Glazunov V. P., Moroz S. V., Vakorina T. I., Odinokov S. E., Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S. F. E. C. S. Third Intl. Confer. Chem. Biotechnol. Biologically Active Natural Product, Sofia, 1985, v. 4, p. 34–38.
7. Однородков С. Е., Набиуллин А. А., Глазунов В. П., Курика А. В., Павленко А. Ф., Оводов Ю. С., Геворкян Б. З. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1315–1322.
8. Manavalan P., Johnson W. C. Nature, 1983, v. 305, p. 831–832.
9. Provencher C. W., Glöcker J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 1, p. 33–37.
10. Osborne J. C., Rosen S. W., Nilsson B., Calvert I., Bohn H. Biochemistry, 1982, v. 21, № 22, p. 5523–5528.

11. Chang C. T., Wu C.-S. C., Yang J. T. *Anal. Biochem.*, 1978, v. 91, № 1, p. 13-31.
12. Ichikawa T., Terada H. *Chem. Pharm Bull.*, 1981, v. 29, № 2, p. 438-444.
13. Храмова Н. И., Абелев Г. И. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 1961, т. 52, № 12, с. 107-111.
14. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, p. 680-685.
15. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение/ Ред. Аксельсен Н., Крелль И., Вееке Б. М.: Мир, 1977, с. 201-203.
16. Nakane P. K., Kavaoi A. J. *Histochem. Cytochem.*, 1974, v. 22, № 12, p. 1084-1090.

Поступила в редакцию
12.III.1986
После доработки
13.VIII.1986

STUDY ON INTERCONNECTION BETWEEN SPATIAL STRUCTURE AND ANTIGEN ACTIVITY OF TROPHOBLAST-SPECIFIC β -GLYCOPROTEIN

MOROZ S. V., GLAZUNOV V. P., VAKORINA T. I., PAVLENKO A. F.,
ODINOKOV S. E., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science
Centre Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Temperature- and pH-dependance of spatial structure of a native trophoblast-specific β -glycoprotein (TSG), its desialated and deglycosylated derivatives, as well as of a fragment obtained by partial acid hydrolysis on the temperature and pH variations has been studied using CD and UV spectroscopy. Within the range 45-50°C a conformational transition of the protein moiety of TSG, leading to partially reversible alterations in tertiary and secondary structures of this glycoprotein after cooling the solution to 20°C has been found out. The results of spectral studies of the spatial structure of the TSG protein component have been compared with the data on antigen activity of native, temperature- and pH-denaturated, desialated, and deglycosilated TSG. It has been concluded that the protein moiety of TSG consists mainly of β -structures; the greater part of antigen determinants of TSG is topographic and belongs to the protein component of TSG, and only 15% of antigen determinants are not connected with TSG's spatial structure.