



УДК 577.152.611*2.083.3

© 1990 г.

Т. А. Заргарова, А. А. Заргаров *, И. А. Болотина,
С. Ф. Берестень, О. О. Фаворова

ПЕПТИД, СОДЕРЖАЩИЙ УНИВЕРСАЛЬНУЮ АНТИГЕННУЮ ДЕТЕРМИНАНТУ ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗ

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР,
Москва;

* Институт биоорганической химии им. И. М. Шемякина АН СССР, Москва

Среди пептидов клостридиального гидролизата триптофанил-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота выявлен пептид $\text{Phe-Ser-Phe-Pro-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Ala-Ala-Pro-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg}$, содержащий непрерывную антигенную детерминанту для моноклонального антитела Am1 , которое специфически взаимодействует с триптофанил-тРНК-синтетазами прокариот, эукариот и архебактерий. Иммуобилизованный на планшете синтетический пептид, имеющий идентичную аминокислотную последовательность и дополнительный остаток Arg на N-конце, также способен связываться с Am1 . Константы аффинности ($K_{\text{аф}}$) антитела, определенные методом неконкурентного иммуоферментного анализа для нативного фермента и синтетического пептида, составили $(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^9$ и $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Аминокислотная последовательность иммуореактивного пептида предполагает наличие β -изгиба(ов) и β -структуры, которая образована обращенным повтором. Однако рассчитанное из спектров кругового дихроизма в дальнем УФ растворенного в воде пептида содержание отдельных элементов вторичной структуры указывает на участие 16% аминокислотных остатков в формировании β -изгиба (ов) и только 8% — β -структуры. В водном растворе не удается наблюдать взаимодействия пептида с Am1 .

Широкое применение иммунологических методов как в области фундаментальных исследований, так и в медицинской практике стимулирует интерес к теоретическим аспектам проблемы иммунного ответа. Для изучения иммуногенности и антигенности отдельных элементов структуры белковых молекул в настоящее время используются два основных подхода: анализ специфичности антипептидных антител и определение антигенной реактивности фрагментов белка, полученных при протеолитическом расщеплении разной глубины, с антибелковыми антителами. Следует, однако, отметить, что взаимодействие антител, полученных к нативному белку, с относительно короткими пептидами наблюдается сравнительно редко [1] и обычно характеризуется низким сродством [2, 3].

Триптофанил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2, ТРСаза) из поджелудочной железы крупного рогатого скота — первый фермент группы аминокцил-тРНК-синтетаз, к которому были получены моноклональные антитела [4]. Одно из антител, обозначенное как Am1 , высокоизбирательно взаимодействует с ТРСазами эукариот, прокариот и архебактерий, что указывает на эволюционную консервативность антигенной детерминанты, узнаваемой Am1 [5]. Вопреки представлениям, связывающим свойство консервативности с областью активного центра, участки структуры ТРСазы, которые входят в эпитоп для Am1 , расположены за пределами активного центра, поскольку связывание с Am1 не влияет на активность как бычьего, так и бактериального ферментов [6]. Тот факт, что детерминанта для Am1 сохраняется в денатурирующих условиях [5], позволяет отнести

Сокращения: ТРСаза — триптофанил-тРНК-синтетаза; ТСБ — 50 мМ буфер tris-HCl (рН 7,5), содержащий 0,15 М NaCl ; Т-буфер — ТСБ, содержащий 0,1% по-видет Р40.

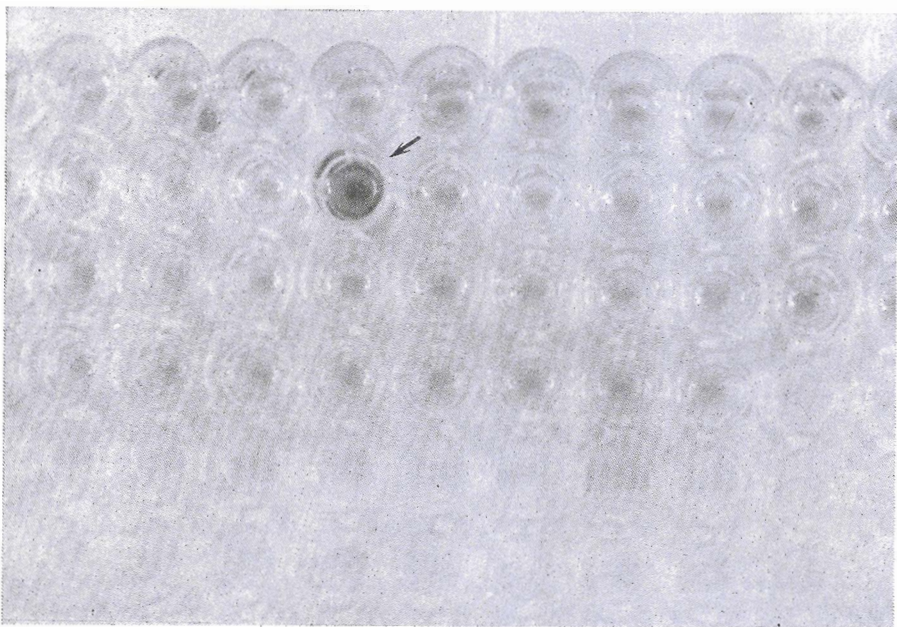


Рис. 1. Иммуноферментный анализ с моноклональным антителом Аm1 пептидсодержащих фракций ВЭЖХ кластрипаинового гидролизата бычьей ТРСазы. В лунке В5 (указана стрелкой) 0,3 мкг пептида ТSC-O-22

ее, согласно современной терминологии [7], к антигенным детерминантам непрерывного типа. Такие эпитопы, находясь в составе фрагмента белка, как правило, сохраняют способность связываться с антителами, полученными к целой белковой молекуле.

Недавно с целью выявления в первичной структуре ТРСазы из поджелудочной железы быка аминокислотной последовательности, пригодной для синтеза олигонуклеотидных зондов, нами было проведено расщепление этого белка кластрипаином; ряд пептидов очищен и секвенирован [8]. Исходя из свойств антигенной детерминанты для Аm1, можно было надеяться обнаружить в числе разделенных пептидов белковый фрагмент, сохраняющий способность реагировать с Аm1, что и входило в задачи настоящей работы.

Иммуноферментный анализ пептидсодержащих фракций ВЭЖХ кластрипаинового гидролизата ТРСазы, иммобилизованных на иммунологических планшетах с помощью глутарового альдегида, показал, что из 45 разделенных фракций только одна, содержащая пептид ТSC-O-22, взаимодействует с Аm1 (рис. 1). Этот 18-членный пептид имеет аминокислотную последовательность Ile-Ser-Phe-Pro-Ala-Ile-Asn-Gln-Phe-Ala-Ala-Pro-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg [8]. Данные таблицы свидетельствуют о специфичности взаимодействия пептида ТSC-O-22 (но не других, контрольных пептидов) с Аm1. ТSC-O-22 не содержит детерминанты для поликлональных антител овцы против целой молекулы иммуноглобулинов мыши, используемых в качестве вторых антител при иммуноферментном анализе, и не взаимодействует с моноклональным антителом ТЗ, полученным против другой аминоксил-тРНК-синтетазы (тирозиновой) из того же источника.

Накопленные за последние годы данные по изучению иммуногенности и антигенности белковых структур свидетельствуют о важности вторичной структуры белка или пептида как для индукции иммунного ответа, так и для последующего узнавания антигена антителами [9—15]. Если рассматривать аминокислотную последовательность иммунореактивного пептида ТSC-O-22 с точки зрения возможной его конформации, то обращает на себя внимание тот факт, что три аминокислотных остатка с N-конца (Ile-Ser-Phe) оказываются повторенными в обратном порядке (Phe-

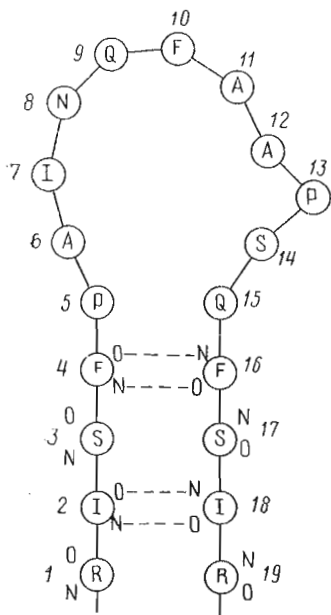


Рис. 2

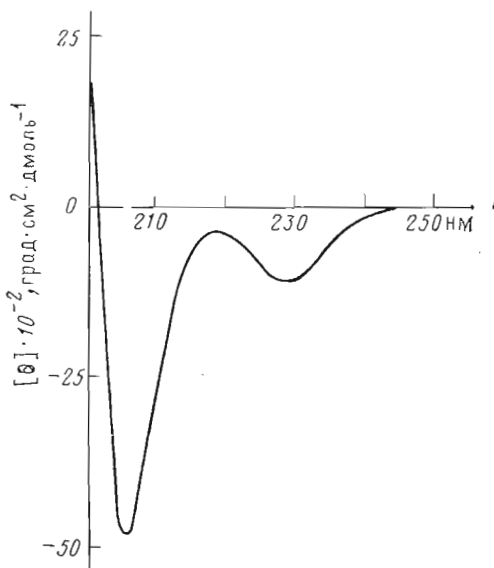


Рис. 3

Рис. 2. Схематическое изображение участка структуры ТРСазы, включающего в себя пептид кластрицианового гидролизата ТSC-O-22 (остатки 2-19). В положении 1 вместо остатка аргинина может с меньшей вероятностью находиться остаток лизина. Аминокислотная последовательность дана в однобуквенном коде. Штриховыми линиями обозначены возможные водородные связи между NH- и CO-группами пептидного остатка в предполагаемой области образования β-структуры

Рис. 3. Спектр КД иммунореактивного С-пептида, растворенного в воде, в области 200—250 нм. θ — молярная эллиптичность в расчете на средний аминокислотный остаток

Ser-Ile) в положениях 15—17. Более того, поскольку кластрициан гидролизует белковые молекулы преимущественно по остаткам Arg (иногда Lys), с большой степенью вероятности можно предполагать, что пептиду ТSC-O-22 в цепи ТРСазы предшествует остаток Arg, и, следовательно, этот участок последовательности фланкирован четырьмя аминокислотными остатками, образующими обращенный повтор (рис. 2). При этом на участках длиной в 5 остатков с N- и С-конца пептида гидрофильные остатки чередуются с гидрофобными, что способствует принятию пептидом β-конформации [16].

Существенную роль в формировании вторичной структуры и антигенных свойств пептида ТSC-O-22 могут играть также остатки пролина. Известно, что пептиды, содержащие пролин, отличаются повышенной иммуногенностью; поскольку остаток этой аминокислоты образует импидную связь, некоторые атомы, окружающие его, фиксированы в пространстве по отношению друг к другу как в коротком пептиде, так и в белке, образуя элементарную «конформационную» детерминанту [13].

Взаимодействие некоторых пептидов кластрицианового гидролизата ТРСазы с моноклональными антителами: Ам1 против ТРСазы и ТЗ против тирозил-тРНК-синтетазы

По данным иммуноферментного анализа; приведена величина A_{465}

Моноклональные антитела	TSC-O-22	TSC-O-15	TSC-O-14
Ам1	0,245	0,019	0,015
ТЗ	0,010	0,015	0,011
Контроль *	0,012	0,009	0,013

* В отсутствие моноклональных антител.

Вероятно, этим объясняется тот факт, что β -изгиб как элемент вторичной структуры белка обладает большей антигенностью [14] по сравнению, например, с α -спиралью [17]. Примечательно, что один из остатков пролина в TSC-O-22 расположен рядом с остатком серина, а соседство этих двух аминокислот вносит дополнительный вклад в стабилизацию β -изгиба при сравнении, в частности, с парой пролин — аланин [18]. Вышеизложенные соображения позволили предположить наличие в структуре пептида TSC-O-22 β -изгиба, однако этот факт нуждается в экспериментальном подтверждении.

Для дальнейшего изучения иммунореактивного пептида возникла необходимость иметь его в количестве, позволяющем проводить структурные исследования. Синтезированный с этой целью 19-членный пептид заданной аминокислотной последовательности (см. рис. 2), обозначаемый далее как С-пептид, также специфически узнавался моноклональным антителом Am1, что дополнительно подтверждало правильность определения первичной структуры и достоверность полученных результатов.

На рис. 3 представлен спектр КД в области 200—250 нм С-пептида в водном растворе. С помощью метода [19], учитывающего вклад ароматических аминокислотных остатков в этой области, рассчитывали содержание в С-пептиде отдельных элементов вторичной структуры. По этим данным, 16% аминокислотных остатков пептида, т. е. 3 остатка, формируют β -изгиб, тогда как остальная часть молекулы фактически не структурирована (α -спиральных участков не содержится, в β -структуре — не более 2 остатков). По-видимому, именно неупорядоченностью структуры большинства конформеров пептида в растворе объясняется тот факт, что этот пептид в концентрациях до 5 мкг/мл не конкурировал за Am1 с иммобилизованной ТРСазой (рис. 4). Возможно и другое объяснение этих результатов: за время инкубации в планшете происходит смещение равновесия, и антитела из комплекса, образованного с С-пептидом, вследствие большего сродства к ТРСазе переходят преимущественно в форму комплекса с последней. Однако такое объяснение кажется маловероятным, так как мы не наблюдали конкуренции С-пептида в растворе за Am1 в опытах не только с иммобилизованной ТРСазой, но и с иммобилизованным пептидом.

Известно, что гибкая неструктурированная антигенная детерминанта не способна прочно связывать антитело; это может объясняться тем, что большая часть свободной энергии связывания расходуется на поддержание единственной конформации, комплементарной антителу [20]. По-видимому, пришивка С-пептида к полимерной подложке с помощью глутаральдегида стабилизирует конформацию, близкую к его конформации в составе молекулы, именно поэтому фиксированный пептид обладает иммунореактивностью. Не исключено, что решающее значение при этом имеет образование ковалентных сшивок, так как при фиксации TSC-O-22 и С-пептида путем высушивания аликвот в лунках [12] иммунореактивность наблюдали только для отдельных партий иммунологических планшет.

Известны примеры того, как антитела, полученные к пептиду, имеющему форму пептида за счет образования дисульфидного моста между концевыми остатками цистеина, не реагировали с тем же пептидом при восстановлении его SH-групп [11]. Антигенные свойства одного и того же пептида на планшете и в водном растворе можно рассматривать как аналогичные свойствам подобного пептида с замкнутыми и разомкнутыми концами [11].

Отсутствие в растворе взаимодействия антитела Am1 с С-пептидом не позволило определить константу диссоциации (K_D) комплекса Am1 с С-пептидом в условиях равновесия по методу [21]. Определенная этим методом на основании графика Скэтчарда (рис. 5) K_D для комплекса Am1 с нативной ТРСазой составила $3,2 \cdot 10^{-9}$ М.

Для определения сродства моноклонального антитела к иммунореактивному пептиду и сопоставления его со сродством к ТРСазе нами использован метод неконкурентного иммуоферментного анализа [22]. Этот ме-

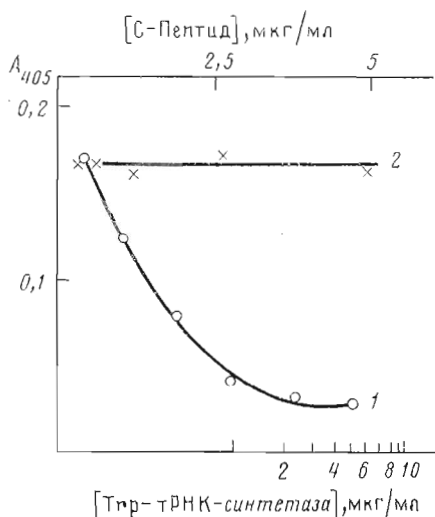


Рис. 4

Рис. 4. Влияние преинкубации антител Ам1 с нативной ТРСазой (1) и С-пептидом (2) на их связывание с иммобилизованной ТРСазой. Антитела в концентрации 30 нг/мл; преинкубировали 1,5 ч при 25° С с ТРСазой (от $4 \cdot 10^{-10}$ до $2 \cdot 10^{-7}$ М) и С-пептидом (от 10^{-7} до $4 \cdot 10^{-5}$ М). Количество свободных антител определяли иммуноферментным анализом на планшетах с иммобилизованным ферментом

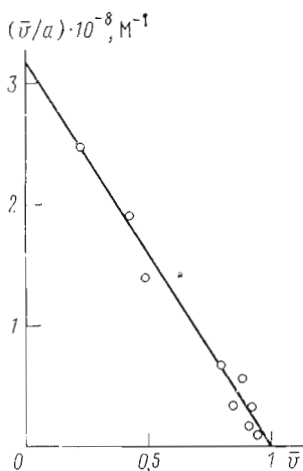


Рис. 5

Рис. 5. График Скэтчарда для системы ТРСаза — Ам1. \bar{v} — доля антител в комплексе с антигеном, a — концентрация свободного антигена в условиях равновесия. $\bar{v} =$

$$= (A_0 - A)/A_0 \text{ и } \frac{\bar{v}}{a} = \frac{\frac{A_0 - A}{A_0}}{a_0 - i_0 \cdot \frac{A_0 - A}{A_0}} \quad (\text{см. уравнение 1 в «Экспер. части»})$$

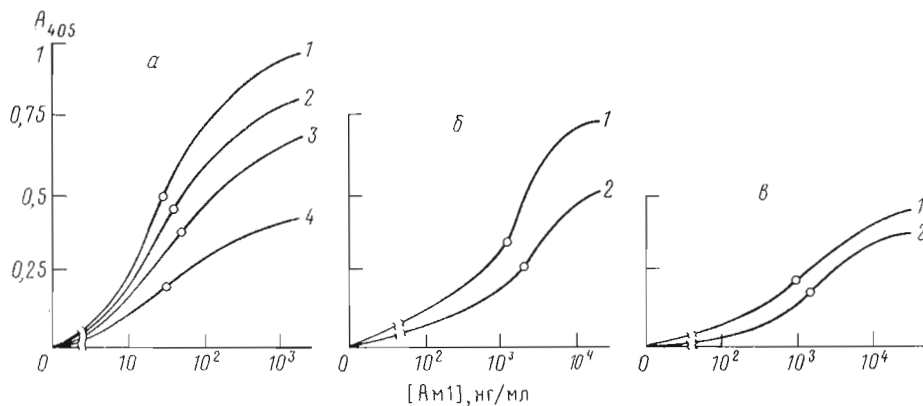


Рис. 6. Неконкурентный иммуноферментный анализ связывания антитела Ам1 с ТРСазой (а) и С-пептидом (б, в). Фермент в концентрациях 2, 1, 0,5 и 0,25 мкг/мл (а, 1—4 соответственно) иммобилизовали в лунках планшета и инкубировали с серийными разведениями Ам1 (от 2000 до 3,2 нг/мл). Иммобилизованный пептид в концентрациях 3 и 1,5 мкг/мл (б, 1, 2), 2 и 1 мкг/мл (в, 1, 2) инкубировали с серийными разведениями Ам1 от 20 мкг/мл до 78 нг/мл. Точкой обозначено положение на кривой, в котором поглощение равно 50% от максимального для каждой кривой

тод дает возможность определить константу аффинности ($K_{\text{аф}}$), используя серийные разведения раствора антител и разные количества иммобилизованного антигена. На рис. 6 представлены кривые, позволившие определить в серии повторных опытов $K_{\text{аф}}$ для ТРСазы (а) и С-пептида (б, в) как $(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^9$ и $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ соответственно.

Достаточно близкие значения констант, характеризующих сродство нативной ТРСазы к Ам1 при разных методах определения, свидетельст-

вуют об адекватности неконкурентного метода [22]. Пептид характеризуется весьма высоким значением константы сродства K_{af} для Am1, всего на 2 порядка отличающимся от K_{af} нативной ТРСазы, тогда как обычно разница в сродстве коротких пептидов и нативных белков составляет 3—4 порядка [2, 3]. Эти результаты свидетельствуют о том, что в пептиде TSC-O-22 локализована критическая часть антигенной детерминанты ТРСазы для Am1.

Как указывалось выше, антигенная детерминанта для Am1 характеризуется эволюционной консервативностью. В частности, Am1 реагирует с ТРСазой из *E. coli* [5], для которой на основании секвенирования ДНК предложена аминокислотная последовательность [23]. Еще для одной прокариотической ТРСазы из *Bacillus stearothermophilus* аминокислотная последовательность прямо определена методами белковой химии [24]. С помощью иммуноблоттинга [5] мы выявили в лизате клеток *B. stearothermophilus* белок с M 37 кДа, реагирующий с Am1, тем самым распространив утверждение о консервативности эпитопа для Am1 на ТРСазу из термофильной бактерии. Таким образом, мы располагали аминокислотными последовательностями двух ТРСаз, узнаваемых антителом Am1. Поиски гомологии между TSC-O-22 и фрагментами цепи этих прокариотических ТРСаз представляют несомненный интерес для выявления отдельных аминокислотных остатков либо других элементов структуры, определяющих связывание антитела Am1. Компьютерный анализ не выявил сколько-нибудь существенного подобия прокариотических ферментов с С-пептидом на уровне первичной структуры. Известны, однако, примеры того, что моноклональные антитела к одному белковому фрагменту реагировали с другим фрагментом, несмотря на то что степень сходства их аминокислотных последовательностей была крайне незначительна [1]. Вероятно, сходство этих фрагментов проявляется на более высоком уровне их структурной организации с учетом таких свойств, как суммарный заряд, гидрофобность, а также профиль гидропатичности, зависящий от чередования гидрофильных и гидрофобных остатков [25, 26].

Полученные данные не позволяют с уверенностью сказать, является ли непрерывная антигенная детерминанта для Am1, входящая в состав 18(19)-членного пептида, полной, либо она представляет собой часть сложного прерывистого эпитопа, что более вероятно. Однако можно предположить, что критические для связывания с антителом остатки располагаются в петлеобразной структуре, сформированной β -изгибом (с участием пролина) и стабилизированной в белке фрагментом β -слоя. Таких критических остатков, согласно последним данным, может быть всего несколько (наименьшие из известных на сегодняшний день антигенных детерминант для нативного белка состоят из 5 [27] или 4 [28] остатков, причем в обоих случаях только 3 боковые цепи участвуют в связывании с антителом). Возможность получения антител к остатку фосфотирозина [29] дает основание полагать, что для узнавания антителом может быть достаточно единственного аминокислотного остатка.

Очевидно, что вопрос о том, какие элементы структуры триптофанил-ТРНК-синтетазы определяют иммунореактивность в отношении антитела Am1, будет окончательно выяснен только после установления первичных структур иммунореактивных пептидов в составе других (в первую очередь эубактериальных и архебактериальных) триптофанил-ТРНК-синтаз.

Авторы признательны Л. Л. Киселеву, В. Г. Туманяну и Н. Г. Есиповой за полезные обсуждения.

Экспериментальная часть

В работе использовали биотинилированные антитела кролика против целой молекулы иммуноглобулинов мыши, конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 2,2'-азиноди[3-этилбензтиазолинсульфонат] (Amersham, Англия), иммунологические планшеты (Nunc, Дания), глутаральдегид (Reanal, Венгрия), нонидет Р40 (BDH, Англия).

Очищенная ТРСаза (M 120 кДа) получена по методу [30]. Пептидсодержащие фракции ВЭЖХ клострипаинового гидролизата разделяли как описано в работе [8]. С-Пептид (Arg-Ile-Ser-Phe-Pro-Ala-Ile-Asn-Gln-Phe-Ala-Ala-Pro-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg) синтезирован твердофазным методом (кооператив «Импульс», Новосибирск). По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, содержание основного вещества в пептиде не менее 98% (по A_{220}). Заданная структура пептида подтверждена аминокислотным анализом и автоматическим секвенированием по Эдману. Концентрацию пептида определяли по спектру поглощения при рН 7,0, основываясь на молярном поглощении трех остатков фенилаланина. Концентрацию других пептидов измеряли на основании аминокислотных анализов их солянокислых гидролизатов (5,7 н. HCl, 24 ч при 105° С) на автоматическом анализаторе D500 (Durrum, США).

Моноклональные антитела Am1 против ТРСазы получены как описано в работе [4], ТЗ против бычьей тирозил-тРНК-синтетазы любезно предоставлены О. А. Вартамян. Иммуноблоттинг лизатов *B. stearothermophilus* (дикий тип) с ^{125}I -мечеными антителами Am1 проводили как описано ранее [5].

Спектр КД С-пептида в области 200—250 нм снимали на дихрографе ДХР-02 (СССР) при концентрации 0,49 мг/мл в 1-мм кювете при чувствительности прибора $2,5 \cdot 10^{-5}$ ОЕ/деление, постоянной времени 30 с, скорости сканирования 1 нм/мин. Расчеты вторичной структуры из спектра КД по методу [19] проводили на компьютере Hewlett-Packard 9830A (США) и на ЭВМ БЭСМ-6.

Поиск гомологий аминокислотных последовательностей осуществляли на персональной ЭВМ IBM-AT по стандартной программе COMPARE пакета DNASTAR (DNASTAR, Inc., США). Профили гидрофобности по отдельным аминокислотным остаткам получали по программе PROTEIN того же пакета программ, используя метод Кайта — Дулитла [26].

Иммуноферментный анализ. ТРСазу (1—10 мкг/мл) вносили в лунки иммунологических планшетов в 100 мкл буфера трис-HCl (рН 9,5) и инкубировали 3 ч при 37° С или ночь при 25° С. Для иммобилизации пептидов лунки предварительно обрабатывали 4 ч при 25° С 0,2% глутаральдегидом в 100 мМ фосфатном буфере (рН 5,0) и трижды промывали этим же буфером. Пептиды (150—200 пмоль) вносили растворенными в 10 мкл фосфатного буфера (рН 8,0) и высушивали. Все последующие реактивы вносили в объеме 0,1 мл каждый. Планшеты промывали 50 мМ буфером трис-HCl (рН 7,5), содержащим 0,15 М NaCl (ТСБ) с добавлением 0,1% нонидета Р40 (Т-буфер). Места неспецифической сорбции насыщали 1% бычьим сывороточным альбумином в Т-буфере, после чего в лунки последовательно вносили моноклональные антитела в нужной концентрации, биотинилированные антитела овцы против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 1000) и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (разведение 1 : 1000). Инкубацию на каждом этапе проводили в течение 1 ч при 37° С и сопровождали многократной промывкой Т-буфером. Комплекс антиген — антитело проявляли 2,2'-азиноди[3-этилбензтиазолинсульфонатом], оптическое поглощение (A_{405}) измеряли на спектрофотометре Tiertek Uniskan (Финляндия).

Определение константы диссоциации (K_D) комплекса ТРСаза — Am1 [21]. ТРСазу в различных концентрациях (от $4 \cdot 10^{-10}$ до $2 \cdot 10^{-7}$ М) смешивали с постоянным количеством Am1 ($2 \cdot 10^{-10}$ М) в ТСБ, содержащем 10 мг/мл БСА, и инкубировали 1,5 ч (время, достаточное для достижения равновесия) при 25° С, после чего концентрацию свободных антител определяли в стандартной процедуре непрямого иммуноферментного анализа. Время преинкубации в растворе (1,5 ч) и последующей инкубации с иммобилизованной ТРСазой (15 мин) подбирали так, чтобы смещение установленного в растворе равновесия антиген—антитело за счет иммобилизованного антигена было минимальным. В выбранных экспериментальных условиях величина f , характеризующая смещение этого равновесия [21], равна 0,23. Используемая для преинкубации концентрация Am1 лежит в линейной области концентрационной зависимости связывания антител

с иммобилизованной ТРСазой. Для этой области уравнение Скэтгарда записывается в виде

$$\frac{(A_0 - A)/A_0}{a_0 - i_0(A_0 - A)/A_0} = \frac{1}{K_D} \left(1 - \frac{A_0 - A}{A_0} \right), \quad (1)$$

где A_0 и A — оптическое поглощение, измеренное в отсутствие и в присутствии антигена в растворе, a_0 и i_0 — общие концентрации антигена и антител в растворе в условиях равновесия.

Константы аффинности ($K_{\text{аф}}$) Ам1 для ТРСазы и С-пептида определяли методом неконкурентного анализа [22], используя серийные 2-кратные разбавления антигена, наносимого в лунки иммунологического планшета, и серийные разбавления Ам1. Значения $K_{\text{аф}}$ вычисляли по формуле

$$K_{\text{аф}} = 1/2(2\text{Ат}' - \text{Ат}), \quad (2)$$

где $\text{Ат}'$ и Ат — общие концентрации антител, при которых окраска, развивающаяся в лунках, покрытых антигеном (Аг) в концентрациях $\text{Аг}'$ и Аг соответственно, равна половине максимальной. При этом $\text{Аг}' = 1/2\text{Аг}$. Величины $\text{Ат}'$ и Ат определяли на основании кривых зависимости оптической плотности от логарифма общей концентрации антител (см. рис. 6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jemmerson R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 24. P. 9180—9184.
2. Westhof E., Altschuh D., Moras D., Bloomer A. C., Mondragon A., Klug A., van Regenmortel M. H. V. // Nature. 1984. V. 311. № 5982. P. 123—126.
3. Leach S. J. // Biopolymers. 1983. V. 22. № 1. P. 425—440.
4. Берестень С. Ф., Заргарова Т. А., Костров С. В., Фаворова О. О. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1407—1411.
5. Заргарова Т. А., Берестень С. Ф., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1484—1486.
6. Beresten S. F., Zargarova T. A., Favorova O. O., Rubikaite B. I., Ryazanov A. G., Kisselev L. L. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 184. № 3. P. 575—581.
7. Berzofsky J. A. // Science. 1985. V. 229. № 4717. P. 932—940.
8. Заргарова Т. А., Ковалева Г. К., Фаворова О. О., Левина Н. Б., Тележинская И. Н. // Биорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1307—1312.
9. Schulze-Gahmen U., Prinz H., Glatter U., Beyreuther K. // EMBO J. 1985. V. 4. № 7. P. 1731—1737.
10. Tainer J. A., Getzoff E. D., Alexander H., Houghten R. A., Olson A. J., Lerner R. A., Hendrickson W. A. // Nature. 1984. V. 312. № 5990. P. 127—134.
11. Arnon R., Maron E., Sela M., Anbinsen Ch. B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 7. P. 1450—1455.
12. Tanaka T., Slamon D. J., Cline M. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 10. P. 3400—3404.
13. Sutcliffe J. G., Schinnick Th. M., Green N., Lerner R. A. // Science. 1983. V. 219. № 4585. P. 660—666.
14. Dyson H. J., Gross K. J., Houghten R. A., Wilson I. A., Wright P. E., Lerner R. A. // Nature. 1985. V. 318. № 6045. P. 480—483.
15. Niman H. L., Houghten R. A., Walker L. E., Reisfeld R. A., Wilson I. A., Hogle J. M., Lerner R. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 16. P. 4949—4953.
16. Brack A., Orgel L. E. // Nature. 1975. V. 256. № 5516. P. 383—387.
17. Geysen H. M., Tainer J. A., Rodola S. J., Mason T. J., Alexander H., Getzoff E. D., Lerner R. A. // Science. 1987. V. 235. № 4793. P. 1184—1190.
18. Aubry A., Marraud M. // Biopolymers. 1983. V. 22. № 1. P. 341—345.
19. Болотина И. А., Лугаускас В. Ю. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. № 5. С. 1409—1421.
20. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.
21. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // J. Immunol. Meth. 1985. V. 77. № 2. P. 305—319.
22. Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G. // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1—2. P. 173—179.
23. Hall C. V., van Cleemput M., Muench K. H., Janofsky C. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 11. P. 6132—6136.
24. Winter G. P., Hartley B. S. // FEBS Lett. 1977. V. 80. № 2. P. 340—342.
25. Sweet R. M., Eizenberg D. // J. Mol. Biol. 1983. V. 171. № 4. P. 479—488.
26. Kyte J., Doolittle R. F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105—132.
27. Worobec E. A., Paranchych W. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 2. P. 938—943.
28. Hodges R. S., Heaton R. J., Parker J. M. R., Molday L., Molday R. S. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 24. P. 11768—11775.

29. Wang J. Y. J. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 172. № 1. P. 1—7.
30. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. // *Meth. Enzymol.* 1979. V. 59. Part. G. P. 234—257.

Поступила в редакцию
17.VII.1989

После доработки
6.XII.1989

T. A. ZARGAROVA, A. A. ZARGAROV *, I. A. BOLOTINA,
S. F. BERESTEN, O. O. AVOROVA

PEPTIDE CONTAINING THE UNIVERSAL ANTIGENIC DETERMINANT
OF TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASES

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Among clostripain hydrolysate peptides of beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase the peptide Ile-Ser-Phe-Pro-Ala-Ile-Asn-Gln-Phe-Ala-Ala-Pro-Ser-Gln-Phe-Ser-Ile-Arg was revealed which contains the continuous antigenic determinant for monoclonal antibody Am1. This antibody specifically cross-reacts with tryptophanyl-tRNA synthetases of procaryotes, eucaryotes and archebacteriae. The synthetic peptide with identical amino acid sequence plus N-terminal Arg residue (S-peptide), being immobilized on enzyme immunoassay (EIA) microtitration plate, also binds with Am1. Am1 affinity constant (M^{-1}) measured by non-competitive EIA was $(3.0 \pm 0.3) \cdot 10^7$ for S peptide and $(1.4 \pm 0.3) \cdot 10^9$ for the native enzyme. The sequence of immunoreactive peptide adopts with high probability the secondary structure including β -turn(s) and antiparallel β -sheet composed of inverted repeats. At the same time, the analysis of circular dichroism spectrum (in the far UV) of the peptide dissolved in water comes closest to 16% β -turn and only 8% β -sheet. The binding of Am1 with peptide was not observed in aqueous solution,