



УДК 577.112.083.3 : 615.371

© 1991 г.

*В. М. Гельфанов, Л. А. Гречанинова, Е. С. Кай,
А. В. Яров, А. Ю. Суровой, О. М. Волынина,
А. В. Чепуркин, В. Т. Иванов*

**АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА
VI*. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ИММУНОДОМИНАНТНОГО
РАЙОНА БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА ШТАММОВ O₁K И A₂₂**

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

Определены В- и Т-эпитопы в последовательности протективных пептидов белка VP₁ вируса ящура: 136—152 штамма O₁K и 135—159 штамма A₂₂. Показано, что при иммунизации пептидом 135—159-A₂₂ различных животных образующиеся антитела направлены к различным участкам пептида. Установлена корреляция между иммуногенностью укороченных фрагментов пептида 135—159-A₂₂ на мышах BALB/c, их активностью на изолированных Т-клетках этих же животных и протективной активностью на морских свинках. Исследования проведены с помощью синтетических укороченных фрагментов пептидов 136—152-O₁K и 135—159-A₂₂.

Использование синтетических пептидов для создания искусственных вакцин требует тщательного изучения противопептидного иммунного ответа, а именно определения участков пептидной цепи, ответственных за проявление пептидами антигенных и иммуногенных свойств.

В предыдущих сообщениях [1—4] были описаны синтетические фрагменты 136—152, 136—148, белка VP₁ штамма O₁K и фрагменты 131—149, 140—149, 136—152, 135—159 штамма A₂₂, обладающие протективным действием при заражении животных вирусом ящура соответствующего штамма. Такие свойства пептидов, как собственная иммуногенность и видоспецифичность противопептидного иммунитета, позволили предположить, что иммунный ответ на эти пептиды находится под контролем Ig-генов и пептиды содержат не только протективные В-эпитопы, но и Т-хелперные эпитопы [3, 4].

Настоящая работа посвящена определению в последовательности протективных синтетических пептидов В- и Т-эпитопов и установлению границ Ig-генного контроля над противопептидным иммунитетом.

Ранее было показано, что фрагмент 136—152 белка VP₁ вируса штамма O₁K в свободном виде индуцирует у кроликов и морских свинок образование противопептидных антител, а также вызывает 100%-ную защиту морских свинок от заболевания ящуром [3, 5]. Для изучения зависимости иммунного ответа на пептид 136—152-O₁K от контроля Ig-генов иммуногенность свободного пептида была исследована на линиях мышей, различающихся типом локуса H-2 главного комплекса гистосовместимости (табл. 1).

Высокий титр противопептидных антител был получен при иммунизации мышей линий BALB/c (H-2^d), CBA/J и C3H (H-2^k). В то же время у мышей линии C57/BL (H-2^b) не происходило образования антител на пептид. Отсутствие иммунного ответа у этих мышей удалось преодолеть, используя конъюгат пептида с гемоцианином улитки. Отсюда следует, что иммунный ответ на свободный пептид 136—152 рестриктирован по главному комплексу гистосовместимости. Иммунизация укороченными фрагментами 136—148 и 141—152 мышей линии BALB/c не вызывает образования противопептидных антител.

* Сообщение V см. [1]. Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, DIEA — диизопропилэтиламин, TFA — трифторуксусная кислота, PAM — феил-ацетамидометил-, PBS — 0,01 M Na-фосфатный буфер, pH 7,4, PBST — PBS с 0,05% твина-20, KLN — гемоцианин улитки.

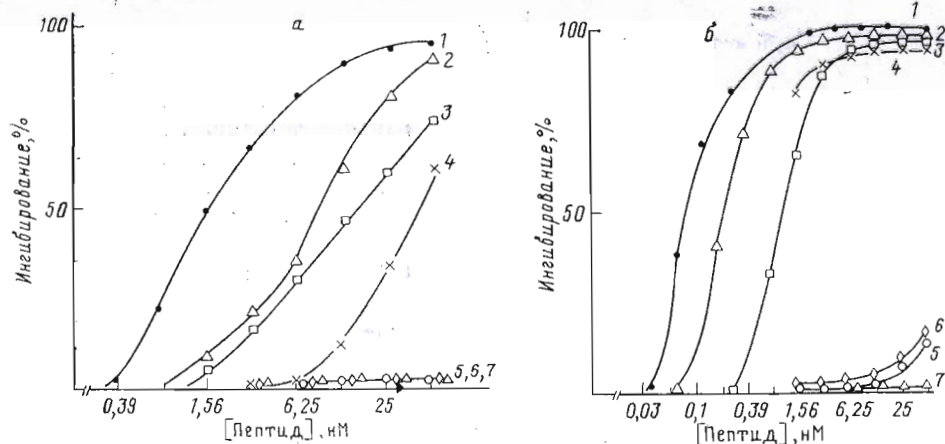


Рис. 1. Ингибирование связывания противовирусных кроличьих антител (а) и противопептидных антител мышей линии BALB/c (б) с пептидом 136—152-О₁К пептидами 136—152 (1), 141—152 (2), 136—148 (3), 141—148 (4), 145—159 (5), 145—152 (6). Контрольный пептид — 90—98 (7)

Для локализации В-эпитопов в последовательности 136—152 была изучена способность перекрывающихся синтетических фрагментов 136—148, 141—152, 145—152, 141—148, 145—159 и 90—98 [3] конкурировать с пептидом 136—152 за связывание с противовирусной сывороткой кроликов. Исследование проводили методом непрямого конкурентного иммуоферментного анализа (рис. 1а). Выяснено, что пептиды 141—152, 136—148 и 141—148 проявляли высокую ингибирующую активность, в то время как фрагменты 145—159, 145—152 и 90—98 не ингибировали связывания пептида 136—152 с противовирусными антителами. Аналогичным образом была изучена ингибирующая активность пептидных фрагментов в реакции связывания пептида 136—152 с противопептидными антителами мышей линии BALB/c (рис. 1б). Так же как и в предыдущем опыте, была обнаружена высокая ингибирующая способность фрагментов 141—148, 136—148 и 141—152. Фрагменты 145—159, 145—152 и 90—98 не были активны и в этом случае. Результаты опытов показывают, что как при иммунизации кроликов вирусом, так и при иммунизации мышей пептидом 136—152 образующиеся антитела направлены к фрагменту 141—148. Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими на важность остатков 144, 148 [6] и участка 143—146 [7] белка VP₁ в формировании нейтрализующих эпитопов вируса типа О.

Т-Клеточная активность пептидных фрагментов была изучена в опытах по антигензависимой пролиферации клеток периферийных лимфоузлов мышей линии BALB/c (рис. 2). Лимфатические узлы животных извлекались через 7 сут после иммунизации животных пептидом 136—152 и изучалась способность лимфоидных клеток пролиферировать при добавлении различных пептидов. Показано, что пептиды 136—152 и 136—148 способны индуцировать пролиферацию клеток периферийных лимфо-

Таблица 1

Иммуногенность пептида 136—152-О₁К белка VP₁ и его фрагментов] на мышах различных линий

Пептид	Линия мышей	Тип H-2	Титр противопептидных антител, -lg
136—152	BALB/c	d	4,4
»	C3H	k	3,1
»	CBA/J	k	3,1
»	C57B1/6	b	<1,0
136—152-KLH	C57B1/6	b	4,4
136—148	BALB/c	d	<1,0
141—152	BALB/c	d	<1,0

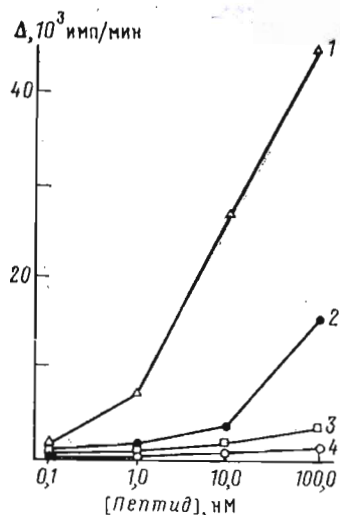


Рис. 2. Антигензависимая пролиферация лимфоцитов периферийных лимфоузлов мышей BALB/c, праймированных пептидом 136—152-O₁K при стимулировании *in vitro* пептидами 136—152-O₁K (1), 136—148-O₁K (2), 136—152-A₂₂ (3) и 90—98 A₂₂ (4)

узлов *in vitro*, однако активность пептида 136—148 значительно ниже и проявляется лишь при 100 нМ концентрации. Пептиды последовательности 90—98 и 136—152 VP₁ штамма A₂₂ не стимулировали пролиферацию клеток. Полученные результаты позволяют идентифицировать Т-эпитоп в последовательности 136—152.

Таким образом, установлено, что фрагмент 136—152 белка VP₁ штамма O₁K содержит все функционально важные участки, обеспечив индукцию этим пептидом противовирусного и противопептидного иммунного ответа: В- и Т-эпитопы. Интересно, что ни по теоретическим расчетам [8], ни по данным КД-спектроскопии пептида в воде и трифторэтаноле (данные не приведены) фрагмент 136—152 не содержит α-спиральной структуры, которая, по данным [9], является наиболее вероятной конформацией Т-эпитопов.

Отработанные на примере иммуногенного фрагмента белка VP₁ вируса лабораторного штамма O₁K подходы к установлению иммунокомпетентных участков позволили перейти к решению аналогичных проблем применительно к вирусу ящура штамма A₂₂, распространенного на территории СССР. Ранее было показано, что фрагмент 135—159 белка VP₁ вируса ящура штамма A₂₂ способен индуцировать у кроликов, морских свинок, крупного рогатого скота и овец образование вируснейтрализующих антител и защиту животных от заболевания ящуром [2].

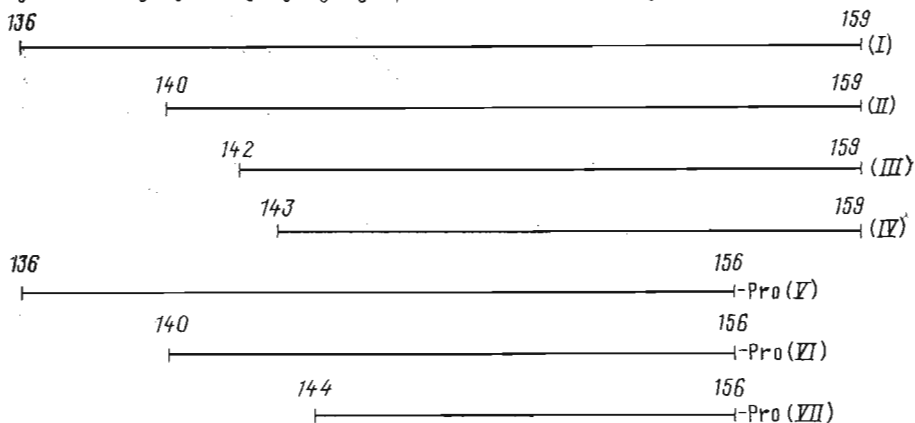
С целью локализации иммунокомпетентных участков была получена серия укороченных с С- и N-конца аналогов пептида 135—159, а именно фрагменты 136—159 (I), 140—159 (II), 142—159 (III), 143—159 (IV), 136—156-Pro (V), 140—156-Pro (VI), 144—156-Pro (VII) (рис. 3). Фрагменты с С-концевым Ala-156 для повышения устойчивости к протеолизу были удлинены с С-конца на остаток Pro. Синтез пептидов проведен твердофазным методом, как описано в работе [1]. Кроме того, в работе были использованы ранее полученные фрагменты белка VP₁ штамма A₂₂: 136—152, 136—151, 140—151, 140—149, 131—149, 90—98 и 143—149 [1, 3].

Таблица 2

Иммуногенность пептидов 135—159 и 136—152 белка VP₁ штамма A₂₂ вируса ящура на мышах различных линий

Линия мышей	Тип Н-2	Титр противопептидных антител, — lg	
		135—159	136—152
BALB/c	d	3,4	<1,0
C57Bl/6	b	4,8	<1,0
CBA/J	k	<1,0	<1,0

Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Met-Gly-Arg-Arg-Gly-Asp-Leu-Glu-Pro-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Ala-Glu-Leu-Pro

Рис. 3. Синтетические фрагменты пептида 135—159-VP₁ A₂₂

Изучение иммуногенности пептида 135—159 на мышах различных линий показало, что у мышей линий BALB/c (d-гаплотип) и C57/BL (b-гаплотип) образуются антитела с высокими титрами на 135—159-пептид, в то время как у мышей CBA/J (k-гаплотип) антитела на данный пептид не образуются (табл. 2). Более короткий пептид 136—152 не индуцировал образования антител ни у одной из использованных линий мышей. Полученные результаты выявляют важность участка 153—159 для индукции противопептидного иммунного ответа у мышей H-2^d- и H-2^b-гаплотипов.

Способность пептидных фрагментов индуцировать пролиферацию Т-клеток периферийных лимфоузлов мышей была изучена на отвечающей линии мышей BALB/c, иммунизированной пептидом 135—159. Как видно из рис. 4, лишь пептиды 143—159 и 140—159 способны интенсивно стимулировать пролиферацию клеток. Активность пептидов 136—156 и 140—156 значительно ниже, хотя достоверно превышает фоновые значения. Т-Клеточная память, стимулированная иммунизацией пептидом 135—159, является вирусоспецифичной, и добавление 146S-частиц вируса штамма A₂₂ к клеткам периферийных лимфоузлов *in vitro* индуцирует пролиферацию лимфоцитов.

Изучение иммуногенности фрагментов пептида 135—159 на мышах линии BALB/c (табл. 3) позволило установить, что укорачивание пептидных фрагментов с С-конца до остатка 156 не влияет существенно на их способность индуцировать образование противопептидных антител. В то же время снижение иммуногенности наблюдается при укорочении пептидов с N-конца до полного исчезновения ее у пептида 144—156.

Таблица 3

Иммуногенность фрагментов белка VP₁ штамма A₂₂ вируса ящура на мышах линии BALB/c

Пептид	Титр противопептидных антител, - lg
135—159	3,4
136—159	3,4
140—159	3,4
142—159	3,4
143—159	3,1
136—156	3,1
140—156	3,1
144—156	1,0

Таблица 4

Протективная активность синтетических фрагментов белка VP₁ штамма A₂₂ вируса ящура на морских свинках

Пептид	Титр противопептидных антител, - lg	Титр вируснейтрализующих антител, - log ₂	Защита *
135—159	3,4	4,5	5/5
136—159	3,4	3,7	5/5
140—159	3,4	2,2	5/5
142—159	3,4	<1,0	5/5
143—159	3,1	<1,0	4/5
136—156	2,8	<1,0	4/5
140—156	1,7	<1,0	2/5
144—156	<1,0	<1,0	0/5

* Количество защищенных/количество зараженных животных.

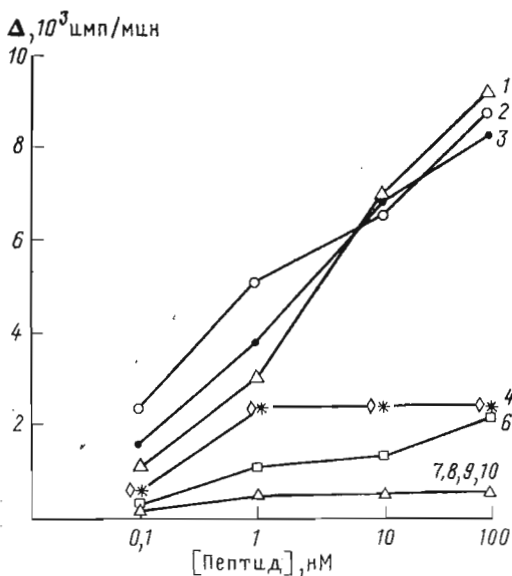


Рис. 4. Антигензависимая пролиферация лимфоцитов периферийных лимфоузлов мышей BALB/c, праймированных пептидом 135—159, при стимулировании *in vitro* пептидами 135—159 (1), 143—159 (2), 140—159 (3), 136—156 (4), 140—156 (5), 144—156 (7), 136—152 (8), 143—149 (9), 136—152-O₁K (10) и 146S-частицами вируса ящура штамма А₂₂ (6) в концентрации 0,1—100 нМ

Исследование протективной активности синтетических фрагментов на морских свинках при однократной иммунизации животных в дозе по 50 мкг показывает, что фрагмент 142—159 является самым коротким среди изученных пептидов, обеспечивающих полную защиту животных от заболевания (табл. 4). Вместе с тем в ряду фрагментов 135—159, 136—159, 140—159 и 142—159 наблюдается падение титра вируснейтрализующих и противопептидных антител. Среди фрагментов, укороченных с С-конца до остатка 156, протективная активность падает до нуля при одновременном укорачивании пептидов с N-конца до остатка 144, и самым коротким пептидом, сохраняющим протективную активность (40%), является пептид 140—156. Обращает на себя внимание тот факт, что иммунизация фрагментами 142—159, 143—159, 136—156, 140—156 хотя и стимулировала защиту животных от заболевания, однако при этом не удалось обнаружить вируснейтрализующих антител. Мы полагаем, что это связано с низкой чувствительностью используемого метода, как было показано ранее, при изучении антител против пептидных фрагментов белка VP₁ штамма O₁K [5].

Таким образом, наблюдается корреляция между иммуногенностью синтетических фрагментов на мышах BALB/c, их способностью индуцировать пролиферацию лимфоцитов тех же животных *in vitro* и протективной активностью на морских свинках. Минимальный фрагмент 140—156, способный индуцировать пролиферацию лимфоцитов, проявляет иммуногенные свойства на мышах и обеспечивает частичную защиту морских свинок от заболевания.

Следующим этапом исследований было определение В-эпитопов в последовательности пептида 135—159. Для определения участка пептидной цепи, ответственного за связывание с антителами, активность перекрывающихся фрагментов была изучена в реакции конкуренции с пептидом 135—159 за связывание с противопептидной и противовирусной сыворотками. В конкуренции за связывание пептида 135—159 с противопептидной сывороткой мышей BALB/c минимальным фрагментом, обладающим ингибирующей активностью, явился пептид 144—156 (рис. 5а). Аналогичное исследование противопептидной сыворотки кроликов показало несколько иные результаты (рис. 5б). В данном случае ингибирующей активностью обладают пептиды 143—159 и 136—152. Все остальные изученные пептиды (140—151, 140—149, 131—149 и 136—151) не активны в этом тесте. Интересно, что, в то время как пептид 136—152 проявляет ингибирующую активность, фрагмент 136—151, отличающийся от него одним аминокислотным остатком, полностью лишен способности ингибировать связывание пептида 135—159 с антителами. Изучение ингибирования

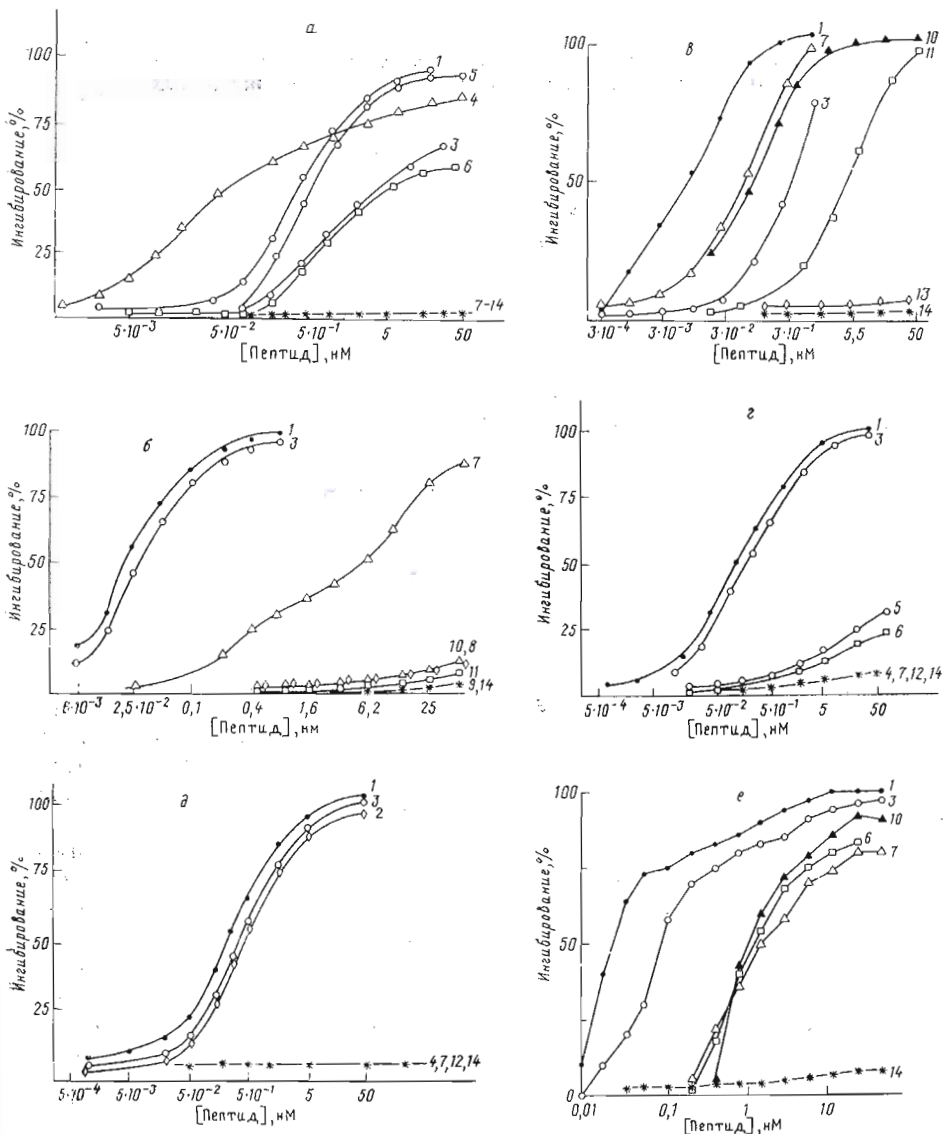


Рис. 5. Ингибирование связывания противопептидных антител мышей BALB/c (а), противопептидных (б) и противовирусных (в) кроличьих антител, противопептидных антител морской свинки (г), противопептидных антител коров первой группы (5 животных) (д) и второй группы (2 животных) (е) с пептидом 135—159 синтетическими пептидами: 135—159 (1), 140—159 (2), 143—159 (3), 136—156 (4), 140—156 (5), 144—156 (6), 136—152 (7), 136—151 (8), 131—149 (9), 140—151 (10), 140—149 (11), 143—149 (12), 136—152-О₁К (13) и 90—98 (14)

пептидными фрагментами связывания пептида 135—159 с противовирусной сывороткой кроликов позволило установить основной участок связывания с антителами — 140—149 (рис. 5в). Таким образом, район связывания противовирусных антител к субтипу А₂₂ аналогичен ранее определенному участку 141—148 у О₁К-субтипа. Все изученные фрагменты белка VP₁ вируса ящура штамма А₂₂ проявляли сходную активность в этом опыте, лишь фрагмент 136—152 VP₁ штамма О₁К и контрольный пептид 90—98 были лишены ингибирующей активности. Исследование противопептидной сыворотки морских свинок позволило сделать вывод, что большинство противопептидных антител связывается с участком 143—159 (рис. 5г). Мы предположили, что аналогично межвидовым различиям образующихся противопептидных антител и внутри популяции при иммунизации пептидом естественно-восприимчивых к ящуру животных. Изучение противопептидных

Таблица 5

В-эпитопы пептида 135—159, определенные с использованием противопептидных сывороток различных видов животных

Вид животного	В-эпитоп*
Кролики	136 ————— 152
Морские свинки	143 ————— 159
Мыши BALB/c	144 ————— 156
Коровы 1 (5 жив.)	143 ————— 159
„ 2 (2 жив.)	144 ————— 156

* Выделен жирной линией.

сывороток группы крупного рогатого скота, состоящей из семи животных, подтвердило это предположение. При иммунизации пептидом 135—159 у пяти животных (рис. 5*д*) происходит образование антител против участка 143—159, а у двух животных (рис. 5*е*) антитела образуются против более короткого участка 144—156.

При интерпретации результатов необходимо иметь в виду, что иммунизация пептидом стимулирует образование антител широкого спектра, и проведенные эксперименты позволяют определить лишь район связывания большинства антител, не исключая наличия ряда минорных В-эпитопов в последовательности 135—159. Однако, несмотря на гетерогенность противопептидных антител, полученные результаты позволяют сделать вывод, что при иммунизации пептидом 135—159 различных видов животных большинство индуцируемых антител направлены против различных участков пептидной цепи (рис. 5): в случае кроликов — к участку 136—152, для морских свинок В-эпитоп заключен в последовательности 143—159, а в случае мышей BALB/c — к участку 144—156.

Изучение противопептидной сыворотки крупного рогатого скота выявило две группы животных, различающиеся по специфичности образующихся у них противопептидных антител. У одной группы животных антитела связываются с участком 143—159, у другой — с участком 144—156. Результаты работы подтверждают литературные данные о существовании множественности последовательных В-эпитопов в пределах основного иммуногенного района VP₁ вирусов различных типов, в том числе и типа А (см., например, [10, 11]). Мы полагаем, что испытания с использованием разных пород скота позволят обнаружить еще большие различия в специфичности образующихся противопептидных антител у различных животных. Отсюда следует, что синтетическая противоящурная вакцина должна включать в себя все потенциальные В- и Т-эпитопы основного иммуногенного района.

Изучаемый пептид последовательности 135—159 хотя и отвечает этим требованиям, но в некоторых случаях не способен вызывать у животных иммунный ответ, как, например, у мышей линии СВА/Ж (табл. 2). С аналогичными трудностями можно столкнуться и при иммунизации пептидом естественно-восприимчивых к вирусу ящура животных; когда для части популяции будет наблюдаться низкий протективный эффект синтетической вакцины либо вследствие пониженного уровня индивидуальной ответности за основной иммуногенный район VP₁, либо в результате индукции

у некоторых особых противопептидных антител, не обеспечивающих нейтрализацию вируса. Мы предполагаем, что решение перечисленных проблем может заключаться в создании пептидных конструкций, включающих в себя кроме иммунодоминантного района также и другие иммунокомпетентные участки вируса ящура, способные стимулировать В- и Т-клеточный противовирусный иммунный ответ.

Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм Reanal, Fluka, Serva, PRF, Merck.

В иммунологической части работы использовались реактивы: среда PRMI1640, сыворотка плода коровы, пенициллин, стрептомицин, НЕРЕС (Flow laboratories, Великобритания); 2-меркаптоэтанол (Merck, ФРГ); полный и неполный адъюванты Фрейнда, *o*-фенилендиамин (Sigma, США); [³H]тимидин (Amersham, США).

Кислотный гидролиз пептидов проводили 45 мин при 160° С смесью HCl — TFA (2 : 1) или 24 ч при 110° С 6 н. HCl.

Синтез пептидов. Синтез пептидов (I)—(VII) проводили твердофазным методом, исходя из Вос-пролил-РАМ-полимера (0,2 ммоль Pro на 1 г полимера) [1]. Исходное количество Вос-пролил-РАМ-полимера для синтеза пептидов (I) и (V) составляло 1 г. Пептиды (II)—(IV) и (VI), (VII) были получены из соответствующих пептидил-полимеров (отбирали по 200 мг) в ходе синтеза пептидов (I) и (V).

Для каждого синтетического цикла использовали следующий протокол (10—15 мл растворителя на 1 г полимера):

1) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин); 2) CH₂Cl₂ — TFA, 1 : 1 (1 мин); 3) CH₂Cl₂ — TFA, 1 : 1 (30 мин); 4) CH₂Cl₂ (5 × 1 мин); 5) DIEA — CH₂Cl₂, 5 : 95 (2 × 2 мин); 6) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин); 7) 3 экв. симметричного ангидрида Вос-аминокислоты в CH₂Cl₂ (2 ч); 8) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин); 9) DIEA — CH₂Cl₂, 5 : 95 (2 × 2 мин); 10) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин); 11) DMF (2 × 1 мин); 12) 3 экв. гидроксibenзотриазолового эфира Вос-аминокислоты в DMF (2 ч); 13) DMF (3 × 1 мин); 14) CH₂Cl₂ (2 × 1 мин); 15) изопропанол (3 × 1 мин); 16) ацилирование смесью CH₂Cl₂ — Ac₂O — пиридин, 60 : 20 : 20 (1 ч); 17) CH₂Cl₂ (3 × 1 мин); 18) изопропанол (3 × 1 мин).

Пептиды отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в два этапа. На первом этапе пептидил-полимеры обрабатывали 2 ч смесью HF — диметилсульфид — *n*-крезол (25 : 65 : 10) при 0° С. Фтористый водород и диметилсульфид отгоняли в вакууме, твердый остаток промывали эфиром и сушили. На втором этапе обработку проводили смесью HF-*n*-крезол (90 : 10) в течение 1 ч при 0° С. После удаления HF остаток промывали эфиром, сушили, экстрагировали пептид 10% уксусной кислотой. Раствор лиофилизировали, пептиды очищали с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии как описано в работе [1]. Выход свободных пептидов в пересчете на С-концевую аминокислоту варьировался от 60 до 75%.

Индивидуальность полученных соединений подтверждали данными аминокислотного анализа (табл. 6), масс-спектрометрии (метод FAB, экспериментальные величины *MH*⁺ для соединений (I)—(VII) соответствовали расчетным), обращенно-фазовой ВЭЖХ (прибор LKB, колонка TSK-ODS, 4,6 × 250 мм, время выхода 20,5 мин (пептид I), 19,5 (II), 19,0 (III), 19,3 (IV), 16,9 (V), 16,7 (VI), 16,5 (VII) при скорости потока 1 мл/мин в градиенте ацетонитрила в 0,05% водной TFA от 0 до 70% за 35 мин).

Иммунизация животных. Кроликов массой 2—3 кг, морских свинок массой 0,5 кг и мышей массой 15 г иммунизировали свободными пептидами в дозе 200 мкг (кролики) и 100 мкг (мыши и морские свинки) в полном адъюванте Фрейнда подкожно. Через 45 сут иммунизацию проводили повторно в той же дозе в неполном адъюванте Фрейнда. Кровь отбирали на 55-е сут после первой иммунизации.

В опытах по определению протективного эффекта морских свинок иммунизировали однократно свободными пептидами в дозе 50 мкг в полном

Данные аминокислотного анализа пептидов (I)—(VII)

Соединение	Tyr	Ser	Ala	Gly	Met	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Pro
I	0,87 (1)	0,76 (1)	5,14 (5)	4,03 (4)	0,82 (1)	3,23 (3)	0,91 (1)	3,17 (3)	1,96 (2)	1,13 (1)	1,82 (2)
II	—	—	4,13 (4)	3,21 (3)	0,90 (1)	3,12 (3)	0,94 (1)	3,05 (3)	2,01 (2)	1,07 (1)	1,91 (2)
III	—	—	4,00 (4)	2,12 (2)	—	3,01 (3)	0,94 (1)	3,21 (3)	1,83 (2)	1,21 (1)	1,87 (2)
IV	—	—	3,97 (4)	1,05 (1)	—	3,11 (3)	0,98 (1)	3,01 (3)	1,72 (2)	1,20 (1)	1,99 (2)
V	0,78 (1)	0,81 (1)	5,01 (5)	4,12 (4)	0,87 (1)	3,05 (3)	1,02 (1)	2,21 (2)	1,03 (1)	1,12 (1)	1,82 (2)
VI	—	—	4,03 (4)	3,00 (3)	0,89 (1)	2,98 (3)	1,05 (1)	2,15 (2)	0,95 (1)	1,13 (1)	1,95 (2)
VII	—	—	3,98 (4)	1,15 (1)	—	2,07 (2)	1,13 (1)	2,27 (2)	1,12 (1)	1,00 (1)	1,67 (2)

адьюванте Фрейнда, на 55-й день отбирали кровь и определяли титры вируснейтрализующих антител и протективный эффект согласно [3, 5]. В работе использовали противопептидные сыворотки крупного рогатого скота, полученные как описано в работе [2].

Твердофазный иммуоферментный анализ («непрямой» метод). Использовали 96-луночные платы из полистирола (Dunatech, Швейцария). Антигены в концентрации 20 мкг/мл вносили в лунки платы в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 16 ч при 4° С. Раствор антигена сливали и трижды промывали лунки 0,01 М Na-фосфатным буфером в 0,1 М NaCl, pH 7,4, содержащим 0,05% твина-20 (PBST). Затем в лунки вносили по 0,1 мл образцов антисывороток в двойных разведениях, начиная с разведения 1 : 20 или 1 : 100. После инкубации платы в течение 1 ч при 37° С раствор антисывороток сливали, платы четырежды промывали PBST и в лунки вносили по 0,1 мл раствора конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител против IgG соответствующего вида животных в разведении 1 : 1000 (Bio-Rad, США). Плату инкубировали 1 ч при 37° С, промывали как описано выше и вносили в лунки по 0,1 мл раствора субстрата (0,05% о-фенилендиамина, 0,05% H₂O₂) в 0,05 М Na-цитратном буфере, pH 4,5. Развитие окраски останавливали через 2—5 мин добавлением 12,5% H₂SO₄. Значения оптического поглощения при 492 нм измеряли на приборе Multiskan (Flow lab., Великобритания). За титр противопептидных антител принимали соответствующее разведение антисыворотки, дающее окрашивание в 0,1 ОЕ и превышающее фоновый уровень в 4 раза.

Конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ. 0,05 мл растворов пептидов в двукратных разведениях, начиная с концентрации 1 нМ смешивали с равным объемом сыворотки в разведении, при котором обеспечивалась окраска в 1,0 ОЕ₄₉₂ при связывании с соответствующим антигеном в иммуоферментном анализе. Смесь инкубировали 2 ч при 37° С, затем переносили в лунки платы с предварительно сорбированным антигеном и оставляли на 2 ч при 37° С. Далее анализ проводили как было описано выше.

Антигензависимая пролиферация клеток периферийных лимфоузлов мышей. Пять мышей линии BALB/c иммунизировали в основание хвоста и подушечки лап 100 мкг пептида в полном адьюванте Фрейнда. Через 7 сут животных забивали, извлекали подколенные и паховые лимфоузлы и готовили суспензию клеток лимфатических узлов. Клетки трижды отмывали, после чего вносили в лунки 96-луночной плоскодонной платы (Nunc, Дания) по 4·10⁵ клеток в лунку в 0,1 мл среды RPMI1640, содержащей 10% сыворотки плода коровы, 0,01 М HEPES (pH 7,4), 10 МЕ/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина и 20 нМ β-меркаптоэтанол. Затем в те же лунки триплетно вносили пептиды (0,1—100 нМ в 0,1 мл среды RPMI1640). Плату инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO₂ и 90% влажности в CO₂-инкубаторе (Heгаeus, ФРГ). Через 3 сут в каждую лунку добавляли по

1 мкКи [³H]тимидина, еще через 18 ч клетки переносили на стекловолоконный фильтр с помощью прибора Harvester (Flow lab., Великобритания). Фильтр высушивали, диски с клетками помещали во флаконы, заливали по 5 мл сцинтилляционной смеси и измеряли количество импульсов в 1 мин (имп/мин) для каждой пробы на сцинтилляционном счетчике Бескман, (США). Значения Δ имп/мин получали путем вычитания усредненной величины имп/мин для лунок с клетками без пептидов из значений имп/мин для лунок с клетками и пептидами. По данным [12, 13], основная часть пролиферирующих клеток в данном опыте относится к популяции Т-лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суевой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Луговой А. А., Дрягалин Н. Н., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 5. № 9. С. 1193—1205.
2. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суевой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Дрягалин Н. Н., Иванющенков В. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1313—1317.
3. Суевой А. Ю., Вольпина О. М., Снеткова В. Е., Волкова Т. Д., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1352—1362.
4. Вольпина О. М., Суевой А. Ю., Ульяшин В. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1363—1371.
5. Суевой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Дрягалин Н. Н., Бурдов А. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1185—1192.
6. Stave J. W., Card J. L., Morgan D. O., Vakharia V. N. // Virology. 1988. V. 162. № 1. P. 21—29.
7. Parry N. R., Barnett P. V., Ouldrige E. J., Rowlands D. J., Brown F. // J. Gen. Virol. 1989. V. 70. № 6. P. 1493—1503.
8. Hopp T. P. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. № 1. P. 1—18.
9. DeLisi C., Berzofsky J. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 20. P. 7048—7052.
10. Bolwell C., Clarke B. E., Parry N. R., Ouldrige E. J., Brown F., Rowlands D. J. // J. Gen. Virol. 1989. V. 70. № 1. P. 59—68.
11. Thomas A. A. M., Woortmeijer R. J., Puijk W., Barteling S. J. // J. Virol. 1988. V. 62. № 6. P. 2782—2789.
12. Corradin G., Etlinger H. M., Chiller J. M. // J. Immunol. 1977. V. 119. № 3. P. 1048—1053.
13. Lee K. C., Singh B., Barton M. A., Procyshyn A., Wong M. // J. Immunol. Meth. 1979. № 25. P. 159—170.

Поступила в редакцию
17.VII.1990

V. M. GEL'FANOV, L. A. GRECHANINOVA, E. S. KAN, A. V. YAROV,
A. Yu. SUROVOY, O. M. VOL'PINA, A. V. CHEPURKIN, V. T. IVANOV

ANTIGENIC STRUCTURE OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS. VI. FUNCTIONAL SITES OF THE IMMUNODOMINANT REGION OF VP₁ PROTEIN OF THE FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS O₁K AND A₂₂ STRAINS

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

B- and T-epitopes have been localized within the protective fragments of VP₁ protein, viz., 136—152 of the O₁K strain and 135—159 of the A₂₂ strain of the foot-and-mouth disease virus (FMDV). Antibodies eliciting after immunization of various animals with the 135—159 A₂₂ peptide are directed to different sites of the peptide. Immunogenicity of fragments of the 135—159 A₂₂ peptide on mice correlates with their activity on T-cells of the same animals and protective activity on guinea pigs. The investigations were carried out using synthetic fragments of the 136—152-O₁K and 135—159-A₂₂ peptides.