



УДК 577.112.853.083+616-066.66

## КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ОНКОПРЕЦИПИТИНА ЦИПРЕИНА И ЕГО ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 1995 г. В. П. Глазунов\*, З. А. Таранкова\*, С. Е. Одинокоев\*, А. Ф. Павленко, И. В. Чикаловец, А. В. Курика<sup>#</sup>

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,  
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159;

\* Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН,  
690041, Владивосток, Балтийская, 43

Поступила в редакцию 28.03.95 г.

Методами спектроскопии КД, УФ и флуоресценции исследовано изменение пространственной структуры ципреина в зависимости от ионной силы раствора, концентрации ионов кальция и температуры. По спектрам КД оценено содержание элементов вторичной структуры молекулы ципреина и показано преобладание (~85%)  $\beta$ -структуры. Выявлен необратимый конформационный переход в области 55 - 60°C, приводящий к уменьшению активности ципреина в связывании с раково-эмбриональным антигеном (РЭА) и антителами против ципреина. Последняя активность обратимо восстанавливается. Показано, что ципреин является кальцийсвязывающим белком. Связывание кальция ципреином и увеличение ионной силы раствора приводит к изменению лишь третичной структуры белка. В кальцийсвязанной форме при ионной силе раствора, близкой к физиологической, ципреин обладает максимальной способностью к связыванию с РЭА и антителами против ципреина. Методом разностной УФ-спектроскопии показано отсутствие специфического взаимодействия ципреина с моносахаридами углеводных цепей РЭА: фукозой, маннозой, галактозой и N-ацетилглюкозамин.

*Ключевые слова:* онкопреципитин; ципреин, раково-эмбриональный антиген; конформация молекулы, РЭА-связывающая активность, антигенная активность; спектроскопия КД, УФ; флуоресценция.

В предыдущих работах сообщалось об обнаружении в экстрактах морских беспозвоночных [1], выделении и характеристике белков – рецепторов, названных онкопреципитинами по их способности специфично реагировать по типу антител в реакции преципитации с раково-эмбриональным антигеном (РЭА) человека [2 - 4].

Настоящее исследование посвящено одному из онкопреципитинов – ципреину, выделенному из моллюска – каури *Suprea caputserpentis* [5, 6]. Ципреин является гликопротеином с общим содержанием углеводов около 18%. Среди моносахаридов в углеводной части обнаружены Fuc, Man, Gal, Glc и GlcN. Возможно, наличие углеводных цепей в ципреине определяет наблюдаемую микрогетерогенность [7], присущую многим гликопротеинам. По данным SDS-электрофореза, основной компонент ципреина имеет молекулярную массу  $46.1 \pm 1.5$  кДа, молярный коэффициент поглощения  $48400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и состоит из одной полипептидной цепи. Способность ципреина связывать РЭА зависит от ряда внешних факторов. На-

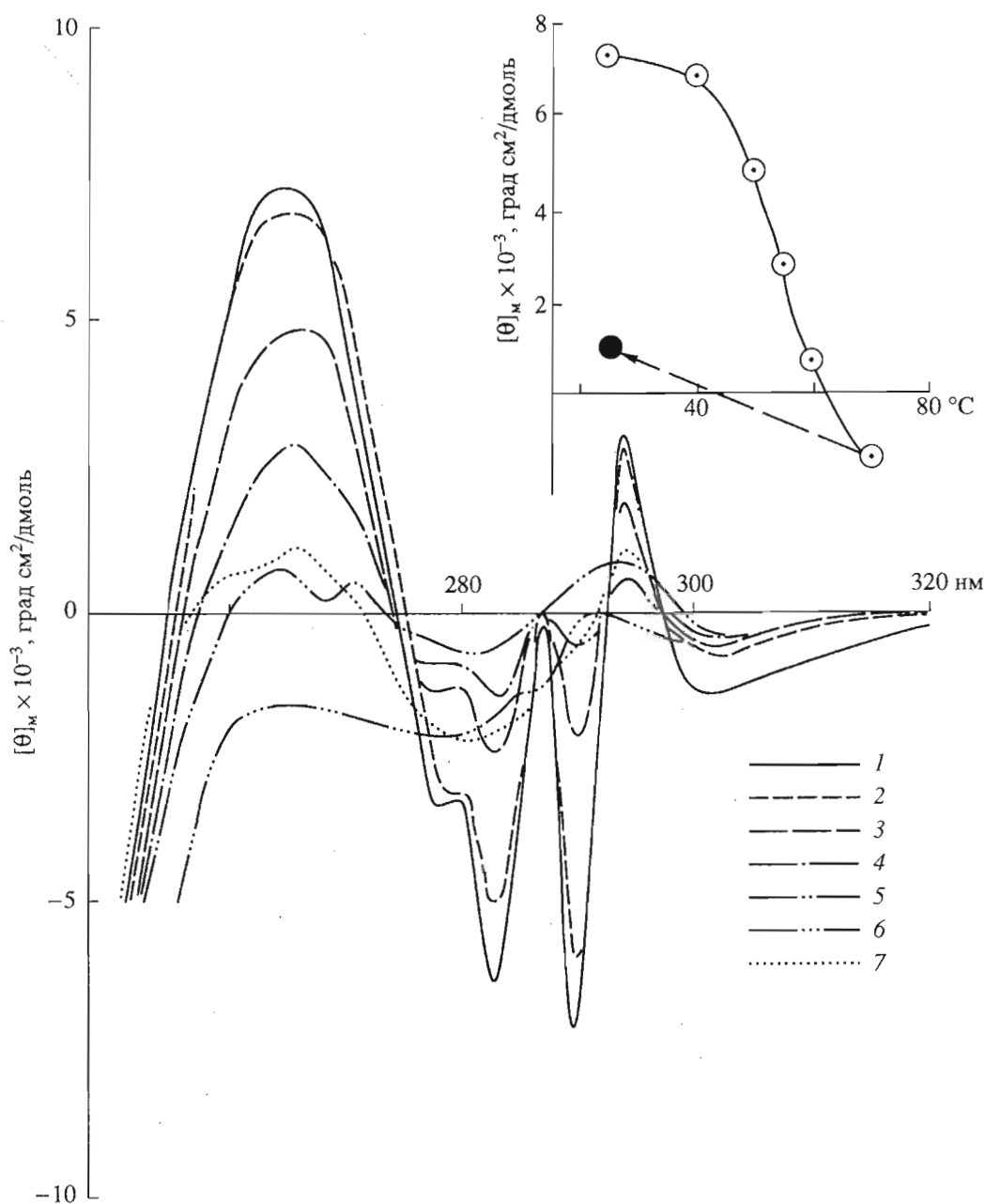
стоящая работа посвящена исследованию методами КД-, УФ-спектроскопии и флуоресценции влияния ионной силы раствора, концентрации ионов кальция и температуры на конформацию ципреина и его иммунологическую активность: способность взаимодействовать с РЭА и антителами против ципреина.

### КД-, УФ-спектроскопия и флуоресценция ципреина

Определение по методу [8] количества остатков ароматических аминокислот из вторых производных УФ-спектров ципреина показало, что в молекуле содержится 5 остатков триптофана, 10 – тирозина и 7 – фенилаланина. Спектр собственной флуоресценции остатков триптофана раствора ципреина в 0.01 М трис-НСl-буфере (рН 7.6) имеет максимум при 335 нм. Тушение акриламидом собственной флуоресценции остатков триптофана в молекуле ципреина характеризуется константой Штерна-Фольмера ( $K$ ) [9], равной  $5.3 \text{ M}^{-1}$ .

В ароматической области (240 - 350 нм) спектра КД ципреина наблюдаются интенсивные

<sup>#</sup> Автор для переписки.

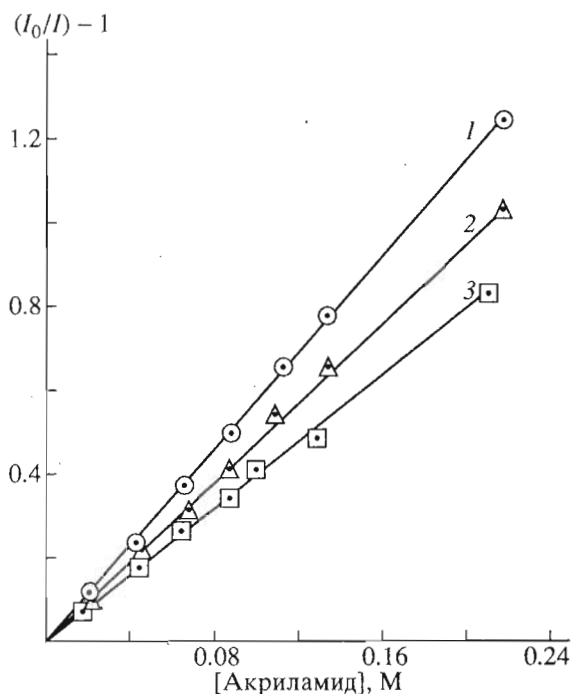


**Рис. 1.** Спектры КД ароматической области раствора ципрейна ( $4 \times 10^{-5}$  M) в 0.01 M трис-HCl-буфере (pH 7.6), содержащем 0.15 M NaCl и 3 mM CaCl<sub>2</sub>, при 20 (1), 40 (2), 50 (3), 55 (4), 60 (5), 70 (6) и 20°C после прогрева до 70°C (7). На врезке: зависимость молярной эллиптичности полосы при 275 нм от температуры раствора ципрейна.

полосы 262 и 294 нм положительного знака, а также 282 и 290 нм – отрицательного, обусловленные остатками ароматических аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина (рис. 1). Высокая молярная эллиптичность этих полос, коротковолновый максимум флуоресценции остатков триптофана и величина константы тушения Штерна–Фольмера (рис. 2) указывают на то, что остатки триптофана расположены во внутренней части молекулы, жестко фиксированы и имеют слабополярное окружение [9 - 12].

В пептидной области спектра КД (190 - 240 нм) наблюдается широкая отрицательная полоса с максимумом 200 нм и плечом около 215 нм (рис. 3). Расчет из спектра КД процентного содержания элементов вторичной структуры раствора ципрейна в 0.01 M трис-HCl-буфере (pH 7.6) методом Провинчера [13] свидетельствует о преобладании β-структуры (см. таблицу).

**Влияние ионной силы раствора.** По данным КД-спектроскопии и флуоресценции изменение

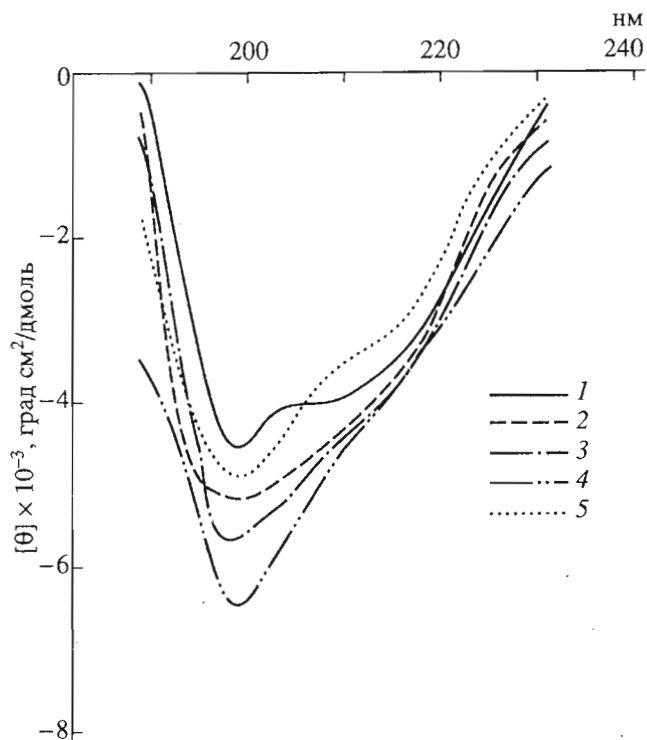


**Рис. 2.** Тушение акриламидом в координатах Штерна-Фольмера собственной триптофановой флуоресценции ципреина ( $2 \times 10^{-7}$  М) в 0.01 М трис-НСl-буфере (рН 7.6), содержащем 0.15 М NaCl (1) ( $K 5.3 \text{ М}^{-1}$ ), в этом же буфере с добавкой 3 мМ CaCl<sub>2</sub> при 20°C после прогрева до 70°C (2) ( $K 4.8 \text{ М}^{-1}$ ) и этого же раствора при 20°C без прогрева (3) ( $K 3.9 \text{ М}^{-1}$ ).

ионной силы раствора не оказывало заметного влияния на конформацию молекулы ципреина. Ни в пептидной, ни в ароматической области спектра КД не наблюдалось изменения эллиптичности какой-либо из полос при увеличении концентрации NaCl или NaF до 0.25 М (данные не показаны). В спектрах собственной флуоресценции ципреина при различной ионной силе раствора также не были зафиксированы заметные изменения в сдвиге максимума полосы при 335 нм и константы тушения Штерна-Фольмера.

По данным иммуноферментного анализа (ИФА), активность ципреина (результаты не приведены) не зависела от характера аниона (Cl<sup>-</sup> или F<sup>-</sup>). Как видно из рис. 4, антигенная активность ципреина существенно не изменяется при увеличении концентрации соли. В то же время его рецепторная активность возрастает при увеличении ионной силы и достигает максимума при концентрации соли 0.15 - 0.2 М.

**Влияние ионов кальция.** Титрование раствора ципреина в 0.01 М трис-НСl-буфере (рН 7.6), содержащем 0.15 М NaCl, хлористым кальцием до концентрации 3 мМ не изменяет спектры КД ни в ароматической, ни в пептидной области. В спектре же флуоресценции ципреина в этих условиях наблюдается сдвиг максимума полосы собствен-



**Рис. 3.** Спектры КД пептидной области раствора ципреина в 0.01 М трис-НСl-буфере (рН 7.6), содержащем 0.15 М NaF, при 20 (1), 40 (2), 50 (3), 70 (4) и 20°C после прогрева до 70°C (5).

ной флуоресценции остатков триптофана в коротковолновую область (327 нм). Графики тушения собственной флуоресценции остатков триптофана в координатах Штерна-Фольмера нейтральным тушителем акриламидом линейны (рис. 2). Титрование раствора ципреина хлористым кальцием до концентрации 3 мМ уменьшает константу Штерна-Фольмера на 26% (от 5.3 до 3.9 М<sup>-1</sup>).

Содержание разных типов вторичной структуры ципреина (%) в 0.01 М трис-НСl-буфере (рН 7.6) по данным спектров КД

Добавки к буферу	°С	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Неупорядоченная
-	20	2	60	25	13
3 мМ CaCl <sub>2</sub>	20	0	59	27	14
0.15 М NaF	20	0	61	29	10
»	40	8	43	33	16
»	50	2	56	29	14
»	70	1	53	24	22
»	20(70)*	0	59	31	10

\* Проба ципреина после прогрева при 70°C и выдержанная 24 ч при 20°C.

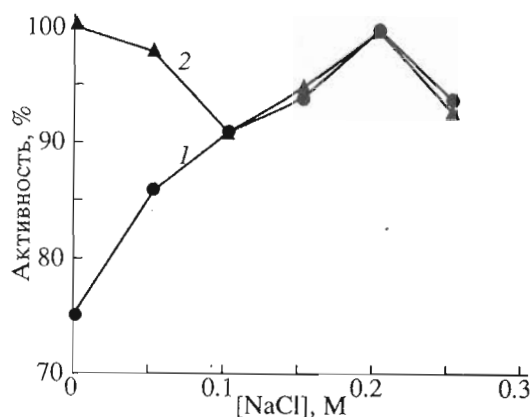


Рис. 4. Зависимость рецепторной (1) и антигенной (2) активности раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-8}$  M) в 0.01 M трис-HCl-буфере (pH 7.6) от ионной силы раствора.

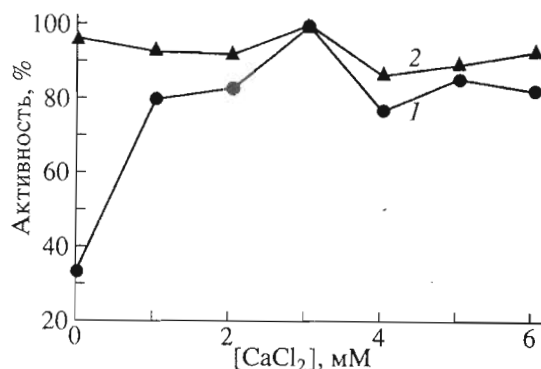


Рис. 5. Зависимость рецепторной (1) и антигенной (2) активности раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-8}$  M) в 0.01 M трис-HCl-буфере (pH 7.6), содержащем 0.15 M NaCl, от концентрации хлорида кальция.

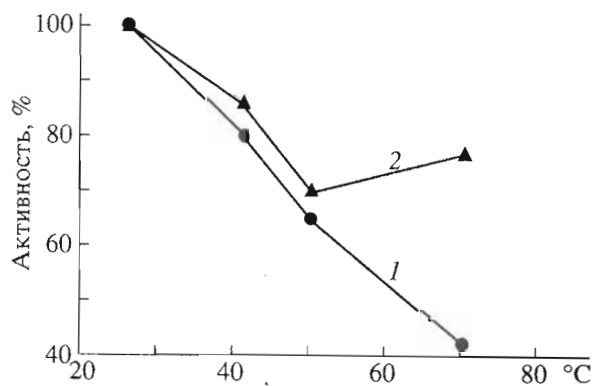


Рис. 6. Зависимость рецепторной (1) и антигенной (2) активности раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-6}$  M) в 0.01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -буфере (pH 7.4) от температуры.

Таким образом, из данных КД-спектроскопии следует, что связывание ионов кальция ципреином не вызывает изменений в третичной и вторичной структуре его белковой части. С другой стороны, анализ спектров собственной флуоресценции остатков триптофана показывает, что

связывание ионов кальция ципреином все-таки приводит к изменениям в структуре молекулы, в результате чего уменьшается доступность остатков триптофана (константа Штерна-Фольмера уменьшается на 26%). Такое несоответствие между данными КД-спектроскопии и флуоресценции, возможно, объясняется тем, что ионы кальция связываются не только белковой частью молекулы, но и углеводными цепями ципреина. Последнее может приводить к изменению ориентации углеводных цепей относительно белковой части молекулы и уменьшать доступность молекул тушителя к хромофорам, что невозможно наблюдать в спектрах КД.

По данным ИФА (рис. 5), при таких условиях (0.01 M трис-HCl-буфер (pH 7.6), содержащий 0.15 M NaCl и 3 mM  $\text{CaCl}_2$ ) проявляется максимальная рецепторная активность ципреина. На его антигенную активность присутствие ионов кальция в среде практически не оказывает влияния.

**Влияние температуры раствора.** При повышении температуры раствора ципреина в присутствии ионов кальция в ароматической области спектра КД наблюдается уменьшение эллиптичности всех полос (рис. 1), что указывает на нарушение исходной третичной структуры молекулы. Прогрев раствора при  $70^\circ\text{C}$  вызывает полное исчезновение исходных полос в спектре КД (рис. 1). Последующее охлаждение раствора до  $20^\circ\text{C}$  независимо от длительности инкубирования (от 15 мин до 24 ч) при этой температуре приводит лишь к частичному восстановлению эллиптичности полос (от 5 до 30% от исходной) в ароматической области спектра КД (за исключением отрицательной полосы при 290 нм, которая не восстанавливается), что свидетельствует о необратимом конформационном переходе при тепловой денатурации.

Константа тушения собственной флуоресценции остатков триптофана для денатурированного ципреина ( $20^\circ\text{C}$  после прогрева при  $70^\circ\text{C}$ ) увеличивается с 3.9 до  $4.8 \text{ M}^{-1}$  (рис. 2), что подтверждает данные спектров КД ароматической области о нарушении третичной структуры и увеличении числа остатков триптофана, доступных тушителю.

Изменения спектров КД пептидной области от температуры показывают увеличение эллиптичности отрицательной полосы 200 нм и изменение ее формы (рис. 3). Охлаждение раствора ципреина после прогрева при  $70^\circ\text{C}$  приводит к восстановлению (до 90%) исходного спектра КД пептидной области. Эллиптичность полосы  $\sim 215$  нм уменьшается на 10%, а полосы 200 нм увеличивается на 10%, что свидетельствует о небольших изменениях вторичной структуры молекулы. Расчеты вторичной структуры при различных температурах растворов были проведены для ципреина в 0.01 M трис-HCl-буфере (pH 7.6), содержащем 0.15 M NaF. Из таблицы видно, что повышение

температуры раствора ципреина до 70°C уменьшает содержание β-структуры и увеличивает содержание неупорядоченной формы.

Как рецепторная, так и антигенная активность ципреина уменьшаются при увеличении температуры (рис. 6). Изучение проб ципреина, прогретых при 70°C и выдержанных 24 ч при 26°C, показало полное восстановление антигенной активности ципреина и уменьшение рецепторной активности до 27% от исходной. Сравнение изменений в спектрах КД в зависимости от температуры с данными по рецепторной и антигенной активности ципреина свидетельствует о том, что уменьшение активности онкопреципитина в большей степени связано с необратимыми нарушениями в третичной структуре белковой части молекулы.

**Взаимодействие ципреина с моносахаридами.** Константа ассоциации  $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  комплекса ципреина с РЭА [5] близка к значениям, характерным для высокоаффинных антител, и выше, чем для лектинов. Методом конкурентного иммуноферментного анализа было показано [5, 6], что реакцию связывания ципреина с РЭА ингибируют только фукоза и хитобиоза. Однако 50%-ное ингибирование достигалось при относительно высоких концентрациях сахара ( $\sim 10^{-1} \text{ M}$ ), что не характерно для лектинов.

В связи с этим представляло интерес выяснить другим, независимым методом характер взаимодействия ципреина с рядом моносахаридов, входящих в состав углеводной части РЭА: *L*-Fuc, *D*-Gal, *D*-Man, *D*-GlcNAc. При исследовании специфических взаимодействий лектинов с сахарами широко применялась разностная УФ-спектроскопия [14, 15]. Ранее этим методом вместе с разностной спектроскопией КД и флуоресценцией не было обнаружено специфическое взаимодействие с рядом моносахаридов для другого онкопреципитина – крустацина [16]. В разностных УФ-спектрах лектинов при их специфическом взаимодействии с сахарами проявляются характерные полосы при 291 - 293, 284 - 285, 288 и 280 нм, обусловленные изменением окружения остатков триптофана и тирозина [14, 15]. Показано, что величины молярного поглощения этих полос растут с увеличением концентрации моносахарида и быстро достигают насыщения, составляя около  $1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . В нашем случае, по данным разностной УФ-спектроскопии, ни один из изученных нами моносахаридов не показал специфического взаимодействия с ципреином. Отрицательный результат по связыванию ципреина с моносахаридами свидетельствует о сложном строении его эпитопа на РЭА.

Ципреин относится к β-структурированным кальцийсвязывающим белкам первой или второй группы [17] с достаточно стабильной пространственной структурой, зависящей от температуры и в меньшей степени от ионной силы раствора и

концентрации ионов кальция. Ципреин в кальцийсвязанной форме обладает наиболее стабильной конформацией. В этом состоянии проявляется его максимальная иммунологическая активность, и рецепторная, и антигенная.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Содержание ароматических аминокислотных остатков в ципреине определяли по методу [8] из второй производной УФ-спектров растворов ципреина в 6 М гуанидингидрохлориде, записанных на спектрофотометре Cary 219 (США) в стандартных кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см и шириной щели 1 нм.

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-500A с процессором DP-501N (Jasco, Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см для ароматической области, 1 и 0.1 мм – для пептидной. Прибор калибровали по 0.06% водному раствору *d*-камфоры-10-сульфоната аммония (Katayama Chemical, Япония); отношение эллиптичности полос при 192 и 290 нм составляло  $2.08 \pm 0.03$ . Концентрации раствора ципреина при изучении ароматической и пептидной областей составляли  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$  и 0.15, 1.5 мг/мл соответственно. Перед записью спектров КД кюветы с раствором ципреина термостатировали 15 мин при заданной температуре (20, 40, 50, 55, 60 и  $70 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ). После прогрева до 70°C раствор ципреина охлаждали до 20°C, инкубировали 15 мин и 24 ч при этой температуре и регистрировали спектры КД. При расчетах эллиптичности учитывали изменение объема растворов белка в зависимости от температуры в кювете. В пептидной области эллиптичность полос (в град  $\text{cm}^2/\text{дмоль}$ ) рассчитывали на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110 Да:

$$[\Theta] = \Theta S \times 110 / (c l \times 10),$$

где *S* – чувствительность прибора, *c* – весовая концентрация ципреина в мг/мл, *l* – толщина кюветы. В ароматической области эллиптичность полос считали как молярную, принимая молекулярную массу ципреина равной 46.1 кДа:

$$[\Theta]_m = \Theta S / (c_m l \times 10),$$

где *c<sub>m</sub>* – молярная концентрация ципреина.

Для выяснения влияния ионной силы раствора на спектры КД к 1 мл раствора ципреина в 0.01 М трис-НСI-буфере (рН 7.6) добавляли аликвоты (10 мкл) 5 М раствора NaCl или NaF в этом же буфере для ароматической области и только NaF – для пептидной. Спектр записывали по истечении 20 мин при 20°C после добавления аликвоты раствора NaCl или NaF к раствору ципреина.

Для установления влияния ионов кальция на спектры КД к 1 мл раствора ципреина в 0.01 М трис-НСI-буфере (рН 7.6) добавляли аликвоты

(10 мкл) 0.1 М раствора  $\text{CaCl}_2$  в этом же буфере. Спектр регистрировали через 20 мин при 20°C после внесения аликвоты  $\text{CaCl}_2$  в раствор ципреина.

Расчеты процентного содержания элементов вторичной структуры ципреина из спектров КД проводили по методу Провинчера [13]. Средне-квадратичное отклонение в расчетах составляло  $\pm 1\%$  для  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры, для остальных структур –  $\pm 2\%$ .

Корректированные по родамину В (Wako Pure Chemical Industries, Япония) спектры флуоресценции растворов ципреина ( $2 \times 10^{-7}$  М) регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Hitachi, Япония) в стандартных, 1-см кварцевых кюветах (ширина щелей возбуждения и эмиссии 6 нм, линия возбуждения 296 нм). Для тушения собственной флуоресценции остатков триптофана добавляли аликвоты (20 мкл) 2 М раствора акриламида (Reanal, Венгрия), дважды перекристаллизованного из  $\text{CHCl}_3$ , к 1 мл раствора ципреина в 0.01 М трис- $\text{HCl}$ -буфере (рН 7.6). Константу тушения флуоресценции считали по формуле Штерна–Фольмера [9]:

$$K = [(I_0/I) - 1]/c_m,$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность флуоресценции без тушителя и с ним;  $c_m$  – молярная концентрация тушителя.

**Взаимодействие с моносахаридами.** Разностные УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss, Германия). Для получения таких УФ-спектров ципреина с моносахаридами базовую линию записывали в шкале поглощения равной 0.02 для одной кюветы с раствором ципреина ( $1.65 \times 10^{-5}$  М) в память ЭВМ спектрофотометра в режиме AUTO ZERO. После этого в кювету вносили аликвоты (20 мкл) такого же раствора ципреина, содержащего 4 мг моносахарида, и регистрировали разностный спектр. Конечное соотношение моносахарид – ципреин составляло 500 : 1. При титровании ципреина использовали перекристаллизованные моносахарида: *L*-фукозу, *D*-галактозу, *D*-маннозу, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин.

**Иммуноферментный анализ с ципреином.** РЭА, ципреин, антитела к ним и конъюгаты с пероксидазой (НПО “Биолар”, г. Олайне) получали как описано ранее [4, 6]. Буферные растворы: А (для нанесения антител на планшет) – 0.1 М раствор  $\text{NaHCO}_3$  (рН 9.5), содержащий 0.15 М  $\text{NaCl}$ ; Б (основной) – 0.01 М раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 7.5), содержащий 0.15 М  $\text{NaCl}$ ; В (для нанесения конъюгата и отмывки) – 0.05% раствор твин-20 в буфере Б; Г (для тепловой обработки ципреина) – 0.01 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7.4); Д (для титрования ципреина солями  $\text{NaCl}$  или  $\text{NaF}$ ) – 0.01 М раствор трис- $\text{HCl}$  (рН 7.6); Е (для титрования ципреина хлоридом кальция) – буфер Д, содержащий 0.15 М  $\text{NaCl}$ . Субстрат – 0.04% раствор *o*-фенилендиами-

на в 0.1 М фосфат-цитратном буфере (рН 5.0), содержащий 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Определение рецепторной активности ципреина (по связыванию с РЭА) в зависимости от температуры, ионной силы раствора и концентрации хлорида кальция.** В лунки планшетов (Dynatech, Швейцария) вносили по 0.1 мл раствора IgG (20 мкг/мл) против РЭА в буфере А и инкубировали 16 ч при 4°C. Избыток иммуноглобулинов отмывали 3 раза буфером Б. Добавляли во все лунки по 0.1 мл раствора РЭА (200 нг/мл) в буфере Б и инкубировали 1 ч при 37°C, избыток антигена отмывали 3 раза как описано выше. Подготовленные таким образом планшеты использовали во всех последующих экспериментах по определению рецепторной активности.

Пробы (0.2 мл) раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-6}$  М) в буфере Г вносили в реакционные сосуды (Pierce, Нидерланды), плотно закрывали и прогревали 15 мин в термостате при 26, 41, 50 и  $70 \pm 0.15^\circ\text{C}$ . После охлаждения (15 мин, 26°C) в трех вертикальных рядах планшета этим же буфером титровали аликвоты (0.1 мл) каждой пробы ципреина (от 250 до 0 нг/мл) после тепловой обработки и на отдельном планшете – пробы, прогретые при 70°C и выдержанные 24 ч при 26°C. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C и промывали как описано выше. Затем во все лунки планшетов вносили по 0.1 мл конъюгата IgG к ципреину с пероксидазой в разведении 1 : 400 и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывки планшетов добавляли во все лунки по 0.1 мл субстрата, инкубировали 5 – 10 мин при 20°C и останавливали реакцию, добавляя 50 мкл 5% раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптическое поглощение измеряли на сканирующем спектрофотометре (Multiskan, Финляндия) при 492 нм.

Аликвоты (1 мл) раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-8}$  М) в буфере Д, содержащем определенное количество хлорида кальция (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 мМ), инкубировали в закрытых флаконах как описано выше. Затем в трех вертикальных рядах планшета титровали аликвоты (0.1 мл) каждой пробы ципреина от 250 до 0 нг/мл соответствующим буфером. Далее планшет обрабатывали как описано выше.

Аликвоты (1 мл) раствора ципреина ( $1.08 \times 10^{-8}$  М) в буфере Е, содержащем точное количество хлорида кальция (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 мМ), инкубировали в закрытых флаконах как описано выше. Затем в трех вертикальных рядах планшета титровали аликвоты (0.1 мл) каждой пробы ципреина от 250 до 0 нг/мл буфером, содержащим соответствующее пробе количество хлорида кальция. Далее планшет обрабатывали как описано выше.

Рецепторную активность ципреина в пробах определяли по формуле

$$\text{рецепторная активность} = A/A_0 \times 100,$$



где  $A$  – оптическое поглощение в обработанных пробах ципреина,  $A_0$  – максимальное оптическое поглощение для каждого эксперимента.

**Определение антигенной активности ципреина (по связыванию с антителами против него) в зависимости от температуры, ионной силы раствора и концентрации хлорида кальция.** В лунки планшетов (Dunatech, Швейцария) вносили по 0.1 мл раствора IgG (20 мкг/мл) против ципреина в буфере А и инкубировали 16 ч при 4°C. Избыток иммуноглобулинов отмывали 3 раза буфером В. Подготовленные таким образом планшеты использовали во всех последующих экспериментах по определению антигенной активности ципреина после соответствующих обработок. Далее в планшетах титровали такие же аликвоты проб ципреина и обрабатывали планшеты как описано выше. Антигенную активность проб ципреина определяли по формуле, аналогичной для определения рецепторной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Ю.С., Павленко А.Ф., Курика А.В., Чикаловец И.В., Коржиков И.А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. С. 1009 - 1010.
2. Gold P., Freedman S.O. // J. Exp. Med. 1965. V. 121. P. 439 - 462.
3. Rogers G.T. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 695. P. 227 - 249.

4. Pavlenko A.F., Chikalovets I.V., Kurika A.V., Glazunov V.P., Mikhalyuk L.V., Ovodov Yu.S. // Tumor Biol. 1990. V. 11. P. 306 - 318.
5. Павленко А.Ф., Курика А.В., Чикаловец И.В., Белогорцева Н.И., Оводов Ю.С. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. С. 58 - 64.
6. Pavlenko A.F., Kurika A.V., Chikalovets I.V., Ovodov Yu.S. // Tumor Biol. 1990. V. 11. P. 137 - 144.
7. Kurika A.V., Korzhikov I.A., Bardyuk V.V., Pavlenko A.F., Ovodov Yu.S. // Abst. XXII Meet. Int. Soc. for OncoDev. Biol. Med. Groningen (Netherlands). 1994. P. 295.
8. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. P. 438 - 444.
9. Eftink M.R., Ghiron C.A. // Analyt. Biochem. 1981. V. 114. P. 199 - 227.
10. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1986.
11. Horwitz J., Stricland T.H., Billups C. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. P. 2119 - 2124.
12. Бурштейн Э.А. // Собственная люминесценция белка. Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 7. М.: ВИНТИ, 1977.
13. Provencher C.W., Glocker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33 - 37.
14. Yamasaki N., Hatakeyama T., Funatsu G. // J. Biochem. 1985. V. 98. P. 1555 - 1560.
15. Yamasaki N., Absar N., Funatsu G. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 828. P. 155 - 161.
16. Глазунов В.П., Таранкова З.А., Одинокоев С.Е., Курика А.В., Павленко А.Ф. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 45 - 52.
17. Пермяков Е.А. Кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1993.

Conformation and Immune Activity of Oncoprecipitin Cypreïn

V. P. Glazunov\*\*, Z. A. Tarankova\*\*, S. E. Odínokov\*\*, A. F. Pavlenko\*, I. V. Chikalovets\*, and A. V. Kurika\*<sup>1</sup>

\*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Far East Division, pr. Stoletiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

\*\*Pacific Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Far East Division, ul. Baltiiskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia

**Abstract** – The effect of solution ionic strength, calcium ion concentration, and temperature on spatial structure of cypreïn was examined by CD, UV, and fluorescence spectroscopy. The secondary structure of the cypreïn molecule was calculated from CD spectra, and the prevalence of the  $\beta$ -structure (85%) was shown. An irreversible conformational transition in the range 55 - 60°C was found, which reduces the binding activity of cypreïn in interaction with carcinoembryonic antigen (CEA) and anti-cypreïn antibodies. In the latter case, the binding activity was reversibly restored. Cypreïn was shown to be a calcium-binding protein. Binding of calcium by cypreïn and increasing the ionic strength of solution affect only tertiary structure of the protein. At an ionic strength of solution close to physiological conditions, calcium-bound cypreïn shows maximum binding to CEA and anti-cypreïn antibodies. It was shown by difference UV spectroscopy that cypreïn does not interact specifically with the monosaccharides of the carbohydrate chains of CEA: fucose, mannose, galactose, and N-acetylglucosamine.

*Key words:* oncoprecipitin, cypreïn, carcinoembryonic antigen, conformation, CEA-binding activity, antigenic activity, CD, UV spectroscopy, fluorescence.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.