



УДК 577.112.6.083.3:615.371

## АНТИТЕЛА ПРОТИВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ПРИОННОГО БЕЛКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2001 г. О. М. Вольпина<sup>##</sup>, М. Н. Жмак<sup>\*</sup>, М. Б. Обнозая<sup>\*</sup>, М. А. Титова<sup>\*</sup>, Д. О. Короев<sup>\*</sup>, Т. Д. Волкова<sup>\*</sup>, А. А. Егоров<sup>\*\*</sup>, С. С. Рыбаков<sup>\*\*</sup>, В. Т. Иванов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>\*\*</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных Министрства сельского хозяйства РФ, г. Владимир

Поступила в редакцию 27.12.2000 г. Принята к печати 13.03.2001 г.

С целью получения антител для диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота синтезировано семь пептидов, соответствующих фрагментам прионного белка, содержащих от 17 до 31 а. о. Проведена иммунизация кроликов свободными пептидами или белковыми конъюгатами пептидов и получены сыворотки с высоким уровнем противопептидных антител. Методом иммуногистохимического анализа выявлены сыворотки к четырем свободным пептидам и к одному белковому конъюгату пептида, эффективно связывающиеся с патогенной изоформой прионного белка в препаратах мозга крупного рогатого скота, большого губкообразной энцефалопатией, и не взаимодействующие с препаратами нормального мозга. Полученные противопептидные сыворотки пригодны для разработки диагностикума на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота.

*Ключевые слова:* прион; синтетические пептиды; губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота; антитела; иммуногистохимический метод.

### ВВЕДЕНИЕ

ГЭ является инфекционным нейродегенеративным заболеванием и относится к группе прионных болезней, которые в настоящее время неизлечимы. Инфекционным агентом прионных болезней служит патогенная изоформа прионного белка PrP<sup>BSE</sup>. Заражение животных происходит через корм, содержащий мясо-костную муку, приготовленную из тканей овец, больных скрепи, или крупного рогатого скота, больного ГЭ. Механизм патогенеза ГЭ заключается в конформационных превращениях нормального белка PrP при его контакте с патогенной изоформой прионного белка овец или крупного рогатого скота в PrP<sup>BSE</sup> с последующим накоплением PrP<sup>BSE</sup> в нервной ткани [1]. ГЭ является одной из самых серьезных

сельскохозяйственных проблем ряда западноевропейских стран. Кроме того, PrP<sup>BSE</sup>, попав в организм человека с продуктами питания либо лекарственными препаратами, полученными из мозга больных ГЭ животных, могут вызвать тяжелое прионное заболевание человека – новый вариант болезни Крейтцфельда–Якоба [2].

Для диагностики ГЭ обычно используют гистологические исследования препаратов среза мозга животных, но более чувствительным является иммуногистохимический метод, когда PrP<sup>BSE</sup> в срезах мозга выявляют с помощью специфических антител [3]. Один из перспективных подходов к получению антител против PrP<sup>BSE</sup> – иммунизация лабораторных животных синтетическими фрагментами PrP. В настоящее время имеются многочисленные публикации о стимуляции PrP-специфичных антител с помощью синтетических пептидов, однако данные о локализации участков белка, способных индуцировать образование высокого уровня специфических антител, пригодных для создания диагностикума, остаются противоречивыми [4–6].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель настоящей работы – синтез фрагментов PrP крупного рогатого скота и получение проти-

Сокращения: ГЭ – губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота; НАФ – неполный адъювант Фрейнда; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; DMAP – 4-диметиламинопиридин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; KLN – гемоцианин улитки; PBS – 0.15 М раствор NaCl в 0.01 М растворе NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7.4); Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBST – раствор PBS, содержащий 0.05% Твин-20; PrP – мембранный прионный белок; PrP<sup>BSE</sup> – патогенная изоформа PrP; ТВТУ – тетрафторборат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-N,N,N,N'-тетраметилмочевины.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; эл. почта: volpina@ibch.ru).

1	20	40
MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKGGGWNTGGSRYPGQGSPGGN		
51	70	90
RYPPOGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGG		
101	120	140
WGQGGTHGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGLGGYMLGSAMSRPLI		
151	170	190
HFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDOYSNQNNFVHDCVNITVKENTV		
201	220	240
TTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPP		
251		
VILLISFLIFLIVG		

Рис. 1. Аминокислотная последовательность PrP крупного рогатого скота [7]. Подчеркнуты участки, выбранные для синтеза.

вопептидных антител, пригодных для выявления PrP<sup>BSE</sup> иммуногистохимическим методом.

Поскольку аминокислотные последовательности PrP и PrP<sup>BSE</sup> идентичны, а нормальный и патогенный белки различаются лишь конформацией и связанной с ней устойчивостью к протеолизу [1], для синтеза выбирали участки, экспонированность которых и устойчивость к протеолизу может меняться в ходе конформационных превращений белка (рис. 1, 2) [7]. Пептид PrP-(17–36)-(62–69) (I) включает последовательности двух участков белковой цепи: N-концевого фрагмента 17–36, содержащего сайт посттрансляционного расщепления PrP, которое происходит по остатку Cys24, и повторяющегося в цепи белка 5 раз участка QPHGGGWG. Включающая повторы часть молекулы PrP (62–102) мало исследована и неизменна при конформационных перестройках белка, но, возможно, опосредованно влияет на превращение PrP в его патогенную изоформу [8, 9]. Пептид PrP-(25–36)-(62–69) (II) представляет собой укороченный вариант пептида (I) и начинается с остатка Lys25, становящимся N-концевым в белке после посттрансляционного расщепления. Пептид PrP-(106–134) (III) включает в себя функционально значимый участок приона 120–133, легко образующий β-складчатые структуры и, возможно, участвующий в превращении PrP в PrP<sup>BSE</sup> [1, 10]. Пептиды PrP-(172–202) (IV) и PrP-(214–240) (VI) содержат соответственно второй (последовательности 184–195) и большую часть третьего (последовательности 211–247) α-спиральных участков белка [11], а также два из трех участков (последовательности 153–159, 173–181 и 225–237), входящих в состав конформационного В-эпитопа, ответственного за связывание с моноклональными антителами, селективно различающими только изоформу PrP<sup>BSE</sup> [12]. Пептиды (V) и (VII) – укороченные аналоги пептидов (IV) и (VI) (см. рис. 2).

Пептиды получены твердофазным методом в ручном варианте на *n*-алкоксибензильном полимере [13]. Защитные группы боковых функциональных групп аминокислотных остатков выбраны с расчетом на конечное деблокирование TFA. Для защиты боковых функций Thr, Tyr, Ser, Cys использовали *Bu*'-группу, для Asp, Glu – *OBu*'-группу, для Lys – *Woc*-, для His – *Trt*-, для Arg – *Pfb*-группы. В качестве временной *N*<sup>α</sup>-защиты служила *Fmoc*-группировка.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли TBTU-метод, используя пятикратный избыток аминокислоты. Отщепление синтезированных пептидов от полимера с одновременным деблокированием осуществляли сме-

17	36 62	69	
MWSDVGLCKKRPKGGGWNT-QPHGGGWG			(I)
25	36 62	69	
KKRPKPGGGWNT-QPHGGGWG			(II)
106		134	
THGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVG			(III)
172		202	
VYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKENTVTT			(IV)
186	202		
FVHDCVNITVKENTVTT			(V)
214		240	
IKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG			(VI)
224	240		
MCITQYQRESQAYYQRG			(VII)

Рис. 2. Синтетические пептиды (I)–(VII). Показаны номера остатков соответствующих фрагментов полипептидной цепи PrP.



**Таблица 1.** Титры противопептидных антител кроликов после иммунизации синтетическими пептидами (I)–(VII)

Иммуноген	Номер животного	Титр противопептидных антител (–lg)		
		1 иммунизация	2 иммунизации	3 иммунизации
(17–36)–(62–69) (I)	1	3.4	4.1	4.5
	2	3.8	4.5	4.8
(25–36)–(62–69) (II)	3	1.6	3.5	3.8
	4	3.1	4.2	4.5
106–134 (III)	5	3.5	4.5	4.8
	6	3.4	4.1	4.8
172–202 (IV)	7	4.1	5.1	5.8
186–202 (V)	8	3.5	3.5	3.8
	9	3.8	4.1	4.1
214–240 (VI)	10	1.6	4.1	4.5
	11	4.1	4.8	5.1
224–240 (VII)	12	3.4	5.1	5.8
	13	2.8	4.8	5.1

стью TFA с добавками, предотвращающими протекание побочных реакций. После деблокирования пептиды обессоливали гель-фильтрацией и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В ходе очистки метионинсодержащих пептидов (I), (III), (VI) и (VII) были выделены побочные продукты, содержащие по данным масс-спектрометрии один окисленный остаток метионина. В случае пептидов (I), (VI) и (VII) выход побочного продукта составил 20–30%, а для пептида (III) количество окисленного продукта достигло 50%. Выход целевого продукта (III) повышали восстановлением окисленного побочного пептида дитиотреитом [14].

Выход конечных продуктов после очистки составлял от 11 до 41% в расчете на С-концевую аминокислоту. Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для получения противопептидных сывороток кроликов трехкратно иммунизировали свободными пептидами (I)–(VII). Первую иммунизацию проводили в ПАФ в дозе 500 мкг на животное, второе введение пептидов проводили через 33 сут в НАФ в той же дозе, а затем через 75 сут после первой иммунизации животным вводили по 50 мкг пептида в НАФ. У кроликов отбирали кровь после первой, второй и третьей иммунизаций, а затем тестировали на наличие противопептидных антител. Результаты исследований (см. табл. 1) показали, что все синтезированные пептиды были способны в свободном виде, без конъюгации с белком-носителем, индуцировать у кроликов образование антител. Высокий уровень антител наблюдался уже после второй иммунизации и дости-

гал титров 3.8–5.8 после третьей иммунизации. Необходимо отметить, что РrР является эндогенным белком с небольшими межвидовыми различиями. Так, различия между аминокислотной последовательностью выбранных для синтеза фрагментов белка крупного рогатого скота и аналогичными последовательностями прионного белка кроликов составляют для пептида (I) одну замену: Met17Thr; для пептида (III) три замены: Gly108Asn, Asn111Gly и Asn119Ser; для пептида (IV) две замены: Asn185Ser и Glu197Gln; для пептида (VI) четыре замены: Met216Leu, Arg231Gln, Tyr236Ala и Gly240Ala. Структуры фрагментов, соответствующих последовательностям пептидов (II), (V) и (VII), идентичны в белке крупного рогатого скота и кроликов [4].

В связи с высокой межвидовой гомологией, отмеченной для белка РrР, для получения РrР-специфических антител чаще всего используют конъюгаты пептидов [4, 5]. В настоящей работе кроликов иммунизировали свободными пептидами, соответствующими фрагментам РrР, и это привело к получению сывороток с высоким уровнем противопептидных антител, несмотря на высокую гомологию последовательности синтезированных пептидов соответствующим последовательностям РrР кролика. В литературе отсутствуют систематические исследования по изучению механизмов индукции иммунного ответа на фрагменты эндогенных белков, поэтому остается открытым вопрос, является ли выявленная иммуногенная активность свободных РrР-фрагментов общей закономерностью или особенностью именно этого белка.

Также были получены сыворотки кроликов после иммунизации их КLN-конъюгатами синтети-

ческих пептидов. Кроликов иммунизировали четырехкратно в дозе 200 мкг (в расчете на пептид) на животное. Первую иммунизацию осуществляли в ПАФ, а через 39, 98 и 108 сут после первой иммунизации проводили соответственно вторую, третью и четвертую иммунизации в НАФ. Результаты исследований показали, что конъюгаты пептидов индуцируют у кроликов образование такого же уровня антител, как и свободные, неконъюгированные пептиды (см. табл. 2). Лишь при иммунизации животного № 24 КЛН-конъюгатом пептида (214–240) (VI) получен низкий уровень антител. Третья и четвертая иммунизации конъюгатами пептидов в большинстве случаев не приводили к существенному повышению титров антител по сравнению с двумя предыдущими иммунизациями, а для ряда животных (кролики № 19, 20, 24–26) сопровождалась падением уровня антител.

Сыворотки, полученные после третьей иммунизации свободными пептидами и после четвертой иммунизации их КЛН-конъюгатами, за исключением низкоактивной сыворотки от животного № 24, были исследованы в иммуногистохимическом тесте на их способность выявлять PrP<sup>BSE</sup> в срезах мозга особой крупного рогатого скота, больных ГЭ. Было изучено связывание антител со срезами мозга больных животных, предварительно обработанными протеиназой К, расщепляющей PrP и не гидролизующей последовательность PrP<sup>BSE</sup>. В качестве контроля использовали аналогично полученные и обработанные препараты мозга здоровых животных. Согласно результатам, приведенным в табл. 3, большинство изученных сывороток в большей или меньшей степени связывались с препаратами мозга больных животных. Исключение составили слабо активные сыворотки с титром <3.0, полученные против КЛН-конъюгата пептида (II), свободного пептида (V), свободного и конъюгированного пептида (VII) (животные № 16, 17, 8, 9, 12 и 25 соответственно).

При интерпретации результатов необходимо учитывать, что для успешного выявления заболевания ГЭ иммуногистохимическим методом необходимо, чтобы разведение сыворотки, выявляющее связывание с препаратом мозга больного животного, не менее чем в 10 раз превышало разведение, при котором происходит связывание с препаратом мозга здорового животного.

Таковыми свойствами обладали только сыворотки животных № 3, 4, 6, 7, 10, полученные после иммунизации свободными пептидами (II), (III), (IV), (VI) и сыворотки животных № 21 и 22, полученные при иммунизации КЛН-конъюгатами пептида (V). Остальные сыворотки имели существенный фон при связывании со срезами ткани мозга здоровых животных. Необходимо отметить, что

**Таблица 2.** Титры противопептидных антител кроликов после второй и четвертой иммунизации КЛН-конъюгатами синтетических пептидов (I)–(VII)

Иммуноген	Номер животного	Титр противопептидных антител (–lg)	
		2 иммунизации	4 иммунизации
(17–36)–(62–69)-КЛН	14	4.2	4.2
	15	4.2	4.5
(25–36)–(62–69)-КЛН	16	3.8	4.2
	17	3.5	3.6
(106–134)-КЛН	18	4.5	4.8
(172–202)-КЛН	19	5.8	4.6
	20	5.8	5.2
(186–202)-КЛН	21	5.8	5.5
	22	5.8	5.8
(214–240)-КЛН	23	4.1	5.6
	24	2.6	2.0
(224–240)-КЛН	25	4.8	4.2
	26	4.1	3.6

большинство сывороток против КЛН-конъюгатов пептидов проявило низкую специфичность. В то же время большинство сывороток, селективно связывающихся с препаратами мозга больных животных, получено против свободных пептидов.

Анализ результатов оценки активности PrP-специфичных сывороток иммуногистохимическим методом позволяет сделать вывод о том, что в каждом из выбранных в настоящей работе для синтеза пяти участков прионного белка (см. рис. 1) существуют фрагменты, способные в свободном виде стимулировать у кроликов образование антител, различающих PrP<sup>BSE</sup>. В случае конструкции, включающей первый (17–36) и второй участок (62–69), лучшие результаты были получены с укороченным пептидом (II) – (25–36)–(62–69), а третьему, четвертому и пятому участкам соответствуют полностью покрывающие их последовательность пептиды (III) (106–134), (IV) (172–202) и (VI) (214–240) соответственно.

Таким образом, в результате проделанной работы выбраны фрагменты PrP крупного рогатого скота и синтезированы соответствующие им пептиды, способные стимулировать у кроликов образование антител, селективно связывающихся с препаратами мозга больных ГЭ животных в иммуногистохимическом тесте и пригодных для разработки диагностикума на ГЭ крупного рогатого скота. Показано, что свободные неконъюгированные пептиды, соответствующие различным районам прионного белка, пригодны для стимуляции PrP-специфических антител.



**Таблица 3.** Титры антител в сыворотках кроликов, полученных после иммунизации синтетическими пептидами (I)–(VII) и их KLH-конъюгатами, в иммуногистохимическом тесте

Иммуноген	Номер животного	Титр антител (–lg)	
		Мозг больных животных	Мозг здоровых животных
(I)	1	3.6	>2.7
	2	3.0	>2.7
(I)-KLH	14	4.2	>3.6
	15	4.2	>3.5
(II)	3	3.6	<2.3
	4	3.3	<2.3
(II)-KLH	16	2.3	<2.3
	17	2.7	2.7
(III)	5	3.0	2.3
	6	3.6	<2.3
(III)-KLH	18	4.2	>3.6
(IV)	7	3.3	2.3
(IV)-KLH	19	4.2	>3.6
	20	3.3	>2.7
(V)	8	<2.3	<2.3
	9	2.7	<2.3
(V)-KLH	21	3.3	<2.3
	22	3.5	2.3
(VI)	10	3.5	2.3
	11	3.6	>3.0
(VI)-KLH	23	4.2	>3.6
(VII)	12	2.7	2.3
	13	4.2	>3.6
(VII)-KLH	25	2.3	2.3
	26	3.3	>2.7

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), *n*-алкоксибензильный полимер (Merck, ФРГ), а также сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция). ВЭЖХ проводили на хроматографе System Gold (Beckman, США) с использованием колонок Jupiter C4 (250 × 4.6 мм) (Phenomenex, США) для аналитической и SynChromak RP-4 (250 × 10 мм) (SynChrom Inc., США) для препаративной хроматографии. Условия хроматографии: УФ-детекция при 226 нм, градиент ацетонитрила в 0.01% TFA от 10 до 50% за 40 мин при скорости потока 1 мл/мин для аналитической и 3 мл/мин для препаративной хроматографии. Гидролиз пептидов проводили смесью 6 н. HCl–TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Растворители очищали согласно известным мето-

дикам [15]. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ).

В иммунохимических исследованиях применяли ПАФ, НАФ и козьи антитела против иммуноглобулинов кроликов, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы Maxisorp (Nunc, Дания). Для иммунизации использовали кроликов весом 1.8–2.0 кг.

Парафиновые блоки стволовой части мозга больных ГЭ животных предоставлены Центральной научной ветеринарной лабораторией г. Дублина, Ирландия. Аналогичные препараты от здоровых животных приготовлены из мозга крупного рогатого скота, забитого на Владимирском мясокомбинате (г. Владимир). В иммуногистохимических исследованиях использовали роторный микротом Microm HM 335E (Microm Laborgerate GmbH, ФРГ) для получения срезов с парафиновых блоков мозга, микроскоп Olympus B × 40 (Olympus optical Co, Япония), протеиназу К с активностью 8.2 ед./мг (Serva, США), антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с биотином, конъюгат экстравидина с пероксидазой, аминоэтилкарбазол (Sigma, США), а также раствор гематоксилина Мейера (Mediate GmbH, ФРГ).

**Пептиды (I)–(VII)** синтезировали на *n*-алкоксибензильном полимере (содержание гидроксильных групп 0.37 ммоль/г). Полимер (200 мг) промывали DMF, эфиром, высушивали. В 5 мл DMF растворяли 5 экв. стартовой Fmoc-аминокислоты и 50 мг (5 экв.) 1-гидроксибензотриазола, к раствору добавляли 57 мкл (5 экв.) *N,N*-диизопропилкарбодимида, а затем перемешивали 10 мин при 0°C. К полимеру в 10 мл DMF добавляли полученный раствор, 1 мг (0.1 экв.) DMAP и перемешивали в течение 4 ч. Затем полимер отфильтровывали, промывали DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и ацилировали непрореагировавшие гидроксильные группы 5 мл смеси Ac<sub>2</sub>O–пиридин–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 : 20 : 60) 1 ч, затем промывали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, изопропанолом, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF. Для наращивания полипептидной цепи использовали следующий протокол для каждого синтетического цикла: 1) 20% пиперидин в DMF (20 мин); 2) DMF (2 × 2 мин); 3) диоксан–вода, 2 : 1 (2 × 5 мин); 4) DMF (3 × 2 мин); 5) 5 экв. активированной Fmoc-аминокислоты в DMF (2 ч); 6) DMF (2 × 2 мин).

Для преактивации аминокислот к раствору 5 экв. Fmoc-защитенной аминокислоты и 5 экв. TBTU в 5 мл DMF добавляли 5.5 экв. DMAP и перемешивали 5 мин. Содержание непрореагировавших аминогрупп контролировали с помощью нингидринового и пикринового тестов после окончания цикла 6 синтетического протокола [16, 17]. При положительном нингидриновом или, в случае



N-концевого Pго, пикриновом тестах цикл конденсации (операции 5, 6) повторяли. Затем проводили повторный анализ оставшихся аминогрупп, при положительных результатах теста аминогруппы ацилировали смесью:  $As_2O$ –пиридин– $CH_2Cl_2$  (20 : 20 : 60) в течение 30 мин.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили на 200 мг пептидилполимера в 3 мл смеси TFA–этандитиол–диметилсульфид–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч, раствор пептида в TFA отфильтровывали от полимера, затем TFA упаривали при пониженном давлении. Пептид осаждали 100 мл эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5 × 20 мл). Осадок перемешивали в 5 мл 10%  $AsOH$  20 мин, отфильтровывали и промывали 5 мл 10%  $AsOH$ . Полученный раствор пептида лиофилизировали и обессоливали на колонке 2.5 × 60 см с сефадексом G-10 в 0.1 М  $AsOH$ . Очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В случае пептида (III), по данным аналитической ВЭЖХ и MALDI-МС, конечный продукт содержал 50% пептида, окисленного по остатку Met120. Пептид (III) перед стадией очистки восстанавливали дитиотреитом [14].

Синтезированные пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и масс-спектрометрии. Выходы пептидов в расчете на исходное количество гидроксильных групп полимера, времена удерживания пептидов при аналитической ВЭЖХ и молекулярные массы по данным масс-спектрометрии представлены в табл. 4. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Получение конъюгатов пептидов.** Раствор 1.5 мг пептида и 3 мг KLN в 1 мл PBS перемешивали 30 мин, затем в течение 1 ч добавляли 400 мкл 0.5% водного глутарового диальдегида. Реакционную массу перемешивали 15 ч, после чего диализовали против PBS с трехкратной сменой буфера.

**Иммунизация животных.** Для иммунизации животных готовили растворы пептидов либо суспензии KLN-конъюгатов пептидов в PBS в концентрации 1 мг/мл (в случае конъюгата в расчете на пептид), а затем смешивали с равным объемом ПАФ для первой иммунизации и НАФ для последующих иммунизаций до получения эмульсии.

Кроликов массой 2–3 кг иммунизировали внутримышечно вдоль позвоночника в шесть точек свободными пептидами трехкратно в дозе 500 мкг на животное для первых двух иммунизаций и 50 мкг на животное для третьей иммунизации. Второе и третье введение пептида проводили через 33 и 75 сут после первой иммунизации.

Первую иммунизацию KLN-конъюгатами пептидов осуществляли подкожно в подушечки пальцев задних лап, три последующие – в задние лапы внутримышечно в дозе по 200 мкг на животное

**Таблица 4.** Выходы, времена удерживания в условиях аналитической ВЭЖХ и молекулярные массы синтетических фрагментов PrP (I)–(VII)

Пептид	Выход, мг (%)	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
			вычисленная	по данным МС ( $M^+$ )
(I)	10(11)	23.0	2993.4	2996.1
(II)	30(41)	17.2	2102.4	2103.4
(III)	10(11)	16.7	2914.4	2916.4
(IV)	16(17)	24.9	3684.1	3686.6
(V)	9(13)	19.3	1942.2	1944.5
(VI)	16(18)	27.6	3368.9	3371.3
(VII)	10(14)	16.8	2124.4	2127.0

(в расчете на пептид) для каждой иммунизации. Введение KLN-конъюгатов пептидов проводили на 39, 98 и 108 сут после первой иммунизации.

**Получение сывороток и определение титра противопептидных антител.** Кровь отбирали из ушной вены кроликов при иммунизации свободными пептидами через 32 сут после первой, через 22 сут после второй и через 8 сут после третьей иммунизаций. В случае использования KLN-конъюгатов кровь отбирали через 24 сут после второй и через 21 сут после четвертой иммунизаций. Из отобранной крови готовили сыворотки и хранили их при температуре  $-20^{\circ}C$ . Титры противопептидных антител определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа как описано в работе [18]. За титр противопептидных антител принимали значение соответствующего разведения сыворотки, выраженное в  $-lg$ , дающее окрашивание более 0.1 ОЕ ( $\lambda$  492 нм) и превышающее фоновый уровень в два раза.

**Иммуногистохимический тест.** Получали срезы толщиной 5 мкм с парафиновых блоков стволочной части мозга здоровых и больных ГЭ коров, расплавляли их в воде при  $45^{\circ}C$  и помещали на предметные стекла, предварительно обработанные 50 мкл 0.01% раствора полилизина. Срезы на предметных стеклах инкубировали при  $37^{\circ}C$  в течение 18 ч, а затем отмывали от парафина ксилолом, этанолом, 70% водным этанолом, водой, промывали PBS и обрабатывали 20 мин 0.01% раствором протеиназы К в PBS. Препараты промывали PBS, протеиназу К инактивировали нагреванием в водяной бане при  $95^{\circ}C$  10 мин, промывали PBS и обрабатывали 3%  $H_2O_2$  в PBS 5 мин.

Иммуногистохимические реакции проводили при  $37^{\circ}C$  в 250 мкл раствора PBST. Каждую обработку завершали трехкратным промыванием PBST. Препараты промывали PBST 5 мин, блокировали 5% BSA 30 мин, инкубировали 2 ч с раствором 1% BSA и противопептидных кроличьих сывороток в двукратных разведениях, начиная с разведения 1 : 200, затем обрабатывали биотинилированными козьими антикроличьими антителами в разведении 1 : 1000 1 ч, конъюгатом экстравидин–пероксидаза в разведении 1 : 100 30 мин.



Для окрашивания к препаратам добавляли 250 мкл раствора, содержащего 0.04% аминоэтилкарбазол и 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.1 М Na-ацетатном буфере (рН 5.0) и выдерживали при 20°C 15 мин. Затем, после трехкратного промывания водой, окрашивали клеточные структуры препаратов раствором гематоксилина Мейера в течение 5 мин и трехкратно промывали водой. На препараты нанесли 90% глицерин в PBS, накрывали покровным стеклом и анализировали с помощью микроскопа. За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, дающее выраженное красно-коричневое окрашивание продукта взаимодействия комплекса (PrP<sup>BSE</sup>-PrP-специфические антитела-антикроличьи биотинилированные антитела-конъюгат экстравидин-пероксидаза) с аминоэтилкарбазолом, соответствующее местам скопления патогенной изоформы белка PrP<sup>BSE</sup> в препаратах мозга.

Работа поддержана федеральными целевыми научно-техническими программами "Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники гражданского назначения", "Создание биологических препаратов для диагностики и профилактики наиболее опасных инфекционных и инвазионных заболеваний животных" и "Создание методов и средств защиты населения и среды обитания от опасных и особо опасных патогенов в чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prusiner S.B. // *Science*. 1997. V. 278. P. 245–251.
2. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith P.G. // *Lancet*. 1996. V. 347. P. 921–925.
3. Jeffrey M., Halliday W.G., Goodsir C.M. // *Acta Neuropathol*. 1992. V. 84. P. 651–657.
4. Harmeyer S., Pfaff E., Groschup M.H. // *J. Gen. Virol*. 1998. V. 79. P. 937–945.
5. Matsushita K., Horiuchi H., Furusawa S., Horiuchi M., Shinagawa M., Matsuda H. // *J. Vet. Med. Sci*. 1998. V. 60. P. 777–779.
6. Takahashi H., Takahashi R.H., Hasegawa H., Horiuchi M., Shinagawa M., Yokoyama T., Kimura K., Haritani M., Kurata T., Nagashima K. // *J. Neurovirol*. 1999. V. 5. P. 300–307.
7. Goldmann W., Hunter N., Martin T., Dawson M., Hope J. // *J. Gen. Virol*. 1991. V. 72. P. 201–204.
8. Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Walchli M., Groth D.F., McKinley M.P., Prusiner S.B., Weissmann C. // *Cell*. 1986. V. 46. P. 417–428.
9. Smith C.J., Drake A.F., Banfield B.A., Bloomberg G.B., Palmer M.S., Clarke A.R., Collinge J. // *FEBS Lett*. 1997. V. 405. P. 378–384.
10. Nguyen J., Baldwin M.A., Cohen F.E., Prusiner S.B. // *Biochem*. 1995. V. 34. P. 4186–4192.
11. Lopez G.F., Zahn R., Riek R., Wuthrich K. // *PNAS*. 2000. V. 97. P. 8334–8339.
12. Korth C., Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H., Raebler A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M., Wuthrich K., Oesch B. // *Nature*. 1997. V. 390. P. 74–77.
13. Udenfriend S., Meienhofer J. *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. London: Academic Press, Inc., 1987. V. 9. P. 27–30.
14. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т., Рубин С.Г., Семашко И.В., Караванов А.С. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 100–111.
15. Perrin D.D. *Purification of Laboratory Chemicals*. N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
16. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // *Anal. Biochem*. 1981. V. 117. P. 147–157.
17. Gisin B.F. // *Anal. Chim. Acta*. 1972. V. 58. P. 248–249.
18. Короев Д.О., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Литвинов И.С., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. 26. С. 323–329.

### Antibodies against Synthetic Fragments of the Prion Protein for Diagnostics of Bovine Spongiform Encephalopathy

O. M. Volpina<sup>\*,#</sup>, M. N. Zhmak<sup>\*</sup>, M. B. Oboznaya<sup>\*</sup>, M. A. Titova<sup>\*</sup>, D. O. Koroev<sup>\*</sup>, T. D. Volkova<sup>\*</sup>, A. A. Egorov<sup>\*\*</sup>, S. S. Rybakov<sup>\*\*</sup>, and V. T. Ivanov<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>All-Russia Research Institute of Plant Protection, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Vladimir, Russia

Seven peptides matching fragments of the prion protein and containing from 17 to 31 amino acid residues were synthesized to obtain antibodies for diagnostics of bovine spongiform encephalopathy. Rabbits were immunized with either free peptides or peptide-protein conjugates to result in sera with a high level of antipeptide antibodies. Immunohistochemical assay revealed sera against four free peptides and a protein-peptide conjugate, which effectively bind to the pathogenic isoform of the prion protein in brain tissue preparations from cattle afflicted with bovine spongiform encephalopathy and do not interact with normal brain preparations. The resulting antipeptide sera can be used in developing a diagnostic kit for bovine spongiform encephalopathy. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* antibodies, bovine spongiform encephalopathy, immunohistochemical assay, prion, synthetic peptides

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: [volpina@ibch.ru](mailto:volpina@ibch.ru).