



УДК 577.112.6:577.27

ИНДУКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ПРИОННОГО БЕЛКА И ИХ АНАЛОГАМИ У МЫШЕЙ РАЗНЫХ ЛИНИЙ

© 2004 г. М. Б. Обозная^{*,#}, О. М. Вольпина^{*}, М. Н. Жмак^{*}, М. А. Титова^{*}, Т. Д. Волкова^{*}, А. А. Егоров^{**}, С. С. Рыбаков^{**}, В. Т. Иванов^{*}

^{*}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных Министерства сельского хозяйства РФ, г. Владимир

Поступила в редакцию 05.12.2003 г. Принята к печати 14.01.2004 г.

С целью получения антител к прионному белку быка проведена иммунизация мышей трех линий пятью синтетическими фрагментами белка и шестью их аналогами. Аналоги содержат аминокислотные замены, приводящие, согласно теоретическим расчетам, к повышению иммуногенной активности пептидов. Все пептиды, кроме одного, индуцировали образование антител. Все сыворотки, содержащие противопептидные антитела, исследованы иммуногистохимическим методом. Выявлены сыворотки, эффективно связывающиеся с препаратами мозга крупного рогатого скота, больного губкообразной энцефалопатией, и не взаимодействующие с препаратами нормального мозга. Таким образом, показано, что иммунизация мышей синтетическими фрагментами прионного белка позволяет получить специфичные антитела, пригодные для исследования и диагностики прионных заболеваний.

Ключевые слова: прионный белок, синтетические пептиды, антитела, иммуногистохимический метод.

ВВЕДЕНИЕ

Прионные болезни человека и животных относятся к группе медленных инфекций, проявляются в дегенеративных изменениях центральной нервной системы и завершаются летальным исходом. Инфекционный агент этих заболеваний представляет собой патогенную изоформу нормального клеточного белка млекопитающих [1]. Для разработки чувствительных методов исследования и диагностики прионных болезней необходимы антитела, специфичные к различным участкам приона.

В связи с тем, что все известные последовательности прионного белка разных видов млекопитающих обладают высокой гомологией [2], существует проблема низкой иммуногенности этого белка при иммунизации лабораторных животных [3]. Но в настоящее время есть несколько подходов, позволяющих получить высокий уровень специ-

фичных антител. Во-первых, для иммунизации используют мышей, у которых отсутствует ген прионного белка. Прионный белок любого вида животных является для них чужеродным, поэтому иммунизация таких мышей нормальным, патогенным или рекомбинантным прионом вызывает сильный иммунный ответ [4–6]. Во-вторых, прионным белком млекопитающих иммунизируют цыплят. Хотя у кур найден ген, кодирующий сходный с прионом белок, его гомология с прионами млекопитающих составляет всего около 30% [7], поэтому в результате иммунизации развивается полноценный иммунный ответ. В-третьих, проблему низкой иммуногенности прионов можно решить, используя для иммунизации животных не целый белок, а его синтетические фрагменты, конъюгированные с белком-носителем [2, 7].

Но наиболее перспективный метод – иммунизация животных синтетическими фрагментами прионного белка в неконъюгированном виде. Иммунизация пептидно-белковыми конъюгатами часто вызывает иммунный ответ в большей степени на белок-носитель [8]. А использование неконъюгированных пептидов хотя и приводит к необходимости поиска белковых фрагментов, обладающих собственной иммуногенностью, но

Сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – 0.15 М раствор NaCl в 0.01 М растворе NaH₂PO₄ (pH 7.4); PBST – раствор PBS, содержащий 0.05% Твин-20.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; эл. почта: oboznaya@mtu-net.ru).

зато позволяет направленно получать высокий уровень антител практически к любым участкам белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель работы заключалась в получении иммунного ответа мышей трех линий на синтетические пептиды, соответствующие разным участкам прионного белка быка, и их аналоги, содержащие аминокислотные замены, а также в изучении полученных иммунных сывороток на их способность связываться с препаратами мозга животных, больных губкообразной энцефалопатией.

Мыши представляют собой удобную модель для изучения прионных заболеваний. Заболевание овец скрепи, которое считают прототипом всех трансмиссивных губкообразных энцефалопатий, экспериментально передается мышам посредством инокуляции в мозг инфекционного материала [1]. Таким образом, развитие болезни можно наблюдать в лабораторных условиях. В то же время у кроликов не удается вызвать заболевание после заражения патогенным материалом, выделенным из мозга самых разных животных [9].

Необходимо отметить, что мыши являются незаменимым источником для получения моноклональных антител, с помощью которых проводится современная диагностика прионных болезней. В литературе практически отсутствуют данные, посвященные получению мышинных антител с помощью неконъюгированных с белком-носителем синтетических фрагментов прионных белков. Существует лишь одна такая работа, но именно получение антител не являлось в ней целью исследования [10].

В настоящей работе были использованы пять пептидов (I)–(V) (рисунок), состоящих либо из двух фрагментов прионного белка крупного рогатого скота: (17–36)–(62–69) (I), (25–36)–(62–69) (II), либо представляющих собой фрагменты этого белка 106–134 (III), 172–202 (IV) и 214–240 (V) [11]. Соответствующие пептиды включают функционально важные участки белка: пептид (17–36)–(62–69) (I) содержит сайт посттрансляционного расщепления белка (участок 24–25) и повторяющийся в структуре белка 5 раз подряд фрагмент (62–69), влияющий на образование патогенной изоформы белка [12, 13]; пептид (25–36)–(62–69) (II) содержит N-концевой участок белка (25–36) и повторяющийся фрагмент (62–69); пептид (106–134) (III) включает участок, образующий β -складчатые структуры и, возможно, участвующий в превращениях белка [1, 14]; пептиды (172–202) (IV) и (214–240) (V) содержат соответственно второй и большую часть третьего α -спиральных участков белка [15]. Ранее нами было показано, что пептиды (I)–(V) способны стимулировать у кроликов

образование противопептидных антител, ряд из которых пригоден для диагностики губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота [16].

Нами был разработан метод предсказания участков белковых последовательностей, ответственных за индукцию образования антител у мышей [17]. Анализ первичной структуры выбранных фрагментов прионного белка выявил такие участки только в последовательностях пептидов (17–36)–(62–69) (I) и его укороченного фрагмента (25–36)–(62–69) (II). Для того чтобы повысить индукцию антител у мышей на остальные фрагменты прионного белка (III)–(V), были синтезированы их аналоги, содержащие такие замены аминокислотных остатков, которые приводили к формированию последовательностей, ответственных за индукцию антител. Были получены шесть аналогов, содержащих аминокислотные замены: [G104L]-101–134 (IIIa), [Q109V]-106–134 (IIIб), [H107V, G108Y]-106–134 (IIIв), [N182K]-172–202 (IVa), [T210N, E211F]-209–240 (Va), [T210N, E211F, T212Y, D213R]-209–240 (Vб) (рисунок). Ранее было показано, что точечные замены в аминокислотной последовательности пептидов, приводящие к формированию иммуноактивных участков, незначительно влияют на специфичность стимулируемых ими антител [17]. Поэтому мы предположили, что антитела против пептидных аналогов будут связываться с прионным белком.

Синтез пептидов (I)–(V) был описан ранее [16]. Пептидные аналоги (IIIa), (IIIб), (IIIв), (IVa), (Va), (Vб) получены твердофазным методом в ручном варианте на *n*-алкоксисбензильном полимере [18]. Для очистки пептидов использовали препаративную ВЭЖХ, все полученные соединения охарактеризованы с помощью аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Для получения антител линейных мышей иммунизировали синтетическими пептидами. Эксперименты проводили на мышах трех линий – BALB/c, C57/Black и SWA/J, – различающихся по гаплотипу главного комплекса гистосовместимости (H-2^d, H-2^b и H-2^k соответственно). Иммунный ответ на пептид зависит от того, есть ли в его последовательности эпитоп, связывающийся с тем или иным аллельным вариантом главного комплекса гистосовместимости. Вследствие небольшой длины пептидные фрагменты несут ограниченный набор эпитопов, поэтому, чтобы увеличить вероятность образования антител, были использованы мыши разных линий.

Для получения противопептидных сывороток мышей иммунизировали свободными, не конъюгированными с белком-носителем пептидами. Иммунизацию проводили подкожно двукратно. Из полученных сывороток готовили пулы и тестировали на наличие противопептидных антител методом твердофазного ИФА. Результаты иссле-

17	36 62 69	
MWSDVGLCKRPRKPGGGWNT-QPHGGGWG		(I)
25	36 62 69	
KKRPRKPGGGWNT-QPHGGGWG		(II)
106	134	
THGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVG		(III)
101	134	
WGQ L GT H GQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVG (G104L)		(IIIa)
106	134	
THG V WNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVG (Q109V)		(IIIб)
106	134	
T VY QWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVG (H107V, G108Y)		(IIIв)
172	202	
VYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKENTVTT		(IV)
172	202	
VYYRPVDQYS K QNNFVHDCVNITVKENTVTT (N182K)		(IVa)
214	240	
IKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG		(V)
209	240	
F NFT DIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG (T210N, E211F)		(Va)
209	240	
F NFYR IKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG (T210N, E211F, T212Y, D213R)		(Vб)

Аминокислотная последовательность синтетических пептидов (I)–(V) и их аналогов. Нумерация приведена в соответствии с аминокислотной последовательностью прионного белка быка [11]. В последовательности пептидов выделены жирным шрифтом и указаны в скобках (за последовательностью) аминокислотные замены и подчеркнуты теоретически рассчитанные участки, ответственные за индукцию антител.

дований показали (табл. 1), что почти все пептиды индуцировали образование антител у мышей. Пептиды (III)–(V), (IIIв), (IVa) и (Va) проявили иммуногенную активность на мышцах всех трех линий. Фрагменты (I) и (Vб) проявили иммуногенность на двух линиях – BALB/c и CBA/J, а пептиды (IIIa) и (IIIб) оказались иммуногенными на мышцах одной линии (CBA/J и C₅₇/Black соответственно). И только фрагмент (II) оказался неиммуногенным. Титры антител большинства сывороток были высокими (>3.0), и только при иммунизации пептидом (III) и его аналогами были отмечены более низкие значения. Таким обра-

зом, был получен иммунный ответ на антигены (I), (III)–(V) и их аналоги.

Сравнение титров антител, индуцированных природными фрагментами (I)–(V) и их аналогами, показало, что в некоторых случаях введение аминокислотных замен привело к небольшому увеличению титров антител (иммунизация пептидом (IIIa) мышей CBA/J, пептидом (IVa) мышей BALB/c и C₅₇/Black, пептидом (Va) мышей C₅₇/Black и пептидом (Vб) мышей BALB/c). В двух случаях введение замен привело к существенному падению титров (иммунизация пептидами (IIIa) и (Vб) мышей C₅₇/Black), а в остальных значения титров не изменились или стали незначительно ниже (табл. 1).

С целью выбора пептидов, перспективных для получения моноклональных антител к прионному белку, мышей линии BALB/c иммунизировали по другой схеме, включающей еще одну дополнительную иммунизацию для усиления иммунного ответа. В этом случае использовали только пептиды (I)–(V), соответствующие природной последовательности приона быка. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно и изучали индивидуальные сыворотки животных. Результаты исследований показали (табл. 2), что пептиды (I) и (III) проявили слабую иммуногенную активность, индуцируя образование антител со значениями титров <1.0–2.1, пептид (II) оказался неиммуногенным, а пептиды (IV) и (V) проявили высокую иммуногенную активность, индуцируя образование антител у всех мышей в группе со значениями титров 4.2–5.6.

Сравнение результатов иммунизации по двум разным схемам показало, что при трехкратной иммунизации пептидами (I) и (III) титры антител значительно ниже. В то же время при иммунизации фрагментами белка (IV) и (V) титры антител остаются на высоком уровне. Таким образом, для получения моноклональных антител могут быть пригодны только пептиды (IV) и (V), гарантированно индуцирующие высокий уровень антител у каждой мыши в группе.

Все содержащие противопептидные антитела сыворотки, полученные в двух экспериментах, были исследованы в иммуногистохимическом тесте на их способность выявлять патогенную изоформу приона в срезах мозга коров, больных губкообразной энцефалопатией. В качестве контроля использовали аналогично полученные и обработанные образцы мозга здоровых животных. Препараты мозга предварительно обрабатывали протеиназой К, которая полностью гидролизует нормальный прионный белок, а от патогенной изоформы приона отщепляет только N-концевую последовательность [19]. Затем проводили инкубацию срезов с различными разведениями иммунных сывороток.

Интерес представляют сыворотки, которые по результатам иммуногистохимического теста (табл. 3) с большей интенсивностью связываются именно с образцами мозга, пораженного губкообразной энцефалопатией, по сравнению с контрольными образцами, полученными от здоровых животных.

Четырехкратное и более превышение титров связывания с препаратами инфицированного мозга по сравнению со здоровым наблюдается у сыворотки мышей BALB/c после двух иммунизаций пептидом (I); от мышей CBA/J после двух иммунизаций пептидом (IIIa); сыворотки № 4 после трех иммунизаций мышей BALB/c пептидом (IV); сывороток мышей C₅₇/Black и CBA/J после двух иммунизаций пептидом (IVa) и сывороток № 3–5

Таблица 1. Титры противопептидных антител в сыворотках мышей трех линий после двукратной иммунизации пептидами (I)–(Vб)

Пептид	Титр антител (–lg)		
	BALB/c	C ₅₇ /Black	CBA/J
(17–36)–(62–69) (I)	4.1	<1.0	3.9
(25–36)–(62–69) (II)	<1.0	<1.0	<1.0
106–134 (III)	2.8	2.8	3.2
101–134 (IIIa)	1.3	<1.0	3.5
106–134 (IIIб)	1.9	2.2	1.3
106–134 (IIIв)	2.8	2.8	3.2
172–202 (IV)	4.4	4.5	4.8
172–202 (IVa)	4.5	4.8	4.8
214–240 (V)	4.5	3.3	4.5
209–240 (Va)	4.5	3.5	3.8
209–240 (Vб)	4.8	<1.0	3.6

Таблица 2. Титры противопептидных антител в индивидуальных сыворотках мышей № 1–5 линии BALB/c после трехкратной иммунизации пептидами (I)–(V)

Пептид	Титр антител (–lg)				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
(17–36)–(62–69) (I)	2.1	2.1	2.1	2.1	<1.0
(25–36)–(62–69) (II)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
106–134 (III)	2.1	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
172–202 (IV)	4.2	4.9	4.9	5.6	5.6
214–240 (V)	4.2	4.2	4.2	4.9	4.9

мышей BALB/c после трех иммунизаций пептидом (V).

Сравнивая результаты иммуногистохимического теста сывороток, полученных после иммунизации пептидами и их аналогами, можно отметить, что в ряде случаев сыворотки, полученные к аналогам, показали лучшие результаты по сравнению с сыворотками, полученными к исходным пептидам. Так, именно к аналогам (IIIa) и (IVa), а не к исходным пептидам (III) и (IV) получены наиболее селективные сыворотки.

Таким образом, в результате иммунизации синтетическими фрагментами прионного белка быка мышей трех линий, различающихся по гаплотипу главного комплекса гистосовместимости, были получены сыворотки, содержащие противопептидные антитела. В отличие от большинства работ, описанных в литературе, антитела вырабатывались в ответ на иммунизацию свободными пептидами, не конъюгированными с белком-носителем. Гуморальный иммунный ответ был получен на пептиды, обладающие высокой степе-

Таблица 3. Связывание сывороток, полученных после иммунизации мышей пептидами (I), (III)–(Vб), с образцами мозга больных губкообразной энцефалопатией и здоровых коров в иммуногистохимическом тесте

Пептид	Число иммунизаций	Линия мышей и номер сыворотки		Титр антител	
				мозг здоровых животных	мозг больных животных
(17–36)–(62–69) (I)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/2000
		CBA/J	Пул	1/500	1/1000
106–134 (III)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/1000
		C ₅₇ /Black	Пул	<1/250	<1/500
101–134 (IIIa)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		CBA/J	Пул	1/250	1/2000
106–134 (IIIб)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/500	1/500
106–134 (IIIв)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/500	1/500
172–202 (IV)	2	BALB/c	Пул	1/250	<1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/500	1/500
172–202 (IVa)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/250	1/1000
214–240 (V)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/500	1/500
209–240 (Va)	2	BALB/c	Пул	1/250	1/500
		C ₅₇ /Black	Пул	1/500	1/500
209–240 (Vб)	2	BALB/c	Пул	1/500	1/500
		CBA/J	Пул	1/500	1/500

нюю гомологию с соответствующими участками прионного белка мыши [20]: пептид (I) содержит замену Ser19Thr и дополнительный остаток Gly31, пептид (III) – замены Gly108Asn и Met120Leu, пептид (IV) имеет замены Val195Ile, Glu197Gln и пептид (V) – замены Ile214Val, Ile226Val, Arg231Lys, Gln238Asp, Gly240Ser и отсутствие фрагмента GlyArg после остатка 238. Синтезированные аналоги вышеперечисленных фрагментов благодаря внесенным аминокислотным заменам обладают большим отличием от прионного белка мыши.

Иммуногистохимическое тестирование иммунных сывороток на связывание со срезами мозга больных губкообразной энцефалопатией и здоровых животных выявило, что к четырем из пяти синтезированных участков прионного белка и их аналогам получены сыворотки, селективно связывающиеся с патогенной изоформой приона в препаратах мозга.

Показано, что пептиды (IV) и (V) индуцируют стабильно высокий уровень антител у мышей линии BALB/c и часть сывороток проявляют специфическую активность в иммуногистохимическом тесте. Эти пептиды могут быть использованы для получения диагностических моноклональных антител, выявляющих губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота.

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 с использованием хроматографа System Gold (Beckman, США) на колонках Jupiter C4 (250 × 4.6 мм) (Phenomemex, США) для аналитической и SynChropak 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 методикам [21]. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ).

В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъювант Фрейнда (Sigma, США), козы антигена против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Предприятие по производству бакпрепаратов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия), 96-луночные платы Maxisorp (Nunc, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей ли-

ний BALB/c, CBA/J и C₅₇/Black весом 18–20 г, выращенных в опытно-племенном питомнике лабораторных животных при НИИ биомоделей РАМН.

Парафиновые блоки стволовой части мозга больных губкообразной энцефалопатией коров предоставлены Центральной научной ветеринарной лабораторией г. Дублина, Ирландия. Аналогичные препараты от здоровых животных приготовлены из мозга крупного рогатого скота, забитого на Владимирском мясокомбинате (Владимир). В иммуногистохимических исследованиях использовали роторный микротом Microm HM 335E (Microtom Laborgerate GmbH, ФРГ) для получения срезов с парафиновых блоков мозга, микроскоп Olympus Vx40 (Olympus optical Co, Япония), протеиназу К с активностью 8.2 ед./мг (Serva, США), антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с биотином, конъюгат экстравидина с пероксидазой, аминоэтилкарбазол (Sigma, США), а также раствор гематоксилина Мейера (Medite GmbH, ФРГ).

Синтез пептидов (I)–(V) описан ранее [16].

Пептиды (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IVa), (Va), (Vb) синтезировали на *n*-алкоксибензильном полимере. Для защиты боковых функций остатков Thr, Tyr, Ser, Cys использовали Bu^t-группу, для Asp, Glu – OBu^t-группу, для Lys – Boc-, для His – Trt-, для Arg – Pbf-группы. В качестве временной N^c-защиты служила Fmoc-группировка.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли (ТВТУ-метод) метод с использованием тетрафторбората 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилмочевины. Отщепление синтезированных пептидов от полимера с одновременным деблокированием осуществляли смесью TFA с добавками, предотвращающими протекание побочных реакций, затем пептиды обессоливали гель-фильтрацией и очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Выход конечных продуктов после очистки составлял от 7 до 20% в расчете на исходное количество гидроксильных групп полимера. Синтезированные пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и масс-спектрометрии. Выходы пептидов, времена удерживания пептидов при аналитической ВЭЖХ и молекулярные массы по данным масс-спектрометрии представлены в табл. 4. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

Иммунизация животных. Для иммунизации животных готовили растворы пептидов в PBS в концентрации 2 мг/мл, а затем смешивали с равным объемом полного – для первой иммунизации или неполного адъюванта Фрейнда – для последующих иммунизаций, до получения эмульсии. Каждым пептидом иммунизировали по пять мышей каждой линии. Пептиды вводили по 100 мкг

Таблица 4. Выходы, времена удерживания в условиях аналитической ВЭЖХ и молекулярные массы синтетических пептидов (IIIa), (IIIб), (IIIв), (IVa), (Va), (Vб)

Пептид	Выход, мг (%)	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
			вычисленная	по данным МС (M ⁺)
(IIIa)	18 (7)	19.9	3455.9	3456.8
(IIIб)	26 (12)	17.8	2885.4	2887.0
(IIIв)	31 (14)	17.7	2982.5	2984.1
(IVa)	55 (20)	24.0	3698.1	3698.9
(Va)	47 (16)	29.2	3993.6	3993.2
(Vб)	52 (17)	29.4	4096.8	4097.6

(0.1 мл эмульсии). Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 45 сут, при этом эмульсию вводили подкожно в основание хвоста или трехкратно с интервалами соответственно в 21 и 14 сут, при этом эмульсию вводили внутрибрюшинно.

Получение сывороток и определение титра противопептидных антител. Кровь отбирали тотально: при двукратной иммунизации – через 10 сут после второго введения пептидов, а при трехкратной – через 5 сут после третьего введения. Из отобранной крови готовили сыворотки и хранили их при температуре –20°C. Для анализа общего иммунного ответа линии мышей готовили пул: отбирали в отдельную пробирку по 20 мкл сывороток, полученных от каждой из пяти мышей в группе. Титры противопептидных антител определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа как описано в работе [22]. За титр противопептидных антител принимали отрицательный логарифм (–lg) значения наибольшего разведения сыворотки, дающего окрашивание более 0.1 ОЕ (λ 492 нм) и превышающего фоновый уровень в два раза.

Иммуногистохимический тест проводили как описано в работе [16]. Препараты здорового мозга инкубировали с противопептидными сыворотками, разведенными в 250 и 500 раз, а препараты пораженного мозга – с противопептидными сыворотками, разведенными в 500, 1000 и 2000 раз, а затем обрабатывали биотинилированными козьими антителами к иммуноглобулинам мыши и конъюгатом экстравидин–пероксидаза. Для окрашивания к препаратам добавляли 250 мкл 0.04%-ного аминоэтилкарбазола и 0.012%-ного H₂O₂ в 0.1 М Na-ацетатном буфере, а затем раствор гематоксилина Мейера. За титр антител

принимали максимальное разведение сыворотки, дающее выраженное красно-коричневое окрашивание в местах скопления патогенной изоформы белка в препаратах мозга.

Работа поддержана федеральной целевой научно-технической программой “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники”, блок 1 “Ориентированные фундаментальные исследования”, раздел “Технология живых систем”, подраздел “Биотехнология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prusiner S.B. // Science. 1991. V. 252. P. 1515–1522.
2. Harmeyer S., Pfaff E., Groschup M.H. // J. Gen. Virol. 1998. V. 79. P. 937–945.
3. Kascsak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringier H. // J. Virol. 1987. V. 61. P. 3688–3693.
4. Prusiner S.B., Groth D., Serban A., Koehler R., Foster D., Torchia M., Burton D., Yang S.L., DeArmond S.J. // PNAS. 1993. V. 90. P. 10608–10612.
5. Zanusso G., Liu D., Ferrari S., Hegyi I., Yin X., Aguzzi A., Hornemann S., Liemann S., Glockshuber R., Manson J.C., Brown P., Petersen R.B., Gambetti P., Sy M.S. // PNAS. 1998. V. 95. P. 8812–8816.
6. Korth C., Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M., Wuthrich K., Oesch B. // Nature. 1997. V. 390. P. 74–77.
7. Groschup M., Harmeyer S., Pfaff E. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 207. P. 89–101.
8. Purcell A., Zeng W., Mifsud N., Ely L., Macdonald W., Jackson D. // J. Pept. Sci. 2003. V. 9. P. 255–281.
9. Loftus B., Rogers M. // Gene. 1997. V. 184. P. 215–219.
10. Souan L., Tal Y., Felling Y., Cohen I.R., Taraboulos A., Mor F. // Eur. J. Immunol. 2001. V. 31. P. 2338–2346.
11. Goldmann W., Hunter N., Martin T., Dawson M., Hope J. // Gen. Virol. 1991. V. 72. P. 201–204.
12. 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.
13. 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.
14. Nguyen J., Baldwin M.A., Cohen F.E., Prusiner S.B. // Biochem. 1995. V. 34. P. 4186–4192.
15. Lopez G. F., Zahn R., Riek R., Wuthrich K. // PNAS. 2000. V. 97. P. 8334–8339.
16. Вольпина О.М., Жмак М.Н., Обозная М.Б., Тумова М.А., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Егоров А.А., Рыбаков С.С., Иванов В.Т. // Биооргани. химия. 2001. Т. 27. С. 352–358.
17. Вольпина О.М., Тумова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т. // Биооргани. химия. 2002. Т. 28. С. 387–395.
18. Udenfriend S., Meienhofer J. The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. London: Acad. Press, 1987. V. 9. P. 27–30.

19. Wiley C., Burrola P., Buchmeier M., Wooddell M., Barry R., Prusiner S., Lampert P. // *Lab. Invest.* 1987. V. 57. P. 646–656.
20. Westaway D., Goodman P., Mirenda C., McKinley M., Carlson G., Prusiner S. // *Cell.* 1987. V. 51. P. 651–662.
21. Perrin D.D. *Purification of Laboratory Chemicals.* N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
22. 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. // *Биоорг. химия.* 2000. Т. 26. С. 323–329.

Induction of Immune Response by Synthetic Fragments of the Bovine Prion Protein and Their Analogues in Mice of Various Lines

M. B. Oboznaya^{*,#}, O. M. Vol'pina^{*}, M. N. Zhmak^{*}, M. A. Titova^{*},
T. D. Volkova^{*}, A. A. Egorov^{**}, S. S. Rybakov^{**}, and V. T. Ivanov^{*}

[#]Phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: oboznaya@mtu-net.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

^{**}All-Russia Research Institute for Animal Protection,
Ministry of Agriculture of Russian Federation, Vladimir, Russia

The antibodies to the bovine prion protein were produced by immunizing mice of three lines with five synthetic fragments of the protein and their six analogues. The analogues contained the amino acid substitutions that, according to theoretical calculation, should lead to an increase in the immunogenic activity of peptides. All the peptides, except for one, induced the formation of antibodies. All the sera containing the antipeptide antibodies were tested by an immunohistochemical method. The sera that were effectively bound to the brain preparations from the bovine with spongiform encephalopathy were identified; it was shown that they do not interact with the preparations of normal brain. Therefore, it was shown that the immunization of mice with the synthetic fragments of a prion protein helps obtain specific antibodies suitable for the study and diagnostics of prion diseases. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antibodies, immunohistochemical method, prion protein, synthetic peptides