



Структура и функция биополимеров

УДК 577.112.083.3

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ БЫЧЬЕЙ ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ, УЗНАВАЕМЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

С. Ф. Берестень, Б. Й. Рубикайте, В. К. Казаков

Введение. Иммунохимическое изучение с помощью поликлональных антител триптофанил-тРНК-синтетазы быка (КФ 6.1.2, $M_r \sim 120000$, α_2 [1]) позволило обнаружить, что у этого белка антигенные детерминанты неравномерно распределены вдоль полипептидных цепей, а антитела к ним по-разному влияют на ферментативную активность [2]. Дальнейшее иммунохимическое изучение фермента было связано с получением гибридом и соответствующих моноклональных антител, обозначенных Ам1, Ам2 и Ам3 [3, 4]. Показано, что антигенная детерминанта для Ам1 и Ам3 локализована на фрагменте длиной ~ 12000 с N-конца молекулы синтетазы [4], а для Ам2 — на фрагменте длиной ~ 40000 с C-конца молекулы фермента [3]. Ам2, но не Ам1 и Ам3, ингибирует реакции АТР-[32 P]пирофосфатного обмена и аминокислотирования тРНК^{Trp} [3]. Методом иммуноблоттинга показано, что антигенная детерминанта для Ам1 сохраняется в денатурирующих условиях и присутствует в триптофанил-тРНК-синтетазах эукариот, прокариот и архебактерий [5]. Поскольку эта антигенная детерминанта определяется линейной последовательностью аминокислот, целью настоящей работы сводилась к локализации эпитопа для Ам1, а также для Ам2 и Ам3.

Материалы и методы. Триптофанил-тРНК-синтетазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота выделяли, как описано в [1]. Активность фермента определяли в реакции аминокислотирования тРНК^{Trp} [1].

Модификацию NH_2 -групп лизиновых остатков белка вели в боратном буфере (0,2 М H_3BO_3 и 0,15 М NaCl , pH 8,7), добавляя 300-кратный по отношению к лизиновым остаткам молекулы фермента молярный избыток свежеевзвешанного под вакуумом малеинового ангидрида. Ангидрид добавляли порциями при 4 °С в течение 1 ч, поддерживая pH реакционной смеси 5 н. NaOH в интервале 8,5—9,0 [6]. Избыток ангидрида удаляли гель-фильтрацией на колонке (1×45 см) с биогелем Р-2, уравновешенной 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,7. Полученный препарат лиофилизировали. Демалеирование NH_2 -групп вели в 10 %-ной уксусной кислоте при 37 °С в течение 24 ч, после чего уксусную кислоту упаривали под вакуумом.

Ограниченный протеолиз трипсином («Merck», ФРГ) выполняли при весовом соотношении трипсин—синтетаза 1 : 100 [7]. Реакцию останавливали добавлением 100-кратного молярного избытка динизопропилфторфосфата по отношению к трипсину. Исчерпывающий трипсинолиз нативной и модифицированной малеиновым ангидридом триптофанил-тРНК-синтетазы проводили при весовом соотношении трипсин—синтетаза 1 : 75 в течение ночи при 37 °С в буфере, содержащем 0,2 М H_3BO_3 и 0,15 М NaCl , pH 8,7 [8]. Реакцию останавливали и демодификацию пептидов после конъюгирования с [125 I]-реагентом Болтона и Хантера осуществляли, как описано выше. Трипсинолиз в присутствии аминокислотиденилата проводили, как описано в [9]. Далее гид-

ролизат разделяли на колонке (K16, «Pharmacia», Швеция) с АсА 34 («LKB», Швеция) в 0,15 М NH_4HCO_3 , рН 7,6, со скоростью 5 мл/ч, объем фракций 1 мл.

Ограниченное расщепление ВгСN. К 60 мкг триптофанил-гРНК-синтазы в 100 мкл 5 мМ НСl добавляли равные объемы 5 мМ НСl, содержащей 5, 1, 0,2 и 0,04 мкг ВгСN («Sigma», США) и инкубировали 15 мин при 37 °С, после чего пробы лиофилизировали.

Исчерпывающее расщепление ВгСN проводили, как описано в [10]. Белок (3—6 мг) растворяли в 10 %-ной муравьиной кислоте до концентрации 6 мг/мл. Затем добавляли 300-кратный молярный избыток сухого ВгСN по отношению к белку и инкубировали 18 ч в темноте при 25 °С. Далее муравьиную кислоту упаривали под вакуумом, и ВгСN-фрагменты растворяли 0,1 %-ной трифторуксусной кислотой (ТФУ) («Merck», ФРГ).

Разделение ВгСN-пептидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Altex с использованием колонки C_8 («Machary Nagel», ФРГ), элюцию вели в градиенте концентрации ацетонитрила (0—100 %), содержащем 0,1 % ТФУ, в течение 2 ч со скоростью 1 мл/мин. Рехроматографию осуществляли в тех же условиях в градиенте ацетонитрила 40—80 %.

Иодирование иммуноглобулинов проводили за счет Na^{125}I в присутствии ICl [11]. Иодирование реагента Болтона и Хантера описано ранее [12]. Конъюгирование ^{125}I -реагента Болтона и Хантера с нативной синтазой и пептидами, модифицированными малеиновым ангидридом, выполняли, как рекомендовано в [12], с некоторыми изменениями [4].

В реакции радиоиммуноадсорбции моноклональные антитела (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл PBS (0,005 М Na-фосфат, рН 7,5, 0,15 М NaCl) адсорбировали в лунках 96-луночного планшета («Flow Laboratory», США) в течение ночи при 4 °С или 2—3 ч при 37 °С. Избыток антител удаляли промыванием лунок планшета 3—4 раза PBS с 10 %-ной телячьей сывороткой (PBS-S), после чего инкубировали с 0,2 мл PBS-S 1 ч при 20—25 °С для блокирования оставшихся мест адсорбции. Затем в лунки добавляли синтазу или ее фрагменты, конъюгированные с ^{125}I -реагентом Болтона и Хантера ($5 \cdot 10^5$ имп/мин в лунку). После инкубации 1 ч при 20—25 °С лунки промывали шесть раз PBS-S. Радиоактивность каждой лунки определяли в γ -спектрометре Intertechnique CG-30.

PBS-S, адсорбированную в лунках планшета 1 ч при 20—25 °С, использовали как контроль на неспецифическую сорбцию радиоактивности.

В реакции радиоиммуноадсорбции с использованием меченых антител белок или его фрагменты (5—100 мкг/мл) в объеме 0,1 мл PBS адсорбировали в лунках, как описано выше. После блокирования оставшихся свободными мест адсорбции в лунки вносили одинаковое количество ^{125}I -меченных Аm1 или Аm3 в 0,1 мл PBS-S ($5 \cdot (10^3—10^5)$ имп/мин на лунку, удельная активность $10^5—10^6$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹) и инкубировали 1 ч. Отмывку лунок и определение радиоактивности проводили, как описано ранее.

В реакции торможения радиоиммуноадсорбции белок (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл адсорбировали в лунках и после блокирования PBS-S добавляли различные количества синтазы или ее фрагментов в объеме 50 мкл PBS-S в лунки планшета. Затем добавляли равное количество на лунку ^{125}I -меченных Аm1 или Аm3 в 50 мкл PBS-S ($10^4—10^5$ имп/мин в лунку). Определение радиоактивности описано выше.

Реакцию непрямой радиоиммуноадсорбции проводили в PBS, адсорбируя синтазу (10 мкг/мл) в объеме 0,1 мл, а затем блокируя оставшиеся места адсорбции. Далее в лунки вносили немеченные моноклональные антитела (0,2—1 мкг) в объеме 0,1 мл PBS-S и инкубировали 1 ч при 20—25 °С, лунки промывали 3—4 раза PBS-S, после чего добавляли равное количество на лунку ^{125}I -меченных кроличьих поликлональных антител к легким цепям иммуноглобулинов мыши (^{125}I -анти- C_L , $10^5—2 \cdot 10^5$ имп/мин, удельная активность $10^5—2 \cdot 10^6$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹) в объеме 0,1 мл PBS-S. После инкубации 1 ч при 20—25 °С несвязавшиеся ^{125}I -анти- C_L удаляли и лунки промывали 6—7 раз PBS-S. Радиоактивность лунок определяли, как описано выше.

В реакции торможения непрямой радиоиммуноадсорбции синтазу адсорбировали описанным способом и после блокирования оставшихся мест адсорбции в лунки добавляли равное количество синтазы или ее фрагментов в 50 мкл PBS-S. Затем добавляли равное количество 0,5 мкг моноклональных антител в 50 мкл

PBS-S. Реакцию вели 1 ч при 20—25 °С, после чего лунки промывали 3—4 раза PBS-S и в них добавляли одинаковое количество $[^{125}\text{I}]$ -анти-С_L (10^5 — $2 \cdot 10^5$ имп/мин на лунку, удельная активность 10^6 — $2 \cdot 10^6$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹) в PBS-S и инкубировали 1 ч, лунки промывали и определяли радиоактивность.

Иммуноблоттинг. После электрофореза продукты ограниченного расщепления BrCN переносили под прессом на два нитроцеллюлозных фильтра (BA 85, «Schleicher and Schull», ФРГ). Один из фильтров после отмывки PBS инкубировали 1 ч с 10 %-ной телячьей сывороткой, после чего фильтр обрабатывали $[^{125}\text{I}]$ Am1 в объеме 5 мл (10^6 имп·мин⁻¹·мл⁻¹) в течение 3 ч. После отмывки фильтра 7—8 раз PBS-S его радиоавтографировали 5—16 ч с рентгеновской пленкой РМВ («Свема», СССР).

Результаты и обсуждение. Взаимодействие моноклональных антител с триптическими фрагментами триптофанил-тРНК-синтетазы. На первом этапе работы для локализации антигенных детерминант использовали трипсин. Трипсинолиз триптофанил-тРНК-синтетазы протекает последовательно с N-конца полипептидной цепи по следующей схеме: 60000 → 51000 → 40000 → → (24000+14000) → ... → ... → 50 пептидов [7, 13].

На рис. 1 (см. вклейку) показана кинетика трипсинолиза синтетазы. Способность продуктов трипсинолиза к взаимодействию с моноклональными антителами исследовали с помощью реакций непрямой радиоиммуноадсорбции и торможения непрямой радиоиммуноадсорбции. Использование непрямых реакций связано с тем, что иодирование моноклональных антител Am2 по методу [11] приводит к их полной инактивации в реакции антиген — антитело.

Мы исследовали взаимодействие моноклональных антител с набором продуктов трипсинолиза синтетазы. Видно (рис. 2, кривая 1), что антитела Am1 и Am3 практически не взаимодействуют с фрагментами, образовавшимися к 20-й мин, когда все исходные цепи синтетазы расщеплены (рис. 1), но все еще сохраняется форма с $M_r \sim 51000$. Антитела Am2 не взаимодействуют с продуктами трипсинолиза синтета-

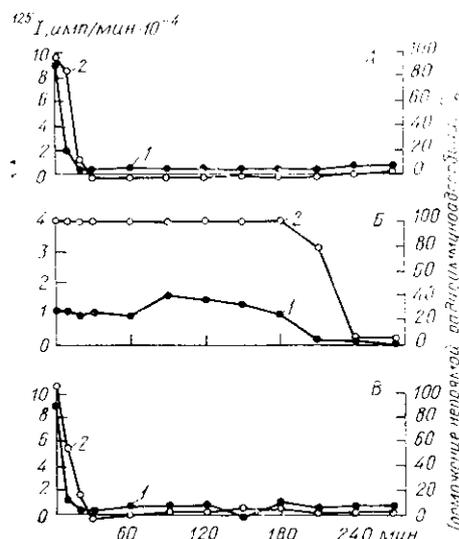


Рис. 2. Реакция непрямой радиоиммуноадсорбции (1) и торможение непрямой радиоиммуноадсорбции (2) продуктами ограниченного трипсинолиза, полученными к моменту времени, указанному в подписи к рис. 1: А — для Am1; Б — для Am2; В — для Am3

Fig. 2. Solid-phase radioimmunoassay: immunoreactivity of Am1, Am2 and Am3 with fragments produced by limited tryptic cleavage of tryptophanyl-tRNA synthetase

зы, образовавшимися к 270-й мин гидролиза. К этому времени форма $M_r \sim 24000$ практически исчезает (рис. 1).

Поскольку форма 51000 не взаимодействует ни с Am1, ни с Am3, можно думать, что антигенные детерминанты для этих антител локализованы на отщепленном фрагменте 9000 с N-конца молекулы фермента. Для проверки этого предположения мы получили «укороченную» димерную форму фермента отщеплением фрагмента 9000 с N-конца каждой из субъединиц в присутствии аминоксиладенилата, как описано ранее [9]. На рис. 3 (кривая 1) приведен профиль гель-фильтрации этой модифицированной формы, а кривые 2, 3 и 4 отражают способность моноклональных антител Am1, Am2 и Am3 к взаимодействию с этой формой фермента (по данным реакции торможения непрямой радиоиммуноадсорбции). Видно, что только Am2 обладает способностью к взаимодействию с модифицированной формой. Следовательно, как и

предполагали, детерминанты для Ам1 и Ам3 действительно локализованы на фрагменте 9000 с N-конца полипептидной цепи, тогда как для Ам2 — на фрагменте 24000, расположенном внутри полипептидной цепи молекулы фермента [14].

Ам1 и Ам3 имеют близкорасположенные антигенные детерминанты, поскольку Ам3, но не Ам2, тормозит реакцию радиоиммуноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{Am1}$ (рис. 4, А и Б). Аналогично Ам1, но не Ам2, тормозит реакцию радиоиммуноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{Am3}$.

Неспособность Ам1, Ам2 и Ам3 взаимодействовать с небольшими триптическихкими пептидами, возможно, объясняется тем, что они могут

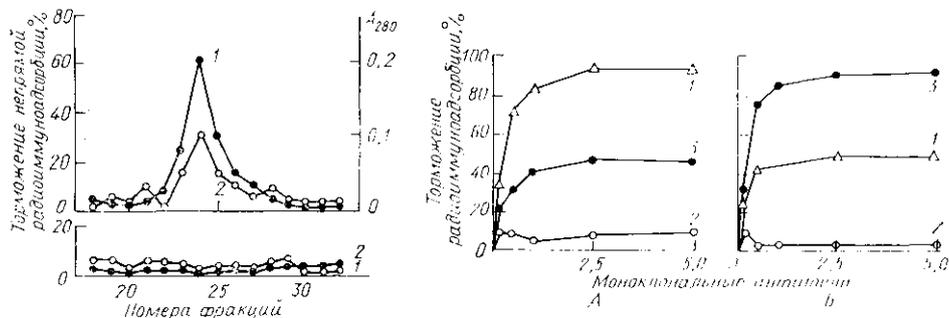


Рис. 3. Способность Ам1 (3), Ам2 (2) и Ам3 (4) к взаимодействию с модифицированной формой синтетазы, полученной отщеплением фрагмента размером 9000 с N-конца каждой из полипептидных цепей; 1 — поглощение при 280 нм

Fig. 3. Solid-phase radioimmunoassay: immunoreactivity of Am1, Am2 and Am3 with tryptophanyl-tRNA synthetase without N-terminal 9 kDa fragment

Рис. 4. Торможение радиоиммуноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{Am1}$ (А) и $[^{125}\text{I}]\text{Am3}$ (Б) моноклональными антителами Ам1 (1), Ам2 (2) и Ам3 (3)

Fig. 4. Solid-phase radioimmunoassay: inhibition of radioimmunoadsorption of $[^{125}\text{I}]\text{-Am1}$ and $[^{125}\text{I}]\text{-Am3}$ with Am1, Am2 and Am3

вообще не адсорбироваться на планшете или адсорбироваться, закрывая антигенную детерминанту, или, наконец, вытесняться крупными фрагментами. Для однозначного решения этого вопроса мы использовали реакцию торможения не прямой радиоиммуноадсорбции. Как видно из рис. 2 (А, Б, В), результаты, полученные с помощью обеих реакций, совпадают. Следовательно, триптические фрагменты не сохраняют антигенных детерминант для Ам1, Ам2 и Ам3, поэтому мы решили получить более длинные полипептидные фрагменты. Известно, что после модификации NH_2 -групп лизиновых остатков расщепление полипептидной цепи идет только у остатков аргинина [8]. Так как модификация NH_2 -групп лизинов приводит к полной потере способности Ам1, Ам2 и в значительной степени Ам3 взаимодействовать с синтетазой [4], мы использовали обратимую модификацию NH_2 -групп лизинов малеиновым ангидридом [6] для последующего получения фрагментов, расщепляемых только по остаткам аргинина.

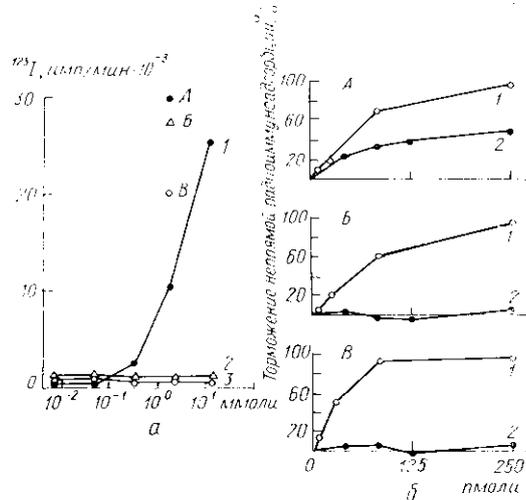
Взаимодействие этих фрагментов после демодификации с Ам1, Ам2 и Ам3 мы использовали в трех реакциях: торможения радиоиммуноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{-}$ меченных моноклональных антител, радиоиммуноадсорбции $[^{125}\text{I}]\text{-}$ меченных «удлиненных» пептидов и $[^{125}\text{I}]\text{-}$ меченных моноклональных антител. Поскольку после демодификации антигенная детерминанта для Ам2 не реактивируется [4], взаимодействие Ам2 с этим пептидом не изучали. По данным реакции торможения радиоиммуноадсорбции, триптические фрагменты, полученные расщеплением только по остаткам аргинина, также не взаимодействуют с Ам1 и Ам3 (данные не приводятся). Аналогичные результаты получены и в реакции радиоиммуноадсорбции (данные не приводятся). Для получения фрагментов молекулы синтетазы, все еще сохраняющих антигенную детерминанту, мы использовали расщепление по остаткам метионина [10].

Взаимодействие моноклональных антител с BtCN-фрагментами триптофанил-тРНК-синтетазы и

выделение ВгСN-фрагмента, сохраняющего антигенную детерминанту для Ам1. Способность к взаимодействию с антителами ВгСN-фрагментов, как и триптических, мы также исследовали в двух реакциях: не прямой радиоиммуноадсорбции и торможения не прямой радиоиммуноадсорбции (рис. 5, а и б). Видно, что только Ам1* взаимодействует с ВгСN-фрагментом. Таким образом, нам удалось получить фрагмент триптофанил-тРНК-синтетазы, сохраня-

Рис. 5. Способность Ам1, Ам2 и Ам3 к взаимодействию с ВгСN-фрагментами синтетазы: а — реакция не прямой радиоиммуноадсорбции Ам1 (1), Ам2 (2) и Ам3 (3) на фрагментах синтетазы, полученных после расщепления ВгСN (точки А, Б, В показана не прямая радиоиммуноадсорбция Ам1, Ам2 и Ам3 соответственно на нативной синтетазе); б — реакция торможения не прямой радиоиммуноадсорбции Ам1 (А), Ам2 (Б) и Ам3 (В) нативной синтетазы (1) и ВгСN-фрагментами (2)

Fig. 5. Solid-phase radioimmunoassay: immunoreactivity of fragments produced by complete ВгСN cleavage of tryptophanyl-tRNA synthetase with Ам1, Ам2 and Ам3



ющий антигенную детерминанту для Ам1. Следующий этап работы состоял в выделении этого фрагмента в гомогенном виде.

Для расщепления ВгСN-фрагментов мы использовали ВЭЖХ (рис. 6). Видно, что наиболее эффективно антитела взаимодействуют с фракциями А и Б. Фракция В представляет собой, по-видимому, продукт неполного гидролиза ВгСN. Ниже приведен аминокислотный состав фракции А после рехроматографии — ВгСN-фрагмента, содержащего антигенную детерминанту для Ам1 (число аминокислотных остатков данного типа на пептид):

Asx — 2—3	Ala — 2	Tyr — 1
Thr — 1	Cys — не опр.	Phe — 1
Ser — 2	Val — 1	His — 1
Glx — 2	Met — 1	Lys — 1
Pro — 2	Ile — 1	Arg — 1
Gly — 2	Leu — 1	Trp — не опр.

Этот пептид состоит из 22—25 аминокислотных остатков. Он содержит только один остаток лизина, который входит в формирование антигенной детерминанты, поскольку модификация NH_2 -групп лизинов приводит к инактивации синтетазы в реакции антиген — Ам1, а демодификация — к полной реактивации [4]. Следует отметить, что это не единственный случай, когда ВгСN-фрагмент сохраняет эпитоп для моноклонального антитела. Например, ВгСN-фрагменты бактериородопсина сохраняют антигенные детерминанты для моноклональных антител [15].

Выделенный нами ВгСN-фрагмент, в который входит антигенная детерминанта, локализован, как показано выше, на NH_2 -конце молекулы синтетазы во фрагменте массой 9000, однако это не предел точности локализации этого фрагмента. Очевидно, что после статистического расщепления по всем остаткам метионина можно получить и выявить наиболее длинный фрагмент, который не взаимодействует с Ам1. Такой фрагмент, вероятно, сохраняет исходный С-конец, а утраченная детерминанта должна находиться на недостающем N-конце, так как статистическое расщепление предполагает в среднем один разрыв на молекулу.

Взаимодействие моноклональных антител Аm1 со «статистическими» BгCN-фрагментами триптофанил-тРНК-синтетазы. На рис. 7 (см. вклейку) показано расщепление триптофанил-тРНК-синтетазы при различных концентрациях BгCN. Видно, что образуется ряд ярко выраженных высокомолекулярных фрагментов с $M_r \sim 55000, 48000, 43000, 35000$ и 28000 . Поскольку нас интересовали фрагменты наибольшей длины, в опытах по иммуноблоттингу мы использовали расщепление при двух наименьших концентрациях BгCN. По данным иммуноблоттинга с использованием

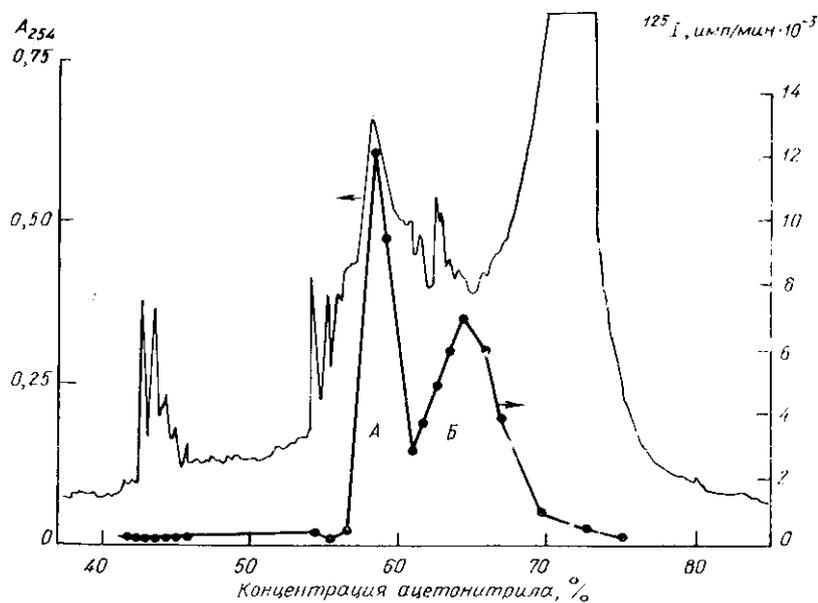


Рис. 6. Разделение BгCN-фрагментов ВЭЖХ с использованием обращенной фазы на колонке С-8: 1 — поглощение при 254 нм; 2 — радиоиммуноадсорбция [125 I]Am1 на BгCN-фрагментах синтетазы после разделения

Fig. 6. HPLC purification of BгCN-fragments which interact with Am1

[125 I]Am1 (рис. 8, см. вклейку), Am1 взаимодействует с фрагментами с $M_r \sim 48000, 35000$ и 28000 . Фрагменты с $M_r \sim 55000$ и 43000 не взаимодействуют с этим антителом. Так как наибольший фрагмент с $M_r \sim 55000$ не взаимодействует с Am1, его детерминанта расположена на фрагменте ~ 5000 с N-конца молекулы фермента, т. е. непосредственно на N-концах полипептидных цепей фермента.

Статистическое расщепление химическим способом применяли также в работе [16] для локализации антигенных детерминант четырех моноклональных антител на полипептидной цепи молекулы миоглобина человека, однако в этом случае знание первичной структуры существенно упрощало задачу.

Таким образом, антигенная детерминанта для моноклонального антитела Am1, которая присутствует в триптофанил-тРНК-синтетазах эукариот, прокариот и архебактерий, в случае бычьей триптофанил-тРНК-синтетазы входит в BгCN-фрагмент, который расположен непосредственно на N-конце полипептидных цепей. Какие именно аминокислотные остатки внутри выделенного BгCN-фрагмента образуют антигенную детерминанту, остается пока неизвестным. Хотя, учитывая наши предшествующие данные [4], единственный остаток лизина должен входить в состав детерминанты. Исходя из описанных выше результатов, единственный остаток аргинина также должен участвовать в формировании антигенной детерминанты.

Полная информация о строении антигенной детерминанты будет получена после определения первичной структуры BгCN-пептида и оп-

ределения его способности к взаимодействию с Am1 после направленной модификации различных аминокислотных остатков.

Авторы благодарят проф. Л. Л. Киселева за поддержку работы, обсуждение результатов и рукописи статьи, а также к. б. н. М. К. Нурбекова за участие в отдельных опытах.

LOCALIZATION OF ANTIGENIC DETERMINANTS OF BEEF
TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE REVEALED
BY MONOCLONAL ANTIBODIES

S. F. Beresten, B. I. Rubikaite, V. K. Kazakov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The method of limited cleavage of tryptophanyl-tRNA synthetase with trypsin and BrCN as well as radioimmunoassay and radioimmunoblotting are used to show that the antigenic determinant for monoclonal antibodies Am1 is located within the 5 kDa fragment and for the Am3—within the 9 kDa fragment, the both are located at the N-termini of the polypeptide chains; the antigenic determinant for Am2 residues is within the 24 kDa fragment located in the middle of tryptophanyl-tRNA synthetase polypeptide chain. BrCN-fragment maintaining the Am1 antigenic determinant is purified by HPLC; it contains 22-25 amino acid residues. Tryptic fragments and fragments obtained by cleavage only at arginine residues are immunologically inactive against Am1, Am2 and Am3.

1. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas // *Meth. Enzymol.*—1979.—59.—P. 234—257.
2. *Immunochemical studies of beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase and its fragments* / V. Sh. Scheinker, S. F. Beresten, A. M. Mazo et al. // *Eur. J. Biochem.*—1979.—97, N 2.—P. 529—540.
3. Моноклональные антитела к триптофанил-тРНК-синтетазе / С. Ф. Берестень, Т. А. Заргарова, С. В. Костров, О. О. Фаворова // *Молекуляр. биология.*—1984.—18, № 5.—С. 1407—1419.
4. Берестень С. Ф., Рубикайте Б. И., Киселев Л. Л. Локализация антигенных детерминант с использованием моноклональных антител и введения α -NH₂-концевой метки в полипептидные цепи // *Биоорг. химия.*—1986.—12, № 3.—С. 316—325.
5. Триптофанил-тРНК-синтетазы эукариот, прокариот и архебактерий имеют общую антигенную детерминанту / Т. А. Заргарова, С. Ф. Берестень, О. О. Фаворова, Л. Л. Киселев // *Докл. АН СССР.*—1985.—285, № 6.—С. 1484—1487.
6. Means G. E., Frency R. E. Acylating and similar reagents // *Chemical modification of proteins.*—San Francisco et al.: Holden Day, Inc., 1971.—P. 68—104.
7. Limited proteolysis of the tryptophanyl-tRNA synthetase / V. S. Prassolov, O. O. Favorova, G. V. Margulis, L. L. Kisselev // *Biochim. et biophys. acta.*—1975.—378, N 1.—P. 92—106.
8. Smyth D. G. Techniques in enzymic hydrolysis // *Meth. Enzymol.*—1967.—11.—P. 214—231.
9. Mutual conformational changes of tryptophanyl-tRNA synthetase and tRNA^{Trp} in the course of their specific interaction / S. F. Beresten, V. Sh. Scheinker, O. O. Favorova, L. L. Kisselev // *Eur. J. Biochem.*—1983.—136, N 2.—P. 559—570.
10. Gross E. The cyanogen bromide reaction // *Meth. Enzymol.*—1967.—11.—P. 238—255.
11. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами.—М.: Наука, 1983.—304 с.
12. Bolton A. E. Radioiodination techniques: Review 18 / *The Radiochemical Center.*—London: Amersham, 1977.—P. 70.
13. The subunit structure of tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase from beef pancreas / C. Gros, G. Lemaire, R. van Rapenbusch, B. Labouesse // *J. Biol. Chem.*—1972.—247, N 9.—P. 2931—2942.
14. The effect of tRNA and tryptophanyl adenylate on limited proteolysis of beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase / V. Sh. Scheinker, S. F. Beresten, S. Kh. Degtyarev, L. L. Kisselev // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7, N 3.—P. 625—637.
15. Kimura K., Mason T. L., Khorana H. G. Immunological probes for bacteriorhodopsin // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 9.—P. 2859—2867.
16. Простой метод локализации антигенных детерминант в белках с известной первичной структурой / М. А. Грачев, С. М. Зеленин, П. П. Лактионов, В. В. Рошке // *Биоорг. химия.*—1986.—12, № 1.—С. 81—88.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 01.08.86