

# МЕТОДИ

УДК 577.112:571.27

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ЕПІТОПНОГО КАРТУВАННЯ АНТИГЕНІВ ПРОТЕЇНОВОЇ ПРИРОДИ

О. Ю. ГАЛКІН

*Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»;  
e-mail: alexfbt@mail.ua*

*Проведено порівняльний аналіз експериментальних підходів до вивчення антигенної структури протеїнів. Переважна більшість відомих методів базується на імунохімічному дослідженні взаємодії молекул протеїнів чи пептидів зі специфічними антитілами. У найефективніших і застосовуваних методах використовують синтетичні та генно-інженерні пептиди. За останні 30 років ці методи пройшли помітний еволюційний шлях, дійшовши до максимальної автоматизації та виявлення антигенних детермінант різного типу (лінійні, конформаційні епітопи та мімотопи). Більшість алгоритмів із пошуку епітопів інтегровано у комп'ютерні програми, що значно полегшує аналіз великих масивів експериментальних даних та дозволяє формувати просторові моделі. Для вирішення прикладних завдань можна використовувати менш трудомісткий метод порівняльного епітопного картування, який базується на аналізі профілів конкуренції різних антитіл під час їх взаємодії з антигеном. До фізичних методів дослідження антигенної будови протеїнів належать рентгеноструктурний аналіз комплексів антиген–антитіло, який можна застосовувати лише для протеїнів, що кристалізуються, та ядерний магнітний резонанс.*

*Ключові слова: епітопне картування, антигенна детермінанта, синтетичні пептиди, фаговий дисплей, сайт-спрямований мутагенез.*

Клітини імунної системи характеризуються здатністю розпізнавати та елімінувати з організму будь-який матеріал, що несе в собі ознаки чужорідності [1]. Реалізація таких функцій імунокомпетентними клітинами здійснюється за рахунок спеціальних рецепторних структур, які розпізнають чужі клітини та тканини різного походження, віруси, біомолекули та їх окремі частини, а також власні морфологічно аномальні структури. Субстанції, які здатні зв'язувати антигенрозпізнавальні рецептори імунокомпетентних клітин, називають антигенами (АГ). Відомо, що антигенність визначається не тільки внутрішніми властивостями самого антигену, але й здатністю його розпізнавання (ідентифікації як антигену) клітинами імунної системи організму-хазяїна [2]. Саме тому існує інше, функціонально відмінне, поняття – імуноген, яке адресоване до агентів, що зумовлюють імунні реакції макроорганізму, зокрема: формування гу-

морального (синтез антитіл) та клітинного імунітету, підвищена чутливість, імунна пам'ять та імунологічна толерантність [3].

Антигенами є віруси, бактерії, гриби, найпростіші, клітини й тканини, що потрапили в організм унаслідок інфекції, ін'єкції або трансплантації, а також клітинні стінки, цитоплазматичні мембрани, рибосоми, мітохондрії, окремі біополімери, що входять до їх складу, мікробні токсини, екстракти гельмінтів, отрути змій та комах, природні протеїни, деякі полісахариди мікробного походження, рослинні токсини тощо [3].

Рецептори імунокомпетентних клітин (В-та Т-лімфоцитів) не розпізнають весь АГ. Вони здатні безпосередньо взаємодіяти лише з його окремим фрагментом, який називають епітопом (для В-лімфоцитів) або імуногенним пептидом (для Т-лімфоцитів) [2]. За таким механізмом В-лімфоцити та антитіла (імуноглобуліни) розпізнають нативний АГ у фізіологічному

середовищі макроорганізму. Тому специфічні ділянки антигену, з якими реагують антитіла чи імуноглобулінові рецептори В-лімфоцитів ще називають В-епітопами. У той же час Т-лімфоцити розпізнають попередньо процесингований антиген, який втратив нативну форму. Частилки АГ, що утворилися внаслідок процесингу (Т-епітопи), потрапляють на поверхню антигенпрезентувальних клітин та разом з молекулами головного комплексу гістосумісності взаємодіють з Т-лімфоцитами, що забезпечує реалізацію іншої ланки імунітету – клітинних реакцій [4].

Раніше вважалося, що кожен антигенрозпізнавальний рецептор здатен взаємодіяти тільки з одним епітопом (принцип «один рецептор – один епітоп»). Саме з цією властивістю пов'язували специфічність імунної відповіді. Згідно з останніми даними кожний антигенрозпізнавальний рецептор може взаємодіяти з кількома епітопами, які мають певні структурні відмінності. У той же час принцип специфічності імунного розпізнавання не втратив свого змісту, адже має значення не сам факт зв'язування епітопу, а сила взаємодії між рецептором та антигенною детермінантою (епітопом), що визначається компліментарністю взаємодії цих молекул [2].

Вивчення епітопної структури (епітопне картування) антигенів є важливим у контексті як фундаментальних, так й прикладних досліджень у біології та в медицині. Ідентифікація та характеристика антигенних детермінант (АД) дозволяє розширювати фундаментальні знання щодо структури та функцій протеїнів-антигенів, закономірностей формування специфічного гуморального імунітету та молекулярних механізмів розвитку різноманітних патологічних станів [5–8]. Відповідні фундаментальні знання дають змогу вирішувати низку завдань прикладного характеру: проводити удосконалення вже існуючих та розробляти нові, ефективніші, вакцинні препарати [8, 9]; підвищувати чутливість та специфічність методів та засобів для діагностики *in vitro* [10, 11]; покращувати профілі безпечності фармацевтичних препаратів, у т.ч. за рахунок зменшення їх алергенності, а також створювати нові та ефективні лікарські засоби для терапії різноманітних захворювань [12, 13].

Мета роботи – аналіз та порівняльна характеристика експериментальних підходів до епітопного картування антигенів протеїнової природи.

### **Загальна характеристика експериментальних методів епітопного картування протеїнів**

Ця група експериментальних методів адресується до імунохімічного вивчення взаємодії фрагментів антигенів зі специфічними антитілами. Головною відмінністю одного підходу від іншого є технологія одержання фрагментів антигенів. Історично першими розроблялися методи, які базувалися на розщепленні фрагментів антигенів за дії хімічних речовин чи ензимів. На сьогодні більш поширеними методами є ті, що базуються на взаємодії синтетичних пептидів або поліпептидів генно-інженерного походження зі специфічними антитілами. Окрему групу експериментальних методів становлять рентгеноструктурні дослідження комплексу антиген–антитіло, а також ядерний магнітний резонанс (ЯМР).

### **Рентгенографічний аналіз антигенної структури протеїнів**

Рентгеноструктурний аналіз комплексів антиген–антитіло – найефективніший метод вивчення АД, оскільки дозволяє точно та наочно визначити амінокислотні залишки (а.з.), які беруть участь у зв'язуванні антигену з антитілом. Кристалографічні дослідження комплексів антиген–антитіло дозволяють порівнювати дані щодо передбачення епітопів, одержані іншими непрямими методами [14]. До особливості цього методу, яка звужує його застосування, слід віднести необхідність попереднього отримання кристалів протеїнів і протеїнових комплексів.

### **ЯМР-аналіз антигенної будови протеїнів**

За останні 15 років зроблено серйозний прорив у застосуванні ЯМР для вивчення структури біомолекул. Про це свідчать Нобелівські премії 2002 року з хімії, які було присуджено за розвиток методів ЯМР-спектроскопії для дослідження тривимірної структури біологічних макромолекул у розчині (Курт Вютріх, Швейцарія) та 2003 року із фізіології та медицини за відкриття в області візуалізації біооб'єктів (Пол Лотербур,

США та Пітер Менсфілд, Велика Британія). Головним завданням цього напрямку досліджень є отримання тривимірної структури протеїну з високою роздільною здатністю, подібною до зображення у рентгенівській кристалографії. Через більшу кількість атомів у протеїновій молекулі (порівняно з простою органічною сполукою), базовий 1D спектр переповнений сигналами, що перекриваються і тому прямий аналіз спектра стає неможливим. На цій підставі розроблено низку багатовимірних технік. Для покращення результатів таких експериментів застосовують метод мічених атомів, використовуючи  $^{13}\text{C}$  або  $^{15}\text{N}$ , що дозволяє отримати 3D-спектр протеїну. Останнім часом набувають поширення також методики одержання 4D-спектрів та спектрів більшої розмірності [15, 16].

#### Епітопне картування з використанням гідролізованих фрагментів антигенів

Перші роботи, що передбачали даний методологічний підхід, проводилися із використанням фрагментації АГ хімічним протеолізом [17, 18], пізніше почали використовувати ензиматичне розщеплення протеїнів [19–21]. Загальна методологія такого епітопного картування

передбачає (рис. 1): 1) розщеплення протеїну за допомогою хімічного агента чи ензиму; 2) розділення отриманих пептидів за допомогою хроматографічних методів; 3) ідентифікація пептидів імунохімічними (радіоімунний, імуноензиматичний аналіз, імуноблотинг тощо) або фізичними (мас-спектрометрія) методами; 4) кон'югацію пептидів із полімерним носієм та дослідження імуногенних властивостей. Підтвердження біологічної функції ідентифікованих епітопів антигенів інфекційного походження проводять шляхом імунізації ними у комплексі із неімуногенним носієм тварин та дослідження протективної дії відповідних специфічних антитіл [22]. За описаною вище методикою було досліджено антигенну структуру міоглобіну, цитохрому *c*, соматотропну та багатьох інших [23–25].

#### Епітопне картування з використанням синтетичних пептидів

Доволі поширеним є методологічний підхід до епітопного картування з використанням синтетичних пептидів, що перекриваються і охоплюють всю амінокислотну послідовність досліджуваного протеїну або певну його частину

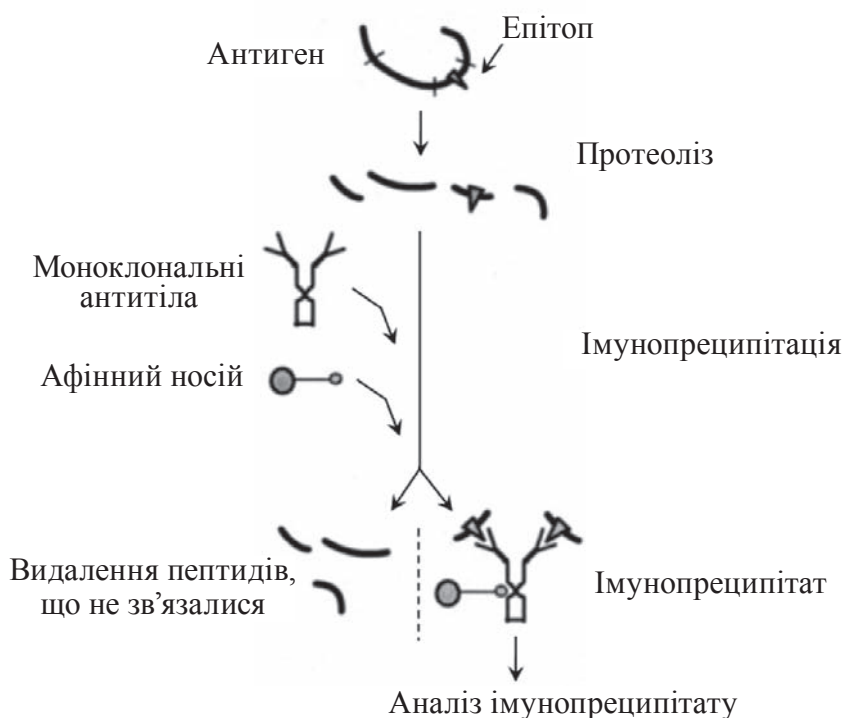


Рис. 1. Принцип епітопного картування на основі імунохімічного вивчення гідролізованих фрагментів антигенів [20]

[23, 26]. Цей підхід базується на біоорганічному синтезі пептидів на основі спеціальної смоли-матриці [27]. Загальна стратегія методу адресована до імітації конформаційного або лінійного епітопа шляхом використання синтетичного пептиду, хімічно зв'язаного із полімерним носієм. Даний підхід дає можливість відтворити конформаційні епітопи, що перериваються, та ті, в яких амінокислоти є «поворотами» складчастої структури, та виступають на поверхні й, відповідно, експонуються для розпізнавання антитілами чи імуноглобуліновими рецепторами [4].

Слід зазначити, що упродовж останніх 30 років поступово відбулася оптимізація техніки епітопного картування за допомогою синтетичних пептидів. На перших етапах дослідники проводили рутинний синтез пептидів, які отримували у вільному стані та тестували різними імунохімічними методами. У 1987 році було зроблено серйозний крок до оптимізації та автоматизації процедури завдяки методу твердофазного синтезу пептидів та їх тестування (Pepscan technology, Multiple pin peptide scanning) (рис. 2) [28]. За цим методом синтез пептидів проводять на спеціальних полімерних голках (пінах), які знаходяться в матрицях планшетів із 96 лунками (8×12), що дає можливість просто й ефективно синтезувати та тестувати велику кількість пептидів за допомогою імуноензиматичного аналізу (ІЕА).

Ще однією модифікацією синтезу та тестування пептидів є так звана SPOT-технологія з використанням спеціальної целюлозної мембрани як матриці для синтезу із густиною до 20 а.з. на 1 см<sup>2</sup> [29].

Важливим етапом епітопного картування за допомогою синтетичних пептидів є, власне, вибір пептидів. По-перше, можна обирати рамку певної довжини (із певною кількістю а.з.), що пересувається по поліпептидному ланцюгу із кроком певної довжини. У даному разі доцільно синтезувати пептиди, що перекриваються, та охоплювати всю послідовність протеїну. По-друге, можна задавати заміну амінокислотних залишків у певній позиції пептиду, що синтезується. Це дозволяє встановлювати роль певних а.з. у взаємодії антиген–антитіло. По-третє, на підставі вже існуючих даних можливо синтезувати пептиди за іншими правилами чи алгоритмами. Наведемо декілька прикладів за-

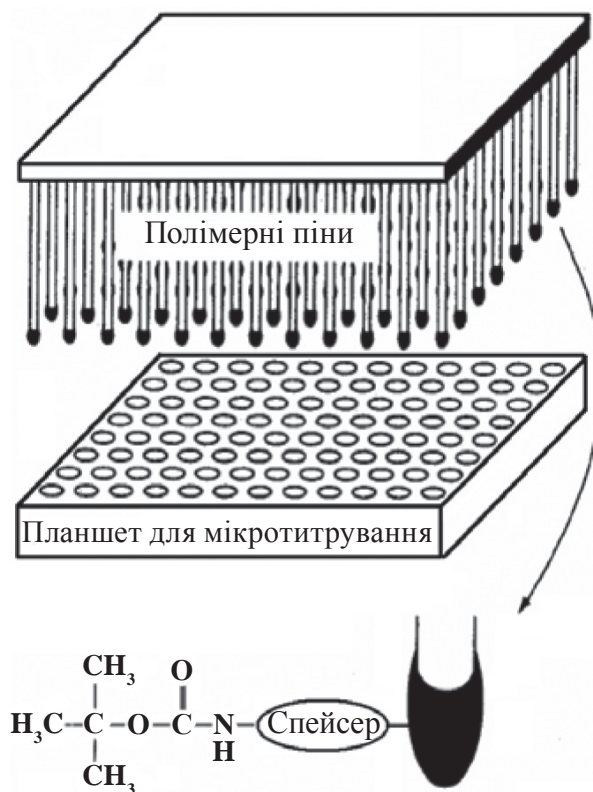


Рис. 2. Принцип синтезу пептидів на полімерних пінах та тестування у мікропланшетах [28]

стосування різних варіантів вибору пептидів на практиці.

У так званому методі «вікна» використовують набір синтетичних пептидів, що відтворюють досліджувану амінокислотну послідовність, проте мають різну довжину. Такий набір пептидів дозволяє визначити мінімальну ділянку («вікно»), яка забезпечує максимальне зв'язування антигену [30]. Існують також підходи із заміщенням амінокислот, зокрема названі Domain scan та Matrix scan, які дозволяють встановлювати конформаційні епітопи [31]. Підхід Domain scan має два варіанти (рис. 3). У випадку O-O формату низка пептидів, що перекриваються, містять цистеїн на C-кінці (n-членні пептиди) й хімічно зв'язані з іншим набором пептидів, що перекриваються (m-членні пептиди), які містять BrCH<sub>2</sub>CO на N-кінці. Таким способом створюють конструкції пептидів типу (n+m): пептид-C-S-CH<sub>2</sub>CO-пептид-поверхня. У випадку C-O формату низка BrCH<sub>2</sub>CO-пептидів, що перекриваються, зв'язані з полімерною поверхнею, з'єднується з тим самим пептидом-SH (константний пептид). Проведен-

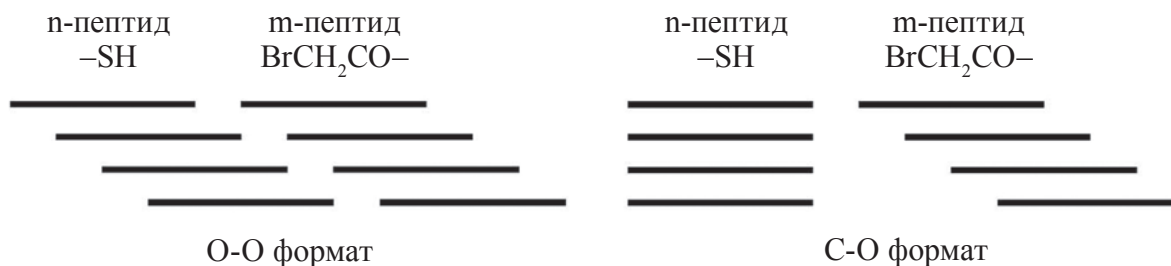


Рис. 3. Схематичне зображення методу Domain scan

ня експериментів за таким сценарієм доцільне у разі, коли є підстави вважати, що константний пептид бере участь у формуванні епітопа зв'язування моноклонального антитіла (мАт) – тоді хімічний зв'язок між пептидами дозволяє ідентифікувати додаткові а.з., що також беруть участь у формуванні конформаційного епітопа. Отже методом Domain scan можна дослідити вагому частину всіх можливих комбінацій пептидів, що перекриваються. У рамках методу Matrix scan низка BrCH<sub>2</sub>CO-пептидів, що перекриваються та хімічно зв'язані з полімерною поверхнею, з'єднана з іншими пептидами того ж набору, що дозволяє підвищити кількість різних комбінацій пептидів [14, 31].

Деякі інші підходи використовують для виявлення так званих мімотопів – антигенних детермінант, що перериваються, тобто утворених віддаленими один від одного амінокислотними залишками (рис. 4). Для дослідження мімотопа необхідне конструювання лінійного пептиду з амінокислотними залишками з віддалених безперервних епітопів, що розпізнаються антитілами. Розвиток технології мімотопів привів до створення так званих пептидних бібліотек, що передбачає одночасний твердофазний синтез від сотень до мільйонів різних пептидів з випадковою послідовністю, заданих а.з. Ці залишки під час розпізнавання антитілами дозволяють виявити конформаційний епітоп. На сьогодні існує декілька технологій створення синтетичних пептидних бібліотек. Усі вони мають загальний принцип – за допомогою комбінаторики задається число різних сполучень амінокислот і проводиться твердофазний синтез [14,32].

Так, технологія CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) дозволяє досліджувати саме переривчасті епітопи [33]. Наголосимо,

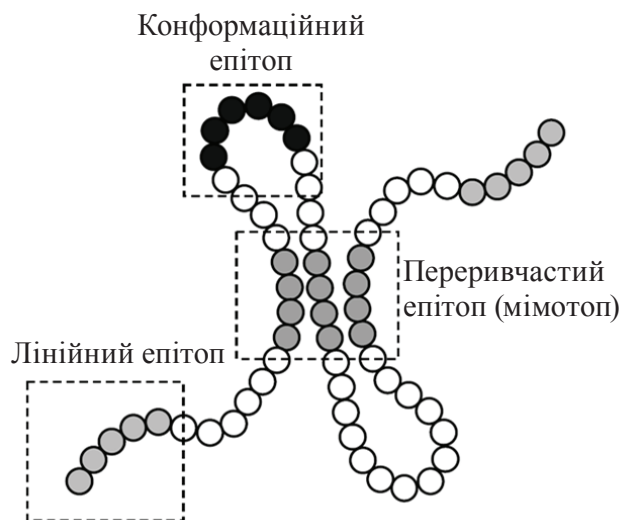


Рис. 4. Відмінність мімотопа від лінійних та конформаційних епітопів [33]

що маленькі та середньорозмірні пептиди (20–30 а.з.) є просторово гнучкими та не мають чітко визначеної структури у розчині, що може суттєво обмежувати їх придатність з позицій протеїнової мімікрії. CLIPS технологія дозволяє «заморожувати» двовимірну та тривимірну структуру невеликих пептидів шляхом циклізації лінійних пептидів за допомогою хімічних «фіксаторів», які забезпечують 2–4 точки фіксації пептиду (рис. 5).

Слід зазначити, що методи епітопного картування з використанням синтетичних пептидів набули чималої популярності. Розробка та патентування нових модифікацій методу підтверджує його актуальність й на сьогоднішній день. Із використанням синтетичних пептидів було досліджено антигенну будову цитохрому c [34], пероксидази хрому [35], лізоциму [36], міоглобіну [23], сироваткового альбуміну [37] тощо.

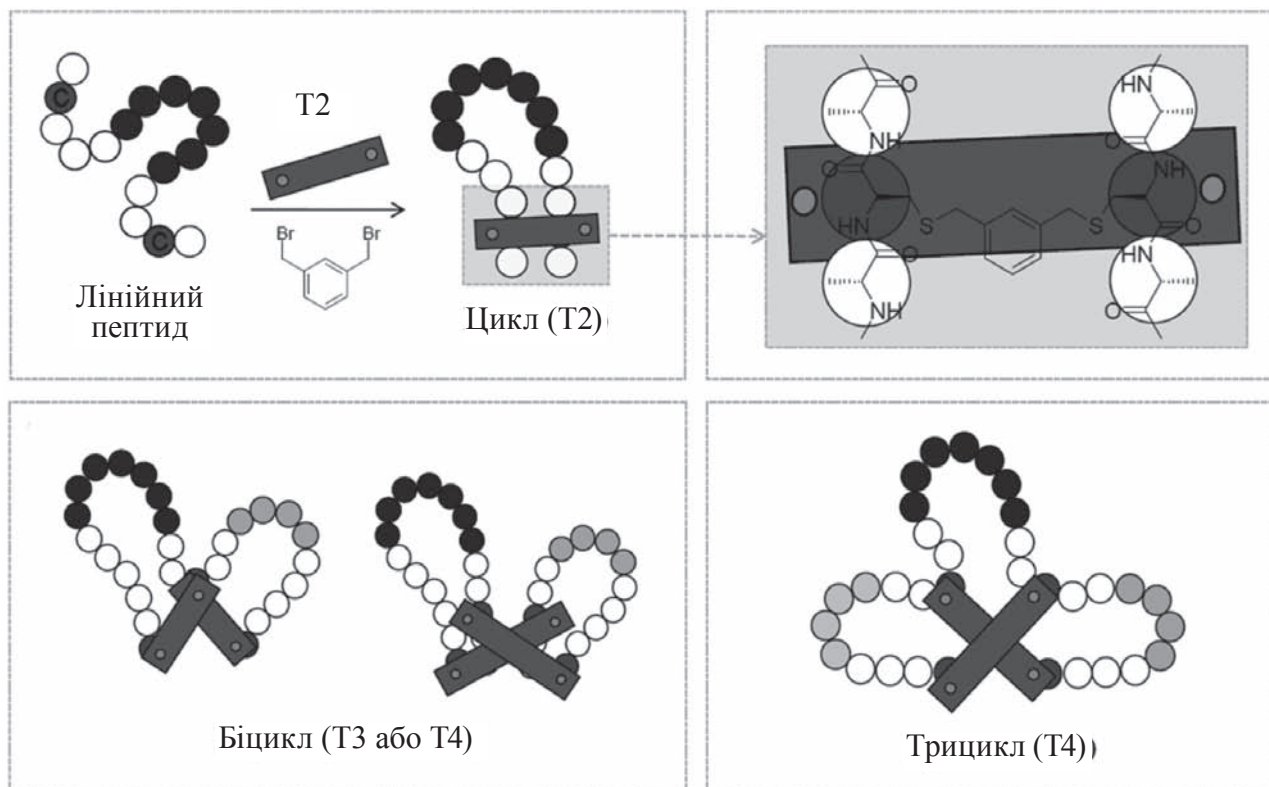


Рис. 5. Принцип «фіксації» пептидів за технологією CLIPS [33]

### Епітопне картування з використанням пептидів (протеїнів) генно-інженерного походження

Ця група методів використовується для створення генно-інженерних пептидів, з наступним їх вивченням як потенційних АД. Методичні варіації пов'язані із характером синтезованих пептидів. Такі пептиди (6–30 а.з.) можуть повністю відтворювати певні ділянки поліпептидного ланцюга досліджуваної протеїнової молекули, містити спеціально індуковані заміни а.з. чи, навіть, мати випадковий амінокислотний склад. Всі ці методи базуються на технології протеїнової інженерії та передбачають створення бібліотеки кДНК з урахуванням первинної амінокислотної послідовності протеїну, антигенна будова якого досліджується. Процес передбачає виділення мРНК та її зворотну транскрипцію у дволанцюгову кДНК, яка включає ДНК, що кодує досліджуваний фрагмент протеїну. На наступному етапі проводять біосинтез фрагментів протеїну за допомогою спеціальних систем експресії. На фінальному етапі відбувається

візуалізація фрагментів протеїну за допомогою різноманітних методів [4].

**Фаговий дисплей.** Метод був вперше описаний у 1985 р. [38]. У цьому методі використовують ниткоподібні фаги, на поверхні яких експресуються химерні протеїни, що містять амінокислотні послідовності – потенційні АД. Метод, який ще називають методом фагових бібліотек, вимагає вбудовування ділянки ДНК, що кодує досліджуваний пептид або протеїн у ДНК фагової частинки. Фагові бібліотеки можуть бути сконструйовані з використанням векторів на основі природної фагової послідовності або гібридів фагових та плазмідних векторів [14]. Вони являють собою суміш ниткоподібних фагів, які експресують у складі свого поверхневого протеїну в імунохімічно доступному вигляді будь-які можливі амінокислотні послідовності певного розміру. Відбір фагів відбувається шляхом їх специфічної взаємодії з досліджуваним антитілом, а далі проводиться секвенування вбудов у геноми відібраних фагових клонів, що дає інформацію про структуру епітопу, який розпізнається відповідним антитілом. До найпоширеніших фагових

конструкції належать фагові бібліотеки випадкового складу. Такі бібліотеки є надзвичайно різноманітними, оскільки варіювати може як довжина пептиду, так і його склад. Існують також й бібліотеки, що відображають всю молекулу, частину протеїну чи його домен [30]. Також чимало прикладів використання фагового дисплею для встановлення антигенної будови протеїнів різного походження, наприклад:  $\alpha_2$ -макроглобулін [39], PDZ-домени різних адаптерних протеїнів [40], вірусні протеїни (нуклеокапсидний протеїн вірусу свинячого репродуктивного та респіраторного синдрому [41], капсидний протеїн вірусу катаральної лихоманки овець [42], глікопротеїн вірусу класичної свинячої лихоманки [43]), протеїни-антигени патогенних мікроорганізмів (гемофільної палички Пфейффера *Haemophilus influenzae*, збудника м'якого шанкру *Haemophilus ducreyi*, одного з етіологічних агентів парадонтиту *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, збудник пастерельозу *Pasteurella multocida* [44], ентомопатогенний мікроскопічний гриб *Beauveria bassiana* [45]).

**Бактерійний дисплей.** Цей підхід є аналогічним до фагового дисплею. Він передбачає експресію пептидних фрагментів, що є передбачуваними АД, на поверхні бактерійних клітин. Один із варіантів реалізації даного принципу зображено на рис. 6. ДНК, що кодує досліджуваний протеїн-антиген, ампліфікується за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та фрагментується за допомогою ультразвуку до розмірів у 50–150 нуклеотидів, після чого одержані фрагменти ДНК клонуються у бактеріальний вектор (разом із послідовністю, що кодує альбумінзв'язувальний протеїн), яким клітини *Staphylococcus carnosus* трансформуються шляхом електропорації. Таким чином, фрагменти антигену є «зшитими» із альбумінзв'язувальним протеїном, що відіграє роль молекулярного спейсера між клітинною стінкою та досліджуваним пептидом, а також є важливим для подальшого сортування клітин у проточній цитофлуориметрії [46, 47]. Синтезовані та експресовані на поверхні *S. carnosus* пептиди на наступному етапі взаємодіють із міченими антитілами та людсь-

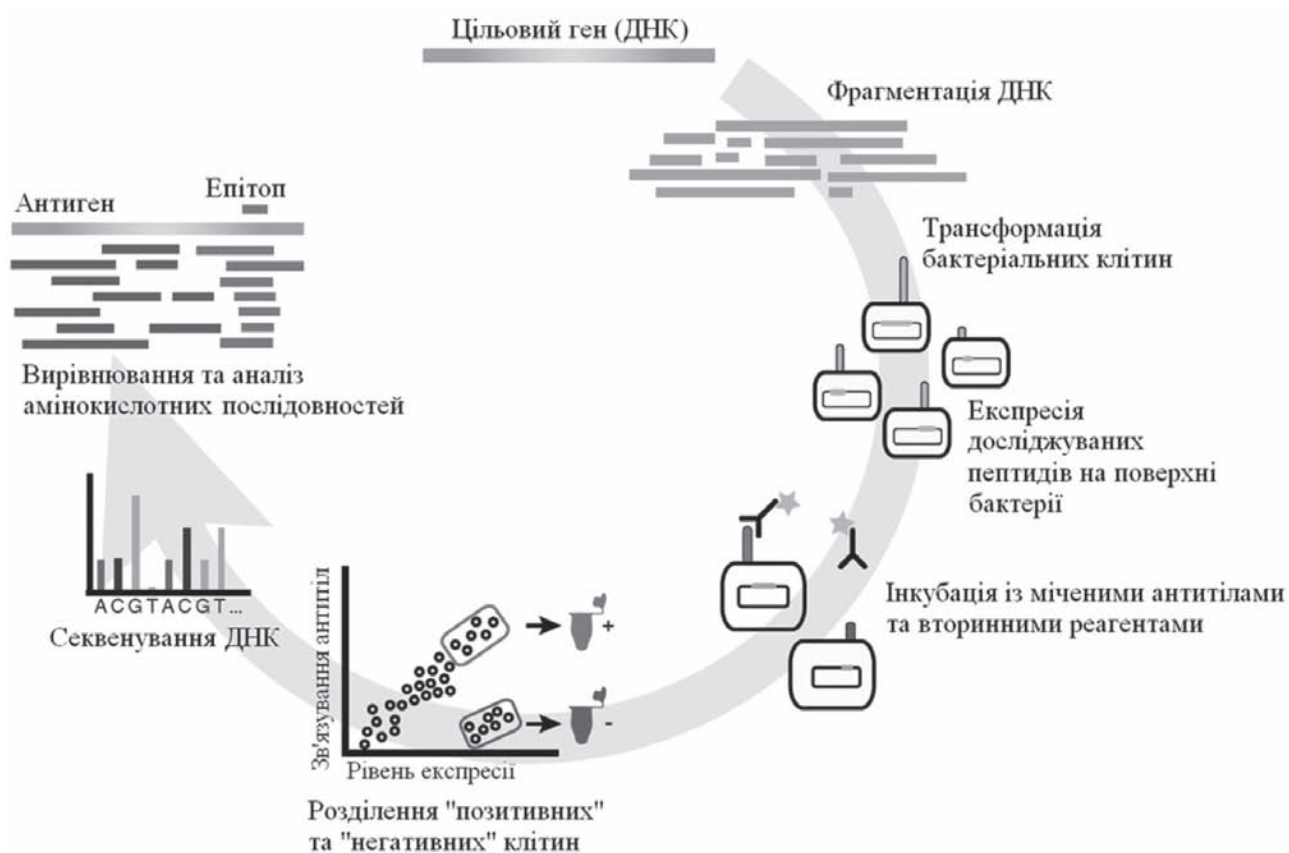


Рис. 6. Принцип епітопного картування із використанням бактеріального дисплею [47]

ким сироватковим альбуміном і сортуються у проточному цитофлуорометрі з подальшим секвенуванням. Людський сироватковий альбумін із флуоресцентною міткою дозволяє проводити відбір різних епітопів та відокремлювати пептиди, що не зв'язалися з антитілами [48]. Цей підхід було використано, наприклад, під час дослідження антигенної будови людського рецептора епідермального фактора росту 2 (HER2), протеїну ефрин-В3 та фактора транскрипції SATB2 [48], а також корового протеїну вірусу гепатиту С [49].

*Сайт-спрямований мутагенез* передбачає внесення *in vitro* мутації в конкретну ділянку клонованої нуклеотидної послідовності ДНК за допомогою мутантних олігонуклеотидів. Так, шляхом мутації в конкретному сайті клонованої послідовності ДНК і спрямованої заміни амінокислотного залишку можна отримувати протеїни зі зміненими властивостями. Суть методу полягає в наступному [50, 51]: спочатку мутагенізовану нуклеотидну послідовність переводять в однопіпетидну форму (наприклад, у складі вектора на основі ДНК фага М13) і синтезують комплементарний ланцюг, використовуючи як затравку для ДНК-полімерази олігонуклеотид, що містить необхідну мутацію. Після трансформації бактеріальних клітин створеним гетеродуплексом і першого раунду реплікації утворюються мутантна і нормальна форми ДНК, які потім розділяють. Цей підхід був розроблений колективом авторів під керівництвом Майкла Сміта [52] та удостоєний Нобелівської премії з хімії 1993 р. Заміна у гені потрібного протеїну в плазміді здійснюється шляхом заміни в потрібному кодоні комплементарного праймера: наприклад, TCC (Ser) → GCC (Ala). Далі полімераза без 3'→5'-екзонуклеазної активності подовжує цей праймер та ДНК-лігаза відновлює цілісність ланцюга. Модифікований

протеїн експресується й піддається необхідним процедурам аналізу (рис. 7). Визначення амінокислотних залишків, що формують АД, проводять шляхом оцінювання характеру зв'язування моноклональних антитіл до досліджуваного протеїну з отриманими мутантами [14].

Серед найпоширених результатів скерованого мутагенезу слід виділити зміну заряду ділянки поліпептидного ланцюга (глутамат замінюють на глутамін чи використовують так званий аланінскануючий мутагенез зі зміною заряджених а.з. на нейтральну амінокислоту аланін) або змінюють довжину бокового ланцюга (заміна серину на лізин). Іноді застосовують комбінацію цих варіантів: наприклад, у разі заміни серину на лізин [14]. Для ілюстрації можливостей сайт-спрямованого мутагенезу детальніше розглянемо варіант аланінскануючого мутагенезу. Введення залишку аланіну до поліпептидних ланцюгів не змінює їх загальної конформації, як, наприклад, через заміну на гліцин або пролін, і не супроводжується електростатичними або стеричними ефектами. Аланін часто зустрічається як у внутрішніх, так і в зовнішніх ділянках поліпептидних ланцюгів. Для різних амінокислотних залишків існують різні причини заміни на аланін: зміна заряду (лізин, аргінін, аспартам, глутамін), поворот ланцюга (гліцин, пролін), зміна об'єму (триптофан, фенілаланін) чи утворення водневих зв'язків (серин, триптофан, тирозин, цистеїн). Окрім епітопного картування цей підхід застосовують для локалізації амінокислот, що утворюють активний центр ензимів, для дослідження ділянок поліпептидних ланцюгів, важливих для взаємодії протеїнів з іншими макромолекулами та низькомолекулярними лігандами, а також для вивчення структурних і функціональних особливостей протеїнів [53].

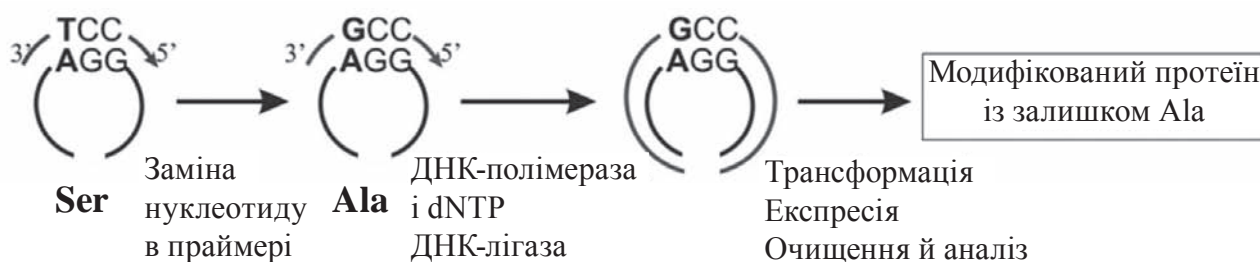


Рис. 7. Принцип одержання спрямованої мутації та амінокислотної заміни у досліджуваному протеїні



Сайт-спрямований мутагенез знайшов широке застосування у разі досліджень антигенної будови протеїнів. У роботі [54] досліджували епітопи, з якими зв'язуються мАт до бичачого  $\beta$ -лактоглобуліну типу А; інша група дослідників [55] визначала АД фосфовмісного цитоплазматичного протеїну НPr; вивчення епітопів *Mycobacterium leprae* стало передумовою розробки відповідного вакцинного препарату [56].

*Епітопне картування рекомбінантних протеїнів із tag-міткою.* У літературі [57, 58] описано доволі цікавий та зручний прийом для встановлення епітопної специфічності рекомбінантних протеїнів, що мають tag-мітку, який передбачає: 1) ензиматичне розщеплення рекомбінантного протеїну; 2) виділення продуктів гідролізу різної довжини, що мають tag-мітку, за допомогою афінної хроматографії; 3) розділення отриманих після розщеплення пептидів різної довжини за їх молекулярними масами, наприклад, за допомогою електрофоретичного методу; 4) імунохімічний аналіз tag-мічених пептидів. У разі відомої специфічності гідролізої активності використовуваних ензимів та первинній послідовності рекомбінантного протеїну відомими є й послідовності та молекулярні маси гідролізованих фрагментів протеїну. Подальше дослідження цих ензиматично фрагментованих tag-мічених пептидів за допомогою різноманітних імунохімічних методів дає інформацію щодо локалізації антигенних детермінант у рекомбінантному протеїні.

#### **Встановлення відносної епітопної специфічності антитіл**

Порівняльне епітопне картування можна проводити з використанням конкурентного ІЕА. Метод передбачає використання мАт до досліджуваного антигену та їхніх імуноензиматичних кон'югатів. Результати конкуруючого ефекту розраховуються як відсоток зниження активності кон'югату мАт у присутності конкуруючого антитіла. У такому варіанті постановки конкурентного ІЕА повне (75–100%) або часткове (25–75%) зниження активності є показником повної або часткової подібності епітопної специфічності досліджуваних мАт. Натомість порівняно (0–25%) із контрольною активність кон'югату

мАт вказує на різну із конкуруючим антитілом епітопну специфічність [59]. Для полегшення аналізу великого масиву даних під час порівняння профілей конкуренції використовують кореляційний аналіз за Браве-Пірсоном. За цією методикою, наприклад, проведено порівняльне вивчення епітопної специфічності мАт до фактора некрозу пухлин людини [60] та IgM людини [61]. Отримані дані мають важливе прикладне значення: порівняльна епітопна характеристика панелі мАт дозволяє використовувати останні для створення високочутливих методів імунохімічного аналізу [62].

#### **Порівняння експериментальних методів епітопного картування**

Перш за все, хотілося б зупинитися на проблемі термінології та класифікації антигенних детермінант. Як відомо, взаємодія антиген–антитіло відбувається за умов комплементарності паратопу антитіла та епітопу антигену. Реалізація принципу комплементарності для епітопів різного типу (В- та Т-епітопи) має відмінності. У разі В-епітопів, що розпізнаються імуноглобуліновими рецепторами В-лімфоцитів, вирішальну роль відіграє їх просторова доступність для молекули рецептора: такі антигенні детермінанти мають знаходитися на поверхні протеїнової молекули [3, 4]. Отже, В-епітопи можуть бути як конформаційними, так і лінійними. Т-клітинні епітопи становлять собою лінійну послідовність амінокислотних залишків, що є частиною молекули антигену, і включають більше число а.з. у порівнянні з В-клітинними. Вважається, що для їх розпізнавання збереження просторової конфігурації не є обов'язковим [4]. На нашу думку, така термінологія є доволі умовною, адже конформаційні характеристики є важливими для взаємодії з імуноглобулінами у будь-якому випадку. На користь цієї тези говорить й існування мімотопів та доволі ефективна CLIPS-технологія пошуку епітопів, що передбачає просторову «фіксацію» синтетичних пептидів. Вважаємо, що коректніше визначати В-епітопи як ділянки амінокислотної послідовності, що здатні зв'язуватися із антитілами, отриманими до цілої протеїнової молекули або індукувати синтез специфічних до даного протеїну антитіл.

Як вже зазначалося, рентгеноструктурний аналіз комплексу антиген–антитіло є

найточнішим та наочним методом встановлення антигенної структури протеїнів. Разом із тим цей підхід можна застосовувати тільки для протеїнів, що кристалізуються, а також для високоафінних мАт, що здатні залишатися зв'язаними із кристалом. Ці обставини можуть істотно обмежувати застосування кристалографії на практиці. Згаданого недоліку позбавлений підхід до вивчення антигенної будови протеїнів за допомогою ЯМР.

Гідроліз протеїнів-антигенів із наступним імунохімічним вивченням одержаних фрагментів характеризується відносною простотою апаратурного забезпечення, проте має низку недоліків та обмежень: по-перше, існує ймовірність розщеплення поліпептидного ланцюга у місці антигенної детермінанти; по-друге, метод дає можливість віднаходження тільки епітопів, що не перериваються; по-третє, існує певна обмеженість щодо виявлення Т-епітопів, адже не завжди є можливість провести повний гідроліз у середині глобулярного протеїну. Зазначені недоліки помітно зменшують загальну точність методу.

Два найбільш розроблені та популярні на сьогодні методи із застосуванням синтетичних та генно-інженерних пептидів не мають згаданих вище недоліків. Різні модифікації базових методів у поєднанні із комп'ютерною обробкою експериментальних даних дозволяють швидко та повно визначати епітопи різних типів, ефективно вирішуючи як фундаментальні, так й прикладні завдання.

Епітопне картування рекомбінантних протеїнів із tag-міткою може вирішуватися у більш простий з методологічної точки зору спосіб за використання таких методів: ензиматичний гідроліз протеїнів, афінна хроматографія та імунохімічний аналіз продуктів гідролізу. Одержані результати не потребують складних підходів до їх інтерпретації, що є беззаперечною перевагою.

Порівняльне епітопне картування, що базується на конкуренції різних мАт, отриманих до одного й того ж антигену, не дозволяє встановити абсолютну локалізацію антигенної детермінанти – проте дає можливість встановити кількість імунодомінантних регіонів та/або епітопів, а також їх віддаленість один від одного.

Така інформація є вкрай важливою під час проведення прикладних розробок в імунобіотехнології, зокрема, вона дозволяє

суттєво підвищувати специфічність та чутливість імунохімічних методів аналізу. Розуміння закономірностей гуморальної імунної відповіді на молекулярному рівні дозволяє проводити ефективну диференціальну діагностику інфекційних, автоімунних, ендокринних та онкологічних захворювань, а також прогнозувати розвиток патологічного стану пацієнта. Останнє має безпосереднє значення для розробки відповідної тактики та стратегії лікування.

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ЭПИТОПНОГО КАРТИРОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ПРОТЕИНОВОЙ ПРИРОДЫ**

*А. Ю. Галкин*

Национальный технический университет Украины  
«Киевский политехнический институт»;  
e-mail: alexfbt@mail.ru

Проведен сравнительный анализ экспериментальных методов изучения антигенной структуры протеинов. Подавляющее большинство известных методов основано на иммунохимическом изучении взаимодействия молекул протеинов или пептидов со специфичными антителами. В наиболее эффективных и широко применяемых методах используют синтетические и генно-инженерные пептиды. За последние 30 лет эти методы прошли заметный эволюционный путь, дойдя до максимальной автоматизации и выявления антигенных детерминант различного типа (линейные, конформационные эпитопы и мимотопы). Большинство алгоритмов по поиску эпитопов интегрировано в компьютерные программы, что значительно облегчает анализ больших массивов экспериментальных данных и позволяет формировать пространственные модели. Для решения прикладных задач можно использовать менее трудоемкий метод сравнительного эпитопного картирования, основанный на анализе профилей конкуренции различных антител при их взаимодействии с антигеном. К физическим методам исследования антигенной структуры протеинов относится рентгеноструктурный анализ комплексов антиген-антитело, который можно применять лишь для кристаллизирующихся протеинов, и ядерный магнитный резонанс.

**Ключевые слова:** эпитопное картирование, антигенная детерминанта, синтетические пептиды, фаговый дисплей, сайт-направленный мутагенез.

### COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE METHODS OF PROTEIN ANTIGENS EPITOPE MAPPING

*O. Yu. Galkin*

National Technical University of Ukraine  
“Kyiv Polytechnic Institute”;  
e-mail: alexfbt@mail.ru

Comparative analysis of experimental methods of epitope mapping of protein antigens has been carried out. The vast majority of known techniques are involved in immunochemical study of the interaction of protein molecules or peptides with antibodies of corresponding specificity. The most effective and widely applicable methodological techniques are those that use synthetic and genetically engineered peptides. Over the past 30 years, these groups of methods have travelled a notable evolutionary path up to the maximum automation and the detection of antigenic determinants of various types (linear and conformational epitopes, and mimotopes). Most of epitope searching algorithms were integrated into a computer program, which greatly facilitates the analysis of experimental data and makes it possible to create spatial models. It is possible to use comparative epitope mapping for solving the applied problems; this less time-consuming method is based on the analysis of competition between different antibodies interactions with the same antigen. The physical method of antigenic structure study is X-ray analysis of antigen-antibody complexes, which may be applied only to crystallizing proteins, and nuclear magnetic resonance.

**Key words:** epitope mapping, synthetic peptides, phage display, site-directed mutagenesis.

#### References

1. *Petrov R. V.* Immunology: textbook for the students. med. universities. – Moscow: Medicine, 1987. – 414 p. (In Russian)
2. *Kazmirchuk V. Eu., Kovalchuk L. V., Maltsev D. V.* Clinical Immunology and Allergology. – Kiev: Phoenix, 2009. – 524 p. (In Russian).
3. *Immunology: Textbook / A. Yu. Vershygora, Eu. U. Paster, D. V. Kolibo et al.; foreword by S. Komisarenko; edited by Eu. U. Paster.* – Kiev: Vysha shola, 2005. – 599 p. (In Ukrainian).
4. *Evstigneeva R. P., Pal'keeva M. E.* Methods of locating antigenic determinants of proteins with known primary structures // *Rus. J. Bioorg. Chem.* – 2000. – **26**, N 4. – P. 217–234. (In Russian).
5. *Chao G., Cochran J. R., Wittrup K. D.* Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display // *J. Mol. Biol.* – 2004. – **342**, N 2. – P. 539–550.
6. *Shreffler W. G., Lencer D. A., Bardina L.* IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2 // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2005. – **116**, N 4. – P. 893–899.
7. *Naperova I. A., Balyasnikova I. V., Schwartz D. E., Watermeyer J., Sturrock E. D., Kost O. A., Danilov S. M.* Mapping of conformational mAb epitopes to the C domain of human angiotensin I-converting enzyme // *J. Proteome Res.* – 2008. – **7**, N 8. – P. 3396–3411.
8. *Mata-Fink J., Kriegsman B., Yu H. X., Zhu H., Hanson M., Irvine D. J., Wittrup K. D.* Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast // *J. Mol. Biol.* – 2013. – **425**, N 2. – P. 444–456.
9. *Han T., Sui J., Bennett A. S., Liddington R. C., Donis R. O., Zhu Q., Marasco W. A.* Fine epitope mapping of monoclonal antibodies against hemagglutinin of a highly pathogenic H5N1 influenza virus using yeast surface display // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – **409**, N 2. – P. 253–259.
10. *Burnie J. P., Al-Dughaym A.* The application of epitope mapping in the development of a new serological test for Helicobacter pylori infection // *J. Immunol. Meth.* – 1996. – **194**, N 1. – P. 85–94.
11. *Robotham J. M., Teuber S. S., Sathe S. K., Roux K. H.* Linear IgE epitope mapping of the English walnut (*Juglans regia*) major food allergen, Jug r 1 // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2002. – **109**, N 1. – P. 143–149.
12. *Chandra A., Latov N., Wormser G. P., Marques A. R., Alaedini A.* Epitope mapping

- of antibodies to VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* in post-Lyme disease syndrome // *Clin. Immunol.* – 2011. – **141**, N 1. – P. 103–110.
13. *Zaripov M. M., Morenkov O. S., Siklodi B., Barna-Vetro I., Gyöngyösi-Horvath A., Fodor I.* Glycoprotein B of Aujeszky's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response // *Res. Virol.* – 1998. – **149**, N 1. – P. 29–41.
  14. *Naperova I. A.* Epitope mapping of the C-terminal domain of the human angiotensin-converting enzyme: Author's abstract of dis. ... cand. chem. sciences: 03.00.04, 03.00.23 / M. V. Lomonosov MSU. – Moscow, 2009. – 24 p. (In Russian)
  15. *Spronk C. A. E. M., Nabuurs S. B., Krieger E., Vriend G., Vuister G. W.* Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2004. – **45**, N 3–4. – P. 315–337.
  16. *Arnautova Y. A., Vila J. A., Martin O. A., Scheraga H. A.* What can we learn by computing <sup>13</sup>C $\alpha$  chemical shifts for X-ray protein models? // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2009. – **5**, N 7. – P. 697–703.
  17. *Arnon R., Sela M.* Antibodies to a unique region in lysozyme provoked by a synthetic antigen conjugate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1969. – **62**, N 1. – P. 163–170.
  18. *Arnon R., Maron E., Sela M., Anfinsen C. B.* Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1971. – **68**, N 7. – P. 1450–1455.
  19. *Papac D. I., Hoyes J., Tomer K. B.* Epitope mapping of the gastrin-releasing peptide/anti-bombesin monoclonal antibody complex by proteolysis followed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Protein Sci.* – 1994. – **3**. – P. 1485–1492.
  20. *Zhao Y., Chalt B. T.* Protein epitope mapping by mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 1994. – **66**. – P. 3723–3726.
  21. *Pimenova T., Nazabal A., Roschitzki B., Seebacher J., Rinner O., Zenobi R.* Epitope mapping on bovine prion protein using chemical cross-linking and mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – **43**. – P. 185–195.
  22. *Sela M.* From synthetic antigens to synthetic vaccines // *Biopolymers.* – 1983. – **22**, N 1. – P. 415–424.
  23. *Atassi M. Z.* Antigenic structure of myoglobin: the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins // *Immunochem.* – 1975. – **12**, N 5. – P. 423–438.
  24. *Jemmerson R., Paterson Y.* Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes // *Science.* – 1986. – **232**, N 4753. – P. 1001–1004.
  25. *Rodionov M. A., Galaktionov S. G., Akhrem A. A.* Prediction of exposure degree diagram and sites of limited proteolysis in globular proteins as an approach to computer-aided design of protein bioregulators with prolonged action // *FEBS Lett.* – 1987. – **223**, N 2. – P. 402–404.
  26. *Atassi M. Z.* Precise determination of protein antigenic structures has unravelled the molecular immune recognition of proteins and provided a prototype for synthetic mimicking of other protein binding sites // *Mol. Cell. Biochem.* – 1980. – **32**, N 1. – P. 21–43.
  27. *Merrifield R. B.* Automated synthesis of peptides // *Science.* – 1965. – **150**. – P. 178–185.
  28. *Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., Tribbick G., Schoofs P. G.* Strategies for epitope analysis using peptide synthesis // *J. Immunol. Methods.* – 1987. – **102**. – P. 259–274.
  29. *Frank R.* The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications // *J. Immunol. Meth.* – 2002. – **267**, N 1. – P. 13–26.
  30. *Kostina L. V.* Epitope mapping of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Dis. ... cand. biol. sciences: 03.00.06 / D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology of RAMS. – Moscow, 2008. – 139 p. (In Russian)
  31. *Timmerman P., Van Dijk E., Puijk W., Schaaper W., Slootstra J., Carlisle S. J., Coley J., Eida S., Gani M., Hunt T., Perry P., Piron G., Meloen R. H.* Mapping of a discontinuous and highly conformational binding site on follicle stimulating hormone subunit-beta (FSH-beta) using Domain Scan and Matrix Scan technology // *Mol. Divers.* – 2004. – **8**, N 2. – P. 61–77.
  32. *Combinatorial library. Methods and protocols* / Editor L. Bellavance. New Jersey: Humana Press, 2002. – 370 p.
  33. *Timmerman P., Puijk W. C., Boshuizen R. S., van Dijken P., Slootstra J. W., Beurskens F. J., Parren P. W. H. I., Huber A., Bachmann M. F.,*

- Meloan R. H. Functional reconstruction of structurally complex epitopes using CLIPSTM technology // *The Open Vaccine J.* – 2009. – **2**. – P. 56–67.
34. Komissarenko S. V., Skok M. V., Kavoon E. M. *et al.* Immune recognition of cytochrome C. I. Molecular requirements for antibody recognition and immune response stimulation studied *in vitro* with synthetic peptides // *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* – 1988. – **139**, N 5. – P. 517–530.
35. Ammosova T. N., Uporov I. V., Rubtsov M. Yu., Ignatenko O. V., Egorov A. M., Kolesanova E. F., Archakov A. I. Antigenic mapping of horseradish peroxidase (isoenzyme C) // *Biochem.* – 1997. – **62**. – P. 440–447.
36. Atassi M. Z. Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme: molecular features of protein antigenic structures and potential of “surface-simulation” synthesis – a powerful new concept for protein binding sites // *Immunochem.* – 1978. – **15**, N 12. – P. 909–936.
37. Benjamin D. C., Berzofsky J. A., East I. J., Gurd F. R. N., Hannum C., Leach S. J., Margoliash E., Michael J. G., Miller A., Prager E. M., Reichlin M., Sercarz E. E., Smith-Gill S. J., Todd P. E., Wilson A. C. The antigenic structure of proteins: a reappraisal // *Ann. Rev. Immunol.* – 1984. – **2**. – P. 67–101.
38. Smith G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science.* – 1985. – **228**. – P. 1315–1317.
39. Birkenmeier G., Osman A. A., Kopperschläger G., Mothes T. Epitope mapping by screening of phage display libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human  $\alpha 2$ -macroglobulin // *FEBS Lett.* – 1997. – **416**, N 2. – P. 193–196.
40. Lee H. J., Zheng J. J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification // *Cell Commun. Signal.* – 2010. – **8**. – P. 8–26.
41. An T. Q., Zhou Y. J., Qiu H. J., Tong G. Z., Wang Y. F., Liu J. X., Yang J. Y. Identification of a novel B cell epitope on the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display // *Virus Genes.* – 2005. – **31**(1). – P. 81–87.
42. Wang L.-F., Du Plessis D. H., White J. R., Hyatt A. D., Eaton B. T. Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the bluetongue virus outer capsid protein VP5 // *J. Immunol. Meth.* – 1995. – **178**(1). – P. 1–12.
43. Peng W.-P., Hou Q., Xia Z.-H., Chen D., Li N., Sun Y., Qiu H.-J. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library // *Virus Res.* – 2008. – **135**, N 2. – P. 267–272.
44. Mullen L. M., Nair S. P., Ward J. M., Rycroft A. N., Henderson B. Phage display in the study of infectious diseases // *Trends Microbiol.* – 2006. – **14**, N 3. – P. 141–147.
45. Cho E. M., Kirkland B. H., Holder D. J., Keyhani N. O. Phage display cDNA cloning and expression analysis of hydrophobins from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* // *Microbiol.* – 2007. – **153**, N 10. – P. 3438–3447.
46. Löfblom J., Wernerus H., Ståhl S. Fine affinity discrimination by normalized fluorescence activated cell sorting in staphylococcal surface display // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – **248**. – P. 189–198.
47. Hudson E. P., Uhlen M., Rockberg J. Multiplex epitope mapping using bacterial surface display reveals both linear and conformational epitopes // *Sci. Rep.* – 2012. – **2**. – P. 706–715.
48. Rockberg J., Löfblom J., Hjelm B., Ståhl S., Uhlén M. Epitope mapping of antibodies using bacterial display // *Nat. Methods.* – 2008. – **5**. – P. 1039–1045.
49. Kang S.M., Rhee J. K., Kim E. J., Han K. H., Oh J. W. Bacterial cell surface display for epitope mapping of hepatitis C virus core antigen // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – **226**(2). – P. 347–353.
50. Benjamin D. C., Perdue S. S. Site-directed mutagenesis in epitope mapping // *Methods.* – 1996. – **9**, N 3. – P. 508–515.
51. Gershoni J. M., Roitburd-Berman A., Siman-Tov D. D., Tarnovitski F. N., Weiss Y. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines // *Biodrugs.* – 2007. – **21**, N 3. – P. 145–156.
52. Hutchison C. A., Phillips S., Edgell M. H., Gillam S., Jahnke P., Smith M. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence // *J. Biol. Chem.* – 1978. – **253**, N 18. – P. 6551–6560.
53. Kochetkov S. N., Kostyuk D. A., Lyakhov D. L. *et al.* Studies of the mechanism of bacteriophage

- T7 RNA polymerase by affinity modification and site-directed mutagenesis / Chemical modification of enzymes / Editors D. I. Kurganov, N. K. Nagradova, O. I. Lavrik. – New York: Nova Science Publ., 1996. – P. 347–387.
54. *Clement G., Boquet D., Frobert Y., Bernard H., Negroni L., Chatel J.-M., Adel-Patient K., Creminon C., Wal J.-M., Grassi J.* Epitopic characterization of native bovine beta-lactoglobulin // *J. Immunol. Meth.* – 2002. – **266**. – P. 67–78.
55. *Sharma S., Georges F., Delbaere L. T., Lee J. S., Klevit R. E., Waygood E. B.* Epitope mapping by mutagenesis distinguishes between the two tertiary structures of the histidine-containing protein HPr // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – **88**. – P. 4877–4881.
56. *Mehra V., Sweetser D., Young R. A.* Efficient mapping of protein antigenic determinants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – **83**, N 18. – P. 7013–7017.
57. *Todorova K., Zoubak S., Mincheff M., Kyurkchiev S.* Biochemical nature and mapping of PSMA epitopes recognized by human antibodies induced after immunization with gene-based vaccines // *Anticancer Res.* – 2005. – **25**, N 6C. – P. 4727–4732.
58. *Terpe K.* Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – **60**. – P. 523–533.
59. *Ehrlich P. H., Moyle W. R., Moustafa Z. A., Canfield R. E.* Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen // *J. Immunol.* – 1982. – **128**. – P. 2709–2713.
60. *Vodyanyk M. O., Chernyshov V. P., Gumenuk M. Eu.* Functional properties of cooperative monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor // *Physiol. J.* – 2001. – **47**, N 3. – P. 73–79. (In Ukrainian).
61. *Galkin O. Yu., Dugan O. M.* Comparison of schemes of Balb/c mice immunization for obtaining of monoclonal antibodies to human IgM // *Immunol. Allergol.* – 2009. – **1**. – P. 68–73. (In Ukrainian).
62. *Galkin O. Yu., Dugan O. M.* Development of ELISA kit for the quantitative determination of total human IgM // *Ukr. J. Clin. Labor. Med.* – 2011. – **6**, N 3. – P. 181–185. (In Ukrainian).

Отримано 06.09.2013