

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к мембранным белкам хлопчатника

З. С. Хашимова, Ю. С. Мангутова, М. Э. Сусло, В. Б. Леонтьев

Институт биоорганической химии им. акад. А. С. Садыхова АН Узбекистана
Пр. Х. Абдуллаева, 83, Ташкент, 700143, Узбекистан

Получены 12 стабильных гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (мкАТ) к мембранным белкам, выделенным из двухдневных проростков хлопчатника. Твердофазным иммуноферментным методом ELISA изучена перекрестная реактивность мкАТ к мембранным белкам: выявлены антитела к белкам клеточной стенки хлопчатника (семейство экстензинов) и различным фракциям лектиноподобных белков.

Введение. Белки клеточной стенки и плазматических мембран растительных клеток играют ключевую роль в жизнедеятельности растений. Это эндо- и экзогенные факторы дифференцировки и межклеточных контактов, ферменты, рецепторы, лектины, стрессовые белки — состав их весьма гетерогенен. Большинство этих белков являются гликопротеидами.

Изучение мембранных белков затруднено незначительностью их содержания, выделение и очистка сопряжены с экспериментальными трудностями и отсутствием четких биохимических маркеров. Эти проблемы можно разрешить с помощью моноклональных антител (мкАТ). К настоящему времени проведен топологический анализ растительных мембран с помощью мкАТ для некоторых технических культур — табака [1, 2], сои [3]; для хлопчатника работы такого рода не велись.

Цель данной работы состояла в получении реагентов, высокоспецифично взаимодействующих с гликопротеидами мембран клеток хлопчатника на основе моноклональных антител, а также в изучении реактивности полученных антител с различными белками, в том числе лектино (ЛПБ)- и экстензиноподобными (ЭПБ) белками для изучения механизма их действия, в частности, при формировании клеточной стенки растений, для волокнуобразования или исследования защитной функции растений.

Материалы и методы. Общие мембранные белки выделяли из проростков хлопчатника. Для этого семена хлопчатника обрабатывали концентрированной серной кислотой в течение 3—5 мин для удаления волокон, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и в дальнейшем использовали для получения проростков и выделения ЛПБ.

Обработанные семена проращивали в рулонах увлажненной фильтровальной бумаги в течение двух суток при температуре 28 °С. Проростки собирали, гомогенизировали в 25 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,4, содержащем 0,25 М сахарозу, 3 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ PMSF, в гомогенизаторе Поттера. Все биохимические работы проводили при температуре 4 °С.

Гомогенат фильтровали через четыре слоя марли, центрифугировали при 1500 об/мин (10 мин). Осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали при 100000 g в течение 90 мин (ультрацентрифуга фирмы «Beckman», L5-75, ротор SW-28, США). После центрифугирования супернатант, содержащий цитоплазматические белки, отбрасывали, полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5, и использовали в дальнейшем как иммуноген для иммунизации мышей и как антиген — для первичного скрининга гибридом.

Общие мембранные белки далее фракционировали в ступенчатом градиенте плотности сахарозы 10/34/45 % в 25 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,4, при

100000 g в течение 90 мин. Интерфазный слой между 34- и 45 %-й сахарозой осторожно извлекали с помощью пипетки, вводя наконечник в этот слой, промывали 10-кратным объемом ФСБ (фосфатносолевой буфер), pH 7,5, и также использовали в дальнейшем как антиген при скрининге гибридом.

Протопласты хлопчатника, полученные обработкой культивируемого 5—6 месячного каллуса ферментативной смесью, содержащей 0,5 %-ю целлюлазу («Sigma», США) и 0,6 %-ю мацеразу («Calbiochem», США), были любезно предоставлены Н. Н. Григиной (Институт генетики Академии наук Республики Узбекистан).

Суммарную фракцию ЛПБ из семян хлопчатника сорта 108-ф выделяли из обработанной для обезжиривания и удаления пигментов муки. Для этого семена очищали от кожуры, тонко измельчали в ступке, обрабатывали холодной смесью ацетон—эфир (1:1) и сушили в вакуум-эксикаторе. Из полученной муки белки дважды экстрагировали раствором 0,14 М NaCl, pH 3,2, содержащим 1 мМ PMSF, 1 мМ аскорбиновую кислоту, а также 0,02 мг/мл бисульфита натрия [4]. Собранные после центрифугирования экстракты (6000 об/мин, 30 мин, К-23) супернатанты (СРБ) были доведены сухим трисом до pH 8,5, осветлены центрифугированием или фильтрацией и подвергнуты ступенчатому высаливанию сульфатом аммония до 30, 60, 80 % насыщения [5]. Фракция, полученная после высаливания при 60—80 % насыщения, содержала обиде ЛПБ (ЛПБ 60—80).

Для выделения галактозоспецифических белков (ЛПБ-1) проводили аффинную хроматографию суммарной фракции ЛПБ 60—80 на сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) на колонке 1,5 × 24 см в ФСБ с десорбцией 0,1 М D-галактозой или D-лактозой.

Для получения конканавалин А-связывающихся белков (ЛПБ-2) из ЛПБ 60—80 нами был приготовлен сорбент с помощью конъюгации сефарозы 4В с Соп-А («Serva», ФРГ) в присутствии 1 М этаноламина, pH 9; аффинную хроматографию проводили на колонке с Соп-А-сефарозой 4В в 0,15 М NaCl—0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 6,0, с десорбцией 50 мМ α -метил-D-глюкозидом. Белки диализовали против нескольких смен воды, лиофильно высушивали и использовали как антиген. Полученные белки были охарактеризованы нами ранее электрофоретически в 15 %-м ПААГ в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия [6, 7].

Гемагглютинирующую активность ЛПБ определяли с использованием 2 % суспензии эритроцитов человека по стандартной методике. Для этого

предварительно в 96-луночные планшеты были внесены по 50 мкл ЛПБ в ФСБ. Затем в кровь, взятую из локтевой вены, добавляли около 500 мкг лимоннокислого натрия в 0,5 мл ФСБ, pH 7,5, для предотвращения свертываемости и кровь трижды отмывали в ФСБ; каждый раз центрифугировали при 1,5 тыс. об/мин (К-23) в течение 5—7 мин. Из осадка забирали 400 мкл крови, добавляли 10 мл ФСБ и раскапывали ее лунки в равном объеме (50 мкл). В качестве стандарта использовали Соп А («Serva»). Выраженная гемагглютинирующая активность наблюдалась в течение 30 мин.

ЭПБ выделяли из суспензионной культуры хлопчатника следующим образом [8, 9]. Клетки собирали центрифугированием (800—1000 об/мин, К-23); к осадку приливали 10-кратный объем дистиллированной воды, гомогенизировали и центрифугировали (3,5—4 тыс. об/мин, 30 мин, К-23). Супернатант, содержащий водорастворимые белки, удаляли. Осадок обрабатывали таким образом 3—4 раза. Из осадка ЭПБ экстрагировали 0,2 М CaCl₂ в течение 30 мин трижды. Собранные после центрифугирования супернатанты концентрировали до 1/3 объема, к экстракту добавляли трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 10 % и оставляли на ночь при температуре 4 °С. Кислоторастворимую фракцию собирали центрифугированием (15 тыс. об/мин, 30 мин, ЦЛР-1), диализовали против воды и лиофильно высушивали. Дальнейшую очистку белка проводили на колонке с КМ-целлюлозой («Whatman», Англия) размером 2,4 × 20 см, уравновешенной 30 мМ Na-фосфатным буфером, pH 7,8; белки элюировали 0,3 М NaCl, диализовали против нескольких смен воды, лиофильно высушивали и в дальнейшем использовали как антиген.

Содержание белка определяли по методу [10]; общих сахаров — следующим образом: к 1 мл образца добавляли 0,5 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, гидролизовали при 80 °С в течение 1 ч и после охлаждения добавляли 3 мл 0,1 %-го раствора антрона в концентрированной серной кислоте. Смесь помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения определяли поглощение (спектрофотометрически при 620 нм). Содержание углеводов устанавливали по калибровочной кривой.

Для получения гибридом мышей линии BALB/c иммунизировали суммарным препаратом мембранных белков (2 мг белка в 0,5 мл ФСБ) внутривенно один раз в неделю в течение трех недель и за три дня до гибридизации внутривенно (в хвостовую вену, 1 мг белка в 0,25 мл ФСБ) [1]. Иммунизацию осуществляли без использования

адьюванта Фрейнда [1], поскольку мембранные белки достаточно иммуногенны.

Для гибридизации спленоциты иммунизированных мышей соединяли с клетками миеломы XAg8.653 в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) по общепринятой методике с некоторыми модификациями [11, 12]. После гибридизации суспензию клеток раскапывали в 96-луночные платы. Гибридомы культивировали на селективной среде НАТ («Flow Laboratories», США) в присутствии 20 % эмбриональной сыворотки. Через две недели образовались клоны гибридных клеток.

Первичным скринингом выявляли гибридомы-продуценты. Для этого в качестве антигена использовали общие мембранные белки и определяли взаимодействие антигена с антителами с помощью твердофазного иммуноферментного метода ELISA. Для иммуноферментного анализа брали пробы с концентрацией белка 20—30 мкг/мл и раскапывали в 96-луночные планшеты («Nunclo», Дания) по 100 мкл раствора. Реакцию АГ-АТ выявляли с помощью конъюгата анти-IgG мыши с пероксидазой хрена («Sigma», США). Связывание определяли по цветной реакции в присутствии о-фенилендиамина в 0,1 М цитрате натрия. Реакцию останавливали добавлением в лунки 50 мкл 10 %-й H_2SO_4 . Положительным контролем служила сыворотка мышей, иммунизированных общими мембранными белками, отрицательным — ФСБ. Отбирали гибридомы с положительным ответом, которые в дальнейшем клонировали методом лимитирующего разведения в присутствии макрофагов, выделенных из брюшной полости мышей.

Первичным скринингом, используя общие мембранные белки в качестве антигена, среди множества клонов отбирали только моно-, ди- и, в крайнем случае, три-клоны в лунке, которые в случае положительного ответа реклонировали и затем отбирали лишь те клоны-продуценты, где в одной лунке находилась одна колония, образовавшаяся из одной клетки. Далее гибридомы-продуценты с устойчивым положительным ответом культивировали в среде RPMI с 10 %-й сывороткой для получения стабильной линии клеток, причем постоянно проводили скрининг против антигена (общие мембранные белки).

Для получения препаративного количества мкАТ гибридомы-продуценты инъецировали мышам линии BALB/c, праймированным полным адьювантом Фрейнда. Проводили также скрининг асцитной жидкости против антигена (общие мембранные белки), и если антиген-связывающая активность падала, то из асцита извлекали клетки центрифугированием, пассировали заново в куль-

туре, реклонировали и таким образом получали стабильную гибридому с высокой антиген-связывающей активностью.

Из асцитной жидкости антитела выделяли двукратным осаждением сульфатом аммония, обессоливали на колонке с сефадексом G-25; дальнейшую очистку мкАТ проводили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. На обоих этапах очистки контролировали аффинность полученных нами мкАТ твердофазным иммуноферментным методом.

В культивируемых клетках гибридом отсутствуют микоплазмы (раздел работы выполнен совместно с ВКНЦ, Россия).

Результаты и обсуждение. Экспериментальные трудности выявления и очистки мембранных белков, а также проблему отсутствия биохимических маркеров можно значительно упростить, используя мкАТ к различным антигенам мембранных белков.

Наибольшее внимание привлекают белки клеточной стенки, обогащенные гидроксипролином (ЭПБ) и ЛПБ, обладающие гемагглютинирующей активностью. Эти белки участвуют в узнавании и избирательном связывании индукторов патогенеза, формировании клеточной стенки и важны в защитной стратегии растений. Известно, что растительные лектины локализируются как в цитозоле, так и в мембранах растительных клеток [13].

При иммунизации мышей и получении гибридом нами были выделены общие мембранные белки из двухдневных проростков хлопчатника. Ранее нами электрофоретически в системе Лэммли выявлено присутствие белковых зон в интервале от 14 до 90 кДа, что указывает на высокую гетерогенность мембранных белков. Также показано, что в состав мембранных белков, выделенных из проростков хлопчатника, входят полипептидные зоны ЛПБ 60—80, полученных после 80 %-го высаливания сульфатом аммония (интервалы молекулярных масс 40—60 и 8—15 кДа) [14]. В этой же работе было установлено присутствие гликопротеидов в составе ЛПБ 60—80. Обнаружено, что как общие мембранные белки, так и ЛПБ 60—80 вызывали агглютинацию эритроцитов человека, причем наиболее значительно I и II групп крови.

Гибридомы получены слиянием в присутствии ПЭГ клеток миеломы XAg8.653 и спленоцитов, иммунизированных общими мембранными белками мышей линии BALB/c, что дало возможность получить более сотни гибридом. При этом гибридомы-продуценты выявляли первичным скринингом, используя как антиген общие мембранные белки, которые были взяты нами в качестве иммуногена для иммунизации мышей. Использование этих белков для первичного скрининга позволяло, на наш

взгляд, охватить как можно больше гибридом, продуцирующим антитела к различным антигенным детерминантам; с другой стороны, в отсутствие достоверных биохимических маркеров для белков плазматических мембран растительных клеток применение дифференцированных клеток из проростков хлопчатника как источника иммуногена позволяло надеяться, что по крайней мере некоторые из полученных антител будут направлены к общим антигенным детерминантам белков как дифференцированных (семена), так и недифференцированных клеток (суспензионная культура). В результате были отобраны 12 популяций гибридом-продуцентов, которые затем были клонированы и при необходимости — реклонированы методом лимитирующего разведения.

Для получения моноклональных антител отбирали лишь гибридомы-продуценты, представленные одной клеткой в лунке; культивирование их привело к получению 12 стабильных клеток-продуцентов, развитых в дальнейшем в мышах линии BALB/c для получения асцита. Из асцитной жидкости осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой на ДЭАЭ-целлюлозе выделены индивидуальные мкАТ, использованные для перекрестного иммунохимического анализа. В таблице отражены результаты, полученные с использованием только мкАТ. Следует отметить, что в иммуноферментном анализе каждый раз применяли лишь свежесыделенные общие мембранные белки, белки, полученные в градиенте плотности сахарозы, и протопласты; опыты проводили в трех повторах.

Учитывая высокую гетерогенность полученных нами мембранных белков [14], мы фракционировали общие мембранные белки в градиенте плотности сахарозы 10/34/45 % (МБгр) при 100000 g в течение 90 мин и собирали фракцию между 34 и 45 % сахарозы. Известно, что в интервале градиента 34—45 % сахарозы находятся белки плазматических мембран [15, 16]. Сравнительный электрофоретический анализ этих белков показал, что данная фракция менее гетерогенна, чем общие мембранные белки [14]. При изучении антигенных свойств МБгр установлено, что наибольшее сродство к ней проявляют мкАТ 2С8.2; обнаружено также взаимодействие с мкАТ 2С8.3, 4G7A9 и 4G7E3. Иммунохимическое перекрывание перечисленных мкАТ наряду с МБгр, а также с протопластами, выделенными из каллуса хлопчатника [17], подтверждает, что в составе протопластов и МБгр имеются общие антигенные детерминанты, относящиеся к белкам плазматических мембран (см. таблицу). Специфическая реактивность МБгр из хлопчатника с указанными мкАТ в сочетании с даль-

нейшим биохимическим анализом, по-видимому, может быть использована для маркирования мембранных эпитопов.

Для определения общности антигенных детерминант, а также относительной специфичности полученных мкАТ нами изучена реактивность их с мембраносвязанными белками (ЛПБ) и белками клеточной стенки (ЭПБ).

ЭПБ выделяли из суспензионной культуры хлопчатника с последующей очисткой на КМ-целлюлозе. Присутствие гидроксипролина, характерного для семейства ЭПБ, выявляли с помощью ФТК-производных, как описано ранее [14]. Известно, что экстенсины являются гликопротеидами, и содержание углеводов в молекуле белка составляет 2/3 и выше [18]. В связи с этим было определено количественное содержание общих сахаров спектрофотометрически с использованием антрон-серно-кислотного реагента. Отношение белка к углеводам в ЭПБ хлопчатника составляет 60—65 % от белковой массы.

Как видно из таблицы, сродство к ЭПБ проявляют мкАТ клонов 2С8.2 и 3А10. Перекрестная реакция мкАТ клона 2С8.2 с протопластами предполагает наличие общих антигенных детерминант; этот факт учтен нами и при оценке роли различных факторов, в том числе и белков клеточной стенки (например, экстенсинов), в изучении механизма формирования клеточной стенки в процессе культивирования протопластов. Важность этой проблемы становится очевидной также и в связи с механизмом волокнообразования.

Далее было проведено перекрестное иммунохимическое исследование этих же мкАТ относительно различных фракций ЛПБ, выделенных из семян хлопчатника: общих ЛПБ 60—80 и их более узких фракций, полученных при аффинной хроматографии. К последним относятся D-галактозилсвязывающиеся ЛПБ, выделенные при хроматографии на сефарозе 4В (ЛПБ-1), и Соп А-связывающиеся белки из общих ЛПБ 60—80, выделенные при аффинной хроматографии на Соп А-сефарозе 4В (ЛПБ-2).

Ранее нами электрофоретически было показано, что в ЛПБ-1 присутствуют низкомолекулярные полипептидные зоны [7].

При изучении антигенных свойств этой группы белков обнаружено, что ряд популяций 2С8—2С8.2; 2С8.7; 2С8.8 и 4G7.1; 4G7A9; 3G5A9 однозначно реагируют как с общими мембранными белками, так и с ЛПБ 60—80, что подтверждает обнаруженную ранее нами [14] общность антигенных детерминант.

Проведен перекрестный анализ реактивности

Иммунохимический анализ мкАТ к различным антигенам

мкАТ	МБ	МБгр	Протопласты	ЭПБ	ЛПБ 60—80	ЛПБ-1	ЛПБ-2	Соп-А	RCA-120
1С6.В8	+	-		-	++	+	-	+	+
1С6.А10	+				+				
2С8.2	+++	+	+	+++	+++	-	+++	+	-
2С8.3	+	+	+	-	-				
2С8.С7	+	-		-	+	-	-	+	
2С8.8	+	-		-	+			+	
3А10	+	-		+	+	-			
3G5A9	+	-	-	-	+	-	-	-	+
3Н11В7	+				-	+		-	+
4G7A9	+	+		-	+				
4G7.1	+	+	+		+				
4G7E3	+	+	+		-				

Примечание. Средство АГ-АТ определено твердофазным иммуоферментным анализом ELISA и обозначено, как: «-» — нет связывания; «+, ++, +++» — степень связывания; в остальных случаях средство не определялось. МБ — общие мембранные белки, полученные после центрифугирования при 100000 g; МБгр — мембранная фракция, полученная после центрифугирования в градиенте 34—45 % сахарозы; протопласты — протопласты, выделенные из каллуса; ЭПБ — экстензиноподобные белки; ЛПБ 60—80 — суммарная фракция лектиноподобных белков, выделенных ступенчатым высаливанием в интервале 60—80 %-го насыщения сульфатом аммония; ЛПБ-1 — β-D-галактозилсвязывающие лектиноподобные белки; ЛПБ-2 — Соп-А-связывающие лектиноподобные белки; Соп-А — конканавалин А; RCA-120 — агглютинин клещевины.

полученных мкАТ к лектинам с известной специфичностью — Соп-А и агглютинину клещевины (RCA-120).

Из таблицы следует, что мкАТ клона 3G5A9 проявляют средство к ЛПБ 60—80 и RCA-120, а мкАТ 1С6.В8 реагируют с ЛПБ 60—80, с выделенными из них галактозилсвязывающимися фракциями (ЛПБ-1) и RCA-120. Поскольку известно, что углеводная специфичность лектина клещевины RCA-120 обусловлена терминальными β-D-галактозилами, то, по-видимому, реактивность вышеуказанных антител связана с антигенными детерминантами ЛПБ, содержащими участки связывания с концевыми β-D-галактозильными остатками [19]. Кроме того, представляет интерес и тот факт, что антитела клона 2С8.2 связываются избирательно с Соп-А-специфическими белками ЛПБ-2, ЭПБ и лектином Соп-А, не содержащим, как известно, углеводных фрагментов. Ранее Мейером [2] была установлена низкая иммуногенность гликочасти экстенсинов. Эти данные указывают на наличие в изучаемых антигенах общих антигенных детерминант, реактивных к мкАТ 2С8.2, расположенных, по-видимому, в полипептидных доменах.

В результате проведенных исследований получены наборы мкАТ к мембранным белкам хлопчатника. Используя ИФА, отобраны клоны-продуценты и изучены антигенные свойства различных фракций белков хлопчатника. Реактивность белковых антигенов с набором мкАТ может быть использована в качестве маркеров для мембранных эпитопов, ассоциированных со специфической функцией, а также для целенаправленного фракционирования гетерогенных мембранных белков.

З. С. Хашимова, Ю. С. Мангутова, М. Е. Суло, В. Б. Леонтьев

Гібридоми, які продукують моноклональні антитіла до мембранних білків бавовнику

Резюме

Отримано 12 стабільних гібридом, які продукують моноклональні антитіла (мкАТ) до мембранних білків, виділених з дводенних проростків бавовнику. Твердофазним імуоферментним методом ELISA вивчено перехресну реактивність мкАТ до мембранних білків: виявлено антитіла до білків клітинної стінки бавовнику (родина екстенсинів) і різних фракцій лектиноподібних білків.

Z. S. Khashimova, Ju. S. Mangutova, M. E. Suslo, V. B. Leontjev

Hybridomas producing the monoclonal antibodies to the cotton membrane proteins

Summary

Monoclonal antibodies (mAb) to membrane antigens were generated by immunization of BALB/c mice with total plasma membrane proteins from cotton seedlings. 12 stable hybridoma clones secreting mAb directed to the components of the total membrane proteins were selected; reactivity of these mAb was determined using ELISA methods. mAb to surface epitopes of isolated cotton protoplasts, membrane and membrane-bound proteins, cell-wall protein (extensin), some groups of lectin-like proteins from cotton seeds have been described, their immunochemical cross-reactivity was discussed. mAb to cotton plasma-membrane proteins can be used as biochemical markers and for fractionation and membrane proteins functional activity study.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norman P. M., Wingate U. P., Fitter M. S., Lamp C. J. Monoclonal antibodies to plant plasma-membrane antigens // *Planta*.—1986.—167.—P. 452—459.
2. Meyer D. J., Afonso C. L., Galbraith D. W. Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against plant plasma membrane and cell wall epitopes: identification of a monoclonal antibodies that recognizes extensin and analysis of the process of epitope biosynthesis in plant tissues and cell cultures // *J. Cell Biol.*—1988.—107.—P. 173—175.
3. Metcalf III T. N., Villanueva M. A., Schindler M., Wang J. L. Monoclonal antibodies directed against protoplast of soybean cells: analysis of the lateral mobility of plasma membrane-bound antibody MVS-1 // *J. Cell Biol.*—1986.—102.—P. 1350—1354.
4. Boather Ch. H. Pigments of cotton seed. Cottonseed and Cottonseed Product. Their chemistry and chemical technology.—New York: Interscience Publ. Inc., 1948.
5. Луцки М. Д., Панасюк Е. А., Луцкий А. Д., Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.—35 с.
6. Мангутова Ю. С., Хашимова З. С., Каталаева Д. М., Сусло М. Э., Леонтьев В. Б. Факторы агглютинации из семян и проростков хлопчатника // Докл. АН Уз.ССР.—1989.—№ 3.—С. 49—52.
7. Хашимова З. С., Саитмуратова О. Х., Мангутова Ю. С.,

Леонтьев В. Б. Влияние гликопротеидов хлопчатника на биосинтез белков и нуклеиновых кислот // *Химия природ. соединений*.—1997.—№ 6.—С. 865—870.

8. Smith J. J., Muldoon E. P., Willard J. J., Lamport D. T. A. Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures // *Phytochemistry*.—1986.—25, N 5.—P. 1021—1030.
9. Stafstrom J., Staehelin L. A. Cross-linking patterns in salt-extractable extensin from carrot cell walls // *Plant. Physiol.*—1986.—81.—P. 234—241.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—P. 265.
11. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*.—1975.—256.—P. 495—497.
12. Игнатьева Г. И., Сидорович И. Г., Болтовская М. И. Гибридомы и моноклональные антитела в биотехнологии и медицине.—М.: ВИНТИ, 1989.—96 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология 20.3).
13. Lis H., Sharon N. The glycosylation of proteins // *Eur. J. Biochem.*—1993.—218.—P. 1—27.
14. Хашимова З. С., Мангутова Ю. С., Сусло М. Э., Бекназарова Д. М., Леонтьев В. Б. Изучение мембранных белков хлопчатника с использованием моноклональных антител // *Химия природ. соединений*.—1994.—№ 1.—С. 292—296.
15. Hurkman W. J., Tanaka Ch. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis // *Plant Physiol.*—1986.—81.—P. 802—806.
16. Gallagher S. R., Leonard R. T. Electrophoretic characterization of a detergent-treated plasma membrane fraction from corn roots // *Plant. Physiol.*—1987.—83.—P. 265—272.
17. Хашимова З. С., Сусло М. Э., Бекназарова Д. М., Григина И. Р., Джатаев С. А. Изучение функциональной роли экстенсинаподобных белков хлопчатника // *Химия природ. соединений*.—1995.—№ 2.—С. 294—297.
18. Lamport D. T. A. Hydroxyproline-O-glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin // *Nature*.—1967.—216.—P. 1322—1324.
19. Хьюз Р. Гликопротеиды.—М.: Мир, 1985.—84 с.

УДК 612.085.4:577.112.853
Поступила в редакцию 22.04.98