

## СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА КАПУСТНОЙ СОВКИ, *MAMESTRA BRASSICAE*

Э. А. Козлов, С. Б. Серебряный

Ранее нами было показано, что полиэдры вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *Mamestra brassicae* строятся из одного белка (полиэдрин) с молекулярной массой около 28000 [1]. Был определен аминокислотный состав и концевые остатки аминокислот [1]. Настоящее сообщение посвящено выделению, очистке и выяснению аминокислотной последовательности триптических пептидов полиэдрин ВЯП *M. brassicae*.

**Материалы и методы.** Полиэдрин получали обработкой полиэдров 67 %-ным раствором уксусной кислоты, как описано нами ранее [1]. Белок восстанавливали и карбоксиметилировали, как описано в работе [2]. Восстановленный и карбоксиметилированный полиэдрин расщепляли трипсином («Sprofa», ЧССР), предварительно обработанным кетоном Шоу [3], для подавления химотрипсиновой активности. Трипсинолиз проводили в 0,2 н. бикарбонате аммония, рН 7,8, при 37 °С в течение 6 ч. Фермент-субстратное соотношение — 1:100. Реакцию останавливали лиофилизацией.

Триптический гидролизат растворяли в 0,2 н. уксусной кислоте. Нерастворимый при этом материал удаляли центрифугированием. Растворимые пептиды предварительно разделяли либо гель-фильтрованием через сефадекс G-25 (тонкий) в 0,2 н. уксусной кислоте, либо на автоматическом пептидном анализаторе АА-II («Technicon», Ирландия). Конкретные условия гель-фильтрования и ионообменной хроматографии указаны в подписях к рисункам. Дальнейшее разделение и очистку пептидов фракций, полученных гель-фильтрованием и ионообменной хроматографией, осуществляли с помощью высоковольтного электрофореза (ЭФ) и хроматографии (БХ) на бумаге FN 17 и FN 18 («Filtrak», ГДР). Электрофорез проводили в течение 1,5 ч при градиенте напряжения 40—60 В/см на приборе, сконструированном нами [4]. Применяли следующие электролиты для высоковольтного электрофореза и растворители для хроматографии на бумаге: ЭФ1, рН 6,5 — пиридин : уксусная кислота : вода (100:4:96); ЭФ2, рН 1,9 — уксусная кислота : муравьиная кислота : вода (10:41,2:948,8); БХ — н-бутанол : уксусная кислота : пиридин : вода (15:3:10:12).

N-концевую последовательность аминокислотных остатков в пептидах определяли методом Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде дансил (Dns)-производных. Деградацию проводили по Грэю [5] в модификации Виноградовой и др. [6]. Dns-производные аминокислот идентифицировали на пластинках с тонким слоем полиамида [7].

Аминокислотный состав определяли на анализаторах аминокислот BC-200 («Bio-cal», ФРГ), Hd 1200E и AAA-881 (ЧССР). Пробы гидролизовали 5,7 н. соляной кислотой, содержащей 0,1 % фенола, в течение 24 ч при 105—110 °С в вакууме. Триптофан определяли реакцией Эрлиха [8]. Амиды определяли по подвижности пептида при высоковольтном электрофорезе на бумаге в системе ЭФ1.

**Результаты и обсуждение.** Стратегия выяснения первичной структуры полиэдрин ВЯП *M. brassicae* была выбрана такая же, как для полиэдринов ВЯП *Porthetria dispar* [9] и *Galleria mellonella* [10]. По нашему мнению, выяснение строения только триптических пептидов позволит выписать аминокислотную последовательность полипептидной цепи всего белка при сравнении триптических пептидов с известной аминокислотной последовательностью полиэдрин ВЯП *Bombyx mori* [11].

Растворимые в уксусной кислоте триптические пептиды предварительно разделяли двумя независимыми путями. Данные рис. 1 демонстрируют результат разделения растворимых при рН 5,0 пептидов гель-фильтрованием через сефадекс G-25 в уксусной кислоте. Образовано пять фракций. Фракцию VI получали после осаждения части материала на колонке в процессе гель-фильтрования и последующей элюцией

этого материала с колонки 0,3 н. раствором аммиака. При растворении лиофильно высушенного триптического гидролизата в небольшом объеме (3—5 мл) 0,2 н. уксусной кислоты получали раствор пептидов с рН 5,0. В процессе гель-фильтрации происходило снижение величины рН раствора с 5,0 до 2,7 (рН уксусной кислоты), что приводило к осаждению части материала.

В результате разделения растворимых пептидов ионообменной хроматографией образовано 14 фракций (рис. 2). Дальнейшее разде-

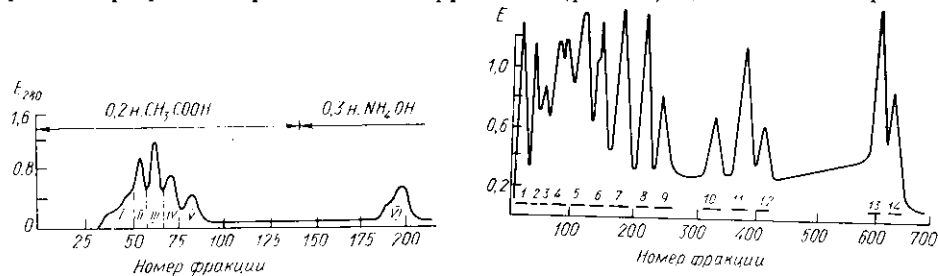


Рис. 1. Разделение растворимых при рН 5,0 триптических пептидов полиэдрина ВЯП *M. brassicae* на колонке (2,5×110 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 30 мл/ч. Объем фракции 5 мл.

Fig. 1. Separation of the tryptic peptides (soluble at pH 5.0) of the polyhedrin of *M. brassicae* NPV on 2.5×110 cm column of Sephadex G-25. Flow rate — 30 ml/h. Column fraction — 5 ml.

Рис. 2. Хроматография растворимых при рН 5,0 триптических пептидов полиэдрина ВЯП *M. brassicae* на пептидном анализаторе. Ионообменник Chromobead P.2.1.01.18 (A). Колонка 1×62 см. Скорость элюции 13,8 мл/ч. Объем фракции 2,3 мл.

Fig. 2. Peptide analyzer chromatography of the tryptic peptides (soluble at pH 5.0) of the polyhedrin of *M. brassicae* NPV on 1×62 cm column of Chromobead P.2.1.01.18 (A). Flow rate — 13.8 ml/h. Column fraction — 2.3 ml.

ление и очистку пептидов фракций с сефадекса и хроматографии проводили различной комбинацией высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге.

В табл. 1 приведен аминокислотный состав некоторых триптических пептидов. Пептид T11 был получен в смеси с пептидом T1. Это было выяснено при структурном анализе смеси, аминокислотный состав которой следующий: Lys(1,2), Arg(0,9), Asp(1,8), Ser(2,9), Pro(0,9), Gly(2,0), Val(1,7), Leu(2,3), Tyr(1,8), Trp(+). Аминокислотный состав пептида T11 получен вычитанием из аминокислотного состава смеси состава пептида T1.

В табл. 2 представлены данные по строению некоторых триптических пептидов.

Строение пептида T6 было выяснено в результате электрофореза его в системе ЭФ1 (рН 6,5). Пептид содержит только лизин. Однако из подвижности при электрофорезе (рН 6,5) ясно, что этот пептид содержит два остатка лизина. Строение пептида T11 было выявлено на смеси с пептидом T1. Дансированием смеси определено две N-концевые аминокислоты — Leu и Tyr. Еще четыре стадии деградации дают следующие результаты: Val+Ser (2-я стадия), Tyr+Val (3-я стадия), Asp (4-я стадия) и Pro (5-я стадия). Ясно, что один из пептидов представляет собой пептид T1, который был получен в чистом виде и структура его была выяснена независимо. На пятом месте пептида T11, по-видимому, находится остаток триптофана, так как в его составе это единственный остаток, который не может быть определен деградацией по Эдману. Пептид T11 не содержит остатка пролина, который определен на 5-й стадии деградации смеси (из пептида T1). При наличии на пятом месте остатков либо Ser, либо Gly они были бы определены.

Таким образом, всего было получено 19 пептидов, включающих 90 остатков аминокислот. 17 пептидов с уникальными последовательностями насчитывают 85 остатков (35 % длины всей полипептидной

Таблица 1

Аминокислотный состав некоторых триптических пептидов полиэдрина ВЯП *M. brassicae*  
 Amino Acid Composition of Some Tryptic Peptides of the Polyhedrin of the Nuclear Polyhedron

Аминокислота	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T6'	T7	T8
Lys	—	1,1 (1)	1,2 (1)	1,0 (1)	—	(2)	(1)	1,0 (1)	1,0 (1)
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	1,2 (1)	—	—	—	1,0 (1)	—	—	—	—
Asp	1,1 (1)	2,0 (2)	—	1,1 (1)	2,0 (2)	—	—	1,0 (1)	—
Thr	—	1,1 (1)	—	—	—	—	—	—	1,0 (1)
Ser	1,7 (2)	—	—	0,9 (1)	—	—	—	—	—
Glu	—	—	—	—	—	—	—	1,0 (1)	—
Pro	1,0 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	1,2 (1)	—	—	1,0 (1)	—	—	—	—	—
Ala	—	—	—	—	1,0 (1)	—	—	—	—
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	—	0,9 (1)	—	0,8 (1)	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	0,7 (1)	—	—	—	—	—
Leu	0,9 (1)	—	—	1,0 (1)	—	—	—	—	2,0 (2)
Tyr	1,8 (2)	1,8 (2)	1,9 (2)	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—	1,0 (1)
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Всего	9	7	3	7	4	2	1	3	5

Таблица 2

Аминокислотная последовательность некоторых триптических пептидов полиэдрина ВЯП *M. brassicae*  
 Amino Acid Sequence of Some Tryptic Peptides of the Polyhedrin of *M. brassicae* NPV

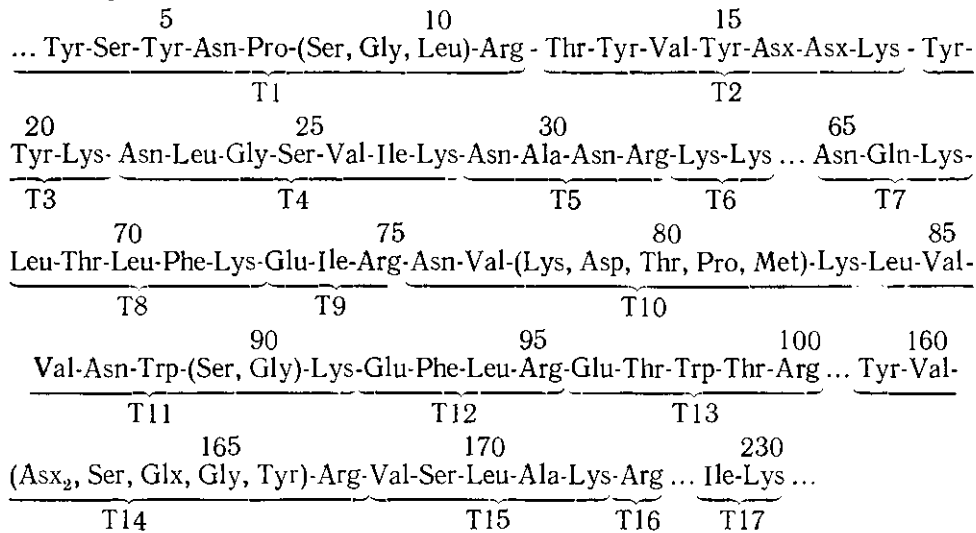
Пептид	Стадии очистки	Последовательность
T1	IV, ЭФ1	Tyr-Ser-Tyr-Asn-Pro-(Ser, Gly, Leu)-Arg
T2	Ch6, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Thr-Tyr-Val-Tyr-Asx-Asx-Lys
T3	V, ЭФ1	Tyr-Tyr-Lys
T4	Ch5, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Leu-Gly-Ser-Val-Ile-Lys
T5	Ch7, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Ala-Asn-Arg
T6	Ch6, ЭФ1	Lys-Lys
T6'	Ch6, ЭФ1	Lys
T7	Ch6, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Gln-Lys
T8	Ch7, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys
T8'	Ch8, ЭФ1	Thr-Leu-Phe-Lys
T9	Ch7, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Ile-Arg
T10	Ch6, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Val-(Lys, Asp, Thr, Pro, Met)-Lys
T11	Ch7, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Val-Val-Asn-Trp-(Ser, Gly)-Lys
T12	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Phe-Leu-Arg
T13	IV, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg
T14	Ch7, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Tyr-Val-(Asx <sub>2</sub> , Ser, Glx, Gly, Tyr)-Arg
T15	Ch6, ЭФ1, ЭФ2	Val-Ser-Leu-Ala-Lys
T16	Ch6, ЭФ1	Arg
T17	Ch8, ЭФ1	Ile-Lys

Примечание. IV, V — фракции, полученные гель-фильтрованием через сефадекс; Ch5—Ch8 — фракции, полученные ионообменной хроматографией; ЭФ и БХ — высоковольтный электрофорез и хроматография на бумаге. Стрелкой обозначены стадии ступенчатой деградации пептида. Штрихом обозначены пептиды с аминокислотной последовательностью, перекрывающейся с последовательностью одноименного пептида без штриха.

*sis Virus (NPV) of M. brassicae*

T8'	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17
1,0 (1)	—	2,0 (2)	1,2 (1)	—	—	—	1,1 (1)	—	1,0 (1)
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	0,9 (1)	—	—	1,0 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	—	(1)	—
—	—	2,0 (2)	0,9 (1)	—	—	2,1 (2)	—	—	—
0,9 (1)	—	1,0 (1)	—	—	1,6 (2)	—	—	—	—
—	—	—	0,9 (1)	—	—	1,1 (1)	0,9 (1)	—	—
—	1,1 (1)	—	—	1,0 (1)	1,1 (1)	1,3 (1)	—	—	—
—	—	1,1 (1)	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	1,0 (1)	—	—	1,1 (1)	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	1,0 (1)	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	0,9 (1)	1,7 (2)	—	—	0,8 (1)	0,8 (1)	—	—
—	—	0,9 (1)	—	—	—	—	—	—	—
—	1,0 (1)	—	—	—	—	—	—	—	1,0 (1)
1,1 (1)	—	—	1,1 (1)	1,0 (1)	—	—	1,2 (1)	—	—
—	—	—	—	—	—	1,6 (2)	—	—	—
1,0 (1)	—	—	—	0,9 (1)	—	—	—	—	—
—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
—	—	—	(1)	—	(1)	—	—	—	—
4	3	8	8	4	5	9	5	1	2

цепи белка). Сопоставляя строение полученных пептидов с первичной структурой полиэдрина ВЯП *B. mori* [11], можно реконструировать три фрагмента полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *M. brassicae*, расположив их вдоль полипептидной цепи в местах, соответствующих аналогичным фрагментам полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *B. mori*. Ниже приведена схема реконструкции фрагментов полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *M. brassicae*:



Приняв принцип подсчета чисел «соответствий» [12], избранный нами для определения степени родства полиэдринов разных бакуловирусов [13], можно выяснить степень гомологии реконструированных фрагментов полиэдрина ВЯП *M. brassicae* с соответствующими фрагментами полиэдрина ВЯП *B. mori*, *G. mellonella* и *P. dispar*. Степень гомологии равна 95 %, 92 % и 90 % соответственно. Можно предположить, что при выяснении полной аминокислотной последовательности степеней гомологии полиэдрина ВЯП *M. brassicae* с полиэдринами перечисленных ранее ВЯП не выйдет за нижний предел (84 %), установленный нами для этих белков [13].

STRUCTURE OF CERTAIN TRYPTIC PEPTIDES OF THE POLYHEDRIN  
OF THE *MAMESTRA BRASSICAE* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

*E. A. Kozlov, S. B. Serebryany*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

19 peptides are isolated from tryptic hydrolysate of the polyhedrin of the *M. brassicae* nuclear polyhedrosis virus and their amino acid sequence comprising 90 amino acid residues is determined. Three fragments (3-34, 65-105, 159-173) accounting for 35 % of the whole polyhedrin polypeptide chain are reconstructed.

1. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.—Биохимия, 1978, 43, № 12, с. 2189—2195.
2. Серусодержащие аминокислоты полиэдренного белка вируса желтухи тутового шелкопряда / С. Б. Серебряный, В. М. Кавсан, В. К. Кибирев, М. С. Кацман.—Химия природ. соединений, 1968, № 3, с. 174—178.
3. Shaw E. Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin.—Meth. Enzymol., 1967, 11, p. 677—686.
4. Кавсан В. М., Мороз Л. В., Серебряный С. Б. Приспособление для горизонтального высоковольтного электрофореза на бумаге упрощенной конструкции.—Укр. биохим. журн., 1968, 40, № 1, с. 104—106.
5. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation.—Meth. Enzymol., 1967, 11, p. 469—475.
6. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата / Е. И. Виноградова, М. Ю. Фейгина, Н. А. Алданова и др.—Биохимия, 1973, 38, № 1, с. 3—21.
7. Хроматография в тонких слоях полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмудов, А. С. Пышкин.—Химия природ. соединений, 1971, № 1, с. 66—88.
8. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques.—Biochim. et biophys. acta, 1969, 107, N 2, p. 386—388.
9. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, *Porthetria dispar* / Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный.—Биоорг. химия, 1981, 7, № 7, с. 985—995.
10. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли, *Galleria mellonella* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный.—Там же, 1981, 7, № 7, с. 996—1007.
11. Реконструкция полипептидной цепи белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. Полная аминокислотная последовательность / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман и др.—Там же, 1978, 4, № 8, с. 1048—1053.
12. Haber J. E., Koshland D. E. An evolution of the relatedness of proteins based on comparison of amino acid sequences.—J. Mol. Biol., 1970, 50, N 3, p. 617—639.
13. Сравнение аминокислотной последовательности белков тел включений вирусов ядерного полиэдроза тутового, непарного шелкопряда и большой вошинной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.—Биоорг. химия, 1981, 7, № 7, с. 1008—1015.

Ин-т молекулярной биологии  
и генетики АН УССР, Киев

Получено 28.08.84