



Структура и функция биополимеров

УДК 577.112.5:578.841

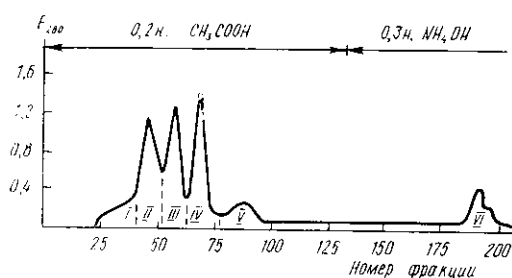
СТРОЕНИЕ ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM*

И. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Роднин, С. В. Серебряный

Из проведенного нами ранее сравнительного исследования физико-химических свойств [1, 2] и первичной структуры [3, 4] полиэдринов ряда бакуловирусов очевидно, что полиэдрины составляют группу высокомолекулярных белков. Поэтому для всех полиэдринов была выбрана одна стратегия выяснения первичной структуры: установление аминокислотной последовательности триптических пептидов и реконструкция полипептидной цепи белка путем сравнения строения пептидов с известной аминокислотной последовательностью эталонного полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *Bombyx mori* [5]. Настоящее сообщение посвящено выделению, очистке и выяснению аминокислотной последовательности триптических пептидов и реконструкции полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *A. segetum*.

Материалы и методы. Белок получали, восстанавливали, карбоксиметилировали и расщепляли трипсином, как описано для полиэдрина ВЯП капустной совки [4]. Растворимые при pH 5,0 пептиды разделяли предварительно гель-фильтрованием через сефадекс G-25 (тонкий). Условия гель-фильтрования приведены в подписи к рисунку. Дальнейшую очистку пептидов высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге осуществляли, как описано в [4]. В этой же работе приведен состав электролитов и растворителей для электрофореза и хроматографии, а также методы определения аминокислотного состава и секвенирования пептидов.

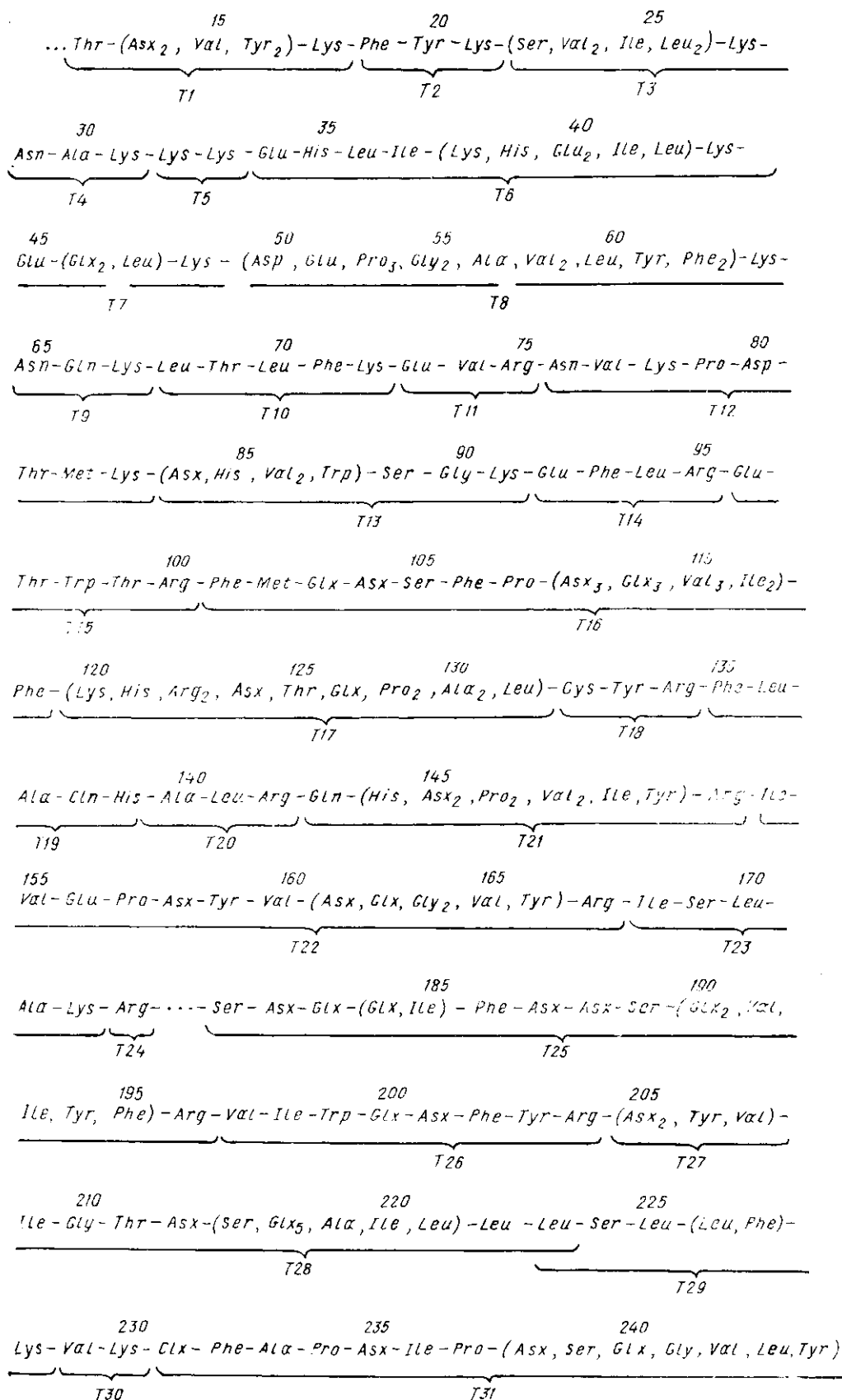
Результаты и обсуждение. На рисунке представлен результат предварительного разделения гель-фильтрованием пептидов, растворимых при pH 5,0. При растворении триптического гидролизата в 0,2 н.



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

Separation of the soluble at pH 5.0 tryptic peptides of the polyhedrin of *A. segetum* NPV on a 2.5×110 cm column with Sephadex G-25. Flow rate — 30 ml/hour. Column fraction — 5 ml.

уксусной кислоте (120 мг в 5 мл) образуется суспензия, величина pH которой 5,0. Нерастворимый материал (ТН) удаляли центрифугированием. При разделении пептидов, растворимых при pH 5,0, часть материала осаждалась на колонке в результате снижения pH с 5,0 до 2,7



Аминокислотный состав триптических пептидов полиэдрина ВЯП *A. segetum*
 Amino acid composition of a tryptic peptides of the polyhedrin of the nuclear polyhedrosis virus

| Амино-кислота | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|-----|---------|---------|---------|---------|
| Lys | 1,0 (1) | 1,0 (1) | 1,0 (1) | 1,0 (1) | (2) | 1,8 (2) | 1,1 (1) | 0,9 (1) | 1,0 (1) |
| His | — | — | — | — | — | 1,6 (2) | — | — | — |
| Arg | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Asp | 2,2 (2) | — | — | 1,0 (1) | — | — | — | 1,2 (1) | 1,0 (1) |
| Thr | 0,8 (1) | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Ser | — | — | 1,2 (1) | — | — | — | — | — | — |
| Glu | — | — | — | — | — | 3,0 (3) | 2,9 (3) | 1,2 (1) | 1,0 (1) |
| Pro | — | — | — | — | — | — | — | 2,5 (3) | — |
| Gly | — | — | — | — | — | — | — | 2,2 (2) | — |
| Ala | — | — | — | 0,8 (1) | — | — | — | 1,2 (1) | — |
| 1/2 Cys | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Val | 1,1 (1) | — | 1,5 (2) | — | — | — | — | 1,5 (2) | — |
| Met | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Ile | — | — | 1,0 (1) | — | — | 2,0 (2) | — | — | — |
| Leu | — | — | 2,0 (2) | — | — | 2,3 (2) | 0,9 (1) | 1,0 (1) | — |
| Tyr | 1,7 (2) | 1,1 (1) | — | — | — | — | — | 0,6 (1) | — |
| Phe | — | 0,9 (1) | — | — | — | — | — | 1,8 (2) | — |
| Trp | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Всего | 7 | 3 | 7 | 3 | 2 | 11 | 5 | 15 | 3 |

| Амино-кислота | T18 | T19 | T20 | T21 | T22 | T22' | T23 | T24 | T25 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|---------|
| Lys | — | — | — | — | — | — | 1,2 (1) | — | — |
| His | — | 0,7 (1) | — | 1,0 (1) | — | — | — | — | — |
| Arg | 1,0 (1) | — | 1,0 (1) | 1,0 (1) | 0,9 (1) | — | — | (1) | 1,1 (1) |
| Asp | — | — | — | 2,2 (2) | 2,3 (2) | 1,2 (1) | — | — | 2,9 (3) |
| Thr | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Ser | — | — | — | — | — | — | 0,9 (1) | — | 2,3 (2) |
| Glu | — | 1,2 (1) | — | 1,2 (1) | 2,3 (2) | 1,2 (1) | — | — | 3,7 (4) |
| Pro | — | — | — | 2,2 (2) | 1,3 (1) | 1,0 (1) | — | — | — |
| Gly | — | — | — | — | 2,3 (2) | — | — | — | — |
| Ala | — | 1,0 (1) | 0,9 (1) | — | — | — | 0,9 (1) | — | — |
| 1/2 Cys | 0,3 (1) | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Val | — | — | — | 1,6 (2) | 2,5 (3) | 0,6 (1) | — | — | 0,6 (1) |
| Met | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Ile | — | — | — | 0,6 (1) | 0,5 (1) | 0,6 (1) | 0,9 (1) | — | 1,3 (2) |
| Leu | — | 1,0 (1) | 1,0 (1) | — | — | — | 1,1 (1) | — | — |
| Tyr | 1,0 (1) | — | — | 0,8 (1) | 1,8 (2) | 1,0 (1) | — | — | 1,2 (1) |
| Phe | — | 1,0 (1) | — | — | — | — | — | — | 1,9 (2) |
| Trp | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Всего | 3 | 5 | 3 | 11 | 14 | 6 | 5 | 1 | 16 |

(рН 0,2 н. уксусной кислоты). Этот материал элюировали с колонки 0,3 н. раствором аммиака. Дальнейшее разделение и очистку пептидов из фракций I—VI, полученных гель-фильтрованием через сефадекс, осуществляли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

В табл. 1 приведен аминокислотный состав полученных пептидов, в табл. 2 — их строение и стадии очистки.

Строение пептида T5 было выяснено, исходя из аминокислотного состава и подвижности пептида при электрофорезе (рН 6,5). Из подвижности пептида следует, что он содержит два остатка лизина.

В пептиде T21 дансил-методом не удается определение N-концевого остатка аминокислоты. По аналогии с соответствующим триптическим пептидом полиэдрина ВЯП *B.mori* [6] предполагается, что пептид T12 содержит на N-конце остаток глутамина, который превратился в пирролидонкарбоновую кислоту в процессе выделения пептида.

Таким образом, всего получено 36 пептидов, насчитывающих в

(NPV) of *A. segetum*

| T10 | T11 | T12 | T13 | T13' | T14 | T15 | T16 | C17 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1,0 (1) | — | 2,0 (2) | 1,0 (1) | 1,0 (1) | — | — | — | 1,2 (1) |
| — | — | — | 1,0 (1) | — | — | — | — | 0,8 (1) |
| — | 1,0 (1) | — | — | — | 1,0 (1) | 1,0 (1) | — | 2,2 (2) |
| 0,9 (1) | — | 2,1 (2) | 1,2 (1) | — | — | — | 4,1 (4) | 0,9 (1) |
| — | — | 1,1 (1) | — | — | — | 1,6 (2) | — | 1,0 (1) |
| — | 1,0 (1) | — | 1,0 (1) | 0,8 (1) | — | — | 0,9 (1) | — |
| — | — | 0,9 (1) | — | — | 1,0 (1) | 1,1 (1) | 3,7 (4) | 1,0 (1) |
| — | — | — | 1,2 (1) | 1,2 (1) | — | — | 1,0 (1) | 2,1 (2) |
| — | — | — | — | — | — | — | — | 2,0 (2) |
| — | — | 0,9 (1) | 1,5 (2) | — | — | — | 2,2 (3) | — |
| — | — | 0,3 (1) | — | — | — | — | 0,7 (1) | — |
| — | 0,8 (1) | — | — | — | — | — | 1,7 (2) | — |
| 2,0 (2) | — | — | — | — | 1,0 (1) | — | — | 0,8 (1) |
| — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 1,1 (1) | — | — | — | — | 1,0 (1) | — | 2,7 (3) | — |
| — | — | — | +(1) | — | — | +(1) | — | — |
| 5 | 3 | 8 | 8 | 3 | 4 | 5 | 19 | 12 |
| T25' | T26 | T26' | T27 | T28 | T28' | T29 | T30 | T31 |
| — | — | — | — | — | — | 0,9 (1) | 1,0 (1) | — |
| — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 1,0 (1) | 0,9 (1) | — | — | — | — | — | — | — |
| 2,0 (2) | 1,1 (1) | 1,1 (1) | 2,2 (2) | 1,1 (1) | 1,1 (1) | — | — | 2,1 (2) |
| — | — | — | — | 0,9 (1) | 1,0 (1) | — | — | — |
| 0,9 (1) | — | — | — | 1,1 (1) | 0,9 (1) | 0,9 (1) | — | 0,9 (1) |
| 2,2 (2) | 1,3 (1) | 1,3 (1) | — | 4,7 (5) | 4,6 (5) | — | — | 2,1 (2) |
| — | — | — | — | — | — | — | — | 1,5 (2) |
| — | — | — | — | 1,3 (1) | 1,0 (1) | — | — | 1,0 (1) |
| — | — | — | — | 0,9 (1) | 1,0 (1) | — | — | 1,1 (1) |
| — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,8 (1) | 0,5 (1) | 0,5 (1) | 0,9 (1) | — | — | — | 1,0 (1) | 0,6 (1) |
| — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,7 (1) | 0,5 (1) | 0,7 (1) | — | 1,5 (2) | 1,6 (2) | — | — | 0,4 (1) |
| — | — | — | — | 2,5 (3) | 1,6 (2) | — | — | 0,6 (1) |
| 1,2 (1) | 0,6 (1) | 0,6 (1) | 0,7 (1) | — | — | 3,0 (3) | — | 1,0 (1) |
| 0,9 (1) | 1,0 (1) | 1,0 (1) | — | — | — | — | — | 1,0 (1) |
| — | +(1) | +(1) | — | — | — | — | — | — |
| 10 | 8 | 7 | 4 | 15 | 14 | 6 | 2 | 14 |

сумме 263 остатка аминокислот. Выяснена полная или частичная аминокислотная последовательность 24 пептидов. Пять пептидов, обозначенные штрихом, имеют последовательности, перекрывающиеся с последовательностями одноименных пептидов без штриха. 31 пептид с уникальными аминокислотными последовательностями насчитывают 226 остатков, что составляет 93 % длины всей полипептидной цепи белка, если считать, что полиэдрин ВЯП *A. segetum* имеет молекулярную массу 28000 и содержит 244 остатка аминокислот [1]. Сопоставление строения пептидов с известной аминокислотной последовательностью полиэдрина ВЯП *V. mori* [5] дает возможность локализовать их вдоль полипептидной цепи и реконструировать таким путем два крупных фрагмента полиэдрина ВЯП *A. segetum*. N-концевой остаток метионина полипептидной цепи определен ранее на целом белке [2].

По реконструированным фрагментам можно рассчитать степень гомологии их с аналогичными фрагментами полиэдрина ВЯП *V. mori*, *Galleria mellonella* и *Porthetria dispar* [3], приняв принцип расчета,

Таблица 2

Аминокислотная последовательность триптических пептидов полиэдрина ВЯП *A. segetum*Amino acid sequence of a tryptic peptides of the polyhedrin of *A. segetum* NPV

| Пептид | Стадии очистки | Последовательность |
|--------|-------------------|--|
| T1 | IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Thr-(Asx ₂ , Val, Tyr ₂)-Lys |
| T2 | IV, ЭФ1, ЭФ2 | Phe-Tyr-Lys |
| T3 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | (Ser, Val ₂ , Ile, Leu ₂)-Lys |
| T4 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Asn-Ala-Lys |
| T5 | III, ЭФ1 | Lys-Lys |
| T6 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Glu-His-Leu-Ile-(Lys, His, Glu ₂ , Ile, Leu)-Lys |
| T7 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Glu-(Glx ₂ , Leu)-Lys |
| T8 | I, ЭФ1, ЭФ2, БХ | (Asp, Glu, Pro ₃ , Gly ₂ , Ala, Val ₂ , Leu, Tyr, Phe ₂)-Lys |
| T9 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Asn-Gln-Lys |
| T10 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Leu-Thr-Leu-Phe-Lys |
| T11 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Glu-Ile-Arg |
| T12 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Asn-Val-Lys-Pro-Asp-Thr-Met-Lys |
| T13 | IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ | (His, Asx, Val ₂ , Trp)-Ser-Gly-Lys |
| T13' | II, ЭФ1, ЭФ2 | Ser-Gly-Lys |
| T14 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Glu-Phe-Leu-Arg |
| T15 | IV, ЭФ1, ЭФ2 | Glu-Thr-Trp-Thr-Arg |
| T16 | I, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Phe-Met-Glx-Asx-Ser-Phe-Pro-(Asx ₃ , Glx ₃ , Val ₃ , Ile ₂)-Phe |
| T17 | II ЭФ1, ЭФ2 | (Lys, His, Arg ₂ , Asx, Thr, Glx, Pro ₂ , Ala ₂ , Leu) |
| T18 | V, ЭФ1, ЭФ2 | (Cys, Tyr)-Arg |
| T19 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Phe-Leu-Ala-Gln-His |
| T20 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Ala-Leu-Arg |
| T21 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Gln-(His, Asx ₂ , Pro ₂ , Val ₂ , Ile, Tyr)-Arg |
| T22 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Ile-Val-Glu-Pro-Asx-Tyr-Val-(Asx, Glx, Gly ₂ , Val, Tyr)-Arg |
| T22' | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Ile-Val-(Asx, Glx, Pro)-Tyr |
| T23 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Ile-Ser-Leu-Ala-Lys |
| T24 | II, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Arg |
| T25 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Ser-Asx-Glx-(Glx, Ile)-Phe-Asx-Asx-Ser-(Glx ₂ , Val, Ile, Tyr, Phe)-Arg |
| T25' | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Asx-Asx-Ser-(Glx ₂ , Val, Ile, Tyr, Phe)-Arg |
| T26 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Val-Ile-Trp-Glx-Asx-Phe-Tyr-Arg |
| T26' | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Val-Ile-Trp-Glx-Asx-Phe-Tyr |
| T27 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | (Asn ₂ , Val, Tyr) |
| T28 | I, ЭФ1, ЭФ2 | Ile-Gly-Thr-Asx-(Ser, Glx ₅ , Ala, Ile, Leu)-Leu-Leu |
| T28' | II, ЭФ1, ЭФ2 | Ile-Gly-Thr-Asx-(Ser, Glx ₅ , Ala, Ile, Leu)-Leu |
| T29 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Leu-Ser-Leu-(Leu, Phe)-Lys |
| T30 | II, ЭФ1, ЭФ2 | Val-Lys, |
| T31 | III, ЭФ1, ЭФ2, БХ | Glx-Phe-Ala-Pro-Asx-Ile-Pro-(Asx, Ser, Glx, Gly, Val, Leu, Tyr) |

Примечание. I—IV — фракции, полученные гелевым фильтрованием через сефадекс; ЭФ1, ЭФ2 — высоковольтный электрофорез в электролитах при pH 6,5 и 1,9 соответственно [4]; БХ — хроматография на бумаге в системе н-бутанол; уксусная кислота: пиридин: вода (15:3:10:12); стрелками обозначены стадии ступенчатой дегградации.

избранный нами для полиэдринов бакуловирусов [3]. Степень гомологии реконструированных фрагментов полиэдрина ВЯП *A. segetum* с аналогичными фрагментами полиэдрина перечисленных выше ВЯП равна соответственно — 84 %, 82 % и 80 %. Очевидно, что все исследованные нами полиэдрины [3, 4] можно отнести к группе высокомолекулярных белков.

THE STRUCTURE OF THE TRYPTIC PEPTIDES OF POLYHEDRIN OF THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *AGROTIS SEGETUM*

N. M. Gusak, E. A. Kozlov, N. V. Rodnin, S. B. Serebryany

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

Summary

36 peptides comprising 263 amino acid residues are isolated from the tryptic hydrolyzate of the polyhedrin of the nuclear polyhedrosis virus of *Agrotis segetum* and amino acid sequence of 24 peptides are determined. Two extended fragments (12-173 and 181-244) comprising 226 amino acid residues are constructed that accounts for 93 % of the length of the whole polyhedrin polypeptide chain.

1. Сравнительное биохимическое исследование полиэдриных белков вирусов ядерного полиэдроза / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.— Биохимия, 1978, 43, № 12, с. 2189—2195.
2. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдроза и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный.— Биополимеры и клетка, 1985, 1, № 3, с. 121—124.
3. 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.— Биоорганическая химия, 1981, 7, № 7, с. 1008—1015;
4. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдроза капустной совки, *Mamestra brassicae*.— Биополимеры и клетка, 1985, 1, № 4, с. 194—198.
5. 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.— Биоорганическая химия, 1978, 4, № 8, с. 1048—1053.
6. Триптические фрагменты маленированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. 2. Аминокислотная последовательность фрагментов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман и др.— Биоорганическая химия, 1978, 4, № 8, с. 1036—1047.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 28.08.84