



УДК 543.51

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ НЕКОТОРЫХ
ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Барам Г. И., Грачев М. А., Назимов Н. В.,
Плетнев А. Г., Прессман Е. К., Рубин С. Г.**,
Савышков Я. А.**, Семашко Н. В.**, Чумаков М. П.**,
Шемякин В. В.*, Ямщиков В. Ф.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР;*

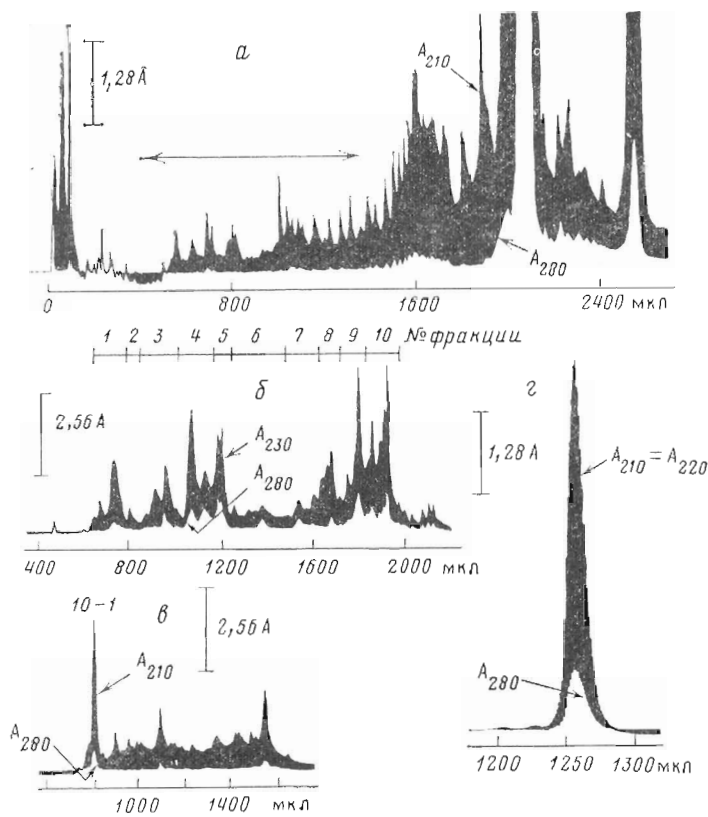
**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва;*

***Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Вирус весенне-летнего клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает тяжелые заболевания у людей во многих странах, и поэтому в настоящее время он всесторонне изучается с использованием современных методов физико-химической биологии. Геном ВКЭ в виде набора кДНК клонирован в *E. coli* и частично секвенирован [1]. Установлена последовательность четырех N-концевых аминокислот белка оболочки ВКЭ (белок Е) [2]. Белок Е был подвергнут триптическому гидролизу, полученные пептиды разделены методом ВЭЖХ и исследованы на их способность реагировать с антителами против ВКЭ [3]. Полученный с помощью физико-химических методов очищенный белок Е в опытах на животных проявил себя как «субъединичная» вакцина — его иммунологические свойства мало отличались от свойств целого ВКЭ [3–5]. Одной из целей вышеуказанных работ является создание генно-инженерных вакцин против ВКЭ.

В данной работе описано разделение триптического гидролизата белка Е обращенно-фазовой микроколоночной ВЭЖХ с использованием многоволновой фотометрической детекции и представлены результаты определения последовательности аминокислот четырех выделенных триптических пептидов. Оказалось, что эти последовательности полностью соответствуют последовательностям нуклеотидов, найденным в гене белка Е.

ВКЭ, штамм Софии, выращивали на культуре клеток почки человека, очищали его ультрацентрифугированием, разрушали тритоном X-100 и полученный белок Е выделяли в индивидуальном состоянии согласно [4]. Значение молекулярной массы, определенное методом гель-электрофореза, оказалось равным 55 000 Да в соответствии с данными работы [6]. Полученный раствор белка (1 мг/мл в 1% тритоне X-100) гидролизовали 24 ч при 37°С трипсином (0,03 мг/мл), очищенным методом ВЭЖХ по [7]. Полученный гидролизат хроматографировали на колонке (2×62 мм) с нуклеосилом 5-C-18 (Maschery-Nagel, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила (0–80%, общий объем 2500 мкл) в 0,01 М трифторуксусной кислоте при скорости элюции 100 мкл/мин (рисунок а) на хроматографе «Обь-4» [8] с одновременной детекцией при двух длинах волны (210 и 280 нм). При низких концентрациях ацетонитрила элюируются пептиды, при высоких — в основном компоненты детергента. Пептиды из 10 разделений (1 мг, 20 нмоль белка Е) объединяли, как отмечено стрелками (см. рисунок а), и рехроматографировали в той же системе с детекцией при 230 и 280 нм (рисунок б). Каждую из полученных фракций 1–10 рехроматографировали на той же колонке при нейтральном pH (градиент концентрации ацетонитрила 0–50% в 0,01 М трис-ацетатном буфере, pH 7,2). Нако-



Хроматография пептидов триптического гидролизата белка Е ВКЭ. Способ графического представления данных при использовании многоволновой детекции подробно описан в работе [8]. *a* — исходный гидролизат с триптоном X-100, хроматография в кислой среде; *б* — объединенные пептидные фракции хроматограммы, показанной на рисунке *a*; *в* — рехроматография фракции 10 (рисунок *б*) в нейтральной среде; *г* — рехроматография пика 10-1 (рисунок *б*) в кислой среде. Условия описаны в тексте

нец, полученные пики снова рехроматографировали в кислой среде (0,01 M трифторуксусная кислота, см. выше). Второй и третий этапы очистки пептида 10-1, одного из исследованных здесь пептидов, показаны на рисунке *в* и *г*. Три других полученных пептида (таблица) также были гомогенными при хроматографии.

Спектральные отношения A_{220}/A_{210} и A_{280}/A_{210} для двух из полученных пептидов свидетельствовали о наличии в них остатков триптофана (пептиды 10-1 и 4-3); на основании аналогичных данных для двух других пептидов можно было утверждать, что триптофан и тирозин они не содержат (пептиды 8-3-2 и 8-4, таблица).

Количества полученных пептидов составляли 2–5 нмоль. После их упаривания автоматическую деградацию пептидов осуществляли на секвенаторе 890 C (Beckman, США) по программе № 102974. Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот проводили методами ВЭЖХ и параллельно путем кислотного гидролиза до аминокислот с их идентификацией на аминокислотном анализаторе с флуориметрической детекцией (реакция с *o*-фталевым альдегидом; анализатор LC 7000, Biotronik, ФРГ). Полученные результаты суммированы в таблице.

Здесь же представлены последовательности аминокислот, выведенные из цуклеотидных последовательностей участка генома ВКЭ. Получение и клонирование кДНК участков генома ВКЭ было описано ранее [1]. Последовательности нуклеотидов определяли методом Максама — Гилберта [9]. Полная последовательность нуклеотидов гена белка Е будет опубликована позднее.

Последовательность аминокислот некоторых триптических пептидов белка оболочки ВРЭ

Номер пептида	Последовательность аминокислот	$\frac{A_{220}}{A_{210}}$	$\frac{A_{220}}{A_{210}}$
4-3	X-Glu-Gly-Ala-Gln-Asn-Trp-Asn-Asn-X-Glu- * Thr-Glu-Gly-Ala-Gln-Asn-Trp-Asn-Asn-Ala-Glu-Arg **	0,95	0,16
8-3-2 ***	X-Val-Leu-Ile-X-Ser-X-Ala-Gln-Gly-Asp-Leu- * Ser-Val-Leu-Ile-Pro-Ser-His-Ala-Gln-Gly-Asp-Leu-Thr-Gly- -Arg **	0,49	0
10-1	X-Leu-Glu-Gly-Asp-X-Leu- * Trp-Leu-Glu-Gly-Asp-Ser-Leu-Arg **	1,0	0,16
8-4	Leu-Val-X-Phe-X-X-X-X-Ala-Val-Lys * Leu-Val-Glu-Phe-Gly-Ala-Pro-His-Ala-Val-Lys **	0,49	0

* По данным секвенирования пептидов.

** По данным определения последовательности нуклеотидов.

*** Этот пептид — N-концевой пептид белка E, судя по тому, что его N-концевая последовательность совпадает с N-концевой последовательностью белка E, определенной в работе [2] (Ser-Val-Leu-Ile-), и по тому, что соответствующая ему последовательность нуклеотидов находится на 5'-конце гена белка E; пептиду 8-3-2 предшествует последовательность Arg-Arg-, известный сайт протенина процессинга [10].

В настоящем сообщении впервые описывается применение микроколонночного жидкостного хроматографа «Обь-4» (коммерческое название «Милхром») [8] для наработки пептидов перед секвенированием. Прибор хорошо подходит для этой цели и позволяет легко выделять пептиды из сложных смесей в масштабе 1–10 нмоль. Его преимуществами по сравнению с другими хроматографами являются: 1) обеспечиваемая им возможность одновременной фотометрической детекции при нескольких длинах волн; 2) уменьшенный примерно в 10 раз расход растворителей и сорбентов; 3) повышение чистоты получаемых пептидов благодаря снижению расхода растворителей; 4) сведение потерь пептидов к минимуму в результате того, что большая удельная нагрузка на сорбент позволяет не уменьшать их концентрацию ниже 10^{-4} М.

Авторы выражают глубокую признательность академикам Ю. А. Овчинникову и Д. Г. Кюорре за интерес к работе и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чумаков М. П., Кусов Ю. Ю., Рубин С. Г., Сальников Я. А., Семашко И. В., Георгиев Г. П., Чумаков П. М., Грачев М. А., Шаманин В. А., Плетнев А. Г. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 276–279.
2. Boege U., Heinz F., Wengler G., Kunz C. Virology, 1983, v. 126, № 2, p. 651–657.
3. Winkler G., Heinz F., Kunz C. J. Chromatogr., 1984, v. 297, № 1, p. 63–73.
4. Чумаков М. П., Кусов Ю. Ю., Рубин С. Г., Семашко И. В., Сальников Я. А., Рейнгольд В. Н., Прессман Е. К., Цехановская Н. А. Вopr. вирусологии, 1984, т. 29, № 6, с. 694–701.
5. Чумаков М. П., Рубин С. Г., Кусов Ю. Ю., Семашко И. В., Сальников Я. А., Прессман Е. К., Цехановская Н. А. Вopr. вирусологии, 1984, т. 29, № 6, с. 701–706.
6. Westaway E. G., Schlesinger R. W., Trent D. W. Intervirology, 1980, v. 14, № 1, p. 114–117.
7. Titani K., Sasagawa T., Resing K., Walsh K. A. In: High-performance liquid chromatography of proteins and peptides/Eds Hearn M. T., Regnier F. E., Wehr C. T. N. Y.—L.: Acad. Press, 1983, p. 121–129.
8. Baram G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. J. Chromatogr., 1983, v. 264, № 1, p. 69–90.
9. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
10. Bell J. R., Kinney R. M., Trent D. W., Lenches E. M., Dalgarno L., Strauss J. H. Virology, 1985, v. 143, № 1, p. 224–229.

Поступило в редакцию
3.IX.1985

SEQUENCES OF SOME TRYPTIC PEPTIDES OF THE TICK-BORNE
ENCEPHALITIS VIRUS ENVELOPE PROTEIN

BARAM G. I., GRACHEV M. A., NAZIMOV I. V.*, PLETNEV A. G.,
PRESSMAN E. K., RUBIN S. G.**, SALNIKOV Ya. A.**, SEMASHKO I. V.**,
CHUMAKOV M. P.**, SHEMYAKIN V. V.*, YAMSHCHIKOV V. F.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR;*

**M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of
Sciences of the USSR, Moscow;*

***Institute of Polyomyelitis and Viral Encephalitides, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Protein E of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) (strain Sofin) was treated with purified trypsin in 1% Triton X-100, and the peptides thus obtained were separated by micro-column reversed-phase chromatography. Four of the purified peptides were sequenced, their structures being in accordance with the nucleotide sequence of the viral protein E gene. Amino acid sequences of peptides deduced from the cDNA primary structure are: Ser-Val-Leu-Ile-Pro-Ser-His-Ala-Gln-Gly-Asp-Leu-Thr-Gly-Arg (N-terminal peptide of protein E); Thr-Glu-Gly-Ala-Gln-Asn-Trp-Asn-Ala-Glu-Arg; Trp-Leu-Glu-Gly-Asp-Ser-Leu-Arg; Leu-Val-Glu-Phe-Gly-Ala-Pro-Ile-Ala-Val-Lys.