



УДК 577.112.5

© 1990 г.

*З. А. Акименко, С. А. Зыков, С. И. Ястребов,  
В. И. Офицеров*

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГРИППА

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии, ИПО  
«Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Для одностадийного выделения белков вируса гриппа А человека — матриксного нуклеопротеинового и гемагглютинина — использован метод обращенно-фазовой ВЭЖХ на макропористом носителе Полисил-ОДС-500. Гомогенность выделенных белков подтверждена данными аминокислотного анализа, секвенированием по Эдману, гель-электрофорезом.

Вирус гриппа — один из наиболее полно изученных вирусных объектов. Из литературы известны различные методы выделения из вирионов гриппа структурных белков: гемагглютинина (НА), нейраминидазы (НА), нуклеопротеинового (НР) и матриксного (М) белка. Используется, например, протеолитическое извлечение НА и НА [1, 2] и выделение НА и НА избирательной солиubilизацией вирионов [3, 4]; выделение М-белка экстракцией [5], разделение белков электрофорезом [6], колоночной хроматографией [7]. Опубликовано несколько работ по применению ВЭЖХ для получения структурных белков вируса гриппа [8, 9]. Однако широкие возможности современной хроматографии, в частности обращенно-фазовой ВЭЖХ, на наш взгляд, использованы с этой целью не полностью. Настоящая работа посвящена хроматографическому разделению и характеристике структурных белков вируса гриппа А двух подтипов — H3N2 и H1N1.

Одной из проблем, возникающих при работе с гидрофобными белками, к которым относится большинство вирусных белков, является их низкая растворимость. Методы солиubilизации таких белков, позволяющие непосредственно после растворения проводить обращенно-фазовую хроматографию, весьма ограничены: элюция гидрофобных полипептидов часто требует особых условий из-за их прочного связывания с сорбентом [10—13]. Структура сорбентов также существенно влияет на эффективность разделения белков. Так, макропористые носители с диаметром пор 30 нм и более обладают значительными преимуществами по сравнению с узкопористыми (диаметр пор 6—7 нм) [14]. В данной работе мы использовали новые отечественные макропористые сорбенты для ВЭЖХ Полисил-300-ОДС и Полисил-500-ОДС. На первом этапе были опробованы опубликованные ранее условия диссоциации вирионов гриппа гуанидинийгидрохлоридом и система элюции с градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте [9]. Однако при этом наблюдалось недостаточно эффективное разделение вирусных белков и их низкий выход, обусловленный, вероятно, необратимой сорбцией.

Известны примеры обращенно-фазовой хроматографии гидрофобных полипептидов яичного желтка и структурных белков полиовируса в системах, содержащих муравьиную кислоту, в градиенте концентрации пропанола или ацетонитрила [13, 15]. Муравьиная кислота в концентрации

Использованные сокращения: НА — гемагглютинин, НА — нейраминидаза, НР — нуклеопротеиновый белок, М — матриксный белок.

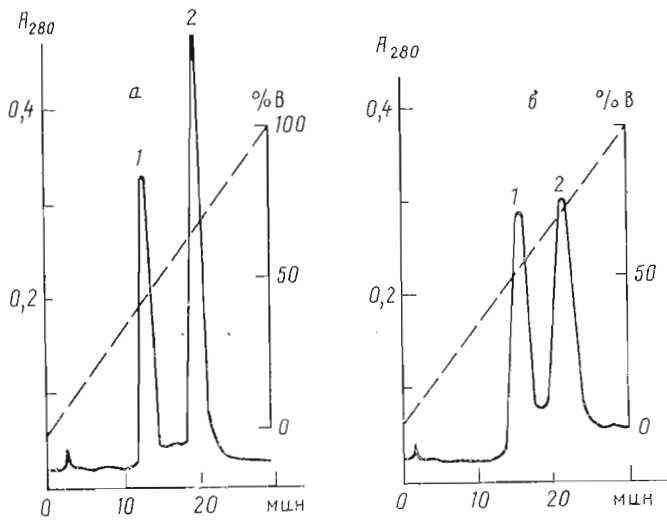


Рис. 1. Разделение модельной смеси бычьего сывороточного альбумина (1) и овальбумина (2) на колонке (4,6 × 40 мм): а — Полисил-ОДС-500 (10 мкм); элюенты: А — 60% муравьиная кислота, В — муравьиная кислота — изопропанол — вода, 4 : 5 : 1 (а), и муравьиная кислота — ацетонитрил — вода, 4 : 5 : 1 (б). Штриховой линией показано процентное содержание элюента В в элюирующем растворе А. Скорость потока 1 мл/мин

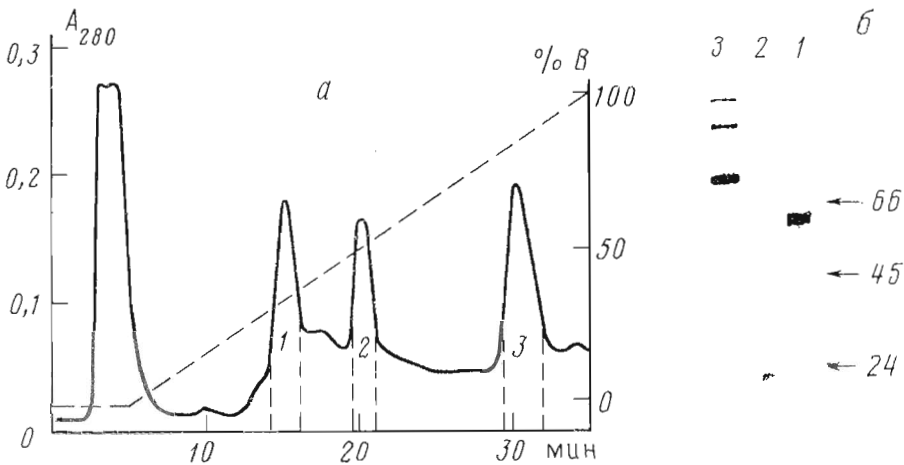


Рис. 2. Хроматографическое разделение белков вируса гриппа, штамм Чили 1/83, подтип H1N1, ВЭЖХ в условиях, приведенных на рис. 1а (а), и электрофоретический анализ чистоты полученных фракций NP- (1), М- (2) и HA-белков (3) по Лэмли [16] (б) (номер дорожки соответствует номеру фракции). Цифры справа — молекулярные массы маркерных белков (в килодальтонах)

60% и выше обладает высокой солибилизирующей способностью и, как показали наши эксперименты, может быть использована также и для диссоциации вирионов гриппа с целью получения растворов вирусных полипептидов, пригодных для нанесения на хроматографическую колонку. Оптимальный состав элюирующих растворов на основе 60% муравьиной кислоты для сорбентов Полисил-ОДС был определен при хроматографии модельной смеси белков: овальбумина и бычьего сывороточного альбумина. Было установлено, что изопропанол в муравьиной кислоте позволяет добиться лучшего разделения белков по сравнению с ацетонитрилом (рис. 1). Кроме того, показано, что качество разделения модельных полипептидов в системах на основе муравьиной кислоты на колонках с Полисилом-300-ОДС несколько хуже, чем на носителе Полисил-500-ОДС, который и был использован во всех дальнейших экспериментах по разделению структурных белков вируса гриппа.

Перед нанесением на колонку вирионы гриппа растворяли в 80% муравьиной кислоте. Все операции по растворению, хроматографии и дис-

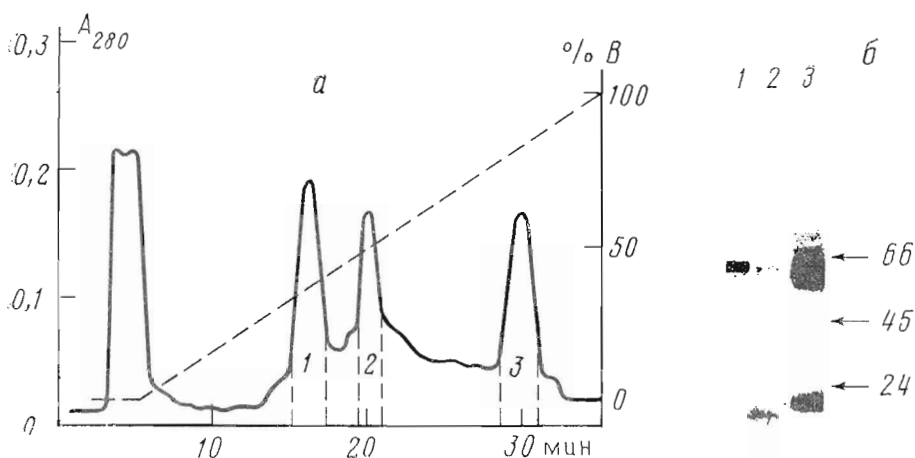


Рис. 3. Хроматографическое разделение белков вируса гриппа, штамм Ленинград 385/80, подтип Н3N2 (а), и электрофоретический анализ фракций (б). Все условия и обозначения как на рис. 2, за исключением того, что перед нанесением на гель фракции прогревались 2 мин при 100° С в присутствии 5 мМ 2-меркаптоэтанола для разрушения дисульфидной связи в молекуле НА

фильной сушке выделенных фракций проводили оперативно в течение 2—4 ч, что позволило избежать гидролиза белков по кислотолабильным связям. При хроматографии на Полисиле-500-ОДС (рис. 2, 3) выделили фракции достаточно гомогенных структурных белков НА, NP и М (М 78, 60 и 22 кДа соответственно). Суммарный выход белков практически количественный, на небольшой аналитической колонке размером 4,6 × 40 мм удалось без ухудшения качества разделения хроматографировать до 2 мг исходной смеси вирусных полипептидов.

С целью подтверждения строения выделенных белков и для соотнесения их с полипептидами вируса гриппа, структура которых определена по последовательности нуклеотидов в геноме [17, 18], мы провели определение N-концевой аминокислотной последовательности белков, полученных при хроматографии. Для НА вируса А подтипа Н1N1 (штамм Чили 1/83) были выявлены две аминокислотные последовательности, соответствующие тяжелой и легкой цепям НА, связанные дисульфидными связями (табл. 1). У гемагглютинина из подтипа Н3N2 (штамм Ленинград 385/80) определялась только аминокислотная последовательность легкой цепи. Этот результат совпадает с опубликованными данными по секвенсу гемагглютинина вируса гриппа А того же подтипа (штамм Гонконг), где в тяжелой цепи гемагглютинина имеется N-концевая пироглутаминовая кислота, неспособная к отщеплению по реакции Эдмана [19].

При секвенировании М- и NP-белков, выделенных нами из двух используемых в работе подтипов вируса гриппа А, аминокислотные последовательности не определялись. Такой результат мог быть следствием модификации, например ацилирования N-концевых аминокислот этих белков в процессе их биосинтеза в клетках. Можно допустить также, что блокирование N-концевых аминокислот выделяемых белков произошло в процессе растворения и хроматографии вирусного материала в муравьиной кислоте.

Для проверки второй гипотезы нами был проведен эксперимент по секвенированию смеси всех белков вириона гриппа в условиях (см. «Экспер. часть»), исключая их N-концевую модификацию в процессе очистки. По литературным данным, белки НА, NP и М составляют примерно по 30% от суммарного количества вирусных полипептидов [20], и лишь 10% суммарного белка приходится на все остальные вирусные белки, включая нейраминидазу, поэтому их вклад в секвенс по сравнению с НА-, NP- и М-белками незначителен и не должен превышать фона. Следовательно, при тотальном секвенсе смеси всех вирусных полипептидов можно было ожидать определения главным образом четырех аминокислотных

Данные секвенирования N-концевых последовательностей  
гемагглютининов  
Подчеркнуты аминокислоты, определенные экспериментально

Пептид	Штамм	Последовательность
HA, тяжелая цепь	Чили 1/83	<u>DTICIGYH</u>
HA, легкая цепь	»	<u>GLFAIAGF</u>
HA, тяжелая цепь	Ленинград 385/80	<u>QDLPGNDN</u>
HA, легкая цепь	»	<u>GLFAIAGF</u>

Таблица 2

Сравнительный аминокислотный состав основных структурных белков  
вируса гриппа, штаммы Чили 1/83 и Ленинград 385/80 \*

Аминокислота	HA (Чили)		** NP (PR8/ /34), рассчитано	NP (Чили), найдено	NP (Ле- нинград), найдено	M (Чили)	
	рассчи- тано	найдено				рассчи- тано	найдено
D+N	65	65	49	50	48,8	17	17,1
T	28	31,1	28	26,6	26	16	12
S	50	48,8	40	32	40	19	20,5
E+Q	60	67,1	57	54,6	57	32	26,2
P	18	23	17	30	21	8	
G	41	46,6	41	37	44	17	16,5
A	27	33,4	39	36	39	25	20
V	33	34,3	23	24,2	27,1	16	13,8
M	8	11,4	25	17	17,8	14	7,2
I	33	34,1	29	25	28,8	11	10,6
L	42	47,8	32	32,5	38,1	26	19,1
Y	26	29	15	11,5	17,9	5	5
F	19	21,6	16	25,3	19,3	7	10
H	13	24	6	10,8	11	5	5
W	11						
K	42	40,5	21	23,5	24,9	13	8,2
R	18	24	48	35	39,1	17	18
C	15		6			3	

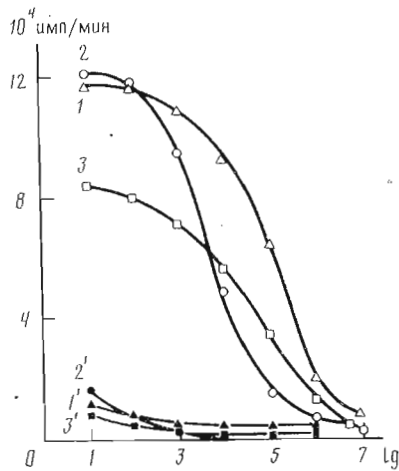
\* Расчетные данные аминокислотного состава белков приведены по работам [17, 18].

\*\* Данные представлены Н. А. Петровым (ВНИИ молекулярной биологии, Новосибирск)..

последовательностей, соответствующих M-, NP-белкам, а также двум цепям гемагглютинина. Однако в этом эксперименте по сиквенсу смеси всех белков вируса гриппа для подтипа H1N1 четко прослеживались лишь N-концевые последовательности легкой и тяжелой цепи HA, а для подтипа H3N2 — только легкой цепи гемагглютинина. В обоих случаях не определялись аминокислотные последовательности M- и NP-белков, что, очевидно, может быть объяснено наличием в них блокированных в процессе биосинтеза N-концевых аминокислот. Строение выделенных хроматографией индивидуальных белков вируса гриппа было подтверждено анализом их аминокислотного состава. Как видно из табл. 2, экспериментально определенный аминокислотный состав HA-, NP- и M-белков удовлетворительно совпадает с данными, рассчитанными на основании структуры соответствующих генов [17, 18].

Жесткие условия солиubilизации и хроматографии, использованные нами, скорее всего могли привести к полной денатурации выделенных белков и утрате отдельных антигенных детерминант. На рис. 4 приведены сравнительные данные радиоиммуноанализа вируса гриппа, а также гемагглютининов, выделенных хроматографически и мягкой обработкой вирионов тритоном X-100 по [20]. Гемагглютинин, выделенный обращенно-фазовой хроматографией, в значительной степени сохраняет иммунохимическую активность нативного белка и взаимодействует с кроличьей антисывороткой к вирусу гриппа (рис. 4).

Рис. 4. Связывание антигенов с гипериммунной кроличьей сывороткой к вирусу гриппа А Чили/1/83 (твердофазный радиоиммуноанализ). По оси абсцисс — lg разведения сыворотки, по оси ординат — связывание антигенов с сывороткой. 1 — вирус гриппа А Чили/1/83; 2 — НА, выделенный солибализацией детергентом тритон X-100; 3 — НА, полученный хроматографией на Полисил-ОДС-500; 1', 2', 3' — связывание этих же образцов с сывороткой неиммунизированного кролика



### Экспериментальная часть

В работе использовали акриламид, N,N-метилен-бис-акриламид, додецилсульфат натрия, кумасси ярко-голубой R-250, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Serva, ФРГ), 2-меркаптоэтанол, азид натрия, бычий сывороточный альбумин, овальбумин (Sigma, США); реактив Фолвина, фенилизотиоцианат, дансилхлорид, бутилхлорид (Merck, ФРГ), остальные реактивы и растворители отечественного производства марки х.ч. или ос.ч. Реактивы и растворители для секвенирования дополнительно очищали по методикам, приведенным в работе [21].

Для ВЭЖХ белков использовали хроматограф Altex 332 и колонки (4,6 × 40 мм) с 10-мкм сорбентами Полисил-500-ОДС и Полисил-300-ОДС производства НПО «Вектор».

Аминокислотный анализ проводили после гидролиза белкового материала (6 н. HCl; 0,05% фенола, 105° С, 24—36 ч) на анализаторе аминокислот Biotronic-5001 (ФРГ); радиоиммуноанализ — как описано в работе [22], измеряя радиоактивность образцов на приборе Rackgamma (ЛКВ, Швеция).

Дегградацию белков по Эдману осуществляли в ручном варианте в модификации [23], а также в полуавтоматическом режиме на газофазном секвенаторе, созданном в НПО «Вектор». Образец белка для секвенирования растворяли в 15 мкл трифторуксусной кислоты и наносили на активированный стеклянный фильтр для последующего секвенирования в ручном или автоматическом режиме. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот в процессе секвенирования проводили на хроматографе Analyst-7800 (DC, США), используя колонку (4 × 250 мм) Spherisorb RP 18 и градиент ацетонитрила в 0,02 М ацетате натрия, рН 5,3, при 37° С со скоростью 0,8 мл/мин.

Электрофорез осуществляли в 13,5% полиакриламидном геле по [16], используя для окраски белковых полос кумасси R-250. Определение количества белка осуществляли по методу Лоурн в модификации [24], используя для построения калибровочной кривой бычий сывороточный альбумин.

В работе использованы вакцинные штаммы вируса гриппа А Чили 1/83 (H1N1) и Ленинград 385/80 (H3N2) в виде концентрата отечественного производства. Перед хроматографией вирионы осаждали в течение 30 мин из концентрата центрифугированием при 15 000 g или концентрат вируса лиофильно высушивали. Непосредственно перед нанесением на колонку образец вирусного материала растворяли в 80% муравьиной кислоте. Выделенные хроматографические фракции упаривали в вакууме при 30° С или лиофильно высушивали.

Для секвенирования смеси структурных белков лиофилизированный образец вируса гриппа растворяли в трифторуксусной кислоте и переносили в ячейку газофазного секвенатора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brand C., Skehel J. // Nature New Biol. 1972. V. 238. P. 145—147.
2. Allen A., Skehel J., Vaferov V. // J. Gen. Virol. 1977. V. 37. № 3. P. 625—628.
3. Brady M., Furminger J. // J. Hyg. 1976. V. 77. № 1. P. 161—172.
4. Bachmayer H. // Intervirology. 1975. V. 5. № 5. P. 260—272.
5. Gregoriadis A. // J. Virology. 1980. V. 36. № 2. P. 470—479.
6. Laver W. // Adv. Virus Res. 1973. V. 18. P. 59—100.
7. Johanson J., Busugara J., Lovgren K., Morein B. // Prep. Biochem. 1988. V. 18. № 4. P. 405—412.
8. Calam D., Davidson J. // J. Chromatogr. 1984. V. 296. № 2. P. 285—292.
9. Phelam M., Cohen K. // J. Chromatogr. 1983. V. 226. № 1. P. 55—66.
10. Walker J., Fearnley J. // Techniques for the Analysis of membrane proteins / Eds. Ragan C., Cherry R. L.: Chapman and Hall, 1986. P. 235—284.
11. Akiomaa P., Hallman M. // Analyt. Biochem. 1988. V. 174. № 1. P. 207—212.
12. Welling G. W., Van Der Zee R., Welling-Wester S. // J. Chromatogr. 1987. V. 418. P. 223—243.
13. Sheumack D., Burley R. // Analyt. Biochem. 1988. V. 174. № 2. P. 548—551.
14. Koraciewicz W., Fulton S., Lee S. // J. Chromatogr. 1987. V. 409. № 1. P. 111—124.
15. Heukeshoven J., Dernik R. // J. Chromatogr. 1985. V. 326. № 1. P. 91—101.
16. Laemmly U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 265—275.
17. Беклемишев А. Б., Блинов В. М., Василенко С. К. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 636—640.
18. Самохвалов Е. И., Каргинов В. А., Чужииков В. Е. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1080—1085.
19. Ward C. W., Dorheide T. A. // Brit. Med. Bull. 1979. V. 35. № 1. P. 51—56.
20. Шопнин П., Компанс Р. // Вирусы гриппа и грипп / Ред. Клязьбурн Э. Д. М.: Медицина, 1978. С. 37—46.
21. Reimann F., Wittman-Liebold B. // Polypeptide hormones / Eds Beers R. F., Bossett E. F. Twelfth miles internat. symp. Raven Press, 1980. P. 87—120.
22. Jackson D., Brown L., White D. // J. Gen. Virol. 1981. V. 52. № 1. P. 163—168.
23. Tarr G. E. // Methods in protein sequence analysis / Ed. Elzinga M. Humana Press, 1980. P. 223—232.
24. Peterson G. L. // Meth. Enzymol. 1983. V. 91. P. 91—119.

Поступила в редакцию  
20.III.1990

Z. A. AKIMENKO, S. A. ZIKOV, S. I. YASTREBOV, V. I. OFITSEROV  
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
AND CHARACTERIZATION OF THE INFLUENZA VIRUS STRUCTURAL  
PROTEINS

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

Constituent proteins of human influenza virus A have been separated by reverse-phase HPLC on Polysil ODS-500. Their homogeneity is confirmed by the data of amino acid composition, Edman analysis and gel electrophoresis.