



УДК 547.962.02

ТРИПТИЧЕСКИЕ ФРАГМЕНТЫ МАЛЕИЛИРОВАННОГО БЕЛКА ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

I. РАЗДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФРАГМЕНТОВ

*Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С.,
Серебряный С. В.*

*Институт молекулярной биологии и генетики
Академии наук УССР, Киев*

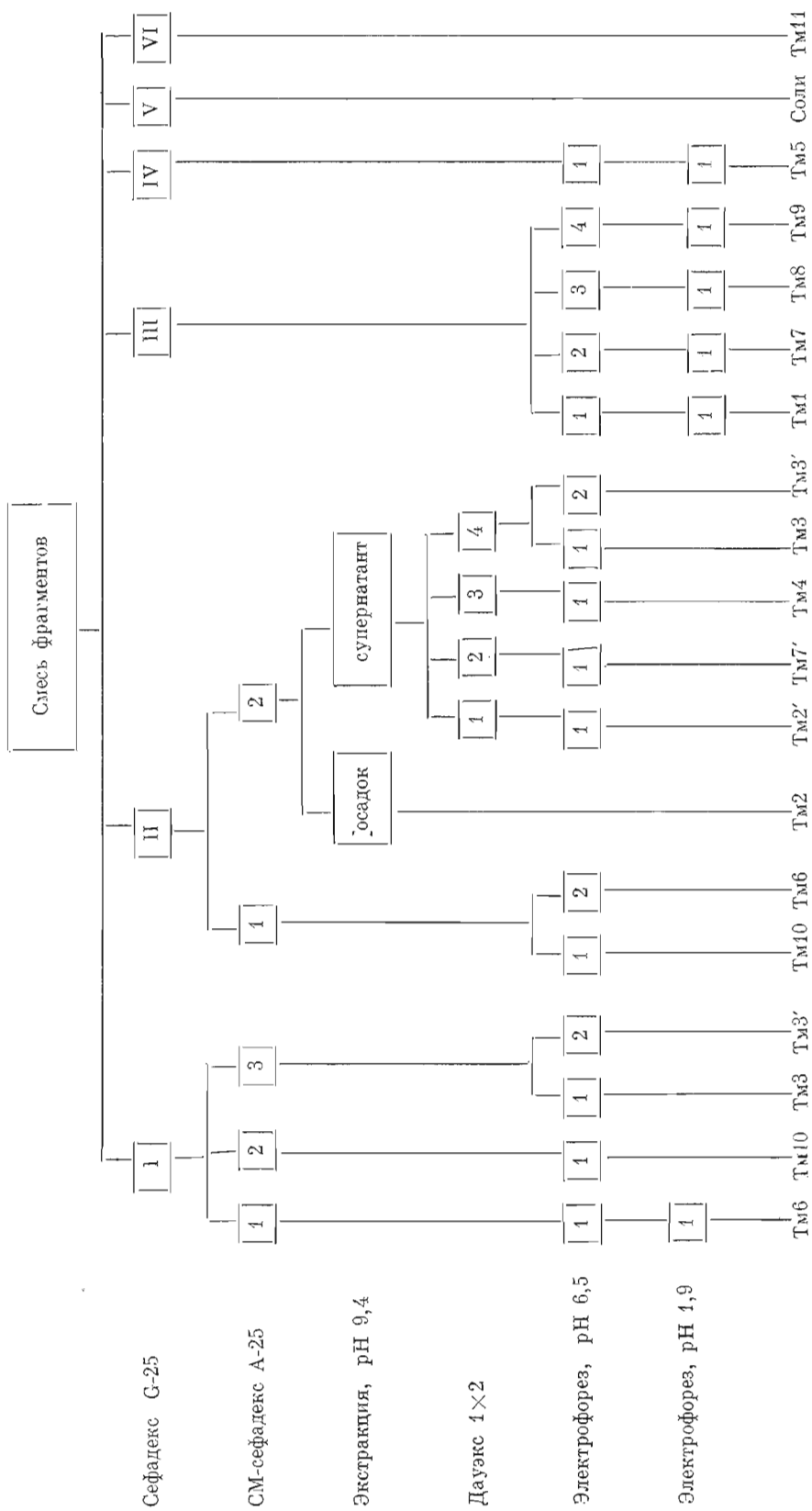
Белок тел включений (полиэдренный белок) вируса ядерного полиэдроza тутового шелкопряда обрабатывали малеиновым ангидридом и малеил-производное белка расщепляли трипсином. Смесь фрагментов после снятия защитных групп разделяли гель-фильтрованием на сефадексе G-25, ионообменной хроматографией на CM-сефадексе, дауэксе 1 × 2 и высоковольтным электрофорезом на бумаге. Получено 11 фрагментов. Определен их аминокислотный состав и N-концевые остатки.

Опубликованные нами результаты исследований пептидов триптического [1], химотриптического [2] и частичного кислотного гидролиза [2] полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроza (ВЯП) тутового шелкопряда не позволили реконструировать полипептидную цепь белка. В связи с этим было предпринято расщепление по остаткам аргинина восстановленного и карбоксиметилированного белка, предварительно модифицированного малеиновым ангидридом. Смесь фрагментов разделяли после удаления малеильных групп (см. схему).

Триптический гидролизат растворяли в концентрированной муравьиной кислоте и подвергали гель-фильтрованию через сефадекс G-25 в 30% уксусной кислоте. При этом часть материала задерживалась на колонке. Этот материал элюировали 0,3 н. аммиаком (рис. 1). Получено 6 фракций. Материал фракции I разделяли хроматографией на CM-сефадексе в градиенте pH. При этом получено 3 фракции: I-1, I-2 и I-3 (рис. 2). Высоковольтным электрофорезом (pH 6,5 и 4,9) из фракции I-1 выделен гомогенный фрагмент Tm6. Электрофорезом при pH 6,5 из фракций I-2 и I-3 выделены фрагменты Tm3, Tm3' и Tm10.

Материал фракции II разделяли на CM-сефадексе в тех же условиях, что и материал фракции I (рис. 3). Из материала пика II-1 очисткой его электрофорезом при pH 6,5 получены фрагменты Tm6 и Tm10. Смесь фрагментов фракции II-2 растворяли в пиридин-коллиндиновом буфере (pH 9,4). При этом часть материала оставалась нерастворенной. Этот материал представлял собой фрагмент Tm2. Растворимые фрагменты из пика II-2 разделяли на дауэксе 1 × 2 в градиенте молярности уксусной кислоты (рис. 4). Из фракций II-2-1, II-2-2 и II-2-3 электрофорезом при pH 6,5

Схема разделения триплических фрагментов малеилированного белка тел включенный вируса ядерного полидроза тутового шелкопряда



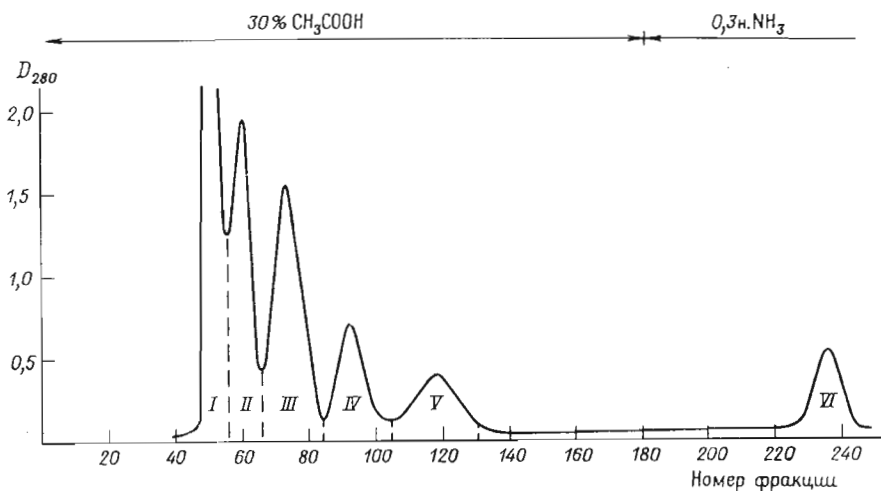


Рис. 1. Гель-фильтрация фрагментов триптического гидролиза малеилированного белка на сефадексе G-25 ($2,5 \times 100$ см). Скорость элюции 20 мл/ч. Объем фракции 3,2 мл. На колонку наносили 125 мг гидролизата в 4 мл 78% муравьиной кислоты

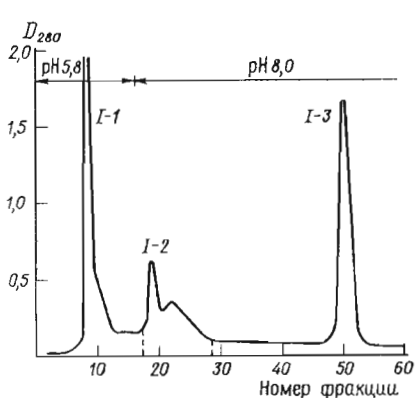


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография фракции I (рис. 1) на CM-сефадексе ($1,0 \times 40$ см) в фосфатных буферах с 6 М мочевиной. Скорость элюции 40 мл/ч. Объем фракции 3,5 мл

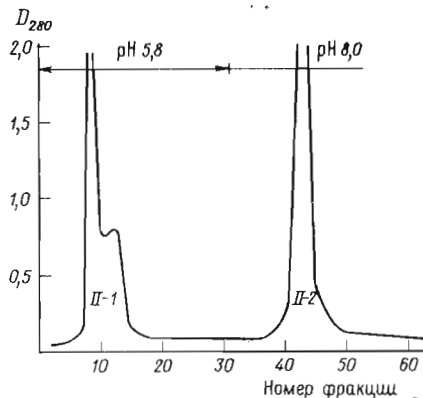


Рис. 3

Рис. 3. Хроматография фракции II (рис. 1) на CM-сефадексе ($1,0 \times 45$ см) в фосфатных буферах с 6 М мочевиной. Скорость элюции 40 мл/ч. Объем фракции 5 мл

получены фрагменты Тм2', Тм7' и Тм4 соответственно, а из фракции II-2-4 — фрагменты Тм3 и Тм3'.

Из фракции III (рис. 1) электрофорезом при pH 6,5 и затем 1,9 получены фрагменты Тм1, Тм7, Тм8, Тм9, а из фракции IV — фрагмент Тм5. Фракция V не содержит пептидного материала. Фракция VI представляет собой фрагмент Тм11.

Аминокислотный состав и N-концевые группы перечисленных выше фрагментов приведены в таблице. Интересно, что при определении аминокислотного состава фрагментов Тм3 и Тм3' метионин не обнаруживался, хотя в триптических пептидах из этих фрагментов [3] определялся.

Дансильрованием и методом Эдмана во фрагменте Тм8 не удалось определить N-концевого остатка: лейцинаминопептидаза на фрагмент не

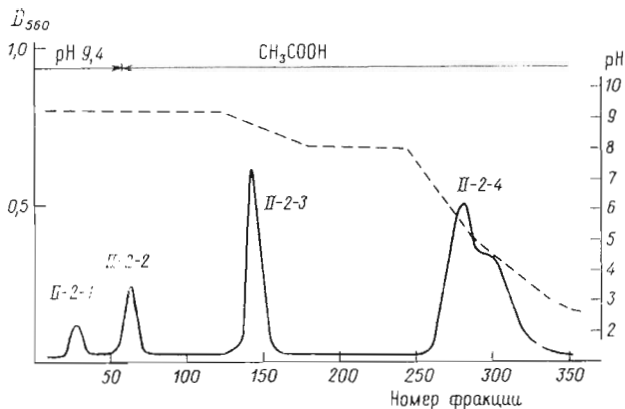


Рис. 4. Разделение фракции II-2 (рис. 3) на дауэксе 1×2 ($2,2 \times 160$ см) в градиенте CH_3COOH от 0,2 до 2 М (см. «Экспер. часть»). Скорость элюции 40 мл/ч. Объем фракции 8,4 мл

действует. Можно было бы думать, что Тм8 — N-концевой фрагмент полипептидной цепи белка, так как в белке N-концевой остаток аминокислоты обнаружен не был [4]. Однако фрагмент Тм1 содержит на N-конце пролин. Трудно предположить, что трипсином в белке полностью расщепляется связь Arg-Pro, так как выход этого фрагмента не ниже выхода любого другого фрагмента. Остается предположить, что полипептидная цепь полиэдренного белка ВЯП содержит на N-конце остаток пролина. Чтобы проверить это предположение, с помощью дансильирования в присутствии додецилсульфата натрия [5] было установлено, что N-концевым остатком белка является пролин. Кроме того, на немодифицированном белке была определена N-концевая последовательность трех остатков аминокислот. После удаления N-концевого остатка пролина по методу Эдмана белок подвергали действию лейцинаминопептидазы, в результате чего отщеплялись серин + амид и тирозин. Ясно, что фрагмент Тм1 представляет собой N-концевой участок полипептидной цепи белка.

Сумма аминокислот всех фрагментов равна 289. Однако по аминокислотному составу полипептидная цепь белка содержит 242 остатка [4]. Можно думать, что последовательности некоторых фрагментов перекрываются. Действительно, по аминокислотному составу фрагмент Тм7 равен фрагменту Тм7' и триптическому пептиду немодифицированного белка Cys-Tyr-Lys [1]. Фрагмент Тм7 содержит на N-конце остаток цистеина. Значит, последовательности фрагментов Тм7 и Тм7' перекрываются. Перекрываются, очевидно, последовательности фрагментов Тм3 и Тм3', так как их составы очень близки и фрагмент Тм3' не содержит аргинина. Аргинина не содержит также и фрагмент Тм11, очевидно, представляющий собой C-концевой фрагмент белка, так как по своему составу и физико-химическим свойствам он похож на C-концевой бромциановый фрагмент белка [6].

Структурные исследования, описанные в сопровождающей статье [3], показывают, что последовательности фрагментов Тм2 и Тм2' также перекрываются. Очевидно, фрагменты Тм2', Тм3' и Тм7' — результат расщепления трипсином в малеилированном белке пептидных связей, образованных остатками лизина. Можно полагать, что в этих участках полипептидной цепи малеилирование остатков лизина происходит не полностью.

Сумма аминокислотных остатков фрагментов Тм1 — Тм11 без перекрывающихся фрагментов, обозначенных штрихами (таблица), равна 244. Это хорошо согласуется с аминокислотным составом белка [4]. Поэтому мы полагаем, что были найдены все триптические фрагменты малеилированного белка. Исследование аминокислотной последовательности этих фрагментов описано в работе [3].

Аминокислотный состав триптических фрагментов малелированного белка (молярные отношения)

АМИНО- КИСЛОТА	Тм1	Тм2	Тм2'	Тм3	Тм3'	Тм4	Тм5	Тм6	Тм7	Тм7'	Тм8	Тм9	Тм10	Тм11
Lys		3,7(4)	4,4(1)	6,5(7)	3,5(4)	2,9(3)		4,1(1)	0,8(1)		0,8(1)		2,0(2)	3,0(3)
His				1,8(2)	1,7(2)				0,7(1)				0,5(1)	
Arg	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)		0,9(1)	1,1(1)	2,1(2)	0,9(1)		1,0(1)	1,2(1)	0,9(1)	
Asp	2,1(2)	3,7(4)	0,9(1)	5,4(5)	4,7(5)	3,1(3)		7,2(7)	1,0(1)		1,9(2)	1,9(2)	3,0(3)	
Thr	1,1(1)	0,9(1)		0,7(1)		1,3(1)	1,6(2)	0,8(1)					1,1(1)	3,1(3)
Ser	1,0(1)					0,6(1)		1,0(1)				1,0(1)	1,1(1)	1,8(2)
Glu		2,1(2)		8,4(8)	7,1(7)	1,0(1)	0,6(1)	1,0(1)	1,3(1)	1,0(1)	1,9(2)	1,0(1)	3,3(4)	1,6(2)
Pro	2,0(2)			1,9(2)	1,8(2)	1,2(1)		3,4(3)			1,0(1)	2,1(2)	2,4(2)	8,0(8)
Gly	1,1(1)			2,4(2)	2,3(2)	1,2(1)		2,6(3)			1,0(1)	1,2(1)	1,0(1)	3,5(4)
Ala		1,2(1)	0,7(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,2(1)				2,1(2)		1,0(1)	3,0(3)	2,0(2)
Cys(Cm)								1,1(1)	1,9(2)				1,1(1)	4,0(4)
Val		1,1(1)		2,2(2)	1,1(1)	2,0(2)		4,4(5)	0,8(1)		2,1(2)	1,2(1)	1,3(1)	2,8(3)
Met				(1)	(1)	0,8(1)		0,8(1)				1,3(2)	0,8(1)	
Ile	1,1(1)	1,2(1)		1,3(1)	1,0(1)	0,9(1)		1,0(1)			0,8(1)	1,1(1)	2,5(3)	5,4(6)
Leu		2,4(2)		5,5(6)	4,3(4)	2,2(2)		1,9(2)	2,1(2)	2,1(2)			1,1(1)	2,6(3)
Tyr		3,7(4)		1,2(1)	1,1(1)			1,0(1)	1,1(1)			2,0(2)	1,2(1)	2,7(3)
Phe	1,6(2)			1,8(2)	1,2(1)	1,0(1)		2,1(2)	1,1(1)	0,9(1)	0,9(1)		1,2(1)	3,9(4)
Trp				+	+	+	+		1,1(1)				1,9(2)	+
Всего	41	21	4	43	33	20	5	31	11	8	11	14	29	48
N-Конец	Pro	Thr	Asx	Lys	His	Asx	Glu	Phe	Cys(Cm)	Phe	-	Ile	Ile	Val

Экспериментальная часть

Белок получали растворением полиэдров в 67% уксусной кислоте [7], восстанавливали и карбоксиметилировали, как описано ранее [8].

Малеилирование белка проводили по методу [9]. К 1 г белка, растворенного в 100 мл 0,1 н. NaOH с 6 М мочевиной, добавляли небольшими порциями в течение 10 мин 1 г малеинового ангидрида в 6 мл диоксана; рН поддерживали в интервале 8,5—9 добавлением 4 н. раствора NaOH. Малеилирование проводили 30 мин при 0°. Белок обессоливали диализом против 0,2 н. NH_4HCO_3 .

Протеолиз трипсином. К раствору белка в 0,2 н. NH_4HCO_3 добавляли трипсин, обработанный кетоном Шоу (Serva, ФРГ). Фермент-субстратное соотношение 1 : 135. Гидролиз проводили 4 ч при 36°.

Удаление защитных групп. К триптическому гидролизату добавляли ледяную уксусную кислоту до рН 3,6, выдерживали 40 ч при 40° и лиофилизовали.

Сумму фрагментов разделяли, как указано в схеме.

Хроматографию на дауксе 1×2 проводили по методу [10]. Смесь фрагментов растворяли в пиридин-коллиндиновом буфере (рН 9,4). Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость наносили на колонку с ионообменником, уравновешенным буферным раствором (рН 9,4). Пропускали 500 мл этого раствора. Затем через смеситель емкостью 1 л, заполненный буфером (рН 9,4), пропускали по 1 л 0,2 и 2 н. уксусной кислоты. Нингидриновую реакцию проводили после щелочного гидролиза аликвот из фракций [11].

Электрофорез и хроматографию осуществляли на бумаге FN-17. Высоковольтный электрофорез проводили 1,5 ч при градиенте напряжения 60 В/см в электролитных растворах пиридин — уксусная кислота — вода (рН 6,5), 100 : 4 : 896 (А) и уксусная кислота — муравьиная кислота — вода (рН 1,9), 10:41,2:948,8 (Б). Хроматографировали в системах пиридин — изоамиловый спирт — вода, 35 : 35 : 30 (А) и бутанол — уксусная кислота — вода, 200 : 30 : 75 (Б).

Обессоливание фрагментов после разделения на СМ-сефадексе (рис. 2,3) осуществляли путем геле-фильтрования через сефадекс G-25 в 0,3 н. аммиаке.

Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот (BC-200, Biosal, ФРГ, Hd 1200E и AAA-881, СССР). Пробы гидролизovali в течение 24 ч при 105° под вакуумом с добавкой фенола. Триптофан определяли реакцией Эрлиха [12], N-концевую аминокислоту — дансилированием [13].

Авторы благодарят С. Н. Веремейченко за выполнение анализов на аминокислотных анализаторах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. (1976) Биохимия, 41, 228—236.
2. Кацман М. С., Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. (1977) Биоорг. химия, 3, 1455—1466.
3. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Гусак Н. М., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. (1978) Биоорг. химия, 4, 1036—1047.
4. Kozlov E. A., Levitina T. L., Sidorova N. M., Radavski Y. L., Serebryani S. B. (1975) J. Invert. Pathol., 25, 103—107.
5. Weiner A. M., Platt T., Weber K. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3242—3251.
6. Радавский Ю. Л., Сухаренко Н. В., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. (1976) Укр. біохім. ж., 48, 706—711.
7. Kozlov E. A., Sidorova N. M., Serebryani S. B. (1975) J. Invert. Pathol., 25, 97—101.
8. Серебряный С. Б., Кавсан В. М., Кибирев В. К., Кацман М. С. (1968) Химия природы. соедин., 174—178.
9. Butler P. J. G., Hartley B. S., Leburman R. (1969) Biochem. J., 112, 679—689.

10. Inouye M., Yamada M., Akaboshi E., Tsugita A. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3455—3484.
11. Moor S., Stein W. H. (1954) *J. Biol. Chem.*, 211, 907—913.
12. Easley C. N. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, 107, 386—390.
13. Gray W. (1967) *Methods Enzymol.*, 11, 469—475.

Поступила в редакцию
14.II.1978

**TRYPTIC FRAGMENTS OF THE MALEYLATED INCLUSION
BODY PROTEIN OF THE SILKWORM NUCLEAR
POLYHEDROSIS VIRUS.**

I. ISOLATION AND AMINO ACID COMPOSITION OF THE FRAGMENTS

KOZLOV E. A., LEVITINA T. L., KATSMAN M. S., SEREBRYANY S. B.

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

The polyhedral protein of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm was maleylated and subjected to tryptic digestion. The fragments were separated by gel filtration, ion-exchange chromatography and high-voltage paper electrophoresis. The amino acid composition and N-terminal residues of the 11 fragments thus obtained were determined.
