



УДК 547.962.02

ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ БЕЛКА ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСА  
ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА  
*PORTHETRIA DISPAR*

*Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Овандер М. Н.,  
Серебряный С. Б.*

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

Проведен триптический гидролиз белка тел включений (полиэдренного белка) вируса ядерного полиэдрога непарного шелкопряда *P. dispar*. Выделено 36 пептидов и установлена их аминокислотная последовательность. В 31 пептиде с перекрывающимися последовательностями содержится 237 остатков аминокислот.

Ранее нами была опубликована полная аминокислотная последовательность полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрога тутового шелкопряда *Bombyx mori* [1]. Полипептидная цепь этого белка содержит 244 аминокислотных остатка. Молекулярный вес полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрога *P. dispar*, так же как и *B. mori*, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, — 28 000 [2]. Мы предполагали, что число аминокислотных остатков в полипептидных цепях полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрога *P. dispar* и *B. mori* одинаковое, поэтому расчет аминокислотного состава белка *P. dispar* производили на 244 остатка [2]. Однако мы не исключаем возможности, что число остатков в этих белках может различаться и возможны вставки или делеции, включающие не более 10 остатков, так как при совместном электрофорезе в полиакриламидном геле полиэдренные белки вируса ядерного полиэдрога *P. dispar* и *B. mori* движутся одной полосой. Исходя из сходства аминокислотных составов и физико-химических свойств этих белков [2], можно предположить, что они гомологичны. Поэтому для выяснения первичной структуры полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрога *P. dispar* мы обратились к исследованию аминокислотной последовательности триптических пептидов этого белка.

Восстановленный и карбоксиметилированный белок гидролизовали трипсином. После удаления нерастворимого при pH 5,0 материала растворимые пептиды подвергали групповому разделению на сефадексе G-25. Получено семь фракций (I—VII) (рис. 1). При гель-фильтрации на сефадексе в 0,2 н. уксусной кислоте часть материала осаждается на колонке в результате снижения pH с 5,0 до 2,7 в процессе фракционирования. Этот материал элюировали 0,3 н. раствором аммиака (фракция VII). Пептиды, содержащиеся во фракциях I—VI, разделяли далее высоковольтным электрофорезом при pH 6,5 (ЭФ1) и 1,9 (ЭФ2) с последующей очисткой хроматографией на бумаге (БХ).

Аминокислотный состав триптических пептидов белка тел включений вируса ядерного полиэдроза *P. dispar*

АМИНО- КИСЛОТА	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T8'
Lys	1,0(1)	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	0,9(1)	0,8(1)	1,0(1)		0,8(1)
His								2,1(2)	2,1(2)
Arg							0,8(1)	1,0(1)	0,9(1)
Asp		1,0(1)	2,0(2)		0,8(1)				
Thr			0,8(1)		0,8(1)				
Ser		0,7(1)							
Glu						1,0(1)	1,2(1)	4,7(5)	5,5(6)
Pro		1,1(1)							
Gly		1,1(1)			1,1(1)				
Ala		1,1(1)				1,2(1)			
Cys(Cm)									
Val			1,0(1)		1,1(1)				
Met	1,0(1)								
Ile					1,1(1)			1,0(1)	1,1(1)
Leu		1,0(1)			1,2(1)			1,1(1)	0,9(1)
Tyr		1,0(1)	1,9(2)	2,0(2)					
Phe									
Trp									
Всего	2	8	7	3	7	3	3	10	12
N-Концевая	Met	Asn	Thr	Tyr	Asn	Gln	Arg	His	Gln

АМИНО- КИСЛОТА	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17
Lys		0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)		1,6(2)	1,0(1)		
His	1,0(1)								
Arg	1,0(1)				1,0(1)			1,0(1)	1,2(1)
Asp	2,1(2)	0,8(1)	1,0(1)			2,0(2)	1,0(1)		
Thr				1,0(1)		1,0(1)			1,7(2)
Ser	0,7(1)						1,0(1)		
Glu		1,0(1)	1,0(1)		0,8(1)			1,1(1)	1,1(1)
Pro		2,2(2)				1,3(1)			
Gly		1,8(2)					1,2(1)		
Ala		1,0(1)							
Cys(Cm)									
Val		1,0(1)				1,3(1)	1,9(2)		
Met						0,6(1)			
Ile					1,1(1)				
Leu	2,2(2)	1,1(1)		2,1(2)			1,0(1)	1,0(1)	
Tyr		2,1(2)							
Phe		1,0(1)		0,9(1)				0,9(1)	
Trp							+ (1)		+ (1)
Всего	7	13	3	5	3	8	8	4	5
N-Концевая	Ser	Tyr	Asn	Leu	Glu	Asn	Leu	Glu	Glu

Аминокислотный состав триптических пептидов, растворимых при pH 5,0, приведен в табл. 1. N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных (табл. 2). Для установления строения крупных пептидов их дополнительно расщепляли ферментами. Образовавшиеся при этом фрагменты разделяли высоковольтным электрофорезом при pH 6,5 и 1,9. Строение этих пептидов обсуждается ниже.

*Пептид T1* (III, ЭФ1, ЭФ2) \*. При аминокислотном анализе пептида обнаружены две аминокислоты, одна из которых лизин. С большой колон-

\* В скобках указаны стадии очистки пептидов (см. «Экспериментальную часть»).

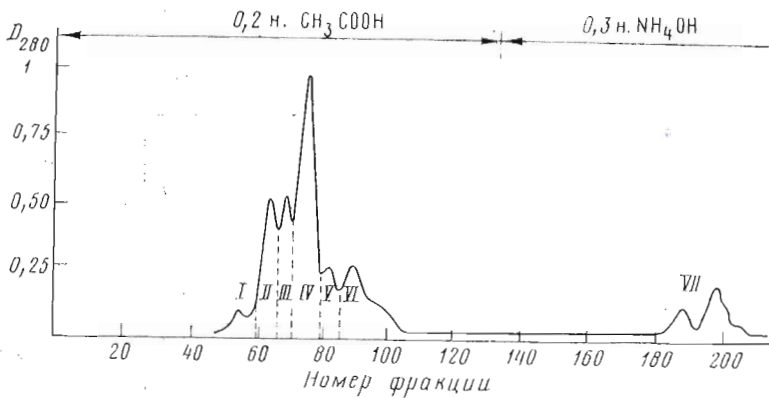
Таблица 1 (продолжение)

АМИНО- КИСЛОТА	T18	T19	T20	T21	T21'	T22	T23	T24	T25
Lys			1,0(1)					0,8(1)	
His				0,9(1)		1,0(1)			
Arg		2,2(3)		1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)	0,9(1)		(1)
Asp	3,9(4)	2,2(2)				1,0(1)	2,0(2)		
Thr		1,7(2)					1,1(1)		
Ser	1,1(1)						1,1(1)	0,7(1)	
Glu	4,2(4)			0,9(1)		2,0(2)	3,4(3)		
Pro	1,0(1)	2,4(2)				1,3(1)	1,5(1)		
Gly						1,1(1)			
Ala				2,0(2)	1,1(1)			1,4(1)	
Cys(Cm)			0,5(1)						
Val	2,3(2)	1,2(1)		1,1(1)		1,9(2)	2,0(2)		
Met	1,2(2)								
Ile	2,0(2)	1,2(1)				0,9(1)	0,7(1)	0,9(1)	
Leu		1,2(1)		1,0(1)	1,1(1)			1,2(1)	
Tyr	0,9(1)		0,9(1)			1,1(1)	1,2(2)		
Phe	2,3(2)			1,0(1)					
Trp									
Всего	19	12	3	8	3	11	14	5	1
N-Концевая	Phe	Leu	Cys(Cm)	Phe	Ala	Gln	Ile	Ile	Arg

АМИНО- КИСЛОТА	T26	T27	T28	T29	T30	T30'
Lys				1,1(1)		1,0(1)
His		0,8(1)	0,9(1)			
Arg	1,0(1)					
Asp		1,1(1)			1,3(1)	1,0(1)
Thr			1,8(2)			
Ser		0,8(1)	0,9(1)			
Glu			1,2(1)		2,0(2)	1,9(2)
Pro	1,1(1)				2,7(3)	3,2(3)
Gly	3,0(3)				1,2(1)	1,1(1)
Ala		1,2(1)			2,8(3)	2,5(3)
Cys(Cm)	+(1)					
Val						
Met						
Ile	0,9(1)			0,9(1)		0,9(1)
Leu		1,2(1)			1,0(1)	1,1(1)
Tyr		1,0(1)			1,0(1)	1,1(1)
Phe			2,0(2)		1,9(2)	2,2(2)
Trp						
Всего	7	6	7	2	14	16
N-Концевая	Gly	Asn	Thr	Ile	Ile	Glu

ки анализатора вторая аминокислота элюируется за несколько минут раньше, чем метионинсульфоксид. Возможно, это какая-то окисленная форма метионина. Дансильным методом в пептиде обнаружена аминокислота, которая не разделяется со стандартом Dns-метионина. На этом основании в табл. 1 состав пептида T1 условно записан как Lys (1,0), Met (1,0). Можно предполагать, что пептид T1 имеет строение Met-Lys.

*Пептид T2* (III, ЭФ1, ЭФ2). Методом Эдмана определена последовательность трех остатков: Asn-Tyr-Ser-. Далее пептид расщепляли химотрипсином в течение 6 ч. Получены 3 пептида со следующим аминокислотным составом: T2Ch1 — Asp (1,0), Tyr (1,0); T2Ch2 — Asp (1,1), Ser (0,8), Pro (1,1), Ala (1,2), Leu (0,8), Tyr (0,9); T2Ch3 — Lys (1,3), Ser (0,6), Pro (1,0), Gly (1,0), Ala (0,9), Leu (1,0). Аминокислотная последовательность пептида T2Ch3, определенная методом Эдмана, приве-



Разделение на колонке (2,5×110 см) с сефадексом G-25 растворимых при pH 5,0<sup>0</sup> триптических пептидов полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *P. dispar.* Скорость элюции 40 мл/ч, объем фракций 5,5 мл

дена в табл. 3. Сопоставлением данных аминокислотного анализа и данных определения N-концевой последовательности полученных пептидов для пептида T2 была установлена полная аминокислотная последовательность: Asn-Tyr-Ser-Pro-Ala-Leu-Gly-Lys.

**Пептид T8** (I, ЭФ1; II, ЭФ1, ЭФ2). Методом Эдмана в сочетании с дансильрованием определены две аминокислоты с N-конца — His-Leu-; в 3-м положении и далее обнаружить аминокислоты не удастся. В результате расщепления пептида T8 термолизином в течение 24 ч получены 4 пептида со следующим аминокислотным составом: T8Th1 — His; T8Th2 — His (1,6), Glu (3,3), Leu (1,0); T8Th3 — Arg (1,0), Glu (2,1), Ile (0,9); T8Th4 — His (0,8), Glu (3,3), Leu (0,9). Результаты определения структуры термолитических пептидов представлены в табл. 3. Анализ полученных данных с учетом определения N-концевой последовательности пептида T8 позволил установить его аминокислотную последовательность: His-Leu-Gln-Glu-Glu-His-Ile-Glu-Glu-Arg.

Из подвижности пептида при электрофорезе при pH 6,5 следует, что из пяти остатков глутаминовой кислоты только один должен быть амидирован. По аналогии с соответствующим пептидом белка тел включений вируса ядерного полиэдроза *B. mori* [1] амид поставлен в 3-м положении.

**Пептид T8'** (ЭФ1, ЭФ2) в отличие от пептида T8 содержит больше на остаток глутаминовой кислоты и лизина. Лейцинаминопептидаза на пептид T8' не действует. Дансильрованием N-концевую аминокислоту определить также не удастся. По-видимому, в пептиде N-концевое положение занимает остаток глутамина, зациклизовавшийся в пирролидонкарбоновую кислоту в процессе очистки пептида. Очевидно, C-концевая часть пептида T7 представляет собой начало последовательности пептида T8'. Поэтому пептиду T8' приписано строение Gln-Lys-His-Leu-Gln-Glu-Glu-His-Ile-Glu-Glu-Arg.

**Пептид T10** (III, ЭФ1, ЭФ2). Лейцинаминопептидаза за 20 ч отщепляет от пептида Glu (1,0), Ala (1,0), Val (1,0), Leu (1,0), Tyr (1,0). Методом Эдмана определены 3 остатка: Tyr-Leu-Val-. При расщеплении пептида T10 химотрипсином получены 2 пептида со следующим аминокислотным составом: T10Ch1 — Asp (1,1), Glu (1,3), Pro (1,0), Ala (1,1), Val (0,6), Leu (1,2), Tyr (0,8), Phe (1,0); T10Ch2 — Lys (1,0), Pro (1,1), Gly (2,1), Tyr (0,8). Определение N-концевой последовательности полученных пептидов (табл. 3) позволило установить последовательность пептида T10: Tyr-Leu-Val-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe-Tyr-Gly-Pro-Gly-Lys.

**Пептид T15** (IV, ЭФ1, ЭФ2) имеет N-концевую последовательность Leu-Val-Val-. В результате расщепления пептида химотрипсином получены 2 пептида со следующим аминокислотным составом: T15Ch1 — Asp (1,4),

Структура триптических пептидов полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *P. dispar*

Пептид	Стадии очистки	Аминокислотная последовательность *
T3	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Thr-Tyr-Val-Tyr-Asp-Asn-Lys
T4	IV, ЭФ1	Tyr-Tyr-Lys
T5	II, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Leu-Gly-Thr-Val-Ile-Lys
T6	III, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Gln-Ala-Lys
T7	III, ЭФ1, ЭФ2	Arg-Gln-Lys
T9	III, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ser-Leu-Asp-His-Leu-Asp-Arg
T11	IV, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Gln-Lys
T12	III, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys
T13	IV, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Ile-Arg
T14	I, ЭФ1; II, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Val-Lys-Pro-Asp-Thr-Met-Lys
T16	IV, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Phe-Leu-Arg
T17	VI, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg
T20	IV, ЭФ1, ЭФ2	Cys (Cm)-Tyr-Lys
T21	II, ЭФ1, ЭФ2	Phe-Val-Ala-Gln-His-Ala-Leu-Arg
T21'	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ala-Leu-Arg
T24	II, ЭФ1, ЭФ2	Ile-Ser-Leu-Ala-Lys
T26	III, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Gly-Gly-Gly-Cys (Cm)-Pro-Ile-Arg
T27	IV, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Leu-His-Ser-Ala-Tyr
T28	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Thr-His-Ser-Phe-Glu-Thr-Phe
T29	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ile-Lys

\* → — последовательность установлена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, ← — действием карбоксипептидазы.

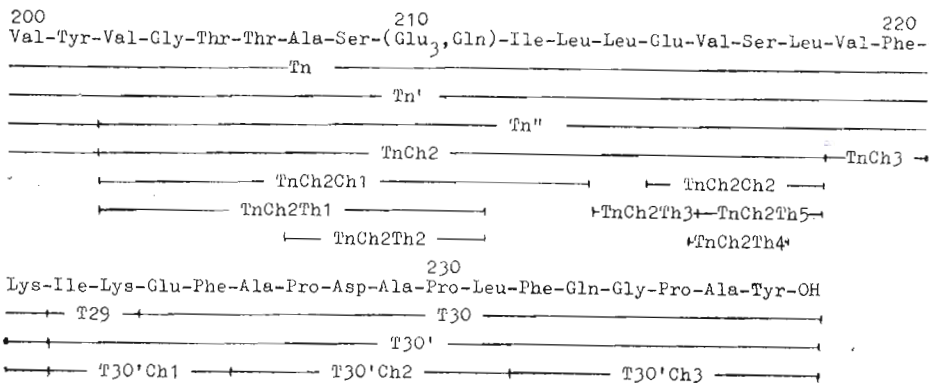
Таблица 3

## Структура химотриптических (Ch) и термолитических (Th) пептидов, полученных при гидролизе триптических пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность
T2Ch3	Ser-Pro-Ala-Leu-Gly-Lys
T8Th2	His-(Leu, Gln, Glu <sub>2</sub> , His)
T8Th3	Ile-Glu-Glu-Arg
T8Th4	Leu-Gln-Glu-Glu-His
T10Ch1	Tyr-Leu-Val-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe
T10Ch2	Tyr-Gly-Pro-Gly-Lys
T18Th1	Phe-Met-Glu-Asn-Ser-Phe-Pro
T18Th2	Ile-Val-Asn-Asp-Gln-Glu-(Glu, Val, Met, Asp)
T19Ch1	Leu-(Thr, Ile)-Asn
T19Ch2	Val-Arg-Pro-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg
T22Ch1	(Gln, Asp)-Gly-Tyr
T22Ch3	Val-Pro-His
T22Ch4	Glu-Val-Ile-Arg
T23Th2	Val-Asn-Gln-Pro-Asn-Glu
T30'Ch2	Ala-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu
T30'Ch3	Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Tyr
TnCh1	Asp-Asn-Phe-Tyr-Lys-(Pro, Ile, Val)-Tyr.
TnCh2	Val-Gly-Thr-Thr-Ala-Ser-(Glu <sub>3</sub> , Gln)-Ile-Leu-Leu-Glu-Val-Ser-Leu
TnCh3	Val-Phe-Lys
TnCh4	Lys-Pro-Ile-Val-Tyr







24 ч при pH 7,8 отщепляет Tyr (1,0), Ile (0,3), Asp (0,1), Met (0,1). При снижении pH до 5,6 и дополнительной инкубации в течение 24 ч карбоксипептидаза отщепляет Tyr (1,0), Ile (1,1), Asp (1,2), Met (1,0), Val (1,1), Glu (1,0), амид (0,7). Далее пептид T18 расщепляли термоллизинном в течение 3 ч. Получены 3 пептида со следующим аминокислотным составом: T18Th1—Met (0,6), Asp (1,1), Ser (0,8), Gln (1,1), Pro (0,9), Phe (2,3); T18Th2—Met (0,4), Asp (3,1), Glu (2,3), Val (1,5), Ile (1,1); T18Th3—Ile (1,0), Tyr (1,0). Лейцинаминопептидаза за 1 ч отщепляет от пептида T18Th2 Ile (1,0), Val (0,5), амиды (0,1), за 24 ч—Ile (1,0), Val (1,2), амиды (1,0), Asp (0,9), Glu (0,6), Met (0,4). Эти данные позволяют установить местоположение остатков аспарагиновой кислоты и ее амида в пептиде T18Th2. Положение амида глутаминовой кислоты установлено по аналогии с белком тел включений вируса ядерного полиэдроза *B. mori*. Структура термолитических пептидов приведена в табл. 3.

Полная аминокислотная последовательность пептида T18, полученная с учетом всех перечисленных данных: Phe-Met-Glu-Asn-Ser-Phe-Pro-Ile-Val-Asn-Asp-Gln-Glu-Glu-Val-Met-Asp-Ile-Tyr.

Пептид T19 (I, ЭФ1) имеет следующую N-концевую последовательность, определенную методом Эдмана: Leu-Thr-Ile-Asn-. Для установления полной последовательности пептид расщепляли химотрипсином в течение 4 ч. Получены 2 пептида со следующим аминокислотным составом: T19Ch1—Asp (1,0), Thr (1,0), Ile (1,0), Leu (1,0), Arg (2,7), Asp (1,0), Thr (1,0), Pro (2,0), Val (1,0). Определение N-концевой последовательности химотриптических пептидов (табл. 3) позволило установить строение пептида T19: Leu-Thr-Ile-Asn-Val-Arg-Pro-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg. Наличие в пептиде аспарагина было установлено после гидролиза его проназой в течение 17 ч.

Пептид T22 (II, ЭФ1, ЭФ2) не окрашивается нингидрином. N-Концевая аминокислота в пептиде не обнаружена ни дансилным методом, ни с помощью акрилонитрила. Можно предположить, что ею является глутамин, который циклизуется в процессе выделения пептида. При расщеплении пептида T22 химотрипсином получены 4 пептида, имеющие следующие аминокислотные составы: T22Ch1—Asp (1,0), Glu (1,1), Gly (1,2), Tyr (0,7); T22Ch2—His (+), Asp (1,0), Glu (1,3), Pro (0,6), Gly (1,2), Val (1,1), Tyr (0,7); T22Ch3—His (0,9), Pro (1,1), Val (1,0); T22Ch4—Arg (1,0), Glu (1,0), Val (0,6), Ile (0,6). Анализ пептидов T22Ch3 и T22Ch4 методом Эдмана и пептида T22Ch1 с помощью карбоксипептидазы (табл. 3) позволил установить последовательность пептида T22: Gln-Asp-Gly-Tyr-Val-Pro-His-Glu-Val-Ile-Arg.

Пептид T23 (II, ЭФ1, ЭФ2). Лейцинаминопептидаза за 5 ч отщепляет от пептида Ile (1,0), Val (0,8), Glu (0,2), Thr (0,1), Ser (0,1), Tyr (0,1). Методом Эдмана установлена последовательность пяти остатков: Ile-Val-Glu-Thr-Ser-. Смесь карбоксипептидаз А и В отщепляет за 4 ч Arg (1,0),

**Аминокислотный состав пептидов, полученных субфрагментацией  
нерастворимой триптической фракции**

Амино- кислота	TnCh1	TnCh2	TnCh3	TnCh4	TnCh1Ch1	TnCh1Ch2	TnCh1Ch3
Lys	0,8(1)		0,9(1)	1,2(1)		1,1(1)	
His							
Arg							
Asp	2,0(2)				2,0(2)		2,0(2)
Thr		1,6(2)					
Ser		1,6(2)					
Glu		5,3(5)					
Pro	1,0(1)			1,2(1)		1,0(1)	
Gly		1,2(1)					
Ala		1,1(1)					
Cys (Cm)							
Val	1,1(1)	1,8(2)	1,1(1)	0,8(1)		0,9(1)	
Met							
Ile	1,1(1)	1,2(1)		0,8(1)		0,9(1)	
Leu		3,3(3)					
Tyr	1,9(2)			0,8(1)	1,0(1)	1,1(1)	
Phe	1,0(1)		1,0(1)		1,1(1)		1,0(1)
Trp							
Всего	9	17	3	5	4	5	3
N-Концевая	Asp	Val	Val	Lys	Asp	Lys	Asp

Амино- кислота	TnCh2Ch1	TnCh2Ch2	TnCh2Th1	TnCh2Th2	TnCh2Th3	TnCh2Th4	TnCh2Th5
Lys							
His							
Arg							
Asp							
Thr	1,6(2)		1,8(2)				
Ser	0,9(1)	0,6(1)	1,1(1)	0,6(1)		0,9(1)	1,0(1)
Glu	3,6(4)	0,8(1)	3,9(4)	4,2(4)	1,1(1)		
Pro							
Gly	1,1(1)		1,1(1)				
Ala	1,1(1)		1,1(1)	1,0(1)			
Cys (Cm)							
Val	1,1(1)	1,3(1)	0,9(1)			1,1(1)	1,1(1)
Met							
Ile	0,9(1)						
Leu	1,3(1)	1,3(1)			0,9(1)		0,9(1)
Tyr							
Phe							
Trp							
Всего	12	4	10	6	2	2	3
N-Концевая	Val	Glu	Val	Ala	Leu	Val	Val

Tyr (0,9). В результате расщепления пептида T23 термолизинном были получены 3 пептида со следующим аминокислотным составом: T23Th1 — Thr (1,0), Ser (1,0); T23Th2 — Asp (1,9), Glu (2,0), Pro (0,7), Val (1,3); T23Th3 — Arg (1,1), Tyr (0,9). Структура пептида T23Th2 приведена в табл. 3. Из подвижности пептида T23Th2 следует, что он содержит одну дикарбоновую кислоту, местоположение которой определено по аналогии с белком тел включений вируса ядерного полиэдруса *B. mori*.

Полученные данные позволили установить аминокислотную последовательность пептида T23: Ile-Val-Glu-Thr-Ser-Tyr-Val-Asn-Gln-Pro-Asn-Glu-Tyr-Arg.



*Пептид T30'* (II, ЭФ1, ЭФ2, БХ). N-Концевая последовательность его: Ile-Lys-Glu-. В результате расщепления пептида химотрипсином получены 3 пептида со следующими аминокислотными составами: T30'Ch1 — Lys (1,0), Glu (1,1), Ile (0,9), Phe (1,0); T30'Ch2 — Asp (0,9), Pro (2,2), Ala (2,0), Leu (0,9); T30'Ch3 — Glu (1,0), Pro (1,1), Gly (1,0), Ala (1,1), Tyr (0,8), Phe (1,0); их аминокислотная последовательность была установлена методом Эдмана (табл. 3).

*Пептид T30* (II, ЭФ1, ЭФ2) отличается от пептида T30' на остаток лизина и остаток изолейцина, т. е. на пептид T29.

Совокупность всех полученных данных позволила реконструировать аминокислотную последовательность пептида T30': Ile-Lys-Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Tyr.

*Пептиды Tn* — пептиды фракции триптического гидролизата, нерастворимой при pH 5,0. Дансильрованием показано, что N-концевые аминокислоты пептидов, входящих в эту смесь, — валин, лизин, аспарагиновая кислота. Так как разделить эти пептиды очень трудно, смесь пептидов Tn подвергали ограниченному химотриптическому гидролизу в течение 22 ч. При этом получены 4 пептида (TnCh1 — TnCh4), которые легко разделяются высоковольтным электрофорезом на бумаге. Аминокислотные составы этих пептидов приведены в табл. 4.

*Пептид TnCh1*. N-Концевая аспарагиновая кислота установлена дансильным методом и по окраске кадмий-пингидриновым реагентом. В результате расщепления пептида химотрипсином в течение 24 ч получены 3 пептида (TnCh1Ch1 — TnCh1Ch3). Аминокислотные составы этих пептидов приведены в табл. 4. Строение пептидов Asp-Asn-Phe-Tyr (TnCh1Ch1), Asp-Asn-Phe (TnCh1Ch3) установлено методом Эдмана. Пептид TnCh1Ch2 имеет аминокислотный состав, идентичный с составом пептида TnCh4, и N-концевую аминокислоту, как и в пептиде TnCh4, — лизин. Выяснение строения пептида TnCh4 см. ниже. Полученные данные позволили установить строение пептида TnCh1 (табл. 3).

*Пептид TnCh2*. Методом Эдмана установлена последовательность 6 остатков. Лейцинаминопептидаза за 5 ч отщепляет Val (1,0), Gly (0,7), Thr (1,3), Ala (0,5), Ser+амид (1,0), Glu (1,7), Leu (0,6), Ile (0,3). Карбоксипептидаза А за 18 ч при pH 7,8 отщепляет от пептида Leu (1,0), Ser (0,5), Val (0,3). Дополнительная инкубация пептида с карбоксипептидазой при pH 5,6 в течение 18 ч приводит к отщеплению Leu (1,0), Ser (0,4), Val (0,4), Glu (0,2), Ile (0,2). Пептид TnCh2 дополнительно расщепляли химотрипсином в течение 20 ч и термолизинном в течение 24 ч. Получены пептиды TnCh2Ch1, TnCh2Th2 и TnCh2Th1—TnCh2Th5. Аминокислотные составы этих пептидов приведены в табл. 4. Строение пептида TnCh2Ch2 установлено методом Эдмана: Glu-Val-Ser-Leu. Совокупность полученных данных позволила установить строение пептида TnCh2 (табл. 3).

Результаты определения структуры химотриптических пептидов TnCh3 и TnCh4 приведены в табл. 3.

На основании полученных данных по химотриптическому гидролизу смеси пептидов Tn реконструирован участок полипептидной цепи (пептид Tn): Asp-Asn-Phe-Tyr-Lys-Pro-Ile-Val-Tyr-Val-Gly-Thr-Thr-Ala-Ser-(Glu<sub>3</sub>, Gln)-Ile-Leu-Leu-Glu-Val-Ser-Leu-Val-Phe-Lys. Поскольку смесь содержит три N-концевых остатка (Asx, Lys и Val), ясно, что смесь состоит из трех триптических пептидов Tn — Tn'', которые образовались из этого участка полипептидной цепи белка при расщеплении трипсином неспецифических для него связей (см. рис. 2). Эти три пептида имеют общее гидрофобное ядро (пептид Tn''). Можно предполагать, что расщепление химотрипсином в смеси пептидов Tn даже одной связи Leu-Val из трех (Tyr-Lys (196—197), Tyr-Val (201—202), Leu-Val (218—219)) приводит к тому, что пептиды становятся растворимыми, как это показано для пептида Tn полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроса *B. mori*

[1]. Поэтому пептиды частичного химотриптического гидролизата смеси Тп хорошо разделяются высоковольтным электрофорезом.

Таким образом, из триптического гидролизата полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *P. dispar* получены 36 пептидов и выяснена их аминокислотная последовательность (см. схему). Триптические пептиды расставлены по аналогии с полиэдренным белком вируса ядерного полиэдроза *B. mori* [1]. Пять пептидов, обозначенных штрихами, представляют собой последовательности, перекрывающиеся с последовательностями одноименных пептидов без штрихов. В 31 пептиде с неперекрывающимися последовательностями содержится в сумме 237 остатков аминокислот. Это на 7 остатков меньше, чем в полипептидной цепи полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *B. mori* [1], и, следовательно, на 7 остатков меньше, чем мы приняли при расчете аминокислотного состава исследуемого белка [2]. Кроме описанных пептидов, мы получили ряд пептидов с незначительным выходом. Как выяснилось, они образовались в результате расщепления связей, специфических для химотрипсина. При тщательном исследовании этих пептидов мы не нашли аминокислотных последовательностей, отличающихся от приведенных выше.

### Экспериментальная часть

*Получение белка.* Белок получали по методу Бергольда [3], восстанавливали β-меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали [4].

*Гидролиз белка трипсином.* Белок после восстановления и карбоксиметилирования диализовали против 0,2 н.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , добавляли трипсин (Srofa, ЧССР), обработанный кетоном Шоу. Фермент-субстратное отношение 1 : 50. Гидролиз проводили 6 ч 30 мин при 37° С. Действие фермента прекращали лиофилизацией.

*Разделение пептидов.* Триптический гидролизат (125 мг) растворяли в 10 мл 0,2 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (рН раствора 5,0). Не растворившиеся при этом пептиды отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в 0,3 н. аммиаке и осаждали 30% уксусной кислотой, доводя рН до 5,0. Надосадочную жидкость после центрифугирования добавляли к растворимым пептидам. Процедуру повторяли дважды. В результате получали нерастворимый при рН 5,0 материал (пептиды Тп).

Для разделения пептидов, растворимых при рН 5,0 (пептиды Т), использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (тонкий), уравновешенном 0,2 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Для элюции оставшегося на сефадексе материала колонку промывали 0,3 н. раствором аммиака (см. рис. 1). Дальнейшее разделение пептидов проводили с помощью высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге. Электрофорез осуществляли при рН 6,5 (ЭФ1) и 1,9 (ЭФ2) в течение 1 ч 30 мин при градиенте потенциала 40 В/см. Хроматографировали в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12). Для разделения пептидов применяли бумагу Filtrak FN-17.

*Определение аминокислотного состава.* Пептиды гидролизовали 24 ч 5,7 н.  $\text{HCl}$  (с добавкой фенола) при 105–110° С в вакууме. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе аминокислот (ААА-881 и Hd 1200 Е, ЧССР). Триптофан определяли реакцией Эрлиха. Амиды определяли, исходя из подвижности пептидов при электрофорезе при рН 6,5, с помощью лейцинаминопептидазы и карбоксипептидаз А и В, а в некоторых случаях — по окраске пептида при проявлении кадмий-нингидриновым реагентом.

*Определение N-концевой последовательности пептидов.* Применяли метод Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде дансил-производных. Деградацию проводили по Грэю [5] в модификации Виноградовой [6]. Dns-аминокислоты идентифицировали на пластинках с полиамидом [7, 8]. Применяли также лейцинаминопептидазу (Worthington,

США), активированную 0,002 М MgCl<sub>2</sub>. Гидролиз ферментом проводили в 0,2 н. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> при 37° С. Отщепившиеся аминокислоты анализировали с помощью анализатора аминокислот.

*Определение С-концевой последовательности пептидов.* Гидролиз пептидов карбоксипептидазами А и В (Worthington, США) проводили в 0,2 н. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> или в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,6, при 30° С.

*Субфрагментацию пептидов* осуществляли химотрипсином (Spofa, СССР), термолизином (Seikagaku, Япония) при рН 7,8 в течение 3–6 ч. Фермент-субстратное отношение 1:100. Ограниченный гидролиз химотрипсином проводили при фермент-субстратном отношении 1:1000. Пептиды, образовавшиеся в результате субфрагментации, разделяли электрофорезом при рН 6,5 или 1,9 и хроматографией на бумаге.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Гусак Н. М., Серебряный С. Б. Реконструкция полипептидной цепи белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. — Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1048–1053.
2. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Ларионов Г. В., Веремейченко С. Н., Серебряный С. Б. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза. — Биохимия, 1978, т. 43, вып. 12, с. 2189–2195.
3. Kozlov E. A., Sidorova N. M., Serebryani S. B. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* under alkaline conditions. — J. Invert. Pathol., 1975, v. 25, № 1, p. 97–101.
4. Серебряный С. Б., Кавсан В. М., Кибирев В. К., Кацман М. С. Серосодержащие аминокислоты полиэдренного белка вируса желтухи тутового шелкопряда. — Химия природн. соед., 1968, № 3, с. 174–178.
5. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation. — In: Methods in Enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 469–475.
6. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата. — Биохимия, 1973, т. 38, с. 3–21.
7. Woods K., Wang K. Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer chromatography. — Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 133, № 2, p. 369–370.
8. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. Хроматография в тонких пленках полиамида. — Химия природн. соед., 1971, № 1, с. 66–68.

Поступила в редакцию  
22.VII.1980  
После доработки  
4.I.1981

#### TRYPTIC PEPTIDES OF INCLUSION BODY PROTEIN OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *PORTHETRIA DISPAR*

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

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

36 peptides were isolated from the tryptic digest of polyhedral protein of *P. dispar* NPV and their structure was determined. 31 peptide have a non-overlapping sequence comprising 237 amino acid residues.