



УДК 547.962.02

**ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ БЕЛКА ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСА
ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ
*GALLERIA MELLONELLA*****Гусак Н. М., Козлов Э. А., Овандер М. Н.,
Серебряный С. Б.***Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев*

Белок тел включений (полиэдренный белок) вируса ядерного полиэдрома большой воцинной моли *Galleria mellonella* расщепляли трипсином с неподавленной химо-трипсиновой активностью. Выделены 54 пептида и установлено строение 52. 31 пептид с неперекрывающимися последовательностями включает в себя 240 остатков аминокислот.

Ранее сравнительными химическими исследованиями было показано [1], что белки тел включений (полиэдренные белки) вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда *Bombyx mori* и большой воцинной моли *Galleria mellonella* гомологичны. При электрофорезе в полиакриламидном геле эти белки имеют одинаковую подвижность [2]. Поэтому можно предположить, что их полипептидные цепи содержат одинаковое число аминокислотных остатков либо разница в числе остатков не должна превышать 10. Первичная структура полиэдренного белка вируса *B. mori* установлена нами ранее [3]. Полипептидная цепь этого белка содержит 244 аминокислотных остатка и имеет молекулярный вес 28 600. Первичная структура полиэдренного белка вируса *G. mellonella* может быть установлена исследованием триптических пептидов этого белка и сопоставлением их с известной структурой гомологичного полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрома *B. mori* [3].

Характерной особенностью полиэдров и лиофильно высушенного полиэдренного белка вируса *G. mellonella* является чрезвычайно плохая растворимость их в водных растворах даже при крайних значениях pH. Восстановление и карбоксиметилирование не приводит к улучшению растворимости, поэтому расщеплять белок ферментами приходится в суспензии. При расщеплении восстановленного и карбоксиметилированного белка трипсином с подавленной химо-трипсиновой активностью получается 50–60% материала, нерастворимого ни в водных растворах с добавкой мочевины, ни в некоторых органических растворителях (спирты, пиридин). Расщепление восстановленного и карбоксиметилированного белка химо-трипсином, хотя и не дает нерастворимого материала, приводит к образованию большого числа мелких пептидов, что значительно осложняет реконструкцию полипептидной цепи белка только по химо-триптическим пептидам. Поэтому для расщепления мы применили препарат трипсина, в котором химо-трипсиновая активность не подавлялась. При этом процент

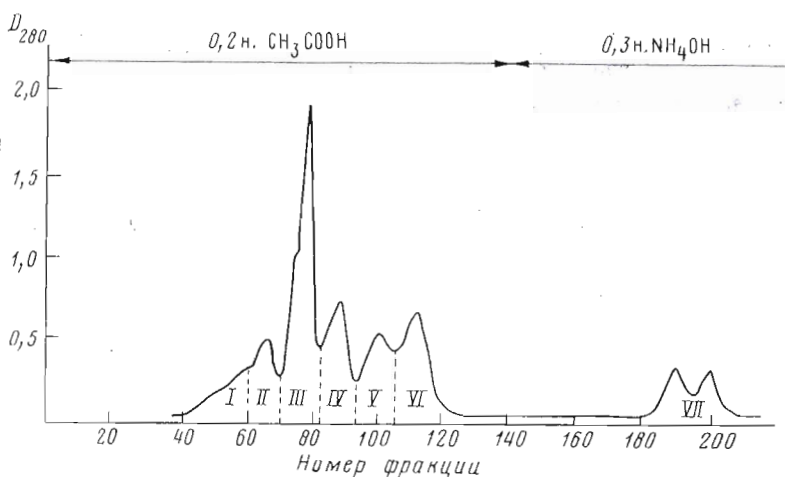


Рис. 1. Разделение растворимых при pH 5,0 триптических пептидов (125 мг) на колонке (2,5×110 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 40 мл/ч. Объем фракции 5,5 мл

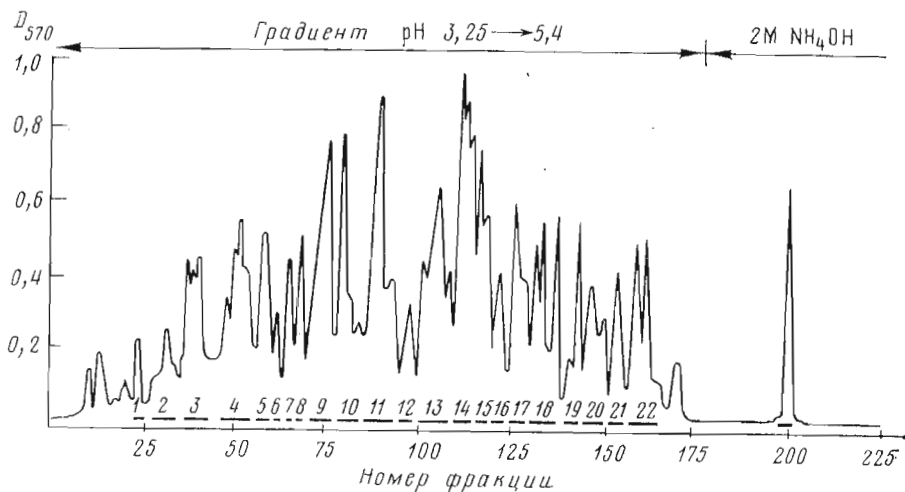


Рис. 2. Разделение материала фракции III (рис. 1) на колонке (1,5×70 см) с катионитом AG 50×8 в градиенте pH 0,2 М пиридин-формиатного буфера; 40° С, скорость элюции 21 мл/ч, объем фракции 4 мл

нерастворимой фракции значительно снижался и увеличивался выход растворимых пептидов.

При разделении на сефадексе G-25 растворимых при pH 5,0 (см. «Экспериментальную часть») триптических пептидов были получены 7 фракций (рис. 1). В результате снижения pH с 5,0 до 2,7 в процессе элюции 0,2 н. уксусной кислотой часть материала задерживалась на колонке. Этот материал элюировали 0,3 н. аммиаком (фракция VII). Фракция III содержит большое количество пептидов, которые трудно разделить электрофорезом и хроматографией на бумаге. Поэтому ее подвергли ионообменной хроматографии на смоле AG 50×8 (рис. 2). 23 фракции, полученные при таком разделении, содержали пептидный материал. Дальнейшую очистку пептидов осуществляли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

В табл. 1 приведены аминокислотные составы триптических пептидов. Аминокислотная последовательность большинства пептидов, определен-

Аминокислотные составы триптических пептидов полиэдренного белка *
вируса ядерного полиэдроса *G. mellonella*

Амино-кислота	T1	T2	T2'	T2''	T2'''	T2''''	T3	T3'	T4
Lys		0,9(1)		0,9(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)	0,9(1)
His									
Arg	2,1(2)				1,0(1)				
Asp	1,1(1)	2,1(2)		2,0(2)	2,1(2)	1,8(2)			1,0(1)
Thr	1,0(1)	1,0(1)	0,7(1)						
Ser	1,0(1)								
Glu									
Pro	2,0(2)								
Gly	1,1(1)								0,8(1)
Ala									0,9(1)
Cys(Cm)									
Val		1,0(1)	1,2(1)			0,7(1)			0,9(1)
Met									
Ile	1,0(1)								1,0(1)
Leu									1,4(1)
Tyr	1,9(2)	2,0(2)	2,0(2)			0,9(1)	1,7(2)	1,0(1)	
Phe									
Trp									
Всего	11	7	4	3	3	5	3	2	7
N-Концевая	Pro	Thr	Thr	Asp	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asp
Амино-кислота	T5	T6	T7	T7'	T8	T9	T10	T11	T11'
Lys	1,1(1)		(2)	(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,2(1)	
His					1,6(2)				
Arg		(1)							
Asp	0,9(1)				3,8(4)	0,9(1)	0,9(1)		
Thr								0,8(1)	0,9(1)
Ser									
Glu					4,9(5)	1,0(1)	1,0(1)		
Pro						1,8(2)			
Gly					1,0(1)	2,3(2)			
Ala	1,0(1)					1,0(1)			
Cys(Cm)									
Val					1,3(1)	1,0(1)			
Met									
Ile					1,3(1)				
Leu					3,0(3)	1,8(2)		1,8(2)	1,9(2)
Tyr									
Phe								1,0(1)	1,0(1)
Trp						0,9(1)			
Всего	3	1	2	1	18	12	3	5	4
N-Концевая	Asn					Leu	Asn	Leu	Leu
Амино-кислота	T12	T12'	T13	T14	T14'	T14''	T15	T16	T18'
Lys		0,9(1)	2,1(2)	1,0(1)			1,0(1)		
His									
Arg	1,3(1)	0,8(1)						1,0(1)	1,2(1)
Asp			1,9(2)		1,1(1)				
Thr			0,9(1)						
Ser									
Glu	1,0(1)	1,2(1)						1,0(1)	
Pro									
Gly						1,2(1)	1,2(1)		
Ala									
Cys(Cm)				1,2(1)					

Таблица 1 (продолжение)

Амино-кислота	T12	T12'	T13	T14	T14'	T14''	T15	T16	T16'
Val			1,0(1)	1,6(2)	1,9(2)	1,8(2)			
Met			1,0(1)						
Ile	1,1(1)	0,9(1)							
Leu				1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)			
Tyr								0,9(1)	0,9(1)
Phe								1,1(1)	
Trp				+	+	+			
Всего	3	4	7	6	5	5	2	4	2
N-Концевая	Glu	Lys	Asn	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	
Амино-кислота	T17	T17'	T17''	T18	T19	T19'	T20	T21	T21'
Lys					1,3(1)		1,2(1)		
His			1,0(1)					0,8(1)	0,7(1)
Arg	1,1(1)			3,7(4)	1,7(2)	2,0(2)			
Asp					2,0(2)	1,0(1)			
Thr	1,9(2)	1,8(2)	0,9(1)		0,9(1)	0,8(1)			
Ser				1,3(1)					
Glu	1,0(1)	1,0(1)		3,2(3)				2,3(2)	1,0(1)
Pro				1,2(1)	2,3(2)	1,3(1)			
Gly									
Ala					0,9(1)			1,6(2)	1,0(1)
Cys (Cm)							(1)		
Val				2,4(4)	0,9(1)				
Met				2,0(2)		0,4(1)			
Ile				1,3(1)					
Leu					1,7(2)			2,0(2)	1,2(1)
Tyr							0,6(1)		
Phe				3,0(3)				1,1(1)	1,0(1)
Trp	+	+							
Всего	5	4	2	19	12	6	3	8	5
N-Концевая	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Met	Cys (Cm)	Phe	Phe
Амино-кислота	T21''	T21'''	T21''''	T22	T23	T23'	T24	T25	T26
Lys							0,9(1)	0,9(1)	
His			0,9(1)	1,0(1)					
Arg	1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)				1,1(1)
Asp				3,0(3)	2,0(2)			1,0(1)	2,0(2)
Thr									0,9(1)
Ser					1,8(2)	1,0(1)	0,8(1)		1,0(1)
Glu		1,0(1)	1,1(1)		2,1(2)				1,0(1)
Pro				2,0(2)	0,9(1)	1,3(1)		1,1(1)	2,2(2)
Gly					1,0(1)	1,1(1)		2,8(3)	
Ala	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)				1,1(1)		
Cys (Cm)								(1)	
Val				2,0(2)	1,5(2)	1,0(1)			
Met								(1)	
Ile				0,8(1)	0,5(1)	0,7(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)
Leu	1,0(1)	1,1(1)	0,9(1)				1,1(1)	1,2(1)	
Tyr				1,0(1)	0,9(1)				
Phe		0,9(1)							1,9(2)
Trp					+	+			
Всего	3	4	4	11	14	6	5	10	10
N-Концевая	Ala	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Ile	Lys	Thr

Аминокислота	T26'	T26''	T27	T27'	T27''	T28	T29	T30	T31
Lys			1,0(1)		1,0(1)		1,1(1)	1,1(1)	
His									
Arg		0,8(1)							
Asp	1,1(1)	0,9(1)	1,2(1)	1,0(1)		1,2(1)			1,2(1)
Thr	0,8(1)					1,8(2)			0,9(1)
Ser	0,9(1)					1,7(2)			
Glu	2,0(2)		1,1(1)	1,0(1)		5,0(5)			1,0(1)
Pro			1,1(1)		1,0(1)				2,8(3)
Gly						1,0(1)			1,3(1)
Ala									2,9(3)
Cys(Cm)									
Val			2,1(2)	0,5(1)	0,9(1)	1,0(1)	0,9(1)	0,9(1)	
Met									
Ile		1,2(1)	1,8(2)	0,5(1)	0,8(1)	1,5(2)			
Leu						2,7(3)			1,1(1)
Tyr			1,9(2)	1,0(1)	1,8(2)				0,9(1)
Phe	2,1(2)		1,1(1)				1,0(1)		2,1(2)
Trp			+	+					
Всего	7	3	12	6	6	17	3	2	14
N-Концевая	Thr	Ile	Val	Val	Tyr	Ile	Val	Val	Glu

* Подчеркнуты пептиды, выделенные в незначительных количествах; их присутствие является, по-видимому, результатом микрогетерогенности белка.

ная методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, дана в табл. 2. Схемы установления аминокислотных последовательностей пептидов, не вошедших в табл. 2, приведены ниже.

Пептид T2''' (III, AG13, ЭФ1, ЭФ2). Методом Эдмана для этого пептида была определена N-концевая последовательность Val-Tyr. Сравнение аминокислотных составов пептидов T2''' и T2'' позволило предположить, что последний является C-концевой частью пептида T2'''. На этом основании пептиду T2''' приписано строение Val-Tyr-Asp-Asn-Lys.

Пептид T2 (III, AG14, ЭФ1 и AG15, ЭФ1, ЭФ2). N-Концевой аминокислотный остаток — Thr. Сопоставление аминокислотных последовательностей пептидов T2', T2'' и T2''' позволило приписать пептиду T2 строение Thr-Tyr-Val-Tyr-Asp-Asn-Lys.

Пептид T7 (III, AG13, ЭФ1). Пептид содержит только лизин. Из подвижности пептида при электрофорезе при pH 6,5 следует, что он представляет собой дилизин.

Пептид T18 (VII, ЭФ1 и II, ЭФ1, ЭФ2) содержит на N-конце Phe. Лейцинаминопептидаза за 4 ч отщепляет от пептида Phe (1,0), Met (0,8), Glu (0,6), амид (0,2). Карбоксипептидаза A+B при pH 8,5 отщепляет за 4 ч Phe (1,0), Val (0,3). После снижения pH до 5,0 с последующим повышением до 8,5 карбоксипептидаза отщепляет Phe (1,0), Val (1,7), Asp (1,0), Met (0,8), Glu (0,3). Таким образом были определены N-концевая (Phe-Met-Glu) и C-концевая (Met-Asp-Val-Phe) последовательности пептида T18. Для установления полного строения пептида его расщепляли термолизином в течение 6 ч. Было получено три пептида (T18Th1 — T18Th3), аминокислотный состав которых приведен в табл. 3. Аминокислотная последовательность термолитических пептидов, определенная методом Эдмана, показана в табл. 4. На основании полученных данных для пептида T18 установлена последовательность Phe-Met-Glu-Asn-Ser-Phe-Pro-Ile-Val-Asx-Asx-Glx-Glu-Val-Val-Met-Asp-Val-Phe.

Пептид T19' (III, AG23, ЭФ1, ЭФ2). Пептид T19' получен с незначительным выходом. Его N-концевая последовательность Met-Thr-Arg-. Так

Структура триптических пептидов полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *G. mellonella*

Пептид	Стадии очистки	Аминокислотная последовательность *
T1	III, AG23, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Pro-(Arg, Asx, Thr, Ser, Phe, Gly, Ile, Tyr ₂)-Arg
T2'	V, ЭФ1, ЭФ2	Thr-Tyr-Val-Tyr
T2''	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asp-Asn-Lys
T2'''	III, AG9, ЭФ1, ЭФ2	Asp-Asn-Arg
T3	III, AG3, ЭФ1, ЭФ2	Tyr-Tyr-Lys
T3'	III, AG13, ЭФ1, ЭФ2	Tyr-Lys
T4	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asn-Leu-Gly-Ala-Val-Ile-Lys
T5	III, AG15, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Ala-Lys
T9	I, ЭФ1, ЭФ2 II, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Val-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe-Leu-(Pro, Gly ₂)-Lys
T10	III, AG14, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Gln-Lys
T11	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys
T11'	III, AG16, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Thr-Leu-Phe
T12	III, AG18, ЭФ1	Glu-Ile-Arg
T12'	II, ЭФ1, ЭФ2	Lys-Glu-Ile-Arg
T13	I, ЭФ1, ЭФ2 II, ЭФ1, ЭФ2	Asn-Val-Lys-Pro-Asp-Thr-Met-Lys
T14	III, AG23, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Val-Val-Ala-Trp-Lys
T14'	III, AG23, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Val-Val-Asn-Trp
T14''	V, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Leu-Val-Val-Gly-Trp
T15	III, AG18, ЭФ1, ЭФ2	Gly-Lys
T16	V, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Phe-Tyr-Arg
T16'	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Tyr-Arg
T17	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg
T17'	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Thr-Trp
T17''	III, AG25, ЭФ1, ЭФ2	Thr-Arg
T19	II, AG23, ЭФ1, ЭФ2	Leu-Val-Ala-(Lys, Arg ₂ , Asn ₂ , Thr, Pro ₂ , Leu)
T20	III, AG14, ЭФ1, ЭФ2	Gys(Cm), Tyr-Lys
T21'	III, AG16-19, ЭФ1	Phe-Leu-Ala-Gln-His
T21''	III, AG23, ЭФ1, ЭФ2	Ala-Leu-Arg
T21'''	III, AG9, ЭФ1, ЭФ2	Phe-Leu-Ala-Gln
T21''''	III, AG11, ЭФ1	Leu-Ala-Gln-His
T23'	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ile-Val-Glu-Pro-Ser-Trp
T24	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ile-Ser-Leu-Ala-Lys
T25	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Lys-Gly-Gly-Gly-Cys(Cm)-Pro-Ile-Met-Asn-Leu
T26'	III, AG7-9, ЭФ1, ЭФ2	Thr-Asx-Ser-Phe-Glx-Glx-Phe
T26''	III, AG14, ЭФ1, ЭФ2	Ile-Asp-Arg
T27'	V, ЭФ1, ЭФ2	Val-Ile-Trp-Glx-Asx-Phe
T27''	IV, ЭФ1, ЭФ2	Tyr-Lys-Pro-Ile-Val-Tyr
T29	III, AG23, ЭФ1, ЭФ2	Val-Phe-Lys
T30	III, AG19, ЭФ1	Val-Lys

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

Аминокислотный состав термолитических (Th) и химотриптических (Ch) пептидов, полученных при гидролизе триптических пептидов

Аминокислота	T18Th1	T18Th2	T18Th3	T22Th1	T22Th2
Lys					
His				0,8(1)	
Arg					1,0(1)
Asp	1,0(1)	3,0(3)		3,1(3)	
Thr					
Ser	0,8(1)				
Glu	1,2(1)	2,3(2)			
Pro	0,9(1)			2,2(2)	
Gly					
Ala					
Cys(Cm)					
Val		1,8(3)	1,0(1)	1,2(1)	0,5(1)
Met	+ (1)	0,6(1)			
Ile		0,6(1)			0,6(1)
Leu					
Tyr				0,7(1)	
Phe	1,2(2)		1,0(1)		
Trp					
Всего	7	10	2	8	3
N-Концевая	Phe	Ile	Val	Asp	Val

Аминокислота	T23Th1	T23Th2	T23Th3	T23Th4	T31Ch1	T31Ch2
Lys						
His						
Arg			0,9(1)	0,7(1)		
Asp		2,0(2)		2,1(2)	0,8(1)	
Thr						1,0(1)
Ser	0,9(1)	1,0(1)		1,0(1)		
Glu	1,0(1)	1,2(1)		1,2(1)	0,9(1)	
Pro	1,2(1)				2,1(2)	1,1(1)
Gly		0,9(1)		1,2(1)		1,2(1)
Ala					2,1(2)	1,0(1)
Cys(Cm)						
Val	0,7(1)	1,0(1)		1,0(1)		
Met						
Ile	0,7(1)					
Leu					0,5(1)	
Tyr			1,1(1)	0,9(1)	1,0(1)	0,8(1)
Phe						0,8(1)
Trp	+ (1)					
Всего	6	6	2	8	8	6
N-Концевая	Ile	Val	Tyr	Val	Glu	Phe

как пептид не расщепляется трипсином и не содержит кислых остатков, мы предполагаем, что в пептиде должна существовать связь Arg-Pro. На этом основании выписана C-концевая последовательность пептида. При сопоставлении этого пептида с известными триптическими пептидами полидренных белков вирусов *B. mori* [4] и *P. dispar* [5] мы пришли к заключению, что пептид T19' аналогичен C-концевой части пептида T9 белка вируса *B. mori* или пептида T19 белка вируса *P. dispar*. В отличие от пептида T9 в пептиде T19' вместо остатка пролина находится остаток метионина, т. е. пептид T19' имеет строение Met-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg. Мы полагаем, что пептид T19' образуется из того же участка белка, что и

Структура термолитических (Th) и химотриптических (Ch) пептидов, полученных при гидролизе триптических пептидов *G. mellonella*

Пептид	Аминокислотная последовательность
T18Th1	<u>Phe-Met-Glu-Asn-Ser-Phe-Pro</u>
T18Th2	<u>Le-Val-Asx-Asx-Glx-Glu-Val-</u> (Val, Met, Asp)
T22Th2	<u>Val-Ile-Arg</u>
T23Th1	<u>Ile-</u> (Val, Glu, Pro, Ser)-Trp
T23Th2	<u>Val-Gly-Ser-Asx-Asx-Glx</u>
T23Th4	<u>Val-</u> (Gly, Ser, Asx ₂ , Glx, Tyr, Arg)
T31Ch1	<u>Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu</u>
T31Ch2	<u>Phe-Thr-Gly-Pro-Ala-Tyr</u>

пептид T19, при замене остатка пролина на остаток метионина, т. е. является следствием микрогетерогенности белка вируса *G. mellonella*. На этом основании пептиду T19 приписано строение Leu-Val-Ala-(Asn, Leu)-Lys-Pro (Met)-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg.

Пептид T21 (III, AG9, ЭФ1, ЭФ2). Пептид T21 получен с незначительным выходом. Это, по-видимому, результат микрогетерогенности белка. Аминокислотный состав и три стадии деградации этого пептида (Phe-Leu-Ala-) убеждают, что одноименные пептиды со штрихами (табл. 2) образуются из одного и того же участка полипептидной цепи. На этом основании структура пептида T21 представлена следующим образом: Phe-Leu-Ala-Gln-Glu(His)-Ala-Leu-Arg. Интересно, что замена остатка гистидина в пептиде T21 на остаток глутаминовой кислоты влияет, вероятно, на расщепление протеазой тел включений полипептидной цепи белка вируса ядерного полиэдрома *G. mellonella* на этом участке (подробнее об этом см. в следующем сообщении).

Пептид T21''' содержит на С-конце остаток глутамина (табл. 2), что необычно для триптических пептидов. Появление этого пептида в результате триптического гидролиза связано, возможно, с наличием протеиназы в телах включения [6], которая расщепляет белки при растворении полиэдров.

Пептид T22 (II, ЭФ1, ЭФ2, БХ). Методом Эдмана определена N-концевая последовательность Asp-Asp-Asp-Tyr-Val-Pro-. Пептид расщепляли термолизином в течение 6 ч. Получены 2 термолитических пептида (T22Th1 и T22Th2), аминокислотный состав которых приведен в табл. 3. Первый из них содержит на N-конце остаток аспарагиновой кислоты. Структура второго пептида была установлена методом Эдмана (табл. 4). На основании полученных данных установлена последовательность пептида T22: Asp-Asp-Asp-Tyr-Val-Pro-(His, Pro)-Val-Ile-Arg.

Пептид T23 (III, AG12-22, ЭФ1, ЭФ2 и VI, ЭФ1, ЭФ2). Пептид расщепляли термолизином в течение 6 ч. Получены 4 пептида (T23Th1 - T23Th4). Аминокислотный состав термолитических пептидов приведен в табл. 3, аминокислотная последовательность дана в табл. 4. В состав пептида T23 входит пептид T23' (табл. 2). Сопоставлением всех полученных данных для пептида T23 была установлена последовательность Leu-Val-Glu-Pro-Ser-Trp-Val-Gly-Ser-Asx-Glx-Tyr-Arg.

Пептид T26 (III, AG13-14, ЭФ1, ЭФ2). По аминокислотному составу (табл. 1) видно, что в состав пептида T26 входят пептиды T26' и T26'', строение которых приведено в табл. 2. На этом основании пептиду T26 приписано следующее строение: Thr-Asx-Ser-Phe-Glx-Glx-Phe-Ile-Asp-Arg.

Пептид Т27 (III, AG22, ЭФ1, ЭФ2). Аминокислотный состав пептида равен сумме аминокислотных составов пептидов Т27' и Т27'' (табл. 2). Поэтому пептиду Т27 можно приписать строение Val-Ile-Trp-Asx-Glx-Phe-Tyr-Lys-Pro-Ile-Val-Tyr.

Пептид Т28 (нерастворимый при pH 5,0 материал, ЭФ1). Нерастворимый материал в виде суспензии наносили на бумагу и подвергали электрофорезу. При этом почти весь материал оставался на старте и только пептид Т28 отделялся. Методом Эдмана была определена последовательность 6 аминокислотных остатков: Ile-Gly-Thr-Asp-Thr-Ser-. Лейцинаминопептидаза за 4 ч отщепляет от пептида Ile (1,0), Gly (0,5), Thr (0,8), Asp (0,3). Карбоксипептидаза А за 6 ч отщепляет от пептида Leu (1,0), Ser (0,8), Val (0,5). Для установления полного строения пептида Т28 его подвергали частичному кислотному гидролизу. Получены 5 фракций (Т28А1 — Т28А5). В состав пептида Т28А1 входит только Glu(Gln). Подвижность при электрофорезе (pH 6,5) свидетельствует о том, что пептид Т28А1 содержит кластер глутаминовых кислот и не более одного амида.

Пептид Т28А2 содержит Ile (1,0) и Leu (0,8). N-Концевая аминокислота — Leu. Строение пептида — Leu (Ile, Leu).

Фракция Т28А3 представляет собой смесь пептидов: Ser (0,7), Val (0,9), Ile (1,0), Leu (1,8). Метод Эдмана в сочетании с дансированием показал, что на первой стадии отщепляются Val и Ile, а на второй — Ser и Leu. Из результата действия карбоксипептидазы и определения N-концевой последовательности пептида Т28 вытекает, что смесь состоит из двух пептидов: Val-Ser-Leu (Т28А3-1) и Ile-Leu (Т28А3-2).

Фракция Т28А4 также является смесью пептидов: Thr (0,5), Ser (0,5), Gly (0,8), Val (1,0), Ile (1,0), Leu (1,0). На первой стадии методом Эдмана обнаружены Val и Ile, на второй — Ser и Gly. Так как единственный остаток Gly содержится в N-концевой последовательности Ile-Gly-Thr, можно заключить, что фракция Т28А4 состоит из двух пептидов: Val-Ser-Leu (Т28А4-1) и Ile-Gly-Thr (Т28А4-2).

Фракция Т28А5 также представляет собой смесь пептидов: Ser (0,6), Glu (1,3), Val (1,1), Ile (0,6), Leu (1,5). Отщеплением по методу Эдмана на первой стадии найдены Glu и Leu, на второй — Val и Ile, на третьей — Ser и Leu. Таким образом, смесь содержит два пептида: Glu-Val-Ser-Leu (Т28А5-1) и Leu-Ile-Leu (Т28А5-2).

Совокупность вышеизложенных данных позволяет реконструировать аминокислотную последовательность пептида Т28: Ile-Gly-Thr-Asp-Thr-Ser-(Glu₃, Gln)-Leu-Ile-Leu-Glu-Val-Ser-Leu.

Пептид Т31 (II, ЭФ1, ЭФ2, ВХ и III, AG11, ЭФ1, ЭФ2). Методом Эдмана установлена последовательность 4 аминокислотных остатков: Glu-Phe-Ala-Pro-. Для определения полной аминокислотной последовательности пептид в течение 6 ч расщепляли химотрипсином. Получены 2 пептида: Т31Сh1 и Т31Сh2. Аминокислотный состав пептидов приведен в табл. 3, а аминокислотная последовательность, определенная методом Эдмана в сочетании с дансированием, дана в табл. 4. Полная аминокислотная последовательность пептида Т31 такова: Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu-Phe-Thr-Gly-Pro-Ala-Tyr.

Итак, из триптического гидролизата полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *G. mellonella* были выделены 54 пептида и установлено строение 52. Большое количество триптических пептидов, полученных расщеплением связей, специфических для химотрипсина, объясняется тем, что мы специально расщепляли белок трипсином, не обработанным ингибиторами химотрипсина. 31 пептид с неперекрывающимися последовательностями насчитывает 240 остатков аминокислот (см. схему).

Триптические пептиды расставлены по аналогии с полиэдренным белком вируса ядерного полиэдроза *B. mori* [3].

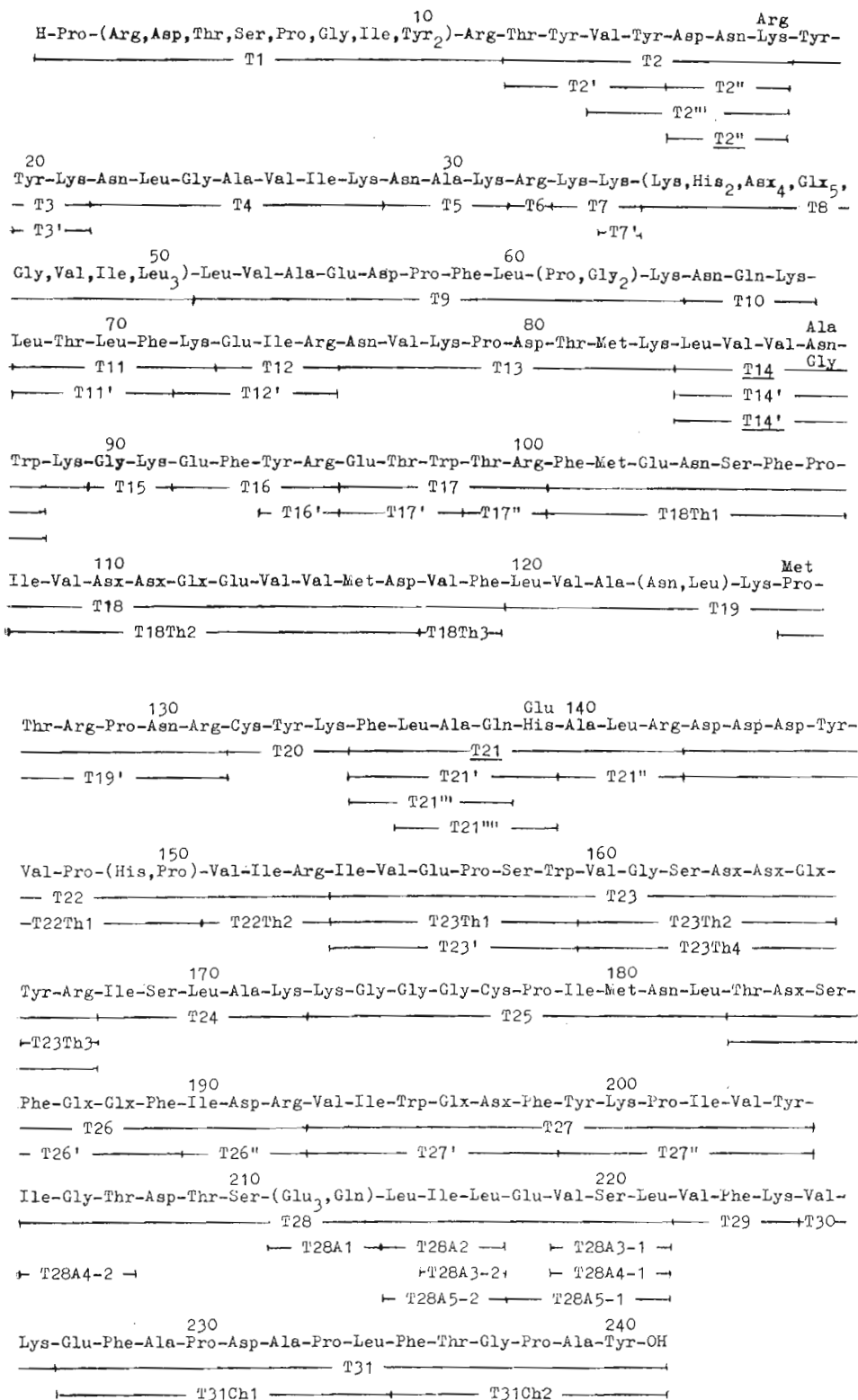


Схема установления аминокислотной последовательности полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроса *G. mellonella*

Экспериментальная часть

Полиэдренный белок получали [6] по методу Бергольда, восстанавливали и карбоксиметилировали как описано ранее [7].

Гидролиз белка трипсином. Восстановленный и карбоксиметилированный белок диализовали против 0,2 н. NH_4HCO_3 и добавляли трипсин (Spofa, ЧССР). Химотрипсиновую активность в препарате трипсина не ингибировали. Фермент-субстратное соотношение 1:50. Гидролиз проводили 6 ч 30 мин при 37°С и смесь лиофилизировали. Лиофильно высушенный гидролизат растворяли в 0,2 н. CH_3COOH . Нерастворимый материал отделяли центрифугированием. Надосадочная жидкость имеет рН 5,0. Растворимые при рН 5,0 пептиды подвергали дальнейшему разделению на колонке с сефадексом G-25 (рис. 1).

Ионообменная хроматография на AG 50×8. Колонку заполняли ионообменником в H^+ -форме и уравнивали 0,2 М пиридин-форматным буфером, рН 3,25. Лиофильно высушенный материал фракции III (рис. 1) растворяли в буфере, рН 3,25, и наносили на колонку. Элюцию осуществляли пропусканьем 700 мл 1,07 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,4 [8, 9], через смеситель, заполненный 500 мл буфера, рН 3,25. Окончательно пропускали 200 мл 2 М раствора аммиака. Нингидриновую реакцию аликуот (0,5 мл) из фракций проводили после щелочного гидролиза [10].

Анализ фракций и пептидов осуществляли методом высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге в условиях работы [5]. Определение аминокислотного состава, N- и C-концевой последовательности пептидов и их субфрагментацию проводили как описано ранее [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kozlov E. A., Levitina T. L., Sidorova N. M., Radavski Y. L., Serebryani S. B. Comparative chemical studies of the polyhedral proteins of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella*.—J. Invert. Pathol., 1975, v. 25, № 1, p. 103–107.
2. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Ларионов Г. В., Вермейченко С. Н., Серебряный С. Б. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза.—Биохимия, 1978, т. 43, вып. 12, с. 2189–2195.
3. 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. Полная аминокислотная последовательность.—Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1048–1053.
4. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Гусак Н. М., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. Аминокислотная последовательность фрагментов.—Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1036–1048.
5. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза ненарного шелкопряда *Porthetria dispar*.—Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 7, с. 985–995.
6. 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.
7. 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.
8. Guidotti G., Hill R. J. The structure of human hemoglobine.—J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 7, p. 2184–2132.
9. Konigsberg W., Hill R. J. Structure of human hemoglobin. Sequence of amino acid in the tryptic peptides of the chain.—J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 8, p. 2547–2562.
10. Moore S., Stein W. The modified ninhydrin reagent for fotometric determination of amino acids and related compounds.—J. Biol. Chem., 1954, v. 211, № 2, p. 907–913.

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

TRYPTIC PEPTIDES OF INCLUSION BODY PROTEIN OF NUCLEAR
POLYHEDROSIS VIRUS OF *GALLERIA MELLONELLA*

GUSAK N. M., KOZLOV E. A., OVANDER M. N., SEREBRYANY S. B.

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

Polyhedral protein of *Galleria mellonella* NPV was cleaved with trypsin preparation having unsuppressed chymotryptic activity. 54 peptides were isolated and the structure of 52 of them was determined. 31 peptides have non-overlapping sequences comprising 240 amino acid residues.