

СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM*

Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов

Ранее мы исследовали первичную структуру полиэдрина ряда вирусов ядерного полиэдроза (ВЯП) [1—5], составляющих группу А семейства бакуловирусов. Вирусы гранулеза (ВГ) представляют собой группу В этого семейства. Результаты сравнительного исследования физико-химических свойств белка тел включений бакуловирусов [6, 7], относящихся к двум группам, позволяют предположить, что по первичной структуре гранулины отличаются от полиэдринов в большей степени, чем полиэдрины между собой. Представлялось интересным сравнить первичную структуру гранулина ВГ и полиэдрина ВЯП, поражающих одного хозяина. Аминокислотная последовательность фрагментов полиэдрина ВЯП *A. segetum*, включающих 155 остатков аминокислот, была выяснена нами ранее [5]. Настоящее сообщение посвящено изучению строения некоторых триптических пептидов гранулина ВГ *A. segetum*.

Материалы и методы. Гранулин получали при растворении гранул в 0,1 н. NaOH. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием, белок осаждали 14 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты, промывали дистиллированной водой, растворяли в 0,5 %-ном аммиаке и лиофилизировали. Белок восстанавливали, карбоксиметилировали [8] и расщепляли трипсином («Worthington», США). Гидролиз проводили в 0,2 н. бикарбонате аммония (рН 7,8; 37 °С) в течение 6 ч при фермент-субстратном соотношении 1 : 50. Реакцию останавливали лиофилизацией. К 120 мг сухого материала добавляли при перемешивании 10 мл 0,2 н. уксусной кислоты. Образовывалась тонкая суспензия с рН 5,0. Нерастворимый материал (фракция Тн) отделяли центрифугированием и разделяли гель-фильтрованием через сефадекс G-50. Растворимые при рН 5,0 пептиды предварительно фракционировали гель-фильтрованием через сефадекс G-25 (тонкий). Фракции I и III, полученные при этом, разделяли ионообменной хроматографией на AG 50×8. Условия гель-фильтрования и ионообменной хроматографии пептидов указаны в подписи к рисунку. При растворении фракции III в буферном растворе, рН 3,25, получали нерастворимый материал (фракция III, AG, Тн). Материал фракций, полученных при гель-фильтровании и ионообменной хроматографии, разделяли высоковольтным электрофорезом (ЭФ) и хроматографией на бумаге (БХ) FN 17 и FN 18 («Filtrak», ГДР) в системах — ЭФ1, рН 6,5 (пиридин : уксусная кислота : вода, 100 : 4 : 896); ЭФ2, рН 1,9 (уксусная кислота : муравьиная кислота : вода, 10 : 41,2 : 948,8); БХ (н-бутанол : уксусная кислота : пиридин : вода, 15 : 3 : 10 : 12).

N-концевую последовательность пептидов определяли методом Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде дансил(Dns)-производных. Деградацию проводили по Грэю [9] в модификации Виноградовой [10]. Dns-аминокислоты идентифицировали на пластинках с тонким слоем полиамида [11]. Аминокислотный состав определяли на анализаторах аминокислот BC-200 («Biocal», ФРГ), Hd 1200E и AAA-881 (СССР). Пробы гидролизуют 5,7 н. соляной кислотой, содержащей 0,1 % фенола, в течение 24 ч при 105—110 °С в вакууме. Триптофан идентифицировали реакцией Эрлиха [12]. О наличии амидов судили по подвижности пептида при высоковольтном электрофорезе в системе ЭФ1.

Результаты и обсуждение. В отличие от исследованных ранее полиэдринов [2—5, 13] расщепление гранулина трипсином приводит к образованию большого количества (свыше 50 %) нерастворимого при рН 5,0 материала (фракция Тн). Проверка электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) фракции Тн показала, что она содержит нерасщепленную полипептидную цепь (молекулярная масса 28 000), ее фрагменты с молекулярными массами 8000, 10 000, 15 000 и крупные пептиды (результаты электрофореза не приводятся). Ясно, что трипси-

полиэдрина в обычных для полиэдрина условиях идет очень плохо, хотя в отличие от полиэдринов расщепление гранулина химотрип-синоподобной протеазой гранул происходит весьма интенсивно [7].

Фракцию Тн разделяли гель-фильтрованием через сефадекс G-50 в 6 М растворе мочевины (рис. 1). Полученную при этом фракцию II, содержащую большие пептиды, разделяли далее высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

Данные гель-фильтрования через сефадекс G-25 растворимых при рН 5,0 пептидов приведены на рис. 2. В процессе гель-фильтрования

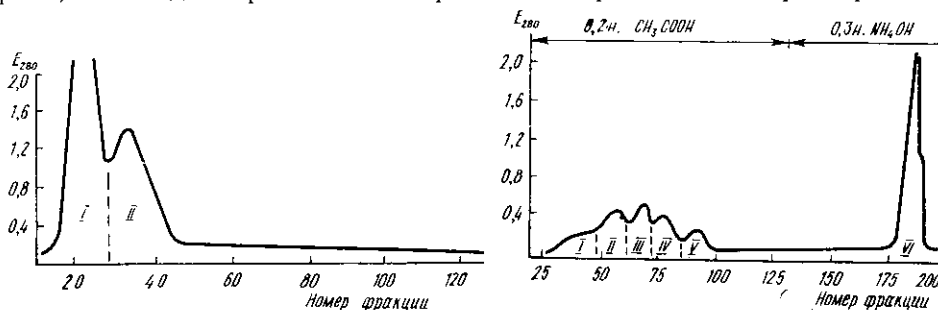


Рис. 1. Разделение нерастворимых при рН 5,0 триптических пептидов на колонке (1,8×110 см) с сефадексом G-50, уравновешенным 0,5 %-ным раствором аммиака с 6 М мочевиной. Скорость элюции 30 мл/ч. Объем фракции 4 мл.

Fig. 1. Separation of the insoluble at pH 5.0 tryptic peptides on a column (1.8×110 cm) with Sephadex G-50 equilibrated with 0.5 % ammonia containing 6 M urea. Flow rate — 30 ml/h, column fraction — 4 ml.

Рис. 2. Разделение растворимых при рН 5,0 триптических пептидов на колонке (1,8×110 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 30 мл/ч. Объем фракции 5,5 мл.

Fig. 2. Separation of the soluble at pH 5.0 tryptic peptides on a column (1.8×110 cm) with Sephadex G-25. Flow rate — 30 ml/h, column fraction — 5.5 ml.

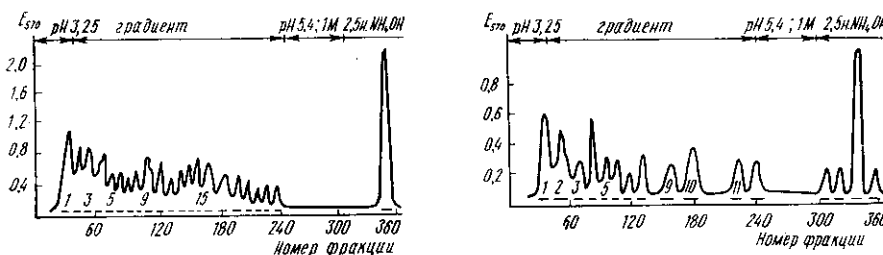


Рис. 3. Разделение триптических пептидов фракции I (рис. 2) на колонке (1,5×60 см) с AG 50×8. Стартовый буфер 0,2 М пиридин-формат, рН 3,25; градиент: 0,2 М, рН 3,25→0,5 М, рН 5,4; t — 40°С. Скорость элюции 32 мл/ч. Объем фракции 5,0 мл.

Fig. 3. Separation of the fraction I (Fig. 2) tryptic peptides on a column (1.5×60 cm) with AG 50×8. Start buifer 0.2 M pyridine formiate, pH 3.25; gradient: 0.2 M, pH 3.25→→0.5 M, pH 5.4; t — 40°. Flow rate — 32 ml/h, column fraction — 5.0 ml.

Рис. 4. Разделение триптических пептидов фракции III (рис. 2) на колонке (1,5×60 см) с AG 50×8. Условия разделения приведены в подписи к рис. 3.

Fig. 4. Separation of the fraction III (Fig. 2) tryptic peptides on a column (1.5×60 cm) with AG 50×8. Separation conditions the same as in the legend to Fig. 3.

величина рН смеси пептидов снижалась с 5,0 до 2,7 (рН 0,2 н. уксусной кислоты), что приводило к осаждению части материала на колонке. Эти пептиды элюировали с колонки 0,3 н. NH₄OH (пик VI).

При сравнении результатов гель-фильтрования триптических пептидов гранулина (рис. 2) и полиэдрина [2—5, 13] очевидно, что бо́льшая часть материала нерастворима при рН 2,7. Если в случае полиэдринов пик VI состоит главным образом из одного пептида, содержащего 19 остатков аминокислот [2—5], то у гранулина материал пика VI представляет собой ассоциат растворимых при рН 5,0 пептидов.

Таблица 1

Аминокислотный состав некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза *A. segetum*
Amino acid composition of some tryptic peptides of the A. segetum granulosis virus granulin

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

Попытка разделить высоковольтным электрофорезом или хроматографией на бумаге материал фракций I и III, полученных гель-фильтрованием (рис. 2), не дала желаемых результатов. Поэтому эти фракции разделяли ионообменной хроматографией (рис. 3 и 4). Фракции II, IV, V, полученные при гель-фильтровании через сефадекс G-25, а также фракции, полученные в результате ионообменной хроматографии, разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

В табл. 1 приведены аминокислотные составы полученных пептидов, а в табл. 2 — их строение. Как можно видеть из табл. 2, некоторые триптические пептиды (T5, T6', T8', T10, T11, T16, T17, T17', T18') образовались при расщеплении связей, специфических для химотрипсина. Наличие такого большого числа неспецифических для трипсина пептидов можно объяснить действием в условиях трипсинолиза протеазы гранул, которая, как известно, обладает химотрипсиноподобной активностью [14] гораздо более высокой, чем протеаза полиэдров [7]. Хотя мы и получили гранулин при растворении гранул в 0,1 н. NaOH, но, как было показано нами, ингибирование щелочью протеазы тел включений бакуловирусов обратимо [6]. Применение же ингибиторов протеаз необратимого действия перед растворением гранул приводит к полной потере их растворимости.

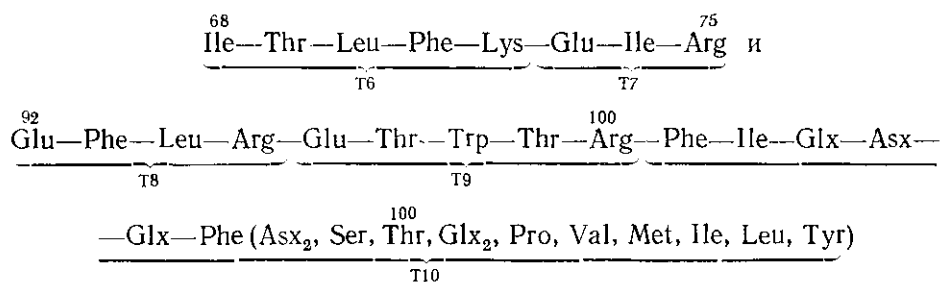
Чрезвычайно низкий выход триптических пептидов можно, по-видимому, объяснить высоким уровнем неспецифического для трипсина расщепления и высокой степенью ассоциации пептидов гранулина.

Таким образом, нами было получено 22 пептида, насчитывающих 131 остаток аминокислот. Четыре пептида, обозначенные штрихом, имеют аминокислотную последовательность, перекрывающуюся с последовательностью одноименных пептидов без штриха. 18 пептидов с уникальной аминокислотной последовательностью насчитывают 113 остатков аминокислот, что составляет 47 % полипептидной цепи гранулина, включающей по данным аминокислотного состава 234 остатка [7].

Большое сходство между собой триптических пептидов полиэдрина различных ВЯП дало возможность реконструировать фрагменты полипептидной цепи нескольких полиэдринов [4, 5, 15] путем сравнения

T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T17'	T18	T18'
—	—	—	—	1,0 (1)	(1)	1,0 (1)	—	—	—	0,8 (1)	—
—	—	—	—	—	—	1,1 (1)	1,0 (1)	—	—	—	—
1,1 (1)	—	—	1,0 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
—	2,8 (3)	—	1,8 (2)	1,1 (1)	—	—	1,0 (1)	2,8 (3)	2,7 (3)	—	—
2,0 (2)	1,0 (1)	0,7 (1)	0,8 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
—	0,9 (1)	—	0,6 (1)	0,9 (1)	—	—	—	0,6 (1)	—	—	—
0,9 (1)	3,9 (4)	1,2 (1)	3,3 (3)	—	—	—	1,0 (1)	1,0 (1)	1,2 (1)	—	—
—	1,3 (1)	—	1,6 (2)	—	—	1,9 (2)	1,0 (1)	—	—	1,2 (1)	1,1 (1)
—	—	—	—	—	—	2,8 (3)	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9 (1)	1,0 (1)
—	—	0,4 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	0,6 (1)	—	—	—	—	—	—	0,8 (1)	—	—	—
—	0,5 (1)	—	0,6 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
—	1,5 (2)	—	1,2 (1)	0,9 (1)	—	—	—	—	—	—	—
—	0,9 (1)	1,1 (1)	1,3 (1)	1,1 (1)	—	—	1,0 (1)	—	—	1,2 (1)	1,1 (1)
—	0,7 (1)	—	—	—	—	—	1,0 (1)	0,8 (1)	—	0,9 (1)	0,8 (1)
—	2,0 (2)	—	1,1 (1)	—	—	—	—	2,7 (3)	2,7 (3)	—	—
+ (1)	—	—	—	—	—	—	+ (1)	—	—	—	—
5	18	4	14	5	1	7	7	10	7	5	4

триптических пептидов с аминокислотной последовательностью полиэдрина ВЯП *Bombyx mori* [1]. Таким путем удалось реконструировать фрагменты полипептидной цепи даже в случае полиэдрина ВЯП *Mamestra brassicae* [4], для которого аминокислотные последовательности полученных пептидов насчитывают только 35 % полипептидной цепи белка. При сопоставлении триптических пептидов гранулина с известной аминокислотной последовательностью полиэдрина ВЯП *B. mori*, *Galleria mellonella* и *Porthetria dispar* [15] удается реконструировать только два небольших фрагмента гранулина, насчитывающих в сумме 36 остатков:



Нумерация последовательности соответствует нумерации в полиэдрине ВЯП *B. mori* [1]. Остальные триптические пептиды гранулина невозможно однозначно локализовать в полипептидной цепи при сравнении их с аминокислотными последовательностями вышеназванных полиэдринов. Совершенно очевидно, что степень гомологии гранулина ВГ *A. segetum* с полиэдринами ВЯП значительно ниже, чем полиэдринов между собой, для которых она при сравнении пяти полиэдринов находится в пределах 80—95 % [4, 5, 15].

Таблица 2

Аминокислотная последовательность некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза *A. segetum*Amino acid sequence of some tryptic peptides of the *A. segetum* granulosis virus granulin

Пептид	Стадии очистки	Последовательность
T1	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Gly-(Thr ₂ , Glu, Pro, Ala, Leu, Tyr ₂)-Arg
T2	III, AG15, ЭФ1, ЭФ2	Ser-Leu(Tyr, Arg)
T3	III, AG10, ЭФ1, ЭФ2	Asp-Arg
T4	III, AG15, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asn-Val-Arg
T5	III, AG4, ЭФ1	Asx-Leu-Ala-Asx-Glx-Tyr
T6	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ile-Thr-Leu-Phe-Lys
T6'	III, AG _{III} , ЭФ1, ЭФ2	Ile-(Thr, Leu, Phe)
T7	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Ile-Arg
T8	III, AG _{III} , ЭФ1, ЭФ2	Glu-Phe-Leu-Arg
T8'	IV, ЭФ1, ЭФ2	Glu-Phe-Leu
T9	IV, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg
T10	IV, II, ЭФ1	Phe-Ile-Glx-Asx-Glx-Phe-(Asx ₂ , Ser, Thr, Glx ₂ , Pro, Val, Met, Ile, Leu, Tyr) Thr-Cys-Leu-Gln
T11	III, AG2, ЭФ1, ЭФ2	Ile-(Asx ₂ , Thr, Ser, Glx ₃ , Pro ₂ , Met, Leu, Phe)-Arg
T12	IV, II, ЭФ1, ЭФ2	Ile-Asn-Leu-Ser-Lys
T13	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Lys
T14	III, AG9, ЭФ1	(Lys, His, Gly ₃ , Pro ₂)
T15	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Asp-Glu-His-Leu-(Pro, Tyr, Trp)
T16	V, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Ser-Val-Tyr-Asx-(Asx ₂ , Glx, Phe ₂)-Phe
T17	IV, ЭФ1, ЭФ2	Asx-(Asx ₂ , Glx, Phe ₂)-Phe
T17'	IV, ЭФ1, ЭФ2	Tyr-Ala-Pro-Leu-Lys
T18	II, ЭФ1, ЭФ2, БХ	Tyr-Ala-Pro-Leu
T18'	III, AG9, ЭФ1	Tyr-Ala-Pro-Leu

Примечание. II — V — фракции, полученные гель-фильтрованием; AG — ионообменная хроматография с соответствующим номером фракции; ЭФ, БХ — высоковольтный электрофорез и хроматография на бумаге в соответствующих системах растворителей; стрелкой обозначены стадии ступенчатой деградации по Эдману; обозначение пептидов произвольное.

THE STRUCTURE OF SOME TRYPTIC PEPTIDES OF THE *AGROTIS SEGETUM* GRANULOSIS VIRUS GRANULIN

T. L. Levitina, S. B. Serebryany, N. V. Rodnin, E. A. Kozlov

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

Summary

22 peptides were isolated from tryptic hydrolyzate of the *A. segetum* granulosis virus granulin and their partial or complete amino acid sequence was determined. 18 unique peptides comprise 113 amino acid residues and account for 47 % of the granulin polypeptide chain.

1. Реконструкция полипептидной цепи белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. Полная аминокислотная последовательность / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман и др. // Биоорганическая химия.—1978.—4, № 8.—С. 1048—1053.

2. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда / Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.—1981.—7, № 7.— С. 985—995.
3. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдрома большой вошинной моли / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.— С. 996—1007.
4. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдрома капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 4.— С. 194—198.
5. Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдрома озимой совки, *Agrotis segetum* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный // Там же.— № 6.— С. 312—317.
6. Сравнительное биохимическое исследование полиэдринных белков вирусов ядерного полиэдрома / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биохимия.—1978.—43, № 12.— С. 2189—2195.
7. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдрома и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 3.— С. 121—124.
8. Серусодержащие аминокислоты полиэдринного белка вируса желтухи тутового шелкопряда / С. Б. Серебряный, В. М. Кавсан, В. К. Кибирев, М. С. Кацман // Химия природ. соединений.—1968.— № 3.— С. 174—178.
9. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation // Meth. Enzymol.—1967.—11.— Р. 469—475.
10. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата / Е. И. Виноградова, М. Ю. Фейгина, Н. А. Алданова и др. // Биохимия.—1973.—38, № 1.— С. 3—21.
11. Хроматография в тонких слоях полиамида / П. Д. Решетов, Г. Г. Честухина, С. Махмутов, А. С. Пышкина // Химия природ. соединений.—1971.— № 1.— С. 66—88.
12. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.—1965.—107, N 2.— Р. 386—388.
13. Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда. I. Разделение и аминокислотный состав фрагментов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман, С. Б. Серебряный // Биоорганич. химия.—1978.—4, № 8.— С. 1029—1035.
14. Eppstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infected the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1975.—62, N 2.— Р. 478—484.
15. Сравнение аминокислотной последовательности белков тел включений вирусов ядерного полиэдрома тутового, непарного шелкопрядов и большой вошинной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорганич. химия.—1981.—7, № 7.— С. 1008—1015.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 10.12.84

УДК 577.32

О ПОГЛОЩЕНИИ РАСТВОРОВ ДНК В ДИАПАЗОНЕ 9—12 ГГц

В. Я. Малеев, В. А. Кашпур, Г. М. Глибицкий,
А. А. Красницкая, Е. В. Веретельник

Введение. В последнее время в связи с проблемой нетеплового воздействия электромагнитного излучения на биологические объекты выполнен ряд работ, посвященных изучению диэлектрических свойств растворов биополимеров в СВЧ-диапазоне. Так, Свайкорд и соавт. [1] с помощью оптического гетеродинного метода обнаружили в диапазоне 8—12 ГГц значительное (на частоте 8 ГГц в 25 раз большее, чем у воды) поглощение электромагнитной энергии молекулами ДНК из *E. coli*. Исследуя этот эффект повторно, но уже на другом образце ДНК *E. coli* более точным диэлектрометрическим методом [2], авторы не нашли заметного превышения поглощения раствора ДНК по сравнению с рас-