

цією з радіоактивними зондами показана ефективність поєднання вказаних підходів для аналізу розмірів та розподілу транскриптів індивідуальних генів між ядром і цитоплазмою.

Summary

A modified method of RNA isolation in the presence of guanidine thiocyanate from the animal cells is suggested. The method permits the purification of high molecular weight samples from nucleus as well as from cytoplasm. The technique is also developed for quick RNA transfer using vacuum blotting from agarose gels to adsorbing membranes after electrophoretic separation of RNA. The efficiency of combination of the above two methods to analyze the size of individual gene transcripts and their distribution between the nucleus and cytoplasm is shown by hybridization of RNA blots with radioactive DNA probes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1985.— 479 с.
2. Транскрипция и трансляция. Методы / Под ред. Б. Хеймеа, С. Хиггинса.— М.: Мир, 1987.— 400 с.
3. Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера.— М.: Мир, 1989.— 368 с.
4. A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid / L. Cathala, L.-F. Savouret, B. Mencler et al. // DNA.— 1983.— 2, N 4.— P. 329—335.
5. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // Anal. Biochem.— 1979.— 98, N 2.— P. 358—367.
6. Зайцев И. З., Яковлев А. Г. Вакуумный перенос ДНК на фильтры для выявления межиндивидуального полиморфизма методом «блоттинг»-гибридизации Саузерна // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1983.— 96, № 10.— С. 84—86.
7. Olszewska E., Jones K. Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer // Trends Genet.— 1988.— 4, N 4.— P. 92—94.
8. Синхронные изменения концентраций *c-fos*-РНК и $B2^+$ мРНК_x в пререпликативном периоде регенерации печени у крыс / В. И. Прима, Т. А. Клочко, М. Ю. Оболенская и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 6.— С. 83—86.
9. Raymond Y., Shore G. C. The precursor for carbamyl phosphate synthetase is transported to mitochondria via a cytosolic route // J. Biol. Chem.— 1979.— 254, N 19.— P. 9335—9338.
10. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.
11. Bittner M., Kupferer P., Morris C. F. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets // Anal. Biochem.— 1980.— 102, N 3.— P. 459—471.

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

Получено 05.09.90

УДК 577.112.5:578.841

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Н. В. Роднин,
С. А. Атепалихина, Л. И. Пальчиковская

ВЫЯСНЕНИЕ ПОЛНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП) ОЗИМОЙ СОВКИ (AGROTIS SEGETUM) И УТОЧНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛИЭДРИНОВ ВЯП ТУТОВОГО (BOMBYX MORI), НЕПАРНОГО (PORTHETRIA DISPAR) ШЕЛКОПРЯДОВ И БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ (GALLERIA MELLONELLA)

Реконструирована полипептидная цепь полиэдрин ВЯП *A. segetum* путем выяснения строения триптических пептидов этого белка и сравнения их с известной аминокислотной последовательностью полиэдрин ВЯП *B. mori*. В дополнение к ранее опубликован-

© Э. А. КОЗЛОВ, Т. Л. ЛЕВИТИНА, Н. М. ГУСАК, Н. В. РОДНИН,
С. А. АТЕПАЛИХИНА, Л. И. ПАЛЬЧИКОВСКАЯ, 1991

ным данным выписана полная аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *G. mellonella* и внесены уточнения в первичную структуру полиэдринов ВЯП *B. mori* и *P. dispar* в результате выяснения строения некоторых триптических пептидов соответствующих полиэдринов.

Введение. Предыдущим исследованием триптических пептидов нам не удалось установить первичной структуры полиэдрина ВЯП *A. segetum* [1], так как у значительной части пептидов не было известно строение. Кроме того, сравнение триптических пептидов с установленной первичной структурой полиэдринов ВЯП *B. mori* [2], *P. dispar* [3] и *G. mellonella* [4] показало, что некоторые пептиды N-концовой и средней части полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *A. segetum* не были выделены в нашей лаборатории. Мы продолжили выяснение строения ранее [1], а также вновь полученных триптических пептидов. Аналогичная работа была проведена нами на полиэдрине ВЯП *G. mellonella*, у которого также не было выяснено первичной структуры нескольких триптических пептидов и потеряны один из них. Появление в печати публикаций с аминокислотными последовательностями полиэдринов ВЯП *B. mori* [5] и *Lymantria dispar* [6], выведенными из нуклеотидной последовательности соответствующих генов, дало возможность сравнить их с первичной структурой полиэдринов этих вирусов, установленной ранее химическими методами [3, 4], уточнить и внести в наши данные соответствующие поправки. Результаты этих исследований приведены в данном сообщении.

Материалы и методы. Условия обработки белка карбоксипептидазой А+В («Worthington», США) в присутствии DS-Na и мочевины [7], а также расщепления белков и пептидов трипсином («Sprofa», ЧССР), химотрипсином («Sprofa», ЧССР) и термолизином («Seikadaku», Япония) описаны в работе [3]. Методы разделения смесей фрагментов, получение индивидуальных пептидов и их аминокислотный состав описаны в ранее опубликованных работах: триптические малеилпроизводного (Tm) [8], химотриптические (Ch) [9] и триптические пептиды (T) [10] немодифицированного полиэдрина ВЯП *B. mori*; триптические пептиды полиэдрина ВЯП *G. mellonella* [4], *P. dispar* [3] и *A. segetum* [1]. Для выявления пептидов, содержащих триптофан, электрофореграммы и хроматограммы окрашивали реактивом Эрлиха [11]. Аминокислотную последовательность в пептидах определяли методом Эдмана в сочетании с дансилированием [12], в белках — этим же методом в модификации для труднорастворимых белков [13]. Остатки глутаминовой, аспарагиновой кислот и их амидов идентифицировали в виде фенилтиогидантоиновых производных по методу [14]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот ААА-339 (ЧССР), как описано ранее [3].

Результаты и обсуждение. Первичная структура полиэдрина бакуловирусов впервые была выяснена в нашей лаборатории для ВЯП *B. mori* и опубликована еще в 1977 г. [15]. В дальнейшем для выяснения аминокислотной последовательности полиэдрина других бакуловирусов мы устанавливали строение только триптических пептидов и располагали их вдоль полипептидной цепи, сравнивая с первичной структурой полиэдрина ВЯП *B. mori* [2—4, 16]. Только в 1985 г. была опубликована аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *B. mori*, выведенная из нуклеотидной последовательности гена [5]. Поскольку для выяснения полной аминокислотной последовательности полиэдрина ВЯП *A. segetum* был применен прежний метод сравнения строения триптических пептидов с первичной структурой полиэдрина ВЯП *B. mori*, мы считаем целесообразным здесь привести сначала полную аминокислотную последовательность полиэдрина ВЯП *B. mori* с описанием некоторых уточнений, а затем обсудить результаты исследований по другим полиэдринам.

Полиэдрин ВЯП *B. mori*. Сравнивая наши данные по первичной структуре [15] с данными Иатроу и др. [5], можно отметить расхождения в следующих положениях полипептидной цепи: 39—40 (Glu-His и His-Glu соответственно), 115 (Val и делеция), 142—144 (делеция-Glu-Asp и Trp-Asp-Glu), 213—214 (Ala-Ser и Ser-Ala), 218 (Gln и Glu). Для проверки этих расхождений мы повторно выделили пептиды Ch12T1, T26Th2 и Tml1Ch1A4, получение, очистка и аминокислотный состав которых описаны ранее [8—10]. Кроме того, из химотриптического гидролизата белка высоковольтным электрофорезом и

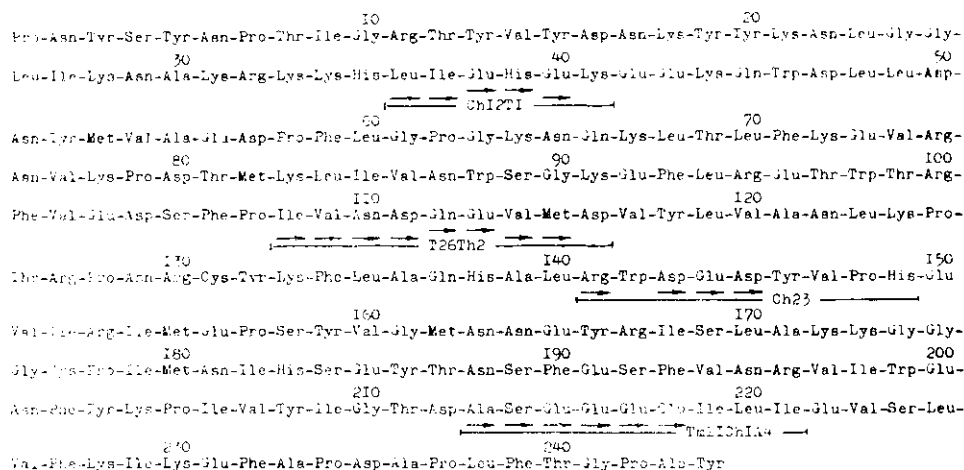


Рис. 1. Уточненная первичная структура полиэдрина ВЯП *B. mori*. Объяснение см. в тексте

Fig. 1. Corrected primary structure of *B. mori* NPV polyhedrin. See details in the text

хроматографией на бумаге выделили пептиды, содержащие триптофан. Был получен ранее не описанный пептид Ch23 с составом: Arg 1,0 (1); His 0,9 (1); Asp 1,9 (1); Glu 1,2 (1); Pro 1,0 (1); Tyr 0,9 (1); Val 1,0 (1); Trp (+). Все отмеченные пептиды секвенировали. Результаты приведены на рис. 1. Как здесь, так и на других рисунках, стадии деградации обозначены стрелками под соответствующими пептидами. Ранее [8] во фрагменте T8 (положение 143 в белке) мы записывали остаток Gln с N-конца исходя из того, что этот фрагмент не окрашивается нингидрином и в нем не удастся определить N-концевого остатка тремя методами. Из полученных в настоящем исследовании данных (пептид Ch23) очевидно, что такими свойствами фрагмент T8 обладает потому, что на N-конце его располагается остаток Trp, который, вероятно, разрушается в процессе выделения или хранения фрагмента T8.

Как видно из рис. 1, из всех указанных выше расхождений между двумя первичными структурами осталось только одно — в положении 213—214. Аминокислотные остатки в остальных местах соответствуют таковым в нуклеотидной последовательности гена полиэдрина ВЯП *B. mori* [5]. Мы считаем, что различие в последовательности аминокислотных остатков 213—214 объясняется отличиями между двумя штаммами ВЯП *B. mori*.

Полиэдрин ВЯП *A. segetum*. Для выяснения полной аминокислотной последовательности полиэдрин расщепляли трипсином. Из триптической смеси высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге были выделены 9 пептидов, ранее не описанных. Их аминокислотные составы приведены в таблице. Кроме вновь выделенных пептидов, в работе по секвенированию использовали некоторые пептиды (T1, T3, T6—T9, T13, T16, T17, T25—T29, T31), получение и аминокислотный состав которых описаны ранее [1]. Из них пептиды T8 и T16 расщепляли соответственно химотрипсином и термолизином

Аминокислотный состав некоторых пептидов полиэдрина ВЯП *A. segetum*
 Amino acid composition of some peptides of the *A. segetum* Nuclear Polyhedrosis
 virus polyhedrin

Аминокислота	T21	T21'	T22''	T25'	T32	T33	T31
Lys							1,0 (1)
His	0,7 (1)						
Arg	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
Asp	1,8 (2)		0,9 (1)	1,9 (2)		1,8 (2)	0,91 (1)
Thr						0,8 (1)	
Ser				1,7 (2)		0,7 (1)	
Glu	1,1 (1)	1,1 (1)	1,1 (1)	2,1 (2)			
Pro	2,0 (2)					1,0 (1)	
Gly			2,2 (2)			1,2 (1)	
Ala							1,1 (1)
1/2 Cys	0,5 (1)						
Val	0,7 (1)	0,8 (1)	2,0 (2)				
Met					0,6 (1)		
Ile	0,7 (1)	0,7 (1)		1,0 (1)		0,9 (1)	
Leu							
Tyr	0,8 (1)		0,9 (1)			1,7 (2)	
Phe				1,9 (2)		1,1 (1)	
Trp	+ (1)						
Всего	12	4	8	10	2	11	4

Аминокислота	T35	T36	T8Ch1	T8Ch2	T8Ch3	T16Tb1	T16Tb2
Lys	(1)				1,0 (1)		
His							
Arg							
Asp		0,8 (1)	2,1 (2)	1,0 (1)		1,2 (1)	3,0(3)
Thr			0,8 (1)				
Ser						0,7 (1)	
Glu				1,1 (1)		1,2 (1)	2,2(2)
Pro		1,0(1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	
Gly		3,3 (3)			2,3 (2)		
Ala				1,1 (1)			
1/2 Cys		0,6 (1)					
Val				1,0 (1)			1,7(2)
Met		0,8 (1)		0,6 (1)		0,7 (1)	0,7(1)
Ile		0,9 (1)					0,7(1)
Leu		1,0 (1)	1,2 (1)		0,8 (1)		
Tyr							
Phe			0,8 (1)	1,0 (1)		2,0 (2)	
Trp							
Всего	1	9	6	7	5	7	9

и гидролизаты разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге. Результаты приведены в таблице. Таким образом, в настоящем исследовании нами было секвенировано 23 триптических пептида, 3 химотриптических и 2 термолитических. У пептидов T28 и T31 идентификацию остатков аминокислот дансированием осуществляли, начиная с 4-й и 6-й стадий деградации соответственно (рис. 2). Все пептиды располагали вдоль полипептидной цепи, сравнивая их строение с первичной структурой полиэдрина ВЯП *B. mori* (см. рис. 1). Пептид T32 помещали в N-концевое положение полипептидной цепи белка на основании того, что на N-конце полиэдрина ранее был определен остаток Met [17], а пептид T32 — единственный из триптических пептидов с таким же N-концевым остатком. Три C-концевых остатка в полиэдрине были установлены на том основании, что карбоксипептидаза А + Б отщепляет от белка за 24 ч лишь Tyr. Следовательно, остаток Pro в белке может быть только на третьем месте от C-конца.

Таким образом, полная аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *A. segetum* включает 246 остатков аминокислот.

Полиэдрин ВЯП *G. mellonella*. При сравнении первичной структуры полиэдрина ВЯП *G. mellonella* [4] с первичной структурой полиэдрина ВЯП *V. mori* (см. рис. 1) для максимальной гомологии необходимо в аминокислотной последовательности первого допустить вставку в положении 115 и делецию 4 остатков в положении 183—186, а также одного остатка в положении 142. Чтобы исследовать альтернативную возможность потери пептида из участка 183—186 при разделении смеси пептидов [4], мы предприняли попытку выделить

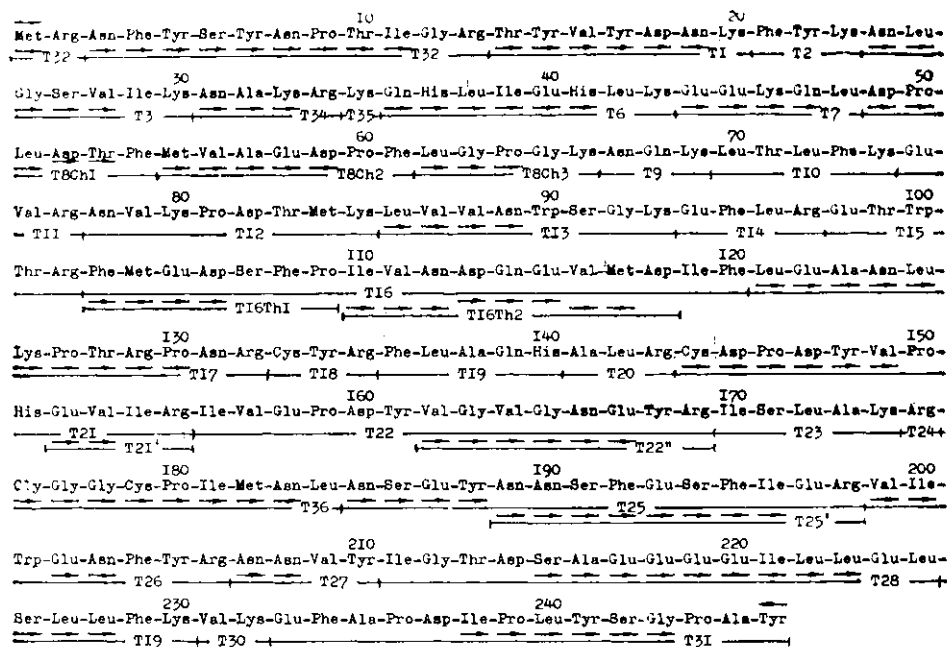


Рис. 2. Схема реконструкции полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *A. segetum*
 Fig. 2. Reconstruction pattern of *A. segetum* NPV polyhedrin polypeptide chain

соответствующий триптический пептид, предполагая его строение по гомологии с другими полиэдринами [18].

Для проверки делеции в положении 143 мы попытались выделить химотриптический триптофансодержащий пептид по аналогии с полиэдрином ВЯП *V. mori* (см. выше). В результате получены три новых триптических пептида, не описанных ранее [4], и один химотриптический. Пептид Т8', состав: Lys 1,2 (1); His 1,4 (2); Glu 5,2 (5); Ile 1,1 (1); Leu 1,2 (1). Пептид Т8, состав: Asp 4,3 (4); Val 0,7 (1); Leu 1,8 (2); Tyr 1,0 (1). Пептид Т26, состав: Arg 1,0 (1); Asp 3,0 (3); Ser 1,8 (2); Thr 0,9 (1); Glu 3,2 (3); Ile 1,0 (1); Tyr 0,9 (1); Phe 2,1 (2). Пептид Ch22, состав: Arg 1,0 (1); His 0,7 (1); Asp 2,2 (2); Pro 2,0 (2); Val 1,0 (1); Tyr 1,0 (1); Trp (+). Параллельно с этим мы повторно выделяли, как описано [4], ряд пептидов (Т1, Т9, Т18, Т19, Т23, Т27, Т28), необходимых для уточнения структуры, приведенной ранее в скобках, и идентификации остатков Asx и Glx. Аминокислотный состав этих пептидов описан в работе [4]. Пептид Т9 расщепляли химотрипсином и выделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге пептид Т9Ch2 с составом: Pro 1,0 (1); Gly 2,2 (2); Leu 1,0 (1); Lys 1,2 (1). Пептиды Т18 и Т23 расщепляли термолизинном и указанным выше способом получили фрагменты Т18Th2 и Т23Th4, составы которых описаны ранее [4]. Все полученные пептиды секвенировали. Результаты приведены на рис. 3. Пептиды, обозначенные на этом рисунке, рассматривали путем сравнения с ранее опубликованной последовательностью [4]. Таким образом, полная аминокислотная последовательность поли-

эдрина ВЯП *G. mellonella* содержит 244 остатка аминокислот, а не 240, как указывалось ранее [4].

Полиэдрин ВЯП *P. dispar*. Сравнение опубликованной нами ранее аминокислотной последовательности полиэдрина ВЯП *P. dispar* [3] с аминокислотной последовательностью полиэдрина ВЯП *L. dispar*, выведенной из нуклеотидной последовательности соответствующего гена [6], обнаруживает ряд расхождений. У полиэдрина ВЯП

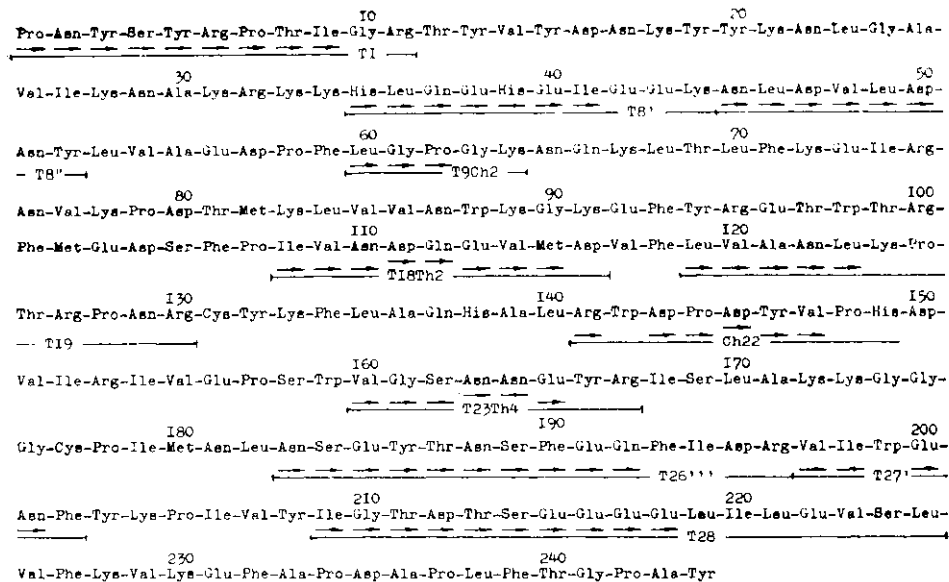


Рис. 3. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *G. mellonella*
Fig. 3. The complete amino acid sequence of *G. mellonella* NPV polyhedrin

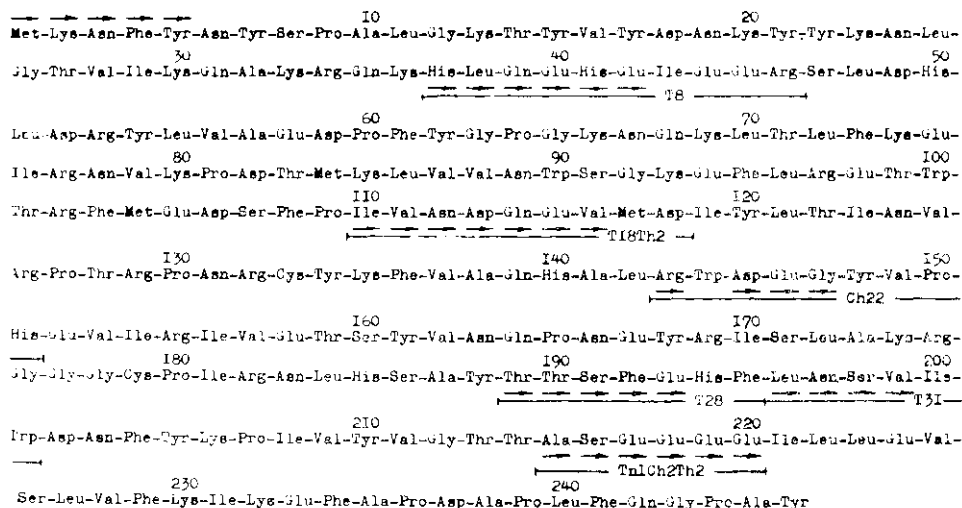


Рис. 4. Уточненная первичная структура полиэдрина ВЯП *P. dispar*
Fig. 4. Corrected primary structure of *P. dispar* NPV polyhedrin

P. dispar в положениях 3—5 и 193—195 имеются делеции, в положении 38—39 — Glu-His (у сравниваемого полиэдрина ВЯП *L. dispar* — His-Glu), в положении 113 — Glu (делеция у *L. dispar*), в положении 142—144 — делеция-Gln-Asp (Cys-Asp-Glu), в положениях 156 и 158 — Thr и Tyr (Pro и Thr соответственно), в положении 160—163 — Asn-Gln-Tyr (Glu-делеция-Asn), в положениях 187 и 191 — His и Thr (Thr и His

соответственно), в положении 208—209 — Ala-Ser (Ser-Ala). Чтобы выяснить причину этих расхождений, мы расщепили белок трипсином и химотрипсином и выделили необходимые для работы пептиды, а также провели секвенирование белка. Исходя из предположения о том, что пептиды, занимающие положения 143—151 и 196—201, могут содержать остаток триптофана [6], мы выделили из триптических и химотриптических смесей два новых триптофансодержащих пептида: T31, состав — Ser 1, 1(1); Asp 1,3 (2); Val 0,7 (1); Ile 0,7 (1); Leu 1,1 (1); Trp (+); Ch22, состав — Arg 1,0 (1); His 0,8 (1); Asp 1,0 (1); Glu 1,1 (1); Pro 1,0 (1); Gly 1,2 (1); Val 1,0 (1); Tyr 0,9 (1); Trp (+). Для исследований использовали также пептиды T8, T18Th2, T28 и Tn1Ch2Th2, получение и аминокислотный состав которых описаны ранее [3]. Все пептиды секвенировали. Таким путем были проверены вышеуказанные расхождения и внесены соответствующие поправки в ранее опубликованную первичную структуру [3]. Результаты приведены на рис. 4. Полная аминокислотная последовательность включает, как выяснилось, 246 остатков аминокислот, а не 237. Различия с аминокислотной последовательностью полиэдрин ВЯП *L. dispar* [6] в положениях 36—37, 142, 156, 158, 160—162 и 206—207 мы принимаем как различия между двумя штаммами вируса.

Резюме

Реконструйовано поліпептидний ланцюг поліедрину ВЯП *A. segetum* шляхом з'ясування будови триптичних пептидів цього білка і порівняння їх з відомою амінокислотою послідовністю поліедрину ВЯП *B. mori*. Як додаток до раніше опублікованих даних вписана повна амінокислотна послідовність поліедрину ВЯП *G. mellonella* і зроблені уточнення в первинній структурі поліедринів ВЯП *B. mori* і *P. dispar* в результаті вивчення будови деяких триптичних пептидів відповідних поліедринів.

Summary

The complete amino acid sequence of *A. segetum* nuclear polyhedrosis virus (NPV) polyhedrin was reconstructed as based on the comparison of tryptic peptides of this protein with the known amino acid sequence of *B. mori* NPV polyhedrin. The previously published primary structures of NPV polyhedrins of *G. mellonella* *P. dispar* and *B. mori* were correlated by means of studying the corresponding tryptic peptides.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Строение* триптических пептидов полиэдрин вируса ядерного полиэдроза озимой совки, *Agrotis segetum* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Родниц, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 6.— С. 312—317.
2. *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. // Биоорг. химия.— 1978.— 4, № 8.— С. 1048—1053.
3. *Триптические* пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, *Porthetria dispar* / Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.— 1981.— 7, № 7.— С. 996—1007.
4. *Триптические* пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошиной моли, *Galleria mellonella* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный // Там же.— 1981.— 7, № 7.— С. 996—1007.
5. *Ialrou K., Ho K., Witkiewicz H.* Polyhedrin gene of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis virus // J. Virol.— 1985.— 54, N 2.— P. 436—445.
6. *Physical map and polyhedrin gene sequence of Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis virus / J. R. L. Smith, N. A. M. Van Beek, J. D. Podgwaite, H. A. Wood // Gene.— 1988.— 71, N 1.— P. 97—105.
7. *Guidotti G.* The action of carboxypeptidase A and B on the separate α and β chains of normal adult human hemoglobin // Biochim. et biophys. acta.— 1960.— 42, N 1.— P. 177—179.
8. *Триптические* фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. II. Аминокислотная последовательность фрагментов / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. С. Кацман и др. // Биоорг. химия.— 1978.— 4, № 8.— С. 1036—1047.
9. *Пептиды* частичного кислотного и химотриптического гидролиза полиэдринного бел-

- ка вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда, *Bombyx mori* / М. С. Кацман, Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина и др. // Там же.— 1977.— 3, № 11.— С. 1455—1466.
10. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Трипсиновые пептиды полиэдреного белка вируса ядерного полиэдрома *B. mori* // Биохимия.— 1976.— 41, № 2.— С. 228—236.
 11. Eastley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 2.— P. 386—388.
 12. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил—Эдман / Н. М. Гусак, М. Н. Овандер, Л. Б. Дробот, С. Б. Серебряный // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка.— 1979.— С. 142—154.
 13. Weiner A. M., Plott T., Weber R. Amino terminal sequence analysis of proteins, purified on a nanomole scale by gel electrophoresis // J. Biol. Chem.— 1972.— 247, N 10.— P. 3242—3251.
 14. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромиданового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 3.— С. 304—314.
 15. The primary structure of the polyhedral protein of Nuclear Polyhedrosis virus (NPV) of *Bombyx mori* / S. V. Serebryani, T. L. Levitina, M. S. Kautzman et al. // J. Invert. Pathol.— 1977.— 30, N 3.— P. 442—443.
 16. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдрома тутового, непарного шелкопряда и большой вошциной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 1008—1015.
 17. 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.
 18. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of Baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // Curr. Top. Microbiol. and Immunol.— 1986.— 131.— P. 131—164.

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

Получено 20.03.90

УДК 535.082.56:577.352.335

Г. П. Горбенко, Т. С. Дюбко, О. А. Нардид, В. А. Моисеев

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P-450 С ФОСФОЛИПИДАМИ МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

С помощью тушения собственной флюоресценции белка исследовали влияние фосфолипидов на структурное состояние цитохрома P-450. Предполагается, что глубина погружения цитохрома P-450 в липидный матрикс модельных мембран уменьшается в присутствии кислых фосфолипидов.

Введение. В настоящее время для исследования молекулярных механизмов структурно-функциональных взаимосвязей в биомембранах широко применяются реконструированные липид-белковые системы. Ранее при изучении взаимодействия интегрального белка цитохрома P-450 с модельными фосфолипидными мембранами было показано, что фосфолипиды оказывают влияние на конформацию и агрегатное состояние белка [1—3], а также на степень погружения белковой молекулы в бислой [4].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании структурного состояния комплексов цитохрома P-450 с фосфолипидами с помощью тушения собственной флюоресценции белка внешним тушителем акрил-амидом.

Материалы и методы. Цитохром P-450 LM₂ выделяли из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал в течение 5 дней [5]. Протеолипосомы получали холат-диализным методом [1] из фосфатидилхолина и смесей фосфатидилхолина с фосфатидилсерином (4:1) и дифосфатидилглицерином (9:1). Молярное соотношение липид: бе-

© Г. П. ГОРБЕНКО, Т. С. ДЮБКО, О. А. НАРДИД, В. А. МОИСЕЕВ, 1991