

4. Barbieri J. T., Moloney B. K., Mende-Mueller L. M. Expression and secretion of the S-1 subunit and C180 peptide of pertussis toxin in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.— 1989.— 171, N 8.— P. 4362—4369.
5. Askelof P., Rodmalm K., Abens J. et al. Use of synthetic peptides to map antigenic sites of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 // J. Infect. Diseases.— 1988.— 157, N 4.— P. 738—742.
6. Askelof P., Rodmalm K., Wragge G. et al. Effective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— 87, N 4.— P. 1347—1351.
7. Mortimer E. A., Kimura M., Cherry J. D. Protective efficacy of the Takeda acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids following household exposure of Japanese children // AIDC.— 1990.— 144.— P. 899—904.
8. Kimura A., Mountzouros K., Relman D. et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model // Infect. and Immunol.— 1990.— 58, N 1.— P. 7—16.
9. Relman D., Tuomanen E., Falkow S. et al. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* // Cell.— 1990.— 61, N 7.— P. 1375—1382.
10. Carlsson J., Drezin H., Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate a new heterobifunctional reagent // Biochem. J.— 1978.— 173, N 3.— P. 723—737.
11. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.— М. Наука, 1985.— 536 с.
12. Muller S., Briandt J. P., Plane S. et al. Immunochemical reactivity of synthetic peptides // Protides Biol. Fluids Proc. 34-th Colloq. (Oxford, sept. 1986).— Oxford, 1986.— P. 87—90.
13. Geysen H. M., Jainer J. A., Rodda S. J. et al. Chemistry of antibody binding to a protein // Science.— 1987.— 235, N 4793.— P. 1184—1190.
14. Carbone F. R., Paterson G. Monoclonal antibodies to horse cytochrome c expressing four distinct idiotypes distribute among two sites on the native protein // J. Immunol.— 1985.— 135, N 4.— P. 2609—2616.
15. Plow E. F., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. et al. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 23.— P. 8057—8061.
16. Putela R., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. A 125/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence from fibronectin // Ibid.— N 17.— P. 5766—5770.
17. Leininger E., Roberts M., Kenimer J. D. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells // Ibid.— 1991.— 88, N 2.— P. 345—349.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев
Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 12.01.93

УДК 577.112.5

**Л. И. Пальчиковская, Т. Л. Левитина,
М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер, М. С. Кацман, Э. А. Козлов**

**УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ВЫСОКОГОМОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ.
ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП)
КАПУСТНОЙ СОВКИ, MAMESTRA BRASSICAE**

*Разработан ускоренный метод («препаративного картирования») определения аминокислотной последовательности высокогомологичных белков. Этим методом выяснена первичная структура полиэдрина ВЯП *M. brassicae*, включающего 246 остатков аминокислот.*

Введение. В течение ряда лет наша лаборатория занимается выяснением первичной структуры белков тел включений (ТВ) бакуловирусов — ВЯП и вирусов гранулеза (ВГ). Соответственно белки ТВ ВЯП называются полиэдринами, а ТВ ВГ — гранулинами. К моменту публика-

© Л. И. Пальчиковская, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер,
М. С. Кацман, Э. А. Козлов, 1993

эти настоящего сообщения нами выяснена первичная структура полиэдринов четырех ВЯП [1] и одного ВГ [2]. Для этого мы применяли классические методы белковой химии с достаточно трудоемкими, требующими длительного времени схемами разделения пептидов, получающихся после расщепления белка несколькими протеазами, а иногда и химическими методами. В других лабораториях мира методом секвенирования соответствующих генов была выведена аминокислотная последовательность полиэдрина и гранулина еще четырех ВЯП [3—5] и двух ВГ [6, 7]. Такое количество известных первичных структур белка ГВ бакуловирусов (8 полиэдринов и 3 гранулина) дало нам возможность рассчитать степень сходства белков внутри каждой группы — полиэдринов и гранулинов [8]. Степень гомологии внутри каждой группы белков одна и та же и лежит в пределах 80—100%. Мы относим такие белки к разряду консервативных, высокогомологических. Это обстоятельство позволило нам разработать относительно быстрый метод определения первичной структуры полиэдрина очередного ВЯП. Для этой цели был выбран ВЯП *M. brassicae*, строение полиэдрина которого мы начали изучать ранее [9] и аминокислотная последовательность другого географического изолята этого вируса выписана по нуклеотидной последовательности гена [4], что дало нам возможность проверить достоверность разработанного метода. Результаты этой разработки и применения метода приведены в настоящем сообщении.

Материалы и методы. Получение полиэдрина описано ранее [9]. Белок восстанавливали и карбоксиметилировали [10]. Расщепление полиэдрина трипсином («Serva», ФРГ) и разделение триптического гидролизата на фракцию растворимых (р) и нерастворимых (н) пептидов проводили по [9]. Субфрагментацию некоторых триптических пептидов химотрипсином («Spofa», ЧССР) и термолизином («Seikagaku», Япония) осуществляли в условиях, описанных в работе [11]. В ней же описаны условия обработки пептидов карбоксипептидазой (КП) А+Б («Worthington», США).

Метод «препаративного картирования» пептидов. Фракцию Р триптического гидролизата 30 мг ВКМ-белка (1 мМ) наносили на лист (17×55 см) хроматографической бумаги Filtrak FN17 (Германия) полоской из расчета 2 мг гидролизата на 1 см длины и подвергали высоковольтному электрофорезу в электролите с рН 6,5 [11] на приборе, сконструированном в нашей лаборатории [12]. После высушивания вдоль длинного края с двух сторон электрофореграммы отрезали гидовые полоски по 1 см шириной и проявляли 0,3%-м раствором нингидрина в ацетоне в сушильном шкафу при 60 °С, 10 мин. По гидовым полоскам электрофореграмму разрезали на шесть зон. Пептиды элюировали 0,5%-м NH_4OH и лиофилизировали. Лиофилизированный материал наносили на шесть полосок (шириной 10 см) хроматографической бумаги FN17 и подвергали восходящей хроматографии в течение 1 сут в системе: изоамиловый спирт : пиридин : вода (35 : 35 : 30). Хроматографию повторяли трижды, подгоняя каждый раз фронт растворителя к одному и тому же месту. Хроматограммы опрыскивали из пульверизатора 0,02%-м раствором нингидрина в ацетоне и проявляли в течение 16 ч в темноте при комнатной температуре. Проявившиеся полоски пептидов вырезали, измельчали, помещали в бюксы и заливали на сутки ацетоном для элюции красителя. Споласкивали повторно ацетоном. Пептиды элюировали 0,5%-м раствором аммиака и элюат высушивали в вакуум-сушильном шкафу.

Секвенирование пептидов осуществляли ручным методом дегидратации [13].

Аминокислотный состав выполняли на анализаторе ААА.339 (ЧССР), как описано [11].

Гриньяфан в пептидах определен по реакции Эрлиха [14], амиды — по подвижности пептидов при высоковольтном электрофорезе.

Обсуждение результатов. Разработанный нами метод «пептидного картирования» для выделения пептидов из фракции р дает значитель-

Строение триптических пептидов и субфрагментов пептидов полиэдрина ВЯП

Пептид	Строение
T1	Met-(Thr, Tyr)-Arg →
T2	Tyr-Ser-Tyr-Asn-Pro-Ser-Leu-Gly-Arg → → → → →
T3	Thr-Tyr-Val-Tyr-Asp-Asn-Lys → → → → →
T4	Tyr-Tyr-Lys →
T5	Asn-Leu-Gly-Ser-Val-Ile-Lys → → → → →
T6	Asn-Ala-Asn-Arg → →
T7	Lys-Lys →
T7'	Lys
T8	His-Tyr-Ile-Glu-His-Glu-Leu-Glu-Glu-Lys → → → → →
T9	Thr-Leu-Asp-Pro-Leu-Asp-Arg → → → → →
T10	Tyr-Leu-Val-(Asp, Glu, Pro ₂ , Gly ₂ , Ala, Leu, Phe)-Lys → → → → →
T11	Asn-Gln-Lys →
T12	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys → → → →
T13	Glu-Ile-Arg →
T14	Asn-Val-Lys-Pro-Asp-Thr-Met-Lys → → → → →
T15	Leu-Val-Val-Asn-(Trp, Ser, Gly)-Lys → → → → →
T16	Glu-Phe-Leu-Arg → →
T17	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg → → → →
T18	Phe-Met-Glu-Asp-(Asp ₃ , Ser, Glu ₂ , Pro, Val ₂ , Met, Ile, Phe)-Val-Phe → → → → → ← ←
T19	Leu-Val-Ile-Asn-Met-(Asp, Thr, Pro ₂ , Arg ₂)-Arg → → → → →
T20	Cys-Phe-Lys →
T21	Phe-Leu-Ala-Gln-(His, Ala, Leu)-Arg → → → →
T22	Cys-Asp-Pro-Asp-(His, Glu, Pro, Val ₂ , Ile, Tyr)-Arg → → → → →
T23	Ile-Val-Glu-(Asp ₂ , Ser ₂ , Glu, Pro, Gly, Val, Tyr ₂)-Arg → → → → →
T23'	Val-Gly-Ser-Asn-Asn-Glu-Tyr-Arg → → → → →
T24	Val-Ser-Leu-Ala-Lys → → → → →
T25	Arg →
T26	Gly-Gly-Gly-(His, Asp, Ser, Glu, Pro, Cys, Val, Met, Leu) ₃ → → → → →
T27	Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-Glu-Phe → → → → →
T28	Ile-Asn-Arg →
T29	Val-Ile-Trp-Glu-Asn-Phe-Tyr → → → → →
T30	Val-Gly-Thr-Asp-(Ser ₂ , Glu ₅ , Ala, Val ₂ , Ile, Leu ₃ , Phe)-Lys → → → → →
T31	Ile-Lys →
T32	Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-(Asp, Pro ₂ , Gly, Ala, Leu, Tyr)-Tyr → → → → →
T18Th1'	Phe-Met-Glu-Asp-Ser-(Pro, Phe) → → → → →
T18Th2'	Ile-Val-Asn-Asp-Gln-(Asp, Glu, Ile, Met) → → → → →
ThCh1 (T33)	Lys-Pro-Ile-Val-Tyr → → → →
ThCh2'	Val-Gly-Thr-Asp-Ser-Ala-(Ser, Glu ₅ , Val ₂ , Ile, Leu ₃)-Phe → → → → →
ThCh3'	Val-Phe-Lys →
ThCh4'	Val-Gly-Thr-(Asp, Ser, Glu ₄ , Ala, Ile, Leu)-Leu → → → → →

	10	20		30
O. pseudotsugata S	Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Gly Arg Thr Tyr Val Tyr Asp Asn Lys Tyr Tyr Lys Asn Leu Gly Ala	Ile Val Lys		
M. brassicae	Ac Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Gly Arg Thr Tyr Val Tyr Asp Asn Lys Tyr Tyr Lys Asn Leu Gly Ser	Ile Val Lys		
	T1	T2	T3	T4
	40	50	60	
Asn Ala	Lys Arg Lys Lys His Gln Ile Glu His Glu Ala Glu Glu His Thr Leu Asp Pro Leu Asp Lys Tyr Leu Val Ala Glu Asp Pro Phe Leu Gly Pro Gly Lys			
Asn Ala	Lys Arg Lys Lys His Tyr Ile Glu His Glu Leu Glu Glu Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asp Arg Tyr Leu Val Ala Glu Asp Pro Phe Leu Gly Pro Gly Lys			
	T6	T7	T8	T9
	70	80	90	100
Asn Gln Lys Leu Thr Leu Phe Lys Glu Ile Arg Asn Val Lys Pro Asp Thr Met Lys Leu Ile Val Asn Trp Ser Gly Lys Glu Phe Leu Arg Glu Thr Trp Thr Arg				
Asn Gln Lys Leu Thr Leu Phe Lys Glu Ile Arg Asn Val Lys Pro Asp Thr Met Lys Leu Val Val Asn Trp Ser Gly Lys Glu Phe Leu Arg Glu Thr Trp Thr Arg				
	T11	T12	T13	T14
	110	120	130	
Phe Met Glu Asp Ser Phe Pro Ile Val Asn Asp Gln Glu Ile Met Asp Val Phe Leu Val Ile Asn Met Arg Pro Thr Arg Pro Asn Arg Cys Phe Arg Phe Leu Ala				
Phe Met Glu Asp Ser Phe Pro Ile Val Asn Asp Gln Glu Ile Met Asp Val Phe Leu Val Ile Asn Met Arg Pro Thr Arg Pro Asn Arg Cys Phe Lys Phe Leu Ala				
	T18Th1	T18Th2	T19	T20
	140	150	160	170
Gln His Ala Leu Arg Cys Asp Pro Glu Tyr Val Pro His Glu Val Ile Arg Ile Val Glu Pro Ser Tyr Val Gly Ser Asn Asn Glu Tyr Arg Ile Ser Leu Ala Lys				
Gln His Ala Leu Arg Cys Asp Pro Asp Tyr Val Pro His Glu Val Ile Arg Ile Val Glu Pro Ser Tyr Val Gly Ser Asn Asn Glu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Lys				
	T21	T22	T23	T24
	180	190	200	210
Arg Gly Gly Gly Cys Pro Val Met Asn Leu His Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Phe Glu Glu Phe Ile Asn Arg Val His Trp Glu Asn Phe Tyr Lys Pro Ile Val Tyr				
Arg Gly Gly Gly Cys Pro Val Met Asn Leu His Ser Glu Tyr Thr Asn Ser Phe Glu Glu Phe Ile Asn Arg Val Ile Trp Glu Asn Phe Tyr Lys Pro Ile Val Tyr				
	T25	T26	T27	T28
	220	230	240	
Val Gly Thr Asp Ser Ala Glu Glu Glu Glu Ile Leu Leu Glu Val Ser Leu Leu Phe Lys Ile Lys Glu Phe Ala Pro Asp Ala Pro Leu Tyr Ser Gly Pro Ala Tyr				
Val Gly Thr Asp Ser Ala Glu Glu Glu Glu Ile Leu Leu Glu Val Ser Leu Val Phe Lys Ile Lys Glu Phe Ala Pro Asp Ala Pro Leu Tyr Asn Gly Pro Ala Tyr				
	T29	T30	T31	T32
	T4Ch4			

ный выигрыш во времени разделения смеси пептидов и в количестве необходимого белка (в 30 раз) для выяснения полной аминокислотной последовательности. Фракцию и триптического гидролизата субфрагментировали химотрипсином и субфрагменты разделяли высоковольтным электрофорезом. Один пептид из фракции р (Т18), содержащий 18 остатков аминокислот, субфрагментировали термолизинном и обрабатывали КП А+Б. В результате всех операций были получены 53 фракции. У всех фракций определялись N-концевые остатки аминокислот и аминокислотные составы. По этим показателям были определены 29 гомогенных пептидов. 24 фракции представляли собой смеси пептидов. Четыре фракции содержали по два N-концевых остатка, а одна — три. Эти фракции подвергали секвенированию и таким путем были установлены смеси пептидов (подчеркнуты в таблице): Т6+Т19, Т10+Т26, Т18+Т30, Т22+Т27, Т3+Т5+Т15. 19 фракций содержали неидентифицированные смеси пептидов.

Таким образом, было установлено полное и частичное строение 40 пептидов, которые приведены в таблице. Число стадий, пройденных эдмановской деградацией, указано стрелками. У пептида Т18 две аминокислоты с С-конца установлены действием КП А+Б (показано стрелками). Шесть пептидов, обозначенных в таблице штрихами, входят в состав других пептидов. 33 пептида с уникальными аминокислотными последовательностями насчитывают 246 остатков аминокислот. Это на два остатка больше, чем было установлено нами ранее [15] при расчете аминокислотного состава на молекулярную массу 28 500. Реконструировать полипептидную цепь можно, сравнивая полученные результаты с аминокислотными последовательностями других полипептидов [3—5], в частности, с полипептидом ВЯП *Orgija pseudotsugata*, штамм S (рисунок). Ранее мы показали, что полипептид ВЯП *M. brassicae* имеет закрытый N-конец. Мы полагаем, что N-конец представляет собой ацилированный метионин (скорее всего, формил-метионин, как это было определено нами для полипептида ВЯП *Porlhetria dispar* [16]).

При реконструкции полипептидной цепи мы раскрыли скобки у пептидов на том основании, что их аминокислотные составы идентичны таковым соответствующих участков полипептидной цепи полипептида ВЯП *P. dispar* или других полипептидов. Выписанная таким путем полная аминокислотная последовательность полипептида ВЯП *M. brassicae* полностью совпадает с аминокислотной последовательностью, выведенной по нуклеотидной последовательности гена полипептида географического изолята ВЯП *M. brassicae* [4], за исключением остатка Lys в 36-м положении. Мы полагаем, что два изолята отличаются одной заменой Lys → Arg.

При сравнении полипептида ВЯП *M. brassicae* с полипептидом ВЯП *O. pseudotsugata* S обнаружено 13 замен (взяты в рамки на рисунке). Из них шесть замен гомологичны [8]. Степень сходства (идентичные + гомологичные остатки аминокислот) составляет 97 %. Степень сходства с другими полипептидами [3—5] лежит в пределах 88—100 %.

Как видно из таблицы, некоторые триптические пептиды (Т18, Т23, Т26, Т27, Т30) получают расщеплением неспецифических для трипсина связей (обозначены вертикальными стрелками на рисунке). По аналогии с другими полипептидами мы полагаем, что это расщепление происходит в результате действия протеазы полипептидов в процессе получения белка (белок получали щелочным методом [8]). Как видим, и в случае ВЯП *M. brassicae* сохраняется закономерность взаимодействия протеазы ТВ с белком ТВ [8].

Резюме. Розроблено прискорений метод («препаративного картування») визначення амінокислотної послідовності високогомологічних білків. За його допомогою знайдено первинну структуру поліпептиду вірусу ядерного поліпептиду *Mamestra brassicae*, у складі якого 246 амінокислотних залишків.

Summary. The accelerated method of amino acid sequence determination has been devised («preparative finger print method»). The primary structure of the *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin has been determined by this method. The complete amino acid sequence comprised 246 residues.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Выявление 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 вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 1.— С. 75—82.
2. Козлов Э. А., Роднин Н. В., Левитина Т. Л. и др. Первичная структура гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Биоорг. химия.— 1990.— 16, № 12.— С. 1675—1677.
3. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // J. Gen. Virol.— 1986.— 67, N 8.— P. 1499—1513
4. Cameron J. R., Posces R. D. Conservation of polyhedrin gene promoter function between *Autographa californica* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus // Virus res.— 1989.— 2, N 3.— P. 183—200.
5. Oakey R., Cameron J. R., Davis B. et al. Analysis of transcription initiation in the *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene // J. Gen. Virol.— 1989.— 70.— P. 769—775.
6. Akiyoshi D., Chakerian R., Rohrmann G. F. et al. Cloning and sequencing of the granulins from the *Trichoplusia ni* granulosis virus // Virology.— 1985.— 141, N 2.— P. 328—332.
7. Chakerian R., Rohrmann G. F., Nesson M. H. et al. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus // J. Gen. Virol.— 1985.— 66, N 6.— P. 1263—1269.
8. 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. 135—164.
9. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Строение некоторых триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдроза капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 4.— С. 194—198.
10. Cleland W. W. Dithiotreitol, a new protective reagent for SH groups // Biochemistry.— 1964.— 3, N 4.— P. 480—482.
11. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С. и др. Триптические фрагменты малеилированного белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда. II. Аминокислотная последовательность фрагментов // Биоорг. химия.— 1978.— 4, № 8.— С. 1036—1047.
12. Кавсан В. М., Мороз Л. В., Серебряный С. Б. Приспособление для горизонтального высоковольтного электрофореза на бумаге упрощенной конструкции // Укр. биохим. журн.— 1968.— 40, № 1.— С. 104—106.
13. Гусак Н. М., Овандер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка, 1979.— С. 142—153.
14. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping technique // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 3.— P. 386—388.
15. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза // Биохимия.— 1978.— 43, № 12.— С. 2189—2195.
16. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроза тутового и непарного шелкопрядов и большой вошинной моли // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 1008—1015.

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

Получено 27.10.92