

16. *Tweeten K. A., Bulfa L. A., Consigli R. A.* Characterization of an alkaline protease associated with a granulosus virus of *Plodia interpunctella* // *J. Virol.*—1978.—26, N 3.—P. 702—711.
17. *Payne C. C., Kalmakoff J.* Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification, and properties // *Ibid.*—N 1.—P. 84—92
18. *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.
19. *Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др.* Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроза тутового и непарного шелкопряда и большой вошинной моли // *Биоорг. химия.*—1981.—7, № 7.—С. 1008—1015.
20. *Eppstein D. A., Thoma J. A.* Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the *Cabbage looper* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1975.—62, N 2.—P. 478—484.
21. *Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л. и др.* Очистка полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда и исследование процессов его ассоциации-диссоциации в растворах // *Биохимия.*—1969.—34, № 4.—С. 679—685.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев
Новосиб. гос. аграр. ун-т

Получено 10.03.93

УДК 577.115.5:578.841

**Л. И. Пальчиковская, М. Т. Бобровская, Н. В. Роднин,
Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов**

ТРИПТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП) КОЛЬЧАТОГО ШЕЛКОПРЯДА, MALACOSOMA NEUSTRIA

*Восстановленный и карбоксиметилированный полиэдрин расщепляли трипсином. Из триптического гидролизата методом гель-фильтрования, высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге выделено 48 пептидов. Определено их строение или аминокислотный состав. 30 пептидов с уникальными аминокислотными последовательностями насчитывают 246 остатков аминокислот. Обсуждаются особенности взаимодействия протеазы полиэдров ВЯП *M. neustria* с полиэдрином.*

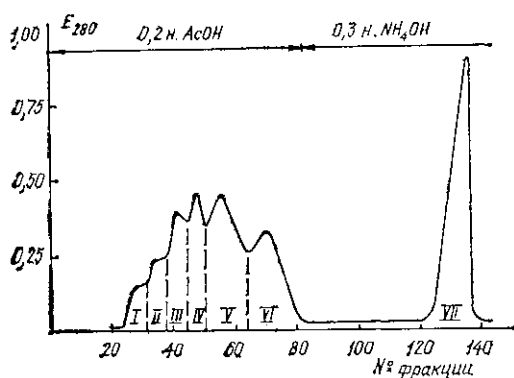
Введение. Ранее [1] мы сообщили о том, что в нашей лаборатории завершается выяснение первичной структуры полиэдрина ВЯП шестого по счету (или десятого в мире) насекомого *M. neustria*. Мы осуществляем подобные исследования непосредственно на белке [2, 3], в других лабораториях мира основываются на нуклеотидной последовательности соответствующих генов [4, 5]. Стратегия выяснения аминокислотной последовательности, выбранная нами, предельно проста, так как полиэдрины относятся к разряду высокомолекулярных белков [4, 6]. В этом случае изучается строение только триптических пептидов. Результаты таких исследований на полиэдрине ВЯП *M. neustria* приведены в настоящем сообщении. Физико-химический анализ этого белка был проведен ранее [7].

Материалы и методы. Полиэдрин получали растворением полиэдров в 0,1 н. NaOH (30 мин) при комнатной температуре. Раствор центрифугировали на ультрацентрифуге в течение 1,5 ч при 20 000 об/мин и 8 °С. Белок осаждали из надосадочной жидкости 14 %-м раствором трихлоруксусной кислоты и промывали дистиллированной водой. Осажденный белок восстанавливали, карбоксиметилировали [8] (ВКМ-белок) и расщепляли трипсином («Worthington», США). Протеолиз проводили в 0,2 н. NH₄HCO₃ (pH 7,8, 37 °С) в течение 12 ч с промежуточной добавкой свежего фермента через 6 ч. Фермент-субстратное соотношение 1 : 50. Реакцию останавливали подкислением реакционной смеси

© Л. И. Пальчиковская, М. Т. Бобровская, Н. В. Роднин, Т. Л. Левитина, Э. А. Козлов, 1993

0,1 н. HCl до pH 6,0. Выпавший при этом осадок (нерастворимая фракция Тн) удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость (растворимая фракция) подвергали гель-фильтрованию через сефадекс G-25 тонкий («Pharmacia», Швеция), уравновешенный 0,2 н. CH_3COOH . После прпускания в несколько приемов всей растворимой фракции на колонке накапливался материал в виде двух окрашенных в желтый цвет зон. Одна зона (фракция Тн) — на вершине колонки, другая — в средней ее части. Верхнюю часть геля, содержащую фракцию Тн, осторожно счищали, заполняли ею небольшую колонку, промывали дистиллированной водой и фракцию Тн элюировали 0,3 н. NH_4OH . После отделения верхней зоны колонку промывали 0,3 н. NH_4OH .

Высоковольтный (в/в) электрофорез и хроматографию осуществляли на бумаге



Разделение растворимых при pH 5,0 триптических пептидов полиэдрина ВЯП *M. neustria* на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 30 мл/ч, объем фракции 5 мл

FN 17 («Filtrak», Германия) в электролитах и системах, описанных ранее [9]. Условия в/в электрофореза описаны в [9].

Расщепление химотрипсином («Srofa», ЧСФР) проводили в условиях, описанных выше для трипсина, в течение 3 ч.

N-концевую последовательность аминокислотных остатков определяли методом Эдмана с последующей идентификацией аминокислот в виде дансил(Dns)-производных. Деграцию производили по Грэйу [10] в модификации Виноградовой и др. [11]. Dns-производные аминокислот идентифицировали на пластинках с тонким слоем полиамида [12].

Аминокислотный состав выясняли на анализаторе аминокислот ААА-339 (ЧСФР). Пробы гидролизовали 5,7 н. HCl, содержащей 0,1 % фенола, в течение 24 ч при 105—110 °C в вакууме. Триптофан определяли реакцией Эрлиха [13]. Остатки глутаминовой, аспарагиновой кислот и их амидов идентифицировали как по подвижности пептида при в/в электрофорезе на бумаге в системе А [9], так и в виде фенилтиогидантоин-производных по методу [14].

Результаты и обсуждение. Приступая к выяснению первичной структуры полиэдрина ВЯП *M. neustria*, мы уже знали те его физико-химические свойства и обстоятельства, которые значительно влияют на степень расщепления белка трипсином — низкая растворимость полиэдров и полиэдрина, высокая способность к агрегации белковых молекул, приводящая к образованию полидисперсной системы из компонентов с молекулярными массами выше 100 000, и высокая протеолитическая активность щелочной протеазы, присутствующей в полиэдрах [7]. Аналогичными свойствами и компонентами обладают тела включения (гранулы, ТВ) и их белок (гранулин) вируса гранулеза (ВГ) озимой совки, *Agrotis segetum* [15]. При изучении первичной структуры этого гранулина [16—18] мы обнаружили взаимосвязь между перечисленными выше физико-химическими свойствами белка ТВ и низкой степенью его расщепления трипсином. В связи с этим и были выбраны столь жесткие условия расщепления полиэдрина ВЯП *M. neustria*. Но даже в таких условиях протеолиза остается некоторое количество нерасщепленного белка или его крупных фрагментов (показано электрофорезом в полиакриламидном геле), и выход нерастворимой фракции Тн составляет 50 вместо 10—15 %, как это наблюдается для других

Строение и аминокислотный состав триптических пептидов (Т) полиэдрина ВЯП *M. neustria* и химоотриптических пептидов (Сн) фракции Тн полиэдрина

Пептид	Строение или состав	Число остатков
1	2	3
T1	Met-Tyr-Thr-Arg	4
T2	Tyr-(Asn, Thr, Ser, Pro, Gly, Leu, Tyr)-Arg	9
T3	Thr-Tyr-Val-Tyr-Asp-Asn-Lys	7
T3 ¹	Val-Tyr-Asp-Asn-Lys	5
T3 ²	Asp-Asn-Lys	3
T4	Tyr-Tyr-Lys	3
T5	Asn-Leu-Gly-His-(Val, Ile)-Lys	7
T6	Asn-Ala-Lys	3
T7	Arg	1
T8	Lys-Lys	2
T7, 8	Arg-Lys	2
T8 ¹	Lys	1
T9	Asn-Ala-Ala-Glu-His-Glu-Leu-Glu-Glu-Arg	10
T10	Asn-Leu-Asp-Pro-(Asp, Leu)-Lys	7
T11	Tyr-Leu-Val-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe-(Pro, Gly ₂ , Leu)-Lys	13
T12	Asn-Gln-Lys	3
T13	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys	5
T14	Glu-Ile-Arg	3
T15	Asn-(Lys, Asp, Thr, Pro, Val, Met)-Lys	8
T16	Leu-Ile-Val-Asn-Trp-Ser-Gly-Lys	8
T16 ¹	Leu-Ile-Val-Asn-Trp	5
T16 ²	Ser-Gly-Lys	3
T17	Glu-Phe-Leu-Arg	4
T18	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg	5
T19	Phe-(Asx ₄ , Ser, Glx ₃ , Pro, Val ₄ , Met ₂ , Ile, Leu ₃ , Phe)	21
T20	Gln-(Lys, Arg ₂ , Thr, Asn, Pro ₂ , Ile)	9
T21	Cys-Phe-Arg	3
T22	Phe-Leu-Ala-Gln-His-Ala-Leu-Arg	8
T22 ¹	Leu-Ala-Gln-His-Ala-Leu-Arg	7
T22 ²	Ala-Leu-Arg	3
T23	Cys-Asp-Ser-Asp-(His, Glu, Pro, Val ₂ , Ile, Trp)-Arg	12
T24	Ile-Val-Glu-Pro-Ser-Tyr-Val-(Asx ₂ , Ser, Glx, Gly, Tyr)-Arg	14
T24 ¹	Val-(Asx ₂ , Ser, Glx, Gly, Tyr)-Arg	8
T25	Ile-Ser-Leu-Gly-Lys	5
T26	Gly-Tyr-Ala-Cys-(Asn, Pro, Val, Met)-Leu-(His, Ser, Glu)-Tyr	13
T26 ¹	Gly-Tyr-Ala-Cys-(Asn, Pro, Val, Met)-Leu	9
T27	Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-Asp-Phe-Ile-Asn-Arg	10
T27 ¹	Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-Asp-Phe	7
T27 ²	Ile-Asn-Arg	3
T28	Val-Ile-Trp-Glu-Asn-Phe-Tyr-Lys-Pro-Leu-Leu-Tyr-Ile-Gly-Thr-Asp-Ser-Ala-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Leu-Leu-Glu-Val-Ser-Leu-Val-Phe-Lys	32
T28 ¹	Val-Ile-Trp-Glu-Asn-Phe-Tyr	7
T28 ²	Lys-Pro-Leu-Leu-Tyr	5
T28 ³	Ile-Gly-Thr-Asp-Ser-Ala-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Leu-Leu-Glu-Val-Ser-Leu-Val-Phe-Lys	20

же месте подобного пептида расщепляются у полиэдринов ВЯП *A. segetum* [2] и *Galleria mellonella* [20, 21] соответственно. Возможно, в полиэдрах ВЯП присутствует не одна протеаза. По числу и разнообразию расщепляемых связей полиэдри ВЯП *M. neustria* ближе к гранулину ВГ *A. segetum* [22], чем к полиэдринам других ВЯП, где гидролиз проходит в основном в 4—6 точках [6, 21]. Мы полагаем, что это определяется больше физико-химическими свойствами белка ТВ [21, 23], чем особенностями протеаз ТВ. Как было отмечено выше, физико-химические свойства полиэдрина ВЯП *M. neustria* более сходны с таковыми гранулина ВГ *A. segetum* в сравнении с другими полиэдринами.

30 триптических пептидов с уникальными аминокислотными последовательностями насчитывают 246 остатков аминокислот и, по-видимому, перекрывают всю полипептидную цепь полиэдрина, так как такое же число остатков имеют полиэдрины с ацилированным метионином на N-конце [2, 3], который обнаруживается и у полиэдрина ВЯП *M. neustria* [7].

Резюме. Відновлений та карбоксиметильований поліедрин розщепляли трипсином. Із триптичного гідролізату методом гелі-фільтрування, високовольтового електрофорезу і хроматографії на папері виділено 48 пептидів. Визначено їх побудову або амінокислотний склад. 30 пептидів з унікальними амінокислотними послідовностями нараховують 246 залишків амінокислот. Обговорюються особливості взаємодії протеази поліедрів ВЯП *M. neustria* з поліедрином.

Summary. The polyhedrin of the *M. neustria* nuclear polyhedrosis virus (NPV) was reduced and carboxymethylated and subjected to tryptic digestion was separated by gel filtration and paper high-voltage electrophoresis and chromatography. 48 peptides were isolated and the structure or amino acid composition of them was determined. 30 peptides have non-overlapping sequences comprising 246 amino acid residues. The peculiarities of the interaction of the *M. neustria* NPV polyhedral protease with the polyhedrin of that are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мирошниченко О. С., Бобровская М. Т., Штерншис М. В. и др. Исследование некоторых физико-химических свойств полиэдрина вируса ядерного полиэдроза лугового мотылька, *Pyrausta sticticalis* // Биополимеры и клетка.— 1993.— 9, № 5.— С. 25—29.
2. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Выяснение полной аминокислотной последовательности полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) озимой совки (*Agrotis segetum*) и уточнение первичной структуры полиэдринов ВЯП тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), непарного (*Porthetria dispar*) шелкопряда и большой вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Там же.— 1991.— 7, № 1.— С. 75—82.
3. Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т. и др. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) капустной совки, *Mamestra brassicae* // Там же.— 1993.— 9, № 4.— С. 44—49.
4. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // J. Gen. Virol.— 1986.— 67, N 8.— P. 1499—1513.
5. Oakey R., Cameron J. R., Davis B. et al. Analysis of transcription initiation in the *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene // Ibid.— 1989.— 70, N 4.— P. 769—775.
6. 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.
7. Эглице Г. К., Козлов Э. А., Левитина Т. Л. Физико-химические свойства полиэдренового белка вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда, *Malacosoma neustria* // Молекуляр. биология.— 1981.— Вып. 29.— С. 49—52.
8. Cleland W. W. Dithiothreitol, A new protective reagent for SH groups // Biochemistry.— 1964.— 3, N 4.— P. 480—482.
9. 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.
10. Gray W. R. Sequence degradation plus dansylation // Meth. Enzymol.— 1967.— 11.— P. 469—477.

11. Виноградова Е. И., Фэйгина М. Ю., Алданова Н. А. и др. Первичная структура цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи. Аминокислотная последовательность растворимых пептидов триптического гидролизата // Биохимия.— 1973.— 38, № 1.— С. 3—21.
12. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. Хроматография в тонких пленках полиамида // Химия природ, соединений.— 1971.— № 1.— С. 66—68.
13. Easley C. W. Combination of specific colour reactions usefullin the peptide mapping technique // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 3.— P. 386—388.
14. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромцианового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 3.— С. 304—314.
15. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Серебряный С. Б. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдроа и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Биополимеры и клетка.— 1985.— I, № 3.— С. 121—124.
16. Левитина Т. Л., Серебряный С. Б., Роднин Н. В., Козлов Э. А. Строение некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Там же.— 1986.— 2, № 1.— С. 30—35.
17. Левитина Т. Л., Роднин Н. В., Серебряный С. Б., Козлов Э. А. Строение некоторых химотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* // Там же.— № 2.— С. 73—81.
18. Роднин Н. В., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Козлов Э. А. Реконструкция полипептидной цепи гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum*. Полная аминокислотная последовательность // Там же.— 1991.— 7, № 1.— С. 87—93.
19. Epstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper // Biochem. and Biophys. Res. Communs.— 1975.— 62, N 2.— P. 478—484.
20. Гусак Н. М., Козлов Э. А., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроа большой вошинной моли, *Galleria mellonella* // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 996—1007.
21. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроа тутового и непарного шелкопряда и большой вошинной моли // Там же.— С. 1008—1015.
22. Kozlov E. A., Rodnin N. V., Levitina T. L. et al. The amino acid sequence determination of a granulin and polyhedrin from two baculoviruses infecting *Agrotis segetum* // Virology.— 1992.— 189.— P. 320—323.
23. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М. и др. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроа // Биохимия.— 1978.— 43, № 12.— С. 2189—2195.

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

Получено 18.03.93

УДК 615.357.631:577.157

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий

МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ФРАКЦИЙ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС

Показана способность к перекислению липидов, входящих в состав фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени интактных крыс. По ряду характеристик (отношение к индукторам и ингибиторам, временная кинетика накопления конечных продуктов) процессы липоперекисления в хроматине отличаются от таковых, происходящих в мембранах эндоплазматического ретикулаума печени. Процессы липоперекисления более лабильны и протекают с большей интенсивностью в активной фракции хроматина, что может иметь решающее значение в механизмах повреждения ядерной ДНК. Если аскорбат-зависимое перекисление протекает исключительно с участием липидов хроматина, то остающаяся после липидной экстракции значительная интенсивность НАДФН-зависимого перекисления позволяет предположить участие в последнем процессе протяженных молекул нуклеиновых кислот и белков. Перекисное окисление липидов в хроматине рассматривается в качестве одного из ведущих механизмов повреждения ядерного генетического аппарата клетки.

Введение. Входящие в состав хроматина липиды обладают ярко выраженной специфичностью состава в интактных клетках и под действием повреждающих факторов [1, 2]. Ранее нами показана способность ли-

© Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, 1993