

Физико-химические свойства полиэдрина вируса ядерного полиэдроза лунчатого шелкопряда, *Selenephra lunigera*

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Полиэдрин получен растворением полиэдров «щелочным» (рН 10,5) и «уксуснокислым» (67 %-я CH_3COOH) методами. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что «уксуснокислый» полиэдрин содержит один компонент, а «щелочной» — исходный компонент и его фрагменты. Ультрацентрифугированием показано, что «уксуснокислый» полиэдрин в 67 %-й CH_3COOH образует один компонент с коэффициентом седиментации 1,9 S, а «щелочной» полиэдрин в растворах при рН 10,5 образует три олигомерных компонента с коэффициентами седиментации 13S (70 %), 19S (20 %) и 23S (10 %). Дансил-методом выявлено, что препарат «щелочного» белка содержит шесть N-концевых остатков аминокислот, а «уксуснокислый белок» не содержит свободной N-концевой аминогруппы. Построена пептидная карта «щелочного» полиэдрина и определен аминокислотный состав «уксуснокислого».

Введение. Ранее в нашей лаборатории определены физико-химические свойства нескольких белков тел включений (ТВ) бакуловирусов [1—6] и установлена полная аминокислотная последовательность белка ТВ шести вирусов ядерного полиэдроза (ВЯП) (полиэдрины): тутового (*Bombix mori*) [7], непарного (*Porthetria dispar*) [7], кольчатого (*Malacosoma neustria*) [8] шелкопрядов, большой вощиной моли (*Galleria mellonella*) [7], озимой (*Agrotis segetum*) [7] и капустной (*Mamestra brassicae*) совок [9]. Кроме этого, были выяснены физико-химические свойства [4] и полная аминокислотная последовательность белка ТВ вируса гранулеза (ВГ) (гранулин) озимой совки (*A. segetum*) [10]. ВЯП и ВГ составляют две группы одного семейства бакуловирусов. Для выяснения особенностей физико-химических свойств и аминокислотных последовательностей, а также филогенетических взаимоотношений первичных структур белков ТВ двух групп вирусов одного семейства необходимо исследовать, по крайней мере, 10 белков в каждой группе. В настоящем сообщении приведены резуль-

таты изучения физико-химических свойств очередного полиэдрина ВЯП *S. lunigera*.

Материалы и методы. Полиэдрин получали растворением полиэдров двумя методами. «Щелочной» метод — полиэдры растворяли при рН 10,5 (0,01 M Na_2CO_3 + 0,05 M NaCl) в течение 2 ч или в 0,1 н. NaOH в течение 30 мин при комнатной температуре и далее, как описано ранее [1] («щелочной» белок). «Уксуснокислый» метод — полиэдры растворяли в 67 %-й CH_3COOH в течение 1 ч при комнатной температуре и далее, как в работе [1] («уксуснокислый» белок).

Электрофорез в 10 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na проводили, как описано нами ранее [2]. Аналитическое ультрацентрифугирование осуществляли на ультрацентрифуге MOM 31706 (Венгрия) при температуре 25 °C с использованием Шлирен-оптики. Седиментацию осуществляли в двухсекторной ячейке при скорости вращения ротора 50000 об/мин. Концентрация белка составляла 0,6 %. Восстановление и карбоксиметилирование «щелочного» полиэдрина, полученного при рН 10,5 (S-BKM-полиэдрин), проводили по методу [11]. Расщепление S-BKM-полиэдрин расщепляли трипсином («Worthington», США) по

методу [12]. Пептидное картирование проводили, как описано в работе [13], на сконструированном в нашей лаборатории приборе [14]. Содержащие триптофан пептиды на карте находили по методу [15]. N-концевой остаток в белке определяли дансил-методом [16]; C-концевой — с помощью карбоксипептидазы А+В («Worthington») [17]. Аминокислотный состав выясняли на анализаторе ВС-200 («Bioscal», Германия) по стандартной методике [4]. Цистеин определяли на окисленном по методу [18] белке. Наличие триптофана в белке устанавливали по числу триптофансодержащих пятен на пептидной карте. Содержание РНК в растворах щелочного полиэдрина определяли орциновой реакцией [19].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены результаты электрофореза в ПААГ двух препаратов полиэдрина. Как видно, «уксуснокислый» полиэдрин содержит один компонент с молекулярной массой (м. м.) 28500 (рис. 1, а), а «щелочной», полученный при pH 10,5, — шесть компонентов с м. м. 28500, 25000, 19000, 14000, 10000 и 8000 (рис. 1, б). Как показано нами ранее на других полиэдринах [1—4], пять компонентов образуются в результате расщепления полипептидной цепи с м. м. 28500 протеазой, содержащейся в полиэдрах. Очевидно, что полиэдры ВЯП *S. lunigera* не представляют исключения. По тому факту, что в результате расщепления получается такое же число компонентов с одними и теми же молекулярными массами, можно сделать вывод о том, что расщепление полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *S. lunigera* происходит в тех же центрах, что и у других ВЯП. Несмотря на то, что большая часть белка расщеплена протеазой полиэдров (рис. 1, б),

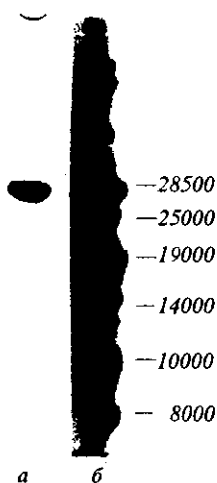


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ полиэдрина ВЯП *S. lunigera*: а — препарат, полученный растворением в 67 %-й CH_3COOH ; б — препарат, полученный растворением полиэдров при pH 10,5

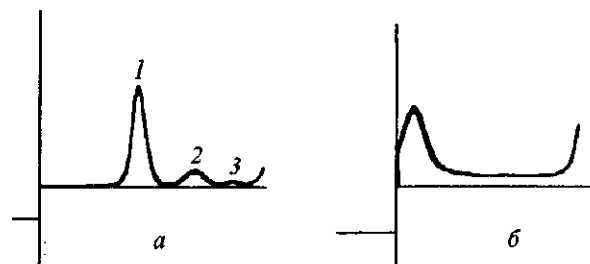


Рис. 2. Седиментограммы полиэдрина ВЯП *S. lunigera* (снимки сделаны через 30 (а) и 60 (б) мин после достижения максимального числа оборотов (50000 об/мин)): а — препарат, полученный при растворении полиэдров при pH 10,5 (0,01 M $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,05$ M NaCl); б — препарат, полученный при растворении в 67 %-й CH_3COOH . Концентрация белка 0,6 %

90 % массы полиэдрина, как показало ультрацентрифугирование, остается при растворении полиэдров при pH 10,5 в виде ассоциата с коэффициентом седиментации 13S (м. м. 350000, додекамер, пик 1, рис. 2, а). Около 10 % полиэдрина образуют более крупные ассоциаты с коэффициентами седиментации 19S и 23S (пики 2 и 3 на рис. 2, а, соответственно). Очевидно, расщепление полиэдрина в нескольких центрах не ведет к изменению конформации полипептидной цепи и распаду главного 13S-компонента при pH 10,5. Только повышение pH до значения 12 (0,01 M NaOH) приводит к полному распаду ассоциатов (при ультрацентрифугировании в 0,01 M NaOH пик не образуется, данные не приведены).

Нерасщепленный полиэдрин (рис. 1, а) при ультрацентрифугировании в 67 %-й уксусной кислоте очень медленно образует седиментирующий пик с коэффициентом седиментации 1,9S (рис. 2, б). Аналогичную картину при ультрацентрифугировании в 0,1 н. NaOH показывает «щелочной» белок, полученный растворением полиэдров в 0,1 н. NaOH (данные не приведены).

Из вышеизложенного следует, что полиэдрин ВЯП *S. lunigera* проявляет в растворах характерные для белков ТВ бакуловирусов физико-химические свойства [1—6]: диссоциация кристалла полиэдров при растворении их при pH 10,5 происходит через дискретные 34S-, 23S-, 19S-компоненты до устойчивого в широком диапазоне pH (от 3,0 до 11,0) 13S-компонента полиэдрина; диссоциация до 2S-мономера происходит в экстремальных условиях (67 %-я CH_3COOH или 0,1 н. NaOH). Вероятно, такие свойства обусловлены особенностями аминокислотного состава белков ТВ. В таблице приведен

аминокислотный состав полиэдрина ВЯП *S. lunigera*. Как и все изученные нами [7—10] белки ТВ, полиэдрин ВЯП *S. lunigera* на 60 % состоит из гидрофобных (Val, Met, Ile, Leu, Ala) аминокислот и аминокислотных остатков, способных в гидрофобном окружении образовывать водородные связи (Asp, Asp, Glu, Gln, Ser, Thr). Известно, что именно водородные связи в гидрофобном окружении вносят основной вклад в белково-белковые взаимодействия [20].

Как показала положительная орциновая реакция, растворы полиэдрина ВЯП *S. lunigera*, так же как и исследованные нами полиэдрины других ВЯП [5, 21, 22], содержат РНК. Наличие в растворах «щелочного» полиэдрина при pH 10,5 целой полипептидной цепи (рис. 1, б) дает основание предположить, что какая-то часть полиэдрина в полиэдрах ВЯП *S. lunigera* ассоциирована с РНК. Ассоци-

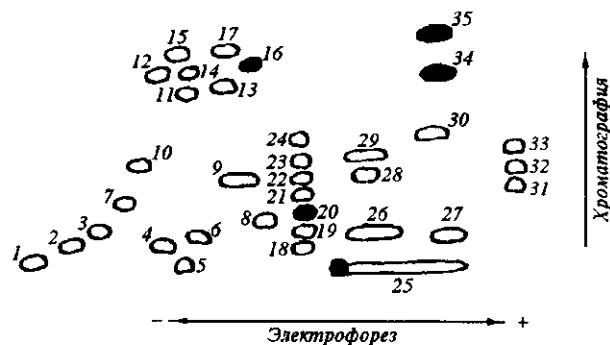


Рис. 3. Пептидная карта триптического гидролизата S-BKM — полиэдрина ВЯП *S. lunigera*, полученного при растворении при pH 10,5. Темные пятна — триптофансодержащие пептиды

Аминокислотный состав полиэдрина ВЯП *S. lunigera*

Аминокислота	Состав	
	Моль на моль белка с м. м. 28500	Принято в остатках
Asp	31,3	31
Thr	10,7	11
Ser	10,3	11
Glu	26,2	26
Pro	15,1	15
Gly	13,8	14
Ala	11,9	12
^{1/2} Cys*	1,8	2
Val	15,4	16
Met	5,5	6
Ile	11,3	12
Leu	19,5	20
Tyr	14,7	15
Phe	15,0	15
Trp**	—	4
His	7,0	7
Lys	13,9	14
Arg	14,6	15
Всего		246

П р и м е ч а н и е. *Определен в виде цистеиновой кислоты на окисленном белке; **обнаружен по числу триптофансодержащих пятен на пептидной карте.

ацию полиэдрина ВЯП *B. mori* и *G. mellonella* с РНК мы описали ранее [21, 22]. Не исключено, что 18S, 23S и 34S-компоненты, обнаруживаемые при ультрацентрифугировании при pH 10,5 «щелочных» препаратов полиэдрина (рис. 2, а, и [5]), представляют собой РНК-комплексы.

На основании представленных результатов можно сделать вывод о том, что предполагаемые нами ранее для полиэдрина ВЯП [5] белково-белковые и белково-нуклеиновые взаимодействия обусловлены характерными особенностями первичной структуры полиэдринов. Мы провели исследование, предшествующее выяснению аминокислотной последовательности полиэдрина ВЯП *S. lunigera*. Полиэдрин с целой полипептидной цепью («уксуснокислый» полиэдрин) не обнаруживает свободной N-концевой аминогруппы. В то же время полиэдрин, обработанный 0,1 н. NaOH (растворение полиэдров в 0,1 н. NaOH), содержит на N-конце остаток Met. Очевидно, у полиэдрина ВЯП *S. lunigera* на N-конце находится формил-метионин, что было обнаружено нами ранее на полиэдринах ВЯП *P. dispar*, *A. segetum* [7], *M. neustria* [8], *M. brassicae* [9]. «Щелочной» полиэдрин, полученный при pH 10,5, содержит пять N-концевых остатков аминокислот (Val, Ile, Leu, Thr, Lys), что подтверждает его расщепление протеазой полиэдров (рис. 1, б). Карбоксипептидаза А+В отщепляет от «уксуснокислого» белка только Tyr. Очевидно, что на третьем месте от С-конца располагается остаток Pro, как это показано нами для других полиэдринов [7—10].

На рис. 3 приведена пептидная карта триптического гидролизата S-BKM «щелочного» полиэдрина, полученного при pH 10,5. На карте насчитыва-

ется 35 нингидрин-положительных пятен, из них пять дают положительную реакцию на триптофан. Пептидная карта очень сходна с таковыми картами других полиэдринов [5, 13, 23—25]. Число 35 несколько превышает теоретическое триптических пептидов (по суммарному содержанию остатков Lys + Arg их 30, таблица). Однако это подтверждает ограниченное расщепление полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *S. lunigera* протеазой полиэдров. Как известно, протеаза полиэдров обладает химотрипсиноподобной активностью [5, 26], т. е. она расщепляет некоторые триптические пептиды. При дальнейшем исследовании строения триптических пептидов, полученных на основании пептидных карт, можно будет выяснить центры расщепления полипептидной цепи полиэдрина ВЯП *S. lunigera* протеазой полиэдров.

E. A. Koslov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaya, M. N. Ovander

Physicochemical properties of the polyhedrin of *Selenophera lunigera* nuclear polyhedrosis virus

Summary

The polyhedrin was obtained by polyhedra dissolution according to the alkaline (pH 10.5) and acetic acid (67% CH₃COOH) methods. It was shown by polyacrilamid gel electrophoresis that acetic polyhedrin contained one component of molecular weight (m. w.) 25000 while alkaline polyhedrin contained 28500-component and its fragments of m. w. 8000, 10000, 14000, 19000, 25000. It was shown by ultracentrifugation that acetic acid polyhedrin revealed in 67% CH₃COOH one monomer component with sedimentation coefficient of 1,9S and alkaline polyhedrin revealed in pH10.5 solution three oligomeric components with sedimentation coefficients of 13S (70%), 19S (20%) and 23S (10%). It was shown by the Dansyl method that alkaline protein contained six N-terminal amino acid residues: Met, Val, Leu, Thr, Lys while Acetic acid polyhedrin had no N-terminal NH₂-group. The peptide map of alkaline polyhedrin was prepared, and amino acid composition of acetic acid polyhedrin was determined.

E. A. Kozlov., T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaya, M. M. Ovander

Фізико-хімічні властивості поліедрину вірусу ядерного поліедрозу лунчастого шовкопряда, *Selenophera lunigera*

Резюме

Поліедрин отримано розчиненням поліедрів «лужним» (рН 10,5) та «оцтовокислим» (67% CH₃COOH) способами. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі показано, що «оцтовокислий» поліедрин являє собою один компонент, а «лужний» складатися з вихідного компонента та його фрагментів. При ультрацентрифугуванні «оцтовокислого» поліедрину в 67%-й CH₃COOH виявляється один компонент з коефіцієнтом седиментації 1,9S, а при ультрацентрифугуванні «лужного» поліедрину в розчинах з рН 10,5 виявляються три олігомерних компоненти з коефіцієнтами седиментації 13S (70%), 19S (20%) та 23S (10%). Дансиль-методом виявлено, що препарат «лужного» білка містить шість N-кінцевих залишків амінокислот — Met, Val, Ile, Leu, Thr, Lys. «Оцтовокислий» білок не містить вільної N-кінцевої аміногрупи. Карбоксипептидаза А+В відщеплює від «оцтовокис-

лого» білка лише один залишок — тирозин. Побудовано пептидну карту «лужного» поліедрину і визначено амінокислотний склад «оцтовокислого».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.—25, N 1.—P. 97—101.
2. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Ларионов Г. В., Веремейченко С. Н., Серебряный С. Б. Сравнительные биохимические исследования полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза // Биохимия.—1978.—43, № 12.—С. 2189—2195.
3. Эглице Г. К., Козлов Э. А., Левитина Т. Л. Физико-химические свойства полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // Молекуляр. биология (Киев).—1981.—Вып. 29.—С. 49—52.
4. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Серебряный С. Б. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдроза и вируса гранулеза озимой совки *Agrotis segetum* // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 3.—С. 121—124.
5. 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.
6. Мирошниченко О. С., Бобровская М. Т., Штерншис М. В., Ермакова Н. И., Козлов Э. А. Исследование некоторых физико-химических свойств полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) лугового мотылька, *Pyrusta sticticalis* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 5.—С. 25—29.
7. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В., Апеналихина С. А., Пальчиковская Л. И. 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 вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 75—82.
8. Козлов Э. А., Роднин Н. В., Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Радомский Н. Ф. Первичная структура полиэдрина вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // Биоорг. химия.—1994.—20, № 5.—С. 543—545.
9. Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н., Кацман М. С., Козлов Э. А. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина (ВЯП) капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 4.—С. 44—49.
10. Kozlov E. A., Rodnin N. V., Levitina T. L., Gusak N. M., Radomskij N. F., Palchikovskaya L. I. The amino acid sequence determination of a Granulin and Polyhedrin from two Baculoviruses infecting *Agrotis segetum* // Virology.—1992.—189, N 1.—P. 320—323.
11. Серебряный С. Б., Кавсан В. М., Кибирев В. К., Кацман М. С. Серусодержащие аминокислоты полиэдренного белка вируса желтухи тутового шелкопряда // Химия природ. соединений.—1968.—№ 3.—С. 174—178.
12. Козлов Э. А., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г., Солодова Е. В. Триптические

- пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.—С. 240—245.
13. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Радавский Ю. Л., Согуляева В. М., Сидорова Н. М., Серебряный С. Б. Определение молекулярного веса белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда, *Bombyx mori* // Биохимия.—1973.—38, № 5.—С. 1015—1019.
 14. 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.
 15. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.—1965.—107, N 2.—P. 386—388.
 16. 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.
 17. Guidotti G. The action carboxypeptidase A and B on the separated A and B chains of normal adult human hemoglobin // Biochim. et biophys. acta.—1960.—42, N 2.—P. 177—179.
 18. Hirs C. H. W. Determination of cysteine as cystic acid // Meth. Enzymol.—1967.—11.—P. 59—62.
 19. Мейбаум В. В. Определение пентоз в нуклеотидах и нуклеозидах посредством реакции Биала // Биохимия.—1945.—10, № 4.—С. 353—359.
 20. Шахман Х. Третичная структура белков // Биосинтез белка и его регуляция / Под ред. Я. М. Варшавского.—М.: Мир, 1967.—С. 349—397.
 21. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л., Верещак В. А., Серебряный С. Б. Очистка полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда и исследование процессов его ассоциации—диссоциации в растворах // Биохимия.—1969.—34, № 4.—С. 679—685.
 22. Козлов Э. А., Сидорова Н. М., Серебряный С. Б. Получение и физико-химические свойства полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли (*G. mellonella*) // Биохимия.—1974.—39, № 1.—С. 130—134.
 23. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Согуляева В. М., Серебряный С. Б. Разделение и аминокислотный состав трипсиновых пептидов белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда *Bombyx mori* // Биохимия.—1973.—38, № 6.—С. 1215—1220.
 24. Kozlov E. A., Levitina T. L., Sidorova N. M., Radavski Yu. L., Serebryani S. B. Comparative chemical studies of the polyhedral proteins of the Nuclear polyhedrosis of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* // J. Invert. Pathol.—1975.—25, N 1.—P. 103—107.
 25. Сидорова Н. М., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Разделение и аминокислотный состав растворимых в кислых условиях трипсиновых пептидов белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли (*G. mellonella*) // Биохимия.—1976.—41, № 5.—С. 781—786.
 26. 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 3.—P. 478—484.

УДК 577.322:578.841

Надійшла до редакції 06.07.2000