

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА И ВИРУСА ГРАНУЛЁЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM*

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный

Введение. Вирусы ядерного полиэдроza (ВЯП) и вирусы гранулеза (ВГ) представляют собой две серологически родственные группы семейства бакуловирусов, поражающие только насекомых и ракообразных. Бакуловирусы вызывают практический интерес в связи с применением их в качестве безвредных для окружающей среды биологических инсектицидов в борьбе с насекомыми — вредителями сельскохозяйственных культур, а также в качестве векторов для производства методами генной инженерии белков и пептидов, имеющих медико-биологическое значение [1]. Эти практически ценные свойства бакуловирусов обусловлены уникальными особенностями биосинтеза, физико-химических свойств и химического строения структурного белка, образующего тела включений вирусных частиц — полиэдры и гранулы. Выяснение первичной структуры белка полиэдров (полиэдрин) и гранул (гранулин) очень важно для фундаментальных исследований строения генов, кодирующих эти белки. Структурные исследования белка тел включений ряда бакуловирусов важны также для выяснения филогенетических взаимоотношений этих белков не только внутри одной серологической группы, но и между двумя группами бакуловирусов.

Ранее нами были проведены исследования физико-химических свойств и первичной структуры полиэдрин ВЯП тутового шелкопряда, *Bombyx mori* [2], непарного шелкопряда, *Porthetria dispar* [3], большой вошинной моли, *Galleria mellonella* [4]. Настоящая публикация продолжает серию работ по выяснению физико-химических свойств и первичной структуры белка тел включений ряда бакуловирусов и посвящена изучению некоторых физико-химических свойств полиэдрин ВЯП и гранулин ВГ, поражающих одного хозяина — озимую совку, *Agrotis segetum*.

Материалы и методы. Тела включений, полиэдры и гранулы были предоставлены нам Н. Г. Унгуриану — сотрудником лаборатории вирусов насекомых ВНИИ микробиологических методов защиты растений, Кишинев.

Полиэдрин и гранулин получали, растворяя в течение 2 ч полиэдры и гранулы либо в растворе Na_2CO_3 по методу Бергольда [5] (препарат I), либо в 67 %-ной уксусной кислоте по описанному нами ранее методу [6] (препарат II).

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na проводили по методу, описанному Майзель [7]. Применяли 10 %-ный разделяющий гель без концентрирующего геля. В качестве стандартов использовали бычий сывороточный альбумин (68000), полиэдрин ВЯП *B. mori* (28000) [8], панкреатическую РНКазу (14000).

N-концевой остаток аминокислоты определяли методом дансилирования в модификации для труднорастворимых белков [9]. Чтобы определить N-концевой остаток в полиэдрине ВЯП *A. segetum*, полиэдры растворяли в течение 1,5 ч в 0,1 н. NaOH при комнатной температуре.

Для построения пептидных карт белок расщепляли трипсином фирмы «Srofa» (Чехословакия). Трипсин для подавления химотриптической активности обрабатывали L-(1-тозиламидо-2-фенил)-этилхлорметилкетон (кетон Шоу) [10]. Расщепление белка трипсином и подробности метода картирования описаны нами в работе [8]. Применяли бумагу 2040 BM фирмы «Schleicher & Schull», ФРГ. Обработку пептидных карт специфическим реагентом на триптофан проводили, как описано в литературе [11].

Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот AAA-881 (Чехословакия). Пробы белка гидролизвали в течение 24, 48 и 72 ч в вакууме в 5,7 н. HCl, содержащей 0,1 % фенола, при температуре 105—110 °С. Количество изолейцина и валина рассчитывали по максимальному времени гидролиза, количество серина и треони-

на экстраполировали к нулевому времени. Триптофан определяли после гидролиза белка 5,7 н. HCl в присутствии 1 %-ной тиогликолевой кислоты [12]. Цистеин определяли в виде цистеиновой кислоты на окисленном надмуравьиной кислотой белке [13].

Результаты и обсуждение. Известно, что тела включений бакуловирусов содержат щелочную протеазу [14] с оптимумом действия при pH 10,5 [15], которая расщепляет белок тел включений на несколько фрагментов с молекулярными массами в диапазоне 10000—25000 [14, 16]. Поэтому в первую очередь мы проверили, содержится ли подобная протеаза в полиэдрах и гранулах *A. segetum*. Действительно, препарат I полиэдрина при электрофорезе в полиакриламидном геле дает несколько компонентов подобно полиэдрину других бакуловирусов [16]. Препарат I гранулина даёт одну мажорную полосу, соответствующую белковому компоненту с молекулярной массой в диапазоне 8000—12000 (рис. 1, а, см. вклейку). Если гранулы растворять при pH 10,5 в течение 6—8 ч, то в гелях практически не обнаруживается никаких полос. Очевидно, что белок расщепляется протеазой гранул на мелкие фрагменты, которые в данных условиях электрофореза не улавливаются. По-видимому, гранулы ВГ *A. segetum* по сравнению с полиэдрами ВЯП *A. segetum* и других вирусов содержат более активную протеазу или протеазы. Возможно, что синергистический эффект гранул ВГ при совместной инфекции ВЯП и ВГ [17] объясняется наличием у ВГ более активной протеазы. Роль протеазы тел включений в инфекционном процессе обсуждалась нами ранее [18].

Понятно, что для химических исследований необходимо выделять белок, учитывая наличие протеазы в полиэдрах и гранулах. Мы получили полиэдрин и гранулин для этих целей, растворяя тела включений в 67 %-ной уксусной кислоте (препарат II). Препарат II как гранулина, так и полиэдрина при электрофорезе в полиакриламидном геле даёт один компонент с молекулярной массой соответственно 27500 и 28000 (рис. 1, б, в). При совместном электрофорезе гранулина и полиэдрина в гелях наблюдается некоторое разделение этих белков (рис. 1, г). Молекулярная масса гранулина несколько отличается от молекулярной массы полиэдрина и других бакуловирусов, которая, как было определено нами электрофорезом в полиакриламидном геле [16], также равна 28000.

Отличается гранулин от полиэдрина также и природой N-концевого аминокислотного остатка. На N-конце гранулина обнаружен остаток глицина. N-концевой остаток в препарате II полиэдрина ВЯП *A. segetum* не удалось определить. Однако на белке, полученном при растворении полиэдров в 0,1 н. NaOH, нами обнаружен остаток метионина. Можно предполагать, что N-концевой остаток полиэдрина ВЯП *A. segetum* ацилирован. Очевидно, что, как и в случае полиэдрина других бакуловирусов [16], N-конец полиэдрина ВЯП *A. segetum* недоступен

Аминокислотный состав гранулина ВГ и полиэдрина ВЯП A. segetum, в остатках на моль белка

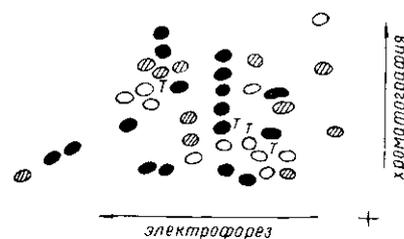
Amino Acid Composition of the Granulosis Virus Granulin and Nuclear Polyhedrosis Virus Polyhedrin of A. segetum in Residues per Mole of Protein

Аминокислота	Гранулин	Полиэдрин	Аминокислота	Гранулин	Полиэдрин
Lys	14	15	1/2 Cys	3	3
His	7	6	Val	13	18
Arg	17	15	Met	6	5
Asp	25	31	Ile	14	15
Thr	12	11	Leu	22	21
Ser	11	11	Tyr	13	13
Glu	25	29	Phe	15	13
Pro	11	12	Trp	3	2
Gly	12	14	Всего	234	244
Ala	11	10			

действию пептидаз. Полиэдрины других бакуловирусов содержат на N-конце либо ацилированный остаток метионина, либо остаток пролина [16]. Остатки глицина и аспарагиновой кислоты были обнаружены на N-концах гранулина ВГ *Pieris brassicae* [19] и *Trichoplusia ni* [20] соответственно. Можно предположить, что доступная для действия аминокислотных пептидаз N-концевая аминокислотная группа свойственна для группы вирусов гранулеза семейства бакуловирусов.

Как видно из таблицы, где приведены аминокислотные составы гранулина и полиэдрина *A. segetum*, гранулин значительно отличается

Рис. 2. Сравнение пептидных карт триптического гидролизата гранулина и полиэдрина озимой совки, *A. segetum*. Темные пятна — пептиды, имеющие одинаковую для двух белков локализацию; светлые — пептиды, уникальные по локализации для гранулина; заштрихованные — пептиды, уникальные по локализации для полиэдрина; T — триптофансодержащие пептиды.
Fig. 2. Comparison of tryptic hydrolysate fingerprints of *A. segetum* granulin and polyhedrin. Opaque spots are peptides with the same localization for two proteins. Open spots are peptides unique to granulin T — tryptophan-containing peptides.



от полиэдрина по содержанию остатков кислых аминокислот, валина и триптофана. В целом аминокислотный состав гранулина отличается от аминокислотного состава полиэдрина и других бакуловирусов больше, чем аминокислотные составы полиэдринов между собой [16]. По-видимому, следует ожидать больших различий в первичной структуре гранулина по сравнению с первичной структурой полиэдринов. Это предположение подтверждается сравнением пептидных карт триптического гидролизата гранулина ВГ и полиэдрина ВЯП *A. segetum* (рис. 2). Как следует из рисунка, гранулин отличается от полиэдрина 10—11 пептидами. В то же время, например, полиэдрины ВЯП *B. mori* и *G. mellonella* по пептидным картам отличаются 5—6 пептидами [21]. В такой же степени отличается полиэдрин ВЯП *A. segetum* от полиэдринов ВЯП *B. mori*, *G. mellonella* и *P. dispar* (данные не приводятся). Такие небольшие различия по пептидным картам полиэдринов ВЯП *B. mori*, *G. mellonella* и *P. dispar* между собой коррелируют с высокой степенью гомологии их первичных структур — 82—94 % [22]. Судя по рассмотренным физико-химическим свойствам, гранулин должен в большей мере отличаться по первичной структуре от перечисленных выше полиэдринов. Следовательно, стратегия исследования первичной структуры, предложенная для высокомолекулярных полиэдринов [3, 4], должна быть изменена для сравнительного изучения первичной структуры гранулина ВГ *A. segetum*.

SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THE PROTEIN OF INCLUSION BODIES OF THE NUCLEAR POLYHEDROSIS AND GRANULOSIS VIRUSES OF *AGROTIS SEGETUM*

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, N. M. Gusak, S. B. Serebryany

Summary

Dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis has shown that polyhedra and granula of the nuclear polyhedrosis (NPV) and granulosis viruses (GV) of *Agrotis segetum* consist of protein with molecular weight of 28000 and 27500, respectively. Using the dansylation method it was shown that glycine and methionine are N-terminal amino acids of the polyhedral (polyhedrin) and granule (granulin) proteins, respectively. Amino acid composition is determined and fingerprints are compiled for the both proteins.

According to physicochemical properties granulins of GV and polyhedrin of NPV of the baculoviruses, affecting the same host, differ to a greater extent from polyhedrins of NPV affecting various hosts.

1. Miller L. K. A virus vector for genetic engineering in invertebrates.—In: Genetic Engineering in the Plant Sciences / Eds. P. Lurquin, A. Kleinhofs. N. Y.: Praeger Publishers, 1981, p. 203—224.
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.—Биоорганическая 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.—Биоорганическая химия, 1981, 7, № 7, с. 985—995.
4. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли, *Galleria mellonella* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, М. Н. Овандер, С. Б. Серебряный.—Биоорганическая химия, 1981, 7, № 7, с. 996—1007.
5. Bergold G. H. Die Isolierung des polyedervirus und die Natur der Polyeder.—Z. Naturforsch., 1947, 2b, S. 122—143.
6. Кавсан В. М., Кацман М. С., Серебряный С. Б. Получение полиэдренного белка *Borrelinavirus bombycis* обработкой полиэдров уксусной кислотой.—Микробиологический журнал, 1970, 32, № 3, с. 355—358.
7. Майзель Д. Фракционирование белков и нуклеиновых кислот с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.—В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии, М.: Мир, 1972, с. 267—293.
8. Определение молекулярного веса белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда, *Bombyx mori* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Ю. Л. Радавский и др.—Биохимия, 1973, 38, № 5, с. 1015—1019.
9. 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.
10. Shaw E. Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin.—Meth. Enzymol., 1967, 11, p. 677—686.
11. 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.
12. Ozols J. Amino acid sequence of rabbit liver microsomal cytochrome b₅.—J. Biol. Chem., 1970, 245, N 19, p. 4863—4874.
13. Hirs C. H. W. Determination of cysteine as cystic acid.—Meth. Enzymol., 1967, 11, p. 59—62.
14. 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. Invertebr. Pathol., 1975, 25, N 1, p. 97—101.
15. 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, p. 478—484.
16. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.—Биохимия, 1978, 43, № 12, с. 2189—2195.
17. Тарасевич Л. М., Китик В. С. Взаимоотношения вирусов и смешанные вирусные инфекции совок.—В кн.: Вирусы совок. Кишинев: Штиинца, 1982, с. 35—46.
18. Возможная роль протеазы тел включений бакуловирусов в инфекционном процессе / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.—Молекулярная биология, 1982, вып. 31, с. 32—35.
19. N-terminal polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution / G. P. Rohrmann, M. N. Pearson, T. J. Bailey et al.—J. Mol. Evol., 1981, 17, N 4, p. 329—333.
20. Summers M. D., Smith G. E. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulins: a phenol-soluble, phosphorylated protein.—J. Virol., 1975, 16, N 3, p. 1108—1116.
21. Comparative chemical studies of the polyhedral proteins of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак et al.—J. Invertebr. Pathol., 1975, 25, N 1, p. 103—107.
22. Сравнение аминокислотной последовательности белков тел включений вирусов ядерного полиэдроза тутового, непарного шелкопряда и большой вошинной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др.—Биоорганическая химия, 1981, 7, № 7, с. 1008—1015.

Ин-т молекулярной биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 14.08.84.