

12. Шаварян В. В., Ягупольский Л. М. Особенности фармакодинамики некоторых новых производных пиридина и пиримидина // Тез. докл. VI съезда фармакологов Украинской ССР.— Харьков, 1990.— С. 432—433.
13. Самвелян В. М., Малакян М. Г., Баджиян С. А. Некоторые аспекты антиаритмического действия парацетама // Фармакология и токсикология.— 1990.— 53, № 6.— С. 22—23.
14. Машиковский М. Д. Лекарственные средства.— М.: Медицина, 1984.— Т. 1.— С. 400—409.
15. Лебедь О. И., Стефанов В. В., Примак Р. Г. Влияние условий ультразвуковой обработки на характеристики формирующихся липосом // Укр. биохим. журн.— 1989.— 61, № 3.— С. 96—101.
16. Лишко В. К., Терлецкая Л. Т., Гегелашвили Г. К. Взаимодействие изолированных синаптических везикул с мембранами синапсом как модель нейросекции // Биол. мембраны.— 1986.— 3, № 2.— С. 191—196.
17. Практикум по биохимии / Под ред. Н. П. Лишковой, Е. Е. Северина.— М.: Изд-во МГУ, 1979.— С. 90.
18. Kendrick N. C., Katzluff R. W., Blaustein M. P. Arsenazo III as an indicator for ionizer calcium in physiological salt solutions; its use for determination of the Ca-ATP dissociation constant // Analyt. Biochem.— 1977.— 83.— P. 433—450.
19. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии.— Л.: Химия, 1985.— С. 174.
20. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.— М.: Наука, 1989.— 277 с.
21. Bauer P. J. Affinity and stoichiometry of calcium binding by arsenazo III // Analyt. Biochem.— 1981.— 110, N 1.— P. 61—72.
22. Сим Э. Биохимия мембран.— М.: Мир, 1985.— 110 с.

Укр. НИИ фармакологии и токсикологии  
 АМН Украины, Киев  
 Мединститут, Запорожье

Получено 14.04.93

УДК 577.322:578.841

**О. С. Мирошниченко, М. Т. Бобровская,  
 М. В. Штерншис, Н. И. Ермакова, Э. А. Козлов**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ  
 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА  
 ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА (ВЯП) ЛУГОВОГО МОТЫЛЬКА,  
 PYRAUSTA STICTICALIS**

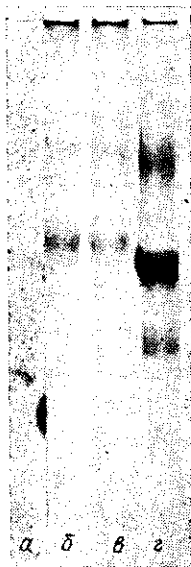
*Электрофорезом в полиакриламидном геле показано, что полиэдрин ВЯП лугового мотылька (ЛМ) имеет молекулярную массу 30 000. Установлено, что полиэдры ВЯП ЛМ включают щелочную протеазу и РНК. Определен аминокислотный состав полиэдрина, который содержит на N-конце остаток ацилированного метионина и на C-конце — тирозина. Построена пептидная карта полиэдрина.*

**Введение.** В нашей лаборатории изучены физико-химические свойства и выяснена первичная структура полиэдрина ВЯП пяти насекомых: тутового (ТШ, *Bombyx mori*) и непарного (НШ, *Porthetria dispar*) шелкопрядов, большой вошинной моли (БВМ, *Galleria mellonella*), озимой совки (ОС, *Agrotis segetum*) [1] и капустной совки (КС, *Mamestra brassicae*) [2]. Первичная структура полиэдрина ВЯП еще трех насекомых выведена из нуклеотидной последовательности соответствующих генов полиэдрина в других лабораториях мира — *Autographa californica*, *Orgyia pseudotsugata* [3], *Panolis flammea* [3]. Мы завершаем также расшифровку первичной структуры полиэдрина ВЯП кольчатого шелкопряда (КШ, *Malacosoma neustria*), а нуклеотидная последовательность гена этого полиэдрина выяснена параллельно в лаборатории биохимической генетики ИМБиг АН Украины. Полиэдрин ВЯП ЛМ — это десятый по счету полиэдрин, первичную структуру которого мы надеемся установить. Однако прежде чем приступить к подобным исследованиям необходимо изучить некоторые очень существенные фи-

© О. С. Мирошниченко, М. Т. Бобровская, М. В. Штерншис, Н. И. Ермакова, Э. А. Козлов, 1993

зико-химические свойства, такие как растворимость полиэдров в нескольких растворителях, гомогенность полиэдрина (электрофорез в полиакриламидном геле (ПАГ), концевые остатки), молекулярная масса, аминокислотный состав, пептидные карты, наличие протеолитической активности в полиэдрах (для правильного выбора метода получения целого полиэдрина), наличие РНК. Результаты таких исследований и описаны в настоящем сообщении.

**Материалы и методы.** Препараты полиэдрина получили тремя методами (препараты 1—3): 1) полиэдры растворяли в 0,05 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,1$  М  $\text{NaCl}$  (рН 11,0), как описано [5]; 2) полиэдры растворяли в 67 %-й  $\text{CH}_3\text{COOH}$  [5]; 3) 50 мг полиэдров растворяли в 4 мл 0,1 М  $\text{NaOH}$  при комнатной температуре в течение 30 мин. Раствор центрифугировали при 15 000 об/мин (1 ч, 8 °С). Надосадочную жидкость нейтрализовали 1 н.  $\text{HCl}$  до рН 4,5. Выпавший при нейтрализации белок центрифугировали, осадок растворяли в небольшом объеме 0,1 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  и лиофилизировали.



Электрофорез в ПАГ в градиенте концентрации геля в присутствии  $\text{DS-Na}$  и мочевины осуществляли по методу, описанному Лэммли [6]. N-концевой остаток аминокислоты определяли методом дансилирования в модификации для труднорастворимых белков [7]; C-концевой остаток — с помощью карбоксипептидазы А (КПА) в присутствии  $\text{DS-Na}$  и мочевины,

Рис. 1. Электрофорез в ПАГ препаратов полиэдрина ВЯП ЛМ, полученных растворением полиэдров в  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (рН 11,0) (а), 67 %-й  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (б), 0,1 н.  $\text{NaOH}$  (в) и полиэдрина ВЯП ТШ (г) в качестве маркера молекулярной массы — 28 000 [5]

как в работе [8]. Для построения пептидных карт белок расщепляли трипсином фирмы «Sprofa» (ЧСФР), обработанным кетоном Шоу [9]. Подробности метода картирования приведены в [10].

Аминокислотный состав выясняли на аминокислотном анализаторе ААА-339 (ЧСФР). Пробы белка гидролизovali в течение 24 ч в вакууме в 5,7 н.  $\text{HCl}$ , содержащей 0,1 % фенола, при 105—110 °С. Цистин определяли в виде цистеиновой кислоты на окисленном надмуравьиной кислотой белке [11]; триптофан — по числу триптофансодержащих пептидов на пептидной карте. РНК в растворах полиэдрина регистрировали с помощью орцина [12].

**Результаты и обсуждение.** Известно, что полиэдры бакуловирусов содержат протеазу, оптимум действия которой соответствует условиям растворения полиэдров в растворах карбоната натрия [13]. При растворении полиэдров в кислой или сильно щелочной (рН 11,0) среде протеаза неактивна. Действие ее на полиэдрин проявляется в наличии в препаратах 1 фрагментов белка, обнаруживаемых электрофорезом в ПАГ [5]. В случае полиэдрина ВЯП ЛМ электрофорезом в ПАГ в препарате 1 не удастся выявить ни исходного белка, ни его фрагментов. В то же время, препараты 2 и 3 полиэдрина содержат один компонент с молекулярной массой 30 000 (рис. 1). Такая же картина наблюдалась в случае гранулина вируса гранулеза (ВГ) ОС [14]. Известно, что гранулы содержат протеазу в большем количестве и более активную, чем полиэдры [15—17]. Для полиэдров такая полнота расщепления наблюдается только при растворении полиэдров при 37 °С [5]. Мы полагаем, что полиэдры ВЯП ЛМ, кроме протеазы, присущей самим телам включения (ТВ), содержат примесные протеазы.

Из рис. 1 ясно, что полиэдры ВЯП ЛМ не имеют примесных белков в таких количествах, которые бы препятствовали выяснению его аминокислотной последовательности. Об этом свидетельствуют иссле-

дования концевых остатков и пептидных карт. В препарате 2 полиэдрин не удастся обнаружить остатка метионина. Очевидно, что полиэдрин ВЯП ЛМ содержит на N-конце формил-метионин, как это наблюдалось в случае полиэдринов ВЯП КС, НШ [18, 19] и ОС [14]. В то же время в препарате 1 полиэдрин ВЯП ЛМ обнаруживаются в больших количествах N-концевые остатки изолейцина, лейцина, валина, фенилаланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, что указывает на полноту расщепления полиэдрина при растворении его при pH 11,0. Содержит небольшие количества этих же N-концевых аминокислотных остатков и препарат 3. С помощью КПА у препарата 2 полиэдрин ВЯП ЛМ выявляется C-концевой остаток тирозина, что отличает все изученные белки ТВ (полиэдров и гранул) бакуловирусов.

В таблице приведен аминокислотный состав полиэдрин ВЯП ЛМ, определенный на основе препарата 2. Состав рассчитывали на моль белка, включающего 246 остатков аминокислот,— число, характерное для полиэдринов, имеющих на N-конце остаток формил-метионина [1, 2].

На рис. 2 представлена пептидная карта препарата 3 полиэдрин ВЯП ЛМ, на которой насчитываются 43 нингидрин-положительных пятна и 4 триптофансодержащих. Количество пятен несколько превышает теоретическое число триптических пептидов по данным аминокислотно-

Аминокислотный состав полиэдрин ВЯП лугового мотылька, *P. sticticalis*

| Аминокислота | Состав, остатки на моль белка |
|--------------|-------------------------------|
| Lys          | 16,8(17)                      |
| His          | 3,9(4)                        |
| Arg          | 17,2(17)                      |
| Asp          | 30,1(30)                      |
| Thr          | 9,6(10)                       |
| Ser          | 13,5(14)                      |
| Glu          | 25,9(26)                      |
| Pro          | 14,2(14)                      |
| Gly          | 13,3(13)                      |
| Ala          | 15,0(15)                      |
| 1/2 Cys      | 2,6(3)                        |
| Val          | 13,7(14)                      |
| Met          | 4,7(5)                        |
| Ile          | 11,8(12)                      |
| Leu          | 20,8(21)                      |
| Tyr          | 14,6(15)                      |
| Phe          | 12,2(12)                      |
| Trp          | (4)                           |
| Итого        | 246                           |



Рис. 2. Пептидная карта триптического гидролизата препарата 3 полиэдрин ВЯП ЛМ; Т — триптофансодержащие пептиды

го состава (35). Но это, очевидно, объясняется действием протеазы в препарате, которая, как известно, обладает химотрипсиноподобной специфичностью [20].

Все три препарата полиэдрин ВЯП ЛМ дают положительную реакцию на орцин, что свидетельствует о наличии в полиэдрах РНК.

РНК является характерным компонентом полиэдров и, как показано в нашей лаборатории [21], образует ассоциат с полиэдрином.

Из приведенных результатов следует, что для исследования первичной структуры полиэдрина ВЯП ЛМ лучше использовать препарат 3, так как препарат 2 после лиофилизации очень плохо растворяется в щелочной среде, а препарат 1 сильно расщеплен протеазой полиэдров. Предварительное же ингибирование протеазы ведет к полной потере растворимости полиэдров ВЯП ЛМ.

**Резюме.** Электрофорезом у полиакриламидному гелі показано, що поліедри ВЯП лугового метелика (ЛМ) має молекулярну масу 30 000. Встановлено, що поліедри ВЯП ЛМ включають лужну протеазу і РНК. Визначено амінокислотний склад поліедрина, який містить на N-кінці залишок ацильованого метіоніна і на С-кінці — тирозина. Побудовано пептидну карту поліедрина.

**Summary.** Dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) has shown that polyhedra of the *P. sticticalis* NPV consist of the protein with molecular weight of 30000. Polyhedrin has amino terminal acylmethionine residue and tyrosine residue as carboxyl terminal group. Amino acid composition is determined and fingerprint is compiled for the protein. Polyhedra contain the alkaline protease as shown by the SDS-PAGE. It is shown that polyhedra contain RNA.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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*) // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 1.— С. 75—82.
2. 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.
3. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // J. Gen. Virol.— 1986.— 67, N 8.— P. 1499—1513.
4. Oakley R., Cameron J. R., Davis B. et al. Analysis of transcription initiation in the *Panolis flammae* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene // Ibid.— 1989.— 70, N 4.— P. 769—775.
5. 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.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1971.— 227, N 5259.— P. 680—685.
7. 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.
8. Guidotti G. The action of carboxypeptidases A and B on the separated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of normal adult human hemoglobin // Biochim. et biophys. acta.— 1960.— 42, N 1.— P. 177—179.
9. Shaw E. Site-specific reagent for chymotrypsine and trypsin // Meth. Enzymol.— 1967.— 11.— P. 677—686.
10. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Радаевский Ю. Л. и др. Определение молекулярного веса белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда, *Bombyx mori* // Биохимия.— 1973.— 38, И 5.— С. 1015—1019.
11. Hirs C. H. W. Determination of cysteine as cystic acid // Meth. Enzymol.— 1967.— 11.— P. 59—62.
12. Мейбаум В. В. // Биохимия.— 1945.— 10, № 2.— С. 353.
13. Yatafuji K., Mukai J., Joschihara F. Deoxyribonuclease and protease in polyhedral viral particles // Enzymology.— 1960.— 22, N 1.— P. 1—12.
14. 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.
15. Hara S., Tanada Y., Onii E. M. Isolation and characterization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* // J. Invert. Pathol.— 1976.— 27, N 1.— P. 115—124.

16. *Tweeten K. A., Bulfa L. A., Consigli R. A.* Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus of *Plodia interpunctella* // *J. Virol.*—1978.—26, N 3.—P. 702—711.
17. *Payne C. C., Kalmazoff 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. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (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