



УДК 578.833.1' 112.5

## РАЗДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ И ИХ СТРОЕНИЕ

© 1999 г. **З. А. Акименко\***, **В. И. Офицеров<sup>#</sup>**, **В. В. Шапров**, **С. И. Ястребов**

ЗАО "Вектор-Бест", 633159, п. Кольцово, Новосибирской обл.;

\* НИИ биоинженерии ГНЦ ВБ "Вектор", п. Кольцово, Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 23.07.98 г.

Принята к печати 13.06.98 г.

Из концентрированных очищенных суспензий вирусов клещевого энцефалита и венесуэльского энцефаломиелита лошадей методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в одну стадию получены индивидуальные по электрофорезу в ПААГ капсидные и поверхностные вирусные белки. Для выделенных белков определен аминокислотный состав и структура *N*-концевых участков полипептидной цепи.

*Ключевые слова:* ВЭЖХ; вирус клещевого энцефалита; вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей; белки вирусные.

Получение в индивидуальном виде некоторых структурных вирусных белков значительно осложняется их низкой растворимостью, обусловленной гидрофобными свойствами. В предыдущей работе [1] нам удалось подобрать условия эффективного разделения белков вируса гриппа с помощью обращенно-фазовой хроматографии на макропористом сорбенте с системой элюентов на основе муравьиной кислоты высокой концентрации. В настоящем сообщении представлены данные по использованию аналогичных условий ВЭЖХ для получения индивидуальных структурных белков вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ), венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВВЭЛ), а также результаты изучения их строения.

На рис. 1 показаны профиль элюции белков ВКЭ и электрофореграммы хроматографических фракций 1, 2. Молекулярные массы полипептидов в этих фракциях (15 и 55 кДа) соответствуют капсидному белку С и поверхностному гликопротеину Е вируса [2]. Результаты количественного анализа аминокислотного состава выделенных белков совпали с теоретическими данными, рассчитанными на основании опубликованной структуры соответствующих генов ВКЭ [3]. Для капсидного белка на полуавтоматическом газофазном секвенаторе была определена *N*-концевая последовательность из четырех аминокислот (Ala-Gly-Lys-Ala-), которая находится непосред-

ственно после первого метионина, соответствующего началу считывания белка с геномной РНК. Аналогичный процессинг характерен для капсидных белков других флавивирусов [4, 5].

Попытки определения *N*-концевой аминокислотной последовательности выделенного из ВКЭ гликопротеина Е не привели к положительному результату, что, вероятно, свидетельствует о том, что *N*-концевая аминокислота в белке модифицирована. В этой связи можно предположить, что посттрансляционные изменения гликопротеина Е в вирусе клещевого энцефалита отличаются от процессинга аналогичных белков близкородственных флавивирусов (Желтой лихорадки, Западного Нила, Денге, Канжин), где *N*-концевая аминокислота незаблокирована [4–6].

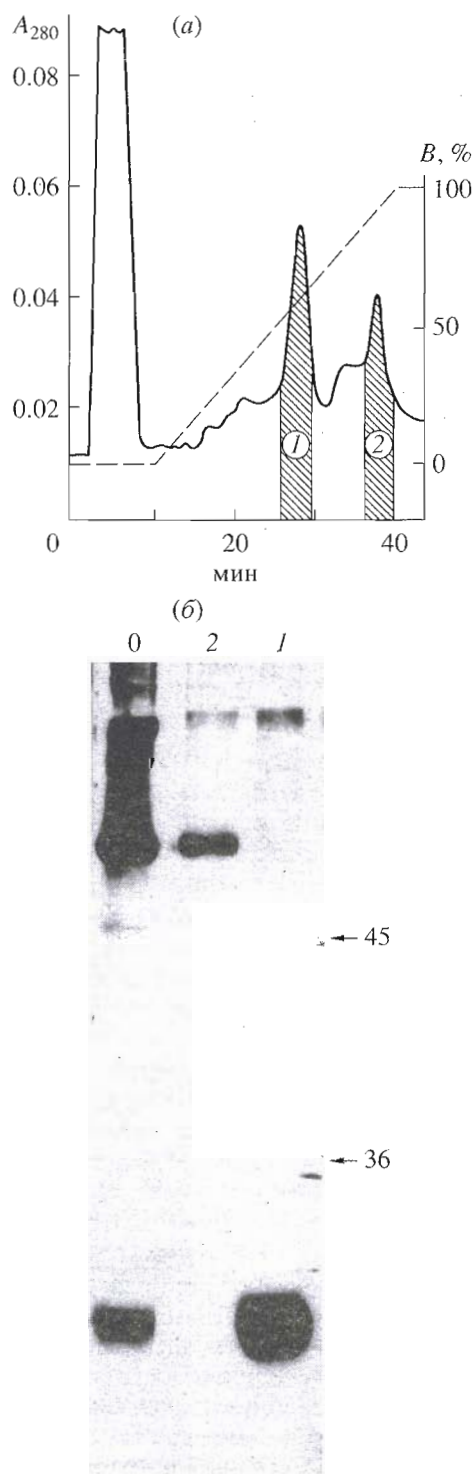
В экспериментах, проведенных с использованием метода иммуноблоттинга, было показано, что выделенный гликопротеин Е несмотря на жесткие условия, примененные для его очистки, сохраняет часть антигенных свойств нативного белка и специфически взаимодействует с гипериммунной сывороткой кролика против ВКЭ.

При хроматографии диссоциированных муравьиной кислотой вирионов ВВЭЛ было выделено 3 белковых препарата с молекулярными массами 33, 50 и 55 кДа, которые по литературным данным соответствуют капсидному белку и поверхностным гликопротеинам Е<sub>1</sub> и Е<sub>2</sub> [7].

Для выделенного белка Е<sub>1</sub> на газофазном секвенаторе Applied Biosystems 470А была определена *N*-концевая 7-членная аминокислотная последовательность (Tyr-Glu-His-Phe-Thr-Thr-Met-), ко-

Сокращения: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ВВЭЛ – вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (3832) 328-144; e-mail: ofitserov@v-best.nsk.su).



**Рис. 1.** Хроматографическое разделение диссоциированных в муравьиной кислоте вирионов клещевого энцефалита, штамм Софьин (а) и электрофореграммы (б) выделенных белков. Колонка (4,6 × 40 мм) с сорбентом Полисил-ОДС-500 (10 мкм); элюенты: А – 60% муравьиная кислота, В – муравьиная кислота-изопропанол-вода, 5 : 4 : 1. Скорость потока 1 мл/мин. Пики 1 и 2, отмеченные штриховкой, соответствуют С- и Е-белкам [2]. Электрофореграмма в 13% ПААГ исходной суспензии вируса (0) и фракций 1 и 2. Цифрами слева указано положение белков-маркеров молекулярной массы.

торая соответствовала структуре, выведенной из нуклеотидной последовательности гена этого белка [8].

Аминокислотную последовательность гликопротеина  $E_2$  в наших экспериментах определить не удалось, что, вероятно, обусловлено наличием в нем как и в белке Е ВКЭ, модифицированной *N*-концевой аминокислоты. Аналогичный результат получен ранее при попытке определения аминокислотной последовательности гликопротеина  $E_2$  близкородственного вируса Синдбис [9, 10].

Определение структуры *N*-концевого фрагмента капсидного белка ВВЭЛ представляло особый интерес, так как механизм процессинга капсидных белков в альфа-вирусах неизвестен, а трансляция его принципиально возможна с одного из трех потенциальных иницирующих АТГ-кодонов геномной 26S-РНК ВВЭЛ [10, 11]. Поскольку ни один из этих кодонов не удовлетворяет правилу Козака [12], теоретический выбор их предпочтительности не возможен.

Выделенный капсидный белок ВВЭЛ был деградирован нами с помощью дансильного варианта метода Эдмана. При этом были определены три аминокислоты с *N*-конца его полипептидной цепи (Met-Gln-Pro-), что соответствует трансляции С-белка с третьего иницирующего АТГ-кодона 26S-РНК. Однако нельзя полностью исключить варианты синтеза капсидного белка с одного из двух предыдущих АТГ-кодонов. В этих случаях в результате процессинга синтезированного полипептида должно происходить отщепление лидерного пептида и образование зрелого капсидного белка, включающегося в состав вирионов ВВЭЛ. Следует отметить, что, синтез С-белка в близкородственном вирусе Синдбис, как установлено в проведенных ранее исследованиях [13], начинается с первого АТГ-кодона РНК. Показано также, что капсидный белок вируса Синдбис содержит на *N*-конце ацилированный метионин [13].

В целом на основании полученных нами экспериментальных данных можно сделать однозначный вывод, что механизм биосинтеза С-белков в вирусах Синдбис и ВВЭЛ различен.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин, глицин, персульфат аммония, Кумасси ярко-голубой R-250 (Serva, Германия); гидрид кальция, реактив Фолина, фенилизотиоцианат, дансилхлорид, бутилхлорид (Merck, Германия); наборы белковых маркеров (Pharmacia-LKB, Швеция); полиамидные тонкослойные пластины (Schleicher & Schull, Германия); остальные реактивы и препараты отече-

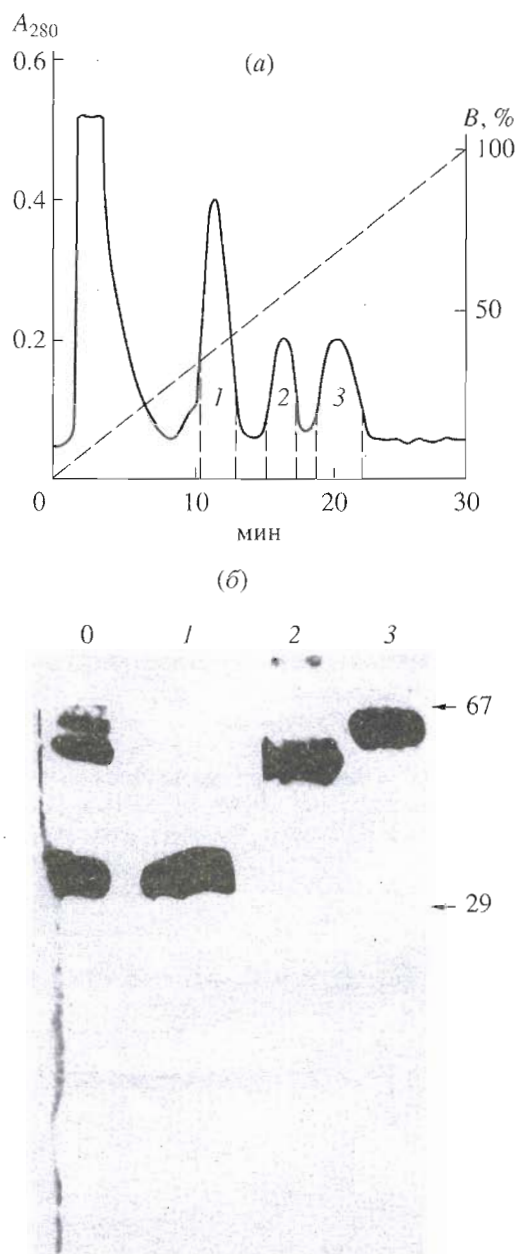


Рис. 2. Хроматографическое разделение белков ВВЭЛ, штамм ТС-83 (а) и электрофореграммы выделенных белков (б). Все условия и обозначения как на рис. 1. Фракции 1, 2, 3 соответствуют С-, Е<sub>1</sub>- и Е<sub>2</sub>-белкам ВВЭЛ [7].

ственного производства марки х. ч. или ос. ч. Реактивы и растворители для определения аминокислотной последовательности белков дополнительно очищали по методикам, приведенным в работе [14]. В работе использовали концентрированную суспензию ВКЭ штамма Софьин, наработанную в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов и любезно предоставленную Е. М. Прессманом; ВВЭЛ штамма ТС-83, полученный в НИИ молекулярной биологии ГНЦ ВБ "Вектор".

ВЭЖХ проводили на хроматографах Altex 332 (Beckman, США) и Analyst-7800 (LDC, США); для разделения использовали колонки из нержавеющей стали размером 4.6 × 40 мм, упакованные сорбентами Полисил-ОДС-500 (10 мкм), произведенными в ГНЦ ВБ "Вектор".

Идентификацию аминокислот проводили на анализаторе LC-5001 (Biotronic, Германия).

Белок определяли по методу Лоури в модификации Петерсона [15].

Анализ аминокислотного состава выполняли после гидролиза исследуемого образца белка при 105°C 24–36 ч в вакуумированной ампуле с 6 н. НСl, содержащей 0.05% фенола [16].

Электрофорез в 13 % ПААГ с 0.1% SDS выполняли по методу [17].

N-Концевой анализ белков осуществляли по методу [18]. Дансиламинокислоты идентифицировали с помощью двумерной ТСХ на полиамидных пластинах по методу [19].

N-Концевую аминокислотную последовательность полипептидов определяли по методу Эдмана в ручном варианте [20], а также в газофазном варианте на полуавтоматической установке с проточной ячейкой. Образец белка, растворенный в 15 мкл трифторуксусной кислоты, наносили на фильтр из стеклобумаги GF/C, высушивали в потоке сухого аргона и проводили его последовательную ступенчатую деградацию. После каждого цикла отщепления N-концевой аминокислоты ее превращали в фенилтиогидантоиновое производное [17] и идентифицировали методом ВЭЖХ на колонке 4.6 × 150 мм с сорбентом Ультрасфер ОДС (5 мкм) производства Beckman (США), используя для элюции градиент ацетонитрила в 0.02 М ацетате натрия рН 5.3. Хроматографию проводили при 37°C со скоростью потока элюента 0.8 мл/мин.

Авторы выражают благодарность В.В. Шемякину (Лимнологический институт СО РАН) за определение аминокислотной последовательности белка Е<sub>1</sub> ВВЭЛ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акименко З.А., Зыков С.А., Ястребов С.И., Офицеров В.И. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 1637–1642.
2. Winkler G., Heinz F.X., Guirakhoo F., Kunz C. // J. Chromatogr. 1985. V. 326. P. 113–119.
3. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.F. // FEBS Lett. 1986. V. 200. P. 317–321.
4. Boege U., Heinz F.X., Wengler G., Kunz C. // Virology. 1983. V. 126. P. 651–657.
5. Барам Г.И., Грачев М.А., Назимов И.В., Плетнев А.Г., Прессман Е.К., Рубин С.Г., Сальников Я.А., Семашко И.В., Чумаков М.П., Шемя-

- кин В.В., Ямицков В.Ф. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 1677–1680.
6. Плетнев А.Г., Ямицков В.Ф., Блинов В.М. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 1509–1520.
  7. Bell J.B., Bond M.W., Huncapillar M.W., Straus J.N. // J. Virol. 1983. V. 45. P. 708–714.
  8. Bell J.P., Kinney R.M., Trent D.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 4704–4706.
  9. Kinney R.M., Johnson B.B., Welch J.B., Tsuchiga K.R., Trent D.W. // Virology. 1989. V. 170. P. 19–70.
  10. Straus J.N., Bell J.B., Rice C.M., Huncapillar M.W. // Virology. 1982. V. 119. P. 255–267.
  11. Волчков В.Е., Волчкова В.А., Нетесов С.В. // Молекулярная генетика микробиологии. 1991. № 5. С. 8–15.
  12. Kozak M. // Nucl. Acid Res. 1981. V. 9. P. 5233–5252.
  13. Boege U., Cygler M., Wengler G., Dumas P., Tsao J., Luo M. // J. Mol. Biol. 1989. V. 208. P. 79–82.
  14. Hunkapiller M.W., Hewick R.M., Dreyer W.J., Hood L.E. // Meth. Enzymol. 1983. V. 91. P. 399–413.
  15. Peterson G.L. // Meth. Enzymol. 1983. V. 91. P. 95–119.
  16. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976.
  17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
  18. Grey W.R. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 121–138.
  19. Арутюнян А.А., Северин Е.С., Варшавский Я.М. // Биохимия. 1975. Т. 40. С. 878–884.
  20. Tarr G.E. // Method in Protein Sequence Analysis/ Ed. M. Elzigna. New Jersey: Humana Press, 1980. P. 223–232.

## The HPLC Separation and Chemical Characterization of Proteins from Tick-borne Encephalitis and Venezuelan Equine Encephalomyelitis Viruses

Z. A. Akimenko\*, V. I. Ofitserov\*\*\*, V. V. Shaprov\*\*, and S. I. Yastrebov\*\*

\*Research Institute of Bioengineering, Vektor State Research Center of Virology and Biotechnology (NGTs VB), pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

\*\*Vektor-Best ZAO, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

Homogeneous (according to PAGE) capsid and surface viral proteins were isolated from concentrated purified suspensions of tick-borne encephalitis and Venezuelan equine encephalomyelitis viruses by one-stage reversed-phase HPLC. The amino acid composition and the sequences of their *N*-terminal parts were determined.

*Key words:* HPLC, tick-borne encephalitis virus, Venezuelan equine encephalomyelitis virus, viral proteins

---

# To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (3832) 328-144; e-mail: ofitserov@v-best.nsk.su.