

Академик АМН СССР В. М. ЖДАНОВ, Т. П. ТИХОНЕНКО,
А. Ф. БОЧАРОВ, Б. А. НАРОДИЦКИЙ

РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

При использовании спаренной системы синтеза РНК и белков была доказана возможность внеклеточного синтеза и самосборки рибонуклеопротеида вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей на преформированных субклеточных структурах (1). В дальнейшем было изучено проникновение (2) и репликация (3) РНК этого вируса в изолированных митохондриях печени крысы. Поскольку митохондрии являются своеобразной

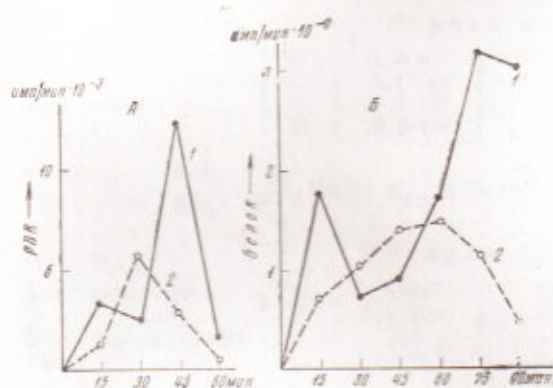


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика синтеза РНК (А) и белков (Б) в митохондриях печени крысы, зараженных (1) и не зараженных РНК в.т.м. (2)

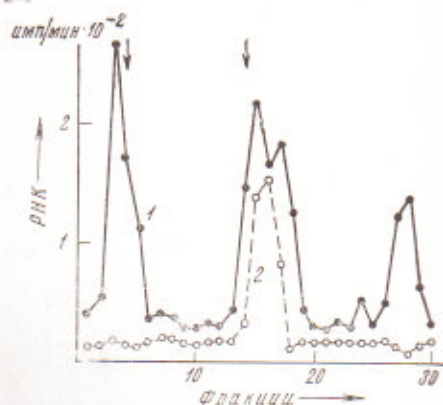


Рис. 2

Рис. 2. Седиментограмма РНК, синтезированной в митохондриях, зараженных РНК в.т.м., после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 5—20% при 18 000 об/мин. в течение 20 час. Половина каждой фракции градиента была оставлена без обработки (1), а половина обработана (5 $\mu\text{г}/\text{мл}$) панкреатической рибонуклеазой (2). Положение маркер-пиков рибосомальной РНК (28S и 18S) показано стрелками

автономной системой, в которой имеются все компоненты для синтеза белков и нуклеиновых кислот (4), была предпринята попытка изучить возможность репродукции вируса табачной мозаики (в. т. м.) в этой системе.

Изолированные митохондрии печени крысы получали по ранее описанному методу (2), который был модифицирован следующим образом: митохондрии суспендировали в сахарозном буфере (трис-НСl 0,01 M рН 7,4, NaCl 0,01 M, ЭДТА 0,001 M, сахароза 0,25 M) и хранили при -20° . РНК в. т. м. подвергали тройной депротенизации (дважды фенолом и один раз смесью хлороформа с изоамиловым спиртом), осаждали спиртом с 0,2% ацетатом натрия и хранили в тех же условиях, растворяя непосредственно перед опытом.

К суспензии митохондрий (10 мг белка) добавляли актиномицин D (50 $\mu\text{г}/\text{мл}$) и инкубировали при 32° в течение 20 мин. для разрушения

эндогенных информационных РНК. Затем в систему вносили вирусную РНК (10 μg) и инкубационную смесь, содержащую (конечная концентрация) трис-НСI 0,05 M рН 7,8, KCl 0,07 M, MgCl_2 0,05 M, 2-меркаптоэтанол 0,006 M, фосфонолпириват 0,005 M, пириваткиназу 50 $\mu\text{g}/\text{мл}$, аминокислоты по 10^{-3} M, нуклеозидтрифосфаты по 10^{-6} M. В некоторых случаях материал, синтезированный в митохондриях зараженных РНК в.т.м., титровали на половинках листьев *Nicotiana glutinosa* по стандартной методике, используя в качестве контроля такие же количества инфекционной РНК в.т.м. Для метки вновь синтезированной РНК использовали H^3 -УТФ (5 $\mu\text{C}/\text{мл}$), для метки белков C^{14} гидролизат хлореллы (2 $\mu\text{C}/\text{мл}$). В опытах по определению тотального синтеза РНК и белка реакцию останавливали добавлением равного объема 0,1 M пиродифосфата с 10% трихлоруксусной кислотой. В тех случаях, когда исследовались свойства вновь синтезированных продуктов, реакцию останавливали добавлением только пиродифосфата (РНК) или быстрым охлаждением (белок). РНК из инкубационной смеси выделяли фенолом, для выделения белков инкубационную смесь центрифугировали в течение 60 мин. при 100 000 g, осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость после диализа против трис-буфера без сахарозы концентрировали высушиванием в эксикаторе. C^{14} -белки, синтезированные в зараженных митохондриях, исследовали в реакции precipitation с антисывороткой к в.т.м. и нормальной кроличьей сывороткой по стандартной методике. Остальные детали применявшихся методов указаны в тексте и в подписях к рисункам.

На рис. 1 показана кинетика синтеза РНК и белков в исследуемой системе при добавлении РНК в.т.м. и без последней. В то время как в интактных митохондриях синтез обоих полимеров постепенно нарастает и затем падает, при внесении в систему РНК в.т.м. отмечается два подъема синтезов, разделенных фазой их угнетения.

При исследовании в градиентах плотности сахарозы H^3 -РНК, экстрагированной фенолом из митохондрий, зараженных РНК в.т.м., отчетливо выявляется два пика с константами седиментации 29—30 S и 14—15 S, второй из которых устойчив к панкреатической рибонуклеазе (рис. 2). По седиментационным характеристикам первый пик соответствует вирусной РНК, а второй — репликативной промежуточной форме (5).

Для изучения C^{14} -белков, синтезированных в митохондриях, зараженных РНК в.т.м., концентрат, полученный как указано выше, подвергали электрофорезу в 5% полиакриламидном геле по ранее описанному методу (6). В качестве белков-маркеров с известным молекулярным весом использовали панкреатическую дезоксирибонуклеазу (молекулярный вес 63 000), пепсин (35 000), трипсин (23 800), белок в.т.м. (18 200) и лизоцим (17 000).

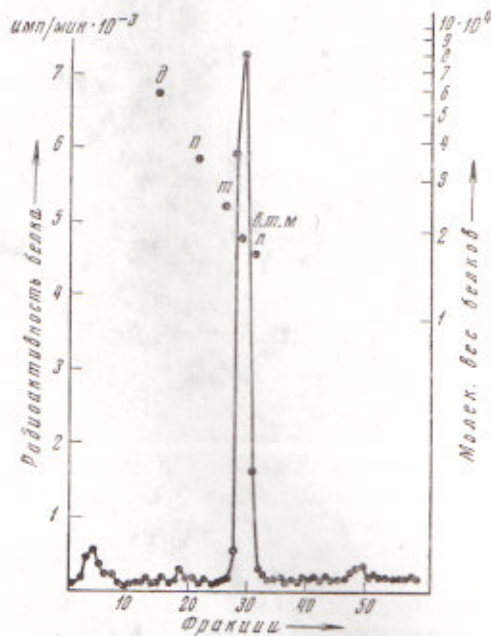


Рис. 3. Электрофореграмма белков, синтезируемых в митохондриях в присутствии РНК в.т.м. в 5% полиакриламидном геле. Положение полос маркер-пиков показано точками: д — дезоксирибонуклеаза, п — пепсин, т — трипсин, в.т.м. — белок в.т.м., л — лизоцим

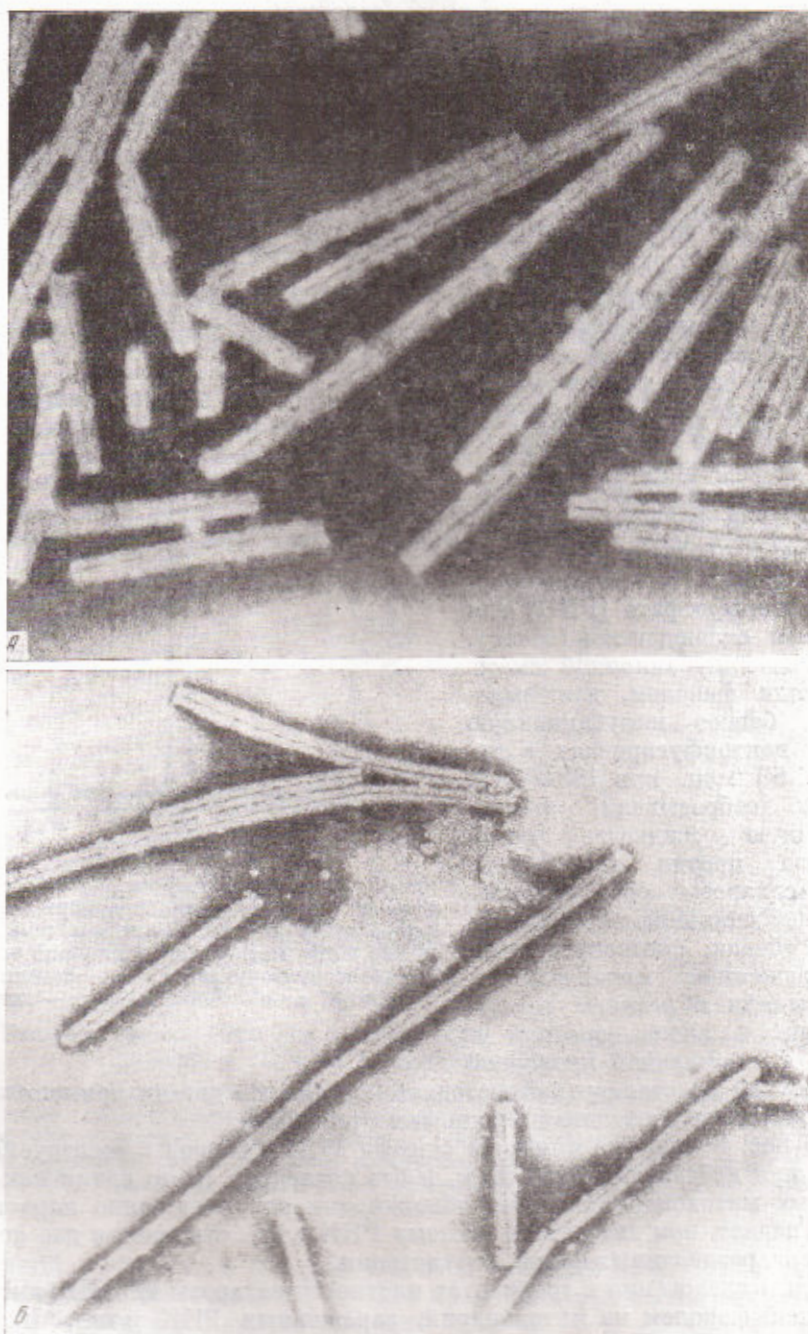


Рис. 4. Электронная микроскопия вирусных частиц, синтезированных в митохондриях, зараженных РНК в.т.м. (А) и очищенных вирионов в.т.м. (Б). Контрастирование 2% фосфорновольфрамовой кислотой рН 6,5. JeM-7A при инструментальном увеличении 50 000. А — 280 000 ×, Б — 175 000 ×

На рис. 3 приведена электрофореграмма белков, синтезированных в митохондриях в присутствии РНК в.т.м. Как видно из рис. 3, электрофоретическая подвижность основного белка, синтезированного в этой системе, полностью совпадает с таковой структурного белка в.т.м. Идентичность вновь синтезированного в митохондриях белка с аутентичным белком в.т.м. была подтверждена иммунологическим тестом. Антисыворотка к в.т.м. в разведении 1:20 и 1:100 осаждала соответственно 93 и 24% C^{14} метки, тогда как неспецифическое осаждение метки в контроле нормальной кроличьей сывороткой мало зависело от разведений и составляло соответственно 28 и 21%. Надосадочная жидкость после осаждения митохондрий центрифугированием при 15 000 g в течение 15 мин. была исследована в электронном микроскопе. На рис. 4 показаны результаты типичного опыта. В препарате, полученном из митохондрий, инкубированных с РНК в.т.м., видны характерные палочковидные частицы с диаметром ~ 180 Å, сходные с вирионами в.т.м. (контроль, рис. 4б). В незараженных митохондриях такого рода структуры полностью отсутствовали. Для вирусных частиц, синтезированных в митохондриях, характерна типичная для в.т.м. периодичность 23 Å и центральный канал диаметром ~ 40 Å (7). Частицы сильно варьировали по длине и лишь немногие обладали нормальной длиной 3000 Å. Большая часть вирусного материала была связана с обрывками митохондриальных мембран. В препарате изредка наблюдались атипичные частицы с меньшей электронной плотностью и диаметром 136 Å, происхождение которых пока не установлено.

Материал, синтезированный в зараженных митохондриях, оказался также инфекционным для листьев.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что в митохондриях печени крысы при их инкубации с РНК в.т.м. синтезируются не только компоненты вируса табачной мозаики, но и происходит сборка зрелых вирусных частиц. Такое заключение, во-первых, иллюстрирует основное положение современной молекулярной биологии об универсальности генетического кода и, во-вторых, показывает, что хозяинно-видовые барьеры не являются препятствием для функционирования генетического материала вирусов в чужеродных и далеких в систематическом отношении системах. Изолированные митохондрии, по сравнению с другими системами спаренного синтеза нуклеиновых кислот и белков, не только являются удобной моделью для изучения репликации, трансляции генетического материала вирусов и сборки рибонуклеопротеидных комплексов, но и могут стать методом выделения и изучения вирусов и субвирусных структур в тех случаях, когда традиционные методы (лабораторные животные, культуры тканей) оказываются мало эффективными.

Институт вирусологии им. Д. И. Иванова
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
22 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ф. И. Ершов, В. М. Жданов, Л. В. Урываев, ДАН, 189, 647 (1969).
² В. С. Гайцхоки, Ф. И. Ершов и др., *Вопр. вирусол.*, № 3 (1971). ³ Ф. И. Ершов, В. С. Гайцхоки и др., *Вопр. вирусол.*, № 3 (1971). ⁴ Е. А. Пинус, А. З. Метлицкая, *Усп. совр. биол.*, 70, 1 (1970). ⁵ A. Brishamer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 506 (1970). ⁶ В. М. Жданов, Ф. И. Ершов, Л. В. Урываев, ДАН, 187, 667 (1969). ⁷ A. Klug, D. L. D. Caspar, *Advances Virus Res.*, 7, 225 (1960).