

В. К. НОВИКОВ, В. З. КИМАЕВ, И. Г. АТАБЕКОВ

РЕКОНСТРУКЦИЯ НУКЛЕОПРОТЕИДА ВИРУСА Х КАРТОФЕЛЯ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 29 VII 1971)

Известно, что нативные вирионы некоторых палочковидных (¹⁻⁴) и сферических (⁵) вирусов растений могут быть реконструированы при инкубации смеси низкомолекулярного структурного вирусного белка и инфекционной свободной РНК. В то же время в литературе отсутствуют данные по реконструкции нитевидных вирусов растений.

Предлагаемая работа имеет своей целью осветить некоторые закономерности самосборки *in vitro* вирионов вируса Х картофеля (Хв.к). Очищенный препарат Хв.к. выделяли из зараженных растений дурмана (*Datura stramonium* L.) методом дифференциального центрифугирования с предварительным осветлением экстракта хлороформом и концентрированием вируса методом изоэлектрической преципитации (⁶).

Для получения препаратов структурного белка и инфекционной РНК Хв.к. применяли метод солевой депротенинизации вирусов (^{7, 8}). К охлажденному вирусному раствору рН 6,5 (20—30 мг/мл) добавляли равный объем 4 *M* раствора CaCl_2 и смесь инкубировали при 0° в течение 15 мин. В этих условиях Хв.к. полностью диссоциирует на белок и РНК. Преципитировавшую в солевом растворе РНК отделяли центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 15 мин, от низкомолекулярного вирусного белка ($S_{20, w} \approx 2S$), растворимого в растворе CaCl_2 . РНК переводили в растворимое состояние, экстрагируя осадок трижды трис-буфером рН 7,5, содержащим ЭДТА 0,02 *M* и бентонит (1/10 от веса исходного вируса). Далее РНК дважды пересаждали 2 объемами этанола с добавлением ацетатного буфера, рН 4,5. Раствор РНК в бидистилляте после ультрацентрифугирования использовали в опытах. РНК также выделяли фепольным методом в присутствии бентонита и додецилсульфата натрия (⁴). Препараты РНК Хв.к., выделенные обоими методами, были очень сходны по спектру поглощения у.-ф. света, удельной инфекционности и седиментационным свойствам.

Отдиализованный против воды рН 6,8 раствор белка центрифугировали при 40 тыс. об/мин в течение 90 мин. для удаления неразрушенного вируса. В препаратах белка, полученных таким образом, присутствовали два компонента с коэффициентами седиментации 3—5 *S* и 10—15 *S*. С понижением концентрации белка содержание тяжелого компонента уменьшалось при возрастании содержания легкого компонента. Белок вируса Х картофеля не может быть реполимеризован с образованием высокомолекулярных агрегатов структурно и антигенно идентичных нативному Хв.к. (⁹⁻¹¹), как это было показано для белка вируса табачной мозаики (в.т.м.) (¹²). Концентрацию Хв.к., белка Хв.к. и РНК определяли спектрофотометрически с применением коэффициентов экстинкции $E_{260}^{1\%} = 28$ (¹³), $E_{280}^{1\%} = 12,3$ (¹⁰) и $E_{260}^{0,1\%} = 25$ соответственно. Седиментационный анализ проводили в ультрацентрифуге «Spinco-E». Электронномикроскопические исследования вели с применением метода негативного контрастирования (¹⁴) на электронном микроскопе «Hitachi» 11В при инструментальном увеличении 20—50 тыс. Иммунологические тесты проводили методом двойной диффузии в геле, как описано ранее (¹⁵).

Реконструкция нуклеопротеида Хв.к. *in vitro* происходит при инкубации смеси вирусного белка и РНК в буферных растворах с низкой ионной силой. Об эффективности реконструкции судили по величине валового выхода нуклеопротеидного материала, выделяемого из инкубационной смеси одним циклом дифференциального центрифугирования, и выражали в процентах от теоретического максимального выхода нуклеопротеида с соотношением D_{260}/D_{280} , равным 1, 2. Как показано в табл. 1, наибольший выход нуклеопротеидного материала наблюдался при концентрации трис-НСl-буфера 0,01 мол/л и фосфатного буфера 0,001 мол/л. Нуклеопротеидный материал образовывался в значительных количествах также и в том случае, если смесь белка и РНК инкубировали в дистиллированной воде. Однако в растворах с очень низкой ионной силой, по-видимому, образуются также нуклеопротеидные комплексы, характеризующие более высоким отношением D_{260}/D_{280} , чем в нативном вирусе (табл. 1). При после-

Таблица 1

Влияние концентрации буфера на эффективность реконструкции нуклеопротеида Хв. к.

Концентрация буфера, мол/л	Выход нуклеопротеида, %				D_{260}/D_{280} в материале, пересаживаемом в ультрацентрифуге			
	фосфатный буфер		трис-НСl		фосфатный буфер		трис-НСl	
H ₂ O	14	15	26	29	1,48	1,21	1,29	1,26
0,0001	14	16	26	—	1,50	1,21	1,36	—
0,001	17	17	34	28	1,44	1,21	1,32	1,26
0,005	—	6	—	—	—	1,18	—	—
0,01	12	3	11	36	1,26	1,18	1,22	1,21
0,05	3	—	—	10	1,20	—	—	1,21
0,10	2	1	2	5	1,20	1,17	1,20	1,21

Примечание. Отношение белка к РНК в инкубационной смеси составляло 20—25, рН 6,9—7,2, инкубировали 20 час. при 20°. Приведены результаты четырех опытов в двух повторностях каждый.

дующих пересаживаниях в ультрацентрифуге или обработке панкреатической РНКазой пересаживаемый в ультрацентрифуге материал характеризовался соотношением D_{260}/D_{280} , равным 1,18—1,21. Выход нуклеопротеидного материала резко снижался с увеличением концентрации соли (табл. 1), а в условиях, оптимальных для реконструкции в.т.м. (0,1 М фосфатный буфер ⁽¹⁶⁾), образование нуклеопротеида Хв.к. практически не происходило. При инкубации белка в отсутствие РНК количество пересаживаемого в ультрацентрифуге материала не превышало 2%. Оптимум рН для образования нуклеопротеидного материала в инкубационной смеси белка и РНК Хв.к. находится в интервале рН 6,5—7,0 (рис. 1а). При значениях рН ниже 6 выход нуклеопротеида резко снижался.

Данные по кинетике образования нуклеопротеидного материала приведены на рис. 1б. При инкубации смеси белка и РНК в 0,025 М трис-НСl-буфере рН 6,7, 20°, примерно половина суммарного нуклеопротеидного материала образуется за первые 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в инкубационную смесь фосфатного буфера до конечной концентрации 0,1 М.

Реконструированный *in vitro* нуклеопротеидный материал, очищенный двумя циклами дифференциального центрифугирования, был охарактеризован с применением ряда методов. В препаратах реконструированного Хв.к. при исследовании в электронном микроскопе выявлено большое количество нитевидных частиц, варьирующих по длине, диаметр которых неотличим от диаметра нативного Хв.к. (рис. 2). В популяции реконструированных частиц удается выявить частицы (рис. 1в) с длиной, харак-

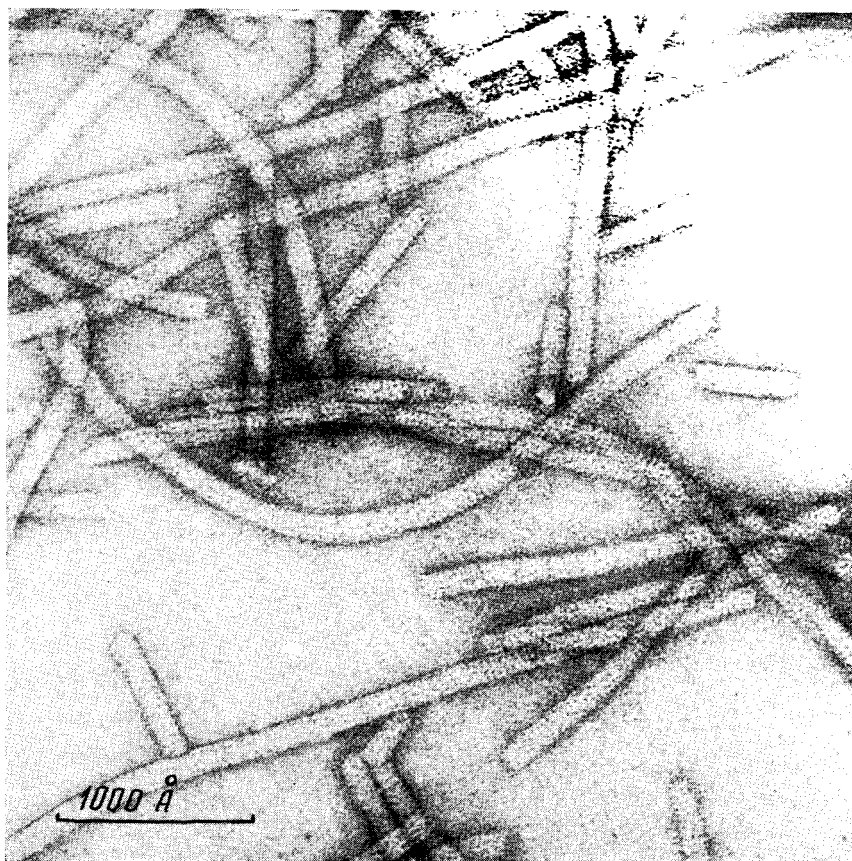


Рис. 2. Электронная микрофотография препарата Хв.к., реконструированного *in vitro* (контрастирование уранил-ацетатом)

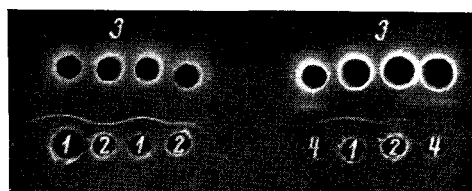


Рис. 3. Реакция преципитации в агаровом геле с антисывороткой к Хв.к. 1 — реконструированный Хв.к., 2 — нативный Хв.к., 3 — антисыворотка к Хв.к., 4 — белок Хв.к.

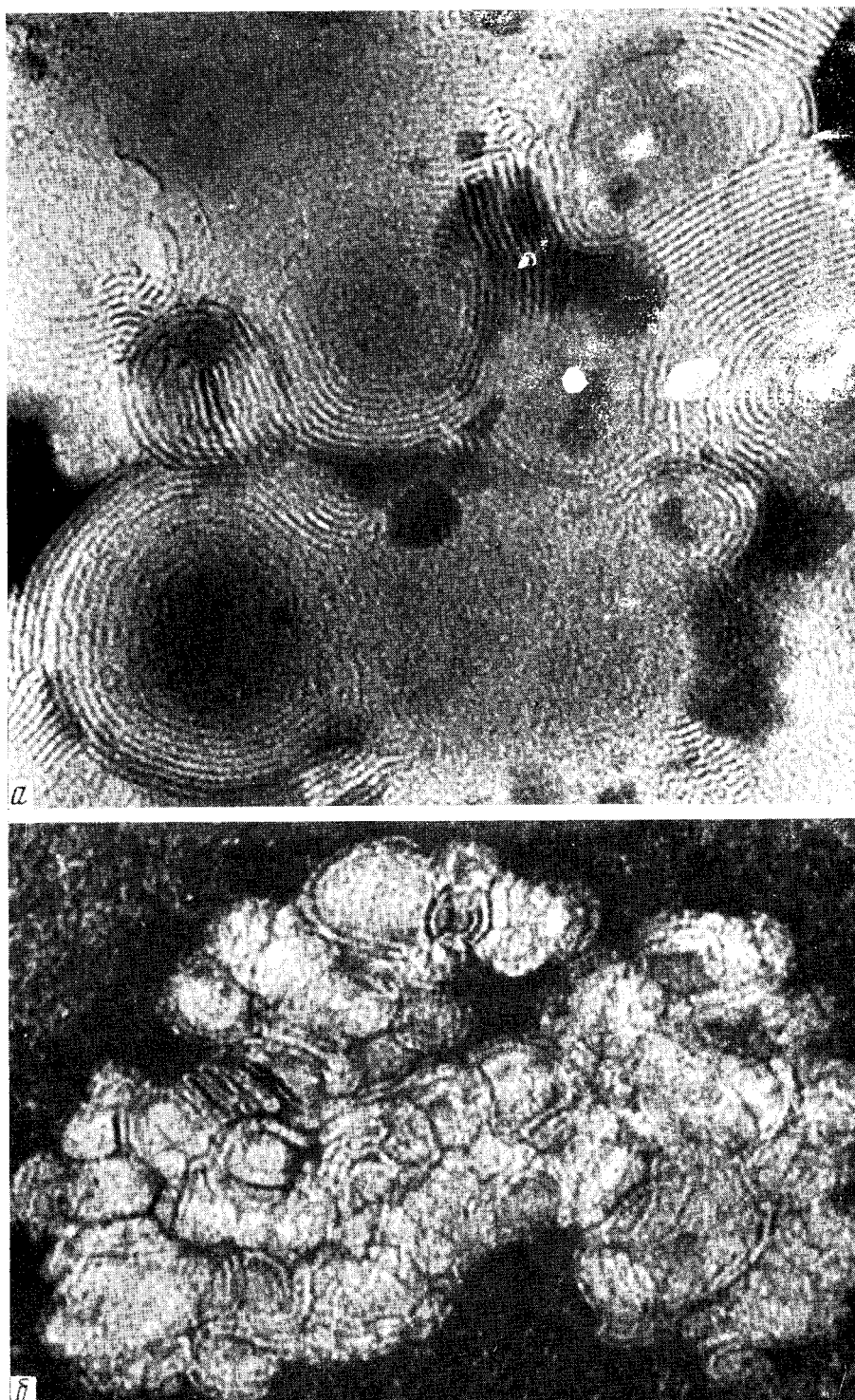


Рис. 2. Структуры, полученные из системы лецитин — вода (электронная фотография). Негативное контрастирование 2% ФВК, pH 7, 200 000 $\times$. а — без белка, б — после обработки белком

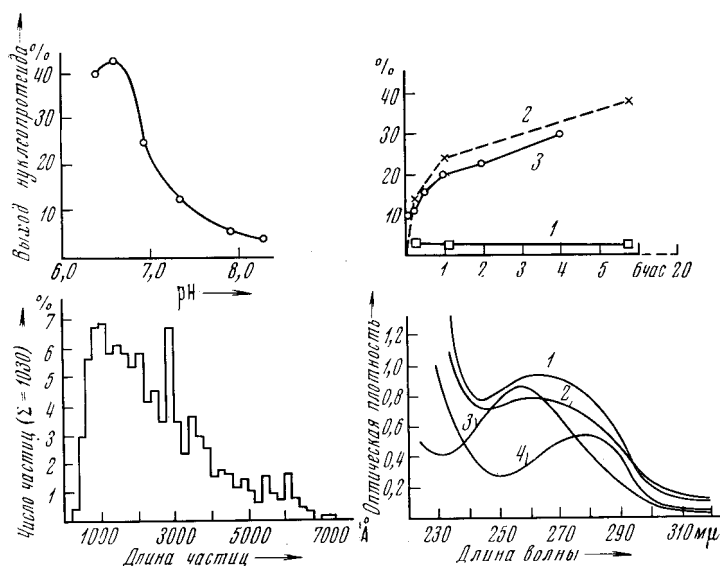


Рис. 1. Реконструкция вируса Х картофеля из белка и РНК. Вверху слева — влияние pH на реконструкцию Хв.к. (смесь инкубировали в 0,025 M трис-НСl-буфере при 20° в течение 16 час.); вверху справа — кинетика образования нуклеопротеида Хв.к. (инкубация в 0,025 M трис-НСl, pH 6,7): 1 — инкубация при 0°, 2 — при 20°, 3 — при 20°; 1, 2 — концентрация белка 2 мг/мл, 3 — 1,5 мг/мл; внизу слева — гистограмма реконструированного Хв.к. (инкубация при реконструкции в 0,01 M трис-НСl, pH 7,0, 20°); внизу справа — спектр поглощения у.-ф. света препаратами: 1 — реконструированным Хв.к., 2 — нативным Хв.к., 3 — РНК Хв.к., 4 — белок Хв.к.

терной для нативного Хв.к., 5150—5400 Å (¹⁷, ¹⁸). Такие препараты обладали небольшой инфекционностью при инокуляции растений *Datura stramonium* L. и *Chenopodium amaranticolor* Coste, Reyn. Спектр поглощения у.-ф. света реконструированного нуклеопротеида был очень близок к спектру поглощения у.-ф. света нативного препарата Хв.к. (рис. 1з). Материал, формируемый при реконструкции, был антигенно идентичен нативному Хв.к. (рис. 3) в отличие от исходного белка Хв.к. Белок Хв.к. был антигенно родствен, но не идентичен Хв.к., в соответствии с предыдущими результатами (¹¹, ²²). При аналитическом ультрацентрифугировании реконструированный материал был гетерогенен. Основная масса реконструированного вируса имела коэффициент седиментации порядка 75—90 S, т. е. приближалась к константе седиментации нативного Хв.к. 118 S (¹⁹).

Рассмотренные выше результаты свидетельствуют о том, что нуклеопротеид Хв.к. может быть реконструирован *in vitro* при инкубации смеси белка и РНК в растворах с низкой ионной силой. Белок Хв.к. в отсутствие РНК не способен образовывать вирусоподобные структуры. Это свидетельствует о том, что реконструкция вируса осуществляется на основе взаимодействия РНК — белок. Тот факт, что низкая ионная сила растворителя является оптимальной для реконструкции Хв.к., позволяет предположить, что основная роль в этом процессе выполняется солевыми связями. Последнее отличает эту систему от в.т.м., частицы которого стабилизированы преимущественно гидрофобными взаимодействиями (²⁰, ²¹).

Далее мы предприняли попытку получения смешанных нуклеопротеидов, состоящих из белка Хв.к. и гетерологичных вирусных РНК. С этой целью использовали инфекционные препараты РНК вируса табачной мозаики, вируса мозаики костра (в.м.к.), вируса штриховатой мозаики ячменя (в.ш.м.я.), а также препараты рибосомальной РНК * *Escherichia coli* 16 и 23 S. В этих опытах были получены нитевидные частицы, неотличимые

* Авторы признательны В. А. Спиридоновой за предоставление рибосомальной РНК *E. coli*.

в электронном микроскопе от реконструированного Хв.к. и антигенно идентичные нативному Хв.к. Спектр поглощения у.-ф. света таких смешанных нуклеопротеидов был также сходен со спектром поглощения нативного Хв.к. Выход нуклеопротеида при инкубации белка Хв.к. с РНК в.т.м., ОВ-3,4 и рибосомальной РНК 23 S был близок к выходу нуклеопротеида при гомологичной реконструкции (табл. 2).

Таблица 2

Образование смешанного нуклеопротеида при инкубации белка Хв. к. и различных РНК

Источник получения РНК	Трис-НСl 0,01 М, рН 6,7—6,8		Фосфатный буфер 0,001 М, рН 6,7	
	выход нуклеопротейда, %	D_{230}/D_{280}	выход нуклеопротейда, %	D_{230}/D_{280}
Кв. к.	16	1,33	31	1,20
	33	1,18		
В. т. м.	18	1,34	34	1,19
	26	1,18		
В. м. к.	8	1,27	12	1,26
	16	1,23		
В. ш. м. я.	12	1,33	20	1,25
	19	1,18		
Рибосомальная				
16 S	—	—	11	1,18
	4	1,18		
23 S	—	—	21	1,27
	18	1,20		

Примечание. Над чертой — результаты опыта I, под чертой — II. Отношение белок — РНК в инкубационной смеси составило 25, инкубировали в течение 20 час. при 20°.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии строгой специфичности взаимодействия белка Хв.к. с гомологичной и гетерологичной РНК при формировании нуклеопротеидных частиц. Последнее, однако, не исключает существования каких-то тонких различий при взаимодействии белка Хв.к. с РНК различного происхождения, так как инфекционные частицы удалось реконструировать только при пользовании гомологичной РНК.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 41, 690 (1955).
- ² Н. А. Киселев, И. Г. Атабеков и др., Биохимия, 31, 4, 670 (1966).
- ³ I. S. Semancik, D. A. Reynold, Science, 164, 559 (1969).
- ⁴ J. G. Atabekov, V. K. Novikov et al., Virology, 41, 519 (1970).
- ⁵ E. Hiebert, J. B. Bancroft, C. E. Bracker, Virology, 34, 492 (1968).
- ⁶ V. K. Novikov, J. G. Atabekov, Virology, 41, 107 (1970).
- ⁷ I. I. Kelley, P. Kaesberg, Biochim. et biophys. acta, 51, 236 (1962).
- ⁸ И. Г. Атабеков, В. К. Новиков, Биохимия, 31, 1, 157 (1966).
- ⁹ F. C. Bawden, A. Kleczkowski, Virology, 7, 375 (1959).
- ¹⁰ M. E. Reichmann, J. Biol. Chem., 235, 2559 (1960).
- ¹¹ С. П. Дементьева, В. К. Новиков, И. Г. Атабеков, Биологические науки, 8, 92 (1970).
- ¹² G. Schramm, W. Zillig, Zs. Naturforsch., 106, 493 (1955).
- ¹³ M. E. Reichmann, Canad. J. Chem., 37, 384 (1959).
- ¹⁴ S. Brenner, R. Horne, Biochim. et biophys. acta, 34, 103 (1959).
- ¹⁵ J. G. Atabekov, N. D. Schaskolskaya et al., Virology, 36, 587 (1968).
- ¹⁶ H. Fraenkel-Conrat, B. Singer, Biochim. et biophys. acta, 33, 359 (1959).
- ¹⁷ J. Brandes, C. Wetter, Virology, 8, 115 (1959).
- ¹⁸ E. Shikata, J. Faculty of Agricult. Hokkaido Univ., 55, Part 1, 2 (1966).
- ¹⁹ M. E. Reichmann, Canad. J. Chem., 37, 4 (1959).
- ²⁰ D. L. D. Caspar, Adv. Protein. Chem., 18, 37 (1963).
- ²¹ M. A. Lauffer, C. L. Stevens, Adv. Virus. Res., 13, 1 (1968).
- ²² I. F. Shepard, J. A. Shalla, Virology, 42, 825 (1970).