

Н. Е. ВЕСЕНИНА, Н. П. РОДИОНОВА, Т. И. ХЕЙФЕЦ,  
И. Г. АТАБЕКОВ

**ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕКОНСТРУКЦИИ ВТМ:  
ОБРАЗОВАНИЕ МИНИМАЛЬНОГО НУКЛЕОПРОТЕИДНОГО  
КОМПЛЕКСА**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 5 X 1972)

Независимыми исследованиями в четырех лабораториях было показано, что молекула РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) содержит участок, обладающий повышенным сродством к структурному белку, ответственный за инициацию процесса реконструкции вирусных частиц (¹–⁸). Участок РНК, инициирующий реконструкцию (у.и.р.) локализован на 5'-конце молекулы ВТМ (¹–⁵).

В условиях частичной реконструкции удается сформировать неполный нуклеопротеидный комплекс (н-НПК), содержащий молекулу РНК ВТМ, лишь частично одетую белком. Частицы н-НПК, полученные при различных условиях реконструкции, содержат белок ВТМ, связанный с одним концом вирусной РНК (⁵, ⁶, ⁸). Было показано, что концевой фрагмент РНК ВТМ, защищенный белком в составе н-НПК, обладает повышенным сродством к структурному белку, т. е. содержит у.и.р. (⁷). Весьма очевидно, что протяженность у.и.р. не может быть слишком велика, так как генетическая информация, обеспечивающая белок-РНК-узнавание (содержащаяся в у.и.р.), и генетическая информация относительно аминокислотной последовательности вряд ли могут быть совмещены в значительной части молекулы РНК ВТМ. В связи с этим представляется маловероятным, что н-НПК, описанный в литературе (⁵, ⁶, ⁸) и содержащий не менее ¼ молекулы РНК ВТМ в форме, связанной со структурным белком, представляет собой минимальный комплекс (м-НПК), образуемый в процессе реконструкции. По-видимому, частицы н-НПК (⁶, ⁸) содержат наряду с у.и.р. часть молекулы РНК ВТМ, расположенную за пределами у.и.р. Настоящая работа имела своей целью обнаружение минимального НПК среди продуктов, образуемых при взаимодействии белка и РНК ВТМ в процессе реконструкции.

Из инкубационной смеси, содержащей РНК и белок ВТМ, после 30–60 мин. инкубации выделяли осадок центрифугированием при 164 000 *g* в течение 90 мин., фиксировали его в 3% формальдегиде и фракционировали в градиенте плотности сульфата цезия. Материалы и методы, применявшиеся в этой работе, были описаны в предыдущих публикациях (⁶, ⁷).

Анализ продуктов, образуемых при различных условиях инкубации белка и РНК ВТМ, позволил сделать следующие выводы. 1) В 0,25 M фосфатном буфере, pH 6,5, т. е. при условиях преимущественного образования н-НПК (⁷, ⁸), в градиенте плотности сульфата цезия удалось выявить м-НПК с величиной плавучей плотности 1,57–1,59 г/см³ (рис. 1A). Уменьшение отношения РНК:белок от 1:20 (стандартная величина при реконструкции ВТМ) до 1:5 сопровождается появлением пика с плотностью 1,67 г/см³, соответствующего свободной РНК ВТМ, не связанной со структурным белком (рис. 1A). 2) Аналогичный м-НПК удалось обнаружить в 0,25 M фосфатном буфере, pH 7,3, т. е. при условиях, обеспечивающих образование нативного ВТМ одновременно с некоторым количеством н-НПК (⁶, ⁷). Нам не удалось отделить в градиенте Cs₂SO₄ частицы н-НПК от частиц свободного ВТМ. К сожалению, описываемые опыты требуют нанесения весьма значительного общего количества материала, по-

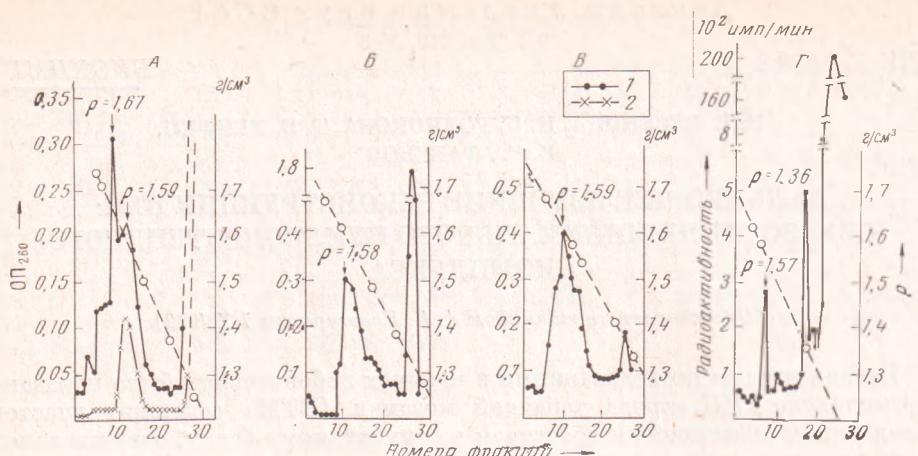


Рис. 1. Центрифугирование в градиенте плотности сульфата цезия материала, реконструированного *in vitro* из РНК и белка ВТМ. Ротор SW 50 центрифуги «Spinco L2»; 37 тыс. об./мин. А — инкубация в течение 30 мин. при  $24^\circ$  в 0,25 M фосфатном буфере pH 6,5: 1 — соотношение РНК / белок 1 : 5, 2 — соотношение РНК / белок 1 : 20; Б — инкубация в течение 60 мин. при  $24^\circ$  в 0,25 M фосфатном буфере pH 7,3; В — инкубация в течение 60 мин. при  $24^\circ$  в 0,08 M фосфатном буфере pH 7,3. Соотношение РНК / белок 1 : 10; Г —  $C^{14}$ -белок ВТМ. Инкубация в течение 60 мин. при  $24^\circ$  в 0,08 M фосфатном буфере pH 7,3. Соотношение РНК / белок- $C^{14}$  1 : 10

скольку м-НПК составляет лишь небольшую часть от массы реконструированного материала. Основная часть этих продуктов присутствует в зоне 1,27—1,35 г/см<sup>3</sup>, образуя нерастворимый в  $C_2SO_4$  преципитат (рис. 1А, Б). 3) В 0,08 M фосфатном буфере pH 7,3, т. е. при условиях преимущественного образования нативного ВТМ (<sup>6</sup>, <sup>7</sup>), м-НПК удается обнаружить в большем количестве, если отношение РНК: белок составляет 1 : 10, вместо обычного 1 : 20 (рис. 1В).

Дополнительные доказательства существования м-НПК были получены в опытах по реконструкции с использованием  $C^{14}$ -меченного белка ВТМ. При этом удалось обнаружить  $C^{14}$ -НПК с плотностью 1,57 г/см<sup>3</sup> и два компонента с величиной плавучей плотности 1,36 и 1,26 г/см<sup>3</sup>, вероятно, соответствующие ВТМ и белку (рис. 1Г).

м-НПК содержит около 25% белка и 75% РНК. Допустив, что в составе частицы м-НПК присутствует интактная молекула вирусной РНК (мол. вес.  $2 \cdot 10^6$  дальтон), следует полагать, что частица м-НПК содержит около 30—40 субъединиц белка ВТМ (мол. вес. 17 000 дальтон). Выше отмечалось, что при инициации реконструкции белок ВТМ взаимодействует с 5'-концевым участком вирусной РНК. Известно, что в процесс реконструкции вовлекается белок, предварительно агрегированный до состояния 20S-агрегата (дисковидная структура, построенная примерно из 34 субъединиц) (<sup>1</sup>). Рассмотренные выше результаты позволяют предполагать, что частица м-НПК образуется в результате взаимодействия индивидуального преформированного диска с молекулой РНК ВТМ, т. е. представляет собой НПК, инициирующий процесс реконструкции.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
22 VIII 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> P. J. G. Butler, A. Klug, Nature, New Biol., 229, 42 (1971). <sup>2</sup> В. Г. Джавахия, Н. П. Родионова, И. Г. Атабеков, Реф. докл. Конфер. ЛБХ МГУ, Декабрь 1970, 1971, стр. 127. <sup>3</sup> H. Guille, C. Stussi, L. Hirth, C. R., 272, 4181 (1971). <sup>4</sup> J. C. Thouvenel, H. Guille et al., FEBS Letters, 16, 204 (1971). <sup>5</sup> T. Ohno, Y. Nozu, Y. Okada, Virology, 44, 510 (1971). <sup>6</sup> N. P. Rodionova, N. E. Vesennina et al., Virology, 46, 183 (1971). <sup>7</sup> N. P. Rodionova, N. E. Vesennina et al., Virology, in press. <sup>8</sup> C. Stussi, G. Lebeurier, L. Hirth, Virology, 38, 16 (1969). <sup>9</sup> И. Г. Атабеков, Исследование свойств и функций структурного белка вирусов растений, Докторская диссертация, МГУ, 1970. <sup>10</sup> И. Г. Атабеков, Реализация генетической информации вирусных РНК, «Наука», 1972.