

Т. Г. СЕНКЕВИЧ, И. М. ЧУМАКОВ, Г. Ю. ЛИПСКАЯ, В. И. АГОЛ
**ОЛИГОМЕРЫ РЕПЛИКАТИВНОЙ ФОРМЫ РНК ВИРУСА
ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 25 XII 1973)

По ходу наших исследований репликативной формы (р.ф.) РНК вируса энцефаломиокардита мы обратили внимание на то, что при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы очищенные препараты р.ф. РНК дают явно асимметричный пик с тяжелым плечом. Эта асимметрия могла быть обусловлена наличием кольцевых молекул^(1, 2) или каких-либо других, новых форм двуспиральной вирус-специфической РНК. В связи с этим была предпринята попытка выделить и идентифицировать быстро седиментирующий компонент р.ф. РНК. В настоящем сообщении описано выделение двуспиральных молекул р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита, длина которых в два раза превышает длину мономерных молекул.

Клетки асцитной карциномы Кребс-II заражали вирусом энцефаломиокардита, через 1,5 часа инкубации к суспензии зараженных клеток добавляли аурантин (5 мкг/мл). Н³-уридин (14,2 С/ммоль) вносили в клеточную суспензию равными порциями по 1,6 мкС/мл через 2, 3 и 4 часа после заражения. Через 5 час. после заражения клетки осаждали центрифугированием и замораживали. До стадии получения фракции, растворимой в 2M LiCl выделение р.ф. РНК проводили так, как описано ранее⁽²⁾. Далее р.ф. РНК очищали путем хроматографии на колонке с целлюлозой⁽³⁾ и обрабатывали свободной от РНКазы ДНКазой (20 мкг/мл, 20 мин., 25°) в присутствии 10⁻³ M MgCl₂. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 10⁻² M и додецилсульфата натрия до концентрации 1%. Далее препарат р.ф. РНК подвергали центрифугированию в градиенте концентраций сахарозы (15–30%) при 24 000 об/мин 20 час. при 20°. В аликвотах полученных фракций определяли радиоактивность.

Полученный в результате такой процедуры пик радиоактивности выявлял явную асимметрию (рис. 1а). Фракции, соответствующие тяжелому плечу этого пика, были объединены, переосаждены спиртом и подвергнуты повторному центрифугированию в градиенте концентраций сахарозы. Распределение радиоактивности на этой стадии изменилось не очень существенно (рис. 1б). Материал из тяжелого плеча был вновь объединен, переосажден этанолом и подвергнут дополнительной очистке путем равновесного центрифугирования в градиенте плотности сульфата цезия. Основную часть материала, имеющую плавучую плотность около 1,63 г/см³, освобождали от Cs₂SO₄ путем пропускания через колонку с сефадексом G-25; РНК концентрировали на колонке с целлюлозой, осаждали спиртом и подвергали третьему центрифугированию в градиенте концентраций сахарозы. Полученные результаты (рис. 1в) показывают, что на этой стадии препарат содержит два основных компонента: большая часть материала осаждается с обычной для р.ф. РНК скоростью, но кроме того имеется отчетливый быстро седиментирующий пик. Материал, соответствующий этому пику, после переосаждения был подвергнут электронно-микроскопическому исследованию и центрифугированию в гра-

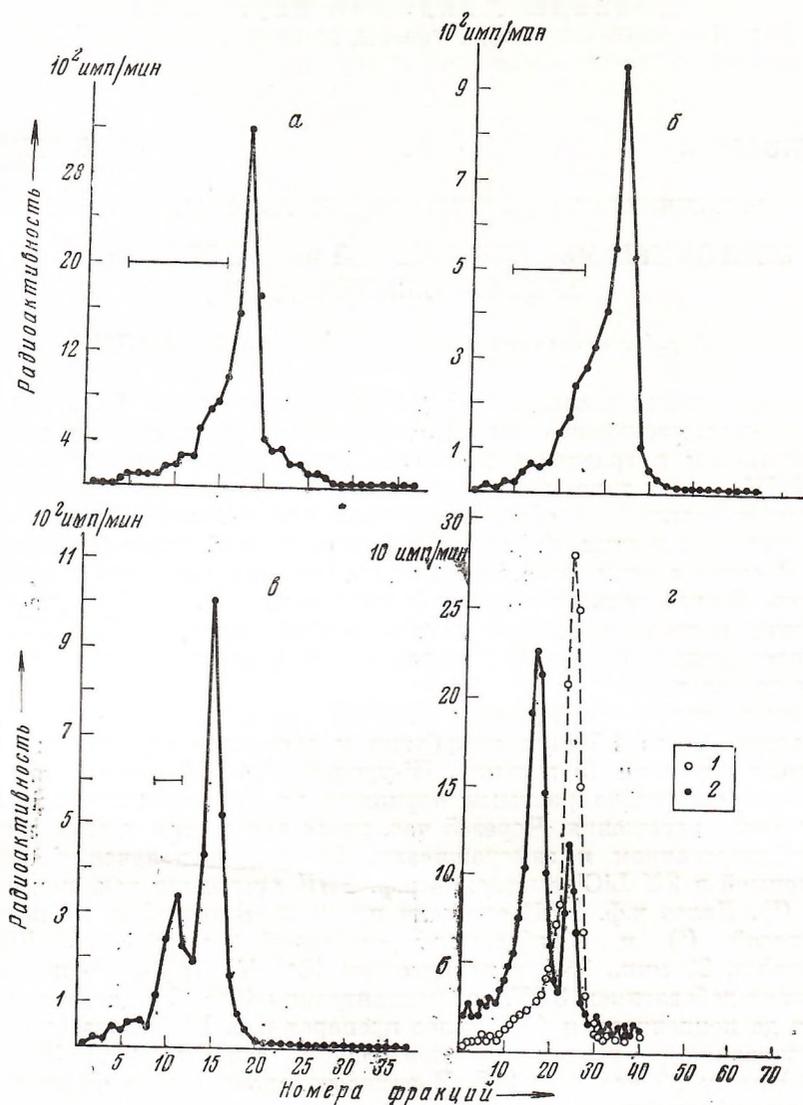


Рис. 1. Выделение быстро оседляющего компонента р.ф. РНК путем повторных центрифугирований. Отрезком прямой линии отмечены фракции, которые были собраны и далее подвергнуты повторному центрифугированию. *a* — профиль седиментации исходного препарата р.ф. РНК; *б* — профиль седиментации радиоактивного материала из фракций 5–15 сахарозного градиента, представленного на рис. 1*а*; *в* — из фракций 5–15 сахарозного градиента, представленного на рис. 1*б* (материал предварительно был очищен путем равновесного центрифугирования в градиенте плотности Cs_2SO_4); *г* — из фракций 9–11 сахарозного градиента, представленного на рис. 1*в*. Радиоактивность во фракциях 41–63 не определяли. В качестве маркера использовался нефракционированный препарат р.ф. РНК, меченной C^{14} . 1 — H^3 -радиоактивность, 2 — C^{14} -радиоактивность

диенте концентраций сахарозы в четвертый раз; в ту же пробирку в качестве маркера была добавлена нефракционированная C^{14} -р.ф. РНК. Как видно из рис. 1*г*, основная часть меченного тритием материала выявляется в быстро оседляющем пике; второй меньший пик осаждается со скоростью маркерной C^{14} -р.ф. РНК. Сравнение скоростей седиментации двух пиков H^3 -р.ф. РНК позволяет приблизительно оценить коэффициент седиментации тяжелого компонента. Если принять коэффициент седиментации легкого компонента равным 20 S, то тяжелый компонент осаждается со скоростью около 24 S.

Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили в основном по методу (4). 5 мкл раствора, содержащего 0,5 М ацетат аммония, $8 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА, рН 7,5 100 мкг/мл цитохрома и 0,5 мкг/мл РНК, наносили на поверхность 0,25 М ацетата аммония, рН 7,5. Далее пленку обрабатывали, как описано ранее (2). Молекулы фотографировали на микроскопе Хитачи HS-7 при увеличениях от 13 000 до 32 000 раз. В качестве стандарта длины при определении увеличения использовали шарики из полистиролового латекса диаметром 0,500 мкм (Dow Latex LS-1029E). Длину молекул измеряли курвиметром при общем увеличении около 200 000 раз.

Всего была измерена 101 молекула. Распределение этих молекул по длинам представлено на гистограмме (рис. 2). Молекулы группируются в три дискретные группы, содержащие соответственно 34, 66 и 1 молекулу. Все молекулы, за исключением одной из первой группы, являются линейными. Средняя длина молекул первой группы равна $1,90 \pm 0,14$ мкм, длина молекул второй группы $3,77 \pm 0,22$ мкм, длина молекул третьей группы 5,86 мкм. Отношение средней длины молекул второй группы к средней длине молекул первой группы равно 1,93, а отношение длины молекулы из третьей группы к средней длине молекул первой группы равно 3,08.

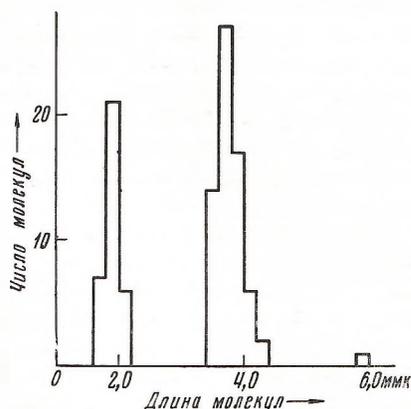


Рис. 2. Гистограмма распределения по длинам молекул тяжелого компонента р.ф. РНК. Материал взят из фракций 9—11 сахарозного градиента, представленного на рис. 1, в

Результаты измерений длин молекул первой группы, которые, учитывая результаты седиментационного анализа (рис. 1а), представляют собой, по-видимому, примесь обычных молекул р.ф. РНК в препарате тяжелого компонента, расходятся с ранее опубликованными нами данными о длине молекул р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита (2). Это расхождение обусловлено некоторыми отличиями в методике приготовления препаратов для электронной микроскопии. Действительно, специальная проверка показала, что молекулы р.ф. РНК в одном из нефракционированных препаратов, приготовленном для электронной микроскопии по капельной методике (2), имели длину $2,44 \pm 0,21$ мкм, а молекулы из того же препарата, но приготовленного по методике, использованной в настоящей работе, имели длину $1,96 \pm 0,23$ мкм.

Хотя окончательная идентификация быстро седиментирующего материала еще не проведена, такие его свойства, как синтез в присутствии аурантина, хроматографическое поведение на целлюлозе, плавающая плотность в Cs_2SO_4 и удвоенная длина по сравнению с обычными молекулами р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита, позволяют полагать, что молекулы второй группы являются димерами двуспиральной вирус-специфической РНК. Молекула с длиной 5,86 мкм является, по-видимому, примером той же РНК (длина этой молекулы близка к длине митохондриальной ДНК (5), но характер проведенной очистки — двукратная хроматография на целлюлозе, обработка ДНКазой, центрифугирование в Cs_2SO_4 — делает предположение о возможности загрязнения нашего препарата митохондриальной ДНК весьма мало вероятным).

Существенный вопрос заключается в том, не являются ли димеры просто агрегатами р.ф. РНК. Тривиальная неспецифическая агрегация кажется мало вероятной, поскольку эти молекулы выдерживают многократные переосаждения и фракционирования. Скорее можно было бы думать о специфической агрегации, обусловленной наличием у молекул

р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита одноцепочечных комплементарных («липких») концов, подобных тем, которые были обнаружены у р.ф. РНК другого пикорнавируса — вируса полиомиелита (⁶). Хотя такая возможность не исключена, наши предварительные опыты говорят против такого объяснения: при денатурирующих условиях (обработка диметилсульфоксидом), которые должны были бы разъединять молекулы, нековалентно соединенные «липкими концами», димеры сохраняются. Поэтому можно полагать, что мономеры, входящие в состав димера, соединены между собой достаточно прочными связями. Для расшифровки структуры димеров р.ф. РНК важно было бы выяснить, образуются ли после их денатурации димерные одноцепочечные РНК. К сожалению, постановке соответствующего опыта мешают поперечные межцепочечные сшивки в препаратах р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита (²).

Наибольший интерес, разумеется, представляет вопрос о том, какое место занимают олигомеры в механизме репликации вирусной РНК. Можно предположить, что олигомеры — промежуточные продукты, возникающие при функционировании «вращающегося кольца» (⁷, ⁸) или же они образуются в результате рекомбинации; однако эти предположения требуют экспериментального подтверждения. Несколько неожиданным является отсутствие или очень низкое содержание кольцевых молекул в быстро седиментирующем компоненте р.ф. РНК, поскольку такие молекулы должны иметь более высокий коэффициент седиментации, чем линейные молекулы. Одно из объяснений может заключаться в том, что кольцевые молекулы либо были удалены, либо деградировали при многоступенчатой очистке олигомеров.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 XI 1973

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. I. Agol, Yu. F. Drygin et al., *Febs Letters*, v. 8, 13 (1970). ² V. I. Agol, L. I. Romanova et al., *J. Mol. Biol.*, v. 72, 77 (1972). ³ R. M. Franklin, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 55, 1504 (1966). ⁴ R. V. Davis, M. Simon, N. Davidson, In: *Methods in Enzymology, Nucleic Acids*, v. 21, Part D, N. Y.—London, 1971, p. 413. ⁵ R. Radloff, V. Bauer, J. Vinograd, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 57, 1514 (1967). ⁶ Y. Yogo, E. Wimmer, *Nature New Biology*, v. 242, 171 (1973). ⁷ F. Brown, S. Martin, *Nature*, v. 208, 861 (1965). ⁸ W. Gilbert, D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 33, 473 (1968).