

В. И. НЕГРУК, В. К. НОВИКОВ, И. Г. АТАБЕКОВ

**ТРАНСЛЯЦИЯ РНК ВИРУСА ШТРИХОВОЙ МОЗАИКИ
ЯЧМЕНЯ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ
ИЗ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ***(Представлено академиком А. С. Спириным 14 VI 1974)*

За последние годы стали понятны основные детали процесса трансляции природных полицистронных информационных РНК (мРНК). Значительная часть информации в этой области была получена благодаря возможности применения вирусных мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе из бактериальных клеток и клеток животных. К сожалению, до последнего времени мы знаем очень немного о принципах регуляции трансляции полицистронных вирусных мРНК в клетках растений. Некоторые успехи в этом направлении были достигнуты недавно благодаря разработке бесклеточной белоксинтезирующей системы из клеток зародышей пшеницы (^{1, 2}), способной эффективно транслировать вирионные РНК некоторых вирусов растений. Так, в присутствии РНК вируса-сателлита вируса некроза табака (ВСНТ) *in vitro* был синтезирован структурный белок этого вируса (^{3, 4}). РНК ВСНТ, по-видимому, содержит генетическую информацию только для структурного белка, т. е. является моноцистронной (³).

Интересные результаты были получены при трансляции *in vitro* РНК вируса мозаики костра безостого (ВМК). Геном этого вируса находится в фрагментированном состоянии в природных условиях (⁵). Генетическая информация ВМК распределена между тремя основными и одним дополнительным фрагментами РНК. Последний, самый короткий, фрагмент (мол. вес $280 \cdot 10^3$) содержит ген структурного белка и представляет собой моноцистронную мРНК. При трансляции этой РНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы синтезируется структурный белок ВМК (⁶). Другой, более крупный, фрагмент (мол. вес $750 \cdot 10^3$) генома ВМК функционирует, по-видимому, в качестве полицистронной мРНК. При трансляции этого фрагмента *in vitro* образуется минимум три разных типа полипептидных цепей, выявляемых электрофорезом в полиакриламидном геле (⁶). Интересно, что ген структурного белка содержится в обоих упомянутых фрагментах РНК ВМК, причем функциональное назначение этого дублирования генов не вполне понятно.

При исследовании трансляции РНК ВТМ в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы были получены несколько противоречивые результаты (^{7, 8}), не позволяющие утверждать, что среди продуктов трансляции присутствует полноценный структурный белок ВТМ.

Вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) относится к группе папочковидных вирусов со спиральной симметрией и содержит 4% РНК (⁹). В структурном белке ВШМЯ отсутствуют серусодержащие аминокислоты (¹⁰). Р-штамм ВШМЯ способен реплицироваться в клетках зародышей пшеницы и передаваться через семена (⁹), т. е. бесклеточная белоксинтезирующая система из зародышей пшеницы является «гомологичной» по отношению к РНК Р-штамма ВШМЯ. Геном разных штаммов ВШМЯ существует в природных условиях в виде набора из двух-четырех фрагментов (¹¹). В настоящей работе представлены результаты, полученные при исследовании продуктов трансляции тотального препарата РНК Р-ВШМЯ в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы.

Зародыши выделяли с применением стандартной процедуры (¹²) из семян озимой пшеницы сорта Мироновская 809. Фракция S-23 выделялась

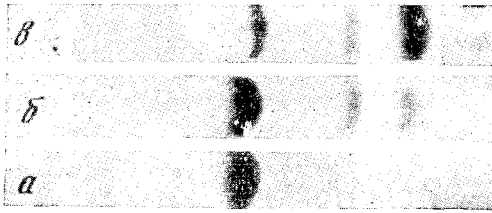


Рис. 1. Фотографии электрофореграмм структурного белка ВШМЯ, полученного при обработке ВШМЯ ДДС (а); свежевыделенного структурного белка ВШМЯ, полученного солевым методом (б) и структурного белка ВШМЯ, полученного солевым методом после двухнедельного хранения при 0° (в)

методом, описанным в (1), с незначительными модификациями. Бесклеточная белоксинтезирующая система содержала в 0,25 мл: 25 ммоль трис-ацетатного буфера, рН 8,0; 50 ммоль КСl; 3,6 ммоль ацетата магния; 2 ммоль дитиотриэтола; 1 ммоль АТФ; 0,2 ммоль ГТФ; 4 ммоль фосфоэнолпирувата, 16 мкг пируваткиназы; 12 мкг РНК ВШМЯ; 0,12 мл S-23; смесь 11 Н³ аминокислот (по 3,3 мкС с удельной радиоактивностью 1 С/ммоль каждая) и смесь остальных аминокислот немеченых (по 0,1 ммоль).

Инкубацию проводили в течение 45 мин. при 30°. После инкубации к смеси добавляли мочевины до конечной концентрации 6 М, гидролизат казеина до 1% и меркаптоэтанол до 0,5%. Полученную смесь оставляли на 30 мин. при комнатной температуре, после чего добавляли к ней додецилсульфат натрия (ДДС) до 1% и инкубировали в течение 5 мин. при 60°. Обработанную таким образом смесь диализовали 24 часа против 0,01 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,1, содержащего 0,1% ДДС и 0,1% меркаптоэтанол. Затем

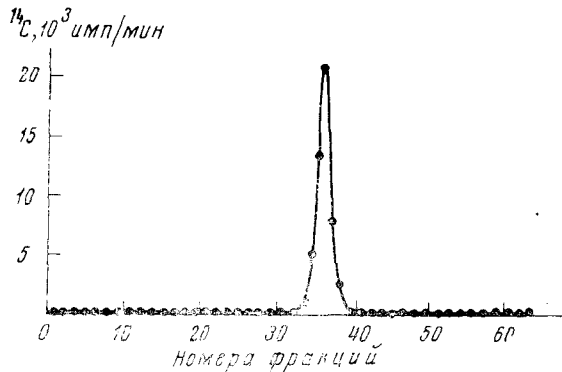


Рис. 2. Распределение радиоактивности при электрофореze структурного ¹⁴C-белка ВШМЯ в полиакриламидном геле (препарат получен, как в случае рис. 1а)

продукты трансляции фракционировались методом электрофореze в полиакриламидном геле (при концентрации геля 10%) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,1, в присутствии 0,1% ДДС с добавлением бромфенолового синего в качестве маркера. После окончания электрофореze исследовались продукты, электрофоретически менее подвижные, чем краситель. Гели извлекали из трубочек, замораживали в смеси спирта и сухого льда и разрезали на диски толщиной 1,1 мм. Диски помещали в 0,5 мл 0,3% ДДС и добавляли 10 мл сцинтилляционной смеси, содержавшей диоксан, ППО, ПОПОП, нафталин и этиловый спирт. Радиоактивность определялась в жидкостных сцинтилляционных счетчиках «Mark I» и «Mark II».

Для препаративного выделения очищенного ВШМЯ и приготовления антисыворотки к ВШМЯ (АсВШМЯ) применялись методы, описанные ранее (10). Меченый ¹⁴C-ВШМЯ получали из растений, зараженных ВШМЯ и выращиваемых в атмосфере, содержащей ¹⁴CO₂ (13). Удельная радиоактивность препарата ¹⁴C-ВШМЯ составляла 5000 имп/мин/мкг.

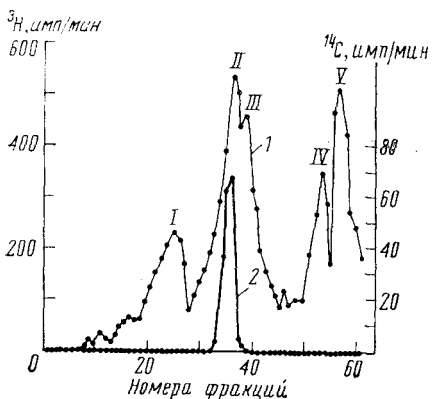


Рис. 3

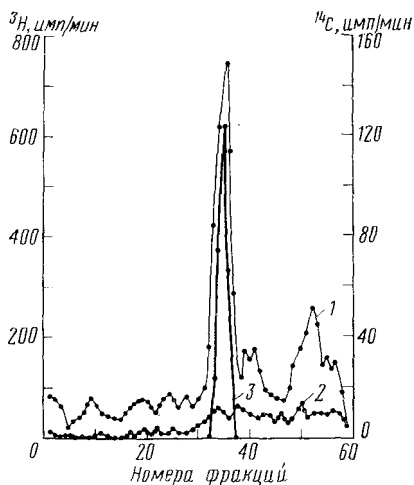


Рис. 4

Рис. 3. Распределение радиоактивности при электрофорезе в полиакриламидном геле. 1 — ^3H -продукты трансляции РНК ВШМЯ в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, 2 — препарат структурного ^{14}C -белка ВШМЯ (маркер). I–V — см. текст

Рис. 4. Электрофореграммы комплексов ^3H -продуктов трансляции РНК ВШМЯ с АсВШМЯ в присутствии немеченого белка ВШМЯ-носителя, диссоциированных 1% ДДС (1). В контроле ^3H -продукты трансляции РНК ВШМЯ инкубировали с АсВТМ в присутствии немеченого белка ВТМ-носителя и обрабатывали, как в предыдущем случае (2). В качестве маркера использовался структурный ^{14}C -белок ВШМЯ (3)

Непосредственно перед проведением электрофореза в полиакриламидном геле препарат ^{14}C -ВШМЯ обрабатывали 1% ДДС и прогревали 5 мин. при 60° . В присутствии 1% ДДС происходит полная диссоциация белка ВШМЯ до элементарных субъединиц (10). Полученный таким образом препарат использовали в качестве маркера белка ВШМЯ при электрофорезе в полиакриламидном геле. Из рис. 1 а и рис. 2 видно, что белок ВШМЯ образует в этих условиях только одну зону, что свидетельствует о присутствии одного типа белковых субъединиц в составе вирусных частиц. Следует заметить, что в препаратах белка ВШМЯ, хранившихся в растворе в течение некоторого времени после его выделения из вируса, присутствуют дополнительные компоненты, превышающие по своей электрофоретической подвижности исходный нативный белок ВШМЯ (рис. 1б, в). Эти компоненты не удается обнаружить при анализе продуктов деградации ВШМЯ в 1% ДДС (рис. 1а), однако они могут появляться в процессе выделения белка ВШМЯ при пользовании ацетатным или солевым (10) методами, и количество этих компонентов прогрессивно нарастает в процессе хранения белка в растворе в отсутствие детергента (рис. 1б, в). Вероятно, эти компоненты являются продуктами протеолитической деградации белка ВШМЯ с участием протеиназ, балластирующих вирусный препарат. Возможность протеолитической деградации вновь синтезируемых *in vitro* молекул структурного белка ВШМЯ следует принимать во внимание при анализе вирус-специфических белков — продуктов трансляции РНК ВШМЯ в бесклеточной системе.

На рис. 3 представлены результаты, полученные при фракционировании методом электрофореза в полиакриламидном геле ^3H -продуктов трансляции РНК ВШМЯ в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Обнаружено пять основных типов полипептидных цепей с величиной молекулярного веса порядка $40 \cdot 10^3$ (I), $26 \cdot 10^3$ (II), $23 \cdot 10^3$ (III), $12 \cdot 10^3$ (IV) и $10 \cdot 10^3$ (V) дальтон. Из рис. 3 следует, что компонент II соответствует по своей электрофоретической подвижности природному ^{14}C -маркеру — структурному белку ВШМЯ.

Следует заметить, что величина молекулярного веса структурного белка ВШМЯ, определенная ранее с помощью гидродинамических методов (¹⁰, ¹⁴), составляла $22 \cdot 10^3$ и $21,5 \cdot 10^3$. Если принять во внимание отмечающуюся возможность деградации полипептидной цепи структурного белка ВШМЯ после или (и) в процессе его препаративного выделения, эта величина должна являться усредненной, и, вероятно, она несколько занижена по сравнению с истинной величиной молекулярного веса нативного недеградировавшего белка ВШМЯ (около $26 \cdot 10^3$).

Представленные выше результаты позволяют предполагать, что полипептид II, выявленный при анализе продуктов трансляции РНК ВШМЯ *in vitro*, идентичен структурному белку ВШМЯ. Дополнительные доказательства возможности специфической трансляции РНК ВШМЯ с образованием нативного вирусного белка были получены постановкой серологического теста. После окончания инкубации к инкубационной смеси добавляли антисыворотку к ВШМЯ и немеченый структурный белок ВШМЯ в качестве носителя. Антиген и антитела добавлялись в эквивалентном количестве. Контролем служила инкубационная смесь, в которую добавлялись антисыворотка к ВТМ и белок ВТМ (также в эквивалентных количествах). Смесь выдерживали в течение ночи при 4° и центрифугировали при 25 000 *g* в течение 20 мин. Осадок суспендировали в 0,1 *M* натрий-фосфатном буфере, pH 7,1, и повторно центрифугировали при том же режиме. Полученный таким образом осадок суспендировали в растворе 1% ДДС, содержащем 0,5% меркаптоэтанола, прогревали 5 мин. при 60° и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле. Результаты представлены на рис. 4, из которого следует, что основным компонентом инкубационной смеси, способным формировать специфический преципитат с антисывороткой к ВШМЯ, является полипептид II.

Из рис. 4 можно заключить, что полипептид IV, синтезируемый *in vitro*, также способен реагировать с АсВШМЯ. Не исключено, что этот полипептид представляет собой недостроенный до конца или частично деградированный *in vitro* структурный белок ВШМЯ. Отметим, что препараты природного белка ВШМЯ, хранившиеся в течение 2 недель в растворе и содержавшие значительное количество продуктов деградации, активно реагировали с АсВШМЯ, т. е. деградация вирусного белка не сопровождалась полной утратой его антигенной специфичности.

Таким образом, полипептид II, синтезируемый *in vitro* в присутствии РНК ВШМЯ, идентичен природному структурному белку ВШМЯ по электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле в присутствии ДДС (т. е. по величине молекулярного веса) и сходен с ним по своим антигенным свойствам. В настоящее время ведется работа с целью окончательной идентификации остальных продуктов трансляции РНК ВШМЯ

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VI 1974

Почвенный институт им. В. В. Докучаева
Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук
им. В. И. Ленина
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Marcus, B. Luginbill, J. Feeley, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 59, 1243 (1968).
- ² D. P. Weeks, A. Marcus, Biochim. et biophys. acta, v. 232, 671 (1971).
- ³ W. H. Klein, C. Nolan et al., Biochemistry, v. 11, 2009 (1972).
- ⁴ R. E. Lundquist, J. M. Lazar et al., Biochemistry, v. 11, 2014 (1972).
- ⁵ L. C. Lane, P. Kaesberg, Nature, v. 232, 40 (1971).
- ⁶ D. S. Shih, P. Kaesberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 1799 (1973).
- ⁷ D. Efron, A. Marcus, Virology, v. 53, 343 (1973).
- ⁸ B. E. Roberts, M. B. Mathews, C. Bruton, J. Mol. Biol., v. 80, 733 (1973).
- ⁹ J. G. Atabekov, V. K. Novikov, Descriptions of Plant Viruses, № 68, S.M.I./A.A.B. (1971).
- ¹⁰ J. G. Atabekov, V. K. Novikov et al., Virology, v. 36, 620 (1968).
- ¹¹ A. O. Jackson, M. K. Brakke, Virology, v. 55, 483 (1973).
- ¹² F. B. Johnston, H. Stern, Nature, v. 129, 160 (1957).
- ¹³ N. P. Rodionova, N. E. Vesenina et al., Virology, v. 46, 183 (1971).
- ¹⁴ Н. А. Киселев, И. Г. Атабеков и др., Биохимия, т. 31, 670 (1966).