

# Сравнительный анализ иммунологически значимой С-концевой последовательности капсидных белков двух новых штаммов ВТМ

С. А. Степанюк

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
252017, Киев, ул. Владимирская, 64

---

*Из растений, произрастающих в районах с плотностью загрязнения по  $^{137}\text{Cs}$  12,6 Ки/км<sup>2</sup> (Житомирская область, с. Народичи) и 11 Ки/км<sup>2</sup> (Киевская область, Пуца-Водица), были выделены два новых штамма ВТМ, получены рекомбинантные плазмиды pTVM7.5 и pTVM9.5, включающие кДНК для С-концевой последовательности капсидных белков. По анализу нуклеотидной последовательности обнаружены аминокислотные замены, предположительно не влияющие на иммунологическую специфичность исследуемых капсидных белков.*

---

**Введение.** Для мониторинга загрязненных зон Украины все более важное значение приобретает проблема минимальных и пороговых доз радиоактивного облучения [1]. Одним из аспектов этой проблемы является стимулирующее влияние низкоэнергетических доз облучения на физиологические и биохимические процессы в целых растениях. Однако на уровне растительной клетки природа активации этих процессов изучена недостаточно отчетливо [1, 2].

Вирус табачной мозаики (ВТМ) растений, особенно таких важных в сельскохозяйственном отношении, как томат и табак, является классическим объектом вирусологических исследований. Как модельная система ВТМ обладает рядом ценных в молекулярно-генетическом и биохимическом плане качеств. Можно отметить, с одной стороны, его зависимость от метаболических процессов клетки растения-хозяина, с другой, — его автономность как независимой генетической системы, не интегрирующей, в отличие от многих вирусов животных, с геномом растения [3].

Штаммы ВТМ, выделенные из разных видов растений, в большей степени отличаются друг от друга по нуклеотидной последовательности, чем искусственно получаемые с помощью химических агентов (азотистая кислота) РНК-мутанты ВТМ.

Так, нуклеотидная последовательность гена структурного белка ВТМ отличается от таковой далемского (томатного) штамма по 18 % нуклеотидов и от последовательности штамма U2 — по 26 % нуклеотидов; в свою очередь, различие между далемским штаммом и штаммом U2 составляет 30 % и все три указанных штамма отличаются от штамма, выделенного из подорожника, по 53—56 % нуклеотидных последовательностей [3].

По данным авторов работы [3], в РНК этих четырех штаммов менее вариabельными являются положения, соответствующие участкам 87—94 и 113—122 структурного белка ВТМ и приходящиеся на его С-конец. Изменения в первичной структуре капсидного белка ВТМ приводят к изменению некоторых его физико-химических свойств, например, электрофоретической подвижности, точки температурной активации и иммунологических свойств. Все это позволяет использовать ВТМ в качестве своеобразной тест-системы физиологического состояния растения на клеточном уровне с точки зрения происходящих в нем изменений трансляционных процессов. Одним из факторов, влияющих на эти процессы, может быть изменение радиологической обстановки в районе произрастания растения-хозяина, обусловленное антропогенным воздействием.

Целью данной работы было получение изолятов ВТМ из растений табака и томата, произра-

ставших в районе радиологического загрязнения, с последующим анализом С-концевой последовательности их капсидных белков.

**Материалы и методы.** Вирусный материал отбирали из растений табака и томата, имевших по габитусу слабые симптомы мозаики в условиях темно-серой оподзоленной почвы из с. Народичи Житомирской области с уровнем загрязнения 12,6 Ки/км<sup>2</sup> по <sup>137</sup>Cs (табачный) и Пущи-Водицы Киевской области (11 Ки/км<sup>2</sup>) (томатный).

Для отбора чистой линии вирусов использовали растения-индикаторы *Datura stramonium* и *Nicotiana glutinosa*. После нескольких раундов пассирования через единичные некрозы вирус выделяли из системно пораженных растений табака и томата, инфицированных одиночным пассированным некрозом.

0,1 кг листьев, хранившихся при температуре -20 °С, быстро гомогенизировали в фосфатном буфере, согласно [4]. В дальнейшем очистку проводили с модификацией по [5], применяя осаждение ПЭГ-6000/NaCl (4 %/0,1 М) с последующим ультрацентрифугированием. DS-Na-ПААГ-электрофорез осуществляли по Лэммли [6]. Для определения количества белка по методу Лоури [7] использовали спектрофотометр фирмы «PalUicam» (Англия). Трипсинизацию и иммуоблот-анализ пептидов белка оболочки изолятов осуществляли по методике Зальцман и Мосс [4], используя ранее полученную антисыворотку к типичному (U1) и далемскому штаммам ВТМ. РНК-изоляты выделяли фенольным методом по Маниатису [8].

Поли(А)-РНК для клонирования получали согласно [8], используя 50 ед. поли(А)-полимеразы («Pharmacia», Швеция). Реакцию вели в течение 2 ч при 37 °С в следующих условиях: 50 мМ трис-НCl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ дитиотреитол, 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ АТР, 300 мМ NaCl (100 мкл).

Двухцепочечную кДНК синтезировали, как описано в [9]. При клонировании фрагментов геномной кДНК применяли синтетические (*Pst*I) олигонуклеотиды-адапторы производства «Boehringer Mannheim» (Германия).

Гибридизационный анализ рекомбинантных клонов, фиксированных на нейлоновых («Хийу Калур», Эстония) фильтрах с размером пор 0,45 мкм, осуществляли согласно Маниатису [8], используя имеющуюся полногеномную кДНК-конструкцию стандартного штамма ВТМ.

Секвенирование ДНК проводили по Сенгеру [10], применяя стандартный набор производства «Ферментас» (Вильнюс) и меченный [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP («Amersham», Англия).

**Результаты и обсуждение.** Коэффициент экстинкции томатного и табачного вирусных препаратов с учетом светорассеяния составил  $E_{260} = 2,0$  и 2,3;  $A_{260/280} = 1,24$  и 1,26 соответственно [11—13]. По результатам ПААГ-электрофореза в треках с образцами заметна одна гомогенная полоса вирусного белка, что свидетельствует о высокой степени чистоты препаратов. Молекулярную массу для белка оболочки можно принять равной 19,5 кДа для табачного (TVM NT9) и 19 кДа для томатного (TVM LE7) вирусных изолятов.

В обоих случаях наблюдается явление «утяжеления» молекулярной массы белка исследуемых вирусных изолятов по сравнению со стандартным U1 штаммом.

В перекрестных иммунологических реакциях с использованием контрольной антисыворотки к ВТМ дикого штамма и антисывороток к выделенным вирусным образцам методом иммунодиффузии в сочетании с электрофорезом в ПААГ трипсиновых переваров белка оболочки табачного и томатного изолятов было обнаружено отсутствие четкой полосы преципитации, характерной для низкомолекулярных С-концевых фрагментов.

Все это послужило основанием для более детального исследования нуклеотидной последовательности вирусной НК (РНК или кДНК), ответственной за синтез С-концевого участка белка оболочки. Для этого были созданы рекомбинантные плазмиды *pTVM9.5* («табачная») и *pTVM7.5* («томатная»), полученные субклонированием определенного фрагмента (кодирующего капсидный белок) соответственно из плазмид *pTVM9* и *pTVM7*, содержащих полногеномные кДНК исследуемых вирусных изолятов.

По результатам секвенирования были обнаружены значащие нуклеотидные замены. В случае TVM NT9 в триplete GTA (гуанин — тимин — аденин) для кДНК (гуанин — урацил — аденин: для участка РНК) гуанин меняется на цитозин; в триplete TCT для кДНК (UCU для участка РНК) цитозин меняется на аденин. Для TVM LE7 характерна замена тимина на аденин (для кДНК) либо урацила на аденин (для участка РНК) в триplete кДНК TCT (либо в триplete UCU — РНК). На основании вышеизложенного вполне вероятно изменения и в первичной структуре С-концевого участка белка капсида. Исходя из этого, а также учитывая другие отличительные признаки (реакция растений-индикаторов, электрофоретическая подвижность и т. п.), эти изоляты были классифицированы как новые штаммы — табачный TVM NT9 и томатный TVM LE7 [12, 13]. Известно, что в белке оболочки ВТМ имеются инвариантные

аминокислоты, одинаковые во всех многочисленных штаммах и жизнеспособных мутантах ВТМ.

Оказывается, что основная часть этих инвариантных участков приходится на так называемые LR- и RR-спирали белка, причем именно на те их участки, которые, вероятно, взаимодействуют с РНК. Инвариантными являются, например, остатки 90 и 92 аргинина в RR-спирали [14].

С другой стороны, помимо конформационной, свою роль может играть и иммунологическая детерминированность аминокислотной последовательности. В белке локализованы семь эпитопов в районе остатков 1—10, 34—39, 55—61, 62—88, 80—90, 108—112, 153—158. N- и C-концевые участки белка расположены на поверхности молекулы и соответствуют линейным антигенным детерминантам [14]. В обнаруженных нами заменах для секвенированных последовательностей две несут консервативный характер (валин замещается лейцином и серин тирозином соответственно в положениях 130 и 148 капсидного белка TVM NT9); одна относится к неконсервативным (серин заменен на треонин в положении 148 для TVM LE7) [15]. В обоих случаях ни одна из замен не совпадает ни с одним из вышеприведенных конформационных и иммунологических эпитопов капсидного белка ВТМ, что можно объяснить опосредованным влиянием специфических экологических условий произрастания инфицированных растений на вирусный геном исследованных изолятов.

С. А. Степанюк

*Порівняльний аналіз імунологічно важливої С-кінцевої послідовності капсидних білків двох нових штамів ВТМ*

Резюме

Із рослин з районів радіологічного забруднення по  $^{137}\text{Cs}$  12,6 Кі/км<sup>2</sup> (Житомирська обл.) і 11 Кі/км<sup>2</sup> (Пуца-Водиця Київської обл.) виділено два нових штами ВТМ — TVM NT9 та TVM LE7, для яких отримано рекомбінантні плазмідні рТVM7.5 і рТVM9.5, що містять кДНК для С-кінцевої послідовності капсидного білка. Аналіз нуклеотидної послідовності виявив амінокислотні заміни, які, скоріш за все, не впливають на імунологічну специфічність капсидних білків ізолятів.

S. A. Stepanyuk

*Comparative analysis of immunospecific C-terminus region of capsid proteins from two new TVM strains*

Summary

Two strains of TVM — TVM NT9 and TVM LE7 have been isolated from plants in regions with  $^{137}\text{Cs}$  nuclear contamination on

apparently 12.6 and 11 Ci/km<sup>2</sup>. Recombinant plasmids (pTVM9, pTVM9.5, pTVM7, pTVM7.5) containing cDNA of full genome and cDNA for C-end specific capsid protein region, correspond from each strain of isolated viruses, have been obtained. Sequencing analysis of capsid C-terminus cDNA of pTVM9.5 and pTVM7.5 revealed two conservative amino acid replacements at position 130, 148 for TVM NT9 strain and one nonconservative amino acid replacement at position 148 for TVM LE7 strain, which probably don't influence immunospecificity of isolated strains.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кузин А. М. О различии ведущих молекулярных механизмов при действии радиации на организм в больших и малых дозах // Изв. АН СССР.—1980.—№ 6.—С. 883—890.
2. Бойко А. Л. Экология вирусов растений.—К.: Вища школа, 1990.—167 с.
3. Sugiyama T., Korant B. D., Lonberg-Holm K. K. RNA virus gene expression and its control // Ann. Rev. Microbiol.—1972.—26.—Р. 457.
4. Методы вирусологии и молекулярной биологии.—М.: Мир, 1972.—480 с.
5. Noordam D. Identification of plant viruses. Methods and experiments /Ed. Noordam D.— Wageningen: Pudoc., 1973.—277 p.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—Р. 680—685.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Rondall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—Р. 265—261.
8. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование—М.: Мир, 1984.—479 с.
9. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы.—М.: Мир, 1988.—538 с.
10. Sanger F., Miklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—Р. 5463—5467.
11. Френкель-Конрад Х. Химия и биология вирусов.—М.: Мир, 1972.—460 с.
12. Бойко А. Л., Степанюк С. А., Гарифулин О. М. Секвенс кДНК С-концевой последовательности капсидного белка ВТМ-изолята томата из района радиологического загрязнения // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 101—106.
13. Бойко А. Л., Степанюк С. А., Гарифулин О. М. Получение и анализ provirusной кДНК для С-концевого фрагмента капсидного белка ВТМ из изолята растений табака, произрастающих в районе радиологического загрязнения Украины // Там же.—№ 6.—С. 112—115.
14. Радавский Ю. В. Антигенная структура капсидных белков вирусов растений и белковых антигенов *Bortetella pertussis*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1994.—32 с.
15. Dayhoff M. O., Schwartz R. M., Orcutt B. C. In Atlas of protein sequence and structure / Ed. M. O. Dayhoff.—New York: Natl. Biomed. Res. Found, 1979.—352 p.

УДК 578.828.11:577.212.3

Поступила в редакцию 29.10.96