

Получение и анализ провирусной кДНК для С-концевого фрагмента капсидного белка ВТМ из изолята растений табака, произраставших в районе радиологического загрязнения Украины

А. Л. Бойко*, С. А. Степанюк, О. М. Гарифулин¹

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

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Из растений, произрастающих в районе (Житомирская обл.) с плотностью загрязнения ^{137}Cs 12,6 Ки/км², выделены два идентичных изолята табачного штамма ВТМ, получены рекомбинантные плазмиды рТVM9 и рТVM9.5, включающие соответственно кДНК провируса одного из выделенных изолятов и его кДНК для С-концевой последовательности капсидного белка. По результатам анализа нуклеотидной последовательности обнаружена неконсервативная аминокислотная замена в положении 130 гомологичного участка белка стандартного штамма ВТМ.

Введение. Вопрос безопасного использования трансгенных растений, острота которого уже сейчас признается во всем мире, не может быть решен без детального молекулярно-генетического исследования поведения используемых природных вирусных и плазмидных векторов. Кроме того, обнаружение новых вирусных штаммов позволяет применять эти патогены как биологические индикаторы резкого изменения экологической ситуации, в том числе и загрязнений радиологического характера, а создание их рекомбинантных провирусных конструкций позволит выявлять родственные вирусы в растительной ткани при выбраковке зараженных растений с помощью гибридизационного анализа [1, 2].

Выяснить, возникают ли мутации в той или иной экологической нише с вирусом, способные привести к появлению неконтролируемых штаммов диких видов, перерастающих на культурах, можно только детальным исследованием биологических свойств конкретного изолята таких вирусов [2].

Целью данной работы было получение изолятов ВТМ из растений табака, произраставших в районе радиологического загрязнения, с последующим анализом С-концевой консервативной для капсидного белка нуклеотидной последовательности, являющейся иммунодоминантной областью.

Материалы и методы. Инфицированный материал отбирали из растений табака (*Nicotiana glutinosa*), имеющих по габитусу слабые симптомы

*Correspondence address.

мозаики в условиях темно-серой оподзоленной почвы из района Житомирской области с загрязнением 12,6 Ки/км² по ¹³⁷Cs. Для отбора чистой линии вирусов использовали растения-индикаторы *Datura stramonium* и *N. glutinosa*. После нескольких раундов пассирования через единичные некрозы вирус выделяли из системно пораженных растений табака, инфицированных одиночным пассированным некрозом.

0,1 кг листьев, хранившихся при -20 °С, быстро гомогенизировали в фосфатном буфере, согласно [3]. Очистку в дальнейшем проводили с модификацией по [4], применяя ПЭГ/NaCl-осаждение (4 %/0,1 М) с последующим ультрацентрифугированием. Ds-Na-ПААГ-электрофорез вели согласно Лэмбли [5]. Для определения количества белка по методу Лоури использовали спектрофотометр фирмы «PalUlicam» (Англия) [6]. Трипсинизацию и иммуноблот-анализ пептидов белка оболочки изолята осуществляли по методике Зальцман и Мосс [3], используя ранее полученную антисыворотку к стандартному штамму ВТМ. РНК изолятов выделяли фенольным методом по Маниатису [7].

Поли(А)-кДНК для клонирования получали, согласно [7], используя 500 ед. поли(А)-полимеразы («Promega», США). Реакцию вели в течение 2 ч при 37 °С в следующих условиях: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 15 мМ дитиотреитол, 5 мМ МпCl₂, 100 мМ KCl, 1 мМ АТР [7].

Двухцепочечную кДНК синтезировали, как описано в [8].

При клонировании фрагментов провирусной кДНК применяли синтетические олигонуклеотиды-адапторы (*Pst*I) производства «Boehringer Mannheim» (Германия).

Гибридизационный анализ рекомбинантных клонов, фиксированных на нейлоновых («Хийу Калур», Эстония) фильтрах с размером пор 0,45 мкм, проводили согласно Маниатису [7], используя имевшуюся провирусную кДНК-конструкцию стандартного штамма ВТМ.

Реакции сиквенса осуществляли по Сенгеру [9], применяя стандартный набор производства «Ферментас» (Вильнюс) и меченный ³⁵S изотоп производства «Amersham» (Англия).

Результаты и обсуждение. Коэффициент экстинкции вирусных препаратов с учетом светорассеяния составил $E_{260} = 2,3$; $A_{260/280} = 1,26$, что соответствует аналогичным параметрам, ранее определенным для РНК-вирионов [10]. По результатам ПААГ-электрофореза (данные не приведены) в треках с образцами заметна одна гомогенная полоса вирусного белка, что свидетельствует о довольно высокой степени чистоты препаратов. M_r для белка оболочки можно принять равным 18,5 кДа. С учетом 10 % отклонения она составит $18,5 \pm 1,9$ кДа по сравнению с 17,5 кДа для типичного штамма тобамовируса [10].

Для изолятов табака распределение иммуноблот-фрагментов трипсиновых пептидов было идентично таковому для стандартного штамма ВТМ. Для выявления нуклеотидных замен и уточнения штаммовой принадлежности выделенных изолятов ВТМ определена нуклеотидная последовательность кДНК *pTVM9.5* для С-концевого района капсидного белка одного из изолятов, полученная субклонированием соответствующего фрагмента из его провирусной конструкции *pTVM9*.

По приблизительным оценкам, естественный фон мутаций для ВТМ составляет 0,1—2 % [10]. Однако в белке оболочки ВТМ существуют и инвариантные аминокислоты. У большинства изученных штаммов и мутантов ВТМ постоянны участки 87—94 и 113—122 [10].

В белке ВТМ, состоящем из 158 аминокислотных остатков, антигенная специфичность в положении 93—112 меняется при удалении в этом пептиде 12 аминокислотных остатков с NH₂-конца, но утрачивается полностью даже при удалении трех остатков с COOH-конца [10].

```

                100                                110
ValGluAsnGlnAlaAsnProThrThrAlaGluThrLeuAspAlaThrArgArgValAsp
GTTGAAAATCAGGCGAAACCCCACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAC
-----
                120                                130
AspAlaThrValAlaIleArgSerAlaIleAsnAsnLeuIleValGluLeuIleArgGly
GACGCAACGCGTGGCCATAAGGAGCGGATAAATAATTTAATACTAGAAATTGATCAGAGGA
-----
                                                G
                                                Leu

                140                                150
ThrGlySerTyrAsnArgSerSerPheGluSerSerSerGlyLeuValIrpThrSerGly
ACCGGATCTTATAATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGCTTGGTTTGGACCTCTGGT
-----
                                                A
                                                Tyr

ProAlaThr
CCTGCAACTTGAGGTAGTCAA*
-----*
```

Анализ нуклеотидной последовательности секвенированного участка рТVM9.5. Сверху приведена последовательность стандартного табачного штамма ВТМ; пунктиром выделена гомологичная последовательность анализируемого изолята; обозначены единичные нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены

Всего в белке локализовано семь эпитопов в районе остатков 1—10, 34—39, 55—61, 62—88, 80—90, 108—112, 153—158 [10].

С-концевая область капсидного белка ВТМ экспонирована наружу как в целом вирусе, так и в отдельных субъединицах. За связывание с рецептором клетки в процессе вирусной инфекции, по-видимому, также отвечает С-концевой эпитоп. Инфекционность вируса уменьшалась на 75—94 % при обработке вируса МКА, специфическим к С-концевому участку белка, но сохранялась, если до взаимодействия вируса с МКА последние обрабатывали синтетическими конъюгатами полилизин — тетрапептид [10].

Замена валина на лейцин в положении 130, обнаруженная по результатам анализа нуклеотидной последовательности кДНК для иммунодоминантного С-конца капсидного белка одного из выделенных вирусных изолятов на участке размером 200 пар нуклеотидов, не совпадает ни с одним из приведенных выше антигенных эпитопов белка ВТМ и носит неконсервативный характер (рисунок). Это согласуется с данными Дэйхофф [11] по семействам аминокислотных замен и может указывать на спонтанность ее возникновения.

А. Л. Бойко, С. А. Степанюк, О. М. Гарифулін

Одержання і аналіз провірусної кДНК для С-кінцевого фрагмента капсидного білка ВТМ із ізолята рослин тютюну, що росли у районі радіологічного забруднення України

Резюме

З рослин, що ростуть у районі з густиною радіологічного забруднення ^{137}Cs 12,6 Ки/км², виділено два ідентичних ізоляти вірусу ВТМ; отримано рекомбінантні плазмідні рТVM9, рТVM9.5, які включають відповідно кДНК повного провірусу і С-кінцеву послідовність кДНК капсидного білка одного з виділених ізолятів. Сиквенс кДНК рТVM9.5 дозволив виявити неконсервативну заміну валина на лейцин в положенні 130 для гомологічного району капсидного білка стандартного штамма ВТМ.

A. L. Boyko, S. A. Stepanjuk, O. M. Garifulin

Obtaining and analysis of provirus cDNA for C-terminus part of capsid protein for tobacco TVM strain isolated from region with nuclear contamination

Summary

Two identical strains of tobacco type TVM have been isolated at region with ^{137}Cs nuclear contamination with apparently $12,6 \text{ Ci/km}^2$ activity density and recombinant plasmids (pTVM9, pTVM9.5) with insert of cDNA provirus and cDNA for C-end specific capsid protein region correspondently from one of isolated viruses have been obtained. Sequencing analysis of cDNA pTVM9.5 revealed on one nonconservative amino acid replacement of leucine instead of valine in position 130 with comparison of that at standard TVM sequencing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды.— М.: Мир, 1987.—403 с.
2. Бойко А. Л. Экология вирусов растений.— К.: Вища шк., 1990.—167 с.
3. Методы вирусологии и молекулярной биологии.— М.: Мир, 1972.—480 с.
4. Noordam D. Identification of plant viruses. Methods and experiments.— Wageningen: Pudoc., 1973.—277 p.
5. Laemmli U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
6. Lowry O. H. et al. // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.
8. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы.— М.: Мир, 1988.—538 с.
9. Sanger F., Miklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—P. 5463.
10. Френкель-Конрад Х. Химия и биология вирусов.— М.: Мир, 1972.—460 с.
11. Dayhoff M. O., Schwartz R. M., Orcutt B. C. In Atlas of Protein Sequence and Structure // Ed. M. O. Dayhoff.— Natl. Biomed. Res. Found, 1979.—P. 345—352.

УДК 578.828.11:577.212.3

Поступила в редакцию 28.10.96