

Порівняння капсидних білків українських ізолятів та типового штаму вірусу тютюнової мозаїки після фрагментації трипсином

Т. П. Шевченко, Т. Ю. Ткаченко¹, С. С. Вітер¹, Ю. Л. Радавський¹,
А. Л. Бойко, В. П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
Вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна

E-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

Проведено порівняльний аналіз українських ізолятів (TMVch і TMVsh) та типового штаму (TMV U1) вірусу тютюнової мозаїки методом пептидного картування капсидного білка, гідролізованого трипсином, з подальшим вивченням одержаних фрагментів з використанням гомо- та гетероспецифічних антисироваток. Результати пептидного картування показали відсутність значних відмінностей в пептидних картах досліджуваних білків, за винятком фракції 7, якої не виявлено в профілі елюції капсидного білка TMV U1. Внаслідок аналізу триптичних фракцій кожного капсидного білка за допомогою вірусспецифічних антисироваток знайдено деякі відмінності у реакції антисироваток з низкою фракцій. Встановлено амінокислотну послідовність пептиду з фракції 12 TMVch, яка повністю збігалася з поліпептидною послідовністю капсидного білка TMV U1 у позиціях 72–90, проте відмічено розбіжності в розпізнаванні цього фрагмента антисироватками.

Вступ. Серед різних груп фітопатогенних вірусів як на рослини природних ценозів, так і на сільсько-господарські культури суттєво впливають представники роду *Tobamovirus*. Гетерогенність представників цього роду ускладнює їхню діагностику та боротьбу з ними.

Високий ступінь генетичної мінливості вірусів та селективний тиск біотичних і абіотичних факторів сприяють постійному, а іноді досить швидкому процесу утворення нових штамів [1]. Вірус тютюнової мозаїки (*Tobacco mosaic virus* — TMV), який є типовим представником роду *Tobamovirus*, характеризується надзвичайним штамовим різноманіттям. На даний час відомо більше 300 штамів TMV [2]. Штамове різноманіття TMV значно уск-

ладнює ідентифікацію вірусу: різні за спектром рослин-господарів штами вірусів можуть відрізнятися за поведінкою в екосистемах. Вивчення вірусних штамів є одним з важливих аспектів вірусології та має як теоретичне, так і практичне значення: з теоретичної точки зору — це дослідження мінливості вірусів та молекулярних механізмів їхньої еволюції, а з практичної — контроль вірусних захворювань сільськогосподарських культур.

Для порівняння та характеристики штамів використовують біологічні (симптоми на рослинах-індикаторах, коло рослин-господарів), серологічні та антигенні, а також молекулярно-генетичні (нуклеотидна послідовність геному, структурно-функціональні характеристики вірусних білків та ін.) критерії.

У даній роботі продовжено дослідження двох ізолятів TMV, виділених на території України: 1)

ізолят, виділений в зоні відчуження Чорнобильської АЕС (TMVch); 2) ізолят, виділений в Шацькому національному парку (TMVsh). Раніше встановлено, що ці ізоляти відрізняються за біологічними властивостями один від одного та від типового штаму TMV (TMV U1) [3]. Метою даної роботи було порівняння фрагментів капсидних білків (capsid protein — CP) двох ізолятів TMVch, TMVsh та штаму TMV U1 шляхом пептидного картування за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), а також антигенних властивостей цих фрагментів, одержаних після гідролізу капсидних білків трипсином. Порівняння TMVch з іншими ізолятами є цікавим також з точки зору виявлення впливу високих доз радіації на мінливість вірусів та відповідно на формування нових штамів.

Матеріали і методи. Виділення вірусів. Ізоляти TMV виділяли з рослин подорожника великого *Plantago major L.* в різних екологічних зонах: у зоні відчуження ЧАЕС біля селища Опаничі (TMVch) та на території Шацького національного парку (TMVsh). Віруси накопичували на рослинах *Nicotiana tabacum* сорту Самсун. Вірусний матеріал виділяли, як описано в [4], гомогенізацією інфікованих рослин в 0,1 М калій-фосфатному буфері, рН 7,4, з додаванням 0,01 М Na_2SO_3 , освітленням хлороформом вірусного екстракту у співвідношенні 1:7 та подальшим низькошвидкісним центрифугуванням протягом 20 хв при 1500 г. Препарат концентрували інкубацією надосадової рідини з 5 %-м розчином ПЕГ-6000 у присутності 1,2 % NaCl протягом 60 хв при температурі 0—4 °С з наступним центрифугуванням впродовж 15 хв при 8000 г. Осад ресуспендували в 0,01 М калій-фосфатному буфері, рН 7,4, з подальшим високошвидкісним центрифугуванням (1,5 год при 80000 г). Осад відбирали, ресуспендували в 0,01 М калій-фосфатному буфері та проводили через сахарозну подушку протягом 2,5 год при 80000 г.

Для порівняння використовували типовий штам TMV U1, люб'язно наданий А. Ф. Бобковою (Московський державний університет, Росія).

Концентрацію та чистоту вірусних препаратів визначали спектрофотометрично за формулою: $C = A_{260} \cdot N / K_e$, де C — концентрація вірусу в мг/мл; A_{260} — екстинкція при довжині хвилі 260 нм; N — розведення вірусного препарату; K_e — коефіцієнт екстинкції, який для ВТМ становить 2,7 [4].

Виділення капсидного білка. Капсидний білок кожного ізоляту TMV виділяли ацетатним методом [4]. У суспензію ВТМ, охолоджену до 0—3 °С, додавали два об'єми льодової оцтової кислоти при постійному перемішуванні. Суміш інкубували протягом 30 хв на льодовій бані, періодично помі-

шуючи. Осаджену РНК відділяли центрифугуванням протягом 15 хв при 8000 г, а прозорий розчин білка розводили рівним об'ємом холодної дистильованої води та діалізували проти трьох—чотирьох змін дистильованої води при 4 °С та постійному перемішуванні впродовж кількох діб. При досягненні величини рН розчину значення ізоелектричної точки капсидного білка ВТМ (рН 4,7) білок випадав в осад, який збирали центрифугуванням протягом 15 хв при 20000 г та температурі 2 °С. Коефіцієнт поглинання білка (E_{280}) становив 13,0 опт. од. Спектр поглинання білка характеризувався наявністю максимуму при 280 нм та мінімуму при 245—250 нм. Співвідношення E_{280}/E_{260} для білка ВТМ становило 1,6—1,7 [4].

Протеоліз капсидних білків трипсином. Капсидні білки гідролізували трипсином («Sigma», США) в 0,1 М амоній-бікарбонатному буфері, рН 8,0, при співвідношенні фермент:субстрат 1:50. Суміш інкубували протягом 4 год при температурі 37 °С. Після завершення гідролізу реакцію зупиняли підкисленням 0,1 %-ю оцтовою кислотою до рН 2,5. Гідролізат ліофілізували та зберігали при 4 °С або заморожували та зберігали при -20 °С.

Пептидне картування. Пептиди, одержані при гідролізі капсидних білків TMV трипсином, розділяли ВЕРХ у зворотній фазі в хроматографічній системі «ЛКВ-РНАРМАСІА» (Швеція). Суміш пептидів фракціонували на колонці «LiChrosorb RP-18», 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Рухома фаза складалася з розчинів-елюентів А та Б. Розчин А містив 2 % ацетонітрилу та 0,1 % трифтороцтової кислоти (ТФО) у деіонізованій воді; розчин Б містив 90 % ацетонітрилу та 0,1 % ТФО у деіонізованій воді. Елюцію проводили з використанням лінійного градієнта 0—50 % від концентрації елюенту Б протягом 42 хв при швидкості елюції 1,0 мл/хв. Далі впродовж 3 хв проводили промивання розчином Б. Детектування на виході з колонки здійснювали при довжині хвилі 214 нм. Фракції пептидів збирали в пробірки та зберігали при -20 °С або висушували у вакуумі та зберігали при 4 °С.

Імуноферментний аналіз. Капсидні білки та одержані при гідролізі трипсином пептиди вивчали методом непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) на платах для мікротитрування. Для аналізу використовували кролячі поліклональні антитіла (ПКА), одержані при імунізації тварин цілими вірусними частками TMVch, TMVsh, TMV U1. Капсидні білки та пептиди розчиняли в 10 мМ Na-фосфатному буфері з 0,15 М NaCl (забуферений фізіологічний розчин, ЗФР), рН 7,4. Проби вносили в лунки по 75 мкл та висушували протягом ночі при температурі 37 °С. Висушені проби

тричі промивали ЗФР по 150 мкл на лунку та вільні сайти адсорбції в лунках блокували 1 %-м розчином БСА в ЗФР протягом 4 год при 37 °С. Після блокування лунки промивали ЗФР та вносили ПКА, розведені в ЗФР з 0,3 % БСА та 0,02 % Твін-20 (ЗФР-Т). Усі сироватки були розведені у співвідношенні 1:15000. Білки та пептиди інкубували з антитілами протягом 2 год при 37 °С. Далі лунки п'ять разів промивали ЗФР-Т, вносили приготовлені в ЗФР-Т з 0,3 % БСА мишачі антикролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, та інкубували впродовж 1,5 год при 37 °С. Після п'ятиразового промивання лунок ЗФР-Т вносили субстратний буфер (0,1 М цитринова кислота, 0,15 М Na_2HPO_4 , рН 4,5), що містив 0,6 мг/мл ортофеніллендіаміну та 0,01 % H_2O_2 . Оптичну густину вимірювали на пристрої Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices, «Fisher», США) при довжині хвилі 450 нм після 10–20 хв інкубації планшетів у темряві за кімнатної температури.

Визначення амінокислотної послідовності пептиду. Автоматичне секвенування пептиду, що містився у фракції 12 (TMVch), було проведене в Інституті Біотехнології (Гельсінкі, Фінляндія).

Результати і обговорення. Два ізоляти TMVch та TMVsh були виділені в регіонах України, які характеризуються різною екологічною ситуацією. Ізолят TMVch виділено в радіаційно забрудненій зоні, а ізолят TMVsh — в екологічно чистій місцевості. Аналіз біологічних властивостей цих штамів та типового штаму TMV U1 продемонстрував деякі відмінності у симптоматиці протікання інфекції при зараженні ряду рослин-індикаторів. Ізолят TMVch, як і типовий штам TMV U1, спричинював утворення некрозів на рослинах *Chenopodium amaranticolor* і *Nicotiana glutinosa* та системну інфекцію на рослинах *Nicotiana sylvestris*. Інфекція TMVsh на *N. glutinosa* та *N. sylvestris* була безсимптомною. При зараженні рослин *N. tabacum* сорту Самсун ізолят TMVch викликав появу помірних некрозів, TMVsh — мозаїку, а TMV U1 — системну реакцію [3]. Аналіз у ПААГ-ДСН електрофорезі не виявив відмінностей в молекулярних масах типового штаму TMV U1 та ізолятів TMVch і TMVsh. Для всіх трьох СР молекулярна маса становила 18 кДа [3].

Для порівняння СР вірусів штаму TMV U1 та ізолятів TMVch і TMVsh на рівні пептидних фрагментів здійснено їхній гідроліз трипсином та розділення гідролізату методом ВЕРХ у зворотній фазі з використанням градієнтного елюювання. Порівняльний аналіз профілів елюції пептидних фракцій може надати інформацію стосовно наявності амінокислотних замінів у складі білка в тому разі, якщо

заміни призводять до зміни часу утримання (retention time) пептиду на носії або кількості одержаних при гідролізі фрагментів. Профілі розділення триптичних гідролізатів СР штаму TMV U1 та ізолятів TMVch і TMVsh наведено на рис. 1.

Результати пептидного картування триптичних гідролізатів СР TMV показали, що профілі елюції для кожного СР складаються з 12 піків та піка трипсину і практично не відрізняються один від одного. Виявлено лише одну відмінність у цих профілях: відсутність фракції 7 у TMV U1, що виглядає як невеличке плече після піка 6, тоді як у профілях елюції гідролізатів СР ізолятів TMVsh і TMVch фракція 7 є повноцінним піком, який незначною мірою перекривається з фракцією 6 (рис. 1). Як видно з рис. 1, час утримання всіх фракцій з трьох гідролізатів СР практично незмінний. Останнє свідчить про те, що гідрофобні властивості пептидів у кожній фракції не змінилися в значній мірі, навіть якщо в деяких фрагментах відбулися заміни амінокислотних залишків. Таким чином, пептидне картування методом ВЕРХ не виявило суттєвої різниці між СР ізолятів TMVch, TMVsh та штаму TMV U1, окрім появи фракції 7 у гідролізатах СР TMVsh і TMVch в порівнянні з гідролізатом СР TMV U1.

Щоб знайти відмінності між фрагментами СР досліджуваних вірусів на серологічному рівні, було проаналізовано їхню взаємодію з поліклональними сироватками, одержаними при імунізації лабораторних тварин нативними вірусними частками. Кожен з фрагментів вивчали методом непрямого ІФА з гомологічною сироваткою (одержаною проти відповідного ізоляту/штаму) та двома гетерологічними (отриманими проти двох інших ізолятів/штамів). Концентрація пептидного матеріалу для аналізу складала 7 нМ на лунку. Негативним контролем при аналізі слугував сік здорової рослини, для якого реакції з сироватками не спостерігалось.

Капсидні білки TMVch, TMVsh і TMV U1, які аналізували в ІФА в концентрації 1 мкг/мл, взаємодіяли з гомологічними та гетерологічними сироватками на одному рівні, тобто серологічних відмінностей між ізолятами TMVch, TMVsh та штамом TMV U1 на рівні білка не виявлено [5].

Серед фрагментів СР, одержаних при триптичному гідролізі, спостерігаються певні відмінності в їхньому розпізнаванні сироватками. Результати аналізу пептидних фракцій вірусспецифічними ПКА наведено на рис. 2. Фракцію 7 для TMV U1 не було проаналізовано через її відсутність.

У непрямому ІФА рівень реакції фракцій 1, 2, 3 (для всіх трьох гідролізатів СР) як з гомо-

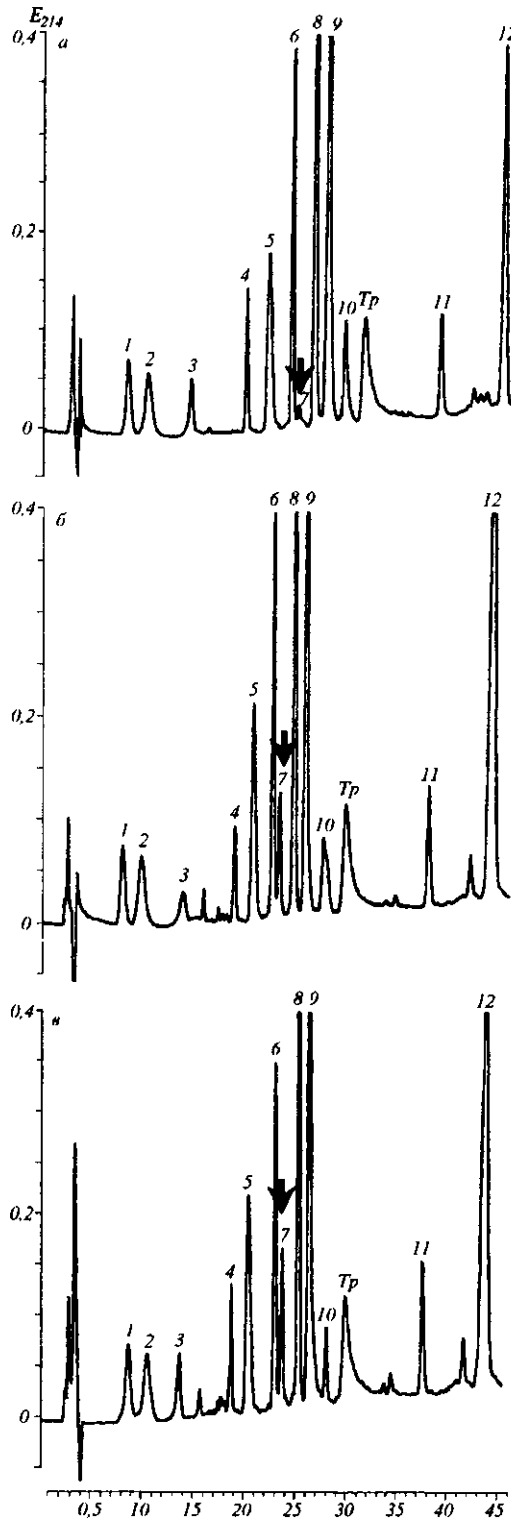


Рис. 1. Профілі елюції триптичних фракцій капсидного білка українських ізолятів та типового штаму TMV методом високо-ефективної рідинної хроматографії: а — типового штаму TMV U1; б — ізоляту TMVsh; в — ізоляту TMVch. Стрілками позначено фракції 7; «Tr» — фракція трипсину

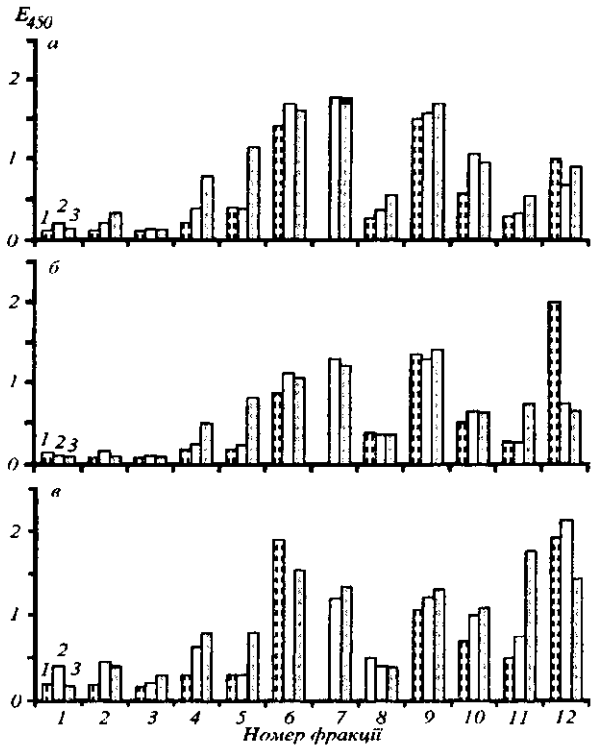


Рис. 2. Діаграма результатів імуноферментного аналізу триптичних фрагментів капсидного білка (CP) TMV з використанням поліклональних вірусспецифічних антисироваток: а — сироватка проти TMV U1; б — проти TMVsh; в — проти TMVch (1 — фракції, одержані при гідролізі CP TMV U1; 2 — при гідролізі CP TMVsh; 3 — при гідролізі CP TMVch)

логічними, так і з гетерологічними сироватками незначний (рис. 2). Скоріш за все, згадані фракції містять короткі гідрофільні пептиди (про це свідчить їхній ранній вихід з колонки при ВЕРХ), що не включають епітопів для розпізнавання ПККА або містять лише частину епітопу, недостатню для специфічного розпізнавання антитілом.

Фракція 4 TMV U1 дає слабку реакцію з усіма сироватками. Відповідна фракція, одержана при гідролізі CP TMVsh, слабо реагує з анти-TMV U1 (рис. 2, а) та з гомологічною сироваткою (рис. 2, б), тоді як з анти-TMVch дає реакцію більше 0,5 одиниць поглинання (о. п.) (рис. 2, в). Для фракції 4 з гідролізату CP TMVch спостерігається підвищення реакції з усіма сироватками від 0,5 (рис. 2, б) до 0,8 о. п. (рис. 2, а, в).

Для фракцій 5 TMV U1 і TMVsh реакція з

трьома сироватками була нижчою 0,5 о. п. (рис. 2). У випадку фракції 5 TMVch спостерігалось підвищення реакції від 0,8 о. п. з анти-TMVsh сироваткою (рис. 2, б) та 0,96 о. п. з анти-TMVch (рис. 2, в) до 1,2 о. п. з анти-TMV U1 (рис. 2, а).

Для фракцій 6 спостерігаються значні показники взаємодії з сироватками. Особливо високого рівня досягають реакції з сироваткою проти TMV U1 (рис. 2, а), а з сироваткою проти TMVch високу реакцію дають фракції 6 TMV U1 і TMVch (рис. 2, в). Рівень реакції фракції 6 з сироваткою проти TMVsh на ~30 % нижчий, ніж з іншими сироватками (рис. 2, б); такі ж показники одержано при взаємодії між фракцією 6 TMVsh з анти-TMVch сироваткою (рис. 2, в). Максимальну реакцію (1,89 о. п.) відмічено при взаємодії анти-TMVch з фракцією 6 TMV U1 (рис. 2, в).

При аналізі фракцій 7 TMVsh і TMVch спостерігається схожа картина: рівень взаємодії з анти-TMV U1 сироваткою приблизно на 30 % вищий, ніж з двома іншими сироватками (рис. 2). Відсутність фракції 7 у гідролізаті CP TMV U1 не дала можливості провести повноцінне порівняння цих фракцій.

Вивчення фракцій 8 усіх трьох гідролізітів визначило відсутність суттєвих відмінностей у реакціях з гомо- та гетерологічними сироватками (рис. 2).

Усі сироватки практично рівноцінно взаємодіяли з фракцією 9, між тим слід зазначити, що реакція анти-TMVch сироватки з цією фракцією дещо слабша (рис. 2, в), а анти-TMV U1 сироватка дає найвищу реакцію з цією фракцією (рис. 2, а).

Фракція 10 TMV U1 розпізнається усіма сироватками слабше, ніж ці ж фракції з TMVch і TMVsh (рис. 2). Сироватки проти TMV U1 (рис. 2, а) і TMVch (рис. 2, в) реагують з фракціями 10 з гідролізітів CP TMVch і TMVsh майже в 1,5—2 рази сильніше, ніж з цією ж фракцією з TMV U1.

Фракція 11 штаму TMV U1 та ізоляту TMVsh характеризується незначним рівнем взаємодії з сироватками, а для відповідної фракції TMVch спостерігається підвищення реакції від 0,5—0,6 о. п. з гетерологічними сироватками до 1,75 о. п. з гомологічною сироваткою (рис. 2).

Фракції 12 притаманна складна картина взаємодії з вірусспецифічними сироватками: з анти-TMV U1 — реакції на середньому рівні (рис. 2, а), з анти-TMVch — на високому (рис. 2, в), сироватка ж анти-TMVsh при слабкій реакції з фракціями 12 з ізолятів TMVsh і TMVch активно взаємодіє з фракцією 12 TMV U1 (рис. 2, б).

Визначено амінокислотну послідовність пептиду, що містився у фракції 12, одержаній при

гідролізі CP TMVch трипсином. Виявилось, що вона збігається з послідовністю ділянки CP типового штаму TMV U1 у позиціях 72—90 білкового ланцюга: $^{72}\text{Tyr-Asn-Ala-Val-Leu-Asp-Pro-Leu-Val-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly-Ala-Phe-Asp-Thr-Arg}^{90}$.

Тобто з'ясовано, що дані ділянки в амінокислотній послідовності CP типового штаму та ізоляту TMVch повністю ідентичні і не містять замінів.

Антигенні властивості TMV та його капсидного білка вже більше 50 років широко досліджуються. В огляді [6] підсумовано дані щодо послідовних епітопів капсидного білка TMV, визначених аналізом його пептидних фрагментів за допомогою ПКА та моноклональних антитіл (МКА). З 10 виявлених за допомогою ПКА епітопів (позиції в амінокислотній послідовності 1—10, 19—32, 34—39, 55—61, 62—68, 80—90, 105—112, 115—134, 134—146 та 153—156) п'ять останніх взаємодіяли також з МКА. Вісім з 10 епітопів, згідно з [7], розташовані на ділянках з високою сегментною рухливістю, які відповідають N- та C-кінцевим сегментам та петлям на поверхні білкової глобули.

Просеквенований пептид містить ділянку в позиціях 80—90, яка є послідовним епітопом CP TMV [8]. Цей епітоп розпізнається як поліклональними, так і моноклональними антитілами. Згідно з результатами рентгеноструктурного аналізу CP TMV [9], ця ділянка утворює α -спіраль та характеризується високою сегментною рухливістю, яка не притаманна більшості впорядкованих структур. На рис. 3 представлено просторову будову CP TMV та позначено ділянку в позиціях 72—90.

Пептидне картування CP штаму TMV U1 та ізолятів TMVsh і TMVch показало, що замість фракцій 6 та 7 при розділенні продуктів гідролізу CP TMV U1 трипсином виходить одна фракція (фракція 6) з невеликим плечем, а при розділенні гідролізітів CP TMVsh і TMVch ці фракції виглядають як не повністю відокремлені, але різні піки. Гетерологічна сироватка анти-TMV U1 активно реагує з фракціями 6 та 7 українських ізолятів, що свідчить про близькі антигенні властивості матеріалу, який міститься у фракціях 6 та 7. Для інших фракцій при порівнянні одержаних пептидних карт відмінностей не виявлено: можливі амінокислотні заміни не торкаються сайтів гідролізу трипсином та не впливають на час утримання пептидів на гідрофобному носії.

При порівнянні антигенних властивостей фракцій капсидних білків за допомогою вірусспецифічних сироваток виявляється, що загальний профіль реактивності відповідних фракцій схожий, але має і деякі відмінності. Для трьох досліджуваних

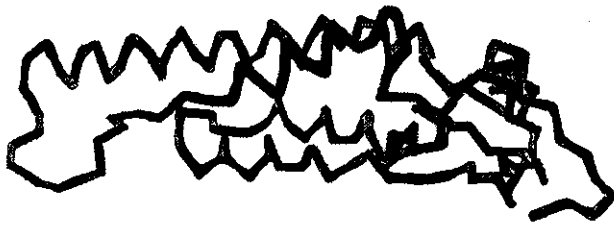


Рис. 3. Схематичне зображення просторової структури капсидного білка (СР) TMV, згідно з [9]; чорним кольором позначено фрагмент у позиціях 72—90, що відповідає фракції 12 СР TMVch

СР спостерігається високий рівень перехресної реактивності: в більшості випадків пептиди розпізнаються гетерологічними сироватками так само, як і гомологічними, а іноді й активніше (явище гетероспецифічності). Така картина часто зустрічається при аналізі споріднених високогомологічних білків. Як правило, гетероспецифічність пов'язана з ідентичністю епітопів на поверхні цих білків, але може бути й наслідком молекулярної мімікрії [10]. Особливо яскраво гетероспецифічність виявляється при взаємодії анти-TMV U1 і анти-TMVsh сироваток з фракціями 4 і 5 TMVch, а також антисироваток проти TMVch і TMVsh з фракціями 6 і 12 TMV U1 відповідно.

Раніше при дослідженні антигенних властивостей СР TMV показано, що перехресна реактивність може існувати і для різних фрагментів СР: МКА проти одного фрагмента взаємодіють також з іншим [11]. Виявлено, що для появи перехресної реактивності в деяких випадках достатньо гомології послідовності в три залишки; в СР типового штаму TMV повторення мотиву Asp-Ala-Thr у позиціях 109—111 і 116—118 та мотиву Glu-Leu-Ile в позиціях 22—24 і 131—134 зумовлює перехресні реакції фрагментів.

Згідно з результатами ІФА, для СР типового штаму та українських ізолятів імунодомінантні ділянки містяться у фракціях 6, 7, 9, 10 та 12, хоча у різних сироваток активність взаємодії з цими фракціями дещо відрізняється. Фракції 1, 2, 3 та 8 для всіх трьох СР неактивні в реакціях з усіма сироватками. Різні рівні реакції з сироватками спостерігаються для фракцій 4, 5 та 11: відповідні фракції, одержані при розділенні гідролізату СР TMVch, характеризуються підвищеним рівнем реакції з сироватками у порівнянні з фракціями інших СР (рис. 2). Така активність фракцій TMVch може бути пов'язана зі зміною амінокислотної послідовності та (або) структури молекули СР TMVch і, як наслідок, появою нових епітопів

на поверхні молекули. Це особливо ймовірно для фракції 11 TMVch, яка взаємодіє з гомологічною сироваткою значно активніше, ніж з гетерологічними.

Як зазначалося вище, активність фракцій, які містять імунодомінантні ділянки, також неоднорідна: деякі фракції різних СР по-різному взаємодіють з однією сироваткою. Це спостерігається при взаємодії антисироватки проти TMVch з фракціями 6 та 12 та антисироватки проти TMVsh з фракцією 12 (рис. 2).

Розбіжності в розпізнаванні вірусспецифічними антисироватками триптичних фракцій свідчать про те, що антигенні властивості СР типового штаму та двох українських ізолятів дещо відрізняються, причому при аналізі цілого білка цієї різниці не було виявлено. Зміна антигенних властивостей СР у ізолятів TMVsh та TMVch може бути пов'язана зі змінами в амінокислотній послідовності та (або) в просторовій структурі молекули СР у порівнянні з типовим штамом TMV.

Таким чином, при порівнянні пептидних карт, а також при аналізі антигенних властивостей триптичних фрагментів гомологічних СР типового штаму TMV та ізолятів TMVsh і TMVch було знайдено незначні, але очевидні відмінності. Для подальшої характеристики ізолятів, виділених в Україні, та порівняння їх з іншими штамами TMV необхідними є дослідження на молекулярно-генетичному рівні.

Автори висловлюють щире подяку директору Інституту Біотехнології (Гельсінкі, Фінляндія) проф. М. Саармі та д-ру Л. Валму за визначення амінокислотної послідовності пептиду.

T. P. Shevchenko, T. Yu. Tkachenko, S. S. Viter, Yu. L. Radavsky, A. L. Boyko, V. P. Polischuk

Comparison of capsid proteins of tobacco mosaic virus Ukrainian isolates and common strain after trypsin fragmentation

Summary

The comparative analysis of tobacco mosaic virus two Ukrainian isolates (TMVch and TMVsh) and common strain (TMV U1) was carried out by means of peptide mapping of capsid protein hydrolyzed by trypsin with the following analysis of tryptic fragments using homo- and heterospecific antisera. Peptide mapping results were not shown significant differences at the peptide maps of investigated proteins with the exception of fraction 7 that was absent at TMV U1 capsid protein elution profile. The analysis of each protein tryptic fractions using virusspecific antisera revealed certain differences at the reactions of antisera with some fractions. The amino acid sequence of peptide from fraction 12 TMVch capsid protein was established. This sequence coincides completely with the polypeptide sequence of TMV U1 capsid protein at the position 72—90, however the recognition of this fragment by antisera was varied.

Т. П. Шевченко, Т. Ю. Ткаченко, С. С. Витер,
Ю. Л. Радавський, А. Л. Бойко, В. П. Полищук

Сравнение капсидных белков украинских изолятов и типичного штамма вируса табачной мозаики после фрагментации трипсином

Резюме

Проведен сравнительный анализ украинских изолятов (TMVch и TMVsh) и типичного штамма (TMV U1) вируса табачной мозаики методом пептидного картирования капсидного белка, гидролизованного трипсином, с последующим изучением полученных фрагментов с использованием гомо- и гетероспецифических антисывороток. Данные пептидного картирования показали отсутствие значительных отличий в пептидных картах исследуемых белков, за исключением фракции 7, которой не выявлено в профиле элюции капсидного белка TMV U1. В результате анализа триптических фракций каждого капсидного белка с помощью вирусспецифических антисывороток найдены некоторые отличия в реакции антисывороток с рядом фракций. Установлена аминокислотная последовательность пептида из фракции 12 TMVch, полностью совпадающая с полипептидной последовательностью капсидного белка TMV U1 в позициях 72—90, однако наблюдались отличия при распознавании этого фрагмента антисыворотками.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Molecular basis of virus evolution* / Eds A. Gibbs, C. H. Calisher, F. Garcia-Arenal.—Cambridge: Univ. press, 1995.—603 p.
2. Шевченко Т. П., Полищук В. П., Бойко А. Л. Класифікація тобамовірусів, характеристика та штамове різноманіття вірусу тютюнової мозаїки як типового представнику роду // Віруси рослин: штамове різноманіття.—Київ: Фітосоціоцентр, 2002.—С. 30—43.

3. Тивончук Т. П., Полищук В. П., Бойко А. Л. Вивчення штамового різноманіття вірусу тютюнової мозаїки на території України // Агроєкологія і біотехнологія. Зб. наук. праць.—Київ, 1998.—Вип. 2.—С. 209—213.
4. *Практикум по общей вирусологии* / Под ред. И. Г. Атабекова—М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981.—192 с.
5. Тивончук Т. П., Шевченко О. В., Бойко А. Л., Полищук В. П. Порівняльне вивчення молекулярних та серологічних властивостей двох ізолятів вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) та його типового штамму (U1) // Бюл. Ін-ту с.-г. мікробіології.—2000.—№ 7.—С. 34—36.
6. Van Regenmortel M. H. V. The antigenicity of tobacco mosaic virus // Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.—1999.—354.—P. 559—568.
7. Westhof E., Altschuh D., Moras D., Bloomer A. C., Mondragon A., Klug A., Van Regenmortel M. H. V. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins // Nature.—1984.—311.—P. 123—126.
8. Al Moudallal Z., Briand J. P., Van Regenmortel M. H. V. A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus protein is antigenic // EMBO J.—1985.—4.—P. 1231—1235.
9. Bhyravbhata B., Watowich S. J., Caspar D. L. D. Refined atomic model of the four-layer aggregate of the Tobacco Mosaic Virus coat protein at 2.4-Å resolution // Biophys. J.—1998.—74, N 1.—P. 604—615.
10. Colman P. M., Air G. M., Webster R. G., Varghese J. N., Baker A. T., Lentz M. R., Tulloch P. A., Laver W. G. How antibodies recognize virus proteins // Immunol. Today.—1987.—8, N 11.—P. 323—326.
11. Van Regenmortel M. H. V., Altschuh D., Zeder-Lutz G. Tobacco mosaic virus: a model antigen to study virus-antibody interactions // Biochimie.—1993.—75.—P. 731—739.

УДК 577.112.5.083.3

Надійшла до редакції 14.11.01