

Сиквенс кДНК С-концевой последовательности капсидного белка ВТМ-изолята томата из района радиологического загрязнения

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

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

Из района с плотностью радиологического загрязнения по Cs^{137} 11 Ки/км^2 выделены из растений томата два идентичных изолята вируса табачной мозаики, получены рекомбинантные плазмиды рТVM7 и рТVM7.5, содержащие кДНК полного провируса и иммуноспецифическую С-концевую последовательность кДНК капсидного белка для одного из выделенных изолятов. Структурные белки полученных вирусов характеризуются довольно высокой — $19 \pm 1,9 \text{ кДа}$ ($17,5 \text{ кДа}$ для стандартного штамма ВТМ) молекулярной массой по результатам $DS-Na$ — ПААГ электрофореза. Иммуноблот-анализ трипсиновых фрагментов капсидных белков изолятов и выделенного ранее контрольного штамма далемского изолята не выявил отличий в распределении иммуноактивных фрагментов относительно антисыворотки контроля. По сиквенсу кДНК рТVM7.5 обнаружена консервативная замена остатка серина на треонин в положении 148 для гомологичного района капсидного белка далемского штамма ВТМ, что может свидетельствовать об иммунологической значимости данного района капсидного белка изолята. Предложен возможный механизм опосредованных физиологическими процессами в инфицированном растении появления и сохранения подобной замены.

Введение. Особенности развития вирусной инфекции в растении в экологических условиях Украины остаются малоизученными. Данные, полученные по вирусным изолятам из регионов, подвергшихся радиоактивному загрязнению, могут помочь в решении ряда вопросов, связанных с выяснением молекулярно-генетических и биохимических основ фитопатогенности вирусов, причин и условий появления их новых штаммовых форм и субтипов в природе в конкретной экологической нише. Создание рекомбинантных провирусных конструкций позволит выявить родственные вирусы в растительной ткани при выбраковке зараженных растений путем гибридизационного анализа [1]. Кроме того, обнаружение новых вирусных штаммов дает возможность использовать эти патогены как биологические индикаторы изменения экологической ситуации, в том числе и для мониторинга загрязненных зон Украины, где все более важное значение приобретает проблема минимальных и пороговых доз радиоактивного облучения [4]. Одним из аспектов проблемы является стимулирующее влияние низкоэнергетических доз облучения на физиологические и биохимические процессы в целых

*Correspondence address.

растениях [2, 5, 7, 8]. Однако на уровне растительной клетки природа активации этих процессов описана менее отчетливо [2, 3, 6, 7].

Как модельная система ВТМ обладает рядом ценных в молекулярно-генетическом отношении качеств, поскольку есть все основания полагать, что *in cell* существует давление отбора, селективно подчиненное биохимическому состоянию физиологических процессов и направленное на отбор популяций транскрипционно активных (–)–цепей РНК-вирусов наиболее подходящих по спектру аминоацил-тРНК компонентов трансляционного аппарата инфицированной клетки [9]. В этом плане можно отметить, с одной стороны, зависимость ВТМ 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.

Так, штаммы ВТМ, выделенные из разных видов растений, в большей степени отличаются друг от друга по нуклеотидной последовательности, чем искусственно получаемые химическими агентами (азотистая кислота) РНК-мутанты ВТМ. 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, различия между далемским штаммом и штаммом U2 составляет 30 %, и все три названных штамма отличаются от штамма, выделенного из подорожника, по 53—56 % нуклеотидных последовательностей [10]. В РНК всех четырех штаммов ВТМ менее вариабельными являются положения 87—94 и 113—122, расположенные на С-конце структурного белка ВТМ [10]. Изменения в последовательности структурного белка ВТМ коррелируют с изменением таких его свойств, как электрофоретическая подвижность, температурная устойчивость и антигенная детерминированность [10].

Целью настоящей работы было получение изолята ВТМ из растений томата, произрастающих в районе радиологического загрязнения, с последующим анализом иммунодоминантной С-концевой последовательности его капсидного белка. Для решения данной задачи осуществлено клонирование провируса ВТМ-изолята. Также субклонирован провирусный фрагмент, ответственный за синтез белка оболочки, и проведен анализ его первичной нуклеотидной последовательности.

Материалы и методы. Инфицированный материал отбирали из растений томата, имеющих по габитусу слабые симптомы мозаики, в условиях темно-серой, оподзоленной почвы с 2—3,5 Cu/км² из района «Пуца-Водича» Киевщины с плотностью загрязнения по Cs¹³⁷ 11 Ки/км².

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

Листья массой 0,3 кг, хранившиеся при —20 °С, быстро гомогенизировали в фосфатном буфере, согласно [11]. Очистку в дальнейшем проводили с модификацией по [12], применяя ПЭГ/NaCl (4 %/0,1 М) и осаждение с последующим ультрацентрифугированием («Beckman», SV-40). DS-Na — ПААГ-электрофорез осуществляли в системе Лэммли [13]. Для определения количества белка по методу Лоури [14] использовали спектрофотометр фирмы «PalUniscam» (Англия). Трипсинизацию и иммуноблот-анализ пептидов белка оболочки изолята проводили по методике Зальцман и Мосс [11], используя ранее полученную антисыворотку к контрольному далемскому штамму ВТМ. РНК изолятов выделяли фенольным методом по Маниатису [15]. Клонирование провирусной геномной РНК осуществляли с примене-

нием поли(А)-полимеразы и обратной транскриптазы производства «Promega», (США) [14], используя синтетические *PstI* олигонуклеотиды-адапторы производства «Boehringer Mannheim» (Германия). Поли(А)-РНК получали фракционированием тотального продукта реакции с поли(А)-полимеразой на олиго(dT)-целлюлозе (Type 7, «Pharmacia LKB», Швеция) [15].

Поли(А)-кДНК для клонирования получали согласно [15, 16], используя 500 ед. поли(А)-полимеразы. Реакцию вели в течение 2 ч при 37 °С в следующих условиях: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 15 мМ дитиотриитол, 5 мМ MnCl₂, 100 мМ KCl, 1 мМ АТФ.

Двухцепочечную кДНК синтезировали, как описано в [16].

При субклонировании фрагментов провирусной кДНК использовали рестриктазы производства «Boehringer Mannheim». Вектором служила плазида *pUC18*, рекомбинанты трансформировали в клетки XL1 *Escherichia coli*. Гибридизационный анализ рекомбинантных клонов, фиксированных на нейлоновых («Хийу Калур», Эстония) фильтрах с размером пор 0,45 мкм, проводили согласно Маниатису [15]. При отмывке фильтров в строгих условиях предельная концентрация NaCl составляла 0,03 М (65 °С), в нестрогих условиях — 0,3 М (5 °С). Зонды кДНК для гибридизации синтезировали с помощью обратной транскриптазы на имевшихся кДНК ВТМ дикого типа для 5'- и 3'-концевых районов его РНК. Условия синтеза зондов были такими же, как при синтезе кДНК для клонирования. Реакции сиквенса проводили по Сенгеру [17], используя стандартный набор производства «Ферментас» (Вильнюс) и меченный изотоп [³⁵S]dАТФ производства «Amersham» (Англия).

Результаты и обсуждение. Коэффициент экстинкции с учетом светорассеяния составил $E_{260} = 2$; $A_{260/280} = 1,24$, что соответствует аналогичным параметрам, определенным для РНК-вирионов ВТМ [11]. В DS-Na — ПААГ геле 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 равной 19 кДа [12].

Для изолятов томата распределение иммуноблот-фрагментов трипсиновых пептидов было идентично таковому для ранее выделенного контрольного томатного штамма ВТМ. Для обнаружения единичных нуклеотидных замен и уточнения штаммовой принадлежности выделенных изолятов ВТМ было осуществлено определение нуклеотидной последовательности кДНК-конструкции *pTVM7.5* для С-концевого района капсидного белка одного из изолятов томата, полученной субклонированием соответствующего фрагмента из его провирусной конструкции *pTVM7* (рис. 1). На рис. 2

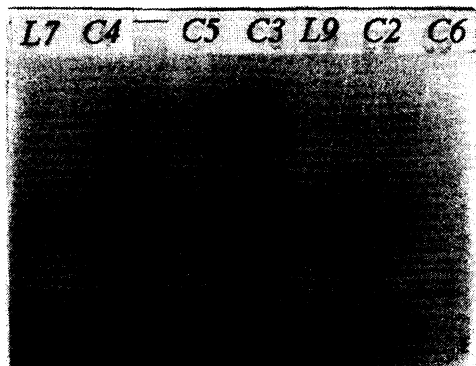


Рис. 1. Результаты блот-гибридизационного анализа нескольких клонов соответствующей последовательности с зондом кДНК для белка оболочки стандартного штамма ВТМ, полученных субклонированием из кДНК провируса табачного изолята. кДНК клонов, дающих позитивный сигнал (L9, C3), взяты для дальнейшего анализа нуклеотидной последовательности

ArgAsnArgIleIleGluValGluAsnGlnGlnSerProThrThr 104
 AGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACCCAGCAGAGTCCGACAACA

AlaGluThrLeuAspAlaThrArgArgValAspAspAlaThrVal 119
 GCTGAAACGTTAGATGCTACCCGAGGGTASACGACGCTACGGTT

AlaIleArgSerAlaIleAsnAsnLeuValAsnGluLeuValArg 134
 GCAATTCCGTCGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTAGTAAGA

GlyThrGlyLeuTyrAsnGlnAsnThrPheGluSerMetSerGly 149
 GGTACTGGACTGTACAATCAGAATACTTTTGAAGTATGTCTGGG

-----A-----
 Thr

LeuValTrpThrSerAlaProAlaSer 158
 TTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCT*

Рис. 2. Анализ секвенированной последовательности. Приведена последовательность стандартного далемского штамма ВТМ; пунктиром обозначена гомологичная последовательность анализируемого изолята. А — единичная нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная замена (Thr)

приведены результаты компьютерного поиска гомологии для секвенированной последовательности в сравнении с соответствующей последовательностью томатного (далемского) штамма ВТМ. Точечная нуклеотидная замена, обнаруженная нами по сиквенсу, приводит к единичной аминокислотной замене в положении 148 капсидного белка для выделенного вируса, причем эта замена носит консервативный характер, согласно данным Дэйхоф [18], по семействам аминокислотных консервативных замен. В то же время треонин замещает «типично» вирусную аминокислоту, причем в серин-богатом районе капсидного белка далемского штамма ВТМ (четыре аминокислотных остатка на участке 146—158).

Ранее в работе [19] показано, что 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, специфичным к С-концевому участку белка, но сохранялась, если до взаимодействия вируса с МКА последние обрабатывали синтетическими конъюгатами полилизин — тетрапептид [19]. По результатам работ, в белке ВТМ, состоящем из 158 аминокислотных остатков, антигенная специфичность в положении 93—112 изменялась при удалении в этом пептиде 12 аминокислотных остатков с NH₂-конца, но утрачивалась полностью даже при удалении трех остатков с COOH-конца [19].

Согласно вышеизложенному, консервативность обнаруженной замены может свидетельствовать об иммунологической специфике данного района капсидного белка, важного при первичном акте взаимодействия вируса с клеточными рецепторами.

Одним из возможных объяснений появления и сохранения такой замены, на наш взгляд, может быть создание в инфицированной клетке определенного селективного преимущества для экспрессии ранее «молчащих» вирусных мРНК, возникающих в клетке в силу спонтанной мутационной изменчивости и содержащих неважные для конформации и функции белка точечные мутации, триплеты которых будут соответствовать изменившимся в клетке наборам тРНК и аминокислот [9, 10]. Такое изменение может быть спровоцировано и изменившейся экологической ситуацией в нише произрастания растения, в том числе, и обусловленное радиологическим ее загрязнением, что может, по мнению Кузина и Гродзинского [20, 21], приводить к своеобразной радиостимуляции физиологических процессов в растении.

Иллюстрацией к положению о самостоятельной эволюции экстрахромосомных нуклеиновых кислот, основное предназначение которых заключается в «эгоистичном» усиленном воспроизведении, является «эволюция» *in vitro* РНК, синтезируемой репликазой фага Q β , описанная в работах Спигельман [21, 22].

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

Секвенс кДНК С-кінцевої послідовності капсидного білка ВТМ-ізолята томата з району радіологічного забруднення

Резюме

Із району зі щільністю радіологічного забруднення по Cs^{137} 11 Кі/км² виділено з рослин томата два ідентичних ізоляти вірусу тютюнової мозаїки, отримано рекомбінантні плазмиди рТVM7 і рТVM7.5, що містять відповідно кДНК повного провірусу і імуноспецифічну С-кінцеву послідовність кДНК капсидного білка для одного з виділених ізолятів. Структурні білки отриманих вірусів характеризуються досить високою — $19 \pm 1,9$ кДа (17,5 кДа для стандартного штама ВТМ) молекулярною масою за результатами DS-Na — ПААГ електрофорезу. Імуноблот-аналіз трипсинових фрагментів капсидних білків ізолятів і виділеного раніше контрольного ізолята томатного (далемського) штама не виявив відмінностей у розподілі імуноактивних відносно антисироватки контролю фрагментів. Секвенс кДНК рТVM7.5 дозволив виявити консервативну заміну залишку серину на треонін у положенні 148 для гомологічного району капсидного білка далемського штама ВТМ, що може свідчити про імунологічну значущість даного району капсидного білка. Запропоновано можливий механізм опосередкованих фізіологічними процесами в інфікованій рослині появи і збереження такої заміни.

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

Sequencing analysis cDNA for C-terminus part of capsid protein for tomato TVM isolated from region with nuclear contamination

Summary

Two identical strains of tomato type TVM have been isolated at region with Cs^{137} nuclear contamination with apparently 11 Ci/km² activity and recombinant plasmids (pTVM7, pTVM7.5) with insert of cDNA provirus and cDNA for C-end specific capsid protein region correspondently from one of isolated viruses have been obtained. The capsid proteins of isolated strains has unusually higher $19 \pm 1,9$ kDa molecular weight than standard TVM strain (17,5 kDa) on SDS-PAAG electrophoresis data. There have not been found differences in distribution of immunoactivity trypsin-digested protein fragments between isolated strains and control strain on immunoblot data analysis with control antiserum. Sequencing analysis of cDNA pTVM7.5 have showed out on one conservative aminoacid replacement of threonine instead of serine in position 148 with comparison of that standard tomato TVM sequencing, which allow to make consideration about immunologically importance of this capsid protein region TVM. Also discussed possible mechanism of appearance and keeping such type aminoacid replacement as mediated of physiological processes in infected plant.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды.—М.: Мир, 1987.—411 с.
2. 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.
3. Тимофеев-Ресовский Н. В. Биофизическая интерпретация явлений радиостимуляции растений // Биофизика.—1956.—1, № 7.—С. 616—627.
4. Тимофеев-Ресовский Н. В. О радиоактивных загрязнениях биосферы и мерах борьбы с этими загрязнениями // Сб. работ лаборатории биофизики (Тр. Ин-та биологии УФ АН СССР).—Свердловск, 1962.—Т. IV, Вып. 22.—С. 7—16.
5. Бойко А. Л. Экология вирусов растений.—К.: Вища школа, 1990.—167 с.
6. Кузин А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии.—М.: Наука, 1970.—222 с.
7. Кузин А. М. Молекулярные механизмы стимулирующего действия ионизирующего излучения на семена растений // Радиобиология.—1972.—12, №5.—С. 635—643.
8. Gordon S. A., Weber R. P. Studies on the mechanism of phytohormone damage by ionizing radiation. I. The radiosensitivity of indoleacetic acid // Plant Physiol.—1955.—30, N 3.—P. 200—210.

9. *Sugiyama T., Korant B. D., Lonberg-Holm K. K.* RNA virus gene expression and its control // *Ann. Rev. Microbiol.*—1972.—26.—P. 457.
10. *Henning B., Wittmann H. G.* The nature of virus multiplication // *Kado and Agrawal, 1972.*—P. 546.
11. *Методы вирусологии и молекулярной биологии.*—М.: Мир, 1972.—480 с.
12. *Noordam D.* Identification of plant viruses. Methods and experiments // *Ed. Noordam D.—Wageningen: Pudoc., 1973.*—277 p.
13. *Laemmli U. K.* Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.
14. *Lowry O. H. et al.* // *J. Biol. Chem.*—1951.—193.—P. 265.
15. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование—М.: Мир, 1984.—479 с.
16. *Гловер Д.* Клонирование ДНК. Методы.—М.: Мир, 1988.—538 с.
17. *Sanger F., Miklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 5463—5467.
18. *Atlas of Protein Sequence and Structure / Ed. Dayhoff M. O.* // *New York: Nat. Biomed. Res. Found, 1979.*—P. 345—352.
19. *Френкель-Конрад Х.* Химия и биология вирусов.— М.: Мир, 1972.—460 с.
20. *Кузин А. М.* Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии.—М: Наука, 1970.—222 с.
21. *Гродзинский Д. М.* Биологическое узнавание в физиологических процессах растения // *Физиология и биохимия культурных растений.*—1985.—17, № 3.—С. 211—219.
22. *Levisohn R., Spiegelman S.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1968.—60.—P. 866—872.
23. *Levisohn R., Spiegelman S.* // *Ibid.*—1969.—63.—P. 805—811.