

Некоторые свойства структурных компонентов фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля

Л. Ф. Диденко, Л. А. Максименко, Н. И. Пархоменко, Н. С. Дяченко,
Л. Д. Варбанец, О. С. Броварская, Н. М. Зарицкий¹

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины им. Д. К. Заболотного
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

¹ Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН
Ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

Изучены структурные белки фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля (ВККК) и выявлена репликационная активность в их составе, определены оптимальные условия для проявления ее активности в системе репликации in vitro. Кроме того, в составе ВККК охарактеризованы моносахариды и жирные кислоты. При сравнении моносахаридного и липидного составов ВККК и вируса везикулярного столбчатита (ВВС) обнаружены уникальные и общие моносахариды и жирные кислоты в каждом из них. Полученные данные свидетельствуют, по нашему мнению, о сходстве организации и универсальном характере экспрессии генома рабдовирусов, поражающих теплокровных и растения.

Введение. Вирус курчавой карликовости картофеля (ВККК) по своим морфолого-структурным особенностям относится к семейству рабдовирусов [1]. Известно, что одним из основных методов идентификации последних является электронная микроскопия, позволяющая изучить морфологию вирионов и их субклеточную локализацию. Однако для более разносторонней характеристики вируса необходимы дополнительные исследования его структурных компонентов. Рабдовирусы отличаются сложным строением: содержат одноцепочечную РНК, несколько типов функциональных белков, обеспечивающих экспрессию вирусного генома [2, 3], а также полисахариды и липиды [4, 5]. Исходя из этого представлялось целесообразным изучить белковый состав ВККК и исследовать наличие в вирионе транскриптазной активности. Были проведены также исследования по обнаружению в ВККК липидов и полисахаридов и идентификации составляющих их жирных кислот и моносахаров.

Материалы и методы. Вирус накапливали на растении махорки (*Nicotiana rustica* L.). Очистку проводили следующим образом. Листья махорки с ярко выраженными симптомами заболевания растирали в жидком азоте. К гомогенату добавляли буфер, содержащий 0,1 М глицин, 0,01 М $MgCl_2$, 0,01 М Na_2SO_3 , pH 8,0, затем фильтровали через нейлоновый фильтр. Фильтрат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Из надосадочной жидкости вирус осаждали 7 %-м полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000) в присутствии 0,15 М NaCl. Вирусный преципитат собирали центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин и ресуспендировали в буферном растворе (pH 7,0), содержащем 0,1 М глицин, 0,01 М $MgCl_2$. От ПЭГ освобождались центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин. Дальнейшую очистку вируса осуществляли методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (5—40 %) при 45000 об/мин в течение 45 мин в роторе SW-55 центрифуги «Beckman» (США). Опалесцирующую зону, содержащую вирус, отбирали.

Полученную вирусную суспензию наносили на

© Л. Ф. ДИДЕНКО, Л. А. МАКСИМЕНКО, Н. И. ПАРХОМЕНКО,
Н. С. ДЯЧЕНКО, Л. Д. ВАРБАНЕЦ, О. С. БРОВАРСКАЯ,
Н. М. ЗАРИЦКИЙ, 2001

сеточки с формваровыми пленками-подложками, контрастировали 2 %-й фосфорновольфрамовой кислотой (рН 6,8—7,0) и просматривали в электронном микроскопе ЭМБ-100. Электронную микроскопию проводили, используя также ультратонкие срезы клеток растений, пораженных вирусом. Для получения ультратонких срезов ткань фиксировали в 6 %-м глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) и осмиевом фиксаторе, обезвоживали и заключали в эпон-812. Срезы получали на ультрамикротоме BS 490 А.

Для идентификации нейтральных моносахаридов препараты гидролизovali 2 N HCl в течение 5 ч при 105 °С. Далее их анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде ацетатов полионов [6] на приборе марки «Сhrom-5» с пламенно-ионизационным детектором при использовании колонки (3,0 мм × 1,2 м) с 3 %-м неопентилсукцинатом на хромосорбе W (80—100 меш) в режиме хроматографии 170—200 °С.

Жирные кислоты метилировали 3 %-м раствором HCl в метаноле при 100 °С в течение 4 ч. Метилвые эфиры жирных кислот анализировали на газовом хроматографе «Цвет-110» с пламенно-ионизационным детектором и колонкой, заполненной 1 % SE-30 на хромосорбе W (AW-DMCS, 80—100 меш). Температуру программировали от 120 до 225 °С со скоростью нагрева 3 °С/мин. Компоненты идентифицировали, сравнивая время удерживания их со временем удерживания стандартов. Наличие оксикислот подтверждали трифторацетилизацией. Ненасыщенные жирные кислоты идентифицировали, используя гидрирование и бромирование [7].

Молекулярную массу вирусных белков определяли методом электрофореза в 8—20 %-м полиакриламидном геле по Лэммли [8]. После окрашивания белки денситометрировали с помощью прибора Du-8B Spectrophotometer («Beckman», США) при длине волны 560 нм.

РНК-полимеразную активность *in vitro* определяли в инкубационной смеси, содержащей 100 мМ трис-HCl (рН 8,0); MgCl₂ в концентрациях от 0 до 10 мМ, 2,5 мМ дитиотреитол, 12,5 мМ (NH₄)₂SO₃ и по 0,1 мМ АТФ, СТР и GTP, 3 мкКи C¹⁴(UTP); 30 мкг ВККК и NP-40 в концентрациях от 0 до 2 % [9].

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопический анализ показал, что препараты вируса не содержали дополнительных примесей. Изолированные вирусные частицы, в основном, имели характерную для рабдовирусов пулевидную форму, размеры их составляли (145 × 75) ± 5 нм (рис. 1, а). Пулевидная форма изолированных вирусных час-

тиц обусловлена разламыванием бациллоидных частиц во время их выделения. В некоторых случаях в соке из пораженных растений обнаруживали и бациллоидную форму вирусных частиц, но на ультратонких срезах ткани листа *N. rustica* вирионы имели, как правило, бациллоидную форму (рис. 1, б). На поперечных срезах вирусной частицы выявляются два наружных слоя (рис. 1, в), представляющих собой оболочку, на которой расположены выступы в виде шероховатого слоя. Внутренний слой диаметром 50 нм является поперечным срезом нуклеокапсида вируса.

Как выяснилось, наиболее типичным местом созревания и локализации вирионов является перинуклеарная зона ядра (рис. 1, в). Кроме того, вирусные частицы, окруженные мембраной, также обнаруживаются и в цитоплазме (рис. 1, з). Такая субклеточная локализация вирионов характерна и для других фиторабдовирусов, в частности, для вируса штриховатой мозаики пшеницы (ВШМП) и вируса желтой карликовости картофеля (ВЖКК) [10, 11].

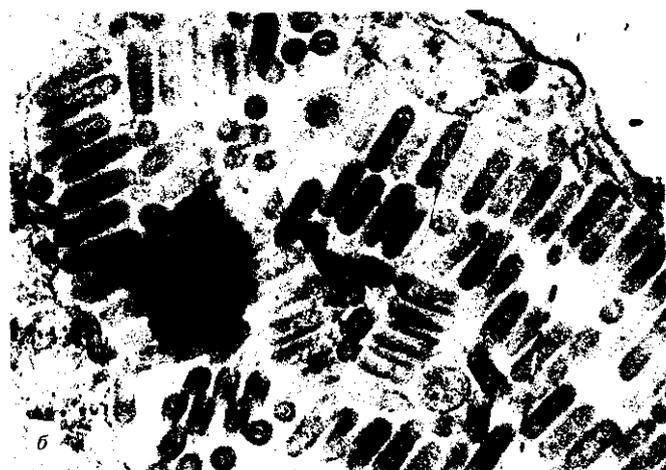
Для фиторабдовирусов характерно наличие в вирионе шести мажорных полипептидов. Согласно принятому в литературе обозначению, белки классифицированы следующим образом: G с молекулярной массой 65—90 кДа — гликопротеид, расположенный на поверхности вириона; M₁ (27—44 кДа) и M₂ (22—25 кДа) — мембранные белки, заполняющие пространство между нуклеокапсидом и липопротеидной оболочкой; N (47—62 кДа) — структурный белок, образующий чехол, в который упакована геномная РНК, а также нуклеокапсидные белки NS (40—50 кДа) и L (150—190 кДа), обладающие транскриптазной активностью [12].

Электрофоретический анализ показал, что молекулярные массы белков ВККК соответствовали 22, 36, 49, 56, 75 и 128 кДа (рис. 2). Следует отметить, что полипептидный состав ВККК очень близок по молекулярным массам полипептидному составу ВЖКК [13] и имеет сходство с молекулярными массами других рабдовирусов, поражающих растения и теплокровных [14].

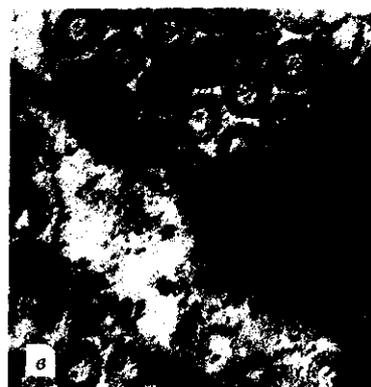
При изучении репликационной активности ВККК *in vitro* нами была проведена оптимизация инкубационной смеси по содержанию ионов Mg и детергента NP-40. При этом состав инкубационной смеси оставался неизменным, кроме содержания ионов Mg в одном варианте опытов и детергента NP-40 — в другом. В результате наибольшее включение метки в синтезируемый продукт отмечалось в пробах, содержащих 2 мМ MgCl₂ (рис. 3, а). Повышенное содержание Mg²⁺ (8 и 10 мМ) в инкубационной смеси ингибировало полимеразную активность



a



b



c

Рис. 1. Электронная микроскопия
ная форма ($\times 42000$); *b* — бак
($\times 75000$); *в* — поперечный среза
($\times 75000$); *г* — вирусные части
($\times 52000$)



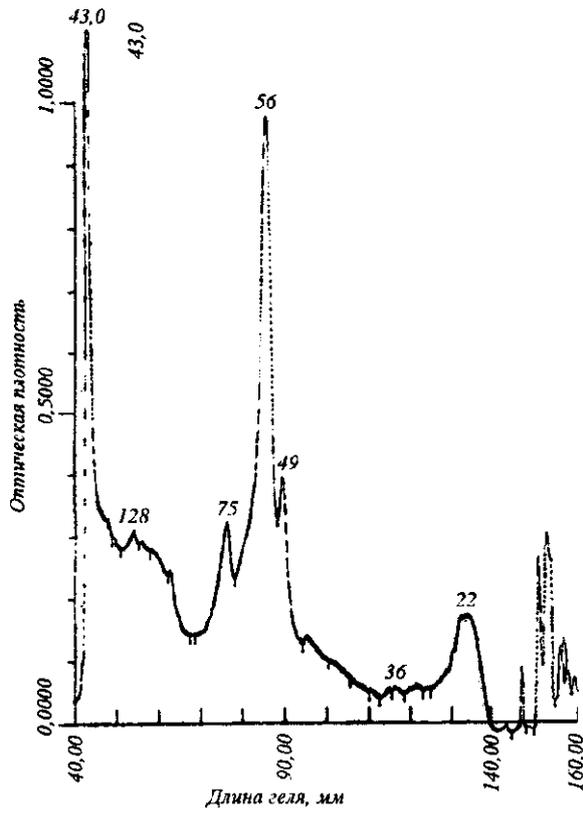


Рис. 2. Денситограмма электрофореграммы в ПААГ структурных белков ВККК

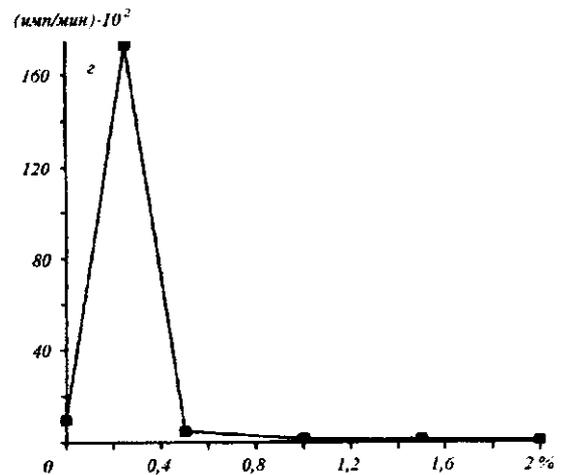
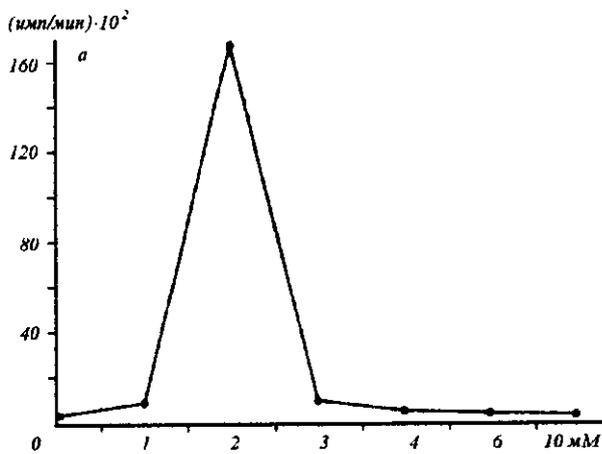
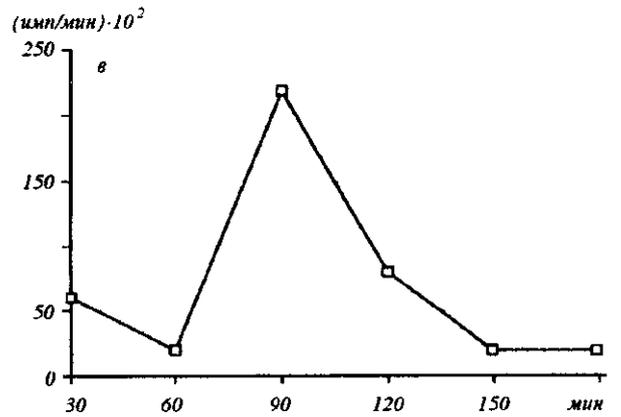
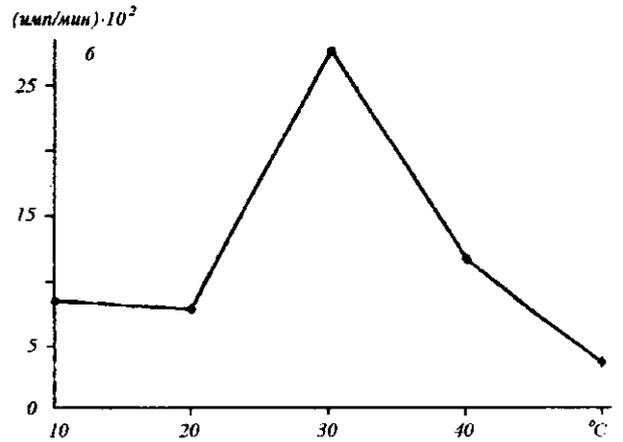


Рис. 3. Влияние на репликационную активность ВККК *in vitro* (по оси ординат — интенсивность мечения продукта РНК-полимеразы ВККК): а — Mg^{2+} ; б — температуры; в — времени инкубации; г — детергента NP-40

ВККК, что согласуется с литературными данными относительно вируса некротического пожелтения брокколи [15]. При изучении влияния температуры и продолжительности инкубации на РНК-полимеразную активность установлено, что наибольшее включение метки в синтезируемый продукт происходит при температуре 30 °С (рис. 3, б) и продолжительности инкубации в течение 90 мин (рис. 3, в).

Кроме того, обнаружено, что при содержании в инкубационной среде 0,2 % детергента NP-40 происходит более активное включение метки в синтезируемый продукт (рис. 3, г).

Таким образом, впервые в составе ВККК выявлены структурные белки, обладающие РНК-зависимой РНК-полимеразной активностью, что характерно для вирусов, принадлежащих к семейству *Rhabdoviridae*.

До настоящего времени имеется очень мало информации относительно моносахаридного состава фиторабдовирусов. Нами установлено, что преобладающими нейтральными моносахаридами в составе ВККК являются глюкоза (35,2) и манноза (23,8), в меньших количествах присутствуют галактоза (12,3), арабиноза (10,4), рамноза (9,7) и фукоза (8,6) (рис. 4). Манноза и глюкоза также были обнаружены в составе вируса везикулярного стоматита (ВВС), однако в отличие от ВККК он содержит N-ацетилглюкозамин [4]. Авторы подчеркивают, что состав углеводов вариабелен и зависит от типа клеток, в которых размножаются рабдовирусы.

Одним из основных структурных компонентов рабдовирусов являются жирные кислоты [5]. Как выяснилось, ВККК также содержит липиды (рис. 5). В составе вириона мы обнаружили октадеценую (олеиновую), октадекановую (стеариновую), гексадекановую (пальмитиновую) жирные кислоты и пока неидентифицированную X-жирную кислоту. В процентном соотношении жирные кислоты распределились следующим образом: X — 28,3, октадеценая — 6,5, октадекановая — 13,7, гексадекановая — 51,5. Последняя обнаружена в наибольшем количестве. Следует отметить, что ранее ее выявили и в ВВС, принадлежащем к тому же семейству [5].

Таким образом, в результате проведенных исследований определены молекулярные массы структурных белков ВККК, обнаружена транскриптазная активность в вирионе и подобраны оптимальные условия для проявления ее функциональной активности в системе репликации *in vitro*. Установлены некоторые закономерности, свойственные ВККК и ВВС. Так, в обоих вирусах выяв-

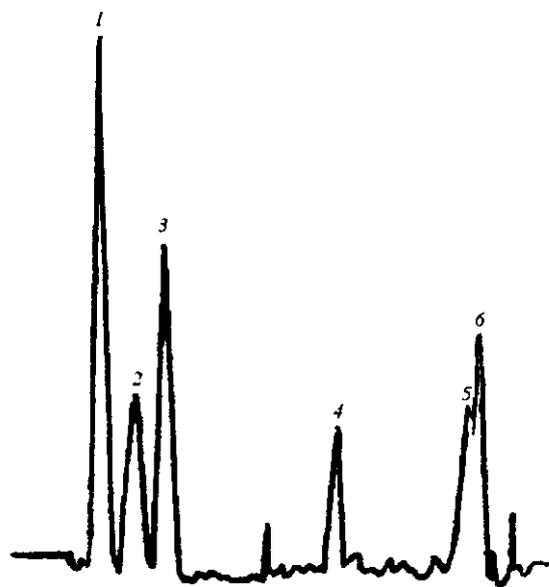


Рис. 4. Идентификация (%) моносахаридов ВККК методом газожидкостной хроматографии: 1 — глюкоза (35,2); 2 — галактоза (12,3); 3 — манноза (23,8); 4 — арабиноза (10,4); 5 — фукоза (8,6); 6 — рамноза (9,7)

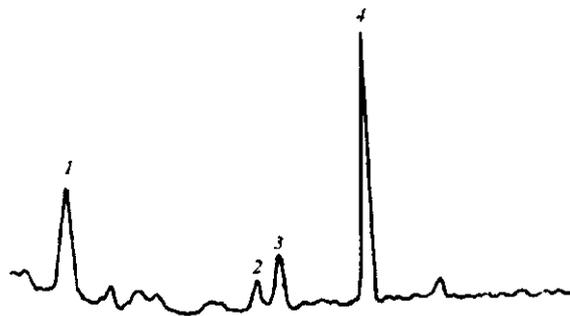


Рис. 5. Наличие (%) жирных кислот в составе ВККК: 1 — неидентифицированная X (28,3); 2 — октадеценая (6,5); 3 — октадекановая (13,7); 4 — гексадекановая (51,8)

лена транскриптазная активность и сходные по молекулярной массе полипептиды.

Впервые охарактеризованы моносахариды и жирные кислоты в составе ВККК. При сопоставлении моносахаридного и липидного составов ВККК

и ВВС выявлены уникальные и общие моносахариды и жирные кислоты в каждом из них. Полученные данные свидетельствуют, по нашему мнению, о сходстве структурной организации вирионов и универсальном характере экспрессии генома рабдовирусов, поражающих теплокровных и растения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований.

L. F. Didenko, L. A. Maksimenko, N. I. Parhomenko,
N. S. Dyachenko, L. D. Varbanets, O. S.
Brovarskaya, N. N. Zaritsky

Some properties of structural components of curly potato dwarf virus

Summary

The curly potato dwarf virus (CPDV) relate to family of Rhabdoviridae according to their morphological and structural peculiarity. It was studied the structural proteins of CPDV. Replicase activity was revealed in their composition and the optimum conditions were defined in the system of a replication in vitro. The monosaccharides and fatty acids were detected in the composition of CPDV. The comparative investigations of monosaccharide and lipid composition both of CPDV and vesicular stomatitis virus (VSV) showed that some of them are as well unique as common for these viruses. The obtained data testify, in our opinion, on a similarity of the organization and universal character of the genome expression of rhabdoviruses infecting both mammals and plants.

Л. Ф. Діденко, Л. А. Максименко, Н. І. Пархоменко,
Н. С. Дяченко, Л. Д. Варбанець, О. С. Броварська,
Н. М. Зарицький

Деякі властивості структурних компонентів фіторабдовірусу кучерявої карликової картоплі

Резюме

Фітовірус кучерявої карликовості картоплі (ВККК) за своїми морфологічними і структурними особливостями належить до родини Rhabdoviridae. Вивчено структурні білки ВККК та визначено репліказну активність у їхньому складі, досліджено оптимальні умови для прояву її активності в системі реплікації in vitro. У складі ВККК охарактеризовано моносахариди і жирні кислоти. При порівнянні моносахаридного і ліпідного складів ВККК і вірусу везикулярного стоматиту виявлено унікальні та загальні моносахариди і жирні кислоти в кожному з них. Одержані дані свідчать, на наш погляд, про схожість організації і універсальність характеру експресії геному рабдовирусів, які уражують теплокровних та рослини.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козар Ф. Е., Курбала М. Я., Щербина Н. В., Зарицкий Н. М. Курчавая карликовость — вирусная болезнь картофеля, вызванная бациллоидным вирусом из группы рабдовирусов // Вирус. болезни с.-х. культур.—М., 1980.—С. 69—76.
2. Wagner R. R. Reproduction of rhabdoviruses // Comprehensive Virology / Eds H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner.—New York: Plenum press, 1975.—Vol. 4.—P. 1—93.
3. Francki R. J. B., Kitajima E. W., Peters D. Rhabdoviruses // Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis / Ed. E. Kurstar.—Amsterdam: Elsevier, 1981.—P. 455—489.
4. Compars R. W., Rlerk H. D. Viral membranes // Comprehensive Virology / Eds H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner // New York; London: Plenum press, 1979.—Vol. 13.—P. 347—355.
5. McSharry J. J., Wagner R. R. Lipid composition of purified vesicular stomatitis virus // J. Virol.—1971.—7, N 1.—P. 59—70.
6. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов.—Киев: Наук. думка, 1982.—201 с.
7. Васюренко З. П., Чернявская Е. Н., Оленко Л. В. Особенности состава жирных кислот липидов у *Providencia alcalifaciens* и *Providencia stuartii* // Микробиология.—1982.—51, № 1.—С. 54—59.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
9. Brakke M. K., White J. L., Samson R. G., Joche J. Chlorophyll, chloroplast ribosomal RNA, and DNA are reduced by barley stripe mosaic virus systemic infection // Phytopathology.—1988.—78, N 5.—P. 570—574.
10. Lee P. E. Morphology of wheat striate mosaic virus and its localization in infected cell // Virology.—1967.—33, N 1.—P. 84—94.
11. MacLeod R., Black L. M., Moyer F. H. The fine structure and intracellular localization of potato yellow dwarf virus // Virology.—1966.—29, N 4.—P. 540—552.
12. Wagner R. R., Prevec L., Brown F., Summers D. F., Sokol F., MacLeon R. Classification of rhabdovirus proteins: a proposal // J. Virol.—1972.—10, N 4.—P. 1228—1230.
13. Khudson D. L., MacLeod R. The proteins of potato yellow dwarf virus // Virology.—1972.—47, N 1.—P. 285—295.
14. Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. V., Martelli G. P., Mayo M. A., Summers M. D. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses // Arch. Virol.—1995.—Suppl. 10.—P. 275—288.
15. Toriyama S., Peters D. Differentiation between Broccoli Necrotic yellows virus and Lettuce Necrotic yellows virus by their transcriptase activity // J. Gen. Virol.—1981.—56, N 1.—P. 59—66.

УДК 578.824+577.15+577.216.3
Надійшла до редакції 29.03.2000