

Lea MEREMAA

ПОЛУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ, МЕЧЕННЫХ ^{14}C

Lea MEREMAA. MÕNEDE ^{14}C -GA MÄRGISTATUD TAIMEVIIRUSTE SAAMINE.

Lea MEREMAA. LABELLING OF SOME PLANT VIRUSES WITH ^{14}C

При изучении биосинтеза вирусных частиц (трансляция вирусной РНК в бесклеточных белоксинтезирующих системах, самосборка вирусной частицы из нуклеиновой кислоты и из структурного белка), а также при исследовании физико-химических свойств вирионов необходимо иметь меченые радиоактивными изотопами (^{14}C , ^3H , ^{32}P) препараты вирусов и их компонентов.

Известно несколько работ, описывающих методики получения радиоактивных вирусов. Обычно наилучший выход меченого вируса получают в результате введения в растение изотопа через корни или через дыхательную цепь в течение нескольких дней в период максимального синтеза вируса (Sugiyama, Fraenkel-Conrat, 1961; Метьюз, 1973). Однако использование подобной методики в ряде случаев ограничено (в зависимости от характера вводимого радиоактивного предшественника — аминокислоты, а также пурины и пиримидины, входящие в состав нуклеиновых кислот). В таких случаях для введения метки кусочки листьев или целые листья (через стебелек) пропитывают раствором радиоактивного изотопа (Eiron, Marcus, 1973; Rice, Fraenkel-Conrat, 1973). Используя последний путь введения радиоактивности, нами получены меченые ^{14}C аминокислотами препараты вируса табачной мозаики (ВТМ), вирусов X_{23} и N_R картофеля ($BX_{23}K$, BN_RK) с удельной активностью соответственно 0,29, 0,14 и 0,03 мкюри на 1 мг структурного белка вируса.

Для получения меченых вирусов брали инокулированные листья инфицированного растения за несколько дней до того, когда концентрация вириона в них достигала максимальной величины: для получения меченого ВТМ брали листья *Nicotiana tabacum* через 7—8 дней после инфицирования (кривую концентрации вириона см. Oxelfelt, 1970), а для получения $BX_{23}K$ и BN_RK — инокулированные листья *N. glutinosa*, соответственно через 8—9 и 5—6 дней (кривые концентрации вирионов см. Хэдрьярв, 1973). В каждый свежесрезанный лист через стебелек вводили по 0,02—0,05 мл раствора аминокислот, меченых ^{14}C (исходный раствор аминокислот, меченых ^{14}C , содержал 1 мкюри/мл и был нейтрализован 1 М щелочью). Для этого использовали чашку Петри с перфорированной крышкой из оргстекла и фторопластовой внутренней подложкой с углублениями для радиоактивного раствора. Для введения метки брали 5—10 листьев. После впитывания раствора

и добавочной порции дистиллированной воды меченые листья переносят в воду и выдерживали в ней в течение 3—4 суток при 20°C (в воду добавляли несколько капель тимола для предотвращения бактериального заражения). По истечении этого срока листья обсушивали фильтровальной бумагой и помещали на несколько дней в холодильник (5°).

Перед выделением вируса к меченым листьям прибавляли примерно одну весовую часть немеченых листьев (для увеличения количества выделяемого вируса) — из той же партии растений, откуда были взяты листья для введения метки. ВТМ изолировали по методике Х. Боздткера и Н. С. Симмонса (Boedtker, Simmons, 1958). ВХ₂₃К и ВN_RК выделяли по методу У. Хэдрейрва (1973). Вирусные препараты очищали от примесей дифференциальным центрифугированием: ВТМ и ВХ₂₃К повторно осаждали при 55 000 *g* в течение 2,5 ч (VAC-60, ротор 6×10 *мл*), а ВN_RК окончательно выделяли центрифугированием в течение 1,5 ч при 105 000 *g*.

Вирусный белок определяли методом Лоури (Lowry и др., 1951) прямо в вирусном растворе, т. е. без выделения белка. Калибровочную кривую составляли по альбумину (альбумин из сыворотки человека — «Serwa»). Оптическую плотность растворов измеряли на фотоэлектрическом колориметре ФЭК-56М. По количеству вирусного белка был рассчитан приблизительный выход данного вируса (в *мкг/г* листьев). По полученным результатам (таблица) видно, что выход ВN_RК завышен по сравнению с данными У. Хэдрейрва (1973). Этот факт, по-видимому, объясняется методикой очистки вирусного препарата, поскольку нами не был проведен электрофорез в градиенте плотности сахарозы для окончательного выделения вируса. Что касается выхода ВХ₂₃К, то тут наблюдается полное совпадение с данными У. Хэдрейрва (1973). Выход ВТМ занижен, если сравнить полученные данные с результатами Ф. С. Боудена (Bawden, 1964), причиной чего является, по всей вероят-

Включение раствора аминокислот, меченых ¹⁴C, в структурный белок растительного вируса

Вирус	Растение-хозяин	Содержание белка, % по данным литературы	Вес листьев, г		Приблизительный выход вируса на 1 г листьев, мкг		Удельная активность структурного белка вируса мкюри/мг		Включенные меченые ¹⁴ C аминокислот, %
			Всего	Меченые ¹⁴ C	По данным литературы	По нашим данным	1	2	
ВТМ	<i>N. tabacum</i>	95 (Мэтьюз, 1973)	10,2	4,8	2000 (Bawden, 1964)	310	0,29	0,62	0,51
ВХ ₂₃ К	<i>N. glutinosa</i>	94 (Bawden, Kleczkowski, 1959)	6,2	2,9	100—200 (Хэдрейрв, 1973)	210	0,14	0,30	0,60
ВN _R К	<i>N. glutinosa</i>	82 (Хэдрейрв, 1973)	7,5	3,0	100—300 (Хэдрейрв, 1973)	460	0,03	0,075	0,29

Примечание. 1 — экспериментальная величина, 2 — производная величина, рассчитанная с учетом разбавления исходного меченого вируса немеченым при выделении вируса.

ности, многократное переосаждение вируса для его окончательной очистки.

При сравнении величин удельной активности структурного белка выделенных вирусов можно увидеть, что удельная активность белка ВТМ почти на порядок выше соответствующей величины для белка ВN_RK. Такой результат в большой мере объясняется тем, насколько активно идет в листьях при их обработке раствором радиоактивного изотопа синтез структурного белка данного вируса, и поэтому, несомненно, самое прямое и существенное влияние на включение метки имеет срок введения метки (продолжительность периода до того дня, когда концентрация вириона в инокулированных листьях достигала максимальной величины). Тщательным подбором условий введения метки для каждого вируса в отдельности, а также варьированием количества вводимой радиоактивности можно, по-видимому, добиться значительного повышения удельной активности структурного белка.

Радиоактивность препаратов подсчитывалась на сцинтилляционных счетчиках Nuclear Chicago (эффективность по стандарту ¹⁴C — 90%) и УРБ-2ЦР, УРБ-2Д (эффективность по стандарту ¹⁴C — 22%).

В заключение автор выражает благодарность И. Сарв из Таллинского научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и гигиены и М. Саарма из Тартуского государственного университета за помощь при измерении радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

- Мэтьюз Р., 1973. Вирусы растений. М.
- Хэдрейрв У. Г., 1973. Очистка вирусов М и N картофеля и изучение некоторых их физико-химических свойств. Автореф. дис. канд. биол. н. Таллин.
- Bawden, F. C., Kleczkowski, A., 1959. Some properties of decomposition products of potato virus X. *Virology* 7 : 375—384.
- Bawden, F. C., 1964. *Plant viruses and virus diseases*. New York.
- Boedtker, H., Simmons, N. S., 1958. The preparation and characterization of essentially uniform tobacco mosaic virus particles. *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (10) : 2550—2556.
- Efron, D., Marcus, A., 1973. Translation of TMV-RNA in a cell-free wheat embryo system. *Virology* 53 : 343—348.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1) : 265—272.
- Oxelfelt, P., 1970. Development of systemic tobacco mosaic virus infection. I. Initiation of infection and time course of virus multiplication. *Phytopathol. Z.* 69 (3) : 202—211.
- Rice, R., Fraenkel-Conrat, H., 1973. Fidelity of translation satellite tobacco necrosis virus ribonucleic acid in a cell-free *Escherichia coli* system. *Biochemistry* 12 (2) : 181—187.
- Sugiyama, T., Fraenkel-Conrat, H., 1961. Identification of 5'linked adenosine as end group of TMV RNA. *Proc. Natl. Acad. U.S.* 47 : 1393—1397.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
4/III 1976