

Леа МЕРЕМАА

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РНК ВИРУСА N_R КАРТОФЕЛЯ ГЕЛЬФИЛЬТРАЦИЕЙ НА БИОГЕЛЕ

Вирус N_R картофеля (BN_RK), относящийся к группе кукумовирусов, судя по его физико-химическим свойствам, является одной из форм вируса огуречной мозаики (ВОМ), наиболее близкой к форме ВОМ_Q (Hödrejäv, Pihelgas, 1974). Это мелкий сферический вирус со средним диаметром частиц около 30 нм (на электронно-микроскопических снимках вирусных препаратов, полученных при негативном контрастировании). Препараты BN_RK состоят из идентичных по седиментационным свойствам нуклеопротеидных частиц с молекулярным весом $5,6 \cdot 10^6$ дальтон, в которые входит РНК с молекулярным весом $1 \cdot 10^6$ дальтон; содержание РНК в вирионах составляет 18%.

Известно, что из двадцати групп растительных вирусов в девять включены вирусы, геном которых состоит из двух или более молекул физически независимых фрагментов одноцепочечной РНК, упакованных в две или более вирусные частицы, которые отличаются по форме и числу включаемых фрагментов РНК (Fenner, 1976). Этим и объясняется то, что препараты некоторых растительных вирусов гетерогенны по частицам (по весу вириона или по плотности). У этих вирусов геном является функционально разделенным, так как инфекционна только тотальная смесь фрагментов вирионной РНК, а каждый из фрагментов в отдельности неактивен (Van Vloten-Doting, Jaspars, 1977).

ВОМ является типичным представителем группы вирусов с фрагментированным геномом. Показано, что при электрофорезе в полиакриламидном геле РНК его разделяется на шесть типов: на четыре основных и два минорных (Kaper, West, 1972; Kaper, Waterworth, 1973; Lot и др., 1974). Генетическая информация вируса распределена между четырьмя основными типами РНК (РНК 1, РНК 2, РНК 3, РНК 4), три из которых (РНК 1, РНК 2, РНК 3) обладают инфекционностью (Pedersen, Symons, 1973; Lot и др., 1974), т. е. в них включена вся информация для размножения вируса. Все четыре РНК являются активными матрицами синтеза белка в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Два крупных фрагмента генома (РНК 1 и РНК 2) содержат один цистрон; третий фрагмент (РНК 3), по-видимому, включает два цистрона, один из которых (ген структурного белка) не может быть выражен при трансляции РНК 3. Самая короткая РНК (РНК 4) содержит только ген структурного белка (Schwinghamer, Symons, 1975, 1977).

Настоящее исследование было предпринято потому, что в предшествующих экспериментах нам не удалось идентифицировать структурный белок BN_RK при трансляции его РНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе, приготовленной из клеток *E. coli* MRE 600. Хотя такой результат, возможно, обусловлен несколькими причинами, нам казалось целесообразным подробнее изучить целостность препаратов

РНК, так как данные, характеризующие вирусную РНК В_{NRK}, недостаточны (Hödrejäv, Pihelgas, 1974). Предварительные результаты наших исследований опубликованы ранее (Меремаа, 1977).

Материал и методика

Очищенный препарат В_{NRK} выделяли в соответствии с разработанными ранее методами из системно инфицированных листьев *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun' или *N. glutinosa* L. через 10 дней после их инокуляции вирусом (Хэдрейрв, 1973). Растения выращивали в боксе при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ при искусственном освещении. Вирус табачной мозаики (ВТМ) выделяли общепринятым методом (Boedtker, Simmons, 1958) из листьев *N. tabacum* L. 'Samsun'. Вирусные препараты были очищены методом дифференциального ультрацентрифугирования ($2\times$): ВТМ осаждали при 55 000 *g* в течение 2,5 ч и В_{NRK} при 105 000 *g* в течение 1,5 ч (VAC-601, ротор 8 \times 11). Вирусную РНК выделяли методом фенольной депротенинизации из вируса, суспендированного в боратном буфере (рН 9,0), содержащем динатриевую соль этилендиаминотетрауксусной кислоты (EDTA), в присутствии додецилсульфата натрия. Окончательно РНК очищали от фенола и прочих низкомолекулярных примесей при помощи многократного нересаждения с этанолом. Препараты РНК хранили в сухом льду в виде замороженного раствора в бидистиллированной воде.

Гельфильтрацию препаратов РНК проводили в 0,02 *M* трис-НСl буфере (рН 8,5), содержащем 0,1 *M* NaCl, 0,001 *M* EDTA (TEN-буфер) при 5—8°. Использовали следующие колонки: сефадекс Г-200 сверхтонкий (1 \times 22 см), Bio-Gel А-1,5м (1 \times 22 см) и Bio-Gel А-5м (1 \times 22 см и 1,3 \times 70 см). В колонку вводили от 0,5 до 2,0 мл исследуемого раствора в зависимости от размеров колонки. Перед внесением в колонку к пробам добавляли раствор 1 *M* NaCl до конечной концентрации 0,1 *M*. Колонки элюировали с TEN-буфером со скоростью 2—3,5 мл/ч. Фракции собирали по 0,5—1,5 мл в зависимости от размеров колонки. Оптическую плотность при 260 нм измеряли на спектрофотометре СФ-26.

При анализе РНК В_{NRK} методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы использовали ее линейный градиент (10—40%), приготовленный в TEN-буфере (Schwinghamer, Symons, 1975). Центрифугировали в течение 7 ч при 36 000 об/мин в роторе SW 3 \times 5 (VAC-601). На градиент наносили 0,2—0,3 мл исследуемого раствора РНК суммарной оптической плотностью 2—4 единицы A_{260} . Градиент фракционировали при помощи сифона (по 10 капель каждой фракции).

В качестве внешних маркеров при гельфильтрации использовали РНК, выделенную из ВТМ, транспортную РНК и тотальную рибосомальную РНК, полученную из *E. coli* В, а также декстрановый синий с молекулярным весом $2 \cdot 10^6$ (Fluka AG, Buchs SG — Швейцария). Транспортную РНК (т-РНК) выделяли из неразрушенных клеток *E. coli* В, выращенных на минимальной среде с глюкозой и очищали от рибосомальной РНК и других примесей на колонке сефадекса А-50 (2 \times 11 см) (Бреслер и др., 1970). Суммарную рибосомальную РНК выделяли из рибосом *E. coli* В методом фенольной депротенинизации. Рибосомы готовили из клеток *E. coli* В, выращенных на максимальной среде. Очищали рибосомы дифференциальным центрифугированием ($2\times$) при 105 000 *g* в течение 2 ч (VAC-601, ротор 8 \times 11) в 0,1 *M* трис-НСl в буфере (рН 7,8), содержащем 0,05 *M* KCl, 0,01 *M* ацетата магния и 0,006 *M* β-меркаптоэтанола.

Результаты и обсуждение

Изученный препарат РНК BN_{RK} , выделенный методом фенольной депротенинизации, характеризуется следующими величинами:

$$A_{260}/A_{230} = 2,1 \dots 2,3 \quad A_{260}/A_{280} = 1,9 \dots 2,1$$

в зависимости от партии препарата. Оказалось, что при гельфильтрации такой РНК через колонку сефадекса Г-200 (1×22, сверхтонкий) в TEN-буфере при pH 8,5, она, как и следовало ожидать, не проникает в частицы геля и элюируется в свободном объеме колонки в виде слегка несимметричного пика. Следует отметить, что в сходных условиях РНК ВТМ проходит также через колонку без задержки, но элюируется в виде симметричного пика. Очевидно, РНК BN_{RK} негомогенна и в ней содержится относительно низкомолекулярный компонент (молекулярный вес около 10^5). Далее РНК была пропущена через колонки с биогелями (1×22 см) Bio-Gel A-1,5m и Bio-Gel A-5m. Соответствующие профили гельфильтрации приведены на рис. 1 и 2, откуда видно, что значительную часть РНК составляет высокомолекулярная фракция (молекулярный вес около 10^6). Часть разделяется на колонках и появляется относительно низкомолекулярная фракция, вероятно, в результате деградации высокомолекулярной РНК. Подбирая условия гельфильтрации, нам удалось разделить BN_{RK} на колонке с биогелем на пять фракций. На рис. 3 приведен профиль элюции BN_{RK} с колонки Bio-Gel A-5m (1,3×70 см). Отдельные пики (1, 2, 3, 4, 5) отмечены в порядке уменьшения молекулярного веса. Отметим, что в аналогичных условиях РНК ВТМ хроматографируется в виде одного высокомолекулярного пика.

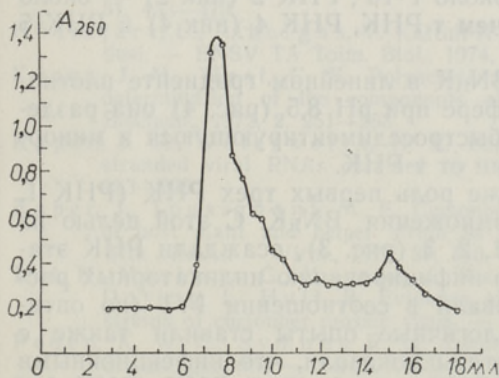


Рис. 1. Гельфильтрация РНК BN_{RK} в колонке (1×22 см) с биогелем Bio-Gel A-1,5m (TEN-буфер, pH 8,5).

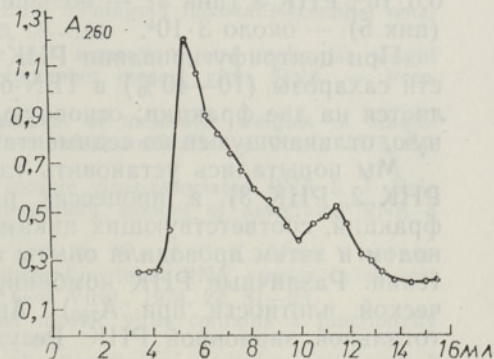


Рис. 2. Гельфильтрация РНК BN_{RK} в колонке (1×22 см) с биогелем Bio-Gel A-5m (TEN-буфер, pH 8,5).

Мы попытались определить ориентировочное значение молекулярного веса РНК соответствующих пиков. С этой целью через колонку пропустили растворы ряда маркеров (рис. 3) с известными молекулярными весами: так, мы использовали декстрановый синий в качестве исключаемого маркера ($M = 2 \cdot 10^6$), суммарную рибосомальную РНК из *E. coli* В, основные компоненты которой имеют $M = 1,2 \cdot 10^6$ и $M = 0,6 \cdot 10^6$, а также т-РНК из *E. coli* В с $M = 2,5 \cdot 10^4$ (Инграм, 1975). Бла-

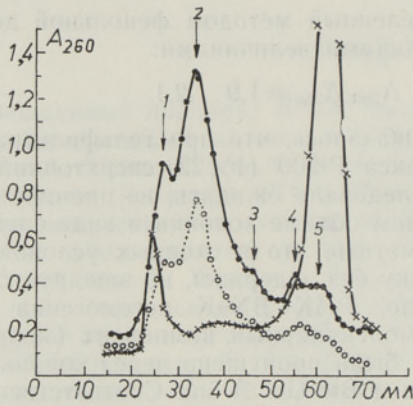


Рис. 3. Гельфильтрация РНК BN_{rK} в колонке ($1,3 \times 70$ см) с биогелем Bio-Gel A-5m (TEN-буфер, pH 8,5). ●, ○ — элюирование различных препаратов РНК, × — элюирование маркеров (декстрановый синий + т-РНК из *E. coli* В).

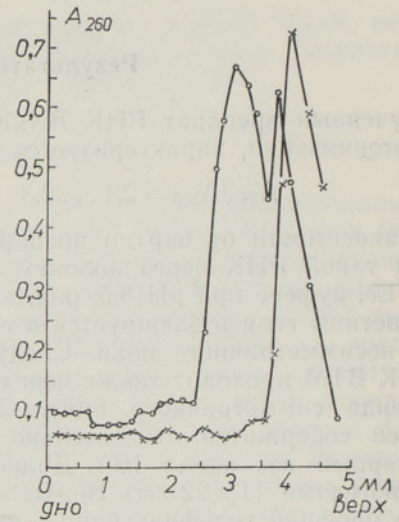


Рис. 4. Центрифугирование РНК BN_{rK} в градиенте плотности сахарозы (10—40%) в TEN-буфере при pH 8,5 в течение 7 ч при 36 000 об/мин (VAC-601, SW 3×5). ○ — РНК BN_{rK} , × — т-РНК из *E. coli* В.

годаря этим соединениям оказалось возможным оценить приближенные величины молекулярных весов РНК, соответствующие пикам 1—5: РНК 1 (пик 1) молекулярный вес около $1 \cdot 10^6$, РНК 2 (пик 2) — около $0,6 \cdot 10^6$, РНК 3 (пик 3) — больше, чем т-РНК, РНК 4 (пик 4) и РНК 5 (пик 5) — около $3 \cdot 10^4$.

При центрифугировании РНК BN_{rK} в линейном градиенте плотности сахарозы (10—40%) в TEN-буфере при pH 8,5 (рис. 4) она разделяется на две фракции: основную, быстроседimentирующую и минорную, отличающуюся по седиментации от т-РНК.

Мы попытались установить также роль первых трех РНК (РНК 1, РНК 2, РНК 3) в процессах размножения BN_{rK} . С этой целью из фракций, соответствующих пикам 1, 2, 3 (рис. 3), осаждали РНК этанолом и затем проводили опыты по инфицированию индикаторных растений. Различные РНК комбинировали в соотношении 1:1 (по оптической плотности при A_{260}). Аналогичные опыты ставили также с тотальной вирионной РНК. Результаты показали, что инфекционными были только тотальная вирионная РНК и смесь трех РНК (РНК 1+РНК 2+РНК 3), но каждая из них в отдельности была неактивной. Отсюда следует, что BN_{rK} , очевидно, является вирусом с функционально фрагментированным геномом. По данным настоящей работы, трудно, однако, что-нибудь определенное сказать о функциях РНК 4 и РНК 5 (рис. 3). Возможно, что обе они являются продуктами разрушения высокомолекулярной РНК нуклеазами, но не исключено, что их функция сходна с функцией соответственно РНК 5 и РНК 6 у ВОР. РНК 5 и РНК 6 были обнаружены в препаратах ВОР уже в относительно ранних исследованиях (Kapre, West, 1972; Peden, Symons, 1973), однако их нативность осталась спорной, так как их не всегда и не во всех штаммах удалось идентифицировать. Более поздними исследованиями доказано, что по крайней мере одна из них, а именно РНК 5,

постоянно присутствует в определенных штаммах ВОМ (Капер, Tousignant, 1977).

В заключение следует отметить, что, по данным гельфильтрации на биогелях и по центрифугированию в градиенте плотности сахарозы, РНК BN_RK негомогенна и состоит из нескольких ее видов, различающихся по молекулярному весу. Три из них необходимы для размножения вируса, т. е. BN_RK , очевидно, является вирусом с функционально фрагментированным геномом. Следует также отметить, что разделение вирусных РНК методом гельфильтрации на биогеле на несколько различных РНК может оказаться перспективным методом выделения гомогенных препаратов различных высокомолекулярных РНК наряду с общепринятыми методами центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и электрофореза в полиакриламидном геле (Schwinghamer, Symons, 1975; Symons, 1978).

ЛИТЕРАТУРА

- Бреслер С. Е., Граевская Р. А., Меремаа Л. А., Саминский Е. М. Синтез полилизина в бесклеточной белоксинтезирующей системе из *E. coli*. — Мол. биол., 1970, 4, 190—199.
- Инграм В. Биосинтез РНК. — В кн.: Биосинтез макромолекул. М., 1975, 103—171.
- Меремаа Л. А. Изучение гомогенности РНК вирусов N_R картофеля. — II Всес. симп. по структуре и функции нуклеиновых кислот и биосинтеза белка в растениях. Тез. докл. Ташкент, 1977, 36.
- Хэдрейарв У. Г. Очистка вирусов М и N_R картофеля и изучение некоторых их физико-химических свойств. — Автореф. дис. канд. биол. н., Таллин, 1973.
- Boedtker, H., Symons, N. S. The preparation and characterization of essentially uniform tobacco mosaic virus particles. — J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2550—2556.
- Fenner, F. The classification and nomenclature of viruses. — J. Gen. Virol., 1976, 31, 463—470.
- Hödrejärvi, U., Pihelgas, V. Kartuli-N-viiruse mõningaid füüsikalisk-keemilisi omadusi. — ENSV TA Toim. Biol., 1974, 23, 99—103.
- Капер, J. M., West, C. K. Polyacrylamide gel separation and molecular weight determination of the components of cucumber mosaic virus RNA. — Prep. Biochem., 1972, 2, 251—263.
- Капер, J. M., Waterworth, H. E. Comparison of molecular weights of single-stranded viral RNAs obtained by two empirical methods. — Virol., 1973, 51, 183—190.
- Капер, J., Tousignant, M. E. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. — Virol., 1977, 80, 186—195.
- Lot, H., Marhoux, G., Marrou, J., Капер, J. M., West, C. K., Van Vloten-Doting, L., Hull, R. Evidence of three functional RNA species in several strains of cucumber mosaic virus. — J. Gen. Virol., 1974, 22, 81—93.
- Peden, K. W. C., Symons, R. H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. — Virol., 1973, 53, 487—492.
- Schwinghamer, M. W., Symons, R. H. Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system. — Virol., 1975, 63, 252—262.
- Schwinghamer, M. W., Symons, R. H. Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and in toad oocytes. — Virol., 1977, 79, 88—108.
- Symons, R. H. The two-step purification of ribosomal RNA and plant viral RNA by polyacrylamide slab gel electrophoresis. — Aust. J. Biol. Sci., 1978, 32, 25—27.
- Van Vloten-Doting, L., Jaspars, E. M. J. Plant covirus systems: three-component systems. — Comp. Virol., 1977, 11, 285—337.

Lea MEREMAA

KARTULI-N_R-VIIRUSE RNA FRAKTSIONEERIMINE GEELFILTREERIMISEL BIOGEEELIS

Artiklis esitatud katsetest ilmneb, et fenool-NaDS-ekstraktsioonimeetodil eraldatud kartuli-N_R-viiruse RNA on tsentrifuugimisel sahharoosi tiheduse gradiendis ja geelfiltreerimisel biogeelides heterogeenne. BioGel-A-5m kolonnis jaguneb ta viieks fraktsiooniks, millest kolm on vajalikud viiruse paljunemisel. On järeldatud, et kartuli-N_R-viirus on funktsionaalselt fragmenteeritud taimeviirus.

Lea MEREMAA

FRACTIONATION OF POTATO N_R VIRUS RNA BY GEL FILTRATION ON BIOGEL

Potato N_R virus RNA (PN_RV-RNA) was isolated by phenol-SDS extraction of purified virus suspensions. Sedimentation analysis of RNA by centrifugation in 10–40% sucrose density gradients showed the presence of two components (TEN-buffer: 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5; 36 000 rpm, 7 h, VAC-601, SW 3×5). Gel filtration RNA preparations on Bio-Gel A-5m column (1.3 × 70 cm) in TEN-buffer resolves five RNA species, designated RNAs 1, 2, 3, 4, and 5 respectively. The infectivity assay on tobacco and cowpea showed that the three largest species (RNA 1, RNA 2, RNA 3) are required for infectivity. This implies that PN_RV is a multicomponent RNA virus containing a functionally divided genome.