

Ульрих ХЁДРЕЯРВ, Хельви ХЁДРЕЯРВ

## ИНТЕРАКЦИЯ ИОНОВ МЕДИ(II) И ЦИНКА(II) С ВИРУСОМ X КАРТОФЕЛЯ

Известно, что растительные вирусы, кроме основных компонентов — нуклеиновой кислоты и белка, содержат металлы, прочно связанные с вирусом (Loring и др., 1962; Тихоненко, 1971). Способность связывать металлы в большей или меньшей мере характерна, по-видимому, для всех растительных вирусов. Кажется достоверным, что для связывания катионов все растительные вирусы имеют по меньшей мере один «сайт» на одну субъединицу вирусного белка (Durham и др., 1977). Полученные ранее данные свидетельствуют о том, что вирионы обладают большей способностью связывать металлы, чем субъединицы структурного белка, взятые отдельно (Durham, Hendry, 1977; Pfeiffer, Durham, 1977). Способность связывать металлы в значительной мере зависит от вируса, а также от pH и ионной силы среды. Для определения способности связывать металлы до сих пор использовали в основном метод потенциометрического титрования или диализ (Durham, Hendry, 1977; Durham, Haidar, 1977; Durham и др., 1977; Shaw, 1977). Ввиду того, что диализ требует длительного времени, а потенциометрическое титрование не позволяет достаточно однозначно определить способность связывания ионов металлов, если в растворе находятся ионы нескольких металлов, для изучения связывания металлов мы использовали предварительное выделение комплексов вирус—металл из реакционной смеси ультрацентрифугированием с последующим определением несвязанных ионов металла в растворе.

Изучение связывания металлов в основном ограничивается ионами кальция(II) и магния(II), которые выявлены в большом количестве у вируса табачной мозаики (ВТМ) (Loring и др., 1962). Нас интересует способность вирионов связывать ионы микроэлементов меди(II) и цинка(II), так как, исходя из выдвинутой нами гипотезы, одной из причин заболевания растений может быть вывод вирионами микроэлементов из процесса обмена веществ (Хёдреярв, Хёдреярв, 1972). При этом особый интерес представляет способность связывания ионов металлов в растворе, содержащем одновременно ионы нескольких металлов.

### Материал и методика

В работе использовали вирусы  $X_{17}$  и  $X_{23}$  картофеля ( $VX_{17}K$  и  $VX_{23}K$ ), полученные от исходного вируса  $X_3$  путем электрофоретического фракционирования в градиенте плотности сахарозы (Хёдреярв и др., 1977). Вирусы размножали в растениях *Nicotiana tabacum* L. var. «Samsun». Через 10 дней после заражения собирали листья растений. Очищенные препараты получали по модифицированному методу (Hödrejäv и др., 1971; Хёдреярв, 1972). Вирус выделяли ультрацентрифугированием и очищали электрофорезом в градиенте плотности сахарозы. После проведения электрофореза собирали фракции, содержащие вирус, и добавляли ЭДТА до 0,01 М концентрации. После этого проводили

трехкратное дифференциальное центрифугирование при 105 000 г в течение 90 мин и при 8000 г в течение 60 мин. При этом полученные вирусные осадки суспендировали в 0,02 М Na-ацетатном буфере (рН 6,5), приготовленном на бидистиллированной воде. Концентрацию вируса в растворах определяли по поглощению света при 260 нм, принимая  $E_{260}^{1 \text{ мг/мл}} = 2,7$  (Reichmann, 1959).

Для изучения связывания меди(II) и цинка(II) к растворам (0,15 мл)  $2 \cdot 10^3$  М сульфата меди(II) и сульфата цинка(II) в 0,02 М ацетатном буфере рН 6,5 добавляли вирусный препарат, доводя объем раствора до 0,6 мл 0,02 М ацетатным буфером. Для предотвращения гидролиза растворы солей готовили непосредственно перед использованием. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. Во всех опытах конечная концентрация ионов металла была  $5 \cdot 10^{-4}$  М.

Полученную смесь тщательно взбалтывали и держали в холодильнике в течение 40 мин. После этого вирионы отделяли центрифугированием при 105 000 г в течение 90 мин. Надосадочную жидкость выливали в калиброванную пробирку, добавляли 0,1 М HCl в таком количестве, чтобы содержание металла находилось в пределах 2—5 мкг/мл. В контрольные пробы вместо вирусного препарата добавляли 0,02 М Na-ацетатный буфер рН 6,5.

Содержание меди(II) и цинка(II) в пробах определяли при помощи атомно-абсорбционного спектрофотометра SP9-700 («Руче Unicam») при длинах волн 324,75 и 213,86 нм соответственно. Для определения использовали ацетилен-воздушное пламя. Чувствительность определения меди 0,035 мкг/мл и цинка 0,01 мкг/мл.

## Результаты

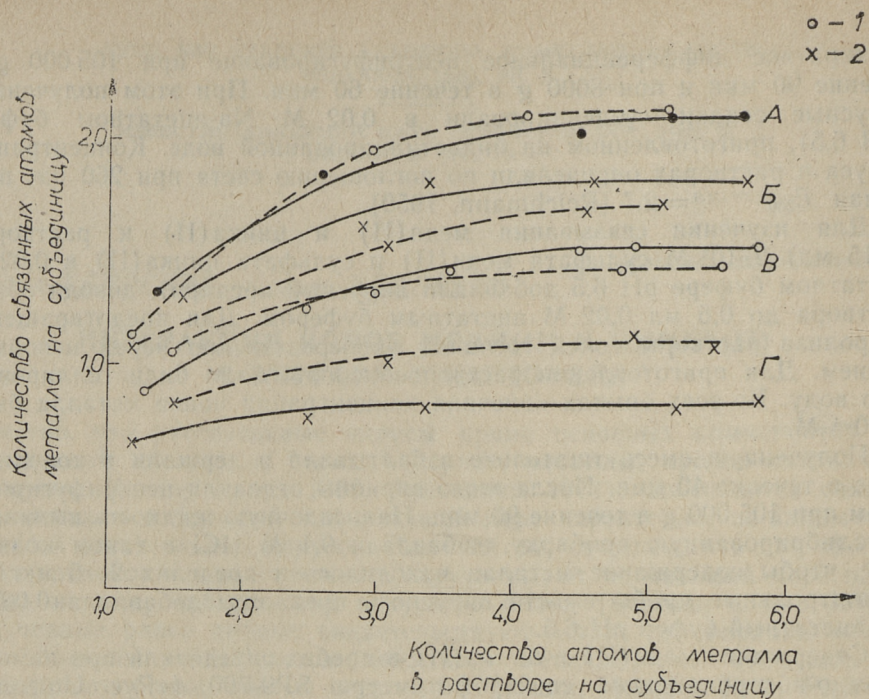
Как показывает рисунок, способность вирионов связывать металлы зависит от соотношения количества атомов металла на одну субъединицу вирусного белка и возрастает при увеличении соотношения до величины 4, после чего она остается постоянной.

С  $VX_{17}K$  (рисунок) связывается максимально 2,15 атома меди и 1,85 атома цинка на одну субъединицу белка. При одновременном нахождении меди(II) и цинка(II) в одном и том же растворе максимальное связывание металлов снижается до 1,55 атома меди и 0,85 атома цинка на субъединицу.

С  $VX_{23}K$  максимально связывается 2,15 атома меди и 1,75 атома цинка. При одновременном нахождении ионов металлов в растворе максимальное связывание металлов снижается до 1,45 атома меди и 1,1 атома цинка. Основное различие между обоими штаммами в данных опытах заключается в способности связывать ионы цинка(II) при одновременном нахождении ионов меди(II) и цинка(II) в растворе. Остальные незначительные различия между штаммами можно объяснить ошибками опыта.

При одновременном нахождении в растворе обоих металлов в случае  $VX_{17}K$  суммарно связывается 2,40 атома металла, а в случае  $VX_{23}K$  — 2,55 атомов металла на одну субъединицу вирусного белка. Следует отметить, что при нахождении в растворе одновременно двух металлов их ионы связываются больше, чем в том случае, когда в растворе они находятся отдельно. При этом атомов меди связывается больше, чем атомов цинка, что закономерно и соответствует изменению констант устойчивости комплексов белков с биометаллами (Яцимирский, 1976):  $Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Fe^{3+}$ .

Исходя из полученных нами и имеющихся в литературе данных о содержании меди, цинка и X-вируса картофеля (ВХК) в зараженном



Связывание меди(II) и цинка(II) с  $VX_{17}K$  и  $VX_{23}K$  в 0,02 М Na-ацетатном буфере pH 6,5. Концентрация меди(II)  $5 \cdot 10^{-4}$  М и цинка(II)  $5 \cdot 10^{-4}$  М. А — медь(II) в растворе; Б — цинк(II) в растворе; В — медь(II) в присутствии цинка(II); Г — цинк(II) в присутствии меди(II); 1 — связывание металла с  $VX_{17}K$ ; 2 — связывание металла с  $VX_{23}K$ .

табаке можно рассчитать возможный процент связывания вышеуказанных металлов при одновременном или раздельном нахождении их в табаке. За основу расчетов мы принимали следующие цифры: молекулярная масса ВХК  $35 \cdot 10^6$  (Reichmann, 1960), молекулярная масса субъединицы структурного белка 22900 (Goodman, 1975), молекулярная масса РНК ВХК  $2,1 \cdot 10^6$  (Гендон и др., 1975), содержание ВХК 100 мг на 1 кг свежих листьев табака (собственные данные), среднее содержание цинка 84 мг на 1 кг сухих листьев табака и среднее содержание сухого вещества в листьях табака 7% (собственные данные). В случае раздельного нахождения меди и цинка в растениях связывалось бы соответственно 41,6 и 5,4% общего количества указанных металлов, а в случае одновременного нахождения этих металлов связывалось бы соответственно 32,9 и 3,9 — 5,0%.

Из малочисленных литературных данных о связывании металлов с вирусами можно привести пример о связывании железа с ВТМ. Известно, что  $^{59}Fe$ , находящийся в питательной среде, скапливается во вновь синтезированных вирионах (Loring и др., 1959) и что с одной частицей ВТМ связывается в среднем 130 атомов железа (Loring и др., 1962). Если считать, что содержание ВТМ в 1 кг зараженных вирусом свежих листьев табака 2 г (Мэтьюз, 1973), а среднее содержание железа в листьях табака 100 мг/кг сухих листьев (DeKock, 1961), то в этом случае связывалось бы с ВТМ 5,3% всего железа.

Приведенные данные не отражают действительного положения, так как, с одной стороны, кроме указанных, находятся и другие ионы металлов, а, с другой стороны, синтез вируса происходит только в части клеток. В связи с последним процент связывания в конкретной клетке может быть в несколько раз выше.

## ЛИТЕРАТУРА

- Гендон Ю. З., Поглазов Б. Ф., Тихоненко Т. И. Нуклеиновые кислоты и белки вирионов. М., 1975, 52.
- Мэтьюс Р. Вирусы растений. М., 1973, 50.
- Тихоненко Т. И. Биохимия вирусов и их компонентов. — В кн.: Молекулярная биология вирусов. М., 1971, 95.
- Хёдрейарв У. Несложный и быстрый метод зонального электрофореза для окончательной очистки некоторых вирусов растений. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1972, 21, 189—192.
- Хёдрейарв У., Хёдрейарв Х. Содержание неорганических элементов в инокулированных листьях *Nicotiana glutinosa* L. при инфекции вирусами N и X картофеля. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1972, 21, 357—365.
- Яцимирский К. Б. Введение в бионеорганическую химию. Киев, 1976, 35.
- DeKock, P. C. Mineral content of plant leaves. — In.: Biochemists' Handbook. London, 1961, 1039—1042.
- Durham, A. C. H., Haidar, M. A. Cation binding to tobacco rattle virus. — *Virology*, 1977, 77, 520—523.
- Durham, A. C. H., Hendry, D. A. Cation binding by tobacco mosaic virus. — *Virology*, 1977, 77, 510—519.
- Durham, A. C. H., Hendry, D. A., von Wechmar, M. B. Does calcium ion binding control plant virus disassembly? — *Virology*, 1977, 77, 524—533.
- Goodman, R. M. Reconstitution of potato virus X in vitro. I. Properties of the dissociated protein structural subunits. — *Virology*, 1975, 68, 287—298.
- Hödrejäre, U., Tarassova, K., Olsper, K. Nn. kartuli-N-viiruse elektroforeetilise uurimisest. — ENSV TA Toim. Biol., 1971, 20, 79—83.
- Loring, H. S., Fujimoto, Y., Eng, L. F. Ultracentrifugal fractionation and iron distribution in infections nucleates from tobacco mosaic virus. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 287—293.
- Loring, H. S., Fujimoto, Y., Tu, A. F. Tobacco mosaic virus — a calcium-magnesium complex. — *Virology*, 1962, 16, 30—40.
- Pfeiffer, P., Durham, A. C. H. The cation binding associated with structural transitions in bromegrass mosaic virus. — *Virology*, 1977, 81, 419—432.
- Reichmann, M. E. Potato X virus. II. Preparation and properties of purified nonaggregated virus from tobacco. — *Canad. J. Chem.*, 1959, 37, 4—10.
- Reichmann, M. E. Potato virus X. Part III. Light scattering studies. — *Canad. J. Chem.*, 1959, 37, 384—388.
- Shaw, J. G. Hydrogen-ion titration of potato virus X protein. — *J. Gen. Virol.*, 1977, 36, 357—360.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
12/X 1982

Таллинский политехнический институт

Ulrich HÖDREJARV, Helvi HÖDREJARV

### VASK(II)- JA TSINK(II)-IOONIDE NING KARTULI-X-VIIRUSE VAHELINE INTERAKTSIOON

Kirjeldatud katsetest ilmneb, et kartuli-X-viiruse tüvedega X<sub>17</sub> ja X<sub>23</sub> seotakse 0,02 M naatriumatsetaatpuhveris (pH 6,5) maksimaalselt 2,15 vaseaatomit ning 1,80 tsingi-aatomit viiruse ümbrisvalgu ühe subühiku kohta. Kui lahuses on mõlema metalli ioone, seotakse X<sub>17</sub>-ga 2,40 ja X<sub>23</sub>-ga 2,55 metalliaatomit ümbrisvalgu ühe subühiku kohta.

Ulrich HÖDREJARV, Helvi HÖDREJARV

### INTERACTION OF COPPER(II) AND ZINC(II) WITH THE POTATO VIRUS X

The interactions of copper(II) and zinc(II) ions with the strains of potato virus X, PVX<sub>17</sub> and PVX<sub>23</sub> were discussed. In the 0.02 M sodium acetate buffer solution (pH 6.5) maximum 2.15 copper atoms and 1.80 zinc atoms, calculated for a subunit of virus protein were bound to PVX<sub>17</sub> and PVX<sub>23</sub>.

In the case of the occurrence of both ions together in the reaction solution, 2.40 and 2.55 metal atoms, calculated for a subunit of virus protein were bound to PVX<sub>17</sub> and PVX<sub>23</sub>, respectively.