



УДК 578.368.1'112.083.3

ИММУНОДЕТЕКЦИЯ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА ЖЕЛТУХИ ТУРНЕПСА С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 2004 г. Е. А. Сухачева*#, В. В. Фомичева**, Н. А. Ефимова*, Й. Шуберт**

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Федеральный центр селекции культурных растений, Институт по изучению устойчивости и диагностике патогенов, Ашерслебен, Германия

Поступила в редакцию 05.07.2002 г. Принята к печати 10.01.2003 г.

С использованием рекомбинантного белка в качестве иммуногена получены моноклональные антитела (МА) к РНК-зависимой РНК-полимеразе лютеовируса желтухи турнепса (ВЖТ). Показано, что полученные МА направлены к С-концевому фрагменту вирусной репликазы. В экстрактах зараженных ВЖТ растений МА взаимодействуют с белковым продуктом с молекулярной массой около 70 кДа. Представленные результаты являются первой успешной попыткой обнаружения РНК-зависимой РНК-полимеразы лютеовирусов в экстрактах инфицированных растений. Они выявили также, что белок далее не процессируется и что его накопление и содержание в инфицированном растении подлжит определенной динамике в процессе инфекции.

Ключевые слова: вирус желтухи турнепса; моноклональные антитела; РНК-зависимая РНК-полимераза.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус желтухи турнепса (ВЖТ) относится к группе полеровирусов семейства лютеовирусов [1]. Это семейство включает в себя значительное количество вирусов растений, которые переносятся тлями и локализируются во флоэме инфицированного растения.

В то время как большинство представителей лютеовирусов имеют узкий спектр растений-хозяев, ВЖТ поражает большое количество видов двудольных и некоторые виды однодольных растений, принося значительный экономический ущерб [2]. Маленькие изометрические вирионы ВЖТ имеют диаметр 24–26 нм и содержат одноцепочечную плюс-РНК длиной около 6000 нт, лишенную 3'-концевой poly(A)-последовательности [3]. С 5'-концом вирусной РНК связан белок VPg [3]. Геном ВЖТ был полностью секвенирован [4], и анализ полной нуклеотидной последовательности выявил шесть открытых рамок считывания (ORF), схематически представленных на рис. 1. 5'-Концевой блок генов кодирует белки, необходимые для репликации вируса [5], тогда как в 3'-концевой области находятся гены, отвечающие за формирование вирусных частиц и за перенос вируса тлями [6–9].

На сегодняшний день наименее изучена экспрессия 5'-концевого фрагмента вирусной РНК, ничего неизвестно о том, какие же белковые продукты образуются при этом, хотя анализ нуклеотидной последовательности ВЖТ (как и всех полеровирусов) выявил некоторые характерные мотивы в ORF1 и ORF2. Так, в составе ORF1 (ко-

тирования (ORF), схематически представленных на рис. 1. 5'-Концевой блок генов кодирует белки, необходимые для репликации вируса [5], тогда как в 3'-концевой области находятся гены, отвечающие за формирование вирусных частиц и за перенос вируса тлями [6–9].

На сегодняшний день наименее изучена экспрессия 5'-концевого фрагмента вирусной РНК, ничего неизвестно о том, какие же белковые продукты образуются при этом, хотя анализ нуклеотидной последовательности ВЖТ (как и всех полеровирусов) выявил некоторые характерные мотивы в ORF1 и ORF2. Так, в составе ORF1 (ко-

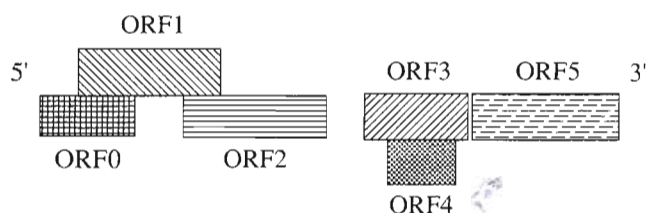


Рис. 1. Структура генома ВЖТ. Показано расположение открытых рамок считывания для вирусных белков, ответственных за проявление симптомов, и круг растений-хозяев (ORF0); за перенос вируса векторами (ORF5), рамки считывания протеиназы, хеликазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы (ORF1/2), белка оболочки (ORF3), транспортного белка (ORF4).

Сокращения: ВЖТ – вирус желтухи турнепса; МА – моноклональные антитела; ORF – открытая рамка считывания (open reading frame); рТНА – плазмида рThioHisA (Invitrogen, США), рТНВ – плазмида рThioHisB (Invitrogen, США); НАТ – раствор, содержащий 10^{-4} М гипоксантина, 10^{-7} М аминоптерина и 1.6×10^{-5} М тимидина; НТ – раствор, содержащий 10^{-4} М гипоксантина и 1.6×10^{-5} М тимидина; IPTG – изопропилтиогаляктозид.

Автор для переписки (эл. почта: eas@mail.ibch.ru; тел.: (095) 336-45-11).

дирует полипептид 66 кДа) имеется мотив, характерный для химотрипсिनотипных сериновых протеиназ [10], а ORF2 (теоретически рассчитанная молекулярная масса белкового продукта 67 кДа) кодирует в С-концевой области GDD-мотив, высоко консервативный для РНК-зависимых РНК-полимераз [11]. В результате механизма 1 рибосомального сдвига рамки считывания в области перекрывания ORF1 и ORF2 образуется РНК-кодируемый полипротеин размером 115 кДа, причем частота этого события низка и соответственно количество этого белка крайне мало [12]. Происходит ли в дальнейшем расщепление этого предполагаемого продукта трансляции ORF1/ORF2, и если происходит, то какие полипептиды при этом образуются, на сегодняшний день неизвестно. На основании существующих данных принято считать, что продукты ORF1 и ORF2 (белки P1 и P2) являются компонентами репликазного комплекса, поскольку внесение мутаций, блокирующих трансляцию ORF1 и ORF2, приводило к полному прекращению репликации ВЖТ [5]. Что же касается полипептида, образующегося при трансляции ORF0, его функции до сих пор не ясны. Предполагается, что он взаимодействует с белками растения-хозяина, определяя тем самым круг хозяев. Вероятно, он также играет роль в проявлении симптомов заболевания. Изучение репликазных белков лютеовирусов осложняется тем обстоятельством, что флоэмная локализация вируса обуславливает крайне низкое накопление вируса в растении, в связи с чем даже очистка вируса вызывает трудности, не говоря о детекции репликазных белков, которые образуются на ранней стадии инфекции и в ограниченном количестве.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель данной работы – иммунодетекция вирусной репликазы в экстрактах инфицированных растений с помощью моноклональных антител. Как уже было упомянуто, количество вирусной репликазы в инфицированном растении настолько ничтожно, что очистка антигена для иммунизации из растительного материала представляется практически невозможной. Поэтому в качестве иммуногена был использован рекомбинантный белок. Для его получения соответствующий участок вирусной РНК был RT-PCR-амплифицирован из тотального препарата РНК, выделенных из инфицированного растения. Основываясь на известной ранее опубликованной нуклеотидной последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы ВЖТ [4], два специфических праймера (5')GTG AGC TCC GCC GAC CGC GAG ACA AAC G (TYORF1B5) и (5')GAA AGC TTT TGT GGT AGC ACT GGG TCG (TYORF1B3) были разработаны для синтеза кДНК-клона, кодирующего вирус-

ную репликазу. Каждый из праймеров был дополнен подходящим для последующего переклонирования рестрикционным сайтом для *SacI*- и *HindIII*-эндонуклеаз соответственно (подчеркнутые участки). Полученный ампликон, размер которого соответствовал ожидаемой молекулярной массе, был клонирован в рGEM-T векторе (Promega, США), секвенирован с целью идентификации и переклонирован в бактериальную экспрессионную плазмиду рThioHisA (рТНА, Invitrogen, США) или рЕТ30a (Novagen, США). Для экспрессии рекомбинантных белков использовали бактериальные штаммы *E. coli* TOP10 и BL21SI соответственно. Использование вектора рЕТ30a приводило к весьма низкому уровню экспрессии конечного продукта, который, кроме того, был практически нерастворимым. Более успешными оказались попытки экспрессии белка P2 в составе “слитого” протеина с тиоредоксином в плазмиде рТНА в клетках *E. coli* TOP10. Полученный белок имел $M \sim 80$ кДа, что соответствует теоретически ожидаемой величине, и был использован в качестве иммуногена для получения моноклональных антител (МА).

В результате слияния миеломных клеток линии sp2/0 со спленоцитами иммунной мыши были получены три стабильные гибридомные линии, одна из которых (клон 2F11) продуцировала МА к тиоредоксину, а две другие (клоны 6B11 и 2H4) – МА к рекомбинантной вирусной репликазе. Все МА специфически взаимодействовали с гомологичным антигеном в ИФА и в иммуноблоттинге (рис. 2).

Для более точной локализации участков связывания полученных МА фрагменты, соответствующие 5'- (остатки 28–449) и 3'-концевым (остатки 782–1477) фрагментам ORF2, были клонированы в плазмиду рТНВ соответственно по внутренним рестрикционным сайтам *SacI/PstI* и *NcoI/EcoRI*. Оба указанных фрагмента были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21SI и очищены из бактериального лизата с помощью аффинной хроматографии на никелевой смоле. МА 2H4 и 6B11 взаимодействовали в иммуноблоттинге с продуктом экспрессии укороченного 3'-концевого фрагмента ORF2 (рис. 2), что соответствует С-концевому участку белка P2. Как известно [5], именно в С-концевой части РНК-зависимой РНК-полимеразы находится характерный для репликаз GDD-мотив.

Дальнейшие усилия были направлены на обнаружение с помощью полученных МА РНК-зависимой РНК-полимеразы или ее фрагментов в экстрактах из листьев зараженных ВЖТ растений. Поскольку в силу указанных выше причин (низкая концентрация вируса и его флоэмная локализация) содержание репликазы в инфицированном растении крайне низко, был использован метод фенольной экстракции белков [13], что позволи-

ло несколько обогатить исследуемые образцы. С помощью МА 6В11 и 2Н4 в экстрактах инфицированных растений рапса, начиная с 4-го дня после инокуляции, с помощью иммуноблоттинга был обнаружен белок размером около 70 кДа, количество которого постепенно уменьшалось вплоть до 14-го дня, когда выявить его было практически невозможно (рис. 3). Отсутствие аналогичной полосы в образцах фенольных экстрактов из листьев здоровых растений рапса позволяет нам утверждать, что данный белок является продуктом экспрессии РНК-зависимой РНК-полимеразы ВЖТ. Вероятно, первоначально считываемый полипептид массой 115 кДа расщепляется протеиназами с образованием практически полноразмерного белка Р2, представляющего собой вирусную репликазу.

Полученные результаты являются первой успешной попыткой обнаружения РНК-зависимой РНК-полимеразы лютеовирусов в экстрактах инфицированных растений. Антирепликазные МА могут оказаться весьма ценным инструментом в изучении механизмов устойчивости растений к вирусной инфекции, в частности, для прояснения вопроса о том, связана ли устойчивость с подавлением репликации вируса или имеют место другие механизмы. Помимо этого, МА 2Н4 и 6В11 могут служить основой для получения одноцепочечных антител, которые, благодаря способности связываться с репликазой, могут обеспечивать противовирусную устойчивость трансгенных растений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среды DMEM, NAT-DMEM, HT-DMEM, телячью эмбриональную сыворотку, глутамин, адъювант Фрейнда (Life Technologies, США), кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой, пристан, Твин-20 (Sigma, США), полиэтиленгликоль-1500, диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ), белок-G-сефарозу (Pharmacia, Швеция), PVDF-мембрану, фенол, полиакриламид, IPTG, тетразолиевый нитросиний и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (Roth, ФРГ), никелевую смолу ProBond TM Resin (Invitrogen, США), пластиковые колонки для очистки рекомбинантных белков (Quiagen, ФРГ), 96-луночные планшеты для иммуноанализа, 24- и 96-луночные планшеты и флаконы для культур клеток (Costar, Нидерланды).

РНК из инфицированных растений выделяли с помощью коммерческого набора Invisorb Plant-RNA Mini Kit (Invitex, ФРГ).

Для создания одноцепочечной кДНК использовали коммерческий набор Superscript TMII

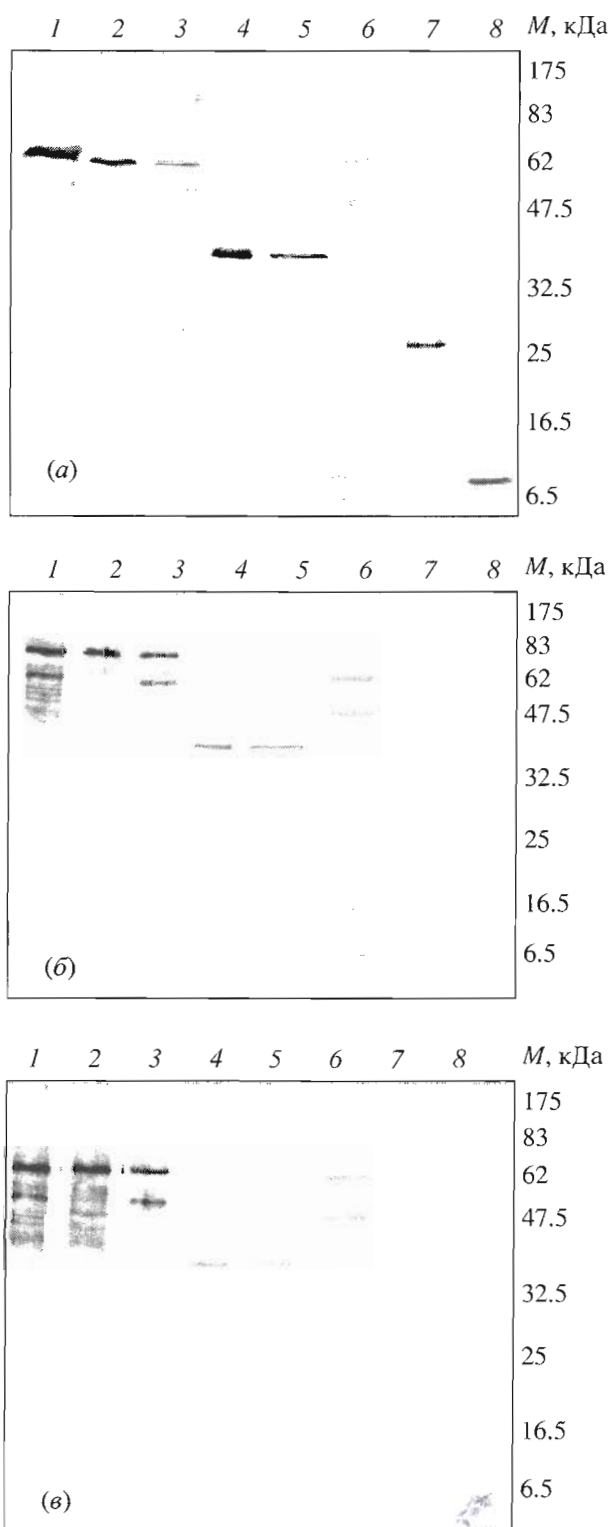


Рис. 2. Иммуноблоттинг с использованием антител 1F12 (а), 2Н4 (б) и 6В11 (в). В качестве антигена использованы рекомбинантные белки тиоредоксин-Р2 (1-3), тиоредоксин-С-концевой фрагмент Р2 (4, 5), тиоредоксин-*N*-концевой фрагмент Р2 (7, 8) из бактериального лизата после индукции (1, 4, 7) или после очистки на никелевой смоле (3, 5, 8). 6 – маркеры молекулярных масс.

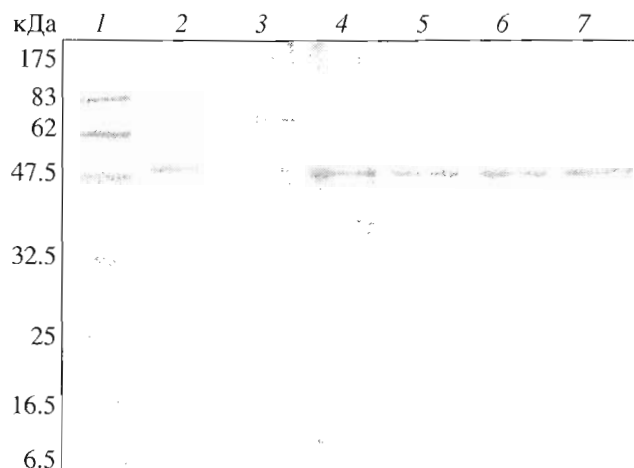


Рис. 3. Иммуноблоттинг с использованием МА 2Н4 с экстрактами из листьев здоровых (2) и инфицированных ВЖТ растений на 4-й (3), 7-й (4), 9-й (5), 11-й (6) и 14-й (7) день после инокуляции. 1 – маркеры молекулярных масс.

RNAse H(-)Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, США).

Двухцепочечная кДНК была синтезирована в амплификаторе PTC-100 (Biozym) с использованием системы TripleMaster PCR System (Eppendorf, ФРГ) при следующих условиях: 1 мин 96°C; 40 циклов: 1 мин 94°C; 1.5 мин 55°C, 2 мин 72°C; 10 мин 72°C.

Экспрессия репликазного гена. Бактерии выращивались в TYE-среде (30 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта на 1000 мл), содержащей 200 мкг/мл ампициллина в случае использования плазмиды рТНА или 50 мкг/мл канамицина для плазмиды рЕТ30а. Синтез белка индуцировали добавлением к клеткам в логарифмической фазе роста (A_{600} 0.8) IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Через 4–6 ч после индукции бактериальные клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в фосфатном буфере рН 7.8. Тотальный бактериальный белковый экстракт получали в результате ультразвуковой обработки клеток. Очистку рекомбинантного белка осуществляли на никелевой смоле в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя, используя для элюции фосфатный буфер, содержащий 50 мМ имидазол. Белковый образец кипятили в течение 5 мин с буфером Лэммли [14] и разделяли электрофоретически в 15% ПААГ в присутствии SDS. Далее белки переносили на PVDF-мембрану в приборе для переноса Trans-Blot R Semi Dry (Bio-Rad, США) с последующим окрашиванием антителами по стандартной методике [15].

Иммунизацию мышей, получение стабильных гибридных клонов и образцов асцитной жидко-

сти, ИФА, а также все манипуляции с РНК и ДНК проводили по стандартным методикам, изложенным в работах [15–17].

МА из асцитной жидкости выделяли путем осаждения полунасыщенным раствором сульфата аммония с последующей аффинной хроматографией на белок-G-сефарозе по прилагаемой изготовителем инструкции.

Фенольные экстракты из листьев здоровых и инфицированных ВЖТ растений получали по методу [13].

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была поддержана грантом Министерства науки и технологии Германии, грант RUS98/168 в течение 1999–2001 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mayo M.A., D'Arcy C.J. // *Luteoviridae* / Eds H.G. Smith, H. Barker. Oxford: CAB International, 1999. P. 15–22.
2. Rochow W.F., Duffus J.E. // *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* / Ed. E. Kurstak. Amsterdam: Elsevier / North-Holland, 1981. P. 147–170.
3. Mayo M.A., Barker H., Robinson D.J., Tamada T., Harrison B.D. // *J. Gen. Virol.* 1982. V. 53. P. 163–167.
4. Veidt I., Lot H., Leiser M., Scheidecker D., Guilley H., Richards K., Jonard G. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 9917–9932.
5. Reutenauer A., Ziegler-Graff V., Lot H., Scheidecker D., Guilley H., Richards K., Jonard G. // *Virology.* 1993. V. 195. P. 692–699.
6. Brault V., van der Heuvel J.F., Verbeek M., Ziegler-Graff V., Reutenauer A., Herrbach E., Garaud J.C., Guilley H., Richards K., Jonard G. // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 650–659.
7. Bruyere A., Brault V., Ziegler-Graff V., Simonis M.-T., van der Heuvel J.F., Richards K., Guilley H., Jonard G., Herrbach E. // *Virology.* 1997. V. 230. P. 323–334.
8. Brault V., Mutterer J., Scheidecker D., Simonis M.-T., Herrbach E., Richards K., Ziegler-Graff V. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 1140–1148.
9. Reinbold C., Gildow F.E., Herrbach E., Ziegler-Graff V., Goncalves M.C., van der Heuvel J.F., Brault V. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 1995–2000.
10. Gorbalenya A.E., Donchenko A.P., Blinov V.M., Koonin E.V. // *FEBS Lett.* 1989. V. 243. P. 103–114.
11. Kamer G., Argos P. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 7269–7282.
12. Veidt I., Bouzoubaa S.E., Leiser R.M., Ziegler-Graff V., Guilley H., Richards K., Jonard G. // *Virology.* 1992. V. 186. P. 192–200.

13. van Etten J.L., Freer S.N., McCune B.K. // *J. Bacteriol.* 1979. V. 138. P. 650–652.
14. Laemmli U.C. // *Nature.* 1970. V. 22. P. 680–685.
15. Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
16. Сухачева Е.А., Новиков В.К., Амбросова С.М. // *Биоорг. химия.* 1994. Т. 20. С. 1060–1069.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Immunodetection of RNA-Dependent RNA Polymerase from Turnip Yellow Luteovirus Using Monoclonal Antibodies

E. A. Sukhacheva*[#], V. V. Fomicheva**[#], N. A. Efimova*, and J. Shubert**[#]

[#]Phone: +7 (095) 336-4511; e-mail: eas@mail.ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

**Institute of Resistance Research and Pathogen Diagnostics, Federal Center for Breeding Research on Cultivated Plants, Theodor-Roemer Weg 4, Aschersleben, D-06449 Germany

Monoclonal antibodies (MAs) to the RNA-dependent RNA polymerase from turnip yellow luteovirus (TYV) were prepared using a recombinant protein as immunogen and were shown to be directed to C-terminal part of the viral replicase. These MAs were found to interact with a 70-kDa protein found in extracts from TYV-infected plants. Our result is the first successful attempt at detecting the RNA-dependent RNA polymerase of a luteovirus in infected plant extracts. We also found that the protein is not processed further and its accumulation and content in the infected plant obey a definite dynamics during the infection. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: monoclonal antibodies, RNA-dependent RNA polymerase, tulip yellow luteovirus