

УДК 578.867

## TBSV ВИРУСЫНЫҢ ӨСІМДІКТІҢ АРНАЙЫ МҮШЕЛЕРІНДЕ КӨРІНІС БЕРУІ

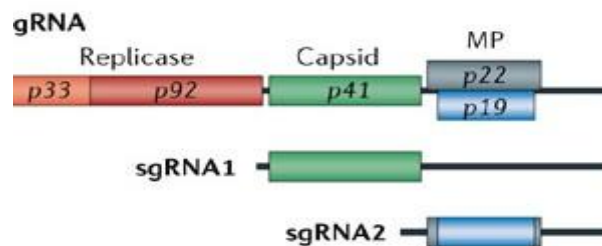
Ергазиева А., Айдарбекова Н., Ли М.

*Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан*

[yergaziyeva@inbox.ru](mailto:yergaziyeva@inbox.ru)

<http://www.enu.kz>

Tombusvirus P19. Зертеулер Tombusviridae туыстығына жататын вирус геномымен коделенетін P19 ақуызы ақуыздың репродукция процесіне, қозғалысқа, РНҚ-ның жиналуына және вирустың векторлық трансмиссиясына қатысатындығын көрсетті. P19 инфекция белгілерінің дамуы үшін қажетті маңызды патогенді фактор болып табылатындығы анықталды [1]. Қалыпты жұмыс жасайтын жасушада әрбір ген өзіне ғана тиесілі қызметті атқарады, мысалы мРНҚ ақуыздың синтезделуіне және оның басқада реттеуші ақуыздармен байланысуына жауап береді. Бұнда жасушадағы геннің қалыпты экспрессиясы (от лат. *expressus* - анық) жайында айтылып отыр. Егер нақты бір геннің өнімі азайса, (мысалы, ақуыз) осы геннің экспрессиясының төмендегені болып табылады. Белгілі бір нақты гендер экспрессиясын қысқа РНҚ-лар арқылы "сөндіру" эффектісі РНҚ-интерференция деген атқа ие болды, ал оның пайда болуына әсерін тигізетін молекулалар *siRNA* (small interfering *RiboNucleic Acids* – қысқа интерферлеуші рибонуклеиндік қышқылдар) деп аталады [2]. Dicer қысқа екі тізбекті РНҚ-ны берілген өлшеммен және нақты құрылымдық ерекшеліктермен қатесіз өлшейтін және белгілейтін “молекулярлы сызғыш” секілді әсер етеді [3]. Содан кейін Dicer қысқа РНҚ-ларды құрыманда Argonaute туысына кіретін ақуыздары бар жиынтыққа береді. Келесі кезеңде қысқа РНҚ дуплексінің айырылуы жүреді, олардың бір тізбегі жасушада өзіне комплементарлы РНҚ молекулаларын таниды, нәтижесінде Argonaute ақуызы олардың экспрессиясының катализдейді. Қазіргі кезіт РНҚ-интерференция кезінде нысаналар экспрессиясы бәсеңдетілетін бірнеше молекулярлы механизмдер белгілі: Argonaute ақуызы РНҚ-нысаналарды бөле алу қабілетіне, сонымен қатар матрицалық РНҚ трансляциясын тоқтату қабілетіне ие [3,4]. Сонымен қатар, қысқа РНҚ-ның Argonaute ақуыздарымен жиынтығы кейбір жағдайларда жасушалық ядродағы нысана-геннің транскрипциясын (РНҚ синтезін) бәсеңдете алады [4,5].



Tomato bushy stunt virus (TBSV) – Tombusvirus туысына жататын вирус (Martelli et al. 1988). Геномы шамамен 4,800 нуклеотидті, вирус позитивті РНҚ – сы капсидтік белокпен қапталады (Hearne et al. 1990) [6,7]. Бүгінгі таңда TBSV вирусының геномы секвенирленген, бірнеше протеинді кодтайды (Hearne et al, 1990), яғни p92 – РНҚ тәуелді РНҚ полимераза, p33 – маңызды қосымша протеині (Oster et al, 1998) p41 – капсидтік протеині (Hillman et al, 1989), тасымалдаушы протеин - p22 (Scholthof et al, 1995), PTGS супрессиялайтын p19 протеині (Voinnet et al, 1999; Ye et al, 2003). P33 және p92 тікелей геномдық РНҚ-дан трансляцияланады, ал p41 протеині субгеномдық мРНҚ1-ден, p19 және p22 субгеномдық мРНҚ2-ден трансляцияланады [8,9].

**Материалдар мен әдістер. Зерттеу объектісі.** TBSV плазмидалары вирус тізбегінің 3' ұшында *SmaI* рестриктазасымен линеаризацияланды, *in vitro* транскрипция T7 РНҚ-полимераза ферментімен жүзеге асырылды, алынған транскриптермен

өсімдіктер инокуляциясы жүзеге асырылды. Зерттеу бөлімде вирионан РНҚ молекуласын бөліп алу, агароздық және полиакриламидтық гель электрофорез әдістері қолданылды.

**Зерттеу әдістерін талқылау.** TBSV вирусының *in vitro* транскрипттерін алу үшін алдымен плазмидтік ДНҚ-ға айналдырылған вирустың геномдық тізбектері ішек таяқшасына трансформация арқылы клондалды. Пайда болған жасушалық культураны центрифугалау арқылы жинақталған тұнбадан плазмидтік ДНҚ-ны тазартуға арналған кит арқылы тазартылды, тазартылған плазмидтік ДНҚ сапасы агароздық гель электрофорез арқылы тексерілді. Тазартылған плазмидалардан *in vitro* транскрипттер алу үшін алдымен сақиналы ДНҚ-ны сызықты күйге айналдыру үшін *Sma*I рестрикция ферменті арқылы рестрикция жүзеге асырылды. Линеаризацияланған ДНҚ-ны фенол-хлороформ әдісімен тазартылды. Содан соң *in vitro* транскрипция арқылы вирустық транскрипттер алынды.



**В**

**А**

**Сурет 1. Вируспен зақымдалған қызанақ өсімдігі (А); Сау өсімдік (В).**

*N.benthamiana* өсімдіктерінде вирустың жұқтырылу сипаты 3-10-шы күндері бақыланды. Вируспен зақымдалған уақыт бойында анық белгілер 5-7 күндері байқалды. Вируспен зақымданған аудандар сарғайып, некроз тудыра бастады. Зақымдалған өсімдіктердің беткі жапырақтары қабыршақтана бастады. Бұл қабыршақтардың пайда болуы антивирустық РНҚ-интерференция процесінің басталғандығын көрсетеді, басқаша айтқанда бұл «сайленсинг аралшықтары» деп аталады. Ал жай сумен инокуляцияланған өсімдіктер бойында ешқандай белгілер анықталмай, өсімдік тіршілігін сақтап отырды. Өсімдіктер қалыпты, бірдей жағдайларда өсірілді. Қызанақты вируспен зақымдаған уақытта аса қатты белгілер айқындалған жоқ. Тек өсімдіктің инокуляцияланған жапырақтарында белгілер байқалды. Бұл қызанақтың тек локальды жолмен зақымданатындығына көз жеткізеді. TBSV вирусының жабайы типінің *in vitro* транскрипциясы және супрессор P19 және капсидтік белоктар экспрессиясы анализдері айқын көрініс берді. Вируспен инокуляцияланған өсімдіктердің арнайы мүшелерінде белгілері анық байқалды. Жарақатталған сімдіктерден вирустық вириондар бөлініп алынды.

#### **Қолданылған әдебиеттер тізімі:**

1. Fire A.Z., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. // *Nature*. 1998. №391. P.806-811.
2. Moissiard, G., Parizotto, E. A., Himber, C., and Voinnet, O. (2007) Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* 13, 1268-1278.
3. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 12, 1484-1495.

4. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001, 411:494-8.
5. Ding S.W., and Voinnet, O. 2007 Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
6. Rustem Omarov, Kim Sparks, Lindsay Smith, Jelena Zindovic, and Herman B. Scholthof Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Mar. 2006, p. 3000–3008.
7. Yi-Cheng Hsieh, Rustem T. Omarov, and Herman B. Scholthof. Diverse and Newly Recognized Effects Associated with Short Interfering RNA Binding Site Modifications on the Tomato Bushy Stunt Virus P19 Silencing Suppressor. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Mar. 2009, p. 2188–2200.
8. Yamamura, Y., and H. B. Scholthof. 2005. Pathogen profile-Tomato bushystunt virus: a resilient model system for studying virus-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* 6:491–502.
9. Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C., and Carrington, J. C. (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549-559.