

УДК 57. 578.2

ТАЗАРТЫЛҒАН ВИРИОНДАРДЫ ИНФЕКЦИЯЛЫҚ ПРОЦЕСТЕР ҮШІН ВИРУСТЫҚ РНҚ КӨЗІ РЕТІНДЕ ПАЙДАЛАНУ

Зейнуллина З. *, Бекеева С., Иқсат Н., Масалимов Ж., Омаров Р.

Zarnzl22000@mail.ru

Бакалавр, 4 курс, Биотехнология және микробиология кафедрасы, Л.Н. Гумилев атындағы
Еуразия ұлттық университеті
Ғылыми жетекшісі – Турпанова Р.

Аннотация: Бұл мақалада тазартылған вириондарды инфекциялық процестер үшін вирустық РНҚ көзі ретінде пайдалану туралы қарастырылған.

Түйін сөздер: *Nicotiana benthamiana*, *Tomato bushy stunt virus*, РНҚ-интерференция, вирион, адаптация, вирустық инфекция, биотикалық фактор

Кіріспе. Вирустар өсімдіктердің әртүрлі ауруларының себебі болып табылады, осылайша ауыл шаруашылығының дамуына зиян келтіреді. Өсімдік ағзасының вирустық инфекцияға төтеп беруін иммунитет деп атайды.

РНҚ-интерференция - екі тізбекті РНҚ молекулалары мен эукариоттардағы гендердің экспрессиясын реттейтін эволюциялық консервативті және жүйелікке тән механизмі. РНҚ интерференция - бұл организмнің бөтен нуклеин қышқылдарынан қорғаныш реакциясы, осылайша вирустық инфекцияларға қарсы иммунитеттің негізгі бөлігі болып табылады. Вирус репликациясы РНҚ интерференцияның іске қосылуын белсендіреді [1].

Зерттеу мақсаты: тазартылған вириондарды инфекциялық процестер үшін вирустық РНҚ көзі ретінде пайдалану.

Әдістер.

Зерттеу нысаны ретінде *Tombusviridae* тұқымдасынан шыққан жабайы типтегі фитопатогендік TBSV вирусы (*Tomato Bushy Stunt Virus*) және *Nicotiana benthamiana* өсімдігі. модельдік өсімдігі алынды.

Өсімдік материалын дайындау. Өсімдіктердің тұқымдары ылғал топыраққа себіліп, өну кезеңінде 5-7 күн ішінде пленкамен жабылған, өніп шыққаннан кейін өсімдіктер бөлек 200 мл құмыраларға ауыстырылды. Аптасына 3 рет 50 мл ағын су құйылды.

Вирустық материалмен *N. benthamiana* өсімдігін инокуляциялау. Өсімдіктерді іріктеу 30-35 күн аралығында жүргізілді, оның басты критерийі: эксперименттердің тең жағдайларын сақтау үшін өсімдіктердің бірдей мөлшері болып табылады. Таңдалған өсімдіктер топтары фенотиптік белгілерді анықтау үшін суретке түсірілді.

Вирустық транскриптер мен инокуляциялық буфері әр өсімдікке 100 мкл көлемінде орта деңгейдегі жапырақтардың бетіне қолданылды. Инокуляцияға арналған буфердің құрамына 10 мМ натрий - фосфат буфері (рН 6,9) және 1 % селит кірді. Жапырақтардың бетіне нитрат көмегімен механикалық зақым келтірілді, ол арқылы вирустық РНҚ өсімдік жасушаларына ене алады.

Инокуляция аяқталғаннан кейін бақылау және жұқтырған өсімдіктер бірдей жағдайларда, бірақ контаминацияны болдырмау үшін бөлек жерлерде ұсталды.

Үлгілерді дайындау.Инокуляциядан кейінгі 7 күні инокуляцияланған өсімдіктерден келесі молекулалық тәжірибелерге материал жиналды. Ол үшін инокуляцияланған жапырақтар ТЕ буферімен гомогенизацияланып, 25 минут бойы 10 000 айн./сек. 4⁰ С-та центрифугаланды. Алынған материал келесі эксперименттерге дейін -20⁰ С-та сақталынды.

Вирустық бөлшектерді бөліп алу және тазартудың экспресс анализі. Вириондарды бөліп алу және тазарту гидроксипатитті қолдана отырып, бағаналық хроматография әдісімен жүргізілді. Содан кейін жұқтырған өсімдіктің өсімдік экстрактісі бағанаға (колонка) қолданылды. Үлгілерді жинау 4 мл бастапқы көлеммен жүргізілді.

Көлденең электрофорездегі вириондарды анықтау. Көлденең электрофорез 1% агарозды қолдану арқылы жүргізілді. Ол үшін 600 мг (0,6 г) агарозаға ТРИС, бор қышқылы және ЭДТА тұратын 60 мл ТВЕ буфері қосылды. Содан кейін агароза ерітіндісі микротолқынды пеште агароза толығымен ерігенше ерітілді. Содан кейін салқындатылған гель көлденең электрофорез үшін камераға құйылады және үлгілерді енгізу үшін тесіктерді қалыптастыру үшін тарақ салынады. Содан кейін гель Vilber Lormat (France) гель-док жүйесіне ауыстырылды және ультракүлгін сәулеленудің әсерінен вириондардың болуы анықталды.

СР ақуызына Экспресс анализі. Хроматографиялық бөлінуден кейінгі үлгілер TBSV вирусының капсид ақуызына (СР) детекцияланды. Фракциялар агарозды геледе бөлінді, содан кейін олардың капиллярлық тасымалдануы 12-14 сағат ішінде нитроцеллюлоза мембранасына буферде жүргізілді. Әрі қарай, ультрафиолет астындағы мембрананың кросслингі өтті, содан кейін мембрананы бір сағат ішінде сүт ұнтағының ерітіндісімен (барлығы) блоктады. Келесі кезең СР ақуызына қарсы поликлональды біріншілік және екінші тышқанға қарсы реттік антиденелердің ерітіндісінде инкубация болды. NBT/BCIP сілтілі фосфатазасына арналған субстрат қолданылды.

Wt TBSV жұқтырған, тазартылған вириондар бұдан әрі *N. benthamiana* өсімдіктерін инокуляциялау үшін қолданылды. Олардың фракцияларда болуын анықтау үшін ультракүлгін сәулеленің астында одан әрі визуализациямен 1% агарозды геледе көлденең электрофорез жүргізілді. Алынған фракциялардағы вириондардың концентрациясына сүйене отырып, олар рН 6,9 10 мм фосфат буферімен араласады.

Вирустық инфекция симптомдарын бекіту инокуляциядан кейін 7-ші күні жүргізілді. Оқшауланған бандалар іс жүзінде Wt TBSV вириондарының жинақталуын көрсету үшін, ақуыздар мен нуклеин қышқылдарының агарозды геледен және нитроцеллюлоза мембранасына капиллярлық трансфер арқылы жүзеге асырылды. Биологиялық молекулаларды ауыстыру аяқталғаннан кейін, мембрана бұғатталып, антиденелермен инкубацияланды (вириондар үшін алынған). Мембрананы кейінгі екіншілік антиденелер ерітіндісімен және NBT/BCIP субстратымен өңдеу, вириондардың wt TBSV транскриптімен жұқтырған өсімдік сығындыларында болатындығын және бақылау (контроль) өсімдіктерінде табылмағанын көрсетті.

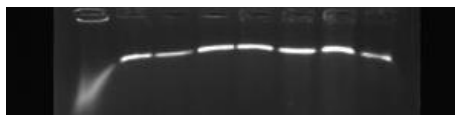
Нәтижелер. Өсімдіктерді инокуляциялау үшін TBSV-мен жұқтырылған *N. benthamiana* тіндерінен адсорбциялық гидроксипатитті хроматография әдісімен вириондар бөлінді. Элюент фракцияларында вириондарды анықтау үшін 1% агарозасы бар көлденең электрофорезде және ультракүлгін сәуле астында жүргізілді. Вириондар транскриптітердің деградациясын тудыратын контаминацияны болдырмау үшін инокуляцияға арналған материал ретінде таңдалды [4].

Инокуляциядан кейін 7-ші күні жабайы түрдегі өсімдік келесі белгілерді көрсетеді: 3 күні апикальды жапырақтардың бұралуы, инокуляциядан кейінгі 5 күні мозаика түрінде солу, сондай-ақ 7 күні апикальды жапырақтар тіндерінің некрозы және 10-14 күнгі инокуляциядан кейін толықтай инфекциялану (Сурет 1) [2]. Жұқтыру фактісінің болуы вирустық бөлшектерді анықтаудың жоғарыда сипатталған экспресс-тестімен анықталды (Сурет 2). Вирустық инфекция симптомдарын бекіту инокуляциядан кейін 7-ші күні жүргізілді. Оқшауланған бандалар іс жүзінде wt TBSV вириондарының жинақталуын көрсету үшін, ақуыздар мен нуклеин қышқылдарының агарозды геледен және

нитроцеллюлоза мембранасына капиллярлық ауыстыру(перенос) жүзеге асырылды. Биологиялық молекулаларды ауыстыру аяқталғаннан кейін, мембрана бұғатталып, антиденелермен инкубацияланды (вириондар үшін алынған). Мембрананы кейінгі екіншілік антиденелер ерітіндісімен және NBT/BCIP субстратымен өңдеу, вириондардың wt TBSV транскриптімен жұқтырған өсімдік сығындыларында болатындығын және бақылау(контроль) өсімдіктерінде табылмағанын көрсетті.



Сур.1. *N. benthamiana* өсімдіктері инокуляциядан 7 күн өткен соң (теріс бақылау – фосфат буферімен инокуляция, TBSV p19– P19 ақуызы бойынша вирустың мутантты түрі, TBSV wt – вирустың жабайы түрі).



Сур.2. Инокуляциядан кейінгі 7-ші күні *N. benthamiana* өсімдіктерінде вирустық бөлшектердің экспресс анализі(теріс бақылау – фосфат буферімен инокуляция, TBSVp19-P19 ақуызы бойынша вирустың мутантты түрі, TBSV wt-вирустың жабайы түрі; оң бақылау - алдын ала тазартылған. Вириондар (TBSV).

Қорытынды.

Вирустар ауыл шаруашылығы дақылдарына айтарлықтай зиян келтіре отырып, көптеген өсімдік ауруларын тудырады. Зияндылығы жағынан тек паразиттік саңырауқұлақтарға ғана өнім беретін дақылдар. Осыған байланысты өсімдіктердің ауруларын диагностикалау бойынша жұмыстарға көбірек көңіл бөлу қажет. Өсімдік ауруларын ерте және дәл диагностикалау егін шаруашылығының кез келген жүйесінің маңызды құрамдас бөлігі болып табылады [5]. Өсімдік ауруларымен күресу шаралары аурудың дамуының ерте кезеңінде қолданылса, ең тиімді күресуге болады. Өсімдіктердің патогендерін анықтаудың дәстүрлі әдістері баяу және нәтижесіз болуы мүмкін, бұл балама диагностикалық әдістерді іздеуге түрткі болды. Молекулярлық биология мен биотехнологиядағы соңғы жетістіктер қарқынды даму үшін қолданылады, өсімдік қоздырғыштарын анықтауға арналған арнайы және сезімтал құралдар. Антиденелерді вирустық ақуыздармен будандастыру өсімдік вирустарын диагностикалаудың өте сенімді және сезімтал әдісі болып шықты. Бұл диагностиканың кез келген вирустық инфекцияны жылдам, арзан және сенімді диагностикалау мүмкіндігі осы барлық жерде таралған патогендерді бақылаудың негізгі параметрі болып табылады. Атап айтқанда, бұл дипломдық жұмыс осы жаңа технологиялардың әлеуетін және олардың болашақта өсімдік вирустарының молекулалық диагностикасының қазіргі хаттамаларымен өзара әрекеттесуін көрсетеді.

Қаржыландыру: Бұл жұмыс AP09258746 «Өсімдіктерге вирусқа қарсы төзімділікті күшейту мақсатында вирустық ақуыз көмегімен CRISPR/Cas13 жүйесінің реттелуі» жобасы негізінде жүргізілді.

Қолданылған әдебиеттер тізімі

1. Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. 2004. V. 431. P. 356. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
2. Hull R. Plant Virology. Academic Press, 2013. 1119 p.
3. Pertermann R., Tamilarasan S., Gursinsky T., Gambino G., Schuck J., Weinholdt C., Lilie H., Grosse I., Golbik R.P., Pantaleo V., Behrens S.-E. A Viral Suppressor Modulates the Plant Immune Response Early in Infection by Regulating MicroRNA Activity // mBio. 2018. V. 9: e00419-18.
4. Cheong Y.H. Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 129. – P. 661-677.
5. Grimm D. and Kay M. (2007) Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time. The Journal of Clinical Investigation, 117, 3633—3641.