



УДК 578.863.1

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СУБГЕНОМНОЙ РНК X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

Д. П. Грама, Н. Н. Машковский

Введение. X-вирус картофеля (ХВК) содержит одну полицистронную РНК с молекулярной массой $2,2 \cdot 10^6$, которая в бесклеточной белоксинтезирующей системе транслируется в белки 180 000 и 145 000. Эти белки содержат общую аминокислотную последовательность [1], и синтез их, по-видимому, происходит с помощью механизма, аналогичного таковому синтезу высокомолекулярных белков ВТМ и вируса желтой мозаики турнепса (ВЖМТ) [2, 3]. Поскольку среди продуктов трансляции РНК ХВК белок оболочки отсутствует [1], можно предположить, что реализация генетической информации, необходимой для синтеза белка оболочки, происходит путем синтеза вирусспецифической, субгеномной РНК.

Расположение гена белка оболочки возле 3'-конца РНК ХВК [4], наличие низкомолекулярных $((0,53-0,3) \cdot 10^6)$ РНК в полисомах инфицированных ХВК растений, выделенных методом иммунопреципитации с использованием антисыворотки к белку ХВК [5, 6], также указывают на возможность синтеза субгеномной РНК ХВК. Однако только прямое выявление и иммунологическое тестирование продуктов трансляции такой РНК могут служить окончательным доказательством ее существования.

Для выявления субгеномной РНК в инфицированных ХВК растениях мы использовали метод блот-гибридизации, который позволяет обнаружить до 10^{-5} % РНК [7], и результаты этих исследований изложены в данном сообщении.

Материалы и методы. Очистка ХВК и выделение вирусной РНК. ХВК размножали в растениях дурмана и вирус очищали, как описано ранее [8]. ХВК (5 мг/мл) суспендировали в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ Na_2 ЭДТА), содержащем 100 мкг/мл бентонита, приготовленного по методу [9], и дважды экстрагировали при 4 °С детергентно-фенольной смесью (1 %-ный саркозил — 80 %-ный раствор фенола, содержащий 0,1 % оксихинолина и 1 % 2-меркаптоэтанола). РНК трижды переосаждали этиловым спиртом в присутствии 0,2 М Na-ацетата, рН 5,0, и хранили при —20 °С под этанолом.

Выделение РНК из здоровых и инфицированных растений дурмана. 3-й и 4-й листья растений дурмана заражали ХВК (концентрация 0,5 мг/мл) и через 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней после заражения из них выделяли общую РНК, как описано в работе [10]. Из верхних, системно инфицированных листьев, общую РНК выделяли через 6, 7, 8 дней после заражения. РНК осаждали этиловым спиртом в присутствии 0,2 М Na-ацетата, рН 5,0, осадок ресуспендировали и односпиральную РНК осаждали 2 М LiCl при —10 °С в течение ночи. LiCl-нерастворимую РНК промывали 2 М LiCl и хранили при —20 °С под спиртом.

Приготовление композиционной смеси и выделение из нее РНК. Композиционную смесь ХВК и листьев здоровых растений готовили путем смешивания 1 мг очищенного вируса в 0,05 М трис-НСl, рН 7,0 и 1 г листьев здоровых растений. РНК выделяли двумя методами: 1) композиционную смесь растирали в

жидком азоте и к замороженному порошку одновременно добавляли фенольно-буферную смесь с последующим размораживанием при постоянном перемешивании; РНК выделяли, как описано в работе [10]; 2) композиционную смесь растирали в жидком азоте и порошок в замороженном состоянии постепенно переносили в фенольно-буферную смесь при постоянном ее перемешивании, исключая кристаллизацию фенола; РНК выделяли, как описано в работе [10].

Фракционирование РНК в сахарозном градиенте. РНК (1,5—2 мг) наслаивали на сахарозный градиент (5—20%), приготовленный на буфере (50 мМ трис, рН 7,6, 100 мМ NaCl, 1 мМ Na₂ ЭДТА), содержащем 0,5% саркозила, и центрифугировали фракционировали, и оптическую плотность фракций измеряли при 260 нм. РНК из фракций осаждали этиловым спиртом и хранили при —20 °С под спиртом.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) на РНК ХВК. кДНК синтезировали, как описано в работе [11]. Реакционную смесь выдерживали при 42 °С в течение 1 ч и невключившийся ³²P-дЦТФ отделяли хроматографией на сефадексе G-50.

Электрофорез РНК, перенос на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизация. Образцы РНК в растворе (20 мМ MOPS-NaOH, рН 7,0, 50 мМ Na-ацетат, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0, 50%-ный формамид, 6%-ный формальдегид) прогревали при температуре 55 °С в течение 15 мин и разделяли в 1,4%-ном агарозном геле (6×13×0,3 см), содержащем тот же буфер и 2,2 М формальдегид, при 70 В в течение 5 ч [12, 13]. После электрофореза РНК переносили на нитроцеллюлозные фильтры («Schleicher and Schull», ФРГ) [14] и гибридизацию проводили при 42 °С 12 ч в растворе 5×SSC (20 мМ натрий-фосфат, рН 6,8, 50%-ный формамид) и 1×Денхардт-раствора (0,1%-ный DS-Na, 100 мкг/мл тимусной ДНК, 7,5%-ный декстран сульфата и 0,6·10⁶ имп·мин⁻¹ кДНК). Фильтры отмывали, как описано в [14], высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 при —50 °С в течение нескольких дней.

Трансляция РНК фракций сахарозного градиента. Бесклеточную систему синтеза белка готовили по методу [15] из зародышей пшеницы сорта Мироновская 808, выделенных по [16]. Инкубационная смесь для трансляции [17, 18] содержала 20 мМ HEPES-KOH, рН 7,5, 70 мМ K-ацетат, 3 мМ Na-ацетат, 1 мМ АТФ, 0,04 мМ ГТФ, 10 мМ креатин фосфат, 20 мкг/мл креатинфосфокиназы, 2 мМ ДТТ, 0,4 мМ спермин, 0,02 мМ смесь аминокислот, 0,001 мМ ³⁵S-метионина и 50—125 мкг/мл РНК. Смесь инкубировали при 25 °С с РНК фракцией градиента в течение 90 мин.

Электрофорез белков в ПААГ. Белки, синтезированные в бесклеточной белоксинтезирующей системе, осаждали 5%-ной ТХУ и отмывали холодным ацетоном, высушивали под вакуумом и разделяли в 11%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу [19]. Гели высушивали [20] и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 в течение 2—4 дней.

Результаты и обсуждение. Метод блот-гибридизации из-за его высокой чувствительности [7] широко используют при исследовании синтеза вирусспецифических РНК. Однако в последнее время появились сообщения, что при блот-гибридизации препаратов РНК, выделенных из вирусинфицированных растений, обнаруживаются артефактные полосы, которые можно принять за вирусспецифические РНК [21—23]. Поэтому мы исследовали возможность появления таких полос в наших экспериментах. На рис. 1 (дорожка 2) представлены результаты блот-гибридизации ³²P-кДНК с РНК инфицированных растений, выделенной по методу 1. Радиоактивный сигнал находится в полосе, соответствующей по подвижности РНК ХВК, и далее распределяется диффузно почти по всей длине геля. Сходные результаты получены и при блот-гибридизации РНК, выделенной этим же методом из композиционной смеси. На рис. 1 (дорожка 4) радиоактивность представлена в полосе РНК ХВК и трех минорных полосах, являющихся продуктами деградации геномной РНК, так как они имеют меньшую электрофоретическую подвижность и гибридизуются с ³²P-кДНК, комплементарной РНК ХВК. В пользу этого заключения свидетельствуют

результаты опыта, в котором РНК из композиционной смеси выделяли по методу 2, где исключено действие РНКаз. Выделенная этим методом РНК при блот-гибридизации образует одну полосу, электрофоретическая подвижность которой соответствует таковой РНК ХВК (рис. 1, дорожка 3). Изложенные выше результаты подтверждают литературные данные о возможности появления при блот-гибридизации препаратов РНК, выделенных из вирусинфицированных растений, аномальных полос, которые можно принять за низкомолекулярные вирусспеци-

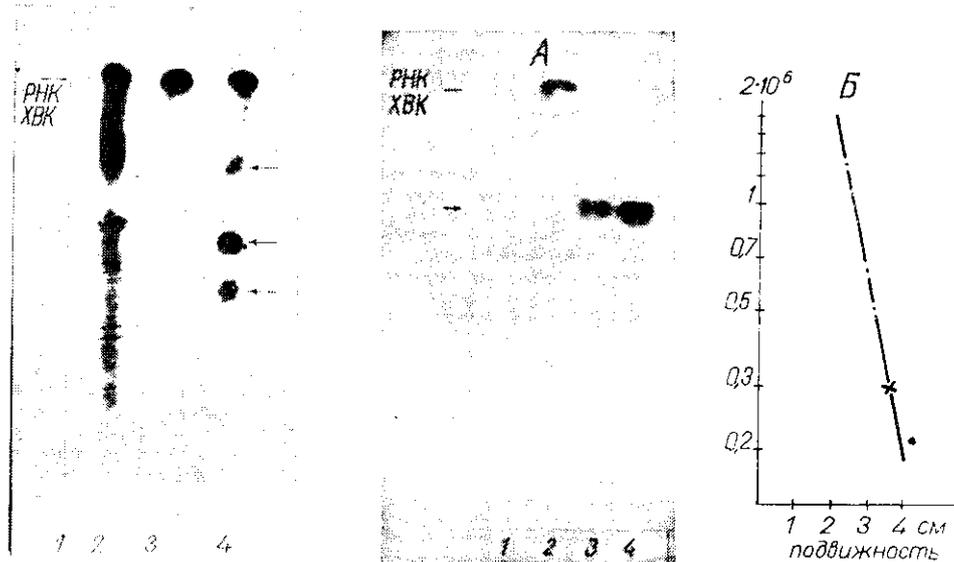


Рис. 1. Гибридизация РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений и композиционной смеси с ^{32}P -кДНК: 1—РНК здоровых растений; 2—РНК инфицированных растений; 3—РНК, выделенная из композиционной смеси (метод 2); 4—то же (метод 1).

Fig. 1. Hybridization of RNA isolated from RVX-infected plants and composed mixture with ^{32}P -cDNA: 1—RNA of healthy plants; 2—RNA of infected plants; 3—RNA isolated from composed mixture (method 2); 4—the same (method 1).

Рис. 2. Гибридизация РНК ХВК и РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений с ^{32}P -кДНК (А): 1—без РНК; 2—РНК ХВК; 3—РНК инфицированных растений (10 мкг); 4—то же (20 мкг) и определение молекулярной массы РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений дурмана (Б): 1—рРНК клеток *HeLa*; 2—25S РНК растений; 3, 4—18S и 16S РНК растений; 5—мРНК глобина.

Fig. 2. Hybridization of PVX RNA and RNA isolated from RVX-infected plants with ^{32}P -cDNA (A): 1—without RNA; 2—RVX RNA; 3—RNA of infected plants (10 μg); 4—the same (20 μg) and the molecular mass determination of RNA isolated from PVX-infected *Datura* plants (B): 1—rRNA of *HeLa* cells; 2—25S and 3, 4—18S, 16S RNA; 5—mRNA of globin.

фические РНК (рис. 1, дорожка 4). Поэтому в последующих экспериментах мы использовали метод выделения нуклеиновой кислоты, исключая появление подобных полос (метод 2).

Результаты блот-гибридизации ^{32}P -кДНК с РНК, выделенной из инфицированных вирусом растений, свидетельствуют о наличии в препаратах РНК низкомолекулярной вирусспецифической РНК (рис. 2, а). Ее молекулярная масса, определенная с помощью электрофореза в агарозе, равна $0,3 \cdot 10^6$ (рис. 2, б). Поскольку синтезированная нами ^{32}P -кДНК комплементарна 3'-концу геномной РНК ХВК (длина около 1000 нуклеотидов [24]) и гибридизуется как с геномной, так и с низкомолекулярной РНК, то это свидетельствует о том, что последняя имеет ту же последовательность нуклеотидов, что и 3'-конец геномной РНК, т. е. является ее субгеномной РНК. Отсутствие на рис. 2, а (дорожки 3, 4) полосы, соответствующей геномной РНК ХВК, обусловлено тем, что при фенольной депротенизации клеточного экстракта, содержащего 0,4 М NaCl [10], геномной РНК из вирусного нуклеопротеида выде-

ляется очень мало, что, соответственно, обуславливает и незначительный радиоактивный сигнал на автографе, который при перепечатавании или не обнаруживается (рис. 2, *a*), или проявляется слабо (рис. 3, *a*).

Согласно представленным на рис. 3 результатам, субгеномная РНК ХВК синтезируется уже на ранних этапах репродукции X-вируса картофеля и с помощью блот-гибридизации обнаруживается в инфицированных листьях на 3-й день после их заражения (рис. 3, *a*, дорожка 2).

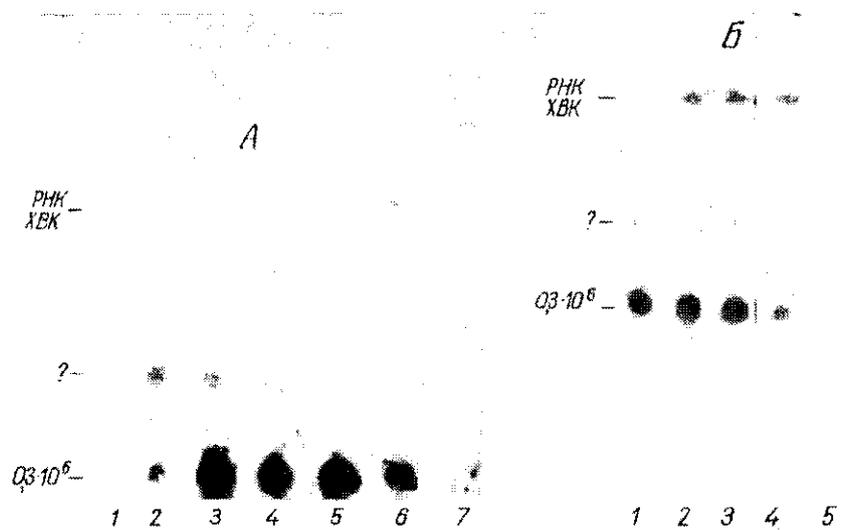


Рис. 3. Гибридизация РНК, выделенной из инокулированных и системно инфицированных ХВК растений с ^{32}P -кДНК: А — инокулированные листья: 1—7—2—8 дней после заражения соответственно; Б — системно инфицированные листья: 1—5—6—10 дней после инокуляции соответственно.

Fig. 3. Hybridization of RNA isolated from inoculated and system-PVX-infected plants with ^{32}P -cDNA: А — RNA inoculated leaves: 1-7—2-8 days after inoculation, respectively; Б — RNA system-infected plants: 1-5—6-10 days after inoculation, respectively.

Наибольшее количество субгеномной РНК в первично инокулированных листьях обнаружено на 4, 5 и 6-й дни после заражения (рис. 3, *a*, дорожки 3—5). Количество субгеномной РНК ХВК в первично инокулированных листьях уменьшается в процессе инфекции (рис. 3, *a*, дорожки 6, 7), в то время как в системно инфицированных листьях (6, 7 и 8-й дни после заражения) синтез субгеномной РНК находится на высоком уровне (рис. 3, *b*).

Увеличение количества субгеномной РНК в процессе инфекции, ее соответствие 3'-концу РНК ХВК, где расположен ген белка оболочки [4], позволяют предположить, что она служит матрицей для синтеза белка оболочки. Если это предположение верно, то очищенная субгеномная РНК должна транслироваться в белок оболочки ХВК. Для частичной очистки субгеномной РНК мы использовали центрифугирование препаратов РНК, выделенных из инфицированных ХВК растений, в линсийном (5—20 %) градиенте плотности сахарозы. На рис. 4 представлены результаты фракционирования РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений, и блот-гибридизация отдельных фракций сахарозного градиента с ^{32}P -кДНК.

Как видно из рис. 4, основное количество субгеномной РНК ХВК находится в правой части пика 18S рРНК (дорожки 5, 6, фракции градиента 31—35). Присутствие небольшого количества субгеномной РНК в границах 25S рРНК (дорожки 1, 2) можно объяснить или агрегацией молекул субгеномной РНК, или неполным разделением препарата РНК. Трудно объяснить наличие геномной РНК ХВК в верхней (дорожки

3—6) и отсутствие ее в нижней частях градиента (дорожка 1, 2; фракции 19, 22).

Фракции сахарозного градиента, содержащие смесь субгеномной РНК и рРНК, после переосаждения этиловым спиртом транслировали в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы. Согласно данным рис. 5, главным продуктом трансляции РНК из фракций сахарозного градиента является белок с электрофоретической подвижностью, идентичной подвижности белка оболочки. Наибольшее

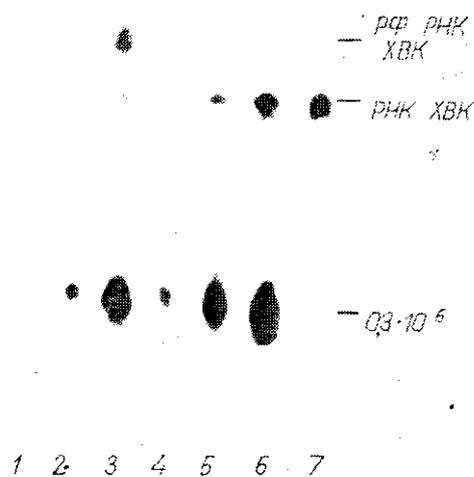


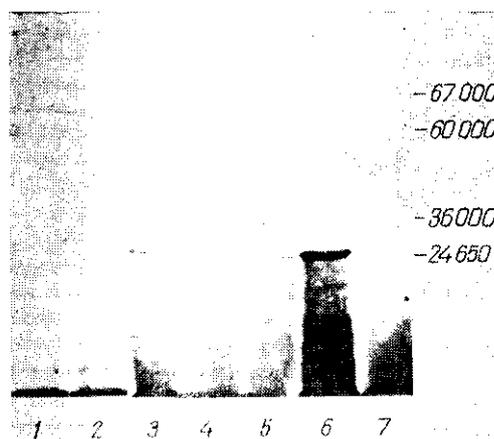
Рис. 5. Авторадиограмма ^{35}S -меченных продуктов трансляции РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений и разделенной в линейном градиенте сахарозы: 1—7 — фракции 19, 22, 25, 28, 31—35, 37, 38 соответственно. Справа указаны положения маркерных белков: альбумин — 67000, каталаза (субъединица) — 60000, лактатдегидрогеназа — 36000, белок оболочки ХВК — 24650.

Fig. 5. Autoradiogram of ^{35}S -labelled translation products of RNA isolated from PVX-infected and separated in the linear sucrose gradient: 1—7 — fractions 19, 22, 25, 28, 31—35, 37, 38, respectively. At the right there are positions of marker proteins: albumin — 67000, catalase (subunit) — 60000, lactate dehydrogenase — 36000, PVX coat protein — 24650.

количество такого белка синтезировано в пробах с РНК фракций градиента 33—35, где, по данным блот-гибридизации (рис. 4, дорожка 6), находится наибольшее количество субгеномной РНК, т. е. существует прямая корреляция между количеством

Рис. 4. Гибридизация РНК, выделенной из инфицированных ХВК растений и разделенной в линейном градиенте сахарозы с ^{32}P -кДНК: 1—7 — фракции 19, 22, 25, 28, 31—35, 37, 38 соответственно.

Fig. 4. Hybridization of RNA isolated from RVX-infected plants and separated in the linear sucrose gradient with ^{32}P -cDNA: 1—7 — fractions 19, 22, 25, 28, 31—35, 37, 38, respectively.



субгеномной РНК ХВК в отдельных фракциях сахарозного градиента и количеством синтезированного *in vitro* белка. Поскольку о вирусспецифической природе этой РНК свидетельствуют данные блот-гибридизации, а ее последовательность соответствует 3'-концу геномной РНК ХВК, где расположен ген белка оболочки [4], то наряду с электрофоретической подвижностью синтезированного *in vitro* белка это позволяет нам предположить, что он является белком оболочки ХВК.

По всей вероятности, в инфицированных ХВК растениях для реализации информации гена белка оболочки синтезируется субгеномная РНК с молекулярной массой $0,3 \cdot 10^6$. Ранее субгеномные РНК для синтеза белка оболочки обнаружены также в растениях, инфицированных ВТМ и ВЖМТ [25—28]. Эти вирусы, как и ХВК, содержат полицистронные РНК, которые в бесклеточной белоксинтезирующей системе транслируются в два высокомолекулярных белка [2, 3], а для реализации информации гена белка оболочки в инфицированных клетках

синтезируются с помощью неизвестного механизма специфические мРНК, которые транслируются в белки оболочки. Следует отметить, что в РНК ВТМ содержится еще ген белка 30 000, который синтезируется в инфицированных клетках с помощью другой субгеномной РНК ($0,78 \cdot 10^6$) [28]. Наличие такой субгеномной РНК в инфицированных ХВК растениях нами с достоверностью не установлено. На рис. 3 видна слабая полоса, соответствующая РНК с молекулярной массой $0,7 \cdot 10^6$, интенсивность которой максимальна на 3-й день после заражения в инокулированных листьях и на 6, 7 и 8-й дни в системно инфицированных. Если в последующих исследованиях существование субгеномной РНК ($0,7 \cdot 10^6$) в инфицированных ХВК растениях будет доказано, это послужит веским доказательством в пользу общности как строения полицистронных РНК ХВК и ВТМ, так и способов реализации их генетической информации.

THE DISCOVERY AND STUDY OF SUBGENOMIC RNA OF POTATO VIRUS X

D. P. Grama, N. N. Mashkovsky

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Virus-specific, low-molecular weight RNA (m. m. $0.3 \cdot 10^6$) is detected in *Datura* plants infected by potato virus X, using ^{32}P -cDNA synthesized on PVX RNA. The low-molecular weight RNA is observed in infected plants three days after infection and it sediments in the linear sucrose gradient between 18S and 5S by ribosomal RNAs, has a nucleotide sequence to 3'-end of genome RNA. It translates in cell-free system into protein with electrophoretic mobility identical to that of coat protein, i. e. it is subgenomic PVX RNA for synthesis of virus coat protein.

1. Woodnar-Filipowicz A., Skrzeczkowski L. J., Filipowicz W. Translation of potato virus X RNA into high molecular weight proteins // FEBS Lett.—1980.—109, N 1.—P. 151—155.
2. Pelham H. R. B. Leaky UAG termination codon in tobacco mosaic virus RNA // Nature.—1978.—272, N 5639.—P. 469—471.
3. Benicourt C., Haenni A. L. Differential translation of turnip yellow-mosaic virus mRNA's *in vitro* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1978.—84, N 4.—P. 831—839.
4. Анализ первичной структуры и локализация гена белка оболочки в геномной РНК X-вируса картофеля / С. Ю. Морозов, В. М. Захарьев, Б. К. Чернов и др. // Докл. АН СССР.—1983.—271, № 1.—С. 211—215.
5. Исследование полисомосвязанных мРНК, выделенных из листьев дурмана, пораженного X-вирусом картофеля / В. Г. Краев, Л. Ф. Диденко, Л. А. Максименко, Л. Н. Тромса // Бактериофаги.—Пушино, 1982.—С. 161—167.
6. Краев В. Г., Диденко Л. Ф., Пархоменко Н. И. Исследование белков в мРНК в составе мРНК цитоплазматических полисом из листьев *Datura stramonium*, пораженных X-вирусом картофеля // 16-я Конф. ФЕБО: Тез. докл.—М., 1984.—С. 233.
7. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocados using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid / P. Palukaitis, A. G. Rakowski, D. E. Alexander, R. H. Symons // Ann. Appl. Biol.—1981.—98, N 2.—P. 439—449.
8. Грама Д. П. Использование коротких препаративных колонок агарозы для очистки палочковидных и нитевидных вирусов растений // Микробиол. журн.—1982.—44, № 1.—С. 78—82.
9. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A. Purification of viral RNA by means of bentonite // Virology.—1961.—14, N 1.—P. 54—58.
10. Garnier M., Mamout R., Bove J. M. TYMV RNA replication *in vivo*: replicative intermediate is mainly single stranded // Ibid.—1980.—104, N 2.—P. 357—374.
11. Синтез и клонирование ДНК, комплементарной пре-мРНК глобина кролика / С. Б. Золотухин, И. Д. Ищенко, О. В. Ставерская и др. // Молекуляр. биология.—1982.—16, № 1.—С. 47—54.
12. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination / H. Lehrach, D. Diamond, J. M. Wozney, H. Boedtker // Biochemistry.—1977.—16, N 21.—P. 4743—4751.
13. Seed B. Diazotizable acrylamide cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 5.—P. 1799—1810.

14. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
15. *Roberts B. E., Paterson B. M.* Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1973.—70, N 8.— P. 2330—2334.
16. *Johnston F. B., Stern H.* Mass isolation of viable wheat embryos // *Nature.*— 1957.— 179, N 4550.— P. 160—161.
17. *Ricciardi R. P., Coodman R. M., Gottlieb D.* Translation of PVX RNA *in vitro* by wheat germ. I. Characterization of the reaction and product size // *Virology.*— 1978.—85, N 1.— P. 310—314.
18. *In vitro* and *in vivo* translation of the ribonucleic acids of a cowpea strain of tobacco mosaic virus / G. Bruening, R. N. Beachy, R. Scalla, M. Zaitlin // *Ibid.*— 1976.—71, N 2.— P. 498—517.
19. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
20. *Bonner M. W., Laskey R. A.* A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels // *Eur. J. Biochem.*— 1974.—44, N 1.— P. 83—85.
21. *Replication* of tobacco mosaic virus. VII. Further characterization of single- and double-stranded virus-related RNAs from TMV-infected plants / P. Palukaitis, F. Garcia-Arenal, M. A. Sulzinski, M. Zaitlin // *Virology.*— 1983.—131, N 2.— P. 533—545.
22. *Otal T., Hari V.* Detection and cell-free translation of subgenomic RNAs of tobacco etch virus // *Ibid.*—125, N 1.— P. 118—126.
23. *Dougherty W. G.* Analysis of viral RNA isolated from tobacco leaf tissue infected with tobacco etch virus // *Ibid.*— 1985.—131, N 2.— P. 473—481.
24. *Нашице поли(А)-последовательности в РНК X-вируса картофеля / Д. П. Грама, Н. Н. Машковский, А. И. Мельник, О. А. Кушниренко // Микробиол. журн.*— 1986.—48, № 1.— С. 78—82.
25. *Messenger RNA* for the coat protein of tobacco mosaic virus / T. R. Hunter, T. Hunt, J. Knowland, D. Zimmer // *Nature.*— 1976.—200, N 5542.— P. 759—764.
26. *A messenger RNA* for capsid protein isolated from tobacco mosaic virus-infected tissue / A. Siegel, V. Hari, I. Montgomery, K. Kolacz // *Virology.*— 1976.—73, N 2.— P. 363—371.
27. *Physical* and functional heterogeneity in TYMV RNA: evidence for the existence of an independent messenger coding for coat protein / C. Klein, C. Fritsch, I. P. Briand et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1976.—3, N 3.— P. 3043—3061.
28. *Synthesis* of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: transient expression of the 30K protein and its mRNA / Y. Watanabe, Y. Emori, I. Ooshika et al. // *Virology.*— 1984.—133, N 1.— P. 18—24.

Ин-т микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного АН УССР, Киев
Ин-т молекуляр. биологии
и генетики АН УССР, Киев

Получено 22.08.85