

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ*

А.А. ШЕВЕЛЕВА, Н.А. НИКИТИН, Е.А. ТРИФОНОВА, А.В. ЗАКУБАНСКИЙ,
С.Н. ЧИРКОВ

В препаратах потивирусов белок оболочки (БО) обычно гетерогенен по молекулярной массе из-за частичного протеолиза N-концевого домена, происходящего, как считается, в процессе препаративного выделения и хранения вирусного препарата под действием клеточных протеаз, которые высвобождаются при гомогенизации растительных тканей и контаминируют очищенный препарат. Неупорядоченный N-домен БО вируса оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV) длиной около 100 аминокислот экспонирован на поверхности вирусной частицы. Он содержит вирус- и штамм-специфические эпитопы и является самой изменчивой частью молекулы БО. Дегградация иммунодоминантного N-терминального домена затрудняет получение вирус-специфических антисывороток и штамм-специфических моноклональных антител и иммунохимический анализ вирусных изолятов. PPV считается самым вредоносным вирусным патогеном косточковых культур. Иммунохимические методы играют важнейшую роль в его диагностике, идентификации штамма, работе по получению устойчивых сортов, а также в эпидемиологических исследованиях и разработке превентивных мер по ограничению распространения этого вируса в насаждениях косточковых культур. Анализ БО PPV методами электрофореза в полиакриламидном геле, иммуноэлектронной микроскопии и вестерн-блота с моноклональными антителами 5B и 4DG5 соответственно к универсальному и PPV-D-специфичному эпитопам показал, что в очищенном вирусном препарате содержится три типа субъединиц: полноразмерный БО и продукты частичного протеолиза БО с молекулярной массой 31 и 28 кДа. Три зоны БО PPV с аналогичной или близкой молекулярной массой регулярно выявлялись также при анализе экстрактов из свежих зараженных листьев табака *Nicotiana benthamiana* и ряда косточковых культур (персика, сливы и алычи), гомогенизированных непосредственно в буфере для нанесения образца, методом вестерн-блота с антителами к универсальному эпитопу. Эти результаты позволяют предположить, что протеолиз БО может происходить уже в зараженных клетках. Нами разработан усовершенствованный протокол препаративного выделения PPV, основанный на сочетании двух оригинальных методик (H.J. van Oosten, 1972; S. Lain с соавт., 1988). Процедура включает накопление вируса в растениях табака *Nicotiana benthamiana*, его экстракцию из зараженных листьев нейтральным NEPES-буфером, инкубацию экстракта, осветленного низкоскоростным центрифугированием, с 5 % Тритоном X-100, ультрацентрифугирование на 20 % сахарозной подушке и очистку вируса посредством ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы (10-40 %) в 0,1 М натрий-боратном буфере (рН 8,2). Метод обеспечивает выход очищенного вируса до 10 мг из 100 г свежих листьев. Вирусные частицы содержат преимущественно полноразмерный БО. Высокий выход обусловлен, по-видимому, эффективной экстракцией вируса с помощью NEPES-буфера, а также отсутствием потерь после осветления экстракта, его обработки Тритоном X-100 и ультрацентрифугирования на сахарозной подушке. Применение Тритона X-100 в указанной концентрации приводит к более полному отделению вируса от мембранных комплексов и солубилизации агрегатов вирусных частиц, что повышает выход вируса. Использование таких вирусных препаратов для иммунизации животных может способствовать получению высокоспецифичных антисывороток и моноклональных антител для диагностики и иммунохимического анализа PPV.

Ключевые слова: вирус оспы сливы, препаративное выделение, белок оболочки, иммуноблот, иммуноэлектронная микроскопия, моноклональные антитела, эпитоп.

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. *Potyviriidae*) считается самым вредоносным вирусным патогеном косточковых культур (1, 2). Нитевидный вирион состоит из молекулы геномной РНК длиной 9,8 тыс. нуклеотидов и 2 тыс. молекул белка оболочки (БО) с молекулярной массой около 36,5 кДа, рассчитанной по аминокислотному составу (3). PPV системно заражает культурные и дикорастущие растения рода *Prunus*

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 14-24-00007.

и многие виды травянистых растений других родов (4-8). В экспериментах, в частности для накопления и препаративного выделения РРV, используют различные виды табака (9, 10).

БО потивирусов состоит из N-терминального, корового и C-терминального доменов. Неупорядоченный N-домен экспонирован на поверхности вирусной частицы. Он содержит вирус- и штамм-специфичные эпитопы и представляет собой самую изменчивую часть молекулы (11). В препаратах потивирусов БО обычно гетерогенен по молекулярной массе из-за частичного протеолиза N-концевого домена, осуществляемого растительными протеазами (12). Так, при электрофорезе очищенных препаратов РРV в полиакриламидном геле выявляются 2-3 белковых зоны. Мажорная зона с молекулярной массой 35-43 кДа соответствует полноразмерному БО. Различия в молекулярной массе определяются штаммовой принадлежностью вирусного изолята, наличием делеций и, по-видимому, зависят от степени посттрансляционных модификаций БО в результате его фосфорилирования и(или) гликозилирования (13-15). Минорные зоны с большей электрофоретической подвижностью образуются при отщеплении от N-конца БО пептидов разной длины (10, 16).

Деградация иммунодоминантного N-конца БО затрудняет получение вирус-специфических антисывороток и штамм-специфических моноклональных антител и иммунохимический анализ вирусных изолятов (17). Между тем, иммунологические методы играют важнейшую роль в диагностике РРV, идентификации его штамма, получении РРV-устойчивых сортов, а также в эпидемиологических исследованиях и разработке превентивных мер по ограничению распространения этого вируса в насаждениях косточковых культур.

Целью нашей работы было усовершенствование процедуры препаративного выделения вируса оспы сливы (РРV) для достижения высокой степени очистки вирусного препарата и высокого выхода вируса, содержащего преимущественно полноразмерный БО. Также мы провели анализ протеолиза БО РРV с помощью моноклональных антител известной специфичности.

Методика. Изолят вируса РРV-NAT (номер последовательности в базе данных GenBank NC_001445), штамм D, был любезно предоставлен E. Maiss (18) и размножен в растениях *Nicotiana benthamiana*.

Листья с мозаикой собирали через 3-4 нед после инокуляции и использовали для выделения вируса. Свежие листья гомогенизировали вручную в 0,02 М НЕРЕС-буфере (рН 6,8), содержащем 0,2 М сахарозу и 10 мМ диэтилдитиокарбамат натрия, при соотношении навески и буфера 1:4 (г/мл). Экстракт осветляли на центрифуге J2-21 («Beckman», США) в роторе JA-20 в течение 15 мин при 13000 об/мин и температуре 4 °С и фильтровали через нетканый материал Miracloth («Calbiochem», США). К осветленному экстракту при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 5 % и перемешивали еще 40 мин при 4 °С. Смесь наслаивали на 20 % (масса/масса) сахарозную подушку в 0,02 М НЕРЕС-буфере (рН 6,8) и центрифугировали на ультрацентрифуге L5-50 («Beckman», США) в угловом роторе 50.2 Ti 210 мин при 28000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 0,1 М натрий-боратном буфере (рН 8,2), содержащем 5 мМ ЭДТА.

Вирусный препарат осветляли 5 мин на настольной центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) при 13400 об/мин и очищали посредством ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы. С этой целью вирусную суспензию наслаивали на преформированный сахарозный

градиент (10-40 %, масса/масса), приготовленный на 0,1 М натрий-боратном буфере (pH 8,2), и центрифугировали в роторе SW 27 120 мин при 25000 об/мин. Содержимое пробирок фракционировали с помощью Auto Densi-Flow ПС («Naakebuchler», США) и Uvicord S («LKB», Швеция), собирая фракции объемом 2 мл. Фракции, содержащие наибольшее количество вируса, объединяли и диализовали против 0,05 М боратного буфера (pH 8,2) в течение ночи. Вирус осаждали центрифугированием в роторе 50.2 Ti 150 мин при 30000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 0,05 М боратном буфере (pH 8,2). На всех стадиях очистки содержание вируса определяли полуколичественным методом иммуоферментного анализа с помощью наборов Reagent Set SRA 31505 («Agdia», США). Концентрацию вируса в очищенном препарате оценивали спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции A_{260} (1 мг/мл) = 2,5 (16).

Анализ вирусного препарата и экстрактов из листьев зараженных растений выполняли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS) и иммуноблота с моноклональными антителами 5В и 4DG5, как описано ранее (15). Источником антител служили наборы K10В и K12В («Agritest», Италия). Были также использованы обнаруженные и охарактеризованные нами изоляты РРV штамма D Cr11 (KR028385), Kobr8 (KP198590), Pav6a (KP198596) соответственно из персика (*Prunus persica*), сливы (*P. domestica*) и алычи (*P. cerasifera*) (19). Иммуноэлектронную микроскопию вирусного препарата проводили, как описано ранее (20), используя первичные антитела 5В в разведении 1:200 и вторичные антитела, конъюгированные с частицами коллоидного золота диаметром 6 нм («Jackson ImmunoResearch, Inc.», США), в разведении 1:50. Образцы контрастировали 2 % раствором уранилацетата и анализировали, используя электронный микроскоп JEM-1400 («JEOL», Япония). Изображение получали с помощью программного обеспечения «Olympus Soft Imaging Solutions GmbH» (Германия).

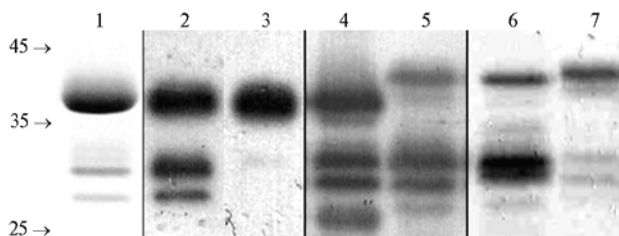


Рис. 1. Результат анализа белка оболочки вируса оспы сливы (*Plum pox virus*) с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле и иммуноблота: 1, 2 и 3 — очищенный вирусный препарат (окраска соответственно Кумасси бриллиантовым синим, моноклональными антителами 5В и 4DG5 в иммуноблоте), 4, 5, 6, 7 — экстракт соответственно из зараженных листьев табака (*Nicotiana benthamiana*), алычи (*Prunus cerasifera*), персика (*P. persica*), сливы (*P. domestica*) (окраска антителами 5В в иммуноблоте). Слева указано положение маркеров молекулярной массы, кДа («Fermentas», Литва).

Результаты. Разработанный способ препаративного выделения РРV был основан на экстракции вируса из зараженных листьев *N. benthamiana* нейтральным НЕРЕС-буфером и сочетании известных способов его последующей очистки (9, 10). Усовершенствованная процедура выделения обеспечивала высокий выход вируса (до 10 мг из 100 г свежих листьев), что в 1,5-2,0 раза больше, чем при использовании традиционного метода (10). Высокий выход, по-видимому, был обусловлен эффективной экстракцией вируса с помощью НЕРЕС-буфера, а также отсутствием потерь после осветления экстракта, его обработки 5 % Тритоном X-100 и ультрацентрифугирования на сахарозной подушке (данные не представлены). Применение Тритона X-100 в высокой концентрации (5 %) способствует более полному извлечению вируса из мембранных комплексов и солюбилизации агрегатов вирусных частиц, что повышает выход вируса (9).

Высокий выход, по-видимому, был обусловлен эффективной экстракцией вируса с помощью НЕРЕС-буфера, а также отсутствием потерь после осветления экстракта, его обработки 5 % Тритоном X-100 и ультрацентрифугирования на сахарозной подушке (данные не представлены). Применение Тритона X-100 в высокой концентрации (5 %) способствует более полному извлечению вируса из мембранных комплексов и солюбилизации агрегатов вирусных частиц, что повышает выход вируса (9).

При электрофорезе очищенного препарата РРV в полиакриламидном геле были выявлены три зоны (рис. 1, дорожка 1). Мажорная зона, по-видимому, представляла собой полноразмерный БО, а минорные зоны 31 и 28 кДа — продукты его частичного протеолиза (10, 16). Явное преваширование зоны полноразмерного БО свидетельствовало о его низкой деградации, что позволяет использовать такой вирусный препарат для получения антисыворотки и моноклональных антител к вирусу.

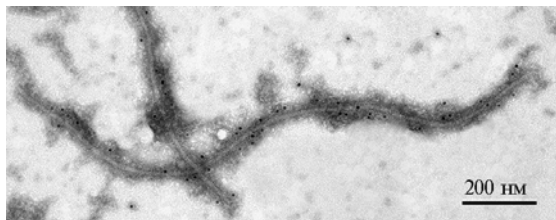


Рис. 2. Иммуноэлектронная микроскопия вируса оспы сливы (*Plum pox virus*), выделенного из листьев табака (*Nicotiana benthamiana*), с использованием первичных антител 5В и вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотом (6 нм). Контрастирование 2 % уранилацетатом. Инструментальное увеличение $\times 20000$, электронный микроскоп JEM-1400 («JEOL», Япония).

то есть они относились к БО (см. рис. 1, дорожка 2). Методом иммуноэлектронной микроскопии было показано, что антитела к универсальному эпитопу связывались с интактным БО по всей длине вирусной частицы (рис. 2). Антитела 4DG5 распознают эпитоп внутри последовательности $^{49}\text{FTPATTQPA TKPV S}^{62}$, характерной для изолятов штамма D (22, 23). Они взаимодействовали с полноразмерным БО, но не выявляли полипептид 28 кДа (см. рис. 1, дорожка 3), который представлял собой БО, лишенный 70 N-терминальных аминокислот. Поскольку сайт протеолиза локализован между остатками глутамина (Q) и треонина (T) в позициях соответственно 70 и 71 (10), полипептид 28 кДа не содержал эпитопа, распознаваемого антителами 4DG5. Кроме того, антитела 4DG5 слабо реагировали с полипептидом 31 кДа (см. рис. 1, дорожка 3). Промежуточный продукт протеолиза 33 кДа, полученный при обработке очищенного препарата изолята 5.15 (L42473) трипсином, четко окрашивался антителами 4DG5 (17). Вероятно, РРV-D-специфический эпитоп сохранялся в полипептиде 33 кДа, но был поврежден в более коротком продукте 31 кДа. Различия в молекулярной массе образовавшихся продуктов могут быть обусловлены разной субстратной специфичностью трипсина и протеазы, ответственной за протеолиз N-конца БО у изолята NAT.

| | | | | | | |
|-------|--|----|----|----|----|-----|
| | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| | 1 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Cr11 | ADEREDEEEVDAGKPIVVTAPAATSPILOQPTPVIQAPRRTTAPMFPNIFTPATTQPA TKPV S RVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAG | | | | | |
| Kobr8 | ADEREDEEEVDAGKPIVVTAPAATSPILOQPPVVIQAPRRTTAPMLNPIFTPATTQPA TKPV S QVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAG | | | | | |
| Pav6a | ADEREDEEEVDAGKPIVVTAPAATSPILOPPVVIQAPRRTTAPMLNPIFTPATTQPA TKPV S QVSGPQLQTFGTGYNEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAG | | | | | |
| NAT | ADEREDEEEVDA-----LQPPVVIQAPRRTTAPMLNPIFTPATTQPA TKPV S QVSGPQLQTFGTYSHEDASPSNSNALVNTNRDRDVDAG | | | | | |

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей N-конца белка оболочки у изолятов вируса оспы сливы (*Plum pox virus*). Последовательности D-специфического эпитопа, дипептида QT и универсального эпитопа затенены. Серия дефисов в последовательности NAT обозначает deletion 15 аминокислот. Цифры сверху элайнмента показывают позицию аминокислоты в последовательности.

Принято считать, что деградация N-конца БО потивирусов происходит в процессе препаративного выделения и хранения вирусного препарата под действием клеточных протеаз, которые высвобождаются при го-

могенизации растительных тканей и контаминируют очищенный препарат (12). Однако три зоны БО РРV с аналогичной или близкой молекулярной массой регулярно выявлялись на иммуоблотах при анализе экстрактов из навесок свежих зараженных листьев, гомогенизированных непосредственно в буфере для нанесения образца. Так, окрашивание антителами 5В всех трех зон наблюдали в экстрактах из листьев *N. benthamiana*, сливы, алычи и персика, зараженных изолятами штамма D (см. рис. 1, дорожки 4-7). Кроме того, в образцах 4-7 антитела 5В окрашивали еще один фрагмент молекулы БО с молекулярной массой около 26 кДа. В экстрактах из зараженных листьев окрашивания не обнаружили (данные не представлены). Аналогичное окрашивание нескольких зон БО РРV наблюдали при анализе экстрактов из листьев *N. benthamiana* и сливы канадской (*P. nigra*), зараженных изолятом 1410 штамма W (24). Таким образом, наши данные показывают, что протеолиз БО мог происходить непосредственно в зараженных клетках. На такую возможность указывают и результаты препаративного выделения РРV с применением ингибиторов протеиназ. В вирусных препаратах, очищенных с применением ингибиторов, также выявляются продукты протеолиза БО, хотя и в меньшем количестве (16, 17). Следует отметить, что подвижность зон 31 и 28 кДа была одинаковой для всех изолятов и растений-хозяев, что предполагает высокую специфичность протеолиза БО. Большая электрофоретическая подвижность интактного БО РРV в очищенном препарате и образце из *N. benthamiana* была обусловлена, по всей вероятности, делецией 15 аминокислот у изолята NAT (18).

Нельзя исключить, что в протеолизе БО принимают участие не только клеточные, но и вирус-специфические протеазы (10). Как известно, в зараженной клетке геномная РНК потивирусов транслируется с образованием полипротеина, который нарезается тремя вирус-специфическими протеазами (P1, HcPro и NIa) на 10-11 белков, включая БО (3). Дипептид ⁷⁰QT⁷¹ может служить субстратом для вирус-специфической протеиназы NIa РРV (25) и ряда других потивирусов (26). В нашей работе он был обнаружен у всех изученных изолятов (рис. 3), что могло бы объяснить происхождение полипептида 28 кДа. Локализацию сайта протеолиза, продуктом которого является полипептид 31 кДа, предстоит выяснить.

Итак, разработанная методика препаративного выделения вируса оспы сливы (РРV) обеспечивает высокий выход очищенного вируса, содержащего преимущественно полноразмерный белок оболочки (БО). Применение таких вирусных препаратов для иммунизации животных может способствовать получению высокоспецифичных антисывороток и моноклональных антител для диагностики и иммунохимического анализа изолятов РРV. Анализ продуктов протеолиза БО РРV с помощью моноклональных антител к различным эпитопам N-конца молекулы показал, что протеолиз может происходить непосредственно в зараженных клетках.

ФГБОУ ВО Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова,
119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 12,
Биологический факультет МГУ, кафедра вирусологии,
e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Поступила в редакцию
19 ноября 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 3, pp. 385-391

IMPROVED METHOD OF PURIFICATION OF *Plum pox virus* AND SEROLOGICAL ANALYSIS OF THE COAT PROTEIN

A.A. Sheveleva, N.A. Nikitin, E.A. Trifonova, A.V. Zakubanskiy, S.N. Chirkov

Abstract

Molecular weight heterogeneity of the coat protein (CP) is commonly observed in the purified potyvirus preparations due to partial proteolysis of the N-terminal domain exposed on the surface of viral particles. The cellular proteases released from disrupted plant tissues are believed to attribute to the partial CP proteolysis during purification and storage of the virus. The N-terminal domain is the most variable part of the CP. It displays virus- and strain-specific epitopes and is highly immunogenic. Degradation of the N-terminal domain creates a potential problem in the production of virus-specific antisera and strain-specific monoclonal antibodies and complicates the serological analysis of virus isolates. *Plum pox virus* (PPV) is considered the most important viral pathogen of stone fruit crops. Serological methods are of great importance for the diagnosis of PPV, strain identification, elaboration of PPV-resistant cultivars, epidemiological surveys and prevention of the uncontrolled spread of the virus in stone fruit plantings. The CP of PPV was studied by polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies 5B and 4DG5 specific to the PPV universal and strain D epitopes, respectively. The purified virus particles have been shown to contain three types of subunits: full-size CP as well as the 28 and 31 kDa products of its partial proteolysis. Three bands of the similar molecular weight were also detected in the analysis of fresh extracts from PPV- infected *Nicotiana benthamiana* tobacco leaves and a number of stone fruits (peach, plum and cherry plum), homogenized directly in the sample buffer, by Western blotting with the antibody 5B suggesting that the CP can be proteolytically processed already in infected plant tissues. The improved procedure of PPV purification, based on the combination of two original methods (H.J. van Oosten, 1972; S. Lain et al., 1988) has been developed. The procedure included accumulation of the virus in *N. benthamiana* plants, its extraction from the infected leaves using a neutral HEPES buffer, the incubation of the clarified extract with 5 % Triton X-100, ultracentrifugation on a 20 % sucrose cushion and purification of the virus using the ultracentrifugation in sucrose concentration gradient (10-40 %) in a 0.1 M sodium borate buffer, pH 8.2. The method provided the yield up to 10 mg of the purified virus from 100 g of infected leaves. The virus particles contained mainly the full-size CP. The high yield of the virus seems to be due to an effective extraction of the virus using HEPES buffer as well as its negligible losses during clarification of the extract, treatment with Triton X-100 and ultracentrifugation on a sucrose cushion. The use of Triton X-100 in the specified concentration leads to a more complete separation of the virus from membrane complexes and solubilization of aggregates of viral particles, that increases the yield of the virus. Application of such the virus preparations for animal immunization can facilitate the high specific antisera and monoclonal antibodies production for reliable detection and serological analysis of PPV.

Keywords: plum pox virus, purification, coat protein, Western blot, immunoelectron microscopy, monoclonal antibody, epitope.

REFERENCES

1. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Llacer G. *Plum pox virus* and estimated cost associated with Sharka disease. *EPPO Bull.*, 2006, 36: 202-204 (doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.01027.x).
2. Chirkov S.N., Prikhod'ko Yu.N. Geneticheskoe raznoobrazie i struktura populyatsii virusa ospy (sharki) sliвы v Rossii [Genetic diversity and population structure of Plum pox virus in Russia]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(5): 529-539 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.529rus, 10.15389/agrobiology.2015.5.529eng).
3. Garcia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol. Plant Pathol.*, 2014, 15: 226-241 (doi: 10.1111/mpp.12083).
4. Llacer G., Cambra M. Host and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *EPPO Bull.*, 2006, 36: 219-221 (doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00975.x).
5. James D., Thompson D. Host and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bull.*, 2006, 36: 222-224 (doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00976.x).
6. Polak J. Host and symptoms of *Plum pox virus*: woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. *EPPO Bull.*, 2006, 36: 225-226 (doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00977.x).
7. Llacer G. Host and symptoms of *Plum pox virus*: herbaceous hosts. *EPPO Bull.*, 2006, 36: 227-228 (doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00978.x).
8. van Oosten H.J. Herbaceous host plants for the sharka (plum pox) virus. *Neth. J. Pl. Path.*, 1970, 76: 253-260 (doi: 10.1007/BF01976584).
9. van Oosten H.J. Purification of plum pox (sharka) virus with the use of Triton X-100. *Neth. J. Pl. Path.*, 1972, 78: 33-44 (doi: 10.1007/BF02077555).

10. Laín S., Riechmann J.L., Méndez E., García J.A. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.*, 1988, 10: 325-341 (doi: 10.1016/0168-1702(88)90074-3).
11. Shukla D.D., Jilka J., Tosic M., Ford R.E. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat protein. *J. Gen. Virol.*, 1989, 70: 13-23 (doi: 10.1099/0022-1317-70-1-13).
12. Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L., Gough K.H., Ward C.W. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.*, 1988, 69: 1497-1508 (doi: 10.1099/0022-1317-69-7-1497).
13. Subr Z., Glasa M. *Plum pox virus* variability detected by the advanced analytical methods. *Acta Virologica*, 2008, 52: 75-90.
14. Kollerova E., Glasa M., Subr Z.W. Western blotting analysis of the *Plum pox virus* capsid protein. *J. Plant Pathol.*, 2008, 90: S1.19-S1.22 (doi: 10.4454/jpp.v90i1sup.610).
15. Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S. Occurrence and genetic diversity of Winona-like *Plum pox virus* isolates in Russia. *Plant Dis.*, 2012, 96: 1135-1142 (doi: 10.1094/PDIS-12-11-1045-RE).
16. Lopez-Moya J.J., Canto T., Lopez-Abella D., Diaz-Ruiz J.R. Differentiation of Mediterranean plum pox virus isolates by coat protein analysis. *Plant Pathol.*, 1994, 43: 164-171 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb00566.x).
17. Lopez-Moya J.J., Sanz A., Cambra M., Gorris M.T., Anaya C., Miguët J.G., Cortes E., Lopez-Abella D. Production and characterization of monoclonal antibodies to plum pox virus and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Arch. Virol.*, 1994, 135: 293-304 (doi: 10.1007/BF01310015).
18. Maiss E., Timpe U., Briske A., Jelkman W., Casper R., Himmler G., Mattanovich D., Kattinger H.W. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J. Gen. Virol.*, 1989, 70: 513-524 (doi: 10.1099/0022-1317-70-3-513).
19. Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Kudryavtseva A., Prihodko Y., Mitrofanova I. Occurrence and characterization of *Plum pox virus* strain D isolates from European Russia and Crimea. *Arch. Virol.*, 2016, 161: 425-430 (doi: 10.1007/s00705-015-2658-x).
20. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis. *Microsc. Microanal.*, 2013, 19: 808-813 (doi: 10.1017/S1431927613000597).
21. Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Perez E., Camarasa E., Garcia J.A., Moya J.J., Lopez-Abella D., Vela C., Sanz A. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bull.*, 1994, 24: 569-577 (doi: 10.1111/j.1365-2338.1994.tb01070.x).
22. Candresse T., Saenz P., Garcia J.A., Boscia D., Navratil M., Gorris M.T., Cambra M. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein. *Phytopathology*, 2011, 101: 611-619 (doi: 10.1094/PHYTO-10-10-0274).
23. Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M.T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J.B., Dunez J. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology*, 1998, 88(3): 198-204 (doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.3.198).
24. Sheveleva A., Chirkov S., Nemova E. Detection of a new Winona-like *Plum pox virus* isolate in naturally infected Canadian plum (*Prunus nigra*) in Russia. *Acta Horticulturae*, 2011, 899: 49-55 (doi: 10.17660/ActaHortic.2011.899.5).
25. Garcia J.A., Martin M.T., Cervera M.T., Reichmann J.L. Proteolytic processing of the plum pox virus polyprotein by the N1a protease at a novel cleavage site. *Virology*, 1992, 188: 697-703 (doi: 10.1016/0042-6822(92)90524-S).
26. Adams M.J., Antoniów J.F., Beaudoin F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.*, 2005, 6: 471-487 (doi: 10.1111/J.1364-3703.2005.00296.X).

Научные собрания

6th EUROPEAN CONGRESS OF VIROLOGY (ECV2016)

(19-22 October 2016, Hamburg, Germany)

Organization: European Society for Virology, Heinrich Pette Institute

The European Congress of Virology is the premier virology conference in Europe and is organized by the European Society for Virology (ESV). ECV2016 will bring together both junior and senior scientists, and will cover all aspects of virus research including basic, clinical, veterinary and plant virology.

The science, the planned special events, and the city itself will make ECV2016 a highly stimulating and unforgettable international event that should not be missed.

Information: <http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2016/10/6th-european-congress-of-virology/>