

Нургазиев Р.З., Кошеметов Ж.К., Крутская Е.Д.

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАР ОБАСЫНЫҢ ВИРУСЫНЫҢ ТАЗА ПРЕПАРАТЫН АЛУ

Нургазиев Р.З., Кошеметов Ж.К., Крутская Е.Д.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

R.Z. Nurgaziev, Zh.K. Koshemetov, E.D. Krutskaya

OBTAINING PURE VIRUS PREPARATION PESTE DES PETITS RUMINANTS

УДК: 619:616-07/619.3

В результате исследования подобран метод ионообменной хроматографии в качестве очистки вируса чумы мелких жвачных животных. Данный метод позволяет получить вирусный препарат с более высокой степенью чистоты.

Ключевые слова: вирус, чума, очистка, метод, жвачные животные.

The study matched by ion exchange chromatography as a purification of the virus plague of peste des petits ruminants. This method allows to obtain viral preparation with a high purity.

Key words: virus, plague, cleaning, method, the ruminants.

Введение

В настоящее время для очистки и концентрирования вирусов используют множество методов, такие как: осаждение на сахарозную подушку, очистка вируса центрифугированием в градиенте плотности, хроматография. Выбор того или иного метода зависит от необходимой степени чистоты получаемого материала.

Ультрацентрифугирование в градиентной плотности сахарозы - самый распространенный метод концентрирования, очистки и фракционирования вирусов. Превосходные препаративные ультрацентрифуги позволяют обрабатывать большие количества материала при низкой температуре. Неотъемлемой и существенной частью вирионов вируса чумы МЖЖ являются липиды, углеводы клетки-хозяина и ее белки, которые существенно различаются по своим размерам и по плотности. Данный метод позволяет разделить частицы по скорости седиментации и плотности в среде [1]. Среди существующих методов очистки и концентрирования пристального внимания заслуживает метод колоночной хроматографии на целлюлозных обменниках. С помощью этого метода можно получить высокоочищенный вирусный материал и одновременно проводить его фракционирование. Хроматография белков на целлюлозных обменниках, впервые успешно примененная Петерсеном и Собером в 1956 году [2], в последние годы стала наиболее распространенным приемом в препаративной химии белков и вирусов на различных стадиях их очистки. С целью освобождения вирусов от посторонних белков используют синтети-

ческие ионообменники на целлюлозной основе. Ионообменники на основе целлюлозы обладают рядом весьма благоприятных для вирусов свойств, предохраняющих их от возможности инактивации.

Целью данных исследований был подбор оптимального способа очистки вируса чумы МЖЖ из вирусосодержащей культуральной жидкости.

Материалы. Вирус – в качестве объекта исследований в работе использовали вирус чумы МЖЖ, штамм "Кентау-7", эпизоотический. Выделен на территории г. Кентау Республики Казахстан от больных овец в 2003 г.

Методы. *Культивирование и титрование вируса чумы МЖЖ.* Вирус чумы МЖЖ культивируют на первично-трипсинизированной культуре клеток ПЯ 1-3 пассажного уровня. Для получения клеток берут почки 1-2 месячных ягнят, готовят первично-трипсинизированную культуру клеток по общепринятой методике, концентрацию клеток доводят до 600 тысяч клеток на 1 см³ и рассеивают в полутора литровые матрасы – 180 см³. При сформировании полного монослоя из сосудов удаляют ростовую среду, клетки заражают вирусосодержащей суспензией чумы МЖЖ в дозе 0,05-0,06 ТЦД₅₀ на клетку и оставляют на контакт при температуре 37,0⁰С в течение 1 ч. Затем в сосуды вносят поддерживающую среду с содержанием глутамина (600мг/мл) и 5% сыворотки крупного рогатого скота, прогретой при 56⁰С в течение 30 мин. Зараженные клетки инкубируют при температуре 37,0⁰С со сменой поддерживающей среды на 2-3 суток.

Инфекционный титр вирусных препаратов рассчитывали по методу Рида и Менча.

Очистка и концентрирование вируса чумы МЖЖ. Для очистки и концентрирования вируса чумы МЖЖ используют наиболее щадящие методы: преципитацию полиэтиленгликолем с м.м. 6000 и ионообменную хроматографию на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе.

Метод с применением ПЭГ-6000. Вирусосодержащую культуральную суспензию подвергают центрифугированию при 2500 г в течение 20-30 мин. Осажденные клетки ресуспендируют в деионизированной воде и гомогенизируют в течение 10 мин. Гомогенат осветляют при 2500 г в течение 30 мин. Полученные над осадочные жидкости объединяют и вносят ПЭГ-6000 в концентрации 6%.

Осаждение вируса проводят в течение 6-7 ч при 4°C. Образовавшийся осадок вируса отделяют центрифугированием при 2500 g в течение 30 минут. Осадок ресуспендируют в 0,05 М ФБР и проводят центрифугирование в ступенчатом (30-45-60%) градиенте сахарозы при 64500 g в течение 30 мин. Затем полученный осадок вируса центрифугируют в линейном (30-60%) градиенте плотности сахарозы при 64500 g в течение 45 мин. Отработанная схема пригодна только для вирусосодержащих материалов свободных от микоплазменной контаминации.

Метод с применением хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. При необходимости удаления из вирусосодержащей жидкости микоплазменной контаминации использована схема очистки с использованием этапа ионообменной хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе. Общая схема очистки вируса чумы КРС включала следующие этапы.

Вирусосодержащую культуральную суспензию центрифугируют при 2500 g в течение 20-30 мин. Осажденные клетки ресуспендируют в деионизированной воде и гомогенизируют в течение 10 мин. Гомогенат осветляют при 2500 g в течение 30 мин. Над осадочные жидкости объединяют и проводят хроматографию на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе. Элюцию вируса с целлюлозы проводят 0,7-1,0М раствором NaCl до появления опалесцирующей фракции. Фракции вируса собирают и центрифугируют при 58000 g через 30% сахарозную "подушку" в течение 60 мин. Фракции, содержащие вирус подвергают центрифугированию в ступенчатом градиенте (20-45-60%) сахарозы при 58000 g в течение 45 мин.

Оценка эффективности методов очистки и концентрирования вируса чумы МЖЖ. На всех стадиях очистки и в исходном материале определяли инфекционность и концентрацию белка. Об эффективности метода судили по выходу вируса, выраженному в % от исходного количества, и по % удаления балластных белков.

Оценку эффективности очистки вируса чумы МЖЖ от балластных белков проводили по формуле: $\% \text{ очистки вируса} = 100 - (V_1 \times C_1) / (V_2 \times C_2)$ [151], (1), где V_1 - объем вирусной суспензии на определенном этапе очистки; C_1 - концентрация белка в вирусной суспензии на определенном этапе очистки; C_2 - концентрация белка в исходной вирусосодержащей суспензии; V_2 - первоначальный объем вирусосодержащей суспензии.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Электрофоретический анализ белков чумы МЖЖ. Препараты для электронной микроскопии готовят методом негативного контрастирования с использованием 2%-ного водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), pH 6,8-7,0 по следующей схеме:

- каплю исследуемого материала и каплю фосфорновольфрамовой кислоты (pH 6,8 и 7,0) помещают на электризованную поверхность фторопласта;
- на каплю исследуемого материала на 10 мин опускают сеточку с формваровой подложкой;
- после адсорбции вируса сеточку помещают на каплю ФВК с pH 6,8 на 1-2 мин, а затем переносят на каплю контрастирующего раствора - ФВК с pH 7,0.

Препараты исследуют в электронном микроскопе JEM-100 CX JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 20000-80000.

Результаты

Прежде чем приступить к разработке метода ПЦР для диагностики вируса чумы МЖЖ, необходимо было выполнить предварительные этапы, которые включали наработку вирусосодержащего материала, его очистку и концентрирование. Подготовительные этапы очень важны в том плане, что для разработки ПЦР необходимо наличие нативных и высокоочищенных полноразмерных препаратов геномной РНК вируса во избежание получения недостоверных результатов. В подобных случаях одним из основных этапов при получении нативной РНК генома вируса является этап получения высокоочищенного вируса, с отсутствием каких-либо примесей. Однако универсального способа очистки пригодного для всех вирусов не существует, это связано с индивидуальной морфологией и физико-химическими свойствами вирусов. Нужно заметить, что выбор методики получения одного и того же вируса определяется целью дальнейшего исследования. В литературе очень мало данных о методах получения очищенного и концентрированного вируса чумы МЖЖ, используемого в дальнейшем для выделения РНК.

При изучении оптимальных параметров культивирования вируса чумы МЖЖ проводили исследование по накоплению вируса в культуре клеток ПЯ в зависимости от величины инфицирующей дозы и состава поддерживающей среды.

Накопления вируса в культуре клеток ПЯ изучали при дозах инфицирования 0,01 и 0,001 ТЦД₅₀/кл в динамике. С этой целью монослойную культуру клеток, инфицированную в указанных дозах, инкубировали при 37°C со сменой среды через каждые 3 суток.

Через каждые сутки после инфицирования отбирали пробы на протяжении 15 суток и замораживали при минус 20 °C. После оттаивания материала определяли активность вирусосодержащих суспензий методом титрования в культуре клеток ПЯ.

Полученные результаты опытов показывают, что при величине инфицирующей дозы 0,01 ТЦД₅₀/кл репродукция вируса в культуре происходит в более ранние сроки (9-10 сут), а активность вирусосодержащих суспензий достигает 6,0 lg ТЦД₅₀/см³.

Тогда при множественности заражения 0,001 ТЦД₅₀/кл накопление вируса идет более медленно и

цитопатическая активность его уступает таковой при использовании дозы инфицирования 0,01 ТЦД₅₀/кл.

При изучении на накопление вируса чумы МЖЖ от поддерживающей среды и концентрации сыворотки в питательной среде было установлено, что присутствие сыворотки КРС в поддерживающих средах играет определенную роль.

В случае использования поддерживающих сред без сыворотки вирус накапливается в сравнительно невысоких титрах (3,25-3,75 lg ТЦД₅₀/см³). Вирус-содержащие материалы с более высокой цитопатической активностью удавалось получать при использовании сред, содержащих 2% и 5% сыворотки.

Для культивирования вируса в ростовую среду вносят 2% прогретой при 56 °С в течение 30 минут сыворотки КРС рН 7,5-7,6.

С целью получения нативного препарата вируса чумы МЖЖ проводился подбор оптимальной методики очистки вируса. Анализируя литературные данные по очистке и концентрированию парамиксовирусов очистку вируса чумы МЖЖ проводили двумя методами, в зависимости от контаминации вирусосодержащего материала: хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и осаждением полиэтиленгликолем (м.м. 6000). Необходимо было подобрать такие схемы очистки и концентрирования, которые бы не нарушали целостность вирусных частиц, и позволяли обрабатывать большие объемы вирусосодержащей суспензии.

Метод очистки и концентрирования вируса с помощью полиэтиленгликоля (м.м. 6000) и последующее центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, первоначально в ступенчатом, затем в линейном имело преимущество перед другими схемами очистки по скорости и простоте выполнения, а также позволило получать высокоочищенные препараты вируса. Отработанная схема пригодна только для вирусосодержащих материалов свободных от микоплазменной контаминации.

При необходимости удаления из вирусосодержащей жидкости микоплазменной контаминации нами использована схема очистки с использованием этапа ионообменной хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе. Общая схема очистки вируса чумы МЖЖ включала следующие этапы. На первом этапе вирус подвергали хроматографии на колонках с волокнистой ДЭАЭ – целлюлозой. Колонку загружали вирусом из расчета 200-300 см³ вирусосодержащего материала на 1 г ионообменника. После адсорбции колонку промывали 0,2 М раствором хлористого натрия на 0,05 М ФБР, рН 7,0 – 7,2 до тех пор, пока поглощение УФ-лучей при 280 нм оттекающей жидкости не становилось равным нулю. Вирус элюировали 0,5 М – 1,0 М растворами хлористого натрия на 0,05 М ФБР, рН 7,0-7,2. Элюаты концентрировали высокоскоростным центрифугированием через 30% сахарозную "подушку". Дальнейшую очистку прово-

дили центрифугированием в ступенчатом градиенте (20-45-60%) сахарозы.

Таким образом, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы являлось одновременно и контролем предшествующих стадий очистки вируса и ее непременно заключительным этапом.

Электронно-микроскопические исследования подтверждают чистоту и целостность вирусных частиц.

Применение метода для очистки и концентрирования вируса чумы МЖЖ с использованием преципитации полиэтиленгликолем (М.М. 6000) позволяет успешно решать задачу по наработке препаративных количеств очищенного и концентрированного вируса.

Наиболее подходящей оказалась методика очистки и концентрирования вируса чумы МЖЖ хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Выбранный нами метод имел преимущество перед другими схемами очистки по простоте выполнения.

Результаты экспериментов показали, что при использовании в качестве элюентов 0,2 М; 0,3 М; 0,4 М; 0,5 М; 0,6 М; 0,7 М; 0,8 М; 0,9 М; 1,0 М; 1,2 М; 1,5 М NaCl выход вируса наблюдается в области 0,7 - 1,0 М NaCl. Повышение концентрации хлористого натрия в элюирующем растворе до 1,5 М не привело к увеличению выхода вируса.

При хроматографировании на колонках с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой сохраняется целостность выделяемых вирусных частиц, т.к. чистота вирусного препарата играет большую роль при последующем выделении РНК вируса, а также удастся очистить вирус от основной массы примесей.

В результате подобранных условий очистки удалось получить препараты вируса, лишенные примесей, о чем свидетельствовал электронно-микроскопический контроль препаратов и спектрофотометрический метод анализа. Полученные результаты совпадают с данными других авторов по очистке представителя семейства парамиксовирусов.

При проведении экспериментов получены аналогичные данные по степени очистки вируса чумы МЖЖ, выход вируса составила 60%. Показатели очистки и концентрирования вируса ЧМЖЖ представлены в таблице.

Таблица 1

Показатели очистки вируса МЖЖ

Стадии очистки	Объем, см ³	Концентрация белка, мг/см ³ (M±m, n=5)	Процент очистки вируса (%) (M±m, n=5)
Исходный материал	500	78,00±2,99	-
Осветление ВСС	492	72,19±2,22	9,94±□□□□
Очистка и концентрирования через ДЭАЭ-целлюлозы	5	5,26±0,44	99,87±□□□□

При использовании данного метода удалось очистить вирус от основной массы балластных белков и при этом не нарушить структуру вирионов.

Выбранный нами метод имел преимущества перед другими схемами очистки по скорости и простоте выполнения.

В наших экспериментах методом электронной микроскопии контролировали чистоту вирусных препаратов, получаемых на разных стадиях очистки и концентрирования. Качество очищенных вирусных препаратов позволило изучить морфологию штамма "Тимурмалик" вируса чумы МЖЖ.

В экспериментах методом электронной микроскопии изучали очищенные негативно контрастированные препараты штамма "Кентау" вируса чумы МЖЖ. На рисунке представлены результаты электронно-микроскопического исследования.

В результате экспериментов исследуемых образцах были обнаружены вирусные частицы.



Рисунок 1. Электронная микрофотография очищенных вирионов вируса чумы МЖЖ (штамм "Кентау").

Микроскопическое исследование штамма "Кентау" вируса чумы МЖЖ, показало, что вирусные частицы имеют характерную икосаэдрическую форму (рисунок). Вирусные частицы содержат капсид (белковую оболочку), который состоит из отдельных идентичных пептидных структурных

субъединиц, или капсомеров. Также вирусные частицы содержат наружную суперкапсидную оболочку. Вирионы без суперкапсида имели размеры около 130-150 нм.

Исследованию морфологии методом электронной микроскопии вируса чумы МЖЖ посвящены работы ряда зарубежных авторов. Результаты экспериментов показали, что вирусные частицы исследуемого штамма не имеют отличительных особенностей. Таким образом, полученные экспериментальные данные относительно формы и размеров элементарных частиц штамма "Кентау" вируса чумы МЖЖ согласуются с данными литературы. Морфологические признаки характерные для штамма "Кентау" вируса чумы МЖЖ, можно использовать для постановки диагноза.

Вывод.

Для каждого штамма вируса чумы МЖЖ нужно подбирать оптимальные условия, при котором можно получить максимально очищенный вирусный концентрат. Это связано с особенностями связи вирионов с белками культуральной жидкости. В результате достигнуто концентрирование исходной вирусосодержащей жидкости в 100 раз с одновременным удалением не менее 90-95% примесей белковой породы.

По полученным результатам можно отметить, что очистка вирусосодержащих суспензий методом ионообменной хроматографии позволяет получить вирусный препарат с более высокой степенью чистоты, чем очистка вируса методом ультрацентрифугирования в градиентной плотности сахарозы, что характеризует большую перспективность хроматографического метода очистки вируса.

Литература:

1. А.С. Гринин, И.Н. Титов. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных. М. «Колос» - 1971. С. 58-61.
2. Peterson E.A., Sober H.A. Chromatography of proteins cellulose ion exchange adsorbents. J. Amer. Chem. Soc. 78. 751-755 (1956).

Рецензент: д.вет.н. Абдикеримов К.А.