

УДК 577.1.576.858

А. С. АГАБАЛЯН, Р. Е. АБРАМОВ, Н. С. ГАСПАРЯН, А. А. ЧАРЧОГЛЯН

О ДВУХ ВАРИАНТАХ ВИРУСА СИНДБИС

Изучались два варианта вируса Синдбис, полученные посредством хроматографии его на фосфате кальция. Показано, что эти варианты вируса отличаются друг от друга размерами бляшек, формируемых ими под агаровым покрытием. Хроматография двух вариантов вируса на сефадексе G-100 позволила установить их сходство по молекулярному весу. В работе обсуждаются возможные различия между ними и по другим параметрам.

Несмотря на большие успехи в изучении структуры вирусов животных, в настоящее время целый ряд вопросов, представляющих несомненный интерес, требует более детального и глубокого исследования с использованием современных методов биохимического анализа. Несколько лет тому назад Ханоин с сотр. [4] показали, что вирус Синдбис, выращенный на культуре клеток куриных фибробластов, состоит из двух видов, которые формируют разные по величине бляшки. Эти бляшечные варианты отличались друг от друга и своей вирулентностью.

О наличии двух вариантов в стоке вируса Синдбис указывали также Безе с сотр. [2]. По данным этих авторов, варианты вируса не отличаются друг от друга ни по количественному содержанию РНК, ни по ее нуклеотидному составу, различия же между ними касаются, по-видимому, поверхностной структуры вирионов.

Два варианта вируса, также отличающиеся друг от друга размерами бляшек, были выявлены в процессе очистки вируса энцефаломиокардита [3].

Материал и методика. Культуру клеток куриных фибробластов готовили по общепринятой методике [1]. Вирус Синдбис, арбовирус группы А, был получен из музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР и прошел около 20 пассажей на куриных фибробластах. Инфекционную активность вирусов определяли по их способности формировать бляшки под агаровым покрытием [7].

Кальций-фосфатный гель готовили по прописи Барнесса [3]. Равные объемы 0,5 М CaCl_2 и 0,5 М Na_2HPO_4 перемешивали при помощи делительных воронок. Скорость вытекания геля составляла 120 капель в минуту. После полного вытекания его перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 часа и отмывали 5—6 раз 0,005 М фосфатным буфером (Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4). Отмытый гель отстаивали при 4° в течение ночи, после чего колонку (2,5×23) заполняли им и уравнивали 0,005 М фосфатным буфером (рН 7,4).

Оптическую плотность фракций определяли спектрофотометрически при 280 мμ на спектрофотометре СФ-16. Сбор фракций проводили коллектором.

Результаты и обсуждение. Хроматография вируса Синдбис на фосфате кальция. Для хроматографии вируса последний предварительно концентрировали диализом против 0,005 М фосфатного буфера в течение 18 часов. Концентрированный вирус наслаивали на поверхность геля. Элюцию адсорбированного материала проводили ступенчатым градиентом фосфатного буфера (0,1 М—0,5 М), pH 7,4, при комнатной температуре.

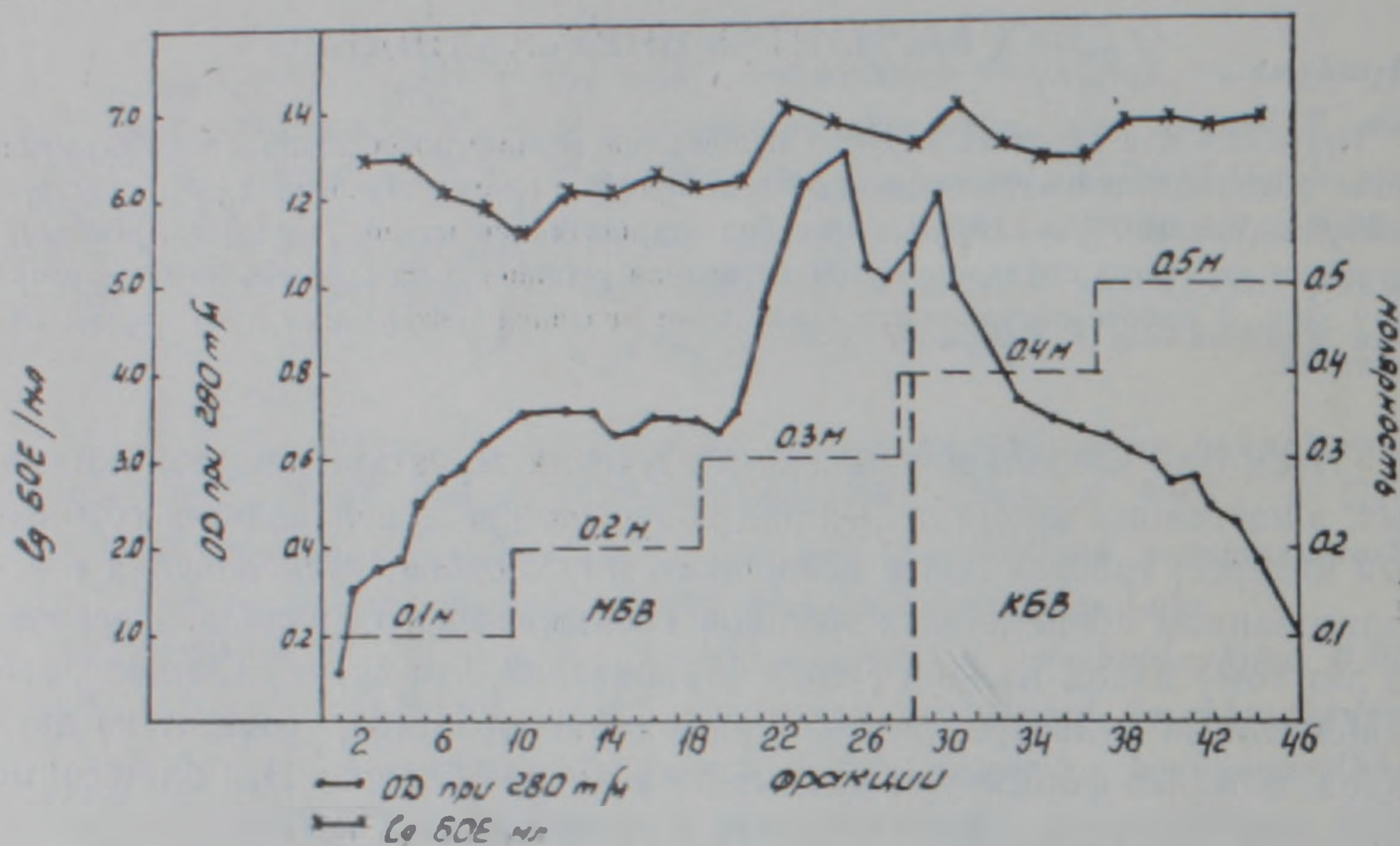


Рис. 1. Хроматография вируса Синдбис на фосфате кальция.
—— ОД при 280, x ——— x lg БОЕ/мл

Из рис. 1 видно, что хроматография вируса Синдбис на фосфате кальция позволила получить два варианта вируса, отличающиеся размерами формируемых бляшек: крупнобляшечный вариант (КБВ) и мелкобляшечный вариант (МБВ). МБВ элюировал с геля 0,1 — 0,2 М фосфатным буфером. Необходимо отметить, что МБВ формировал только мелкие, точечные бляшки, в то время как КБВ, наряду с крупными, формировал, хотя и в незначительном количестве, мелкие бляшки.

Гель-хроматография КБВ и МБВ на сефадексе G-100. Представляло определенный интерес изучение хроматографического поведения двух вариантов вируса Синдбис на сефадексе G-100. С этой целью фракции, соответствующие мелким и крупным бляшкам, отбирались и в количестве 3 мл наслаивались на колонку с сефадексом G-100, (2,5×100). Последнюю готовили по методу, описанному Мериганом [5]. Материал с геля элюировался 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,4). Рис. 2 показывает гель-хроматографию КБВ. Как видно из рисунка, КБВ элюируется с сефадекса двумя четкими пиками. Хроматография МБВ во всех экспериментах выявила один пик, что говорит о гомогенности этого варианта (рис. 3). Анализ пиков оптической плотности КБВ и МБВ показал, что основной материал обоих вариантов обнаруживается практически в од-

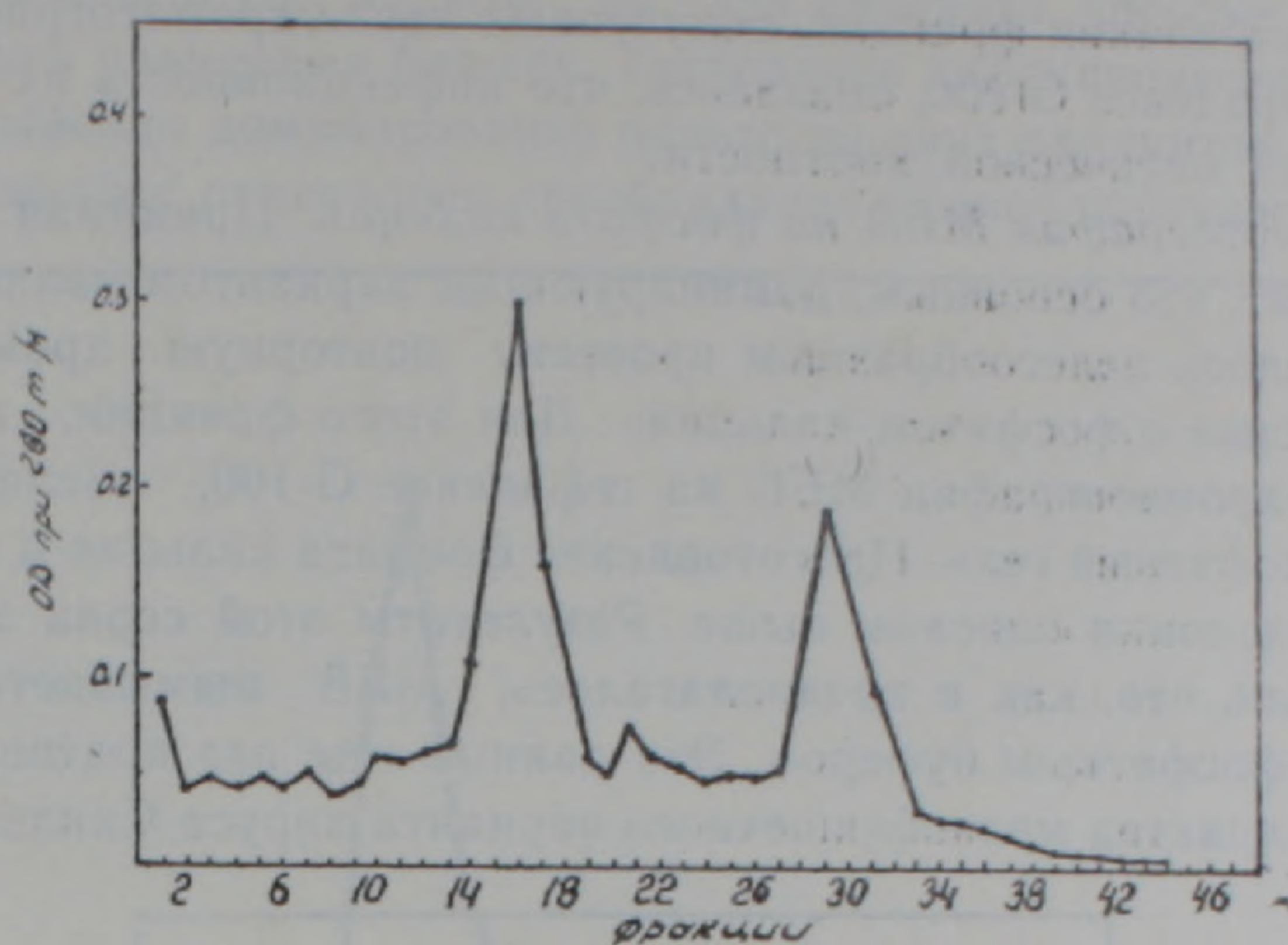


Рис. 2. Хроматография КБВ на сефадексе G-100.

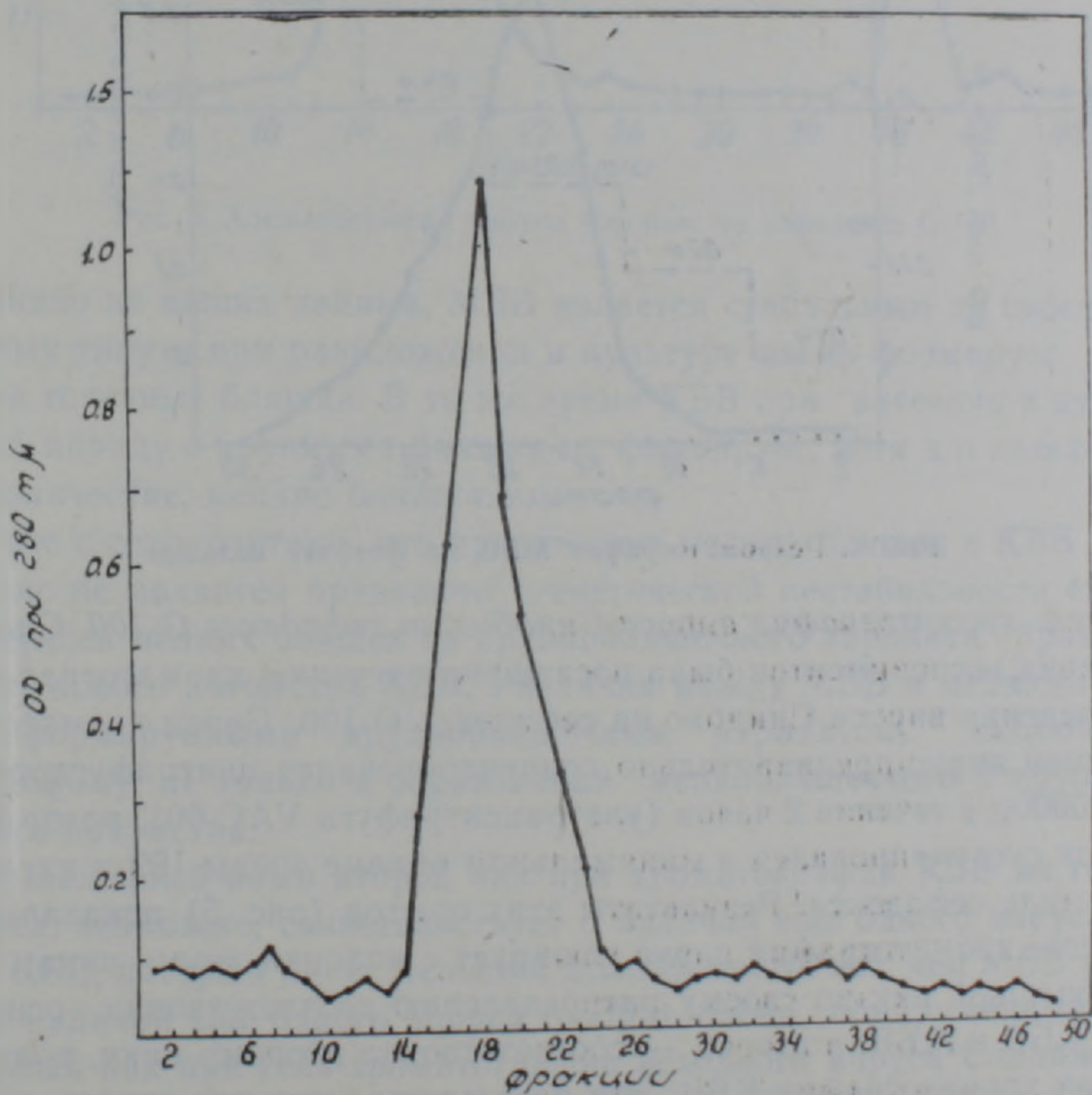


Рис. 3. Хроматография МБВ на сефадексе G-100.

них и тех же фракциях. Учитывая идентичность условий хроматографии в этих экспериментах, можно предположить, что оба варианта имеют одинаковый молекулярный вес.

При титровании фракций, полученных после хроматографии КБВ и МБВ на сефадексе G-100, оказалось, что инфекционность их коррелирует с пиками оптической плотности.

Рехроматография МБВ на фосфате кальция. Принимая во внимание тот факт, что основным, доминирующим вариантом является МБВ, представлялось целесообразным провести повторную хроматографию его на колонке с фосфатом кальция. Для этого фракции, полученные после гель-хроматографии МБВ на сефадексе G-100, наслаивались на кальций-фосфатный гель. Приготовление фосфата кальция и элюция материала с колонки описаны выше. Результаты этой серии экспериментов показали, что, как и предполагалось, МБВ вымывается с геля 0,2—0,3 М фосфатным буфером. Эти данные еще раз подтверждают гомогенный характер мелкобляшечного варианта вируса Синдбис (рис. 4).

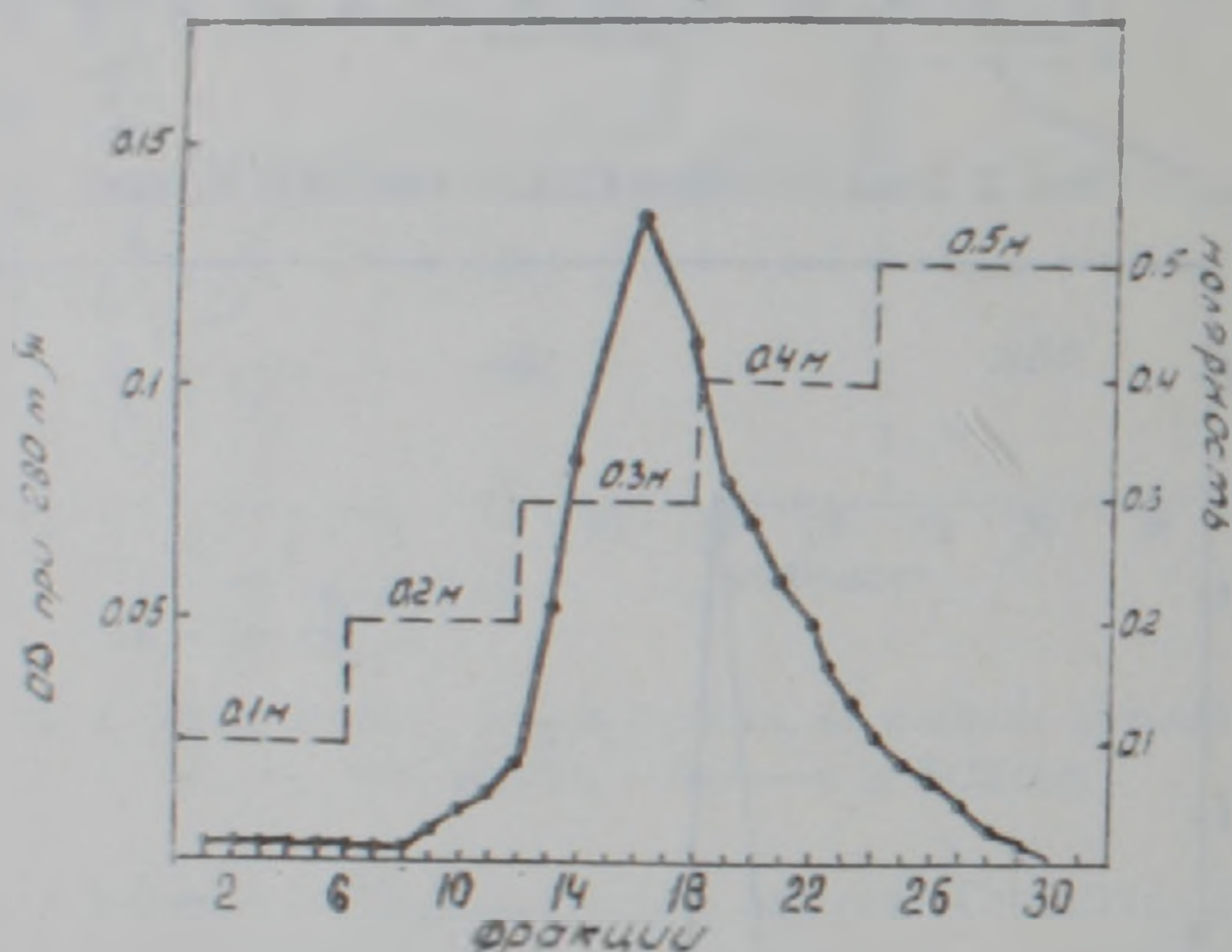


Рис. 4. Рехроматография МБВ на фосфате кальция.

Гель-хроматография вируса Синдбис на сефадексе G-100. Специальная серия экспериментов была посвящена изучению хроматографического поведения вируса Синдбис на сефадексе G-100. Перед хроматографированием вирус предварительно концентрировался центрифугированием при 90000g в течение 2 часов (ультрацентрифуга VAC-601, ротор 8X35). Осадок суспендировался в минимальном объеме среды 199 и наслаивался на гель сефадекса. Результаты этих опытов (рис. 5) показали, что в процессе хроматографии вирус элюируется с колонки двумя пиками. Первый большой пик по своему распределению соответствовал основному пику КБВ и МБВ, а второй — соответствовал второму пику, полученному при хроматографии КБВ. Эти результаты еще раз свидетельствуют об одинаковых молекулярных весах двух вариантов вируса Синдбис.

Хроматография вирусов животных на колонке с фосфатом кальция была впервые описана Таверне-с сотр. [8]. В дальнейшем этот метод успешно использовался в качестве простого и доступного способа очистки вирусов [6]. Кроме того, хроматография вирусов на фосфате кальция по-

зволила разделить ряд вирусов на два варианта, которые отличались друг от друга размерами бляшек. Титрование инфекционного материала фракций выявило доминирование одного из двух вариантов. В случае с вирусом Синдбис отмечалось преобладание мелкобляшечного варианта.

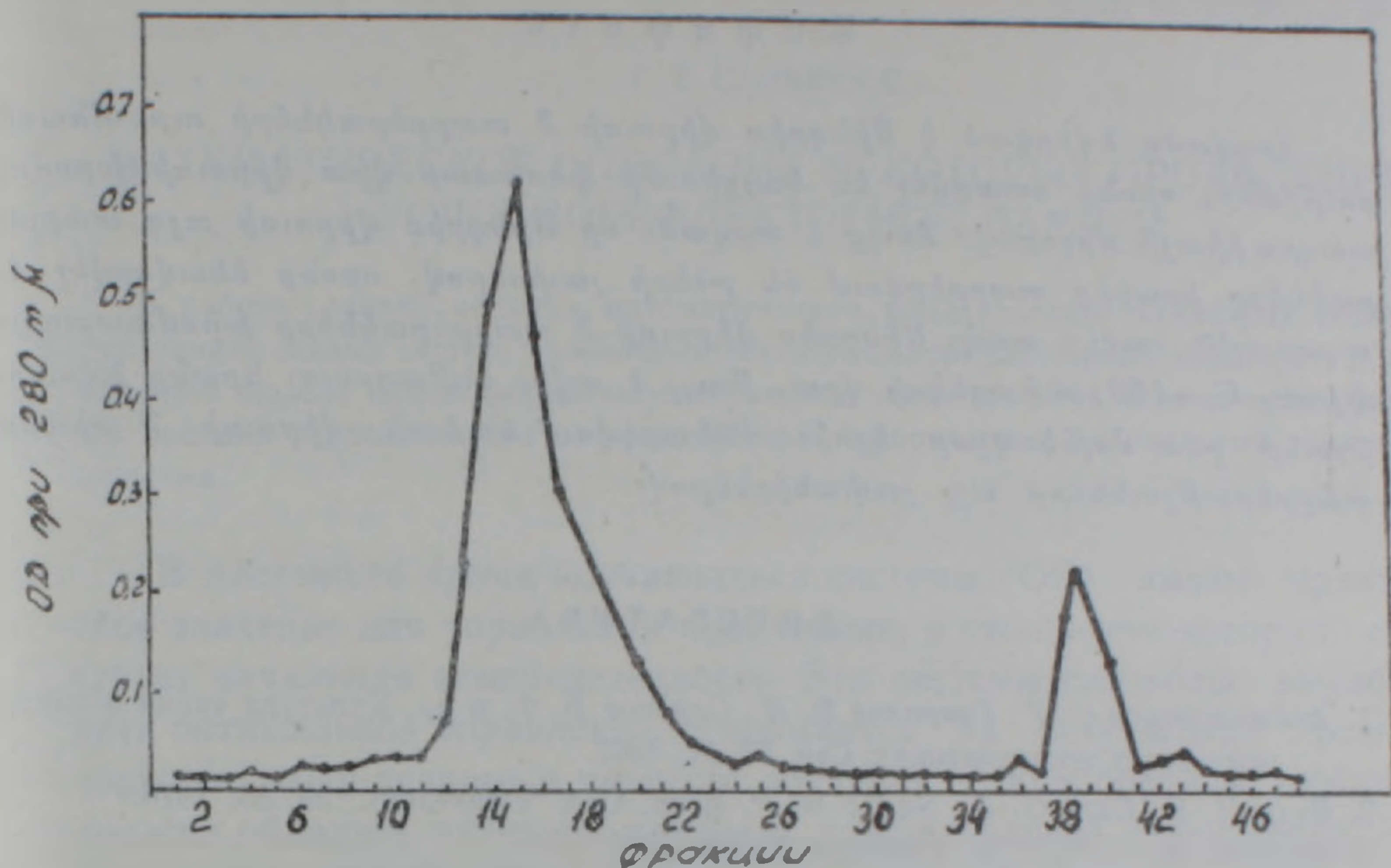


Рис. 5. Хроматография вируса Синдбис на сефадексе G-100.

Как видно из наших данных, МБВ является стабильным по своему бляшечному типу и при размножении в культуре ткани формирует только мелкие точечные бляшки. В то же время КБВ при внесении в культуру клеток, наряду с крупными бляшками, формирует, хотя и в незначительном количестве, мелкие бляшки.

Безе с сотр. считают, что присутствие мелких бляшек в КБВ вируса Синдбис не является признаком генетической нестабильности его, так как пересев мелких бляшек из крупнобляшечного варианта приводит к синтезу нового потомства КБВ. Различия между МБВ и мелкими бляшками, формируемыми крупнобляшечным вариантом, заключаются, по-видимому, не только в образовании мелкобляшечного и крупнобляшечного потомства.

Выявленный нами второй пик при хроматографии КБВ на геле сефадекса, возможно, свидетельствует о наличии еще одного вируса в составе КБВ, который имеет меньший молекулярный вес, чем МБВ и КБВ.

О наличии еще одного вируса говорит также обнаруженный нами минорный пик при гель-хроматографии исходного вируса Синдбис, распределение которого четко коррелирует с аналогичным пиком в КБВ.

Ա. Ս. ԱՂԱԲԱՅԱՆ, Ռ. Ե. ԱԲՐԱՄՈՎ, Ե. Ս. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՉԱՐՉՈՂՅԱՆ

ՎԻՐՈՒՍ ՍԻՆԴԻՍԻ ԵՐԿՈՒ ՏԱՐԵՆՐԱԿՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոգվածը նվիրված է Սինդբիս վիրուսի 2 տարբերակների ուսումնասիրությանը, որոնք ստացվել են կալցիումի ֆոսֆատի վրա վիրուսի խրոմատագրաֆիայի միջոցով: Ցույց է տրված, որ Սինդբիս վիրուսի այդ տարբերակները իրարից տարբերվում են բժերի չափսերով, որոնք ձևավորվել են ագարային ծածկի տակ: Սինդբիս վիրուսի 2 տարբերակների խրոմատագրաֆիան, $G-100$ սեֆադեկսի վրա, թույլ է տվել ենթադրելու նրանց նմանությունը ըստ մոլեկուլյար կշռի: Քննարկվում են նաև վիրուսի 2 տիպերի տարբերությունները այլ չափանիշներով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анджанаридзе О. Г., Гаврилов В. И., Семенов Б. Ф. и др. Культура ткани в вирусологических исследованиях. Стр. 57, М., 1962.
2. Bose H. R. Carl G. Z., Sagik B. P. Arch. Ges. Virusforsch., 29, 83, 1970.
3. Burness A. T. H. J. of Virology 1, 308, 1967.
4. Hannoun C., Cisso J., Andoin P. Ann. Inst. Pasteur., 107, 598, 1964.
5. Merigan T. C., Gregory D. K., Petra'li J. K. Virology, 29, 515, 1966.
6. Mizutani H. Nature. 198, 109, 1963.
7. Porterfield J. S. Nature. 183, 1069, 1959.
8. Taverner J., Marshall J. H., Fulton F. J. Gen. Microbiol., 19, 451, 1958.