

И. М. ЗАРАФЯН, Ш. К. ГРИГОРЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН, А. С. АГАБАЛЯН

ХАРАКТЕРИСТИКА РНК ВИРУСА СИНДБИС

Изучались свойства РНК вируса Синдбис, способы ее получения, а также методы фракционирования вирусспецифических РНК, выделенных из инфицированных клеток куриных фибробластов. Фракционирование вирусспецифических РНК на колонке с микроцеллюлозой с предварительным солевым осаждением позволило разделить вирусспецифические РНК, формируемые в инфицированных вирусом Синдбис клетках.

Получение арбовирусных РНК представляет значительную сложность в связи с крайне низким содержанием их в составе этих вирусов (3—6%), и перед исследователями стоит проблема постоянного совершенствования способов выделения арбовирусных РНК. В процессе репликации вирусной РНК в инфицированной клетке синтезируются три вида вирусспецифических РНК, отличающихся друг от друга целым рядом свойств (константой седиментации, плавучей плотностью, отношением к РНК-азе, инфекционностью и т. д.).

Целью настоящей работы являлось препаративное получение указанных видов РНК при помощи хроматографии тотальной вирусной РНК на колонке с микроцеллюлозой.

Материал и методика. Культуру клеток куриных фибробластов готовили по общепринятой методике [2]. Вирус Синдбис, полученный из музея вирусных штаммов Института вирусологии АМН СССР, концентрировали центрифугированием при 90000 об. в течение 2 час., с последующим повторным осаждением в 20% сахарозе в том же режиме центрифугирования. Экстракцию РНК из выростов и инфицированных клеток проводили по описанному нами ранее способу [3] с использованием различных температур экстракции. Для фракционирования тотальной, вирусной РНК применяли метод, описанный Барбером [6]. Этот метод основан на способности целлюлозы разделять нуклеиновые кислоты в зависимости от степени их спирализации. Колонку 1×20 заполняли микроцеллюлозой из расчета 1 г микроцеллюлозы на 1 мг РНК. Элюцию материала с колонки проводили дробно, используя различные концентрации этанола 15 и 35% в ТЭН—буфере (0.01 М трис, 0.001 М ЭДТА, 0.1 М NaCl, pH 7.2). Для фракционирования вирусспецифических РНК вируса Синдбис тотальную нуклеиновую кислоту, изолированную из инфицированных клеток, переосаждали 95% этанолом, центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 минут. Перед хроматографией РНК осаждали 2 М NaCl, добавлением равного объема 4 М NaCl, и смесь инкубировали 10—14 час. при 4°.

Количественный анализ собранных фракций проводили спектрофотометрически при 260 мμ, учитывая, что 1 ОЕ при 260 мμ соответствует 40 мкг РНК.

Обработку РНК панкреатической РНК-азой проводили при 37° в течение 30 мин.

Результаты и обсуждение. Влияние температуры экстракции на выход вирусной РНК. В связи с тем, что для фракционирования вирусной РНК требуются большие количества ее, предоставлялось целе-

сообразным провести сравнительный анализ ряда способов экстракции вирусной РНК.

Как показано в таблице, наибольшее количество РНК из вирионов получено при использовании горячей фенол-детергентной депротеинизации вирусных частиц. Аналогичные результаты отмечены при экстракции РНК из инфицированных клеток. Эти данные полностью подтверждают результаты, полученные при выделении РНК из других арбовирусов группы А [5].

Таблица
Влияние температурного режима экстракции на выход вирусной РНК

Источник выделения	Температура экстракции	Количество РНК, м г
Инфицированные клетки	4°	400—600
	20°	400—600
	65°	600—800
Вирион	4°	100—200
	20°	200—300
	65°	300—500

Динамика синтеза вирусной РНК в клетках. Для определения времени максимального синтеза вирусной РНК клетки куриных фибробластов инфицировали вирусом Синдбис с множественностью 20 БОЕ на клетку. Синтез клеточных РНК подавляли актиномицином Д (5 мкг/мл), внесенным вместе со средой накопления. Через определенные интервалы времени пробы отбирали, надосадочную жидкость сливали и из инфицированных клеток экстрагировали вирусную РНК. На рис. 1 видно, что максимальный синтез РНК вируса Синдбис отмечается к 6—7 час. после заражения. Установленное время максимального синтеза было использовано в последующих экспериментах.

Фракционирование вирусной РНК. Осажденную 2М хлористым натрием тотальную нуклеиновую кислоту центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую двухспиральные формы нуклеиновых кислот (двухспиральная вирусная РНК и частично клеточная ДНК) и осадок, содержащий односпиральную вирусную РНК и РПФ РНК, переосаждали этанолом, суспендировали в 1 мл 35% этанола и насаивали на колонку с микроцеллюлозой. Из рис. 2б видно, что при хроматографии осадка получали четкое разделение видов РНК, причем РНК, элюируемая 15% этанолом, соответствует односпиральной форме вирусной РНК, а РНК, элюируемая только ТЭН-буфером, соответствует РПФ РНК. Наблюдающийся в первых фракциях незначительный пик объясняется присутствием следов двухспиральных форм, элюируемых 35% этанолом.

На рис. 2а показана хроматография надосадочной жидкости, полученной после обработки препаратов тотальной нуклеиновой кислоты 2М. Из рисунка видно, что основной материал элюируется в первых фракциях 35% этанолом. Эти данные убедительно доказывают, что двухспираль-

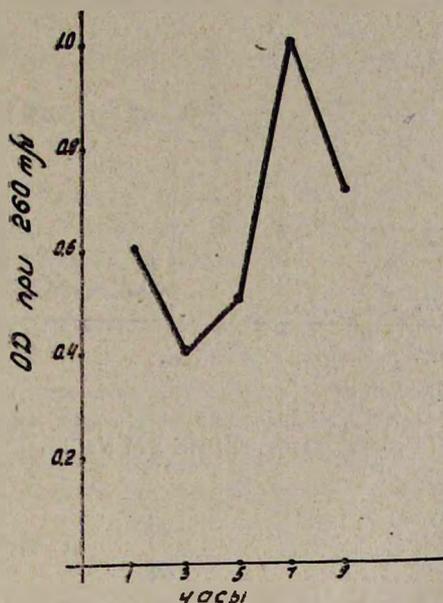


Рис. 1. Динамика синтеза РНК вируса Синдбис в клетках.

ные формы нуклеиновых кислот не адсорбируются на микроцеллюлозе и вымываются 35% этанолом.

В ряде экспериментов фракционирование тотальной вирусной РНК проводили без солевого осаждения. Рис. 3 показывает наличие двух пиков, из которых первый соответствует двухспиральным формам нуклеиновых кислот, а второй, элюируемый 15% этанолом, соответствует односпиральной вирусной РНК.

Обработка препаратов тотальной РНК—РНК-азой (10 мкг/мл) с последующим фракционированием на микроцеллюлозе приводила к полному перевариванию односпиральных вирусных РНК, в то время как двухспиральные формы как ДНК, так и РНК были резистентны к действию РНК-азы (рис. 4).

Одной из основных проблем молекулярной вирусологии является изучение синтеза вирусспецифических РНК. О наличии нескольких форм вирусных РНК, синтезируемых в инфицированных арбовирусами клетках, сообщалось различными группами авторов [2, 8, 10]. Непосредственное участие этих РНК в процессе репликации делает особенно важным получение каждой отдельной формы в чистом виде. Полученные нами данные показывают, что фракционирование РНК вируса Синдбис на колонках с микроцеллюлозой позволяет получить гомогенные препараты всех видов вирусспецифических РНК. Эти результаты полностью согласуются с данными, приведенными Бишопом и Кохом [7] при изучении хроматографического поведения полиовирусной РНК. Аналогичные результаты получены Колтером с сотр. [9], которые после осаждения тотальной РНК вируса Менго 1,5М раствором хлористого лития фракционировали вирусную РНК на целлюлозе.

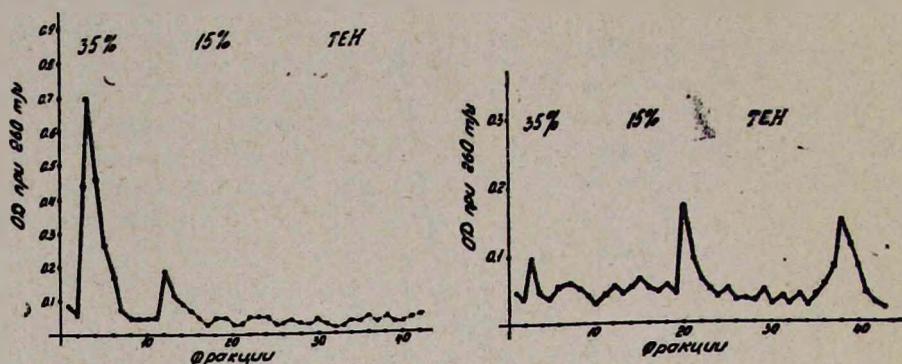


Рис. 2. Слева—хроматография надосадочной жидкости, полученной после обработки РНК 2 М NaCl. Справа—хроматография осадка, полученного после обработки РНК 2 М NaCl.

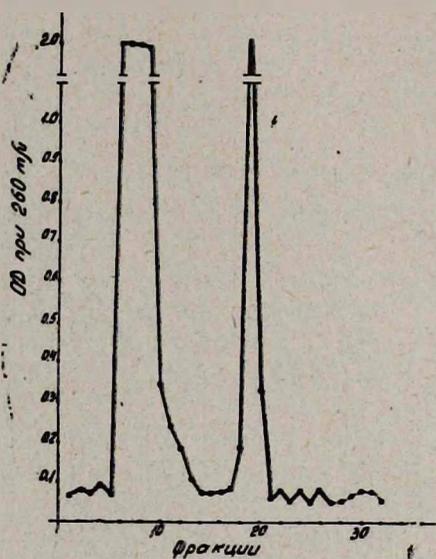


Рис. 3.

Рис. 3. Фракционирование РНК без предварительного осаждения хлоридом натрия.

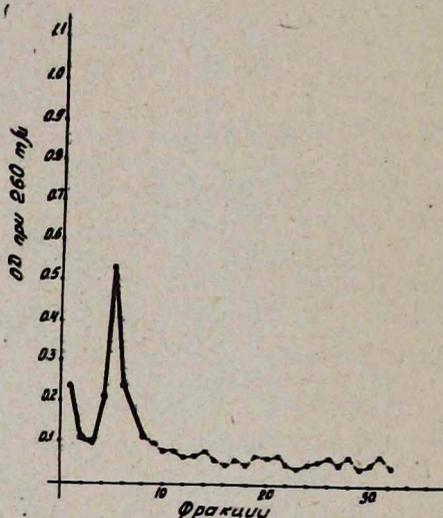


Рис. 4.

Рис. 4. Хроматография РНК, обработанной РНК-азой.

Препаративное получение вирусспецифических РНК является важнейшим этапом в изучении таких кардинальных вопросов вирусологии, как выяснение молекулярных основ инфекционности вирусных РНК, структуры и функции репликативных и репликативных промежуточных форм РНК, их участия в синтезе вирусспецифических белков и т. д.

Ի. Մ. ԶԱՐԱՅՅԱՆ, Շ. Կ. ԳԻՆԳՈՐՅԱՆ, Է. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ԱԳԱՔԱԼՅԱՆ

ՍԻՆԴԲԻՍ ՎԻՐՈՒՍԻ ՌՆԹ-Ի ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են Սինդբիս վիրուսի հատկությունները, ստացման եղանակները, հավի վարակված ֆիբրոբլաստներից անջատված վիրուսապեցիֆիկ ՌՆԹ-ի բաժանման մեթոդները: Վիրուսային ՌՆԹ-ի մաքսիմալ պինթեզը նկատվում է բջիջների վարակումից 5—7 ժամ հետո: Վիրուսային ՌՆԹ-ի ամենամեծ ելքը ստացվում է վարակված բջիջներից և վիրուսային մասնիկներից ՌՆԹ-ի ֆենոլ-դետերգենտային ջերմային էքստրակցիայի (65°) օգտագործման պայքարում:

Նախապես աղերով նստեցված վիրուսապեցիֆիկ ՌՆԹ-ի բաժանումը միկրոցելյուլոզի վրա հնարավորություն է տվել տարբերելու վիրուսապեցիֆիկ ՌՆԹ-ները, որոնք կազմավորվում են բջիջներում, վարակված Սինդբիս վիրուսով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабалян А. С., Урываев Л. В., Еришов Ф. И. *Вопр. вирусол.*, 4, 490, 1972.
2. Анджапаридзе О. Г., Гаврилов В. И., Семенов Б. Ф. *Культура тканей в вирусологических исследованиях*. 57, М., 1962.
3. Меньших Л. К., Агабалян А. С. *Вопр. мед. вирусол.*, 12, 31, 1972.
4. Aaslestad H. J. *of Virol*, 2, 972, 1968.
5. Ada S., Anderson R. J. *Gen. Microbiol*, 29, 165, 1962.
6. Barber R. *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 422, 1966.
7. Bishop J., Koch G. *Virology*, 37, 521, 1969.
8. Martin E. *Brit. Med. Biol*, 50, 185, 1970.
9. Scraba D., Kay C., Colter J. J. *Mol. Biol*. 26, 67, 1967.
10. Zeboultr R., Brown A. J. *Mol. Biol*. 50, 185, 1970.