

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.858

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ НА КОЛОНКЕ
 С БИОГЕЛЕМ А-5m ДЛЯ ОЧИСТКИ ВИРУСА
 ОХОТСКИЙ (ORBIVIRUS, REOVIRIDAE)

Б. Г. САРКИСЯН, А. С. НОВОХАТСКИЙ, Л. К. БЕРЕЗИНА, Д. К. ЛЬВОВ

На территории СССР в последнее десятилетие выделен ряд новых арбовирусов, для классификации которых необходимо изучение физических и биохимических свойств. К их числу относится вирус Охотский, впервые изолированный в 1970 г. из клещей *Ceratixodes putus* Pick comb., собранных в Сахалинской области [2]. Изучение некоторых биохимических и биофизических свойств, а также серологическое исследование антигенных связей дало основание включить его в антигенную группу Кемерово (род *Orbivirus*, семейство *Reoviridae*).

Для получения очищенного и концентрированного вируса был применен ряд методов, среди которых высокой эффективностью отличается метод гель-фильтрации на колонке с биогелем А-5m, впервые использованный применительно к орбивирусам.

Материал и методика. Штамм LEIV-287 Ка вируса Охотский прошел 7 мозговых пассажей на сосунках белых мышей. Для заражения культуры клеток эмбрионов кур использовали мозговой вирус, инфекционный титр которого при титровании на культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) достигал $91 \text{ г ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. Для инфицирования клеток вирус вносили в разведении 10^{-2} по 10 мл на матрац. Контакт клеток с вирусом проводили в течение 1 ч при 37° , после чего вирус отделяли, культуры отмывали и заливали средой поддержки—средой 199 с 2% бычьей сыворотки. Работа с вирусосодержащим материалом проводилась в условиях, обеспечивающих максимальное сохранение его активности, а именно: вирусосодержащую культуральную жидкость (КЖ) снимали до наступления цитопатического действия (ЦПД), переливали в заранее охлажденную посуду, помещенную в ледяную баню, и в дальнейшем тщательно избегали нагревания материала выше $4-8^\circ$. В буферные растворы, используемые для работы с очищенным вирусом, добавляли 0,02% бычьего альбумина.

Для получения меченого вируса клетки после заражения обрабатывали 1—2 мкг/мл актиномицина D фирмы Calbiochem (США) в течение 1 ч, после чего вносили меченый предшественник: H^3 уридин (10 мкюри/мл) с удельной активностью 22 К/ммоль производства Ленинградского межреспубликанского отделения Всесоюзного объединения «Изотоп».

Культура клеток, первично трипсинизированных ФЭК, получена из лаборатории культур ткани Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР. Посевная доза составляла 1 млн клеток на 1 мл, для заражения брали 48-часовые культуры со сформированным монослоем.

Титрование вируса производили по ЦПД на ФЭК. Титр рассчитывали по Риду и Менчу и выражали в $1 \text{ г ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Радиоактивность фракций в виде кислотонерастворимого материала после обработки образцов ТХУ-спирт-эфиром просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике фирмы Packard-3380 (США). Вирус Охотский концентрировали и очищали следующим образом: вирусосодержащую КЖ осветляли на центрифуге J21 В Векстап в роторе JA-14 в течение 30 мин при 12000 об/мин, затем центрифугировали на ультрацентрифуге L 5-65 Векстап в роторе Туре 35 в течение 2 ч при 33000 об/мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в STE (содрум-трис-этиленгликоль) в объеме 1—1,5 мл, наносили на колонку (размером 12×300 мм) фирмы LKB (США) с биогеом А-5п и смывали с помощью STE. Фракции вирусосодержащего материала собирали в объеме 0,8 мл и использовали для определения радиоактивности и инфекционности. При необходимости дальнейшей концентрации вирусосодержащие фракции объединяли и вирус осаждали центрифугированием на ультрацентрифуге L 5-65 Векстап в роторе Туре 65 Тi в течение 1 ч при 40000 об/мин.

Результаты и обсуждение. Результаты титрования и определения радиоактивности фракций в двух независимых опытах показали (рис. 1, 2), что вирус снимается с колонки в виде гомогенного пика, причем максимум инфекционности совпадает с максимумом радиоактивности.

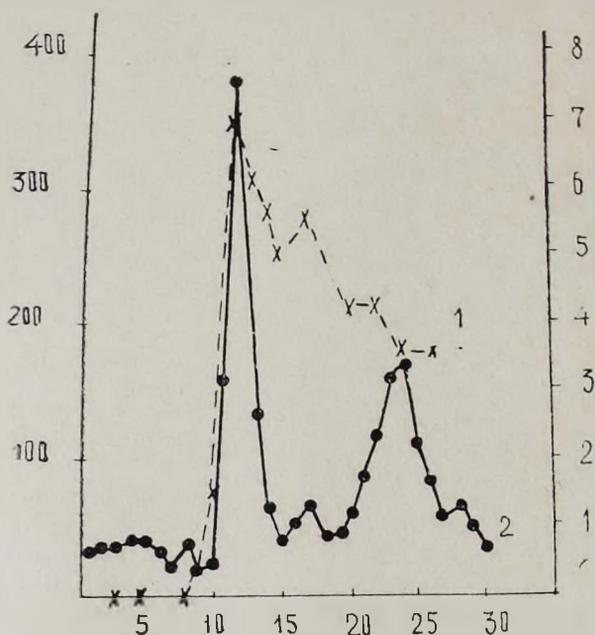


Рис. 1. Фракционирование вируса Охотский на колонке с биогеом А-5п. Распределение инфекционности и радиоактивности. 1—инфекционность фракций. 2—радиоактивность фракций. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат слева—радиоактивность H^3 -уридина (в имп/мин), справа—инфекционность вируса в $1 \text{ г ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Кроме основного, вирусосодержащего пика, определяется небольшой пик радиоактивности, который имеет, видимо, клеточное происхождение, так как инфекционность материала его фракций намного меньше, чем в основном пике.

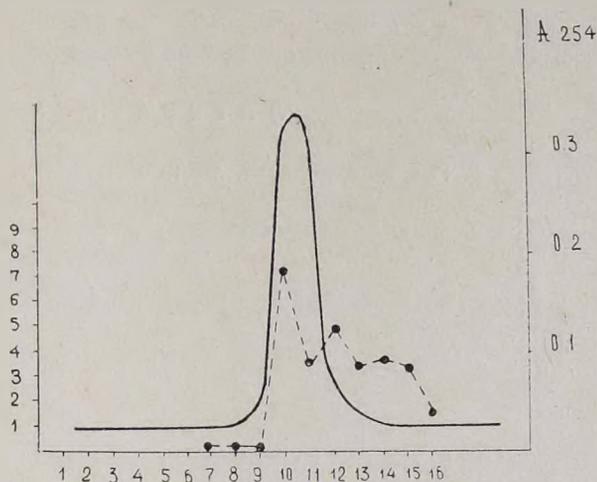
В одном из экспериментов для концентрации и очистки использовали немеченый вирус. Фракции наносили под контролем «Уввикорда» по поглощению УФ в зоне 254 нм, а затем титровали. В этом случае узкий гомогенный пик поглощения совпадал с пиком инфекционности.

Хроматография на гелях—новый эффективный метод разделения,

очистки и анализа органических соединений, основанный на различиях в размере молекул. Гель-хроматография имеет сравнительно короткую историю, насчитывающую не более 20 лет, причем именно в последние годы этот метод нашел широкое применение в различных областях химии, биохимии, молекулярной биологии, в частности при изучении водорастворимых биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и смешанных полимеров).

Прежде всего необходимо выбрать гель с точно заданной величиной пор, что позволило бы использовать его для решения конкретных задач. Поскольку тип геля зависит от природы веществ, образующих его, материал, из которого получен гель, не должен, по возможности, содержать никаких ионогенных группировок [1].

Рис. 2. Распределение инфекционности и поглощения УФ (при 254 мμ). 1—инфекционность фракций, 2—кривая поглощения. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат слева—инфекционность вируса в lg ТЦД₅₀/0.1 мл, справа—поглощение УФ в оптических единицах.



В нашей работе был использован биогель А-5 m, гель агарозы, способный разделять вирусы, фаги, фрагменты клеток и бактерии. Молекулярная масса соединений, которые могут быть разделены на данном типе агарозы, составляет от $1 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$. Гели агарозы, в отличие от агара, не оказывают специфического действия на вирусы, однако их недостатком, существенно ограничивающим сферу применения, является то, что при повышенной температуре или при использовании элюентов, разрушающих водородные мостики (например, раствор мочевины), гель «плавится» и его применение становится невозможным. Эти гели необходимо также тщательно консервировать, добавляя вещества, препятствующие росту бактерий.

Подвергаясь высокоскоростному центрифугированию, орбивирусы в отличие от реовирусов проявляют достаточно выраженную лабильность. В связи с этим метод гель-хроматографии, являясь более мягким, щадящим методом, имеет несомненное преимущество. В то же время он дает возможность быстро отделить вирусы от большей части белковых и других некорпускулярных загрязнений.

Полученные нами данные свидетельствуют об эффективности метода гель-хроматографии и о возможности дальнейшего его применения

не только в отношении вируса Охотский, но, возможно, и других орби-
вирусов.

Институт вирусологии имени Д. И. Ивановского, г. Москва

Поступило 5.X.1979 г.

ԲԻՈՒԿԵԼ A-5m ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ՍՅՈՒՆԱԿԻ ՎՐԱ ԴԵԼ-ՖԻԼՏՐԱՑԻԱՅԻ
ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ՕԽՈՏՍԿՈՒ ՕՐԲԻՎԻՐՈՒՄԻ ՄԱՔՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ
(ORBIVIRUS, REOVIRIDAE)

Բ. Հ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ա. Ս. ԿՈՎՈՆԱՏՍԿԻ, Լ. Կ. ԲԵՐԵՋԻՆԱ, Գ. Կ. ԼՎՈՎ

Հողվածում շարադրված են տվյալներ Օխոտսկու օրբիվիրուսի մաքրման
և խտացման համար բիոգել A-5m պարունակող սյունակի վրա դել-ֆիլտրա-
ցիայի եղանակի օգտագործման մասին: Բերված տվյալները ցույց են տալիս
այդ մեթոդի արդյունավետությունը, որը միաժամանակ աչքի է ընկնում
պարզությունը ու վիրիոններին չվնասող ազդեցությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Детерман Г. Гель-хроматография, М., 1970.
2. Lvov D. K., Timofeeva A. A., Gromashevsky V. L., Tsyarkin Yu. M., Veselovskaya O. V., Gostinshikova G. V., Khutoretskaya N. V., Pogrebenko A. G., Aristova V. A., Sazonov A. A., Chervonski V. I., Sidorova G. A., Fomina K. B., Zhezmer V. Yu. Arch. ges. Virusforsch., 41, 160, 1973.
3. Verwoerd D. W. Progr. Med. Virol., 12, 192, 1970.