

УДК 576.858.25.098.396.332

А. С. Агабалян, Ал. М. Кушкян

**Физико-химическая и биологическая характеристика РНК вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей**

(Представлено академиком К.Г. Карагезяном 2/IX 2004)

Данные, накопленные в результате исследований онтогенеза вирусов позвоночных, следовавших за изучением основных закономерностей репродукции фагов, позволяют выделить ряд последовательных этапов, из которых складывается взаимодействие вирусов с клетками. Процессы, связанные с репродукцией вирусов, в основном состоят из трех периодов: начального (адсорбция и проникновение вируса в клетку депротенизация вирусной нуклеиновой кислоты), среднего (репликация вирусных нуклеиновых кислот, синтез структурных вирусных белков) и конечного (формирование вирионов и освобождение вируса). Синтез вирусных рибонуклеиновых кислот, как показано на модели ряда вирусов, проходит через стадию синтеза репликативной формы РНК и одного из возможных механизмов репликации - «консервативного» или «полуконсервативного» [1,2].

Целью настоящей работы явились изучение репликации РНК вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) и определение биологической активности вирионной и вновь синтезированных РНК.

Вирус ВЭЛ, принадлежащий к семейству альфа-вирусов, был получен из музея вирусных штаммов Института вирусологии АМН РФ и поддерживался периодическими пассажами на белых беспородных мышках.

Фибробласты куриного эмбриона (ФКЭ) готовили по общепринятой методике [3]. Культуру ФКЭ заражали вирусом ВЭЛ (5-10 БОЕ/клетка), обрабатывали актиномицином Д (2 мкг/мл) и вносили <sup>3</sup>Н-уридин (5 мккюри/мл). Через 18 часов после инфицирования клетки из суспензии удаляли осаждением посредством центрифугирования при 3000 g в течение 15 мин, а надосадочную жидкость (вирус) подвергали дальнейшей очистке по описанному в [4] методу. Очищенный вирус содержал 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> БОЕ/мл и 6400-12800 ед. гемагглютинирующей активности. Инфекционную активность вируса и вирусной РНК определяли по их способности формировать бляшки под агаровым покрытием.

РНК из очищенного и меченного по <sup>3</sup>Н-уридину вируса выделяли трехкратной горячей фенольной депротенизацией [5].

Для фракционирования РНК и определения констант седиментации РНК подвергали центрифугированию в градиенте плотности сахарозы. Изучение плотностных характеристик вирионной РНК проводили центрифугированием последней в градиенте плотности сернокислого цезия. Методы центрифугирования в градиентах плотности сахарозы и сернокислого цезия изложены в [6].

Электрофорез РНК проводили в 3.5% акриламидном геле и 0.5% агарозы. В качестве маркеров для определения седиментационных и плотностных характеристик вирусной РНК, а также для установления ее молекулярного веса использовали 28 и 18 S РНК, выделенных из незараженных клеток ФКЭ и меченных по  $^{14}\text{C}$ -уридину. Радиоактивность регистрировали в радиоактивном счетчике SL-20.

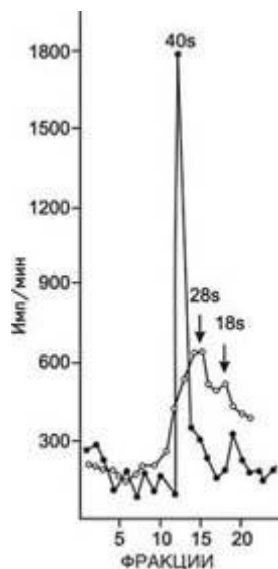


Рис. 1. Седиментационный профиль РНК вируса ВЭЛ: ●-●-●— вирионная РНК; ○-○-○— маркерные РНК.

В наших исследованиях при изучении седиментационных и плотностных характеристик РНК вируса ВЭЛ установлено, что РНК, экстрагированная из очищенной вирусной суспензии после центрифугирования в 10/30% градиенте сахарозы и в градиенте плотности сернокислого цезия имеет коэффициент седиментации 38-40 S и распределяется в одной зоне с плавучей плотностью  $1.66 \text{ г/см}^3$ , что отчетливо видно на рис. 1 и 2.

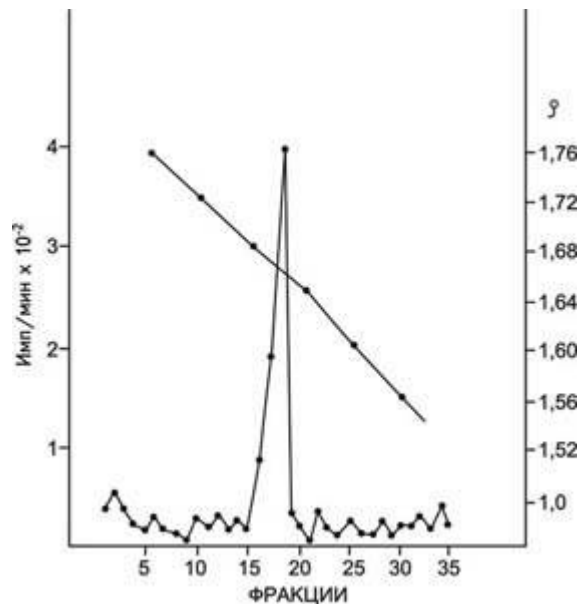


Рис. 2. Плотностная характеристика РНК вируса ВЭЛ.

Для изучения электрофоретического профиля вирионной РНК и определения ее молекулярного веса соответствующие РНК-содержащие фракции сахарозного градиента объединяли, повторно экстрагировали фенолом и исследовали путем электрофореза в 3.5% полиакриламидном геле (рис. 3). На представленной электрофореграмме отчетливо видно, что вирионная 40 S РНК гомогенна и свободна от каких-либо примесей. Молекулярный вес вирионной РНК рассчитывали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркерных 28 и 18 S  $^{14}\text{C}$ -уридин РНК. Подсчитанный таким образом молекулярный вес вирионной РНК вируса ВЭЛ оказался равным  $4.3 \times 10^6$  дальтон. Надо сказать, что при расчете молекулярного веса РНК по формуле  $MV = 1550 \times S^{2.1}$ , где  $S$  - коэффициент седиментации, получали значения, близкие к таковым, определенным при помощи электрофореза РНК в полиакриламидном геле. В то же время седиментационный анализ РНК, выделенной из клеток ФКЭ, инфицированных вирусом ВЭЛ, обработанных актиномицином Д и инкубированных с  $^3\text{H}$ -уридином, показал, что вирус ВЭЛ индуцирует в клетках куриных эмбрионов синтез трех основных типов РНК с коэффициентами седиментации 40, 26, и 20-22 S. Первая из них РНК с коэффициентом седиментации 40 S аналогична вирионной РНК и чувствительна к действию РНК-азы, вторая, вновь синтезированная РНК с коэффициентом седиментации 26 S, также чувствительна к РНК-азе и большинством исследователей рассматривается в качестве *репликативной промежуточной* формы РНК, хотя ее функция до настоящего времени окончательно не выяснена. И наконец последний вид РНК, выявленной нами при седиментационном анализе вирусиндуцированной РНК-РНК с коэффициентом седиментации 20-22 S, - резистентная к действию РНК-азы и обозначенная как *репликативная* форма РНК (рис. 4). Фракционирование вирусиндуцированной РНК в градиенте плотности сернокислого цезия показало, что РНК распределяется в двух зонах с плавучей плотностью 1.66 и 1.60 г/см<sup>3</sup>.

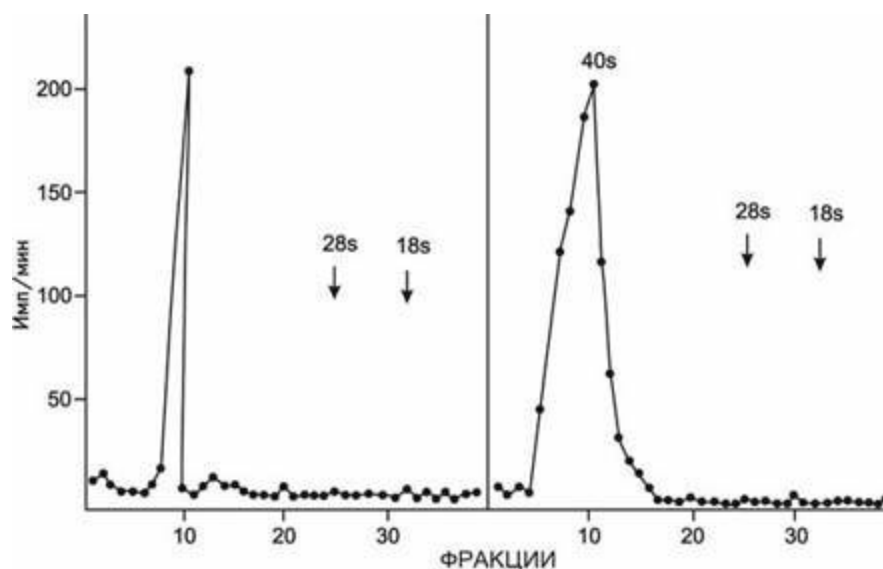


Рис. 3. Электрофоретическая характеристика РНК вируса ВЭЛ.

Ранее было обнаружено, что олигорибонуклеотиды и олигодезоксирибонуклеотиды усиливают иммунный ответ у нормальных и облученных животных, активируют процессы пролиферации антителообразующих и других клеток. Биологическая активность ДНК и РНК была изучена при лечении таких заболеваний как центральная и периферическая тапеторетинальная дистрофия, незаживающие трофические язвы различной локализации, при экспериментальном гепатите и аллоксановом диабете. Положительный эффект нуклеиновых кислот отмечался также при их воздействии на экспериментальные опухоли и др. [7-10].

Сегодня инфекционные нуклеиновые кислоты выделены из многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов. С целью выявления инфекционных свойств вируса ВЭЛ были изучены факторы, влияющие на инфекционные свойства РНК вируса: концентрация NaCl и время обработки клеток хлористым натрием для повышения проницаемости клеток для РНК, влияние ДЭАЭ-декстрана и протамин-сульфата на количество и размер бляшек, выявляемых под агаровым покрытием, время адсорбции РНК на клетках, чувствительность РНК к прогреванию и др.

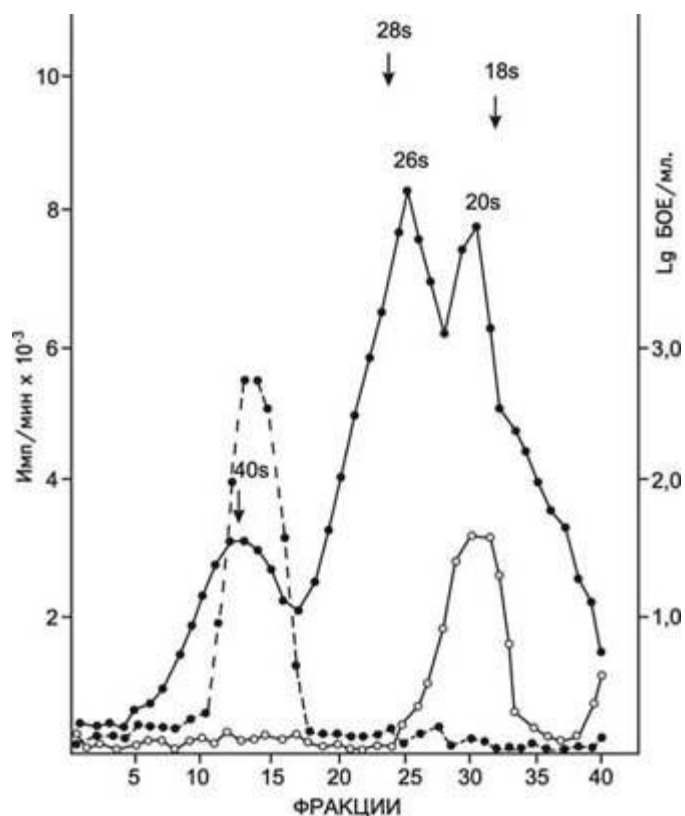


Рис. 4. Седиментационные и инфекционные свойства вирусспецифических РНК, синтезированных *de novo* в клетках инфицированных вирусом ВЭЛ: ●—●— вирусспецифические РНК; ●—●— инфекционность; °—°— РНК, обработанная РНК-азой.

Для выявления инфекционности РНК нами модифицирован метод титрования инфекционности вирусов. Монослой культуры клеток ФКЭ обрабатывали 1 М раствора NaCl в течение 15 мин при 18-20° С, в состав агарового покрытия добавляли 2-3 мг/мл ДЭАЭ-декстрана, а адсорбция РНК на клетках в отличие от вируса (30 мин) проходила в течение 3-5 мин при комнатной температуре или при 37° С. Было установлено, что РНК, выделенная из очищенного вируса ВЭЛ с титром инфекционности  $10^{10}$  БОЕ/мл обладает инфекционными свойствами, т.е способна при введении в организм лабораторных животных или в монослой культуры клеток вызвать инфекционный процесс, причем титры инфекционности РНК были в несколько раз ниже титров вируса -  $10^3-10^4$  БОЕ/мл.

В отличие от вируса обработка РНК-азой полностью инактивировала инфекционные свойства РНК, а обработка РНК иммунной сывороткой против вируса ВЭЛ не оказывала влияния на бляшкообразование, вызываемое препаратами РНК. Аналогичные результаты были получены при обработке препаратов вируса и РНК трипсином. Кроме того обнаружено, что прогревание инфекционной РНК при 56° не влияло на ее инфекционные свойства в отличие от вируса, который в этих условиях инактивировался уже через 2-3 мин. Инфекционная РНК, выделенная как из вирусодержащей суспензии, так и из

инфицированных клеток, лучше сохраняет активность при хранении при - 20° С, хотя и при - 10° С она не теряет инфекционности в течение 7-10 дней.

Данные по определению чувствительности РНК к действию различных ферментов, иммунной сыворотки и прогреванию свидетельствуют в пользу того, что инфекционность препаратов, полученных в результате фенольной депротеинизации вирусных частиц, принадлежит именно вирусной РНК, а не остаточному вирусу, что позволяет рекомендовать метод выявления инфекционной активности РНК вируса ВЭЛ для титрования инфекционности РНК, выделенных из альфа-вирусов (таблица).

### Влияние различных факторов на инфекционные характеристики вируса ВЭЛ и препаратов вирусных РНК

Обработка	Титры инфекционности, в lg БОЕ/мл			
	РНК		Вирус	
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки
РНК-аза (5мкг/мл)	3.0	0	8.1	8.0
Трипсин (5мг/мл)	3.0	3.0	8.1	7.8
Иммунн. сыворотка	3.1	2.9	8.1	6.0
1 М NaCl	0	3.5	8.8	7.1
ДЭАЭ-декстран	0	3.5	8.8	9.0
Протамин- сульфат	0	3.3	8.6	8.7

Описанный способ выявления титрования инфекционности вирусной РНК был использован нами для определения инфекционных свойств вирусспецифических РНК, выделенных из инфицированных вирусом ВЭЛ клеток, и полученных в чистом виде после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. После раскапывания фракций градиента было установлено, что инфекционными свойствами обладают вирусспецифическая РНК с коэффициентом седиментации 40 S (аналогичная вирионной РНК) и РНК с коэффициентом седиментации 20-22 S (репликативная форма РНК) (рис. 4).

Таким образом РНК, выделенная из очищенной суспензии альфа-вируса ВЭЛ, имеет константу седиментации 40 S, плавучую плотность 1.66 г/см<sup>3</sup> и обладает инфекционными свойствами, причем в отличие от вирусных частиц чувствительны к действию РНК-азы и резистентны к иммунной сыворотке. Из культуры клеток фибробластов эмбриона курицы, инфицированных вирусом ВЭЛ, выделены три типа вирусспецифических РНК с различными константами седиментации и разной плавучей плотностью, что указывает на их синтез de novo в процессе репликации депротеинизированной вирусной РНК. Инфекционными

свойствами обладала РНК с константой седиментации 20-22 S, что вкупе с устойчивостью к разрушающему действию РНК-азы указывает на стабильный характер этой РНК. Полученные нами результаты в отношении инфекционных свойств 20-22 S репликативной формы РНК вируса ВЭЛ находятся в полном соответствии с данными, полученными в других работах при изучении физико-химических и инфекционных свойств репликативной формы РНК других вирусов [11-13]. Можно предположить, что репликация РНК вируса ВЭЛ проходит по полуконсервативному механизму репликации.

Ереванский государственный медицинский колледж "Эребуни"

### Литература

1. Агабян А.С. - Биолог. ж. Армении. 1973. №6. С. 40-46
2. Агол В.И. В кн.: Мол. биология вирусов. М. Наука. 1971. 395 с.
3. Анджапаридзе О.Г., Гаврилов В.И., Семенов Б.Ф. и др. В кн.: Культура ткани в вирусологических исследованиях. М. Медгиз. 1962. 235 с.
4. Мейхл Б. В кн.: Вирусология. Методы. М. Мир. 1988. 344 с.
5. Wecker E. - Virology. 1959. N7. P. 241-245.
6. Остерман Л.Л. В кн.: Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М. Наука. 1981. 285 с.
7. Агабян А.С. - Глобус науки. 2002. N2. С. 63-65.
8. Агабян А.С., Карагезян К.Г. - ДНАН Армении. 2002. N3. С. 258-261.
9. Агабян А.С., Макарян А.П., Давтян О.Я. и др. - ДНАН Армении. 2000. N2. С. 177-181.
10. Агабян А.С., Туманян М.А., Захарян Р.А. и др. - ДНАН Армении. 1998. N4. С. 363-366.
11. Chambers T., Hahn C., Galler R. et. al. - Annu. Rev. Microbiol. 1990. V. 44. P. 649-688.
12. Edward Z., Takegami T. - Microbiol. Immunol. 1993. V. 37. P. 239-243.
13. Egger D., Passamontes L., Bolten R. et. al - J. Virol. 1996. V. 70. P. 8675-8683

Ա. Ս. Աղաբալյան, Ալ. Ս. Քուշկյան

**Ձիերի վենեսուելական էնցեֆալոմիելիտի վիրուսի ՌՆԹ-ի ֆիզիկա-քիմիական  
և կենսաբանական բնութագիրը**

Որոշված են ձիերի վենեսուելական էնցեֆալոմիելիտի վիրուսի ՌՆԹ-ի մի քանի ֆիզիկա-քիմիական և ինֆեկցիոն պարամետրերը: Նշված է, որ վիրուսի ՌՆԹ-ի վարակելիության աստիճանը բնորոշող գործոնների մեջ մեծ նշանակություն ունի բջիջների վրա ՌՆԹ-ի ադսորբցիայի և NaCl-ի խտության և բջիջների մշակման ժամանակները:

Ապացուցված է, որ վիրուսային ՌՆԹ-ն ցենտրիֆուգելու ժամանակ սախարոզայի խտության աստիճանում, նստեցվում է 38-40q հաստատունով, իսկ  $C_3Cl$ -ի խտության աստիճանը որոշված է խտության 1,66 գ/սմ<sup>3</sup> զոնայում:

**A. S. Agabalyan, Al. M. Kushkyan**

**Physico-chemical and Biological Characteristics of Equine Encephalomyelitis RNA**

It was shown that among the factors determining the level of virus RNA infectivity considerable importance belonged to the time of RNA adsorption on cells, concentration and duration on treatment cells with NaCl.

Physico-chemical properties of infectious RNA of VEE virus were determined. The virion RNA was found to sediment in sucrose gradient at 38-40 S. In fractionation of RNA in cesium sulphate density gradient RNA was found in one zone of 1,66 g/cm<sup>3</sup> density.