



УДК 578.821:577.323.2

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОЧИСТКИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСА ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ

К.Т. Султанкулова, Д.Т. Ажибаева, К.А. Шораева, В.Л. Зайцев, Н.Т. Сандыбаев

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,  
пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область

Оптимизированы условия получения препаративных количеств высокоочищенного вируса оспы верблюдов из культурального вирусодержащего материала, обеспечивающие степень очистки по белку на 99,9%, с целью изучения физико-химических свойств вируса, выделения его геномной ДНК и изучения полипептидного состава вируса.

### Введение

Вирус оспы верблюдов относится к вирусам рода *Orthopoxvirus*, подсемейства *Chordopoxvirinae*, семейства *Poxviridae*. Эта группа вирусов поражает человека и многие виды животных, а также насекомых. Вирус оспы верблюдов генетически близок к вирусу натуральной оспы. Летальность при данной инфекции у верблюдов составляет 4-7% [1].

Целью наших исследований являлась оптимизация условий очистки вируса оспы верблюдов из культуральных вирусодержащих материалов для получения препаративных количеств вируса, пригодного для выделения структурных белков и вирионной ДНК.

### Материалы и методы

*Вирус.* В работе использовали вирус оспы верблюдов штамм «М-96», выращенный в культуре клеток ПЯ (почки ягненка) с активностью  $5,5 \div 6,0 \text{ lg TCD}_{50}/\text{мл}$ .

Методы, используемые для концентрирования и очистки поксвирусов:

- гельфильтрация на Сефарозе-4В;
- ионообменная хроматография на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе (ДЕ-81);
- градиентное центрифугирование в растворе сахарозы [2-4].

На всех стадиях очистки и концентрирования определяли концентрацию

белка спектрофотометрическим методом по формуле:

$$\text{Белок (мг/мл)} = 1,55 \times \text{Abs } 280 - 0,76 \times \text{Abs } 260$$

Процент очистки рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ очистки вируса} = 100 - (V_1 \times C_1) / (V_2 \times C_2) \times 100;$$

где  $V_1$  – объем очищенного материала ( $\text{см}^3$ );

$C_1$  – концентрация белка в очищенном материале ( $\text{мг}/\text{см}^3$ );

$V_2$  – объем неочищенного материала ( $\text{см}^3$ );

$C_2$  – концентрация белка в неочищенном материале ( $\text{мг}/\text{см}^3$ ).

Чистоту препаратов контролировали с помощью электронной микроскопии.

### Результаты и обсуждение

Для очистки вируса оспы верблюдов были использованы различные методы, такие как гель-фильтрация, ионообменная хроматография и ультрацентрифугирование.

Очистка вируса методом гель-фильтрации через биогели широко применяется для различных групп вирусов. В наших экспериментах была использована сефароза 4В, позволяющая фильтровать вирионы с м.м.  $> 20 \times 10^6 \text{ Д}$  и задерживать низкомолекулярные примеси. В результате очистки вируса оспы верблюдов гель-фильтрацией на сефарозе 4В установлено, что выход виру-



са варьирует в пределах 50-52%, а степень очистки от примесей составляет 85-87%.

Метод ионообменной хроматографии на целлюлозах также широко применяется для препаративной очистки различных групп вирусов. В качестве сорбента была использована волокнистая ДЭАЭ (DE-81, Wathman) целлюлоза, как наиболее эффективный и щадящий ионообменник. Результаты опытов ионообменной хроматографии вируса оспы верблюдов, штамма «М-96», на колонках с ДЭАЭ целлюлозой показали, что выход вируса варьировал в пределах 25-45%, а степень очистки не превышала 20% (рис. 1).

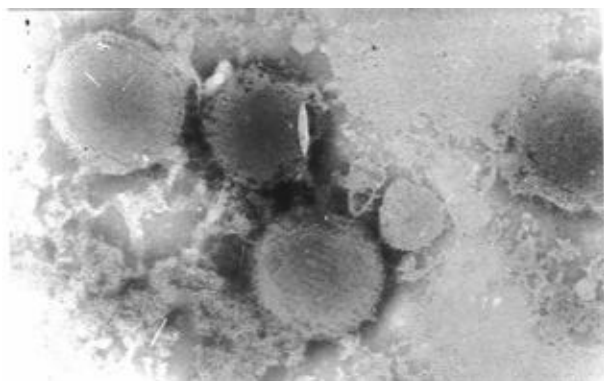


Рис. 1. Электронная микроскопия препарата вируса оспы верблюдов, выделенная хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Ув.50000

Как видно из рисунка 1, в вирусном препарате присутствуют низкомолекулярные примеси, а также происходит разбавление препарата элюентом.

Таким образом, методы гель-фильтрации и ионообменной хроматографии для очистки вируса оспы верблюдов оказались малоэффективными, так как приводят к большим потерям выхода вирусного препарата и недостаточной очистке.

Высокий процент очистки вируса и его выход получен нами при использовании метода ультрацентрифугирования в градиенте раствора сахарозы в комбинации с преципитацией полиэтиленгликолем. Результаты количественного анализа процесса очистки вируса оспы верблюдов методом ультрацентрифугирования приведены в таблице.

Таблица

**Показатели очистки и концентрирования вируса оспы верблюдов из культуральной вирусодержащей жидкости методом ультрацентрифугирования**

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	% очистки вируса
Исходная культуральная жидкость	1550	3,2	-
Осаждение ПЭГ 6000	150	3,0	94,0
Ультрацентрифугирование через 45%-ную сахарозу	15	0,135	99,8
Ультрацентрифугирование в градиенте (45-48-60%) сахарозы	2	0,075	99,9

Примечание: «->» – определение не проводили

Электронно-микроскопический анализ полученных препаратов показал, что при преципитаций ПЭГ с м.м. 6000 вирусные препараты содержали белковые примеси невирусной природы (рис. 2).

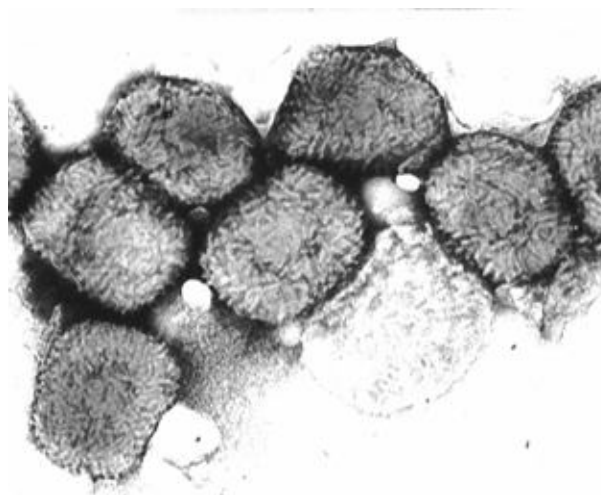


Рис. 2. Электронная микроскопия препаратов вируса оспы верблюдов, штамм «М-96», полученного преципитацией ПЭГ с м.м. 6000. Ув. 50000

При очистке и концентрировании вируса методом ультрацентрифугирования через слой 45%-ного раствора сахарозы потери вируса были незначительными, выход вируса составлял не менее 90%, со степенью очистки 99,8% (рис. 3).

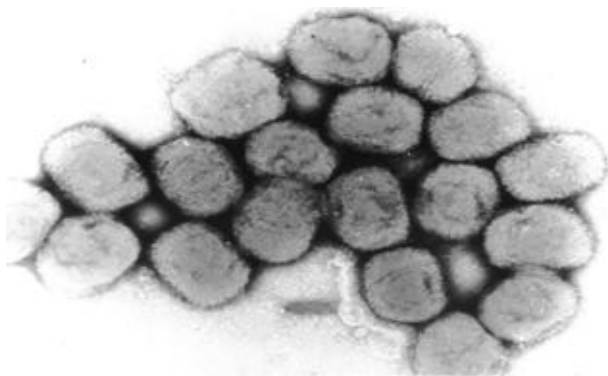


Рис. 3. Электронная микроскопия препаратов вируса оспы верблюдов, штамм «М-96», полученного методом ультрацентрифугирования через слой 45%-ного раствора сахарозы. Ув. 50000

Для удаления оставшихся балластных белков из препаратов вируса использовали ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотностей 45-48-60% растворов сахарозы. При ультрацентрифугировании основная масса вируса (до 95%) локализовалась над 60%-ным раствором сахарозы. Использование указанных этапов позволяет получать препаративные количества вируса оспы верблюдов со степенью очистки выше 99,9%, пригодные для выделения структурных белков и геномной ДНК (рис. 4).

При изучении вирусной суспензии, очищенной методом ультрацентрифугирования с помощью электронной микроскопии, в препаратах наблюдались только целые вирионы диаметром 250-280 нм, имеющие четкую структуру.

Из трех использованных методов очистки и концентрирования вируса оспы верблюдов наиболее эффективными по выходу

и чистоте вирусного препарата оказался метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы в комбинации с ПЭГ.

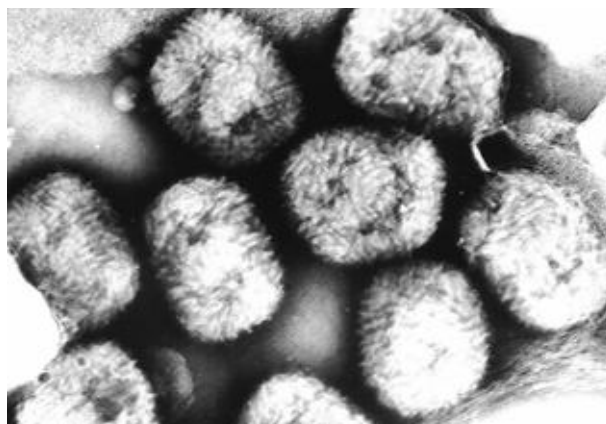


Рис. 4. Электронная микроскопия очищенных препаратов вируса оспы верблюдов, штамм «М-96». Негативное контрастирование 2% ФВК. Ув. 50000

### Выводы

Таким образом, оптимизированы условия получения препаративных количеств высокоочищенных препаратов вируса оспы верблюдов из культурального вирусосодержащего материала с титром инфекционности 5,5-6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, обеспечивающий степень очистки по белку на 99,9%. Применение метода ультрацентрифугирования позволяет успешно решать задачу по обработке больших объемов вирусосодержащей суспензии и получать нативный вирус оспы верблюдов, свободный от балластных белков. Данная методика будет в дальнейшем использоваться для изучения полипептидного состава вируса и выделения его геномной ДНК.

### Литература

1. Tantawi H.H., Dahaby H.E., Fanny L.S. Comparative studies on Poxvirus strains isolative from camels // *Acta virologica*, 1978, 22. - P. 451-457.
2. Сюрин В.Н. Руководство по ветеринарной вирусологии. – М., 1996. - С. 632-633.
3. Gubser C., Hue S. et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis // *J. of General Virology*. - 2004. - V. 85. - P. 105-117.
4. Тотменин А.В., Колосова И.В., Щелкунов С.Н. Изучение ортопоксвирусных генов, кодирующих kelch-подобные белки. 1 Анализ видоспецифических различий по структурной организации // *Молекулярная биология*, 2002. - Т. 36. - №4. - С. 1-7.