

УДК 578.083

МЕТОД ОТРИМАННЯ ОЧИЩЕНИХ ПРЕПАРАТІВ ВІРУСІВ РОСЛИН**Мамчур О.С., Дмитрук О.О., Коломієць Л.П.,
Зарицький М.М.**Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

Пропонується метод концентрування та остаточного очищення вірусів рослин з освітленої вірусної суспензії шляхом електрофоретичного осадження через сахарозну подушку на поліакриламідний гель. Метод може використовуватись на доповнювання хроматографічних та седиментаційних методів, а в окремих випадках і самотійно.

Ключові слова: електрофорез, сахарозна подушка, поліакриламідний гель, вірусний антиген.

Осадження вірусів є одним з важливих етапів їх виділення та отримання очищених препаратів. Відомо багато методів осадження фітопатогенних вірусів, в основі яких лежить фізичний та хімічний вплив на суспензію, що містить вірус [3]. Вибір конкретного методу залежить від властивостей вірусу, а також наявності відповідного обладнання та реактивів. В умовах серійного виробництва діагностичних сироваток доступність та економічність методів набуває особливого значення, оскільки собівартість вірусних антигенів впливає на ціну, а, отже, і на конкурентоздатність кінцевої продукції.

Електрофоретичне осадження використовується в промисловості при нанесенні захисного композиційного покриття на металеві вироби. Для надання полімерним молекулам необхідного позитивного заряду їх ацетоніві розчини змішують з водними розчинами детергентів та гальванічних електролітів з іонами металу і диспергують за допомогою ультразвуку. При пропусканні постійного електричного струму через таку емульсію на катоді утворюються композиційні покриття [1].

Частково очищений вірусний препарат являє собою водну суспензію вірусних часток та компонентів рослинних клітин, звіль-

нену від дейтритних домішок [5]. З електрофізичної точки зору така суспензія подібна до згаданої вище емульсії, відрізняючись від неї за ступенем дисперсності, величиною та концентрацією заряджених часток.

Значення ізоелектричної точки більшості фітопатогенних вірусів перебувають у кислій зоні рН. Отже, в нейтральному або слаболужному середовищі їх віріони мають виражений негативний заряд і в електричному полі рухаються в бік аноду, що уможливило використання електрофоретичних методів [6]. Однак через складність їх застосування та погану відтворюваність результатів ці методи використовуються рідко.

В Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН розроблено простий пристрій для препаративного електрофорезу білків у гранульованому середовищі [7]. Внаслідок мінімальних змін у конструкції цей пристрій пристосовано нами до роботи з частково очищеними вірусними препаратами, зокрема, для електрофоретичного осадження вірусів рослин з освітлених рослинних екстрактів. Осаджувати вірусні частки безпосередньо на аноді неможливо через виділення на ньому іонів водню та молекулярного кисню, здатних інактивувати вірус. Крім того, при прямому осадженні разом з вірусними частками осаджуватимуться всі негативно заряджені домішки незалежно від їх величини. Тому осадження доцільно проводити на проміжну (відносно аноду) основу у середовищі з підвищеною в'язкістю. Як проміжну основу використовували поліакриламідний гель (ПААГ), в'язкість середовища підвищували за допомогою сахарози. Принципова схема пристрою показана на рис. 1.

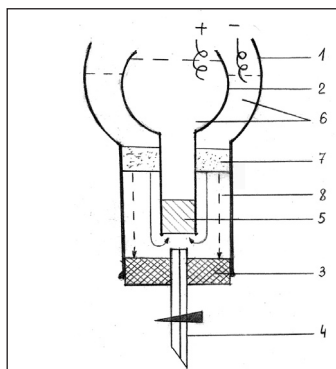


Рис. 1. Принципова схема пристрою для електрофоретичного осадження вірусів рослин із освітлених рослинних екстрактів

Пристрій складається з двох вкладених одна в одну скляних посудин, які мають циліндричні відростки (1, 2). Посудини виконують роль електрофоретичних колонок та резервуарів електродного буфера. Зовнішня посудина знизу щільно закривається гумовою пробкою (3) з капілярним краном (4). У циліндричному відростку внутрішньої посудини попередньо формується стовпчик 10% ПААГ (5). В зовнішню і внутрішню посудину заливається електродний 0,005 М трис-гліциновий буфер, рН 8,3 (6). Під буфер через капілярний кран за допомогою шприца обережно нашаровується частково очищений препарат вірусу з додаванням 10% сахарози та 1-2 крапель барвника бромфенолового синього (7). У той же спосіб під зразок нашаровується 40%-ний розчин сахарози в електродному буфері (8). Пристрій підключається до джерела живлення таким чином, щоб анод був у внутрішній посудині.

В електричному полі вірусні частки із зони зразка (7) рухаються через сахарозну подушку (8) спочатку донизу, а потім у напрямку аноду (суцільна стрілка). На шляху свого руху вони зустрічають перепону у вигляді стовпчика ПААГ (5). 10%-ний ПААГ не впливає на електропровідність системи, він проникний для білків та дрібніших молекул і непроникний для вірусів. Внаслідок цього віруси осідають на поверхні гелю подібно до того, як вони осідають на дно пробірки при ультрацентрифугуванні. ПААГ має дуже низький показник електроосмосу, а тому не спостерігалось зустрічного руху води – від аноду до катоду (ефект Бете-Торопова), внаслідок чого електрофоретичне осадження вірусів на ПААГ відбувається активніше, ніж при використанні напівпроникних мембран [4].

Вірусні частки на поверхні ПААГ додатково піддаються дії електродіалізу, в результаті чого видаляються низькомолекулярні домішки рослинного походження, які мають негативний заряд. Електрично нейтральні домішки з високою плавучою щільністю під дією сили тяжіння проходять через сахарозну подушку і осідають на гумовій пробці (пунктирна стрілка). Відносно легші домішки затримуються в подушці або зоні зразка. Позитивно заряджені домішки мігрують в електродний буфер та осідають на катоді. В результаті частково очищений препарат вірусу звільняється від більшої частини домішок.

По закінченні процесу, про що свідчить вихід барвника в анодний буферний резервуар, пристрій знеструмлюють, розбирають і ресуспендують осад з нижнього кінця стовпчика ПААГ. Оскільки

осад ресуспендують у невеликому об'ємі буферного розчину, відбувається концентрування вірусу. Звичайно при промиванні гелевого стовпчика не всі вірусні частки переходять у ресуспендуючий розчин, оскільки частина з них утворює малорозчинні комплекси за рахунок гідрофобних та інших нековалентних зв'язків. Розчинність осаду можна підвищити, використовуючи такі фактори впливу на ПААГ, як детергенти і температура. Однак наявність ПААГ в антигені не перешкоджає одержанню якісних діагностичних сироваток, оскільки ПААГ може слугувати ад'ювантом при імунізації тварин [2]. Тому, крім промивання гелю, доцільно відбирати поверхневий його шар і, після подрібнення, використовувати для підшкірних та внутрішньом'язових ін'єкцій.

Важливою перевагою електрофоретичного осадження вірусів рослин є можливість його постійного контролю і активного впливу на процес, змінюючи товщину сахарозної подушки, напругу, силу струму, полярність, температуру та інші чинники. Залежно від об'єму частково очищеного вірусного препарату, враховуючи властивості кожного конкретного вірусу, процес електрофоретичного осадження при напрузі 200-600 В і силі струму до 10 мА може тривати від 3 до 8 годин. Тому необхідно забезпечити циркуляцію електродного буфера між анодним та катодним резервуарами для запобігання зміни його рН.

Таким чином, електрофоретичне осадження вірусів рослин можна розглядати як перспективний метод, який доповнює хроматографічні та седиментаційні методи. Враховуючи те, що для дослідження деяких вірусів традиційні методи не прийнятні, розроблений нами метод може стати реальною альтернативою. Як його застосовувати – чи як допоміжний чи самостійний – може залежати також від наявності в частково очищеному вірусному препараті фенольних сполук, пектинів та інших домішок, які можуть впливати на процес осадження.

Шляхом електрофоретичного осадження Х-вірусу картоплі та вірусу аукуба мозаїки картоплі одержані препарати з виходом вірусу до 300 мг/кг та 280 мг/кг, відповідно. Співвідношення $D_{260/280}$ для препарату ВАМК дорівнювало 1,2, для препарату ХВК – 1,3, що свідчить про досить високу ефективність використаного методу.

Отже запропонований метод електрофоретичного осадження вірусів рослин із освітлених рослинних екстрактів доповнює методичний арсенал фітовірусології.

1. Дейнека Ю.Ф., Ульберг З.Ф., Эстрела-Льопис В.Р. Электрофоретическое осаждение металлополимеров. – К.: Наук. думка, 1976. – 165 с.
2. Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ // Антитела. Методы. Кн. 1 / Под ред. Д. Кэтти; Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – С. 33-76.
3. Мэтьюз Р. Вирусы растений / Под ред. Атабекова И.Г.; Пер. с англ. – М.: Мир, 1973. – С. 37-52.
4. Тихо ненко Т.И. Методические основы биохимии вирусов. – М.: Медицина, 1973. – С. 81-84.
5. Шелудько Ю.М. Фітовірусологія. – К.:Вища шк., 1970. – 271 с.
6. Van Regenmortel M.H.V., Purification of plant viruses by zone electrophoresis // *Virology*. – 1964. – Vol. 23. – P. 495-503.
7. Пат. 64377А Україна, МПК⁷ С 12 N 7/00. Пристрій для препаративного електрофорезу в гранульованому середовищі / О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, М.М. Зарицький // Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004, Бюл. № 2.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТЫХ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

Мамчур А.Е., Дмитрук О.А., Коломиец Л.П., Зарицкий Н.М.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Предлагается метод концентрирования и конечной очистки вирусов растений из осветленной вирусной суспензии путем электрофоретического осаждения через сахарозную подушку на полиакриламидный гель. Метод может использоваться в дополнение к хроматографическим и седиментационным методам, а в отдельных случаях и самостоятельно.

Ключевые слова: электрофорез, сахарозная подушка, полиакриламидный гель, вирусный антиген.

THE METHOD FOR THE OBTAINING PURE PREPARATIONS OF THE PLANT VIRUSES

Mamchur A.E., Dmitruk O.A., Kolomietz L.P., Zaritsky M.M.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

It has been proposed the method for the concentration and final purifying of plant viruses from cleared virus suspension. This method includes the virus electrophoretic precipitation through the sucrose pillow on the polyacrylamide gel layer. It may use in addition to the chromatographically and sedimentational methods and independently in the individual cases.

Key words: electrophoresis, sucrose pillow, polyacrylamide gel, virus antigen.