DOI: 10.17117/na.2016.02.03.199

<http://ucom.ru/doc/na.2016.02.03.199.pdf>

Поступила (Received): 27.02.2016

Доронин М.И., Пичуева А.А., Павлов Д.К. Очистка и концентрирование вируса весенней виремии карпа

Doronin M.I., Pichueva A.A., Pavlov D.K.
Purification and concentration of spring viraemia of carp virus

Получен очищенный и концентрированный культуральный антиген вируса весенней виремии карпа. Осаждение вируса проводили с помощью ПЭГ-6000 с последующим центрифугированием при 25000 об/мин, очистку – в градиенте плотности хлорида цезия. Проведена оценка степени чистоты культурального антигена вируса ВБК методом SDS-ПААГ электрофореза

Ключевые слова: вирус весенней виремии карпа, концентрирование и очистка культурального антигена, SDS-ПААГ электрофорез, концентрация вирусного белка

Доронин Максим Игоревич

Кандидат биологических наук
Федеральный центр охраны здоровья животных
г. Владимир

Пичуева Алена Александровна

Кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
Федеральный центр охраны здоровья животных
г. Владимир

Павлов Дмитрий Константинович

Кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник
Федеральный центр охраны здоровья животных
г. Владимир

The purified and concentrated culture antigen of the virus of spring viremia of carp was obtained. Deposition of virus was performed using PEG-6000, followed by centrifugation at 25000 rpm, the purification was performed in density gradient of cesium chloride. An assessment of the purity culture antigen of SVC virus was conducted by method SDS-PAGE electrophoresis

Key words: spring viraemia of carp virus, Purification and concentration of culture antigen, SDS-PAGE electrophoresis, the concentration of viral protein

Doronin Maxim Igorevich

Candidate of Biological Sciences
Federal centre for animal health
Vladimir

Pichueva Alena Aleksandrovna

Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher
Federal centre for animal health
Vladimir

Pavlov Dmitry Konstantinovich

Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher
Federal centre for animal health
Vladimir

Введение

Весенняя виремия карпа (ВБК, SVC) – высококонтагиозное вирусное заболевание карповых рыб, выращиваемых в рыбоводных хозяйствах и в естественных водоемах. Болезнь характеризуется развитием некротических изменений в печени, деформацией селезенки, дистрофией и отечностью почек, очаговыми

кровоизлияниями в сердце, утолщениями слизистой оболочки кишечника, что приводит к массовой гибели рыбы [5].

Возбудителем ВБК является РНК-содержащий вирус, который принадлежит к роду *Vesiculovirus* в семействе *Rhabdoviridae* порядка *Mononegavirales* [8]. Впервые вирус был обнаружен в Югославии Н. Фияном в 1968 г., в России – Н.И. Рудиковым в 1971 г. [1]. В настоящее время возбудитель ВБК распространен в странах Западной Европы, а также встречается на территории РФ [3, 4, 9]. Последние вспышки данного заболевания в нашей стране были зарегистрированы в 2008 и 2014 гг. [2].

Распространение вируса ВБК наносит значительный экономический ущерб, который складывается из потерь от гибели рыб (смертность достигает 70% в стаде), затрат на проведение ветеринарно-санитарных и карантинных мероприятий и ограничений в торговле [4]. Своевременное выявление антигена вируса ВБК позволяет проводить необходимые мероприятия по защите рыбы. Согласно Руководству МЭБ (OIE), лабораторная диагностика ВБК предусматривает выделение возбудителя в чувствительных клеточных линиях папулезной эпителиомы карпа (ЕРС) и хвостового стебля черного толстоголова (FHM), серологическую идентификацию вируса с помощью реакции нейтрализации, ИФА и РИФ, а также выявление генома вируса ВБК в ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ [9]. Важную роль играют иммунологические методы, основанные на использовании специфичных высокоактивных сывороток, для получения которых необходимо проводить иммунизацию лабораторных животных очищенным и концентрированным антигеном вируса ВБК.

Основная цель работы – подобрать оптимальные методы и условия для очистки и концентрирования культурального антигена вируса ВБК и оценить степень его чистоты.

Материалы и методы исследований

В работе использовали референтный штамм вируса ВБК «Яяла», репродуцированный в монослойной перевиваемой культуре клеток FHM в среде ДМЕМ, с титром инфекционной активности 7,25–8,00 lgТЦД₅₀/см³.

Для очистки и концентрирования культурального антигена вируса ВБК применяли следующие методы: осаждение вируса ВБК полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующим очищением в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl) и диализом против 0,15М STE-буферного раствора.

Осветление клеточного лизата проводили центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об/мин (ротор J-698). Полученный супернатант с добавлением ПЭГ-6000 центрифугировали в течение 50 мин при 8000 об/мин (ротор JA-10). Осадок ресуспендировали в 0,15М STE-буферного раствора (1:150–1:200 от исходного объема). После этого получали 2 элюата и далее препараты вируса ВБК центрифугировали при 25000 об/мин (ротор АН-650) в течение 2 ч в градиенте плотности CsCl: 1,25; 1,18; 1,16; 1,14; 1,07 г/см³ с концентрациями: 30, 22, 20, 18, 10%, соответственно. Из слоя CsCl с концентрацией 22% отбирали опалесцирующую вирусосодержащую зону и очищали от соли диализом против 0,15 М STE-

буфера в течение 3 суток со сменой раствора 5 раз в сутки. Плотность опалесцирующей зоны препарата в CsCl определяли на рефрактометре. Очищенный культуральный антиген вируса ВВК, концентрированный в 1500-2000 раз по объему, хранили при температуре минус 20°C.

Концентрацию белка в полученных препаратах вируса ВВК определяли по методу Лоури [11]. Степень чистоты контролировали методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ) в денатурирующих условиях. Титр накопления вируса в очищенном препарате определяли с применением клеточной линии FHM. Определение стерильности вирусного материала проводили в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы биологического контроля на стерильность».

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы была проведена очистка и концентрирование трех образцов культурального антигена вируса ВВК. После центрифугирования препарата в градиенте плотности хлорида цезия из слоя с концентрацией соли 22% (плотность 1,18 г/см³) отобрана опалесцирующая вирусосодержащая зона. Согласно литературным данным, плавучая плотность вируса ВВК в градиенте CsCl составляет 1,14-1,19 г/см³ [6, 7], отсюда следует, что отобранная зона в слое с плотностью 1,18 г/см³ содержит антиген вируса ВВК.

Для оценки степени чистоты полученных образцов вируса ВВК проводили вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в денатурирующих условиях, результаты которого представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

М – маркер молекулярного веса белков (*Pharmacia*);

1 – элюат №1 очищенной вирусной суспензии ВВК;

2 – элюат №2 очищенной вирусной суспензии ВВК;

I – III – три препарата культурального антигена вируса ВВК после очистки и концентрирования

Рис. 1. Электрофореграмма очищенного и концентрированного вируса ВВК

Таблица 1. Идентификация белков вируса ВВК методом SDS-ПААГ электрофореза

Белки вируса ВВК	Молекулярный вес структурных белков вируса ВВК, кДа		
	по данным Hill et al. (1975)	по данным McAllister, Wagner (1975)	исследование препарата №1
L-белок	180,0	183,0	>116,0
G-белок	75,0	72,0	70,0
N-белок	44,0	40,0	45,0
P(M ₁)-белок	34,0	30,0	35,0
M ₂ -белок	20,0	25,0	20,0

На следующем этапе работы в очищенных образцах были определены титр накопления вируса и концентрация вирусного белка по Лоури. Полученные результаты отражены в таблице 2, которая показывает, что наблюдается прямая зависимость концентрации вирусного белка в очищенных препаратах от титра накопления антигена в исходной вирусосодержащей суспензии.

Таблица 2. Результаты очистки и концентрирования культурального антигена вируса ВВК

п/п № образца	Характеристика вирусной культуральной суспензии до очистки		Характеристика вирусной суспензии после очистки					
	объем вирусной культуральной суспензии, см ³	титр накопления вируса, lgТЦД ₅₀ /см ³	объем вирусной суспензии, см ³	титр накопления вируса, lgТЦД ₅₀ /см ³	концентрация вирусного белка (по Лоури), мг/см ³			
					№ элюата			
					№1	№2	№1	№2
1	1500	7,38	1,0	0,5	10,70	6,23	1,80	0,31
2	1850	8,00	1,0	1,0	11,31	7,35	2,05	0,56
3	2000	7,25	1,0	0,5	10,54	6,10	1,73	0,27

По результатам титрования в культуре клеток FHM, SDS-ПААГ электрофореза и определения концентрации вирусного белка в полученных препаратах по методу Лоури во втором элюате остается малое количество антигена вируса. При этом, как следует из рисунка 1, вирус в нем достаточно хорошо очищен и может быть использован для иммунизации животных.

Проведена также оценка стерильности препаратов, по результатам которой установлено, что образцы очищенного антигена вируса ВВК не контаминированы бактериями, грибами и микоплазмами.

Дальнейшая работа будет направлена на отработку технологии очистки и концентрирования культурального антигена вируса ВВК. Полученные препараты планируется применять для получения высокоактивных сывороток крови кроликов и морских свинок с целью разработки серологических тест-систем.

Заключение

Предложенная технология очистки и концентрирования культурального антигена вируса ВВК позволяет получать достаточно чистый препарат, что подтверждают результаты SDS-ПААГ электрофореза. Очищенный антиген пригоден для проведения гипериммунизации лабораторных животных с целью получения высокоактивных сывороток и их применения в ИФА и реакции нейтрализации.

Список используемых источников:

1. Грищенко Л.И. Акбаев М.Ш. *Болезни рыб и основы рыбоводства*. М.: Колос, 2013. 456 с.
2. Пичуева А.А., Доронин М.И. Вспышка весенней виремии карпа в Приволжском Федеральном округе РФ в 2014 году // *Ветеринария сегодня*. Владимир, 2014. №4 (15). С. 66-69.
3. Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Завьялова Е.А., Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И. Весенняя виремия карпов // *Ветеринария*. 2004. №5. С. 28-30.
4. Гулюкин М.И., Борисова М.Н., Пичугина Т.Д. Эпизоотологический мониторинг заболеваний рыб в РФ // *Ветеринарная медицина*. Харьков, 2008. Вып. 90. С. 142-146.
5. Fijan N. Spring viraemia of carp and other viral disease agents of warm water fish. In: *Fish Disease and Disorders, Volume 3; Viral, Bacterial and Fungal infections*, Woo P.T.K., Bruno D.W. CABI Publishing, UK, 1999:177-244.
5. Fraenkel-Conrad. *Comprehensive Virology*. New York. Vol. 3, Ch. 5. 1979. P. 405, 427.
6. Hill B.J. Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. 1975. №27. P. 369-378.
7. International Committee on Taxonomy of Viruses. URL: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
8. OIE. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris, 2006. P. 128-141.
9. Philip E. Fish Viruses and Viral Infections // *J. Comprehensive Virology*. 1979. Chapter 7, Vol. 14. P. 401-544.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. №1. P. 265-275.

© 2016, Доронин М.И., Пичуева А.А., Павлов Д.К.
Очистка и концентрирование вируса весенней
виремии карпа

© 2016, Doronin M.I., Pichueva A.A., Pavlov D.K.
Purification and concentration of spring viraemia of
carp virus