

STANISŁAWA WEREMOWICZ, TOMASZ MICHALAK

Analiza stopnia oczyszczenia wirusa grypy koni

Z Zakładu Wirusologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie
Z Zakładu Immunopatologii Państwowego Zakładu Higieny

W wielu badaniach wirusologicznych, a zwłaszcza przy określeniu składu chemicznego wirusów, konieczne jest użycie możliwie dokładnie oczyszczonego preparatu wirusowego. W tym celu stosuje się różne fizyczne i chemiczne metody oczyszczania wirusów (11, 16, 17, 21, 23). Do najczęściej stosowanych obecnie metod oczyszczania wirusów należy ultrawierowanie (1, 4, 5, 6, 7, 8, 20, 24, 25).

Przy oczyszczaniu wirusów grypy pojawiają się problemy, które nie występują przy oczyszczaniu innych wirusów. Jest to związane z ich właściwościami, a także ze sposobem, w jaki uwalniają się one z zakażonej komórki. Z wirionami grypy związane są bowiem lipidy i węglowodany pochodzące z komórki gospodarza (2, 3, 7, 9, 10, 12, 14). W związku z tym oczyszczone preparaty wirusa grypy zawsze zawierają materiał pochodzący z komórki gospodarza. Trudno jest zatem ustalić jaką część tego materiału jest faktycznie związana z wirionem, a jaka jest zanieczyszczeniem pochodzenia komórkowego.

W celu określenia stopnia oczyszczenia wirionów grypy stosuje się wiele kryteriów, jednak żadne z nich stosowane oddzielnie nie wydaje się być w pełni zadowalające (13).

W badaniach własnych podjęto próbę kompleksowej oceny stopnia oczyszczenia preparatu wirusa grypy koni, oczyszczanego metodą ultrawierowania w gradiencie skokowym sacharozy.

Materiał i metody

Wirus. Do badań użyto wirusa grypy koni A (Equi-2/Warszawa/9/69) namnażany w 11-dniowych zarodkach kury i po wstępnym odwirowaniu oczyszczany metodą dwukrotnego ultrawierowania w gradiencie sacharozy (25). Miano hemaglutynacyjne (HA) materiału wyjściowego — płynu omocznioowego z zakażonych zarodków — wynosiło 1/64.

Kryteria oceny stopnia oczyszczenia wirusa

1. Wzrost miana HA wirusa. Miano wirusa określano przy pomocy odczynu hemaglutynacyjnego (HA) używając 1% zawiesiny krwinek czerwonych kury.

2. Liczba jednostek hemaglutynacyjnych na mg białka preparatu wirusa (j. HA/mg). Zawartość białka w badanym materiale określano metodą Lowry i wsp. (15).

3. Kontrola w mikroskopie elektronowym. Kontroli w mikroskopie elektronowym poddano:

— osad wirusa uzyskany po odwirowaniu płynu omocznioowego przy szybkości 25 000 obr./min przez 1 h w temp. 4°C (osad I)

— osad wirusa uzyskany z frakcji pobranych po pierwszym ultrawierowaniu w gradiencie skokowym sacharozy, osadzony przy szybkości 30 000 obr./min, przez 1 h w temp. 4°C (osad II)

— osad wirusa uzyskany z frakcji pobranych po drugim ultrawierowaniu w gradiencie skokowym sacharozy, osadzony przy szybkości 30 000 obr./min, przez 1 h w temp. 4°C (osad III).

Osad uzyskany po poszczególnych wirowaniach zawieszano w 0,2 ml wody dwukrotnie destylowanej i delikatnie wstrząsano w temp. 4°C przez 1 h. Z uzyskanej zawiesiny, 0,025 ml nanoszono na 100 meshowe miedziane siatki pokryte błoną formwarową napyłoną węglem. Po 1 min. inkubacji siatki płukano trzykrotnie w wodzie dwukrotnie destylowanej, suszono bibułą filtracyjną i barwiono negatywowo 1% wodnym roztworem soli sodowej kwasu fosforowo-wolfrامowego (PTA), pH 7,0 przez 1 min. w komorze wilgotnej. Po odciągnięciu nadmiaru płynu bibułą filtracyjną, siatki oglądano w kolumnie mikroskopu elektronowego JEM 6C. Zdjęcia wykonywano przy powiększeniu mikroskopu 25 000×

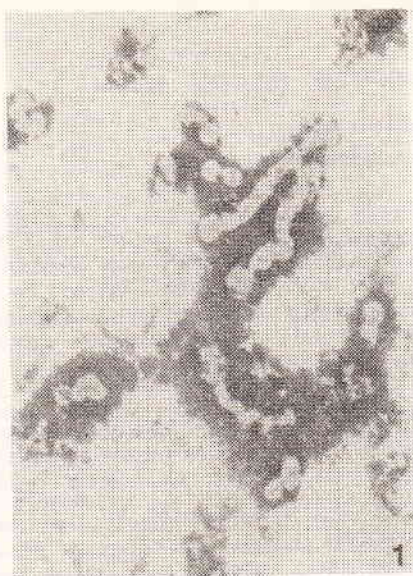
Wyniki i omówienie

W osadzie I, zawierającym wirus osadzony z płynu omocznioowego i zawieszony w 2 ml soli fizjologicznej buforowanej buforem fosforanowym (PBS), miano wynosiło 25 600 j. HA, a zawartość białka 6,4 mg/ml (tab. 1.). Badanie w mikroskopie elektronowym siatek przygotowanych z osadu I wykazało obecność licznych, kulistych i pałeczkowatych form wirionów grypy oraz liczne fragmenty błon i organelli komórkowych (ryc. 1). Średnica form kulistych i szerokość form pałeczkowatych wahała się od 70—110 nm. Długość form pałeczkowatych dochodziła do 2 μm.

Tab. 1. Wzrost miana HA oraz liczby j.HA/mg białka po kolejnych etapach oczyszczania wirusa grypy koni

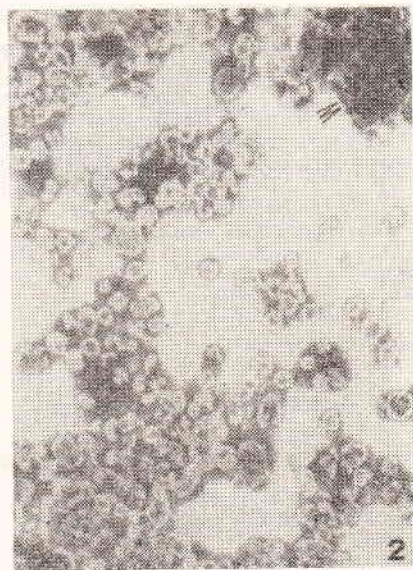
Materiał	Miano HA	Wielokrotność wzrostu miana HA	Zawartość białka w mg	Liczba j.HA/mg białka
Płyn omocznioowy (mat. wyjściowy)	1/64	—	n.o.	n.o.
Osad I	1/25 600	400	6,4	4 000
Osad II	1/327 680	5 120	3,8	86 232
Osad III	1/819 200	12 800	3,7	221 405

Objaśnienie: n.o. = nie oznaczano.



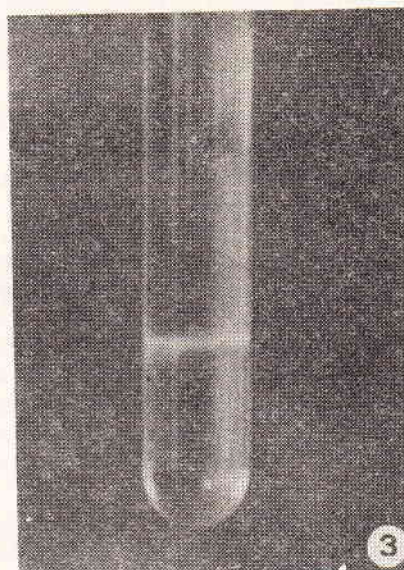
Ryc. 1. Liczne kuliste i pałeczkowate formy cząstek wirusa grypy koni w preparacie wykonanym z osadu po wstępnym utrawiowaniu (Osad I) (powiększenie pierwotne 12.000 \times)

W osadzie wirusa uzyskanym po pierwszym utrawiowaniu w gradiencie skokowym sacharozy (osad II) zawieszonym w 2 ml PBS miano wynosiło 327 680 j.Ha, a zawartość białka 3,8 mg/ml. W preparatach badanych w mikroskopie elektronowym stwierdzono w tym materiale obok licznych, kompletnych wirionów, również wiriony z uszkodzoną otoczką oraz ich fragmenty. Znajdowano również nieliczne, drobne fragmenty struktur komórkowych (ryc. 2).



Ryc. 2. Preparat wykonany z osadu po pierwszym utrawiowaniu w gradiencie skokowym sacharozy (Osad II). Liczne pełne cząstki wirusa, fragmenty uszkodzonych wirionów oraz nieliczne struktury komórkowe (W) (powiększenie pierwotne 12.000 \times)

W osadzie III zawierającym wirus uzyskany po drugim utrawiowaniu w gradiencie skokowym sacharozy miano wynosiło 819 200 j.Ha, a zawartość białka 3,7 mg/ml. Osad ten układał się w gradiencie sacharozy w postaci pojedynczego, ostro ograniczonego prążka (ryc. 3). W preparatach sporządzonych z tego osadu stwierdzono wyłącznie liczne, kuliste wiriony, z których większość miała dobrze zachowaną strukturę morfologiczną. Zanieczyszczeń pochodzenia komórkowego nie napotkano (ryc. 4).



Ryc. 3. Ostro ograniczony, pojedynczy prążek uzyskany po wtórnym utrawiowaniu w gradiencie skokowym sacharozy preparatu cząstek wirusa grypy koni, układający się w stężeniu sacharozy odpowiadającym gęstości 1,18—1,22 g/cm³



Ryc. 4. Preparat wykonany z osadu po wtórnym utrawiowaniu w gradiencie skokowym sacharozy (Osad III). Liczne pełne i uszkodzone kuliste cząstki wirusa grypy koni (powiększenie pierwotne 12.000 \times)

Wielokrotność wzrostu miana HA po kolejnych etapach oczyszczania w stosunku do materiału wyjściowego oraz liczbę j.HA/mg białka ilustruje tab. 1.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczny spadek zawartości białka przy jednoczesnym bardzo wyraźnym wzroście miana HA oraz liczbę j. HA/mg białka w osadach uzyskanych po poszczególnych etapach oczyszczania wirusa. Z tabeli wynika, że większość zanieczyszczeń zostało usuniętych już w czasie pierwszego ultrawierowania w gradiencie sacharozy. Świadczy o tym niewielka różnica między zawartością białka w osadzie II i III. Potwierdzają to również wyniki badań w mikroskopie elektronowym. W osadzie II stwierdzono tylko nieliczne fragmenty struktur komórkowych, natomiast osad III był wolny od zanieczyszczeń pochodzenia komórkowego. Obecność uszkodzonych wirionów w preparatach z osadu II i III można wytłumaczyć wpływem przyspieszeń zastosowanych do osadzenia wirionów. Wiadomo, że przyspieszenia rzędu 50 000—100 000 g powodują znaczne uszkodzenia wirionów grypy (18, 19).

Poza kontrolą w mikroskopie elektronowym o jednorodności materiału w osadzie III może świadczyć fakt, że wirus zawarty w tym osadzie układał się w gradiencie w postaci pojedynczego, wyraźnie ograniczonego prążka, w stężeniu sacharozy 39—42%, co odpowiada gęstości 1,18—1,22 g/cm³ równej gęstości wirusów grypy. Dostateczne oczyszczenie wirusa zostało również potwierdzone w poprzednich naszych badaniach w żelu poliakrylamidowym (26).

Porównanie uzyskanych obecnie wyników z wynikami innych badaczy nastęrcza pewne trudności. Takatsy (22) w pracy dotyczącej oczyszczania wirusów grypy stosuje jako kryterium czystości zawartość azotu całkowitego w płynie omoczniovym i oczyszczonym materiale. Uzyskanych wyników nie odnosi do wzrostu miana HA wirusa. Laver (13) rekomenduje opracowaną przez siebie metodę oczyszczania wirusów grypy, polegającą na adsorpcji, elucji i ultrawierowaniu — jako wystarczającą do uzyskania materiału nadającego się do oznaczania składu chemicznego wirusa. Nie podaje jednak, na podstawie jakich kryteriów określił stopień oczyszczenia uzyskanego materiału.

Dla oceny stopnia oczyszczenia preparatu wirusa grypy wydaje się konieczne zastosowanie przynajmniej kilku różnych kryteriów. Wzrost miana HA świadczy przede wszystkim o stopniu zagęszczenia materiału, który mimo znacznej koncentracji może zawierać pewne zanieczyszczenia pochodzenia komórkowego. O jednorodności i oczyszczeniu materiału można wnioskować na podstawie uzyskania w czasie wirowania w gradiencie sacharozy pojedynczego, wyraźnie ograniczonego prążka w zakresie gęstości odpowiadającej oczyszczanemu wirusowi.

Warunek stanowi tutaj dostateczna różnica między gęstością zanieczyszczeń i materiału oczyszczanego. Ważną rolę przy ocenie stopnia oczyszczenia wirusa odgrywa kontrola w mikroskopie elektronowym.

Wnioski

1. Dla określenia stopnia oczyszczenia preparatu wirusowego konieczne jest zastosowanie kilku kryteriów.

2. Kontrola w mikroskopie elektronowym wydaje się być jednym z ważniejszych kryteriów oceny stopnia oczyszczenia preparatu wirusowego.

Piśmiennictwo

1. Bauer H.: Zentbl. Vet. Med. B 17, 582, 1970.
2. Blough H. A.: J. gen. Virol. 12, 317, 1971.
3. Blough H. A., Tiffany J. M.: Adv. Lipid Res. 11, 267, 1973.
4. Bolognesi D. P., Bauer H.: Virology 42, 1097, 1970.
5. Bose H. R., Carl G. Z., Sagik B. P.: Arch. ges. Virusforsch. 31, 200, 1970.
6. Chucholowius H. W., Rott R.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 140, 245, 1970.
7. Compans R. W., Klenk H. D., Caligiuri L. A., Choppin P. W.: Virology 42, 880, 1970.
8. Filczak K., Semkow R., Wrzos H., Zakrzewski K., Zgorzelska K.: Acta microb. pol. A 5, 261, 1973.
9. Haslam E. A., Hampson A. W., Egan J. A., White D. O.: Virology 42, 555, 1970.
10. Klenk H. D., Choppin P. W.: Proc. natn. Acad. Sci. USA 66, 57, 1970.
11. Larin N., Gallimore P.: J. Hyg., Camb. 69, 27, 1971.
12. Laver W. G., Webster R. G.: Virology 30, 104, 1966.
13. Laver W. G.: Met. Wirusolol. i Mol. „Mir” Moskwa 65, 1972.
14. Le L. T., Howe G., Meyer K., Choi H. U.: J. Immun. 102, 1144, 1969.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. biol. Chem. 193, 265, 1951.
16. Mac Farlane D. E., Mc Lure A. R., Sommerville R. G.: Arch. ges. Virusforsch. 34, 346, 1971.
17. Mc Sharry J., Benzinger R.: Virology 40, 745, 1970.
18. Polson A., Stannard L.: Virology 49, 781, 1970.
19. Polson A.: Methods in Virology. Academic press, New York 5, 34, 1971.
20. Skehel J. J., Schild G. C.: Virology 44, 396, 1971.
21. Smirnova V. I., Rybakova T. M., Choporova M. J., Matusyukewich E. I.: Acta Virol., Praga 13, 242, 1969.
22. Takatsy G. Y.: Acta microbiol. hung. 3, 185, 1952.
23. Wagner G. C., Card J. L., Cowan K. M.: Arch. ges. Virusforsch. 30, 343, 1970.
24. Weremowicz St., Majewska H., Matusiewicz J., Zebrowski L.: Bull. vet. Inst., Puławy 17, 96, 1973.
25. Weremowicz St.: Med. dośw. 30, 189, 1978.
26. Weremowicz St.: Zentbl. Vet. Med. B 27, 549, 1980.

Adres autora: dr Stanisława Weremowicz, ul. Zabłocińska 6/42, 01-697 Warszawa.

Веремович С., Михалык Т. — Анализ степени очистки вируса гриппа лошадей.

Степень очистки вируса гриппа лошадей после двукратного ультрацентрифугирования в скачкообразном градиенте сахарозы оценивали на основе роста геммагглютинационного титра, числа геммагглютинационных единиц на мг белка и контроля в электронный микроскоп.

Констатировали, что вирус, полученный из фракций, взятый после второго ультрацентрифугирования в скачкообразном градиенте сахарозы, лишен загрязнений клеточного происхождения и может применяться в качестве материала для исследования химического состава вируса.

Weremowicz St., Michalak T. — Analysis of an equine influenza virus purification.

The degree of an equine influenza virus purification, following double ultracentrifugation in a sucrose gradient, was evaluated on the basis of haemagglutination titer, the number of HA units per 1 mg of protein and control under an electron microscope. It was found that the virus obtained after the second ultracentrifugation had no cellular debris and could be used for viral chemical analysis.