

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛЬНОВИРИОННОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF VARIOUS METHODS OF OBTAINING WEST NILE VIRUS WHOLE VIRION ANTIGEN

E. Korol
T. Kuznetsova
N. Tetyryatnikova
T. Sharov

Summary. The article is devoted to the evaluation of the efficiency of different methods for isolation and concentration of the whole virion of West Nile fever virus.

The aim of the work was to find the optimal method for obtaining the whole virion antigen of West Nile fever virus. *Methods.* The objects of the study were collection strains of West Nile fever virus, as well as fractions isolated from the virus-containing fluid. The virus strains cultivated in Vero cells were disinfected, then the cell components and virions were separated by ultracentrifugation, precipitation, and chromatography. The analysis of the preparations was carried out using polyacrylamide gel electrophoresis and ELISA. *Results.* Five samples of material presumably containing the virus were isolated and analyzed. It was determined that a single band in the region of 65 kDa on the electrophoregram most likely corresponds to the whole virion antigen of West Nile fever virus. It was shown that the method of ion-exchange chromatography with the sorbent «CHT Type I» turned out to be optimal for solving the problem, since it allowed the most effective concentration and purification of the whole-virion antigen of WNV.

Keywords: West Nile virus, chromatography, ultracentrifugation, antigen.

Король Екатерина Васильевна

Научный сотрудник,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
katherine.korol@mail.ru

Кузнецова Татьяна Владимировна

Научный сотрудник,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
tanechka.kuznecsova.89@mail.ru

Тетеряятникова Наталья Николаевна

Научный сотрудник,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
nataliatet@bk.ru

Шаров Тимур Николаевич

Кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник,
ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора
timursharov@gmail.com

Аннотация. Статья посвящена оценке эффективности различных способов выделения и концентрирования цельного вириона вируса лихорадки Западного Нила.

Целью работы был поиск оптимального метода получения цельновирионного антигена вируса лихорадки Западного Нила. *Методы.* Объектами исследования служили коллекционные штаммы вируса лихорадки Западного Нила, а также фракции, выделенные из вирусодержащей жидкости. Штаммы вируса, культивируемые в клетках линии Vero, обеззараживали, затем компоненты клеток и вирионы разделяли методами ультрацентрифугирования, преципитации и хроматографии. Анализ препаратов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и реакции ИФА. *Результаты.* Выделено и проанализировано 5 проб материала, предположительно содержащих вирус. Определено, что одиночная полоса в районе 65 кДа на электрофорограмме вероятнее всего соответствует цельновирионному антигену вируса лихорадки Западного Нила. Показано, что метод ионообменной хроматографии с сорбентом «CHT Type I» оказался оптимальным для решения поставленной задачи, так как позволил наиболее эффективно сконцентрировать и очистить цельновирионный антиген ВЗН.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, хроматография, ультрацентрифугирование, антиген.

Введение

В последние годы широкое распространение имеют заболевания вирусной этиологии. Для южных территорий РФ особую актуальность приобрели арбовирусные трансмиссивные инфекции, в частности лихорадка Западного Нила [1]. По данным ВОЗ, тяжелые формы лихорадки Западного Нила (ЛЗН), характеризующиеся, прежде всего, острым интоксикационным синдромом с поражением центральной нервной системы, несут серьезную эпидемическую угрозу для населения, в связи с чем не вызывает сомнений необходимость постоянного мониторинга за ЛЗН, изучения естественного коллективного иммунитета, тщательной работы по выявлению заболевших.

В отличие от рекомбинантных вирусных белков, цельновирионный антиген может быть выделен только из зараженных вирусом клеточных линий, и очистка вирусных частиц от компонентов клеток — достаточно сложная и трудоёмкая задача [2]. Представляется актуальной разработка и оптимизация методологических подходов получения высокоочищенного цельновирионного антигена вируса Западного Нила. При этом особенно важно сохранение диагностически значимых эпитопов и иммунологической активности выделенного антигена с целью его использования для иммунизации линейных мышей Balb/c при получении моноклональных антител, а также в качестве положительного контроля в тест-системах.

Также следует отметить, что не существует какого-либо наиболее эффективного метода очистки нативного цельновирионного антигена, в зависимости от поставленной цели применяют различные комбинированные методы и подходы [3,4]. Целью данного исследования было определить оптимальный способ получения цельновирионного антигена вируса лихорадки Западного Нила.

Материалы и методы

На начальном этапе работы использовали штамм вируса Западного Нила «Volgograd_601/18» из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Вирус культивировали в клетках линии Vero. Для инактивации во флакон с культуральной средой, содержащей вирус, добавляли мертиолат натрия в конечной концентрации 0,01 % и в последующем прогревали в течение 30 минут при 56 °C. Разрушение мембран клеток Vero осуществляли троекратной процедурой замораживания и оттаивания. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 4000 г в течение 10 минут. Концентрирование и очистку вирусной фракции проводили несколькими способами: переосаждением трихлоруксусной кислотой и разство-

ром полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000), ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы в течение 4 часов. Кроме того, осуществляли хроматографическое разделение вирусодержащей жидкости (ВСЖ) методами ионообменной хроматографии («DEAE-сепароза А-25», керамический гидроксиапатит «СНТ Type I») на хроматографе среднего давления «Akta Explorer 10». Фракции дополнительно концентрировали методом ультрафильтрации с использованием фильтра РМ-10. Иммунологическую активность выделенных вирусных фракций определяли с помощью иммуноферментного анализа с сыворотками больных лихорадкой Западного Нила, а также со специфичными к ВЗН моноклональными антителами.

Результаты

Анализировались пробы материала, предположительно содержащие вирус: элюат с хроматографических колонок, фракция сахарозы с границы 20 %–60 % градиента, а также растворы белков после переосаждения трихлоруксусной кислотой и с помощью ПЭГ-6000 (Рисунок 1).

Как видно, из рисунка 1, препараты ВСЖ после различных методик выделения и очистки цельновирионного антигена ВЗН существенно отличались по составу. Множество полос на дорожке 2 соответствует эукариотическим белкам клеток Vero и компонентам среды DMEM. Следует отметить, что не заражённые клетки этой линии на электрофорограмме выглядят идентично. Это можно объяснить схожестью электрофоретической подвижности компонентов клеток Vero и вириона ВЗН, что делает метод электрофореза малопригодным как для препартивного получения вириона ВЗН, так и для определения наличия или отсутствия репликации вируса в данной клеточной линии. Электрофорограмма элюатов после ионообменной хроматографии содержала полосу в районе 60–66 кДа, более отчётливо выраженную по сравнению с изначальной клеточной взвесью. Электрофорез вирусной фракции в растворе градиента сахарозы продемонстрировал наличие нескольких очень слабовыраженных полос с молекулярной массой от 25 до 66 кДа. Пробы после переосаждения трихлоруксусной кислотой и ПЭГ-6000 состояли из множества визуально отчётливых полос с молекулярными массами в районе от 20 до 100 кДа, присутствующих также и в исходной взвеси клеток Vero с вирусом.

Результаты иммуноферментного анализа с сыворотками больных лихорадкой Западного Нила, а также со специфичными к ВЗН моноклональными антителами показали, что высокой иммунологической активностью обладали только препараты, содержащие фракцию с молекулярной массой 66 кДа, после хроматографической очистки (оптическая плотность фракций составляла

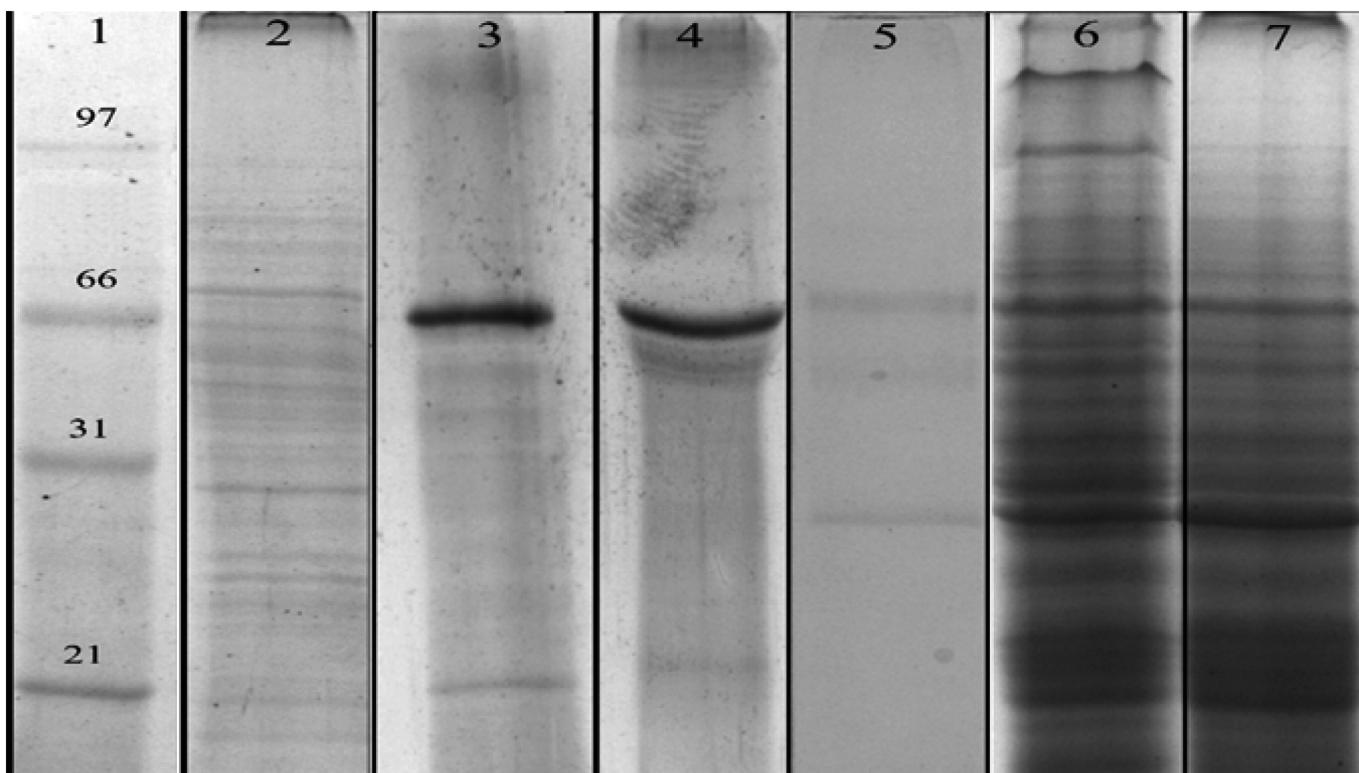


Рис. 1. Картина распределения фракций различной молекулярной массы

Дорожка 1 — маркеры молекулярной массы. 2 — гомогенизат общеклеточных белков клеток Vero, зараженных ВЗН, полученный в результате обработки ультразвуком. 3 — элюат после хроматографии с «DEAE-сепарозой А-25». 4 — элюат после хроматографии с «СНТ-1». 5 — фракция сахарозы после ультрацентрифугирования. 6 — препарат ВСЖ после осаждения трихлоруксусной кислотой. 7 — препарат ВСЖ после осаждения ПЭГ-6000. Гель окрашен нитратом серебра

1,20–1,28 в сравнении с оптической плотностью положительного контроля 1,25). Фракции после переосаждения трихлоруксусной кислотой и ПЭГ-6000 не взаимодействовали с содержащими антитела к ВЗН сыворотками, что по всей видимости, означает их принадлежность к эукариотическим белкам из клеток Vero (оптическая плотность фракции составляла 0,07 в сравнении с плотностью положительного контроля 1,25). В свою очередь, фракции, сконцентрированные методом ультрацентрифугирования, показали лишь незначительную активность, не достигающую границы положительного результата (оптическая плотность фракции составляла 0,28 в сравнении с плотностью положительного контроля 1,25).

Заключение

Использование метода ультрацентрифугирования в градиенте плотности достаточно часто описывается в российской или зарубежной литературе [5]. Однако

в данном случае концентрация вирионов ВЗН в полученным препарате очень мала, что требует применения дополнительных методик концентрирования и избавления от материала градиента. Использование методик переосаждения позволяет значительно сконцентрировать не только вирион ВЗН, но и белки клеток Vero, а также компоненты среды DMEM и входящей в её состав эмбриональной телячьей сыворотки. Этим объясняется отсутствие у полученных переосаждением фракций специфической активности в реакции ИФА, даже при наличии на электрофорограмме этих препаратов полос характерных препаратов, обладающих специфичной иммунологической активностью. Метод ионообменной хроматографии оказался оптимальным для решения поставленной задачи, так как позволил наиболее эффективно сконцентрировать и очистить цельновирионный антиген ВЗН от компонентов питательной среды и клеток линии Vero в один этап, что было подтверждено наличием у выделенных вирусных фракций специфической иммунологической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н., Бородай Н.В., Колоскова А.Ю., Антонов А.С., Бондарева О.С., Топорков А.В. Лихорадка Западного Нила в Российской Федерации в 2024 г., прогноз на 2025 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2025;(1):84–95. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2025-1-84-95>.
2. Pan Y., Yan J., Zhang Y., Lin J., Liang Z., Sun J. Centrifugation-Based Purification Protocol Optimization Enhances Structural Preservation of Nucleopolyhedrovirus Budded Virion Envelopes. *Insects*. 2025 Apr 17;16(4):424. doi: 10.3390/insects16040424.
3. Zhang F., Luo J., Teng M., Xing G., Guo J., Zhang Y. Purification of cell-derived Japanese encephalitis virus by dual-mode chromatography. *Biotechnol Appl Biochem*. 2021 Jun;68(3):547–553. doi: 10.1002/bab.1960. Epub 2020 Jun 11.
4. Hirst J., Hutchinson E. Purification of Influenza Virions. *Methods Mol Biol*. 2025:2890:27–51. doi: 10.1007/978-1-0716-4326-6_2.
5. Kim H., Yi J., Yu J., Park J., Jang S. A Simple and Effective Method to Concentrate Hepatitis C Virus: Aqueous Two-Phase System Allows Highly Efficient Enrichment of Enveloped Viruses. *Viruses* 2022, 14(9), 1987; <https://doi.org/10.3390/v14091987>.

© Король Екатерина Васильевна (katherine.korol@mail.ru); Кузнецова Татьяна Владимировна (tanechka.kuzneczova.89@mail.ru);

Тетерятникова Наталья Николаевна (nataliatet@bk.ru); Шаров Тимур Николаевич (timursharov@gmail.com)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»