

Библиографический список:

1. Туберкулёз животных и меры борьбы с ним / Под ред. Ю.Я. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 303 с.
2. Деклараційний патент 62584А Україна, ПМК 7 G01N33/50. Спосіб визначення бактерицидної дії дезінфектантів при туберкульозі / Ю.Я. Кассіч, А.І. Завгородній, П.М. Тихонов, Г.В. Пономаренко (ІЕКВМ). – № 2003043293; Заявл. 14.04.2003; Опубл. 15.12.2003, Бюл. № 12.
3. Патент на корисну модель № 30045 Україна, МПК А 61L 2/16. Спосіб визначення норми витрати дезінфектантів при знезараженні об'єктів контамінованих мікобактеріями / А.П. Палій, А.І. Завгородній. – № у 2007 10837; заявл. 01.10.2007; опубл. 11.02.2008, Бюл. № 3.
4. Патент на корисну модель № 26856 Україна, МПК А 61L 2/16 С12Q 1/00. Спосіб визначення ефективності дезінфекції при туберкульозі / А.І. Завгородній, А.П. Палій (ННЦ «ІЕКВМ»). – № у 2007 05638; заявл. 22.05.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. № 16.

УДК 619:616.98:578.827.15

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРЕЦИПИТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРЕПАРАТОВ КОНЦЕНТРИРОВАННОГО ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Першин А.С., ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, г. Покров

pershinandre@mail.ru

Новиков Б.В., ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, г. Покров

bvnov@yandex.ru

Ключевые слова. Ринотрахеит КРС, герпесвирус-1, концентрирование, преципитационный анализ, иммуноэлектрофорез.

Описаны два метода получения препаратов концентрированного вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и результаты их иммунологического сравнения в реакции диффузной преципитации и иммуноэлектрофорезе.

Введение. При получении моноклональных антител, для иммунизации важно иметь препарат концентрированного вируса, в котором наиболее полно присутствуют вирусные белки. Для скрининга желательно использовать отличающийся от него препарат, характеризующийся высокой чистотой. Методы очистки герпесвирусов довольно сложны по сравнению с другими вирусами. Их эффективность варьирует в зависимости от штамма и вируса [1]. Поэтому, целью нашей работы являлось получение различных препаратов очищенного вируса для дальнейшего их использования при получении моноклональных антител.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали штамм ТК-А/К вируса инфекционного ринотрахеита КРС культивируемый на культуре MDBK в среде Игла с добавлением 10% сыворотки крови КРС. Инфекционный титр 7-8 \log ТЦД₅₀/мл. По достижении 90-100% цитопатического действия вируса, культуру снимали механическим способом и подвергали трёх кратной криогенной деструкции при температуре заморозки -70 °С и разморозки при +37 °С, а затем центрифугировали при 3000 G в течение 30 минут.

Концентрацию белка определяли методом Лоури и соавт. [6] в качестве стандарта использовали альбумин бычий сывороточный кристаллический фирмы «Sigma».

Иммуноэлектрофорез ставили по методу Грабара и Уильямса в модификации Шейдегерра [2]. Электрофорез проводили на пластине 85x90 мм при силе тока 28 мА на пластину, в течение 45 минут. Пластины заливали расплавленной агарозой, так чтобы агаровый слой был толщиной 1.5 мм (12 см³ агарозы на пластину). После застывания агарозы вырезали лунки диаметром 4 мм и канавки между ними размером 55x2 мм. Расстояние между канавками и лунками составляло 4 мм. Канавки заполняли специфическими сыворотками вровень с поверхностью агарозы. Учет результатов проводили через 24 и 48 часов инкубирования при комнатной температуре. Учет производили визуально при просмотре пластин в проходящем свете. Для документирования результатов гели отмывали физиологическим раствором, переносили на GelBound и окрашивали Кумасси R-250.

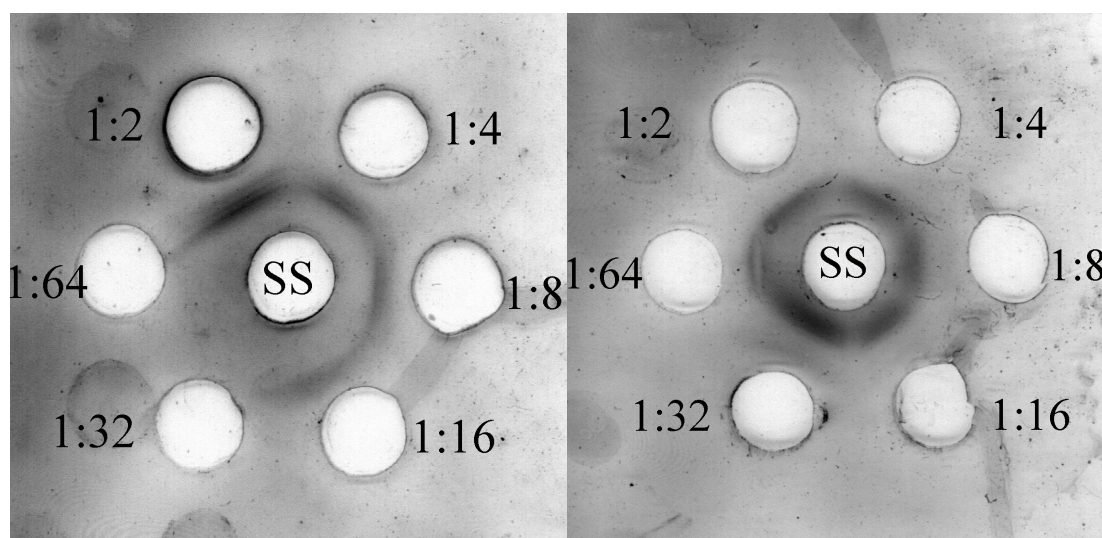
Иммунодиффузию ставили согласно стандартной процедуре на стёклах покрытых 1% гелем агарозы приготовленной на Tris-EDTA буфере, pH 8,4.

Преципитационные анализы проводили со специфическими сыворотками крови кролика и КРС. Для исключения взаимодействия сывороточных антител с нормальными культуральными антигенами, сыворотки истощали инкубируя с лизатом клеток MDBK в течении 30 мин при 37 °С и последующим центрифугированием. В обоих случаях, лунки заполняли исследуемыми препаратами вровень с поверхностью агарозы (18 мкл).

Концентрирование. Перед осаждением проводили первичное концентрирование обратным диализом в ПЭГ 6000 до 10 кратного уменьшения начального объема.

На дно пробирки наслаивали 55% раствор сахарозы с плотностью 1,26 г/см³, затем наслаивали 45%-ный раствор сахарозы с плотностью 1,20 г/см³ и 25%-ный раствор с плотностью 1,10 г/см³. Сверху наслаивали вирусный препарат и центрифугировали при 125000g в течение 2 часов. Согласно исследователям, определявшим плавучую плотность вируса [3,4] он локализуется между 45% и 55%-ным раствором сахарозой. Вирус локализованный на данной интерфазе собирали и ресуспендировали в Tris-EDTA буфере, pH 7,4.

Фильтрацию проводили двукратно, уменьшая первоначальный объем в 150 раз, на проточном тангенциальном концентраторе через фильтры Diaflo Ultrafilters тип PM10 (Amicon, США), пропускающие частицы с молекулярной массой менее 10000 Да.



а)

б)

Рис 1. Активность препаратов концентрированного вируса в РДП. а) препарат концентрированный в градиенте плотности сахарозы. б) препарат концентрированный фильтрацией.

Результаты исследования. Концентрация белка составила 5,4 мг/мл в препарате концентрированном фильтрацией, 1 мг/мл в препарате концентрированном ультрацентрифугированием.

В реакции диффузной преципитации наивысший титр имел препарат концентрированного фильтрацией вируса 1:64-1:128, у вируса концентрированного в градиенте плотности сахарозы 1:16-1:32. Полосы преципитации первого препарата более широкие и располагаются ближе к центральной лунке, что говорит о большей концентрации вирусного препарата (рис 1).

Это подтверждает и электрофоретическое разделение. Препарат концентрированный фильтрацией преципитирует с образованием более широкой и толстой линии преципитации (рис 2). Однако, мы считаем, что среди присутствующих вирусных белков, довольно большое количество занимают культуральные белки, остающиеся при данном методе концентрирования.

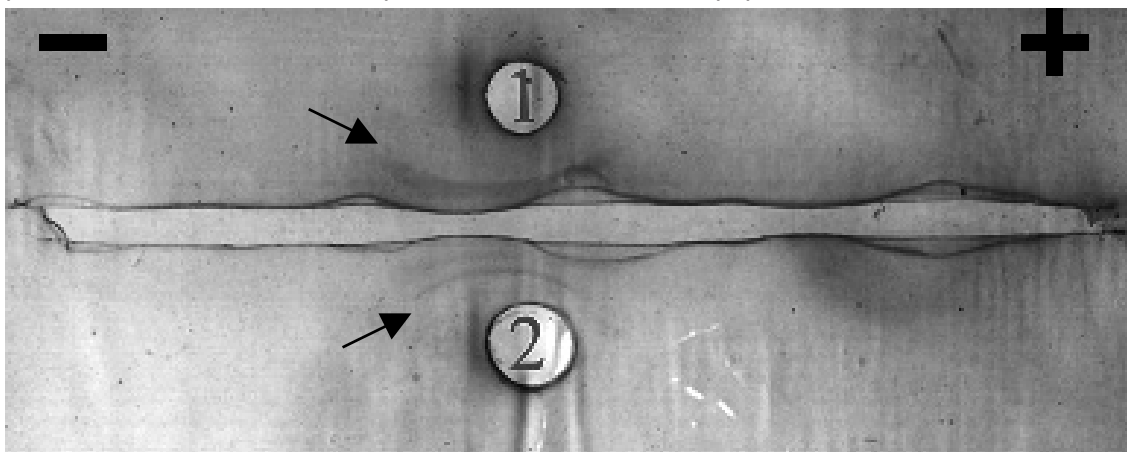


Рис 2. Иммуноэлектрофореграмма препаратов концентрированного вируса. 1) препарат концентрированный фильтрацией. 2) препарат концентрированный в градиенте плотности сахарозы.

Полученные нами препараты также пригодны для выявления антител против антигенов вируса ИРТ в сыворотках с.-х. и лабораторных животных в непрямом твёрдофазном иммуноферментном анализе [5].

Заключение. Отработаны два метода концентрирования и очистки вируса ИРТ КРС. Ультрацентрифугирование более сложный метод, но он позволяет получить более чистый вирусный препарат. Фильтрация позволяет сохранить более полный состав вирусных белков в препарате.

Библиографический список:

1. Вирусология. Методы [текст] /Баррет Т. Берд П. Клегг Дж. и [др]; под редакцией Б. Мейхи; пер.с англ – М.: Мир, 1988. – 344с. ISBN 5-03-001371-7
2. . Иммунологические методы [текст] / Под редакцией Г.Фримеля; пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987, 472 с.. – 1985. – № 10. – с 31-32 ISSN 0042-4846.
- 3 **Кузнецова С.В.** Концентрирование вируса инфекционного ринотрахеита [текст] / С.В. Кузнецова, А.А. Бойко, В.С. Иванов, Э.Я. Сазанова // Ветеринария
4. **Кучерявенко Р.О.** Концентрування, очистка та визначення плавучої щільності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби за допомогою інструментального методу [текст] / Р.О Кучерявенко, В.О. Бусол, О.Ю. Семенченко. // Ветеринарна медицина міжвідомчий тематичний науковий збірник– 2000. –№ 78 (1) – с197-199. ISSN 0321-0502.
5. **Першин А.С.** Непрямой иммуноферментный анализ для определения антител к антигенам вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота [текст] / Першин А.С., Казакова А.С., Капустина О.В., Чурин А.И., Стрижакова О.М., Новиков Б.В. // Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации. Материалы Междун. Науч.- практич. конф. – Покров, 2011. – С. 112-114. .
6. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin pheno reagent [text] / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – № 193. – с. 265–275. ISSN 1225-8687.