

УДК 576.858.6

ВИРУСОЛОГИЯ

И. З. ЗАРЕЦКИЙ, К. В. ИЛЬИН, М. Я. ВОЛКОВА,
А. Ф. БЫКОВСКИЙ, действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ

АНАЛИЗ БЕЛКОВ ОНКОРНАВИРУСА В-ТИПА, ВЫДЕЛЕННОГО
ИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ГОРТАНИ
ЧЕЛОВЕКА НЕр-2

Ранее сообщалось о выделении из перевиваемой линии клеток карциномы гортани человека НЕр-2 вирусных частиц НЕр-2V (^{1, 2, 6}). По морфологии, характерной плотности в сахарозе 1,16–1,17 г/мл, наличию в вирионе 60–70 S РНК, содержанию РНК-зависимой ДНК-полимеразы и чувствительности процесса репродукции вируса к актиномицину D выделенный вирус отнесен к группе онкорнавирусов В-типа. Было показано, что в антигенном отношении вирус НЕр-2V отличается от вируса рака молочных желез мышей, также являющегося онкорнавирусом В-типа (¹). В настоящем сообщении представлены результаты анализа белкового состава вируса НЕр-2V.

Материалы и методы. Клетки НЕр-2, продуцирующие вирус НЕр-2V, культивировали на среде 199 с добавлением 10% гидролизата лактальбумина и 10% предварительно прогретой бычьей сыворотки. Клетки пассировались с частотой один пассаж через каждые 7 дней. Вирус НЕр-2V метили ³⁵S-белковым гидролизатом (удельная активность 30 С/ммоль). С этой целью к культуре клеток НЕр-2 (концентрация клеток $5 \cdot 10^6$ в 1 мл) перед установлением монослоя добавляли ³⁵S-белковый гидролизат в количестве 5 μ C/мл. Гидролизат перед внесением в культуру нейтрализовали щелочью. Через 24 часа после добавления к культуре радиоактивной метки культуральную жидкость сливали и использовали для получения вируса.

Очистку вируса проводили по следующей схеме: культуральную жидкость центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. для осаждения клеточных обломков, надосадочную жидкость наносили на слой 20% сахарозы и центрифугировали при 42 000 об/мин в течение 2 час. (ротор Ti 60, «Spinco» L2-65). Осадок ресуспендировали, осветляли центрифугированием на низкой скорости и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 20–60% в течение 16 час. (ротор SW 27.1, «Spinco» L2-65, скорость 25 000 об/мин). Материал из зоны с плотностью 1,17 г/мл собирали, осаждали повторно через слой 20% сахарозы и снова центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 20–60% в течение 2 час. (ротор SW 40, «Spinco» L2-65 при 35 000 об/мин). Материал из зоны 1,16–1,18 г/мл осаждали при 42 000 об/мин (ротор Ti 60, «Spinco» L2-65) в течение 2 час., ресуспендировали в 0,1 M трис-HCl буфере pH 6,8 и использовали для анализа белков.

Электронная микроскопия. Препараты очищенного вируса анализировали в электронном микроскопе, используя метод негативного контрастирования. С этой целью вирусную суспензию, помещенную на формваровую подложку, обрабатывали 1% водным раствором уранилацетата и исследовали в электронном микроскопе JEM-7 при инструментальном увеличении 5000, 50 000 и 70 000 \times .

Электрофорез в поликариламидном геле. Аналитический электрофорез вирусных белков в поликариламидном геле проводили по методу (³). Концентрация геля 12%. Диаметр трубок 6 мм, длина разделительного геля 8 см. Сила тока 3,5 ма на трубку. Время электрофо-

К статье И. З. Зарецкого, К. В. Ильина и др. стр. 976



Рис. 2. Электронная микрофотография фракций вирусных частиц HEp-2V, взятых из зоны (1,46—1,17 г/мл) сахарозного градиента

К статье Б. С. Ксенофонтова, А. И. Виленской и др., стр. 994

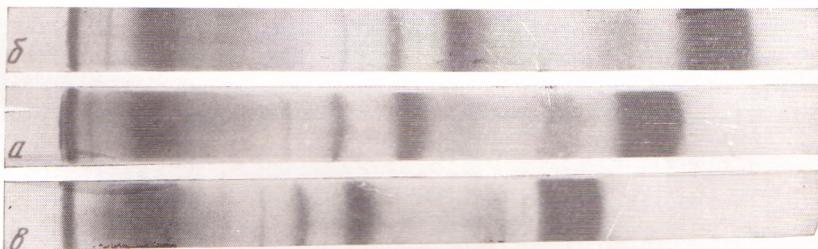


Рис. 1. Фореграммы деления сыворотки крови. *a* — контрольная, *б*, *в* — при предварительной магнитной обработке раствора мономера и дистиллированной воды соответственно

реза 4–4,5 часа. В качестве маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), пируваткиназу (ПКА), овоальбумин (ОВА) и карбоксипептидазу (КОП). Анализ распределения белков в геле проводили либо путем разрезания геля на пластинки толщиной 1 мм с последующим растворением геля в 30% H_2O_2 и подсчета радиоактивности в спиритуальном счетчике «Packard – Triacar», либо путем приготовления радиоавтографа геля и сканирования фотопегатива в денситометре «Opton».

Приготовление радиоавтографов. После окончания электрофореза гель разрезали продольно, высушивали под вакуумом и экспонировали с чувствительной пленкой РТ-6 в течение 37 дней.

Получение антисыворотки к вирусным антигенам проводилось по методике, описанной ранее⁽¹⁾.

Результаты. Для анализа белков вируса НЕр-2V использовали вирус, подвергшийся двум циклам центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Это связано с тем, что после одного центрифугирования в сахарозном градиенте распределение радиоактивного материала по зонам градиента было недостаточно гомогенным и, кроме характерного пика радиоактивности в зоне 1,17 г/мл, обычно имелись пики в зоне 1,20–1,25 г/мл и в зоне 1,1–1,13 г/мл. Повторное центрифугирование материала, взятого из зоны 1,16–1,18 г/мл первого градиента давало гомогенное распределение вирусного материала в сахарозном градиенте (рис. 1), что может свидетельствовать о чистоте препарата вируса НЕр-2V, использованного затем для анализа вирусных белков и электронной микроскопии (рис. 2).

К препарату очищенного вируса добавляли додецилсульфат натрия и 2-меркаптоэтанол в концентрации 2 и 5% соответственно и смесь прогревали при 100° в течение 3 мин., после чего подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле. Как видно из рис. 3, в состав вируса НЕр-2V входит 11 белков с молекулярным весом от 23 000 до 79 000 дальтон, при-

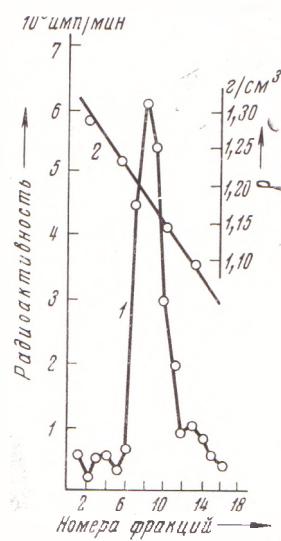


Рис. 1. Распределение вируса НЕр-2V, меченного C^{14} -белковым гидролизатом, в градиенте плотности сахарозы. 1 — радиоактивность, 2 — плавучая плотность

Таблица 1

Молекулярный вес белков вируса НЕр-2V и вируса опухоли молочных желез мышей (в дальтонах)

Белки	НЕр-2V	ММТ ⁽⁵⁾	Белки	НЕр-2	ММТ ⁽⁵⁾
I	79000	90000	VII	41000	—
II	63000	70000	VIII	38000	—
III	57000	52000	IX	33000	—
IV	52000	33000	X	28000	—
V	50000	23000	XI	23000	—
VI	45000–47000	—			

чем белок с молекулярным весом 33 000 (белок (IX)) является основным белковым компонентом вирусной частицы. На долю этого белка приходится от 38 до 47% всей радиоактивности, включившейся в белки вируса НЕр-2V.

Предварительные результаты электрофореза специфического белкового преципитата, полученного при инкубации меченого вируса НЕр-2V, раз-

рушенного эфиром, с антисывороткой, полученной к разрушенному вирусу и истощенной против цельного вируса, позволяют предполагать внутривирусную локализацию белка IX и рассматривать его в качестве составной части вирусного нуклеоида. Однако прямой ответ на вопрос о локализации вирусных белков могут дать эксперименты по анализу белкового состава субвирусных структур, полученных при ступенчатой деградации вирионов. Такая работа в настоящее время проводится.

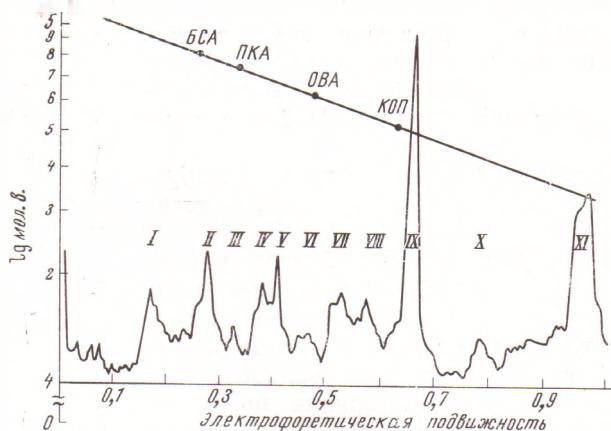


Рис. 3. Денситограмма радиоавтографа геля после электрофореза в нем белков вируса HEp-2V. Белки-маркеры: БСА, ПКА, ОВА, КОП. I—XI — белки

Изучение вируса HEp-2V, выделенного из клеток карциномы гортани человека, позволяет, с одной стороны, отнести его к группе онкорнавирусов В-типа, а с другой стороны, подозревать в нем этиологический агент рака человека. Наличие или отсутствие сходства между параметрами исследуемого вируса и свойствами других известных онкорнавирусов, в частности онкорнавирусов В-типа, может подтвердить или опровергнуть причастность данного вируса к развитию неопластических процессов у человека.

Таблица 2
Молекулярный вес белков онкорнавирусов * (в дальтонах)

Белки	AvLV	MuLV	HaSV	MTV	M—PMV
I	100000 **	100000 **	100000 **	90000	100000 **
II	70000	70000	70000	70000	70000
III	27000	31000	31000	56000	51000
IV	19000	—	—	32000	31000
V	15000	15000	15000	26000	25000
VI	12000	12000	12000	—	14000
VII	10000	10000	10000	—	—

* Цитируется по работе ⁽⁴⁾, определено методом гель-фильтрации.

** Белок является агрегатом белковых молекул, так как при электрофорезе в полиакриламидном геле он представлен одним полипептидом, имеющим м. в. 32 000.

При сравнении белков вируса HEp-2V с белками вируса опухоли молочных желез мышей ⁽⁵⁾ (табл. 1) становятся очевидными различия между белковым составом указанных вирусов. Основным белковым компонентом вируса опухоли молочных желез мышей является белок с молекулярным весом 52000 дальтон, тогда как роль основного белка в вирусе HEp-2V выполняет, по-видимому, белок IX, молекулярный вес которого равен 33000. Ранее полученные данные ⁽¹⁾ указывают на отсутствие им-

мунологического родства между исследованным вирусом и вирусом опухоли молочных желез мышей.

Анализ белков онкорнавирусов С-типа⁽⁴⁾ показал, что РНК-содержащие онкогенные вирусы млекопитающих, вызывающие опухоли у различных видов животных, содержат в своем составе в одинаковых белков, которые по молекулярному весу и антигенным свойствам отличаются от белков вирусов В-типа и вируса Mason — Pfizer (M — PMV). Сопоставление данных табл. 2 с результатами анализа белков вируса НЕр-2V свидетельствует о том, что белки НЕр-2V отличаются от белков известных онкорнавирусов В- и С-типа, а также от белков вируса М — PMV, который в настоящее время не может быть отнесен ни к одной из известных групп онкорнавирусов. Однако следует отметить, что несмотря на явные различия в полипептидном составе вирусов НЕр-2V и М — PMV, имеются данные, указывающие на наличие определенного антигennого родства между этими вирусами. Эксперименты, проводимые в настоящее время, направлены на выяснение природы общих антигенов в вирусах НЕр-2V и М — PMV.

Институт вирусологии
им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР

Поступило
21 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. В. Ильин, А. Ф. Быковский, В. М. Жданов, Вопр. вирусол., № 4, 494 (1972).
² К. В. Ильин, А. Ф. Быковский, В. М. Жданов, Cancer, v. 32, 1, 89 (1973). ³ U. K. Laemlli, Nature, v. 227, 5259, 680 (1970). ⁴ R. Nowinski, L. Fleishner, N. Sarkar, Persistent Virus Infection, N. Y.—London, 1973. ⁵ R. Nowinski, N. Sarkar et al., Virology, v. 46, 1, 21 (1971). ⁶ К. В. Ильин, А. Ф. Быковский, Ж. Ж. Спуре, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 2, 1, 86 (1972).