

УДК 576.858.5.098.396.332.06

БИОХИМИЯ

Т. Г. ОРЛОВА, Н. Г. ОРЛОВА

ИНФЕКЦИОННОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ДНК — РНК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК НА РАННИХ СТАДИЯХ МИКСОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 4 XI 1974)

Значительный интерес в изучении репродукции миксовирусов вызывает вопрос о первых стадиях функционирования вирусной РНК, так как по существующим представлениям она не обладает информационными свойствами (¹⁻³). Открытие РНК—РНК транскриптазы, входящей в состав РНП вириона и обнаружение в ранние сроки инфекции транскриптивного комплекса (⁴⁻⁷) явилось шагом вперед в понимании сложных процессов, происходящих вслед за вирусным инфицированием. Однако целый ряд фактов, а к ним относится чувствительность репродукции вируса гриппа на ранних стадиях к актиномицину D (⁸), неспособность вируса гриппа репродуцироваться в безъядерных клетках (⁹), позволяют предположить более сложные взаимоотношения между вирусом и клеткой, чем автономное функционирование вирусного генома.

Исходя из того, что существует сходство в репродукции вируса гриппа и РНК-содержащих онкогенных вирусов (¹⁰), а также на основании опубликованных данных об инфекционности ДНК клеток, зараженных вирусом саркомы Рауса (^{11, 12}), мы попытались изучить инфекционность комплекса ДНК—РНК клеток на ранней стадии миксовирусной инфекции.

Первичную культуру куриных эмбрионов (к.к.э.) заражали вирусом гриппа А/WSN и вирусом болезни Ньюкасл с множественностью 10—50 б.о.е. на 1 клетку. Через 1, 2 и 3 часа клетки промывали 3 раза бесцветным раствором Хенкса и к ним добавляли 10% спиртовой раствор додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Из полученного клеточного лизата выделяли комплекс ДНК—РНК (¹³). Данный метод основан на диссоциации ДНК и белка при высокой ионной силе растворов (1 M NaCl) с последующей 3-кратной депротеинизацией нуклеиновых кислот смесью хлороформа-бутанола и осаждением спиртом. На этапе осаждения отделяли образующиеся нити ДНК, которые затем растворяли в 1 мл разведенного в 10 раз натрий-цитратного буфера (0,015 M NaCl, 0,002 M Na-цитрат, рН 7,0). Эту фракцию условно обозначили как «нити» ДНК. Оставшуюся смесь (водная фаза+спирт) держали при —20° в течение 18—20 час. и центрифугировали при 6000 об/мин 30 мин. Полученный осадок также растворяли в 1 мл выше указанного буфера и данную фракцию условно обозначали как «осадок» ДНК. В некоторых случаях к лизату клеток добавляли фенол (рН 5,0) и проводили обычную трехкратную депротеинизацию на холоду (¹⁴). И в этом случае после осаждения спиртом отдельно собирали «нити» и «осадок». В некоторых опытах за 15 мин. до начала выделения нуклеиновых кислот в культуральную среду добавляли ³H-тимидин и ¹⁴C-уридин, а из полученных нуклеиновых кислот приготавливали кислотонерастворимые фракции, радиоактивность которых определяли в спинсцилляционном счетчике.

После растворения полученные препараты ДНК — РНК добавляли к к.к.э., которые предварительно в течение 4 час. обрабатывали актиномицином D (1 мкг/мл) для высвобождения рибосом от эндогенной клеточной

Таблица 1

Свойства нуклеиновых препаратов, выделенных из клеток на ранних стадиях гриппозной инфекции

Препарат	Фракции	D_{260}/D_{280}	Радиоактивность, имп/мин на 1 мг		Инфекционность в клетках-реципиентах	
			^{14}C -тимидин	^3H -уридин	обработанные актиномицином	необработанные актиномицином
ДНК — РНК из контрольных к.к.э.	«нити»	1,97	64000	30000	—	—
	«осадок»	1,93	20000	30000	—	—
ДНК — РНК из к.к.э. на 3 часу инфекции	«нити»	2,00	43000	15000	++++	—
	«осадок»	1,9	10000	65000	++++	—
ДНК — РНК (фенольная депротеинизация) из к.к.э. на 3 часу инфекции	«нити»	1,95	250000	3500	—	—
	«осадок»	1,9	830	70	—	—

мРНК и в течение 1 часа ДЭАЭ — декстраном (100 мкг/мл) ⁽¹⁵⁾. ДНК—РНК выдерживали в контакте с клетками в течение 1 часа, затем клетки заливали средой 199 с 2% бычьей сывороткой. Через 17 час. культивирования при 37° жидкость и клетки собирали и вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов. Через 48 час. проверяли наличие гем-агглютининов в зараженных эмбрионах.

Из 10 поставленных опытов (7 с вирусом гриппа и 3 — с вирусом болезни Ньюкасл) в 9 случаях результат был положительный, т. е. комплекс ДНК—РНК, выделенный на 1, 2 и 3 час. инфекции, оказывался инфекционным при внесении в клетки-реципиенты, обработанные актиномицином D. Если клетки-реципиенты не подвергались обработке актиномицином D, то инфекционность не выявлялась. Такая зависимость от обработки клеток-реципиентов актиномицином D, с одной стороны, указывает на возможность разобщения в экспериментальных условиях двух стадий развития вируса гриппа, еще раз подчеркивает независимость репродукции вируса гриппа от клеточного генома на поздней стадии репродукции, а кроме того снимает возможные возражения о «загрязнении» полученных препаратов «гипотетическими» оставшимися неразрушенными вирионами, так как в последнем случае инфекционность могла бы проявиться только в клетках, необработанных актиномицином.

Титр гемагглютининов, полученных после 1 пассажа на куриных эмбрионах, колебался от 1/10 до 1/320 и был наиболее высоким при применении ДНК—РНК, изолированных на 3 часу инфекции. Инфекционность была присуща двум фракциям: как «нитям», так и «осадку». Полученный вирус нейтрализовался в реакции торможения гемагглютинации только соответствующей специфической антисывороткой. Препараты ДНК—РНК, полученные фенольной депротеинизацией, инфекционностью не обладали.

Для иллюстрации описанных результатов приводим протокол одного из опытов (табл. 1). Из таблицы видно: 1) депротеинизация хлороформом — бутанолом обеспечивает высокую степень очистки нуклеиновых кислот; 2) судя по включению тимидина и уридина, все фракции содержали смесь ДНК и РНК, причем фракция «нити» содержала большее количество метки, связанной с тимидином; 3) инфекционность присуща комплексу ДНК—РНК, полученному депротеинизацией хлороформом — бутанолом.

Результаты указывают на то, что на ранних стадиях миксовирусной инфекции в клетках образуется инфекционный комплекс ДНК—РНК. Выявление инфекционности в клетках-реципиентах, обработанных актиномицином D, свидетельствует о том, что выделенный комплекс может осуществлять дальнейшую транскрипцию и трансляцию вирусных белков. Ка-

кая структура (ДНК, РНК или прочный комплекс ДНК—РНК) является функционально активной — по полученным данным сказать трудно и выяснение данного вопроса будет предметом дальнейшего изучения.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
30 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Г. Атабеков, Реализация генетической информации вирусных РНК, «Наука», 1972. ² D. W. Kingsbury, R. G. Webster, Virology, v. 56, 2, 654 (1973). ³ H. O. Stone, A. Portner, D. W. Kingsbury, Virology, v. 8, 2, 174 (1971). ⁴ D. H. Bishop, J. Obijeski, R. W. Simpson, J. Virology, v. 8, 1, 66 (1971). ⁵ D. H. Bishop, J. Obijeski, R. W. Simpson, J. Virology, v. 8, 1, 74 (1971). ⁶ Редакционная заметка, Вопр. вирусол., т. 1, 125 (1972). ⁷ A. Portner, D. W. Kingsbury, Virology, v. 47, 3, 711 (1972). ⁸ R. D. Barry, D. R. Ives, J. G. Cruickshank, Nature, v. 194, 4834, 1139 (1962). ⁹ E. A. Follett, C. R. Pringle et al., J. Virology, v. 13, 2, 394 (1974). ¹⁰ J. Bader, In: Mol. Biol. of Viruses, N. Y.—London, 1967, p. 697. ¹¹ M. Hill, J. Hilova, C. R., D, v. 272, 3094 (1971). ¹² L. Montagnier, P. Vigier, C. R., D, v. 274, 1977 (1972). ¹³ H. M. Temin, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 52, 2, 323 (1964). ¹⁴ К. Шерер, В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии, М., 1972, стр. 337. ¹⁵ J. De Maeyer-Guignard, E. De Maeyer, L. Montagnier, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 1203 (1972).