



УДК 547.963.1.05:578.832.1.088.2

ПРЕПАРАТИВНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ  
ВИРУСА ГРИППА*Медведев С. А., Арбатский Н. П., Лихошерстов Л. М.,  
Юртов Д. В., Дерезицкая В. А., Кочетков Н. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Разработаны два препаративных метода получения биологически активных гликопротеинов из вируса гриппа А/Ленинград/80 и А/Техас/77 с использованием детергентов тритона N-101 и цетилпиридинийхлорида (СРС). Оптимальными условиями солиubilизации гликопротеинов с выходами 70–80% являются обработка вируса гриппа (1 мг/мл по белку) детергентами (при весовом соотношении тритон – белок 20 : 1 или СРС – белок 1 : 1) в течение 1 ч при 20° С. Отделение гликопротеинов от коровой части вирионов осуществлялось с помощью центрифугирования. Гликопротеины освобождались от детергентов осаждением бутанолом в случае тритона или отделением осадка СРС, после охлаждения (4° С) раствора, центрифугированием.

Поверхностные гликопротеины – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) – главные антигены вируса гриппа. Выделение их в чистом виде связано с решением ряда вопросов профилактики эпидемий гриппа. Главным из них является создание эффективных субвирионных вакцин, свободных от побочных действий, присущих обычно применяемым цельновирионным и сплит-вакцинам.

Для извлечения гликопротеинов с поверхности вирионов обычно используют неионные (тритон X-100, тритон N-101, твин 20), анионные (соли дезоксихолевой кислоты, SDS) и катионные детергенты. Несмотря на то что неионные детергенты типа тритон широко используются для выделения гликопротеинов вируса гриппа [1, 2], исследование влияния условий солиubilизации вирионов на выход и степень очистки гликопротеинов ранее не проводилось.

Обработка вируса гриппа SDS часто приводит к потере нейраминидазной и антигенной активности поверхностных гликопротеинов. Среди катионных детергентов примером достаточно успешного применения является только цетилтриметиламмонийбромид. Солюubilизация гликопротеинов вируса гриппа другими катионными детергентами, в частности СРС, ранее вообще не изучалась, имеется только упоминание о некоторых из них в патенте [3].

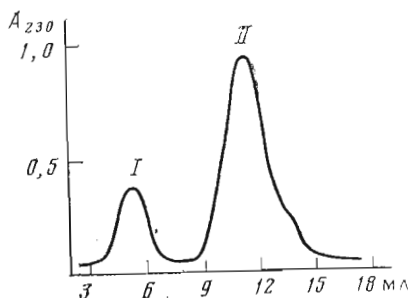
Данная работа посвящена разработке удобного препаративного метода получения биологически активных гликопротеинов вируса гриппа А/Техас/77 и А/Ленинград/80 с использованием детергентов тритон N-101 и СРС.

Солюubilизация вирусных гликопротеинов проводилась путем добавления к суспензии вирионов детергента, перемешивания реакционной смеси и отделения коровой части вирусных частиц центрифугированием с последующим анализом раствора и осадка.

Вирус гриппа помимо гликопротеинов содержит матриксный белок и нуклеопротеид, поэтому определение белка по Лоури характеризовало общее количество белка. Поскольку НА и НА – единственные гликопротеины вируса, а наиболее характерным моносахаридом гликопротеинов является глюкозамин, то по его количеству определялась степень солиubilизации вирусных гликопротеинов. Главными компонентами липидной оболочки вируса гриппа являются фосфолипиды, составляющие 10–13%

Сокращения: СРС – цетилпиридинийхлорид, НА – гемагглютинин, НА – нейраминидаза, SDS – додецилсульфат натрия.

Гель-хроматография продуктов солиubilизации вируса триптоном N-101 (0,3 мг вирусного белка и 2 мг тритона в 0,2 мл; 30 мин, 20° С) на сефарозе CL-4В (колонка 0,7×40 см) в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,2, содержащем 0,1 М NaCl и 1 мМ EDTA. I — коровая часть вирионов, II — гликопротеины



массы вириона [4], поэтому степень солиubilизации липидов определялась по количеству переходящего в раствор фосфора. Чистота получаемых гликопротеинов контролировалась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [5].

Эти методы анализа компонентов вируса достаточно хорошо воспроизводимы при работе с малыми количествами вируса, что позволяет надежно контролировать ход солиubilизации.

Смесь продуктов солиubilизации вируса разделялась в аналитическом варианте опыта (0,2–0,5 мг вирусного белка) хроматографией на сефарозе CL-4В (рисунок), причем со свободным объемом колонки выходила коровая часть расщепленных вирионов (фракция I), а фракция II кроме тритона содержала, по данным гель-электрофореза, HA и NA.

В случае препаративного выделения гликопротеинов смесь продуктов расщепления вируса разделялась центрифугированием, при этом в супернатанте находились гликопротеины, а в осадке — коровая часть вируса.

Исследование влияния концентрации вируса и детергента, а также температуры и времени обработки на солиubilизацию гликопротеинов показало, что наиболее существенным фактором является соотношение детергент — белок. Процесс солиubilизации гликопротеинов практически заканчивается через 30–60 мин при 20° С, и выход гликопротеинов не увеличивается при более продолжительной (2 ч) обработке и повышении температуры до 30 или 40° С. Поэтому в дальнейшем приводятся данные обработки вируса гриппа триптоном и СРС в течение 1 ч при 20° С. Как видно из табл. 1, при постоянной концентрации вирусного белка (1 мг/мл) увеличение концентрации тритона с 2 до 20 мг/мл повышает выход гликопротеинов с 50 до 80%, а количество солиubilизированного белка — с 38 до 62% (опыты 1–3). Из этого следует, что при обработке вируса триптоном в указанных условиях происходит преимущественная солиubilизация гликопротеинов по сравнению с белками. Это подтверждается и гель-электрофорезом полученных продуктов: при всех изученных соотношениях тритон — вирусный белок солиubilизированный материал содержал практически лишь гликопротеины HA и NA. При увеличении концентрации вируса в реакционной смеси до 3 мг/мл для получения удовлетворительного выхода гликопротеинов (опыт 5) концентрацию тритона необходимо повышать до 100 мг/мл. Однако при этом в раствор переходят нежелательные компоненты вируса — нуклеопротеид и матриксный белок.

Таким образом, было найдено, что оптимальными условиями для избирательной солиubilизации гликопротеинов являются: концентрация вируса 1 мг/мл, весовое соотношение тритон — вирусный белок 10–20 : 1.

При солиubilизации гликопротеинов с помощью СРС концентрация вируса также была 1 мг/мл (опыты 6–9, 14–17, табл. 1). Оптимальным весовым соотношением СРС — вирусный белок для обоих штаммов вирусов оказалось 1 : 1 (опыты 8 и 15), при котором выходы гликопротеинов составляют 65–70% без присутствия заметных количеств нуклеопротеида и матриксного белка (контроль — гель-электрофорез). Добавление к СРС небольшого количества тритона (оптимально 20% от СРС) при расщеплении вируса А/Ленинград/80 и А/Техас/77 повышает выход гликопротеинов до 75–80% (опыты 10, 11 и 18). Следует заметить, что при использовании тритона для отделения солиubilизированных гликопротеинов необходимо ультрацентрифугирование. В случае применения в качестве

## Зависимость степени солюбилизации гликопротеинов от концентраций детергента и вируса гриппа

Номер опыта	Вирус А/Техас/77					Номер опыта	Вирус А/Ленинград/80				
	концентрация, мг/мл			солюбилизация, % *			концентрация, мг/мл			солюбилизация, % *	
	вирус (белок)**	тритон N-101	СРС	общий белок **	гликопротеины ***		вирус (белок)**	тритон N-101	СРС	общий белок **	гликопротеины ***
1	1,0	2,0	—	38	49	12	1,0	10	—	66	78
2	1,0	10	—	50	74	13	1,0	20	—	70	82
3	1,0	20	—	62	80	14	1,0	—	0,6	46	51
4	0,5	10	—	56	83	15	1,0	—	1,0	62	66
5	3,0	100	—	52	70	16	1,0	—	1,5	72	75
6	1,0	—	3,0	80	80	17	1,0	—	2,0	75	80
7	1,0	—	1,5	76	78	18	1,0	0,2	1,0	77	76
8	1,0	—	1,0	63	70						
9	1,0	—	0,6	45	50						
10	1,0	0,1	1,0	70	74						
11	1,0	0,2	1,0	72	79						

\* Рассчитывали после отделения коровой части вирионов.

\*\* Определяли по методу Лоури.

\*\*\* Определяли по глюкозамину.

Таблица 2

## Характеристика исходных вирусов и полученных из них препаратов гликопротеинов

Препарат	Объем буфера, рН 7,2, мл	Концентрация, мг/мл		Белок по Лоури		Глюкозамин		Н.А. *, мг	Активность, %	
		три-тона	СРС	мг	%	мг	%		актив-ная (Н.А) *	ферей-тативная (Н.А) **
Вирус А/Техас/77	10,5	1,02	—	10,5	100	0,37	100	3,1	100	100
Гликопротеины	10,5	0,02	—	3,5	34	0,24	66	1,9	61	70
Вирус А/Техас/77	10	—	0,1	10	100	0,34	100	2,9	100	100
Гликопротеины	10	—	0,004	5	50	0,18	54	1,5	53	59
Вирус А/Ленинград/80	97	1,0	—	97	100	4,9	100	19	100	100
Гликопротеины	97	0,03	—	48	49	3,2	65	10,6	56	65
Вирус А/Ленинград/80	54	—	0,1	54	100	24	100	15,1	100	100
Гликопротеины	54	—	0,003	28	51	14	61	9,3	62	69

\* Определено реакцией со специфической антисывороткой.

\*\* Рассчитано по количеству отщепившейся нейрамининовой кислоты из овомукоида.

детергента СРС сохранившиеся вирионы и их коровая часть выпадают в осадок, а гликопротеины остаются в растворе. Осадок легко удаляется низкоскоростным центрифугированием (4000 g, 10 мин, 20° С), что является серьезным преимуществом использования этого детергента.

При получении вирусных гликопротеинов удаление детергента и фосфолипидов представляет серьезную проблему, так как фосфолипиды в значительной степени переходят в раствор (~70% с тритоном и ~40% с СРС) при солюбилизации мембранных компонентов вируса. Часто применяемые в таких случаях диализ или ультрафильтрация через мембраны малоэффективны: они трудоемки и приводят к значительной потере вещества (20%).

В случае гликопротеинов, солюбилизированных в тритоне, было использовано их осаждение бутанолом [6], при котором удаляется ~98% детергента, потери гликопротеинов за счет денатурации составляют 15–20%, а содержание фосфолипидов уменьшается в 8–10 раз.

Была исследована также возможность удаления детергентов с помощью нейтральной смолы Bio-Beads SM-2. При этом удаляется ~98% тритона или СРС, потери гликопротеинов составляют ~25%, а содержание фосфолипидов уменьшается в 5 раз.

Наиболее просто проблема удаления детергента решается в случае СРС путем использования его ограниченной растворимости в воде. Охлаждение раствора гликопротеинов в детергенте до 4°С приводит к образованию осадка СРС, который отделяется центрифугированием (10 000g, 10 мин, 4°С) или микрофильтрацией. При этом удаляется ~97% СРС, потери гликопротеинов не превышают 5–7%, а содержание фосфолипидов уменьшается в 2 раза.

Схема 1

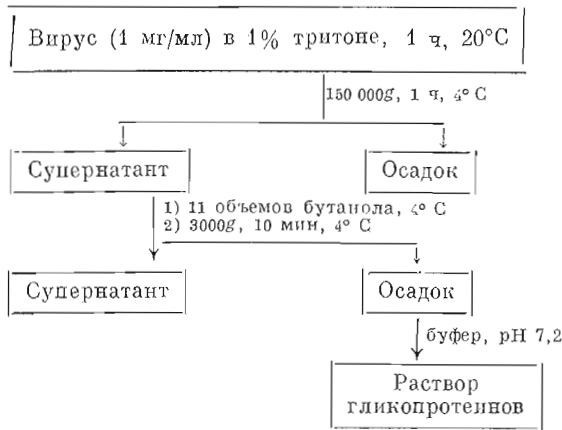
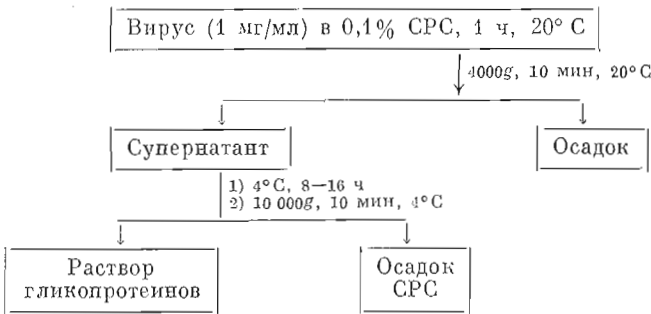


Схема 2



Разработаны и апробированы в препаративных опытах две схемы получения вирусных гликопротеинов с помощью тритона N-101 и СРС.

Результаты препаративного расщепления вирусов А/Техас/77 и А/Ленинград/80 (состав, выходы, ферментативная и антигенная активность) приведены в табл. 2.

Таким образом, разработанные нами схемы позволяют выделить вирусные гликопротеины в биологически активном состоянии с выходом 50–70%. Эти схемы могут быть использованы как в качестве удобного лабораторного метода получения гликопротеинов с целью дальнейшего их изучения, так и для разработки на их основе технологической схемы получения противогриппозной субвирионной гликопротеиновой вакцины. Особенно перспективна в этом случае схема с использованием СРС.

### Экспериментальная часть

Вirus гриппа штаммов А/Техас/1/77 (H3N2) и А/Ленинград/355/80 (H3N2) выращивали на 11-дневных куриных эмбрионах в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР и очищали по методу [7]. Детергенты: тритон N-101 (Serva, ФРГ), СРС квалификации ч.

отечественного производства. Содержание белка определяли по методу Лоури, модифицированному как описано в работе [8]. Фосфор анализировали по методу [9]. Содержание гликопротеинов оценивали по количеству глюкозамина, который определяли после кислотного гидролиза (4 н. HCl, 105° С, 20 ч) на анализаторе аминокислот Biotronik (CL 4010, ФРГ) на колонке (0,9×22 см) со смолой Аминекс А-5 в 0,35 М (по Na<sup>+</sup>) натрий-цитратно-солянокислом буфере, рН 5,3. Количество СРС или тритона N-101 в растворах гликопротеинов оценивали по разнице в поглощении при 260 и 280 нм. Ферментативную активность пейрамнидазы определяли по методу [10] с использованием в качестве субстрата овомукоида. Антигенную активность и количественное содержание гемагглютинина определяли в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии со специфическими антисыворотками [11]. Гель-электрофорез проводили в 5,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,2% SDS [12], белок проявляли кумасси бриллиантовым голубым R-250, углеводы — реактивом Шиффа.

**Выделение гликопротеинов.** К суспензии вирионов в буфере с рН 7,2 (0,05 М трис-HCl, содержащий 0,1 М NaCl и 1 мМ EDTA) добавляли 20% раствор тритона N-101 или 5% раствор СРС в том же буфере до нужных конечных концентраций (см. табл. 1, 2), перемешивали 1 ч при 20° С и центрифугировали в случае тритона N-101 при 150 000g (1 ч, 4° С) на ультрацентрифуге Beckman L5-65, а в случае СРС — при 4000g (10 мин, 20° С) на центрифуге Janetzki K24. В супернатанте и осадке определяли содержание белка, гликопротеинов (см. табл. 1), фосфора; распределение белков и гликопротеинов оценивали с помощью гель-электрофореза.

Удаление тритона или СРС из супернатанта, содержащего гликопротеины, проводили различными методами. К супернатанту, содержащему тритон N-101, добавляли при перемешивании 11 объемов бутанола при 4° С, выпавший осадок гликопротеинов через 0,5 ч отделяли центрифугированием (3000g, 10 мин, 4° С). Осадок освобождали от остатков бутанола с помощью вакуума или промыванием эфиром, не содержащим перекисей. Сухой остаток растворяли в буферном растворе с рН 7,2, анализировали на содержание тритона, белка, глюкозамина и определяли ферментативную и антигенную активность (см. табл. 2).

В случае супернатанта, содержащего СРС, раствор выдерживали 16 ч при 4° С, выпавший осадок СРС отделяли центрифугированием (10 000g, 10 мин, 4° С) или пропусканием суспензии под избыточным давлением (1 атм) через мембрану (Millipore, США) с диаметром пор 450 нм. Полученный раствор анализировали на содержание СРС, белка, глюкозамина и определяли ферментативную и антигенную активность (см. табл. 2).

Авторы выражают глубокую благодарность акад. АМН СССР М. П. Чумакову, канд. биол. наук С. К. Мельниковой, канд. хим. наук Ю. Ю. Кусову (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР) за предоставленные образцы препарата вируса гриппа и анализы гемагглютинина методом иммунодиффузии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brady M. I., Furminger I. G. S. J. Hyg. Camb., 1976, v. 77, № 1, p. 161–172.
2. Gentsch J. R., Bishop D. H. L. J. Virol., 1979, v. 30, № 3, p. 767–770.
3. Bachmayer H., Schmidt G. Пат. Великобритания, № 1498261, А 61 К 39/18, опубл. 13.1.75.
4. Вирусы гриппа и грипп/Ред. Кильбурн Э. Д. М.: Медицина, 1978, с. 46.
5. Арбатский Н. П., Лихошерстов Л. М., Медведев С. А., Новикова О. С., Сенченкова С. Н., Юргов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1983, т. 271, № 5, с. 1257–1260.
6. Scheid A., Caligniri L. A., Choppin C. Virology, 1972, v. 50, № 3, p. 640–652.
7. Laver W. G. Fundamental techniques in virology/Eds Habel K., Salzman N. P. N. Y.: Acad. Press, 1969, p. 82–86.
8. Кусов Ю. Ю., Шибанов В. Н., Галинчук Н. А., Куряинов В. В., Гозилашвили Л. М., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 438–448.
9. Hess H., Derr J. E. Anal. Biochem., 1973, v. 63, № 1, p. 607–613.
10. Warren L. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 7, p. 1971–1975.

11. Wood J. M., Schild G. C., Newman R. W., Seagroatt V. A. J. Biol. Standardization, 1977, v. 5, № 1, p. 237-247.  
12. Fairbanks G., Steck T., Wallach D. Biochemistry, 1971, v. 10, № 13, p. 2606-2617.

Поступила в редакцию  
6.VII.1984  
После доработки  
15.X.1984

## LARGE-SCALE ISOLATION OF INFLUENZA VIRUS GLYCOPROTEINS

MEDVEDEV S. A., ARBATSKY N. P., LIKHOSHERSTOV L. M.,  
YURTOV D. V., DEREVITSKAYA V. A., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Two preparative methods for isolation of biologically active glycoproteins from influenza virus A – hemagglutinin and neuraminidase, were elaborated. A three-step procedure involves solubilization of glycoproteins with nonionic (Triton N-101, TN) or cationic (cetylpyridinium chloride, CPC) detergents, separation from degraded virions by centrifugation, and removal of detergents and lipids by precipitation of the glycoproteins with butanol (TN), or, alternatively, precipitation of CPC upon cooling. Using virion concentration of ~1 mg/ml and optimal weight ratio of detergent to virus (protein) of ~20:1 (for TN) and 1:1 (for CPC), the glycoproteins were obtained with the overall yield of 70–80%. The isolated glycoproteins exhibit the same immunological and enzymatic activities as intact virus A/Texas/77 and A/Leningrad/80.