

**В.Л.ЗАЙЦЕВ, Н.Т.САНДЫБАЕВ, К.Т.СУЛТАНКУЛОВА, В.Ю.БЕЛОУСОВ,
О.В.ЧЕРВЯКОВА, В.М.СТРОЧКОВ**

**ВИРУС ОСПЫ ОВЕЦ:
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
И СТРУКТУРА ГЕНОМА**

Алматы 2011

УДК 619.616.988.1

ББК 48.1

В 52

ЗАЙЦЕВ В.Л, САНДЫБАЕВ Н.Т, СУЛТАНКУЛОВА К.Т, БЕЛОУСОВ В.Ю, ЧЕРВЯКОВА О.В, СТРОЧКОВ В.М.- **Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома.** г.Алматы, 2011.-

с.

V.L.ZAITSEV, N.T.SANDYBAYEV, K.T.SULTANKULOVA, V.Y.BELOUSOV, O.V.CHERVYAKOVA, V.M.STROCHKOV. - Sheep pox virus: molecular-biologicals properties and structure genome. Almaty, 2011. ISBN 978-601-278-599-9

В монографии представлены материалы научных исследований авторов и данные литературы по проблеме оспы овец. Эта проблема продолжает оставаться актуальной для большинства стран с интенсивным овцеводством. В книге изложены современные представления о морфологии, тонкой структуре вируса и его морфогенезе. Подробно рассматриваются различные методы очистки и концентрирования возбудителя, а также его физико-химические свойства. Освещены вопросы структуры генома и ПЦР диагностики.

Книга адресована научным работникам, аспирантам, студентам, а также специалистам, работающим в области ветеринарной вирусологии. В книге представлено 36 таблиц, 70 рисунков, библиография включает-340 названий.

Рецензенты:

- доктор биологических наук, профессор Жамбакин.К.Ж,
- доктор биологических наук, профессор Искаков Б.К.,

Печатается по решению Ученого совета Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (ГУ НИИПББ) КН МОН РК пгт. Гвардейский 2011 г.

ISBN 978-601-278-599-9

О РГП«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ)КН МОН РК 2011

Формат книги 74 x 112/16, тираж 300 экз

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Физико-химические свойства вируса оспы овец	6
1.1 Общие сведения о поксвирусах	6
1.2 Морфология и морфометрия штаммов вируса оспы овец	10
1.3 Физические характеристики вируса оспы овец	17
Глава 2. Очистка и концентрирование вируса оспы овец	23
2.1 Методы очистки и концентрирования	23
2.2 Препаративные методы очистки и концентрирования из культуральных вирусосодержащих материалов	31
Глава 3. Структурные белки поксвирусов и вируса оспы овец	60
3.1 Структурные белки поксвирусов	60
3.2 Физико-химические свойства структурных белков вируса оспы овец	64
3.3 Методы выделения и очистки белков поксвирусов	69
Глава 4. Электронная микроскопия морфогенеза вируса оспы овец	70
4.1 Репликация и морфогенез поксвирусов	70
4.2 Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток	73
4.3 Электронная микроскопия вируса оспы овец в тканях зараженных животных	85
Глава 5. Структура генома Orthopoxvirus и вируса оспы овец	89
5.1 Природа нуклеиновой кислоты поксвирусов	89
5.2 Выделение и очистка нуклеиновой кислоты вируса оспы овец	93
5.3 Физико-химические свойства ДНК вируса оспы овец	97
5.4 Биологическая активность ДНК вируса оспы овец	105
5.5 Рестрикционный анализ ДНК вируса оспы овец	106
5.6 Нуклеотидная последовательность генома вируса оспы овец	112
5.7 Сравнительный анализ геномов вируса оспы овец и вируса оспы коз	113
Глава 6. ПРЦ диагностика оспы овец	117
6.1 Конструирование и синтез специфических праймеров для идентификации вируса оспы овец методом ПЦР	119
6.2 Подбор оптимальных условий постановки ПЦР при оспе овец	120
6.3 Чувствительность и специфичность ПЦР при оспе овец	122
6.4 Дифференциация вируса оспы овец и оспы коз методом ПЦР	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
Список литературы	133

ВВЕДЕНИЕ

Заболевание, вызываемое вирусом оспы овец, имеет довольно широкий географический ареал распространения и является постоянной угрозой овцеводству многих стран, нанося ощутимый экономический ущерб во время эпизоотий. Для животноводства республики Казахстан вирус оспы овец представляет реальную опасность. Подтверждением этому являются постоянно регистрируемые вспышки этого заболевания на территории республики. По квалификации и номенклатуре вирусов, принятой в 1975 году в Мадриде, вирус оспы овец отнесен к роду *Capripoxvirus*, входящему в обширное семейство *Poxviridae* [1-4].

Род *Capripoxvirus* включает три вида: вирус оспы овец (*Sheep pox*), вирус оспы коз (*Goat pox*) и вирус бугорчатки крупного рогатого скота (*Neethling*). Оспа овец и оспа коз в соответствии с классификацией МЭБ отнесены к особо опасным болезням животных (группа-А) [5,6]. Заболеваемость при оспе овец колеблется от 20 до 90%, а летальность в зависимости от породы, возраста животных и формы течения болезни может достигать 50-100%. Возбудитель оспы овец состоит в близком генетическом, антигенном и серологическом родстве с возбудителем оспы коз, но по патогенности они обладают строгой видовой специфичностью [7-16].

Несмотря на широкое распространение и наносимый экономический ущерб, вирус оспы овец остается в числе малоизученных. Анализ литературы по оспе овец показывает малочисленность или отсутствие сведений, касающихся аспектов морфологии вируса, его морфогенеза, физико-химических свойств, очистки и концентрирования возбудителя, а также структурным белкам и структуре генома.

Одной из первых работ по морфологии вируса оспы овец можно считать работу *Abaussalam* [17]. Более полные сведения по морфологии и структуре данного вируса представлены *Скалинским* и другими авторами [18-20]. В этих работах показано, что вирионы вируса оспы овец имеют овальную форму и размер в пределах 100-200x150-250 нм, покрыты многослойной мембраной с филаментозными выростами. В центре вириона расположен нуклеоид, содержащий ДНК вируса. Вирионы содержат 89-92% белка, 2,8% углеводов, 5-7% липидов и 3-6% ДНК. По морфологическим свойствам отмечено большое сходство вируса оспы овец с другими представителями поксвирусов, особенно с вирусом оспы коз.

Этапы морфогенеза вируса оспы овец представлены в работе *Cohen* [21]. Автором показано, что морфогенез вируса представляет собой сложный многоэтапный процесс. В клетку вирус проникает путем виропексиса или фагоцитоза. Формирование вирионов происходит в цитоплазме клетки в зоне виропласта, последующие этапы морфогенеза не представлены.

Несмотря на значительное сходство вируса оспы овец по морфологии и онтогенетическому циклу развития с другими представителями группы поксвирусов, данному возбудителю присущи свои, характерные особенности,

которые не позволяют отнести его к группе паровакцины, куда ранее вирус оспы овец был отнесен по квалификации Johlik [22]. Кроме перечисленных данных, в литературе имеются сведения об использовании морфологических особенностей и особенностей цитопатологии поксвирусов для экспресс-диагностики заболевания [23-29].

Сведения по очистке и концентрированию вируса оспы овец, изложены в нескольких работах [22,53,56-58]. Данные этих работ свидетельствуют о малой эффективности методов в отношении выхода вируса и очистки препарата от балластных белков. В доступной литературе, также имеются данные по анализу полипептидов вируса оспы овец [59]. Однако результаты этих работ акцентированы на их фракционировании, количестве и определении молекулярных масс. Геном вируса оспы овец по литературным данным представлен двухцепочечной нефрагментированной линейной ДНК, имеющей молекулярную массу $137,5 - 200 \times 10^6$ дальтон, что соответствует 145,6 тысячам пар оснований, кодирующих 200 генов. К настоящему времени опубликованы результаты совместных работ Пламайлендского центра болезней животных США и НИИ Проблем биологической безопасности РК по полному секвенированию генома двух штаммов вируса оспы овец. Установлено, что большинство существенных генов возбудителя локализованы в центральной части генома, тогда как несущественные гены находятся на концевых участках генома. Сравнительный анализ генов A33R и ORC122 показал их 30% идентичность по аминокислотным последовательностям. В последовательности ORC122 присутствует трансмембранный домен, локализующийся ближе к N-концу белка на участке 45-67 позиций аминокислот. Величина полной нуклеотидной последовательности генома вируса оспы овец составила для штамма "А"-150057 п.н. для "НИСХИ"-149662 п.н. Геном штамма "НИСХИ" имеет более 70 различий по сравнению со штаммом "А"[283].

Исходя из анализа изложенного нами предпринята попытка представить собственные обобщенные экспериментальные данные по структурной и функциональной организации вируса оспы овец и его генома, полученные в НИИПББ МОН РК (ранее НИСХИ) при выполнении научно-исследовательских программ. Считаем, что наши данные восполняют некоторые пробелы в изучении этого опасного возбудителя, а также могут быть использованы при решении задач диагностики и профилактики оспы овец на современном этапе развития молекулярной биологии и генной инженерии.

ГЛАВА 1.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

1.1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПОКСВИРУСАХ

Семейство поксвирусов подразделяется на подсемейства вирусов, реплицирующихся в цитоплазме. Энтомопоксвирусы (entomopoxvirus (EnPV)) и хордопоксвирусы (chordopoxvirus (ChPV)) (Entomopoxvirinae and Chordopoxvirinae), инфицирующие насекомых и позвоночных соответственно.

Хордопоксвирусы затем подразделяются на восемь родов (Avipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Capripoxvirus, Suipoxvirus, Leporipoxvirus, Yatapoxvirus and Parapoxvirus), в то время как энтомопоксвирусы делятся на три рода (А, В и С) [2-4].

Вопросу очистки и концентрирования различных представителей поксвирусов посвящено большое количество работ и фундаментальных исследований. Наиболее часто используются такие методы очистки, как центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия [30], сахарозы [31-33] и глицерина [34]. Кроме этого, используются и такие методы, как дифференциальное и зональное центрифугирование [35,36], обработка фреоном [37-42], ферментами [43-45], хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе [46-48], сефарозах 2В, 4В и 6В [49-51], гель-фильтрация на сефадексах и биогелях [52,53], осаждение полиэтиленгликолем [54,55].

К настоящему времени сведения по исследованию физико-химических свойств семейства поксвирусов показывают, что из 300 представителей изучено лишь не более 50 членов этой группы (Таб.1).

Таблица 1 - Физические характеристики некоторых представителей поксвирусов

Вирус	Константа седиментац. (S)	Плав.плотн. (г/см ³)	Молек.масса вириона (Д)	Ист. лит.
вакцины – Vaccinia virus	5150	1,195-1,280	3313x10 ⁶	60-62
контагиозного моллюска Molluscum contagiosum virus	5250	1,261-1,288 1,275-1,278	-	61-63
энтомопоксвирус Melolontha entomopoxvirus	-	1,31 1,262 – 1,282	-	64 65,66
оспы овец штамм НИСХИ Sheep pox virus	4367	1,282	3875-3940x10 ⁶	67

В таблице 1 приведены данные, касающиеся констант седиментации, плавучей плотности и молекулярной массы вирионов некоторых представителей поксвирусов.

Наиболее изученным и, пожалуй, модельным из группы поксвирусов является вирус вакцины. Исследование седиментационных свойств вируса вакцины в условиях аналитического центрифугирования показало, что его константа седиментации составляет 5150 S [62]. Молекулярная масса вириона вакцины определена в 3313×10^6 дальтон путем эмпирического расчета [59,60] и в 3940×10^6 дальтон методом количественной электронной микроскопии [68]. Близкое значение константы седиментации с вирусом вакцины имеет вирус контагиозного моллюска (5250 S) [62,63].

В экспериментах по выделению структурных белков поксвирусов важное значение имеют данные по их электрофоретическим характеристикам. По литературным публикациям значение константа электрофоретической подвижности вируса осповакцины составляет $10,0 \times 10^{-5}$ см²/вольт/сек, рН 7,9. [6,3].

Плотностная характеристика поксвирусов является самой изученной физической константой. Если вирус осповакцины образует после равновесного центрифугирования в градиенте хлористого цезия узкую симметричную полосу с максимумом при $1,280$ г/см³, то вирусы из группы энтомопокс несколько гетерогенны по плотности, что сказывается на расширении полосы распределения плотности. Плотность этой полосы составляет от $1,262$ г/см³ до $1,282$ г/см³. Авторы объясняют такую плотностную гетерогенность существованием особой структуры вирионов энтомопоксвирусов, отличающихся от структуры поксвирусов позвоночных. В очищенных препаратах энтомопоксвирусов наблюдались частицы с так называемым ореолом и без ореола. Первые имеют плавучую плотность $1,282$ г/см³, а вторые $1,262$ г/см³ [65,66]. Интересными оказались исследования плотностного распределения вируса контагиозного моллюска. Вирус останавливался в градиенте хлористого цезия двумя полосами при плотности $1,325$ г/см³ до $1,340$ г/см³ и от $1,261$ г/см³ до $1,281$ г/см³ [62,63]. Хотя инфекционность вируса не изменялась от высокой концентрации хлористого цезия, электрофорезом в полиакриламидном геле было найдено, что соль удаляет некоторые негликолизированные полипептиды с молекулярным весом от 15000 до 60000 дальтон. Полосу высокой плотности авторы объясняют появлением вирусных частиц без этих структурных компонентов.

Наряду с физико-химическими характеристиками вирионов представителей поксвирусов в литературе имеются обстоятельные данные, касающиеся нуклеиновой кислоты этих вирусов. Вопрос о типе нуклеиновой кислоты оказался спорным. Так, еще в 1962 году исследования нуклеиновой кислоты вируса вакцины показали, что вирионы содержат небольшое количество аномальной ДНК [69,70]. Авторы считают, что это односпиральная ДНК (по профилю температурного плавления) и даже

выделили чистую фракцию вирусных частиц, содержащих максимальное количество такой ДНК после фракционирования вируса в градиенте плотности хлористого цезия. Одновременно с этими исследованиями появились другие работы, показавшие, что в вирионах вакцины присутствует РНК в количестве 0,2% от веса ДНК на вирион [30,72]. Очищенный вирус осповакцины, меченный C^{14} -уридином содержал 0,1-0,2% (по весу) рибополинуклеотидов, чувствительных к гидролизу РНК-азой и щелочью. Около половины этой РНК входит в состав нуклеотидов и при мягких способах деструкции РНК седиментирует независимо от ДНК с константой седиментации 8-10 S. Эти полирибонуклеотиды с неизвестной функцией являются вирусспецифическими и гибридизируются с вирионной, но не клеточной ДНК. Свойства и величина остального рибонуклеотидного материала, включая возможную примесь рибосомальных РНК, у вируса не установлена. Другой член из группы поксвирусов - вирус контагиозного моллюска также содержал в своем составе около 0,1%-0,6% РНК [63].

В последующие годы различными авторами экспериментально установлено, что поксвирусы содержат в своем составе нефрагментированные нити ДНК длина которых колеблется в пределах 130-360 т.п.н. Это обстоятельство, а также факт присутствия небольших количеств РНК обуславливают выбор способа освобождения нуклеиновой кислоты из вирионов этой группы.

К настоящему времени известно несколько способов выделения нуклеиновой кислоты из вирусов группы оспы. Наиболее часто для этой цели используют обработку очищенных вирусных концентратов детергентами, проназой, холодным или горячим фенолом, а также безфенольные способы – обработку проназой, меркаптоэтанолом, саркозилатом натрия [66,70-74].

Однако все перечисленные способы приводят к значительной деградации ДНК в процессе выделения и очистки. Сравнительно недавно был предложен модифицированный способ получения интактных молекул ДНК из вируса вакцины. Способ заключается в быстром лизисе вируса вакцины в нейтральном градиенте сахарозы, содержащем 0,5% додецилсульфата натрия и 2% 2-меркаптоэтанола. Очищенный вирусный концентрат наслаивался поверх приготовленного градиента. Этот способ преимущественно используется для выделения меченных нуклеиновых кислот в аналитических целях [75].

Для изучения физико-химических свойств вирусных нуклеиновых кислот используют обширный набор методов современной вирусологии и молекулярной биологии. Многие представители группы поксвирусов изучены в этом отношении достаточно детально. Ниже приведены данные из доступных источников литературы о физических константах ДНК вирусов группы оспы - седиментации, молекулярной массе и плавучей плотности (табл.2) . Из представленных данных видно, что ДНК вируса вакцины седиментирует в градиенте плотности сахарозы при 68-72S по сравнению с ДНК фага T_2 [84].

Таблица 2 - Физико-химические характеристики ДНК некоторых оспенных вирусов

Вирус	Константа седиментации (S)	Молекулярная масса (Д)	Плавуч. плотн. (г/см ³)	Источ. лит.
вакцины Vaccinia virus	50-100-	132x10 ⁶	-	76
	50-100	-	-	77
	-	120-127x10 ⁶ 150-170x10 ⁶	1,701-1,706 (CsCl)	92,78,79 31
	-	120-130x10 ⁶	-	71
	68-72	120-152x10 ⁶	-	79,80,83,86
фибромы Шоупа Sphore fibroma	-	192x10 ⁶	-	81
оспы птиц Fowlpox virus	-	200x10 ⁶ 206 - 210x10 ⁶ 185-190 x10 ⁶	- 1,749 (CsCl)	78,90,91
оспы обезьян Monkey pox virus	-	159x10 ⁶	-	85
энтомопоксвирус Melolontha entomopoxvirus	-	132-250x10 ⁶	1,676-1,681 (CsCl)-	88,89,90
оспы овец Sheep pox virus	65-102	156-200x10 ⁶	1,280	15
	67,9	129-146x10 ⁶	1,420	67

Величина константы седиментации ДНК других поксвирусов варьирует в пределах 65-80S. Однако молекулярные массы таких больших молекул как оспенные ДНК сильно различаются и лежат в довольно широких пределах от 119x10⁶ дальтон для вируса Яба [87] до 250x10⁶ дальтон для энтомопоксвируса Coleopteran [89]. Большие различия между величинами молекулярных масс ДНК представлены для вируса вакцины. Значение молекулярной массы ДНК колеблется от 122x10⁶ дальтон до 200x10⁶ дальтон [31,71,76,78-80,82-84,86,92].

Значительные вариации в значении молекулярной массы ДНК поксвирусов могут быть объяснены техническим трудностями при выделении ДНК, а также от способа определения размера молекул. Способы определения молекулярных масс высокомолекулярных ДНК различны. Это и коседиментация с маркером и непосредственное измерение длин молекул под электронным микроскопом. В настоящее время для определения молекулярной массы больших молекул ДНК используют метод рестрикции эндонуклеазами с последующей седиментацией фрагментов ДНК или их электрофоретическим анализом в полиакриламидном геле. Так, рестрикция эндонуклеазой Hind III приводит к образованию 14 фрагментов ДНК вируса вакцины [83]. Молекулярная масса этих фрагментов, определенная электрофорезом в геле, оказалась равной от 0,5x10⁶ дальтон до 30x10⁶

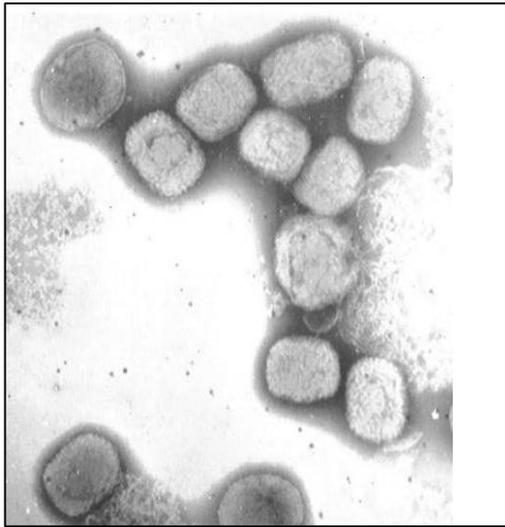
дальтон. Средняя молекулярная масса всего генома вируса вакцины определена в 125×10^6 дальтон. Расщепление ДНК этого же вируса эндонуклеазами *E.coli* выявило наличие 28 фрагментов с молекулярной массой от $0,4 \times 10^6$ дальтон до 14×10^6 дальтон, причем суммарная молекулярная масса этих фрагментов составляла $130-132 \times 10^6$ дальтон [76].

Метод электронной микроскопии является самым точным методом определения масс макромолекул путем непосредственного измерения их длин. Однако и здесь могут быть серьезные ошибки, так как величина линейной плотности ДНК, выраженная в мегадальтонах на микрометр контурной длины меняется в зависимости от конформации ДНК [92].

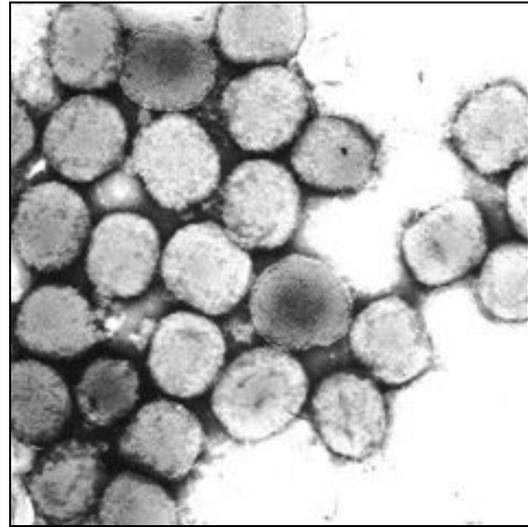
Поксвирусы - первые вирусы для которых строго и последовательно установлено наличие транскриптазы, как составной части структуры вириона, играющей существенную роль в инициации цикла инфекции [93-100]. Так, при обработке вируса вакцины неионным детергентом и 2-меркаптоэтанолом происходит освобождение вируса от наружных оболочек и оставшееся ядро способно осуществлять синтез РНК без добавления матрицы за счет ДНК-зависимой РНК-полимеразы, являющейся частью вирусного ядра [94]. Определенную роль в репликации вирусного потомства играет и масса других ферментов, входящих в структуру вирионов оспы. Так в частицах поксвирусов обнаружены нуклеотидфосфогидролаза, рибонуклеаза, липаза [93, 97, 98, 100-103]. В системе *in-vitro*, используемой для синтеза вирусных мРНК, сердцевина вируса осповакцины катализировала образование молекул поли-А [104,105]. В работах по изучению биологической активности нуклеиновой кислоты оспенных вирусов большинство представленных данных показывают, что препараты выделенной ДНК вирусов не проявляют инфекционных свойств, хотя в ранних работах имеются сведения о выделении ДНК вируса оспы птиц и других поксвирусов с инфекционными свойствами [106,107].

1.2 МОРФОЛОГИЯ И МОРФОМЕТРИЯ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

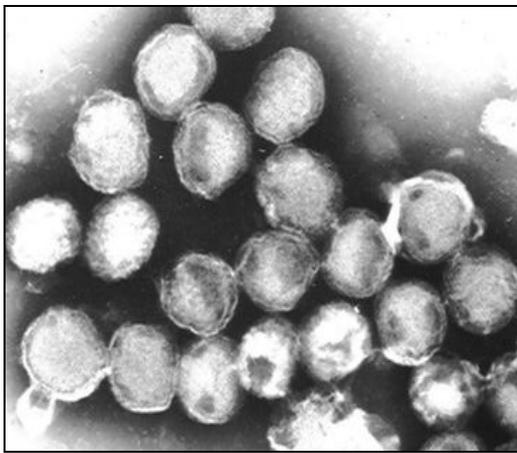
Как упоминалось ранее, в литературе данные по структуре вируса оспы овец представлены в нескольких работах. Нами проведены исследования по изучению морфологии и тонкой структуры вируса оспы овец, используя в качестве модели штаммы «А» - эпизоотический и «НИСХИ» - вакцинный в сравнении с другими штаммами этого возбудителя. Исследование контрастированных препаратов эпизоотических и вакцинных штаммов вируса оспы овец показало наличие в их популяции вирионов округлой или кирпичеобразной формы (рис. 1).



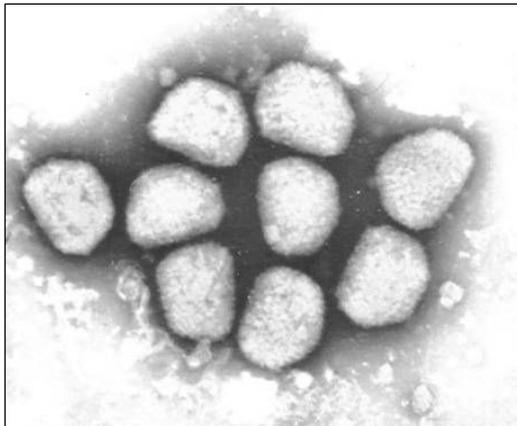
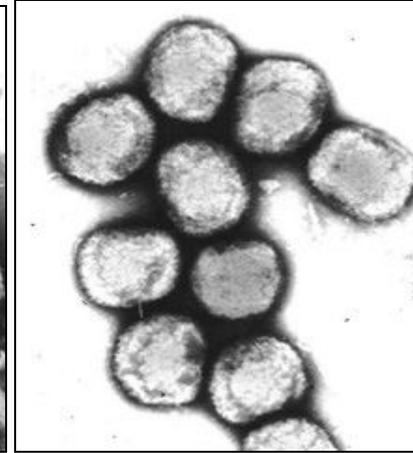
А



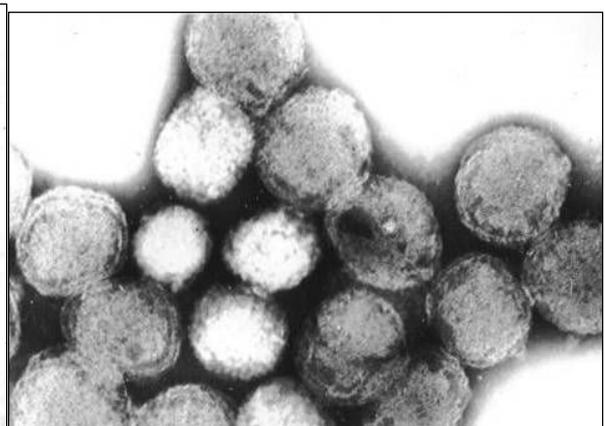
Б



В Г



Д



Е

А – «А» - эпизоотический; Б – «НИСХИ» - вакцинный; В – «Индийский» - эпизоотический; Г – «Казахстанский» - эпизоотический; Д – «ВГНКИ» - вакцинный; Е – «Румынский»- вакцинный

Рисунок 1 - Морфология эпизоотических и вакцинных штаммов вируса оспы овец. х 50000

Из представленных данных по средней арифметической величине и среднему квадратичному отклонению размеры вирионов в популяции

исследованных штаммов вируса оспы овец существенных различий не имеют. Морфометрия вирионов в препаратах эпизоотического и вакцинного штаммов вируса оспы овец выявила незначительные колебания размера поперечника и длины вирусных частиц. Величина вирионов в данной популяции варьируют в пределах 200-340x240-400 нм, при этом основная масса частиц (90%) имеет размеры 240-340x280-340 нм. Размеры вирионов других исследованных штаммов вируса оспы овец имели близкие значения (рис.2, таб.3).

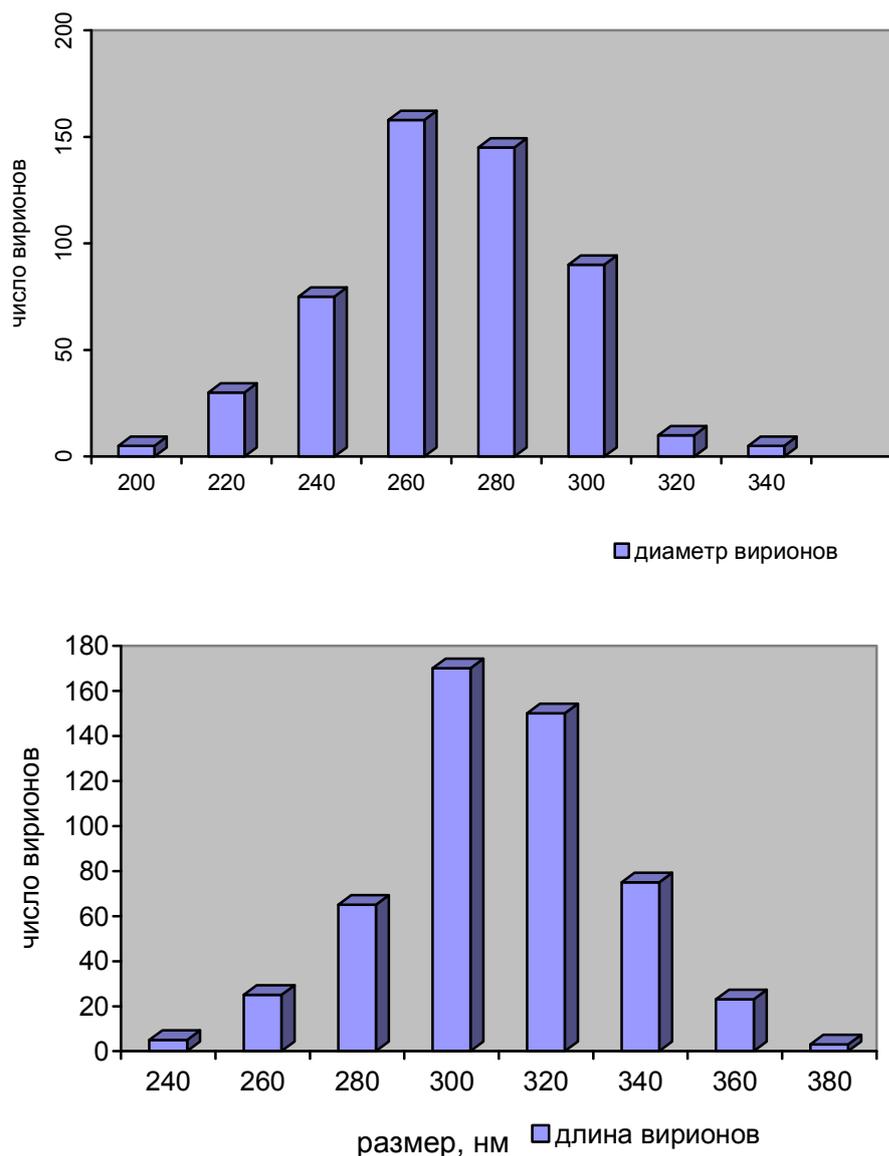


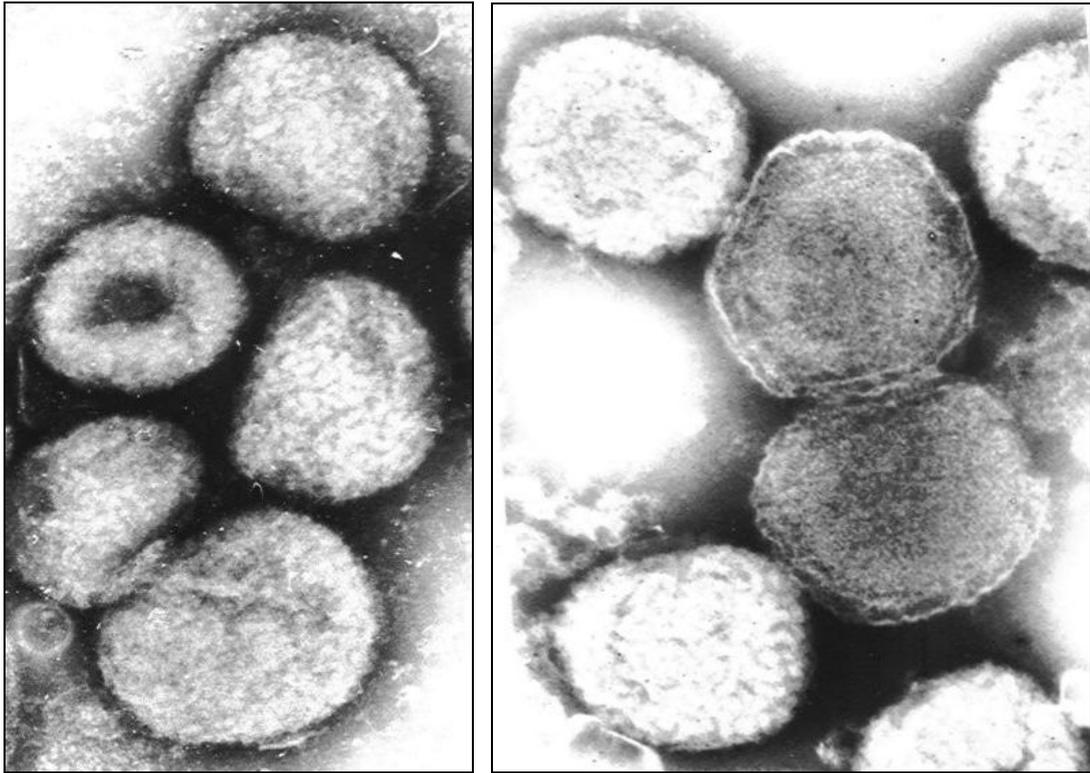
Рисунок 2. Гистограммы распределения вирионов по размерам в популяции эпизоотического штамма «А» вируса оспы овец.

Таблица 3 - Результаты статистической обработки размеров вирионов штаммов вируса оспы овец.

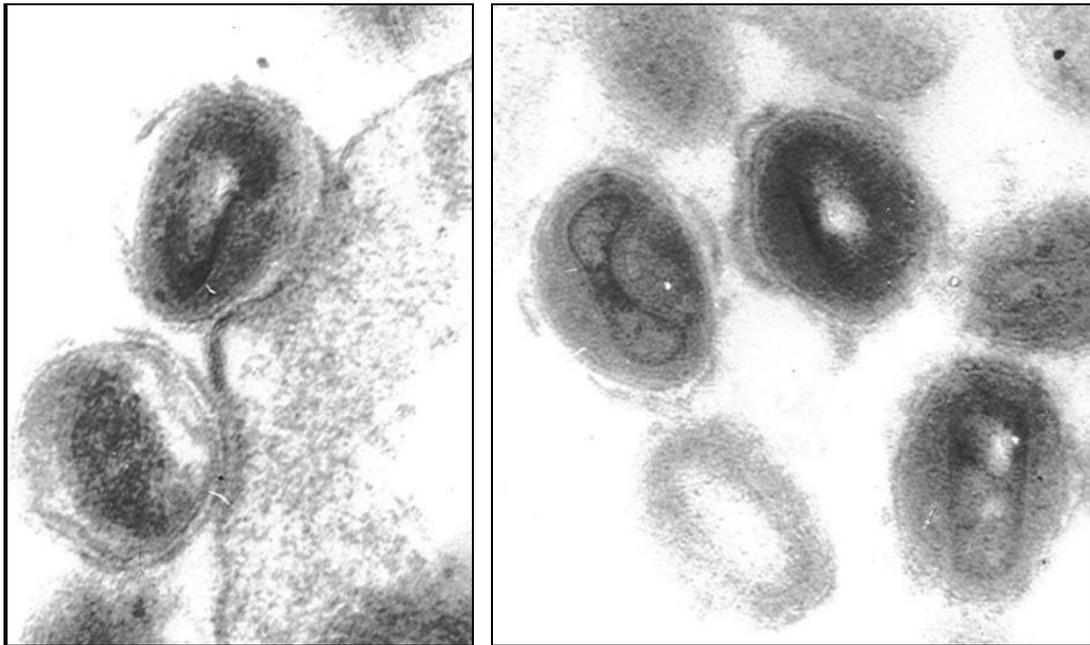
Штамм вируса оспы овец	Средняя арифметическая величина (M±m) нм	Лимиты нм	Среднее квадратичное отклонение, диам/длина	Мод.знач., нм	Число вирионов
«А», эпизоотический	251,6±1,13 310,1±1,12	200×240	25,4/25,1	340×400	500
«НИСХИ», вакцинный	251,6±1,13 310,10±1,12	200×240	25,4/25,1	340×400	500
«Индийский», эпизоотический	267,6±2,23 304,6±2,50	220×220	23,4/25,34	340×360	100
«Казахстанский», эпизоотический	267,6±1,21 315,2±1,13	180×240	27,1/25,3	340×400	500
«ВГНКИ», вакцинный	239,2±2,0 287,4±2,3	200×260	20,1/23,0	300×360	100
«Румынский», «РМ» вакцинный	251,0±2,2 283,3±2,3	220×240	21,6/23,4	300×340	100

Независимо от методов приготовления препаратов при электронно микроскопическом исследовании негативно контрастированного вируса оспы овец, аналогично другим авторам, нами выявлены, два типа вирионов, отличающихся по электронной плотности и структуре поверхностной оболочки. Электронноплотные – внеклеточные (EEV) вирионы и с меньшей электронной плотностью – внутриклеточные (IMV) вирионы. Экспериментально установлено, что внеклеточные вирионы имеют дополнительную липопротеидную оболочку, содержащую около десяти полипептидов. Количество внеклеточных вирионов в популяции значительно превалирует (до 30%) над внутриклеточными.

Проведенные исследования показали, что внеклеточные вирионы оспы овец имеют хорошо выраженную оболочку толщиной 20-25 нм, покрытую полыми выростами диаметром 7-9 нм и длиной до 15 нм. При проникновении контрастера внутрь вирионов можно видеть, что оболочка представляет собой двухслойную мембрану. Центральная часть вириона занята образованием из электронноплотных гранул 3-4 нм в диаметре (рис. 3.).



А



Б

А- метод негативного контрастирования; Б – метод ультратонких срезов

Рисунок 3 - Строение вириона вируса оспы овец. x 100000

Более детально структура вирионов прослеживается на ультратонких срезах. В центральной части вириона находится двояковогнутый нуклеоид размером 200-220 нм, состоящий из гранулярно-фибрилярного материала. Нуклеоид ограничен от остальной части вириона мембраной толщиной 10-15 нм. Исследование нативных и очищенных препаратов эпизоотических и

вакцинных штаммов вируса оспы овец не выявило существенных различий в деталях морфологического строения.

Обработка вирусосодержащих препаратов фреоном 113, детергентами и трипсином способствовала более четкому выявлению тонкой структуры вирионов оспы овец. При обработке фреоном 113, наблюдается частичное удаление материала оболочки и детализация поверхностных структур (рис.4)

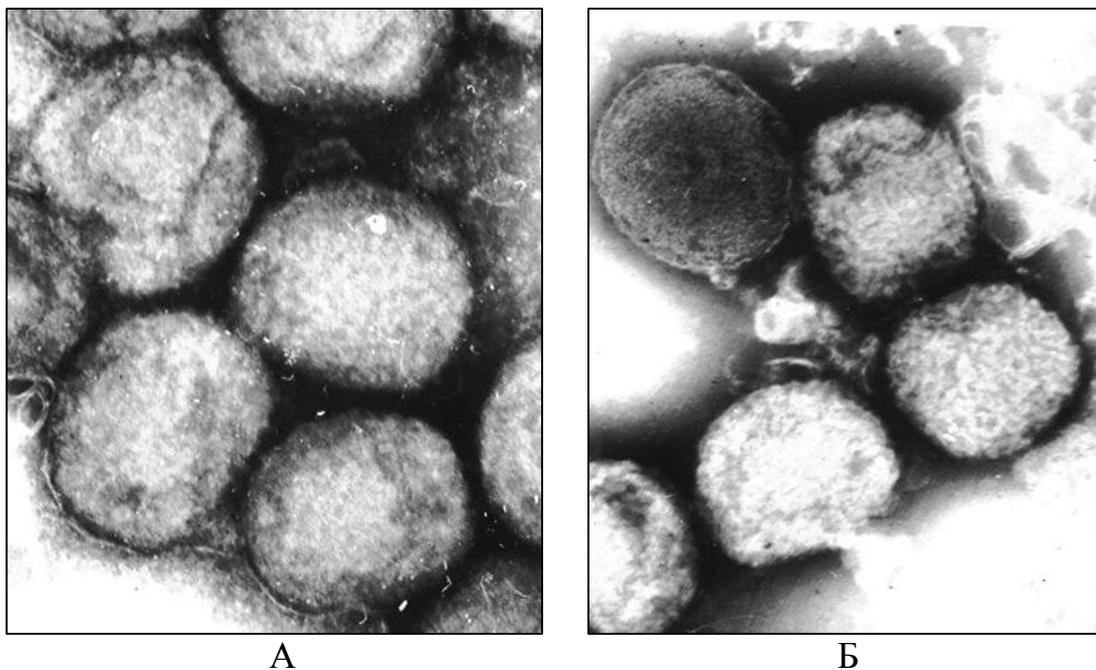


Рисунок 4 - Вирус оспы овец (А) до обработки, (Б) после обработки фреоном. Негативное контрастирование. x 100000

Вирионы, обработанные фреоном имели просветленную оболочку, без каких-либо видимых признаков ее разрушения. При обработке вируса оспы овец неионным детергентом нонидетом NP-40 в комплексе с 2-меркаптоэтанолом, как правило, наблюдалось полное удаление поверхностного слоя оболочки вириона, содержащего выросты и проявление базальной мембраны толщиной 3-6 нм. При этом у части вирионов происходило разрушение оболочки и выход внутреннего материала во внешнюю среду. После обработки основная масса вирионов имела вид пустых капсул (рис.5).

Действие на вирус оспы овец дезоксихолата и додецилсульфата натрия менее эффективно, чем NP-40.

Обработка дезоксихолатом и додецилсульфатом натрия вируса приводила лишь к частичному снятию материала верхнего слоя оболочки вирионов. При этом большая часть вирионов остаётся целой.

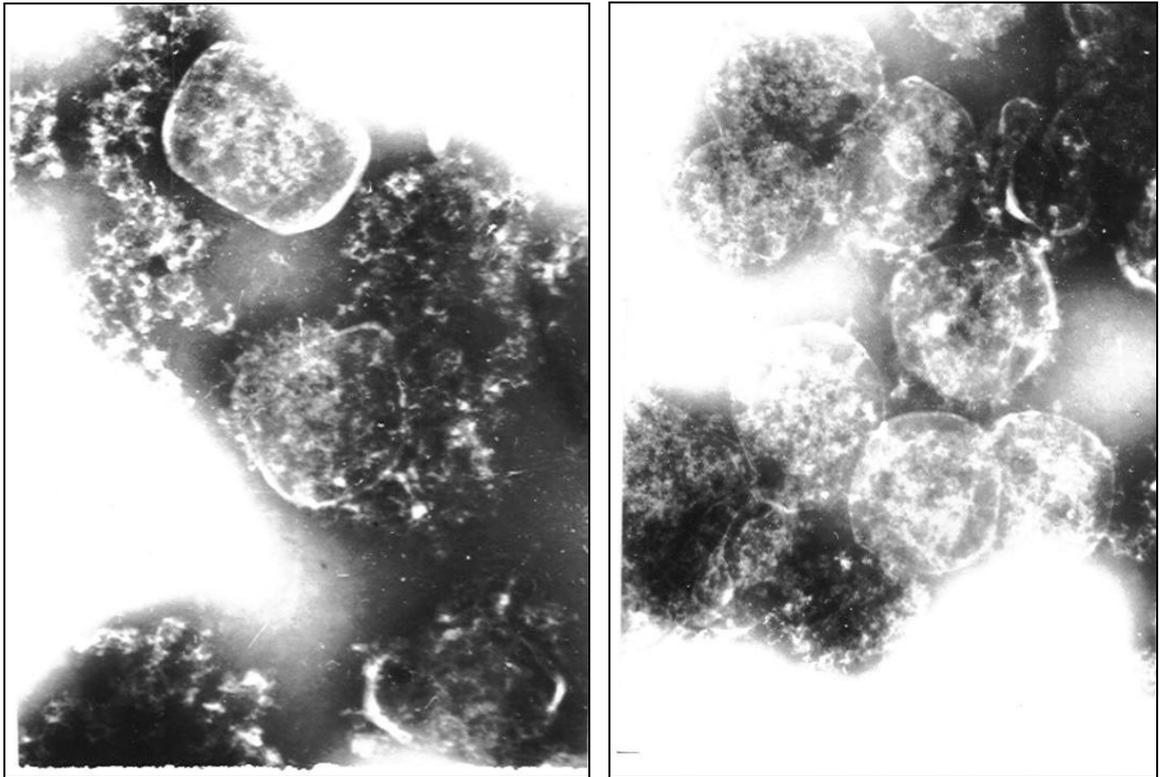
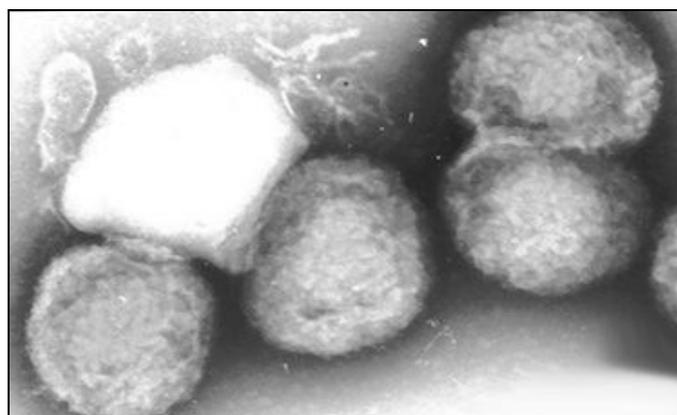


Рисунок 5 - Вирус оспы овец после обработки NP-40 в присутствии 2-меркаптоэтанола. x 100000

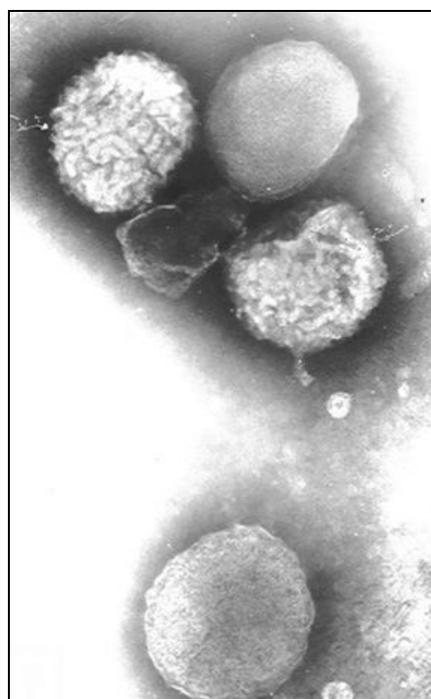
Обработка вируса оспы овец трипсином способствовала выявлению строения поверхностных выростов. Степень снятия материала оболочки и дезинтеграции структур вириона зависела от концентрации фермента и времени воздействия. При небольшой концентрации и кратковременном воздействии наблюдались лишь незначительное снятие вещества оболочки, по мере дальнейшего увеличения концентрации фермента и времени обработки возрастала степень удаления материала оболочки, что в конечном счете, приводило к полному удалению верхнего слоя оболочки и дезинтеграции вирионов (рис. 6.).

Исследование вируса оспы овец после обработки данными реагентами позволило выявить у вирусных частиц многослойную оболочку, состоящую из органически связанных между собой базальной мембраны и наружного рыхлого слоя, несущего выросты. Толщина базальной мембраны варьирует в пределах 5-6 нм. Диаметр поверхностных выростов и их внутреннего канала составлял соответственно 9 и 4 нм. Полученные нами данные по морфологии и структуре вируса оспы овец в основном совпадают с данными других авторов по штаммам «Ставропольский», «Voûga» и Алжирский вируса оспы овец [18,21,24,108]. Некоторые расхождения имеются лишь по величине поверхностных выростов. В то же время полученные данные показывают, что в основных чертах морфология и тонкая структура вируса оспы овец аналогична морфологии и структуре других представителей поксвирусов за

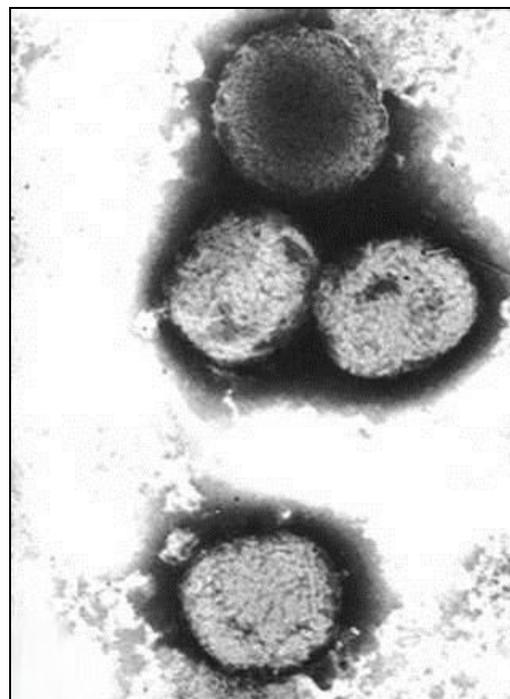
исключением представителей рода *Pararoxvirus* – вируса контагиозной эктимы овец и пустулезного дерматита верблюдов [23,109,110].



А



Б



В

А – 0,6 мг/мл; Б – 1,25 мг/мл; В – 2,5 мг/мл

Рисунок 6 - Очищенный вирус оспы овец после обработки различными концентрациями трипсина. Негативное контрастирование. x 100000

1.3 ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Определение физических констант имеет значение преимущественно в таксономии вирусов. Однако без знания этих характеристик нельзя приступать к биохимическому анализу отдельных компонентов вируса и к решению ряда практических вопросов вирусологии. Нами проведены исследования по изучению некоторых физических свойств и характеристик вируса оспы овец. В частности, были определены константа седиментации,

плавучая плотность вирионов, их молекулярная масса и константа инактивации.

В условиях лаборатории культуральная вирусосодержащая суспензия часто хранится до 1-3 суток после приготовления при +4 С. Более длительно вирусную суспензию хранят при значительных минусовых температурах (-40 -70С). При выращивании или на некоторых этапах очистки вируса рабочей температурой является температура +37С. В этой связи, представлялось необходимым проведение экспериментов по сохраняемости вируса овец при некоторых температурах.

Результаты экспериментов по термической инактивации вируса овец показали (табл.4), что вирус, суспендированный в культуральной среде, теряет половину инфекционности при -40С за 9,24 суток, при +4С за 4,82 суток, при + 20С за 3,79 суток и при +37С за 0,72 суток (17,3 часа).

Данные литературы по термической инактивации с другими представителями группы поксвирусов [64, 111-113] показывают, что вирус вакцины инактивируется наполовину за 36 часов при +25С и за 24 часа при +37С [112], вирус Яба теряет половину инфекционности при +25С за 9,4 часа, а при +37С за 0,62-0,75 часа [113]. Половина инфекционной активности культурального вируса контагиозного моллюска оставалась через 26,5 часов при +26С и через 11,2 часов при +37С[114].

Таблица 4 - Сохраняемость вируса оспы овец при различных температурах

	Исходная вирусная суспензия	Вирус хран-ся при -40С	Вирус хранился при +4С	Вирус хранился при +20С	Вирус хранился при +37С
Титр инфекционности lg ТЦД ₅₀ /мл	6,08	4,58	3,50	2,45	2,25
Константа инактивации (К)	–	0,075±0,008	0,129±0,000	0,160±0,007	0,958±0,000
Период полураспада (Т суток)	–	9,24	4,82	3,79	0,072

Результаты, полученные нами по термостабильности вируса оспы овец, находятся в соответствии с данными для вируса вакцины и контагиозного моллюска, и совпадают с данными для вируса Яба (таб.5).

При прогревании вируса оспы овец в культуральной среде с 15% бычьей сыворотки при 56С половина инфекционности теряется за 1,87 минуты. Также быстро инактивировался вирус контагиозного моллюска. Его инфекционность исчезала на 99,9% за три минуты при 50 °С [64].

Таблица 5 - Инактивация вируса оспы овец при 56 °С.

Время прогрева вируса (мин)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл)	Константа инактивации (M±m)	Период полураспада T (мин)
0	5,50		
2	4,83		
4	4,08	0,373±0,015	1,87
6	3,08		
8	2,92		
10	1,42		

Определение плавучей плотности вирусов имеет большую практическую ценность, во-первых, для постоянного контроля чистоты вирусных концентратов, во-вторых, плотностный анализ используется для изучения природной плотности гетерогенности вирусных частиц, а также для индуцированной гетерогенности мутантов. В-третьих, по величине плавучей плотности можно разделять инфекционные частицы от неинфекционных, если потеря инфекционности связана с утратой части нуклеиновой кислоты или белка, а также других компонентов, например, липидов.

Результаты наших исследований плотностных характеристик чистых препаратов вируса оспы овец представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Плавучая плотность вируса оспы овец при различных режимах центрифугирования

Центрифуга, ротор	Скорость, g	Время центрифугирования (час)	Соль	Пл. плотность, г/см ³
MSE, ротор №39	176000	2,0	CsCl	1,250
Beckman L2-65B SW 50.1	300000	2,5	CsCl	1,283
Beckman L2-65B SW 25.1	75000	3,5	Cs ₂ SO ₄	1,265
Beckman L2-65B SW 50.1	300000	18,0	CsCl	1,283

В результате установлено, что при увеличении g и времени центрифугирования в преформированном градиенте хлористого цезия достигается состояние равновесия, при котором вирус останавливается в полосе градиента с плотностью 1,283 г/см³.

Полученная величина хорошо согласуется со значениями плавучей плотности других представителей группы поксвирусов [61-66, 114].

При увеличении скорости центрифугирования снижается время, необходимое для концентрирования вирионов в зоне своей плотности ($t \sim 1/w^4$). Однако, при этом не происходит увеличения разрешающей способности и скорость не влияет на время установления равновесного

градиента концентрации соли. Время достижения макромолекулярным веществом состояния равновесия значительно сокращается, если вещество не равномерно распределено в пробирке, а наслоено на уже созданный равновесный градиент [115]. В наших экспериментах препарат вируса оспы овец наслаивался наверх преформированного градиента хлористого цезия. Это обстоятельство, а также увеличение скорости вращения ротора до 300000 g позволили сконцентрировать вирус оспы овец в полосе его плотности от 1,261 г/см³ до 1,288 г/см³. Пик оптической плотности соответствовал значению плотности 1,282 г/см³. Аналогичная плотностная гетерогенность наблюдалась также у вирусов вакцины [62], энтомопоксвируса [66], вируса контактного моллюска [64].

При равновесном центрифугировании вируса оспы овец, меченого тритием по тимидину в преформированном градиенте плотности хлористого цезия вирус локализуется в двух областях градиента. Первый пик радиоактивности соответствует значению плавучей плотности, равному 1,283 г/см³ (рис.7). Второй пик оптической плотности или радиоактивности присутствовал в придонной области градиента во всех случаях центрифугирования. Значение средней величины плавучей плотности меченого и немеченого вируса оспы овец составило $1,2820 \pm 0,0007$ г/см³.

Аналогичная картина наблюдалась при изоплотностном центрифугировании других поксвирусов [63-65].

Имеющиеся сведения по центрифугированию вируса контактного моллюска показали постоянное присутствие придонного пика. Плотность его составляла 1,31 г/см³. Авторами установлено, что этот пик содержит агрегаты вирусных частиц. Другое объяснение этому явлению – деструкция вирусных частиц в результате отщепления белков при контакте с хлористым цезием высокой концентрации. Плотность таких деструктивных вирионов значительно увеличивалась. Так, вирус контактного моллюска при изоплотностном центрифугировании останавливался двумя пиками плотности от 1,325 г/см³ до 1,340 г/см³ и от 1,261 г/см³ до 1,281 г/см³ [64]. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что после контакта вирионов с молекулами хлористого цезия происходит удаление некоторых негликозилированных полипептидов с молекулярными массами от 15000 до 60000 дальтон. Отмеченные вирионы имеют значительно большую плавучую плотность, образуя придонный пик после изоплотностного центрифугирования.

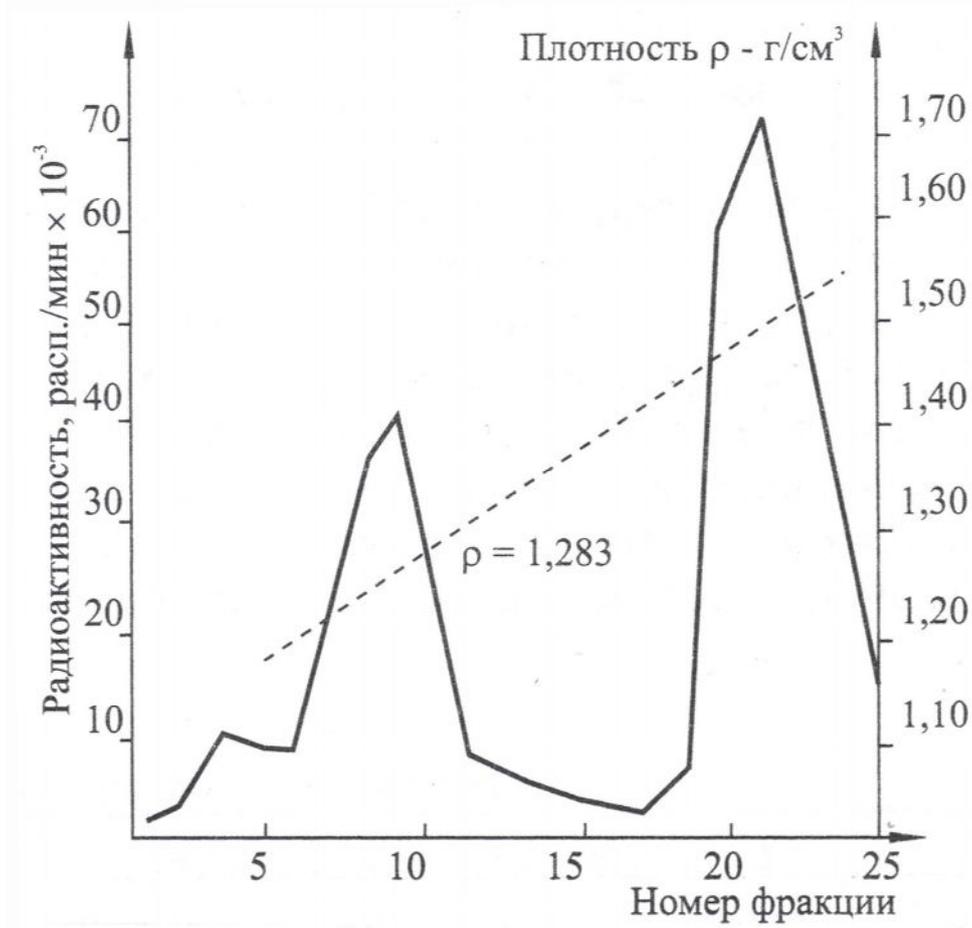


Рисунок 7 - Плотностная характеристика меченого тритием вируса оспы овец после равновесного центрифугирования в градиенте CsCl в роторе SW50.1 ультрацентрифуги L2-65B Beckman при 300000g

Постоянная седиментации частиц в поле центробежной силы в зависимости от их молекулярной массы – одна из важных физических характеристик биологических объектов, в частности, вирусов. Величина константы седиментации используется для расчета молекулярной массы вирусных частиц. В доступной литературе нет сведений о седиментационных свойствах вируса оспы овец.

Проведенные нами эксперименты по определению константы седиментации вируса оспы овец после осаждения вируса из культуральной вирусодержащей жидкости при различных режимах центрифугирования (табл.7) показали, что среднее значения константы седиментации для вируса оспы овец, соответствует значению 4367 ± 538 единиц Сведберга (S). Эта величина сходна со значениями констант седиментации других членов группы поксвирусов. Так, вирус вакцины седиментирует при 5150 S, а вирус contagiозного моллюска при 5250 S [63].

Таблица 7 - Характеристики седиментации вируса оспы овец

Центрифуга, ротор	Скорость вращения, об/мин	Время снижения титра инфекц. на 2 lg ТЦД ₅₀ /мл (сек)	Конст. седиментации - S	M±m
MSE Super speed 65,R- 25	10000	16,8*60	6880	4367±538
Beckman L2-65B, SW 50.1	5000	131,1*60	3431	
Beckman L2-65B, SW 50.1	10000	30,2*60	3575	
Beckman L2-65B, SW 50.1	10000	31,2*60	3461	
Beckman L2-65B, SW 50.1	15000	16,0*60	4275	
Beckman L2-65B, SW 50.1	20000	9,6*60	4580	

При расчете молекулярной массы вируса оспы овец использовали полученные нами значения плавучей плотности и константы седиментации. По значению константы седиментации был рассчитан радиус вирусных частиц. Он составил $83,3 \times 10^{-7}$ см. Радиус вируса оспы овец, измеренный под электронным микроскопом, находился в пределах 85×10^{-7} см – 150×10^{-7} см. Используя значения радиусов частиц и полагая, что вирионы оспы овец имеют близкую к шаровидной форму или форму шарового пояса, мы рассчитали молекулярные массы таких частиц (табл.8.).

Таблица 8 - Значения молекулярных масс вирионов оспы овец, полученные в экспериментах

Молекулярная масса вириона – шара		Молекулярная масса вириона – шарового пояса	
Радиус (см)	М.М. (дальтон)	Радиус (см)	М.М. (дальтон)
$83,3 \times 10^{-7}$	1870×10^6	$r1=85 \times 10^{-7}$	5405×10^6
$85,0 \times 10^{-7}$	1980×10^6	$r2=125 \times 10^{-7}$	
125×10^{-7}	6260×10^6	$r1=85 \times 10^{-7}$ $r2=150 \times 10^{-7}$	8247×10^6

На основе проведенных расчетов среднее значение молекулярной массы вируса оспы овец составило $(3879 \pm 1140) \times 10^6$ дальтон. Полученная величина сходна с таковой для вируса вакцины, определенной с помощью электронной микроскопии. Эта величина составляет 3940×10^6 дальтон для частиц 176×10^{-7} см [68].

Изучение химического и компонентного состава поксвирусов стало возможным после разработки методов получения высокоочищенных

препаратов вирусов. Представленные в литературе данные показывают, что химический состав вирусных частиц относительно сложен. Согласно имеющимся оценкам, на долю ДНК приходится около 5 - 6% массы вириона, белков – 80 - 89%, липидов до 5,7%, фосфолипидов до 2% и углеводов до 3%. Углеводы обнаруживаются в составе гликолипидов и гликопротеидов поверхностных структур вирусной частицы. Липиды входят в состав мембранных структур. В состав вириона, также входит фосфорилированный белок с м.м.11000 Д, на долю которого приходится 11% массы вириона. Данный белок участвует в конденсации ДНК вируса. В сердцевину вириона входят белок с м.м.25000 Д, участвующий в репликации вируса, на его долю приходится 7% массы вириона, белок с м.м.78000 Д, который участвует в процессе созревания вируса и белок с м.м.93000 Д, несущий антигенные детерминанты. В состав дополнительной оболочки входит гликопротеид с м.м.89000 дальтон, определяющий гемагглютинирующую активность. Дополнительная оболочка содержит еще один не гликозилированный белок с м.м. 34000 Д.

ГЛАВА 2.

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

2.1 МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Существующее в природе множество типов вирусов определило и множество способов очистки и концентрирования вирусов, так как любой из указанных в литературе методов специфичен лишь для данного вируса и его использование для очистки других вирусов, нуждается в предварительной проверке и доработке.

В связи с этим нами были предприняты исследования по использованию некоторых химических реагентов и физических способов для очистки и концентрирования вируса оспы овец. В частности – было определено влияние фреона, протеолитических и липолитических ферментов, нуклеаз на инфекционные свойства вируса оспы овец, а также возможность использования преципитации полиэтиленгликолем, хроматографии на ионообменных целлюлозах и фильтрации на сефарозе 4В.

Выбор методов очистки вирусов основывается на физико-химических свойствах исследуемого возбудителя. Для очистки поксвирусов чаще других методов используют преципитацию полиэтиленгликолем или сульфатом аммония, а также ионнообменную хроматографию на целлюлозах и гель-фильтрацию на сефарозах. Такие методы, как обработка вируса фреоном и другими липорастворителями, а также ферментами мало пригодны для очистки поксвирусов в следствии их сильного инактивирующего действия. Трипсин, проназа и другие ферменты применяются лишь в низких концентрациях для удаления балластных белков на промежуточных этапах очистки. Использование для очистки вируса полиэтиленгликоля 6000,

сульфата аммония, и ионообменных целлюлоз в комбинации с градиентным центрифугированием в растворе сахарозы обеспечивает получение высокоочищенных препаратов вирусов группы оспы.

Кроме того, нами была проведена серия опытов по отработке оптимальных условий очистки вируса из вирусосодержащих материалов и схемы препаративной наработки очищенных вирусных препаратов.

В процессе исследований были испытаны различные схемы очистки, из которых предпочтение было отдано ультрацентрифугированию, осаждению полиэтиленгликолем с м.м. 6000 и градиентному центрифугированию в сахарозе.

Известно, что фреон, как органический растворитель используется на предварительном этапе очистки различных вирусов. Однако, для ряда вирусов с липопротеидной оболочкой, применение фреона оказывается неприемлемым вследствие сильного инактивирующего действия [116]. Наши исследования по влиянию фреона на инфекционность вируса оспы овец показали, что даже 10-минутный контакт вируса оспы овец с фреоном снижает инфекционность вируса на 90,7 % (таб.9). Увеличение времени обработки несущественно сказывается на этой величине. Другими авторами показано, что двукратная обработка вируса вакцины фреоном 113 в концентрации 50 % в течение в общей сложности 4-х минут не вызвала снижение бляшкообразующей активности данного вируса [117]. Арктон 113 в конечной концентрации 10 % успешно использовали при очистке противооспенной вакцины, что позволило удалять до 50 % балластных белков [53].

Таблица 9 - Инфекционность вируса оспы овец после обработки фреоном 113

№ опыта	Титр инфекцион. исх.вир.суспенз. (lg ТЦД ₅₀ /мл)	Снижение титра инфекционности вируса после обработки фреоном (время обработки в мин.)			Снижение титра (%)
		10 lg ТЦД ₅₀ /мл	20 lg ТЦД ₅₀ /мл	30 lg ТЦД ₅₀ /мл	
1	5,25	0,75	0,75	0,75	90,7
		0,75	1,25	0,75	
		0,75	0,75	1,0	
2	5,0	1,25	1,25	1,25	92,8
		1,00	1,25	0,75	
		1,00	1,25	1,50	
3	5,25	1,25	1,25	1,00	89,3
		1,25	1,25	1,00	
		1,25	1,25	1,70	
M±m	5,16±0,08	1,03±0,07	1,04±0,07	0,97±0,09	-
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-

Использование фреона в комплексе с другими способами очистки, как правило приводит к большим потерям инфекционности вирусов группы

оспы. После очистки поксвирусов с участием декстрана при 25 % его концентрации биологическая активность снижалась до 35-67% [118]. Вирус вакцины, предварительно обработанный трипсином после очистки фреоном терял до 90 % инфекционности [34].

Обработка ферментами – одна из промежуточных стадий очистки вирусных суспензий с целью удаления разрушенных элементов клетки и структурных элементов вирусов белковой, липидной и нуклеиновой природы. В частности, этот этап применим и к оспенным вирусам [117,118].

В наших экспериментах для очистки вируса оспы овец были испытаны ферменты трипсин, папаин, проназа и различной специфичности липазы (таб.10.).

Таблица 10 - Действие ферментов на вирус оспы овец

Проба	Титр инфекц. исх. вир.суспензии lgТЦД _{50/мл}	Титр инфекц. вир.суспензии после обраб. ферментом lgТЦД _{50/мл}	Снижение титра инфекц. lgТЦД _{50/мл}	Снижение титра инфекц. (%)
Вирус+фосфолипаза С	5,25±0,25	5,25±0,25	0,00	0,00
Вирус+фосфолипаза Д	5,25±0,25	4,50±0,25	0,75	82,2
Вирус +R липаза	5,25±0,25	4,50±0,25	0,75	82,2
Вирус +папаин	5,25±0,15	5,50±0,25	0,00	0,00
Вирус +проназа	5,25±0,15	2,0±0,15	3,25	99,9
Вирус +трипсин	5,25±0,15	2,5±0,15	2,75	99,9

Результаты экспериментов показали, что фосфолипаза Д и R – липаза в одинаковой степени, на 82,2 % снижают инфекционность культуральной суспензии, содержащей вирус оспы овец. Фосфолипаза С не влияет на активность вируса. Сильное инактивирующее действие на вирус оспы овец оказывают трипсин и проназа, причем проназа в большей степени гидролизует вирионы.

По некоторым данным литературы трипсин оказывает деструктивное действие на вирусы группы оспы. Так, в концентрации 0,25 % при длительности инкубирования 120 мин трипсин приводил к потере инфекционности вируса вакцины в 3-10 раз [117]. В наших экспериментах трипсин концентрации – 0,06 % при воздействии на вирус в течение 30 мин не снижал его биологическую активность. Однако, такая обработка вируса приводила к значительной потере его инфекционности (до 90%) на последующем этапе очистки фреоном.

Если трипсин гидролизует только внешнюю оболочку осповакцины, то проназа нарушает внутреннюю структуру вирионов, проникая до нуклеоида, вследствие чего титр инфекционности падает на 4 lgТЦД_{50/мл}. Последние данные совпадают с результатами других исследователей [45].

Считается, что обработка нуклеазами обычно не оказывает заметного действия на интактные вирусные частицы. Наши эксперименты показали, что инфекционность культуральной жидкости, содержащей вирус оспы овец уменьшается на 43,9 % в присутствии ДНК-азы и на 84,2 % в присутствии РНК-азы (табл.11). Возможно, что в препаратах вируса имеются или появляются в процессе инкубации (+37⁰С) полуразрушенные частицы. Нуклеазы снимают часть общей инфекционности препарата за счет этих частиц.

Таблица 11 - Действие нуклеаз на инфекционность вируса оспы овец

Титр инфекц. исх. суспенз. lgТЦД _{50/мл}	Титр инф. (вир.суспенз +ДНК-аза)	Титр инф. (вир.суспенз +РНК-аза)	Снижение титра инф-ти	
			вирус+ДНК-аза	вирус+РНК-аза
5,25	4,00	5,00	0,75	0,25
4,75	4,00	4,75	0,75	0,00
5,75	4,75	5,25	1,00	0,50
6,25	5,75	6,25	0,50	0,00
5,75	4,75	5,25	1,00	0,50
M+m	-	-	0,80±0,09	0,25±0,11
Снижение титра в %	-	-	8462	4369

В литературе имеются данные, что вирионы группы оспы содержат в своем составе РНК, включенную в поверхностную оболочку [117,119]. Не разрушенные вирусные частицы могут быть инактивированы РНК-азой, гидролизующей РНК, инкорпорированную на поверхности оболочки вириона. Об этом же свидетельствуют и данные по вирусу осповакцины, который терял до 12 % инфекционности после обработки нуклеазами и фреоном [117].

Использование полиэтиленгликоля с м.м.6000 в практике очистки вирусов позволяет получать высококонцентрированные препараты [58, 120,121].

Наши эксперименты показали, что увеличение титра инфекционности вируса в осадках прямо пропорционально используемой концентрации полиэтиленгликоля за первые 4 часа осаждения. При этом максимум инфекционности осаждается 8%-ным полиэтиленгликолем. Увеличение времени контакта полиэтиленгликоля с вирусом не приводило к увеличению титра инфекционности. Результаты экспериментов позволили установить, что использование полиэтиленгликоля с м.м. 6000 в концентрации 6-8% в преципитации вируса оспы овец из осветленной культуральной жидкости обеспечивает увеличение титра инфекционности, при этом максимум

инфекционности достигается при использовании 8%-ного полиэтиленгликоля в течение 6-8 часов (таб.12.).

Таблица 12 - Концентрирование вируса оспы овец полиэтиленгликолем 6000 в концентрации 8 % в течение 4 часов.

№ п.п	Титр инфекц. исх. вир.суспензии lgТЦД _{50/мл}	Титр инфекц. надосадочн. вир.суспензии lgТЦД _{50/мл}	Титр инфекц. осадочн. вир.суспензии lgТЦД _{50/мл}	Снижение титра инфекц. в надосад. %	Повыш. титра инфекц. осадке %	Выход вируса %	Фактор конц.
1	5,25	2,75	7,0	-	-	-	-
2	5,25	3,25	7,25	-	-	-	-
3	5,00	3,25	7,50	-	-	-	-
4	5,25	3,25	3,76	-	-	-	-
M± m	5,19±0,06	3,13±0,12	7,13±0,16	-	-	-	-
P	0,001	0,001	0,001	99,13	98,8	866,8	10

Так, при использовании культурального вирусосодержащего материала с титром инфекционности 5,00 – 5,25 lgТЦД_{50/см³}, после низкоскоростного центрифугирования в надосадочной жидкости титр инфекционности в среднем составлял 5,1 lgТЦД_{50/см³}. После осаждения вируса ПЭГом титр инфекционности в преципитате возрастал до 7,0-7,5 lgТЦД_{50/см³}. Выход вируса при этом составлял 85-87%. Электронно-микроскопический анализ полученных препаратов показал, что они содержат белковые примеси невирусной природы (рис. 8)

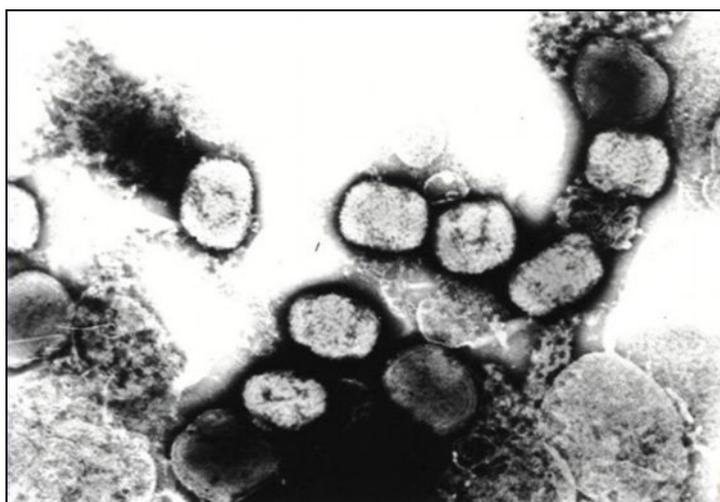


Рисунок 8 - Электронная микроскопия препарата вируса оспы овец, полученного преципитацией ПЭГом с м.м. 6000. x 50000.

Одним из способов предварительной очистки и концентрирования вирусов является осаждение вируса через сахарозу при ультрацентрифугировании (таб.13.).

Однако, этот метод позволяет получать небольшие количества вируса, пригодные только для аналитических целей. Он удобен, например, при работе с меченым материалом.

Таблица 13 - Концентрирование вируса центрифугированием через «подушку» 38 % раствора сахарозы

№ п.п	Проба	Объем мл.	Титр инфекц. lgТЦД _{50/мл} M±m	Изменение титра инф. по отн. к исх	Выход вируса %	Фактор конц.
1	Исходный вирус	25	5,00±0,00	-	-	-
2	Надсахарозный слой	25	2,33±0,16	-2,76	-	-
3	Сахарозный слой	2	3,50±0,00	-1,57	-	-
4	Осадок вируса	1	6,50±1,14	+1,50	126,5	25

Применение целлюлозных обменников для очистки вирусов имеет ряд своих преимуществ по сравнению с другими сорбентами. В настоящее время метод ионообменной хроматографии получил достаточно широкое распространение. Однако нельзя механически переносить методику ионообменной хроматографии на целлюлозе от одного вируса к другому без предварительных экспериментов вследствие многообразия ионообменных свойств вирусов. Прежде всего необходимо выбрать обменник и определить условия элюирования вируса.

Нами были использованы катионообменники карбоксиметилцеллюлоза, сульфо- и фосфоцеллюлозы и анионообменники – амино-, ди- и триаминоэтилцеллюлозы в различной консистенции (порошковые и волокнистые) (таб 14.).

Таблица 14 - Адсорбция – элюция вируса оспы овец на ионообменных целлюлозах

№ п.п	Сорбент	Количество вируса %	
		адсорбирован.	элюировавш.
1	Карбоксиметилцеллюлоза, порошковая	78,6	21,4
2	Карбоксиметилцеллюлоза, волокнистая	81,0	12,2
3	Сульфоцеллюлоза	98,1	1,8
4	Фосфоцеллюлоза	99,7	0,9
5	Аминоэтилцеллюлоза	99,0	7,6
6	ДЭАЭ, порошок «Реахим»	81,0	13,8
7	ДЭАЭ, волокн. «Реахим»	89,0	24,4
8	ДЭАЭ, волокн.	92,4	67,4
9	ТЭАЭ, порошок «Реахим»	100,0	1,8
10	ДЭАЭ, волокн. «Whatman»	82,3	100,0

Результаты показали, что вирус оспы овец удовлетворительно адсорбируется всеми типами целлюлоз. Однако элюция вируса происходит в разной степени. Нам не удалось элюировать значительное количество вируса с катионообменников. Триаминоэтилцеллюлоза освобождала только следовые количества вируса. Волокнистая целлюлоза фирмы «Whatman» оказалась наиболее пригодной для адсорбции и элюции вируса оспы овец. Количество адсорбированного вируса на этом обменнике составляло 82,3 % и весь адсорбированный вирус элюировался. В процессе отработки оптимальной схемы очистки вируса оспы овец нами проведены эксперименты с использованием схемы, включающей этап хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (таб.15.).

Таблица 15 - Очистка и концентрирование вируса оспы овец с этапами ионообменной хроматографии и градиентного центрифугирования в сахарозе.

№ п.п	Характеристика вируса	Исходная суспензия	После ДЭАЭ ц. и 32 % сахарозы	После 20-60 % град. сахар.
1	Объем суспензии (мл)	500	11	33
2	Титр вируса (ТЦД _{50/мл})	3,0	5,5	5,0
3	Кол-во доз в 1 мл	1000	3.16×10^5	1,1
4	Кол-во доз всего	$5,0 \times 10^5$	3.16×10^5	11
5	Кол-во белка (мг/мл)	0,52	0,80	0,9
6	Кол-во белка (мг)	260	8,8	1
7	Кол-во белка на 1 ТЦД _{50/мл}	52×10^{-5}	$2,53 \times 10^{-5}$	0,0
8	Очистка вируса по белку (%)	-	95,14	99
9	E260/E 280	-	-	1,
10	Кол-во нукл. кислоты (мкг/мл)	54	-	0,543
11	Очистка вируса по нуклеиновым кислотам (%)	-	-	99,0 ^ж

В отдельных опытах очистка по нуклеиновой кислоте достигала – 99,97%.

Анализ полученных вирусосодержащих материалов показал, что препараты вируса обладают удовлетворительной степенью чистоты по белку и нуклеиновым кислотам и пригодны для физико-химического анализа вирионов и их нуклеиновой кислоты.

Очистка вирусов фильтрацией через биогели, агарозы, сефарозы и ультрафильтрации через мембранные фильтры, также применимы для большинства вирусов.

В процессе отработки методов очистки концентратов вируса оспы овец также были использованы сефарозы 4В и 2В. Сефароза 4В позволяет фильтровать вирионы с мол.массой $>20 \times 10^6$ дальтон и задерживать низкомолекулярные примеси. Исследование препаратов полученных при фильтрации вируса оспы овец через сефарозу 4 В в УФ- свете длиной волны

254 нм показало (рис.9.), что пик инфекционности совпадает с первым пиком оптической плотности. Второй пик оптической плотности отделен от первого широким плато. Кроме того установлено, что фракции материала из этого пика не обладают инфекционностью и содержат максимальное количество белка. Электронно-микроскопический анализ показал отсутствие вирусных частиц в этом пике.

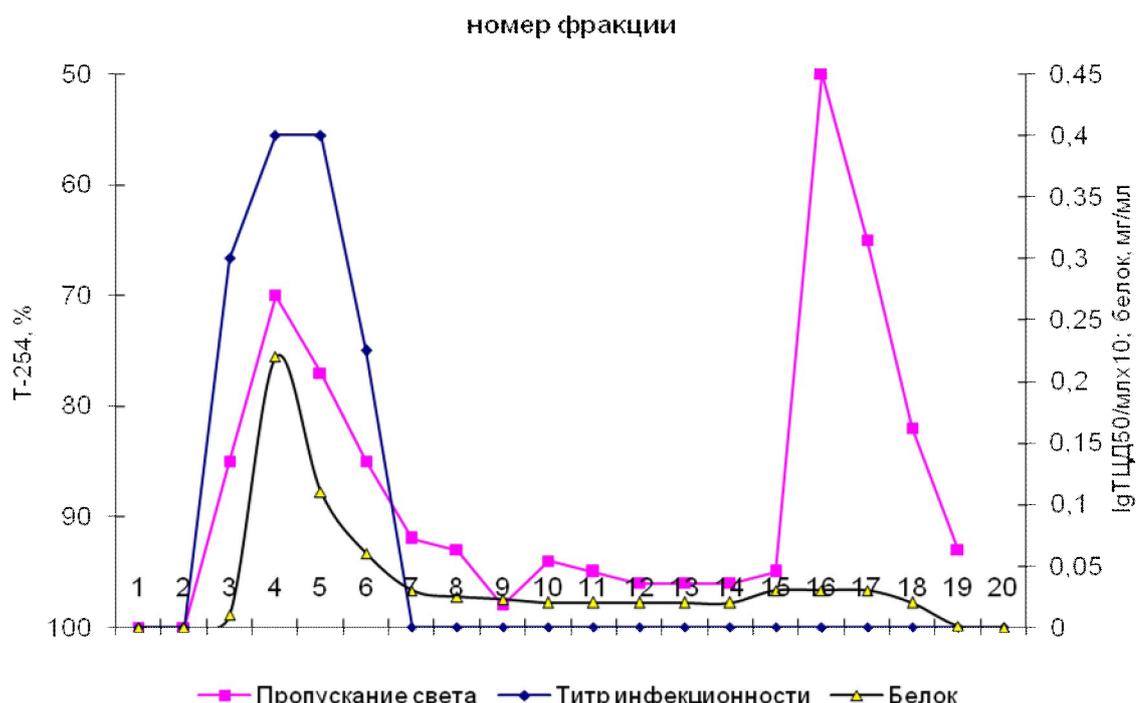


Рисунок 9 - Профиль гельфильтрации вируса оспы овец через сефарозу 4 В.

При фильтрации имеет место разбавление вируса, степень очистки по белку и процент выхода вируса были незначительными (таб.16).

Таблица 16 - Очистка вируса оспы овец с использованием сефарозы 4 В

№ п.п	Характеристика вируса	Исходный препарат	Пик 1	Пик 2
1	Объем (мл)	1	3	5
2	Число инфекционных доз всего	1×10^5	$5,17 \times 10^4$	-
3	Количество белка всего (мг)	3,0	0,22	1,48
4	Количество белка на 1 lgТЦД _{50/мл}	3×10^{-5}	4×10^{-6}	-
5	Очистка вируса по белку (%)	-	86,7	-
6	Выход вируса (%)	-	51,7	-

Отрицательным свойством гелей всегда является разбавление концентрированных вирусных препаратов, что делает необходимым этап дополнительного концентрирования. Важным является также правильный выбор типа геля с учетом размера фильтрующихся вирусов.

Использование для очистки сефарозы 2В показало, что эволюция вирусных концентрированных препаратов имеет классический профиль гелиевой фильтрации. Частицы с молекулярной массой $> 4 \times 10^7$ дальтон отделялись при свободной диффузии от второго пика. Первый пик был инфекционен и содержал все вирусные частицы. Однако выход вируса не всегда был высоким. Так, для аллантаисного миксовируса выход составлял всего 28,6-63,1 % инфекционной активности исходного [122]. Очистка вируса паротита путем фильтрации через сефарозу 6В составляла 97 % по белку [123]. Для объяснения данных результатов, можно предположить, что часть вирусных частиц прочно связывается с сефарозой. Ионный характер связи исключен, так как известно, что сефарозы ионообменными свойствами не обладают [124]. Низкий выход вируса и неудовлетворительная степень чистоты по белку ограничивают применение сефарозы 2В и 4В для очистки и концентрирования вируса оспы овец.

2.2 ПРЕПАРАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ВИРУССОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ

Использование целлюлозных ионообменников на волокнистой основе обеспечивает широкие возможности препаративной очистки вирусов. Обладая высокой проходимостью матрицы такие ионообменники обеспечивают возможность не только очистки, но и 10- 20- кратного концентрирования по объему вирусодержащих материалов [124, 117, 118]. Опыты по подбору модифицированных целлюлоз, пригодных для очистки вируса оспы овец из культуральной жидкости, показали, что ДЭАЭ-целлюлоза хорошо адсорбирует вирус оспы овец при pH 7,5-7,8. Адсорбированный вирус полностью элюирует 2М раствор NaCl (табл.17). Нами была проведена серия экспериментов по определению адсорбционной емкости ДЭАЭ-целлюлозы на волокнистой основе фирмы «Ватман» по отношению к вирусу оспы овец в составе культуральной жидкости. Установлено, что один грамм волокнистой ДЭАЭ-целлюлозы адсорбирует $1,18-1,8 \times 10^7$ ТЦД₅₀ вируса из осветленной культуральной жидкости с титром инфекционности 4-4,5 lg ТЦД_{50/мл} и концентрацией белка 3-6 мг/мл. Таким образом, на колонке содержащей 8-10 г целлюлозы можно адсорбировать вирус из 4-5 л культуральной жидкости с аналогичной активностью вируса. Полученное значение емкости адсорбента использовано нами в опытах по отработке препаративного метода ионообменной хроматографии вирусодержащих материалов на ДЭАЭ-целлюлозе. Результаты определения оптимальных концентраций растворов хлористого натрия для отмывки колонки от сопутствующих веществ и элюции эпизоотического "Казахстанский" и вакцинного "RM" штаммов вируса оспы овец показали, что популяции исследованных штаммов вируса оспы овец по степени

связывания с ионообменником проявляют выраженную гетерогенность. В большей степени эта гетерогенность выявлена у вакцинного штамма. Максимальная элюция эпизоотического штамма наблюдается при одномолярной концентрации хлористого натрия, полумолярный раствор извлекает в 2.5 раза меньше вируса. Еще меньше вируса элюируют 0.25, 1.5 и 2.0 М растворы соли. В то же время степень элюции вакцинного штамма 0.25, 0.5, 1.0 и 1.5 М хлористого натрия почти одинакова (табл.17.). Таким образом, очевидна необходимость использования высоких концентраций соли для элюции обоих штаммов с ДЭАЭ-целлюлозы. Значительная прочность связи с ДЭАЭ-целлюлозой поксвирусов – осповакцины отмечали другие авторы и использовали это свойство для хроматографического разделения смеси вирусов оспы и энтеровирусов, а также вирионов оспы и гемагглютинина вируса. [46,47]. Интересен и тот факт, что в наших опытах вирионы оспы овец, элюированные с ДЭАЭ-целлюлозы различными концентрациями хлористого натрия, не имели морфологических различий (рис.10).

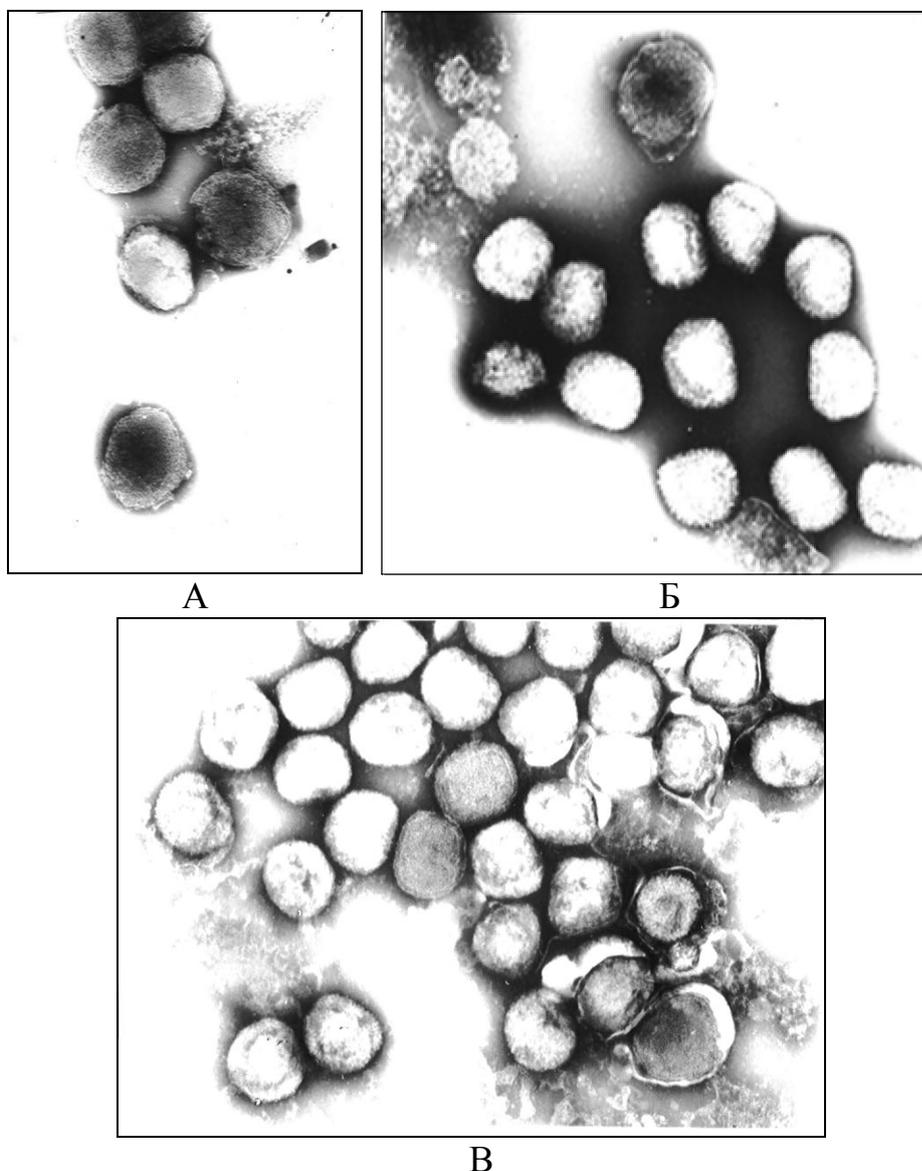
Таблица 17 – Результаты определения оптимальных концентраций растворов хлористого натрия для элюции вируса оспы овец при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

№№ опыта	Концентрация NaCl (М)	% элюции	
		Эпизоотический «Казахстанский»	Вакцинный «RM»
1	0.25	10	11.6
2		-	28.9
3		10.3	
X±m		10.1±0.15	20.3±8.7
1	0.5	22.4	22.4
2		-	33.7
3		27.8	
X±m		25.1±2.7	28±5.7
1	1.0	47.6	20.2
2		83.4	20.3
3		57.4	-
X±m		62.8±10.8	20.3±0.01
1	1.5	9.3	25.3
2		9.3	12.2
3		3.3	
X±m		7.3±2	18.75±6.6
1	2.0	10.7	4.6
2		7.3	4.7
3		1.0	
X±m		6.3±2.9	4.65±0.05

Примечание: 1. проценты элюции вируса рассчитаны от суммарного количества вируса, элюированного всеми концентрациями соли.

2. Суммарная элюция эпизоотического штамма в % от исходного количества 31-77 %, вакцинного – 14-100 %.

Полученные результаты дают основание полагать, что хроматографическая гетерогенность вирионов оспы овец обусловлена только физико-химическими особенностями наружной оболочки. Аналогичное предположение было сделано относительно хроматографической гетерогенности вирусов оспы коров и оспы кроликов [125].



а) 0.25; б) 0.5; в) 1.0 М хлористого натрия.

Рисунок 10 – Вирионы оспы овец, элюированные с ДЭАЭ-целлюлозы.
x30000

Учитывая высокую степень связывания обоих штаммов вируса оспы овец с ДЭАЭ-целлюлозой и ярко выраженную хроматографическую гетерогенность, в препаративном варианте очистки для удаления сопутствующих белков необходимо использовать растворы хлористого натрия в концентрации 0.2 М и ниже, а для элюции вируса – в концентрации 1.5-2.0 М. Следует подчеркнуть большие колебания степени элюции обоих штаммов с колонки ДЭАЭ-целлюлозы, характеризуемой общим количеством

элюированного всеми фракциями вируса, выраженным в % к исходному количеству. Для эпизоотического штамма выход вируса варьировал от 31 до 77 %, для вакцинного – от 14 до 100 %. Возможным объяснением таких вариаций, на наш взгляд, может служить использование различных партий материалов, отличающихся по содержанию вируса. Необходимо отметить, что при использовании более активных исходных материалов с титром вируса выше $4.5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ выход вируса в элюатах превышал 50 %. Однако, следует учесть и то, что сравнительно низкая степень элюции с ДЭАЭ-целлюлозы характерна и для некоторых других вирусов группы оспы, в частности, для оспы коров – 4 %, оспы кроликов – 16.6 %, хотя исследования проведены с частично очищенными и концентрированными препаратами ($10^7 \text{ БОЕ}/\text{см}^3$), и для элюции использовали растворы хлористого натрия ступенчато возрастающей концентрации в пределах 0.15 – 2 М [48,125].

При использовании нами препаративной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе для очистки эпизоотического и вакцинного штаммов вируса оспы овец из культуральной жидкости величина выхода активного вируса, извлекаемого из колонки для эпизоотического штамма вируса колеблется от опыта к опыту в пределах 17-40 % и, в среднем составляет 25 %, для вакцинного штамма от 23 до 80% (табл.18).

Таблица 18 – Результаты препаративной очистки вируса оспы овец на колонке с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой.

№ опытов	Штаммы вируса					
	Эпизоотический			Вакцинный		
	Выход вируса (% от исх.)	мг белка/ $\text{ТЦД}_{50} \times 10^{-5}$	Кратность очистки (раз)	Выход вируса (% от исх.)	мг белка/ $\text{ТЦД}_{50} \times 10^{-5}$	Кратность очистки (раз)
1 ^ж	18.4	12.0	14.3	41.7	-	
2 ^ж	16.7	4.4	34.6	33.3	1.4	18
3 ^{жж}	40.2	0.07	537	22.4	0.1	9.5
4 ^{жж}	-			79.7	0.07	258
$\bar{X} \pm m$	25.1 ± 7.7			44.3 ± 12.4		
Примечание: ж – исходные материалы с титром $3,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; жж – исходные материалы с титром $4,5-5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$						

Таким образом препаративная хроматография на колонках с волокнистой ДЭАЭ-целлюлозой приемлема как первый этап очистки вируса оспы овец из культуральных вируссодержащих материалов с высокой концентрацией вируса ($5,5-6.0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Ее использование предпочтительнее после предварительного концентрирования вируса полиэтиленгликолем или другим реагентами.

При очистке вирусов группы оспы на первых этапах наиболее часто используют центрифугирование при средних значениях центробежного

ускорения (23000-68000g), через слой 36 % раствора сахарозы в течение 30-45 минут [32,30,117,126].

Наши эксперименты по определению некоторых условий концентрирования и очистки вируса оспы овец с использованием ультрацентрифугирования проведены с вируссодержащими материалами с относительно низкими концентрациями вируса оспы овец и микоплазменной контаминацией. Сравнивали эффективность использования 36 и 45 % (в/о) растворов сахарозы после их предварительного замораживания и последующего оттаивания перед центрифугированием, что значительно упрощало и ускоряло процедуру подслаивания растворов сахарозы под центрифугируемый материал. После замораживания 4см³ 36 % и 45 % (в/о) растворов сахарозы в пробирках роторов SW25 и SW27 центрифуги L2-65B (Beckman) по высоте слоя создавали градиент концентрации сахарозы 30-38 % и 39-45 %, соответственно. Исходя из константы седиментации вируса оспы овец и плотности растворов на дне пробирки при 4⁰C (1,14 и 1,17 г/мл, соответственно) осаждение вируса проводили при 80000-90000g течение 45 минут.

Результаты экспериментов показали (табл.19), что при центрифугировании в заданных условиях вирус хорошо осаждается на дно пробирок как через слой 36%, так и 45% раствора сахарозы. Выход вируса составляет 100%. В то же время при использовании 45% раствора сахарозы удаляется наибольшее количество балластных белков. В препаратах, сконцентрированных без подслаивания сахарозы, содержание белка в 1,5 и 1,9 раза было выше, чем в препаратах, сконцентрированных через слой 36% и 45% растворов сахарозы, соответственно. Это свидетельствует в пользу необходимости подслаивания испытанных растворов сахарозы при концентрировании вируса оспы овец ультрацентрифугированием. Более предпочтительно подслаивать при режиме осаждения через 45% растворы сахарозы.

На заключительных этапах очистки поксвирусов многие экспериментаторы используют непродолжительное центрифугирование (45-60 мин) в линейном градиенте плотности сахарозы 35-55% в/о при 23000g [30, 32, 51,117, 118,].

В препаративных вариантах очистки предпочтительно использование центрифугирование в ступенчатом градиенте сахарозы, так называемом осаждении на градиентную интерфазу, когда в пробирку вносится несколько слоев сахарозы с различными плотностями [104]. Плотности растворов сахарозы подбирают так, чтобы низкомолекулярные продукты не проходили через зону, в которой локализуется вирус. И хотя этот метод не позволяет добиваться высокой степени очистки, он широко используется как одна из промежуточных стадий при очистке больших объемов вирусов [119, 128].

Таблица 19 – Осаждение вируса оспы овец из культуральной жидкости через слой 36 и 45% растворов сахарозы

Материал	Всего ТЦД ₅₀ /10 ⁵	Выход (%) от исходного	Всего белка (мг)
Культуральная жидкость до центрифугирования	1,5	100	102,6
	1,5	100	102,6
Осадок через 36% сахарозу	1,5	100	0,89
	1,5	100	0,89
Осадок через 45% сахарозу	1,5	100	0,72
	1,5	100	0,72
Осаждение без сахарозы	1,5	100	1,35
	1,5	100	1,35

Исходя из представленных выше данных по центрифугированию вируса оспы овец через слой 36 и 45% растворов сахарозы при 80000-90000 g, для градиентной интерфазы с целью доочистки частично сконцентрированного и очищенного вируса оспы овец нами испытаны 45, 48 и 60% (в/о) растворы сахарозы в объеме 10, 12 и 3 мл, соответственно. Эксперименты показали, что при центрифугировании в течение 45 мин при 80000-90000g основная масса вируса (83-93%) локализуется над 60% раствором сахарозы. В зонах 45-48% растворов остается 0,4-0,8% и 5-16% вируса, соответственно. В то же время в них задерживается значительное количество различных примесей (рис.11).

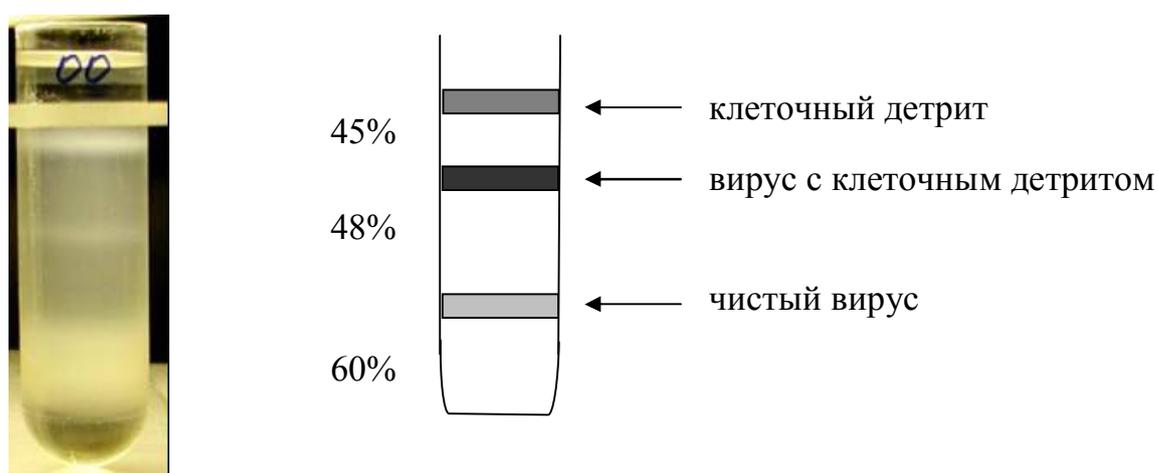


Рисунок 11 – Схема распределения вакцинного вируса оспы овец (штамм «НИСХИ») в ступенчатом градиенте плотности растворов сахарозы 45-48-60%

В наших опытах центрифугирование в указанном ступенчатом градиенте сахарозы использовано в качестве третьего этапа очистки и концентрирования вируса оспы овец. Для отработки оптимальной схемы

очистки и концентрирования вируса оспы овец была опробована комбинация трех методов: хроматография на колонке из волокнистой ДЭАЭ-целлюлозы, ультрацентрифугирования через слой 36 или 45% сахарозы при 90000g в течение 45-30 мин и концентрирования полиэтиленгликолем с м.м. 6000 в концентрации 6%. Эксперименты показали, что на первом этапе очистки наиболее эффективным по выходу вируса и кратности очистки является ультрацентрифугирование (табл.20). Менее эффективно было осаждение полиэтиленгликолем, кратность очистки составила всего 8 раз, а выход вируса – 50%. Меньший выход вируса в сравнении с полученными данными (таб.13 и 14) мы связываем с более выраженной агрегацией материала вследствие большей кратности концентрирования по объему – 20-40 раз.

В результате препаративной хроматографии выход вируса составил в среднем 28%, кратность очистки 74%. В препаратах после хроматографической очистки и после ультрацентрифугирования было в 9-11 раз меньше белка в расчете на 1 ТЦД₅₀/мл, чем в препаратах, сконцентрированных ПЭГ. После второго этапа очистки, то есть центрифугирования первично очищенных, сконцентрированных в 20-30 раз по объему образцов через слой 36% раствора сахарозы кратность очистки значительно варьировала, но все же возрастала и была более высокой в препаратах, полученных хроматографией, хотя выход вируса был ниже, чем в препаратах после ультрацентрифугирования и концентрирования полиэтиленгликолем. Большие колебания кратности очистки и соотношения миллиграмм белка на единицу ТЦД₅₀/мл можно объяснить различной чувствительностью культур клеток, используемых для определения титра вируса в препаратах и различным качеством исходных материалов.

На третьей стадии очистки, то есть центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (45-48 и 60%) материалов из предыдущих двух этапов, резко увеличивались потери вируса, а следовательно, снижалась кратность очистки, оцениваемая по уменьшению количества белка, приходящегося на одну ТЦД₅₀. Значительные потери инфекционности были на последнем этапе очистки – центрифугировании материалов в линейном градиенте плотности сернокислого цезия. Выход вируса в среднем составлял для препаратов, очищенных хроматографией, полиэтиленгликолем и ультрацентрифугированием 1; 7,6 и 3%, соответственно.

Оценка эффективности использованных методов и этапов очистки по удалению меченных 2-¹⁴C гидролизатом белка белков неинфицированных клеток показала, что в результате первичной очистки и концентрирования вируса удаляется основная масса внесенной метки – 86,5; 84,5 и 72,8%, соответственно, для хроматографии, ультрацентрифугирования и осаждения полиэтиленгликолем. На втором этапе наибольшая очистка (98,8%) достигается для препаратов, первично очищенных хроматографией, значительно меньше – 90%, для первично очищенных полиэтиленгликолем и 95% - центрифугированием. После третьего этапа степень очистки еще возрастает и составляет 99,8; 99,4 и 92% при хроматографии,

ультрацентрифугировании и осаждении полиэтиленгликолем, соответственно. Наибольшее количество примесей остается в препаратах, первично очищенных полиэтиленгликолем. Аналогичное явление отмечено при определении степени очистки от меченных нуклеиновых кислот неинфицированных культур клеток. Различие состоит лишь в том, что при очистке ПЭГом на первом этапе удаляется больше меченных нуклеиновых кислот, чем белков, и степень очистки по этапам возрастает незначительно.

Центрифугирование материалов, полученных сравниваемыми методами после второго этапа очистки, в ступенчатом градиенте цезия показало присутствие значительно большего количества примесей в препаратах после очистки ультрацентрифугированием и полиэтиленгликолем, по сравнению с хроматографией (рис.12 и 13). По данным электронной микроскопии, степень загрязненности препаратов, очищенных ультрацентрифугированием и полиэтиленгликолем, была значительно больше, чем после хроматографии (рис. 14). Эти факты можно объяснить значительной агрегацией препаратов, полученных после очистки ультрацентрифугированием и полиэтиленгликолем, которая возрастает после второго и третьего этапов.

Попытка уменьшить агрегацию и количество примесей в препаратах на второй стадии очистки, то есть при ультрацентрифугировании через слой сахарозы, путем снижения скорости центрифугирования до 18000 об/мин. (40000g) и увеличения концентрации подслаиваемой сахарозы до 45% не привела к желаемым результатам, хотя при этом удельная инфекционность возрастала в 2-3 раза, а потери вируса достигали 79%.

Таблица 20. Показатели сравнительной оценки трех методов первичной очистки и концентрирования вируса оспы овец

Показатели очистки	Методы											
	Ионообменная хроматография				Ультрацентрифугирование				Осаждение ПЭГом			
	Этапы											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	X±m, n=4											
Выход вируса, % от исходного	28,5±7,8	13±4,5	3±0,6	1,1±0,2	73±1,2	71,2±3,3	26,6	3,00	50±3,5	56,5	32	7,6±1,7
Кратность очистки, раз	74,5±8,2	713±286	776±198	615	71	-	49	10,0	8±1,6	31	21	14
Белок, мг/ТЦД ₅₀ ×10 ⁶	10±3,4	1,0±0,45	2,16	3,45	8,2	4,5	7,8	32	94±20	21	14,7	2
% очистки от метки ² 14С гидр. белка клетки	86,5±5,5	98,8±0,7	99,8	x	84,5±5,5	95±5	99,4±0,7	99,1±0,7	72,8±5	90,2±0,8	92±2,5	96±0,65
% очистки от метки ² 14С цитозина клетки	83,7±5,7	98±1,2	99,8±1	99,6	90,5±3,3	94,5±3,3	96,9±2,4	98,2±1	88±3,6	97±1,4	96,3±1	97,4±1,5
Примечание: использовали исходные вирусосодержащие материалы с титром 3,0 – 4,0 lgТЦД ₅₀ /мл (300-4600×10 ⁻⁶ мг белка на 1 ТЦД ₅₀)												

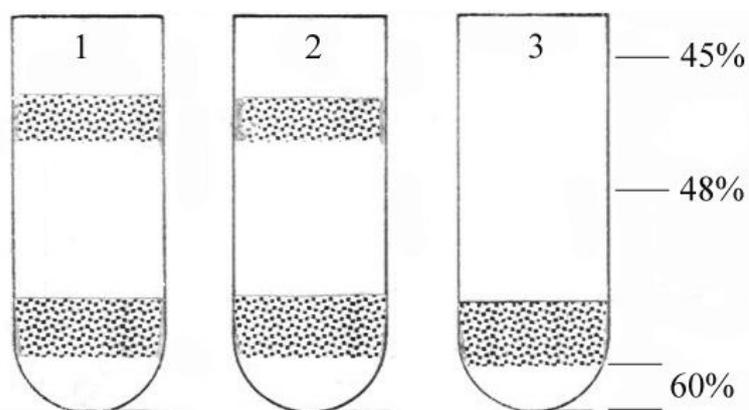


Рисунок 12 – Схематическое изображение центрифужных пробирок после центрифугирования вирусосодержащих материалов, очищенных двумя этапами в ступенчатом градиенте плотности сахарозы при 90000g в течение 45 мин (сахароза в концентрации 45, 48, 60% в объеме 15,12 и 3 мл) (в/о) , 1- ультрацентрифугирование , 2- осаждение ПЭГ, 3 – хроматография.

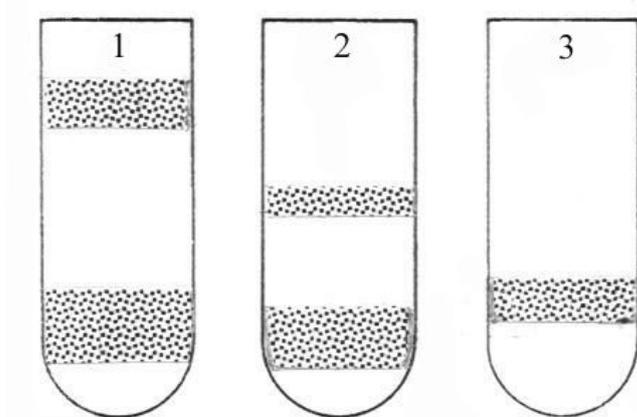


Рисунок 13 – Схематическое изображение центрифужных пробирок после центрифугирования вирусосодержащих материалов, очищенных и сконцентрированных тремя различными методами в линейном градиенте плотности (1,1/1,5 г/см³) сернокислого цезия при 90000g в течение 60 мин , 1- ультрацентрифугирование , 2- осаждение ПЭГ, 3 – хроматография

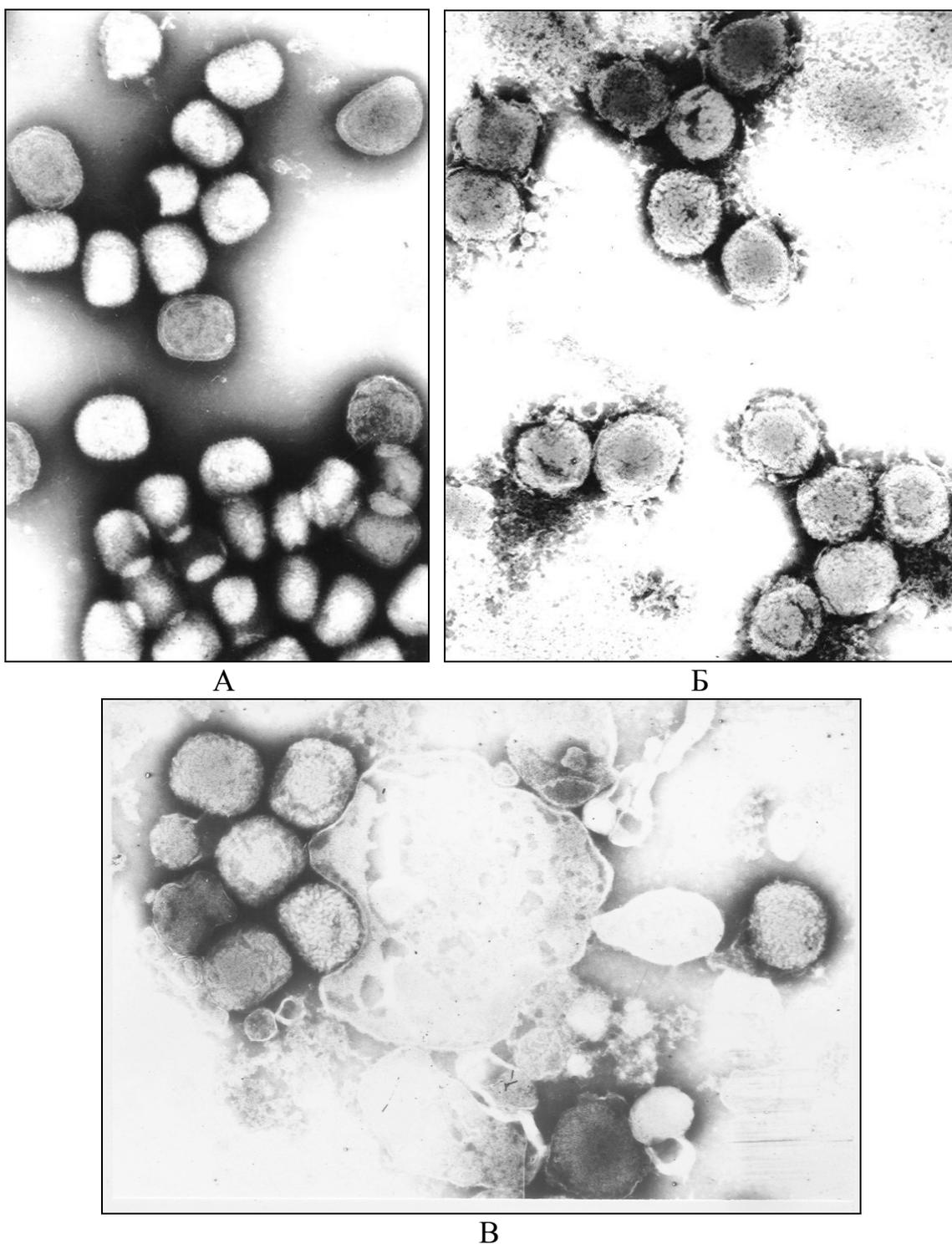


Рисунок 14 – Электронная микроскопия очищенных и сконцентрированных препаратов вируса оспы овец: А - хроматография на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе; Б- ультрацентрифугирование через слой 36% раствора сахарозы; В- осаждение полиэтиленгликолем. x 50000.

Результаты опытов по отработке эффективной и простой схемы очистки показали, что использование препаративной хроматографии на волокнистой ДЭАЭ-целлюлозе не дает стабильного высокого выхода вируса с колонки.

Кроме того, ультрацентрифугирование через слой 36-45% растворов сахарозы мало пригодно в качестве первого этапа при очистке и обработке больших объемов культуральной вирусосодержащей жидкости из-за значительных затрат времени. Процедура с использованием подвесных роторов более приемлема на втором этапе для очистки предварительно сконцентрированного вирусосодержащего материала. В-третьих, концентрирование вируса полиэтиленгликолем имеет существенный недостаток: возникающая при обработке ПЭГом агрегация компонентов суспензии настолько сильна, что все использованные нами последующие этапы очистки оказывались малоэффективными и конечные препараты были в значительной степени загрязнены клеточными компонентами.

Результаты данных экспериментов послужили причиной дальнейшего поиска эффективных способов доочистки препаратов вируса оспы овец, частично очищенных и сконцентрированных полиэтиленгликолем и ультрацентрифугированием.

Учитывая склонность поксвирусов к агрегации и возможности ее снижения, были определены некоторые условия обработки частично очищенных образцов вируса оспы овец ультразвуком и трипсином.

Результаты опытов по обработке вируса оспы овец ультразвуком (табл. 21) показали, что при испытанных режимах озвучивания 10 сек. при частоте 20 кГц и амплитуде 20 (ультразвуковой дезинтегратор MSE-150, Англия) наблюдается достоверное увеличение титра вируса в пределах 0,75-0,5 lgТЦД₅₀/мл, как мы полагаем, вследствие разрушения вирусных агрегатов.

Таблица 21 – Значения титра частично очищенных препаратов вируса оспы овец после ультразвуковой обработки

Кратность обработки	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /мл						Увеличение титра, lgТЦД ₅₀ /мл X±m
	Оп.1		Оп.2		Оп.3		
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки	
10 сек. x3	3,0	3,62	3,0	3,37	2,75	3,25	0,5±0,07
10 сек. x2	3,0	3,5	2,75	3,25	-	-	0,5±0,00
10 сек. x1	4,63	5,62	2,87	3,62	3,0	3,5	0,75±0,08

В связи с тем, что снижение агрегации повышает эффективность очистки, мы попытались уменьшить количество примесей в частично очищенных и сконцентрированных ультрацентрифугированием препаратах вируса оспы овец чередованием ультразвуковой обработки и ультрацентрифугирования через слой 45% раствора сахарозы при 90000g в

течение 45 мин. Однако, степень очистки при этом оказалась незначительной.

В поисках более эффективного метода доочистки препаратов нами был испытан протеолитический фермент трипсин, который эффективно используется в низких концентрациях для очистки вируса осповакцины при ее кратковременной обработке [32,129]. В результате экспериментов было установлено, что трипсин в концентрации 2,5 ед/мл вызывает значительную инактивацию вируса оспы овец в составе культуральной жидкости. В опытах с частично очищенным вирусом были испытаны концентрации фермента от 2,5 до 0,075 ед/мл. Результаты этих исследований (табл.22) показали, что трипсин в концентрациях 2,5 и 1,25 ед/мл значительно снижает титр инфекционности частично очищенного вируса оспы овец. В меньшей степени вирус инактивируется при концентрациях трипсина 0,62 и 0,31 ед/мл.

Таблица 22 – Значения титра инфекционности частично очищенного вируса оспы овец при воздействии трипсина

Концентрация трипсина, ед/мл	Изменение титра, lgТЦД ₅₀ /мл					P
	Оп.1	Оп.2	Оп.3	Оп.4	X±m	
2,5	-2,5	-1	-1,25	2,25	-1,75±0,36	<0,025
1,25	-1,75	-0,25	-0,5	-1,0	-0,87±0,32	<0,1
0,62	-1,0	-0,25	0	-0,25	-0,37±0,21	<0,2
0,31	-0,5	-0,25	-0,25	0	-0,25±0,10	<0,1
0,155	+0,5	0	0	0	+0,12	
0,07	+0,25	0	0	0	+0,12	

Примечание: опыты проведены с эпизоотическим «А» штаммом вируса оспы овец

В то же время под воздействием 0,15 и 0,07 ед/мл фермента вирус не инактивировался, а в отдельных опытах активность вируса незначительно возрастала. Параллельные электронно-микроскопические исследования обработанных препаратов вируса показали, что 2,5 и 1,25 ед/мл фермента обуславливают значительное воздействие на наружную оболочку вирионов с освобождением отдельных внутренних структур. При концентрации трипсина 0,62 и 0,31 ед/мл выщепляются отдельные компоненты наружной оболочки вируса. Более низкие из испытанных концентраций фермента способствуют более четкому проявлению структуры наружной оболочки по сравнению с необработанным контролем (рис.15).

Результаты определения титра инфекционности и электронно-микроскопические исследования образцов вируса оспы после обработки различными концентрациями трипсина показали, что для доочистки частично очищенных препаратов можно использовать этот фермент в концентрации 0,15 ед /мл и ниже.

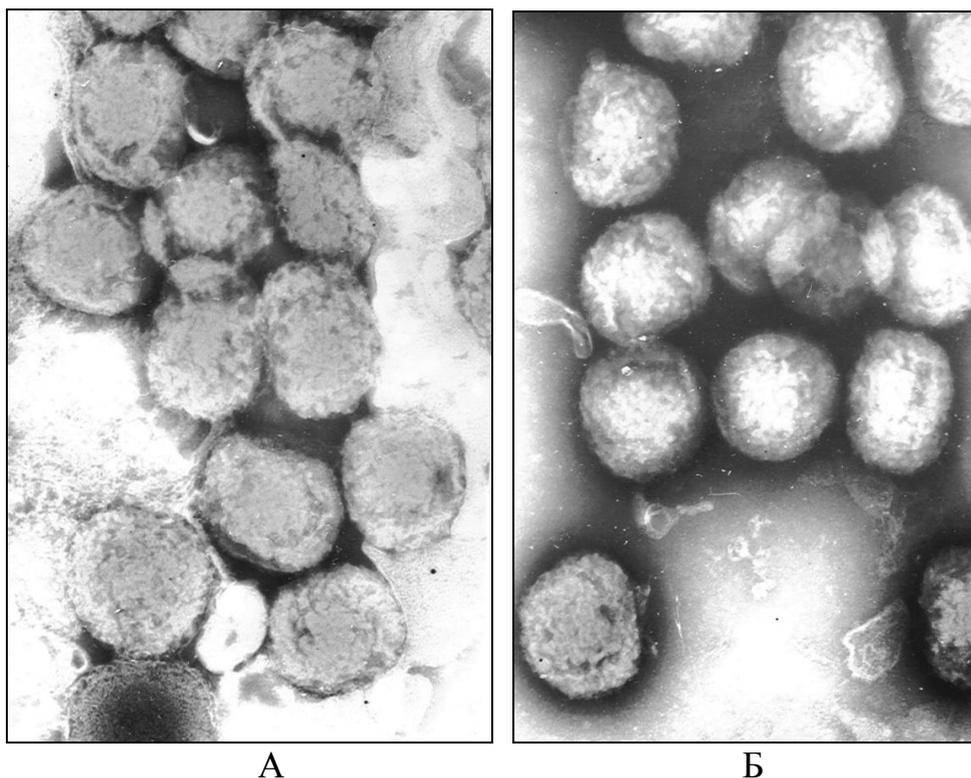
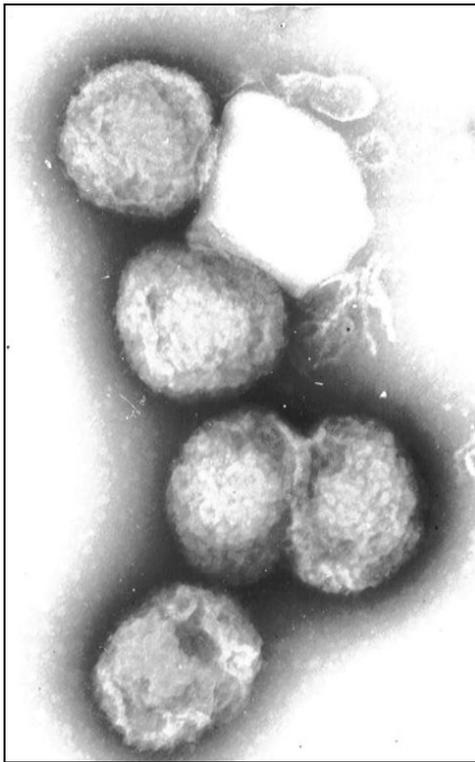


Рисунок 15 – Вирус оспы овец, эпизоотический «А» штамм, после обработки трипсином в концентрациях А-2,5 ед/мл, Б-1,25ед /мл. 60000 х

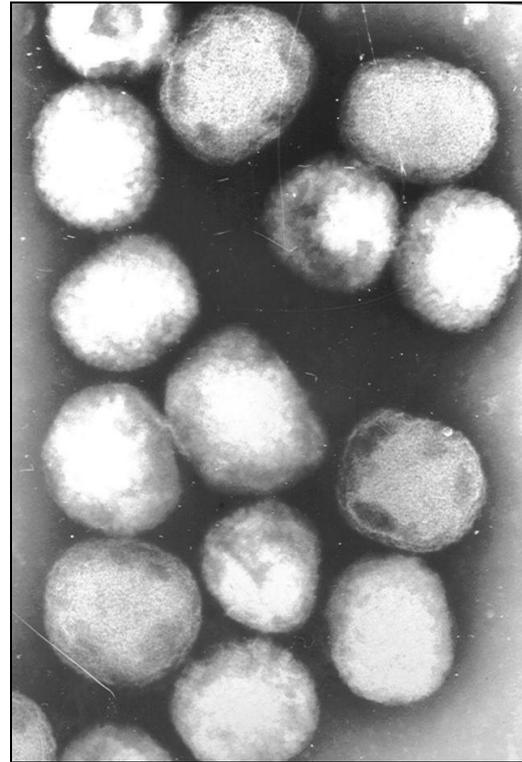
На последующих этапах исследований были определены пределы концентрации белка вирусных препаратов, в которых была эффективна такая концентрация трипсина. В экспериментах использовали концентрации фермента от 1,2 до 0,15 мг/мл. Обработанные ферментом образцы вируса с различной концентрацией белка центрифугировали через слой сахарозы при 90000g параллельно с необработанными контрольными препаратами. При электронной микроскопии суспендированных осадков оказалось, что наименьшее количество примесей клеточных компонентов содержали образцы вируса, обработанные ферментом при концентрации белка в препарате 0,6-0,15 мг/мл (рис. 16).

Полученные результаты показали, что оптимальными можно считать концентрации белка в препарате частично очищенного вируса при обработке трипсином – 0,15-0,6 мг/мл. Фермент и расщепленные низкомолекулярные клеточные компоненты могут быть удалены ультрацентрифугированием через слой 36-45% растворов сахарозы при 90000g в течение 45 мин.

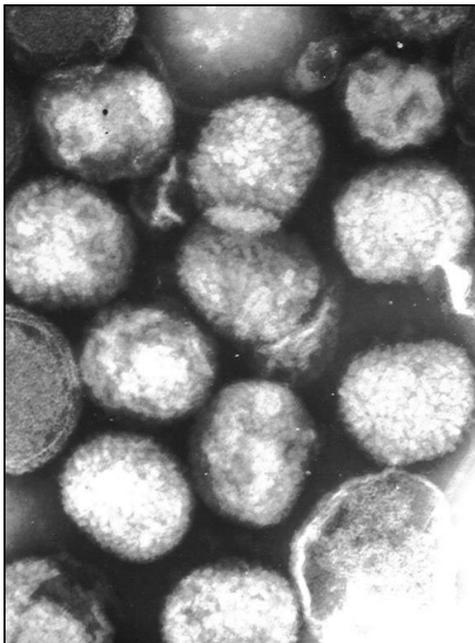
При сравнительной оценке методов первичной очистки и концентрирования вируса оспы овец из культуральной жидкости, следует особо подчеркнуть, что поиск эффективного способа препаративной очистки вируса может быть осложнен такими обстоятельствами, как низкая концентрация вируса в вирусосодержащих жидкостях и загрязненность микоплазменными агентами.



А



Б



В



Г

А – 1,2 мг/мл, Б – 0,6 мг/мл, В – 0,3 мг/мл, Г – 0,15 мг/мл
Рисунок 16 – Электронная микроскопия образцов вируса оспы овец,
обработанных трипсином в концентрации 0,2 ЕД/мл с различным
содержанием
белка в препарате после центрифугирования через слой 45% раствора

. Полученные нами экспериментальные данные определили следующую схему очистки вируса овец из культуральной жидкости:

- Осветление культуральной жидкости (2-4л) центрифугированием при 1080g (2500 об/мин) 20-30 мин.
- Двукратная гомогенизация клеток в деионизированной воде, отделение детрита после каждой гомогенизации центрифугированием 20 мин. при 2000 – 3000g.
- Добавление к осветленной вирусосодержащей жидкости 6% по весу полиэтиленгликоля с м.м. 6000, преципитация 4-12 ч. при 4 °С; отделение осадка центрифугированием 30 мин. при 1080 g, суспендирование осадка в 0,05 М ФБР рН 7,8 в 1/10-1/20 исходного объема.
- Нанесение концентрата на слой замороженного 36% (в/о) раствора сахарозы и центрифугирование после его оттаивания 45 мин. при 90000g.
- Суспендирование осадков в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,8 (180-300 мкл), температура 37 °С, добавление трипсина 0,15-0,07 ЕД/мл, контакт 20-30 мин.
- Разлив материала в центрифужные пробирки на слой замороженного 36-45% раствора сахарозы на STE буфере. Центрифугирование после оттаивания раствора сахарозы 45 мин при 90000g.
- Суспендирование осадков в мл 0,05 М ФБР, рН 7,8 или STE, ультразвуковая обработка 10 сек.2 при частоте 20 кГц и амплитуде 20 при 0°С.
- При необходимости повторное осаждение через слой 45% (в/о) раствора сахарозы.

Результаты опытов по испытанию представленной схемы очистки вируса овец из культуральной жидкости (табл.23 –25) показали ее эффективность.

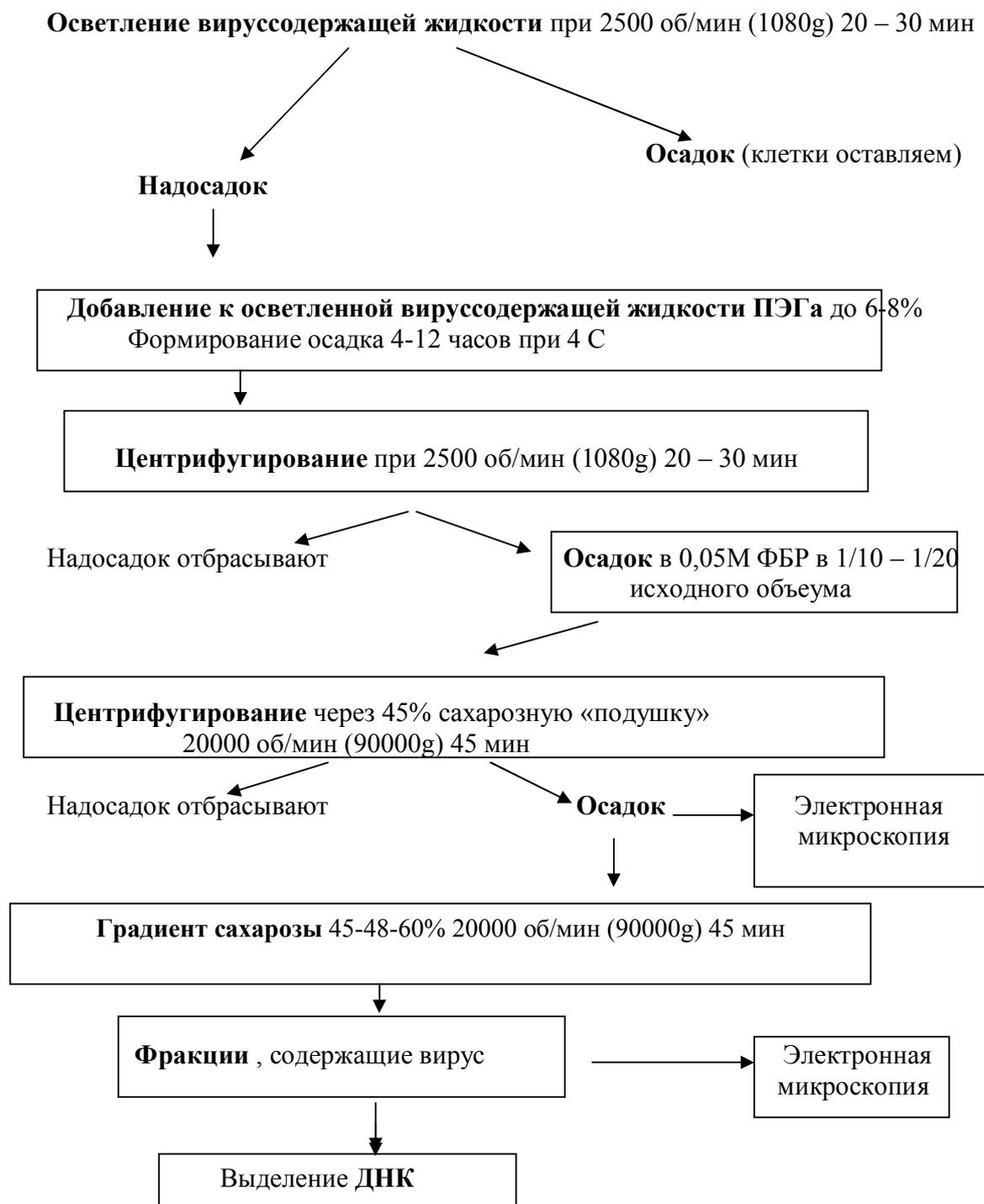


Рисунок 17 – Схема очистки вируса оспы овец из культуральной вирусосодержащей жидкости

Таблица 23 – Показатели очистки и концентрирования эпизоотического «А» штамма вируса оспы овец, выращенного в культуре клеток почки ягненка (ПЯ).

№ п/п	Характеристика препарата											
	Этап очистки	Объем, мл	Титр lgТЦД ₅₀ /мл	Всего ТЦД ₅₀ ×10 ⁸	Выход вируса, % от исход.	Концентрац. белка, мг/мл	Всего белка, мг	% очистк. по белку	$\frac{\text{ТЦД}_{50} \times 10^5}{\text{мг белка}}$	Кратн. очистки	Всего расп./мин. ×10 ⁶	% очистк. от метки
0	Исходная культуральная жидкость	2100	5,25	3,73	100	2,6	5460	100	0,7	-	7,13	0
1	Концентрир. ПЭГом и Ультрацентрифугирование	400	5,87	3,12	83,6	0,15	60,0	98,9	49	70	1,12	84,3
2	Обработка трипсином	400	5,87	3,12	83,6	-	-	-	-	-	-	-
3	Ультрацентрифугирование	30	7,0	3,0	80,4	0,5	15,0	99,8	200	285	0,085	98,8
4	Обработка ультразвуком, повторное ультрацентрифугирование	27	6,87	2,0	53,6	0,18	4,86	99,9	420	600	0,058	99,2
Примечание: 1 Удельная радиоактивность экстракта клеток ПЯ ,меченных ¹⁴ C-гидролизатом белка, 1,08×10 ⁶ расп.мин. ⁻¹ /мг белка 2 Чистота конечного препарата, определенная методом изотопного разбавления, - 99%												

Таблица 24 - Показатели очистки и концентрирования вакцинного «НИСХИ» штамма вируса оспы овец, выращенного в культуре клеток ПЯ

№ п/п	Характеристика препарата											
	Этап очистки	Объем, мл	Титр lgТЦД ₅₀ /мл	Всего ТЦД ₅₀ ×10 ⁷	Выход вируса, % от исходн.	Концентрац. белка, мг/мл	Всего белка, мг	% очистк по белку	ТЦД ₅₀ ×10 ⁵ мг белка	Кратн. очистки	Всего расп/мин.×10 ⁶	% очистк. от метки
0	Исходная культуральная жидкость	1550	4,5	4,9	100	3,2	4960	0	0,1	0	4,67	0
1	Концентрирование ПЭГом,	100	5,63	4,2	85,7	3,0	300	94,0	1,42	14	2,3	51,0
2	Ультрацентрифугирование	300	5,0	3,0	61,2	0,135	40,5	99,8	7,4	74	0,7	85
3	Обработка ферментами	300	5,0	3,0	61,2	-	-	-	-	1	-	-
4	Ультрацентрифугирование	20	6,25	3,55	72,4	0,135	2,7	99,95	131	1317	0,022	99,5
5	Обработка ультразвуком, повторное ультрацентрифугирование	22	6,25	3,91	79,8	0,075	1,5	99,9	237	2370	0,004	99,9

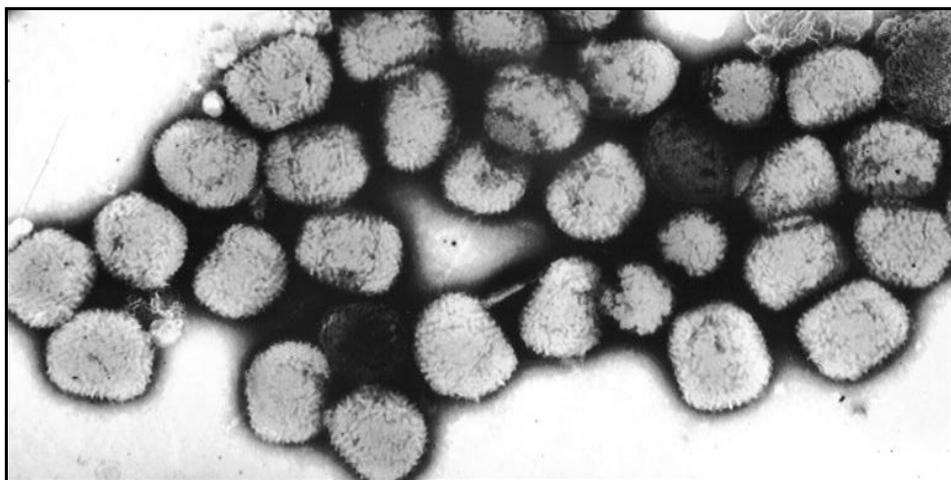
Примечание: 1 Использована вирусодержащая культуральная жидкость без клеток
 2 Удельная радиоактивность экстракта клеток ПЯ ,меченных ¹⁴C-гидролизатом белка, 1,08×10⁶ расп.мин.⁻¹/мг белка
 3 Радиоактивные примеси в конечном препарате, определенные методом изотопного разбавления, - 0,7%

Таблица 25 - Показатели очистки и концентрирования вакцинного «ВГНКИ» штамма вируса оспы овец из культуральной жидкости по стадиям

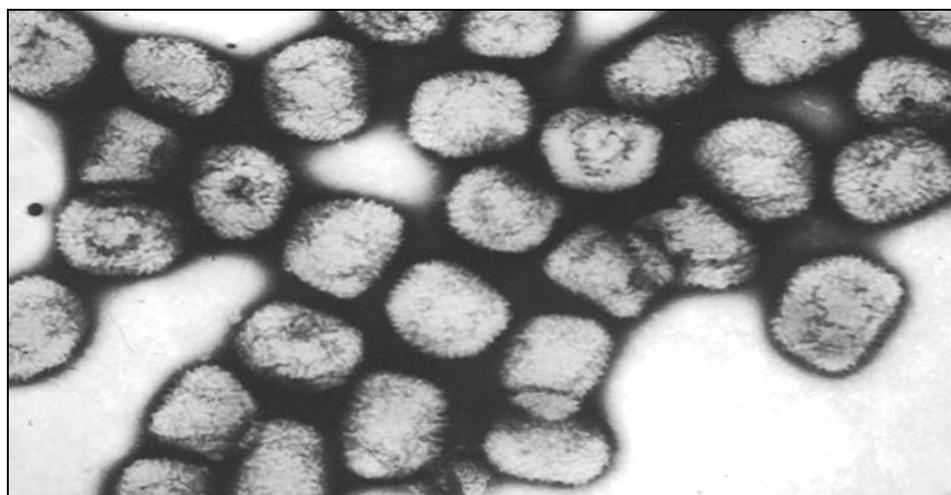
№ п/п	Характеристика препарата											
	Этап очистки	Объем, мл	Титр lgТЦД ₅₀ /мл	Всего ТЦД ₅₀ ×10 ⁷	Выход вируса, % от исход.	Концентрац. белка, мг/мл	Всего белка, мг×10 ³	% очистк. по белку	ТЦД ₅₀ ×10 ⁵ мг белка	Кратн. очистки	Всего расп./мин.×10 ⁸	% очистк от метки 2- ¹⁴ С-гидрол. белка неин.кл.
0	Исходная культуральная жидкость	2000	4,5	6,32	100	2,5	5,0	0	0,126	-	0,5	0
1	Концентрирование ПЭГом	100	5,67	4,7	74,3	7,5	0,75	85	0,623	4,9	0,135	73
2	Ультрацентрифугирование	300	5,25	5,33	84,3	0,4	0,12	97,6	4,445	35,3	0,065	87
3	Обработка ферментами	300	4,75	1,68	26,0	0,4	-	-	-	-	-	-
4	Ультрацентрифугирование	30	5,25	1,27	20,0	0,4	0,012	99,76	4,445	35,3	0,0045	99,1
5	Обработка ультразвуком, повторное ультрацентрифугирование	30	5,5	1,68	26,0	0,4	0,012	99,76	14,06	111	0,0022	99,55
Примечание: 1 Удельная радиоактивность экстракта клеток ПЯ, меченных 2 ¹⁴ С-гидролизатом белка, 0,073×10 ⁸ расп.мин. ⁻¹ /мг белка 2 Чистота конечного препарата, определенная методом изотопного разбавления, - 99,5%												

Выход эпизоотического штамма «А» вируса в конечном очищенном препарате составил 53%, а вакцинного штамма «НИСХИ» - 79%. Эффективность многоступенчатой процедуры очистки по удалению белковых примесей, в обоих случаях составляла – 99,9%. В этой связи особо следует подчеркнуть, что резкое повышение кратности очистки является результатом обработки трипсином препаратов, частично очищенных и сконцентрированных на предшествующих двух стадиях.

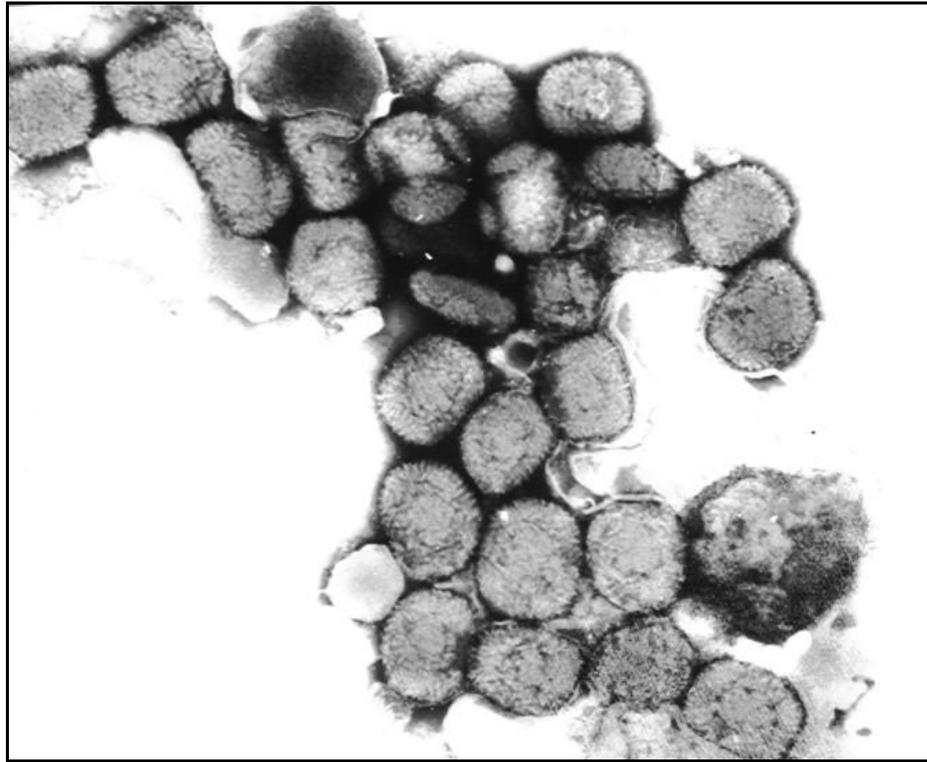
Аналогичные опыты с вакцинным штаммом «ВГНКИ» вируса оспы овец (табл.25) показали, что предложенная многоступенчатая процедура очистки, включающая обработку трипсином в сравнительно низких концентрациях, в данном случае не дала положительного эффекта. Выход вакцинного штамма «ВГНКИ» в конечном препарате составлял всего 20-26% от исходного, вследствие снижения титра цитопатогенного действия на $0,5 \text{ IgTCID}_{50}/\text{мл}$ под воздействием обработки трипсином. Кратность очистки естественно была ниже, чем в опытах с другими штаммами (табл.23, 24,25). Чистота препаратов, определенная методом изотопного разбавления, во всех трех случаях была сравнимой и колебалась от 99,0 до 99,5%. Высокая степень очистки препаратов подтверждена и электронно-микроскопическими исследованиями (рис.17).



а



б

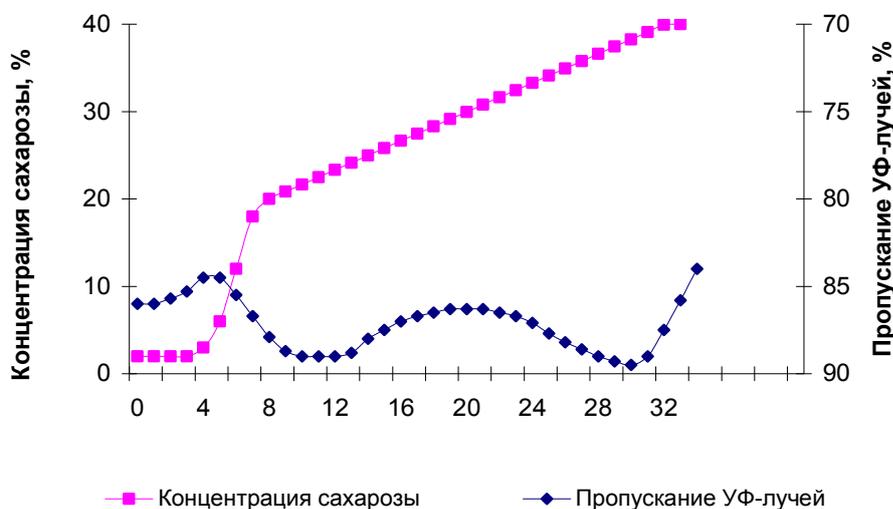


а) штамм эпизоотический «А»; б) штамм вакцинный «НИСХИ»; в) штамм вакцинный «ВГНКИ».

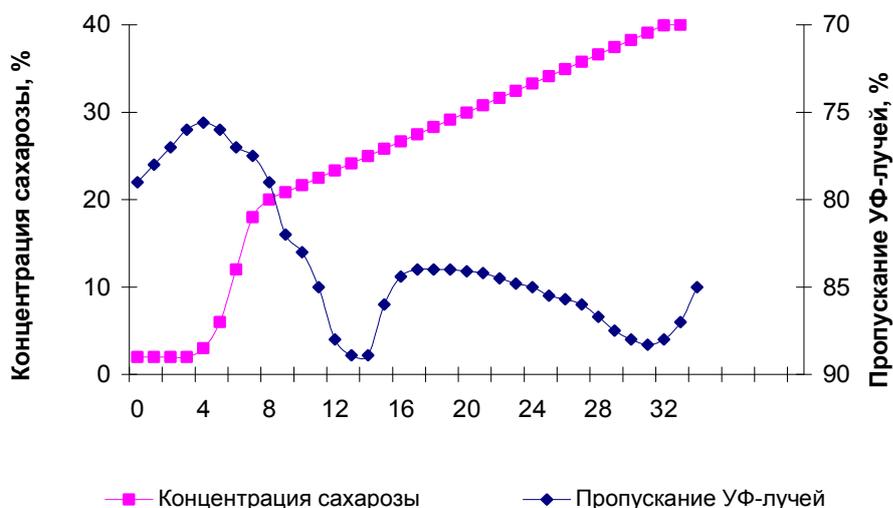
Рисунок 17 - Электронная микроскопия очищенных препаратов вируса оспы овец с использованием этапов преципитации 6% ПЭГом с м.м. 6000, седиментации через слой 45% раствора сахарозы, обработки трипсином (40 мг/мл) и двукратной седиментации через слой раствора сахарозы (45% в/о) при 90000g 45 мин. x 50000

Однако следует отметить, что в процессе такой многоступенчатой очистки присутствует вероятность не полного удаления контаминирующих агентов от очищаемого вируса. Учитывая это обстоятельство и при необходимости, на последнем этапе очистки вируса целесообразно использовать зональное центрифугирование в линейных градиентах концентрации сахарозы. С этой целью были испытаны градиенты емкостью 30 мл с пределами концентрации сахарозы 16-32 и 30-60% (в/в). Время центрифугирования при 6000g составляло 180 мин и 45 мин при 40000 и 90000g. Растворы сахарозы готовили на 0,05 М ФБР, рН – 8,0 и буфере STE, рН – 8,0. Перед градиентным центрифугированием образцы суспендировали в соответствующем буфере и двукратно обрабатывали ультразвуком в течение 10 сек с минутным интервалом. Результаты экспериментов показали (рис.18), что 6000g пик поглощения локализуется в менее плотной зоне градиента, соответствующей 8-16% концентрации сахарозы. Обращает внимание тот факт, что при использовании градиента, приготовленного на ФБР, пик на вершине градиента незначителен, визуальное в этой части градиента не обнаружено заметной опалесценции. При использовании STE

буфера на вершине градиента после центрифугирования препаратов обнаруживали заметную зону опалесценции. При электронной микроскопии



а



б

- а) градиент концентрации сахарозы приготовленный на STE-буфере,
- б) градиент концентрации сахарозы, приготовленный на 0,05 М ФБР

Рисунок 18 - Спектрофотометрия в УФ-свете (280 нм) фракций частично очищенного вируса оспы овец, полученных в градиенте концентрации сахарозы 16-32% центрифугированием в течение 180 мин. при 6000g.

выявлено, что этот пик (рис.19) оптически активного материала обусловлен субструктурами клетки-хозяина: мелкими обломками клеточных мембран, мелкими вакуолями и фибриллами. Основная часть вируса фракционируемых препаратов в обоих случаях оседала на дно пробирки и

локализовалась в нижней трети пробирки (фракции 17-30). Причем в случае центрифугирования препаратов в градиенте сахарозы, приготовленном на буфере STE, осевший вирус был, по данным электронной микроскопии, гораздо чище, чем при использовании 0,05М ФБР.

Для поксвирусов градиент концентрации сахарозы является наиболее приемлемым, поскольку известно, что эта группа вирусов склонна к агрегации в условиях высокой ионной силы, в частности в растворах солей цезия [32,129, 74].

Наши эксперименты с вирусом оспы овец также показали значительную потерю активности после кратковременного центрифугирования в линейном градиенте концентрации сернокислого цезия (табл.20, этап IV).

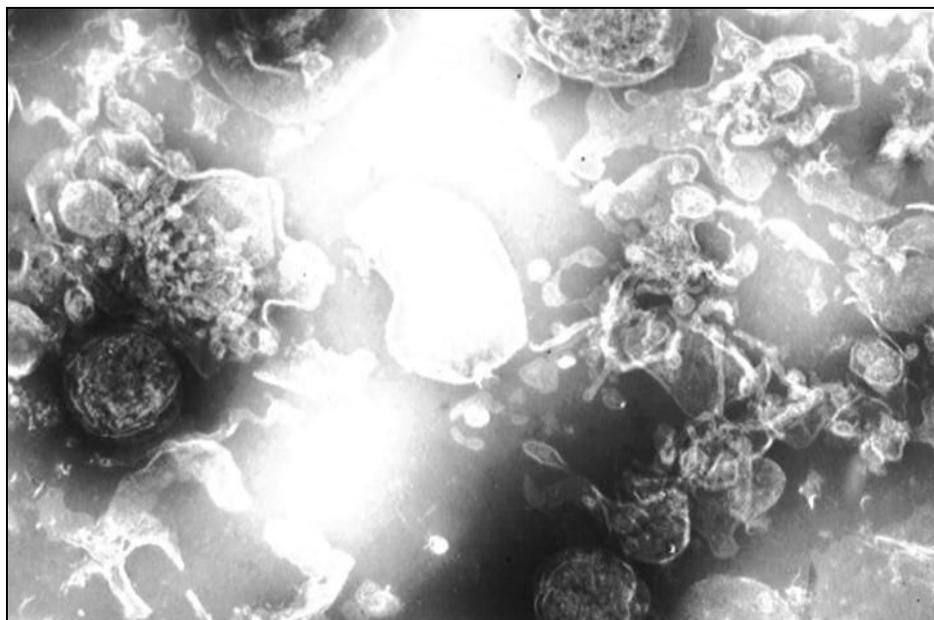
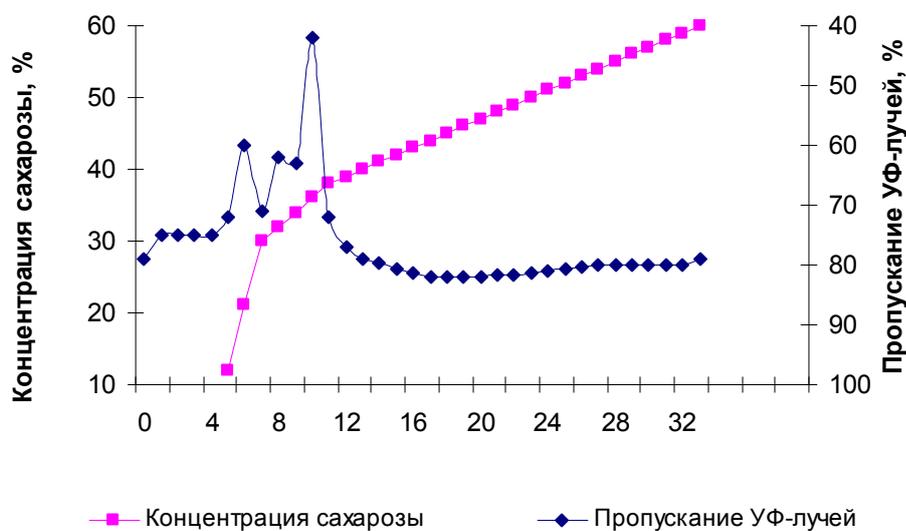


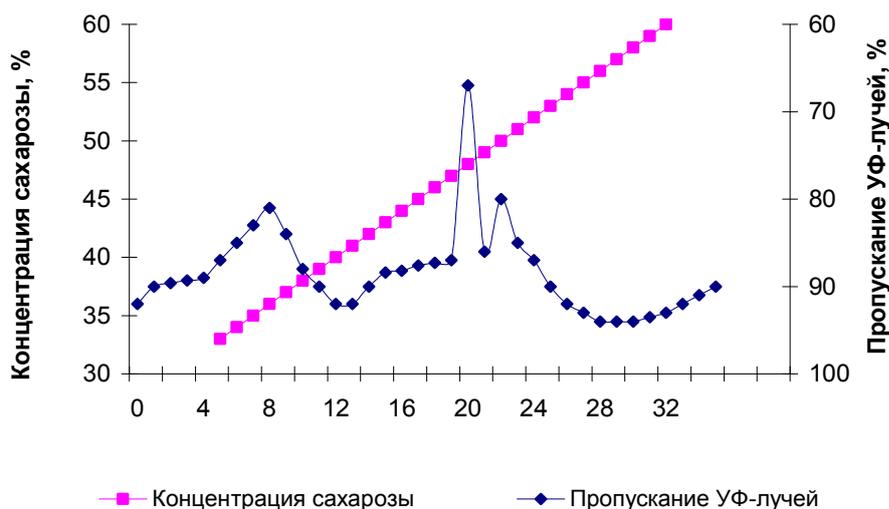
Рисунок 19 - Микрофотография оптически активного материала, локализуемого на вершине градиента при центрифугировании (180 мин. 60000 g) частично очищенного препарата вируса оспы овец в градиенте концентрации сахарозы 16-32%.x 30000

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности очистки от клеточных субструктур частично очищенных препаратов вируса оспы овец при центрифугировании в линейном градиенте 16-32% сахарозы, приготовленном на STE-буфере. Следует упомянуть, что процедура приготовления градиента концентрации сахарозы с пределом 16-32% значительно упрощается, если такой градиент получать путем замораживания и оттаивания 30 мл 26% (в/в) раствора сахарозы на STE буфере в центрифужной пробирке. Ограничивающим на наш взгляд обстоятельством применения центрифугирования в градиенте концентрации

сахарозы при 6000g для доочистки препаратов вируса может быть длительное время центрифугирования. В этой связи с целью доочистки вирусных препаратов можно использовать центрифугирование в течение 45 мин. при 40000 и 90000g в градиенте концентрации сахарозы 30-60% (в/в). Как показали исследования, частично очищенный препарат при 40000 и 90000g разделяется на три фракции оптически активного материала (рис.20). В случае центрифугирования при 40000g верхняя полоса опалесценции располагается в зоне концентрации сахарозы 11-28% ,то есть не входит в градиент, а при 90000g достигает более плотных слоев сахарозы с



а



б

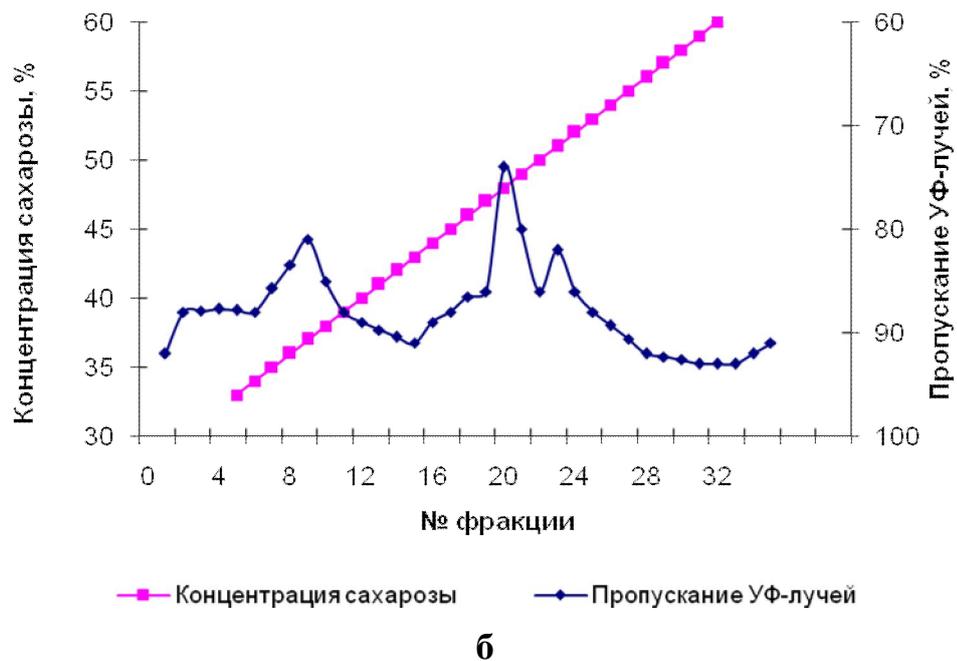
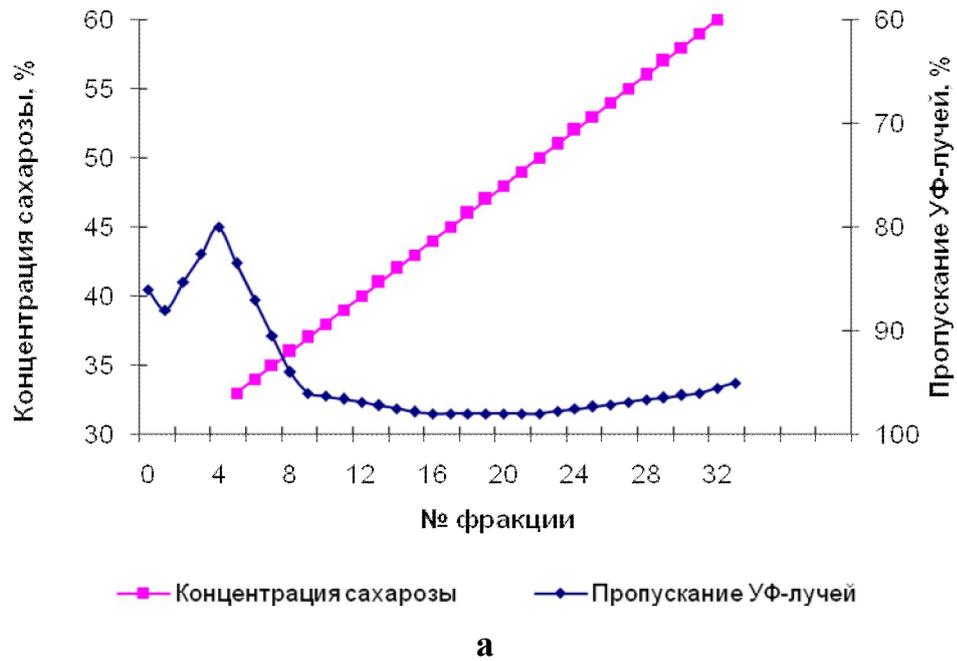
а) 40000 g; б) 90000g

Рисунок 20 - Спектрофотометрия в УФ-свете (280 нм) фракций частично очищенного вируса оспы овец, полученных в градиенте концентрации сахарозы 30-60% центрифугированием 45 мин. при 40000g и 90000g.

концентрацией 32%. В обоих случаях верхняя зона опалесценции не содержала вируса и представляла скоплением мелких обломков клеточных субструктур. В случае центрифугирования при высокоочищенного вируса при 40000g он локализовался во фракциях №№ 7, 8 с концентрацией сахарозы 35-37%. В более плотной зоне (пик III) сосредотачивались агрегаты вируса с примесью клеточных компонентов. Два пика оптической плотности (II и III), обусловленные вирусом и его агрегатами различного размера почти сливались друг с другом и близко располагались к верхнему пику (I), обусловленному компонентами клетки хозяина. При увеличении центробежного ускорения до 90000g вирус перемещался в более плотные зоны сахарозы с концентрацией 42-48%. Все три зоны значительно отделялись друг от друга, особенно верхняя, что обеспечивало возможность свободного отбора вирусосодержащих полос шприцом с иглой без опасения захвата соседней. Полученные в этой серии опытов результаты дают основание считать более предпочтительным при доочистке вируса оспы центрифугирование в линейном градиенте концентрации 30-60% в течение 45 мин при 90000g.

Контрольные опыты с обработкой суспензии неинфицированных клеток ПЯ по схеме очистки вируса оспы овец показали, что в результате этапа центрифугирования в линейном градиенте 30-60% сахарозы концентрируется незначительное количество белка (~2 мг), который при 45 минутном центрифугировании в линейном градиенте концентрации 30-60% сахарозы при 90000g располагается на вершине градиента, а не в зоне расположения вируса (рис. 21). Результаты этих опытов явились веским подтверждением возможности получения высокоочищенных препаратов вируса оспы овец из культуральной жидкости по отобранной схеме с использованием в качестве заключительного этапа центрифугирования в линейном градиенте концентрации сахарозы 30-60% при 90000g 45 мин.

Анализ данных литературы показывает, что наряду с традиционными методами очистки вирусов, базирующимися на зональном центрифугировании в линейном градиенте плотности сахарозы с использованием подвесных роторов, используют центрифугирование в зональных роторах [36, 37, 130, 131, 127, 132]. Использование зональных роторов в практике очистки многих вирусов обусловлено рядом их важных преимуществ перед горизонтальными роторами. Это, прежде всего, высокая разрешающая способность градиента вследствие отсутствия «пристеночного» эффекта в секториальных ячейках ротора, а также его большая емкость, позволяющая получать значительное количество очищенного материала в минимальные сроки. Не маловажное значение имеет стабилизация градиента в течение всей операции низкоскоростным центрифугированием и механизация всех процессов центрифугирования [131,127].



- а) материала после обработки суспензии неинфицированных клеток ПЯ по схеме очистки вируса оспы овец,
- б) очищенного по схеме вируса оспы овец

Рисунок 21 - Спектрофотометрия в УФ-свете (280 нм) фракций частично очищенного вируса оспы овец, полученных в градиенте концентрации сахарозы 30-60% центрифугированием в течение 45 мин. при 90000g.

Обычно в зональных роторах дочищают предварительно очищенные и сконцентрированные материалы [36, 37, 132].

Нами проведены опыты по центрифугированию вируса оспы овец с применением зонального ротора для очистки вируса от балластных белковых веществ без предварительного концентрирования материала (рис.22).

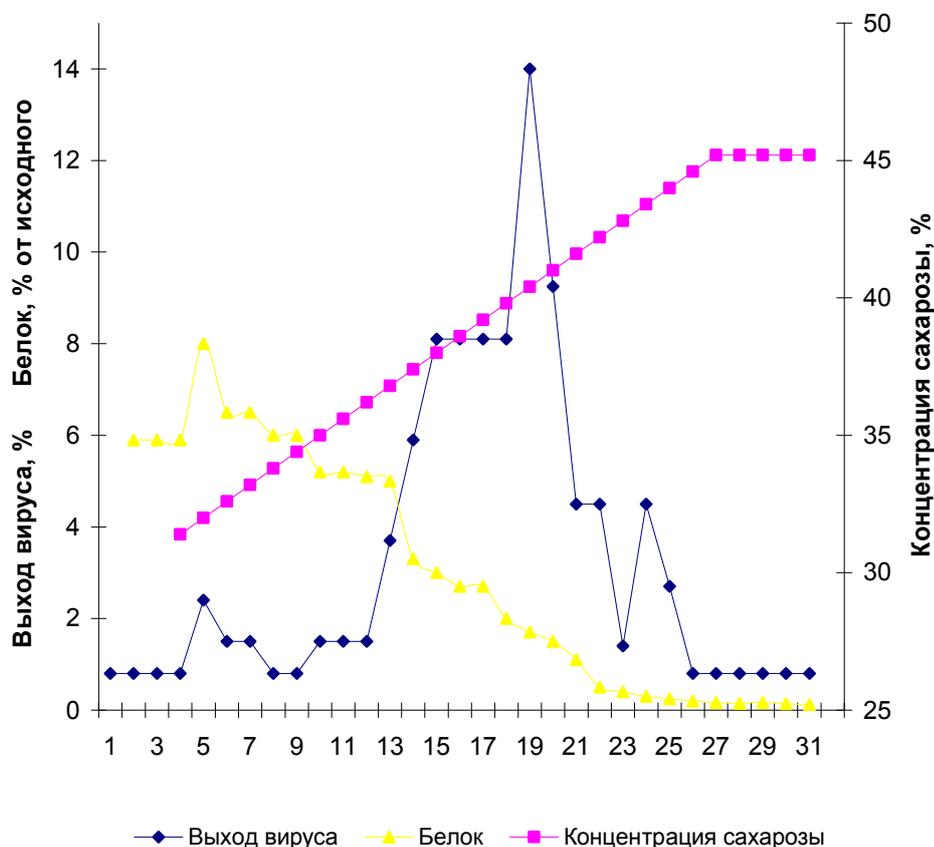


Рисунок 22 - Распределение цитопатогенной активности вируса оспы овец и белка культуральной жидкости по фракциям, полученным в результате ультрацентрифугирования в зональном роторе В XIV в течение 2 часов при 40000g в градиенте концентрации сахарозы.

Результаты опытов показали, что в условиях создавшегося линейного градиента концентрации сахарозы 30-45% в зональном роторе происходит четкое деление материала на две зоны. В легкой части градиента – 30-36% сахарозы локализуется основная часть белка (~80%) внесенной в градиент культуральной жидкости и 24% цитопатогенной активности вируса. В более плотной зоне градиента – 38-42% сахарозы сосредотачивается 76% цитопатогенной активности вируса и 20% белка. Таким образом, в данных условиях однократное центрифугирование в зональном роторе позволяет отделить 80% белка культуральной жидкости от вируса. Степень концентрирования зависит от активности вируса. Использование культуральной вирусосодержащей жидкости с низкой удельной активностью не дает нужного эффекта. Полученные нами результаты дают основание рассматривать зональное центрифугирование в градиенте концентрации

сахарозы, как перспективный метод первичной очистки и концентрирования вируса оспы овец при условии использования высокоактивных исходных вирусосодержащих материалов.

В дальнейших опытах по фракционированию в зональном роторе частично очищенного и сконцентрированного полиэтиленгликолем и ультрацентрифугированием вирусного препарата получено более четкое отделение вируса от клеточных компонентов (рис.23).

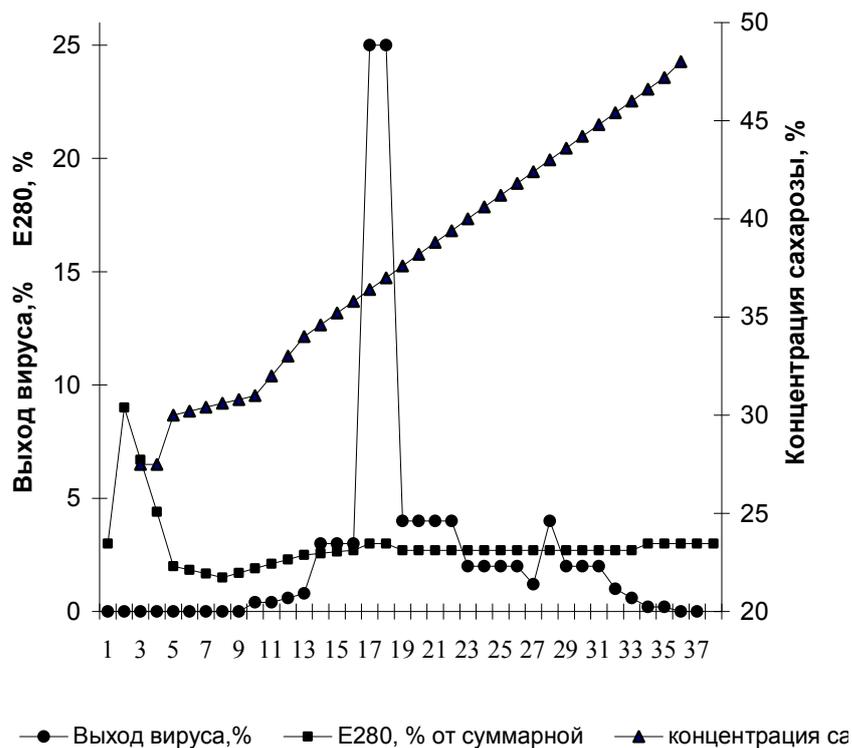


Рисунок 23 - Распределение цитопатогенной активности и оптической плотности по фракциям, полученным после центрифугирования концентрата вируса оспы овец в зональном роторе ВХІV в течение 2 часов при 40000g в градиенте концентрации сахарозы.

Судя по цитопатогенной активности в легкой части градиента сахарозы оставалось 5,6% вируса и 41-45% материала концентрировалось в более плотной зоне сахарозы. В зоне плотности 36-41%, сосредотачивалась основная часть вируса (~70%) и оптически активного материала. Таким образом, при однократном центрифугировании частично очищенного и концентрированного препарата вируса оспы овец в градиенте концентрации сахарозы 32-49% в течение 120 мин. при 40000g в роторе В ХІV эффективность очистки составляла 70%.

По данным электронной микроскопии, фракции с максимальной концентрацией вируса содержали незначительное количество примесей клеточных компонентов (рис.24). Вероятно, и высокая разрешающая способность в зональных роторах линейного градиента концентрации

сахарозы не обеспечивает полное отделение компонентов клетки от вируса оспы овец и в данном случае нужна предварительная обработка трипсином препарата вируса, подлежащего фракционированию.

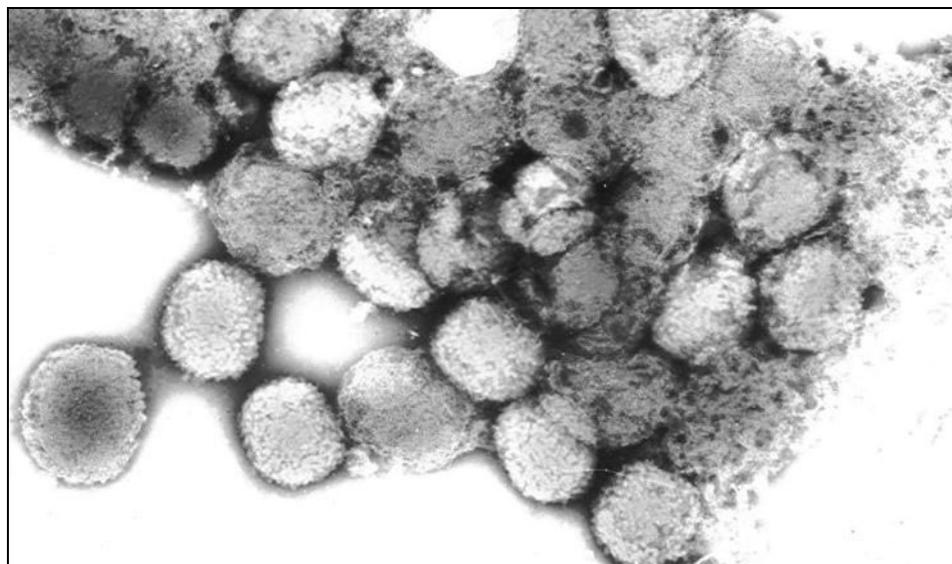


Рисунок 24 - Электронная микроскопия препарата вируса оспы овец из фракций №№ 16-26 с максимальным содержанием вируса, полученного центрифугированием в зональном роторе. x 50000

Отработанная комбинированная схема оказалась эффективной также для выделения, очистки и концентрирования вирусов оспы коз, и оспы верблюдов.

ГЛАВА 3

СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ПОКСВИРУСОВ И ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

3.1 СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ПОКСВИРУСОВ

Многочисленными исследованиями установлено, что в отличие от большинства ДНК-содержащих вирусов животных, жизненный цикл поксвирусов происходит в цитоплазме клетки в значительной степени автономно от ядра. Представители этого семейства располагают ферментативными системами синтеза РНК и ДНК. Инфекционные вирусные частицы в своем составе содержат полную ферментативную систему транскрипции, синтезирующую функциональную мРНК в полиаденилированной, кэпированной и метилированной форме. Это способствует вирусам оспы самостоятельно осуществлять эффективную защиту от ранних специфических реакций на инфекцию и противодействовать развивающимся позже специфическим реакциям, а

также размножаться до высокого уровня, обеспечивающего быструю передачу инфекции другому хозяину. Поксвирусы имеют сложную антигенную структуру и существуют в двух зрелых формах (IMV - внутриклеточный зрелый вирион и EEV -внеклеточный оболочечный вирион), способных вызывать инфекцию в организме хозяина. Внутриклеточные зрелые формы вирионов (IMV) образуются на заключительной стадии морфогенеза вируса имеющие липопротеиновую мембрану, способные обеспечить инфекционный процесс и передачу возбудителя другому хозяину. IMV формы вирионов высвобождаются из инфицированных клеток в процессе их лизиса, а также в процессе почкования вирионов вместе с мембраной клетки хозяина с образованием внеклеточного оболочечного вируса (EEV) [133-136].

Анализ опубликованных данных показал, что многие структурные белки различных представителей поксвирусов имеют близкую функциональную значимость. Наиболее исследованными в этом направлении являются вирусы осповакцины и натуральной оспы. В соответствии со структурой вирионов поксвирусы содержат более 100 полипептидов, входящих в состав 20 белковых групп. Вирионы поксвирусов содержат полипептиды с молекулярной массой от 8 до 200 кД. В вирионах осповакцины методом электрофореза в ПААГе обнаружено более 30 полипептидов из которых 11 полипептидов составляют примерно 85% по массе от всех белков вириона. Содержание остальных 19 полипептидов не превышает 15%. В сердцевине (нуклеоиде) вириона обнаружено 17 полипептидов, остальные 13 обнаружены в составе наружной оболочки [137-139]. Большинство полипептидов поксвирусов обладают иммуногенной активностью. У вируса оспы птиц иммунодоминантной активностью обладают полипептиды с молекулярной массой 37 и 35 кД [140].

В составе белков вируса натуральной оспы мажорными являются полипептиды с молекулярными массами 85 000 и 66 000 кД. Кроме того, содержатся полипептиды с м.м. около 44 000, 35 000, 28 000, 23 000 и 20 000 кД. Установлено, что полипептиды с высокой молекулярной массой образуют поверхностные трубчатые структуры вириона [139,141-144]. Оболочка внеклеточного вириона осповакцины (EEV) предположительно содержит 10 структурных вирусспецифических белков, которые являются поверхностными антигенами, определяющими иммунный ответ организма хозяина. Из них белок A56R представляет собой высоко гликозилированный гемагглютинин вируса с молекулярной массой 86 кД, B5R – гликопротеин с м.м. 42 кД, A33R- гликопротеин с м.м. 23-28 кД, F13L- белок с м.м. 37 кД, A34R- гликопротеин (триплет) с м.м. 22-24 кД, [140,145-153]. Эти белки отсутствуют в мембране внутриклеточных (IMV) вирионов.

Оболочка внутриклеточного вириона (IEV) содержит более семи белков: A27L, A12L, D8L, H3L, G3L, L1R. Белок A27L с мол. массой 14 кД обладает мультифункциональными свойствами, включая прикрепление вирионов к мембране клетки и их фузирование, а также нейтрализующей

активностью [154-156]. Аналогичными функциями обладает белок D8L, имеющий мол.массу 22-24 кД [157]. Белок A12L с мол.массой 25 кД изучен недостаточно. Полипептид A12L синтезируется на поздних этапах морфогенеза вируса при этом происходит протеолиз белка. Однако ясной картины протеолиза и локализации полноразмерного белка не установлено. Вероятно, белок A12L и продукты его протеолиза вовлечены в процесс регуляции морфогенеза вируса [158-159]. Белок H3L с м.м. 35 кД характеризуется как иммунодоминантный антиген оболочки вириона, одна из его функций участие в процессе сборки вириона [160,161]. Оболочечный белок G3L расположен внутри мембраны вируса. Его роль в жизненном цикле вирусвакцины мало изучена. Предположительно G3L регулирует проникновение вируса в клетку, а также воздействует на его морфогенез. Молекулярная масса белка G3L составляет 12,8 кД [162]. Белок L1R по данным литературы играет основную роль в процессе созревания вирионов поксвирусов. L1 представляет собой миристиолированный оболочечный белок, состоящий из 250 аминокислотных остатков. Белок экспрессируется на мембране IMV-форм вирионов в виде консервативного антигена и имеет м.м. в пределах 25 кД [163 - 166].

Полученные за последние годы данные по разработке средств диагностики и конструированию рекомбинантных вакцин против поксвирусов показывают высокую эффективность использования различных комбинаций оболочечных белков, в сравнении с использованием индивидуальных полипептидов [167-172]. Для изучения иммуногенных свойств оспенных вирусов широко используются белки A33R, L1R, B5R, A27L, H3L, D8L, F36R, A56R, A34R. В основном это иммунодоминантные структурные полипептиды оболочки внутриклеточных (IEV) и внеклеточных (EEV) зрелых вирусных частиц [173-182]. Экспериментально установлено, что мыши, вакцинированные антигенами A33R, L1R, A27L и B5R вируса вакцины, приобретают невосприимчивость к поксвирусной инфекции [156,157,167,168,184,185].

В последние годы для дифференциации поксвирусов успешно используют иммунодоминантные белки поксвирусов и их генноинженерные аналоги. Для вируса оспы овец это генноинженерные аналоги полипептидов P17, P18, P32. [171,186]. Установлены белки поксвирусов, связанные с поверхностью мембраны внутриклеточного зрелого вириона и участвующие в формировании дисульфидно-связанного матрикса [181,187-188]. Данные о функциональной роли вирусных белков представляют большую теоретическую и практическую важность, являясь основой в решении таких проблем, как раскрытие механизмов патогенности, получение генетически измененных вариантов вирусов, а также создание специфических средств профилактики и промышленного получения рекомбинантных вирусных белков. С вирионными белками оспенных вирусов связана ферментативная активность возбудителя. С нуклеоидом ассоциировано более 10 ферментов,

участвующих в транскрипции ДНК и модификации информационных РНК. Экспериментально выявлено наличие ДНК-зависимой РНК-полимеразы [93,94,98,99,189], концевой рибоаденилаттрансферазы, нуклеотидфосфогидролазы [100,190-194], протеинкиназы [195-198], ДНК-экзонуклеазы и ДНК-эндонуклеазы [199].

По результатам большого количества экспериментов установлено, что свойства патогенности поксвирусов определяется и регулируется большим набором различных вирусных белков – так называемых факторов вирулентности. Эти факторы разделены на несколько групп. Основные из них белки-модуляторы защитных механизмов хозяина (ингибиторы воспалительных реакций, белки, контролирующие систему комплемента, модуляторы иммунного ответа хозяина, ингибиторы действия интерферона, модуляторы системных эффектов вирусной инфекции на организм). Другая группа, это белки необходимые для распространения вируса в организме и белки обеспечивающие репликацию вируса.

Большинство иммуномодуляторных белков ортопоксвирусов секретируются в зараженных клетках на ранних этапах вирусной инфекции. Потенциально поксвирусам для эффективного подавления воспалительных реакций необходимо иметь несколько генов, белковые продукты которых могли бы воздействовать как ингибиторы различных этапов развития воспаления [179].

Вирусный ген, продукт которого ингибирует развитие воспалительного ответа на инфекцию, был выявлен у вируса оспы коров и назван SPI-2 или *sgmA*. Установлено, что белок SPI-2 является ингибитором клеточной протеазы и играет важную роль в определении патогенных свойств ортопоксвирусов. SPI-2 белок вируса натуральной оспы отличается по аминокислотной последовательности от гомологов вируса оспы обезьян, вируса оспы коров и вирусвакцины, которые имеют минимальные различия между собой [200-204].

Белок фактора некроза опухоли (TNF receptor II) считается одним из факторов вирулентности поксвирусов и определяет развитие генерализованной инфекции, столь характерной для вируса натуральной оспы [205,206].

Белок вирусвакцины (VCP), секретируемый из инфицированных клеток и контролирующей реакции активации комплемента первый идентифицированный вирусный белок. Данный белок состоит из четырех коротких вырожденных повторов (около 60 а.о. каждый, обозначаемых SCR), характерных для семейства белков - регуляторов активации комплемента (RCA). Белок VCP, вирусов натуральной оспы, оспы коров и вирусвакцины содержат четыре SCR [207-210].

Уникальная структура белка VCP выявлена у вируса оспы обезьян. Данный белок вируса оспы обезьян имеет укороченную последовательность с делецией С-концевого SCR 4, что существенно отличает этот вид от других изученных видов [204].

3.2 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СОЙСТВА СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Сведения, касающиеся структуры и функциональной роли белков вируса оспы овец представлены в единичных публикациях. В процессе исследований у вируса оспы овец обнаружено около 33 структурных полипептидов. По электрофоретической оценке в ДСН-буферной системе, их молекулярная масса лежит в пределах от 11 до 150 кД. Электрофорезом в ПААГ выявлены 27 белков с м.м. 15-81 кД. Молекулярные массы отдельных полипептидов составляли: 10, 17, 21, 23, 28, 33, 39, 41, 47, 52, 55, 59, 68, 70,81 кД. При использовании ультрацентрифугирования и иммуноафинной хроматографии из очищенного вируса оспы овец выделены растворимые антигены представляющие белки с молекулярной массой 220, 168, 87.3, 71.5, 52.5, 36.7, 31, 23.4, 18.3 и 14.2 кД. Девять из этих белков проявляли преципитиногенную активность. Пять были идентифицированы как структурные компоненты вирусных частиц. На основе результатов иммуноблоттинга выявлено два полипептида с м.м. 100 и 64 кД с высокой иммуногенной активностью [211 - 214].

Выполненный нами количественный анализ структурных белков вакцинного и эпизоотического штаммов вируса оспы овец и контрольных препаратов поксвирусов с помощью электрофореза и денситометрии полиакриламидном геле очищенных вирусосодержащих материалов показал наличие в 10 % SDS-ПААГе 27 вирусспецифических полипептидов с молекулярными массами от 15,5 до 81 кД, из которых 6-8 полипептидов являются основными структурными белками. Полипептиды с молекулярными массами 85 и 66 кД являются мажорными (табл.26 , рис.25). При использовании градиентного электрофореза (5-20%) количество белков для вируса оспы овец увеличивалось до 44, с молекулярной массой от 10 до 190,5 кД.

В вирионах эктимы овец и оспы верблюдов при использовании 10% ПААГ выявлено 27 полипептидов с молекулярными массами в пределах 15 – 83 кД и 16-87 кД соответственно. Для вирусов эктимы овец, оспы коз и оспы верблюдов (таб.26) эти значения составляли 54- м.м.10,2-170 кД, 37- м.м.15-174 кД и 37- м.м. 11-174 кД соответственно.

Таблица 26 - Электрофоретическая характеристика структурных белков вируса оспы овец, оспы коз, эктимы овец и оспы верблюдов

Вирусы	10% ПААГ		5-20% градиент ПААГ	
	Количество полипептид.	Предел молек.масс, кД	Количество полипептид.	Предел молек.масс, кД
Оспа овец	27	15,5-81	44	10-190,5
Экtima овец	27	15-83	54	10,2-170
Оспа коз	-	-	37	15-174
Оспа верблюдов	27	16-87	37	11-174

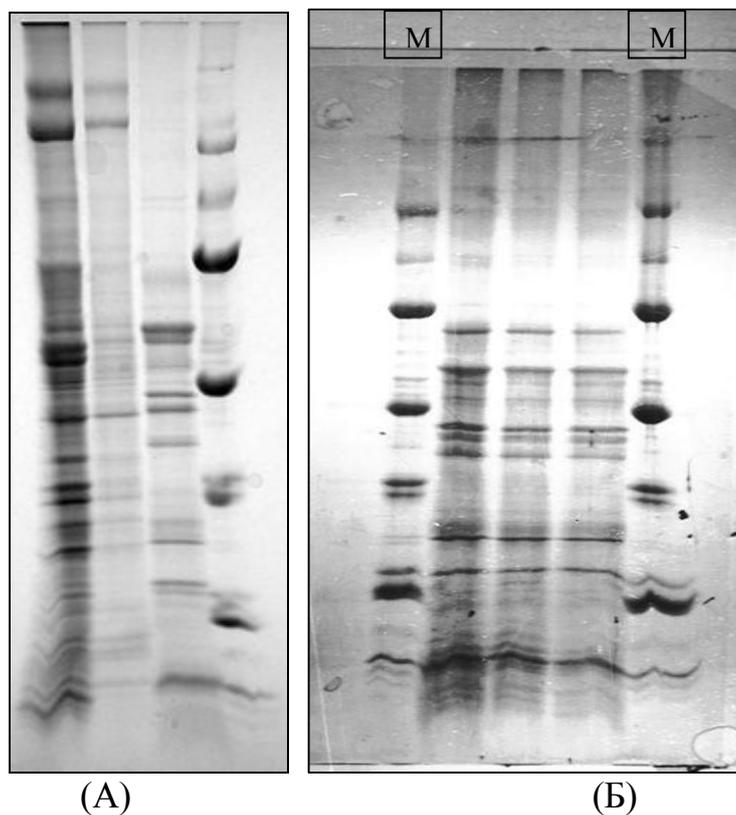
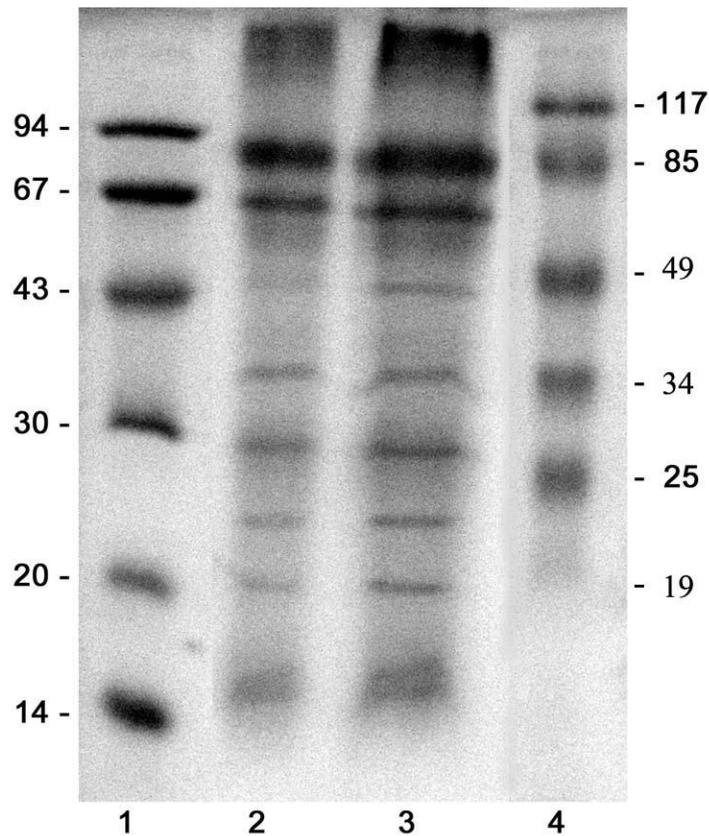


Рисунок 25 - Электрофореграммы структурных белков очищенных препаратов вирусов оспы овец и контагиозной эктимы овец, А- (штамм "НИСХИ"), Б- эктимы овец (штамм "МТМ-НИСХИ"); М-стандарт молекулярных масс "Combitek"

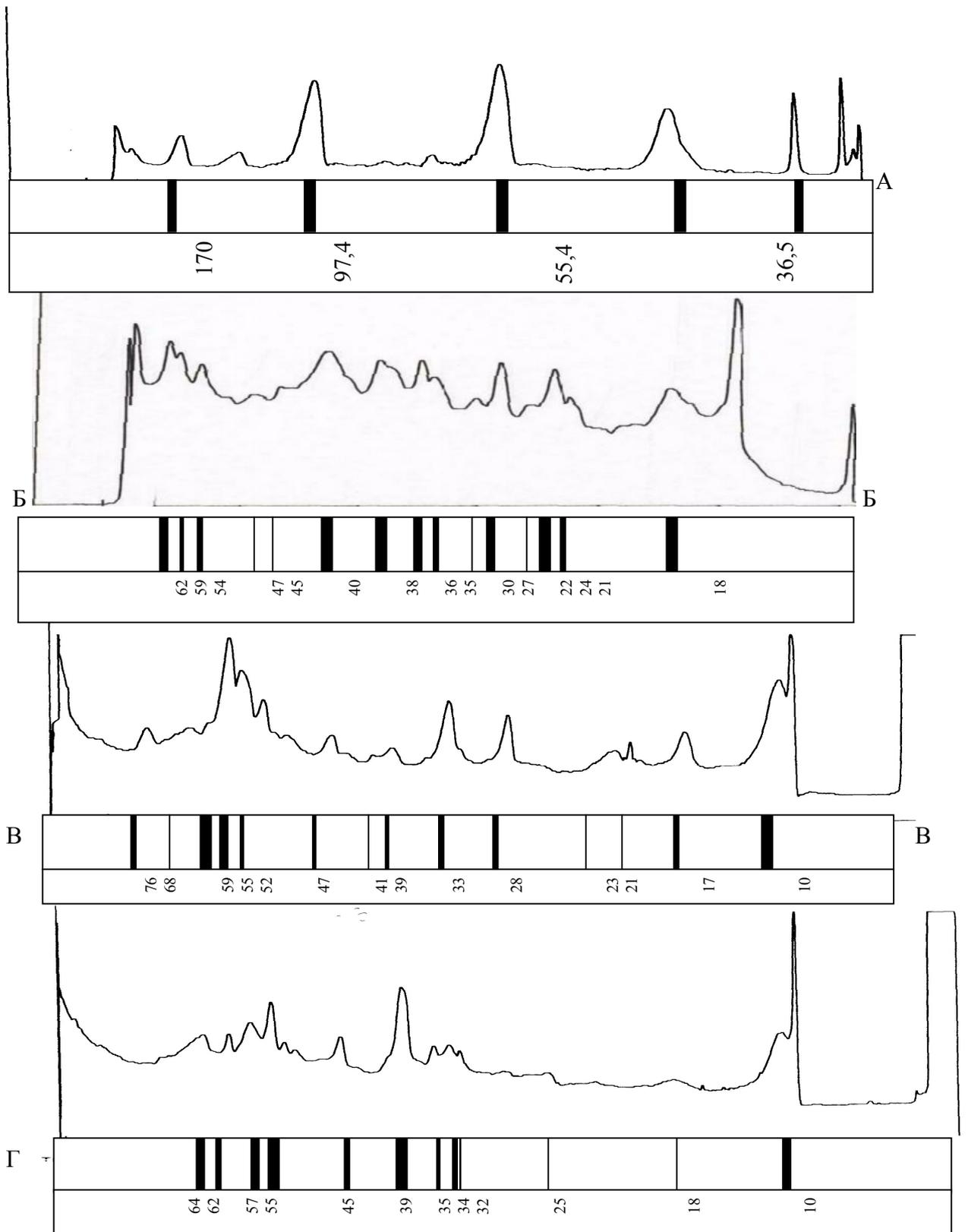


Обозначения: дорожки 1 и 4 – маркерные белки, размеры которых указаны в кД; дорожки 2 и 3 анализируемый вирусный белок -20 и 30 мкг – соответственно.

Рисунок 26 - Электрофоретический анализ в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия белков, содержащихся в очищенном препарате эпизоотического штамма "А" вируса оспы овец.

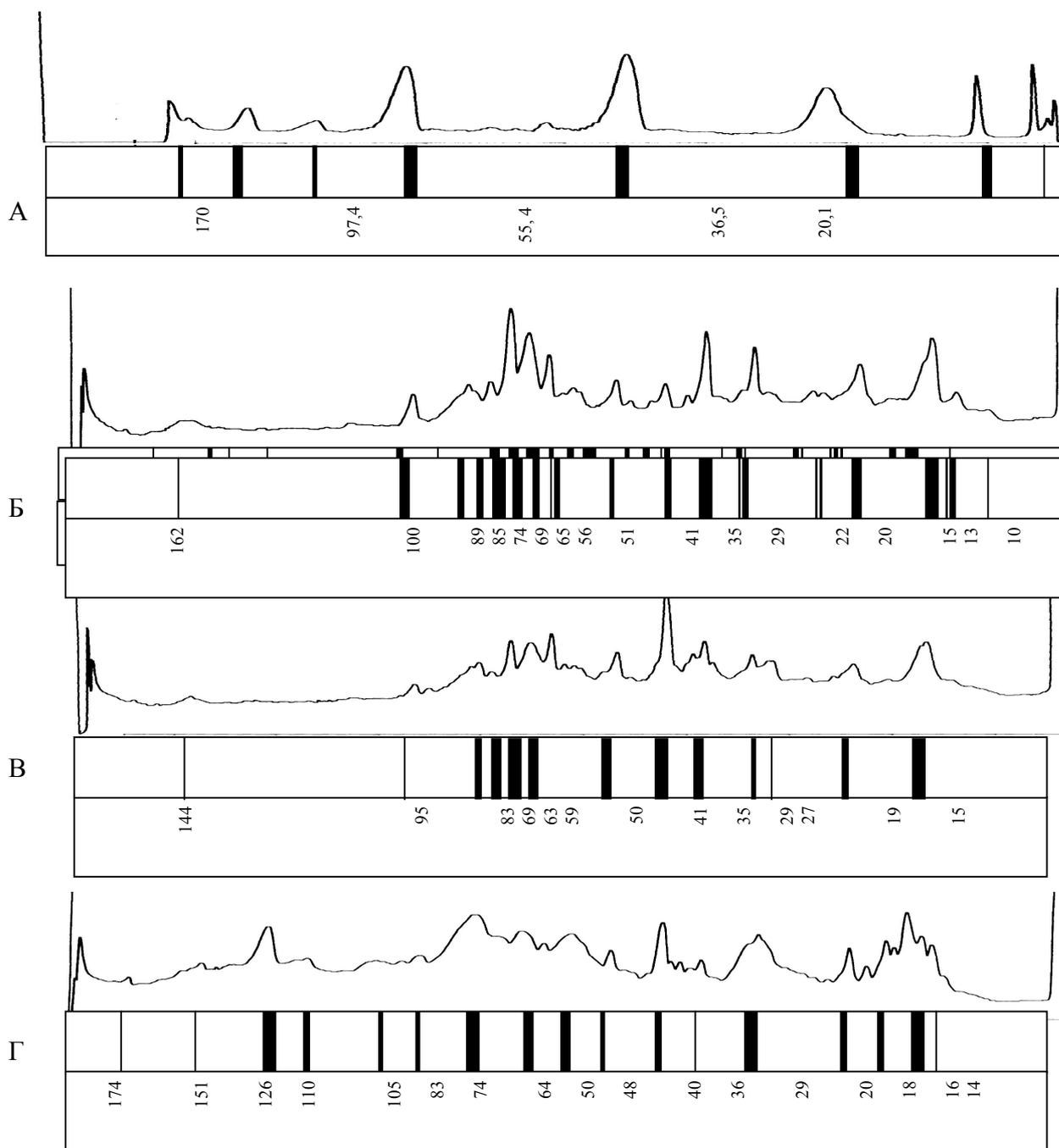
Результаты денситометрии электрофореграмм полипептидов вирусов оспы овец и контагиозной эктимы овец полученных в 10 % геле и 5 – 20 % градиенте ПААГ (рис. 26 и 27) показали, что для вируса оспы овец молекулярные массы в первом случае составляли 10 , 17, 21, 23, 28, 33, 39, 41, 47, 52, 55, 59, 68, 70 кД, во втором случае 10, 13, 15, 20, 22, 29, 35, 41, 51, 56, 65, 69, 74, 85, 89, 100, 162 кД.

Для вируса контагиозной эктимы овец молекулярные массы белков в данных экспериментах составляли: 18, 21, 24, 25, 27, 30, 34, 36, 38, 40, 45, 47, 54, 59, 62 кД и 14, 15, 20, 23, 28, 30, 38, 42, 45, 50, 57, 62, 63, 69, 74, 89, 102, 135, 144, 168 кД соответственно.



Значения м.м. в кД; А – стандарт белков "Combitек"; Б – полипептиды вируса контагиозной эктимы овец; В – полипептиды вируса оспы овец; Г – полипептиды вируса оспы верблюдов

Рисунок 26 – Денситограммы полипептидов очищенных поксвирусов (10%ПААГ).



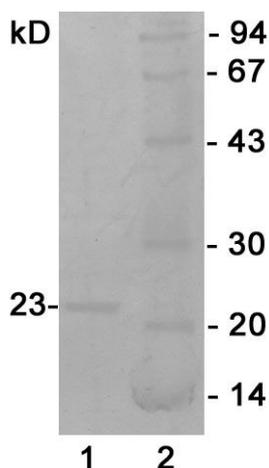
Значения м.м. в кД; А – стандарт белков "Combitek"; Б – ВИРУСА оспы овец; В –ВИРУСА оспы верблюдов; Г – ВИРУСА оспы коз.

Рисунок 27 – Денситограммы полипептидов очищенных поксвирусов (ПААГ 5-20%).

При изучении структурных белков вируса оспы овец наибольший интерес представляют оболочечные белки поксвирусов А33R, В5R, А27L и L1. Данные полипептиды чаще других используются в экспериментах по созданию субъединичных рекомбинантных и ДНК – вакцин [167,215,216]. Гомологом гена А33R осповакцины у вируса оспы овец является ген ОРС122, который имеет длину 650 п.н. и кодирует белок размером 23 кД. Сравнительный анализ генов А33R (VV-COP) и ОРС122 (SPPV-A)

проведенный нами показал 30% идентичность по их аминокислотными последовательностям.

Для определения иммуногенных свойств белка A33R (23 кД) нами проведен иммуноблоттинг белков вируса оспы овец с использованием специфической сыворотки, полученной от иммунизированных лабораторных животных. Результаты показали детектирование полипептида р23 антителами сыворотки (рис.28).



1 –белок вируса оспы овец, 2 – маркерные белки в кД

Рисунок 28– Иммуноблоттинг белков, содержащихся в очищенном препарате вируса оспы овец (штамм “А”).

В последние годы в публикациях ряда авторов представлены данные о функциональной роли некоторых структурных белков различных штаммов (KS-1, InS-1, НИСХИ, “А”, ВНИИЗЖ, Б-5/96) вируса оспы овец. Однако большая часть этих белков до настоящего времени не идентифицирована, также отсутствуют сведения, о кодирующих их генах [217-223].

3.3.МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ ПОКСВИРУСОВ

Как уже сказано выше, для большинства представителей семейства *Roxviridae* содержание мажорных белков лежит в пределах 20 и минорных более 100. Получение отдельных структурных белков поксвирусов до настоящего времени является трудной проблемой в силу сложности строения вириона, большого количества белков, входящих в его состав, а также их способностью к солюбилизации. Представленные различными авторами данные показывают низкую солюбилизирующую активность белков поксвирусов. Полная солюбилизация достигается лишь при нагреве белков до 100 °С в присутствии ионных детергентов (додецилсульфата натрия,

дезоксихолата натрия) в комплексе с восстанавливающими агентами [139,224,225].

Получение структурных полипептидов из очищенных препаратов поксвирусов с использованием методов и схем, применяемых для выделения и очистки белков других семейств вирусов не дает желаемых результатов. Методы ионообменной хроматографии, гельфильтрации на сефадексах и ультрафильтрации используют лишь для получения суммарных препаратов оболочечных и коровых белков поксвирусов. Эффективность получения отдельных структурных белков значительно возрастает при использовании белков инфицированных вирусом клеток, так как в таких препаратах содержится большое количество полипептидов, в число которых входят как структурные, так и неструктурные белки. Кроме сильных ионных детергентов для солюбилизации препаратов вирусов наиболее часто используют анионные детергенты Triton X-100 , NP-40 , твины, октиглюкопиранозид и другие реагенты в различной концентрации [140,141,143,226-231].

Кроме перечисленных, для выделения отдельных структурных белков широко используют метод электрофореза. Вирусные полипептиды фракционируют в полиакриламидном геле в концентрации 11-13% в присутствии додецилсульфата натрия, который позволяет охватить значительный диапазон молекулярных масс структурных белков возбудителя. С помощью одномерного электрофореза удастся выявить 30-60 полипептидных полос и определить их молекулярные массы. При использовании двумерного электрофореза количество обнаруживаемых полос полипептидов возрастает до 100. В экспериментах, как правило, используют очищенный и концентрированный вирус, после обработки детергентами, протеиназами, мочевиной или липорастворителями [74,116,232-235]. Полипептиды из полос акриламидного геля могут быть выделены в чистом виде путем электроэлюции и использованы в качестве антигена для получения моноспецифических сывороток, а также их идентификации и изучения иммунобиологических свойств. В последние годы для изучения функциональной роли и идентификации отдельных белков поксвирусов успешно используют рекомбинантные аналоги полипептидов, иммуноблоттинг и метод масс спектрометрии [150, 224, 225, 235-239].

ГЛАВА 4.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

МОРФОГЕНЕЗА ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

4.1 РЕПЛИКАЦИЯ И МОРФОГЕНЕЗ ПОКСВИРУСОВ

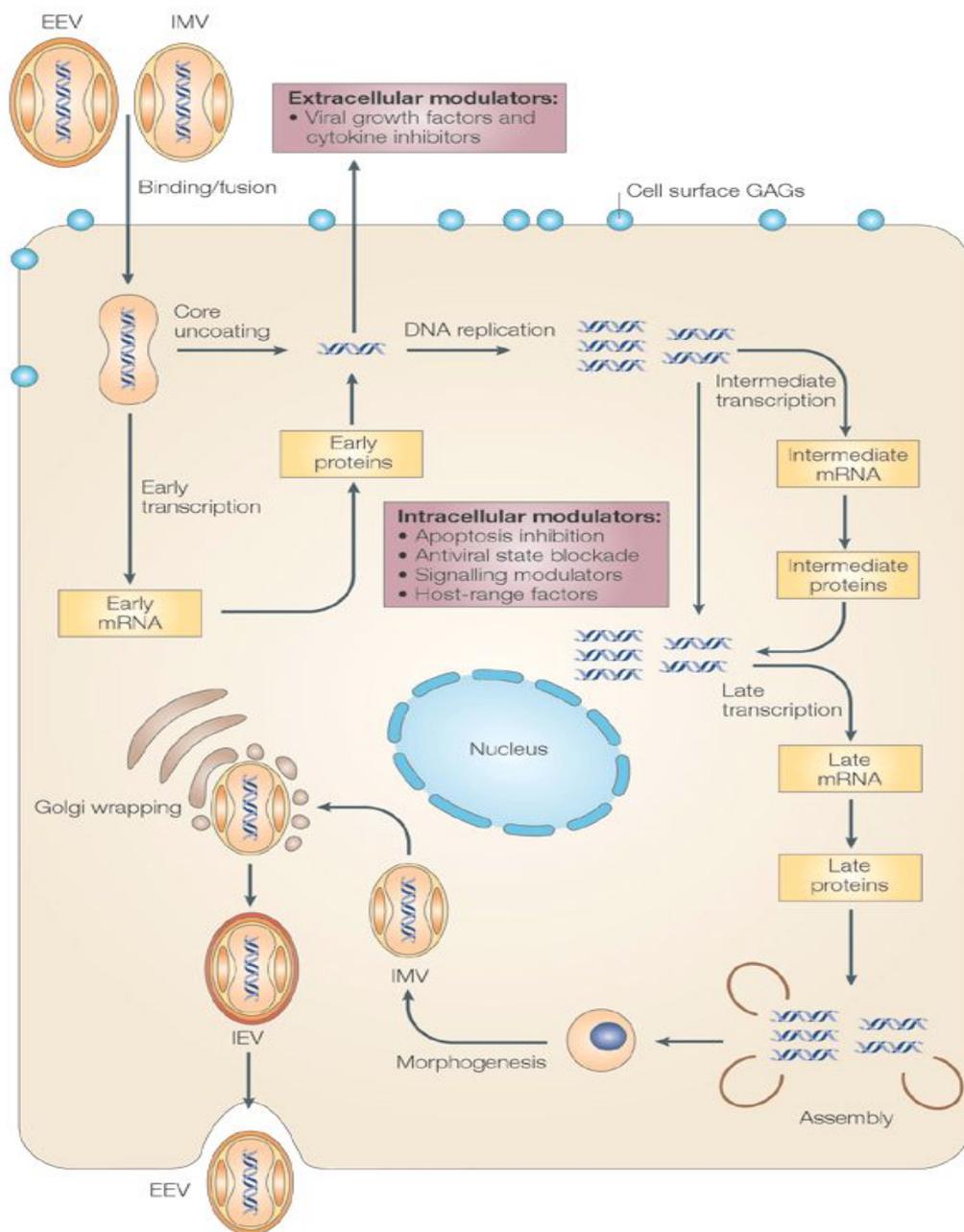
Поскольку геном поксвирусов сам по себе не инфекционный, для репликации вируса необходим комплекс вирусной транскрипции.

Поксвирусы имеют собственную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, которая обеспечивает считываемость более половины вирусного генома в течение начальной и ранней стадий. После проникновения внутрь клетки хозяина комплекс транскрибирует большой набор ранних генов в мРНК. Трансляция ранних мРНК продуцирует белки вовлеченные в процессы блокирования антивирусного ответа клетки хозяина, репликации ДНК и транскрипции промежуточных генов. Транскрипция промежуточных генов начинается только после репликации ДНК. Промежуточные гены кодируют белки - факторы транскрипции поздних белков, инициирующие транскрипцию белков вириона [240-242].

В культуре клеток продолжительность цикла репликации зависит от вируса, типа культуры клеток и множественности инфицирования. Например, вирусвакцина инициирует репликацию ДНК и продуцирует новые вирусные частицы уже через 6 и 8 часов соответственно. Репликация ДНК нуждается во многих факторах, многие из которых остаются неясными. Таковыми являются процессы сборки вирионов и их покрытие мембраной. Существует предположения, что вирусвакцина образует четыре типа вирионов, различающиеся по плотности, структуре, локализации и роли в жизненном цикле вируса. При исследовании ультратонких срезов инфицированных клеток выявлено, что частицы внутриклеточного вируса не имеют четко выраженной мембраны и высвобождаются из клеток в процессе лизиса. Некоторые зрелые вирионы окружены двойным слоем внутриклеточной мембраны и формируют внутриклеточный оболочечный вирус. Эта мембрана содержит как минимум семь кодирующихся полипептидов. Благодаря микротрубочкам внутриклеточный оболочечный вирус мигрирует к периферии клетки, где сливается с плазматической мембраной. Это слияние образует на поверхности ассоциированный с клеткой оболочечный вирус, который затем выходит наружу при помощи роста нитей актина. Ассоциированный клеткой оболочечный вирус в дальнейшем высвобождается из клетки с образованием внеклеточного оболочечного вируса. Все формы вируса, играют большую роль в распространении вируса в культуре клеток и организме хозяина, а также в вирулентности возбудителя [177,182,243-251].

На представленной ниже схеме McFadden G.(Nat.Rev.Microbiol.2005,3,Р.201-213) показан полный цикл репликации и морфогенез поксвируса. Отмечены три инфекционные формы вирионов: IMV-зрелый, внутриклеточный, не содержащий поверхностной мембраны, IEV – зрелый, внутриклеточный, с поверхностной мембраной и EEV – зрелый, внеклеточный. После проникновения и раздевания вирионов в цитоплазме клетки транскрибируются ранние гены вируса. Образовавшихся продукты ранних и промежуточных генов включаются в поддержку репликации вирусной ДНК и модуляцию процессов в клетке. На поздних этапах процесса продукты генов направлены на сборку вирусных частиц в фабриках вирусов (виропластах).

Полный цикл репликации и морфогенеза поксвирусов показан на схеме McFadden G. Nat.Rev.Microbiol.2005,3,P.201-213.



Nature Reviews | Microbiology

Схема полного цикла репликации и морфогенеза поксвируса по McFadden G. Nat.Rev.Microbiol.2005,3,P.201-213

4.2 МОРФОГЕНЕЗ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Проведенные нами исследования ультратонких срезов культуры клеток почки ягненка (ПЯ) через 5-10 мин после внесения вирусосодержащего материала показали, что вирусные частицы обнаруживаются как вблизи клеток, так и на их поверхности (рис. 29) Адсорбировавшиеся вирионы на плазматической мембране и вне клетки имеют размеры 150-200x250-275 нм. У вирионов хорошо просматривается оболочка и нуклеоид. В месте контакта вирусных частиц с клеткой плазматическая мембрана слегка вогнута, что говорит о начале фагоцитоза. Не смотря на сравнительно высокую множественность заражения, адсорбция вируса происходит неравномерно. На отдельных срезах можно наблюдать находящиеся рядом клетки, причем на одной из них процесс адсорбции вируса происходил интенсивно, а на другой вирусные частицы не наблюдались. Неравномерность процесса адсорбции наблюдается даже в пределах одной клетки.

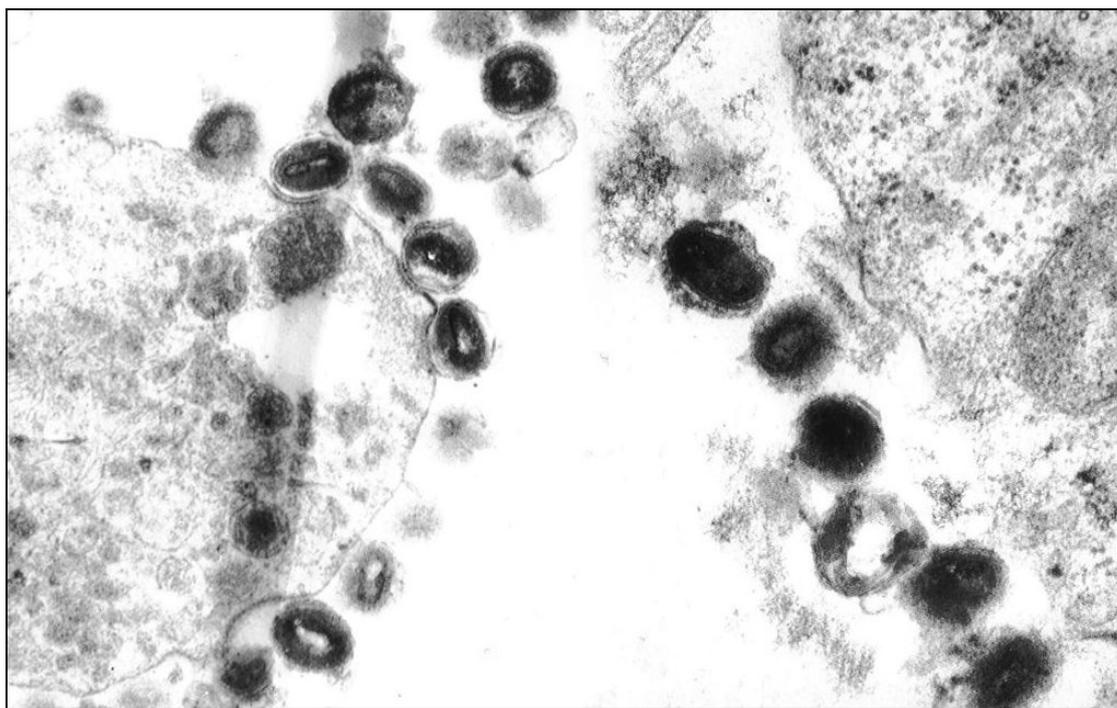


Рисунок 29 - Срезы культуры клеток ПЯ через 10 мин после заражения вирусом оспы овец, штамм «А» эпизоотический. x 50000

Очевидно, что процесс адсорбции в значительной степени зависит от функционального состояния клетки. При исследовании срезов культуры клеток через 15-30 минут после заражения прослеживались отдельные этапы проникновения вирионов в клетку (рис.30).

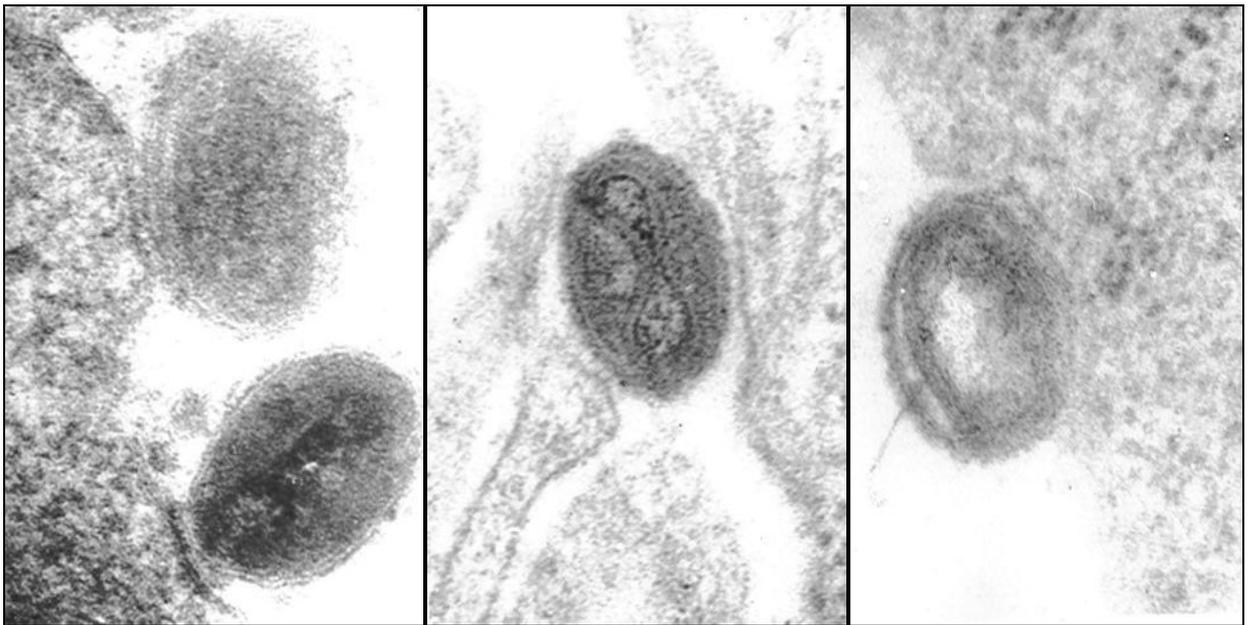


Рисунок 30 - Культура клеток ПЯ через 30 мин после заражения. Этапы проникновения вируса оспы овец. x 100000

Процесс проникновения начинается с инвагинации тех участков плазматической мембраны, на которых адсорбированы вирусные частицы. Эти участки постепенно обособляются, образуя вакуоль с заключенными в ней вирионами, одновременно с процессом погружения вакуоли внутрь цитоплазмы клетки, наблюдается постепенная деструкция мембраны вакуоли и дезинтеграция содержащихся в ней вирионов.

Находящиеся в вакуоле вирионы не имеют четко выраженной оболочки и других структурных компонентов. Несмотря на большое количество исследованных срезов, нам не удалось наблюдать стадию полной деструкции вириона и выход структурных компонентов в цитоплазматический матрикс. Очевидно, данный этап составляет небольшой промежуток времени и кроме того, маскируется структурами самой клетки. Следует также отметить, что помимо фагоцитоза вирус оспы овец проникает в клетку в процессе обволакивания клеткой части частиц, находящихся в лакунах и вакуолях клетки (рис.31,32).

Путь проникновения вируса оспы овец в клетку также возможен в процессе слияния граничащих участков цитоплазматической мембраны клеток и через межклеточные каналы. Первые признаки развития инфекции в культуре клеток нами отмечены только через три часа после заражения. В этот период в отдельных клетках можно было наблюдать появление небольших зон цитоплазмы с повышенной электронной плотностью, отсутствующих в контрольных препаратах.

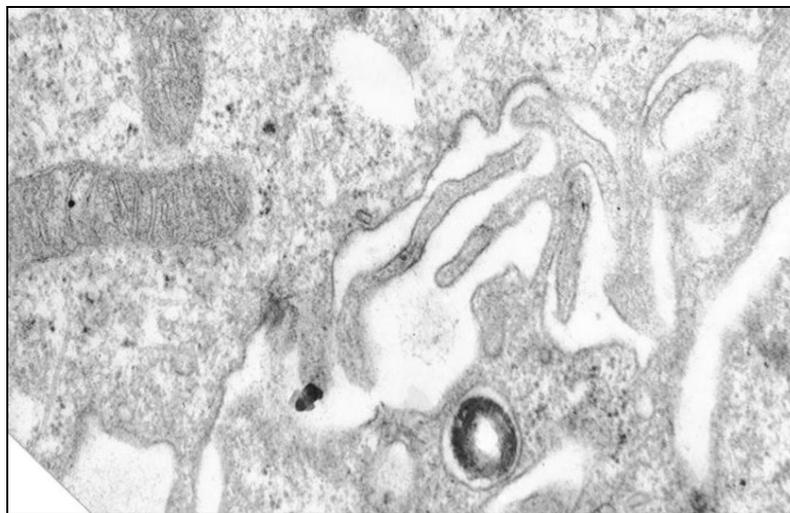
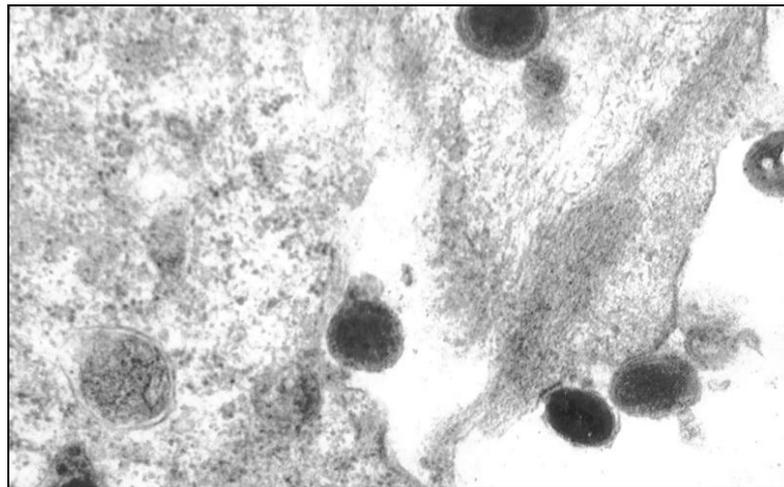


Рисунок 31 - Срезы культуры клеток ПЯ через 30 мин после заражения. Вакуоли, содержащие вирионы на разной стадии дезинтеграции. х30000

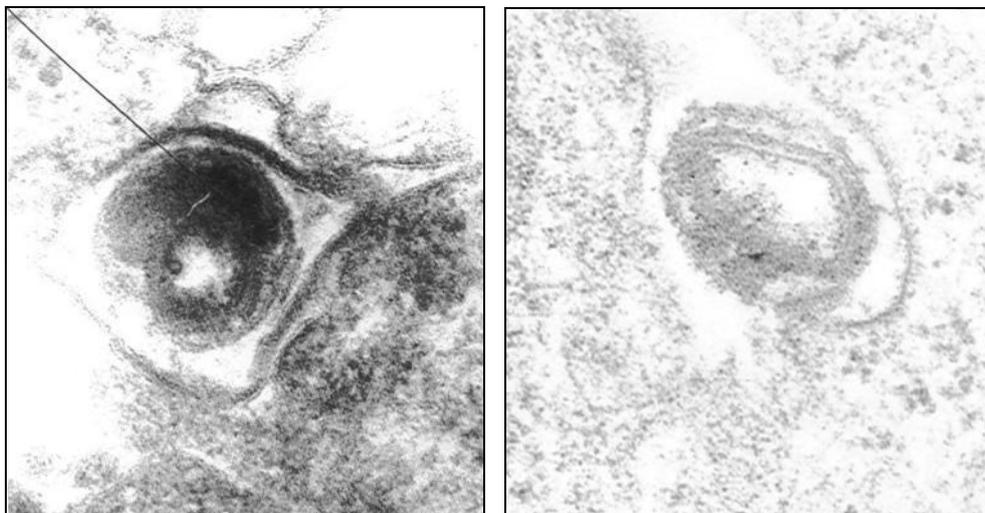


Рисунок 32 - Участки клеток ПЯ через 30 мин после заражения. Показан процесс обволакивания вирионов, находящихся в лакунах. х 100000

Путь проникновения вируса оспы овец в клетку также возможен в процессе слияния граничащих участков цитоплазматической мембраны клеток и через межклеточные каналы. Первые признаки развития инфекции в культуре клеток нами отмечены только через три часа после заражения. В этот период в отдельных клетках можно было наблюдать появление небольших зон цитоплазмы с повышенной электронной плотностью, отсутствующих в контрольных препаратах. Детальное изучение этих участков показало, что они представляют собой хаотическое скопление электронноплотных гранул диаметром 2-2,5 нм и тонких фибрилл толщиной 3-4 нм (рис.33). Других изменений в цитоплазме инфицированных клеток обнаружить не удалось. Однако, уже через 6-12 часов после заражения в цитоплазме отдельных клеток с одновременным увеличением размеров и количества электронноплотных зон наблюдалось развитие процесса вакуолизации цитоплазмы, нарушение эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (рис.34).

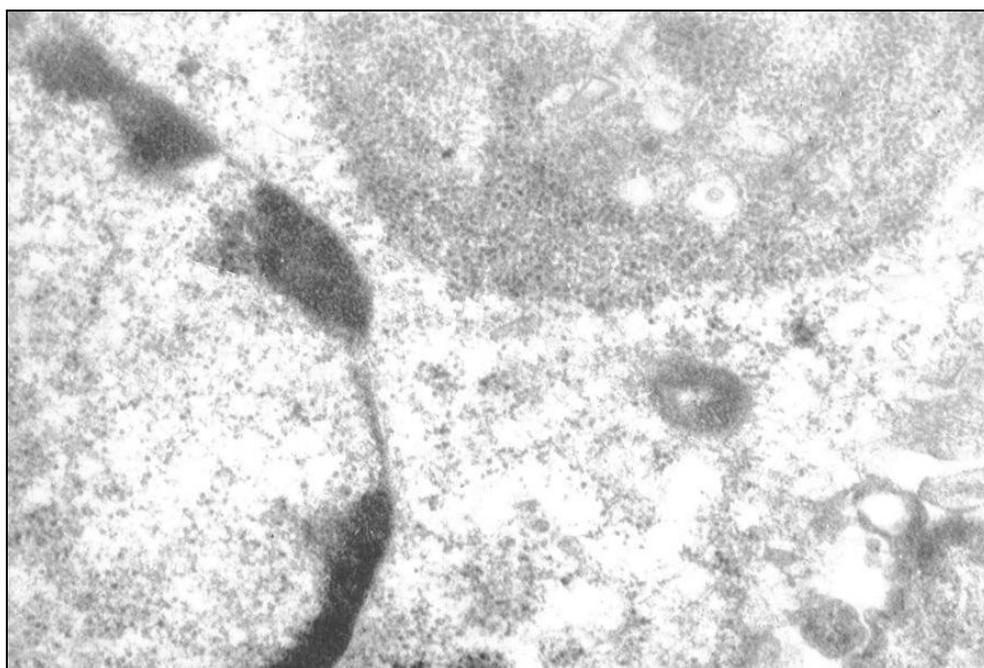


Рисунок 33 - Цитоплазма инфицированной клетки через 3 часа после заражения. Уплотненные зоны, состоящие из гранул и фибриллярного материала. x 50000

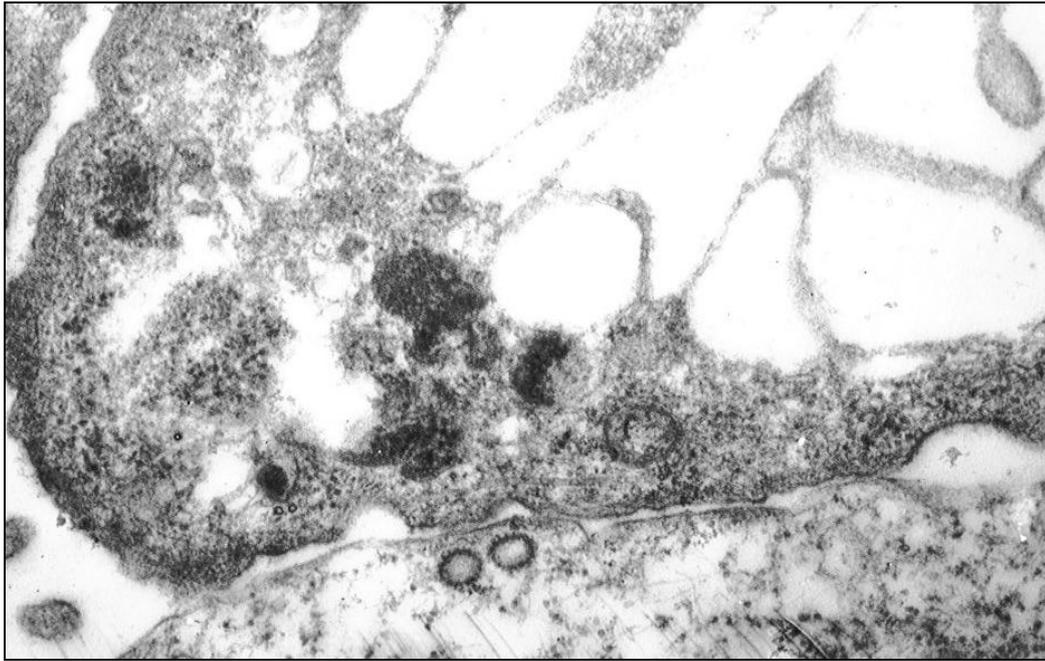


Рисунок 34 - Срез культуры клеток через 12 часов после заражения. Процесс вакуолизации цитоплазмы и гипертрофии аппарата Гольджи. x50000.

Электронно -микроскопическое обнаружение нового поколения вируса оспы в инфицированных клетках культуры ПЯ в интервале 18-24 часа после заражения совпадает с нарастанием титра вируса в культуре клеток ПЯ. В этот период в цитоплазме зараженных клеток наблюдается интенсивное формирование вирусного матрикса. Уплотненные участки цитоплазмы увеличиваются и образуют обширные зоны. Эти зоны вытесняют органеллы к периферии клетки. Внутри вирусного матрикса и его периферии наблюдается образование структур, напоминающих собой однослойные и многослойные «скобы» или «шляпки», а также формирование полных мембран вирионов. При формировании мембран, часть материала вирусного матрикса постепенно отторгалось мембранами. Одновременно включаемый материал матрикса дифференцируется и образует электронноплотную сердцевину вириона. Процесс заканчивается полным замыканием мембраны и формированием «незрелой» вегетативной формы вириона (рис.35). К местам формирования вирионов, как правило примыкают скопления полирибосом.

В последующие этапы структура «незрелых» вирионов подвергается уплотнению и более четкой дифференциации. Вирионы несколько удлиняются и уменьшаются в размерах. Плотностью сформировавшиеся вирионы обладают большей электронной плотностью с четко выраженной структурой. Размер вирионов варьировал в пределах 220-240x260-280 нм.

Созревшие вирионы наблюдаются в цитоплазме клетки в виде одиночных частиц или формируют скопления, состоящие из нескольких десятков, а в отдельных случаях, сотен вирусных частиц (рис.36).

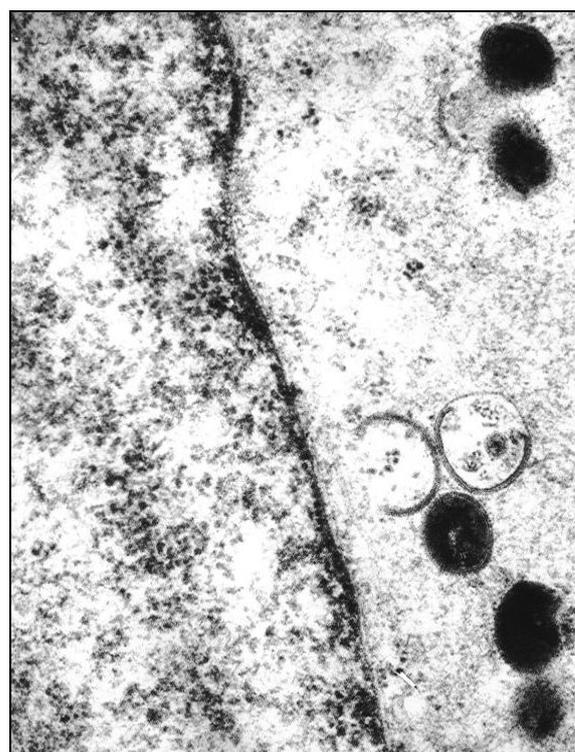
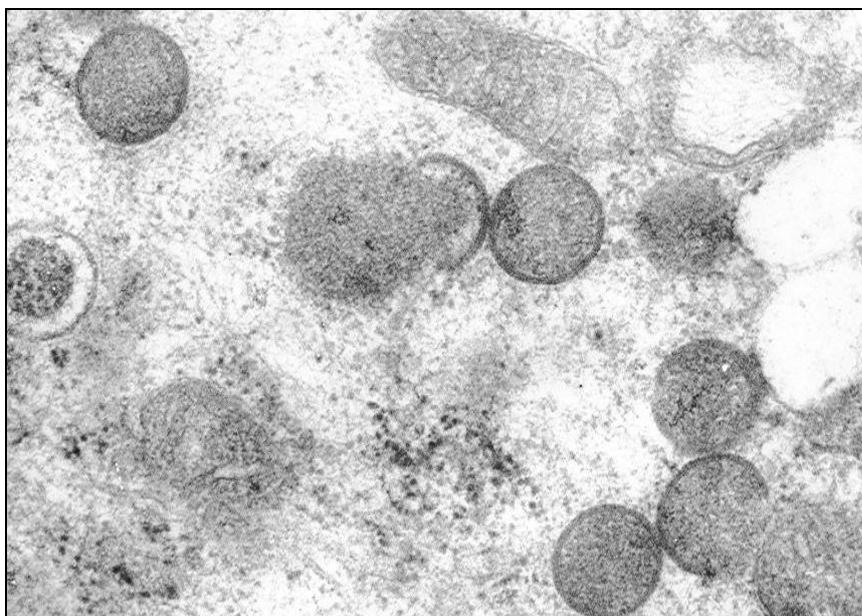


Рисунок 35 - Срезы культуры клеток ПЯ через 24 часа после заражения. Область цитоплазмы, содержащая вирусный матрикс с вирионами на разной стадии формирования. Размер «незрелых» вирионов составляет 275 x 300 нм x 50000

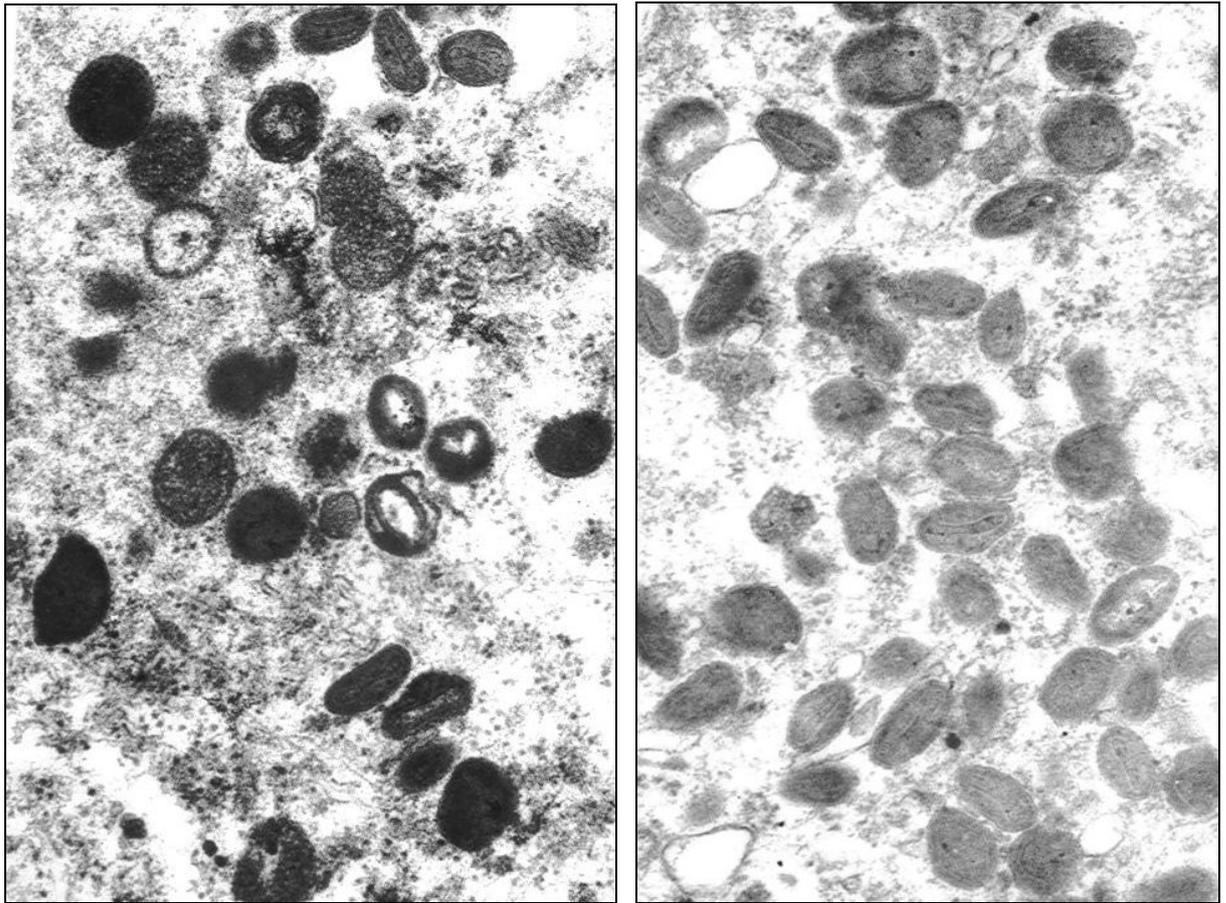


Рисунок 36 - Культура клеток ПЯ через 48 часов после заражения. Срезы, содержащие зоны цитоплазмы со скоплением зрелых форм вируса оспы овец. x40000.

Исследование зараженных клеток показало, что типичным местом внутриклеточной локализации вируса оспы овец являются участки цитоплазмы смещенные к периферии, граничащие или содержащие большое количество вакуолей, цистерн аппарата Гольджи, а также эндоплазматического ретикулума. Одиночные зрелые вирионы встречались по всей цитоплазме инфицированных клеток как свободно, так и в связи с мембранными структурами клетки. Отдельные вирионы наблюдались в цитоплазматических вакуолях, каналах эндоплазматической сети и цистернах аппарата Гольджи (рис.37).

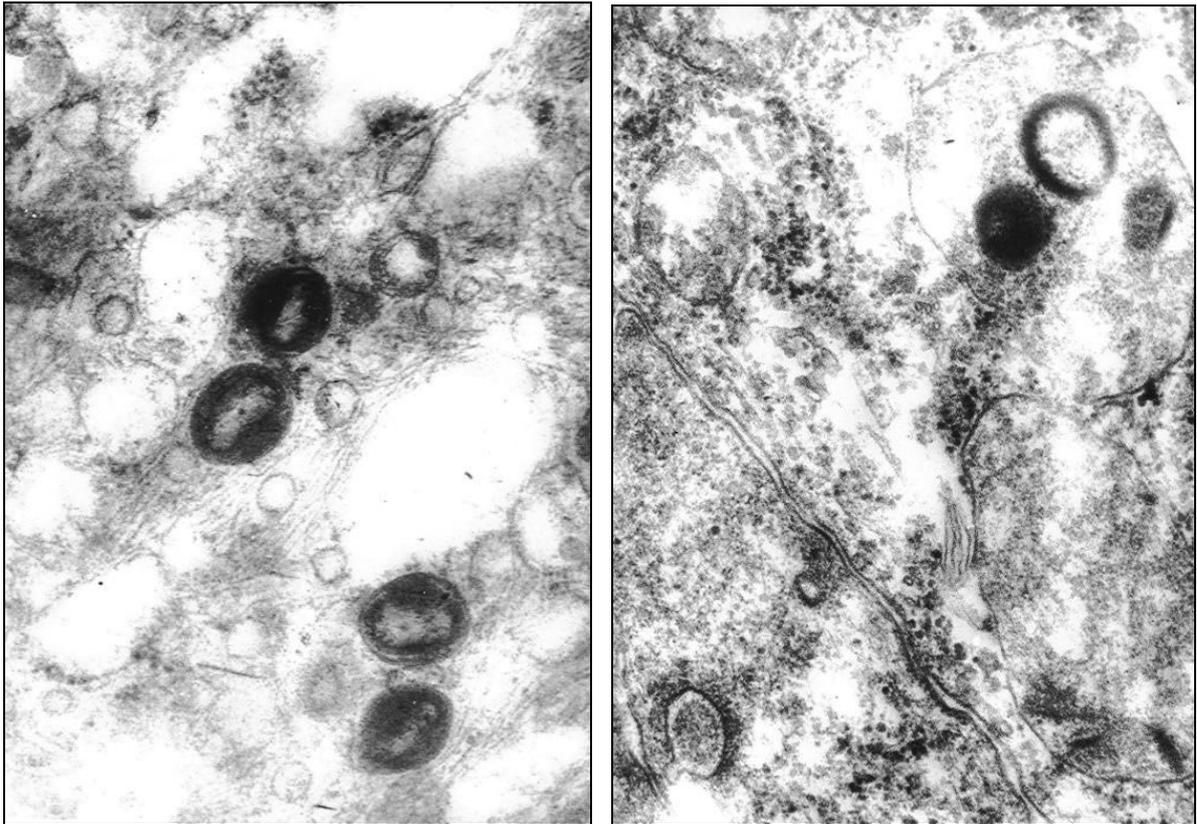


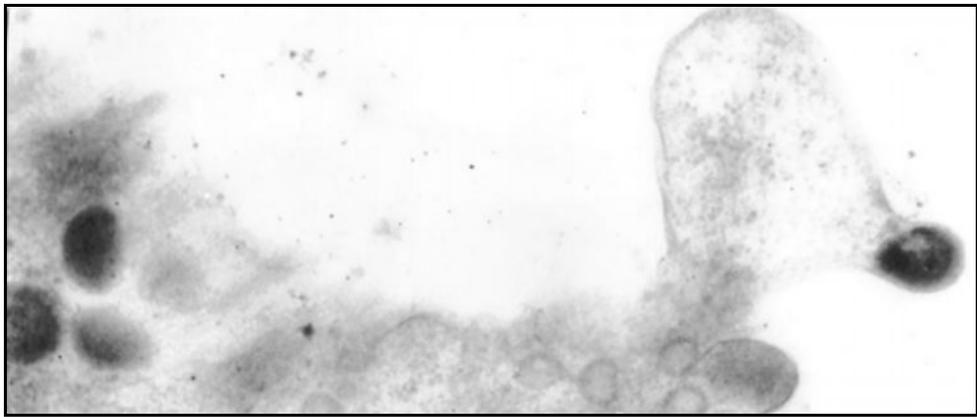
Рисунок 37 - Культура клеток ПЯ через 72 часа после заражения. Участки цитоплазмы клеток с вирионами внутри цистерн аппарата Гольджи. x50000.

Вирионы или вирусоподобные частицы в ядрах зараженных клеток не обнаружены. При исследовании культуры клеток через 72 часа после заражения удалось наблюдать пути выхода зрелых форм вирионов из клетки.

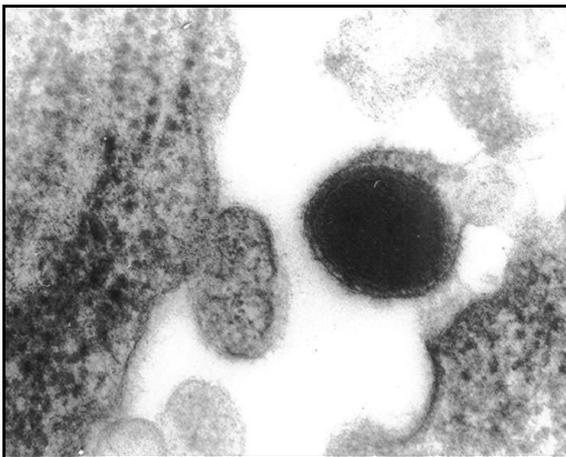
В этот период в одних клетках можно было видеть, что выход вирионов осуществляется в процессе частичной или полной деструкции клетки, в других выход одиночных частиц проходил с помощью почкования отдельных участков мембраны клетки. При этом в момент отделения вирионы захватывали фрагменты цитоплазматической оболочки. Выход вирионов, также происходил в процессе клазматоза (рис .38).



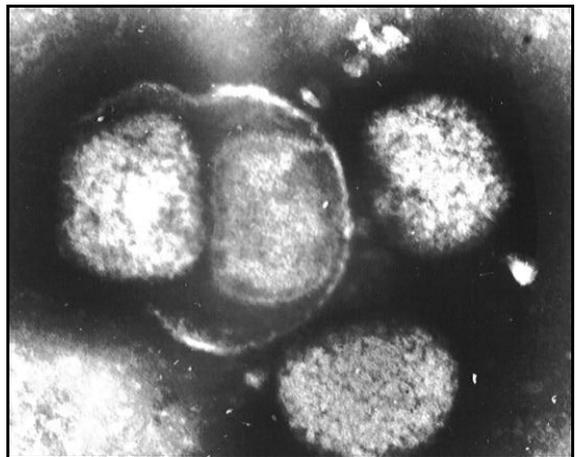
А



Б



Б



В

А – выход зрелых вирионов в процессе частичной деструкции клетки; Б – выход вирионов в процессе почкования; В – выход вирионов оспы овец в процессе клазматоза. х 50000 (А и Б) и х100000 (В)

Рисунок 38 - Культура клеток ПЯ через 72 часа после заражения.

Выраженный характер изменений в цитоплазме зараженных клеток проявляется лишь к 12-48 часам. Прежде всего он заключается в увеличении

размеров электронноплотных зон, представляющих собой вирусный матрикс. Одновременно с развитием и дифференциацией вирусного матрикса идет процесс вакуолизации цитоплазмы. Максимум процесс вакуолизации клеток достигает к 48-72 часам. Кроме вакуолизации цитоплазмы, в зараженных клетках наблюдается изменение митохондрий, эндоплазматической сети и аппарата Гольджи. Митохондрии вследствие набухания увеличивались в размерах. Матрикс митохондрии содержал деформированные кристы (рис.39).

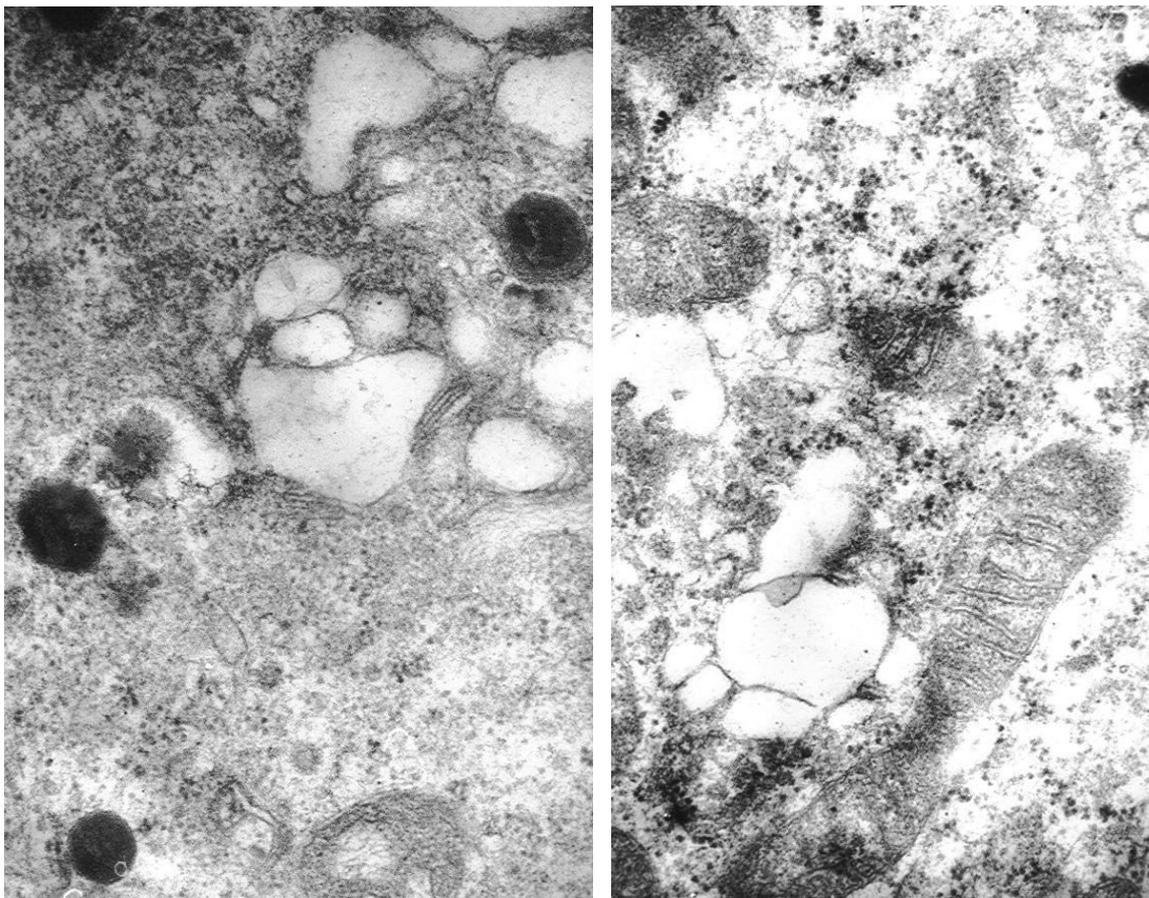


Рисунок 39 - Участки цитоплазмы клетки, через 72 часа после заражения. Митохондрии с признаками набухания и деформации крист. x50000.

Значительной гипертрофии подвергались эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи (рис.40).

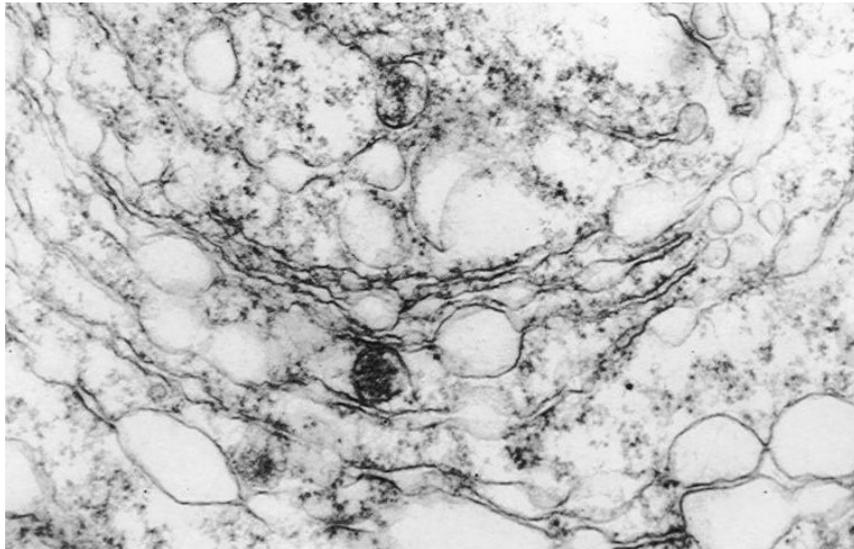


Рисунок 40 - Аппарат Гольджи в клетке ПЯ, зараженной вирусом оспы овец, через 72 часа после заражения. x 50000.

При исследовании зараженной культуры клеток было также установлено, что некоторым изменениям подвержена ультраструктура части ядер. Чаще всего изменения проявлялись в увеличении ядрышек, а на поздних этапах инфекционного процесса миграции хроматина ядра к периферии. В некоторых ядрах в разреженных зонах нуклеоплазмы наблюдалось появление пучков фибрилл, а также изменение формы ядра и образование впадин и пустот (рис.41).

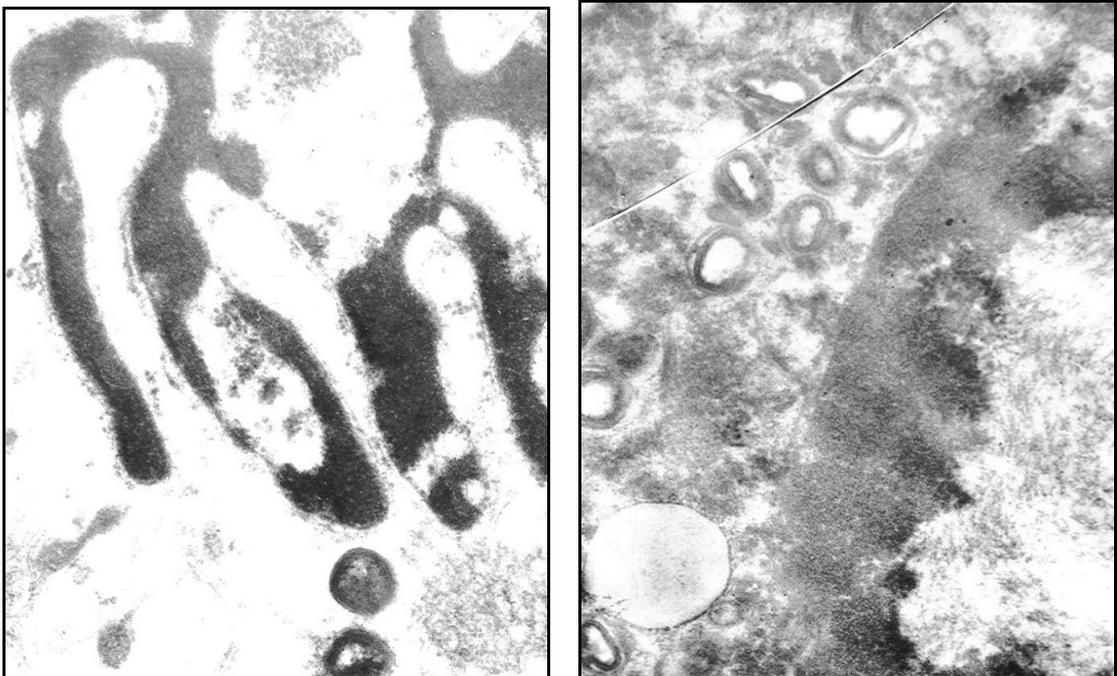


Рисунок 41 - Структура ядер в инфицированных клетках. Ультратонкие срезы культуры клеток ПЯ через 72 часа после заражения. x30000.

В процессе формирования вируса особый интерес представляет структура цитоплазматических включений, которые выявляются в ультратонких срезах через 18 часов после заражения и в последующие сроки развития инфекции. Обнаружено два типа цитоплазматических включений.

Первый тип включений, как уже описано нами ранее, представляет собой вирусный матрикс, состоящий из хаотического скопления тонких нитей и электронноплотных гранул. Наряду с этим нами обнаружены цитоплазматические включения, состоящие из материала высокой электронной плотности. Детальные исследования структуры этого типа включений показали, что они состоят из параллельно уложенных электронноплотных нитей диаметром 9-10 нм с интервалом в 5 нм (рис.42)

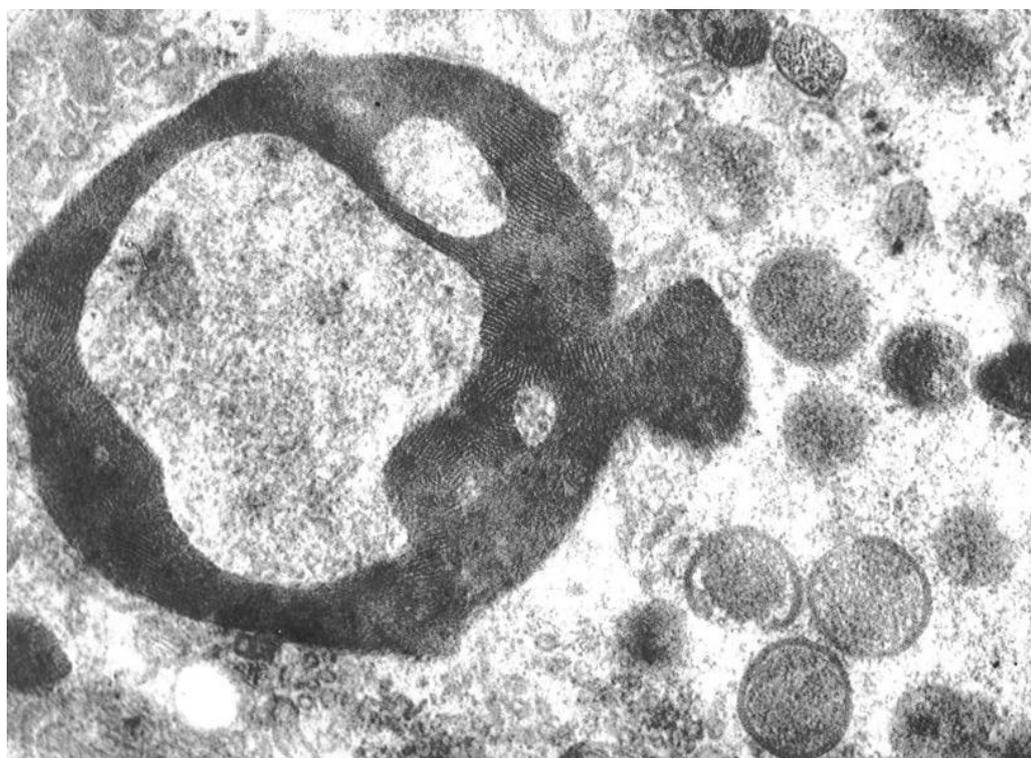


Рисунок 42 - Участок цитоплазмы зараженной клетки, содержащей включения из электронноплотных нитей. x 50000 .

Включения этого типа имеют характерный рисунок в виде «отпечатков пальцев» и четко ограничены от цитоплазмы клетки. Включения данного типа часто содержали небольшие зоны с меньшей электронной плотностью. Форма таких включений разнообразная, но чаще всего овальная. В отличие от первого типа включений, эти включения не содержали зон формирования вирусных частиц или отдельных вирионов.

4.3 ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ В ТКАНЯХ ЗАРАЖЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В литературных источниках показано, что вирус оспы овец активно размножается в эпителиальных тканях зараженных животных.

Кроме того, имеются данные об обнаружении вируса оспы овец в лимфатических узлах, селезенке, легких и других органах больных животных [96, 127].

Проведенные нами детальные исследования ультратонких срезов пораженных участков кожи, отечной ткани, папул, слизистой ротовой полости, гортани и трахеи легкого показали, что клетки этих тканей содержит как зрелые вирионы, так и вирионы на разных этапах сборки (рис.43). Цитоплазма зараженных клеток сильно вакуолизирована и содержит обширные зоны формирования вирусного матрикса. Формирование вирионов вируса оспы овец наблюдается как внутри вирусного матрикса, так и по периферии.

При исследовании тонких срезов лимфатических узлов и селезенки от зараженных животных, вирусные частицы обнаружены в макрофагах и ретикулярных клетках этих органов. Кроме вирионов, в клетках наблюдаются зоны, состоящие из электронноплотных нитей и гранул, которые были идентичны зонам, встречаемым в эпителиальных клетках и в культуре клеток ПЯ (рис.44).

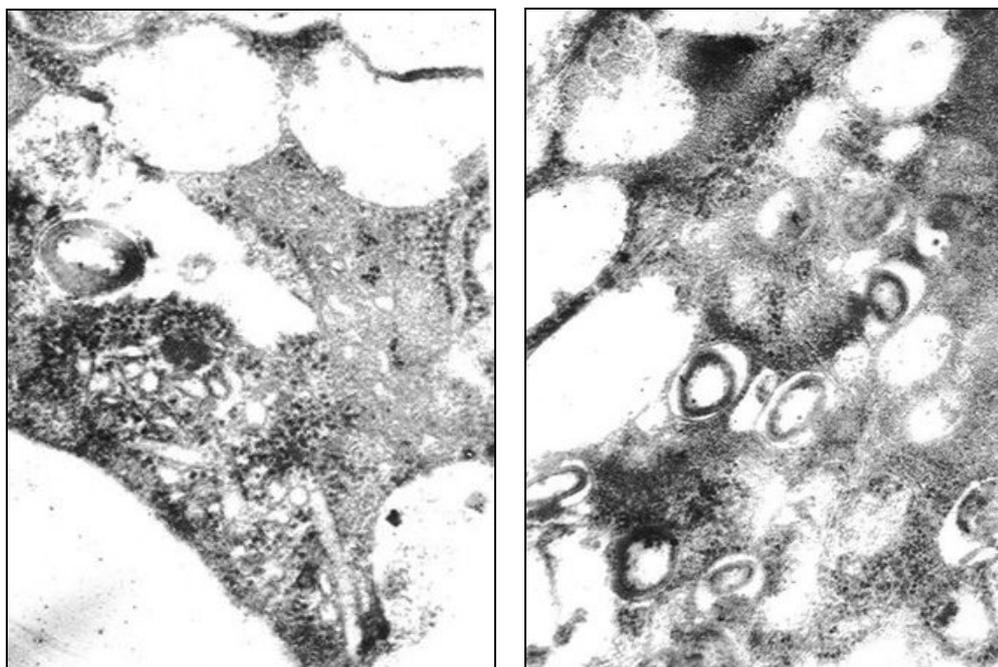


Рисунок 43 - Ультратонкие срезы кожи (а) и слизистой ротовой полости (б), от животных, зараженных вирусом оспы овец.х30000.

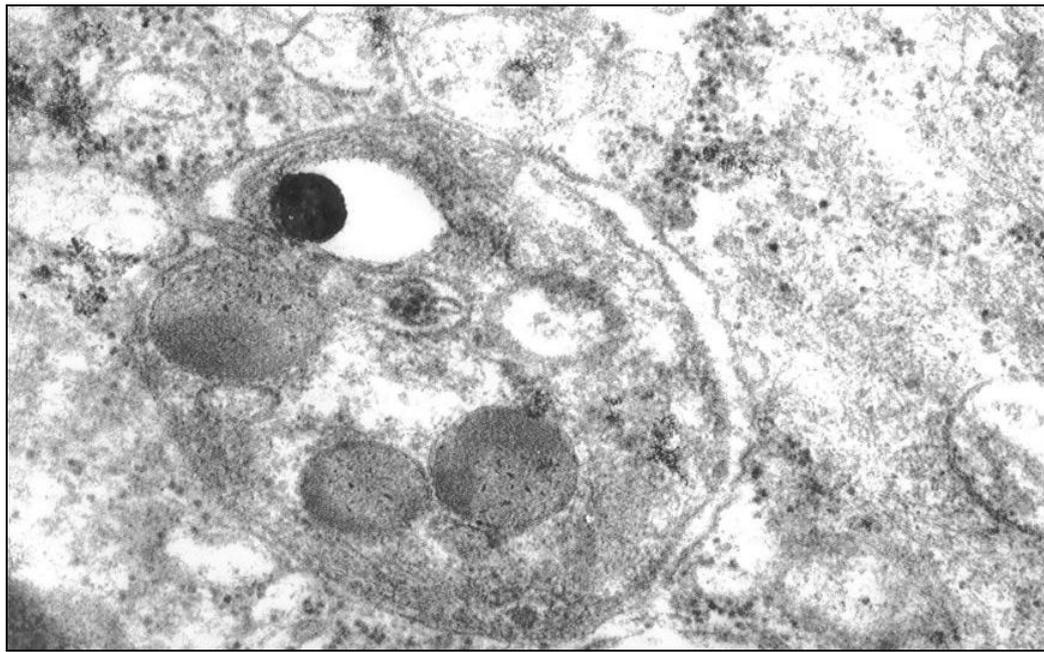


Рисунок 44 - Срез макрофага лимфатического узла от овцы, зараженной вирусом оспы овец. x 50000.

Зрелые вирионы чаще обнаруживались в межклеточном пространстве, как в свободном состоянии, так и в процессе адсорбции на мембранах клеток (рис.45). В срезах пораженных клеток часто можно было наблюдать появление различной формы мембранных структур, увеличение количества лизосом и фагосом. В ядрах зараженных клеток часто наблюдалось перемещение хроматина и образование разреженных зон.

Кроме указанных изменений, в зараженных клетках эпителиальной и лимфоидной ткани обнаружены различного типа включения. Включения, наблюдаемые в цитоплазме, по своей структуре были аналогичны включениям, встречаемым в инфицированных вирусом оспы овец клетках культуры ПЯ. Ядерные включения обнаружены только в клетках эпителиальной и лимфоидной ткани, зараженных животных. По своему строению они были однотипными и представляли собой упорядоченное скопление мембран и тонких фибрилл в виде колец, эллипсоидов или фигур неопределенной формы (рис.45).

В большинстве случаев в ядрах, содержащих включения, хроматин был разряжен и небольшими зонами расположен у ядерной мембраны. Вирусные частицы или вирусоподобные структуры в ядрах нами не обнаружены.

При исследовании процесса формирования вируса в клетках эпителиальной и лимфоидной ткани, зараженных животных установлено, что он включает стадии аналогичные стадиям формирования вирионов оспы овец в культуре клеток ПЯ.

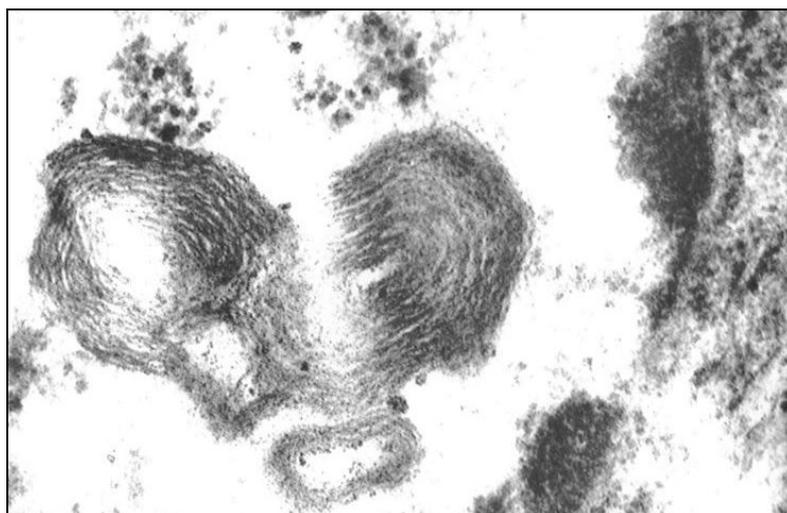


Рисунок 45 - Ядро в клетке лимфоидной ткани от овцы, зараженной вирусом оспы овец. x 30000

Исследования морфогенеза вируса оспы овец и вызываемой им цитопатологии в культуре клеток ПЯ показывают, что взаимодействие вируса с клеткой происходит сразу же после внесения вирусосодержащего материала в культуральную среду. Уже через 10-15 мин значительное количество клеток содержит адсорбировавшиеся вирионы. Опыты показали, что проникновение вируса оспы овец в основном происходит подобно другим поксвирусам, путем фагцитоза [133,136,155,235].

В процессе инвагинации и образования фагоцитарной вакуоли вирионы постепенно углубляются в цитоплазму клетки. При инвагинации вирионы обычно выглядят интактными, однако уже к моменту образования фагоцитарной вакуоли появляются признаки их деструкции. Выход вирионов в цитоплазму клетки осуществляется в процессе разрушения оболочки вакуоли. В последующее время, включительно до 3-4 часов с момента заражения видимых признаков развития вируса в клетках не обнаруживается. Однако к 3 часам в цитоплазме некоторых зараженных клеток уже появляются небольшие участки, содержащие электронноплотный фибриллярно-зернистый материал. Образование обширных цитоплазматических включений (вирусных матриксов) и формирование вирионов вируса оспы овец обнаруживается в клетках только через 15-20 часов после заражения.

При изучении морфогенеза нами установлено, что он представляет собой многоэтапный процесс, включающий в себя дифференциацию материала виропласта. Образование первичных оболочек вирионов и формирование зрелых вирионов. Вначале в виропласте появляются первичные оболочки в виде полулунных мембран или «шляпок» толщиной 5,0-5,5 нм, разделенных светлой зоной шириной 6 нм. Затем в процессе роста эти оболочки постепенно отделяют часть материала виропласта и смыкаются. В результате этого образуются округлые или овальные образования диаметром 250-300 нм, которые представляют собой вегетативные формы

вируса. По морфологии и структуре эти формы идентичны «неполным» вирионам, обнаруживаемым при негативном контрастировании очищенных препаратов вируса оспы овец.

В дальнейшем происходит дифференциация включенного в вирион материала виропласта и образование внутренних структур вириона. Одновременно идет дифференциация и утолщение оболочки вириона, образование наружного рыхлого слоя, несущего шнурообразные вырасты.

Зрелые вирионы, как правило, имеют электронноплотный нуклеоид и выраженную трехслойную мембрану, они несколько меньше по размерам, чем вегетативные «неполные» вирионы. Размер зрелых вирионов на срезах идентичен размеру негативноокрашенных вирионов и составляет 200-250x280-300 нм.

Изучение процесса выхода вирионов из клетки показало, что в отличие от вируса оспы коз, у которого выход вирионов осуществляется в процессе множественного почкования плазмолеммы пораженных клеток выход вирионов оспы овец чаще всего осуществляется в процессе частичной или полной деструкции клетки. Кроме того часть вирионов выходит из клетки путем почкования и клазматоза. Однако путь выделения вируса оспы овец с помощью клазматоза, по-видимому, носит случайный характер, так как наблюдается крайне редко.

В зараженных клетках выявлено два типа цитоплазматических включений. Первый тип включений, состоящий из рыхло расположенных тонких фибрилл и электронноплотных гранул встречается в зараженных клетках довольно часто и представляет собой материал виропласта. Вторым типом цитоплазматических включений, состоящий из параллельно уложенных электронноплотных тяжей, встречается значительно реже и выявляется в более поздние сроки инфекционного процесса. Однако, если учесть отсутствие таких образований в незараженной культуре клеток, то можно предположить, что эти включения являются результатом процесса обособления или кристаллизации отдельных структур вирусного матрикса.

Сопоставление обнаруженных нами типов цитоплазматических включений с включениями, наблюдаемыми при развитии других представителей поксвирусов, показывает, что первый тип включений присущ развитию вирусов оспы коз, осповакцины, экстромелии [20,252-268], в то же время второй тип включений при развитии указанных поксвирусов не отмечен.

Анализ цитопатогенных изменений в культуре клеток ПЯ в различные сроки после заражения вирусом оспы овец показывает, что характер наблюдаемых изменений в цитоплазме клетки в общих чертах присущ для всей группы поксвирусов. Это, прежде всего, касается образования электронноплотных участков через 3-5 часов после заражения, а также процесса вакуолизации цитоплазмы, гипертрофии эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Эти изменения становятся выраженными через 24-48 часов после заражения. Кроме того, в пораженных клетках

можно наблюдать заметное увеличение количества лизосом и набухание митохондрий.

Незначительные изменения наблюдались в ядрах зараженных клеток. Они, прежде всего, выражались в уменьшении электронной плотности нуклеоплазмы и концентрации хроматина по периферии ядра. Очень редко, в отдельных ядрах наблюдалось появление кольцеобразных структур или небольших пучков тонких нитей. В ядрах мы не обнаружили включений типа цитоплазматических или включений, описанных для других поксвирусов [259,267,269-272].

При исследовании биопсированного материала от животных, зараженных вирусом оспы овец, вирус легко обнаруживали в эпителиальных клетках пораженных участков кожи, папул, слизистой ротовой полости, трахеи и легкого. Значительно труднее обнаруживались вирионы в клетках лимфоидной ткани.

Вирусные частицы, наблюдаемые в клетках эпителиальной и лимфоидной ткани, были морфологически однотипными. Процесс образования вирионов в этих клетках не имел отличий от процесса образования вирионов в клетках культуры. Кроме вирионов, в цитоплазме пораженных эпителиальных клеток обнаружены зоны фибриллярно-зернистого материала с наличием вирионов на разных стадиях формирования. Эти зоны по своей структуре были идентичны зонам, наблюдаемым в клетках культуры ПЯ, зараженной вирусом оспы овец.

Аналогичные изменения обнаружены в пораженных клетках лимфоидной ткани. Однако, следует отметить, что они проявлялись в менее выраженной форме. Как в эпителиальных, так и в лимфоидных пораженных клетках выявлены ядерные включения. Ядерные включения были однотипными по структуре и отличались друг от друга только по форме и размерам. При сопоставлении полученных данных по структуре ядерных включений с литературными, нами не найдено аналогичных сведений.

ГЛАВА 5.

СТРУКТУРА ГЕНОМА ORTHOROXVIRUS И ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ.

5.1 ПРИРОДА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОКСВИРУСОВ

Как известно, геном вируса оспы овец представлен молекулой ДНК с молекулярной массой 73-91кД, содержащий концевые инвертированные повторы (КИП), размер которых колеблется от 0,1 до 12,4 т.п.н. Размер генома составляет около 150 000 пар нуклеотидов, он не обладает инфекционностью. Центральная часть генома размером около 100 тыс. п.н. высококонсервативна по последовательности и кодирует большинство

жизненно важных для вируса генов. Многие концевые участки генома содержат несколько спиральных оснований являющиеся результатом образования двух изоформ и две цепи ДНК ковалентно соединяются с образованием концевых шпилек. Инвертированные концевые последовательности содержат прямые повторности ДНК, однако механизмы их образования и функционирования еще не известны. Одним из возможных объяснений является то, что центральный регион генома содержит гены кодирующие функционально-значимые для вируса белки и имеющие незначительные промежутки между генами.

К настоящему времени из всех секвенированных геномов поксвирусов обнаружено около 49 генов, которые присутствуют у всех представителей этого семейства вирусов. Было также определено, что для всех поксвирусов позвоночных общими являются около 90 генов. Данные гены кодируют белки, участвующие в репликации, транскрипции и в сборке вириона, локализованные в центральной части генома, а также гены видо- и хозяино-специфичные, обычно распределенные на обоих концах генома. Многие из генов, расположенных на коцевых участках генома, кодируют белки, обладающие функциями подавления антивирусных процессов клетки-хозяина, таких как апоптоз, узнавание антигена, функции интерферона и процессов иммунного сигнала, их называют генами вирулентности [178,283].

По нуклеотидному составу (А+Т) геномы поксвирусов довольно сильно различаются между собой. Например, процентный состав А+Т оснований в геноме штамма NZ2 вируса контагиозной эктимы овец и коз составляет 18-61% и 65-83% в геноме штамма НИСХИ вируса оспы овец. Таким образом средний процент А+Т оснований для эктимы составляет 36% и 75% для вируса оспы овец. Причины большой разбросанности нуклеотидного состава в геномах поксвирусов до сих пор еще не выяснен. Полагают, что поксвирусы в процессе эволюции включили в состав своей ДНК нуклеотидные последовательности, кодирующие различные белки клетки, которые в первую очередь необходимы для модулирования иммунных реакций организма на вирусную инфекцию, обеспечивая тем самым преодоление различных защитных систем хозяина [279,283]. Кроме того, в геноме ортопоксвирусов выявлены гены, продукты которых гомологичны представителям семейств белков клетки не участвующих напрямую в процессе иммуномодуляции, а регулирующих такие процессы как клеточный цикл, формирование цитоскелета. В эту группу белков входят так называемые *kelch*-белки, функции которых пока не известны [273-275].

В процессе секвенирования генома у представителей рода *Leporipoxvirus* (вирус фибромы Шоупа), выявлены повторяющиеся гены с взаимной гомологией – Т6, Т8 и Т9. Характерной особенностью белков, кодируемых данными генами, является наличие на их С-концевом районе вырожденных повторов размером около 50 а.о., содержащих характерную пару аминокислот Gly-Gly [205,276].

В геноме вируса натуральной оспы содержится ген C11R VAC-COP, кодирующий белок VGF, отнесенный к фактору роста. Он стимулирует рост и метаболическую активность неинфицированных клеток, обеспечивая тем самым распространение вируса по организму [203,204,277,278].

Имеющиеся данные филогенетического анализа 26 представителей семейства поксвирусов показывает, что центральная область генома вирусов имеет консервативную организацию. Гены этой области кодируют очень схожие ферменты синтеза РНК и ДНК, процессинга белка, сборки вириона, а также структурные белки. В противоположность этому, гены концевых участков значительно различаются у представителей разных родов. Длина генома у разных представителей также варьирует. У вируса контагиозной эктимы овец длина генома лежит в пределах 134000-139000 п.н., тогда как длина генома вируса оспы кур составляет 289000 п.н., вируса оспы свиней – 144575, оспы овец – 161774 п.н., оспы лошадей -212000 п.н. Содержание А+Т варьирует от 75% до 36%. Секвенирование геномов поксвирусов определило 90 консервативных генов в геноме представителей рода *Chordoroxvirus* и 49 у всех остальных [279 – 284].

Variola virus и *Camelproxvirus* являются представителями субгруппы *Orthoroxvirus*. Геном вируса оспы верблюдов представлен двуцепочечной ДНК, размер которого варьирует от 177000 до 205719 п.н., кодирующий около 211 белков. Геном вируса оспы верблюдов, как и у всех представителей поксвирусов, представлен центральной областью и концевыми регионами. Центральная консервативная часть генома кодирует белки, вовлеченные в основные процессы репликации вируса, такие как синтез ДНК-полимеразы, субъединиц РНК-полимеразы, инициации транскрипции мРНК, факторов элонгации и терминации. Концевые регионы генома вируса кодируют белки, ответственные за круг хозяев, фактор вирулентности, гликопротеин гемагглютинаина, протеинкиназу, гликопротеин внеклеточной оболочки вируса и другие [285].

Как уже было сказано выше в отличие от большинства ДНК-содержащих вирусов животных, жизненный цикл поксвирусов происходит в цитоплазме клетки в значительной степени автономно от ядра. Представители этого семейства располагают ферментативными системами синтеза РНК и ДНК. Инфекционные вирусные частицы в своем составе содержат полную ферментативную систему транскрипции, синтезирующую функциональную мРНК в полиаденилированной, кэпированной и метилированной форме. Это способствует вирусам оспы самостоятельно осуществлять эффективную защиту от ранних специфических реакций на инфекцию и противодействовать развивающимся позже специфическим реакциям, а также размножаться до высокого уровня, обеспечивающего быструю передачу инфекции другому хозяину.

Особенности биологических свойств любого вируса невозможно объяснить без детального изучения молекулярно-биологических механизмов

инфекции и, прежде всего, без анализа функционирования вирусного генома. Особенно это важно в плане современного направления в вирусологии – генной инженерии вирусов.

Основой для изучения молекулярно-биологических механизмов функционирования геномов вирусов являются сведения об их физико-химических и биологических свойствах.

В доступной литературе имеются отрывочные и противоречивые сведения о структуре и свойствах нуклеиновой кислоты вируса оспы овец. В серии экспериментов с использованием радиоактивной метки нуклеиновой кислоты вируса нами предприняты попытки определить ее тип. В опытах использовали технику одновременного мечения генетического материала двумя различными метчиками.

Результаты определения типа нуклеиновой кислоты с вирусом меченым *in vivo* радиоактивным тритием и углеродом после очистки в ступенчатом 20-60% градиенте сахарозы показали (табл.27), что количество кислотонерастворимой радиоактивности уменьшается по мере обработки нуклеазами почти до одного уровня (62-64%) в случае обеих меток в первые 60 минут, а далее оно становится постоянным.

Таблица 27 - Радиоактивность аликвот вируса оспы овец, меченого тритием и углеродом после обработки нуклеазами

Время отбора проб (мин)	³ H ₁ -тимидин (имп./мин.)	² C ¹⁴ -уридин (имп./мин.)	% от исх.		Уридин/тимидин (%)
			³ H ₁	² C ¹⁴	
Исх.	4185±115	408±50	100	100	9,0±1,0
10	4223±90	345±43	100	84	8,0±0,0
20	3731±150	353±11	89	86	9,0±1,0
30	3487±117	343±7	83	84	9,0±0,0
40	3330±67	301±10	79	73	8,0±0,0
50	3122±56	272±5	74	66	8,5±0,5
60	2863±175	257±30	68	62	8,3±0,3
70	2622±91	258±18	62	63	9,0±1,0
80	2633±70	264±11	62	64	9,7±0,7
M±m	-	-	-	-	8,7±0,2

Это говорит о наличии примесей свободных нуклеиновых кислот в вирусном препарате. Из таблицы 27 также видно, что после 1 часа обработки нуклеазами вирусный препарат не меняет радиоактивности. При этом количество уридиновой метки по отношению к тимидиновой составляет в среднем 8,7%. Это отношение практически не меняется на протяжении всего времени обработки нуклеазами. Наблюдаемая дижекция по-видимому обусловлена не за счет примесей нуклеиновых кислот в препарате, а за счет вирионных РНК и ДНК, освобождающихся в процессе обработки вируса.

Тем не менее, полученные результаты позволяют предположить, что вирус оспы овец содержит небольшое количество РНК, около 0,35%. Содержание ДНК в вирусных частицах, составляет 4-5% от веса вируса.

5.2 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Вирионы семейства поксвирусов – крупные сложноорганизованные частицы, содержащие в своем составе ДНК с очень большой, пожалуй, максимальной, массой из всех вирусов, достигающей 200 миллионов дальтон. Однако, содержание нуклеиновой кислоты невелико и составляет от 4 до 5% от веса вирусной частицы [22]. Все это создает определенные трудности для экстракции ДНК из вирусных частиц.

К настоящему времени известно несколько способов освобождения нуклеиновой кислоты из вирусов группы оспы. Чаще всего используют очищенные вирусные концентраты, которые обрабатывают детергентами- додецилсульфатом натрия, дезоксихолатом натрия, лаурилсульфатом натрия, лаурилсоркозилатом в комплексе с холодным или горячим фенолом, либо используют обработку ферментами- проназой, протеиназой К в комплексе с 2-меркаптоэтанолом и другими реагентами [69-71,73-74,80,91,286,287].

Все перечисленные методы имеют свои преимущества и недостатки, влияющие на степень деградации ДНК в процессе ее выделения и очистки. Сравнительно недавно был предложен новый способ получения интактных молекул ДНК из вируса вакцины, который заключается в быстром лизисе вируса вакцины в нейтральном градиенте сахарозы, содержащем 0,5% додецилсульфата натрия и 2% 2-меркаптоэтанола. При центрифугировании такого градиента одновременно происходили мягкое освобождение и очистка ДНК [117].

Наши попытки выделить ДНК из очищенных вирусных концентратов вируса оспы овец, с применением проназы в количестве 100-200 мкг/мл в присутствии 1-2% 2-β-меркаптоэтанола в процессе перемешивания смеси на магнитной мешалке в течение суток оказались безуспешными. Положительные результаты были получены при использовании детергентов и двукратной обработки вируса фенолом при комнатной температуре или горячим способом. Данные методы обеспечили получение высоко очищенных препаратов нативной нуклеиновой кислоты вируса оспы овец (рис.46 и табл.28).

На рисунке 46 представлен типичный спектр поглощения ультрафиолетового света полученными препаратами ДНК. Спектр поглощения имеет максимум при 258 нм и минимум при 230 нм, что характерно для спектров нуклеиновых кислот. Результаты экспериментов показали, что детергент-фенольные методы выделения ДНК из вируса оспы овец обеспечивают возможность получения чистых препаратов нуклеиновой кислоты. Однако выход ДНК невелик и составляет всего $53 \pm 3,1\%$.

Последующая фильтрация полученных препаратов нуклеиновой кислоты на микрогранулярной целлюлозе улучшает их качество.

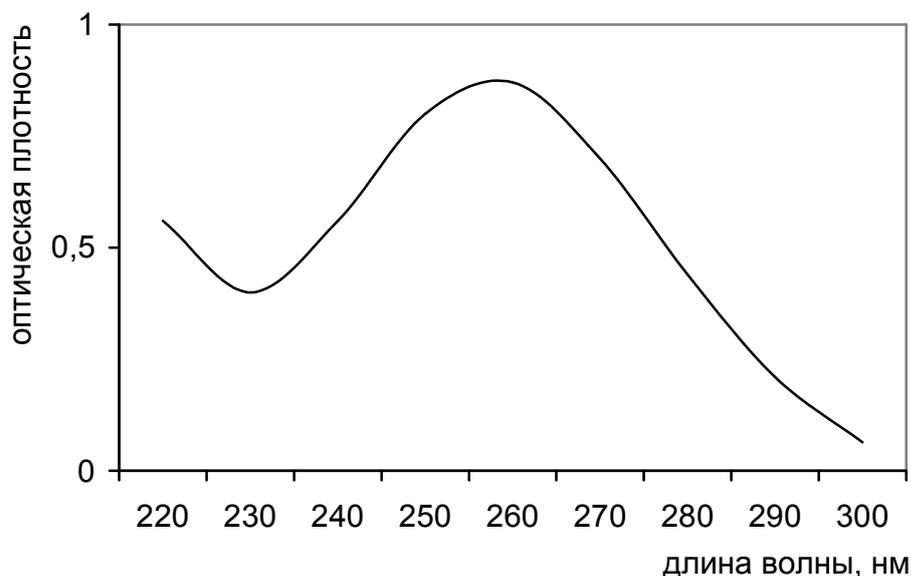


Рисунок 46 - Спектр поглощения препарата нуклеиновой кислоты вируса оспы овец.

Таблица 28 - Выделение и очистка нуклеиновой кислоты вируса оспы овец.

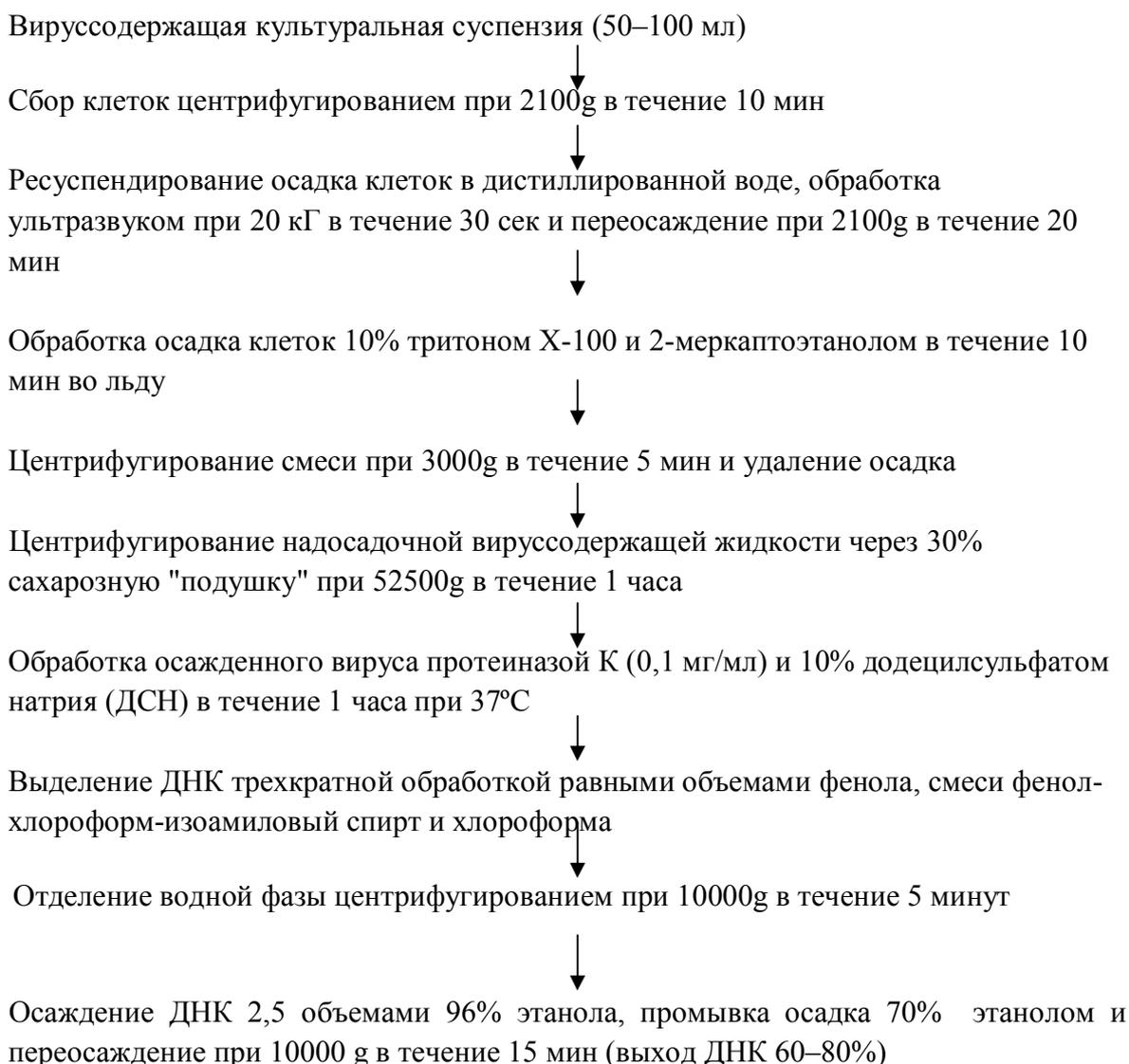
№№	Характеристика препарата	Опыт №1	Опыт №2	Опыт №3
1	Объем исходного вируса (мл)	5,0	23,0	10,0
2	Количество вируса (мг/мл)	16,0	3,6	6,0
3	Количество всего вируса	80,0	82,8	60,0
4	К-во ДНК после детер-фенольн. депрот. (мкг)	1500	1850	1350
5	E260/E230 фен.экстр. ДНК	2,1	<2	2,3
6	E260/E280 фен.экстр. ДНК	1,80	1,72	1,8
7	Выход ДНК после фен.экстр. (%)	46,9	55,8	56,3
8	К-во ДНК для фильтрации (мкг)	200	1850	1350
9	Объем р-ра ДНК для CF – 11ф (мл)	2	8	5
10	Выход ДНК после фильтр. CF – 11 (%)	51	60	59
11	E260/E230 очищ.преп.ДНК	2,0	2,38	2,40
12	E260/E280 очищ.преп.ДНК	2,0	1,90	2,10
13	E270/E240 очищ.преп.ДНК	1,26	1,39	1,22
14	Объем преп. ДНК после фильтр. (мл)	20	15	11
15	К-во ДНК после фильтрации (мкг)	105	1080	800

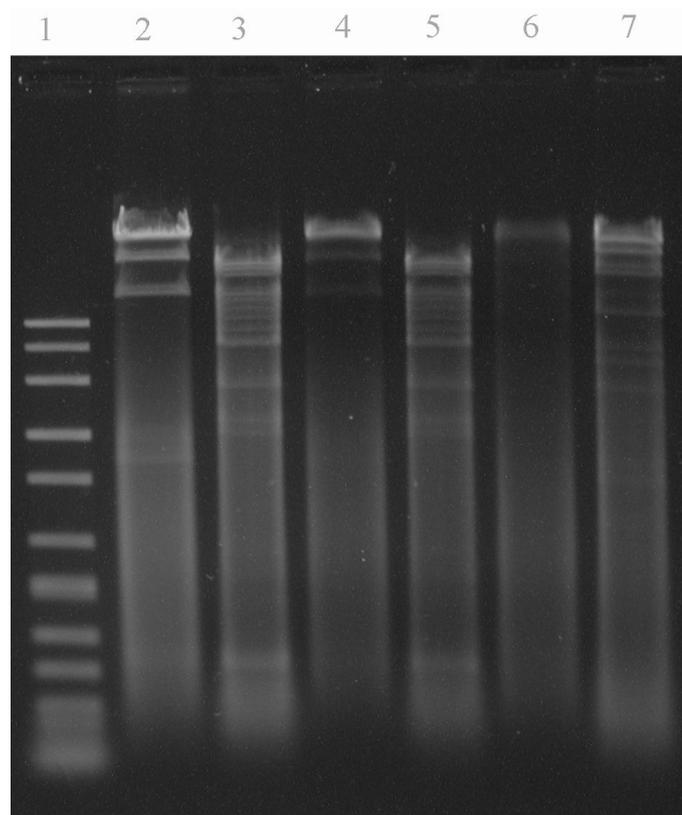
Спектрофотометрические характеристики растворов нуклеиновой кислоты после фильтрации имели значения – E260/E230>2,3, E260/E280>2,0 и E270/E240<1,5, что свидетельствует об отсутствии белка и фенола в таких препаратах. При этом выход ДНК составляет 56,7±2,9%. Другим недостатком фильтрования является разбавление, требующее дополнительного концентрирования. В дальнейшем эти обстоятельства

заставили нас отказаться от очистки детергент-фенольных экстрактов фильтрованием на целлюлозе CF-11. Вместо фильтрования на целлюлозе в экспериментах был использован этап двукратного переосаждения ДНК.

В наших исследованиях по подбору оптимальной схемы выделения ДНК вируса оспы овец были испытаны простые методы и комбинированные схемы выделения ДНК из очищенных препаратов вирусов. Различные варианты режимов обработки фенолом и хлороформом, инкубирования и центрифугирования, а также другие методики. Полученные результаты позволили выбрать наиболее оптимальные методы выделения ДНК. В экспериментах количество полученной ДНК варьировало в пределах 0,5-2,0 мкг из 1л инфицированной культуры клеток, в зависимости от титра и штамма вируса. Выход геномной ДНК составлял 60-80%. Оптические показатели полученных препаратов ДНК имели близкие значения и составили при $E_{260}/E_{280}=2,01$; $E_{260}/E_{230}=2,55$; $E_{270}/E_{240}=1,5$.

На представленной ниже схеме показаны этапы получения препаратов ДНК вируса оспы овец из культуральных вирусосодержащих материалов. Электрофореграммы препаратов показаны на рисунке 48.





1 – маркер; 2 - контагиозная эктима овец , 3 – оспа овец (НИСХИ), 4 - контагиозная эктима овец, 5 – оспа овец (НИСХИ), 6 - контагиозная эктима овец, 7 - оспа овец (НИСХИ) BamH I–(2,3,4,5), Pst I–(6,7)

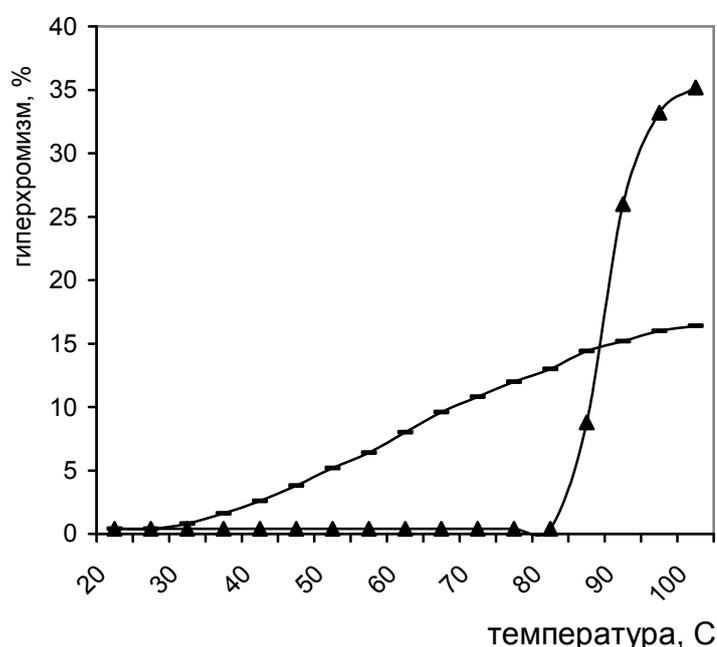
Рисунок 48 - Электрофорез геномных ДНК выделенных из очищенных препаратов вирусов оспы овец и контагиозной эктимы овец, обработанных рестриктазами BamH1 и Pst I.

В последние годы в связи с автоматизацией процессов нуклеотидного секвенирования учеными разных стран разработаны экспресс методы выделения ДНК из вирусных частиц непосредственно в инфицированной культуре клеток [288,289]. В настоящее время для выделения нуклеиновых кислот микроорганизмов превалирующее положение занимают методы с использованием гуанидин тиоцианата (GuSCN) и гуанидин гидрохлорида (GuHCl), обеспечивающими максимальный лизис животных и растительных тканей. Многими фирмами для автоматизации процесса разработаны наборы для экспрессного выделения РНК и ДНК из широкого спектра образцов. Наборы обеспечивают лизис клетки с помощью гуанидин изотиоцианата с высокой степенью очистки нуклеиновой кислоты. Выделение нуклеиновой кислоты занимает не более 20 минут. В наборе не используются опасные для исследователя фенол и хлороформ [290-296].

5.3 ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Выяснение структурной и функциональной организации генома невозможно без знания физических характеристик нуклеиновых кислот.

Температурное плавление нуклеиновых кислот в растворах позволяет получить информацию по их типу, величинам гиперхромизма и температуре плавления. Доказательством целостности структуры, гомогенности и чистоты препаратов является ширина интервала плавления. Ренатурация также позволяет судить о чистоте и гомогенности препарата. Нами проведены исследования по определению термической денатурации ДНК вируса оспы овец (рис.49 и табл.29).



▲ - кривая плавления нативной ДНК в буфере STE; x-x-x- кривая плавления ренатурировавшей после быстрого охлаждения ДНК в буфере.

Рисунок 49 - Кривые термической денатурации препаратов ДНК вируса оспы овец.

Таблица 29 - Параметры термического плавления ДНК вируса оспы овец

№№	Характеристика	Опыт №1	Опыт №2	Опыт №3	Опыт №4	M±m
1	Интервал плавления (°C)	75-85	75-85	79-89	80-90	77-87
2	Температура плавления (°C)	84,0	83,0	85,0	85,5	84,4±0,6
3	Гиперхромизм Г.Х.Э. (%)	33,0	32,2	30,2	29,6	31,4±0,8
4	Остаточных ГХЭ после ренатурации (%)	13,3	15,8	—	—	—
5	ГХЭ после вторичного плавления	20	16	—	—	—

Результаты опытов показали, что параметры температурного плавления характеризуют нуклеиновую кислоту вируса оспы овец, как высокомолекулярную структуру ДНК. Об этом свидетельствуют узкий интервал плавления – переход спираль-клубок, равный 8-10°, высокие значения гиперхромизма и температуры плавления, равные 31,4% и 84,4%, соответственно. Расплавленная ДНК не полностью ренатурирует при быстром охлаждении. Вторичное плавление охлажденных ДНК типично для плавления односпиральных структур (плавный характер перехода спираль-клубок, низкое значение гиперхромизма). Все эти свойства характеризуют геном вируса оспы овец, как жесткую двуспиральную структуру дезоксирибонуклеиновой кислоты. Выявление конформационных особенностей нуклеиновой кислоты при гидролизе щелочью или кислотой дает дополнительную информацию о ее структуре и свойствах. На рис.50 представлена типичная кривая изменения величины поглощения ультрафиолетового света при 260 нм препаратами ДНК вируса оспы овец после действия на них щелочи или кислоты. Данные экспериментов титрования сведены в таблицу 30.

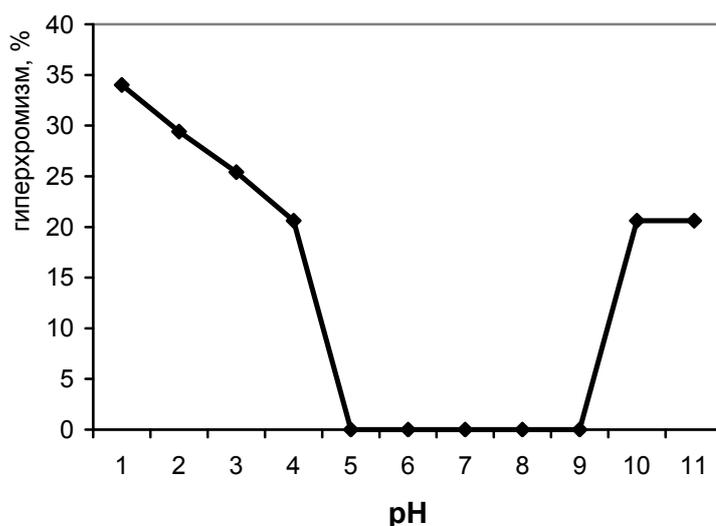


Рисунок 50 - Кривые титрования ДНК вируса оспы овец

Таблица 30 - Щелочно-кислотный гидролиз ДНК вируса оспы овец

Характеристика	Номер опыта			M±m
	1	2	3	
Максимальный гиперхромизм после действия кислоты (%)	37,0	34,0	35,0	35,3±0,9
Максимальный гиперхромизм после действия щелочи (%)	20,0	16,0	18,0	18,0±1,2
Область pH с постоянным значением оптической плотности	5-9	4,5-8,5	4-9	4,5-8,8

Эксперименты показали что, высокие величины гиперхромизма после действия кислоты и щелочи равные 35,3% и 18,0%, соответственно, свидетельствует о двуспиральном строении нуклеиновой кислоты вируса оспы овец, о ее высокой молекулярной массе. О ДНК-овой природе молекул в препаратах говорит довольно широкая область стабильности рН (от 4,0 до 9,0). Однако, следует отметить, что ДНК вируса оспы овец не полностью гидролизуется щелочью (ГХЭ=18-20%). ДНК с такой характеристикой может обладать белковыми сшивками (58, 66).[297,298]. Спектры поглощения ультрафиолетового света препаратами нуклеиновой кислоты вируса оспы овец при обработке рибонуклеазами совпадают с исходным, а обработанных ДНК-азой в присутствии 0,001 М $MgCl_2$ значительно увеличивается при 260 нм по сравнению с исходным. Характер спектра остается идентичным исходному (рис.51).

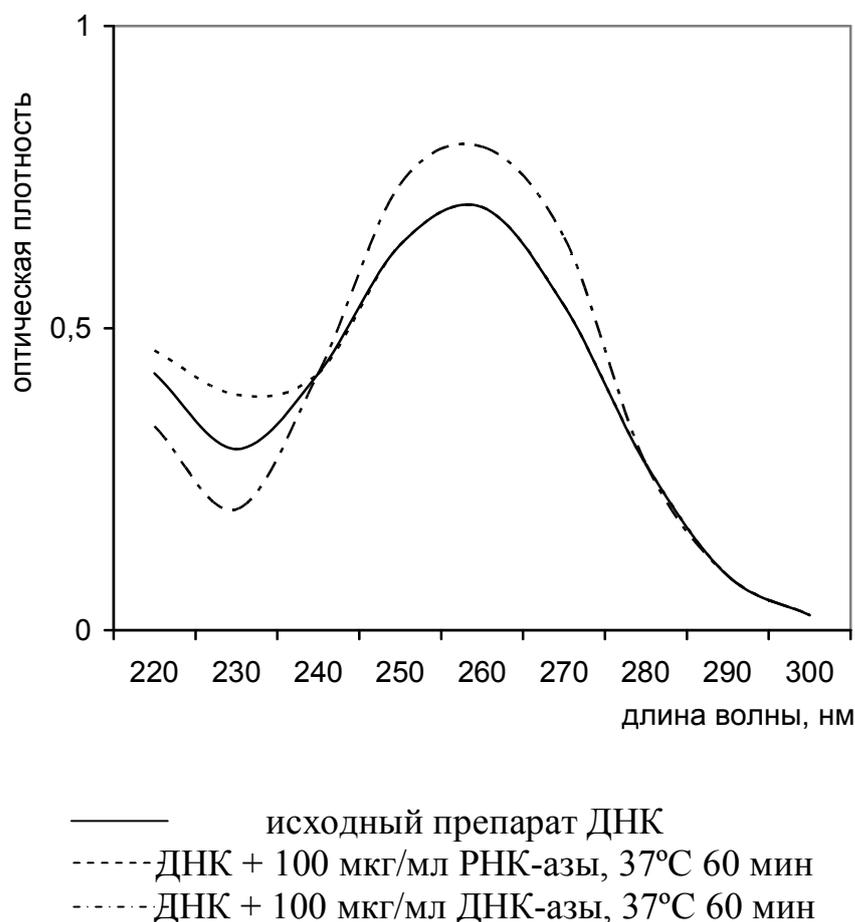


Рисунок 51 - Типичные спектры поглощения ДНК вируса оспы овец после обработки нуклеазами.

Таблица 31 - Гиперхромизм препаратов нуклеиновой кислоты после действия нуклеаз

Реакционная смесь	Номер опыта			M±m
	1	2	3	
Нуклеиновая кислота вируса + РНК-аза	0	0	0	–
РНК дрожжевая + РНК-аза	15,5	4,0	6,0	15,2±0,6
Нуклеиновая кислота вируса + ДНК-аза + 0,001 М MgCl ₂	1,8	6,5	8,5	25,6±1,9
ДНК из митохондрий печени овцы + ДНК-аза + 0,001 М MgCl ₂	27,0	5,5	4,0	25,5±0,9

Обработка препарата нуклеиновой кислоты вируса оспы овец РНК-азой не приводит к изменению поглощения при 260 нм, тогда как контрольная дрожжевая РНК при обработке той же нуклеазой в аналогичных условиях гидролизует и сопровождается гиперхромизмом, равным 15,2%. ДНК-азная обработка препаратов ДНК вируса в присутствии ионов Mg⁺⁺ приводит к гиперхромизму до 28,5% за сутки. Полнота гидролиза доказывается дижекцией контрольной ДНК из митохондрий печени (ГХЭ = 25,5%). Поглощение обработанной ДНК вируса дезоксирибонуклеазой резко увеличивается в первые 5-10 минут, далее рост его уменьшается, а затем к 5 часу инкубации становится постоянным и через 24 часа незначительно уменьшается (рис.52).

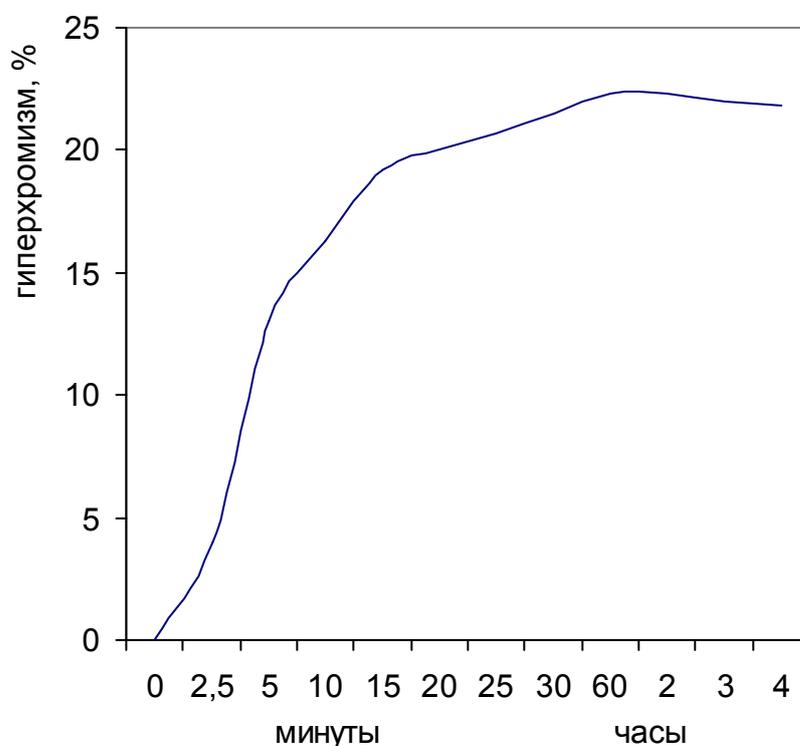


Рисунок 52 - Динамика гидролиза нуклеиновой кислоты вируса оспы овец ДНК-азой.

Полученные данные свидетельствуют, прежде всего, о том, что препарат нуклеиновой кислоты вируса оспы овец представлен молекулами дезоксирибонуклеиновой кислоты. Рибонуклеаза не деградирует препараты нуклеиновой кислоты вируса оспы овец, значит либо препараты не содержат РНК, либо в них присутствуют следовые количества РНК, обнаружение которых описанным методом невозможно.

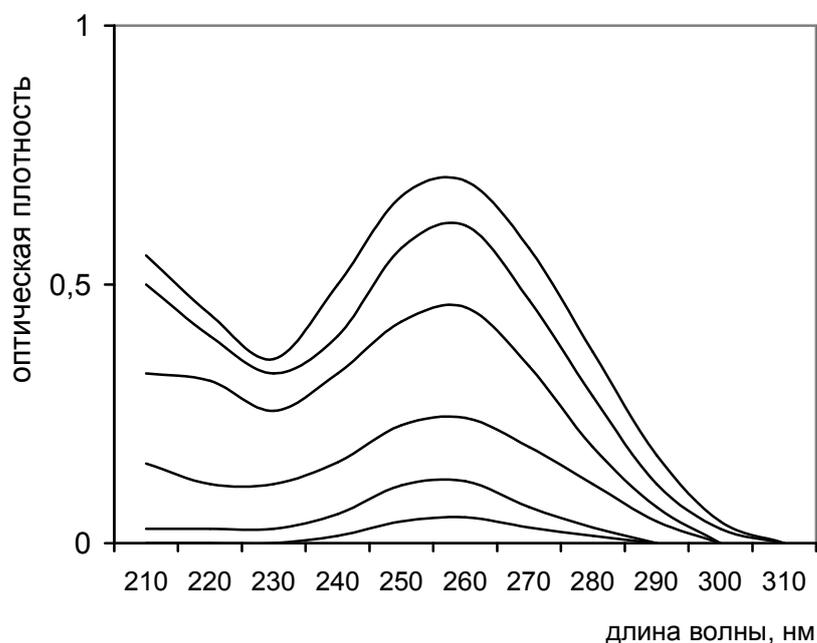
Седиментация биологических макромолекул – самый распространенный способ фракционирования их по молекулярной массе. Обычно для определения константы седиментации изучаемых объектов используют два способа центрифугирования в градиенте плотности сахарозы в присутствии маркера или без маркера. Чаще используют способ определения констант седиментации ($S_{20, w}$) РНК и ДНК без маркера [299-302]. В наших экспериментах для изучения седиментационных свойств ДНК вируса оспы овец использован способ без маркера в откидных роторах ультрацентрифуг. В таблице 32 представлены результаты центрифугирования и расчетов константы седиментации ДНК вируса оспы овец.

Таблица 32 - Характеристики седиментации ДНК вируса оспы овец

№ опыт	Кон-ция сахарозы для подготов. градиента(%)	Пределы градиент. сахарозы (%)	К-во ДНК (мкг)	Время центрифугир. (час)	Скорость вращен. (об/мин)	Вычислен. значен. конст. седим. (S)	
						Пик 1	Пик 2
1	20	10-15	200	1,70	26328	75,0	102
2	16	5-20	400	1,00	26340	60,1	95
3	16	5-20	600	0,82	48450	68,3	90,2
M±m	–	–	–	–	–	67,9±4,3	–

Полученные данные показали, что нуклеиновая кислота вируса оспы овец седиментирует в градиенте плотности сахарозы двумя пиками. Нуклеиновая кислота в пике №1 седиментируют со скоростью 67,9 S. Спектры поглощения фракции нуклеиновой кислоты из пика №1 после переосаждения соответствуют спектрам поглощения нуклеиновых кислот (рис. 53). Кроме указанных пиков, в экспериментах всегда наблюдается широкая полоса нуклеиновой кислоты, седиментирующая от верха пробирки до значений константы седиментации 45 S. Эта полоса представлена продуктами деградации молекул ДНК. После объединения фракций из пиков нами проведено определение концентрации нуклеиновой кислоты в каждой из них. Полученные результаты показали, что пик с константой седиментации 67,9 S составляет всего около 10% от количества ДНК, наносимой на градиент. Основную массу представляет широкая полоса до 45 S. Придонный пик нуклеиновой кислоты (около 100 S) составляет не более 1%. Полученная величина 67,9 S близка по значению к константе

седиментации оспы коров 68-72 S и геномных ДНК других членов группы поксвирусов – 70 S [15,67,76,84,91,303].



4,5,6,7,8,9 – номера фракций. Пик №2 также представлен молекулами ДНК. Рисунок 53 - Спектр поглощения ультрафиолетового света препаратом нуклеиновой кислоты из пика №1 после седиментации в градиенте 5-20% сахарозы и последующего переосаждения.

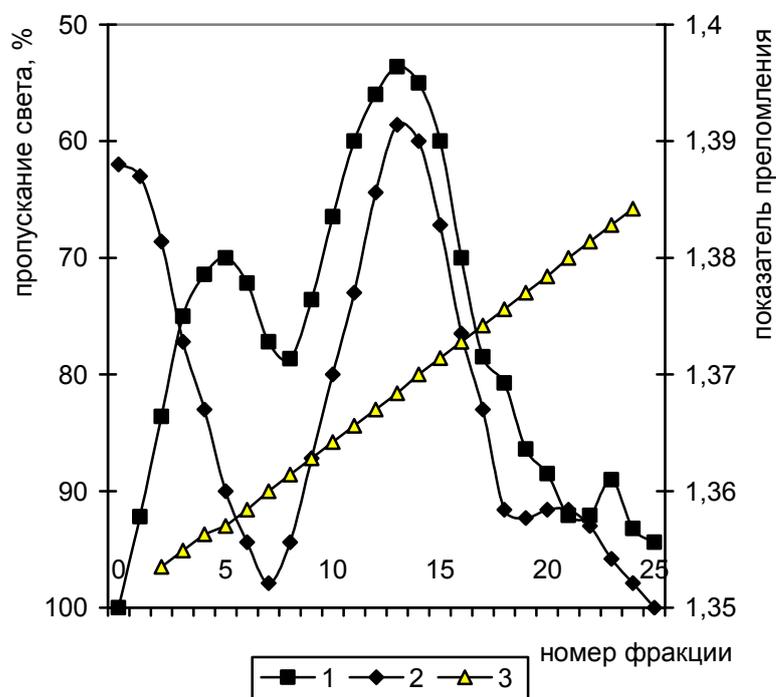
Метод равновесного центрифугирования в градиенте плотности – один из наиболее распространенных методов для фракционирования и характеристики ДНК. При этом обычно используются две соли цезия CsCl и Cs₂SO₄. Свойства градиентов плотности, приготовленных с этими солями несколько различны. При одинаковой скорости вращения ротора Cs₂SO₄ дает градиенты значительно круче, чем CsCl, что предпочтительно для фракционирования ДНК с сильно различающимися плавучими плотностями.

Известно, что время достижения макромолекулярного вещества до равновесного уровня значительно сокращается, если вещество не равномерно распределено в пробирке, а наслоено на уже создавшийся градиент соли перед центрифугированием. Также известно также, что более высокомолекулярные соединения быстрее достигают положения равновесия. По ранее разработанной нами методике замораживание раствора сернокислого цезия концентрацией 50 % в буфере STE, последующее оттаивание при комнатной температуре и выравнивание при +4°C приводят к образованию линейного градиента плотности с пределами от 1,33 г/см³ до 1,46 г/см³. При увеличении скорости центрифугирования снижается время, необходимое для концентрации полимера в зоне своей плотности [303]. Для

чего необходима максимальная скорость вращения ротора SW 50.1, равная 50000 об/мин.

Результаты центрифугирования в преформированном градиенте плотности Cs_2SO_4 препарата ДНК из вируса оспы овец показали (рис.54), что ДНК распределяется двумя пиками с плотностями: 1 пик $\rho=1,330 \text{ г/см}^3$; II пик $\rho=1,420 \text{ г/см}^3$. Переосаждение ДНК из фракций каждого пика позволило определить концентрацию молекул. Количество ДНК в пике 1 составляет 53%, а в пике II – 47%. ДНК из обеих пиков имеет характерный для нуклеиновых кислот спектр поглощения света в области длин волн 190-310 нм. ДНК из пика II плавится как типичная двуспиральная структура с максимальным гиперхромизмом, равным 31%. ДНК из пика 1 плавится с гиперхромизмом, равным всего 17%. Рецентрифугирование ДНК, переосажденной из пика II с плотностью $1,420 \text{ г/см}^3$ при условиях первичного центрифугирования показано, что основная масса ДНК (90%) концентрируется одним симметричным пиком с плотностью $1,420 \text{ г/см}^3$.

Положение пиков после центрифугирования, величина плавучей плотности молекул нуклеиновой кислоты в пиках и значение гиперхромизма говорят, прежде всего о том, что в них концентрируются ДНК, причем пик 1 представлен частично денатурированными формами ДНК, а пик II – целостными высокомолекулярными геномными ДНК вируса оспы овец.



1 – первичное центрифугирование, 2 – рецентрифугирование, 3 – значение плотности

Рисунок 54 - Плотностное распределение ДНК вируса оспы овец.

Из данных литературы известно, что плавучая плотность ДНК в Cs_2SO_4 варьирует у разных объектов от 1,42 до 1,45 г/см³ [304,305]. Среднее значение плавучей плотности ДНК вируса оспы овец после равновесного центрифугирования в преформированном градиенте Cs_2SO_4 составило $1,414 \pm 0,002$ г/см³.

По данным электронной микроскопии геномы поксвирусов имеют молекулярную массу 100-120 миллионов дальтон [65, 76, 77, 79, 82, 89]. Аналогичных данных по нуклеиновой кислоте вируса оспы овец в литературе нет.

Отработанный в лаборатории метод выделения ДНК вируса оспы овец позволил приступить к поискам способа ее электронно-микроскопического анализа. В основу исследований при приготовлении препаратов ДНК был взят метод белковой пленки [306-308]. Модификация метода – подбор угла наклона при напылении (6°), концентрации (10 мкг/мл), объема (0,2 мкл) наносимой ДНК, позволила получать электронно-микроскопические фотографии молекул нуклеиновой кислоты вируса оспы овец (рис.55).

Проведенные исследования показали, что толщина молекул ДНК вируса оспы овец лежит в пределах 20-22 Å, что соответствует толщине молекул типичных линейных, двуспиральных ДНК. При измерении длины нитей ДНК оказалось, что большая их часть имела длину 15-25 микрон, отдельные молекулы достигали длины 31-41 микрон (рис. 55). Исходя из того, что масса молекулы ДНК составляет в конфигурации Б 192 дальтона, молекулярная масса молекул ДНК, обнаруженных в препаратах составила для длин 15-25 микрон 29×10^6 – 48×10^6 дальтон, для длин 31-41 микрон 59×10^6 – 78×10^6 дальтон. Молекулы ДНК на препаратах были представлены в виде отдельных нитей или клубков. Кольцевых молекул при электронной микроскопии не обнаружено.

Можно предполагать, что фрагментация молекулы ДНК происходит как в момент выделения, так и в момент приготовления препаратов. Полученные нами величины молекулярных масс фрагментов молекулы ДНК вируса оспы овец близки к аналогичному показателю для других поксвирусов [70].

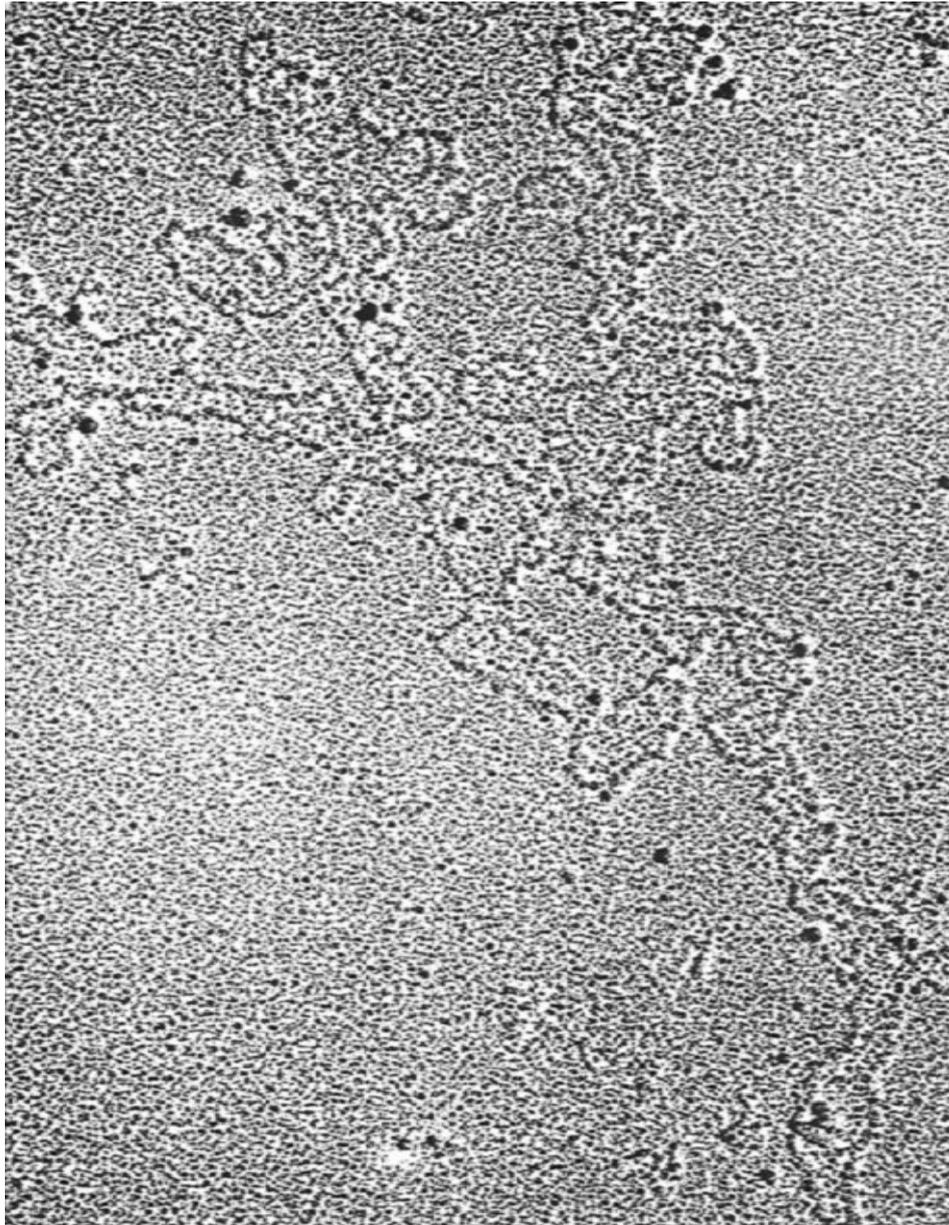


Рисунок 55 - Электронная микроскопия ДНК вируса оспы овец. Напыление Pt : Pd = 4 : 1. x 80000. Показана часть молекулы ДНК.

5.4 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Известно, что полиамины, встраиваясь в структуру нуклеиновых кислот, повышают их протективные свойства, защищая нуклеиновую кислоту от воздействия нуклеаз и способствует проявлению её инфекционности.

В наших экспериментах мы использовали нетоксичные для первичной культуры клеток почки ягненка и почки овцы дозы веществ-добавок, стабилизирующих молекулы ДНК перед нанесением препарата на монослой культуры клеток. Для обработки клеток применяли различные концентрации

протаминсульфата, ДЭАЭ-декстрана, цитохрома С, декстрансульфата, бычьего сывороточного альбумина, а также раствор хлористого кальция. ДНК вносили в концентрации от 5 мкг/мл до 50 мкг/мл. Время контакта ДНК с клетками составляло 1-3 часа. Проведенные опыты по выявлению инфекционности ДНК вируса оспы овец показали отсутствие цитопатогенного действия в монослое культур клеток. Электронно-микроскопический анализ срезов культур клеток, «инфицированных» препаратами вирусной ДНК не выявил наличие вирусных частиц в цитоплазме клеток или межклеточном пространстве. Препараты ДНК вируса оспы овец не проявляли какой-либо биологической активности у восприимчивых лабораторных животных при их подкожном введении.

5.5 РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

Для изучения структуры генома вирусов и решения задач диагностики заболеваний, вызываемых ДНК-содержащими вирусами, наряду с другими методами геномной инженерии, в настоящее время с высокой эффективностью используется метод рестрикционного анализа. Основными инструментами данного метода являются эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), различающиеся между собой по структурной организации, субстратной специфичности и потребности к кофакторам [14,15,309-313].

Важной функциональной характеристикой рестриктаз является место расщепления ДНК в узнаваемом участке. Более половины эндонуклеаз расщепляют ДНК внутри участка узнавания с образованием либо "тупых" концов (полностью спаренные фрагменты), либо образуются выступающие односторонние концы, получившие название "липких", т.е. способных "слипаться" с комплементарным концом, образующимся в противоположной цепи в результате ее разрыва [144,314,315]. Благодаря своим свойствам, каждая рестриктаза узнает свой строго специфичный сайт. При использовании для рестрикции нескольких эндонуклеаз и последующего анализа электрофоретических картин гидролиза можно добиться полного упорядочивания расположения сайтов рестрикции друг относительно друга и создавать таким образом карты исследуемых последовательностей ДНК. При гидролизе ДНК известной последовательности и конкретным ферментом на электрофореграммах наблюдаются фрагменты нуклеиновой кислоты специфичные по набору и размерам.

В связи с этим, рестриктазы, наряду с их значимостью для научных экспериментов, имеют огромное практическое значение, поскольку являются незаменимым инструментом молекулярных генетиков при выполнении диагностических исследований и выявления различных мутаций. В настоящее время в распоряжении исследователей имеется более 200

прототипов рестриктаз и следовательно имеется потенциальная возможность проводить рестрикцию ДНК и продуктов полимеразной реакции по 200 и более специфическим участкам узнавания. Таким образом стратегия рестрикционного картирования состоит в расщеплении геномной ДНК подходящим ферментом и последующем определении размера и порядка расположения образующихся фрагментов в геноме. Наиболее часто для этих целей используют так называемые "крупнощепляющие" рестриктазы – Hind III, BamH I, EcoR I, Sma I, Pst I, Bgl I, Bgl II, Sal I. Порядок расположения рестриктов дает возможность проводить сравнительный анализ рестрикции ДНК исследуемых возбудителей.

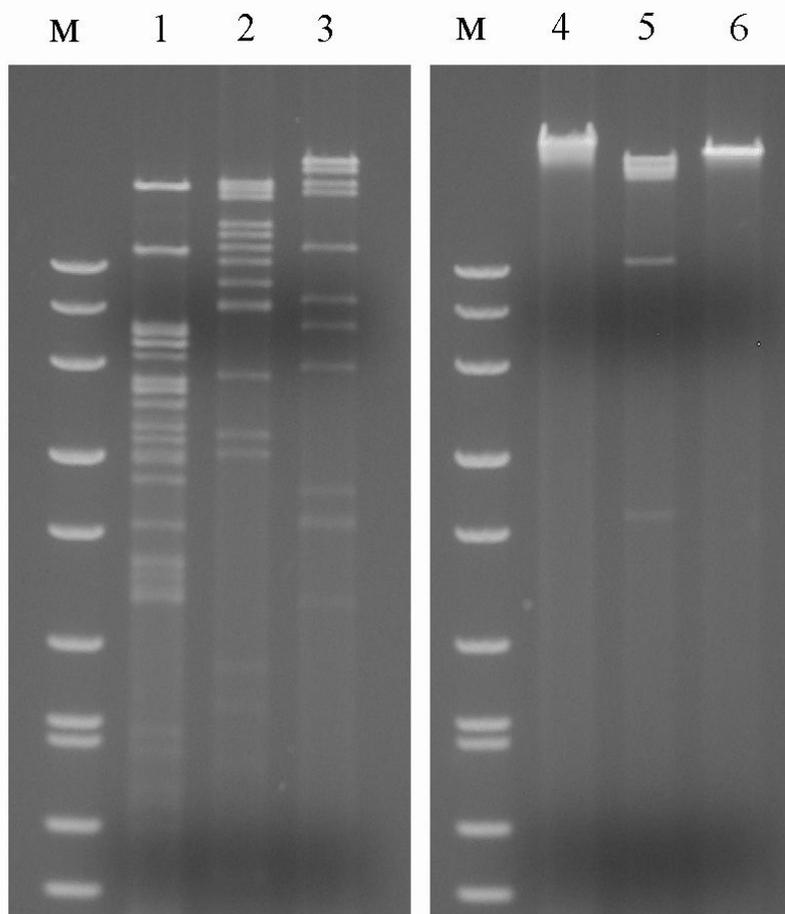
Данные по сравнительному анализу рестрикционных профилей, обработанных HindIII, ДНК каприпоксвирусов, вирусвакцины и вируса контагиозной эктимы (представителей родов *Ortho-* и *Parapoxvirus*) показали значительные различия между этими тремя представителями. Попытки гибридизации HindIII Р-фрагмента ДНК вируса оспы овец из Нигерии с HindIII фрагментами ДНК вируса контагиозной эктимы овец и вируса вакцины не увенчались успехом [61,316]. Результатами других исследований показано, что штаммы каприпоксвирусов не могут быть различимы по спектру хозяев, которых они заражают. Штаммы оспы овец и коз из Кении, оспы овец из Омана и оспы овец из Йемена не могут быть с точностью идентифицированы по этому критерию[317,318,319]. С помощью обработки ДНК крупнощепляющими рестриктазами (такими как HindIII) установлено, что гомология между двумя ДНК составляет более 80%[319]. На основе данных расчётов можно рассматривать эти вирусы как близкородственные, в независимости от спектра хозяев, которых данные вирусы поражают. Это заключение подтверждено с помощью данных перекрёстной гибридизации, которая показала высокую степень геномной гомологичности между тремя изолятами каприпоксвирусов [316].

Сравнительный рестрикционный анализ ДНК каприпоксвирусов и ДНК представителей орто- и парапоксвирусов с помощью рестриктазы HindIII , показал, что результаты могут быть использованы для их идентификации. Несмотря на то, что ДНК каприпоксвирусов меньше, их HindIII образцы содержат намного больше фрагментов, чем вирусвакцина или контагиозная эктима овец. Из этого следует, что последовательности геномов каприпоксвирусов сильно отличаются от таковых у орто - и парапоксвирусов. Но с другой стороны, присутствие рестрикционных фрагментов, которые быстро ренатурируются после денатурации, говорит о присутствии концевых ковалентно-замкнутых участков и у других поксвирусов [316].

В наших экспериментах по выбору оптимальных ферментов рестрикции ДНК вируса оспы овец были использованы рестриктазы Pst I, BamH I, Hind III, Sma I KpnI, и XhoI. Результаты рестрикции ДНК вируса оспы овец

показали, что для дифференциации штаммов вируса оспы овец оптимальными являются рестриктазы Pst I и BamH I.

Молекулярные размеры фрагментов гидролизованной ДНК различных штаммов вируса оспы овец, полученных с помощью рестриктаз PstI, показывают, что каждый штамм вируса обладает индивидуальным профилем рестрикции (табл.33 и рис. 56, 57).



М – маркер ДНК, 1-HindIII; 2-BamHI; 3-PstI; 4-SmaI; 5-KpnI; 6-XhoI

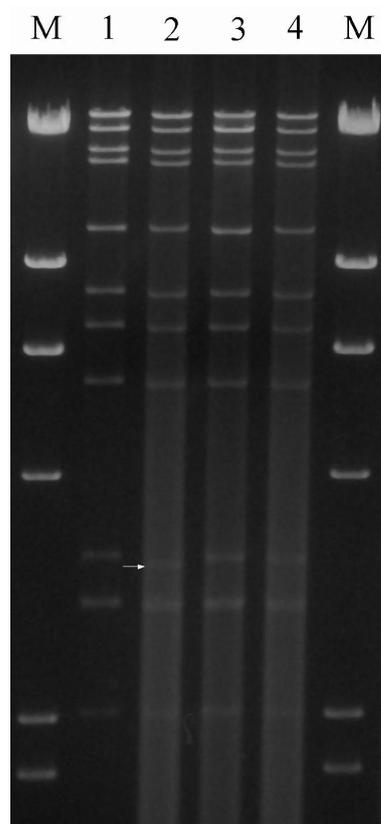
Рисунок 56 - Электрофоретический профиль рестрикции ДНК вируса оспы овец (штамм НИСХИ) различными рестриктазами.

Результаты рестрикции ДНК вируса оспы овец показали, что для дифференциации штаммов вируса оспы овец оптимальными являются рестриктазы Pst I и BamH I.

Эксперименты показали, что при гидролизе ДНК вируса оспы овец рестриктазой PstI наблюдается близкое сходство в профилях рестрикции у исследованных нами штаммов. Фермент расщепляет ДНК вирусов на 11 различных фрагментов.

Таблица 33 - Размеры и количество фрагментов ДНК штаммов вируса оспы овец, обработанной рестриктазой PstI (M+m, n=3).

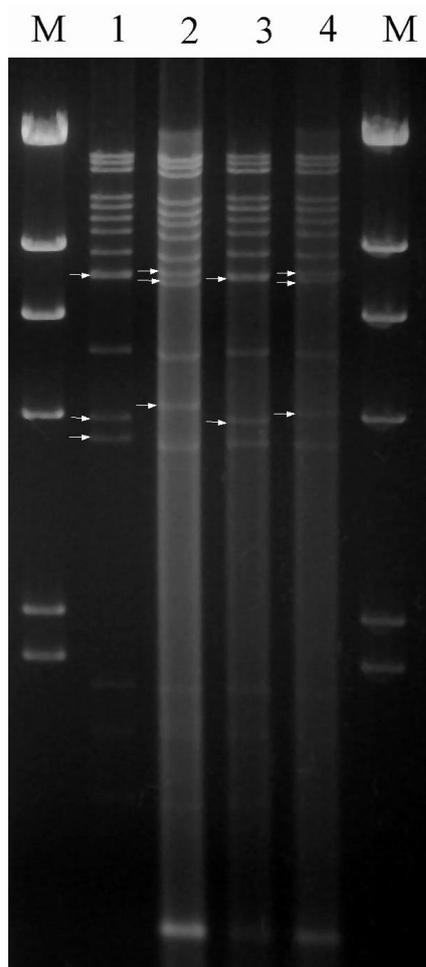
Фрагменты	Штаммы оспы овец			
	НИСХИ	Ставропольск.	Сары-Суйский	Афганский
	Размеры фрагментов, тыс. пар оснований (т.п.о.)			
A	25,05±1	25,05±1	25,05±1	25,05±1
B	22,73±1	22,73±1	22,73±1	22,73±1
C	19,82±0,8	19,82±0,8	19,82±0,8	19,82±0,8
D	18,44±0,4	18,44±0,4	18,44±0,4	18,44±0,4
E	11,86±0,4	11,86±0,4	11,86±0,4	11,86±0,4
F	8,41±0,4	8,41±0,4	8,41±0,4	8,41±0,4
G	7,28±0,4	7,28±0,4	7,28±0,4	7,28±0,4
H	5,93±0,4	5,93±0,4	5,93±0,4	5,93±0,4
I	3,52±0,4	3,46±0,4	3,52±0,4	3,52±0,4
J	3,10±0,4	3,10±0,4	3,10±0,4	3,10±0,4
K	2,31±0,4	2,31±0,4	2,31±0,4	2,31±0,4
Суммарный размер (т.п.о.)	128,45±6	128,39±6	128,45±6	128,45±6
Количество фрагментов	11	11	11	11



1—"НИСХИ", 2—"Ставропольский", 3—"Сары-Суйский", 4—"Афганский", М – ДНК фага λ (маркер).

Рисунок 57 - Электрофореграмма гидролизатов ДНК штаммов вируса оспы овец, обработанных рестриктазой PstI.

При суммировании размеров фрагментов, полученных обработкой ДНК рестриктазой PstI, величина длины геномов, составила $128,45 \pm 6$ т.п.о. ($83,36 \pm 3,8$ кД) для штаммов "НИСХИ", "Сары-Суйский" и "Афганский" и $128,39 \pm 6$ т.п.о. ($83,32 \pm 3,8$ кД) для штамма "Ставропольский". Анализ электрофореграммы ДНК штаммов вируса оспы овец, обработанных рестриктазой BamHI показал, что рестриктаза BamHI расщепляет ДНК всех 4-х штаммов на 16 фрагментов (рис.58 и табл.34). В результате исследований выявлены отличия в размерах I, J и L фрагментов гидролизатов ДНК. У штаммов "НИСХИ" и "Сары-Суйский", рестрикционные профили имели сходную картину. Рестрикционно-эндонуклеазный анализ генома вируса оспы овец с помощью рестриктазы BamHI показал, что существует ряд рестрикционных профилей, свидетельствующих о присутствии среди изолятов генетической гетерогенности вследствие точечных мутаций.



1—"НИСХИ", 2—"Ставропольский", 3—"Сары-Суйский", 4 – "А", М – ДНК фага λ
(маркер ДНК)

Рисунок 58 - Электрофореграмма гидролизатов ДНК штаммов вируса оспы овец, обработанной рестриктазой BamHI.

Таблица 34 - Размеры и количество фрагментов ДНК штаммов вируса оспы овец, обработанной рестриктазой BamHI.

Фрагмент	Штаммы вируса оспы овец			
	НИСХИ	Ставропольский	Сары-Суйский	Афганский
	Размеры фрагментов, т.п.о.			
A	19,99±0,3	19,99±0,3	19,99±0,3	19,99±0,3
B	18,99±0,2	18,99±0,2	18,99±0,2	18,99±0,2
C	17,84±0,2	17,84±0,2	17,84±0,2	17,84±0,2
D	14,25±0,1	14,25±0,1	14,25±0,1	14,25±0,1
E	13,15±0,1	13,15±0,1	13,15±0,1	13,15±0,1
F	11,96±0,1	11,96±0,1	11,96±0,1	11,96±0,1
G	10,72±0,1	10,72±0,1	10,72±0,1	10,72±0,1
H	9,16±0,1	9,16±0,1	9,16±0,1	9,16±0,1
I	8,20±0,1	8,36±0,1	8,20±0,1	8,25±0,1
J	8,14±0,1	7,80±0,1	8,14±0,1	8,00±0,1
K	5,70±0,1	5,70±0,1	5,70±0,1	5,70±0,1
L	4,32±0,1	4,62±0,1	4,32±0,1	4,43±0,1
M	4,04±0,1	4,04±0,1	4,04±0,1	4,04±0,1
N	1,84±0,1	1,84±0,1	1,84±0,1	1,84±0,1
O	1,58±0,1	1,58±0,1	1,58±0,1	1,58±0,1
P	1,24±0,1	1,24±0,1	1,24±0,1	1,24±0,1
Суммарный размер (т.п.о.)	151,12±2	151,24±2	151,12±2	151,14±2
Количество фрагментов	16	16	16	16

. О таких различиях свидетельствуют фрагменты разных размеров в результате утраты или приобретения сайтов расщепления рестрикционными эндонуклеазами. У вакцинного штамма "НИСХИ" произошли мутации, приведшие к изменению молекулярных масс рестрикционных фрагментов у эпизоотического штамма "Афганский", из которого он был получен в результате длительного пассирования.

Различия в профилях рестрикции наблюдаются так же у штаммов, полученных из различных географических регионов ("Ставропольский", "Сары-Суйский" и "Афганский"). Существенные различия у всех трёх штаммов наблюдаются при обработке геномной ДНК вирусов рестриктазой BamHI.

При суммировании размеров фрагментов, полученных обработкой ДНК рестриктазой BamHI, рассчитана величина геномов, которые имеют очень близкие значения, и составляют для штаммов: "НИСХИ" – 151,12±2 т.п.о. (98,08±1,9 кД), "Ставропольский" - 151,24±2 т.п.о. (98,15±1,9 кД), "Сары-Суйский" – 151,12±2 т.п.о. (98,08±1,9 кД) и "Афганский" – 151,14±2 т.п.о. (98,09±1,9 кД).

Геномы вируса оспы овец эпизоотических штаммов "TU" и "A", вакцинного штамма "НИСХИ", секвенированы и объединены в полные геномы размером 149,955, 150,057 и 149,662 соответственно. Геномы оспы овец и оспы коз, подобно другим представителям поксвирусов, содержат центральный регион, граничащий двумя идентичными инвертированными концевыми повторностями (inverted terminal repeat -ITR). Секвенированные концевые участки штаммов "TU", "A" и "НИСХИ" имеют размеры 2,213, 2,349 и 2,127 п.н., соответственно.

Нами полученные данные по некодируемым тандемным последовательностям генома штаммов вируса оспы овец "TU", "A" и "НИСХИ". Установлено, что у всех штаммов вирусов оспы овец тандемные повторности, располагающиеся ближе к концам всех открытых рамок считывания (ОРС) содержат 46 оснований. Штаммы вирусов оспы овец содержат 147 ОРС, являющиеся предполагаемыми белками и имеющие аналоги на геноме вируса бугорчатки. Эти гены показали до 93% кодирующей последовательности и кодировали белки размером от 53 до 2027 аминокислот. Центральный регион генома вирусов оспы овец (ОРС 024-123) представлен консервативными генами, вовлеченными в основные механизмы репликации, включающих вирусную транскрипцию и репликацию, а также образование и сборку внутриклеточного зрелого и внеклеточного оболочечного вирионов.

Концевые регионы генов вирусов оспы овец (ОРС 001 - 0023), как и у вируса бугорчатки, содержат гены, кодирующие белки с предполагаемыми свойствами вирулентности и отвечающие за специфичность круга хозяев.

Сюда входят группы генов - пять генов с повторяющимися анкириновыми "мотивами" и три гена с повторяющимися келч-подобными "мотивами", а также другие гены, которые, вероятно, задействованы (участвуют) в модификации вирусов или в отклонении от проявления ответов клеток хозяина, от апоптоза, от проявления иммунных ответов или процессов, включая гомологи цитокин-связывающих белков, интерлейкина-10 (IL-10), EGF(фактор роста эпидермиса)-подобного белка, PKR-ингибиторов, серпина, а также гены поксвирус-специфичной вирулентности и диапазона хозяев.

5.6 НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ

В результате секвенирования геномов штаммов "А" (Афганский) и "НИСХИ" вируса оспы овец проведенное нами установлено, что геном вируса представлен ДНК длиной 150057 пар нуклеотидов у штамма "А" и 149662 пар у штамма "НИСХИ" (рис.59). При анализе нуклеотидного состава геномов установлено, что сумма А+Т нуклеотидных оснований составляет около 75% по отношению к G+C составу для представителей рода

Capripoxvirus. Секвенирование концевых участков геномов выявило, что их длина у всех штаммов имеет различные величины. Так, длина инвертированных концевых повторов для штамма “А” составляет 2349 п.н. и 2127 п.н. для штамма “НИСХИ” [14,283].

5.7 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ ОСПЫ ОВЕЦ И ОСПЫ КОЗ

На уровне генома вирусы оспы овец и оспы коз имеют высокую степень сходства и более 96% идентичности по нуклеотидной последовательности всей длины геномов.

В то же время внутривидовая идентичность геномов по нуклеотидной последовательности составляет до 99%. На примере сравнительного анализа штаммов “TU” и “А” вируса оспы овец было показано около 192 геномных изменений, включающих 131 одиночных нуклеотидных замен. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей геномов вирусов оспы овец и оспы коз показывает, что несмотря на высокую степень идентичности по нуклеотидной последовательности, данные вирусы филогенетически различны.

Эпизоотические штаммы вирусов оспы овец и оспы коз проявляют 4% различие по аминокислотной последовательности. Геномы штамма “А” вируса оспы овец и штамма “Peloor” вируса оспы коз имеют 101 ген со степенью гомологичности 96-100% по аминокислотам, 39 генов с процентом идентичности от 91% до 95% и 7 генов имеющие степень идентичности по аминокислотным остаткам 80-90%. 26 открытых рамок считывания (ОРС) геномов вирусов оспы овец и оспы коз различаются по длине (от 1 до 18 аминокислот) вследствие вставок или делеций аминокислот в пределах ОРС или в изменении старт- или стоп-кодонов.

Открытая рамка считывания ОРС 136а генома вируса оспы коз содержит 90 аминокислот, гомологичные к концевому участку ОРС LSDV136 вируса бугорчатки, однако данная последовательность отсутствует в геноме вируса оспы овец.

Более высокие различия между геномами вирусов оспы овец и оспы коз как по аминокислотным остаткам так и по размерами наблюдаются в концевых регионах генома в генах с функциями вирулентности и круга хозяев. В данной области, составляющая 35% генома (ОРС 001-023 и ОРС 122-156), выявлено 97%-ная идентичность по аминокислотной последовательности и 54% различий по размеру ОРС между вирусами оспы овец и оспы коз. У 7 ОРС проявлена 82-90% идентичность по аминокислотам, среди которых гомологичность ОРС 021 к M016L миксома вируса, ОРС 135 к интерферон связывающему белку вирусвакцины, ОРС 142 к N1L секретируемому фактору вирулентности вирусвакцины, а также 4 ОРС различающиеся по размеру (от 1 до 14 аминокислот), включающие ОРС специфического для капripоксвирусов, ОРС 076 гомологичный фактору

поздней транскрипции 4, ОРС 129 и M130R миксомы вируса и ОРС 138 гомологичная белку ОХ-2.

Различия по длине ОРС (от 4 до 19 аминокислотных остатка) между вируса оспы овец и оспы коз также представлены в гомологах рецептора цитокина СС (ОРС 011), EGF-подобного фактора роста (ОРС016), кельч-подобного белка (ОРС 019), ингибитора связывания двухцепочечной РНК (ОРС 035), RPO 30 (ОРС036), белка mutT вирусвакцины и т.д. Данные различия в белках, расположенных на концевых участках генома выражают эффект вирулентности вируса и специфичности круга хозяев [317,318].

Вакцинные штаммы "НИСХИ" вируса оспы овец и G-20 вируса оспы коз имеют высокую степень идентичности по аминокислотной последовательности (около 99,9%) к своим эпизоотическим штаммам.

Так вакцинный штамм "НИСХИ" имеет только 71 геномных различий в сравнении с эпизоотическим штаммом "А". Данные различия включают 36 одиночных нуклеотидных замены, 15 вставок от 1 до 29 нуклеотидов и 20 делеций от 1 до 4 нуклеотидов, в целом повлиявших на 17 белков.

Вакцинный штамм "G-20" имеет очень высокую степень идентичности с эпизоотическим штаммом "Pelooq" вируса оспы коз. Различия наблюдаются только в семи геномных участках и включают четыре одиночных нуклеотидных замен, два одиночных нуклеотидных вставок и одну делецию из 28 нуклеотидов, оказавших влияние на 6 белков.

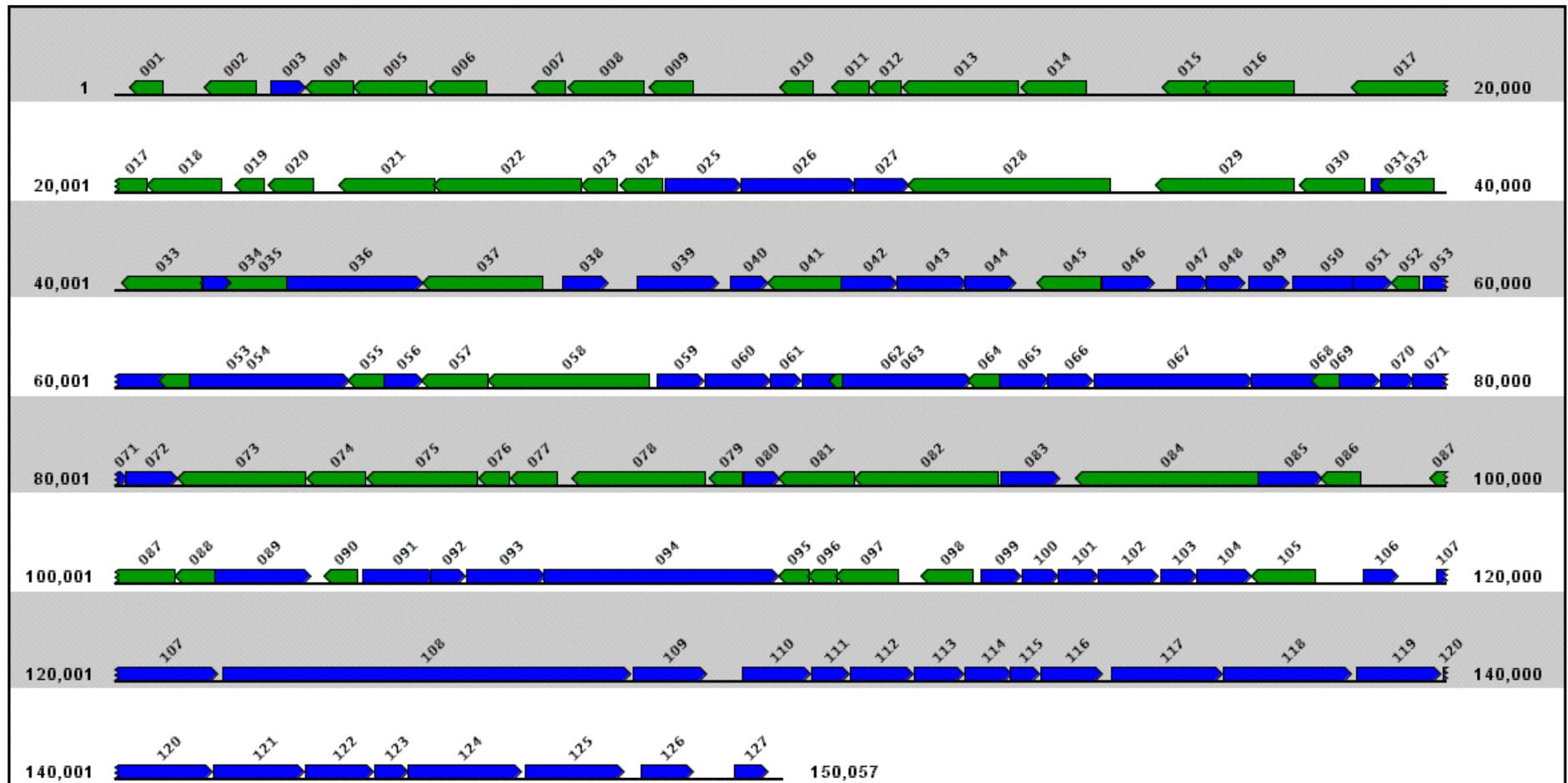
Анализ данных также показал, что геномные изменения являются результатом вирусной аттенуации и эти изменения оказали влияние только на гены, отвечающие за вирулентность и специфичность круга хозяев.

У вакцинного штамма "НИСХИ" смещение рамки считывания представлены в генах ОРС 145 и ОРС 148, содержащих анкириновые повторы. Каждый ген разделен на два маленьких гена ОРС 145а и ОРС 145b; ОРС 148а и ОРС 148b (рис.59). Гены анкириновых повторов поксвирусов ассоциированы с функцией специфичности круга хозяев и они могут ингибировать вирус индуцированный апоптоз. Разрушение двух из пяти генов анкириновых повторов в геноме вакцинного штамма "НИСХИ" вируса оспы овец подтверждает важную роль их в вирулентности вируса и специфичности круга хозяев [275].

Вакцинный штамм "G-20" вируса оспы коз несет мутации во всех генах, кодирующие кельч-подобные белки (ОРС 019, 144, 151). ОРС 019 имеет одиночный сдвиг рамки считывания, являющийся результатом образования двух маленьких открытых рамок считывания (ОРС 019а и ОРС019b), ОРС 144 имеет 28-членную делецию в некодируемом участке и ОРС 151 содержит одиночную замену аминокислот (N на H).

Эти три ОРС у эпизоотических штаммов каприпоксвирусов содержат дефектные концевые повторы, гомологичные к кельч белкам и кельч-подобным белкам, обнаруженным у некоторых представителей семейства хордопоксвирусов.

“A”- 150057 п.н.,127- OPC



“НИСХИ”- 149662 п.н., 128 - ОРС

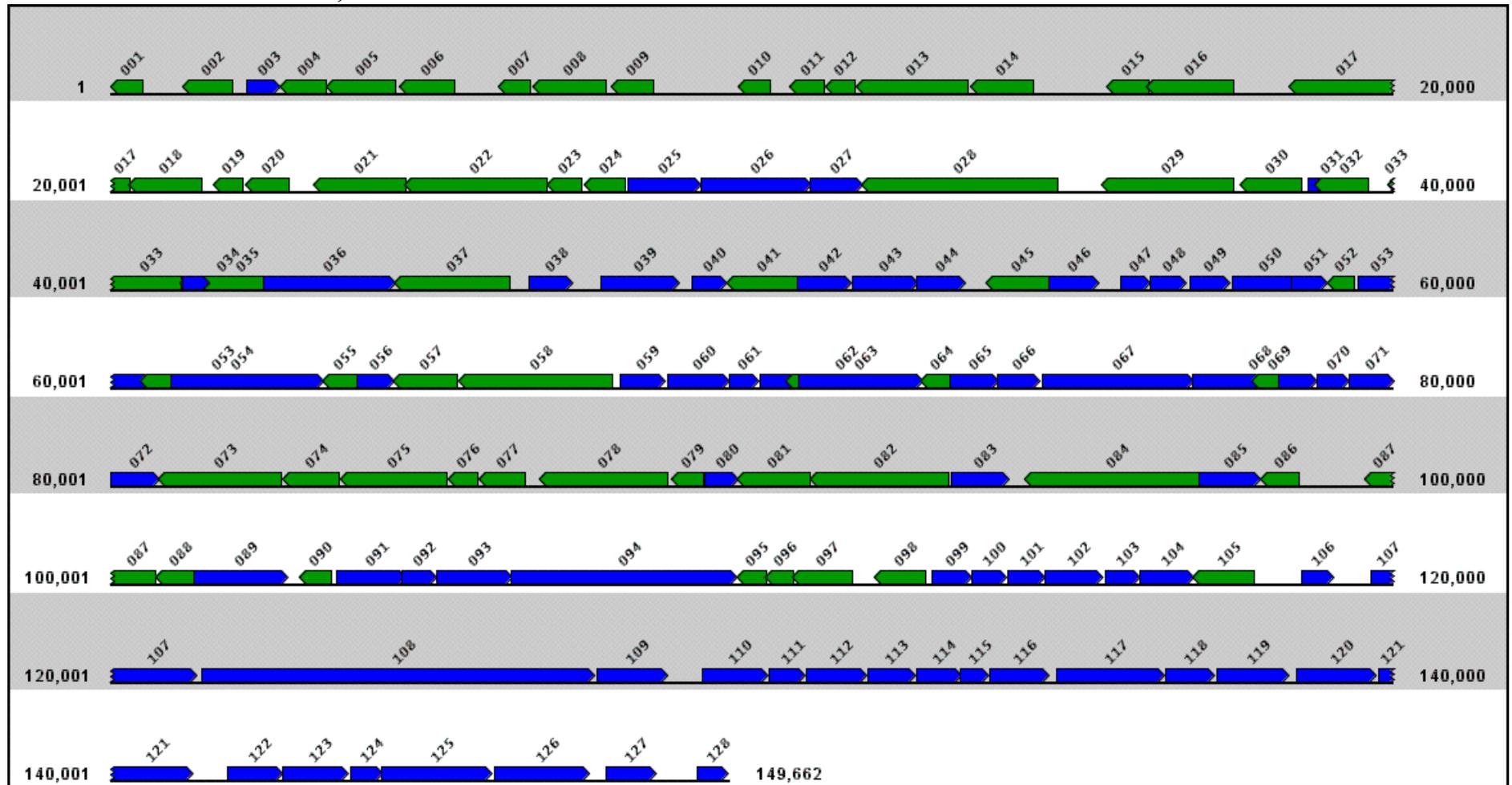


Рисунок 59 - Генетические карты геномов вируса оспы овец, штамм "А" и штамм "НИСХИ".

Кельч и кельч-подобные белки имеют аминотерминирующую область (ВТВ/POZ domain), участвуют в формировании белковых комплексов многочисленных клеточных актин-связывающих и регуляторных белков.

Изменения, наблюдаемые во всех кельч-подобных генах вакцинного штамма “G-20” вируса оспы коз могут быть очень важными при аттенуации эпизоотического вируса.

ГЛАВА 6

ПЦР ДИАГНОСТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ

В последние годы в диагностике и классификации вирусных инфекций широкое распространение получили молекулярно-генетические методы, такие как ДНК-ДНК гибридизация, ДНК-РНК гибридизация, рестрикционный анализ, ПЦР, а также их сочетание друг с другом или другими методами. Отличительной особенностью данных методов является их поразительная чувствительность и специфичность.

Изучение нуклеиновых кислот обусловлено, прежде всего, тем, что они являются носителями генетической информации и определяют биологические свойства бактерий и вирусов. И вполне естественно, что различия, например, между различными штаммами микроорганизмов связаны с различиями в строении ДНК и РНК. Соответственно, методы, основанные на выявлении этих различий в строении нуклеиновых кислот, могут служить для индикации того или иного вида микроорганизмов в биологическом материале [320-323].

Принцип ПЦР основан на реакции амплификации определенных участков нуклеиновой кислоты. Специфичность реакции определяется связыванием небольших участков ДНК (праймеров) с комплементарными им участками ДНК изучаемого вируса. На месте сцепления праймеров запускается синтез новых небольших молекул ДНК строго определенной длины. Длина молекулы определяется расстоянием между праймерами. На вновь синтезированную молекулу опять гибридизируются такие же праймеры, иницируя синтез новой ДНК, и этот цикл может повторяться 20-30 раз, наработка ДНК в течение этих циклов вполне достаточна для обнаружения их методом электрофореза [61,323].

Разработка тест-системы на основе ПЦР основано на сложнейшем математическом вычислении, основой которого является анализ нуклеотидных последовательностей ДНК. Для получения информации о нуклеотидной последовательности геномов необходимо проведение расшифровки (секвенирования) ДНК, однако в настоящее время нередко используют последовательности ДНК уже полученные кем-то и размещенные в общедоступной базе данных. Современное программное обеспечение позволяет не только подобрать оптимальные праймеры, но и рассчитывать параметры реакции, смоделировать их на компьютере [324].

Специфичность ПЦР зависит от многих обстоятельств, таких как конструирование праймеров, GC-состав ДНК, времени и температуры денатурации и элонгации, состава буферных систем, количества циклов амплификации и т.д.

Первостепенными и необходимыми условиями при разработке ПЦР являются стратегия конструирования специфических праймеров для наработки нуклеотидных последовательностей и определение оптимальных параметров ПЦР амплификации. При конструировании праймеров не последнюю роль играет длина олигонуклеотидов. Обычно используемые в ПЦР праймеры варьируют по длине от 15 до 22 нуклеотидных звеньев, но они могут быть значительно короче или длиннее. Не менее важным критерием при постанове ПЦР является так называемый GC-состав как всего генома анализируемого организма (который может варьировать у микроорганизмов в очень широких пределах от 30 до 70%), так и самих праймеров. В идеале состав оснований в олигонуклеотиде составляет от 45 до 55 % [324-326].

Одним из основных параметров при конструировании праймеров является подбор температуры плавления, при котором параметры для одной пары праймеров должны быть в одинаковом диапазоне. Для вычисления параметров олигонуклеотидов существуют специальные математические формулы, варьирующие от многих параметров, например, длина праймера, его нуклеотидный состав и т.д. В среднем при длине в 18-20 нуклеотидов температура плавления праймера составляет 50-60 °С.

Большое значение при проведении ПЦР имеют такие параметры как температуры денатурации, отжига и элонгации ДНК, а также их временной режим. Температура денатурации необходима прежде всего для разделения цепей ДНК и имеет довольно высокие значения. Обычно время денатурации составляет 1 мин при 94 °С и если это возможно, то время денатурации уменьшают до 30 сек и менее. В некоторых случаях увеличивают температуру денатурации, уменьшая его длительность [327].

Критическим параметром является температура отжига и элонгации и их время. Данные значения находятся в большой зависимости от длины праймеров и их нуклеотидного состава. В среднем для отжига праймеров используют температуру чуть ниже температуры плавления олигонуклеотида. Оптимальным режимом для элонгации ПЦР продукта является 70-72 °С в течение от 0,5 до 3 минут.

Другим важным параметром при постановке ПЦР является количество циклов реакции. Данное значение подбирается, прежде всего, для визуализации продукта ПЦР в электрофорезе, т.е. от наработки фрагментов ДНК. Недостаточное количество циклов амплификации не позволит выявлять полосы ДНК, тогда как его чрезмерное количество влияет на ингибирование реакции. В среднем количество циклов ПЦР составляет 30-40 [323-327]. Многие параметры реакции подобранные при помощи различных

компьютерных программ по мере оптимизации уточняются эмпирически в ходе экспериментальных работ при проведения ПЦР. Компьютерные подсчеты, указывающие на очень высокую специфичность ПЦР, на практике будут иметь место лишь при отжиге праймеров в условиях 100% спаривания, зависящая от многих факторов реакции [328]. Метод ПЦР широко внедряется для диагностики различных вирусных инфекций. Литературные данные показывают на широкий спектр объектов исследований [329-340].

Исследования по применению метода ПЦР для выявления *Carpoxviruses* показали возможность диагностики вирусов оспы и выявления их геномной ДНК в культуральной суспензии и органо-тканевых материалов [318,334].

Также представлены работы по идентификации вируса оспы овец из различных вирусосодержащих материалов. В экспериментах с использованием специфических праймеров KS-1 и InS-1 были идентифицированы различные штаммы вируса оспы овец как из клинических образцов, так и из инфицированной культуры клеток [9,220,338].

6.1 КОНСТРУИРОВАНИЕ И СИНТЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ МЕТОДОМ ПЦР

На основании анализа литературных данных нами были проведены исследования по разработке метода диагностики оспы овец на основе полимеразной цепной реакции. В результате для постановки ПЦР были подобраны праймеры OLIGO KS-1,5/ KS-1,6 и OLIGO InS-1,1/ InS-1,1' [15]. Характеристики данных праймеров представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Краткие характеристики специфических праймеров для идентификации вируса оспы овец.

Наименование праймера (5'→3')	Старт. позиция	Длина	T _m	Последовательность	Продукт амплификации (п.о.)
OLIGO KS-1,5/KS-1,6 Левый праймер Правый праймер	1249 1398	20 20	60,12 59,97	gtg tga ctt tcc tgc cga at tct att tta ttt cgt ata tc	149
OLIGO InS-1,1/InS-1,1' Левый праймер Правый праймер	452 740	20 20	60,13 59,97	aga aac gag gtc tcg aag ca gga ggt tgc tgg aaa tgt gt	289
NSV-1 NSV-2	169 395	20 20	55,3 55,3	cac ccc aat att ctg ctg ct gga ggt tgc tgg aaa tgt gt	227

Для подбора специфических праймеров были проанализированы секвенированные концевые участки генома оспы овец штамма "НИСХИ".

Полученные характеристики праймеров показывают полное соответствие параметрам олигонуклеотидов, используемых для постановки ПЦР [324].

Компьютерно-моделированные последовательности праймеров в дальнейшем были нами синтезированы (рис. 60) использованы для постановки ПЦР при оспе овец



Рисунок 60 - Локализация праймеров NSV-1, NSV-2 и продукт амплификации при проведении ПЦР на оспе овец

6.2. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ПЦР ПРИ ОСПЕ ОВЕЦ

Специфичность и чувствительность ПЦР находятся в большой зависимости от таких параметров, как концентрация $MgCl_2$ и KCl , pH буфера, а так же концентрации фермента в реакционной смеси. Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР был использован набор для оптимизации ПЦР – "PCR Optimization Kit II", фирмы "Sigma".

В ходе работы были апробированы 12 буферных систем, которые различались концентрацией хлористого магния и калия, а также величиной pH. Состав буферных систем приведен в таблице 36.

Таблица 36 - Буферные системы оптимизации ПЦР

№№ буфера	Состав ПЦР буфера, x10
1	100 mM Трис HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
2	100 mM Трис HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl
3	100 mM Трис HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
4	100 mM Трис HCl, pH 8.3, 35 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl
5	100 mM Трис HCl, pH 8.8, 15 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
6	100 mM Трис HCl, pH 8.8, 15 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl
7	100 mM Трис HCl, pH 8.8, 35 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
8	100 mM Трис HCl, pH 8.8, 35 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl
9	100 mM Трис HCl, pH 9.2, 15 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
10	100 mM Трис HCl, pH 9.2, 15 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl
11	100 mM Трис HCl, pH 9.2, 35 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl
12	100 mM Трис HCl, pH 9.2, 35 mM MgCl ₂ , 750 mM KCl

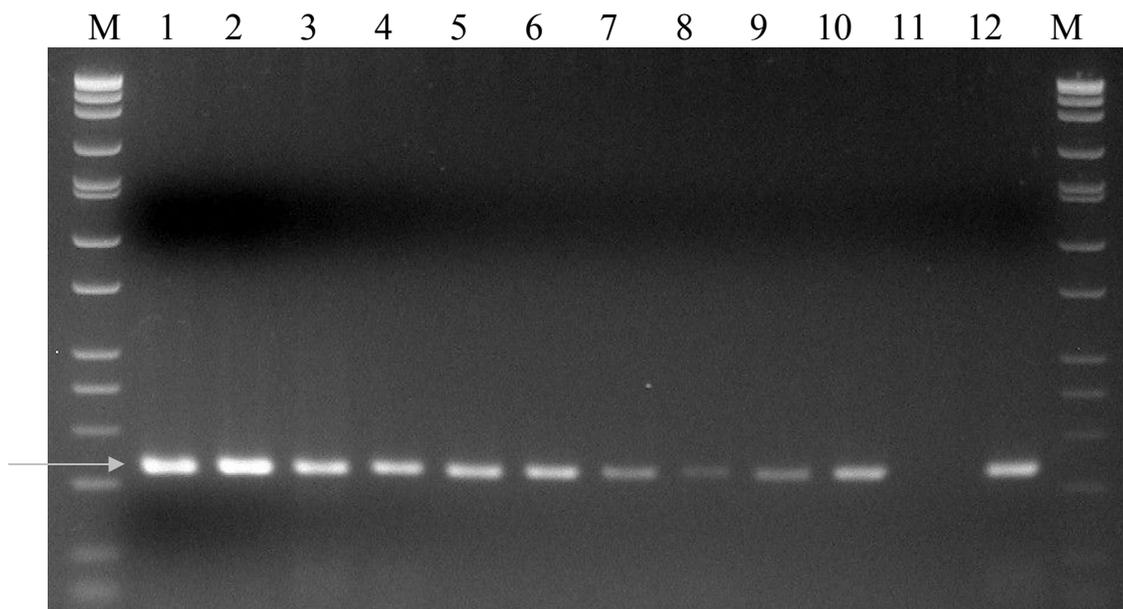
Для амплификации ДНК использовали реакционную смесь объемом 50 мкл, состоящую :

x10 (один из 12 буферов) ПЦР буфер	- 5 мкл
x50 универсальный буфер (20 mM ТрисHCl, pH 8.0, 250 нМ ЭДТА)	- 1 мкл
10 mM dNTP mix	- 1 мкл
Праймер NSV-1 (15 мкг/мл)	- 1 мкл
Праймер NSV-2 (15 мкг/мл)	- 1 мкл
ДНК вируса оспы овец (4,6 мкг/мл)	- 2 мкл
Таq ДНК полимеразы (50 Ед)	- 0,5 мкл
Деиониз. стерил. вода	- 39 мкл

Амплификацию специфического участка проводили на термоциклере "GeneAmp PCR 9700", фирмы "Applied Biosystems" при следующих режимах:

пре-денатурация, 95 °С	- 5 мин
денатурация, 95 °С	- 20 сек
отжиг, 50 °С	- 15 сек
репликация, 72 °С	- 10 сек.
пост-репликация, 72 °С	- 15 мин

Амплификацию продукта ПЦР осуществляли в течение 35 циклов. По завершении наработки ДНК, полученные пробы анализировали в электрофорезе в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Результаты экспериментов показали (рис.61), что продуктом амплификации является участок ДНК генома вируса оспы овец длиной 227 пар оснований в виде наиболее яркой и четкой одной полосой.



М – маркер ДНК, 1-12 – буферные системы, продукт - . 227 п.о.

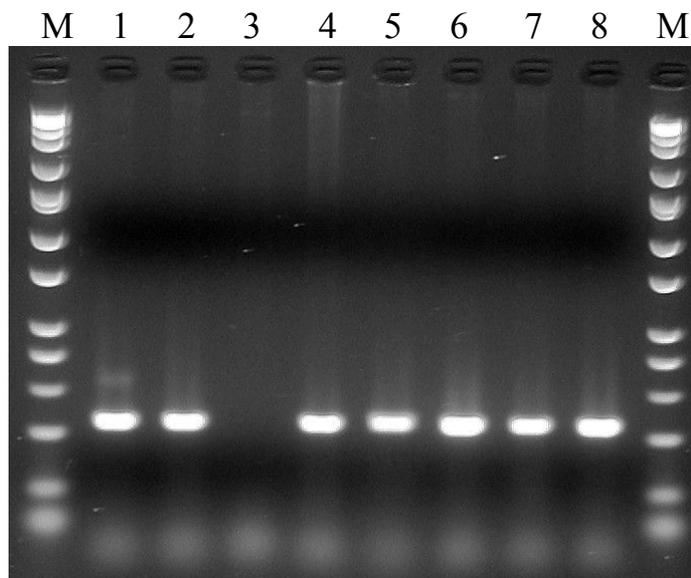
Рисунок 61 - Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец в различных буферных системах и режимах.

Данные литературы по оптимизации ПЦР показывают, что использование различных, так называемых добавочных компонентов к основному буферному раствору, оказывает различное влияние на процессы амплификации. Например, формамид используют для увеличения специфичности при высоком содержании ГЦ-оснований. При использовании в наших экспериментах бычьего сывороточного альбумина, формамида, диметилсульфоксида, глицерина, сульфата аммония, бетаина и связующего белка, которые вносились в основной буфер, существенного положительного влияния не выявлено (рис.62). Добавление сульфата аммония в концентрации 30мМ ингибировало процесс амплификации, а использование нативного связующего белка вызывало появление добавочной более тяжелой полосы ДНК. На основе полученных данных подобран оптимальный десятикратный буферный раствор, состоящий из 100 mM Трис HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 750 mM KCl, позволяющий проводить наработку специфического участка ДНК с генома вируса оспы овец длиной в 227 пар оснований.

6.3.ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЦР ПРИ ОСПЕ ОВЕЦ

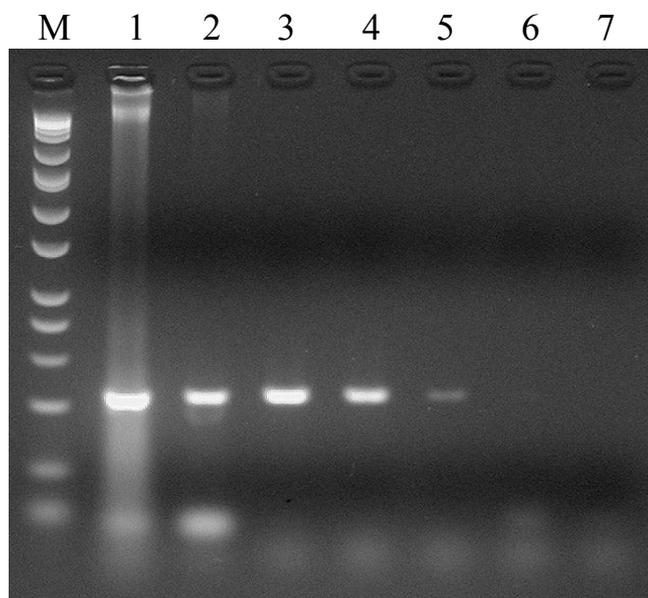
При определении чувствительности полимеразной цепной реакции при диагностике вируса оспы овец нами использованы отработанные оптимальные условия реакции и различные разведения ДНК вируса. Эксперименты показали, что метод ПЦР при диагностике оспы овец позволяет выявлять ДНК вируса оспы в количестве 2-20 пг в пробе (рис.63). Аналогичные результаты представлены в работе О. Mangana-Vougiouka

[327], с использованием аналогичных праймеров, при этом чувствительность метода составляла 30 пг.



М – маркер ДНК, 1 – нитевой связующий белок, 2 – формамид, 3 – сульфат аммония, 4 – БСА, 5 – глицерин, 6 – диметил сульфоксид, 7 – бетаин, 8 - деонизированная вода (контроль)

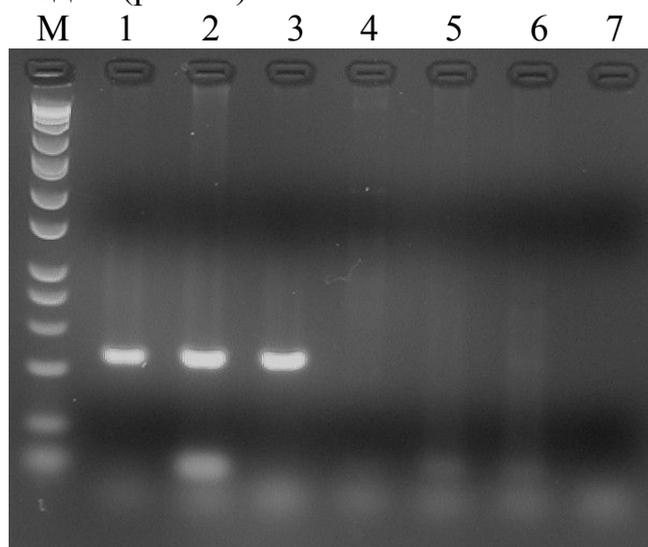
Рисунок 62 - Электрофореграмма амплифицированной ДНК вируса оспы овец с различными добавками.



М – маркер ДНК, 1 – 200 нг ДНК вируса, 2 – 20 нг ДНК вируса, 3 – 2 нг ДНК вируса, 4 – 0,2 нг ДНК вируса, 5 – 20 пг ДНК вируса, 6 – 2 пг ДНК вируса, 7 – 0,2 пг ДНК вируса.

Рисунок 63 - Электрофореграмма образцов, содержащих различные количества ДНК вируса оспы овец.

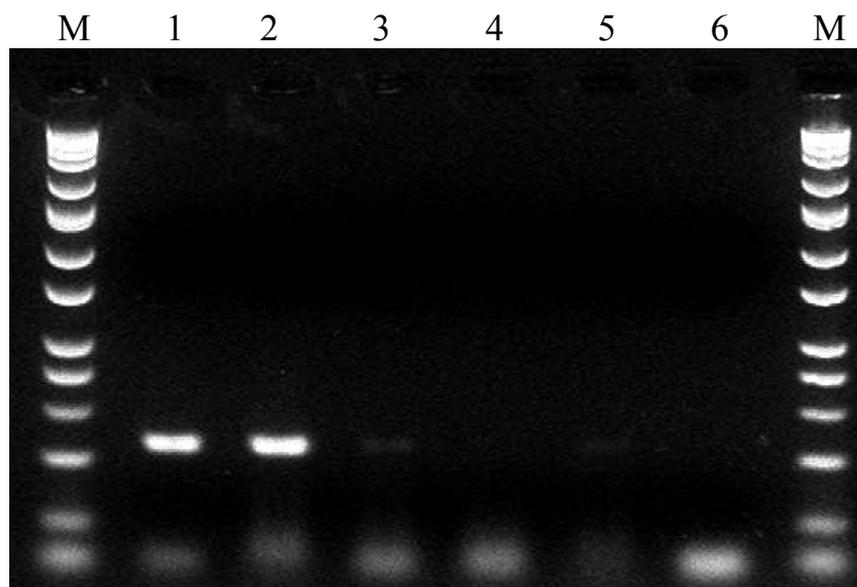
При исследовании специфичности ПЦР при диагностике оспы овец мы проводили с использованием ДНК других вирусов семейства Poxviridae. Результаты экспериментов показали высокую специфичность реакции ПЦР при оспе овец, при которой продуктом амплификации является четко видимая полоса длиной 227 пар оснований (1-3 полосы). Отрицательные результаты были получены при использовании в качестве матриц ДНК вирусов оспы лошадей, верблюдов и контагиозной эктимы овец, а также с деионизированной водой (рис.64).



М – маркер ДНК, 1 – ДНК оспы овец, штамм "НИСХИ"; 2 – ДНК оспы овец, штамм "Ставропольский"; 3 – ДНК оспы овец, штамм "Сарысуйский"; 4 – ДНК контагиозной эктимы овец, штамм "МТМ-НИСХИ"; 5 – ДНК оспы верблюдов, штамм "М-96"; 6 – ДНК оспы лошадей, штамм "МНР-96"; 7 - H₂O.

Рисунок 64 - Электрофореграмма ДНК вируса оспы овец и других представителей поксвирусов (специфичность ПЦР на оспе овец).

Для определения чувствительности ПЦР амплифицировали различные количества ДНК, выделенной из культуры клеток ПЯ, которая была инфицирована исследуемыми штаммами НИСХИ, Сары-Суйский, Ставропольский, Афганский вируса оспы овец с активностью 4-6 lg и контроли штаммы вируса контагиозной эктимы овец МТМ-НИСХИ, А-1, НИСХИ-ЛКВсММ-97 – 5-6 lg ТЦД₅₀/мл и вирус осповакцины – 4 lg ТЦД₅₀/мл.. Чувствительность реакции была одинаковой для всех 4-х штаммов вируса оспы овец, и составляла 3 нг ДНК (рис. 65). В качестве отрицательного контроля использовали неинфицированную культуру клеток ПЯ, а так же культуры клеток ПЯ инфицированные вирусами контагиозной эктимы овец (штаммы "МТМ-НИСХИ", "А-1" и "НИСХИ-ЛКВсММ-97"), осповакцины (штамм "БЭМГ-51").



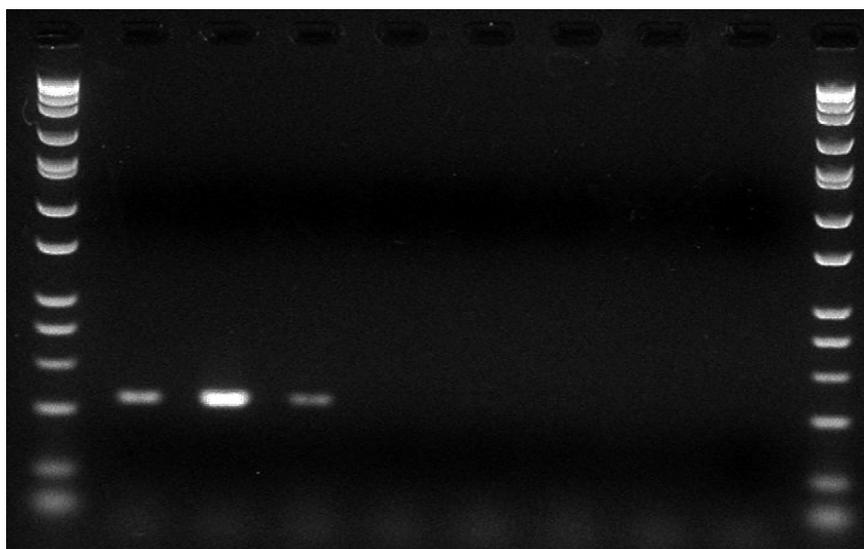
1-3 мкг ДНК; 2-300 нг ДНК; 3-30 нг ДНК; 4-3 нг ДНК; 5-300 пг ДНК; 6-30 пг ДНК;
 М-маркер ДНК (WideRange DNA Marker, Sigma).

Рисунок 65 - Определение чувствительности ПЦР при серийных разведениях ДНК, выделенной из культуры клеток ПЯ, инфицированной вирусом оспы овец, штамм "Сары-Суйский".

При этом специфический продукт реакции, размером 227 п.о., нарабатывался только у всех 3-х штаммов вируса оспы овец (рисунок 66).

Для выявления гомологии нуклеотидной последовательности амплифицированного продукта реакции (227 п.о.) и нуклеотидной последовательности специфического участка генома вируса оспы овец нами проведено прямое секвенирование продуктов ПЦР на секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems. Сравнительный анализ последовательности продукта ПЦР с последовательностью генома вируса оспы овец штамма "НИСХИ", находящегося в GenBank (#AY077834) при помощи программы BLAST показал полную идентичность данной последовательности, которая располагается на концевых участках генома вируса оспы овец. Аналогичная специфичность разработанного метода ПЦР установлена и при выявлении вируса оспы овец из органно-тканевых материалов (рис.67).

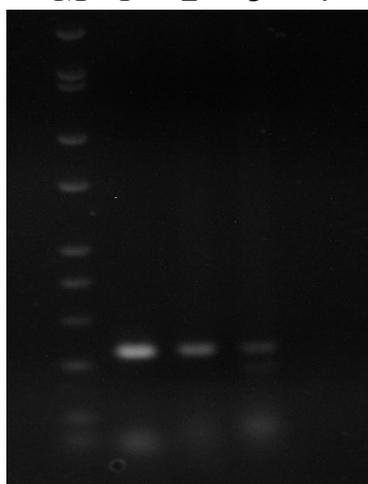
М 1 2 3 4 5 6 7 8 М



1-оспа овец, штамм "Ставропольский"; 2-оспа овец, штамм "Сары-Суйский"; 3-оспа овец, штамм "Афганский"; 4-контагиозная эктима, штамм "МТМ-НИСХИ"; 5-контагиозная эктима, штамм "А-1"; 6-контагиозная эктима, штамм "НИСХИ-ЛКВсММ-97"; 7-осповакцина, штамм "БЭМГ-51"; 8-неинфицированная культура клеток ПЯ; М-маркер ДНК (WideRange DNA Marker, Sigma).

Рисунок 66 - Определение специфичности реакции ПЦР при идентификации вируса оспы овец в культуре клеток ПЯ.

М 1 2 3 4



М – маркер ДНК, 1 – ДНК из культуры клеток шт. НИСХИ, 2 – ДНК из кожи больной овцы, с/з Чокпар (28.04.1995), 3 – ДНК из кожи (папулы) больной овцы, с/з Кирова (24.03.1996); 4 – неинфицированная культура клеток ПЯ (в качестве контроля).

Рисунок 67 - Электрофореграмма образцов ДНК вируса оспы овец, выделенных из патологических материалов. Идентификация вируса оспы овец из патматериала с использованием праймеров NSV-1 NSV-2.

Полученные данные показывают, что разработанный метод ПЦР при оспе овец со специфическими праймерами NSV-1 и NSV-2 позволяет выявлять нуклеиновую кислоту вируса из органно-тканевых материалов с образованием характерного продукта амплификации размером 227 п.о.

Секвенирование продуктов ПЦР показало гомологию полной нуклеотидной последовательности амплифицированного участка ДНК вируса оспы овец длиной 227 п.о. и специфического участка генома вируса оспы овец (рис.68).

```
1- CACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTAAAATTCCAATCACTGCACATGATTCCCTAATGTGA
GTGGGGTTATAAGACGACGAGAACGATTTTAAGGTTAGTGACGTGTAATAAGGGATTACACT

TTTTCTTTTTTTAACATGGAATTAATCATAATTTTTGATTGTTCAAATCCAATTTTAGAA
AAAAGAAAAAATTGTACSTTAATTAGTATTAATAAATAACAAGTTTAGGTTAAAAATCTT

TCCAAAAACATGTTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTTCCAAATACAAGTGAGGCATCC
AGGTTTTTGTACAAAACTGTTTTCGACAATCTAGTAAAGGTTTATGTTCACTCCGTAGG

TTTTTGAAAGATTCAAAAACTAAGAACACATTTCCAGCAACCTCC - 227
AAAAACTTTCTAAGTTTTTGATTCTTGTGTAAGGTCGTTGGAGG
```

Рисунок 68 - Нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта, при использовании праймеров NSV-1 и NSV-2

Сравнительный анализ последовательности продукта ПЦР с последовательностью генома вируса оспы овец штамма "НИСХИ" выявил полную идентичность данной последовательности, которая располагается на концевых участках генома вируса оспы овец.

На основании полученных результатов нами разработан простой, быстрый и специфический метод идентификации вируса оспы овец на основе ПЦР, позволяющий дифференцировать возбудитель оспы овец от контагиозной эктимы овец и коз, что не всегда является простой задачей для классических методов диагностики. Из существующих методов, только электронная микроскопия и реакция нейтрализации вирусов позволяют дифференцировать данные вирусы. Однако, первый из методов является не всегда доступным, а второй является трудоёмким и продолжителен по времени [327,336].

6.4.ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВИРУСОВ ОСПЫ ОВЕЦ И ОСПЫ КОЗ МЕТОДОМ ПЦР

Вирусы оспы овец и оспы коз являются близкородственными возбудителями и имеют высокую идентичность по нуклеотидным основаниям и аминокислотам геномов, что влечет за собой затруднения при дифференциации этих инфекций серологическими методами. Сравнительный анализ геномов вирусов оспы овец и оспы коз указывает на их высокую гомологичность. Идентичность нуклеотидных последовательностей геномов

вирусов оспы овец и оспы коз достигает 96 %. Хотя и обнаружена высокая идентичность геномов в нуклеотидной последовательности вирусов оспы овец и оспы коз, но в филогенетическом отношении имеются различия, и эти различия основываются на специфичности круга хозяев. Для дифференциации вирусов оспы овец и оспы коз нами проведен компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей геномов вирусов оспы овец (штамм "НИСХИ") и коз (штамм "G₂₀-ЛКВ") позволил подобрать праймеры ShG-1 и ShG-2, которые ограничивают последовательность ДНК длиной 216 п.о. Амплифицированный ПЦР-продукт имеет сайт рестрикции для EcoRI при использовании в качестве матрицы ДНК оспы овец, при оспе коз данный сайт отсутствует (рис. 69).

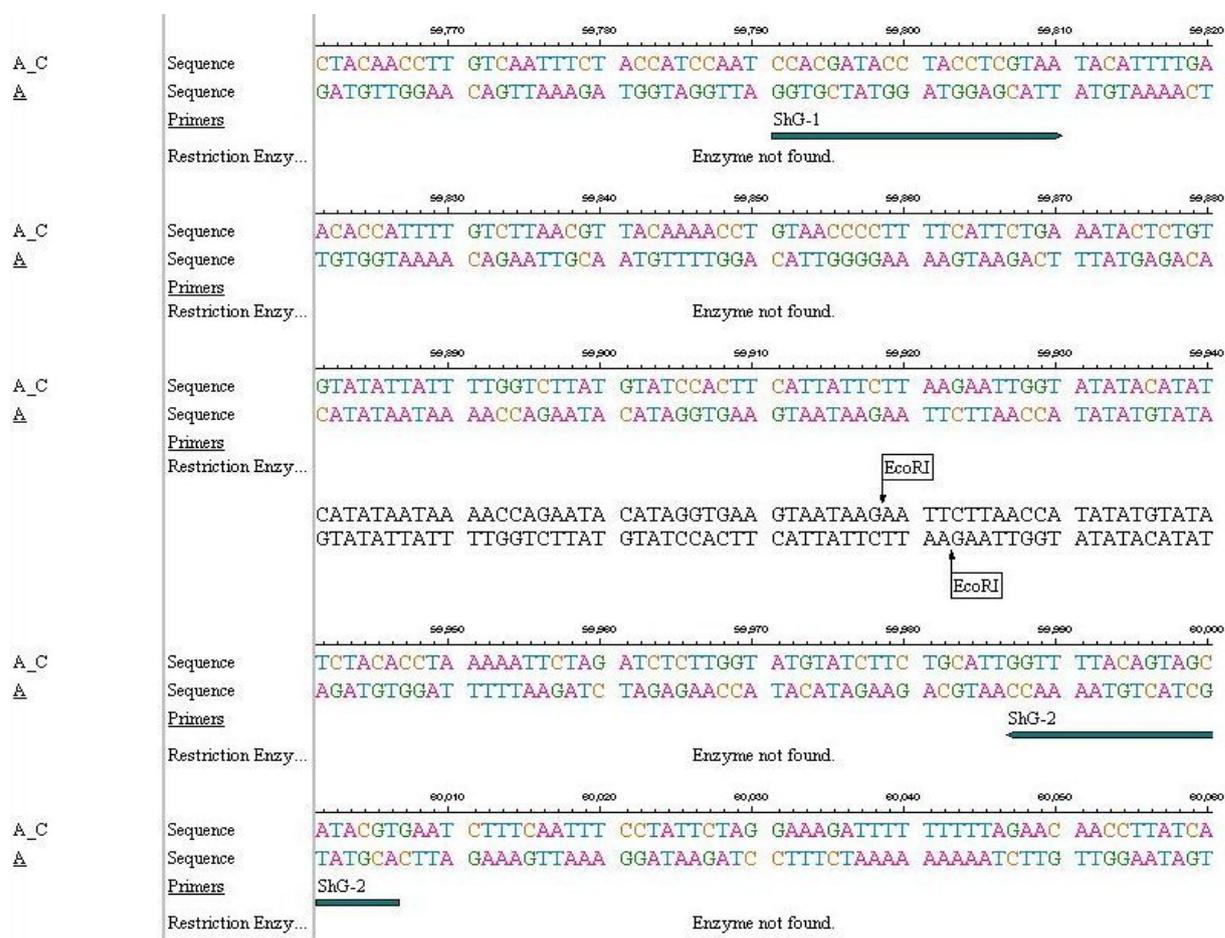


Рисунок 69 - Локализация праймеров и сайта рестрикции при ПЦР на оспе овец

Для проведения ПЦР использовали реакционные смеси с конечным объёмом 50 мкл, состоящие из следующих компонентов:

- x10 буфер (Roche) - 5 мкл
- 10 мМ dNTP mix (Roche) - 1 мкл
- Праймер ShG-1 (15 мкг/мл) - 1 мкл
- Праймер ShG-2 (15 мкг/мл) - 1 мкл

ДНК вируса оспы овец или коз (1 мкг)	- 1 мкл
Тақ ДНК полимераза (Roche)	- 2,5 мкл
Деиониз. стерил. вода	- 38,5 мкл

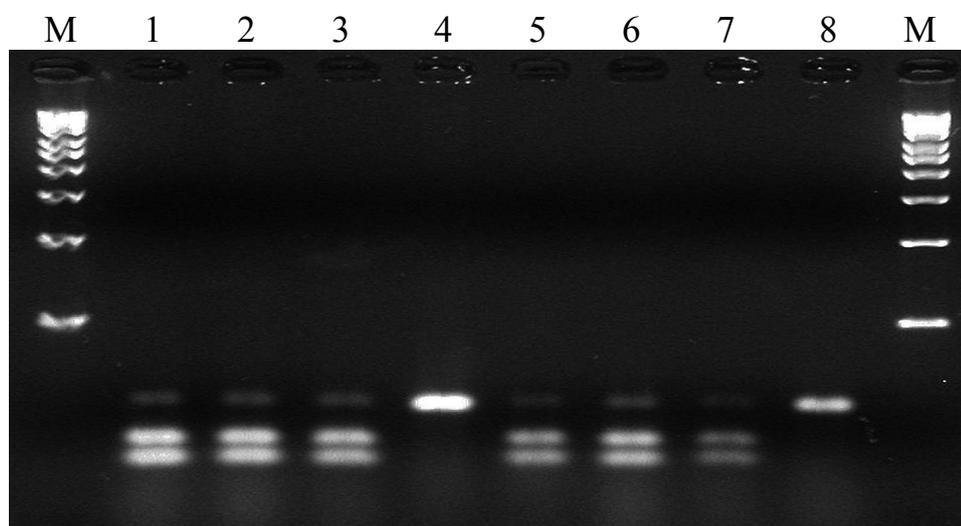
Параметры реакции:

пре-денатурация 95 °С	- 5 мин;
денатурация 95 °С	- 10 сек;
отжиг 50 °С	- 10 сек;
репликация 72 °С	- 10 сек;
пост-репликация 78 °С	- 15 мин.

Реакцию проводили в течение 35 циклов.

В процессе экспериментов постановки ПЦР на оспу овец с праймерами ShG-1 и ShG-2 установлено образование продукта амплификации размером 216 п.н. с сайтом рестрикции для рестриктазы EcoRI. При расщеплении ДНК-продукта образуются два фрагмента ДНК длиной 130 и 86 пар нуклеотидов.

При ПЦР на оспу коз с использованием вышеуказанных праймеров установлено образование продукт амплификации, как и при оспе овец, но не имеющего сайта рестрикции для рестриктазы EcoRI. При электрофорезе ПЦР продуктов в 2% арагозном геле четко наблюдается наличие двух полос размером 130 и 86 п.н. при оспе овец и одной полосы ДНК длиной 216 п.н. при оспе коз (рис. 70).



М-маркер ДНК; 1-4 – ДНК, выделенная из очищенных препаратов вирусов, 1-вируса оспы овец "НИСХИ", 2-вируса оспы овец "Ставропольский", 3-вируса оспы овец "Афганский", 4- ДНК вируса оспы коз "G₂₀-ЛКВ"; 5-8 – ДНК из инфицированных культур клеток, 5-вируса оспы овец "Сары-Суйский", 6-вируса оспы овец "Ставропольский", 7-вируса оспы овец "Афганский", 8-вируса оспы коз "G₂₀-ЛКВ".

Рисунок 70 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов, гидролизованных рестриктазой EcoRI.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десять лет по изучению различных свойств возбудителей, входящих в семейство *Poxviridae* накоплен большой экспериментальный материал. Использование современных молекулярно-генетических методов и нанотехнологий позволило получить новые данные по молекулярно-биологическим свойствам возбудителей, структуре генома и отдельным белкам. Полное секвенирование геномов и отдельных генов стало отправной точкой при исследовании их функциональной роли. На основе полученных данных на совершенно новом уровне уже разработаны или ведутся работы по созданию высокоэффективных генноинженерных вакцин, включая ДНК-вакцины и вакцины на основе трансгенных растений. Для диагностики и дифференциации поксвирусов разработаны методы рестрикционного анализа и ПЦР.

Возбудителем оспы овец является вирус, который относится к роду *Capripoxvirus*, входящему в обширное семейство *Poxviridae*. К данному роду так же относятся возбудители оспы коз и бугорчатки. Оспа овец является очень важной с точки зрения экономики и эпидемиологии, так как вызывает высокий процент смертности среди животных. В противоположность бугорчатке, оспа овец и оспа коз распространены по всей юго-восточной и центральной Азии, на Индийском полуострове, а так же в северной и центральной Африке. Оспа овец не наблюдается в странах Европы, за исключением редких спорадических вспышек в Восточной Греции. Представители рода *Capripoxvirus* вообще считаются хозяинспецифическими. В частности это было показано для штаммов оспы овец, оспы коз и бугорчатки в Нигерии и Индии. Однако, способность штаммов оспы овец и оспы коз в естественных условиях и экспериментально перекрёстно инфицировать и вызывать заболевания у обеих видов животных описывалась ранее. Эта очевидная вариабельность оспы овец и коз при выборе хозяина, схожесть клинических признаков и невозможность дифференциации двух возбудителей с помощью серологических методов приводит к заключению, что оспа овец и оспа коз являются частями комплексного заболевания которое вызывается одним видом вируса, и что конкретный спектр хозяев для данных возбудителей является результатом региональной адаптации вируса к овцам или козам. Методами рестрикционно-эндонуклеазного анализа и перекрёстной гибридизации ДНК вирусов оспы овец и оспы коз показано, что эти вирусы могут быть дифференцированы один от другого, хотя и являются близкородственными (приблизительно 96-97% идентичности последовательности нуклеотидов), а так же могут подвергаться рекомбинации в естественных условиях.

Стремительный прогресс в изучении представителей семейства поксвирусов в меньшей мере касается вируса оспы овец. В доступной литературе представлены данные по исследованию морфологии, тонкой

структуры вирионов вируса оспы овец, морфогенеза, а также некоторым физико-химическим характеристикам и структуре генома возбудителя.

Вирионы вируса имеют овальную или кирпичеобразную форму размером 200-250 нм и 300-350 нм по малой и большой оси. Вирионы имеют липопротеиновую поверхностную мембрану с тубулярными структурами, а также коровую мембрану, отделяющую латеральные тела. По морфологии, физико-химическим и иммунобиологическим свойствам отмечено большое сходство вируса оспы овец с вирусом оспы коз. Средняя величина плавучей плотности меченого и немеченого вируса оспы овец составляет $1,2820 \pm 0,0007$ г/см³, а средняя величина константы седиментации равна 4367 ± 538 S. Эти величины сходны со значениями для других поксвирусов. Среднее значение молекулярной массы вируса оспы овец составляет $(3879 \pm 1140) \times 10^6$ Д. Данная величина сходна с таковой для вируса вакцины, определённой с помощью электронной микроскопии и равной 3940×10^6 Д, для частиц радиусом 176×10^{-7} см.

Геном вируса оспы овец представлен двухцепочечной нефрагментированной линейной ДНК, имеющей молекулярную массу по одним источникам $137,5 \pm 8,6 \times 10^6$, по другим $156-200 \times 10^6$ дальтон, что соответствует 145,6 тысячам пар оснований, кодирующих около 200 генов. Большинство существенных генов локализованы в центральной части генома, тогда как гены, не существенные для роста в культуре клеток находятся на концевых участках генома. Анализ нуклеотидных последовательностей двух участков, локализованных в центральной части ДНК капripоксвирусов, показал сходство с участками ДНК вируса осповакцины.

Среднее значение плавучей плотности ДНК вируса оспы овец после равновесного центрифугирования в преформированном градиенте Cs₂SO₄ равно $1,440 \pm 0,002$ г/см³. Из данных литературы известно, что плавучая плотность ДНК в Cs₂SO₄ варьирует у разных объектов от 1,42 до 1,45 г/см³. По данным электронной микроскопии геномы поксвирусов имеют молекулярную массу в пределах 100-120 кД]. Длина большей части ДНК вируса оспы овец составляет 15-41 мкм при толщине 20-22 Å, что является типичным для линейных двуспиральных ДНК. Рассчитанная молекулярная масса обнаруженных в препаратах нитей ДНК составила 29×10^6 - 48×10^6 Д для фрагментов длиной 15-20 мкм и 59×10^6 - 78×10^6 Д – для фрагментов длиной 31-41 мкм; среднее значение молекулярной массы генома составило $(137,5 \pm 8,6) \times 10^6$ Д.

Как было показано, ДНК вирусов рода *Capripoxvirus* и *Parapoxvirus* содержат ковалентно-замкнутые концы геномов. Обработка вирусных ДНК рестрикционными эндонуклеазами позволяет определить концевые фрагменты генома по их способности быстро ренатурировать после денатурации. Сравнение рестрикционных профилей обработанных HindIII

ДНК каприпоксвирусов, вирусвакцины и вируса эктимы (представителей родов *Ortho-* и *Parapoxvirus*) показало несоответствие между этими тремя представителями. Попытки гибридизации *Hind*III Р-фрагмента ДНК вируса оспы овец из Нигерии с *Hind*III фрагментами ДНК вируса контагиозной эктимы овец и вируса вакцины не увенчались успехом.

Сравнительный рестрикционный анализ ДНК каприпоксвирусов, с представителями орто- и парапоксвирусов, показал сильное отличие. Это может быть использовано для идентификации каприпоксвирусов на основе рестрикционного анализа ДНК с помощью *Hind*III. Не смотря на то, что ДНК каприпоксвирусов меньше, их *Hind*III образцы содержат намного больше фрагментов, чем вирус вакцины или орф. Из этого следует, что последовательности геномов каприпоксвирусов сильно отличаются от таковых у орто- и парапоксвирусов.

При рестрикционном анализе ДНК 3-х вирулентных штаммов оспы овец и вирулентного изолята крупного рогатого скота из Кении наблюдали что, рестрикционные профили, при обработке рестриктазами *Pst*I и *Vam*HI, являются довольно разными. Эти результаты подтверждают, что изоляты каприпоксвирусов выделенные от различных животных имеют специфические отличия в их рестрикционных профилях ДНК.

Из этих результатов следует, что рестрикционный анализ ДНК каприпоксвирусов можно использовать для дифференциации полевых и вакцинных изолятов полученных из различных географических регионов, а так же для дифференциации от близкородственных вирусов.

При оспе овец, как при высоко контагиозном заболевании необходим быстрый и достоверный диагноз. Эта проблема решена с помощью ПЦР. Разработан простой, быстрый и специфический метод ПЦР для идентификации вируса оспы овец в культурах клеток и органно-тканевых материалах животных. При ПЦР диагностике очень важно использовать более чем одну пару праймеров, полученных для геномов вируса из различных регионов. Значительная экономия времени и усилий может быть достигнута при одновременной амплификации нескольких последовательностей в одной реакционной смеси ("сложная" ПЦР).

Рассматривая совокупность полученных нами результатов можно заключить, что они совпадают или нашли подтверждение при исследовании вируса оспы овец другими авторами. В нашей стране с ее огромной территорией и развитым овцеводством необходима постоянная и достоверная информация по мониторингу этого опасного возбудителя, также необходимы дальнейшие исследования по расшифровке функциональной роли отдельных генов и структурных белков.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Fenner F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of viruses in Madrid, 1975./F.Fenner . // J.Gen. Virology.-1976.-V.- 71.-P.- 371-378.
- 2 Matthews R.E.F. Classification and Nomenclature of viruses./ R.E.F. Matthews // Intervirology. 1982.-V. 17.,P.- 1-199.
- 3 Murphy F.A. Virus Taxonomy the Classification and Nomenclature of Viruses: 6-th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses./ F.A. Murphy Vienna, 1995.
- 4 Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee in Taxonomy of Viruses / Van M.H.V. Regenmortel, C.M.Fanguet, D.H.L. Bishop— London: Academic Press, 2000.
- 5 OIE. Bulletin . 1989, P.431-432.
- 6 OIE. Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines. Sheep pox and goat pox. 4 edition, chap.2.1.10. 2000.
- 7 Hailat N., An outbreak of sheep pox associated with unusual winter conditions in Jordan./ N.Hailat, O.Al-Rawashdeh, S.Lafi and Z.Al-Rawashdeh // Trop.Anim.Health Prod.1994. V.26.P.-79-80.
- 8 Garner M.G., The extent and impact of sheep pox and goat pox in the state of Maharashtra, India./ M.G.Garner, S.D.Sawarkar, E.K.Brett, J.R.Edwards, V.B.Kulkarni , V.B.Boyle and S.N.Singh // Trop.Anim.Health Prod.2000. V. 32. P. 205-223.
- 9 Mangana-Vougiouka O., Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay/ O.Mangana-Vougiouka, O.Markoulatos , P.Koptopolos, P.Nomikju,

- N.Bakandritsos and P.Papadopolos, // Molec. and Cellular Probes. 2000.V. 14. P. 305-310.
- 10 Carn V.M. Control of capripoxvirus infections/ V.M.Carn, // Vaccine.- 1993.- V.-11.- P.1275-1279.
- 11 Uppal P.K., Studies on the serological relationship between avian pox, sheep pox, goat pox and vaccinia viruses./P.K.Uppal, P.R.Nilakantan.//J.Hyg.Comb.1970.V.68.P.-349-358.
- 12 Subba Rao M.V., Реакция перекрестной нейтрализации между вирусами оспы овец, оспы коз и контагиозного пустулярного дерматита./M.V. Subba Rao and B.S. Malik, //Acta virol. 1979., 23. P.-165-167.
- 13 Chand P., Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripoxvirus and contagious pustular dermatitis infections in sheep./ P.Chand, R.P. Kithing and D.N Black, // Epidemiol.Infect.,-1994.,- V.-113.- P.-377-385.
- 14 Kitching R.P., Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses/ R.P. Kitching and W.P.Taylor.//Trop.Anim.Health Prod.1985.17.- P.-64-74.
- 15 Gershon P.D., Physical characterization of genome of cattle of capripoxvirus / P.D. Gershon and D.N. Black , // Virology.- 1987.-V.- 160.- P.-473-476.
- 16 Gershon P.D., A comparison of the genomes of capripoxvirus isolates of sheep, goats, and cattle/ P.D. Gershon and D.N. Black , // Virology.- 1988.-V.- 164.- P.-341-349.
- 17 Abdussalam M. Elementary bodies of sheep Pox / M.Abdussalam, // Amer.J. vet. Res., 1954.- V. 18 P.- 614-617.
- 18 Скалинский Е.И. Электронная микроскопия вируса оспы овец./ Е.И. Скалинский, // Труды Гос. Научно – контрольного института вет. препаратов.1962. Т.XI.C.40-42.

- 19 Ramyar H. Studies on the immunogenic properties of tissue culture sheep pox virus. H. Ramyar, //Zbl.Vet. Med., 1965.B.12.P.-537 – 540.
- 20 Bhanuprakash V., The current of sheep pox disease. //V.Bhanuprakash, B.K.Indrani, M.Hosamani,R.K.Singh//Indian J.Comp.Microbiol.Immunol.Infect.Dis.2006,V.29,P.27-60.
- 21 Cohen J., Bererhi A., Ribero M., Vincent J. and Delagneau J.F. Etude en microscopie electronique de la morphogenese du virus de la clavelee (Variole ovine) en culture de tissues./ J.Cohen, A.Bererhi, M.Ribero, J. Vincent and J.F.Delagneau, // Ann.Inst. Pasteur.,1971.,№121.,C.569-577.
- 22 Joklik W.K. Poxviruses./ W.K. Joklik, //Bacteriological Reviews.1966.V.30. №1 P.33-66.
- 23 Росляков А.А. Сравнительная ультраструктура вирусов оспы верблюдов, оспоподобного заболевания верблюдов (ауздик) и контагиозной эктимы овец. /А.А Росляков, //Вопросы. Вирусологии.1972.17.,С.-26-30.
- 24 Росляков А.А. Электронномикроскопическая дифференциация некоторых возбудителей группы оспы по структуре вирионов. /А.А Росляков //Труды Алма-Атинского зооветинститута.1972.,Т.20.,С.-64-71
- 25 Cruicckshank J.G., Elektron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox./ J.G.Cruicckshank, H.S.Bedson, D.H.Watson, //Lancet 1966.,P.-527-530.
- 26 Скалинский Е.И. Об электронномикроскопической диагностике оспенных болезней животных/ Е.И.Скалинский.// Ветеринария.,1978.,№6.,С.-46-47.
- 27 Afshar A., Sheep Pox: Experimental Studies with a West African isolate / A. Afshar, A.Bundza, D.J Myers, G.C.Dulac, F.C.Thomas //Can.Vet.J.,1986.,V.-27.,P.-301-306.

- 28 Miller S.E. Bioterrorism and electron microscopic differentiation of poxviruses from herpesviruses: do and don'ts./ S.E Miller, //Ultrastruct.Pathol.,2003,27 (3),P.-133-140.
- 29 Catroxo M.N.B, Identification of Poxvirus under Transmission Electron Microscopy during outbreak period in wild birds, in Sao Paulo, Brasil./ M.N.B. Catroxo, T.Pongiluppi, N.A Melo, L.Milanelo, S.Petrella, A.M.Martins and M.M.Reboucas, //Int.J.Morphol.,2009, 27(2).P.-577-585.
- 30 Planterose D.N., The purification of Vaccinia virus from cell culture./D.N. Planterose, D.N., Nishimura, N.P.Salzman, //Virology,1962, V.18. P.-294-301.
- 31 Sarov I., Studies on vaccinia virus DNA./ I.Sarov and Y.Becker, //Virology 1967, V.33, P.369-375.
- 32 Joklik W.K. The purification of the four of poxvirus./ W.K.Joklik, // Virology 1962.-V 18.-P. 9-18.
- 33 Zwartouw H.T., Purification of Pox viruses by density gradient centrifugation./ H.T.Zwartouw, J.C.N.Westwood , G.Appleyard, //J.Gen.Micobiol.1962., V.29, P.-523-529.
- 34 Зайцева Т.И. Очистка оспенной вакцины центрифугированием в градиенте плотности сахарозы./ Т.И. Зайцева // “Вирусы и вирусные заболевания “. Республиканский межвед. сборник.1974 в.6.№8.С.-89-90.
- 35 Зайцева Т.И. Очистка оспенной вакцины центрифугированием в градиенте плотности глицерина./ Т.И.Зайцева // “Вирусы и вирусные заболевания “. Республиканский межвед. сборник.1976 в.4,С.-89-90.
- 36 Schwenen M., Isolation of Vaccinia virus from Dermovaccine. A comparative study of modern preparative methods for vaccine production.11.Zonalcentrifugation in sucrose density gradient and differential

- centrifugation./M.Schwenen., M.Richter //Zbl.Bact.Hyg.,1.Abt.Orig.A.1974, V.228. P.-415-442.
- 37 Madalinski W., Purification of Vaccinia virus by zonal centrifugation and analysis of viral protein composition./ W.Madalinski, A.Bankovski, M.Korbecki //Acta virol. 1977, V.21.P.-104-108.
- 38 Kaplan C., The infectivity of purified and partially purified preparations of Vaccinia and Cowpox viruses./C.Kaplan, R.C.Valentine //J.gen.Microbiol.1959.V.20.P.-612-619.
- 39 Yohn D.S., Some physiochemical properties of Yaba Poxvirus deoxyribonucleic acid./ D.S.Yohn and J.F.Gallagher //J.of Virology,1969, V.3, №2, P.114-118.
- 40 Муравлев А.И., Анализ структурных белков и продуктов бесклеточной трансляции м-РНК вируса осповакцины с помощью моноспецифических сывороток./ А.И.Муравлев, Н.А. Нетесова, С.Я. Тихонов и Э.Г.Малыгин. / Молек генетик., микроб. и вирусол.,1989, №10, С.19-24.
- 41 Douglas H.W., Micro-electrophoresis of Cowpox and Vaccinia virus in molar sucrose./H.W.Douglas, J.M.Rondle, B.L.Williams. //J.Gen.Microbiol.1966, V.42.P.107-113.
- 42 Olsen R.G. and Yohn D.S. Immunodiffusion analysis of Yaba poxvirus structural and associated antigens./R.G.Olsen, D.S.Yohn //J.of Virol.1970, V.5 №2, P.212-220.
- 43 Easterbook K.B. Controlled degradation vaccinia virus in vitro: an electron microscopic study./K.B.Easterbook //J.Ultrastructur.Res.1966,V.14.p.-484-486.
- 44 Graves L.L. Evidence for a change in certain properties of vaccinia virus after trypsinization: heat inactivation or a postulated trypsin-sensitive inhibitor on virions./L.L. Graves //Amer.J.Vet.Res.1971,V.32 №5.P.-775-782

- 45 Петерсон О.П., К вопросу об изучении индуктора фермента депротеинизации нуклеокапсида вируса осповакцины. О.П. Петерсон, И.А.Орлова // Вопросы вирусологии 1970 №2,С.-156-161.
- 46 Kasza L., Purification experiments of swine enterovirus and swinepox virus on ion-exchange cellulose column./L.Kasza, G.Graf, J.L.Kovach //Amer.J.Vet.Res.1962,V.23(97),P.1150
- 47 Петерсон О.П., К вопросу об очистке вирусов осповакцины и полимиелита методом хроматографии/ О.П. Петерсон., Л.Ф. Мельникова, И.Ф. Козлова, Б.В. Гуцин //Вопр.Вирусол.1964.№6.С. 738.
- 48 Гендон Ю.З., Хроматографическая характеристика некоторых вирусов подгруппы осповакцина./ Ю.З.Гендон, Т.С.Данилова //Вопр. вирусол. – 1969. - №1. – С. -83-88.
- 49 Larbaigt G., Filtration sur gel du virus de la myxomatose etude analytique des particules virales./ G.Larbaigt , P.Precausta, E.Leftheriotis //Ann.Inst.Pasteur, 1970, V.119. P.-761-766.
- 50 Larbaigt G., Precausta P.,et Leftheriotis E. Chromatographia par gelfiltration du virus de la myxomatose./ G.Larbaigt , P.Precausta, E.Leftheriotis //C.R.Acad.Sci., 1970, V.270.№4, P.-656-658.
- 51 Hedstrom K.G. Studies on a purified inactivated and freeze-dried vaccinia virus preparation grown on chick embryo membranes./ K.G. Hedstrom //Nat. Baqteriol.Lab.Stockholm.1973.20.
- 52 Lai C., Gong S.C., and Esteban M. The purified 14-kilodalton envelope protein of Vaccinia virus produced in Escherichia coli induced virus immunity in animals./ C.Lai, S.C.Gong, and M.Esteban //J.of Virology 1991.V.65. №10. P.5631-5635.

- 53 Шедрин Е.Л., Использование иммобилизованных протеиназ для очистки вируса оспы./ Е.Л.Шедрин А.П.Простяков, С.И.Цыганкова, Е.И.Скалинский, О.Д.Зинкевич, Е.Г.Титова и Ю.Ф.Борисович //Биохимия 1979.Т.44. В.10.С.1776-1778.
- 54 Obijeski J.F., Polyacrylamide gel electrophoresis of fowlpox and vaccinia virus proteins./ J.F.Obijeski, E.L.Palmer, L.G. Gafford. and C.C. Randall //Virology,1973, V.51, №2. P.-512-516.
- 55 Weintraub S. and Dales S. Biogenesis of poxviruses: Genetically controlled modification of structural and functional components of the plasma membrane./ S. Weintraub and S. Dales //Virol.1974, V.60, №1. P.-96-127.
- 56 Титова Е.Г. Получение очищенных и концентрированных препаратов вирусов группы оспы. Разработка, апробация и государственный контроль ветеринарных препаратов./Е.Г. Титова //Тез. докл. ВГНКИ ветпрепаратов. М., 1981. – С. -115-116.
- 57 Простяков А.П., Очистка вирусов оспы коз и оспы овец./ А.П.Простяков, Е.И.Скалинский, Ю.Ф. Борисович //Тр. ВГНКИ ветпрепаратов. М., 1977.Т.24-25, С. -156-160.
- 58 Bhanuprakash V., Isolation, purification and comparison of protein profiles of sheep poxviruses.//V.Bhanuprakash, B.K.Indrani, A.R.S.Moorty, G.Krishnappa//Indian J.Comp.Microbiol.Immunol.Infect.Dis.2003,V.24,P.15-20
- 59 Jaikumer D., Virion polypeptides of sheep-pox virus (Ranipet strain) //D. Jaikumer, K.Kumanan, P.Ramadass and V.D.Padmanaban //Indian J.Animal Sciences 1996.V.66,№1,P.35-36.
- 60 Joklik W.K. Some properties of poxvirus DNA./ W.K. Joklik //J.Mol.Biol., 1962.V.5. P.265-274.

- 61 Esposito J.J., Orthopoxviruses DNA: Strain differentiation by electrophoresis of restriction endonuclease fragmented virion DNA./ J.J.Esposito, J.F.Obijeski and J.H.Nakano // *Virology*.- 1978.-V.- 89 (1).-P.- 53-56
- 62 Gangeni J.D., Host-induced influences on the synthesis of defective vaccinia particles/ J.D.Gangeni and D.G.Sharp // 1976. V. 73, P.-165-172.
- 63 Pirie G.D., Some properties of purified *Moluscum contagiosum* virus./ G.D.Pirie ,P.M.Bishop, D.C.Burke and R.Postlethwaite // *J.Gen.Virol.*,1971.V.13.P.311-320.
- 64 Francis R.D, Some biological and physical properties *Moluscum contagiosum* virus propagated in cell culture./ R.D.Francis and H.B.Bradford // *J. Virol.*,1976.V.19.№2. P.282-288.
- 65 Arif B.M. Isolation of on Entomopox virus and characterization of its DNA. B.M.Arif // *Virology* 1976.V.69.P.626-634.
- 66 McCarthy W.J., Isolation of on characterization of Entomopox virions from virus containing inclusion of *Amsacta moorei*./ W.J.McCarthy, R.R.Granados and D.W.Roberts // *Virology* 1974.V.59.P.59 -69.
- 67 Зайцев В.Л., Изучение физико-химических свойств вируса оспы овец и его нуклеиновой кислоты./ В.Л.Зайцев, Л.В.Маликова // *Биотехнология. Теория и практика*. 1997.№4.С.40-45.
- 68 Bahr G.F., Determination of the masses of virus by quantitative electron microscopy./ G.F.Bahr, W.F.Engler, H.M.Mazzone // *Quart Rev.Biophys.*1976.V.94, P.459-489.
- 69 Pfau C.J., Release of deoxyribonucleic acid from vaccinia virus by 2-mercaptoethanol and pronase./ C.J.Pfau and J.F.McCrea // *Nature* 1962, V.194,P.894-895.

- 70 Pfau C.J., Studies on the deoxyribonucleic acid of vaccinia virus.111. Characterization of DNA isolated by different methods and its relation to virus structure./ C.J.Pfau and J.F.McCrea //Virology 1963, V.21. №3,P.425-435.
- 71 Cabrera C.V., Procedura for purification of intact DNA from vaccinia virus./ C.V.Cabrera and M.Esteban //J.of Virology Jup.1978, V.25 N1.P.442-445.
- 72 Boening G., Evidence for the presence of RNA in the purified virions of vaccinia virus./ G.Boening and J.A.Holowczak //J.of Virol., 1974, V.14,P.704-708.
- 73 Babbar O.P., Isolation and characterization of infective DNA from vaccinia virus./ O.P.Babbar, B.L.Chowdhury and M.M.Dhar //Ind.J.Biochem.1964(6), V.1,P.83-85.
- 74 Holowczak J.A., Isolation and characterization of vaccinia virus nucleoid./ J.A.Holowczak, V.L.Thomas and L.Flores //Virology1975 V.67, P. 506-519 .
- 75 DeFilippes F.M. Restriction enzyme digests of rapidly renaturing fragments of vaccinia virus DNA./ F.M.DeFilippes.// J.Virol. 1976 .V.17,P.227-238
- 76 Esteban M., Topography of vaccinia virus DNA./ M.Esteban, L.Flores and J.A.Holowczak // Virology 1997,V. 82. N1.P. 163-181.
- 77 Fil W., Biochemical and electron microscopic observational of vaccinia virus morphogenesis in Hela cells after hydroxyureas reversal./ W.Fil , J.A.Holowczak, L.Flores and V.Thomas // Virology. 1974, V.61, N2, P. 376-396
- 78 Gafford L.G., Further studies on high molecular weight fowlpox virus DNA and its hydrodynamic properties./ L.G.Gafford.and C.C.Rondall // Virology. 1970, V.40,N2, P.298-301.
- 79 Pogo B.G., Biogenesis of poxviruses: synthesis and phosphoralation of a basis proteins associatied with the DNA./ B.G.Pogo, J.R.Katz and S.Dales // Virology. 1975,V. 64,N2,P. 531-543.
- 80 Jungwirth C. Vaccinia DNA: separation of viral from host cell DNA./ C.Jungwirth and I.B.Dawid // Arch. Ges. Virusforsch. 1967,V. 20,N4,P. 464-468.

- 81 Jacquemont B., Composition and size of Shope Fibroma virus deoxyribonucleic acid./ B.Jacquemont , J.Grance., L.Gazzolo and M.H.Richard // J.of Virology 1972, V.9, N5, P. 836-841.
- 82 Geshelin P., Characterization and localization on the naturally occurring cross-linkes in Vaccinia virus DNA./ P.Geshelin and K.T.Berns // J. Mol. Biol. 1974,V. 88,N4,P. 785-796.
- 83 Gangeni J.D., Use of a restriction endonuclease in analyzing the genomes from two different straing of Vaccinia virus./ J.D.Gangeni and D.G.Sharp // J. Virology, 1976,V. 20, N1.P. 319-323.
- 84 Holowczak J.A ., Poxvirus DNA: II. Replication of Vaccinia virus DNA in the cytoplasm of Hela cells./ J.A.Holowczak and L.Diamond // Virol. 1976,V. 72,N1,P.134-146.
- 85 Yan T., Characterization of monkey poxviruses DNA genome./ T.Yan and H.Rauhandeh // Biochim. Biophys. Acta, 1973,V. 299,P.210-217.
- 86 Grady L.J., Molecular complexity of vaccinia DNA and the presenses of veiterated sequences in the genome./ L.G.Grady and E.Paoletti // Virology. 1977,V.79,P.337-341.
- 87 Rouhandeh H., Molecular weight of Yaba monkey Aumuo virus DNA./ H.Rouhandeh // Biochim. Biophys. Acta, 1976,V.442,N1,P.66-70.
- 88 Hoover R., Specificity of developmental resistance in gypsy moth (*Lymantria dispar*) to two DNA-insect viruses./ R.Hoover and M.G.Grove //Virologica sinica 19 , V.24, N5,P.493-500.
- 89 Langridge W.H.R., The base composition of entomopoxvirus DNA./ W.H.R.Langridge., R.F.Bozarth and D.W.Roberts //Virology 1977,V.76,N2,P.616-620.
- 90 McCarthy W.J., Characterization of entomopox virions of the army cutworm, *Euxoa auxiliaries* (Lepidoptera: Noctuidae)/ W.J.McCarthy, R.R.Granados., G.R.Sutter and D.W.Roberts //J.of Invertebrate Pathology 1975,V.25,N2,P.215-220.

- 91 Gafford L.G., Sedimentation characteristics and molecular weights of three poxvirus DNAs./ L.G.Gafford., E.B.Mitchell and C.C.Randall // *Virology* 1978, V.89,N1,P.229-239.
- 92 Becker Y., Electron microscopy of vaccinia DNA./ Y.Becker and I.Sarov // *J.Mol.Biol.*1968,V.34,P.655-660.
- 93 Munyon W., RNA – polymerase activity in purified infection vaccinia virus./ W.Munyon, E.Paoletti and J.T.Grace // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967,V.58,P.2280- 2288.
- 94 Cates J. Transcription of the vaccinia virus genome is messenger RNA./ J.Cates // *Cold Spring Haubor Symp. Quantit. Biol. N.Y.*, 1970 (197),V.35,P.743-752.
- 95 Szilegyi J.F., Effect of rifampycins and related antibiotics on the deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid- polymerase of vaccinia virus particles./ J.F.Szilegyi and T.H.Pennington // *J. Virology*, 1971,V.8, N2, P.133-141.
- 96 Citarelle R. V. Studies on Vaccinia virus – directed deoxy ribonucleic acid polymerase./ R.V.Citarelle // *J. Virology*. 1972, V.10, N4, P.721-729.
- 97 Dales S. The structure and replication of poxviruses as exemplified by vaccinia./ S.Dales // *Ultrastruc. Anim. Virus and Bacteriophage: an Atlas. N.Y.* – London. 1973, 109.
- 98 Hamilton M.D., Duplex strand joining reaction catalyzed by vaccinia virus DNA polymerase./ M.D.Hamilton , A.A.Nuara , D.B.Gammon , R.M.Buller and D.H.Evans // *Nucleic Acids Research*, 2007, V.35,№ 1,P.143-151.
- 99 McCrea M., APreparation and characterization a subviral component vaccinia virus containing the DNA- dependent RNA polymerase activity./ M.A.McCrea and J.F.Szilagyii // *Virology*. 1975.V.68,N1,P. 234-244.
- 100 Martins A.,G., Mutational analysis of vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase 1, a DNA-dependent ATPase of the DExH BOX family./

- A.G.Martins , Ch.H.Gross and S.Shuman // J.of Virology,1999, V.73, №2,P.1302-1308.
- 101 Rosemond – Horinbeak H., Single – stranded deoxyribonucleic acid – specific nuclease from vaccinia virus./ H.Rosemond – Horinbeak., Enzo Paoletti and B.Moss // J. Biol. Chem. 1974,V. 249,N 10,P. 3287-3291.
- 102 Barbosa E. and Moss B. mRNA(nucleoside-2-)-methyltransferase from vaccinia virus./ E.Barbosa and B.Moss // J.of Biolog. Chemistry,1978,V.253,№ 21,P.7652-7697.
- 103 Suc-Hwan Baek., Lipase activities of p37, the major envelope protein of vaccinia virus./ Suc-Hwan Baek., Jong-Young Kwak., S.H.Lee, Lee T., Sung Ho Rau., D.J.Uhlinger and J.D.Lambeth //J.of Biolog. Chemistry 1997,V.272, № 51,P.32042-32049.
- 104 Moss B., Polyadenylate polymerase from vaccinia virions./ B.Moss , E.N.Rosenblum and E.Paolletti // Nature New Biol., 1973 V. 245 (141), P. 59-69.
- 105 Kates J., RNA synthesis in vaccinia virus I. The mechanism of synthesis and release of RNA in vaccinia virus cores./ J.Kates and J.Beeson // J. Mol. Biol. 1970,V.50,N1.P.
- 106 Randall C.C., Physicochemical properties of fowlpox virus deoxybomicleic and its anomalous infections behavior./ C.C.Randall , L.G.Gafford , R.L.Soehner and J.M.Hyde // J. Bacteriol. 1966,V.91,P 95-100.
- 107 Babbar O. P., Образование оспенной пустулы дезоксирибо-нуклеиновой кислотой вируса осповакцины после пассажа на сферобластах./ O.P.Babbar // Acta Virol. 1966,№ 10,С.15-19.
- 108 Иванющенко В.Н., Биологические свойства вакцинного штамма НИСХИ вируса оспы овец./ В.Н.Иванющенко, О.А.Кореба, И.Г.Кекух, Т.Н.Уфимцева, К.П.Уфимцев, В.Л.Зайцев и Ф.П.Курченко. //Ветеринария 1990,№8,С.22-24.
- 109 Nagington J., The structure of Orf virus./ J.Nagington, A.A.Newton, B.W.Horn //Virology 1964,V.23.P.461-472.

- 110 Файзулина С.И., Электронномикроскопическая структура клонов вируса контагиозной эктимы овец./ С.И. Файзулина, В.Л.Зайцев, Ц.Ц. Хандуев и А.И. Ануфриев //Изв.АН Киргиз.ССР 1973, №3,С.44.
- 111 Fenner F. Classification of Мухома and Fibroma viruses./ F.Fenner //Nature 1953, V.171,Р.562-563.
- 112 Wallis G., Effect of cations thernal inactivation of vaccinia, herpes simplex end adenoviruses./ G.Wallis, Czau-Siung Yang and L.Melnick //J.Immunol .1962,V.89,Р.41-46.
- 113 Yohn D.S., Yaba tumor poxvirus synthesis in vitro. 2.Adsorption, inactivation and assay studies./ D.S.Yohn, F.R.Marmol, V.A.Haendiges and J.T.Jr.Grace //J.Bacteriol.1966,V.91,Р.1953-1968.
- 114 Postlethwaite R. Antiviral activity in extracts from lesions of Molluscum contagiosum./ R.Postlethwaite //Virology 1964, V.22,N4,Р.508-519/
- 115 Hu A.S., Separation of labeled from unlabelled proteins by equilibrium density gradientsedimentation./ A.S.Hu , R.M.Bock and H.O.Halvorson //Anal.Biochem., 1962,V.4,Р.489-504.
- 116 Hill B.J., Microelectrophoresis of ensime and chemically treated viruses and cores of vaccinia, buffalopox, variola and alastrim./ B.,J.Hill, D.Baxby and H.W.Douglas //J.Gen.Virol.1972,V.16,N1,Р.39-46.
- 117 Parkhust J.R., Rapid lysis of vaccinia virus en neutral sucrose gradient with realease of intact DNA./ J.R.Parkhust and C.Heidelberger //Anal.Biochem/1976,V.71, №1, P.53-59.
- 118 Boisvert J., Effect of detergents and chemicals on purifid vaccinia virus: analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electron microscopy. J.Boisvert and T.Yamamoto //Canad.J.Microbiol.1977,V.23,Р.240-252.
- 119 Киселев Ф.Л., Биохимические методы в вирусологии./ Ф.Л.Киселев, Е.Н.Добров //М. 1970. С. 22
- 120 Пономарев А.П., Влияние некоторых физико-химических факторов на структуру и свойства вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней./

А.П.Пономарев, О.С.Пузанкова, О.П.Бьядовская., О.Г.Андреева, Т.З.Байбииков. Л.Б.Прохватилова. //Труды федерального центра охраны здоровья животных (ФГУ ВНИИЗЖ) Владимир 2005, Том 3, С.261-271.

121 Adams A. Concentration of Epstein Bare viruses from cell culture fluids with polyethylenglycol./ A.Adams //J.of Gen.Virology 1977,V.20,P.391-394.

122 Краузова В.И., Гельхроматография миксовирусов на сефарозе./ В.И.Краузова //Труд.Ин.полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР,1971.Т.16.С.295-307.

123 Орлов Г., Очистка вируса паротита путем фильтрации через сефарозу 6В./ Г.Орлов //Проблемы заразных и паразитарных болезней.1974,№2,С.59-64.

124 Тихоненко Т.И. Методические основы биохимии вирусов./ Т.И. Тихоненко . М.1973.С.272-343.

125 Гендон Ю.З., Хроматографическая характеристика некоторых вирусов подгруппы оспавакцина./ Ю.З.Гендон, Т.С. Данилова //Вопр. вирусол. 1969, №1. С. 83-88.

126 Ikuta K., Studies on the polypeptides of poxviruses. K.Ikuta , H.Miyamoto and S.Kato //Biken J.1978, N21, P.77-94.

127 Pric C.A. Zonal centrifugation./ C.A.Pric //Subcell.Particl. Structur. Organelles.N.Y.1974, P.155-230.

128 Гринин А.С., Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных./ А.С.Гринин, И.Н.Титов // М.: Колос.1971. С. 107-125

129 Joklik W.K. The preparation and characteristics of highly purified radioactively labelled poxvirus./ W.K.,Joklik //Biochem.et Biophys.Acta. 1962.V.- 61.N2.P.290-301.

130 Sharp D.G. Host-induced influences on syntesis of defective vaccinia particles./ Sharp D.G. //Virology 1976,V.72,P.65-72.

- 131 Anderson N.G. An introduction to particle separation in zonal centrifuge./ N.G.Anderson //Natl. Cancer Inst. Monograph.1966.V.21.P.9-40.
- 132 Reimer C.B., Influenza virus purification with the zonal ultracentrifuge./ C.B.Reimer, R.S.Baker, T.E.Newlin and M.L.Havens //Science 1966, V.152, P.1379-1381.
- 133 Payne L.G. and Norrby E. Adsorption and penetration of enveloped and naked vaccinia virus particles./ L.G.Payne and E.Norrby //J.Virol.1978,V.27,P.19-27.
- 134 Payne L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia./ L.G.Payne // J.Virol.1980,V.50,P.89-100.
- 135 Dales S.K. The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earles strains L cells.1.Uptake and penetration./ S.K.Dales //Virology 1964,V.24,P.278-294.
- 136 Armstrong J.A., The mode of entry of vaccinia virus into L cells./ J.A.Armstrong, D.H.Metz, M.R.Young //J.Gen.Virol.,1973, V.21,P.533-537.
- 137 Carrasco I., Specific proteins synthesized during the viral lytic cycle in vaccinia virus-infected Hela cells: analysis by high-resolution, two-dimensional gel electrophoresis./I.Carrasco, R.Bravo // J.Virol.1986,V.58,P.569-577.
- 138 Essani K. and Dales S., Biogenesis of vaccinia: evidens for more than 100 polypeptides in the virion./ K.Essani and S.Dales // Virology 1979,V.95,P.385-394.
- 139 Jensen O.N., Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis./ O.N.Jensen, T.Houthaeve, A.Shevchenko, S.Cudmore, T.Ashford, M.Mann , G.Griffiths and L.G.Krijnse // J.Virol.1996,V.70,P.7485-7497.
- 140 Boulanger D., Identification and characterization of three immunodominant structural proteins of fowlpox virus./ D.Boulanger, P.Green, B.Jones, G.Henriquet , L.G.Hunt, S.M.Laidlaw, P.Monaghan and M.A.Skinner //J.of Virology,2002, V.76, №19,P.9844-9855.

- 141 Payne L.G. Polypeptide composition of extracellular envelope Vaccinia virus./ L.G.Payne //J.of.Virol.,1978,V.27,P.28-37.
- 142 Payne L.G. Identification of the vaccinia haemagglutinin polypeptide from cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus./ L.G.Payne //J.of Virology,1979, V.31,P.147-155.
- 143 Juehn-Shin Maa., Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of vaccinia virus./ Juehn-Shin Maa., J.F.Rodrigues , and M.Esteban //J.of Biological Chemistry 1990, V265,№3,P.1569-1577.
- 144 Щелкунов С.Н., Изучение структурно-функциональной организации генома вируса натуральной оспы. III. Секвенирование и анализ последовательности нуклеотидов консервативного района Hind III-F-, -N- и -A- фрагментов генома штамма Индия-1967./ С. Н.Щелкунов, С.М.Ресенчук , А.В.Тотменин, А.А.Колыхалов, И.В .Фролов, С.М.Дрыга, В.В.Волчков, В.Е.Чижииков, В.В.Гуторов, В.М.Блинов и Л.С.Сандахчиев //Молекулярная биология, 1994,Т. 28, В.2. С.392-788
- 145 Shida H. Variant of vaccinia virus hemagglutinin altered in intracellular transport./ H.Shida //Mol.Cell Biol.1986,V.6,P.3734-3745.
- 146 Hirt P., Localization and fine structure of a vaccinia virus gene encoding an envelope antigen./ P.Hirt, G.Hiller and R.Witteck //J.Virology1986, V58,P.757-764.
- 147 Engelstad M., A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope./ M.Engelstad, S.T.Howard and G.L.Smith //Virology.1992,V.188, P.801-810.
- 148 Isaacs S.N., Characterization of a vaccinia virus- encoded 42- kilodalton class 1 membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope./

S.N.Isaacs, E.J.Wolffe, L.G.Payne and B.Moss //J.Virology 1992,V.66,P.7217-7224.

149 Roper R.L., Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene./ R.L.Roper, L.G.Payne and B.Moss //J.Virol.1996, V.70.P.3753-3762.

150 Duncan S.A., Identification and characterization of an extracellular envelope glycoprotein affecting Vaccinia virus egress./ S.A.Duncan and G.L.Smith // J.Virology1992, V66,P.1610-1621.

151 Parkinson J.E., Vaccinia virus gene A36R encodes aM[®] 43-50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus./ J.E.Parkinson and G.L.Smith //Virology 1994,V.204,P.376-390.

152 van Eijl., The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles. van Eijl., H.M.Hollinshead and G.L.Smith // Virology 2000,V.271,P.26-36.

153 Zhang W.H., Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence./ W.H.Zhang, D.Wilcock and G.L.Smith //J.Virology 2000, V.74, P.11654-11662.

154 Vazques M., Identification of functional domains in the 14- Kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus./ M.Vazques and M.Esteban //J.of Virology1999, V.73, №11, P.9098-9109.

155 Sanderson Ch.M., Hollinshead M. and Smith G.L. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. / Ch.M.Sanderson., M.Hollinshead and G.L.Smith //J.of General Virology2000, V.81, P.47-58.

156 Fogg Ch. N., Disparity between levels of in vitro neutralization vaccinia virus by antibody to the A27 and protection of mice against intranasal challenge./

Ch.N.Fogg, J.L.Americo, P.L.Earl, W.Resch, L.Aldaz-Corrol, R.J.Eisenberg, G.H.Cohen and Moss B., Americo J.L., Earl P.L., Resch W., Aldaz-Corrol L., Eisenberg R.J., Cohen G.H. and B.Moss //J.of Virology 2008, V.82, №16, P.8022-8029.

157 Jye-Chian Hsiao., Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells./ Jye-Chian Hsiao., Che-Sheng Chung and Wen Chang. //J.of Virology 1999, V.73, №10, P.8750-8761.

158 Su Jung Yang and Hruby D.E. Vaccinia virus A12L protein and its AG/A proteolysis play an important role in viral morphogenic transition./ Su Jung Yang and D.E.Hruby //Virology Journal 2007, 4:73, P.1-6.

159 Su Jung Yang. Characterization of vaccinia virus A12L protein proteolysis and its participation in virus assembly./ Su Jung Yang. //Virology Journal 2007, 4:78, P.1-12.

160 Flavio G.da Fonseca., Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: Topology and posttranslation membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail./ Flavio G.da Fonseca., E.J.Wolffe, A.Weisberg and B.Moss //J.of Virology 2000, V.74, №16, P.7508-7517.

161 Chi-Long Lin., Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparin sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo./ Chi-Long Lin., Che-Sheng Chung., H.G.Heine and Wen Chang.//J.of Virology 2000, V.74, №7, P.3353-3365.

162 Izmailyan R.A., The envelope G3L protein is essential for entry of vaccinia virus into host cells./ R.A.Izmailyan, Cheng-Yen Huang., Shamim Mohammad., S.N.Isaacs and Wen Chang.//J.of Virology 2006, V.80, №17, P.8402-8410.

- 163 Franke Ch.A., Use of a cell-free system to identify the vaccinia virus L1R gene product as the major late myristylated virion protein M25./ Ch.A Franke, E.M.Wilson and D.E.Hruby //J.of Virology 1990, V.64, №12, P.5988-5996.
- 164 Ravanello M.P., Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly./ M.P.Ravanello and D.E.Hruby //J.of Virology 1994, V68, №10, P.6401--6410.
- 165 Martin K.H., Identification and analysis of three myristylated vaccinia virus late proteins./ K.H.Martin, D.W.Grosenbach , Ch.A.Franke and D.E.Hruby //J.of Virology 1997, V71, №7, P.5218-5226.
- 166 Bisht H., Vaccinia virus L1 protein is required for cell entry and membrane fusion./ H.Bisht, A.S.Weisberg and B.Moss //J.of Virology 2008, V82, №17, P.8687-8694.
- 167 Hooper J.W., DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge./ J.W.Hooper, D.V.Custer, C.S.Schmaljohn and A.L.Schmaljohn //Virology 2000,V.266, №2.P.329-339.
- 168 Hooper J.W., Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates./ J.W.Hooper, D.V.Custer , and E.Thompson //Virology 2003,V.306,№1.P.181-195.
- 169 Lustig S., Combination of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infectious forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge./ S.Lustig, Ch.N.Foog, J.C.Whibeck, R.J.Eisenberg , G.H.Cohen and B.Moss //J.of Virology 2005, V79, №21, P.13454-13465.
- 170 Kaufman D.R., Differential antigen requirements for protection against systemic and intranasal vaccinia virus challenges in mice./ D.R.Kaufman, J.Goudsmit, L.Holterman, B.A.Ewald, M.Denholtz, C.Devoy, L.E.Grandpre,

J.M.Heraud, G.M.Franchini, M.S.Seaman, M.J.E.Havenga and D.H.Barouch //J.of Virology 2008, V82, №14, P.6829-6837.

171 Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз./ Е.С.Орлова //Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владимир-2007.С.23-29,76-79.

172 Tang J., Human T-cell responses to vaccinia virus envelope proteins./ J.Tang , M.Murtadha, M.Schnell, L.C.Eisenlohr, J.Hooper and P.Flomenberg //J.of Virology 2006, V80, №20, P.10010-10020.

173 Rottger S., Interaction between vaccinia virus IEV membrane proteins and their roles in IEV assembly and actin tail formation./ S.Rottger, F.Frischknecht , I.Recmann, C.L.Smith and M.Way //J.of Virology 1999, V73, №4, P.2863-2875

174 Gordon J., A prominent antigenic surface polypeptide involved in the biogenesis and fuction of the vfccinia virus envelope./ J.Gordon, F.Mohandas, S.Wilton and S.Dales //Virologe 1991,V.181, №2, P.671-686.

175 Ramizer J.C., Administration to mice of a monoclonal antibody that neutralizes the intracellular mature virus from of vaccinia virus limits virus replication efficiently under prophylactic and therapeutic conditions./ J.C.Ramizer, E.Tapia and M.Esteban //J.Gen. Virology 2002,V.83,№5.P.1059-1067.

176 Law V., Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus./ V.Law and G.L.Smith // Virology 2001,V.280,№1.P.132-142.

177 Laliberte J.P., Lipid membranes in poxvirus replication./ J.P.Laliberte and B.Moss //Viruses 2010,2,P.972-986.

178 Dunlop L.R., Variola virus immune evasion proteins./ L.R.Dunlop, K.A.Othiberg, J.J.Reld, D.Avci and A.M.Rosengard //Microbes and infection 2003, V.5,№11,P.1049-1056.

- 179 Щелкунов С.Н. Иммуномодуляторные белки ортопоксвирусов./С.Н. Щелкунов //Молекулярная биология 2003,Т.37, №1, С.41-53.
- 180 Galmiche M.C., Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens./ M.C.Galmiche, J.Goenaga, R.Wittek and L.Rindisbacher // Virology 1999,V.254,P.71-80.
- 181 Senkevich T.G., Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses./ T.G.Senkevich, C.L.White, E.V.Koonin and B.Moss //Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2002,V.99,P.6667-6672.
- 182 Smith G.L., The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus./ G.L.Smith, A.Vanderplasschen and M.Law // J.Gen. Virology 2002,V.83,№.P.2915-2931.
- 183 Golden J.W., Targeting the vaccinia virus L1 protein to the cell surface enhances production of neutralizing antibodies./ J.W.Golden, M.D.Josleun and J.W.Hooper //Vaccine 2008, V.26, issues 27-28,P.3507-3515
- 184 Berhanu A., Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli- expressed vaccinia virus proteins A27L,B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge./ A.Berhanu, R.L.Wilson, D.L.Kirkwood-Watts, D.S.King, T.K.Warren, S.A.Lund, L.L.Brown, A.K.Krupkin, E.Vander May, W.Weimers, K.M.Honeychurch , D.W.Grosenbach, K.F.Jones and D.E.Hruby // J.of Virology 2008,V.82,№7.P.3517-3529
- 185 Pulford D.J., Differential efficacy of vaccinia virus envelope proteins administered by DNA immunization in protection of BALB/c mice from a lethal intranasal poxvirus challenge./ D.J.Pulford D, A.Gates, S.H.Bridge, J.H.Robinson and D.Ulaeto // Vaccine 2004, V.22, ,P.3558-3566.
- 186 Gomez C.E., Recombinant protein produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV) into different compartment./ C.E.Gomez and M.Esteban //Arch.Virol.2001,V.146, №5, P.875-892.

- 187 White C.L., Senkevich T.G. and Moss B. Vaccinia virus G4L glutaredoxin is an essential intermediate of a cytoplasmic disulfide bond pathway required for virion assembly./ C.L.White, T.G.Senkevich and B.Moss //J.Virol.2002,V.76, P.467-472.
- 188 Hua-Poo Su., The structure of G4, the poxvirus disulfide oxidoreductase essential for virus maturation and infectivity./ Hua-Poo Su., D.Yin-wei Lin and D.N.Garbocki // J.of Virology 2006, V.80, №15.P.7706-7713.
- 189 Kates J.R., Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. J.R.Kates and B.R.McAuslan //Microbiology, 1967,V58, P.134-141.
- 190 Gold H., Localization of nucleotide phosphogylase activity within vaccinia./ H.Gold and S.Dales //Proc. Natl.Acad. Sci. USA 1968,V.60, P.845-852-141.
- 191 Munyon W.E., Nucleotide phosphogylase in purified vaccinia virus. W.E.Munyon, E.Paolletti , J.Ospina and J.T.Grace //J.Virol.,1968,V.2,P.167-172.
- 192 Pogo B.T.G., Regulation of the synthesis of nucleotide phosphogylase and neutral deoxyribonuclease: two activities present within purified vaccinia virus. B.T.G.Pogo and S.Dales//Proc.Nat.Acad.Sci.USA.1969.V.63.P.1297-1303.
- 193 Paolletti E., Deoxyribonucleic acid-dependent nucleotide phosphogylase activity in purified vaccinia virus./ E.Paolletti and B.Moss //J.Virol.1972,V.10,P.866-868.
- 194 Paolletti E., Regulation of synthesis of two immunologically distinct nucleic acid-dependent nucleoside triphosphate phosphogylase in vaccinia virus-infected HeLa cells./ E.Paolletti, N.Cooper and B.Moss //J.Virol.1974,V.14,P.578-586.
- 195 Ichihashi Y., Proteolytic activation of vaccinia virus for penetration phase of infection./ Y.Ichihashi and M.Oie // Virology 1982, V.116.P.297-305.

- 196 Paolletti E., Protein kinase and specific phosphate acceptor proteins associated with vaccinia virus cores./ E.Paolletti, and B.Moss //J.Virol.1972,V.10,P.417-424.
- 197 Downer D.N., Endogenous protein kinase and phosphate acceptor protein in vaccinia virus./ D.N.Downer, H.W.Rogers and C.C.Randall //Virology 1973,V.52,P.13-21.
- 198 Kleiman J., Protein kinase activity from vaccinia virions: Solubilization and separation into heat-labile and heat-stable components./ J.Kleiman and B.Moss //J.of Virology 1973,V.12, №4,P.684-689.
- 199 Aubertin A., Virus-associated nucleases: evidence for endonuclease and exonuclease activity in rabbit pox and vaccinia virus./ A.Aubertin and B.R.McAuslan //J.Virol.,1972,V.9,P.554-556.
- 200 Гилева И.П., Сравнительное изучение свойств ортопоксвирусных растворимых рецепторов фактора некроза опухолей./ И.П Гилева, И.А.Рязанкин, Т.С.Непомнящих, А.В.Тотменин, Л.Р.Лебедев, Ф.Е.Нестеров, В.Ф.Агеенко, С.Н.Щелкунов, Л.С.Сандахчиев // Доклады РАН.2003.Т.290.С.688 -692.
- 201 Polumbo G.J., Inhibition of an inflammatory response is mediated by 38-kDa protein of cowpox virus/ G.J.Polumbo, D.J.Pickup, T.N.Frederickson, L.J.McIntyre and R.M.L.Buller //Virology 1989, V.172, P.262-273.
- 202 Polumbo G.J., Poxvirus-induced alteration of arachidonate metabolism. G.J.Polumbo, W.C.Glasgow and R.M.L.Buller.//Proc.Natl.Acad.Sci USA.1993,V.90, P.2020-2024.
- 203 Shchelkunov S.N. Species-specific differences in organization of molecular virulence factors of variola, cowpox, and vaccinia virus./ S.N.Shchelkunov //Infec.Dis.Rev.Suppl.2001,V.3, P.16-25.

204 Shchelkunov S.N., Human monkeypox and smallpox viruses: Genomic comparison./ S.N.Shchelkunov, A.V.Totmenin, I.V.Bakin, P.F.Safronov, O.I.Ryazankina, N.A.Petrov, V.V.Gutorov, E.A.Uvarova, M.V.Mikheev, J.R.Sisler, J.J.Esposito, P.B.Jahrling, B.Moss, L.S.Sandakhchiev //FEBS Lett.2001,V.509,P.66-70.

205 Upton C., Myxoma virus expresses secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to virulence./ C.Upton, J.L.Macene, M.Schreiber and G.McFadden //Virology 1991,V.184,P.370-382.

206 Гилева И.П., Экспрессия генов TNF-связывающих белков ортопоксвирусов в клетках насекомых и изучение свойств рекомбинантных белков./ И.П.Гилева, И.А.Рязанкин, Т.С.Непомнящих, З.А.Максютов, А.В.Тотменин, Л.Р.Лебедев, Г.Н.Афиногенова, Н.М.Пустошилова, С.Н.Щелкунов // Молекуляр.биология 2005.Т.39.С.245 -254.

207 Kotwal G.J., Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins./ G.J.Kotwal and B.Moss //Nature 1988,V.335,P.176-178.

208 Aso T., Genomic organization of the alpha chain of the human C4b-binding protein gene./ T.Aso , S.Okamura , T.Matsuguchi, N.Sakamoto, T.Sata and Y.Niho //Biochem. Biophys.Res.Commun.1991,V.174,P.222-227.

209 Kirkitadze M.D., Central modules of the vaccinia virus complement control protein are not in extensive contact./ M.D.Kirkitadze, C.Henderson, N.C.Price, S.M.Keely, N.P.Mullin, J.Parkinson, D.T.F.Dryden and P.N.Barlow. //Biochem.J.1999,V.344,P.167-175.

210 Smith S.A., Conserved surface-exposed K/R-X-K/R motifs and charge on poxvirus complement control proteins serve as putative heparin binding site and contribute to inhibition of molecular interaction with human endothelial cells: a novel mechanism for evasion of host defense./ S.A. Smith, N.P.Mullin,

J.Parkinson, S.N.Shchelkunov, A.V.Totmenin, V.N.Loparev, R.Srisatjaluk, D.N.Reynolds, K.L.Keeling, D.E.Justus, P.N.Barlow and G.J.Kotwal //J.Virology 2000,V.74,P.5659-5666.

211 Rao T.V., Isolation and charactirezation of soluble antigens of sheep poxvirus./ T.V.Rao, B.S.Negi, M.P.Bansal.//Indian J.Exp.Biol. 1997, V.35.P.597-602

212 Kitching R.P., Studies on the major common precipitating antigen of Capripoxvirus./ R.P.Kitchin, J.M.Hammond and D.N.Black //J.Gen.Virol.1986,V.67, P.139-148.

213 Chakrabarty A.K., Structural proteins of sheep pox virus: Analysis by polyacrylamide gel electroporesis./ A.K.Chakrabarty, R.Pandey and V.K.Sharma. //Indian J.Phamol. Microbiol.1978,V21,№4,P.325-328.

214 Chand P., Western blot analysis of virus-specific antibody responce for capripox and contagious pustular dermatitis viral infections in sheep./ P.Chand, R.P.Kitching and D.N.Black //Epidemiol.Infect.1994,V.113,P.377-385.

215 Shinoda K., Engineering the vaccinia virus L1 protein for increased neutralizing antibody response after DNA immunization./ K.Shinoda, L.S.Wyatt, K.R.Irvine and B.Moss //Virology Journal 2009, 6:28, P.1-8.

216 Fogg Ch., Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions./ Ch.Fogg, S.Lustig , C.Whitbeck , R.J.Eisenberg , G.H.Cohen and B.Moss //J.of Virology 2004,V.78, №19,P.10230-10237.

217 Sambyal D.S., Immunogenecity of soluble antigens of sheep-pox virus. D.S.Sambyal and I.P.Singh // Indian J.Anim.Sci.,1978, V.48,№7, P.511-514.

- 218 Rao T.V., Isolation and characterization of soluble antigens of sheep poxvirus./ T.V.Rao, B.S.Negi and M.P.Bansal //Indian J.Exp.Biol. 1997, V.35.P.597-602.
- 219 Kitching R.P., Studies on the major common precipitating antigen of Capripoxvirus./ R.P.Kitching, J.M.Hammond and D.N.Black //J.Gen.Virol.1986,V.67, P.139-148.
- 220 Gershon P.D., A comparison of the genome organization of Capripoxvirus with that of the Orthopoxviruses./ P.D.Gershon , D.M.Ansell and D.N.Black //J.of Virology,1989, V.63, №11, P.4703-4708.
- 221 Beard P.M., A description of two outbreaks of Capripoxvirus disease in Mongolia./ P.M.Beard, S.B.Sugar, E.Bazarragchaa , U.Gerelmaa , Sh.Tserendorj , E.Tuppurainen and R.Sodnomdarjaa //Veterinary Microbiology, 2010, V.19, 142(3-4),P.427-431.
- 222 Вишняков И.Ф., Разработка и испытание вирусвакцины против оспы овец сухой, культуральной./ Вишняков, В.М.Балышев., В.И. Жестерев . //Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России.М., 1999.- Т.1, С.138-140.
- 223 Cao J.X., Sequence analysis of Hind 111 Q2 fragment of Capripoxvirus reveals a Putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue./ J.X.Cao, P.D.Gershon and D.N.Black //Virology,1995,V.209,P.207-212.
- 224 Cao J.X ., Characterization of the Myxoma virus M118L protein: A novel essential poxvirus IMV- associated protein./ J.X.Cao and G.Mcfadden //Virus Genes 2001 ,V.23, №3, P.303-313.
- 225 Zachertowska A., Characterization of the major capsid proteins of Myxoma virus particles using MALDI-TOF mass spectrometry./ A.Zachertowska, D.Brewer and D.Evans //J.of Virological Methods 2005, V.132, is.1-2,P.1-12.

- 226 Муравлев А.И., Изменение антигенных свойств белка Р35 вируса осповакцины в составе различных белковых фракций вириона с помощью моноспецифических антисывороток./ А.И.Муравлев, В.Ф.Порываева и С.С.Решетников // Молек генетик., микроб. и вирусол.,1989, №9, С.3-8
- 227 Ansachar-Sobrincho C., Vaccinia virus G1 protein, a predicted metalloprotease, is essential for morphogenesis of infectious virions but not for cleavage of major core proteins./ C.Ansachar-Sobrincho and B.Moss // J.of Virology 2004, V.78, №13, P.6855-6863.
- 228 Ojeda S., Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex./ S.Ojeda, A.Domi and B.Moss // J.of Virology 2006, V.80, №19, P.9822-9830.
- 229 Zurkova K., Attenuation of vaccinia virus by the expression of human FLt3 ligand./ K.Zurkova, P.Hainz, J.Krystofova, L.Kutinova , M.Sanda and S.Nemeckova // Virology Journal 2010, 7:109, P.1-15.
- 230 Czerny C.P., Structural and functional analysis of orthopox-virus epitopes with neutralizing monoclonal antibodies./ C.P.Czerny and H.Machnel // J.of Gen.Virology 1990, V.71, P.2341-2352.
- 231 Burns J.M., Comprehensive mapping of poxvirus Vcci chemokine-binding protein./ J.M.Burns, D.J.Dairaghi , M.Deitz, M.Tsang and T.Schall //J.of Biolog.Chemistry 2002, V.277, №4, P.2785-2789.
- 232 Sarov I., Characterization of intermediates in the uncoating of vaccinia virus DNA./ I.Sarov and W.K.Joklik //Virology 1972, V.50, P.593-602.
- 233 Soloski M.J., Characterization of supercoiled nucleoprotein complex released from detergent-treated vaccinia virions./ M.J.Soloski and J.A.Holowczak // J.of Virology 1981, V.37, №2, P.770-783.

234 Bragitha A.J., Effect of trypsin treatment on pigeonpox virus./ A.J.Bragitha , S.Krishnaswamy and B.S.Keshavamurthy //Haryana agric.Univ.J.Res.1982, V.12, №1, P.26-29.

235 Townsley A., The product of the vaccinia virus L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all poxviruses that is required for cell entry and cell-cell fusion./ A.Townsley, T.G.Senkevich and B.Moss // J.of Virology 2005, V.79, №17, P.10988-10998.

236 Donofrio J.C., Electroelution for purification of influenza A matrix protein for use immunoassay./ J.C.Donofrio, J.D.Coonrod, V.Karathanasis and K.V.Coelingh //J.Virol.Methods 1986, 13(2), P.107-120.

237 Яшина Л.Н., Экспрессия гена неструктурного белка 36К вируса осповакцины в Escherichia coli и изучение протективных свойств продуктов экспрессии./ И.П.Гилева, И.П.Рыжиков, В.А.Порываева, В.А.Рязанкин, Т.С.Бондарь, Т.С.Овечкина, О.И. Рязанкина и Э.Г. Малыгин // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 1997, №3, С.36-40.

238 Ward B.M., Mapping and functional analysis of interaction sites within the cytoplasmic domains of the vaccinia virus A33 and A36 envelope proteins./ B.M.Ward , A.S.Weisberg and B.Moss // J.of Virology 2003, V.77, №7, P.4113-4126

239 Senkevich T.G., Poxvirus multiprotein entry-fusion complex./ T.G.Senkevich, S.Ojeda , A.Townsley, G.E.Nelson and B.Moss //PANS 2005, V.102, №51, P.18572-18577.

240 DeLange A.M., Replication and resolution of cloned poxvirus telomeres in vivo generates linear minichromosomes with intact viral hairpin termini./ A.M.DeLange, M.Reddy , D.Scraba , C.Upton and G.McFadden // J.of Virology 1986, V.59, №2, P.249-259.

- 241 Moyer R.N., The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication./ R.N.Moyer and R.L.Graves //Cell 1981,V.27, P.391-401.
- 242 Esteban M., Relication of vaccinia DNA in mouse L cell.111.Intracellular forms of viral DNA./ M.Esteban and J.A.Holowczak // Virology 1977,V. 82.P.308-322.
- 243 Boulanger D., Motphogenesis and release of fowlpox virus./ D.Boulanger, T.Smith and M.A.Skinner // J.Gen.Virology 2000, V.81, P.675-687.
- 244 Silver M., Biogenesis of vaccinia: interrelationshipbetween posttranslation cleavage, virus assembly, and maturation./ M.Silver and S.Dales //Virilogy 1982, V.117,P.341-356.
- 245 Sodeik B., Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65./ B.Sodeik , G.Griffiths , M.Ericsson , B.Moss and R.W.Doms //J.of Virology 1994,V.68,P.1103-1114.
- 246 Broyles S.S. Vaccinia virus transcription./ S.S.Broyles // J.Gen.Virology 2003, V.84, P.2293-2303.
- 247 Condit R.C., In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion./ R.C.Condit, N.Moussatche and P.Traktman /Adv.Virus Res.2006, V.66, P.31-124.
- 248 Tolonen N., Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei./ N.Tolonen , L.Doglio, S.Schleich and J.Krijnse Locker //Mol.Biol.Cell 2001, 12, P.2031-2046.
- 249 Katsafanas G,C. and Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. //Cell Host Microbe 2007, 2, P.221-228.
- 250 Moss B. Poxvirus entry and membrane fusion./ B.Moss // Virology 2006,V.344, P.48-54.

- 251 Griffiths G., Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: Isolate-particle analysis./ G.Griffiths, R.Wepf, T.Wendt, J.Krijnse Locker, V.Cyrklaff and N.Roos // J.of Virology 2001, V.75 № 22, P.11034-11055.
- 252 Кадыров У.Г., Оспа животных./ У.Г. Кадыров и Ю.Ф.Борисович //Москва “Колос” 1981, С.10-15.
- 253 McFadden G. Poxvirus tropism. G.McFadden //Nat.Rev.Microbiol.2005,3, P-201-213.
- 254 Avila F.R., Specific macrophage immunity to vaccinia virus: Macrophage-virus interaction./ F.R.Avila, M.Schultz and W.A.F.Tompkins //Infection and Immunity 1972, V.6 № 1, P.9-16.
- 255 Greer B., Electron microscope study of the interaction of vaccinia virus with macrophages from immunized and nonimmunized rabbits./ B.Greer, D.Delfs and H.McElree // Infection and Immunity 1974, V.9 №2, P.452-459.
- 256 Buchmeier N.A., Abortive replication of vaccinia virus in activated rabbit macrophages./ N.A.Buchmeier, S.R.Gee, F.A.Murphy and W.E.Rawls // Infection and Immunity 1979, V.26 №1, P.328-338.
- 257 Скалинский Е.И., Ультраструктура вируса оспы овец./ Е.И Скалинский , Ю.Ф. Борисович //Акт. Вопр.Вет.Вирусол. Матер. III Всесоюз. вет.вирусол. конф. М 23-25 январь 1968г, С.153.
- 258 Murray M. Experimental sheep pox. A histology and ultra – structure studing./ M.Murray //Res.Vet.Sci.1979, 15, P.201-208.
- 259 Kasza L., Experimental swine pox./ L.Kasza and R.A.Griesemer // Amer. J. Vet. Res, 1962, V. 29 N94, P. 443-450.
- 260 Dales S., The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earles strain. L cells. I. Uptake and penetration./ S.Dales and R.Kajioka // Virology. 1964, V. 24, P. 278-294.

- 261 Dales S. Penetration of animal viruses into cells./ S.Dales // *Progr. Med. Virol.*, 1965, V. 7, P. 1.
- 262 Быковский А. Ф. Электронмикроскопическое исследование некоторых вирусов человека и животных в культуре ткани./ А.Ф.Быковский Автореф. Дисс. М. 1965.
- 263 Ichihashi Y., Studies on the nature of Macchall bodies (A type inclusion) during ectromelia virus infection./ Y.Ichihashi, S.Matsumoto // *Virology.* 1966, V. 29, P. 264-275.
- 264 Ichihashi Y., Biogenesis of Poxviruses: Role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination./ Y.Ichihashi, S.Matsumoto and S.Dales // *Virology.* 1971, V.46, P. 507-532.
- 265 Ichihashi Y., Biogenesis of Poxviruses: Relationship between a translation complex and formation of A-type inclusions./ Y.Ichihashi and S.Dales // *Virology.* 1973, V.51, P. 297-319.
- 266 Teppema J.S., Ultrastructural aspects of experimental Swinpox with special reference with endusion bodies./ J.S.Teppema and Y.F.De Boer // *Arch. Virol.* 1975, V.49, P.151-163.
- 267 Patrizi G., In vivo and in vitro demonstration of nuclear bodies in vaccinia infected cells./ G.Patrizi and Y.F.Meddelkamp // *J.Ultrastruc.Res.* 1969, V. 28, P. 275-278.
- 268 Butler-Cole Ch., An ectromelia virus profiling homolog interacts with cellular tropomyosin and viral A-type inclusion protein./ Ch.Butler-Cole , M.J.Wagner, M.Da Silva, G.D.Brown, R.D.Burke and Ch.Upton // *Virology Journal* 2007, V.4:76, P.1-15.
- 269 Purcell D.A., Some aspects of the morphogenesis of myxoma virus in vivo. D.A.Purcell and J.K.Clarke // *Arch. Virol.*, 1972, V.39.№4. P.369-375.
- 270 Moura Nunes J.F. Etude ultrastructure du release du virus de la variola vine. J.F.Moura Nunes // *J.Microscopie*, 1968, V.7, P.462-

- 271 Vanderplasschen A., Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms./ A.Vanderplasschen, M.Hollinshead and G.L.Smith //J.of Gen.Virol.1998,V.79.,P.877-887
- 272 Mercer J., Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells./ J.Mercer and A.Helenius //Science 2008,320,P.530-535.
- 273 Тотменин А.В., Изучение ортопоксвирусных генов, кодирующих kelch-подобные белки.1.Анализ видоспецифических различий по структурной организации./ А.В.Тотменин, И.В.Колосова и С.Н.Щелкунов //Молекулярная биология, 2002, Т.36, №4, С.1-7.
- 274 Beard P.M., Vaccinia virus kelch protein A55 is a 64-kDa intracellular factor that affects virus-induced cytopathic effect and the outcome of infection in a murine intradermal model./ P.M.Beard, G.C.Froggatt and G.L.Smith // J. Gen.Virol.2006,V.87.,P.1521-1529.
- 275 Balinsky C.A., Sheeppox virus kelch-like gene SPPV-019 affects virus virulence./ C.A.Balinsky, J.Delhon, C.L.Afonso, G.R.Risatti, M.V.Borca, R.A.French, E.R.Tulman, S.J.Geary and D.L.Rock // J.of Virology 2007, V.81, №20.P.11392-11401.
- 276 Upton C., Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like proteuin important for virus virulence./ C.Upton, J.L.Macen , D.S.Wishart and G.McFadden //Virology 1990, V.179, №2.P.618-631.
- 277 Shchelkunov S.N. Functional organization of variola major and vaccinia virus genomes./ S.N. Shchelkunov // Virus Genes 1995, V.10, №1, P.53-71.
- 278 Randall A.Z., Structural proteomics of the poxvirus family./ A.Z.Randall , P.Baldi and L.P.Villarreal //Artificial Intelligence in Medicine 2004, V.31, P.105-115.
- 279 Delhon G., Genomes of the Parapoxviruses Orf virus and bovine popular stomatitis virus./ G.Delhon , E.R.Tulman, C.L.Afonso, Z.Lu , de la Concha-Bermejillo A., H.D.Lehmkuhl, M.E.Piccone, G.F.Kutish and D.L.Rock //J.of Virology 2004,V.78, , №1,P.168-177.

- 280 Afonso C.L., The genome of fowlpox virus./ C.L.Afonso, E.R.Tulman , Z.Lu, L.Zsak , G.F.Kutish and D.L.Rock // J.of Virology 2000,V.74, , №8,P.3815-3831.
- 281 Afonso C.L., The genome of swinepox virus./ C.L.Afonso, E.R.Tulman , Z.Lu, L.Zsak , F.A.Osorio, C.Balinsky , G.F.Kutish and D.L.Rock // J.of Virology 2002a,V.76, , № 2,P.783-790.
- 282 Gubser C., Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis./ C.Gubser , S.Hue , P.Kellam and G.L.Smith // J.of Gen. Virology 2004,V.85, , №8,P.105-117.
- 283 Tulman E.R., The genomes of sheeppox and goatpox viruses./ E.R.Tulman., C.L.Afonso,Z.Lu , L.Zsak., J.H/Sur, N.T.Sandybaev., U.Z.Kerembekova, V.L.Zaitsev, G.F.Kutish and D.L.Rock //J.of Virology, 2002, V.76, №12,P.6054-6061.
- 284 Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F. and Rock D.L. Genomes of Horsepox virus. //J.of Virology, 2006, V.80, №18,P.9244-9258.
- 285 Afonso C.L., The genome of camelpox virus./ C.L.Afonso , E.R.Tulman , Z.Lu , L.Zsak , N.T.Sandybaev, U.Z.Kerembekova, V.L.Zaitsev, G.F.Kutish and D.L.Rock // Virology 2002,V.295, , № 1,P.1-9.
- 286 Esposito J., The preparation of ortopoxvirus DNA./ J.Esposito , R.Condit and J.Obijeski //J.of Virological Methods 1981,V.2, P.175-179.
- 287 McFadden G., Biogenesis of poxviruses: mirror-image deletion invaccinia virus DNA./ G.McFadden and S.Dales //Cell 1979,V.18, P.101-108.
- 288 Boom R., Rapid and simple nmethod for purification of nucleic acids./ R.Boom , C.J.A.Sol, M.M.Salimans, C.L.Jansen , P.M.E.Wertheim –van Dilien and van der Noordaa J, //American Society for Microbiology 1990, V.28, №3, P.495-503.
- 289 Xiao-Dan Yao., High-Frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected

cells./ Xiao-Dan Yao and D.H.Evans // J.of Virology, 2003, V.77, №13,P.7281-7290.

290 Nevins J.R., Isolation and properties on the vaccinia virus DNA- dependent RNA polymerase./ J.R.Nevins and W.K.Joklik // J.of Biological Chemistry 1977, V.252, №19, P. 6330-6338.

291 McDonald W.F., Transient expression of the early phase of infection and is unlinked to DNA replication and late gene expression./ W.F.McDonald, V.Crozel-Goudot and P.Traktman // J.of Virology, 1992, V.66, №1,P.534-547.

292 Bendahmane M., Identification and characterization of wheat dwarf virus from France using a rapid method for Geminivirus DNA preparation./ M.Bendahmane, H.J.Schalk and B.Gronenborn //Phytopatology 1995, V.85, №11,P.1449-.1455.

293 Bergallo V., Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples./ V.Bergallo , C.Costa , G.Gribaudo , S.Tarallo, S.Baro, A.N.Ponzi and R.Covallo //New Microbiologica 2006, V.29, P.111-119.

294 Rensen G.J., Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay for the detection of prohibited mtat and bone meal in cattle feed and feed ingredients./ G.J.Rensen , W.L.Smith , C.V.Jaravata, B.Osburn B. and J.S.Cullor //Foodborne Pathogenes and Disease 2006, V.3, №4,P.337-.346.

295 Verma M. High molecular weight DNA isolation by guanidine hydrochloride or guanidinium isothiocyanate treatment./ M.Verma //Biotechniques 1988, 6(9), P.848-853.

296 Ciulla T.A., A simple method for DNA purification from peripheral blood./ T.A.Ciulla, R.V.Sklar and S.L.Hauser //Anal.Biochem.1988, 174(2), P.485-488.

297 Porter C.D., Characterization and physical mapping of Molluscum contagiosum virus DNA and location of a sequence capable of encoding a conserved domain of epidermal growth factor./ C.D.Porter and L.C.Archard // J.Gen. Virology, 1987, V.68, P.673-682.

- 298 Ichihashi Y., Location of DNA –binding protein and disulfide-linked proteins in vaccinia virus structural element./ Y.Ichihashi , M.Oie and T.Tsuruhara //J.Virology 1984, V.50.P.929-938.
- 299 Остерман Л.А. Нонограммы для определения констант седиментация нуклеиновых кислот центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы на ультрацентрифугах Spinco./ Л.А.Остерман // Молек.Биолог. 1977,Т.3,№11,С. 694-705.
- 300 Hausmann R. Sedimentation analysis of phage T7-directed DNA synthesized in the presence of a dominant conditional lethal phage gene./ R.Hausmann //Biochem.Biophys.Res.Commun.1968,V.31,P.609-615.
- 301 Eigner J., The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid. J.Eigner and P.Doty //J.Mol.Biol.1965, V.12, №3,P.549-580.
- 302 Hausmann R., Variations in sedimentation patterns among deoxyribonucleic acids synthesized after infection of Escherichia coli by different amber mutants of bacteriophage T7./ R.Hausmann and K.LaRue // J.of Virology, 1969, V.3, №2,P.278-281.
- 303 Thomas V., Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milkers node virus./ V.Thomas , L.Flores and J.A.Holowczak // J.of Virology, 1980, V.34, №1,P.244-255.
- 304 Szybalski W. Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation./ W.Szybalski //Methods in Enzymology 1968, V.12,part 2, P.330-360.
- 305 Ludlum D.B., Equilibrium centrifugation in cesium sulfate solutions./D.B.Ludlum and R.C.Warner //J. of Biological Chemistry 1965,V.240, №7,P.2961-2965.
- 306 Davis R. W., Electron microscope heteroduplex methods of mapping regions of base sequence homology in nucleic acid/ R.W.Davis, M.Simonand, N.Davidson // Methods in Enzymology N.J. 1971,V. 21,P. 413-428.

- 307 Kleinschidt A.K., Uber Deoxyribonuklein- saure-molekuler in Protein – mischfilmen./ A.K.Kleinschidt , R.K.Zahn // Z. Naturforsch., 1959, V.14, P.776-779.
- 308 Kleinschidt A.K. Monolayer technique in electron microscope of nucleic acid molecules./ A.K.Kleinschidt //Method in Enzymology 1968, V.12B, P.361-376.
- 309 Esposito J.J., Orthopoxvirus DNA: A comparison of restriction profiles and maps./ J.J.Esposito and J.C.Knight //Virology 1985, V.143, P.230-251.
- 310 Robinson A.J., The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of Orf virus in sheep./ A.J.Robinson , G.Ellis and T.Balassu //Arch.Virol. 1982, P.43-55.
- 311 Gilray J.A., Restriction endonuclease profiles of Orf virus isolates from the British Isles./ J.A.Gilray, P.F.Nettleton, I.Pow // Vet. Rec.- 1998.- 143 (9).- P. - 237-240.
- 312 Mazur C., Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus./ C.Mazur C., I.I.Ferreira, F.B.Rangel Filho, R.Galler R.,// Veterinary Microbiology.- 2000.-V.- 73.- P.-253-259.
- 313 Рязанкина О.И., Картирование генов вируса осповакцины./ О.И.Рязанкина и С.Н.Щелкунов С.Н. //Молекулярная биология 1993, Т.27, вып.26 С.269-289.
- 314 Wittek R., Inverted terminal repeats in rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA./ R.Wittek , A.Menna , H.K.Muller , D.Schumperli , G.Boseley and R.Wyler // J.of Virology, 1978, V.28, №1,P.171-181.
- 315 Darai G., Analysis of the genome of Molluscum contagiosum virus by restriction endonuclease analysis and molecular cloning./ G.Darai, H.Reisner, J.Scholz , H.Schnitzier and H.Lorbacher de Ruiz // J.of Medical Virology, 1986, V.18, №1,P.29-39.
- 316 Black D.N. The capripoxvirus genome/ D.N.Black // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.- 1986.- №5 (2).- P.-495-501.

- 317 Davies F.G., Relationships of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses / F.G.Davies and C.Otema // Res. Vet. Sci.- 1981.- №31.- P.-253-255
- 318 Ireland D.C., Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR/. D.C.Ireland and Y.S.Binepal // J.of Virological Methods, 1998, V.74, P.1-7.
- 319 Schumperli D., DNA sequence homology estimation by combinatorial analysis of endonucleases restriction data/ D.Schumperli , R.Lagadec and H.K.Muller // J. Gen. Virol.- 1977.- №38.- P.-161-166.
- 320 Kitching R.P., Bhatt P.P. and Black D.N. The characterization of African strains of capripoxvirus/ R.P.Kitching, P.P.Bhatt and D.N.Black // Epidemiol. Infect.-1989.- №102.- P.-335-343.
- 321 Ropp S.L., PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses./ S.L.Ropp, Q.Jin , J.C.Knight, R.F.Massung and J.J.Esposito // J. of Clinical Microbiol. 1995. V.33, No.8, P. -2069-2076.
- 322 Heine H.G., A capripoxvirus detection by PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene./H.G.Heine, M.P.Stevens M, A.J.Foord and D.B.Boyle //J. Immunol.Methods 1999,V.227, P.187-196.
- 323 Орлова Е.С., Видовая и штаммовая дифференциация каприпоксвирусов методом полимеразной цепной реакции./ Е.С.Орлова, А.В.Щербаков, В.И.Диев и В.М.Захаров //Молекулярная биология,2006, Т.40, №1,С.158-164.
- 324 Aoyagi K. PCR. Molecular biology Problem Solver./ K.Aoyagi .// A Laboratory Guide. Wiley-Liss Inc.-2001.- P. 291-329.
- 325 Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Short protocols in molecular biology // Wiley.- 1999.-P.- 560

- 326 Sharrocks A.D. The design of primers for PCR, in PCR Technology. Griffin H.G. and Griffin A.M. Ed., CRC Press// London.- 1994.- P. 5-11.
- 327 Innis M.A., Optimization of PCR. PCR Protocols: A guide to methods and applications/ M.A.Innis and D.H.Gelfand // 1990.-P.- 3-12.
- 328 Чемерис А.В, Новая старая ДНК. Уникальные черты самой главной молекулы, или Почему ученые разных специальностей в последнее время обращают на ДНК все больше внимания./ А.В.Чемерис и В.А.Вахитов // Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. Уфа.- 2002.-Т.-80.- С. -118-120.
- 329 Reid S.M., Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction./ S.M.Reid , N.P.Ferris, G.H.Hutchings, A.R.Samuel, N.J.Klowles.// Journal of Virological Methods.- 2000.-V. 89.-P.-167 – 176.
- 330 Ibrahim M.S., Esposito J.J., Jahrling P.B. and Lofts R.S. The potencial of 5-nuclease PCR for detecting a singl-base polymorphism in orthopoxvirus./ M.S.Ibrahim, J.J.Esposito, P.B.Jahrling and R.S.Lofts. //Mol.Cell.Probes 1997, V.11, , P.143-147.
- 331 Lee L.H., Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxviruses infection/ L.H.Lee and K.H.Lee // J. of Virological Methods. 1997.V. 63, 1-2. P. 113-119.
- 332 Oleksiewicz V.B., Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues/ V.B.Oleksiewicz , A.I.Donaldson and S.Alexandersen // Journal of Virological methods.- 2001.-V. 92.- P. 23 – 35.
- 333 Alexandersen S., Development of reverse transcription-PCR (oligonucleotide probing) enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and preliminary typing of foot-and-mouth disease: a new system using simple and aqueous-phase

hybridization/ S.Alexandersen, M.A.Forsyth, S.M.Reid and G.J/Belsham // Journal of Clinical Microbiology. 2000. V.-38. No.12. P. 4604-4613.

334 Markoulatos P., Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction/ P.Markoulatos , O.Mangana-Vougiouka , G.Koptopoulos, K.Nomikou and J.Papadopoulos // J. of Virol. Methods, 2000. V. 84. P. 161-167.

335 Torfason E.G., Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections/ E.G.Torfason and S.Gunadottir Markoulatos P., Mangana-Vougiouka O., Koptopoulos G., Nomikou K. and Papadopoulos J.// J. Clin. Virol.- 2002.-V.- 24 (1-2).- P. 79-84.

336 Inoshima Y., Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction/ Y.Inoshima, A.Morooka and H.Sentsui // Journal of Virological Methods. 2000.V.84(2). P. 201-208.

337 Ibrahim M.S., Real-time PCR assay to detect smallpox virus./ M.S.Ibrahim D.A.Kulesh, S.S.Salesh, I.K.Damon, J.J.Esposito. //J.of Clinical Microbiology 2003, V.41, . No.8, P.3835-3839.

338 Mangana-Vougiouka O., Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures O.Mangana-Vougiouka, P.Markoulatos, G.Koptopoulos, K.Nomikou, N.Bakandritsos and O.Papadopoulos . // J. of Virology, 1999, V. 77, P. 75-79.

339 Mangana-Vougiouka O., Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell cultures, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay./ O.Mangana-Vougiouka, P.Markoulatos, G.Koptopoulos, K.Nomikou , N.Bakandritsos and O.Papadopoulos . //Molecular and Cellular Probes, 2000, V. 14, P. 305-310.

340 Lamien C.E., Use of the capripoxvirus homologue of vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate goat poxvirus from

sheep poxvirus./C.E. Lamien, C.LeGoff, R.Silber , D.B.Wallace, V.Gulyaz, E.Tuppurainen, H.Madani., P.Caufour , T.Adam, M.Ei Harrak ,F.G.Luckins, E.Albina and A.Diallo //Vet. Microbiology 2011, V.149 (1-2),P.