

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii fakulty všeobecného lékařství KU, Praha

PURIFIKACE VIRU TĚŠÍNSKÉ NEMOCI VEPŘŮ (TDV) NA DEAE CELULÓZE

B. KORYCH, M. MÁRA, F. PATOČKA

Rezistence viru těšínské nemoci (TDV) dovolila použít pro purifikaci viru řadu různých chemických a fyzikálně chemických metod bez porušení jeho struktury. Nejčastějším purifikačním způsobem byly metody precipitující virus jako např. metanolová precipitace, vysolování síranem amonným, precipitace rivanolem a kyselá precipitace využívající izoelektrického bodu viru při pH 4—5, v některých případech bylo výhodné použití kombinace těchto metod (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 21).

Nevirové doprovodné látky je možno odstranit při purifikaci různými činidly: lipoidní složky chloroformem a éterem (4, 11, 12, 15, 16), látky proteinového charakteru fluorokarbonovými sloučeninami (12). Centrifugace byla používána především k odstranění hrubších partikulárních znečištěnin v prvních fázích purifikace a pak jako poslední stupeň, kdy ultracentrifugací byl virus koncentrován (2, 20).

Z adsorpčních činidel byl použit pro odstranění impurit bentonit. Purifikací bentonitem se současně snižovalo kvantum viru o 1 (14) až 2 log. (1, 19).

Gelové filtrace na Sephadexu G-25 bylo použito k odstranění solí a nízkomolekulárních látek z infekčních medií tkáňových kultur (13).

Přítomná práce podává výsledky purifikace TDV z infekčního média tkáňových kultur jako výchozího materiálu, s použitím freonové precipitace, dialýzy nebo gelové filtrace a chromatografie na DEAE celulóze.

M A T E R I Á L A M E T O D Y

Virus: Jako výchozího materiálu k purifikačním experimentům byla použita 119. pasáž avirulentního klonu A3b viru Kloboukovy obrny — kmen Praha, připravená na tkáňových kulturách buněk PK ve velkém množství, takže ke všem pokusům bylo použito stejného materiálu.

Tkáňové kultury: Pro pomnožení viru a všechny titrační pokusy byly použity buňky permanentní linie vepřových ledvin PK (3). Zkumavkové kultury byly nasazovány s počtem 50 000 živých buněk v objemu 1 ml na zkumavku, kultury na Petriho miskách o průměru 6 cm s jedním miliónem buněk v objemu 10 ml (10).

Jako *kultivačního média* bylo používáno 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu (LAH) v Earlově roztoku s dvojitou glukózou (E) a 10 % telecího séra (TS). Penicilin a streptomycin byly přidávány stejným dílem v koncentraci 100 j. resp. gama na ml, pH bylo upravováno 7,5 % NaHCO₃ do konečné koncentrace 0,38 % bikarbonátu.

Udržovací médium, používané pro infekci kultur, mělo stejné složení s výjimkou séra, které bylo vynecháno.

Titrace viru: Titry byly vyhodnocovány na základě cytopatického efektu (TCID₅₀) za použití desíti zkumavkových tkáňových kultur na jedno ředění viru nebo stanovením počtu plakformujících jednotek (PFU) u titrací na kulturách kultivovaných na Petriho miskách (10). V tomto případě byl počet PFU

vypočítáván jako průměr z hodnot odečtených na dvou Petriho miskách použitých pro jedno ředění viru. Všechny kvantitativní údaje byly vztaženy na 1 ml.

Kromě výchozího materiálu, který byl uskladněn zmrazený při -20°C , všechny ostatní materiály byly bezprostředně po získání až do doby zpracování uchovávány při $+4^{\circ}\text{C}$.

Chromatografie na DEAE celulóze byla prováděna na koloně o průměru 1,6 cm opatřené vodním chlazením. Kolona byla plněna do výše 9 cm. Suspenze 3 g DEAE celulózy (Watmann, powder DE 50) byla roztřepána v 0,1 NaOH a plněna běžným způsobem. Kolona byla opatřena výměnným rezervoárem spojeným s kolonou pomocí zábrusové kapačky. DEAE celulóza byla aktivována postupně 1 M NaOH, 2 M NaCl, 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,2 a tridestilovanou vodou. V jednotlivých pokusech bylo chromatografováno vždy 10 ml vzorku. Nanesený materiál byl eluován postupně 60 ml tridestilované vody, 70 ml 0,005 M fosfátového pufru pH 7,2, 70 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,2 a konečně 70 ml gradientu 1 M NaCl v 0,05 M fosfátovém pufru (18).

Jednotlivé frakce byly jímány po 10 ml do sterilních kalibrovaných zkumavek, ihned zazátkovány a ukládány do lednice při $+4^{\circ}\text{C}$. Biologická aktivita byla testována bezprostředně po chromatografii, nejpozději druhý den.

Freonová purifikace: Směs stejných dílů centrifugované virové suspenze a freonu (Ledon ČSSR) byla třepána 10 min ve třech cyklech. Freon v precipitátech byl oddělen od supernatantního média s virem pětiminutovou centrifugací při 3000 rpm. Freon, virová suspenze i centrifugační nádobky s patronami byly předchlazeny na $+4^{\circ}\text{C}$.

Dialýza: Materiál byl dialyzován proti destilované vodě po 48 hod. při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ s průběžnou výměnou destilované vody.

Gelová filtrace: Pro odstranění solí z virové suspenze bylo použito Sephadexu G-25 (Pharmacia Uppsala). Pět ml suspenze bylo filtrováno běžně připravenou kolonou o délce 36 cm a průměru 1,75 cm. Objem gelu byl $82,5\text{ cm}^3$, mrtvý objem V_0 25 ml, nosný roztok tridestilovaná voda.

V Ý S L E D K Y

Ve všech pokusech byla použita jedna šarže infekčního média tkáňových kultur s titrem viru $10^{9,2}$ TCID₅₀/ml.

Roux láhvvé kultury infikované 100 PFU/buňku avirulentního klonu viru vepřové obrny A3b, byly zmrazeny 24 hod. po infekci, kdy kultury byly úplně rozrušeny a zbývaly jen ostrůvky kulatých buněk. Po rozmrazení bylo médium kultur slito, promícháno, ponecháno při 41°C po 10 min po dezagregaci shluků virových částic a centrifugováno při 3500 rpm po 15 min. Supernatantní tekutina byla opatrně přepipetována a rozdělena po 50 ml do transfúzních nádobek objemu 100 ml, ve kterých byl virus uskladněn do doby použití při -20°C , kdy byl rozmrazen ve 40°C teplé vodě a ponechán při této teplotě 10 min pro rozptýlení event. shluklých virových částic. Takto připravená virová suspenze byla pak pokládána za výchozí materiál pro další purifikační procedury, titrována jako vzorek číslo 1 (tab. 1) a paralelně byl stanoven dusík.

Freonová purifikace vedla již v prvním cyklu k precipitaci většiny makromolekulárního proteinového materiálu, pocházejícího z buněk tkáňových kultur. Další cyklus freonové purifikace měl již na rozhraní vodné a freonové fáze precipitát menšího rozsahu, ve třetím cyklu již nebyl žádný makroskopicky patrný precipitát.

Ve vodní fázi jednotlivých cyklů freonové purifikace bylo vyhodnocováno virové kvantum titrací na zkumavkových a miskových kulturách buněk PK.

Freonová purifikace vedle k určitému poklesu viru (tab. 1). Analýza ukázala snížení dusíku ve vodní fázi.

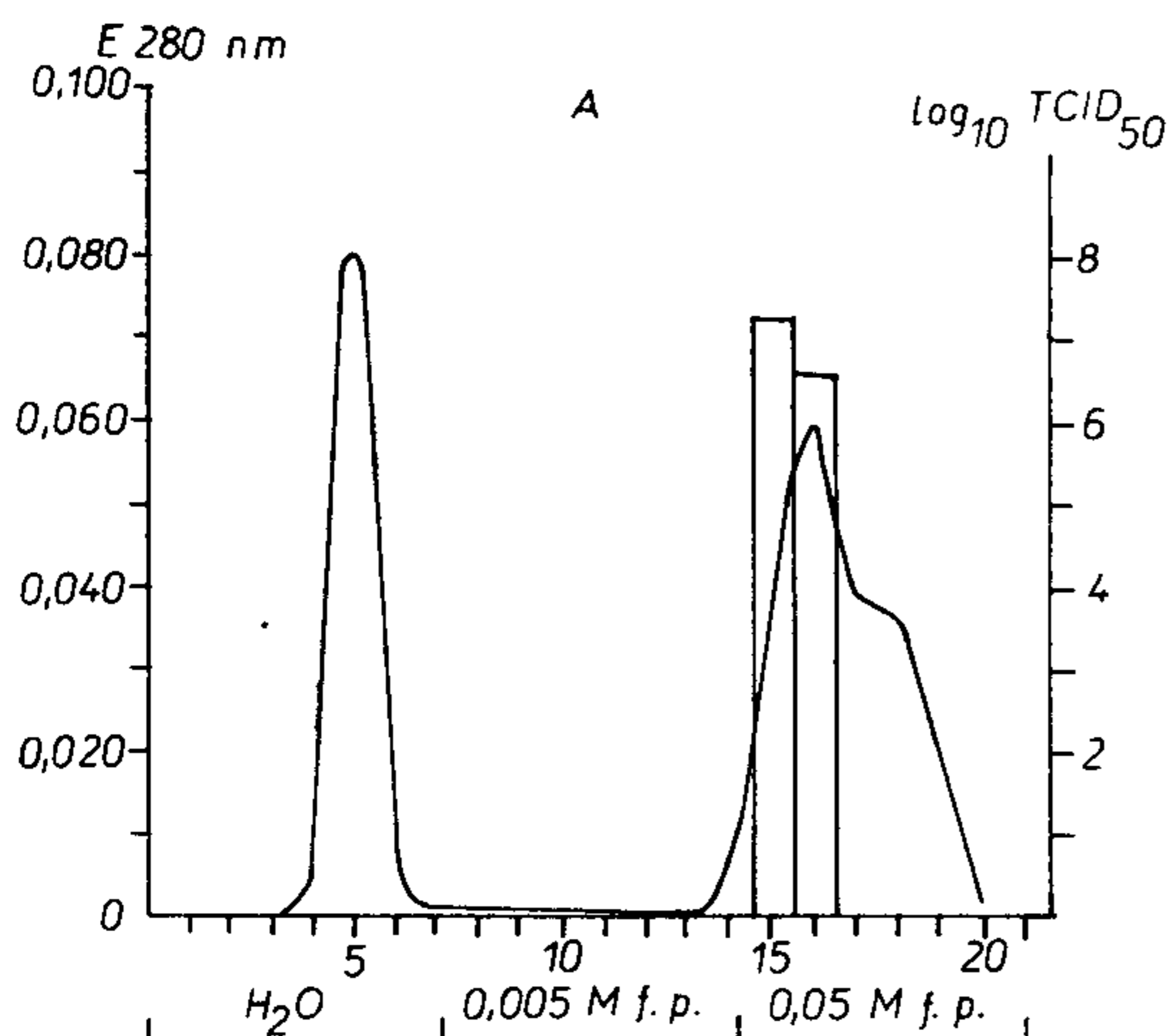
Freonový purifikát byl dialyzován proti destilované vodě pro odstranění organických nízkomolekulárních látek a solí. Titrace viru ukázala, že dialýza byla bez vlivu na jeho množství, chemická analýza pak ukázala předpokládané

Tab. 1. Hodnoty dusíku a biologicky prokazatelného viru v jednotlivých purifikačních stupních

Vzorek	gama N/ml	log ₁₀ /PFU/ml	log ₁₀ TCID ₅₀ /ml
Infekční médium	460	9,2	9,5
Infekční médium dialyzované	47	9,63	9,33
Infekční médium + FREON	380	8,2	8,3
Infekční médium + FREON + dialýza	36	8,13	8,28
Infekční médium + FREON + dialýza + DEAE/15	11	8,3	8,45

snížení obsahu dusíku. Paralelně byl stejný virový purifikát filtrován sloupcem Sephadexu G-25 za stejným účelem. Odsolení a odstranění nízkomolekulárních látek bylo analogické dialyzaci, virové kvantum gelovou filtrací na Sephadexu G-25 nebylo sníženo.

Další purifikační stupeň, chromatografie na DEAE celulóze, vedl k dalšímu snížení dusíku způsobeném jednak ředěním vzorku na koloně, jednak frakcionací virového a zbytku nevirového materiálu, jak ukazuje graf závislosti elučního objemu na extinkci při 280 a 260 nm (graf 1). Výsledky titrací jednotlivých frakcí ukázaly, že virus je eluován 0,05 M fosfátovým pufrům v jednom vrcholu ve frakcích 15, 16, 17 (graf 1).



Graf 1a. Chromatografie na DEAE celulóze infekčního média TDV, dialyzovaného proti destilované vodě

Chromatografie freonového purifikátu bez dialyzace nevedla na DEAE celulóze k jednorázové eluci viru. Virová aktivita byla prokázána již v prvních frakcích kromě maxima ve frakci 15 a 16, což ukázalo na nutnost odstranění solí a opodstatněnost použití pufrů o velmi nízké iontové síle pro eluci.

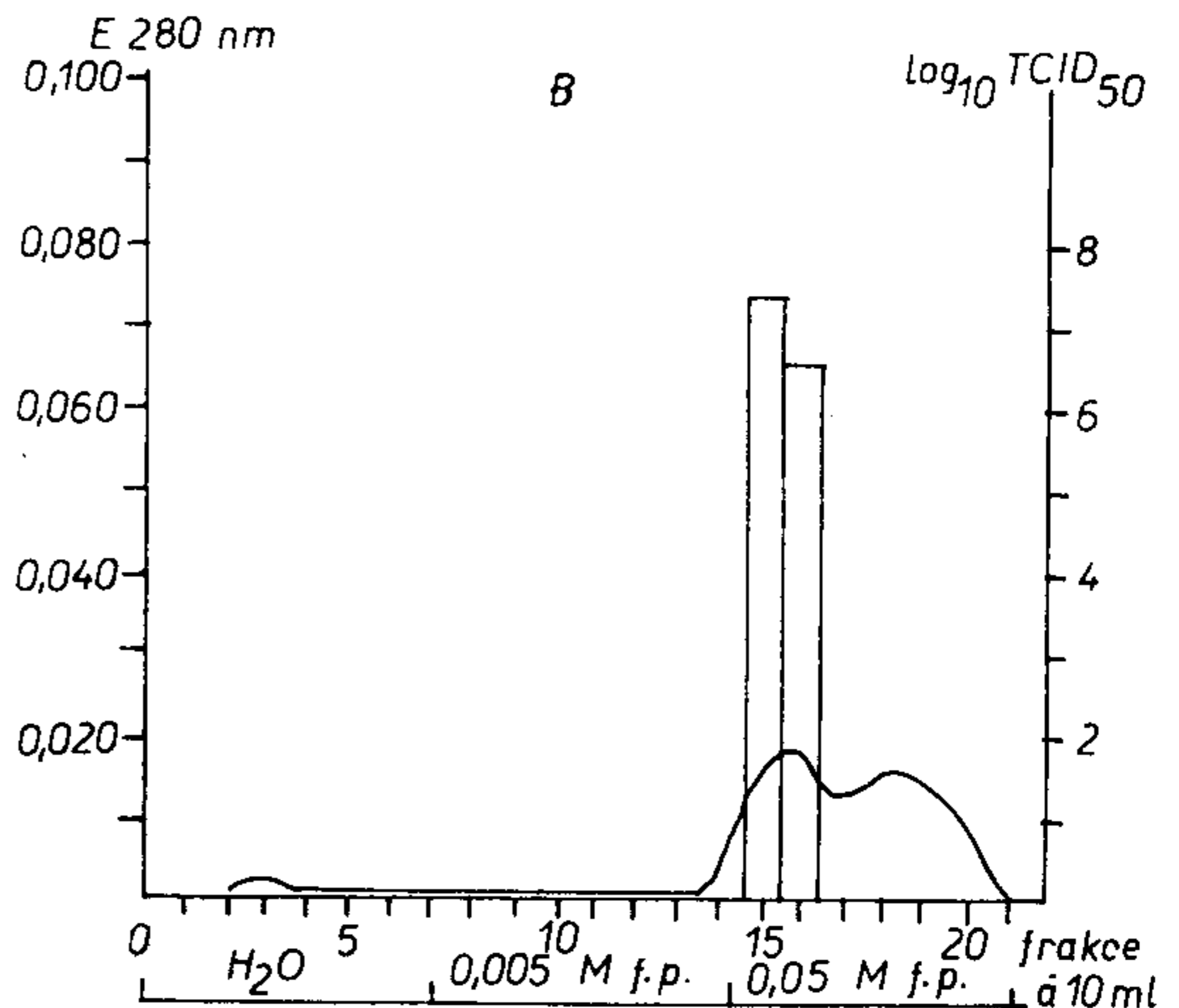
Množství viru po chromatografii na DEAE celulóze ve srovnání s naneseným vzorkem nebylo zřetelně ovlivněno.

DISKUSE

Ačkoliv infekční médium tkáňových kultur představuje v porovnání s mozkomíšní suspenzí, užívané dříve jako zdroje viru Kloboukovy obrny, poměrně velmi čistý materiál, přesto obsahuje znečištěniny, které se rušivě uplatňují v elektronoptickém obraze nebo imunizačních pokusech.

Pro purifikaci viru KO z infekčního média tkáňových kultur bylo použito chloroformu s následnou koncentrací srážením metanolem za chladu (5, 6)

Graf 1b. Chromatografie na DEAE celulóze infekčního média TDV, purifikovaného freonem a dialyzovaného proti destilované vodě. Plná čára znázorňuje extinkci při 280 nm v jednotlivých frakcích. Sloupečky znázorňují maximum biologické aktivity (MBÚ) v \log_{10} TCID₅₀/ml



nebo samotné metanolové precipitace (8), s menší výhodou síranu amonného (17).

V naší práci jsme vyšli z možnosti aplikace chromatografické dělicí metody (17) pro purifikaci virů, dovolující jednoduchým způsobem získat čištěný virový materiál (9).

Rezistence viru KO umožnila dialýzou proti destilované vodě odstranění solí a nízkomolekulárních látek z infekčního média tkáňových kultur bez ztráty virové aktivity podobně jako gelová filtrace na Sephadexu G-25 (13), která poskytovala výhodu časové úspory. Dialyzace a gelová filtrace odstraněním solí, jako předpokladu pro chromatografii na DEAE celulóze, umožnily obejít dvoucyklovou ultracentrifugaci, jak ji používal Hoyer (9).

První pokusy o purifikaci viru KO chromatografií na DEAE celulóze ukázaly, že infekční médium tkáňových kultur, do kterého byl virus uvolněn disrupcí buněk jednorázovým cyklem zmrazení a rozmrazení, obsahuje relativně značné množství proteinů, které bylo těžko kvantitativně od viru oddělit pouze chromatografií na DEAE celulóze. S výhodou jsme použili jednoduché purifikační metody precipitace nevirálních proteinových impurit fluorokarbony, která je bez vlivu na virus KO, jak prvně ověřil Liebenow et al. (12) na viru z mozkomíšní suspenze. Titrační pokusy s jednotlivými vzorky ze třícyklové precipitace freonem ukázaly, že virus není nijak podstatně inaktivován

a že nedochází k redukci jeho kvanta. V prvních dvou cyklech bylo odstraněno maximum příměsí, které byly makroskopicky patrné jako precipitát na rozhraní vodné a freonové fáze. Poslední (třetí) precipitační cyklus již nevedl k makroskopicky patrné precipitaci. Odstraněním solí a nízkomolekulárních látek z virové suspenze purifikované freonem, dialýzou proti destilované vodě nebo gelovou filtrací, byl materiál připraven pro chromatografii na DEAE celulóze. Obě tyto procedury nevedly k podstatnější ztrátě viru nebo jeho inaktivaci (tab. 1).

Chromatografie na DEAE celulóze ukázala, že předcházející purifikační procedury neodstraňují nevirový doprovodný materiál kompletně, jak bylo prokázáno měřením extinkce při 280 nm jednotlivých frakcí eluovaných z iontoměniče a průkazem přítomnosti viru v jednotlivých jímáných frakcích. Virus byl opakovaně prokazován pouze v jednom maximu ve frakcích eluovaných 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,2. Po nasazení gradientu NaCl nebyl již žádný virus, prokazatelný na tkáňových kulturách, z kolony vymýván. To ukazuje jednak na homogenitu virového materiálu, nanášeného na kolonu, jednak, vzhledem k nízké iontové síle elučního činidla potřebného pro kvantitativní vymytí viru z iontoměniče, na bezpodmínečnou nutnost dokonalé dialýzy (nebo jiného způsobu odstranění solí), zabraňujících vazbě viru na iontoměnič, a tím vedoucích k jeho eluci již destilovanou vodou.

Celkové množství dusíku bylo sníženo námi užitými purifikačními postupy proti původnímu materiálu 42krát. Podstatná část proteinových přímíšenin byla odstraněna freonovou precipitací, nízkomolekulární složky média (zvláště aminokyseliny) dialýzou nebo gelovou filtrací na Sephadexu G-25. Nicméně maxima extinkcí při 280 nm, nalezená v jednotlivých frakcích po chromatografii na DEAE celulóze, a to i v těch, kde nebyl prokázán virus, ukazují, že odstranění nevirových bílkovin freonovou precipitací a dialýzou není úplné. Tímto byla odůvodněna nutnost použití chromatografie jako dalšího purifikačního stupně, což současně ukazují i hodnoty dusíku, ještě dále tímto purifikačním stupněm snížené.

Stupeň purifikace vztažený na hodnotu dusíku (tab. 1) ve frakci obsahující virus je, ve srovnání s jinými purifikačními postupy, používajícími především mozkomíšních suspenzí jako výchozího materiálu (12), podstatně vyšší.

S O U H R N

1. Byl vypracován purifikační postup pro virus Těšínské nemoci prasat (TDV) z infekčního média tkáňových kultur. Při purifikaci bylo použito deproteinace freonem, odstranění nízkomolekulárních složek dialýzou proti destilované vodě nebo gelovou filtrací na Sephadexu G-25 a chromatografie na DEAE celulóze.

2. Purifikací bylo dosaženo 42násobného snížení dusíku.

3. Při chromatografii na DEAE celulóze byl virus uvolňován jednorázově 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,2.

4. Celkové ztráty viru nepřekračovaly v opakovaných pokusech 2 log.

В ы в о д ы

Очистка вируса Тешинской болезни свиней (TDV) на целлюлозе DEAE

К о р ы х Б., М а р а М., П а т о ч к а Ф.

1. Был выработан метод очистки вируса Тешинской болезни свиней (TDV) из инфекционной среды тканевых культур. При очистке применялась депротенизация фреоном. Устранение низкомолекулярных компонентов с помощью диализа против дистиллированной воды, или гелевого фильтрования на сефадексе Г-25, и хроматография на целлюлозе DEAE.

2. Очищением было достигнуто уменьшения содержания азота в 42 раза.

3. При хроматографии на целлюлозе DEAE вирус высвобождался однократно 0,05 M фосфатным буфером pH 7,2.

4. Общие потери вируса не превышали в повторных опытах 2 log.

Čs. Epidem., 17, 1968, 1: 8—13.

SUMMARY

Purification of Teschen Disease Virus (TDV) on DEAE Cellulose

Korych B., Mára M., Patočka F.

1. The purification procedure for Teschen disease virus (TDV) from tissue culture infectious fluid was developed. It involves deproteination by freon, removal of low-molecular components by dialysis against distilled water or gel-filtration on Sephadex G-25, as well as chromatography on DEAE cellulose.

2. The 42 times decrease of nitrogen was achieved by purification.

3. During chromatography on DEAE cellulose the virus was released at one time by 0.05 M phosphate buffer pH 7.2.

4. The total losses of virus did not exceed 2 log. in repeated experiments.

Čs. Epidem., 17, 1968, 1: 8—13.

LITERATURA

1. **Armbruster, O., Zimmermann, Th.:** Z. Hyg. Infekt.-Kr., 145, 1958: 123. — 2. **Brown, F., Stewart, D. L.:** Nature, 187, 1960: 714—715. — 3. **Černý, M., Korych, B., Soukup, F.:** J. Hyg. Epidem. (Praha), 8, 1964: 353—363. — 4. **Gard, S.:** Arch. ges. Virusforsch., 4, 1952: 249. — 5. **Gralheer, H.:** Vet. Med., 6, 1961: 35—38. — 6. **Gralheer, H.:** Arch. exp. Vet.-Med., 15, 1961: 458—459. — 7. **Gralheer, H., Fischer, K.:** Arch. exp. Vet.-Med., 12, 1958: 657—661. — 8. **Hahnefeld, H., Hantschel, H., Hahnefeld, E.:** Arch. exp. Vet.-Med., 16, 1962: 45—59. — 9. **Hoyer, B. H., Bolton, E. T., Ormsbee, R. A., Bouvier Le, G., Ritter, D. B., Larson, C. L.:** Science, 127, 1958: 859—863. — 10. **Korych, B., Chýle, M.:** J. Hyg. Epidem. (Praha), 2, 1965: 37—42. — 11. **Kubelka, V., Patočka, F.:** Arch. exp. Vet.-Med., 8, 1954: 666—674. — 12. **Liebenow, W., Fischer, K., Röhrer, H.:** Arch. exp. Vet.-Med., 12, 1958: 627—642. — 13. **Matheka, H. B., Wittmann, G.:** Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 182, 1961: 169—178. — 14. **Patočka, F., Kubelka, V.:** Přednáška na společnosti maďarských humánních a veterinárních virologů. Budapest, listopad 1955. — 15. **Patočka, F., Kubelka, V., Slavík, K., Boháč, J.:** Věstník ČsAZV, 25, 1951: 461—476. — 16. **Patočka, F., Kubelka, V., Slavík, K., Boháč, J.:** Internat. Congr. Microbiol. Proc. Sixth, 1955, 3: 181—183. — 17. **Peterson, E. A., Sober, H. A.:** Amer. J. Chem., 78, 1956: 751—755. — 18. **Schmidt, B., Harzmann, B., Grossgebauer, K.:** Arch. ges. Virusforsch., 10, 1961: 361. — 19. **Strohmayer, K.:** Z. Naturforschg. 18 b: 788—798 (1963). — 20. **Strohmayer, K., Zimmermann, Th.:** Z. Naturforsch., 13 b, 1958: 234—237. — 21. **Szurman, J., Larski, Z.:** Med. weteryn., 13, 1957: 139.