

Анализ белков вирусосодержащих суспензий, хранившихся в условиях умеренно низких температур

М.Ю. СТЕГНИЙ¹, А.Ю. СЕМЕНЧЕНКО²

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Analysis of Proteins of Virus Containing Suspensions, Stored under Moderately Low Temperatures

M.YU. STEGNIY¹, A.YU. SEMENCHENKO²

¹National Pharmaceutical University, Kharkov

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проведен анализ белков неочищенных суспензий вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота штамм "Орегон C24-V", подвергавшихся замораживанию с последующим хранением при температурах -18, -30°C от 20 сут до 10 лет. При этом выявлены снижение инфекционной активности и деградация белков вирусосодержащих суспензий, хранившихся длительное время в условиях умеренно низкой температуры.

Ключевые слова: белки вирусосодержащих суспензий, умеренно низкие температуры

Проведено аналіз білків неочищених суспензій вірусу діареї великої рогатої худоби штам "Орегон C24-V", що заморожували з наступним збереженням при температурах -18, -30°C від 20 діб до 10 років. При цьому виявлено зниження інфекційної активності і деградація білків вірусвміщуючих суспензій, що зберігалися тривалий час в умовах помірно низької температури.

Ключові слова: білки вірусвміщуючих суспензій, помірно низькі температури.

The authors have performed the analysis of proteins of non-purified suspensions of cattle diarrhea virus (DV), "Oregon C-24 V" strain, subjected to freezing with a further storage at -18, -30°C from 20 days to 10 years. At the same time there were revealed both the decrease of infectious activity and the degradation of virus-containing suspensions proteins, stored for a long time at moderately low temperature.

Key-words: proteins of virus-containing suspensions, moderately low temperatures.

Биологические свойства микроорганизмов при консервировании можно сохранить добавлением в среды консервирования таких криопротекторов, как ДМСО, ПЭГ-400, глицерин и другие [1, 3]. Однако известно, что криопротекторы могут вызывать конформационные изменения белков и нуклеиновых кислот микроорганизмов [4, 8]. Поэтому при консервировании вирусов мы по возможности не использовали искусственные криопротекторы, замораживая ВД крупного рогатого скота штамм "Орегон C24-V" в клеточном детрите, поскольку в [5] было отмечено, что субклеточные компоненты детрита в условиях гипотермического хранения (4°C) оказывали протективное действие на вирус ринотрахеита штамм "Молдавский".

Цель работы – анализ белков в вирусосодержащих суспензиях, подвергавшихся замораживанию, долгосрочно и кратковременно хранившихся при -18, -30°C, и выявление при этом возможных естественных протективных компонентов данных суспензий.

Microorganism's biological properties during cryopreservation can be preserved by adding into the preservation media such cryoprotectants as DMSO, PEG-400, glycerol and others [1,3]. However, cryoprotectants are known to provoke the conformational changes in proteins and nucleic acids of microorganisms [4,8]. Thus during cryopreservation of viruses we, as far as possible, have not used artificial cryoprotectants, freezing DV of cattle "Oregon C24-V" strain in cellular detritus, because in the paper [5] there was noted, that subcellular components of detritus under hypothermic storage (4°C) had performed a protective influence on rhinotracheitis viruses, "Moldavskiy" strain.

The aim of the work was both to analyze the proteins in virus-containing suspensions, subjected to freezing, for a long time and shortly stored at -18, -30°C; and to reveal, at the same time, possible natural protective components of these suspensions.

Materials and methods

Cattle diarrhea virus "Oregon C24-V" strain was provided by the Institute of Experimental and Clinical

Адрес для корреспонденции: Стегний М.Ю., Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина 61002; тел. +38 (0572) 47-16-82, факс: +38 (0572) 470164

Address for correspondence: Stegnyy M.Yu., National Pharmaceutical University, 53, Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +38 (0572) 47 1682, fax: +38 (0572) 47 0164.

Материалы и методы

Вирус диареи крупного рогатого скота штамм "Орегон С24-V" был предоставлен Украинским НИИ экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН.

Вирусосодержащий материал замораживали и хранили после полного разрушения перевиваемой клеточной культуры трахеи телят (ТрТ) вирусом диареи крупного рогатого скота штамм "Орегон С24-V", который обладает выраженным цитопатическим действием (ЦПД). Перевиваемые культуры клеток выращивали в питательной среде следующего состава: по 45% сред Игла и 199 с добавлением 10% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота. После заражения клеточных культур в поддерживающую среду сыворотку крови не вносили. Время хранения вирусного материала при -18, -30°C составляло от 20 дней до 10 лет. В качестве контрольных исследовали образцы клеточной культуры ТрТ, незараженной замороженной при -18, -30°C и незараженной, хранившейся при 4°C.

Вирусосодержащий материал после хранения в условиях умеренно низких температур осаждали на ультрацентрифуге "MSE" при 4°C и 76000g в течение часа. Анализ белков осадков после ультрацентрифугирования проводили путем горизонтального SDS электрофореза в ультратонких гелях [6].

Высокоскоростные супернатанты анализировали методом гель-фильтрации на колонке длиной 40 см и диаметром 1,6 см, заполненной поливиниловым гелем (TSK-Gel Toyopearl HW-55F). Гель разделяет протеины в диапазоне молекулярных масс от 1000 до 700000 Д. Элюэнт служил буфер следующего состава: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ – 30 ммоль/л; NaCl – 100 ммоль/л, pH 7,5. Супернатант в количестве 0,5 мл вводили в колонку петлевым инжектором. Буфер подавали в колонку перистальтическим насосом LKB 2132 Microperpex со скоростью потока приблизительно 1,7 мл/мин. Выходящие из колонки фракции регистрировали ультрафиолетовым оптическим монитором LKB 2238 Uvicord SII при длине волны 276 нм с чувствительностью на первом канале 2,00 AUFS (относительных оптических единиц), на втором – 0,05 AUFS. Сигнал детектора записывали в виде хроматограмм двухканальным самопишущим потенциометром LKB 2210 Recorder. Скорость диаграммной ленты составляла 2 мм/мин.

Перед анализом колонку калибровали стандартными белками с известной молекулярной массой (β -амилаза – 200000 Д, бычий сывороточный альбумин – 66000, карбонгидраза – 29000, цитохром С – 12300, инсулин – 6000, витамин B_{12} – 1357).

Veterinary Medicine of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences.

Virus-containing material was frozen and stored after a complete destruction of recultured cell culture of calf's trachea (CT) by cattle diarrhea virus, "Oregon C24-V" strain, which has expressed a cytopathic effect (CE). Recultured cell cultures were grown in nutrient medium of the following composition: 45% Eagle medium and 199 one with adding of 10% inactivated cattle serum. After infectioning the cellular cultures in nutrient medium blood serum was not added. Time of viral material storage at -18, -30°C was from 20 days to 10 years. As the control served the investigated samples of both non-contaminated CT cellular culture, frozen at -18, -30°C and the same one, kept at 4°C.

Virus-containing material after storage under moderately low temperatures was fractionated using ultracentrifuge "MSE" at 4°C and 76000g for one hour. The analysis of protein deposits after ultracentrifugation was performed using the horizontal electrophoresis SDS in ultrathin gels [6].

High rate supernatants were analyzed by gel-filtration method on the 40cm column with 1.6 cm diameter, which is filled with polyvinyl gel (TSK-Gel Toyopearl HW-55 F). Gel divides proteins within the range of molecular weight from 1000 to 700000 D. As eluent the buffer of the following composition served: NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 – 30 mmol/l; NaCl – 100 mmol/l, pH 7.5. Supernatant in amount of 0.5 ml was added into the column by loop injector. Buffer was supplied into the column by peristaltic pump LKB 2132 Microperpex at a stream rate about 1.7 ml/min.

Releasing out from the column fractions were recorded by ultraviolet optical monitor LKB 2238 Uvicord SII at a wave length 276 nm with sensitivity on the first channel 2.00 AUFS and 0.05 AUFS (relative optical units) on the second one.

Detector signal was noted as chromatogrammes by 2-channel recording potentiometer LKB 22 10 Recorder.

Before the analysis the column was calibrated by standard proteins of known molecular weights (β -amylase – 200000 D, bovine serum albumin – 66000, carbonhydrase – 29000, cytochrome C – 12300, insulin – 6000, vitamin B_{12} – 1357).

Infectious activity of viral suspensions was determined by titration method according to virus CE on CT cellular culture.

Results and discussion

Totally in samples of the material being stored under moderately low temperatures, and in non-frozen samples, being stored at 4°C, were found 9 protein bands (Fig.1). Molecular weight of these proteins is shown in the Table.

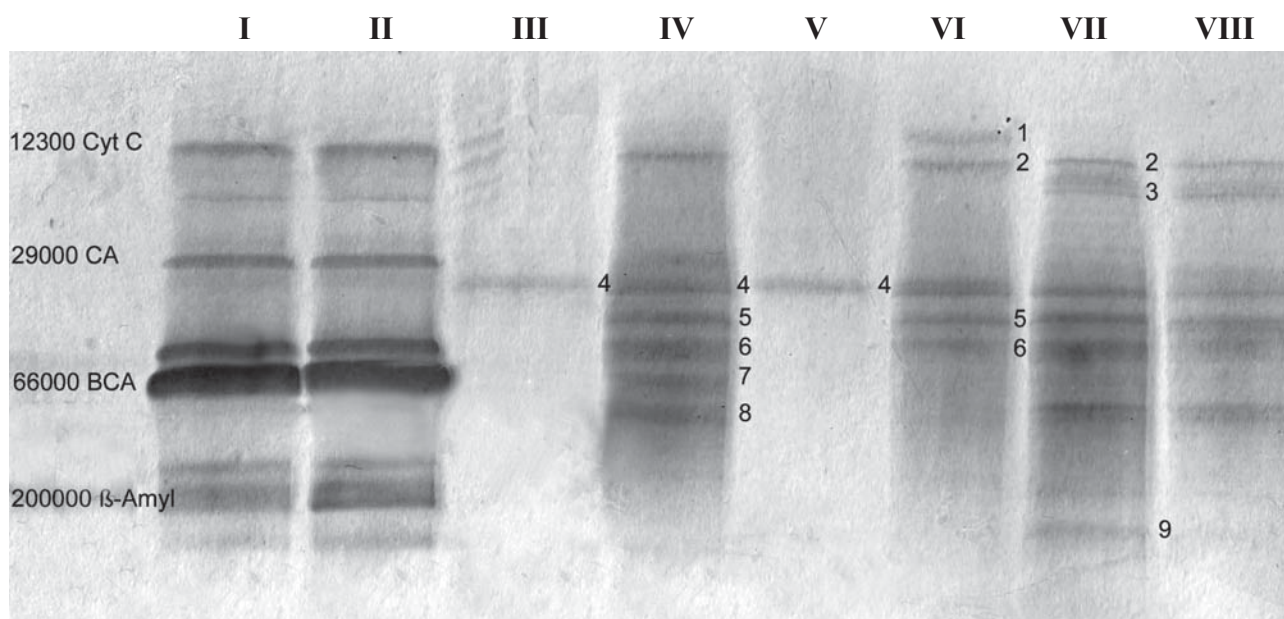


Рис. 1. Электрофореграмма белков вирусосодержащих суспензий: I, II – стандартные белки; III – суспензия, хранившаяся 10 лет при -18, -30°C; IV – суспензия, хранившаяся в течение 20 сут при -18, -30°C; V – суспензия, хранившаяся в течение 10 лет при -18, -30°C; VI – суспензия, хранившаяся 20 сут при -18, -30°C; VII – суспензия незараженных клеток, хранившихся при 4°C; VIII – суспензия незараженных клеток, хранившихся при -18, -30°C.

Fig.1. Electrophoregramme of virus-containing suspensions proteins: I, II – standard proteins; III – suspension, stored during 10 years at -18, -30°C; IV – suspension, stored during 20 days at -18, -30°C; V – suspension, stored during 10 years at -18, -30°C; VI – suspension, stored during 20 days at -18, -30°C; VII – suspension of non-contaminated cells, stored at 4°C; VIII – suspension of non-contaminated cells, stored at -18, -30°C;

Инфекционную активность вирусных суспензий определяли методом титрования по ЦПД вируса на клеточную культуру TrT.

Результаты и обсуждение

Всего в образцах материала, который хранился при умеренно низких температурах, и в незамороженных образцах, которые хранились при 4°C, было обнаружено 9 белковых полос (рис.1). Молекулярные массы этих белков представлены в таблице.

В результате электрофоретического исследования в образцах вирусосодержащего материала, замороженных и хранившихся 20 дней при -18, -30°C, было определено 7 белковых полос (рис.1). В вирусных суспензиях, хранившихся в аналогичных условиях на протяжении 10 лет, установлен только один из 7 белковых компонентов, по сравнению с образцами, хранившимися 20 сут, с молекулярной массой 37600 Д (таблица). Белок с молекулярной массой 59000 Д, определяющийся в вирусных суспензиях, хранившихся при -18, -30°C в течение 20 сут, является основным белком ВД, ответственным за выработку вируснейтрализующих антител в организме инфицированных или иммунизированных животных [6, 9]. В неинфицированных клеточных суспензиях, которые не подвергались замораживанию, а хранились при 4°C в течение 20 сут, удалось обнаружить еще 2 белковых компонента с молекулярными массами 16700 и

As a result of electrophoretic investigation in the samples of virus-containing material, frozen and being stored during 20 days at -18, -30°C, were determined 7 protein bands (Fig.1). In viral suspensions, being stored under the same conditions during 10 years, was established only 1 among 7 protein components, in comparison with the samples, being stored for 20 days, with molecular weight 37600 D (Table). Protein with molecular weight 59000D, determining in viral suspensions, stored at -18, -30°C during 20 days, is main DV protein, responsible for the producing of viral neutralizing antibodies in the organism of infected or immunized animals [6,9].

In non-infectious cellular suspensions, which were not subjected to freezing, but were stored at 4°C during 20 days, were possible to find 2 more protein components with molecular weight 16700 and 24000 D. The same protein components only under lower concentrations were found in frozen at -18, -30°C non-infectious cellular suspensions at the same time storage terms.

The identification of infectious activity of suspensions after 10 years of storage under moderately low temperatures has shown the decrease of the titer of infection rate in 2.7 lg, comparing with the virus, stored for 20 days.

Obtained data testify that during 10-years' storage of virus-containing material the protein degradation of viral suspensions took place, probably, as the cause of

240000 Д. Аналогичные белковые компоненты только в меньших концентрациях были выявлены и в замороженных при -18, -30°C неинфицированных клеточных суспензиях при тех же сроках хранения.

Определение инфекционной активности суспензий после 10 лет хранения в условиях умеренно низких температур показало снижение титра инфекционности на 2,7 lg по сравнению с вирусом, хранившимся 20 сут.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в течение 10-летнего хранения вирусосодержащего материала произошла белковая деградация вирусных суспензий, очевидно, за счет действия протеолитических ферментов клеточного детрита, сохранивших определенную активность в условиях умеренно низких температур. По данным [2] активность ферментов тормозится неполностью при температурах значительно ниже 0°C.

Хроматографический анализ (рис.2,3) показал наличие от 6 до 8 фракций с молекулярной массой от 6100 до менее чем 800 Д, а также низкомолекулярных компонентов, не определяемых калибровочным графиком для использовавшегося нами геля. Можно предположить, что в группу обнаруженных нами фракций входят олигопептиды – фрагменты протеолиза вирусных и (или) индуцированных ВД в клетках ТрТ белков, поскольку в суспензиях контрольных незараженных клеток, хранившихся как в условиях гипотермии, так и при умеренно низких температурах в течение 20 сут, полипептидных фракций не было обнаружено.

Молекулярные массы (MW) белков исследованных вирусосодержащих суспензий
Protein molecular weights (MW) of the investigated virus-containing suspensions

Номер белковой фракции Number of protein fraction	Rf	lg MW	MW, Δ/D
I	0,638	4,057	11400
II	0,616	4,147	14000
III	0,596	4,224	16700
IV	0,507	4,575	37600
V	0,480	4,677	47500
VI	0,457	4,770	59000
VII	0,428	4,916	82000
VIII	0,403	4,972	94000
X	0,299	5,378	240000

Примечание: Rf – отношение длины миграции белковой зоны к длине миграции лидирующего красителя бромтимолового синего.

Note: Rf – ratio of protein zone migration length to the one of bromthymol blue leading dye.

effect of cellular dendrite proteolytic enzymes, preserved a certain activity under moderately low temperature. According to the data [2], the activity of enzymes is not completely inhibited at the temperatures lower than 0°C.

Chromatographic analysis (Fig.2, 3) has shown the presence from 6 to 8 fractions with molecular weight

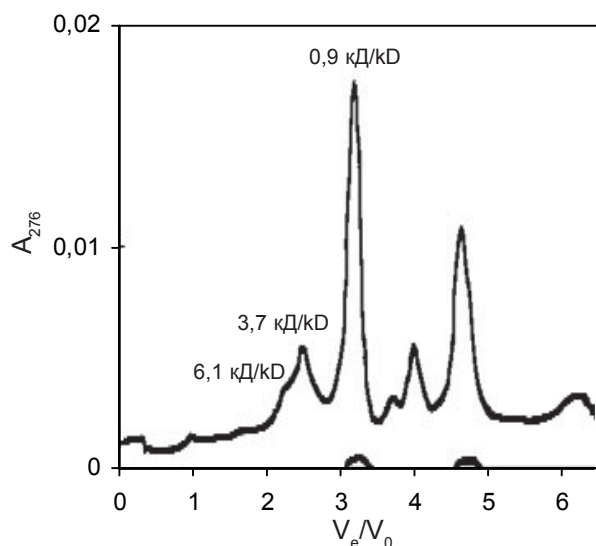


Рис. 2. Хроматограмма супернатанта вирусной суспензии, хранившейся при -18, -30°C в течение 20 сут.

Fig. 2. Chromatogramme of viral suspension supernatant, stored at -18, -30°C during 20 days.

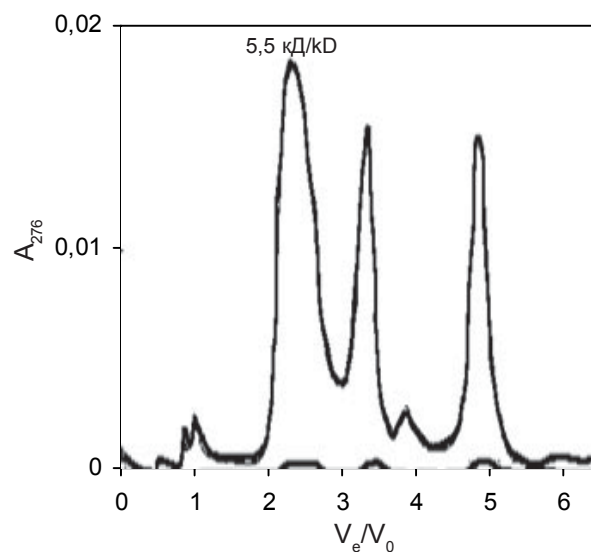


Рис. 3. Хроматограмма супернатанта вирусной суспензии, хранившейся при -18, -30°C в течение 10 лет.

Fig. 3. Chromatogramme of viral suspension supernatant, stored at -18, -30°C during 10 years.

Выводы

Хранение в течение 10 лет при -18, -30°C исследованных неочищенных вирусосодержащих суспензий ведет к снижению их инфекционной активности, деградации белков, вероятно, за счет действия протеолитических ферментов клеточного детрита.

Поэтому для длительного сохранения биологической активности ВД штамма "Орегон C24-V" рекомендуем применять более низкие, чем -18, -30°C температуры консервирования. В то время как умеренно низкие температуры можно использовать для непродолжительного сохранения вируса.

Литература

1. *Ананьина А.Е.* Изучение влияния криопротекторов на сохранность криоконсервированных актиномицетов // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. тр.– Харьков, 1990.– С. 3-4.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– С. 117-121.
3. *Высеканцев И.П., Микулинский Ю.Е., Степанюк Л.В.* Влияние глицерина на выживаемость криоконсервированных бактерий *E. coli* в условиях ингибирования биосинтеза РНК // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. тр.– Харьков, 1990.– С. 30-32.
4. *Грек А.М., Луговий В.И., Белоус А.М.* Вплив криопротекторів на спектри флуоресценції альбуміну сироватки крові // Укр. біохім. журн.– 1974.– Т. 46, №1.– С. 62-63.
5. *Холодовой стресс* и биологические системы / Под ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1991.– 174 с.
6. *Bolin S.R., Ridpath J.F.* Frequency of association of noncytotoxic bovine viral diarrhea virus with bovine neutrophils and mononuclear leukocytes before and after treatment with trypsin // Amer. J. Vet. Res.– 1990.– Vol. 51.– P. 703.
7. *Gorg A., Postel W., Weser J., et al.* Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore – gradient gels for the analysis of urinary proteins // Science Tools – The LKB Instrument Journal.– 1985.– Vol. 32, N1.– P. 5-9.
8. *Ruwart M.J., Holland G.F., Haug A.* Fluorimetric evidence of interactions involving cryoprotectants and biomolecules // cryobiology.– 1975.– Vol. 12, N1.– P. 26-33.
9. *Xue W., Minocha H.C.* Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhea virus using anti-idiotypic antibodies // J. Gen. Virol.– 1993.– Vol. 74, N1.– P. 73-79.

Поступила 24.12.2004

from 6100 to less than 800 D, and molecular components as well, not determined with calibrating diagram for the used by us gel. It is possible to suppose that in the group of found by us fractions there are included oligopeptides- proteolysis fragments of viral and (or) induced by DV in CT cells proteins, because in the suspensions of the controlled non-infectious cells, stored both under hypothermia conditions and in those of moderately low temperatures during 20 days, we have found no polypeptide fractions.

Conclusions

Ten years' storage at -18, -30°C of the investigated non-purified virus-containing suspensions results in the decrease in their infectious activity, protein degradation, probably, because of the effect of proteolytic cellular enzymes of dendrite.

Thus for a long-term storage of biological activity of DV "Oregon C24-V" strain we recommend to use the cryopreservation temperatures lower than -18, -30°C. Meanwhile moderately low temperatures may be used for not long term storage of virus.

References

1. *Ananjina A.E.* Investigation of cryoprotectants influence on permeability of cryopreserved actinomyces // Physical and chemical peculiarities and biological influence of cryoprotectants: Collection of Scientific works.– Kharkov, 1990.– P. 3-4.
2. *Belous A.M., Grisichenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Nauk.dumka, 1994.– P. 117-121.
3. *Vysekantsev I.P., Mikulinskiy Yu.E. Stepanuk L.V.* Influence of glycerol on viability of cryopreserved bacteria *E. coli* under conditions of RNA biosynthesis inhibition cryoprotectants // Physical and chemical peculiarities and biological influence of cryo-protectants: Collection of Scientific works.– Kharkov, 1990.– P. 30-32.
4. *Грек А.М., Луговий В.И., Белоус А.М.* Cryoprotectants' influence on spectrum of albumin fluorescence of blood serum // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 1974.– Vol. 46, N1.– P. 62-63.
5. *Cold stress* and biological systems / Edited by A.A. Tsutsaeva.– Kiev: Nauk.dumka, 1991.– 174 p.
6. *Bolin S.R., Ridpath J.F.* Frequency of association of noncytotoxic bovine viral diarrhea virus with bovine neutrophils and mononuclear leukocytes before and after treatment with trypsin // Amer. J. Vet. Res.– 1990.– Vol. 51.– P. 703.
7. *Gorg A., Postel W., Weser J., et al.* Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore – gradient gels for the analysis of urinary proteins // Science Tools – The LKB Instrument Journal.– 1985.– Vol. 32, N1.– P. 5-9.
8. *Ruwart M.J., Holland G.F., Haug A.* Fluorimetric evidence of interactions involving cryoprotectants and biomolecules // cryobiology.– 1975.– Vol. 12, N1.– P. 26-33.
9. *Xue W., Minocha H.C.* Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhea virus using anti-idiotypic antibodies // J. Gen. Virol.– 1993.– Vol. 74, N1.– P. 73-79.

Accepted in 24.12.2004