

МЕТОДЫ

УДК 578.22

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СФЕРИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ — НОВЫХ БИОГЕННЫХ ПЛАТФОРМ

Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, М.П. Кирпичников, О.В. Карпова, И.Г. Атабеков

(кафедра вирусологии; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru)

Создана и отработана методика получения в препаративных количествах сферических частиц из палочковидного фитовируса — вируса табачной мозаики. Подобраны условия выделения и очистки вируса, необходимые для получения сферических частиц. Сферические частицы охарактеризованы с помощью методов электронной микроскопии, анализа траекторий наночастиц, динамического рассеяния света. Получены сведения о внутренней структуре сферических частиц. Продемонстрировано, что они обладают высокой электронной плотностью. Анализ ультратонких срезов показал, что сферические частицы не содержат внутренних полостей и являются внутри однородными.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус табачной мозаики, сферические частицы.

Вирусы растений и их вирусоподобные частицы применяют в различных областях биотехнологии: разработка вакцин и адъювантов, создание биологически активных комплексов, разработка контрастирующих агентов, адресная доставка, микроэлектроника [1–12]. Важное преимущество фитовирусов состоит в том, что они непатогенны для человека [1]. Ранее было показано, что при нагревании палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ) до 94°C происходит структурная перестройка вирусного белка оболочки (БО) и формируются сферические частицы (СЧ) контролируемого размера. СЧ обладают высокой стабильностью, не содержат РНК, биодеградируемы [11–12]. Продемонстрированы уникальные адсорбционные свойства СЧ, на их основе созданы комплексы как с различными белками, так и с икосаэдрическими вирионами [2–4]. Установлено, что СЧ являются эффективным адъювантом и активно стимулируют иммунный ответ на белки и вирусные частицы, адсорбированные на их поверхности [2, 4]. Для проведения термической перестройки вирионов ВТМ в СЧ ранее использовался термоциклер, позволяющий получать СЧ в аналитических количествах [11]. Для доклинических исследований медицинских препаратов на основе СЧ необходимо было масштабировать методику. Ранее была предпринята попытка получения СЧ в большом количестве с помощью проточной системы (100°C, 125 сек). Данная технология позволила увеличить количество получаемых СЧ до 60 мг/ч [13].

Материалы и методы

Для выделения ВТМ штамма U1 (коллекция кафедры вирусологии МГУ) замороженные листья (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*) гомогенизировали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,8, содержащем

0,02 М ЭДТА (Gerbu, Германия) и 0,1% β-меркаптоэтанола (Serva, Германия) в соотношении 2 мл буфера на 1 г листьев. Сок растений осветляли (10 000g, 20 мин, 4°C), добавляли хлороформ (Химмед, Россия) в соотношении 1:6 и встряхивали полученную смесь (10 мин), центрифугировали (15 мин, 10 000g, 4°C). Водную фазу отбирали и к ней добавляли полиэтиленгликоль (Mg 6000) (Gerbu, Германия) до концентрации 2% и NaCl (MP Biomedicals, США) до концентрации 1%, раствор инкубировали (12 ч, 4°C). Осадок вируса отделяли центрифугированием (10 000 g, 20 мин, 4°C). В течение 2–3 ч вирус экстрагировали из полученного осадка в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8 (MP Biomedicals, США) при постоянном перемешивании (4°C). Экстракт осветляли центрифугированием (20 мин, 10 000g, 4°C). Дальнейшую очистку вируса проводили с помощью двух циклов дифференциального центрифугирования. При первом цикле осветленный экстракт центрифугировали с использованием 20%-й сахарозной подушки (100 000g, 120 мин) (сахароза фирмы “Helicon”, Россия), приготовленной на 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8. Осадки растворяли в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8 (12 ч, 4°C). При втором цикле препарат центрифугировали без сахарозной подушки (100 000g, 90 мин). Вирусный осадок растворяли в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8. Концентрацию вируса определяли спектрофотометрически ($E_{260nm}^{0,1\%} = 3,0$, $OD_{260}/OD_{280} = 1,2$). Вирусный препарат хранили при 4°C в течение года, для длительного хранения препараты замораживали при –70°C.

Для получения СЧ препарат ВТМ (1 мл) помещали в стандартные 1,5 мл полипропиленовые пробирки (Sarstedt, Германия), после чего пробирки переносили в нагретый до 94°C термостат Термит

(ДНК-Технология, Россия) и инкубировали в течение 3–7 мин. Количество ячеек в приборе — 40.

Приготовление образцов для электронной микроскопии (ЭМ) и ультратонких срезов проводили согласно ранее описанным методикам [11, 14]. Препараты исследовали с помощью электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL, Япония) и LEO-912AB (LEO, Германия). Микрофотографии были проанализированы с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

Для метода динамического рассеяния света (ДРС) измерения образцов проводили на установке Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software version 5.10.

Измерения размеров СЧ с помощью метода анализа траекторий наночастиц (АТН) проводили с использованием прибора NanoSight NS500 и программного обеспечения NanoSight NTA 2.3 (NanoSight, Великобритания) согласно стандарту [15].

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что при нагревании препарата ВТМ до 94°C происходит структурная перестройка БО палочковидных вирионов в СЧ [11]. Разработанная методика позволяла получать СЧ в достаточных количествах для проведения лабораторных исследований. Важно отметить, что при получении СЧ в термоциклере использовались тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл (Sarstedt, Германия). Объем пробы составлял 50 мкл. В этом случае прибор обеспечивал равномерное прогревание всего препарата. Технические возможности прибора были ограничены максимальным объемом пробы и количеством ячеек в термоциклере (40). Было продемонстрировано, что из вирусного препарата с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл можно получить СЧ размером 50–160, 100–340, 250–800 нм [11]. Таким образом, за один цикл

работы можно было получить 0,2, 2 и 20 мг СЧ соответствующего размера. Для получения СЧ в препаративных количествах для доклинических испытаний вакцинного препарата, созданного на основе сферических частиц, методика была модифицирована. Термообработку препарата вируса проводили в стандартных полипропиленовых пробирках (1,5 мл) в твердотельном термостате. Объем пробы составлял 1 мл. Использование пробирок с более толстыми стенками и большего объема пробы могло привести к неравномерному прогреву вирусного препарата и неполной структурной перестройке БО ВТМ в СЧ. В данной работе были оптимизированы температурные и временные условия обработки вирусного препарата для получения СЧ, не отличающихся по морфологии от сферических частиц, образующихся в термоциклере, в препаративных количествах. Показано, что помещение вирусного препарата в прогретый до 94°C термостат с последующей инкубацией в течение 7 мин приводит к 100% переходу вирионов ВТМ в СЧ. Уменьшение времени инкубации приводит к неполной перестройке ВТМ в СЧ. Представлены электронные микрофотографии СЧ, полученных при термической обработке препарата ВТМ (94°C, 1 мл) с различной исходной концентрацией (рис. 1). Во всех случаях нативный ВТМ (рис. 1, г) полностью переходил в форму СЧ. С увеличением исходной концентрации вирусного препарата увеличивался размер получаемых СЧ, что согласуется с ранее опубликованными данными [11].

В процессе приготовления образцов для ЭМ может происходить деформация и агрегация препарата на подложке, что иногда приводит к неверной трактовке полученных результатов. В связи с этим данные ЭМ были сопоставлены с результатами методов АТН и ДРС, которые позволили изучить размеры СЧ в жидкости. Приведенные в таблице средние значения диаметра СЧ, измеренные методами ЭМ, ДРС и АТН, были сопоставимы друг с другом. Таким образом, из препаратов

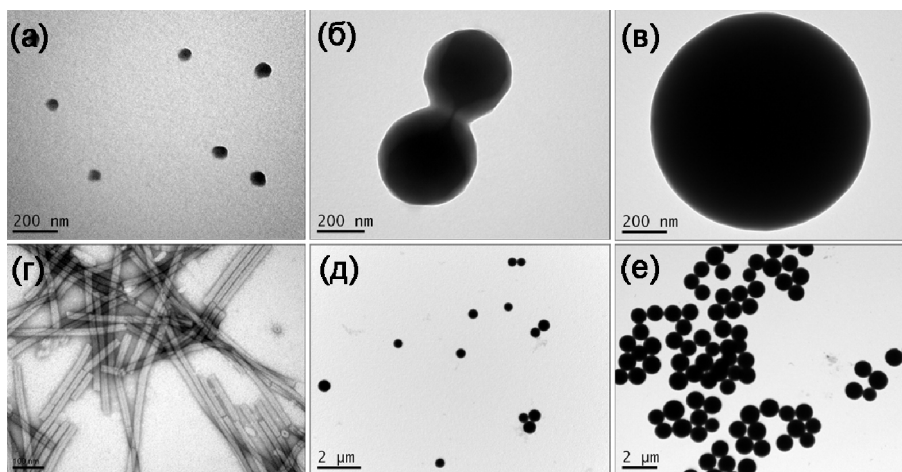


Рис. 1. Сферические частицы, полученные при нагревании в термостате (94°C) препарата вируса табачной мозаики (ВТМ) с исходной концентрацией вируса: 0,1 мг/мл (а); 1 мг/мл (б, д); 10 мг/мл (в, е). Контроль — нативный ВТМ (г). Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2%-м уранилацетатом

ВТМ объемом 1 мл с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл при термической обработке можно получить СЧ с диаметром 65–72, 399–500, 1060–1300 нм в количестве 4, 40, 400 мг за один цикл работы прибора (7 мин) соответственно. Изменение условий термической перестройки частиц ВТМ не повлияло на морфологию СЧ и зависимость их размера от исходной концентрации вируса.

Значения среднего диаметра сферических частиц, полученных при соответствующей концентрации вируса. Приведены значения среднего диаметра (нм) ± стандартное отклонение

Метод	0,1 мг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
ЭМ	65±16	460±34	1060±160
ДРС	65±7	480±40	1300±34
АТН	72±4	399±37	1256±46

По данным АТН количество СЧ в 1 мг, полученных из препарата ВТМ с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл, составило $7,8 \times 10^{12}$, $4,5 \times 10^{10}$ и 5×10^9 соответственно. Эти данные могут оказаться полезными для стандартизации при получении фармацевтических препаратов.

На процесс образования СЧ и полидисперсность полученных препаратов по размерам влияет состав буфера для дифференциального центрифугирования, состав буфера хранения и агрегационное состояние вируса. Наименьшее влияние состав буфера оказывает на получение СЧ из ВТМ с концентрацией 0,1 мг/мл, так как в разбавленном растворе расстояния между отдельными вирионами больше длины индивидуальной вирусной частицы и агрегация вируса минимальна [16]. Наиболее оптимальными буферными системами для получения СЧ, в которых осуществляется очистка вирусного препарата на стадии дифференциального центрифугирования и последующее хранение ВТМ, является раствор трис-НСl pH 7,5–8 и деионизированная вода. При использовании фосфатного буфера возникают сложности с получением СЧ с размером больше 70 нм из вируса с концентрацией больше 0,1 мг/мл. При термической обработке ВТМ с концентрацией от 1 мг/мл, растворенного в фосфатном буфере, или ВТМ, при выделении которого на стадии дифференциального центрифугирования использовался фосфатный буфер,

структурная перестройка вирионов ВТМ проходила не полностью, а препараты СЧ обладали высокой полидисперсностью по размерам. Эти данные согласуются с полученными ранее сведениями о том, что в фосфатном буфере вероятность агрегации вирионов ВТМ выше [17]. По-видимому, буферные растворы на основе трис-НСl создают оптимальные условия для получения неагрегированных препаратов ВТМ. Длительное хранение препарата вируса (2–3 г.) тоже может приводить к изменению агрегационного состояния, что, безусловно, влияет на значение среднего диаметра СЧ, сдвигая его в большую сторону. Сведения об агрегационном состоянии вирусного препарата играют принципиальную роль при получении СЧ, поскольку они позволяют более точно контролировать размеры частиц с помощью изменения концентрации ВТМ.

Ранее было показано, что СЧ обладают более высокой плотностью ($1,43 \text{ г/см}^3$), чем многие спиральные вирусы растений [18–19]. В связи с этим было интересно изучить внутреннюю структуру СЧ с помощью метода ультратонких срезов и ЭМ. Проведен анализ ультратонких срезов СЧ, полученных из нативного препарата ВТМ с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл. Представлены данные для СЧ, образующихся из вируса с концентрацией 1 мг/мл (рис. 2, а). Установлено, что СЧ не содержат внутренних полостей и слоев и являются внутри однородными. Далее была исследована электронная плотность частиц в отсутствие контрастирующих агентов. Показано, что как СЧ, полученные из препарата ВТМ с концентрацией 0,1 мг/мл (рис. 2, б), так и сферические частицы, полученные из препарата ВТМ с концентрацией 1 мг/мл (рис. 2, в), являются объектами с высокой электронной плотностью. Это дает возможность не обрабатывать СЧ контрастирующими агентами, что расширяет возможности их анализа различными методами.

СЧ — уникальные биогенные частицы, способные исполнять роль платформы для создания функционально активных комплексов и служить основой для получения вакцинных препаратов, адъювантов, контрастирующих агентов. В связи с этим предложенная в настоящей работе методика препаративного получения СЧ является актуальной. Разработанный подход для получения СЧ является хорошо воспроизводимым и позволяет по-

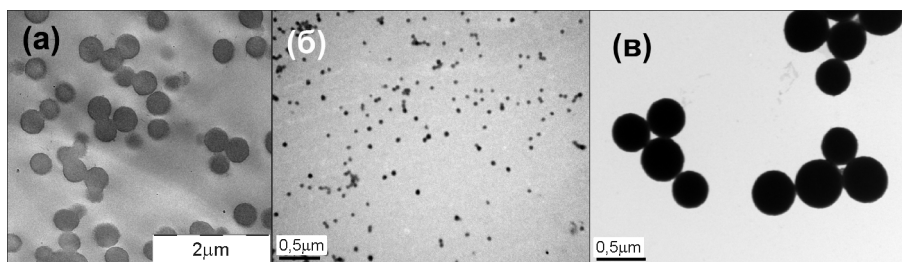


Рис. 2. Изучение структуры и электронной плотности сферических частиц (СЧ). Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов СЧ, полученных при термической перестройке препарата вируса табачной мозаики (ВТМ) с концентрацией 1 мг/мл, контрастирование 2%-м уранилацетатом (а). СЧ, полученные из препарата ВТМ с концентрацией вируса 0,1 мг/мл (б), 1 мг/мл (в), изображения получены без контрастирующих агентов

лучать частицы заданного размера в количестве, в 20 раз превышающем количество, которое можно получить по ранее описанной методике. Впервые продемонстрировано, что СЧ не содержат полостей и их внутренняя структура однородна. Показано, что СЧ можно визуализировать без контрастирующих агентов с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Bashieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. N 37. P. 5069–5076.
2. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platform and foreign antigens // *J. Gen. Virol.* 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
3. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis // *Microsc. Microanal.* 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
4. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
5. Nikitin N.A., Malinin A.S., Trifonova E.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavov A.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
6. Soto C.M., Ratna B.R. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010. Vol. 21. N 4. P. 426–438.
7. Leong H.S., Steinmetz N.F., Ablack A., Destito G., Zijlstra A., Stuhlmann H., Manchester M., Lewis J.D. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles // *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5. N 8. P. 1406–1417.
8. Bruckman M.A., Hern S., Jiang K., Flask C.A., Yu X., Steinmetz N.F. Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents // *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* 2013. Vol. 1. N 10. P. 1482–1490.
9. Aljabali A.A., Shukla S., Lomonosoff G.P., Steinmetz N.F., Evans D.J. CPMV-DOX Delivers // *Mol. Pharm.* 2013. Vol. 10. N 1. P. 3–10.
10. Lebel M.E., Daudelin J.F., Chartrand K., Tarrab E., Kalinke U., Savard P., Labrecque N., Leclerc D., Lamarre A. Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8⁺T

Авторы выражают благодарность докт. биол. наук Е.В. Шевалю за помощь в получении ультратонких срезов СЧ и канд. биол. наук Е.А. Лазаревой за помощь в выделении вируса табачной мозаики.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192. N 3. P. 1071–1078.

11. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *J. Gen. Virol.* 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.

12. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // *Polym. Sci. Ser. A.* 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.

13. Bruckman M.A., VanMeter A., Stienmetz N.F. Nanomanufacturing of tobacco mosaic virus-based spherical biomaterials using a continuous flow method // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015. Vol. 1. N 1. P. 13–18.

14. Volkova E.G., Kurchashova S.Y., Polyakov V.Y., Sheval E.V. Self-organization of cellular structures induced by the overexpression of nuclear envelope proteins: a correlative light and electron microscopy study // *J. Electron Microsc.* 2011. Vol. 60. N 1. P. 57–71.

15. ASTM Standard E2834, 2012. ASTM International. West Conshohocken. PA, 2012.

16. Loh E., Ralston E., Schumaker V.N. Quasielastic light scattering from solutions of filamentous viruses. I. Experimental // *Biopolymers.* 1979. Vol. 18. N 10. P. 2549–2567.

17. Sano Y. Translational diffusion coefficient of tobacco mosaic virus particles // *J. Gen. Virol.* 1987. Vol. 68. N 9. P. 2439–2442.

18. Dobrov E.N., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Parshina E.Y., Makarov V.V., Maksimov G.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.

19. Sehgal O.P., Jean J., Bhalla R.B., Soong M.M., Krause G.F. Correlation between buoyant density and ribonucleic acid content in viruses // *Phytopathology.* 1970. Vol. 60. N 12. P. 1778–1784.

Поступила в редакцию
08.04.15

OBTAIING AND CHARACTERIZATION OF SPHERICAL PARTICLES — NEW BIOGENIC PLATFORMS

E.A. Trifonova, N.A. Nikitin, M.P. Kirpichnikov, O.V. Karpova, J.G. Atabekov

The technique of spherical particles obtaining from rod-like plant virus — tobacco mosaic virus in preparative scale was developed. The conditions of tobacco mosaic virus isolation for spherical particles obtaining were selected. Spherical particles were examined by methods of electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. Information about inner structure of spherical particles was obtained. High electron density of spherical particles was demonstrated. The analysis of ultrathin sections showed that spherical particles are homogeneous within and do not contain any cavities.

Key words: *plant viruses, tobacco mosaic virus, spherical particles.*

Сведения об авторах

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, академик, декан биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, академик, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru