

Культивування, виділення і отримання кристалів вірусу зеленої водорості *Tetraselmis viridis*

Д. В. Сізов, В. П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна
sizovd@yahoo.co.uk

*Наведено методику отримання вірусу водоростей *T. viridis* у високих концентраціях і розроблено схему його кристалізації, що в подальшому (за умови відповідності кристалів вимогам рентгеноструктурного аналізу) дасть змогу визначити структуру віріонів. Отримані дані є корисними також для розробки нової модельної системи культивування вірусів, зокрема, фікоднавірусів.*

*Ключові слова: вірус *Tetraselmis viridis*, структура віріонів, культивування вірусів, фікоднавіруси.*

Активне вивчення вірусів, які інфікують водні організми, призвело до розширення знань в галузі вірусів мікроводоростей протягом останніх 10 років. Ці досягнення дозволили об'єднати представників альговірусів у нову родину — фікоднавіруси, для яких характерними є ікосаедрична форма віріону з діаметром до 220 нм і геном, що складається з дволанцюгової ДНК. На сьогодні відомо щонайменше по одному представнику фікоднавірусів для 10 (44 таксони) з 14 описаних класів водоростей [1, 2].

Мікроводорості лежать в основі харчової піраміди Світового океану і є головними первинними продуцентами. Їхня фотосинтетична активність забезпечує збагачення гідро- і атмосферу киснем. Очевидно, що зниження біомаси мікроводоростей зумовить порушення в океанічних харчових ланцюгах, а також зміни концентрації кисню і вуглекислого газу в атмосфері і гідросфері. Останнє може стати причиною розвитку тепличного ефекту. Сьогодні водорості розглядаються також як потенційний сировинний ресурс для людства. У той же час альговіруси є фактором, який може суттєво вплинути на загальну чисельність фітопланктону

та істотно знизити його загальну біомасу [1]. Тому всебічне вивчення альговірусів становить значний практичний і науковий інтерес, враховуючи майже повну відсутність наукової інформації щодо їхніх біологічних особливостей.

Отримання і виділення вірусу. Для отримання великої кількості вірусу використано альгологічно чисту культуру одноклітинної морської водорості *T. viridis* Norris (*Chlorophyta, Prasinophyceae*), а також прекультуру вірусу TvV-S1.

Культуру водоростей вирощували на середовищі Гольдберга, яке готували на стерильній морській воді. Після 4—5 днів інкубації за температури 27 °C і цілодобового освітлення водорості інфікували прекультурою вірусу (1:100) та інкубували при кімнатній температурі зі штучним 12-год освітленням протягом 3—4 днів, після чого відбирали прозору культуральну рідину [3, 4]. Вірус з культуральної рідини виділяли центрифугуванням протягом 30 хв при 5000 об/хв. Супернатант центрифугували упродовж 2,5 год при 28000 об/хв, після чого отриманий склоподібний осад ресуспендували в якомога меншому об'ємі фізіологічного розчину. Для контролю чистоти вірусу використано електронну мікроскопію.



Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення віріонів TvV-S1

Одержання кристалів вірусу. Вірус кристалізували за допомогою стандартних скринінгових розчинів Crystal Screen 2 («Hampton Research», США) за методом «сидячої краплі» при змішуванні вірусомісного матеріалу зі скринінговим розчином 50:50 у кристалізаційних планшетах типу «greiner» (Falcon) [5]. Об'єм резервуара становив 80 мкл, краплі — 1 мкл, концентрація вірусу (за білком), визначена методом Лоурі, складала ~4 мг/мл. Умови кристалізації наступні: 0,05 М CsCl, 0,1 М MES, pH 6,5, 30 %-й реагент джефамін M-600.

За допомогою електронної мікроскопії зразків виявлено ікосаедричні віріони TvV-S1 діаметром 56—58 нм. Їхнє зображення представлено на рис. 1.

При цьому визначено, що при тривалому зберіганні за температури 4 °С зростає кількість порожніх капсидів, яка є незначною у свіжому препараті. Очевидно, саме це і є причиною істотної втрати інфекційності, відміченої в попередніх дослідженнях [7].

Після внесення препарату вірусу в кристалізаційний планшет кристали пірамідальної форми з'являлися на 2-й день інкубації при кімнатній температурі. Розміри кристалів складала близько 0,3 мм (рис. 2), вони виявилися стійкими і зберігалися в розчині протягом кількох місяців. Слід відмітити, що кристали можна отримати лише із свіжих препаратів вірусу. Зберігання вірусу за кімнатної температури протягом кількох днів спри-

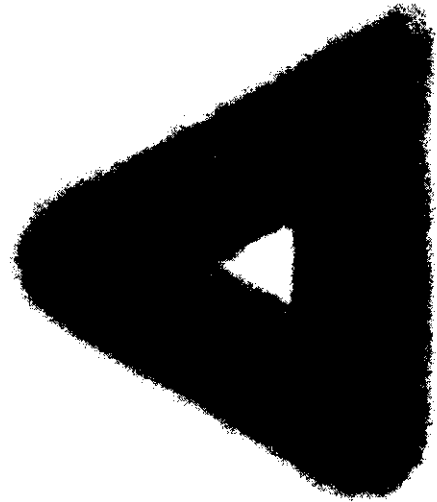


Рис. 2. Кристали вірусу TvV-S1

чиняє суттєве зниження концентрації і порушення структури віріонів, що робить формування кристалів неможливим.

Розроблено схему культивування і виділення окремих представників родини фікодनावірусів із зеленої водорості *T. viridis* Norris як специфічного високочутливого хазяїна. Відпрацьовано режим культивування і отримання вірусу в значних концентраціях. Культивування водорості є досить простим і не вимагає особливих умов і реагентів. Таким чином, зелену морську мікроводорість *T. viridis* можна успішно використовувати як модельний організм при вивченні інших альговірусів. Отримання кристалів фікодनावірусу TvV-S1 є першим кроком для подальших структурних досліджень. Надалі в разі відповідної якості кристалів для рентгеноструктурного аналізу можливо буде одержати тривимірну модель білків капсиду, що дозволить проаналізувати їхню будову і фолдинг та розглянути їхнє потенційне функціональне значення.

D. V. Sizov, V. P. Polischuk

Cultivation, purification and crystallization of virus of green algae *Tetraselmis viridis*

Summary

The methodical approach to obtaining of virus of algae *Tetraselmis viridis* in large quantities is represented. The scheme of virus crystallization is developed, what enables revealing of virion structure via X-ray analysis if the crystals proved to correspond to

X-ray technique demands. Obtained data are also useful for the development of novel model system for cultivation of viruses, in particular phycodnaviruses.

Key words: virus *Tetraselmis viridis*, virion structure, cultivation of viruses, phycodnaviruses.

Д. В. Сизов, В. П. Полищук

Культивирование, выделение и получение кристаллов вируса зеленых водорослей *Tetraselmis viridis*

Резюме

Представлена методика получения вируса водорослей *T. viridis* в больших количествах и разработана схема его кристаллизации, что в дальнейшем (при условии соответствия кристаллов требованиям рентгеноструктурного анализа) даст возможность определить структуру вирионов. Полученные данные могут также быть полезными для разработки новой модельной системы культивирования вирусов, в частности, фикодрнавирусов.

Ключевые слова: вирус *Tetraselmis viridis*, структура вирионов, культивирование вирусов, фикодрнавирусы.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brussard C. P. D. Role of viruses in controlling phytoplankton

blooms // Ecology of marine viruses (Banyuls-sur-mer, 19–22 March 2003).—Monaco, 2003.—P. 67–73.

2. Castberg T. Algal viruses: Characteristics and ecological effects.—DS. Thesis: Univ. of Bergen, 2001.—204 p.
3. Степанова О. А. Альговирussy из бухт Севастополя // Ботанические исследования в азиатской России: Материалы XI съезда Русского ботанического общества (18–22 августа 2003 г., Новосибирск—Барнаул).—Барнаул: Изд-во АзБука, 2003.—Т. 1.—С. 143–144.
4. Пат. 65864А Украина, МКИ 7 C12 N1/12. № 2003065499. Способ изоляции альговирусов одноклеточных водорослей, например *Platymonas viridis* Rouch (*Chlorophyta*) / О. А. Степанова // Промислова власність.—2004.—№ 4.—С. 1–4.
5. Культивирование коллекционных штаммов водорослей: Межвуз. сб. / Под ред. Б. В. Громова.—Л., 1983.—153 с.
6. McPherson R. Protein crystallization.—Hampton, 2004.—255 p.
7. Степанова О. А., Бойко А. Л., Гордиенко А. И., Щербань С. А., Шевченко Т. П., Полищук В. П. Характеристика вируса *Tetraselmis viridis* Norris (*Chlorophyta*, *Prasinophyceae*) // Докл. НАН Украины.—2005.—№ 1.—С. 157–162.

УДК 578.32:579:582.232:577.1 (262.5)
Надійшла до редакції 10.09.05