

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312  
 УДК 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076

## Определение концентрации 146S частиц вируса ящура спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК

М. И. Доронин<sup>1</sup>, Д. В. Михалишин<sup>2</sup>, В. А. Стариков<sup>3</sup>, Д. А. Лозовой<sup>4</sup>, Ю. С. Елькина<sup>5</sup>, А. В. Борисов<sup>6</sup>

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062

<sup>5</sup> ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina\_ys@arriah.ru

<sup>6</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov\_av@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют концентрации 146S частиц, которые наделены важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, влияющими на иммуногенную активность вакцинных препаратов. По этой причине каждую серию вакцинного сырья исследуют на определение концентрации 146S компонента. В статье представлены результаты изучения применения спектрометрического метода для определения концентрации полных частиц при оценке количества РНК вируса ящура, выделенной после иммунного захвата. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неинактивированной культуральной суспензии. Выявлено существование зависимости между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из вирионов после их штаммоспецифического иммунного захвата и количественно детектированных спектрометрическим методом. Представленный метод позволяет определять значение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированном сырье для вакцины с применением предложенной линейной модели. Корреляция спектрометрического способа с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени и реакцией связывания комплемента при тестировании 360 неинактивированных суспензий вируса ящура всех типов составила 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов соответствовало 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что соответствовало ожиданиям.

**Ключевые слова:** РНК вируса ящура, концентрация 146S компонента, спектрометрический анализ, иммунный захват.

**Благодарность:** Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

**Для цитирования:** Доронин М. И., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Лозовой Д. А., Елькина Ю. С., Борисов А. В. Определение концентрации 146S частиц вируса ящура спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 304–312. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

UDC 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076

## Determination of FMDV 146S particle concentration by spectrometric method during viral RNA quantification

M. I. Doronin<sup>1</sup>, D. V. Mikhilishin<sup>2</sup>, V. A. Starikov<sup>3</sup>, D. A. Lozovoy<sup>4</sup>, Yu. S. El'kina<sup>5</sup>, A. V. Borisov<sup>6</sup>

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062

<sup>5</sup> ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina\_ys@arriah.ru

<sup>6</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov\_av@arriah.ru

**SUMMARY**

During FMD vaccine production, special attention is paid to the concentration of 146S particles bearing the critical biological features of FMDV and being the main components that have an effect on vaccine immunogenicity. For this reason, each batch of vaccine raw material is tested for 146S component concentration. The paper presents the results of the use of a spectrometric method for whole particle concentration determination during quantification of FMDV RNA extracted after immune capture. It is an inexpensive, easy-to-perform method allowing for determination of FMDV 146S particle concentration in the non-inactivated culture suspension. 146S particle concentration was found to depend on the number of RNA molecules extracted from virions after their strain-specific immune capture and quantitatively detected by the spectrometric method. The presented method allows for determination of 146S component concentration in the non-inactivated vaccine raw material using the proposed linear model. The spectrometric method showed 94.5–99.5% correlation with real time reverse transcription polymerase chain reaction and complement fixation test based on the results of tests of 360 non-inactivated suspensions of FMDV of all types. Tests of the positive control demonstrated 99.0–99.6% compatibility of actual and expected results. FMDV genome and 146S particles were not detected in the negative control, and that was in line with expectations.

**Key words:** FMDV RNA, 146S component concentration, spectrometric analysis, immune capture.

**Acknowledgements:** The study was funded by the FGBl "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

**For citation:** Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Lozovoy D. A., El'kina Yu. S., Borisov A. V. Determination of FMDV 146S particle concentration by spectrometric method during viral RNA quantification. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 304–312. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312.

**Conflict of interests:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: [doronin@arriah.ru](mailto:doronin@arriah.ru).

**ВВЕДЕНИЕ**

Ящур – острое высококонтагиозное вирусное заболевание, сопровождающееся лихорадкой, которому подвержены дикие и домашние парнокопытные животные [1]. Возбудителем является РНК-содержащий вирус, принадлежащий к порядку *Picornavirales*, семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Вирус ящура характеризуется высокой антигенной изменчивостью за счет мутаций в генах капсидных белков, представлен типами А, О, С, Азия-1, CAT-1, CAT-2, CAT-3 и множеством генетических линий [2].

Вирион вируса ящура имеет диаметр около 23–25 нм. Геном представляет собой одноцепочечную позитивную РНК, состоящую приблизительно из 8500 н. о. Молекулярный вес вириона составляет около 8 080 000 Да [3]. При репродукции в чувствительных клеточных линиях вирус ящура формирует 4 варианта компонентов: 146S частицы (вирионы), состоящие из одной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представлена комплексом белков VP<sub>1</sub>-VP<sub>2</sub>-VP<sub>3</sub>-VP<sub>4</sub>; 75S компонент, лишенный РНК и включающий в себя 60 копий полипептида VP<sub>1</sub>-VP<sub>3</sub>-VP<sub>6</sub>; 12S частицы, представленные белками VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub>; 3,8S субъединицы, состоящие из неструктурного белка VP<sub>9</sub> [4].

Система мер борьбы и профилактики заболевания предусматривает массовую иммунизацию крупного и мелкого рогатого скота, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [1, 5]. В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют концентрации 146S частиц, которые являются носителями основных биологических свойств вируса ящура и основными компонентами, влияющими на иммуногенную активность вакцинных препаратов [4]. Для определения концентрации 146S компонентов в вакцинном сырье каждой серии используют количественный вариант

реакции связывания комплемента (РСК) и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Первый метод имеет ряд недостатков: трудоемкость и продолжительность проводимого анализа (до 3 сут), невозможность одновременного исследования большого количества проб, достаточно высокая себестоимость [6]. Метод ОТ-ПЦР-РВ позволяет ускорить проведение анализа до 4 ч, однако требует дорогостоящего оборудования и реактивов [7]. Кроме того, при наличии в пробе избыточного количества балластных компонентов степень достоверности точного определения концентрации 146S иммуногенного компонента может снижаться за счет явления антикомплемментарности в РСК и высокой нагрузки сорбента балластным белком на этапе выделения РНК.

В связи с этим целесообразно провести поиск способа определения количества 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины на основе альтернативного метода.

Цель работы – определить возможность применения спектрометрического способа для определения концентрации 146S частиц при оценке количества РНК вируса ящура.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Вирус.** В работе использовали неинaktivированные суспензии культурального вируса ящура вакцинных штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/Таджикистан/2011, С<sub>1</sub>/Закарпатский/1972, CAT-1/Ахалкалакский/62, CAT-2/Саудовская Аравия 7/2000, CAT-3/Бечуаналенд 1/65, которые депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Репродукцию вируса осуществляли в перевиваемой суспензионной культуре клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21).

**Сенсибилизация иммунологического планшета.** Сенсибилизацию 24-луночного планшета, поверхность которого свободна от ДНК и РНК, ДНКаз и РНКаз, проводили штаммоспецифическими поликлональными антителами против вируса ящура в объеме 1,0 см<sup>3</sup> с концентрацией иммуноглобулинов G в суспензии 5,0 мкг/см<sup>3</sup> при температуре (4 ± 2) °С в течение 18 ч. Открытые сайты связывания блокировали 0,5%-й суспензией бычьего сывороточного альбумина при температуре (37 ± 1) °С в течение 1 ч. Данный процесс является подготовительным, его проводят заранее, до начала анализа.

**Иммунный захват вирионов вируса ящура.** В лунки с нанесенными антителами против вирионов определенного штамма вируса ящура вносили по 3,0 см<sup>3</sup> вирусной суспензии и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Формировались иммунные комплексы, одни из которых были вида «146S частица – штаммоспецифические антитела». Из лунок удаляли суспензию, не затрагивая поверхностный слой на дне планшета. Затем в лунки добавляли по 1,0 см<sup>3</sup> 1/15 М фосфатно-солевого буферного раствора и проводили ресуспендирование.

**Выделение РНК из 146S частиц вируса ящура.** К 1,0 см<sup>3</sup> суспензии иммунного комплекса «146S частица – антитела» добавляли 10 мл раствора, содержащего 50% фенола (рН < 7,0) и 50% 4 М гуанидин изотиоцианата (ГТЦ), и инкубировали 20 мин при температуре 23–25 °С. Полученный лизат центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 8 мин.

Надосадок переносили в центрифужную пробирку, добавляли 2,5 см<sup>3</sup> хлороформа и инкубировали содержимое в течение 4 мин с периодическим перемешиванием. После экспозиции смесь центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 12 мин при температуре 4–5 °С. В результате осаждения происходило фракционирование содержимого пробирки на три фазы: 1) нижнюю фазу соломенного цвета, содержащую комплекс фенола и хлороформа со связанными липидами и полипептидами; 2) среднюю фазу белого цвета, включающую в свой состав пептидные составляющие и ДНК; 3) верхнюю фазу, представляющую собой прозрачный экстракт РНК [8, 9]. В пустую пробирку полностью отбирали верхнюю фазу, не затрагивая остальные фракции, и добавляли 4,5 см<sup>3</sup> 100%-го изопропилового спирта. Полученную смесь инкубировали в течение 8 мин при температуре 23–25 °С, затем содержимое пробирки центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 8 мин при температуре 23–25 °С. Супернатант удаляли, оставляя полученный осадок РНК вируса ящура. К осажденной РНК добавляли 2,0 см<sup>3</sup> 80%-го этилового спирта. Содержимое перемешивали и осаждали при 14 000 об/мин в течение 6 мин при температуре 23–25 °С. Удаляли супернатант, а осадок РНК высушивали в потоке воздуха комнатной температуры в течение 5 мин. К РНК добавляли 0,1 см<sup>3</sup> буфера TE (10 мМ трис(оксиметил)аминометан, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота, рН 7,0–7,2), свободного от РНКаз и катионов Mg<sup>2+</sup>, прогревали содержимое при 55–60 °С в течение 2–3 мин для максимального

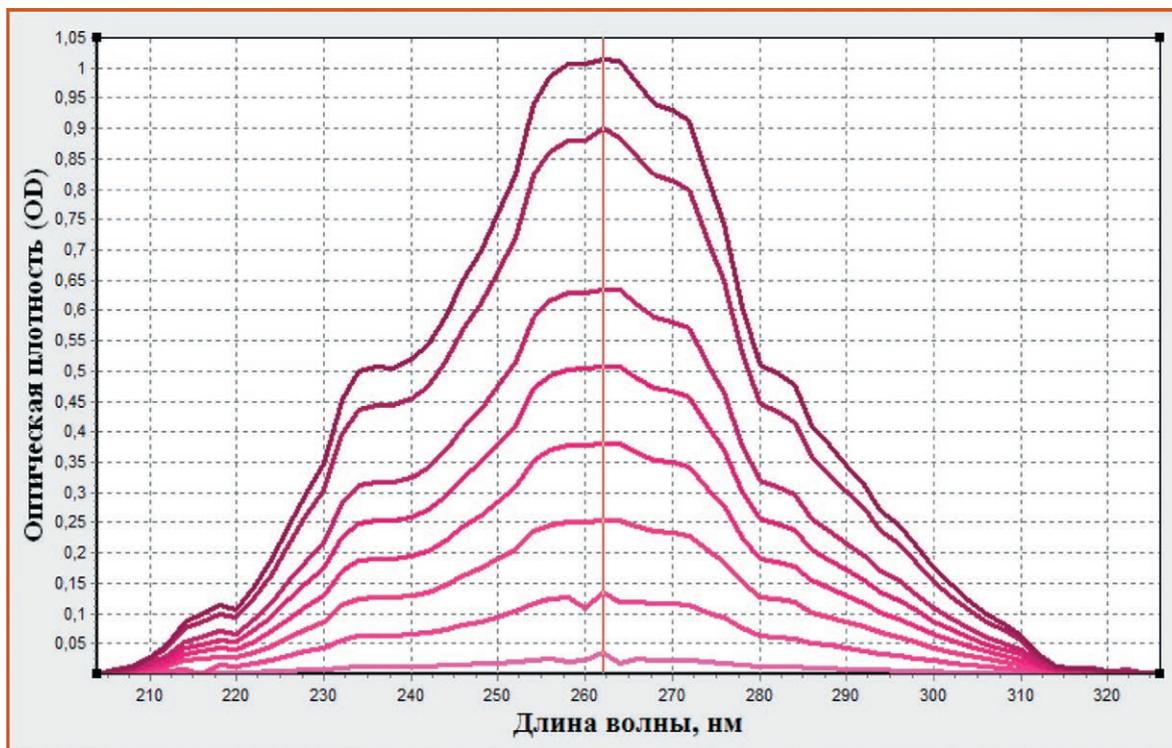


Рис. 1. Спектрограммы разведений стандартного элюата РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011. Сверху вниз отражены графики для некоторых разведений элюатов, соответствующих концентрациям 146S частиц: 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,1 мкг/см<sup>3</sup> (n = 3)

Fig. 1. Spectrograms of dilutions of standard FMDV Asia-1/Tajikistan/2011 strain RNA eluate. The figure shows (from top downwards) graphs for some dilutions of eluates corresponding to the following 146S particle concentrations: 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5; 1.0; 0.5; 0.1 µg/cm<sup>3</sup> (n = 3)

растворения РНК вируса ящура. Получали 30-кратные элюаты РНК вируса ящура стандартных разведений и отрицательного контроля 146S частиц.

*Оценка степени чистоты элюата РНК вируса ящура с помощью спектрального анализа.* Измерение спектральной поглощающей способности элюатов РНК вируса ящура проводили при длинах волны в диапазоне 205–325 нм. В указанном спектре оценивали содержание в препарате остатков фосфолипидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата, фенола, полипептидов, крупных конгломератов, определяя значения оптической плотности (OD) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно [10, 11]. Элюат РНК считали свободным от примесей белка и фенола, если коэффициент экстинкции  $R_1$  ( $OD_{262}/OD_{280}$ ) находился в пределах 1,8–2,2 и его значение приближалось к 2,0. Экстракт РНК вируса ящура считали незагрязненным полисахаридами, если коэффициент экстинкции  $R_2$  ( $OD_{262}/OD_{235}$ ) соответствовал значению 2,00–2,02 [12]. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие значение  $R_2$  уменьшается на 0,002. При  $R_2 > 2,02$  отмечали диссоциирование нуклеиновой кислоты и наличие нуклеотидов в элюате. Если  $OD_{320}$  стремилась к нулевому значению, это указывало на отсутствие взвеси крупных частиц в экстракте [8].

*Реакция связывания комплемента (РСК).* Для определения концентрации 146S частиц вируса ящура применяли количественный вариант РСК, проведение которого осуществляли в соответствии с требованиями [6].

*Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).* Индикацию и количественный анализ генома вируса ящура в неинaktivированном материале для вакцины проводили методом ОТ-ПЦР-РВ. Количество компонентов для реакции, а также временные и температурные параметры термоциклирования указаны в требованиях, описанных ранее [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы исследовали положительный стандарт, в качестве которого использовали неинaktivированную суспензию культурального вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 с концентрацией 146S частиц ( $4,00 \pm 0,11$ ) мкг/см<sup>3</sup> (по данным РСК и ОТ-ПЦР-РВ). Проводили иммунный захват вирионов вируса ящура с применением иммунологического планшета, который был сенсibilизирован поликлональными антителами, специфичными к полным частицам вируса указанного штамма. Отрицательным контрольным образцом служила суспензия клеточной линии ВНК-21 с концентрацией клеток ( $3,00 \pm 0,10$ ) млн/см<sup>3</sup>, не инфицированных вирусом ящура. По итогам серологической реакции получили суспензию связанных с помощью штаммоспецифических иммуноглобулинов G 146S частиц вируса ящура. Данную суспензию использовали для выделения РНК из полных вирусных частиц и в результате получили 30-кратный экстракт РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 в количестве 0,1 см<sup>3</sup>.

На следующем этапе исследования проводили оценку степени чистоты элюата РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 положительного стандарта с помощью спектрального анализа в излучении ультрафиолетового света. Регистрировали значения экстинкции образца в диапазоне от 205 до 325 нм

каждые 2 нм и осуществляли полную запись спектра поглощения РНК с помощью программного обеспечения Spectrum v. 5.0 (рис. 1).

Полученные результаты анализа 30-кратного препарата показали, что значения  $OD_{205-259}$  и  $OD_{263-325}$  не превышали  $OD_{260-262}$  ( $0,001-1,006 < 1,007-1,014$  и  $1,013-0,004 < 1,007-1,014$ ), что является признаком высокой степени чистоты полученного элюата РНК. При проведении спектрального исследования стандарта наблюдали отсутствие выраженных пиков на графике при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения препарата примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, фенола, полипептидов и крупных конгломератов соответственно. При этом коэффициент экстинкции  $R_1$  составлял 1,988 ( $OD_{262}/OD_{280} = 1,014/0,510$ ), что приближалось к норме 2,000 и подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей белка. Дегградации нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в растворе не наблюдалось, поскольку  $R_1$  не превышал 2,000. Элюат РНК вируса ящура положительного стандарта не был загрязнен полисахаридами и ГТЦ, так как коэффициент экстинкции  $R_2$  ( $OD_{262}/OD_{235} = 1,014/0,506$ ) соответствовал значению 2,004. Учитывая, что при замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие значение  $R_2$  уменьшается на 0,002, в полученном элюате наличие примесей углеводов выявлено не было.

На следующем этапе исследования проводили определение количества молекул РНК, экстрагированных из 146S частиц вируса ящура. Максимальный уровень поглощения одноцепочечных РНК отмечают при длинах волн 252–271 нм, что объясняется высокой спектральной поглощающей способностью рибонуклеозид-5'-трифосфатов в данном диапазоне, а именно: для аденозин-5'-трифосфата ( $\lambda_{АТР}$ ) – 259 нм, уридин-5'-трифосфата ( $\lambda_{УТР}$ ) – 262 нм, гуанозин-5'-трифосфата ( $\lambda_{СТР}$ ) – 252 нм, цитидин-5'-трифосфата ( $\lambda_{СТР}$ ) – 271 нм [13]. Спектральные исследования доказывают, что поглощения мономеров цельных РНК сливаются,

**Таблица 1**  
Процентное содержание рибонуклеозид-5'-трифосфатов и длины волн с максимальным поглощением РНК вируса ящура разных типов

**Table 1**  
Ribonucleoside-5'-triphosphate percentages and maximum absorption wavelengths for RNAs of different FMDV types

Тип вируса ящура	Среднее значение доли рибонуклеозид-5'-трифосфатов в геноме вируса ящура (И), %				Длина волны с максимальным поглощением для РНК, нм	
	АТР	УТР	ГТР	СТР	расчетная	эмпирическая
A	25,1	20,9	25,7	28,3	261,64	262
O	25,6	21,4	25,9	27,1	261,51	262
C	25,1	21,2	25,4	28,3	261,68	262
Азия-1	24,7	21,2	25,9	28,2	261,63	262
CAT-1	25,2	20,9	25,1	28,7	261,74	262
CAT-2	25,4	21,0	25,3	28,6	261,70	262
CAT-3	25,3	20,9	24,9	28,9	261,77	262

**Таблица 2**  
Зависимость между концентрацией 146S частиц и 30-кратным количеством молекул РНК, выделенных из полных частиц вируса ящура ( $n = 3, p < 0,005$ )

**Table 2**  
Relationship between 146S particle concentration and 30-fold number of RNA molecules extracted from whole particles of FMDV ( $n = 3, p < 0.005$ )

Тип контрольного образца	Концентрация 146S частиц, мкг/мл	Среднее количество молекул РНК, выделенных из 146S частиц вируса ящура, в 30-кратном элюате		
		теоретическое значение	по данным спектрометрического метода	степень достоверности, %
положительный стандарт	0,1	7 457 680 118	7 315 278 733	98,05
	0,2	14 915 360 236	14 349 200 591	96,05
	0,3	22 373 040 353	21 383 122 450	95,37
	0,4	29 830 720 471	28 698 401 183	96,05
	0,5	37 288 400 589	36 013 679 916	96,46
	0,6	44 746 080 707	43 328 958 649	96,73
	0,7	52 203 760 825	49 800 166 759	95,17
	0,8	59 661 440 943	57 115 445 492	95,54
	0,9	67 119 121 060	66 118 865 471	98,49
	1,0	74 576 801 178	73 715 501 078	98,83
	1,1	82 034 481 296	79 061 281 690	96,24
	1,2	89 492 161 414	88 346 058 544	98,70
	1,3	96 949 841 532	95 379 980 402	98,35
	1,4	104 407 521 649	100 163 047 266	95,76
	1,5	111 865 201 767	109 166 467 245	97,53
	1,6	119 322 881 885	114 512 247 858	95,80
	1,7	126 780 562 003	122 952 954 088	96,89
	1,8	134 238 242 121	130 830 946 570	97,40
	1,9	141 695 922 239	137 302 154 679	96,80
	2,0	149 153 602 356	147 712 359 030	99,02
	2,1	156 611 282 474	153 620 853 391	98,05
	2,2	164 068 962 592	158 403 920 255	96,42
	2,3	171 526 642 710	164 875 128 365	95,97
	2,4	178 984 322 828	170 502 265 852	95,03
	2,5	186 442 002 946	180 349 756 454	96,62
	2,6	193 899 683 063	190 197 247 056	98,05
	2,7	201 357 363 181	196 949 812 040	97,76
	2,8	208 815 043 299	203 421 020 150	97,35
	2,9	216 272 723 417	211 580 369 506	97,78
	3,0	223 730 403 535	221 146 503 234	98,83
	3,1	231 188 083 652	224 522 785 726	97,03
	3,2	238 645 763 770	228 743 138 841	95,67
	3,3	246 103 443 888	237 465 201 946	96,36
	3,4	253 561 124 006	245 061 837 553	96,53
	3,5	261 018 804 124	255 190 685 029	97,72
	3,6	268 476 484 242	261 943 250 013	97,51
	3,7	275 934 164 359	265 038 175 631	95,89
	3,8	283 391 844 477	271 790 740 615	95,73
	3,9	290 849 524 595	284 451 799 961	97,75
	4,0	298 307 204 713	287 546 725 579	96,26
отрицательный контроль	0,0	0	не обнаружено	–

обеспечивая максимальную экстинкцию в указанном диапазоне длин волн [14]. При проведении эксперимента был проведен нуклеотидный анализ РНК широкого спектра изолятов и штаммов 7 типов вируса ящура, представленных в архивной базе данных GenBank [3]. По результатам исследования были определены средние процентные соотношения рибонуклеозид-5'-трифосфатов ( $W_{АТФ}, W_{УТФ}, W_{ГТФ}, W_{СТФ}$ ) в составе генома. Результаты исследования отражены в таблице 1.

Полученные данные позволили рассчитать средние значения длин волн с максимальным уровнем поглощения ( $\lambda_{max}$ ) РНК для каждого типа возбудителя ящура, пользуясь формулой:  $\lambda_{max} = \lambda_{АТФ} \times W_{АТФ} + \lambda_{УТФ} \times W_{УТФ} + \lambda_{ГТФ} \times W_{ГТФ} + \lambda_{СТФ} \times W_{СТФ}$ . Так, определено, что для генома штаммов вируса ящура типа А  $\lambda_{max}$  составляет 261,64 нм, О – 261,51 нм, С – 261,68 нм, Азия-1 – 261,63 нм, САТ-1 – 261,74 нм, САТ-2 – 261,70 нм, САТ-3 – 261,77 нм. Значения  $\lambda_{max}$  были получены экспериментально биоспектрометрическими исследованиями элюатов РНК вируса ящура всех типов и оказались приближены к эмпирическим значениям – 262 нм (табл. 1).

Количество молекул одноцепочечной РНК в чистом препарате рассчитывали, пользуясь законом Бугера – Ламберта – Бера, в соответствии с которым отмечается ослабление параллельного монохроматического пучка света при прохождении через поглощающую среду [10]. На основании данного закона возможно найти соотношение концентрации частиц, поглощающих излучение, и количества поглощенного света. При  $\lambda = 260\text{--}262$  нм средний коэффициент экстинкции для одноцепочечной РНК составляет  $0,024$  (мкг/см<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Исходя из этого, раствор с содержанием нуклеиновой кислоты  $1,00$  мг/см<sup>3</sup> при прохождении ультрафиолетового света с длиной волны  $260$  нм имеет значение  $OD_{260}$  соответствующее  $24,000$ , и, как следствие, оптическая плотность, равная  $1,000$ , соответствует элюату, содержащему  $41,67$  мкг РНК/см<sup>3</sup> [13]. В случае с нуклеиновой кислотой вируса ящура в результате измерений выявили, что максимальное поглощение РНК наблюдается при  $\lambda = 262$  нм, при этом для высокоочищенного экстракта с содержанием РНК  $41,67$  мкг/см<sup>3</sup> значение  $OD_{262}$  составляет  $1,000$ .

Применение закона Бугера – Ламберта – Бера справедливо для определения числа молекул вирусной РНК в разбавленных элюатах, поскольку при высоких концентрациях аналита ( $> 1,00$  мг/см<sup>3</sup>) расстояние между молекулами поглощающего ультрафиолетовый свет вещества значительно снижается. В результате увеличивается влияние каждой частицы на распределение поверхностного заряда между соседними молекулами, что может изменить способность РНК поглощать излучение при указанной длине волны. Таким образом, для определения количества молекул РНК вируса ящура в препаратах с высокой концентрацией требуется готовить разведения аналита с использованием буфера ТЕ. До измерения абсорбции разведения элюата необходимо проводить автоматическое вычитание фоновых значений буфера ТЕ. Для расчета содержания РНК 146S частиц в препарате требуется учитывать фактор пересчета для нуклеиновой кислоты возбудителя ящура ( $F_{РНКвЯ} = 41,67$ ), кратность разведения ( $K$ ), а также вычитать фоновое значение проб ( $OD_{320}$ ) и отрицательного контроля ( $OD_{260К}$ ) из  $OD_{262}$ . При определении количества молекул РНК вируса ящура (РНКвЯ) учитывают число Авогадро ( $6,022045 \times 10^{23}$  моль<sup>-1</sup>), средний молекулярный вес рибонуклеозида ( $Mw_{рибонуклеозида} = 340,5$  Да),

длину РНК вируса ящура ( $L = 8500$  н. о.) [13], а также производят перевод массы нуклеиновой кислоты из [мкг] в [г] в соответствии с требованиями Международной системы единиц Le Systeme International d'Unites [11] (коэффициент  $1/10^6$ ) и пересчет количества молекул из 30-кратного элюата в однократный раствор (коэффициент  $1/10^{1,48}$ ) (общий коэффициент пересчета составляет  $1/10^{7,48}$ ).

При репродукции вируса ящура в чувствительных клеточных линиях происходит формирование 146S частиц (вирионов), каждая из которых включает в свой состав одну молекулу РНК. Необходимо отметить, что в суспензиях вируса ящура РНК находится не только в составе вирионов (98–99%), но и в незначительном количестве (1–2%) в свободном состоянии по итогам процесса репродукции [4, 15]. Иными словами, при расчете количества РНК, выделенных из полных частиц, следует учитывать коэффициент 0,98.

Количество молекул РНК, экстрагированных из 146S частиц вируса ящура ( $N_{\text{РНК } 146S}$ ), с учетом указанных выше параметров предложено определять с использованием расчетной формулы:

$$N_{\text{РНК } 146S} = 0,98 \times \frac{41,67 \times K \times (OD_{262} - OD_{320} - OD_{260K}) \times N_A}{10^{7,48} \times Mw_{\text{рибонуклеозида}} \times L},$$

где  $K$  – кратность разведения элюата РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура;

$OD_{262}$  – значение оптической плотности элюата РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура, при длине волны 262 нм;

$OD_{320}$  – значение оптической плотности экстракта РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура, при длине волны 320 нм;

$OD_{260K}$  – значение оптической плотности отрицательного контроля при длине волны 260 нм;

$N_A$  – постоянная Авогадро ( $6,022045 \times 10^{23}$  моль $^{-1}$ );

$Mw_{\text{рибонуклеозида}}$  – средний молекулярный вес рибонуклеозида (340,5 Да);

$L$  – длина генома вируса ящура (8500 н. о.);

41,67 – фактор РНК вируса ящура ( $F_{\text{РНКВР}}$ );

$1/10^{7,48}$  – суммарный коэффициент перевода массы из [мкг] в [г] и пересчета количества молекул РНК вируса ящура из 30-кратного элюата в однократный раствор.

На следующем этапе исследования проводили поиск модели определения концентрации 146S частиц вируса ящура по количеству молекул выделенной вирусной РНК. Для выявления зависимости концентрации 146S частиц вируса ящура от количества молекул вирусной РНК составляли серию разведений 30-кратного стандарта РНК, экстрагированной из суспензии вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 с содержанием полных частиц  $4,0$  мкг/см $^3$ , получая стандартные образцы нуклеиновой кислоты, соответствующие концентрациям 146S частиц от  $0,1$  до  $4,0$  мкг/см $^3$  с шагом  $0,1$  мкг/см $^3$ . До измерения абсорбции полученных стандартных образцов осуществляли автоматическое вычитание фоновых значений буфера ТЕ. Проводили спектральный анализ приготовленных положительных стандартов, определяя значения экстинкции при длинах волны 262 и 320 нм. Оптическую плотность отрицательного контроля измеряли для выявления наличия неспецифических молекул РНК, максимальное поглощение для которых отмечалось при  $\lambda = 260$  нм. Спектральный анализ некоторых из указан-

ных стандартов представлен на рисунке 1. Результаты измерений и расчета количеств молекул РНК, выделенных из 146S частиц, отражены в таблице 2, из которой видно, что значения  $N_{\text{РНК } 146S}$  для всех разведений 30-кратного стандарта с количеством 146S частиц от  $0,1$  до  $4,0$  мкг/см $^3$  находились в диапазоне от  $7\,315\,278\,733$  до  $287\,546\,725\,579$  соответственно.

Известно, что полные частицы вируса ящура включают в свой состав одну молекулу РНК, при этом содержание свободной РНК в вирусных суспензиях незначительно [4], отсюда следует, что существует прямая зависимость количества 146S частиц и числа молекул РНК вируса ящура при расчетах в одинаковом объеме неинактивированной суспензии после репродукции возбудителя. Известно, что для вируса ящура молекулярная масса цельных вирионов ( $Mw_{146S}$ ) в среднем составляет  $8\,080\,000$ – $8\,167\,500$  Да [3, 4, 15]. Учитывая, что геном вируса имеет длину около  $8500$  н. о. [3, 4] и средний молекулярный вес рибонуклеозида равен  $340,5$  Да, молекулярная масса вирусной РНК ( $Mw_{\text{РНКВР}}$ ) составляет около  $2\,894\,250$  Да, что в среднем в  $2,79$ – $2,82$  раза меньше по сравнению с  $Mw_{146S}$ . Иными словами, теоретически концентрация 146S частиц (мкг/см $^3$ ) в суспензиях вируса ящура в среднем в  $2,79$ – $2,82$  раза выше, чем концентрация вирусной РНК (мкг/см $^3$ ), отсюда следует,

$$\text{что } \frac{m_{146S}}{m_{\text{РНК } 146S}} = 2,79 \div 2,82, \text{ или } m_{\text{РНК } 146S} = \frac{m_{146S}}{2,79 \div 2,82}.$$

Данное выражение подставляем в отношение  $\frac{m_{146S}}{N_{\text{РНК } 146S}}$  вместо  $m_{\text{РНК } 146S}$ , учитывая, что

$$N_{\text{РНК } 146S} = \frac{m_{\text{РНК}} \times N_A}{10^6 \times L \times Mw_{\text{рибонуклеозида}}},$$

где  $m_{\text{РНК}}$  – масса РНК вируса ящура;

$N_A$  – постоянная Авогадро ( $6,022045 \times 10^{23}$  моль $^{-1}$ );

$L$  – длина генома вируса ящура ( $8500$  н. о.);

$Mw_{\text{рибонуклеозида}}$  – средний молекулярный вес рибонуклеозида ( $340,5$  Да);

$1/10^6$  – коэффициент перевода массы из [мкг] в [г].

В результате преобразований получаем, что

$$\frac{N_{\text{РНК } 146S}}{m_{146S}} = 7,38 \times 10^{10} - 7,46 \times 10^{10}.$$

Это означает, что теоретически число молекул РНК 146S в среднем в  $7,38 \times 10^{10}$ – $7,46 \times 10^{10}$  больше концентрации 146S частиц, что было подтверждено экспериментально при проведении анализа разведений стандартов с известными концентрациями 146S частиц с помощью предложенного способа. Полученные результаты анализа отражены в таблицах 2 и 3.

Как следует из данных таблицы 2, степень достоверности определения количества молекул РНК, выделенных из суспензий вируса ящура с концентрациями 146S частиц от  $0,1$  до  $4,0$  мкг/см $^3$ , находилась в диапазоне от  $95,03$  до  $99,02\%$ .

На основе полученных данных о количестве молекул вирусной РНК в разведениях стандарта и концентрации соответствующих им 146S частиц был построен калибровочный график зависимости  $C_{146S}$  и  $N_{\text{РНК } 146S}$ , который представлен в виде модели

$$C_{146S} = \frac{3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689}{280\,818\,944\,837}$$

с достоверностью аппроксимации  $R^2 = 0,9996$  (рис. 2). В отрицательном контроле вирус ящура не обнаружен.

**Таблица 3**  
**Зависимость между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из полных частиц вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011**  
 ( $n = 3, p < 0,005$ )

**Table 3**  
**Relationship between 146S particle concentration and the number of RNA molecules extracted from whole particles of FMDV Asia-1/Tajikistan/2011 strain**  
 ( $n = 3, p < 0.005$ )

Концентрация 146S частиц в стандарте, МКГ/мл	Средние значения оптической плотности			Расчетное количество молекул РНК <sub>146S</sub>
	стандартных образцов		отрицательного контроля	
	OD <sub>262</sub>	OD <sub>320</sub> *	OD <sub>260К</sub> *	
0,1	0,026 ± 0,001	0,002	0,006	7 315 278 733
0,2	0,051 ± 0,001	0,000	0,006	14 349 200 591
0,3	0,076 ± 0,001	0,001	0,006	21 383 122 450
0,4	0,102 ± 0,001	0,002	0,006	28 698 401 183
0,5	0,128 ± 0,001	0,001	0,006	36 013 679 916
0,6	0,154	0,002	0,006	43 328 958 649
0,7	0,177 ± 0,001	0,001	0,006	49 800 166 759
0,8	0,203	0,003	0,006	57 115 445 492
0,9	0,235 ± 0,001	0,002	0,006	66 118 865 471
1,0	0,262 ± 0,001	0,003	0,006	73 715 501 078
1,1	0,281 ± 0,001	0,004	0,006	79 061 281 690
1,2	0,314 ± 0,001	0,003	0,006	88 346 058 544
1,3	0,339 ± 0,001	0,003	0,006	95 379 980 402
1,4	0,356 ± 0,001	0,005	0,006	100 163 047 266
1,5	0,388	0,004	0,006	109 166 467 245
1,6	0,407	0,005	0,006	114 512 247 858
1,7	0,437 ± 0,001	0,006	0,006	122 952 954 088
1,8	0,465 ± 0,001	0,006	0,006	130 830 946 570
1,9	0,488 ± 0,001	0,004	0,006	137 302 154 679
2,0	0,525 ± 0,001	0,007	0,006	147 712 359 030
2,1	0,546 ± 0,001	0,005	0,006	153 620 853 391
2,2	0,563	0,005	0,006	158 403 920 255
2,3	0,586 ± 0,001	0,007	0,006	164 875 128 365
2,4	0,606 ± 0,001	0,005	0,006	170 502 265 852
2,5	0,641 ± 0,001	0,008	0,006	180 349 756 454
2,6	0,676 ± 0,001	0,006	0,006	190 197 247 056
2,7	0,700	0,002	0,006	196 949 812 040
2,8	0,723 ± 0,001	0,002	0,006	203 421 020 150
2,9	0,752 ± 0,002	0,003	0,006	211 580 369 506
3,0	0,786 ± 0,001	0,004	0,006	221 146 503 234
3,1	0,798 ± 0,002	0,001	0,006	224 522 785 726
3,2	0,813 ± 0,001	0,005	0,006	228 743 138 841
3,3	0,844 ± 0,001	0,001	0,006	237 465 201 946
3,4	0,871 ± 0,002	0,003	0,006	245 061 837 553
3,5	0,907 ± 0,001	0,001	0,006	255 190 685 029
3,6	0,931 ± 0,002	0,002	0,006	261 943 250 013
3,7	0,942 ± 0,001	0,002	0,006	265 038 175 631
3,8	0,966 ± 0,001	0,002	0,006	271 790 740 615
3,9	1,011 ± 0,002	0,003	0,006	284 451 799 961
4,0	1,024 ± 0,002	0,002	0,006	287 546 725 579

OD<sub>262</sub> – значение экстинкции при 262 нм; OD<sub>320</sub> – значение экстинкции при 320 нм;

OD<sub>260К</sub> – значение экстинкции для отрицательного контроля при 260 нм;

\* значения при измерениях не менялись.

OD<sub>262</sub> – extinction value at 262 nm; OD<sub>320</sub> – extinction value at 320 nm;

OD<sub>260К</sub> – extinction value for the negative control at 260 nm;

\* values remained unchanged when measured.

Полученная модель на основе количества молекул РНК вируса ящура, выделенной из 146S частиц после иммунного захвата вирионов, позволяет определять концентрацию цельных частиц в культуральных неинaktivированных вирусных суспензиях.

На заключительном этапе исследования проводили тестирование представленного способа определения концентрации 146S частиц в 360 неинaktivированных суспензиях вируса ящура вакцинных штаммов А/Турция/2006 (40 проб), А/ВНИИЗЖ/2015 (40 проб), О/Приморский/2012 (40 проб), О/Приморский/2014 (40 проб), Азия-1/Таджикистан/2011 (40 проб), С<sub>1</sub>/Закарпатский/1972 (40 проб), САТ-1/Ахалкалакский/62 (40 проб), САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 (40 проб), САТ-3/Бечуаналенд 1/65 (40 проб). Исследования параллельно проводили методами ОТ-ПЦР-РВ и РСК в трех повторениях (табл. 4).

Совпадение фактических и ожидаемых (по данным ОТ-ПЦР-РВ и РСК) результатов определения концентрации 146S компонента культурального вируса ящура для штамма А/Турция/2006 составило 96,2–99,4%, для А/ВНИИЗЖ/2015 – 94,9–99,3%, для О/Приморский/2012 – 97,2–99,2%, для О/Приморский/2014 – 97,0–99,3%, для Азия-1/Таджикистан/2011 – 97,6–99,5%, для С<sub>1</sub>/Закарпатский/1972 – 95,2–97,7%, для САТ-1/Ахалкалакский/62 – 94,8–97,3%, для САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 – 96,5–99,1%, для САТ-3/Бечуаналенд 1/65 – 94,5–98,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов составило 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что также соответствовало ожиданиям.

Таким образом, по результатам проведенного исследования корреляция спектрометрического способа определения концентрации 146S компонента культурального вируса ящура с ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,5%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен способ спектрометрического определения концентрации 146S частиц при оценке количества РНК вируса ящура, выделенной после иммунного захвата. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины с завышенным содержанием балластных компонентов.

Выявлено существование зависимости между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из вирионов после их штаммоспецифического иммунного захвата и количественно определенным спектрометрическим методом. Представленный спектрометрический способ позволяет определять значение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины с помощью предложенной линейной модели вида

$$C_{146S} = \frac{3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566 783 689}{280 818 944 837}.$$

Установлено, что корреляция данного способа с ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов было 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что соответствовало ожиданиям.

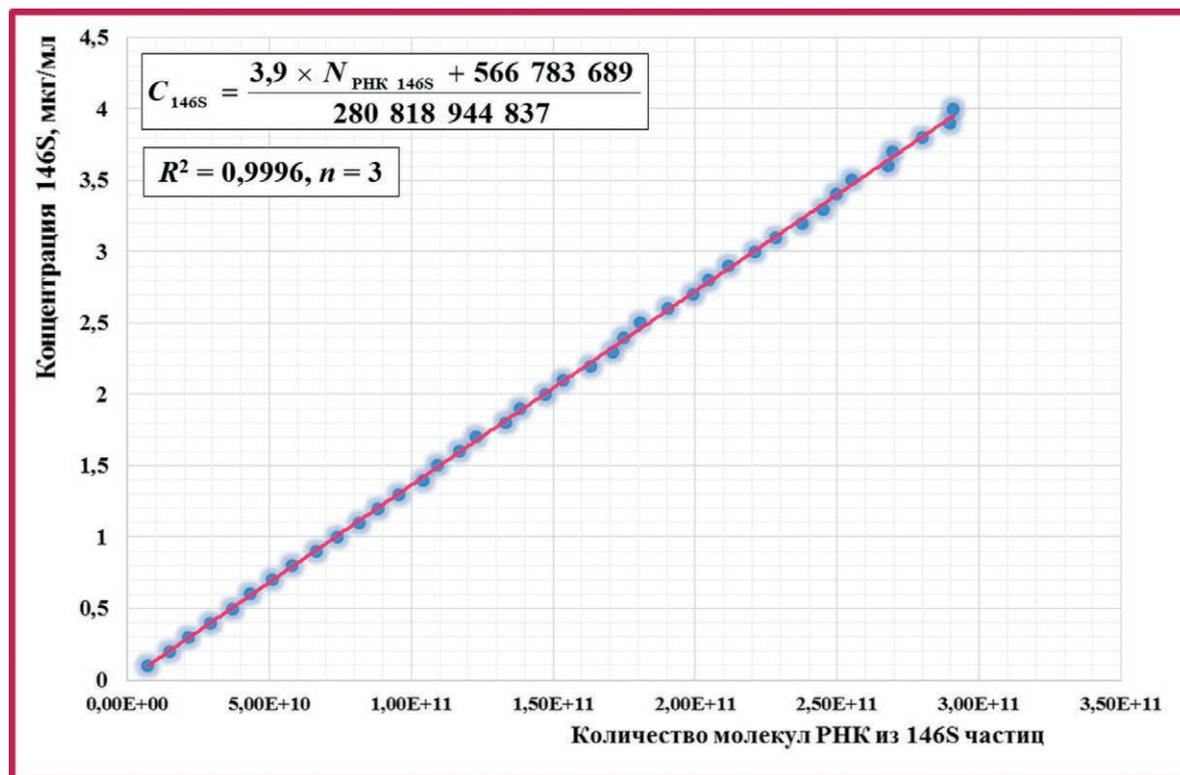


Рис. 2. Зависимость концентрации 146S частиц вируса ящура от количества молекул вирусной РНК в стандартных растворах. Количество молекул выражено в экспоненциальном формате (E = 10)

Fig. 2. Relationship between FMDV 146S particle concentration and the number of viral RNA molecules in standard solutions. The number of molecules is expressed in exponential notation (E = 10)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ  
(п. п. 1–3, 5, 8, 9, 12, 14, 15 см. REFERENCES)**

4. Пономарев А. П., Узюмов В. Л. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. Владимир: Фолиант; 2006. 250 с.  
 6. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль; 1994. 92 с.  
 7. Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Щербаков А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А. и др. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Патент № 2619878 Российская Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2016140460. Заявл. 14.10.2016. Опубл. 18.05.2017. Бюл. № 14.  
 10. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высшая школа; 1989: 20–22.  
 11. Капорский Л. Н. Оптическая плотность. В кн.: Физическая энциклопедия. Т. 3: Магнитоплазменный – Пойнтинга теорема. Гл. ред. А. М. Прохоров. М.: Большая Российская энциклопедия; 1992: 441.  
 13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: пер. с англ. М.: Мир, 1991. 544 с.

**REFERENCES**

1. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018; Chap. 3.1.8: 433–464. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_FMD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf).  
 2. Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases. In: Diseases of Swine. Ed. by B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D’Allaire, D. J. Taylor. 9th ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional; 2006: 517–536.  
 3. Nucleotide Database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=FM-DV+complete> (date of access: 25.02.2019).  
 4. Ponomarev A. P., Uzyumov V. L. Foot-and-mouth disease virus: structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svoystva]. Vladimir: Foliant; 2006. 250 p. (in Russian)

**Таблица 4**  
Степень совпадения фактических и ожидаемых результатов спектрометрического способа определения концентрации 146S частиц с ОТ-ПЦР-РВ и РСК ( $n_{иссл.} = 3$ )

**Table 4**  
Compatibility of actual and expected results of 146S particle concentration determination by spectrometric method with rtRT-PCR and CFT ( $n_{tests} = 3$ )

Статус образца	Штамм вируса ящура	Количество образцов	Степень совпадения результатов спектрометрического способа с другими методами, %	
			ОТ-ПЦР-РВ [7]	РСК
опытные	А/Турция/2006	40	97,0–99,4	96,2–97,1
	А/ВНИИЗЖ/2015	40	96,8–99,3	94,9–97,0
	О/Приморский/2012	40	98,3–99,2	97,2–98,5
	О/Приморский/2014	40	98,0–99,3	97,0–98,1
	Азия-1/Таджикистан/2011	40	98,4–99,5	97,6–98,5
	С <sub>1</sub> /Закарпатский/1972	40	97,0–97,7	95,2–97,1
	CAT-1/Ахалкалакский/62	40	96,1–97,3	94,8–96,0
	CAT-2/Саудовская Аравия 7/2000	40	98,0–99,1	96,5–98,2
	CAT-3/Бечуаналенд 1/65	40	97,9–98,5	94,5–97,9
контроль положительный	Азия-1/Таджикистан/2011	40	99,2–99,6	99,0–99,3
контроль отрицательный	–	40	100	100

5. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. L., Garland A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129 (1): 1–36. DOI: 10.1016/s0021-9975(03)00041-0.
6. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical assay of viral proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij analiz virusnyh belkov]. Suzdal; 1994. 92 p. (in Russian)
7. Lozovoy D. A., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Shcherbakov A. V., Timina A. M., Shishkova A. A., et al. Method for foot and mouth disease virus 146S-component concentration determination in virus-containing raw material for vaccine using reverse transcription-polymerase chain reaction method in real time mode. Patent No. 2619878 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 2016140460. Date of filing: 14.10.2016. Date of publication: 18.05.2017. Bull. No. 14. (in Russian)
8. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
9. Peirson S. N., Butler J. N. RNA extraction from mammalian tissues. In: *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology*<sup>™</sup>. Ed. by E. Rosato. 2007; 362: 315–327. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1\_22.
10. Vladimirov Yu. A., Potapenko A. Ya. Physics and chemistry of photo-biological processes [Fiziko-himicheskie osnovy fotobiologicheskikh processov]. M.: Vysshaya shkola; 1989; 20–22. (in Russian)
11. Kaporsky L. N. Optical density [Opticheskaya plotnost']. In: *Encyclopedia of Physics. Vol. 3: Magnetoplasma – Poynting's theorem* [Fizicheskaya enciklopediya. T. 3: Magnitoplazmennyy – Poyntinga teorema]. Editor-in-Chief A. M. Prokhorov. M.: Great Soviet Encyclopedia; 1992: 441. (in Russian)
12. Glasel J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques.* 1995; 18 (1): 62–63. PMID: 7702855.
13. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. Data for Biochemical Research. Oxford: Clarendon Press; 1989. 592 p.
14. Newell D. B. A more fundamental International System of Units. *Physics Today.* 2014; 67 (7): 35–41. DOI: 10.1063/PT.3.2448.
15. Strohmaier K., Adam K.-H. Die Struktur des Virus der Maul- und Klauenseuche. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B.* 1976; 23 (5/6): 483–506. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1976.tb01628.x.

Поступила 23.07.2020

Принята в печать 25.09.2020

Received on 23.07.2020

Approved for publication on 25.09.2020

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Доронин Максим Игоревич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Михалишин Дмитрий Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Стариков Вячеслав Алексеевич**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Лозовой Дмитрий Анатольевич**, доктор ветеринарных наук, доцент, г. Владимир, Россия.

**Елькина Юлия Сергеевна**, аспирант, технолог лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Борисов Алексей Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Maksim I. Doronin**, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry V. Mikhailishin**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Vyacheslav A. Starikov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry A. Lozovoy**, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Vladimir, Russia.

**Yulia S. El'kina**, Post-Graduate Student, Technologist, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Alexey V. Borisov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.