

PRAKTYCZNE WSKAZÓWKI DO OZNACZANIA  
WSPÓŁCZYNNIKA SEDYMENTACJI WIRUSÓW  
NA PRZYKŁADZIE WIRUSA MOZAIKI TYTONIU

*Bartłomiej Miciński, Wojciech Kaniewski, Lidia Dunajska*

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

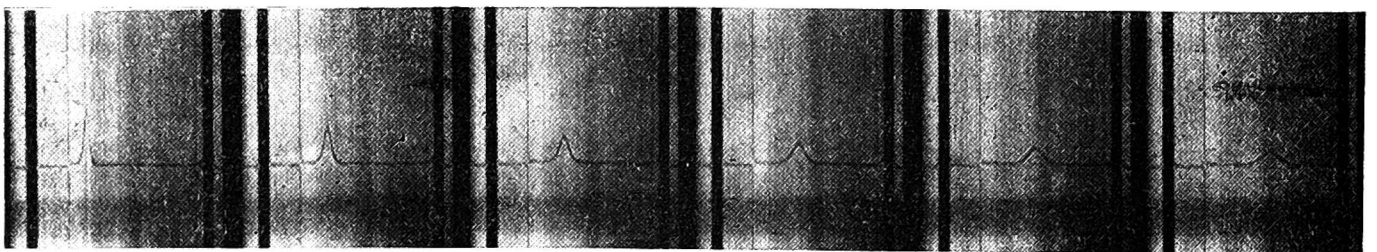
Od czasu wprowadzenia do badań podstawowych w wirusologii techniki ultrawiorowania analitycznego, oznaczany tą drogą współczynnik sedymentacji stał się jedną z podstawowych cech fizykochemicznych charakteryzujących wirusy. Oznaczanie współczynnika sedymentacji wirusa może być jednym z testów służących do jego identyfikacji, jest parametrem bliżej charakteryzującym wielkość i kształt wirusa, a także punktem wyjściowym do oznaczania i obliczania innych wielkości charakteryzujących wirusy, a zwłaszcza ich ciężar cząsteczkowy. Stąd precyzyjne oznaczenie współczynnika sedymentacji jest tak ważne przy identyfikacji wirusów, względnie przy ustaleniu własności fizykochemicznych wirusów nowo odkrytych, lub dla różnicowania ich szczepów. Spotykane w literaturze wartości liczbowe współczynników sedymentacji dla określonego wirusa różnią się między sobą znacznie bardziej, niż wskazywałyby na to błąd metody. Chcąc wyjaśnić przyczynę różnic w wynikach używanych przez różnych badaczy, a zarazem wyeliminować przyczyny błędów w pomiarach własnych wykonaliśmy pomiary współczynnika sedymentacji wirusa mozaiki tytoniu, różnicując każdorazowo te fragmenty pracy, których wpływ na wynik wydawał nam się najbardziej prawdopodobny.

Materiał do badań stanowił wirus mozaiki tytoniu pochodzący z *Phy-salis alkekengi* L. (Miechunka rozdęta) rozmnożony na tytoniu i pomidorach i pobierany 19 dni po zakażeniu roślin. Reakcja na tytoniu odmiany Samsun, pomidorach oraz fasoli wykazywała, że jest to szczep wirusa o właściwościach szczepu „Dahlemense”. Oczyszczano go tą samą metodą by stwierdzić ewentualny wpływ rośliny gospodarza na uzyskany współ-

czynnik sedymentacji. Oczyszczanie prowadzono przy pomocy strącania wirusa w jego punkcie izoelektrycznym wg metody Maata [6]. Proces strącania przeprowadzono w każdym przypadku trzykrotnie nie uzyskując jednak wystarczająco czystego preparatu wirusa. Różnica między czystością preparatu po drugim i trzecim strąceniu była stosunkowo niewielka więc zaniechano dalszego oczyszczania tą metodą. Doczyszczanie preparatów przeprowadzono na drodze ultrawierowania różnicowego stosując 0,2 M bufor fosforanowo-sodowy o pH 7,0 i sedymentację wirusa przy 30 000 obr/min przez 1 godzinę a usuwanie zanieczyszczeń przez wirowanie przy 6000 obr/min w ciągu 20 minut.

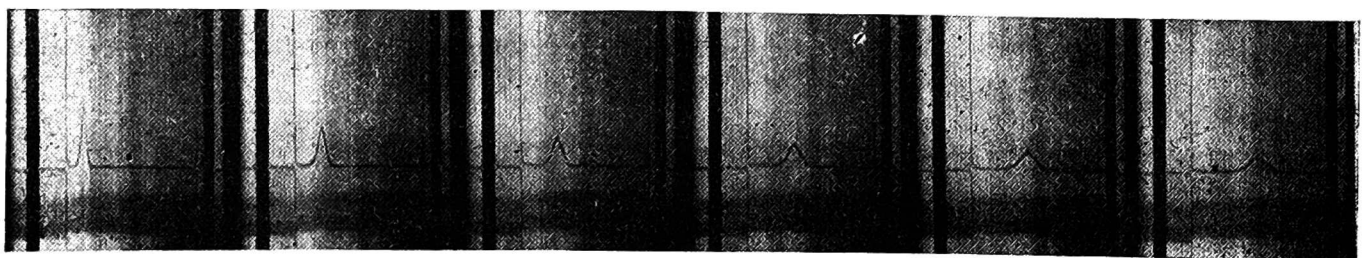
Proces ten powtórzono w przypadku pomidora pięciokrotnie, a w przypadku tytoniu ośmiokrotnie uzyskując preparaty wirusa o stopniu czystości wystarczającym do uzyskania pojedynczego, symetrycznego piku podczas ultrawierowania analitycznego. Dla obu tak uzyskanych preparatów wykonano oznaczenie współczynnika sedymentacji wykonując ultrawierowanie analityczne na wirówce firmy Beckman model E, w rotorze analitycznym An-D. Pomiary wykonano na roztworach wirusa w 0,2 M buforze fosforanowo-sodowym o pH 7,0. Stężenie wirusa wynosiło około 1 procent. Wirowano zawsze w temperaturze 20°C próbując różne prędkości wirowania w granicach od 15 220 do 25 980 obr/min. Zdjęcia wykonano przy kącie schlieren 70° w dwu lub czterominutowych odstępach czasu, naświetlając kliszę przez 10 sekund.

Uzyskano bardzo niskie wyniki pozornego współczynnika sedymentacji. Dla wirusa oczyszczonego z pomidora  $(S_c)_{app} = 118,0 S$  (rys. 1), a dla wirusa oczyszczonego z tytoniu  $(S_c)_{app} = 122,3 S$  (rys. 2). Różnica między uzyskanymi wynikami a wartościami współczynnika sedymentacji poda-



Rys. 1. Oznaczenie współczynnika sedymentacji wirusa mozaiki tytoniu oczyszczonego z pomidora (preparat I).

Prędkość wirowania 20 410 obr/min, zdjęcia wykonywano co 4 min.



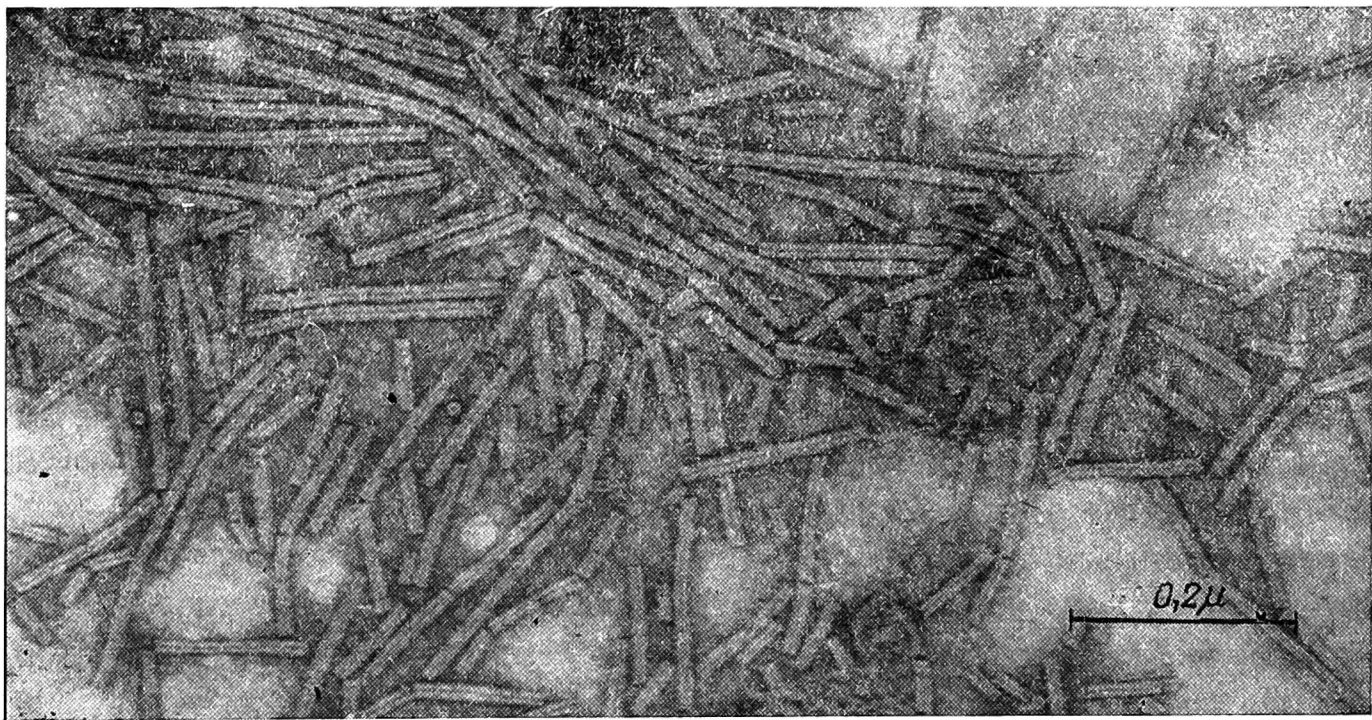
Rys. 2. Oznaczenie współczynnika sedymentacji wirusa mozaiki tytoniu oczyszczonego z tytoniu (preparat II).

Prędkość wirowania 20 410 obr/min, zdjęcia wykonywano co 4 min.

wanymi w literaturze była tak duża, że nie można było wytłumaczyć jej warunkami pomiaru, sposobami obliczeń i przeliczeń lub błędem metody [3]. Szukając przyczyny uzyskania tak niskich wartości współczynników sedymentacji zwrócono uwagę na stosunkowo znaczne rozmycie pików w czasie 10 lub 20-minutowego wirowania. Oszacowany stąd współczynnik dyfuzji był kilkakrotnie wyższy od podawanego dla TMV w literaturze.

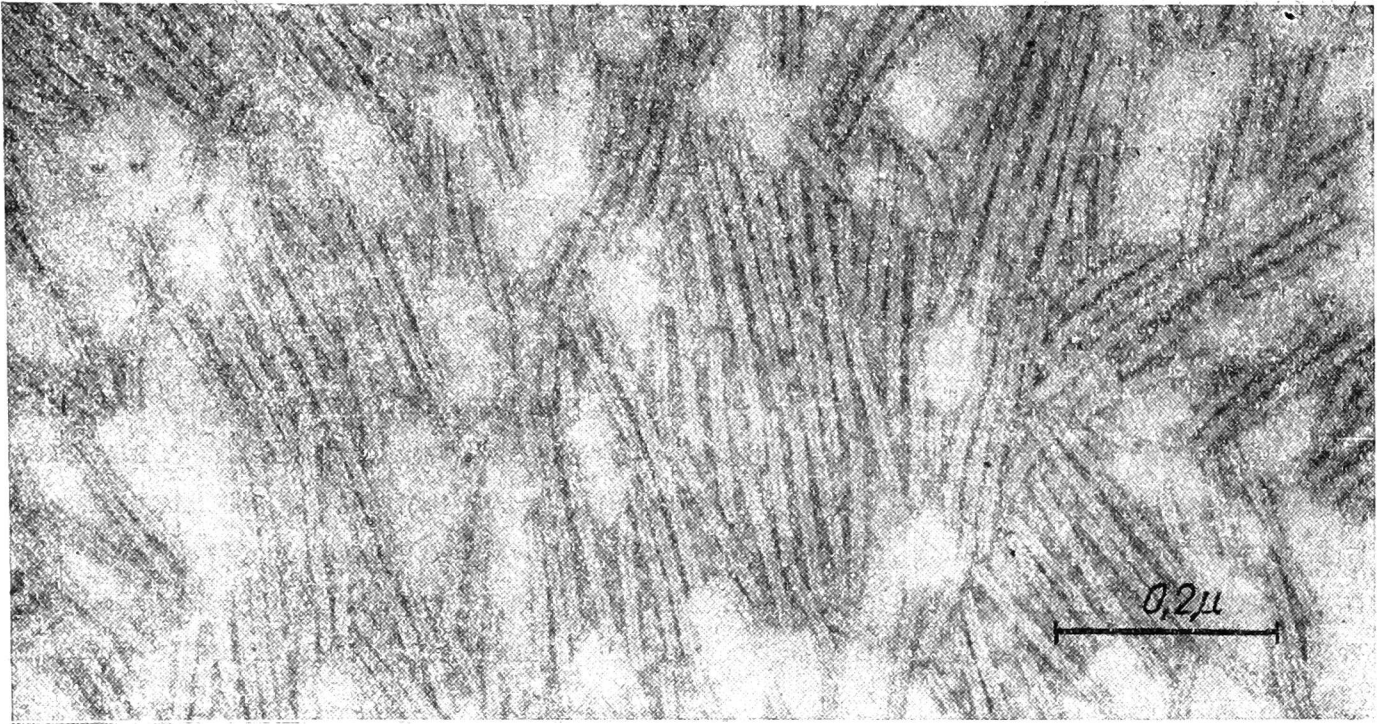
Uznając wynik taki za nierealny założono, że oczyszczone przez nas preparaty wirusa są układami polimolekularnymi [2]. W celu potwierdzenia tej hipotezy wykonano zdjęcia mikroskopowe badanych roztworów wirusa. W przypadku zarówno preparatu uzyskanego z pomidora, jak i z tytoniu uzyskano zbiór pałeczek wirusa o jednakowej grubości lecz o znacznie zróżnicowanej długości. Zmierzono długości 300 przypadkowo wybranych pałeczek z każdego preparatu i obliczono ich średnie ważone [1, 4].

Średnia długość pałeczki TMV wyizolowanej z pomidora wynosiła 144,9 nm (rys. 3), a z tytoniu 166,1 nm (rys. 4). Biorąc pod uwagę fakt,



Rys. 3. Zdjęcie elektronomikroskopowe preparatu I. Barwienie negatywowe 2% PTA

że podawana w literaturze średnia długość pałeczki TMV wynosi ok. 280 nm [8] stwierdziliśmy, iż w preparatach naszych uzyskanych przez oczyszczenie znaną, powszechnie stosowaną metodą była mieszanina pałeczek o różnej długości, z przewagą jednak pałeczek krótkich. Obliczony z średniej długości pałeczki dla obu preparatów ciężar cząsteczkowy wirusa, a stąd przyjmując dane z literatury dla współczynnika dyfuzji i molarnej objętości właściwej — współczynnik sedymentacji okazał się w przybliżeniu zgodny z uzyskanymi przez nas danymi eksperymentalnymi.

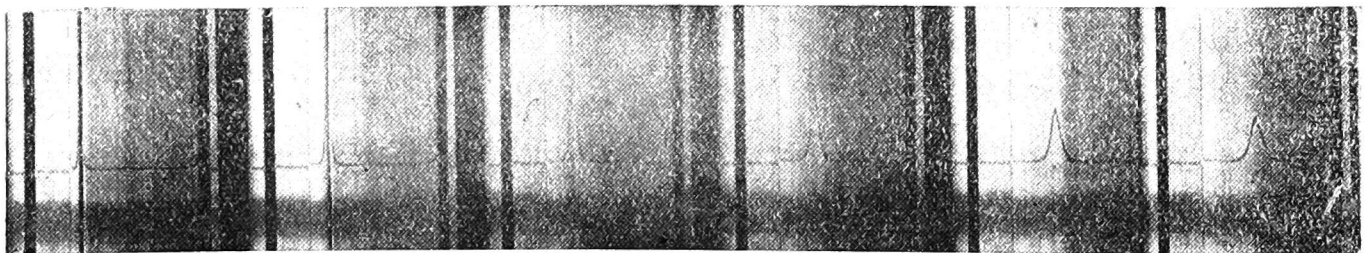


Rys. 4. Zdjęcie elektronomikroskopowe preparatu II. Barwienie negatywowe 2% PTA

W doświadczeniu tym wpływ stopnia rozbicia pałeczek wirusa na współczynnik sedymentacji był tak duży, że uniemożliwił stwierdzenie ewentualnego wpływu nań rośliny—gospodarza.

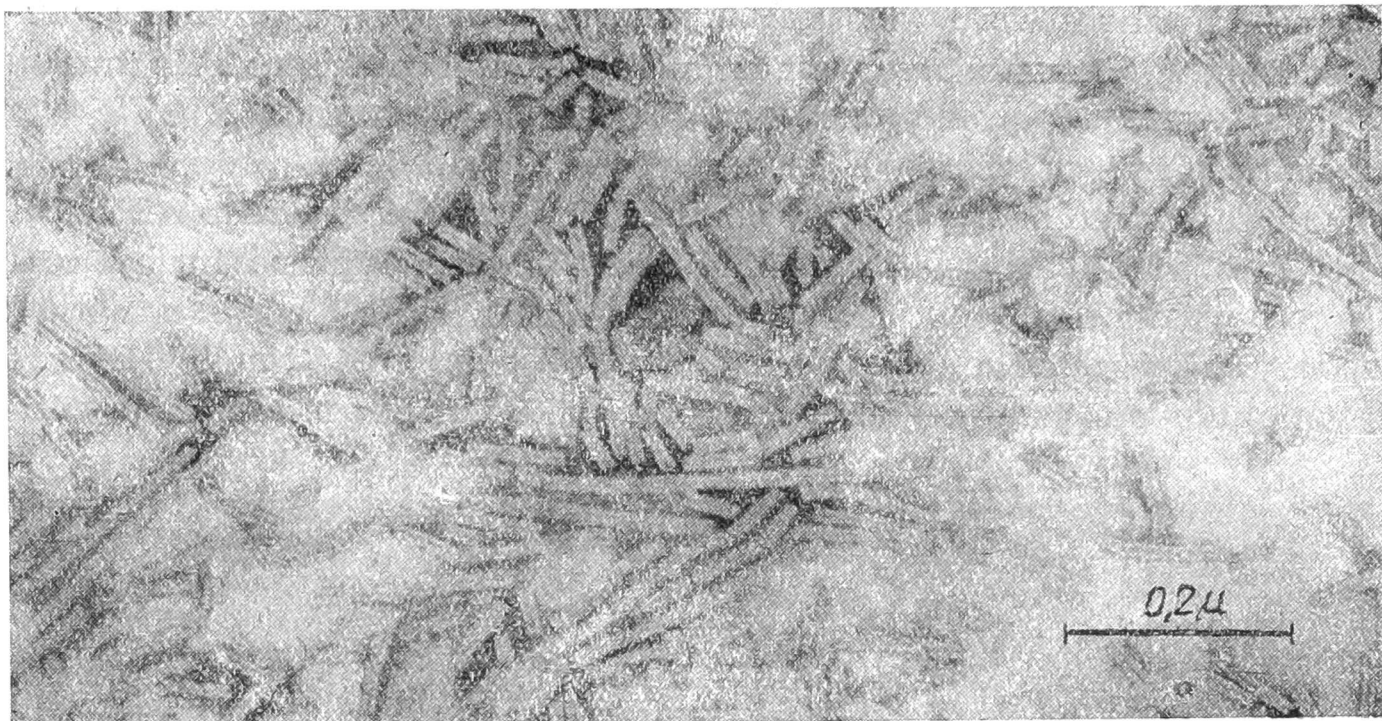
Dla ustalenia, jaki etap oczyszczania był głównie odpowiedzialny za częściową degradację wirusa wykonano oczyszczanie TMV z dwóch dalszych prób tytoniu.

Jedną próbę oczyszczono dokładnie według metody polecanej dla TMV przez Maata i nie stosującej strącania wirusa w punkcie izoelektrycznym [5]. W metodzie tej stosuje się wstępne oczyszczanie homogenatu przez ekstrakcję eterem etylowym i czterochlorkiem węgla a następnie doczyszczanie przez csadzanie wirusa przy 30 000 obr/min w ciągu 1 godz., rozpuszczanie osadu w 0,18 M buforze fosforanowo-cytrynowym o  $\text{pH} = 7,0$  i usuwanie zanieczyszczeń przy 6000 obr/min przez 20 minut. Dla uzyskania preparatu dającego przy ultrawiwaniu analitycznym pojedynczy pik wykonano 6 cykli wirowania. Tak uzyskany preparat wirusa wykazywał współczynnik sedymentacji równy 106,3 S (rys. 5) i średnią długość pałeczki wirusa 99,3 nm (rys. 6). Aby otrzymany wynik lepiej



Rys. 5. Oznaczenie współczynnika sedymentacji wirusa mozaiki tytoniu oczyszczonego z tytoniu (preparat III)

Prędkość wirowania 20 410 obr/min, zdjęcia wykonywano co 4 min.

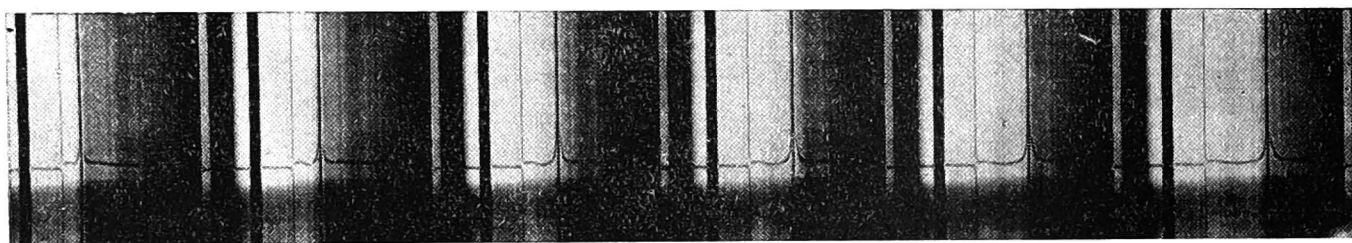


Rys. 6. Zdjęcie elektronomikroskopowe preparatu III. Barwienie negatywowe 2% PTA

porównać z pomiarami wcześniejszymi wirowano wirusa przy 30 000 obr/min i rozpuszczono w 0,2 M buforze fosforanowo-sodowym o  $\text{pH} = 7,0$ . Tak uzyskano współczynnik sedymentacji 99,6 S, który sugeruje dalsze rozbicie pałeczek wirusa przez dodatkowe ultrawierowanie, lub zmianę współczynnika sedymentacji spowodowaną zmianą buforu. Czwarty preparat uzyskano przez zastosowanie własnej kombinacji znanych metod oczyszczania wirusa, jednak bez stosowania ultrawierowania. Tok postępowania był następujący: 150 g liści tytoniu homogenizowano z 150 ml 0,2 M buforu fosforanowo-sodowego o  $\text{pH} = 7,0$  z dodatkiem 0,1% kwasu tioglikolowego i odsączono. Roztwór ogrzewano do temperatury  $70^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut. Wytrącone tak zanieczyszczenia odwirowano przy 6000 obr/min przez 10 minut. Z supernatantu strącono wirusa przez dodanie stałego siarczanu amonu doprowadzając roztwór do stężenia równego 50% nasycenia w  $20^{\circ}\text{C}$ . Osad odwirowano przy 6000 obr/min przez 30 minut i rozpuszczono w 140 ml 0,05 M buforu fosforanowo-sodowego o  $\text{pH} = 7,5$ . Roztwór zakwaszono 10% kwasem octowym o  $\text{pH} 5$  i tak wytrącony osad odwirowano przy 6000 obr/min w ciągu 20 minut. Supernatant zakwaszono następnie do  $\text{pH} 3,6$  i osad wirusa odwirowano przy 10 000 obr/min przez 10 minut. Osad rozpuszczono w 100 ml 0,2 M buforu fosforanowo-sodowego o  $\text{pH} 7,0$  i strącono wirusa przez dodanie 31,2 g siarczanu amonu i pozostawienie roztworu przez noc w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$ . Osad odwirowano przy 6000 obr/min w ciągu 30 minut i rozpuszczono w 20 ml 0,05 M buforu fosforanowo-sodowego o  $\text{pH} 7,5$  i nierozpuszczalne zanieczyszczenia odwirowano przy 4000 obr/min przez 10 minut. Tak otrzymany roztwór wirowano przy 15 000 obr/min przez 30 minut i po wirowaniu usunięto górną warstwę roztworu, pozostawiając

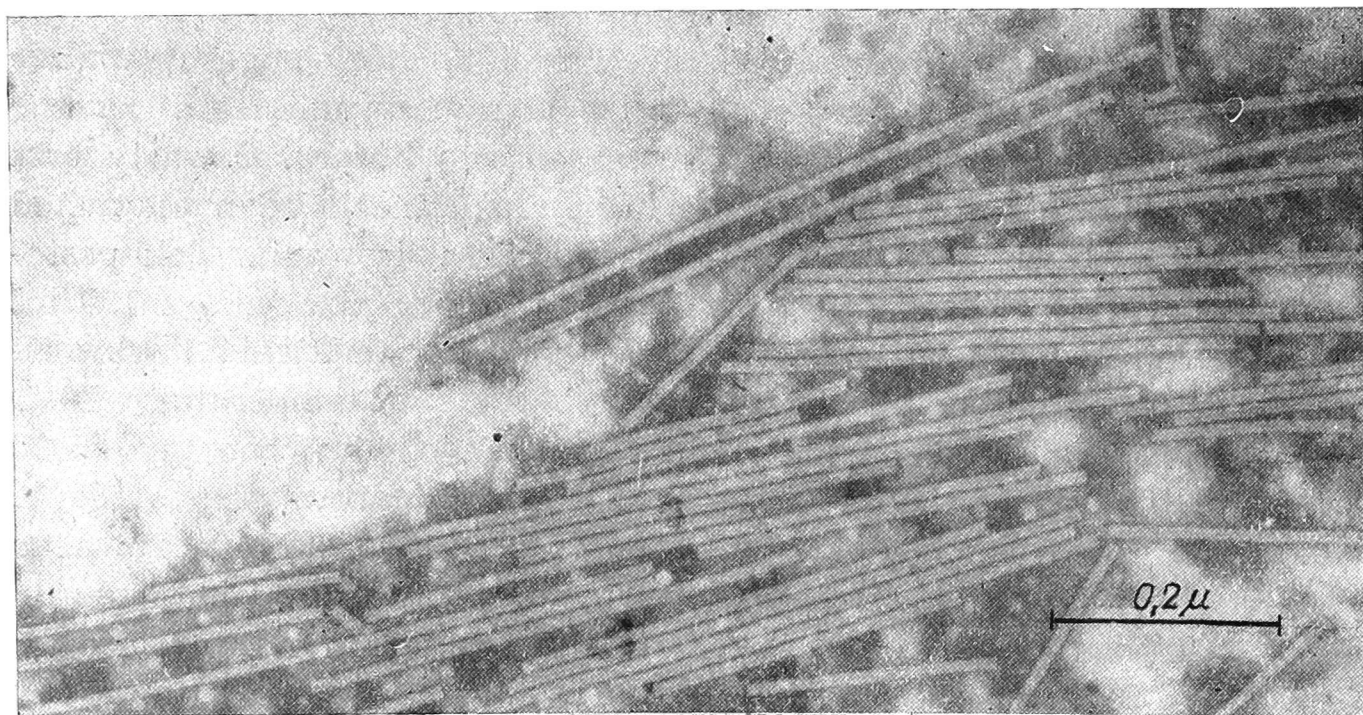
w sumie 2 ml roztworu wirusa. Powstały osad roztworzono i nierozpuszczalne części usunięto przez wirowanie w 4000 obr/min przez 10 minut. W końcu próbę wirowano przez 2 ml 20% sacharozy rozpuszczonej w tym samym buforze przy 23 000 obr/min przez 2 godziny w rotorze SW-39.

Osad rozpuszczono w 0,6 ml 0,05 M buforu fosforanowo-sodowego o pH 7,5 i odwirowano przy 4000 obr/min przez 10 minut. Supernatant był roztworem wirusa o stężeniu około 1 procent. Tak uzyskany preparat wirusa wykazywał współczynnik sedymentacji  $(S_c)_{app} = 192,7 S$  (rys. 7) przy średniej długości pałeczki 289,6 nm (rys. 8). Za pomocą mikroskopu elek-



Rys. 7. Oznaczenie współczynnika sedymentacji wirusa mozaiki tytoniu oczyszczonego z tytoniu (preparat IV)

Prędkość wirowania 24 630 obr/min, zdjęcia wykonywano co 2 min.



Rys. 8. Zdjęcie elektronicznoscopowe preparatu IV. Barwienie negatywowe 2% PTA

tronowego stwierdzono także obecność w tym preparacie cząsteczek wirusa o podwójnej i potrójnej długości a więc dimerów i trimerów. Wyniki uzyskane dla tego preparatu są zbliżone do wyników podanych w literaturze.

Cztery opisane wyżej preparaty wirusa mozaiki tytoniu wirowano w różnych warunkach, by dobrać możliwie najkorzystniejsze parametry wirowania dla oznaczania współczynnika sedymentacji. Na podstawie wykonanych doświadczeń stwierdzono duże różnice w wielkości współczynnika

sedymencacji przy wirowaniu roztworów o różnych stężeniach. Proste przeliczenie na roztwór o nieskończenie wielkim rozcieńczeniu okazało się niewystarczające, szczególnie dla układów polimolekularnych. Współczynnik proporcjonalności  $K_s$  [2] był różny dla badanych preparatów. Stąd stwierdziliśmy konieczność wykonywania pomiarów na różnych, znanych stężeniach wirusa i ekstrapolowanie uzyskanych wyników współczynnika sedymencacji na stężenie równe zero.

Kąt schlieren, nie mający wpływu na uzyskane wyniki, należy dopasować do stężenia wirusa tak, by można było dokonywać odczytów z wykresu funkcji  $\frac{dn}{dr} = f(r)$  z możliwie największą precyzją. Także prędkość wirowania i odstępy czasu między zdjęciami trzeba dobrać tak, by uzyskać serię zdjęć pików wystarczająco ostrych dla odczytu, o wyraźnie zróżnicowanych odległościach od linii menisku.

Dla układów polimolekularnych okazało się konieczne wirowanie przy stosunkowo dużych prędkościach, np. 24 630 obr/min i fotografowanie w dwuminutowych odstępach czasu, by uniknąć nadmiernego rozmycia pików a zarazem spowodować wystarczającą dla dokładnego zmierzenia migrację granicy między rozpuszczalnikiem a roztworem. Dla bardziej jednorodnego preparatu wirusowego dobre wyniki daje wirowanie przy nieco niższych obrotach (np. 21 740 obr/min) i fotografowanie co 4 minuty.

Żadną z czterech opisanych metod oczyszczenia nie uzyskano na tyle jednorodnego preparatu wirusowego, by decydującym czynnikiem rozmywającym piki była dyfuzja cząsteczek wirusa, a nie różnice w szybkości sedymencacji cząsteczek o różnych wielkościach. Potwierdziły to pomiary wirusów w mikroskopie elektronowym.

Pomiary sedymencacji wykonywano w temperaturze 20°C, by uniknąć przeliczeń wyników na tę temperaturę przyjętą umownie za standardową. Przeliczenie takie jest żmudne i związane z dokonywaniem dodatkowych pomiarów, takich jak lepkość buforu w temperaturze pomiaru, objętość właściwa wirusa w temperaturze pomiaru i w temperaturze 20°C, czy gęstość buforu w temperaturze pomiaru. Stąd we wszystkich przypadkach, gdy wirus nie rozkłada się jeszcze w temperaturze 20°C korzystne i obarczone mniejszym błędem jest wirowanie w tej właśnie temperaturze. Istotne jest również odpowiednie dobranie buforu—rozpuszczalnika wirusa, a więc jego składu, stężenia i pH. Rozpuszczalnik nie powinien powodować rozkładu i agregacji wirusa lub w jakikolwiek sposób wpływać na kształt i wielkość wirusa.

Stosując bardzo rozcieńczone bufony — rzędu 0,01 M można zaniedbać przeliczania uzyskanego wyniku na wirowanie w wodzie, gdyż poprawka mieści się wtedy w błędzie metody. Stwierdzono, że wirując ten sam preparat wirusa z zastosowaniem różnych buforów uzyskać można wyniki bardzo zróżnicowane, nawet po uwzględnieniu powszechnie przyjętych

poprawek. W przypadku TMV wirowanie w wodzie dawało zwykle niższe wartości współczynnika sedymentacji niż wirowanie w buforach, nawet bez uwzględnienia poprawki na bufor, która zwykle jest dodatnia.

W opisanych doświadczeniach współczynnik sedymentacji obliczano najczęściej stosowaną w przypadku systemu optycznego schlieren, metodą graficznego całkowania [7]. Obliczone tak wyniki są średnią dla wszystkich sfotografowanych położów granicy między rozpuszczalnikiem a roztworem i zależą od parametrów wirowania. Bardziej poprawne byłoby całkowanie rachunkowe wszystkich funkcji  $\frac{dn}{dr} = f(r)$  i ekstrapolowanie wyników na poziom menisku. Współczynnik sedymentacji na poziomie menisku jest zawsze wyższy od obliczanej zwykle średniej i różnica ta jest istotna, szczególnie w przypadku dużych odległości „granicy” od poziomu menisku.

Obliczenie współczynnika sedymentacji metodą rachunkowego całkowania jest żmudne i wymagające dużo większej, niedostępnej dla nas precyzji odczytywania z płyt fotograficznych. Z tych powodów jest ono w praktyce rzadko stosowane.

#### WNIOSKI

1. Współczynnik sedymentacji wirusów pałeczkowatych zależny jest od stopnia degradacji lub asocjacji wirusa, a więc pośrednio od sposobu jego oczyszczenia. Stopień czystości i jednorodności preparatu powinno się zbadać np. za pomocą mikroskopii elektronowej, pomiarów dyfuzji wirusa czy też przez analityczne wirowanie w gradiencie gęstości.

2. Te parametry wirowania, które nie mają bezpośredniego wpływu na wynik analizy, a więc prędkość wirowania, kąt schlieren, czas wykonania pierwszego zdjęcia i różnice czasu między kolejnymi zdjęciami, czas naświetlania kliszy, rodzaj rotora i komórki wirowniczej należy tak dobrać do badanego roztworu, by uzyskać możliwie największą precyzję odczytów istotnych parametrów funkcji  $\frac{dn}{dr} = f(r)$ .

3. Analizę sedymentacyjną wykonywać w temperaturze 20°C, a jeśli jest to niemożliwe, należy podać temperaturę wirowania i przeliczyć uzyskany wynik.

4. Trzeba wyeliminować wpływ stężenia przez analizowanie szeregu rozcieńczeń wirusa i ekstrapolowanie współczynnika sedymentacji na nieskończenie wielkie rozcieńczenie. W razie oczyszczenia małej ilości wirusa, wystarczającej do wykonania analizy tylko przy jednym, niskim stężeniu, należy podać dokładną wielkość tego stężenia (w g/ml).

5. Konieczne jest dokładne podanie składu, stężenia i pH buforu użytego jako rozpuszczalnika wirusa, niezależnie od ewentualnego przeliczenia współczynnika sedymentacji na wirowanie w wodzie. W razie wy-



konywania analizy sedymentacyjnej w wodzie trzeba to wyraźnie zaznaczyć.

6. Celowe jest podanie sposobu obliczania wyniku analizy.

7. Jedynie szczegółowe podawanie wszystkich istotnych parametrów wirowania pozwala na właściwe interpretowanie uzyskanej wartości liczbowej współczynnika sedymentacji lub porównywanie ich z wartościami uzyskanymi przez innych badaczy.

8. Należałoby w przyszłości ustalić pewne ramowe zasady postępowania przy analizie sedymentacyjnej w wirusologii.

#### LITERATURA

1. Brandes J., Paul H. L.: Das elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virose. Betrachtungen zur Vermessung faden- und stäbchenförmiger Virusteilchen. Arch. mikrobiol., 1957, t. 26, s. 358-368.
2. Elias H. G.: Ultrazentrifugen—Methoden. Beckman Instruments G m b H. München, 1969.
3. Kaniewski W.: Wpływ parametrów ultrawirowania analitycznego na uzyskane tą metodą wyniki współczynnika sedymentacji. Pr. nauk. Inst. Ochr. Rośl., 1973, t. 15, z. 1, s. 127.
4. Klinkowski M.: Pflanzliche Virologie. Band I. Berlin, 1967.
5. Maat D. Z.: Purification of Plant Viruses. Wageningen, 1965, s. 8.
6. Maat D. Z.: Purification of Plant Viruses. Wageningen, 1965, s. 6.
7. Schachman H. K.: Ultracentrifugation in Biochemistry. New York, 1968.
8. Schramm G.: Die Biochemie der Viren. Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1954.

*Бартоломей Мициньски, Войцех Каневски, Лидия Дунайска*

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОЭФФИЦИЕНТА СЕДИМЕНТАЦИИ ВИРУСОВ НА ПРИМЕРЕ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА

#### Резюме

В работе было исследовано влияние способа приготовления вирусного препарата и параметров центрифугирования на полученный по методу аналитического ультрацентрифугирования коэффициент седиментации по TMV.

Дифференцируя каждый раз эти фрагменты работы, влияние которых на результат казалось наиболее вероятным, получен ряд значений коэффициентов седиментации TMV, отличающихся между собой значительно больше, чем указывала бы на это ошибка метода. Были обсуждены причины получения разных значений коэффициента седиментации по тому же вирусу и представлены практические указания по определению коэффициента седиментации вирусов, дающие одновременно возможность облегчить соответствующую интерпретацию полученных в опытах результатов.

*Bartłomiej Miciński, Wojciech Kaniewski, Lidia Dunajska*

PRACTICAL HINTS CONCERNING DETERMINATION OF VIRUS  
SEDIMENTATION COEFFICIENT, EXEMPLIFIED BY TOBACCO MOSAIC  
VIRUS

S u m m a r y

Study was made of the effect of both the procedure used for preparation of virus material and of the centrifugation parameters on the value of the TMV sedimentation coefficient, obtained by analytical ultracentrifugation.

In consequence of modifying some fragments of the procedure, which seemed to have the greatest effect on the results, a series of values of the TMV sedimentation coefficients was obtained, these values proved to be much more discrepant than it might have been expected from the error of the method. The reasons why different values of the sedimentation coefficient have been obtained for the same virus are discussed; practical instructions concerning the determination of the virus sedimentation coefficient, aimed at facilitating correct interpretation of the experimental results, are given.