

## ANALIZA SEDYMENTACYJNA WIRUSA MOZAIKI OGÓRKA

*Wojciech Kaniewski*

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Poprawnie oznaczony współczynnik sedymentacji wirusa jest jedną z najważniejszych cech fizykochemicznych służących do scharakteryzowania jego własności. Na podstawie wyników analizy sedymentacyjnej ocenia się wielkość i kształt wirusa, a także zmiany zachodzące na powierzchni cząsteczki wirusa pod wpływem rozpuszczalników o różnych własnościach. Wiąże się to głównie z rozkładem ładunków elektrostatycznych na powierzchni wirusa zależnych od składu i siły jonowej buforu użytego jako rozpuszczalnika. Współczynnik sedymentacji jest poza tym podstawową wielkością służącą do oznaczania bezwzględnego ciężaru cząsteczkowego wirusa. Dlatego też poprawne wykonanie analizy sedymentacyjnej wirusa jest tak ważne przy identyfikacji wirusów i określeniu ich podstawowych własności fizykochemicznych.

W przypadku wirusów trwałych w roztworze i możliwych do uzyskania w postaci zupełnie czystych, jednorodnych preparatów o ściśle określonym stężeniu, analiza sedymentacyjna nie przedstawia większych trudności pod warunkiem właściwego jej wykonania i poprawnej interpretacji uzyskanych wyników. W przypadku jednak większości wirusów preparat taki jest praktycznie niemożliwy do uzyskania, albo ze względu na nietrwałość wirusa w roztworze, albo z powodu trudności z idealnym oczyszczeniem wirusa, zwłaszcza w przypadku, gdy wirus nie osiąga zbyt dużej koncentracji w roślinie.

Taki problem wyniknął w trakcie szerszych badań wirusa mozaiki ogórka (WMO). Wirus ten jest stosunkowo nietrwały w roztworze i trudno znosi wieloetapowe, wykorzystujące różne techniki oczyszczania.

Podstawową jednak trudnością w uzyskaniu serii preparatów do analizy sedymentacyjnej okazała się niemożność uzyskiwania w pewny sposób roślin o określonej, dużej zawartości wirusa mozaiki ogórka. Na każ-

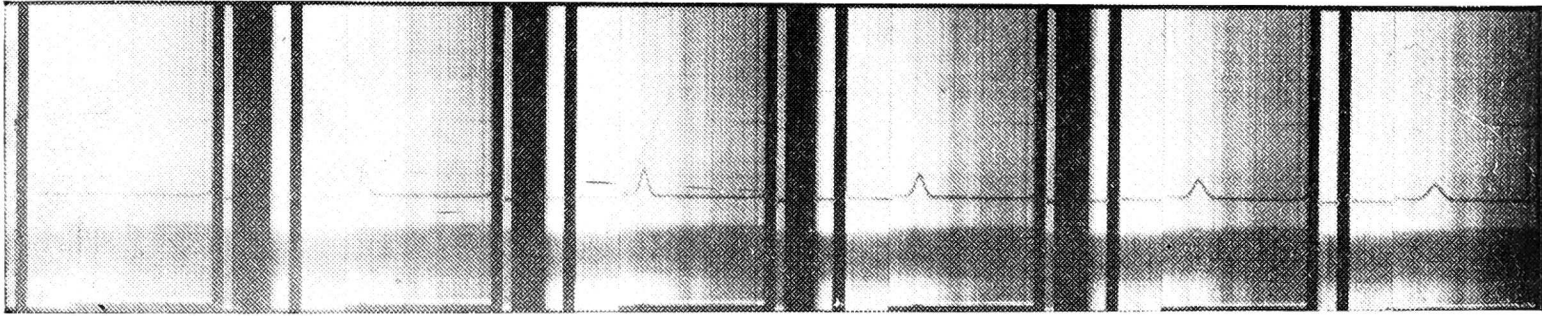
dym etapie oczyszczania wirusa dochodzi do pewnych strat, dlatego też jeśli początkowa koncentracji wirusa w roślinie jest mała, można uzyskać jedynie wstępnie oczyszczone preparaty o takim stężeniu, by nadawały się do analizowania na ultrawirówce. Z kolei analizowanie niezbyt czystych preparatów daje mniej pewne wyniki ze względu na dodatkowe oddziaływanie w roztworze wirusa z zanieczyszczeniami. W trakcie prowadzonych prac mających na celu zbadanie i porównanie własności fizykochemicznych dwóch izolatów wirusa mozaiki ogórka umownie nazwanymi szczepem selerowym i grochowym oraz wielokrotnie wykonano analizę sedymentacyjną tego wirusa. Badano na ultrawirówce wszystkie uzyskane przez oczyszczenie preparaty, które wykazywały wystarczające stężenie wirusa. Ponieważ oba szczepy wirusa były oczyszczane z różnych roślin i różnymi metodami, analizowano preparaty rozpuszczone w różnych buforach i wykazujące dużą różnorodność stężeń i stopnia czystości.

Wyniki uzyskane z pojedynczych pomiarów różniły się między sobą znacznie bardziej niż na to wskazywałby błąd metody. Podobnie duży rozrzut wyników stwierdzono porównując wyniki z literatury podawane przez różnych autorów. Kaper [3] podaje współczynnik sedymentacji WMO  $S_{20,w} = 91$ , a Francki [2]  $S_{20,w} = 99$ , mimo, że obaj analizowali preparaty wykazujące w układzie optycznym schlieren jeden wyraźnie dominujący szczyt z ledwie widocznymi śladami zanieczyszczeń.

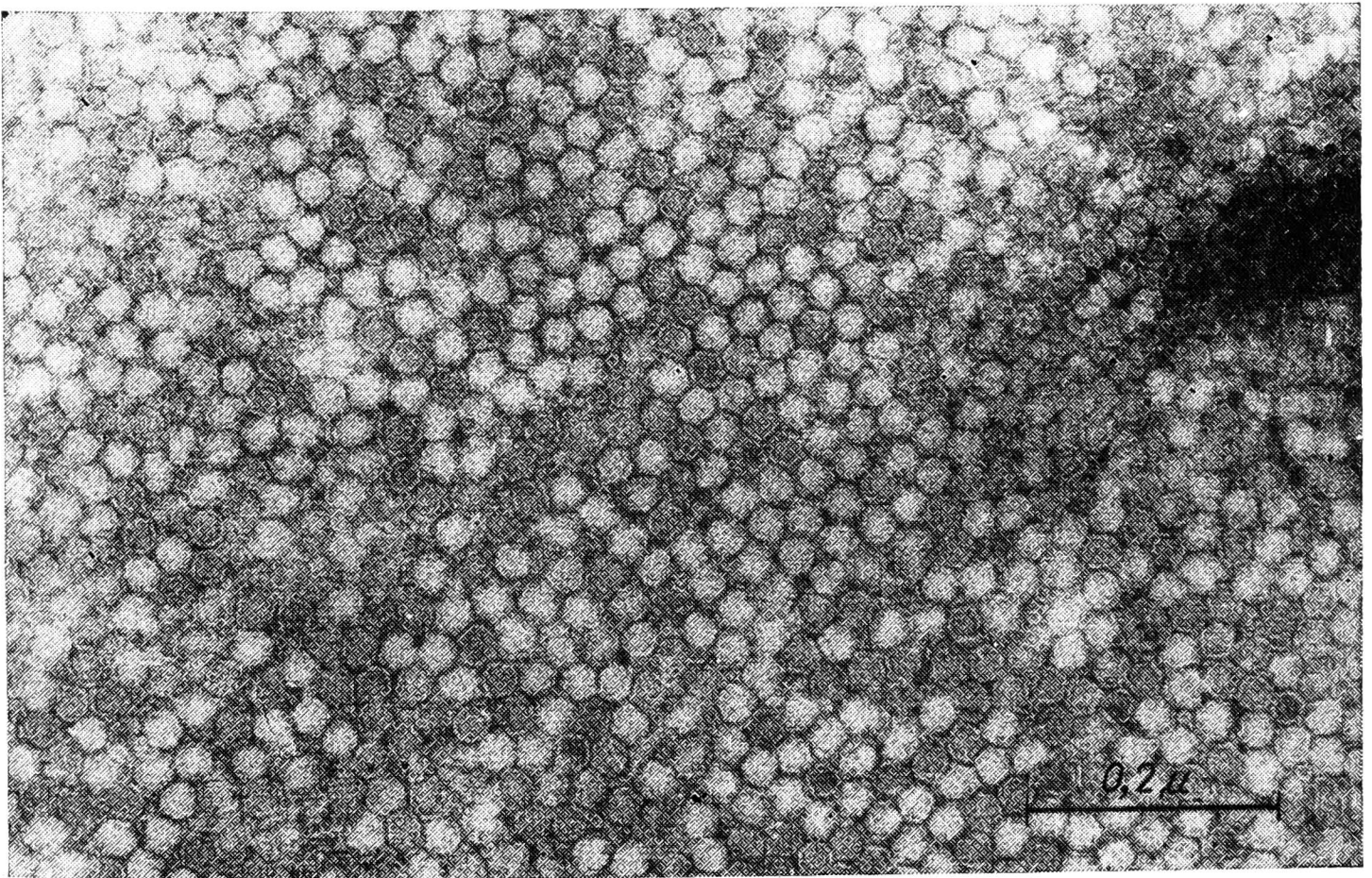
Chcąc poznać współczynnik sedymentacji WMO i ustosunkować się do innych wyników badań, a zarazem prześledzić wpływ różnych czynników na wynik analizy, zebrano i przeanalizowano współczynniki sedymentacji z różnych doświadczeń. Jednorazowo wykonano pełną analizę sedymentacyjną wirusa mozaiki ogórka (szczep grochowy). Wirusa oczyszczono z roślin grochu metodą opracowaną wg Varma [7].

Homogenizowano 100 g liści grochu z 200 ml 0,2 M buforu fosforanowo-askorbinianowego (pH 7,0). Homogenat emulgowano w mikserze z 100 ml chloroformu przez 3 minuty, po odwirowaniu przy 4000 obr/min przez 5 min., fazę wodną wirowano przy 35 000 obr/min przez 90 min.

Osad rozpuszczono w 60 ml buforu stanowiącego mieszaninę w stosunku 4:1 0,01 M buforu fosforanowo-sodowego (pH 7,0) i 0,2 M buforu fosforanowo-askorbinianowego (pH 7,0). Po odwirowaniu przy 4000 obr/min przez 5 min. supernatant wirowano ponownie przy 35000 obr/min w ciągu 90 min. Osad rozpuszczano w 12 ml buforu mieszanego i odwirowano przy 4000 obr/min przez 5 minut. Po kolejnym ultrawirowaniu (35000 obr/min 90 min.) osad w zależności od jego ilości rozpuszczono w odpowiedniej ilości (1-5 ml) 0,005 M buforu boranowego o pH 7,0. Otrzymany po odwirowaniu na niskich obrotach roztwór traktowano jako

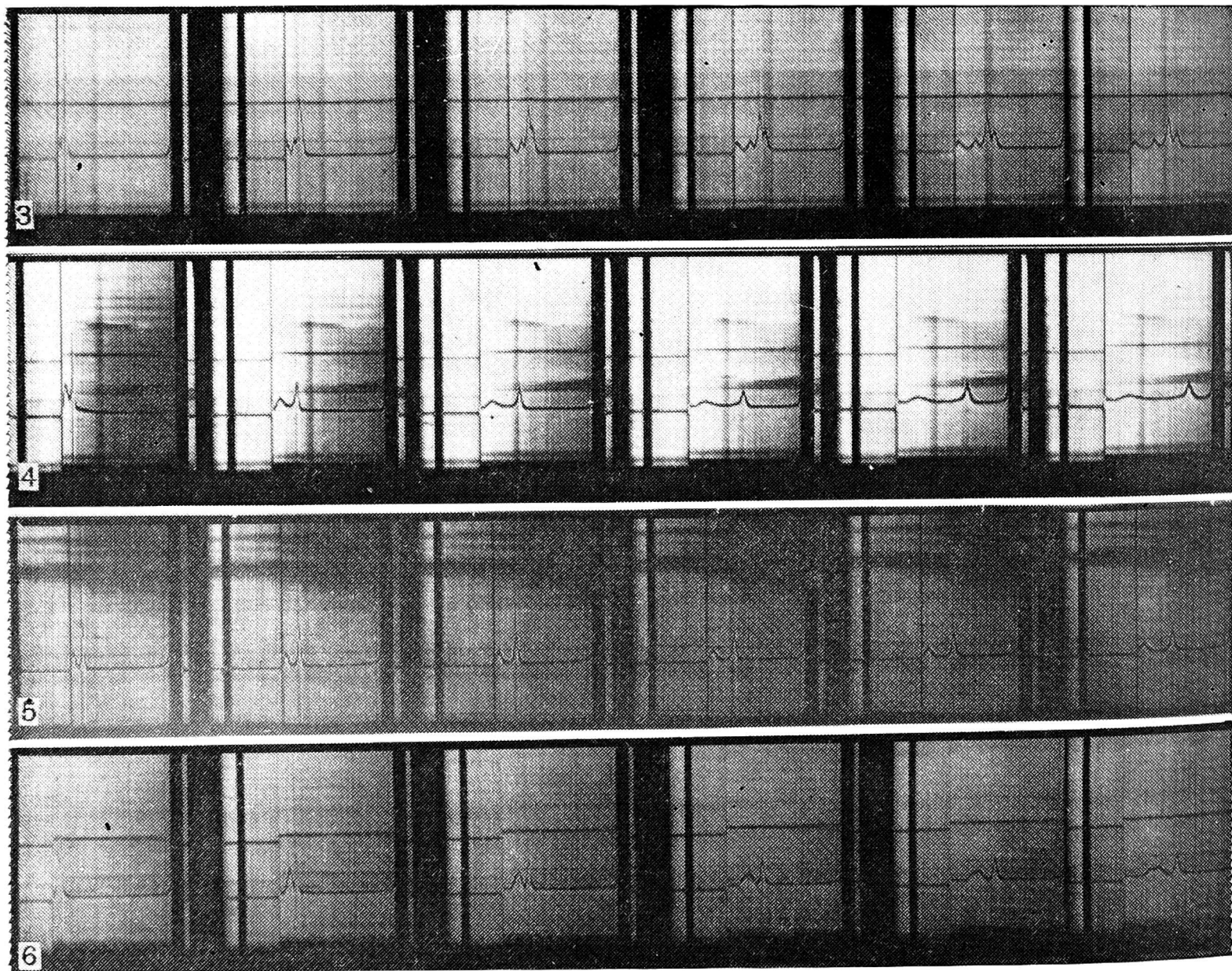


Ryc. 1. Analiza sedymentacyjna wirusa mozaiki ogórka (szczep grochowy); 17980 obr/min, kąt schlieren 70°, stężenie 5  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ , zdjęcia co 4 minuty, bufor boranowy 0,005M, pH 9,0



Ryc. 2. Wirus mozaiki ogórka — preparat jak na ryc. 1. Zdjęcie elektronomikroskopowe. Barwienie negatywowe 2% kwasem fosforo-wolframowym





Ryc. 3. Analiza sedymentacyjna wirusa mozaiki ogórka (szczep grochowy) oczyszczonego z grochu [7]; 20410 obr/min, kąt schlieren  $70^\circ$ , zdjęcia co 4 minuty, bufor boranowy 0,005M, pH 7,0

Ryc. 4. Analiza sedymentacyjna wirusa mozaiki ogórka (szczep grochowy) oczyszczonego z ogórka [4]; 25980 obr/min, kąt schlieren  $70^\circ$  i  $60^\circ$ , zdjęcia co 4 minuty, bufor fosforanowy 0,01M, pH 7,0

Ryc. 5. Analiza sedymentacyjna WMO (szczep selerowy) oczyszczonego z ogórka [6]. 24630 obr/min, kąt schlieren  $70^\circ$ , zdjęcia co 2 min, bufor boranowy 0,005M, pH 9,0

Ryc. 6. Analiza sedymentacyjna WMO (szczep selerowy) oczyszczonego z ogórka [4]. 27690 obr/min, kąt schlieren  $70^\circ$ , zdjęcia co 4 min, bufor boranowy 0,05M pH 7,5

wstępnie oczyszczony preparat wirusa. Ostateczne oczyszczenie wykonano przez wirowanie w gradiencie sacharozy.

Tak oczyszczony preparat WMO dializowano wobec wody i zliofilizowano. Sporządzono szereg roztworów o określonym stężeniu w zakresie od 1-24 mg/ml w buforach, w których wirowane były wstępnie oczyszczone preparaty wirusa. Były to bufony: 0,05 M fosforanowo-potasowy o pH 7,5; 0,005 M boranowy o pH 9,0; 0,005 M boranowy o pH 7,0 i 0,05 M boranowy o pH 7,5.

Analizę sedymentacyjną [1, 5] wirusa mozaiki ogórka wykonano przy użyciu ultrawirówki analitycznej firmy Beckman model E. Roztwór wirusa wirowano w rotorze analitycznym AnD (zawsze w temp. 20°C). Stosowano prędkości wirowania w zakresie 17980-33450 obr/min. Kąt schlieren dobierano odpowiednio do stężenia wirusa. Wykonywano każdorazowo po 6 zdjęć wykresu funkcji  $\frac{dn}{dr} = f(r)$  w 2 lub 4 minutowych odstępach czasu. W podobny sposób wykonano analizy współczynnika sedymentacji preparatów wstępnie oczyszczonych. W przypadku wirusa całkowicie oczyszczonego otrzymywano pojedynczy, symetryczny szczyt w układzie optycznym schlieren (ryc. 1-2). Bez doczyszczania w gradiencie gęstości, na kliszy widoczne były 2-4 szczyty z dominującym przeważnie szczytem wirusa (ryc. 3-6). Współczynnik sedymentacji obliczano każdorazowo metodą graficznego całkowania.

Stężenie wirusa w roztworze szacowano przez porównanie powierzchni szczytu uzyskanego przy tym samym kącie schlieren z powierzchnią szczytu o znanym stężeniu. Każdy wynik uzyskany w buforze przeliczano na warunki normalne wg wzoru:

$$S_{20,w} = (S_c)_{app} \frac{\eta_w}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_b}{\eta_w} \cdot \frac{1 - \bar{V}_{20} \cdot \rho_{20}}{1 - \bar{V} \cdot \rho_b}$$

gdzie:

$\frac{\eta_w}{\eta_{20,w}}$  — stosunek lepkości wody w temp. pomiaru  $t$  do lepkości w temp. 20°C (puaz),

$\frac{\eta_b}{\eta_w}$  — stosunek lepkości buforu, w którym przeprowadza się pomiary w temp.  $t$  do lepkości wody w tej samej temp. (puaz),

$\bar{V}$  — objętość właściwa substancji badanej w temp. pomiaru  $t$   $\left(\frac{\text{ml}}{\text{g}}\right)$

$\rho_{20}$  — gęstość wody w temp. 20°C  $\left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)$ ,

$\rho_b$  — gęstość buforu w temp. pomiaru  $t$   $\left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)$ .

Gęstość buforu mierzono piknometrycznie, a lepkość wiskozymetrem Ubbelohde'a.

Bufor	$\eta_b$	$\rho_b$
0,005 M boranowy pH = 9,0	1,0059	0,9984 $\frac{g}{ml}$
0,005 M boranowy pH = 7,0	1,0042	0,9983 $\frac{g}{ml}$
0,005 M boranowy pH = 7,5	1,0077	0,9997 $\frac{g}{ml}$
0,05 M fosforanowy pH = 7,5	1,0179	1,0047 $\frac{g}{ml}$

Molową objętość właściwą zmierzono tylko jednorazowo ze względu na trudność uzyskania dużej ilości roztworu wirusa o określonym, wystarczająco wysokim stężeniu. Pomiar piknometryczny 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu wirusa w wodzie wykazał jego gęstość równą 0,9985  $\frac{g}{ml}$ ,

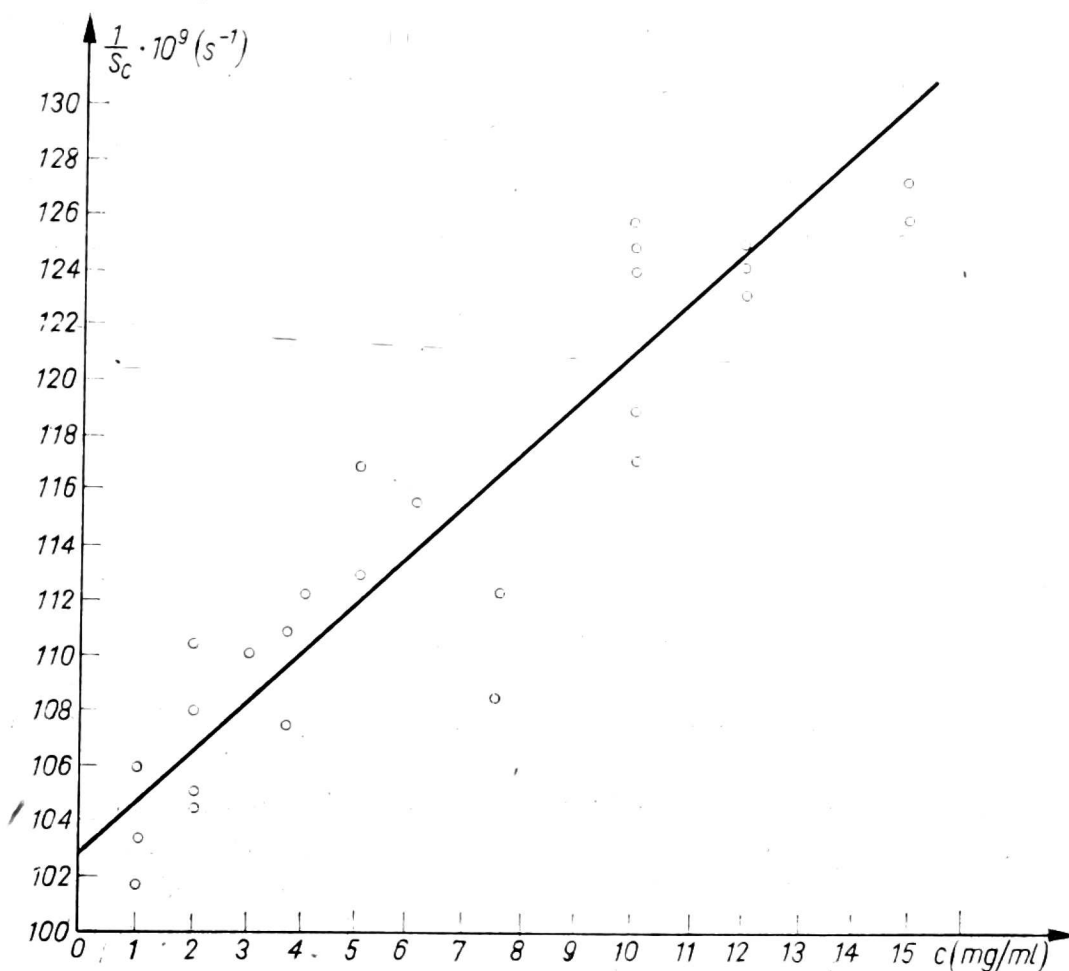
$$\text{stąd: } \bar{V}_2 = \frac{c_2 - (\rho_3 - \rho_1)}{\rho_1 \cdot c_2} \quad \begin{array}{l} c_2 \text{ — stężenie wirusa } \left(\frac{g}{ml}\right) \\ \rho_3 \text{ — gęstość roztworu } \left(\frac{g}{ml}\right) \\ \rho_1 \text{ — gęstość rozpuszcz. } \left(\frac{g}{ml}\right) \end{array}$$

$$\bar{V}_2 = \frac{0,001 - (0,9985 - 0,9982)}{0,001 \cdot 0,9982}$$

$$\bar{V}_2 = 0,67 \frac{ml}{g}$$

Molowa objętość właściwa tego wirusa wyliczona z jego składu wyniosła 0,71 ml/g. Przyjęto zawartość RNA w wirusie 18<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, molową objętość właściwą RNA — 0,55 ml/g i molową objętość właściwą białka wirusowego 0,74 ml/g. Do dalszych obliczeń przyjmowano  $\bar{V}$  wirusa = 0,71, gdyż wynik obliczony z pomiarów piknometrycznych z pewnością obarczony był dużym błędem i zbyt odbiegał od wartości podawanych w literaturze dla molowej objętości właściwej tego wirusa.

Chcąc określić wpływ buforu na wynik współczynnika sedymentacji, znaleźć ewentualne różnice współczynnika sedymentacji badanych szczepów wirusa, a zarazem ekstrapolować uzyskane wyniki na nieskończenie wielkie rozcieńczenie, wszystkie uzyskane z różnych doświadczeń wyniki współczynnika sedymentacji, przeliczone na warunki normalne, naniesiono na wykres zależności odwrotności współczynnika sedymentacji od stężenia (ryc. 7).



Ryc. 7. Ekstrapolacja współczynnika sedymentacji WMO na nieskończenie wielkie rozcieńczenie

Do celów ekstrapolacji na nieskończenie wielkie rozcieńczenie stosowano zależność:

$$\frac{1}{S_c} = \frac{1}{S_0} \cdot (1 + k_s c); \quad c \text{ — stężenie wirusa } \left( \frac{g}{ml} \right).$$

Współczynnik sedymentacji ekstrapolowany na stężenie  $c = 0$  wyniósł 97,15 S. Nie udowodniono istotnych różnic współczynnika sedymentacji dla badanych szczepów wirusa. Nie zaobserwowano także istotnego wpływu różnych buforów na wynik. Rozrzut wyników widoczny na rysunku 7 jest duży, większy niż na to wskazywałby błąd metody. Przypuszcza się, że powodem tego może być z jednej strony wpływ zanieczyszczeń w przypadku wirowania preparatów nie w pełni oczyszczonych, a z drugiej niedokładne, szacunkowo jedynie określone stężenie wirusa w roztworze. Wystarczające oczyszczenie WMO jest trudne ze względu na jego nietrwałość w roztworze, a praktycznie niemożliwe w przypadku małego stężenia wirusa w roślinie. Dokładne określenie stężenia wirusa w roztworze jest z kolei możliwe jedynie dla bardzo czystych preparatów.

Dla większości preparatów WMO poddanych analizie sedymentacyjnej najdokładniejszą metodą określenia stężenia okazało się porównanie po-



wierzchni pików ze zdjęć z ultrawirówki z powierzchnią uzyskaną dla preparatów o znanym stężeniu. Takie określenie stężenia jest jednak mało dokładne jeśli chce się uzyskać pewne wyniki współczynnika sedymentacji w warunkach normalnych. Nie mogąc z jakichś względów poddać analizie sedymentacyjnej serii kilku rozcieńczeń zupełnie czystego preparatu o ściśle określonym stężeniu, jedynym sposobem uzyskania możliwie prawdziwego wyniku współczynnika sedymentacji jest wykonanie dużej liczby analiz dla uzyskania wyniku średniego. Odnosi się to również do próby znalezienia różnic w współczynnikach sedymentacji różnych wirusów czy szczepów jakiegoś wirusa.

#### LITERATURA

1. Elias H.: „Ultrazentrifugen — Methoden”, Beckman Instruments GmbH, München, 1969.
2. Francki R. I. B., Randles J. W., Chambers T. C., Wilson S. B.: Some Properties of Purified Cucumber Mosaic Virus (Q Strain). *Virology* 1966, t. 28, 729-741.
3. Kaper J. M., Diener T. O., Scott H. A.: Some Physical and Chemical Properties of Cucumber Mosaic Virus (Strain Y) and of Its Isolated Ribonucleic Acid, *Virology* 1965, t. 27, 54-72.
4. Maat D. Z.: „Purification of Plant Viruses”, Inst. Phytopath. Res., Wageningen, 1965 (skrypt).
5. Miciński B., Kaniewski W., Dunajska L.: Praktyczne wskazówki do oznaczania współczynnika sedymentacji wirusów na przykładzie wirusa mozaiki tytoniu. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 1966, z. 174, 39-48.
6. van Regenmortel M. H. V.: Purification of Plant Viruses by Zone Electrophoresis. *Virology* 1964, t. 23, 495-502.
7. Varma A.: Red Clover Vein Mosaic Virus, C.M.I./A.A.B. *Descriptions of Plant Viruses* 1970, nr 22.

*Войцех Каневски*

#### СЕДИМЕНТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ОГУРЕЧНОЙ МОЗАИКИ

##### Резюме

На примере седиментационного анализа вируса огуречной мозаики представлены проблемы, связанные с определением коэффициента седиментации нестойких шарообразных вирусов, для которых затруднительно получение совершенно чистых препаратов высокой, точно определенной концентрации. Детально описан примененный ход определения. Обсуждены полученные результаты на фоне данных из литературы. Предпринимались попытки выяснения причины относительно большего разброса результатов коэффициента седиментации в проводимых у себя опытах, а также результатов, цитированных разными авторами в литературе.



*Wojciech Kaniewski*

SEDIMENTATION ANALYSIS OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS

S u m m a r y

Using as an example the sedimentation analysis of cucumber mosaic virus, discussion was made of the problems concerning the determination of the sedimentation coefficient of unstable spherical viruses, whose completely pure preparations of a high and closely defined concentration are difficult to obtain. The procedure applied was described in detail. Results were discussed in the light of the data from the literature. Attempts were made to explain the relatively wide dispersion range of the values of the sedimentation coefficient, as obtained in the present study or reported by other authors.

*Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 20 12 76*