

OCZYSZCZANIE WIRUSA X ZIEMNIAKA PRZY POMOCY SĄCZENIA MOLEKULARNEGO NA KOLUMNIE Z SEPHAROSE 2B

Lech Skrzeczkowski

Instytut Ziemniaka, Młochów

W ostatnich latach powszechnie używa się metody sączenia molekularnego do izolowania i frakcjonowania materiałów biologicznych. Jako wypełniacze do kolumn chromatograficznych stosowane są najczęściej modyfikowane żele dekstranowe (Sephadex'y) lub specjalnie preparowane żele poliakryloamidowe (Biożele ser. P) oraz agarozowe (Biożele ser. A, Sepharose 2B, 4B, 6B).

Sączenie przez żele znalazło między innymi zastosowanie do wydzielania i oczyszczania wirusów roślinnych. Szereg interesujących badań nad zastosowaniem żelu agarowego do oczyszczania wirusów przeprowadzili Steree i Ackers [1, 14]. Stosując kolumny wypełnione granulowanym żelem agarowym, autorzy ci oczyścili wirus mozaiki tytoniu (TMV) oraz wirus południowej mozaiki fasoli (SBMV). Nieco później Steree [15] wykazał, że stosując kolumny ze zmiennym stężeniem żelu agarowego można posegregować cząsteczki TMV na kilka klas odpowiadających ich długości. Posługując się powyższą metodą Steree oczyścił również wirus X ziemniaka [16]. Ostatnio Rich i wsp. [12] stwierdzili przydatność sączenia przez kolumnę z żelem agarowym do końcowego etapu oczyszczania wirusa mozaiki aukuba. Żele typu Sephadex stosowane są rzadko do sączenia wirusów roślinnych [11] głównie ze względu na ograniczone możliwości rozdziału dużych makrocząsteczek. Częściej stosuje się je do zatężania lub odsalania preparatów wirusowych.

Modyfikowane żele agarowe (Sepharose 2B, 4B, 6B) nie były dotychczas stosowane na szerszą skalę w wirusologii roślinnej. Do ciekawszych prac można zaliczyć oczyszczenie satelita wirusa nekrozy tytoniu przez Fridborga i wsp. [7] przy pomocy kolumny z Sepharose 4B. Haman [8] wykorzystał sączenie molekularne do przygotowania preparatów wirusów X i S ziemniaka do mikroskopii elektronowej. Stwierdził, że sączenie przez Sepharose 4B było efektywniejsze od sączenia przez żel agarowy. Häni [13] na przykładzie wirusa mozaiki ogórka wykazał sze-

reg takich zalet sączenia przez Sepharose jak wysoką infekcyjność preparatów, małą ilość zanieczyszczeń oraz niski stopień agregacji wirusa.

W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie sączenia na kolumnie z Sepharose 2B jako jednego z etapów przy oczyszczaniu wirusa X ziemniaka.

MATERIAŁ I METODY

Do badań stosowano zwykły szczep wirusa X (pochodzący z kolekcji Instytutu Ziemniaka w Młochowie) prowadzony na *Datura stramonium*. Szczepem tym inokulowano młode siewki tytoniu odm. Samsun w fazie sześciu liści. Po 10-14 dniach od momentu inokulacji rośliny podległe systemicznej infekcji stanowiły materiał do oczyszczania wirusa.

Przebieg preparatyki: całe rośliny zamrażano w temp. -20°C , a następnie rozmrażano i homogenizowano w mikserze z 150 ml 0,1 M cytrynianu sodowego pH 7,4, zawierającego 0,01 M cysteiny. Homogenat przeciskano przez podwójną warstwę gazy i wirowano 15 min 5000 xg. Do uzyskanego supernatantu dodawano nasycony roztwór siarczanu amonowego do 10% nasycenia i po 2 godz. wirowano 15 min 5000 xg. Osad odrzucano, a do supernatantu dodawano ponownie siarczan amonowy do 33% nasycenia i pozostawiano na noc w chłodni. Wytrącony osad zawierający wirus X zbierano przez wirowanie 15 min 5000 xg, zawieszano za pomocą homogenizatora Pottera w 20 ml 0,01 M cytrynianu sodowego pH 7,4 i dializowano przez 4-5 godz. wobec ok. 200-krotnej objętości takiego roztworu. Po zakończeniu dializy i usunięciu nierozpuszczalnych domieszek przez wirowanie (15 min 5000 xg) ok. 5 ml opalizującego roztworu używano do rozdzielania na kolumnie wypełnionej Sepharose 2B (Farmacia Uppsala). Stosowano kolumnę o wymiarach $2,5 \times 38$ cm zrównoważoną 0,01 M cytrynianem sodowym pH 7,4. Elucję prowadzono cytrynianem j.w. z szybkością około 0,4 ml/min zbierając frakcje o objętości 4 ml przy pomocy kolektora frakcji f-my Unipan. W poszczególnych frakcjach wyznaczano wartość absorpcji przy 260 m μ oraz sprawdzono obecność wirusa metodami: serologiczną i biologiczną. Frakcje odpowiadające szczytowi wirusowemu łączono, dializowano wobec wody dejonizowanej i po liofilizacji rechromatografowano jak wyżej.

Infekcyjność określano liczbą nekroz powstałych po zakażeniu odciętych liści *Gomphrena globosa* oraz stosunkiem liczbowym roślin tytoniu porażonych do inokulowanych. Aktywność serologiczną badano metodą mikroprecypitacji kropłowej z surowicą specyficzną dla wirusa X.

Pomiary wartości absorpcji wyznaczano w 0,01 M cytrynianie sodowym pH 7,4 na spektrofotometrze VSU-2P Zeiss Jena w 1 cm kuwetach. Zawartość wirusa w preparacie końcowym obliczano w oparciu o znaną z literatury [4] wartość absorpcji posługując się zależnością:

$$c = \frac{E_p \cdot 1 \text{ mg}}{2,9} \cdot V_p$$

gdzie: c — stężenie wirusa w próbie w mg,

V_p — objętość próby w ml,

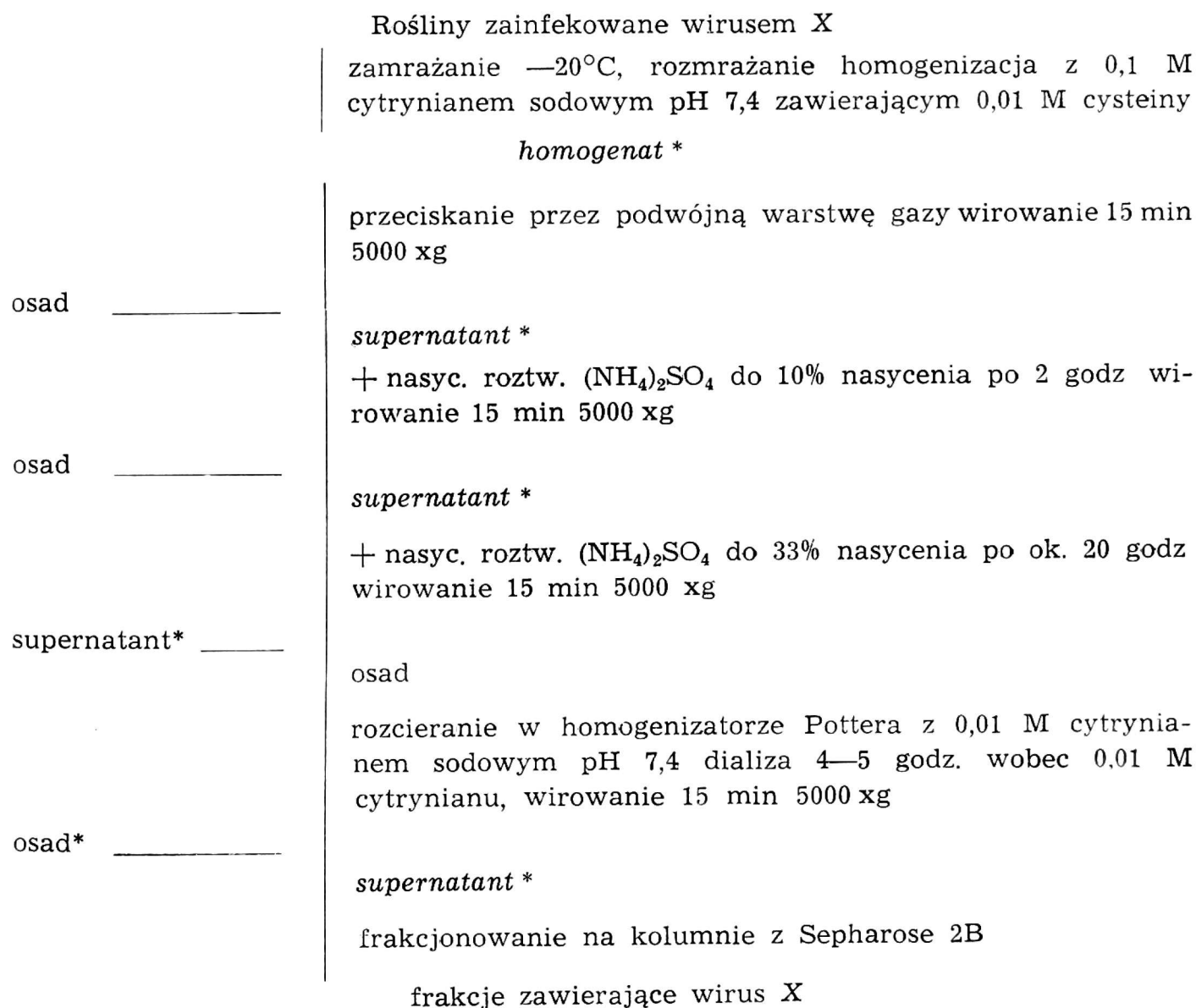
E_p — ekstynkcja próby przy 260 m μ dla 1 cm warstwy,

2,9 — ekstynkcja odpowiadająca 1 mg wirusa X/ml 0,01 M buforu fosforanowego pH 7,0.

Wszystkie operacje prowadzono w temperaturze ok. 3°C.

WYNIKI I DYSKUSJA

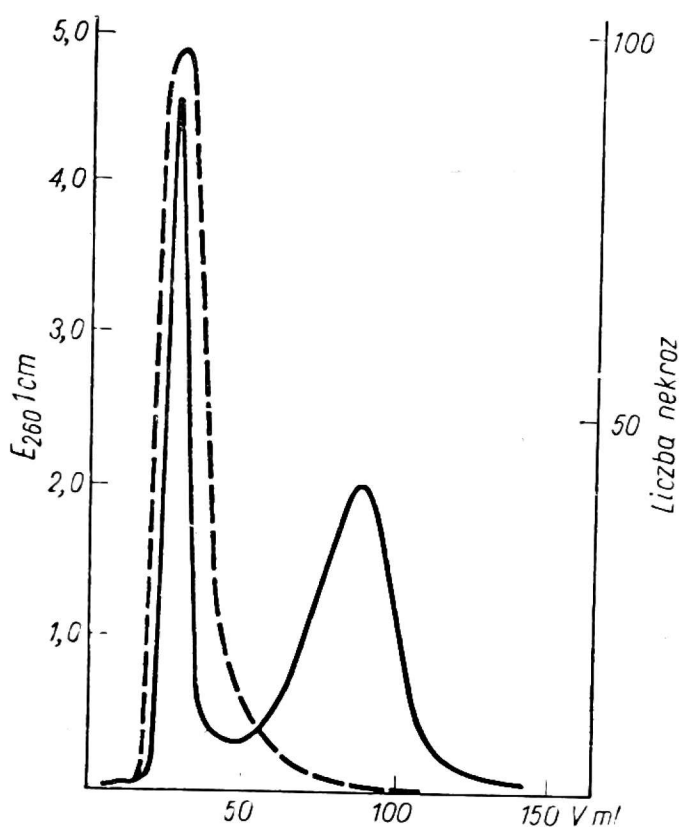
Początkowe etapy preparatyki wirusa X nie odbiegały od ogólnie stosowanych zasad podawanych w literaturze [5, 9, 10, 17]. Stosowane natomiast w dalszym oczyszczaniu ultrawirowanie różnicowe zastąpiono z powodzeniem sączeniem molekularnym na kolumnie z Sepharose 2B.



Rys. 1. Schemat preparatyki wirusa X ziemniaka. * — miejsca, w których pobierano próby do oznaczania aktywności serologicznej i infekcyjności wirusa, kursywą oznaczono etapy, na których stwierdzono wysoki poziom obydwu aktywności

Na rys. 2 przedstawiono typowy obraz rozdziału mieszaniny zawierającej wirus X i inne elementy niewirusowe na kolumnie z Sepharose 2B. Wirus oddziela się w trakcie elucji od pozostałych zanieczyszczeń opuszczając kolumnę począwszy od objętości $V_0 = 25$ ml w postaci symetrycznego szczytu. Drugi wyraźnie oddzielający się szczyt stanowią zanieczyszczenia. Można zaobserwować, że infekcyjność związana jest głównie z pierwszym szczytem elucyjnym.

Tabela 1 przedstawia rozkład aktywności serologicznej w poszczególnych frakcjach wypływających z kolumny. Najwyższa aktywność serologiczna odpowiada najbardziej infekcyjnym frakcjom szczytu elucyjnego (rys. 2).



Rys. 2. Rozdział wirusa X ziemniaka na kolumnie z Sepharose 2B. Wymiary kolumny $2,5 \times 38$ cm. Elucja 0,01 M cytrynianem sodowym pH 7,4. Linia ciągłą zaznaczono absorpcję przy 260 m μ , linią przerywaną infekcyjność jako liczbę nekroz na liściach *Gomphrena globosa*

Tabela 1

Aktywność serologiczna poszczególnych frakcji z surowicą anty wirus X po sączeniu przez kolumnę Sepharose 2B

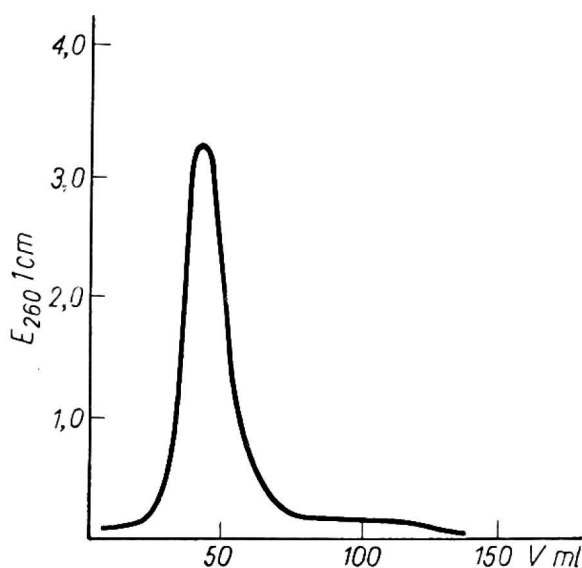
Nr frakcji	Aktywność serologiczna	Nr frakcji	Aktywność serologiczna
1	—	11	++
2	—	12	+
3	—	13	+
4	—	14	+
5	—	15	+
6	—	16	+
7	+	17	+
8	+++	18	+
9	+++	19	±
10	+++	20-40	—

— brak reakcji, ± reakcja bardzo słaba, + słaba, ++ silna, +++ bardzo silna.

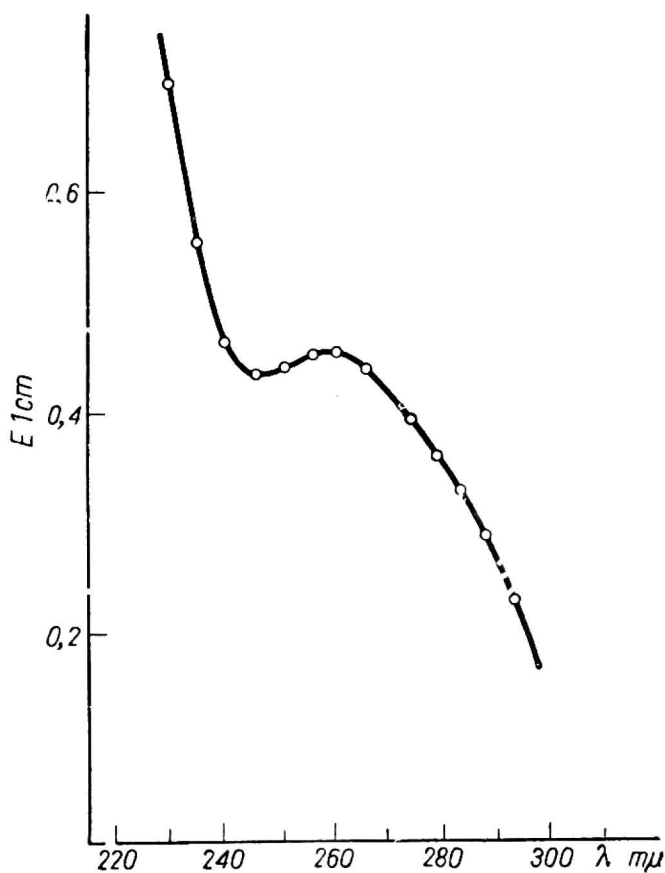
Stwierdzona w dalszych frakcjach niska aktywność serologiczna bez jednoczesnej infekcyjności może wskazywać na obecność infekcyjnych fragmentów wirusa czynnych serologicznie.

Celem sprawdzenia efektywności jednorazowego sączenia przez kolumnę przeprowadzono rechromatografię szczytowych frakcji zawierających wirus X. Rysunek 3 przedstawia wynik rozdziału rechromatograficznego. Widoczny pojedynczy szczyt elucyjny wskazuje na dobre oddzielenie się wirusa od pozostałych składników już w trakcie pierwszego frakcjonowania.

Przybliżona wydajność preparatyki, obliczona na podstawie pomiaru absorpcji przy 260 m μ , wyniosła ok. 343 μ g/g infekcyjnej tkanki tytoniu i mieści się w granicach wydajności podawanej dla wirusa X w literaturze [2, 10].



Rys. 3. Rechromatografia połączonych frakcji szczytu wirusowego. Warunki rozdzielania jak na rys. 2



Rys. 4. Krzywa absorpcji w UV wirusa X oczyszczonego przez sączenie molekularne na Sepharose 2B

Oczyszczony preparat wirusowy (połączone frakcje 8-11) wykazywały charakterystyczną krzywą absorpcji w UV o maksimum przy 260 m μ i minimum przy 245 m μ (rys. 4). Stosunek wartości absorpcji E_{280}/E_{260} wynosi 0,84. Może to wskazywać na zawartość RNA rzędu 6% [6]. Trzeba podkreślić, że jest to wartość orientacyjna, ponieważ nie badano szczegółowo czystości wyodrębnionego wirusa.

Można sądzić na podstawie przedstawionych wyników, że sączenie molekularne przez Sepharose 28 jest dobrą metodą izolowania infekcyjnego wirusa X ziemniaka. Opisana metodyka jest prosta i mało kosztowna. Z pewnością może ona znaleźć zastosowanie przy oczyszczaniu innych wirusów roślinnych.

LITERATURA

1. Ackers G. K., Steree R. L.: Restricted diffusion of macromolecules through agar gel membranes. *Biochem. biophys. Acta*, 1962, t. 59, s. 137.
2. Bawden F. C.: *Plant viruses and virus diseases*, New York 1964, s. 391.
3. Brakke M. K.: *Iscotables*, Inst. Spec. Co. Linc. Nebraska 1967.
4. Brakke M. K.: *Methods in Virology* (Maramorosch K., Koprowski H.) New York 1967, s. 119-135.
5. Chico A. W., Guthrie M.: Changes in potato particle length following purification by differential centrifugation. *Phytopathology* 1969, t. 59, Ann. Abstr., s. 1021.
6. Dawson R., Elliot D., Jones K.: *Data for biochemical research*, Oxford Univ. Press 1969, s. 626.
7. Fridborg K., Hjerten S., Höglund A.: Purification, electron microscopy and X-ray diffraction studies of the satellite tobacco necrosis virus. *Proc. natn. Acad. Sci. US* 1965, t. 54, z. 2, s. 513-521.
8. Haman V., Pett I.: Contribution to the serial preparation of rodshaped plant virus specimens for electron-microscopical diagnosis. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1971, z. 111, s. 59-63.
9. Maat D. Z.: Purification of plant viruses. *Phytopath. Res. Wageningen* 1965, s. 2-5.
10. Matthews R. E.: *Plant Virology*, New York 1970, s. 35-56.
11. Munro J.: Use of molecular gel column to prepare potato X virus inocula for antisera. *Am. Potato J.* 1967, t. 44, z. 7, s. 249-254.
12. Pei Show Juo, Rich A.: Purification of potato aucuba mosaic virus. *Phytopathology* 1969, t. 59, z. 11, s. 1816-1819.
13. Pelet F., Häni A.: Dosage of cucumber mosaic virus by means of spectrophotometry, serology and infectivity. *Schweiz. landw. Forsch.* 1971, t. 10, z. 1, s. 94-110.
14. Steree R. L., Ackers G. K.: Purification and separation of tobacco mosaic virus and southern bean mosaic virus by agar gel filtration. *Nature* 1962, t. 192, z. 4823, s. 114-116.
15. Steree R. L.: Tobacco mosaic virus: purifying and sorting associated particles according to length. *Science* 1964, t. 140, s. 1089-1090.
16. Steree R. L.: Potato X virus purification with agar gel columns. *Phytopathology* 1964, t. 54, z. 7, s. 748.
17. Steree R. L.: *Plant Virology* (Corbett M., Sisler H., Univ. of Florida 1967, s. 211-234.

Autor składa podziękowania Doc. dr K. Toczko za cenne wskazówki udzielane w czasie prowadzenia badań, jak również T. Młotkowi za wydatną pomoc techniczną.

Lech Skrzeczkowski

ОЧИСТКА X ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО
ФИЛЬТРОВАНИЯ НА КОЛОНКЕ С СЕФАРОЗЕ 2Б

Резюме

В работе представлено применение молекулярного фильтрования для очищения X вируса картофеля. Вирус изолировано из растений табака сорта Самсун путем высаливания сульфамой аммония и фракционированием на колонне наполненной Сефарозе 2Б. Метод оказался пригодным и в некоторых случаях может заменять ультрасентри-футирование. Получено около 345 мкг инфекционного вируса из 1 г ткани табака.

Lech Skrzeczkowski

POTATO VIRUS X PURIFICATION BY GEL FILTRATION ON A SEPHAROSE
2B COLUMN

Summary

The application of gel filtration to potato virus X purification is described. The virus was isolated from tobacco plants of the Samsun variety by salting out with ammonium sulphate and fractionation on a Sepharose 2B column. The method proved useful, and may in some instances be applied instead of ultracentrifugation. About 345 μ g of infective virus were obtained from 1 g of tobacco plant tissue.