

## PORÓWNANIE DWÓCH METOD OCZYSZCZANIA WIRUSA X ZIEMNIAKA

*Lech J. Skrzeczkowski, Tadeusz Młotek*

Instytut Ziemniaka, Młochów

### WSTĘP

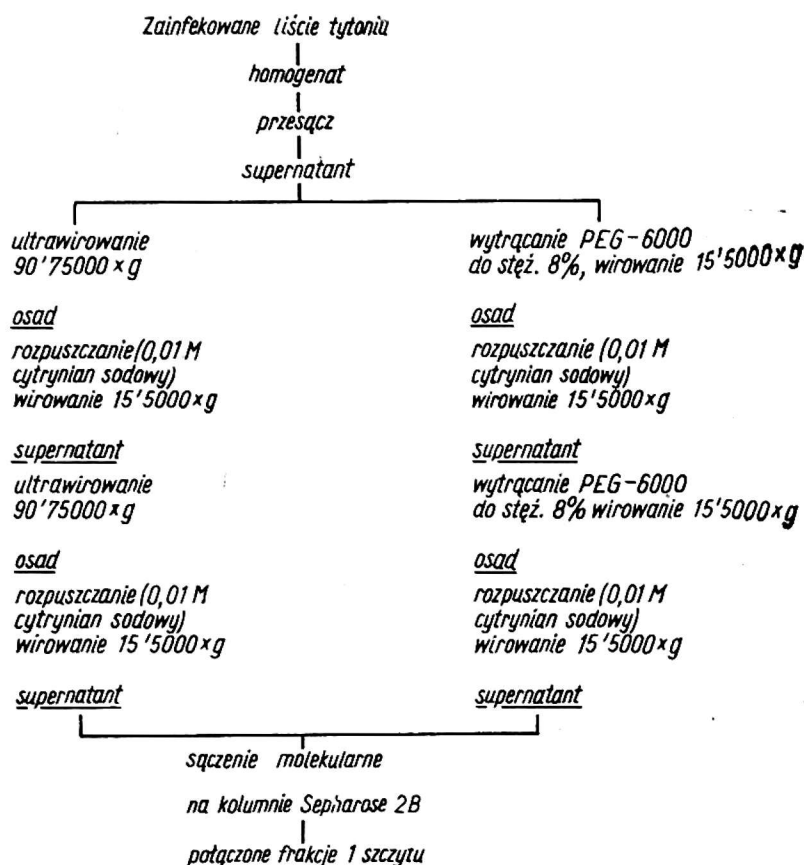
Wirus X ziemniaka (PVX) został oczyszczony po raz pierwszy stosunkowo dawno. Istnieją jednak nadal trudności związane z wydzielaniem niezagregowanych cząsteczek pozbawionych całkowicie zanieczyszczeń. Głównymi zjawiskami utrudniającymi oczyszczanie jest tworzenie niciowatych i sieciowatych struktur pod wpływem roztworów soli [10, 20], tendencja do tworzenia żeli [16] oraz częściowa degradacja podjednostek białkowych zachodząca już na etapie homogenatu [12].

Dotychczas opisano wiele metod oczyszczania [4, 5, 20, 22] eliminujących w różnym stopniu wyżej wymienione zjawiska. Większość tych metod jest jednak pracochłonna i wymaga stosowania wirowania różnicowego lub wirowania w gradiencie gęstości.

Poprzednio [23] opisano uproszczoną metodę oczyszczania PVX, w której zastosowano sączenie molekularne na Sepharose 2B [6, 8, 21]. W niniejszej pracy przedstawiono dalsze udoskonalenie powyższej metody, w której wysalanie zastąpiono wytrącaniem przez glikol polietylenowy [1, 7, 22]. Zbadano ponadto efektywność nowo opracowanej metody porównując ją z oczyszczaniem przez klasyczne wirowanie różnicowe [4, 5, 11, 15].

### MATERIAŁ I METODY

Do badań używano nekrotyczny izolat PVX, wyizolowany z odmiany Bintje. Wirus namnażano w roślinach tytoniu odmiany Samsun, w doniczkach o  $\phi$  10 cm wypełnionych dezynfekowaną ziemią kompostową. Inokulowano młode siewki tytoniu w fazie 6 liści. Po 14-16 dniach od momentu inokulacji, rośliny z wyraźnymi objawami systemicznego porażenia stanowiły materiał do dalszych badań.



Rys. 1. Schemat oczyszczania PVX dwiema metodami

W celu oczyszczenia wirusa (rys. 1) całe rośliny (bez korzeni) zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , następnie rozmrażano i homogenizowano dwukrotnie w mikserze z 0,1 M cytrynianem sodowym zawierającym 0,01 M cysteiny-HCl (pH 7,5). Homogenat przeciskano przez podwójną warstwę gazy i wirowano 15 min.  $5000 \times g$ . Supernatant zawierający wirus oczyszczano dalej dwiema metodami.

Pierwsza metoda polegała na wytrącaniu glikolem polietylenowym m.c.z. 6000/PEG — do połowy supernatantu dodawano NaCl do stężenia 0,25 M oraz glikol polietylenowy do stężenia 8% i mieszano na mieszadłe magnetycznym przez około 2 godziny. Wytrącony osad odwirowywano 15 min.  $5000 \times g$ , zawieszano za pomocą homogenizatora Pottera w 0,01 M cytrynianie sodowym (pH 7,5) pozostawiano przez 3-4 godziny a następnie wirowano 15 min.  $5000 \times g$ . Osad zawieszano ponownie w dodatkowej porcji 0,01 M cytrynianu i odwirowywano. Połączone supernatanty wytrącano po raz drugi glikolem i odzyskiwano wirus z osadów w sposób opisany. Połączone supernatanty stanowiły częściowo oczyszczoną zawiesinę wirusa, używaną do sączenia molekularnego.

Druga metoda polegała na wirowaniu różnicowym (WR). Drugą część supernatantu ultrawirowano 90 min.  $75000 \times g$  (VAC-601, rotor  $8 \times 35$  ml). Osad zawieszano w 0,01 M cytrynianie sodowym (pH 7,5) i odstawiano na około 18 godzin. Następnie zawiesinę odwirowywano 15 min.  $5000 \times g$ , osad ekstrahowano dodatkową porcją 0,01 M cytrynianu i ponownie wirowano. Supernatanty łączono, ultrawirowano 90 min.  $75000 \times g$  i oddzielony osad poddawano następnej ekstrakcji cytrynianem odwirowując nierozpuszczalne części (15 min.  $5000 \times g$ ). Połączone super-

natanty używano do dalszego oczyszczania przez sączenie molekularne.

Sączenie molekularne prowadzono podobnie jak opisano w poprzedniej pracy [23]. Połączone frakcje o najwyższej absorpcji z pierwszego szczytu elucyjnego (ok. 80%) przyjmowano za oczyszczony preparat wirusowy, który przechowywano w temp. 4°C.

Wirowanie w gradiencie rozpuszczalności glikolu polietylenowego przeprowadzono metodą Clarka i Listera [3] z niewielkimi modyfikacjami. Nawarstwiano ręcznie odwrotny gradient PEG-6000 (10, 8, 6, 4, 2, 0%) zawarty w normalnym rosnącym gradiencie sacharozy (od 5 do 35%) rozpuszczonym w 0,01 M cytrynianie sodowym (pH 7,5) zawierającym 0,15 M NaCl. Gradienty inkubowano w temperaturze 6°C przez 48 godz., następnie nakładano próbkę wirusową o objętości 1-2 ml wytrąconą 10% PEG i wirowano w temperaturze 13°C przez 30 min. 15 000 × g (VAC-601, rotor SW 3×35). Po zakończonym wirowaniu gradienty frakcjonowano, rejestrowano spektrofotometrycznie przy 260 nm i fotografowano.

RNA wydzielano wg zaleceń Munro i Flecka [18] i oznaczano spektrofotometrycznie przy 260 nm. Białko oznaczano metodą Lowry [14] a azot całkowity metodą Kjeldahla [13]. Wydajność wirusa obliczano na podstawie sumarycznej zawartości RNA i białka oraz ze znanej dla PVX wartości absorpcji:  $E_{260}$  1 mg/ml = 2,7 [2, 20]. Krzywą absorpcji w UV wyznaczano na spektrofotometrze Zeiss — VSU 2P.

Infekcyjność badano przez inokulację odciętych par liści *Gomphrena globosa* oraz poszczególnych liści na roślinach *Chenopodium amaranticolor* [19]. Testy serologiczne prowadzono metodą podwójnej dyfuzji w żelu agarozowym stosując dodatkowo barwienie linii precypitacyjnych błękitem Coommasie Brilliant Blue R 150 [24].

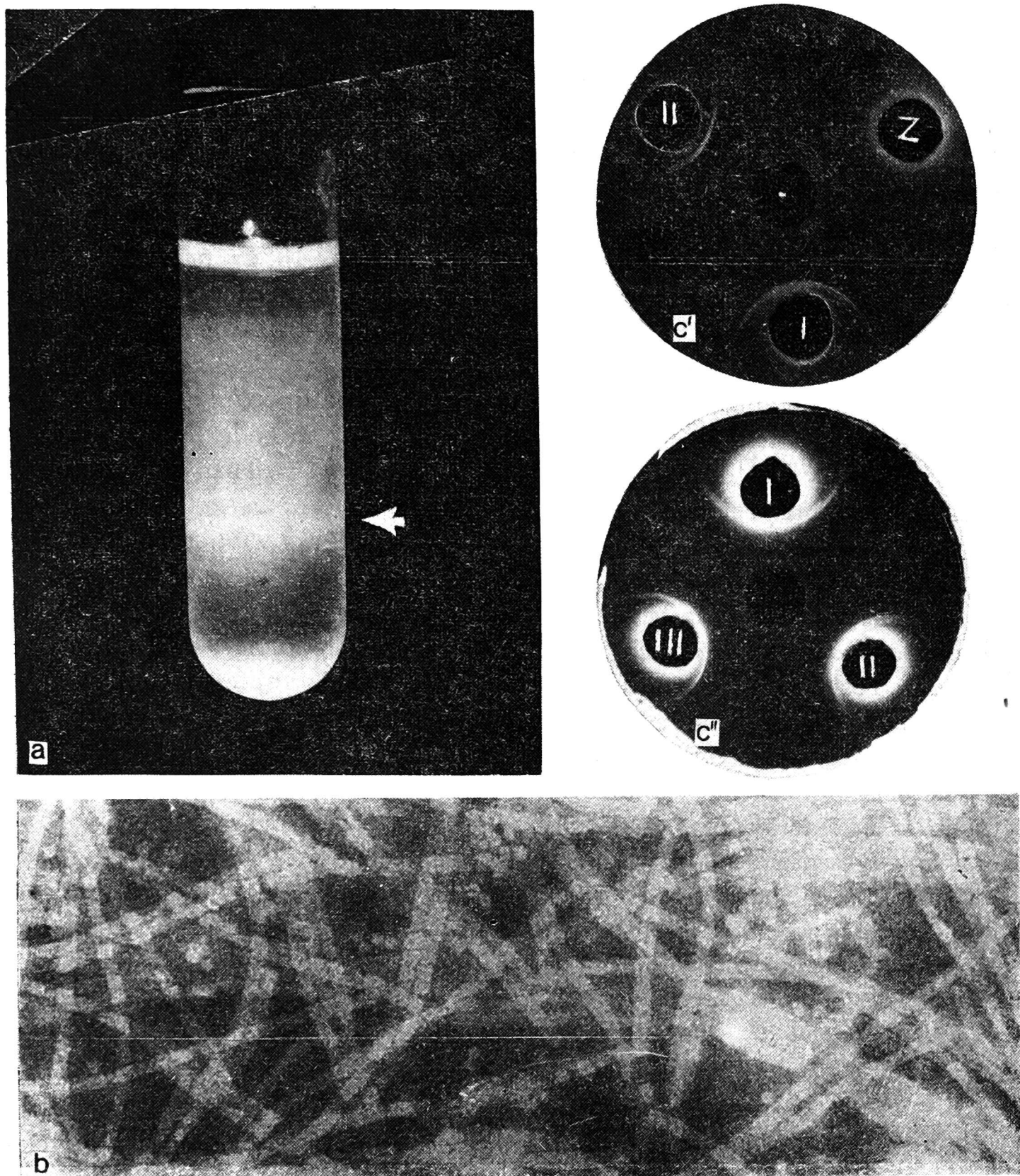
Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym Siemens-1. Preparaty do zdjęć barwiono negatywnie 1,5% roztworem kwasu fosforowolframowego. W pracy stosowano glikol polietylenowy firmy Koch-Light Ltd. Anglia, agarozę firmy BDH Chemicals Ltd., Sepharose 2B firmy Farmacia Uppsala oraz Coomassie Brilliant Blue firmy Serva. Pozostałe odczynniki wyprodukowane były przez POCh Gliwice.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Stosując metodę wirowania w gradiencie rozpuszczalności glikolu polietylenowego [3], opracowano najkorzystniejsze warunki do selektywnego wytrącania PVX glikolem. Wynik tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 2a. Widoczna na fotografii opalizująca strefa zawierająca wirus, tworzy się po 30 min. wirowania w gradiencie, w warstwie zawierającej 6% PEG i 15% sacharozy. Na tej podstawie ustalono, że 8-9% PEG stanowi wystarczające stężenie do wytrącenia wirusa z oczyszczono-



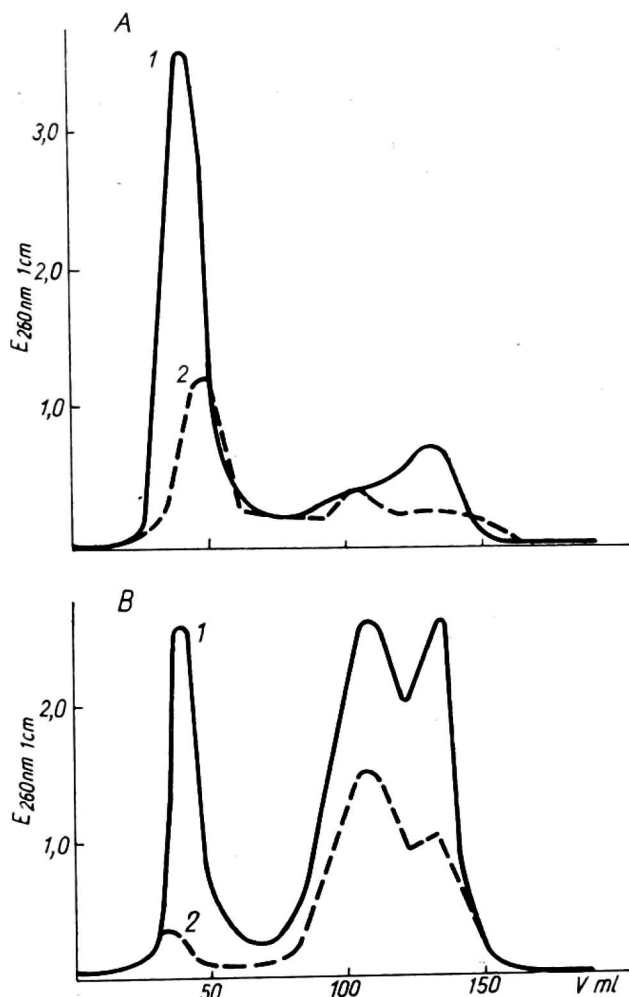
nego soku oraz pozwalające uniknąć niepotrzebnego nadmiaru PEG. Obliczone stężenie jest zbliżone do podawanego przez Herberta [7] dla TMV, niższe natomiast od stężenia stosowanego przez Albrechtową [1] dla PVX.



Rys. 2. a) gradient rozpuszczalności glikolu polietylenowego 10-0% PEG stabilizowany gradientem sacharozy od 5 do 35% w 0,01 M cytrynianie sodowym, pH 7,5, strzałka wskazuje pozycję rozpuszczalności PVX; b) zdjęcie PVX oczyszczonego metodą PEG w mikroskopie elektronowym, powiększenie 55 000×; c) reakcje serologiczne w żelu agarozowym, łuki precipitacyjne barwione Coomassie Brilliant Blue (negatyw); c') PVX oczyszczony metodą PEG; c'') sok z tytoniu zainfekowanego PVX; z) sok z rośliny zdrowej; I, II, III, kolejne rozcieńczenia (0, 1:2, 1:4)

Obydwie metody oczyszczania PVX (rys. 1) okazały się zadowalające i prowadziły do wydzielenia infekcyjnego wirusa. Preparaty, po dwóch cyklach wirowania różnicowego (WR), otrzymywano w postaci brunatno-żółtych roztworów o zawartości azotu 0,52 mg/ml, oraz wysokiej infekcyjności ocenianej zarówno na liściach *G. globosa* jak i *Ch. amaranticolor*. Oczyszczając przez dwukrotną precypitację PEG otrzymywano prawie bezbarwne roztwory o blisko czterokrotnie większej (1,95 mg/ml) zawartości azotu i infekcyjności podobnej (*G. globosa*) lub wyższej (*Ch. amaranticolor*). Obydwa roztwory wykazywały silną opalizację i podwójne załamanie w przepływie.

Podobnie jak w poprzedniej pracy [23] otrzymano charakterystyczne krzywe elucji, występujące w postaci dwóch wyraźnie oddzielających się szczytów, z których pierwszy odpowiada frakcjom zawierającym wirus, drugi natomiast zanieczyszczeniom o niższej masie cząsteczkowej (rys. 3).



Rys. 3. Rozdział częściowo oczyszczonego PVX na kolumnie Sepharose 2B i podobnie oczyszczonego materiału ze zdrowych roślin tytoniu (elucja 0,01 M cytrynianem sodowym, pH 7,5)  
A — metoda WR, B — metoda PEG, 1 — zainfekowane PVX, 2 — zdrowe

Szczyt wirusowy otrzymany metodą WR posiadał zawsze wyższą absorpcję od szczytu wirusowego PEG. Więcej zanieczyszczeń (drugi szczyt elucyjny) obserwowano w preparatach przygotowanych metodą PEG.

Oczyszczając w podobny sposób (rys. 1) sok ze zdrowych liści tyto-

niu, wykazano w nim (poprzez sączenie molekularne) obecność związków o masie cząsteczkowej zbliżonej do wirusa. Związków tych wydzielono więcej metodą WR.

Końcowe preparaty w postaci połączonych frakcji wykazywały różnice w zabarwieniu (PEG — bezbarwne, WR — żółtozielone), nie różniły się natomiast wyglądem w mikroskopie elektronowym, infekcyjnością i reakcją w testach dyfuzyjnych. Dla przykładu zamieszczono zdjęcie elektrono-mikroskopowe połączonych frakcji otrzymanych metodą PEG (rys. 2b), na którym widoczne są liczne wydłużone cząsteczki typowe dla PVX (frakcji nie rozcieńczano). Te same preparaty badane w testach dyfuzyjnych w żelu przedstawiono na rysunku 2c'. Można zaobserwować wyraźne linie precypitacyjne z homologiczną surowicą. Infekcyjny sok tytoniu w odróżnieniu od oczyszczonego wirusa, tworzył oprócz linii precypitacyjnych charakterystyczne strefy precypitacji wokół zbiorników (rys. 2c").

Tabela 1

Porównanie niektórych właściwości roztworów PVX oznaczanych na dwóch podstawowych etapach oczyszczania

Analizy	Etap	Metoda oczyszczania			
		PEG		WR	
Infekcyjność	I	48*	346**	47*	202**
	II	25	235	17	249
Azot (mg/ml)	I	1,95		0,52	
	II	0,25		0,31	
RNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	II	30		27	
Białko ( $\mu\text{g/ml}$ )	II	583		800	
RNA/białko (%)	II	95/5		97/3	

\* Średnia liczba nekroz na liściach *G. globosa*.

\*\* Średnia liczba nekroz na liściach *Ch. amaranticolor*.

I - Etap przed sączeniem molekularnym.

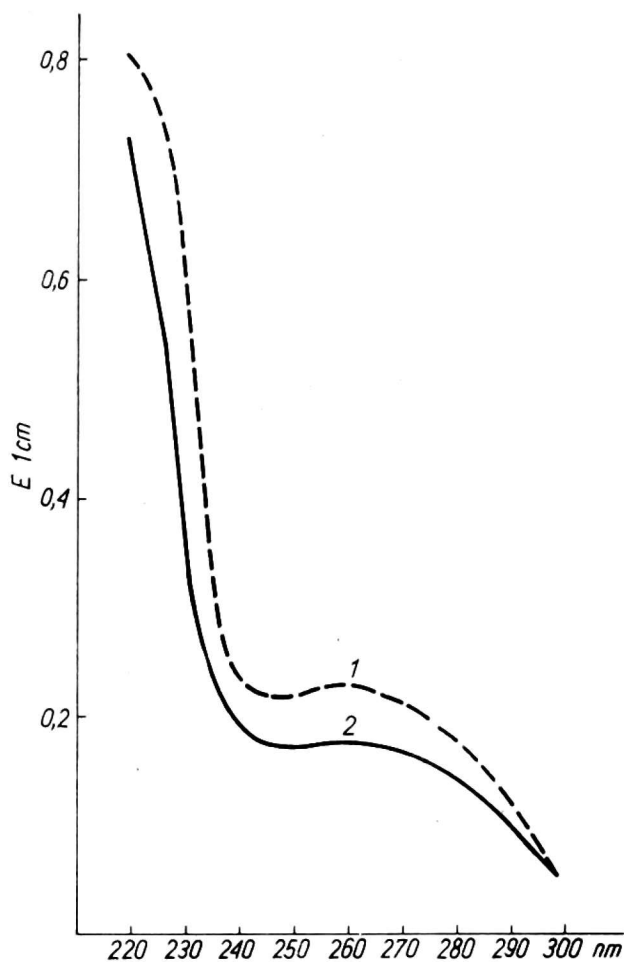
II - Połączone frakcje pierwszego szczytu elucyjnego.

Pełniejsze porównanie dwóch metod oczyszczania obrazują wyniki zbiorcze zamieszczone w tabeli 1. Rozpatrując infekcyjność obserwujemy dla obydwu metod oczyszczania spadek liczby nekroz po sączeniu molekularnym jako skutek rozcieńczenia, widoczny szczególnie w testach na *G. globosa*. Tendencja ta nie jest tak wyraźna u *Ch. amaranticolor* co jest zapewne wynikiem większej czułości i mniejszej precyzji odczytu na tej roślinie. Sposób oczyszczania nie wpływał wyraźnie na infekcyjność PVX, ponieważ na obydwu etapach (I i II) otrzymywano podobne liczby nekroz.

Duża zawartość azotu przed sączeniem (etap I) ma swoje odbicie w obecności zanieczyszczeń (drugi szczyt, rys. 3B), których więcej usuwano z preparatów PEG przez sączenie molekularne niż z preparatów WR.

Zawartość azotu po sączeniu była większa w wirusie oczyszczonym metodą WR i ma również swój odpowiednik w wyższej zawartości białka (tab. 1, etap II).

Wyraźne różnice pomiędzy metodami zaobserwowano w procentowym stosunku RNA do białka. Metodą PEG otrzymywano preparaty PVX o składzie bardziej zbliżonym do podawanego w literaturze [11, 17]. Różnicę wynoszącą 1 i 3% odpowiednio dla PEG i WR stanowią zanieczyszczenia, które spowodowały również przesunięcia w widmach absorpcyjnych obu preparatów (rys. 4) i wpłynęły na pozorne zwiększenie wydajności metody WR (tab. 2).



Rys. 4. Krzywe absorpcji w UV preparatów oczyszczonych dwiema metodami  
1 — WR, 2 — PEG

Po określeniu wydajności PVX obliczonej na podstawie absorpcji przy 260 nm oraz na podstawie zawartości RNA i białka, stwierdzono większą zgodność dla wirusa oczyszczonego metodą PEG, co dowodzi większej czystości wirusa izolowanego tą metodą. W kilku doświadczeniach obserwowano znaczne wahania w wydajności dla obu metod o rozpiętości od 92 do 323  $\mu\text{g/g}$  tkanki tytoniu. Wahania takie obserwowane są często w preparatyce wirusów roślinnych [17] szczególnie w przypadku wirusów pałczkowatych [9]. Otrzymane przez nas wartości średnie są jednak zbliżone do niektórych danych spotykanych w literaturze [5].



Tabela 2

Porównanie wydajności oczyszczania PVX (w  $\mu\text{g}$  wirusa na 1 g świeżej masy liści)

Metoda	Na podstawie absorpcji przy 260 nm		Na podstawie zawartości RNA i białka	
		$\bar{x}$		$\bar{x}$
PEG	92-104*	97	87-103*	95
WR	122-242*	169	124-328*	226

\* Zakres zmienności.

## WNIOSKI

1. Obydwie ze stosowanych metod oczyszczania prowadzą do wydzielenia infekcyjnego wirusa X różniącego się jednak stopniem czystości.

2. Przez wytrącanie glikolem polietylenowym i sączenie molekularne można otrzymać wirus o wyższym stopniu czystości; Metoda ta jest mniej pracochłonna i nie wymaga stosowania ultrawierowania.

*Autorzy składają podziękowania doc. dr K. Toczko za pomoc i cenne uwagi w czasie wykonywania niniejszej pracy, dr A. Kowalskiej za wielce pomocną dyskusję, mgr L. Dunajskiej za wykonanie zdjęć elektrono-mikroskopowych oraz mgr St. Skrzeczkowskiej za przygotowanie materiału roślinnego.*

## LITERATURA

1. Albrechtova L., Kliř O.: Precipitation of S, M, X and Y potato viruses by polyethyleneglycols with different molecular weights. *Biol. Plant.* 1970, t. 12 z. 1, s. 31
2. Brakke M.: Ultraviolet extinction coefficients of some representative viruses. *ISCO tables*. 4 ed. Inst. Spec. Co. Lincoln, Nebraska. 1972, s. 16
3. Clark M., Lister R. M.: The application of polyethylene glycol solubility — concentration gradients in plant virus research. *Virology*. 1971, t. 43, s. 338
4. Corbett M. K.: Purification of potato virus X without aggregation. *Virology*, 1961, t. 15, s. 8
5. Francki R. I. B., McLean G. D.: Purification of potato virus X and preparation of infectious ribonucleic acid by degradation with lithium chloride. *Aust. J. biol. Sci.* 1968, t. 21, s. 1311
6. Fridborg K. i wsp.: Purification, electron microscopy and X-ray diffraction studies on the satellite tobacco necrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 1965, t. 54, s. 513
7. Gooding G. V., Herbert T. T.: A simple technique of purification of TMV in large quantities. *Phytopath.* 1957, t. 57, s. 1285
8. Haman U., Pett I.: Beitrag zur serienmässigen Herstellung von Preparaten zur elektronenmikroskopischen Diagnose stäbchenförmigen Pflanzenviren. *Zesz. probl. Post. Nauk. rol.* 1970, z. 3, s. 58



9. Jones R. K., Tolin S. A.: Factors affecting purification of maize dwarf mosaic virus from corn. *Phytopath.* 1972, t. 62, s. 82
10. Kleczkowski A., Nixon H. L.: An electron microscopic study of potato virus X in different stages of aggregation. *J. gen. Microbiol.* 1950, z. 4, s. 220
11. Knight C. A.: *Chemistry of viruses. Protoplasmatologia.* Springer Verl. Wien. 1963, t. 4, z. 13, s. 23
12. Koenig R. i inni: Protein subunit in the potato virus group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. *Acta Biochem. Biophys.* 1970, t. 207, s. 184
13. Ślopek S.: *Immunologia praktyczna.* PZWL, Warszawa, 1970, s. 585
14. Lowry O. H. i inni: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 1951, t. 193, s. 265
15. Maat D. Z.: Purification of plant viruses (skrypt). *Inst. Phytopath. Res., Wageningen.* 1965, s. 16
16. Markham R.: *The biochemistry of plant viruses. The viruses* (Burnet F. M., Stanley M. V. eds.), Acad. Press New York 1961, s. 114
17. Matthews R. E. F.: *Isolation. Plant virology.* Acad. Press New York 1970, s. 41 i 645
18. Munro H. N., Fleck A.: *Methods of biochemical analysis.* (Glick D., ed.), Interscience Publ. New York, 1966, t. 14, s. 113
19. Noordam D.: *Practical course on the identification of plant viruses* (skrypt). *Inst. Phytopath. Res. Wageningen.* 1969, s. 8
20. Reichman M. E., Stace-Smith R.: Potato virus X. Preparation and properties of purified, nonaggregated virus from tobacco. *Can. J. Chem.* 1959, t. 37, s. 4
21. Richter J., Proll E.: Reinigung und Fractionierung des latenten Erdbeerfleckenvirus (SLRV). *Acta. phytopath. hung.* 1970, t. 7, s. 151
22. Shepard J. F., Secor C. A.: Detection of PVX in infected plant tissue by radial and double-diffusion test in agar. *Phytopath.* 1969, t. 59, s. 1838
23. Skrzeczkowski L. J.: Oczyszczanie wirusa X ziemniaka przy pomocy sączenia molekularnego na kolumnie z Sepharose 2B. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1973, z. 142
24. Skrzeczkowski L. J., Kowalska A., Waś M.: Niektóre czynniki wpływające na wykrywalność kilku wirusów roślinnych metodą podwójnej dyfuzji w żelu. *Zesz. probl. Post. Nauk rol. (w przygotowaniu)*

*Лех Скрещковски, Тадеуш Млотек*

## СПРАВНЕНИЕ ДВУХ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ X ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

### Резюме

X вирус картофеля (PVX) выделялся из листьев табака путем гомогенизации в 0,1 М лимоннокислом натрии с добавлением 0,01 М цистеина — HCL, а затем очищался в течение двух циклов дифференциального вращения (15 мин.  $5000 \times г$ , 90 мин.  $75000 \times г$ ) или двукратно осаждался полиэтиленовым гликолом м.ч. 6000. Дальнейшая очистка проводилась по методу молекулярной фильтрации на колонне, наполненной Sepharose 2B. Обоими методами получались очищенные инфекционные препараты PVX, однако метод осаждения гликолом позволяет получить препараты более высокой степени чистоты без применения ультрацентрифуги.

*Lech J. Skrzeczkowski, Tadeusz Młotek*

## COMPARISON OF TWO METHODS OF POTATO VIRUS X PURIFICATION

### Summary

Potato virus X (PVX) was isolated from tobacco leaves by homogenization in 0.1 M sodium citrate 0.01 M cysteine-HCL and purified further by two cycles of differential centrifugation (15 min 5000  $\times$  g, 90 min 75 000  $\times$  g) or twofold precipitation with polyethylene glycol 6000. Further purification was accomplished by molecular filtration on a Sepharose 2B column. Both methods yielded infective preparation of PVX, the method of precipitation with glycol, however gave preparations of a higher purity without ultracentrifugation.