

Beitrag zur serienmässigen Herstellung von Präparaten zur elektronenmikroskopischen Diagnose stäbchenförmiger Pflanzenviren

U. HAMAN und I. PETT

Institut für Pflanzenzüchtung, Rožtok, Deutsche Demokratische Republik

Voraussetzung für die elektronenmikroskopische Virusdiagnose ist die Herstellung von Präparaten mit hoher Viruskonzentration bei minimaler Verunreinigung. Die siebchromatographische Reinigung mittels Agargelgranulat ergibt bei mässigen Reinigungseffekt eine relativ starke Verteilung der Viruspartikel auf viele Fraktionen. Eine Verbesserung konnte durch Anwendung von Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) bei pH 7,0 erreicht werden [2].

Untersuchungen des Ablaufs serologischer Redaktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigten, dass bei pH-Werten von 5,4-5,8 ein höherer Reinigungseffekt bei Pflanzensäften erzielt wurde. Wir prüften deshalb die Wirkung des Ammoniumacetatpuffers [3] pH 5,5 auf den Effekt bei der siebchromatographischen Reinigung von Pflanzensaft. Hierzu wurde X- und S-virushaltiger Blattsaft der Kartoffelsorte Jubel einer siebchromatographischen Reinigung in folgenden Varianten unterzogen.

Tabelle 1

Varianten der Reinigung

Variante	Säule	Vorreinigung
1*	Agargelgranulat	Chloroform 1:10; 60' 10000 g
2	Agargelgranulat	Ammoniumacetatpuffer (Am.-acetatp.) pH — 5,5; 3:1 30' 5600 g
3	Sepharose 4 B	Chloroform 1:10 60' 10000 g
4	Sepharose 4 B	Ammoniumacetatpuffer (Am.-acetatp.) pH — 5,5; 3:1 30' 5600 g
5	Sepharose 4 B	Blätter eingefroren (4h — 18°C) + Ammoniumacetatpuffer (Am.-acetatp.) pH — 5,5; 3:1 30' 5600 g

* Variante 1 nach Polson 1961 und Cech 1962.

Die Reinigung erfolgte in Säulen von 18 mm Durchmesser (± 1 mm) und 380 mm Länge. Je Säule wurde 1 ml vorgereinigter virushaltiger Jubelsaft aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde bei alle Säulen *aqua bidest* benutzt. Je Säulen wurden 50 ml Fraktionen per Hand aufgefangen und serologisch auf X-Virus getestet.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden 5 Fraktionen vor und 5

Fraktionen nach der Fraktion mit maximaler serologischer Präzipitation präpariert. Viruskonzentration und Reinigungseffekt wurden im Elektronenmikroskop D 2 der Firma VEB Carl Zeiss Jena ermittelt. Die Auszählung der Viruspartikel erfolgte in der Kleinbildmarkierung des Endbildschirmes (15,7 mm × 10,3 mm) bei jeweils zufällig gewählten Einstellungen. Um möglichst grosse Bereiche der Präparate zu erfassen, wurden je Feld der Netzobjektträger höchstens 3 Einstellungen ausgezählt.

Tabelle 2

Viruskonzentration und serologische Präzipitation der untersuchten Fraktionen

Agangelgranulat						Sepharose 4B									
Frakt.-Nr.	Chloroform			Am.-acetatp. pH-5,5			Chloroform			Am.-acetatp. pH-5,5			Blätter 4h-18°C Am.-acetatp. pH 5,5		
	n 1	2	3	n 1	2	3	n 1	2	3	n 1	2	3	n 1	2	3
21															
2															
3													3	14	
4													30	21	
5													34	45	
6							-	7				73	38	297	73
7							37	12				62	66	136	107
8							59	13		52	23	101	54	135	144
9							29	23		117	33	53	91	33	358
30							112	-		271	94	29	211	39	316
1							135	-	14	134	130	100	55	15	-
2							47	-	48	154	87	86	51	16	-
3							69	-	59	80	103	35			-
4							55	-	32	65	56	77			-
5							-	-	15	29	69	19			9
6									21	93	45				
7									38	3	-				
8									27						
9									17						
40									11						
1		-													
2		-													
3		-													
4		-													
5		-													
6		-													
7		-													
8		-													
9		-													
50	70	-					37	12							
1	22						42								162
2	16		67				40								67
3	57		136				84								35
4	8		180				96								66
5	32		127				81								125
6	135		58				42								79
7	138		99				1								79
8	30		90												76
9	35		71												
60			70												
1			96												

1
 2
 3
 4

1 — nicht auswertbare Präparate, 2 — maximale Zahl der Viruspartikel von 10 untersuchten Fraktionen, 3 — maximale Zahl der Viruspartikel einer Wiederholung, 4 — serologische Präzipitation.

Die Ergebnisse gehen aus der Tabelle 2 hervor.

Spalte 1 zeigt die Fraktionen, und in den Spalten 2-6 sind Viruspartikel von 3 Wiederholungen in der verglichenen Varianten (Tab. 1) enthalten.

1. Die serologische Reaktion erstreckt sich bei Agargelgranulat maximal über 13 und bei Sepharose 4 B maximal über 7 Fraktionen.

2. Die Viruspartikel werden bei Agargelgranulat zwischen der 40. und 61. Fraktion und bei Sepharose 4 B zwischen der 23. und 38. Fraktion gefunden.

3. Die Konzentration der Viruspartikel ist bei Sepharose 4 B bis doppelt so hoch wie bei Agargelgranulat. (Die niedrige Zahl bzw. das Fehlen der Viruspartikel bei Variante 3, 2). Wiederholung und Variante 1, 2. Wiederholung ist auf ungenaues Erfassen der serologischen Präzipitation zurückzuführen. Bei den übrigen nicht auswertbaren Präparaten handelt es sich um Fehler in der Folie der Netzobjektträger.

4. Die maximale serologische Präzipitation und die Maxima der Viruspartikel stimmen nicht in jedem Fall überein.

Der Reinigungseffekt in den verglichenen Varianten ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Verunreinigungsgrad der Fraktionen mit maximaler Viruskonzentration
(elektronenopt. Feststellung)

Vorreinigung	Agargelgranulat		Sepharose 4 B		
	Chloroform	Am.-acetatp. pH — 5,5	Chloroform	Am.-acetatp. pH — 5,5	Blätter 4h — 18°C + Am.- acetatp. pH — 5,5
Grenzwerte der Verunreinigung	2-4	2-3	2-3	1-3	1,2
Verunreinigungsgrad, \bar{x} von 3 Wiederholungen	3,3	2,6	2,6	1,6	1,6

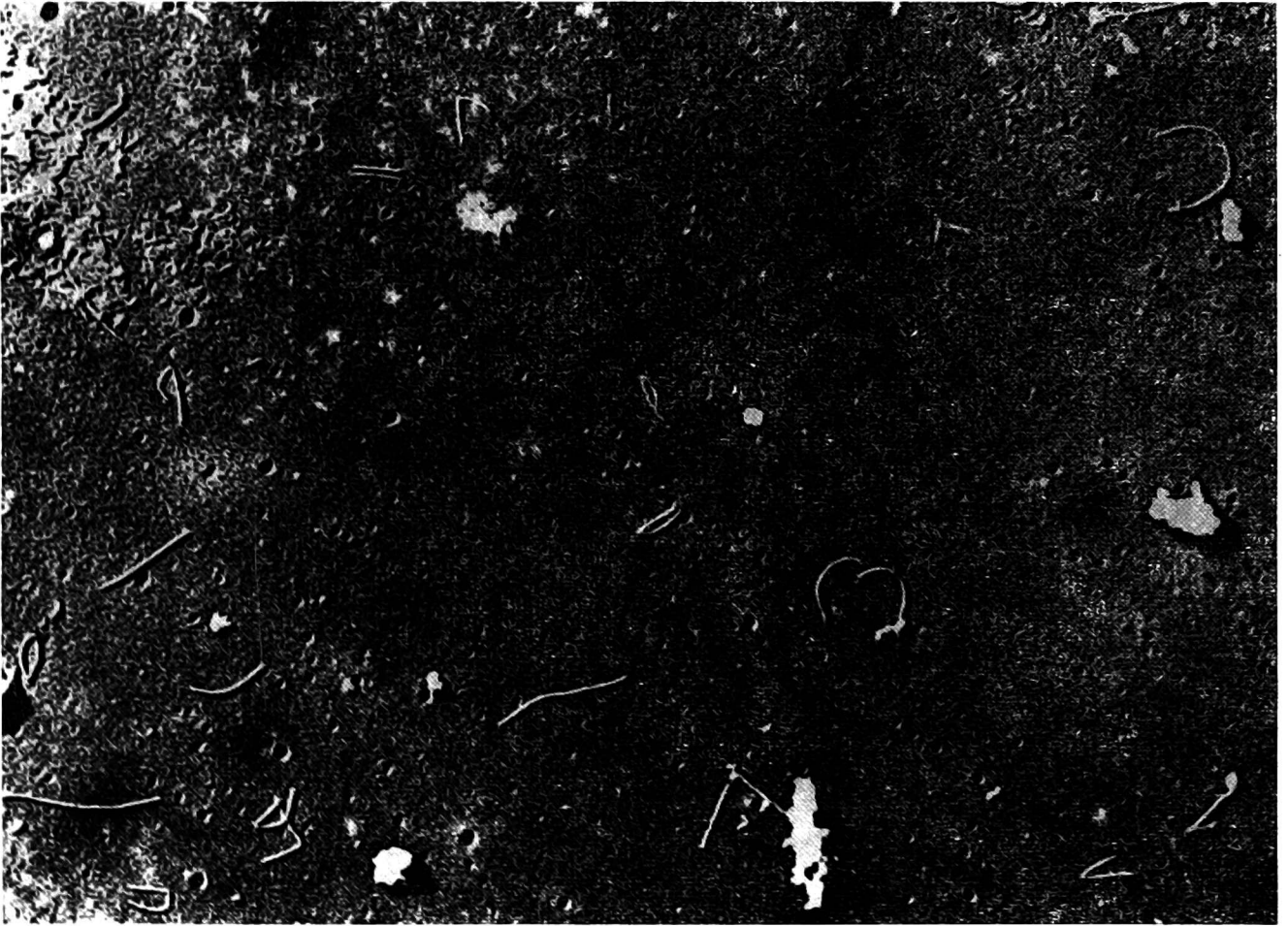
Die Verunreinigungsgrade wurden nach folgendem Schema erfasst:

- 0 = ohne Verunreinigungen,
- 1 = geringe Verunreinigungen,
- 2 = stellenweise stärker verunreinigt,
- 3 = gleichmässig stärker verunreinigt,
- 4 = stark verunreinigt,
- 5 = unbrauchbar.

Zur Charakterisierung des Reinigungseffektes der einzelnen Varianten wurde n die Grenzwerte der Verunreinigung der Fraktionen mit maximaler Viruskonzentration und die Durchschnittswerte von 3 Wiederholungen angegeben.

Bei Sepharose wurde ein Reinigungseffekt von 1,1-2,6, bei Agargelgranulat

von 2,6-3,3 ermittelt. Der Günstigste Reinigungseffekt wird bei Variante 5 (Vorreinigung durch Einfrieren der Blätter und Zusatz von Ammoniumacetatpuffer zum Saft) erzielt. Gleichzeitig verursacht diese Variante der geringste Verschmutzung der Säulen.



Der hohe Reinigungseffekt der Variante 5 ist auf die gute Trennschärfe der Sepharose 4 B und die leichte Sedimentierbarkeit störender Verunreinigungen bei pH 5,5 zurückzuführen. Virusverluste wurden dabei nicht festgestellt.

Bei der Reinigung mit Sepharose 4 B treten neben einer Abnahme der serologischen Aktivität Deformationen an Viruspartikeln auf (Dia). Diese Erscheinung muss besonders bei der Diagnose stäbchenförmiger Viruspartikel durch Vermessen als nachteilig angesehen werden. Trotzdem kann zusammenfassend festgestellt werden, dass durch Anwendung der Sepharose 4 B eine Verbesserung bei der Präparation stäbchenförmiger Viren für die elektronenoptischen Darstellung erreicht wurde.

ZUSAMMENFASSUNG

Die bereits beschriebene siebchromatographische Reinigung mit Sepharose 4 B zur Herstellung von elektronenmikroskopischen Viruspräparaten kann durch eine Fällung des Virushaltigen Saftes bei pH 5,5 verbessert werden.

Als Fällungsmittel wird Ammoniumacetatpuffer benutzt.

Im Vergleich zur Vorreinigung des Saftes mit Chloroform werden bei Vorreinigung mit Ammoniumacetat bei Sepharose 4 B als Säulenfüllung höhere Virus-

konzentrationen und höhere Reinigungseffekte erzielt. Darüber hinaus wird die Verschmutzung der Säulenfüllung auf ein Mindestmass reduziert.

LITERATUR

1. Cech M., 1962. *Plant Virology, Proc. 5th Conf. Czechoslovak Plant Virologists, Prague*, 83-84.
2. Haman U., 1967. *Proc. 6th Conf. Czechoslovak Plant Virologists, Prague (im Druck)*.
3. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H. 1952. *J. biol. Chem.* **195**: 669-677.
4. Polson A., 1961. *Biochem. Biophys. Acta* **50**: 565-567.