

## OCZYSZCZANIE WIRUSÓW ROŚLINNYCH METODĄ CHROMATOGRAFII KOLUMNOWEJ ORAZ ULTRAWIROWANIA

*Alicja Głowinkowska*

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Dla badań właściwości wirusa takich jak: wielkość cząstki, ciężar cząsteczkowy, budowa chemiczna, a także dla badań serologicznych, istotne jest wyizolowanie cząstek wirusa wolnych od materiału gospodarza, a przy tym w miarę możliwości wyizolowanie ich tak, aby nie utraciły infekcyjności.

Badania z zakresu biochemii wirusów oraz ich izolacji rozpoczęto stosunkowo niedawno, bo w latach trzydziestych.

Badania takie mogły być możliwe dopiero z chwilą, gdy w wirusologii znalazła zastosowanie ultrawirówka i mikroskop elektronowy. Nie jest dziwne, że pierwszymi wirusami, które zostały wyizolowane i dokładnie zbadane były: wirus mozaiki tytoniu i wirus ziemniaka X, ponieważ są to wirusy dosyć stabilne i występują w wysokiej koncentracji w roślinie gospodarzu.

Dzisiaj zainteresowanie problemem izolowania wirusów bardzo wzrosło, obejmuje szeroki wachlarz wirusów, niemniej jest w tej dziedzinie bardzo wiele do zrobienia.

Metody oczyszczania, które są efektywne dla jednego wirusa mogą być zupełnie bezużyteczne dla innego, nawet bardzo podobnego. Niekiedy różne szczepy tego samego wirusa mogą wymagać różnych metod oczyszczania.

Przy homogenizowaniu materiału roślinnego ważne jest zwrócenie uwagi na skład jonowy buforu, jego pH i siłę jonową, ze względu na tak różną wrażliwość wirusów na te czynniki. Mając homogenat roślinny zadanie polega na usunięciu cząstek niewirusowych i niepożądanych soli w taki sposób, aby wirus pozostał rozproszony w buforze o znanym nam składzie, a następnie usunięcie wirusa z roztworu i rozpuszczenie go w małej ilości znanego buforu. Wszystkie metody oczyszczania polegają na wykorzystywaniu różnic w chemicznych i fizycznych właściwościach między wirusami i normalnymi komponentami roślinnymi.

Preparaty wirusowe, które przeszły jeden stopień oczyszczania będą

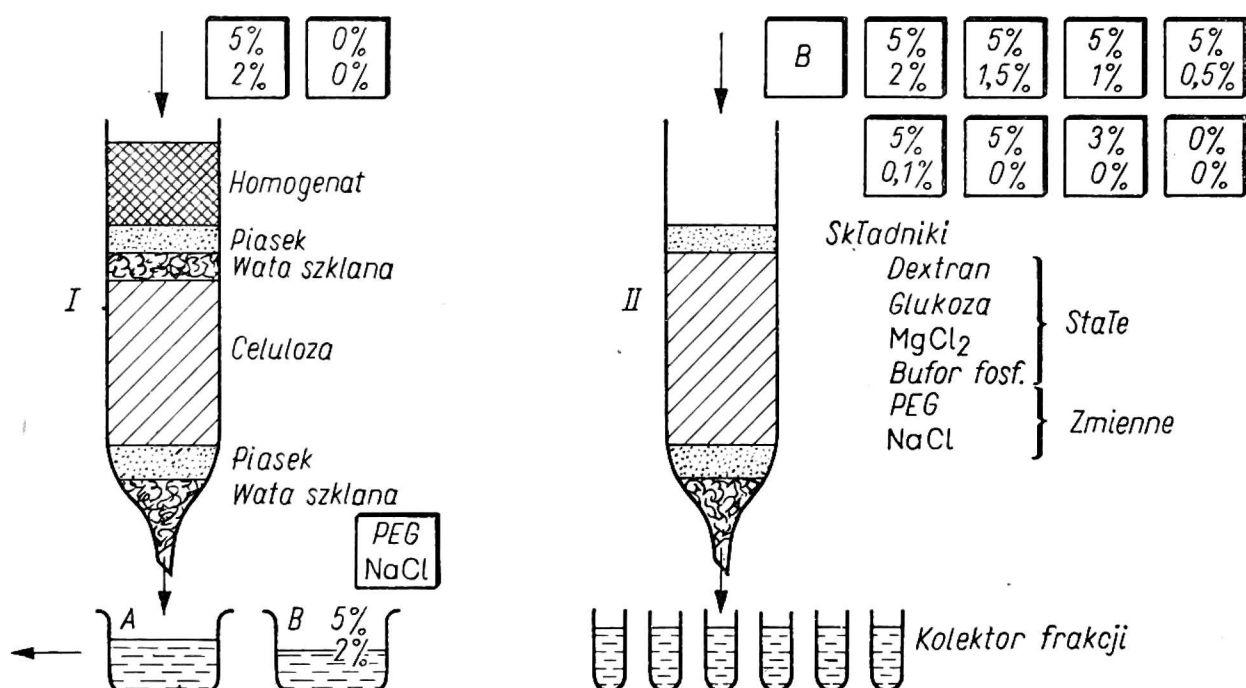
ciągle zawierały molekuly o niskim i wysokim ciężarze cząsteczkowym materiału roślinnego. Większość z nich może być usunięta przez następne stopnie oczyszczania. To, jaka metoda będzie wybrana, zależy jest od stabilności wirusa i celu oczyszczania. Trzeba również pamiętać, że z chemicznego punktu widzenia nie istnieje czysty preparat wirusowy. Nawet jeśli preparat ten nie zawiera zupełnie komponentów gospodarza, co jest mało prawdopodobne, to trzeba pamiętać, że większość preparatów zawiera mieszaninę infekcyjnych i nieinfekcyjnych cząstek wirusa, i że preparaty wirusowe zawierają zwykle mieszaninę mutantów tego wirusa.

Jest wiele metod oczyszczania wirusów, a chromatografia i ultrawirowanie mają duży udział w pracy nad oczyszczaniem wirusów i właśnie głównie na ultrawirowaniu i chromatografii kolumnowej oparliśmy nasze próby oczyszczania wirusów roślinnych w Pracowni Wirusologii IOR.

### CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

Chromatografia znalazła zastosowanie w wirusologii roślinnej bardzo niedawno, bo od 1954 r., kiedy to Tiselius opisał zdolność żelu fosforanowo-wapniowego do adsorpcji protein [6, 7]. Później stosowano inne adsorbenty jak silica żel czy bentonit [2]. Albertsson natomiast wykazał, że mieszanina glikolu polietylenowego, dextranu i wody wytrząsane razem, mogą być użyte do oczyszczania makromolekuł [1].

Venekamp i Mosch zastosowali układ dwufazowy wysokich polimerów do klarowania ekstraktów roślinnych [9]. W układzie zawierającym glikol polietylenowy, dextran i glukozę, materiał chloroplastów zbiera się w fazie dextranowej, a w fazie glikolu polietylenowego — wirus. Pozwala



Rys. 1. Sposób pakowania kolumny chromatograficznej i przebieg procesu chromatografii

to na zastosowanie podobnych układów w procedurze chromatograficznej. Badania nasze oparte są na metodzie chromatografii kolumnowej opisanej przez Venekampa i Moscha [8-12]. Stosując tę metodę autorzy wyizolowali szereg wirusów roślinnych o bardzo różnych kształtach i wielkościach cząstek [13], z czego wynikałoby, że metoda ta może mieć szerokie zastosowanie w pracach nad izolacją wirusów roślinnych. Rysunek 1 przedstawia sposób pakowania kolumny chromatograficznej i przebieg procesu chromatografii.

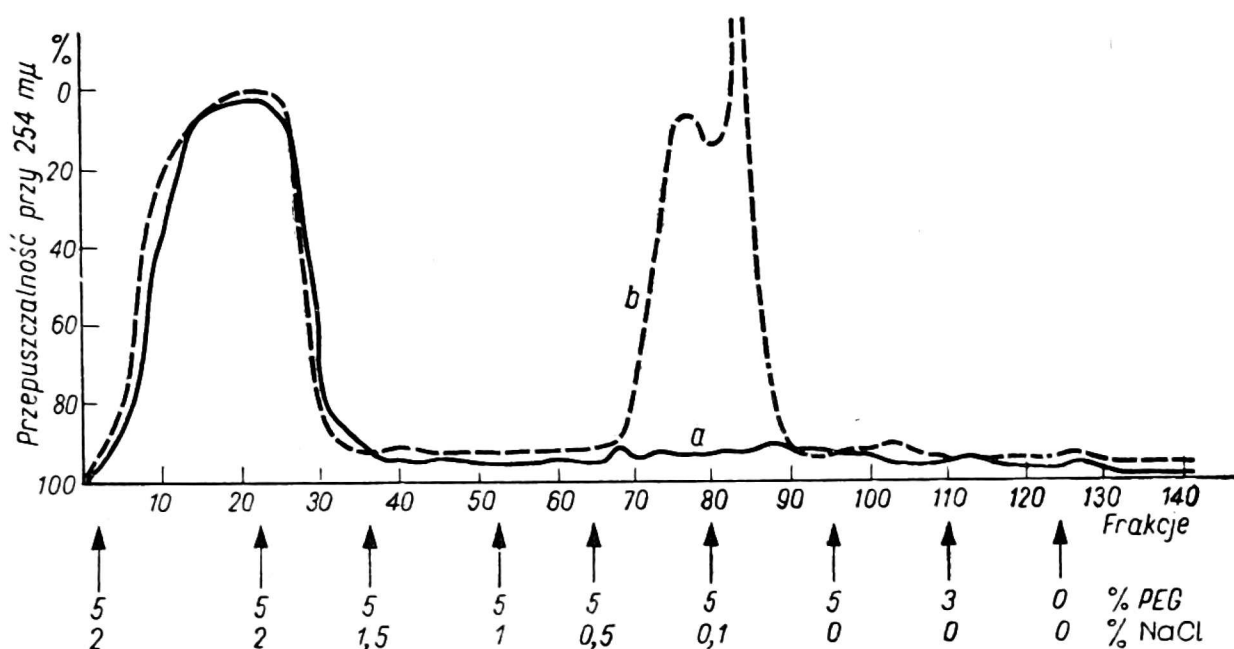
Do pakowania kolumny chromatograficznej stosujemy celulozę (CM 11-Whatman), celuloza bowiem pozwala na sączenie lepkiego płynu z wymaganą szybkością w przeciwieństwie do Sephadexu-G-25 lub skrobi.

Roztwór do klarowania ekstraktu roślinnego powinien zawierać 5% glikolu polietylenowego, 4,5% glukozy, 0,05% dextranu, bufor fosforanowy (w celu utrzymania stałego pH) 0,004 m  $MgCl_2$  oraz 2% NaCl dla wytrącenia wirusa. Podczas całej procedury zielone części komórkowe pozostają na szczycie kolumny. Wirus adsorbuje się na celulozie, wpływają natomiast brązowo zabarwione substancje, proteiny, cukry i aminokwasy. Eluent stopniowo staje się bardziej czysty. Następnie płyn przepływający przez kolumny jest modyfikowany przez wyeliminowanie glikolu polietylenowego i chlorku sodu. Taki roztwór wymywa cząsteczki wirusa z kolumny. Następna czynność, to rechromatografia płynu zawierającego wirus, po uprzednim dodaniu do niego 5% glikolu polietylenowego i 2% chlorku sodu. Wirus adsorbuje się ponownie na celulozie. Następnie poddaje się kolumnę przepływowi roztworów, w których zawartość glikolu polietylenowego i NaCl stopniowo maleje aż do zupełnej eliminacji. Podczas rechromatografii kolekcjonuje się wypływające frakcje, a następnie bada się je spektrofotometrycznie na obecność białka wirusowego.

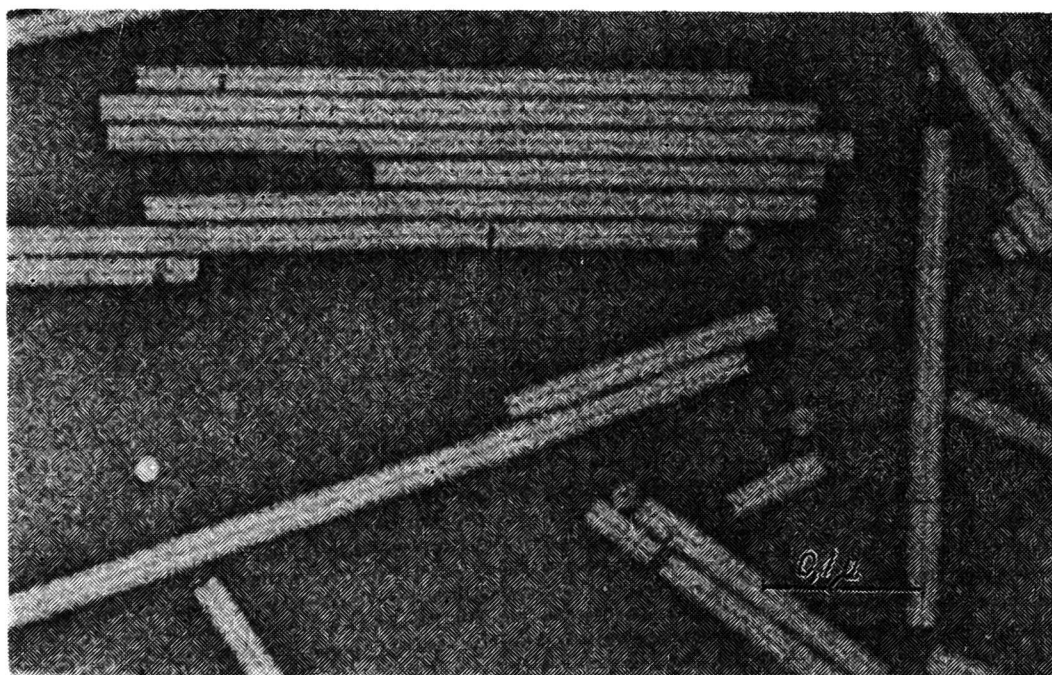
W doświadczeniach naszych porównywaliśmy pomidory porażone TMV z pomidorami zdrowymi. Do analiz brano 25 g próby liści pomidorów (Potentat) 8-tygodniowych. Wyniki doświadczenia przedstawia rys. 2, na którym obie krzywe reprezentują szereg wykonanych prób.

Przepływ roztworu zawierającego 5% glikolu polietylenowego i 2% NaCl powodował wypływ materiału nieinfekcyjnego, ale absorbującego światło UV, ze względu na obecność w tym materiale substancji barwnych. Dopiero roztwory o niskiej zawartości NaCl wymywają wirus.

Wszystkie frakcje badane były spektrofotometrycznie przy długości fali 254 m $\mu$  (Spektr. Unicam SP 700). Dla nas interesujące były frakcje w obrębie dużego piksu. W celu sprawdzenia aktywności biologicznej tych frakcji stosowaliśmy test szklarniowy na *Nicotiana glutinosa*. Rośliny inokulowane frakcjami bezbarwnymi, a wykazującymi absorpcję światła UV o długości fali 254 m $\mu$ , wykazywały typowe objawy zakażenia wirusem mozaiki tytoniu. Rośliny inokulowane frakcjami nie absorbującymi światła UV — 254 m $\mu$  nie wykazywały takich objawów. Frakcje absorbu-



Rys. 2. Chromatogram homogenatów liści pomidorów zdrowych i porażonych TMV na kolumnie celulozowej  
*a* — pomidory zdrowe, *b* — pomidory chore



Rys. 3. Wirus mozaiki tytoniu. Powiększenie pierwotne mikroskopu elektronowego 55 000 × (fot. W. Wieczorek)

jące fale długości 254 m $\mu$  i aktywne biologicznie badane były po odpowiednim ich przygotowaniu [10] pod mikroskopem elektronowym (JEM 7A Japonia). Badania te wykazały obecność pałeczek wirusa TMV. Preparaty wirusowe były bardzo czyste, a barwiono je negatywowo 1% kwasem fosforo-wolframowym (rys. 3).

#### METODA ULTRAWIROWANIA

„Metoda ultrawirowania” jest nazwą zbyt uproszczoną, wchodzi tu bowiem w grę zarówno ultrawirowanie, jak i wirowanie niskoobrotowe, czy wstrząsanie z rozpuszczalnikami organicznymi [3, 4, 5], ale wytrąca-

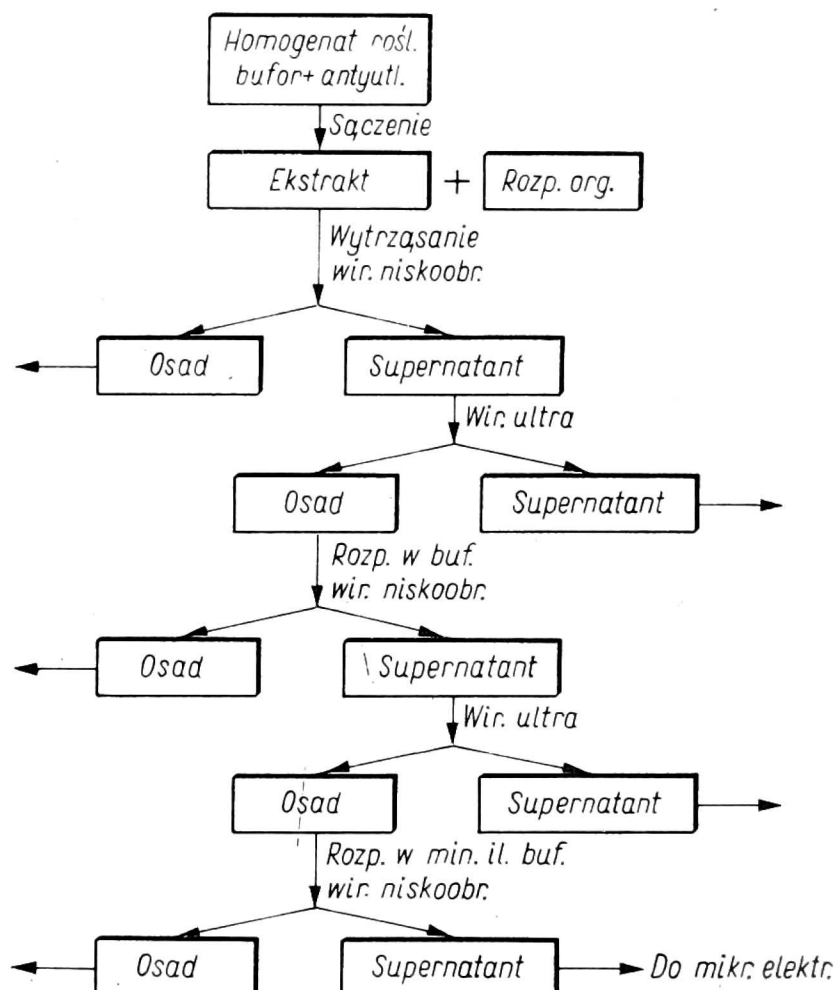


nie z roztworu wirusa następuje wskutek sedymentacji jego cząstek przy użyciu dużych sił wirowania. Stosując ultrawirowanie należy zawsze liczyć się z tym, że mogą nastąpić straty wirusa wskutek nieodwracalnej agregacji jego cząstek i dlatego nie należy oddziaływać dużymi siłami wirowania dłużej niż to jest konieczne. W celu unieaktywnienia enzymów utleniających, których działanie powoduje stratę wirusów, podczas homogenizowania materiału roślinnego stosuje się dodatek niewielkich ilości substancji redukujących np. kwas tioglikolowy, kwas askorbinowy, chlorowodorek cysteiny i inne.

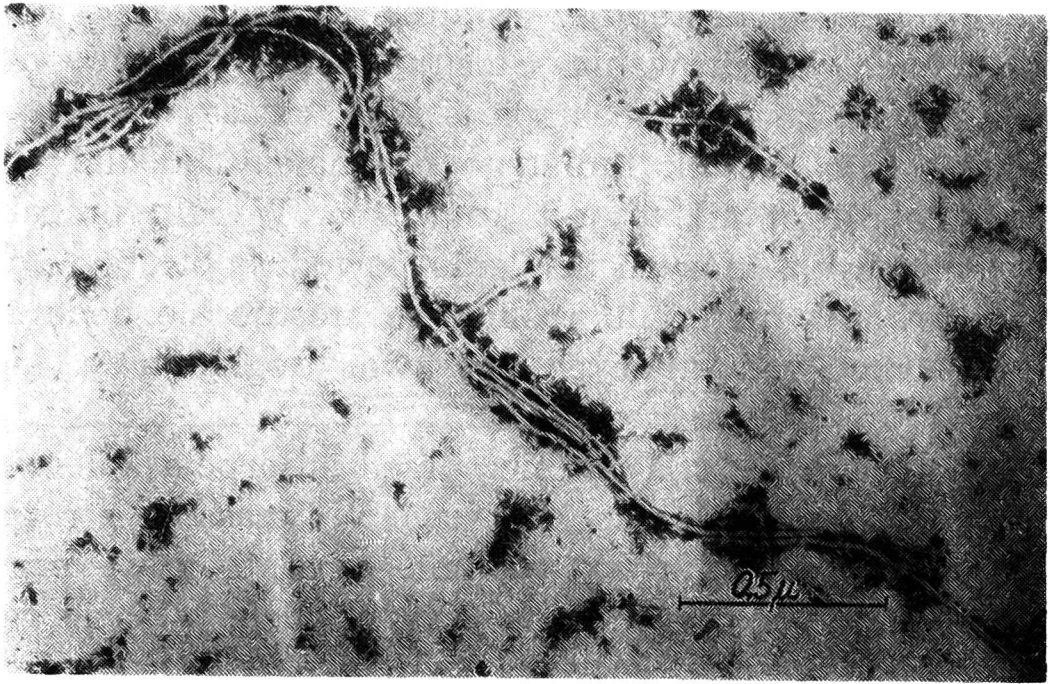
Substancje te zabezpieczają również przed adsorpcją kolorowych komponentów roztworu na cząsteczkach wirusa. Wytrząsanie z rozpuszczalnikami organicznymi powoduje wytworzenie emulsji, która przy wirowaniu wolnoobrotowym rozdziela się na 3 fazy, gdzie w fazie rozpuszczalnika znajdują się substancje barwne, w interfazie większość zdenaturowanych protein roślinnych, a w fazie wodnej badany wirus. Wirowanie niskoobrotowe usuwa z roztworu wszystkie większe cząstki od cząsteczki wirusa.

Ultrawirowanie powoduje sedymentację cząsteczek wirusa. Rozpuszczenie sedymentu w odpowiedniej ilości buforu powoduje zwykle powrót wirusa do roztworu w swej aktywnej formie.

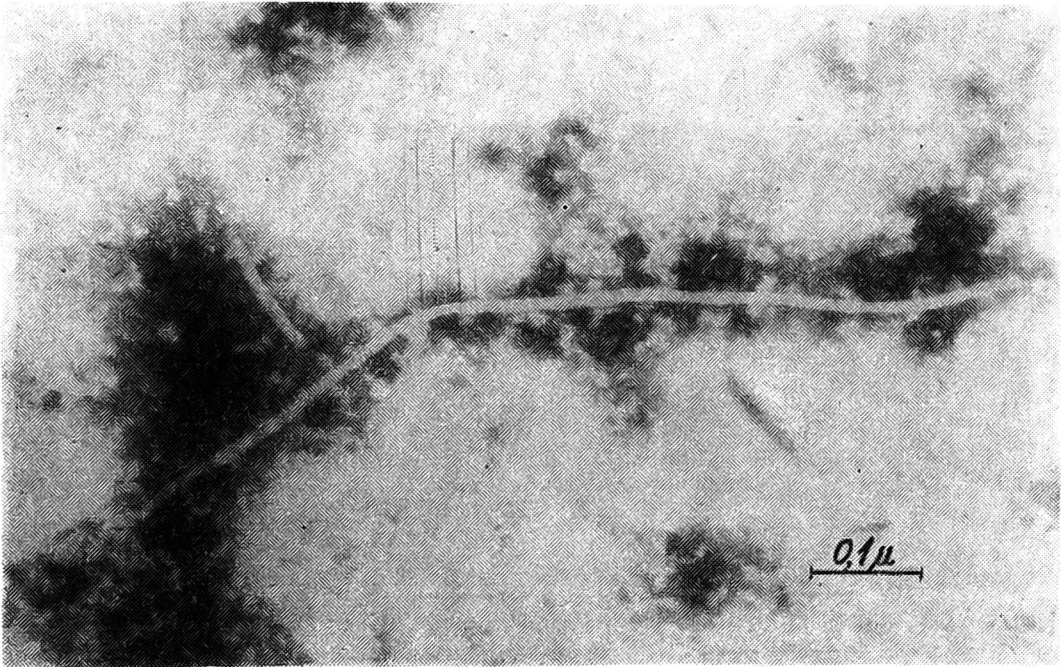
W badaniach naszych stosując następujący schemat postępowania (rys. 4) udało się wyizolować i sfotografować wirus żółtej karłowatości cebuli.



Rys. 4. Wytrącanie z roztworu wirusa — schemat postępowania



Rys. 5. Wirus żółtej karłowatości cebuli. Powiększenie pierwotne mikr. elektr. 24 000 × (fot. W. Wieczorek)



Rys. 6. Wirus żółtej karłowatości cebuli. Powiększenie pierwotne mikr. elektr. 65 000 × (fot. W. Wieczorek)

Do badań brano 25-gramowe próby cebuli odmiany Rawska, zainfekowanej przez mszyce wirusem żółtej karłowatości cebuli i takie same próby liści cebuli zdrowej jako kontroli.

Próby homogenizowano z połową objętości (w stosunku do ciężaru próby) buforu fosforanowo-cytrynowego z dodatkiem kwasu tioglikolowego. Wytrząsano z chloroformem. Zastosowano na przemian wirowanie niskoobrotowe 6000 rpm (wirówki H. Janetzki K 50) i ultrawirowanie 30 000 rpm — 80 000 g (ultrawirówka Spinco Model L. rotor 40). W wyniku otrzymano 1-mililitrowe preparaty, które następnie badano po uprzednim barwieniu negatywowym pod mikroskopem elektronowym (JEM

7A Japonia). Badania te wykazały w preparatach z porażonej żółtą karłowatością cebuli obecność długich nitkowatych cząsteczek (wirusa żółtej karłowatości cebuli) wielkości rzędu 1000-2000 m $\mu$  (rys. 5 i 6).

Obydwie omówione metody mają szereg zalet i mogą być szeroko stosowane w pracach nad oczyszczaniem wirusów roślinnych, nie można ich jednak traktować jako uniwersalne, metody takie bowiem nie istnieją. Omówiony schemat postępowania przy ultrawiirowaniu może doprowadzić tylko do częściowego oczyszczenia badanego wirusa i aby otrzymać preparat bardziej czysty, należałoby go poddać następnym stopniom oczyszczania jak dializie, wirowaniu w gradiencie cukrów czy elektroforzezie. Dla pewnych jednak etapów badań ten rodzaj oczyszczania jest wystarczający, a sama procedura wymaga mniej czasu w porównaniu z metodą chromatografii kolumnowej. W wyniku tej ostatniej jednak, jeśli uda się oczyścić badany wirus, otrzymany preparat jest bardzo czysty. Ponadto stosując tę metodę zbędne jest przesączenie homogenatu roślinnego, wirowanie, czy wytrząsanie z rozpuszczalnikami organicznymi, przez co eliminuje się niebezpieczeństwo strat cząsteczek wirusa.

W przypadku naszych badań pomidorów porażonych TMV i zdrowych, niejednokrotnie rośliny ocenione wizualnie jako zdrowe, poddane analizie chromatograficznej wykazywały obecność frakcji aktywnej biologicznie wirusa mozaiki tytoniu. Świadczy to w tym przypadku o dużej czułości metody i możliwości wyizolowania cząsteczek wirusa, którego efektów działania wizualnie jeszcze nie zauważamy. Metoda ta może więc być przydatna do stawiania wczesnej diagnozy choroby pomidorów, powodowanej wirusem mozaiki tytoniu.

#### LITERATURA

1. Albertsson P. A.: Fractionation of particles and macromolecules in aqueous two-phase systems. *Biochem. Pharmacol.* 1961, t. 5, s. 351-358.
2. Dunn D. B., Hitchborn J. H.: The use of bentonite in the purification of plant viruses. *Virology*, 1965, t. 25, z. 2, s. 171-192.
3. Maat D. Z.: Pea early-browning virus and tobacco rattle virus — two different but serologically related viruses. *Neth. J. Pl. Path.*, 1963, t. 69, z. 5, s. 287-293.
4. Maat D. Z.: Serological differences between red currant spoon leaf virus, virus isolates from Eckelrade — diseased cherry trees and the Scottish raspberry ringspot virus. *Neth. J. Pl. Path.* 1965, t. 71, z. 2, s. 47-53.
5. Regenmortel M. H. V., Brandes J., Bercks R.: Investigations on the properties of watermelon mosaic virus. *Phytopath. Z.* 1962, t. 45, z. 3, s. 205-216.
6. Tiselius A.: Chromatography of proteins on calcium phosphate columns. *Ark. Kemi.* 1954, t. 7, s. 443.
7. Tiselius A., Hjerten S., Levin O.: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.* 1956, t. 65, s. 132-155.
8. Venekamp J. H., Mosch W. H. M.: Chromatographic studies on plant viruses. I. The isolation of potato virus X, by means of various system of adsorption chromatography. *Virology*, 1963, t. 19, z. 3, s. 316-321.

9. Venekamp J. H., Mosch W. H. M.: Chromatographic studies on plant viruses. II. The use of polyethylene glycol in clarification and purification of tobacco mosaic virus. *Virology*, 1964, t. 22, z. 4, s. 503-507.
10. Venekamp J. H., Mosch W. H. M.: Chromatographic studies on plant viruses. III. The purification of potato virus X, potato virus Y, tobacco mosaic virus and potato stem mottle virus by chromatography on cellulose columns with polyethylene glycol-containing solutions as solvents. *Virology*, 1964, t. 23, z. 3, s. 394-402.
11. Venekamp J. H., Mosch W. H. M.: Chromatographic purification of plant viruses on cellulose columns with polyethylene glycol containing solutions as solvents. *Neth. J. Pl. Path.*, 1964, t. 70, z. 3, s. 85-89.
12. Venekamp J. H., Mosch W. H. M., Erkelens-Nanninga K. E.: Chromatographic purification of the carnation ringspot, carnation mottle, and tobacco necrosis viruses. *Phytopath.*, 1964, t. 54, z. 5, s. 608-609.
13. Venekamp J. H., Mosch W. H. M., Noordink J. P. W.: Chromatographic purification of plant viruses. *Viruses of plants. Proceedings of the International Conference on Plant Viruses, Wageningen, July, 1965, 1966, s. 108-124.*

*Składam serdeczne podziękowanie Panu mgr Edwardowi Czaplickiemu za koleżeńską pomoc podczas moich pierwszych prac nad oczyszczaniem wirusów roślinnych, a szczególnie za pomoc w zorganizowaniu warsztatu do pracy chromatografii kolumnowej.*

*Алиция Гловинковска*

## ОЧИЩЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ ПО МЕТОДУ КОЛОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И УЛЬТРАЦЕНТРИФУГОВАНИЯ

### Резюме

В докладе рассмотрены два метода по очистке растительных вирусов: метод ультрацентрифугирования и относительно недавно развитый метод колонной хроматографии на клетчатке. Оба метода иллюстрированы примерами собственных исследований — очисткой вируса мозаики табака из листьев томатов зараженных этим вирусом по методу колонной хроматографии и вируса желтой карликовости лука из листьев лука по методу ультрацентрифугирования.

Обсуждено применение и достоинства обоих методов.

*Alicja Głowinkowska*

## PURIFICATION OF PLANT VIRUSES BY THE METHODS OF COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ULTRACENTRIFUGATION

### Summary

Two methods of plant virus purification are described: ultracentrifugation and the recently developed method of column chromatography on cellulose. Both methods are illustrated by examples from the author's own practice — purification of the tobacco mosaic virus from infected tomato leaves by the method of column chromatography and the onion yellow dwarf virus from onions by the ultracentrifugation method.