

<https://doi.org/10.3176/biol.1971.1.13>

УДК $\frac{576.858.8}{632.38}$

U. HÖDREJÄRV, K. TARASSOVA, KERSTI OLSPERT

NN. KARTULI-N-VIIRUSE ELEKTROFOREETILISEST UURIMISEST

Senistes uurimustes N-viiruse peremeestaimede ringi ja virioonide mõõtmete kohta olemasolevad andmed viitavad selle viiruse suurele sarnasusele kurgimosaiigiviirusega (Agur, 1966, 1968; Хёдреярв jt., 1968). Et senine eraldamismetoodika (Scott, 1963; Хёдреярв jt., 1968) ei võimaldanud saada piisava puhtusega preparaate viiruse füüsikalis-keemiliste omaduste väljaselgitamiseks, siis puhastati neid järgnevalt elektroforeesi abil sahharoosi tihedusgradiendis. Võrdluseks puhastati samades tingimustes ka kartuli-X-viirust. Käesolevas esitatakse andmed puhastamise meetodi täienduste, preparaatide puhtusastme ja viiruse liikumise kiiruse kohta elektriväljas, kõrvutades neid vastavate kirjanduses avaldatud andmetega (eeldades, et N-viirus on üks kurgimosaiigiviiruse vorme).

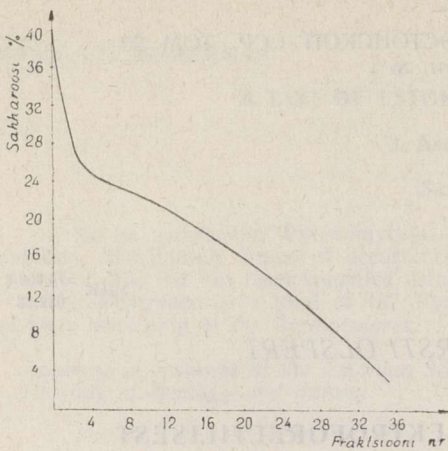
Materjal ja meetoodika

Tööks kasutati N-viiruse vormi N_R (Хёдреярв jt., 1968) ja X-viiruse vormi, mis pärinesid erinevatest kartulisortidest*. Mõlemad viirused paljundati liigil *Nicotiana glutinosa* L. Kümnenal päeval peale nakatamist, s. o. virioonide kontsentratsiooni maksimumi ajal, korjati N_R -viiruse eraldamiseks inokuleeritud, X-viiruse eraldamiseks aga kogu taime lehed. Taimede kasvutemperatuur hoiti 20...25 °C piires.

N_R -viiruse eelnevaks puhastamiseks kasutati juba tuttavat meetoodikat (Scott, 1963; Хёдреярв jt., 1968), ainult selle erinevusega, et ultratsentrifuugiti üks kord (150 min. 78 000 g juures), mille järel sade suspendeeriti 0,005 M tsitraatpuhveris (pH 6,8). Sellele järgnes tsentrifuugimine madalatel tuuridel (15 min. 5400 g juures). Järgnevalt dialüüsiti supernatanti öö vältel vastu boraatpuhvrit (pH 8,6) (van Regenmortel, 1964; Polson, Russell, 1967). Dialüsaadile lisati sahharoosi kuni 37%-lise kontsentratsioonini (kaal/maht) ja märkelahuseks mõni tilk fenüülpuna vesilahust. Sellega oli preparaat valmis elektroforeesikoloni viimiseks.

Kartuli-X-viiruse eelnevaks puhastamiseks hoiti taimedelt korjatud lehed üks ööpäev külmutuskapis temperatuuril 2°. Seejärel purustati nad uhmris lehtede kaaluga võrdse mahu kloroformi ja 0,05 M tsitraatpuhvri (pH 6,7) juuresolekul. Puhver sisaldas 0,1% tioglükoolhapet. Saadud koe-matseraati tsentrifuugiti 15 min. 1200 g juures. Supernatanti tsentrifuugiti edasi 120 min. 55 000 g juures. Sade suspendeeriti 0,005 M boraatpuhveris

* X-viiruse vorm pärines Jõgeva Sordiaretusjaamas teostatud ristamiskombinatsiooni 'Kameras' × 'Agrie (V)' kartuliseemiku reproduktsioonist.



Joon. 1. Elektroforeesikolonnist väljalastud fraktsioonide sahharoosi kontsentratsioonikõver.

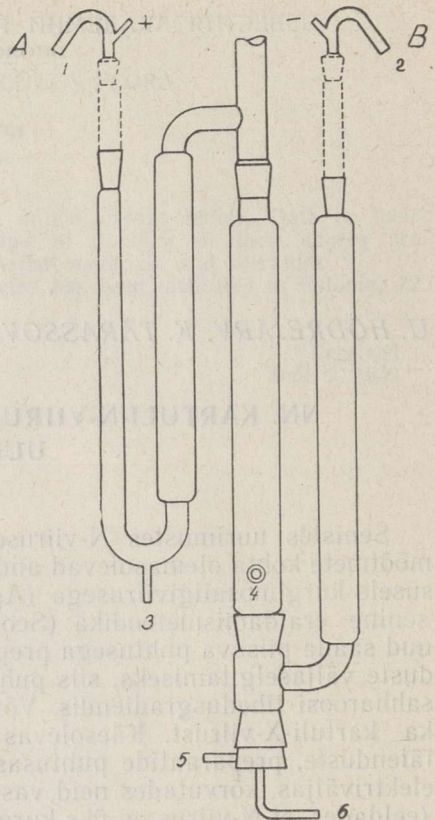
(pH 9,0) ja tsentrifugeeriti 15 min. 18000 g juures. Supernatanti dialüüsi kestel vastu boraatpuhvril (pH 8,6). Saadud preparaadiga toimiti edasi nagu N_R -viirusega.

Sahharoosi gradiendi valmistamiseks vajalik 40%-line sahharoosilahus valmistati boraatpuhvril (pH 8,6). Lahuse pH kontrolliti ja reguleeriti leelise lisamise teel.

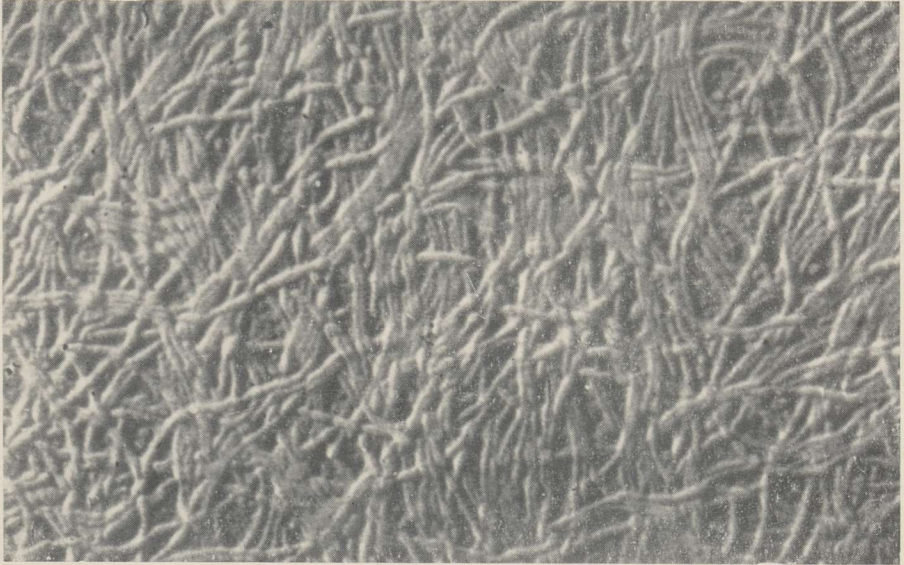
Sahharoosi gradiendi kontrollimiseks täideti kolonn allpool kirjeldatud viisil ja jäeti üheks ööks seisma. Järgmisel päeval võeti kolonnist 8 ml suurused fraktsioonid, mille määrati murdumisnäitaja 20° temperatuuril ja vastav sahharoosi kontsentratsioon (joon. 1).

Elektroforeesimisel kasutati seeriaviisiliselt toodetavat kolonni (tüüp AӨB), mis kohandati viroloogilises praktikas kasutatavaks tsoonelektroforeesiks tihedusgradiendis (van Regenmortel, 1964; Polson, Russell, 1967) (joon. 2).

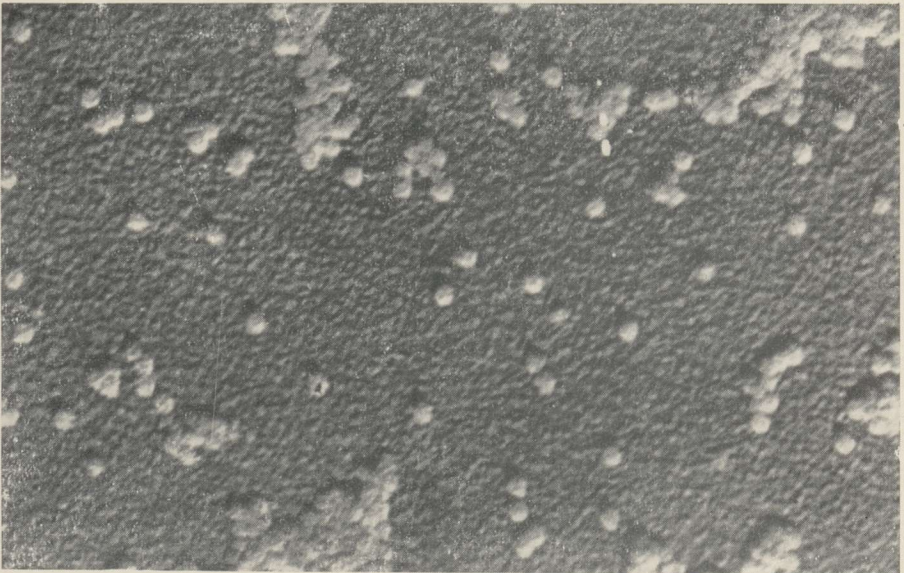
Kolonni täitmine. Elektroodid 1 ja 2 eemaldati elektroodinõudest. Voolikutega varustatud torud 3, 4, 5 ja kapillaar 6 suleti näpitsatega. Viimane koos lehtriga oli nihutatud kolonni põhjast mõni sentimeeter allapoole. Läbi elektroodinõu B täideti kolonni alumine osa (paari sentimeetri kõrgusele kolonni põhjast) boraatpuhvriga (pH 8,6). Pärast seda lasti toru 5 kaudu kolonni ettevaatlikult umbes 1 l 40%-list sahharoosilahust. Elektroodinõud A ja B täideti puhvriga ning vedeliku tase tõsteti elektroforeesiks vajaliku kõrguseni. Ühtlasi asetati elektrood elektroodinõusse B ja suleti toru 2. Ettevaatlikult avati toru 4 ja lasti täituda kolonni põhja juures asuval õhuruumil sahharoosilahusega. Seejärel suleti toru. Kapillaari küljes olev lehter tõsteti vastu kolonni põhja, avati näpits ja lasti $4/5$ kolonnist olevast vedelikust välja tilkuda. Siis ühendati gradiendi valmistamise seade kapillaariga ja moodustati kolonni sahharoosi gradient, mis antud tingimustes oli peaaegu lineaarne (joon. 1).



Joon. 2. Täiendatud elektroforeesikolonn (tüüp AӨB). Punktiiriga on märgitud tehtud täiendused.



Joon. 3. Kartuli-X-viiruse elektroforeetiliselt puhastatud preparaadi elektronmikroskoopiline foto. Preparaati varjutati kroonnikliga 15°-se nurga all. (Suurend. $3 \times 16\,200$.)



Joon. 4. Nn. kartuli-N_R-viiruse elektroforeetiliselt puhastatud preparaadi elektronmikroskoopiline foto. Preparaati varjutati kroonnikliga 15°-se nurga all. (Suurend. $4,5 \times 20\,000$.)

Pärast gradiendi valmistamist viidi süstlaga kapillaari kaudu kolonni 20...30 ml 40%-list sahharoosilahust ja kolonn jäeti üheks ööks seisma. Pärast seda eemaldati kapillaari kaudu lisatud sahharoosilahus ja veel umbes 2 ml lahust. Seejärel viidi süstla abil kolonni 1,0...1,5 ml ülalkirjeldatud viisil valmistatud preparaati, surudes selle kolonni 30 ml 40%-lise sahharoosilahusega.

Nüüd lasti kapillaar koos lehtriga paar sentimeetrit kolonni põhjast allapoole ja elektroodinõu A kaudu täideti kolonni ülemine osa boraatpuhvriga (pH 8,6), mille tase viidi ühele kõrgusele elektroodinõus B oleva vedeliku tasemega. Ühtlasi paigaldati elektrood I, avati ettevaatlikult toru 2 ja elektroforeesiseade jäeti gradiendi ühtlustamiseks kaheks tunniks seisma.

Elektroforeesiruumi temperatuur hoiti 8...10° piires. Soojema ruumi korral jahutati kolonni veega.

Pärast ettenähtud aja möödumist lülitati elektrivool sisse ja jälgiti, et selle tugevus ei ületaks 30 mA. Elektroforees kestis 30...38 tundi.

Pärast elektroforeesi lõppu lülitati vool välja ja mõõdeti nähtavate fraktsioonide kaugused lähtekohast. Tõsteti kapillaari küljes olev lehter vastu kolonni põhja, avati kapillaar ning koguti fraktsioonid 2 ml kaupa. Fraktsioonidel määrati neeldumisspekter lainepikkustel 220...320 nm ja kontrolliti infektsioossust. Virioone sisaldavad fraktsioonid ühendati ja tsentrifuugiti N_R-viiruse puhul 90 min. 105 000 g ning X-viiruse puhul 120 min. 55 000 g juures. Viirussademed suspendeeriti edasiseks tööks väikeses hulgas 0,005 M boraatpuhvris (pH 9,0) ja tsentrifuugiti 15 min. 5400 g juures.

Puhastatud preparaatide elektronmikroskoopiliseks uurimiseks kasutati mikroskoopi ЭМ-7. Preparaadid lahjendati veega 1:10 ja kanti formvar-kilega kaetud 2 mm läbimõeduga võrgukestele, külmutati, lüofiliseeriti ja varjutati kroonnikliga 15°-se nurga all.

Lähtepreparaatide ja elektroforeesil tekkinud fraktsioonide asend kolonnis ning viirusfraktsioonide liikumise kiirus, võrreldes kirjanduse andmetega

Viiruse nimetus	Viiruspreparaadi lähtelasend, cm	Virioone sisaldav fraktsioon, cm	Taimset materjali sisaldav fraktsioon, cm	Fenüülpuna	α^*
Kartuli-X-viirus					
Katse nr. 1	0—1,3	0,2—1,5	2,4—4,3	6,8— 8,8	34,0
Katse nr. 2	0—0,3	0,2—0,6	2,9—4,2	7,7— 9,6	38,5
Kartuli-N _R -viirus					
Katse nr. 1	0—0,4	1,0—1,7	2,3—3,3	10,3—11,3	10,3
Katse nr. 2	0—0,2	0,7—1,1	1,7—2,5	7,6— 8,5	10,8
Tubakanekroosiviirus**	—	—	—	—	8,8
	—	—	—	—	11,3
Kurgimosaiigiviirus**	—	—	—	—	2,5
	—	—	—	—	2,8
Kartuli-X-viirus**	—	—	—	—	15,0
	—	—	—	—	32,0

* α on suhtarv, mis näitab, mitu korda kiiremini liigub kolonnis ühtedel ja samadel tingimustel (boraatpuhver pH 8,6) fenüülpuna alumine piirjoon virioonide alumisest piirjoonest (või virioonide maksimaalse suhtelise kontsentratsiooni kohast). α on kasutusele võetud, et hõlbustada katsetulemuste ja kirjanduses esitatud andmete võrdlemist.

** α väärtused on arvatud kirjanduses leiduvate andmete põhjal (van Regenmortel, 1964; Polson, Russell, 1967).

Tulemused

Elektroforeesikolonnis tekkis kolm silmaga nähtavat fraktsiooni. Ülemise neist moodustas fenüülpuna. Järgmine fraktsioon oli samblarohelist värvi ja sisaldas preparaadis olevaid lisandeid. Kõige alumine, valge ja opalestseeruv fraktsioon sisaldas viirust, mille kohta andmed on esitatud tabelis. Virioonide olemasolu kriteeriumiks kolonnist saadud 2-milliliitris-tes fraktsioonides oli neeldumine spektri ultravioletses osas. Viirust sisaldavates fraktsioonides oli suhe $D_{260} : D_{245} \geq 1,1$. Antud kriteeriumi õigsust kontrolliti vaatluste abil elektronmikroskoobis ja infektsioonikatsetega.

Elektronmikroskoopilised mikrofotod (joon. 3 ja 4) näitavad, et eespool kirjeldatud meetodil on võimalik saada küllaltki suure puhtusega X- ja N_R -viiruse preparaate.

Nagu tulemused näitavad, ei lange N_R -viiruse α -väärtus kokku kirjan- duses esitatud kurgimosaiigiviiruse vastavate väärtustega, küll aga võib täheldada küllaltki suurt kokkulangevust tubakanekroosiviiruse vastava väärtusega: N_R -viiruse keskmine α -väärtus on 10,5, tubakanekroosiviirusel 9,5. Kui pidada N_R -viirust kurgimosaiigiviiruse üheks vormiks, siis tuleks alla kriipsutada seda suurt erinevust viriooni pinna elektrilistes omadus- tes, võrreldes sama viiruse teiste seni uuritud vormidega. Taolisi erinevusi ühe ja sama viiruse eri vormide elektrilistes omadustes on leitud kirjan- duse andmetel ka kartuli-X-viiruse kohta (vt. tabel).

KIRJANDUS

- Agur M., 1966. Ühest nn. N-viiruse puhul täheldatud mutatsiooninähtusest. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria **15** (4) : 524—529.
- Agur M., 1968. Andmeid kartuli nn. N-viiruse ja kurgimosaiigiviiruse identsuse kohta. ENSV TA Toimet., Biol. **17** (3) : 288—300.
- Polson A., Russell B., 1967. Electrophoresis of viruses. In : Methods in Virology 2. ed. by K. Maramorosch and H. Koprowski, New York—London : 391—426.
- van Regenmortel M. H. V., 1964. Purification of plant viruses by zone electropho- resis. Virology **23** : 495—502.
- Scott H. A., 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology **20** : 103—106.
- Хёдрейрв У., Олсперт К., Тарасова К., 1968. Некоторые данные о так наз. вирусе N картофеля. Изв. АН ЭССР, Биол. **17** (4) : 385—388.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalsbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
6. X 1969

U. ХЕДРЕЙРВ, К. ТАРАСОВА, КЕРСТИ ОЛСПЕРТ

ОБ ИССЛЕДОВАНИИ ТАК НАЗ. ВИРУСА N КАРТОФЕЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Резюме

Очистка мутантной формы N_R вируса N картофеля проводилась методом зональ- ного электрофореза в градиенте плотности сахарозы в приспособленной для этой цели колонке серийного производства (тип АЭВ). Сравнивалась скорость движения вируса N_R картофеля как предполагаемой формы вируса мозанки огурца (ВОМ) со скоростью движения некоторых ранее исследованных другими авторами штаммов ВОМ.

Установлено, что скорость движения вируса N_R не совпадает с известными до сих пор скоростями движения штаммов ВОМ. Однако выяснилось, что она близка к скоро- сти движения вируса некроза табака.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
6/X 1969

U. HÖDREJARV, K. TARASSOVA, KERSTI OLSPERT

A STUDY OF THE SO-CALLED N VIRUS OF POTATO BY ZONE ELECTROPHORESIS

Summary

The mutant form N_R of potato N virus was purified by zone electrophoresis in sucrose density gradient. The electrophoresis column used in this work was a column of serial production (type AЭВ) adapted for this purpose.

The migration rate of potato N_R virus as a supposed strain of cucumber mosaic virus (CMV) was compared with the one of the other CMV strains described in the literature

It was found that the migration rate of N_R virus differed from that of CMV, but was similar to the migration rate of tobacco necrosis virus.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Oct. 6, 1969