

УЛЬРИХ ХЕДРЕЯРВ

НЕСЛОЖНЫЙ И БЫСТРЫЙ МЕТОД ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ДЛЯ ОКОНЧАТЕЛЬНОЙ ОЧИСТКИ НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

ULRICH HÖDREJÄRV. LIHTNE JA KIIRE TSONAALSE ELEKTROFOREESI MEETOD MÕNIN-
GATE TAIMEVIIRUSTE LÕPLIKUKS PUHASTAMISEKS

ULRICH HÖDREJÄRV. A SIMPLE AND RAPID ZONE ELECTROPHORETIC METHOD FOR
PURIFICATION OF SOME PLANT VIRUSES

Используемый для окончательной очистки растительных вирусов метод зонального электрофореза в градиенте плотности сахарозы (Brakke, 1951, 1955; Cramer и др., 1961; van Regenmortel, 1964; Polson, 1967) позволяет получить препараты с достаточно высокой степенью чистоты. Однако несмотря на удовлетворительные результаты, этот метод не может быть широко применен в качестве препаративного метода при окончательной очистке растительных вирусов. Главными причинами этого являются длительность электрофоретического процесса (20—30 и более часов) и небольшой объем разделяемого препарата (1—2 мл). Попытки сокращения затрачиваемого времени (электрофорез высокого напряжения) или увеличения диаметра колонки привели к усложнению аппаратуры, так как понадобилась еще охлаждающая система.

В данной статье изложена новая модификация метода зонального электрофореза с применением высокого напряжения в градиенте плотности сахарозы для окончательной очистки устойчивых в трис-глициновом буфере вирусов растений. Используемое напряжение в 1000 в обеспечивает достаточно высокую скорость движения компонентов (длительность опыта 4—6 ч). Сила тока при предложенной аппаратуре не превышает 1,5—2,0 мА, что исключает возможность нежелательного нагревания растворов. Диаметр колонки позволяет за один прием очистить сравнительно большие объемы вирусных препаратов (6 и больше миллилитров).

Предложенная аппаратура очень проста (рис. 1). Она состоит из колонки (диаметром 36 мм и длиной 90 мм), двух электродных сосудов, двух платиновых электродов и изогнутой трубки (диаметром 20 мм) для соединения электродных сосудов. Используемый трис-глициновый буфер содержит 0,60 г трис(гидроксиэтил)аминометана, 2,88 г глицина в 1 л воды, рН 8,5

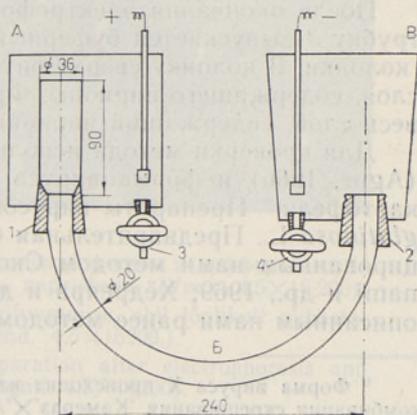


Рис. 1. Прибор зонального электрофореза.

Joon. 1. Tsonaalse elektroforeesi seade.

Fig. 1. Zone electrophoresis apparatus.

(Davis, 1964). Все растворы сахарозы содержали вышеуказанное количество трис-глицина.

Проведение опыта. Отверстие в резиновой пробке 2 (рис. 1) покрывается полупроницаемой пленкой из целлофана, которая закрепляется проволокой из нержавеющей стали или хром-никеля. Этой пробкой закрывается один конец трубки *Б*, на второй конец которой надевается пробка 1 с коническим отверстием в верхней части. Затем трубка *Б* наполняется 40%-ным (в/о) раствором сахарозы, на пробку 1 надевается колонка и соединяется с электродными сосудами. Этим же раствором (около 1 л) наполняется электродный сосуд *В*, а также колонка на 1 см от верхнего края пробки 1. После этого в колонку при помощи инъекционного шприца вводится вирусный препарат и таким же способом образуется над ним ступенчатый градиент плотности сахарозы. Для этого в колонку вводится по 10 мл 35, 30, 25, 20 и 10%-ных (в/о) растворов сахарозы, а затем до верхнего края колонки — буферный раствор трис-глицина (удельные проводимости полученного ступенчатого градиента см. на рис. 2). Далее, с целью достижения контакта между

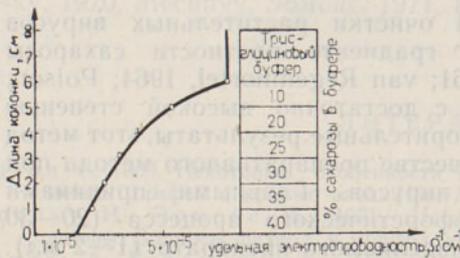


Рис. 2: Удельные электропроводимости растворов в колонке электрофореза.

Joon. 2. Elektroforeesikolonnis kasutatud lahuste erielektrijuhivus.

Fig. 2. Electric conductivities of the solutions in the electrophoretic column.

электродным сосудом и колонкой в электродный сосуд *А* несколько миллиметров выше верхнего края колонки наливается трис-глициновый буфер. В сосуды *А* и *В* вставляются платиновые электроды, и прибор оставляют на 2 ч для выравнивания температуры системы. Затем включается ток и электрофорез проводится при напряжении 1000 в (сила тока не превышает 1,5—2,0 мА). Прибор во время электрофореза находится в холодильнике. Температура в колонке держится в пределах 2—4°C. Электрофорез длится до тех пор, пока опалесцирующий слой, содержащий вирионы, не отделится от слоя, содержащего растительный материал.

После окончания электрофореза из электродного сосуда *А* через трубку 3 выпускается буферный раствор несколько ниже верхнего края колонки. В колонку сверху опускается капилляр (сифон) на 1 мм ниже слоя, содержащего вирионы. Фракции собирали по 2 мл или выпускали весь слой, содержащий вирионы, в одну фракцию.

Для проверки метода использовались форма N_R вируса *N* картофеля (Agur, 1966) и форма вируса *X*, выделенная из определенной формы картофеля.* Препараты вирусов N_R и *X* получены из листьев *Nicotiana glutinosa* L.. Предварительная очистка вируса N_R проводилась модифицированным нами методом Скотт-Таканамитомару (Scott, 1963; Takanami и др., 1969; Хёдрейарв и др., 1971). Вирус *X* картофеля выделен описанным нами ранее методом (Hödrejäv и др., 1971).

* Форма вируса *X* происходит из репродукции сеянца картофеля, полученного от комбинации скрещивания 'Камераз'Х'Аргие (V) на Йёгеваской селекционной станции.

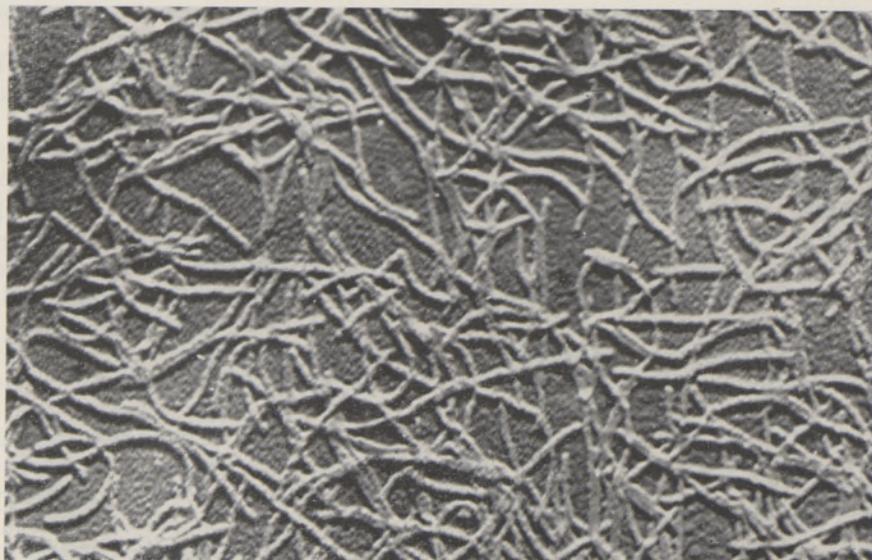


Рис. 3. Окончательно очищенный при помощи электрофореза и дифференциального центрифугирования препарат вируса X картофеля. (Увел. $2,5 \times 16\,200$).
Joon. 3. Elektroforeesi ja diferentsiaalse tsentrifuugimise abil lõplikult puhastatud kartuli-X-viirus. (Suurend. $2,5 \times 16\,200$).
Fig. 3. Finally purified potato virus X preparation after electrophoresis and differential centrifugation. (Magnif. $2,5 \times 16\,200$).

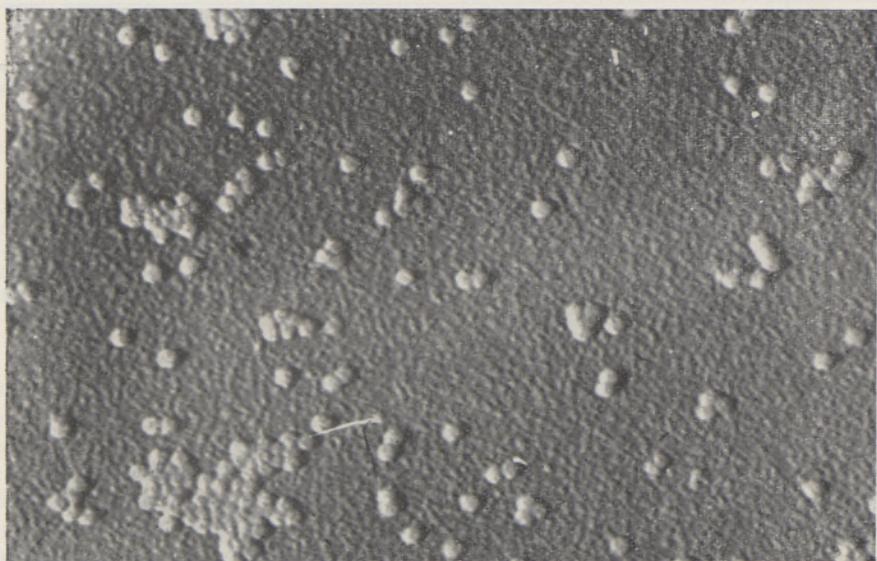


Рис. 4. Окончательно очищенный при помощи электрофореза и дифференциального центрифугирования препарат вируса N_R картофеля. (Увел. $4,5 \times 16\,200$).
Joon. 4. Elektroforeesi ja diferentsiaalse tsentrifuugimise abil lõplikult puhastatud kartuli- N_R -viirus. (Suurend. $4,5 \times 16\,200$).
Fig. 4. Finally purified potato virus N_R preparation after electrophoresis and differential centrifugation. (Magnif. $4,5 \times 16\,200$).

Полученные препараты после первого дифференциального центрифугирования диализировали в течение ночи против предусмотренного для электрофореза трис-глицинового буферного раствора. Перед введением в колонку к диализированному препарату добавлялись: несколько капель фенильного красного и сахара до 37%-ной концентрации.

После электрофореза полученные фракции, содержащие вирионы, центрифугировали в случае вируса N_R в течение 90 мин, а в случае вируса X — 60 мин при 105 000 g. Осадки вирусов суспендировали в малом объеме 0,005 M боратного буфера (рН 9,0) и центрифугировали в течение 15 мин при 5400 g.

Чистота препаратов проверялась при помощи электронного микроскопа ЭМ-7 (рис. 3 и 4), и были обнаружены вирусные препараты высокой степени чистоты.

Инфекционность препаратов определялась методом титрования на половинках листьев растений *Vigna sinensis* L. (для вируса N_R) и *Comphrena globosa* L. (вируса X). Определялось также поглощение препаратов при 260 нм. Результаты титрования пересчитывались на 1 единицу оптической плотности и на половинку листа.

Выявлено, что в случае вируса X картофеля инфекционность очищенных препаратов в 2 раза, а вируса N_R в 1,3 раза выше инфекционности соответствующих исходных препаратов.

При электрофорезе в колонке образовались три видимые глазом зоны: верхняя — фенильный красный, средняя, зеленая — растительный материал и нижняя, белая, опалесцирующая зона — вирионы. Результаты электрофореза вирусов N_R и X картофеля приведены в таблице.

Расположение фракций при электрофорезе в колонке в определенные моменты времени

Время, мин	Вирус X			Вирус N_R		
	Фракция вирионов, см	Фракция растительного мате- риала, см	Фракция фенильного красного, см	Фракция вирионов, см	Фракция растительного мате- риала, см	Фракция фенильного красного, см
0	—	—	0—0,6	—	—	0—0,4
120	0,6—1,2	1,2—1,6	1,7—2,2	0,7—1,2	1,2—1,5	1,9—2,3
180	0,9—1,6	1,6—2,1	2,5—3,1	1,1—1,5	1,5—2,2	2,6—3,1
240	1,4—2,1	2,1—2,7	3,4—4,0	1,4—1,9	2,0—2,6	3,4—3,9
300	1,9—2,5	2,5—3,3	4,1—4,8	1,8—2,3	2,5—3,2	4,4—4,9
360	1,9—2,7	2,8—3,6	5,0—5,7	2,2—2,6	2,9—3,5	5,2—5,9

В ходе электрофореза наблюдалось различие в скоростях движения вышеуказанных зон в боратном (Hödgejägvi и др., 1971) и трис-глициновом буферах. Например, скорость движения фенильного красного в трис-глициновом буфере значительно меньше, чем в боратном буфере, а скорость движения вируса X больше, причем она почти одинакова со скоростью движения вируса N_R картофеля. Изменения скоростей движения зон, по-видимому, связаны с изменениями в величинах зарядов поверхности молекул под действием буферной системы.

Предложенный в статье электрофоретический метод отличается быстротой проведения опыта, благодаря чему оказалось возможным использовать в качестве стабилизирующей среды ступенчатый градиент сахаразы, поскольку скорость диффузионных процессов между концентрационными ступенями сахаразы по сравнению со скоростями движения компонентов препарата является незначительной. Исключено также вредное влияние продуктов электролиза из-за малой плотности тока.

Полученные предварительные данные позволяют предполагать, что данный метод применим и для окончательной очистки препаратов вирусов М и S картофеля.

Автор сердечно благодарит старшего инженера К. Тарасову за проверку чистоты вирусных препаратов в электронном микроскопе.

ЛИТЕРАТУРА

Хёдреярв У., Олсперт К., 1971. Некоторые данные о физико-химических свойствах вируса N картофеля. VI Всесоюзное совещание по вирусным болезням растений. Доклады. Киев (в печати).

Agur M., 1966. Ühest nn. N-viiruse puhul täheldatud mutatsiooninähtusest. ENSV TA Toimet., Biol. 15 (4) : 524—529.

Brakke M. K., 1951. Density gradient centrifugation: A new separation technique. J. Am Chem. Soc. 73 : 1847—1848.

Brakke M. K., 1955. Zone electrophoresis of dyes, proteins and viruses in density gradient columns of sucrose solution. Arch. Biochem. Biophys. 55 : 175—190.

Cramer P., Svensson H., 1961. Density gradient electrophoresis as a new tool in virology. Experientia 17 : 49—57.

Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Ac. Sci. 121 (2) : 410.

Hödrejärv U., Tarassova K., Olsper K., 1971. Nn. kartuli-N-viiruse elektroforeetilise uurimisest. ENSV TA Toimet., Biol. 20 (1) : 79—83.

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 electrophoresis. Virology 23 : 495—502.

Scott H. A., 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology 20 : 103—106.

Takanami Y., Tomaru K., 1969. Effect of EDTA on cucumber mosaic virus and its application in purification. Virology 37 : 293—295.

Институт экспериментальной биологии Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию 14/XII 1971

| Фракция
красного
цветка
см |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0-0.4 | 0-0.4 | 0-0.4 | 0-0.4 | 0-0.4 | 0-0.4 | 0-0.4 |
| 1.9-2.3 | 1.9-2.3 | 1.9-2.3 | 1.9-2.3 | 1.9-2.3 | 1.9-2.3 | 1.9-2.3 |
| 2.6-3.1 | 2.6-3.1 | 2.6-3.1 | 2.6-3.1 | 2.6-3.1 | 2.6-3.1 | 2.6-3.1 |
| 3.4-3.9 | 3.4-3.9 | 3.4-3.9 | 3.4-3.9 | 3.4-3.9 | 3.4-3.9 | 3.4-3.9 |
| 4.4-4.9 | 4.4-4.9 | 4.4-4.9 | 4.4-4.9 | 4.4-4.9 | 4.4-4.9 | 4.4-4.9 |
| 5.2-5.9 | 5.2-5.9 | 5.2-5.9 | 5.2-5.9 | 5.2-5.9 | 5.2-5.9 | 5.2-5.9 |

В ходе электрофореза наблюдаются различия в скорости движения зон в боратном (Hödrejärv и др., 1971) и триэтанолном боратном буфере. Напряжением электрофореза движется фракция фенольного красителя, скорость движения которой значительно меньше, чем в боратном буфере. В боратном буфере X доминирует принцип зонального движения. Изменения скорости движения зон по-видимому связаны с изменениями в вязкости раствора и в момент действия буферной системы. Предложенный метод отличается от метода электрофореза тем, что в нем не требуется предварительная очистка препарата. В качестве стабилизирующей среды используются растворы, поскольку скорость диффузионных процессов между компонентами раствора по сравнению со скоростью движения компонентов является незначительной. Некачественно выделенные продукты электрофореза из-за малой плотности тока