

ONDERZOEKINGEN OVER DE ZUIVERING VAN *CUCUMIS VIRUS 1 ST. CHR.* UIT TABAK¹

With a summary:

Studies on the purification of Cucumis virus 1 st. Chr. from tobacco

DOOR

J. A. VAN DER VEKEN

Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse

INLEIDING

Bij het zuiveren van *Cucumis virus 1* worden vaak sterk wisselende resultaten verkregen. Sommige onderzoekers menen dat de verschillen te wijten zijn aan adsorptie aan celbestanddelen of aggregatie van het virus (SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER, 1952; NOORDAM, 1952). In verband met een onderzoek naar de biochemische eigenschappen van enkele virussen, die tot het *Cucumis virus 1* gerekend worden, werd de zuivering van een door NOORDAM uit *Chrysanthemum indicum* geïsoleerde stam van *Cucumis virus 1* nader bestudeerd.

METHODEN

Alle onderzoeken werden uitgevoerd met *Nicotiana tabacum*, die een goede waardplant is voor *Cucumis virus 1 st. Chr.* Jonge planten werden geïnfecteerd met dit virus, dat indertijd door NOORDAM aan ons laboratorium ter beschikking was gesteld. Na het duidelijk zichtbaar worden van de symptomen werden de bladeren geoogst en, nadat de nerven waren verwijderd, gemalen met twee gewichtsdelen van één der bufferoplossingen, vermeld in tabel 1, respectievelijk 0,8 % NaCl-oplossing. Deze suspensie werd nu verder gezuiverd volgens schema 1.

De hoeveelheid virus in verschillende fracties werd serologisch bepaald volgens de microprecipitatiemethode (VAN SLOGTEREN, 1955a), met een door VAN SLOGTEREN (1955b) bereid antiserum.

Agarelektroforese werd uitgevoerd volgens de methode van CLEVE & SCHWICK (1957).

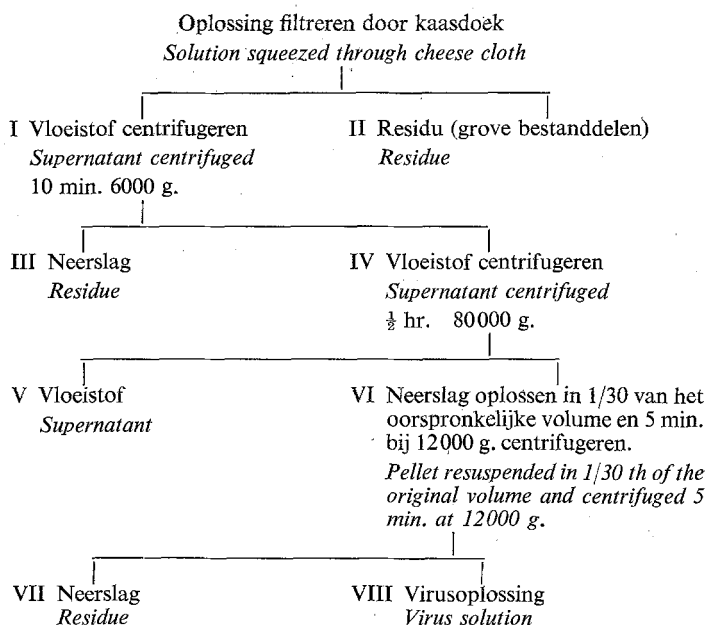
RESULTATEN

1. Invloed van enkele factoren op de virusopbrengst

Om de invloed van verschillende zouten op de virusopbrengst na te gaan werd een aantal bladeren van geïnfecteerde planten gehalveerd. De ene helft werd met 0,8 % NaCl, de andere helft met een bufferoplossing gemalen, waarna beide oplossingen volgens schema 1 werden gezuiverd. De verschillen in opbrengst bij gebruik van een aantal bufferoplossingen zijn niet groot. Met 0,8 % NaCl schijnt de opbrengst iets lager te zijn dan bij extractie met bufferoplossing pH 7,0 (tabel 1). Toevoegen van verschillende stoffen zoals KCN, NaHSO₃

¹ Aangenomen voor publikatie 3 september 1958.

SCHEMA 1. Zuivering van *Cucumis virus 1 st. Chr.* door centrifugeren.
Purification of Cucumis virus 1 st. Chr. by centrifugation.



TABEL 1. Invloed van verschillende zoutoplossingen op de virusconcentratie in fractie VIII.
 Zie ook schema 1.

*Effect of different salt solutions on the virus concentration in fraction VIII. See also
 scheme 1.*

Oplosmiddel Solvent	Titer van de virusoplossing Dilution end-point of virus		
	Proef 1 Exper. 1	Proef 2 Exper. 2	Proef 3 Exper. 3
Fosfaatbuffer, 0,1 Mol., pH 7,0	1/32	1/128	1/32
Fosfaatbuffer, 0,1 Mol., pH 7,0+0,02 Mol. Verseen	1/32	1/128	
Maleaatbuffer, 0,1 Mol., pH 7,0	1/32	1/128	1/32
Citraatbuffer 0,1 Mol., pH 6,0	1/32	1/ 64	1/32
0,8 % Natriumchloride	1/16	1/ 64	1/32

en Verseen, een complexbindend reagens, heeft geen invloed op de virusconcentratie in fractie VIII. Bij deze proeven hebben wij ons meestal beperkt tot het bepalen van het virus langs serologische weg. Uit infectieproeven bleek dat de oplossingen infectievermogen bezaten, maar dit ging vrij snel verloren.

Uit oudere bladeren kan volgens de toegepaste zuiveringsmethode weinig virus worden geïsoleerd.

Het leek gewent na te gaan in welke andere fracties dan fractie VIII virus terechtkomt bij deze methode van zuivering. Daartoe werden alle fracties van

een zuivering met 0,8 % NaCl nog eens geëxtraheerd met fosfaatbuffer. Hierbij bleek, dat vooral in fractie VII een belangrijke hoeveelheid virus voorkomt. Dit virus was niet extraheerbaar met 0,8 % NaCl.

Het grote bezwaar van gebruik van de fosfaatbuffer is, dat naast virus ook een grote hoeveelheid chromoproteïne geëxtraheerd wordt. Later bleek een groot gedeelte van het virus uit fractie VII in oplossing te gaan bij incubatie in citraatbuffer pH 6,0.

Uit andere proeven is ons gebleken, dat grote hoeveelheden virus verloren kunnen gaan bij bevriezen van de ruwe bladextracten of bij precipitatie van het virus met 30 % ammoniumsulfaat. Meestal wordt in zulke gevallen het virus aangetroffen in de fracties welke tijdens centrifugeren bij laag toerental neerslaan. Het kan hieruit vrijgemaakt worden door incuberen in citraatbuffer pH 6,0.

2. Enkele eigenschappen van de gezuiverde virussuspensies

Reeds bij bewaren in de ijskast ontstaat na enkele dagen een neerslag, zonder dat daarbij enige vermindering van de serologische activiteit valt waar te nemen. Vooral in 0,8 % NaCl en citraatbuffer pH 6,0 treedt dit verschijnsel snel op. Ook bij bevriezen ontstaat een dergelijk neerslag, waarbij soms een geringe hoeveelheid virus verloren gaat. In dit geval was het mogelijk door toevoegen van 10 % glycerol de vorming van een precipitaat te voorkomen.

Deze verschijnselen waren aanleiding tot een onderzoek naar het aantal hoog-moleculaire componenten in deze suspensies. Daaruit bleek een groot verschil tussen het suspenderen in citraatbuffer pH 6,0 en 0,8 % NaCl enerzijds en dat in de andere buffermedia anderzijds. Treffen we in laatstgenoemde milieus steeds twee componenten aan, met sedimentatieconstanten 18 S en 88 S, in de beide eerstgenoemde oplosmiddelen komt meestal alleen de component met sedimentatie-constante 88 S voor. Ondanks de homogeniteit van de verbinding 88 S in de ultracentrifuge, moeten we uit de voorgaande resultaten besluiten, dat in deze preparaten nog meer componenten voorkomen. Resultaten van de agar-elektroforese bevestigen deze conclusie. Om de bijmengsels te verwijderen werden de viruspreparaten 10 uur bij 35°C in citraatbuffer pH 6,0 geïncubeerd, waarna het ontstane neerslag werd afgecentrifugeerd. De serologische activiteit vermindert hierbij in geringe mate, maar het infectievermogen gaat geheel verloren. Met de agar-immuno-elektroforese vinden we geen verschil in de antigeencomponent voor en na de incubatie. Wel schijnt het virus na de incubatie gemakkelijker te aggregeren. Na precipitatie met de ultracentrifuge is het virus, vermoedelijk tengevolge van deze eigenschap, moeilijk weer in oplossing te brengen.

Een zeer merkwaardig feit is het virusverlies dat optreedt bij dialyse van de virussuspensie in 0,8 % NaCl tegen water. Zo was in een experiment de precipitatie-titer van het virus vóór dialyse 1/32, terwijl na dialyse geen virus meer aangetoond kon worden. In overeenstemming hiermee treffen we in de elektronenmicroscopische opnamen slechts enkele bolvormige virusdeeltjes aan met een diameter van 50 tot 100 m μ . In overeenkomstige geïncubeerde preparaten treffen we veel meer van deze deeltjes aan.

DISCUSSIE EN SAMENVATTING

Uit de resultaten van ons onderzoek kan worden besloten dat *Cucumis virus 1 st. Chr.* uit tabak gedeeltelijk gezuiverd kan worden door het virus te extraheren met zoutoplossingen, te centrifugeren en vervolgens de normale nucleoproteïnen te verwijderen door de preparaten in citraatbuffer te incuberen. Het infectievermogen blijkt, helaas, niet behouden te zijn gebleven. Hoewel de hoeveelheid virus, die geïsoleerd kan worden bij extractie met bufferoplossingen van pH 7,0 iets hoger is dan met 0,8 % NaCl, verdient het gebruik van laatstgenoemde oplossing, evenals dat van citraatbuffer pH 6,0 toch de voorkeur, daar hiermee niet de normale eiwitcomponent met sedimentatieconstante 18 S geëxtraheerd wordt (EGGMAN, SINGER & WILDMAN, 1953).

Niettegenstaande de extractie met zoutoplossing gaat toch een aanmerkelijke hoeveelheid virus verloren in de fracties, die reeds bij centrifugeren met laag toerental neerslaan. Vaak worden de chloroplasten beschouwd als de bestanddelen welke het virus binden (SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER, 1952). Gezien de sterke binding tussen virus en de normale nucleoproteïnen uit de microsoomfractie, welke bleek uit de agarelektroforese en de sedimentatiebepalingen, achten wij het niet uitgesloten, dat ook deze verbindingen een belangrijke rol spelen bij de virusverliezen. In alle gevallen waarin de oplosbaarheid van deze normale nucleoproteïnen verandert, o.a. bij bevriezen van ruw sap of bij precipitatie met ammoniumsulfaat, gaat ook vaak virus verloren. Hiermee is natuurlijk niet te verklaren, dat hierbij nogal wisselende resultaten verkregen worden.

Door incubatie in citraatmilieu worden de normale nucleoproteïnen afgebroken, waarbij het virus, althans voor zover het de fysisch-chemische eigenschappen betreft, geen verandering ondergaat; vermeld is reeds, dat het infectievermogen verloren gaat, wat bij tabaksmozaïekvirus niet het geval is (PIRIE, 1950, 1956).

De virusverliezen, die optreden bij dialyse van de niet geïncubeerde viruspreparaten in 0,8 % NaCl tegen water, zijn van groot belang voor het elektronenmicroscopisch onderzoek. Waarschijnlijk slaat het virus neer met de normale nucleoproteïnen die onoplosbaar zijn in zoutvrij milieu. De vorm en de grootte der virusdeeltjes komt overeen met die, beschreven door DE BRUYN OUBOTER, BEIJER & VAN SLOGTEREN (1952) en NOORDAM (1952).

SUMMARY

Purification of *Cucumis virus 1 st. Chr.* by precipitation with ammonium sulphate sometimes gives poor results (NOORDAM, 1952). In these cases the virus is lost in fractions precipitated at low centrifugation speed. It is believed that adsorption of the virus to cell constituents or aggregation is the cause of these losses. The same phenomenon was observed with *Cucumis virus 1* (SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER, 1952).

It was possible partly to purify the virus from *Nicotiana tabacum* var. White Burley by extraction with 0,8 % NaCl, ultracentrifugation and removal of the normal nucleoproteins by incubation in citrate buffer pH 6.0 (scheme 1). During incubation the infectivity was lost.

The total amount of virus extracted if the buffer solution was pH 7.0 seemed

somewhat higher, but a large amount of chromoproteins and a normal nucleoprotein with sedimentation constant 18 S are extracted as well (EGGMAN, SINGER & WILDMAN, 1953). So for purification 0.8 % NaCl or citrate buffer pH 6.0 were used.

The virus, purified by centrifugation, contained material that can be removed by incubation in citrate buffer pH 6.0, without affecting the virus content measured by the microprecipitation test (VAN SLOGTEREN, 1955a). These substances resembled the normal nucleoproteins from the microsome fraction (PIRIE 1950, 1956). The agar electrophoresis and the ultracentrifugation studies indicate that in vitro the virus is firmly bound to the normal nucleoproteins. So it seems possible that changes in the solubility of the nucleoproteins cause loss of virus. This is confirmed by the loss of virus from an unincubated virus solution during dialysis against water.

In the virus preparations we found particles 50–100 m μ diam. as described by DE BRUYN OUBOTER, BEYER & VAN SLOGTEREN (1952) en NOORDAM (1952).

LITERATUUR

- BRUYN OUBOTER, M. P. DE, J. J. BEIJER & E. VAN SLOGTEREN, – 1952. Diagnosis of plant diseases by electron microscopy. *Ant. v. Leeuwenhoek* 17: 189–208.
- CLEVE, H. & G. SCHWICK, – 1957. Immuno-elektrophoretische Serumanalyse bei Makroglobulinaemie Waldenstrom. *Z. Naturforsch.* 12b: 375–384.
- EGGMAN, L., S. J. SINGER & S. G. WILDMAN, – 1953. The proteins of green leaves. *J. biol. Chem.* 203: 969–983.
- NOORDAM, D., – 1952. Virusziekten bij chrysanten in Nederland. *T. Pl.ziekten* 58: 121–189.
- PIRIE, N. W., – 1950. The isolation from normal tobacco leaves of nucleoprotein with some similarity to plant viruses. *Biochem. J.* 63: 316–325.
- PIRIE, N. W., – 1956. Some components of tobacco mosaic virus preparations made in different ways. *Biochem. J.* 63: 316–325.
- SILL, W. H., W. C. BURGER, M. A. STAHMANN & J. C. WALKER – 1952. Electron microscopy of Cucumber virus I. *Phytopath.* 42: 420–422.
- SLOGTEREN, D. H. M., VAN – 1955a. Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil. *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954*: 51–54.
- SLOGTEREN, D. H. M., VAN – 1955b. Serological analysis of some plant viruses with the gel diffusion method. *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954*: 45–50.