

Purificación en gran escala de una variedad del virus del mosaico del tabaco hallada en Cuba

S. QUINTERO, S. KORNEVA Y R. H. MARIBONA

Red Nac. de Investigaciones Tabacaleras, MINAG y Grupo de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,

Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 5 de agosto de 1977

Recibido: 23 de mayo de 1979

ABSTRACT. A Tobacco Mosaic Virus strain (TMVsc) is purified by mean of the ultracentrifugation in a sucrose gradient, in a titanium zonal rotor B-XV, in a continuous flow rotor, by differential centrifugation and by Sephadex G-200. Different buffers, ionic strength, and times are used for the dialysis. 500 mg of pure, active, and nonaggregated virus, analyzed by the ultracentrifugation and the analytical sucrose gradient, were purified.

RESUMEN. Una variedad del Virus del mosaico del tabaco (VMTsc) es purificada mediante el uso de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en un rotor zonal B-XV de titanio, en rotor de flujo continuo, por centrifugación diferencial y por Sephadex G-200. Se usan distintos tampones, fuerzas iónicas y tiempos de dialización. Se obtuvieron 500 mg del virus puro, activo y sin agregados detectables en la ultracentrifuga analítica y en gradiente analítico de sacarosa.

INTRODUCCION

El estudio de las macromoléculas biológicas requiere a menudo, la obtención en cantidades de cientos de mg de material homogéneo y biológicamente activo. Estas cualidades a veces son antagónicas, por lo que el objetivo se logra con dificultad. Pequeñas cantidades del virus del mosaico del tabaco (VMT) se obtienen con relativa facilidad, puras y activas, pero cuando se requieren centenares de mg aparece la agregación como uno de los problemas fundamentales, frecuente en la purificación de macromoléculas, lo que fue detectado para el VMT desde los primeros trabajos bioquímicos; sugerido primeramente por Bawden y Pirie

(1937), Bald y Briggs (1937) y confirmado por Loring y cols., (1938) y Lauffer (1938, 1944a). Este problema no ha sido totalmente resuelto. Algunos autores han obtenido la purificación en gran escala (Gooding y Hebert, 1967) pero no se han propuesto la obtención del virus en grandes cantidades sin agregados.

En este trabajo, los autores se proponen la obtención del virus puro, activo y homogéneo sin agregados que pueden enmascarar la presencia de otras especies macromoleculares e impiden su utilización en posteriores investigaciones moleculares. Para ello se combina la tecnología disponible de la ultracentrifugación con otros métodos de purificación de virus: centrifugación en rotor de flujo continuo, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en rotor zonal, centrifugación diferencial y cromatografía en columna de Sephadex. La clarificación se realizó mediante el punto isoeléctrico y cloroformo; la precipitación fue por ultracentrifugación, por precipitación salina o por el punto isoeléctrico. Además, se utilizaron distintos tampones, tiempos de diálsis y fuerzas iónicas para disminuir o evitar la agregación.

Para tener un criterio sobre la homogeneidad del preparado y por consiguiente determinar la calidad de la purificación, el virus purificado se analizó en la ultracentrifuga analítica y por centrifugación en gradiente analítico de sacarosa de 5-20% o de 10-40%.

La infectividad del virus fue determinada en los distintos pasos de la purificación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó la variedad severa de Cuba del Virus del mosaico del tabaco (VMTsc), (Quintero, 1975; y Quintero y Kouri, inédito) la que fue inoculada en plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum* L.vc. Criollo de 8-10 hojas, cultivadas en aislador en temperatura entre 21 y 33 °C con iluminación natural de 12,5 horas diarias.

El virus fue inoculado mecánicamente mediante espátula de vidrio y carbonudo de 900 mallas. A los 25-30 días de inoculadas las plantas, se cosecharon las hojas que presentaban síntomas de mosaico verde en

fondo claro en estado de desarrollo completo y se utilizaron como fuente de virus (*Quintero y cols., 1975*).

Obtención de virus

Las hojas que contenían el virus fueron desnervadas y congeladas a -20 °C. Se usó una máquina cromada., de moler carne, para moler las hojas (*Steere, 1959*), las cuales fueron pasadas tres veces por la misma, añadiendo 4 ml de tampón tris-CLH 0,1 M pH 7,3 con 0,5% de 2-mercaptopetanol (*Walker y Pirone, 1972*) por gramo de tejido fresco. Las hojas trituradas se agitaron durante 10 minutos en agitador eléctrico y el macerado se filtró por tela fina de "nylon" y se ajustó a pH 5,0 con CLH al 5% (*Lindberg y cols., 1956*). El filtrado se introdujo en un rotor de flujo continuo (RFC) de 300 ml de capacidad y se extrajo a una velocidad de flujo de 100 ml/minuto.

Después de llenar el rotor hasta el nivel de rebozo, se continuó la centrifugación a 16,000 rpm durante 5 minutos antes de abrir el flujo. Al terminar el mismo se continuó la centrifugación durante 5 minutos. El sobrenadante fue emulsificado con 1/7 de cloroformo (v/v) en agitación constante durante 30 minutos en temperatura de 20 °C y fue pesado por el RFC en las mismas condiciones anteriores, pero con un flujo de 200 ml/minuto. El sobrenadante fue precipitado con 0,35 g de sulfato de amonio por ml en agitación lenta durante una hora a temperatura ambiente, o se le ajustó el pH al del punto isoeléctrico del virus, en baño de hielo. En uno u otro caso se centrifugó en el RFC con un flujo de 50 ml/minuto, a 17,000 rpm. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El precipitado se resuspendió en tampón EDTA Na₂ 0,001 M pH 7,0 y se dializó contra el mismo tampón en una relación de 1:1000 durante 16 horas a 7 °C. Posteriormente se eliminaron agregados por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se ultracentrifugó a 80 000 g durante una hora. El precipitado, que contenía el virus, fue resuspendido en el tampón anterior y mantenido en un agitador de tubos durante una hora. La resuspensión fue dializada como en el caso anterior y cromatografiada en una columna de Sephadex G-200, o ultracentrifugada en gradiente de sacarosa en un rotor zonal B-XV de titanio.

Cromatografía

Se preparó una columna de 1,5 m × 4 cm con Sephadex G-200 en tampón Tris-ClH 0,02 M pH 7,3 y se equilibró con el doble de su volumen inerte con una velocidad de flujo de 0,5 ml por minuto. Se chromatografiaron 1 500 D.O. del virus y se colectaron fracciones de 6 ó de 10 ml. Las que contenían el virus, fueron detectadas por su absorbancia a 280 nm en un densitómetro de flujo continuo (Uvicord II) y se les ajustó el pH del punto insoeléctrico del virus en baño de hielo. Se centrifugó a 5 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en el tampón EDTA Na₂ y el pH fue ajustado a 7,0 manteniéndose en agitación constante durante 10 minutos. Después se dializó contra el mismo tampón en una relación de 1:1000 a 7 °C durante 40 horas. El virus fue chromatografiado; después de la diálisis fue analizado en la ultracentrifugadora analítica y en gradiente analítico de sacarosa.

Rotor zonal

También se utilizó la alternativa de purificar el virus mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en un rotor zonal, según Pérez y cols., (1976), para lo cual se preparó 1,2 l de un gradiente lineal de sacarosa de 5-20% en el rotor zonal B-XV de titanio. La muestra de 1 000 D.O. se introdujo con una solución de sacarosa al 2,5% en un volumen de 75 ml. Se ultracentrifugó a 35 000 rpm durante 1,5 horas en la MSE SS 75. Se colectaron fracciones de 20 ml y se les determinó el índice de refracción a 20 °C y la absorbancia a 260 nm.

Gradiente de sacarosa

Para determinar la homogeneidad del preparado, alícuotas de 5-8 D.O. del virus purificado fueron ultracentrifugadas en gradientes analíticos de sacarosa de 5-20% preparado en tampón EDTA Na₂ 0,001 M en el rotor 3 × 10 de ángulo libre a 29 000 rpm durante 30 minutos en la ultracentrifugadora MSE SS 50. También se usó alternativamente el gradiente de sacarosa de 10-40% a 29 000 rpm durante una hora.

Ultracentrifugación analítica

Alícuotas del virus de 10 D.O. fueron analizadas en la ultracentrífuga analítica MSE en las condiciones reportadas anteriormente por Quintero y cols., (1975).

Diálisis

Se realizaron varias diálisis comparativas para determinar su influencia en la desagregación y en la estructura nativa. Para ello se utilizó tampón EDTA Na_2 0,1, 0,01, 0,001 M y agua destilada durante 24, 48, 72, 90 y 108 horas en una temperatura aproximada de 6 °C, en agitación constante y en una relación de volumen de $1:500 \times 2$ ó 1:1000. También se utilizó tampón Tris-ClH 0,1, 0,02 y 0,05 M pH 7,0.

Prueba de infectividad

Todos los pasos de la purificación fueron muestrados y se les determinó la infectividad en *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn en las condiciones previamente reportadas por Quintero y cols., (1975) y en *N. tabacum* L. cv. Criollo Especial.

RESULTADOS

El virus semipurificado, sin cromatografiar o sin ultracentrifugar en el rotor zonal, describió un sedimentograma compuesto por dos componentes pesados Fig. 1, con una distribución asimétrica.

La diálisis contra agua desde 24 hasta 90 horas permitió la obtención de un sistema aparentemente monodisperso (Fig. 2) con un coeficiente de sedimentación de más de 206 S y se observó una pérdida considerable por agregación del material viral. La diálisis contra tampón EDTA Na_2 0,1 M desde 24 hasta 108 horas, resolvió un solo componente (Fig. 3) mucho más simétrico, con coeficientes de sedimentación que oscilaron entre 177 y 194 S, se observó también una pérdida considerable por agregación del virus: en cambio, el tampón 0,01 M permitió la obtención de un componente simétrico con pérdida despreciable cuando se dializó

de 36 a 48 horas. Similares resultados se obtuvieron con el tampón 0,001 M; o sea, entre 24 y 48 horas de diálisis, permitió la obtención de sistemas monodispersos (Fig. 4) con una constante de sedimentación alrededor de $184 \text{ S} \pm 5$, pero otros tiempos de diálisis produjeron agregados o no permitieron la resolución del material en un solo componente. La pérdida por agregación del virus fue despreciable con este tampón.

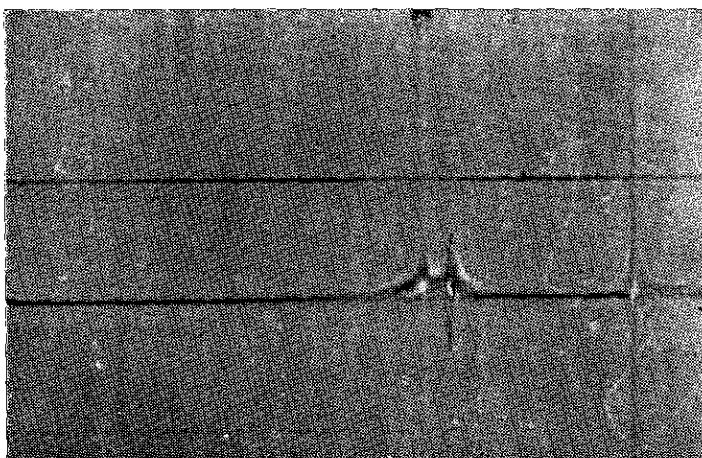


Fig. 1. Sedimentograma de una muestra sin chromatografiar.

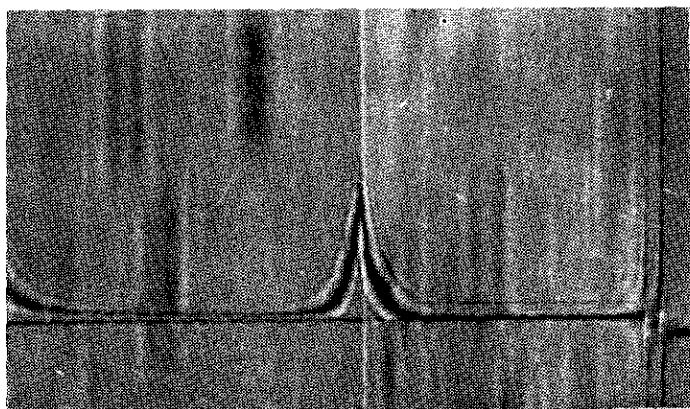


Fig. 2. Sedimentograma de una muestra dializada contra agua durante 48 horas.

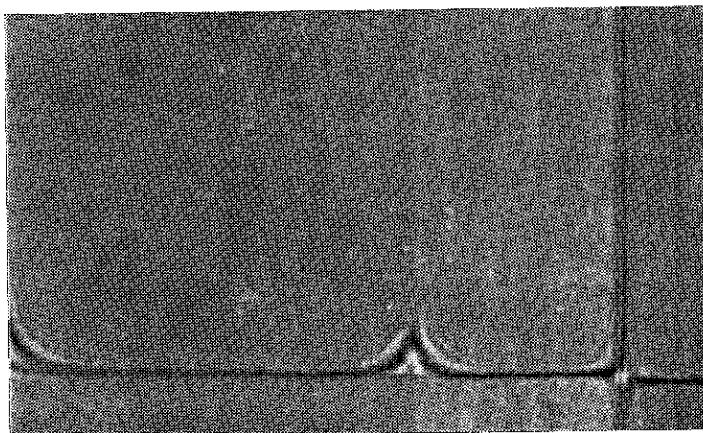


Fig. 3. Sedimentograma de una muestra dializada contra tampón EDTA Na_2 0,1 M.

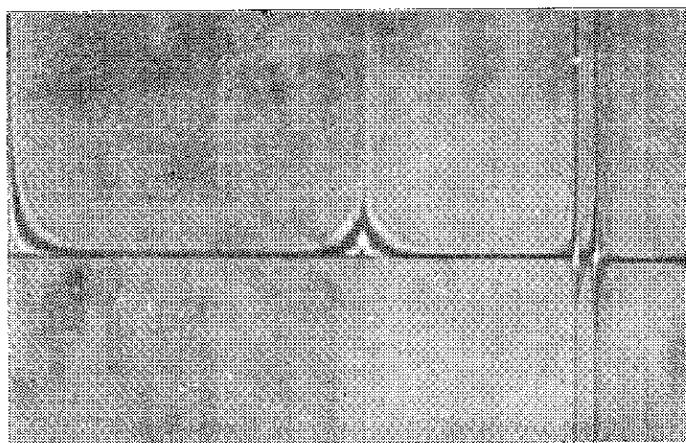


Fig. 4. Sedimentograma de una muestra dializada contra tampón EDTA Na_2 0,001 M durante 40 horas.

El efecto de la diálisis sobre la dispersión del sistema viral del VMT purificado fue analizado paralelamente por ultracentrifugación en gra-

diente analítico de sacarosa, obteniéndose una distribución agudizada y simétrica sin contaminantes al menos detectables a 260 nm.

Todas las diálisis contra tampón Tris-ClH dieron agregados de distintos tamaños.

El incremento de infectividad, no obstante de que las cantidades de virus purificado ascendió a una escala aproximadamente veinte veces mayor, resultó comparable con lo reportado anteriormente por los autores (*Quintero y cols., 1975*).

La cantidad total obtenida de virus activo, puro y desagregado, fue de 0,5 g determinada por el índice de absorbancia a 260 nm, ajustado por el método de Lowry y cols., (1951) de suspensiones virales (1 D.O. = 0,36 mg).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La presencia de dos componentes pesados en el sedimentograma de la ultracentrífuga analítica, exige la investigación de las alternativas siguientes:

La primera alternativa sería considerar que el virus se encuentra en forma de distintos estados de agregación. La segunda es que el virus esté contaminado con ribonucleoprotéidos de la planta, y por último, la alternativa más peligrosa para una purificación viral, la presencia de otro virus contaminante.

Es conocido el efecto del EDTA sobre la agregación de partículas virales, así como, el hecho de que el VMT forma distintos tipos de agregados reversibles al estado de monómero (*Lauffer y Stevens, 1968*). Si el preparado viral, que había mostrado dos componentes, al ser dializado contra EDTA conduce a la formación de una sola frontera simétrica al análisis en la ultracentrífuga analítica y en gradiente de sacarosa, y si además se confirma la reproducción del síndrome característico del virus purificado (Fig. 5) podemos descartar inequívocamente la presencia de ribonucleoprotéidos o de otro virus contaminante.

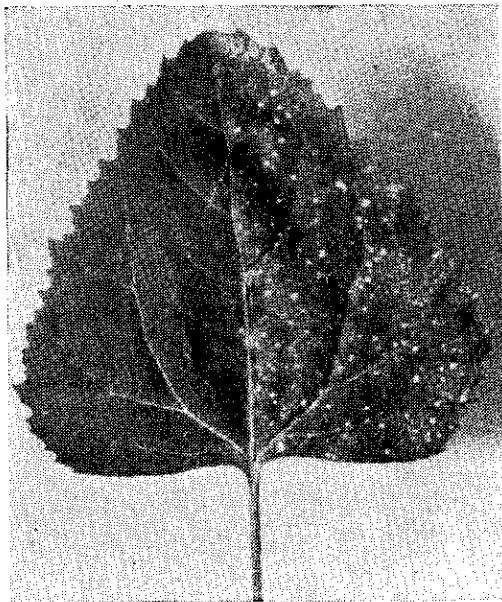


Fig. 5. Hoja de *C. amaranticolor* que muestra lesiones necróticas locales producidas por el VMTsc.

Los resultados de la Fig. 6 y del gradiente analítico de sacarosa muestran que los dos componentes virales correspondientes a distintos estados de agregación después de la diálsis contra EDTA Na_2 0,01 y 0,001 M, revierten a un solo componente cuyo coeficiente de sedimentación ($184 \pm 4,5$) corresponde al descrito por Quintero y cols., (1975) y otros autores (Lauffer, 1944a y 1944b).

La separación del VMT de proteínas ajenas, especialmente de ribonucleasa, requiere particular atención, ya que es uno de los factores principales en la inactivación del virus.

Algunos autores han utilizado la cromatografía de Sephadex G-200 para separar la ribonucleasa de los ribosomas (Kiselev y cols., 1961) y de Sephadex G-25 para separar inhibidores de este virus Nienhaus y Yar-

wood, 1972). Los resultados de la Fig. 7, presentan una resolución de la muestra cromatografiada en Sephadex G-200, en la separación de especies macromoleculares que acompañan al virus con una marcada disminución de la absorbancia (Fig. 7, fracciones 31-44) cuyo espectro de absorbancia en la región u.v. indicó una máxima y una mínima típica de proteínas. Los resultados de los gradientes analíticos de sacarosa, la ausencia de infectividad en estas fracciones, así como la infectividad del ARN obtenido de este preparado viral (Korneva y cols., 1976) permiten concluir que las posibles contaminantes protéicas incluida la ribonucleasa, fueron eliminadas en la cromatografía.

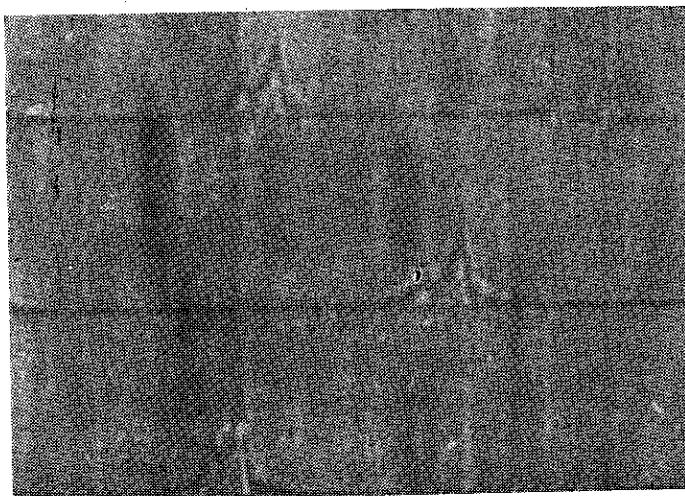


Fig. 6. Sedimentograma de cada uno de los componentes de los agregados (I-III) de la Fig. 2.

El uso del punto isoelectrónico, aunque no es recomendable para algunos virus, fue adecuado para la purificación del VMT en las condiciones citadas, ya que no se detectó disminución apreciable de la infectividad y permitió ahorro de tiempo.

El procedimiento aquí descrito, resulta útil si se tiene en consideración que se puede obtener desde 0,5 g de virus puro, biológicamente activo

y desagregado. El uso de algunos procedimientos permitió gran ahorro de tiempo, por ejemplo: el rotor de flujo continuo, utilizado en otros trabajos de bioquímica preparativa, también puede ser usado con buenos resultados para separar virus semipurificado en las etapas iniciales de la purificación, así como para su clasificación.

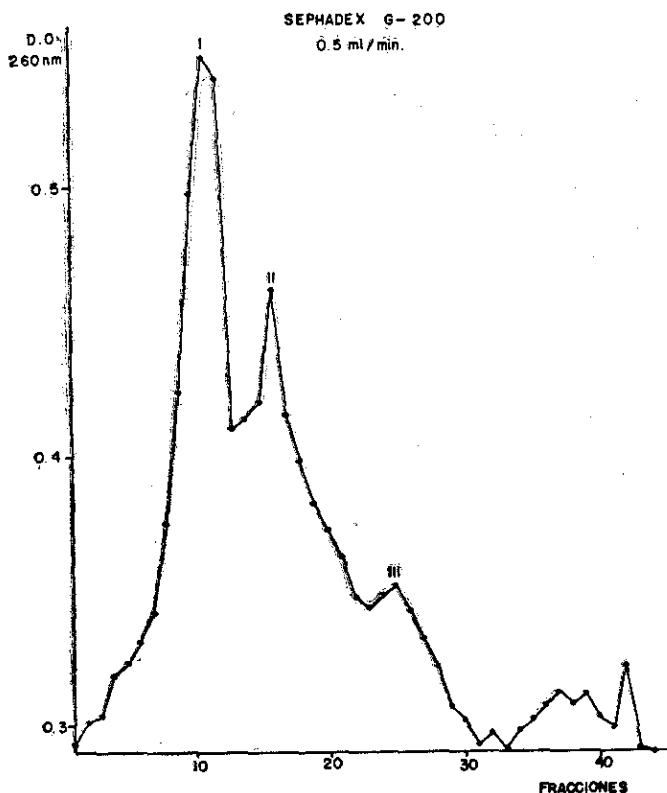


Fig. 7. Gráfico que muestra los resultados de la cromatografía realizada en columna de Sephadex G-200.

Los resultados del rotor zonal permiten considerar que es un método de calidad, mediante el cual se pueden purificar grandes cantidades de virus en corto tiempo (Fig. 8).

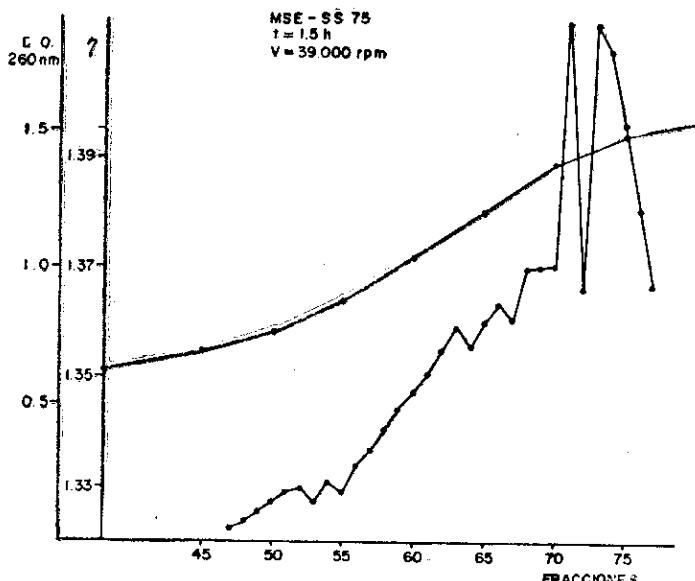


Fig. 8. Gráfico del gradiente de sacarosa que muestra la separación de dos componentes virales (agregados) del VMT mediante el rotor zonal BXV de titanio.

REFERENCIAS

- BALD J. G. AND BRIGGS G. E. Aggregation of virus particles. *Nature* 140, 111, 1937.
- BAWDEN F. C. AND PIRIE N. W. *Proc. Royal Soc. B*, 123, 274, 1937. Citado por LAUFLER M. A. AND STEVENS C. L. *Adv. Virus Res.* XIII, 1, 1968.
- GOODING G. V. JR. AND HEBERT T. T. A simple technique for purification of Tobacco Mosaic Virus in large quantities. *Phytopathology* 57, 1285, 1967.
- KISELEV N. A., GRAVRILIVA L. P. AND SPIRIN A. S. On confirmation of high polymer RNA macromolecules as reversed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 3, 778, 1961.
- KORNEVA S., MARIBONA R. H. Y QUINTERO S. Obtención y caracterización física del ácido ribonucléico de una variedad del virus del mosaico del tabaco hallada en Cuba. I Cong. Nac. Soc. Cubana Microb. y Parasitología. Habana, Sept. 22-25 de 1976.
- LAUFLER M. A. *Science* 87, 469, 1938. Citado por LAUFLER M. A. AND STEVENS C. L. en *Adv. Virus Res.* XIII, 2, 1968.

- LAUFLER M. A. The size and shape of Tobacco Mosaic Virus particles. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1188, 1944a.
- LAUFLER M. A. The influence of concentration upon the sedimentation rate of Tobacco Mosaic Virus. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1195, 1944b.
- LAUFLER M. A. AND STEVENS C. L. Structure of Tobacco Mosaic Virus particles; polymerization of Tobacco Mosaic Virus protein. *Adv. Virus Res.* XIII, 1, 1968.
- LINDBERG G. D. *Phytopathology* 46, 489, 1956. Citado por STEERE R. L. en *Adv. Virus Res.* VI, 21, 1959.
- LORING R. S., LAUFLER M. A. AND STANLEY W. M. *Nature* 142, 841, 1938. Citado por LAUFLER M. A. AND STEVENS C. L. en *Adv. Virus Res.* XIII, 2, 1968.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- NIENHAUS F. AND YARWOOD C. E. Transmission of virus from oak leaves fractioned with Sephadex. *Phytopathology* 62, 313, 1972.
- PÉREZ S., PÉREZ R. Y MARIBONA R. H. Separación de grandes cantidades de sub-unidades ribosomales de levadura por centrifugación zonal. I Cong. Nac. Soc. Cubana Microb. y Parasitología. Habana, Sep. 22-25, 1976.
- QUINTERO S. Y KOURÍ J. B. Un complejo viroso del tabaco en Cuba. (inédito).
- QUINTERO S. Nueva variedad del Virus del Mosaico del Tabaco. V Seminario Científico, CENIC, Univ. Hab. Cuba, Ed. Orbe, 250, 1975.
- QUINTERO S., KORNEVA S. Y MARIBONA R. H. Purificación y algunas propiedades físicas de una variedad del virus del Mosaico del Tabaco hallada en Cuba. V Seminario Científ. CENIC, Univ. Habana, Cuba. Ed. Orbe. I Simp. sobre genética y bioquímica de microorganismos en el CENIC 14, 1975.
- STEERE R. L. The purification of plant viruses. *Adv. Virus Res.* VI, 1, 1959.
- WALKER H. L. AND PIRONE T. P. Particle numbers associated with mechanical and aphid transmission of some plant viruses. *Phytopathology* 62, 1283, 1972.