

NIKTORÉ FYZIKÁLNE VLASTNOSTI VÍRUSU TABAKOVEJ MOZAIKY ČISTENÉHO KOMBINÁCIOU CHEMICKEJ A SEDIMENTAČNEJ METÓDY

FRANTIŠEK SOKOL

Virologický ústav Československej akadémie vied v Bratislave

Pre štúdium chemických a fyzikálnych vlastností vírusov je vo väčšine prípadov potrebné oddeliť od nich čo možno najväčšiu časť nevírusových látok. Na prípravu vírusových purifikátov sa musia voliť také metódy, aby sa vyčistený vírus svojimi biologickými, chemickými, fyzikálnymi a morfológickými vlastnosťami čo najviac približoval infekčnej častici prítomnej v rastlinnej alebo živočíšnej bunke. Z týchto príčin je najsprávnejšie použiť na prípravu purifikátu vírusu tabakovej mozaiky (v ďalšom VTM) sedimentačnú metódu, ktorú opísal Wyckoff [1].

Najvýhodnejšie je uskutočňovať sedimentáciu VTM v Sharplesovej supercentrifúge [2], ktorá je vhodná na spracovanie niekoľkolitrových objemov surovej šťavy z infikovaných listov. My sme na prípravu purifikátu volili kombináciu chemickej a sedimentačnej metódy, ktorou je možné vyčistiť väčšie množstvo vírusu i na vzduchom hnanej uhlovej supercentrifúge. Tento postup je vhodný aj z toho hľadiska, že takto čistený vírus je dokonalejšie zbavený farebných látok [3, str. 176] prítomných v surovej šťave, a preto je vhodnejší pre optické (napr. rozptylové) merania. V tejto práci opíšeme niektoré fyzikálne vlastnosti VTM pripraveného uvedenou čistiacou metódou.

Materiál a metódy

Príprava vírusového purifikátu. Východiskovým materiálom pre získanie čistého vírusu boli listy prirodzene infikovaných hrajčiakov z poľnej kultúry na juhozápadnom Slovensku, ktoré boli priebehom 5 mesiacov udržiavané pri teplote -25°C . Spracovali sme 2,38 kg zmrazených listov, z ktorých sme po pomletí, vylisovaní, filtrovaní cez dvojitú gázu a po nízkoobrátkovom odstredení získali 1200 g infikovanej šťavy. Štava obsahovala 0,576 mg/ml nedialyzovateľného dusíka stanoveného mikrometódou podľa Kjeldahla. Vírus sme čistili a koncentrovali v prvej etape chemickou cestou podľa Bawdena a Pirieho [3, str. 172]. VTM sme trikrát prezrážali síranom amónnym. Po treťom zrážaní bol vírus skoncentrovaný v 270 ml roztoku. Nasledovalo izoelektrické zrážanie pri pH 3,30 a dialýza proti obyčajnej a destilovanej vode. Po vyčistení roztoku nízkoobrátkovým odstredením bol vírus skoncentrovaný v 60 ml roztoku a obsahoval 1,78 mg N/ml. VTM sme dvakrát sedimentovali v supercentrifúge pri 30 000 ot/min. (75 000 g v strede skúmavky) po dobu 90 minút, pričom po každej supercentrifugácii nasledovalo rozpúšťanie vírusu v destilovanej vode a čírenie koloidného roztoku nízkoobrátkovým odstredením. Všetky operácie pri čistení vírusu sa robili pri $+5^{\circ}\text{C}$. Konečný roztok mal čistobiely zákal a obsahoval 2,00 mg N/ml. Získaný preparát sme testovali polarografickou metódou [4]. Zistilo sa, že obsahuje len zanedbateľné množstvá balastných bielkovín. O vysokej čistote purifikátu svedčí aj to, že skoncentrovaním VTM supercentrifugáciou na koncentráciu 2,00 % a státím v chladničke pri $+5^{\circ}\text{C}$ sa roztok rozdelil na dve vrstvy, z ktorých spodná

mala spontánny dvojlom [3, str. 204; 5]. Dokladom čistoty získaného preparátu je aj elektrónová mikrofotografia (obr. 5). Na základe týchto vlastností purifikátu sme predpokladali, že na stanovenie prítomných nečistôt nie je potrebné použiť relatívne málo citlivú metódu elektroforézy. Purifikát sme testovali na infekčnosť na oddelených listoch *Nicotiana glutinosa*. Bol infekčný ešte pri riedení 10^{-6} . 4 ml tohto roztoku sme použili na všetky merania uvádzané v tejto práci.

Odstreďovanie. Sedimentovanie vírusu, ako aj odstraňovanie prachu zo základného roztoku pre rozptyľové merania sme robili odstredovaním na vzduchom hnanej uhlovej supercentrifúge LKB v skúmavkách z plastickej látky. Na nízkoobrátkové odstredovanie sme používali chladenú odstredivku MSE.

Stanovenie koncentrácie. Koncentráciu VTM sme určovali na základe obsahu dusíka v roztokoch, stanoveného mikro-Kjeldahlovou metódou. Prepočítavací faktor z obsahu dusíka na obsah VTM je 6,024 [3, str. 185]. Relatívnu koncentráciu roztokov pri rozptyľových prácach sme kontrolovali meraním extinkcie¹ pri 2620 Å.

Absorpčná fotometria. Ultrafialovú absorpčnú krivku roztokov VTM sme určili meraním na ultrafialovom absorpčnom fotometri „Unicam“ v kremenných kvetách. Hrúbka roztoku bola 1 cm.

Elektrónová mikroskopia. Elektrónové mikrofotografie boli zhotovené mikroskopom Siegbahn-Schönander. Preparáty sa tienili chrómom. Soľ sa z preparátov odstraňovala spláchnutím destilovanou vodou. Zväčšenie mikroskopu sa kalibrovalo štandardným polystyrénovým latexom, odtlačkom mriežky (576 čiar na 1 mm) a priamym meraním otvorov v sieťke svetelným a elektrónovým mikroskopom. Maximálny rozdiel medzi zväčšovacími faktormi stanovenými jednotlivými metódami bol niečo nad 10 %.

Meranie pH. pH sme merali na elektrónkovom pH-metri „Multoscop“ v spojení s elektrónkovým stabilizátorom napätia „Křížik“. Používali sme Beckmanovu sklenú a nasýtenú kalomelovú elektródu.

Meranie rozdielu indexu lomu. Rozdiel indexu lomu medzi roztokom VTM a rozpúšťadlom sme merali na laboratórnom interferometri Zeiss pri polychromatickom svetle, ktoré je ekvivalentné zelenému svetlu o vlnovej dĺžke 546 m μ (údaj fy C. Zeiss, Jena, NDR). Interferometer bol kalibrovaný na štandardné roztoky NaCl v destilovanej vode. Inkrement indexu lomu pri 546 m μ sa stanovil ako podiel rozdielu indexu lomu a koncentrácie VTM.

Rozptyľové merania. Rozptyľové merania sa robili na vizuálnom prístroji vlastnej konštrukcie [6], zhotovenom adaptáciou Pulfrichovho fotometra, ktorý sa v hrubých črtách podobá vizuálnemu prístroju opísanému Sedláčkom [7]. Správnosť justácie nášho prístroja bola overená zmeraním molekulových váh a disymetrií viacerých vzoriek konského sérumalbumínu ($M = 67\,000\text{--}71\,000$, $z = 0,95\text{--}1,05$, kde M je molekulová váha a z je disymetria, t. j. pomer intenzít svetla rozptýleného pod uhlom 45° a 135°), ako aj disymetrie a priemeru sférických častíc štandardného polystyrénového latexu (Dow Chemical Company, Midland, Michigan, USA) v destilovanej vode [8]. Uholový faktor redukcie osvetleného objemu na podmienky pri uhle 90° bol stanovený premeraním radiačnej obálky fluoresceínového roztoku a rovnal sa $\sin\Theta$ (Θ je uhol, pod ktorým sa pozoruje intenzita rozptýleného svetla). Používali sme valcovité kvety o priemere 40 mm a obsahu 50 ml so zábrusovým vrchnáčikom. Objem rozptyľujúceho roztoku bol 22 ml. Prachové častice sme zo základného roztoku odstraňovali odstredovaním po dobu 120

¹ Pod pojmom extinkcia tu rozumieme mieru zoslabenia primárneho lúča po prechode roztokom, spôsobenú jednak absorpciou, jednak rozptyľom, čiže výraz $\log I_0/I$, kde I_0 je intenzita primárneho a I intenzita prejdeho lúča.

minút pri 10 000 g, načo sme roztok preniesli pipetou premytou acetónom filtrovaným trikrát cez frit G4 (Schott, Jena) a chránenou zábrusovým puždom do rozptylovej kyvety. Roztoky o nižšej koncentrácii sme pripravovali postupným riedením základného roztoku v pomere 1 : 1 destilovanou vodou filtrovanou 3—4 krát cez frit G5 (Schott, Jena) pretlakovou filtráciou v zábrusovej aparatuře. Ako štandard pre rozptylové merania sme používali chemicky čistený a trikrát predestilovaný sírouhlik, pričom za jeho Rayleighovu konštantu² pri 546 m μ a izbovej teplote sme vzali hodnotu 44,2 · 10⁻⁶. Pri výpočtoch sme aplikovali len korekčný faktor na rozdielnosť indexu lomu prostredia v kyvete a prostredia detektora. V našom usporiadaní sa tento korekčný faktor rovná n , t. j. indexu lomu roztoku pri danej vlnovej dĺžke a teplote.

Experimentálna časť

Rozptylové merania

Stanovenie molekulovej váhy. Zmerali sme intenzitu rozptýleného svetla piatich roztokov VTM v destilovanej vode o klesajúcej koncentrácii pri uhloch 135°, 90°, 45°. Intenzitu svetla rozptýleného rozpušťačom sme vždy odpočítavali. Váhový priemer molekulovej váhy VTM sme získali extrapoláciou hodnôt:

$$\frac{K \cdot c \cdot P(90)}{R_{90}} = \frac{1}{M_w} + 2 \cdot B \cdot P(90) \cdot c \quad (1)$$

na nulovú koncentráciu, kde c = koncentrácia vírusu v g/ml, R_{90} = redukovaná intenzita rozptýleného svetla pri uhle 90°, M_w = váhový priemer molekulovej váhy vírusu, B = interakčná konštanta, $P(90)$ = disymetrický faktor rozptylu pri uhle 90° a

$$K = \frac{2 \cdot \pi^2 \cdot n_0^2 \cdot (\partial n / \partial c)^2}{N \cdot \lambda_0^4}, \quad (2)$$

pričom n = index lomu roztoku, $\partial n / \partial c$ = inkrement indexu lomu roztoku pri vlnovej dĺžke λ_0 (vo vákuu, v centimetroch), N = Avogadrovo číslo [9]. Extrapoláciu je výhodnejšie vykonať vo dvoch stupňoch: extrapolovať osobitne hodnoty Kc/R_{90} a z na nulovú koncentráciu. Z vnútornej disymetrie

$$\lim_{c \rightarrow 0} z = [z] = \frac{P(45)}{P(135)} \quad (3)$$

môžeme určiť príslušný disymetrický faktor $P(90)$ pre paličkovitý tvar makromolekuly a týmto vynásobiť hodnotu $\lim_{c \rightarrow 0} Kc/R_{90}$.

Váhový priemer molekulovej váhy potom bude:

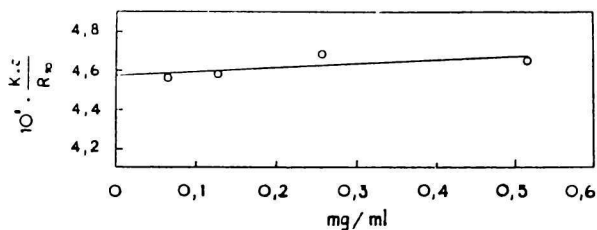
$$M_w = \frac{1}{K \cdot P(90)} \cdot \lim_{c \rightarrow 0} \frac{R_{90}}{c} \quad (4)$$

Medzi $P(\Theta)$, λ_0 , L (dĺžka paličky) a Θ platí vzťah

$$P(\Theta) = \frac{1}{x} \int_0^{2x} \frac{\sin w}{w} dw - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2, \quad (5)$$

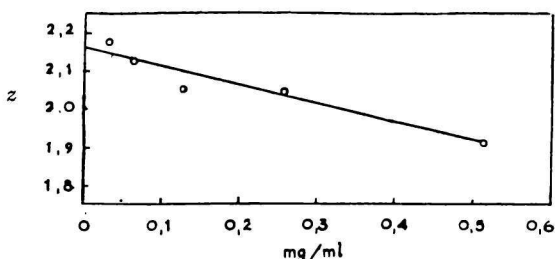
² Redukovaná intenzita svetla rozptýleného sírouhlikovým štandardom pod uhlom 90° vo valcovitej kyvete bez aplikácie korekčných faktorov.

kde $x = k \cdot s \cdot L/2$, $k = 2 \cdot \pi \cdot n_0/\lambda_0$, $s = 2 \cdot \sin\Theta/2$. Z tohto vzťahu možno určiť vzťah medzi $P(90)$ a z pre rôzne hodnoty x [9]. Na obr. 1 je znázornený vzťah hodnôt Kc/R_{90} a c .



Obr. 1. Závislosť hodnôt Kc/R_{90} od koncentrácie VTM.
Rozpúšťadlo: destilovaná voda, vlnová dĺžka monochromatického svetla 547 m μ .

Ako vidieť, namerané hodnoty ležia v rámci experimentálnych chýb na priamke. Možno teda metódou najmenších štvorcov vypočítať hodnotu $\lim_{c \rightarrow 0} Kc/R_{90}$. Na obr. 2 je znázornený



Obr. 2. Závislosť disymetrie ($z = i_{45}/i_{135}$) od koncentrácie VTM.
Rozpúšťadlo: destilovaná voda, vlnová dĺžka monochromatického svetla 547 m μ .

vzťah disymetrie a c . Hodnotu $[z]$ možno tak isto vypočítať metódou najmenších štvorcov. V tab. 1 sú uvedené koncentrácie, pH, hodnoty Kc/R_{90} a z jednotlivých roztokov VTM. V poslednom riadku tabuľky sú hodnoty Kc/R_{90} a z , extrapolované na nulovú koncentráciu, ako aj pH rozpúšťadla.

Hodnota $z = 2,16$ prislúcha pre tvar paličky hodnota $P(90) = 0,424$. Keďže zmeraná hodnota $\partial n/\partial c$ pri izbovej teplote a vlnovej dĺžke 546 m μ je 0,163, konštanta $K = 1,72 \cdot 10^{-7}$. M_w má potom hodnotu 5,16 $\cdot 10^7$.

Dĺžka vírusových častíc. Rovnica (5) slúži za základ pre určenie vzťahu medzi z a $n_0 \cdot L/\lambda_0$. Pre tvar paličky odpovedá $z = 2,16$ hodnota $n_0 \cdot L/\lambda_0 = 0,750$, z čoho pri vlnovej dĺžke rozptýleného svetla 547 m μ dostávame pre váhový priemer dĺžky vírusových častíc hodnotu $L_w = 308$ m μ .

Hrúbka vírusovej častice. Ak predpokladáme, že VTM má tvar valca, hrúbka vírusovej častice vyplýva zo vzťahu

$$d = 2 \cdot \sqrt{\frac{v_0 \cdot M_w}{N \cdot \pi \cdot L_w}} \quad (6)$$

T a b u l k a 1

Rozptyl roztokov VTM v destilovanej vode

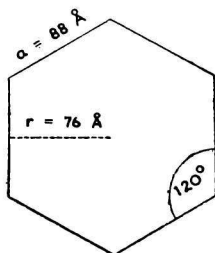
Č.	Konc. $10^4 \cdot \text{g/ml}$	pH	$10^8 \cdot Kc/R_{90}$	z
1	5,14	7,00	4,65	1,91
2	2,57	6,85	4,68	2,05
3	1,29	6,65	4,58	2,05
4	0,643	6,50	4,57	2,12
5	0,321	6,35	—	2,17
6	0	6,00	4,575	2,16

kde v_0 = špecifický objem VTM, d = jeho priemer. Ak za špecifický objem VTM vezmeme hodnotu 0,73, dostaneme $d = 161 \text{ \AA}$. Ak predpokladáme podľa Bernala a Fankuchena [10] a Williamsa [11], že základňa častice VTM je rovnostranný šesťuholník, z jeho geometrie vyplýva:

$$a = \sqrt{\frac{v_0 \cdot M_w}{3 \cdot N \cdot L_w \cdot \sin \pi/3}} \quad (7)$$

$$r = a \cdot \sin \pi/3$$

Ak do vzťahu (7), ako aj do výrazu pre r dosadíme príslušné hodnoty, dostaneme pre a , t. j. polomer kruhu opísaného okolo šesťuholníka (strana šesťuholníka) 88 \AA a pre r , t. j. polomer vpísaného kruhu 76 \AA (pozri obr. 3).



Obr. 3. Rozmery šesťuholnikovej základne VTM zistené nepriamo z rozptylových údajov.

Interakčná konštanta. Z rovnice (1) po vydelení s $P(90)$ vyplýva, že smernica priamky vyjadrujúca závislosť Kc/R_{90} od c (pozri obr. 1) je dvojnásobnou hodnotou interakčnej konštanty VTM v destilovanej vode. Hodnota B zistená metódou najmenších štvorcov je $0,94 \cdot 10^{-6}$.

Porovnanie teoretického a nameraného disymetrického faktora rozptylu pre paličku. Zmerali sme radiačnú obálku roztoku obsahujúceho $6,43 \cdot 10^{-5} \text{ g VTM/ml}$ v rozmedzí $45\text{--}135^\circ$

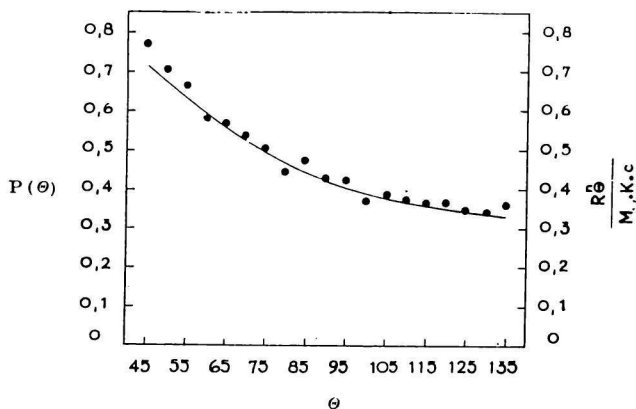
v 5° intervaloch. Vzhľadom na to, že hodnoty $2 \cdot B \cdot P(90) \cdot c$ možno prakticky považovať za rovné 0, z nameraných hodnôt použitím vzťahu

$$\frac{K \cdot c \cdot (1 + \cos^2 \theta)}{R_\theta} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} \quad (8)$$

vypočítali sme hodnoty

$$P(\theta) = \frac{R_\theta}{M_w \cdot K \cdot c \cdot (1 + \cos^2 \theta)} = \frac{R_\theta^n}{M_w \cdot K \cdot c} \quad (9)$$

kde R_θ = redukovaná intenzita svetla rozptýleného pod uhlom θ , $R_\theta^n = R_\theta / (1 + \cos^2 \theta)$. Takto získané experimentálne hodnoty $P(\theta)$ sme porovnali s teoretickými hodnotami $P(\theta)$ pre paličku o dĺžke 308 m μ pri vlnovej dĺžke svetla 547 m μ . Výsledky sú znázornené na obr. 4.



Obr. 4. Porovnanie disymetrického faktora rozptylu pre tyčinku dĺžky 3080 Å (plná čiara) a nameraných hodnôt $R_\theta^n / M_w K c = P(\theta)$ (plné body). Rozpúšťadlo: destilovaná voda, koncentrácia VTM $6,43 \cdot 10^{-5}$ g/ml, vlnová dĺžka monochromatického svetla 547 m μ .

Stabilita VTM v destilovanej vode. R_{90} a disymetriu roztokov VTM v destilovanej vode o koncentráciách a pH³ udávaných v tab. 1 sme pozorovali pri izbovej teplote po dobu 18 dní. Medzi meraniami sme roztoky udržiavali v chladničke pri $+5^\circ$ C. Namerané hodnoty boli po tento čas v rámci experimentálnych chýb konštantné pre všetky roztoky. V tab. 2 sú uvedené výsledky pre roztok o koncentrácii $6,43 \cdot 10^{-5}$ g VTM/ml.

Pôsobenie borátového tlmivého roztoku o pH 9,90. Roztoky VTM v destilovanej vode sme po 18 dňovom pozorovaní zriedili v pomere 1 : 1 borátovým tlmivým roztokom o pH 9,90⁴ filtrovaným trikrát cez frit G5 (Schott, Jena). Pri všetkých roztokoch sme počas 17⁵ dní merali pri izbovej teplote hodnoty R_{90} a z. Medzi meraniami boli roztoky v chlad-

³ Hodnoty pH roztokov sa priebehom 18 dní prakticky nemenili. Najväčšia odchýlka od pôvodných hodnôt bola 0,1 pH.

⁴ Tlmivý roztok sa pripravil zmiešaním alkalického roztoku kyseliny boritej (0,2 mólu H_3BO_3 v 100 ml 1 N-NaOH, doplnený do 1 l destilovanou vodou) a 0,1 N-NaOH v pomere 3 : 2.

⁵ Na konci 17 dňového obdobia sme znovu kontrolovali pH všetkých roztokov a zistili sme pokles o 0,5 pH.

ničke pri $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hneď v prvý deň bolo pri všetkých roztokoch možné pozorovať vzhľadom na očakávanú hodnotu prudký pokles R_{90} za súčasného vyzrážania látky z roztoku. Osvetlený objem roztoku nevykazoval však pod malými uhlami pozorovania nijakú heterogenitu, čiže vzniknuté agregáty denaturovaných štiepov pravdepodobne sedimentovali kvantitatívne ku dnu kvety a nerušili rozptylové meranie. Disymetria roztokov bola prvých 7 dní konštantná a v ďalších 10 dňoch poklesla asi o 10 %. Tento pokles nie je však možné objektívne hodnotiť, pretože po 7 dňoch sa v osvetlenom objeme roztoku pri nízkych uhloch objavila heterogenita. Po prudkom poklese R_{90} , ktorý nastal hneď v prvý deň, nasledovalo pomalšie klesanie hodnôt redukovanej intenzity, ktoré bolo výraznejšie pri roztokoch o nižšej koncentrácii. Hodnoty z a R_{90} pre roztok vzniknutý zriedením pôvodného základného roztoku sú pre sedemdňové pozorovacie obdobie uvedené v tab. 3.

T a b u l k a 2
Stabilita VTM v destilovanej vode

Čas v dňoch	1	2	8	10	17	18
$R_{90} \cdot 10^4$	—	2,42	2,45	—	2,52	2,55
z	2,10	2,15	2,15	1,98	2,02	2,10

T a b u l k a 3
Pôsobenie borátového tlmivého roztoku o pH 9,90 na VTM

Čas v dňoch	1	2	3	4	7
$R_{90} \cdot 10^4$	6,51*	5,66	5,47	5,20	5,27
z	1,85	1,83	1,83	1,83	1,83

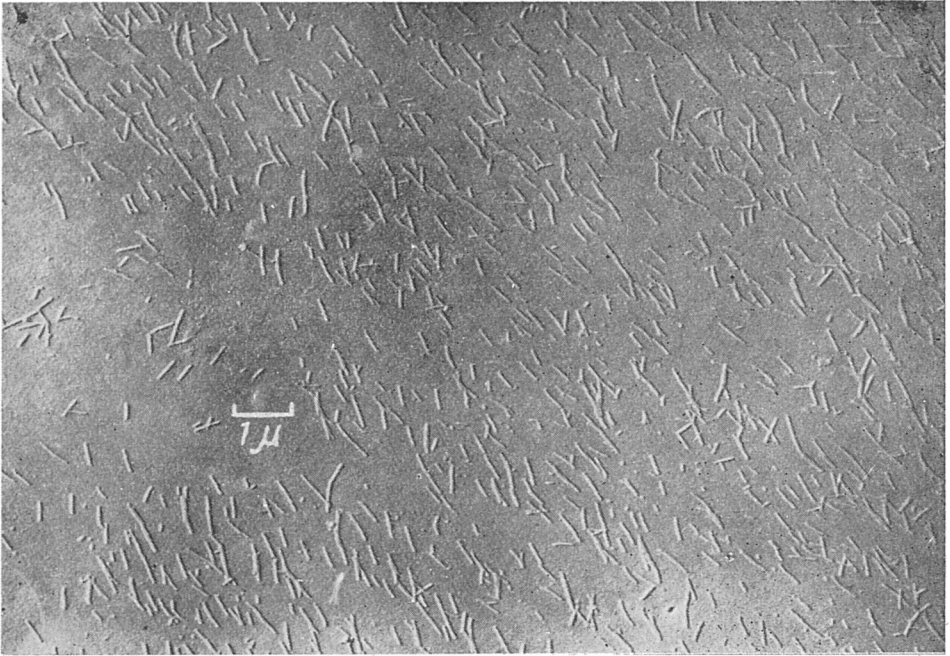
* Očakávaná hodnota bola $R_{90} = 9,50 \cdot 10^{-4}$.

Absorpčná krivka v ultrafialovej oblasti

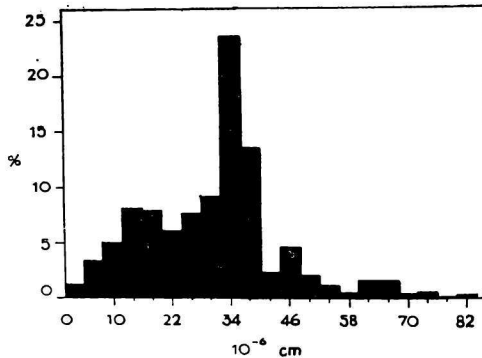
Zmerali sme extinkcie roztokov VTM hrubých 1 cm v destilovanej vode v obore vlnových dĺžok 2300—3100 Å. Absorpčné krivky mali charakteristický priebeh [3, str. 186] s maximom pri 2620 Å a s minimom pri 2480 Å. Extinkčný koeficient pre koncentráciu 1 g VTM/100 ml a hrúbku roztoku 1 cm bol pri 2620 Å 31,1 a pri 2480 Å 27,7.

Elektrónová mikroskopia

Na obr. 5 je pri 11 000 násobnom zväčšení znázornený purifikovaný VTM v destilovanej vode. Premerali sme dĺžku 597 častíc, ktoré sme zadelili do skupín o intervale 40 μ



Obr. 5. Vírus tabakovej mozaiky čistený kombináciou chemickej a sedimentačnej metódy. Rozpúšťadlo: destilovaná voda, zväčšenie 11 000 krát; tienené chrómom.



Obr. 6. Distribúcia dĺžky častíc purifikátu vírusu tabakovej mozaiky znázorneného na obr. 5.

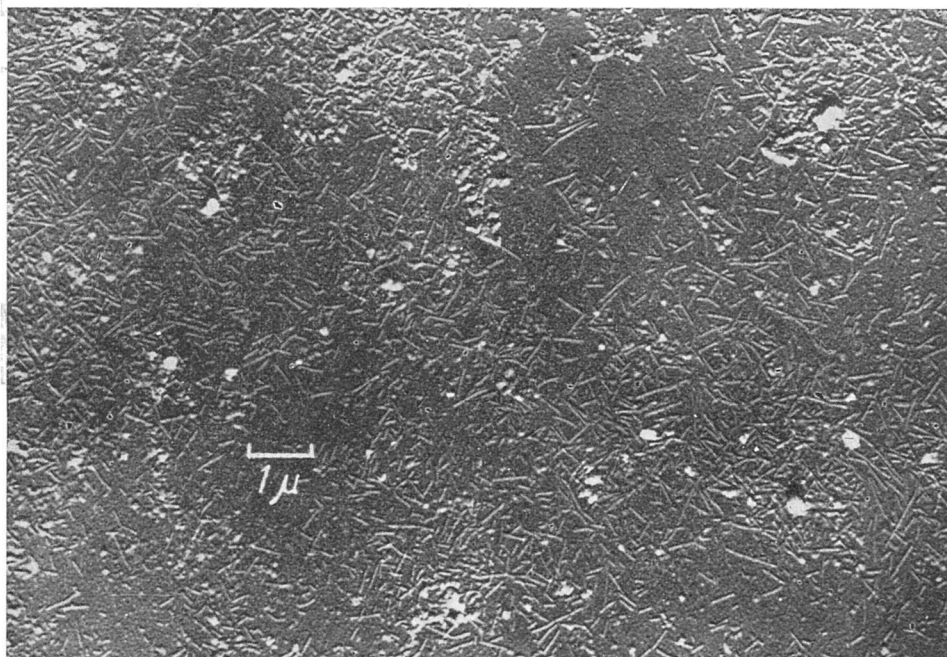
(pozri obr. 6). Na dĺžku vírusových častíc sme neaplikovali žiadnu korekciu. Z nameraných hodnôt vyplýva, že číselný priemer dĺžky vírusových častíc

$$L_n = \frac{\sum n_i \cdot L_i}{\sum n_i} \quad (10)$$

je $304 \text{ m}\mu$ a váhový priemer

$$L_w = \frac{\sum n_i \cdot L_i^2}{\sum n_i \cdot L_i} \quad (11)$$

je $368 \text{ m}\mu$, kde n_i = počet častíc patriacich do jednej skupiny. Na obr. 7 vidieť VTM po desaťdňovom pôsobení borátového tlmivého roztoku o pH 9,90. Okrem veľkého množstva nerozštiepených pôvodných častíc pozorovať aj ich štiepy rozličnej dĺžky.



Obr. 7. Vírus tabakovej mozaiky po desaťdňovom pôsobení borátového tlmivého roztoku o pH 9,90.

Zväčšenie 11 000 krát; tienené chrómom. Veľké svetlé amorfné útvary sú zvyšky solí.

Diskusia

Prípravený purifikát VTM nemá jednotnú dĺžku a tým ani molekulovú váhu, ako majú niektoré purifikáty pripravené sedimentačnou metódou. Kým napr. preparát pripravený Osterom, Dotym a Zimmom [12] obsahoval 67 % častíc dĺžky $280 \pm 20 \text{ m}\mu$ (hodnota váhového priemeru dĺžky častíc určená metódou rozptylu svetla a elektrónovej mikroskopie bola $270 \text{ m}\mu$), v našom prípade bola distribúcia dĺžky vírusových častíc omnoho širšia, obzvlášť v prospech častíc kratších, než je priemerná dĺžka. Ťažko odpovedať na otázku,

či tieto kratšie vírusové častice vznikli z pôvodných intaktných častíc pri chemickom čistení. Ak áno, tak pôsobením pomerne koncentrovaného roztoku síranu amónneho, pretože pri izoelektrickom zrážaní môže dôjsť v prevažnej miere len k agregácii [5]. Nepovažujeme za možné, aby pri sedimentovaní VTM z destilovanej vody o pH blízkom neutralite došlo k jeho štiepeniu. Skôr je pravdepodobná agregácia. Tak isto nepovažujeme za správne označovať všetky vírusové častice dlhšie ako 250—350 $m\mu$ za agregované. Ak by tomu tak bolo, museli by sa tieto „dlhé“ častice pôsobením iónov OH^- prvé rozštiepiť vzhľadom na pravdepodobnú labilnú väzbu a malú styčnú plochu medzi pôvodnými vírusovými časticami. Na obr. 7 však vidieť, že aj po desaťdňovom pôsobení borátového tlmivého roztoku o pH 9,90 sú v roztoku prítomné častice dĺžky až 700—800 $m\mu$. Priamym dôkazom by v tomto prípade, pravda, bolo len štúdium štiepenia umele agregovaných častíc VTM. Naše tvrdenie podporuje aj pozorovanie J. Brandesa [13], ktorý metódou ultratenkých rezov zistil pod elektrónovým mikroskopom, že v infikovanej bunke sú prítomné častice VTM väčšinou podstatne dlhšie ako 300 $m\mu$. Predpokladáme, že to, čo sme povedali o „dlhých“ časticách, platí do určitej miery aj pre „krátke“ častice. Je celkom predstaviteľné, že pri pochodoch reprodukcie a degenerácie vírusu v bunke sa vytvárajú častice; ktoré sú oveľa kratšie ako priemerná dĺžka VTM. Je preto pravdepodobné, že distribúciu dĺžky purifikátu VTM vytvárajú jednak prirodzené procesy odohrávajúce sa v bunke, jednak fyzikálne a chemické účinky pri čistení.

Váhové priemery⁶ dĺžky VTM, zistené pomocou rozptylu svetla a elektrónovej mikroskopie, líšia sa navzájom asi o 20 %. Vzhľadom na to, že pravdepodobná chyba stanovenia váhového priemeru dĺžky VTM metódou disymetrie⁷ je asi ± 4 %, považujeme údaj získaný z rozptylových meraní za presnejší. Pomerne značný rozdiel medzi hodnotami určenými dvoma metódami vysvetľujeme tým, že kalibrácia mikroskopu mala len asi 10 % presnosť a že sme merané dĺžky častíc nekorigovali na pokovenie.

Kým dĺžka častíc VTM je veľmi premenlivá, ich hrúbka sa vo všeobecnosti považuje za konštantnú. Správnosť zmeranej molekulej váhy potvrdzuje aj to, že z rozptylových údajov vychádza správna hodnota pre hrúbku vírusu, pričom treba obzvlášť vyzdvihnúť mimoriadne dobrú zhodu s údajmi J. D. Bernala a I. Fankuchena [10] pre rozmery šesťuholníkovej základne VTM. Je zaujímavé, že najnovšie stanovené priemerné dĺžky VTM sa pohybujú všetky asi pri 300 $m\mu$, kým molekulej váhy asi pri $4-5 \cdot 10^7$ [5, 12, 14]. Pravdepodobná chyba stanovenej molekulej váhy je asi ± 6 %.

⁶ Rozptylom svetla sa môže stanoviť len váhový priemer dĺžky, a preto číselný priemer dĺžky nie je porovnateľný s rozptylovými údajmi.

⁷ Stanovená hodnota vnútornej disymetrie nie je zatažená chybami určovania koncentrácie VTM, pretože sme pracovali metódou známeho zriedenia, pri ktorej nie je potrebná znalosť absolútnej koncentrácie.

Metódu rozptylu svetla a obzvlášť Zimmovu [15] metódu extrapolácie na nulový uhol a koncentráciu považujeme za najvhodnejšiu na určenie molekulovej váhy vírusov, pokiaľ nie je limitovaná príliš veľkými rozmermi makromolekulovej častice. Molekulové váhy počítané i z veľmi presných sedimentačných údajov sú najmä pri asymetrických vírusoch zaťažené pomerne veľkými chybami vzniknutými aproximáciami a predpokladmi pri výpočte [16]. Metódu disymetrie na stanovenie molekulovej váhy VTM sme volili preto, lebo je podstatne jednoduchšia ako Zimmova metóda a jej platnosť pre náš prípad už bola dokázaná [12]. Platnosť modelu paličky pre častice VTM v roztoku vyplýva aj z našich údajov uvedených na obr. 4, i keď sme pracovali s pomerne polydisperznou vzorkou.

Hoci hodnota interakčnej konštanty je malá, možno usudzovať, že medzi časticami VTM v destilovanej vode pri pH hodnotách blízkych neutralite pôsobia odpudivé sily, čím možno vysvetliť aj ich pomernú stabilitu v tomto rozpúšťadle.

Štiepenie VTM v alkalickom borátovom tlmivom roztoku sme skúmali za účelom zistenia, približne aké množstvo vírusových častíc agregovalo na „dlhé“ útvary pri izoelektrickom zrážaní a ostatných procesoch čistenia, ktoré trvali 7 dní. Predpokladali sme totiž, že sa agregované útvary musia pôsobením iónov OH^- štiepiť prvé, čo by sa v počiatočných fázach štiepenia prejavilo pomerne prudkým poklesom disymetrie a R_{90} . V ďalších fázach štiepenia sme očakávali pomalší, rovnomerný pokles disymetrie a R_{90} , ktorý by podľa našich predpokladov prislúchal štiepeniu pôvodných vírusových častíc. Ako sa ukázalo, je veľmi ťažké pri týchto experimentoch dodržiavať také podmienky, ktoré by zaručovali prísne kvantitatívny charakter meraní. Jednak kleslo pH roztokov za 17 dní z 9,90 na 9,40, jednak pH borátových tlmivých roztokov má značný negatívny teplotný koeficient. Keďže sme rozptylové merania robili pri izbovej teplote (asi 20 °C) a roztoky boli medzi meraniami uložené v chladničke pri +5 °C, musíme počítať s tým, že sa pH roztokov menilo už vplyvom zmien teploty v rozmedzí 0,2 jednotky pH. Ďalšou okolnosťou, ktorá sťažovala kvantitatívne vyhodnotenie týchto pokusov, bolo vyzrážanie látky (pravdepodobne agregátov vzniknutých denaturáciou bielkovinových štiepov pri izbovej teplote) z roztoku, i keď sa zdá, že táto okolnosť nenarušovala vážnejšie prvých 7 dní rozptylové merania. Neznalosť presnej koncentrácie VTM ostavšieho v roztoku nie je na závalu, lebo môžeme oprávnené predpokladať, že namerané hodnoty R_{90} sú priamo úmerné koncentrácii. Predpokladáme totiž, že všetky vzniknuté štiepy pri izbovej teplote zagregovali a vyzrážali sa z roztoku. Ak by to tak nebolo, museli by sme aj v prvých 7 dňoch zistiť pokles disymetrie vybočujúci z rámca experimentálnych chýb. Získané experimentálne výsledky nasvedčujú tomu, že po pridaní alkalického tlmivého roztoku sa „labilné“ častice VTM okamžite štiepia na rádovo menšie útvary, ktoré pri

izbovej teplote denaturujú a vylúčia sa z roztoku. Táto etapa štiepenia „labilných“ častíc prebieha veľmi rýchlo, pravdepodobne za niekoľko málo hodín⁸. Priebehom tejto etapy sa rozruší asi 40 % častíc VTM pôvodne prítomných v roztoku, čo vyplýva z poklesu R_{90} z očakávanej hodnoty $9,50 \cdot 10^{-4}$ na hodnotu $5,66 \cdot 10^{-4}$ na druhý deň experimentu. Po dobu ďalších 6 dní zostávajú hodnoty z nezmenené, kým R_{90} nepatrne klesá. Svedčí to o pomernej stabilite tej časti vírusových častíc, ktoré po prvom dni zostali v roztoku. Zdá sa, že po 7 dňoch dochádza k štiepeniu aj „stabilných“ častíc VTM, ako tomu nasvedčuje prítomnosť značného množstva rozštiepeného vírusu na obr. 7, ako aj pokles disymetrie na hodnotu 1,60 na konci 17 dňového obdobia. Toto štiepenie je však podstatne pomalšie ako štiepenie, ktoré sme pozorovali v prvej etape, a prebieha rýchlejšie pri nižších koncentráciách VTM. Uvedené výsledky sú v kvalitatívnej zhode s výsledkami práce G. Schramma [17] a G. Schramma, G. Schumachera a W. Zilliga [18]. Podľa nášho názoru za „labilné“ treba považovať tie častice VTM, pri ktorých boli intramolekulové sily, spájajúce jednotlivé stavebné kamene vírusu, zoslabené faktormi pôsobiacimi priebehom čistenia, ako aj tie častice, ktoré boli pri začatí čistenia v štádiu syntézy alebo degenerácie kompletného vírusu. Za „stabilný“ môžeme považovať kompletný vírus, ktorý nebol čo do fyzikálnych a chemických vlastností čistiacim procesom podstatne pozmenený.

Ďakujem pracovníkom Virologického ústavu Československej akadémie vied v Bratislave V. Bystrickému za zhotovenie a vyhodnotenie elektrónových mikrofotografií, G. Ruttkaymu - Nedeckému za polarografické testovanie čistoty vírusového purifikátu a V. Valentovi za mnohé cenné rady o čistení vírusu. Ďakujem Š. Hupkovi z Onkologického ústavu v Bratislave za zmeranie ultrafialových absorpčných spektier.

Súhrn

Metódou rozptylu svetla sa určil váhový priemer molekulevej váhy, dĺžky a nepriamo aj hrúbka vírusu tabakovej mozaiky, čisteného kombináciou chemickej a sedimentačnej metódy. Naš purifikát mal pomerne širokú distribúciu dĺžky častíc; v práci sa diskutuje o jej príčinách.

Priebehom 18 dní sme pozorovali disymetriu a redukovanú intenzitu pri uhle 90° roztokov vírusu v destilovanej vode a pri pH hodnotách blízkyh neutralite. Nezistili sme nijakú zmenu vybočujúcu z rámca experimentálnych chýb, z čoho usudzujeme, že vírus je v tomto prostredí stabilný. Borátový tlmivý roztok o pH 9,90 pôsobí na purifikát vírusu tak, že sa účinkom iónov OH' najprv rýchlo štiepia „labilné“ vírusové častice. V ďalšom šesťdňovom období je vírus ostavší v roztoku pomerne odolný voči účinku iónov OH' . Po tomto období sa začína aj štiepenie „stabilného“ vírusu. Diskutuje sa o pravdepodobných príčinách týchto javov.

⁸ Túto etapu štiepenia sme pri našich meraniach pre technické ťažkosti nezachytili.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ, ОЧИЩЕННОГО КОМБИНАЦИЕЙ ХИМИЧЕСКОГО И СЕДИМЕНТАЦИОННОГО СПОСОБОВ

ФРАНТИШЕК СОКОЛ

Вирусологический институт Чехословацкой Академии Наук в Братиславе

Выводы

Методом рассеянного света определен средний молекулярный вес, длина а тоже косвенно и толщина вируса табачной мозаики приобретенного комбинационной химической и седиментационной очистками. Наш пурификат отличался довольно широкой дистрибуцией длин частиц и в этой работе дискутируется об их причинах.

Мы наблюдали в течение 18 дней диссиметрию и редуцированную интензивность при 90° угле растворов вируса в дистиллированной воде и в растворах рН, которых приблизительно 7,0. Не найдено никакое изменение, перевышающее экспериментальные ошиоки, из чего заключаем, что вирус в этой среде устойчив. Боратный буферный раствор о рН 9,90 действует на пурификат вируса так, что под воздействием OH' ионтов расщепляются во первых „лабильные“ частицы вируса. В течение дальнейших 6 дней оставшийся в растворе вирус довольно устойчив против воздействию OH' ионтов. После этого времени начинается щепление „устойчивого“ вируса. Дискутируется о вероятных причинах этих явлений.

Поступило в редакцию 18. 9. 1956 г.

EINIGE PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DES DURCH EINE KOMBINATION EINER CHEMISCHEN MIT EINER SEDIMENTA- TIONSMETHODE GEREINIGTEN TABAKMOSEKVIKUS

FRANTIŠEK SOKOL

Virologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften
in Bratislava

Zusammenfassung

Durch die Methode der Lichtstreuung wurde das durchschnittliche Molekulargewicht die durchschnittliche Länge und indirekt auch die Dicke des durch eine Kombination einer chemischen mit einer Sedimentationsmethode gereinigten Tabakmosaikvirus bestimmt. Das Purifikat hatte eine verhältnismässig breite Distribution der Teilchenlänge und in der vorliegenden Arbeit wird über deren Ursache diskutiert.

Es wurden während 18 Tagen die Dissymetrie und die reduzierte Intensität bei einem Winkel von 90° der Lösungen des Virus in destilliertem Wasser und bei pH-Werten in der Nähe des Neutralpunkts beobachtet. Dabei wurde keine den Rahmen experimenteller Fehler überschreitende Änderung festgestellt, woraus geschlossen wird, dass das Virus unter diesen Bedingungen stabil ist. Die Boratpufferlösung mit einem pH-Wert von 9,90 wirkt auf das Viruspurifikat in der Weise ein, dass sich durch die Einwirkung der OH'-Ionen zunächst rasch die „labilen“ Virusteilchen spalten. Im weiteren 6 Tage dauernden Zeitraum wird das in der Lösung verbliebene Virus verhältnismässig widerstandsfähig gegen die Einwirkung von OH'-Ionen. Nach dieser Zeitperiode beginnt jedoch auch die Spaltung des „stabilen“ Virus. Schliesslich wird über die wahrscheinlichen Ursachen dieser Erscheinungen diskutiert.

In die Redaktion eingelangt den 18. 9. 1956

LITERATÚRA

1. Wyckoff R. W. G., *J. biol. Chem.* *121*, 219—224 (1937). 2. Stanley W. M., *J. am. chem. Soc.* *64*, 1804—1806 (1942). 3. Bawden F. C., *Plant viruses and virus diseases*, Waltham, Mass. 1950. 4. Ruttkay-Nedecký G. (v tlači). 5. Oster G., *J. gen. Physiol.* *33*, 445—473 (1950). 6. Sokol F., *Chem. Zvesti* *10*, 322—329 (1956). 7. Sedláček B., *Chem. Listy* *47*, 1120—1125 (1953). 8. Sokol F. (v tlači). 9. Doty P., Edsall J. T., *Advances in Protein Chemistry* *6*, 35—121 (1951). 10. Bernal J. D., Fankuchen I., *J. gen. Physiol.* *25*, 147—165 (1941).

11. Williams R. C., *Biochim. Acta* *8*, 227—244 (1952). 12. Oster G., Doty P. M., Zimm B. H., *J. am. chem. Soc.* *69*, 1193—1197 (1947). 13. Brandes J., *Die Naturwissenschaften* *42*, 101 (1955). 14. Doty P., Steiner R. F., *J. chem. Phys.* *18*, 1211—1220 (1950). 15. Zimm B. H., *J. chem. Phys.* *16*, 1093—1099 (1948). 16. Svedberg T., Pedersen K. O., *The ultracentrifuge*, Oxford 1940. 17. Schramm G., *Z. Naturforsch.* *2b*, 112—121 (1947). 18. Schramm G., Schumacher G., Zillig W., *Z. Naturforsch.* *10b*, 481—492 (1955).

Došlo do redakcie 18. 9. 1956

ZPRÁVA

XVI. medzinárodný kongres teoretickej a praktickej chémie v Paríži

V dňoch 16.—25. júla 1957 bude v Paríži XVI. kongres teoretickej a praktickej chémie a XIX. konferencia Medzinárodnej chemickej únie (UICHPA).

Pracovná náplň kongresu je rozdelená do troch hlavných sekcií:

I. Fyzikálna chémia

1. Fyzikálno-chemické vlastnosti rádioaktívnych prvkov
2. Spaľovanie plynných zmesí
3. Voda v chemických zlúčeninách
4. Difúzia v kvapalinách a géloch (reakcia a štruktúra)

II. Anorganická chémia

1. Tuhé zlúčeniny prechodných prvkov (okrem komplexných zlúčení)
2. Zlúčeniny bóru s vodíkom a nekovmi
3. Chemické vlastnosti aktinidov
4. Chemické vlastnosti látok pri vyšších teplotách

III. Organická chémia

1. Mechanizmus reakcií a intramolekulové prešmyky
2. Organometalické a organometaloidné zlúčeniny
3. Selektívne reakcie a orientačné javy — stereochemia
4. Štruktúra a syntéza prirodzených látok (s výnimkou makromolekulových látok)

Témy ostatných prednášok, ktoré sa nemôžu zaradiť do príslušnej problematiky, uvedú sa v jednotlivých sekciách pod názvom „rozličné zprávy“.

Vlastný program kongresu sa uskutoční v dňoch 16.—25. júla 1957.

16. júla — schôdzka výboru a recepcia účastníkov

17. júla — oslavy 100 ročného jubilea Francúzskej chemickej spoločnosti

18. júla — otvorenie XVI. kongresu a prednášky, ktoré potrvávajú až do 24. júla