

ФИТОПАТОЛОГИЯ

В. Л. РЫЖКОВ и Е. П. ГРОМЫКО

**НОВЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ**

(Представлено академиком А. А. Рихтером 8 III 1938)

В основу описываемого здесь метода положен открытый нами совместно с Г. Л. Эйнгорном факт адсорбции вируса табачной мозаики бензойной кислотой.

Адсорбция вируса табачной мозаики бензойной кислотой устанавливается следующим опытом. Было взято 50 см<sup>3</sup> сока помидора, больного табачной мозаикой. Был приготовлен раствор бензойнокислого натра путем растворения 1 г бензойной кислоты в растворе соды (NaHCO<sub>3</sub>). Соды берется количество, необходимое для растворения бензойной кислоты, около 0.6 г на 1 г этой последней. К соку помидора добавляется раствор бензойной кислоты и затем добавлением раствора нормального HCl бензойная кислота вытесняется из раствора. Она выпадает в виде хлопьев, окрашенных пигментом в коричневый цвет, увлекающих за собой вирус. Осадок отфильтровывается и растворяется 0.1 молярным раствором Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Титр вируса в исходном соке и остальных фракциях был определен по числу некрозов на лист *N. glutinosa*, причем везде приводится среднее от двух-трех проб. Мы получили следующие цифры.

	Число некрозов на лист
Исходный сок табака 1 : 10 . . . . .	38.3
Адсорбент на бензойную кислоту после растворения в буфере . . . . .	95
Жидкость, отфильтрованная от адсорбента . . . . .	11

Оказалось, что не только бензойная кислота, но и обладающая большими антисептическими свойствами и большей растворимостью в воде салициловая кислота может адсорбировать вирус. На 100 см<sup>3</sup> сока табака было прибавлено 2.5 г салицилового натра в растворе и затем салициловая кислота была вытеснена соляной кислотой, как описано выше. Мы получили следующие титры вируса в различных фракциях.

	Число некрозов на лист
Сок табака до адсорбции . . . . .	27.5
Сок после адсорбции . . . . .	6.5
Адсорбент после его растворения . . . . .	35

Установив способность бензойной кислоты адсорбировать вирус, не инактивируя его, мы решили воспользоваться этим для получения вируса в кристаллическом виде. Главная трудность, с которой приходится считаться при очистке вируса, состоит в том, что трудно избавиться от пиг-

мента, до удаления которого кристаллизация по большей части невозможна. И метод Стенли<sup>(3)</sup> и метод Боудена и Пири<sup>(1)</sup> основаны на многократных осаждениях вирусного белка и растворении его. И даже после этого иногда не удается избавиться от пигмента и приходится прибегать к перевариванию препарата трипсином и т. п. (Боуден и Пири). Вот, что по поводу этих трудностей пишут Лоринг и Стенли<sup>(2)</sup>: «Если в случае неочищенного табачного глобулина достаточно 4—6 осаждений  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и 2—3 осаждений на целит для того, чтобы получить белый опалесцирующий препарат, то неочищенный глобулин томата требует приблизительно вдвое больше обработок  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и целитом» (стр. 735). Применяя адсорбцию бензойной кислотой, нам удалось разработать метод, который в несколько раз сокращает процедуры осаждения, адсорбции и фильтрации и поэтому сильно экономит время. Мы не имеем права сейчас утверждать, что нашим методом мы так же полно извлекаем вирус из исходного материала, как это делается методом Стенли, так как не производили таких сравнительных исследований, однако уже самая возможность быстро получить кристаллический препарат представляет известный интерес.

Для получения вируса табачной мозаики в качестве исходного материала для нас служили листья и стебель большого мозаикой табака или помидора, причем хорошо очищенные препараты нами были получены и из наименее благоприятного по литературным данным материала—зимних, оранжерейных старых помидоров, которые очень богаты пигментом.

Самый метод состоит в следующем. Исходный материал подвергается замораживанию и дважды экстрагируется децимолярным раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . В отдельных опытах мы брали например на 328 г сырья два раза по 250 см<sup>3</sup> буферного раствора. Полученный сок фильтруется через фильтровальную бумагу и к нему прибавляется приготовленный описанным выше способом раствор бензойнокислого натра из расчета 1.5—2 г на 100 см<sup>3</sup> сока. После тщательного размешивания прибавляют нормальный раствор соляной кислоты до тех пор, пока выделяются хлопья бензойной кислоты. Затем осадок отфильтровывают и растворяют его, избегая слишком большого разведения децимолярным раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Полученную жидкость очищают от пигментов карболеном (активированный уголь). В тех случаях, когда жидкость не особенно богата пигментом, очистку производят дважды, первый раз 2% угля и второй раз 1% угля. Если жидкость более богата пигментом, то приходится брать угля 4% и затем 2%. Наш опыт показывает, что при таком применении угля значительных потерь вируса не наблюдается. В одном опыте до применения угля мы имели 46 некрозов на лист *N. glutinosa*, после 2% угля—39 некрозов и после второй очистки 1% угля—43 некроза. В результате очистки мы получаем бесцветную или едва желтоватую хорошо опалесцирующую жидкость, из которой мы выкристаллизовываем вирус. Сама кристаллизация ведется по рецепту Стенли. К жидкости прибавляется 5% раствор уксусной кислоты в полунасыщенном растворе сернокислого аммония до достижения рН приблизительно 5.5. После этого мы прибавляем 8% кристаллического сернокислого аммония и затем в зависимости от количества белка некоторое количество концентрированного раствора сернокислого аммония, во всяком случае не больше, чем нужно для достижения 20% этой соли в нашей жидкости. После этого начинается выпадение кристаллов, причем желательнее, чтобы кристаллизация шла медленно, поэтому не следует прибавлять слишком много сернокислого аммония.

Таким образом получают кристаллы, морфологически совершенно подобные кристаллам Стенли. Их раствор дает биуретову реакцию и реакцию Миллона. Для получения постоянных микроскопических препаратов капля взвеси кристалла в растворе сернокислого аммония размазывается

по предметному стеклышку и высушивается, а затем фиксируется концентрированным спиртовым раствором пикриновой кислоты. Остаток пикриновой кислоты и сернокислый аммоний осторожно смываются под краном водопровода. Препарат окрашивается водным 10% раствором кислого фуксина и заливается обычным образом в канадский бальзам.

Полученный нами препарат очень вирулентен. Взвесь кристаллов в сернокислом аммонии при разведении 1 : 100 000 дает значительное количество некрозов на лист *N. glutinosa*. В отдельных опытах мы получали в среднем 6 некрозов на половинку листа, нами получены были также большие количества некрозов (до 36.5) на половинку листа, но они не были типичными, и мы не будем здесь использовать этот материал. Если принять во внимание, что у нас исходным материалом была взвесь, а Стенли исчисляет титр, исходя из разведения твердого вещества, то мы не можем считать титр нашего вируса более низким, чем титр вируса Стенли. Стенли при разведении 1 : 100 000 получал на лист 25.8—14.2 некрозов.

Очистка вируса бензойной кислотой значительно упрощалась бы, если бы можно было удалить бензойную кислоту после адсорбции эфиром. Опыты в этом направлении были поставлены. Адсорбент взвешивался в дистиллированной воде, или 0.1 молярного раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , или в 1% растворе поваренной соли и взбалтывался с эфиром. Бензойная кислота увлекает за собой почти весь пигмент и переходит в эфир. Остается почти бесцветная жидкость, однако при этом сильно падает титр вируса, и жидкость содержит мало белка.

Предлагаемый нами метод допускает различные вариации, не отражающиеся существенно на конечном результате. Можно исходить не из сока растения, а из высушенного сернокислым аммонием глобулина, который растворяется в децимолярном растворе  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и затем уже адсорбируется бензойной кислотой. Можно брать сок, выжатый и отцеженный через марлю, минуя предварительную фильтрацию. При применяемом нами методе часть бензойной кислоты обычно еще остается в фильтрате, но это не влияет существенно на результат, так как подавляющая часть пигмента и вируса увлекается уже первыми порциями осаждающейся бензойной кислоты. Если желательно получить особенно чистые препараты, то дальнейшая очистка ведется путем перекристаллизации и очистки углем.

Сок здорового помидора так же, как сок капусты и лука, содержит мало белка, который может быть адсорбирован бензойной кислотой и высушен сернокислым аммонием.

Лаборатория растительных вирусов.  
Микробиологический институт.  
Академия Наук СССР.  
Москва.

Поступило  
11 III 1938.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Bawden a. Pirie, Proc. of Roy. Soc., B, 123, № 832 (1937). <sup>2</sup> Loring a. Stanley, Journ. of Biolog. Chem., 117, № 2 (1937). <sup>3</sup> Stanley, Phytopathology, 26, 320—365 (1936).