

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra KRAMBERGER (ŠOSTER)

**RAZVOJ TEHNOLOGIJE ZA KONCENTRIRANJE IN ČIŠČENJE  
RASTLINSKIH VIRUSOV Z MONOLITNIMI  
KROMATOGRAFSKIMI NOSILCI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR CONCENTRATION AND  
PURIFICATION OF PLANT VIRUSES ON MONOLITHIC  
CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti. Opravljeno je bilo v podjetju BIA Separations, d.o.o. v Ljubljani in delno na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je na seji 31.5.2004 za doktorsko nalogu imenoval mentorja in somentorja:

Mentor: prof. dr. Maja Ravnikar

Somentor: doc. dr. Aleš Štrancar

Komisija za oceno in zagovor doktorske naloge, imenovana 30.1.2006 na senatu Biotehniške fakultete:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR  
Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ  
Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Član: doc. dr. Aleš ŠTRANCAR  
BIA Separations, d.o.o.

Datum zagovora: 18.4.2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra KRAMBERGER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 578.083:543.544 (043)=863

KG CIM® Convective Interaction Media / monolitni kromatografski nosilci / paradižnikov mozaični virus/ ToMV/ kumarični mozaični virus / CMV / koncentriranje rastlinskih virusov / čiščenje rastlinskih virusov

AV KRAMBERGER (ŠOSTER), Petra, univ. dipl. biol.

SA RAVNIKAR, Maja (mentor) / Štrancar, Aleš (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije

LI 2006

IN RAZVOJ TEHNOLOGIJE ZA KONCENTRIRANJE IN ČIŠČENJE RASTLINSKIH VIRUSOV Z MONOLITNIMI KROMATOGRAFSKIMI NOSILCI

TD Doktorska disertacija

OP XVI, 135 str., 7 pregl., 52 sl., 11 pril., 63 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI

V prikazanih raziskavah smo razvili tehnologijo za koncentriranje in čiščenje virusov s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci in ob tem karakterizirali CIM monolitne nosilce. Kot modelna virusa smo uporabili izometrični kumarični mozaični virus (CMV) in paličasti paradižnikov mozaični virus (ToMV). Za okvirno kvantifikacijo smo uporabljali prirejeno metodo ELISA. CMV smo koncentrirali na šibkem anionskem izmenjevalcu (CIM DEAE disk), ToMV na močnem anionskem izmenjevalcu (CIM QA disk). Pokazali smo, da lahko z uporabo CIM monolitnih nosilcev za nekaj velikostnih razredov povečamo koncentracijo virusa v vzorcu. Koncentriran virusni pripravek je mogoče neposredno uporabiti za detekcijo virusnih delcev z metodo ELISA. V primerjavi z drugimi metodami za koncentriranje rastlinskih virusov iz vode, ki se uporablja za zalivanje, je zgoraj opisana metoda hitrejša in zanesljivejša. Postopek je možno prilagoditi za koncentriranje virusnih delcev, ki bi bili zanimivi za proizvodnjo protiteles ali rastlinskih virusnih vektorjev. Z uporabo očiščenega ToMV smo določili kapaciteto CIM QA monolitnega nosilca za ToMV, ki je  $1.7 \cdot 10^{14}$  virusnih delcev čistega virusa / mL nosilca. Pokazali smo, da koncentracija virusnih delcev v čistem vzorcu na kromatografsko ločbo ne vpliva, medtem ko pretok mobilne faze vpliva na izkoristek: pri večjem pretoku je izkoristek boljši. Izdelali smo metodo za čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (homogeniziranega in klarificiranega rastlinskega materiala). ToMV smo čistili na CIM QA monolitnem nosilcu pri čemer smo kot vezni pufer uporabili 20 mM natrijev acetat, pH 5.5. 75 % na disk naloženega delno očiščenega virusnega pripravka smo iz diska eluirali z 0.45 M NaCl v veznem pufru, v obliki očiščenega ToMV. Čistost iz diska eluiranega ToMV smo preverili z SDS-PAGE, imunskim pivnikom in PCR v realnem času. Po čiščenju na CIM nosilcu je ostal ToMV infektiven. Čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku je zelo učinkovito, izgube virusnih delcev so majhne (približno 25 %), predvsem pa je postopek čiščenja zelo kratek, le nekaj ur v primerjavi s klasičnimi postopki čiščenja, ki običajno potekajo do 5 dni.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

**DN** Dd  
**DC** UDC 578.083:543.544 (043)=863  
**CX** CIM® Convective Interaction Media / monolithic chromatographic supports / *Tomato mosaic virus/ ToMV/ cucumber mosaic virus / CMV / concentration of plant viruses / purification of plant viruses*  
**AU** KRAMBERGER (ŠOSTER), Petra  
**AA** RAVNIKAR, Maja (supervisor) / ŠTRANCAR, Aleš (co-advisor)  
**PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology  
**PY** 2006  
**TI** DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR CONCENTRATION AND PURIFICATION OF PLANT VIRUSES ON MONOLITHIC CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS  
**DT** Doctoral dissertation  
**NO** XVI, 135 p., 7 tab., 52 fig., 11 ann., 63 ref.  
**LA** sl  
**AL** sl / en  
**AB**

The technology of virus concentration and purification on CIM Convective Interaction Media monolithic supports has been developed and CIM monolithic supports have been characterized. Two plant viruses have been selected as model viruses: isometric cucumber mosaic virus (CMV) and rod-shaped tomato mosaic virus (ToMV). ELISA was used for semi-quantitative analysis. CMV was concentrated using a weak anion exchanger (CIM DEAE disk) and ToMV using a strong anion exchanger (CIM QA disk). It has been demonstrated that both viruses, which had been diluted way below the sensitivity of ELISA, were concentrated by several orders of magnitude in the one-step procedure. Concentrated virus preparations could be used directly for ELISA analysis. In comparison with previously described methods for concentrating plant viruses from irrigation water, the above procedure may provide a much faster and more efficient way to concentrate highly diluted plant viruses. The procedure could be applied to the analysis of other highly diluted plant viruses, and to concentrate viruses for antiserum production and for the production of plant viral vectors. Using purified ToMV we determined the capacity of CIM QA monolithic disk for ToMV to be  $1.7 \cdot 10^{14}$  purified viral particles / mL of monolithic support. We have shown that the concentration of the purified virus in separated sample does not have the influence on ToMV separation, while the flow rate of the mobile phase influences the recovery of separated virus: higher flow rate means better recovery of the virus. We developed the method for purification of ToMV from partially purified ToMV preparation (homogenised and clarified plant material). ToMV was purified on CIM QA monolithic disk using 20 mM acetate buffer, pH 5.5 as loading buffer. 75 % of partially purified ToMV loaded on the disk was eluted with 0.45 M NaCl in loading buffer. With SDS-PAGE, western blot and real-time PCR we showed that the purity of ToMV purified on CIM QA monolithic disk is comparable with ToMV purified by the conventional method, regarding proteins and DNA. Viral particles are after purification still infective. Purification of ToMV on CIM QA monolithic disk is efficient, with minimal losses (only 25 %) and the purification process is very short: just two hours compared to conventional purification, which takes up to 5 days.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XV
Okrajšave in simboli	XVI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZA	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 VIRUSI	4
2.1.1 Kumarični mozaični virus (Cucumber mosaic virus, CMV)	6
2.1.2 Paradižnikov mozaični virus (Tomato mosaic virus, ToMV)	6
2.2 KONCENTRIRANJE VIRUSOV	7
2.3 ČIŠČENJE VIRUSOV	9
2.3.1 Klasičen način čiščenja rastlinskih virusov	10
2.3.2 Čiščenje virusov z gelsko kromatografijo	14
2.3.3 Čiščenje virusov z ionsko izmenjevalno kromatografijo	16
2.4 CIM MONOLITI	19
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>23</b>
3.1 ČIŠČENJE VIRUSOV PO KLASIČNEM POSTOPKU	23
3.1.1 Kumarični mozaični virus (CMV)	23
3.1.2 Paradižnikov mozaični virus (ToMV)	24
3.2 KROMATOGRAFIJA NA CIM MONOLITNIH DISKIH	26
3.2.1 Optimizacija puferskega sistema, pH in nosilca za ločevanje, koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov	27
3.2.2 Vpliv pretoka in koncentracije ToMV v vzorcu na ločbo na CIM QA monolitnem disku	27
3.2.3 Koncentriranje CMV in ToMV iz pufra in vodovodne vode	27
3.2.4 Določanje dinamične vezne kapacitete CIM QA monolitnega diska za ToMV	28
3.2.5 Čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku	28

<b>3.3 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA</b>	<b>30</b>
3.3.1 Lovljenje virusov s protitelesi za CMV	30
3.3.2 Negativno kontrastiranje za ToMV	30
<b>3.4 METODA ELISA</b>	<b>30</b>
3.4.1 DAS ELISA za relativno delno kvantifikacijo CMV	32
3.4.2 DAS ELISA za kvantifikacijo ToMV	34
<b>3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU-DETEKCIJA 18S rRNA</b>	<b>35</b>
<b>3.6 SDS POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA</b>	<b>36</b>
<b>3.7 IMUNSKI PIVNIK</b>	<b>37</b>
<b>3.8 TESTNE RASTLINE</b>	<b>38</b>
3.8.1 Testiranje infektivnosti virusa po prehodu skozi CIM monolitni nosilec in celoten HPLC sistem	38
3.8.2 Okužba rastlin z virusom preko koreninskega sistema	38
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>39</b>
<b>4.1 ČIŠČENJE VIRUSNIH DELCEV PO KLASIČNEM POSTOPKU</b>	<b>39</b>
4.1.1 Čiščenje CMV	39
4.1.2 Čiščenje ToMV	40
<b>4.2 OPTIMIZACIJA PUFERSKEGA SISTEMA, pH PUFRA IN IZBIRA NOSILCA ZA KROMATOGRAFSKO LOČBO CMV IN ToMV</b>	<b>43</b>
4.2.1 Kumarični mozaični virus	43
4.2.2 Paradižnikov mozaični virus	45
<b>4.3 VPLIV PRETOKA MOBILNE FAZE IN KONCENTRACIJE ToMV V VZORCU NA KROMATOGRAFIJO ToMV</b>	<b>50</b>
4.3.1 Vpliv pretoka mobilne faze na kromatografijo ToMV	50
4.3.2 Vpliv koncentracije ToMV v vzorcu na kromatografijo ToMV	59
<b>4.4 OKUŽBA RASTLIN PREKO KORENINSKEGA SISTEMA</b>	<b>61</b>
<b>4.5 KONCENTRIRANJE CMV IN ToMV IZ VZORCEV Z NIZKO KONCENTRACIJO VIRUSA</b>	<b>64</b>
4.5.1 Koncentriranje CMV iz pufra	64
4.5.2 Koncentriranje ToMV iz pufra in vodovodne vode na CIM QA monolitnih diskih	68
4.5.3 Primerjava koncentriranja rastlinskih virusov na CIM monolitnih nosilcih z drugimi metodami	77
4.5.4 Postopek za čiščenje CMV in ToMV iz vzorcev z nizko koncentracijo virusa v vzorcu	79
<b>4.6 DOLOČANJE DINAMIČNE KAPACITETE CIM QA MONOLITNEGA DISKA ZA ToMV</b>	<b>79</b>
<b>4.7 ČIŠČENJE ToMV IZ DELNO OČIŠČENEGA VIRUSNEGA PRIPRAVKA NA CIM QA MONOLITNEM NOSILCU</b>	<b>82</b>
4.7.1 Priprava delno očiščenega ToMV	82

4.7.2 Izbira delno očiščenega virusnega pripravka za čiščenje ToMV na CIM QA disku	83
4.7.3 Optimizacija gradiента za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku	87
4.7.4 Ponovljivost čiščenja ToMV	95
4.7.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (detekcija 18S rRNK)	100
4.7.6 Infektivnost ToMV po čiščenju na CIM QA monolitnem disku	102
4.7.7 Primerjava čiščenja ToMV po klasični metodi in na CIM QA monolitnem disku	103
<b>5 SKLEPI</b>	<b>107</b>
<b>6 POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>109</b>
6.1 POVZETEK	109
6.2 SUMMARY	111
<b>7 VIRI</b>	<b>114</b>
<b>8 PRILOGE</b>	<b>122</b>
ZAHVALA	135

## KAZALO PREGLEDNIC

	S.
<b>Preglednica 1:</b> Primer podatkov za izris umeritvene krivulje za delno kvantifikacijo CMV v vzorcu.	33
<b>Preglednica 2:</b> Koncentracije ToMV v listih in koreninah rastlin, zalivanih z vodo z in brez dodanega ToMV, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.	63
<b>Preglednica 3:</b> Koncentracije ToMV v redčini pred koncentriranjem in v kromatografskih frakcijah po koncentriranju na CIM QA monolitnem disku, določene z delno kvantitativno ELISA.	73
<b>Preglednica 4:</b> Primerjava uspešnosti koncentriranja ToMV iz pufra in iz vodovodne vode na CIM QA monolitnem disku. Koncentracije ToMV v vzorcih pred koncentriranjem so teoretične koncentracije, izračunane glede na volumen in koncentracijo dodanega ToMV v pufer ali vodovodno vodo.	76
<b>Preglednica 5:</b> Količina ToMV v delno očiščenih virusnih pripravkih (analiza vzorcev z delno kvantitativno metodo ELISA).	86
<b>Preglednica 6:</b> Vsebnost ToMV (v odstotkih glede na količino na disk nanešenega ToMV) v frakcijah čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku po dveh različnih metodah.	92
<b>Preglednica 7:</b> Poraba časa za čiščenje ToMV po klasični metodi in za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku.	104

## KAZALO SLIK

	S.
<b>Slika 1:</b> Družine in rodovi rastlinski virusov (Agrios, 1997).	5
<b>Slika 2:</b> Slika poli(glicidil metakrilat-ko-eten dimetakrilat) monolita posneta z elektronskim vrstičnim mikroskopom (JEOL Ltd, Tokyo, Japan).	18
<b>Slika 3:</b> Nekateri izmed CIM monolitnih diskov in CIM ohišje. Različne barve obročkov predstavljajo različne aktivne skupine monolita ( <a href="http://www.biaseparations.com">http://www.biaseparations.com</a> ).	19
<b>Slika 4:</b> Cevni moduli večjih dimenzij ( <a href="http://www.biaseparations.com">http://www.biaseparations.com</a> ).	20
<b>Slika 5:</b> Shematski prikaz čiščenja ToMV po klasičnem postopku.	26
<b>Slika 6:</b> Shematski prikaz priprave delno očiščenih virusnih klarifikatov ToMV.	29
<b>Slika 7:</b> Primer umeritvene krivulje za relativno delno kvantifikacijo CMV.	33
<b>Slika 8:</b> Primer umeritvene krivulje za delno kvantifikacijo ToMV.	34
<b>Slika 9:</b> Elektronska mikroskopija: negativni kontrast virusnih delcev kumaričnega mozaičnega virusa v delno očiščenem virusnem pripravku po predhodnem lovljenju virusnih delcev s protitelesi.	39
<b>Slika 10:</b> Izmerjene absorbance frakcij po centrifugiranju v saharoznem gradientu pri čiščenju ToMV iz <i>N. clevelandii</i> .	40
<b>Slika 11:</b> Izmerjene absorbance frakcij po centrifugiranju v CsCl gradientu pri čiščenju ToMV iz <i>N. clevelandii</i> .	41
<b>Slika 12:</b> Elektronska mikroskopija: negativni kontrast virusnih delcev ToMV v različnih korakih čiščenja: slika A (ToMV po centrifugiranju v saharoznem gradientu), slika B (ToMV po centrifugiranju v CsCl gradientu) in slika C (ToMV po dializi).	42
<b>Slika 13:</b> Elektronska mikroskopija: negativni kontrast očiščenega paradižnikovega mozaičnega virusa.	42
<b>Slika 14:</b> Kromatogrami ločb delno očiščenega CMV na CIM DEAE monolitnem disku z različnimi pufrskimi sistemi in pri različnih pH vrednostih: FP (20 mM fosfatni pufer), TP (20 mM Tris-HCl pufer).	44

	S.
<b>Slika 15:</b> Skupni izkoristki posameznih ločb delno očiščenega CMV na CIM DEAE monolitnem disku: FP (20 mM fosfatni pufer), TP (20 mM Tris-HCl pufer).	45
<b>Slika 16:</b> Optimizacija pufrskega sistema in pH ter izbira CIM monolitnega nosilca za kromatografsko ločevanje ToMV: izkoristki pri kromatografiji čistega ToMV v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 z uporabo različnih pufrov.	47
<b>Slika 17:</b> Primerjava kromatografije čistega ToMV pri dveh različnih pH 20 mM fosfatnega pufrskega sistema na CIM QA monolitnem disku.	48
<b>Slika 18:</b> Optimizacija pufrskega sistema in pH ter izbira CIM monolitnega nosilca za kromatografsko ločevanje ToMV: izkoristki pri kromatografiji čistega ToMV v 20 mM veznem pufru z uporabo različnih pufrov.	49
<b>Slika 19:</b> Kromatografija 50 µL (A), 100 µL (B) in 150 µL (C) očiščenega ToMV pri različnih pretokih (2 mL/min, 3 mL/min in 6 mL/min) na CIM QA monolitnem disku.	51
<b>Slika 20:</b> Količine ToMV v kromatografskih vrhovih št. 2 zbranih med kromatografijo različnih količin čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku, pri različnih pretokih mobilne faze. Količine ToMV so določene z delno kvantitativno metodo ELISA.	53
<b>Slika 21:</b> Vpliv pretoka na kromatografijo ToMV: prikazane so vrednosti ToMV v kromatografskih vrhovih št. 2 pri različnih pretokih v odstotkih, glede na količino ToMV, nanešeno na CIM QA monolitni disk.	54
<b>Slika 22:</b> Količine ToMV v kromatografskih vrhovih št. 1 zbranih med kromatografijo čistega ToMV na CIM QA monolitnih diskih, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.	55
<b>Slika 23:</b> Količine ToMV v vzorcih, zbranih pri prvem spiranju diskov z elucijskim pufrom po dejanski kromatografiji ToMV, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.	56

	S.
<b>Slika 24:</b> Prikaz vsebnosti ToMV v frakcijah, zbranih pri kromatografiji različnih količin čistega ToMV pri različnih pretokih in v frakciji spiranja diska z elucijskim pufrom po kromatografiji.	57
<b>Slika 25:</b> Primerjava meritev površine kromatografskega vrha št. 2 pri kromatografiji čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku pri pretoku 2 mL/min (A), 3 mL/min (B) in 6 mL/min (C) in količine ToMV v tem kromatografskem vrhu (določene z delno kvantitativno metodo ELISA).	59
<b>Slika 26:</b> Kromatogrami ločbe neredčenega in v pufru A redčenega čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, UV detekcija pri 280 nm, pretok 6 mL/min, gradient prikazan na sliki.	60
<b>Slika 27:</b> Količina ToMV v kromatografskem vrhu pri kromatografiji 20 µL čistega ToMV v 20 mM natrijevem acetatnem pufru, pH 5.5 z različno koncentracijo na CIM QA monolitnem disku.	61
<b>Slika 28:</b> Shematski prikaz preverjanja sposobnosti ToMV, da okuži rastline <i>N. clevelandii</i> preko koreninskega sistema.	62
<b>Slika 29:</b> Koncentriranje CMV iz redčin pripravljenih z veznim pufom in delno očiščenim CMV (5, 20, 50 in 100 µL CMV/0.5 L 20 mM Tris-HCl pufera, pH 8) na CIM DEAE monolitnem disku.	65
<b>Slika 30:</b> Koncentracije CMV v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju na CIM DEAE monolitnem disku.	66
<b>Slika 31:</b> Koncentriranje ToMV iz redčin pripravljenih z veznim pufom (20 mM natrijev acetatni pufer, pH 5.5) in očiščenim ToMV (0.5, 1 in 2 µL ToMV / 0.5 L pufera) na CIM QA monolitnem disku.	70
<b>Slika 32:</b> Koncentriranje ToMV iz redčin pripravljenih z vodovodno vodo (4996 mL vodovodne vode z dodanimi 4 mL 2.5 M natrijevega acetata, pH 5.5) in očiščenim ToMV (0.5, 1 in 2 µL ToMV / 0.5 L) na CIM QA monolitnem disku.	71

	S.
<b>Slika 33:</b> Koncentracija ToMV v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju ToMV iz 20 mM natrijevega acetata, pH 5.5 na CIM QA monolitnem disku, določena z metodo ELISA.	74
<b>Slika 34:</b> Koncentracija ToMV v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju ToMV iz vodovodne vode z 20 mM natrijevim acetatom, pH 5.5 na CIM QA monolitnem disku, določena z metodo ELISA.	75
<b>Slika 35:</b> Test infektivnosti ToMV na <i>N. glutinosa</i> po koncentriranju ToMV na CIM QA monolitnem disku.	77
<b>Slika 36:</b> Prebojna krivulja za merjenje dinamične kapacitete CIM QA monolitnega diska za ToMV. Pufer A: 20 mM fosfat citratni pufer, pH 7, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A.	80
<b>Slika 37:</b> Delno očiščeni virusni pripravki: 1 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala brez kloroform), 2 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom), 3 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom, oborjen s 5 % PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen s pipetiranjem) in 4 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom, oborjen s 5 % PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen z 12 urnim stresanjem v pufru).	83
<b>Slika 38:</b> Primerjava ločbe 50 µL delno očiščenega virusnega pripravka 1 in 2 v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku.	84
<b>Slika 39:</b> Primerjava ločbe 50 µL delno očiščenega virusnega pripravka 3 in 4 v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pretok: 6 mL/min, UV detekcija pri 260 nm, gradient prikazan na sliki.	85

	S.
<b>Slika 40:</b> Ločba delno očiščenih virusnih pripravkov na poliakrilamidnem gelu, barvanim s srebrom: 1 (Markerski proteini, BioRad, Kaleidoscope Prestained Standards, 161-0324), 2 (ToMV očiščen po klasičnem postopku), 3 (delno očiščen ToMV-vzorec 1), 4 (delno očiščen ToMV-vzorec 2), 5 (delno očiščen ToMV-vzorec 3) in 6 (delno očiščen ToMV-vzorec 4).	87
<b>Slika 41:</b> Ločba 100 µL delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pH 5.5, pretok 6 mL/min, UV detekcija pri 260 nm, gradient je prikazan na sliki, kromatografske frakcije 1-7 so označene s F1-F7.	88
<b>Slika 42:</b> Poliakrilamidna ločba frakcij ločevanja 100 µL delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku, gel barvan s srebrom. Vzorci: 1 (Markerski proteini: BioRad, 161-0317), 2 (ToMV pripravljen po klasičnem postopku), 3 (frakcija po nanosu 100 µL delno očiščenega ToMV v HPLC brez diska), 4-10 (kromatografske frakcije 1-7).	89
<b>Slika 43:</b> Primerjava ločbe 1 mL vzorca 2 v 20 mM natrijevem acetatu, pH 5.5 po dveh različnih metodah na CIM QA monolitnem disku.	91
<b>Slika 44:</b> Ločba ToMV čiščenega po klasičnem postopku (1), delno očiščenega virusnega pripravka (2), tretje frakcije čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (3) na poliakrilamidnem gelu, barvanim s srebrom. Na desni strani so markerski proteini (BioRad, 161-0317).	93
<b>Slika 45:</b> Poliakrilamidna ločba vzorcev: levo (gel barvan s srebrom), desno (proteini iz gela prenešeni na PVDF membrano-western blot). Vzorci: 1 (markerski proteini BioRad, 161-0317), 2 ( <i>N. clevelandii</i> ), 3 (delno očiščen virusni pripravek nanešen na disk) in 4 (tretja kromatografska frakcija čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku).	94

	S.
<b>Slika 46:</b> Drugo čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (1 mL vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: pufer A+1.5 M NaCl, pH 5.5, UV detekcija pri 260 nm, gradient je prikazan na sliki.	96
<b>Slika 47:</b> Tretje čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku. Gradient (% pufra B) je prikazan na sliki, pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: pufer A+1.5 M NaCl, pH 5.5.	97
<b>Slika 48:</b> Grafični prikaz rezultatov čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku (analiza frakcij z metodo ELISA).	98
<b>Slika 49:</b> S srebrom barvan poliakrilamidni gel: 1 (markerski proteini, BioRad, 161-0317), 2 (neokužena <i>N. clevelandii</i> ), 3 (s ToMV okužena <i>N. clevelandii</i> ), 4 (ToMV čiščen po klasičnem postopku), 5 (4x redčen delno očiščen ToMV-drugo čiščenje), 6 (tretja kromatografska frakcija drugega čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku), 7 (delno očiščen ToMV-tretje čiščenje) in 8 (tretja kromatografska frakcija tretjega čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku).	99
<b>Slika 50:</b> Koncentracije DNK (zaporedja za 18S rRNK) v delno očiščenih ToMV pripravkih pred čiščenjem, kromatografskih frakcijah po čiščenju na CIM QA monolitnem disku in v ToMV pripravku, ki je bil očiščen na konvencionalen način. Koncentracije DNK so bile določene z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in uporabo Human 18S rRNA kita (Applied Biosystems).	101
<b>Slika 51.</b> Fotografije rastlin <i>N. glutinosa</i> 14 dni po mehanski inokulaciji z vodo-negativna kontrola (slika A), s tretjo kromatografsko frakcijo drugega (slika B) in tretjega (slika C) čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku.	102
<b>Slika 52.</b> Primerjava sheme čiščenja ToMV po klasičnem postopku (levo) in z uporabo CIM QA monolitnega diska (desno).	103

## KAZALO PRILOG

	S.
<b>Priloga A.</b> Sestava pufra za mehansko inokulacijo rastlin.	122
<b>Priloga B.</b> Sestava pufrov, ki smo jih uporabljali pri metodi ELISA.	123
<b>Priloga C.</b> Sestava pufrov za SDS-PAGE in imunski pivnik (western blot).	124
<b>Priloga D.</b> Ločevanje delno očiščenega virusnega pripravka CMV ob uporabi različnih pufrskih sistemov - rezultati analize kromatografskih frakcij z relativno delno kvantitativno metodo ELISA	125
<b>Priloga E.</b> Kromatografija očiščenega virusnega pripravka ToMV (cToMV) v 200 mM McIlvaine fosfat-citratnem pufru, pH 7 ob uporabi različnih pufrskih sistemov in različnih pH - rezultati analize kromatografskih frakcij z delno kvantitativno metodo ELISA.	126
<b>Priloga F.</b> Kromatografija očiščenega virusnega pripravka ToMV (cToMV) v veznih pufrih ob uporabi različnih pufrskih sistemov in različnih pH: rezultati delno kvantitativne metode ELISA.	129
<b>Priloga G.</b> Vpliv pretoka na kromatografijo čistega ToMV (cToMV) na CIM QA monolitnem disku-rezultati delno kvantitativne metode ELISA.	130
<b>Priloga H.</b> Koncentriranje CMV iz 20 mM Tris pufra, pH 8 na CIM DEAE disku: koncentracija CMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z relativno delno kvantitativno metodo ELISA.	131
<b>Priloga I.</b> Koncentriranje ToMV iz 20 mM natrijevega acetata, pH 5.5 na CIM QA disk: koncentracija ToMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z delno kvantitativno metodo ELISA.	132
<b>Priloga J.</b> Koncentriranje ToMV iz vodovodne vode z dodanim natrijevim acetatom do končne koncentracije 20 mM, pH 5.5 na CIM QA disk: koncentracija ToMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z delno kvantitativno metodo ELISA.	133
<b>Priloga K.</b> Čiščenje ToMV iz rastlinskega materiala na CIM QA monolitnem disku-rezultati analize frakcij z delno kvantitativno metodo ELISA.	134

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonium persulfat
CIM	Convective Interaction Media
CP	coat protein (plaščni protein)
CFP	Citrat fosfatni pufer
CMV	Cucumber mosaic virus (kumarični mozaični virus)
Da	dalton
DAS-ELISA	double–antibody sandwich ELISA (ELISA dvojni sendvič)
DEAE	Diethylamine
dsRNK	double stranded RNK (dvostruka RNK)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FP	Fosfatni pufer
HPLC	Visoko ločljivostna tekočinska kromatografija
KP	Karbonatni pufer
kDa	kilo dalton
kb	kilo baz
ME	merkaptoetanol
NA	Natrijev acetat
OD	Optical density (optična gostota)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	phosphate buffer saline (fosfatni pufer)
PEG	polietilenglikol
pNPP	para nitrofenil fosfat
PVDF memb.	polivinildifluoridna membrana
PVP	Polivinilpirolidon
QA	Quaternary amine
R <sup>2</sup>	Standardni odmik
RT	reverzna transkriptaza (transkripcija)
RT-PCR	reakcija reverzne transkriptaze in verižna reakcija polimeraze
Real-time PCR	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času
rpm	Rounds per minute (obrati / minuto)
SDS	sodium dodecil sulfat (natrijev dodecilsulfat)
ToMV	Tomato mosaic virus (paradižnikov mozaični virus)
TP	Tris pufer
WB	western blot (imunski pivnik)

## 1 UVOD

Pogost problem pri raziskavah in detekciji virusov v rastlinski in humani virologiji so nizke koncentracije virusnih delcev v gostiteljih in okolju. Kljub novim, bolj občutljivim metodam za detekcijo virusov, je pri nekaterih vzorcih potrebno njihovo koncentracijo povečati in s tem omogočiti njihovo detekcijo. Poleg potreb po hitrih in učinkovitih metodah za koncentriranje virusnih delcev iz močno redčenih vzorcev (voda za zalivanje vrtnin, pitna voda) se vedno bolj pojavljajo tudi potrebe po hitrih in učinkovitih metodah za čiščenje virusnih delcev (proizvodnja čistih virusnih delcev za potrebe proizvodnje poliklonskih protiteles, genske terapije, proizvodnje cepiv). Konvencionalne metode čiščenja virusnih delcev vključujejo številna centrifugiranja,obarjanja in ultracentrifugiranja v gostotnih gradientih. Postopki so zapleteni, dolgotrajni, pogosto neučinkoviti in ne omogočajo enostavnega prenosa v industrijsko merilo.

Z namenom skrajšati in izboljšati učinkovitost koncentriranja in čiščenja virusnih delcev so se v zadnjih dveh desetletjih raziskovalci intenzivno ukvarjali z razvojem novih metod. Lete so najpogosteje vključevale uporabo elektropozitivnih ali elektronegativnih filterov ali ultracentrifugiranja. Kljub temu, da so bile te metode bolj učinkovite pri koncentriranju in čiščenju virusnih delcev v primerjavi s klasičnimi metodami, imajo določene slabosti. Postopki so še vedno dolgotrajni, pogosto je prenos proizvodnje virusnih delcev iz laboratorijskega na industrijski nivo težaven.

V zadnjih letih se za čiščenje virusnih delcev vedno bolj uporablja tekočinska kromatografija, ki omogoča doseganje visoke čistosti končnega proizvoda in visoko produktivnost. Kromatografski nosilci za biokromatografijo so bili v preteklosti namenjeni predvsem čiščenju proteinov. Za čiščenje virusov so ti kromatografski nosilci, ki temeljijo na poroznih delcih, neprimerni, saj je proces počasen in so izpleni virusnih delcev nizki. V nasprotju s tradicionalnimi kromatografskimi nosilci so metakrilatni monoliti (CIM Convective Interaction Media) načrtovani predvsem za potrebe čiščenja velikih molekul oz. nanodelcev, kot so imunoglobulini, plazmidna DNK in virusi. CIM monolitni kromatografski nosilci so iz enega kosa poroznega materiala s povezanimi mikro kanali, ki merijo v premeru povprečno 1500 nm. Taka struktura materiala omogoča hitre ločbe ob nizkih padcih tlaka pri visokih pretokih mobilne faze. Ker poteka izmenjava molekul med mobilno in stacionarno fazo na podlagi konvektivnega snovnega prenosa, je produktivnost

v primerjavi s tradicionalnimi kromatografskimi kolonami napolnjenimi s poroznimi delci, kjer izmenjava poteka v glavnem na podlagi difuzivnega snovnega prenosa, večja. Poleg tega, velikost kanalov omogoča dostop velikim molekulam do večine veznih mest na nosilcu, kar omogoča visoke kapacitete na volumsko enoto nosilca in s tem, v primerjavi s klasičnimi nosilci, večjo zmogljivost (Štrancar in sod., 2002). Ker se molekule na samem nosilcu zadržujejo kratek čas, je možnost poškodbe ali spremembe aktivnosti ciljne biomolekule majhna.

### 1.1 NAMEN DELA

Dva glavna cilja doktorske disertacije sta bila s pomočjo dveh modelnih rastlinskih virusov različnih oblik in dimenzij:

- razviti metodo za uspešno koncentriranje rastlinskih virusov iz vzorcev, v katerih je koncentracija le-teh pod mejo detekcije diagnostičnih metod,
- razviti metodo za hitro čiščenje virusnih delcev iz rastlinskega materiala in
- karakterizirati CIM monolitne nosilce za koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov.

V okviru treh glavnih ciljev smo zasledovali več manjših ciljev:

- namnožiti in očistiti izbrana modelna virusa (kumarični in paradižnikov mozaični virus) po klasičnem postopku za nadaljnjo uporabo in primerjalno študijo,
- prirediti kvalitativno metodo ELISA v delno kvantitativno metodo za določanje CMV in ToMV,
- preveriti, ali je ToMV sposoben okužiti propagacijske rastline preko koreninskega sistema,
- preveriti, kateri izmed CIM monolitnih nosilcev je najprimernejši za ločevanje, koncentriranje in kasnejše čiščenje kumaričnega oz. paradižnikovega mozaičnega virusa,
- poiskati najprimernejši pufrski sistem in pH za koncentriranje in čiščenje CMV in ToMV,
- preveriti uporabnost CIM monolitnih nosilcev za koncentriranje rastlinskih virusov iz vzorcev, kjer so virusni delci v izredno nizkih koncentracijah (pod mejo

detekcijske metode ELISA) in ugotoviti ali so virusi po koncentriranju na CIM nosilcih še infektivni,

- ugotoviti vpliv pretoka in koncentracije virusa v vzorcu na ločevanje na CIM monolitnih nosilcih,
- določiti kapaciteto CIM monolitnega nosilca za ToMV in
- preveriti uporabnost CIM monolitnih nosilcev za čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka, ugotoviti čistost očiščenega virusa in preveriti ali so virusi po končanem čiščenju infektivni.

## 1.2 HIPOTEZA

Kromatografska ločba virusov je zaradi njihove velikosti možna predvsem na podlagi adsorpcije. Virusi, tako rastlinski kot živalski so navzven obdani s plaščem, ki največkrat vsebuje samo proteine, včasih pa jih obdajajo tudi lipidne ovojnice. Proteini virusnega plašča se v okolju z določenim pH negativno oz. pozitivno nabijejo, glede na njihove izoelektrične točke. Le-te se pri večini virusov gibljejo med pH vrednostmi 3 in 7. V okolju s pH vrednostjo 3 so virusi navadno pozitivno nabiti in se vežejo na negativno nabite kromatografske površine, nad pH vrednostjo 7 pa so negativno nabiti in se vežejo na pozitivno nabite površine. Adsorpcija virusov na nosilce, kjer se nahajajo nabite skupine je torej možna, potrebno pa je zagotoviti tudi, da ima kromatografski nosilec dovolj velike pore, skozi katere virus lahko potuje. Pri klasičnih kromatografskih nosilcih je temu pogoju težko zadostiti, drugače pa je pri monolitnih kromatografskih kolonah, ki so bile razvite z namenom, da bodo omogočale separacije zelo velikih molekul in nanodelcev.

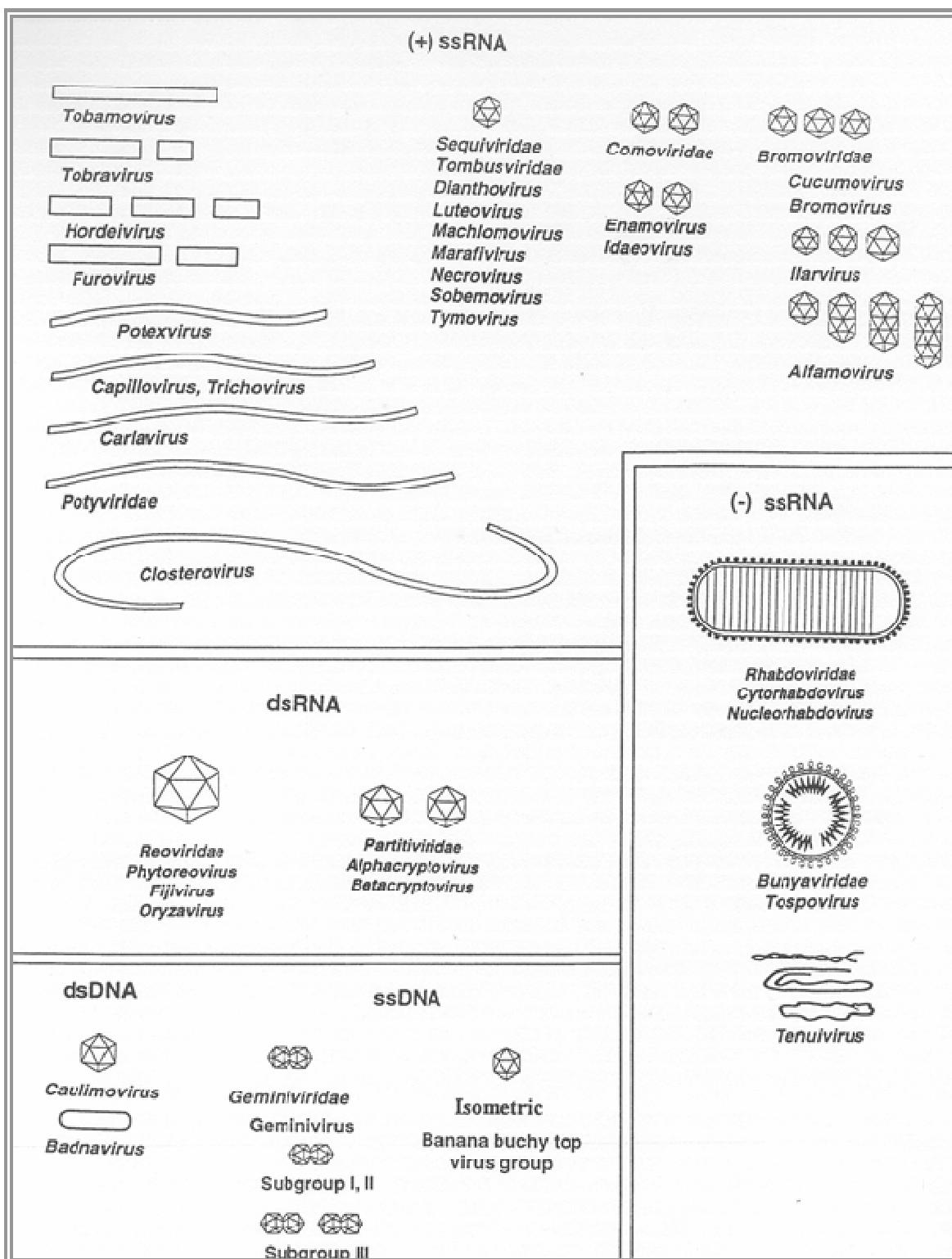
Predpostavljam, da bo zaradi lastnosti CIM monolitnih nosilcev možno koncentrirati in čistiti izbrana modelna rastlinska virusa na omenjenih kromatografskih nosilcih, kar bo omogočilo zaznavati virus v zelo nizkih koncentracijah ter skrajšalo postopek čiščenja virusnih delcev iz rastlinskega materiala.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VIRUSI

Virusi so infektivni delci, sestavljeni iz molekule nukleinske kisline, ki je obdana z virusnim plaščem ali kapsido. Proteine, ki v pretežni meri sestavljajo kapsido, imenujemo proteinske podenote ali kapsomere, ki so lahko sestavljene iz enega ali več različnih proteinov (Brock in Madigan, 1991). Nekateri virusi so dodatno oviti v lipidno membrano, ki prav tako vsebuje proteine (Alberts in sod., 1994). Kljub svoji enostavnosti, se virusi razlikujejo po strukturi, morfologiji in načinu razmnoževanja.

Virusi so različnih oblik (slika 1). Najpogosteje so podolgovati (paličice, nitke) ali sferični (izometrični, poliedrični). Velikost podolgovatih paličic je do 300 nm, dolžina nitastih virusov se giblje od 480 do 2000 nm, sferični virusi pa merijo v premeru od 15 do 100 nm (Agrios, 1997). Virusi se razlikujejo tudi po nukleinski kislini



Slika 1. Družine in rodovi rastlinskih virusov (Agrios, 1997).

### 2.1.1 Kumarični mozaični virus (Cucumber mosaic virus, CMV)

CMV je izometričen virus iz skupine Cucumovirusov. Virusni delec meri v premeru 30 nm, virusni plašč je sestavljen iz 180 proteinskih podenot, molekulska masa ene podenote je 24.5 kDa. Poleg zapisa za plaščni protein je v genomu virusa tudi zapis za gibalni protein (9.9 kDa), RNK replikazo (36.3 kDa) in RNK polimerazo (31 kDa). Genom CMV sestavljajo širje deli linearne enoverižne molekule RNK, katere skupna velikost je 8.621 kb. RNA-1 in RNA-2 se nahajata v dveh ločenih virusnih delcih, RNA-3 in RNA-4 pa skupaj v enem virusnem delcu (Francki in sod., 1979). Genom predstavlja 18 % teže virusnega delca. Molekulska masa celotnega virusnega delca je  $5.8\text{--}6.7 \times 10^6$  Da. Virusni delci ne vsebujejo lipidov (Francki in sod., 1979).

Absorbanca čistega virusnega pripravka pri 260 nm je 5, kadar je koncentracija virusa v pripravku 1 mg/mL. Razmerje  $A_{260}/A_{280}$  je za čist virusni pripravek enako 1.65. Izoelektrična točka CMV je pri pH 4.7.

Virus se prenaša mehansko in s prenašalcji (s 60 različnimi vrstami listnih uši), prenos preko semen ni običajen. CMV povzroča mozaičnost listov na dvokaličnicah (kumare, bučke, zelena) in enokaličnicah ter praprotovor listov pri paradižniku (Francki in sod., 1979).

Okužba rastlin z mehansko inokulacijo s sokom okužene rastline ni problematična. Propagacijska rastlina za CMV je *Nicotiana tabacum*, testna rastlina pa *Chenopodium quinoa*.

### 2.1.2 Paradižnikov mozaični virus (Tomato mosaic virus, ToMV)

ToMV je tipičen predstavnik skupine Tobamovirus. Soroden je Tobačnemu mozaičnemu virusu (Tobacco mosaic virus-TMV), vendar se od njega razlikuje po drugačnem odzivu gostitelja, seroloških reakcijah in zaporedju aminokislin virusnega proteina (van Regenmortel, 1975).

ToMV je po svetu močno razširjen (povsod, kjer raste paradižnik) in pogosto povzroča epidemije na paradižniku (*Lycopersicon esculentum*). Bolezenski znaki, ki se razvijejo na rastlini po okužbi s ToMV, so odvisni od temperature, dolžine dneva, intenzitete svetlobe in kultivarja paradižnika, na splošno pa povzroči mozaičnost in pozimi ožanje listov.

Virus se ne prenaša z vektorji, prenaša pa se mehansko, s cepljenjem, z dotikom med rastlinami in s semenimi.

ToMV je paličaste oblike, njegova tipična velikost je 300 nm x 18 nm.

Genom ToMV je enoverižna linearna molekula RNK, velikosti 6.384 kb in predstavlja približno 5 % teže virusnega delca (Mosch in sod., 1973).

Izoelektrična točka ToMV je pri pH 4.50-4.64 – odvisno od linije (Oster, 1951; Hollings in Huttinga, 1976).

Virusni delci ToMV vsebujejo 95 % proteinov. V genomu je zapisana informacija za en plaščni protein (17-18 kDa) in tri nestruktурne proteine: replikaza ali njene komponente (126-129 kDa), polipeptid, ki ima motiv, podoben od RNK odvisni RNK polimerazi (183-187 kDa) in protein za gibanje-angl. movement protein (28-31 kDa) (Lewandowski, 2000). Aminokislinska sekvenca plaščnega proteina ToMV linije Dehlamense sestavlja 158 aminokislin (Hollings in Huttinga, 1976), z molsko maso 17.4 kDa. Virusni delci ne vsebujejo lipidov.

Najpogosteje uporabljeni propagacijski rastline za ToMV je *Nicotiana clevelandii*. Majhne rastline po okužbi z virusom hitro propadejo in dajejo majhne izkoristke, večje rastline pa razvijejo nekrotične lezije, čemur sledi sistemsko gubanje in splošna klorozija. Izkoristek virusa je visok, vendar rastline propadejo po 2-4 tednih. Testna rastlina za ToMV je najpogosteje *Nicotiana glutinosa*.

## 2.2 KONCENTRIRANJE VIRUSOV

V rastlinski virologiji je pri določanju prisotnosti virusov pogosto problem nizka koncentracija virusnih delcev v vzorcu. Občutljivost pogosto uporabljane metode dvojni sendvič ELISA (DAS ELISA, angl. **D**ouble-**A**ntibody-**S**andwich **E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) v diagnostiki rastlinskih virusov je, kljub uporabi dobrih, visoko specifičnih protiteles, 1-10 ng/mL (Bergmayer, 1986). Obstajajo seveda tudi druge metode določanja rastlinskih virusov, kot je npr. RT-PCR (**R**everse **T**ranscriptase-**P**olymerase **C**hain **R**eaction, reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo), ki je sto do tisočkrat bolj občutljiva (Candresse in sod., 1998). Vendar nizka koncentracija virusnih delcev v nekaterih vzorcih, kljub diagnostičnim metodam z večjo občutljivostjo, ne omogoča določanja virusnih delcev v takih vzorcih. Voda, ki se uporablja za zalivanje

poljščin in vrtnin, je primer vzorca z nizko koncentracijo virusnih delcev. Koncentracije potencialno prisotnih patogenih virusov v vodah so navadno pod mejo detekcije diagnostičnih metod in brez predhodnega koncentriranja njihove prisotnosti ni mogoče potrditi.

Že pred dvema desetletjema so številni avtorji ugotovili, da nekateri rastlinski virusi lahko okužijo rastline skozi koreninski sistem (Koenig, 1986; Van Dorst, 1988) in da se nekateri rastlinski virusi sproščajo iz korenin okuženih rastlin v podtalno vodo (Koenig, 1986). Van Dorst (1969, cit. po Tomlinson in sod., 1983) je v vodi za zalivanje potrdil prisotnost Cucumber green motle mosaic virus-a (CGMMV) in pokazal povezavo med virusom in okužbami kumar v rastlinjaku, kjer so to vodo uporabljali za zalivanje. Ugotavljanje prisotnosti škodljivih rastlinskih virusov v vodi za zalivanje rastlin je torej izrednega pomena, predvsem v rastlinjakih, kjer je sistem zaprt (Koenig in Lesemann, 1985; Horvath in sod., 1999; Tomlinson in sod., 1983), saj lahko že prisotnost majhnega števila virusov v vodi povzroči epidemijo. Zaradi nizke koncentracije povzročiteljev bolezni v vodi je potrebno pred uporabo diagnostičnih metod koncentracijo potencialno prisotnega patogenega virusa v vodi povečati do meje zaznavanja metode, ki se bo uporabljala.

Koncentriranje potencialno prisotnih rastlinskih virusov iz vode pred uporabo detekcijske metode opisuje več avtorjev. Opisane metode so dolgotrajne, sestavljene iz številnih korakov in zahtevajo drago opremo. Tomlinson in sodelavci (1983) so koncentrirali 60 litrske vzorce vode. Vodo so najprej filtrirali skozi 2 filtra: filter s porami velikosti 5 µm in filter s porami velikosti 1 µm. Prefiltrirani vodi so umerili pH na 5.5 in jo filtrirali skozi Zeta-Plus adsorpcijski filter. Viruse so iz adsorpcijskega filtra eluirali z 1 % govejim ekstraktom, dobljeni eluat pa so na koncu ultrafiltrirali na filtrski membrani z izključitveno molekulske maso velikosti 100 kDa. Prisotnost virusov v koncentriranem vzorcu vode so ugotovljali z mehansko inokulacijo testnih rastlin. Koenig in Lesemann (1985) sta koncentrirala manjše volumne vode (200-300 mL) z ultracentrifugiranjem in nato preverjala prisotnost rastlinskih virusov z inokulacijo testnih rastlin s koncentriranimi vzorci vode. Skoraj vsi odvzeti vzorci vode so po koncentriranju na rastlinah *Chenopodium quinoa* (testna rastlina za *potex-* in *tombusviruse*) povzročili nastanek lokalnih lezij. Le-te so nato homogenizirali v pufru in inokulirali druge testne rastline, ki so občutljive za druge skupine virusov. Metoda koncentriranja z ultracentrifugiranjem je enostavna in hitra,

vendar je uspešnost koncentriranja iz tako majhnega volumna vode in z uporabo metode inokuliranja testnih rastlin za ugotavljanje prisotnosti virusov vprašljiva (Koenig, 1986). Podobno je Horvath s sodelavci (1999) na Madžarskem koncentriral vzorce vode iz rek in jezer. Sedeminštirideset odvzetih vzorcev so koncentrirali z ultracentrifugiranjem in nato z metodo ELISA preverjali prisotnost šestindvajsetih rastlinskih virusov. Različne rastlinske viruse so potrdili v sedemnajstih odvzetih vzorcih.

Pri preverjanju prisotnosti humanih patogenih virusov v pitni vodi se pojavlja podoben problem-nizka koncentracija virusnih delcev, pod mejo detekcije diagnostičnih metod. Na področju koncentriranja humanih virusov iz vodnih vzorcev je objav veliko (Gajardo in sod., 1991; Wommack in sod., 1995; Jothikumar in sod., 1995; Jothikumar in sod., 1998; Wyn-Jones in sod., 2000), saj je pri določanju humanih virusov v pitni vodi ključna zanesljivost metode, ki jo uporabljam za koncentriranje.

Najpogosteje omenjana metoda za koncentriranje humanih virusov iz vodnih vzorcev je uporaba elektronegativnih ali elektropozitivnih filterov ali ionsko izmenjevalna kromatografija. Za elucijo adsorbiranih virusov iz filterov ali drugih kromatografskih nosilcev se najpogosteje uporablja goveji ekstrakt (angl. beef extract), ki vsebuje visoke koncentracije slabo poznanih komponent, ki lahko vplivajo na detekcijsko metodo (Pepper in sod., 1995; Schwab in sod., 1995). Zaradi tega je potrebno nadaljnje koncentriranje in čiščenje virusov iz govejega ekstrakta (Pepper in sod., 1995; Schwab in sod., 1995). Schwab in sodelavci (1995) so razvili in ovrednotili metode, s katerimi lahko določimo prisotnost nizkih koncentracij Enterovirusov v eluatih govejega ekstrakta z RT-PCR. Postopek vključuje obarjanje s PEG, čiščenje s Pro-Cipitatom (Affinity Technology, New Brunswick, N.J.), ponovno obarjanje s PEG, »spin column« kromatografijo in ultrafiltracijo. Vsak korak čiščenja seveda bistveno podaljša čas priprave vzorca.

### 2.3 ČIŠČENJE VIRUSOV

Najpogosteje uporabljeni metoda za detekcijo rastlinskih virusov je ELISA, ki sta jo prvič opisala Clark in Adams (1977). Specifičnost in občutljivost metode je odvisna od specifičnosti in občutljivosti protiteles. Za produkcijo specifičnih protiteles pa je pomembno, da je antigen za imunizacijo živali, ki bodo proizvajala protitelesa (predvsem poliklonska protitelesa), zelo čist. Klasični postopki za čiščenje antigenov (npr. virusnih

delcev) so navadno dolgotrajni. Vključujejo številne korake (centrifugiranja pri nizkih obratih, obarjanja, centrifugiranja v saharoznem in/ali CsCl gradientu), vsak korak pa seveda pomeni določeno izgubo ciljnega antigena, zaradi česar je izplen virusa pri klasičnem čiščenju virusnih delcev relativno nizek. Za potrebe proizvodnje specifičnih poliklonskih protiteles za uporabo v diagnostiki rastlinskih virusov se kaže potreba po krajsih in bolj učinkovitih postopkih čiščenja virusnih delcev.

Rastlinski virusi se uporabljajo tudi kot vektorji pri proizvodnji različnih proteinov v rastlinah. Proizvodnja tujih proteinov v rastlinah je lahko izredno velika, saj rastline predstavljajo največji vir biomase. Virusi, ki so bili spremenjeni za potrebe izražanja tujih proteinov v rastlinah, vključujejo cowpea mosaic virus (Dalsgaard in sod., 1997), tomato bushy stunt virus (Joelson s sod., 1997) in alfalfa mosaic virus (Yusibov in sod., 1997). Od paličastih virusov iz skupine Tobamovirusov se v te namene najpogosteje uporablja tobačni mozaični virus (TMV). Rekombinantni TMV so uporabili kot vektor pri proizvodnji Bovine Herpes Virus gD proteina v rastlinah *Nicotiana benthamiana*, protein so izolirali iz listov in ga uporabili kot cepivo za miši. Le-te so razvile specifični imunski odgovor proti nativnemu govejemu herpes virusu (BHV-1), katerega protein so proizvajale rastline (Perez Filgueira in sod., 2003). Podobno so za proizvodnjo nevropeptida »nocistatin« naredili rekombinantni tobačni mozaični virus (Lim in sod., 2002). Spremenjeni virusni delci, ki na svoji površini izražajo živalske ali človeške virusne epitope, imenujemo himerni virusni delci (angl. chimeric viral particles, CVP). Le-ti predstavljajo cenovno ugodno in varno različico cepivom proizvedenih v živalskih celičnih linijah (Dalsgaard in sod., 1997).

Ključen korak pri proizvodnji tujih proteinov oz. cepiv v rastlinah z uporabo virusnih vektorjev je čiščenje virusnih delcev.

### **2.3.1 Klasični način čiščenja rastlinskih virusov**

Enotne sheme, ki bi veljala za čiščenje vseh rastlinskih virusov ni, saj se virusi močno razlikujejo po občutljivosti na različne fizikalne in kemijske agente, ki jih uporabljamo pri čiščenju. Tudi količina virusa, ki jo lahko izoliramo iz rastlinskega materiala, je glede na virus in gostiteljsko rastlino zelo različna (Matthews, 1992).

Za uspešno izolacijo je zelo pomembna izbira propagacijske rastline. Pomembno je, da gostiteljska rastlina ne vsebuje snovi (ali vsaj v zelo nizkih koncentracijah), ki inaktivirajo ali nepovratno oborijo virus. Med te snovi spadajo fenoli, tanini, organske kisline, sluzi in smole (Matthews, 1992). Zaželjeno je, da je vzgoja gostiteljske rastline iz semena hitra in enostavna in da je enostavna tudi ločitev virusa od komponent gostiteljske rastline (Walkey, 1985). Drugi pomemben dejavnik je povečanje koncentracije virusa v rastlini, kar je odvisno od izbire gostiteljske rastline, časa, ki preteče med inokulacijo gostiteljske rastline in čiščenjem virusa, pogojev, v katerih gostiteljska rastlina raste in izbire tkiva, iz katerega čistimo virus (Matthews, 1992).

Prva stopnja v procesu čiščenja virusa je **ekstrakcija** virusnih delcev iz celic gostiteljske rastline in ločba virusov od komponent gostitelja (**klarifikacija**). Po končani klarifikaciji dobimo delno očiščen virus, ki še vedno vsebuje majhne količine nekaterih komponent gostitelja. Sledi postopek koncentriranja in končnega čiščenja virusnih delcev. Celoten proces čiščenja se mora odvijati pri temperaturah 3-5 °C.

#### 2.3.1.1 Ekstrakcija

Viruse ekstrahiramo iz okuženega rastlinskega materiala (navadno listov) tako, da tkivo zmeljemo v primernem pufru pri nizkih temperaturah. V homogenatu, ki ga dobimo, se nahajajo virusni delci in komponente gostiteljske rastline: deli fragmentiranega tkiva, kloroplasti, ribosomi, topni celični proteini in nizkomolekularne snovi. Nekatere komponente v homogenatu lahko inhibirajo ali inaktivirajo proste virusne delce, zato moramo biti natančni pri izbiri in pripravi ekstrakcijskega pufra, s pomočjo katerega pripravimo homogenat (Walkey, 1985).

Izbira pufra je odvisna od virusa in gostiteljske rastline, iz katere virus čistimo. Pomembna je molarnost pufra, saj so nekateri virusi nestabilni v pufru z nizko molarnostjo, medtem ko velja za druge ravno nasprotno. Največkrat se molarnost pufrov giblje med 0,1 in 0,5.

Izoelektrične točke različnih virusov se nahajajo pri različnih pH vrednostih. To je tista pH vrednost, pri kateri virus nima nobenega naboja in se lahko obori. Da se to ne zgodi, se moramo tej pH vrednosti izogibati. Večina virusov ima izoelektrično točko pri pH manjšem od 7, zato se navadno uporabljajo nevtralni ali rahlo alkalni ekstrakcijski pufri

(pH=7,0-8,5), vendar pa pufer ne sme biti preveč alkalen, ker se lahko povezava med virusnim proteinom in njegovo nukleinsko kislino podre in virusni delec razpade.

V nizkih koncentracijah ekstrakcijskemu pufru navadno dodamo:

- **reducente** (tioglikolna kislina, merkaptoetanol), ki preprečujejo virusno inaktivacijo zaradi oksidacije in absorpcijo komponent gostitelja na viruse; virusno inaktivacijo z vezavo na fenole preprečujeta tudi polietilenglikol in polivinilpirolidin,
- **kelirajoče snovi** (EDTA), ki sodelujejo pri odstranjevanju gostiteljskih ribosomov in poliribosomov ter z vezavo na katione preprečujejo agregacijo virusov in oksidacijo polifenolov,
- **detergente** (Triton X-100, Tween-80), ki pomagajo pri sproščanju virusov iz gostiteljskih komponent in preprečujejo njihovo agregacijo. Podoben učinek lahko dosežemo tudi z dodatkom uree.

### 2.3.1.2 Klarifikacija

Cilj klarifikacije je ločba virusnih delcev, ki se nahajajo v homogenatu, od rastlinskih celičnih fragmentov. Homogenat najprej centrifugiramo pri nizkih obratih (1.000-10.000 g, 15-20 minut), kar povzroči usedanje večjih rastlinskih komponent, virus pa ostane v vodni fazi (supernatantu). Pri prvem centrifugiranju homogenata ostane v supernatantu navadno le delež celotne količine virusa, zato lahko izplen virusa povečamo tako, da usedlini dodamo svež pufer in centrifugiranje ponovimo.

Usedlino zavrzemo in združimo obe vodni fazi, kateri navadno dodamo organsko topilo (etanol, butanol, eter ali kloroform), ki povzroči koagulacijo večjih celičnih komponent. Včasih je dobro, da pustimo topilo nakaj časa delovati, s čimer izboljšamo klarifikacijo. Nato mešanico ekstrahiranega rastlinskega soka in organskega topila centrifugiramo (5.000-10.000 g, 20 minut). Po centrifugiranju dobimo tri plasti - virusi se nahajajo v zgornji, vodni fazi. Pri nekaterih postopkih čiščenja lahko dodamo organsko topilo skupaj z drugimi dodatki ekstrakcijskemu pufru (Walkey, 1985).

### 2.3.1.3 Koncentriranje

Ko odstranimo večje celične delce, v procesu koncentriranja odstranimo nizkomolekularne komponente, ki so še vedno prisotne in virus koncentriramo.

Najpogosteje uporabljena metoda je ultracentrifugiranje. Vodno fazo, kjer je virus, centrifugiramo pri visokih obratih (75.000 g, 1-2 uri) v rotorju, ki je pod določenim kotom, zaradi česar se virus usede na dno, nizkomolekularne rastlinske komponente pa ostanejo v vodni fazi. Tako ko je ultracentrifugiranje zaključeno, odstranimo vodno fazo, usedlino pa raztopimo v majhni količini primerrega pufra in inkubiramo. Takšen, delno očiščen in koncentriran vzorec lahko dodatno čistimo s pomočjo centrifugiranja pri nizkih obratih, po koncu katerega se virus nahaja v vodni fazi. Če želimo čistost vzorca še povečati lahko centrifugiranje pri nizkih in visokih obratih še nekajkrat ponovimo.

Ultracentrifugiranje pa ni primerno za vse viruse, saj so nekateri na močne gravitacijske sile neodporni ali pa se med ultracentrifugiranjem močno agregirajo. Pri takšnih virusih uporabljam koncentriranje s pomočjo polietenglikola (PEG). To je hidrofilna molekula, ki je popolnoma topna v vodi. PEG dodamo vodni fazi, ki vsebuje virus, mešamo 1-2 uri, nato pa centrifugiramo pri nizkih obratih (15.500 g, 20 minut). Usedlino, ki vsebuje virus, raztopimo v majhni količini primerrega pufra. Če nadaljujemo s centrifugiranjem pri nizkih obratih, se denaturirani proteini in koagulirani rastlinski ostanki usedejo (zaradi dodanega PEG), virus pa ostane v vodni fazi. Sledi centrifugiranje pri visokih obratih, kar povzroči usedanje virusa. Tudi pri tem načinu koncentriranja lahko dosežemo večjo čistost vzorca, če zadnja dva koraka večkrat ponovimo (Walkey, 1985).

Tretja metoda, kjer virus iz klarificirane raztopine koncentriramo z obarjanjem s soljo, je relativno groba, zato se uporablja zelo redko. Klarificiranemu vzorcu dodamo koncentrirano raztopino amonijevega sulfata, močno premešamo in pustimo stati nekaj ur. Oborjen virus nato sedimentiramo s centrifugiranjem pri nizkih obratih in ga raztopimo v primernem pufru (Walkey, 1985).

### 2.3.1.4 Končno čiščenje

V primeru, da potrebujemo očiščene virusne delce za nadaljnjo uporabo (npr. pripravo protiteles, pripravo virusnih vektorjev ali pripravo virusnega cepiva) je potrebno iz delno

očiščenega virusnega pripravka odstraniti vse (ali skoraj vse) prisotne komponente gostitelja.

Najpogosteje uporabljeni metoda za končno čiščenje je centrifugiranje v gostotnem gradientu. To je centrifugiranje pri visokih obratih (50.000-70.000 g) skozi gostotni gradient vzdolž horizontalne osi. Največkrat se uporablja linearni saharozni gradient (10-40 %), kjer se virus loči od ostalih komponent glede na sedimentacijsko konstanto. Poleg saharoznega poznamo tudi centrifugiranje v gostotnem gradientu cezijevega klorida ali cezijevega sulfata. Po koncu centrifugiranja lahko virus odstranimo ročno z injekcijo ali pa uporabimo fotometrični detektor in zbiralec frakcij. Saharozo ali soli nato odstranimo z dializo ali pa virusni pripravek centrifugiramo pri visokih obratih, pri čemer se virus usede na dno (Walkey, 1985).

Konvencionalne metode čiščenja virusov temeljijo predvsem na ciklih diferencialnega centrifugiranja in se končajo s centrifugiranjem v gostotnem gradientu. Manj stabilni virusi se lahko v gostotnem gradientu poškodujejo, pri čiščenju vseh virusov pa moramo po končanem čiščenju odstraniti gostotni gradient. Predvsem pri paličastih virusih lahko pride do popolne sedimentacije virusnih delcev, kar lahko povzroči njihovo agregacijo (Barton, 1977).

Zaradi dolgotrajnosti in neučinkovitosti konvencionalnih metod so se zadnjih desetletja pospešeno razvijale nove metode za čiščenje virusov. Te metode so se razvijale predvsem na področju čiščenja humanih virusov, saj se zaradi genske terapije pojavlja velika potreba po hitrih in učinkovitih postopkih za čiščenje le-teh. V rastlinski virologiji so te metode povzeli in prilagodili za potrebe čiščenja rastlinskih virusov.

### **2.3.2 Čiščenje virusov z gelsko kromatografijo**

Gelska kromatografija (tudi gelska filtracija, kromatografija na molekularnih sitih, izključitvena kromatografija) ločuje molekule le na osnovi njihovega molekulskega volumna in od tod tudi ime molekulska sita. Material, s katerim so polnjene gelske kolone, je v glavnem polistiren, polimeriziran in zamrežen z divinilbenzenom. Od tega, koliko imamo molekul stirena na molekul divinilbenzena, je odvisna stopnja zamreženja in posledično velikost por. Običajno kolona, polnjena z materialom določene zamreženosti

(velikost por), pokriva določeno območje molekulskih volumnov. Ločevanje temelji na difuziji molekul v pore. Večje molekule v pore ne morejo in se zato eluirajo s topilom. Manjšim pa pore ne predstavljajo nobene ovire in vanje vtopajo, zato se na koloni zadržijo dlje in se eluirajo na koncu kromatograma. Kolona je uporabna le za molekule z molskim volumnom znotraj tega območja, ki se bolj ali manj zadržijo na koloni in med seboj delno ali popolno ločijo (Štrancar, 1998).

Z gelsko kromatografijo sta Albrechsten in Heide (1990) iz rastlinskega materiala čistila izometrične in paličaste rastlinske viruse. Metoda, ki sta jo razvila, je odstranila večino rastlinskih proteinov, virusni izplen je bil v povprečju 30 % (Albrechsten in Heide, 1990).

Stacionarna faza pri gelski filtraciji je stisljiva, zato je lahko pretok relativno nizek, kar je primer tudi pri Albrechsten in Heide (1990), ki sta pri čiščenju rastlinskih virusov uporabila pretok 0.8 mL/min. Na ločljivost pri gelski kromatografiji vpliva tudi volumen vzorca, ki je nanešen na kolono. Velja, da volumen vzorca ne sme presegati 5 % celotnega volumna kolone (Kuhelj, 1998), kar sta upoštevala tudi Albrechsten in Heide (1990), ki sta na kolono pri čiščenju rastlinskih virusov nanašala po 100 µL delno očiščenega virusnega pripravka. Poleg majhnega pretoka in zato podaljšanega časa čiščenja ter majhnega volumna vzorca so slabosti gelske filtracije z organskimi geli tudi: možnost okužbe nosilca z mikroorganizmi, uporaba večine organskih topil ni možna, sterilizacija nosilcev ni zadostna (Barton, 1977). Zaradi zgoraj omenjenih slabosti kolon, kjer je nosilec organski gel, je Barton (1977) rastlinske viruse čistil na kroglicah stekla s kontroliranimi velikostmi por (angl. controlled pore glass). Pred nanosom na kromatografsko kolono je rastlinske viruse različnih oblik in velikosti delno očistil iz rastlinskega materiala po postopkih opisanih v Commonwealth Mycological Institute /Association of Applied Biologist Plant Virus Descriptions do stopnje, ko bi moral čiščenje nadaljevati s centrifugiranjem v gradientu. Barton (1977) je ugotovil, da se sferični virusi iz kolone izperejo v ostrem kromatografskem vrhu, medtem ko so kromatografski vrhovi paličastih virusov repičasti (pojavlja se t.i. tailing) zaradi daljšega zadrževanja majhnih delcev zlomljenih virusov na kromatografskem nosilcu. Na splošno je viruse učinkovito ločil od nečistoč z nizkimi molekulskimi masami, izpleni virusa so bili skoraj 100 %. Slabost Bartonove metode čiščenja virusnih delcev so veliki volumni elucijskih frakcij (25-35 mL) in dolgotrajna predpriprava kromatografskega nosilca. Le-tega je avtor najprej raztopil v 0.05 M fosfatnem pufru, pH 7, ga večkrat spral in nato raztopil v pufru, ki je vseboval PEG.

Raztopljeni nosilec je nato razplinjeval ter ponovno spiral s pufrom. Sledilo je polnjenje kolone z nosilcem in 2 urna ekvilibracija kolone pri sobni temperaturi pod pritiskom, da se je odstranil odvečni PEG.

### 2.3.3 Čiščenje virusov z ionsko-izmenjevalno kromatografijo

Ionsko-izmenjevalna kromatografija ima širok spekter uporabnosti, njena prednost pred drugimi je predvsem doseganje visoke čistosti produkta (Levitt, 1983).

Ionsko izmenjevalna kromatografija je učinkovita metoda za ločevanje proteinov, kakor tudi za ločevanje velikih biomolekul kot so imunoglobulini, plazmidna DNK in virusi. V primerjavi z objavami o ločevanju proteinov so objave o ločevanju virusnih delcev na ionsko izmenjevalnih nosilcih manj številne (Yamamoto in Miyagawa, 1999; Yamamoto in Miyagawa, 2000).

Ionsko-izmenjevalna kromatografija temelji na elektrostatskih interakcijah med nasprotno nabitimi delci. Proteini, ki obdajajo virusne delce, imajo skupine, ki se lahko ionizirajo. Dejstvo, da imajo virusni delci zaradi teh skupin negativen ali pozitiven neto naboj, lahko izkoristimo za njihovo ločbo. Neto naboj virusnega delca je odvisen od njegove izoelektrične točke in pH vrednosti raztopine, v kateri se nahaja. Stacionarno fazo ionsko-izmenjevalne kromatografije predstavljajo skupine, kovalentno vezane na skupine nosilca (npr. hidroksilne, epoksi skupine). Kemična narava teh skupin določa vrsto molekul (virusnih delcev), ki se bodo vezale na ionski izmenjevalec, pa tudi moč te povezave. Na pozitivno nabite skupine se adsorbirajo molekule z negativnim neto nabojem, zato imenujemo takšne nosilce anionski izmenjevalci. Kationski izmenjevalci imajo negativno nabite skupine. Ionske izmenjevalce delimo tudi na močne in šibke. Prvi so ionizirani, torej v nabiti obliki pri skoraj vseh vrednostih pH, slednji pa le v razmeroma ozkem območju pH (Kuhelj, 1998).

Kolone polnjene s **poroznimi delci** imajo visoko kapaciteto vezave molekul in kažejo visoko ločljivost pri ločevanju molekul. Večina aktivne površine, na kateri poteka ločevanje, leži znotraj zaprtih por. Tekočina v teh porah skoraj miruje, kar pomeni, da potujejo v njih molekule na podlagi difuzije. V takšnem primeru moramo zagotoviti dovolj časa, da molekule pripotujejo do aktivne površine. Tipični potrebni časi za makromolekule

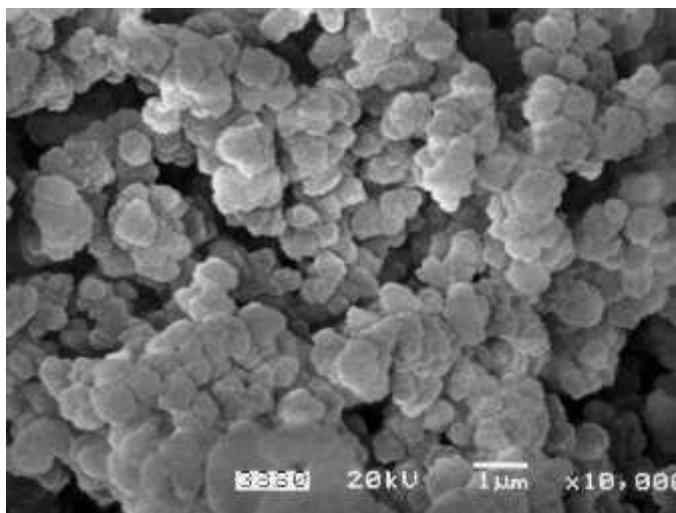
so nekaj deset minut ali celo ur (Podgornik, 1998). Anionsko izmenjevalno kromatografijo na kolonah, ko so bile polnjene s poroznimi delci (Q Sepharose, Pharmacia Biotech), so za vezavo in ločevanje virusnih delcev (*petunia vein-clearing virus*, PVCV) od inhibitornih substanc uporabljali Harper in sodelavci (2003). Yamamoto in Miyagawa (1999) sta ločevala Hepatitis virus B na kolonah polnjenih s poroznimi sferičnimi celuloznimi delci, na katerih so bile vezane sulfatne skupine. Pokazala sta, da so za virusne delce Hepatitisa B dostopne le sulfatne skupine na površini celuloznih delcev, kamor se le-ti učinkovito vežejo in kasneje iz njih sproščajo. Adsorpcijsko-desorpcijski čas je kratek, vendar pa je kapaciteta nosilca zelo nizka (Yamamoto in Miyagawa, 1999). Glede na to, da so se virusni delci vezali le na aktivne skupine na površini delcev, je opisan nosilec deloval kakor kolona, polnjena z neporoznimi delci.

**Neporozni delci** ne vsebujejo por. Vezava molekul poteka samo na zunani površini delcev. Ker pri teh delcih ni difuzije v pore, se tipičen čas ločevanja zmanjša na nekaj minut ali sekund. Vendar pa ima odstranitev por nekaj slabih lastnosti. Neporozni delci imajo bistveno manjšo aktivno površino in s tem tudi nižjo kapaciteto vezave molekul (Podgornik, 1998), kar se je pokazalo tudi v primeru, ki sta ga opisala Yamamoto in Miyagawa (1999).

Poleg delcev poznamo ionsko izmenjevalne nosilce v obliki **membrane**, kjer predstavlja izmenjevalno površino vlaknasta struktura z velikimi pretočnimi porami. Pri membranah ni difuzije v slepe pore, torej so po tej lastnosti membrane precej podobne neporoznim delcem, vendar za razliko od slednjih kažejo izredno nizek povratni tlak. Kljub mnogim dobrim lastnostim (nizki povratni tlaki, kratki zadrževalni časi, možnost uporabe visokih pretokov mobilne faze, itd.) pa imajo tudi slabe lastnosti kot so težave s porazdelitvijo in zbiranjem vzorca (Podgornik, 1998) ter velik mrtvi volumen. Primer membranskih ionsko izmenjevalnih kromatografskih nosilcev so Mustang membrane, podjetja Pall (New York, ZDA). Mustang Q membrane so močni anionski izmenjevalci, Mustang S membrane pa močni kationski izmenjevalci. Šestnajst slojev pozitivno ali negativno nabitih membran se nahaja v posebnem ohišju. Premer por je 800 nm, kar pomeni, da je možno na teh membranah ločevati tudi zelo velike molekule, npr. virusne delce (Dynamic high..., 2002). Kapaciteta Mustang Q membran za rekombinantne Adenoviruse je  $4.9 \cdot 10^{13}$  virusnih delcev/mL Mustang Q membrane pri 10 % preboju (Lajmi, 2005). Ionsko izmenjevalne kromatografske nosilce v obliki membran proizvaja tudi podjetje Sartorius (Goettingen,

Nemčija), katerih pore merijo 450-3000 nm in so tudi primerni za ločevanje virusov: Alphaherpes virusov, Adenovirusov in Adenoasociated virusov (Fischer-Fruhholz, 2003). Podjetje Sartorius proizvaja močne in šibke anionske in kationske ionsko izmenjevalne nosilce. Na kationsko izmenjevalnih nosilecih je Karger s sodelavci (1998) uspešno očistil virusne delce alphaherpesvirusa, v povprečju je v eni kromatografski frakciji eluiral 85 % na membrano naloženih virusnih delcev.

**Monolitni nosilci** so zadnja generacija v razvoju kromatografskih nosilcev. Lahko rečemo, da predstavljajo vmesno stopnjo med nosilci v obliki delcev in membranami. Njihova posebnost je, da je nosilec sestavljen iz enega kosa. Zgrajeni so iz mikronskih kroglic, ki pa so med seboj združene. Ta struktura jim daje edinstvene lastnosti (slika 2). Med mikronskimi zrni obstajajo večje in manjše pore, skozi katere teče mobilna faza. Prenos snovi poteka pretežno na osnovi konvekcije, ker ni nobenih zaprtih por. Monoliti imajo visoko kapaciteto vezave, saj je kljub absolutno manjši specifični površini, v primerjavi z drugimi nosilci, le-ta dostopna za velike molekule. Hkrati omogočajo monoliti hitre procese ločevanja ob nizkem padcu tlaka (Podgornik, 1998).



**Slika 2:** Poli glicidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat-ni monolit posnet z vrstičnim elektronskim mikroskopom, 10.000 x povečava (Švec in sod., 2003: 57).

Predstavnik polimernih monolitnih nosilcev je CIM Convective Interaction Media. CIM monolitni kromatografski nosilci so iz enega kosa poroznega materiala s povezanimi kanali, ki omogočajo hiter prenos molekul vzorca med mobilno in stacionarno fazo. Hiter

masni prenos je posledica konvektivnega toka. Aktivne skupine se nahajajo na površini kanalov, ki merijo v premeru približno 1500 nm in so tako prehodni tudi za zelo velike molekule in nanodelce.

#### 2.4 CIM MONOLITI

CIM (Convective Interaction Media) je tržno ime za monolitne kromatografske nosilce na osnovi polimerov poli(glicidil metakrilat-*ko*-etilenglikol dimetakrilat) - a in poli(stiren-*ko*-divinilbenzen) – a (Štrancar s sod., 2002). Manjše, analitske enote z volumnom 0,34 mL se imenujejo CIM disk (slika 3), večje, semi - preparativne in preparativne enote pa so t.i. CIM cevni moduli (slika 4) z volumnom 8, 80 in 800 mL, 8 L enota pa je trenutno v razvoju.



**Slika 3.** Nekateri izmed CIM diskov in CIM ohišje. Različne barve obročkov predstavljajo različne aktivne skupine monolita (CIM Disk..., 2005).

Diski se vstavijo v CIM ohišje, ki se potem priključi na kromatografski sistem, možno pa je disk v ohišju uporabljati tudi v kombinaciji z brizgo, ki nadomesti uporabo HPLC črpalk. Pomembna lastnost ohišja je, da ima majhen mrtvi volumen ter minimalno disperzijo, kar omogoča ostre kromatografske vrhove ločenih substanc na kromatogramu (Podgornik, 1998).



Slika 4. 8, 80 in 800 mL cevni moduli v ohišjih (CIM Tube..., 2005).

Večje enote so nameščene v ustreznih ohišjih in se priključijo na ustrezen kromatografski sistem.

Vse enote so načrtovane tako, da zagotavljajo odlične lastnosti kot so kemijska stabilnost, dobre pretočne karakteristike ter hitra ločba komponent vzorca. Manjše in večje enote imajo enako monolitno strukturo ter gostoto ligandov (Štrancar in sod., 2002).

CIM monolitni nosilci omogočajo hitre ločbe ob nizkih padcih tlaka pri visokih pretokih mobilne faze (Štrancar in sod., 2002), kar je rezultat monolitne strukture z dovolj velikimi pretočnimi porami. Te pore omogočajo molekulam dostop do aktivnih mest na monolitu v toku mobilne faze. Ker poteka izmenjava molekul med mobilno in stacionarno fazo na podlagi konvekcije, je produktivnost v primerjavi s tradicionalnimi kromatografskimi kolonami, napolnjenimi s poroznimi delci, večja. Poleg tega narava porozne strukture omogoča enostaven dostop tudi večjim molekulam, ki jih lahko zato ločimo v zelo kratkem času.

Za čiščenje večjih biomolekul mora biti dolžina poti skozi kolono kratka, pri čemer se padec tlaka zniža, predvsem pa se izognemo nespecifični vezavi, razpadu labilnih molekul ter morebitnim spremembam v strukturi biomolekule (Štrancar in sod., 2002). Zaradi omenjenega razloga so dolžine kromatografskih slojev CIM monolitov kratke, v primeru diskov samo 3 mm. Ugotovljeno je namreč bilo, da dolžina kolone v primeru ločbe večjih molekul z linearnim gradientom mobilne faze nima vpliva na ločljivost (Štrancar in sod., 2002; Tennikova in Švec, 1993).

Lastnosti, ki postavljajo CIM monolitne nosilce v primerjavi z delčnimi nosilci v prednostni položaj pri ločevanju in koncentriranju velikih biomolekul in virusov so predvsem (Štrancar in sod., 2002; Štrancar in sod., 1998):

- Možnost izvedbe zelo hitrih ločb in posledično zmanjšana možnost deaktivacije biomolekul zaradi dolgih kontaktnih časov molekul s kromatografskim nosilcem.  
Pri delčnih nosilcih zaradi pretežno difuzivnega prenosa snovi trajajo ločbe dalj časa, ker morajo imeti biomolekule, ki so večje in zaradi tega počasnejše, daljše kontaktne čase s kromatografskim nosilcem.
- Posamezna molekula se lahko eluira v zelo koncentrirani obliki s spiranjem enote z nizkim volumnom elucijskega pufra. To je možno zaradi konvektivnega prenosa

snovi ter posledično potrebnih nižjih kontaktnih časov ter volumnov pufra.

➤ Visoka vezna kapaciteta za velike biomolekule.

Večje molekule zaradi svoje velikosti ne dosežejo aktivnih mest v difuznih porah delčnih nosilcev, kar se odraža v nižji vezni kapaciteti. V primeru CIM monolitov s pretočnimi porami, pa te molekule lahko dosežejo vsa aktivna mesta.

➤ Ločljivost in vezna kapaciteta sta neodvisni od pretoka.

Pri delčnih nosilcih se omenjeni lastnosti slabšata z višjim pretokom, kar je posledica difuzivnega prenosa snovi. Pri višjih pretokih mobilne faze namreč molekula, ki jo ločujemo, ne doseže vseh aktivnih mest oz. del molekul zaostaja za elucijskim vrhom zaradi krajšega kontaktnega časa z nosilcem.

➤ Padec tlaka in hitrost mobilne faze sta v linearini zvezi.

➤ Enostavno rokovanje: ni izgube časa s polnjenjem in praznjenjem kolon, kot v primeru delčnih nosilcev. CIM disk se enostavno vstavlja v CIM ohišje ali so že v njih (CIM cevni moduli), spiranje z mobilnimi fazami je hitro, ker so vse pore pretočne.

➤ Možnost CLC (ang. Conjoint Liquid Chromatography). V isto CIM ohišje lahko namestimo več CIM diskov z različnimi aktivnimi skupinami, kar omogoča večdimenzionalno kromatografijo v enem koraku.

V primeru delčnih nosilcev je za to potrebno več ločenih korakov.

CIM monoliti so zaradi zgoraj opisanih lastnosti predvsem primerni za kromatografske ločbe in čiščenja večjih biomolekul, kot so večji proteini, plazmidna DNK in virusni delci.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 ČIŠČENJE VIRUSOV PO KLASIČNEM POSTOPKU

##### 3.1.1 Kumarični mozaični virus (CMV)

Kumarični mozaični virus (angl. Cucumber mosaic virus-CMV) smo delno očistili po protokolu, ki ga je opisal Lot s sodelavci (Francki in sod., 1979).

Virus CMV smo namnožili v rastlinah *Nicotiana tabacum* kultivar *Samsun*, ki smo jih vzgajali v rastni komori z vlogo pod naslednjimi pogoji: relativna zračna vлага  $75 \pm 2\%$ , temperatura  $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  v času osvetljevanja in  $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  v času teme, gostota pretoka fotonov  $120 - 150\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo. Liste *N. tabacum* smo mehansko inokulirali z izolatom CMV 373 iz zbirke virusov Nacionalnega inštituta za biologijo. Izvorni material uporabljenega izolata je bila paprika, kultivar Adria, vzorčena junija 2000 v Središču ob Dravi, virusi so se namnoževali na rastlinah *Nicotiana rustica*. Inokulum za mehansko inokulacijo *N. tabacum* (propagacijska rastlina za CMV) smo pripravili iz 0.05 g liofiliziranih listov *Nicotiana rustica*, ki smo jih strli v tarilnici in dodali 5 mL 0.02 M fosfatnega pufra za mehansko inokulacijo (priloga A). S karborundom posute liste rastlin *Nicotiana tabacum* kultivar *Samsun*, smo mehansko inokulirali s pripravljenim inokulumom in jih po desetih minutah izprali z vodo.

Po 5 tednih smo liste *Nicotiana tabacum* kultivar *Samsun* pobrali in jih zmleli s pomočjo tekočega dušika. Rastlinskemu prahu smo dodali 1 mL ekstrakcijskega pufra in 1 mL kloroform na 1 g rastlinskega prahu. Ekstrakcijski pufer je vseboval 0.5 M natrijev citrat, pH 6.5, 1 % 5 mM EDTA in 0.5 % 2-merkaptoetanola, 2-ME). EDTA preprečuje agregacijo virusov in odstranjuje ribosome/polisome, ME je reducent, ki preprečuje inaktivacijo virusa zaradi oksidacije in adsorpcijo virusa na rastlinske komponente, kloroform pa je organsko topilo, v katerem so topni lipidi.

Homogenat smo centrifugirali pri 10.000 g 10 minut (rotor Beckmann JA14, centrifuga Avanti<sup>TM</sup> J-25 Beckmann). Pufrski fazi smo dodali 10 % polietilenglikola (PEG) 6000 in mešali 60 minut pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter ponovno centrifugirali pri 10.000 g 10 minut (rotor Beckmann

JA18, centrifuga Avanti™ J-25 Beckmann). Usedlino (pelet) v vsaki centrifugirki smo raztopili v 40 mL 5 mM natrijevega borata z 0.5 M EDTA, pH 9 in mešali 30 minut pri sobni temperaturi. Vzorec smo centrifugirali 15 minut pri 11.500 rpm (rotor Beckmann JA18, centrifuga Avanti™ J-25 Beckmann). Delno očiščen virusni pripravek smo filtrirali skozi 0.45 µm filter in ga shranili pri -20 °C. Vsa centrifugiranja v postopku čiščenja virusa so potekala pri 4 °C.

### 3.1.2 Paradižnikov mozaični virus (ToMV)

ToMV izolat in protokol za čiščenje virusa iz rastlinskega materiala smo dobili od Renee Van der Vlugt-a (Vlugt, 2001) iz inštituta Plant Research International, Wageningen, Nizozemska.

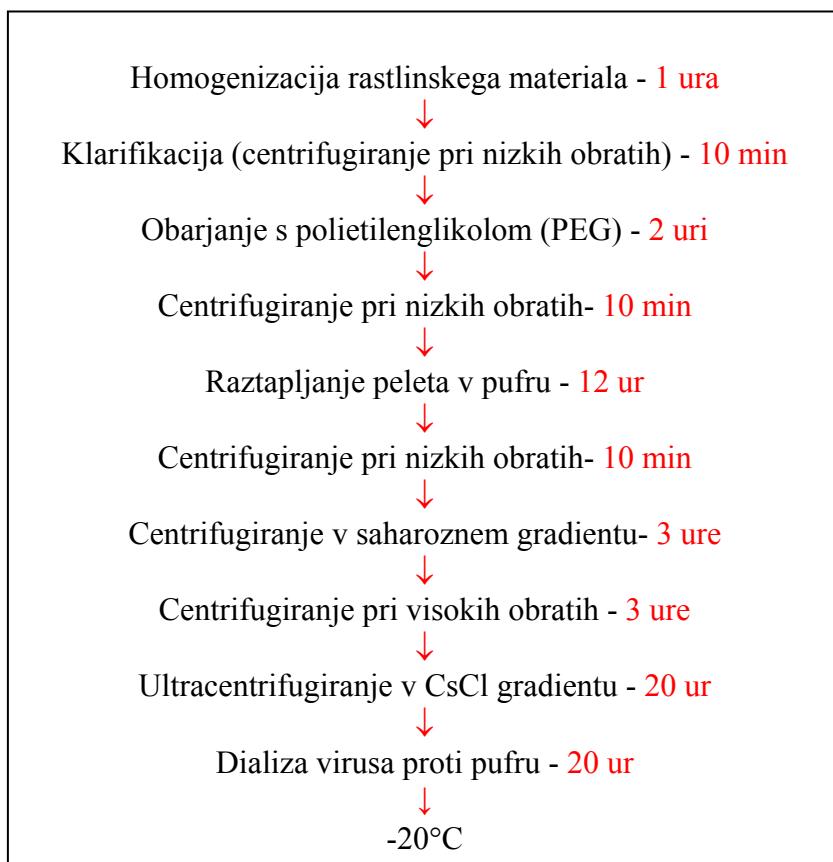
Liste rastlin *Nicotiana clevelandii*, stare približno 4 tedne, gojene v rastni komori pod pogoji opisanimi v poglavju 3.1.1 smo posuli s karborundom in jih mehansko inokulirali z izolatom paradižnikovega mozaičnega virusa (angl. Tomato mosaic virus-ToMV), linije Dehlaemense, redčenem 1:10 v 0.02 M fosfatnem pufru za mehansko inokulacijo rastlin (priloga A). Po desetih minutah smo liste rastlin sprali z vodo in rastline postavili v rastno komoro. Po približno treh tednih smo liste rastlin pobrali in jih zmleli v tekočem dušiku. ToMV smo navadno izolirali iz najmanj 30 g listov. Pripravili smo McIlvaine fosfat-citratni pufer (29.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 3.6 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O in deionizirana voda do skupnega volumna 1L, pH 7) in ga dodali rastlinskemu prahu (na 1 g rastlinskega prahu 2 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufra). Preden smo dodali odmerjeni volumen pufra k zmletemu rastlinskemu prahu smo dodali v pufer še 1 % 2-ME in 0.2 % Na-dietiltio-karbamat-trihidrata. Rastlinski prah smo dobro zmešali s pufrom in nato homogenatu dodali še kloroform (1 mL kloroforma na 1 g rastlinskega prahu). Homogenat smo 10 minut centrifugirali pri nizkih obratih (10.000 g) v rotorju Beckmann JA14 in centrifugi Avanti™ J-25 Beckmann. Po centrifugiranju so bile v centrifugirkah tri faze: usedlina, kloroformna faza in vodna faza (supernatant). Odvzeli smo vodno fazo, dodali PEG 6000 (1 g / 20 mL vodne faze) in mešali 2 uri pri 4 °C. Vodno fazo s PEG smo nato centrifugirali 10 minut pri 10.000 g in usedlino (pelet) v vsaki centrifugirki raztopili v 3 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufra, pH 7 (brez 2-ME in Na-dietiltio-karbamat-trihidrata)

preko noči pri 4 °C. Po centrifugiraju pri nizkih obratih (10.000 g, 10 minut) smo odvzeli vodno fazo in jo centrifugirali v saharoznem gradientu (10-40 %). Saharozni gradient smo pripravili s pomočjo posebne naprave za pripravo gradientov. Z McIlvaine fosfat-citratnim pufrom, pH 7 (brez 2-ME in Na-dietiltio-karbamat-trihidrata) smo pripravili 10 % in 40 % raztopino saharoze in nanesli po 18 mL vsake raztopine v ločena valja naprave za pripravo gradienta. Nato smo odprli stišček med valjema in stišček na izhodni cevi. Obe raztopini sta se v napravi med seboj mešali in tako je iz izhodne cevi v centrifugirko kapljala saharozna raztopina, ki je v centrifugirki ustvarila 36 mL gostotnega gradienta.

Centrifugiranje v saharoznem gradientu je potekalo 2 uri in pol pri 22.000 rpm v TST 28.38 swing-out rotor (centrifuga T-2070 Centrikon). Po končanem centrifugiraju smo iz vsake centrifugirke od vrha navzdol odvzeli frakcije po približno 2 mL. Iz ene centrifugirke smo tako dobili 18-20 frakcij, katerim smo izmerili absorbanco pri 260 nm. Frakcije z visokimi absorbancami smo združili in redčili 1:2 z McIlvaine fosfat-citratnim pufrom, pH 7. Redčeno virusno frakcijo smo centrifugirali 2 uri in pol pri 35.000 rpm v TFT 70.38 fixed-angle rotorju (centrifuga T-2070 Centrikon). Usedlino (pelet) smo raztoplili v 29 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufra, pH 7, ki smo mu dodali CsCl do končne koncentracije 3.8 M. Težo centrifugirk smo natančno uravnali in centrifugirali pri 23.500 rpm v TST 28.38 swing-out rotorju (centrifuga T-2070 Centrikon) 20 ur. Po centrifugiraju smo iz centrifugirk od vrha navzdol odvzeli frakcije po približno 2 mL, vsaki posamezni frakciji izmerili absorbanco pri 260 nm in združili frakcije z visokimi absorbancami. Združeno virusno frakcijo smo 20 ur dializirali proti McIlvaine fosfat-citratnemu pufru, pH 7. Za dializo smo uporabili dializno kaseto slide-a-lyzer (Pierce, 66110), v katero smo nanesli združeno virusno frakcijo in kaseto potopili v pufer. Razmerje volumnov vzorec: pufer je bilo 1:50, dialzno kaseto smo trikrat prestavili v svež pufer, dializa je potekala pri sobni temperaturi. Po končani dializi smo očiščen virusni pripravek shranili pri -20 °C. Vsak korak čiščenja smo preverili z elektronsko mikroskopijo. Vsa centrifugiranja v postopku čiščenja virusa so potekala pri 4 °C. Poenostavljena shema klasičnega postopka čiščenja je prikazana na sliki 5.

Čistost virusnega pripravka smo določili z merjenjem razmerja A<sub>260/280</sub>, kjer razmerje 1.17 pomeni, da virusni pripravek ne vsebuje nečistoč (Hollings in Huttinga, 1976).

Koncentracijo očiščenega virusa smo izračunali na podlagi podatka za ToMV, ki pravi, da je koncentracija čistega virusa 1 mg/mL, če je absorbanca pri 260 nm 3.1 (Vlugt, 2001).



**Slika 5.** Shematski prikaz čiščenja ToMV po klasičnem postopku.

**Figure 5.** Schematic drawing of conventional ToMV purification

### 3.2 KROMATOGRAFIJA NA CIM MONOLITNIH DISKIH

Za koncentriranje, ločevanja in čiščenje rastlinskih virusov smo uporabljali Convective Interaction Media® (CIM) disk monolitne nosilce (BIA Separations, d.o.o., Slovenija) s premerom 12 mm, dolžino 3 mm in volumnom 0.34 mL. Diski so bili nameščeni v ohišjih in povezani s HPLC sistemom (Knauer, Berlin, Nemčija). Sistem je vseboval dve K-1000 črpalki, UV-VIS detektor K-2501, nastavljen na odzivni čas 0.1 s z 10 nm optično potjo, ki je deloval pri 260 nm in 10 µl pretočno celico, povezano z 0.75 mm I.D. PEEK kapilarnimi cevmi. S sistemom je bil povezan tudi merilnik prevodnosti. Pri vseh poskusih smo

uporabljali programsko opremo podjetja Knauer (angl. data acquisition and control station).

### **3.2.1 Optimizacija pufskega sistema, pH in nosilca za ločevanje, koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov**

Pri obeh virusih, CMV in ToMV, smo preizkusili uspešnost ločevanja virusnih delcev z različnimi pufri, pri različnih pH. Testirali smo dva monolitna kromatografska nosilca: CIM DEAE in CIM QA monolitni nosilec. CIM DEAE monolitni nosilec je šibek anionski izmenjevalec, CIM QA monolitni nosilec pa močan anionski izmenjevalec. Po vsaki ločbi smo z delno kvantitativno metodo ELISA določili koncentracije virusnih delcev v elucijskih frakcijah in glede na izkoristek izbrali najboljšo kombinacijo pufra, pH in nosilca.

### **3.2.2 Vpliv pretoka in koncentracije ToMV v vzorcu na ločbo na CIM QA monolitnem disku**

Vpliv pretoka na ločbo ToMV smo preverili z ločevanjem ToMV pri različnih pretokih, vpliv koncentracije virusnih delcev v vzorcu pa z ločevanjem vzorcev z različno koncentracijo ToMV na monolitnem disku. Pri ločevanju smo uporabili predhodno določen optimalni pufske sistem in pH: pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, ter CIM QA monolitni kromatografski nosilec.

### **3.2.3 Koncentriranje CMV in ToMV iz pufra in vodovodne vode**

Delno očiščen CMV in očiščen ToMV iz rastlinskega materiala smo redčili v veznem pufru (pufru A) (20 mM Tris-HCl, pH 8 za CMV in 20 mM natrijev acetat, pH 5.5 za ToMV). Očiščen ToMV smo redčili tudi v vodovodni vodi, kateri smo dodali natrijev acetat do končne koncentracije 20 mM, pH smo umerili na 5.5.

Redčine, pripravljene s CMV smo koncentrirali na CIM DEAE monolitnih diskov, redčine, pripravljene s ToMV pa na CIM QA monolitnih diskov.

Vzorce smo nalagali na CIM monolitne nosilce pri pretoku 8 mL/min in zbirali vse kar je priteklo skozi disk (nevezna frakcija, angl. flow-through). Viruse smo eluirali iz diska v enem koraku z uporabo elucijskega pufra (pufra B: 20 mM Tris-HCl z 1.5 M NaCl, pH 8

za CMV in 20 mM natrijev acetat z 1.5 M NaCl, pH 5.5 za ToMV) pri pretoku 6 mL/min, pri čemer smo zbrali 3 frakcije.

### 3.2.4 Določanje dinamične vezne kapacitete CIM QA monolitnega diska za ToMV

Vzorec (primerno redčen ToMV z znano koncentracijo) smo nalagali na CIM QA monolitni disk pri pretoku 3 mL/min. Iz prebojne krivulje smo odčitali čas, v katerem je prebojna krivulja dosegla 10 % največjega odziva in s pomočjo enačbe (1) izračunali dinamično kapaciteto CIM QA diska za ToMV.

$$q = (\phi \cdot t - V_d) \cdot c \quad \dots(1)$$

$q$ -kapaciteta (mg ToMV/CIM disk)

$\phi$ -pretok (mL/min)

$t$ -čas, pri katerem je prebojna krivulja 10 % največje vrednosti (min)

$V_d$ -mrтvi volumen (mL)

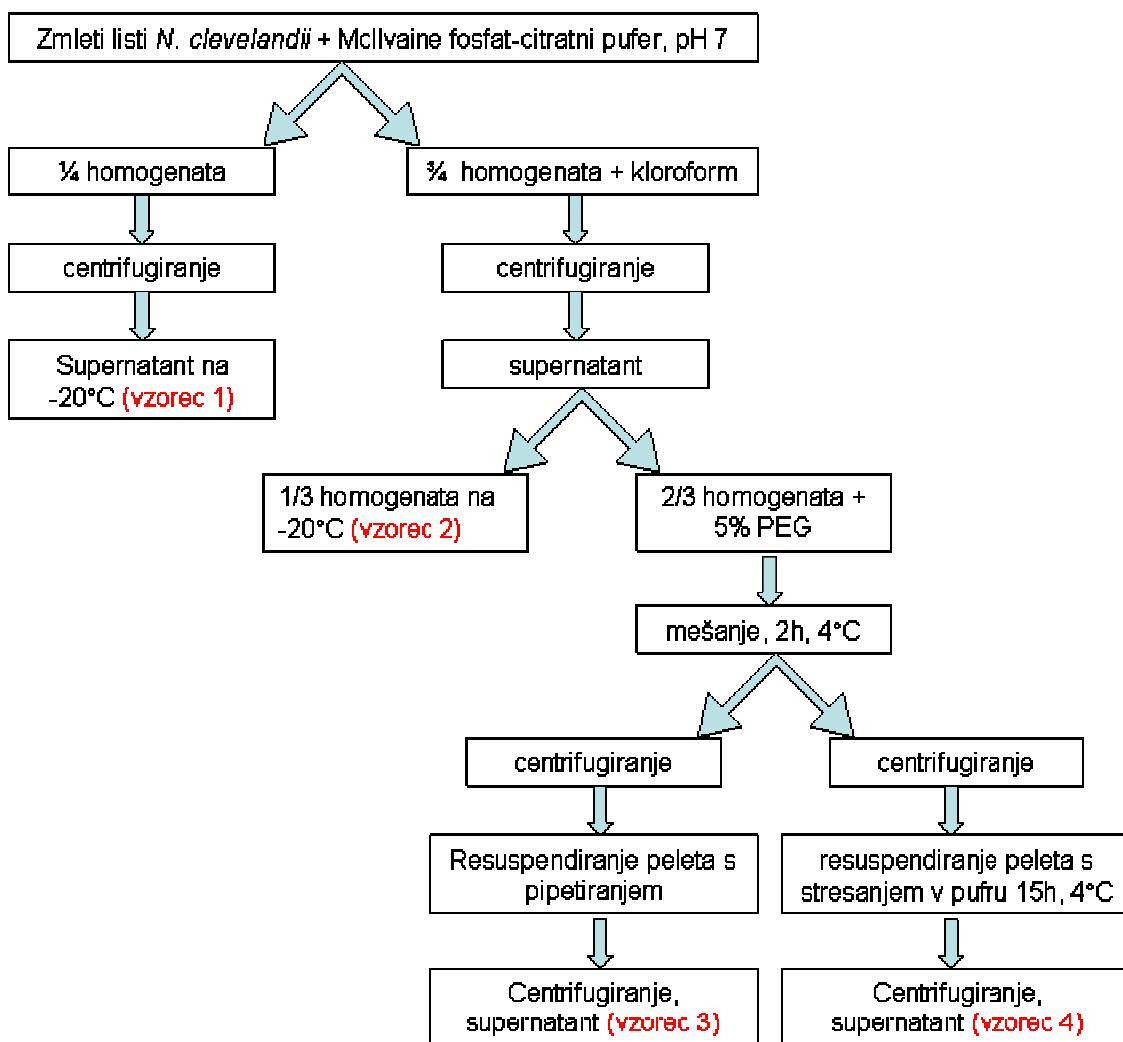
$c$ -koncentracija ToMV v vzorcu, ki smo ga nalagali na CIM nosilec (mg/mL)

### 3.2.5 Čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku

ToMV smo čistili na CIM QA monolitnem disku iz delno očiščenega virusnega pripravka, ki smo ga pripravili, kot je opisano v nadaljevanju.

120 g listov rastline *Nicotiane clevelandii*, okužene s ToMV smo zmleli v tekočem dušiku in na 1 g rastlinskega prahu dodali 2 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufera, pH 7 (200 mM fosfat citratni pufer z 1% 2-ME in 0.2% Na-dietiltio-karbamat-trihidrata).  $\frac{3}{4}$  homogenata smo dodali kloroform v razmerju 1:1,  $\frac{1}{4}$  homogenata pa ne. Oba vzorca smo centrifugirali 10 minut pri nizkih obratih (10.000 g) v rotorju Beckmann JA14 in centrifugi Avanti<sup>TM</sup> J-25 Beckmann. Supernatant vzorca, kateremu kloroforma nismo dodali smo shranili pri -20 °C (vzorec 1), supernatant vzorca s kloroformom smo razdelili na 3 dele. 1 del smo shranili pri -20 °C (vzorec 2), drugima dvema vzorcema pa smo dodali PEG 6000 (1 g / 20

mL vzorca), mešali dve uri pri 4 °C in oba vzorca centrifugirali pri nizkih obratih. Pelet enega vzorca smo raztopili v 10 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufra s pipetiranjem in takoj centrifugirali pri nizkih obratih, ter supernatant shranili pri -20 °C (vzorec 3). Pelet drugega vzorca pa smo raztopili v 10 mL McIlvaine fosfat-citratnega pufra, pH 7 s stresanjem pri 4 °C čez noč, centrifugirali pri nizkih obratih in supernatant shranili pri -20 °C (vzorec 4). Priprava vzorcev je shematsko prikazana na sliki 6.



Slika 6. Shematski prikaz priprave delno očiščenih virusnih klarifikatorov ToMV.

Figure 6. Schematical drawing of semi purified ToMV sample preparation.

Vzorec 2 se je po nekaj testih izkazal za vzorec, katerega priprava traja le 30 minut, kljub temu pa vsebuje vse nujno potrebne korake za čiščenje ToMV na monolitnih nosilcih. Zato

smo na PD-10 koloni (GE, 17-0851-01) delno očiščenemu virusnemu pripravku (vzorcu 2) zamenjali pufer iz 200 mM fosfat citratnega pufra, pH 7 v 20 mM natrijev acetat, pH 5.5. Tako pripravljen vzorec smo uporabljali za čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na monolitnem nosilcu. ToMV smo čistili na CIM QA monolitnem disku, kot vezni pufer smo uporabljali 20 mM natrijev acetat, pH 5.5 in vezni pufer z 1.5 M NaCl kot elucijski pufer.

### 3.3 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Za preverjanje celovitosti virusnih delcev in za kontrolo prisotnosti virusnih delcev med postopkom čiščenja smo uporabljali elektronsko mikroskopijo.

#### 3.3.1 Lovljenje virusov s protitelesi za CMV

Na bakrovo mrežico (400 MESH, 2r = 3mm), prevlečeno s formvarjem in naparjeno z ogljikom smo vezali specifična protitelesa proti CMV (Loewe, kat. št. 07108), ki smo jih redčili 1:1000 v 0.1 M fosfatnem pufru, ki je vseboval 2 % PVP in 0.2 % natrijevega sulfita. Po inkubaciji smo mrežice sprali s fosfatnim pufrom, ki je vseboval PVP in Na sulfit, mrežice osušili s filter papirjem in nanje nanesli vzorec. Po 15 minutni inkubaciji smo mrežice sprali z bidestilirano vodo, jih osušili in negativno kontrastirali z 1 % uranilnim acetatom.

#### 3.3.2 Negativno kontrastiranje za ToMV

Vzorce smo nanesli na bakrove mrežice (400 MESH, 2r = 3mm), prevlečene s formvarjem in naparjene z ogljikom, jih po 5 minutni inkubaciji sprali z bidestilirano vodo in negativno kontrastirali z 1 % uranilnim acetatom.

### 3.4 METODA ELISA

ELISA je serološka metoda, ki sta jo prvič opisala Clark in Adams (1976). Pri tej metodi ugotavljamo imunospecifično aktivnost posredno prek delovanja encima, ki je navadno vezan na virusno specifično protitelo.

Velikega pomena pri metodi ELISA je vezava primarnega protitelesa na polistirensko površino, čemur sledi nanašanje različnih reaktantov. Po vsaki fazi z izpiranjem ploščice

odstranimo nevezane snovi (nevezana protitelesa oz. po nanosu testiranih vzorcev inhibitorne snovi ali z gostiteljem povezane encime, ki bi lahko hidrolizirali testno substanco), ki se tako ne nabirajo na reakcijskem mestu, ampak ostanejo tam le specifično vezani reaktanti. Zaradi tega je test lahko skoraj enako uspešen, če uporabimo grob rastlinski material ali očiščen virusni izvleček, ki vsebuje enako količino virusnih delcev.

V rastlinski patologiji se uporablja dve različici ELISA: direktno in indirektno. Pri direktni ELISA se z encimom označeno specifično protitelo direktno veže na antigen (virus), pri indirektni ELISA pa antigen prepozna specifično protitelo, ki nima vezanega encima, zato potrebujemo protitelo proti specifičnemu protitelesu, ki ima vezan encim. Antigen lahko vežemo direktno na trdno površino ali pa na predhodno vezana specifična protitelesa (dvojni sendvič ELISA, angl. double-antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA). Za detekcijo in delno kvantifikacijo CMV in ToMV smo uporabljali dvojni sendvič ELISA. Pri DAS ELISA za detekcijo CMV smo uporabljali virusno specifična poliklonalna protitelesa podjetja Loewe (kataloška št. 07108, redčena 1:200), za ToMV pa poliklonalna protitelesa proti ToMV (PRI, Plant Research Institute, Wageningen, Nizozemska), redčena 1:1000. Sekundarna protitelesa so bila virusno specifična in v obeh primerih označena z alkalno fosfatazo. Negativna kontrola so bili listi zdrave propagacijske rastline (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun za CMV in *Nicotiana clevelandii* za ToMV), zmleti v ekstrakcijskem pufru. Pozitivna kontrola je bila v primeru CMV delno očiščen CMV, v primeru ToMV pa čist virusni pripravek. Končni volumen reagentov, dodanih na mikrotitrsko ploščico je bil 200 µl / luknjico. Sestave pufrov, ki smo jih uporabljali pri metodi ELISA, so prikazane v prilogi B.

Uporabljali smo mikrotitrsko ploščice z ravnim dnom (Nunc, Maxisorb, Roskilde, Denmark za CMV in Polysorb za ToMV). Optično gostoto smo odčitavali pri 405 nm, 90 minut po dodatku substrata (para nitrofenil fosfat, Sigma, 104-105) v koncentraciji 1 mg/mL. Uporabljali sem ELISA čitalec Dynatech MR 5000 (Virginia, USA) in program BioLinx.

### 3.4.1 DAS ELISA za relativno delno kvantifikacijo CMV

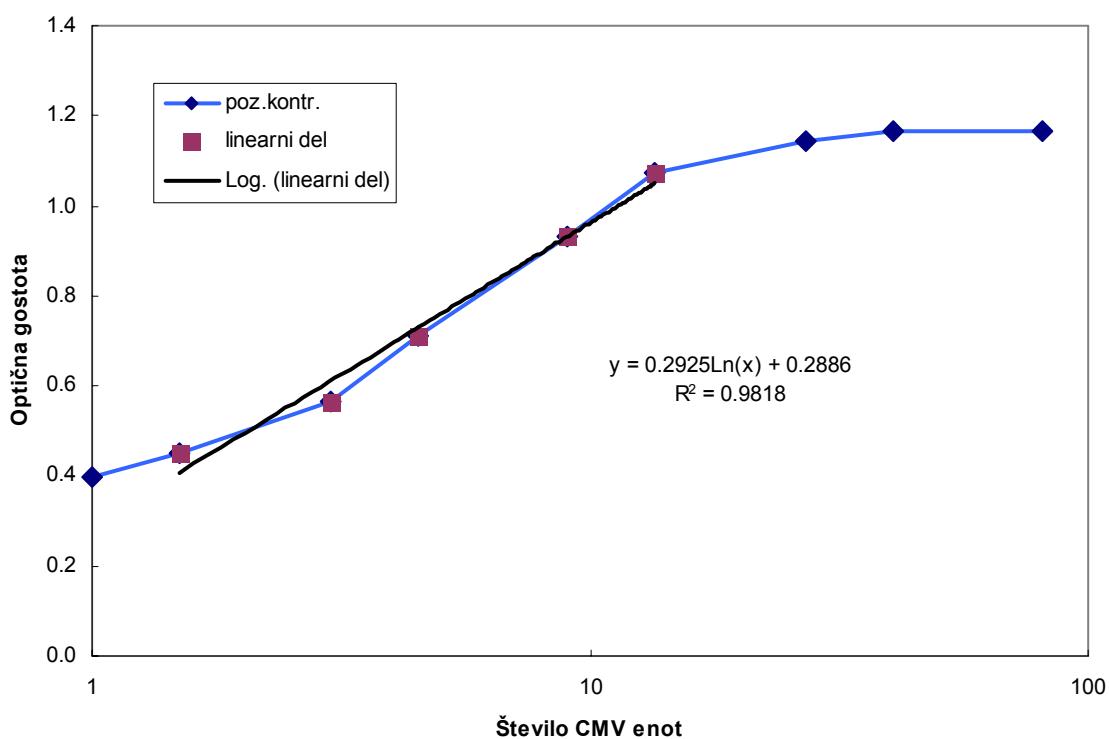
DAS ELISA je kvalitativna metoda, ki smo jo priredili tako, da je delovala kot delno kvantitativna metoda. Ker nismo imeli čistega CMV smo za umeritveno krivuljo uporabili pozitivno kontrolo za CMV - liofiliziran rastlinski material (Bioreba, 160653), ki smo jo v paralelah na vsaki mikrotitrski ploščici večkrat redčili. Iz enačbe linearne dela umeritvene krivulje in izmerjenih optičnih gostot posameznih vzorcev smo lahko izračunali koncentracijo CMV v posameznem vzorcu. Ker koncentracija CMV v Biorebini pozitivni kontroli, ki smo jo uporabljali za pripravo umeritvene krivulje, ni bila znana, smo se odločili, da bomo postavili mejo med pozitivnimi in negativnimi vzorci in prvi redčitvi pozitivne kontrole, ki bo imela vrednost optične gostote (OD) nad pragom, pripisali koncentracijo 10 ng CMV/mL, vsaki naslednji redčitvi pa vrednost, glede na faktor redčenja pozitivne kontrole. Namreč, meja detekcije ELISA je med 1 in 10 ng/mL (Bergmayer, 1986). Problem se je pojavil pri postavitvi praga. Kriteriji, ki se za postavitev praga uporablajo (npr. povprečje optičnih gostot dveh negativnih kontrol + 3 standardne deviacije) (Gillett, 1986), ni bil primeren, ker je lahko povišana vrednost OD negativne kontrole povzročila veliko razliko v vsebnosti CMV pri enako redčeni pozitivni kontroli na dveh različnih ploščicah (in posledično tudi razliko v vsebnosti CMV v vzorcih). Zaradi tega smo se odločili, da izključimo določanje praga in uvedemo »fiktivne enote CMV«, glede na redčenje pozitivne kontrole. Negativni kontroli smo tako pripisali 0 »CMV enot«, najbolj redčeni pozitivni kontroli vrednost 1, vsaki naslednji redčitvi pa vrednost povezano s faktorjem redčenja pozitivne kontrole. Iz OD vrednosti posameznih redčitev pozitivne kontrole in pripadajočih CMV enot smo dobili umeritveno krivuljo. Linearni del umeritvene krivulje je moral potekati skozi najmanj štiri točke in vrednost  $R^2$  je morala biti večja od 0.9.

Vzorce, katerih optična gostota je bila zelo visoka (zaradi visoke vsebnosti virusa) smo pred nanosom na mikrotitrsko ploščico redčili z ELISA ekstrakcijskim pufom tolkokrat, da je bila optična gostota vzorca v linearinem delu umeritvene krivulje. Primer vrednosti za umeritveno krivuljo je prikazan v preglednici 1. Vrednostim v preglednici 1 pripada umeritvena krivulja na sliki 7.

**Preglednica 1.** Primer podatkov za izris umeritvene krivulje za delno kvantifikacijo CMV v vzorcu.

**Table 1.** An example of data for calibration curve for semi quantitative assesement of CMV in the sample.

REDČITEV POZ. K.	ŠTEVILO CMV ENOT / mL	OPTIČNA GOSTOTA (OD)
1000	81	1.168
2000	40.5	1.168
3000	27	1.146
6000	13.5	1.075
9000	9	0.930
18000	4.5	0.710
27000	3	0.564
54000	1.5	0.449
81000	1	0.397
Negativna kontrola	0	0.273



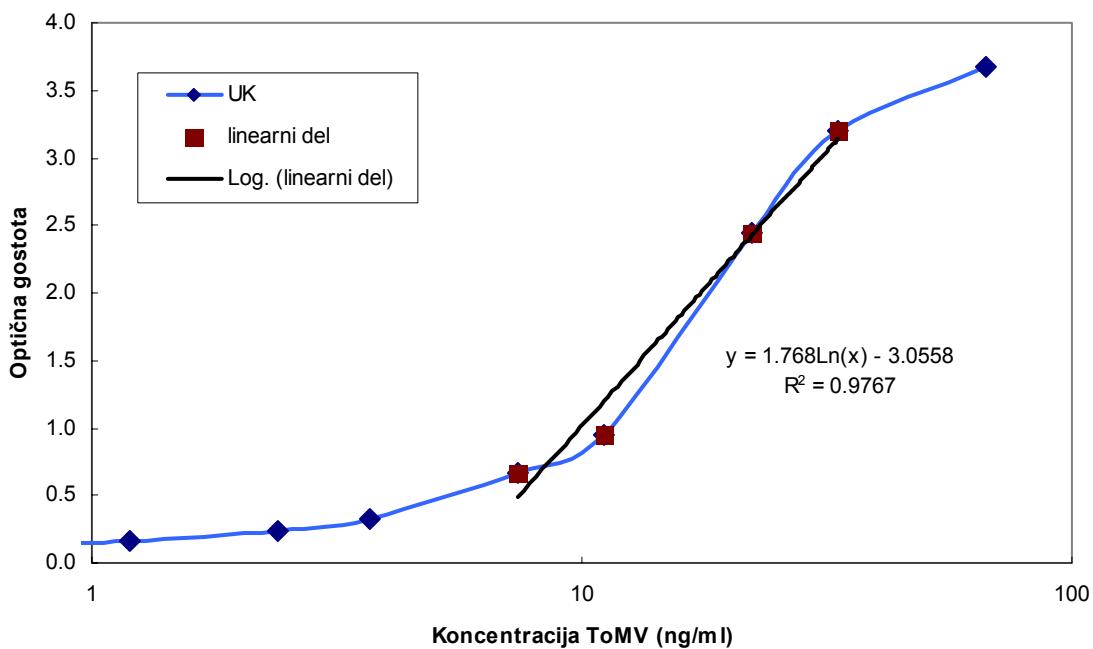
**Slika 7.** Primer umeritvene krivulje za delno kvantifikacijo CMV.

**Figure 7.** An example of calibration curve for semi quantitation of CMV.

### 3.4.2 DAS ELISA za kvantifikacijo ToMV

Na vsaki mikrotitrski ploščici smo pripravili umeritveno krivuljo s serijo redčitev čistega virusa. Ker je bila koncentracija virusa v pripravku znana, je bila znana tudi koncentracija ToMV v vsaki točki umeritvene krivulje. Iz enačbe linearne dela umeritvene krivulje in optične gostote vzorca smo lahko izračunali koncentracijo ToMV v vsakem vzorcu. Vzorce, katerih optična gostota je bila zelo visoka (zaradi visoke vsebnosti virusa), smo pred nanosom na mikrotitrsko ploščico redčili z ELISA ekstrakcijskim pufom tolkokrat, da je bila optična gostota vzorca v linearinem delu umeritvene krivulje.

Kakor pri delno kvantitativni DAS ELISA za CMV sta bila pogoja za ustrezeno umeritveno krivuljo  $R^2$  (večji od 0.9) in število točk skozi katere je potekal linearni del umeritvene krivulje (4). Primer ustrezne umeritvene krivulje je prikazan na sliki 8.



**Slika 8.** Primer umeritvene krivulje za delno kvantifikacijo ToMV.

**Figure 8.** An example of calibration curve for semi quantitation of ToMV.

### 3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU-DETEKCIJA 18S rRNK

Za ugotavljanje prisotnosti DNK v vzorcih smo uporabili Human 18S rRNA kit (Applied Biosystems, 4319431E).

Vzorce (HPLC frakcije in na disk nanešene vzorce) smo najprej izpostavili temperaturi 90 °C za 10 minut, da smo razbili sekundarne strukture nukleinskih kislin. Iz vsakega vzorca smo z redčenjem v deionizirani vodi pripravili serijo desetkratnih redčitev (10x-100.000 x) in jih do nanosa na ploščico shranili pri temperaturi 4 °C. Pripravili smo mešanico kemikalij za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Mešanica je za eno reakcijo vsebovala: 5 µL TaqMan 2x PCR Master Mix (Roche, 605925), 0.5 µL sonde in začetnih oligonukleotidov iz kita in 2.5 µL deionizirane in avtoklavirane vode. 8 µL mešanice smo nanesli v vsako luknjico na plošči (Applied Biosystems, 4309849), nato smo v luknjice dodajali po 2 µL redčenih vzorcev. Skupni volumen reakcije je bil torej 10 µL. Ploščico smo pokrili s folijo (Applied Biosystems, 4309849) in centrifugirali 1 minuto pri 1000 g. Za umeritveno krivuljo smo uporabili Calf Thymus DNA iz Fluorescent DNA Quantitation Kit (BioRad, 170-2480), v koncentraciji 1 mg/mL.

Vsek redčen vzorec oz. DNK standard je bil na ploščico nanešen trikrat. Verižna reakcija s polimerazo je potekala v ABI PRISM 7900HT Sequence detection system (Applied Biosystem) pod univerzalnimi pogoji: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C, 45 ciklov po 15 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C.

Prag (C<sub>t</sub> vrednost) smo določili po nastavitevi bazne linije z uporabo programske opreme SDS 2.1 (Applied Biosystems). Vzorci z vrednostjo C<sub>t</sub> ≤ 40 so bili negativni. To je teoretična meja in pomeni, da je v redčitveni vrsti pri 100 % pomnoževalni učinkovitosti le ena kopija tarčnega zaporedja detektirana pri 38. ciklu. Pri C<sub>t</sub> ≥ 40 tarčnega zaporedja ne moremo določiti.

Na vsako mikrotitrsko ploščico smo pred začetkom nanosa vzorcev nanesli negativno kontrolo (no template control)-vodo, enako tudi po koncu nanašanja vzorcev.

### 3.6 SDS POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA

Za ločevanje proteinov smo uporabljali SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE), klasično denaturacijsko elektroforezo, ki jo je opisal Laemmli leta 1970 (Dunbar, 1994).

SDS (natrijev dodecil sulfat) je anionski detergent, ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule SDS negativen naboј, imajo tudi vsi z SDS denaturirani proteini negativen naboј, velikost naboja pa je odvisna od velikosti proteinske molekule. V električnem polju proteinske molekule potujejo od negativne katode proti pozitivni anodi, dolžina njihovega potovanja pa je prenosorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule potujejo počasneje od manjših, ker jim nosilec nudi večji upor (Sepčić s sod., 1997).

Vzorce (frakcije dobljene pri kromatografski ločbi vzorca na CIM monolitnem nosilcu) pred nanosom na gel 6 minut vremo, s čimer dosežemo večjo topnost in denaturacijo proteinov, vključno s proteazami.

Elektroforeza poteka na poliakrilamidnih nosilcih z različno zamreženostjo, ki jo izberemo glede na red velikosti molekul, ki jih želimo ločiti. Za ločevanje večjih molekul mora biti zamreženost manjša (večje pore), kot pri ločevanju majhnih molekul. Elektroforezo lahko izvedemo v kontinuirnem ali diskontinuirnem sistemu. Slednji je bolj primeren, ker se posamezne lise oblikujejo kot zelo ozke plasti, s čimer se ločljivost močno izboljša. Gel, na katerega nanašamo vzorec (spojitveni gel), ima bistveno manjšo zamreženost kot gel, na katerem pride do ločevanja molekul (ločitveni gel). Vse molekule pripotujejo do meje med obema geloma v izredno tanki liniji, zaradi česar v ločitvenem gelu ne pride do prekrivanja lis kot je pogosto v kontinuirnem sistemu (Sepčić in sod., 1997). SDS elektroforeza naj ne bi potekala v prisotnosti reducentov, saj redukcija disulfidnih mostov v proteinih navadno povzroči zmanjšano sposobnost vezave proteinov, kljub temu pa se je v nekaterih primerih pokazalo, da prisotnost reducentov ne zmanjša te sposobnosti (Dunbar, 1994).

Prisotnost proteinov v naših vzorcih smo preverjali na diskontinuiranih poliakrilamidnih gelih, pri čemer je bil spojitveni gel 4 %, ločitveni gel pa 12 %. Elektroforeza je potekala 1 uro pri napetosti 200 V.

Proteine na gelu smo barvali s srebrom. Tehniko barvanja gelov s srebrom je leta 1979 opisal Switzer s sodelavci (Hames in Rickwood, 1990). Ta metoda je do 100x bolj občutljiva od barvanja s »Coomassie Blue R-250«, spodnja meja detekcije je 0.38 ng govejega albuminskega seruma /mm<sup>2</sup> gela (Hames in Rickwood , 1990:60).

Za barvanje poliakrilamidnih gelov smo uporabljali Silver stain kit (GE, 17-1150-01), katerega občutljivost je 0.2-0.6 ng proteinov/proteinsko liso.

### 3.7 IMUNSKI PIVNIK

Metodo imunski pivnik (angl. western blot) je prvi opisal Towbin leta 1979 v članku z naslovom "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets". Metoda je sestavljena iz elektroforetske ločitve proteinov, ki jih nato s pomočjo električnega toka prenesemo na membrano, kjer jih zasledimo s pomočjo protiteles (immunoblotting) ali specifičnih ligandov (ligand blotting) (Dunbar, 1994). Za ločevanje proteinov navadno uporabljam SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo, klasično denaturacijsko elektroforezo. Po končani elektroforezi proteine iz gela prenesemo na ustrezeno membrano. Primerna membrana, če smo uporabili SDS elektroforezo, je najljonska membrana, ki je kationske narave in ima večjo kapaciteto od nitrocelulozne membrane. Poleg te je primerna tudi PVDF (polivinildifluoridna) membrana, ki je hidrofobna (Patel, 1994). Pred uporabo moramo zrak, ki se zadržuje v mikroskopski strukturi membrane, nadomestiti s pufrom. V pufru za prenos proteinov iz gela na membrano je navadno metanol, ki pri prenosu preprečuje nabrekanje gela, zmanjša velikost por, odstrani SDS iz proteinov in poveča afiniteto vezave proteinov na membrano (Dunbar, 1994). Po prenosu proteinov na membrano sledi serološka reakcija, ki je precej podobna serološki reakciji pri ELISA. Na proteine vežemo specifična protitelesa, ki so fluorescentno ali radioaktivno označena, ali pa imajo nase vezan encim (Dunn, 1994). V primeru encimske označenega protitelesa nanesemo na membrano substrat, kar povzroči obarvanost proteinskih lis, ki jih je protitelo prepoznalo.

Elektroforetsko ločene proteine smo prenesli na PVDF membrano (BioRad, 162-0174), ki smo jo nato inkubirali v pufru za blokiranje, kamor smo dodali ToMV specifična protitelesa, označena z alkalno fosfatazo (Plant Research Institute, Wageningen,

Nizozemska), redčena 1:1000. Po končani inkubaciji smo membrano osušili in jo prelili s substratom NBT/BCIP (Perkin Elmer, NEL937). Po nekaj minutah so se pojavile vijolične lise tam, kjer so se nahajali ToMV proteini. Sestava vseh pufrov, ki smo jih uporabljali pri elektroforetski ločbi proteinov na poliakrilamidnem gelu in pri metodi imunski pivnik, je zapisana v prilogi C.

### 3.8 TESTNE RASTLINE

#### **3.8.1 Testiranje infektivnosti virusa po prehodu skozi CIM monolitni nosilec in celoten HPLC sistem**

Infektivnost virusa (CMV oz. ToMV) po prehodu skozi HPLC sistem in CIM monolitni nosilec smo preverjali na testnih rastlinah (*Chenopodium quinoa* za CMV in *Nicotiana glutinosa* za ToMV). Frakcije, zbrane med elucijo virusa iz diska smo redčili v pufru za mehansko inokulacijo (priloga A) in jih nanesli na liste testnih rastlin, ki smo jih pred tem posuli s karborundom. Po 10 minutni inkubaciji smo inokulirane liste sprali z vodo. 10-20 dni po okužbi so se na listih testnih rastlin pojavili bolezenski znaki, če je bil v vzorcu, s katerim smo rastlino okužili, infektiven virus.

#### **3.8.2 Okužba rastlin z virusom preko koreninskega sistema**

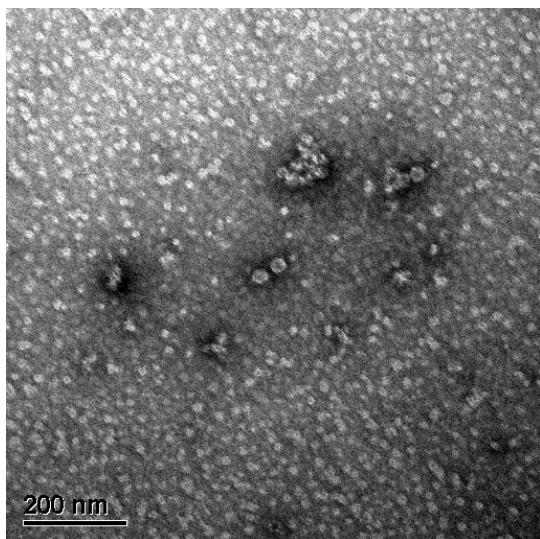
Propagacijske rastline za ToMV (*Nicotiana clevelandii*) smo 15 dni zalivali z vodo, ki je vsebovala izredno majhne količine ToMV (10 µL čistega virusnega pripravka s koncentracijo 0.6 mg/mL redčenega v 1L vode). Koncentracija ToMV v vodi, s katero smo rastline zalivali, je bila pod mejo detekcije ELISA. V 15 dnevih smo porabili 1L tako pripravljene vode za 3 propagacijske rastline. Vzporedno smo 3 rastline zalivali z vodo, ki ni vsebovala ToMV. Po 15 dnevih smo pobrali liste in korenine vseh rastlin, jih homogenizirali v ekstrakcijskem pufru za ELISA (razmerje 1:10) in z delno kvantitativno metodo ELISA preverili prisotnost ToMV v listih in koreninah.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 ČIŠČENJE VIRUSNIH DELCEV PO KLASIČNEM POSTOPKU

#### 4.1.1 Čiščenje CMV

CMV smo delno očistili iz listov rastlin *Nicotiana tabacum* kultivar *Samsun*, okuženih s CMV, kakor je opisano v poglavju Material in metode. Z elektronsko mikroskopijo smo preverili ali delno očiščen virusni pripravek vsebuje nepoškodovane virusne delce. Ker se virusni delci niso vezali na mrežice za elektronsko mikroskopijo, smo na mrežice pred nanosom vzorca vezali virusno specifična protitelesa, ki so nato vezali virusne delce. Izvedli smo tako imenovano metodo lovljenja (angl. trapping) s protitelesi. Nato smo mrežice kontrastirali z 1 % uranilnim acetatom in pogledali mrežice z elektronskim mikroskopom. Virusni delci so bili nepoškodovani, kakor je vidno na sliki 9.



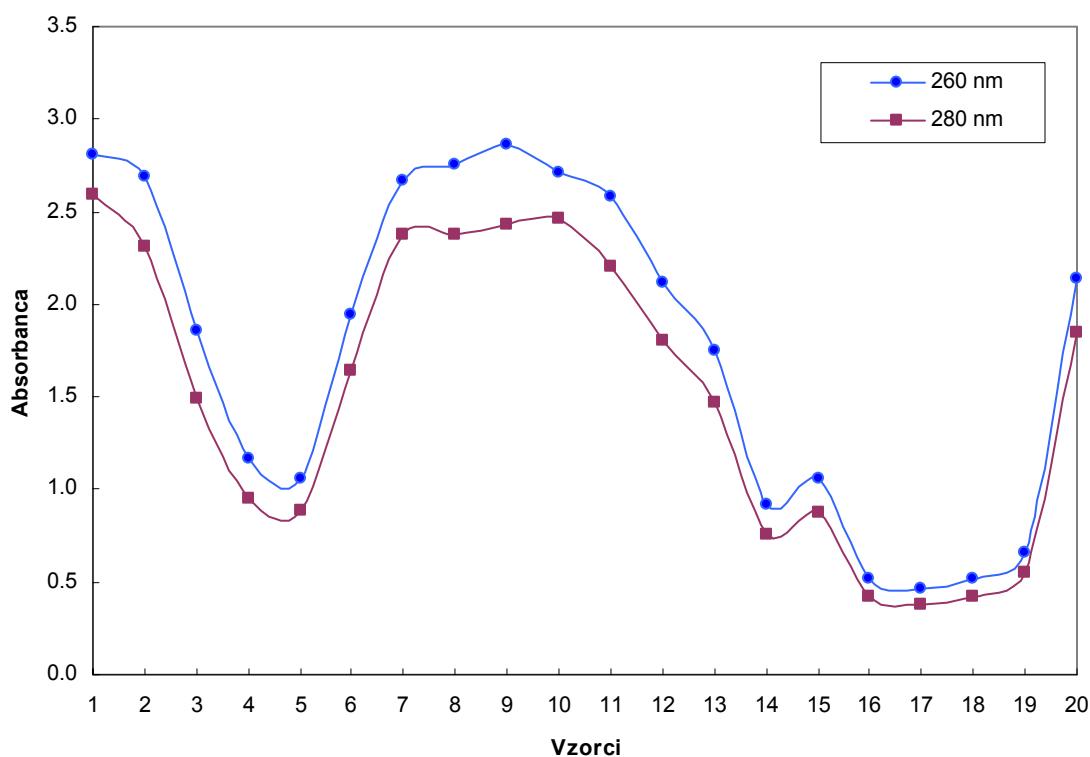
**Slika 9.** Elektronska mikroskopija: negativni kontrast kumaričnega mozaičnega virusa v delno očiščenem virusnem pripravku po predhodnem lovljenju virusnih delcev s protitelesi.

**Figure 9.** Trapping and negative contrast electron microscopy of *Cucumber mosaic virus* in semi purified CMV sample.

#### 4.1.2 Čiščenje ToMV

ToMV smo čistili iz listov rastline *Nicotiana clevelandii*, okužene s ToMV po protokolu, ki je opisan v poglavju Material in metode.

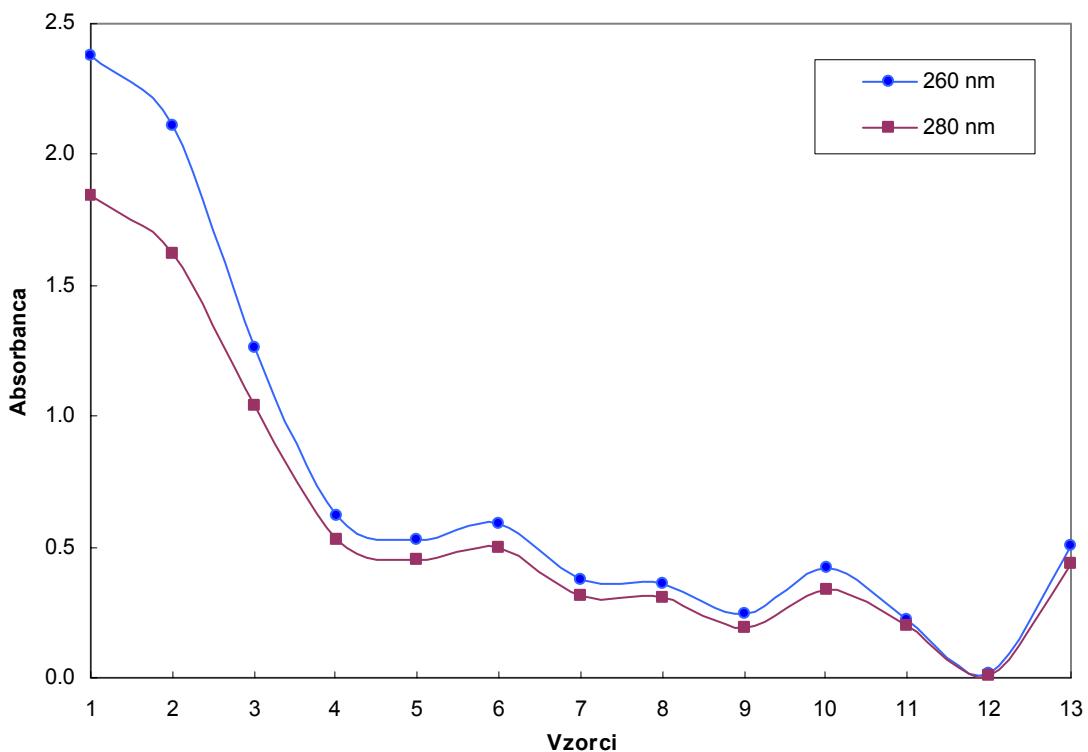
Po začetnih korakih (homogenizaciji in klarifikaciji) je slediloobarjanje s PEG 6000, nato pa centrifugiranje v saharoznem gradientu. Po končanem centrifugiranju smo iz vsake centrifugirke pobirali frakcije od zgoraj navzdol po približno 2 mL. Vsaki frakciji smo nato izmerili absorbanco pri 260 nm in 280 nm, primer izmerjenih absorbanc je prikazan na sliki 10. Za nadaljnje čiščenje smo izbrali frakcije z visoko absorbanco pri 260 nm (v prikazanem primeru na sliki 10 so bili to vzorci od 7 do 12), ki so se ponavadi nahajali na sredini saharoznega gradiента.



**Slika 10.** Izmerjene absorbance frakcij po centrifugiranju v saharoznem gradientu pri čiščenju ToMV iz *N. clevelandii*.

**Figure 10.** Conventional purification of ToMV from leaves of *N. clevelandii*: absorbances of fractions after centrifugation in sucrose gradient.

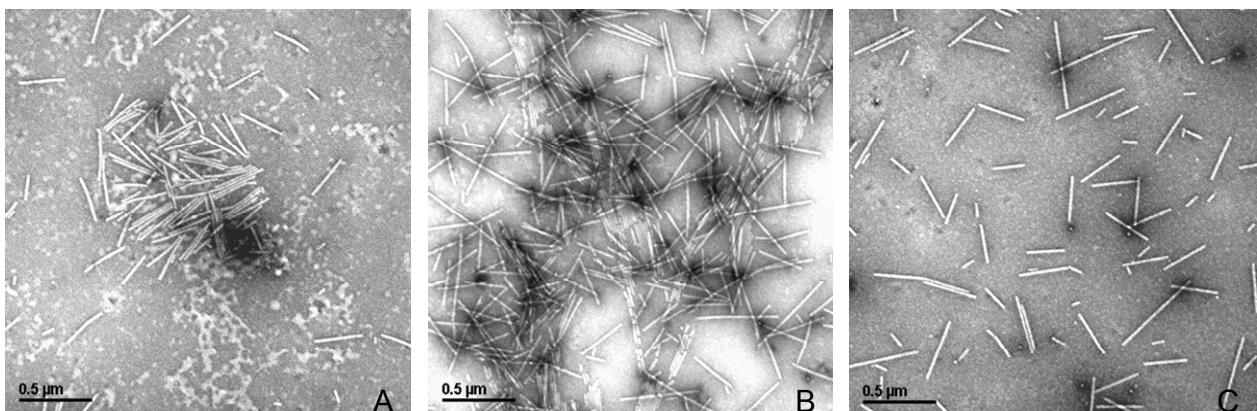
Centrifugiraju v saharoznem gradientu je sledilo centrifugiranje pri visokih obratih in nato centrifugiranje v CsCl gradientu. Podobno kot po centrifugiranju v saharoznem gradientu smo iz centrifugirke pobrali frakcije po približno 2 mL in izmerili absorbanco pri 260 nm in 280 nm. Vzorci z visoko absorbanco so se po CsCl gradientu nahajali na vrhu gradiента, v prikazanem primeru na sliki 11 smo izbrali vzorce 1-4 in jih dializirali proti pufru.



**Slika 11.** Izmerjene absorbance frakcij po centrifugiranju v CsCl gradientu pri čiščenju ToMV iz *N. clevelandii*.

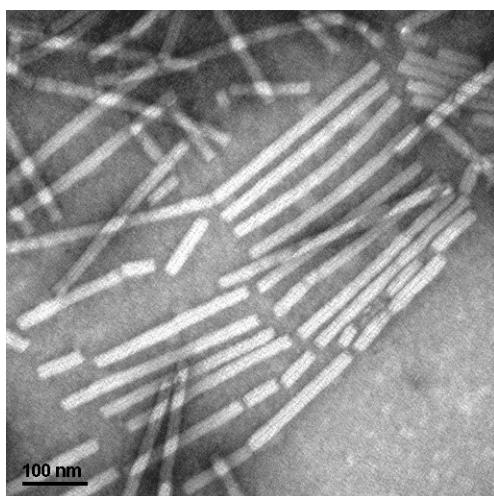
**Figure 11.** Conventional purification of ToMV from leaves of *N. clevelandii*: absorbances of fractions after centrifugation in CsCl gradient.

Na vsaki stopnji čiščenja smo pripravili mrežice za elektronsko mikroskopijo in opazovali virusne delce z elektronskim mikroskopom ter tako preverili ali so virusni delci nepoškodovani (slika 12 in slika 13).



**Slika 12.** Elektronska mikroskopija: negativni kontrast virusnih delcev ToMV v različnih korakih čiščenja: slika A (ToMV po centrifugiranju v saharoznem gradientu), slika B (ToMV po centrifugiranju v CsCl gradientu) in slika C (ToMV po dializi).

**Figure 12.** Negative contrast electron microscopy of ToMV in samples during the conventional purification of virus particles: figure A (ToMV after centrifugation in sucrose gradient), figure B (ToMV after centrifugation in CsCl gradient), slika C (ToMV after dialysis).



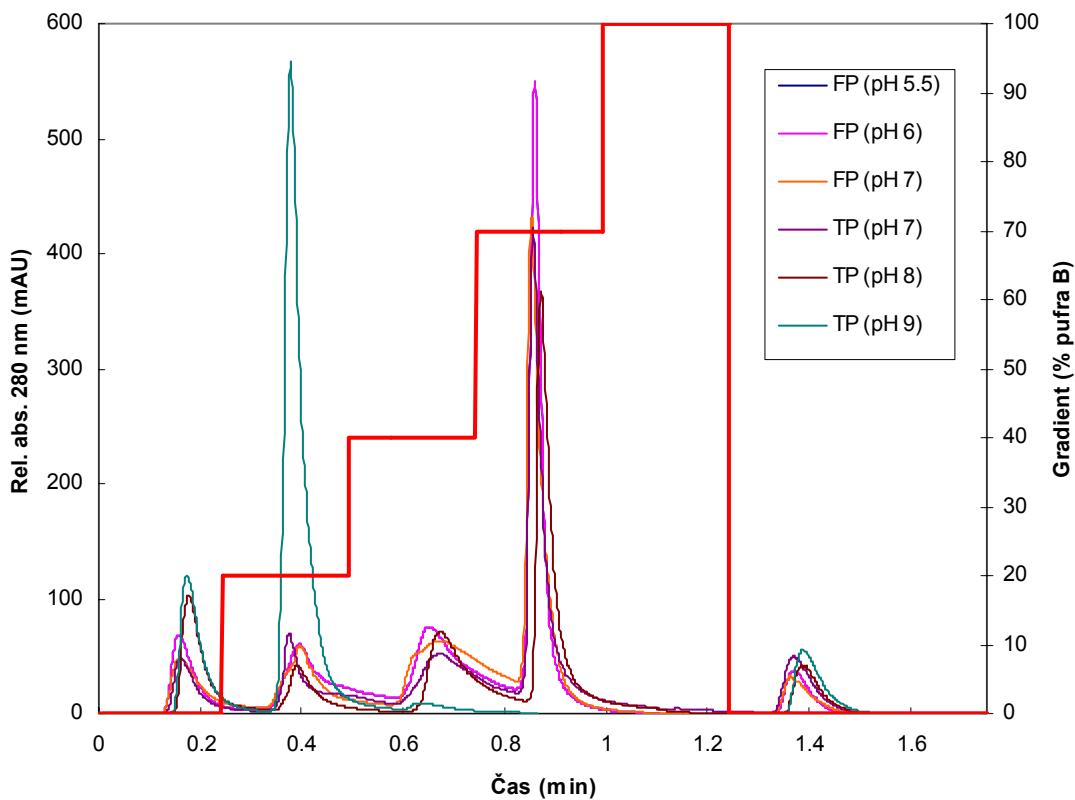
**Slika 13.** Elektronska mikroskopija: negativni kontrast očiščenega paradižnikovega mozaičnega virusa.

**Figure 13.** Negative contrast electron microscopy of *Tomato mosaic virus* in purified ToMV sample.

## 4.2 OPTIMIZACIJA PUFRSKEGA SISTEMA, pH PUFRA IN IZBIRA NOSILCA ZA KROMATOGRAFSKO LOČBO CMV IN ToMV

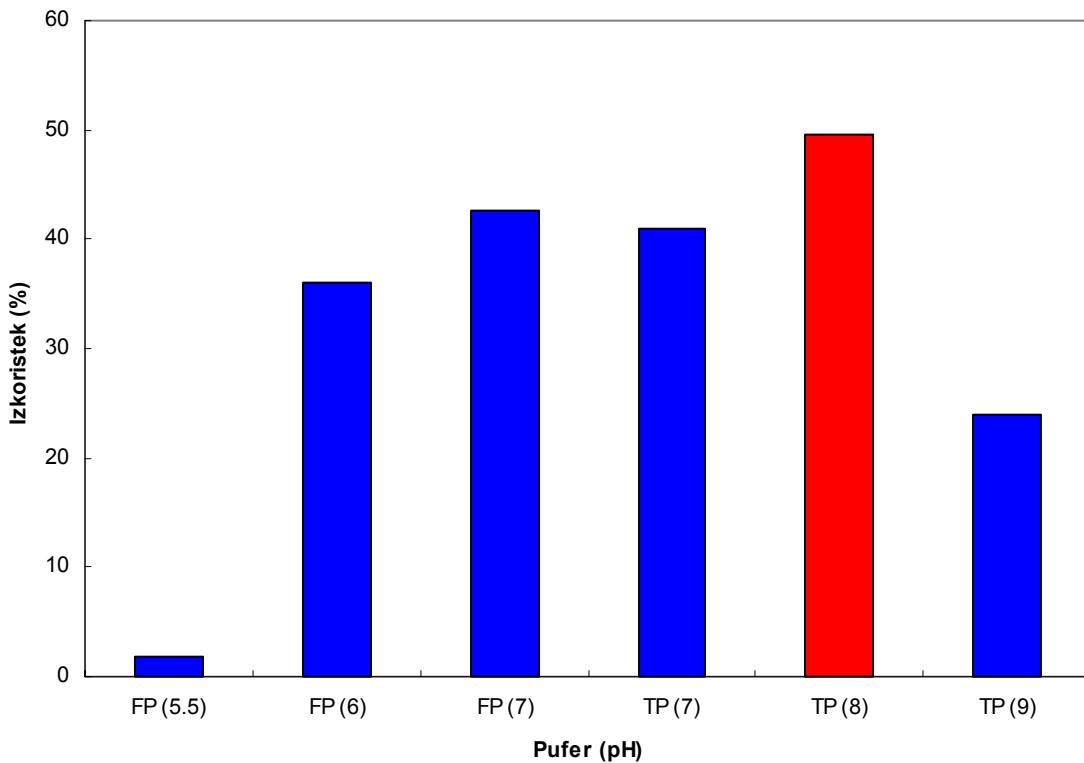
### 4.2.1 Kumarični mozaični virus

Za ločevanje delno očiščenega pripravka CMV smo preizkusili 2 različna pufrska sistema: 20 mM fosfatni pufer (pufer A) – 20 mM fosfatni pufer z 1.5 M NaCl (pufer B) in 20 mM Tris-HCl pufer (pufer A) – 20 mM Tris-HCl z 1.5 M NaCl (pufer B). Prvi pufrski sistem smo umerili na pH 5.5, 6 in 7, drugega na 7, 8 in 9. 50 µL (približno 34000 CMV enot) delno očiščenega virusnega pripravka CMV smo injicirali na CIM DEAE monolitni disk, pri čemer smo za vsako ločbo uporabili drug pufrski sistem z določenim pH. Gradient je bil stopenjski in sicer 0, 20, 40, 70 in 100 % pufra B, ter na koncu spiranje s 100 % pufrom A, da se je iz diska izprala sol. Vsako ločbo CMV pod določenimi pogoji smo naredili najmanj dvakrat, na sliki 14 so prikazani reprezentativni kromatogrami ločb CMV z različnimi pufrskimi sistemi, pri različnih pH. Kromatogram posamezne ločbe je seštevek absorbanc virusnih delcev CMV in vseh nečistoč, ki so bile prisotne v delno očiščenem virusnem pripravku, ki smo ga ločevali. Vsaka stopnica gradiента na sliki 14 predstavlja hkrati tudi kromatografsko frakcijo, ki smo jo po kromatografski ločbi analizirali z relativno delno kvantitativno metodo ELISA. Tako smo določili vsebnost CMV v posameznih kromatografskih frakcijah. Sestava in pH pufrov, ki smo jih uporabljali za ločevanje delno očiščenega virusnega pripravka na CIM DEAE monolitnem disku, je vplivala na čas v katerem se je CMV spral iz diska (v kateri frakciji). Tako se je pri vseh ločbah večina CMV iz diska izprala v tretji ali četrtri frakciji, razen pri uporabi Tris pufrov, pH 9, ko se je večina CMV iz diska izprala v drugi kromatografski frakciji (priloga D). Zato smo za kriterij uspešnosti ločbe upoštevali seštevek CMV enot v vseh frakcijah, ki smo ga primerjali s količino naloženega CMV. Reprezentativni izkoristki ločb delno očiščenega virusnega pripravka CMV z različnimi pufrskimi sistemi, pri različnih pH so prikazani na sliki 15. Pri puferškem sistemu 20 mM Tris-HCl pufer, pH 8 (pufer A) in 20 mM Tris-HCl z 1.5 M NaCl, pH 8 (pufer B) je bil skupni izkoristek CMV najvišji, kar pomeni, da je za ločevanje in koncentriranje CMV na CIM DEAE monolitnem disku najprimernejši prav ta pufrski sistem.



**Slika 14.** Kromatogrami ločb delno očiščenega CMV na CIM DEAE monolitnem disku z različnimi pufrskimi sistemi in pri različnih pH vrednostih: FP (20 mM fosfatni pufer), TP (20 mM Tris-HCl pufer).

**Figure 14.** Separation of semi purified CMV on CIM DEAE disk monolithic column using different buffer systems with different pHs: FP (20 mM phosphate buffer), TP (20 mM Tris-HCl buffer).



**Slika 15.** Skupni izkoristki posameznih ločb delno očiščenega CMV na CIM DEAE monolitnem disku: FP (20 mM fosfatni pufer), TP (20 mM Tris-HCl pufer).

**Figure 15.** Recovery of semi purified CMV separations on CIM DEAE disk monolithic column: FP (20 mM phosphate buffer), TP (20 mM Tris-HCl buffer).

#### 4.2.2 Paradižnikov mozaični virus

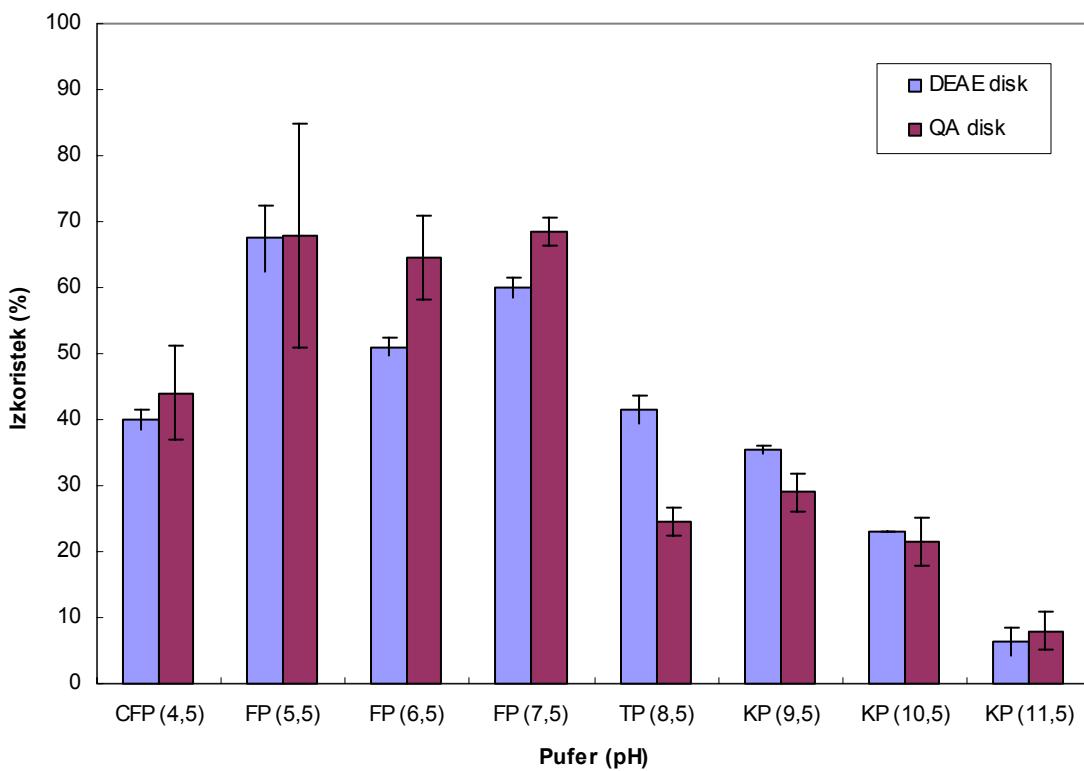
Za optimizacijo pufrskega sistema pri ToMV smo uporabili očiščen virus po protokolu Van der Vlugt-a (2001). Pripravili smo naslednje puferske sisteme:

- 20 mM citrat fosfatni pufer in 20 mM citrat fosfatni pufer z 1.5 M NaCl, pH 4.5,
- 20 mM fosfatni pufer in 20 mM fosfatni pufer z 1.5 M NaCl, pH 5.5,
- 20 mM fosfatni pufer in 20 mM fosfatni pufer z 1.5 M NaCl, pH 6.5,
- 20 mM fosfatni pufer in 20 mM fosfatni pufer z 1.5 M NaCl, pH 7.5,
- 20 mM Tris-HCl pufer in 20 mM Tris-HCl pufer z 1.5 M NaCl, pH 8.5 in
- 20 mM karbonatni pufer in 20 mM karbonatni pufer z 1.5 M NaCl, pH 9.5.

ToMV smo ločevali na šibkih in močnih anionskih izmenjevalcih. Za anionske izmenjevalce smo se odločili na podlagi izoelektrične točke ToMV, ki je 4.5, kar pomeni, da je virus v pufrih s  $\text{pH} > 4.5$  negativno nabit in se bo vezal na anionski izmenjevalec. Teoretično bi lahko uporabili tudi kationske izmenjevalce, vendar bi v tem primeru morali uporabiti pufre s  $\text{pH} < 4.5$ , pri teh vrednostih pH pa je ToMV manj stabilen.

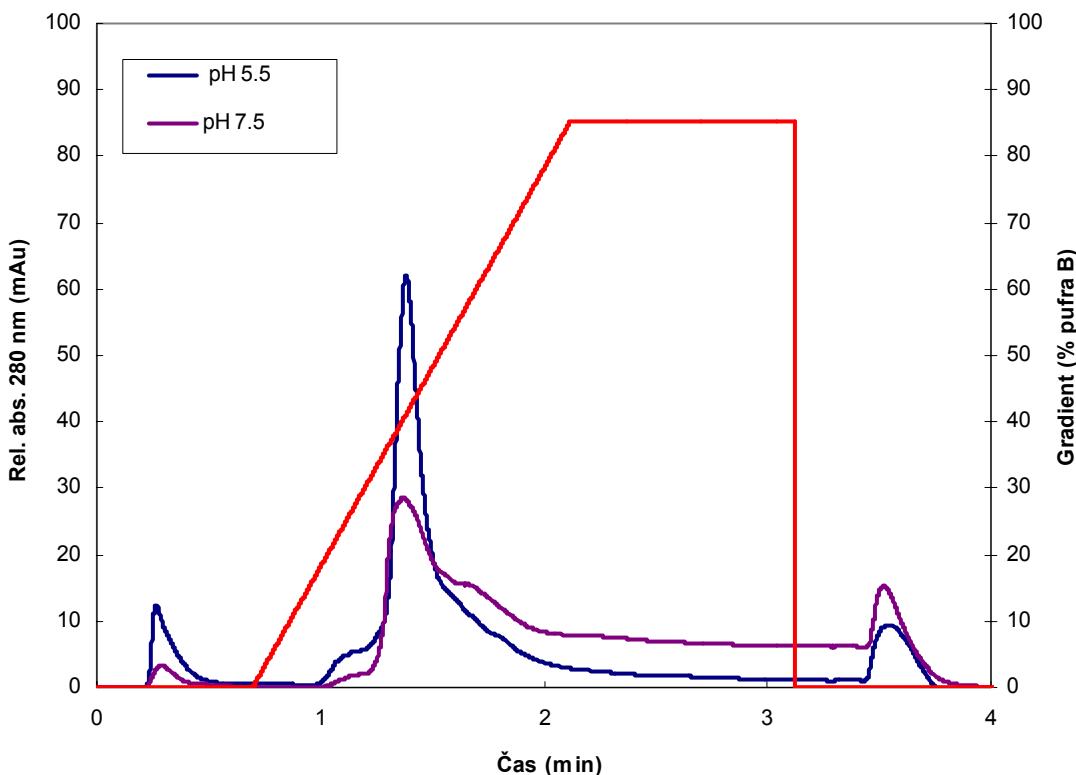
20  $\mu\text{L}$  čistega virusnega pripravka smo injicirali na CIM QA in DEAE monolitni disk, vsaka ločba čistega ToMV na CIM monolitnem nosilcu pod določenimi pogoji je bila izvedena v dveh ponovitvah. Gradient je bil stopničast: 100 % pufra A (izpiranje potencialno prisotnih nečistoč), 100 % pufra B (izpiranje ToMV) in 100 % pufra A (izpiranje NaCl iz diska). Ker se je virus iz diska izpral v istem časovnem intervalu, ne glede na uporabljen pufrski sistem, smo za kriterij primernosti uporabljenega pufrskega sistema vzeli izkoristek elucijske frakcije (razmerje med količino virusa v elucijski frakciji in celotno količino virusa, ki je bila na disk nanešena).

Da pH frakcij ne bi vplival na metodo ELISA, smo pH vsake frakcije umerili na pH 7, nato smo izmerili končni volumen vsake frakcije in le-tega upoštevali pri izračunu koncentracije ToMV v določeni kromatografski frakciji. Rezultati analize vseh kromatografskih frakcij ločevanja ToMV z določenim pufrskim sistemom in pH-jem so prikazane v prilogi E. Analiza frakcij z metodo ELISA je pokazala, da dosežemo najvišje izkoristke pri uporabi 20 mM fosfatnih pufrskih sistemov (pH 5.5-7.5) in da je pri istem puferskem sistemu izkoristek vedno malo višji na QA disku v primerjavi z DEAE diskom (slika 16). Ker je bil kromatografski vrh virusa v linearinem gradientu pri 20 mM fosfatnem puferskem sistemu pH 5.5 bolj ozek kakor pri pH 7.5 (slika 17), smo se odločili, da bomo za nadaljnje poskuse uporabljali 20 mM fosfatni pufer, pH 5.5 kot vezni pufer in 1.5 M NaCl v veznem pufru kot elucijski pufer.



**Slika 16.** Optimizacija pufrskega sistema in pH ter izbira CIM monolitnega nosilca za kromatografsko ločevanje ToMV: izkoristki pri kromatografiji čistega ToMV v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 z uporabo različnih pufrov (CFP-20 mM citrat fosfatni pufer, FP-20 mM fosfatni pufer, TP-20 mM Tris-HCl pufer, KP-20 mM karbonatni pufer), pH in kromatografskih nosilcev.

**Figure 16.** Optimisation of the buffer system, pH and the selection of CIM monolithic support for chromatographic separation of ToMV: recovery of chromatography of purified ToMV in 200 mM citrate phosphate buffer, pH 7 using different buffer systems (CFP-20 mM citrate phosphate buffer, FP-20 mM phosphate buffer, TP-20 mM Tris-HCl buffer, KP-20 mM carbonate buffer), pH and monolithic supports.

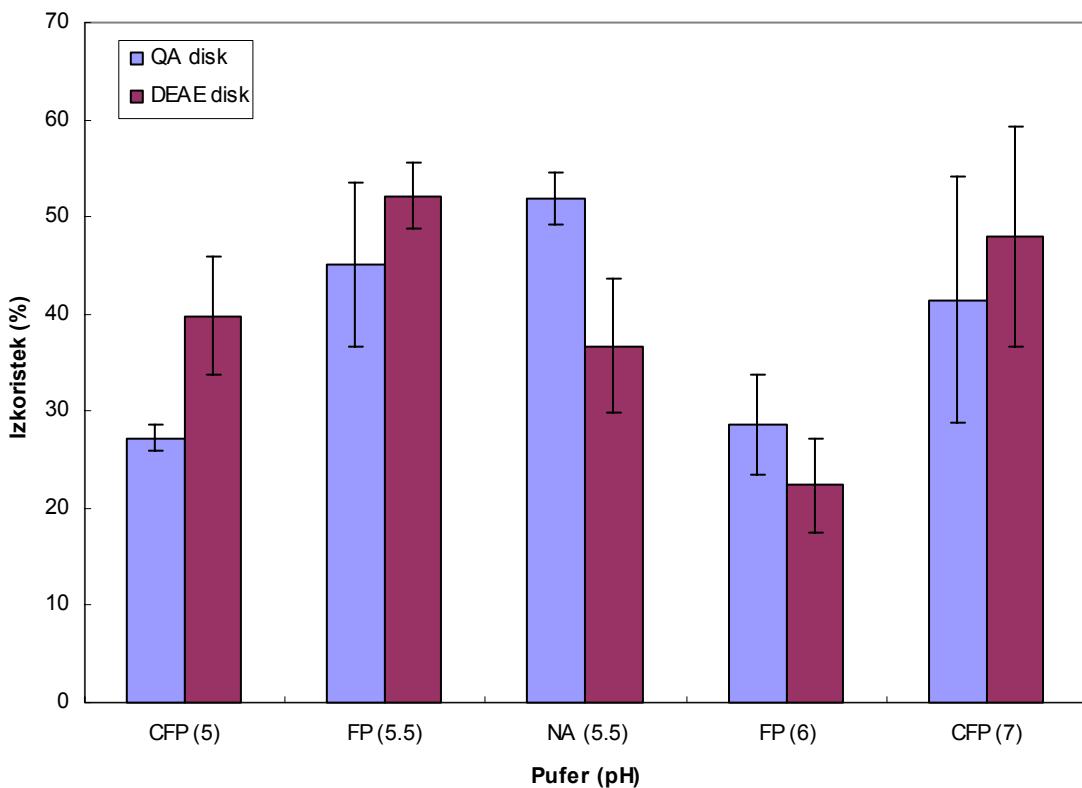


**Slika 17.** Primerjava kromatografije čistega ToMV pri dveh različnih pH vrednostih 20 mM fosfatnega pufrskega sistema na CIM QA monolitnem disku.

**Figure 17.** Chromatography of purified ToMV using 20 mM phosphate buffer system, pH 5.5 and 7.5 on CIM QA monolithic disk.

Pri prvih poskusih koncentriranja ToMV iz 20 mM fosfatnega pufra, pH 5.5 se je pokazalo, da vsebuje fosfatni pufer anione, ki se med nalaganjem vzorca vežejo na disk in se skupaj z virusom iz diska kasneje tudi izperejo, kar se na kromatogramu vidi kot visoko ozadje. Poleg tega je kromatografsko bolj pravilno, da se vzorec (v našem primeru čist virusni pripravek pred nanosom na disk) nahaja v veznem pufru. Zgoraj opisani poskusi za optimizacijo pufrskega sistema in pH so bili namreč narejeni s čistim virusnim pripravkom v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7. Zaradi teh dveh razlogov smo optimizacijo pufrskega sistema ponovili, tokrat z ločevanjem čistega ToMV v veznih pufrih, ki smo jih testirali. 200 mM fosfat citratni pufer čistega virusnega pripravka smo v željeni pufer zamenjali na PD-10 kolonah. Le-te so polnjene s Sephadex G-25 nosilcem in so namenjene ločevanju komponent z večjo ( $\text{Mr} > 5000$ ) od komponent z manjšo ( $\text{Mr} < 1000$ )

molekulsko maso. Tako pripravljen ToMV smo ločevali na CIM QA in DEAE monolitnem disku, vsaka ločba je bila narejena v dveh ponovitvah. Z delno kvantitativno metodo ELISA smo določili koncentracije ToMV v kromatografskih frakcijah in izračunali izkoristek za vsako posamezno ločbo (priloga F). Na sliki 18 je povzetek analize frakcij z delno kvantitativno metodo ELISA.



**Slika 18.** Optimizacija pufrskega sistema in pH ter izbira CIM monolitnega nosilca za kromatografsko ločevanje ToMV: izkoristki pri kromatografiji čistega ToMV v 20 mM veznem pufru (citrat fosfatnem pufru-CFP, fosfatnem pufru-FP, natrijevem acetatnem pufru-NA ali 20 fosfat citratnem pufru-FCP ) z uporabo različnih pufrov (20 mM FC, FP, NA ali FCP), pH in kromatografskih nosilcev.

**Figure 18.** Optimisation of the buffer system, pH and the selection of CIM monolithic support for chromatographic separation of ToMV. 20 mM buffer systems CFP (citrate phosphate buffer), FP (phosphate buffer), NA (sodium acetate buffer) were used.

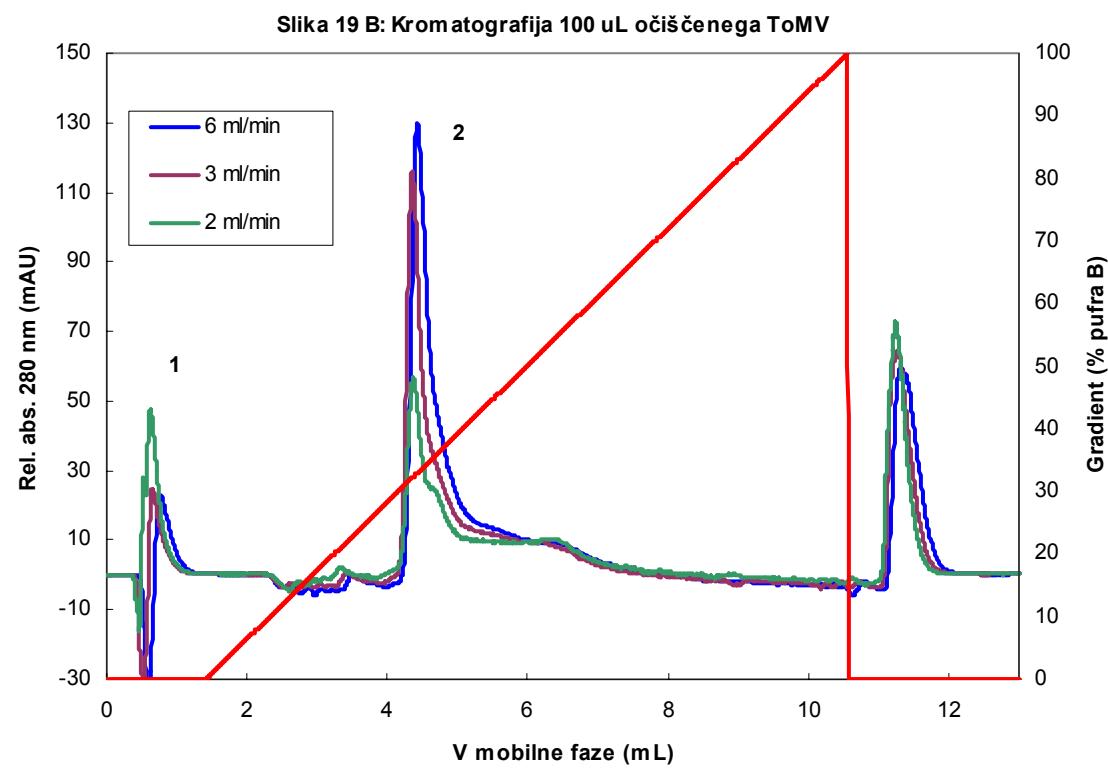
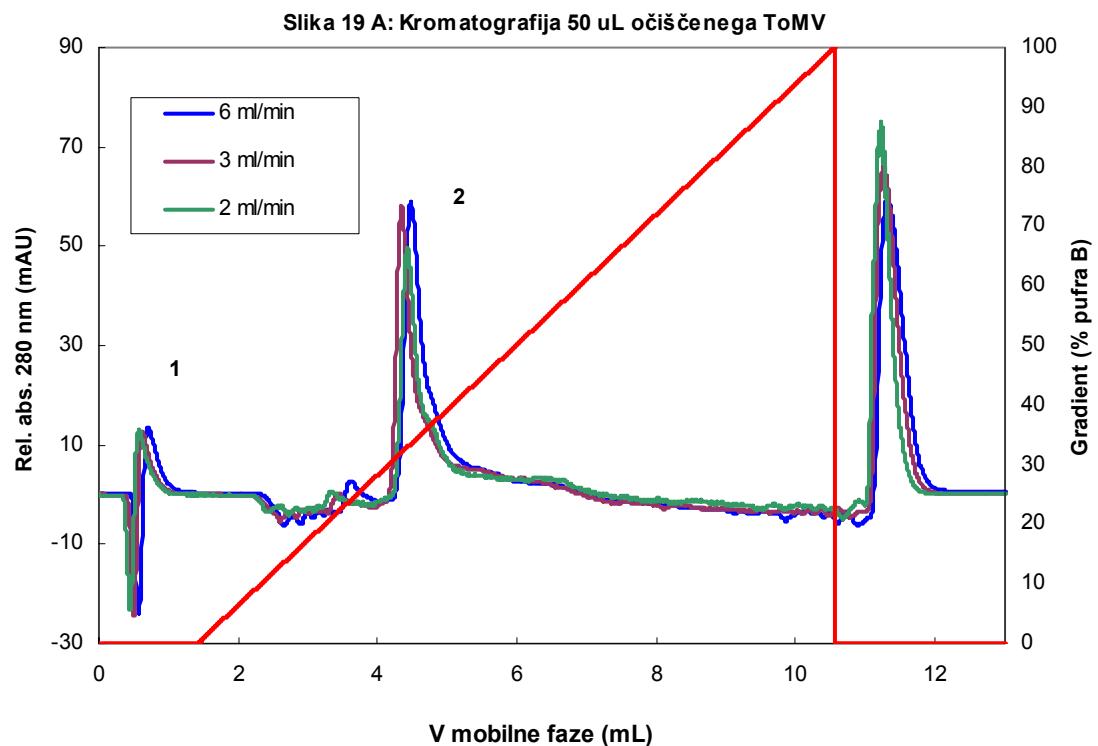
Najvišji izkoristek smo dosegli pri ločbi na CIM DEAE monolitnem disku in uporabi 20 mM fosfatnega pufra, pH 5.5 ter pri ločbi na CIM QA monolitnem disku in uporabi 20 mM natrijevega acetatnega pufra, pH 5.5. Ker smo vedeli, da pri postopku koncentriranja na CIM monolitnem nosilcu povzroča fosfatni pufer širjenje kromatografskih vrhov, smo se odločili, da bomo za koncentriranje ToMV uporabljali 20 mM natrijev acetatni pufer, pH 5.5 in CIM QA monolitni disk.

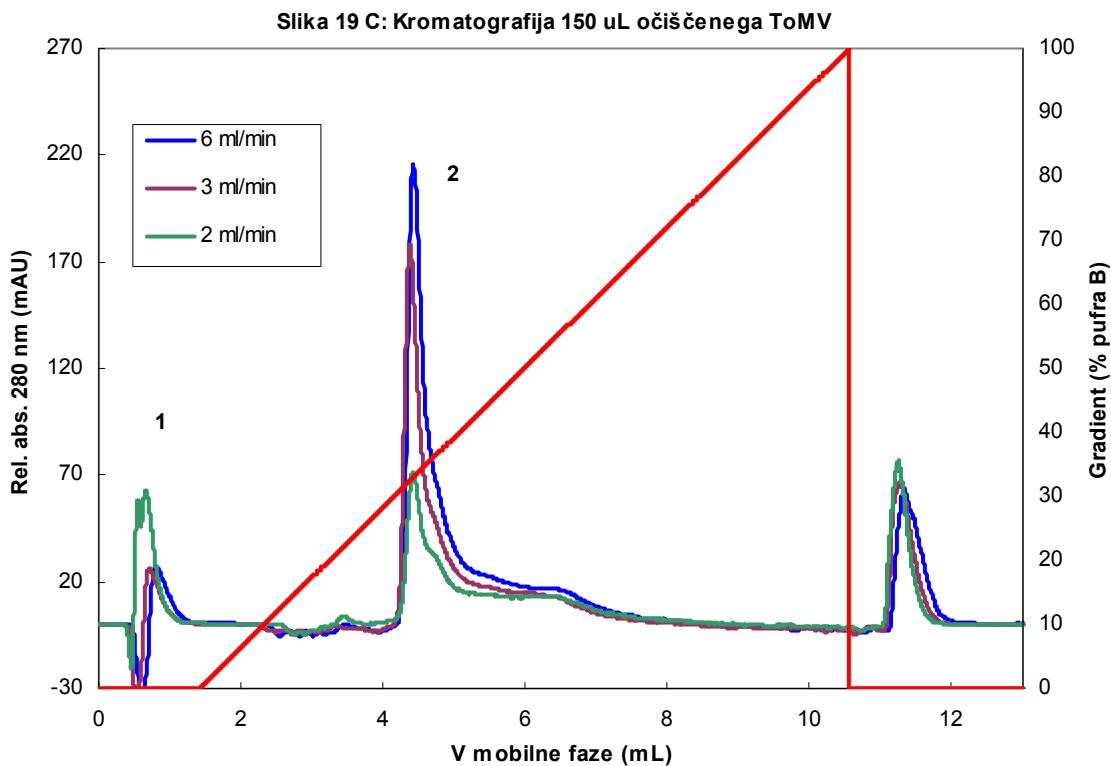
#### 4.3 VPLIV PRETKA MOBILNE FAZE IN KONCENTRACIJE ToMV V VZORCU NA KROMATOGRAFIJO ToMV

##### 4.3.1 Vpliv pretoka mobilne faze na kromatografijo ToMV

Da bi preverili, ali je kromatografija ToMV na CIM QA monolitnem disku odvisna od pretoka smo kromatografirali čist ToMV pod enakimi pogoji, pri različnih pretokih. Kromatografirali smo 50 µL (15000 ng ToMV), 75 µL (23000 ng ToMV), 100 µL (30000 ng ToMV), 125 µL (38000 ng ToMV) in 150 µL (46000 ng ToMV) čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku pri pretoku 2, 3 in 6 mL/min.

Reprezentativni kromatogrami kromatografije 50 µL očiščenega ToMV pri različnih pretokih so zelo podobni (slika 19 A). Ko se volumen vzorca nanešenega na CIM QA monolitni disk veča, se večajo razlike med kromatogrami (slika 19 B in C). Kromatogrami so prikazani tako, da je na osi x volumen mobilne faze, ki je pri vseh poskusih, ne glede na pretok, enak. Z večanjem pretoka se veča površina drugega kromatografskega vrha.

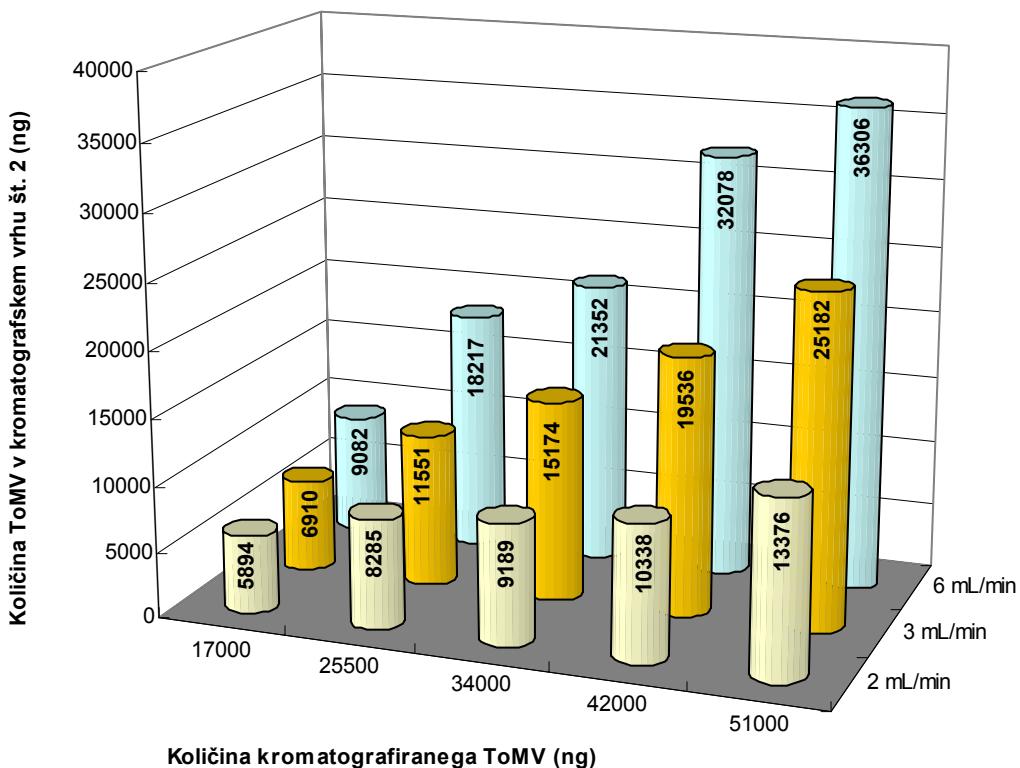




**Slika 19.** Kromatografija 50  $\mu\text{L}$  (A), 100  $\mu\text{L}$  (B) in 150  $\mu\text{L}$  (C) očiščenega ToMV pri različnih pretokih (2 mL/min, 3 mL/min in 6 mL/min) na CIM QA monolitnem disku. Pogoji: pufer A (20 mM natrijev acetat, pH 5.5), pufer B (1.5 M NaCl v pufru A), UV detekcija pri 260 nm, gradient-prikazan na sliki.

**Figure 19.** Chromatography of 50  $\mu\text{L}$  (A), 100  $\mu\text{L}$  (B) in 150  $\mu\text{L}$  (C) of purified ToMV with different flow rates (2 mL/min, 3 mL/min and 6 mL/min) on CIM QA monolithic disk. Conditions: buffer A (20 mM sodium acetate, pH 5.5), buffer B (1.5 M NaCl in buffer A), UV detection at 260 nm, gradient-as shown on the figure.

Da bi ugotovili, kaj površina kromatografskega vrha pomeni v smislu koncentracije ToMV, smo z delno kvantitativno metodo ELISA analizirali kromatografske frakcije, zbrane pri kromatografiji ToMV na CIM QA monolitnem disku (priloga G). Pri vsaki kromatografiji smo analizirali dve frakciji (prvi in drugi kromatografski vrh). Količine ToMV v drugem kromatografskem vrhu, kjer se je iz diska izprala večina ToMV pri vseh poskusih, so prikazane na sliki 20.

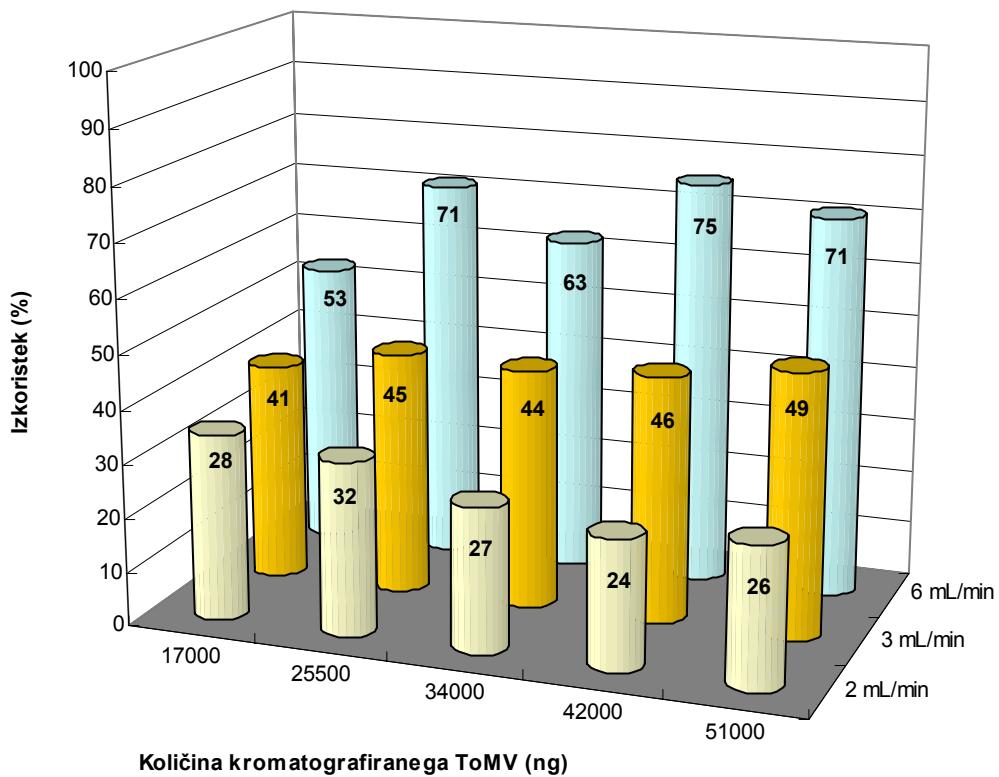


**Slika 20.** Količine ToMV v kromatografskih vrhovih št. 2 zbranih med kromatografijo različnih količin čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku, pri različnih pretokih mobilne faze. Količine ToMV so določene z delno kvantitativno metodo ELISA.

**Figure 20.** Chromatography of purified ToMV on CIM QA monolithic disk under different flow-rates: quantity of ToMV in the chromatographic peak No. 2, determined with semi quantitative ELISA.

Vpliv pretoka na kromatografijo ToMV je bolje viden na sliki 21, kjer so prikazane iste vrednosti kot na sliki 20 v odstotkih, glede na količino ToMV, ki je bila na CIM QA monolitni disk nanešena: večji pretok pomeni večjo količino ToMV v drugem kromatografskem vrhu in s tem večji izkoristek. Razlike med kromatografijo ToMV pri 2, 3 ali 6 mL/min so 10-30 %.

Kot je zapisano v uvodnem poglavju, pretok mobilne faze ne vpliva na ločljivost CIM monolitnih nosilcev. V primerjavi z delčnimi kromatografskimi nosilci je ravno v tem prednost CIM monolitnih nosilcev. Za kromatografske nosilce polnjene z delci namreč velja, da se z večanjem pretoka slabša sposobnost ločevanja na kromatografskem nosilcu.

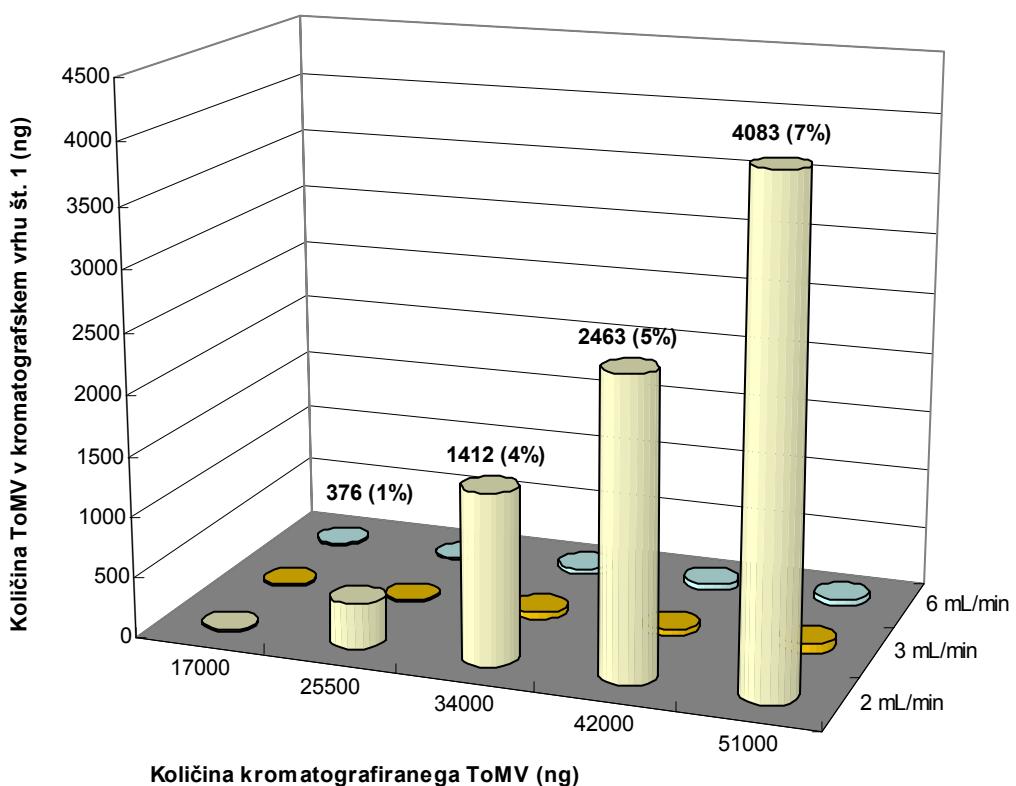


**Slika 21.** Vpliv pretoka na kromatografijo ToMV: prikazane so vrednosti ToMV v kromatografskih vrhovih št. 2 pri različnih pretokih v odstotkih, glede na količino ToMV nanešeno na CIM QA monolitni disk.

**Figure 21.** The influence of flow rate on ToMV chromatography: yield of ToMV in chromatographic peaks No. 2 using different flow rates.

Analiza kromatografije čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku pri različnih pretokih mobilne faze je pokazala, da pretok mobilne faze ne vpliva na kromatografijo virusnih delcev, vpliva pa na izkoristek: le-ta je pri večjih pretokih mobilne faze večji. Ena od hipotez bi lahko bila povezana z velikostjo virusnega delca. Ker je precej velik ( $18 \times 300$  nm) se na CIM monolitni nosilec predvidoma veže na več mestih. Predpostavljam, da je pri nižjih pretokih mobilne faze kontaktni čas virusnih delcev z nosilcem daljši, zaradi česar se lahko na nosilec veže na več mestih kot pri višjih pretokih in je zaradi tega njegova vezava na nosilec močnejša, njegovo izpiranje pa mnogo bolj težavno in povezano z razgraditvijo delca. Z delno kvantitativno ELISA smo določili tudi količino ToMV v prvem (neveznem) kromatografskem vrhu vsakega poskusa. Pri pretoku 3 ali 6 mL/min (ne

glede na količino na disk nanešenega ToMV) prvi kromatografski vrh vsebuje zelo malo ToMV (manj kot 0.3 % na disk nanešenega ToMV), pri 2 mL/min pa se količina ToMV v prvem kromatografskem vrhu veča z večanjem na disk nanešenega ToMV (slika 22). To dejstvo postavlja pod vprašanje predpostavko o vezavi virusnih delcev na kromatografski nosilec, saj bi glede na predpostavko pričakovali, da bo prišlo do preboja virusnih delcev kvečjemu pri večjih pretokih. Kljub povečanju vsebnosti ToMV v teh frakcijah, pomeni to v odstotkih glede na količino nanešenega ToMV na disk zelo malo (1-7 %), kar verjetno predstavlja napako delno kvantitativne metode ELISA, s katero smo analizirali omenjene kromatografske frakcije.

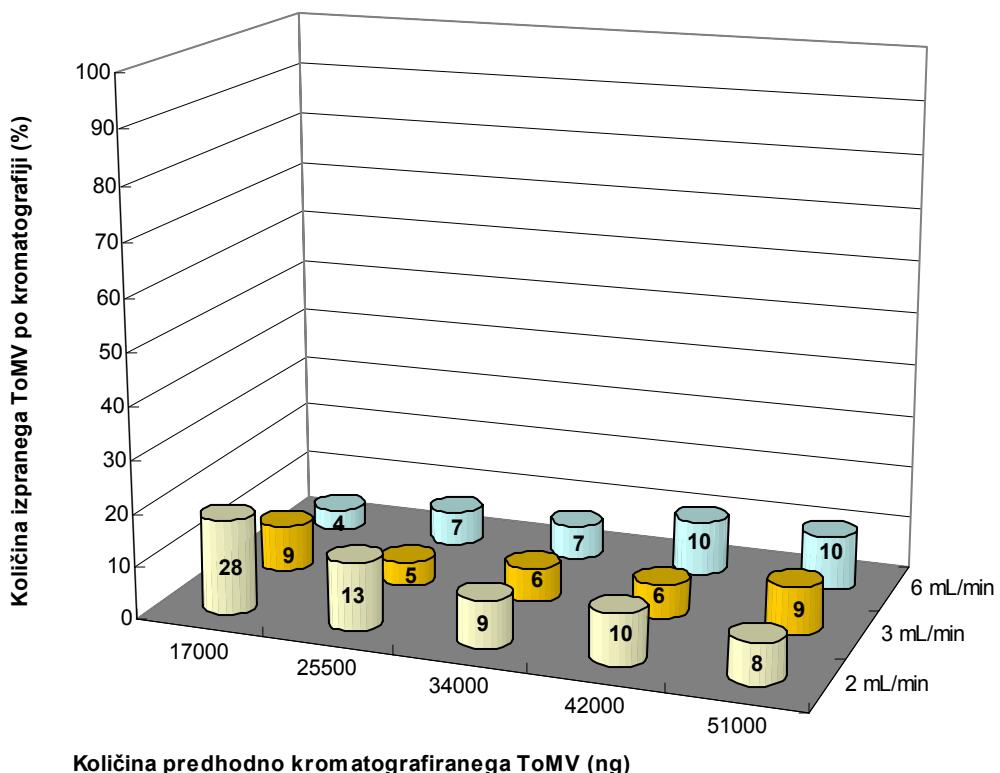


**Slika 22.** Količine ToMV v kromatografskih vrhovih št. 1 zbranih med kromatografijo čistega ToMV na CIM QA monolitnih diskih, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.

**Figure 22.** Quantity of ToMV in chromatographic peaks No. 1 collected during the chromatography of purified ToMV on CIM QA monolithic disk, determined with semi quantitative ELISA.

Ker je seštevek izkoristkov ToMV v prvem in drugem kromatografskem vrhu manjši od 100 %, nas je zanimalo, kje se nahaja preostali ToMV.

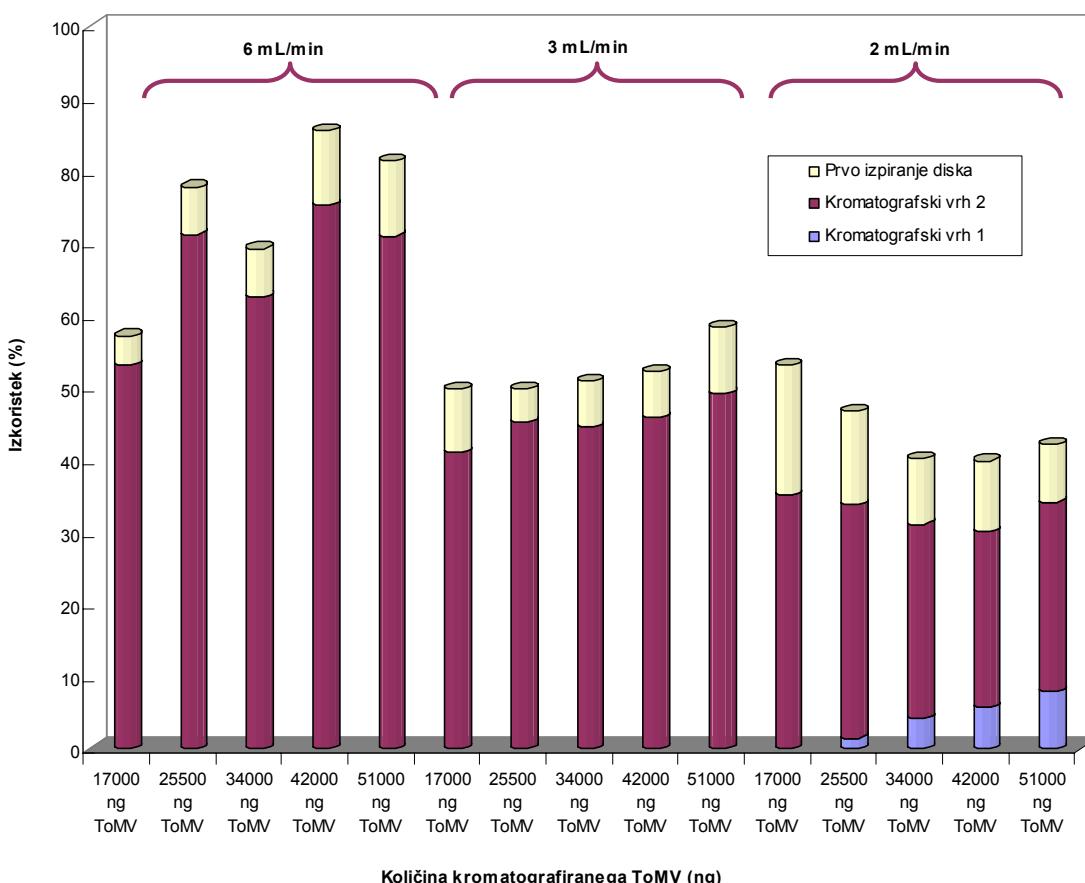
Po vsaki kromatografiji čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku smo disk večkrat izmenično izpirali s pufrom A in B. Ko smo disk izprali s pufrom B prvič, smo ulovili elucijsko frakcijo in jo analizirali z delno kvantitativno metodo ELISA. Na sliki 23 so prikazane količine ToMV v teh vzorcih (v odstotkih, glede na predhodno količino na disk nanešenega ToMV) po vsaki kromatografiji ToMV pri določenem pretoku. Delež ToMV v frakcijah prvega izpiranja diska po kromatografiji je v povprečju nižji pri večjem pretoku mobilne faze, kar potrjuje predpostavko o načinu vezave ToMV na disk v odvisnosti od pretoka.



**Slika 23.** Količine ToMV v vzorcih, zbranih pri prvem spiranju diskov z elucijskim pufrom po dejanski kromatografiji ToMV, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.

**Figure 23.** Quantity of ToMV in the fraction, collected during the elution of the disk with the elution buffer, after the chromatography of ToMV on CIM QA monolithic disk, determined with semi quantitative ELISA.

Iz slike 23 je razvidno, da po kromatografiji ToMV na CIM QA monolitnem disku v linearinem gradientu, nekaj ToMV ostane na disku. Del vezanega ToMV lahko z elucijskim pufom iz diska izperemo, vendar ne vsega, saj se števek odstotkov ToMV v frakcijah zbranih med kromatografijo in frakcijo zbrano po kromatografiji pri izpiranju z elucijskim pufom še vedno ni enak 100 (slika 24).

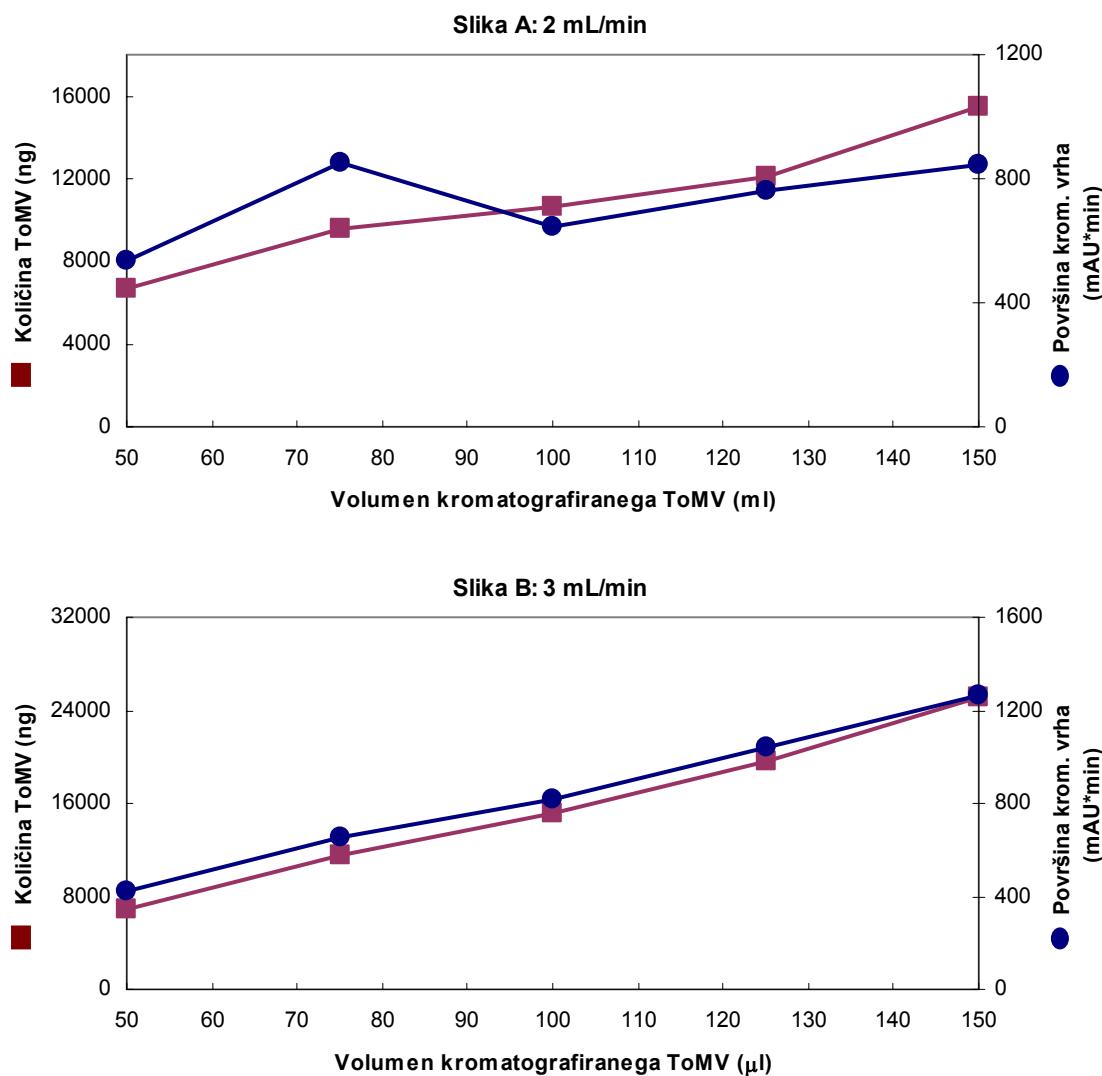


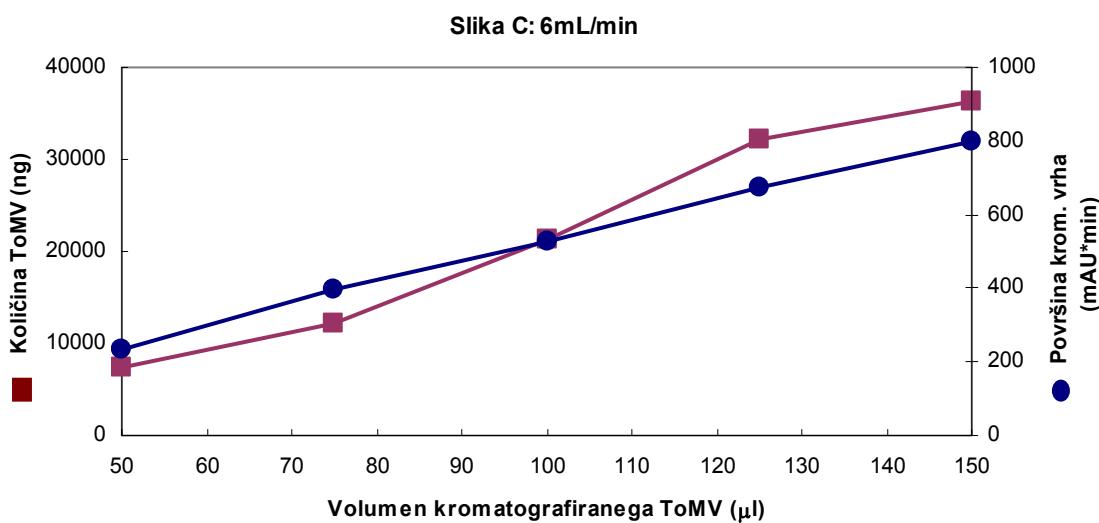
**Slika 24.** Prikaz vsebnosti ToMV v frakcijah, zbranih pri kromatografiji različnih količin čistega ToMV pri različnih pretokih in v frakciji spiranja diska z elucijskim pufom po kromatografiji.

**Figure 24.** Yield of ToMV in the fractions, collected during and after the chromatography of different amount of purified ToMV using different flow rates on CIM QA monolithic disk.

Ker smo v zgoraj opisanih poskusih kromatografirali očiščen ToMV, smo želeli ugotoviti ali je možno oceniti koncentracijo ToMV na podlagi površine kromatografskega vrha.

Primerjava med površino drugega kromatografskega vrha in količino ToMV v tem vrhu (določena z delno kvantitativno metodo ELISA) je prikazana na sliki 25. Meritvi se dokaj dobro ujemata kar pomeni, da lahko količino ToMV v določenem kromatografskem vrhu ocenimo iz njegove površine. Seveda le ob predpostavki, da nobena od komponent pufrskega sistema ne prispeva k absorbanci, ki jo vidimo na kromatogramu.





**Slika 25.** Primerjava meritev površine kromatografskega vrha št. 2 pri kromatografiji čistega ToMV na CIM QA monolitnem disku pri pretoku 2 mL/min (A), 3 mL/min (B) in 6 mL/min (C) in količine ToMV v tem kromatografskem vrhu (določene z delno kvantitativno metodo ELISA).

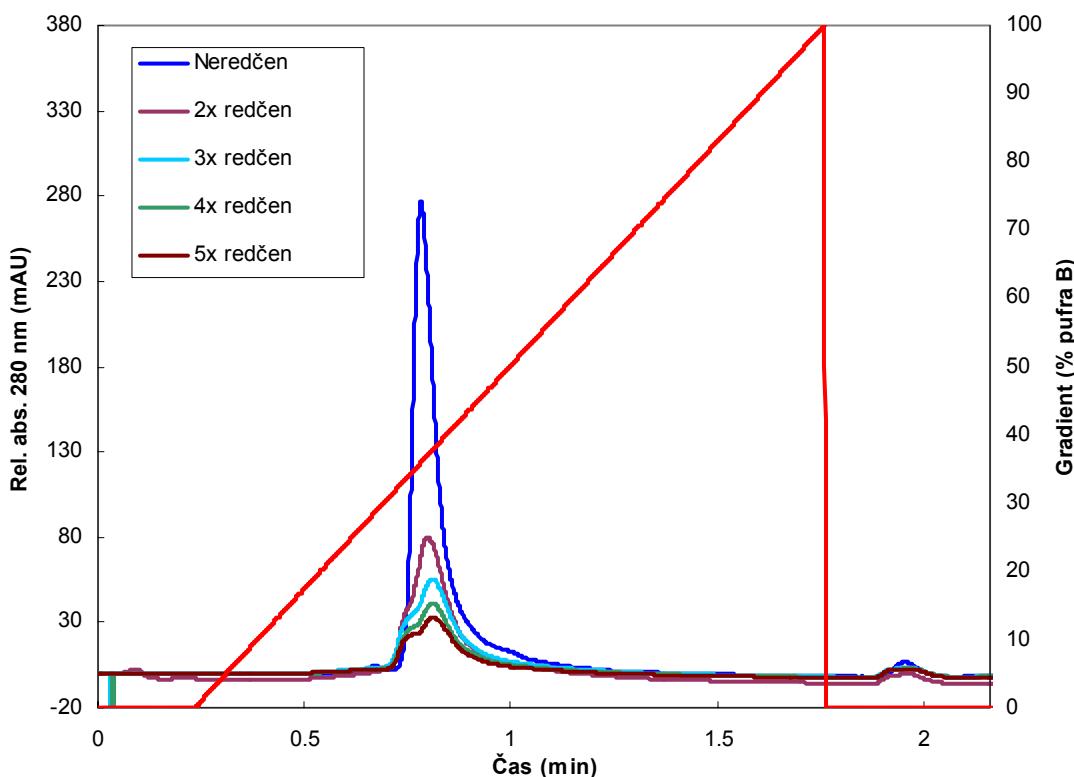
**Figure 25.** Comparison of the chromatographic peak area No. 2 and quantity of ToMV in the same peak (determined with semi quantitative ELISA) after the chromatography of purified ToMV on CIM QA monolithic disk using different flow rates: 2 mL/min (A), 3 mL/min (B) and 6 mL/min (C).

#### 4.3.2 Vpliv koncentracije ToMV v vzorcu na kromatografijo ToMV

Vpliv koncentracije virusa v vzorcu na kromatografijo smo ugotavljali s kromatografijo čistega ToMV (v 20 mM natrijevem acetatu, pH 5.5, s koncentracijo 0.6 mg ToMV/mL), ki smo ga 2x, 3x, 4x in 5x redčili v 20 mM natrijevem acetatu, pH 5.5 na CIM QA monolitnem disku. Vedno smo na CIM QA monolitni disk nanesli enak volumen (200 μL) različno redčenega vzorca ToMV. Pretok (6 mL/min), linearni gradient in puferski sistem so bili enaki pri vseh poskusih. Vsaka kromatografska ločba je bila izvedena v dveh ponovitvah, na sliki 26 so prikazani reprezentativni kromatogrami.

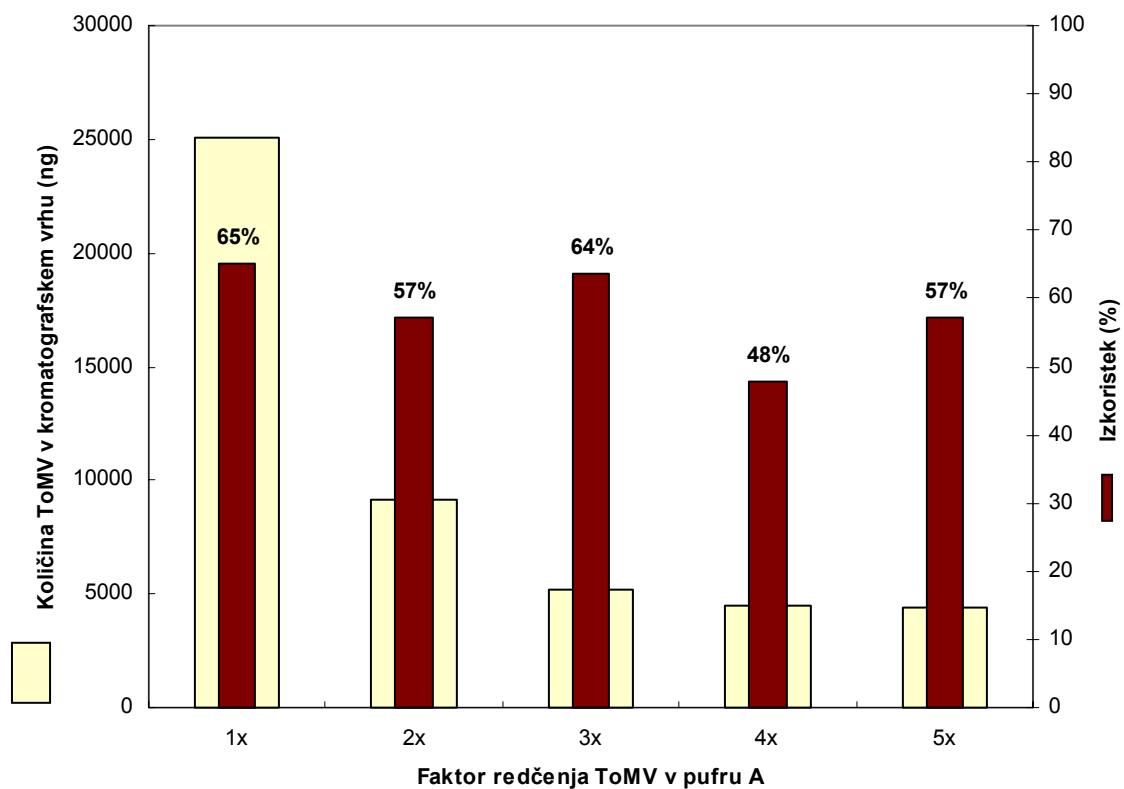
Z delno kvantitativno metodo ELISA smo v vseh kromatografskih vrhovih določili količino ToMV in izračunali kolikšen delež ToMV se nahaja v kromatografskem vrhu glede na celotno količino na disk nanejenega ToMV. Izkoristki so med 48 % in 65 %

(slika 27). Glede na dejstvo, da je metoda, s katero smo analizirali na disk nanešene vzorce (različno redčen ToMV) in kromatografske vrhove samo delno kvantitativna, bi lahko rekli, da so izkoristki pri kromatografijah, ne glede na koncentracijo ToMV v vzorcu, primerljivi in da koncentracija ToMV v vzorcu na kromatografijo nima večjega vpliva.



**Slika 26.** Kromatogrami neredčenega in v pufru A redčenega čistega ToMV na CIM QA monolitnem diskusu. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, UV detekcija pri 280 nm, pretok 6 mL/min, gradient prikazan na sliki.

**Figure 26.** Chromatography of non-diluted and with buffer A diluted purified ToMV on CIM QA disk monolithic column. Conditions: buffer A: 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5; buffer B: 1.5 M sodium chloride in buffer A; UV detection at 280 nm, flow rate 6 mL/min, gradient: as noted on the figure.



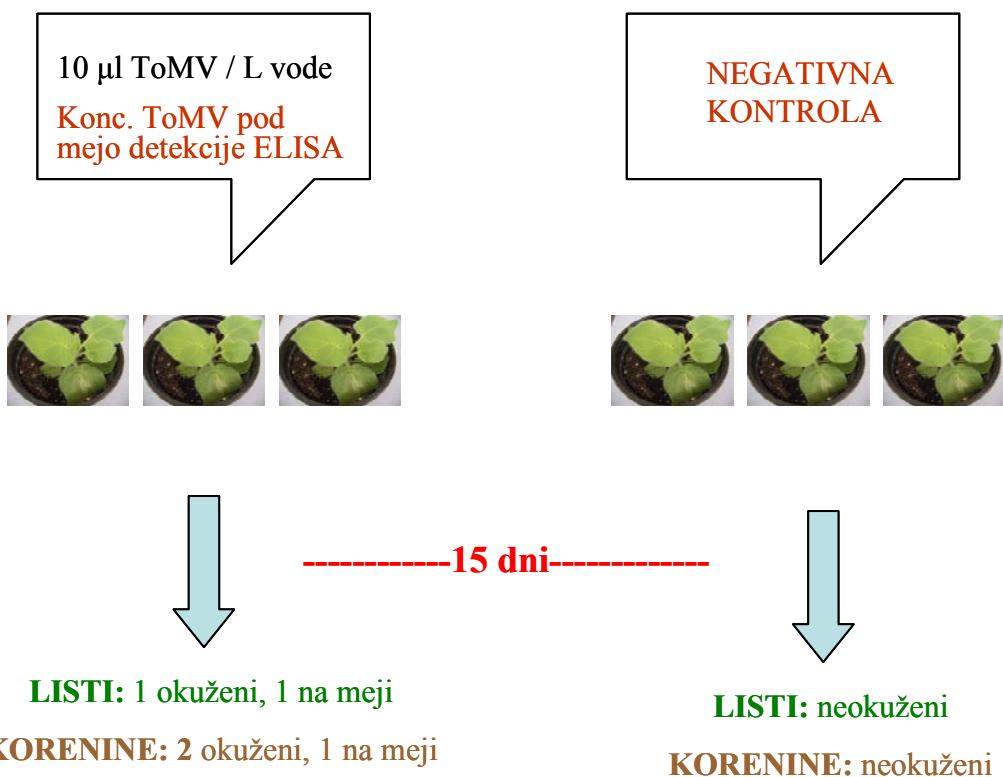
**Slika 27.** Količina ToMV v kromatografskem vrhu pri kromatografiji 20 µL čistega ToMV v 20 mM natrijevem acetatnem pufru, pH 5.5 z različno koncentracijo na CIM QA monolitnem disku. Prikazani so tudi izkoristki za vsako kromatografijo. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A.

**Figure 27.** Quantity of ToMV in the second peak collected during the elution of ToMV from CIM QA disk monolithic column after the chromatography of differently diluted ToMV on CIM QA disk monolithic column and yields in these experiments. Loading buffer (20 mM sodium acetate, pH 5.5) and elution buffer (loading buffer with 1.5 M NaCl, pH 5.5).

#### 4.4 OKUŽBA RASTLIN PREKO KORENINSKEGA SISTEMA

Preveriti smo žeeli ali lahko ToMV okuži rastline preko koreninskega sistema, če testne rastline *Nicotiana clevelandii* zalivamo z vodo, kateri dodamo ToMV. Kot je opisano v poglavju Material in metode smo tri rastline *N. clevelandii* 15 dni zalivali z vodo, ki smo ji dodali 10 µL čistega ToMV/1L vode. Koncentracija ToMV v vodi je bila pod mejo

detekcije ELISA. Vzporedno smo tri rastline *N. clevelandii* zalivali z vodo brez dodanega ToMV.



**Slika 28.** Shematski prikaz preverjanja sposobnosti ToMV, da okuži rastline *N. clevelandii* preko koreninskega sistema.

**Figure 28.** Schematical drawing of the exsperiment: is ToMV capable of infecting *N. clevelandii* plants through the root system.

Po 15 dnevih smo pobrali liste in korenine vseh rastlin in z delno kvantitativno metodo ELISA preverili ali je v rastlinah prisoten ToMV. Prisotnost ToMV v rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo z dodanim ToMV smo dokazali v koreninah pri dveh rastlinah, pri eni rastlini je bila vsebnost ToMV v koreninah na meji detekcije metode ELISA. Ugotovili smo tudi prisotnost ToMV v listih ene rastline, pri eni rastlini je bila vsebnost ToMV na meji detekcije metode ELISA, v listih ene rastline pa prisotnosti ToMV nismo mogli dokazati. Pri kontrolnih rastlinah, ki smo jih zalivali z vodo brez dodanega ToMV, prisotnosti ToMV v listih in koreninah nismo mogli določiti (preglednica 2). V listih in koreninah rastlin, kjer je bila vsebnost ToMV na meji detekcije ELISA, je bila OD

vrednost vzorcev sicer višja od OD vrednosti negativnih kontrol, vendar ne 2x višja, kar je potrebno, da nedvoumno dokažemo prisotnost virusnih delcev. Predpostavimo lahko, da bi prisotnost virusnih delcev lahko nedvoumno dokazali, če bi korenine in liste rastlin pobrali nekaj dni kasneje.

Rezultati kažejo, da je ToMV uspešno okužil korenine in liste *N. clevelandii*, čeprav je bila količina ToMV dodana v vodo, ki smo jo uporabljali za zalivanje teh rastlin pod mejo detekcije ELISA. S tem smo potrdili že objavljene ugotovitve, da lahko nekateri virusi okužijo rastline skozi koreninski sistem (Koenig, 1986 in Van Dorst, 1969, cit. po Tomlinson in sod., 1983), čeprav so v vodi prisotni v tako nizkih koncentracijah, da z diagnostičnimi metodami njihove prisotnosti ne moremo dokazati (Koenig, 1986, Horvath s sod., 1999 in Van Dorst, 1988). Ta poskus nazorno kaže, da moramo potencialno prisotne viruse, ki se nahajajo v vodi za zalivanje rastlin v zelo nizkih koncentracijah, pred uporabo standardnih laboratorijskih metod koncentrirati, da omogočimo njihovo detekcijo.

**Preglednica 2.** Koncentracije ToMV v listih in koreninah rastlin zalivanih z vodo z in brez dodanega ToMV, določene z delno kvantitativno metodo ELISA.

**Table 2.** Results of ToMV detection (by semi quantitative ELISA) in leaves and roots of *N. clevelandii* plants after watering of the plants with water with and without ToMV.

	10 µL ToMV / L vode		Voda brez ToMV	
	OD (ELISA)	Konc. ToMV (ng/mL)	OD (ELISA)	Konc. ToMV (ng/mL)
<b>Voda za zalivanje</b>	0.183	1.6	0.159	1.5
<b>Listi</b>	Rastlina 1	1.352	6.2	0.179
	Rastlina 2	0.426	2.1	0.177
	Rastlina 3	0.170	1.5	0.180
<b>Korenine</b>	Rastlina 1	2.192	16.8	0.175
	Rastlina 2	1.081	4.5	0.182
	Rastlina 3	0.387	2.0	0.243

## 4.5 KONCENTRIRANJE CMV IN ToMV IZ VZORCEV Z NIZKO KONCENTRACIJO VIRUSA

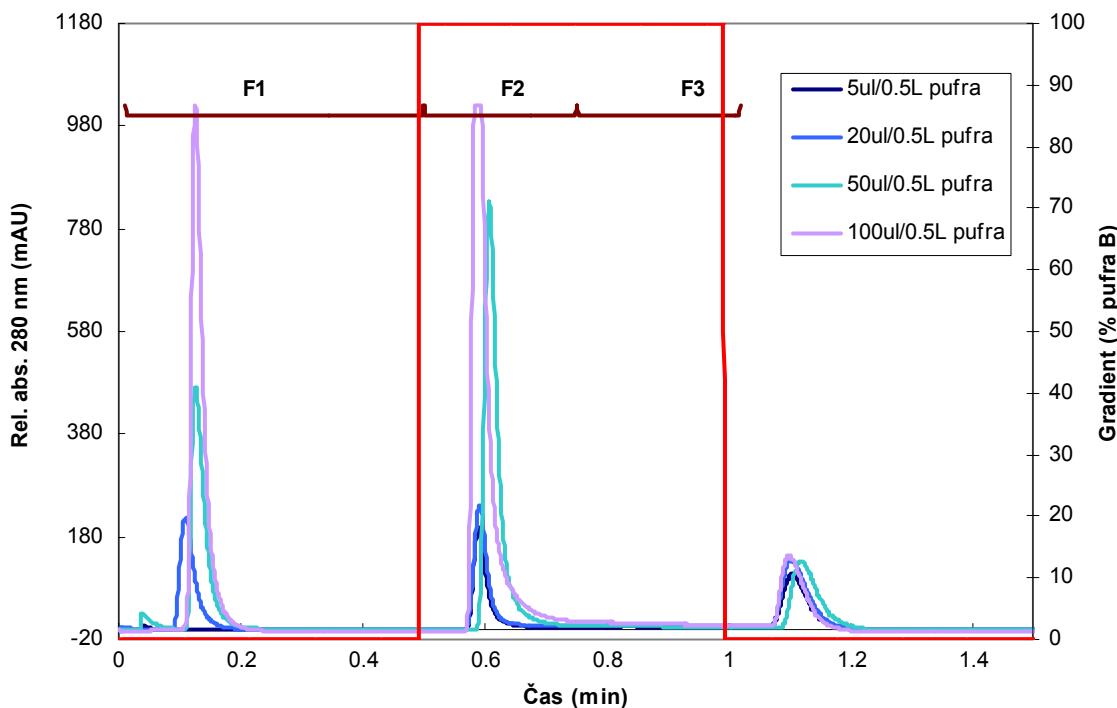
### 4.5.1 Koncentriranje CMV iz pufra

#### 4.5.1.1 Priprava redčin

Z delno očiščenim CMV smo pripravili 5 redčin z različno koncentracijo CMV: v 500 mL veznega pufra (20 mM Tris-HCl, pH 8) smo dodali 5 µl (1100 enot CMV), 20 µl (5400 enot CMV), 50 µl (11600 enot CMV) in 100 µl (24800 enot CMV) delno očiščenega CMV. Koncentracije CMV v posameznih redčinah so bile torej: 2.2 CMV enoti / mL pufra, 10.8 CMV enot / mL pufra, 23.2 CMV enot / mL pufra in 49.6 CMV enot / mL pufra.

#### 4.5.1.2 Koncentriranje CMV iz pufra na CIM DEAE monolitnem disku

Redčine (0.5 L 20 mM Tris-HCl pufra z določeno količino delno očiščenega CMV, kakor je opisano v poglavju 4.5.1.1) smo nalagali na CIM DEAE monolitni disk pri pretoku 8 mL/min in zbirali vse kar je iz diska priteklo (nevezna frakcija). Po nalaganju vzorca smo disk sprali z veznim pufrom, pufrom A (pri tem so se iz diska izprale morebitne nečistoče), nato z elucijskim pufrom, pufrom B (v tem koraku se je iz diska izprala večina CMV) in na koncu z veznim pufrom, da se je iz diska izprala sol. Disk smo izpirali pri pretoku 6 mL/min, tekom izpiranja diska smo zbrali 3 frakcije. Koncentriranje iz vsake pripravljene redčine z določeno koncentracijo CMV je bilo narejeno v dveh ponovitvah. Reprezentativni kromatogrami izpiranja diska po nalaganju različnih redčin ter zbiranje frakcij za kasnejšo analizo so prikazani na sliki 29. Pričakovali smo, da se bo v drugih kromatografskih frakcijah nahajala večina CMV, kar bi omogočilo določanje CMV z delno kvantitativno metodo ELISA, ki pred koncentriranjem na CIM DEAE monolitnem disku ni bila možna. V prvih kromatografskih frakcijah CMV nismo pričakovali, kromatografski vrhovi v teh frakcijah predstavljajo skupno absorbanco iz diska izpranih nečistoč (prisotnih v delno očiščenem virusnem pripravku, s pomočjo katerega smo pripravili redčino). Da bi potrdili ali ovrgli zgornje predpostavke, smo frakcije vseh poskusov analizirali z delno kvantitativno metodo ELISA.



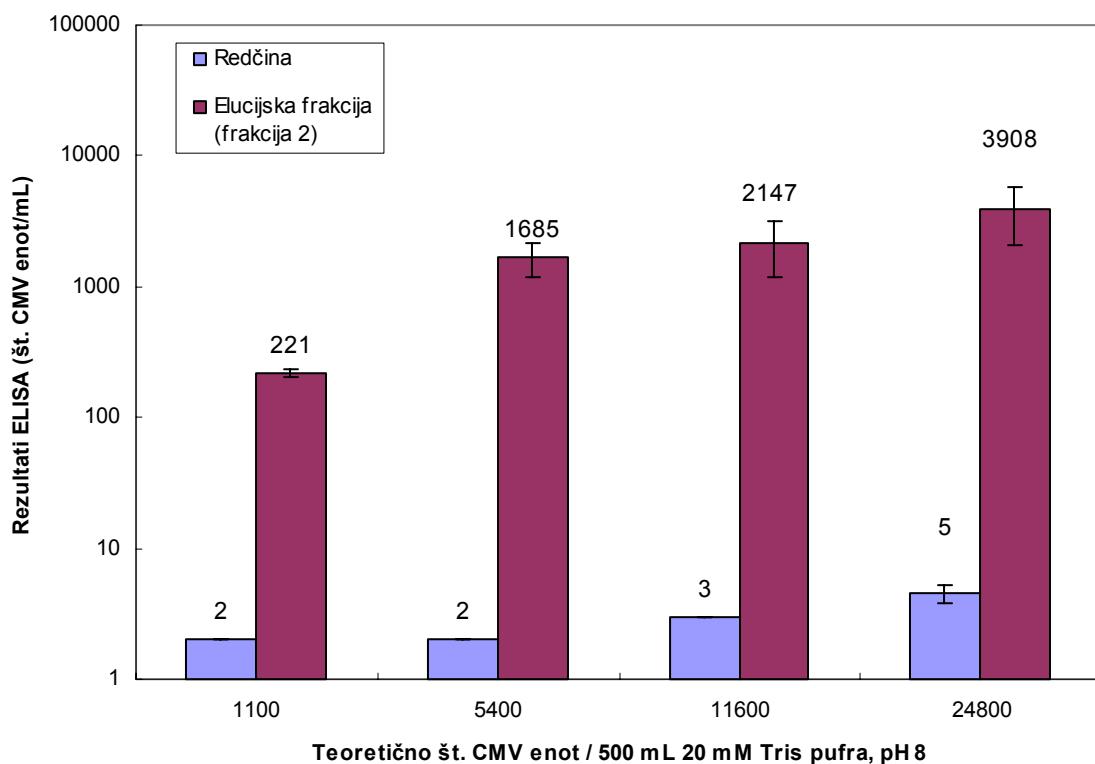
**Slika 29.** Koncentriranje CMV iz redčin pripravljenih z veznim pufrom (pufrom A) in delno očiščenim CMV (5, 20, 50 in 100  $\mu$ L CMV/0.5 L 20 mM Tris-HCl pufra, pH 8) na CIM DEAE monolitnem disku. Pufer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pretok: 6 mL/min, UV detekcija pri 280 nm, gradient prikazan na sliki.

**Figure 29.** Concentration of CMV from samples prepared with loading buffer (5, 20, 50 and 100  $\mu$ L of semi purified CMV / 0.5 L of buffer A) using CIM QA disk monolithic column. Conditions: buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A; flow-rate: 6 mL/min, UV detection at 280 nm, gradient: as noted on the Figure.

#### 4.5.1.3 Kvantifikacija CMV v kromatografskih frakcijah z DAS ELISA

Vzorce redčin, nevezne frakcije in elucijske frakcije smo analizirali z delno kvantitativno metodo ELISA. Spodnja meja detekcije CMV v »CMV enotah« je približno 4 CMV enote/mL. Dvakratna povprečna izmerjena optična gostota treh negativnih kontrol je enaka optični gostoti vzorca, ki vsebuje 4 CMV enote/mL. Razen v redčini, kjer smo 0.5 L 20 mM Tris-HCl pufra, pH 8 dodali 100  $\mu$ L delno očiščenega CMV z metodo ELISA, ni bilo možno določiti prisotnosti CMV, prav tako prisotnosti CMV nismo določili v vzorcih neveznih frakcij. Količina CMV v redčinah in v elucijskih frakcijah (frakcijah 2) je

prikazana na sliki 30, v prilogi H pa so prikazane meritve (optične gostote) za vse vzorce (redčine, nevezane frakcije in kromatografske frakcije) analizirane z delno kvantitativno metodo ELISA.



**Slika 30.** Koncentracije CMV (določenih z ELISA) v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju na CIM DEAE monolitnem disku.

**Figure 30.** Concentration of CMV (assessed with semi quantitative ELISA) in diluted samples and elution fractions after the concentration of CMV from these samples on CIM DEAE disk monolithic column.

Iz podatkov prikazanih na sliki 30 smo izračunali izkoristke, dosežene pri koncentriranju CMV na CIM DEAE monolitnem disku ter faktor koncentriranja. Izkoristki koncentriranja so med 30 in 60 %, faktor koncentriranja pa 80-170x. Gornji podatki povedo, da smo iz redčin, kjer detekcija CMV ni bila možna, na CIM DEAE monolitnem disku skoncentrirali virus za dva velikostna razreda in s tem omogočili detekcijo CMV z delno kvantitativno metodo ELISA.

#### 4.5.1.4 Testiranje infektivnosti CMV

Infektivnost CMV v elucijskih frakcijah smo preverjali na testnih rastlinah *Chenopodium quinoa*. Liste testnih rastlin smo posuli s karborundom in na vsaki rastlini inokulirali 3 liste z elucijsko frakcijo, redčeno v pufru za mehansko inokulacijo. Negativna kontrola so bile testne rastline inokulirane s pufrom za mehansko inokulacijo brez dodanega virusa, pozitivna kontrola pa so bile testne rastline, inokulirane z delno očiščenim CMV v pufru za mehansko inokulacijo. 10 dni po inokulaciji smo pregledali liste testnih rastlin, vendar bolezenski znaki niso bili vidni. Predvideli sem 3 možne vzroke za izgubo infektivnosti CMV po koncentriranju na CIM DEAE monolitnem disku:

- vpliv temperature oz. časa, ki ga CMV preživi pri sobni temperaturi, preden ga naložimo na disk,
- vpliv NaCl v elucijskem pufru ali
- vpliv HPLC sistema oz. vpliv strižnih sil, katerim je izpostavljen CMV pri prehodu skozi HPLC sistem.

Da bi ugotovili, zakaj CMV po koncentriranju na CIM DEAE monolitnem disku ni več infektiven, smo naredili spodaj opisane poskuse.

##### ➤ Vpliv časa preživetega na sobni temperaturi na infektivnost CMV

Delno očiščen virusni pripravek smo inkubirali pri sobni temperaturi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 in 50 ur, ga nato redčili v pufru za mehansko inokulacijo ter inokulirali s karborundom posute liste testnih rastlin *C. quinoa*. 10 dni po inokulaciji so bili na vseh rastlinah vidni bolezenski znaki. Sobna temperatura torej nima vpliva na infektivnost CMV.

##### ➤ Vpliv NaCl v elucijskem pufru na infektivnost CMV

V veznem pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8) smo pripravili naslednje koncentracije NaCl: 0.5 M NaCl, 0.75 M NaCl, 1 M NaCl, 1.25 M NaCl in 1.5 M NaCl. 1 mL pufra z določeno koncentracijo NaCl smo dodali 100 µL delno očiščenega virusnega klarifikata in inokulirali s karborundom posute liste testnih rastlin. Po 10 dnevih so bili na vseh rastlinah vidni bolezenski znaki, razen na rastlini, ki je bila inokulirana s CMV v 20 mM Tris-HCl

pufru z 1.5 M NaCl, pH 8. 1.5 M NaCl torej vpliva na virusne delce CMV in virus izgubi sposobnost okužbe testne rastline.

➤ Vpliv sistema in ohišja na infektivnosti CMV

Delno očiščen virusni pripravek smo redčili v veznem pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8). Polovico smo ga prečrpali skozi celoten HPLC sistem, v katerega je bilo vezano ohišje za CIM monolitni disk, vendar v ohišju ni bilo diska. Liste testnih rastlin smo inokulirali z vzorcem, ki je pritekel skozi HPLC sistem in ohišje ter z vzorcem, ki ni šel skozi sistem in ohišje. Lokalne lezije so se 10 dni po inokulaciji razvile le na rastlini, okuženi z vzorcem, ki ni šel skozi sistem in ohišje.

Iz zgoraj opisanih rezultatov sledi, da CMV izgubi infektivnost bodisi zaradi NaCl v elucijskem pufru in / ali zaradi strižnih sil, katerim je izpostavljen pri prehodu skozi HPLC sistem. Iz literature je razvidno, da je CMV relativno labilen virus (Koenig, 1986). Očiščen CMV je posebej občutljiv na pufre z visoko ionsko jakostjo, ki vplivajo na interakcijo med virusno RNK in proteini, pomembno za integrirato virusnih delcev (Fauquet, 2005). Ker je za določene aplikacije potrebno, da virus obdrži infektivnost, smo se odločili, da nadaljujemo delo z drugim modelnim virusom, ki je bolj stabilen. Delo z modelnim virusom CMV smo na tej točki zaključili. S poskusi smo dokazali, da s CIM monolitnimi diskami uspešno koncentriramo virusne proteine, tudi če niso združeni v virusne delce.

#### **4.5.2 Koncentriranje ToMV iz pufra in vodovodne vode na CIM QA monolitnih diskih**

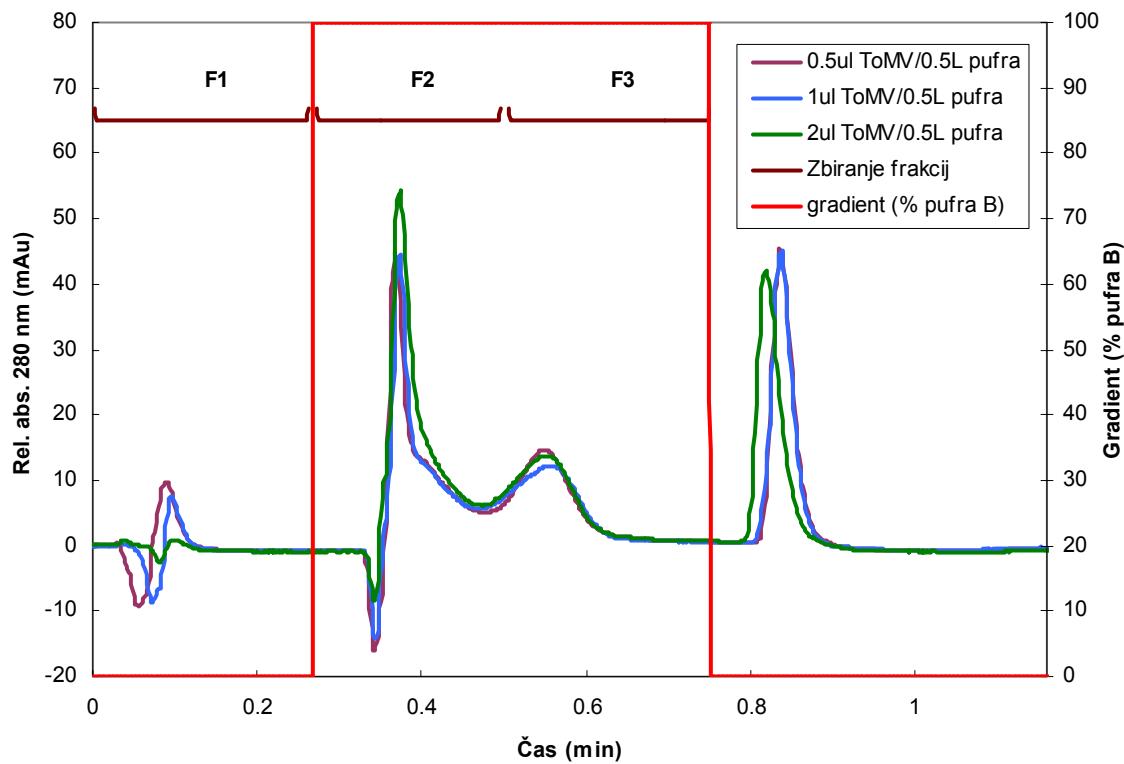
##### **4.5.2.1 Priprava redčin**

Redčine iz katerih smo koncentrirali ToMV, smo pripravili z veznim pufrom (20 mM natrijev acetat, pH 5.5), kateremu smo dodali različne volumne očiščenega ToMV s koncentracijo 0.5 mg/mL. V 500 mL veznega pufra smo dodali 0.5 µL ToMV (250 ng ToMV), 1 µL ToMV (500 ng ToMV) oz. 2 µL ToMV (1000 ng ToMV). Teoretične koncentracije ToMV v redčinah so bile torej: 0.5 ng ToMV/mL, 1 ng ToMV/mL oz. 2 ng

ToMV/mL pufra. Redčine z enakimi koncentracijami ToMV smo pripravili tudi v vodovodni vodi. V 496 mL vodovodne vode smo najprej dodali 4 mL 2.5 M natrijevega acetata, pH 5.5, tako da je bila končna koncentracija natrijevega acetata 20 mM, nato smo dodali čisti ToMV (0.5 µL, 1 µL oz. 2 µL) s koncentracijo 0.5 mg/mL.

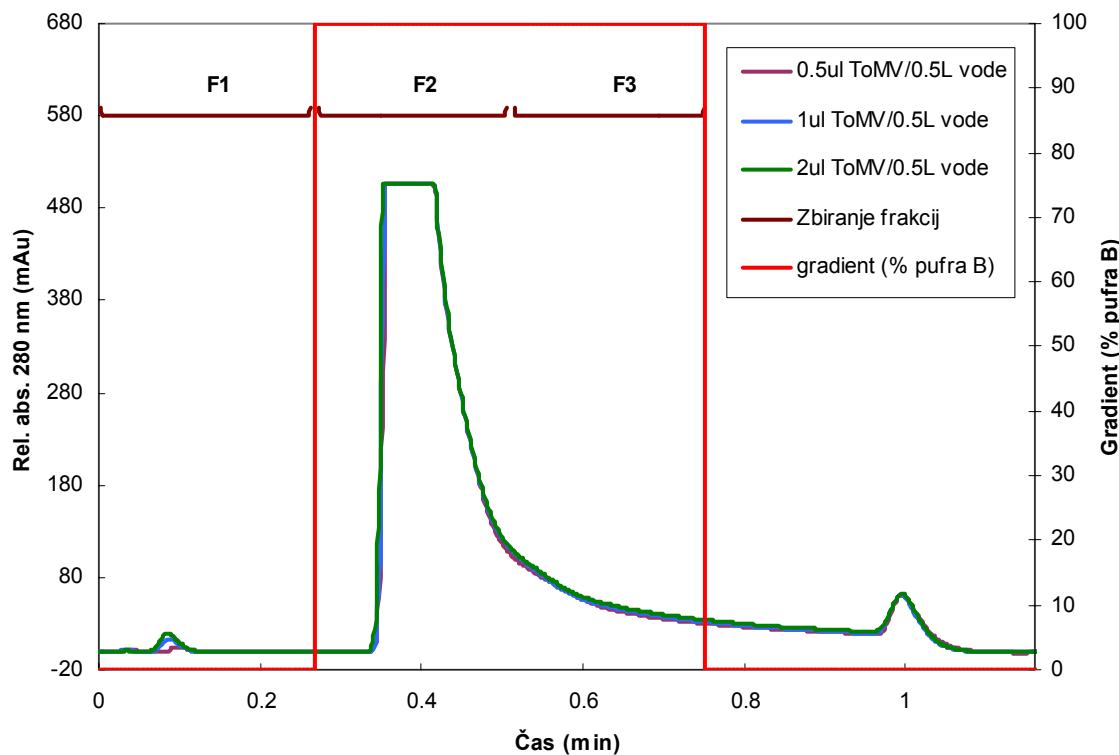
#### 4.5.2.2 Koncentriranje ToMV iz pufra in vode na CIM QA monolitnem disku

Redčine pripravljene z veznim pufrom ali z vodovodno vodo smo nalagali na CIM QA monolitni disk pri pretoku 8 mL/min in zbirali vse, kar je priteklo skozi disk (nevezna frakcija, angl. flow through). Po nalaganju redčine smo disk sprali najprej z veznim pufrom (pri tem so se iz diska izprale morebitne nečistoče), nato z elucijskim pufrom (v tem koraku se je iz diska izprala večina ToMV) in na koncu spet z veznim pufrom, da se je iz diska izprala sol. Disk smo izpirali pri pretoku 6 mL/min, tekom izpiranja smo zbrali 3 frakcije. Kromatogrami izpiranja diska po nalaganju različnih redčin ter zbiranje frakcij za kasnejšo analizo so prikazani na sliki 31 in sliki 32.



**Slika 31.** Koncentriranje ToMV iz redčin pripravljenih z veznim pufrom (20 mM natrijev acetatni pufer, pH 5.5) in očiščenim ToMV (0.5, 1 in 2  $\mu$ L ToMV / 0.5 L pufra) na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pretok: 6mL/min, UV detekcija pri 280 nm, gradient prikazan na sliki.

**Figure 31.** Concentration of ToMV from samples prepared with loading buffer (0.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L and 2  $\mu$ L of purified ToMV / 0.5 L of buffer A) using CIM QA disk monolithic column. Conditions: buffer A: 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5; buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A; flow-rate: 6 mL/min, UV detection at 280 nm, gradient: as noted on the Figure.



**Slika 32.** Koncentriranje ToMV iz redčin pripravljenih z vodovodno vodo (4996 mL vodovodne vode z dodanimi 4 mL 2.5 M natrijevega acetata, pH 5.5) in očiščenim ToMV (0.5, 1 in 2  $\mu$ L ToMV / 0.5 L) na CIM QA monolitnem diskusu. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pretok: 6 mL/min, UV detekcija pri 280 nm, gradient prikazan na sliki.

**Figure 32.** Concentration of ToMV from samples prepared with tap water (0.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L and 2  $\mu$ L of purified ToMV / 0.5 L of tap water with sodium acetate, pH 5.5) using CIM QA disk monolithic column. Conditions: buffer A: 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5; buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A; flow-rate: 6 mL/min, UV detection at 280 nm, gradient: as noted on the Figure.

Absorbanca pri 280 nm, ki je prikazana na sliki 32, je seštevek absorbance virusnih delcev in drugih neznanih komponent prisotnih v pufru ali vodovodni vodi, ki so se koncentrirale na CIM QA monolitnem diskusu in se iz njega izprale skupaj z virusnimi delci. Količina teh komponent v vodovodni vodi je mnogo večja (relativna absorbanca kromatografskega vrha je približno 500 mA), kakor v pufru (relativna absorbanca je le 55 mA). Zaradi

prisotnosti teh komponent v pufru in še bolj v vodovodni vodi ni možno določiti koncentracije ToMV iz kromatogramov. Zaradi tega smo koncentracije ToMV v redčinah, neveznih frakcijah in elucijskih frakcijah določali z delno kvantitativno metodo ELISA.

#### 4.5.2.3 Kvantifikacija ToMV v kromatografskih frakcijah z DAS ELISA

Rezultati analize vzorcev z ELISA so pokazali, da detekcija ToMV v nobeni nevezni frakciji ni možna (ne glede na to, koliko ToMV smo dodali v redčino), kar pomeni, da se je ToMV uspešno vezal na kromatografski nosilec in da ga lahko na ta način koncentriramo iz vzorcev, ki vsebujejo zelo nizke koncentracije ToMV. ToMV je bil prisoten v visokih koncentracijah v elucijskih frakcijah 2, kjer smo disk izpirali s pufrom B (20 mM natrijevim acetatom z 1.5 M NaCl, pH 5.5). V preglednici 3 so zbrani rezultati ELISA analize reprezentativnega poskusa koncentriranja ToMV na CIM QA monolitnem disku. V preglednici 3 predstavlja »redčina« vzorec pred koncentriranjem (1 µL čistega ToMV v 0.5 L veznega pufra-20 mM natrijev acetat, pH 5.5), nevezna frakcija pa predstavlja vse, kar je priteklo skozi disk med nalaganjem redčine na disk (angl. flow through). Sledijo frakcije 1-3 (tri zaporedne kromatografske frakcije, zbrane med elucijo). Optične gostote (OD) so ELISA meritve. Frakcije 2 in 3 smo morali redčiti, kar je v preglednici prikazano s številko redčitvenega faktorja poleg vrednosti OD, da so vrednosti OD padle v linearni del umeritvene krivulje. Izkoristek predstavlja delež ToMV v drugi frakciji glede na celotno količino ToMV dodano v redčino. Spodnja meja detekcije je enaka dvojni OD negativne kontrole (sok neokužene rastline *N. clevelandii*). Ob upoštevanju tega kriterija in glede na umeritvene krivulje, ki smo jih pripravili in analizirali, to pomeni, da je spodnja meja detekcije približno 4-5 ng ToMV/mL, kar je skladno s podatkom iz literature, da je spodnja meja detekcije 1-10 ng/mL (Bergmayer, 1986).

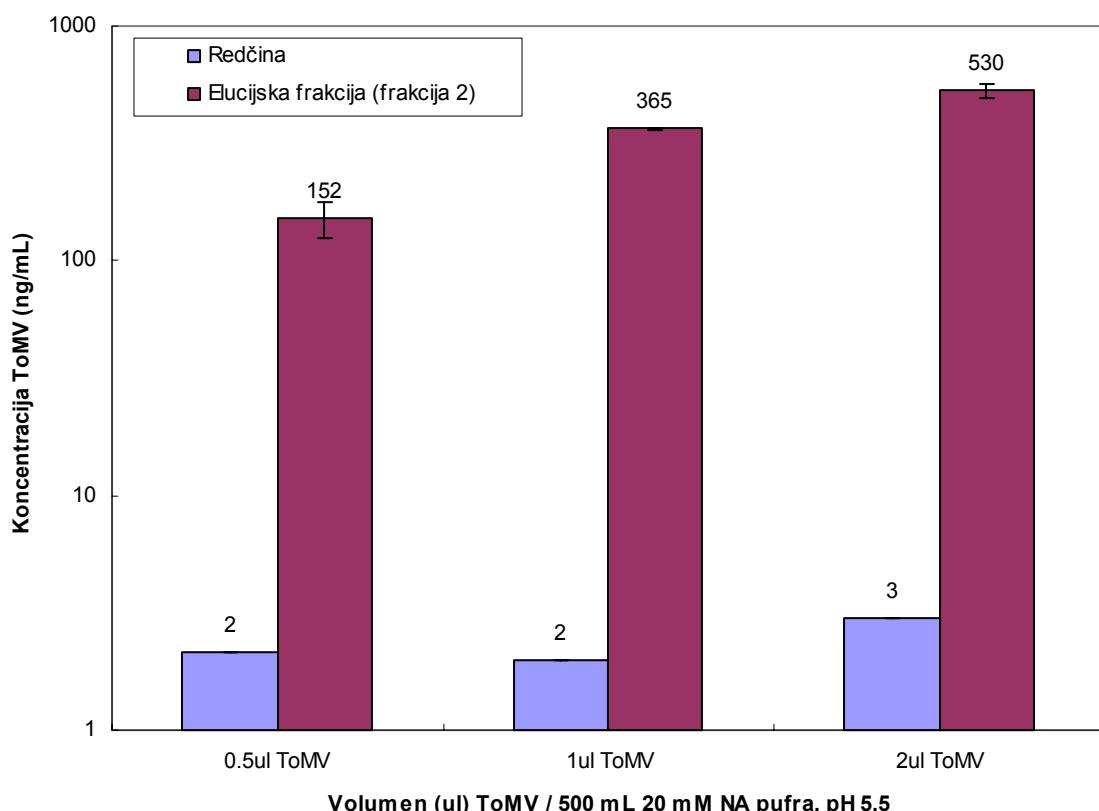
**Preglednica 3.** Koncentracije ToMV v redčini (1 µL čistega ToMV v 0.5 L veznega pufr-a 20 mM natrijev acetat, pH 5.5) pred koncentriranjem in v kromatografskih frakcijah po koncentriranju na CIM QA monolitnem disku, določene z delno kvantitativno ELISA.

**Table 3.** Concentration of ToMV in starting sample (1 µl of purified ToMV in 0.5 L of loading buffer (20 mM sodium acetate, pH 5.5) before the concentration and in chromatographic fractions after the concentration of ToMV on CIM QA disk monolithic column, determined with semi quantitative ELISA.

	VZOREC	OPTIČNA GOSTOTA (OD)	KONCENTRACIJA ToMV (ng/mL)	IZKORISTEK (%)
Poskus 1	Redčina	0.18	0	
	Nevezna frakcija	0.256	0	
	Frakcija 1	0.256	0	
	Frakcija 2	0.737 (81x)	<b>365</b>	<b>90</b>
	Frakcija 3	0.545 (3x)	11	
Poskus 2	Redčina	0.216	0	
	Nevezna frakcija	0.229	0	
	Frakcija 1	0.332	0	
	Frakcija 2	1.646 (27x)	<b>364</b>	<b>89</b>
	Frakcija 3	0.603 (3x)	12	
Čist ToMV		0.864 (90000x)	405	
Negativna kontrola		0.273	0	

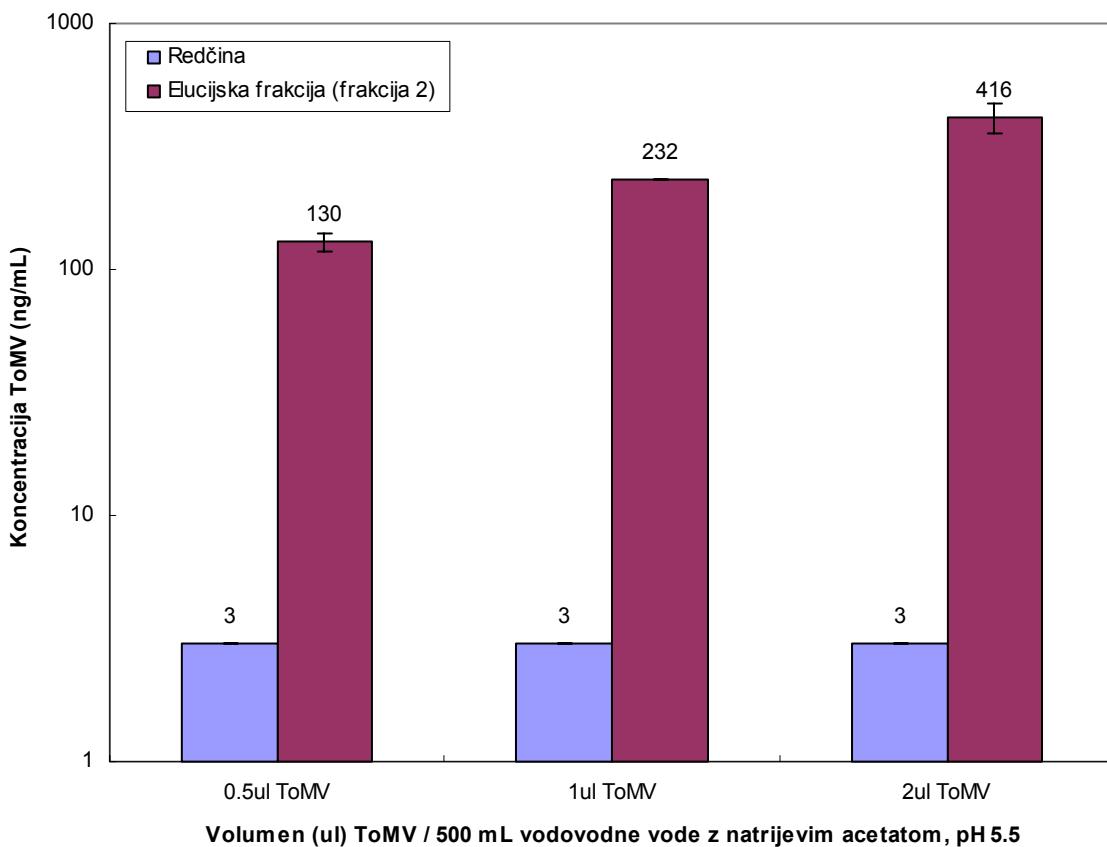
Iz preglednice 3 je razvidno, da v redčini, nevezani frakciji in prvi elucijski frakciji detekcija ToMV z ELISA ni možna. Večina virusa se iz diska izpere v drugi elucijski frakciji, kjer je koncentracija ToMV 365 ng/mL oz. 364 ng/mL. Izkoristka poskusov prikazanih v preglednici 3 sta 90 % in 89 %. Izkoristki drugih poskusov so bili med 70 % in 90 % (rezultati prikazani v prilogi I in J). Rezultati analize kromatografskih frakcij koncentriranja ToMV iz različnih redčin (vedno v dveh ponovitvah) z delno kvantitativno metodo ELISA so shematsko prikazani na sliki 33 in sliki 34. Optične gostote redčin so bile manjše ali enake vrednosti optičnih gostot negativne kontrole. V redčinah prisotnosti ToMV z metodo ELISA torej nismo mogli dokazati. Na sliki 33 in 34 so prikazane koncentracije ToMV (izračunane iz OD in enačbe linearne dela umeritvene krivulje) za lažjo predstavo, kolikšna je razlika v koncentraciji ToMV pred in po koncentriranju. Poudariti je treba, da so vse prikazane koncentracije ToMV redčin pod mejo detekcije

ELISA, ki je za ToMV približno 5 ng ToMV / mL. Uspešnost koncentriranja ToMV smo zato preračunali glede na teoretično koncentracijo ToMV, izračunano iz volumna in koncentracije ToMV, ki smo jo dodali pufru ali vodovodni vodi.



**Slika 33.** Koncentracija ToMV v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju ToMV iz 20 mM natrijevega acetata, pH 5.5 na CIM QA monolitnem disku, določena z metodo ELISA.

**Figure 33.** Concentration of ToMV (assessed with semi quantitative ELISA) in diluted samples (prepared with loading buffer) and elution fractions after the concentration of ToMV from these samples on CIM QA disk monolithic column.



**Slika 34.** Koncentracija ToMV v redčinah in elucijskih frakcijah po koncentriranju ToMV iz vodovodne vode z 20 mM natrijevim acetatom, pH 5.5 na CIM QA monolitnem disku, določena z metodo ELISA.

**Figure 34.** Concentration of ToMV (assessed with semi quantitative ELISA) in diluted samples (prepared with tap water) and elution fractions after the concentration of ToMV from these samples on CIM QA disk monolithic column.

Koncentriranje ToMV na CIM QA monolitnem disku je bolj učinkovito, kadar ToMV koncentriramo iz pufra, saj koncentracijo ToMV v povprečju povečamo 300x, medtem ko pri koncentriranju ToMV iz vodovodne vode povečamo koncentracijo ToMV v povprečju le 230x (preglednica 4). Slabšo učinkovitost koncentriranja ToMV iz vodovodne vode lahko pojasnimo s prisotnostjo nečistoč v vodovodni vodi.

Na splošno rezultati kažejo, da ToMV, ki ga v redčinah ni možno določiti z metodo ELISA, z uporabo CIM QA monolitnega diska koncentriramo od 208x do 365x in s tem omogočimo detekcijo.

**Preglednica 4.** Primerjava uspešnosti koncentriranja ToMV iz pufra in iz vodovodne vode na CIM QA monolitnem disku. Koncentracije ToMV v vzorcih pred koncentriranjem so teoretične koncentracije, izračunane glede na volumen in koncentracijo dodanega ToMV v pufer ali vodovodno vodo.

**Table 4.** Concentration of ToMV from buffer and water on CIM QA monolithic disk-comparison. ToMV concentrations in samples before concentration on CIM supports are theoretical concentrations, calculated from volume and concentration of ToMV added to the starting sample.

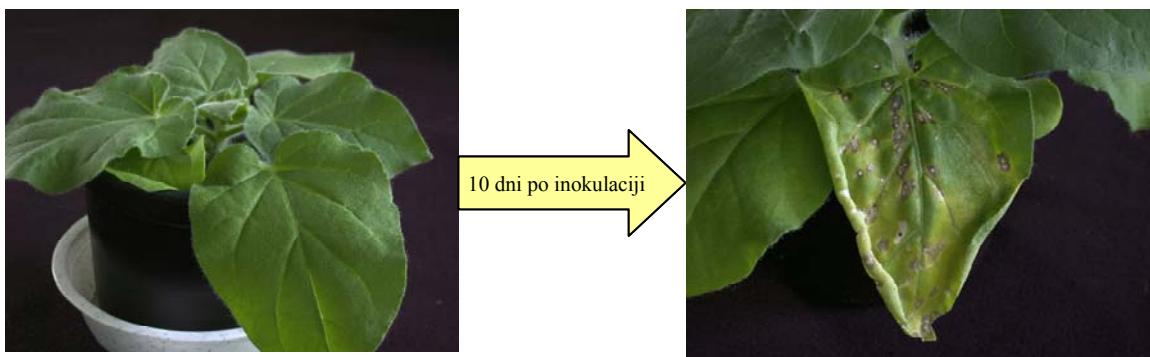
		Koncentracija ToMV (ng/mL)		
Koncentriranje iz pufra	Pred koncentriranjem	0,5	1	2
	Po koncentriranju	152	365	530
	<b>FAKTOR KONC.</b>	<b>300 x</b>	<b>365 x</b>	<b>265 x</b>
Koncentriranje iz vodovodne vode	Pred koncentriranjem	0,5	1	2
	Po koncentriranju	130	232	416
	<b>FAKTOR KONC.</b>	<b>260 x</b>	<b>232 x</b>	<b>208 x</b>

ToMV smo uspešno koncentrirali iz pufra in vodovodne vode. Iz vodovodne vode smo koncentrirali ToMV z namenom, da se začetni vzorec (redčina) po lastnostih približa realnemu vzorcu, npr. vzorcu vode iz reke, ki seveda poleg izredno majhnih količin potencialno prisotnega ToMV (ki jih z detekcijskimi metodami ne moremo določiti) vsebuje tudi veliko nečistoč. Če bi želeli preveriti prisotnost ToMV v vodi, ki jo uporabljamo za zalivanje poljščin, bi bilo pred detekcijsko metodo potrebno ToMV iz tega vzorca koncentrirati. Vzorce različnih slovenskih rek smo po enakem postopku kot je opisan v tem poglavju za koncentriranje ToMV iz vodovodne vode koncentrirali na 8 mL CIM QA monolitnih kromatografskih kolonah. Postopek je bil uspešen, saj je bila koncentracija ToMV po koncentriranju za 3 velikostne razrede večja (Boben in sod., poslano v tisk), med koncentriranjem pa kljub nečistočam, prisotnih v odvzetih vzorcih vod do mašenja kromatografskega nosilca ni prišlo.

#### 4.5.2.4 Infektivnost ToMV po koncentriranju ToMV iz pufra in vodovodne vode

Po koncentriranju ToMV na CIM QA monolitnem disku smo preverili infektivnost virusnih delcev. S karborundom posute liste tobaka (*Nicotiana glutinosa*) smo mehansko

inokulirali z drugo elucijsko frakcijo, ki je vsebovala večino virusnih delcev. Lokalne lezije so se na listih tobaka razvile približno 10-20 dni po inokulaciji, kar pomeni, da ToMV pri koncentriranju na CIM QA monolitnem disku ni izgubil infektivnosti (slika 35).



**Slika 35.** Test infektivnosti ToMV na *N. glutinosa* po koncentriranju ToMV na CIM QA monolitnem disku.

**Figure 35.** Infectivity test: *N. glutinosa* inoculated with ToMV after the concentration of ToMV on CIM QA disk monolithic column.

#### 4.5.3 Primerjava koncentriranja rastlinskih virusov na CIM monolitnih nosilcih z drugimi metodami

Metode, ki se uporabljajo za koncentriranje virusov iz vode, so številne, vendar metode, ki bi bila brez slabosti oz. omejitev, ni. Metoda, po kateri so koncentrirali viruse iz velikih volumnov vode Tomlinson in sodelavci (1983), je učinkovita, vendar dolgotrajna. Zanesljivost časovno nezahtevne in enostavne metode koncentriranja virusov iz manjših volumnov vode (Koenig in Lesemann, 1985) z ultracentrifugiranjem je po pričevanju enega od avtorjev (Koenig, 1986) vprašljiva. Na problem pri sicer hitrem in učinkovitem koncentriranju humanih virusov iz pitne vode z uporabo elektronegativnih ali elektropozitivnih filterov, kjer se za elucijo virusov iz filterov uporablja goveji ekstrakt, opozarjajo Pepper s sodelavci (1995) ter Shwab s sodelavci (1995). Problem govejega ekstrakta je prisotnost neznanih komponent v končnem vzorcu, ki lahko vplivajo na detekcijsko metodo in s tem povzročijo lažno pozitivne ali negativne rezultate. Da bi se temu izognili je potrebno po uporabi nabitih filterov iz eluata odstraniti vse potencialno

moteče komponente (Pepper in sod., 1995), kar celoten postopek koncentriranja virusov podaljša.

Metoda koncentriranja rastlinskih virusov z uporabo CIM monolitnih nosilcev je zanesljiva in ponovljiva, predpriprava vzorca je hitra, eluat, kjer se po koncentriranju nahajajo virusni delci pa, razen NaCl, ne vsebuje komponent, ki bi vplivale na detekcijske metode. Tako je eluat po koncentriranju mogoče neposredno uporabiti za detekcijo virusnih delcev. V primeru, da NaCl vpliva na izbrano detekcijsko metodo jo lahko enostavno in hitro odstranimo z uporabo PD-10 kolone, saj so elucijski volumni v primeru koncentriranja na najmanjših CIM monolitnih nosilcih (diskih) majhni (nekaj mL).

Koncentriranje virusov iz vzorcev (redčin), ki jih pripravimo v laboratoriju in za katere vemo, koliko virusa vsebujejo, imajo veliko prednost. Po koncentriranju lahko izračunamo, kako učinkovit je postopek-izračunamo lahko izkoristek in tako ugotovimo, kolikšen delež v redčini prisotnega virusa se po koncentriranju nahaja v vzorcu, ki ga analiziramo z izbrano detekcijsko metodo. Izkoristki pri koncentriranju CMV in ToMV na CIM monolitnih nosilcih so visoki. Pri koncentriranju CMV smo dosegli 30-60 % izkoristek, pri koncentriranju ToMV iz pufra in vodovodne vode pa 70-90 %. Pri koncentriranju rastlinskih virusov iz realnih vzorcev (vodotokov, jezer) učinkovitost metode, ki jo uporabljam za koncentriranje virusov, težko ocenimo, saj ne vemo, koliko virusov se v začetnem vzorcu dejansko nahaja. Zaradi tega nihče od avtorjev omenjenih v poglavju 2.2, ki opisujejo različne načine koncentriranja rastlinskih virusov iz realnih vzorcev, ne omenja kolikšen je izkoristek oz. kolikšna je učinkovitost uporabljenе metode. Zaradi zagotavljanja zanesljivosti končnih rezultatov ob potencialno nizki učinkovitosti izbrane metode za koncentriranje virusov, poteka koncentriranje virusov iz realnih vzorcev iz velikih volumnov vode, kot je opisal Tomlinson s sodelavci (1983).

Ker je metoda koncentriranja virusnih delcev na CIM monolitnih nosilcih učinkovita, lahko potencialno prisotne virusne delce v vodi za zalivanje poljščin koncentriramo iz relativno majhnih volumnov. V primeru, da želimo koncentrirati virusne delce iz večjih volumnov pa lahko metodo za koncentriranje enostavno prenesemo iz CIM monolitnih diskov na CIM monolitne kolone z volumnom 8 mL, 80 mL ali celo 800 mL, kjer lahko uporabimo večje pretoke in s tem skrajšamo metodo koncentriranja.

#### **4.5.4 Postopek za čiščenje CMV in ToMV iz vzorcev z nizko koncentracijo virusa v vzorcu**

Z optimizacijo pufrskega sistema, pH in izbiro CIM monolitnega nosilca za najbolj učinkovito koncentriranje CMV oz. ToMV na izbranem CIM monolitnem nosilcu lahko zapišemo kratek postopek za koncentriranje CMV oz. ToMV iz realnega vzorca:

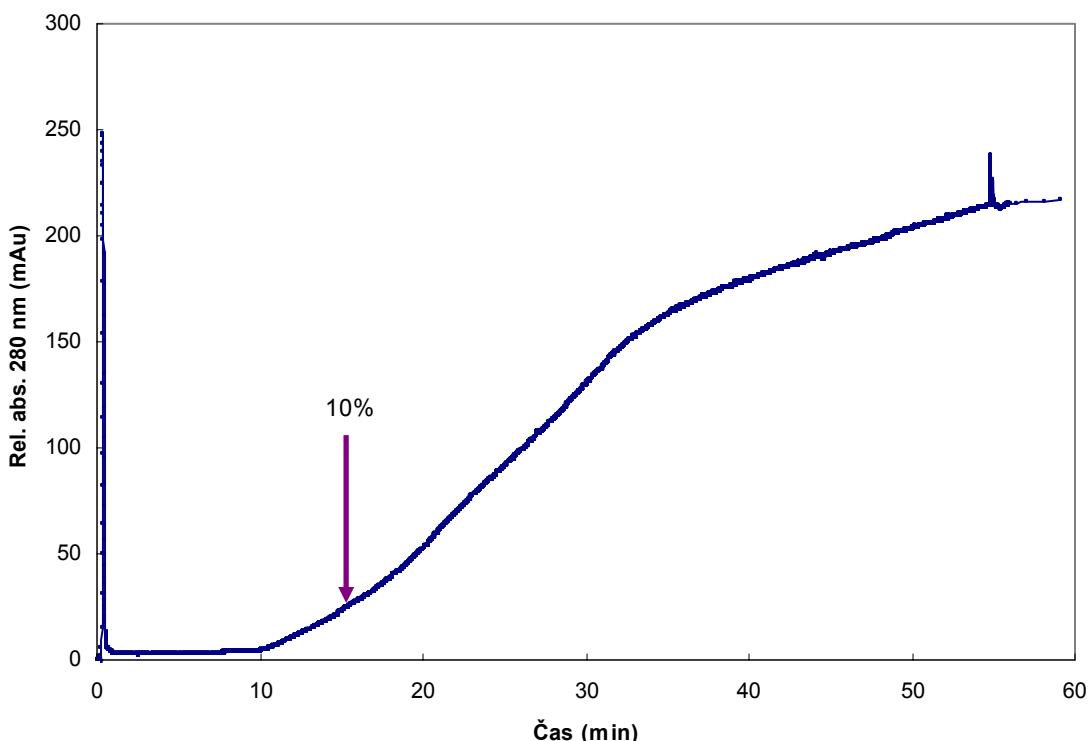
- Priprava vzorca za koncentriranje: 4950 mL realnega vzorca dodamo 50 mL 2 M Tris, pH 8 (za koncentriranje CMV) oz. 50 mL 2 M Na acetata, pH 5.5 (za koncentriranje ToMV).
- Pripravimo pufre za spiranje kromatografskega nosilca: 20 mM Tris-HCl, pH 8 (vezni pufer za CMV) in 20 mM Tris-HCl + 1.5 M NaCl, pH 8 (elucijski pufer za CMV) / 20 mM Na acetat, pH 5.5 (vezni pufer za ToMV) in 20 mM Na acetat + 1.5 M NaCl, pH 5.5 (elucijski pufer za ToMV).
- Pri pretoku 8 mL/min naložimo pripravljen vzorec na CIM DEAE monolitni disk (CMV) oz. CIM QA monolitni disk (ToMV), ki smo ga pred tem dobro sprali z veznim pufrom.
- CIM monolitni disk speremo z veznim pufrom (s tremi volumni nosilca), nato eluiramo na CIM monolitni disk vezane virusne delce z elucijskim pufrom (s štirimi volumni nosilca) in na koncu z veznim pufrom iz CIM monolitnega nosilca izperemo sol
- Dobljeni eluat, v katerem se nahajajo virusni delci (če so le-ti bili prisotni v realnem vzorcu), lahko neposredno uporabimo za detekcijo virusa z metodo ELISA.

#### **4.6 DOLOČANJE DINAMIČNE KAPACITETE CIM QA MONOLITNEGA DISKA ZA ToMV**

Vzorec za merjenje dinamične kapacitete CIM QA monolitnega diska za ToMV smo pripravili iz 42 mL čistega virusnega pripravka ToMV, ki smo ga 4x redčili v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 (pufer, v katerem se je nahajal čist virusni pripravek). Vzorec smo pred nalaganjem na CIM QA monolitni disk filtrirali skozi 0.22 µm filter in izmerili absorbanco pri 260 nm. Iz izmerjene absorbance ( $A_{260}=0.278$ ) smo izračunali

konzentracijo ToMV v vzorcu (0.09 mg ToMV / mL). Volumen vzorca, ki smo ga naložili na disk je bil 164 mL, kar pomeni, da smo na disk naložili 14.7 mg ToMV.

Pri nalaganju vzorca na CIM QA monolitni disk pri pretoku 3 mL/min smo dobili prebojno krivuljo, iz katere smo odčitali čas, pri katerem je krivulja dosegla 10 % najvišjega signala. To se je zgodilo po 15 minutah nalaganja vzorca (slika 36).



**Slika 36.** Prebojna krivulja za merjenje dinamične kapacitete CIM QA monolitnega diska za ToMV. Pufer A: 20 mM fosfat citratni pufer, pH 7, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A.

**Figure 36.** Determination of the capacity of CIM QA monolithic disk for ToMV. Conditions: 50 mM phosphate citrate buffer pH 7, flow rate 3 mL/min, concentration of ToMV 90 µg/mL.

S pomočjo enačbe (1) smo izračunali kapaciteto CIM QA monolitnega diska za ToMV. Mrtvi volumen, ki ga pri tej enačbi upoštevamo, je seštevek mrtvega volumna kapilar, ki potekajo od kromatografskega nosilca do detektorja in mrtvega volumna diska, pri čemer mrtvi volumen diska izračunamo iz poroznosti (62 %) in volumna (0.34 µL) diska (2 in 3).

$$q = (\phi \cdot t - Vd) \cdot c \quad \dots(1)$$

$$Vd = Vd_{diska} + V_{kapilar} \quad \dots(2)$$

$$Vd_{diska} = \varepsilon \cdot V_{diska} \quad \dots(3)$$

*q*-kapaciteta (mg ToMV/ CIM disk)

$\phi$ -pretok (mL/min)

*t*-čas, pri katerem prebojna krivulja doseže 10 % največje vrednosti (min)

*Vd*-mrtvi volumen (mL)

*c*-koncentracija ToMV v vzorcu, ki smo ga nalagali na CIM monolitni nosilec (mg/mL)

$\varepsilon$ -poroznost nosilca (/)

Dinamična vezna kapaciteta CIM QA diska za ToMV je 4 mg ToMV / disk, oz. 11.7 mg ToMV / mL monolitnega kromatografskega nosilca.

Molekulska masa enega virusnega delca tobačnega mozaičnega virusa (TMV) je približno  $39.4 \cdot 10^6$  Da (Zaitlin, 1975). TMV in ToMV sta zelo podobna virusa in če privzamemo, da je molekulska masa ToMV virusnega delca enaka molekulski masi TMV, potem lahko izračunamo, kolikšna je dinamična vezna kapaciteta CIM QA monolitnega nosilca v številu virusnih delcev, ki se na nosilec lahko vežejo.

Če vemo, da je 1Da<sup>1</sup> enak  $1.6605655 \cdot 10^{-24}$  g lahko izračunamo, da je masa 1 virusnega delca ToMV enaka  $65.4 \cdot 10^{-9}$  ng. Dinamična vezna kapaciteta CIM QA monolitnega diska je torej  $1.7 \cdot 10^{14}$  virusnih delcev ToMV / mL nosilca.

Kapaciteta Mustang Q membran (proizvajalca Pall) za rekombinantne Adenoviruse je  $4.9 \cdot 10^{13}$  virusnih delcev / mL Mustang Q membrane pri 10 % preboju (Lajmi, 2005). Kapaciteti CIM nosilca za ToMV in Mustang Q membrane za Adenoviruse nista bili narejeni pod enakimi pogojimi, pa tudi velikost in oblika virusov je različna. Adenovirusi merijo v premeru 70-90 nm (Fields, 1990) in so okrogli, velikost ToMV pa je 18 x 300 nm, virusni delci so paličaste oblike. Kljub razliki v velikosti in obliki virusnih delcev, so lastnosti, pomembne za kromatografsko ločevanje virusov na ionsko izmenjevalnih

---

<sup>1</sup> Dalton (Da) je enota atomske mase in predstavlja 1/12 mase naravnega C<sup>12</sup> atoma, kar je približno  $1.6605655 \cdot 10^{-24}$  g (Singleton in Sainsbury, 1994: 66).

nosilcih pri obeh virusih podobne. Oba virusa obdaja proteinski plašč in izoelektrična točka obeh virusov je okrog pH 5. Izoelektrična točka Adenovirusnih delcev je pri pH 5 (Herzer in sod., 2003), izoelektrična točka virusnih delcev ToMV pa pri pH 4.6 (Oster, 1951; Hollings in Huttinga, 1976). Sklepamo lahko, da se virusni delci Adenovirusa in ToMV na anionskih kromatografskih nosilcih obnašajo podobno. Če torej primerjamo obe kapaciteti, ugotovimo, da je kapaciteta CIM nosilca za ToMV za en velikostni razred večja od kapacitete Mustang Q membran za rekombinantne Adenoviruse.

#### 4.7 ČIŠČENJE ToMV IZ DELNO OČIŠČENEGA VIRUSNEGA PRIPRAVKA NA CIM QA MONOLITNEM NOSILCU

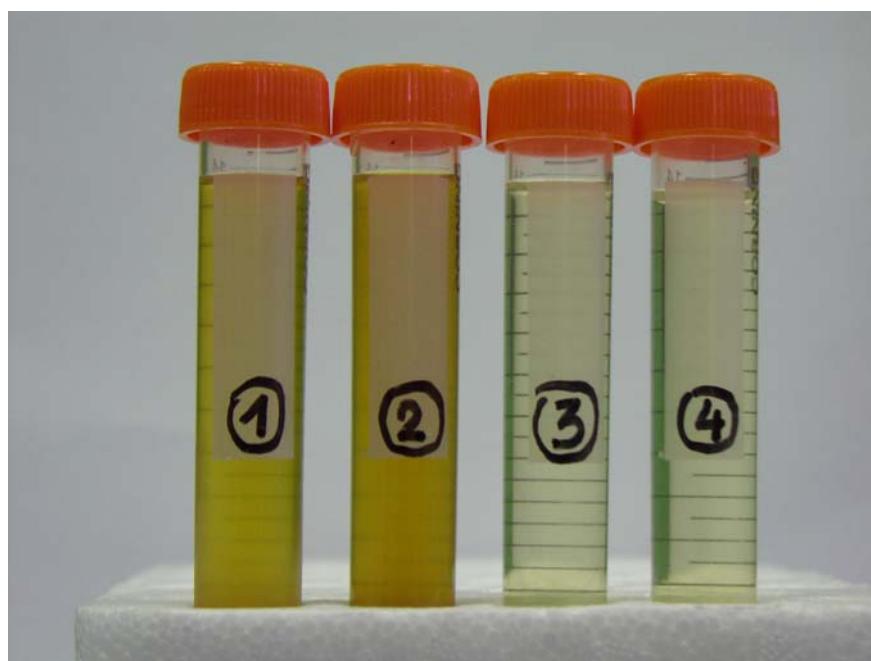
##### 4.7.1 Priprava delno očiščenega ToMV

Za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku smo pripravili 4 različne delno očiščene virusne pripravke, kot je opisano v poglavju »Material in metode«:

- Vzorec 1: klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala brez kloroformata
- Vzorec 2: klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom
- Vzorec 3: klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom,  
oborjen s 5 % PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen s pipetiranjem
- Vzorec 4: klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom,  
oborjen s 5 % PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen s stresanjem v  
pufru preko noči.

Različne vzorce smo pripravili zato, da bi ugotovili, kateri koraki so nujno potrebeni za pripravo vzorca, iz katerega je možno čistiti ToMV na CIM QA monolitnem disku.

Razlika med prvim in drugim vzorcem je kloroform, ki smo ga dodali le drugemu, razlika med tretjim in četrtem vzorcem pa je v načinu in času, porabljenem za razapljanje peleta po obarjanju s PEG in centrifugiraju. Na sliki 37 je lepo vidna tudi razlika v obarvanosti delno očiščenih virusnih pripravkov.



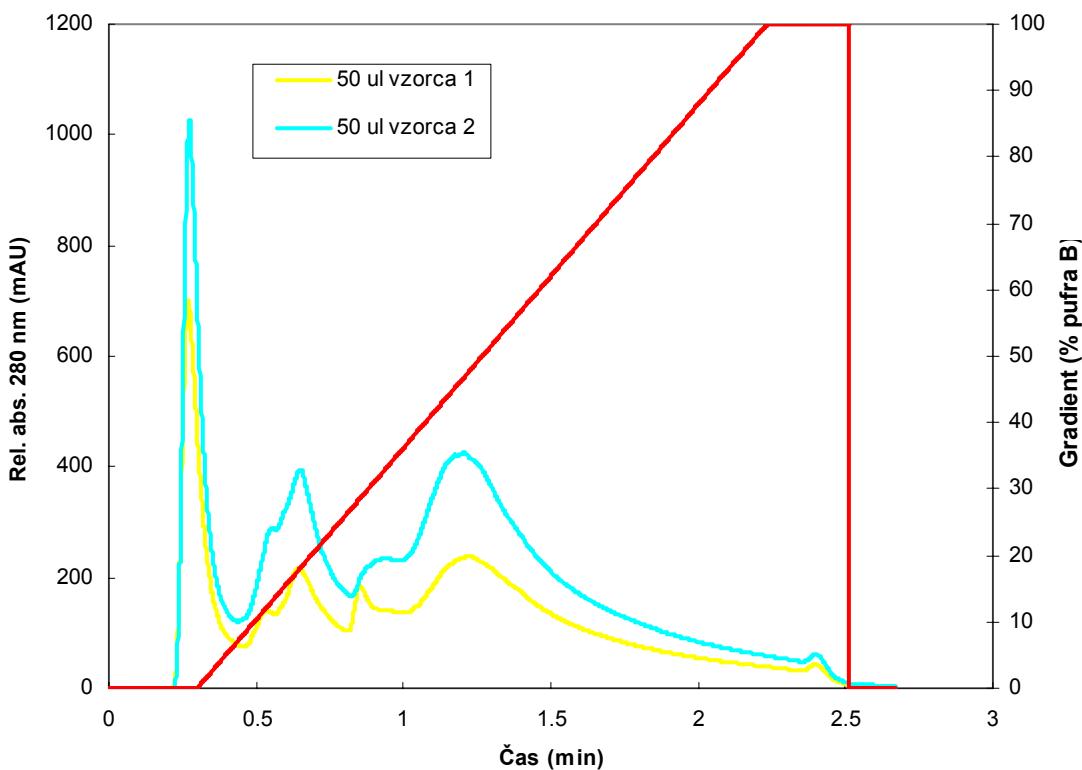
**Slika 37.** Delno očiščeni virusni pripravki: 1 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala brez kloroformata), 2 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom), 3 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom, oborjen s 5 % PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen s pipetiranjem) in 4 (klarifikat homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom, oborjen s 5% PEG in po centrifugiraju pelet raztopljen z 12 urnim stresanjem v pufru).

**Figure 37.** Semi purified ToMV preparations: 1 (clarificate of homogenised plant material without chloroform), 2 (clarificate of homogenised plant material with chloroform) 3 (clarificate of plant material with chloroform precipitated with PEG, centrifuged and pellet resuspended with pipetting) and 4 (clarificate of plant material with chloroform precipitated with PEG, centrifuged and pellet resuspended with shaking for 12 hours in buffer).

#### 4.7.2 Izbira delno očiščenega virusnega pripravka za čiščenje ToMV na CIM QA diskusu

Primerjava ločbe 50 µL prvega in drugega vzorca v linearinem gradientu je pokazala, da v kromatografskem smislu med njima ni bistvene razlike (slika 38), oba se na CIM monolitnem diskusu ločujeta podobno. Površine kromatografskih vrhov dajejo slutiti, da k absorbanci drugega vzorca prispeva obarvanost vzorca, oz. večje količine nevirusnih proteinov v vzorcu, kar je vidno tudi na poliakrilamidnem gelu ločenih delno očiščenih

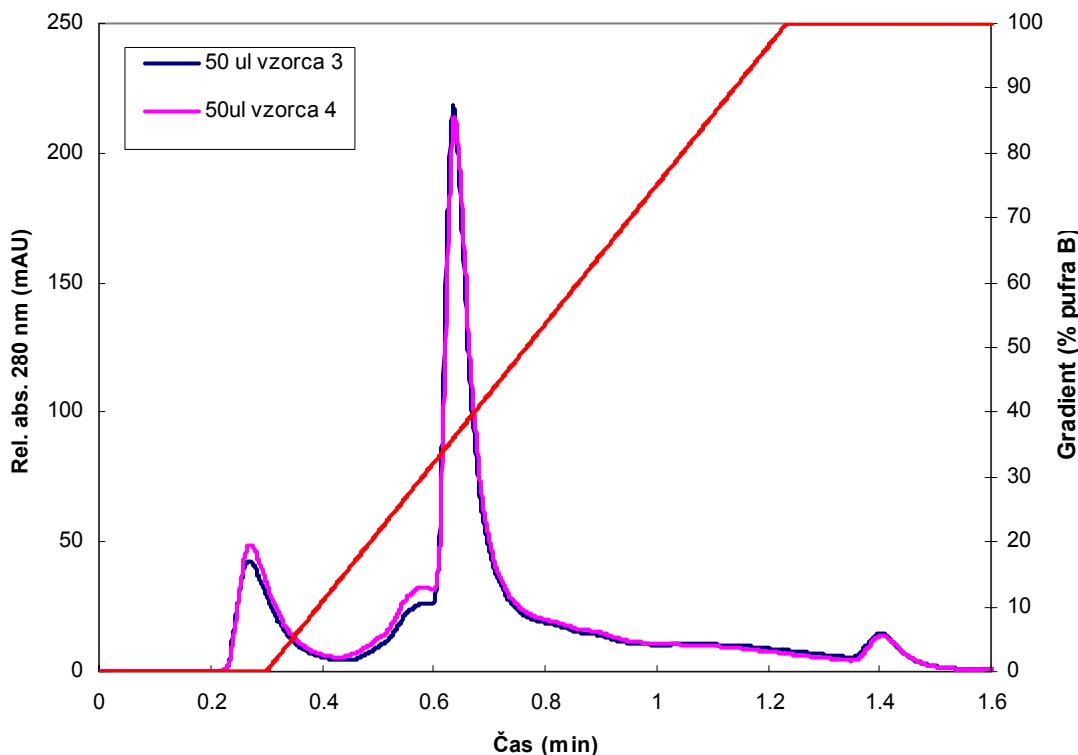
virusnih pripravkov (slika 40). Kloroform smo v fazi klarifikacije (centrifugiranje, s katerim odstranimo grob rastlinski material) dodali, ker se v njem topijo in tako odstranijo rastlinski lipidi, ki bi potencialno lahko povzročali mašenje na CIM monolitnih nosilcih. Kljub temu, da vzorcu 1 kloroforma nismo dodali, do mašenja ni prišlo, res pa je, da bi se lahko mašenje pojavilo pri nalaganju večjih količin delno očiščenega virusnega pripravka. Ker dodajanje kloroformata bistveno ne podaljša časa priprave vzorca, je bolje, da ga v koraku homogenizacije dodamo.



**Slika 38.** Primerjava ločbe  $50 \mu\text{L}$  delno očiščenega virusnega pripravka 1 in 2 v  $200 \text{ mM}$  fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku. Pufer A:  $20 \text{ mM}$  natrijev acetat, pH 5.5, pufer B:  $1.5 \text{ M}$  NaCl v pufru A, pretok:  $6 \text{ mL/min}$ , UV detekcija pri  $260 \text{ nm}$ , gradient prikazan na sliki.

**Figure 38.** Separation of  $50 \mu\text{L}$  of semi purified ToMV preparation 1 and 2 in  $200 \text{ mM}$  phosphate citrate buffer, pH 7 on CIM QA disk monolithic column. Buffer A:  $20\text{mM}$  sodium acetate, pH 5.5, buffer B:  $1.5 \text{ M}$  NaCl in buffer A, flow rate:  $6 \text{ mL/min}$ , UV detection at  $260 \text{ nm}$ , gradient: as noted on the Figure.

Na CIM QA monolitnem disku smo v linearjem gradientu ločili tudi tretji in četrti delno očiščen virusni pripravek. Na sliki 39 vidimo, da imata oba vzorca enak kromatografski profil. To pomeni, da je raztpljanje peleta s pipetiranjem, kateremu takoj sledi centrifugiranje, enako učinkovito kot raztpljanje peleta z 12 urnim stresanjem v pufru pri 4 °C.



**Slika 39.** Primerjava ločbe 50  $\mu\text{L}$  delno očiščenega virusnega pripravka 3 in 4 v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pretok: 6 mL/min, UV detekcija pri 260 nm, gradient prikazan na sliki.

**Figure 39.** Separation of 50  $\mu\text{L}$  of semi purified ToMV preparation 3 and 4 in 200 mM phosphate citrate buffer, pH 7 on CIM QA disk monolithic column. Buffer A: 20mM sodium acetate, pH 5.5, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A, flow rate: 6 mL/min, UV detection at 260 nm, gradient: as noted on the Figure.

Iz kromatogramov ločbe delno očiščenih virusnih pripravkov vidimo, da dodajanje kloroformata v fazi klarifikacije ni nujen, vendar priporočljiv korak in da raztopljanje peleta s stresanjem preko noči po obarjanju s PEG ni potrebno-vzorec 2 ali 3 sta delno očiščena virusna pripravka, katerih priprava vključuje vse potrebne korake, da je iz vzorca možno čistiti ToMV na CIM QA monolitnem disku.

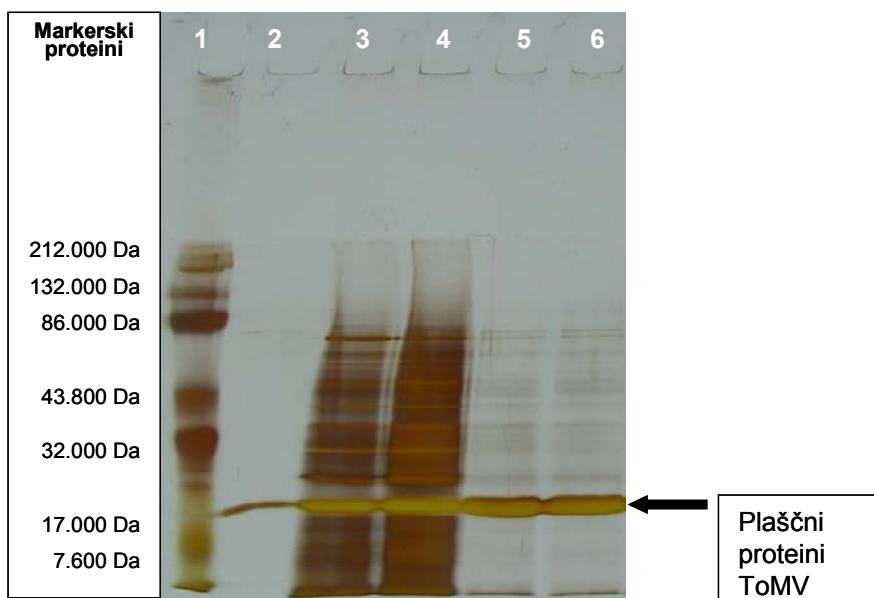
Delno očiščene virusne pripravke smo analizirali z metodo ELISA (določanje koncentracije ToMV) in SDS-PAGE (določanje čistosti). Kvantifikacija vzorcev z delno kvantitativno ELISA je pokazala, da je koncentracija ToMV v vseh štirih vzorcih približno enaka, do razlik v izplenu virusnih delcev pride, ko pri izračunu upoštevamo dobljene volumne posameznih vzorcev. Iz preglednice 4 je razvidno, da korak obarjanja s PEG (vzorec 3 in 4) povzroči izgube ToMV.

**Preglednica 5.** Količina ToMV v delno očiščenih virusnih pripravkih (analiza vzorcev z delno kvantitativno metodo ELISA).

**Tabele 5.** Concentration of ToMV in semi purified viral preparations determined with semi quantitative ELISA.

VZOREC	KONCENTRACIJA ToMV (mg/mL)	V (mL)	MASA ToMV (mg)
Vzorec 1	0.51	20	10.2
Vzorec 2	0.57	15	8.6
Vzorec 3	0.64	10	6.4
Vzorec 4	0.75	10	7.5

Na sliki 40 vidimo ločbo delno očiščenih virusnih pripravkov na poliakrilamidnem gelu. Vzorca 3 in 4 vsebujeta veliko manj nevirusnih proteinov v primerjavi s prvima dvema vzorcema. To pomeni, da obarjanje s PEG sicer odstrani veliko rastlinskih proteinov, vendar zmanjša izplen ToMV ter zahteva dodatni dve uri dela pri pripravi začetnega vzorca.



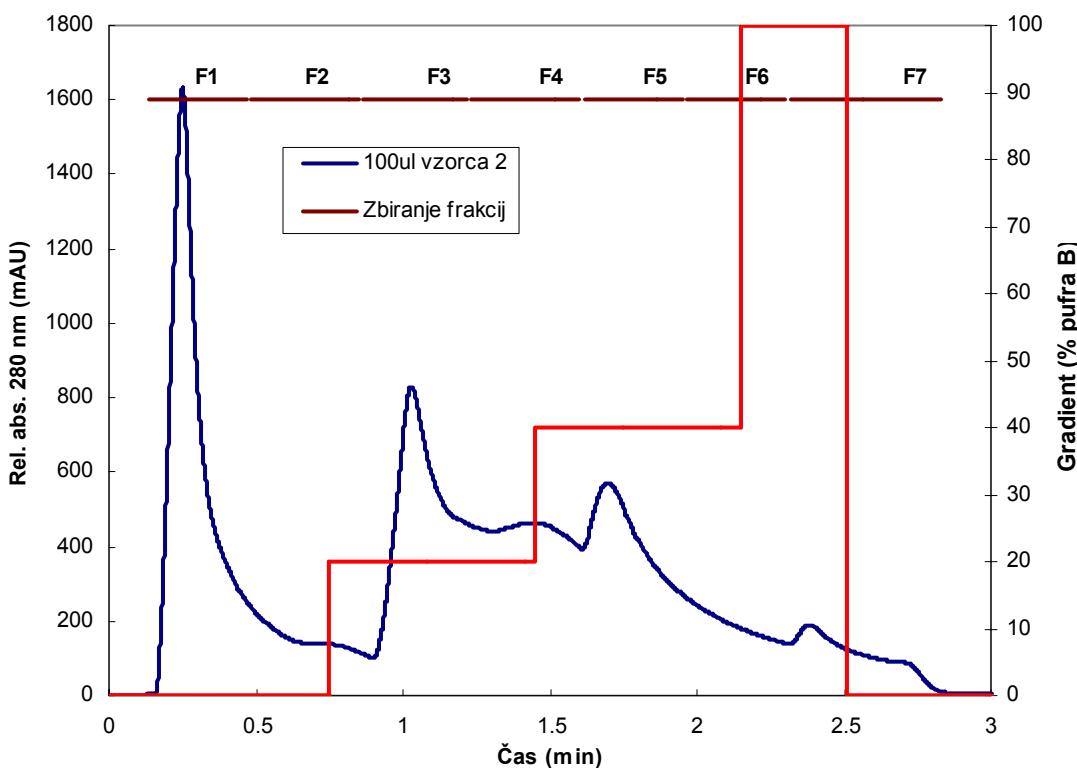
**Slika 40.** Ločba delno očiščenih virusnih pripravkov na poliakrilamidnem gelu, barvanim s srebrom: 1 (Markerski proteini, BioRad, Kaleidoscope Prestained Standards, 161-0324), 2 (ToMV očiščen po klasičnem postopku), 3 (delno očiščen ToMV-vzorec 1), 4 (delno očiščen ToMV-vzorec 2), 5 (delno očiščen ToMV-vzorec 3) in 6 (delno očiščen ToMV-vzorec 4).

**Figure 40.** Separation of semi purified viral prepartions on silver stained polyacrilamide gel: 1 (Marker proteins, BioRad, Kaleidoscope Prestained Standards, 161-0324), 2 (ToMV purified by conventional method), 3 (semi purified ToMV preparation 1), 4 (semi purified ToMV preparation 2), 5 (semi purified ToMV preparation 3) and 6 (semi purified ToMV preparation 4).

Na podlagi rezultatov zgoraj opisanih poskusov smo se odločili, da bomo ToMV čistili iz vzorca 2 (klarifikata homogeniziranega rastlinskega materiala s kloroformom), katerega priprava traja približno 1 uro.

#### 4.7.3 Optimizacija gradiента za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku

Ločevanje 100 µL vzorca 2 v stopničastem gradienetu (0-20-40-100 % pufra B) in zbiranje frakcij je prikazano na sliki 41.

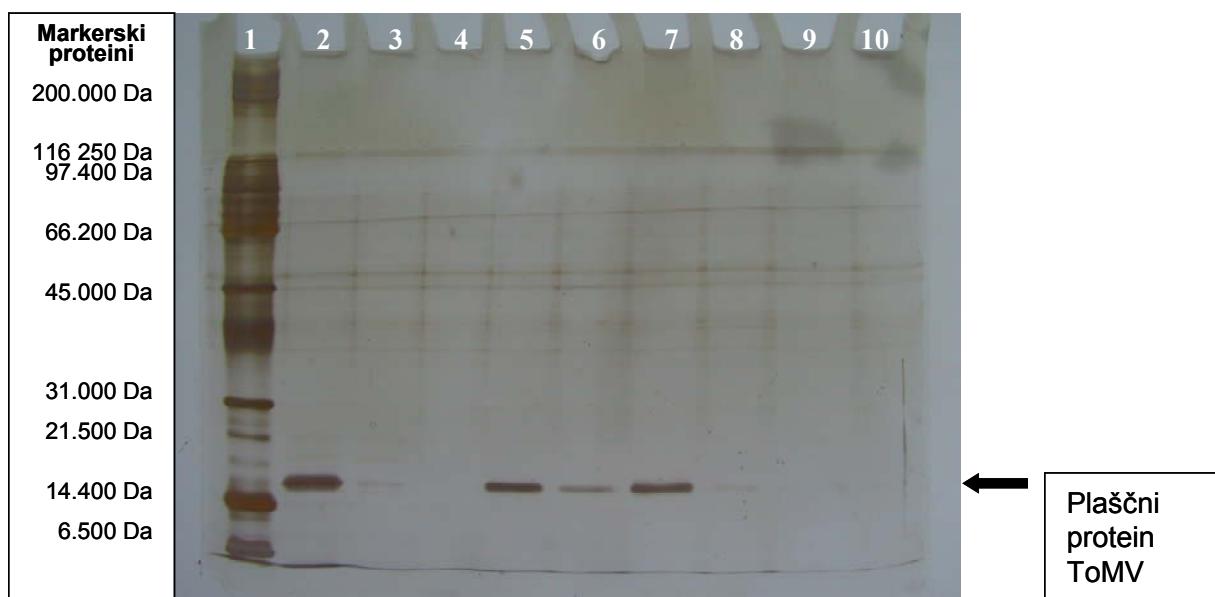


**Slika 41.** Ločba 100  $\mu\text{L}$  delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) v 200 mM fosfat citratnem pufru, pH 7 na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: 1.5 M NaCl v pufru A, pH 5.5, pretok 6 mL/min, UV detekcija pri 260 nm, gradient je prikazan na sliki, kromatografske frakcije 1-7 so označene s F1-F7.

**Figure 41.** Separation of 100  $\mu\text{L}$  of semi purified ToMV preparation 2 in 200 mM phosphate citrate buffer, pH 7 on CIM QA disk monolithic column. Buffer A: 20 mM sodium acetate, pH 5.5, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A, pH 5.5, flow rate: 6 mL/min, UV detection at 260 nm, gradient: as noted on the Figure, chromatographic fractions 1-7 (F1-F7).

Zbrane frakcije smo ločili na poliakrilamidnem gelu in gel barvali s srebrom (slika 42). V tretji žepku na gelu smo naložili frakcijo, ki smo jo zbrali po nanosu 100  $\mu\text{L}$  vzorca 2 v HPLC sistem brez diska. Proteinska lisa virusnega plaščnega proteina je slabo vidna, proteinskih lis nečistoč pa v drugi koloni tega gela ne vidimo, verjetno je koncentracija proteinov prenizka, saj je prišlo pri prehodu skozi HPLC sistem do redčenja. Na disk smo nanesli 100  $\mu\text{L}$  delno očiščenega virusa, ki smo ga ulovili po prehodu skozi HPLC sistem v

1.3 mL, torej se je delno očiščen virusni pripravek 13x redčil, zaradi česar se na gelu ne vidi proteinских lis. Liza virusnega plaščnega proteina je lepo vidna v kolonah 5, 6 in 7, kjer so frakcije 3, 4 in 5. V teh treh frakcijah se nahaja čist virusni plaščni protein (slika 42), vendar je skupni volumen vseh treh frakcij relativno velik (6 mL). Naš cilj je bil, da virus izperemo iz diska v čim manjšem volumnu, zato smo temu primerno spremenili gradient. Da bi videli nečistoče v frakcijah pri spiranju diska z veznim pufrom, smo se odločili, da bomo ločevali večje količine delno očiščenega virusnega pripravka.



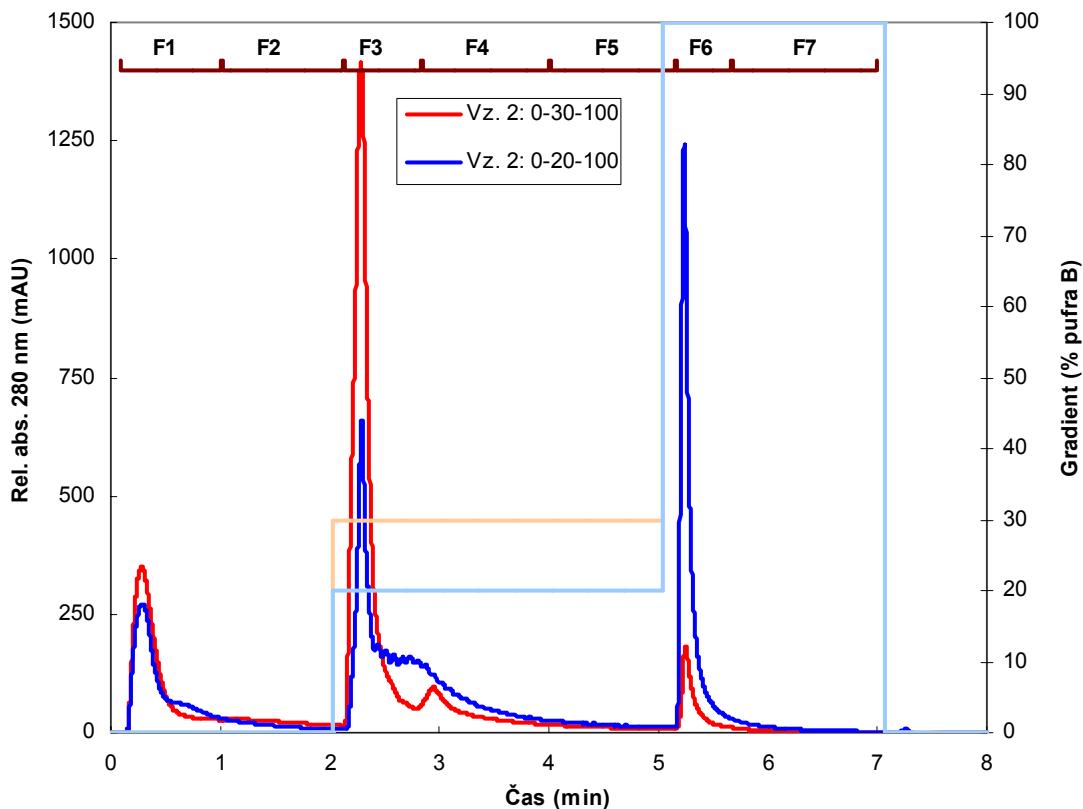
**Slika 42.** Poliakrilamidna ločba frakcij ločevanja 100  $\mu\text{L}$  delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku, gel barvan s srebrom. Vzorci: 1 (Markerski proteini: BioRad, 161-0317), 2 (ToMV pripravljen po klasičnem postopku), 3 (frakcija po nanosu 100  $\mu\text{L}$  delno očiščenega ToMV v HPLC brez diska), 4-10 (kromatografske frakcije 1-7).

**Figure 42.** Silver stained polyacrylamide gel: 1 (Markerski proteini: BioRad, 161-0317), 2 (ToMV purified by conventional method), 3 (fraction of passing 100  $\mu\text{L}$  of semi purified ToMV through the HPLC system without the disk), 4-10 (chromatographic fractions 1-7).

Pred nanosom večjih količin delno očiščenega virusnega pripravka na QA disk smo pufer, v katerem se je nahajal delno očiščen virusni pripravek (vzorec 2-v 200 mM fosfat

citratnem pufru, pH 7), zamenjali z 20 mM natrijevim acetatom, pH 5.5 na PD-10 koloni za razsoljevanje in menjavo pufra. Nujno je, da je vzorec, ki ga nanesemo na kromatografski nosilec, v veznem pufru oz., da sta vsaj pH in ionska jakost vzorca in veznega pufra čim bolj podobni. Še posebej je to pomembno, kadar na nosilec nanašamo večje volumne vzorca, ki so v velikostnem redu volumna kolone. Pri menjavi pufra na PD-10 koloni se vzorec redči 1.4 x, saj na kolono nanesemo 2.5 mL vzorca in ga eluiramo iz kolone s 3.5 mL pufra, v katerem želimo imeti vzorec. Prednost menjave pufra na PD-10 koloni pred čiščenjem ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku je tudi odstranitev barvil. Vzorec je po prehodu skozi PD-10 kolono namreč manj obarvan.

1 mL vzorca 2 (koncentracija ToMV = 0,23mg/mL) v 20 mM natrijevem acetatu, pH 5.5 smo injicirali na CIM QA monolitni disk. Vzorec smo ločili po dveh metodah, ki sta se razlikovali po gradientu pufra B (slika 43).



**Slika 43.** Primerjava ločbe 1 mL vzorca 2 v 20 mM natrijevem acetatu, pH 5.5 po dveh različnih metodah na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: pufer A+1.5 M NaCl, pH 5.5, pretok 6 mL/min, UV detekcija pri 260 nm, gradienata prikazana na sliki.

**Figure 43.** Separation of 1 mL of semi purified ToMV preparation 2 in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 on CIM QA disk monolithic column using two different salt gradient. Buffer A: 20 mM sodium acetate, pH 5.5, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A, flow rate: 6 mL/min, UV detection at 260 nm, gradient: as noted on the Figure.

Če primerjamo ločbo delno očiščenega vzorca 2 na sliki 41 in sliki 43 vidimo, da so kromatografski vrhovi na sliki 43 veliko bolj ozki, kar omogoča boljšo ločljivost. Ker ToMV v primeru prikazanem na sliki 41 ni bil v veznem pufru, ampak v pufru s pH različnim od veznega pufra in je bila tudi ionska jakost različna, je prišlo do širjenja kromatografskih vrhov. Širjenje je posledica dejstva, da je ioniziranost molekul na vhodu na kolono različna od tiste na izhodu iz kolone. Sprememba ionizacije pa se za vsako

molekulo iste spojine dogaja na različnih mestih kolone, posledično je tudi čas izpiranja različen. Taka napaka v kromatografiji je še predvsem velika, kadar je volumen vzorca, ki ni v veznem pufru, v velikostnem redu volumna kolone.

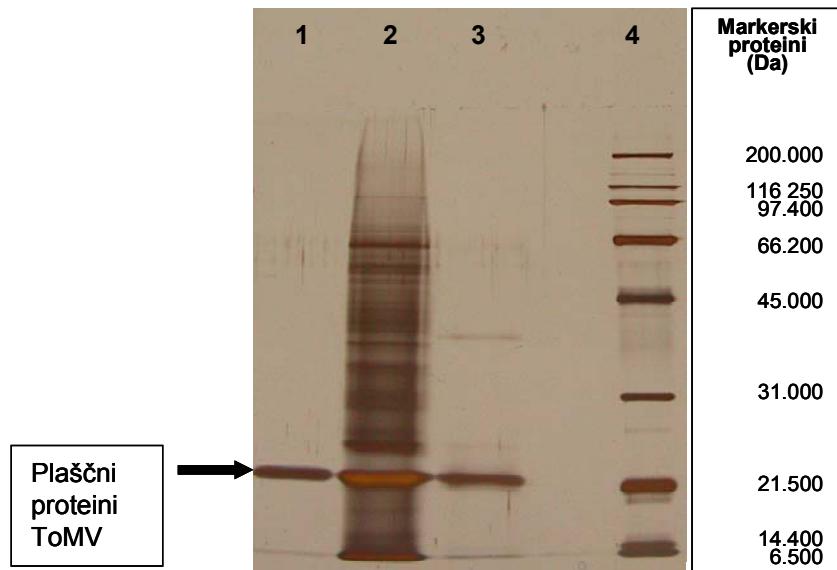
Po kromatografski ločbi delno očiščenega ToMV na CIM QA monolitnem disku po dveh metodah (različen gradient) smo z metodo ELISA določili vsebnost ToMV v posameznih frakcijah in glede na količino na disk nanešenega ToMV izračunali izkoristek za posamezne kromatografske frakcije (preglednica 6). Ugotovili smo, da je gradient 0-30-100 % pufra B primernejši, saj se v frakciji 3 (0.45 M NaCl) iz diska izpere več ToMV, kakor pri gradientu 0-20-100 % pufra B, kjer se v frakciji 3 (0.3 M NaCl) iz diska izpere le manjši del ToMV, v frakciji 6 (1.5 M NaCl) pa približno polovica na disk nanešenega ToMV (preglednica 6).

**Preglednica 6.** Vsebnost ToMV (v odstotkih glede na količino na disk nanešenega ToMV) v frakcijah čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku po dveh različnih metodah.

**Tabele 6.** Purification of semi purified ToMV on CIM QA disk monolithic column using two different salt gradient: yield of ToMV (the amount of ToMV in the fraction compared to the total amount of ToMV loaded on the disk) in the chromatographic fractions.

GRADIENT (% PUFRA B)	IZKORISTEK (%)	
	0-20-100	0-30-100
Frakcija 1	1	0
Frakcija 2	0	0
Frakcija 3	5	<b>98</b>
Frakcija 4	5	0
Frakcija 5	2	0
Frakcija 6	<b>57</b>	0
Frakcija 7	13	0
<b>SKUPAJ</b>	<b>83</b>	<b>98</b>

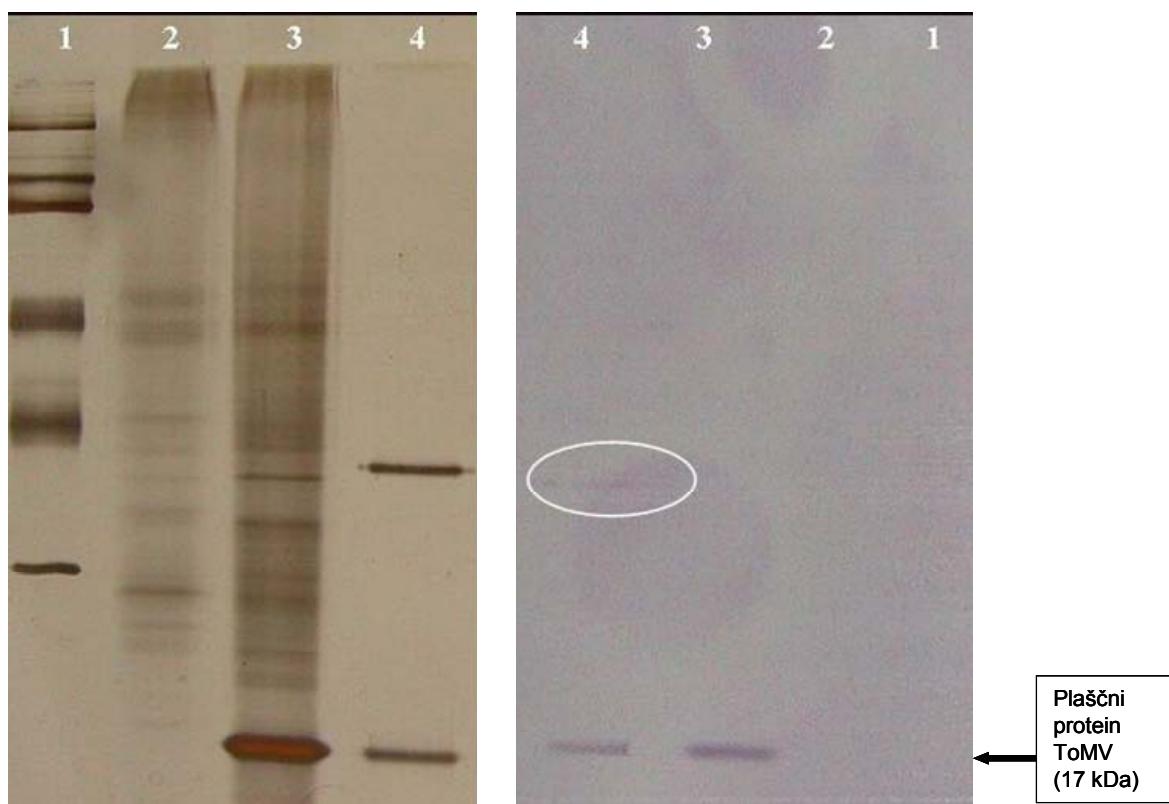
Čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku v stopničastem gradientu (0-30-100 % pufra B) je glede na izkoristek izredno učinkovito. 98 % na disk nanešenega ToMV (v obliki delno očiščenega virusnega pripravka) smo eluirali iz diska v ozkem kromatografskem vrhu, katerega volumen je bil 4 mL. Da bi ugotovili ali je virus v tej frakciji čist (brez rastlinskih proteinov), smo to frakcijo ločili na poliakrilamidnem gelu in ga barvali s srebrom (slika 44).



**Slika 44.** Ločba ToMV čiščenega po klasičnem postopku (1), delno očiščenega virusnega pripravka (2), tretje frakcije čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (3) na poliakrilamidnem gelu, barvanim s srebrom. Na desni strani (4) so markerski proteini (BioRad, 161-0317).

**Figure 44.** Silver stained polyacrylamide gel: 1 (ToMV purified by conventional method), 2 (semi purified ToMV in 20 mM sodium acetate, pH 5.5), 3 (third chromatographic fraction of purification of 1 mL of semi purified ToMV on CIM QA disk monolithic column). On the right are Marker proteins (BioRad, 161-0317).

Primerjava kolone 1 (ToMV čiščen po klasičnem postopku) in 3 (tretja frakcija čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku) na sliki 44 pove, da se v slednji poleg plaščnega proteina ToMV nahaja proteinska lisa, velika približno 40 kDa. Da bi ugotovili ali je proteinska lisa rastlinska ali virusna, smo na dveh poliakrilamidnih gelih ločili to kromatografsko frakcijo: en gel smo barvali s srebrom, proteine iz drugega gela pa smo prenesli na PVDF membrano in s specifičnimi protitelesi proti ToMV izvedli imunski pivnik (western blot) kot je opisano v poglavju Material in metode.



**Slika 45.** Poliakrilamidna ločba vzorcev: levo (gel barvan s srebrom), desno (proteini iz gela prenešeni na PVDF membrano-western blot). Vzorci: 1 (markerski proteini BioRad, 161-0317), 2 (*N. clevelandii*), 3 (delno očiščen virusni pripravek injiciran na disk) in 4 (tretja kromatografska frakcija čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku).

**Figure 45.** Polyacrylamide gel: silver stained on the left and on the right PVDF membrane after immuno blotting. Samples: 1 (marker proteins BioRad, 161-0317), 2 (*N. clevelandii*), 3 (semi purified virus loaded on the disk) and 4 (third chromatographic fraction of ToMV purification on CIM QA disk monolithic column).

Na levi strani slike 45 vidimo poliakrilamidni gel, barvan s srebrom, na desni pa membrano po prenosu proteinov iz gela na membrano in določanju s specifičnimi protitelesi proti ToMV. Na gelu, barvanim s srebrom vidimo markerske proteine in vse proteine, ki so se v ločevanih vzorcih nahajali. Na membrani, kamor smo prenesli elektroforetsko ločene proteine iz gela, seveda ne vidimo proteinskih lis v koloni 1 in 2, saj so se tukaj ločevali markerski proteini in proteini neokužene *N. clevelandii*. V koloni 3 in 4 sta lepo vidni proteinski lisi 17 kDa virusnega plaščnega proteina, v koloni 4 se je poleg tega obarvala tudi dodatna 40 kDa proteinska lisa. Ker virusni delci ToMV ne vsebujejo

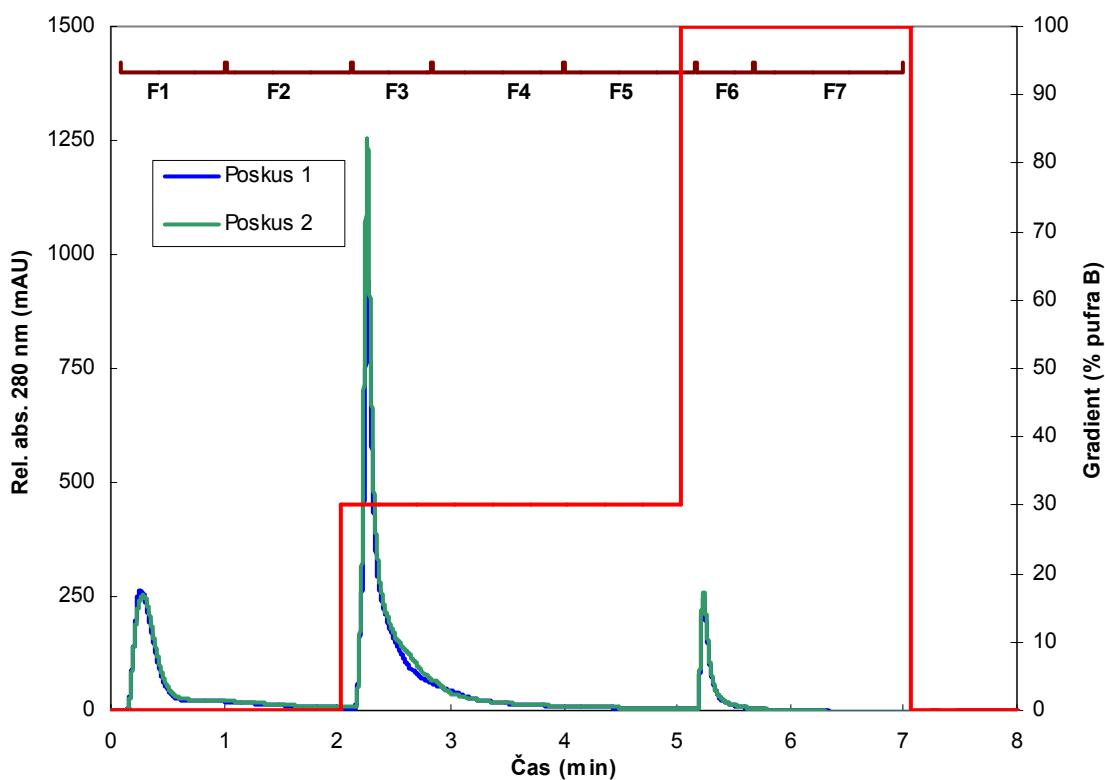
nobenega proteina takšne velikosti in ker so se protitelesa proti ToMV vezala na to preoteinsko liso, bi lahko predpostavili, da predstavlja ta proteinska lisa dimere podenot virusnega plaščnega proteina. Ker smo pri imunskem pivniku uporabili poliklonalna protitelesa, ki so bila pripravljena z uporabo antigena očiščenega iz rastlin pa obstaja tudi možnost, da antigen, ki so ga proizvajalci uporabili za imunizacijo, ni bil dobro očiščen in so tako nastala tudi protitelesa, ki prepoznavajo določen rastlinski protein. Protein Rubisco predstavlja 60 % topnih celokupnih rastlinskih proteinov in ga je pri čiščenju virusnih delcev iz rastlinskega materiala izredno težko odstraniti. V primeru, da je antigen za imunizacijo vseboval npr. protein Rubisco, so nastala protitelesa tudi proti temu proteinu. Z gotovostjo bi lahko trdili, da pripada 40 kDa lisa ToMV le v primeru, da bi pri metodi imunski pivnik uporabili dobro očiščena monoklonalna protitelesa proti ToMV.

Zaključimo lahko, da 40 kDa lisa morda predstavlja dimere plaščnega proteina ToMV in dopuščamo možnost, da poliklonalna protitelesa, ki smo jih uporabili niso specifična le za ToMV in poleg proteinov ToMV prepoznavajo tudi določen rastlinski protein.

#### 4.7.4 Ponovljivost čiščenja ToMV

Pričakovali smo, da delno očiščen virusni pripravek (vzorec 2), kljub vedno enaki pripravi ne bo vseboval enake količine ToMV, rastlinskih proteinov in rastlinskih nukleinskih kislin. Vsebnost posameznih komponent je odvisna od tega, kdaj so bile rastline *N. clevelandii* z virusom inokulirane (pri kakšni starosti) in koliko časa po inokulaciji je bila izvedena priprava vzorca iz listov.

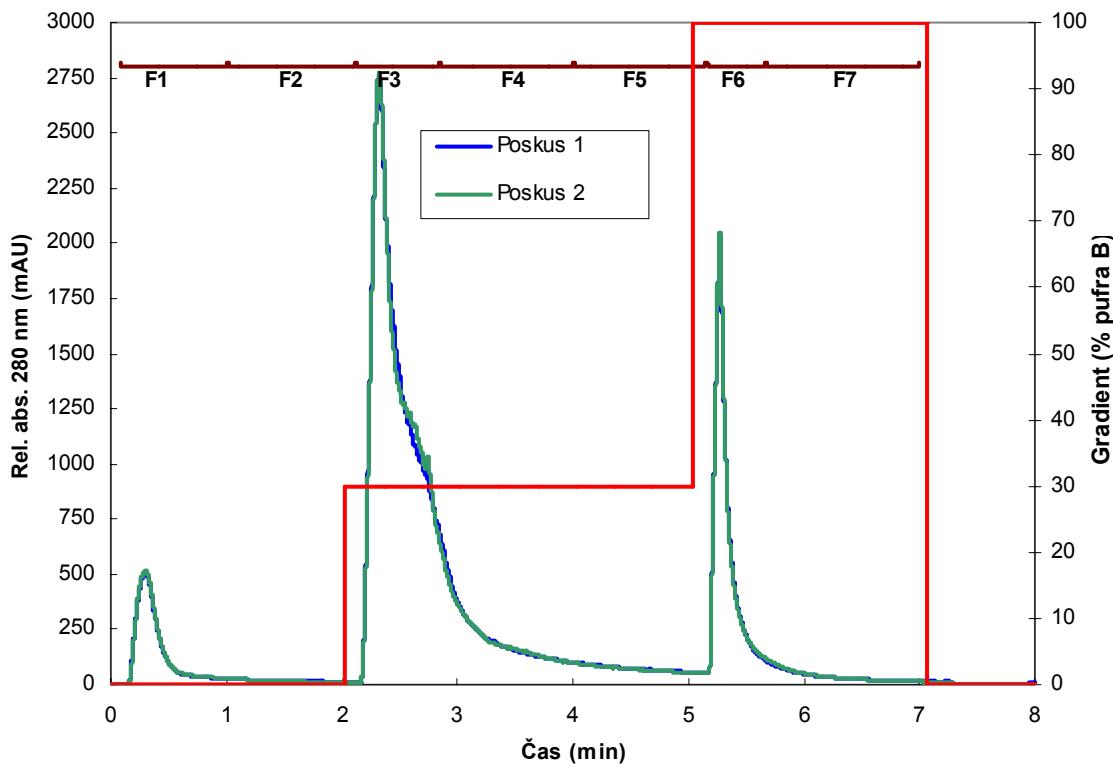
Zaradi tega smo poleg prvega delno očiščenega virusnega pripravka pripravili še dva, ki smo jih, po enakem postopku kot prvega, pripravili in čistili na CIM QA monolitnem disku. Koncentracija ToMV v drugem delno očiščenem virusnem pripravku je bila 0.18 mg/mL, v tretjem pa 0.1 mg/mL. Rastlinski material (listi *N. clevelandii* okužene s ToMV) je bil za tretje čiščenje morda pobran prepozno, saj je bilo veliko listov skorajda posušenih. Barva delno očiščenega virusnega pripravka je bila zaradi tega temno rjave barve. To je verjetno tudi razlog za visoko absorbanco, ki je vidna na sliki 47. Kromatograma čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (drugo in tretje čiščenje) na CIM QA monolitnem disku sta prikazana na sliki 46 in sliki 47.



**Slika 46.** Drugo čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (1 mL vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku. Pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: pufer A+1.5 M NaCl, pH 5.5, UV detekcija pri 260 nm, gradient je prikazan na sliki.

**Figure 46.** Second purification of ToMV from semi purified viral prepartion (1 mL of sample 2) on CIM QA disk monolithic column. Buffer A: 20 mM sodium acetate, pH 5.5, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A, flow rate: 6 mL/min, UV detection at 260 nm, gradient: as noted on the Figure.

Frakcije, ki smo jih zbrali pri čiščenju ToMV na CIM QA monolitnem disku in vhodne vzorce smo analizirali z delno kvantitativno metodo ELISA (priloga K), ter tako določili vsebnost ToMV v posameznih vzorcih in izračunali izkoristek čiščenja. Izkoristek prvega čiščenja je bil izredno visok (98 %), drugega v povprečju nižji (60 %), pri tretjem čiščenju pa je bil izkoristek v povprečju 73 %. Vzorci, iz katerih smo čistili ToMV, so bili enako pripravljeni in kasneje enako čiščeni na CIM QA monolitnem disku. Iz tega sledi, da je učinkovitost čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku verjetno zelo povezana s stanjem rastlinskega materiala, iz katerega pripravimo delno očiščen virusni pripravek.

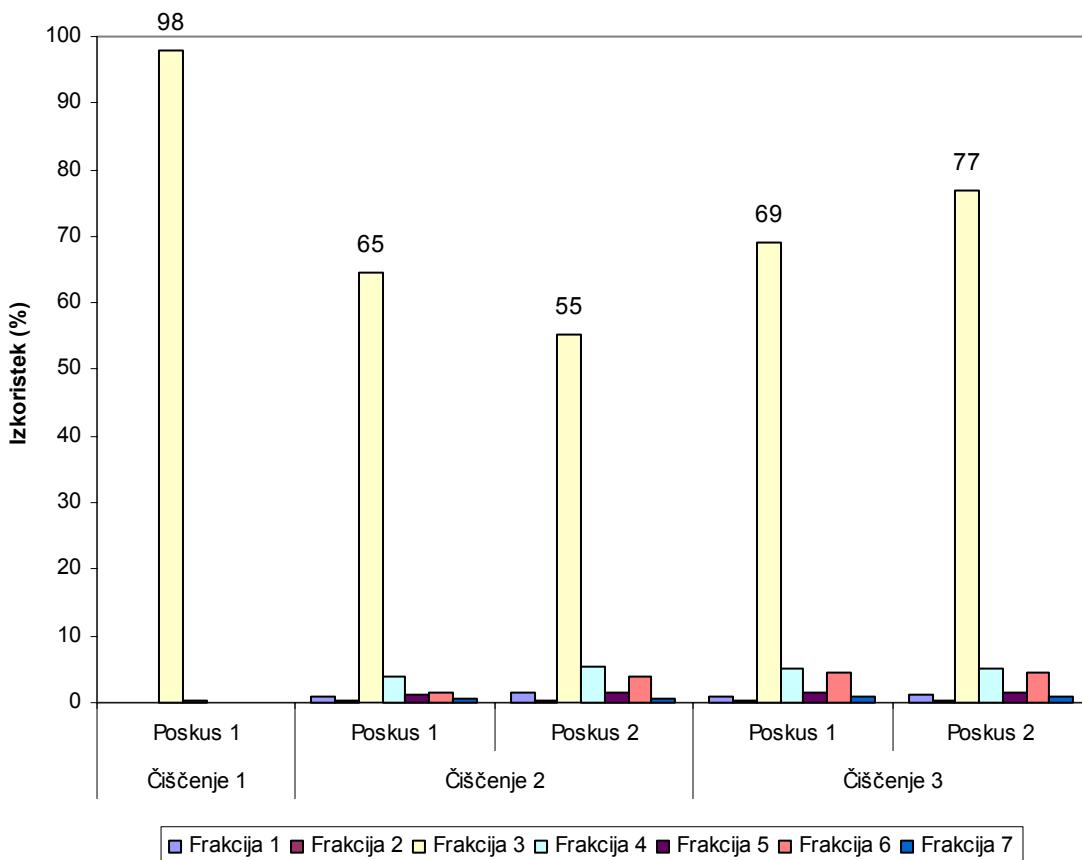


**Slika 47.** Tretje čiščenje ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka (vzorca 2) na CIM QA monolitnem disku. Gradient (% pufra B) je prikazan na sliki, pufer A: 20 mM natrijev acetat, pH 5.5, pufer B: pufer A+1.5 M NaCl, pH 5.5.

**Figure 47.** Third purification of ToMV from semi purified viral prepartion (1 mL of sample 2) on CIM QA disk monolithic column. Buffer A: 20 mM sodium acetate, pH 5.5, buffer B: 1.5 M NaCl in buffer A, flow rate: 6 mL/min, UV detection at 260 nm, gradient: as noted on the Figure.

V povprečju je izkoristek čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem nosilcu 75 %. Podoben izkoristek čiščenja so dosegli pri čiščenju Adenovirusov na Mustang® Q membrani proizvajalca Pall, kjer je izkoristek virusnih delcev v povprečju 80 % (Dynamic high..., 2002). Skoraj 100 % izplen pri čiščenju rastlinskih virusov iz delno očiščenega rastlinskega materiala z gelsko filtracijo (na kroglicah stekla s kontroliranimi velikostmi por, angl. controlled pore glass) je dosegel Barton (1977). Zaradi velikih elucijskih volumnov (25-35 mL) in dolgotrajne predpriprave kromatografskega nosilca je metoda kljub učinkovitosti slaba alternativa klasičnemu postopku čiščenja virusnih delcev.

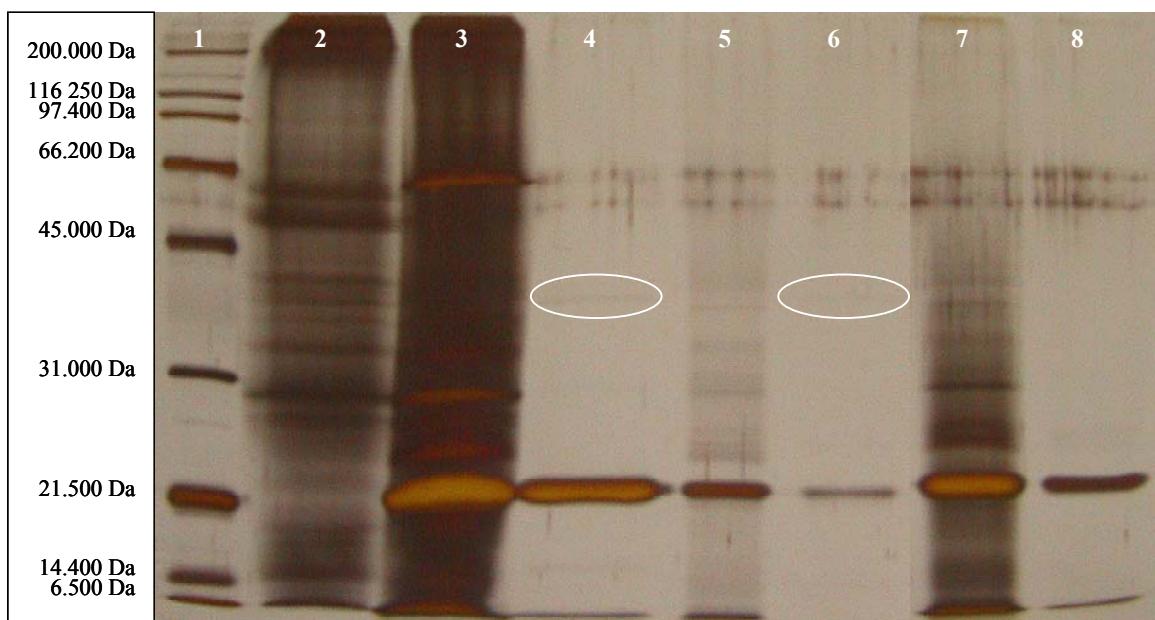
Veliko nižji izplen virusnih delcev (v povprečju 30 %) sta dosegla Albrechsten in Heide (1990) pri čiščenju rastlinskih virusov iz rastlinskega materiala z gelsko filtracijo. V primerjavi s tem izplnom je izkoristek pri čiščenju ToMV na CIM monolitnem nosilcu zelo visok.



**Slika 48.** Grafični prikaz rezultatov čiščenja ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku (analiza frakcij z metodo ELISA).

**Figure 48.** Purification of ToMV from semi purified viral preparation (clarificate of homogenised plant material with cloroform) on CIM QA disk monolithic column. On the Figure yields (determined with semi quantitative ELISA) of all chromatographic fractions are shown.

Z ločevanjem proteinov na poliakrilamidnem gelu smo želeli preveriti, kakšne proteine vsebuje delno očiščen virusni pripravek in kakšne proteine vsebujejo posamezne kromatografske frakcije čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku.



**Slika 49.** S srebrom barvan poliakrilamidni gel: 1 (markerski proteini, BioRad, 161-0317), 2 (neokužena *N. clevelandii*), 3 (s ToMV okužena *N. clevelandii*), 4 (ToMV čiščen po klasičnem postopku), 5 (4x redčen delno očiščen ToMV-drugo čiščenje), 6 (tretja kromatografska frakcija drugega čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku), 7 (delno očiščen ToMV-tretje čiščenje) in 8 (tretja kromatografska frakcija tretjega čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku).

**Figure 49.** Silver stained polyacrylamide gel: 1 (marker proteins BioRad, 161-0317), 2 (*N. clevelandii*), 3 (*N. clevelandii* infected with ToMV), 4 (ToMV purified by conventional method), 5 (4x diluted semi purified ToMV-second purification), 6 (third chromatographic fraction of the second purification of ToMV on CIM QA disk), 7 (semi purified ToMV-third purification) and 8 (third chromatographic fraction of the third purification of ToMV on CIM QA disk).

Na sliki 49 vidimo, poleg proteinov neokužene in s ToMV okužene *N. clevelandii*, delno očiščena virusna pripravka za drugo in tretje čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku ter tretji kromatografski frakciji teh dveh čiščenj. V koloni 4 in 6 je z belo črto obkrožena sicer slabo vidna proteinska lisa, ki se je pojavljala tudi v kromatografski frakciji prvega čiščenja in za katero smo z imunskim pivnikom (western blot) pokazali, da jo prepoznajo poliklonalna protitelesa proti ToMV. Te proteinske lise pri kromatografski frakciji tretjega čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku ne vidimo (kolona 8 na sliki).

49). Dejstvo, da se 40 kDa proteinska lisa pojavlja tudi na membrani, kjer je bil na gel naložen ToMV očiščen po klasičnem postopku (kolona 4 na sliki 49), nam dovoljuje postaviti trditev, da smo ToMV na CIM QA disku očistili vsaj tako dobro, kakor je očiščen ToMV po klasičnem postopku. Ali predstavlja 40 kDa proteinska lisa proteine, ki pripadajo virusu (dimeri plaščnega proteina) ali rastlini pa bi z gotovostjo lahko ugotovili le z uporabo monoklonalnih protiteles proti ToMV.

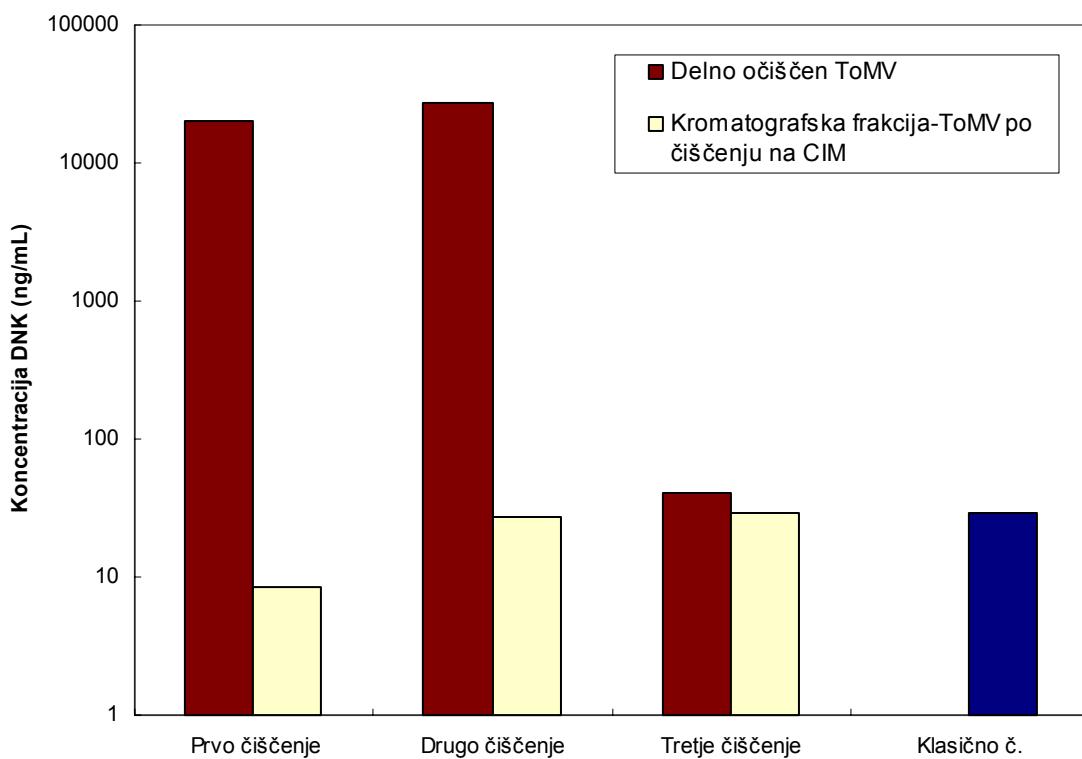
#### **4.7.5 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (detekcija 18S rRNK)**

V kromatografskih frakcijah zbranih pri čiščenju ToMV na CIM QA monolitnem disku smo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času določili prisotnost DNK zaporedja, ki pri evkariontih kodira 18S podenote ribosomov (18S rRNK). Na ta način smo določili prisotnost gostiteljske DNK. Koncentracije DNK v vzorcih, iz katerih smo čistili ToMV in v kromatografskih frakcijah čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku (kromatografske frakcije spiranja diska z 0.45 M NaCl), so prikazane na sliki 50, kjer je za primerjavo prikazana tudi koncentracija DNK v ToMV izolatu, čiščenem na klasičen način po van der Vlugt-u.

Pri prvem in drugem čiščenju ToMV na CIM QA monolitnem disku smo odstranili večino DNK, prisotne v delno očiščenem ToMV pripravku, iz katerega smo ToMV čistili. V povprečju med vsemi čiščenji je v kromatografski frakciji, kjer se je nahajal očiščen ToMV ostalo 23 µg/mL, kar pomeni le 0.05-0.1 % DNK, ki je bila prisotna v začetnem vzorcu, iz katerega smo ToMV čistili. Absolutna koncentracija DNK v kromatografskih frakcijah pri prvem in drugem čiščenju je v povprečju 18 ng/mL, kar je 10 ng/mL manj od koncentracije DNK v ToMV pripravku, čiščenem na klasičen način.

Tretje čiščenje pa se od obeh prejšnjih razlikuje, saj je bil rastlinski material, iz katerega smo pripravili delno očiščeni virusni pripravek v zelo slabem stanju, kakor je že omenjeno v poglavju »Ponovljivost čiščenja ToMV«. Vsebnost DNK v delno očiščenem virusnem pripravku za tretje čiščenje je bila v primerjavi s prvim in drugim delno očiščenim virusnim pripravkom izredno nizka (0.2 % DNK povprečja prvega in drugega delno očiščenega virusnega pripravka), verjetno se je DNK v rastlinskem materialu razgradila in se je zato tudi drugače ločevala na CIM nosilcu. To je verjetno tudi razlog, da se je 75 % DNK, prisotne v delno očiščenem virusnem pripravku za tretje čiščenje iz CIM QA

monolitnega diska izpralo skupaj s ToMV. Absolutna koncentracija DNK v kromatografski frakciji je primerljiva s koncentracijo DNK v ToMV pripravku čiščenem na konvencionalen način. Zaključimo lahko, da pri čiščenju ToMV iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku poleg gostiteljskih proteinov uspešno odstranimo tudi večino gostiteljske DNK. Koncentracija DNK je po čiščenju na CIM QA monolitnem disku enaka ali manjša od koncentracije DNK v ToMV pripravku, ki smo ga očistili na klasičen način.

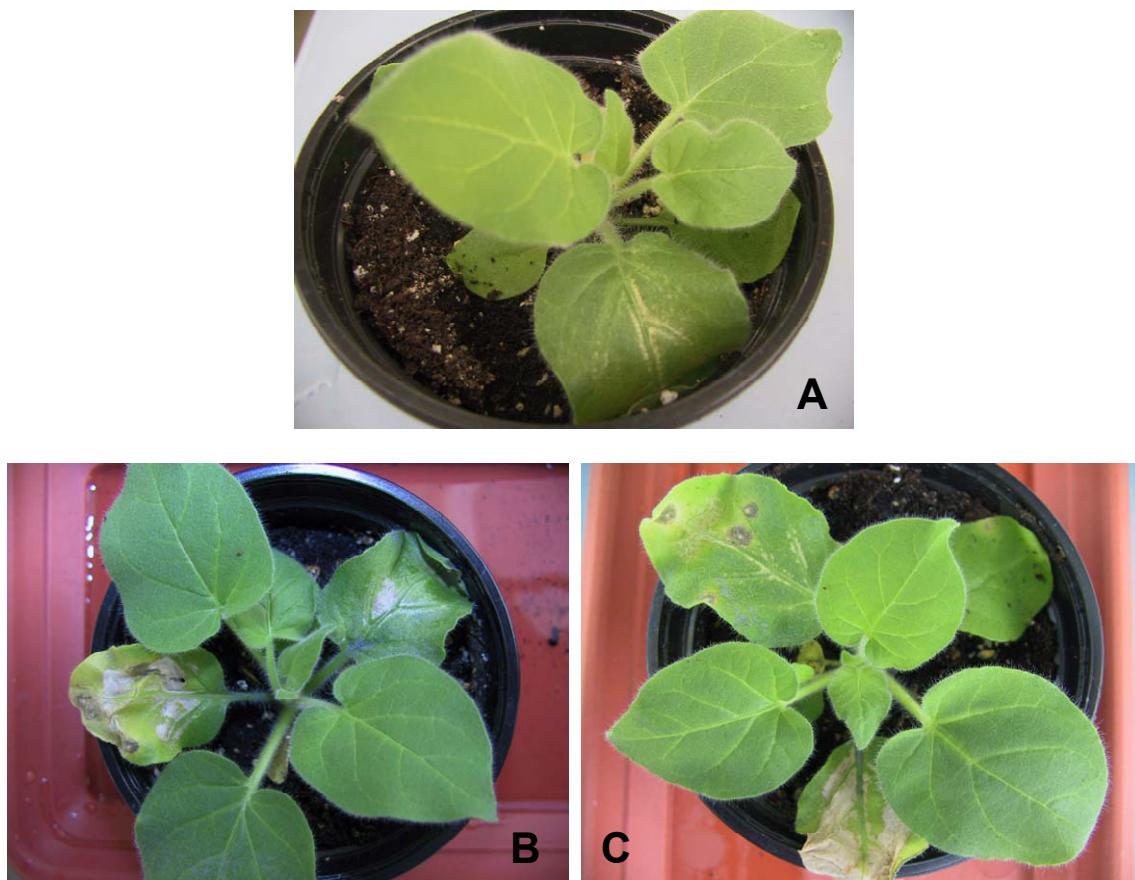


**Slika 50.** Koncentracije DNK (zaporedja za 18S rRNK) v delno očiščenih ToMV pripravkih pred čiščenjem, kromatografskih frakcijah po čiščenju na CIM QA monolitnem disku in v ToMV pripravku, ki je bil očiščen na klasičen način. Koncentracije DNK so bile določene z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in uporabo Human 18S rRNA kita (Applied Biosystems).

**Figure 50.** Concentration of DNA (18S rRNA sequence) in loading samples (semi purified ToMV), in chromatographic fractions after purification of ToMV on CIM QA disk monolithic column and in ToMV prepartion, purified by conventional method.

#### 4.7.6 Infektivnost ToMV po čiščenju na CIM QA monolitnem disku

Infektivnost ToMV po čiščenju virusa iz delno očiščenega virusnega pripravka na CIM QA monolitnem disku smo preverili na rastlinah *N. glutinosa*. S karborundom posute liste tobaka smo mehansko inokulirali s tretjo kromatografsko frakcijo, ki je vsebovala večino virusnih delcev. Lokalne lezije so se na listih tobaka razvile 10-20 dni po inokulaciji, kar pomeni, da čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku ne vpliva na infektivnost ToMV.

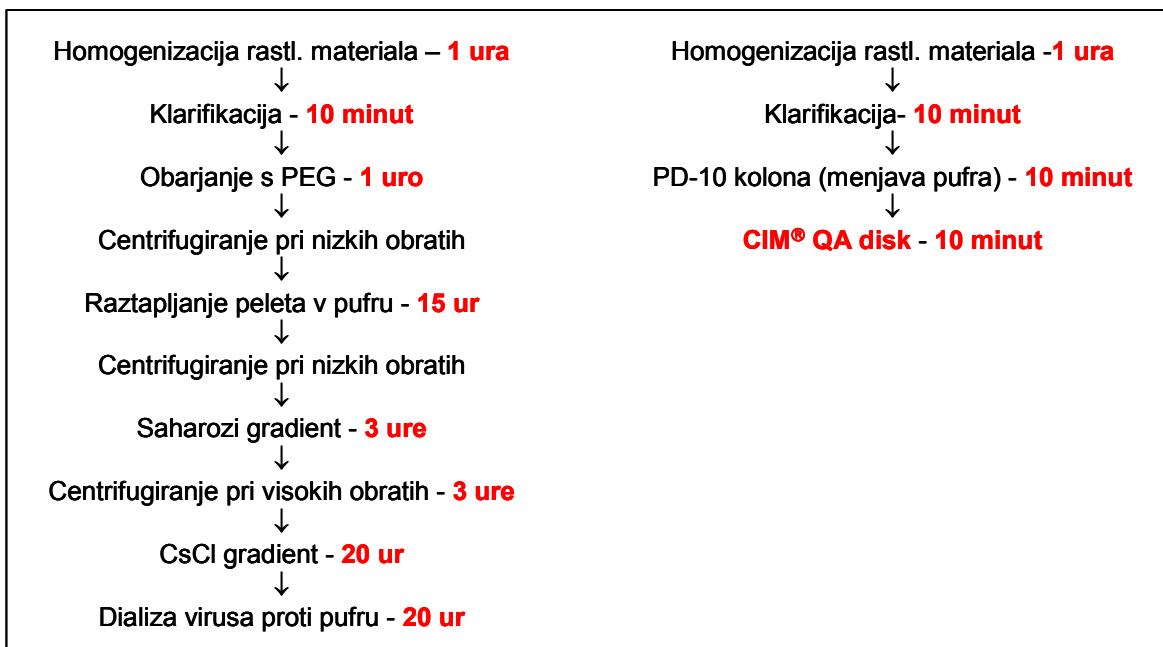


**Slika 51.** Fotografije rastlin *N. glutinosa* 14 dni po mehanski inokulaciji z vodo-negativna kontrola (slika A), s tretjo kromatografsko frakcijo drugega (slika B) in tretjega (slika C) čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku.

**Figure 51.** Photography of *N. glutinosa* plants 14 days after mechanical inoculation with water-negative control (figure A), with the third chromatographic fraction of the second (figure B) and the third (figure C) ToMV purification on CIM QA disk monolithic column.

#### 4.7.7 Primerjava čiščenja ToMV po klasični metodi in na CIM QA monolitnem disku

Na levi strani slike 52 je shematsko prikazano čiščenje ToMV po klasičnem načinu, na desni strani pa čiščenje ToMV, ki se po homogenizaciji in klarifikaciji rastlinskega materiala nadaljuje na CIM QA monolitnem disku.



**Slika 52.** Primerjava sheme čiščenja ToMV po klasičnem postopku (levo) in z uporabo CIM QA monolitnega diska (desno).

**Figure 52.** Scheme comparison of ToMV purification by conventional method (on the left) and on CIM QA disk monolithic column (on the right).

Pri obeh shemah so pripisani predvideni časi trajanja posameznega koraka. Čas, ki ga potrebujemo za posamezen korak in je naveden v shemi, ne vključuje priprave na posamezen korak. Za pripravo saharoznega gradiента potrebujemo vsaj 1 uro. Ker se po centrifugiraju v saharoznem in CsCl gradienatu v centrifugirkah ne vidi, kje se virusni delci nahajajo, je potrebno odvzemati frakcije in izmeriti absorbanco pri 260 in 280 nm, za kar potrebujemo dodatni 2 uri za vsako centrifugiranje v gradienatu. Tako traja čiščenje ToMV po klasični metodi približno 5 delovnih dni, čiščenje ToMV, ki vključuje CIM nosilec pa približno dve uri. Prihranek časa je torej zelo velik, kar je glavna prednost

uporabe CIM monolitnega nosilca. Preglednica 7 prikazuje porabo časa za celoten postopek čiščenja ToMV po klasični metodi in čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku, skupaj s porabo časa za pripravo na posamezen korak. Z močnejšim tiskom so v preglednici 7 označeni koraki, ko dejansko delamo in na koncu te preglednice je seštevek teh ur-torej ur, ko dejansko delamo. Razlika je več kot dvakratna, torej tudi v tem smislu pomeni čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku prihranek časa.

**Preglednica 7.** Poraba časa za čiščenje ToMV po klasični metodi in za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku.

**Table 7.** Consumption of time for purification of ToMV by conventional method and for purification of ToMV on CIM QA monolithic disk.

<b>Korak</b>	<b>Klasično čiščenje</b>	<b>Čiščenje na CIM disku</b>
Homogenizacija rastlinskega materiala	<b>1 ura</b>	<b>1 ura</b>
Klarifikacija	<b>10 minut</b>	<b>10 minut</b>
Menjava pufra na PD-10 koloni	/	<b>10 minut</b>
Priprava HPLC sistema in pufrov	/	<b>30 minut</b>
Čiščenje na CIM QA disku	/	<b>10 minut</b>
Obarjanje s PEG	1 ura	/
Centrifugiranje pri nizkih obratih	<b>10 minut</b>	/
Raztpljanje peleta v pufru	15 ur	/
Priprava saharoznega gradiента	<b>1 ura</b>	/
Saharozni gradient	3 ure	/
Odvzemanje frakcij iz sah. gradiента	<b>1 ura</b>	/
Merjenje absorbanc pobranih frakcij	<b>1 ura</b>	/
Centrifugiranje pri visokih obratih	3 ure	/
CsCl gradient	20 ur	/
Odvzemanje frakcij iz CsCl gradiента	<b>1 ura</b>	/
Merjenje absorbanc pobranih frakcij	<b>1 ura</b>	/
Priprava pufra za dializo	<b>30 minut</b>	
Dializa virusa proti pufru	20 ur	/
Menjava pufra na PD-10 koloni		10 minut
<b>SKUPAJ</b>	<b>6 ur in 50 minut</b>	<b>2 uri in 10 minut</b>

Ker je čistost ToMV, čiščenega po obeh postopkih primerljiva, lahko rečemo, da CIM QA monolitni nosilec nadomesti tri pomembne korake klasičnega čiščenja: obarjanje s PEG, centrifugiranje v saharoznem gradiantu in ultracentrifugiranje v CsCl gradiantu. Pri klasičnem čiščenju je potrebno CsCl iz virusnega pripravka odstraniti, kar pri klasičnem

postopku storimo s postopkom dialize. Pri čiščenju ToMV na CIM monolitnem nosilcu pa dializa ni potrebna, virus se nahaja v 20 mM natrijevem acetatu z 0.45 M NaCl, pH 5.5.

Z delno kvantitativno metodo smo določili vsebnost ToMV v propagacijski rastlini pred uporabo rastlinskega materiala za čiščenje. Ugotovili smo, da je v 1 g listov približno 30 mg ToMV (približno 3 % teže lista). Če torej čistimo ToMV iz 30 g listov, bi ob 100 % učinkovitosti postopka čiščenja lahko očistili 900 mg ToMV. V najboljšem primeru smo po delnem čiščenju ToMV iz 30 g listov očistili približno 10 mg ToMV (vzorec 1), kar pomeni, da je izplen virusnih delcev po klarifikaciji rastlinskega materiala manj kot 2%! Do tako velikih izgub pride pri klarifikaciji rastlinskega materiala (homogenata), kjer gre za ločevanje večjih celičnih struktur, ki niso topne od topnih komponent, ki se nahajajo v homogenatu. Ker so virusni delci pogosto vezani na strukture v celicah, predvsem na notranje celične membrane, pri klarifikaciji hkrati s celičnimi strukturami in notranjimi celičnimi membranami odstranimo tudi veliko virusnih delcev. Izgube pri nadaljnjih korakih klasičnega čiščenja ToMV niso tako drastične, saj je bil končen izplen virusa po klasični metodi v povprečju 0.4 % (iz 30 g listov *N. clevelandii* smo očistili 4 mg ToMV). Pri čiščenju ToMV na CIM QA disku je bil končni izplen ToMV glede na začetni material 1.6% (približno 14 mg ToMV iz 30 g listov). Izkoristek je pri čiščenju ToMV na CIM monolitnem nosilcu sicer 4x večji, vendar pa so izgube pri obeh postopkih zelo velike pri homogenizaciji in klarifikaciji rastlinskega materiala, ki je del obeh postopkov čiščenja.

Kot je zapisano v poglavju »Pregled objav« pod naslovom »Čiščenje virusov« lahko izboljšamo izplen virusnih delcev pri klarifikaciji tako, da pustimo delovati organsko topilo dalj časa in / ali večkrat ponovimo centrifugiranje s svežim pufrom, ki ga dodamo usedlini po prvem centrifugiraju (Walkey, 1985). Slednje smo preizkusili tako, da smo korak klarifikacije (centrifugiranje pri nizkih obratih) 3x ponovili, kar pomeni, da smo po prvem centrifugiraju pri nizkih obratih ponovno dodali pufer in centrifugiranje ponovili. Z delno kvantitativno metodo smo določili vsebnost ToMV v dobljenih klarifikatih, vendar je bilo v njih manj kot 2 % ToMV, prisotnega v prvem klarifikatu. Vsebnost ToMV virusnih delcev je bila prenizka, da bi čiščenje ToMV iz dodatno dobljenih klarifikatov prineslo bistveno razliko v skupnem izplenu virusa.

Optimizacija homogenizacije in klarifikacije rastlinskega materiala iz katerega čistimo ToMV ostaja torej nedokončana in bi jo bilo potrebno nadaljevati, saj bi tako povečali koncentracijo virusnih delcev v vzorcu, ki ga čistimo na CIM QA monolitnem disku.

## 5 SKLEPI

Dva modelna rastlinska virusa, ToMV in CMV, smo namnožili na propagacijskih rastlinah in jih uspešno očistili oz. delno očistili iz rastlinskega materiala po klasičnih postopkih za čiščenje rastlinskih virusov. Očiščen ToMV oz. delno očiščen virusni pripravek CMV smo uporabili za določanje optimalnih pogojev za ločevanje, koncentriranje in čiščenje obeh virusov na CIM monolitnih nosilcih.

Priredili smo kvalitativno metodo ELISA za delno kvantifikacijo CMV in ToMV.

Izbrali smo optimalne pogoje za ločevanje, koncentriranje in čiščenje obeh virusov, ki so za CMV 20 mM Tris-HCL pufer, pH 8 (vezni pufer), 1.5 M NaCl v veznem pufru, pH 8 (elucijski pufer), ter CIM DEAE monolitni nosilec in za ToMV 20 mM natrijev acetat, pH 5.5 (vezni pufer), 1.5 M NaCl v veznem pufru (elucijski pufer) ter CIM QA monolitni nosilec.

Pretok mobilne faze vpliva na izkoristek ločbe: pri večjem pretoku je izkoristek višji. Koncentracija virusa v vzorcu na ločevanje ToMV ne vpliva.

Ugotovili smo, da je ToMV sposoben okužiti rastline *N. clevelandii* skozi koreninski sistem, z zalivanjem rastlin z vodo, ki vsebuje virusne delce ToMV v tako nizki koncentraciji, da jih z metodo ELISA ne moremo določiti.

Koncentriranje CMV in ToMV iz vzorcev, kjer so virusni delci v koncentracijah pod mejo detekcijske metode ELISA, je bilo uspešno. Koncentracija CMV v elucijski frakciji je 80-170x večja v primerjavi s pripravljeni redčino, koncentracija ToMV pa v povprečju 300x večja kakor v redčini.

CMV po koncentriranju na CIM DEAE monolitnem disku ni več infektiven. Vzroka za izgubo infektivnosti CMV sta visoka koncentracija NaCl v elucijskem pufru in/ ali strižne sile pri prehodu virusnih delcev skozi HPLC sistem (brez CIM monolitnega diska). Izguba infektivnosti CMV je torej posledica labilne narave virusnih delcev, kar je skladno z literurnimi podatki (Koenig, 1986). ToMV je po koncentriranju na CIM QA monolitnem disku ostal infektiven.

Kapaciteta CIM QA monolitnega diska za ToMV je 11.7 mg ToMV / mL nosilca oz.  $1.7 \cdot 10^{14}$  virusnih delcev ToMV / mL nosilca (merjeno pri 10 % preboju).

Čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem disku je bilo uspešno, test infektivnosti je pokazal, da je virus po končanem čiščenju na monolitnem nosilcu infektiven. Čistost ToMV po čiščenju na CIM QA monolitnem disku je primerljiva s čistostjo ToMV čiščenega po klasični metodi. Čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem nosilcu je v primerjavi s konvencionalno metodo veliko krajše (celoten postopek traja približno dve uri), izgube ToMV so v povprečju le 25 %. Ker imajo vse CIM monolitne enote (od diskov do 800 mL cevnih modulov) enako monolitno strukturo ter gostoto ligandov (Štrancar in sod., 2002), predvidevamo, da bi bilo čiščenje enako učinkovito tudi na CIM monolitnih nosilcih z večjim volumnom, kar bi povečalo produktivnost oz. omogočilo čiščenje virusnih delcev v industrijskem merilu.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Cilj doktorskega dela je bilo preučiti možnosti uporabe CIM monolitnih nosilcev za ločevanje, koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov. CIM monolitni nosilci so bili zasnovani za potrebe ločevanja velikih molekul oz. nanodelcev kot so imunoglobulini, plazmidna DNA in virusi.

Potrebe po hitrih in učinkovitih metodah za koncentriranje virusov iz vzorcev, kjer so le-ti v izredno nizkih koncentracijah, se pojavljajo pri preverjanju prisotnosti patogenih rastlinskih virusov v vodi, ki se uporablja za zalivanje rastlin v rastlinjakih. Metode, ki bi omogočale hitro in enostavno čiščenje virusnih delcev iz rastlinskega materiala, pa bi nadomestile obstoječe dolgotrajne in neučinkovite metode. Čisti virusni delci so potrebni pri proizvodnji poliklonskih protiteles, standardnih raztopin, cepiv in pri pripravi virusnih vektorjev za potrebe genske terapije.

Uporabnost CIM monolitnih nosilcev za koncentriranje in čiščenje virusnih delcev smo preverjali z dvema modelnima rastlinskima virusoma: kumaričnim mozaičnim virusom (cucumber mosaic virus, CMV) in paradižnikovim mozaičnim virusom (tomato mosaic virus, ToMV), ki se razlikujeta po obliki in velikosti. CMV je izometričen virus, ki meri v premeru 30 nm, ToMV pa je paličaste oblike in meri 300 nm x 18 nm.

CMV in ToMV smo namnožili v propagacijskih rastlinah (CMV v *Nicotiana tabacum* in ToMV v *Nicotiana clevelandii*) in jih delno ali popolnoma očistili po prej opisanih konvencionalnih metodah. Dobljene virusne pripravke smo uporabili za optimizacijo pufrskega sistema in pH ter za izbiro CIM monolitnega nosilca. Optimalni pogoji za ločevanje in koncentriranje CMV so 20 mM Tris-HCL pufer, pH 8 (vezni pufer) in 1.5 M NaCl v veznem pufru, pH 8 (elucijski pufer) ter CIM DEAE monolitni nosilec. Za ToMV pa so optimalni pogoji 20 mM natrijev acetat, pH 5.5 (vezni pufer) in 1.5 M NaCl v veznem pufru (elucijski pufer) ter CIM QA monolitni nosilec.

Čist virusni pripravek ToMV smo uporabili za ugotavljanje vpliva pretoka mobilne faze in koncentracije virusa v ločevanem vzorcu na kromatografsko ločbo. Pokazalo se je, da pretok mobilne faze vpliva na izkoristek ločbe ToMV (pri večjem pretoku je izkoristek višji), koncentracija virusa v vzorcu pa na ločevanje nima vpliva.

Preverili smo sposobnost ToMV, da okuži rastline *N. clevelandii* preko koreninskega sistema in ugotovili da je ToMV sposoben okužbe korenin in listov, če rastline zalivamo z vodo, ki vsebuje ToMV, čeprav je koncentracija ToMV pod mejo detekcije ELISA.

Vzorce, iz katerih smo koncentrirali CMV in ToMV (redčine), smo pripravili v veznem pufru, za ToMV smo pripravili redčine tudi v vodovodni vodi. Koncentriranje CMV in ToMV iz pripravljenih redčin je bilo uspešno. Koncentracija CMV v kromatografskem vrhu je bila 80-170x večja v primerjavi z redčino, koncentracija ToMV pa v povprečju 300x večja, kakor v redčini. To pomeni, da smo za 80-170x / 300x izboljšali občutljivost ELISA metode za določanje CMV / ToMV.

Koncentracijo virusnih delcev v posameznih vzorcih smo določali z metodo ELISA, ki smo jo priredili tako, da je bila delno kvantitativna. Infektivnost virusov (CMV oz. ToMV) po prehodu skozi CIM monolitni nosilec in celoten HPLC smo preverjali na testnih rastlinah (*Chenopodium quinoa* za CMV in *Nicotiana glutinosa* za ToMV). Inokulirali smo jih s kromatografskimi frakcijami, ki so vsebovale največ virusnih delcev. CMV po koncentriranju ni bil več infektiven, vendar smo ugotovili, da je vzrok za izgubo infektivnosti visoka koncentracija NaCl v elucijskem pufru oz. strižne sile pri prehodu skozi HPLC sistem (brez CIM monolitnega nosilca). Na testnih rastlinah, ki smo jih inokulirali s kromatografskimi frakcijami koncentriranja ToMV na CIM QA monolitnem disku, so se po 10 dnevih razvile lokalne lezije, ToMV je torej ohranil infektivnost.

S čistim virusnim pripravkom smo določili tudi kapaciteto CIM QA monolitnega diska za ToMV, ki je  $11.7 \text{ mg ToMV / mL nosilca}$  oz.  $1.7 \cdot 10^{14}$  virusnih delcev ToMV / mL nosilca.

Za preučevanje čiščenja virusnih delcev na CIM monolitnih nosilcih smo pripravili 4 različno delno očiščene virusne pripravke ToMV. Na podlagi kromatografskih ločb delno očiščenih pripravkov smo izbrali pripravek, katerega priprava traja približno 30 minut in pri pripravi katerega so izgube ToMV minimalne. Delno očiščenemu virusnemu pripravku smo na PD-10 koloni (GE, 17-0851-01) zamenjali pufer iz 200 mM fosfatnega pufra, pH 7 v 20 mM acetatni pufer pH 5.5 (vezni pufer, ki smo ga uporabili pri nadalnjem čiščenju na CIM monolitnem nosilcu). Optimizirali smo gradient za čiščenje ToMV na CIM QA monolitnem nosilcu. Koncentracije ToMV v posameznih kromatografskih frakcijah smo določali z delno kvantitativno metodo ELISA, čistost pa z SDS-PAGE (vsebnost proteinov) in z verižno reakcijo s polimerazo (določanje vsebnosti gostiteljske DNK). ToMV smo na CIM QA monolitnem nosilcu čistili v stopenjskem gradientu, večina ToMV

(v povprečju 75 % na disk nanešenega ToMV) se je iz diska izprala z 20 mM natrijevim acetatom, ki je vseboval 0.45 M NaCl, pH 5.5. Čistost ToMV v tej kromatografski frakciji je bila primerljiva s čistostjo ToMV, čiščenega po konvencionalni metodi, pri kateri traja celoten postopek 5 delovnih dni. ToMV je bil po čiščenju na CIM monolitnem nosilcu infektiven, kar smo preverili z mehansko inokulacijo testne rastline *N. glutinosa*.

Metoda čiščenja ToMV na CIM QA monolitnem disku je v primerjavi s konvencionalno metodo veliko krajsa (približno 2 uri v primerjavi s 5 delovnimi dnevi), izgube ToMV so v povprečju le 25 %. Čiščenje ToMV bi lahko prenesli na CIM monolitne nosilce z večjim volumnom, kar bi omogočilo čiščenje virusnih delcev v industrijskem merilu. Predvidevamo, da bi bila učinkovitost čiščenja virusnih delcev na CIM monolitnih nosilcih z večjim volumnom zaradi skupnih lastnosti vseh CIM monolitnih enot (enaka monolitna struktura in gostota ligandov), podobna učinkovitosti na CIM monolitnem disku.

## 6.2 SUMMARY

The aim of this doctoral thesis was to examine the potential of CIM monolithic supports (BIA Separations d.o.o., Ljubljana) for separation, concentration and purification of plant viruses. CIM monolithic supports were designed for purification of large molecules and nanoparticles like immunoglobulins, plasmid DNA and viruses.

Fast and efficient methods for concentration of viruses from samples where viruses are in very low concentration are essential to increase the virus titre to the detectable level. An example of such sample is irrigation water used in greenhouse plant production. Methods for fast and efficient purification of virus particles would substitute for currently used time consuming and ineffective methods. Purified viral particles are needed for polyclonal antibody production, vaccine production and production of viral particles for gene therapy. Applicability of CIM monolithic supports for concentration and purification of viral particles were examined using two model plant pathogenic viruses: cucumber mosaic virus (CMV) and tomato mosaic virus (ToMV). Two viruses differ in shape and size. CMV is small isometric virus, 30 nm in diameter, ToMV is rod shaped and its dimensions are 18 x 300 nm.

CMV and ToMV were propagated in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii*, respectively. Viral particles were purified (ToMV) or semi purified (CMV) from plant

material using previously described method. Viral preparations were used for buffer system and pH optimisation and for selection of optimal CIM monolithic support. Optimal conditions for separation and concentration of CMV are 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8 as loading buffer, 1.5 M NaCl in loading buffer as elution buffer using CIM DEAE monolithic support. Optimal conditions for ToMV are 20 mM sodium acetate, pH 5.5 as loading buffer, 1.5 M NaCl in loading buffer as elution buffer using CIM QA monolithic support.

Influence of the flow rate of mobile phase and concentration of ToMV in the sample were determined using purified ToMV. Concentration of the virus in separated sample does not have the influence on ToMV separation, while flow rate of the mobile phase influences the recovery of separated virus: higher flow rate means better recovery of the virus.

The ability of ToMV to infect *N. clevelandii* through the root system was examined. The experiment showed that ToMV is capable to infect plants through the root system, even if the water used for watering of the plants contains ToMV in the concentration below the detection limit of ELISA.

Starting samples (dilutions of viral particles) for concentration of viruses on CIM monolithic column were prepared in loading buffer, for ToMV also dilutions of ToMV in tap water were prepared. Concentration of CMV and ToMV from dilutions was successful. Concentration of CMV in chromatographic peak was 80-170 times higher compared to starting dilution and concentration of ToMV in chromatographic peak was on average 300 times higher than in starting dilution which means the detection limit of the ELISA methods was greatly improved.

Concentrations of CMV or ToMV in chromatographic fractions were determined with ELISA, which was adapted in order to work like semi quantitative method. Infectivity of CMV and ToMV after passing through the monolithic support and HPLC system was determined by mechanical inoculation of test plants (*Chenopodium quinoa* for CMV and *Nicotiana glutinosa* for ToMV) with chromatographic fractions comprising majority of viral particles. After the concentration of CMV on CIM monolithic support CMV lost infectivity. With additional experiments it was determined that high salt concentration or passing the virus through HPLC system even without monolithic support is the reason for infectivity loss. On test plants inoculated with chromatographic fractions of ToMV

concentration local lesions developed 10 days after inoculation-ToMV retained the ability to infect *N. glutinosa*.

Purified ToMV was used to determine the capacity of CIM QA disk monolithic column for ToMV. Binding capacity of CIM QA monolithic support is 11.7 mg ToMV / mL of support or  $1.7 \cdot 10^{14}$  viral particles / mL of support.

Four different partially purified viral preparations were prepared for the purification of ToMV on CIM QA monolithic support. On the basis of chromatographic profiles of these preparations, partially purified ToMV preparation, which takes 30 minutes to prepare and where loses of ToMV are minimal, was chosen. On PD-10 column (GE, 17-0851-01) buffer of partially purified ToMV was changed to 20 mM sodium acetate, pH 5.5 (loading buffer used for purification on CIM QA disk monolithic column). Buffer gradient for purification of ToMV on CIM support was optimised. Concentration of ToMV in chromatographic fractions were determined with semi quantitative ELISA and purity with SDS-PAGE (detection of host proteins) and with real-time PCR (detection of 18S rRNA). ToMV was purified on CIM QA disk monolithic column using step gradient. The majority of ToMV (80% of loaded ToMV on average) was eluted from the disk with 0.45 M NaCl in loading buffer. Purity of ToMV was comparable with ToMV purified by conventional method, which takes 5 working days. After purification of ToMV on CIM QA disk monolithic column ToMV was still able to infect *N. glutinosa*.

Purification of ToMV using CIM QA disk monolithic column compared to conventional purification method is much faster (2 hours compared to 5 working days), loss of ToMV is minimal (25 % on average) and the method can be easily transferred to CIM support with bigger volume (scale-up) which increases productivity.

## 7 VIRI

Agrios G.N. 1997. Plant pathology. 4<sup>th</sup> ed. San Diego, Academic Press: 635 str.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular biology of the cell. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Gerland Publishing, Inc.: 1294 str.

Albrechstein M., Heide M. 1990. Purification of plant viruses and virus coat proteins by high performance liquid chromatography. Journal of Virological Methods, 28: 245-256

Barton R.J. 1977. An examination of permeation chromatography on columns of controlled pore glass for routine purification of plant viruses. Journal of General Virology, 35: 77-78

Bergmayer H.U. 1986. Antigens and antibodies 2. V: Methods of enzymatic analysis. 3<sup>rd</sup> ed. Bergmayer J., Grassl M. (eds.). Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 474-481

Boben J., Kramberger P., Petrovič N., Cankar K., Peterka M., Štrancar A., Ravnikar M. 2006. Detection and quantification of *Tomato mosaic virus* (ToMV) in irrigation waters. Applied and Environmental Microbiology (poslano v tisk)

Brock T.D., Madigan M.T. 1991. Biology of microorganisms. 6<sup>nd</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall Inc.: 874 str.

Candresse T., Hammond R. W., Hadidi A. 1998. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). V: Plant virus disease control. Hadidi A., Khetarpal R.K., Koganezawa H. (eds). St. Paul, APS Press: 409-410

CIM® Disk Monolithic Columns. 2005. Ljubljana, BIA Separations d.o.o.

<http://www.biaseparations.com/documents/Products/cimdisks.asp> (23.11.2005): 1 str.

CIM® Tube Monolithic Columns. 2005. Ljubljana, BIA Separations d.o.o.

<http://www.biaseparations.com/documents/Products/cimtubes.asp> (23.11.2005): 1 str.

Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483

Dalsgaard K., Utenthal A., Jones T. D., Xu F., Merryweather A., Hamilton W.D., Langeveld J.P., Boshuizen R.S., Kamstrup S., Lomonossoff G.P., Porta C., Vela C., Casal J.I., Meloen R.H., Rodgers P.B. 1997. Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nature Biotechnology, 15, 3: 248-252

Dunbar B.S. 1994. Protein blotting: a practical approach. Oxford, Oxford University Press: 242 str.

Dynamic high capacity Mustang® Q membrane units for scaleable anion exchange chromatography purification of adenoviral vectors. New York, Pall Corporation.  
[http://www.pall.com/34696\\_38549.asp](http://www.pall.com/34696_38549.asp) (november 2005): 5 str.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds.) 2005. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 1259 str.

Fields B.N., Knipe D.M. (eds.) 1990. Fields virology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Raven Press: 1267 str.

Fischer-Fruhholz S. 2003. Introduction to technology and products of Sartobind membrane adsorbers. Goettingen, Sartorius.

[http://www.sartorius.com/fileadmin/sartorius\\_pdf/chromatography/Sartobind\\_Membrane\\_Adsorbers\\_Products\\_Process1.pdf](http://www.sartorius.com/fileadmin/sartorius_pdf/chromatography/Sartobind_Membrane_Adsorbers_Products_Process1.pdf) (November 2005): 39 str.

Francki R.I.B., Mossop D.W., Hatta T. 1979. Cucumber mosaic virus, No. 213. V: C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. Wellesbourne, UK, Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists: loč. pag.

Gajardo R., Diez J.M., Jofre J., Bosch A. 1991. Adsorption-elution with negatively and positively-charged glass powder for the concentration of hepatitis A virus from water. Journal of Virological Methods, 31: 345-352

Gillett J.M., Morrissey S.M., Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Disease, 70, 8: 722-726

Hames B.D., Rickwood D. (eds.). 1990. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, IRL Press: 383 str.

Harper G., Richert-Pöggeler K.R., Hohn T., Hull R. 2003. Detection of petunia vein-clearing virus: model for the detection of DNA viruses in plants with homologous endogenous pararetrovirus sequences. Journal of Virological Methods, 107: 177-184

Herzer S., Beckett P., Wegman T., Moore P. 2003. Isoelectric titration curves of viral particles as an evaluation tool for ion exchange chromatography. New York, Amersham Biosciences Corporation. (Februar 2003)

[http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/lsn\\_online\\_article\\_280203\\_f](http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/lsn_online_article_280203_f) (november 2005): 3 str.

Hollings M., Huttinga H. 1976. Tomato mosaic virus, No. 156. V: C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. Wellesbourne, UK, Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists: loc. pag.

Horvath J., Pocsai E., Kazinczi G. 1999. Plant virus contamination of natural waters in Hungary. V: Zbornik predavanj 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 3. do 4. marca 1999. Maček J. (ur.) Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 353-356

Joelson T., Akerblom L., Oxelfelt P., Strandberg B., Tomenius K., Morris T.J. 1997. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. Journal of General Virology, 78, 6: 1213-1217

Jothikumar N., Cliver D.O., Mariam T.W. 1998. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2: 504-508

Jothikumar N., Khanna P., Paulmurugan R., Kamatchiammal S., Padmanabhan P. 1995. A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 55: 401-415

Karger A., Bettin B., Granzow H., Mettenleiter T.C. 1998. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane. Journal of Virological Methods, 70: 219-224

Koenig R. 1986. Plant viruses in rivers and lakes. Advances in Virus Research, 31: 321-333

Koenig R., Lesemann D.E. 1985. Plant viruses in German rivers and lakes. Phytopathologische Zeitschrift, 112: 105-116

Kuhelj R. 1998. Biokemija v praksi: načela in tehnike. 1. izdaja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo: 113 str.

Lajmi A. 2005. Purification of different serotypes of adeno and adeno-associated viral vectors for gene therapy. V: WilBio –Asia/Pacific Viral Vectors and Vaccines, 2<sup>nd</sup> Annual Meeting, September 5-7, 2005, Singapore. Virginia, The Williamsburg BioProcessing Fundation: 1 str.

Levitt R. 1983. Ion exchange chromatography and chromatofocusing: principles and methods. Uppsala, Pharmacia Fine Chemicals: 184 str.

Lewandowski D.J. 2000. Genus tobamovirus. V: Virus taxonomy: clasification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel M.H.V, Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J, Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 889-894.

Lim A.A., Tachibana S., Watanabe Y., Wong S.M. 2002. Expression and purification of a neuropeptide nocistatin using two related plant viral vectors. Gene, 289, 1-2: 69-79

Matthews R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. San Diego, Academic Press: 403 str.

Mosch W.H.M, Huttinga H., Rast A.T.B. 1973. Some chemical and physical properties of 18 tobacco mosaic virus isolates from tomato. European Journal of Plant Pathology (Historical Archive), 79, 3: 104-111

Oster G. 1951. The isoelectric points of some strains of tobacco mosaic virus. Journal of Biological Chemistry, 190: 55-59

Patel D. 1994. Gel electrophoresis: essential data. Oxford, John Wiley & Sons, BIOS Scientific Publishers: 137 str.

Pepper I.L., Gerba C.P. Brendecke J.W. 1995. Detection of enteric viruses in water. V: Environmental microbiology: a laboratory manual. Pepper I.L., Gerba C.P. Brendecke J.W. (eds.). San Diego, Academic Press: 95-102

Perez Filgueira D.M., Zamorano P.I., Dominguez M.G., Taboga O., Del Medico Zajac M. P., Puntel M., Romera S.A., Morris T.J., Borca M.V., Sadir A.M. 2003. Bovine herpes virus G-D protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. Vaccine, 21, 27-30: 4201-4209

Podgornik A. 1998. Imobilizacija in karakterizacija lastnosti proteinov imobiliziranih na kompaktnem poli(glicidilmetakrilatnem-etylendimetakrilatnem) nosilcu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 136 str.

Schwab K.J., Leon R., Sobsey M.D. 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. Applied and Environmental Microbiology, 61, 2: 531-537

Sepčić K., Anderluh G., Maček P., Turk T. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze: 58-61

Singleton P., Sainsbury D. 1994. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, John Wiley and Sons: 66-66

Štrancar A. 1998. Vrste visokoločljivostne tekočinske kromatografije. V: Osnove HPLC tehnik. Stražiščar R. (ur.). Ljubljana, BIA: 20-22

Štrancar A., Barut M., Podgornik A. Koselj P., Josić D., Buchacher A. 1998. Convective interaction media: polymer-based supports for fast separation of biomolecules. LC-GC 11, 660-669

Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. V: Modern advances in chromatography. 3<sup>rd</sup> ed. Freitag R. (ed.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 50-82

Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (eds.). 2003. Monolithic materials: preparation, properties and applications. Amsterdam, Elsevier Science: 773 str.

Tennikova T.B., Švec F. 1993. High performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. Journal of Chromatography, 646: 279-288

Tomlinson J.A., Faithfull E.M., Webb M.J.W., Fraser R.S.S. 1983. Chenopodium necrosis: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. Annals of Applied Biology, 102: 135-147

Van der Vlugt R. 2001. Clean purification of ToMV. Wageningen, Plant Research International, personal communication

Van Dorst H.J.M. 1969. Virus diseases of cucumbers. Annual Report Glasshouse Crops Research and Experimental Station, Naaldwijk. Cit. po: Tomlinson J.A., Faithfull E.M., Webb M.J.W., Fraser R.S.S. 1983. Chenopodium necrosis: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. Annals of Applied Biology, 102: 135-147

Van Dorst H.J.M. 1988. Surface water as source in the spread of cucumber green mottle mosaic virus. Netherlands Journal of Agricultural Science, 36: 291-299

Van Regenmortel M.H.V. 1975. Antigenic relationships of tobacco mosaic virus. *Virology*, 64: 415-420

Walkey D.G.A. 1985. Applied plant virology. London, William Heinemann Ltd.: 329 str.

Wommack K.E., Hill R.R.T., Colwell R.R. 1995. A simple method for the concentration of viruses from natural water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 22: 57-67

Wyn-Jones A.P., Pallin R., Dedouddid S., Shore J., Sellwood J. 2000. The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *Journal of Virological Methods*, 87: 99-107

Yamamoto S., Miyagawa E. 1999. Retention behavior of very large biomolecules in ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 852: 25-30

Yamamoto S., Miyagawa E. 2000. Dynamic binding performance of large biomolecules such as  $\gamma$ -globulin, viruses and virus-like particles on various chromatographic supports. V: Bioseparation engineering: proceedings of an International Conference on Bioseparation Engineering, July 4-7, Nikko, Japan. Endo I., Nagamune T., Katoh S., Yonemoto T. (eds.). Amsterdam; New York, Elsevier Science B.V.: 81-86

Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D.C., Koprowski H. 1997. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94, 11: 5784-5788

Zaitlin M. 1975. Tobacco mosaic virus (type strain), No. 151. V: C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. Wellesbourne, UK, Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists: loč. pag.

## 8 PRILOGE

### Priloga A.

Sestava pufra za mehansko inokulacijo rastlin.

#### 0,2 M raztopina A:

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ( $M=156,1$ )	31,2 g
dd $\text{H}_2\text{O}$	1000 mL

#### 0,2 M raztopina B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ( $M=141,96$ )	28,39 g
dd $\text{H}_2\text{O}$	1000 mL

Raztopino A in B hranimo na -20°C!

### FOSFATNI PUFER (100 mL, pH=7.4)

raztopina A	1,3 mL
raztopina B	8,7 mL
NaCl	0,8 g
dd $\text{H}_2\text{O}$	do 100 mL

Fosfatni pufer hranimo na 4°C!

## Priloga B.

Sestava pufrov, ki smo jih uporabljali pri metodi ELISA.

### COATING PUFER (pH=9,6; za 1000 mL)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g

### EKSTRAKCIJSKI PUFER (pH=7,4; za 1000 mL)

Tris	2,4 g
NaCl	8 g
PVP (polyvinylpyrrolidone) MW 24000	20 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 mL

### 10 x PBS PUFER (za 1000 mL)

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KCl	2 g

### PUFER ZA IZPIRANJE (pH=7,4; za 1000 mL)

10x PBS pufer	100 mL
Tween 20	0,5 mL

### KONJUGATNI PUFER (pH=7,4; za 1000 mL)

Tris	2,4 g
NaCl	8 g
PVP (polivinilpirilidon) MW= 24000	20 g
Tween 20	0,5 g
BSA (bovine serum albumin)	2 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,2 g
KCl	0,2 g

### SUBSTRATNI PUFER (pH=9,8; za 1000 mL)

Dietanolamin (Sigma D 8885)	97 mL
MgCl <sub>2</sub>	0,2g

### Priloga C.

Sestava pufrov za SDS-PAGE in imunski pivnik (western blot).

#### VZORČEV PUFER (za 100 mL)

Tris, pH 6.8	84,9 mL
Glicerol	10 mL
SDS	2.0 g
2-merkaptoetanol	5 mL
Bromfenol blue	0.05 g

#### 10x TRIS GLYCIN (1000 mL)

Tris	30.2 g
Glycin	144.4 g

#### ELEKTROFORETSKI (RUNNING) PUFER (za 1000 mL, pH=8,3)

10x Tris Glycin	100 mL
SDS	1 g

#### PRENOSNI (TRANSFER) PUFER (za 1000 mL, pH=8,3)

10x Tris Glycin	100 mL
Metanol	(20%) 200 mL

#### PUFER ZA BLOKIRANJE (30 mL)

1 x PBS	24.4 mL
Tween 20	0.6 mL
MLEko v prahu	3 g

#### 10x PBS (za 1000 mL)

NaCl	80.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g
KCl	2.0 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

#### 1x PBS pufer (za 1000 mL, pH= 7.4)

10x PBS pufer	100 mL
Tween 20	0.5 mL

## Priloga D.

Ločevanje delno očiščenega virusnega pripravka CMV ob uporabi različnih pufrskih sistemov - rezultati analize kromatografskih frakcij z relativno delno kvantitativno metodo ELISA.

	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Št. enot CMV/mL	V frakcije/nanosa (ml)	Normirano št. enot CMV	Skupno št. enot v vseh frakcijah	Izkoristek (%)
	frakcija 1	30	0.499	129	1.5	193		
	frakcija 2	30	0.227	64	1.4	89		
<b>Fosfatni pufri,</b>	frakcija 3	30	0.246	67	1.8	121		
<b>pH=5,5</b>	frakcija 4	30	0.26	69	1.8	125		
	frakcija 5	30	0.182	57	2.0	114	642	2
	frakcija 1	30	0.822	298	1.5	446		
	frakcija 2	30	0.634	183	1.6	293		
<b>Fosfatni pufri,</b>	frakcija 3	90	1.193	2333	1.7	3966		
<b>pH=6</b>	frakcija 4	810	0.637	4978	1.5	7467		
	frakcija 5	30	0.352	88	2.2	194	12365	36
	frakcija 1	90	0.861	1022	1.5	1533		
	frakcija 2	90	0.613	436	1.4	610		
<b>Tris pufri,</b>	frakcija 3	810	0.604	3802	1.8	6844		
<b>pH=7</b>	frakcija 4	810	0.536	3009	1.8	5417		
	frakcija 5	30	0.552	118	2.0	236	14639	43
	frakcija 1	90	0.79	801	1.5	1201		
	frakcija 2	30	0.504	100	1.6	160		
<b>Fosfatni pufri,</b>	frakcija 3	810	0.578	3477	1.7	5911		
<b>pH=7</b>	frakcija 4	810	0.649	4438	1.5	6657		
	frakcija 5	30	0.362	61	2.2	135	14063	41
	frakcija 1	90	0.813	987	1.5	1480		
	frakcija 2	90	0.492	340	1.4	476		
<b>Tris pufri,</b>	frakcija 3	810	0.631	4852	1.8	8734		
<b>pH=8</b>	frakcija 4	270	0.851	3358	1.8	6045		
	frakcija 5	30	0.572	148	2.0	295	17030	50
	frakcija 1	90	0.679	632	1.5	948		
	frakcija 2	810	0.574	4015	1.6	6424		
<b>Tris pufri,</b>	frakcija 3	30	0.842	362	1.7	616		
<b>pH=9</b>	frakcija 4	30	0.284	57	1.5	85		
	frakcija 5	30	0.329	66	2.2	145	8218	24
<b>Negativna kontrola</b>		1	0.185	2				
<b>Delno očiščen CMV</b>		54000	0.84167	19239268	0.05	34315	34315	

## Priloga E.

Kromatografija očiščenega virusnega pripravka ToMV (cToMV) v 200 mM McIlvaine fosfat-citratnem pufru, pH 7 ob uporabi različnih pufrskih sistemov in različnih pH - rezultati analize kromatografskih frakcij z delno kvantitativno metodo ELISA; CFP-20 mM fosfat citratni pufer, FP-20 mM fosfatni pufer, NA-20 mM natrijev acetatni pufer, TP-20 mM Tris-HCl pufer, KP-20 mM karbonatni pufer.

CFP, pH 4,5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
<b>DEAE disk</b>								
Poskus 1	frakcija 1	1	3	71	1.56	111	40	39
	frakcija 2	810	0.921	4667	1.45	6767		
	frakcija 3	10	1.371	99	1.47	146		
	frakcija 4	3	0.745	14	1.12	16		
Poskus 2	frakcija 1	1	3	71	1.45	103	45	41
	frakcija 2	810	0.999	5129	1.41	7232		
	frakcija 3	10	1.426	106	1.58	168		
	frakcija 4	3	3	214	1.32	282		
<b>QA disk</b>								
Poskus 1	frakcija 1	1	2.992	70	1.63	115	52	49
	frakcija 2	810	1.163	6254	1.37	8568		
	frakcija 3	10	1.116	73	1.33	97		
	frakcija 4	3	3	214	1.29	275		
Poskus 2	frakcija 1	1	3	71	1.61	115	42	39
	frakcija 2	810	0.973	4970	1.37	6809		
	frakcija 3	10	0.963	61	1.48	90		
	frakcija 4	3	3	214	1.16	248		
Neg. kontr.		1	0.130	2				
cToMV		81000	1.438	872070	0.02	17441		
FP, pH 5,5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
<b>DEAE disk</b>								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.22	2	1.47	4	65	64
	frakcija 2	810	1.284	7536	1.38	10399		
	frakcija 3	10	1.22	86	1.34	115		
	frakcija 4	1	0.328	3	1.09	3		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.323	3	1.46	4	73	71
	frakcija 2	810	1.324	7923	1.45	11489		
	frakcija 3	10	1.609	140	1.40	196		
	frakcija 4	3	1.485	36	1.33	48		
<b>QA disk</b>								
Poskus 1	frakcija 1	1	3	80	1.63	131	57	56
	frakcija 2	810	1.178	6597	1.37	9038		
	frakcija 3	10	1.040	68	1.38	95		
	frakcija 4	3	0.903	17	1.22	21		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.527	4	1.56	6	81	80
	frakcija 2	810	1.447	9246	1.40	12944		
	frakcija 3	10	1.451	115	1.41	162		
	frakcija 4	3	1.423	33	1.21	40		
Neg. kontr.		1	0.122	2				
cToMV		81000	1.339	807402	0.02	16148		

FP, pH 6,5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.336	3	1.50	4	52	50
	frakcija 2	810	1.039	6019	1.46	8787		
	frakcija 3	10	1.12	83	1.39	115		
	frakcija 4	3	1.678	51	1.22	62		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.364	3	1.64	5	53	52
	frakcija 2	810	1.116	6651	1.37	9112		
	frakcija 3	10	1.073	78	1.35	105		
	frakcija 4	3	1.599	46	1.18	54		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.523	4	1.58	6	61	60
	frakcija 2	810	1.202	7437	1.40	10412		
	frakcija 3	10	1.123	83	1.40	116		
	frakcija 4	3	1.426	37	1.28	47		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.444	3	1.66	6	70	69
	frakcija 2	810	1.328	8759	1.37	12000		
	frakcija 3	10	1.214	93	1.35	126		
	frakcija 4	3	1.375	34	1.29	44		
Neg. kontr.		1	0.112	2				
cToMV		81000	1.323	870239	0.02	17405		
FP, pH 7,5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.832	5	1.43	8	62	61
	frakcija 2	810	1.198	6774	1.41	9551		
	frakcija 3	10	1.411	108	1.54	167		
	frakcija 4	3	1.845	55	1.32	73		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.761	5	1.49	7	61	59
	frakcija 2	810	1.158	6451	1.43	9225		
	frakcija 3	30	0.686	134	1.64	220		
	frakcija 4	3	2.256	91	1.47	134		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.993	7	1.54	10	68	67
	frakcija 2	810	1.262	7324	1.43	10474		
	frakcija 3	10	1.338	99	1.48	147		
	frakcija 4	3	1.446	34	1.33	45		
Poskus 2	frakcija 1	1	1.406	11	1.61	17	71	70
	frakcija 2	810	1.287	7551	1.45	10949		
	frakcija 3	10	0.973	64	1.45	92		
	frakcija 4	3	1.539	38	1.36	52		
Neg. kontr.		1	0.144	2				
cToMV		81000	1.321	787115	0.02	15742		
TP, pH8,5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.435	3	1.43	5	46	43
	frakcija 2	270	1.984	4534	1.39	6302		
	frakcija 3	30	1.075	194	1.31	254		
	frakcija 4	3	3.000	147	1.47	216		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.438	3	1.51	5	44	40
	frakcija 2	270	1.899	4146	1.41	5846		
	frakcija 3	30	1.570	326	1.61	525		
	frakcija 4	3	3.000	147	1.06	155		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.588	4	1.50	6	24	23
	frakcija 2	270	1.502	2731	1.26	3441		
	frakcija 3	10	0.998	60	1.47	87		
	frakcija 4	3	0.985	18	1.42	25		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.778	5	1.43	7	26	26
	frakcija 2	270	1.494	2708	1.40	3791		
	frakcija 3	10	0.895	53	1.39	74		
	frakcija 4	3	0.936	17	1.22	20		
Neg. kontr.		1	0.174	3				
cToMV		81000	1.403	738181	0.02	14764		

KP, pH 9.5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.184	2	1.50	4	40	36
	frakcija 2	810	1.078	4912	1.24	6091		
	frakcija 3	30	1.983	469	0.97	455		
	frakcija 4	3	3.000	136	1.90	258		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.653	4	1.42	6	40	35
	frakcija 2	810	1.065	4846	1.23	5960		
	frakcija 3	90	0.909	457	1.19	544		
	frakcija 4	3	3.000	136	1.65	224		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.524	3	1.52	5	28	27
	frakcija 2	810	0.791	3639	1.23	4475		
	frakcija 3	10	0.813	46	0.96	44		
	frakcija 4	3	2.523	82	1.94	160		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.542	3	1.43	5	33	31
	frakcija 2	810	0.915	4142	1.24	5136		
	frakcija 3	30	0.938	157	1.27	200		
	frakcija 4	3	2.843	115	1.72	198		
Neg. kontr.		1	0.157	2				
cToMV		81000	1.592	840873	0.02	16817		
KP, pH 10.5	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.418	3	1.45	4	46	43
	frakcija 2	810	1.240	6033	1.22	7360		
	frakcija 3	30	1.01	174	1.14	198		
	frakcija 4	3	3.000	152	1.68	256		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.781	5	1.39	6	7	3
	frakcija 2	90	0.881	453	1.22	553		
	frakcija 3	90	0.741	389	0.90	350		
	frakcija 4	3	3.000	152	1.89	288		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.611	4	1.48	6	21	19
	frakcija 2	270	1.609	3007	1.08	3247		
	frakcija 3	30	0.845	145	1.25	182		
	frakcija 4	3	2.474	86	1.83	157		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.541	3	1.41	5	27	24
	frakcija 2	270	1.729	3427	1.21	4146		
	frakcija 3	30	0.831	143	1.17	167		
	frakcija 4	3	3.000	152	1.80	274		
Neg. kontr.		1	0.131	2				
cToMV		81000	1.553	848568	0.02	16971		
KP, pH 11.5	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Celoten izkoristek (%)	Izkoristek frakcije 2 (%)
DEAE disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	3.000	51	1.42	72	9	8
	frakcija 2	270	1.193	1911	1.21	2312		
	frakcija 3	10	1.201	71	1.15	82		
	frakcija 4	3	1.272	23	1.78	41		
Poskus 2	frakcija 1	1	2.235	22	1.42	31	6	5
	frakcija 2	90	1.747	1165	1.17	1363		
	frakcija 3	10	1.525	102	1.29	131		
	frakcija 4	3	1.779	40	1.77	71		
QA disk								
Poskus 1	frakcija 1	1	0.723	4	1.43	6	7	6
	frakcija 2	270	0.934	1441	1.14	1642		
	frakcija 3	30	1.061	184	1.22	224		
	frakcija 4	3	1.661	35	1.80	64		
Poskus 2	frakcija 1	1	0.885	5	1.47	7	12	10
	frakcija 2	270	1.327	2211	1.23	2720		
	frakcija 3	30	1.108	194	1.22	236		
	frakcija 4	3	3.000	152	1.76	268		
Neg. kontr.		1	0.475	3				
cToMV		81000	2.008	1393345	0.02	27867		

## Priloga F.

Kromatografija očiščenega virusnega pripravka ToMV (cToMV) v veznih pufrih ob uporabi različnih pufrskih sistemov in različnih pH: rezultati delno kvantitativne metode ELISA.

Elucijske frakcije/ injiciran vzorec	Faktor redčitve	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Izkoristek (%)
FCP, pH 5-1	50	0.983	229	1.4	320	26
FCP, pH 5-2	50	1.034	245	1.4	343	28
FP, pH 5-1	50	1.120	276	1.4	386	39
FP, pH 5-2	150	0.515	361	1.4	505	51
NA, pH 5.5-1	50	1.581	520	1.4	728	50
NA, pH 5.5-2	50	1.637	561	1.4	786	54
FP, pH 6-1	50	0.965	223	1.4	312	32
FP, pH 6-2	50	0.780	173	1.4	242	25
FCP, pH 7-1	50	0.826	184	1.4	258	24
FCP, pH 7-2	50	1.238	325	1.4	454	41
Neg. kontr.	1	0.135	1			
ToMV v FCP, pH 5	12000	1.057	60756	0.02	1215	
ToMV v FP, pH 5.5	12000	0.906	49382	0.02	988	
ToMV v NA, pH 5.5	12000	1.191	73026	0.02	1461	
ToMV v FP, pH 6	12000	0.893	48509	0.02	970	
ToMV v FCP, pH 7	12000	0.982	54813	0.02	1096	

Elucijske frakcije/ injiciran vzorec	Faktor redčitve	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Normirano (ng)	Yield (%)
FCP, pH 5-1	50	1.097	307	1.4	430	36
FCP, pH 5-2	150	0.519	381	1.4	533	44
FP, pH 5-1	50	1.221	371	1.4	519	50
FP, pH 5-2	150	0.563	407	1.4	570	55
NA, pH 5.5-1	150	0.490	364	1.4	510	32
NA, pH 5.5-2	150	0.665	476	1.4	667	42
FP, pH 6-1	50	0.8	195	1.4	273	26
FP, pH 6-2	50	0.599	143	1.4	201	19
FCP, pH 7-1	50	1.013	270	1.4	378	32
FCP, pH 7-2	150	0.560	406	1.4	568	48
Neg. kontr.	1	0.135	1			
ToMV v FCP, pH 5	12000	0.967	60414	0.02	1208	
ToMV v FP, pH 5.5	12000	0.872	52254	0.02	1045	
ToMV v NA, pH 5.5	12000	1.151	80019	0.02	1600	
ToMV v FP, pH 6	12000	0.878	52735	0.02	1055	
ToMV v FCP, pH 7	12000	0.954	59226	0.02	1185	

## Priloga G.

Vpliv pretoka na kromatografijo čistega ToMV (cToMV) na CIM QA monolitnem disku-rezultati delno kvantitativne metode ELISA.

	Vzorec	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Izkoristek (%)
<b>Pretok=6 mL/min</b>							
<b>50 ul cToMV (17000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	3	0.135	11	1.34	<b>15</b>	<b>53</b>
	Kromatografski vrh 2	810	0.559	4587	1.98	<b>9082</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	1.342	353	1.98	<b>700</b>	
<b>75 ul cToMV (25500 ng toMV)</b>	Kromatografski vrh 1	3	0.162	12	1.34	<b>16</b>	<b>71</b>
	Kromatografski vrh 2	270	2.477	9200	1.98	<b>18217</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	2.272	844	1.98	<b>1671</b>	
<b>100 ul cToMV (34000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.165	39	1.34	<b>52</b>	<b>63</b>
	Kromatografski vrh 2	900	1.360	10784	1.98	<b>21352</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	1.423	1144	1.98	<b>2265</b>	
<b>125 ul cToMV (42000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.160	39	1.34	<b>52</b>	<b>75</b>
	Kromatografski vrh 2	900	1.795	16201	1.98	<b>32078</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	1.890	1771	1.98	<b>3506</b>	
<b>150 ul cToMV (51000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.176	40	1.34	<b>53</b>	<b>71</b>
	Kromatografski vrh 2	1350	1.494	18336	1.98	<b>36306</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	2.334	2683	1.98	<b>5312</b>	
<b>Pretok=3 mL/min</b>							
<b>50 ul cToMV (17000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	3	0.174	12	1.34	<b>16</b>	<b>41</b>
	Kromatografski vrh 2	270	1.441	3490	1.98	<b>6910</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	2.160	760	1.98	<b>1505</b>	
<b>75 ul cToMV (25500 ng toMV)</b>	Kromatografski vrh 1	3	0.261	13	1.34	<b>17</b>	<b>45</b>
	Kromatografski vrh 2	810	0.816	5834	1.98	<b>11551</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	1.913	603	1.98	<b>1194</b>	
<b>100 ul cToMV (34000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.159	39	1.34	<b>52</b>	<b>44</b>
	Kromatografski vrh 2	900	0.995	7664	1.98	<b>15174</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	1.385	1104	1.98	<b>2186</b>	
<b>125 ul cToMV (42000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.150	39	1.34	<b>52</b>	<b>46</b>
	Kromatografski vrh 2	900	1.265	9866	1.98	<b>19536</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	1.625	1382	1.98	<b>2736</b>	
<b>150 ul cToMV (51000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	10	0.586	58	1.34	<b>78</b>	<b>49</b>
	Kromatografski vrh 2	1350	1.103	12718	1.98	<b>25182</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	90	2.196	2358	1.98	<b>4668</b>	
<b>Pretok=2 mL/min</b>							
<b>50 ul cToMV (17000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	3	0.274	13	1.34	<b>17</b>	<b>35</b>
	Kromatografski vrh 2	270	1.271	2977	1.98	<b>5894</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	2.918	1544	1.98	<b>3058</b>	
<b>75 ul cToMV (25500 ng toMV)</b>	Kromatografski vrh 1	9	2.381	280	1.34	<b>376</b>	<b>32</b>
	Kromatografski vrh 2	270	1.635	4184	1.98	<b>8285</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	30	3.000	1668	1.98	<b>3302</b>	
<b>100 ul cToMV (34000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	90	1.335	1053	1.34	<b>1412</b>	<b>27</b>
	Kromatografski vrh 2	300	1.633	4641	1.98	<b>9189</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	100	1.638	1554	1.98	<b>3077</b>	
<b>125 ul cToMV (42000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	90	1.930	1838	1.34	<b>2463</b>	<b>24</b>
	Kromatografski vrh 2	300	1.759	5221	1.98	<b>10338</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	300	0.792	2113	1.98	<b>4183</b>	
<b>150 ul cToMV (51000 ng ToMV)</b>	Kromatografski vrh 1	90	2.470	3047	1.34	<b>4083</b>	<b>26</b>
	Kromatografski vrh 2	450	1.601	6756	1.98	<b>13376</b>	
	Izpiranje po kromatografiji	100	1.935	2052	1.98	<b>4063</b>	
<b>Neg. kontr.</b>		1	0.116	<b>4</b>			
cToMV-50 ul		30000	1.304	<b>341211</b>	0.050	17061	
cToMV-75 ul		30000	1.304	<b>341211</b>	0.075	25591	
cToMV-100 ul		30000	1.304	<b>341211</b>	0.100	34121	
cToMV-125 ul		30000	1.304	<b>341211</b>	0.125	42651	
cToMV-150 ul		30000	1.304	<b>341211</b>	0.150	51182	

## Priloga H.

Koncentriranje CMV iz 20 mM Tris pufra, pH 8 na CIM DEAE disku: koncentracija CMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z relativno delno kvantitativno metodo ELISA.

500 ml pufra A+5 ul delno očiščenega CMV	Vzorec	Faktor redčenja (ELISA)	OD	Št. CMV enot (redčen vz.)	Št. CMV enot /mL	V (mL)	Rel. št. CMV enot v frakciji	Izkoristek (%)
Ponovitev 1	Redčina	1	0.207	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.194	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	1	0.295	0.0	0	1.99	0	
	Frakcija 2	9	2.367	23.4	210	2.05	431	
	Frakcija 3	1	2.144	18.5	19	2.21	41	39
Ponovitev 2	Redčina	1	0.228	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.236	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	1	0.22	0.0	0	2.07	0	
	Frakcija 2	9	2.457	25.7	231	2.15	497	
	Frakcija 3	1	1.62	10.7	11	1.73	19	45
Negativna kontrola		1	0.193	0.0	0		0	
Delno očiščen CMV		18000	1.751	12.3	221614	0.005	1108	

500 ml pufra A+20 ul delno očiščenega CMV	Vzorec	Faktor redčenja (ELISA)	OD	Št. CMV enot (redčen vz.)	Št. CMV enot /mL	V (mL)	Rel. št. CMV enot v frakciji	Izkoristek (%)
Ponovitev 1	Redčina	1	0.257	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.22	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	1	0.311	0.0	0	2.09	0	
	Frakcija 2	27	3.5	75.1	2029	2.02	4098	
	Frakcija 3	1	2.632	30.0	30	1.73	52	76
Ponovitev 2	Redčina	1	0.28	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.269	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	3	2.721	0.0	0	2.07	205	
	Frakcija 2	27	3.109	49.7	1341	1.82	2441	
	Frakcija 3	1	3.291	60.2	60	1.62	98	45
Negativna kontrola		1	0.259	0.0	0			
Delno očiščen CMV		18000	1.981	15.1	270955	0.02	5419	

500 ml pufra A+50 ul delno očiščenega CMV	Vzorec	Faktor redčenja (ELISA)	OD	Št. CMV enot (redčen vz.)	Št. CMV enot /mL	V (mL)	Rel. št. CMV enot v frakciji	Izkoristek (%)
Ponovitev 1	Redčina	1	0.34	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.238	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	10	0.315	0.0	0	2.08	0	
	Frakcija 2	270	1.57	10.5	2836	2.11	5984	
	Frakcija 3	90	1.508	9.9	887	1.39	1232	52
Ponovitev 2	Redčina	1	0.326	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.23	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	10	2.111	18.4	184	1.95	359	
	Frakcija 2	90	1.989	16.2	1458	2.12	3092	
	Frakcija 3	90	1.52	10.0	898	1.69	1517	26
Negativna kontrola		1	0.258	0.0	0			
Delno očiščen CMV		18000	1.773	13.0	233269	0.05	11663	

500 ml pufra A+100 ul delno očiščenega CMV	Vzorec	Faktor redčenja (ELISA)	OD	Št. CMV enot (redčen vz.)	Št. CMV enot /mL	V (mL)	Rel. št. CMV enot v frakciji	Izkoristek (%)
Ponovitev 1	Redčina	1	0.536	4.6	5	500	2314	
	Nevezana frakcija	1	0.209	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	30	1.437	11.3	338	1.97	666	
	Frakcija 2	270	1.283	9.7	2612	2.10	5485	
	Frakcija 3	90	2.363	28.1	2529	1.68	4248	22
Ponovitev 2	Redčina	1	0.379	0.0	0	500	0	
	Nevezana frakcija	1	0.239	0.0	0	500	0	
	Frakcija 1	30	0.303	0.0	0	1.90	0	
	Frakcija 2	270	1.981	19.3	5203	2.07	10770	
	Frakcija 3	90	2.845	45.2	4070	1.55	6308	43
Negativna kontrola		1	0.234	0.0	0			
Delno očiščen CMV		18000	1.642	13.8	248197	0.10	24820	

## Priloga I.

Koncentriranje ToMV iz 20 mM natrijevega acetata, pH 5.5 na CIM QA disku: koncentracija ToMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z delno kvantitativno metodo ELISA.

0.5 L pufra+ 0,5 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
<b>Poskus 1</b>	Redčina	1	0.184	<b>2.3</b>	500	1154	<b>61</b>
	Nevezna frakcija	1	0.168	<b>2</b>	500	1134	
	Frakcija 1	1	0.164	<b>2</b>	1.41	3	
	Frakcija 2	9	1.877	<b>133</b>	1.19	158	
	Frakcija 3	1	0.542	<b>3</b>	1.26	4	
	Frakcija 4	1	0.212	<b>2</b>	1.90	5	
<b>Poskus 2</b>	Redčina	1	0.187	<b>2.3</b>	500	1158	<b>80</b>
	Nevezna frakcija	1	0.182	<b>2</b>	500	1151	
	Frakcija 1	1	0.175	<b>2</b>	1.42	3	
	Frakcija 2	27	1.100	<b>170</b>	1.22	208	
	Frakcija 3	1	0.790	<b>4</b>	1.30	6	
	Frakcija 4	1	0.312	<b>3</b>	1.88	5	
Neg. kontr.		1	0.170	<b>2</b>			
cToMV		90000	1.015	<b>516751</b>	0.0005	258	

0.5 L pufra+ 1 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
<b>Poskus 1</b>	Redčina	1	0.180	<b>2.3</b>	500	1153	<b>90</b>
	Nevezna frakcija	1	0.256	<b>3</b>	500	1264	
	Frakcija 1	1	0.256	<b>3</b>	1.39	4	
	Frakcija 2	81	0.737	<b>366</b>	1.17	428	
	Frakcija 3	3	0.545	<b>11</b>	1.23	13	
	Frakcija 4	1	0.315	<b>3</b>	1.83	5	
<b>Poskus 2</b>	Redčina	1	0.216	<b>2.4</b>	500	1205	<b>89</b>
	Nevezna frakcija	1	0.229	<b>2</b>	500	1224	
	Frakcija 1	1	0.332	<b>3</b>	1.43	4	
	Frakcija 2	27	1.646	<b>364</b>	1.15	419	
	Frakcija 3	3	0.603	<b>12</b>	1.30	15	
	Frakcija 4	1	0.433	<b>3</b>	1.87	6	
Neg. kontr.		1	0.273	<b>3</b>			
cToMV		90000	0.864	<b>473413</b>	0.001	473	

0.5 L pufra+ 2 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
<b>Poskus 1</b>	Redčina	1	0.120	<b>2.5</b>	500	1236	<b>67</b>
	Nevezna frakcija	1	0.218	<b>3</b>	500	1356	
	Frakcija 1	1	0.162	<b>3</b>	1.43	4	
	Frakcija 2	27	2.259	<b>505</b>	1.26	637	
	Frakcija 3	3	0.565	<b>11</b>	1.27	14	
	Frakcija 4	1	0.209	<b>3</b>	1.88	5	
<b>Poskus 2</b>	Redčina	1	0.215	<b>2.7</b>	500	1352	<b>72</b>
	Nevezna frakcija	1	0.195	<b>3</b>	500	1326	
	Frakcija 1	1	0.220	<b>3</b>	1.32	4	
	Frakcija 2	27	2.359	<b>555</b>	1.23	683	
	Frakcija 3	3	0.839	<b>15</b>	1.25	18	
	Frakcija 4	1	0.235	<b>3</b>	1.90	5	
Neg. kontr.		1	0.228	<b>3</b>			
cToMV		90000	0.926	<b>476910</b>	0.002	954	

## Priloga J.

Koncentriranje ToMV iz vodovodne vode z dodanim natrijevim acetatom do končne koncentracije 20 mM, pH 5.5 na CIM QA disku: koncentracija ToMV v posameznih kromatografskih frakcijah, določenih z delno kvantitativno metodo ELISA.

0.5 L vode z Na acetatom+ 0,5 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
Poskus 1	Redčina	1	0.136	2.6	500	1285	76
	Nevezna frakcija	1	0.182	3	500	1340	
	Frakcija 1	1	0.24	3	1.43	4	
	Frakcija 2	27	0.888	138	1.30	179	
	Frakcija 3	1	0.791	5	1.19	6	
	Frakcija 4	1	0.140	3	1.82	5	
Neg. kontr.							
cToMV		90000	0.920	473794	0.0005	237	

0.5 L vode z Na acetatom+ 1 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
Poskus 1	Redčina	1	0.134	2.7	500	1336	80
	Nevezna frakcija	1	0.115	3	500	1297	
	Frakcija 1	1	0.14	3	1.38	4	
	Frakcija 2	27	0.886	231	1.64	379	
	Frakcija 3	3	0.268	10	1.61	16	
	Frakcija 4	1	0.134	3	0.80	2	
Neg. kontr.							
cToMV		90000	0.570	472460	0.001	472	

0.5 L vode z Na acetatom+ 2 ul cToMV	Vzorec	Faktor redčenja	OD	Koncentracija ToMV (ng/ml)	V frakcije/ nanosa (ml)	Masa ToMV v frakciji (ng)	Izkoristek (%)
Poskus 1	Redčina	1	0.144	2.6	500	1318	86
	Nevezna frakcija	1	0.140	3	500	1311	
	Frakcija 1	1	0.153	3	1.41	4	
	Frakcija 2	27	1.457	459	1.67	766	
	Frakcija 3	3	0.454	12	1.65	20	
	Frakcija 4	1	0.479	4	0.79	3	
Neg. kontr.							
cToMV		90000	0.586	444270	0.002	889	

## Priloga K.

Čiščenje ToMV iz rastlinskega materiala na CIM QA monolitnem disku-rezultati analize frakcij z delno kvantitativno metodo ELISA.

	Frakcija	Faktor redčenja	OD (ELISA)	Konc. ToMV (ng/ml)	V frakcije/nanosa (ml)	Masa ToMV (ng)	Izkoristek (%)	Skupni izkoristek (%)
<b>Prvo čiščenje ToMV</b>	1	30	0.242	<b>20</b>	5	102	0	89
	2	10	0.303	<b>7</b>	6.5	47	0	
	3	18900	1.517	<b>57163</b>	4	228652	<b>98</b>	
	4	100	0.561	<b>99</b>	6.5	641	0	
	5	30	0.316	<b>22</b>	6.4	142	0	
	6	50	0.621	<b>53</b>	2.5	132	0	
	7	10	0.413	<b>8</b>	7	58	0	
<b>Neg. kontr.</b>		1	0.170	<b>1</b>			<b>Recovery (%)</b>	
<b>Delno očiščen ToMV</b>		45000	1.978	<b>233731</b>	1.00	<b>233731</b>	<b>98</b>	
<b>Drugo čiščenje ToMV</b> <b>Poskus 1</b>	1	30	0.888	<b>281</b>	5.5	1547	1	69
	2	10	0.247	<b>59</b>	6.5	386	0	
	3	2100	0.481	<b>14742</b>	4	58966	<b>55</b>	
	4	100	0.741	<b>845</b>	6.8	5743	5	
	5	30	0.648	<b>237</b>	7	1660	2	
	6	150	0.726	<b>1253</b>	3.3	4136	4	
	7	10	0.631	<b>78</b>	7.4	578	1	
<b>Drugo čiščenje ToMV</b> <b>Poskus 2</b>	1	30	0.158	<b>167</b>	5	837	1	72
	2	10	0.141	<b>55</b>	6.5	358	0	
	3	2100	0.698	<b>17201</b>	4	68804	<b>65</b>	
	4	100	0.299	<b>617</b>	6.5	4009	4	
	5	30	0.273	<b>182</b>	6.4	1162	1	
	6	50	1.251	<b>607</b>	2.5	1517	1	
	7	10	0.559	<b>74</b>	7	519	0	
<b>Neg. kontr.</b>		1	0.117	<b>5</b>			<b>Recovery (%)</b>	
<b>Delno očiščen ToMV</b>		9000	1.216	<b>106549</b>	1.00	<b>106549</b>	<b>72</b>	
<b>Tretje čiščenje ToMV</b> <b>Poskus 1</b>	1	30	0.140	<b>201</b>	5	1007	1	82
	2	10	0.120	<b>66</b>	6.5	431	0	
	3	2100	0.549	<b>17976</b>	4	71903	<b>69</b>	
	4	100	0.383	<b>776</b>	6.7	5196	5	
	5	30	0.376	<b>232</b>	6.7	1552	1	
	6	150	0.885	<b>1568</b>	3	4704	5	
	7	10	0.806	<b>100</b>	8	798	1	
<b>Tretje čiščenje ToMV</b> <b>Poskus 2</b>	1	30	0.339	<b>227</b>	5.5	1247	1	91
	2	10	0.169	<b>68</b>	6.5	444	0	
	3	2100	0.733	<b>20055</b>	4	80219	<b>77</b>	
	4	100	0.393	<b>780</b>	6.7	5227	5	
	5	30	0.407	<b>236</b>	6.7	1581	2	
	6	150	0.91	<b>1592</b>	3	4775	5	
	7	10	0.899	<b>105</b>	8	843	1	
<b>Neg. kontr.</b>		1	0.128	<b>7</b>			<b>Recovery (%)</b>	
<b>Delno očiščen ToMV</b>		9000	1.057	<b>104184</b>	1.00	<b>104184</b>	<b>91</b>	

## ZAHVALA

*Doktorska dela sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Maje Ravnkar in somentorstvom doc. dr. Aleša Štrancarja. Maja in Aleš: Hvala za nasvete, diskusije, usmerjanje pri delu, ter seveda za spodbudne besede, ki so dale ob slabih dnevih ponoven zagon za delo.*

*Pričujoče delo je nastajalo v podjetju BIA Separations in na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Lepa hvala vsem sodelavcem BIE Sep za zanimive debate - znanstvene in tiste malo manj znanstvene, ki so poskrbeli za sprastitev. Še posebej hvala kolegom iz oddelka MBL (Matjažu, Marku in Nataši) za prijetno delovno vzdušje, debate, predloge in še kaj.*

*Hvala dr. Van der Vlugt-u za darovani začetni pripravek ToMV in protokol za njegovo čiščenje.*

*Vse meritve ELISA in real-time so bile narejene na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na oddelka za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo. Najlepša hvala vodstvu tega oddelka, da so omogočili delo v njihovih laboratorijskih, ter vsem zaposlenim, ki so naredili gostovanje prijetno. Predvsem hvala dr. Nataši Petrovič, ki me je že kot somentorica pri diplomskem delu uvedla v svet virologije in detekcijskih tehnik. Nataša, hvala tudi za nasvete in utemeljene pripombe pri pregledovanju doktorskega naloge. Hvala Jani Boben za sodelovanje pri številnih poskusih in pomoč pri obdelavi real-time rezultatov in mag. Magdi Tušek za pomoč pri pregledovanju vzorcev z elektronskim mikroskopom.*

*In ob koncu:*

*Mami in ati – hvala. Poleg ostalega predvsem zato, da sta me nekate odurnila od pravtno izbranega študija in s tem omogočila use kar je sledilo.*

*Eva-zaradi tebe sem se v vsem svojem šolanju trudila bolj, kot sem se bila učasih pripravljena truditi, za kar ti gre usa pahala.*

*Gregor in Živa-hvala vama, ker sta! Obljubim, da bom zdaj bolj »vajina«!*