ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

УМУМИЙ ВИРУСОЛОГИЯДАН АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР

(I-жилд)

Тошкент - 2004

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

А.Ҳ.ВАҲОБОВ

УМУМИЙ ВИРУСОЛОГИЯДАН АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР

(I –жилд)

Тошкент - 2004

Ушбу ўқув қўлланма "Микробиология ва вирусология" умумий курси дастурининг вирусология қисмида бакалавр талабалар учун бажаришга мўлжалланган амалий машғулотлар, ҳамда магистрлар учун тасдиқланган дастур-ларга мослаб ёзилган. Қўлланмага умумий вирусология со-ҳасида бажариладиган лаборатория ишларининг энг муҳим-лари фитопатоген вирусларга асосланган ҳолда киритилган. Унда вирусларни соғ ўсимликга юқтириш, фитопатоген ви-руслар симптомлари, индикатор ўсимликлар воситасида ви-русларни тадқиқ қилиш усуллари, вирусларни тозалашнинг молекуляр вирусологияда ишлатиладиган ҳар хил усуллари, вирус, унинг оқсили ва нуклеин кислоталарини ажратиш усуллари, ҳамда вирусларни диагностика қилишда ишлати-ладиган тезкор ва сезгир усуллари ҳақида назарий ва амалий маълумотлар берилган.

Ўқув қўлланма биология факультетлари бакалавр, ма-гистр, аспирант ва илмий ходимлари учун мўлжалланган.

Тузувчи: проф. А. Ҳ. Ваҳобов

Тақризчилар: проф. М. М. Раҳимов
доц. Ш. И. Ҳакимова

Масъул мухаррир: Россия Фанлар Академияси
академиги, И. Г. Атабеков

КИРИШ

Вирусология фанининг ривожланиши, вирусларнинг тадқиқ қилишнинг замонавий, тезкор ва сезгир услубларини, жиҳозларини, асбоб—ускуналарини яратилиши ўз—ўзидан баъзи умумий вирусология методларидан кам фойдаланишга олиб келди. Шу сабабли мазкур қўлланмада биз бундай ме—тодларни четлаб ўтдик. Вирусология ҳозирги кунда жуда тез ривожланаётган бўлиб, у ўсимлик, ҳайвон, одам, ҳашорат, бактерия, актономицет, замбуруғ вирусларини, вироид ва прионларни ўрганади. Биз умумий вирусологияда қўлланиладиган замонавий методлар ҳақида, асосан фито—патоген вируслар мисолида сўз юритамиз.

Мазкур ўқув қўлланма "Микробиология ва вирусоло—гия" умумий курсини вирусология қисмида бажарилишига мўлжалланган амалий машғулотларни ҳамда Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги томонидан магистрлар учун тас—диқланган дастурга мослаб ёзилган бўлиб, университетлар—нинг биология факультетларида таълим олаётган талабаларга, вирусология соҳасидаги мутахассисларга мўлжалланган бў—либ, унга умумий вирусология соҳасида бажариладиган ла—боратория ишларининг энг асосийлари киритилган. Дарс—ликни биринчи қисмида вирусларни соғ ўсимликка юқтириш усуллари, фитопатоген вирусларнинг симптомлари ва улар асосида идентификация қилиш, индикатор ўсимликлар во—ситасида вирусларнинг охирги суюлиш даражаси, темпера—тура таъсирида активлигининг йўқотишини аниқлаш каби машғулотлар берилган.

Кейинги иккинчи қисмида вирусларни тозалашнинг назарий ва турлича амалий томонлари ёритилади. Жумла—дан, гельфилтрация, дифференциал центрифугалаш, модда—ларнинг градиент зичлигида центрифугалаш, биоспецифик хроматография ва полакриламид гелида электрофорез ме—тодида тозалаш каби молекуляр вирусология методлари ҳақида маълумотлар берилган.

Учинчи қисмда ёруғлик ва электрон микроскопда ви—русларни тадқиқ қилиш усуллари берилган.

Тўртинчи қисмда эса вирусларни иммунология усуллари ёрдамида аниқлашга эътибор қаратилиб, иммунологиянинг баъзи фитовирусологияга оид замонавий, тезкор ва сезгир усуллари ҳақида сўз боради.

Машғулотларнинг баъзилари бир, икки, уч дарс давомида бажаришга мулжалланган, яъни кичик ва катта амалий машғулотларга мўлжалланган. Ушбу қўлланмадаги 4 бўлимнинг ҳар бирида ўзбек тилида ёзилган дарсликларни йўқлигини назарда тутиб, бажарилаётган амалий машғулотларни моҳиятини тушуниб бажариш учун назарий маълумотлар баён этилган.

Ушбу дарсликни тузишда "Практикум по общей вирусологии" (1981) ўқув қўлланмасидаги С.В.Куст, Т.И. Атабекова, Е.Н.Добров, В.К.Новиков, Е.Н. Фролов ва В.В.Доляларнинг умумий вирусологияга оид машғулотларидан тўлалигича фойдаланилди, вирусларни юқтириш, физик хусусиятларини ўрганиш, Ю.И.Власовнинг "Сельскохозяйственная вирусология" (1967), А. Гиббс. Б. Харрисонларнинг (1978) "Основы вирусологии растений" китобларидан ҳамда А.Ҳ.Ваҳобовнинг "Применение метода гельфильтрации для препаративных и аналитических работ в вирусологии" (фан номзоди дисс. (1970), "Характеристика наиболее распространённых вирусов в экологических условиях Узбекистана" (1989) (фан доктори диссертацияларида ҳамда илмий тадқиқот ишларида қўлланилган амалий машғулотлар асосида тузилди. И.Г. Атабеков мухаррирлигида тайёрланган муаллифлар жамоасининг "Практикум по общей вирусологии" (1981) қўлланмасида умумий вирусологияда қўлланиладиган баъзи биология методлари (ҳайвон вирусларини товуқ эмбрионларига юқтириш ва кўпайтириш, титрини гемагглютинация реакцияси ёрдамида аниқлаш, Т-жуфт бактериофагларини ўстириш, титрлаш ва ҳоказолар) келтирилган.

Махсус дарсликларни йўқлигини назарда тутиб, талабаларни ўзлаштиришларини осонлаштириш мақсадида "Ўсимлик вируслари" қисмини баъзи бир бўлимларини бироз кенгайтирган ҳолда назарий маълумотлар билан тўлдирдик. Вируслар ва уларни таркибий қисмларга ажратиш ва тозалаш қисмига баъзи янги маълумотлар киритдик. Мазкур амалий машғулотлар Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон

Миллий Университетида биринчи марта чоп этилаяпти. Юқорида айтилгандек одатдаги умумий вирусологияда қўлланиладиган анъанавий методлар билан бир қаторда молекуляр вирусологияда қўлланиладиган методлар билан ҳам таништирамиз. Талаба вирусларни, уларни оқсилларини, РНК ва ДНК ларини ажратиш техникалари билан танишади. Дарсликдан фойдаланишни осонлаштириш учун ҳар бир машғулотни назарий қисмлари, мақсади, керакли асосий реактив, асбоб—ускуналар ва ишнинг бажариш йўл—йўриқлари ҳамда мазкур машғулотни тузишда фойдаланилган адабиётлар келтирилган. Амалий машғулотнинг ҳажми дастурда белгиланганидан каттароқ бўлиб, улар "мажбурий" (юлдузча билан қўлланма мундарижасида белгиланган) ва "факультатив" (асосий дастурдаги машғулотларни бажаргандан сўнг) талаба ҳоҳишига яраша танлаб бажариладиган машғулотларга ажратилган. Вирусология фанининг ривожланиши мазкур амалий машғулотни янги машғулотлар билан бойитилишини кўзда тутади.

ВИРУСОЛОГИЯ ЛАБОРАТОРИЯСИНИНГ ТУЗИЛИШИ

Вирусологиядан олиб бориладиган амалий машғулотлар, илмий тадқиқот ишлари махсус жиҳозланган лабораторияларда, ҳайвонлар билан ўтказиладиган тажрибалар виварийларда, ўсимликлар билан олиб бориладиган тажрибалар иссиқхоналарда, ҳайвонлар, одам, ўсимлик тўқималари, ҳужайра культуралари (экмалари) ва бактериофаглар билан ўтказиладиган тажрибалар бактериоцид лампалар билан стерилланган бокслар ёки айрим хоналарда олиб борилади. Бокс олдидаги хонада боксга киришда кийиладиган махсус кийимлар сақланади. Боксда энг зарур асбоб—ускуналаргина сақланади: стол, стуллар, инструментлар учун шиша шкаф, газ горелкаси, гугурт, каттакичик қайчилар, скалпеллар, пинцетлар, игналар, стерилизатор, ишлатилган пипеткалар сақланадиган 2%—ли фенолли ёки хлораминли идиш, дезактивация қилиш учун ишлатиладиган фенол ёки хлораминли идиш, ишлатилган материалларни соладиган идиш, 70%—ли йодни спиртли эритмаси,

пробиркалар учун штативлар, стерилланган оддий ва пастер пипеткалари, стерил пробиркалар, оддий ва мум қаламлар, лейкопластир, стерил пахта ва ҳоказолар. Бундан ташқари боксга ҳар бир вазифани бажариш учун ишлатиладиган материаллар ва эритмалар олиб кирилиб, иш тамом бўлгандан сўнг олиб чиқиб кетилади.

Яна бир айрим хонада вирусларни тоза препаратларини олишда ишлатиладиган ҳар хил айланиш тезлигида ишлайдиган совутгичли центрифугалар бўлади (минутига 6—12 мингдан 30—60 минг.марта айл.тез.).

Вирусология лабораторияси яна электрон микроскоп, спектрофотометр, электрофорез, хроматография асбоблари (фракцияларни автоматик йиғувчи коллекторлар), дистилланган сув олиш асбоби, гомогенизатор, техник ва аналитик торозилар, қуритиш шкафлари, совутгич, термостат, pH—метр, диффузия насоси, лиофил қуритгич ва ҳоказоларга эга бўлиши лозим.

Вирусология лабораториясининг тузилишининг ташкиллаштириш принциплари ва унда ишлаш шароитлари, ишлаш жойларини тақсимланиши, ювиш ва дезинфекциялаш хонаси, асосий асбоб—ускуналар, реактив ва озиқа муҳитлар, шишадан ясалган идиш ва асбоб—ускуналар, стериллаш антизардоб олиш ва тайёрлаш, вирусларни сақлаш, вирусология лабораториясида дезинфекция ва стерилизация шартлари, айниқса медицина ва ветеренария вирусологиялари соҳасидаги амалий машғулотлар билан Гюнтер Штаркенинг "Практическая вирусология" (1968) ўқув қўлланмаси асосида бўлиши керак.

Адабиёт

Гюнтер Штарке "Практическая вирусология" Перевод с немецкого Москва, 1970, 356 с.

1—ҚИСМ. ВИРУСЛАРНИ ЎСИМЛИКЛАРГА ЮҚТИРИШ УСУЛЛАРИ

Умумий қоидалар

Вирусларни ўсимликга юқишига бир қанча факторлар таъсир қилади ва улар вирусни дастлабки ҳужайрага кири—

шида, касалликни ривожланишида ва кейинги жараёнларда муҳум рол ўйнайди. Тарр (1975) бу омилларни 4 гуруҳга бўлди: биринчи гуруҳга ўсимликни хусусиятлари, иккинчи — сига патогенлик хусусиятлари, учинчиси — экология ва тўр — тинчиси биотик факторлардир.

а) **Ўсимликни хусусиятларига** уни ирсий чидамлилиги киради. Чидамлилик даражаси эса ўсимлик тўқимасининг ёшига ва озиқланишига (м.; микроэлементларни етишмас — лиги ўсимликни вирусга чидамлилигини пасайтиради) қараб ўзгаради. Чидамлилик ҳароратга қараб ҳам ўзгаради. Вирус ҳужайрага киргандан сўнг юқори температурага тўғри келиб қолса, ўсимлик барглари ва бошқа органларини ўзгариши — сиз, симптомлар яширин ҳолатда ўтиши мумкин.

Нимжон ва кучсиз ўсимликлар касалликга сезгироқ (чидамсизроқ) бўлса, бақувват, яхши ривожланаётган ўсим — ликлар вирусга анча чидамли бўлади, уларни тўқималари анча қаттиқ. дағал бўлади. Уларга вирус юқиши ўсимликда енгил симптомлар ҳосил бўлишига олиб келади ва ўсимлик — ни бутунлай нобуд бўлмай қолиши мумкин

Ўсимликни вирусга сезгирлиги ёки чидамлилиги ўғитлар билан уни таъминланишига ҳам боғлиқ, масалан, азотли ўғитларни кўплиги ўсимлик чидамлилигини пасайти — ради.

Ўсимликни вирус билан касалланишига ўсимликни ви — русга бўлган "мойиллиги" ҳам ёрдам беради. Уокер (1950) "мойиллик" деган тушунчага ўсимликни бир ёки бир неча факторлар таъсири натижасида вирус билан осон касалла — нишини кўзда тутади. Честер бу тушунчани бойитиб "мой — иллик" қаторига сезгирлик ёки "касалланиш тенденцияси борлиги" тушунчаларини киритади.

Ўсимликни вирус билан касалланишига яна ўсимликни ёши, бир сутка давомидаги, фасл мобайнидаги чидамлилиги, механик босим, ўғит (калий, фосфор, азот), фунгицид ва пестицидлар ҳам таъсир қилади.

б) **Патогенлик хусусиятлари** (патоген — организмда паразитлик билан ҳаёт кечирувчи организм) уни агрессив — лигига (ўсимликни касаллантириб, уни қаршилигини енгиб, унда яшаши, кўпайиши) боғлиқдир. Вирусни оз миқдори (зарралар сони) тез ва қисқа муддатда (касалланишга кетган

вақт) ўсимликни касаллантиришга етарли бўлса, уни агрес — сивлиги юқори ҳисобланади.

Патогенни яна бир хусусияти уни **вирулентлиги** — патогенни ирусни) касаллик қўзғатиш хусусиятидир.Бу хусусият барарор хусусият бўлиб, у генотип ўзгаргандагина ўзгаради.

в) **Экологик омиллар.** Ўсимликка вирус зарралари ки — риб, уларда симптомлар ҳосил бўлишида экология омиллари — намлик, температура, ёруғлик, pH, инокулюмни ион кучи ва ҳоказолар ҳам рол ўйнайди.

г) **Бистик омиллар.** Бунга, интерференция ҳодисаси мисол бўлиши мумкин, яъни бир турни ривожига иккинчи урни ёки бир хил вирусларни ноинфекцион зарралари ўсимлик рецепторларини банд қилиши сабабли вирус ҳу — жайрага кираолмайди ёки кам миқдордаги вирус зарралари киради ва юқумлилик даражаси пасаяди.

С.В.Кустни (1981) фикрича ўсимлик вирус юқишига 4 хил реакция билан жавоб беради: 1) иммунлик — ўсимликга вирус юқмайди; 2) ўта сезгирлик — ўсимликни вирус кирган жойидаги тўқималар нобуд бўлиб некроз каби симптомлар ҳосил бўлади; 3) толерантлилик — вирус ўсимлик тўқималари бўйлаб тарқалади, аммо симптомлар кучсиз кў — ринади; 4) тизимли касалланиш (системное поражение) ор — ганизмни ҳамма тўқималари касалланади, вирус ўсимликни ҳамма тўқималари бўйлаб тарқалади ва касаллик симптом — лари яққол кўринган бўлади. Симптомлар ҳар хил бўлиши мумкин — мозаика, барг шаклини ўзгариши, томирларни рангсизланиши, хлоротик доғларни ҳосил бўлиши ва ҳоказо. Баъзан юқорида кўрсатилган 4 гуруҳ симптомлар орасида аниқ чегара бўлмаслиги ҳам мумкин. Масалан, толерантлик билан системали касалланишни аниқ ажратиш баъзан қийин бўлади, баъзи ўсимликларда механик инокуляцияда аввал некроз ҳосил бўлиб (ўтасезгирлик), сўнгра ўсимликни ҳамма органлари касалланади.

Агар ҳар бир тип касалланишга мисол келтирадиган бўлсак, биринчи тип — иммунлик ҳолати. Ғўза ўсимлигига — арпа мозаикаси вируси ёки жўхори пакана мозаикаси ви — русларини юқтирилса, ғўза бу вируслар билан касаллан — майди, яъни ғўза ўсимлиги бу вирусларга чидамли — им — мунир. Аммо юқорида келтирилган вирусларни билан ар —

пага ёки жўхорига юқтирилса, уларда чизиқли мозаика аломатлари 12—14 кунлардан сўнг ҳосил бўлади. Бу ҳолда ҳосил бўлган симптомларни тизимли касалланиш (системное поражение) дейилади. Агар худди шу вирусларни шўра ўсимлигини маълум навига юқтирилса, 10—12 кунлардан сўнг касаллантирилган баргда диаметри 2—3 мм катталикдаги сариқ доғлар — некрозлар ҳосил бўлади.Бу хилдаги касалланиш ўсимликнинг ўта сезгирлигига мисол бўлаолади. Толерант ўсимлик деб аталадиган ҳолатга мисол қилиб картошканинг Х вируси билан помидор ўсимлигини касаллантиришни, яъни вирус зарралари картошка ўсимлигида бўлса ҳам кўзга яққол ташланадиган аломат, биринчидан сезилмайди ва иккинчидан бу вируснинг зарари ўсимлик ҳосилдорлигига унча сезиларли таъсир кўрсатмаслиги мумкин.

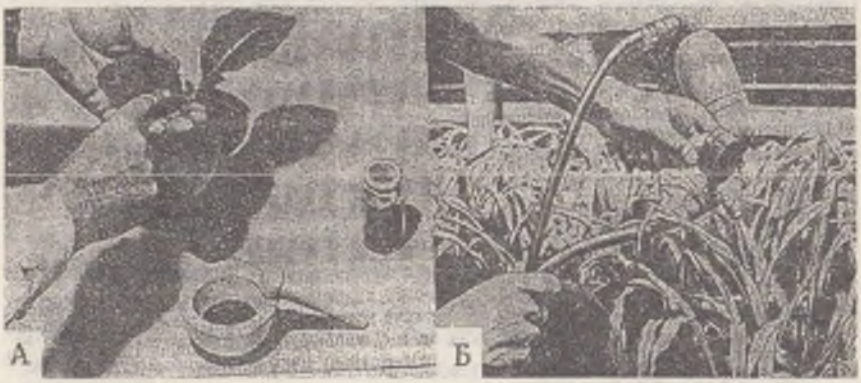
Вирус ўсимликка юқорида айтилган усул билан юқтирилгандан сўнг маълум вақт соя ерда сақланса, ўсимлик тўқималарида абразивлар таъсирида ҳосил бўлган микрожароҳатларнинг битишини, яъни репарациясини тезлатади (Власов, 1982). Инокуляция қилинган (касаллик юқтирилган) ўсимликларда касаллик аломатларини кузатиш 1—2 суткадан то 4 ҳафтагача ва ундан кўпроқ вақт мобайнида олиб борилади. Некроз каби аломатларни 3—12 кун давомида кузатилса, тизимли касалланиш аломатларини 7—30 кун ва ундан кўпроқ муддат давомида олиб борилади.

Аниқлагич ўсимлик ёрдамида фақат бир ўсимликдаги биргина вирусни ажратиб ва аниқлабгина қолмасдан, балки бир неча вируслар бирга аралаш ҳолда учрайдиган ҳолатларда ҳам вирусларни аниқлаш мумкин. Табиатда ҳар хил ўсимликларнинг маданий ва ёввойи турлари тарқалган бўлиб, уларда ҳам вируслар унга ихтисослашишига қараб ёввойи тур ўсимлик шу вирусга сезгир бўлиши, унинг маданийлашган навларининг линиялари бу вирусга турғун бўлиши мумкин. Бир тур ичидаги ҳар хил навлар вирус тури ва штаммларига нисбатан ҳар хил реакция билан жавоб бериши мумкин. Табиатда, масалан, арпа ўсимлиги бир вақтнинг ўзида икки вирус билан — арпа чизиқли мозаикаси ва ялтирбош мозаикаси вируслари билан касалланиши мумкин. Тамаки ўсимлиги ҳам тамаки мозаикаси вируси ва бодринг мозаикаси вируси билан касалланган бўлиши мумкин ва ҳоказо. Ана шунга ўхшаш вируслар аралашмаларидан ҳам

аниқлангич ўсимликларни тўғри танлаб тоза вирусни ажратиш ва аниқлаш мумкин. Масалан, тамаки ўсимлигидаги бодринг мозаикаси вирусини аралаш вируслар ичидан ажратиб олиш учун вирусли ўсимлик шираси билан бодринг ва тамакининг Nicotina sylvestris навини касаллантирилса, бодрингда фақат бодринг мозаикаси вируси, тамакида эса фақат тамаки мозаикаси вируси кўпайиб, мозаика аломатлари намоён бўлади. Арпани касаллантирувчи арпа чизиқли мозаикаси вирусини шу вирусини шу ўсимликдаги ялтирбош мозаикаси вирусидан ажратиш учун эса жўхори ўсимлигини касаллантирилса, жўхорида фақат ялтирбош мозаикаси вирусигина кўпаяди. Вирусларни аралашмалар ичидан ажратиб олишда қўлланиладиган ўсимликларни дифференциатор ўсимликлар дейилади .Худди шунга ўхшаш табиатда картошканинг вирусларини (картошка 20 га яқин вирус билан касалланади) ажратиш учун ҳар хил картошка вирусини аниқлагич ўсимликлари мавжуддир. Баъзан ўсимликга вирус юқтириш ва вирусни аниқлаш холларида аниқлагич ўсимликлар ҳам ёрдам бераолмаганда бир қатор вирус тарқатувчи ёки юқтирувчи хашоратлардан фойдаланилади (Власов, 1974, 1982).

1. Вирусларни механик усулда юқтириш ва уни оптималлаштириш

Механик усулда вирус (ёки уни РНК си) хужайрага барг кутикуласидаги жароҳатлар (микротравмалар) орқали киритилади (1 — расм).



1 — расм. Вирусларни механик усулда бармоқ ёрдамида (А) ва бўёқ пуркагич (краскапульт) ёрдамида юқтириш (Б).

Барг кутикуласида микрожароҳатларни диатом сувут — лари (целит) ёки карборунд (кремний карбиди) ёки корунд (алюминий оксиди) каби абразивларни майда кукуни (400 — 700 меш ёрдамида ҳосил қилинади (меш 2,5 см^2 (1 дюм) даги поралар (тешиклар) сони). Абразив ишлатилганда инокуля — ция эффекти 20 — 50 баробар ошади. Автоклавда ёки қуритиш шкафларида стерилланган карборунд, корунд ёки селитни, ёки диатом тупроғини барг юзасига инокуляция — дан олдинроқ чанглатилади, чунки улар сувда осон чўкади, аммо целит уларга қараганда секин чўкмага тушади, шунинг учун уни инокулум билан аралаштириб ишлатса ҳам бўлади. Абразивни барг сатҳига чанглатиш учун пробирка ёки 50 мл лик ҳажмга эга бўлган колбага солиб, уни оғзини 2 қаватли дока билан ёпиб сўнгра уни чанглатишда фойдаланиш мум — кин. Инокулум билан абразивни аралаштирилганда унинг миқдори 50 — 100 мг/мл бўлиши керак.

Инокулумдан барг сатҳига 1 — 2 томчи вирус суспен — зиясидан томизилади ва стерилланган шиша тайёқча, пахта ёки дока тампон ёки яхшилаб ювилган ва артилмай қуритилган бармоқлар ёрдамида охисталик билан суртилади (1 — расм). Суртишдаги куч катталиги бир қанча омилларга боғлиқ бўлади: ўсимликнинг тури, ёши, баргнинг ҳолати, абразивни сифати ва ҳ. Абразив ишлатилгандан сўнг барг сўлиб қолишга мойилроқ бўлгани учун улар қуриб қолишининг олдини олиш мақсадида бир неча соат нам ат — мосферада сақлаш яхши натижалар беради. Вирус юқумлилигини ошириш учун Гиббс ва Харрисон (1978) қуйида бир қанча омиллар муҳимлигини уқтирадилар.

а) **Инокулумда ионларнинг бўлиши.** Инокулумнинг юқумлилиги ундаги ионлар ва уларнинг миқдорига боғлиқ бўлади. Масалан, фосфат концентрацияси 0,02 — 0,1 М ва pH 7,0 — 8,5 бўлиши вирус юқумлилигини оширади. Яна юқумлилик вирус ва хўжайин ўсимлик ва уларни комбина — циясига боғлиқ бўлади. Кўпгина вируслар pH нинг қуйи да — ражаларида фаоллигини йўқотади.

б) **Юқумлилик ингибиторлари.** Баъзан вирусларни сезгир ўсимликга механик усулда ўтказиш ўта қийин бўлади.

Бундай ходиса кўпгина ўсимлик ҳужайрасидаги "юқумлиликни ингибитори" бўлиб хизмат қиладиган баъзи оқсил ва полисахаридларга боғлиқ бўлади. Булар вирус фаоллигини йўқотмайди, аммо қандайдир йўл билан вирус юқишига таъсир қилади. Бундай ингибиторлар қанд лавлаги, Chenopodium spp. Phytolacca spp. ва Dianthus spp. ўсимликларидан ажратилган шираларда бўлади Ингибитор таъсирини йўқотиш учун вирус концентрацияси каттароқ бўлса вирусли ўсимлик ширасини суюлтирилганда, ингибитор ҳам суюлади ва таъсири йўқолади. Ёки ингибитор таъсирини йўқотиш учун вирусни ингибитордан тозалаш керак бўлади, ёки вирус юқумлилигини баҳолаш учун ингибитор таъсир этмайдиган ўсимлик турлари ишлатилади. Шунинг учун, бодринг, Chenopodium amaranticolor, Gomphrena globosa каби ўсимликларга ингибиторлар таъсир этмайди. Шунинг учун беда мозаикаси вирусини Ch. amaranticolor дан Nicotiana spp. га механик инокуляция ёрдамида ўтказиш қийин, чунки Ch. amaranticolor ингибиторга эга. Лекин уни аввал Gomphrena globosa га ва сўнгра G. globosa дан Nicotiana spp. га ўтказиш яхши натижа беради.

в) **Вирус фаоллигини йўқотувчи моддалар.** Вирус юқумлилигига яна уни фаоллигини йўқотувчи ўсимликдаги моддалар ҳам таъсир этади. Дарахтсимон ўсимликлар барларининг ширалари таннинга эга бўлиб, улар маълум шароитда вируслар билан боғланиб, вирусларни чўкмага туширади, натижада вирус юқумлилиги йўқолади. Аммо бундай ҳолатларнинг олдини олиш учун ўсимлик баргларини гомогенизация қилиш жараёнида pH 8—9 га тенг бўлган буфер ишлатилади ва никотин ёки кофеин каби эритмаларида эзилади. Ишқорий муҳитда таннинларнинг вирус билан боғланиши сусаяди. Бошқача усуллар ҳам мавжуд бўлиб, бунда вирус гомогенизация қилинадиган муҳитга бирорта оқсил солинади (масалан, кукун қилиб майдаланган тери солинади). Бу оқсил вирус билан бирга таннинни бирлаштириш учун рақобат қилади. Бу усул "какао шоҳларини шаклини ўзгариши вирусининг" бир дарахтдан иккинчисига ўтказишга имкон яратади. Фаол вирус олишнинг яна бир усули бу таннинга бой ўсимликлардан актив вирус олишда ўсимликни таннин миқдори кам қисмидан вирус ажратиш—

дир. Масалан, гултожибарглар ва ёш илдизчаларда таннин миқдори кам бўлади.

Ўсимлик ширалари одатда фаол оксидазаларга эга бўлиб, уларни маҳсулотлари вируслар фаоллигини йўқотади. Бу ҳолатларни олдини олиш учун муҳитга қайтаргичлар (масалан, дитиорейтол, меркаптоэтанол, тиогликол кислотаси, цистеин солянокислий) ёки ёки хелатлашитирувчи агентлар (масалан, натрий диэтилдитиокарбамат) солинади.

Баъзи "дефект" (нуқсонли) вирусларни нуклеин кислоталарини муҳофазаси кучсизроқ бўлади; баргни гомогенизация қилиш даврида ширадаги нуклеаза ва бошқа вирус фаоллигини йўқотувчи агентлар вирус нуклеин кислотасини ўта тез парчалаб юборади. Шу сабабли керакли муҳофаза амалларини қилинса вирус юқумлилигини қисман сақлаб қолиш мумкин. Жумладан, муҳитга бентонит солиб вирус ажратиш нуклеазаларни бентонитга адсорбция қилинишига олиб келади ёки вирусни ишқорий (pH 9,5) муҳитда экстракция қилиш ҳам вирус нуклеин кислотаси активлигини сақлаб қолади.

Вирус юқумлилигини сақлашнинг яна бир йўли вирус ажратиш вақтида вирусли ўсимлик ширасини депротеинизация қилишдир. Бунинг учун ўсимлик ширасини $+2^0C$ да суюлтирилган буфер ишлатиб уни тенг ҳажмда сувга тўйинган фенол билан аралаштирилади. Сўнгра аралашма центрифуга ёрдамида вирус нуклеин кислотасига эга "сувли фракция"ни барг қолдиқлари, фенол каби бошқа моддалардан ажратилади.Кейин эса "сувли фракция" совитилган диэтил эфирни бир неча ҳажми билан яхшилаб чайқатилиб фенол қолдиқларидан тозаланади. Эфирни йўқотиш учун эса ундан азот ўтказилади. Шундан сўнг препарат инокуляцияга тайёр ҳисобланади. Фенол вирус фаоллигигнинг йўқотувчи агентларни денатурация қилади ва вирус нуклеопротеидидан вирус нуклеин кислотасини ажратади ва оқсил табиатли вирус юқумлилигини ингибиторларини денатурация қилади.

Юқорида кўрсатилган қоидаларга роия қилинган ҳолда вирус механик усулда юқтирилганда ўсимликларда маълум муддат ўтгандан сўнг ҳар хил симптомлар ҳосил бўлади. Ўсимликни ҳар хил турлари вирус юқиши жараёнида тур—

лича таъсирланади, бу таъсирланиш ўсимликни ирсиятига, вирусни типига ва ҳакозоларга боғлиқ бўлади.

2. Вирусларни пайвандлаш ёрдамида юқтириш

Пайвандлаш боғдорчиликда қадимдан ишлатилади. Бунда ҳар хил ўсимликлар тўқималарнинг (кесмаларини) устки томонларини бир—бирига ёпиштириб қисиб қўйилади, кейинчалик улар бир—бири билан қўшилиб ўсиб кетади. Одатда бир ўсимликни (пайвандустни) дисталь қисмини иккинчи илдизли ўсимликка (пайвандтагга) ўтказилади. Агар пайвандустда ёки пайвандтагда вирус бўлса, пайвандлашдан сўнг вирус иккинчи жуфтига ўтади ва унда кўзга кўринадиган касаллик симптомлар ҳосил бўлади (2—расм).

Биринчи марта пайвандлаш воситасида вирусларни юқтириш XVII асрда Голландия боғбонлари томонидан қўлланилди. Улар лола гултожибаргларининг атласга ўхшаш симптомлар ҳосил қилишини билишди ва бу ўта юқори баҳоланадиган лола хусусиятини пайвандлаш билан соғлом лола пиёзларига ўтказишни амалга ошириб келишди.

Асосан пайвандлаш билан дарахт ўсимликларга (олма, нок, олхўри, олча ва цитрус ўсимликлари) вируслари юқтирилади.

Пайвандлаш яхши натижа бериши учун пайвандтаг ва пайвандустнинг камбий тўқималари бир—бирига тўғри келиши ва уларнинг мойиллиги бўлиши керак. Мойиллик эса турлар бир—биридан узоқ бўлса, ҳамда бир паллалик ўсимликларда ўта суст бўлади.

Пайвандлашдан сўнг ўсимликни яхлит бўлиб ўсишига баъзан уларни биридаги вирус ҳам таъсир қилади.

Цитрус ўсимликларини пайвандлашда анча мураккаб ходиса кузатилади. Кўпинча иқтисодий аҳамияти катта бўлган нав, пайвандлангандан сўнг ўзини вирусга чидамлилик хусусиятидан айрилади.

Вирус юқиши баъзан пайвандланиш амалга ошмаса ҳам юз бераверади.

Таксономик бир—биридан узоқ бўлган ўсимликлардан Chenopodium amaranticolor ва ток ўсимликларини ҳам бир—бири билан яқинлаштирилганда (2—расм), уларнинг кесилган қисмлари устида каллуслар ўсганда ҳам вирус юқади. Баъзан пайвандлаш яхши амалга ошгани билан вирус юқмаслиги мумкин. Масалан, тамакини "қалдираши" вируси (вирус по—

тремковости табака) картошкани пайвандлаганда (бошқа вирусларга қараганда) ўта суст юқади, балки бу вирусни ўсимлик танаси бўйлаб тўла тарқалмаслигидан бўлиши ҳам мумкин.

Вирусларни пайвандлаш усули билан юқтиришнинг кўпгина усуллари мавжуд. Масалан, энг кенг тарқалганларидан ўсимликдан қирқиб олинган пайвандтагга пайвандустни ўтказиш ва икки ўсимликни яқинлаштириш билан амалга оширилади.

Биринчи усул — пайвандустдаги вирусни пайвандтагга юқтиришда ишлатилади. Бу усулни ҳар хил вариантлари мавжуд.

а) ўтсимон ўсимликларни пайвандлаганда пайвандуст — нинг пастки қисмини понасимон қилиб ўткирлаштирилади.

б) дарахтсимон ўсимликларни куртак пайванд қилиш йули билан (пайвандуст бўлиб куртак хизмат қилади).

в) малинага ўхшаш ўсимликларни шоҳларининг сувли идишга солиб ("бутилка усул"), картошка, земляника ва бошқа ўсимликларни ҳам пайвандлаш орқали уларга вирус юқтириш мумкин (2 — расм). Яқинлаштириб пайвандланганда иккала партнёр ҳам илдиз қисмини сақлаб қолади.

2 — расм. Пайвандлашнинг вирусларни юқтиришда ишлатилади-ган турлари (Garlet, 1958; Гиббс, Харрисон, 1978).

А. Дарахтсимон ўсимликларни "кўз пайвандлаш" усули. Пай-вандуст (куртак) пайвандтаг пўсти тагига жойлаштирилади. Кўз пай-вандлашдан олдин пайвандустдаги (куртак) бирга кесиб олинган ёғоч қатламини олиб ташласа ҳам бўлади.

Б. Пайвандлашнинг "бутилка" усули малинани пайвандлашда ишлатилади. Пайвандустнинг баргли шоҳчаси сувли пробиркага со-линади. Пробиркадаги сувда сувўтлари ўсиб кетмаслиги учун алюми фолгаси билан ўраб қўйилса яхши бўлади.

В. Пайвандлашни "ёрма" (ускуна) усули картошка каби ўтсимо ўсимликларни пайвандлашда ишлатилади.

Г. Пайвандлашни "копулировка" — яқинлаштириш усули, шўр ўсимлиги вирусининг ток ўсимлигига ўтказишда ишлатилади. Илдизли икки ўсимликнинг камбий қисми очилгунча тозаланади, сўнгра иккала ўсимлик кесилган жойлари билан бир — бирига жипслаштирилади ва боғланади.

Д. Пайвандлашнинг "тилсимон копулировка" усули. Бу усу земляника каби ўсимликлар вирусларини ўтказишда ишлатилади. Ўсимликлар махсус лента билан боғланади (Гиббс ва Харрисон, 1978).

Пайвандлашни қайси усули қўлланилишидан қатъий назар, уланадиган ўсимлик тўқимасини бир — бирига зич қилиб туташтириш муҳим бўлиб, улар то бир — бири билан қўшилиб ўсиб кетгунча қолдирилади.

Пайвандуст ва пайвантагларни бир — бирига боғлаш учун махсус ленталар ишлатилади. Пайвандланган қисмнинг усти, айниқса ўтсимон ўсимликларнинг устки юзаси доимо намланиб туриши катта аҳамиятга эга.

Агар вирус концентрацияси ўсимликда юқори бўлса ҳамда ўсимликнинг бутун танаси бўйлаб бир текис тарқамаган бўлса, икки кундан сўнг пайвандланган жойда вирус иккинчи ўсимликга ўтади. Аммо вируснинг концен — трацияси ўсимликда кам ва бутун тана бўйлаб бир текисда тарқалган бўлса вирус партнёр ўсимликга ўтиши учун ҳафта ва ундан ошиқроқ, дарахтсимон ўсимликларда бир неча ой бўлиши мумкин. Касаллик симптомлари аввал соғ ўсимлик шоҳларининг энг устки қисмларида пайдо бўлади. Ўтсимон ўсимликларда эса симптомлар бир ва бир неча ҳафтада, да — рахтларда 1 йилдан сўнг ёки бир неча йилдан сўнг пайдо бўлади.

3. Вирусларни зарпечак ёрдамида юқтириш

Гиббс ва Харрисон бу усулни ҳам "Ўсимлик вируслари" китобида келтирган бўлиб, тўла ахборат олиш учун шу ман—бага мурожаат қилинса мақсадга мувофиқ бўлади.

Бу усул ҳам пайвандлашга ўхшаб кетади, чунки бу ҳолда ҳам вирус ўтиши учун ҳар хил ўсимликларнинг ҳужайралари ва ўтказувчи тўқималари орасида жипс боғланиш бўлиши муҳим.

Зарпечак—Cuscuta spp.—кўплаб ингичка шоҳларга эга поялі паразит ўсимлик бўлиб ҳўжайин ўсимлик поясини ўраб олади ва тегиб турган жойларида ҳўжайин—ўсимликни ўтказувчи тўқималарига кирган илдизсимон гаусториялар ҳосил қилади.

Зарпечак ёрдамида икки ўсимликни бирлаштириш мумкин. 1940 йилдан Bennet биринчи марта баъзи вирус—ларни зарпечак канали орқали бошқа ўсимликга ўтишини аниқлади. Зарпечакнинг 20 дан ортиқ тури вирус юқтиришда ишлатилади (3—расм). Энг кўп ишлатиладиганлари Cuscuta campestris. Бу тур 39 та текширилган вирусдан 24 тасини ўтказган, C.subinclusa эса 23 тадан 12 тасини ўтказди. Одатда зарпечак тўқималарида ҳам кўпаядиган вируслар (бодринг мозаикаси вируси) соғлом ўсимликга яхши ўтади, аксинча зарпечакда пассив тарқалувчи вирусларнинг юқиш самара—дорлиги паст бўлади.

Бу усулда вирус юқтириш, одатда, механик инокуляция билан, ҳашоратлар билан, пайвандлаш билан вирус бошқа ўсимликга ўтказа олинмаган холларда қўлланилади. Баъзан икки ўсимлик бир—биридан таксономик узоқ бўлади, шу вақтларда юқоридаги усуллар қўлланилганида вирус юқмайди. Шундай вақтларда зарпечак билан вирусни ўтка—зиш қўл келади.

Зарпечак уруғи ўз унувчанлигини бир нечта йилларгача (10 йилгача) сақлаши мумкин. Уларни ҳўжайин— ўсимлик—ларнинг орасига уруғи экилса улар ўз ҳаёт фаолиятини яхши сақлайдилар. Зарпечак кўчатларини бирданига ишлатса ҳам бўлади, ёки уларни аввал хўжайин—ўсимлик танасига ях—шилаб ёпишиб олганидан сўнг, уни шоҳлари ишлатилади. Зарпечакнинг кўчати ёки шоҳини вирус билан касалланган ўсимлик яқинига жойлаштирилади ва у ўсимликга яхши ёпишиб олганидан сўнг уни иккинчи учини индикатор ўсимликга бириктирилади. Кўпгина вирусларда симптомлар

аввало индикатор — ўсимликларнинг учларидаги ёш барг — ларда ҳосил бўлади. Масалан, бодринг мозаикаси вируси зарпечакни ўзида симптомлар ҳосил қилади.

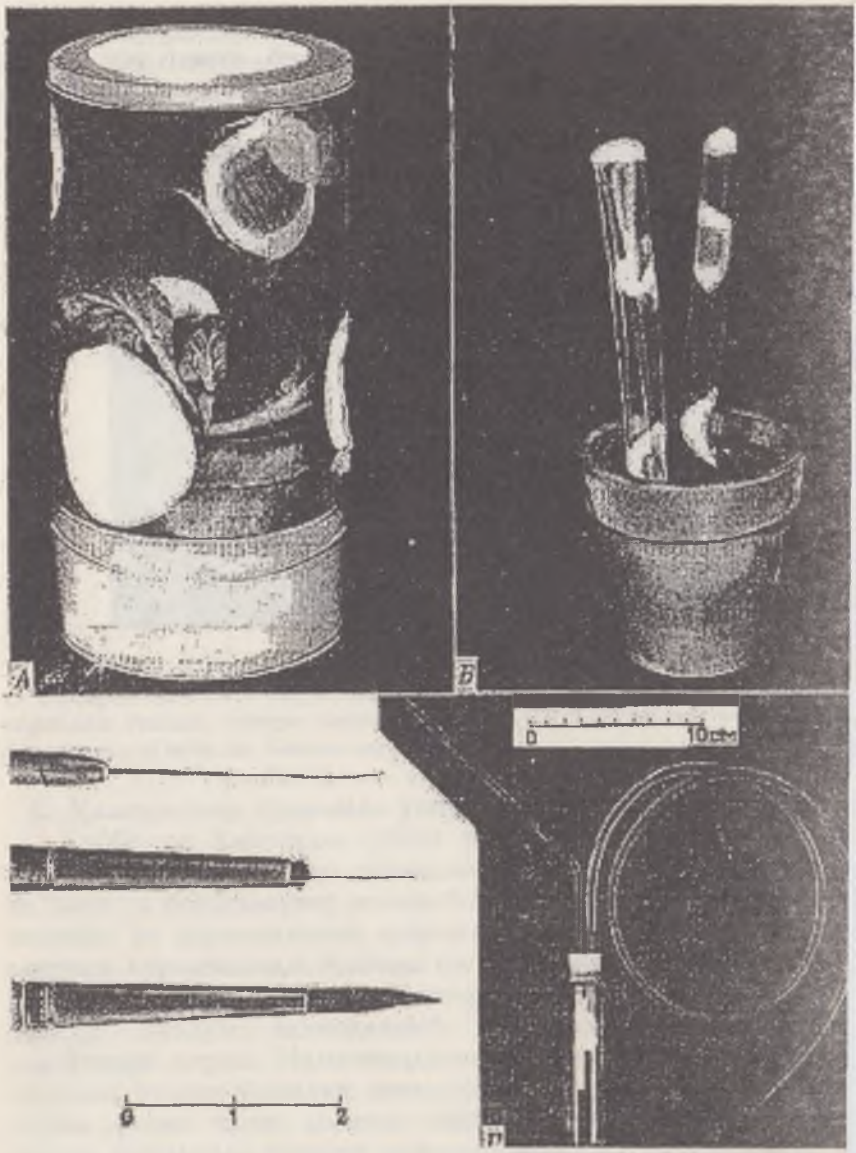
3 — расм. Зарпечак ёрдамида вирус юқтириш.

Зарпечак аввал вирус билан касалланган қанд лавлагига ёпиш — тирилади (чапда), сўнгра зарпечакнинг пояси соғ тамаки ўсимлигига ўтказилади (Гиббс ва Харрисон, 1978).

4. Ҳашоратлар ёрдамида ўсимликларга вирус юқтириш

Гиббс ва Харрисон (1978) ўсимликларни вирус билан касаллантириш учун ишлатиладиган ҳашоратларни (ширин — ча, кана ва бошқаларни) доимо боқиб турадиган шароит бў — лишини ва парваришлаш шароитларининг қуйидагича бў — лишини кўрсатишади. Қуйида шу усулларни батафсил кўр — сатишга харакат қиламиз. Ҳашоратлар боқиладиган ўсим — ликлар ма'лум шамолланиб туриладиган камераларда сақланиши керак. Ишлатиладиган ўсимлик эса шу вирусга чидамли бўлган ўсимлик (иммун) бўлиши керак. Ҳашорат — ларни доимо яхши ҳолатда сақлаш учун улар фаол ўсиб турган ўсимликда бўлиши мақсадга мувофиқ бўлади. Каме — ранинг тузилишини қуйидагича тасвирлаш мумкин. Диа — метри 10 смга тенг келадиган гул — тувак учун мосланадиган камерани таг қисми диаметри 10 — 12 смлик тагликдан ибо —

рат пластмасса ёки бошқа материалдан тузилган, баландлиги 5—7 смлик берк элаксимон идиш бўлиб, унинг уст қисми 25—30 смлик целлулоид пленка билан айлантириб қопланади ва унинг устки қисми эса ҳашоратлар размеридан кичикроқ бўлган тўр ўралган қопқоқ билан ёпилади (дока ишлатиш ҳам мумкин). Тўр ишлатишдан мақсад ўсимлик ўстирилаётган ва ҳашорат парваришланадиган бу камеранинг ичида конденсацияланган сув (кам шамоллантирилса) йиғилишини олдини олиш, ҳашоратларни унда чўкиб қолиши, ҳамда замбуруғлар ривожланиб моғорлашига йўл қўймасликдир. (4—расм).



4 – расм. Вирус ташувчи ҳашоратларни кўпайтириш ва улар би – лан ишлашда қўлланиладиган мосламалар.

А. Шираларни кўпайтириш учун ишлатиладиган целлулоиддан тайёрланган мослама. Уни бир неча жойида дока (тўр) билан тўсилган шамоллатишга хизмат қиладиган тирқишлар мавжуд.

Б. Цикадаларни (чирилдоқ) сақлашда қўлланиладиган кичик мослама.

В. Вирус — ташувчи ҳашоратлар билан ишлашда қўлланиладиган асбоблар. Юқорида: тиш муолажасида ишлатиладиган учи қайрилган асбоб бўлиб, у нематодалар билан ишлаш жараёнида фойдаланилади.

Ўртада каналарни ўтказишда фойдаланиладиган 1 дона олмахон мўйи. Пастда — худди шунга ўхшаш, ширалар билан ишлашда фойдаланиладиган олмахон мўйи тўплами.

Г. Цикадалар (чирилдоқ) билан ишлашда ишлатиладиган аспиратор. Сўриб олиш учун ишлатиладиган найчани бир томони дока билан беркитилган бўлади.

Ҳашоратларни бир ўсимликдан иккинчисига ўтказиш учун қўлланиладиган мослама одатда қуйидагича тузилишларда бўлади, нематодлар билан ишлаганда тиш дўхтирлари тишнинг каваклари муолажа қилишда ишлатадиган учи қайрилган металлдан ясалган бандлик мослама қўлланилади, каналар билан ишлаш учун эса биргина ҳайвон мўйи ўрнатилган (кўпинча олмахон мўйи) мўйқалам ишлатилади, чирилдоқлар билан ишлаш ва уларни йиғиш учун аспираторлар ишлатилади. Аспиратор бу катта пробиркага пўкак ёрдамида киритилган икки найча бўлиб, унинг бири дока билан ёпилгани бўлиб оғизда тортиш учун хизмат қилса, иккинчиси 20—25 смлик осон букилувчан тиниқ пластмасса найчадан иборатдир, одатда (аспираторнинг бу томони) цикадаларни йиғиш учи ҳисобланади.

Ширалар партеногенез ёки тирик туғиб кўпайгани учун улар жуда тез кўпаяди ва қанотли, қанотсиз шакллари пайдо бўлади, шунинг учун хам уларни кўпайтириш анча осондир. Қўнғизлар, чирилдоқларни кўпайтириш анча қийин бўлиб, айрим малака талаб этади. Нематодларни кўпайтирганда эса туироқ ўта қуруқ ёки сернам бўлмасдан мўътадил бўлиши зарур. Замбуруғларни вирус юқтирувчи қилиб ўстириш учун стерил қумда сақланадиган ўсимлик илдизларида сақлаш мақсадга мувофиқ бўлади, чунки унинг зооспораларини керак вақтда осон ювиб олса бўлади.

Вирус тарқатувчи ҳашоратлар билан ишлаш ҳам мутахассисдан малака талаб қилади. Масалан, ширалар билан ишлашда уларни бир ўсимликдан бошқасига ўтказиш учун

мўйқалам сал ҳўлланилади, сўнгра мўйқаламдаги ягона мўй ёрдамида ширалaрнинг қорин қисмига салгина уриб — уриб қўйилади, натижада шира ўз стилетини барг тубидан суғириб олади. Кейин уни қил ёрдамида кўтариб олинади ва янги касаллантириладиган барг устига охиста қўйилади. Баъзи ҳолларда, айниқса ширинча озиқланаётган баргда вирус катта миқдорда бўлса, бехосдан стилет суғириб олинганда ўсимлик шираси мўйқалам қилига тегиб сўнгра соғ ўсимликга ўтиб кетмаслигининг олдини олиш учун мўйқалам билан ажратиб олинган ширинча аввал барг устига қўйилган кичик қоғоз парчасига қўйилади, қоғоздан эса ширинча секин — аста ўзи баргга ўтади. Чирилдоқлар жуда фаол бўлганлиги учун уларни аспиратор ёрдамида бошқа баргга ўтказилади. Нематодалар билан касаллантириш учун эса уларни тупроқ суспензиясида ажратиб олинади ва у билан касаллантириладиган ўсимлик илдизи касаллантирилади. Нематодаларни ажратиб олишнинг биринчи стадияси тупроқ бўлакчаларини майдалаб, кўпроқ хажмдаги сувга ўтказилади. Сўнгра нематодаларни ҳар хил ўлчамлик элаклардан ўтказиб, сузиб олинади. Биринчи энг йирик тешикли ва кейин ундан майда ва энг майда тешикли элаклардан ўтказиб, керакли тур нематодаларни йиғиб олинади. Одатда керакли тур биринчи ёки иккиинчи элакда йиғилади. Сўнгра уларни стереомикроскоп ёрдамида ҳар хил ўсимлик илдизи қолдиқларидан, бошқа ҳар хил организм ва бегона буюмлардан тозалаб ажратиб олинади ва уларни идишдаги сувда сақланади. Нематодалар билан ишлаш, улар билан ўсимликларни касаллантириш учун тиш дўхтирларини тиш муолижасида ишлатадиган қайрилган учли асбоблардан фойдаланилади. Бошқача усул ҳам бўлиб, бу усулни ишлатганда пахтадан тўқилган материал жойлаштирилади, бу материал (фильтр) устига эса элакдан ажратилган нематодалар солинади. Бир неча соатдан сўнг нематодалар тўқимадан секин аста сувга ўтадилар ва бу тозаланган нематодларни вирусюқтириш тажрибаларида ишлатиш мумкин.

Яна бошқа усул бу **элютриатор** деган асбобдан фойдаланиб ажратилади. Бу асбобнинг принципи шундайки, унда сувнинг кучсиз оқими юқорига йўналтириб оқизилади, тупроқ заррачалари эса чўкиб қолади, асбобдан ўтган сув фракцияларида эса нематодлар бўлади.

Вирус ташувчи замбуруғларни вируса эга бўлишлари учун Olpidium замбуруғи зооспорасини тамаки некрози вируси (ТНВ) билан таъминлаш керак. Бунинг учун тозаланган вирусни зооспоралар суспензияси билан аралаштирилади, 5—15^{0}С да бир неча дақиқа сақланади. Сўнгра суспензияни вирус юқтириладиган ўсимлик илдизига ўтказилади. Зооспораларни активлигини 2 кун ва ундан ортиқроқ сақлаш учун уларни суюлтирилган фосфат буфери ёки 5% ли Хоглэнд эритмасида сақланади.

Вирус ташувчи ҳашоратларга вирус юқтириш учун уларни мембрана орқали озиқлантириш керак. Мембрана вазифасини Парафильм бажариши мумкин. Ширалар 10—20% сахароза солинган вирус препаратларини севиб истеъмол қилишади.

Баъзи вируслар ҳашоратларда узоқ вақтгача сақланадилар. Баъзи ҳолларда ҳашорат вирусини ўсимликга юқтиришдан илгари маълум вақт ўтиши зарур бўлади. Чунки бу вақт ичида вирус овқат билан ҳашорат ичагидан гемолимфага сўнгра эса ундан сўлак безларига ўтади, ана шу вақт ичида бир хил тур вируслар кўпаядилар ва ўсимликга юқадилар. Бунда вирус—ташувчилар (ширинча, қўнғиз, чирилдоқлар) вирусни тўғридан—тўғри инъекция қилиши мумкин.

Ҳашоратларни 4^{0}С да $C0_2$ билан анестезия қилиниб, диаметри 30 мкм ли шиша капилляр билан вирус препарати ҳашорат қорнидаги сегментлар орасига юборилади.

Инокулум миқдори ҳашорат оғирлигининг 1% дан камроғига тенг бўлиши ва бактериялардан ҳоли бўлиши керак (1 ширага 5 мкл). Инъекциядан сўнг ҳашорат бир неча соат салқин нам камерада сақланади, сўнгра индикатор ўсимликга ўтказилади.

Вирус юқтирувчи замбуруғлар билан ишлаганда замбуруғларнинг зооспораларидан фойдаланилади. Зооспора олиш учун масалан, олпидиум замбуруғи билан касалланган ўсимлик илдизини қуруқроқ шароитда бир кун сақланади, бунда зооспораларнинг чиқиши кечикади, кейинчалик илдизни хўллаб (сувга ботириб) зооспораларни олинади. Бунинг учун илдиз 15—20 дақиқа давомида сувга ёки бирорта замбуруғ ўстириладиган озуқа муҳитига солиб қўйилади. Сувга ўтган зооспораларни центрифуга ёрдамида концентр—

лаш мумкин. Зооспораларни эҳтиётлик билан асраш зарур, совуқ шароитда яхши сақланади, бўлмаса зооспоралар ха—ракатчанликларини йўқотади, шу билан бирга вирус тарқатиш,ўсимликда касалликни қўзғатиш хусусиятларини ҳам йўқотиши мумкин.

5. Вирусларни ҳужайра (тўқима) лар культураларига (эк—маларига) юқтириш

Кўпгина вируслар фақат ўсимликларнигина эмас, улардан ажратиб олинган пробиркаларда ўстириладиган ҳу—жайраларни ҳам касаллантиради. Каллус тўқималари ёки каллус ҳужайралари суюқ ёки қаттиқ озиқа муҳитларида ўстирилади.

Махсус муҳитларда ўсимлик меристемалари культура—ларини олинган бўлиб, уларни ҳозир вируссиз ўстириш ишларида қўлланилади.Баъзи каллус ҳужайралари ғовак тўпламлар ҳосил қилади. Тамакининг каллус ҳужайраларини ТМВ билан касаллантириш учун вирусни улар билан гомо—генизаторда аралаштириб амалга ошириш мумкин. Бу усулда 50 дан 90% гача ҳужайра суспензиясига вирус юқтириш мумкин 100 соатдан сўнг бир ҳужайрага 10^7 ча вирус зарраси тўғри келади. Ўсимлик вирусларини юқтириш учун баргни ферментлар ёрдамида мацерация қилинган ҳужайра пўсти сақланган ҳужайралар ишлатилади.

Кейинги вақтларда ҳужайра пўстисиз протопластлар вирус юқтиришда ишлатилмоқда. Протопластларни олиш учун тамаки барг ҳужайраларини пектиназа ва целлюлаза ферментлари ёрдамида ишлов бериб олиш мумкин. Улар ўз ҳаёт фаолиятларини, бир неча кунгача сақлайдилар. Прото—пластларни поли L—орнитин иштирокида ТМВ ни РНК си билан ёки бутун вирус билан ҳам касаллантириш мумкин, 20 минутдан сўнг бир ҳужайрага 10^6 вирус зарраси тўғри ке—лади. Протопластларга картошкани вируси, бодринг мозаи—каси вирусини ва шунга ўхшаш бир қанча вирусларни юқтирилган.

6. Томат ўсимлиги вирусларини диагностика қилиш

Табиатда томат ўсимлигида энг кўп тарқалган вирус—ларга қуйидаги вирусларни келтириш мумкин:

1. Тамаки мозаикаси вируси — Nicotiana virus 1
2. Томатни зархалланиши вируси (вирус бронзовости тома—тов) — Lycopersicum virus 3

1. Томатни бепуштлилиги вируси (вирус аспермии томатов) Lycopersicum virus 7.

2. Бодринг мозаикаси — 1(огуречный вирус — 1)Cucumus virus 1

3. Беда мозаикаси вируси — вирус мозаики люцерны — Medicago virus 1 (Вирусларни лотинча номлари Смит (19) бўйича берилган)

Бу вируслардан ташқари томат картошкани М, Х, У — вируслари билан касаланади. М — вирус одатда латент (яши — рин) ҳолатда бўлади. Томатда яна қўқонгулни сариқ касал — лиги (желтуха) вируси учрайди.

Томатда вирусларни аниқлашни Власов(19) қуйидаги усулини таклиф этади.

ТМВ ни ташқи симптомлари ўсимликни кўчатлик дав — ридан то вегетациясининг охиригача бўлади, зархалланиш (бронзовость) ва бошқа вируслар симптомлари ўсимликнинг мева ҳосил қилиш даврида яхши кузатилади.

Касал ўсимликларни аниқлаб юлиб ташлаш ва касал — ликнинг ривожланиш динамикасини ўрганиш учун кузатув — ни ўсимлик ривожланишининг эрта даврларида бошлаган маъқул. Иссиқхона шароитида ҳамма ўсимликлар кузатувдан ўтказилади, чунки кузатув майдони ҳам кичик, ҳам касаллик ҳар ер, ҳар ерда учрайди.

Очиқ дала шароитида касалланган ўсимликларни аниқлаш учун икки бир — бири билан кесишадиган диагонал бўйлаб ҳар текширув намунаси 10 тадан ўсимликда олиб борилади. Бир гектар майдонда 20 та намуна текширилади (1 намунада 10 та ўсимлик), жаъми 200 та ўсимлик бўлади.

Демак 1 га да жаъми 200 та ўсимлик кузатилади.

3 гектарда 40 намуна

5 гектарда 60 намуна

10 гектарда 80 намуна ва яна 10 гектарга қўшиладиган ҳар гектар майдонга 1 тадан намуна (10 та ўсимлик) қўшилиб бораверади.

Томатдаги яширин вирусларни (латент) аниқлаш учун (М., ТМВ ни) гуруҳли намуналаридаги вирус аниқланади. Томатнинг 10 — 15 ўсимлигини юқори, ўрта ва қуйи ярусла — ридаги барглардан биттадан намуна олиб уларни аниқлагич ўсимликлар ёрдамида ёки серология усуллари билан анализ қилиб кўрилади. Агар вирус топилса намунадаги ўсимликлар сонини камайтириб касал ўсимликни аниқлаб олиш мумкин.

Кузатиш методикаси ҳар бир объект ва вазифага қараб ўзгариши мумкин.

1. Томат ўсимлигида учрайдиган ТМВ ва бошқа вирусларни идентификация қилиш учун бу вируснинг кўп йиллардан буён ўрганилган хусусиятларидан фойдаланиб қуйидаги усуллар Власов Ю.И томонидан амалиётда кенг кўламда қўлланилмоқда (1—3 жадвалларга қаралсин).

а) ТМВ баргларида мозаика ва уларни баъзан ипси—монлашиши, стрик, мевасини ичини қўнғир рангга кириши кузатилади.

б) ТМВ вирусининг бошқа индикатор ўсимликлардаги симптомлари 1—жадвалда келтирилган.

в) Вирусларнинг физик хусусиятлари: О—ТМВ ни ха—рорат таъсирида вирус фаоллигини йўқолиши(ХТФЙ) —93—96^{0}С, аукуба штаминики—80,6^{0}С, қозоқ штаминики эса—82^{0}С; охирги суюлиш миқдори (ОСМ)—1:1000000. Ўсимлик—дан ажратилган ширада сақланиш муддати—бирнеча ой.

г) Серология усулида диагностика "томчи усул"да ба—жарилади.

д) Микроскоп билан анализ қилиш — вирус зарралари таёқчасимон шаклга эга; ўлчамлари — 300х15—18 нм.

1—жадвал

Томат вирусларининг индикатор—ўсимликлардаги реакцияси

Вирус	Индикатор ўсимлик тури	Реакция ха—рактери	Эслатма
ТМВ	Nicotiana gluti—nosa	L;LLN	Кўпчилик ТМВ ни штаммлари маҳал—лий некрозлар ҳо—сил қилади
	Datura stramo—nium	L;LLN	ТМВ ни одатдаги штаммларининг ВТМ vulgare—(О—ТМВ) реакцияси
	Petunia hybrida	L;LLN	ТМВ ни томат штаммлари реак—цияси
	Petunia hybrida	S;M	Тамакини дурагай навлари шундай

			реакция беради
	Nicotiana tabacum	L;LLN	Грузия тамаки ва махорка инситути – ни селекция қилинган навлари – нинг реакцияси
	Petunia hibrida	L;LLN	
	Nicotiana gluti – nosa	L;LLN, S;M, N	
ТЗВ	Datura stramo – nium	L NR, S NOL	
	Nicotiana tabacum	L NR, S N, NR	
	Nicotiana rustica	L NR, S N, NR	
	Lycopersicum es – culentum	S BsN, VO, NR	
ТБВ	Petunia hibrida	S M, En, Vb	
	Tetragonia ex – pansa	L LL	
	Nicotiana gluti – nosa	S M, D S N, En	
БВ №1	Nicotiana gluti – nosa	S M, Dis	
	Nicotiana tabacum	S M, Sis	
	Cucumis sativus	S YMO	
	Datura stramo – nium	L Sp S Mo, M, Ch, Rp	Ҳамма штаммла – рида ҳам шундай реакция бўлавер – майди
	Chenopodium murale	L LL	
КХВ	Datura stramo – nium	L N Sp, S Mo	
	Nicotiana gluti – nosa	S Mo,N	
	Gomphrena glo – bosa	L LLN	
КУВ	Nicotiana tabacum Самсун нави	S VC Vb	
	Datura metel	S Ve LB	
	Solanium demis – sum hybr. H_6	L Ve LB	
	Solanium demis –	L. N Sp Br	

	sum Coc Ker hemo		
БВ	Datura stramo – nium	L, Sp, S Vc, Y Sp M, N	
	Capsicum annum	S ym	

2 – жадвал

Томат вирусларини идентификация қилишда фойда–ланиладиган баъзи хусусиятлари

Вирус	Симптом	ХТФЙ	ОСМ	ДШС	Сер	Киритма	Морфологияси
ТМВ	Мозаика, баргини ипсимон шакли бў–лиши, мева ичи қўнғир рангга ки–ради	0 – ТМВ – 93^0, Аукуба штамм, К – ТМВ 80^0	1;1000000	ой–лар	Том–чи усул	Тукларида игнаси–мон, дугсимон кристаллар	300x1 290x1
ТЗВ	Баргни за–рҳалланиши, мевада юмалоқ ҳалқалар	$40 – 48^0$	1;100 – 1;5000	4 – 10 соат			40
ТБВ	Мозаика, ўта шоҳ–лаш,барг–ларини май– да–лашиши, барг шак–лини ўзга–риши, бу–ралиши,	$50 – 55^0$					200

	меваси май далашиши, уруғи етил майди.						
БВ – 1	Барги ипси мон, папо – рат – ник – симон шаклга ки – риши	$60-70^0$	1;10000	6 – 8 кун	Том – чи усул	–	35
КХВ	Вирулент штаммларда: баргда некроз, кейинчалик некрозли ҳалқа ҳосил бўлади. Вирулент – лиги кучсиз штаммда: хол – холлик ва уни тезда йўқолиши кузатилади.	70^0	10^5		Том – чи усул	–	480 – 12; 520x10
КУВ	Барг томир ларини оқариши (рангсизла – ниши), ва сўнгра то – мирлар тўқ яшил ҳо – шияга эга бўлади Баъзан симптомлар ноаниқ бў – либ, тезда йўқолади	$55-60^0C$	1;1000 – 1:8000		Том – чи усул		756 x 12
	Баргни ҳар хил жадал –	62^0-64^0C	1:2000 – 1:10000	3 – 8 кун	Икки ёқлам		

БМВ	ликдаги мозаикаси, ўтказувчи тўқималар — нинг нек — рози				а имму но — дифф узия		

е) "Киритмалар" усулини қўллаш. Томат баргларидан ТМВ ни кристалл киритмаларини кузатиш анча кенг тарқалган. Барг тукчаларидаги ҳужайралардан киритмалар топиш тавсия этилади.

Томатни кўк меваларида эса вирус барги ва мевасининг қопловчи тўқималардаги киритмалар борлигига қараб, вирус аниқланади. Пишган меваларда киритмаларни қидириш яхши натижалар бермайди. Шунинг учун улардан вирус киритмалари аҳтарилганда уруғни ўраб олган шиллиқ тўқима анализ қилинади. Касалланган меванинг тўқима ҳужайраларида ҳар хил катталикдаги игнасимон ва дугсимон киритмалар тўпламлари кузатилади. Соғ ҳужайраларда эса бундай киритмалар кузатилмайди (топилмаган).

Препаратлар микроскопда 200 — 400 марта катталаштириб кузатилади.

2. Томатни зарҳалланиши вирусини (ТЗВ) (вирус бронзовость томатов) томатда идентификация қилиш учун ТЗВ ни қуйидаги хусусиятларидан фойдаланилади.

а) Томат ўсимлиги баргларида зарҳалланиш, "крапчатость" ва меваларида юмалоқ халқалар кузатилади. Кўпинча бутунлай ўсимлик нобуд бўлади.

б) Аниқлагич ўсимликлардаги симптомлар 1 — жадвалда келтирилган.

в) Физикавий хусусиятлари.ХТФЙ — $40^0 - 48^0$С; ОСМ 1:100 — 1:5000; ажратилган ширада сақланиши (АШС) — 4 — 10 соат.

г) Микроскопда тадқиқ қилиш: зарралар диаметри 40 нм.

3. Томатнинг бепуштлилиги вируси (вирус аспермии томатов) (ТБВ)

а) Томатдаги симптомлари: ўсимлик ўта шоҳланган бўлади, барглари майдалашади, мозаика ҳосил бўлади. Баргни

шакли ўзгаради, деформацияланади ва барглар буралади. Меваларги майда ва деформацияланади, уруғлари етилмайди.

б) Индикатор—ўсимликлардаги симптомлари: 1—жадвалда келтирилган.

в) Вирусни физикавий хусусиятлари: ХТФЙ 50—55^{0}С.

г) Микроскопда тадқиқ қилиш: диаметри 200 нм га тенг сферик вирус зарралари.

4. Бодиринг вируси—№ 1 (Cucumis virus—1).

а) Томатдаги симптомлари: ипсимон ва папоротникси—мон барглилик.

б) Индикатор—ўсимликлардаги симптомлари 1—жадвалда келтирилган.

в) Вирусни физикавий хусусияти ХТФЙ—60—70^{0}С: ОСМ—1:10000, АШС—6—8 кун.

г) Серология анализлари томчи усул билан бажарилади.

д) Микроскоп ёрдамидаги тадқиқотлар: диаметри 35 нм га тенг сферик вирус зарралари.

5. **Картошкани Х—вируси** (КХВ)

а) Томатдаги симптомлари: ўта вирулент штамм вирус юқтирилган баргда некрозлар ҳосил қилади ва у кейинчалик ривожланиб думалоқ некрозланган ҳалқа ҳосил қилади. Кучсиз вирулентликка эга бўлган штаммлари баргда ёруғ ва тўқ яшил ҳол—ҳоллик (светло—темнозелёная крапчатость) ҳосил бўлиши ҳам мумкин.

б) Индикатор—ўсимликлардаги симптомлари 1—жадвалда берилган.

в) Вирусни физикавий хусусиятлари:ХТФЙ — 70^{0}С, ОСМ = 10^{-5} штаммларига қараб бу кўрсаткичлар ўзгариши мумкин.

г) Серология анализлари томчи усулда бажарилади.

д) Микроскоп ёрдамидаги тадқиқотлар: вирус зарралари ипсимон шаклли, узунлиги 520 нм, эни 10 нм.

6. Каротошкани У—вируси (КУВ)

а) Томатдаги симптомлари — томирларининг оқариши (рангсизланиши), "крапчатость", сўнгра томирларни тўқ—яшил хошияга эга бўлиши.

Баъзан симптомлари аниқ бўлмасдан кейинчалик йўқолиб кетади.

б) Индикатор ўсимликларидаги симптомлари 1—жадвалда берилган.

в) Вирусни физикавий хусусиятлари: ХТФЙ — 55—60^{0}С; ОСМ — 1:1000 — 1:8000

г) Серология анализи томчи усулида бажарилади.

д) Микроскоп ёрдамидаги тадқиқотлар: вирус заррачалари ипсимон шаклли, узунлиги — 756 нм

7. Беда мозаикаси вируси

а) Томатдаги симптомлари: баргни ҳар хил жадаллик — даги мозаикаси, ўтказувчи тўқималарининг некрози.

б) Индикатор ўсимликлардаги симптомлари: ХТФЙ — 62—64^{0}С;

в) Вирусни физикавий хусусиятлари: ОСМ = 1:2000 — 1:10000; АШС = 3—8 кун.

г) Серология анализи; иккиёқлама иммунодиффузия ёрдамида бажарилади.

8. Аралаш инфекциялар

Иссиқхоналарда томатлар бир вақтни ўзида ТМВ ва КХВ ёки очиқ далада ТМВ ва КХВ, ТМВ ва КУВ, ТМВ ва бошқа юқоридаги кўрсатилган вируслар билан бирга учрайди. Бундай холларда анализни тезлик билан амалга ошириш учун серология усулларидан фойдаланилади. Индикатор — ўсимликлар ёрдамида анализ қилинадиган бўлса, айтилган вирусларни аниқ идентификация қилиш учун индикатор ўсимликлар тўплами бўлиши зарур. Томатда ТМВ дан бодринг мозаикаси вирусини (БМВ) ажратиш учун киритмалар усули яхши натижа беради, чунки БМВ ҳужайрада киритмалар ҳосил қилмайди.

3 — жадвал

Симптомларни белгилашда ишлатиладиган шартли белгилар

Қисқартма	Инглиз тилида	Рус тилида	Ўзбек тилида
Br	brown	Коричневый	Жигарранг
Ch	chlorosis, chlorotic —	Хлороз, хлоратичный	Хлороз
Dis	distortion —	Деформация	Деформация
En	enation —	Выросты	Усимталар
L	locally —	Локальный, местный	Махаллий
LL	local lession —	Местные поврежде-	Маҳаллий жар

		ния	ҳатланиш
M	mosaic —	Мозаика	Чипорланиш
Mo	mootl]ing —	Крапчатость	"Хол — холлик"
N	necrosis —	Некроз	Некроз, тўқималарни доира шаклига ўтиши
Nli	necrotirmg —	Некротические кольца	Некроз халқаси
NV	necrlotic vëin	Некроз жилок	Томир некрози
Nq1	necrotic qeerçees le — slon	Некротический Дубовидный рисунок	Дубсимон кўри — нишдаги некроз
S	systemically	Системный	Бутун тана бўйлаб вируснинг тарқалиши
Sp	spots	Пятна	Доғ
VB	Vein banding	Окаймление жилок	Томирларни ҳо — шияланиши
VC	Vein cleearing	Посветление жилок	Томир рангсизла — ниши
Ym	Yellow mosaic	Жёлтая мозаика	Сариқ мозаика
Ymo	Yellow motling	Жёлтая крапчатость	Сариқ хол — холлик

1—машғулот

Фитопатоген вируслар билан касалланган ўсимлик—ларнинг симптомлари

Ишдан мақсад: Фитопатоген вируслар билан касал—ланган ўсимликларда ҳосил бўладиган симптомлар ҳақида маълумот олиш.

Керакли материаллар: Помидор, тамаки, бодринг, ғўза, рапс ва бошқа ўсимликларнинг мозаика симптомли барглари (расм ёки гербарий материаллари), жўхори, ғумай, арпанинг чизиқли мозаика барглари, карам, шолғом, редис ва турп—нинг мозаикали барглари. Даладан ёки иссиқхонадан янги териб келинган ўсимликлардан гербарийлар тайёрланади ва уларни систематик ўринлари аниқланади, ҳар бир гербарий материали остида ёзиб қўйилади.

Машғулот лаборатория ва дала шароитида (баҳор, ёз ва куз фаслларида), иссиқхоналарда ўтказилади. Касаллик симптомлари соғ ўсимлик билан таққосланади ва кундалик

дафтарларга ёзилади, расм дафтарларга чизилади ҳамда улардан гербарийлар тайёрланади.

Кузатув олиб борилганда асосий эътибор ўсимликнинг ташқи кўринишига, баргларига, бўғим оралиқларига, барг томирларига, рангига, умумий ривожига эътибор берилади. Вирус касалликлари ўсимликнинг ўсиш нуқтасида яққол кўрингани учун аввало ўсимликнинг ўсиш нуқтаси кузатилади. Симптомларнинг асосийлари қуйидагича бўлади: мозаика гуруҳига мансуб симптомлар, ипсимонланиш, буришиш (ажинлашиш), жингалакланиш, қирққулоққа ўхшашлик баргидаги чизиқли мозаика, барг, томир, поя ва мева некрозлари, ўсимликни ёки баргини шоҳланиши, рангини йўқотиши, сарғайиши, шаклини ўзгартириши, ўсишдан қолиши, гулларнинг бадбуришлашиши, гул қисмлари ривожланмаслиги, гултожбаргларининг яшил тусга кириши, гул ўрнига шоҳлаб кетиши, редукцияланган барг пайдо бўлиши, тўп гул марказида ҳақиқий барг ҳосил бўлиши ва ҳ. (Иловадаги расмларга қаралсин).

Қуйида Ўзбекистонда тарқалган вирус касалликлари ва уларнинг симптомлари ва баъзи бошқа хусусиятлари ҳақида қисқача тўхтаб ўтамиз.

1. Ғўза вирус касалликлари ғўзанинг ингичка ва ўрта толали навларида тарқалгандир. Улар дунё бўйича 18 дан ортиқ бўлиб, улардан энг асосийлари: "ғўзанинг жингалак барглилик" (курчавоть листьев) касаллигида ғўза баргининг асосий томирининг ривожланмай қолиши сабабли барглар жингалаклашади ва баъзан мозаика аломатлари (чипорланиш) кузатилади. Барглар сони ҳам касал ўсимликларда анча камроқ, баргларда ҳол—ҳол доғлар пайдо бўлади, барг қавариқ шаклга киради. Баъзан баргда оқиш, тўқ—яшил мозаика кузатилади, барг пластинкаси дағаллашади, бўғинлар ораси қисқаради, барг юқорига қараб буралади.

"Ўсимлик ўсиш нуқталарини дасталашиши" (пучковидная верхушка) вирус касаллигида ўсимликнинг ўсиш нуқтасидаги барглар, гуллар ораси қисқаради, томирлари йўғонлашади, ўсимликнинг учида шоҳлар дасталашади.

Ғўзада яна "томирлараро сариқ мозаика", "ҳол—ҳол (чипор) барглилик" (крапчатость), "псиллоз" (барг ва поянинг жигарранг тусга кириши), "баргларнинг майдалашиши" (измелченность листьев), "антоцианоз", "томирлараро мозаика"

"Бутгилар орасининг қисқариши" (укорочение междоузлий) каби касалликлар мавжуд.

2. **Картошканинг вирус касалликлари** ҳам жуда кенг тарқалган бўлиб, дунё бўйича 20 дан ортиқ вирус касаллик — лари топилган. Уларнинг 10 таси МДХ давлатларида ва 4 та — си (Х,У,А,К) Ўзбекистонда учрайди. Вирус билан касалланган ўсимлик баргининг томирлари оч тусга киради, баргида "доғ — ҳоллик" (крапчатость) ёки ажинлар пайдо бўлади. "А" вирус билан касалланган картошка баргида катта — катта доғли мозаика ҳосил бўлади, кейинчалик барг тўлқинсимон эгилиб, жингалак бўлади. Вируснинг вирулент штаммлари кескин мозаика ҳосил қилади. Агарда картошканинг "А" вируси "Х" вируси билан бирга учраса картошка баргида бурмалар, гижимлар пайдо бўлиб, барг буралади, томирла — ри ёрилиб шишлар пайдо бўлади, барглар мўртлашиб, осон сина — ди. Картошка "К" вируси билан касалланган бўлса ўсим — ликнинг юқори ярусидаги ёш баргларда кучсиз доғлар пайдо бўлади.

Картошка "У" вируси билан касалланса яққол кўзга ташланадиган аниқ симптомлар кўзга ташланмаслиги мум — кин. Агарда "У" вируси бошқа вируслар билан биргаликда учраса мозаика, йўл — йўл штрихлардан иборат ("стрик") мозаика ҳосил бўлади. Баъзан бошқа картошка вируслари билан биргаликда учраганда ўсимликда паканалик (карли — кость) аломатлари кузатилади.

3. **Бутгулли ўсимликларда** (шолғом, редис, турп, карам, рапс) "шолғом мозаикаси вируси", "редис мозаикаси виру — си", "гулкарам мозаикаси вирус" лари учрайди. Касал ўсимликларда аниқ мозаика ва баргни бўжмайиши ва ри — вожланишдан тўхташи кузатилади.

4. **Дуккакли ўсимликларда** 6 хил вирус касаллиги уч — райди. Улардан "нўхат мозаикаси вируси" билан касалланган нўхатда барг томирларининг оқариши ва мозаика ҳосил бў — лади. Нўхатда яна бошқа симптомга эга касаллик — "нўхатнинг юқори ярусларини сарғайиши" касаллиги уч — райди, юқори ярус баргларида кучли хлороз (барг рангини йўқолиши) кузатилади, барг мўрт бўлиб қолади. Мош ўсим — лигида эса "мош мозаикаси вируси" учрайди, барг томирла — ри оқаради ва барг пастки томонга қараб буралади, шишлар ҳосил бўлади, барг пластинкаси шакли ўзгаради, ўсимлик

ўсишдан қолади, уруғи майдалашиб кетади. Бу вирус ловия ўсимлигини ҳам касаллантиради.

Мошда яна "мошнинг сариқ мозаикаси вируси" учрайди. Касалланган ўсимлик баргида доғлар жадаллик билан кўпаяди, ўсимлик ўсишдан қолади. Бу касаллик ловия, соя ва бошқа дуккакли ўсимликларда ҳам учрайди.

5. Қовун ва бодринг ўсимликларида "бодринг мозаикаси вируси" учрайди. Иккала ўсимликда ҳам мозаика симптомлари кузатилади. Бу вирус қовоқсимонлар, мураккаб гулли ўсимликлар ва дуккаклиларда учрайди.

6. Беда ўсимлигида "беда мозаикаси вируси" учрайди, касалланган ўсимлик баргида доира шаклдаги доғлар ҳамда мозаикали баргларнинг жингалакланиши кузатилади.

7. Жўхорининг "жўхори пакана мозаикаси вируси" касаллантиради. Баргларида чизиқ—чизиқ шаклли сариқ мозаика кузатилади, ўсимлик ўсишдан қолади, жўхори сўталарида дон миқдори ўта камайиб, 20—30% гина қолади. Айниқса ўсимликни вирус билан жуда эрта касаллантирса вируснинг зарари жуда катта бўлади, жўхори дони майдалашади, олинган уруғнинг униши ўта пасаяди.

Юқорида кўрсатилган касаллик аломатларини эътиборга олган ҳолда машғулотда бериладиган табиий ва гербарий материалларни гуруҳларга ажратиш, улар ҳақида чуқур билимга эга бўлиш зарур.

Адабиётлар

1. Ю.И.Власов, Э.И.Ларина. Сельскохозяйственная вирусология. 1982, 238 с.
2. С.Е.Грушевой. Сельскохозяйственная фитопатология. 1965, 447 с.
3. П.К.Головин, М.В.Арсеньева, А.Т.Тропова, И.Шестиперова. Практикум по общей фитопатологии. 1967. 183 с.

2—машғулот
Механик инокуляция ёрдамида вирусларни ўсимликка юқтириш

Ишдан мақсад Вирус намунасини соғ ўсимликка юқтириш малакасини ҳосил қилиш.

Керакли материаллар: вируслар, ўсимликлар.

1. Индикатор ўсимликлар: Nicotiana glutinosa, ёки N. sylvestris, Chenopodium amaranticolor ёки Ch. quenea.

2. Вирус намунаси: ТМВ ни томат штамми билан касалланган томат ёки тамаки барглари (5—10 грамм).

3. Корунд (300—600меш) ёки "целит" (диатом тупроғи),

4. Шиша таёқча, шпатель,

5. Чинни ҳавонча (25—50 мл),

6. Эксикатор (ҳажми 20 литр),

7. Ип,

8. Пластилин.

Ишнинг бориши. Вируслар билан ишлаганда ҳар бир қилинадиган амаллардан аввал қўлларни, иш жойини, иш асбобларини яхшилаб ювиш, тозалаш, баъзиларини стерилланг зарур. Иш фильтр қоғози устида бажарилади.

Вирусли намунадан вирусли шира ажратиш: ТМВ билан касаллантирилган томат ёки тамаки баргини (5—10 гр) чинни хавончада 0,1 М фосфат буфери (1 гр намунага 1 мл буфер миқдорида) (pH 7,8) иштирокида эзиб майдаланилади. Янада яхшироқ майдалаш учун гомогенизатордан (1—2 минут) фойдаланса ҳам бўлади. Гомогенатни 2—3 қаватли докадан ўтказилади, сўнгра 1 минутда 6—8минг айланиш тезлигида 10 минут давомида центрифуга қилинади. Чўкмага яхши эзилмаган ўсимлик қолдиқлари, ҳужайрани йирик бирикмалари тушади, вирус эса чўкманинг устида бўлади.

Вирус юқтириш. Касал ўсимликдан ажратиб олинган ширани 2—3 томчисини соғ ўсимлик баргига томизилади ва игна билан барг сатҳи тирналади. Аммо бу усуллар кам натижа беради. Ҳозирги вақтда эса бу усул сал ўзгартирилган, барг сатҳига озгина образив сепилади, 2—3 томчи ширани томизилади ва тоза бармоқ ёки шиша тайёқча ёки шпатель ёрдамида оҳисталик билан суртилади. Суртишнинг кучи баргнинг ҳолатига, ёшига, ўсимликни, абразивни сифатига боғлиқ бўлади, 10—15 минутдан сўнг вирус препарати ва абразивларни ортиқчалари дистилланган сув билан ювиб ташланади. Вирус барг туклари ва эпидермисидаги микро-жароҳатлари орқали киради.

Вирус юқтирилган баргларга вирус номи, сана ва ҳо-латлар ёзилган этикеткалар боғланади. Сўнгра уларни нам қилиб солинган катта эксикатор ёки шишадан ясалган 15—20 л ҳажмли усти зич ёпиладиган идишларда сақланади. Бунинг

учун эксикаторни устки қисмига 3—4 қатор ип тортилади ва ипнинг икки учи эксикатор деворларига пластилин ёки ёпишқоқ ленталар ёрдамида ёпиштирилади. Вирус юқтирилган барглар ана шу ипларга боғланиб осиб қўйилади. Вируснинг юқиш кучини ошириш учун вирус юқтирилган барглар қоронғироқ ва нам жойга қўйилади.

Вирус юқтирилган барглларда касаллик аломатлари пайдо бўлиши ишлатиладиган индикатор ўсимликнинг турига (Nicotiana glutinosa да 48 соат, N. sylvestris да 76—80 соатда некроз ҳосил бўлади), вируснинг турига, ҳароратга ва шу каби факторларга боғлиқ бўлади.

Вирус юқтирилгандан сўнг 48 соат (N. glutinosa), 76—80 соат (N. sylvestris), икки ҳафта (Ch amaranticolor, Ch. quenea), 1—2 ой ва йиллар мобайнида (дарахтларда) кузатилиб борилади. Индикатор ўсимликларда пайдо бўлган симптомлар 48—72 соатдан сўнг ҳисобга олинади ва назорат баргдаги (ёки баргни ярмидаги) ҳамда тажриба барглардаги симптомлар саналади (некроз ёки доғ, ҳалқа бўлса), диаметри ўлчанади, яъни тасвирланади.

3—машғулот

Индикатор ўсимликлар ёрдамида фитопатоген вирусларни (штаммларни) биологик тозалаш

Ишдан мақсад: Фитопатоген вируслар аралашмасидан маълум бир вирусни (штаммни) тоза ҳолда ажратиш услуби билан таништириш.

Керакли материаллар: Тамаки мозаикаси вируси билан касалланган тамакининг мозаикали барги. Nicotiana glutinosa, N. sylvestris ва N. tabacum нинг Самсун нави, корунд, фосфат буфери, эксикатор, ип, пластилин, вазелин ва ҳ.к.

Табиатдан ажратиб олинган вирус намунасидан аниқлагич (индикатор) ўсимликлар тўпламини тўғри танлаб, агротехника шарт—шароитларига ва тозаликка роия қилиб, уларни инокуляция қилинса маълум муддатдан сўнг вирус юқтирилган ўсимликда шу вирусга оид симптомлар ҳосил бўлади.

Ҳар бир ўрганилаётган вируслар учун шундай индикатор ўсимликлар гуруҳини танлаш мумкинки, ўсимлик бу вирусга хос специфик симптом ҳосил қилсин. Вирусни ҳар

хил штаммлари сезгирлиги жиҳатидан аниқлагич ўсимликлар тўпламы билан ҳамда сезгир аниқлагич ўсимликларда ҳосил қиладиган симптомлари билан фарқланиши мумкин. Масалан, тамаки мозаикаси вирусининг (ТМВ) оддий штамми (ОТМ – vulgare) Nicotiana sylvestris ўсимлигида "системали реакция" беради, яъни касаллик ўсимликнинг бутун танаси бўйлаб тарқалади ва баргларида, ўсиш нуқталарида мозаика симптомлари пайдо бўлади. ТМВ нинг бошқа штаммлари эса бу ўсимликда "некроз" ҳосил қилади.Агар бир ўсимликда мазкур вирусларнинг аралашмалари бўлса ундан шу айтилган вируслардан бирини шу икки дифференцияция қилувчи ўсимликлар ёрдамида ажратиш мумкин. Ажратиб олинган вирусни (штаммни) фақат шу вирусдан (штаммдан) иборат эканлигини ишонч ҳосил қилиш учун микробиологиядаги бактерияларни тоза культураларини ажратиш усулидан фойдаланилади.

Ишнинг бориши. Бир хил вирус (штамм) дангина ташкил топган ТМВ нинг тамаки штаммини (0–ТМВ) биологик тоза штаммини олиш учун N. tabacum ўсимлигидан ажратилган шира билан N. glutinosa нинг барги қуйидаги схема бўйича инокуляция қилинади ва уларни нам камерага (эксикаторга) жойлаштирилади.

I – ПАССАЖ

ИЗОЛЯТ →гомогенизация → N.glutinosa → 1 некроз → N.tabacum.
0,1М Ф.Б.рН 7–8 (некроз) Самсун нави (мозаика) (1–П)

2 – ПАССАЖ

1–П → гомогенизация → N.glutinosa → 1 некроз → N.tabacum.
0,1М Ф.Б.рН 7–8 (некроз) Самсун нави (мозаика) (2–П)

3–ПАССАЖ

2–П → гомогенизация → N.glutinosa → 1 некроз → N.tabacum.
0,1М Ф.Б.рН 7–8 (некроз) Самсун нави (мозаика) (3–П)

4 – ПАССАЖ

3–П → N.tabacum Самсун нави (вирус тўпловчи ўсимликлар)

Маълум вақт ўтгандан сўнг (48 соат) барг сатҳида некрозлар ҳосил бўлади. Мазкур барг сатҳидаги айрим жойлашган 1 та некрозни тоза қайчи ёрдамида кесиб олинади ва уни 0,5 мл буфер иштирокида кичик чинни ҳавончада гомогенизация қилинади. Гомогенат сўнгра N. tabacum Самсун навининг битта баргига инокуляция қилинади. 15–20 кундан сўнг мазкур ўсимликда мозаика симптоми ҳосил бўлади. Бу биринчи мононекроздан ўтказиш биринчи пассаж деб аталади. Иккинчи пассажнинг бошланиши биринчи пассаж охирида мозаика ҳосил қилган ўсимликдан яна "инокулюм" олиб уни гомогенизация қилиб, сўнгра некроз ҳосил қилувчи N. glutinoza ўсимлигига инокуляция қилишдан бошланади. Бу ўсимлик баргида некрозлар ҳосил бўлганидан сўнг унда "мононекроз" ни қирқиб олиб "системали" симптом ҳосил қиладиган N. tabacumни Самсун навига инокуляция қилиш билан тугайди. Худди шу йўсинда учинчи пассажни ҳам бажарилади ва энди бу пассаж охирида N. tabacumни Самсун навида тўпланган вирус зарралари уч мононекроздан ўтказилган биологик ТМВ нинг 0–штамми ҳисобланади. Эндиги вазифа мононекроз усулида биологик тозаланган штаммни "вирус тўплагич" ўсимликларда миқдорий кўпайтириш ва уни физик–кимёвий усуллар ёрдамида тозалаш ва тоза препарат олишдир.

4–машғулот
Вирус аралашмаларидаги вирусларни идентификация қилиш.

Ишдан мақсад, Индикатор ўсимликлар тўплами ёрдамида ТМВ, картошкани Х вирусини (КХВ) ва ялтирбош мозаикаси вируси (ЯМВ) ларини идентификация қилиш билан таништириш.

Керакли материаллар 1. Вируслар: ТМВ, КХВ, ЯМВ.

2. Ўсимликлар: глютиноза (N. glutinosa L.), дўрмон (Datura stramonium L.), гомфрена (Gomphrena globosa L.), шўра (Chenopodium amaranticolor Coste, Reyn), ловияни Пинто нави (Phaseolus vulgaris var. Pinta) ва арпа (Hordeum vulgare L.)

3. Корунд (400–600 меш) ёки "целит" (диатом тупроғи)

4. Шиша таёқча (0,2—0,4x15 см) ёки бактериал сиртмоқ:
5. Чинни ҳавонча (20—50 мл).
6. Вирус юқтирилган ўсимликни сақланадиган жой (ис—сиқхона, нам камера— эксикатор).
7. Юқорида зикр этилган вирусларни сунъий аралаш—маси (10—50 мкг/мл)
8. ТМВ, КХВ ва ЯМВ ларига қарши тайёрланган анти—зардоблар.

Ишнинг бориши. Механик инокуляция усулида глюти—ноза, дўрмон, гомфрена, шўра, арпа ва ловия (Пинто нави) барги 2—3 та баргига вирус юқтирилади. Сўнгра 12—15 кунгача вирус юқтирилган ўсимликлар кузатиб борилади. Симптомларнинг пайдо бўлиш муддати ва характери белги—ланиб борилади ва улар асосида жадвал тузилади (4—жадвал). Жадвалдаги натижаларни таҳлили асосида ҳар бир вирус идентификация қилинади.

Масалан, вирус аралашмаси глютиноза ва дўрмонда некрозлар ва бир вақтнинг ўзида мозаика ҳосил қилса, гом—френа ўсимлигида некроз, хеноподиумда эса икки хил нек—розлар ҳосил қилса, мушоҳада қилиб айтиш мумкин: ара—лашмада ТМВ ва КХВ бор экан.

Жадвалдан фойдаланиб бошқа хил вирус аралашмала—рининг таркибини ҳам аниқлаш мумкин.

Олинган натижаларнинг тўғрилигини "тизимли" касал—ланган ўсимликлар шираларини антизардоблар ёрдамида "томчи реакцияси" ўтказилиб тасдиқлаш мумкин.

4—жадвал

Аниқлагич ўсимликларида вируслар ҳосил қилган сим—птомлар

Ўсимлик	Ҳосил бўлган симптомлар		
	ТМВ	КХВ	АЧМВ
Nicotiana glutinosa	Вирус юқтирилгандан сўнг йирик (2 мм га) нек—розлар	Вирус юқтирилгандан 10—12 кун кейин кучсиз ҳол—хол мо—заика (крап—чатая мозаика)	Иммун

		ҳосил бўлади	
Datura stramonium	Вирус юқтирилгандан 3 – 5 кундан сўнг майда (0,5 – 1 мм) некрозлар	Вирус юқтирилгандан 6 – 7 кун кейин "системали" вирус юқади, мозаика ҳосил бўлади	Иммун
Gomphrena glo – bosa L	Вирус юқтирилгандан 4 – 5 кундан сўнг йирик (2 мм ча) нек – розлар ҳосил бўлади	Вирус юқтирилгандан 6 – 7 кун кейин қизил ҳошияли некрозлар ҳо – сил бўлади	Иммун
Chenopodium amaranticolor Coste, Reyn	Вирус юқтирилгандан 4 – 5 кундан сўнг майда (0,2 – 0,5 мм ча) некрозлар	Вирус юқтирилган 12 – 20 кун кейин йирик (1 – 1,5 мм) қизил ҳошияли некрозлар ҳо – сил бўлади.	Вирус юқтирилганда 2 – 4 кун жу кичик (0,1 – 0 мм) некрозла
Hordeum vulgare L.)	Иммун (вирус юқмайди)	Иммун	"Тизимли" вирус юқад калта қўнғи штрихли мо заика
Phaseolus vulgaris var. Pinta	Вирус юқтирилгандан 2 – 3 кундан сўнг (1 мм) некрозлар	Иммун	Иммун

Адабиётлар

1. Власов Ю.И., Редько Г.А., Литаева Г.К., Вирусные болезни овощных и бахчевых культур. Ленинград, 1973.
2. Вахабов А Х.., Дехканова З.Н. , Исамухамедов М.З. Некоторые свойства и идентификация вируса мозаики редиса. Узб. б.ж., №:6, 1982, -С 15-18.
3. Гольдин М.И. Вирусные включения в растительной клетке и природа вирусов. 1963, 204 с.

4. Дехканова З.Н. Очистка, характеристика и иммунодиагностика вирусов крестоцветных растений. Канд..дис. 1992.
5. С.В. Куст. Идентификация вирусов в инфекционной смеси с помощью набора растений-индикаторов. Практикум по общей вирусологии. Изд-во МГУ ,1981, С. 43-46.
6. Р.Метьюз. Вирусы растений. М., "Мир", 1973
7. А.Гиббс, Б.Харрисон. Основы вирусологии растений. М. Изд-во "Мир" 1978. 429 с.

5–машғулот
Вирусларнинг охирги суюлиш миқдорини (даражасини) аниқлаш

Вируслар ҳужайрада ҳар хил миқдорда тўпланади. Баъзи вирус билан касалланган ўсимликларнинг 1 кг дан 1–3 гр тоза вирус ажратиб олинса, баъзиларидан 3–5 мг гина ажратиб олиш мумкин, бу биринчи навбатда вируснинг ҳужайрада тўпланишига боғлиқдир. Иккинчидан вирусларнинг охирги суюлиш миқдорини (ОСМ) аниқлаш вирусларни идентификация қилишда катта аҳамиятга эгадир.

Вирус ҳужайрада кўп тўпланган ҳолларда суюлиш даражаси 10^{-6}– 10^{-7} ни ташкил қилса (ТМВ) баъзи ҳолларда 10^{-2}– 10^{-3} нигина ташкил этади. (М. жўхорининг пакана чизиқли мозаикаси вируси) (5–жадвал).

Ишдан мақсад: Вирусларнинг охирги суюлиш даражасини аниқлагич ўсимликлар ёрдамида аниқлаш.

Материаллар: вирусли намуна (тамаки мозаикаси вирусининг помидордаги штамми), корунд ёки карборунд ёки шелит, 0,1 М фосфат буфери, 7,5 20 мл лик пробиркалар 10–15 дона, пипеткалар 1,2,5,10 мл (3–6 донадан), ҳавонча, 50 мл лик 2 та колба, воронка, дока, 2та эксикатор, вазелин, ип (№10), этикеткалар (2х2 см^2), сув (0,5 л), хлороформ (5 мл).

Ишнинг бориши. Тамаки мозаикаси вирусининг томат штаммини (ТМВ–ТШ) охирги суюлиш миқдорини (ОСМ) аниқлаш учун шу вирус билан касаллантирилган ўсимлик баргларидан 50–60г 0,05 М фосфат буфери иштирокида (олинган вирусли материал вазнига тенг миқдорда 1:1 нисбатда буфер олинади ва суюлтирилган вақтда ҳисобга олиниши керак) ҳавончада эзиб майдаланади. Сўнгра 3–4 қаватли докадан сузилади ва бу вирусли суюқлик центри–

фугада 10 минут давомида минутига 5—6 минг айланиш тезлигида айлантирилади. Чўкма усти суюқлигидан қатор пробиркаларга 10,
10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} марта суюлтирилган вирус эритмалари тайёрланади ҳамда N. glutinosa ёки N. sylvestris баргларининг корунд сепилиб тайёрланган ўнг томонига 4—5 томчи томизилиб оҳиста бармоқ билан суртилади. Баргнинг чап томонига эса суюлтирилмаган ўсимликнинг ширасн то—мизилади ва суртилади. Ҳар бири суюлтирилган пробирка—даги вирусли эритма 5—6 баргга юқтирилади. Этикеткалар боғлангандан сўнг нам камера ҳосил қилинган эксикаторга осиб қўйилади. Эксикаторга бактерияларга қарши 3—4 томчи хлороформ томизиб қўйилади.

Касаллик аломатлари 48—72 соатлардан сўнг пайдо бўлганидан сўнг натижалар ҳисобга олинади, яъни ҳосил бўлган некрозлар сони ҳисобланади. Назорат ва тажрибадан олинган некрозлар айрим —айрим қилиб жадвалга тушири—лади, 5—6 баргнинг ўнг томонидан олинган некрозларнинг ўртачаси ҳисобланади.

Натижаларни график равишда тасвирлаш учун орди—ната ўқига некрозлар сони контролга нисбатан фойиз ҳисо—бида, абсицага эса суюлиш даражаси қўйилади. Олинган натижалар нуқталари бирлаштирилса суюлиш даражаси ошиши билан, эгри чизиқ 0 га интилади. Олинган натижа—лардаги энг охирги касаллик амаломатлари ҳосил бўлган суюлиш миқдори шу вируснинг охирги суюлиш даражаси деб ҳисобланади.

Суюлиш даражаси ҳар бир вирусни идентификация қилишда аҳамиятга эга бўлиб, уларни вирус турига ва штаммига қараб ҳар хил бўлади (5—жадвал).

5—жадвал

Ҳар хил шаклли вирусларнинг охирги суюлиш миқдори

Вирус ёки унинг штамми	Охирги суюлиш миқдори
ТМВ	10^{-6}
ТМВ—ТШ	10^{-7}
ТМВ—Коз.Ш	10^{-5}
Жўхорининг пакана мозаикаси	10^{-3}
Шолғом мозаикаси	10^{-3}

Редис мозаикаси	10−3
Бодринг мозаикаси вируси	10^3
Гулкарам мозаикаси	10^5
Гўза мозаикаси вируси	−

Адабиётлар

1. А.Гиббс, Б.Харрисон. Основы вирусологии растений. 1978 429
2. С.В.Куст. Идентификация вирусов в инфекционной смеси с помощью набора растений-индикаторов. Практикум по общей вирусологии. Изд-во МГУ, 1981 г., С-43-46.
3. Ю.И.Власов, Э.И.Ларина Сельскохозяйственная вирусология .1982, 238 с.
4. Ю.И.Власов. Закономерности развития вирусных эпифитотий. 1974, 160 с.

6−машғулот

Вирусларни ҳарорат таъсирида фаоллигини йўқотиш нуқтасини аниқлаш

Вирусларни ҳарорат таъсирида фаоллигини йўқотиш (ҲТФЙ) нуқтасини аниқлаш уларни идентификация қилишда асосий мезонлардан бири ҳисобланади. Ундан ташқари вирусларга қарши кураш чораларини ишлаб чиқиш жараёнида ҲТФЙ нуқтасини аниқлаш катта аҳамият касб этади.

Ишдан мақсад. Вирусларни иссиқликдан активлигини йўқотиш нуқтасини аниқлаш усули билан таништириш.

Керакли материаллар: вирусли намуна (тамаки мозаикасия вирусининг томатдаги штамми билан касаллантирилган мозаика симптомли томат барглари), корунд, 0,1 М фосфат буфери, 20 мл ли юпқа деворли шиша пробиркалар (12−14 дона), 1−10 мл ли пипеткалар (6−8 та), 50 мл колба (2 дона), ванна (5 дона, дока 1м^2, эксикаторлар (2 дона), вазелин, ип (№10), этикеткалар (15−16 дона), дистилланган сув (0,5 л), хлороформ (5 мл), центрифуга (минутига 6000 айл /тез), pH−метр, тарозилар, чинни ҳовонча, сув ҳаммоми, термометр (0−100°С).

Ишнинг бориши: Тамаки мозаикаси вирусининг (ТМВ) томатдаги штаммини ҳарорат таъсирида фаоллигини йўқотиш нуқтасини аниқлаш учун томатнинг томат билан касаллантирилган барглари (50−60 г) 0,1 М фосфат буфери

билан ҳавончада яхшилаб майдаланади (вирусли материал ва фосфат буферининг нисбати — 1:1), сўнгра 4 қават докадан ўтказилади. Докадан ўтказилган суюқликни 10 дақиқа давомида минутига 6000 марта айланиш тезлигидаги центрифугада айлантирилади. Чўкма усти суюқлигини юпқа деворли шиша пробиркаларга (12 дона) 5 мл дан қилиб қуйилади. Биринчи пробиркадаги вирусли ўсимлик шираси назорат вариант қилиб олинади ва қиздирилмайди. Қолган иккита пробиркадаги вирусли намуналар ҳар хил ҳароратда (50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100^{0}C) сув ҳаммомида 10 дақиқа давомида қиздирилади, яъни пробиркадаги вирусли ўсимлик шираси термометр билан бир хил чуқурликда сув ҳаммомига жойлаштирилади. Термометр 50^{0}C ни кўрсатиши билан сув ҳаммомидаги иссиқлик 10 минут давомида 50^{0}C да сақланади. Сўнгра у сув ҳаммомидан олиниб водопровод тагида совитилади. Совитилган вирусли ўсимлик ширасини Nicotina glutinosa аниқлагич ўсимлигининг корунд билан чанглатилган баргини ўнг томонига пипетка ёрдамида 4—5 томчиси томизилади. Сўнгра стерилланган шиша тайёқча ёки шиша куракча ёрдамида ёки стерилланган пахта билан ёки совунлаб ювиб артилмай қуритилган бармоқлар билан оҳисталик билан суртилади (ишқаланади). Баргнинг чап томонига эса қиздирилмаган назорат ўсимлик шираси томизилади ва у ҳам оҳисталик билан суртилади. Сўнгра икки томонига вирусли ўсимлик шираси суртилган баргга этикетка богланади ва нам камера вазифасини бажарувчи эксикатордаги ипга осиб қўйилади. Худди шу усулда иккинчи пробирка—55^{0}C да, учинчиси—60^{0}C, тўртинчиси—65^{0}C, бешинчиси—70^{0}C, олтинчиси—90^{0}C, ўнинчи—95^{0}C ва ўн биринчиси—100^{0}C да алоҳида—алоҳида сув хаммомида 10 дақиқа давомида иситилиб, совитилиб тайёрланган шира аниқлагич ўсимликлар баргини ўнг томонига юқтирилади ва улар ҳам эксикаторга этикеткалари билан осиб қўйилади. Ҳар бир вариант 4—6 та баргга юқтирилади. Этикеткаларга вирус юқтирилган вақт, қиздирилган температура, вируснинг номи, чап томонига қиздирилмаган назорат вирусли шира юқтирилган бўлиб, у ҳам белгиланиб қўйилади. Эксикатор қопқоғига вазелин суртилиб зич қилиб ёпилади ва 48 соатга (аниқлагич ўсимлик қилиб N. glutinosa ишлатилганда) ёки 72 соат (N. sylvestris ишлатилганда) ҳаво ҳароратида

ҳосилдирилади. Кўрсатилган муддат ўтгандан сўнг, пайдо бўлган касаллик симптомлари ҳисобига олинади ва жадвалда қайд этилади. Натижалари график равишда тасвирлаш учун абсцца ўқига некрозларни сони, ордината ўқига эса ҳарорат қийматлари қўйилади. Олинган натижалар нуқталари бирлаштирилади. Назарий равишда қаралганда ҳароратнинг ошиши билан эгри чизиқ нолга интилади. Қайси бир қиздириш ҳароратида вирус активлиги О гача пасайса (некрозлар кузатилмаса) шу ҳарорат вируснинг ҳарорат таъсирида фаоллигининг йўқотиш (ҲТФЙ) нуқтаси деб белгиланади(6-жадвал).

Одатда тамаки мозаикаси вирусини тамакидаги штаммининг ҲТФЙ нуқтаси – 95^0C-97^0C, ТМВ нинг Қозоқ штамминики 80^0C-82^0C, ТМВ нинг томатдаги штаммини-ки – $96-98^0C$, жўхорининг пакана мозаикаси вирусиники-$50-52^0C$, шолғом мозаикаси вирусиники $60-62^0C$ ва ҳ.к.

Бу кўрсаткичлар вирус ёки унинг штаммини идентификация қилишда ишлатилади.

Адабиётлар

1. Власов Ю.И., Редько Г.А. Литаева Г.К-Вирусные болезни овощных и бахчевых кульур. Ленинград. 1973.

6-жадвал

Ҳар хил шаклли баъзи фитопатоген вирусларнинг ҳарорат таъсирида фаоллигини йўқотиш нуқталари

Вирус ёки штамм	Шакли	Диаметри (нм)	Ҳарорат таъсирида фаоллиги-нинг йўқотиш нуқтаси ,С	Адабиёт Лар
ТМВ	тайёқча	300x18	95-96	Гольдин М.И.
ТМВ ни помидордаги штамми	тайёқча	280x18	96-98	Хасанова Р., Ваҳобов А.Ҳ., Деҳқонова З.Н.
Жўхорини	ипсимон	720-750x12	50-52	Давронов

мозаикаси вируси				Қ.С.
Шолғом мозаикаси вируси	ипсимон	720 – 10	50 – 52	Деҳқонова З.Н.
Редис мозаикаси вируси	шарсимон	30	60 – 62	Деҳқонова З.Н.
Бодринг мозаикаси вируси	шарсимон	26 – 30	60 – 62	Юлдашев Ж.
Гулкарам мозаикаси вируси	шарсимон	50		Деҳқонова З.Н.

7–машғулот
Ўсимликларнинг вирус билан касалланиш даражасини аниқлаш

Дала шароитида, иссиқхоналарда, тажриба участкаларида табиий шароитда вирус билан касалланган ўсимликларни, баъзан вирус вирулентлигини, ўсимлик навининг вирусга чидамлилигини аниқлашда сунъий касаллантирилган ўсимликларнинг касалланиш даражаси – "Р" ни аниқлаш зарур бўлади. Касалланиш даражасини қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$P = \frac{n.100}{N}$$

Р – касалланиш даражаси,
n – касал ўсимликлар сони,
N – соғ ўсимликларнинг умумий сони.

Ишдан мақсад: Дала ва тажриба участкаларидаги ўсимликларни фитопотаген вируслар билан касалланиш даражасини аниқлаш усули билан таништириш.

Материаллар: 1. ТМВ билан касалланган томат экилган участка (0,1 гектаргача).
2. ТМВ га қарши олинган антизардоб.
3. Вирус диагностикасини иммунология усуллари ("томчи усул" виро – бактериал агглютинация, иммуноферментана –

лизи, икки ёқлама иммунодиффузия), аниқлагич ўсимликлар ёки симптомлар аниқ кўринса кузатиш ёрдамида амалга оширилиш мумкин. Қанчалик сезгир усул қўлланилса, диагностика шунчалик аниқ бўлади.

Ишнинг бориши: Тажриба участкасидаги эгатлардаги соғ ўсимликлар ҳисобланиб чиқилади ва уларни формулалардаги ўрнига қўйилади, м., "N" (250 та) улар ичидаги касал ўсимликлар аниқлаб чиқилади ва уларни "n" (50 та) ўрнига қўйилади.

Агар формуладаги сонлар ҳисоблаб чиқилса, у 20% ни ташкил этади.

$$P = \frac{50 \cdot 100}{250} = 20\%$$

Демак, тажриба участкасидаги томатларнинг (250 туп) ТМВ билан касалланиш даражаси 20% ни ташкил этади.

8–машғулот
Фитопатоген вирусларнинг зарарини аниқлаш.

Вирусларнинг зарарини аниқлаш, яъни вирус таъсирида ҳосилдорликнинг пасайишини аниқлаш фитовирусологияда қуйидаги формула билан аниқланади.

$$B = \frac{(A - a) \cdot 100}{A}$$

В – вируснинг зарари ёки йўқотилган ҳосил % .

А – соғ ўсимликлардан олинган ҳосил.

а – касал ўсимликлардан олинган ҳосил.

Ишдан мақсад: Дала ва тажриба участкаларидаги ўсимликлардаги фитопатоген вируслар (ТМВ) зарарини аниқлаш усули билан таништириш.

Материаллар: 1. ТМВ билан касалланган томат экилган микро участка. 2. Техник тарози.

Ишнинг бориши: Тажриба участкасидаги эгатлардаги соғ ўсимликлардан олинган ҳосил ҳисобланади (масалан, 180 кг) ва формуладаги "А" нинг ўрнига қўйилади, сўнгра шу участкадаги касал ўсимликлардан йиғилган ҳосил ҳисобла–

ниб унинг қиймати (масалан,120 кг) кичик "а" ўрнига қўйилади ва "В"нинг қиймати аниқланади.

$$B = \frac{(180 - 120)\ 100}{180} = \frac{60.100}{180} = 33,3\%$$

Демак, мазкур участкадаги томат ҳосилдорлигига етган зарар 33,3% ни ташкил қилади.

Адабиётлар

1. Власов Ю.И. Растения индикаторы для диагностики вирусов-Защита растений от вредителей и болезней. 1961. №3 с 49-50

2. Власов Ю.И., Лантас Е.С. Методические указания по обследованию сельскохозяйственных растений на порожённость вирусными болезнями. -Л: ВИЗР, 1962, с 8.

II ҚИСМ
ВИРУСЛАРНИ ТОЗАЛАШ

Вирусларнинг тоза ва фаоллигини сақлаган ҳолда аж—ратиб олиш, уларнинг хусусиятларини чуқурроқ ва атроф—лича кенгроқ ўрганишга имкон яратади.

Вирус зарраси ўта кичик ўлчамли (ангстрем ёки нано—метрлар билан ўлчанади)

биополимер (молекула массаси $4 \cdot 10^6$ — $50 \cdot 10^6$ ва ундан юқори дальтон) бўлгани учун уларни тозалаш ва ўрганишда бошқа фанлар (биокимё, молекуляр биология, иммунология, биотехнология, физик—кимё, кристаллография, кимё физи—каси) методларидан кенг ва унумли фойдаланилади.

Тоза ҳолда ажратилган вирус заррасини морфологияси структураси, кимёвий таркиби, антигенлиги, оқсил ва нук—леин кислотаси ва бошқаларининг хусусиятлари ўрганилади.

Вирус препаратларининг тозалик мезонлари

Тозаланган вирус препаратларини тозалигини ва го—могенлигини (бир жинсли) ҳамда ҳақиқатдан ҳам ажратилган бу препарат ўз юқумлилигини сақлаб қолганлигини билди—рувчи омиллар бор (Атабеков, 1966).

1. Ажратиб олинган препаратнинг юқумлилигини, шу вирусниг ўзига хос индикатор ўсимликларига юқтириб, ижобий натижа олиш билан тасдиқланади.

2. Препаратнинг гомогенлигини исботлаш учун бирор моддани (сахароза, цезий хлор) градиент зичлигида тадқиқ қилинганда бир вирус зонаси (доира) ҳосил бўлиши кўрсатади.

3. Тозаланган вирус препаратини электрон микроскопда текширилганда препарат фақат вирус зарраларидангина иборат бўлиши керак. Электрон микроскоп натижалари олинган препаратни гомогенлигидан ва вирус агрегатлари ҳақида маълумот беради.

4. Изотоп анализи усулини қўллаш. Тоза препаратни шу вирус ажратилган ўсимликни нишонланган муқобил (нормал) ҳужайра қисмлари билан сунъий аралашма тайёрланади. Сўнгра вирус тозаланган усул билан вирус ажратилади. Тозаланган препарат таркибида изотоп нишони бўлмаслиги вирус тозалигини кўрсатади.

5. Серологик анализ ўта яхши самара беради. Иммунодиффузия ва иммуноэлектрофорез усуллари билан реакция ўтказилганда шу вирус антизардоби билан мазкур препарат преципитация линиясини ҳосил қилиши зарур, ўсимликни муқобил ҳужайра қисмларига тайёрланган антизардоб билан преципитация линияси ҳосил бўлмаслиги керак.

6. Аналитик центрифугалаш ва электрофорез методлари ишлатиш ҳам препаратнинг тозалигини билдиради. Аналитик центрифуга қилинганда олинган седиментограммада битта симметрик чўққи олиниши ҳам вирус препаратини гомогенлигидан дарак беради.

Атабековнинг (1966) фикрича ўта сифатли тозаланган вирус препаратида ҳам оз миқдорда бўлса ҳам ҳужайра моддалари қолган бўлиши мумкин. Юқорида айтилган методлар билан тозалиги текширилганда ҳам бу методлар сезгирлиги етмаслиги мумкин. Ундан ташқари кичик малекулали баъзи моддалар вирус сиртига адсорбцияланган ҳам бўлиши мумкин (Ackers, Steere, 1967).

Вирусларни тозалашнинг асосий ўзига хос хусусиятлари

Фитопатоген вирусларни шу кунгача фақат 10—15% нигина тоза ҳолда ажратилган ва уларни ажратиш методлари ишлаб чиқилган.

1898 йилда Бейеринк ТМВ нинг этил спирти билан чўкмага тушишини, чўкмадаги вирусни қуритиб қайтадан сувда эритилганда ҳам ўз юқумлилигини сақлашини айтади. Бу ишларни вирусларни биринчи тозалаш устидаги ури—нишлардан дейиш мумкин. Кейинчалик ўсимлик вирусла—рини ҳўжайин—ҳужайралари қисмларидан специфик хусу—сиятлари билан фарқ қилиши аниқланади. Бундай фарқларни аниқлаш ва уларни вирус препаратини хўжайин материалларидан вирус юқумлилигини сақлаган ҳолда иш—латиш вирус тозалашнинг асосини ташкил қилади (Гиббс, Харрисон, 1978). Ҳар қандай вирус ҳужайрада бўлиб уни тоза ҳолда олиш учун ҳужайранинг асосий элиментларидан ажратилади. Муқобил ҳужайра — ҳужайра пўсти, цито—плазма мембранаси, унинг ички томонида желатинасимон цитоплазмадан иборат. Цитоплазмада эса ҳар хил киритма—лар, крахмал доналарини тутувчи хлоропластлар, митохонд—риялар ва ядро бор. Ҳужайрада вакуола, эндоплазматик тўр, рибосомалар мавжуд.

Вирус тозалашнинг биринчи босқичи, ҳужайрани пар—чалаб вирусли ширани ажратиб олиш—экстракция қилишдир.

Шира мураккаб аралашмадан ташкил топган. Улар ичида ўсимлик ширасидаги баъзи қисмларни парчалаб, вирус фаоллигининг йўқотадиган ферментлар бор.

Шира анча беқарор бўлиб, pH паст бўлади. Бунда энг йирик таркибий қисмлар (хлоропластлар, митохондрийлар, крахмал доналари, ҳужайра пўсти фрагментлари бўлиб, уларни анча паст даражада центрифугалаш (минутига 5000—7000 айл тез) ёрдамида чўкмага тушириш мумкин. Ширада майда молекулали массага эга—қандлар, аминокислоталар, тузлар ва улардан йирикроқ оқсиллар, рибосомалар, микро—сомалар (эндоплазматик тўрнинг майда фрагментлар) мав—жуд.

Охирги гуруҳ моддалар ўз ўлчами, стабиллиги, таркиби билан вирусларга анча яқин бўлганликларидан, улардан қутилиш ва тозалаш жараёни анча мураккаб бўлади. Ҳу—жайра ширасига яна бошқа седиментация коэффиценти 4 ва

185 га тенг оқсиллар протопластларнинг парчаланишидан фитоферритин келиб қўшилади. Унда темир атоми бўлиб, унинг ўлчами кичик бўлса ҳам (10 нм) "сузиш зичлиги" юқори, уни седиментация коэффиценти 60 S га яқин. Протоплазмада хлоропластларда 70S рибосомалар бўлиб, уларга Mg^{++} ионларининг етишмаслик ҳолатларида улар 35 S ва 50 S суббирликларга парчаланади. Цитоплазмадаги рибосомалар эса 80 S бўлиб, 35 S ва 58 S суббирликларга диссоциацияланади.

Булардан ташқари ҳужайрада ҳали қурилиб бўлмаган бир хил ўлчамли вирус зарралари ҳам бўлади. Вирусни тозалаганда ана шу юқорида айтилган органелла ва бошқа моддалардан ажратиш керак. Бу эса ўта мураккаб жараёнлар. Чунки кўпчилик вирусларни седиментация коэффиценти ва баъзи бир хусусиятлари (изоэлектрик нуқтаси, "сузиш зичлиги" ўлчамлари ҳужайра қисмларникига жуда яқин бўлади. Жуда кўп вирусларни тозалаш жараёнларини ўта эҳтиёткорлик билан бажарилмаса, уларнинг юқумлилик хусусиятлари йўқолади.

Вирус ажратишни оптималлаштириш

а) Ўсимликнинг аҳамияти. Вирусни ажратиш у қайси ўсимликдан эканлигига боғлиқ бўлади, баъзи ўсимликлар улардан вирус ажратишга ўта мос бўладилар, чунки уларда вирус кўп миқдорда тўпланади. Масалан, тамаки ширасидан ундаги вирусни ажратиш нисбатан осон. Вирусни яна 20—25°С да етарлича намликда, ўғит жуда кўп бўлмаган тупроқда ўстирилган ёш ўсимликлардан анча енгил ажратиш мумкин.

б) Вируснинг аҳамияти. Биринчи гуруҳ системали касалланган ўсимликда маҳаллий касалланган ўсимликга нисбатан кўп вирус тўпланади. Масалан, ТМВ тамаки ширасини 1 литрида 2—3 г бўлиб, ширани 50—80% оқсилини ташкил этади.

Иккинчи гуруҳ вируслар— беда мозаикаси вируси— миқдори ўртача, тозалаш жараёнида концентрацияси тезгина пасайиши мумкин.

Учинчи гуруҳ вируслари катта миқдорда тўпланмайди. Масалан, сули ўсимлигининг 1 л ширасида 100 мкг арпанинг сариқ пакана вирусини тўтади.

Кўп вирусларнинг концентрацияси (қуюқлиги) уларни хўжайин—ўсимликларини ўстиришга боғлиқ бўлади ва ви—рус тўплашини тажриба йўли билан аниқланади.

в) Ҳароратнинг аҳамияти. Одатда вирусларни +4^{0}С да ажратилади, ҳарорат ундан юқори бўлса вирус парчаланиб кетиш эҳтимоли бўлади. Масалан, ТМВ хона ҳароратда бир неча йиллаб юқумлилигини сақласа, олма мозаикаси виру—синиг фаоллиги эса ҳар 7 минутда икки баробар пасаяди (Гиббс, Харрисон, 1978). Барқарор вирусларнинг тоза пре—паратларини, музлатилган ўсимлик баргидаги ширасидан ажратилса ундаги вирус миқдори ошади.

Хона ҳароратида ширани вирус билан касалланган ўсимликдан ажратиш учун механик усулда, хавончада, электр гомогенизаторлари ёрдамида майдаланади. Бунда ўсимлик ширасига фақат вирусларнинг ярмигина ўтади хо—лос, уларнинг миқдорини ошириш учун эса шира ажра—тилган ўсимлик баргларини яна сув ёки буферда эзиш за—рур.

г) Буфернинг аҳамияти. Буфер ширанинг pH ни ўзга—ришидан сақлайди (7—жадвал), ҳужайрадан чиққан вирус ўзининг оптимал pH да бўлади. Вируснинг эрувчанлиги ва барқарорлиги pH ўзгаришига қараб ўзгаради. Вирус оқсилининг баъзи аминокислоталаридаги кимёвий гуруҳлар маълум pH да ионлашади. Аспарагин ва глутамин кислота—лари нордон, аргинин лизин—асосли гуруҳлар тутади. Улар ионлашади ва вирус сиртининг зарядланишини таъминлайди. Шунинг учун, ҳар хил pH да эритилганда, вирус заррасининг ионизация даражаси ва сирт заряди ўзгаради. Салбий за—рядлар йиғиндисининг, ижобий зарядлар йиғиндисига тенг бўлган pH **изоэлектрик нуқта** (И.Э.Н) номини олган. Ви—руснинг эрувчанлиги уни сирт зарядларига боғлиқ. ИЭН сига қанча яқин бўлса вирус эрувчанлиги шунча кам бўлади. Кўпгина тайёқчасимон вируслар ИЭН асл ҳолига қайтаоладиган бўлиб чўкмага тушади. Кўпчилик вирусларни ИЭН pH—4 га яқин бўлади. Вируснинг энг яхши эриш ва барқарорлиги нейтрал pH да намоён бўлади.

Шунинг учун беда мозаикаси вирусини (И.Э.Н=4,5) та—маки баргидан 0,1 М фосфат буферида (pH 7) ажратилса, сувда (pH 5,8) ажратилгандагига қараганда вирус 3 марта кўп ажралади.

7 – жадвал

Баъзи стандарт буферлар ва уларнинг pH ларини чегараси

pH	Таркиби
2,2 – 3,6	Глицин, HCl
2,2 – 8,0	Лимон кислота, натрий фосфорнокислий
3,0 – 6,6	Лимон к – та, лимон кислотани натрийли тузи
3,6 – 5,8	Сирка кислота, натрий ацетат
5,8 – 8,0	Натрий фосфат, калий фосфат
7,2 – 9,1	Трис – 0ксиметиламинометан (трис), HCl
6,8 – 9,2	Бор кислота, бура
8,6 – 10,6	Глицин, натрий гидроокси
9,2 – 11,0	Бура, натрий гидроокиси

Ўсимлик оқсиллари ва рибосомалар pH 7 да барқарор ва турувчан бўладилар, pH 4,5 да эса ўзини аввалги ҳолига қайтмайдиган изометрик вируслардан бўлиб бира тўла чўк – мага тушади. Ялтирбош мозаикаси вирусига, йўлдош ви – русларининг И.Э.Н си pH – 7 га яқин бўлиб, улар pH – 7 га қараганда pH – 5 да анча барқарор бўлади. Шунинг учун уларни pH – 4,5 бўлган 0,1 М ацетат буфери ишлатиб ўсим – лиқни қисмларидан ажратиш ва бир вақтнинг ўзида қисман тозалаш мумкин. pH нейтрал бўлган, концентрацияси ба – ланд буферда ўсимлик ширасини маълум муддат тутиб ту – риш ўсимликнинг таркибий қисмларини чўкмага тушишига олиб келади. Бу кўпгина тайёқчасимон вирусларни экстрак – ция қилишда цитрат (pH – 6,5), фосфат (pH – 7,0) ёки борат (pH – 7,5) буферларини юқори молярлигини ишлатса вирус яхши тозаланади. Бу ҳолатда ўсимлик оқсилларининг сирт зарядлари нейтраллашса керак, натижада улар чўкмага ту – шади. Лимон кислотасининг аниони Mg^{2+} ионини боғлайди ва рибосомаларнинг парчаланишига йўл очади. Фосфат бу – фери спиралсимон симметрия асосида тузилган таёқчасимон, ипсимон, умуман, чўзинчоқ вирусларни агрегацияланишига олиб келади. Буфернинг бу хусусиятидан томат зархалла – ниши вирусини тозалашда фойдаланилади.

Ялтирбош мозаикаси вируси эса юқори молярли буфер ишлатилганда парчаланиб кетади. Тузларнинг юқори кон –

центрациясига чидамли вирусларни суюлтирилган буфер эритмаларида сақланади.

Скотнинг (1963) фикрича бодринг мозаикаси вирусини ўсимликдан экстракция қилиш 0,5 М цитрат буферида олиб борилиб, кейинги тозалаш босқичларини pH 9 бўлган 0,005 М борат буферида бажариш яхши натижа беради.

д) Вирус тозалашдаги бошқа қўшиладиган моддалар. Рибосомаларни ширадан йўқотиш учун Ca^{++} ва Mg^{++} ионларини боғлайдиган хелат моддалари ва этилендиамин—тетра ацетатни (ЭДТА) экстракция буферига қўшилади.

Кўпгина вирус зарралари агрегацияга мойил бўлади, бу ҳолатни экстракция буферига детергент—полиоксиэтиленсорбитанмонолеат (твин 80) қўшиб йўқотиш мумкин. Брэкке (1959) фикрича арпанинг чизиқли мозаикаси вируси N—метил—N—олеоилтауратнинг натрийли тузи (игепон Т—73) қўшилган буферда яхши дисперсияланади. Кўпгина потивирусларни ажратганда 0,5 М мочевинанинг буферда бўлиши яхши натижа беради (Дамирдах, Шефферд, 1970). Чунки мочевинанинг паст концентрацияси гидрофоб, водород боғларини кучсизлантирса керак.

Ўсимлик ширасидаги фенол бирикмаларининг оксид—ланишида ҳосил бўладиган полифенолоксидаза, таннинлар баъзи (бодринг мозаикаси вируси) вирусларнинг фаолли—гини йўқотади. Бундай ҳолларда ўсимликни майдалаш вақтида буферга 2%—ли никотин эритмаси ёки ҳар хил қайтарувчи моддалар (сульфит, тиогликолат, меркаптоэтанол ёки дитиорейтол) қўшилади.

Вирус тозалаш методлари ҳақида

Стир (Steere,1964) вируслар морфологияси, кимёвий ва физик—кимёвий хусусиятларидаги фарқлар асосида қуйидаги тозалаш методларини таклиф қилади.

1.Зарядларнинг ўлчамларига асосланиб фракцияларга ажратиш:

а) агар ва сефадекс гелларида фильтрлаш,

б) қуруқ агар ва сефадексга адсорбциялаш,

в) чўктириш.

2. Зарраларни шаклларига қараб фракцияларга ажра—тиш:

а) агар ва сефадекс колонкаларида фильтрлаш,

б) бирор моддaнинг градент концентрациясида цен—трафугалаш.

3.Кимёвий тузилиши ва ички структурасининг парқарорликларининг фарқланишига асосан фракциялаш:

а) қиздириб денатурациялаш,

б) ҳар хил шароитда сақлаш,

в) ион кучини ёки pH ни ўзгартириш,

г) маълум ионларни (Ca^{++}, Mg^{++}) ишлатиш.

4. Зарраларнинг сиртқи зарядларига асосланиб:

а) электрофорез ёки pH градиентида электрофорез,

б) изоэлектрик преципитация,

в) ион алмашиш хроматографияси.

Ушбу усулларни ҳар хил комбинацияда ишлатиб вирус заррачини фаоллигини сақлаган ҳолда тозалаш мумкин.

Вирус ажратиш ва тозалаш методларини шартли ра—вишда икки гуруҳга: кимёвий ва физик—кимёвий метод—ларга бўлиш мумкин (Атабеков, 1966).

Вирусларни тозалашнинг кимёвий усуллари

Бу усулларни қўллаганда вирус кимёвий моддалар (этанол, аммоний сульфати, полиэтиленгликол) билан чўк—тирилади. Бу гуруҳга яна тозалаш жараёнида аралашмага ферментлар билан ишлов бериш (ҳужайра қисмларини ферментлар билан парчалаш) киради. Аммоний сульфат би—лан чўктириш икки босқичда ўтказилади:

1. Вирус экстрактига фақат ҳужайра қисмларигина чў—каднган миқдордаги туз солинади ва уни центрифугалаш билан ажратиб ташланади. Сўнгра чўкма усти суюқлигига юқори концентрациядаги (25—30%) аммоний сульфатига қўшилади. Ҳосил бўлган вирус чўкмаси центрифугаланиб ажратиб олинади. Бу усулни бир неча марта қайтарилиб тоза вирус препарати олинади. Методни фақат юқори концен—трациядаги тузга чидамли бўлган вируслар учун қўлланилади. Кимёвий методни қўллаганда кўпгина беқарор (лабил) ви—руслар тозалаш жараёнида фаоллигини йўқотади ёки пар—ланади, чунки кимёвий моддаларни қўллаганда улар ви—русни денатурацияга учратади. Агар вирус ферментлар таъсирига чидамли бўлса, у ҳолда вирус суспензияси про—теолитик ферментлар ёки нуклеазалар билан ишлов берилиб, ҳужайра оқсилларини ва нуклеин кислоталарини майда ма—

лекулали бирикмаларга парчаланади. Сўнгра вирус экстрак — тини бошқа методлар қўллаб толзаланади.

Вирусларни ажратиш ва тозалашнинг физик—кимёвий методлари.

Бу методларни қўллаганда вирус ва ҳужайра қисмлари физик—кимёвий хусусиятларига қараб маълум фракция—ларга ажралади.

Ҳамма физик—кимёвий методларни қўллаганда вирус ўзининг бирламчи хусусиятларини сақлаб қолган бўлиши керак. Физик—кимёвий усулларнинг вирусларга бўлган таъсирига қараб "аёвсиз" (жёсткий) ва "эҳтиёткор" (щадящий) методларга бўлинади.

1. "Аёвсиз" вирус ажратиш усуллари қўлланилганда вирусли экстрактга иссиқлик таъсир этдирилганда ҳам, ви—рус "натив" (ўзгармаган ҳолда) ҳолатда бўлади ёки вирусли экстрактни музлатиб нормал ҳужайра қисмларини денату—рацияланади. Тозалашнинг бу усулини қўллаганда ис—сиқликга ёки музлатишга чидамсиз бўлган ҳужайра қисмлари денатурацияланади ва чўкмага тушади. Бу усулни бошқа методлар билан биргаликда тоза вирус препаратини олиш мумкин. Бу методлар термостабил ва музлатишга чи—дамли вируслар учун қўлланилади.

"Беаёв" вирус тозалаш методларига яна икки фаза че—гарасида сиртқи денатурациялаш методи ҳам киради. Маса—лан,, "сув— ҳаво", "сув—қутбсиз модда, сув—қаттиқ модда" каби икки модда фазалари чегарасида ҳужайра қисмлари осон денатурацияланади. Оқсилларни сирт денатурация қилиш учун улар орасидан ҳаво пуфакчаларини ўтказиш ёки хлороформ ва бензол билан эмульциялаш мумкин. Бу усул қўлланилганда бир қисм ҳужайра оқсиллари денатура—цияланади ва эримайдиган ҳолатга ўтади. Сўнгра уларни центрифугалаб йўқотилади. Албатта бу метод ҳам сирт—денатурацияга чидамли бўлган вируслар учун қўлланилади.

Кимёвий методларга, физик—кимёвий таъсирларга сезгир бўлган вирусларни тозалаш учун физик—кимёвий усулларни вирусни "аяйдиган" методлари қўлланилади.

2. Вирусларни тозалашни "аёвчи" физик—кимёвий методларига гель хроматографияси, хроматография, цен—трифугалаш, электрофорез ва ҳакозолар киради. Бу усуллар

ўланилганда вирус вирусли экстрактдан фракцияларга ажратилган ҳолда олинади.

Вирусларни ион алмашиш ва адсорбцион хромотрафия методларида тозалаш вирус ва ҳужайра қисмларини сиртқи зарядларини фарқларига асосланган. Вирусларни **дифференциал центрифугалаш** усулида тозалаганда икки марта бир йўла бажарилиши мумкин: вирус концентрацияси ошади (қуюқлашади) ва у яна ҳужайра қисмларидан озод қилади. Бу усул энг ишончли вирус тозалаш методидир. Тиндирилган вирусли эритма 1 дақиқада 20—50 минг марта айланиш тезлигида ультрацентрифуга қилинади. Вирус ва у каби хужайранинг йирик таркибий қисмлари пробирка тагига чўкади. Чўкма вирусга мос буферда эритилади. Йирик новирус қисмларни 8—15 м.м.а.т.да центрифугалаймиз. Чўкма усти суюқлиги 20—50 минг м.м.а.т. да яна центрифугаланади ва чўкма устида қолган кичик малекулали қисмлардан ажратилади. Уч—тўрт цикл дифференциал центрифугалаш тоза вирус препаратини олиш учун етарли ҳисобланади.

Вирусларни сахарозанинг ҳар хил концентрацияли градиентида ва оғир металларни градиент зичлигида центрифугалаб тоза препарат олиш мумкин.

Вирус зарралари ва бошқа қисмларини центрифугалаш давомида градиент бўйича жойлашиши уларнинг ўлчами, шакли ва зичлигига боғлиқ.

Вирусларни **"изоэлектрик преципитация"** методида тозалаганда эритма pH ни вирус изоэлектрик нуқтасигача ўзгартирилганда вирус чўкмага тушади. Бунда вирус ИЭН ни фарқланадиган бир қисм "нормал ҳужайра қисмлари" эритмада қолади. Чўкмага тушган вирус мўътадил центрифугалаш билан ажратиб олинади ва ўзига мос буферда эритилади. Изоэлектрик нуқтада чўктириш циклини (ИЭН чўктириш, эритиш ва центрифугалаш) бир неча марта қайтариб, тоза вирус препаратини олиш мумкин.

Вирусларни ажратишда **препаратив электрофорез методи** ҳам ишлатилади. Бу методда вирус зарралари ва ҳужайра қисмлари сиртқи зарядларини фарқларига қараб ажратилади. Градиент зичликда электрофорез олиб борилганда концентрацияси юқори вирус сахароза градиенти солинган пробиркага солинади ва электрофорез ўтказилади. Сахароза

ўрнига бошқа геллар (крахмал, агар, агароза, желатина, полиакриламид) ишлатилиши ҳам мумкин.

Шундай қилиб юқорида бир неча хил вирус тозалаш методларига қисқача тавсиф берилди. Юқорида таърифланган методлардан энг афзалларидан модда градиентида центрифугалашни айтиш мумкин, чунки бу ҳолатда вирус доимо эритмада бўлади. Препаратив электрофорезда ҳам вирус эритмада бўлса ҳам электрофорез давомида у қизиши мумкин.

Гельфильтрация

Яна бир истиқболли методлардан бири вирусларнинг гранулаланган агар, агароза гелларида тозалашдир. Бу метод гельфильтрация номи билан машҳур бўлиб, кўпгина биокимёвий ва вирусология лабороторияларида кенг қўлланилади. Бу усулни қўлланилганда кўпгина беқарор (нозик) вируслар ўзининг асл ҳолларини ўзгаришсиз сақлайдилар. Лекин бу метод ёрдамида вирус тозаланганида энг катта ролни вирус тозалашда (экстракция, элюция) жараёнларида ишлатиладиган буфер эритма ўйнайди. Бир хил вируслар эритма pH ни юқори ёки паст бўлишига ўта сезгир бўладилар, бошқа хиллари эса ўта нордон ёки ўта ишқорий бўлганда сезгир бўладилар. Баъзи вируслар маълум ионлар бўлишини талаб қилса, баъзиларига эса бундай ионларнинг бўлиши уларнинг табиий хусусиятига салбий таъсир кўрсатади.

Гельфильтрация ёрдамида вирус тозаланганда ишлатиладиган энг оддий ва арзон вирус тозалаш асбоби гранулаланган агар ёки агароза билан тўлатилган шиша колонкалардир.

1. Гельфильтрация методининг принципи. Гельфильтрация методи нисбатан янги методларга киради, моддаларнинг ажралиши улар молекуласининг массаси ва ўлчамларига қараб бўлади. Бу метод охирги йилларда кўплаб кимёвий, биокимёвий ва вирусология лабораторияларида кенг қўлланилмоқда. Бу метод оқсил, нуклеин кислота, вирус, гормон, антибиотиклар, липидлар ва бошқа молекуляр биология объектлари бўлган биополимерларни ўрганишда ишлатилмоқда.

Бу методни имкониятлари анча кенг бўлиб, у молекуларнинг молекула массасини аниқлашда, молекулаларни ўлчамига қараб фракцияларга ажратишда ишлатилади. Бу ме—

Буни қулайлиги шундаки, у минимал асбоб—ускуна талаб қилади, бажариш жараёни ўта "юмшоқ" шароитда ўтганлиги учун кўпгина беқарор моддаларни (вирусларни) ажратишда яхши натижа беради.

Гельфильтрация кўндаланг—тикилган декстран, агар, агароза, полиакриамид гелларида амалга оширилади (Polson, 1961; Детерман, 1971).

Гельфильтрация учун ишлатиладиган шиша колонкалар декстран, полиакриламид, агар, агароза геллари, порали кремний гранулалари ва бошқалар билан тўлатилади. Хромо—тографиянинг бу тури ҳозирги вақтда биополимерларни ажратишда энг асосий методлардан ҳисобланади. Адабиётда метод ҳар хил ном билан аталади: "молекула элаги", "гель—фильтрация", "гелга—кириш хроматографияси" ва ҳ.з. Гельфильтрация дейилганда бу гелда одатдаги фильтрланиш жараёни эмас, аммо бу ном бошқаларига қараганда анча кўпроқ ишлатилади.

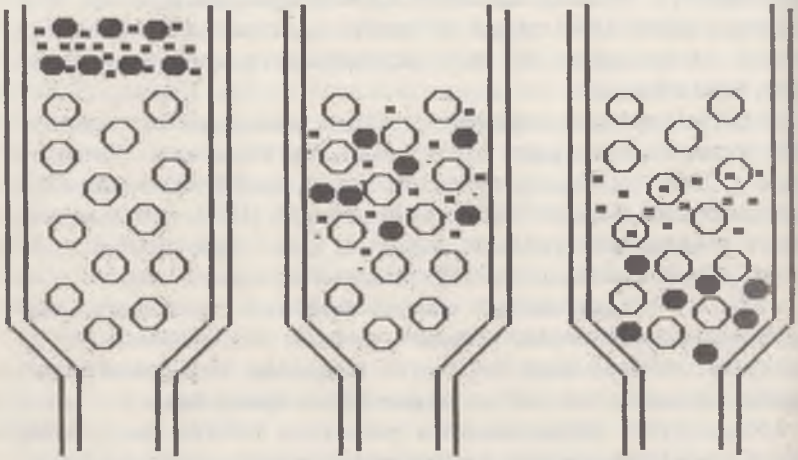
Гельфильтрация жараёнида йирик молекулалар майда—ларига қараганда гельдан осон ўтади. Бу ҳодисани Стир ва Эккерс (1962) гел грануласига модда диффузияланиши—нинг камайиши, Порат (1963) ва Педерсон (1962) эса модда—ларнинг гелдан чиқарилиши жараёни деб тушунтиришади. Лаурент ва Киллендер (1964) гельфильтрацияда юқоридаги бир шкала механизмнинг ҳам борлигини такидлайдилар. Гельфильтрацияда молекуланинг ўлчами ва массаси катта аҳамиятга эга эканлиги бир неча моддалар гельфильтрация методида ажратилган пайтда яққол кўзга ташланади.

Моддаларни фракцияларга ажратиш табиий ва сунъий ишланган цеолитларда амалга оширилганда "молекула—элак" принципи ишлайди. SiO_4 ва AlO_4 ларни тетраэдрик гуруҳлари уч ўлчамли тўр ҳосил қилади ва уларда ички бўшлиқлар ҳо—сил бўлади. Улар бир—бирлари билан поралар орқали би—рикади. Цеолит пораларининг ўлчамларини чегараланганлиги сабабли ҳам катта молекулаларнинг унга киришига тўсқинлик қилади, майдалари эса эркин диффузияланади (Детерман, 1970) (5—расм).

1956 йилда Флодин ва Порат кўндаланг тикилган дек—стран гранулаларини колонкали хроматографияда ишла—тишди. Хиертон ва Мозбах (1962) гранулаланган полиакри—ламидни, Полсон ва Хиертон (1961, 1962) агар ва агароза

гелларини макромалекулаларни ажратишда, Эккерс (1964), Мале (1967) ва бошқалар гельфильтрация принципи устида ишлар олиб боришди.

Гельфильтрация методини қўллаганда моддаларни аж—ратиш принципи шунга асосланган, яъни фильтрланганда молекула массаси, молекула ўлчами ва шаклига қараб бўли—нади. Гельфильтрация принципига асосан моддаларни ко—лонкадан ўтказилганда, моддалар фақат фильтраланиб қолмасдан балки улар молекула массаси, ўлчами ва шаклига қараб ҳам бўлинади. Шунинг учун ҳам ҳар бир моддани элюция ҳажми унинг сирт заряди ва хусусиятларига эмас, балки молекуланинг ўлчами ва шаклига боғлиқ (5—расм).



5—расм. Гельфильтрация жараёнининг чизмадаги кўрини—ши.

а—колонкага аралашма солингандан сўнг;

б—майда молекулаларнинг гел грануласига диффузияси ва йи—рик молекулаларнинг гранула атрофидаги эритувчида тақсимланиши;

в—колонкадаги кичик молекулаларнинг гель гранулаларига диффузияланиши, катталарининг эса гранулаларга кира олмасдан улар орасидан ўтиши.

Агар колонкадаги гелнинг устига катта ва кичик молекулалар аралашмасини қатлаб солинса гелнинг элюент билан ювилиши жараёнида ҳар хил молекуляр массага эга моддалар олдинда ҳаракат қилади, улар орқасидан кичиклари, яъни ҳар хил молекуляр массасига эга моддалар колонкада хромотографияланади Бунда ҳар бир тур молекулалар гел гранулаларига ҳар хил тезликда диффузияланади ва гелнинг ичидаги маълум фракция суюқлигида тақсимланади, элюент билан ювилганда колонкадан молекуляр массанинг камайиши тартибида ювилади. Порали структурага эга бўлган гель ҳар хил ўлчамдаги пораларга эга бўлиб, маълум ўлчамдаги молекулалардан бошқасини ўтказмайди ("гелдан чиқарилиш чегараси").

Шундай қилиб, "гелдан чиқарилиш чегараси" дан йирик молекулалар гел зарраларига кира олмай уларни четлаб ўтиб, гранулани ўраб турган суюқликда ҳаракатланади. Бу суюқлик билан банд бўлган бўшлиқ колонканинг "эркин ҳажми" ёки "чиқарилиш ҳажми" (V_0) дейилади.

Жуда майда молекулалар гел зарраларига кириб, гел зарраларининг ички ва ташқи суюқликларига эркин диффузиланади. Уларга гелнинг матрикиси тўсиқ бўла олмайди. Шунинг учун ҳам улар колонкадаги суюқликнинг бутун ҳажмини бўйлаб ҳаракатланади. Бу бўшлиқ (V_0) ва гел зарраларидаги суюқлик ҳажми (V_i) ларнинг йиғиндисига тенг. Демак, майда молекулаларнинг катта ҳажмдаги суюқликдан ўтишлари учун, улар катта молекулалардан орқада қолади ва бутун колонка бўйлаб ўтиб, қуйидаги элюция ҳажмини ташкил қилади.

$$V_e = V_0 + V_I \quad (1)$$

Колонканинг умумий ҳажми (V_t) қуйидагича аниқланади:

$$V_t = V_0 + V_I + V_g \quad (2)$$

V_g – гел матрикиси ҳажми,

V_I – стационар фаза ҳажми.

Гельфильтрацияда ишлатиладиган муҳитлар

Гельфильтрация учун идеал муҳит – муҳитнинг адсорбция қилиш хусусиятининг йўқлиги, барқарорлиги ва денатурацияланмаслигидир. Муҳитда пораларни турлари

диапазонини кенглиги уни ҳар хил ўлчам ва молекула мас — сасига эга макромолекулаларни ўрганишга имкон туғдиради. Аммо шу вақтгача идеал муҳит ҳали бўлмаган. Энг тарқалганлари декстран геллари (сефадекс), полиакриламид геллари (биогель Р), агар ва агароза геллари (сефароза, са — гароза, биогель А), ҳамда порали шишалар бўлиб хисобла — нади.

1.**Декстран геллари.**Бу геллар бактерияларнинг маҳсу — лоти бўлиб сувсиз муҳитда эпихлоргидрин билан кўндалан — гига тикилган. Бу геллар "сефадекс" деб номланади. Сувда эримайди, инерт, гранулалари сферасимон шаклга эга, сувли эритмаларда осон бўкилади ва 1 млн молекула массасига эга биополимерларни гельфильтрация қилишда ишлатилади. Гелнинг сув тортиши ундаги тикилиш миқдорига боғлиқ. 8 — жадвалда сефадекс турлари ва уларнинг хусусиятлари санаб ўтилган.

8 — жадвал

Сефадекс типлари ва уларнинг тавсифи (Детерман, 1970)

Тип	Тақрибий гелдан чиқариш чегараси (мол. масса)	Сув юти — ши грамм сув/ грамм қуруқ гел	Гелнинг тўла ҳажми (мл да)	Зарра — нинг ўлчами (мкм)
Сефадека G — 10	700	1,0±0,1	2 — 3	40 — 120
Сефадека G — 15	1500	1,5±0,1	2,5 — 3,5	40 — 120
Сефадека G — 25	5000	2,5±0,2	5	
Нафис				20 — 80
Дағал				100 — 30
Ўртача				50 — 150
Сефадека G — 50 Нафис Дағал Ўртача	1000	5,0±0,3	10	 20 — 8 100 — 3 50 — 15
Сефадека G — 75	5000	7,5±0,5	12 — 15	40 — 120
Сефадека G — 100	100.000	10,0±1,0	15 — 20	40 — 12
Сефадека G — 150	150.000	15,0±1,5	20 — 30	40 — 12
Сефадека G — 200	200.000	20,0±2,0	30 — 40	40 — 12

Сефадекс геллари вирус тозалашнинг ҳамма босқичларида ишлатилади.

Колонка тўлатишдан илгари сефадекснинг қуруқ гранулалари сувга ёки буфер эритмасига 24—60 соатга бўктириш учун солинади. Бўктиришни тезлатиш учун уни сувда қайнатиш ҳам мумкин, лекин қайнатилганда баъзи гранулалар ёрилиб кетади, улардан декантация йўли билан тозаланади.

Тайёрланган сефадекс гранулалари билан хроматографик колонкани маълум баландлигигача тўлатилади. Ўзига хос буфер билан гел ювилгандан сўнг уни хроматография мақсадларида қўлланилади.

2. **Полиакриламид геллар.** Акриламидни кўндаланг-тикиш агенти N.N—метиленбис—акриламид иштирокида сувли эритмада полимерланади. Таркибни ўзгартириб ҳар хил порали қатор геллар олиш мумкин. АҚШ да чиқариладиган полиакриламид геллари "биогел" деб аталади. 10 тип биогел Р бор. Улар уч турда чиқарилади: 5—100, 100—200 ва 400 меш лик. Биогел Р—2 энг кичик порали, биогел Р—300 энг кўп порали. Ҳамма геллар гранулаланган шаклда, қуруқ ҳолда чиқарилади. 9—жадвалда биогеллар типи ва уларнинг хусусиятлари келтирилган (MaLe, 1967).

Биогел сефадексга қараганда анча яхши натижалар беради, чунки улар инерт бўлганлиги учун паст ион кучда хроматография ишларида қўллаш мумкин. Детерман (1970) фикрича pH 2—11 орасида у турғун бўлади.Биогель сунъий гел бўлгани учун микроорганизмларга ҳам чидамли.

9—жадвал

Полиакриламид гели биогел Р нинг хусусиятлари

Тип	Тақрибий чиқариш чегараси (мол. масса)	Зарра ўлчами	Сув ютиши гр сув/грамм қуруқ гел (мг/г)	Гелни тўла ҳажми (мл/г)
Р—2	200—2. 000	50—100	1,5	3,8
Р—4	500—4. 000	50—150	2,4	5,8
Р—6	1.000—5. 000	50—150	3,7	8,8
Р—10	5.000—17. 000	50—150	4,5	12,4

Р – 30	20.000 – 5 000	50 – 150	5,7	14,8
Р – 60	30.000 – 70.000	50 – 150	7,2	19,0
Р – 100	40.000 – 100.000	50 – 150	7,5	19,0
Р – 150	50.000 – 150.000	50 – 150	9,2	24,0
Р – 200	80.000 – 300.000	50 – 150	14,7	34,0
Р – 300	100.000 – 400.000	50 – 150	18,0	40,0

3. Порали шишалар: Халлер (1965) юқорида айтилган гелларга қараганда афзалликлари кўпроқ бўлган порали шишаларни гельфильтрация учун таклиф этди. Уни поралари вирус ўлчамларига яқин, у кислотага чидамли стерилизация қилиш мумкин, босим остида гельфильтрация қилинганда ҳам ҳажми ўзгармайди, ҳоҳлаганча элюция тезлигини ошириш мумкин. Камчилиги баъзи вирус ва оқсилларни порали шишага адсорбцияланишидир.

1969 йилда Бреслер ходимлари билан кенг порали шиша ишлаб чиқишди. Бунда майда поралар учрамайди. Катта порали шиша олиш учун шишани натрийборсиликатини ишқор билан ишлов берилади. Добичин (1959; 1962) бундай шишаларни пораси 9000 Е лигини тайёрлайди.

Халлер (1965), Бреслер (1969) порали шишаларни вирусларни, бактериофагларни тозалашда, вирус аралашмаларини ажратишда қўллашди. Халлер тамакининг ҳалқа доғли вирусини тамаки мозаикаси вирусидан ажратишда 1700 Е порали шишани, жанубий ловия ўсимлиги мозаикаси вирусини альбуминдан ажратишда 260 Е ли порали шишаларни ишлатишди.

4. Стирагель. Стирол ва дивинилбензолни полимерлаб стирагель олинади. Гель АҚШ томонидан ишлаб чиқарилади. Гел гранулалари умуман бўкмайди. Гел гранулалари сферасимон бўлиб диаметри 40 – 80 мк.

5. Желатина гели. Желатинанинг ошланишидан гельфильтрация учун мос желатин тайёрланади. Желатинадан 2 дан то 30% гача гель олса бўлади. Желатина геллари молекула массалари 20 – 600000 бўлган ҳар хил объектларни (оқсиллар, аминокислоталар) ажратишда ишлатилади.

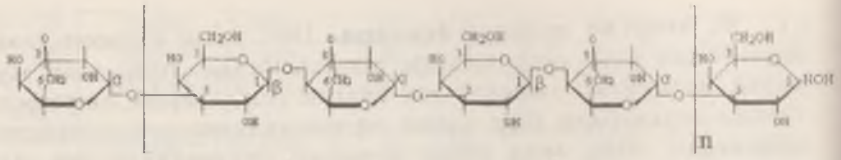
6. Агар ва агароза геллари. 1961 йили Полсон гель—фильтация учун агар гелини таклиф қилди. Агар гели жуда катта молекуляр массага эга бўлган моддаларни ажратишда бошқа гельлардан бир қанча афзалликларга эга эканлигини кўрсатади. Агар гели яхши механик пишиқликка эга. Агар геллари энг юқори концентрацияда ҳам (12%) фракцияларга ажратиш қобилиятига эга бўлади ва сефадекс G—200 да олинган натижаларни беради. Агар гелларининг энг паст концентрациялари жуда катта молекула массасига эга мод—даларни (бир неча миллионгача) фракцияларга ажратиш имконини беради. 1—2% ли агар етарлича механик мустаҳ—камликга эга бўлиб, улар молекула ва заррача ўртасидаги катта молекула массали субстанцияларни фракцияларга аж—ратиш имконига эга ("Фармация Файн Кемикали" фирмаси маърузасидан, 1967).

Агар—агар денгиз сувўтларидан олинади, у 2 полиса—харид аралашмасидан ташкил топади. Асосан Д—галактоза ва 6—6—ангидро—L—галактоза қолдиқларидан иборат. Қ ҳаган сувда тезда эрийди. Совутилганда сувли эритма—лари энг паст концентрацияда ҳам (0,5%) гел ҳосил қилади. Агарнинг камчилиги унинг таркибида зарядли молекула гу—руҳлари бўлиб, кимёвий беқарор. Зарядли молекула гуруҳ—лари асосан сульфатли гуруҳлар бўлиб, улар агарга ион ал—машиниш хусусиятларини беради. Нордон гуруҳларнинг бўлиши электрофорезда ишлатганда кучли эндоосмос ҳосил қилади ва жараён кучсиз ион кучига эга эритувчида олиб борилса модданинг гелга адсорбцияси кузатилади. Гель—фильтрацияда агар гели ишлатилганда албатта элюент ион кучи юқори бўлиши керак.

Гельфильтрацияни паст ион кучида ишлатиш мақсадга мувофиқ бўлса, агарозанинг ишлатган маъқул.

1937 йилда Араки агарни икки гуруҳ полисахаридлардан ташкил топганлигини, бирини агаропектин ва иккинчисини агароза деб атади. Агаропектин агарни зарядли гуруҳларига (карбоксил ва сульфогуруҳлар) эга. Агарнинг асосий қисми — агароза эса зарядли гуруҳлардан ҳоли.

Шу йили Араки агарни агароза ва агаропектинга аж—ратиш методини ишлаб чиқди. Тоза агароза Д—галактоза ва 3,6—ангидро—L—галактозадан иборат



1 2

6 — расм. Агарозанинг структураси
1 — 3,6 — ангидро — L — галактоза.
2 — D — галактоза.

Агароза олиш методлари. Араки агарни тўла ацетил — лашни ва у сувли ва хлорофилли фазалар орасида тақсимланишини аниқлади. Ацетилланган агароза хлоро — формли фазага, агаропектин эса сувли фазага ўтади (Хьер — тон, 1961).

1964 йилда Рассел ва бошқалар агарни мочевинали эритмадан полиэтиленгликол ёрдамида ажратиб олишади.

Иссиқ агар эритмасидан агаропектинни (45^0 ва ундан юқори ҳароратда) пиридин хлорид билан чўктириб, агаро — зани ажратиш ҳам мумкин. Чўкмани центрифуга қилиб аж — ратилади. Цетилпиридин ювилиб, инфузория тупроғига ад — сорбцияланиб йўқотилади. Агароза гели эса музлатилиб — қуритилиб, ёки этанол билан чўктирилиб сувсизлантирилади. Тайёрланган агароза оқ рангли порошок ҳолида бўлади. Бу метод билан анча кўп миқдорда агароза олиш мумкин.

1962 йилда Рассел, Ионагар — 2 нинг иссиқ эритмасини полиэтиленгликол (м.м.6000) билан катта миқдордаги агарни фракцияларга ажратиб агароза олишни кўрсатиб берди. 1966 йилда Сёдж агарни диметилсульфоксид ёрдамида агароза ва агросульфоксид ёрдамида агароза ва агаропектинга ажрата — ди. Агарни $60 — 80^0$ да 50 марта кўп диметилсульфоксид би — лан ишлов бериб сўнгра 13000 g да центрифуга қилинади. Чўкма усти суюқлигидан 3 марта кўп ацетон билан агароза чўктириб ажратилади. Оппоқ агароза ва сариқ — кулранг агароза препаратларига ажралади. Бу методда олинган ага — розада зарядли гуруҳлар минимал миқдорда бўлганлиги учун, гельфильтрацияда ўта қўл келади.

Олинган агароза барқарор гел ҳосил қилади. Агароза геллари pH 4,5 дан паст ва 9 дан юқори бўлганда беқарор

бўлади. Баъзан агароза гелини органик (ацетон) билан ишлов берилганда структуралари ўзгармайди, барқарор бўлади.

Гранулалаш. Ҳамма хроматография материаллари каби агар ва агароза геллари ҳам гранулаланган ҳолда яхши иш— лайди. Хьертон гранулалаш учун гелнинг талаб қилинган концентрациясини олиб аралаштиргичда аралаштиради ва сув ҳаммомида агар тўла эригунча қиздирилади. Олинадиган грануланинг ўлчами аралаштириш тезлигига боғлиқ бўлади.

Гранулалар сувли ҳолатда элакдан ўтказилади. Олинган гранулалар хроматография колонкаларини тўлатиш учун ишлатилади.

Бенгтсон ва Филипсон (1964) усулида агар гранулалан— ганда агарни гранулалаш учун аввал агарни автоклавда эри— тиб, 65^{0}С гача совутилади , сўнгра эса уни 65^{0}С гача қиздирилиб учига 0,5 мм ли трубкага бириктирилган Зейтц фильтрига солинади. Сўнгра гел сиқилган азот ёрдамида (2— 4 атм) совутилган эфирга эзиб чиқарилади. Ҳосил бўлган гранулалар эфирдан ювиб тозаланади ҳамда ҳар хил ўлчамли элакларда эланиб фракцияларга ажратилади.

1968 йилда Фернелиус ва Велисерлар агар гранулала— рини олиш учун бир стакандаги 54°С гача қиздирилган минерал мойга (150 мл агарга 600 мл минерал мой) солиб, аралаштиргич билан жадал аралаштиришди. Ҳарорат 25^{0}С гача камайганда муз ваннасига жойлаштиришди ва яна 10— 15 мин аралаштирилади. Мойли фазада гел гранулалари шакллашади. Уларни кейинчалик центрифугалаб ажратиб олишади. Гранулалар 3 марта сув билан ювилади, мойни эса этил эфири билан экстракция қилинади. Сўнгра гранулалар ҳосилланади, 40—50 меш ли фракциялари экспериментларда ишлатилади.

Регенмортел ва Энгелбрехтлар (1962) агар эритмасини автоклавда эритиб, совутиб гелни майда бўлакларга кеси— шади, элакдан ўтказиб, олинган фракцияларни гельфильт— рация экспериментларида ишлатишади.

Юқорида айтилган методларнинг энг афзаллари Бенгт— сон ва Филипсон (1964) ҳамда Хьертонларникидир (1964). Чунки бу усуллар ишлатилганда стандарт гранулалар ҳосил бўлади. Бир хилдаги фракциялардан тайёрланган гранулалар барқарор вирусларни тозалашда катта элюция тезлиги билан таъминлайди.

3. Гельфильтрация ёрдамида вирусларни тозалаш. 1962 йилда Чех 3% агар билан тўлатилган колонкада тамаки мозаикаси вирусини ўсимлик ширасидан ажралишини ўр—ганди. ТМВ ни эркин объёмда тақсимланиб гелдан тўлиқ чиқишини аниқлади. Бу шароитда мономер ва агрегация бўлган вирус зарралари бир—биридан ажралмаслигини ку—затди. Хлоропластлар ҳам хроматография жараёнида вирус—ли зонада тақсимланади.

Регенмортел ва Энгелбрехтлар 5% агар гранулалари билан данаклиларнинг ҳалқа доғли вирусини тозаладилар. Иммунология усуллари ёрдамида вирус зарраларини эркин ҳажмда биринчи бўлиб колонкадан ювилиб чиқиши, ҳу—жайранинг қисмлари эса иккинчи пикни ташкил қилиши аниқланди. Олинган натижаларни яна юқумлилигини бод—ринг ўсимлигида текшириб тасдиқланди.

Гельфильтирация ёрдамида вирусларни бир—биридан ажратиш. ТМВ ва нўхатнинг жанубий мозаикаси вирусидан ажратиш Стир ва Аккерс (1962) ва Оберглар (1965) томонидан амалга оширилди. Фридборг (1965), Когланд (1968) тамаки некрози вируси ва унинг йўлдошини ажратиш ва тозалашда 4% ва 10% агар гелларидан фойдаланишди.

Гельфильтирация ёрдамида вирус зарраларининг узунлигига қараб фракцияларга ажратиш. Хроматографик колонкадан ҳар хил узунликдаги вирус зарраларини гель—фильтрация қилинганда элюция тезлиги ўта секин бўлганда зарралар колонкадан ўтиш ва диффузия вақтида айланади—лар. ТМВ нинг 3000 Е зарраларини улардан калта бўлган зарралардан (2000 Е ва ундан кичик) ажратиш мумкин.

Вирус зарралари колонкадан ўта секин ҳаракатланган холатда улар ўз узунлигига тенг диаметрли айланаётиган шарни эслатади.Узунлиги 3000 Е га тенг тайёқча 2500 Е ли порага (1% ли гел) қийин киради. 2000 Е ли зарралар ко—лонкада 3000 Е ли зарраларга қараганда бирмунча узоқроқ тутилиб қолади. Шу методдан фойдаланиб Стир ва Аккерес (1964), Кадо, Найт (1966) ТМВ ни узунликларига қараб фракцияларга ажратишди. Ваҳобов, Атабековлар (1971) қисман депротеинизация қилинган ТМВ ни фракцияларга ажратганлар.

ТМВ ни ўлчамига қараб фракцияларга ажратишда маълум қоидаларга амал қилиш зарур (Steere, 1964): ТМВ ни

агрегация бўлишининг олдини олиш учун элюентнинг pH 7,2 дан паст бўлмаслиги, ион кучи ҳам минимал бўлиши, элюция тезлиги 5 мл соатдан ошмаслиги керак.

Гельфильтрация ёрдамида вирус ва ҳужайра нуклеин кислоталарини ҳам фракцияларга ажратиш мумкин. Полиомиелит вируси РНК сини ҳужайра нуклеин кислоталаридан гельфильтрация усули ёрдамида тўла ажратиш мумкин. Ҳужайранинг ДНК си колонканинг "эркин" ҳажмида колонкадан ювилиб чиқади, рибосома РНК си ва транспорт РНК лари ДНК дан ва бир—бирларидан тўла ажралади (Оберг, Филипсон, 1967).

Полиомиелит вирусининг РНК си колонкадан ДНК ва рибосома РНК ларининг орасидан ювилиб чиқади. Гельфильтрация бир занжирли РНК ни унинг репликатив шаклидан ҳам осонлик билан ажратади, яъни полиовирусларнинг икки занжирли шаклини, унинг бир занжирли РНК сидан ажрата олади. Полиомелитни икки занжирли репликатив шакли колонкадан аввал ювилиб чиқади ва бир занжирли РНК ундан кейин чиқиб улар бир—биридан тўла ажралади.,

Агар ва агароза геллари ёрдамида Т—2 бактериофагининг ДНК си ва грипп вирусининг РНК сидан, Т—2 бактериофатининг ДНК фрагментларини бактериофагнинг репликатив шаклидан тўла ажратиш мумкин.

Гельфильтирация ёрдамида қон липопротеидларини, одам сўлаги гликопротеидларини, қўй ошқозон ости бези экстрактларини ва ҳ.к.зларни ажратиш ва тозалаш мумкин.

9—машғулот
Гранулаланган 3% агарда тайёқчасимон ва ипсимон вирусларни (спирал структурали вирусларни) тозалаш

Машғулотдан мақсад. Гельфилтирация усулида вирус тозалаш учун колонка ва вирусли намунани тайёрлаш ва колонкага солиб фракцияларга ажратиш ва улардан вирусининг тоза фракциясини ажратиш.

Керакли материаллар;1. 0,1 М фосфат буфери; 2. Вер—син; 3. 0,1 М HCl; 4. 0,1 М NaOH; 5. 0,05 М трис — HCl буфер, pH 7,6; 6. Аммоний сульфати; 7. Хлороформ; 8. Гўш—тмайдалагич; 9. Дока—1 метр; 10. Стаканлар 1 — 2 л; 11.

Центрифуга ЦВР; 12. Центрифуга пробиркалари 200 мл, 100 мл, 10 мл.; 13. Магнит аралаштиргич; 14. Штатив (физик); 15. Спектрофотометр; 16. pH – метр; 17. Хроматрография ко – лонкаси 2x60 см; 18. Гранулаланган агар "Difco"; 19. Хро – матрография коллектори; 20. Хроматрография коллектори – нинг пробиркалари; 21.Электрон микроскопнинг мис тўрла – ри; 22 .ТМВ ва тамакига олинган антизардоблар; 23. Анали – тик ультрацентрафуга.

Ишнинг бориши.

а) Хроматография колонкасини тайёрлаш. Шиша хроматография колонкасини (2 x 60 см) вертикал равишда "шайтон" ёрдамида ўрнатилади. Колонканинг уч қисмига ички томондан паралон (0,5x2см) ёстиқча жойлаштирилади. Ингичкалаштирилган уч қисмига эса резина ёки тефлондан ясалган узунлиги 80 – 100 см ли шланг (диаметри 0,3 – 0,5 мм) уланади ва ва уни колонканинг устки қисмига қисқич ёрда – мида маҳкамланиб қўйилади. Колонканинг 1/3 қисмига дис – тилланган сув ёки 0,05 М фосфат буфери (pH 7,5) солинади.

Параллель 3% ли гранулаланган агар ёки (агароза) гели тайёрланади, яъни 200 мл ли стакандаги 3% ли грануллaнган гелга 0,05 М фосфат буферидан солинади ва шиша тайёқча ёрдамида аралаштирилади, 20 минутдан сўнг агар гранула – лари стакан тубига чўкади ва унинг устидаги суюқликни шланг (диаметри 5 мл) ёрдамида сўриб олинади. Стакандаги гел эса яна шиша тайёқча ёрдамида оҳисталик билан ара – лаштирилади (тез аралаштирилганда ҳаво пуффакчалари кириб қолади) ва уни колонкага оҳисталик билан қуйиб тў – латилади. 15 – 20 минутдан сўнг колонкадаги гел секин аста чўкиб икки фаза – гел ва сув фазалари яққол кўриниб қолади. Сув фазаси имкони борича олиб ташланади, унинг усти аралаштирилади ва унга яна гел солиб колонка тўлати – лади.

Колонканинг учидаги шлангни пасайтириб кўтариб ко – лонкадан оқиб чиқадиган элюент (буфер) тезлигини 5 – 6 сек/томчига келтирилади ва колонкадаги оқиб чиқишига қараб колонка гел билан тўлатилиб борилади. Шу тартибда тайёрланган колонканинг устки қисмига фильтр қоғоздан доира шаклида қилиб қирқиб олинади ва уни гелни устки қисмига жойлаштирилади. Фильтр қоғоз устида доимо 5 – 6см дан кам бўлмаган ҳолда буфер бўлиши шарт. Акс ҳолда

колонканинг "эркин" ҳажмдаги суюқлиги ҳам оқиб чиқиб кетади ва унинг ўрнини эса ҳаво эгаллайди. Ундай ҳолда колонкани қайтадан тайёрлаш керак бўлади.

Колонканинг устки қисмига 0,05 М фосфат буфери (pH 7,5) солинган (0,5—1 л ҳажмли) шиша идиш билан бирлаштирилади. Колонканинг оқиш тезлигини 5—6 сек/томчи ҳолда сақлаб туриш учун элюент солинган идишни юқорига пастга тушириб кўтариш билан тезлик тартибга солинади. Колонканинг ҳажмини 3 қисми миқдоридаги суюқлик оқиб чиқандан сўнг бу колонка вирус тозалаш учун тайёр ҳисобланади.

б) **Вирусли намунани тайёрлаш.** ТМВ билан касалланган тамаки барглари (500г) аввалроқ музлатилади ва уни тўшмайдалагичда майдаланади. Майдалаш жараёнида 0,05—0,1М фосфат буферидан (pH 7,8) (500мл) аралаштириб борилади. Олинган массани музи эриши билан 4 қаватли докадан утказилади ва уни 2—3 литрлик шиша стаканга солинади. Эритма pH нордон томонга ўзгарган бўлса, 0,1—1 М NaOH билан уни pH 7,5 гача келтирилади ва 1 минутда 3—5 минг айл/миш тезлигида центрифуга қилинади (мин/айл). Чўкма ташлаб юборилади, чўкма усти суюқлигига 1/8 ҳажм миқдорда хлороформ (ёки бутанол) солинади ва 20 минут давомида силкитиб чайқатилади. Сўнгра яна 20 минут давомида 3—8 минг мин/айл тезликда центрифуга қилинади. Центрифугадан сўнг пробирканинг тагида хлороформ ва у таъсирида денатурацияга учраган яшил рангли ҳужайра қисмлари (хлоропластлар, оқсиллар ва ҳ.з.) ва унинг устида тўқ жигарранг вирусли чўкма усти суюқлиги ҳосил бўлади.

Чўкма усти суюқлигини ҳар хил усуллар билан тозалаш мумкин: изоэлектрик преципитация, тузлаш, дифференциал центрифугалаш, гельфильтрация қилиш ва ҳ.з.

Гельфильтрация усули билан тозалаш методи ишлатилганда колонкага солинадиган вирусли намунани концентрациясини ошириш мақсадида аммоний сульфатдан фойдаланилади. Чўкма усти суюқлигига 25% миқдорда аммоний сульфати солинади ва уни магнит аралаштиргичда тўла эриганлиги 60 минутга +4^{0}С га совутгичга қўйилади. Сўнгра 8—10 минг мин. айл тезлигида 20—30 минут давомида центрифуга

қилинади. Чўкмадаги вирусни 0,05 М фосфат буфери билан эритилади ва уни тиниқлаштириш ҳамда эримаган қисмидан ажратиш учун яна 10 минут давомида 10 минг. мин айл тез — лигида айлантирилади. Чўкмаусти суюқлиги гельфильтрация колонкасида кейинги тозалашга тайёр ҳисобланади.

Ишнинг бориши. Вирусли намунани колонкага солиш икки хил йўлда амалга оширилиши мумкин: 1. Хроматогра — фик колонкадаги гель устидаги буфер шприц ёки пипетка ёрдамида сўриб олинади ва фильтр устига вирусли намуна (3—5 мл) солинади. Секин — аста у фильтр орқали гелга ши — милади, сўнгра 2—3 мл буфер билан фильтрнинг устки қисми ювилади ва бу суюқлик ҳам фильтрдан ўтгандан сўнг, фильтр устига 5—6 см баландликда колонкага буфер эрит — маси солинади ва асосий элюент солинган идишига уланади. Элюатларни йиғиш фракцияларни йиғувчи коллектор орқали амалга оширилади. Гельфильтрация тезлиги 5—6 сек/томчи қилиб белгиланади. 5—6 соат давомида фракциялар (3—5 мл) коллекторда йиғилади.

2. Вирусли намунани буфер ва гел устидаги фильтр оралиғига киритиш усули қўлланилганда вирусли намунага унинг зичлигини ошириш мақсадида 0,5 мл сахароза ёки NaCl солинади. Зичлиги ошган вирусли намунани энди бу — фер ва фильтр қоғоз орасига шприц орқали юборилса у бу — фернинг остида, фильтр устида текис зона ҳосил қилиб жойлашади ва гельфильтрация жараёни давом этдирилади. Элюент билан гел колонкасини ювиш 5—8 соат давом этади. Шу муддатда хроматография колонкасидан оқиб чиқадиган суюқлик (элюат) коллектор пробиркаларида йиғилади. Ав — вало колонкадан колонканинг эркин ҳажмига тенг суюқлик (V_0) чиқади, худди шу ҳажмда энг йирик моддалар — вирус зарралари элюцияланади. Ундан сўнг ундан майда молеку — лали моддалар — ўсимликларнинг ҳужайраси таркибидаги моддалар — оқсиллар, пигментлар, полисахаридлар ва ҳако — золар гелдан ювилиб чиқади. Одатда булар иккинчи элюция ҳажмини ташкил қилади.

Олинган фракциялар анализи;

1. Аввало олинган фракцияларни спектрофотометрда 260 нм ва 280 нм тўлқин узунлигида ультрабинафша нурни ютиши аниқланади ва у асосида график тузилади. Абсица ўқига фракциялар хажми (мл) ёки сони, ордината ўқига эса

фракцияни ультрбинафша нурни ютиш миқдори белгилана — ди.

Олинган натижаларни график асосида белгиланганда икки чўққига эга бўлган эгри чизиқ ҳосил бўлади.

2. Биринчи чўққи ташқи кўринишдан сутсимон рангли моддалардан, иккинчи чўққи эса жигарранг тусли модда — лардан иборат.

3. Олинган фракцияларнинг чўққи фракциялари билан N. glutinosa ўсимлигининг баргларини механик усулда ка — галлантириб чиқилади. Натижада биринчи чўққи фракция — лари барг сатҳида 48 соатдан сўнг некрозлар ҳосил қилади, иккинчи чўққи фракциялари юқумлилик намоён қилмайди.

4. Чўққидаги фракцияларни спектрофотометрда 220 нм дан 320 нм гача ультрабинафша нурни ютишлари ўлчаб чиқилганда, 260 нм да фракциядаги моддани (юқумлилигини билгандан сўнг вирус десак бўлади) УБ — нурни энг кўп ютиши, 320 нм да эса уни минимумга интилиши кузатилади. 260 нм да УБ — нур ютишда олинган натижани 280 нм да олинган натижага нисбати 1,18 — 1,22 ($A_{260нм}$ / $A_{280нм}$ =1,18 — 1,22) тенг бўлади.

Бундай натижа фақат 95% оқсил ва 5% нуклеин кисло — тага эга нуклеопротеидлар учун олинадиган константа сон бўлади.

5. Электрон микроскоп усулида текширилганда биринчи чўққида фақат катта молекуляр массали вируслар (тайёқчасимон вируслар, ипсимон) учратилади (10 — расм).

6. Иккиёқлама иммунодиффузия усули билан иккала чўққи фракциялари текширилганда биринчи чўққи фрак — циялари фақат ТМВ га олинган антизардоб билан преципи — тация чизиғини (ПЧ) юзага келтиради. Тамакини нормал ҳужайраларига олинган антизардоб билан эса ПЧ кузатил — майди. Аммо иккинчи чўққи фракцияларидаги моддалар эса, аксинча, ПЧ ни ҳосил қилади. Назорат фракция — колонкага солинмасдан аввалги гельфильтрация қилинмаган намуна иккала антизардоб билан ҳам ПЧ ни ҳосил қилади. Демак, колонкага солинган қисман тозаланган вирус гельфильтра — ция натижасида вирус ва ҳужайра қисмларига тўла ажралди.

7. Биринчи чўққи фракциясини аналитик ультрацен — трифугада текширилганда битта симметрик чўққи ҳосил бў — лиши ундаги моддаларнинг — вируслар гомоген эканлигидан

ҳам далолат беради. Демак гельфильтрация методи билан ТМВ ни тоза, юқумлилик ва антигенлик хусусиятларини сақлаган оппоқ рангли гомоген препарати олинади.

10 – машғулот
Гранулаланган 5% ли агароза колонкасидаги тайёқчасимон (ТМВ) ва шарсимон (ТМВ) вирусларни сунъий аралашмасидан ажратиш

Машғулотдан мақсад. Табиатда ёки лаборатория шароитида бирга аралаш ҳолда учрайдиган вирусларни бир-биридан ажратиш методи билан таништириш.

Керакли материаллар. 1. Ялтирбош мозаикаси вируси (молекула массаси $4 \cdot 10^6$). 2. ТМВ (молекула массаси $40 \cdot 10^6$). Арпанинг Винер нави ҳамда 8-машғулотда ишлатилган материаллар.

а) **Хроматография колонкасини тайёрлаш.** Худди 8-машғулотдагидек олиб борилади, аммо гель колонкасининг узунлиги 80–90 см бўлиши яхши натижа беради. Элюент ишлатилганда ҳам аралашмани ташкил қилаётган иккала вируслар учун оптимал буфер олинади. ТМВ ва ЯМВ учун pH 6 бўлиши иккала вирус учун ҳам бехавотирроқ ҳисобланади ЯМВ ни гелга қисман адсорбциясининг олдини олиш учун буферга 0,1 М KCl солинади. Гельфильтрация тугаши билан яна иккала вирус фракцияларини ўзлари учун оптимал бўлган pH га ўзгартирилади, яъни ТМВ ни pH 7,5 га кўтарилса, ЯМВ нинг pH 4,8 га туширилади.

Ишнинг бориши. Узунлиги 1,2 х 80–90 см узунликдаги 5% ли грануллaнган агароза колонкасини 0,05 М фосфат буфери (pH 6–6,2) билан 3 ҳажм буфер билан ювилгандан сўнг ТМВ–ЯМВ аралашмаларидан 50 мг ни (1–2 мл 0,05 М фосфат буферидаги) колонкага солинади, вирус аралашмалари фильтр орқали гельга диффузия бўлиши билан pH 6,2 га тенг бўлган 0,05 М фосфат буферига тенг бўлган 0,05 М фосфат буфери билан ювиш бошланади.

Колонкадан чиқадиган фракциялар коллекторда 3 мл дан йиғиб олинади. Гельфильтрация ўтказиш тезлиги 6–8 томчи/мин ёки ундан ҳам секинроқ қилиб мосланади. Гельфильтрация 10–14 соат давом этади. Олинган фракциялар

анализи худди 8—машғулот каби ўтказилади, аммо бу гельда иккинчи анализда ЯМВ антизардоби ишлатилади.

1.Худди 8—машғулотдагидек фракцияларни 260 нм ва 280 нм тўлқин узунлигида УБ—нурларни ютиши аниқланади, икки чўққига эга эгри чизиқ олинади. 1 чўққини Д 260/Д 280 нисбати 1,2 га ва иккинчи чўққиники 1,6—1,7 га тенг (тар—кибида 20% атрофида РНК га эга нуклеопротеидларни УБ—нурларини икки тўлқин узунлигида ютиш натижалари нис—бати 1,6 га тенг ҳисобланади) бўлади.

2.Икки чўққи фракцияларини УБ—спектрларида УБ нурларини ютиш чўққиси 260 нм га тўғри келади, минимуми 245 нм.

3.Иккала фракция вирусларини электрон микроскопда кўрилганда 1 чўққи фракцияларида фақат спиралсимон ви—руслар бўлади.

4. Биринчи чўққи фракциялари N. glutinosa да (48 со—атдан сўнг) некрозлар ҳосил қилади, иккинчи фракция эса Chenopodium amaranticolor да некрозлар ҳосил қилади.

5. Биринчи чўққи фракция вируслари ТМВ га тайёр—ланган антизардоб билан, иккинчи чўққи фракцияси вирус—лари ЯМВ га тайёрланган вирус антизардоби билан ПЧ ҳо—сил қилса, демак ТМВ ва ЯМВ тўла икки чўққи фракцияла—рига ажралганлиги ҳақида фикр юритилади.

Демак, 5% ли гранулаланган агароза колонкасида икки хил шаклли вирусларни тўлиқ ажратиш мумкин.

11—машғулот

Гранулаланган 5% ли агароза колонкасида 3 хил ўлчамли — вируслар ва ҳужайра моддаларини ажратиш

Машғулотдан мақсад. Табиатда учрайдиган вирус ара—лашмаларидан тўғридан — тўғри вирусларни тоза ҳолда бир—биридан ва ўсимлик қисмларидан ажратиш.

Керакли материаллар. 8 ва 9—машғулотларда ишла—тилган материаллар ҳамда ТМВ ва бодринг мозаикаси ви—руслари (молекула массаси $5{,}5 \cdot 10^6$) билан касалланган тамаки ўсимлиги pH 7,5 бўлган 0,05 М фосфат буфери.

Ишнинг бориши. Хроматография колонкасини гель—фильтрацияда ювиладиган буфери билан 3 ҳажмда ювилиб

гельфильтрация олиб боришга тайёрланади. Колонкага вирусли намунани худди юқорида вирус тозалаш жараёнидагидек (8—машғулот) усулда тайёрланади, аммо аммоний сульфати билан иккинчи сферасимон вирусни ҳам чўкмага тушириш учун унинг миқдори 25% дан 35% га оширилади. 60 минутдан сўнг чўктирилган чўкма эритилиб, сўнгра тиниқлаштирилгандан сўнг гель колонкасига солинади ва гельфильтрация қилинади.

Хроматография колонкасидаги тўқ жигарранг пигментли фракциялар колонкадан ювилиб чиқиши билан гельфильтрация тугалланган ҳисобланади ва фракциялар анализ қилинади. УБ—нурни 260 нм ва 280 нм да ютишига қараб графиги чизилади. Фракциялар 9—машғулотдагидек анализ қилингандан сўнг 3 чўққи яққол ажралиб туради: 1 чўққи фракцияларида ТМВ, 2 чўққи фракцияларида бодринг мозаикаси вируси ва учинчи чўққида ҳужайрани нормал қисмлари (пигментлар, оқсиллар бўлиб уларнинг м.м. 300000 атрофида).

Демак, табиатда учрайдиган ўсимликлардаги вирус аралашмаларининг молекула массалари фарқланса, уларни бир—биридан ва ҳўжайин ўсимлигининг қисмларидан гельфильтрация методида ажратиш мумкин.

12—машғулот

Гранулаланган 1% ли агароза колонкасида ТМВ ва унинг РНК си сунъий аралашмасини ажратиш

Машғулотдан мақсад. Гельфильтрация имкониятини кенглигини кўрсатиш, буфер ва ион кучи, хроматография колонкасининг ўлчами ва гельнинг концентрацияларини мувофиқлаштириб вирус РНК сини (м.м. $1\ 10^6$) унинг вирусидан (м.м. $40 \cdot 10^6$) ҳам ажратиш мумкинлиги билан таништириш.

Керакли материаллар. 8—машғулотда ишлатилган материаллар ҳамда: 1. Хроматография колонкаси—1,8x90 см; 2. Элюент 0,01 М ЭДТА, 0,02% ДДС, 0,1 М NaCl, pH 7,5; 3. ТМВ—10 мг; 4. ТМВ нинг РНК си—1 мг.

Ишнинг бориши. Гранулаланган 1% ли агароза колонкасида олиб борилади. Колонка 0,01 м ЭДТА , 0,02% ДДС, 0,1 м NaCl ли эритма билан ювилиб тайёрлангандан сўнг унга 1,5 мл ТМВ (10 мг) ва ТМВ РНК си (1 мг) нинг сунъий эритмасини колонкасига солинади ва улар колонкадаги гельга шимдирилгандан сўнг элюент билан ювилади. Аралашманинг бир-биридан ажралганлигини А 260/280 бўлган нисбатини ўзгаришига қараб фикр юритилади. Натив (табий) ТМВ нинг 260/280= 1,2, ТМВ РНК синики 260/280=2,0 га тенг.

Бу моддаларнинг самарали бўлиши элюент сифатида катта ион кучига эга бўлган буфер ишлатилганда кўринади, чунки ион кучи юқори бўлганда, РНК компакт структурага эга бўлади ва сунъий аралашмада колонканинг "эркин ҳаж-мида" ҳаракатланаётган ТМВ дан ажралиб у 1% агароза гранулаларига диффузланади ва гельфильтрация жараёни натижасида у ТМВ дан сўнг ювилиб чиқади. Агар элюентни ион кучи ўта паст бўлса, РНК структураси ўзгаради ва ёйилган ҳолда бўлиб, у ТМВ каби у билан бирга "эркин ҳаж-мда" ҳаракатланади. Демак, элюент ион кучини оширганда РНК иккинчи чўққи фракцияларида бўлади. Иккинчи фракция билан N. glutinosa баргларини механик усулда касаллантирилганда ўсимликдаги ҳосил бўлган некрозлар тажриба вақтида рибонукеаза ферменти фаоллиги йўқлигидан дарак беради.

13 – машғулот

Тамаки мозаикаси вирусининг қисман тозаланган препаратини уларнинг и.э.н. да олиш

Ишдан мақсад. Вирусни тезкорлик билан pH ўзгаришига асосланиб қисман тозаланган препаратини олиш билан таништириш.

Керакли материаллар.

1. ТМВ билан касалланган тамаки барги (500 г) 0,1 М фосфат буфери, pH 7,0–7,5 2. 0,1М, 1 М HCl, 3. 0,1 М., 1 М Na OH, 4. pH-метр, 5. N. glutinosa, 6.Эксикатор, 7.Хлороформ ҳамда вирус экстракциясида ишлатиладиган асбоб-ускуна ва идишлар.

Ишнинг бориши. Тамаки мозаикаси вируси билан ка—салланган ўсимлик ширасини юқорида айтилган усулларда ажратиб олинади ва уни хлороформ ёки бутанол ёрдамида яна ишлов бериб, центрифуга ёрдамида тиниқлаштирилиб, вирусли экстракт ажратиб олинади. Сўнгра унга 1 н HCl дан қўшиб доимо аралаштириб турилади. pH ни 5,0—5,5 га келгунча индикатор қоғоз билан текшириб борилади.

Энди 0,1 н HCl ёрдамида pH 4,5 га туширилади, бу босқичда pH—метрдан фойдаланилади.

4,4—5,5 орасида оҳисталик билан кислота томизган маъқул, акс ҳолда вирусли экстрактнинг маҳаллий участка—сида pH кескин пасаяди ва балласт оқсиллар билан бирга вирус ҳам изоэлектр ҳолатга келиб чўкиши мумкин. pH 4,5 га тенг бўлганда суспензиядан чўкмага ўтадиган ҳужайра балластларини 3—5 минг айл/ тезлигида центрифуга ёрда—мида 3—5 минг айланиш тезлигида 20 минут айлантириб ташланади. Чўкма усти суюқлигини 0,1 н HCl билан pH 3,5 гача нордонлаштирилади. Бу pH да ТМВ зарралари изо—электрик ҳолатга ўтади, агрегатлар пайдо бўлади ва аралаш—тирилганда сезиладиган даражада игнасимон паракристаллар ҳосил бўлади. Натижада эритма ипаксимон ялтирайди. Эритмани совуқхонада тўлиқ кристалланиши учун кечасига қолдирилади. Эртасига вирусли экстракт солинган стаканга ташқаридан назар солинса, унинг тубида вирусли чўкма яққол кўзга ташланади. Вирусли чўкмани 6000 айланиш тез—лигида 20 минут давомида центрифугалаш билан ажрати—лади. Чўкмани 0,01 М фосфат буферида эритилади. Эритиш учун ишлатиладиган буфернинг миқдори энг биринчи ви—русли материални экстракция қилиш учун ишлатилган бу—ферни 1/10 миқдорини ташкил қилади. Демак, вирус 10 марта қуюқлашади.

Вирусли эритмани 0,1 NaOH билан pH—7,0—7,5 гача кўтарилади (pH индикатор қоғоз ёрдамида назорат қилиб борилади). Сўнгра эритма 15—18 минг айланиш тезлигида 10 минут давомида центрифуга қилиниб, эримаган чўкма узоқлаштирилади.

Сўнгра вирусни иккинчи марта қайтадан чўктирилади. Вирусли суспензияни 0,1 н HCl билан эҳтиёткорлик билан муттасил аралаштирилган ҳолда pH 3,5 гача нордонлашти—рилади (pH диққат билан pH—метрда назорат қилиб бори—

лади). Вирусли экстрактни тўлиқ кристалланиши учун муз — ваннасида ёки музли ҳаммомда 1 соатга қолдирилади. Чўкма минутига 6000 айланиш тезлигида 20 минут давомида цен — трифуга қилинади.

Тиниқ чўкмаусти суюқлигини ташлаб юборилади, чўк — мадаги вирус кристаллари 15—20 мл 0,01 М фосфат буфе — ридa (pH 7,5) эритилади. Суспензия эҳтиёткорлик билан pH 7,5 гача ишқорийлаштирилади. Сўнгра минутига 15—18 минг айланиш тезлигида 10 минут давомида центрифуга қилинади. Чўкма 5—6 мл 0,1 М фосфат буфери билан ювиб ташланади ва центрифуга қилинади. Ювинди сувлар одатда асосий вирусли эритма билан бирлаштирилади.

Юқоридаги усуллар билан тозаланган вирус бошқа ме — тодлар билан охиригача тозаланади.

Катта ҳажмдаги (бир неча литр) вирусли эритмани и.э.н да чўктирилганда, чўкма усти суюқлигини чўкмадан сифон ёрдамида ажратиш мумкин.

14 — машғулот

Тамаки мозаикаси вирусини туз ёрдамида чўктириб қисман тозаланган препаратини олиш

Ишдан мақсад. Юқори ион кучига чидамли вирус — ларни аммоний сульфати ёрдамида қисман тозалаш методи билан таништириш.

Керакли материаллар. 1. ТМВ билан касалланган та — маки барги (500 г), 2. 0,1 М фосфат буфери, pH 7,0—7.5, 3. 0,1 н HCl, 4. 0,1 н NaOH, 5. ЭДТА, 6. Аммоний сульфати, 7. Хлороформ, 8. Вирус экстракциясида ишлатиладиган асбоб — ускуна ва идишлар.

Ишнинг бориши: 8—машғулотда экстрация қилиниб, хлороформ билан ишлов берилиб тозаланган вирус экс — трактига 20% аммоний сульфати солиниб яхшилаб аралаш — тирилади. Сўнгра 30 минут давомида совуттичда тутилади, чўкмага талайгина балласт моддалар тушади. Уларни мину — тига 3 минг айл/тезлигида 20 минут давомида центрифуга қилинади. Чўкма усти суюқлигига 25% гача аммоний суль — фати солинади ва яхшилаб аралаштирилади ва яна 60 минут

кристаллар ҳосил бўлиши учун сақланади. Инкубация вақтида вирус паракристаллари ҳосил бўлиши жараёнида ипаксимон ялтираш пайдо бўлади.

Вирусли идиш вирус тўлиқ кристалланиши ва чўкиши учун кечасига совутгичда қолдирилиб кетилади. Эртасига сифон ёрдамида чўкма усти суюқлиги ажратилади. Қолган чўкмадаги вирусли суспензия минутига 6—8 минг айланиш тезлигида 15—20 минут центрифуга қилинади ва чўкма 100 мл 0,01 М фосфат буферига, pH 7,5 0,005 М ЭДТА солинган эритувчида эритилади. Сўнгра тозалашнинг кейинги босқичида — диализ қилинади. Бу жараёнда вирусли сус—пензия таркибидаги ионлар йўқотилади, ҳамда ўсимликни кўпгина моддалари денатурацияланиб эримайдиган ҳолатга ўтади.

Диализ қопчасига вирусли суспензияни солингандан сўнг уни 3—5 литрли сув ёки буфер эритмаси тўлатилган идишга тушириб қўйилади. Сувли идиш магнитли айлан—тиргичга ўрнатилади. Диализ 24 соат давомида олиб борилиб, шу даврда 3 марта диализ суви (буфер) алмаширилади. Диализ тугагандан сўнг препарат 10 минут 15—18 минг айл.тезлигида центрифуга қилинади. Чўкма ташлаб юбори—лади. Вирусли эритмани (чўкмаусти суюқлиги) қайтадан 25% ли сульфат аммоний билан чўктирилади ва 20—30 минутдан сўнг 20 минут давомида 6 минг айл тезлигида центрифуга қилинади. Чўкмаусти суюқлиги ташлаб юборилади, чўкмали стакан эса тоза фильтр қоғози устига (тузли эритма оқиб тушиши учун) тўнтариб қўйилади. Сўнгра чўкмани 20 мл 0,01 М фосфат буферида (pH 7,0—7,5) эритилади ва 15—18 минг айланиш тезлигида центрифуга қилиниб, эримаган қисм ажратиб ташланади.

Шу усулларда ажратиб олинган қисман тозаланган препарат энди бошқа усуллар билан тўлиқ тозаланиши мумкин.

15 — машғулот

ТМВ нинг дифференциал центрифугалаш методи билан тоза препаратини олиш

Ишдан мақсад. Ҳар хил тезликда моддаларни чўкмага тушишига асосланиб вирусларни тозалаш усули билан таништириш.

Керакли материаллар. Препаратив ультрацентрифуга ва унинг роторлари, пробиркалари, шприц ва вирус тозалашнинг бошқа методларида ишлатилган материаллар ва х.з.лар.

Ишнинг бориши. Центрифуганинг яхшилаб ювилиб қуритилган пробиркаларига вирусли эритма (8—машғулотдаги "намуна тайёрлаш" бўлимига қаралсин) центрифуга қопқоғидаги қараш тешикчасигача қуйилади, сўнгра пробиркалар тарози ёрдамида тенглаштирилади ва қопқоқлар аввал қўл билан, сўнгра махсус "калит—мослама" билан ёпилади. Пробиркаларнинг тенглиги қайта торозида текширилади, сўнгра бурама қопқоқлари билан герметик ёпилади (агар пробиркаларнинг бири оғирроқ бўлса, баробарлаштириш учун шприц ёрдамида эритмадан қўшилади).

Пробиркалар центрифугани роторига бир—бирига қарама—қарши қилиб қўйилади. Ротор зич қилиб қопқоқ билан ёпилади ва ультрацентрифуга камерасига жойлаштирилади (ультрацентрифуга роторини ўрнатиш ва центрифугани ишлатиш оператор томонидан бажарилади) Центрифугалаш 90 минут давомида 105 000 g да центрифугаланади.

Ультрацентрифуга тўхтагандан сўнг, ротордан пробиркаларни чиқариб олинади, пробирканинг энг тагида озгина жигарранг вирус чўкмаси ва чўкма усти суюқлиги кузатилади. Чўкма усти суюқлигини тўкиб ташланади, вирус чўкмасини эса озгина 0,01 М трис—HCl буферида (pH—7,6) эритилади. Агар вирус яхши тозаланган бўлса оқ—ҳаворанг "опалесценция" кузатилади. Эритмани 15—18 минг айл. тезлигида центрифугаланади ва эримаган қисмидан ажратилади. Эримаган чўкмани яна бир марта 1—2 мл буфер билан эритиб, чўктириб, чўкмаусти суюқлигини асосий вирус эритмасига қўшилади ва сақланади.

Шу дифференциал центрифугалаш циклини 3—4 марта қайтариб етарлича тозаланган вирус препарати олинади.

Вирусларнинг ўлчамлари (10—600 нм) ва зичликлари шундайки, агар уларга марказдан қочма кучини 30000 дан 200000 g таъсир эттирилса, вирус зарралари чўкмага тушади. Шу мақсадда препаратив ультрацентрифугаларнинг ротор—

ларини минутига 50000—60000 марта айланадиган центри—фугалари ишлатилади. Энг машҳурларидан Hitachi MSE фирмасининг Spinco L 2 ва Spinco L 50, Super—Speed—25, Super—Speed—40, Super—Speed—50, ГДР нинг Vac—40, Vac—60 центрифугалари ишлатилади. Улар ротор тўпламла—рига эга. 1500 мл суюқликни 59000 да айлантирадиган ро—торлардан 80—100 мл суюқликни 200000 g гача айлантира—диган роторларга эга.

Дифференциал центрифуга усулида вирус тозалаганда вирусни суспензиядан чўктирилади, бошқатдан суспензия ҳолатига ўтказилади, совуқда магнит айлантиргичида чайқатилади ҳамда паст тезликда центрифугаланади (6000 g, 30 мин). Бу жараённи бир неча марта қайтариш мумкин.

Ҳайвон вирусларини, бактериофагларни бир цикл дифференциал центрифугалаш билан тозалаш қийин бўлади. Бунда аввал ҳар хил усулларда (м., ионалмашиш хромато—графияси) вирус тозалаш босқичларидан ўтиб, вирусни катта ҳажмли суюқликдан кичик ҳажмга ўтказишда ишлатилиши мумкин. Ўсимлик вирусларини тозалашда бу метод яхши самара беради.

16 – машғулот

ТМВ нинг "сахароза градиенти концентрациясида центри—фугалаш" усулида тозалаш

Сувда яхши эрийдиган кимёвий инерт моддалар гра—диенти концентрациясида центрифугалаб макромолекулалар аралашмаларини (вируслар, нуклеин кислота) фракцияларга ажратиш мумкин. Бундай моддаларга сахароза, глицерин, рубидий ёки цезий тузлари, поливинилпирролидон кабилар киради.

Бу методларни асосий принципи шундан иборатки, се—диментация тезлиги билан фарқланадиган аралашма қисмлари марказдан қочма куч таъсирида центрифуга про—биркасида бошқа—бошқа ўз седиментация коэффицентига тенг бўлган сахароза градиентининг жойига кўчиб ўтади. Центрифугалаш натижасида фракцияларга ажратилаётган моддаларнинг дискрет зоналари ҳосил бўлади. Сахарозанинг ёпишқоқлиги зоналарга ажралган қисмларни стабиллашти—

риб аралашиб кетишидан сақлайди. Вируслар пробирканинг маълум қисмида зона ҳосил қилади, бу пробиркани нур таъсирида қоронғу хонада кузатилса вирусли зона яққол оппоқ бўлиб кўринади.

Маркер моддаларини (коэффиценти седиментацияси аниқ бўлган макромолекулалар) ишлатиб туриб сахароза градиенти концентациясида ноаниқ вируснинг тахминий седиментацияси коэффицентини аниқлаш мумкин. Қуйидаги мутаносибликдан фойдаланилади:

$$\frac{S_x}{S_y} = \frac{d_x}{d_y}$$

S_x ва S_y — седиментация коэффицентлари,
d_x ва d_y — градиентни тепа сатҳидан центрифуга жараёнида ўтилган масофа.

Бу усулда центртифугаланганда энг аҳамиятли нарса бу роторни танлашдир. Препаратив ультрацентирифуга — лар ичида энг қулайи "Spinco" L модели центрифугалари — дир. Улар ҳар хил хажмдаги роторлар билан таъминланган. Сахароза концентрацияси граднентида ишлатиш учун осма стаканларга (пробирка) эга "бакет — роторлар" (Swinging Bucket Rotor ёки SW) ишлатилади, қуйида уларнинг баъзи типлари берилган (9 — жадвал).

9 — жадвал

"Spinco" (модел L) центрифугасининг баъзи роторларининг тавсифи

"Spinco" L центрафугасининг осма стаканли (бакет — роторли) роторларининг баъзи типлари				
Ротор типи	Максимал айланиш тезлиги мин/ айл	Максимал тезланиш X_g	Про — бир — калар сони	Про — бир — калар ҳаж — ми, мл
SW — 65 T	65000	249000	3	5,0
SW — 50,1	50000	300000	6	5,0
SW — 41 Ti	41000	286500	6	13,2
SW — 40 Ti	40000	284000	6	14,0
SW — 36	36000	193000	4	13,5

SW—27,1	27000	135000	6	17,0
SW—27	27000	131000	6	38,5
SW—25,1	25000	90000	3	34,0
SW—25,2	25000	107000	3	60,0

Керакли материаллар: а) асбоб ускуналар: ультрацентрифуга "Spinco", бакет—ротор SW—27 ва унинг пробиркалари (38,5 мл ҳажмли), штативлари, градиент тайёрлаш учун керакли аралаштиргич, томчилатиб фракцияларга ажратишда ишлатиладиган қурилма, фракцияларни йиғишда ишлатиладиган пробиркалар (35 донадан кам миқдорда бўлмаган), спектрофотометр ёки "Увикорд" типидаги спектрофотометр.

б) Реативлар: 0,1 М ацетат буфер, pH 5,0, 5% ва 20% 0,1 М ацетат буферида (pH 5,0) тайёрланган сахароза эритмаси;

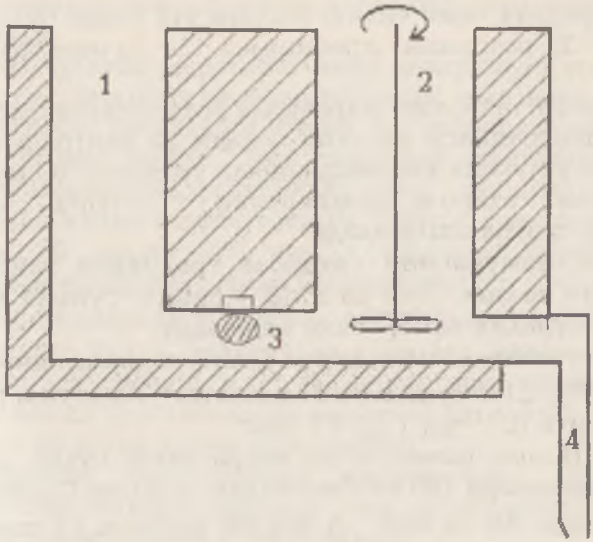
в) Вируслар: ТМВ ва ялтирбош мозаикаси вируслари—нинг тоза препаратлари.

Ишнинг бориши. Сахароза эритмасини "линияли" концентрацияси градиентини тайёрлаш. Тайёрланадиган сахароза градиентининг концентрацияси тадқиқ қилинадиган объектининг молекула массаси, зичлиги ва шунга ўхшаш кўрсаткичлари рол ўйнайди. Центрифугалаш муддати ҳам катта аҳамиятга эга.

Қуйидаги 7—расмда "линияли" концентрация градиенти тайёрлашда ишлатиладиган қурилма кўрсатилган.

Қурилма одатда шаффоф сунъий шишадан (плексиглас) дан тайёрланади. Қурилма иккита бир—бири билан туташ идишдан иборат бўлиб, улар пастки қисмидан бир—бирлари билан туташтирилган бўлади. Идишлардан бири аралаштиргичлик вазифасини бажаради ва у аралаштиргич билан таъминланади. Иккинчи идиш бўлиб тургич идишлик вазифасини бажаради. Иккала идишни тўлатиш вақтида идишлар орасидаги ҳўмрак ёпиқ ҳолатда бўлади.

Бу қурилма ёрдамида концентрацияси катта бўлган сахароза эритмаси резервуардан келаётган концентрацияси паст бўлган сахароза эритмаси билан узлуксиз аралаштириб борилади ва секин аста ажратгич қувур орқали центрифуга пиробиркасида тўпланади. Агар иккала идиш ҳажми тенг бўлса, сахарозанинг линияли градиенти ҳосил бўлади.



7 – расм. "Линияли" концентрация градиентини тайёрлашда ишлатиладиган қурилма: 1 – резервуар, 2 – аралаштиргич, 3 – жўмрак, 4 – ажратадиган труба.

5 – 20% линияли градиент тайёрлаш тартиби:

1. Икки идиш орасидаги жўмракни ёпиш. Аралаштиргичдаги эритма оқиб кетмаслиги учун ажратгич турубани ёпиш ёки кўтариш керак.
2. Аралаштиргич идишга 20% ли сахароза қуйилади.
3. Жўмрак очилиб, икки идиш орасидаги труба 20% ли сахароза эритмаси билан тўлдирилади.
4. Жўмрак ёпилади ва идишларни бирига 5% ли сахароза эритмаси қуйилади.
5. Икки идиш орасидаги жўмрак очилади ва аралаштиргич ишга солинади ва унинг тезлигини экспериментал равишда аниқланиб, 5% ва 20% сахароза эритмаларини оптимал аралаштирадиган қилинади.
6. Ажратгич қувурча очилади пастга туширилади ва аралашма пробиркага туша бошлайди. Қувурча учи пробирка деворига тегиб туриши керак. Унинг учи эритма сатҳидан баландроқ қилиб ўрнатилади.

Сахарозани оқиб чиқиш тезлиги ўта секин бўлиши керак. (SW—27 роторнинг пробиркаси 15—20 минутда тўлиши керак).

Градиент тайёрлаш жараёнида аралаштиргичдаги сахароза концентрацияси пасайиб боради ва центрифуга пробиркасида узлуксиз концентрацияли градиент ҳосил бўлади. Тайёрланган сахароза градиентини 1 суткага совутгичда сақланади, сўнгра ишлатилади.

Вирус намунасини сахароза градиенти тайёрланган пробиркага солиш. ТМВ ва ЯМВ ларининг сунъий аралашмалари намуналик вазифасини бажаради.

ТМВ—тайёқчасимон вирус бўлиб, седиментация коэффиценти $S^0_{20,w}$180 S, Д 260/280 нисбати 1,2 тенг, экстинкация коэффиценти ($E^{0,1\%}_{260,1\,см}$) 2,7 тенг.

ЯМВ (Brome mosaic virus) майда вирус бўлиб, диаметри 25 нм, заррачалари 180 суббирликдан тузилган.Седиментация коэффиценти 90S га тенг. Д 260/280 нисбати 1,7 тенг, Экстинкция коэффиценти ($E^{0,1\%}_{260,1см}$) 5,2 тенг. Бу икки вируснинг седиментация коэффицентлари бир—биридан икки баробар фарқ қилади, демак бу усулда уларни осон ажратиш мумкин.

Бу икки вирусни оптимал pH лари ИЭН ларини солиштириб иккала вирус учун ҳам оптимал бўлган pH ни танланади. Чунки ЯМВ, муҳит pH— и 7 га тенг бўлса, осон парчаланиши мумкин. Шунинг учун сахароза градиентини муҳит pH— и 5 га тенг қилиб 0,1 М ацетат буфери ёрдамида тайёрланади.

Градиент тайёрланган пробиркага 1 мл 0,1 М ацетат буферида (pH 5,0) эритилган ТМВ (1 мг) ва ЯМВ (1 мг) аралашмаси солишда учи ингичка пипеткадан фойдаланилади ва унинг учи пробирка четига текизиб турилади ва вирус аралашмаси оҳисталик билан солинади.

Центрифугалаш олдидан пробиркаларнинг оғирликлари тенглаштирилади ва уларни бакет роторнинг осма стаканларига жойлаштирилади. Стаканлар қалпоқчалар ёрдамида зич қилиб ёпилади, сўнгра роторга маҳкамланади. Роторни центрифуга ўқига ўрнатилади ва минутига 25000 айл.тезлигида 1,5 соат давомида центрифугаланади. Центрифугалангандан сўнг ҳосил бўлган фракцияларни пипетка ёки

шприц ёрдамида ёки автоматик аппаратура ёрдамида ажратиб олинади.

Фракцияларни ажратиб олишда центрифуга пробиркасини махсус штативга жойлаштирилади, штативга аввалдан шприц игнаси ўрнатилган бўлиб у, пробирканинг тагини тешишга ёрдам беради. Таги тешилган пробиркадан игна орқали томчилаётган фракциялар қатор пробиркаларга 10—20 томчидан қилиб йиғиб олинади. Сўнгра спектрофотометр ёрдамида УБ нурни 260 нм да ютишига қараб талқиқ қилинадаган фракцияларнинг концентрацияси ўлчанади. Ҳар бир зонанинг вирусли чўққисида Д260/280 нисбати ўлчанади.

Абсцисса ўқида фракциялар сони ёки миқдори, ордината ўқига эса 260 н даги оптик зичлигининг қиймати ёзилади. Графикда фракцияларга ажратиш йўналиши пробирканинг таг ва устки қисми кўрсатилади.

Автоматик фракцияларга ажратилганда фракциялар пробирканинг тагидан йиғилади, ёки пробирканинг устидан махсус капилляр ёрдамида ажратилади.

Иккала ҳолатда ҳам пробиркадан олинадиган фракциялар спектрофотометр кюветасидан ўтиб УБ—нурни ютиши ўлчаб борилди

17 – машғулот

ГМВ ни биоспецифик хромотография усулида тозалаш

Ишдан мақсад. Вирусларни махсус синтезланган сорбитлар ёрдамида тозалаш билан таништириш.

Керакли материаллар ва уларни тайёрлаш. Полиамид гранулаларидан биоспецифик сорбент тайёрлаш учун П—6 маркали полиамид кукуни (2х2 мм) олинади.

Полиамид кукуни тўқимачилик комбинатидаги чиқинди капронлардан тайёрланади, уларни концентрланган хлорид кислотада (d=1,17) эритиб (1 кг капрон матосига 2,5 л хлорид кислота ҳисобида), унга 0—50 ҳажмда ацетоннинг сувли эритмаси 1 л/г тезликда аралаштирилган ҳолда қуйилади. Полиамид чўкмаси декантация йўли билан ажратиб олинади, сўнгра Бюхнер воронкасида фильтрланиб, ҳавода

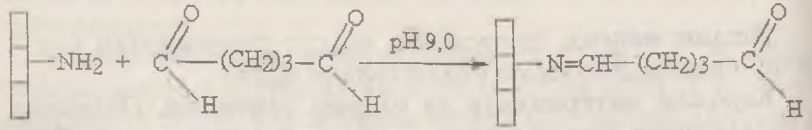
қуритилади ва эланади (0,14, 0,25, 0,5, 1 мм тешикли элаклар ишлатилади.)

Полиамид гранулаларини фаоллаштириш учун уларни 3,0 н хлорид кислотада 45^0С да 2 соат давомида инкубация қилинади (1:2 нисбатда). Сўнгра полиамид гранулалари ав— вал сув билан, сўнгра 0,1 М борат буфер (рН 8,5) билан ювилади.

Бу гранулалар лиганд реакцияга қобилиятли аминогу— руҳларга эга. Биоспецифик сорбентни синтезлашда худди шу гуруҳларни лиганд билан бириктирилади. Бириктириш бифункционал бирикмалар (глутар альдегид) орқали амалга оширилади.

Бу бирикманинг полиамидга бирикиши хона ҳароратида олиб борилади. Шифф реакцияси асосларини ҳосил қилиш принципида ишқорий муҳитда (рН 8,0—9,5) олиб борилади. Реакция модифиткатор иштирокида боради. Модификация қилиш қуйидаги тартибда олиб борилади: фаоллаштирилган полиамид гранулаларига 0,1 М борат буфери (рН 9,0) соли— нади, сўнгра 6 марта кўп ҳажмда глутаральдегид (1 г сор— бентга 2,5% ли глутар альдегиддан 3.14 мл) солинади. Сўнгра кечасига муттасил аралаштирилган ҳолда қолдирилади. Ре— акцияга кирмаган глутар альдегидни 4 марта суюлтирилган буфер билан ювиб ташланади.

Полиамид гранулаларини глутардиальдегиди билан мо— дификация қилиш қуйидагича боради.



Сўнгра бу модификацияланган полиамидга лиганд (АТ) уланади, янги тозаланган антителодан 10 мг солиб 2 сутка совутгичда муттасил аралаштирган ҳолда қолдирилади. Энди модификацияланган капронга ТМВ антителаси бирикади (Шиффа реакцияси асосида) лизин амина гуруҳи орқали бирикмаган ортиқча антителолар сўриб ташланади, полиамид эса 30 марта ошиқ хажмдаги 0,1 М борат буфери (рН 9,0)

билан, сўнгра 20 марта ошиқ хажмдаги шу буфер билан ювилади.

Очиқ қолган эркин альдегид гуруҳларини блоклаб қўйилади. Бунинг учун биоспецифик сорбентга моноэтаноламин (МЭА) солинади (1г полиамидга 0,36 мл МЭА солинади ва муттасил аралаштирилган ҳолда) 2 сутка давомида қолдирилади. МЭА нинг ортиқчаси 10 марта кўп хажмдаги 0,1 М борат буфер (pH 8,5) билан ювилади.

Биоспецифик сорбентга вирусни сорбциялаш. Биоспецифик сорбентга (поламид гранулага диальдегид орқали бириктирилган антитела) ТМВ ни сорбциялаш ва сўнгра десорбция қилиб тозалаш учун хроматографик колонка (0,7x7 см) сорбент билан тўлатилади ва 0,05 М трис—HCl, 30 мМ $CaCl_2$, 5% этиленгликоллик сорбциялаш буфери билан тўйинтрилади, сўнгра колонкага 10 мг (1,5 мл) тоза ТМВ солинади. Ушбу колонка сорбциялаш буфери билан ювилади (6 мл/соат), фракциялар 3 мл дан тўпланади. Адсорбцияланмаган вирус спектрофотометр ёрдамида ўлчанади. Колонка ювилаб юмилгандан сўнг колонка сорбцияланган вирусни 0,05 г трис—HCl, 1 М KCl ва 0,015 М ЭДТА солинган буфер ва pH градиенти 7,5 дан то 11,0 бўлган десорбцияловчи эритмада десорбция қилинади. Эритма pH ини 0,1 н ли Na0H билан оширилади. Десорбция қилиш бошланганда аввал колонкадан вирусни адсорбцияланган қисми ювилиб чиқади. Лекин аста pH ни ошириши натижасида вируснинг сорбентга сорбцияланган қисми десорбцияланиб чиқади. Десорбцияланиш максимуми pH 10,5—11,0 да кузатилади, яъни вируснинг асосий қисми ювилиб чиқади. Спектефотометрда УБ—нурларни 260 нм да ютиши, N. glutinosa ўсимлигида некрозларни ҳосил бўлиши колонкадан pH градиентига ТМВ десорбцияланганини кўрсатади.

Тоза вирус препарати билан юқоридаги услуб ёрдамида сорбентли колонка калибрланади (аниқ бир ўлчамга келтирилади).

ТМВ билан касалланган ўсимликлардан биоспецифик хроматография усулида тоза вирус ажратиш

Вирусли материалга н—бутанол (8%) билан ишлов берилгандан сўнг, вирусли экстракт 6000 молекула массали полиэтилен гликол (4%) ва 1,5 М ош тузи ёрдамида концентрацияси оширилади,

Колонкага 1 мл вирусли намуна солинади ва сорбция-ловчи буфер (0,05 М трис-HCl+5%этилингликол +30 мМ $CaCl_2$) билан у ювилади.

Ювиш жараёнида элюатлар 3 мл дан қилиб йиғилади ва спектрофотометрда 260 нм га УБ- нурини ютишга асосла-ниб элюция графиги чизилади. Колонкани яхшилаб жигар-ранг тусли пигментлар кетгунча ювилади. Колонкага ад-сорбцияланган вирусни десорбцияловчи буфер (0,05 М трис-HCl+0,1 М NaCl+0,015 М ЭДТА, pH 5,0) билан юви-лади. Олинган фракциялар 260 нм да УБ-нурларни макси-мал бтйш хусусиятига эга. Шу фракциялардаги Д 260/280 нисбати 1,20-1,25 га тенг бўлади. Электрон микроскопда мазкур фракцияларни анализ қилиш уларда тайёқчасимон вирус зарралари борлигини кўрсатди. Унинг юқумлилигини N. glutinasa баргларида аниқланади (1 баргда 16-18 некроз). Демак, аффин хроматография усулида ҳам вирусларни то-залаш имконияти мавжуд экан.

Адабиёт

1. Ваҳобов А.Ҳ. Характеристика наиболее распространённых фито-вирусов в экологических условиях Узбекистана. Дис.док. наук. Ташкент, 1989, 344 с

18 - машғулот

ТМВ ни полиакриламид гели (ПААГ) колонкасида элек-трофорез усулида тозалаш

1975 йили Паул (Paul, 1975) полиакриламид гелидаги электрофорез ёрдамида картошка А, М, У вирусларини, бақлажон мозаикаси вирусини, турнепсни сариқ мозаикаси вирусларини аниқлади, Георг ва Алтман (Georgy, Altman, 1971) эса бу методни мевали дарахтлар вирусларини диаг-ностика қилишда ишлатишди. Бунинг учун вирусли намуна-ни майдалаб, ундан олинган вирусли эритмани трис-HCl буферида эритиб, гельфильтрация қилиб, уни концентрлан-ди. Концентрланган вирус 4% ли полиакриламидда электро-форез қилинади (полиакриламид гелининг 3,75% ва ундан

паст концентрацияларининг юмшоқлиги сабабли уларни ишлатиш мумкин эмас). Поликариламиднинг 4,5,6,7—% ли гелларн мустаҳкам бўлишига қарамасдан пораларининг ки—чиклиги сабабли вирусдан ташқари ҳужайра таркибидаги моддаларни ҳам тутиб қолади. Шу сабабли улар вирус тоза—лашда ишлатилмайди. Кичик малекулали оқсиллар трубкада осон ҳаракатланади, вируслар эса нисбатан катта молекула массасига эга бўлганликларидан гел ичига 1 см гагина кира—дилар холос. Оқсилларни фракцияларига ажратишда ишла—тиладиган гелларга 5—6% вируслар умуман кирмайдилар.

Қора амид буёғи билан бўялганда гел пробиркасининг тагида ҳужайранинг нормал оқсилларидан ташкил топган битта зона ҳосил бўлади. Демак, вирусларни ва нормал ҳу—жайра оқсилларини фракцияга ажратишда, сифат реакцияси ўтказишда ПАЛГ электрофорезидан фойдаланиш мумкин.

Бу методнинг имкониятларини янада кенгайтириб, унда ишлатиладиган гел концентрациясини пасайтириб (пора—ларни кенгайтириб) вирус тозалашда ишлатиш мумкин.

Ишдан мақсад. Полиакриламид тўлатилган колонкада вирус тозалаш мумкинлигини кўрсатиш.

Керакли матеғиаллар. Совутиш мосламасига эга хро—матография колонкаси (20х2 см), спектрофотометр, универ—сал ток манбаи, 30%—сахароза, 4% полиакриламид, 0,05 М фосфат буфери, диализ мембранаси.

Ишнинг бориши. Вериткал қилиб ўрнатилган хромато—графия колонкаси электрофорез ўтказиш учун 4% ли ПААГ оҳисталик билан тўлатилади. Гель полимерланганидан сўнг, аввалдан тайёрланган анод ва катод идишлари буферлар билан тўлатилиб, улар электрофорез ўтказилган колонкага улашга тайёрланади. Колонкага 40 мг қисман тозаланган вирус солинади ва у катод идишига уланади (8—расм) элек—трофорезгача бўлган ҳолат). Сўнгра ток манбаига уланиб ток кучи берилади. Электрофорезни 1—3 соат давомида ўтка—зилади. Электрофорез тугагандан сўнг, гел устидаги вирус минимал буфер билан эритиб олинади.

Электрофорез жараёнида ҳужайранинг нормал қисмлари вирусга қараганда старт нуқтасидан тезроқ ҳара—катланиб сахарозадан (8—расм, 2 зона) ва гелдан 3 соат ичида ўтиб кетадилар ва колонканинг 20—25 см лик ора—лиғида зонасида тор зона ҳосил қилади (8—расм, 4 зона). Бу

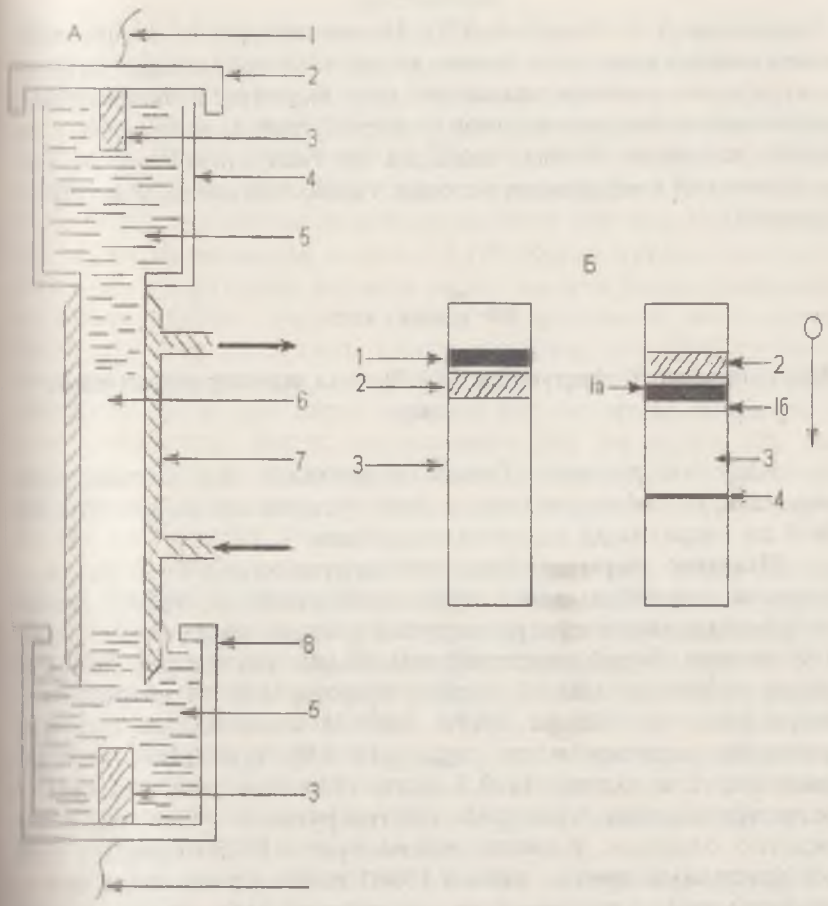
муддатда вирус зарралари ҳам сахарозадан осон ўтиб, гел колонкаси юзасида тўпланади.

Маълум қисм вирус зарралари (10% гача) гельга киради (8 — расм 1 б).

Электрофорез тугаши билан колонка анод ва катод идишлари ажратилади, гел колонкаси устидаги вирус 2 мл буфер билан эритиб олинади (буфер солиб эритиш 3 марта қайтарилади). Гелга кирган вирусни ажратиш учун гел 1 см дан қилиб кесилади ва ҳавончада фосфат буфери билан эзилади, сўнгра вирус гелдан фильтрланиб ажратиб олинади. Гел устидан ажратиб олинган (1 а) ва гелга кирган вирус — ларни (1 б) электрон микроскопда кўрилганда уларни тайёқчасимон вирус зарралари эканлиги аниқланади.

Олинган вирус УБ — нурларни 260 нм да максимум ютади, А 260/280=1,2 коэффицентни кўрсатади. Вирусларни N. glutinosa га юқтирилганда барг сатҳида 40 — 65 та нек — розлар ҳосил бўлади.. Иккиёқлама иммунодиффузия усулида текширилганда вирус антигенлик хусусиятини сақлаб қолади.

ПААГ электрофорези билан стабил вирусларни муваф — фақиятли тозалаш мумкин.



8 – расм. Полиакриламид гелида препаратив электрофорез ўтказиладиган приборнинг схемаси (А) ва унда вирус тозалаш (Б)

А. 1 – ток манбаи,
2 – қопқоқ,
3 – платина электроди,
4 – анод идиши,
5 – электрод буфери,
6 – полиакриламид гели,
7 – совутадиган сув,
8 – катод идиши,

Б. 1 – вирус ва ҳужайра қисмлари, (электрофорезгача бўлган ҳолат),
1 а – гел устидаги вирус,
1б – гел ичидаги вирус,
2 – сахароза (30%),
3 – полиакриламид гели (4%),
4 – ҳужайра қисмлари.

Адабиётлар.
1.Пармонов А.Т., Ваҳобов А.Ҳ., Исамухамедов М.З. Дополнительная очистка казахского штамма вируса табачной мозаики методом электрофореза в полиакриламидном геле. Биология, культирование и использование микроорганизмов (бактерий, грибов, водорослей) в народном хозяйстве. Тезисы докладов III Республиканский научно-теоретической конференции молодых учёных-микробиологов .1983 г. Ташкент.

19–машғулот

Картошкани Х–вирусини (КХВ) тоза препаратини ажратиш

КХВ ни дўрмон (Datura stramonium L.) ўсимлигидан ажратилади. Материаллар, асбоб–ускуналар ва реактивлар ТМВ ни ажратишда ишлатилгандагидек.

Ишнинг бориши: Вирусли намуна худди ТМВ ни ажратилган тартибда аввал гўшт майдалагичда буфер билан ((1:1) майдаланади сўнгра вирусли ширага хлороформ билан (1:8) ишлов бериб, центрифугаланади. Экстрация қилувчи буфер сифатида 0,02 М фосфат буфери 0,01 М натрий гипосульфити ва 0,01 М ЭДТА (рН7,5) ишлатилади. Вирусли эритмани вирусни и.э.н сида (рН 4,0) чўктириб ёки бир ҳажм вирусли экстратни 0,5 ҳажм тўйинган аммоний сульфати эритмасида чўктириб центрифугалаб (6000 айл.тезл) ажратиб олинади. Вирусли чўкма трис–HCl буферида (рН 7,6) эритилади, эриган қисми 15000 айланиш тезликда центрифугаланади, эримаган қисми ташлаб юборилади. Чўкма устидаги вирусли эритмадан тоза вирус ажратиш гранулаланган агар гелида хроматография қилиб дифференциал центрифугалаш усули билан ёки сахароза градиенти концентрациясида центрифугалаш усулидан фойдаланиб тозаланади. Натижада 1 кг вирусли намунадан 100 мг тоза вирус ажратиш мумкин.

Вирус зарраларини таркибий қисмларига ажратиш методлари

Вирусларнинг структураларини назарий жиҳатдан ўрганиш учун уларни таркибий қисмларга ажратилади.

Маълумки, вирус зарраси таркибида оқсил ва нуклеин кислота мавжуд. Ундан ташқари, қатор вирусларда (миксовируслар ва ҳакозо) углевод ва липидлар учрайди.

Энг содда тузилишга эга тамаки мозаикаси вирусининг тузилиши билан танишадиган бўлсак, унинг узунлиги 3000А ва эни 180 А га тенг. Вируснинг молекула массаси $40 \cdot 10^6$ га тенг. Вирус таркибида молекула массаси бир хил 18000 бўлган оқсил ва молекула массаси $2 \cdot 10^6$ бўлган нуклеин кислотаси бор. Бу нуклеин кислота вирус оқсили билан муҳофаза қилинади. Вирус зарраси ичида спиралсимон жойлашган битта нуклеин кислотаси, унинг атрофида эса 2200 субъединицалардан ташкил топган оқсил пардаси бор. Оқсил субъединицалар ҳам вирус зарраси ўқи атрофида спиралсимон жойлашган. Вирус заррасининг 95% ни оқсил, 5% эса нуклеин кислота ташкил қилади. Аммо нуклеин кислота миқдор жиҳатдан кам бўлсада, вирус заррасининг хусусиятлари унга боғлиқ бўлади.

Қатор вирусларда нуклеин кислота вирус заррасининг оқсил қобиғидан фазовий ажралган бўлади. Уларга кўпгина ўсимлик вируслари, полиовируслар, Т—гуруҳига мансуб бактериофаглар киради. Бошқа бир гуруҳ вирусларда (миксовируслар, чечак вируслари каби) нуклеин кислота ва оқсил билан мустаҳкам боғланиб ички нуклеопротеид ҳосил қилади. Шунинг учун ҳам вирус зарралари дезинтеграция қилиш ишларида уч хил методда олиб борилади: 1. Нуклеин кислоталарни ажратиш, 2. Оқсилларни ажратиш, 3. Вирусининг ички нуклеопротеидини ажратиш.

Бу мавзудаги тўлиқ маълумотни Киселёв ва Добровларни (1970) адабиётларидан. олиш мумкин. Биз бу ерда улардан фойдаланиб қисқача тавсиф берамиз.

Вирус нуклеин кислоталарини ажратиш

Вирус нуклеин кислотаси вирус заррасининг марказий қисмини эгаллайди, ташқи қисми оқсил қобиқ билан ўралган (Илова-1).

Вирус нуклеин кислотасининг хусусиятларини ўрганиш учун уни вирус заррасидан экстракция қилиб олиш керак. Шу мақсад билан вирус зарраларидаги оқсил пўст орасидаги ҳамда оқсил ва нуклеин кислота орасидаги водород

боғларига, туз боғларига ва бошқа типдаги боғларга таъсир этувчи бирикмаларни қўллаш керак.

1. Юқори ҳароратда тузли эритмалар ёрдамида вирус нуклеин кислотасини экстракция қилиш. Бу усул фитовирусларнинг РНК ларини ажратишда қўлланилади. РНК нинг умумий ажратиш миқдори вирус зарраларининг бир қисмини парчаланмаслиги сабабли анча кам бўлади. Сув хаммомидаги 0,3 NaCl эритмасига охирги концентрацияси 10—15 мг/мл дан оширмасдан ТМВ суспензиясини 100^0С да 1 минут сақланади ва муз ҳаммомига ўтказилади. Совутилгандан сўнг суспензияни 5000—10000 g да центрифуга қилиниб коагуляцияга учраган оқсилдан ажратилади. РНК нинг натрийли тузи совуқ шароитда диализ қилиниб туздан ажратилади ёки этанол билан икки марта чўктирилади.

Авторларнинг кўрсатишича, бу методни модификацияси ҳам бўлиб турнепсни сариқ мозаикаси вируси ва тамакининг халқали доғи вирусларига қўлланилган. Бунда NaClнинг концентрацияси 1 М гача оширилади, вируснинг концентрацияси эса 5—10 мг/мл гача пасайтирилади, қиздириш муддати 35 сек. га камайтирилади. Қолган жараёнлар юқоридагидек бажарилади.

Бу метод ҳайвон вирусларидан грипп ва Раус саркомаси вирусларига қўлланилган. Аввало иккала вирус ҳам хлороформ ва метанол аралашмаси (2:1) билан сўнгра эса н-бутанол ва икки марта эфир билан ишлов берилади. РНК ни ажратиш учун 10% NaCl эритмаси билан 100^0С да 20 минут давомида 1 тадан 3 мартагача экстракция қилинади. Бу методни Фх174 бактериофагидан ДНК ажратиш учун ҳам тадбиқ қилинади.

Бу методни камчилиги 100^0С да қиздириш жараёнида кўпгина вирус РНК лари натив (бирламчи) хусусиятларини йўқотиши, ДНК эса денатурацияга учраши мумкинлигидир.

2. Детергентлар ишлатиш. Аввало методни анчагина ижобий томонлари бор, чунки вирусга 100^0С ли ишлов бериш, кучли чайқатиш каби таъсирлар қилинмайди. Аммо 100% вирус зарралари парчаланмайди, шунинг учун қўшимча фенол билан ишлов берилади. Детергентни ўзи билан ишлов бериб ҳам юқори сифатли тоза ТМВ нинг РНК си ажратилган.

Детергент сифатида натрийнинг додецил сульфати (дюпанол С, ДДС) натрий лаурил сульфат, натрий дезокси—холат, цитримид ишлатилади.

Полиома вирусидан ДНК ажратиш учун вирус диффе—ренциал ва градиент центрифугалаш усуллари билан тоза—ланади. Сўнгра вирус суспензияси ва 10% ли ДДС (pH 7) баробар ҳажмда аралаштирилади ва 2 соат давомида 65^0С иситилади. Аммоний ацетатининг охирги концентрацияси 0,1 М гача қилиб қўшилади ва ДНК ни 2 ҳажм этанол солиб чўктирилади.

Шоп папилломи вирусини ДНК сини ҳам детергент метод билан ажратилган.

3. **Детергент ва туз ёрдамида экстракциялаш** метод—ларини биргаликда қўллаб РНК ажратилади, чунки биргина усулни ишлатилганда нуклеин кислота кам ажралади. Иккала метод биргаликда ишлатилганда РНК миқдори ошади.

Вируснинг сувли эритмасига (10 мг/мл) 1/4 ҳажм 10 % ли ДДС солинади. Аралашма 100^0С да 4 минут қиздирилади, сўнгра муз ҳаммомида совутилади. Детергентни асосий қисмини диализ ёрдамида йўқотилади. Сўнгра охирги кон—центрацияси 1 М бўлгунча NaCl қўшилади. Аралашма 100^0С да 3 мин. иситилади, совутилади, денатурацияланган оқсил центрифугалаб йўқотилади, РНК эса этанол билан чўктири—лади.

4. **Фенол ёрдамида ажратиш.** Бу метод ҳар хил вирус—ларидан нуклеин кислота ажратишда ишлатилади. Вирусли суспензияни сувга тўйинган фенол билан яхшилаб қайнатилгандан сўнг центрифугаланганда аралашмани 2 фа—за ажралганлиги кузатилади. Денатурацияланган оқсил остки (фенол) фазасига ўтади ёки интерфазада чўкмага тушади, нуклеин кислота эса сувли фазада қолади. Бу усул биринчи марта Шустер томонидан нуклеин кислоталарни ажратишда қўлланилган. ТМВ РНК си худди шу усулда аж—ратилади. Кейинчалик полиомиелит, картошкани Х—вируси, ларнинг мозаикаси вируси, РНК тутувчи ҳашорот вируслари ва ДНК тутувчи бактериофаглар Т2, Т4 ва ФХ 174 ларнинг нуклеин кислоталари ажратилади.

5. **Детергент ва фенол билан экстракциялаш усулла—рини биргаликда қўллаш.** Аввало вирусли суспензияни фенол билан экстрация қилишдан олдин вирус зарралари

детергент билан (ДДС) парчаланади. Томат тупини пакана-лашиши вирусининг РНК си ушбу усул ёрдамида ажратил-ган. Яшур вирусининг РНК си, Фх174 бактериофагини ДНК си ва ҳакозолар нуклеин кислоталарини ажратишда ушбу методдан фойдаланилган.

6. Нуклеин кислоталарни ажратишда ферментларни ишлатилиши. Нуклеин кислоталарни ажратишдаги энг қийин жиҳати уларнинг вирус оқсилларидан ажратишдир. Оқсилларга протеолитик ферментлар ёрдамида ишлов бе-риб, сўнгра детергент ва фенол билан ишлов бериш керак. Фермент сифатида проназа (осповакцина вирусининг ДНК сини ажратишда) ва папаин (аденовируслар ДНК сини аж-ратишда) ишлатилади.

Юқоридаги методлардан ташқари бир қанча бошқа ме-тодлар ҳам бўлиб, уларнинг бирорта универсали йўқ, ҳар бир вирус учун конкрет услуб ишлаб чиқиш зарур.

Вирус оқсилларини ажратиш

Вирус оқсилларини ажратиш жараёнида ишлатиладиган метод оқсилнинг бирламчи структураларини сақлайдиган, иккиламчи ва учламчи структураларини узса ҳам қайта тикланиши осон бўлиши керак. Аввалдан тўртламчи струк-тураларни бузиш вирус зарраларини кислота, ишқор ёки детергент ёрдамида амалга оширилади. Баъзан мочевина ёки оқсил табиатли моддалар хам ишлатилади.

1. **Ишқор ёрдамида "юмшоқ" усулда вирус оқсилини ажратиш.** Вирус препаратини (ТМВ) совуқда ишқорий му-ҳитда (pH 10–10,5) инкубация қилиш, ундан 90000–100000 молекула массага тенг "А–оқсилини" ажратишга олиб ке-лади.

Параллел равишда РНК олигонуклеотидларгача гидро-лизланади. Ишқорий муҳит борат, карбонат ва глицин бу-ферлари ёрдамида яратилади. Баъзи амин спиртлари (эта-ноламин) ҳам ишқорий буферларга ўхшаш самара беради.

ТМВ дан оқсил ажратиш учун 10 мг/мл концентрацияли вирус суспензиясини целлофан қопчасига солинади ва 0,1 М карбонат буферида 4^0С pH 10,5 2–5 кун диализ қилинади. Парчаланмаган вирус центрифугалаш ёрдамида 1 соатда 105000 g да ажратилади. Чўкма ташлангандан сўнг чўкмаусти суюқлигига тенг ҳажмда тўйинган аммоний сульфатини

солинади. Чўкмага тушган оқсил 5000 g да центрифугаланади сўнгра сувда ресуспензияланади. Оқсил яна икки марта сульфат аммоний билан чўктирилади. 4^0C да сувга қарши диализланади. Сув диализ давомида бир неча марта алмаштирилади Диализ охирида муҳит pH ини 7,0 келтирилади, сўнгра 60000—100000 g да центрифуга қилинади ва йирик заррачалар йўқотилади. Олинган оқсилни ультрабинафша нурларини максимум ютишини минимум ютишига нисбати A_{280}/A_{250}=2,4 бўлиши билан тавсифланади.

2. **Вирус оқсилини кислота билан экстракциялаш.** Вирусларнинг ишқорга нисбатан ўта чидамлилари ҳам бор. Бундай ҳолларда вирус зарраларини бузиш учун кислотадан фойдаланилади. Вируснинг сувли эритмасига (10—30 мг/мл) икки ҳажм совутилган сирка кислотасини аралаштириб турган ҳолда қуйилади. Чўкмага тушган нуклеин кислотани центрифуга ёрдамида ажратилади, чўкмаусти суюқлигидаги оқсил 2—3 кун 4^0C ли сув ёрдамида диализланади (бу вақт ичида эритмадаги оқсил изоэлектр нуқтасига етиб келади). Диализ қопчасидаги оқсил ажратиб олиниб центрифугаланади. Чўкма қайтадан сувда эритилади, оқсилнинг pH и суюлтирилган ишқор билан pH 8,0 га келтирилади. Оқсил эритмаси 100000 g да 1 соат давомида центрифугаланиб парчаланмаган вирус ва денатурацияга учраган оқсилдан ажратилади. Чўкма устидаги оқсил экспериментларда ишлатилиши мумкин.

3. **Иссиқ тузли эритмалар ёрдамида вирус оқсилини ажратиш.** Бу усул беда мозаикаси вируси каби 81% оқсил ва 19% РНК—ли тайёқчасимон вирусдан оқсил субъединицаларини ажратиб олишда ишлатилади. 0,01 М фосфат буферидан (pH 7,0) вирусли суспензияга (130 мг) тенг ҳажмда 2 М NaCl солиб аралаштирилади ва 20 минут 45^0C да инкубация қилинади. Лжралиб чиққан оқсилни эрувчанлигини пасайтирувчи сабабли эритма лойқаланади. 20 минутдан сўнг эритма совутилади ва центрифугаланади. Оқсил чўкмага тушади, РНК ва унинг парчаланган бўлаклари чўкмаусти суюқлигида қолади. Чўкмани 1 М NaCl билан ювилади ва центрифугаланади. Чўкмадаги оқсил 0,01 М фосфат буфери (pH 7) 0,005 М ДДС иштирокидаги эритмада эритилади. Эритма 24 соат дистилланган сувда диализланади, оқсилни 0,66 ҳажмдаги тўйинган аммоний сульфати билан чўктирилади. Чўкма

қайтадан 0,05 М ДДС тутувчи фосфат буферида қайтадан эритилади ва 4 соат давомида 0,005 М ДДС тутувчи фосфат буферида диализланади. Шу усулда ажратилган оқсилнинг молекула массаси 34000 ташкил қилади, оқсил серологик фаоллигини тўла сақлайди.

4. **Фенол ёрдамида экстракция қилиш.** Баъзи вируслар оқсилини (ТМВ) фенол фазасидан ёки интерфазадан махсус ишлов бериб ажратиб олиш мумкин. Бунинг учун сувли фаза ажратиб олингандан сўнг фенол фазасига ва интерфазага (нуклеин кислоталарни фенол билан ажратиш бўлимига қаралсин) 5—10 ҳажм метанол ва 2—3 ацетат натрий кристалидан солинади. Чўкма центрифуга қилиб ажратиб олинади ва 3 марта метанол, 1 марта эфир билан ювилади. Олинган оқсилни ҳавода қуритилади ва сувда эритилади (10 мг:5мл сув), сўнгра 60—80^{0}С да (pH ни 0,02 М NaOH билан 7,5 га келтирилади) қиздирилади. Шундай шароитда оқсил эрийди.

Вирусларнинг ички нуклеопротеидларини ажратиш

Чечак, миксовируслар ва бошқа бир қатор вируслар мураккаб тузилишга эга бўлиб, уларнинг нуклеин кислоталари оқсил билан мустаҳкам комплекс—нуклеопротеид ҳосил қилади. Бундай ҳолатларда нуклеин кислота ажратиш бошқача тадбир билан амалга оширилади. Аввало вирус заррасидан ички нуклеопротеидни ажратиш керак. Ички нуклеопротеидни ажратиш жараёнида тозалик даражаси ўта сифатли бўлиши керак. Маълумки, кўпгина вируслар сиртида ҳар хил ифлослантирувчи моддалар тўпланади. Нуклеопротеидни натив сақловчи шароитда вирус заррачаси парчаланганда кўп қисмли система ҳосил бўлади. Уларни бир—бирларидан молекуляр массаси, сузиш зичлиги ёки ион—алмашиниш смоласи билан бириқиш хусусиятлари билан фарқ қиладиган вирус қобиғи қисмлари билан бириккан ифлослантирувчи моддалар бўлиши мумкин.

Кўрсатилган таъсирлардан бирортаси ёрдамида ўта тоза вирус нуклеопротеидини олиш мумкин. Тоза нуклеопротеиддан ёки нуклеин кислота ёки оқсил ажратиш мумкин. Худди шу усулларни қўллаб парагрипп SV5 вирус билан касаллантирилган ҳужайралардан CsCl градиентида центрифугалаш усулида вирус рибонуклеопротеиди (РНП) ажратишдалди. Кўпгина бу типдаги вируслар таркибида липид

бўлганлиги учун ички РНП ни ажратишда эфир, натрий де—зоксихолати каби моддаларни ишлатилади. Баъзан Твин 80 ишлатиш ҳам яхши самара беради. Лейкемия вирусларидан РНП ажратишда Твин 80 қўлланилади. Миксовируслардан РНП ажратишда дезоксихолат ишлатилади.

Киселев ва Добровлар (1970) Сендай вирусининг РНП сини ажратиш учун тоза вирусга натрий дезоксихолат (ДХН) билан (вирус ва ДХН) билан (вирус ва ДНХ нисбати 1:4) ишлов берилади. Ишлов бериш 20^0С да 5 минут давомида рН 7,0 да бажарилади. Парчаланган вирус 20—60: сахароза гра—диентида центрифугаланади ёки ТЭАЭ целлюлоза билан хроматография қилинади. Сўнгра минутига 17500 айланиш тезлигида 2,5 соат 10^0С да MSE—50 центрифуганинг 3х20 мл роторида градиентда центрифуга қилинганда 3 фракция ку—затилади. Пробирканинг юқорисида вирус қобиғи қисмлари жойлашади, 40% сахароза пробиркасининг марказида вирус РНП си эса пробирка тубида унинг агрегатлари жойлашади. Худди шундай натижа РНП нинг ТЭАЭ целлюлозасида хро—матография қилинганда ҳам кузатилади. РНП ион алмашиш колонкасида адсорбцияланмайди. Колонкани ишқор билан регенерация қилинганда вирус қобиғининг ҳар хил қисмлари ювилиб чиқади. Бу методни қулайлиги яна шундаки, натив Сендай вируси колонкага адсорбцияланади ва 0.6 М NaCl ёрдамида десорбцияланади. Юқорида келтирилган усулни бошқа вирусларга ҳам қўллаб, РНП ажратиш мумкин.

Юқоридаги методлардан ташқари казеининказа С ва фосфолипаза С ферментлари ёрдамида ҳам вирус РНП сини ажратиш мумкин.

Вирус препаратларини биокимёвий тадқиқ қилишнинг умумий методикаси

Тоза вирус препарати олингандан сўнг вирусни ташкил қилувчи таркибий қисмлар структураларини ўрганиш мум—кин. Масалан, вирус заррасининг нуклеин қисмини ўрганиш мумкин, чунки охирги вақтларда вирусларга тавсиф бериш ва классификация қилишда вирус нуклеин кислотасининг типи ва структурасига эътибор берилмоқда.

1. Вирус нуклеин кислотасини ўрганиш унинг типини ўрганишдан бошланади. Бу иш умуман осон бўлса ҳам, ам—мо вирус нуклеин кислоталарининг бирламчи ва иккиламчи

структураларидаги қатор аномалиялар уни ўта мураккаб-лаштиради. Масалан, бактериофаг ФХ—174 бир спираллик ДНК га, реовирус, ўсимликлар жароҳатланиши шиши вируси икки спираллик РНКга эга. Қатор ДНК тутувчи фаглар ДНК сида тимин ўрнига оксиметилурацил, урацил учрайди. Та-биий, бу ҳолатлар вирус нуклеин кислотасининг типини ёки иккиламчи структураларини аниқлашни қийинлаштиради.

Шунинг учун нуклеин кислота типини аниқлашнинг асосий методи рибоза ва дезоксирибозаларни рангли реак-ция ёрдамида аниқлашдир. ДНК ни индол ва дифениламин билан РНК ни орцин билан бўлган реакциялари асосида аниқланади. Ёрдамчи метод сифатида РНК ёки ДНК препа-ратларини махсус ўзига мос ферментлар билан (ДНК аза ва РНК аза билан) ишлов беришни тавсия қилиш мумкин.

2. **Вирус нуклеин кислотасини вирус заррасидаги миқдорини аниқлаш**. Нуклеин кислотанинг вирус зарраси-даги миқдорини (фойизи) ва бир вирус заррасидаги ДНК ва РНК нинг миқдорини (дальтон ҳисобида ёки 1 вирус зар-расидаги мг ҳисобида) аниқлаш муҳимдир.

Кўпгина ўрганилган вирусларда бир молекула ДНК ёки РНК мавжуд, уларнинг молекуляр массаси деб, бир вирус заррасидаги абсолют миқдори (дальтонда) кўзда тутилади (1 мг 6.10^{17} дальтонга тўғри келади).

Нуклеин кислоталарнинг молекуляр массасини аниқлаш учун ҳар хил методлардан фойдаланилади. Масалан, нур таратиш методи майда молекулали вирус нуклеин кислота-ларини аниқлашда ишлатилади. Энг кенг тарқалган метод-лардан моддаларнинг диффузия константаси, седимента-цияси ва ёпишқоқлиги каби хусусиятларига асосланган ус-лубларни кўрсатиш мумкин.

Ультрацентрифуга ёрдамида сахароза градиентида мо-лекуляр массалари аниқ моддаларни қўллаб, вирус нуклеин кислотасининг молекуляр массасини аниқлаш кенг қўлланилиши мумкин.

Охирги йилларда нуклеин кислоталар молекула масса-ларини электрон микроскоп ёрдамида, авторадиография ёр-дамида, кимёвий ва бошқа услубларда авниқланмоқда.

Нуклеин кислоталарни тадқиқ қилиш

1) **Полиакриламид гелида фракциялаш.** Бишоп, Клейврук ва Шпигелман вирус нуклеин кислоталарини

пролиакриламид гелида электрофорез қилиб фракциялашни тавсия қилишди. Бу метод оқсил химиясида аввалдан қўлланилар эди, аммо вирус нуклеин кислоталарини тадқиқ қилиш кейинги йиллардагина бошланди.

Муаллифлар полиакриламид гелларини бис—акриламид ёрдамида тикиб яратилган геллардан фойдаланишни тавсия қилдилар. Гелларнинг полимеризациясини сунъий шиша трубаларда ўтказилади. Фракцияларга ажратиш 90 мин ни эгаллайди (гель устунларининг узунлиги 5 см бўлганда) ҳар бир трубага 100—200 мкг РНК ни 0,1 мг РНК солинади.

Нуклеин кислоталарни бўлинганлигини гель устунлаpини тўғридан тўғри хромосканда 260 нм да ультрабинафша нурларни ютишига қараб аниқланади.

Муаллифлар бу усул ёрдамида MS 2 бактериофаги РНК сини, ФХ—174 бактериофагини бир занжирли ва икки занжирли шаклларини ва ҳ.к. ларни ажратиш мумкинлигини кўрсатишган.

ВИРУС НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАРИ ВА ОҚСИЛЛАРИНИ АЖРАТИШ

20—машғулот

ТМВ РНК сини фенол ёрдамида депротеинизация қилиб ажратиш

Бу метод билан вирус РНК сини ажратишдаги асосий қийин энг тоза препаратларда ҳам учрайдиган РНК аза ҳавфидир. Шу сабали нуклеаза фаоллигини йўқотадиган махсус усуллар ишлатилади. Масалан, РНК ажратишда бентонит, поливинилсульфат ёки муҳит pH ни 9,0 да сақлаш кабилар ишлатилади. Ҳамма жараён совуқ хоналарда бажарилади.

Идишлар хром аралашмасида аввал водопровод суви, кейин детергент билан яхшилаб ювилиб, сўнгра дистиллан—ган сувда чайилади. Ювилган идишлар 160—180^{0}С да 2 соат қуритиш шкафида қиздирилади.

Ишдан мақсад. Вирус нуклеин кислотасини ажратиш технологияси билан таништириш.

Керакли асбоблар. Вирус тозалашда ишлатилган асбоб—ускуналар. Реактивлар: хлороформ, янги ҳайдаб тозаланган сувга тўйинтирилган фенол, 10% бентонит суспензияси, совутилган 96% этанол (—20^{0}С), 10 М LiCl, 3 М ацетат буфери, pH 5,0, 0,01 М фосфат буфери, pH 7,2, ТМВ нинг тоза препарати (10—50 мг/мл).

Ишнинг бориши. Совутилган вирус эритмасига бентонит суспензияси солинади (вирус ҳажмини 1/10 миқдорида), сўнгра тенг ҳажмда фенол солинади. Аралашмани 15—20 минут совуқ хонада яхшилаб чайқатилади ва 20 минутча 6000 айл. тезлигида +2^{0}С да центрифугаланади. Пробиркада 3 қават — РНК тутувчи сувли, фенол ва вирус оқсили тутувчи интерфазалар ҳосил бўлади. Юқоридаги сувли қаватни оҳисталик билан пипетка ёрдамида совуқ шароитда олинади, унга 0,5 ҳажм фенол ва 0,5 ҳажм хлороформ солиб яна 1[illegible] мин чайқатилади ва центрифугаланади. РНК тутувчи сувли фазани совуқхонага қўйилади. РНК нинг қолган қисмини ажратиш учун фенол—хлороформ фазасини фенол фаза билан қўшилади, 0,5 ҳажм 0,1 М фосфат буфери солинади ва яна 15 минут чайқатилади. Олинган сувли фаза ажратилган РНК нинг совуқхонадаги асосий қисмига қўшилади ва уларга РНК ни яхши чўктириш учун ацетат буфери солинади (бир томчи ацетат буферини 1 мл эритма ҳисобида) ва 20 ҳажм —20^{0}С да совутилган этанол солинади. Аралашмани яхшилаб чайқатиб —20^{0}С да совутгичга қўйилади. 1—2 соатдан сўнг РНК чўкмаси центрифуга ёрдамида (20 минут, 6000 айл.тез.) ажратилади, чўкма озгина сувда эритилади. Эримаган материал эса минутига 15000 айл. тезлигида 20 минут центрифуга қилиниб РНК дан ажратилади.

Этанол билан чўктиришда қайнатилади, чўкмадаги РНК сув билан эритилади ва унга юқори полимерли РНК ни чўктириш учун 10 М LiCl (охирги концентрация 2 М бўлгунча) солинади ва бир неча соатга —20^{0}С да совуқхонага қўйилади. Чўкма 0,1 М фосфат буфери (pH 7,2) билан эритилади.

Тозаланган РНК нинг $A_{260}/_{280}$ =2,1—2,3 ва $A_{260}/_{230}$ =2,4—2,6 бўлади. УБ—ютиш коэффиценти ($A^{0,1\%}_{260,\ 1\ см}$) 0,1 М фосфат буферида 25,0 оптик бирликга тенг бўлади.

Фенол ёрдамида вируслардан РНК ажратилганда 50—60% РНК олиш мумкин.

РНК ни музхонада бир неча кун, узоқ муддат сақлаш учун унга этанол (66% гача) ёки LiCl (2 М гача) солинади ва –20^{0}С ли музхонада сақланади.

21–машғулот.

ТМВ РНК сини натрий додецил сульфати ва перхлорат ёрдамида ажратиш.

Бу усул вирус РНК сини энг тез ажратиш усулларидан бўлиб, бу усул билан 80% гача вирус РНК сини ажратиш мумкин.

Керакли материаллар центрифуга ва шаффоф центрифуга пробиркалари. Реактивлар: 0,25% натрий додецил сульфатининг сувли эритмаси, 100% $NaClO_4$, 3 М ацетат буфери, pH 5,0, 96% этанол, 10М LiCl, 0,1 М фосфат буфери pH 7,2., ТМВ нинг тоза препарати (10–50 мг/мл).

Ишнинг бориши. ТМВ суспензиясига натрий додецил сульфатидан охирги концентрацияси 5% бўлгунча қуйилади. Аралашмани шаффоф центрифуга пробиркаларига солинади, сўнгра 3 мин 70^{0}С да қиздирилади (ТМВ нинг оқиш–ҳаворанг ранги йўқолади), 3 ҳажм 100% $NaClO_4$ (охирги концентрацияси 75% бўлгунча) солинади ва 10 минут минутига 3000 айл. тезлигида, +2^{0}С да центрифугаланади. Натижада оқсил 75% ли $NaClO_4$ додецил сульфат билан комплексда центрифуга пробиркасини юқори қисмида қалин бойитган (флотацияланган) оқсил қавати ҳосил бўлади. Пробирканинг тагини игна билан тешиб РНК ни пастки сувли фазаси ажратиб олинади, вирус оқсилини тутувчи қисм ташлаб юборилади. РНК эритмасига 3 М ацетат буфер (pH 5,0) солинади қолган РНК ажратиш жараёни худди фенол ёрдамида РНК ни экстракция қилингандек бажарилади, аммо спирт билан чўктириш бир марта амалга оширилади, холос (фенол билан РНК ажратилган холатда). Фенолнинг ҳиди йўқотилиши учун одатда спирт билан чўктириш амалга оширилади.

22–машғулот

Картошканинг Х–вируси РНК сини тузлар ёрдамида ажратиш

Юқори ион кучига эга эритма ёрдамида вирус вирионларини парчалаб РНК ажратиш энг осон усуллардандир.

Бу усулни ижобий томони бир вақтни ўзида ҳам РНК, ҳам оқсил, олиш мумкинлигидадир.

Керакли материаллар: асбоб–ускуналар; совутгичли центрифуга. **Реактивлар**: 1 М $CaCl_2$ ёки $BaCl_2$ 0,01 М ЭДТА ли 0,01 М трис–HCl буфери ва 0,001% натрий додецил сульфати (pH 7,5): КХВ нинг (10–30 мг/мл) тоза препарати.

Ишнинг бориши. КХВ нинг совутилган тоза препаратига тенг ҳажмда 1 М $CaCl_2$ (ёки $BaCl_2$) қуйилади ва яхшилаб аралаштирилади, сўнгра $+2^0C$ ли совутгичга қўйилади. Шу муддатда КХВ нинг вириони парчаланади. Вирус РНК си кальций (ёки барий) нуклеати сифатида ажралиб чиқади. РНК чўкмаси 15 минут давомида минутига 6000 айл. тезлигида центрифугаланиб ажратиб олинади, чўкма устида қолган оқсилдан кейинчалик вирус оқсили тозаланади.

РНК ни эритиш учун нуклеат кальций чўкмасига 5 мл 0,01М ЭДТА 0,01 М трис–HCl ва 0,001 % натрий додецил сульфат (pH 7,5) қуйилади.

Хелатловчи агент бўлган ЭДТА Ca^{++}ионларини боғлаб РНК ни эритмага ўтказишда ишлатилади. Натрий додецил сульфати эса нуклеаза активлигини ингибитори ҳисобланади.

Аралашма 30 минут совутгичда сақланади, сўнгра центрифугаланади (15 мин. 6000 айл.тез.), чўкмага буфер эритмасидан солинади. Экстракция 3 марта қайтарилади. Уччала экстракцияда ажратилган сувли қисм бирлаштирилади, 3 М ацетат буферидан солинади (pH 5,0) ва РНК ни аввал этанол ва сўнгра LiCl билан чўктирилади (юқоридаги машғулотдагидек).

23–машғулот

Cd бактериофагининг ДНК сини хлороформ ёрдамида ажратиш

Керакли материаллар: аввалги ишларда қўлланилган асбоб—ускуна, реактив ва материаллар ишлатилади.

Бактериофаг препаратига тенг ҳажмда хлороформ ва изоамин спирти (8:1 нисбатда) қуйилади ва 30 минут яхши—лаб чайқатилади. Аралашмани центрифугалаш билан фрак—ияларга ажратилади. Сувли фаза ажратиб олинади. ДНК экстракциясини хлороформ ва изоамин спирти аралашма—сидан солиб яна қайтарилади. Мазкур шароитда, фенол би—лан экстракциялашга қараганда ДНК тезроқ фрагментларга ажралашади. Шунинг учун фазаларга ажралиш тезроқ бўлади ва центрифугалаш муддатини (5000—6000 айл.тез.) 30 мин.га кисқаради.

ДНК ни хлороформ билан 2—3 марта экстракция қилинганидан сўнг сувли фазадаги ДНК ни 2 ҳажм этанол билан чўктирилади, тузли эритмада эритилади ва хлороформ қолдиғини 4—6 марта эфир ёрдамида экстракцияланади. Эфирни йўқотиш учун эритмадан стерил ҳаво ўтказиш ки—либ қилинади.

24—машғулот
ТМВ нинг структура оқсилни ацетат методи билан ажратиш

Керакли материаллар: ТМВ нинг тоза препарати (10—20 мг/мл), совутилган сирка препарати (к.т. ёки а.т.), +2^{0}С гача совутилган дистилланган сув, 1 М ацетат буфери (pH 4,8), 0,01 М фосфат буфери (pH 8,5), муз ҳаммоми, совут—ма билан центрифуга (ЦЛР—1), диализ учун целлофан қопча, 3 ҳажми диализ идиши, магнит аралаштиргич, совуқхона, ультрацентрифуга.

Ишнинг бориши: Центрифуга стаканини муз хаммо—мига жойлаштирилади ва унга 0—+2^{0}С гача совитилган ТМВ нинг суспензияси солинади, сўнгра 2 ҳажм музлатилган сирка кислотаси (ледяная уксусная кислота, удельн. вес. 1,05) аралаштириб қуйилади. Аралашмани 30 минут муз хаммо—мида вақти—вақти билан аралаштирилган ҳолда сақланади.

Бу ҳолатда вирус парчаланади ва РНК ни чўкмага тушуши кузатилади.

РНК нинг паға—паға бўлиб турган чўкмасини центрифуга ёрдамида (15 мин.10000 айл.тез., +2^{0}С) ажратилади. Тиниқ оқсил тенг ҳажмдаги совутилган дистилланган сув билан суюлтирилади ва целлофан қопчага солиб диализ қилинади. Эритма бир неча сутка давомида дистиллаган сув 3—4 марта (3 л дан ҳар гал) алмаштирилади(+2^{0}С +4^{0}С да амалга оширилади). Диализ давомида магнит аралаштиргич ёрдамида аралаштирилиб турилади.

Диализ жараёнида диализ қопчасидаги оқсилни pH и ТМВ нинг оқсилини изоэлектрик нуқтасигача чиқади, натижада диализ қопчасидаги суюқлик лойқаланади. Оқсил чўкмаси центрифугалаб (15 мин, 18000 айл.тез.+2^{0}С) ажратиб олинади ва 0,01 М фосфат ёки трис—HCl буферида pH 8,5 эритилади. Парчаланмаган вирусларни ва денатурация бўлган оқсилни ажратиб ташлаш учун эритмани 90 минут давомида, 105 000 g да ультрацентрифуга қилинади. Олинган шаффоф вирус оқсилини +2^{0}С да сақланади. Бу усул билан 60—70% оқсил ажратиш мумкин. ТМВ нинг УБ нурни ютиш коэффиценти ($A^{1\%}_{280,\ 1\ см}$) 13,0 оптик бирликни ташкил қилади. Агар оқсилни нур ютиш спектрини кузатадиган бўлсак, максимум—280 нм ва минумум 245—250 га тенг бўлади, $A_{280/260}$ ТМВ оқсилининг нисбати 1,60—1,70 га тенг.

25—машғулот

КХВ нинг структура оқсилини туз ёрдамида ажратиш

Керакли материаллар: КХВ нинг тоза препарати (10—20 мг/мл), ёки 1 М $CaCl_2$, совутилган дистилланган сув (pH 7,8—8,0), 0,001 М трис— HCl буфер (pH 8,5), диализ учун целлофан қопча, 3 л ли диализ идиши, магнит аралаштиргич, совутгич, центрифуга (ЦЛР—1), ультрацентрифуга.

Ишнинг бориши. Бу метод билан бир вақтни ўзида ҳам КХВ нинг РНК препаратини ҳам КХВ нинг оқсилини олиш мумкин.

Совутилган КХВ нинг тоза препаратига тенг ҳажмда 1 М $CaCl_2$ (ёки $BaCl_2$) солинади, аралашмани яхшилаб ара-лаштирилади ва $+2^0C$ да совуқхонага қўйилади. Бу ҳолатда вирус зарраси парчалана бошлайди, ажраган РНК нуклеат кальций (ёки барий) ҳолатда ажралади ва уни центрифуга ёрдамида чўкмага туширилади, чўкма устидаги суюқликдаги оқсил бир сутка давомида кучсиз ишқорий(pH 7,8-8,0) 3 л дистилланган (pH 7,8-8,0), сувда диализ қилинади.

Диализ қопчасидаги оқсил чўкмаси центрифуга қилиниб, (15 мин, 18000 айл. тез., $+2^0C$) ажратилади ва 0,001 М трис-буферда (pH 8,5) эритилади. Парчаланмаган вирус ва денатурацияга учраган оқсилни ультрацентрифуга қилиб ажратиб (90 минут, 105000 g) олинади. Оқсил $+2^0C$ да сақланади.

26-машғулот

ТМВ оқсилини ишқорий метод билан ажратиш

Керакли материаллар. ТМВ нинг препарати (10-15 мг/мл), юқорида ишлатилган буферлар, центрифугалар 0,1 М карбонат бикарбонат буфери (2 литр), целлофан диализ қопчаси.

Ишнинг бориши. ТМВ ни(1%) суспензияси 3-4 кун давомида 2 л 0,1 М карбонат бикарбонат буферида (pH 10,5) диализ қилинади. Парчаланмаган вирус ва денатурация бўл-ган оқсил центрифуга ёрдамида чўктириб ажратилади (60 мин, 100000 g). Чўкма устидаги оқсилни бир ҳажм аммоний сульфатининг тўйинган эритмаси билан чўктирилади.

Оқсил чўкмасини 10-15 минут давомида 5000 g да центрифугалаб ажратиб олинади ва уни 5 мл ча сувда эри-тилади ва яна қайтадан 0.5 ҳажм аммоний сульфатнинг тўй-инган эритмаси билан чўктирилади. Чўкмани эритиб, қайта чўкишини яна бир марта қайтариб, сўнгра оқсил эритмаси $+4^0C$ ли дистилланган сувда диализланади.

Оқсил эритмасининг pH ни 7,0-8,0 га келтириб 100000 g да 1 соат давомида ультрацентрифуга қилиб оқсил агре-гатлари чўктирилади. Чўкма устидаги оқсил эритма концен-

трацияси аниқлангандан сўнг кейинги тажрибаларда ишлатилади ёки юқорида айтилган шароитда сақланади.

III ҚИСМ

Вирусларнинг киритмалари ва уларга асосланган диагностика усули

Ўсимлик ҳужайраларидаги вирус киритмалари ҳақида биринчи марта рус олими Д.И.Ивановский "Тамакининг мозаика (чипорланиш) касаллиги" (1902) китобида тамаки ҳужайрасини мозаикали қисмида қандайдир рангсиз, кристаллсимон моддалар борлигини айтган эди. Булардан ташқари уларни олдида (касал ҳужайралар ядроси яқинида) ҳужайранинг бошқа таркибий қисмларидан фарқланадиган амёбаларга ўхшаш плазма тўпламлари учрайди. Бу хилдаги киритмалар кейинчалик амёбасимон таналар, вакуоллашган ёки Х—таналар деб номланди.

М.И.Гольдин томонидан. вирус билан касалланган одам ва ҳайвон ҳужайраларида ҳам майда тимонуклеин кислота тутувчи элементлар таначалар — вирус зарралари борлиги аниқланди. Кўпинча ўсимлик, одам ва ҳайвон вирус касалликларида Х—таналар диагностика мақсадларида ҳам ўрганилади.

Тамакининг мозаикали қисмидаги кристалл киритмалари бор тўқимага 0,1 н HCl таъсир эттирилганда кристалл киритмалар игнасимон кристалларга парчаланиб кетади, бундай кристаллар тозаланган вирус препаратларида учрайди. Демак, кристалл вирус киритмалари вирус зарраларидан тузилгандир. Тамаки мозаикаси вирусининг "яширинган" (маскированный штамм) штамм киритмалари ҳужайрада ТМВ га қараганда анча кам тўпланади (Beale, 1936).

Лингвистон ва Дуггарлар вирус зарраларининг локализациясини ўрганишиб, вирусни асосий қисми протоплазмада бўлишини аниқлашди.

ТМВ билан касалланган тамаки тўқималарида кристаллсимон вирус киритмалари бир текисда тарқалмаган. Масалан, баъзи тамаки ёки томат барглaридаги туклар да кристалл вирус киритмалари умуман кўринмаслиги мумкин,

баъзиларида эса жуда кўп бўлиши мумкин. Тадқиқотларнинг кўрсатишича, киритмалар вирус тўпламлари ёки ҳужайрада вирус тўпланиши билан боғлиқ бўлган маҳсулотдир. Булар М.И. Гольдининг маълумотларига қараганда, вирус билан касалланган тамаки ёки томатнинг барг тукларида ва эпидермисида тўпланади.

М.И.Гольдин тадқиқотлари натижасига кўра вирус суюқлтирилганда, юқумлилигининг сақланиш даражаси 10^8 гача деб ҳисобланса, вирус киритмаси 20 мкм ($2x10^{-3}$) см бўлса, унинг ҳажми $4 \cdot (10^{-3})^3$ см ^{3} га яқин бўлар экан.

Битта киритманинг оғирлиги 4 (10^{-9}) г бўлади. Суюлиш даражасини 10^8 бўлиши учун 4 мл сувда 10 та киритма бўлиши зарур бўлади. Микроманипулятор ёрдамида Х-таналарни ажратиб олиб, бир неча марта ювиб, сўнгра ҳосил бўлган суспензия билан глютинозани касаллантирилади ва 60 та касаллантирилган баргда 15 некроз ҳосил бўлиши кўзатилган. Тажрибада натижасига кўра, киритмаларда вирус борлиги ва у сезиларли даражадалиги аниқланади.

Гольдин фикрича, ТМВ билан касалланган баргдаги киритмаларда вирус бўлади. Гольдин ва Шеффильд тажрибаларининг кўрсатишича Ивановский кристаллари ва Х-таналар ТМВ нинг тўпламидир .

Тамаки бошқа вирус билан касаллантирилса, ўсимлик ҳужайрасида аморф киритмалар ҳосил бўлади, улар ҳам вирус зарраларининг тўпламларидан иборат бўлиши аниқланган.

Ҳисоблашларнинг кўрсатишича, битта кристаллнинг массаси 1/125000 мг га тенг бўлар экан.

Ивановский кристаллари, одатда, гексагонал кўринишда бўлади. ТМВ нинг бошқа штамми билан касалланган тамаки ипсимон шаклли киритмалар ҳам учрайди. Баъзан иккала киритма бир вақтнинг ўзида битта ҳужайрада учраши мумкин. Ҳар хил ўсимлик бир хил вирус билан касалланган бўлса, унинг шакли ўзгармайди. Ҳар хил моддалар таъсирида масалан, 0,1 н HCl) ТМВ нинг касалланган ўсимлик ҳужайраларида дугсимон (веретиновидный) кристаллар учраши мумкин.

Шеффильд (1939) фикрича, ТМВ билан касалланган тамаки ҳужайраларида Х-таналарнинг ҳосил бўлишини кузатилганда, вирус юқтирилгандан бир неча кун ўтгач, ҳу-

жайра протоплазмаси анча зичлашади ва ҳаракатчан бўлади. Плазма оқимида оқсил зарралар кўпайиб боради ва улар бир—бирлари билан тўқнашиб қўшилади ва каттароқ масса ҳосил қилади. Булар кўпинча думалоқ шаклга киради ва зичлашади. Бир ойчадан сўнг бу Х—таналар дегенерацияга учрайди. Баъзан киритманинг аморф материали ипсимон кристалларга айланади.

Аммо М.И.Гольдин бунга баъзи далилни қарама—қарши қўяди, чунки у вирус юқтирилгандан сўнгги биринчи кун—лардаёқ типик кристаллсимон критмаларни кузатади ва Х—таналарнинг парчаланишидан Ивановский кристаллари ҳосил бўлади дейишни нотўғри деб ҳисоблайди.

Гольдиннинг (1963) фикрича, ҳужайра ва вирус ораси—даги муносабатларнинг кечишига қараб ёки Х—тана ёки Ивановский кристаллари ҳамда ипсимон кўринишга эга бўлган маҳсулотлар ҳосил бўлиши мумкин (spika—кристаллар). Баъзан Х—танадан аввалроқ ҳам кристалл критмалар ҳосил бўлади. Х—таналар ҳужайрадаги тўрлардан ҳосил бўлади. Х—таналар ҳосил бўлгандан сўнг ҳам тўрлар ҳосил бўлиб туради. Шунинг учун ҳужайрада бир вақтнинг ўзида кристаллар, иплар, тўрлар ва Х—таналарни кузатиш мумкин.

Кристалл киритмаларининг баъзи физикавий ва кимёвий хоссалари

Ивановский кристалларига энг хос хусусиятлардан би—ри, улар ҳужайранинг салгина бузилишидан тезгина эриб кетади. Уларга 0,1 н гипосульфат ёки 1% ли цистеин 1 % ли пикрин кислотаси, 20—25% аммоний сульфатлар эритмала—рини таъсир эттириб эриб кетишидан сақлаш мумкин. Пик—рин кислотаси кристаллари фиксация қилишда яхши нати—жалар беради ва улар фуксин, феносафранин каби бўёқлар билан яхши бўялади.

Тўқималарнинг нозик кесмаларини баъзи стабиллаш—тирувчи эритмаларга солиб, микроманипулятор ёрдамида Ивановский кристалларини, ипчаларини ўсимлик тукларидан ажратиб олиш мумкин.

Вирус киритмаларини тадқиқ қилиш ўсимлик вирусла—рини ўрганишнинг ёруғлик микроскопи ёрдамида бажари—ладиган методларидан биридир (киритмалар методи).

Киритмаларни анализ қилиш вирус касалликларини диагностикасини осонлаштиради ва уларни классификация қилишда, яширин инфекцияни аниқлашда маълум роль ўй-найди.

Қуйида Х-тана, кристалл киритмалари яхши ўрганил-ган баъзи ўсимлик вирусларининг рўйхати берилган.

Х-тана ҳосил бўладиган вирус касалликлари

1. Томат мозаикаси вируси гуруҳи, Картошканинг Х-вируси, Картошканинг У-вируси, Картошка баргининг буралиши, Буғдой мозаикаси, Шоли паканалиги (карлико-вость), Маис мозаикаси, Шакарқамишнинг 1-вируси, Ша-карқамишнинг хлоротик некрози, Пиёз мозаикаси, Пиёзнинг сариқ паканалиги, Картошкагул мозаикаси ва паканалиги, Гулсафсар мозаикаси, Папоротник мозаикаси, Лавлаги юқори қисмининг буралиши, Ток бўғимларининг қисқариши вируси, Шолғом мозаикаси вируси, Шафтоли сарғайиши, Тут мозаикаси, Томат баргларининг зархалланиши билан ка-салланган ўсимликларда вирус киритмалари ҳосил бўлиши мумкин. Қуйида эса вирус касалликларида кристалл ёки кристаллсимон таналар (кўпинча Х-танадан ташқари) ҳосил бўладиган касалликлар келтирилган: Томат вируси гуруҳи, Тамакининг ҳалқасимон доғлилиги, Тамаки нақшинкорлиги, Бодринг мозаикаси вируси №2, Қизил беда мозаикаси, Ловия сариқ мозаикаси, Нўхат мозаикаси вируси №2, Лавлаги мо-заикаси, Лоланинг атласланиши (пёстралепестность), Зубту-рум мозаикаси.

27-машғулот

Вирус киритмалари ва уларга асосланган диагностика усули

Ишдан мақсад: "Вирус киритмалари" усулини ўрганиш ва айниқса бу усул ёрдамида яширин симптомли вирус ка-салликларини аниқлашдир.

Реактивлар: фуксин, пикрин кислота, H_2O, кедр мойи. Лабоб-ускуна: микроскоп х10, х40, х90 объективлари, буюм ойнаси, қоплағич ойна, шиша тайёқча.

Ишнинг бориши: Ўткир тиғ билан баргнинг пастки томонидаги томиридан юпқа кесма олинади. Кесмани оҳисталик билан тукчаларини зарарламасдан олиб, буюм ойнасига томизилган бир томчи водопровод сувига қўйилади ва қоплағич ойна билан ёпилади.

Препаратни (асосан тукларни)аввал 250—300 марта катталаштирилишда микроскоп остида кузатилади. Шишасимон ҳосилалар кузатилган туклар энди микроскопнинг кучлироқ катталаштирилишида кузатилади. Агар тамакининг одатдаги мозаикаси вируси билан касалланган бўлса, ҳамма ҳужайраларда битта ёки бир неча рангсиз, олти қирралик, юпқа шишасимон пластинкалар кузатилади. Бундай критмаларни кузатиш—вирус борлигини исботи бўлади. Агар ўсимлик шу гуруҳдаги вируснинг ҳар хил штаммлари билан касалланса, тукнинг асоси томонидаги биринчи ҳужайрада шишасимон моддалар ва ундан кейингиларида олтибурчакли ёки шунга ўхшаш унсурлар кузатилади.

Ҳужайраларда ипсимон ёки игнасимон кристалларнинг, амёбасимон Х—таналарнинг топилиши диагнознинг тўғрилигини тасдиқлайди. Х—танада ядрочаларнинг йўқлигига қараб, ядрони адаштирмасдан фарқлаш мумкин.

Диагноз олиб боришда М.И.Гольдиннинг қуйидаги кўрсатмаларига амал қилиш муҳимдир.

1. Киритмалар (шишасимон пластинкалар) кесмани ҳамма ҳужайраларида ҳам учрайвермаслиги мумкин. Агар битта ҳужайрада кузатилса, у тукнинг бошқа ҳужайраларида ҳам бўлиши мумкин.

2. Вирус киритмаларини топиш учун битта кесмани кўриш етарли бўлади. Салбий натижа олинганда бир ўсимликдан 9 та кесма олиш керак—3 таси ўсимликнинг энг тепадаги ярусидан, 3 та ўртасидан ва яна 3 таси эски (қари) барглардан тайёрланади. Яна симптомлари яққол кўринган жойларидан тайёрлаш тавсия қилинади.

3. Тук ҳужайраларининг йиртилиши, жароҳатланишидан кристаллар эриб йўқолади.

4. Кесмага 0,1 н HCl билан ишлов берилса кристалл киритмалар ипсимон кристалл боғларига парчаланади.

5. Вирус киритмалари 1% ли пикрин кислота билан бўялса тўқсариқ рангга бўялади..

Олинган натижалар расм дафтарга чизиб олинади.

Адабиётлар

1. М.И.Гольдин. Вирусные включения в растительной клетке. Изд-во АН СССР. 1954, 148 с..

2. М.И.Гольдин. Вирусные включения в растительной клетке и природа вирусов.Москва. 1963.

28–машғулот

Вирус перепаратларини электрон микроскопда кўриш учун тайёрлаш

Ҳамма микроскопларни асосий кўрсаткичларидан бири уларни кўрсата билиш қобилиятидир. Бу катталик қуйидаги формула билан ифодаланади.

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin\alpha}$$

d – масофа,

λ – тўлқин узунлиги,

n – объект ва олдинги линза орасидаги муҳитни синдириш кўрсаткичи,

α – объект линзасининг аппретурасини ярим бурчаги.

Агар ёруғлик микроскопи учун ҳар бир символларнинг қийматини қўйиб чиқсак, микроскопнинг кўрсатиш қобилияти 0,2 мкм га тенг бўлади. Формуладан кўриниб турибдики, тўлқин узунлигини камайтириш кўрсатиш қобилиятини анча оширар экан, чунки бошқа катталиклар–нинг ўзгариши микросконинг кўрсатиш қобилиятига унча катта таьсир қилмас экан.

1930 йилларга келиб электронлар тўпламини хусусиятлари аниқланди. Бу электронлар тўпламини магнит майдони ёрдамида бошқариш мумкинлиги аниқланди. Бу фактлар электрон микроскоп конструкцияси асосини ташкил қилди. Электрон микроскопнинг кўрсатиш қобилияти 0,1–0,2 нм га етди.

Электрон микроскопда кузатиладиган вирус препаратлари махсус ишловдан ўтади. Электрон микроскопни қуйидагича кўз олдига келтириш мумкин. У ичидан ҳавоси сўриб олинган металл цилиндр. Бу цилиндрда (микроскоп колоннаси деб аталади) кетма—кет вольфрам ип (катод), ўртасида тешикли металл пластинка (анод), қатор магнит линзалар бўлиб, улар орасида объект тутқич, люминицирланувчи экран ва фотография ғалтаги жойлашган магнит линзалар мавжуд. Бир неча минг симлар ўрамидан ташкил топган ғалтакдан ўтадиган токнинг йўналиши концентрик магнит ёрдамида электрон фокусга тўғриланади.

Вольфрам ипдан ўтадиган ток уни қиздиради ва электронлар эмиссиясини (чиқишини) ҳосил қилади. Ипга берилган юқори манфий кучланиш ип ва ерга уланган анод пластинкаси орасида катта кучланишлар фарқини ҳосил қилади. Потенциаллар фарқи анодга йўналган электронлар ҳаракатини тезлатади. Электронларнинг бир қисми анод марказидаги тешикдан ўтади ва микроскоп колонкаси бўйлаб пастга томон электрон нур ҳосил қилади.

Биринчи магнит линза (конденсор) ёрдамида фокусга йўналтирилган электрон нур объектни ёритади.

Объект микроскоп колонкасига киритилганда у. электрон нур билан тўқнашади ва электронларни объект билан муносабати рўй беради, бир қисм электронлар объектнинг оғир атомлари билан тарқалади ва умумий электрон нур тутамидан ташқари чиқади. Электронларнинг асосий қисми объектдан бурилмасдан ўтади ва люминесцент экранни электрон тушган нуқталарини нурлантиради.

Қора ва ёруғ нуқталар тўплами экранда тасвир яратади. Агар ишлов берилмаган вирусни микроскоп колонкасига киритилса, экранда ноаниқ тасвир пайдо бўлади.

Шунинг учун объектни контрастлаштирилади, унинг учун объектга яқин жойлар электрон зичликка эга бўлиши лозим. Биологик объектларнинг сунъий электрон зичлигини оширилади. Аввало микроскопга объектни киритиш учун мис тўрлардан фойдаланилади, уларни таглик пардалар билан қопланади. Уларга эса объект солинади (жойлаштирилади).

Мақсад. Талабаларни электрон микроскопда кўриш учун ишлатиладиган тўрчалар ва таглик плёнкалар тайёрлаш билан таништириш.

Асосий керакли асбоб–ускуна ва материаллар: электрон микроскоп, металл ва углерод электродлар билан чанг–латгич вакуум аппарат, коллодий, формвар, дихлорэтан, амилацетат, платина сими ва х.к.

Коллодийдан таглик–парда(плёнка–подложка) тайёрлаш.

Плёнка–подложка тайерлаш учун колодийнинг 0,5–2% ли амилацетатдаги эритмаси тайёрланади. Плёнканинг қалинлиги коллодийнинг амилацетатда эриган миқдорига боғлиқ бўлади. Объект қанча кичик бўлса плёнка шунча юпқа бўлиши керак. Плёнка қуйидагича тайёрланади. Қуйи қисмида жўмрак билан таьминланган воронка сув билан тўлдирилади ва сув тагига шиша фильтр ўрнатилади. Унинг устига фильтр қоғоз қўйилиб, фильтр қоғозга мис тўрчалар жойлаштирилади.

Воронкадаги сув юзига 1 томчи коллодий эритмасидан томизилади, 2–3 минутдан сўнг эритувчи (амилацетат) учиб кетади ва сув юзасида юпқа парда (плёнка) қолади. Сув юзасида ҳосил қилинган плёнкаларнинг дастлабкиларини шиша таёқча билан олиб ташланади.

Кейинги ҳосил бўлган плёнкани эса ишлатиш учун, воронканинг тубидаги жўмракни очиб юборилади ва сувни оҳисталик билан туширилади. Мис тўрчаларни уларга ёпишган коллодий плёнкаси билан олинади, ҳавода қуритилади ва Петри ликопчасида сақланади

Формвардан таглик–плёнка тайёрлаш

Формвардан плёнка тайёрлаш учун 0,1–0,2% ли формварни дихлорэтандаги эритмаси ишлатилади. Тоза ювилган буюм ойнасини тезгина формвар эритмаси солинган идишга солинади (5–10 сек). Буюм ойнаси олинади ва қуритилади (қуритиш 40–60 сек давомида эритувчининг ҳиди йўқолгунча давом этади).

Вирус намуналарини металл билан бўрттириш (яққоллаштириш)

Вирус намунасини металл ёрдамида яққоллаштириш учун 10^{-4} мм с.уст. кам бўлмаган ҳосил қилувчи вакуум асбоби лозим. Вакуум қурилмада металл парлатилади (чангла–

тилади). Чанглатилган зарралар тўғри йўналишдаги траек — тория бўйлаб тарқалади. Агар уларнинг йўлига объект ўр — наштирилса, унинг сиртига металл зарралари чўкади. Учиб кетаётган зарра йўналишига перпендикуляр жойлашган объект сиртида энг қалин қават ҳосил бўлади. Объект тўсиб турган жойларда эса "соялар" ҳосил бўлади. Пировард охир биз таглик плёнка устида ҳар хил электрон зичликка эга намунани кўрамиз. Намунани микроскопда кўрилганда кон — траст тасвир кўринади.

Бу усул билан объектнинг ўлчами ва шаклини билиш мумкин. Ҳосил бўлган "соя" узунлиги, объект баландлигини ($h=l\ tg\beta$) ўлчанади. Металл билан чанглатиш бурчаги аниқ (14^0) бўлганда вирус ўлчамини топиш мумкин.

Вирус зарраларини бўрттириш учун пластинка ва пал — ладий қўлланилади. Пластинканинг энг майда зарраларини олиш учун пластинка симини спирал қилиб бураб конусси — мон қилиб тарашланган кўмир электродга ўрнатилади. Вирус эса чанглатиш мобайнида 8 — 10 см масофада ўрнатилади.

Вируслар ва фагларни бўртириш учун "соя" узунлиги — нинг объект баландлигига нисбати 1:1 дан 5:1 га бўлган бур — чаклар ишлатилади. Вирусли намунани тайёрлаш учун таг — лик — плёнкали мис тўрни олинади ва унга бир томчи вирус суспензияси томизилади. Бир минутдан сўнг фильтр қоғози билан шимдириб олинади ва ҳавода қуритилади. Сўнгра тўрни вакуум қурилма столига жойлаштирилади, чанглати — ладиган металл ўрнатилади, ҳаво сўриб олинади ва металл чанглатилади, тўрни вакуум қурилмадан олинади. Металл чанглатилганда 10^{-4} мм симоб устунига тенг бўлиши керак.

Негатив контрастлаш методи

Вирусларнинг электрон зичлиги юқори бўлган моддага аралаштирилса, контрастлиги кам бўлган объект уни ўраб турган қора фонда аниқ равшан кўринадиган бўлади. Бунда негатив самара кузатилади. Негатив контрастлаш учун оғир металл тузлари ишлатилади. Энг кўп ишлатиладиганлари 1 — 2% ли дистилланган сувдаги фосфор вольфрам кислотаси (pH 7 — 7,4) ёки 2% уранил ацетат.

IV ҚИСМ

ИММУНОЛОГИЯ УСУЛЛАРИ ҲАҚИДА ТУШУНЧА.

Ҳозирги вақтда ўсимлик вирусларини диагностика қилишда ишлатиладиган методларни такомиллаштириш ва уларнинг сезгирлик даражаларини, тезкорлигини ва кам маблағ сарфлаб аниқланишлари каби муаммолар мавжуддир. Аввалиги вақтларда вирусларни аниқлашда қўлланиладиган иммунология усуллари бўлсин ёки вирусологияда кенг қўлланиладиган ўсимлик аниқлагичлари усуллари бўлсин ёки вирус киритмаларига асосланган усуллар бўлсин, улар биринчидан кўп вақт, ҳамда кўп сармоя талаб қилибгина қолмасдан. балки уларнинг сезгирлиги ҳам анча пастдир (10—жадвал). Масалан, энг оддий индикатор ўсимликлар ёрдамида аниқлаш усули билан вирусларни диагностика қиладиган бўлсак, вирус организмга кирганидан сўнг касаллик аломатлари ҳосил қилувчи вирулент вирусларини аниқлаш бу касаллик аломатларига қараб аниқланади, аммо касаллик аломатлари ҳосил қилмайдиган ёки кучсиз касаллик аломатлари ҳосил қиладиган ҳолатларда бу методни қўллаш етарлича яхши, ишончли натижалар бера олмайди. Айниқса касалликни бир эмас бир неча вирус қўзгатадиган бўлса касаллик аломатлари ҳам ўзгаради ва ўз—ўзидан қўшимча метод билан диагностика қилишга тўғри келади. Ўсимлик индикаторлари ёрдамида аниқланганда шу индикаторларни ўстириш вақти, касаллантириш шарт—шароитларга ва ундан сўнги аломатларнинг пайдо бўлишига кетган вақт ҳам анча кунни талаб этади. Вирус киритмаларига асосланган усулни ишлатиш, фақат вирус ҳужайрада киритма ҳосил қилгандагина қўлланилиши мумкин. Инструментлар ёрдамида диагностика қилиш усулини кўрадиган бўлсак, бу усул кўп информация беради—ю, аммо у ҳам камчиликлардан ҳоли эмас. Масалан. бу усул ишлатилганда объектни бирмунча тозалаш, ўсимлик ҳужайрасини ҳар хил зарарли моддалардан холилаш, агарда ўта юпқа кесмаларда вирусларни кўрадиган бўлинса, бир қатор қўшимча ишларни олиб бориш керак бўлади. Ундан ташқари бундай асбоблар ҳамма лабороторияларда ҳам мавжуд эмас. Агар дала шароитларини оладиган бўлсак, бу усул умуман қўлланилмайди.

Шунинг учун ҳам фитовирусологияда кўпгина илмий тадқиқотларни иммунология усуллари ёрдамида олиб борилади ва бу усулларга бўлган қизиқиш кундан кунга ошиб бормоқдадир. Айниқса бу усулларни ўта сезгирлиги ва кам меҳнат талаблиги уларнинг ишлаб чиқаришда долзарблигини ошира бораяпти.

10–жадвал

Ҳар хил иммунология усулларининг сезгирликларини солиштириш

Усул	Вирус	Усулларнинг вирус аниқлаш сезгирликлари	Сарфланадиган вақт
ДТУ[x]	ТМВ	1–10 мкг/мл	30–60 мин
МПР	КХВ	0,5 мкг/мл	24 соат
ЛУ	КХВ, КСВ	0,1–0,5 мкг/мл	10–60 мин
ПЛЛАС–Тест	ҚУВ	0,01–0,5 мкг/мл	4–10 мин
Аниқлагич Ўсимликлар	ТМВ	0,5 мкг/мл	кунлар
РИД	КХВ	1 мкг/мл	24–48 соат
ИИД	КХВ	1–10 мкг/мл	24–48 соат
ИЭФ	АШМВ	1 мкг/мл	48 соат
НГАР	АШМВ	0,01 мкг/мл	
БУ	ТМВ	0,1–0,5 мкг/мл	10–20 мин
ВБА	ЖПМВ	0,2 мкг/мл	1–2 мин
РИА	ГКМВ	10–300 нг/мл	1–2 соат
ИФА	ЖПМВ	5 нг/мл	100 та анализга 2–3 соат

[x] Шартли қисқартмалар 2,3,4–чи иловаларда келтирилган.

Ҳозирги вақтда фитовирусологияда ишлатиладиган иммунология методларини шартли равишда бир неча турга бўлиш мумкин. Бу жараёнларда бўладиган реакциялари антиген билан антитело орасидаги реакцияга асослангандир.

Бу қисмда ўсимлик вирусларини диагностикасида иш-латиладиган амалиётда кенг тарқалган иммунология усуллари ҳақида қисқача назарий маълумотлар бериш билан бир қаторда 3 гуруҳга мансуб усулларни энг кенг қўлланиладиган, сезгирликлари микрограммдан нанограмм-гача бўлган баъзиларини амалий бажариш шартлари билан таништирамиз.

Иммунология усулларига қисқача тавсиф

Иммунология усулларига антиген ва антителонинг бир-бири билан реакцияга кириши шароитларига қараб агглютинация, преципитация ва иммунодиффузияга асос-ланган усуллар гуруҳларига бўлиш мумкин. Ҳозирги вақтда кенг қўлланилаётган ўта сезгир усуллардан яна бири ни-шонланган моддалар қўлланиладиган 4-гуруҳни ташкил қилувчи усулдир. Масалан, радиоиммун, иммунофермент анализига асосланган усуллар шулар жумласидандир. Юқорида айтилган усуллар ёрдамида фанда катта ютуқларга эришилган бўлса ҳам фитовирусларни аниқлашда ўта сезгир усуллар яратиш доимо долзарб муаммо бўлиб қолмоқда.

Вируслар ҳам бошқа антигенлар каби турлича антиген детерминантларни ўз оқсил қаватида сақлайди. Уларни ҳай-вон организмига киритилса, уларга қарши ҳайвон қонида махсус
антителолар ҳосил бўлади. Худди шундай хусусиятга вирус-дан ажратиб олинган унинг оқсил қисми ҳам эгадир. Улар-нинг антиген детерминантлари 3-5 аминокислота қолдиқларидан ташкил топган бўлади. Кимёвий табиати ва физик-кимёвий хусусиятларига кўра антителолар оқсил зардоби глобулинлари синфига киради. Уларда бошқа оқсилларда бўлмаган хусусиятлар мавжуддир, яъни улар ўз антигенлари билан специфик муносабатда бўлиши мумкин. (9-расм). Сунъий равишда ҳайвонларни иммунизация қилинганда ҳосил бўлган антителолар иммуноглобулинлар синфига киради ва улар кўпинча иммунология усуллари ёр-дамида аниқлаш ишларида катта аҳамиятга эгадир.

Юқорида айтилгандек, ишлаб чиқилган диагностиканинг иммунологияга асосланган усуллари антиген ва антителонинг ўзаро таъсирига асосланган бўлиб, уларни шартли равишда бир неча гуруҳларга бўлиш мумкин:

Вирусларни антителолар билан **преципитациясига** асосланган усуллар; Антиген ва антителонинг преципитация қилиниш реакцияси бирор нейтрал муҳитда, масалан, агар гелида юз берадиган усуллар, яна бир қатор диффузияга асосланган, аммо диффузия доимий электр майдони ёрда—мида тезлатиладиган усуллардир.

Бир қатор усуллар эса **агглютинация** реакциясига асосланган бўлиб, бу ҳолатда бирорта олиб юрувчи зарра (носитель) антителолар билан бириктирилиб унга вирус қўшилганда вируслар унга ёпишиб агглютинат ҳосил қилади. Ҳосил бўлган агрегатларни оддий кўз билан лупа ёрдамида 2—5 маротаба катталаштириб кўриш мумкин.

Яна бир гуруҳ усуллар мавжуд бўлиб, улар жуда катта сезгирликка эга. Бу усуллар ишлатилганда иммун реакция—ларда **нишонланган** моддалар (ё антитело, ё вирус) ишлати—лади. Нишон бўлиб радиоактив моддалар, флуоресценсия **(ўтувчи нурда бир рангда (яшил), қайтувчи нурда бошқа (қўнғир) рангда товланиш ҳодисаси)хусусиятига эга модда—лар, ферментлар ёки ДНК—зондлар—**(аввалдан таркиби маълум бўлган номаълум моддаларга қўшилиб унинг тузи—лишини аниқлашда ёрдам берувчи моддалар) нишонланган аниқ нуклеотидлар ишлатилади.

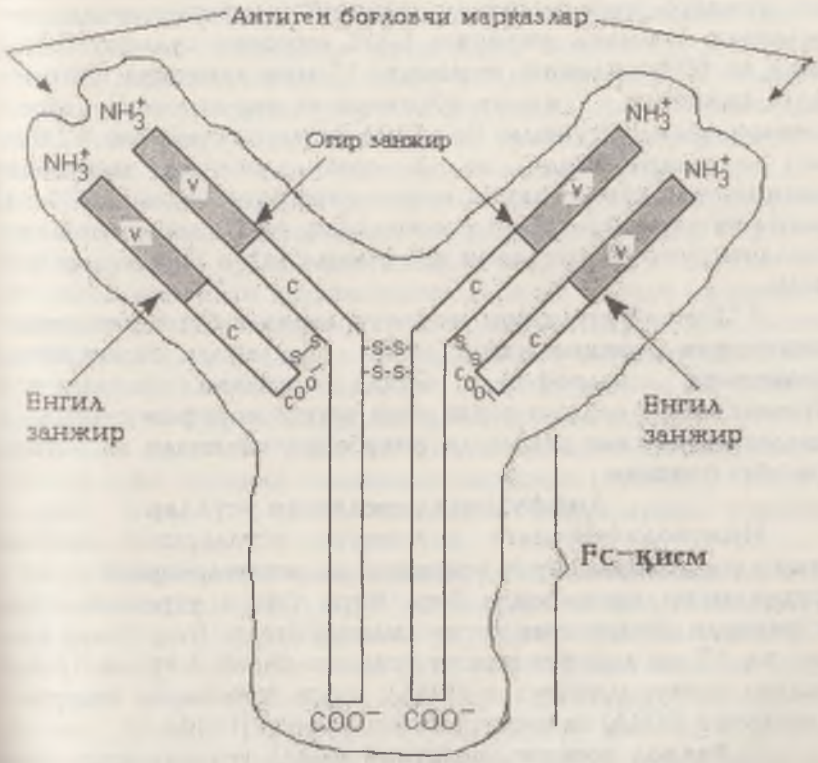
Булардан ташқари қимматбаҳо асбобларга боғлиқ бўл—ган иммунология усуллари бўлиб буларга **иммуноэлектрон микроскоп** ёрдамидаги усулни кўрсатиш мумкин.

Преципитация реакциясига асосланган усуллар.

1. Қишлоқ хўжалигида кенг кўламда қўлланилган пио—нер усуллардан бири Дунин ва Попова томонидан яратилган, антитело ва антиген тутувчи томчиларни бир—бирига ара—лаштиришга асосланган ва амалиётда **"томчи усули"** (ТУ) деб ном олган усулни кўрсатиш мумкин.

Бу усул ишлатилганда ўсимликни тозаланмаган шира—сининг 1 томчиси антизардобнинг бир томчиси билан ара—лаштирилади. Бунда хлоропластларга, ҳужайра деворининг қисмларига, митохондрияларга ва бошқа ҳужайра қисмларига ёпишган вирус зарралари буюм ойнасига томи—зилган бир томчи антизардоб билан муносабатда бўлади, реакцияга киришади ва кўз илғайдиган преципитат ҳосил қилади. Бу усулнинг сезгирлиги тозаланмаган ўсимлик ши—раларидаги вирусларни жиҳатдан анча пастдир, шунинг учун

ҳам бу усул ўсимлик ҳужайраларида кўп тўпланадиган ви— русларни аниқлашда ишлатилади. Масалан, бундай вирус— ларга тамаки мозаикаси (ТМВ), картошканинг Х—вируслари киради, улар ҳужайрада юқори концентрацияда тўпланади, яъни 1 кг вирус билан касалланган тамаки баргидан 1—3 грамм вирус ажратиш мумкин (10а—10г расмлар). Бошқа хил вируслар масалан, картошканинг У—вируси, жўхорининг пакана мозаикаси вируслари эса ҳужайрада жуда кам тў— планади. 1 кг ўсимлик баргидан 0,02 гр ва ундан ҳам кам вирус ажратиб олиш мумкин (10 д расм).



9—расм. Антитела молекуласининг тузилиши. Оғир ва енгил занжирлар дисульфид боғлар билан бириктирилган. N—томони оғирги (NH_3^+) ва С—томони (COO^-)қисмлар, ҳамда ҳар бир занжир— ларги вариабел (V) (ўзгарувчан) ва константа (С) қисмлари кўрсатилган.

"Томчи" усулнинг (ТУ) такомиллаштирилган варианти ҳам мавжуд бўлиб, улардан ҳалқа преципитация усулини кўрсатиш мумкин, бу усул қўлланилганда реакция пробиркаларда олиб борилади. Пробиркадаги вирусга (антигенга) гомолог бўлган антизардоб қўшилганда вирус ва антисиворотка бир бири билан қўшилган зонада ҳалқасимон преципитат ҳосил бўлади. Бу усулда вирусларни аниқлаш тез амалга ошади, аммо усулнинг сезгирлиги анча пастдир.

2. "Томчи" методнинг яна бир такомиллаштирилган тури — аммоний сульфат усулидир (АСУ). Унинг юқоридаги вариантларидан фарқи шундаки, реакцияда иштирок этаётган ҳужайра ширасиқисман аммоний сульфат ёрдамида тозаланади. Ўсимлик ширасига 1,31% аммоний сульфат солинади ва 6000 айланиш тезлигида 15 мин давомида центрифуга қилинади. Ўсимлик тўқимаси ва ҳар хил оқсил агрегатлари чўкмага тушади. Ва чўкма устидаги суюқлик АС билан аралаштирилади ва 3 соат давомида инкубация қилингандан сўнг реакция натижалари лупа ёрдамида 10—16 марта катта қилиб кўриб ҳисобланади. АСУ картошкани касаллантирувчи вирусларни аниқлашда яхши натижалар беради.

3."Томчи" усулининг микротурларидан бири **микропреципитация реакциясидир** (МПР). Бу усулда оширилганда реакцияси гидрофоб сатҳда амалга оширилади, буғланишнинг олдини олиш учун устига парафин суртилади, аралашма 24 соат давомида инкубация қилинади ва натижа ҳисобга олинади.

Диффузияга асосланган усуллар

Иммунодиффузияга асосланган усулларнинг асосида агар—агар гелида вирус (антиген) ва антителоларнинг диффузияланиш натижасида бир—бири билан учрашиб, кўзга кўринарли преципитат ҳосил қилиши ётади. Бу усуллар вирус ва АТ ни диффузиясини ўтишига қараб 3 турли бўлади: радиал иммунодиффузия (РИД), икки томонлама иммунодиффузия (ИИД) ва иммуноэлектрофорез (ИЭФ).

1. **Радиал иммунодиффузия** (РИД) усулида агар—агар гелига АС солиниб шимдирилади ва гелда тайёрланган чуқурчага вирус (АГ) қуйилади. Вирус радиал йўналишда тарқалади (диффузия бўлади) ва чуқурча атрофида антиген

билан учрашиб преципитат ҳосил бўлади. РИД қулай ва сезгир усуллардандир. Уларни биринчи марта Ухтерлони ва сўнгра мукаммаллаштирилган вариантларини Зильбер ва Абелев тиббиёт ишларида қўлладилар. Кейинчалик бу усул ўсимлик вирусларини аниқлашда ишлатила бошланди. Шарсимон вируслар агар—агар гелида осон диффузия бў—лади ва чуқурча атрофида кўзга яхши кўринадиган ҳалқасимон преципитат ҳосил бўлади. Аммо 0,75—1% агар—агар геллари бўшлиқларида йирик ва ипсимон вирусларнинг диффузияси анча қийин бўлади. Диффузияни енгиллашти—риш ва махсус преципитатнинг ҳосил бўлишини тезлашти—риш учун вирус заррасини (антигенини) парчаланади ва ре—акцияда ишлатилади. Парчаланиш учун одатда баъзи кимё—вий моддалар—пиридин, пирролидон, формамид,, мочевина, натрий додецилсульфати (SDS) ҳамда физикавий таъсир—лардан ультратовуш, термоденатурация ва бошқалардан фойдаланилади. Вирус оқсилининг бу хилдаги деградацияси таъсирида вирус ташқи қаватининг олигомер оқсиллари ҳо—сил бўлади ва уларни Д—оқсили деб аталади. Д—оқсили молекула массаси жиҳатидан вирус молекуласидан бир неча баробар кичик бўлганлиги сабабли агар—агар гелининг те—шиклари орасидан қаршиликсиз ҳаракат қилади ва преци—питация реакцияларида иштирок этади. Шуни ҳам айтиш жойизки, баъзи ҳолларда Д—оқсилининг спецификлиги ви—рус спецификлигидан бирмунча фарқ қилади ва шу сабабли денатурация бўлган вирус преципитацияда иштирок этмас—лиги ҳам мумкин. Масалан, бундай ҳолатни денатурация—ланган арпа чизиқли мозаикаси вирусида (АЧМВ), картош—канинг Х—, С—, М— мозаикали вирусларида учратиш мумкин.

2. Иккиёқлама иммунодиффузия реакциясидан (ИИД) фойдаланилганда РИД каби антизардоб агарга шимдирил—майди, АГ ва АЗ тўлдирилган чуқурчалар орасида преципи—тат ҳосил бўлади. Бу икки усул баъзи жиҳатларидан бир—биридан фарқ қилса ҳам олинган натижалар ИИД дагига ўхшаш бўлади (Ухтерлрони томонидан ишлаб чиқилган, кейинчалик микроварианти Зильбер ва Абелов томонидан яратилди). РИД нинг сезгирлиги ИИД никига қараганда анча юқоридир. Масалан, бу ҳолатни картошканинг Х—вирусини аниқлашда яхши кўриш мумкин, яъни РИД усулида ХВК ни

1 мкг/мл, ИИД эа эса 10 мкг/мл миқдорида аниқлаш мумкин (10—жадвал). РИД ва ИИД усулларининг сезгирлигини ХВК нинг Д—оқсилини аниқлашдаги ҳолатини кўрадиган бўлсак, бу сезгирлик қуйидагича бўлади: МПР—0,5 мкг/мл, РИД—1мкг/мл ва ИИД—10 мкг/мл дир.

ИИД нинг сезгирлиги қатор омилларга боғлиқдир. Шу—лардан маълум ўринни "вирус—антитело" системаси ўй—найди. Чунки, 0,6% ли агар—агарда 0,1% натрий додецил сульфат ва АЧМВ нинг д—оқсили антизардоб иштирокида АЧМВ ни 0—15 мкг/мл концентрацияда аниқлаш мумкин. Аммо, худди шунга ўхшаш шароитда цитрус ўсимликлари—нинг вирусларини аниқганда сезгирлик даражаси 1—2 мкг/мл гача боради. Кўринишдан, биринчи ҳолатда ишла—тилган АЗ нинг титри паст бўлган бўлиши мумкин, иккин—чидан АГ ва АЗ солинган чуқурчаларнинг кенглиги ва ҳажми орасидаги масофа, детергент тури ва концентрацияси, на—трий азиди ва агар—агарларнинг концентрацияси ва марка—си маълум роль ўйнаши мумкин.

РИД ва ИИД усуллари ёрдамида кенг масштабда кўплаб анализлар қилишга имкониятлар туғилди. Масалан, 90 мм диаметрли Петри косачасида 500—600 намунани жойлашти—риш ва анализ қилиш мумкин.

3. Иммуноэлектрофорез усули (ИЭУ). Бу усул вирус—ларни аниқлашда, аввалгиларига қараганда нисбатан камроқ ишлатилади. Бу усулда чуқурчадаги АГ ни эркин радиал диффузияси доимий электр майдони таъсирида бир йўналиш бўйлаб бўладиган диффузия билан алмаштирилади. АЗ билан реакцияга электр майдонида ҳар хил диффузия натижасида ҳар хил масофада жойлашган АГ лар киради ва преципитат чўққилари ҳосил бўлади. Денситометр ёрдамида кузатила—диган АГ концентрацияси қанча юқори бўлса преципитация чўққилари ҳам шунча кўп ва баланд бўлади.

Оптимал шароитда ИЭФ ўтказиб бодиринг мозаикаси вирусини 0,5—5 мкг/мл миқдоргача аниқлаш мумкин. ИЭФ ни тобамовирусларни (тобамовирус—тамаки мозаикаси ви—руси "инглизча") серология типларини аниқлашда кенг иш—латилади.

Ҳамма иммунодиффузия усулларидан яхши натижа олиш АГ ва АТ нинг агар—агардаги диффузиясига

боғлиқдир. Ундан ташқари баъзи ҳолларда носпецифик ре—акциялар ҳам бўлади ва "ёлғон" преципитация линиялар ҳосил бўлади. Бундай ҳолни кузатиш асбобларидан бири денатурацияга учраган ҳужайра қисмларини носпецифик бирикишидан, ўсимлик ҳужайра ширасидаги фитогемоагг—лютининлар борлигидан, ўсимлик полифенол ва танин мод—даларининг АЗ оқсиллари билан реакцияси натижасида ҳамда "ёпиштирғич" ва бошқа моддаларни бор эканликлари бундай ҳолатларни юзага келтирадиган сабаблардандир.

Агглютинация реакциясига асосланган усуллар.

Бу усулда бирорта модда ёки ҳужайра (латекс, бенто—нит, эритроцит, бактерия ҳужайраси ва ҳакозолар) АЗ билан нишонланади (сенсибилизация қилинади). Агар бундай сен—сибилизация қилинган модда ёки ҳужайра суспензиясига вирус зарралари қўшилса вирус ва антизардобнинг реак—цияси натижасида ҳар хил размерлик агрегатлар ҳосил бў—лади. Қуйида шу усуллар ҳақида сўз юритилади.

1. Латекс усули (ЛУ). АЗ ни полистиролдан тайёрланган латекс зарраларига аралаштириб латекс зарраси устига АТ молекулаларини иммобилизацияланади, ва латекс зарраси АТ билан нишонланади. Бундай нишонланган латекс зарралари ёрдамида вирусларни аниқлашни биринчи марта Беркс то—монидан амалга оширилди. Латекснинг 0,81 мкм диаметрли зарраларини АЗ нинг гамма глобулин фракциясига қўшилса нишонланган латекс ҳосил бўлади ва уни диагностикум (аниқлагич) деб аталади. Бу усулни фитовирусларни аниқлашда ишлатиш учун бир томчи диагностикумни буюм ойнасида ёки капилярда 1 томчи ўсимлик шираси билан аралаштирилади ва махсус тебратгичда тебратилади, маълум муддатдан сўнг натижа кузатилади ва ҳисобланади. Агарда реакция натижаси ижобий бўлса, латекс зарралари бирла—шиб агглютинатлар ҳосил қилади, натижани оддий кўз ёр—дамида ёки микроскопнинг кичик объективида кузатса ҳам бўлади.

Бу усул билан шолғомнинг сариқ мозаикаси (шарсимон формада) аниқланганда "томчи" усулига қараганда 25—100 марта сезгирлик юқори бўлади, тайёқчасимон вирусларни аниқлаганда эса бу катталик 12—100 марта бўлиши мумкин. ХВК ва СВК тоза препаратларини аниқлаганда сезгирлик

0,1—0,5 мкг/мл ни ташкил этади. Аниқлашга сарфланган вақт 10—60 мин ни ташкил этади.

2. Латекс оқсил—А усули (ЛОА). Латекс усулининг сўнгги такомиллаштирилган варианти тилла ранглі стафилококкларнинг А—оқсилини ишлатиб амалга оширилади. Бу усулда латекс зарралари аввало А—оқсили билан сенсибиллашади, сўнгра унинг устидан АЗ нинг иммуноглобулин фракцияси билан нишонланади. Қолган аниқлаш усуллари латекс усулларидек олиб борилади. Бу усул қўлланилганда латекс усулига қараганда сезгирлик анча ошади. Бу усулнинг яна бир афзаллик томони шундан иборатки, титри паст бўлган АЗ лар ҳам бемалол ишлатилаверади.

Усулнинг сезгирлиги латекс тестига қараганда картошканинг У—вирусини ва олма мозаикаси вирусларини аниқлаганда 2—16 мартани ташкил этади. Сезгирлик ошишини қуйидагича тушунтириш мумкин: латекс усулида АТ ларни носпецифик равишда бириктиради, ЛОА усулида латекс зарралари А—оқсили билан сенсибиллаштирилганда эса иммуноглобулинларни бирикиш миқдори ошади. Иккинчидан ЛУ ва АТ лар латекс заррасига бириккан бўлса, ЛОА усулида эса сенсибилланган латексга маълум томони билангина батартиб боғланади ва антиген—боғловчи марказларнинг ҳаммаси фақат ташқарига йўналган бўлади.

Латексга асосланган усулларнинг юқори сезгирлиги тез амалга оширилиши ва паст титрлик АЗ ларни ишлатиш мумкинлиги, уларни фақат лабороториялардагина эмас, балки кенг дала шароитларида ҳам ишлатиш мумкин. Бу усул ёрдамида ХВК, УВК, СВК вирусларини ўсимлик баргларида 4—10 минутдаёқ аниқлаш мумкин.

3. Бентонит флокуллациясига асосланган усул (БФУ). Бу усулнинг ўзига хослиги шундан иборатки, латекс ўрнига бентонит зарралари ишлатилади. Бентонит осон гидратланувчи алюмосиликат бўлиб, суспензия ҳолатида турганда, латекс каби носпецифик равишда оқсилларни ёпиштириш хусусиятига эга. Шунинг учун бентонитни АЗ билан эмас, балки ундан аммоний сульфат билан ажратиб олинадиган гаммаглобулин фракцияси билан сенсибилланади. БФУ ни амалга ошириш ва уни натижаларини ҳисоблаш ЛУ га ўхшайди. Тамаки мозаикаси вируси, помидордаги ҳалқа доғли

вирусларни бу усул билан тоза препаратда 0,3—1 мкг/мл гача аниқлаш мумкин.

4. Тескари гемааглютинацияси усули (ТГА). Бу усул фитовирусларни аниқлашда жуда кам қўлланилади. Фақатгина вирусларнинг капсид оқсилида гемагглютинин бўлсагина ТГА усули қўл келади. Одатда эритроцитлик ди—агностикум "тескари" ҳолда тайёрланади, яъни эритроцитни ташқи сатҳига АТ ларни би— ва полифункцияли агентлар (глутар диальдегиди, госсипол, формальдегид, хлорли хром, танин ва бошқалар) ёрдамида "тикилади". Қолган аниқлаш ишлари худди ЛУ ни эслатади. ТГА усули фитовирусларни аниқлаганда унинг сезгирлиги АЧМВ учун 0,01 мкг/мл ни ташкил этади. Қатор вируслар учун ТГА усулининг сезгир—лиги ЛУ никидан 8—40 марта кўпдир.

5. Вирус бактерия аглютинацияси усули (ВБА). Латекс, бентонит ёки эритроцит кабиларни ўрнига микроорганизм—ларни ҳам ишлатиш мумкин. Масалан, баъзи микроорга—низмларнинг ташқи пўст қаватида фанда А—оқсил деб ном—ланган оқсил мавжуд бўлиб, у АТ лар билан специфик боғланиш хусусиятига эгадир. Бундай микроорганизм ста—филакокклар авлоди вакилларидан бўлган тилласимон ста—филакокк бўлиб, у анча кенг кўламда, ҳар хил мақсадларда қўлланилади.

АЗ ларни стафилакокк ҳужайраларига қўшиб, сўнгра АГ ни қўшилса, натижада, жуда тезлик билан агглютинатлар ҳосил бўлади. Бу усул авваллари микроорганизмларни серо—логик гуруҳларга бўлишда ишлатилган эди. Кейинчалик бу усул фитовирусларни аниқлашда ўзига хос муносиб ўринни эгаллайдиган бўлди.Тилларанг стафилакокларнинг ҳужайра пўстидаги А—оқсили иммуноглобулинларнинг фақат F_c—участкалари билангина боғланиш хусусиятига эгадир, шу билан бирга АТ даги АГ бирикадиган қисм банд бўлмай очиқ қолади. Бу хусусият қатор микроорганизмларга хос бўлса керак, аммо бу ишлар ҳали чуқур ўрганилган эмас. А—оқсилининг жойланиши билан чуқурроқ танишмоқчи бўлсак, у ҳужайрани ташқи деворининг энг устки қаватида бир те—кисда тарқалган ҳолда жойлашгандир. А—оқсилнинг тоза—ланган препаратларини хроматография усули билан тоза ҳолда олиб, унинг физикавий ва кимёвий хусусиятларини ўрганилган. Натижалар шуни кўрсатадики, АГ ва АТ бир—

бири билан боғланган бўлсада бу комплекс А—оқсили билан боғланиш хусусиятларини йўқотмайди. Ундан ташқари АТ нинг F_c фрагментининг А—оқсилига нисбатан мойиллиги ошади. А—оқсилининг бу хоссалари ва унинг микробиология амалиётида кенг кўламда қўлланилиши ВБА усулини фито—вирусларни тезкорлик билан аниқлаш учун ишлаб чиқилишига сабаб бўлди. Бу усулнинг моҳияти қуйидагичадир: бир ҳажм 10 % стафилакоккнинг суспен—зияси 5—7 ҳажмда аниқланадиган вирус АЗ билан аралаш—тирилади. Ҳосил бўлган комплекс диагностикум дейилади. Намуналардаги вируснинг миқдорини аниқлаш учун диаг—ностикумнинг бир томчисини буюм ойнасидаги бир томчи вируси бор намуна билан аралаштирилади. Пайдо бўлган агглютинатларни оддий кўз билан ҳам кўриш мумкин. Бу усул билан вирусларни 0,2—0,5 мкг/мл гача аниқлаш мумкин Бу усулнинг сезгирлиги РИД, ФИА ва ИФА усулларникига яқинлашиб боради. ВБА усулининг оддийлиги кам реактив—ларнинг сарфланиши ҳамда кам вақт талаб қилишлиги ама—лиётда кўп муаммоларни ечишда қўл келади ва уни кенг тарқалишига сабаб бўлади. Бу усулнинг авторларидан бири бўлган Чирков С.Н. тадқиқотларида бу усулнинг кенг ку—ламда қўлланиб 7 та ҳар хил гуруҳга мансуб вирусларни аниқлашда ишлатилган. Усулни тежамлилигини шундан кўрса ҳам бўлади, масалан, ишлатиладиган АЗ лар 100—200 мартагача суюлтирилиб сўнгра ишлатилади. Ҳужайрада кам тўпланадиган вирусларни аниқлаганда ўсимлик ширасини 2000 мартагача суюлтирилганда ҳам ВБА усули қўл келади. Бу усул билан бодиринг, арпа мозаикалари вирусларини 32—64 марта суюлтирилганда ҳам касал ўсимлик шираларида аниқланди.

Маълумки, олинган АЗ ларда АТ лардан ташқари кўп—гина қондаги ҳар хил оқсиллар бўлади. Буларнинг орасидан АТ ларни тоза ҳолда олинган препаратлари ишлатилиб, усулнинг сезгирлигини янада ошириш мумкин. Чирков то—монидан тозаланган АТ лар ишлатилиб усул сезгирлигини 0,002 мкг/мл гача оширилади. Қисман тозаланган аммоний сульфати ёрдамида ажратилган гамма глобулин фракциясини ишлатилганда эса сезгирлик 0,2 мкг/мл ни ташкил қилади, холос.

Носпецифик реакцияларнинг олдини олиш мақсадида юқори титрли АЗ ларни ишлатиш мақсадга мувофиқ бўлади. ВБА усули ҳужайрада кўп тўпланадиган вирусларни — Х, У, М каби картошка вирусларини, тамаки, бодиринг мозаикаси вирусларини аниқлашда кенг кўламда қўлланилмоқда. Ана шу билан бир қаторда баъзи ўсимликлардаги вирусларни аниқлаш зарур бўлганда ўсимликларнинг ўсиш ва ривожланиш жойига қараб уларда тўпланадиган баъзи моддалар носпецифик реакцияларнинг содир бўлишига сабаб бўлиши мумкин. Масалан, бу ҳодисани Ленинград областида помидор вирусларини (ТМВ) ни аниқлаганда кузатилди. Шу ўсимлик вирусини ВБА усули билан жанубий минтақаларда аниқланса (масалан, Тошкент областида) носпецифик реакция, аксинча кузатилмайди. Демак, ўсимликларнинг ривожланиш ери унда тўпланадиган баъзи моддалар ВБА усулида аниқлаш ишларини олиб боришга ҳалақит қилиши мумкин. Бундай вақтларда ўсимлик ширасини центрифуга қилиниб қисман тозаланса, носпецифик реакциянинг олди олинади.

ВБА агглютинация усулларига асосланган усулларнинг энг афзалидир. Чунки "томчи" ёки "аммоний сульфат" усуллари ёрдамида вирусларни аниқлаб бўлмаган ҳолларда ВБА усулида вирусларни бемалол аниқласа бўлади. Шунинг учун ҳам картошкани кўзчаларидаги, ўсимталаридаги кам миқдорда тўпланадиган картошка вирусларини юқоридаги усулларда аниқлаб бўлмаган ҳолларда ВБА усули ёрдамида муваффақият билан аниқланади. Бу усул яна картошка вирусларини, жўхорининг пакана мозаикаси вирусларини тўқимада тўпланиш динамикасини ўрганишда ҳар хил навларга караб картошкада вирусларни ҳар хил тўпланиши мумкинлигини кўрсатиб беради.

Шу билан бир қаторда иммунология усулларини солиштирма ўрганишлар меристемадаги чиннигул вирусларини РИД, ИИД, ВБА ва ИФА усуллари билан аниқлаш мумкинлигини кўрсатади. Аммо ёз фаслида ВБА усули, куз ва қиш фаслларида эса тўқима вирус миқдори кам бўлган ҳолларда ИФА усули яхши натижалар беради.

Нишонланган моддалар ишлатишга асосланган усуллар.

Юқорида келтирилган преципитация ва агглютинация реакцияларига асосланган усуллар аниқланадиган вируснинг

миқдори намунада кўп бўлишини талаб этади. Табиийки, иммунохимия реакциясида қатнашадиган АТ ни ёки АГ ни бирорта модда (фермент, радиоактив моддалар) билан нишонланса, иммунохимия реакциясини ўтишини яхшилаб, усул сезгирлигини бир неча мартага ошириш мумкин. Кейинги йилларда ҳар хил нишонларга асосланган усуллар ривожланмоқда. Булардан РИА, ФИА, ИФА ва комплементар ДНК—зондга ("дот—спот") асосланган усулларни кўрсатиш мумкин.

1. РИА усули. Сезгирлиги жиҳатидан энг мукаммал бўлган иммунология усулларидандир. Бу усулнинг моҳияти шундан иборатки, бирорта вирус АТ си радиоактив йод (I^{125} ёки I^{131}) билан нишонланади. Бу усулни фитовирусологияда 1973 йилда Болл томонидан қўлланилди. Аввало қаттиқ фазага (полистиролдан қилинган чуқурчалар мажмуаси) вирус зарраларининг АТ лари иммобилизация (полистиролга боғланиб, ҳаракатсизланиш) қилинади ва ундан сўнг АГ солинади ва маълум вақтдан сўнг нишонланган АТ лар солинади. Бу усулни ишлатиб вирус аниқланганда сезгирлик 0,5 мкг/мл дан то нанограммаларгача бўлиши мумкин. Масалан, Габриель ўз ўқувчилари билан ушбу усулни қўллаб гулкарам мозаикаси вирусини 5 нг/мл гача сезгирлик билан аниқлади.

2. Флуоресцент зондлар (Флуресценция бирорта модданинг (м., хлорофилл) ўтувчи нурда бир рангда (яшил) қайтарувчи нурда бошқа (қўнғир) рангда турланувчи хусусияти). (Зонд аввалдан таркиби маълум бўлган ва номаълум моддага қўшиб унинг тузилишини аниқлашда ёрдам берувчи модда.) ёрдамида вирус аниқлаш усулларида люминесцент нишонни аниқланмоқчи бўлган вируснинг АТ си таркибига киритилади. Жўхори хлорози вирусини АТ сини флуресцент зонд билан кимёвий ўзгартириб юқори сезгирликда аниқланганлиги бунга мисол бўлиши мумкин. Бу усул фақатгина вируснинг миқдорий аниқлашдан ташқари, касал ўсимлик тўқималарида жойлашган ўрнини аниқлашда ҳам катта аҳамиятга эгадир.

3. Иммунофермент анализи. Кейинги йилларда нишон сифатида биокатализаторлар—ферментлар ишлатилмоқда. Бу ҳолда фермент ўтказадиган реакция иммун реакцияни ўзига хос "молекулали кучайтиргичи" бўлиб хизмат қилади. Иммунофермент усули микроорганизмларни, вирусларни ва

бошқа тур моддаларни аниқлашда махсус ўрин эгаллайди ва иммунология усуллари орасида фитовирусларни аниқлайдиган энг сезгир усул ҳисобланади.

1976 йилда Адамс ва Кларк ўсимлик вирусларини аниқлашда биринчи марта ИФА ни қўллади. Бу усулнинг моҳияти шундан иборатки, фермент ёки кофермент ўтадиган кимёвий реакцияни тезлаштиради.

Ҳозирги вақтда ишлатиладиган ИФА 4 принципга асосланган-дир: титрлаш, конкуренция, экранланиш ва "сэн—двич"—вариант. Бу принциплардан ўсимлик вируслари аниқлаш амалиётида энг кўп қўлланиладигани "сэндвич"—вариантдир. Бу принципни қўллаб вирус аниқлаш қуйидагича амалга оширилади. Полистирол платаларга (Полистиролдан ясалган АТ ларни иммобилизация қиладиган чуқурчалар мажмуаси) аниқланадиган вируснинг иммуноглобулинлари иммобилизация қилинади ортиқча АТ лар ювиб ташланади. Унинг устига аниқланадиган вирус намунаси қуйилади, маълум вақт инкубация қилингандан сўнг ёпишмаган ортиқча вирус иммуноглобулинлари иммобилизация қилинади, сўнгра ортиқча АТ лар ювиб ташланади ва сўнгра аниқланадиган вирус намунаси қуйилади, маълум вақт инкубация қилингандан сўнг ёпишмаган ортиқча вирус ювиб ташланади. Сўнгра фермент билан нишонланган конъюгат қуйилади. Маълум муддатдан кейин яъни инкубация қилингандан сўнг конъюгатнинг ҳам ортиқчаси ювиб ташланади ва нишон сифатида ферментга хос субстрат солинади. Субстратни фермент томонидан парчаланганда ҳосил бўлган модда рангли бўладиган бўлса платаларда ёрқин ранг ҳосил бўлади. Рангнинг кўп ёки камлиги вируснинг борлигини ёки камлигини ёки йўқлигини кўрсатади. Фермент—субстрат жуфтини мослаб, у ёки бу субстратни ишлатиб ҳосил бўлган моддаларнинг ранги, электр ўтказувчанлиги, pH нинг ўзгариши, бирорта моддани ҳосил бўлиши ёки йўқолишига қараб ишлатиладиган ИФА усулининг аниқлагич ашаратларини тузиш ва уларни автоматлашган ҳолда аниқлашга ўтказиш мумкин. Баъзи вақтда микроплаталарга иммуноглобулинлар ёпиштирилиб ўтирмасдан, тўғридан—тўғри аниқланадиган вирус (АГ) ёпиштирилади ва қолган аниқлаш йўллари юқорида кўрсатилгандек олиб борилади. Бу

усулга ИФА нинг "сэндвич" турининг "тўғри" тури дейилади.

ИФА нинг бошқа бир кўринишига эса "нотўғри" тур дейилади. Бу ҳолда платаларни АТ ларни сенсибилизация (сезиш — инглизча) қилиб ёки қилмасдан ҳам ишлатиш мумкин. Фермент билан иммуноглобулинлар эмас АТ лар нишонланади. Қолган аниқлаш ишлари юқоридагидек олиб борилади.

ИФА усулининг сезгирлигини оширишнинг бирдан бири тозаланган АТ лар ишлатишдир. АТ ларни тозалашни аммоний сульфат, полиэтиленгликоль каби чўктирувчи моддалар билан гаммаглобулин фракцияларини олиш каби усуллари ўрнига хроматография, айниқса, биоспецифик хроматография усуллари катта натижалар бермоқда.

Ҳозирги вақтда АТ ларни олишни ген инженерлиги ёрдамида амалга ошириш ишлари йўлга қўйилмоқда. Олинган АТ лар маълум антиген детерминантга (вирус устидаги АТ ҳосил қилишда иштирок этадиган бирикма) хос бўлгани учун уни моноклонал АТ дейилади. Вирус оқсилининг юзасида бир нечта юз аминокислота қолдиғидан иборат антиген детерминанта эпитоп дейилади. Шунинг учун ҳам ҳайвон қонидан олинган зардобда кўпгина ҳар хил АТ лар типи учрайди. Уларнинг ҳар бири оқсил молекуласининг бирорта эпитопига мос келади. АТ ни ҳар бир типи ўзининг В лимфоцит клони томонидан ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган АТ лар моноклонал АТ лар дейилади (МКАТ). МКАТ ишлатиш вирус штаммларини нозик серотипларга гуруҳлашда жуда қўл келади. Масалан, ТМВ нинг ўнта штаммини серотипларга ажратиш МКАТ ишлатган ҳолда ИФА усулида аниқланганда 7 та ҳар турли штаммлар эканлиги аниқланди.

ИФА ёрдамида кўплаб вирусларнинг тозаланган препаратларида, ўсимлик шираларида ўтасезгирлик билан аниқлаш мумкинлиги 11 — жадвалда кўрсатилган

11 — жадвал

ИФА ёрдамида фитовирусларни диагностика қилиш

Вирус гуруҳлари	Вирус номлари	Намуна турлари	Сезгирлик даражаси
Клостеро —	цитруслар вируси	Апельсин дарах —	2 — 20 нг/м^{1}

вируслар		тининг ҳар хил қисмлари	
Потивирус лар	жўхорининг пакана мозаикаси вируси	жўхори барги	1 – 40 нг/м
Карлови – руслар	хмел мозаикаси ви – руси	тоза вирус	10 нг/мл
Потексви – руслар	беданинг оқ мозаи – каси вируси	беда барги	5 нг/мл
Гордеови – руслар	арпа штрихли мо – заикаси вируси	арпа уруғи	5 нг/мл
Тобамови – руслар	ТМВ	тамаки барги	1 нг/мл
Беда мо – заикаси вируси	Беда мозаикаси ви – руси	беда барги	5 нг/мл
Кукумови – руслар	бодринг мозаикаси вируси	тоза вирус	10 нг/мл
Каулимо вируслар	чиннигулни ҳалқа нақшли вируси	чиннигул барги	1 нг/мл
Реовируслар	шолининг пакана чизиқли вируси	шоли барги	1:320

[1]Нанограмм – 0,000 000 001 граммга тенг бўлиб, нано сўзи лотинча тўққиз деган маънони англатади.

Адабиётлар

1. Атабеков И.Г. Иммунодиагностика вирусов растений- резервные милиарды в сельском хозяйстве . Биотехнология.-1984. -С. 234-238.
2. Атабеков И.Г. .Чирков С.Н. Методические рекомендации по применению реакции виробактериальной агглютинации (АБВ-теста)для диагностики . вирусов растений -М. -1985. -С. 20.
3. Зильбер Л.А., Абелев Г.И. Вирусология и иммунология рака. -М 1962. -458 с.
4. Жатон Ж.К., Брандт Д.Ч., Вассали П. Выделение и характеристика иммуноглобулинов, антител и их полипептидных цепей. Методы исследований в иммунологии. -М: Мир, 1981. -С. 58-82.
5. Чирков С.Н. Новый метод иммунодиагностики фитовирусов-виробактериальная агглютинация (АБВ-тест). Дис... канд.биол. наук. -Киев. 1982. 22 с.

6. Чирков С.Н. АБВ-тест: экспресс-метод иммунодиагностики фитовирусов. Сельскохозяйственная биология. -1983. - №5. -С. 42-46.
7. Чирков С.Н . ,Варицев Ю.А., Герасимов К.Ф., Атабеков И.Г. Сравнение трех серологических методов диагностики Х-, С-.М- и У-вирусов картофеля на разных стадиях развития растений. Доклады ВАСХНИЛ. № 3. -С.14-16

29–машғулот

Вирус бактерия агглютинацияси усули

ВБА усулини юқорида баён этилган усуллар билан солиштирилганда унинг қуйидаги афзалликлари намоён бўлади: диагностиканинг аниқлиги ВБА усули ишлатилганда 5 марта ошади, шу билан бирга вирус аниқлаш сезгирлиги 0,2–0,5 мкг/мл ни ташкил этади, "томчи" усулига қараганда 10–12 минут кам вақт сарфланади. Вирус билан касалланган ўсимликдан олинган ширада вирус 32 мартагача суюлтирилганда ТУД билан 10–20 минут давомида аниқланса, шу намунани ВБА усулида 1–2 минутда аниқласа бўлади. Титр даражаси 1:32 бўлган АЗ билан 100 та анализни қилиш учун 1 мл 50–100 марта суюлтирилганда АЗ ишлатилади ва унга кетадиган вақт 5–6 соатдан ошмайди.

Ишдан мақсад. ВБА усулини ўрганиш ва у ёрдамида қишлоқ хўжалик ўсимликларида, вирус сақловчи резерватор ўсимликларда, вирус тарқатувчи ҳашоратларда, ўсимликларга ишлов берувчи асбоб–ускуналарда, тупроқда ва бошқа намуналарда вирусларнинг борлигини, қайси таксономия гуруҳига мансублигини аниқлашда ҳамда тажрибахоналарда олиб бориладиган ҳар хил анализлар қилишдир.

Материаллар: вирусли намуна, корунд ёки корборунд, фрейнд адюванти, Staphiloccus aureus Кован штамми, иммунзардоб олишда ишлатиладиган ҳайвонлар: (2–2,5 кг ли Шиншилла зотига мансуб қуёнлар)

Аниқлагич ўсимликлар: Nicotiana tabacum Самсун нави lycopersicum esculentum Юсупов нави ёки бошқа вирусга сезгир ва вирус кўп тўпловчи ўсимликлар.

Ускуналар: Минутига 6000 айланадиган центрифуга, пробиркалари pH метр, , аналитик ва техник тарозлар, сув пурковчи насос, спектрофометр Сф–26, 1,2 ва 5 мл шприц–лар, термостат, кристализатор, магнит аралаштиргич, ўсим–лик ширасини сиқиб чиқарадиган қурилма (пресс).

Реактивлар: "Дифко" агари, натрий хлор, формальде–гид, мертиолат, вирус билан касалланган ўсимлик барги, вируснинг тоза препарати, антизардоб, дистилланган сув, фосфат буфери ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ва K H_2PO_4), А оқсилини тутувчи стафилакокк реагенти.

Ишнинг бориши: Тамаки мозаикаси вирусининг тоза–ланган препаратини олиш. Помидорни ТМВ нинг штамми билан касаллантирилган барглари 2–3 ҳафта давомида мо–заика аломатлари пайдо бўлгунча иссиқхонада сақланади. Сўнгра 500 г касалланган помидор баргларини 0,1 М pH, 7,5 бўлган фосфат буфери иштирокида гўшт майдалагичда майдаланади (материал ва буферни нисбати 1:1 ҳисобида бўлади). Бу массани 4 қават докадан ўтказилади. Докадан ўтган суюқликни 20 мин 10 000 айланиш тезлигида центри–фуга қилинади ва чўкма усти суюқлигига 1/8 миқдорда хло–роформ солиб яхшилаб чайқатилади. Чўкма усти суюқлигига эса 25% миқдорда сульфат аммоний тузидан ёки 4% поли–этиленгликоль ва 4% ош тузи солинади. Бир соатдан сўнг чўкмани центрифугалаш ёрдамида (10 000 айланиш тезли–гида) ажратиб олинади ва уни 0,05 М pH 7,5 фосфат буфе–рида эритилади. Ҳосил бўлган эритмани эримаган модда–лардан тозалаш учун яна бир марта 10 000–12 000 айланиш тезлигида 5–7 минут давомида центрифуга қилинади ва эримаган қисм ташланади. Чўкма усти суюқлиги 3% грану–лаланган агар гели тўлатилган хроматография колонкасидан ўтказилади ёки ультрацентрифуга ёрдамида 35000 айланиш тезлигида 2 соат давомида центрифуга қилинади. Чўкма 0,05 М фосфат буферида эритилади. Ультрацентрифугада чўкти–риш ва эритиш ишларини 2–3 марта такрорлаб тоза вирус препарати олинади. Олинган вируснинг миқдори спектро–фотометрда аниқлангандан сўнг қуён организмига ҳар хил усуллар билан юборилади (қулоқ венасига, оёқ мушагига, курак териси остига ёки бир нечта усулларни кетма–кет қўлланилади). Венага юборилганда 3, 5, 7, 9, 11, 13 мг/мл ви–русни кунора 0,85% ли ош тузи эритмаси қўшиб юборилади

(1:1 нисбатда). Охирги инъекциядан 10 кун ўтгандан сўнг, 40—50 мл дан ҳафта давомида 3 марта қон олинади. Олинган қоннинг учта партиясини ҳам 37^0С да термостатга қўйилади, 2—3 соатдан сўнг 5^0С да совутилади (5—6 соат). Сўнгра секин аста қоннинг зардоб қисми ивиб қолган қисмидан ажратилади. Зардоб қисмини 6 000 айлантириш тезлигида центрифуга қилиб, қолдиқ қон элементларидан тозаланади. Чўкма усти суюқлигидаги қоннинг зардоб қисми (АЗ) титри аниқланади. Титрни аниқлаш учун "томчи" усули ёки ИИД усуллари қўлланилиши мумкин. АЗ солинган идишга унинг титри, титр аниқлаш усули ёзилади ҳам 1—2 томчи хлороформ солинган ҳолда музлатиб сақланади.

Стафилакоккни тайёрлаш. Охирги вақтларда А—оқсилни тутувчи стафилакокк реагенти Ленинграддаги Эпидемиология ва микробиология илмий текшириш институтида чиқарилмоқда. Шу стафилакокк реагентининг бир флаконига 5 мл (ёки 5—10% гача суспензия) физиология эритмаси қўшилади (0,008 М фосфат буферига 0,14 мМ ош тузи, pH 7,2—7,5) ва эригунча чайқатилади. Ҳосил бўлган чўкма диагностикум тайёрлашда ишлатилади.

Диагностикум тайёрлаш. Пробиркада бир томчи стафилакоккни 5—7 томчи суюлтирилган (50—100 марта) АЗ билан аралаштирилади. Ҳосил бўлган аралашмадан бир томчидан олиб (0,2 мл) шиша пластинкага томизилади, сўнгра унинг устига бир томчи буфер қўшилади ва аралаштирилади. Агар АЗ кераклигича суюлтирилмаса, стафилакокк ҳужайраси агрегацияланади. Бу ҳолда пластинкада оқиш рангга хос бўлмаган реакция кузатилади. АЗ ни ишлатиш учун зарур бўлган суюлтирилиш даражаси—энг сўнгги агглютинация ҳосил бўлган миқдори (титри) ҳисобланади.

Контрол реакция ўтказиш. ВБА—усулида реакция ўтказиш жараёнида суюлтирилмаган АЗ ишлатилганда ёки соғ ўсимлик ҳужайра компонентларига ҳам хос АТ АЗ таркибида бўлса носпецифик реакция пайдо бўлиши мумкин. Ёки баъзи тур ўсимликлар ҳужайрасидаги шира стафилакокк билан вируссиз ҳам агглютинантлар ҳосил қилиши мумкин.

Носпецифик реакциянинг олдини олиш учун Атабеков ва Чирков соғ ўсимликнинг ширасы билан контроль реакция ўтказишни таклиф этишган. Бу анализ жараёнида иммунодиагностикум томчисини соғ ўсимлик ширасы билан

қўшилади. Носпецифик реакция ҳосил бўлса АЗ ни суюлтириш орқали уни йўқотилади. Ҳар бир соғ ўсимлик шираси билан контроль реакция қўйиб кўриш керак.

Ўсимлик шираси томонидан ҳосил бўладиган носпецифик реакцияларни аниқлашда стафилакокк билан нормал қуён АЗ дан тайёрланган диагностикум билан ҳам контрол реакция олиб бориш мумкин. Бу ҳолда агглютинантлар ҳосил бўлса, демак шу ўсимликнинг ширасида носпецифик реакция ҳосил қиладиган моддалар бор деб ҳисоблаш мумкин.

Вирусли намуналарни анализга тайёрлаш. Вирусли намуналарни анализ қилиш учун помидор, булғор қалампири барглари ёки ёш ниҳоллар ёки бошқа хил вирусли намуналарни чинни ҳавончаларда 1—2 гр ни 1—2 мл 0,008 М фосфат буферли физиологик эритмасида эзилади (майдаланади). Тайёр бўлган материал ўсимликнинг дағал тўқималаридан тозалаш учун центрифугада 15 минут давомида 6000 айланиш тезлигида центрифуга қилинади. Чўкма усти суюқлиги эса диагностикум солиб реакция ўтказишга тайёр намуна ҳисобланади. Вируснинг табиатда айланишида вирус тарқатувчи ҳашаротлар, вирусни қишда ва бошқа вақтларда ўзида сақловчи резерватор ўсимликларни таҳлил қилишда баъзан носпецифик реакциялар ҳосил бўлиши мумкин. Бу ҳолларда ҳам ажратилган ўсимлик ширасини центрифугалаш ёки фильтрлаш йўли билан носпецифик реакциялардан қутилиш мумкин, ҳамда параллель равишда соғ ўсимлик шираси билан ҳам контрол реакция ўтказиш мақсадга мувофиқдир.

Уруғчилик муаммоларини ҳал қилишда уруғда вирус борлигини аниқлаш ишларида усулнинг сезгирлигини оширишу учун уруғни ундириб, унда ўсиб чиққан ниҳолни анализга ишлатса анча яхши бўлади. Чунки миқдори оз бўлган вирус ниҳол ўсиши билан кўпайиши мумкин ва аниқлаш ишлари осонлашади. Катта масштабларда вирусларни аниқлашда ўсимликлардан шира ажратиб олиш учун махсус шира ажратгич асбобдан фойдаланилади. Намуна материални тахминан 3—5 гр ни махсус ячейкага жойлаб, махсус босқич билан эзилади. Баргдан эзиб чиқарилган шира қўшни чуқурчага оқиб ўтади. Чуқурча ҳажми 0,2—0,4 мл ни ташкил этади. Ажратилган ширани бир неча марта суюлтирилиб (2, 4, 8, 16 ...) сўнгра диагностикум томизиб вирус аниқланади.

Диагностика ўтказиш. Помидорда ТМВ ни аниқлаш учун таҳлил қилинаётган баргдан тайёрланган намунани (0,2 мл) шиша пластинкага (15х20 см^2) томизилади, ҳар бир намунага аввалдан тайёрланган ТМВ диагностикумини қўшилади ва шиша тайёқча билан аралаштирилади. Агглютинат ҳосил бўлиши 1—3 минут вақтни талаб этади. Ҳосил бўлган агглютинатларни оддий кўз билан кузатиш мумкин. Стафилакокк билан АТ дан диагностикум ва унга вирусли намуна қўшилгандан сўнг агглютинат ҳосил бўлиши схемаси 11—расмда кўрсатилган.

ВБА усулида сифат реакциясигина олиб борилмасдан, миқдор реакциясини ҳам қилса бўлади. Миқдори аввалдан аниқ бўлган вирус препарати суюлтирилади, сўнгра юқорида таҳлил қилинганидек вируснинг миқдори аниқланади (12—жадвал). Параллель касал ўсимлик шираси ҳам бир неча марта суюлтирилади ва энг охирги реакция ҳосил бўлган намуна аниқ вируснинг энг охирги реакция ҳосил бўлган намунасига солиштирилади ва миқдори тоза препарат миқдори билан тенглаштирилади. Тўғри келган концентрация ширанинг суюлган концентрациясидаги вируснинг миқдорини белгилайди.

12—жадвал

Ўсимлик ширасидаги вирус миқдорини аниқлаш

Томатдаги тамаки мозаикаси вируси				
Тоза вирус препарати		Ўсимлик ширасидаги вирус		Аниқланадиган намунадаги вирус
Вируснинг миқдори мкг /мл	Реакция натижаси	Суюлиш даражаси	Реакция натижаси	Миқдори мкг/мл
1	++++	1 :2	++++	
0,5	++++	1 :4	++++	
0,25	+++	1 : 8	++	
0,125	++	1 :16	++	
0,65	++	1 :32	+	0,3
0,32	+	1:64	–	
0,16	–	1 :128	–	

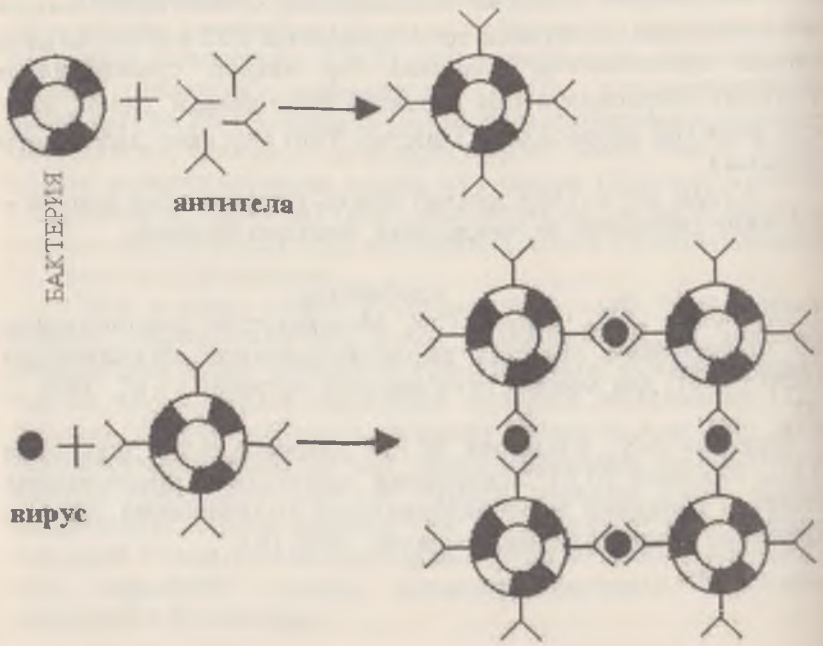
Жадвалдан олинган натижаларни солиштириб, охири агглютинация реакцияси тоза препаратда 0,32 мкг/мл миқдор билан бўлганлигини кўрамиз. Бу миқдор суюлтирилган ўсимлик ширасидаги 1:64 даражага тўғри келади. Демак, касал ўсимлик ширасида 0,3 мкг/мл ТМВ бор экан деб хулоса қиламиз.

Худди шу усулни қўллаб бошқа ўсимликларда ҳам вируснинг сифатини ва миқдорини аниқлаш мумкин.

Адабиётлар

1. Атабеков И.Г., Чирков С.Н. Методические рекомендации но применению реакции виробактериальной агглютинации (АБВ—тест) для диагностики вирусов растений. —М., 1995. с. 20.

2. Ваҳобов А.Х., Юлдашев Ж.Ю., Давронов К.С., Деҳқонова З.Н., Рахимов М.М Ускоренная диагностика растительних вирусов реакцией виробактериальной агглютинации. Методические рекомендации. Ташкент, 1988. 16 с.



11 – расм. Вирус бактрия агглютинацияси реакциясининг схе–маси (чизмаси) (Чирков, 1983)

30–машғулот

Томчи–усули

Бу усул вирусология амалиётида тезкор, анча осон ва ялпи қилинадиган анализларда қўл келадиган усул бўлиб, асосан ҳужайрада вирус миқдори кўп тўпланадиган (1 кг 0,1 – 1 г) ўсимликларнинг анализида ишлатилади. Одатда бу усул ишлатилганда антизардобни титри имкони борича юқори бўлиши мақсадга мувофиқ бўлади.

Ишдан мақсад. "Томчи" усулини ўрганиш ва у ёрда–мида ўсимликлардаги (тўқималардаги), ҳашоратлардаги ва

бошқа вируси борлигини аниқланиши зарур бўлган наму—налардаги вирусни тезкорлик билан аниқлаш.

Материаллар: вирусли намуна (ТМВ билан касаллан—тирилган тамаки барги) ТМВ—иммун зардоби, буюм ойнаси, шиша тайёқча, фильтр қогози, дистиллнган сув, пробирка—лар, пипеткалар.

Ишнининг бориши: Вирус—бактерия агглютинация усули машғулотида баён этилганидек помидорнинг тамаки мозаикаси вируси билан касалланган баргларидан 5 граммча олинади ва уларни чинни ҳавончада эзиб ёки махсус "қисгич" асбоб ёрдамида унинг шираси ажратиб олинади.

Буюм ойнасининг икки жойига 2—3 см масофа узоқлигида зардоб солинади, чап томонга — нормал (назо—рат, қуёнга вирус юборилмасдан олинган) ва ўнг томонига вирусга қарши олинган специфик антизардоб солинади. Ҳар бир зардоб томчиси ёнига бир томчидан (0,1—0,2 мл) тадқиқ қилинадиган ўсимлик ширасидан томизилади. Ўсимликнинг ширасини олиш учун эса уни майдалаб қирқилади, сўнгра чинни ҳавончада (ёки махсус мослама ёрдамида ўсимликдан уни шираси ажратиб олинади) гомоген масса ҳолатига кел—гунча эзиб майдаланади, сўнгра уни икки қават докадан ўт—казилади. Докадан сиқиб олиш жараёнида биринчи сиқиб олинадиган икки томчи ўзида вирусни камроқ тутгани учун ташлаб юборилади ва ундан кейинги томчилар йиғиб чиқади ва тажрибада ишлатилади. Томдирилган ўсимлик ширалари антизардоблар билан махсус шиша таёқча ёрдамида ара—лаштирилади. Аввал ўсимликдан ажратилган шира назорат антизардоб билан, сўнгра эса специфик антизардоб билан аралаштирилади.

Агар тадқиқ қилинаётган ўсимлик ширасида вирус миқдори етарлича бўлса 2—20 минутдан сўнг (18—20^{0}С) да специфик антизардоб билан аралаштирилган ўсимлик ши—расида чўкма ҳосил бўлади. Нормал антизардоб билан ара—лаштирилганда чўкма кузатилмайди. Реакция натижаларини яхши кузатиш учун лупадан фойдаланилса, реакция нати—жаларини анча осонлик билан аниқлаш мумкин бўлади.

Реакция натижаси қуйидагича белгиланади: реакция 1—2 минут ичида йирик—йирик преципитатлар (чўкма) ҳосил бўлиши—4+, преципитация даражаси анча секинроқ ва камроқ бўлса—3+, преципитат ҳосил бўлса—ю аввалгилардан

1—2 баробар камроқ бўлса — 2+, реакция 20 минутгача ҳосил бўлса, преципитатни борлиги аниқ билинса—ю, аммо аввалгилардек бўлмаса уни — 1+ билан, борлиги аниқ эмас, чунки назорат вариантдан фарқ қилади, аммо бор хам ,йўқ ҳам, деб бўлмайди, бу ҳолатда ±, аниқ реакция кетмаганлиги кўриниб турса,, уни — билан белгиланади (13—жадвал). Олинган натижаларни дафтарга қайд этилади.

13—жадвал

"Томчи" усули билан вирус титрини аниқлаш

Вирус анти зардоби ва уни суюлиш даражаси	Вирус билан касаллантирилган ўсимликдан олинган шира ва уни суюлиш даражаси						
Суюлтирилмаган анти зардоб	++++	Суюлмаган ўсим. ширасси ++ +	1:2 ++ +	1:4 +++	1:8 +	1:16 —	1:32 —
1:2	++++	++ +	++	+	—	—	—
1:4	++++	++	+	—	—	—	—
1:8	++ +	+	—	—	—	—	—
1:16	++	—	—	—	—	—	—
1:32	—	—	—	—	—	—	—
1:64	—	—	—	—	—	—	—
1:128							
1:256							
1:512							
1:1024							
1:2048							
1:4096							

Эслатма: 4+ — Аниқ ва мўл преципитат кузатилади.

3+—Преципитат мўл, аммо биринчи вариантдан анча кечроқ ҳосил бўлади.

2+—Аввалги иккисига қараганда камроқ ва кечроқ реакция кузатилади.

+— Реакция кузатилади.

— —Реакция назорат вариантларидек бўлади.

Реакция натижаларини оддий кўз ва лупа ёрдамида кузатилади. Аниқ натижа олинмаган тақдирдаёқ реакция ўтказилаётган буюм ойнасини қўлга олиб секин аста қимирлатилса преципитатни кузатиш анча яққоллашади.

Адабиётлар

Дунин М.С., Попова Н.Н., Капельный метод диагностики вирусов в растениеводстье. Москва, 1937.

31–машғулот

Иккиёқлама иммунодиффузия реакцияси (ИИД).

Ишдан мақсад. ИИД–усулини ўрганиш ва у ёрдамида ҳар хил объектлардан олинган намуналарда вирус борлигини, серология жиҳатидан ҳар хил вирус штаммларининг яқин қариндошлигини, қисман қариндошлигини, ўхшашлигини, умуман ўхшаш эмаслигини реакцияда ҳосил бўлган преципитация чизиқларига қараб аниқлаш усуллари билан танишиш.

Материаллар ва қуроллар

Реактивлар: усулни ишлатиш учун махсус олинган АЗ, агар–агар ("Дифко" агари) ёки агароза (агар–агарнинг нейтрал қисми, махсус усул билан зарядли гурухли агаро–пектиндан тозаланган), агар–агарни эритиш учун ҳар хил эритмалар: 0,07 М фосфат буферига 0,15 М NaCl солинган pH 7,2 бўлган эритма (9 қисм 0,15 М NaCl ва 1 қисм 0,07 М) фосфат буфери. Фосфат буферини тайёрлаш: KH_2PO4–9,073 г/л; $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$–11,87 г/л: 29,6 мл KH_2PO_4 эритмасини 100 мл гача Na_2HPO_4 эритмаси билан олиб борилади. Натижада pH 7,2 га тенг 0,07 М фосфат буфери ҳосил бўлади, қора амид, метанол, сирка кислотаси, вазелин.

Ускуналар: агар–агар гелида чуқурча ҳосил қилиш учун ишлатиладиган махсус штамп (қолиплар), вакуум насоси, "шайтон", агар–агар қуйиш столчаси.

Ишнинг бориши. Бир процентли "Дифко" агари эритмасини вирус учун оптимал ҳисобланган буферда (ТМВ учун 0,05 М фосфат ёки 0,05 М трис–HCl буфери ҳисобланади) тайёрланади. Антисептик сифатида мертиолат ёки натрий

азидини ишлатиш мумкин. Баъзи бир узунчоқ вирусларни (масалан: жўхорининг пакана мозаикаси, шолғом мозаикаси вирусларини) аниқлаганда 0,1% натрий додецил сульфат со—линади. Шу реактивлар солиб тайёрланган агар—агарни сув ҳаммомида эригунча қайнатилади. Сўнгра 25 мл ўлчаб оли—нади ва шайтон билан горизонтал қилиб ўрнатилган ойна пластинка устига (9х12 см) оҳисталик билан қуйилади ва совуб қотгунча ва парланишни камайтириш мақсадларида қопқоқ билан ёпилади. Қотиб гел холига келган агар—агарнинг қалинлиги 3 ммга яқин бўлади. Сўнгра махсус штамплар ёрдамида 2 мм диаметрлик ва чуқурчалар ораси—даги масофа 6 мм бўлган чуқурчалар қилинади. Чуқурчалардан агар—агар парчаларини вакуум насос ёрда—мида тортиб олинади. Пластинканинг четки қисмларида агар—агар гелининг намлигини маълум даражада сақлаш мақсадида махсус 6 мм диаметрлик чуқурчалар қилинади ва уларга буфер билан тўлғазилади. АГ (10а—расм) ва АЗ (9—расм) лар солиш учун чуқурчалар ёки "юлдузча" шаклида ёки икки қатор қилиб тайёрланади. Реакция "юлдузча" шаклида қилинган чуқурчаларда олиб борилса, марказдаги чуқурчага АГ солинади ва атрофидаги чуқурчаларга эса АЗ нинг ҳар хил суюлтирилган эритмалари солиб тўлатилади. Реакция икки қатор қилиб тайёрланган чуқурчаларда олиб борилса, устки қатордаги чуқурчаларга АГ (ёки АТ лар) со—линади. АЗ нинг титри баланд бўлса у бир неча марта су—юлтирилади. Суюлтириш учун одатда 0,85% лик ош тузи эритмаси ишлатилади.

Чуқурчалар махсус АГ ва АЗ лар билан тўлатилгандан сўнг 48 соатга нам камерага қўйилади. Камера сифатида эк—сикатор ишлатиш мумкин. Унинг тагига 5—7 см водопровод сувидан солинади ва қопқоқ четлари вазелин билан мойла—нади. Шундай қилиб тайёрланган нам камерага реакция қўйилган шишани махсус кўтаргичга жойлаштирган ҳолда ўрнатилади, нам камера қопқоқ билан ёпилиб 48 соатга хона ҳароратида сақланади. Бу вақт ичида вирус (АГ) ва АТ лар агар—агар гелининг тешикчалари орқали ҳар томонга тарқаладилар (1% ли агар—агар гелининг тешиклари радиуси 120 нм атрофида бўлади) ва учрашган жойларида АГ ва АТ биоспецифик равишда боғланадилар. Бундай боғланган мо—лекулаларнинг миқдори шунчалик кўплигидан улар кўзга

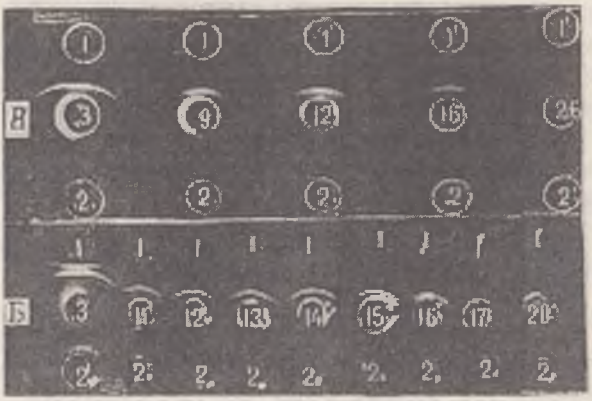
яхши кўринадиган хира оқиш рангда преципитация линия—ларини ҳосил қилади (ташқи кўринишидан худди 3—5 кун—лик ойсимон кўринишда бўлади). Преципитация чизиғининг қалин ёки ингичкалиги АГ ва АТ нинг концентрацияларига қараб ҳар хил қалинликда бўлади. (12—расм) Амалиётда уларнинг қалинлик даражаларини кўрсатиш учун 4 баллик системадан фойдаланилади: энг қалин преципитация чизиғи 4 та мусбат белгиси билан белгиланади (++++), ундан ингич—кароғи "+++", "++", "+", "—" қилиб белгиланадилар. Манфий "—" белгиси реакцияни йўқлигини кўрсатади.

ИИД—усули ёрдамида икки ёки бир нечта вирус АГ ларининг бир—бирига тўла ўхшашлигини қисман ўхшаш—лигини, ҳам аниқлаш мумкин. Бунинг учун қўйиладиган ре—акция аввалдан шу мақсад учун мослаб қўйилади. Реакция агар линия ҳолда қўйилса тепа (биринчи) қаторга 2 ёки бир нечта антигенлар ёнма—ён чуқурчаларга қуйилади, тагидаги (иккинчи) қатордаги қарама—қарши чуқурчаларга эса АГ ларнинг фақат биттасининг АЗ си солинади. Преципитация чизиқлари ҳосил бўлгандан сўнг шу чизиқларнинг кўрини—шига қараб АГ ларнинг бир—бирига муносабатлари аниқланади. Икки АГ орасидаги преципитация чизиғи **бир чизиқ бўлиб қўшилиб кетса—АГ лар бир—бири билан ўх—шаш ҳисобланади:** преципитация чизиқлари қўшилса—ю, лекин қўшилган ерида бир—бирини кесиб ўтиб кетса—АГ лар **тўла (бутунлай) ўхшаш эмас** дейилади. Масалан, бир вируснинг икки штамми помидордаги ТМВ ва тамакидаги ТМВ штаммлари кўп ўсимликларда ҳар хил аломатлар ҳосил қилсалар ҳам АГ жиҳатидан улар тўла бир—бирлари билан ўхшашдирлар: шу помидордаги ТМВ тамакини ТМВ виру—сининг Қозоқ штамми билан қисман ўхшашдир ва ҳоказо (12—расм).

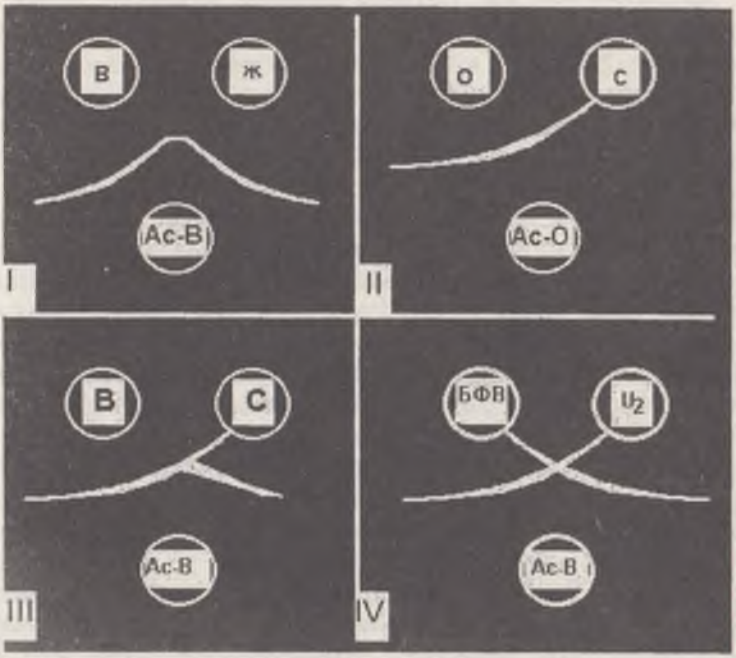
Реакция натижалари махсус кундалик дафтарга белги—лаб қўйилгандан сўнг, суръатга олиш мумкин, натижаларини узоқ муддатга сақламоқчи бўлинса икки хил усул қўлланилади.

1. Реакция натижаларини тўғридан тўғри суратга оли—нади.

2. Шиша пластинка устидаги бизни қизиқтирган реак—ция натижалари оҳисталик билан ўткир тиғ ёрдамида кесиб олинади (шартли белги қўйиш мақсадга мувофиқ бўлади).



12 – расм. Иккиёқлама иммунодиффузия реакцияси. А – КХВ билан унинг АЗ си орасидаги преципитация реакциялари. 1,2 чуқурчалар АЗ билан, 3,9,12, 16,26 чуқурчалар КХВ билан тўлдирилган. Б. Арпанинг чизиқли мозаика вируси билан унинг АЗ си орасидаги преципитация реакцияси. 1 – 2 чуқурчалар АЧМВ АЗ си, 3 – 20 чуқурчалар АЧМВ билан тўлдирилган.



13 – расм. Иммунодиффузия тажрибаларидаги преципитация чизиқларининг (ПЧ) жойлашиш (ҳосил бўлиши) типлари.

I. Ўхшашлик (бир хиллик, яқинлик реакцияси (реакция иден – тичности) – икки вирус (штамм) АЗ билан ҳосил қилган ПЧ ларининг қўшилиб кетиши, яъни В ва Ж штаммларнинг антигенлари серология томонидан ўхшаш (идентичность).

II. Антизардоб гетерологик антиген билан реакцияга кирмайди, С антигени АЗ – 0 антизардоби (АЗ) билан реакцияга кирмайди, ПЧ ҳосил қилмайди, О антигени гомологик АЗ (Ас – 0) билан ПЧ ҳосил қилади.

III. Қисман ўхшашлик реакцияси (реакция частичной идентич – ности): ПЧ лари қисман кесишади ва шпора ҳосил қилади. Бу типдаги ПЧ шуни кўрсатадики, В – АЗ даги ҳамма АТ ҳам С – антигени билан ПЧ ҳосил қилавермайди; С – антиген билан боғланмаганлари ПЧ дан диффузия бўлиб ўтиб, В – антигени билан реакцияга кириб шпора ҳосил қилади.

IV. Тўла ўхшамаслик реакцияси (реакция полной неидентично – сти): икки ёқлама шпора ҳосил бўлади. БФВ ва

U_2 Ас – В АЗ таркибидаги маълум миқдор АТ билан ПЧ ҳосил қилади ва ҳар бир штамм иккинчи штамм муносабатида бўлмайдиган АТ билан ПЧ ҳосил қилади.

Белгилар ҳар хил бўлиши мумкин. Масалан, тўғри тўрт бурчак қилиб реакциялик агар—агар гелининг юқори ўнг бурчагидан 2—3 мм^2 қилиб тиғ учи билан кесиб олиб ташланади, иккинчи юлдузчадаги реакцияни бошқа бурчагида шунга ўхшамаган белги қилинади ва кундалик дафтарга белгилаб қўйилади. Белгилаш ишлари тугаганидан сўнг 0,85% лик ош тузи эритмасига 2—5 соатга солиб қўйилади. Бу вақт ичида реакцияга қатнашмаган АЗ оқсиллари, АҒ нинг таркибидаги оқсил, пигмент, танинсимон моддалари ва ҳокозолар гелдан ювилиб чиқади; акс ҳолда булар ҳам преципитация чизиқлари билан бирга амид қора ранг билан бўялади ва реакция натижаларини кузатишни қийинлаштиради. Сўнгра агар—агар гелини оҳисталик билан буюм ойнасига ўтказилади (буюм ойналари яхшилаб хром аралашмаси билан ювилиб этанолда ёпиқ ҳолатда сақланади, акс ҳолда унга қуйилган агар—агар кўчиб кетиши мумкин) ва унинг устига хроматографияда ишлатиладиган қоғоз ёки фильтр қоғози бўлакчаси билан ёпилади ва қуритиш учун 24 соатга қўйилади ёки вентилятор ёрдамида 2—3 соат давомида қуритилади. Сўнгра оқиб турган сувга тутиб туриб фильтр қоғози ва унинг майда бўлакларидан тозаланади. Кейинги қилинадиган иш—реакция натижаларини бўяшдир. Бўёқ сифатида 0,3% ли амидошварц (қора амид) бўёғи ишлатилади. Бўёқ эритувчиси қилиб метанол, концентрланган сирка кислотаси ва сувни 4:4;1 нисбатда аралаштирилиб 0,3% қора амидни эритилади. Бўялган препаратни бўёқни ортиқчасидан ювиш учун юқоридаги эритувчининг ўзи қора амидсиз ҳолда ишлатилади. Бўяш 10 минут давом этади, сўнгра бўялган препарат ювилишга қўйилади. Вақти—вақти билан ювувчи эритма сутка давомида 3—4 марта алмаштирилиб турилади. Шу усул ёрдамида реакция натижалари яна бир марта кузатилади, ҳисобга олинади, суратга олинади ва узоқ муддатга сақланиши мумкин.

Адабиётлар

1. Зильбер Л.А., Абелев Г.И. Вирусология и иммунология рака М.: 1962. 458 с.

2. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и

радиоизотопными методами. Изд—во Наука, М, 6 1983, С. 124—127.

3. Бем Э. Иммунодиффузия . Иммунологические методы Изд—во Медицина М.: 1987. С. 73—88.

32—машғулот

Иммунофермент анализи усули

Юқорида айтилгандек бу усул энг сезгир усулдир. Вирус (АГ) борлигини бошқа усуллар билан аниқлаб бўлмаган вазиятларда бу усул қўл келади, яъни у билан нанограмм миқдордаги вируслар (АГ) ларни аниқласа бўлади. Бу усулни қўллаганда АТ ва АГ, АТ билан конъюгат (фермент ва АТ комплекси), фермент билан субстрат орасидаги реакциялар бирорта қаттиқ фазада (полистиролда ёки полиамид мембранада) олиб борилади (14 расм).

ИФА нинг "сэндвич" тури

Ишдан мақсад. ИФА ни ўрганиш ва бу усул ёрдамида бошқа усуллар сезгирлиги етмаган ҳолларда ва ҳужайрада жуда кам тўпланадиган вирусларни ҳар хил намуналарида аниқлашни ўрганиш.

Материаллар ва асбоб—ускуналар

Реактивлар: иммун АЗ, пероксидаза ёки бошқа фермент, натрий перйодат, K_2HPO_4, сефадекс Г—200, тритон—Х—100, субстрат (H_20_2 ва аминосалицил кислотаси), контроль зардоб, вирус намуналари, ПЭГ (молекула массаси 6000) полистирол микроплатлар (Швецария фирмаси чиқаради) ёки полиамид мембрана, термостат, хроматография колонкаси, фракция йиғувчи коллектор, ФЭК, спектрофотометр СФ—26, титратор Т—107.

Ишнинг бориши. ИФА вирусларни аниқлаш қуйидаги босқичларда олиб борилади: 1. ИФА олиб бориладиган полистирол платалар (ёки полиамид мембраналари) га АТ ларни иммобилизация қилиш; 2. АТ ва ферментдан синтезланган конъюгат—пероксидаза ва АТ; 3. ИФА ни амалга ошириш.

Аввало полистирол платага ёки полиамид мембранага иммобилизация қилинадиган АТ ни АЗ дан тоза ҳолда ажратиб олиш ёки гаммаглобулин қисмини ажратиб олиш за—

рурдир. Глобулин қисмини ажратиб олиш учун 10 мл АЗ га тенг ҳажмда 20 % лик ПЭГ солинади ва бу аралашма 15 ми — нут 8000 айланиш тезлигида центрифуга қилинади. Чўкмага тушган АЗ ни гаммаглобулин қисми 10 мл 0,01 М калий фосфат (КФБ) буферида эритилади (рН 7,4). Чўктириб сўн — гра яна қайтадан эритиб тозалаш ишлари икки қайта олиб борилади. Сўнгра 4^0С да кечасига КФБ да диализ қилинади. Ҳосил бўлган АЗ нинг глобулин қисми полстирол платага иммобилизация қилишга ва фермент билан конъюгат олишда ишлатилади.

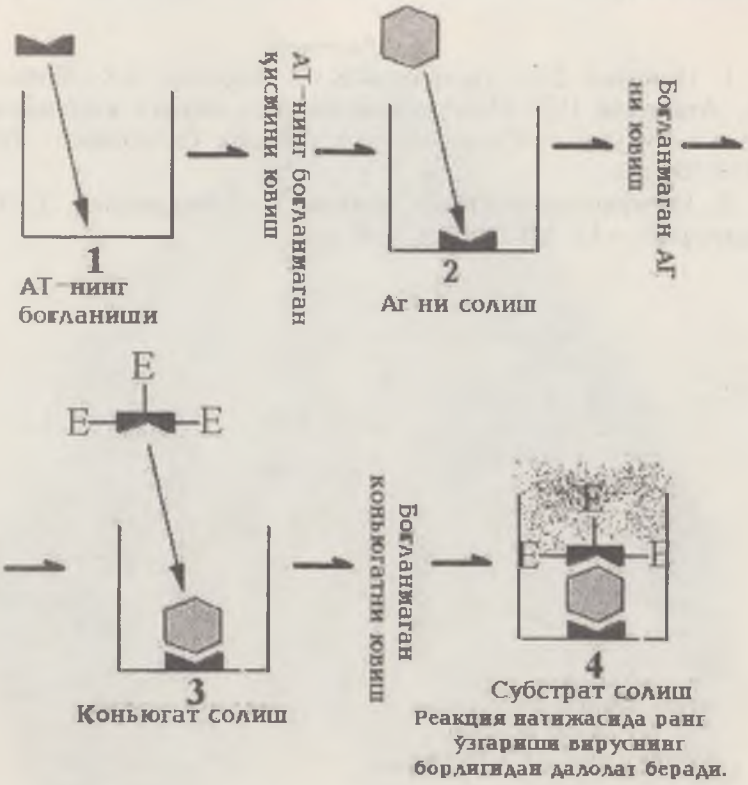
АЗ нинг глобулин қисми билан пероксидазадан конъюгат олиш. 5 мг пероксидазани 1 мл совутилган дис — тилланган сувда эритилади ва 0,2 мл 0,1 М натрий перйодат қуйилади, сўнгра 7,4 лик 0,01 М КФБ билан диализ қилинади. Диализдан сўнг эритманинг рН 9,5 гача кўтари — лади ва унга 5 мг рН 9,5 га келтирилган гамма глобулин қўшилади. Ҳосил бўлган аралашма 2 соат давомида хона ҳа — роратида мунтазам аралаштирилган ҳолда инкубация қилинади. Ҳосил бўлган конъюгатни эритмадаги бошқа моддалардан тозалаб олиш учун гельфильтрация ёрдамида Г — 200 маркали сефадекс тўлатилган колонкадан (1,5х100 см) КФБ билан элюция қилинади. Олинган фракциялар спек — трофотометр ёрдамида анализ қилинади ва конъюгатни ташкил қилган қисм ажратиб олинади, концентрацияси ўл — чанади, ампулаларга солинади ва —20^0С да музлаган ҳолда сақланади. Ишлатиладиган қисми ишдан олдин эритилади.

Субстрат тайёрлаш. Иссиқ дистилланган сувда 0,8 мг/мл лик 5 — аминосалицил кислотасини эритилади ва эритманинг рН ни 6,0 га 1 н ли КОН ёрдамида келтирилади. ИФА ўтказишдан олдингина тайёрланган 5 — аминосалицил кислота водород пероксиди билан 10:1 нисбатда аралашти — рилиб ишлатилади.

Гаммаглобулиннинг иммоблизация қилиш учун поли — строл плашка ишлатилади. Унинг гамма глобулин ёки АТ ни плашканинг ҳар бир чуқурчаларига 200 мкл дан солинади ва 4^0С ҳароратда бир кечага қолдирилади. Иммобилизация қилинмаган АТ лар бир минутдан 3 марта 0,05% тритон Х — 100 солинган 0,01 М рН 7,4 бўлган КФБ билан ювилади.

Кейинги босқичда реакция шу иммобилизация қилинган АТ билан аниқланадиган вирус (АГ) орасида бўлади. Унинг

учун тозаланган вирус еки текширадиган вирусли намуна шу микроплат чуқурчаларига солинади ва бир соат давомида 37^0С да сорбция қилинади (14 – расм).



14 – расм. ИФА – усулида вирус аниқлаш схемаси.

Е – фермент, – субстрат, – АТ: – АГ

Сўнгра боғланмаган АГ ва бошқа ортиқча моддалар ювиб ташланади. Энди плашкага 200 мкл конъюгат солинади ва бир соат давомида 37^0Сда инкубация қилинади.Ортиқча конъюгат ҳам ювилгандан сўнг микроплаталарга субстрат солинади. Пероксидаза оксидланишидан сўнг ҳосил бўлган

маҳсулот оддий кўз билан аниқланади ёки 490 нм тўлқин узунлигида спектрофотометрда ёки абсорбциметрда нур ютиш даражаси ўлчанади (Платаларнинг жигар рангини кўп камлигига қараб вирусни миқдори аниқланса ҳам бўлади).

Адабиётлар

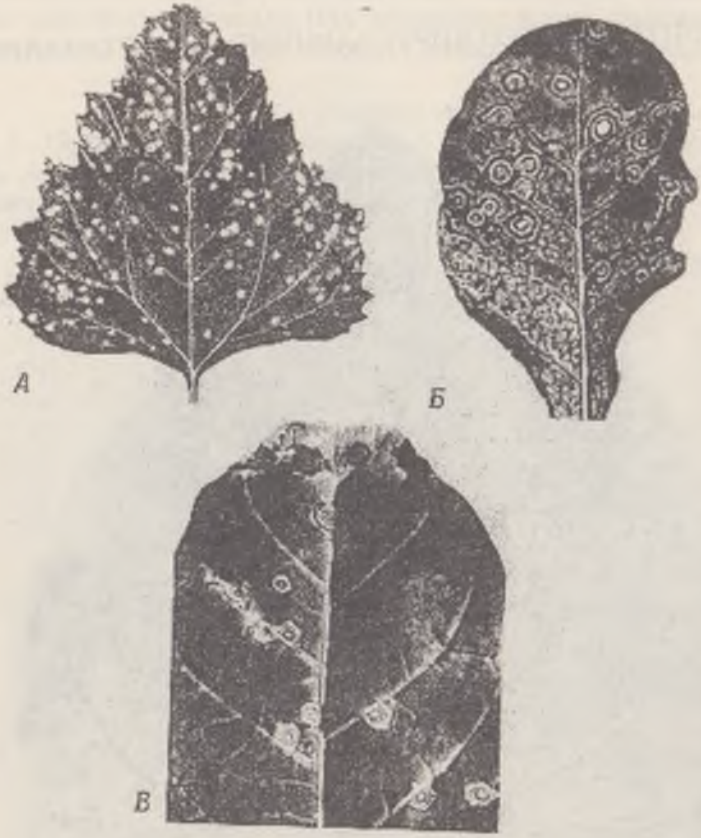
1. Новиков В.К., Давранов К.С., Ваҳобов А.Х., Бобкова А.Ф., Атабеков И.Г. Иммунодиагностика вируса карликовой мозаики кукурузи. Сельскохозяйственная биология. —1984. 11. С—56—59.

2. Иммуноферментный анализ. Под редакцией Т.НГО. Г.Ленгоффа.—М: МИР, 1988, 446 с.

ИЛОВА – 1

ФИТОПАТОГЕН ВИРУСЛАРНИНГ СИМПТОМЛАРИ

1 – расм. Ловия баргидаги "тамаки некрози вируси" (ТНВ) зараридан ҳосил бўлган некрозлар



2 – расм . Ҳар хил ўсимлик баргларида ҳосил бўлган маҳал – лий (местный) касаллик симптомлари.

А. "Қанд лавлаги мозаикаси вируси" нинг Ch. amaranticolor баргидаги хлоротик жароҳат симптомлари.

Б. Тамаки баргидаги "беда мозаикаси вируси" ҳосил қилган ҳалқали доғлар.

В. Тамаки баргидаги "тамаки зарҳалланиши вируси" ҳосил қилган некрозлар.

3 — расм. Сельдерей ўсимлигидаги "сельдерей мозаикаси вируси" нинг сельдерейни паканалаштириши. Чапда — соғ ўсимлик.

4 – расм. "Турнепс сариқ мозаикаси" билан зарарланган хи – той карамидаги мозаика.

5—расм. А. "Сутчўп (латук) салати ўсимлиги томирларининг йириклашиши вируси" зараридан томирлари оқарган сутчўп салати (салат—латук) ўсимлиги. Ўнг томонда—соғ ўсимлик барги.
Б. "Гулкарам мозаикаси вируси" билан зарарланган гулкарам барги.

6 – расм. "Нарцис мозаикаси вируси" билан касалланган наргис барги. Ўнгда – соғ барг.

7 — расм. Гулларнинг вирус касаллиги.

А. "Турнепс мозаикаси вируси" билан зарарланган шаббўй (левкой).

Б. "Бодринг мозаикаси вируси" билан зарарланган гладиолус.

В. "Бодринг мозаикаси вируси" билан зарарланган бинафша. Чапда — соғ гул.

8 — расм. Мевали ўсимликларни вирусдан зарарланиши.

А. "Бодринг мозаикаси вируси" билан зарарланган бодринг меваси. Чапда — соғ бодринг.

Б. "Нок мевалари шаклининг ўзгариши вируси" билан касалланган нок меваси. Чапда — соғ мева.

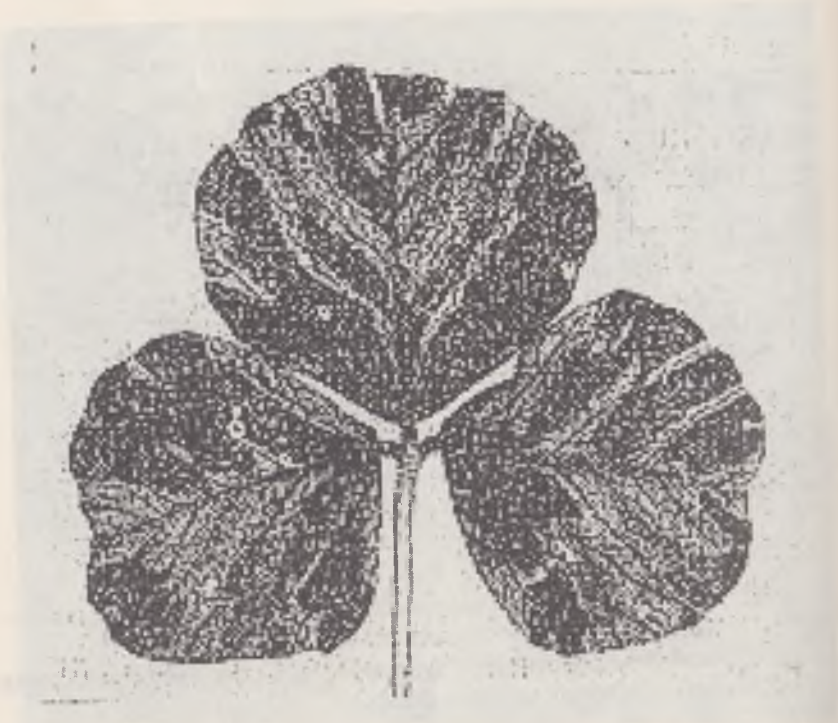
В. "Олма ҳалқали доғи вируси" билан зарарланган олма. Қизил — жигарранг доиралар шаклли мева.

9 – расм. "Тамаки шалдироқ вируси" штаммини тамаки (чапда) ва томатдаги (ўнгда) ҳалқали ва чизиқли бузилиши симптомлари.

10 – расм. Б. "Арпанинг сариқ пакана вируси" билан ҳар хил фазада шира ҳашорати билан касаллантирилган арпа (чапдан ўнга): назорат, гуллаш даври, трубка ҳосил қилиш даври, тупланиши, уч баргли даври, бир баргли даври.

11 – расм. А. "Лола гултож баргларининг рангбарангла – шиши" вируси билан касалланган лола гули.

Б. Хитой караминнинг "турнепс сариқ мозаикаси" билан касалланиши. Юқорида – соғ барглар.



12 – расм. "Пиёз сариқ мозаикаси вируси" нинг беда – даги мозаикаси

13 – расм. Тамаки ўсимлигидаги "бодиринг мозаикаси вируси" штаммларининг таъсири

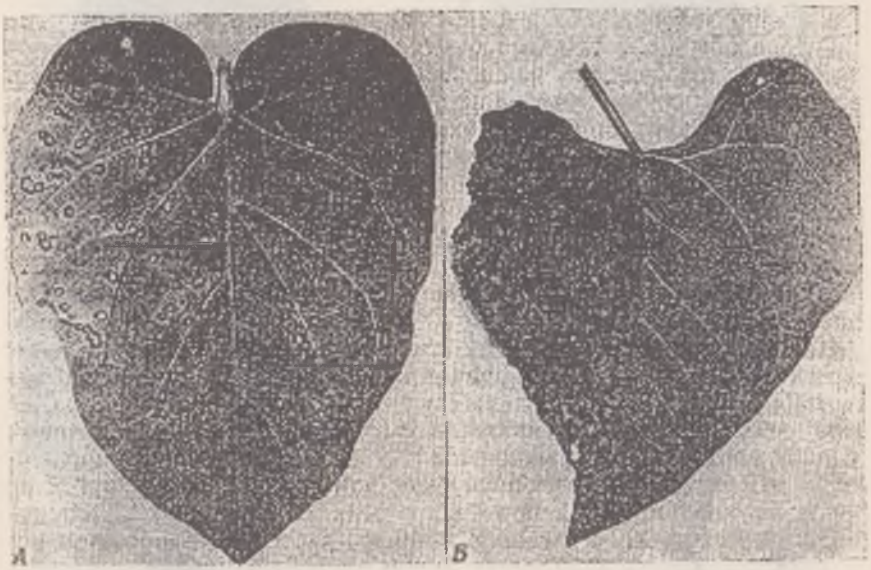
А. Некроз ҳосил қилувчи штамм.

Б. Сариқ мозаика ҳосил қилувчи штамм.

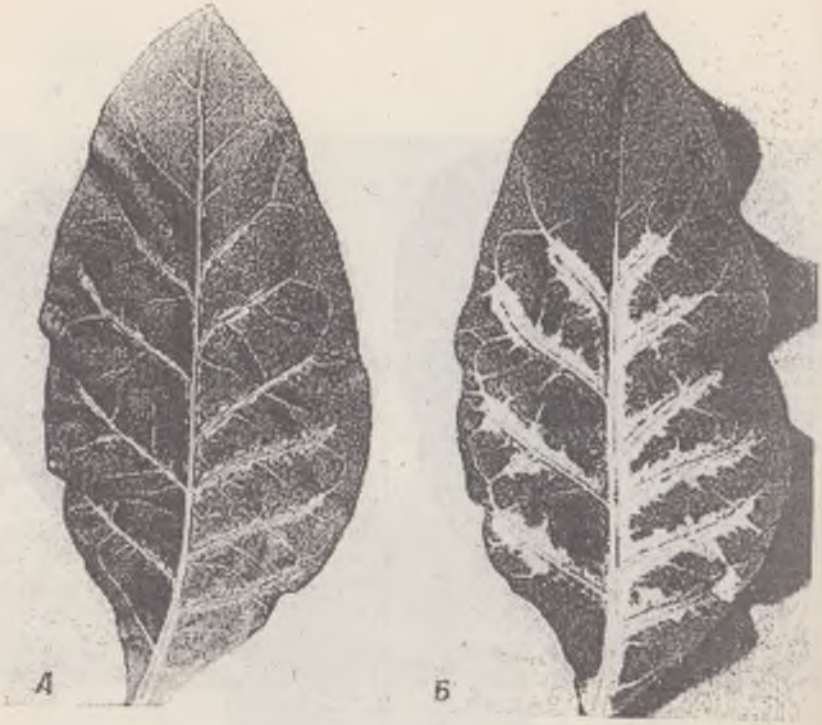
В. Яшил мозаика ҳосил қилувчи штамм.

Г. Соғ ўсимлик.

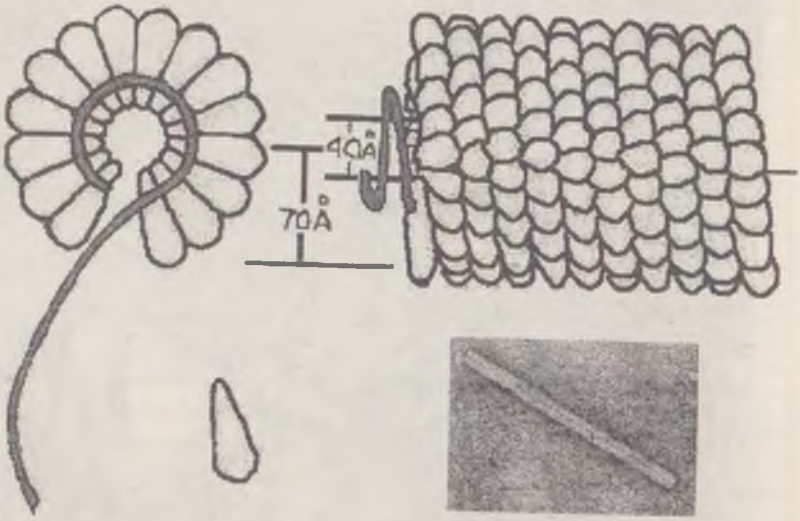
14—расм. Chenopodium quinoa ўсимлигидаги малина халқа доғли вируси симптомлари.



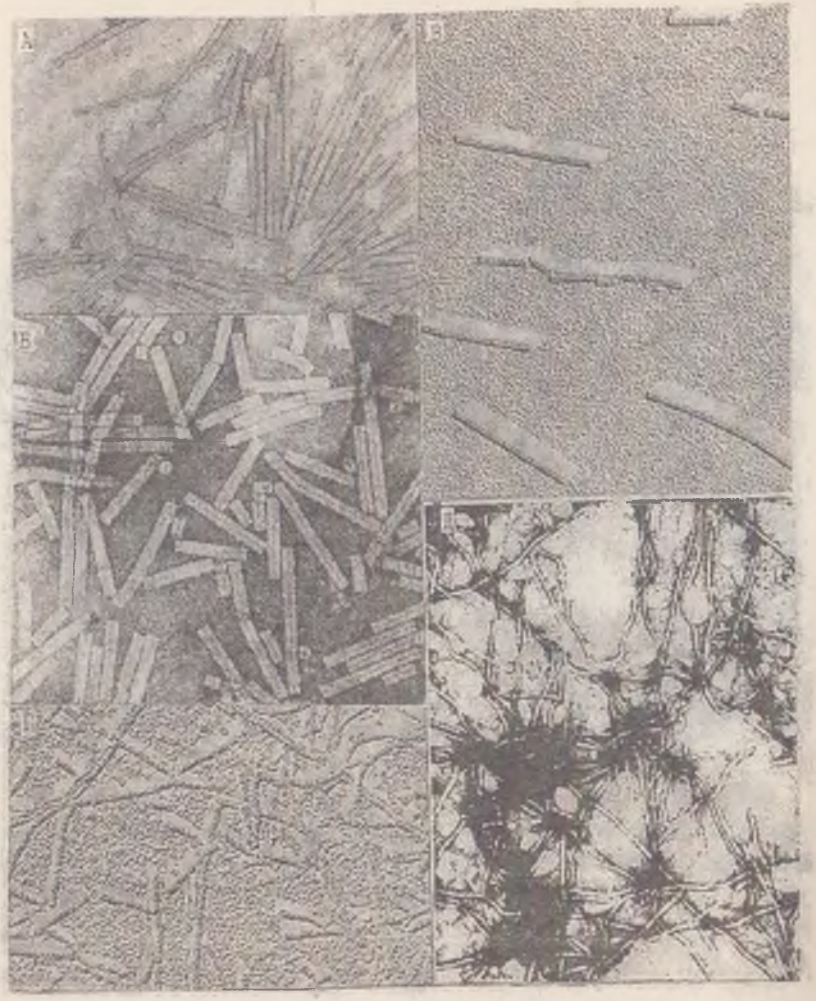
15—расм. Nicotiana glutinosa баргидаги тамаки мозаи—каси вирусининг (А) ва Phaseolus vulgaris баргидаги тамаки некрози вирусиларининг некрозлари (Б).



16 – расм. Тамаки баргидаги томат зархалланиши вирусининг системали некрозланиши. Расм ёруғлик нурида (А) ва ультрабинафша нурлари ёрдамида олинган (Б).



17 – расм. Тамаки мозаикаси вирусининг ультраструктураси.



18 — расм. Спирал симметрия асосида тузилган ўсимлик вирусларининг электронмикрофотографиялари:

А — тамаки мозаикаси (катталаштирилиши — 60 000), Б — арпа (катталаштирилиши — 150 000), В — бодринг (катталаштирилиши — 90.000) мозаикаси, Г — картошканинг Х — вируси (катталаштирилиши — 90.000) ва Д — жўхорининг пакана мозаикаси вируслари (катталаштирилиши — 50.000)

Илова–2. Асосий қисқартмалар

Рус тилида		Ўзбек тилида	
Қисқартма	Полное название	Қисқартма	Тўлиқ номи
АГ	антиген	АГ	антиген
АТ	антитело	АТ	антитело
АС	антисивиротка	АЗ	антизардоб
АСМ	аммонийно–сульфатный метод	АСУ	аммоний сульфат усули
АБВ–тест	вибробактериальная агглютинация	ВБА	вирус–бактерия агглютинацияси
БСА	бычий сывороточный альбумин	МЗА	буқа қони зардоби–нинг альбумини
БА	белок–А	АО	А–оқсили
БФТ	тест на флокуллации бентонита	БФУ	бентонит флокулла–цияси усули
ГА	гемагглютинация диагностикаси	ГА	гемагглютинация диагностикаси
РИД	радиальная иммуно–диффузия	РИД	радиал иммунодиф–фузия
ДСН	додецильсульфат на–трия	ДНС	натрий додецил сульфати
"Дот–спот"	комплементар ДНК–зонд	К–ДНК–зонд	комплементар ДНК–зонд
ДИД	двойная иммуно–диффузия	ИИД	иккиёқлама имму–нодиффузия
ИЭФ	иммуноэлектрофорез	ИЭФ	иммуноэлектрофорез
ИЭМ	иммуноэлектронная микроскопия	ИЭМУ	иммуноэлектрон–микроскоп усули
КМД	иапельный метод иммунодиагностики	ДТУ	диагностиканинг "томчи" усули
ЛТ–тест	латекс–тест	ЛУ	латекс усули
ЛП	иния преципитации	ПЧ	преципитация чизиғи
МКАТ	моноклональные АТ	МКАТ	моноклонал АТ
ПЛЛАС–тест	латекс–оқсил агл–лютинацияси	ЛОА	латекс–оқсил агг–лютинацияси

ПЭГ	полиэтиленгликоль	ПЭГ	полиэтиленгликоль
РИА	радиоиммунологиче — ский анализ	РИА	радиоиммунология анализи
РМП	реакция микропре — ципитации	ТГАР	тескари гемагглю — тинация реакцияси
ФИА	флуоресцентный анализ	ФИА	флуоресцент имму — ноанализ
ПП	полистрол плашка	ПП	полистролдан тай — ёрланган иммуно — фермент анализ ўт — казиладиган платалар (чуқурчалар) тўплами
ВКГ	вирус крапчатости гвоздики	ЧХВ	чиннигул холдорлиги вируси
ВКМК	вирус карликовой мозаики кукрузы	ЖПМВ	жўхори пакана мо — заикаси вируси
ВОМ	вирус огуречной мо — заики	БМВ	бодринг мозаикаси вируси
ВТМ	вирус табачной мо — заики	ТМВ	тамаки мозаикаси вируси
ХВК	Х — вирус картофеля	КХВ	картошканинг Х — вируси
СВК	С — вирус картофеля	КСВ	картошканинг С — вируси
МВК	М — вирус картофеля	КМВ	картошканинг М — вируси
УВК	У — вирус картофеля	КУВ	картошканинг У — вируси
ТШ-ВТМ	томатный штамм ВТМ	ТШ-ТМВ	тамаки мозаикаси вирусининг томат штамми
БТ	бронзовость томатов	ТЗВ	томат зархалланиши вируси
ВАТ	вирус аспермии томатов	ТБВ	томат бепуштлилиги вируси
ТТИ	точка тепловой инакти-вации	ХТФИ	ҳарорат таьсирида фаоллигининг йўқолиши
ПР	предельное разведение	ОСМ	охирги суюлиш

			миқдори
СВС	сохранение выделенном соке	АШС	ажратилган ширада сақланиши
Сер	серология	Сер	серология

Илова–3

Баъзи бирликларни СИ бирлигида^{x} белгилаш

Бирликлар	СН бирлигида^{x}
Узунлик бирлиги	
Микрон (мк) Ангстрем (A^0)	10^{-6}м = 10^{-4}см 10^{-10}м = 10^{-8}см
Ҳажм бирлиги	
Литр (л) Миллиметр (мл)	1,000028. $^{-3}$ м^3 =1000,028 см^3 1,000028 см^3
Зичлик бирлиги	
1 г /см^3	1000 кг/см^3 (2,52 см^2)
1 меш	1 дюйм^2 даги поралар сони

СИ – халқаро бирликлар тизими

Илова–4

Баъзи атамаларнинг маъноси

АТАМА	МАЪНОСИ
Адсорбция –	адсорбция, сатҳга ютилиш, шимилиш
Адъювант –	зардобларнинг иммунлигини оширади–ган кимёвий моддалар
Акриламид –	акрил кислота амиди, органик бирикма, нуклеин кислота, оқсиллар ва вирус–ларни электрофорез ёрдамида ажра–тишда ишлатилади.

Актиномицетлар —	нурли замбуруғлар
Актинофаглар —	актиномицет вируслари
Антиген —	одам, ҳайвон организмини вирусга иммун жавоб реакциясига — антителолар юзага келишига сабаб бўлувчи мураккаб органик моддалар.
Антиген детерменати —	антитело боғланадиган антигендар гуруҳини таркибий қисми.
Антитело —	организмда антигенлар пайдо бўлиши билан юзага келадиган ва уларнинг зарарли таъсирини йўқотадиган алоҳида махсус глобулинлар.
Моноклоналные антитела —	якка клонли антителолар — бир хил турдаги иммуноглобулин молекулаларидан ташкил топган бир турдаги ҳужайраларни ўстиришдан олинадиган антителолар.
ТМВ — 0 —	тамаки мозаикаси вирусининг оддий штамми
ТМВ — ТШ —	тамаки мозаикаси вирусининг томат штамми
ТЗВ —	томат зарҳалланиши вируси
ТБВ —	томат бепуштлилиги вируси
БВ — 1	1 — сонли бодринг вируси
КХВ —	картошканинг Х — вируси
КУВ —	картошканинг У — вируси
БМВ —	беда мозаикаси вируси
Бокс —	алоҳида хона — микроорганизмларни, вирусларни экиш ва ишлаш учун фойдаланиладиган (стерилланган) хона
Вирион —	нуклеин кислота ва оқсил қобиғидан (капсид) ташкил топган етилган, ҳужайрадан ташқаридаги вирус зарраси.
Вироид —	фақат нуклеин кислотадан иборат, вирусдан майда, ўсимликларда касаллик қўзғатувчи агент.
Вирулентлик —	микрорганизмларнинг касаллик қўзғатувчанлик (патогенлик) даражаси.
Гель	муҳит шаклини мустаҳкамлигини сақлаб

—	қолиш хусусиятига эга бўлган дисперс тузилма.	49
Гельфилтирация —	молекула элаклардан фойдаланилган холда молекулаларни ўлчамларига қараб фракцияларга ажратиш.	50 50
Гель—электрофорез—	гель солинган муҳитдаги электр майдони таъсирида моддаларни ажратиш.	51 53
Капсид—	Вирус заррачаларининг сиртқи оқсил қобиғи.	56 57
Колонкали хро—матография—	шиша, пластмасса ёки металлдан ясал—ган бўлиб, моддаларни ажратишда иш—латиладиган узун най.	58 60
Лабиллик —	беқарор—турғун бўлмаган	63
Оборот в минуту —	бир дақиқа давомида айланиш сони.	70
Преципитация —	Чўктириш—зардоб таъсирида суюқликда антигенларнинг чўкишига асосланган зардоблар реакциясининг тури.	71 76
Преципитин —	Антиген билан қўшилиб чўкмага туша—диган антителолар.	77
Элюирование (элюция) —	Эритувчилар ёрдамида ювиб, модда—ларни ажратиш.	78 79 81 82 84 89 92 96

МУНДАРИЖА

Босшга рухсат этилди 1.07.2004. Ҳажми 11.5 босма табок
Бичими 60ч84 1/16. Адади 300 нусха. Буюртма 285
М.Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университети
босмахонасида чоп этилди.

1460