

## Labaratoriya mashg'uloti: Viruslarning qisman tozalangan preparatini olish.

**Ishdan maqsad.** Virusni tezkorlik bilan pH o'zgarishiga asoslanib qisman tozalangan preparatini olish bilan tanishtirish.

**Kerakli materiallar.**

I TMV bilan kasallangan tamaki bargi (500 g) 0,1 M fosfat buferi, pH7, 0-7,5 2.0,1M, 1 M HCl, 3. 0,1 M., 1M NaON, 4. pH-metr, 5. N. glutinosa, 6.Eksikator, 7.Xloroform hamda virus ekstraksiyasida ishlatiladigan asbob-uskuna va idishlar.

**Ishning borishi.** Tamaki mozaikasi virusi bilan kasallangan o'simlik shirasini yuqorida aytilgan usullarda ajratib olinadi va uni xloroform yoki butanol yordamida yana ishlov berib, sentrifuga yordamida tiniqlashtirilib, virusli ekstrakt ajratib olinadi. So'ngra unga 1n NS1dan qo'shib doimo aralash tirib turiladi. pH ni 5,0-5,5 ga kelguncha indikator qog'oz bilan tekshirib boriladi. Endi 0,1 n NS1 yordamida pH 4,5 ga tushiriladi, bu bosqichda p H-metrdan foydalaniladi. 4,4-5,5 orasida ohistalik bilan kislotaga tomizgan maqul, aks holda virusli ekstraktning mahalliy uchastkasida pH keskin pasayadi va ballast oqsillar bilan birga

virus ham izoelektr holatga kelib chukishi mumkin. pH 4,5ga teng bo'lganda suspenziyadan cho'kmaga o'tadigan hujayra ballastlarini 3-5 ming ayl/ tezligida sentrifuga yordamida 3-5 ming aylanish tezligida 20 minut aylantirib tashlanadi.

Cho'kma usti suyuqligini 0,1 n NS1 bilan p H 3,5

gacha nordonlashtiriladi. Bu pH da TMV zarralari izoelektrik holatga o'tadi, agregatlar paydo bo'ladi va aralashirilganda seziladigan darajada ignasimon parakristallar hosil bo'ladi. Natijada eritma ipaksimon yaltiraydi. Eritmani sovuqxonada to'liq kristallanishi uchun kechasiga qoldiriladi. Ertasiga virusli ekstrakt solingan stakanga tashqaridan nazar solinsa, uning tubida virusli cho'kma yaqqol ko'zga tashlanadi. Virusli cho'kmani 6000 aylanish tezligida 20 minut davomida sentrifugalash bilan ajratiladi. Cho'kmani 0,01 M fosfat buferida eritiladi. Eritish uchun ishlatiladigan buferning miqdori eng birinchi virusli materialni ekstraksiya qilish uchun ishlatilgan buferni 1/10 miqdorini tashkil qiladi. Demak, virus 10 marta quyushadi. Virusli eritmani 0,1 NaOH bilan pH-7,0 -7,5 gacha ko'tariladi (pH indikator qog'oz yordamida nazorat qilib boriladi). So'ngra eritma 15-18 ming aylanish tezligida 10 minut davomida sentrifuga qilinib, erimagan cho'kma uzoqlashtiriladi. So'ngra virusni ikkinchi marta qaytadan cho'ktiliriladi. Virusli suspenziyani 0,1 n HCl bilan ehtiyotkorlik bilan muttasil aralashirilgan holda pH 3,5 gacha nordonlashtiriladi (pH diodat bilan pH-metrdan nazorat qilib boriladi). Virusli ekstraktni tuluq kristallanishi uchun muzlatgichda yoki muzli hammomda 1 soatga qoldiriladi. Cho'kma minutiga 6000 aylanish tezligida 20 minut davomida sentrifuga qilinadi.

Tiniq cho'kma usti suyuqligini tashlab yuboriladi, cho'kmadagi virus kristallari 15-20 ml 0,01 M fosfat buferida (pH 7,5) eritiladi. Suspenziya ehtiyotkorlik bilan pH gacha ishqoriylashtiriladi. So'ngra minutiga 15-18 ming aylanish tezligida 10 minut davomida sentrifuga

qilinadi. Cho'kma 5-6 ml 0,1 M fosfat buferi bilan yuvib tashlanadi va sentrifuga qilinadi. YUvindi suvlar odatda asosiy virusli eritma bilan birlashtiriladi.

YUqoridagi usullar bilan tozalangan virus boshqa metodlar bilan oxirigacha tozalanadi.

Katta hajmdagi (bir necha litr) virusli eritmani **i.e.n.** da cho'ktilirilganda, cho'kma usti suyuqligini cho'kmadan sifon yordamida ajratish mumkin.