

Labaratoriya mashg'uloti: Viruslarni izoelektrik nuqtada cho'qqishini aniqlash

Ishdan maqsad. Yuqori ion kuchiga chidamli viruslarni ammoniy sulfati yordamida qisman tozalash metodi bilan tanishtirish.

Kerakli materiallar. 1.TMV bilan kasallangan tamaki bargi (500 g), 0,1 M fosfat buferi, pH 7,0-7,5, 0,1 n HCl, 0,1 n NaOH, EDTA, Ammoniy sulfati, Xloroform, Virus ekstraksiyasida ishlatiladigan asbob-uskuna va idishlar.

Ishning borishi: Ekstratsiya qilinib, xloroform bilan ishlov berilib tozalangan virus ekstraktiga 20% ammoniy sulfati solinib yaxshilab aralashtiriladi. So'ngra 30 minut davomida sovutgichda tutiladi, cho'kmaga talaygina ballast moddalar tushadi. Ularni minutiga 3 ming ayl/tezligida 20 minut davomida sentrifuga qili nadi. Cho'kma usti suyuqligiga 25% gacha ammoniy sulfati solinadi va yaxshilab aralashtiriladi va yana 60 minut kristallar hosil bo'lishi uchun saqlanadi. Inkubatsiya vaqtida virus parakristallari hosil bo'lishi jarayonida ipaksimon yaltirash paydo bo'ladi. Virusli idish virus to'liq kristallanishi va cho'kishi uchun kechasiga sovutgichda qoldirilib ketiladi. Ertasiga sifon yordamida cho'kma usti suyuqligi ajratiladi. Qolgan cho'kmadagi virusli suspenziya minutiga 6-8 ming aylanish tezligida 15-20 minut sentrifuga qilinadi va cho'kma 100 ml 0,01 M fosfat buferiga, pH 7,5 0,005 M EDTA solingan erituvchida eritiladi. So'ngra tozalashning keyingi bosqichida-dializ qilinadi. Bu jarayonda virusli suspenziya tarkibidagi ionlar yo'qotiladi, hamda o'simlikni ko'pgina moddalari denaturatsiyalanib erimaydigan holatga o'tadi.

Dializ qopchasiga virusli suspenziyani solingandan so'ng uni 3-5 litrli suv yoki bufer eritmasi to'latilgan idishga tushirib qo'yiladi. Suvli idish magnitli aylantirgichga o'rnatiladi. Dializ 24 soat davomida olib borilib, shu davrda 3 marta dializ suvi (bufer) almashiriladi. Dializ tugagandan so'ng preparat 10 minut 15-18 ming ayl.tezligida sentrifuga qilinadi. Cho'kma tashlab yuboriladi. Virusli eritmani (cho'kma usti suyuqligi) qaytadan 25% li sulfat ammoniy bilan cho'ktiriladi va 20-30 minutdan so'ng 20 minut davomida 6 ming ayl tezligida sentrifuga qilinadi. Cho'kma usti suyuqligi tashlab yuboriladi, cho'kmali stakan esa toza filtr qog'ozi ustiga (tuzli eritma oqib tushishi uchun) to'ntarib qo'yiladi. So'ngra cho'kmani 20 ml 0,01 M fosfat buferida (pH 7,0-7,5) eritiladi va 15-18 ming aylanish tezligida sentrifuga qilinib, erimagan qism ajratib tashlanadi. Shu usullarda ajratib olingan qisman tozalangan preparat endi boshqa usullar bilan tuliq tozalanishi mumkin.

