

Labaratoriya mashg'uloti: Viruslarning oxirgi suyulish darajasini aniqlash.

Viruslar hujayrada har xil miqdorda to'rlanadi. Ba'zi virus bilan kasallangan o'simliklarning 1 kg dan 1-3 gr toza virus ajratib olinsa, ba'zilaridan 3-5 mg gina ajratib olish mumkin, bu birinchi navbatda virusning hujayrada to'planishiga bog'liqdir. Ikkinchidan viruslarning oxirgi suyulish miqdorini (OSM) aniqlash viruslarni identifikatsiya qilishda katta ahamiyatga egadir.

Virus hujayrada ko'p to'plangan hollarda suyulish darajasi 10^{-6} - 10^{-7} ni tashkil qilsa (TMV) ba'zi vaqtlarda 10^{-2} - 10^{-3} nigina tashkil etadi. (Makkajo'horining pakana chiziqli mozaikasi virusi)

Ishdan maqsad: Viruslarning oxirgi suyulish darajasini aniqlagich yordamida aniqlash.

Kerakli materiallar: Virusli namuna (tamaki mozaikasi virusining pomidordagi shtammi), korund yoki karborund yoki selit, 0,1 M fosfat buferi, 7,5 20 ml lik probirkalar 10-15 dona, pipetkalar 1,2,5,10 ml (3-6 donadan), havoncha, 50 ml lik 2 ta kolba, voronka, doka, 2 ta eksikator, vazelin, ip (№10), etiketkalar ($2 \times 2 \text{ cm}^2$), suv (0,5l), xloroform (5 ml).

Ishning borishi. Tamaki mozaikasi virusining tomat shtammini (TMV-TSH) oxirgi suyulish miqdorini (OSM) aniqlash uchun shu virus bilan kasallantirilgan o'simlik barglaridan 50-60 g 0,05 M fosfat buferi ishtirokida (olingan virusli material vazniga teng miqdorda 1:1 nisbatda bufer olinadi va suyultirilgan vaqtda hisobga olinishi kerak) havonchada ezib maydalaniladi. So'ngra 3-4 qavatli dokadan suziladi va bu virusli suyuqlik sentrifugada 10 minut davomida minutiga 5-6 ming aylanish tezligida aylantiriladi. Cho'kma usti suyuqligidan qator probirkalarga 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} marta suyultirilgan virus eritmaları tayyorlanadi hamda **Nicotina glutinosa** yoki **Nicotina sylvertris** barglarining korund sepilib tayyorlangan o'ng tomonga 4-5 tomchi tomizilib ohista barmoq bilan surtiladi. Bargning chap tomoniga suyultirilmagan o'simlikning shirasi tomiziladi va surtiladi. Har biri suyultirilgan probirkadagi virusli eritma 5-6 bargga yuqtiriladi. Etiketkalar bog'langandan so'ng nam kamera hosil qilingan eksikatorga osib qo'yiladi. Eksikatorga bakteriyalarga qarshi 3-4 tomchi xloroform tomizib qo'yiladi.

Kasallik alomatları 49-72 soatlardan so'ng paydo bo'lgandan so'ng natijalar hisobga olinadi, ya'ni hosil bo'lgan nekrozlar soni hisoblanadi. Nazorat va tajribadan olingan nekrozlar ayrim-ayrim qilib jadvalga tushiriladi, 5-6 bargning o'ng tomonidan olingan nekrozların o'rtachasi hisoblanadi.

Natijalarni grafik ravishda tasvirlash uchun ordinata o'qiga nekrozlar soni kontrolga nisbatan foyiz hisobida, absitsaga esa suyulish darajasi qo'yiladi. Olingan natijalar nuqtalari birlashtirilsa suyulish darajasi oshishi bilan, egri chiziq oga intiladi. Olingan natijalardagi eng oxirgi kasallik alomatları hosil bo'lgan suyulish miqdori shu virusning oxirgi suyulish darajasi deb hisoblanadi.

Suyulish darajasi har bir virusni identifikatsiya qilishda katta ahamiyatga ega bo'lib, ularni virus turiga va shtammiga qarab har xil bo'ladi.

Har xil shaklli viruslarning oxirgi suyulish miqdori

Virus yoki uning shtammi	Oxirgi suyulish miqdori
TMV	10^{-6}
TMV-TSH	10^{-7}
TMV-Koz. SH	10^{-5}
Jo'horining pakana mozaikasi	10^{-3}
SHolg'om mozaikasi	10^{-3}
Redis mozaikasi	10^{-3}
Bodring mozaikasi virusi	10^3
Gulkaram mozaikasi	10^5
G'o'za mozaikasi virusi	-

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), 2.0,1 M fosfat buferi, pH 7,0-7,5, 3.0,1 n HCl, 4. 0,1 n NaOH, 5. EDTA, 6. Ammoniy sulfati, 7.Xloroform, 8.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 qilinadi. 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 jarayoni da 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'kmausti 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.