

## Laboratoriya mashg'uloti: Immunoferment analizi usuli va uning viruslar diagnostikasida qo'llanilishini o'rganish.

**Ishdan maqsad:** IID-usulini o'rganish va u yordamida har xil ob'ektlardan olingan ma'lumotlarda virus borligini, serologik jihatdan har xil virus shtamlarining yaqin qarindoshligini, qisman qarindoshligini, o'xshashligini, umuman o'xshash emasligini reaksiyada hosil bo'lgan pretsipitatsiya chiziqlariga qarab aniqlash usullari bilan tanishish.

**Kerakli materiallar:** *reaktivlar* : usulni ishlatish uchun maxsus olingan AZ, agar-agar ("Difko" agari) yoki agaroz (agar-agarning neytral qismi, maxsus usul bilan zaryadli guruhli agaropektindan tozalangan), agar-agarni eritish uchun har xil eritmalar: 0,07 M fosfat buferiga 0,15 M NaCl solingan pH 7,2 bo'lgan eritma (9 qism 0,15M NaCl va 1 qism 0,07 M)

fosfat buferi. Fosfat buferini tayyorlash:  $\text{KN}_2\text{R}_0_4$  -9,073 g/l;  $\text{Na}_2\text{P}_0_4\text{-}2\text{H}_2\text{O}$  -11,87 g/l; 29,6 ml  $\text{KN}_2\text{R}_0_4$  eritmasini 100 ml gacha  $\text{Na}_2\text{HP}_0_4$  eritmasi bilan olib boriladi. Natijada pH 7,2 ga teng 0,07 M fosfat buferi hosil bo'ladi, qopa amid, metanol, sirka kislotasi, vazelin.

**Uskunalar:** agar-agar gelida chuqurcha hosil qilish uchun ishlatiladigan maxsus shtamp (qoliplar), vakuum nasosi, "shayton", agar-agar quyish stolchasi.

**Ishning borishi.** Bir protsentli "Difko" agari eritmasini virus uchun optimal hisoblangan buferda (TMV uchun 0,05 M fosfat yoki 0,05 M tris-HCl buferi hisoblanadi) tayyorlanadi. Antiseptik sifatida mertiolat yoki natriy azidini ishlatish mumkin. Ba'zi bir uzunchoq viruslarni (masalan: jo'horining pakana mozaikasi, sholg'om mozaikasi viruslarini) aniqlaganda 0,1% natriy dodetsil sulfat solinadi. SHu reaktivlar solib tayyorlangan agar-agarni suv hammomida eriguncha qaynatiladi. So'ngra 25 ml o'lchab oli nadi va shayton bilan gorizontal qilib o'rnatilgan oyna plastinka ustiga (9x12 sm) ohistalik bilan quyiladi va sovub qotguncha va parlanishni kamaytirish maqsadlarida qonqoq bilan yopiladi. Qotib gel xoliga kelgan agar-agar qalinligi 3 mmga yaqin bo'ladi. So'ngra maxsus shtamplar yordamida 2 mm diametrik va chuqurchalar orasidagi masofa 6 mm bo'lgan chuqurchalar qilinadi. CHuqurchalardan agar-agar parchalarini vakuum nasos yordamida tortib olinadi. Plastinkaning chetki qismlarida agar-agar gelining namligini ma'lum darajada saqlash maqsadida maxsus 6 mm diametrik chuqurchalar qilinadi va ularga bufer bilan to'lgaziladi. AG (10a-rasm) va AZ (9-rasm)lar solish uchun chuqurchalar yoki "yulduzcha" shaklida yoki ikki qator qilib tayyorlanadi. Reaksiya "yulduzcha" shaklida qilingan chuqurchalarda olib borilsa, markazdagi chuqurchaga A G solinadi va atrofidagi chuqurchalarga esa AZning har xil suyultirilgan eritmaları solib to'latiladi. Reaksiya ikki qator qilib tayyorlangan chuqurchalarda olib borilsa, ustki qatordagi chuqurchalarga A G (yoki ATlar) solinadi. AZ ning titri baland bo'lsa u bir necha marta suyultiriladi. Suyultirish uchun odatda 0,85% lik osh tuzi eritmasi ishlatiladi. CHuqurchalar maxsus A G va AZ lar bilan tulatilgandan so'ng 48 soatga nam kameraga qo'yiladi. Kamera sifatida eksikator ishlatish mumkin. Uning tagiga 5-7sm vodoprovod suvidan solinadi va qopqok, chetlari vazelin bilan moylanadi. SHunday qilib tayyorlangan nam kameraga reaksiya qo'yilgan shishani maxsus ko'targichga joylashtirgan holda o'rnatiladi, nam kamera qopqok bilan yopilib 48 soatga xona haroratida saqlanadi. Bu vaqt ichida virus (AG) va AT lar agar-agar gelining teshikchalari orqali har tomonga tarqaladilar

(1 % li agar-agar gelining teshiklari radiusi 120 nm atrofida bo‘ladi) va uchrashgan joylarida AG va AT biospetsifik ravishda bog‘lanadilar. Bunday bog‘langan molekulalarning miqdori shunchalik ko‘pligidan ular ko‘zga yaxshi ko‘rinadigan xira oqish rangda pretsipitatsiya liniyalarini hosil qiladi (tashqi ko‘rinishidan xuddi 3-5 kunlik oysimon ko‘rinshda bo‘ladi). Pretsipitatsiya chizig‘ining qalin yoki ingichkaligi AG va ATning konsentratsiyalariga qarab har xil qalinlikda bo‘ladi. (12-rasm) Amaliyotda

ularning qalinlik darajalarini ko‘rsatish uchun 4 ballik sistemadan foydalaniladi: eng qalin pretsipitatsiya chizig‘i 4 ta musbat belgisi bilan belgilanadi (++++), undan ingichkarog‘i "+++", "++", "+", "--" qilib belgilanadilar. Manfiy "-" belgisi reaksiyani yo‘qligini ko‘rsatadi.

IID-usuli yordamida ikki yoki bir nechta virus AG larining bir —biriga to‘la o‘xshashligini qisman o‘xshashligini, ham anshqlash mumkin. Buning uchun quyiladigan reaksiya avvaldan shu maqsad uchun moslab qo‘yiladi. Reaksiya agar liniya holda qo‘yilsa tepa (birinchi) qatorga 2 yoki bir nechta antigenlar yonma -yon chuqurchalarga quyiladi, tagidagi (ikkinchi) qatordagi qarama-qarshi chuqurchalarga esa AGLarning faqat bittasining AZ si solinadi. Pretsipitatsiya chiziqlari hosil bo‘lgandan so‘ng shu chiziqlarning ko‘rinishiga qarab AGLarning bir-biriga munosabatlari aniqlanadi. Ikki AG orasidagi pretsipitatsiya chizig‘i bir chiziq bo‘lib qo‘shilib ketsa -AG lar bir-biri bilan o‘hshash hisoblanadi: pretsipitatsiya chiziqlari qo‘shilsa-yu, lekin qo‘shilgan erida bir-birini kesib o‘tib ketsa-AGlar to‘la (butunlay) o‘xshash emas deyiladi. Masalan, bir virusning ikki shtammi pomidordagi TMV va tamakidagi TMV shtammlari ko‘p o‘simliklarda har xil alomatlar hosil qilsalar ham A G jihatidan ular to‘la bir-birlari bilan o‘xshashdirlar: shu pomidordagi TMV tamakini TMV virusining Qozoq shtammi bilan qisman o‘xshashdir va hokazo.

Reaksiya natijalari maxsus kundalik daftarga belgilab qo‘yilgandan so‘ng, sur‘atga olish mumkin, natijalarini uzoq muddatga saqlamoqchi bo‘linsa ikki xil usul qo‘llaniladi.

1. Reaksiya natijalarini to‘g‘ridan to‘g‘ri suratga olinadi.
2. SHisha plastinka ustidagi bizni qiziqtirgan reaksiya natijalari ohistalik bilan o‘tkir tig‘ yordamida kesib olinadi (shartli belgi qo‘yish maqsadga muvofiq bo‘ladi).

Belgilar har xil bo‘lishi mumkin. Masalan, to‘g‘ri to‘rt burchak qilib reaksiyalik agar-agar gelining yuqori o‘ng burchagidan 2-3 mm<sup>2</sup> qilib tig‘ uchi bilan kesib olib tashlanadi, ikkinchi yulduzchadagi reaksiyani boshqa burchagida shunga o‘xshamagan belgi qilinadi va kundalik daftarga belgilab qo‘yiladi. Belgidash ishlari tugaganidan so‘ng 0,85% lik osh tuzi eritmasiga 2-5 soatga solib qo‘yiladi. Bu vaqt ichida reaksiyaga qatnashmagan AZ oqsillari, AGning tarkibidagi oqsil, pigment, taninsimon moddalar va hakoza geldan yuvilib chiqadi; aks holda bular ham pretsipitatsiya chiziqlari bilan birga amid qopa rang bilan bo‘yaladi va

reaksiya natijalarini kuzatishni qiyinlashtiradi. So‘ngra agar-agar gelini ohistalik bilan buyum oynasiga o‘tkaziladi (buyum oynalari yaxshilab xrom aralashmasi bilan yuvilib etanolda yopik; holatda saqlanadi, aks holda unga qo‘yilgan agar-agar ko‘chib ketishi mumkin) va uning ustiga xromatografiyada ishlatiladigan qog‘oz yoki filtr qog‘ozi bo‘lakchasi bilan yopiladi va quritish uchun 24 soatga qo‘yiladi yoki ventilyator yordamida 2 - 3 soat davomida quritiladi. So‘ngra oqib turgan suvga tutib turib filtr

qog'ozi va uning mayda bo'laklaridan tozalanadi. Keyingi qilinadigan ish - reaksiya natijalarini bo'yashdir. Bo'yoq sifatida 0,3% li amidoshvars (qora amid) bo'yog'i ishlatiladi. Buyoq erituvchisi qilib metanol, konsentrlangan sirka kislotasi va suvni 4:4;1 nisbatda aralashtirilib 0,3% qopa amidni eritiladi. Bo'yalgan preparatni bo'yog'ni ortiqchasidan yuvish uchun yuqoridagi erituvchining o'zi qora amidsiz holda ishlatiladi. Bo'yash 10 minut davom etadi, so'ngra bo'yalgan preparat yuvilishga qo'yiladi. Vaqti-vaqti bilan yuvuvchi eritma sutka davomida 3-4 marta almashtirilib turiladi. SHu usul yordamida reaksiya natijalari yana bir marta kuzatiladi, hisobga olinadi, suratga olinadi va uzoq muddatga saqlanishi mumkin.