

Laboratoriya mashg'uloti: Virus preparatning miqdori va tozaligini aniqlash

Ishdan maqsad. Har xil tezlikda moddalarni cho'kmaga tushishiga asoslanib viruslarni tozalash usuli bilan tanishtirish.

Kerakli materiallar. Preparativ ultratsentrifuta va uning rotorlari, probirkalari, shprints va virus tozalashning boshqa metodlarida ishlatilgan materiallar va h.z.lar.

Ishning borishi. Sentrifuganing yaxshilab yuvilib quritilgan probirkalariga virusli eritmadan "namuna tayyorlash" bo'limiga qaralsin) sentrifuga qopqog'idagi qarash teshikchasigacha qo'yiladi, so'ngra probirkalar tarozi yordamida tenglashtiriladi va qopqoqlar avval qo'l bilan, so'ngra maxsus "kalit-moslama" bilan yopiladi. Probirkalarning tengligi qayta tarozida tekshiriladi, so'ngra burama qopqoqlari bilan germetik yopiladi (agar probirkalarning biri og'irroq bo'lsa, baro-barlashtirish uchun shprints yordamida eritmadan qo'shiladi).

Probirkalar sentrifugani rotoriga bir-biriga qarama-qarshi qilib qo'yiladi. Rotor zich qilib qopqoq bilan yopiladi va ultratsentrifuga kamerasiga joylashtiriladi (ultratsentrifuga rotorini o'rnatish va sentrifugani ishlatish operator tomonidan bajariladi) Sentrifugalash 90 minut davomida 105000 g da sentrifugalanadi.

Ultratsentrifuga to'xtagandan so'ng, rotordan probirkalarni chiqarib olinadi, probirkaning eng tagida ozgina jigaprang virus cho'kmasi va cho'kma usti suyuqligi kuzatiladi. Cho'kma usti suyuqligini to'kib tashlanadi, virus cho'kmasini esa ozgina 0,01 M tris-NS1 buferida (pH -7,6) eritiladi. Agar virus yaxshi tozalangan bo'lsa oq-havorang "opalessensiya" kuzatiladi. Eritmani 15-18 ming ayl.tezligida sentrifugalanadi va erimagan qismidan ajratiladi. Erimagan cho'kmani yana bir marta 1-2 ml bufer bilan eritib, cho'ktirib, cho'kmausti suyuqligini asosiy virus eritmasiga qo'shiladi va saqlanadi.

Shu differensial sentrifugalash siklini 3-4 marta qaytarib etarlicha tozalangan virus preparati olinadi. Viruslarning o'lchamlari (10-600 nm) va zichliklari shundayki, agar ularga markazdan qochma kuchini 30000 dan 20000g ta'sir ettirilsa, virus zarralari cho'kmaga tushadi. Shu maqsadda preparativ ultratsentrifugalarning rotorlarini minutiga 50000-60000 marta aylanadigan sentrifugalari ishlatiladi. Eng mashhurlaridan Hitachi MSE firmasining Spinco L 2 va Spinco L 50, Super-Speed-25, Super-Speed-40, Super-Speed-50, GDRning Vac-40, Vac-60 sentrifugalari ishlatiladi. Ular rotor to'plamlariga ega. 1500 ml sukyauş kni 59000 da aylantiradigan ro- torlardan 80-100 ml suyuqlikni 200000 g gacha aylantiradigan rotorlarga ega.

Differensial sentrifuga usulida virus tozalaganda virusni suspenziyadan cho'ktiriladi, boshqatdan suspenziya holatiga o'tkaziladi, sovuqda magnit aylantirgichida chayqatiladi hamda past tezlikda sentrifugalanadi (6000g,30 min). Bu jarayonni bir necha marta qaytarish mumkin.

Hayvon viruslarini, bakteriofaglarni bir sikl differensial sentrifugalash bilan tozalash qiyin bo'ladi. Bunda avval hap xil usullarda (m., ionalmashish xromatografiyasi) virus tozalash bosqichlaridan o'tib, virusni katta hajmli suyuqlikdan kichik hajmga o'tkazishda ishlatilishi mumkin. O'simlik viruslarini tozalashda bu metod yaxshi samara beradi.