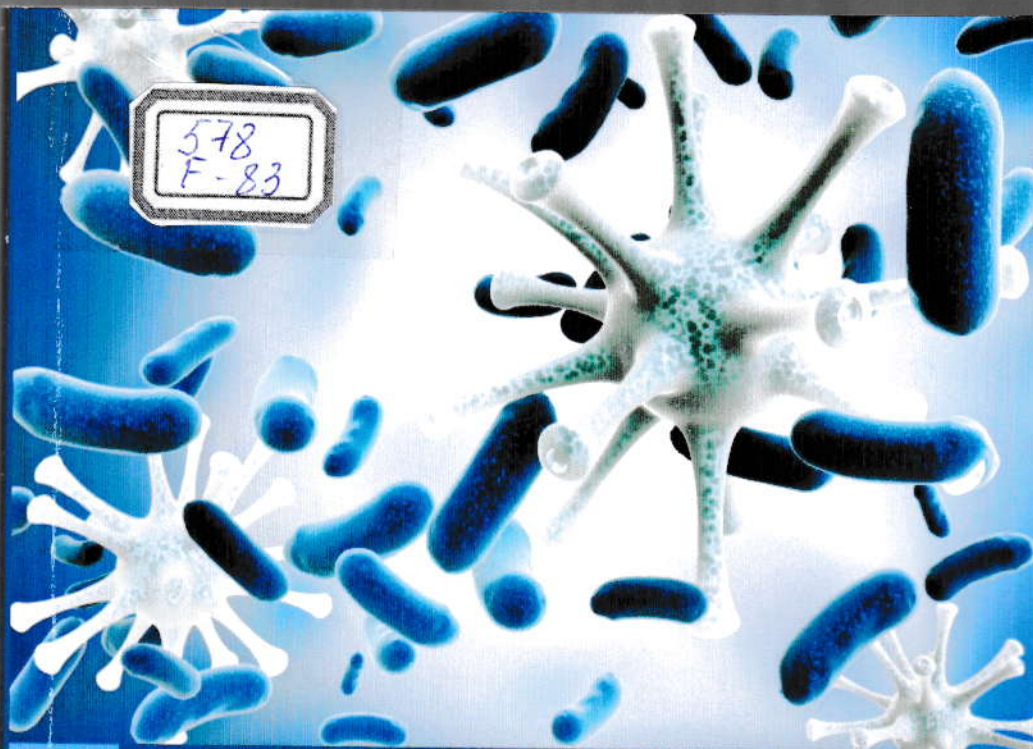




578
F-83

V.B. FAYZIYEV, D.T. JOVLIYEVA,
N.I. SHONAZAROVA, G.U. SUYUNOVA

VIRUSOLOGIYA

laboratoriya mashg'ulotlari

O'quv qo'llanma

Книга должна быть
возвращена не позже
указанного здесь срока

Количество предыдущих
выдач

--	--

578
F-83

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIIY TA'LIM, FAN VA INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI

CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI

V.B. FAYZIYEV, D.T. JOVLIYEVA, N.I. SHONAZAROVA,
G.U. SUYUNOVA

VIRUSOLOGIIYA

laboratoriya mashg'ulotlari

(o'quv qo'llanma)

14534/49

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIIY TA'LIM,
FAN VA INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI
CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI
AXBOROT RESURS MARKAZI
1-FILIALI

«Renesans sari» FAN VA INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI
TOSHKENT 2024
CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI
AXBOROT RESURS MARKAZI

UO'K 578;579
KBK 28.3
F-83

Virusologiya fanidan laboratoriya mashg'ulotlari uchun o'quv qo'llanma pedagogika oliy o'quv yurtlarining "5110400-Biologiya" ta'lim yo'nalishi o'quv rejasiga kiritilgan "Virusologiya" hamda universitetlarning "5140100-Biologiya" ta'lim yo'nalishi o'quv rejasidagi "Mikrobiologiya va virusologiya" fani va "Mikrobiologiya va virusologiya" magistratura mutaxassisligi bo'yicha "Mikrobiologiya va virusologiya tadqiqot usullari" fanlaridan o'quv dasturlar asosida laboratoriya mashg'ulotlarini o'tish uchun, shuningdek virusologiya sohasida izlanishlar olib boruvchi tadqiqotchilar va ilmiy-xodim izlanuvchilar uchun tayyorlangan.

Tuzuvchilar:

V.B. Fayziyev – CHDPU Biologiya kafedrası mudiri, biologiya fanlari doktori, professor.

D.T. Jovliyeva – CHDPU Biologiya kafedrası o'qituvchisi

N.I. Shonazarova – CHDPU Biologiya kafedrası o'qituvchisi

G.U. Suyunova – CHDPU Biologiya kafedrası o'qituvchisi

Taqrizchilar:

T.S. Xusanov – O'zRFA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi, biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori.

I.V. Safarov – CHDPU Biologiya kafedrası dotsenti, biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori.

UO'K 578;579
KBK 28.3

Mazkur o'quv qo'llanma Ozbekiston Respublikasi oliy ta'lim, fan va innovatsiyalar vazirligining 2024-yil 25-iyndagi 218-sonli buyrug'iga asosan nashr etishga ruxsat berilgan.

ISBN 978-9910-751-14-5

KIRISH

Yer sharida mikroorganizmlar bilan bir qatorda hayotning hujayrasiz shakli hisoblangan viruslar ham tarqalgan bo'lib, bakteriya, zamburug', aktinomitset kabi mikroorganizmlarni, shu bilan bir qatorda odam, hayvon va o'simliklarni ham kasallantirib, ularning organizmiga zarar yetkazadi. Virusologiya biologiyaning alohida tarmog'i hisoblanib, viruslarning tuzilishi, tarqalishi, saqlanishi kabilarni o'rganadi.

Ushbu o'quv qo'llanmada dastlab virusologiya laboratoriyasining tuzilishi va unda ishlash qoidalari keltirilgan bo'lib, bunda talabalar virusologiya laboratoriyasining umumiy tuzilishi va unda ishlash qoidalari bilan tanishishadi. Qo'llanmaning keyingi bo'limlarida viruslarni kasallik alomatlariga qarab aniqlash, odam va hayvon viruslarini rasmlar hamda atlaslar yordamida aniqlash, viruslarning zarari va tarqalish darajasini aniqlash, viruslarni diagnostika qilish, immunologik usullar va ularning qo'llanilishi, molekulyar diagnostika usullaridan PZR usuli va uning viruslar diagnostikasida qo'llanilishiga oid laboratoriya ishlari kiritilgan bo'lib, bu talabalarda virusologiyaning zamonaviy usullari haqida amaliy ko'nikmalarni hosil bo'lishiga yordam beradi.

Laboratoriya ishlarining har biri ishning mavzusi, maqsadi, kerakli jihozlar va ashyolar ro'yxati, nazariy ma'lumot, ishning borish tartibi hamda mavzuni mustahkamlash uchun nazorat savollari keltirilgan bo'lib, bu talablarga bilimlarini nazorat qilishga ko'maklashadi.

Virusologiya fani universitetlarning va pedagogika oliy ta'lim muassasalarining biologiya ta'lim yo'nalishi o'quv rejasiga muvofiq o'qitiladigan fanlar qatoriga kiritilgan bo'lib, nazariy va laboratoriya mashg'ulotlaridan iboratdir.

Fanning nazariy qismi-bu ma'ruza mashg'ulotlari hisoblanib, nazariy mashg'ulotlarni mustahkamlash uchun turli laboratoriya mashg'ulotlari olib borilishini talab etadi, bu esa o'z navbatida talabalarda amaliy ko'nikmlarning shakllanishiga ko'maklashadi.

Bugungi kunda virusologiya fani laboratoriya ishlari uchun zarur bo'lgan o'quv adabiyoti faqatgina universitetlarning biologiya ta'lim yo'nalishi talabalari uchun "Virusologiyadan amaliy va laboratoriya mashg'ulotlari" (universitet nashriyoti, 2004 yil) nashr etilgan bo'lib, pedagogika oliy ta'lim muassasalari talabalari uchun bugungi kungacha ushbu fandan o'quv adabiyoti yaratilmaganligi, ushbu o'quv qo'llanmani yaratishga ehtiyoj tug'dirdi.

Laboratoriya mashg'ulotlarini o'tkazishda asosan inson uchun xavfsiz bo'lgan viruslar, asosan fitopatogen viruslardan foydalanilgan bo'lib, bu mashg'ulotlarni xavfsiz va oson o'tkazish imkonini beradi.

Yuqoridagilarni e'tiborga olib, pedagogik OTMlarining 60110900-Biologiya va 5110400-Biologiya ta'lim yo'nalishi o'quv rejasiga kiritilgan "Virusologiya" fanidan, asosan laboratoriya mashg'ulotlarini bajarish uchun bugungi kungacha o'zbek tilida o'quv adabiyotlarining mavjud emasligi talabalar uchun bir qator qiyinchiliklar paydo bo'lishiga olib kelmoqda. Bu muammo ushbu kurs bo'yicha o'zbek tilida o'quv adabiyotlari tayyorlashni talab etadi. Shuning uchun ushbu tayyorlangan o'quv adabiyoti o'z vaqtida tayyorlangan hamda talabalar bilimini chuqur bo'lishi uchun muhim ahamiyat kasb etadi.

Ushbu o'quv qo'llanma biologiya ta'lim yo'nalishi bakalavr talabalari uchun tayyorlangan bo'lib, qo'llanmaning birinchi qismida talabalar viruslar haqida to'liqroq ma'lumotga ega bo'lishi uchun viruslarning tuzilishi va turlari haqida ma'lumotlar keltirilgan. Ikkinchi qismida esa virusologik tadqiqotlar uchun zarur bo'lgan asbob-uskunalarining tuzilishi va ishlash mexanizmi, sterillash usullari, ozuqa muhitlari va ularni tayyorlash, namunalarni olish, virusologik tadqiqotlar uchun tayyorlash, o'simliklarga salbiy va ijobiy ta'siri kabilarni o'rganadi.

Ushbu o'quv qo'llanmani tayyorlash jarayonida o'quv adabiyotlar tayyorlashga qo'yilgan zamonaviy tendensiyalarga amal qilingan holda, virusologiya fani laboratoriya mashg'ulotlari tayyorlangan, jumladan: A.Vahobovning "Virusologiyadan laboratoriya mashg'ulotlari uchun o'quv qo'llanma (lotincha)" ("Universitet" nashriyoti, 2004 y.) kabi o'zbek tilida tayyorlangan hamda xorijiy oliy ta'lim muassasalarida A.Bukrinskayaning "Virusologiya" (Meditsina, 1986), I.G.Atabekovning "Praktikum po obshey virusologii" (MGU, 2002 yil) kabi bir qator tayyorlangan o'quv adabiyotlaridan foydalanildi.

Shuningdek, ushbu o'quv qo'llanma mualliflar va mutaxassislarining fikr-mulohazalari asosida tayyorlangan bo'lib, undagi mavjud xato va kamchiliklarni tuzatish maqsadida bildirilgan fikrlar uchun mualliflar jamoasi o'z minnatdorchiligini bildiradi.

1-laboratoriya mashg'uloti **Virusologiya laboratoriyasining tuzilishi va unda** **ishlash qoidalari**

Darsning maqsadi: Virusologiya laboratoriyasining tuzilishi hamda unda ishlash qoidalari bilan talabalarni tanishtirish.

Nazariy tushuncha. Bizga ma'lumki viruslar ko'zga ko'rinmaydigan faqat elektron mikroskoplardagina ko'rinadigan hayot shakli hisoblanadi. Ular tirik organizmlar—odam, hayvon, suvo'tlari, zamburug'lar, aktinomitsetlar va bakteriyalar organizmlarida parazitlik qilib ko'payadigan, kattaligi nanometr, angstremlar bilan o'lchanadigan tayoqchasimon, sharsimon, ipsimon, batsillasimon nukleoproteidlardir.

Virusologiyadan olib boriladigan mashg'ulotlar, ilmiy-tadqiqot ishlari maxsus jihozlangan laboratoriyalarda, hayvonlar bilan o'tkaziladigan tajribalar vivariylarda, o'simliklar bilan olib boriladigan tajribalar issiqxonalarda, hayvonlar, odam, o'simlik to'qimalari, hujayra kulturalari (ekmalari) va bakteriofaglar bilan o'tkaziladigan tajribalar bakteritsid lampalar bilan sterillangan bokslar yoki ayrim yopiq laboratoriyalarda olib boriladi.

Virus laboratoriyasi bevosita laboratoriyadan, shuningdek, yordamchi xonalardan iborat. Virusologik laboratoriyani tashkil etish va jihozlash xususiyatlari muassasaning o'ziga xos xususiyatlariga, hal qilinishi kerak bo'lgan vazifalarga va miqyosiga qarab belgilanadi.

Masalan, bunday laboratoriya kattaroq tashkilot - institut, sanitariya-epidemiologiya stansiyasining bir qismi bo'lishi mumkin. Bunday holda, yordamchi xonalar laboratoriyaning o'zi uchun ham, ushbu tashkilot uchun ham umumiy bo'lishi mumkin. Virusologik laboratoriyani tashkil etish va jihozlashda quyidagi ish turlarini amalga oshirish imkonini beruvchi sharoitlar yaratiladi:

= diagnostik: masalan, viruslarni ajratish va serologik testlar bilan bog'liq;

= viruslarning xossalari, shuningdek, tuzilishini o'rganish;

= genetik tadqiqotlar o'tkazish va boshqalar.

Virusologik laboratoriyani tashkil qilish uchun 5-6 ta alohida xonadan iborat bo'lgan izolyatsiya qilingan bo'lim ishlatiladi. Asosiy ish maydoni sifatida ikkita zonaga bo'lingan yorqin xona - laboratoriya, laboratoriya oldi, boks va boks oldi xonasi.

Boks oldidagi xonada boksga kirishda kiyiladigan maxsus kiyimlar saqlanadi. Boksdan eng zarur asbob-uskunalariga saqlanadi: stol, stullar,

gaz gorelkasi, gugurt, qaychilar, skalpellar, pinsetlar, ignalar, sterilizator, ishlatilgan pipetkalar saqlanadigan 2% li fenolli yoki xloraminli idish, dezaktivatsiya qilish uchun ishlatiladigan materiallarni soladigan idish, 70% li yodning spirtli eritmasi, probirkalar uchun shtativlar, sterillangan oddiy va paster pipetkalari, steril probirkalar, oddiy va mum qalamlar, leykoplastir, steril paxta va hokazolar. Bundan tashqari boksga har bir vazifani bajarish uchun ishlatiladigan asbob-uskunalar va eritmalar olib kirilib, ish tamom bo'lgandan keyin olib chiqib ketiladi. Yana bir ayrim xonada viruslarni toza preparatlarini olishda ishlatiladigan har xil aylanish tezligida ishlaydigan sovitgichli sentrifugalar bo'ladi (daqiqasiga 612 ming aylanish tezligi.).

Virusologiya laboratoriyasida gomogenizator, sentrifuga, elektron mikroskop, spektrofotometr, elektroforez, xromatografiya asboblari (fraksiyalarni avtomatik yig'uvchi kollektorlar), distillyator, texnik va analitik tarozilar, quritish shkaflari, sovitgich, termostat, pH-metr, diffuziya nasosi va boshqalarga ega bo'lishi lozim.

Virusologiya laboratoriyasining tuzilishi va unda ishlash sharoitlari, ishlash joylarini taqsimlanishi, yuvish va dezenfeksiyalash xonasi, asosiy asbob-uskunalar, reaktiv va ozuqa muhitlar, shishadan yasalgan idish va asbob-uskunalar, sterillash, antizardob olish va tayyorlash, viruslarni saqlash, virusologiya laboratoriyasida dezinfikasiya va sterilizatsiya shartlari, ayniqsa tibbiyot va veterinariya virusologiyasi sohasidagi amaliy mashg'ulotlari o'simlik viruslarini o'rganishdan keskin farq qiladi.

Virusologik laboratoriya xonasi majburiy ravishda samarali shamollatish-ventilyatsiya tizimi, vodoprovod tizimi (issiq suv va sovuq suv) bilan jihozlangan bo'lishi va elektrlashtirilgan bo'lishi kerak. Bundan tashqari, markazlashtirilgan havoni siqish va vakuum tizimi bo'lishi maqsadga muvofiqdir.

Virusologiya laboratoriyasida ishlash o'ziga xos qoidalarga amal qilishni talab etadi, ushbu yo'nalishda ilmiy-tadqiqot hamda mashg'ulot olib boradigan ilmiy xodimlar hamda professor-o'qituvchilar ushbu qoidalaridan xabardor bo'lishi shart. Laboratoriyaning barcha xodimlari xavfsiz ishlash usullari bo'yicha o'qitilib, tegishli standartlarga muvofiq ish kiyimi, xavfsizlik poyabzali, sanitariya-gigiena vositalari va himoya vositalari bilan ta'minlanadi.

Ishning asosiy qoidalarini quyidagilardan iborat:

- ishlab chiqarish laboratoriyasiga ruxsat etilmagan shaxslarning hamda xalat va almashtiriladigan poyabzalsiz xodimlarning kirishi ham qat'iy man etiladi;

- laboratoriyadan xalat va xavfsizlik poyabzali bilan chiqish yoki palto ustidan xalat kiyish, chekish, ovqatlanish va laboratoriyada saqlash taqiqlanadi. Boksdan ular steril xalatda, niqobda, qalpoqda ishlashadi va kerak bo'lganda rezina qo'lqop va ko'zoynak taqishadi. Oyoq kiyimlarini almashtirishga ishonch hosil qilinadi;

- tadqiqot ishlari uchun laboratoriyaga kiritilgan barcha materiallar infeksiyalangan deb hisoblanishi kerak. Ularni juda ehtiyotkorlik bilan ishlatish hamda o'rashda idishlarni tashqi tomondan dezinfeksiyalay eritma bilan artib, patnisga yoki kyuvetalarga qo'yish kerak. Stol ustidagi ish joyi xloraminning 5% li eritmasi bilan namlangan bir necha qatlamli doka bilan qoplangan bo'lishi shart. Pipetkalar bilan ishlashda kauchuk so'rg'ich ishlatiladi. Pipetkalar, buyum va qoplagich oynalar hamda boshqa foydalaniladigan idishlar 5% li xloramin, fenol, lizol, sulfat kislotaga botirib dezinfeksiya qilinadi;

- ish tugagandan so'ng, ish joyi tartibga solinadi va yaxshilab dezinfeksiya qilinadi. Keyingi ish uchun zarur bo'lgan virusli material muzlatgichda saqlanadi va muhrlanadi;

- qo'llar 5% li xloramin bilan yaxshilab yuviladi, qo'lqoplar chiqariladi, ikkinchi marta dezinfeksiya qilinadi va yuviladi. Virusologik laboratoriyada ishlaganda xodimlar aseptika va antiseptika usullari va qoidalariga qat'iy rioya qilishlari kerak.

Aseptika - bu atrof-muhitdan mikroorganizm va viruslarning inson tanasiga, shuningdek, tekshiriladigan materialga kirishiga to'sqinlik qiluvchi chora-tadbirlar va ish usullari tizimi. U steril asbob va uskunalardan foydalanishni, xodimlarning qo'llarini qayta ishlashni, maxsus sanitariya-gigiyena qoidalariga va ish usullariga rioya qilishni ta'minlaydi.

Antiseptiklar - bu teri va shilliq pardalarning shikastlangan yoki buzilmagan joylariga kirganda yuqumli jarayonni keltirib chiqarishi mumkin bo'lgan mikroorganizm va viruslarni yo'q qilishga qaratilgan chora-tadbirlar majmui. Antiseptik sifatida etil spirti (70%), yodning spirtli eritmasi, florosent va boshqalar ishlatiladi.

Dezinfeksiya - inson va hayvonlar uchun patogen mikroorganizmlar va viruslarni jismoniy vositalar va kimyoviy vositalar yordamida yo'q qilish orqali atrof-muhit obyektlarini zararsizlantirish.

Sterilizatsiya - har xil materiallardagi mikroorganizm va viruslarni zararsizlantirish, to'liq yo'q qilish.

1-ish. Virusologiya laboratoriyasi tuzilishi va unda ishlash qoidalarini o'rganish

Ishning borish tartibi:

- ta'lim muassasasida mavjud biologiya laboratoriyasini virusologiya laboratoriyasi bilan qiyosiy o'rganib chiqish;
- virusologiya laboratoriyasiga infeksiyon materiallarni qabul qilish va saqlash qoidalarini manbalar asosida o'rganish;
- tekshirilgan infeksiyon materiallarni utilizatsiya qilish qoidalarini manbalar asosida o'rganish;
- virusologik laboratoriyalarning ixtisoslashuviga ko'ra turlarini aniqlash va tavsiflash.

Nazorat savollari

1. Virusologiya laboratoriyasining qanday bo'limlari mavjud?
2. Virusologiya laboratoriyasida qo'llaniladigan qanday asbob - uskunalarini bilasiz?
3. Virusologiya laboratoriyasi ixtisoslashuviga ko'ra qanday turlarga bo'linadi?
5. Virusologiya laboratoriyasida dezenfeksion vositalar sifatida nimalardan foydalaniladi?
6. Pipetka, buyum va qoplag'ich oynalar hamda foydalaniladigan boshqa idishlar qanday sterillanadi?
7. Virusologiya laboratoriyasi ishlash qoidalarini aytib bering.
8. Infeksiyon materialni utilizatsiya qilish qanday amalga oshiriladi?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: "FSMU" metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»

F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Virusologiya laboratoriyasining bo'limlari nimalarga ixtisoslashganligini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering.
2. Virusologiya laboratoriyasida infeksiyani neytrallash uchun qanday dezinfeksion vositalardan foydalaniladi va nima uchun?

2-laboratoriya mashg'uloti

Virusli kasalliklarning alomatlarini fitopatogen viruslar misolida o'rganish

Darsning maqsadi: talabalarni fitopatogen viruslar bilan kasallangan o'simliklarda hosil bo'ladigan kasallik alomatlari bilan tanishtirish.

Kerakli jihozlar: turli kasallik alomatlari mavjud o'simlik barglari, korund, chinni hovoncha, fosfat buferi, qaychi, moy qalam.

Nazariy tushuncha. Viruslar tirik organizmlarda shu jumladan o'simliklarda ham turli-tuman kasallik alomatlarini keltirib chiqaradi. Bunday aolamlarga o'sish nuqtasi nekrozi, pakanalik, o'simlik bargida sistemali mozaika, xloroz, xloritik dog'lar, nekrotik dog'lar kabi qator alomatlarni sanab o'tish mumkin.

Simptomlarning asosiylari quyidagicha bo'ladi: mozaika guruhiga mansub simptomlar-ipsimonlanish, burishish (ajinlashish), jingalaklanish, qirg'uloqqa o'xshash bargidagi chiziqli mozaika, tomir, poya va meva nekrozlari, o'simlikni yoki bargini shoxlanishi, rangini yo'qotishi, barg'ayishi, shaklini o'zgartirishi, o'sishdan qolishi, gullarning badburiylanishi, gul qismlari rivojlanmasligi, gultojbarglarining yashil tusga kirishi, gul o'rniiga shoxlab ketishi, reduksiyalangan barg paydo bo'lishi, to'pgul markazida haqiqiy barg hosil bo'lishi kabilarni sanab o'tish mumkin.

Quyida O'zbekistonda tarqalgan virus kasalliklari va ularning simptomlari hamda ba'zi boshqa xususiyatlari haqida qisqacha to'xtalib o'tamiz.

1. G'o'za virus kasalliklari g'o'zaning ingichka va o'rta tolali navlarida tarqalgan. Ular dunyo bo'yicha 18 dan ortiq bo'lib, ulardan eng asosiylari: g'o'za bargining jingalaklanishi kasalligida g'o'za bargining asosiy tomiri rivojlanmay qolishi sababli barglar jingalaklashadi va ba'zan mozaika alomatlari (chiporlanish) kuzatiladi. Barglar soni ham kasal o'simliklarda ancha kamroq, barglarda xol-xol dog'lar paydo bo'ladi, barg qavariq shaklga kiradi. Ba'zan bargda oqish, to'q-yashil mozaika kuzatiladi, barg plastinkasi dag'allashadi, bo'g'inlar orasi qisqaradi, barg yuqoriga qarab buraladi.

O'simlikning o'sish nuqtalarini dastalashishi kasalligida o'simlikning o'sish nuqtasidagi barglar hamda gullar orasi qisqaradi, tomirlari yo'g'onlashadi, o'simlikning uchida shoxlar dastalashadi.

G'o'zada yana tomirlararo sariq mozaika, xol-xol mozaika, barg va poyaning jigarrang tusga kirishi (psilloz), barglarning maydalashishi, antotsianoz, tomirlararo mozaika, bo'g'inlar orasining qisqarishi kabi kasalliklar mavjud.

2. Kartoshkaning virusli kasalliklari ham juda keng tarqalgan bo'lib, dunyo bo'yicha 50 dan ortiq virus kasalliklari topilgan. Ularning o'ntasi MDH davlatlarida va oltitasi esa O'zbekistonda uchrashi ushbu yo'nalishda tadqiqot olib borgan olimlar tomonidan tasdiqlangan (Fayziyev, 2020).

Virus bilan kasallangan o'simlik bargining tomirlari och tusga kiradi, bargida xol-xollik yoki ajinlar paydo bo'ladi. Kartoshka A virusi (KAV) bilan kasallangan kartoshka bargida katta-katta dog'li mozaika hosil bo'ladi, keyinchalik barg to'liqsimon egilib, jingalak bo'ladi.

Virusning virulent shtammlari Kartoshka X virusi (KXV) bilan birga uchrasa kartoshka bargida burmalar, g'ijimlar paydo bo'lib, barg buraladi, tomirlararo shishlar paydo bo'ladi, barglar mo'rtlashib, oson sinadi. Kartoshka M virusi (KMV) bilan kasallangan bo'lsa, o'simlikning yuqori yarusidagi yosh barglarda kuchsiz dog'lar paydo bo'ladi.

Kartoshka Y virusi bilan kasallansa, yaqqol ko'zga tashlanadigan aniq simptomlar sezilmasligi ham mumkin.

Agarda kartoshka Y virusi boshqa viruslar bilan birgalikda uchrasa mozaika, yo'l-yo'l shtrixlardan iborat mozaika hosil bo'ladi. Ba'zan boshqa kartoshka viruslari bilan uchraganda o'simlikda pakanalik alomatlari kuzatiladi.

3. Butgulli o'simliklarda (sholg'om, rediska, turp, karam) sholg'om mozaikasi virusi, rediska mozaikasi virusi, gulkaram mozaikasi viruslari uchraydi. Kasal o'simliklarda aniq mozaika hamda bargning bujmayishi va rivojlanishdan to'xtashi kuzatiladi.

4. Dukakkli o'simliklarda olti xil virus kasalligi uchraydi. Ulardan no'xat mozaikasi virusi bilan kasallangan no'xatda barg tomirlarining oqarishi va mozaika hosil bo'ladi. No'xatda yana boshqa simptomga ega kasallik—no'xatning yuqori yaruslarini sarg'ayishi kasalligi uchraydi, yuqori yarus barglarida kuchli xloroz (barg rangini yo'qotishi) kuzatiladi, barg mo'rt bo'lib qoladi.

Mosh o'simligida esa mosh mozaikasi virusi uchraydi, barg tomirlari oqaradi va barg pastki tomonga qarab buraladi, shishlar hosil bo'ladi, barg plastinkasi shakli o'zgaradi, o'simlik o'sishdan qoladi, urug' maydalashib ketadi. Bu virus loviya o'simligini ham kasallantiradi.

Moshda bundan tashqari yana moshning sariq mozaikasi virusi ham uchraydi. Kasallangan o'simlik bargida dog'lar jadallik bilan ko'payadi, o'simlik o'sishdan qoladi. Bu kasallik loviya, soya va boshqa dukkakli o'simliklarda ham uchraydi.

5. Qovun va bodring o'simliklarida bodring mozaikasi virusi uchraydi. Ikkala o'simlikda ham mozaika simptomlari kuzatiladi. Bu virus qovoqsimonlar, murakkabgulli o'simliklar va dukkaklilarda uchraydi.

6. Beda o'simligida beda mozaikasi virusi uchraydi, kasallangan o'simlik bargida doira shaklidagi dog'lar hamda mozaikali barglarning jingalaklanishi kuzatiladi.

7. Jo'xorini jo'xori pakana mozaikasi virusi kasallantiradi. Barglarida chiziq - chiziq shaklli sariq mozaika kuzatiladi, o'simlik o'sishdan qoladi, jo'xori so'talarida donning miqdori o'ta kamayib, 20-30 % gina qoladi. Ayniqsa, o'simlik virus bilan juda erta kasallantirilsa virusning zarari juda katta bo'ladi, jo'xori doni maydalashadi, olingan urug'ning unishi o'ta pasayadi.

Yuqorida ko'rsatilgan kasallik alomatlarini e'tiborga olgan holda mashg'ulotda beriladigan tabiiy va gerbariy materiallarini guruhlariga ajratish, ular haqida chuqur bilimga ega bo'lish zarur.

Ishning borish tartibi

1. Mashg'ulot olib boriladigan joy tanlab olinadi. Laboratoriya, dala sharoitida (bahor, yoz va kuz fasllarida) va issiqxonalarda o'tkaziladi.

2. Kasallik simptomlari sog'lom o'simlik bilan taqqoslanadi va ish daftariga chiziladi hamda ulardan gerbariyalar tayyorlanadi.

3. Kuzatuv natijasiga ko'ra aniqlangan kasallik alomatlari simptomal analiz qilinadi va tavsiflanadi.

4. Dala sharoitida bo'lsa, umumiy ekin maydonida sog'lom va kasallangan o'simliklar alomatlariga ko'ra aniqlanib ajratib olinadi.

5. Internet va boshqa manbalar asosida aniqlangan kasallik alomatlarining qaysi virusga xos ekanligi haqidagi tahlil o'tkaziladi.

Kuzatuv olib borilganda asosiy e'tibor o'simlikning tashqi ko'rinishiga, barglariga, bo'g'im oraliqlariga, barg tomirlariga, rangiga, umumiy rivojiga beriladi.

Nazorat savollari

1. Fitopatogen viruslar o'simliklarda qanday alomatlarni keltirib chiqaradi?

2. Fitopatogen viruslar bilan kasallangan o'simliklarda hosil bo'lgan simptomlarni kuzatish qanday sharoitlarda olib boriladi?

3. Kuzatuv olib borilganda asosiy e'tibor nimaga qaratiladi?

4. Virus kasalliklari o'simlikning qaysi qismida yaqqol ko'rinadi?

5. O'simliklarda virus kasalliklarini o'rganish jarayonida nima uchun dastlab o'simlikning o'sish nuqtasi kuzatiladi?

6. O'simliklarda kuzatiladigan simptomlarning asosiy belgilari nimalardan iborat?

7. Virus alomatlarining qaysi virusga xos ekanligi qanday aniqlanadi?

8. Sistemali mozaika va nekroz alomatlarining qanday farqi borligini izohlang?

3-laboratoriya mashg'uloti

Atlaslar va jadvallarga asoslangan holda hayvon va odamlarning virusli kasalliklari alomatlarini o'rganish

Darsning maqsadi: atlas, rasmlar va jadvallarga asoslangan holda hayvonlar va odamlarning virusli kasalliklari alomatlarini o'rganish.

Kerakli jihozlar: odam va hayvon virusli kasalliklari tushirilgan rasmlar, virusli kasalliklar atlas, virus kasalliklari alomatlarini tasvirlangan jadvallar.

Nazariy tushuncha. Hozirgi kunda 1000 ortiq viruslar kashf qilingan bo'lib, ular keltirib chiqaradigan kasalliklar yil sayin ko'payib bormoqda.

Ularning ellik foizi odamlar uchun patogen hisoblanadi. Viruslar klassifikatsiya bo'yicha 20 ta oilaga birlashtirilgan bo'lib, ulardan 13 ta oila RNK va 7 ta oila DNK saqlovchi viruslar hisoblanadi.

Odamlarda uchrovchi umumiy yuqumli kasalliklarning 85-90% ini viruslar keltirib chiqaradi. Barcha viruslar keltirib chiqaradigan kasalliklar oltita guruhga bo'linadi.

1. O'RV (o'tkir respirator virusli infeksiyalar) - bu kasalliklarni 130 dan ortiq viruslar keltirib chiqaradi, bulardan eng ko'p - gripp, paragripp, adeno, rino, RS, reoviruslari tarqalgan.

2. Neyrotrop viruslar - bularga qutirish, poliomielit, EXO va koksaki viruslari va arbovirus, togovirus, bunyanvirus, arenavirus vakillari kiradi.

3. Ichak yuqumli virusli kasalliklari qo'zg'atuvchilari - bularga RNK va DNK saqlovchi viruslar (poliomielit, EXO, koksaki, gepatit A, E, kam hollarda pikornoviruslar bolalarda entritlarni keltirib chiqaradi) kiradi.

4. Dermotrop viruslar - bularga gerpes, ospa (chechak), suv chechak viruslari kiradi.

5. Gepatotrop viruslar - gepatit viruslari (A, B, C, D, E, F va bosh.) kiradi.

6. Immunotrop viruslar - bularga retroviruslar (OITV 1, 2 tiplari va bosh.) kiradi.

Viruslar keltirib chiqaruvchi kasalliklarning laboratoriya diagnostikasida virusologik, serologik va biologik usullari qo'llaniladi. Bularning ichida virusologik usul eng asosiy hisoblanadi, lekin, viruslarni ajratib olish juda katta mehnat talab qiladi, chunki tekshirilayotgan materiallar maxsus laboratoriyalarda hujayra kulturalari va tovuq embrionlariga yuqtirilib ajratib olinadi.

Viruslarning hujayra kulturalariga har xil sezuvchanlik xususiyatlarini hisobga olib, bir vaqtning o'zida bir qancha hujayra kulturalariga viruslar yuqtiriladi. Ayrim viruslar laboratoriya hayvonlariga tekshiruvchi materialni yuqtirish yo'li bilan aniqlanadi.

Laboratoriya sharoitida ajratib olingan viruslarni identifikatsiya qilishda ularning hujayralarga ko'rsatgan sitopatik ta'siri va quyidagi serologik reaksiyalar yordamida (virobakterial agglutinatsiya, presipitatsiya reaksiyasi va bosh.) olib boriladi. Tekshirilayotgan viruslarni antigen tuzilishiga qarab u yoki bu reaksiyalar qo'llaniladi. Viruslarni ajratish va identifikatsiya qilish 7-10 kundan 30 kungacha va undan ortiq vaqt talab qiladi. Ko'pchilik viruslarni hujayra kulturalariga moslashishi uchun 2-3 marotaba passaj qilinadi. Shu sababli tekshirishni tezlashtirish uchun ayrim vaqtlarda tekshiriluvchi materialdan virusni tez topish va taxminiy diagnozni qo'yish uchun immunoflyuorescent usuli eng qulay hisoblanadi.

Virus yuqumli kasalliklarida serodagnostikasi ko'pchilik hollarda retro spetsifik zardoblar muhim ahamiyatga ega bo'lib, asosiy diagnozni tasdiqlash uchun xizmat qiladi. Diagnostik maqsadda qo'llanilganda albatta juft qon zardobdan foydalaniladi. Kasallikning turli davrlarida AT larning titrini oshib borishi mazkur diagnozni tasdiqlash imkonini beradi.

Oxirgi yillarda viruslar keltirib chiqaruvchi yuqumli kasalliklarning diagnostikasiga o'ta sezgir zamonaviy usullar (IFA, DNK-gibridizatsiya, PZR, immunoblotting va bosh.) kirib keldi, bu usullar yordamida viruslar keltirib chiqaruvchi yuqumli kasalliklarga o'ta tez diagnoz qo'yish imkoniyatlarini bermoqda.

Virusologik va serologik tekshirishlar ahamiyati shundan iboratki, faqat shu yo'l bilan olingan natijalarga ko'ra virus yuqumli kasalliklarining tarqalishini epidemiologik tahlil qilib, kasallik manbai va yuqish yo'llari aniqlanib, ularga qarshi profilaktik ishlar ishlab chiqiladi.

O'tkir resperator virusli infeksiyalar qo'zg'atuvchilari

Resperator - yuqori nafas yo'llarining virusli yuqumli kasalliklari qo'zg'atuvchilari tarkibida RNK - va DNK - bo'lgan turli viruslar oilasi kiradi (1-jadval).

Ular organizmga faqat yuqori nafas yo'llarining shilliq qavati orqali kirish xususiyatlari va laboratoriya diagnostika prinsiplarining umumiyliigi tufayli bir gruppaga kiritilgan.

Jadvalda yuqori nafas yo'llarini shikastlaydigan viruslar keltirilgan. Ulardan ayrimlari kishi organizmining boshqa to'qima va organlarini ham shikastlashi mumkin. Qator viruslar, masalan, tepki faqat so'lak bezlarini, o'g'il bolalarda moyak to'qimalarini va boshqa organlarni, qizilcha virusi esa limfa tugunlari sistemasini, homilador ayollarda homilani, herpes viruslari teri va jinsiy organlarni ham shikastlaydi (1-jadval).

Yuqori nafas yo'llarining virusli, virus+bakteriya, virus+mikoplazma bilan birgalikda aralash infeksiyalari juda xarakterliki, bularni laboratoriya diagnostikasida ushbu xususiyatini hisobga olish zarur.

1-jadval

Virusli o'tkir resperator yuqumli kasalliklarning qo'zg'atuvchilari		
Viruslar nomi		Qo'zg'atadigan kasalliklari
DNK- viruslar	Adenoviruslar oilasi (Adenoviridae)	Rinit, larengit, traxeobronxitlar, O'RK, zotiljam, o'rta quloqning yallig'lanishi, o'tkir kon'yuktivit
	Herpesviridae oilasi	Yosh bolalarda o'tkir gingivostomatit, gerpetik ekzema keratokonyuktivit,

I-tip uchuq virusi	gerpetik isitma
II-tip uchuq virusi	Chaqaloqlar uchug'i (qon orqali tarqalgan va jinsiy organlar uchug virusi)
Suv chechak va o'rab oluvchi temiratki virusi	Bolalarda suv chechak, kattalarda o'rab oluvchi temiratki
Orthomyxoviridae oilasi	Gripp (epidemiya, pandimiyalar, sporadik xollari)
Gripp A viruslari	Gripp (sporadik xollari, epidemiyalar)
Gripp B va C viruslari	
Paramyxoviridae oilasi	O'tkir resperator kasalliklar (O'RK)
Paragripp viruslari, Nyukastl, respirator sinsital virus (RSV)	Tepki
Tepki virusi	Qizamiq
Qizamiq virusi	
Coronaviridae oilasi	O'tkir resperator kasalliklar (O'RK)
Korona viruslar	
Picornaviridae oilasi	Rinitlar, bronxitlar, o'tkir resperator kasalliklar (O'RK)
Rinoviruslar	Gerpangin va O'tkir resperator kasalliklar (O'RK)
A ₁₀ , A ₂₁ , A ₂₄ , A ₂ , A ₄ , A ₅ Koksaki viruslari va boshqalar	
ESNO ₂₀ virusi va boshqalar	
Reoviridae oilasi	O'tkir resperator kasalliklar (O'RK), zotiljam, bronxitlar
Rioviruslar	

Shuning uchun burun-halqumdan olingan surtma va chayindilar, o'pka shikastlanganda esa balg'am va bronxlar chayindisi tekshiriluvchi material bo'lib hisoblanadi.

Uchuq va suvchechak kasalligida viruslar og'iz bo'shlig'ining shilliq qavati, teri hamda jinsiy organlardagi toshmalarda bo'ladi. Virusemiya, yuqorida yozilgan viruslar qo'zg'atgan yuqumli kasalliklarning eng og'ir formalarida, shuningdek qizamiq, tepki, qizilcha, suvchechak kabi bolalar yuqumli kasalliklarida kuzatiladi.

O'tkir resperator kasalliklari laboratoriya diagnostikasida tezkor usullar: immunoflyuoressensiya va rinositoskopiya (DNK-gibridizatsiya,

PZR ham qo'llanilmoqda) nihoyatda keng qo'llaniladi va 2-3 soat davomida taxminiy diagnoz qo'yish imkonini beradi.

Gripp va O'RKlarda serologik diagnostika retrospektiv xarakterga ega bo'ladi, chunki antitanalar rekonvalissent davrida (kasallik tuzalgandan 2-3 hafta keyin) ko'payadi. Serodiagnostika uchun GART, KBR, IFA, immunobloting va virusli neytrallash reaksiyalaridan foydalaniladi.

Gepatit viruslari va ularning laboratoriya diagnostikasi

Ishning borish tartibi:

- odam va hayvon virusli kasalliklari alomatlari atlas va rasmlar yordamida o'rganiladi hamda ish daftariga rasmi chiziladi;
- virusli kasalliklardan birining (korona, gepatiti va bosh.) yuqish yo'llari va tarqalish sxemasi ishlab chiqiladi hamda ish daftariga chizib tavsiflanadi;
- virusli kasalliklarning tabiiy o'choqlari hamda ularning tiplari ilmiy manbalar yordamida o'rganiladi;
- viruslar diagnostikasining tezkor (ekspres) usullari o'rganiladi;
- gepatit virusli kasalligi va uning diagnostikasi usullari o'rganiladi;
- odam va hayvon viruslarini o'rganishning ahamiyati izohlanadi;
- odam va hayvon virusli kasalliklaridan eng xavflilari guruhlanib, ularning xavflilik darajasi aniqlashtiriladi;
- odam va hayvon virusli kasalliklari haqidagi qisqa metrajli hujjatli film namoyish etiladi va film haqidagi fikrlar ish daftariga yoziladi.

Topshiriqlar

1. Gepatit B bilan kasallangan bemor qon zardobidagi HBs-Ag, unga qarshi antitelalar shimdirilgan eritrotsitar diagnostikum bilan BGAR qo'yish va natijalash.
2. Gepatit viruslarining serodiagnostika natijalari bo'yicha xulosa qiling.

Gepatotrop viruslar

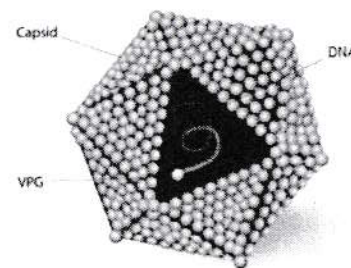
Virusli yuqumli gepatitlar - polietilogik antropoz jigar virusli shikastlanishi bilan boruvchi va turli yo'llar bilan yuquvchi infeksiyon kasalliklar hisoblanadi. Gepatit kasalliklarida viruslar jigar to'qimalarini diffuzli yallig'lanishini keltirib chiqaradi, buning natijasida organizmda astenovegetativ kamchiliklar hamda umumiy zaharlanish alomatlari ro'y berib, kasallikning klinik sindromlarini keltirib chiqaradi.

Gepatit kasalligini keltirib chiqaruvchi viruslar tarkibiga RNK va DNK bo'lgan turli oila virus vakillari kiradi. Ular organizmga turli yo'llar

bilan yuqishi mumkin, lekin hammasi jigar hujayralarini spetsifik jarohatlashi va gepatit keltirib chiqarganligi sababli gepatit viruslari guruhlariga kiritilgan.

Hozirgi kunda 8 ta tip viruslar gepatit kasalligini odamlarda keltirib chiqaradi. Bular lotin alfavitining bosh harflari bilan (A, B, C, D, E, F, G, TTV) nomlanadi. Gepatit F virusini borligini ko'pchilik mualliflar inkor qilishadi, TTV (ing. Transfusion transmitted virus- transfuziya yo'li bilan yuquvchi virus) 1997 - yilda kashf qilingan va hozirgi kungacha u haqida to'liq ma'lumot berilmagan.

Ijtimoiy xususiyati va iqtisodiy jihatdan keltirayotgan zarari bo'yicha virusli gepatit kasalliklar sog'liqni saqlash tizimida eng dolzarb kasalliklar guruhiga kiritilgan. Yer yuzida har yili gepatit A bilan bir mln kishi kasallanadi, gepatit B virusini tashib yuruvchilar esa bir mlrdan oshib ketgan. Virusning umumiy ko'rinishi rasmda keltirilgan (1 - rasm).



1-rasm. Gepatit B virusining umumiy tuzilishi

Hozirgi kunda gepatit viruslarining beshta tipi yaxshi o'rganilgan. Epidemiologik jihatdan o'ziga xos xususiyatlari hisobga olinib, gepatit viruslari ikkita guruhga bo'lingan:

a) Parental yo'l bilan yuquvchi (B, C, D, F, G, TTV) gepatit viruslari.

Viruslar asosan transfuzion (qon quyish), ineksiya, perinatal va jinsiy yo'l bilan yuqishi kuzatiladi. Nisbatan har qanday holatda virus bilan zararlangan qon bilan kontaktda bo'lish kasallikni keltirib chiqarishi mumkin.

Yuqorida keltirilgan viruslar keltirib chiqargan gepatit jarayonlari, kasalliklarni surinkali formada kechishi va virus tashib yuruvchilarni shakllanishi bilan xarakterlanadi.

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY TALIM,
FAN VA INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI
CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI
AXBOROT RESURS MARKAZI

b) Enteral (og'iz orqali) yo'l bilan yuquvchi (A, E va F) gepatit viruslari. Qo'zg'atuvchilar odamlarga oziq - ovqatlar, suv va kontakt yo'li bilan yuqadi. Bu kasalliklarga xarakterli xususiyat ularni mavsumiy (kuz, qish) ko'p uchrashi va asosan bolalar, o'spirinlarni kasallanishidir.

Yuqorida keltirilgan gepatit viruslari keltirib chiqargan bu kasalliklar doimo o'tkir formada o'tishi va surinkali formaga o'tmasligi bilan ajralib turadi (2-jadval).

Gepatit kasalligini keltirib chiqaruvchi (A, E, C, D, F, G, TTV) viruslar tarkibida RNK tutadi. Faqat gepatit B virusi DNK tutuvchi viruslarga kiradi (2-jadval).

2-jadval

Gepatit viruslarining qiyosiy xarakteristikasi

Xususiyatlari	A (HBFA)	B (HBB)	C (HBC)	D (HBD)	E (HBE)
Toksonomik o'rni	Picornoviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Togaviridae	Caliciviridae
NK-tipi	+RNK	DNK	+RNK	RNK	+RNK
Kasallik manbasi	Odam	Odam	Odam	Odam	Odam
Yuqish yo'llari	Alementar	Parentral	Parentral	Parentral	Alementar
Kasallikni surinkali formaga o'tishi	O'tmaydi	O'tadi	O'tadi	O'tadi	O'tmaydi
Tashhisi:					
Ekspress	+	+	+	+	+
Virusologik	-	-	-	-	-
Serologik	+	+	+	+	+

Gepatit A virusi. Hozirgi kunda gepatit A virusi Hepatovirus avlodi va Picornoviridae oilasiga kiritilgan (eski nomlanishi entiroviruslarni 72 tipi). Virus tarkibida segmentlanmagan + RNK (infeksion) tutadi, RNK oqsil qobiq bilan o'ralgan, bularda superkapsid uchramaydi, yalong'och viruslar guruhiga kiradi. O'lchami o'ta kichik 25-27 nm. Nukleokapsidi kubik simmetriya shaklida. Virusni faqat bitta antigeni HA-Ag tafovut qilinadi. Virus hujayra kulturalarida ko'paymaydi, ularni faqat leykotsitar va organ kulturalarida ko'paytirish mumkin.

Laboratoriya hayvonlari ham gepatit A virusiga beriluvchan emas. Lekin, primatlarda ko'paytirish mumkin, diagnostikada qo'llanilmaydi.

Bemor organizmida gepatit virusini HA-Ag qarshi AT (IgM va IgG) sintez bo'ladi.

Gepatit B virusi. Hozirgi kunda gepatit B virusi Orthohepadnavirus avlodiga va Hepadnaviridae oilasiga kiritilgan. Gepatit B virusi virioni sferik shaklda bo'lib o'lchami 42 nmga teng, superkapsidi mavjud. Virus genomi ikki ipli DNK bo'lib, halqasimon ko'rinishda. DNKning musbat ipli defektlil bo'lib, to'liq emas. Virus tarkibida virus replikatsiyasi uchun zarur bo'lgan DNK polimeraza mavjud.

Bemor qon zardobida virusning uchta morfologik formasi uchrashi mumkin. Eng ko'p sferik shakldagi 22 nm o'lchamdagi, kamroq ipsimon shakldagi 50-230 nm va faqat 7% hollarda to'liq strukturali (kapsid va superkapsidli) Deyna bo'lakchasi uchraydi. Deyna bo'lakchasi infeksiyon xususiyatga ega, qolgan ikkita formalari infeksiyon xususiyatga ega emas, chunki ularning tarkibi faqat superkapsiddan tarkib topgan.

Virus tarkibida virusning 4 ta (HBc-Ag, Hbe-Ag, HBs-Ag, HBx-Ag) antigenlari uchraydi.

HBc-Ag. Gepatit B virusini nukleokapsid antigeni Deyna bo'lakchasida uchraydi, alohida qonga ajralib chiqmaydi. Virus bilan zararlangan gepatit hujayralarida topilishi mumkin.

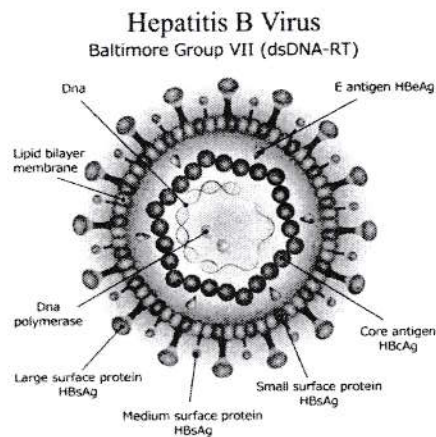
HBe-Ag. Deyna bo'lakchasi tarkibiga kirmaydi, lekin u bilan bog'langan bo'ladi. Bemor qonida kasallikning inkubatsion davrida paydo bo'ladi. HBe-Agning vazifasi noma'lum bo'lsada, eng sezgir diagnostik ko'rsatkich hisoblanadi.

HBs-Ag. Gepatit B virusining asosiy Agi hisoblanadi. Superkapsid tarkibida uchraydi. Qonda ko'proq uning defektlil 1 va 2 morfologik tiplari uchraydi. Ularning hosil bo'lishi virus metabolitik sikli replikatsiyasining asorati hisoblanadi. HBs-Ag virus yuqqanidan boshlab bir yarim oydan keyin qonda paydo bo'ladi va infeksiya yuqqan kishilar qonida doimo uchraydi. HBs-Ag kuchli immunogen xususiyatga ega bo'lib, unga qarshi hosil bo'lgan AT uzoq yillar organizmida topiladi. Shuning uchun HBs-Agning rekombinat mahsulotlaridan vaksina sifatida foydalanilmoqda.

HBx-Ag. Antigen yaxshi o'rganilgan emas, ba'zi fikrlarga qaraganda gepatotsit hujayralarini xavfli o'sma hujayralariga transformatsiya bo'lishiga olib kelishi mumkin. Gepatit B virionining tuzilishi quyidagi rasmda keltirilgan (2-rasm).

Gepatit D virusi. Delta virus bir ipli halqasimon RNK saqllovchi virus bo'lib, Togaviridae oilasiga va Deltavirus avlodiga kiradi. Delta virus faqat gepatit B bilan kasallangan bemorlardan ajratib olinadi. Delta virusni ko'payishi uchun albatta gepatit B virusi bo'lishi shart, agar

gepatit B virusi (hamkor) bo'lsa bu virus ko'paya olmaydi. Virioni sferik shaklda 35-37 nm. Virusning superkapsidida oz miqdorda gepatit B virusining HBs-Agi uchraydi. Kasallik manbasi odamlar, virus parentral yo'l bilan yuqadi, ko'proq qon quyish orqali.



2-rasm. Gepatit B virusi virionining umumiy tuzilishi

Gepatit C virusi. Virus hozirgi kunda Flaviviridae oilasiga kiritilgan. Tashqi tomondan ko'rinishi kichik sferik shaklda (35-50 nm), tashqi qobig'ida superkapsidi mavjud. Virus genomi bir ipli fragmentlanmagan (+) RNK hisoblanadi. Tarkibida sakkiztadan kam bo'lmagan genlar tutadi. Uchta geni struktura oqsillarini sintezida qatnashadi, qolgan genlar strukturaga taalluqli bo'lmagan oqsillarni sintezlaydi. Virus genomi o'ta variabil, o'zgaruvchan. Virusning oltita serovariantlari uchraydi, har bir serovarlari ma'lum mamlakatlarda registratsiya qilinadi. Masalan C1 tipi AQSH da uchrasa, C3 tipi Yaponiyada aniqlangan.

Gepatit C virusi tarkibida struktura oqsillari uchraydi, bulardan tashqi qobiq oqsili - E1, E2, E3 virus hayot faoliyatida o'ta muhim ahamiyatga ega. Ulardan E1 va E2 oqsillar birikib, tashqi oqsil kompleksini hosil qiladi hamda virusning sezgir hujayra bilan birikishi va unga kirishini ta'minlaydi.

Virus genomining eng ajoyib xususiyatlaridan biri uning tarkibida tez va ko'plab mutatsiyaga uchrovchi bo'lakchasining borligidir. Bular doimo virus genomida mutatsiyalar kelib chiqishiga olib keladi. Bu mutatsiyalar natijasida gen komponentlarini almashinuvi kuzatiladi va virus qobig'i oqsillarining doimo o'zgarib turishini ta'minlaydi. Ya'ni, tashqi qobiq

antigeni hisoblangan E1 hamda E2 antigenlar o'zgaradi, yangi virus variantlarini hosil bo'lishiga olib keladi.

Bemor organizmida virus antigenlariga qarshi AT hosil bo'ladi, lekin virus o'zining tashqi antigen determinantlarini doimo o'zgartirib turganligi sababli, hosil bo'lgan ATlar viruslarni neytralizatsiya qila olmaydi. Virus organizmning immun nazoratidan chetda qoladi. Ko'plab virusning yangi antigen variantlari hosil bo'lishi natijasida immun sistema hujayralari yuqori tezlikda ishlaydi va tezda faoliyatlari sustlashib qoladi, bu esa kasallikning surinkali uzoq davom (15-20 yil) etishiga va natijada ilgari sirrozi yoki o'smasiga olib kelishi mumkin. Kasallik 60-80 % surunkali formaga o'tishi mumkin. Ko'pchilik hollarda makrofaglarda ham virus topilishi mumkin. Virus yuqqandan boshlab uch oylardan keyin qonda spetsifik AT topiladi.

Gepatit E virusi. Jigarning o'tkir yallig'lanishini keltirib chiqaradi, toksikatsiya kuzatiladi, kam hollarda sariqlik namoyon bo'ladi. Virus Calicivirus avlodiga va Caliciviridae oilasiga mansub. Virioni sferik shaklda, diametri 27-38 nm. Virus genomi segmentlanmagan + RNK molekulasidan iborat. Kasallik manbasi tabiatda odamlar hisoblanadi. Epidemiologik jihatdan Gepatit A ga o'xshab ketadi. Kasallik "epidemik birlanish" tarzda kuzatiladi. Gepatit E surunkali formaga o'tmaydi, sog'ayib ketgandan so'ng turg'un immunitet qoladi. Virus yuqqandan boshlab 10-12 kundan keyin spetsifik AT hosil bo'ladi.

Gepatit G virusi. Virusning toksonomik o'rni haligacha to'liq aniqlangan emas. Hozirgi kunda shartli ravishda Flaviviridae oilasiga kiritilgan. Virioni sferik shaklda va tarkibida segmentlanmagan + RNK molekulasi tutadi. Antigen nabori bo'yicha 3 ta tipi uchraydi. Gepatit G virusi nuqsonli virus deb qaralmoqda, uning reproduksiyasi uchun gepatit C virusini bo'lishi zarur degan taxminlar qilinmoqda. Kasallik manbasi kasal odam va surinkali gepatit G virusi bilan og'rigan bemorlar, virus tashovchilar hisoblanadi. Virus yuqqandan so'ng 10-12 kundan keyin spetsifik AT (IgM) hosil bo'ladi.

Metodik ko'rsatmalar

Gepatit B bilan og'rigan kasallar qon zardobida virus yuqqandan keyin 3-5 haftadan so'ng virus HBs-Ag paydo bo'ladi va uni aniqlash mumkin. Bu antigeni qondan topilishi organizmida gepatit virusi borligini bildiradi.

HBs-Agni dinamikada yo'qolib ketishi bemorni sog'ayib ketishidan darak beradi yoki uzoq muddat topilib turishi kasallikni surinkali formaga

o'tganligini bildiradi. Kasallikning o'tkir davrida HBs-Ag qarshi AT deyarli aniqlanmaydi. Bemor tuzalish davrida HBs-Agga qarshi AT hosil bo'lib, uzoq vaqt saqlanib qoladi. Virusni HBs-Ag qonda topilmaydi, faqat jigar to'qimasidan olingan biologik materialdan topilishi mumkin. AT HBs-Agga qarshi kasallikning o'tkir davrida IgM, keyinchalik IgG ko'rinishida paydo bo'ladi, lekin uzoq saqlanmaydi. Virus HBe-Ag va uning ucha qarshi AT esa qondan topiladi, ularning qondan topilishi kasallikning o'tkir kechayotganligidan darak beradi.

Surinkali gepatit B bilan og'rigan bemorlar qon zardobidan HBe-Ag topilishi kasallikni yana avjlanganligini bildiradi. Gepatit B virusini yuqorida keltirilgan antigen va ularga qarshi hosil bo'lgan antitelalarini (sxema) aniqlash virus diagnostikasining asosini tashkil qiladi.

Hozirgi kunda gepatit B virusining antigen va antitelalarini aniqlashda pretsipitatsiya reaksiyasi asosida bir qator ekspress usullar ishlab chiqilgan.

Bilvosita gemagglutinatsiya reaksiyasi yordamida gepatit B virusini HBs-Agga bemor qon zardobidan aniqlash. Bu maqsadda standart (komersiya) diagnostikumlardan (HBs-Agga qarshi ATlar bilan eritrotsitlar shimdirilgan) foydalaniladi.

Maxsus polistirol plastinka chuqurchalarida bemor qon zardobi avtomatik mikropipetkalar yordamida diagnostik titrga mo'ljallab suyultiriladi. So'ngra har bir chuqirchaga bir hajmda antitela yuklatilgan eritrotsit suspenziyasi tomiziladi. Albatta parallel zardob va diagnostikum kontroli qo'yiladi. Plashkalar xona temperaturasida yoki 37° C da 2 soat termostatda saqlanadi va natija ko'riladi. Natijani ko'rishda plashkalar silkitilmaydi, chunki silkitish reaksiyaning natijasiga salbiy ta'sir ko'rsatadi.

Nazorat savollari

1. Gepatit viruslarining turlari va o'rganilish tarixi.
2. Gepatit viruslarining tashqi va ichki tuzilishini ayting.
3. Gepatit A viruslari haqida tushuncha bering.
4. Gepatit B viruslari haqida tushuncha bering.
5. Gepatit C viruslari haqida tushuncha bering.
6. Gepatit D virusi haqida ma'lumot bering.
7. Gepatit E viruslari haqida ma'lumot bering.
8. Gepatit G viruslari haqida ma'lumot bering.

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «AQLIY HUJUM» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi fikrlash, hozirjavoblik, axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarida, mustahkamlashda, o'qitilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

Topshiriqlar

1. Gepatit virusining qanday turlari mavjud va u nimada patogenlik qiladi?
2. Gepatit viruslarini aniqlashning eng sezgir usuli qaysi usul hisoblanadi?
3. Gepatit viruslarining ichidan eng xavfli shtammi qaysi hisoblanadi?
4. Gepatit A virusining yuqish yo'llarini izohlab bering?
5. B gepatitning yuqish yo'llari qanday hisoblanadi?

4-laboratoriya mashg'uloti Virusli namunalarni yig'ish va tahlil qilish

Darsning maqsadi: o'simlik virusi bilan kasallangan virusli namunalarni aniqlash va yig'ish metodikasi bilan tanishish.

Kerakli jihozlar: polietilen qopchalar, qaychi, chizg'ich, chinni hovoncha, abraziv, yozish uchun moy qalam, lupa, termos muzlatgich, toza mato, virusli kasalliklar atlasi va boshqalar.

Nazariy tushuncha. Fitopatogen viruslar o'simliklarda turli-tuman kasalliklarni keltirib chiqaradi. Buni aniqlash uchun albatta talabadan diqqat-e'tiborli bo'lish talab etiladi. Shuning uchun virusli kasalliklarni aniqlash uchun ko'p hollarda ekin maydonlarida monitoring ishlari olib boriladi.

Monitoring vaqtida ekin maydonidagi o'simliklar diqqat bilan kuzatib boriladi hamda sog'lom o'simlikdan farqlanuvchi alomatlar ajratib olinadi va ushbu o'simlikdan dastlabki material sifatida namunalar yig'ib olinadi. Namunalarning har biri alohida polietilen qopchalarga solinadi va bu qopchalarning ustiga namuna olingan hudud, sana, o'simlik nomi, navi

(agar madaniy bo'lsa) yoziladi hamda namuna termos muzlatgichga solinadi.

Ishning borish taribi

- virusologik kuzatuv va monitoring o'tkaziladigan hudud dastlab tanlab olinadi;

- ekin maydoni yoki tabiiy hudud bo'lsa, undagi o'simliklar fan o'qituvchisi bilan birgalikda kuzatuvdan o'tkaziladi;

- monitoring vaqtida sog'lom o'simlikdan farqlanuvchi har qanday belgi nazoratdan chetda qoldirmasdan ajratib olinadi hamda olingan namuna sog'lom o'simlikka taqqoslanadi;

- kasallik alomati mavjud bo'lgan o'simlikdan 5-10 g olinib, polietilen qopchaga solinadi hamda uning ustiga namuna olingan sana, o'simlik nomi yoki navi moy qalam yordamida yoziladi va yig'ilgan namunalar termos muzlatgichda saqlanadi;

- laboratoriya sharoitida bu namunalar o'qituvchi bilan birgalikda tavsiflanadi hamda ish daftariga chizib olinadi;

- bajarilgan ish yuzasidan daftarga xulosa yoziladi.

Nazorat savollari

1. Virusli namuna yig'ish bosqichlarini izohlab bering!
2. Nima uchun virusli namuna yig'iliadi?
3. Virusli namuna nimalarda yig'lsa maqsadga muvofiqligini izohlab bering?
4. Namunani virusga xos ekanligi qanday aniqlanadi?
5. O'simliklarda uchraydigan virusli, bakterial, zamburug'li hamda noinfektsion kasalliklarning farqlarini misollar yordamida izohlab bering!
6. Virusli namunani qanday saqlasa tog'ri bo'ladi?
7. Namunalarni uzoq muddat saqlash uchun nima qilish kerak?
8. Virusli namunani tavsiflashda nimalarga e'tibor berish zarur deb o'ylaysiz?

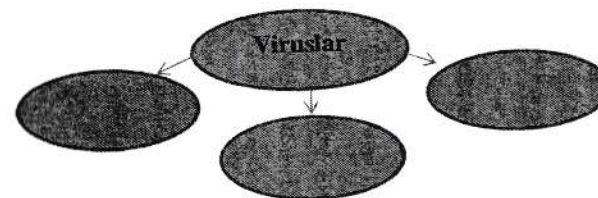
Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar:

« KLASSTER » metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«KLASTER»



Topshiriqlar

1. Viruslar morfologiyasi bo'yicha klaster tuzing.
2. Oddiy viruslar turlari bo'yicha klaster tuzing va izohlab bering.
3. Bakteriya viruslari bo'yicha klaster tuzing.

5-laboratoriya mashg'uloti

Viruslarning tarqalish darajasi va zararini aniqlash

Darsning maqsadi: talabalarda viruslarning tarqalish darajasini va zararini aniqlash bo'yicha ko'nikma hosil qilish.

Nazariy tushuncha. Dala sharoitida, issiqxonalarda virus bilan kasallangan o'simliklarni, ba'zan virus virulentligini, o'simlik navining virusga chidamliligini aniqlashda sun'iy kasallantirilgan o'simliklarning kasallanish darajasini aniqlash zarur bo'ladi. Kasallanish darajasi quyidagi formula bilan Yu. Vlasov metodi yordamida hisoblanadi.

$$P = \frac{n \times 100}{N}$$

P-kasallanish darajasi;

n-kasal o'simliklar soni;

N-sog'lom o'simliklarning umumiy soni.

1-ish. Fitopatogen viruslarning tarqalish darajasini aniqlash Ishning borish tartibi

1. Viruslarning tarqalish darajasi o'rganilayotgan ekin maydoni diogonaliga bir - biri bilan markazda kesishadigan 20 ta 1 m² (1 ga uchun) nuqta tekshiriladi va jadvalga tushiriladi (3-jadval).

3-jadval

Fitopatogen viruslarning tarqalish darajasini aniqlash

Monitoring o'tkazilgan nuqtalar tartib raqami	Umumiy o'simlik soni (1m ²)	Kasallangan o'simliklar soni	Kasallanish darajasi, (%) hisobida
1			
2			
.....			
n			
Umumiy			

2. Jadvalga tushirilgan ma'lumotlar yuqoridagi formula orqali hisoblanadi hamda o'simliklarning kasallanish darajasi aniqlanadi. Bu tajriba kamida uch marotaba o'tkazilishi talab etiladi, undan so'ng bu natijalar qo'shilib o'rtacha qiymat topiladi va bu virusning **tarqalish darajasi** deb ataladi.

2. Ushbu ish bo'yicha bitta misol ko'rsatib o'tamiz. Masalan, umumiy o'rganilgan o'simliklar soni (N) 250 ta, ular ichidagi kasal o'simliklar soni esa (n) 50 tani tashkil etsa, quyidagi formula orqali hisoblab chiqiladi:

$$P = \frac{50 \times 100}{250} = 20\%$$

Agar formuladagi sonlar hisoblab chiqilsa 20% ni tashkil etadi.

Demak, tajriba uchastkasidagi o'simliklarning kasallanish darajasi 20% ni tashkil etadi.

2-ish. Fitopatogen viruslarning zararini aniqlash

Viruslarning zararini aniqlash, ya'ni virus ta'sirida hosildorlikning pasayishini aniqlash fitovirusologiyada quyidagi formula bilan aniqlanadi:

$$B = \frac{(A-a) \times 100}{A}$$

B - virusning zarari yoki yo'qotilgan hosil, % hisobida;

A - sog' o'simliklardan olingan hosil;

a - kasal o'simliklardan olingan hosil.

Materiallar: TMV bilan kasallangan pomidor ekilgan mikro uchastka, texnik tarozi.

Ishning borish tartibi:

- tajriba uchastkasidagi sog'lom o'simliklardan olingan hosil hisoblab chiqiladi (masalan, 180 kg) va formuladagi A ning o'rniga qo'yiladi;

- so'ngra shu uchastkadagi kasal o'simliklardan yig'ilgan hosil hisoblanib, uning qiymati (masalan, 120 kg) kichik a o'rniga qo'yiladi va B ning qiymati aniqlanadi. Quyida hisoblash keltirilgan:

$$B = \frac{(180-120) \times 100}{180} = \frac{60 \times 100}{180} = 33.3\%$$

Demak, mazkur uchastkadagi pomidor hosildorligiga yetgan zarar 33,3 % ni tashkil qiladi;

- har ikkala ish bo'yicha ham xulosa qilinib, ish daftariga tushiriladi.

Nazorat savollari

1. Viruslarni dala sharoitida monitoring qilish qanday amalga oshiriladi?
2. Fitopatogen viruslarni tarqalish darajasi qanday aniqlanadi?
3. Yu. Vlasov metodini izohlab bering!
4. O'simlik viruslarini keltiradigan zarari qanday aniqlanadi?
5. Virusli kasalliklar tarqalgan tajriba maydonchasidagi virus donatlarini kuzating va olgan bilimlaringizni mustahkamlang.
6. Viruslarning tarqalish darajasi qaysi formula orqali aniqlanadi va formuladagi berilgan qiymatlarni izohlab bering!
7. Viruslarning iqtisodiy zarari qaysi formula orqali aniqlanadi va formuladagi berilgan qiymatlarni izohlab bering!
8. O'simliklarning kasallanish darajasi hamda virusli kasalliklarning tarqalish darajasi orasida qanday bog'liqlik va farqlar mavjud, fikringizni izohlab bering!

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «FSMU» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»	
F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltiring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Viruslarning tarqalish darajasini aniqlashning ahamiyati nimalardan iboratligini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering.
2. Fitopatogen viruslarning iqtisodiy zararini aniqlash qaysi formula asosida hisoblab topiladi?
3. Viruslar adaptatsiyasi natijasida qanday o'zgarish yuzaga kelishini izohlab bering.

6-laboratoriya mashg'uloti Viruslarning yuqish yo'llarini o'rganish

Darsning maqsadi: talabalarni viruslarni o'simliklarga turli xil usullar bilan yuqtirish yo'llari bilan tanishtirish.

Kerakli jihozlar: virusli namuna, korund yoki karborund, chinni hovoncha, indikator o'simliklar.

Nazariy tushuncha. 1. Viruslarni mexanik usulda yuqtirish va uni optimallashtirish. Mexanik usulda virus (yoki uni RNKsi) hujayraga barg kutikulasidagi jarohatlar (mikrotravmalar) orqali kiritiladi.

Barg kutikulasida mikrojarohatlar diatom suvo'tlari (selit), karborund (kremniy karbid) yoki korund (alyuminiy oksidi) kabi abrazivlarni mayda kukuni (400-700 mesh) yordamida hosil qilinadi (mesh 2,5 sm² (1 dyum) dagi poralar (teshiklar) soni). Abraziv ishlatilganda inokulyatsiya effekti 10-50 barobar oshadi.

Avtoklavda yoki quritish shkaflarida sterillangan korund, karborund, selit yoki diatom tuprog'i barg yuzasiga inokulyatsiyadan oldinroq changlatiladi, chunki ular suvga oson cho'kadi, ammo selit ularga qaraganda sekin cho'kmaga tushadi, shuning uchun uni inokulum bilan aralashtirib ishlatsa ham bo'ladi.

Abrazivni barg sathiga changlatish uchun probirka yoki 50 ml hajmli kubaga solib, og'zini 2 qavatli doka bilan yopib, so'ngra changlatishda foydalanish mumkin. Inokulum bilan abrazivni aralashtirganda uning miqdori 50-100 mg/ml bo'lishi kerak. Barg sathiga 1-2 tomchi virus suspenziyasidan tomiziladi va sterillangan shisha tayoqcha, paxta yoki doka tampon yoki yaxshilab yuvilgan va artilmay quritilgan barmoqlar yordamida ohistalik bilan surtiladi.

Surtishdagi kuch kattaligi bir qancha omillarga bog'liq bo'ladi: o'simlikning turi, yoshi, bargning holati, abrazivning sifati va boshqalar. Abraziv ishlatilgandan so'ng barg so'lib qolishga moyilroq bo'lgani uchun qirib qolishining oldini olish maqsadida bir necha soat nam atmosferada saqlash yaxshi natija beradi.

2. Viruslarni payvandlash yordamida yuqtirish

Payvandlash bog'dorchilikda qadimdan ishlatiladi. Bunda har xil o'simlik to'qimalarining (kesmalarini) ustki tomonlari bir-biriga yopishtirib qisib qo'yiladi, keyinchalik ular bir-biri bilan qo'shilib, o'sib ketadi. Odatda, bir o'simlikning distal qismi ikkinchi ildizli o'simlikka (payvandtagga) o'tkaziladi. Agar payvandustda yoki payvandtagda virus bo'lsa, payvandlashdan so'ng virus ikkinchi juftiga o'tadi va unda ko'zga ko'rinadigan kasallik simptomlari hosil bo'ladi.

Birinchi marta payvandlash yordamida viruslarni yuqtirish XVII asrda Gollandiyalik bog'bonlar tomonidan qo'llanilgan. Ular lola gubajibarglarining atlasga o'xshash simptomlar hosil qilishini bilishdi va bir o'ta yuqori baholanadigan lola xususiyatini payvandlash bilan sog'lom lola piyozlariga o'tkazishni amalga oshirib kelishdi.

Asosan, payvandlash bilan daraxt o'simliklarga (olma, nok, olxo'ri, olcha va sitrus o'simliklari) viruslar yuqtiriladi. Payvandlash yaxshi natija berishi uchun payvandtag va payvandustning kambiy to'qimalari bir-

biriga to'g'ri kelishi va ularning moyilligi bo'lishi kerak. Moyillik esa turlar bir-biridan uzoq bo'lsa hamda bir pallalik o'simliklarda o'ta sust bo'ladi.

Payvandlashdan so'ng o'simlikning yaxlit bo'lib o'sishiga ba'zan ularning biridagi virus ham ta'sir qiladi.

Sitrus o'simliklarini payvandlash jarayonida ancha murakkab hodisa kuzatiladi. Iqtisodiy ahamiyati katta bo'lgan nav payvandlangandan so'ng o'zini virusga chidamlilik xususiyatidan ayriladi.

Ba'zi hollarda virus yuqishi payvandlanish amalga oshmasa ham yuz beraveradi. Taksonomik jihatdan bir-biridan uzoq bo'lgan o'simliklardan *Chenopodium amaranticolor* va tok o'simliklari ham bir-biri bilan yaqinlashtirilganda, ularning kesilgan qismlari ustida kalluslar o'sganda ham virus yuqadi. Ba'zan payvandlash yaxshi amalga oshgani bilan virus yuqmasligi mumkin. Masalan, tamaki shaldirashi virusi kartoshkani payvandlaganda (boshqa viruslarga qaraganda) o'ta sust yuqadi, balki bu virusni o'simlik tanasi bo'ylab to'la tarqalmasligidan bo'lishi ham mumkin.

Viruslarni payvandlash usuli bilan yuqtirishning ko'pgina usullari mavjud. Masalan, eng keng tarqalgan o'simlikdan qirqib olingan payvandtaga payvandustni o'tkazish va ikki o'simlikni yaqinlashtirish bilan amalga oshiriladi.

Birinchi usul payvandustdagi virusni payvandtaga yuqtirishda ishlatiladi. Bu usulning quyidagi turlari mavjud:

- o'tsimon o'simliklarni payvandlaganda payvandustning pastki qismi ponasimon qilib o'tkirlanadi;

- daraxtsimon o'simliklarni kurtak payvand qilish yo'li bilan (payvandust bo'lib kurtak xizmat qiladi);

- malinaga o'xshash o'simliklarning shoxlarini suvli idishga solib kartoshka, zemlyanika va boshqa o'simliklarni ham payvandlash orqali ularga virus yuqtirish mumkin. Yaqinlashtirib payvandlanganda ikkala juftlik ham ildiz qismini saqlab qoladi.

Ikkinchi usul - daraxtsimon o'simliklarni *ko'z payvandlash* usuli. Payvandust payvandtag po'sti tagiga joylashtiriladi. Ko'z payvandlashdan oldin payvandustdagi (kurtakdagi) birga kesib olingan yog'och qatlamini olib tashlasa ham bo'ladi.

Uchinchi usul - payvandlashning *butilka* usuli bo'lib, malinani payvandlashda ishlatiladi. Bunda payvandustning bargli shoxchasi suvli probirkaga solinadi. Probirkadagi suvo'tlari o'sib ketmasligi uchun probirka alyumin folgasi bilan o'rab qo'yilsa yaxshi bo'ladi.

To'rtinchi usul - payvandlashning *yorma* (uskuna) usuli kartoshka bo'lib o'tsimon o'simliklarni payvandlashda ishlatiladi.

Beshinchi usul - payvandlashning *kopulirovka* - *yaqinlashtirish* usuli bo'lib, sho'ra o'simligi virusini tok o'simligiga o'tkazishda ishlatiladi. Ikki o'simlikning kambiy qismi ochilguncha tozalanadi, so'ngra ikkala o'simlik kesilgan joylari bilan bir-biriga jipslashtiriladi va bog'lanadi.

Oldinchi usul - payvandlashning *tilsimon kopulirovka* usuli bo'lib, zemlyanika kabi o'simliklar viruslarini o'tkazishda ishlatiladi. O'simliklar maxsus lenta bilan bog'lanadi. Payvandlashni qaysi usuli qo'llanilishidan qat'iy nazar, ulanadigan o'simlik to'qimasini bir-biriga zich qilib yaqinlashtirish muhim bo'lib, ular to bir-biri bilan qo'shib o'sib ketguncha qoldiriladi.

Payvandust va payvantaglarni bir-biriga bog'lash uchun maxsus lentalar ishlatiladi. Payvandlangan qismning usti, ayniqsa, o'tsimon o'simliklarning ustki yuzasi doimo namlanib turishi katta ahamiyatga ega.

Virus konsentratsiyasi o'simlikda yuqori bo'lsa hamda o'simlikning butun tanasi bo'ylab bir tekisda tarqalmagan bo'lsa, ikki kundan keyin payvandlangan joyda virus ikkinchi o'simlikga o'tadi.

Virusning konsentratsiyasi o'simlikda kam va butun tana bo'ylab bir tekisda tarqalgan bo'lsa virus juftlik o'simlikka o'tishi uchun haftadan biroz qo'shimcha, daraxtsimon o'simliklarda esa bir necha oy bo'lishi mumkin. Kasallik simptomlari avval sog'lom o'simlik shoxlarining eng ustki qismlarida paydo bo'ladi. O'tsimon o'simliklarda esa simptomlar bir va bir necha haftada, daraxtlarda bir yildan so'ng yoki bir necha yildan so'ng paydo bo'ladi.

3. Viruslarni zarpechak yordamida yuqtirish

Zarpechak - *Cuscuta* spp. - ko'plab ingichka shoxlarga ega poyali parazit o'simlik bo'lib, xo'jayin o'simlik poyasini o'rab oladi va tegib turgan joylarida xo'jayin o'simlikni o'tkazuvchi to'qimalariga kirgan ildizsimon gaustoriyalar hosil qiladi. Zarpechak yordamida ikki o'simlikni yaqinlashtirishi mumkin.

1940-yilda Bennet birinchi marta ba'zi viruslarni zarpechak kanali orqali boshqa o'simlikka o'tishini aniqladi. Zarpechakning yigirmadan ortiq turi virus yuqtirishda ishlatiladi. Eng ko'p ishlatiladiganlari *Cuscuta campestris*. Bu tur o'ttiz to'qqizta tekshirilgan virusdan yigirma to'rttasini o'tkazgan, *C. subinclusa* esa yigirma uchtdan o'n ikkitasini o'tkazadi.

Odatda, zarpechak to'qimalarida ham ko'payadigan viruslar (bodring mozaikasi virusi) sog'lom o'simlikga yaxshi o'tadi, aksincha zarpechakda parvarishlanadigan bu kameraning ichida kondensatsiyalangan suv (kam hamollantirilsa) yig'ilishini oldini olish, hasharotlarni unda cho'kib qolishi hamda zamburug'lar rivojlanib mog'orlashiga yo'l qo'ymaslikdir.

A. Shira bitlarini ko'paytirish uchun ishlatiladigan selluloiddan tayyorlangan moslama. Uni bir necha joyida doka (to'r) bilan to'silgan hamollatishga xizmat qiladigan tirqishlar mavjud.

B. Sikadkarni saqlashda qo'llaniladigan kichik moslama.

V. Virus tashuvchi hasharotlar bilan ishlashda qo'llaniladigan shiralar. Ular tish muolajasida ishlatiladigan uchi qayrilgan asbob bo'lib, uning nematodalar bilan ishlash jarayonida foydalaniladi.

Odatda kanalarni o'tkazishda foydalaniladigan bir dona olmaxon mo'yi. Pastda esa xuddi shunga o'xshash, shiralar bilan ishlashda foydalaniladigan olmaxon mo'yi to'plami.

4. Hasharotlar yordamida o'simliklarga virus yuqtirish

Gibbs va Xarrison o'simliklarni virus bilan kasallantirishda foydalaniladigan hasharotlarni (o'simlik shira biti, kana va boshqalarni) doimo boqish va parvarishlash uchun zarur bo'ladigan sharoitlar qanday bo'lishi kerakligini quyidagicha tushuntiradi. Quyida shu usullarni batafsil ko'rsatishga harakat qilamiz.

Hasharotlar boqiladigan o'simliklar doimiy ravishda shamollatib turiladigan kameralarda saqlanishi kerak. Ishlatiladigan o'simlik esa shu virusga chidamli bo'lgan o'simlik (immun) bo'lishi kerak. Hasharotlarni doimo yaxshi holatda saqlash uchun ular faol o'sib turgan o'simlikda bo'lishi maqsadga muvofiq bo'ladi. Kameraning tuzilishini quyidagicha tasvirlash mumkin.

Diametri 10 smga teng keladigan gultuvak uchun moslanadigan kameraning tag qismi diametri 10-12 smli taglikdan iborat plastmassa yoki boshqa materialdan tuzilgan bo'ladi. Balandligi 5-7 sm keladigan berk elaksimondan idish bo'lib, uning ustki qismi 25-30 smli selluloid plyonka bilan aylantirib qoplanadi va hasharotlar o'lchamidan kichikroq bo'lgan to'r o'ralgan qopqoq bilan yopiladi (doka ishlatish ham mumkin).

To'r ishlatishdan asosiy maqsad, o'simlik o'stiriladigan va hasharot parvarishlanadigan bu kameraning ichida kondensatsiyalangan suv (kam hamollantirilsa) yig'ilishini oldini olish, hasharotlarni unda cho'kib qolishi hamda zamburug'lar rivojlanib mog'orlashiga yo'l qo'ymaslikdir.

A. Shira bitlarini ko'paytirish uchun ishlatiladigan selluloiddan tayyorlangan moslama. Uni bir necha joyida doka (to'r) bilan to'silgan hamollatishga xizmat qiladigan tirqishlar mavjud.

B. Sikadkarni saqlashda qo'llaniladigan kichik moslama.

V. Virus tashuvchi hasharotlar bilan ishlashda qo'llaniladigan shiralar. Ular tish muolajasida ishlatiladigan uchi qayrilgan asbob bo'lib, uning nematodalar bilan ishlash jarayonida foydalaniladi.

Odatda kanalarni o'tkazishda foydalaniladigan bir dona olmaxon mo'yi. Pastda esa xuddi shunga o'xshash, shiralar bilan ishlashda foydalaniladigan olmaxon mo'yi to'plami.

G. Sikadkalar bilan ishlashda ishlatiladigan aspirator. So'rib olish uchun ishlatiladigan naychani bir tomoni doka bilan berkitilgan bo'ladi.

Hasharotlarni bir o'simlikdan ikkinchi o'simlikga o'tkazish uchun qo'llaniladigan moslama quyidagicha tuzilishda bo'ladi: nematodalar bilan ishlash uchun qayrilgan metallardan yasalgan bandli moslama qo'llaniladi, kanalar bilan ishlash uchun esa birgina hayvon mo'yi ishlatilgan (ko'pincha olmaxon mo'yi) mo'yqalam ishlatiladi, chirildoqlar bilan ishlash va ularni yig'ish uchun aspiratorlar ishlatiladi.

Aspirator - bu katta probirkaga po'kak yordamida kiritilgan ikki naycha bo'lib, uning biri doka bilan yopilgan bo'lib og'izda tortish uchun zimat qilsa, ikkinchisi 20-25 smli oson bukiluvchan tiniq plastmassa naychadan iboratdir, odatda aspiratorning bu tomoni sikadkarni yig'ish uchun hisoblanadi.

Shiralar partenogenez yoki tirik tutib ko'paygani uchun ular juda tez ko'payadi va qanotli, qanotsiz shakllari paydo bo'ladi, shuning uchun ham ularni ko'paytirish ancha osondir.

Qo'ng'iz va chirildoqlarni ko'paytirish ancha qiyin ish bo'lib, ayrim hollarda malaka talab etadi. Nematodalarni ko'paytirganda esa tuproq o'ta quruq yoki sernam bo'lmasdan mo'tadil bo'lishi zarur. Zamburug'larni virus yuqtiruvchi qilib o'stirish uchun steril qumda saqlanadigan o'simlik idishlarida saqlash maqsadga muvofiq bo'ladi, chunki uning zoosporalarini kerak vaqtda oson yuvib olsa bo'ladi. Virus tarqatuvchi hasharotlar bilan ishlash ham mutaxassisdan malaka talab qiladi.

Masalan, shiralar bilan ishlashda ularni bir o'simlikdan boshqasiga o'tkazish uchun mo'yqalam sal ho'llanib, mo'yqalamdagi yagona mo'yordamida shiralarning qorin qismiga salgina urib-urib qo'yiladi, natijada shira o'z stiletini barg tubidan sug'irib oladi.

Keyin qil yordamida ko'tarib olinadi va yangi kasallantiriladigan barg ustiga ohista qo'yiladi. Ba'zi hollarda, ayniqsa shira biti oziqlanayotgan bargda virus katta miqdorda bo'lsa, bexosdan stilet sug'irib olinganda o'simlik shirasi mo'yqalam qiliga tegib so'ngra sog'lom o'simlikga o'tkaziladi. Ketmasligining oldini olish uchun mo'yqalam bilan ajratib olingan shira biti avval barg ustiga qo'yilgan kichik qog'oz parchasiga qo'yiladi, qog'ozdan esa shira biti sekin-asta o'zi bargga o'tadi. Chirildoqlar juda faol bo'lganligi uchun aspirator yordamida boshqa bargga o'tkaziladi.

Nematodalar bilan kasallantirish uchun esa nematodalar tuproq suspenziyasidan ajratib olinadi va ular bilan kasallantiriladigan o'simlik ildizi kasallantiriladi. Nematodalarni ajratib olishning birinchi bosqichida tuproq bo'lakchalari maydalanib, ko'proq hajmdagi suvga o'tkaziladi. So'ngra nematodalarni har xil o'lehamdagi elaklardan o'tkazib, suzib olinadi. Birinchi eng yirik teshikli va keyin undan mayda va eng mayda teshikli elaklardan o'tkazib, kerakli tur nematodalar yig'ib olinadi.

Odatda, kerakli tur birinchi yoki ikkinchi elakda yig'iladi. So'ngra ular streomikroskop yordamida har xil o'simlik ildizi qoldiqlaridan, boshqa har xil organizm va begona buyumlardan tozalab ajratib olinib, suv solingan idishda saqlanadi. Nematodalar bilan ishlash, ular bilan o'simliklarni kasallantirish uchun tish shifokorlari tish muolajasida ishlatadigan qayrilgan uchli asboblardan foydalaniladi. Boshqacha usul ham mavjud bo'lib, bu usulni ishlatganda paxtadan to'qilgan material joylashtiriladi, bu material ustiga esa elakdan ajratilgan nematodalar solinadi. Bir necha soatdan so'ng nematodalar to'qimadan sekin-asta suvga o'tadi va bu tozalangan nematodalarni virus yuqtirish tajribalarida ishlatish mumkin.

Yana boshqa usul bu elutriator qurilmasidan foydalanib ajratiladi. Bu asbobning ishlash prinsipi shundaki, unda suvning kuchsiz oqimi yuqoriga yo'naltirib oqiziladi, tuproq zarrachalari esa cho'kib qoladi, asbobdan o'tgan suv fraksiyalarida esa nematodalar bo'ladi.

Virus tashuvchi zamburug'larni virusga ega bo'lishlari uchun olpidium zamburug'i zoosporasini tamaki nekrozi virusi (TNV) bilan ta'minlash kerak. Buning uchun tozalangan virus zoosporalar suspenziyasi bilan aralashtiriladi, 5-15°C haroratda bir necha daqiqa saqlanadi. So'ngra suspenziya virus yuqtiriladigan o'simlik ildiziga o'tkaziladi.

Zoosporalar aktivligini 2 va undan ortiqroq kun saqlash uchun qurilgan fosfat buferi yoki 5% li Xoglend eritmasida saqlanadi.

Virus tashuvchi hasharotlarga virus yuqtirish uchun ularni membrana usuli oziqlantirish kerak. Membrana vazifasini parafilm (MPm 992) bajarishi mumkin.

Shiralar 10-20% saxaroza solingan virus preparatlarini sevib iste'mol qiladi. Ba'zi viruslar hasharotlarda uzoq vaqtgacha saqlanadilar. Ba'zi hollarda hasharot virusni o'simlikga yuqtirishidan oldin ma'lum vaqt ichida zarur bo'ladi. Chunki bu vaqt ichida virus ovqat bilan hasharot o'zidan gemolimfaga, so'ngra esa undan so'lak bezlariga o'tadi, ana shu vaqt ichida bir xil tur viruslar ko'payadilar va o'simlikga yuqadilar. Bunda virus tashuvchilar (shira bitlari, qo'ng'iz, chirildoqlar) virusni to'g'ridan - to'g'ri inyeksiya qilishi mumkin.

Hasharotlar 4°C da CO₂ bilan anesteziya qilinib, diametri 30 mkml i dda kapillyar bilan virus preparati hasharot qornidagi segmentlar usuliga yuboriladi. Inokulum miqdori hasharot og'irligining 1% dan ko'prog'iga teng bo'lishi va bakteriyalardan holi bo'lishi kerak (1 shiraga 1 ml). Inyeksiyadan so'ng hasharot bir necha soat salqin nam kamerada saqlanadi, so'ngra indikator o'simlikga o'tkaziladi.

Virus yuqtiruvchi zamburug'lar bilan ishlaganda zamburug'larning zoosporalaridan foydalaniladi. Zoospora olish uchun masalan, olpidium zamburug'i bilan kasallangan o'simlik ildizi quruqroq sharoitda bir kun saqlanadi, bunda zoosporalarning chiqishi kechikadi, keyinchalik ildizni ajratib zoosporalar olinadi.

Buning uchun ildiz 15-20 daqiqa davomida suvga yoki birorta zamburug' o'stiriladigan ozuqa muhitiga solib qo'yiladi. Suvga o'tgan zoosporalarni sentrifuga yordamida konsentrlash mumkin. Zoosporalarni to'yotik bilan asrash zarur, chunki ular sovuq sharoitda yaxshi saqlanadi, shu holda zoosporalar harakatchanliklarini yo'qotadi, shu bilan birga virus tarqatish va o'simlikda kasallik qo'zg'atish xususiyatlarini ham yo'qotishi mumkin.

5. Viruslarni hujayra kulturalariga (ekmalariga) yuqtirish

Ko'pgina viruslar faqat o'simliklarnigina emas, balki ulardan ajratib olingan probirkalarda o'stiriladigan hujayralarni ham kasallantiradi. Kallus to'qimalari yoki hujayralari suyuq yoki qattiq ozuqa muhitlarida o'stiriladi.

Maxsus muhitlarda o'simlik meristemalari kulturalari olingan bo'lib, ulardan hozirgi vaqtda virussiz o'stirish ishlarida qo'llaniladi. Ba'zi kallus hujayralari g'ovak to'plamlar hosil qiladi. Tamakining kallus hujayralarini

TMV bilan kasallantirish uchun virusni ular bilan gomogenizatorda aralashtirib amalga oshirish mumkin. Bu usulda 50% dan 90% gacha hujayra suspenziyasiga virus yuqtirish mumkin. 100 soatdan so'ng bir hujayraga 10^7 ta virus zarrasi to'g'ri keladi. O'simlik viruslarini yuqtirish uchun bargni fermentlar yordamida matseratsiya qilingan hujayra پوست saqlangan hujayralar ishlatiladi.

Nazorat savollari

1. Viruslarni mexanik usulda yuqtirish qanday amalga oshiriladi?
2. Viruslarni payvandlash yo'li bilan qanday yuqtirish mumkin?
3. Viruslar zarpechak yordamida qanday yuqtiriladi?
4. Hasharotlar yordamida o'simliklarga virus yuqtirishni izohlab bering!
5. Virusni hasharotga yuqtirish qanday amalga oshiriladi?
6. Virusli shirani hasharotga yuqtirish uchun qanday moddadan foydalaniladi?
7. Zamburug'lar yordamida virus yuqtirish qanday amalga oshiriladi?
8. Viruslarni hujayra kulturalariga (ekmalariga) yuqtirish qanday amalga oshiriladi?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «AQLIY HUJUM» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi tezkor fikrlash, hozirjavoblik, axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarida, mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

Topshiriqlar

1. Viruslarning yuqish yo'llarini aniqlash qanday ahamiyatga ega?
2. Viruslarni mexanik usulda yuqtirish qanday maqsadlarda ishlatiladi?
3. Viruslarni hasharotlar yordamida yuqtirishda qanday hasharotlardan foydalanish mumkin?
4. Qaysi viruslarni zamburug'lar yordamida yuqtirish mumkin?

7-laboratoriya mashg'uloti

O'simlik viruslarini indikator o'simliklar yordamida aniqlash

Darsning maqsadi: talabalarni fitopatogen viruslarini indikator o'simliklar yordamida aniqlash usuli bilan tanishtirish.

Kerakli jihoz va ashyolar: Virusli namuna, indikator o'simliklar: glyutsinoza (*Nicotiana glutinosa* L.), do'rmon (*Datura stramonium* L.), gomfrena (*Gomphrena globosa* L.), sho'ra (*Chenopodium amaranticolor*), toviyani Pinto navi (*Phaseolus vulgaris* var. Pinto) va arpa (*Hordeum vulgare* L.), korund yoki karborund, sentrifuga, eksikator, qaychi, buyoncha.

Nazariy tushuncha. Fitopatogen viruslarni aniqlashning bir qator usullari mavjud bo'lib, bulardan indikator o'simliklar usuli viruslarning o'simliklarda keltirib chiqaradigan kasallik alomatlariga asoslangan usul hisoblanadi. Indikator o'simliklarning virusli kasalliklari o'simlik turiga bog'liq holda nekrotik dog'lar, sistemali mozaika, xloritik dog' kabi o'simlikka xos alomatlarni keltirib chiqaradi. Quyida bir qator viruslarning indikator o'simliklardagi kasallik alomatlari keltirilgan (3-jadval).

3-jadval

Indikator o'simliklarda viruslar hosil qilgan alomatlar

O'simlik	Hosil bo'lgan simptomlar		
	TMV	KXV	ACHMV
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Virus yuqtirilgandan so'ng yirik (2 mm ga) nekrozlar hosil bo'ladi	Virus yuqtirilgandan 10-12 kun keyin kuchsiz xol-xol mozaika hosil bo'ladi	Immun
<i>Datura stramonium</i>	Virus yuqtirilgandan 3-5 kundan so'ng mayda (0,5-1 mm) nekrozlar hosil bo'ladi	Virus yuqtirilgandan 6-7 kun keyin sistemali virus yuqadi, mozaika hosil bo'ladi	Immun
<i>Gomphrena globosa</i>	Virus yuqtirilgandan 4-5 kundan so'ng yirik (2 mm cha) nekrozlar hosil bo'ladi	Virus yuqtirilgandan 6-7 kundan keyin qizil hoshiyali nekrozlar hosil bo'ladi	Immun

<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn	Virus yuqtirilgandan 4-5 kundan so'ng mayda (0,2 -0,5 mmcha) nekrozlar hosil bo'ladi	Virus yuqtirilgan 12-20 kun keyin yirik (1-1,5 mm) qizil hoshiyali nekrozlar hosil bo'ladi.	Virus yuqtirilgandan 2-4 kun juda kichik (0,1-0,2 mm) nekrozlar hosil bo'ladi
<i>Hordeum vulgare</i> (L.)	Immun (virus yuqmaydi)	Immun	Tizimli, kalta qo'ng'ir shtrixli mozaika hosil bo'ladi
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Pinta	2-3 kundan so'ng (1 mm) nekrozlar hosil bo'ladi	Immun	Immun

Indikator o'simliklarning har biri o'ziga xos kasallik alomatlarini keltirib chiqaradi hamda bu alomatlarining paydo bo'lishi ham turli o'simliklarda keskin farqlanadi. Kasallik alomatlarining paydo bo'lishi tashqi muhit omillariga bog'liq bo'lib, haroratning haddan tashqari isishi yoki sovub ketishi kasallik alomatlarining paydo bo'lishini kechiktirishi mumkin. Aralash holdagi infeksiyalar indikator o'simliklarda kasallik alomatlarining o'zgarishiga olib keladi.

Viruslarni o'simliklarga yuqishiga bir qancha omillar ta'sir qiladi va ular virusni dastlabki hujayraga kirishida, kasallik rivojlanishining keyingi jarayonlarida muhim rol o'ynaydi. Bu omillar 4 guruhga bo'linadi:

- o'simlikning xususiyatlari;
- patogenlik xususiyatlari;
- ekologik omillar;
- biotik omillar.

A) O'simlikning xususiyatlariga uning irsiy chidamliligi kiradi. Chidamlilik darajasi esa o'simlik to'qimasining yoshiga va oziqlanishiga (mikroelementlarning yetishmasligi o'simlikning virusga chidamliligini pasaytiradi) qarab o'zgaradi. Chidamlilik haroratga qarab ham o'zgaradi.

Virus hujayraga kirgandan so'ng yuqori temperaturaga to'g'ri kelib qolsa, o'simlik barglari va boshqa organlarini o'zgarishsiz, simptomlar yashirin holatda o'tishi mumkin. Nimjon va kuchsiz o'simliklar kasallikka sezgirroq bo'lsa, baquvvat, yaxshi rivojlanayotgan o'simliklar virusga ancha chidamli bo'ladi, ularni to'qimalari ancha qattiq va dag'al bo'ladi. Ularga virus yuqishi o'simlikda yengil simptomlar hosil bo'lishiga olib keladi va o'simlik butunlay nobud bo'lmay qolishi mumkin.

O'simlikning virusga sezgirligi yoki chidamliligi o'g'itlar bilan uni ta'minlanishiga ham bog'liq, masalan, azotli o'g'itlarni ko'pligi o'simlik

chidamliligini pasaytiradi. O'simlikni virus bilan kasallanishida o'simlikni kasallatgan "moyilligi" ham yordam beradi. Uoker "moyillik" tushunchasida o'simlikni bir yoki bir necha omillar ta'siri natijasida virus bilan kasallanishini ko'zda tutadi. Chester bu tushunchani boyitib, "moyillik" qatoriga sezgirlik yoki "kasallanish tendensiyasi borligi" tushunchalarini kiritadi.

O'simlikning virus bilan kasallanishiga yana uning yoshi, bir sutka davomidagi, fasl mobaynidagi chidamliligi, mexanik bosim, o'g'it (kaliy, fosfor, azot), fungitsid va pestitsidlar ham ta'sir qiladi.

B) Patogenlik xususiyatlari (patogen - organizmda parazitlik bilan kasallatuvchi organizm) uni agressivligiga (o'simlikni kasallantirib, uni qushilgini yengib, unda yashashi, ko'payishi) bog'liqdir. Virusni oz miqdori (zarralar soni) tez va qisqa muddatda o'simlikni kasallantirishga qodir bo'lsa, uni agressivligi yuqori hisoblanadi. Patogenning yana bir xususiyati uning virulentligi bo'lib, u genotip o'zgargandagina o'zgaradi.

V) Ekologik omillar. O'simliklarga virus zarralari kirib, ularda simptomlar hosil bo'lishida ekologik omillar - namlik, harorat, yorug'lik, mikrolyum, ion kuchi va hokazolar ham rol o'ynaydi.

G) Biotik omillar. Bunga interferensiya hodisasi misol bo'lishi mumkin, ya'ni bir turning (shtamm) rivojiga ikkinchi turning yoki bir xil viruslarni noinfeksion zarralari o'simlik retseptorlarini band qilishi sababli virus hujayraga kira olmaydi yoki kam miqdordagi virus zarralari kiradi va yuqumlilik darajasi pasayadi.

B.V.Kustni fikricha o'simlik virus yuqishiga 4 xil reaksiya bilan javob beradi.

- 1) Immunlik, o'simlikga virus yuqmaydi.
- 2) O'ta sezgirlik, o'simlikni virus kirgan joyidagi to'qimalar nobud bo'ladi va nekroz kabi simptomlar hosil bo'ladi.
- 3) Tolerantlilik, virus o'simlik to'qimalari bo'ylab tarqaladi, ammo simptomlar kuchsiz ko'rinadi.
- 4) Tizimli kasallanishda o'simlikning hamma to'qimalari kasallanadi, virus o'simlikni hamma to'qimalari va yaruslaridagi barglari va o'simlikni butun tanasi bo'ylab tarqaladi va kasallik simptomlari yaqqol ko'ringan bo'ladi.

Simptomlar har xil bo'lishi mumkin, ya'ni - mozaika (mozaikani 6-7 xil mavjud), barg shaklini o'zgarishi, tomirlarni rangsizlanishi, xloritik dag'larni hosil bo'lishi va hokazo. Ba'zan yuqorida ko'rsatilgan 4 guruh simptomlar orasida aniq chegara bo'lmasligi ham mumkin.

Masalan, tolerantlik bilan sistemali kasallanishni aniq ajratish ba'zi qiyin bo'ladi, ba'zi o'simliklarda mexanik inokulyasiyada avval nekroz hosil bo'lib, so'ngra o'simlikning hamma organlari kasallanadi. Agar ha bir tip kasallanishga misol keltiradigan bo'lsak, birinchi tip immunlik holati.

G'o'za o'simligiga arpa mozaikasi virusi yoki jo'xori pakanaligi mozaikasi viruslari yuqtirilsa, g'o'za bu viruslar bilan kasallanmaydi, ya'ni g'o'za o'simligi bu viruslarga chidamli - immundir. Ammo yuqorida keltirilgan viruslar bilan arpa yoki jo'xori kasallantirilsa (o'ziga mo spetsifik o'simlikga), ularda chiziqli mozaika alomatlari 12-14 kun o'tgandan keyin hosil bo'ladi. Bu holda hosil bo'lgan simptomlar **tizimli kasallanish** deyiladi.

Agar xuddi shu viruslar sho'ra o'simligining ma'lum turiga yuqtirilsa 10-12 kundan so'ng kasallantirilgan bargda diametri 2 - 3 mm kattalikdagi sariq dog'lar - nekrozlar hosil bo'ladi. Bu xildagi kasallanish o'simlikning o'ta sezgiriligiga misol bo'la oladi.

Tolerant o'simlik deb ataladigan holatga misol qilib kartoshkaning X virusi bilan pomidor o'simligining kasallanishini, ya'ni virus zarralar kartoshka o'simligida bo'lsa ham ko'zga yaqqol tashlanadigan alomat birinchidan sezilmaydi va ikkinchidan bu virusning zarari o'simlik hosildorligiga uncha sezilarli ta'sir ko'rsatmasligi mumkin.

Virus o'simlikga yuqorida aytilgan usul bilan yuqtirilgandan so'ng ma'lum vaqt soya joyda saqlansa, o'simlik to'qimalarida abraziylar ta'sirida hosil bo'lgan mikrojarohatlarning bitishini, ya'ni reparatsiyasini tezlatadi.

Inokulyasiya qilingan (kasallik yuqtirilgan) o'simliklarda kasallik alomatlarini kuzatish 12 sutkadan 4 haftagacha va undan ham ko'proq vaqt mobaynida olib boriladi. Nekroz kabi alomatlar 3-12 kun davomida kuzatilsa, tizimli kasallanish alomatlarini 7-15 kun va undan ko'proq muddat davomida kuzatish mumkin.

Ishning borish tartibi

Fitopatogen viruslarni indikator o'simliklar yordamida aniqlash uchun quyidagi ishlar olib boriladi:

- virusli namuna olinib, qaychi bilan yaxshilab maydalab kesiladi va chinni hovonchaga namuna og'irligiga teng miqdorda 0,01 M li fostat buferi bilan birgalikda maydalanadi hamda to'rt qavatli dokadan o'tkaziladi va yuqumli shira tayyorlab olinadi;

- yuqumli shirani turli zamburug', bakteriya hujayralaridan holi

qilinib, uchun 2000 ayl/tezlikda 5 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, shu kama usti suyuqligi alohida probirkaga quyib olinadi;

bu yuqumli shirani indikator o'simliklarga yuqtirish uchun kasallantiriladigan indikator o'simliklar bargining yuzasiga abraziy changlatiladi;

abraziy changlatilgan barglar yuzasiga bir tomchi yuqumli shira qo'yiladi va sovunlab yuvilgan barmoqlar yordamida ohistalik bilan barg yuzasiga surtilib chiqiladi hamda har bir o'simlikka yuqtirilgan virus namuni sanasi yozilgan etiketkalar osib qo'yiladi;

natijalarni hisobga olish uchun kasallantirilgan o'simliklar doimiy nazorat qilib boriladi hamda natijalar jadvalga kiritib boriladi.

Nazorat savollari

1. Indikator o'simliklar qanday o'simliklar hisoblanadi?
2. Indikator o'simliklardan qanday maqsadda foydalanish mumkin?
3. O'simlik viruslarini indikator o'simliklar yordamida aniqlash uchun nima qilish talab etiladi?
4. Indikator o'simliklarga fitopatogen virusini yuqtirish uchun nimalardan foydalaniladi?
5. Nima sababdan virusli shira sentrifuga qilinadi?
6. O'simliklarda kasallik alomatlarining paydo bo'lishi nimalarga bog'liq?
7. Kasallantirilgan o'simliklarga nima sababdan etiketkalar osiladi?
8. Indikator o'simliklar usulining afzalligi va kamchiligi nimalardan iborat?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar:

«FSMU» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash, ma'lumot axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda, olingan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»	
F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Fitopatogen viruslarni aniqlash uchun indikator o'simliklarni nimaga asosan tanlab olinishini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering!
2. Virus diagnostikasi uchun ishlatiladigan indikator o'simliklarni qanday sharoitlarda o'stirish mumkin?
3. Indikator o'simliklarda virus bilan kasallanish natijasida paydo bo'ladigan kasallik alomatlarining qanday turlari uchraydi?

8-laboratoriya mashg'uloti Fitopatogen viruslarni biologik tozalash

Darsning maqsadi: indikator (aniqlagich) o'simliklar yordamida o'simlik viruslarini biologik tozalash.

Kerakli jihozlar: virus bilan kasallantirilgan indikator o'simliklar, korund yoki karborund, sentrifuga, qaychi, hovoncha.

Nazariy tushuncha. Virus toza preparatlarini olish shartli ravishda ikki bosqichda amalga oshiriladi.

Birinchi bosqichda virusni biologik tozalash ko'zda tutiladi, ya'ni bunda virus indikator o'simliklar yordamida boshqa viruslar, bakteriyalar, zamburug'lar va mikroskopda ko'rinadigan biologik organizmlardan ajratib olinadi (ammo virus ba'zan xo'jayin o'simlikning nekrozidagi hujayralari ichida, ba'zan xo'jayin o'simlik hujayrasida bo'ladi).

Bu ish avvaldan xususiyati aniq bo'lgan virusologiya amaliyotida ishlatilib kelinayotgan har bir virus uchun uning spetsifikligiga mos indikator (aniqlagich), differensiator (ajratuvchi) va to'plovchi virus o'simlikni tizimli kasallantiradi.

Demak, virusni birinchi ko'paytirib olish uchun xo'jayin o'simlik yordamida, ikkinchidan bu virus nekrozlar hosil qilishi bilan kasallanadigan indikator o'simlik va undagi hosil bo'lgan nekrozdan ajratib olinadigan mononekrozidagi virus zarralarini ko'paytiradigan virus to'plovchi o'simliklar yordamida olish taqazo etiladi.

Kartoshka o'simligini kasallantiradigan qator viruslar birgalikda kasallikni yanada kuchaytiradi. Bunday holatda KXVni aralash tozalash viruslardan biologik tozalash muhim amaliy ahamiyat kasb etadi. Buning uchun dastlab virusni differensiator o'simlik ya'ni *Datura stramonium* o'simligiga yuqtirib ajratib olindi, undan so'ng aralash kelgan viruslardan biologik tozalash uchun esa *Gomphrena globosa* o'simligiga yuqtirib tozalab olindi, undan so'ng virusni to'plovchi o'simlik ya'ni *Datura stramonium* o'simligiga yuqtirilib ko'paytirib olindi. Bu biologik tozalash virusli namunadan toza virus preparatini olishda foydalanildi (Fayziyev, 2020).

TMVni oddiy shtammini O-TMV (adabiyotda —VTM vulgare deb ataladi) mononekrozdan ajratiladigan bo'lsa, unga *Nicotiana sylvestris* (differensiator), *Nicotiana glutinosa* va *Nicotiana tabacum*ning Samsun shtammi kerak bo'ladi. Masalan, pomidor o'simligidan TMVning tomat shtammini va oddiy TMVni birinchi *Nicotiana sylvestris*ga yuqtirilganda O-TMV (TMVning tomat shtammi) bu o'simlikda nekrozlar hosil qiladi. O-TMV esa tizimli kasallantiradi, ya'ni mozaika hosil qiladi. Demak, ikkala shtammni fizik-kimyoviy usullarda ajratish mumkin bo'lmagan yoki o'ta mushkul bo'lgan bo'lsa, bu ish indikator o'simlik yordamida faqat mosgina ajratib olinadi, ya'ni biologik shtamlari ham bir-biridan ajratiladi va tozalanadi. Albatta bu ishni kamida uch marta qaytarilishi muvofiq bo'ladi (uch marta mononekrozdan o'tkaziladi) (Vahobov, 2004).

Ikkinchi bosqichda esa toza preparatni olish uchun fizik-kimyoviy usullar qo'llaniladi, ya'ni differensial sentrifugalash, xromatografiya, elektroforez, gradient zichlikda sentrifugalab tozalash metodlari qo'llaniladi.

Aniqlagich o'simlik yordamida faqat bir o'simlikdagi birgina virusni ajratib va aniqlabgina qolmasdan, balki bir necha viruslar birga aralash holatda uchraydigan holatlarda ham viruslarni aniqlash, ajratish mumkin. Bunday holatda har xil o'simliklarning madaniy va yovvoyi turlari tarqalgan bo'lib, ularda ham viruslar unga ixtisoslashishiga qarab yovvoyi tur o'simlik shu virusga sezgir bo'lishi, uning madaniylashgan navlarining xususiyatlari bu virusga turg'un bo'lishi mumkin. Bir tur ichidagi har xil

navlar virus turi va shtammlariga nisbatan har xil reaksiya bilan javob berishi mumkin. Masalan, tabiatda arpa o'simligi bir vaqtning o'zida ikki virus bilan arpa chiziqli mozaikasi virusi va yaltirbosh mozaikasi virusi bilan, tamaki o'simligi esa tamaki mozaikasi virusi hamda bodring mozaikasi virusi bilan kasallangan bo'lishi mumkin va hokazo.

Ana shunga o'xshash viruslar aralashmalaridan ham aniqlagich o'simliklarni to'g'ri tanlab toza virusni ajratish hamda aniqlash mumkin. Masalan, tamaki o'simligidagi bodring mozaikasi virusini aralash viruslar ichidan ajratib olish uchun virusli o'simlik shirasi bilan bodring va tamakining *Nicotina sylvestris* navi kasallantirilsa, bodringda faqat bodring mozaikasi virusi, tamakida esa faqat tamaki mozaikasi virusi ko'payib, mozaika alomatlari namoyon bo'ladi. Arpani kasallantiruvchi arpa chiziqli mozaikasi virusini yaltirbosh mozaikasi virusidan ajratish uchun esa jo'xori o'simligi kasallantirilsa, jo'xorida faqat yaltirbosh mozaikasi virusigina ko'payadi. Viruslarni aralashmalar ichidan ajratib olishda qo'llaniladigan o'simliklar **differensiator o'simliklar** deyiladi.

Tabiatda xuddi shunga o'xshash kartoshka viruslarini ajratish uchun turli xil kartoshka viruslarini aniqlagich o'simliklari mavjuddir. Ba'zan o'simlikka virus yuqtirish va aniqlash jarayonida aniqlagich o'simliklar ham yordam bera olmasa, bir qator virus tarqatuvchi yoki yuqtiruvchi hasharotlardan ham foydalaniladi.

Ishning borish tartibi

Aralash kelgan viruslari ajratish va biologik tozalash uchun quyidagi ishlar amalga oshiriladi:

- KXV va TMV ning namunalarini olib, aralashtiriladi.
- Aralash viruslarni ajratish va biologik tozalash uchun har bir virus uchun alohida indikator o'simliklar to'plamidan foydalaniladi va quyidagi sxema orqali biologik tozalash amalga oshiriladi:
- KXVni biologik tozlash uchun: *Datura stramonium* – *Gomphrena glabosa*- *D.stramonium*;
- TMVni biologik tozalash uchun: *Nicotiana tabacum* – *N.glutinosa* - *Chenopodium amaranticolor*.
- Viruslarning biologik jihatdan toza ekanligini tekshirish uchun indikator o'simliklardan va boshqa immunologik usullardan foydalaniladi.
- KXVning aralash infeksiyadan tozalanganligini aniqlash uchun KXV yuqtirilgan to'plovchi o'simlik ya'ni *D.stramonium* o'simligidan namuna olinib, TMVni aniqlashda ishlatiladigan *N.glutinosa* va *Chenopodium amaranticolor* o'simligiga yuqtiriladi.

Natijalarni hisobga olish uchun, kasallantirilgan o'simliklar kuzatib boriladi. Agar *N.glutinosa* va *Chenopodium amaranticolor* o'simliklarida TMVga xos bo'lgan kasallik alomatlar paydo bo'lmasa, biologik tozalash jarayonida TMVdan tozalanganligidan dalolat beradi.

Nazorat savollari

1. Virusni birinchi ko'paytirib olish uchun qanday o'simliklar kerak bo'ladi?
2. Toza preparatni olish uchun qanday usullar qo'llaniladi?
3. Xo'jayin o'simliklardan viruslar qanday ajratiladi?
4. Differensiator o'simliklar nima maqsadda qo'llaniladi?
5. Yaltirbosh mozaika virusini qanday usulda tozalab olish mumkin?
6. Viruslarni biologik tozalash deyganda nimani tushunasiz?
7. O'simlik viruslarining har qanday o'simlikni kasallantirmasligini qanday izohlash mumkin?
8. Arpani kasallantiruvchi arpa chiziqli mozaikasi virusini yaltirbosh mozaikasi virusidan ajratish uchun nima ish qilish zarur?

9-laboratoriya mashg'uloti

Fitopatogen viruslarni kiritmalar asosida aniqlash

Darsning maqsadi: o'simliklarni kasallantiruvchi fitopatogen viruslarni kiritmalar asosida identifikatsiya qilishni o'rganish.

Kerakli jihozlar: mikroskop, buyum va qoplag'ich oyna, indikator o'simliklar, chinni hovoncha, korund yoki karborund, virusli namuna.

Nazariy tushuncha. O'simlik hujayralaridagi virus kiritmalari haqida birinchi marta rus olimi D.I. Ivanovskiy "Tamakining mozaika (chiporlanish) kasalligi" (1902) kitobida tamaki hujayrasini mozaikali qismida qandaydir rangsiz, kristallsimon moddalar borligini aytgan edi. Shundan tashqari, ularning oldida (kasal hujayralar yadrosi yaqinida) hujayraning boshqa tarkibiy qismlaridan farqlanadigan amyobalarga o'xshash plazma to'plamlari uchraydi. Bu xildagi kiritmalar keyinchalik amyobasimon tanalar, vakuollashgan yoki X-tanalar deb nomlandi.

M.I. Goldin tomonidan virus bilan kasallangan odam va hayvon hujayralarida mayda timonuklein kislota tutuvchi elementar tanachalar-virus zarralari borligi aniqlandi. Ko'pincha o'simlik, odam va hayvon virus kasalliklarida X-tanalar diagnostika maqsadlarida ham o'rganiladi. Tamakining mozaikali qismidagi kristall kiritmalari bor to'qimaga 0,1 n

HCl ta'sir ettirilganda kristall kiritmalar ignasimon kristallarga parchalanib ketadi, bunday kristallar tozalangan virus preparatlarida uchraydi. Demak, kristall virus kiritmalari virus zarralaridan tuzilgandir.

Tamaki mozaikasi virusining yashiringan shtamm kiritmalari hujayrada TMVga qaraganda ancha kam to'planadi (Beale, 1936). Lingviston va Duggarlar virus zarralarining lokalizatsiyasini o'rganishda virusni asosiy qismi protoplazmada bo'lishini aniqlashdi.

TMV bilan kasallangan tamaki to'qimalarida kristallsimon virus kiritmalari bir tekisda tarqalmagan. Masalan, ba'zi tamaki yoki pomidor barglaridagi tuklarda kristall virus kiritmalari umuman ko'rinmasligi mumkin, ba'zilarida esa juda ko'p bo'lishi mumkin.

Tadqiqotlarning ko'rsatishicha, kiritmalar virus to'plamlari yoki hujayrada virus to'planishi bilan bog'liq bo'lgan mahsulotdir. Bular M.I. Goldinning ma'lumotlariga qaraganda, virus bilan kasallangan tamaki yoki pomidorning barg tuklarida va epidermisida to'planadi.

Goldin fikricha, TMV bilan kasallangan bargdagi kiritmalarda virus bo'ladi. Goldin va Sheffield tajribalarining ko'rsatishicha Ivanovski kristallari va X-tanalar TMVning to'plamidir. Tamaki boshqa virus bilan kasallantirilsa, o'simlik hujayrasida amorf kiritmalar hosil bo'ladi, ular ham virus zarralarining to'plamlaridan iborat bo'lishi aniqlanilgan.

Hisoblashlarning ko'rsatishicha, bitta kristallning massasi 1/125000 mg ga teng. Ivanovski kristallari, odatda, geksagonal ko'rinishda bo'ladi. TMVning boshqa shtammi bilan kasallangan tamakida ipsimon shakl kiritmalar ham uchraydi. Ba'zan har ikkala kiritma bir vaqtning o'zida bitta hujayrada uchrashi mumkin. Turli xil o'simliklar bir xil virus bilan kasallangan bo'lsa, uning shakli o'zgarmaydi. Har xil moddalar ta'sirida (masalan, 0,1 n HCl) TMVning kasallangan o'simlik hujayralarida dugsimon kristallar uchrashi mumkin.

Sheffield (1939) fikricha, TMV bilan kasallangan tamaki hujayralarida X-tanalarning hosil bo'lishi kuzatilganda, virus yuqtirilgandan bir necha kun o'tgach, hujayra protoplazmasi ancha zichlashadi va harakatchan bo'ladi. Plazma oqimida oqsil zarralar ko'payib boradi va ular bir-birlari bilan to'qnashib qo'shiladi va kattaroq massa hosil qiladi. Bular ko'pincha dumaloq shaklga kiradi va zichlashadi. Bir oylardan so'ng bu X-tanalar degeneratsiyaga uchraydi.

Ba'zan kiritmaning amorf materiali ipsimon kristallarga aylanadi. Ammo M.I. Goldin bunga ba'zi dalilni qarama-qarshi qo'yadi, chunki u virus yuqtirilgandan birinchi kunlardayoq tipik kristallsimon kiritmalarini

topadi va X-tanalarning parchalanishidan Ivanovski kristallari hosil bo'ladi deyishni noto'g'ri deb hisoblaydi.

Goldinning fikricha, hujayra va virus orasidagi munosabatlarning o'zgarishiga qarab X-tana yoki Ivanovski kristallari hamda ipsimon kiritmalarga ega bo'lgan mahsulotlar hosil bo'lishi mumkin (spikal kristallar). Ba'zan X-tanadan avvalroq ham kristall kiritmalar hosil bo'ladi.

Kristall kiritmalarining ba'zi fizikaviy va kimyoviy xossalari

Ivanovski kristallariga xos asosiy xususiyatlardan biri, ular hujayraning salgina buzilishidan tez erib ketadi. Ularga 0,1 n giposulfat yoki 1% li sistein, 1% li pikrin kislotasi, 20-25% ammoniy sulfat kristallarini ta'sir ettirib erib ketishidan saqlash mumkin. Pikrin kislotasi kristallari fiksatsiya qilishda yaxshi natijalar beradi va ular fuksin, karotinin kabi bo'yoqlar bilan yaxshi bo'yaladi. To'qimalarning nozik qismlarini ba'zi stabilashtiruvchi eritmalarga solib, mikromanipulyator yordamida Ivanovski kristallarini, ipchalarini o'simlik tuklaridan ajratib olish mumkin.

Virus kiritmalarini tadqiq qilish o'simlik viruslarini o'rganishning muhimlik mikroskopi yordamida bajariladigan metodlaridan biridir. Kiritmalarni analiz qilish virus kasalliklarini diagnostikasini osonlashtiradi va ularni klassifikatsiya qilishda, yashirin infeksiyani aniqlashda ma'lum bo'laydi.

Quyida X-tana, kristall kiritmalari yaxshi o'rganilgan bazi o'simlik kasalliklarining ro'yxati berilgan.

X-tana hosil bo'ladigan virus kasalliklari

1. Pomidor mozaikasi virusi guruhi, kartoshkaning X virusi, Y virusi, kartoshka bargining buralishi, bug'doy mozaikasi, sholi pakanaligi (kardikovost), shakarqamish 1-virusi, shakarqamishning xlorotik nekrozi, piyoz mozaikasi, piyozning sariq pakanaligi, kartoshkagul mozaikasi va pakanaligi, gulsafsar mozaikasi, paporotnik mozaikasi, lavlagi yuqori qismning buralishi, tok bo'g'imlarining qisqarishi virusi, sholg'om mozaikasi virusi, shaftoli sarg'ayishi, tut mozaikasi, tomat barglarining parchalanishi bilan kasallangan o'simliklarda virus kiritmalari hosil bo'lishi mumkin.

Quyida esa virus kasalliklarida kristall yoki kristallsimon tanalar (x-tanadan tashqari) hosil bo'ladigan kasalliklar keltirilgan: tomat virusi guruhi, tamakining halqasimon dog'liligi, tamaki naqshinkorligi, bodring mozaikasi virusi №2, qizil beda mozaikasi, loviya sariq mozaikasi, no'xat

mozaikasi virusi №2, lavlagi mozaikasi, lolaning atlaslanishi, zubturi mozaikasi.

Ishning borish tartibi

O'simlik viruslarini kiritmalar asosida diagnostika qilish uchun quyidagi ishlar amalga oshiriladi:

-TMV bilan kasallangan *Nicotiana tabacum* o'simligi bargida yupqa barg kesmasi tayyorlab olinadi;

-tayyorlangan kesma buyum oynasi yuzasiga tomizilgan bir tomchi suv ustiga joylashtiriladi hamda uning ustidan qoplag'ich oyna qo'yiladi;

-preparat yorug'lik mikroskopiga joylanadi va turli obyektlarda kuzatib chiqiladi hamda natijalar hisobga olinadi;

-kuzatish natijalari ish daftariga tushiriladi.

Nazorat savollari

1. Kiritmalar yoramida fitopatogen viruslarni aniqlash qanday tamoyilga asoslangan?

2. X-tanacha hosil qiladigan viruslarga qaysilar kiradi?

3. Virus ta'sirida hujayrada qanday o'zgarishlar sodir bo'ladi?

4. Kiritmalar asosida diagnostika qilishni kim fanga kiritgan?

5. Qanday holda o'simlikda kiritmalar paydo bo'ladi?

6. X-tanachaning qanday turlari virus bilan kasallangan o'simlikda paydo bo'ladi?

7. Kiritmalarni o'rganishning qanday ahamiyati bor?

8. Kiritmalarni qanday usul yordamida o'rganish mumkin?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar «AQLIY HUJUM» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi tezkor fikrlash, hozirjavoblik, axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarida, mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

Topshiriqlar

1. Kiritmalarga asoslangan diagnostika usuli qanday holatlarda qo'llaniladi?

2. Kiritmalarga asoslangan usul dastlab qaysi olim tomonidan virus diagnostikasida qo'llangan?

3. Nima sababdan o'simliklarda kiritmalar hosil bo'lishini izohlab bo'lmaydi?

4. Kiritmalarni qaysi qurilma yordamida aniqlash mumkin?

5. Kiritmalarni o'simlikning qaysi organlarida aniqlash mumkin?

10-laboratoriya mashg'uloti

Viruslarning harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasini aniqlash

Darsning maqsadi: talabalarni viruslarni issiqlik ta'sirida aktivligini yo'qotish nuqtasini aniqlash usuli bilan tanishtirish.

Kerakli materiallar: virusli namuna (tamaki mozaikasi virusining pomidoridagi shtammi bilan kasallantirilgan mozaika simptomli pomidor barglari), korund, 0,1 M fosfat buferi, 20 ml li yupqa devorli shisha idishlar (12-14 dona), 1-10 ml li pipetkalar (6-8 ta), 50 ml li kolba (2 dona), voronka (5 dona), doka 1m², eksikatorlar (2 dona), vazelin, ip (10), etiketkalar (15-16 dona), distillangan suv (0,5 l), xloroform (5 ml), termometr (minutiga 6000 ayl /tez), pH-metr, tarozilar, chinni hovoncha, suv hammomi, termometr (0-100° C).

Nazariy tushuncha. Viruslarni harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasini aniqlash ularni identifikatsiya qilishda asosiy mezonlardan biri hisoblanadi. Undan tashqari viruslarga qarshi kurash choralarini ishlab chiqish jarayonida HTFY nuqtasini aniqlash katta ahamiyat kasb etadi. Viruslarning HTFY nuqtasi virusning turiga, shtammlariga bog'liq holda bir-biridan farqlanadi. Bugungi kungacha aniqlangan barcha viruslarning faolligini yo'qotish nuqtasi o'rganilgan (4-jadval).

4-jadval

Har xil shaklli ba'zi fitopatogen viruslarning harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtalari

Virus yoki shtamm	Shakli	Diametri (nm)	Harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasi, C	Adabiyotlar
TMV	Tayoqcha	300x18	95-96	Goldin M.I.
TMV ni pomidoridagi	Tayoqcha	280x18	96-98	Xasanova R., Vahobov A.H.,

shtammi				Dehqonova Z.N.
Jo'xori mozaikasi virusi	Ipsimon	720-750x12	50-52	Davronov Q.S.
Sholg'om mozaikasi virusi	Ipsimon	720-10	50-52	Dehqonova Z.N.
Redis mozaikasi virusi	Sharsimon	30	60-62	Dehqonova Z.N.
Bodring mozaikasi virusi	Sharsimon	26-30	60-62	Yuldashev J.
Gulkaram mozaikasi virusi	Sharsimon	50		Dehqonova Z.N.

Ishning borish tartibi

Tamaki mozaikasi virusining (TMV) pomidordagi shtammini harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasini aniqlash uchun pomidorning virus bilan kasallantirilgan barglaridan 50-60 g olinib, 0,1 M fosfat buferi bilan hovonchada yaxshilab maydalanadi (virusli material va fosfat buferining nisbati -1:1), so'ngra to'rt qavat dokadan o'tkaziladi. Dokadan o'tkazilgan suyuqlik 10 daqiqa davomida daqiqasiga 6000 marta aylanish tezligidagi sentrifugada aylantiriladi. Cho'kma usti suyuqligi yupqa devorli shisha probirkalarga (12 dona) 5 ml dan qilib quyiladi.

Birinchi probirkadagi virusli o'simlik shirasi nazorat variant qilib olinadi va qizdirilmaydi. Qolgan probirkalardagi virusli namunalar har xil haroratda (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100° C) suv hammomida 10 daqiqa davomida qizdiriladi, ya'ni probirkadagi virusli shira termometri bilan bir xil chuqurlikda suv hammomiga joylashtiriladi. Termometr 50° C ni ko'rsatishi bilan suv hammomidagi issiqlikda 10 daqiqa davomida 50° C da saqlanadi.

So'ngra suv hammomidan olinib, oqar suvda sovutiladi. Sovutilgan virusli o'simlik shirasini *Nicotina glutinosa* aniqlagich o'simligining korund bilan changlatilgan bargining o'ng tomoniga pipetka yordamida 4-5 tomchisi tomiziladi va sterillangan shisha tayoqcha yoki sovunlab yuvib artilmay quritilgan barmoqlar bilan ohista surtiladi (ishqalanadi). Bargning chap tomoniga esa qizdirilmagan nazorat o'simlik shirasi tomiziladi va u ham ohistalik bilan surtiladi.

Keyin ikkala tomoniga ham virusli o'simlik shirasi surtilgan barglarga etiketkalar bog'lanib, nam kamera vazifasini bajaruvchi eksikatorga

qo'yiladi. Har bir variant to'rt-oltitadan bargga yuqtiriladi. Etiketkalariga virus yuqtirilgan vaqt, qizdirilgan harorat, virusning nomi, chap tomoniga qizdirilmagan nazorat virusli shira yuqtirilgan bo'lib, u ham belgilab qo'yiladi. Eksikator qopqog'iga vazelin surtilib zich qilib yopiladi va 48 soat (aniqlagich o'simlik qilib *N. glutinosa* ishlatilganda) yoki 72 soat (*N. glutinosa* ishlatilganda) havo haroratida qoldiriladi.

Belgilangan muddat to'g'agandan keyin paydo bo'lgan kasallik nuqtalari hisobga olinadi va jadvalda qayd etiladi. Natijalarni grafik usulda tasvirlash uchun absissa o'qiga nekrozlar soni, ordinata o'qiga esa harorat qo'yiladi. Olingan natijalar nuqtalari birlashtiriladi. Nazariy jihatdan qaranganda haroratning oshishi bilan egri chiziqli nolga intiladi. Har bir qizdirish haroratida virus aktivligi 0 gacha pasaysa (nekrozlar kuzatilmasa) shu harorat virusning harorat ta'sirida faolligini yo'qotish (HTFY) nuqtasi deb belgilanadi.

Odatda, tamaki mozaikasi virusining tamakidagi shtammining HTFY nuqtasi 95-97° C, TMVning Qozoq shtamminiki 80-82° C, TMVning pomidordagi shtamminiki 96-98° C, jo'xori pakanaligi mozaikasi virusiniki 50-52° C, sholg'om mozaikasi virusiniki 60-62° C va hokazo. Bu ko'rsatkichlar virus yoki uning shtammini identifikatsiya qilishda ishlatiladi.

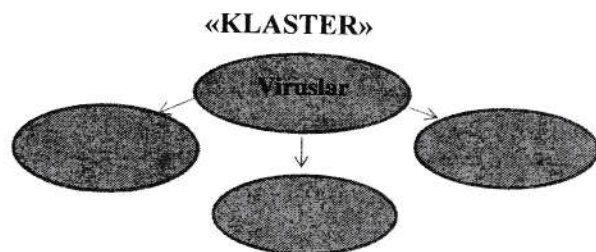
Nazorat savollari

1. Viruslar harorat ta'sirida qanday o'zgarishga uchraydi?
2. O'simlik viruslarini harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasi qanday aniqlanadi?
3. Viruslarning harorat tufayli faolligini yo'qotish nuqtasini o'rganish qanday ahamiyatga ega?
4. Virusni IENda cho'ktirish qanday ahamiyatga ega?
5. Viruslarni tuzlar yordamida cho'ktirish qanday amalga oshiriladi?
6. Viruslarni tuzlar yordamida cho'ktirish uchun ishlatiladigan tuzlar miqdorini aytib bering!
7. TMV shtammlarida harorat ta'sirida faolligini yo'qotish darajasi qanday o'zgaradi?
8. Virus alomatlarining paydo bo'lishini qanday qurilma yordamida aniqlash mumkin?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar «KLASTER» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilarda taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.



Topshiriqlar

1. Viruslarga ta'sir ko'rsatuvchi abiotik omillar klasterini tuzing.
2. Viruslarga ta'sir ko'rsatuvchi biotik omillar klasterini tuzing.

11-laboratoriya mashg'uloti Viruslarning oxirgi suyulish darajasini aniqlash

Darsning maqsadi: viruslarning oxirgi suyulish darajasini aniqlash.

Kerakli jihozlar: shisha probirkalar, virus bilan kasallangan o'simlik namunasi, chinni hovoncha, korund yoki karborund, eksikator, vazelin.

Nazariy tushuncha. Viruslar hujayrada har xil miqdorda to'planadi. Ba'zi virus bilan kasallangan o'simliklarning 1 kilogrammdan 1-3 gr toza virus ajratib olinsa, ba'zilaridan 3-5 mg olinadi, bu birinchi navbatda virusning hujayrada to'planishiga bog'liqdir.

Viruslarning oxirgi suyulish darajasini (OSD) aniqlash viruslarni identifikatsiya qilishda katta ahamiyatga egadir. Virus hujayrada ko'p miqdorda to'plangan hollarda suyulish darajasi 10^{-6} - 10^{-7} ni tashkil qilsa, (TMV) ba'zi vaqtlarda 10^{-2} - 10^{-3} ni tashkil etadi (makkajo'xori pakanaligi mozaikasi virusi).

Uchun borishi. Tamaki mozaikasi virusining tomat shtammini 10⁻¹ suyulish darajasini aniqlash uchun shu virus bilan kasallantirilgan o'simlik barglaridan 50-60 gr olinib, 0,05 M fosfat buferi ishtirokida kasallangan virusli material vazniga teng miqdorda 1:1 nisbatda bufer olinadi va suyultirilgan vaqtda hisobga olinishi kerak) hovonchada ezib foydalanadi. So'ngra 3-4 qavatli dokadan suziladi va bu virusli suyuqlik eksikatorida 10 daqiqa davomida daqiqasiga 5000-6000 aylanish tezligida suziladi.

Cho'kma usti suyuqligidan qator probirkalarga 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} marta suyultirilgan virus eritmaları tayyolanadi hamda *Phaseolus glutinosa* yoki *Nicotina sylvestris* barglarining korund sepib kasallangan o'ng tomoniga 4-5 tomchi tomizilib ohista barmoq bilan surtiladi. Bargning chap tomoniga suyultirilmagan o'simlikning shirasi tomiziladi va surtiladi. Har bir suyultirilgan probirkadagi virusli eritma 5-6 tomchi yuqtiriladi. Etiketkalar bog'langandan so'ng nam kamera hosil qilish uchun eksikatorga osib qo'yiladi. Eksikatorga bakteriyalarga qarshi 3-4 tomchi xloroform tomizib qo'yiladi.

Belgilangan 48-72 soatdan keyin paydo bo'lgan kasallik alomatlarini natijalari hisobga olinadi, ya'ni hosil bo'lgan nekrozlar soni hisoblanadi. Natijalar va tajribadan olingan nekrozlar soni ayrim-ayrim qilib jadvalga kiritiladi, 5-6 bargning o'ng tomonidan olingan nekrozlarning o'rtachasi hisoblanadi.

Natijalarni grafik ravishda tasvirlash uchun ordinata o'qiga nekrozlar soni kontrolga nisbatan foiz hisobida, absissaga esa suyulish darajasi qo'yiladi. Olingan natijalar nuqtalari birlashtirilsa suyulish darajasi oshishi bilan egri chiziq 0 ga intiladi. Olingan natijalardagi eng oxirgi kasallik alomatlari hosil bo'lgan suyulish miqdori shu virusning oxirgi suyulish darajasi deb hisoblanadi. Suyulish darajasi har bir virusni identifikatsiya qilishda katta ahamiyatga ega bo'lib, ular virus turiga va shtammiga qarab aniqlanadi bo'ladi (5-jadval).

5-jadval

Har xil shaklli viruslarning oxirgi suyulish darajasi	
Virus yoki uning shtammi	Oxirgi suyulish miqdori
TMV	10^{-6}
TMV-TSH	10^{-7}
TMV-Koz. SH	10^{-5}
Jo'xori pakanaligi mozaikasi	10^{-3}

Sholg'om mozaikasi virusi	10^{-3}
Redis mozaikasi virusi	10^{-3}
Bodring mozaikasi virusi	10^{-3}
Gulkaram mozaikasi virusi	10^{-5}
G'o'za mozaikasi virusi	-

Nazorat savollari

1. Viruslarning oxirgi suyuqlanish darajasini aniqlash uchun kerakli jihozlarni ayting?
2. Oxirgi suyulish darajasi qanday aniqlanadi?
3. Viruslarni oxirgi suyulish darajasini o'rganish qanday ahamiyatga ega?
4. Viruslarning oxirgi suyulish darajasi nimaga bog'liq?
5. Nima uchun eksikatorga solingan suvga xloroform tomiziladi?
6. Virus shtammlarida OSD qanday farqlanadi?
7. Bodring mozaikasi virusining OSD nechiga teng?
8. O'simlik to'qimasida virus konsentratsiyasini aniqlashning qanday usullari mavjud?

Talaba bilimni mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar «KLAUSTER» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash orqali axborotni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»

F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltiring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Fitopatogen viruslarning oxirgi suyuqlanish darajasi qaysi tajriba yordamida aniqlanishini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering.
2. Viruslarning oxirgi suyuqlanish darajasini aniqlash nima ahamiyat kasb etishini izohlab bering?
3. Oxirgi suyulish darajasi barcha viruslar uchun bir xil emasligini qanday izohlash mumkin?
- 4.

12-laboratoriya mashg'uloti Viruslarning izoelektrik nuqtasini aniqlash

Darsning maqsadi: viruslarni izoelektrik nuqtada cho'kish darajasini aniqlash bilan talabalarni tanishtirish.

Kerakli jihozlar: sentrifuga, probirka, pipetkalar, xlorid kislotaning 0,1-0,001M li eritmaları.

Nazariy tushuncha. Viruslar tashqi qobig'i odatda kuchsiz nordon qoplamdan iborat bo'lganligi sababli, ko'pchilik viruslarda IENda pH-4,3-6,0 atrofida. IENda cho'ktirish usulini uning oddiy variantida amalga oshirish mumkin, bunda suspenziya pH ko'rsatgichi kerakli nuqtaga olib kelinadi va virus preparati past tezlikdagi sentrifugalash yordamida qat'irladi.

Tabiiyki, bunda virus bilan birgalikda virusga nisbatan yuqoriroq pH-ga ega bo'lgan hujayra oqsillari ham cho'kish mumkin. IENda cho'ktirish virusni konsentrlab olish va uni qisman tarzda sentrifugalash yordamida cho'ktirib olmasdan turib, past molekulyar aralashmadan foydalaniladi.

IENda cho'ktirish usulini **bo'lish** variantida ham amalga oshirish mumkin. Masalan, virusning IENdagi pH 4,0 atrofida. Bunday holatda

avval suspenziyaning pH 5,0 gacha oshirib kelinadi va past tezlik sentrifugalash yordamida cho'kuvchi aralashmalar yo'qotiladi. Keyin suspenziya pH 4,0 gacha nordonlashtiriladi. Bunda virus agregirlanadi va cho'kadi. Biroq, birinchi cho'ktirishni virus IENga yaqin bo'lgan pH ko'rsatgichida amalga oshirish mumkin emas, chunki tozalash bosqichida bunday holat virusning ko'p miqdorining yo'qotilishiga olib keladi.

Bu juda oddiy va juda samarali usulning kamchiligi, ko'pgina viruslar muhit (pH) ning ozgina o'zgarishlariga ham o'ta sezgiriligida va bunda ishlov berish virionlar biologik faolligining yo'qolishiga yoki ularning parchalanib ketishiga olib kelishi mumkinligidadir.

Ishning borish tartibi

Tamaki mozaikasi virusi bilan kasallangan o'simlik shirasi yuqoridagi keltirilgan usullar bilan ajratib olinadi va yana xloroform yoki butanol yordamida ishlov berilib, sentrifuga yordamida tiniqlashtirilib, virusli ekstrakt ajratib olinadi. So'ngra unga 1M li HCl dan qo'shib aralashtiriladi. pH 5,0-5,5 ga kelguncha indikator qog'oz bilan tekshirib boriladi. Endi 0,1M HCl yordamida pH 4,5 ga tushiriladi, bu bosqichda pH metrdan foydalaniladi. 4,4-5,5 orasida ohistalik bilan kislota tomizgani ma'qul, aks holda virusli ekstraktning mahalliy uchastkasida pH keskin pasayadi va ballast oqsillar bilan birga virus ham izoelektr holatga kelib cho'kish mumkin.

pH 4,5 ga teng bo'lganda suspenziyadan cho'kmaga o'tadigan hujayra ballastlarini sentrifuga yordamida 3-5 ming aylanish tezligida 20 daqiqa aylantiriladi. Cho'kma usti suyuqligini 0,1M HCl bilan pH 3,5 gacha nordonlashtiriladi. Bu pHda TMV zarralari izoelektrik holatga o'tadi, agregatlar paydo bo'ladi va aralashtirilganda seziladigan darajada ignasimon parakristallar hosil bo'ladi.

Natijada eritma ipaksimon yaltiraydi. Eritma to'liq kristallanishi uchun sovuq xonada kechasi 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 daqiqa davomida sentrifugalash bilan ajratiladi. Cho'kma 0,01M fosfat buferida eritiladi. Eritish uchun ishlatiladigan buferning miqdori eng birinchi virusli materialni ekstraktsiya qilish uchun ishlatilgan buferni 1/10 miqdorini tashkil qiladi. Demak, virus 10 marta quyushtiriladi.

Virusli eritmani pH 0,1M NaOH bilan 7,0-7,5 gacha ko'tariladi (pH indikator qog'oz yordamida nazorat qilib boriladi). So'ngra eritma 15000-

aylanish tezligida 10 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, erimagan cho'kma ozoqlashtiriladi.

So'ngra virus yana ikkinchi marta qaytadan cho'ktiriladi. Virusli suspenziya 0,1 n HCl bilan muttasil aralashtirilgan holda pH 3,5 gacha tashlanadi (pH-metr yoki indikator qog'ozda nazorat qilib boriladi). Virusli ekstrakt to'liq kristallanishi uchun muzlatgichda yoki hammomida bir soatga qoldiriladi. Cho'kma 6000 ayl/ tezligida 20 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi.

To'liq cho'kma usti suyuqligi tashlab yuboriladi, cho'kmadagi virus tashlab 15-20 ml 0,01 M fosfat buferida (pH-7,5) eritiladi. Suspenziya tashlab pH bilan pH gacha ishqoriylashtiriladi. So'ngra 15-18 ming aylanish tezligida 10 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi. Cho'kma 5-6 daqiqa 0,1 M fosfat buferi bilan yuvib tashlanadi va sentrifuga qilinadi. Virusli suvlar odatda asosiy virusli eritma bilan birlashtiriladi.

Yuqoridagi usullar bilan tozalangan virus boshqa usullar bilan tozalangan holda tozalanadi. Katta hajmdagi (bir necha litr) virusli eritma IENda ajratilganda, cho'kma usti suyuqligini cho'kmadan sifon yordamida olish mumkin.

Nazorat savollari

1. Viruslarni izoelektrik nuqtasi qanday topiladi?
2. Viruslarni IEN yordamida konsentrlash uchun qanday moddadan foydalaniladi?
3. Virusning qisman tozalangan preparatini olish bosqichlarini tushuntirib bering.
4. IENda cho'ktirish ishlarini amalga oshirish uchun qanday moddalar zarur bo'ladi?
5. Viruslarni IENda konsentrlashning ahamiyati qanday?
6. Viruslarni IENda konsentrlashda nimalarga e'tibor berish zarur?
7. IENda konsentrlashning "bo'lish" usulini izohlab bering?
8. IENda virusni cho'ktirish uchun pHni o'zgartirishda nimalardan foydalaniladi?

13-laboratoriya mashg'uloti

Viruslarning qisman tozalangan preparatini olish

Darsning maqsadi: viruslarning tezkorlik bilan pHni o'zgarishiga asoslanib, qisman tozalangan preparatini olish usuli bilan tanishish.

Kerakli jihozlar: virusli namuna, sentrifuga, tarozi, qaychi, chinni hovoncha, probirkalar, pipetkalar, bufer, xloroform, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HCl va NaOH 0,1 - 0,001M li eritmaları.

Nazariy tushuncha. Viruslarning qisman tozalangan preparatini olishdan avval virusli namunani bufer bilan gomogenizatsiyalash, filtrlash, yirik hujayra komponentlaridan preparatni holi qilish uchun yuqori aylanishli tezlikda sentrifugalash, preparatni keraksiz oqsillardan tozalash xloroform yoki boshqa denaturatsiyalovchi moddalardan foydalangan holda amalga oshiriladi hamda so'ngi bosqichda ultrasentrifugalash yoki gelfiltratsiyalash kabilardan foydalaniladi.

Ishning borishi. Tamaki mozaikasi virusining qisman tozalangan preparatini olish uchun virusli namuna 0,01M li fosfat buferi solib ekstraksiya qilinadi. Olingan virusli shira o'simlik to'qimasidan holi bo'lishi uchun to'rt qavatli dokadan o'tkaziladi. Dokadan o'tgan yuqumli shira 5000 ayl/tez.da 20 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi va cho'kma usti suyuqligi olinadi. Undan so'ng hujayraning komponentlaridan holi bo'lish uchun xloroform (7:1) solib, 20 daqiqa davomida chayqatiladi, undan so'ng yana 5000 ayl/tez.da 20 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma usti suyuqligi olinadi. Cho'kma usti suyuqligini quyib olish juda ehtiyotkorlikni talab etadi, chunki suyuqlikning ostki qismida xloroform bo'ladi.

Ehtiyotkorlik bilan cho'kma usti suyuqligi quyib olinadi. Cho'kma usti suyuqligiga 20% ammoniy sulfat tuzi yoki 4% PEG solib, eritilgandan keyin yana 6000 ayl/tez.da 30 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi, cho'kma usti suyuqligi tashlab yuboriladi, cho'kma esa 1 ml 0,01M li fosfat buferi solib eritiladi hamda steril probirkaga quyib olinadi. Bu virusning qisman tozalangan preparati hisoblanib, bundan virusning toza preparatini olish uchun foydalanish mumkin.

Nazorat savollari

1. Virusning qisman tozalangan preparati uchun virusli material sifatida nimadan foydalaniladi?
2. Virus preparatini hujayra komponentlaridan tozalash uchun nima ish qilish kerak?

3. Nima sababdan xloroform kabi organik erituvchilar ishlatiladi?
4. Denaturatsiyalovchi moddalardan preparat qanday qilib tozalanadi?
5. Virus preparatini konsentrlashda nimadan foydalaniladi?
6. Virusning qisman toza preparatini olish qanday bosqichlarni o'z ichiga oladi?
7. Qisman tozalangan virus preparati nima maqsadda ishlatiladi?
8. Qisman tozalangan virus preparati pH ko'rsatkichini tog'rilashda qanday moddalardan foydalaniladi?

14-laboratoriya mashg'uloti

Toza virus preparatlarini olish usullarini o'rganish

Darsning maqsadi: viruslarning toza preparatini olish usuli bilan shabloni tanishtirish.

Nazariy tushuncha. Har qanday virusni o'rganish uning toza preparatini olishdan boshlanadi, chunki o'simlik hujayrasi komponentlari o'zining to'liq xususiyatlarini o'rganishga monelik qiladi. KXVni o'rganishning bir nechta usullari mualliflar tomonidan ishlab chiqilgan bo'lib, bu usullar tozalash bosqichlarining turli-tumanligi va olinadigan toza preparatining miqdori hamda tozalik darajasiga qarab bir-biridan farq qiladi. Toza virus preparatini olish uchun differensial sentrifugalash, ultrasentrifugalash hamda gelfiltratsiya kabi usullardan foydalaniladi.

Sentrifuganing yaxshilab yuvilib quritilgan probirkalariga virusli eritmadan quyiladi, 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 qarama-qopqoqlari bilan germetik yopiladi (agar probirkalarning biri qo'l bilan bo'lsa, barobarlashtirish uchun shprits yordamida eritmadan tozalanadi).

Probirkalar sentrifuganing rotoriga bir-biriga qarama-qarshi qilib yopiladi. Rotor zich qopqoq bilan yopiladi va ultrasentrifuga kamerasiga o'rnatiladi (ultrasentrifuga rotorini o'rnatish va sentrifugani ishlatish probirkalar tomonidan bajariladi). Sentrifugalash 90 minut davomida 105000 g ga sentrifugalanadi.

Ultrasentrifuga to'xtagandan so'ng, rotordan probirkalar chiqarib olinadi, probirkaning eng tagida ozgina jigarrang virus cho'kmasi va tepasida cho'kma usti suyuqligi kuzatiladi. Cho'kma usti suyuqligi to'kib olinadi, virus cho'kmasi esa juda oz miqdordagi 0,01 M tris-HCl eritmasida (pH-7,6) eritiladi. Agar virus yaxshi tozalangan bo'lsa oq-

havorang kuzatiladi. Eritma 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'kma usti suyuqligining asosiy virus eritmasiga qo'shiladi va saqlanadi.

Shu differensial sentrifugalash sikli 3-4 marta qaytarilib, yetarlicha tozalangan virus preparati olinadi. Viruslarning o'lchamlari (10-600 nm) va zichliklari shundayki, agar ularga markazdan qochma kuchni 30000 dan 200000 xg ta'sir ettirilsa, virus zarralari cho'kmaga tushadi. Shu maqsadda preparativ ultrasentrifugalarning rotorlari daqiqasiga 50000-60000 marta aylanadiganlari 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 suyuqlikni 59000 xgda aylantiradigan rotorlardan 80-100 ml suyuqlikni 200000 xggacha aylantiradigan rotorlarga ega.

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

Hayvon viruslarini, bakteriofaglarini bir sikl differensial sentrifugalash bilan tozalash qiyin bo'ladi. Bunda avval har xil usullarda (masalan, ion almashish xromatografiyasi) virus tozalash bosqichlaridan o'tib, virusni katta hajmli suyuqlikdan kichik hajmga o'tkazishda ishlatilishi mumkin. O'simlik viruslarini tozalashda bu usul yaxshi samara beradi.

Virus tozalashning dastlabki bosqichi yig'ilgan virusli namunani gomogenizatsiya qilishdan boshlanadi. Bu jarayonda ishlatiladigan bufer turi va uning konsentratsiyasi virusni tozalashda muhim ahamiyat kasb etadi.

Masalan, KXVni tozalashda to'plangan virusli namunani gomogenizatsiya qilishda pH-7,5 0,1 M li yoki tarkibida 0,01 M li natriy tiosulfat va 0,01M li EDTA bo'lgan 0,2 M li fosfat buferidan (pH-7,5), ayrim hollarda tarkibida 0,01M li natriy askorbat bo'lgan 0,02 M li natriy borat (pH-8,2) buferidan foydalaniladi (Vahobov, 2004).

Keyingi bosqich virusni hujayradan chiqarish hamda hujayra devorini to'liq maydalash bo'lib, bunda ko'pchilik hollarda xloroform (1:8), triton X-100 yoki butanol kabi organik erituvchilardan, ba'zan suyuq azotdan foydalaniladi va 20 daqiqadan 1 soatgacha aralashtiriladi.

Ayrim usullarda virusli namuna gomogenizatsiya qilinib, to'rt qavat dokadan o'tkazilgandan so'ng, xloroform aralashtirishdan oldin 10000

aylanish tezligida 20 daqiqa sentrifuga qilinadi. Bu o'z navbatida hujayra komponentlari qoldiqlaridan virusli shirani tozalashga yordam beradi.

Keyingi bosqich virusli shirani hujayra komponentlaridan tozalash bo'lib, bu turli aylanish tezligida sentrifuga qilish orqali amalga oshiriladi. Masalan, Pfankuxe usulida virusli shira 3000 aylanish tezligida, qolgan hollarda esa 10000 aylanish tezligida 20 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma tashlab yuboriladi va virus tutuvchi cho'kma usti suyuqligi (ChUS) olinadi.

Undan keyingi bosqich virus konsentratsiyasini oshirish bo'lib, bu uddi tuzlar, 4% li PEG va NaCl, 25% li sulfat ammoniy yordamida yoki IEN, ya'ni pH-4,0 da cho'ktirish orqali, ayrim hollarda 5 ml qalinlikdagi 100mM li tris-HCl va 1 mM li EDTA (pH-8,0) da tayyorlangan 30% li saxaroza qatlamidan R30 (Beckman) rotorining probirkasida 3 soat 27000 ayl/daq.da sentrifuga qilish orqali amalga oshiriladi.

Ko'pgina hollarda virus konsentratsiyasini oshirishda PEG va NaCl (3%) yoki ammoniy sulfat (25%) kabi tuzlar solib eritilgandan so'ng 1 soat IEN da cho'ktirishda esa, virusli suyuqlikning pHi 4,0 ga to'g'rilanib 10 daqiqa sovutgichda saqlanadi va 9000-10000 aylanish tezligida 20-30 daqiqa davomida sentrifuga qilinib cho'kma olinadi. Virus IENda cho'ktirilganda yoki saxaroza yostiqchasidan o'tkazilganda ham xuddi qatlamidagi singari cho'kma olinib, cho'kma usti suyuqligi tashlab yuboriladi (Fayziyev, 2011).

Keyingi bosqich virusni ekstraksiya qilish bo'lib, bunda cho'kma 0,05 M li (pH-7,5) (1:10), 0,3 mM li fosfat buferida yoki 10 mM li tris-HCl va 10mM li EDTA yordamida (1:10) eritiladi, ayrim hollarda kechasiga sovutgichda +4°C da qoldiriladi. Sovutgichdan olingan virusli eritma 3000 aylanish tezligida 1,5-2 soat sentrifuga qilinib, virus tozalanadi yoki 10000-15000 aylanish tezligida 15-20 daqiqa sentrifuga qilingandan so'ng 15 soat davomida dializ qilinib tozalanadi. Boshqa usulda esa cho'kma usti suyuqligi 3% li granulalangan agar gelida gelfiltratsiya qilinib, KXVning tozalangan preparati olinadi (Vahobov, 2017).

Gelfiltratsiya usuli boshqa usullar ichida viruslarni tozalashning kam zararli ketadigan, ishonchli va yumshoq usuli ekanligi bilan bir qator afalliklarga ega. Bu usul moddalarning ajralishi, ularning molekulyar og'irligi va o'lchamiga asoslangan bo'lib, oqsil, virus, gormon, antibiotik, lipid va boshqa biopolimerlarni o'rganishda keng qo'llaniladi. Virus tozalashda turli konsentratsiyadagi agar-agar geli ishlatilgan bo'lib, uning ichida 3-5% li eritmasidan tayyorlangan gellar viruslarni tozalashda va aralash viruslarni ajratishda yaxshi samara beradi. Gelda

agar-agar miqdori oshgan sayin poralar o'lchami kichrayib boradi (Fayziyev, 2020).

Bir qator mualliflar gelfiltratsiya usulidan foydalanib toza virus preparatini olishga erishgan, ammo ular kolonkani to'ldirishda granulalangan agar gelidan hamda uzunligi 80 sm dan kam bo'lmagan kolonkalardan foydalanib, tozalash ishlari olib borgan. Bu usulda kolonkaga joylanadigan modda, ya'ni kolonka matriksi turli moddalarni ajratishda muhim hisoblanadi.

Bugungi kungacha gelfiltratsiya uchun dekstranli gellar (sefadeks), poliakrilamid geli (biogel R), agar va agarozadan (sefaroza, segaroza, biogel A), oxirgi paytlarda esa har xil porali mayda shisha donalar kabilardan foydalanib kelinmoqda. Bu moddalar bir-biridan moddalarning ajratish chegarasi bilan farq qilib, asosan ajratiladigan modda shakli va molekulyar massasiga qarab tanlab olinadi. Masalan, sefadeksning G-200 turi 200 kD m.m. gacha bo'lgan, agar-agar esa 1000 kD gacha bo'lgan makromolekulalarni ajratadi (Vahobov, 2004).

Mualliflarning ma'lumotiga qaraganda, organik erituvchilar bilan ishlov berilib, bir necha marta sentrifuga qilinib, tuz bilan kontsentratsion virus preparatida 50-60 kD m.m. gacha bo'lgan makromolekulalar qolishi isbotlab berilgan. Bundan ko'rinib turibdiki, sefadeks va agar-agar gellarini birga joylanishi kalta o'lchamli kolonkada ham toza virus preparatini olish imkoniyatini beradi. Bunda kolonkaning yuqoridagi ya'ni sefadeksdan iborat bo'lgan qismi 200 kD m.m. gacha bo'lgan moddalarni ushlab qolib, undan yiriklarini o'tkazib yuboradi, kolonkaning agar-agaridan iborat bo'lgan qismi esa 1000 kD m.m. gacha bo'lgan makromolekulalarni ushlab qolib undan yiriklarini o'tkazib yuboradi. Bizga ma'lumki KXVning m.m.si 35 000 kD ni tashkil etib, u har ikkala qavatdan ham hech qanday to'siqsiz o'tib ketadi va dastlabki fraksiyalarda kolonkaning erkin hajmida filtrlanib chiqadi (Fayziyev, 2011).

Bu usulda moddalarning bo'linishi quyidagi qonuniyatga asoslanadi: kolonkadan moddalar o'tganda faqatgina filtrlanmasdan, balki molekulyar og'irligi, o'lchami va shakliga qarab ajraladi. Shuning uchun yuvuvchi suyuqlik (elyuent) miqdori o'rganilayotgan modda o'lchami va shakliga bog'liq bo'ladi. Agar gel ustiga yirik va kichik m.m. ga ega bo'lgan moddalar aralashtirib solinsa, turli o'lchamdagi molekulyar geli elyuent bilan yuvilish jarayonida fraksiyalarga ajraladi. Bir qator yirik molekulyar oldinda, ya'ni kolonkaning erkin hajmi orqali harakatlanadi, undan so'ng esa kichik o'lchamdagi moddalar harakatlanadi. Shuning uchun har bir molekula gel poralari orasiga kirib, har xil tezlikda harakatlanadi va

olib, kolonkani yuvuvchi elyuentning turli fraksiyalarida molekulyar massaning kamayishi tartibida yuvilib chiqadi.

Bu sababdan, yirik molekulyalar "qoidadan tashqari", ya'ni gel poralari ichiga kirmaydi va ularning yonidan, granularni o'rab turgan suyuqlik orqali harakatlanadi, suyuqlik egallagan bu qism, kolonkaning erkin hajmi (V_0) hisoblanadi. Juda kichik molekulyalar esa gel poralari orasiga kiradi hamda ichki va tashqi suyuqlikda erkin harakatlanadi (Vahobov, 2017).

Sefadeks suvda erimaydi, ammo ma'lum miqdorda suvni o'ziga tortib oladi. Uning granulari sharsimon shaklda bo'lib, suvda erimaydigan sefadeks turiga qarab, gelfiltratsiyada 10-200 kD m.m. gacha bo'lgan makromolekulalarni ajratishda yaxshi samara beradi. Uning bir qator turlari (G-10, G-15, G-50, G-100, G-200) ma'lum bo'lib, ular bir-biridan suv shimish miqdori va moddalarni ajrata olish chegarasi bilan farq qiladi (Fayziyev, 2020).

1961-yili Polson gelfiltratsiya uchun agar gelini taklif qildi, bunda juda katta m.m. ega bo'lgan makromolekulalar, jumladan viruslar va bakteriya qismlarini ham ajratish mumkinligini isbotladi.

Gelfiltratsiya uchun ishlatiladigan agar-agar moddasi dengiz suvo'ti (Laminaria) dan olinadi. Agar-agar ikki qismdan: agaroz va agaropektindan iborat. Agaroz neytral polisaxarid, agaropektin zaryadli polimer ega. Agaroz kabi agar ham gelfiltratsiyada virus tozalashda ishlatilganda, elyuentga 0,1 M KCl qo'shib ishlatilsa viruslar gelga qo'yib qolmaydi. Arakining aniqlashicha, toza holda ajratilgan agaroz va agar qator polisaxaridlar: D-galaktoza va 6-6-angidro-L-galaktoza qatag'idan iborat (Vahobov, 2004).

Agar-agar qaynayotgan suvda juda tez suyuqlanadi, gidrofob muhitda (suv va suvda) esa sovutilganda eritmadagi agar miqdoriga qarab har xil suyuqlikdagi va turli xil porali gel holatiga keladi hamda viruslarni tozalashda yaxshi samara beradi, ayniqsa $20-50 \times 10^6$ m.m. ga ega bo'lgan viruslarni toza preparatini olishda 3% granulalangan agar-agar, 5% gelda 10^6 m.m. li viruslarni tozalashda, 1,5-2% lari esa tayoqchasimon viruslarni sortlarga ajratishda samarali qo'llash mumkin.

Kerakli materiallar: kartoshkaning X virusi, yaltirbosh mozaikasi virusi (m.m. 4×10^6), TMV (m.m. 40×10^6), arpaning Viner navi hamda oldingi mashg'ulotda ishlatilgan materiallar.

Xromatografiya kolonkasini tayyorlash. Mashg'ulot xuddi oldingi mashg'ulotdagidek olib boriladi, ammo gel kolonkasining uzunligi 80-90 sm bo'lishi yaxshi natija beradi. Elyuent ishlatilganda ham aralashmani

tashkil qilayotgan ikkala viruslar uchun optimal bufer olinadi. TMV va YAMV uchun pH-6 bo'lishi ikkala virus uchun ham bexavotirroq hisoblanadi. YAMVni gelga qisman adsorbsiyasining oldini olish uchun buferga 0,1 M KCl solinadi. Gelfiltratsiya tugashi bilan yana ikkala virus fraksiyalarini o'zlari uchun optimal bo'lgan pHga o'zgartiriladi, ya'ni TMVni pH 7,5ga ko'tarilsa, YAMVning pH 4,8 ga tushiriladi.

Ishning borishi. Uzunligi 1,2×80-90 sm uzunlikdagi 5% li granulalangan agaroz kolonkasini 3 hajm 0,05 M fosfat buferi (pH 6-6,2) bilan yuvilgandan so'ng TMV-YAMV aralashmalaridan 50 mg ni (1-2 ml 0,05 M fosfat buferidagi) kolonkaga solinadi, virus aralashmalari filtr orqali gelga diffuziya bo'lishi bilan pH 6,2, ga teng bo'lgan 0,05 M fosfat buferiga teng bo'lgan 0,05 M fosfat buferi bilan yuvish boshlanadi.

Kolonkadan chiqadigan fraksiyalar kollektorda 3 mldan yig'ib olinadi. Gelfiltratsiya o'tkazish tezligi 6-8 tomchi/min yoki undan ham sekinroq qilib moslanadi. Gelfiltratsiya 10-14 soat davom etadi. Olingan fraksiyalar ya'ni geldan filtrlanib chiqqan virusli preparat quyidagi bosqichlarda analiz qilinadi.

1. Xuddi oldingi mashg'ulotdagidek fraksiyalarni 260 nm va 280 nm to'liq uzunligida UB-nurlarni yutishi aniqlaniladi, ikki cho'qqiga ega egri chiziq olinadi. Birinchi cho'qqini 260/280 nisbati 1,2 ga va ikkinchi cho'qqiniki 1,6-1,7 ga teng (tarkibida 20% atrofida RNKga ega nukleoproteidlarni UB - nurlarini ikki to'liq uzunligida yutish natijalari nisbati 1,6 ga teng hisoblanadi) bo'ladi.

2. Ikki cho'qqi fraksiyalarini UB-spektrlarida UB nurlarini yutish cho'qqisi 260 nmga to'g'ri keladi, minimumi 245 nm.

3. Ikkala fraksiya viruslarini elektron mikroskopda ko'rilganda birinchi cho'qqi fraksiyalarida faqat spiralsimon viruslar bo'ladi.

4. Birinchi cho'qqi fraksiyalari *N. glutinosa* o'simligida (48 soatdan so'ng) nekrozlar hosil qiladi, ikkinchi fraksiya esa *Chenopodium amaranticolor* o'simligida nekrozlar hosil qiladi.

5. Birinchi cho'qqi fraksiya viruslari TMVga tayyorlangan antizardob bilan, ikkinchi cho'qqi fraksiyasi viruslari YAMVga tayyorlangan virus antizardobi bilan pretsipitatsiya chizig'ini hosil qilsa, demak TMV va YAMV to'la ikki cho'qqi fraksiyalariga ajralganligi haqida fikr yuritiladi.

Demak, 5% li granulalangan agaroz kolonkasida ikki xil shaklli viruslarni to'liq ajratish mumkin.

Nazorat savollari

1. Toza virus preparati olishning qanday ahamiyati bor?
2. Viruslarni toza preparatini olish usullariga qaysi usullar kiradi?
3. Gelfiltratsiya usulini izohlang!
4. Viruslarni geldan o'tkazishda e'tibor berilishi kerak bo'lgan omillar nima?
5. Ultracentrifugalash yordamida toza virus preparatini olish qanday amalga oshiriladi?
6. Fizik virus zarrasi deyganda nimani tushunasiz?
7. Yuqumli virus zarrasi deyganda nimani tushunasiz?
8. Preparatning tozalik darajasini qanday aniqlash mumkin?

Ulaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar:

« AQLIY HUJUM » metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi fikrlash, hozirjavoblik, axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarida, mustahkamlashda, o'qilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

Topshiriqlar

1. Toza virus preparati deyganda nimani tushunasiz?
2. Toza virus preparatini olishda qanday usullardan foydalanish mumkin?
3. Gelfiltratsiya usuli yordamida qanday qilib toza virus preparatini olish mumkin?
4. Fizik-kimyoviy usullar yordamida toza virus preparatini olish qanday amalga oshiriladi?
5. Differensial sentrifugalash yordamida toza virus preparati qanday amalga oshirilishini izohlab bering.

15-laboratoriya mashg'uloti

Toza virus preparatining miqdori va tozaligini aniqlash

Darsning maqsadi: talabalarni toza virus preparati miqdorini aniqlash usuli bilan tanishtirish.

Kerakli jihozlar: spektrofotometr, pipetkalar, toza virus preparati va boshqalar.

Nazariy tushuncha. Toza virus preparati deyilganda virus zarrasidan holi bo'lgan preparat tushuniladi. Uning miqdorini o'rganishning bir qator usullari mavjud bo'lib, bu usullar virus turi, laboratoriya sharoiti kabilarga bog'liq holda tanlab olinadi.

O'simlik viruslari miqdorini aniqlashning eng sodda usuli - nekrotik alomatlar hosil qiladigan test indikator o'simliklardan foydalanish hisoblanadi. Masalan, TMV preparatidagi miqdorini aniqlash uchun undan bir tomchi (0,1 ml) olinib, bir nechta *Nicotiana glutsinosa* o'simligi bargiga mexanik inokulyatsiya qilib, unda hosil bo'lgan nekrozlar soniga qarab hisoblab topiladi.

Bundan tashqari, preparatdagi virus miqdorini aniqlashning yana bir usuli – bu spektrofotometriya usuli hisoblanib, buning uchun virusli preparatdan ma'lum miqdorda olinib, spektrofotometrik tahlil qilinadi. Bunda preparat 245-310 nm oralig'ida o'lchanadi va bu ko'rsatkichlarning ichidan 260/280 nisbati virusning tozalik darajasini ko'rsatib beradi. Bu ko'rsatkich har bir viruslar guruhi uchun individual hisoblanib, masalan, spiral simmetriya asosida tuzilgan viruslar uchun 1,2 ni tashkil etadi.

Virus miqdori spektrofotometrik usulda ularning nur yutish ko'rsatkichi, ya'ni $E_{260}^{0,1\%}$ 1 sm da UB-nurini yutish koeffitsenti asosida aniqlanadi. Bu har bir virus uchun induvidial hisoblanib, masalan, KXV ning $E_{260nm}^{0,1\%}$ $1cm \approx 2,8$ ni, 260/280 nisbati esa 1,2 ni tashkil etadi (Vahobov, 2004).

Ishning borish tartibi

Toza virus preparatining miqdorini va tozalik darajasini aniqlash quyidagi bosqichlarda olib boriladi:

- toza virus preparatidan 0,3 ml olinib, unga 2,7 ml bufer solinadi va preparat 10 marta suyultirib olinadi;

- suyultirilgan preparatdan spektrofotometriya kyuvetasiga mo'ljellandirilgan miqdorda virus preparati solinadi va spektri olinadi;

- buning uchun dastlab spektrofotometr qurilmasi 10-20 daqiqa oldin qizdirish uchun yoqib qo'yiladi;

- nazorat kyuvetasiga suyultirilgan bufer solinadi va preparatning 40 nm dan 310 nm gacha bo'lgan spektri olinadi;

- virus preparatining miqdorini spektrofotometrik usulda ularning nur yutish ko'rsatkichi, ya'ni $E_{260}^{0,1\%}$ 1 smda UB-nurini yutish koeffitsenti asosida aniqlanadi. Bunda har qanday virusning avvaldan aniqlangan ekstinksiyasi asos qilib olinadi, masalan, KXV ning $E_{260nm}^{0,1\%}$ $1cm \approx 2,8$ ni tashkil etadi. Buning uchun 260 nmdagi optik ko'rsatkich olinib, virusning miqdori oddiy proporsiya asosida hisoblab topiladi;

- viruslarning tozalik darajasini spektrofotometriya usuli yordamida aniqlash uchun uning 260/280 ga nisbati asos qilib olinadi, bu ko'rsatkich viruslar simmetriyasiga va morfologiyasiga qarab bir-biridan farqlanadi. Spektrofotometrik o'lchashlar natijasida 260/280 ning nisbati 1,2 ni tashkil qiladi, bu ko'rsatkich spiral simmetriya asosida tuzilgan viruslar uchun tozalik ko'rsatkichini bildiradi, agar bu ko'rsatkich yuqori chiqsa, virus preparatida boshqa aralashmalar mavjudligidan, ya'ni virus preparati toza ekanligidan dalolat beradi;

- bundan tashqari preparatning tozalik darajasini aniqlash uchun virusga tayyorlangan spetsifik zardob olinib, ikkiyoqlama immunodiffuziya usuli yordamida aniqlanadi. Buning uchun shisha plastinka yuzasida hosil qilingan radial chuqurchalarning birinchisiga tozalangan preparat, keyingilariga esa fraksiyalar ketma-ketligida solib boriladi hamda uni xona sharoitida nam kameraga joylab qo'yiladi. Har soat o'tgandan keyin kuzatish ishlari olib boriladi, natijada birinchi tozalangan preparat orasida hamda spektrofotometriya usuli yordamida pik chiqqan fraksiyalar orasida presipitatsiya chizig'i paydo bo'lib, undan keyingi fraksiyalar orasida presipitatsiya chizig'i paydo bo'lmasa, unda virusli preparat gomogen ekanligidan dalolat beradi.

Nazorat uchun savollar

1. Toza virus preparatini tozalik darajasiga qanday talablar qo'yiladi?
2. Toza virus preparatining tozalik darajasi qanday aniqlanadi?
3. Virus preparatining tozalik darajasini qanday qurilma yordamida aniqlash mumkin?
4. Immunologik usullar yordamida virus preparatining tozalik darajasi qanday aniqlanadi?
5. Indikator o'simliklar usuli yordamida virus preparatining tozalik darajasi aniqlash mumkinmi?
6. Virus preparatining tozalik darajasini aniqlash bosqichlari nimadardan iborat?

7. Virus preparatining tozalik darajasi nimalarga qarab aniqlanadi?
8. KXV toza preparatining tozalik kriteriyalari nimalardan iborat?

16-laboratoriya mashg'uloti

Viruslarning nuklein kislotasi va oqsilini ajratib olish usullari

Darsning maqsadi: talabalarni viruslarning nuklein kislotasini ajratib olish metodi bilan tanishtirish.

Kerakli jihozlar: spektrofotometr, pipetka, probirka, suv hammomi, toza virus preparati, virus preparatini denaturlash uchun SDS, fenol va boshqalar.

Nazariy tushuncha. Viruslarning strukturasi nazariy jihatdan o'rganish uchun ular tarkibiy qismlarga ajratiladi. Ma'lumki, virus zarrasi tarkibida oqsil va nuklein kislota mavjud. Undan tashqari, qator viruslarda (miksoviruslar va hokazo) uglevod va lipidlar ham uchraydi.

Eng sodda tuzilishga ega tamaki mozaikasi virusining tuzilishi bilan tanishadigan bo'lsak, uning uzunligi 3000, eni 180 A ga teng. Virusning molekulyar massasi 40×10^6 ga teng. Virus tarkibida molekulyar massasi bir xil 18000 bo'lgan oqsil va molekulyar massasi 210^6 bo'lgan nuklein kislotasi bor. Bu nuklein kislota virus oqsili bilan muhofaza qilinadi. Virus zarrasi ichida spiralsimon joylashgan bitta nuklein kislotasi, uning atrofida esa 2200 subbirliklardan tashkil topgan oqsil pardasi bor. Oqsil subbirliklar ham virus zarrasi o'qi atrofida spiralsimon joylashgan. Virus zarrasining 95% ni oqsil, 5% ni esa nuklein kislota tashkil qiladi. Ammo nuklein kislota miqdor jihatdan kam bo'lsada, virus zarrasining xususiyatlari unga bog'liq bo'ladi.

Qator viruslarda nuklein kislota virus zarrasining har xil qobig'idan fazoviy ajralgan bo'ladi. Ularga ko'pgina o'simlik viruslari, polioviruslar, T-guruhiga mansub bakteriofaglar kiradi. Boshqa bir guruh viruslarda (miksoviruslar, chechak viruslari kabi) nuklein kislota oqsil bilan mustahkam bog'lanib ichki nukleoproteid hosil qiladi. Shuning uchun ham virus zarralari dezintegratsiya qilish ishlarida uch xil metodda olib boriladi:

Bu mavzudagi to'liq ma'lumotni Kiselyov va Dobrovlarni (1970) adabiyotlaridan olish mumkin. Biz bu yerda ulardan foydalanib qisqacha tavsif beramiz.

Virus nuklein kislotalarini ajratish

Virus nuklein kislotasi virus zarrasining markaziy qismini egallaydi, boshqa qismi oqsil qobig'i bilan o'ralgan.

Virus nuklein kislotasining xususiyatlarini o'rganish uchun uni virus zarrasidan ekstraksiya qilib olish kerak. Shu maqsad bilan virus zarrasidagi oqsil qobig'i orasidagi hamda oqsil va nuklein kislota zarrasidagi vodorod bog'lariga, tuz bog'lariga va boshqa tipdagi bog'larga ta'sir etuvchi birikmalarni qo'llash kerak.

1. Yuqori haroratda tuzli eritmalar yordamida virus nuklein kislotasini ekstraksiya qilish. Bu usul fitoviruslar RNKlarini ajratishda qo'llaniladi. RNKning umumiy ajratish miqdori virus zarralarining bir qismini parchalanmasligi sababli ancha kam bo'ladi. Suv hammomidagi 0.1 M li NaCl eritmasiga oxirgi konsentratsiyasini 10-15 mg/ml dan boshlab TMV suspenziyasini 100°C da 1 minut saqlanadi va muz hammomiga o'tkaziladi. Sovutilgandan so'ng suspenziya 5000-10000 gda sentrifuga qilinib, koagulyatsiyaga uchragan oqsildan ajratiladi. RNK ning qolgan tuzi sovuq sharoitda dializ qilinib tuzdan ajratiladi yoki etanol bilan ikki marta cho'ktiriladi.

Mualliflarning ko'rsatishicha, bu usulning modifikatsiyasi ham bo'lib, tamaki sariq mozaikasi virusi va tamakining halqali dog'lanish viruslariga qo'llanilgan. Bunda NaClning konsentratsiyasi 1M gacha oshiriladi, suspenziya konsentratsiyasi esa 5-10 mg/ml gacha pasaytiriladi, qizdirish vaqtidati 35 soniyaga kamaytiriladi. Qolgan jarayonlar yuqoridagidek bajariladi.

Bu usul hayvon viruslaridan gripp va Raus sarkomasi viruslariga qo'llanilgan. Avval ikkala virusga ham xloroform va metanol aralashmasi (1:1) bilan, so'ngra esa normal butanol va ikki marta efir bilan ishlov beriladi. RNKni ajratish uchun 10% li NaCl eritmasi bilan 100°C da 20 daqiqa davomida bir martadan uch martagacha ekstraksiya qilinadi. Bu usulni Fx174 bakteriofagidan DNK ajratish uchun ham tadbqiq qilinadi.

Bu usulning kamchiligi shundaki, 100°C da qizdirish jarayonida ko'pgina virus RNKlari nativ (birlamchi) xususiyatlarini yo'qotishi, DNK zarrasi denaturatsiyaga uchrashi mumkinligidir.

2 Detergentlar ishlatish usuli. Avvalo bu usulning anchagina ijobiy xususiyatlari bor, chunki virusga 100°C da ishlov berish, kuchli chayqatish tabii ta'sirlar qilinmaydi. Ammo 100 % virus zarralari parchalanmaydi, shuning uchun qo'shimcha fenol bilan ishlov beriladi. Detergentni o'zi bilan ishlov berib ham yuqori sifatli toza TMV ning RNK si ajratilgan.

Detergent sifatida natriy dodetsil sulfati (dyupanol S, DDS) natriy lauril sulfat, natriy dezoksixolat, sitrimid ishlatiladi.

Polioma virusidan DNK ajratish uchun virus differensial va gradient sentrifugalash usullari bilan tozalanadi. So'ngra virus suspenziyasi va 10% li DDS (pH-7) barobar hajmda aralashtiriladi va 2 soat davomida 65°C da isitiladi. Ammoniy atsetatining oxirgi konsentratsiyasi 0,1 M gacha qilib qo'shiladi va DNK ni 2 hajm etanol solib cho'ktiriladi.

Shop papilloma virusining DNKsi ham detergent usul bilan ajratilgan.

3. Detergent va tuz yordamida ekstraksiyalash usullarini birgalikda qo'llab RNK ajratiladi, chunki birgina usul ishlatilganda nuklein kislota kam ajraladi. Ikkala usul birgalikda ishlatilganda RNK miqdori oshadi.

Virusning suvli eritmasiga (10 mg/ml) 1/4 hajm 10% li DDS solinadi. Aralashma 100°C haroratda to'rt daqiqa davomida qizdiriladi, so'ngra muz hammomida sovutiladi. Detergentning asosiy qismi dializ yordamida yo'qotiladi. So'ngra oxirgi konsentratsiyasi 1 M bo'lguncha NaCl qo'shiladi. Aralashma 100°C haroratda uch daqiqa davomida isitiladi, sovutiladi, denaturatsiyalangan oqsil sentrifugalab yo'qotiladi, RNK esa etanol bilan cho'ktiriladi.

4. Fenol yordamida ajratish. Bu usuldan turli xil viruslardan nuklein kislota ajratishda foydalaniladi. Virusli suspenziya suvga to'yingan fenol bilan yaxshilab chayqatilgandan so'ng sentrifugalanganda aralashmani 2 fazaga ajralganligi kuzatiladi.

Denaturatsiyalangan oqsil pastki (fenol) fazaga o'tadi yoki interfazada cho'kmaga tushadi, nuklein kislota suvli fazada qoladi. Bu usul birinchi marta Shuster tomonidan nuklein kislotalarni ajratishda qo'llanilgan. TMVning RNKsi xuddi shu usulda ajratiladi. Keyinchalik poliomielit, kartoshkaning X-virusi, bodring mozaikasi virusi, RNK tutuvchi hasharot viruslari va DNK tutuvchi bakteriofaglar T2, T4 va Fx174 larning nuklein kislotalari ajratiladi.

5. Detergent va fenol bilan ekstraksiyalash usullarini birgalikda qo'llash. Virusli suspenziyani fenol bilan ekstraksiya qilishdan oldin virus zarralari detergent bilan (DDS) parchalanadi. Tomat tupini pakanalashishi virusining RNKsi ushbu usul yordamida ajratilgan. Yashur virusining RNKsi, F x 174 bakteriofagining DNKsi kabilarning nuklein kislotalarini ajratishda ushbu usuldan foydalanilgan.

6. Nuklein kislotalarni ajratishda fermentlarning ishlatilishi. Nuklein kislotalarni ajratishdagi eng qiyin jihat ularni virus oqsillaridan ajratishdir. Oqsillarga proteolitik fermentlar yordamida ishlov berib, so'ngra detergent va fenol bilan ishlov berish kerak. Ferment sifatida

panaza (ospovaksina virusining DNKsini ajratishda) hamda papain adenoviruslar DNKsini ajratishda) ishlatiladi.

Yuqoridagi usullardan tashqari yana bir qancha boshqa usullar ham mavjud bo'lib, ularning birorta universali yo'q, har bir virus uchun aniq usul ishlab chiqish zarur.

Virus oqsillarini ajratish

Virus oqsillarini ajratish uchun ishlatiladigan usul oqsilning birlamchi strukturalarini saqlaydigan, ikkilamchi va uchlamchi strukturalarini buzsa ham qayta tiklanish jarayoni oson bo'lishi kerak. Avvaldan to'rtlamchi strukturalarni buzish virus zarralarini kislota, ishqor yoki detergent yordamida amalga oshiriladi. Ba'zan mochevina yoki oqsil tabiatli addalar ham ishlatiladi.

1. Ishqor yordamida yumshoq usulda virus oqsilini ajratish. Virus preparatini sovuqda ishqoriy muhitda (pH=10-10,5) inkubatsiya qilish, undan 90000-100000 molekulyar massaga teng A-oqsilini ajratishga olib boriladi.

Parallel ravishda RNK oligonukleotidlarga gidrolizlanadi. Ishqoriy muhit borat, karbonat va glitsin buferlari yordamida yaratiladi. Ba'zi amin qitlari (etanolamin) ham ishqoriy buferlarga o'xshash samara beradi.

TMVdan oqsil ajratish uchun 10 mg/ml konsentratsiyali virus suspenziyasi sellofan qopchasiga solinadi va 0,1 M karbonat buferida 4°C (pH 10,5) 2-5 kun dializ qilinadi. Parchalanmagan virus sentrifugalash yordamida bir soatda 105000 gda ajratiladi. Cho'kma tashlangandan so'ng cho'kma usti suyuqligiga teng hajmda to'yingan ammoniy sulfat solinadi. Cho'kmaga tushgan oqsil 5000 gda sentrifugalanadi, so'ngra suvda suspenziyalanadi.

Oqsil yana ikki marta ammoniy sulfat bilan cho'ktiriladi. 4°C da suvda dializ qilinadi. Suv dializ davomida bir necha marta almashtiriladi. Dializ oxirida muhit pHi 7,0 ga keltiriladi, so'ngra 60000-100000 gda sentrifuga qilinadi va yirik zarrachalar yo'qotiladi. Olingan oqsilning ultrabinafsha nurlarini maksimum yutishini minimum yutishiga nisbati: $A_{260}/A_{280}=2,4$ bo'lishi bilan tavsiflanadi.

2. Virus oqsilini kislota bilan ekstraksiyalash usuli. Viruslarning ishqorga nisbatan o'ta chidamlilari ham bor. Bunday hollarda virus zarralarini buzish uchun kislotadan foydalaniladi. Virusning suvli eritmasiga 10-30 mg/ml ikki hajm sovutilgan sirka kislotasini aralashtirib olingan holda quyiladi. Cho'kmaga tushgan nuklein kislota sentrifuga yordamida ajratiladi, cho'kma usti suyuqligidagi oqsil 2-3 kun davomida

4°C li suv yordamida dializ qilinadi. Dializ qopchasidagi oqsil ajratib olinib sentrifugalanadi. Cho'kma qaytadan suvda eritiladi, oqsilning pH suyultirilgan ishqor bilan pH 8,0 ga keltiriladi. Oqsil eritmasi 100000 gda 1 soat davomida sentrifugalanib parchalanmagan virus va denaturatsiyaga uchragan oqsildan ajratiladi. Cho'kma ustidagi oqsil eksperiment (tajriba) larda ishlatilishi mumkin.

3. Issiq tuzli eritmalar yordamida virus oqsilini ajratish usuli. Bu usul beda mozaikasi virusi kabi 81 % oqsil va 19 % RNKli tayogchasi mo' virusdan oqsil subbirliklarini ajratib olishda ishlatiladi. 0,01 M li fosfat buferidan (pH-7,0) virusli suspenziyaga (130 mg) teng hajmda 2 M NaCl solib aralashtiriladi va 20 daqiqa 45°C da inkubatsiya qilinadi.

Ajralib chiqqan oqsil eruvchanligi pastligi sababli eritma loyqalanadi, yigirma daqiqadan so'ng eritma sovutiladi va sentrifuga qilinadi. Oqsil cho'kmaga tushadi, RNK va uning parchalangan bo'laklari cho'kma usti suyugligida qoladi. Cho'kma 1 M NaCl bilan yuviladi va sentrifugalanadi. Cho'kmadagi oqsil 0,01 M fosfat buferi (pH-7) hamda 0,005 M DDT ishtirokidagi eritmada eritiladi. Eritma 24 soat isitilgan suvda dializlanadi, oqsil esa 0,66 hajmdagi to'yingan ammoniy sulfati bilan cho'ktiriladi. Cho'kma qaytadan 0,05 M DLS tutuvchi fosfat buferida qaytadan eritiladi va 4 soat davomida 0,005 M DDS tutuvchi fosfat buferida dializlanadi. Shu usulda ajratilgan oqsilning molekulyar massasi 34000 tashkil qiladi, oqsil serologik faolligini to'la saqlaydi.

4. Fenol yordamida ekstraksiya qilish usuli. Ba'zi viruslar oqsilini (TMV) fenol fazasidan yoki interfazadan maxsus ishlov berib ajratib olish mumkin. Buning uchun suvli faza ajratib olingandan so'ng fenol fazasiga va interfazaga (nuklein kislotalarni fenol bilan ajratish bo'limiga qaralsin) 5-10 hajm metanol va 2-3 hajm natriy asetat kristalidan solinadi. Cho'kma sentrifuga qilib ajratib olinadi va 3 marta metanol, 1 marta efir bilan yuviladi. Olingan oqsil havoda quritiladi va suvda eritiladi (10mg, 5ml suv), so'ngra 60-80°C da (pH 0,02 M NaOH bilan 7,5 ga keltiriladi) qizdiriladi. Shunday sharoitda oqsil eriydi.

Nazorat savollari

1. Virus zarrasini denaturatsiyalash qanday amalga oshirilishini izohlab bering.
2. Virus zarrasini denaturatsiyalashda qanday usullardan foydalaniladi?
3. Qanday moddalar virus zarrasini parchalishi mumkin?

4. Fenol yordamida virus nuklein kislotasini denaturlash qanday amalga oshirilishini izohlab bering.

5. Issiq tuzli eritmalar yordamida virus oqsilini ajratish qanday amalga oshiriladi?

6. Virus oqsilini kislota yordamida ajratish qanday bosqichlarni o'z ichiga oladi.

7. Ishqor yordamida yumshoq usulda virus oqsilini ajratish qanday amalga oshiriladi?

8. Virus nuklein kislotalarini ajratishda qanday fermentlardan foydalaniladi?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «FSMU» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash, o'z qadri axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda, o'qilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»	
F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Viruslar qismlarini alohida o'rganishning ahamiyatini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering.
2. Viruslarda nuklein kislotaning qanday turlari mavjud va nima sababdan bunday ekanligini FSMU texnologiyasi yordamida izohlab bering.

17-laboratoriya mashg'uloti

Pretsipitatsiyaga asoslangan diagnostika usullari va ularning ishlash prinsipini o'rganish

Darsning maqsadi: pretsipitatsiyaga asoslangan diagnostika usullari haqida ma'lumot olish va ularning ishlash prinsipini o'rganish.

Nazariy tushuncha. Antigen bu har qanday kimyoviy modda bo'lib, u organizmga kiritilganda antitanalarni ishlab chiqaradi, ular bilan aniqlanadigan tarzda reaksiyaga kirishadi.

Antitanalar - umurtqali hayvonlar tanasidagi diskret moddalar bo'lib, ular maxsus reaksiyaga kirishadigan begona moddalar (antigenlar) tomonidan stimulyatsiyaga javoban limfoid hujayralar tomonidan chiqariladi. Antigen va antitana o'rtasidagi o'zaro ta'sir noyob kimyoviy jarayondir.

Epitop va **paratop** o'rtasidagi ko'plab kovalent bo'lmagan o'zaro ta'sirlar antitana va antigen o'rtasidagi javobda ishtirok etadi. Epitop Ag bilan bog'lanish joyidir, paratop esa Ab bilan bog'lanish joyidir.

Serologiya - antigen va antikor o'rtasidagi reaksiyani o'rganadigan fan.

Serologik tasniflarga **presipitatsiya**, **agglyutinatsiya**, **komplement fiksatsiyasi**, **neytrallash**, **immobilizatsiya** va **intradermal** reaksiyalar kiradi.

Serologiya qon zardobini o'rganadigan ilmiy fandır.

Antigen-antitana reaksiyasi - bu antigen va antitana o'rtasidagi noyob javobni tavsiflovchi asosiy immunologik javob.

Immunologiyadagi kelib chiqadigan reaksiyalar antigenlar va antitelalarning o'zaro ta'siriga asoslanadi.

Ular ikkita eruvchan reaktivning birikmasiga asoslanib, cho'kma, erimaydigan mahsulot hosil bo'ladi. Antigen va antikor o'rtasidagi o'zaro ta'sir noyob kimyoviy jarayondir. Tegishli nisbatlarda antigen va antikor mavjudligi paydo bo'lgandan so'ng, panjaralar (o'zaro bog'lanishlar) hosil bo'ladi.

Pretsipitatsiya reaksiyasi prinsipi

Antigen va antitanalar aminokislotalar komplekslaridan iborat bo'lib, ularning yuzasida o'ziga xos, ammo qarama-qarshi tartibda joylashgan ijobiy va manfiy qutb guruhlar mavjud.

Antigen va mos keladigan antitana molekulalari aralashganda, elektr tortishish va itarish sodir bo'ladi, natijada tegishli antigen va antitana

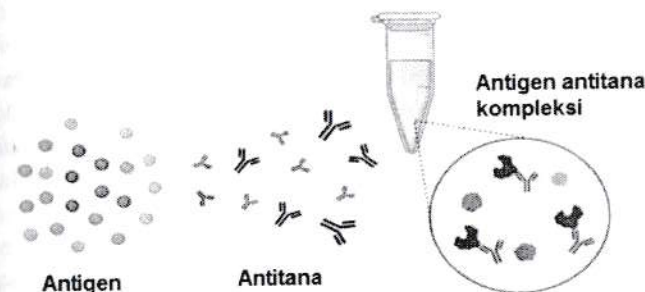
molekularining molekulyar shakllari va elektr zaryadlari bo'yicha o'ralishi bo'ladi va shu bilan mutlaq mos shakl va qolip hosil qiladi.

Cho'kma reaksiyalarida eruvchan antigen IgG yoki IgM antitanalari bilan reaksiyaga kirishib, panjaralar deb nomlanuvchi massiv o'zaro bog'langan molekulyar agregatlarni hosil qiladi.

Ikki alohida faza pretsipitatsiya reaksiyalarini o'z ichiga oladi. Antigenlar va antitanalar tezda kichik antigen-antitana komplekslarini hosil qiladi. Antigen-antitana komplekslari bir necha daqiqadan bir necha soatgacha davom etishi mumkin bo'lgan sekinroq reaksiyada eritmadan cho'kma panjara hosil qiladi. Cho'kma reaksiyalari faqat tegishli antigen-antitana nisbatida sodir bo'ladi.

Diagrammada ko'rsatilganidek, har qanday komponentning ortiqcha miqdori bilan ko'rinadigan cho'kma yo'q. Alohida antigen va antikor miqdorlari yonma-yon joylashtirilsa va birgalikda tarqalishiga ruxsat berilsa, optimal nisbatga erishiladi.

Ekvivalent zonasi to'liq cho'kma sodir bo'lgan antigen va antitana konsentratsiyasini ko'rsatadi (3-rasm).



3-rasm. Pretsipitatsiya reaksiyasining umumiy prinsipial sxemasi

Prozon hodisasi

Ideal antigen-antitana reaksiyasi faqat antigen va antitanaga nisbati teng bo'lganda sodir bo'lishi mumkin (ekvivalent zona).

Ekvivalent zonaning har ikki tomonida antigen yoki antikorning ortiqcha bo'lishi yog'ingarchilikni oldini oladi.

Ortiqcha antitanalar zonasi **prozon fenomeni**, antigenning ortiqcha zonasi esa **postzona fenomeni** deb ataladi.

Panjara gipotezasi 1934-yilda Marrak tomonidan prozona hodisasini tushuntirish uchun kiritilgan. Marrak gipotezasiga ko'ra, har bir antikor

molekulasi kamida ikkita bog'lanish joyiga ega bo'lishi kerak va antigen multivalent bo'lishi kerak.

Pretsipitatsiya reaksiyalarining turlari

Pretsipitatsiya reaksiyalari ko'pincha uch toifaga bo'linadi:

- eritmadagi pretsipitatsiya;
- agardagi pretsipitatsiya;
- agarda elektr maydon bilan pretsipitatsiya.

1. Eritmadagi cho'kma.

Eritmadagi pretsipitatsiya halqa va flokulyatsiya sinovlari bilan tasvirlangan.

A. halqa testi

Ushbu protsedura uchun probirkadagi antizardobga antigen eritmasi quyiladi. Antizardob eritmasida antigen va antitanalar orasidagi cho'kma ikki suyuqlik qatlami chegarasida cho'kma halqasining shakllanishi bilan tavsiflanadi. C-reaktiv oqsil (CRP) va streptokokklarni tasniflash uchun Lancefield usuli halqa testlariga misoldir.

B. Flokulyatsiya testi

Flokulyatsiya testi shisha idishda yoki probirkada amalga oshirilishi mumkin. Idish flokulyatsiyasi testiga misol sifatida sifilida reaksiya antitanalarini aniqlash uchun VDRL testi hisoblanadi.

Ushbu testda VDRL antigeni suspenziyasining bir tomchisi benzi zardobining bir tomchisiga qo'shiladi va natija VDRL shaykerida idishni silkitish orqali qayd etiladi.

2. Agar cho'kmasi.

Ushbu testda reagentlar gelga yuboriladi va antigen-antitana birikmasi diffuziya orqali sodir bo'ladi.

Diffuziya tezligiga zarrachalar hajmi, harorat, gelning yopishqoqligi, gidratsiya darajasi va matritsa-reagent o'zaro ta'sir qiladi.

Agarning 0,3% dan 1,5% gacha bo'lgan konsentratsiyasi ko'pchilik reagentlarning tarqalishini ta'minlaydi.

3. Elektr maydonida agarda pretsipitatsiya reaksiyasi.

Bu reaksiya moddalarning diffuziyasiga asoslanadi, lekin oqim yoki elektr maydoni qo'shilishi bilan antitanalar va antigenlarning tezroq o'zaro ta'siri uchun geldagi harakat tezligini oshiradigan qo'shimcha kuch beradi.

Immunoэлектрофорез uchun elektr ta'minoti bilan электрофорез to'plami, bufer, agaroz geli, antigen va antitana eritmaları, shisha idishlar.

A. Immunoэлектрофорез (Immunodiffuziya va электрофорез)

Buni agar gelida bajarish mumkin, bunda elektr maydon mavjud bo'lganda reaktivlarning bir-biriga nisbatan tezroq harakatlanishi natijasida biziqlari hosil bo'ladi. Antigenlarning harakatiga ularning kattaligi yoki zaryadi ta'sir qiladi. Immunoэлектрофорез qo'llanilishi odamlarning zardobida mavjud bo'lishi mumkin bo'lgan miyeloma kabi antitanalarni aniqlashda qo'llaniladi.

B. Qarshi oqim электрофорезi.

Idishda saqlanadigan agarozga geli bilan amalga oshiriladi va ikkita probirkada qilinadi, biri antigen uchun, ikkinchisi antitana uchun. U antigenlarni anodga va antitanalarni katodga jalb qilishga asoslangan. Cho'kma chizig'ining shakllanishi yarim yoki bir soat ichida tez sodir bo'ladi. Qarshi oqim электрофорезini qo'llash gepatit B virusini aniqlashda qo'llaniladi.

Ishning borishi tartibi

Pretsipitatsiyaga asoslangan reaksiyani aniqlash uchun quyidagi ishlar amalga oshiriladi:

- virusga tayyorlangan spetsifik zardob olinadi va 10 marta suyultirib probirkaga solinadi;
- uning ustiga virus aniqlanishi kerak bo'lgan, qisman tozalangan namuna solinadi;
- virusli namuna quyidagicha tayyorlanadi: buning uchun virus bilan tozalangan o'simlik bargi olinib, hovonchada yaxshilab ezilgandan keyin 10 qavat dokadan o'tkazilib, probirkalarga solinadi va 3000-5000 aylanish tezligida 10 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma usti suyuqligi olinadi, cho'kma esa tashlab yuboriladi;
- reaksiya jarayoni kuzatib boriladi, bunda probirkadagi suyuqlikda antigen va antitana orasida qatlam hosil bo'ladi va bu antigen va antitana orasidagi pretsipitatsiya hisoblanadi.

Nazorat savollari

1. Serologiya fani turlarini tasniflang.
2. Pretsipitatsiya reaksiya prinsipini tushuntiring
3. Pretsipitatsiya reaksiya turlarini ayting.
4. Eritmadagi cho'kma reaksiyani tasniflang
5. Agardagi cho'kma reaksiyasining mohiyati nimadan iborat?
6. Elektr maydonida agarda cho'kma reaksiya turlarini ta'riflang.
7. Virusli namuna qanday tayyorlanishini izohlab bering.

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar « AQLIY HUJUM » metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi tezkor fikrlash, hozirjavoblik, axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarida, mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

Topshiriqlar

1. Immunologik usullarning ishlash prinsipi nimaga asoslangan?
2. Immunologik usullarning qanday turlarini bilasiz?
3. Pretsipitatsiyaga asoslangan usullarning qanday turlari mavjud?
4. Pretsipitatsiyaga asoslangan usullar virusologiyaning qaysi sohalarida qo'llaniladi?

18-laboratoriya mashg'uloti

Immunodiffuziyaga asoslangan usullar va ularning viruslarni aniqlashda qo'llanilishini o'rganish

Darsning maqsadi: Immunodiffuziyaga asoslangan usullar va ularning viruslarni aniqlashda qo'llanilishini o'rganish.

Kerakli jihozlar: suv hammomi, shayton tarozi, Difko agari, fosfat buferi, tarkibida 1% li amidoshvars, metanol, sirka kislotasi va suv (4:4:1) aralashmasidan iborat bo'lgan maxsus bo'yoq, tarkibida bo'yoqsiz metanol, sirka kislotasi va suv bo'lgan preparatni yuvish uchun zarur bufer.

Nazariy tushuncha. Immunodiffuziyaga asoslangan usullar agar-agar gelida AG va ATning diffuziyalanishini va bir-biri bilan to'qnashishi natijasida ko'zga ko'rinuvchi pretsipitatsiya chizig'i hosil bo'lishiga asoslangan (Vahobov, 2017) bo'lib, ularning quyidagi turlari mavjud.

1. Radial immunodiffuziya usuli birinchi marta 1965-yilda Djuliyetta Manchini, D.L.Fey va E.M.Mak Kelvi tomonidan ishlab chiqilgan. Bunda agar-agar geliga dastlab AT solinib shimdiriladi va gelda chuqurcha tayyorlanib unga AG (virus) quyiladi. AG radial yo'nalishida tarqaladi va chuqurcha atrofida AG bilan uchrashib pretsipitat hosil qiladi.

Radial immunodiffuziya KXVni va uning D-oqsilini 1 mkg/ml gacha aniqlay oladi. Bu usulni birinchi bo'lib Uxterloni, keyinchalik uni

mikromodifikatsiyasini Zilber va Abelevlar ishlab chiqishgan (Fayziyev, 2010).

2. Ikkiyoqlama immunodiffuziya (IID) usulida RID kabi AT agarga shimdirilmasdan, balki gel tayyorlanib unda chuqurchalar hosil qilinadi. AG va AT to'ldirilgan chuqurchalar orasida pretsipitat chizig'i hosil bo'ladi (Jovliyeva, 2023).

3. Immunoelktroforez (IEF) usuli birinchi marta 1953-yilda P.Grabar va C.S.Williams tomonidan taklif qilingan bo'lib, bunda chuqurchadagi antigenni erkin radial diffuziyasi doimiy elektr maydoni ta'sirida bir yo'nalish bo'ylab bo'ladigan diffuziya bilan almashtiriladi.

AT bilan reaksiyaga elektr maydonida har xil diffuziya natijasida turli masofada joylashgan AGlar kiradi va pretsipitat cho'qqilari hosil bo'ladi. Titrimetr yordamida kuzatiladigan AG konsentratsiyasi qancha yuqori bo'lsa pretsipitatsiya cho'qqilari ham shuncha ko'p va baland bo'ladi (Vahobov, 2017; Jovliyeva 2023).

Ishning borish tartibi

Viruslar hamda ularga tayyorlangan zardob titrini ikkiyoqlama immunodiffuziya usuli yordamida aniqlashda Uxterloni ishlab chiqqan hamda Zilber va Abelevlar tomonidan mikromodifikatsiya qilingan IID usulidan foydalaniladi. Bunda 1% li «Difco» agari 0,1 M fosfat buferida (pH = 8,0) eritilib, 24 ml 60-65°C da sovutilgan suyuq agar "shayton" (suv tarozi) bilan gorizontal joylashtirilgan, o'lchami 9x12 sm bo'lgan shisha plastinka ustiga quyiladi.

Agar-agar geli qotgandan keyin, teshikchalar orasi 4 mm bo'lgan maxsus shtamlar yordamida yulduzchalar shaklidagi hamda to'g'ri chiziq bo'ylab chuqurchalar tayyorlanadi va bu chuqurchalarga 80 mkldan AG va zardob solinadi hamda shisha plastinkalar maxsus moslamaga joylanib, ularga 200 ml suv solingan eksikatorida 48 soat davomida saqlanadi.

Bu muddat davomida AG va AT diffuziyasi ro'y berib, ularning spetsifik to'qnashishidan pretsipitatsiya liniyalari hosil bo'ladi. Har bir reaksiya natijalari aks etgan agar bo'lakchalari yog'sizlantirilgan buyum shishasi ustiga joylashtirilib, xromatografik yoki filtr qog'oz bilan yopilgan holatda 20°C da 15-20 soat davomida quritiladi.

So'ngra suv tagida namlanib filtr qog'ozdan tozalanadi. Tozalanagan agar bo'lakchalari tarkibida 1% li amidoshvars, metanol, sirka kislotasi va suv (4:4:1) aralashmasidan iborat bo'lgan maxsus bo'yoqqa solinib, 10 daqiqa davomida pretsipitatsiya chiziqlari bo'yaladi va undan so'ng preparat yuvuvchi suyuqlik (bo'yoqsiz metanol, sirka kislotasi va suv)

bilan bir necha marta yuviladi. Quritilgandan so'ng reaksiya natijalari hisobga olinadi.

Ikkiyoqlama immunodiffuziya usuli yordamida tadqiq qilinadigan o'simlik namunasi quyidagicha tayyorlandi: o'simlik bargi hovonchada ezilib shirasi chiqariladi va 1:1 nisbatda 0,02 M li fosfat buferi (pH-7,5) bilan aralashtiriladi, so'ngra 8000 aylanish tezligida 10 daqiqa davomida sentrifuga qilingandan so'ng cho'kma usti suyuqligi olinadi. Cho'kma usti suyuqligi AG sifatida ishlatiladi.

Nazorat savollari

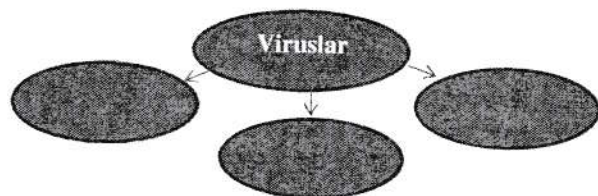
1. IID usulining qanday turlarini bilasiz?
2. Qanday tadqiqotlar uchun IID usulidan foydalaniladi?
3. Radial immunodiffuziya usuli qanday amalga oshiriladi?
4. Ikkiyoqlama immunodiffuziya usulining ishlash prinsipini izohlab bering.
5. Immunelektroforez usuli qanday usul va u qaysi tadqiqotlar uchun ishlatiladi?
6. IID usuli qaysi tamoyil asosida ishlashini izohlab bering.
7. Nima sababdan ikkiyoqlama immunodiffuziya usuli agar gelida bajariladi?
8. Hosil bo'lgan pretsipitatsiya chizig'ini qanday bo'yash mumkin?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «KLAUSTER» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilarda taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«KLAUSTER»



Topshiriqlar

1. Viruslar diagnostikasida qo'llaniladigan immunologik usullar klasterini tuzing!
2. Viruslar diagnostikasida qo'llaniladigan molekulyar-genetik usullar klasterini tuzing!

19-laboratoriya mashg'uloti Virobakterial agglyutinatsiya usuli

Darsning maqsadi: VBA usulini o'rganish va u yordamida qishloq xo'jalik o'simliklarida, virus saqlovchi rezervator o'simliklarda, virus tarqatuvchi hasharotlarda, ishlov beriladigan asbob-uskunalarda, tuproqda hamda boshqa namunalarda viruslarning borligini va qaysi taksonomiya guruhiga mansubligini aniqlashda hamda tajriba o'tkaziladigan xonalarda turli xil tahlillar olib borishdir.

Materiallar: virus bilan kasallangan o'simlik namunasi, korund yoki karborund, freynd adyuvanti, Staphiloccus aureus Kovan shtammi, immun zardob olishda ishlatiladigan hayvonlar (2-2,5 kgli Shinshilla zotiga mansub quyonlar).

Aniqlagich o'simliklar: *Nicotiana tabacum* Samsun navi, *Lycopersicum esculentum* Yusupov navi yoki boshqa virusga sezgir hamda virus ko'p to'plovchi o'simliklar.

Uskunalar: daqiqasiga 6000 ayl/tezligida aylanadigan. sentrifuga, probirkalar, pH-metr, analitik va texnik tarozilar, suv purkovchi nasos, spektrofometr Sf-26, 1,2, 5 ml shpritslar, termostat, kristalizator, magnitli aralashtirgich, o'simlik shirasini siqib chiqaradigan qurilma (npccc).

Reaktivlar: Difko agari, natriy xlorid, formaldegid, mertiolat, virus bilan kasallangan o'simlik bargi, virusning toza preparati, antizardob, distillangan suv, fosfat buferi ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ va KH_2PO_4), A oqsilini tutuvchi stafilakokk reagenti.

Nazariy tushuncha. Virobakterial agglyutinatsiya usuli biror modda yoki hujayra (lateks, bentonit, eritrotsit, bakteriya hujayrasi va bosh.) antizardob bilan nishonlanishiga asoslangan. Usulning quyidagi turlari bo'lanadi (Jovliyeva, 2023).

1. Lateks usuli Berks tomonidan birinchi bo'lib o'simlik viruslarini diagnostika qilishda qo'llanilgan. Bunda antizardob (AZ) ni polistiroldan tayyorlangan lateks zarralariga aralashtirib, lateks zarrasi ustiga AT molekullari immobilizatsiyalanadi hamda lateks zarrasi AT bilan nishonlanadi.

Lateksning diametri 0.81 mkml zarralari AZning gammaglobulin fraksiyasiga qo'shilsa nishonlangan lateks hosil bo'ladi va u *diagnostikum* deb ataladi. Fitoviruslarni aniqlash uchun 1 tomchi diagnostikum va bir tomchi o'simlik shirasi aralashtirilib, maxsus tebratgichda tebratiladi, ma'lum vaqtdan so'ng natija hosil bo'ladi. Usulning sezgirliги yuqori bo'lib, kartoshka X virusi va kartoshka S virusini 0,1-0,5 mkg/ml gacha aniqlay oladi (Vahobov, 2020). Bu usul viruslarni 10-60 daqiqa davomida aniqlaydi.

2. Bentonit flokulyatsiyasiga asoslangan (BDU) usulda lateks o'rniga bentonit zarrachalari qo'llaniladi. Bentonit oson gidratlanuvchi alyumosilikat bo'lganligi uchun suspenziya holatida turganda lateks kabi nospetsifik ravishda oqsillarni yopishtirish xususiyatiga ega bo'ladi.

Shu sababli bentonit zardob bilan emas, balki undan ammoniy sulfat bilan ajratib olinadigan gammaglobulin fraksiyasi bilan sensiabilanadi. Bentonit flokulyatsiyasi (BDU) ga asoslangan usul yordamida viruslarni aniqlash lateks usuliga o'xshash (Fayziyev, 2020).

3. Lateks oqsil usuli. Bu usul tillarang stafilakokklarning A oqsilidan foydalanish orqali amalga oshiriladi. Buning uchun dastlab lateks zarralari A-oqsil bilan sensiabilanadi va uning ustidan antizardob (AZ) ning immunoglobulinlari bilan nishonlanishida lateks usulidan farqlanadi.

4. Virus bakteriya agglyutinatsiya usuli (VBA) da avval antizardob stafilakokk hujayralariga kiritiladi, keyin antigen (AG) qo'shilganda agglyutinatlar hosil bo'ladi. Stafilakokklarning hujayra po'stidagi A-oqsili immunoglobulinlarning faqatgina F_s -uchastkalari bilan bog'lanish xususiyatiga ega, shu bilan birga antitanadagi antigen birikadigan qismi band bo'lmay ochiq qoladi. Natijada AG va AT bir-biri bilan bog'langan bo'lsada bu kompleks A-oqsili bilan bog'lanish xususiyatini saqlab qoladi. Bundan tashqari, AT ning F_s -fragmentining A-oqsiliga nisbatan moyilligi ortadi hamda A-oqsilini bu xossasiga asoslanib VBA usuli ishlab chiqiladi (Fayziyev, 2022).

Bu usul yordamida viruslarni diagnostika qilish uchun dastlab bir hajmli 10% li stafilakokkning suspenziyasi va 5-7 hajmda aniqlanadigan virus antizardob bilan aralashtiriladi hamda diagnostikum tayyorlangach diagnostikum va tekshirilayotgan o'simlik shirasi bir tomchidan buyum oynasiga tomizilib aralashtiriladi va paydo bo'lgan agglyutinatlarni oddiy ko'z bilan (vizual) aniqlay olish mumkin. Bu usulning sezgirliги RID, FIA kabi usullarga yaqin bo'lib, viruslarni 0,2-0,5 mkg/ml gacha aniqlay oladi (Jovlijeva, 2023).

Tamaki mozaikasi virusining tozalangan preparatini olish. Pomidorni TMVning shtammi bilan kasallantirilgan barglari 2-3 hafta davomida mozaika alomatlari paydo bo'lguncha issiqxonada saqlanadi. 300 gr kasallangan pomidor barglari olinib, 0,1 M pH-7,5 bo'lgan fosfat buferi ishtirokida go'sht maydalagichda maydalanadi (material va buferni nisbati 1:1 hisobida bo'ladi). Bu massa to'rt qavat dokadan o'tkaziladi. Dokadan o'tgan suyuqlik 20 daqiqa davomida 10000 aylanish tezligida sentrifuga qilinadi va cho'kma usti suyuqligiga 1:8 miqdorda xloroform solib, yaxshilab chayqatiladi. Cho'kma usti suyuqligiga esa 25% miqdorda ammoniy sulfat tuzidan yoki 4% polietilenglikol va 4% osh tuzi solinadi. Bir soatdan so'ng cho'kma sentrifugalash yordamida (10000 aylanish tezligida) ajratib olinadi va 0,05 M (pH-7,5) fosfat buferida eritiladi. Hosil bo'lgan eritmani erimagan moddalardan tozalash uchun yana bir marta 10000-12000 aylanish tezligida 5-7 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi va erimagan qism tashlanadi.

Cho'kma usti suyuqligi 3% granulatlangan agar geli to'latilgan stomatografiya kolonkasidan o'tkaziladi yoki ultrasentrifuga yordamida 15000 aylanish tezligida 2 soat davomida sentrifuga qilinadi. Cho'kma 0,05 M fosfat buferida eritiladi. Ultrasentrifugada cho'ktirish va eritish ishlari 2-3 marta takrorlanib toza virus preparati olinadi.

Olingan virusning miqdori spektrofotometrda aniqlangandan so'ng qayon organizmiga har xil usullar bilan yuboriladi (quloq venasiga, oyoq mushagiga, kurak terisi ostiga yoki bir nechta usullar ketma-ket qo'llaniladi). Venaga yuborilganda 3, 5, 7, 9, 11, 13 mg/ml virusga kunora 0,05% li osh tuzi (NaCl) eritmasi qo'shib yuboriladi (1:1 nisbatda). Oxirgi inyeksiyadan o'n kun o'tgandan keyin, 40-50 ml dan hafta davomida uch marta qon olinadi.

Olingan qonning uchta partiyasi ham 37°C da termostatga qo'yiladi, 1-3 soatdan so'ng 5°C da sovutiladi (5-6 soat). So'ngra asta-sekin qonning zardob qismi ivib qolgan qismidan ajratiladi. Zardob qismi daqiqasiga 6000 ayl./tez.da sentrifuga qilinib, qoldiq qon elementlaridan tozalanadi. Cho'kma usti suyuqligidagi qonning zardob qismi (AZ) titri aniqlanadi. Titrni aniqlash uchun "tomchi" yoki IID usullari qo'llanilishi mumkin. AZ solingan idishga uning titri, aniqlash usuli yoziladi hamda 1-2 tomchi xloroform solib muzlatib saqlanadi.

Stafilakokkni tayyorlash. Oxirgi vaqtlarda A-oqsilni tutuvchi stafilakokk reagenti Leningraddagi Epidemiologiya va mikrobiologiya

ilmiy tekshirish institutida chiqarilmoqda. Shu stafilakokk reagentining bir flakoniga 5 ml (yoki 5-10% gacha suspenziya) fiziologiya eritmasi qo'shiladi (0,008 M fosfat buferiga 0,14 mM osh tuzi, pH 7,2-7,5) va eriguncha chayqatiladi. Hosil bo'lgan chokma diagnostikum tayyorlashda ishlatiladi.

Diagnostikum tayyorlash. Probirkada bir tomchi stafilakokkni 5-7 tomchi suyultirilgan (50-100 marta) AZ bilan aralashtiriladi. Hosil bo'lgan aralashmadan bir tomchidan olib (0,2 ml), shisha plastinkaga tomiziladi, so'nra uning ustiga bir tomchi bufer qo'shiladi va aralashtiriladi. Agar AZ kerakligicha suyultirilmasa, stafilakokk hujayrasi agregatsiyalanadi. Bu holda plastinkada oqish rangga xos bo'lmagan reaksiya kuzatiladi. AZni ishlatish uchun zarur bo'lgan suyultirilish darajasi eng so'nggi agglyutinatsiya hosil bo'lgan miqdori (titri) hisoblanadi.

Kontrol reaksiya o'tkazish. VBA-usulida reaksiya o'tkazish jarayonida suyultirilmagan AZ ishlatilganda yoki sog' o'simlik hujayra komponentlariga ham xos AT AZ tarkibida bo'lsa nospetsifik reaksiya paydo bo'lishi mumkin. Yoki ba'zi tur o'simliklar hujayrasidagi shira stafilakokk bilan virussiz ham agglyutinantlar hosil qilishi mumkin. Nospetsifik reaksiyaning oldini olish uchun Atabekov va Chirkov sog' o'simlikning shirasi bilan kontrol reaksiya o'tkazishni taklif etishgan. Bu analiz jarayonida immunodiagnostikum tomchisi sog'lom o'simlik shirasi bilan qo'shiladi. Nospetsifik reaksiya hosil bo'lsa AZ ni suyultirish orqali yo'qotiladi. Har bir sog' o'simlik shirasi bilan kontrol reaksiya qo'yib ko'rish kerak.

O'simlik shirasi tomonidan hosil bo'ladigan nospetsifik reaksiyalarni aniqlashda stafilakokk bilan normal quyon AZdan tayyorlangan diagnostikum bilan ham kontrol reaksiya olib borish mumkin. Bu holda agglyutinatlar hosil bo'lsa, demak shu o'simlikning shirasida nospetsifik reaksiya hosil qiladigan moddalar bor deb hisoblash mumkin.

Virusli namunalarni analizga tayyorlash. Virusli namunalarni analiz qilish uchun pomidor, bulg'or qalampiri barglari, yosh nihollar yoki boshqa xil virusli namunalardan 1-2 gr olinib, chinni hovonchalarda 1-2 ml 0,008 M fosfat buferli fiziologik eritmada eziladi. Tayyor bo'lgan materialni o'simlikning dag'al to'qimalaridan tozalash uchun 15 daqiqa davomida 6000 aylanish tezligida sentrifuga qilinadi. Cho'kma uni suyuqligi esa diagnostikum solib, reaksiya o'tkazish uchun tayyor namuna hisoblanadi.

Virusning tabiatda aylanishida virus tarqatuvchi hasharotlar, virusni qishda va boshqa vaqtlarda o'zida saqlovchi rezervator o'simliklarni tahlil

qilishda ba'zan nospetsifik reaksiyalar hosil bo'lishi mumkin. Bu hollarda ajratilgan o'simlik shirasini sentrifugalash yoki filtrlash yo'li bilan nospetsifik reaksiyalardan qutilish mumkin hamda parallel ravishda sog'lom o'simlik shirasi bilan ham kontrol reaksiya o'tkazish maqsadga muvofiqdir.

Urug'chilik muammolarini hal qilishda urug'da virus borligini aniqlash ishlarida usulning sezgirligini oshirish uchun urug'ni undirib, unda o'sib chiqqan niholni analizga ishlatga ancha yaxshi bo'ladi. Chunki miqdori oz bo'lgan virus nihol o'sishi bilan ko'payishi mumkin va aniqlash ishlari osonlashadi. Katta masshtablarda viruslarni aniqlashda o'simliklardan shira ajratib olish uchun maxsus shira ajratgich asbobdan foydalaniladi. Namuna materialdan taxminan 3-5 grni maxsus yacheykaga solib, maxsus bosqich bilan eziladi. Bargdan ezib chiqarilgan shira qo'shni chuqurchaga oqib o'tadi. Chuqurcha hajmi 0,2-0,4 mlni tashkil etadi. Ajratilgan shira bir necha marta suyultirilib (2, 4, 8, 16 ...) so'ngra diagnostikum tomizib virus aniqlanadi.

Diagnostika o'tkazish. Pomidorda TMVni aniqlash uchun tahlil qilinayotgan bargdan tayyorlangan namuna (0,2 ml) shisha plastinkaga (15x20 sm²) tomiziladi, har bir namunaga avvaldan tayyorlangan TMV diagnostikum qo'shiladi hamda shisha tayoqcha bilan aralashtiriladi. Agglyutinat hosil bo'lishi 1-3 daqiqa vaqtni talab etadi. Hosil bo'lgan agglyutinatlarni oddiy ko'z bilan kuzatish mumkin. Stafilakokk bilan AT dan diagnostikum va unga virusli namuna qo'shilgandan so'ng agglyutinat hosil bo'ladi.

VBA usulida faqatgina sifat reaksiyasi olib borilmasdan, miqdor reaksiyasini ham amalga oshirsa bo'ladi. Miqdori avvaldan aniq bo'lgan virus preparati suyultiriladi, so'ngra yuqorida tahlil qilinganidek virusning miqdori aniqlanadi (6-jadval). Parallel kasal o'simlik shirasi ham bir necha marta suyultiriladi va eng oxirgi reaksiya hosil bo'lgan namuna aniq virusning eng oxirgi reaksiya hosil bo'lgan namunasiga solishtiriladi va miqdori toza preparat miqdori bilan tenglashtiriladi. To'g'ri kelgan konsentratsiya shiraning suyultirilgan konsentratsiyasidagi virusning miqdorini belgilaydi.

O'simlik shirasidagi virus miqdorini aniqlash

Tomatdagi tamaki mozaikasi virusi				
Toza virus preparati		O'simlik shirasidagi virus		Aniqlanadigan namunadagi virus
Virusning miqdori, mkg/ml	Reaksiya natijasi	Suyulish darajasi	Reaksiya natijasi	Miqdori, mkg/ml
1	++++	1:2	++++	
0.5	++++	1:4	++++	
0.25	+++	1:8	++	
0.125	++	1:16	++	
0.65	++	1:32	+	0.3
0.32	++	1:64	-	
0.16	-	1:128	-	

Jadvaldan olingan natijalarni solishtirib, oxiri agglyutinatsiya reaksiyasida toza preparat 0,32 mkg/ml miqdor bo'lganligini ko'ramiz. Bu miqdor suyultirilgan o'simlik shirasidagi 1:64 darajaga to'g'ri keladi. Demak, kasal o'simlik shirasida 0,3 mkg/ml TMV bor ekan deb xulosa qilamiz.

Xuddi shu usulni qo'llab boshqa o'simliklarda ham virusning sifatini va miqdorini aniqlash mumkin.

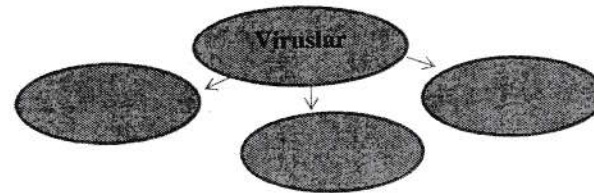
Nazorat savollari

1. Nima sababdan Virobakterial agglyutinatsiya usuli deb nomlanadi?
2. Virobakterial agglyutinatsiya usuli qaysi usullar tipiga mansub?
3. Virobakterial agglyutinatsiya usuli yordamida virusni diagnostika qilish qanday amalga oshirilishini tushuntirib bering.
4. Bentonit flokulyatsiyasiga asoslangan usulni izohlab bering.
5. Virobakterial agglyutinatsiya usuli yordamida virusni diagnostika qilish uchun nimalar zarurligini izohlang.
6. Virobakterial agglyutinatsiya usuli uchun virusli namuna qanday tayyorlanadi?
7. Virobakterial agglyutinatsiya usuli yordamida virusni diagnostika qilish uchun bakterianing qanday turi ishlatiladi?
8. VBA usulini qanday virusologik tadqiqotlarda qo'llash mumkin?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar:
«KLAUSTER» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi muqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«KLAUSTER»**Topshiriqlar**

1. Virobakterial agglyutinatsiya usuli biologiyaning qaysi sohalarida qo'llanilishini izohlab bering.
2. VBA usuli tarkibiga kiruvchi komponentlar yuzasidan klaster tuzing.
3. VBA usulining afzalligi hamda kamchiliklari yuzasidan klaster tuzing.

20-laboratoriya mashg'uloti. Tomchi usuli

Darsning maqsadi: Tomchi usulini o'rganish hamda usul yordamida o'simliklardagi (to'qimalardagi), hasharotlardagi va boshqa virus borligini aniqlanish zarur bo'lgan namunalardagi virusni tezkorlik bilan aniqlash.

Materiallar: virusli namuna (TMV bilan kasallangan tamaki bargi), TMV immun zardobi, buyum oynasi, shisha tayyoqcha, filtr qog'ozi, distillangan suv, probirkalar, pipetkalar.

Nazariy tushuncha. Bu usul virusologiya amaliyotida tezkor, ancha oson va yalpi qilinadigan analizlarda qo'l keladigan usul bo'lib, asosan hujayrada virus miqdori ko'p to'planadigan (1 kg 0,1-1 g) o'simliklarning

analizida ishlatiladi. Odatda, bu usul ishlatilganda antizardobning turi imkonni boricha yuqori bo'lishi maqsadga muvofiq bo'ladi.

Bu usul M.S. Dunin va N.N. Papova tomonidan 1937-yilda yaratilgan bo'lib, AG va AT tutuvchi tomchilarni bir-biriga aralashib reaksiya hosil qilishi natijasida **tomchi usuli** deb nomlanadi. Bu usulda o'simlikdan faqat gomogenezatsiya qilinib ajratilgan shiraning bir tomchisi AT bilan aralashtiriladi, agar o'simlikda virus (AG) bo'lsa aralashmada pretsipitat hosil bo'ladi. Quyida tomchi usulining turlari keltirilgan.

1. Tomchi usulining takomillashgan turi. Bunda probirkadagi virus va AT qo'shilgan qavatda halqasimon pretsipitatsiya hosil bo'ladi.

2 Tomchi usulining ammoniy sulfat usuli (ASU). Bu usul kartoshka viruslarini diagnostika qilishda ko'p qo'llaniladi.

3. TUning mikropretsipitatsiya reaksiya usuli (Jovliyeva, 2023).

Ishning borish tartibi: Virobakterial agglutinatsiya usuli mashg'ulotida bayon etilganidek pomidorning tamaki mozaikasi virusi bilan kasallantirilgan barglaridan 5 gr olinib, chinni hovonchada eziladi yoki maxsus qisgich asbob yordamida shirasi ajratib olinadi. Buyum oynasining ikki joyiga 2-3 sm masofa uzoqligida zardob solinadi, chap tomoniga normal (nazorat, quyonga virus yuborilmasdan olingan) va o'ng tomoniga virusga qarshi olingan spetsifik antizardob solinadi. Har bir zardob tomchisi yoniga bir tomchidan (0,1 - 0,2 ml) tadqiq qilinadigan o'simlik shirasidan tomiziladi.

O'simlik shirasini ajratib olish uchun maydalab qirg'iladi, so'ngra chinni hovonchada (yoki maxsus moslama yordamida o'simlikdan shirasi ajratib olinadi) gomogen massa holatiga kelgunicha ezib maydalanadi va ikki qavat dokadan o'tkaziladi. Dokadan siqib olish jarayonida birinchi siqib olinadigan ikki tomchi o'zida virusni kamroq tutgani uchun tashlab yuboriladi hamda undan keyingi tomchilar yig'ib chiqiladi va tajribada ishlatiladi. Tomizilgan o'simlik shiralari antizardoblar bilan maxsus shisha tayoqcha yordamida aralashtiriladi.

Avval o'simlikdan ajratilgan shira nazorat antizardob bilan, so'ngra esa spetsifik antizardob bilan aralashtiriladi.

Agar tadqiq qilinayotgan o'simlik shirasida virus miqdori yetarlicha bo'lsa, yigirma daqiqadan so'ng 18-20°C da spetsifik antizardob bilan aralashtirilgan o'simlik shirasida cho'kma hosil bo'ladi. Normal antizardob bilan aralashtirilganda cho'kma kuzatilmaydi. Reaksiya natijalarini kuzatish uchun lupadan foydalanilsa, natijalarni ancha osonlik bilan aniqlash mumkin bo'ladi.

Reaksiya natijasi quyidagicha belgilanadi: agar reaksiyada 1-2 daqiqa davomida yirik-yirik pretsipitatlar hosil bo'lsa - 4 +, pretsipitatsiya darajasi ancha sekinroq va kamroq bo'lsa - 3 +, pretsipitat avvalgilardan 1-2 barobar kamroq hosil bo'lsa - 2 +, reaksiya 20 daqiqagacha hosil bo'lsa, pretsipitatning borligi aniq, avvalgilardagidek yaxshi bilinmasa - 1 + bilan, borligi aniq emas, chunki nazorat variantdan farq qiladi, ammo bor ham, yo'q ham deb bo'lmaydigan holatda ±, aniq reaksiya ketmaganligi ko'rinib tursa - bilan belgilanadi (7-jadval). Olingan natijalar daftarga qayd etiladi.

7-jadval

Tomchi usuli yordamida virusni diagnostika qilish natijalarini hisobga olish jadvali

Virus antizardobi va uning suyuqlash darajasi	Virus bilan kasallantirilgan o'simlikdan olingan shiraning suyuqlash darajasi						
Suyultirilmagan antizardob	++++	Suyultirilmagan o'simlik shirasi +++	1:2 ++	1:4 +++	1:8 +	1:16 -	1:32 -
1:2	++++	+++	++	+	-	-	-
1:4	++++	++	+	-	-	-	-
1:8	+++	+	-	-	-	-	-
1:16	++	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-
1:128							
1:256							
1:512							
1:1024							

Eslatma: - 4 + bo'lsa aniq va mo'l pretsipitat kuzatiladi;

- 3 + bo'lsa pretsipitat mo'l, ammo birinchi variantdan ancha kechroq hosil bo'ladi;

- 2 + bo'lsa avvalgi ikkisi qaraganda kamroq va kechroq reaksiya kuzatiladi;

- 1 + bo'lsa bor, ammo avvalgilardagidek yaxshi bilinmaydi;

- bo'lsa reaksiya kuzatiladi;

- bo'lsa reaksiya nazorat variantlaridek bo'ladi.

Nazorat savollari

1. Tomchi usulida viruslar qanday aniqlanadi?
2. Tajriba natijasi nimaga asoslanib aniqlanadi?
3. Tajribaning salbiy tomonlari nimadan iborat?
4. Tomchi usuli birinchi marta qaysi olimlar tomonidan kashf etilgan?
5. Usul virusologiyaning qanday tadqiqotlarida ishlatiladi?
6. Reaksiya ko'rsatkichlari qanday belgilanadi?
7. Tomchi usulida nima sababdan spetsifik zardob qo'llaniladi?
8. Namuna qanday usulda tayyorlanadi?

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar: «FSMU» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi umumiy fikrlardan xususiy xulosalar chiqarish, taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan ma'ruza mashg'ulotlarini mustahkamlashda, o'tilgan mavzuni so'rashda, uyga vazifa berishda hamda amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.

«FSMU»	
F	• fikringizni bayon eting
S	• fikringiz bayoniga sabab ko'rsating
M	• ko'rsatgan sababingizni isbotlab bering va misol keltring
U	• fikringizni umumlashtiring

Topshiriqlar

1. Tomchi usulini virusologiyaning qanday tadqiqotlarida samarali qo'llanilishi mumkinligini FSMU texnologiyasi asosida izohlab bering.

2. Tomchi usulida antigen va antitana sifatida nimalar ishlatilishini izohlab bering.

3. Virus diagnostikasida birinchi marta Tomchi usuli qaysi olimlar tomonidan qo'llanilgan?

21-laboratoriya mashg'uloti

Immunoferment analiz usuli va uning viruslar diagnostikasida qo'llanilishini o'rganish

Darsning maqsadi: Immunoferment analiz usuli, ishlash prinsipi, bu usul yordamida viruslarni diagnostika qilishni talabalarga o'rgatish.

Nazariy tushuncha: Bu usul AT yoki AGni birorta modda (ferment, radioaktiv moddalar) bilan nishonlashga asoslangan bo'lib, virus miqdori kam bo'lgan hollarda ham aniqlay oladi (Fayziyev, 2011). Usulning quyidagi turlari mavjud:

1. Radioimmun analiz usulida birorta virus ATsi radioaktiv yod (I^{125} yoki I^{131}) bilan nishonlanadi. Unda avval qattiq fazaga (polistrol platalarga) virus ATlari immobilizatsiya qilinadi va undan keyin AG solinib, ma'lum vaqtdan so'ng yod bilan nishonlangan ATlar solinadi. Bu usul fitovirusologiyada birinchi bo'lib 1973-yilda Boll tomonidan qo'llanilgan. Usulning sezgirligi 0,5 mkg/ml dan 1 ng (10^{-9} g) gachani tashkil etadi (Vahobov, 2017).

2. Flyuoessent zondlash usuli. Bu usulda lyuminesesent nishoni aniqlanayotgan virus ATsi tarkibiga kiritiladi va faqatgina virusning miqdorini aniqlashdan tashqari kasallangan o'simlik to'qimalarida joylashgan o'rnini ham aniqlashi mumkin (Fayziyev, 2022).

3. Immunoferment analiz usuli (IFA). Nishon sifatida fermentlardan foydalaniladi. Immunoferment analiz usuli mikroorganizmlarni, viruslarni, ayniqsa fitoviruslarni aniqlaydigan eng sezgir immunologik usul hisoblanadi. Virus (AG) borligini boshqa usullar bilan aniqlab bo'lmagan vaziyatlarda bu usuldan foydalaniladi, ya'ni usul yordamida nanogrammi miqdordagi viruslarni aniqlasa bo'ladi. Bu usulni qo'llaganda AT va AG, AT bilan kon'yugat (ferment va AT kompleksi), ferment bilan substrat orasidagi reaksiyalar birorta qattiq fazada (polistirolda yoki poliamid membranada) olib boriladi (Jovliyeva, 2023).

Immunoferment analiz usulining sendvich turi

Ishning maqsadi: Immunoferment analiz usuli yordamida boshqa usullar sezgirligi yetmagan hollarda va hujayrada juda kam to'planadigan viruslarni har xil namunalarda aniqlashni o'rganish.

Kerakli jihozlar: Immun AZ, peroksidaza yoki boshqa ferment, natriy peryodat, K_2HPO_4 , sefadeks G-200, triton-X-100, substrat (H_2O_2 va $C_6H_7NO_3$ -aminosalitsil kislotasi), kontrol zardob, virus namunalari, PEG (molekulyar massasi 6000) polistrol mikroplatlar (Shvetsariya) yoki poliamid membrana, termostat, xromatografiya kolonkasi, fraksiya, o'yuvchi kollektor, FEK, spektrofotometr, titrator T-107.

Ishning borishi. Immunoferment analiz usuli yordamida viruslarni aniqlash quyidagi bosqichlarda olib boriladi:

- Immunoferment analizda olib boriladigan polistrol platalar (yoki poliamid membranalar) ga ATlarni immobilizatsiya qilish;
- AT va fermentdan sintezlangan konyugat-peroksidaza va AT;
- Immunoferment analizni amalga oshirish.

Avval polistrol plataga yoki poliamid membranaga immobilizatsiya qilinadigan ATni AZdan toza holda ajratib olish yoki gammaglobulin

qismini ajratib olish zarurdir. Globulin qismini ajratib olish uchun 10 ml AZga teng hajmda 20 % lik PEG solinadi va bu aralashma 15 daqiqa davomida 8000 aylanish tezligida sentrifuga qilinadi. Cho'kmaga tushgan AZni gammaglobulin qismi 10 ml 0,01 M kaliy fosfat buferida eritiladi (pH-7,4). Cho'ktirib, keyin yana qaytadan eritib tozalash ishlari ikki qayta olib boriladi. So'ngra, kaliy fosfat buferida dializ qilinadi va 4° C da kechasiga qoldiriladi. Hosil bo'lgan AZning globulin qismi polistirol plataga immobilizatsiya qilishda va ferment bilan kon'yugat olishda ishlatiladi.

AZning globulin qismi bilan peroksidazadan kon'yugat olish.

5 mg peroksidaza 1ml sovutilgan distillangan suvda eritiladi va unga 0,2 ml 0,1 M natriy peryodat quyiladi, so'ngra (pH-7,4) 0,01 M kaliy fosfat buferi bilan dializ qilinadi. Dializdan so'ng eritmaning pHi 9,5 gacha ko'tariladi va unga 5 mg pHi 9,5 ga keltirilgan gammaglobulin qo'shiladi. Hosil bo'lgan aralashma ikki soat davomida xona haroratida muntazam aralashtirilgan holda inkubatsiya qilinadi.

Hosil bo'lgan kon'yugatni eritmadagi boshqa moddalardan tozalab olish uchun gelfiltratsiya yordamida G-200 markali sefadeks to'latilgan kolonkadan (1,5x100 sm) kaliy fosfat buferi bilan elyusiya qilinadi. Olingan fraksiyalar spektrofotometr yordamida analiz qilinadi va kon'yugatni tashkil qilgan qismi ajratib olinadi, konsentratsiyasi o'lchanadi, ampulalarga solinadi va - 20°C da muzlagan holda saqlanadi. Ishlatiladigan qismi ishdan oldin eritiladi.

Substrat tayyorlash. Distillangan issiq suvda 0,8 mg/ml lik 5-aminosalitsil kislota eritiladi va eritmaning pHini 6,0 ga 1 n li KOH yordamida keltiriladi.

IFA o'tkazishdan oldin tayyorlangan 5 - aminosalitsil kislota vodorod peroksidi bilan 10:1 nisbatda aralashtirib ishlatiladi.

Gammaglobulinni immobilizatsiya qilish uchun polistirol plashka ishlatiladi. Gammaglobulin yoki AT plashkaning har bir chuqurchasiga 200 mkldan qilib solinadi va 4°C haroratda bir kechaga qoldiriladi. Immobilizatsiya qilinmagan ATlar bir daqiqadan 3 marta 0,05 % triton X-100 solingan 0,01 M pHi 7,4 bo'lgan kaliy fosfat buferi bilan yuviladi.

Keyingi bosqichda reaksiya immobilizatsiya qilingan AT bilan aniqlanadigan virus orasida boradi. Buning uchun tozalangan virus yoki tekshiriladigan virusli namuna shu mikroplat chuqurchalariga solinadi va bir soat davomida 37°C da sorbsiya qilinadi.

So'ngra bog'lanmagan antigen va boshqa ortiqcha moddalar yuvib tashlanib, plashkaga 200 mkl kon'yugat solinadi va bir soat davomida

17°C da inkubatsiya qilinadi. Ortiqcha kon'yugat ham yuvilgandan keyin mikroplatalarga substrat solinadi. Peroksidaza oksidlanishidan keyin hosil bo'lgan mahsulot oddiy ko'z bilan aniqlanadi yoki 490 nm to'lqin uzunligida spektrofotometrda nur yutish darajasi o'lchanadi (Platalar jigar rangining ko'p-kamligiga qarab virus miqdorini aniqlasa ham bo'ladi).

Nazorat savollari

1. IFA usuli qanday turlarga bo'linadi?
2. IFA usulida tajriba olib borish uchun kerakli jihozlarni sanab bering.
3. Tajriba natijasi qanday aniqlanadi?
4. Nima uchun bu usul IFA deb nomlangan?
5. IFAning natijalari qaysi qurilmada va qanday qilib hisobga olinadi?
6. IFA usulida immobillash qanday tartibda amalga oshirilishini izohlab bering.
7. Sendvich variant yordamida virus qanday qilib aniqlanadi?
8. IFAning gomogen va geterogen turlarini izohlab bering.

22-laboratoriya mashg'uloti

PZR usuli yordamida viruslarni aniqlash

Darsning maqsadi: talabalarga PZR usuli, uning ishlash prinsipi hamda usul yordamida viruslarni aniqlashni o'rgatish.

Kerakli jihozlar: reaksiya buferi - 8 mkl, dNTP - 2 mkl, revertaza- 1 mkl, RNK - 9 mkl, agaroz, elektroforez, sentrifuga, nuklein kislota ajratish uchun zarur bo'lgan to'plam va boshqalar.

Nazariy tushuncha. Ko'pchilik o'simlik viruslari genomi bir zanjirli RNKdan iborat bo'lib, ularni QT-PZR usulida diagnostika qilish quyidagi bosqichlarda amalga oshiriladi:

- virus RNKsini ajratib olish;
- teskari transkripsiya usulida bir zanjirli virus RNKsidan qo'sh spiralli kDNK sintezlash;
- kDNK amplifikatsiyasi.

Virus bilan kasallangan namunalardan umumiy RNK ajratish "Invitrogen" (Thermo Fisher, AQSH) "PURELINK RNA MINI KIT" to'plamlari yordamida ilova qilingan ko'rsatmalariga muvofiq amalga oshiriladi.

Ishning borishi. Buning uchun yig'ilgan namunadan chinni hovonchaga 5 gr solib, suyuq azot qo'shib ekstraksiya qilinadi. Tayyor

ekstraktdan 200 mg olinadi, 2 ml hajmli eppendorf probirkaga solinadi va (1ml lizis buferi uchun 10 mkl 2-merkaptotanol qo'shib oldindan tayyorlangan) lizis buferidan 1,5 ml qo'shib vorteksda (Vortex MX-8, DLAB) yaxshilab aralashtiriladi.

So'ngra xona haroratida uch daqiqa davomida inkubatsiya qilinib, besh daqiqa (2600 xg ayl\daq.) sentrifuga qilinadi. Cho'kma usti suyuqligi ajratilib yangi probirkaga solinadi, cho'kma tashlab yuboriladi. Cho'kma usti suyuqligiga nisbatan 1:1,5 nisbatda 96% li etanol qo'shiladi va vorteksda aralashtiriladi. To'plam tarkibidagi filtrli probirkaga quyiladi va so'ngra o'n besh soniya (12000 xg ayl\daq.) sentrifuga qilinadi, pretsipitat tashlanadi. 700 mkl yuvuvchi bufer (Wash buffer I) qo'shiladi va yana qaytadan 15 soniya (12000 xg ayl\daq.) sentrifuga qilinadi.

Kolonkali probirkaning pastki qismi tashlab, o'rniga yangi probirka qo'yiladi. So'ngra to'plamdagi ikkinchi yuvuvchi buferdan (Wash buffer II) 500 mkl qo'shib, 15 soniya (12000 xg ayl\daq.) sentrifuga qilinadi. Probirkaning filtrli qismi olib qolinadi va steril yangi probirkaga qo'yiladi. Probirkaning markaziy qismidan asta - sekinlik bilan 100 mkl RNK - azu fermentidan holi steril suv (R Nase-Free water) solib, xona haroratida 2 daqiqa inkubatsiya qilinadi. Belgilangan vaqt o'tganidan keyin 2 daqiqa (12000 xg ayl\daq.) sentrifuga qilinadi va probirkaning filtrli qismi olib tashlanadi.

Shu yo'l bilan pastki probirkada umumiy RNK ajratib olinadi. RNK matritsasidagi kDNK "Invitrogen" (Thermo Fisher, AQSH) reagentlar to'plami yordamida olinadi. Bunda bitta namuna uchun dd H₂O (2 mkl), 5 mkl ajratib olingan RNK, konsentratsiyasi 10 pM/mkl bo'lgan teskari praymer (*reverse primer*) qo'shib reaksiya aralashmasi tayyorlanadi va 70°C da 2 daqiqa inkubatsiya qilinadi. Inkubatsiya vaqti yakunlanishi bilan aralashma tezlikda muz solingan idishga olinadi. ToMV RNK sidan teskari transkripsiya usulida kDNK olish uchun reaksiya aralashmasi quyidagilarni o'z ichiga oladi: reaksiya buferi - 8 mkl, dNTP - 2 mkl, revertaza - 1 mkl, RNK - 9 mkl. Tayyor reaksiya aralashma 37 °C da 60 daqiqa, 70 °C da 10 daqiqaga amplifikatorga qo'yiladi (8-jadval).

8-jadval

Bir zanjirli RNKdan kDNK sintezlashning harorat-vaqt rejimi

Harorat	Vaqt	Davomiyligi
37 °C	60 daqiqa	1 sikl
70 °C	10 daqiqa	

Sintezlangan kDNKni amplifikatsiya qilish uchun reaksiya aralashmasi (25 mkl) quyidagicha tayyorlab olinadi:

NCBI bazasi asosida tanlangan har biri 10 pM/mkl bo'lgan praymerlar

ToMV - *Forward primer* - GAGCYTTCACTGAAAGATG (0,5 mkl)

ToMV - *Reverse primer* - GGTGGTGTGCCTCTCTGT (0,5 mkl)

Master mix 7,5 mkl, dd H₂O 12,5 mkl, sintezlangan kDNK 4 mkl, PZR amplifikatsiyasi uchun quyidagicha dasturlanadi (9-jadval):

9-jadval

M. Chikh-Ali bo'yicha amplifikatsiyaning harorat-vaqt rejimi

Bosqich nomi	Harorati	Vaqt	Davomiyligi
Boshlang'ich denaturatsiya	94° C	2 daqiqa	1 sikl
Denaturatsiya	94° C	30 soniya	45 sikl
Praymerni DNKga joylashuvi	56° C	30 soniya	
Elongatsiya	72° C	45 soniya	
Yakuniy elongatsiya	72° C	2 daqiqa	1 sikl

PZR mahsulotlari gorizontal gel elektroforez (Xelikon, Rossiya) yordamida 1 x TBE buferida (Thermo Fisher, AQSH) tayyorlangan 2% li agarozda gelida, etidiumbromid (3 mkl) yordamida aniqlanadi. 10 mkl PZR mahsulotiga 3 mkl bo'yoq (Blue Juice Gel Loading Buffer) qo'shiladi va agarozda chuqurchasiga solinadi. DNKning ma'lum o'lchamdagi (Gene Ruler Plus 100 bp DNA ladder) molekulalari aralashmasidan marker sifatida foydalaniladi. Elektroforez 80 mA oqim va 220 Vt kuchlanishda amalga oshiriladi. Gel transillyuminator Kvant 312 B (Xelikon, Rossiya) da 312 nm to'lqin uzunligida tahlil qilinadi va gelni ro'yxatga oluvchi sistema "Vzglyad" (Xelikon, RF) yordamida rasmga olinadi. Praymerlar ro'yxati, PZR amplifikatsiyaning harorat - vaqt rejimini aniqlash shartlari adabiyotlar tahlillari asosida amalga oshiriladi.

Nazorat savollari

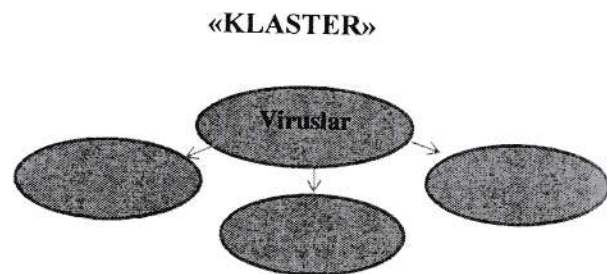
1. PZR uslining boshqa usullardan afzallik tomonlari nimada?
2. PZR usulida tajriba qanday bajariladi?
3. PZR usulining mohiyati nimada?
4. PZR usulini qaysi olim ilk marotaba fanga kirtgan?
5. PZR usulining qanday turlarini bilasiz?

6. Praymer nima va u PZR usulida qanday ishlatiladi?
7. PZR usuli yordamida viruslarni aniqlash uchun nima substrat bo'lib xizmat qiladi?
8. PZR usuli uchun qanday fermentlar zarurligini izohlab bering.

Talaba bilimini mustahkamlash uchun qo'llanilgan texnologiyalar «KLASTER» metodi

Texnologiyaning maqsadi: mazkur texnologiya ishtirokchilardagi taqqoslash, qiyoslash orqali axborotlarni o'zlashtirish, xulosalash, shuningdek, mustaqil ijodiy fikrlash ko'nikmalarini shakllantirishga xizmat qiladi.

Mazkur texnologiyadan amaliy mashg'ulot natijalarini tahlil etishda foydalanish tavsiya etiladi.



Topshiriqlar

1. PZR usulining bugungi kunda mavjud turlarining klasterini tuzing.
2. PZR usulining amalga oshirish bosqichlarining klasterini tuzing.
3. PZR usulining qo'llanilish sohalarining klasterini tuzing.

GLOSSARIY

Agar (agar-agar)	Qattiq ozuqaviy muhitni tayyorlash uchun ishlatiladigan dengiz suvo'tlaridan olinadigan (polisaxarid) mahsulot.
Adyuvant	Immunitet reaksiyasini kuchaytiradigan yordamchi modda.
Agglyutinatsiya	Hujayralarni (mikroorganizmlar, qizil qon tanachalari, oq qon hujayralari va boshqalar) o'ziga xos antitanalar bilan bog'lash natijasida kelib chiqadigan reaksiya turi.
Adaptatsiya	Mikroorganizmlarning belgilari yoki xususiyatlarining o'zgarishi bilan namoyon bo'ladigan atrof-muhitdagi o'zgarishlarga moslashuvchan reaksiya.
Allergenlar	Yuqori sezuvchanlik reaksiyasini (allergiya) keltirib chiqaradigan antigen tabiatli moddalar (to'liq antigenlar yoki gaptenlar).
Allergiya	Allergenlar bilan qayta aloqa natijasida paydo bo'ladigan immunoglobulinlar yoki T - limfotsitlarning to'planishi natijasida kelib chiqadigan immun javob shakli.
Ammonifikatsiya	Azot tutuvchi tirik organizm qoldiq moddalarini (oqsillarni) parchalanishi natijasida ammiak va uning tuzlari mikroorganizmlar fermenti ta'sirida chiqarilishi bilan ketadigan tabiatda azot aylanishining bosqichlaridan biri.
Anatoksinlar	Formalin bilan neytrallangan (3-4 hafta davomida 37-40°C haroratda) mikroorganizmlar toksinlari, ammo antigenlik va immunogenlikni saqlab qolgan mikrobiaal toksinlar, faol immunoprofilaktika uchun ishlatiladi.
Anaerostat	Anaerob mikroorganizmlarni o'stirish uchun qurilma.
Anaeroblar	Havoda erkin molekulyar kislorod mavjud bo'lmagan sharoitda, ozuqa moddalarining parchalanishi natijasida energiya oladigan mikroorganizmlar.
Antigenlar	Organizmga tushgandan so'ng immun javobning rivojlanishiga hamda antitanalar ishlab chiqarilishiga olib keluvchi begona genetik moddalar hisoblanadi.
Anafilaksiya	Organizmga parenteral yo'l orqali yuborilgan antigenga nisbatan sezuvchanlikning ortishi bilan ifodalanadigan allergik reaksiya.
Anergiya	Antigenga immun javobning mavjud kuzatilmasligi.
Antibiotiklar	Tabiiy, yarim sintetik yoki sintetik kimyoviy terapevtik moddalar, ular mikroorganizmlarning o'sishi va ko'payishini oldini oladi yoki ularning o'limiga olib keladi.
Antiseptika	Turli xil usullar bilan infetsiyaga qarshi kurash.
Antitana	Antigenning ta'siriga javoban tananing immunitet

	tizimining hujayralari tomonidan ishlab chiqarilgan globulin zardob oqsillari hisoblanadi.
Antitoksinlar	Mikrobial toksinlariga qarshi ishlab chiqarilgan antitanalar.
Apoptoz	Hujayralar o'limining dasturlashtirilgan biologik mexanizmi.
Aseptika	Tibbiy manipulyatsiyalar paytida bemorning organlari va to'qimalariga mikroblarning kirib borishini oldini olishga qaratilgan profilaktika choralar tizimi.
Attenuatsiya	Patogen mikroorganizmlarning shtammlarining virulentligini turli yo'llar bilan kamaytirish vaktsinalarini ishlab chiqarishda qo'llaniladi.
Auksotrof	Har qanday fermentni sintez qilish qobiliyatini yo'qotgan va ba'zi moddalarni ozuqaviy muhitga kiritishini talab qiladigan bakteriya.
Autovaksina	Bemorning tanasidan ajratilgan mikroorganizmlarning shtammlaridan tayyorlangan, davolash uchun ishlatiladigan antigen preparat.
Autoinfeksiya	Kasallik keltirib chiqaruvchi bemor mikroflorasiga xon bo'lgan infeksiya.
Autotrof	Tabiiy organik bo'lmagan moddalardan (atmosfera-dagi karbonat anhidrid, molekulyar azot, ammoniy tuzlari, nitratlar, nitritlar va boshqalar) o'z hujayrasining organik birikmalarini qurish uchun uglerod va azot manbai sifatida ishlatadigan bakteriya.
Affinlik	Antigen va antitana o'rtasidagi aloqaning mustahkamligi.
Aeroblar	Havoda erkin molekulyar kislorod yordamida energiya oladigan mikroorganizmlar.
Bakteriemiya	Qonda mikroorganizmlarning mavjudligi.
Bakteriya tashuvchi	Infeksiyaning klinik ko'rinishlari hamda organ va to'qimalarda patologik o'zgarishlar yo'qligi fonida patogen mikroblar topilgan organizm.
Bakteriofag	Bakteriya virusi.
Bakteritsid ta'sir	Mikroorganizmlarning o'limiga olib keladigan turli xil omillarning ta'sir xili.
Vaksinatsiya	Sun'iy faol immunitetni hosil qilish uchun vaktsinani yuborish jarayoni.
Tur	Mikroorganizmlar sistematikasidagi taksonomik kategoriya.
Viroidlar	Oqsil qobig'isiz va RNK molekulasidan iborat yuqumli agentlar.
Virulentlilik	Daraja, bakteriyalar patogenligini o'lchovi.

	Virulentlikning miqdoriy ifodasi: O'MD - minimal o'lim dozasi, LD50 - letal 50%.
Gapten	Antitana ishlab chiqarilishiga olib kelmaydigan, ammo tayyor antitanalar bilan reaksiyaga kirishadigan to'liq bo'lmagan antigen.
Gemagglutinatsiya	Qizil qon hujayralarini yopishtirish. Qizil qon hujayralari va ba'zi mikroorganizmlarning (shu jumladan viruslarning) o'zaro ta'sirida to'g'ridan-to'g'ri (serologik bo'lmagan) reaksiyalar, shuningdek qizil qon hujayralarining o'zaro ta'sirida bilvosita (passiv) serologik reaksiya mavjud bo'lib, ularning yuzasida antitanalar yoki antigenlar adsorbsiyalangan, mos ravishda antigellar yoki antitanalar molekullari mavjud.
Gemokultura	Qondan ajratilgan mikroorganizmlar kulturasi.
Gemoliz	Qizil qon hujayralarini yo'q qilish (liziz).
Gen	Belgilarning nasldan-naslga o'tishini ta'minlaydigan DNKning eng kichik qismi (irsiyat birligi).
Genom	Hujayradagi barcha genlarining yig'indisi.
Genetik rekombinatsiya	(Transformatsiya, transduksiya, konyugatsiya) – ikkita organizm genetik materiallarining qo'shilishidan yangi genomning paydo bo'lish jarayoni hisoblanadi.
Geterotroflar	Uglerod yoki azot manbai sifatida organik birikmalarni ishlatadigan bakteriya turlari.
Gipersezgirlik	Antigenlarga (allergenlarga) yuqori sezuvchanlik.
Dezinfeksiya	Atrof-muhit obyektlaridagi patogen mikroorganizmlarni turli usullar bilan yo'q qilish.
Disbakterioz	Normal mikrofloraga kiruvchi bir mikroorganizm biotopining miqdor va sifatining o'zgarishi tufayli kelib chiqadigan holat.
Immunitet	Ko'p hujayrali organizmning genetik yot bo'lgan agentlardan himoyalaniş mexanizmi.
Immun kompleks	Antigen-antitana kompleksi.
Invazivlik	Patogen mikroorganizmlarning organizmga kirib borishini va tarqalishini ta'minlaydigan patogenlik omili.
Interleykin	Sitokinlar guruhi.
Interferonlar	Organizmning hujayra ichidagi himoyasini ta'minlovchi sitokinlar. Eng muhim antiviral mudofaa tizimi.
Infeksi o'chog'i	Kasallikning qo'zg'atuvchisi manbai (yuqtirgan odam, hayvon yoki o'simlik).
Klon	Bitta hujayradan hosil bo'lgan nasl.
Kommensalizm	Mikroorganizmlarning birgalikda hayot kechirish shakli bo'lib, unda bir tur ikkinchi turga zarar yetkazmagan holda foydalanadi.

Komplement	Makroorganizmni spetsifik bo'lmagan himoya qilish reaksiyalarida ishtirok etadigan zardob oqsillari guruhi.
Lizogeniya	Bakteriyofag nuklein kislotasining bakterial genomga qotshilishi.
Lizosoma	Hujayra ichidagi ovqat hazm qilish funksiyalarini bajaradigan eukariotik hujayralar organelalari. Fagotsitoz jarayonida faol ishtirok etadi.
Lizotsim	Hujayra devoridagi peptidoglikanning parchalashiga olib keluvchi ferment.
Lipopolisaxaridlar (LPS)	Grammusbat bakteriyalarning tashqi membranasini tashkil etuvchi moddalar. Ular yuqori toksiklikka ega (lipid A tufayli) va antigenik xususiyatlarga ega (O-antigeni).
L-formali bakteriyalar	Ma'lum omillar (antibiotiklar, antikorlar, tuzlar va boshqalar) ta'sir qilishi natijasida qisman yoki to'liq hujayra devoridan mahrum bo'lgan bakteriyalar.
Mezosoma	Sitoplazmatik membranani sitoplazmaga invaginatsiyasi natijasida hosil bo'lgan prokariotlarning energiya saqlovchi organoidi tuzilishi. Hujayralardagi metabolik jarayonlarda ishtirok etadi.
Mezofil mikroorganizmlar	Optimal o'sish darajasi 35-37°C bo'lgan mikroorganizmlar.
Metabioz	Bir tur boshqa turning (aeroblar - anaeroblar) hayoti uchun qulay sharoit yaratadigan mikroorganizmlar o'rtasidagi o'zaro bog'liqlik munosabat turi.
Mikroorganizmlar metabolizmi	Mikrobial metabolizm.
Mikoz	Patogen zamburug'lar keltirib chiqaradigan kasalliklar.
Mikoplazma	Qattiq hujayrali devorga ega bo'lmagan grammanfiy mikroorganizmlar.
Mikroaerofillar	Oz miqdordagi molekulyar kislorodga muhtoj mikroorganizmlar.
Normal mikroflora	Organizmning organlari va to'qimalarida yashaydigan mikrobial jamoalar (biotoplar).
Mitseliy	Zamburug'lar hujayra iplari.
Mutagen agentlar	Mikroorganizmlarda mutatsiyalarni keltirib chiqaradigan fizik, kimyoviy yoki biologik tabiat omillari.
Mutant	Mutatsiyalar natijasida xususiyatlari ota-onadan farq qiladigan mikroorganizm.
Mutualizm	O'zaro foydali simbioz munosabat.
N-antigen	Bakteriyalarning oqsil tabiatli xivchinsimon antigeni.
Nitrifikatsiya	Aerob sharoitida ammiakning nitrit va nitratlarga oksidlanish jarayoni.
Nozokomial	Tibbiy muassasalarda uchraydigan va kasallik keltirib

infeksiya	chiqaradigan infeksiyalar.
O-antigen	Hujayra devorida, sitoplazma va membranalarda lokalizatsiya qilgan bakteriyaning somatik antigeni.
Opportunist mikroblar	Shartli-patogen mikroorganizmlar.
Parazitizm	Bir mikroorganizm (parazit) boshqasi hisobiga yashab, unga zarar yetkazadigan o'ziga xos munosabatlar shakli.
Pasterizatsiya	Sterilizatsiya usullaridan biri.
Patogenlik	Mikroorganizmning yuqumlilik jarayonini keltirib chiqarishi mumkin bo'lgan qobiliyati.
Pili (fimbriy, vorsinki)	Mikroorganizm hujayrasining boshqa hujayra yoki substratga yopishish hamda jinsiy material almashinuvda foydalaniladigan pilin oqsilidan iborat bo'lgan tashqi organoidi.
Plazmida	Mikroorganizm DNKsining avtonom holatda ko'paya oladigan bir bo'laki.
Prionlar	Oqsil tabiatidagi yuqumli moddalar, ba'zi sekin infeksiyalarning qo'zg'atuvchisi.
Prototroflar	Mustaqil ravishda zarur bo'lgan barcha organik birikmalarni sintez qilishga qodir mikroorganizmlar.
Profag	Bakterial hujayraning xromosomasi bilan bog'liq bo'lgan o'lgan fag nuklein kislotasi.
Psixrofil mikroorganizmlar	Optimal o'sish harorati 10-15°C bo'lgan mikroorganizmlar.
Vaksina	Emlash reaksiyalari va emlashdan keyingi asoratlarni keltirib chiqaradigan vaksina shtammlarining xususiyati.
Revaksinatsiya	Vaksinani takroriy yuborish.
Remissiya	Infeksion kasallikning organizmdagi yashirin bosqichi.
Retsidiv	Remissiyadan keyin kasallik alomatlarini qaytarish.
Saprofitlar	O'lik organik moddalar bilan oziqlanadigan mikroorganizmlar.
Simbioz	Jamoa a'zolari o'zaro foyda keltiradigan o'ziga xos munosabatlar.
Sterilizatsiya	Mikroorganizmlarning vegetativ va spora shakllarini to'liq yo'q qilish jarayoni.
Sinergizm	1) Organizm tizimlari ya a'zolarining birgalikda hamda yakka holda ta'sir qilishi; 2) Ikki ya undan ortiq omillarning (odatda, kimyoviy) birgalikda ta'sir qilishi.
Immun zardoblar	Turli antigenlarga ega hayvonlarni turli xil antigenlar bilan giperimmunizatsiya qilish natijasida hosil qilingan hamda qon zardobidan olingan preparatlar.
Sivorotka kasalligi	Allergik reaksiyaning bir shakli.
Superinfeksiya	Ma'lum moddalar ta'sirida bakteriyalarning yo'naltirilgan harakati.

Termostat	Ma'lum bir doimiy haroratni ushlab turadigan mikroorganizmlarni o'stirish uchun ishlatiladigan apparatlar.
Termofil mikroorganizmlar	Optimal o'sish harorati 45° C va undan yuqori bo'lgan bakteriyalar.
Tindalizatsiya	Oqsillarni o'z ichiga olgan muhitni yumshoq sterilizatsiya qilish usuli.
Toksemiya, toksinemiya	Qonda mikrobial toksinlarning mavjudligi.
Toksigenlik	Mikroorganizmlarning ekzotoksin ishlab chiqarish qobiliyati.
Immunologik tolerantlik	Ma'lum antigenlarga nisbatan areaktivlik holati (immun tizimining reaksiyasi yo'qligi).
Tropizm	Patogen mikroorganizmlarning ma'lum organizmlarni, organlarni yoki to'qimalarni kolonizatsiya qilish va yuqtirish uchun tanlab olinadigan xususiyati.
Fag konversiyasi	Profilaktika yordamida hujayraning lizogenlashishi natijasida mikroorganizmlar xususiyatlarining o'zgarishi.
Fagotsitoz	Eukariotik hujayra tomonidan begona agentlarni adsorbsiya qilish, ushlash, yutish va yo'q qilish jarayoni.
Fitopatogen mikroblar	O'simliklarda yuqumli kasalliklarni keltirib chiqaradigan mikroorganizm turlari.
Xronik infeksiya	Uzoq davom etadigan yuqumli kasallik.
Sitokinlar	Immun reaksiyalarda hujayralararo aloqalarni tartibga solishda ishtirok etadigan oqsil molekulalari.
Toza kultura	Bir turdagi mikroblardan hosil bo'lgan kultura.
Shtamm	Ma'lum bir manbadan ajratilgan mikroorganizmning sof kulturasi.
Ekzotoksin	Mikroorganizmlar tomonidan ishlab chiqarilgan va atrof-muhitga chiqariladigan oqsil moddasi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI

1. Аграновский А., Н.О.Х. Алиева, И.Г. Атабеков и др. практикум по общей вирусологии: Учеб. пособие / Под П68 ред. И.Г. атабекова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 2002. - 84 с.
2. Vahobov A.H. Virusologiya: darslik. / -T.: Universitet, 2017. 304 b.
3. Вахабов А.Х. Умумий вирусологиядан амалий машгулотлар: қув қўлланма./ -Т.: Университет, 2004. — 189 б.
4. Борисов Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. М. Медицина, 1984. -234 с.
5. Богоутдинов Д.З., Фоминых Т.С., Кастальева Т.Б., Гирсова И.В., Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Мишуров Н.П., Неменушая Л.А., Пискунова Н.А. Методы диагностики возбудителей заболеваний овощных культур: анализ. обзор. —М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2020. — 116 с.
6. A.X. Vahobov T.X. Rasulova, Ya.F. Nizametdinova, M.I. Mansurova, I.A. Muzaffarova. Mikrobiologiyadan amaliy va laboratoriya mashg'ulotlari uchun o'quv qo'llanma (lotincha). T.: "Universitet" nashriyoti, 2009. - 76 b.
7. Воробьева А.А., Кривошеина Ю.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. - М.: Мастерство, 2001. -148 с.
8. Gnutova R.V., Kakareka N.N., Pleshakova T.I., Sibiryakova I.I. Far Eastern strains bean common mosaic virus and methods of their immunodiagnostic // Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz. 2000. - Vol. 33. — P. 207-217
9. Гусев М.В., Л.А. Минеева. Микробиология: учебник для вузов. — Москва, 2004. — 345 с.
10. Громов Б. Строение бактерий. Учеб. пособие. — Л.: Из-во универ, 1985. -192 с.
11. Дикий И.Л., Сидорчук И.И., Холупяк И.Ю. и др. Микробиология: Руководство к лабораторным занятиям: Учеб. пособие для студентов высш.учеб.заведений. Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2002. — 165 с.
12. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.:ДРОФА. 2006. — 324 с.

13. Иногимова М., Вахобов А.Х. Микробиология ва вирусология асослари. Т.: "Университет" нашриёти, 2010. 224 б.

14. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенов Г.М. Биология почв. Учебник. -3-е изд., испр. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.

15. Қалганова, Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы. – Южно-Сахалинск: СахГУ, 2011. 56 с.

16. Лысак В.В. Микробиология: учеб. пособие. Минск: БГУ, 2007. -430 с.

17. Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии. – М. Академия, - 2005. – 167 с.

18. Расулова Т.Х., Магбулова Н.А. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Ташкент, 2014. – 56 с.

19. Расулова Т.Х., Давронов К.Д., Жураева У.М., Магбулова Н.А. Микробиологик тадқиқотлар учун услубий қўлланма. Тошкент, 2012. 45 б.

20. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 234 с.

21. Хоулт Дж. Краткий определитель бактерий Берги. М.: "Мир" 1980. – 187 с.

22. Jo'raeva U.M., Magbulova N.A. Microbiologiyadan laboratoriya mashg'ulotlariga qo'llanma. Toshkent, 2017. 45 b.

23. John W. Foster, Joan L. Slonczewski Microbiology: An Evolving Science USA, 2012, WW Norton & Co, English, 2011. P. 345.

24. Jovlijeva D.T. et. al. Determination of the effect of alstromeria x virus on chlorophyll amount in plant leaves// Modern Biology and Genetics. International scientific journal, №1-2 (1-2), 2022. pp. 8-13.

25. Umarova G.M. G'alla o'simliklari viruslarini ajratish, tozalash va ularni immunodiagnostikasi. Biol. fan. nom. dis... avtoref. – Toshkent: O'zRFA Mikrobiologiya instituti, 2009. -22 b.

26. Файзиев В.Б. Картошка X-вирусининг Ўзбекистонда тарқалган изолятини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва унинг диагностикаси; Док. дисс. Тошкент, 2019. 230 б.

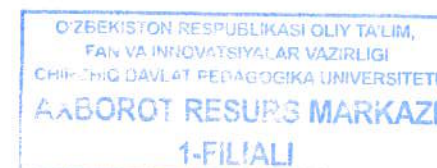
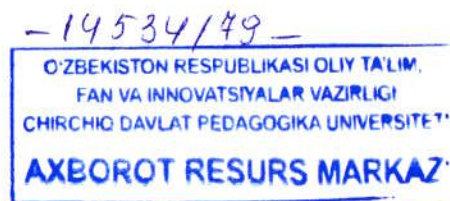
Интернет сайтлари:

<http://www.cspi.uz>

<http://www.ziyo.net>

www.nature.uz

www.pedagog.uz



MUNDARIJA

Kirish	3
1-laboratoriya mashg'uloti. Virusologiya laboratoriyasining tuzilishi va undagi ishlash qoidalari.....	5
2-laboratoriya mashg'uloti. Virusli kasalliklarning alomatlarini fitopatogen viruslar misolida o'rganish.....	9
3-laboratoriya mashg'uloti. Atlaslar va jadvallarga asoslangan holda hayvon va odamlarning virusli kasalliklari alomatlarini o'rganish	12
4-laboratoriya mashg'uloti. Virusli namunalarni yig'ish va tahlil qilish	23
5-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning tarqalish darajasi va zararini aniqlash.....	25
6-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning yuqish yo'llarini o'rganish	28
7-laboratoriya mashg'uloti. O'simlik viruslarini indikator o'simliklar yordamida aniqlash	37
8-laboratoriya mashg'uloti. Fitopatogen viruslarni biologik tozalash	42
9-laboratoriya mashg'uloti. Fitopatogen viruslarni kiritmalar asosida aniqlash.....	45
10-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning harorat ta'sirida faolligini yo'qotish nuqtasini aniqlash.....	49
11-laborat. mashg'uloti. Virusning oxirgi suyulish darajasini aniqlash.....	52
12-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning izoelektrik nuqtasini aniqlash	55
13-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning qisman tozalangan preparatini olish	58
14-laboratoriya mashg'uloti. Toza virus preparatlarini olish usullarini o'rganish	59
15-laboratoriya mashg'uloti. Toza virus preparatining miqdori va tozaligini aniqlash	66
16-laboratoriya mashg'uloti. Viruslarning nuklein kislotasi va oqsilini ajratib olish usullari.....	68
17-laboratoriya mashg'uloti. Pretsipitatsiyaga asoslangan diagnostika usullari va ularning ishlash prinsipini o'rganish.....	74
18-laboratoriya mashg'uloti. Immunodiffuziyaga asoslangan usullar va ularning viruslarni aniqlashda qo'llanilishini o'rganish	78
19-laboratoriya mashg'uloti. Virobakterial agglyutinasiya usuli	81
20-laboratoriya mashg'uloti. Tomchi usuli.....	87
21-laboratoriya mashg'uloti. Immunoferment analiz usuli va uning viruslar diagnostikasida qo'llanilishini o'rganish.....	90
22-laboratoriya mashg'uloti. PZR usuli yordamida viruslarni aniqlash	93
GLOSSARIY.....	97

V.B. FAYZIYEV, D.T. JOVLIYEVA, N.I. SHONAZAROVA,
G.U. SUYUNOVA

VIRUSOLOGIYA

laboratoriya mashg'ulotlari

(o'quv qo'llanma)

Muharrir: X. Tahirov
Texnik muharrir: S. Meliqo'ziyeva
Musaxxih: M. Yunusova
Sahifalovchi: A. Muxammadiyev

Nashr. lits № 2244. 25.08.2020 y.
Bosishga ruxsat etildi 09.10.2024 y.
Bichimi 60x84 1/16. Ofset qog'ozi.
"Times New Roman" garniturasida.
Xisob-nashr tabogi. 6,5.
Adadi 100 dona. Buyurtma № 2728567.

«Renesans sari» MChJ bosmaxonasida chop etildi.

Nashriyot tel. raqami +998 (97) 017-01-01
+998 (94) 673-66-56

ISBN 978-9910-751-14-5



9 789910 751145