



Ankara Üniversitesi
ZİRAAT FAKÜLTESİ

Yayın No : 1424
Yardımcı Ders Kitabı : 413

BİTKİ VİRUSLARININ SAFLAŞTIRILMA METODLARI

Prof.Dr.Gürsel ERDİLLER

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

Ankara - 1995

Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1424
Yardımcı Ders Kitabı: 413

BİTKİ VİRUSLARININ SAFLAŞTIRILMA METODLARI

Prof.Dr.Gürsel ERDİLLER

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

ANKARA
1995

ISBN 975-482-271-9

A.Ü.Ziraat Fakültesi Halkla İlişkiler ve Yayın Ünitesi 1995-ANKARA

İÇİNDEKİLER

A. Giriş	1
B. Kömüğe seçimi	2
C. Hasat edilen materyalin depolanması	2
D. Bulasık bakanın yumurtlanması	3
E. Berraklaştırma	5
F. Safılaştırma	5
G. Koyulaştırma	6
H. Baki safılaştırma yöntemleri	7
Kloroform ve amonyum sülfat ile	7
pH değişimi ile	8
Aseton ile	9
Dietyl-eter karbon tetra klorid, ultrasantrifüj ile	10
Kloroform ve ultrasantrifüj ile	11
n-butanol ve ultrasantrifüj ile	13
Kalsiyum fosfat jeli ve ultrasantrifüj ile	14
İndürülerek karotulmuş materyalden safılaştırma	15
Yoğunluk çıkarma santrifüjasyonu ile	16
Farklı santrifüjasyon	19
Acar-jel filtrasyonu ile	19
Kromatografik işlemler	22
Elektroforetik işlemler	23
I. Standart pH solüsyonları	24
J. Virus safılaştırma yöntemleri akis diyagramı	31
Çok amaçlı	31
Tymoviruslar	32
Tombusviruslar, Yarmoviruslar, Sobemoviruslar	33
Luteoviruslar	34
Nepoviruslar, Comoviruslar	35
Cicmoviruslar	36
Harviruslar	37
Reoviruslar	38
Caulimoviruslar	39
Tobamoviruslar	40
Tobraviruslar	41
Potyviruslar	42
Fluente sınırlı, mekanik olarak nakledilmeyen viruslar	43
Rhabdovirus	44

ÖNSÖZ

Viruslar, biyoteknolojik çalışmalara öncülük eden hastalık etmenleridir. Bitkileri hastalıklardan olduğu kadar zararlılarından koruma yönünde de son yıllarda geniş çapta çalışmalar yapılmaktadır. Bilindiği gibi viruslar yapıları itibarıyla genetik bir materyali temsil etmektedir. Patojen virusların, böceklerin zararlarını önlemek açısından kullandığı; lahanada keleş, bozkurt, kırtarılı, cam kesetirtili gibi türlerin virus süspansiyonu uygulamaları ile kontrol altına alındığı hatta bazı ülkelerde ruhsatlı viral insektisitlerin (Elcar, Gypchek, Biochek S ve TM-1) kullanımına sınırıldığı bilinmektedir.

Günümüzde bitkileri hastalıklara karşı duyarsız hale getirmek için harcanan gayretler virus ve viroid hastalıkları yönünden olumlu sonuçlar vermiştir. Domates ve patates gibi bitkileri, virulent olan ve büyük ekonomik kayıplara yol açan domates mozaiği ve patates X virüsü enfeksiyonlarından korumanın, virüsün zayıf ırkı ile buluşturmaya çalışıldığı görülmüştür. Amerika ve Brezilya'da Tristeza virüsünün zararından korumak için turuncuğil plantasyonlarında bu tip uygulamalar yapılmıştır.

Biyoteknolojik yöntemlerin sağladığı diğer önemli bir kolaylık ise, çok sayıdaki virus hastalığının kısa sürede teşhis edilmesine imkan veren, monoklonal antiserum üretimidir. Bugün viruslarda bulunan nükleik asitlerin bir parçasının izole edilerek rekombinant DNA tekniği aracılığı ile konukçu bitkilere aktarılması üzerinde önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu uygulamaları yapabilmek, virusların fiziksel ve kimyasal yapıları üzerinde çalışabilmek için az veya çok saflaştırılmış durumdaki viruslara gereksinim vardır.

Bu amaçla, virusların genel olarak saflaştırılma yöntemlerine değinmeyi ve bugün için sayıları 39'a ulaşan virus gruplarından bazılarının saflaştırılmasındaki akış diyagramını vermeye uygun buldum. Eserin, viroloji konusunda çalışacak öğrencilerime ve meslektaşlarıma yararlı olmasını dilerim.

A. Giris

Virusların, partikül ölçüsü, moleküler ağırlığı, kimyasal bileşikleri ve serolojik özellikleri gibi özellikleri üzerinde çalışmak için az veya çok saf durumda virusa sahip olmamız gereklidir. Bunun nedeni virüs ve normal bitki komponentlerinin karışımı ile çalışmaya bağlarken, bu karışımdan normal bitki komponentlerini elmeden virüsü ayırmak ve uygun bir buffer ile virüsü yeniden sulandırmaktır. Bu işlemler için bir yolla bitki materyalini ayırılması ki virüs özü içinde dağılsın ve bitkinin tecirinden kurtulmalıdır. Fakat sarılaşma metodu bu iki ihtimalin kombinasyonudur. Ayırma tekniği virüs ile normal bitki komponentleri arasındaki fiziksel ve kimyasal özelliklerdeki farklılıklara dayanır. Özellikle fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde çok fazla farklılık bulunan değişik virüsler gibi bütün virüslere tatmin edilebilen bir seted yaktır. Değişik konukçular da değişik denemeler istenmektedir. Purifikasyon metodlarının ve onların modifikasyonlarının tam bir listesini vermek imkânsızdır. Aşağıdaki surveyde purifikasyonun değişik kademeleri boyunca yapılabilecek değişiklikleri ve değişik ayırma olanakları verilmeye çalışacaktır. Bazı uygulamaların sonunda, bunların daha geniş kullanılma şekilleri verilecektir. Bu kitabın amacı virüs purifikasyonuna yeni başlayanlara pratik olarak yardım etmektir; fakat bu virüs purifikasyonunda karşılaşılan bütün problemlerin tamamını halledemez. Virüs purifikasyonu üzerinde daha yoğun bilgi genel olarak aşağıdaki araştırmalara verilmektedir:

Steers, E.L., 1959. The purification of plant

viruses. Advances in virus research 6: 1-7).

Steere, R.L., 1964. Purification. In: Corbett, R.K. and R.D. Stolars: Plant Virology University of Florida Press, Gainesville, 211-234.

Wardner, F.C., 1964. Plant viruses and virus diseases: 170-182. (The Ronald Press Company, New York).

B. Konukçu Seçimi:

1. Konukçu Üretimi: İyi neticeler alınmak için yüksek virus konsantrasyonlu meydana getiren konukçuya sahip olmak gereklidir. Toplam maddelerde virüsü inaktive edici bileşimlerin bulunmaması ve bitki materyalinden elde edilen ekstraktın kolay çıkması bu maddelerdir. Açıklama ve hasat zamanları ile birlikte büyüme şartları (ışık, ıstak, gübreleme) de göz önünde tutulmalıdır.

2. Deneme Bitkisi: Her purifikasyon işleminin değişik kademeslerini lokal leke verene bir konukçu bitki ile kontrol etmek büyük değer taşır.

C. Hasat Edilecek Materyalin Depolanması:

Hasat edilmiş yaprak materyali arsuya göre depolanır veya değişik yollarda yentiden denendir.

1. Kısa periyotlar için (bir hafta kadar) buzdolabında 0-4°C'de saklanır.

Fizyolojik aktivitede fazla miktarda azalacaktır, ve ekstraksiyondan (suyunu çıkardıktan) sonra, bu maddelerde enzimlerle oksidasyonu çok azalacaktır.

2. Uzun periyotlar için, materyal derin dondurmada -20°C'de saklanabilir. Korunmuş bitki materyalleri üretilen aloroplastlar koagule olabilir ki bu da purifikasyon için bir avantajdır. Keskinleşmiş bazı virüsler özellikle uzun

bir miktar depolanacağı zaman bu maddelere dayanamazlar.

3. Çok uzun zaman saklamak için, yapraklar dondurulup kurutulabilir (freesedried). Bu materyal ile özel ekstraksiyon metodları uygulanabilir. (Vexen, J.A. van der, 1960. Tijdschrift over Plantenziekten 66: 111).

C. Biyolojik Sulu ve Sulu Ekstraksiyonunun Sulu bir Maddeye Yatırarak Yutulması (Inoculation)

I. Buffer kullanılarak

Stabil virüslerle ekstraksiyon ve purifikasyon denemeleri için buffer kullanılır. Bufferın kimyasal iyonların iyonik gücü ve pH sı önemli bir değişik virüsler için değişik bufferlar isterler, halbuki purifikasyon işleminin değişik kademelerinde bufferın kompozisyonu, yapısı, pH sı ve iyonik gücü değişebilir. Buffer konsantrasyonunu 0,005 - 0,5 ml arası arasında değiştir. Bufferın pH sı genellikle 6 ile 9 arasında, 7 den 6'ya kadar olan dizi çok fazla kullanılmaktadır. Bilseniz sulu bir maddeye yatırarak yutulması ve sulu ekstraksiyonu esnasında okside edici enzimleri önlemek için bufferlara thioglycolic asit (0,1 %), sodium diethyldithiocarbamate (0,01 m), cysteine - hydrochloride (0,01 m), KCN (0,01 m), NaHSO_3 (% 3), ascorbic asit, ve diğer asitler veya tuzların kombinasyonu gibi gerçek kimyasal bileşikler ilâve edilir (Hak. Hampton, R.A. ve R.W. Fulton, 1939. Phytopath 49: 240, ve Hampton, R.A. ve R.W. Fulton, 1961. Virology 13: 44-52). Bazı virüsleri stabil hale getirmek için özel iyonlara ihtiyaç vardır, Brocğin Broc necrotic virüsü olduğu takdirde Ca^{++} veya Mg^{++} kullanılır. (Hrabe, A.R. 1963. Virology 19: 367 - 374). Benzer diğer durumlarda, Mg^{++} iyonları bertaraf edilir (Dunn, D.B. ve J.H. Mitcham,

1965. Virology 25: 171-192, Wollett, G.H. ve H.S. Loring
1965. Virology 25: 416-430). Proteinlerin de ilavesi
faydalı olur (örneğin yumurta albümini) (Brunt, A.A
B.H Kenten., 1961. Virology 19: 388 - 392). Tanen ve ni-
kotin ($\frac{1}{2}$ & 5) içeren bitkilerden üzsü çıkarmak için vi-
rusun çökmesine mani oluruz.

II. Üzsü ekstraksiyonu

İnsan ediliği materyalin ön işlemlerine bağ-
lı olarak, buffer solüsyonlarının ilâve edilmesi veya
edilmemesi gibi değişik ekstraksiyon yöntemleri uygulanır.

1. İnce materyal havan ve havan eli ile veya
et makinesinde veya bir Waring blöndör'ün uygun bir buf-
fer ilâvesi ile edilebilir. Özel durumlarda parçalar
homojenize olmadan önce likid nitrojen içerisinde don-
durulur.

2. Dondurulmuş materyal için bir et makinesi
veya havan ve havan eli kullanılabilir. Buzları eridik-
ten sonra buffer ilâvesi ile bir Waring karıştırıcısı
kullanılabilir.

3. Dondurularak - kurutulmuş materyalin
ekstraksiyon metodları için organik eriticiler buffer
ile aynı derecede kullanılır. Üzsü, homojenize tüben-
ten süzerek veya homojenize cam psmuğundan veya filtre
kağıdından filtre ederek ayrılır.

a. Derinleştirme

Normal bitki materyali uzaktan değişik işlemlerle
uygulanmasıyla ayrılabilir.

1. 4000 devirde santrifüj edilerek
2. 50-60°C'de 3-10 dakika ısıtarak

3. Dondurarak ve sonra bunlarını çözerak
4. Kloroform ile karıştırarak ($\frac{1}{4}$) içinde)
5. Diethylether ile " "
6. Karbontetraklorid ile: " "
7. Eşit miktarda karıştırılmış eter ve karbon tetraklorid karışımı ile karıştırarak
8. Eşit miktarda karıştırılmış kloroform ve n- butanol karışımı ile karıştırılarak
9. Eşit miktarda fluorokarbon ile (örneğin, Freon 11) karıştırarak
10. n- butanol (5-9 %) ilavesiyle
11. Etilalkol ilavesiyle
12. Karbon kömürü, bentonite, kalsiyum fosfat çözümleri ilâve ederek
13. Gerçek pH ya getirmek için kullanılmış asit solüsyonu ilâve ederek
14. Amonyum sülfat ilâve ederek (% 10-30 dozajlanmış)
15. Aseton ilavesiyle

2-14 numaralı işlemi takiben alpak devirde santrifüj edilir veya organik eriticileri veya denatüre olmuş bitki materyalini ortadan kaldırmak için filtre edilir ya da adsorbentler (yumuşak toprak) ilâve edilir.

Ekstraksiyona yukarıda daha önce söylenmiş olan organik eriticiler bir bufferle birlikte ilâve edilir.

F. Tetraasetilasilik Süspansiyonun Daha Sonraki İşlemi

1. Ultra santrifüjasyonun yardımıyla virüsün çöktürülmesi
2. Amonyumsülfat yardımıyla virüsün çöktürülmesi

3. İlg - elektrik noktasında virusun çöktürülmesi K-1 numaraları takiben alçak devirde santrifüj yapılır. 1-3 numaralardaki çökelti uygun bir buffer içinde yeniden sulandırılır ve süspansiyon katı materyali atmak için alçak devirde santrifüj edilir. Bu işlem birkaç defa tekrarlanır.
4. Şeker miktarının yoğunluğu üzerinde ultrasantrifügasyon (sıcaklık gradient).
5. Çöçel solüsyonu ile ultrasantrifügasyon.
6. Elektroforetik işlem (indüksiyon meydana getirme).
7. Ağar-gel filtrasyonu.
8. Kromatografik işlem.
9. İki faz sistemi.

Molekül ağırlığı düşük olan materyaller dializ (çözülmüş maddeleri kolloidlerden ayırma) vasıtasıyla ayrılabilir.

Yukarıda söylenen değişik işlemler yalnız veya kombinasyon halinde kullanılabilir.

6. Koyulştırma

Bitki ösuyunda bulunan bazı virüslerde olduğu gibi, bazı teşhis denemeleri için de konsantrasyon çok önemlidir, onu konsantre etmek gerekir. Bu da şöyle yapılır:

1. F1-3.deki virüs önce sulandırılmış olduğu hâlden daha küçük bir hacimdeki buffer ile yeniden sulandırılır.

2. Sulandırılmış virüs süspansiyonundan suyun çıkarılması için jeller, ultrafiltrasyon, dializ, tonajlaştırma, dondurarak çıkarma ve iki - faz sistemi ile olur.

ii. Bazı Purifikasyon (Safletirme) Yöntemleri

Aşağıda bazı safletirme yöntemleri anlatılmıştır. Bu yöntemler, virüsle ilgili olarak, değiştirilerek veya değiştirilmeden başka virüslerin safletirilmesinde kullanılmıştır. Bu el kitabı belirli bir tekniği gösteren veya onların tam bir listesini veren kitap değildir. Onlar sadece bir örnekler ve ilerdeki literatür çalışmaları için bir anahtar olabilir. Virüsün tabiatına bağlı olarak belirli bir tekniğin uygulanmasındaki büyük değişiklikler hakkında bir fikir verir. Bazı hallerde, bu araştırmayı yapan yazarın suayyen bir yöntem üzerinde araştırmacı olduğunu zannın, yalnızca bazı kaynaklar literatür verilir.

Genellikle burada tarif edilen safletirme yöntemlerinde buğzadı ilinde edilinceye kadar 1-10 ve 4°C arasında tutulur.

Dokuların macerasyanonu (suolu bir maddeye batırarak yumuşatma) için yalnızca taffer ilâve edilmiş Polypnenajene inhibitörleri kullanılmıştır.

Sentrifüj olarak 15.000 rpm ilâve, jenetik K 24, Elyve dispirouette sentrifüjü ve ultrasentrifüj olarak da 30-40.000 rpm'lik Spinco L 50 kullanılabılır.

Bu kitabın sonunda ayrıca purifikasyonda kullanılan taffer maddelerini de verilmiştir.

Ultrasentrifüj Yapanın Safletirme

a. Kloroform ve amonyum sülfatla

Kıymalı maddeler: Kloroform

Amonyum sülfat (doymuş)

solüsyonu = 76 g / 100 ml su)

buffer (örneğin fosfat ; pH 7; 0,2 M.), thioglycolic asit.

I. Homojenize 100 gr yaprak materyali ile birlikte 100-200 ml olan ve içinde % 0,1 thioglycolic asit içeren bufferi tülbentten süzünüz.

II. Özeuya 1/4 hacminde kloroform karıştırın.

III. 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin.

Yüseydeki kısım + eşit hacimde doyurulmuş $(NH_4)_2 SO_4$ solüsyonu

10 dakika 10.000 rpm de santrifüj edin. Çökeltiyi sulandırın (25 ml buffer pH.7; 0,2 M) 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin. Bu işlemi temizleninceye kadar tekrarlayın.

Sonucu $(NH_4)_2 SO_4$ çökeltisini 5 ml buffer ile yeniden sulandırın ve bütün gece buffere karşı (fosfat buffer pH.7, 0,005 M) dialize bırakın. 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin. Yüseyde kalan kısım kullanılır.

Özel buffer edüsyonları ile bu yöntem pekçok virüsler için faydalıdır.

b. pH daki Değişikliğe Göre

Kimyasal maddeler: % 10 luk asetik asit (veya 0,1 N HCl) buffer (bak a.)
thioglycolic asit.

Homojenize 100 gr yaprak dokusunu içerisinde % 0,1 thioglycolic asit içeren 100-200 ml buffer ile birlikte tülbentten sıkarak süzünüz.

Özeuya pH sı 5'e gelinceye kadar asetik asit ilave ediniz.

20 dakika 6.000 rpm de santrifüj ediniz. Yüseyde kalan kısım pH 3,6 oluncaya kadar asetik asit ilave ediniz.

10 dakika 10.000 rpm de santrifüj ediniz. ph sı 7 (0,2 M) lik bufferin 25 ml sı ile çökeltiyi yeniden sulandırın.

20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin. Bu işlemi temallerinceye kadar tekrar edin.

Son çökeltiyi (ph sı 3.6) yeniden yalnız 5 ml buffer ile sulandırın. Bir gece boyunca buffer içinde (örnek: ph 7, 0,05 M.) dağılmasını için bırakın.

20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin. Yüzejde kalan kısım kullanılır.

Tymolosa - Mikent: Yalnız izoelektrik noktası ph 3.6 olan NaV için bu asit kullanılır. ph sı değişik olan diğer viruslar için de izoelektrik noktalarına bağlı olarak kullanılabilir.

c. Aseton

Kıymalı maddeler: Aseton

buffer (örneğin fosfat-sitrik asit ph 7; 0,10 M).

Yaprakları suvan ve suvan eli ile eziniz.

Homojenatı tülbantten süzünüz.

20 dakika 6.000 rpm de özsuyu santrifüj ediniz.

Yüzejde kalan kısım 1/10 - 3 hacimle 2 hacim soğuk aseton ilâve edin. 10 dakika 6.000 rpm de santrifüj edin.

Çökeltiyi yeniden bufferla sulandırın (öasuyun 1/10 - 1/5 hacmi keser buffer ile)

20 dakika 6.000 rpm de santrifüj ediz. Yüzejde kalan kısım kullanılır.

Uygulama : Raspberry ringspot virus
 Beet ringspot virus
 Arabis mosaic virus
 Cherry leaf-roll virus için

kullanılır.

Maat, D.E., 1965. Meth.J. Plant Path. 71: 47-53
e bakınız.

Bu metod asla "saf" virus preparasyonu vermez.
Bununla beraber çok faydalı bir arıtma yöntemidir. Yalnız
kullanılabildiği gibi diğer purifikasyon metodlarıyla
kombinasyon halinde de kullanılabilir.

DIETİL-ETER, KARBONTETRAKLORİD ve ULTRASANTRİFÜJ YARUINIYLA HAVLAŞTIRMA

Kimyasal maddeleri: dietil eter (peroksid'den arındırılmış),
karbontetrazlorid)
buffer (örneğin fosfat-sitrik asit
pH 7; 0.15 M)
thioglycolic asit.

Homojenize 100 gr yaprak materyali ile birlikte
içerisinde 0,1 thioglycolic asit bulunan 100 ml
buffer, 25 ml dietil eter ve 25 ml karbontetrazlorid
varlığında karıştırıcısı içinde 1-2 dakika karıştırılır.

Homojenat 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilir.

Yüzeyde kalan kısım 1 saat 30.000 rpm (50.000 g) de
santrifüj edilir.

Çökelti 25 ml buffer ile sulandırılır. En az 1 saat
dinlendirilir (Buz dolabında). 20 dakika 6.000 rpm de san-
trifüj edilir. Bu işlem 1-3 defa tekrarlanır. (Alçak ve

yüksek devir). Sonuncu yüksek devir çökeltisi 5 ml veya daha az buffer ile yeniden sulandırılır. Bir saat dinlendirilir ve santrifüjle temizlenir, baraklaştırılır .

Yüzeyde kalan kısım direkt olarak kullanılır veya sonraki brneğin density gradient santrifüjasyonu ile saflaştırılmak için kullanılır.

Uygulama: T.M.V, Potato virus X; Tobacco rattle virus; Pea early browning virus ve diğer çubuk şeklindeki virüslere uygulanır.

Wetter, C., 1960. Archiv für Microbiologie 37:278-292,
Aust, D.Z., 1963. Letn f. Plant Path. 69:287-293

KLOROFORM ve ULTRAHANTMİŞÜS YARDIMIYLA SAFLAŞTIRMA

Kimyasal maddeler: Kloroform

Buffer (fosfat sitrik asit;
ph 7; 0,1M)

thioglycolic asit

100 gr homojenize yaprak materyalini içeride % 0,1 thioglycolic asit içeren buffer ile karıştırılır. Tabiiyetten sıkılarak süzülür. Sıvıya asit kloroform ile 1/4 oranında karıştırılır. 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilir. Yüzeyde kalan kısmı 30.000 rpm de (80.000g) 2 saat santrifüj edilir. Çökeltiyi yeniden 25 ml buffer ile sulandırılır. 1 saat dinlenmeye bırakılır (bu dinlenme esnasında partiküller buffer içinde dağılır). 10 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilir. Yüzeyde kalan kısmı 2 saat 30.000 rpm de santrifüj edilir.

Çökeltiyi 2-5 ml buffer ile yeniden sulandırılır.

1 saat dinlenmeye bırakılır. 30 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilir. Yüzeyde kalan kısım kullanılır veya direkt

purifikasyonlar için kullanılır.

Uygulama : hampberry ringspot virusa ve hast. de-
ğişiklerle TMV için, Potato virus X, Nu-
termelon mosaic virus, Tabacco ettle
virus ve diğerlerine uygulanır.

Went, D.S., 1965. Meta J. Plant Path. 71:47-53.

Regehrstel, M.D.V. van, et al., 1967. Phytopath.
Zeitschrift 45: 205 -216.

KLOROFORM, n-BUTANOL ve ULTRASABİTİFÜS YARDIMIYLA SAFLAŞTIRMA

Kimyasal Maddeler: Kloroform:

n-butanol:

Fosfat buffer pH 7; 0,2 ve 0,01 M)

thioglycolic asit.

Homojenize 100 gr yaprak içerisinde % 0,1 thioglyco-
lic asit bulunan (0,2 M) bufferin 100 ml'si ile birlikte,
100 ml kloroform ve 100 ml n-butanol karışımında
içinde karıştırılır. Oda sıcaklığında 16 saat bırakılır.
5 dakika 1.000 rpm de santrifüj edilir.

Bulu kısmı alın ve 20 dakika 6.000 rpm de santrifüj
edin.

Yüzeyde kalan kısmı 90 dakika 10.000 rpm de (80.000 g)
santrifüj edin.

Çökeltiyi 5 ml buffer pH 7 (0,01 M) içinde yeniden
süzdürün. Bir saat dinlendirin.

20 dakika 8000 rpm de santrifüj edin. Yüzeyde
kalan kısım kullanılır veya farklı purifikasyonlarda
kullanılır.

Uygulanırlar: Tobacco ringspot virus,
Bean pod mottle virus,
cucurbit mosaic virus ve diğerlerine

uygulanır.

Steere, H.L., 1956, *Phytopath.* 46: 60-69

Scott, H.A., et al, 1961. *Phytopath.* 51: 755-756.

n- BUTANOL ve ULTRASANTRİFÜJ YAKINDIRIYLA SAFLAŞTIRMA

Kimyasal maddeleri: n-Butanol

Borat buffer

(pH 7.5; 0,5 ve 0,05 M)

thioglycolic asit

homojenize 100 gr yaprak materyali içinde % 0,1
thioglycolic asit içeren 0,5 M borat buffer pH 7.5
ile süzülür. Cam pamuğundan süzülür.

Üzeye damla damla n-butanol son konsantrasyon %8,5
oluncaya kadar ilave edilerek her damlanan sonra karış-
tırılır (ozan 100 ml ise n-butanol 8,5 ml)

45 dakika karıştırılır.

30 dakika 6.000 rpm santrifüj edilir. Üzeye kalan
kısm 30.000 rpm de bir saat santrifüj edilir (60.000 g)

Özaltiyi 0,05 M borat buffer pH 7.5 içinde yeni-
den süzülür. Bir saat dinlenmeye terk edilir.

15 dakika 5.000 rpm de santrifüj edilir. Sıvı kısmı
kullanılır.

Uygulanırları: lettuce mosaic virusu, madyen değık-
liklerle cucumber mosaic virusu, Tobacco ringspot virus
ve diğerlerine uygulanır.

Tomlinson, J.A., 1962. *Nature* 193: 299

Tomlinson, J.A., et al 1959. *Phytopath.* 49: 291-299.

Hollings, K. ve O.A. Stone, 1962. Nature 194-607.
Hollings, K., 1969. Ann. appl. Biol. 55: 447-457.

KALSİYUM FOSFAT JELİ VE ULTRASANTRİFÜJ YARDIMIYLA SAFLAŞTIRMA

"Kapsül"

Maddeler : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

CaCl_2

Sodyum dietil ditriokarbonat

Sodyum tetroglikolate

Fosfat buffer pH 8; 0,02 %.

Jelin hazırlanışı: 1 lt 0,1 M $\text{Ca}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözünücü
(17,8 g/L)

1 lt 0,1 M CaCl_2 çözünücü
(11,1 g/L)

CaCl_2 u fosfat çözünümünün içerisine damla damla ilâve ederek karıştır. Süspansiyonu jel çökünceye kadar dağıtmadan sulafana edin. Sulu kat kısmı dikkatlice dökün.

Taze destile su ilâve edin. Bunu 15-20 defa tekrarlayın. Son çöküntüden sonra su ilâve etmeyin. Bu jelimül süspansiyon saflaştırmada kullanılır.

Purifikasyon

100 gr nemojenize yaprak materyali içinde 0,01 M sodyum-dietil ditriokarbonat ve 0,02 % sodyumtetroglikolate içeren 150 ml buffer pH 8 (0,02 %) içine konur. Tuhantten çıkarılır. 20 dakika 8.000 rpm (8.000 g) de santrifüj edilir.

Yüseyde kalıcı kısım 50 ml jel süspansiyonu ilâve edilir.

20 dakika 8.000 g de santrifüj edilir. Yüseyde kalan kısım 2 saat 10.000 rpm (10.000 g.) de santrifüj edilir.

Çökelti 0,02 M fosfat buffer pH 6'ya 25 ml'et
içerisinde yeniden eritilir.

20 dakika 0.000 g. de santrifüj edilir. Yüzye
kalan kısım 2 saat 00.000 g. de santrifüj edilir.

Çökelti 5 ml buffer (pH 6; 0,02 M) içinde yeniden
süslendirilir.

20 dakika 0.000 g. de santrifüj edilir. Sıvı kısım
kullanılır.

uygulamalar: Sour cherry necrotic ringspot virus,

Prune dwarf viruslarında uygulanır.

Fulton, R.W., 1959. Phytopath. 49: 539.

Fulton, R.W., 1959. Virology 9: 522-535.

DONDURULMALAR- KURUTULMUŞ KATKIYALIKIN SAKLANMASI

Kimyasal maddeler: Kloroform (-15°C)

Alkol (-15°C)

aseton (-15°C)

Dietilster(-15°C)

Fosfat buffer 1/15 M, pH 7.3

KCl

NaHSO₃

0 gr. maddelerde azu yavaş matorfali ile 300 ml
soğuk kloroform, 100 ml ve 100 ml to. 100 ml'ün suyu.

Çökelti (pasta) kloroform ile 200 ml 100 ml, 100 ml
bir zaman kırılır ve 30 dakika sonra edilir.

Aynı 100 ml'alkol, aseton ve etanol ile 100 ml, 100 ml,
100 ml bir zaman kırılır, 30 dakika sonra filtre edilir.

Steri vakum altında uçurun. Sarı tozu muhafaza edin. homojenize 8 gr toz, içinde % 0,3 KCK ve % 0,3 Na_2SO_3 içeren 250 ml buffer (pH 7.1; 1/15 M) tülbentten sıkılarak süzülür. 10 dakika 1.500 rpm de santrifüj edilir.

Yüneyde kalan kısım 45 dakika 60.000 g. de santrifüj edilir.

Çökelti 20 ml (% 0,85) tuzlu su içerisinde yeniden sulandırılır.

16 saat müsluk suyu içinde dialize terk edilir.

% 0,85 oluncaya kadar NaCl ilâve edilir. 10 dakika 1.500 rpm de santrifüj edilir. Yüneyde kalan kısım kullanılır.

Uygulamalar: Potato virus S, K, X ve Y, Cucurbit mosaic virus, Tomato aspermy virus, Tobacco rattle virus ve Nergis, Sümbül, Süsen virüslerine tatbik edilir.

Bosendaal, A. ve D.H.M. van Elgteren, 1958. Proc. 3 rd. Conf. Pot. Virus Dis., Lisse, Wageningen, 1957:20-36.

Veken, J.A. vander, 1960. Tijdschrift over Plantenziekten 66: 1-11 .

Density Gradient Santrifügasyonu

(Değişik yoğunluk santrifügasyonu)

Üç inkân vardır:

1. Halka nisbetine göre santrifügasyonu

Çöküntü oranındaki değişikliklerin yardımı ile santrifüj.

2. Denge halkası santrifügasyonu

Partikül yoğunluğu ve çöküntü oranındaki değişikliğe dayanarak ayırma.

3. Isopycnic halka santrifüjasyonu:

herbir partikül, sulandırma ortamı bu partikülün yoğunluğuna eşit noktaya gelinceye kadar santrifüje devam edilir.

Density gradient kolonlarının hazırlanmasında, daha ziyade sakkaroz çeker solusyonları kullanılır. (Sırasıyla 1 ve 2 için) 3 için daha ağır yoğunluğa ihtiyaç vardır. Meselâ CaCl_2 solusyonlarına.

Farklı Sakkaroz Kolonlarının Hazırlanması:

Kimyasal maddeleri: Sakkaroz
çeşitli ayraçlar
Fosfat buffer 0,01 M; pH 7.2

Buffer ile herbir lt'da 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 gr. sakkaroz içeren sakkaroz solusyonları yapın.

Halka nisbeti ve denge halkası santrifüjasyonları için 1 x 3 santrifüj tüplü Spinco SW 25.1 rotorları kullanılır.

Halka Oranı Santrifüjasyonu İçin:

Sırasıyla %40, %30, %20 ve %10'luk solusyonlardan 7,7,7 ve 4 ml'lik tabakalar halinde santrifüj tüplerine koyun.

Tüpleri 24 saat sakkarozun difüzyon kabiliyeti sakıncasızca kadar muhafaza edin.

Kullanmadan biras önce, 2 ml terraklaştırılmış suyu tabakasını sakkaroz tabakasının üzerine koyun.

1-2 saat 24.000 rpm de Spinco SW 25.1 rotor içinde santrifüj edin.

Hasta ve sıhhatli materyal ile dolu olan tüpleri küçük bir lamba ışığı (özel olarak yapılmış, ayarlı ışık veren) altında kontrol ediniz (kırılma teoirine bakınız).

Denge Halkası Santrifügasyonu İçini

Santrifüj tüplerine sırasıyla %60, %50, %40 ve %30'lük şeker solusyonlarından 4,4,4 ve 4 ml'lik tabakalar halinde koyun.

Tüpleri 24 saat muhafaza edin.

Kullanmadan önce (kolona stabil halde tutan şeker tabakası içeren kolonun üzerinde 5 ml'lik virus preparasyonu tabakası koyun ve bunun üzerine tüpün içindeki çökmei öpmek için 7 ml su tabakası ilâve edilir.

7 saat 24.000 rpm'de Spinco Sw 25.1 rotorda santrifüj edilir.

İsoyonic Halka Santrifügasyonu

Örneğin yoğunluğu 1.45 olan Cacl solusyonları kullanılarak yapılabilir.

Virus suspensiyonu, swayyen bir yoğunluktaki Cacl tabakası üzerine yayılır.

Santrifügasyon esnasında (örneğin 24 saat 35.000 rpm de Spinco Sw 39 rotorda) yükselme olacak ve partiküller isopycnic pozisyonlarını buluncaya kadar toplanacaktır.

Uygulama: Kissen saflaştırılmış veya berraklaştırılmış preparasyonların ileriki saflaştırılmalarında uygulanır.

Literatür:

Brakke, M.K., 1958. Phytopath. 48: 439-445.

Brakke, M.K., 1960. Advances in Virus Research
7: 193-224.

Corbett, M.K., 1961. Virology 15: 8-15.

Agrawal, H.O., 1964. Dissertation.

Communication 64-5 of the state Agricultural University .
Wageningen p. 33-36.

Farklı Santrifügasyon

Farklı santrifügasyon yalnız başına veya daha
ziyade diğer işlemlerin kombinasyonuyla beraber kulla-
nılır. Örneğin alçak devir santrifüjünde (örneğin 20 dakı-
ka 6.000 rpm) nücre artıklarını usaklaştırmak için santri-
füj edilir. Yüsyde kalan kısım, virusları göktürsek
için yüksek devir santrifügasyonuna maruz bırakılır.
Çökelti (ki bazı kirleri ihtiva eder) bufferin küçük
bir hacmi ile yeniden sulandırılır ve katı materyali
atsak için alçak devirde santrifüj edilir. Bütün işlem
temiz bir preparasyon alsak için lüzumu olduğu kadar
fazla tekrarlanır. Santrifügasyon zamanı ve devri virusa
bağlı olarak çok geniş değişiklikler gösterir.

Uygulama: Bu teknik daha ziyade bitki viruslarına
tattik edilen saflaştırma yöntemlerinde kullanılır.

Agar-gel Filtrasyonu İle Saflaştırma

Virusların saflaştırılmasına ait olan pekçok işlem-
ler virüs partiküllerinin kimyasal özellik ve izoelektrik
noktasına dayanarak çökeltilmesi yolu ile olmaktadır.
Bununla beraber pekçok virüs agregasyon adı verilen
topaklaşma durumuna geçmekte ve yeniden sulandırma

yapıldığı zaman çökelmeden kolayca ayrılmamaktadır. Bu şekildeki aggregasyonu önlemek ve virus konsantrasyonunu artırmak amacı ile Agar-gel filtrasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem;

- 1) Virus için uygundur ve işlemler boyunca virusları suspensiyon halinde tutar.
- 2) Yalnız ucu ekipmanlar ister.
- 3) Büyük volümleri elde tutmağa elverişlidir.
- 4) Çabuk ve kolayca uygulanabilir.

4 ve 8'lik agar (Ionagar No:2) solusyonları 15 atmosfer basınç altında 22°C de 30 dakika bırakılır.

Soğuduktan sonra kesilerek küçük parçalara ayrılır. 40 meshten geçebilecek 60 meshten geçemeyecek şekilde su ile yıkanır. Cam silindirlere doldurulur.

100 gr yaprak (0,2 sodyum dihidrojen fosfat - 0,3 M sodyum Klorid içeren 100 ml buffer solusyonu ile blender mikserde ezilir. Lapa tülbentten süzülür.

Özsu 30 dakika 5.00 g. de santrifüj edilir.

Taefiye edilmiş virus suspansiyonu, parçalanmış 8'lik agar kolonları üzerine yayılır. (4,5x60 cm'lik kolonun üzerine 150 ml konabilir). NaOH ile pH si 6.8'e ayarlanmış 0,2 M sodyum dihidrojen fosfat ve 0,3 M sodyum klorid içeren buffer ile dengelenir ve kolonlardan aynı buffer ile yıkanır. Virus agar kolonundan çıkarken en az hem özsuyun iki misli fazla bir sıvı içindedir. Bunun konsantrasyonu ultrasantrifüjle orijinal hacminin 1/10 ve 1/100 ü arasında koyulaştırılabilir. Koyulaştırılmış

kısım 30 dakika 500 g. de santrifüj edilerek tasfiye edilir.

 8 lik agar kolonunda virustan ayrılmamış kirleri ortadan kaldırmak amacı ile  4 lik agar dolu kolondan (2x60 cm) koyulaştırılmış ve kısmen tasfiye edilmiş virus filtre edilir.

Yüseyde kalan kısım 30 dakika 500 g.de tasfiye edilir.

Uygulama: TKV ve southern bean mosaic virus.

Literatür:

Ackers, G. K. ve H.L. Steere, 1961. Nature 192: 436-437.

Ackers, G.K. ve H.L. Steere 1962. Biochim. Biophys. Acta. 59: 137-149.

Hegunmortel, M.H.V. van. 1962. Virology 17: 601-602.

Steere, H.L. ve G.K. Ackers, 1962. Nature 194: 114-116.

Steere, H.L., 1963. Science 140: 1089-1090.

Steere, H.L., 1964. Purification. In: Corbett, M.K.ve H.D Sialer: Plant Virology 217-220 ve 232-233.

Steere, H.L. ve G.K. Ackers. 1964. Nature 196: 475-476.

Walters, H. J . ve M.A. Bryan, 1965. Phytopath. 55: 502.

Kromatografik İşlemler

Ultracentrifügasyon ve kromatografi virus araştırmalarında iki önemli yardımcıdır.

Bitkisel virüslerin saflaştırılmasında Steere (1959) tarafından özetlenen ısı ile muamele, organik sıvılarla çalkalama ve tuzlar ile çöktürme gibi çeşitli tasfiye yöntemleri izlenmiştir. Bu yöntemlerde kloroplast ve diğer protoplazmik bileşiklerin uzaklaştırılması bazı virüslerin bulgunculuklarını ortadan kaldırabilir. (Venekamp ve Kosch 1963).

Bitki virüslerinin tasfiyesinde yüksek polymer iki-faz sistemlerinin kullanılması (Albertson, 1960, 1961) ile virus partikülleri polymer sistem içinde dağılırken kirlerde adsorbe edilerek ortadan ayrılırlar. Buna ilâveten böyle solusyonlar virüsü stabilize ederler. Bu da, kromatografik sistemin virüslerin purifikasyonunda uygulanabileceğini gösterir. Kromatografik yöntemde birinci basamak kromatografik tasfiye, ikinci basamak kromatografik purifikasyondur. Kromatografik purifikasyondan önce, kloroplastlar, mitokondiriler ve çekirdekler gibi hücresel maddelerin ortadan kaldırılması için %5 polyetylene glukol, %0,5 dextran, %4,5 glukoz ve %2 NaCl, %0,4 $MgCl_2$ ve 0,01 % fosfat buffer pH 7 içeren bir sıvıdan hasta bitki özünü geçirilir. Buna benzeyen yalnız polyetylene glukol ve NaCl bulunmayan solusyon virüslerin serbest kalmasına neden olur.

Yukarıda söylenen solusyonlar içerisinde NaCl'in bulunuşu, kloroplastların bağlanıştaki koagülasyonunu nispetendirir. 30 dakikalık inkübasyona bırakılacak olursa kloroplastlar çöker.

Çöken kloroplastlar temiz kum ile dakikada 2 ml akıntı verecek şekilde karıştırılır. Buna çözünmüş maddede ilâve edilir. Başlangıçta akıntı kahverenkli olur, daha sonra 250 ml'lik solusyon da kolondan geçtikten sonra berraklaşır. Sonra PEG ve NaCl suz olarak hazırlanmış 150 ml'lik solusyon kolondan geçirilirse virusları da alır. İkinci bir kromatografik işlem, virusların iyice saflaştırılmasına yardım eder. Virus partikülleri üzerine absorbe olmuş maddeler ikinci kolondan geçirilen birinci eriticilerin pasajı ile ortamdaki ayrılmış olur.

Uygulama: Potato X virus, TMV, Potato virus Y,
Tobacco rattle.

Literatür:

Cochran, G.W. et al, 1959. Biochem. Biophys.
Acta. 35: 190-196.

Sela, I. et al, 1964. Virology 22: 446-451.

Tremains, J.H., 1961. Can. J. Bot. 39: 1705-1709.

Venekamp, J.H. ve W.H.N. Mosch, 1963.

Virology 19: 316-321.

Venekamp, J.H. ve W.H.N. Mosch, 1964. Virology
22: 503-507.

Venekamp, J.H. ve W.H.N. Mosch, 1964. Virology
23: 394-402.

Venekamp " " " 1964. Neth.J.Plant
Path. 70: 65-69.

Venekamp " " " 1964. Phytopath.
54: 606-609.

Elektroferetik İşlemleri

Bak: Brakke, M.K., 1955. Archives of Biochemistry and
and Biophysics 55: 175-190.

Brakke, M.K., 1958. Phytopath. 48: 439-445.

Roggenmortal, M.H.V. van, 1964. Virology 23: 495-502.

I. Standart pH Solusyonları:

İngiliz Standartlar Enstitüsü (Publication B.S. 1647: 1950) aşağıdaki solusyonları cam elektrodların kalibrasyonu için önermektedir:

İsare Standartı:

0.05 M-potasyum hidrojen fitalate (potassium hydrogen phthalate) 10-21 gr saf kuru KH fitalate taze destile su içinde veya yeni kaynatılıp soğutulmuş destile su ile eritilerek 1000 ml'ye tamamlanır. Bu solusyonun pH'si: 15°C'de 4.000, 25°C'de 4.005 ve 38°C'de 4.026'dir.

İkinci Derecede Standartlar:

1) 0.1 M -potasyum tetroxalate* ($\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M. wt =254.19). pH =25°C'de 1.48, 38°C'de 1.50'dir.

2) 0.01 M -HCl +0.09 M -KCl. pH =25°C'de 2.07 ve 38°C'de 2.08'dir.

3) 0.1 M $-\text{CH}_3\text{COOH}$ ve 0.1 M $-\text{CH}_3\text{COONa}$ (NaOH) ile yarı yarıya nötralize edilmiş asetik asit'ten hazırlanmıştır. Fakat sodyum asetat nötralize edilmemiştir). pH =12°C'de 4.65, 25°C'de 4.64 ve 38°C'de 4.55'dir.

4) 0.025 M $-\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 0.025 M $-\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. pH =25°C'de 6.85, 38°C'de 6.84'dür.

5) 0.05 M $-\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}^{**}$ (M.wt =381.43). pH =25°C'de 9.18, 38°C'de 9.07'dir.

* 60°C nin altında kuru

** Su kaybeder

Amerikan Milli Standartları da aşağıdaki solusyonları önermektedir (Kaynak; Electrometric pH Determinations Wiley & Sons Inc, New York (1954). p.118):

1) 0.05 M -Potassium tetroxalate (herbir litreye 12.71 g $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). pH =20-25°C de 1.68, 30°C de 1.69 dir.

2) 25°C de doyurulmuş potasium hydrogen tartarate solusyonu. pH =25°C de 3.56, 30°C de 3.55 dir.

3) 0.05 M -potasium hydrogen phthalate (litreye 10.211 g). pH =20°C de 4.00, 25-30°C de 4.01 dir.

4) 0.025 M $\text{-KH}_2\text{PO}_4$ + 0.025 M $\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (litreye 3.402 g KH_2PO_4 + 4.451 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). pH = 20° de 6.88, 25°C de 6.86, 30°C de 6.85 dir.

5) 0.01 M -borax (litreye 3.814 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). pH =20°C de 9.22, 25°C de 9.16, 30°C de 9.14 tür.

Bufferların hazırlanması:

Not: Elektroforsis için en iyi iyonik güçlü bufferlar Miller ve Golder, Arch. B. 29, 420 (1950) ve Green J.A.C.S. 55. 2331 (1933) tarafından tarif edilmiştir.

Birçok bufferlarda pH nin 1ci ile farkedilir pekilde değığine uğradığı kaydedilmiştir. Bufferlarda Na^{++} ve K^+ kullanılarak belki de pH değerinin az miktarda değığini ile bu durum düzeltilerir.

1. Fosfat - Sitrat Buffer

Na_2HPO_4 - citric asit buffer, pH 2,2-6.0

(McIlvaine, J.B.C. 49; 104 (1921)

Ca^{++} ve Mg^{++} iyonlarının varlığında kullanılmazdır.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.w.t = 176.05; 0,2 M lik solusyon 1.000 ml de 35.61 gr içerir. Citric asit H_3C , M.w.t 210.14; 0,1 M'lik solusyon 1000 ml de 21.01 g içerir.

ph	0,2 M- Na_2HPO_4 (ml)	0,1 M- citric acid (ml)	ph	0,2 M- Na_2HPO_4 (ml)	0,1 M- citric acid (ml)
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.16	17.84	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.13	15.87	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	14.96	6.2	13.24	6.76
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.53	5.47
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.81
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

2. Eosun asetat - asitik asit buffer

Sodium acetate - acetic acid buffer (0.2 M),
ph 3.6 - 5.0

(analogue W.D.S. 105.4501 (1914))

Na acetate, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, M.W.t = 136.09

0.2 M'lik solusyon 1000 ml de 27.22 gr içerir.

pH	18°J de	0.2 M-sodium	0.2 M-acetic acid
		acetate	
		(ml)	(ml)
3.6		0.75	9.25
3.8		1.20	8.80
4.0		1.60	8.40
4.2		2.65	7.35
4.4		3.70	6.30
4.6		4.90	5.10
4.8		5.90	4.10
5.0		7.00	3.00
5.2		7.90	2.10
5.4		8.60	1.40
5.6		9.10	0.90
5.8		9.40	0.60

3. Mesitat buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (0.1 M), pH 5.6 - 6.0

(Comari, *entando in anayolojia*, vol 1. academo

Press. Inc., New York (1955) p. 143; after Sorenson)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, w.w.t. = 176.03; 0.2 M'ita. solution 100 ml de
10.01 gr 100 ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, w.w.t. = 390.22; 0.2 M'ita " " 74.04 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, w.w.t. = 130.03; 0.2 M'ita " " 47.6 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, w.w.t. = 156.03; 0.2 M'ita " " 31.21 g

pH	0.2 M	0.2 M	
	Na_2HPO_4	NaH_2PO_4	
	(ml)	(ml)	
5.6	6.0	92.0	200 ml'ye H_2O ile tamamlanır
6.0	12.3	87.7	" "
6.2	16.5	83.5	" "
6.4	26.5	73.5	" "
6.6	37.5	62.5	" "
6.8	49.0	51.0	" "
7.0	61.0	39.0	" "
7.2	72.0	28.0	" "
7.4	81.0	19.0	" "
7.6	87.0	13.0	" "
7.8	91.5	8.5	" "
8.0	94.7	5.3	" "

4. Tris - HCl buffer

Tris -(hydroxymetyl) -aminonitrojen -HCl (Tris -HCl) buffer (0.05 M), pH 7.2 - 9.1
(Sigma Chemical Co. Bulletin, 106)

Tris -(hydroxymetyl) -aminonitrojen. k. wt. = 121.14;
0.2 M'lik salıyın 1000 ml'ne 24.23 g ikerir.

pH		0,2 M-Tris	0,1 M-HCl	H ₂ O ile 100 ml'ye tamamlanır
23°C	37°C			
		(ml)	(ml)	
9.10	6.95	25	5	"
8.92	6.70	25	7.5	"
8.74	6.60	25	10.0	"
8.62	6.48	25	12.5	"
8.50	6.37	25	15.0	"
8.40	6.27	25	17.5	"
8.32	6.18	25	20.0	"
8.23	6.10	25	22.5	"
8.14	6.06	25	25.0	"
8.02	7.30	25	27.5	"
7.96	7.12	25	30.0	"
7.87	7.73	25	32.5	"
7.77	7.63	25	35.0	"
7.66	7.52	25	37.5	"
7.54	7.40	25	40.0	"
7.36	7.22	25	42.5	"
7.20	7.05	25	45.0	"

3. Borik asit - borax buffer

Borik asit - borax buffer (0,2 M) pH: 7.4 - 9.0

(Sölgör, anal. reagent, 157 (1941))

Borax, $10 \text{ B}_2\text{O}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ m. et. = 361.43; 0,05 M'lik çözümü (100 ml'ye tamamlanır) 18.07 gr içerir.

Borik asit, m. et. = 61.04; 0,2 M'lik çözümü 100 ml'ye 12.37 gr içerir.

Boraks, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ kristalizasyon ile suyunu kaybedebilir, H_2O kapalı şişede muhafaza edilmelidir. So-raklı solusyonu tartıa asit solusyonunun yarısına nötralizasyonu ile de sınırlanabilir.

pH	0.05 M-borax (ml)	0.2 M-boric acid (ml)
7.4	1.0	9.0
7.6	1.5	8.5
7.8	2.0	8.0
8.0	3.0	7.0
8.2	3.5	6.5
8.4	4.5	5.5
8.7	6.0	4.0
9.0	8.0	2.0

pH metre yardımıyla arzu edilen her aralıktaki buffer ve pH kolaylıkla yapılabilir. Düşük pH'lar için asetik veya sitrik asit bufferleri, 6 ve 8 arasındaki pH'lar için fosfat, 7,5 ve 9 arasındaki pH'lar için borat buffer kullanılır.

3. VIRUS SAFLASTIRMA ISLEMLERİ AKIS DİYAGRAMI

COE AMAÇLI
(Mg-aktifleşmiş bentonit)

Enfekteli Doku

1-2 hacim 0.05 M ile 0.5 M fosfat, borat, sitrat bufferlar pH 6.5-7 ile bir antioksidant (Na sülfat, Na askorbat, askorbik asit, Na- tioglikolat, 2-merkaptoetanol, merkaptosasetat karıştırılır

↓
Homojenize edilir

↓
Tübenitten süzülür

↓
Süzüğe 18 Mg-aktive edilmiş bentonit katılır. 15 dak. karıştırılır.

↓
Düşük devirli santrifügasyon
12.000 devir/dak. da 15 dak.

↓
Çökelti atılır

Ust sıvı

↓
Yüksek hızlı santrifügasyon. 27.000 devir/dak. da 2.5 saat.

↓
Çökelti
Düşük molariteli bufferda yeniden sulandırılır.

↓
Yüksek hızlı santrifügasyon. 27.000 devir/dak. da 2.5 saat.

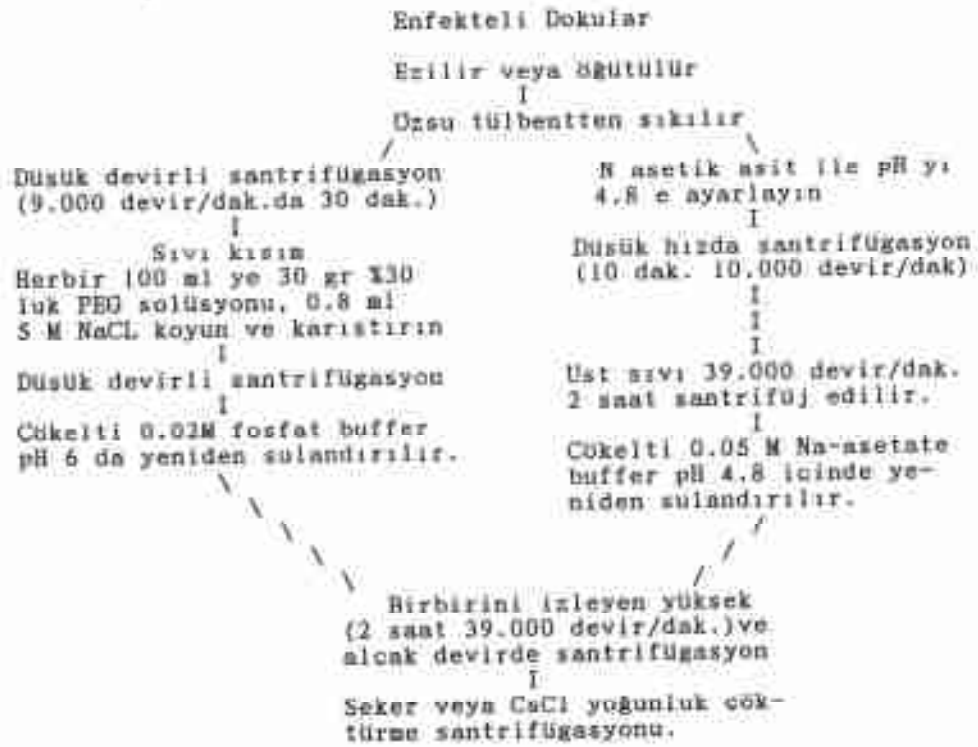
↓
Çökeltiiler düşük molariteli buffer içinde eritilir.

↓
Yoğunluk öktürme santrifügasyonu

Literatür:

Dunn, D.B. ve Hiltchborn, J.H., 1965. Virology, 25:171-192.

TYMOVIRUSLAR



Literatür:

- Leberman, R., 1966., Virology, 30:341-347
Matthews, R.E.F., 1960. Virology, 12:521-529.

**TOMBUSVIRUSLAR
CARMOVIRUSLAR
SOBEMOVIRUSLAR**

Efekteli Doku

2 hacim. 50 mM Na-asetat buffer pH 5.0, 1% askorbik asit

Homojenize edin ve tülbentten süzün

Filtratı 2 saat 4°C de saklayın

Düşük devirli santrifugasyon (10 dak.
10.000 devir/dak.da)

Cökeltiyi atın

Ust sıvı

pH 5.5 e ayarlayın. 0.2 M NaCl,
1% 10 PEG 1 (M.W.6000) karıştırır-
ken (ilave edin. 1 saat 4°C de
bırakın.

Düşük hızda santrifugasyon
(10 dak. 10.000 devir/dak.)

Cökelti 50 mM asetat buffer
icinde yeniden sulandırılır

Düşük hızda santrifugasyon
(10 dak. 10.000 devir/dak.)

Ust sıvı 36.000 devir/dak.da
1.5 saat santrifuj edilir.

Cökelti 50 mM asetat buffer
icinde yeniden sulandırılır.

10-40 seker yoğunluk cöktürme
santrifugasyonu

veya
denge santrifugasyonu
(2.65 gr CsCl'ü 5 ml virus icinde
eritin. 10 °C de sabit açılı ro-
taria 36.000 devir/dak.da bir
gece santrifuj edin. Opal bandı
alin ve 0.05 M NaCl pH. 5.5 e
karşı dializ edin).

Literatür:

Gallitsis, D., Hull, R. ve Koenig, R., 1985. Journal of General
Virology, 66:1523-1533.

LUTEOVIRUSLAR

Enfekteii Dokular

(Tercihan gövde, yaprak petiolleri ve damarları alın)
2 vol. 0.1M Na sitrat buffer pH 6
0.5% mercaptoethanol (2 ml/g bitki dokusu).

↓
Homojenize edin

1% endüstriyel pektin glikosidaz ilave edin. 24-37 °C de 5-7 saat caikalayın.

↓
Tülbentten süzün

Süzüğe, 0.67 hacim 1:1 kloroform-butanol ilave edin, oda sıcaklığında 30 dak karıştırın.

↓
Düşük hızda santrifügasyon (10 dak. 6000 devir/dak.)

Cökeltiiler atılır

↓
Ust sıvıya 1% PEG (m.w. 8000, 1% NaCl ilave edin.) 1 saat 4°C de bırakın.

↓
Düşük hızda santrifügasyon (20 dak. 8.000 devir/dak.)

↓
Cökeltiiler 1% Triton-X100 içeren 0.02 M fosfat buffer ile yeniden sulandırılır.

↓
Yüksek hızda santrifügasyon (4 saat 30.000 devir/dak, 120 seker kullanarak).

↓
Cökeltiiler 0.02 M fosfat buffer içinde yeniden sulandırılır.

↓
10-40 seker yoğunluk caktürme santrifügasyonu.

Literatür:

Casper, R., The Plant Viruses, 3:235-238.

Takanami, Y ve Kubo, S., 1979. Journal of General Virology, 44:153-159.

**NEPOVIRUSLAR
COMOVIRUSLAR**

Eufekteii dokular

1 hacim fosfat buffer 0.1M, pH 7.2 10 mM
EDTA, 0.1 % 2-mercaptoethanol katılır.

↓
Homojenize edilir

↓
Tribentien süzülür

↓
Filtrata

1 hacim 1:1 kloroform-butanol katılır
15 dak. oda sıcaklığında karıştırılır

↓
Düşük hızda santrifügasyon
(10 dak.da 5.000 devir/dak.)

↓
Üst sıvıya

24 PEG 6000, %1 NaCl ilave edin
1 saat oda sıcaklığında bırakın

↓
Düşük hızda santrifügasyon
(10 dak.da 10.000 devir/dak.)

↓
Çökeltiler

0.02 M pH 7.2 fosfat bufferde yeniden
sülandırılır.

↓
Yüksek ve alçak hızda 1-2 kez santrifüj
edilir. (İsteğe göre)

↓
Yoğunluk çıkarma santrifügasyonu

Literatür:

Kentch, R.H., Cockbain, A.J. ve Woods, R.D., 1980. Annals of
Applied Biology, 96:79-85

Van Kammen, A. ve de Jager, C.F., 1978. CMI/AAE Descriptions
of Plant Viruses, No. 197.

CUCUMOVIRUSLAR

Enfekteli dokular

1 hacim 0.5 m Na sitrat buffer pH 6.5
5mM EDTA, % 0.5 1 hacim kloroform ile
emülsifiye edilmiş thioglycolic asit

↓
Düşük hızda santrifügasyon
(10 dak 8000 rpm)

↓
Ust sıvıya

% 10 PEG 6000 ilave edilir ve 1 saat 4 C 'de
karıştırılır

↓
Düşük hızda santrifügasyon
(10 dak 8000 devir/dak)

Ust sıvı atılır / /

↓
Cökelti

0.5 M Na borat bufferda, 0.5 M
EDTA pH 9 ile sulandırılır, % 2
Triton X-100 katılır

↓
Düşük hızda santrifügasyon
(10 dak 8000 devir/dak)

↓
Ust sıvı

2-3 kez yüksek(2.5 saat 29000
devir/dak) ve düşük hızda
santrifüj edilir

↓
Cökeltiler

0.5 mM EDTA pH 9 içeren 5 mM
borat bufferda sulandırılır

↓
% 5-25 seker yoğunluk çöktürme
santrifügasyonu

Literatür:

Francki, R.I.B., Mossop, D.W. ve Hatta, T., 1979. CMI/AAB
Descriptions of Plant Viruses, No 213.

Lot, H., Marrou, J. Ousot, J.B. ve Esvan, C., 1972. Annales de
Phytopathologie, 4:25-38.

İLARVIRUSLAR

Eufekteli dokular

1,5 hacim 0.02 M fosfat buffer pH 8, 0.02 M
2 - merkaptoetanol. 15 g alüminyum oksit kat.

↓
Homojenize edilir

↓
Homojenats

15 dak. 5.000 devir/dak.da santrifüj edin.

↓
Üst sıvıyı

her 100 g. doku için 80 ml zulu kalsiyum sülfat
karıştırın

↓
Düşük hızda santrifüj edin (15 dak. 5.000 d/d)

Cökeltiyi alın

↓
Üst sıvıyı

3 saat 29.000 d/d'da santrifüj edin.

↓
Cökeltiler

0.01 M EDTA pH 6.0 içinde sulandırılır.
Sitrik asit ile pH 5.0'a ayarlanır ve
düşük devir santrifügasyonu ile cökelti
alılır.

↓
Üst sıvı

yeniden pH 6.0'a ayarlanır. 3 saat 29.000
d/d'da santrifüj edilir.

↓
Cökeltiler

0.01 M EDTA pH 6.0 da sulandırılır.

↓

Seker yoğunluk-cukürme santrifügasyonu.

Literatür:

Fulton R., 1967. Virology 32:153-162

REOVIRUSLAR:

Enfekteii dokular

(Kokler veya yaprak ve gövde kısmı alınır.)
0.05 ila 0.4 M fosfat buffer pH 7, 5 mM NaEDTA,
10 M sodyum sulfit ile karıştırılır.

↓
Homojenize edilir ve tülbent veya nylon
çoraptan süzülür.

Süzik

↓
Bir hacim Preon 113 ile 30 dak. çalkalanır.
10 dak. 6.000 d/d santrifüj edilerek sıvı faz
elde edilir.

Sıvı faz

↓
1,5 saat 29.000 d/d santrifüj edilir.

Çökeltiler

↓
Ekstraksiyon bufferi ile yeniden sulandırılır.

↓
Düşük hızda santrifüj edilir,
(10 dak. 6.000 d/d)

↓
Seryum sülfat yoğunluk çöktürme işlemi
5 mM EDTA'ı; 0.1 M fosfat buffer ile yapılır.

Literatür:

Luisoni, E. Boccardo, G., Milne, R.G ve Conti, M., 1979. Journal
of General Virology, 45: 651-658.

CAULIMOVIRUSLAR



Literatür:

Hull, R., Shepherd, R.J. ve Harvey, D.J., 1976. Journal of General Virology, 31:93-100.

Lawaon R.H. ve Civerolo, E.L., 1976. Acta Horticulturae, 59:49-54.

TOBAMOVIRUSLAR

Enfekteli dokular
|
1 hacim 0.5M fosfat buffer pH 7.2 .% 1 lik
merkaptoetanol ile karıştırılır.
|
Homojenize edilir ve tübentten süzülür.
|
Süzüğe
18 n-butanol katılır. 15 dak. karıştırılır.
|
Düşük hızda santrifüj (30 dak. 8.000 d/d)
|
Üst sıvıya
Herbir 100 ml'ye 4 g PEG ilave edilir.
karıştırılır.
|
Düşük hızda santrifüj (15 dak. 8.000 d/d)
|
Cökeltiler
Son ekstrakt 20 ml/100 ml olacak şekilde
0.01 M fosfat buffer pH 7.2 ile sulandırılır.
|
Düşük hızda santrifüj (15 dak. 8.000 d/d)
|
Üst sıvıya
14 NaCl ve 14 PEG ilave edilerek karıştırılır.
|
Düşük hızda santrifüj (15 dak. 8.000 d/d)
|
Cökeltiler
Son ekstraktan her 100 ml'sinde 3 ml olacak
şekilde 0.01 M fosfat buffer ile eritilir.
|
Düşük hızda santrifüj (5 dak. 8.000 d/d)
|
Üst sıvı alınır.
(saf virus)

Literatür:

Gooding, G.V. ve Hebert, T.T., 1967. Phytopathology 57: 1285.

TOBRAVIRUSLAR

Enfekteii dokulara

67 mM fosfat buffer pH 7.3 (1 ml buffer/2 g yaprak)
katilir.

Homojenize edilir ve -20 °C'de 7 gün veya daha uzun
süre dondurulur.

Ekstrakt çözülür, NaOH ile pH 8.0'e ayarlanır, 10
dak. 50 °C'de ısıtılır (isteğe bağlı).

Düşük hızda santrifüj (10 dak. 5.000 d/d).

Cökelti atılır

Ust sıvı:
Herbir litre sıvıya 100 g. PEG 6000,
20 g. NaCl katılır, 1 saat 4 °C'de
karıştırılır.

Düşük hızda santrifüj edilir.

Ust sıvı:
2 kez yüksek (2 saat 28.000 d/d) ve
düşük hızda santrifüj edilir.

Cökeltiiler 17 mM fosfat buffer pH 7.8
ile sulandırılır.

10 - 40 seker yogunluk cöktürme
santrifüjasyonu.

Literatür:

Kurppa, A., Jones, A.T., Harrison, B.D. ve Bailiss, K.W., 1981. Annals of Applied Biology, 98:243-254.

Robinson, D.J. ve Harrison, B.D., 1985. Journal of General Virology, 66:2002-2009.

POTYVIRUSLAR

Enfekteli dokulara

2 hacim 0.5 M Na-sitrat buffer pH 6.5 , % 0.1 lik tiyogolik asit, 2 hacim kloroform katılır.

↓
Homojenize edilir.

↓
Tulbentten süzülür. 20 dak. 5.000 d/d santrifüj edilir.

↓
Ust sıvı

2 saat 27.000 d/d santrifüj edilir.

↓
Çökeltiler

16 saat 0°C'de 0.05 M Na-asetat buffer pH 6.5 içinde bırakılarak yeniden sulandırılır.

↓
100 mM Tris ile pH 8.0'a ayarlanır. 25 µm/ml trypsin ilave edilip oda sıcaklığında 30 dak. bırakılır.

↓
Bir kez, düşük ve yüksek hızda santrifüj edilir.

↓
Çökeltiler su ile sulandırılır.

↓
Şeker veya sodyum klorit (CaCl) ile yoğunluk köktürme santrifügasyonu yapılır.

Literatür:

Thompson, S., Frazier, R.S.S. ve Barnden, K.L., 1988. Journal of Virological Methods, 20:57-64.

FLOEMLE SINIRLI, MEKANİK OLARAK NAKLEDİLMİYEN VIRUSLAR

Doğal enfekteli bitki dokuları
(Yaprak damarları ve petioller veya kabuklar)
↓
Sıvı nitrojen veya kuru buz içinde dondurulur.
Toz haline getirilir.
↓
Toz ekstrakt, 3-5 hacim 0.5 M Tris-HCl buffer
pH 8.2 ile % 4 polyclar, % 0.5 bentonit, % 1
Triton X-100 ve % 2 lik 2-merkaptoetanol içi-
ne konur.
↓
Düşük hızda santrifüj (20 dak. 5.000 d/d)
↓
Üst sıvı alınır.
↓
% 4 PEG 6000 ve % 8 NaCl ilave edilir. / Yüksek hızda santrifüj
(2 saat 27.000 d/d)
↓
Düşük hızda santrifüj (20 dak. 5.000 d/d) / Cökelti
0.01 M Mg-klorit ile
0.1 M Tris-HCl pH 8.2
içinde sulandırılır.
↓
Cökelti, 0.04 M fosfat buffer pH 8.2
ile sulandırılır. / Kısmen saf virus
↓
Düşük hızda santrifüj (10 dak. 3.000 d/d)
↓
Üst sıvıya % 5 PEG 6000, % 1 NaCl konur.
1 saat karıştırılır.
↓
Düşük hızda santrifüj (15 dak. 5.000 d/d)
↓
Cökelti, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 ile
sulandırılır.
↓
Sodyum sulfat ile yoğunluk cöktürme
santrifüjü yapılır.

Literatür:

Güçerli, P., Brugger, J.J. ve Bovey, R., 1984. Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture, 16:299-304.

Lee, R.P., Garnsey, S.M., Briansky, E.H. ve Goheen, A.C., 1987. Phytopathology, 77: 543-549.

RBABDOVIRUS

Efekteli dokular

Küçük parçalar halinde kesilir ve 2 saat vakum altında 4 °C'de 0.02 M Mg-klorit içeren 0.05 M glisin solusyonu pH 8.5 içinde infiltrate edilir.

Soğukta ekstraksiyon ortamında homojenize edilir.

Homojenat tülbentten süzülür, pH 7.5'e ayarlanır.

Düşük hızda santrifüj (5 dak. 2.000 d/d).

Ust sıvıya

1 mM DTECA ve 23 aktif kömür katılarak karıştırılır.

Daha önce 100 ml pH 7.5 ekstraksiyon ortamı ile yıkanmış 7 mm den kalın olmayan Celite pamuğundan orta derecedeki vakum altında filtre edilir.

Süzük

1.5 saat 25.000 d/d'da santrifüj edilir.

Çökeltiler

25 seker ile pH 7.5 olan ekstraksiyon ortamında çözünmeye bırakılır.

2'30 ile 60 seker yoğunluk cöktürme santrifüj (40 dak. 22.500 d/d)

Literatür:

Peters. B. ve Kitajima. E.W., 1970. *Virology*, 41:135-150.

Rana. G.L., Di Franco. A. ve Galasso. I., 1988. *Journal of Phytopathology*, 123:147-155.

Jackson. O.A. ve Christie. S.R., 1977. *Virology*, 77:344-355



ISBN 978-602-711-0