

## 9. KONU:

### VİRÜSLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Virüslerin izole edilmesi diğerk bir deyimle saflaştırılması alçak ve yüksek devirli santrüfigasyonlardan sonra ultra santrüfigasyon ile elde edilir. Ultra santrüfigasyon 100.000 g üstünde olup virüsü konukçu hücre bileşiklerinden ayırır. Virüs saflaştırılmasında density gradient saflaştırılması oldukça iyi sonuçlar vermektedir. Uygulana tüm bu yöntemlerde virüs test tüpünü dibinde renksiz bir çökelti ve ya test tüpünün içinde bir bant şeklinde görülür. Bu şekilde saflaştırılan virüs elektromikroskop, serolojik çalışmalar ve nükleik asit çalışmaları için başlangıç materyalini oluşturur

### VİRÜS HASTALIKLARININ TESPİTİ

#### 1. Mekanik İnokulasyon ( konukçu dizisinin belirlenmesi)

Virüs hastalıklarının belirlenmesinde birinci aşamadır. Virüsün enfekte ettiği bitki familyası olmak üzere, fosfat buffer içinde belli oranda sulandırılmış bitki özsuyu başta konukçu bitkinin içinde bulunduğu familya üyelerini akabinde *Nicotiana*, *Chenopodium*, *Amaranthus* sp., şayet odunsu dokularda enfeksiyon yapan bir virüs ise konukçunun bulunduğu familya üyelerine aşılır. Virüsün orjinal konukçusu ile birlikte hangi konukçularda enfeksiyon oluşturduğu saptanır. Ayrıca virüsün otsu lokal leke konukçusu bu şekilde belirlenmiş olur. Bu çalışmada aşılama sonrasında bitkide oluşan simptomlar günlük yapılan gözlemlerle kaydedilir dolayısıyla enfeksiyonu takiben ne kadar süre sonra hastalığın ortaya çıktığı belirlenmiş olur.

#### 2. Serolojik Yöntemler

Bir antigen, örneğin yabancı bir protein, mesela bir virüs proteini bir memeliye (tavşan, kobay, at) veya bir kuşa tavuk veya bıldırcına verildiğinde hayvanın kanında yeni spesifik proteinler meydana gelir. Buna **antibody** denir. Antibodyler kan sıvısında veya serumunda dolaşır. Ve tamamı ile enjekte edilen antigen, antigenik determinantları ile özel olarak birleşir. Antigenin küçük bir yüzeyi ile

birleşir. Her antigenin örneğın bir virüsün yüzeyinde 6-10 aminoasitten oluşan farklı antigenik determinant bölgeleri mevcuttur. Antibodyleri ihtiva eden kan serumuna **antiserum** adı verilir. Antiserum hayvandan belli dönemlerde kan alınarak elde edilir. Sıcak kanlı hayvanların vücutlarında çok farklı antibodylerin bir karışımı oluşur ki bu tür antibodylere **poliklonal antibody** denir. Tek bir klondan elde edilen antibodylere ise **monoklonal antibody** adı verilir. Bunlar genellikle dalak hücrelerinden elde edilir ve belli bir virüs ırkına karşı afinitesi olan antiserumlardır. Bu tekniğe **hibridoma teknolojisi** adı verilir.

Antiserum ve virüs en basit olarak **presipitasyon testlerinde** bir araya gelir. Bu basit bir test olup tüp içinde veya petri kabı içindeki damlacıklarla gerçekleştirilir. Hangi sulandırma derecesine kadar antiserumun virüsü tanıdığı ortaya çıkarılır.

Diğeri ise **Agar jel testi** olup katı agar jel ortamında antigen ve antiserum karşı karşıya gelerek beyaz bir çizgi veya zoom meydana getirerek virüs belirlenir.

Son dönemlerde yaygın olarak kullanılan serolojik test **ELISA**'dır. Bu teknik 1970 ortaya çıkmış ve 1977'de bitki virolojisinde uygulanmıştır. Mikro titre tabakalar adını verdiğimiz saydam tabakalarda test gerçekleşir. Antigen ve antiserum belli bir düzende tabakaya yerleştirilir uygulamalar arasında tween içeren buffer solusyonu ile tabakalar yıkanır. Antiserum alkalın fosfataz ile etiketli ise paranitrofenil fosfat substratı ile reaksiyon belirlenir. Test iki günde gerçekleşir. Ve neticede boşluklar sarı renkli olarak gözlenir. Antiserumlar ayrıca virüslerin elektromikroskop ile tesbitinde de kullanılmaktadır. Bu tekniğe **immonosorban (İSEM)** adı verilmektedir. Bu teknikte giritler önce antibody ile kaplanmakta daha sonra üzerine enfekteli bitki özsuğu damlatılarak virüs özsuğu yakalanmaktadır.

### **3. Fiziksel özellikler**

**a. En son sulandırma noktası**

**b. İn vitro ömür uzunluğu**

**c. Termal inaktivasyon noktası**

**En son sulandırma noktasında** virüs, virüs enf bitki özuyu 10<sup>19</sup> den kadar sulandırma seri hazırlanır. Daha sonra bunlar her bir örnek virüsün lokal leke konukçusuna aşılansarak virüs enfeksiyonun gelişmediği sulandırma derecesi saptanır.

**Termal inaktivasyon noktasında**, virüs ile bulaşık bitki özsuğu çeşitli sıcaklık derecelerinde 10 dakika tutulur virüsün lokal leke konukçularına aşılansarak virüsün hangi sıcaklık derecelerine kadar aktif olduğu belli olur.

**İn vitro ömür uzunluğu**, enfekteli bir özsuğu hazırlanır. İçine birkaç damla streptomycin ilave edilir. Bu şekilde oda sıcaklığında tutulan ekstraktan belli aralıklarla örnek alınarak konukçu aşılansır.

#### **d. Elektromikroskop**

Bu teknikte virüs (formvar ile kaplı ) küçük bakır Giritlere virüs enfekteli bitki özsuğu konur. Giritler %1'lik granil aseatat PTA ile boyanarak elektromikroskopunda gözlenir. BU yöntem virüsün büyüklüğu hakkında fikir vermektedir.

#### **4. Moleküler yöntemler**

En son gelişen tekniktir. RT-PCR RNA virüslerinde uygulanır. Direkt PCR ise DNA virüslerinde uygulanır. Bu yöntemlerde virüsün DNA'sı veya RNA'sı izole edilerek taq DNA polimeraz enzimi ve 20-30 baz uzunluğundaki primerlerle suni ortamda çoğaltılır. Genellikle virüslerde RNA olduğundan dolayı RT enzimi yardımıyla RNA' dan cDNA elde edilir. Daha sonra PCR uygulanır. Genom büyüklüğüne göre virüsün ne olduğü saptanır.

Viroid enfeksiyonlarında serolojik olarak tespitleri mümkün değildir. Sadece moleküler teknikler kullanılarak tespitler yapılabilir.

# VİRÜS TAKSONOMİSİ