م/ تنقية الفايروسات النباتية

التنقية Punication: هي تحضير محلول فايروسي يحوي جسيمات مركزة وفعالة نقية غير ملوثة بأي ملوثات نباتية او مركبات أخرى، بدأت اولى محاولات التنقية عندما نجح العالم بايرنك سنة 1898 بترسيب فايروس موزائيك التبغ TMV بالايثانول دون تجفيفه واعادة اذابته بالماء فاستعاد فاعليته، وتجري عملية التنقية لتحقيق الأهداف التالية:-

1. انتاج مصول مضادة للفايروسات التي لا يمكن انتاجها الا باستعمال تحضيرات فايروسية نقية تماماً خالية من أي ملوثات نباتية.
2. إجراء التحليلات الكيميائية للفايروسات التي تشمل نوع الاحماض النووية وتتابع الاحماض الامينية فيها والمركبات الاخرى الداخلة في تركيب الفايروسات.
3. دراسة الأشكال الفايروسية وتركيبها المظهري باستعمال المجهر الالكتروني اذ تكون هذه الدراسات أكثر دقة عندما تجرى على التحضيرات الفايروسية النقية
4. فصل الانواع الفايروسية عند وجودها في الاصابات الخليطة.

<u>اساسيات عامة تراعى عند تنقية الفايروسات</u>

هناك جملة اساسيات يجب الالتزام بها قبل اجراء عملية التنقية وهي:

1. انتخاب نباتات اكثار مناسبة للفايروسات المراد تنقيتها والتي يكون فيها تركيز الفايروسات عالياً ولا تحتوي على مواد مثبطة تؤثر على فعالية الفايروسات، واذا اضطر الباحث الى استعمال نباتات تحوي تركيز عالي من المثبطات عندها يجب استعمال النموات الحديثة لتحضير العصير اذ تقل فيها المواد المثبطة مقارنة بالنموات الكبيرة.
2. معرفة العمر المناسب للنباتات التي سيتم الحصول على الفايروسات منها ويكون تركيزها بأعلى مستوياته.

<u>طرائق تنقية فايروسات النبات:</u>

عند تنقية أي فايروس نباتي فأنها تمر بالمراحل الثلاث المتتابعة الأتية:

1. **<u>مرحلة استخلاص العصير النباتي</u>** : هي عملية الحصول على العصير النباتي من النباتات التي تم اكثار عزلة الفايروس فيها وذلك للحصول على اكبر كمية ممكنة من الجسيمات الفايروسية، وتتبع طريقة التلقيح الميكانيكي لتحضير العصير الخام، تضاف الى العصير في نهاية هذه المرحلة العديد من المضافات التي تقلل تأثير العوامل المتلفة للفايروسات، وهذه المضافات هي

- **المواد المانعة للتأكسد:** هي مواد تمنع تأكسد الفايروسات بسبب تعرضها للأوكسجين الجوي وكذلك تقلل من التأثير الضار للمواد الفينولية النباتية والتانينات اذ ترتبط بها وتسحبها من العصير واكثرها استعمالاً هي كبرتيت الصوديوم.
- **مواد مثبطة لعمل انزيمات اكسدة الفينولات:** وتشمل النيكوتين والحليب المزال منه الدهن هذه مركبات تثبط فعل انزيمات اكسدة الفينولات التي تحول الفينولات النباتية الى تانينات والتي هي أكثر اتلافاً للفايروسات من الفينولات البسيطة اذ تعمل هذه المركبات على تعطيل عمل الانزيمات بإزالتها لأيون النحاس الضروري لعمل هذه الانزيمات.
- **الفحم:** يضاف الى العصير لأدمصاص الانزيمات النباتية والصبغات النباتية، ثم يتم التخلص منه بتمرير العصير عبر ورقة ترشيح، من سلبياته هي ادمصاص جسيمات الفايروسات على حبيباته وفقدها من العصير.
- **انزيمات محللة للجدر الخلوية:** ولاسيما انزيمي البكتينيز Pectinase والسليليز Cellulase وهي تستعمل لتسهيل تحرير الجسيمات الفايروسية من الخلايا مثل فايروس التفاف اوراق البطاطا PLRV من اوراق البطاطا.

2. <u>**مرحلة تصفية العصير**</u>**:** وهي تعقب مرحلة الاستخلاص مباشرة يتم فيها التخلص من المواد النباتية الكبيرة الحجم نسبياً وتشمل المايتوكوندريا والبلاستيدات والاغشية والجدر الخلوية وأجزاءها وتتم بالطرق التالية:

- **التصفية بالمذيبات العضوية:** تستعمل العديد من انواع المذيبات العضوية لتصفية العصير وأزالة المواد الدهنية النباتية، هذه المذيبات هي الايثر والاسيتون والايثانول والكلوروفوم و رباعي كلوريد الكاربون اذ تضاف للعصير وتمزج معه بنسبة لاتزيد عن 20% ويفضل ان يتم المزج بسرعة متوسطة في الخلاط الكهربائي لعدة دقائق ثم يعرض فوراً للانتباذ بقوة 5000-10000 دورة لمدة 10-20 دقيقة وبعدها تتكون طبقتان سائلتان، السفلية وهي الطبقة الدهنية التي تحوي على المذيب العضوي مع المواد التي اذيبت فيه وهي الاغشية الخلوية والمواد الشمعية والكلوروفيلات التي ترمى، اما الطبقة العلوية فهي الطبقة المائية التي تحوي الجسيمات الفايروسية والتي تسكب بحذر في بيكر معقم، لا ينصح باستعمال هذه الطريقة مع الفايروسات المغلفة لانها تذيب الغلاف الخارجي الليبيدي للفايروس وتتلفه.
- **التصفية بالانتباذ الواطئ:** يعرض العصير الى انتباذ واطئ وعند سرعة 1000-10000 دورة لمدة 10-15 دقيقة ويرمى الراسب ويؤخذ الراسب لأنه يحوي الجسيمات الفايروسية، يمكن

تحسين عملية الترسيب بإضافة مادة مرسبة للعصير قبل الانتباذ واكثرها شيوعاً هي كبريتات الامونيوم بتركيز 15%.

- **التصفية بالمرشحات الدقيقة:** تستعمل انواع من المرشحات التي تسمح بمرور الفايروسات والاجسام النباتية الاصغر منها ويطلق مصطلح الترشيح الفائق على هذا النوع من الترشيح، توجد العديد من المرشحات الجاهزة التي تستعمل في التصفية مثل مرشح شامبرلان المصنوع من الخزف ومرشح السيلايت، كما تستعمل انواع من الاغشية الجزيئية منها مرشح النتروسليلوز، يفضل الترشيح اولاً بورق الترشيح كي لا تقفل ثقوب هذه المرشحات لدقتها.

3. **مرحلة التنقية النهائية للفايروس:** يتم فيها فصل الجسيمات الفايروسية نقية تماماص في محلولها الخالي من أي ملوثات نباتية، وتتم الطريقة الاتية:

1) **التنقية بالانتباذ التناوبي Centerfuge:** إحدى اهم طرائق تنقية فايروسات النبات واكثرها شيوعاً والذي يعتمد على استعمال دورات متتالية من الانتباذ واطئ السرعة ثم عالي السرعة باستعمال جهاز Centerfuge المبرد الذي يوفر درجة حرارة تصل الى 4°م في داخل الجهاز وذلك لمنع تاثير ارتفاع درجة الحرارة بسبب الدوران الشديد على السرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة ويهمل الراسب الذي يحوي الملوثات النباتية الكبيرة الحجم ويؤخذ الرائق الذي يعرض الى انتباذ يصل 400000 دورة / دقيقة لمدة 2–3 ساعات وفق نوع الفايروس إذ تترسب الجسيمات وتفصل عن الرائق.

تقييم نقاوة المحلول الفايروسي النقي

لغرض تقييم النتائج تنقية الفايروسات فإنه تجرى على المحلول الناتج من التنقية اختبارات للتأكد من نقاوته وفعاليته واجتيازه لمراحل التنقية دون اتلافه ومن هذه الطرق هي

1) الاختبار الحيوي باستعمال نباتات كاشفة ويفضل تلك التي تستجيب موضعياً بهيئة بقع وذلك بتلقيح اوراقها بالمحلول الفايروسي النقي ثم يحسب معدل عدد البقع ويتم مقارنة ذلك مع معدلها في اوراق المقارنة التي تلقح بعصير خام غير منقى لنبات مصاب بالفايروس، ان هذه الطريقة مناسبة للفايروسات المنقولة ميكانيكياً فقط.
2) الاختبار المصلي وهو اختبار سريع يدل على وجود الفايروس في المحلول النقي، الا ان هذا الجهاز لا يميز اذا كان الفايروس فعال او فاقد قدرته المعدية بسبب تعرضه لإجهاد التنقية.
3) استخدام جهاز Spectrophotometer
4) استخدام جهاز Nano drop