الاختبارات الجزيئية التشخيصية لفايروسات النبات

التشخيص بتقانة تفاعل تسلسل البوليميريز Poly merase Chain Reaction (PCR)

تمت التهيئة لهذا الاختبار الهام عام 1955 عندما اكتشف كورنبرج الانزيم الخلوي DNA polymerase وهو الانزيم المسؤول عن تضاعف حامض الدنا ثم في سنة 1983 شهدت ابتكار تقانة تفاعل تسلسل البوليميريز PCR من قبل مولس، هذا الابتكار خلق ثورة في الكشف عن الفايروسات وتشخيصها فضلاً عن استعمالاته في العديد من الجوانب العلمية الاخرى، تعرف هذه التقانة PCR بأنها العملية المتضمنة انتاج خيوط تكاملية منفصلة للحامض النووي المستهدف من بادئين قصيري النيوكليوتيدات ثم اطالة البادئين لتخليق التعاقب النيوكليوتيدي الكامل للحامض النووي المطلوب، وبذلك اصبح من اهم التقانات المستعملة في تشخيص امراض النبات بواسطة الاستنساخ عالي الكفاءة للتعاقبات النيوكليوتيدية وانتاج ملايين النسخ الكاملة ولا يتم هذا التفاعل الا بوجود البادئ المتخصص على الحامض النووي الفايروسي أي ان لكل فايروس نباتي بادئه المتخصص الذي يعمل عليه ويضاعف حامضه النووي وبذلك يتم تشخيص الفايروسات، هذا الاختبار عالي الحساسية والتخصص بقدرته على تمييز التعاقبات المختلفة عن بعضها في النيوكليوتيدة الواحدة وبالتالي لديه قدرة الكشف عن أي طفرة حصلت في الجينوم، ان تقنية الـ PCR مصمم للتعامل مع الـ DNA فقط وهذا فأنه لا يناسب الفايروسات ذات الجينوم RNA ولغرض جعله صالحاً لهذه الفايروسات فقد تمت اضافة خطوة تطويرية له باستعمال الاختبار المسمى " تفاعل تسلسل البوليميريز بالاستنساخ العكسي Revers Transcription- PCR ويعرف اختصاراً RT-PCR والذي يتم فيه تحويل الرنا RNA الفايروسي الى نسخة من الدنا cDNA ثم اجراء التضاعف بواسطة اختبار الـ PCR بالخطوات نفسها.

خطوات تفاعل تسلسل البوليميريز: يتم هذا التفاعل في ثلاث خطوات هي:

1- صهر الحامض النووي (الدنترة) Denaturation

هي اول مرحلة يتم فيها فك ارتباط خيطي الحامض النووي الفايروسي إذ ينفصل خيطا DNA عن بعضهما عند تعريضه لدرجة حرارة عالية تصل الى 95° سيليزية لتكسير الاواصر الهيدروجينية التي تربط بين خيطي الحامض ليصبح كل منهما قالباً لبناء القطعة المكملة له بواسطة البادئ.

2- مرحلة ارتباط البادئ Primer Annealing

يرتبط البادئ بخيط الحامض وبناء اواصر هيدروجينية تربط بينها لتكوين خيط جديد، في هذه المرحلة تخفض درجة حرارة التفاعل الى 55° سيليزي فيرتبط البادئ primer بالموقع المكمل له على الخيط وفق الارتباط المعتاد للقواعد النتروجينية اذ ترتبط السايتوسين مع الكوانين والادنين مع الثايمين.

3- اكمال بناء الخيط Extension

تتم عند درجة 72° سيليزية وهذه هي الدرجة المثلى لعمل انزيم Taq-polymerase إذ يقوم بإضافة قواعد نتروجينية عند منطقة ارتباط البادئ وبهذا يتم ربط النيوكليوتيدات في الخيط الجديد. يوضح الشكل التالي خطوات التفاعل

المواد المستعملة في تفاعل تسلسل البوليميريز PCR

1-الحامض النووي القالب DNA template:

هو قطعة من شريط DNA الفايروسي المراد اكثاره، اما اذا كان الجينوم الفايروسي من نوع الرنا RNA عندها يتم تحويله الى cDNA بواسطة انزيم الاستنساخ العكسي Revers Transcriptase.

2-انزيم Taq-polymerase:

هو انزيم مستخلص من بكتريا *Thermus aquaticus* المحبة للحرارة لذلك يمتاز بثباته وقدرته على تحمل درجات الحرارة العالية.

3-كلوريد المغنسيوم $Mgcl_2$:

هو عامل مساعد co-factor لإنزيم Taq- polymerase

4-**القواعد النتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين** de-oxy Nucleotides Tri-Phosphate ويرمز لها dNTPs إذ تستعمل اربعة انواع منها الادنين ثلاثي الفوسفات والكوانين ثلاثي الفوسفات والسايتوسين ثلاثي الفوسفات والثايمين ثلاثي الفوسفات.

5- المحلول المنظم Buffer solution:

هو محلول ملحي يوفر PH مناسبة لعمل الانزيم.

6- **البادئات Primers:** هي قطعة من الدنا DNA مصممة صناعياً (مختبرياً) للتكامل مع جزيئة الدنا DNA الفايروسي المراد تشخيصه إذ ترتبط بها وتبدء عملية نسخ وتكثير الجينوم، يتكون البادئ من عدد محدود من النيوكليوتيدات يتراوح عددها ما بين 18-30 نيوكليوتيدة، عادة ما يتم استعمال بادئين للتفاعل مع الدنا DNA المزدوج أي بواقع بادئ لكل خيط من خيطي الدنا المنفصلينDNA ، البادئ الاول يعرف بالبادئ الامامي forward primer والثاني يعرف بالبادئ الخلفي revers primer، يتم وضع كل من هذه المكونات معاً في انابيب خاصة تسمى انابيب ابيندورف Eppendorf tubes

طريقة تشخيص فايروس تكتل قمة البطاطا *Potato mop-top virus* بواسطة تفاعل تسلسل البوليميريز بالاستنساخ العكسي Revers Transcriptase-PCR

تجري هذه الطريقة بخطوات متسلسلة هي :

أ- **مرحلة عزل الحامض النووي:**

1- يتم فيها تحضير نسيج من اوراق البطاطا بوزن 100ملغم/عينة ويوضع في انبوبة ابيندورف بحجم 1.5 مل ويضاف لها $500\mu L$ من محلول هضم العينات المكون من مزيج الفينول والكلوروفورم بنسبة 1:1 على التوالي

2- تسحق العينات وهي بداخل الانبوبة بواسطة مدقة بلاستيكية دقيقة للحصول على مستحلب حليبي متجانس

3- ترج بواسطة جهاز الـ vortex لمدة 3-5 ثواني

4- تسخن الانابيب بجهاز تسخين جاف عند درجة 60° سيليزي لمدة 20 دقيقة

5- توضع الانابيب في جهاز الطرد المركزي عند سرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة 10د.

6- ينقل الرائق الى انابيب ابيندورف جديدة بواسطة الماصة الدقيقة مع ملاحظة استبدال الرأس البلاستيكي التب tip عند رأس الماصة عند نقل الرائق مع كل عينة

7- أضافة 300 μl من محلول الترسيب ايزوبروبانول Isopropanol لكل عينة

8- توضع في جهاز الطرد المركزي Centerfugeعند سرعة 13000دورة لمدة 15 د.

9- يتم التخلص بحذر من السائل الطافي بواسطة الماصة الدقيقة

10- أضافة 500 μl من الكحول الاثيلي تركيز 70% ترج الانابيب عمودياً ب جهاز ال vortex لمدة 3-5 ثواني

11- توضع في جهاز الطرد المركزي Centerfugeعند سرعة 13000دورة لمدة5 د.

12- يتم التخلص بحذر من السائل الطافي بواسطة الماصة الدقيقة

13- أضافة 500 μl من الاسيتون 70% و ترج الانابيب عمودياً ب جهاز ال vortex لمدة 3-5 ثواني

14- توضع في جهاز الطرد المركزي Centerfugeعند سرعة 13000دورة لمدة5 د.

15- يتم التخلص بحذر من السائل الطافي بواسطة الماصة الدقيقة

16- تترك الانابيب مفتوحة داخل جهاز تسخين عند 65° سيليزية لمدة 5 دقائق لكي يتبخر الاسيتون

17- أضافة 100 μl من الماء المقطر المعقم و تترك الانابيب مفتوحة داخل جهاز تسخين عند 65° سيليزية لمدة 10. دقائق

18- تغلق الانابيب وترج الانابيب عمودياً ب جهاز ال vortex لمدة 15 ثانية

عندها تكون عينات الحامض النووي الفايروسي جاهزة لإجراءات النسخ العكسي ويستدل على نجاح عزل الحامض النووي ظهور الراسب الهلامي المائل للون الابيض .

ب-قياس التركيز والنقاوة بواسطة جهاز Nano drop المبين بالشكل التالي

ت- مرحلة النسخ العكسي Revers transcription (تحويل RNA الى cDNA)

ث-مضاعفة الـ DNA باستعمال جهاز الـ PCR الموضح بالشكل

الكت نوع PCR-premix	**جهاز PCR نوع فيرتي**

ج- الكشف عن الحامض النووي بأجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

Gel electrophoresis : تستعمل هذه التقانة للحصول على نتائج تضخيم الحامض النووي، اذ ان الاحماض النووية هي مركبات سالبة الشحنة الكهربائية لذلك يتم استخدام تيار كهربائي لفصل قطع الـ DNA والتي تتجه من القطب الكهربائي السالب الى القطب الموجب في جهاز الترحيل الذي يفصل جزيئات الحامض النووي باستعمال هلام الاكاروز agarose gel المغمور في المحلول المنظم الـ TBE، يتم وضع محلول DNA المجهز بالخطوة السابقة (ج) في الحفر الخاصة الموجودة وسط الهلام ثم يشغل الجهاز فتتحرك جزيئات DNA في الهلام وتنفصل بشكل حزم حسب احجامها ومقارنتها مع جزيئات DNA معلومة تمرر معها في الهلام تسمى بالمؤشرات Markers، عادةً ما تستعمل صبغات خاصة لإظهار حزم الحامض المنفصلة منها صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide وبالتالي يمكن رؤية الحزم بالعين المجردة

ح- قراءة الحزم في جهاز التصوير Gel documentation system المبين بالشكل التالي: