الاختبارات التشخيصية لفايروسات النبات

الكشف عن الفايروسات باختبار اليزا ELISA :

تعتبر طريقة Enzyme linked Immunosorbent assay أحدى الطرق السيرولوجية لتشخيص الامراض الفايروسية والفطرية والبكتيرية وقد ابتكرت هذه الطريقة من قبل كلارك و ادمز Clark و Adams سنة 1976 واستعملت بعد سنوات قليلة في تشخيص الامراض الفايروسية في الاجزاء النباتية والعوائل الحشرية او في البذور ويمتاز هذا الاختبار بسهولة اجرائه والحساسية الشديدة والدقة وتتوفر المواد اللازمة بشركات متخصصة، وتنقسم الى الطريقة المباشرة وغير المباشرة والاختلاف بينها هو اضافة انزيم اضافي للتفاعل.

يعتمد في الكشف على ان الفيروس يتكون من حامض نووي محاط بغلاف بروتيني ولذلك فأنه ينتج اجساماً مضادة في احد الحيوانات ذوات الدم الحار وتستخدم هذه الاجسام المضادة بعد فصلها من الحيوان وحين تتفاعل مع مستخلص النبات تعطي نتيجة ايجابية في حالة وجود الفايروس في مستخلص النبات ولكي يمكن رؤية هذا التفاعل يربط بأنزيم تفاعل لونياً واضحاً.

تعريف بعض المصطلحات التي تستخدم في الاختبار

- **<u>الانتيجينات Antigens</u>**: تعرف على انها جزيئات تحتوي على بروتين او متعدد السكريات Poly saccharides وهي تعتبر اجساماً غريبة (Microbes) مثل الفايروسات النباتية والحيوانية والفطريات و البكتريا واذا ما تم حقن انواع من الفقاريات بها كالأرانب او الفئران فأنه يستحث الجهاز المناعي على انتاج نوع معين من البروتينات يطلق عليه بالأجسام المضادة Antibodies التي تكون في سيرام هذا الحيوان ويطلق عليه بالسيرام المضاد Antiserum وله القدرة على التفاعل او الاتحاد مع هذا الانتيجين
- **<u>الأجسام المضادة Antibodies</u>:** وهي اجسام مضادة تنتج في دم الحيوانات الفقارية نتيجة لوجود انتيجين غريب في الدم، وهي نوع من البروتينات عالية التخصص تعرف باسم Immunoglobulins او IgG وهو قادر على الاتحاد بالانتيجين الخاص به.
- **<u>السيرام المضاد Antiserum</u>**: وهو ما يطلق عليه بالسيرام المضاد للفايروسات النباتية، يمكن انتاجه في الارانب وهو الحيوان الرئيس لسهولة التعامل معه وانتاجه الجيد للسيرام المضاد للفايروسات النباتية ويتم فصل IgG من الدم بطرق تنقية معينة خلال الترشيح بفلاتر خاصة.

<u>ملاحظة</u>: الاختبار لا يكشف عن الفايرويدات لعدم امتلاكها غطاء بروتيني.

طريقة اختبار الاليزا المباشر الثنائي Double Antibody Sandwich (DAS)- ELISA

1. أضافة السيرام المضاد المتخصص: يضاف 100−200 μl(ميكروليتر) من المضاد المتخصص IgG (وهو بروتين شديد التخصص) وبتركيز 1 ملغم مع المحلول المنظم buffer الى جميع الحفر wells الموجودة بالطبق بواسطة ماصة دقيقة Micropipette باستثناء حفر العمودين الايمن والايسر إذ يوضع فيها محلول منظم او ماء مقطر Blank solution
2. يغلق الطبق ويحضن عند 37° سيليزي لمدة (2−4 ساعات) او ليلة كاملة عند 4° سيليزي
3. تغسل الحفر كافة 3 مرات بواسطة محلول منظم فوسفاتي المضاف له مادة توين PBS- tween-20 (ترفق مع الكت Kits) يقلب الطبق للتخلص من محلول الغسل وبفاصل 30 ثانية بين الغسلة والاخرى ثم تجفف للتخلص من الرطوبة وذلك بقلبها وضربها على محارم معقمة
4. أضافة العينات النباتية المحتوية على الفايروس: تحضر العينات مسبقاً بسحقها بمحلول منظم ثم اضافة 100−200 μl(ميكروليتر) من عصير النبات المصاب الى حفرتين عموديتين تخصصان لكل عينة ويضاف الى الحفرتين التاليتين عصير النبات السليم (المقارنة) المحضر بالطريقة نفسها لكن تستعمل ماصة دقيقة اخرى.
5. يغلق الطبق ويحضن ليلة كاملة في الثلاجة عند 4 ° سيليزي.
6. يغسل الطبق كما في الخطوة 3
7. اضافة 100−200 μl(ميكروليتر) من المحلول المترابط Enzyme conjugate (هو المحلول المضاد المرتبط بأنزيم الفوسفاتيز القاعدي اذ يستخدم لربط السيرام المضاد ويعطي نتائج جيدة مع الفايروسات النباتية اذ انه سوف يرتبط بجزيئات الفايروس الموجودة في العينة.
8. يغطى الطبق ويحضن عند 37° سيليزي لمدة 4−6 ساعات.
9. يغسل الطبق كما في الخطوة 3 مع اجراء غسلة اضافية رابعة.
10. اضافة 100−200 μl(ميكروليتر) من محلول المادة الاساس Substrate solution (هي مادة تتفاعل فقط مع الانزيم وتغير اللون في حفر العينات مما يدل على وجود الفايروس).
11. يوقف التفاعل بإضافة اضافة50 μl(ميكروليتر) من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH المركز او حامض الكبريتيك H_2SO_4.
12. بتغير اللون في حفر عصير النبات المصاب وعدم ظهوره في حفر عصير النبات السليم الذي يشاهد بصرياً، ويمكن قراءة هذه النتائج بواسطة جهاز ELISA Reader حيث يحول اللون وكثافته الى نتائج رقمية يمكن مقارنتها بالعينات المختلفة