# الباب الثانى

# التركيب البنائى والكيميائى لفيروسات النبات

# STRUCTURAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

# الفصل الأول

# التركيب البنائى لفيروسات النبات

# STRUCTURAL OF PLANT VIRUSES

من الضرورى جداً توافر معلومات تفصيلية عن التركيب البنائى للفيروسات لعديد من الأغراض فعلى سبيل المثال لمعرفة كيف تحدث الإصابة، وكيف تتضاعف الفيروسات فى الخلية، وكيف تحيا خارج الخلية، وما علاقة الفيروسات المختلفة ببعضها؟ ودراسة التركيب البنائى لفيروس ما تبدأ بدراسة شكل الفيروس.

وأوضحت الدراسات الدراسات الكثيرة المتواصلة أن الجزيئات الفيروسية صغيرة جداً، ولا يمكن رؤيتها، وقد صمم مارتون (Marton, 1934) أول ميكروسكوب إلكترونى، وأخذت أول صورة لفيروس موزيك الدخان (TMV) عام ١٩٣٩. **ووجد بواسطة الميكروسكوب الإلكترونى أن الجزيئات أو الفيريونات الفيروسية تنقسم من حيث الشكل إلى ثلاث مجاميع، وهى:**

١ – مجموعة الفيروسات عصوية الشكل Rod shaped viruses.

٢ – مجموعة الفيروسات خيطية الشكل Filamentous viruses.

٣ – مجموعة الفيروسات كروية الشكل Spherical viruses.

**المجموعة الأولى:**

كروية الشكل Spherical shape، وهى جزئيات كروية صغيرة متلاصقة ومن أمثلتها فيروس موزيك الخيار (CMV)، وفيروس التقزم الشجيرى فى الطماطم (TBSV)، وفيروس نيكروزيس الدخان (TNV).

**المجموعة الثانية:**

عصوية الشكل Rod-shape، وهى جزيئات مستقيمة عصوية مثل فيروس موزيك

الدخان ( TMV )، وكذا جزيئات ( PVX ) فيروس X البطاطس.

**المجموعة الثالثة:**

خيطية الشكل Filament shape، وهى عبارة عن خيوط طويلة مرنة ملتوية، وقد تكون شبكة تختلف فى درجة نسجها حسب طول الفيروس ومرونته، ومن أمثلتها: فيروس Y البطاطس ( PVY ) وفيروس موزيك الخيار رقم ٢ ( $CMV_2$ ) وفيروس موزيك الخس ( LMV ).

**وهناك تقسيم آخر لأشكال الفيروسات بصفة عامة، وهو:**

١ – فيروسات متماثلة Isometric viruses، وهى إما مستديرة Spherical أو عديدة الأوجه Polyhedral، وهذه تأخذ الشكل الهندسى Icosahedron، وهو شكل عدد أوجهه عشرون أو مضاعفات العشرين، له ثلاث أنوع من المحاور والتماثل الدائرى ( ثلاثية وخماسية وثمانية ).

٢ – فيروسات غير متماثلة Anisometric viruses وهى عصوية طولها عدة أضعاف عرضها، ومنها:

أ – فيرونات عصوية مستديرة الطرفين Bacillus-Like bodies.

ب – فيرونات مستقيمة صلبة Rigid rods.

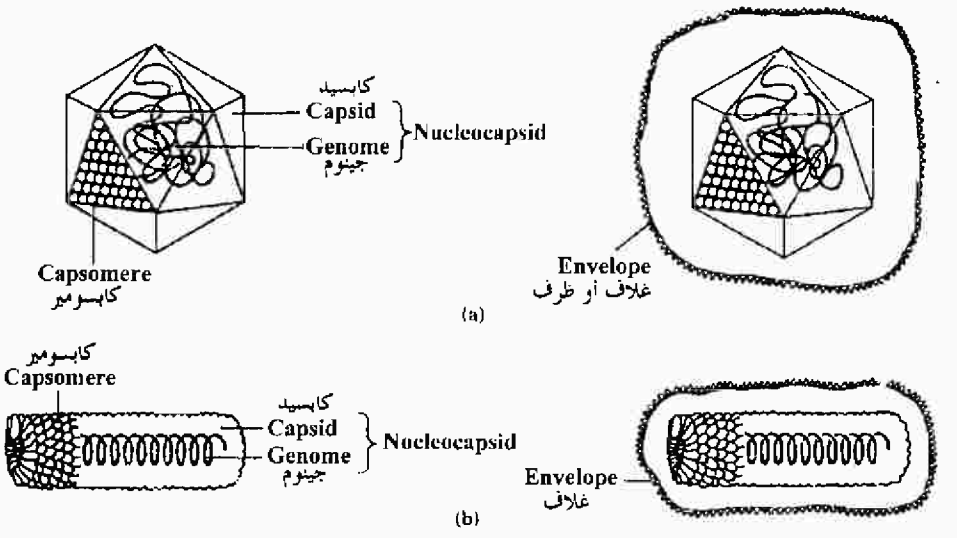
جـ – فيرونات خيطية مرنة Flexible threads.

**أما الفيروسات الكبيرة والتى يحيطها غلاف فيمكن وصفها فى مجموعتين كالآتى:**

١ – فيرونات كروية Spherical، مثل: فيروس الذبول المنقط فى الطماطم ( TSWV ).

٢ – فيرونات عصوية Bacilliform أو شبه الرصاصة Bullet shape، مثل: فيروس التقزم الأصفر فى البطاطس ( PYDV ) والنيكروزيس الأصفر فى الخس ( LYNV )، وفيروس الجومفرينا ( المدنة )، وفيروس موزيك الذرة ( MMV )، وفيروس موزيك وتخطيط القمح ( WSMV ).

تقاس الجزيئات الفيروسية بالنانومتر ( nm )، ويمكن تقدير هذه المقاييس بالدقة الكافية بواسطة الصور المأخوذة بالميكروسكوب الإلكتروني لتحضيرات نباتات مصابة. ومن المعروف أن مقاس جزيئات الفيروسات يختلف اختلافاً كبيراً، ويحتفظ كل فيروس بمقاييسه فمثلاً جزيئات فيروس نيكروزس الدخان ( TNV )، قطرها ١٧ نانوميتر، وجزيئات فيروس اللون البرونزى فى الطماطم قطرها ٩٠ نانوميتر، كذلك طول جزيئات فيروس موزيك الدخان ( TMV ) ٣٠٠ نانوميتر، أما فيروس X البطاطس ( PVX ) فطول جزيئاته ٥٠٠ نانوميتر، وفيروس أصفرار البنجر خيطى وطول الخيط فيه ١٢٥٠ نانوميتر، بينما طول خيط فيروس تخطيط البسلة ٥٠٠٠ نانوميتر.




**شكل (٢ – ١): رسومات تبين الشكل العام لبعض الفيروسات**

**أ – (a) فيروس (كروي) أيكوزا هيدرال دون غلاف (Macked)، وآخر محاط بغلاف وتظهر الكبسوميرات على وجه واحد من الكابسيد والحمض النووي فهو ملتف ومكثف.**

**ب – (b) فيروس (خيطي) حلزوني السيمتريه في شكل عارٍ دون غلاف Nacked أو بغلاف Envoeloped والحمض حلزوني والكبسوميرات منسوجة بشكل حلزوني.**

أظهرت الدراسات باستعمال الأشعة السينيه ( أشعة X ) والميكروسكوب الإلكترونى أن الفيروسات تحتوى على حمض نواة واحد، إما DNA أو RNA محاطًا بغلاف بروتينى Pro-tein shell or coat أطلق عليه اسم نيوكليوكابسيد هذا الغلاف البروتينى يتكون من وحدات بنائية يطلق عليها اسم كابسوميرات Capsomeres، وقد تحاط النيوكليوكابسيد فى بعض الفيروسات بغلاف خارجى يطلق عليه ظرف Envelope.

أوضحت التجارب السابقة أن الفيروسات تحتوى على ٥٠ - ٦٠٪ من تركيبها بروتين، والأكثر من ذلك هو إمكانية فصل الحمض النووى عن البروتين وإعادة تركيبهما معا. ولذلك أوضحت التجارب أن هناك طرقاً عديدة مختلفة يترتب بها البروتين حول حمض النواة لحمايته، إلا أنه لوحظ وجود بعض التصميمات المحددة.

**وقبل النظر فى التركيب البنائى لبعض الفيروسات، لابد وأن نتذكر الآتى:**

**أولاً:** على الرغم من أن البروتينات فى تركيبها الثانوى تكون فى شكل حلزونى helical إلا أن التركيب الثلاثى لها غير سيمترى أى غير منتظم، وهذا يرجع بالطبع إلى طبيعة الروابط الأيدروجينية، والكبارى ثنائية الكبريت Disulphids bridges إلى جانب تداخل البرولين فى التركيب البنائى.

**ثانياً:** قد يظن البعض أن حمض النواة ربما يغلف بواسطة جزئ كبير من البروتين، ولكن هذا لا يحدث إذ إن البروتينات تكون غير مرتبة Irregular فى شكلها، كما تظهر معظم جزيئات الفيروس منتظمة الشكل عند فحصها بالميكروسكوب الإلكترونى.

**ثالثاً:** إن الشفرة الوراثية الثلاثية Triplet ذات وزن جزيئى يصل إلى حوالى ١٠٠٠ وحدة وزن جزيئى، ولكنها مسئولة عن تكوين حمض أمينى واحد فقط يكون وزنه الجزيئى ١٠٠ وحدة؛ ولهذا فإن حمض النواة يمكنه تمثيل ١٠ / ١ وزنه بروتين. وحيث إن الفيروسات تحتوى على ٥٠٪ بالوزن بروتين؛ فهذا يدل على وجود أكثر من بروتين مميز، وذو وزن جزيئى صغير.

**رابعاً:** يتضح أنه إذا ما استخدم جزىء البروتين بمفرده كتحت وحدة Subunit كروية أو مستديرة؛ فهذا يحتاج إلى استخدام قليل من المادة الوراثية. وبذلك فليس من الضرورى أن يتركب الغلاف البروتينى بنائيًا من تحت وحدات متشابهة.

**خامساً:** إن الأوزان الجزيئية لتحت الوحدات المختلفة تكون صغيرة مقارنة بجزئ حمض

النواة التى تحيط به إلى جانب أن بناء الفيروس من تحت وحدات يجعله ثابتاً وراثياً؛ حيث يقلل صغر حجم تحت الوحدات البنائية فرصة حدوث طفرات غير مرغوبة؛ نتيجة لعدم دخول تلك تحت الوحدات غير المرغوب فيها والموجودة على الجين، الذى يمثلها فى تركيب جزئ الفيروس أثناء التجميع.

**سادساً**: إن العدد الأكبر من الروابط يكون بين تحت الوحدات، وكما ذكر سابقاً أن تحت الوحدات تكون غير منتظمة التركيب، نجد أن تحت الوحدات فى أقل قوة متحررة فيما بينها، وهذا يجعل التركيب البنائى ثابتاً، وبذلك يمكن الحصول على المعلق الفيروسى فى المعمل ولمدة طويلة.

ويخضع نظام وضع حمض النواة وما يحيط به من بروتين إلى نظام معين أو سيمترية معينه نتيجة لتراص تحت الوحدات Subunits طبقًا لأسس هندسية بسيطة نسبيًا مبنية على اعتبارات فيزيائية.

**وهناك نوعان من نظام التجمع للوحدات البنائية، يؤديان إلى نوعين من السيمترية لبناء النيوكليوكابسيدات هما:**

١ – السيمترية الحلزونية Helical symmetry (H) وهى تجمعات حلزونية.

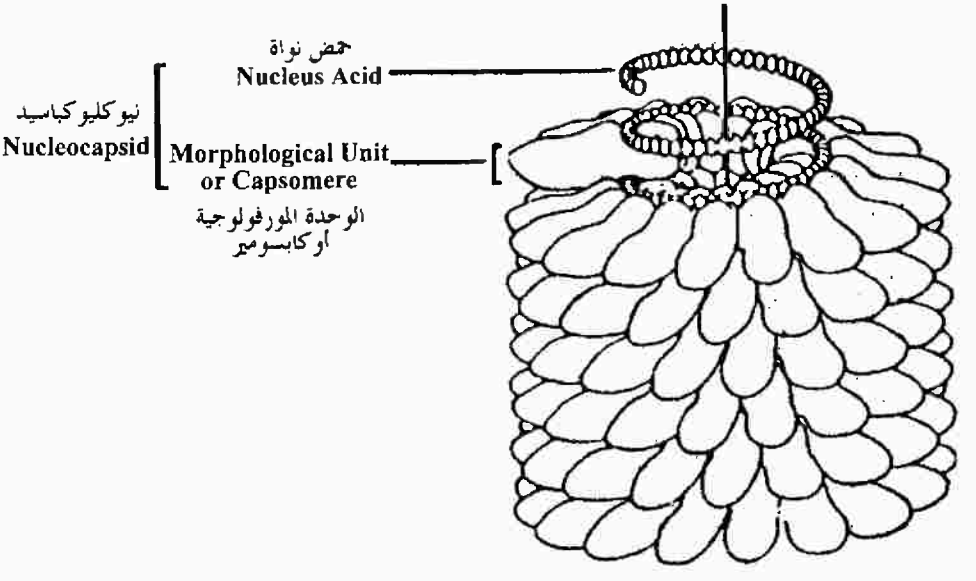
٢ – السيمترية المكعبة Cubical symmetry (C) أو ذات الأوجه المتساوية Sometric symmetry.

وقد وجد أن كل الفيروسات العصويه الشكل التى فحصت هى حلزونية السيمترية أكثر من أن تكون أسطوانية، وأن وجود حمض النواه ربما يكون هو العامل المسبب لهذا الترتيب –كما تظهر نيوكليوكابسيدات بعض هذه الفيروسات أكثر صلابة rigid كما فى فيروس موزيك الدخان (TMV)، بينما يوجد فيها ما هو رخو تقريبًا Flexible كفيروس موزيك البطاطس (PVX). وهذا دليل على أن الروابط التى تربط الوحدات البنائية تكون فى لفات متعاقبة قوية بالنسبة للفيروس الأول (TMV) وأقل قوة ومتانة بالنسبة للفيروس الثانى (PVX).

بينما الفيروسات الكروية أو الدائرية الشكل، فهى تتبع السيمترية المكعبة، حيث ترتب تحت الوحدات حول رؤوس Vertices أو أوجه Faces ذات سيمترية مكعبة مثل الرباعية الأوجه tetrahedron أو مكعب ذات اثنى عشر (١٢) وجها Dodecohedron أو عديد

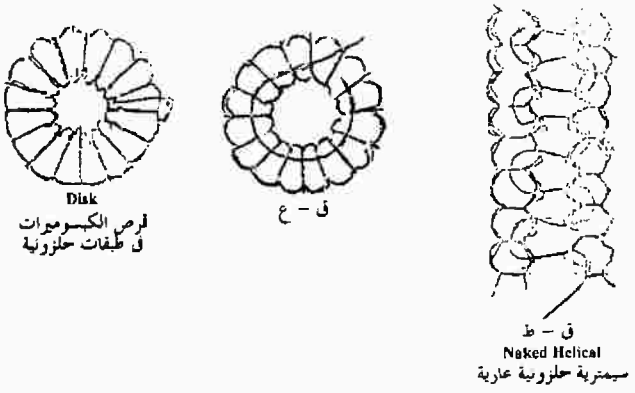
الأوجه Icosahedron ذات عشرين وجه مثلث متساوى الأضلاع Triangle face وثلاثين حافه Vertices، واثنتى عشر قمة Edges وهو الشكل المميز للفيروسات الكروية ويسمى Icosahedron ايكوزاهيدرال.

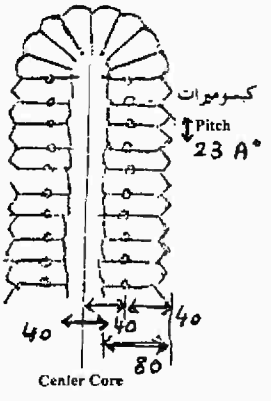
وقد حظى فيروس موزيك الدخان بدراسات واسعة لتركيبه البنائى كمثل للفيروسات ذات السيمترية الحلزونية، وقد وجد أن جزيئات الفيروس تظهر كأسطوانة قطرها ١٥ نانوميتر وطولها ٣٠٠ نانوميتر، وأصبحت هناك صورة واضحة حقيقية، توضح أن الأسطوانة تتكون من وحدات بروتينية (كابسوميرات) تكون متراصة بجانب بعضها البعض، وتتكرر فى شكل حلزونى حول محور الجزئ بفراغ فى وسطها قطرة ٤٠ A° انجستروم والكبسوميرات ذات شكل بيضى Ellipsoid، وتشمل كل لفة على ١٦ كبسوميرة تتكرر كل ٦٩ إنجستروم، ويصل مجموع الكبسوميرات فى الفيريون إلى ٢١٣٠ + ٢٪ والوزن الجزيئى للوحدة ١٧٣٠٠ دالتون.

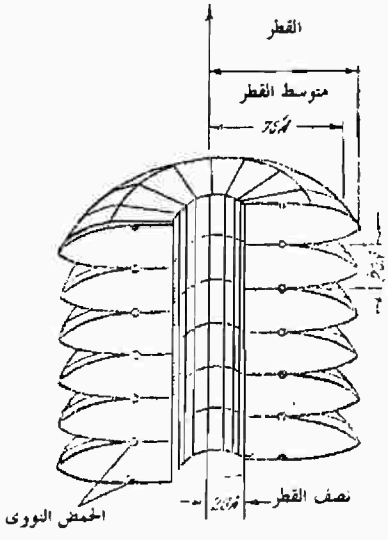


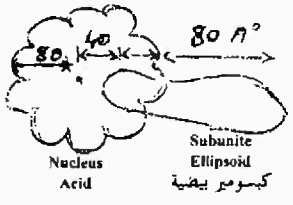

**شكل (٢ – ٢): رسم تخطيطي يمثل نيوكليوكابسيد لجزئ فيروس حلزوني السيمترية (TMV).**

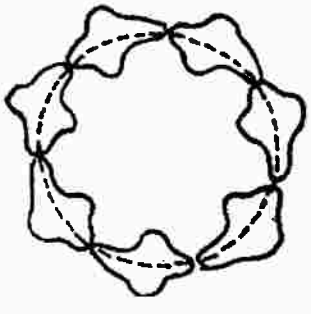
وللفيرون ٣٩ X ٦١٠ دالتون، بينما الوزن الجزيئى لحمض النواه RNA هو ٢,٦ X ٦١٠ دالتون. يكون وسط الجزىء أجوف، وعلى سطحه ترتب تحت الوحدات فى نظام حلزونى ولها Pitch حوالى ٢٣ A° انجستروم ونصف قطر Radial ٧٥ انجستروم (شكل ٢).



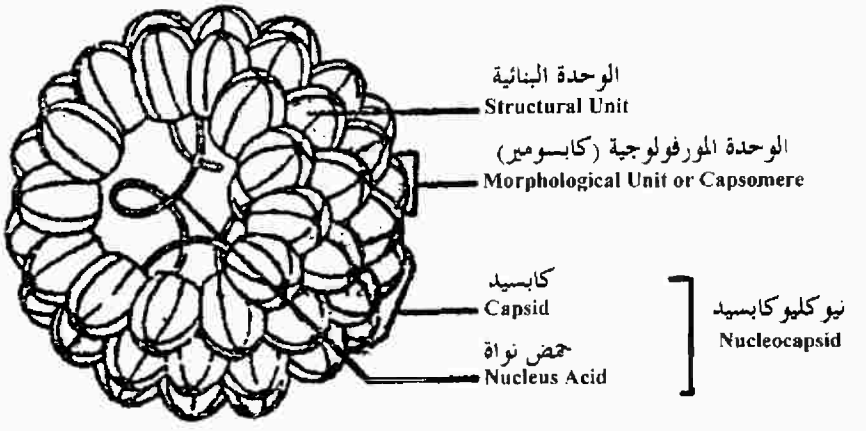



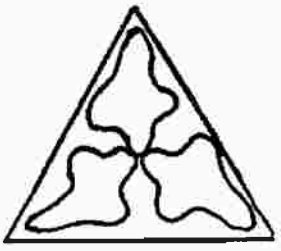
**شكل (٢ - ٣): رسم تخطيطى يبين خطوات تجمع الوحدات البنائية فى نظام حلزونى لإنتاج نيوكليوكابسيد فيروس (TMV) موزايك الدخان.**

وبالنسبة للسيمترية المكعبة فإن كثير أمن الفيروسات ذات كابسيدات كروية Spheri-cal، تظهر فى الميكروسكوب الإلكترونى ذات أوجه عديدة. وتظهر الوحدات البنائية التى ترى فى الصورة كابسوميرات Capsomeres أو الوحدات المورفولوجية دائرية الشكل أو منشورية مسمطة أو مفرغة. وهذه بدورها تتكون من وحدات أقل، توجد منفردة أو فى مجاميع، والتى هى الجزيئات البروتينية المكونة للجزىء الخاص بغطاء الكابسيد Capsid shell ( شكل ٢ – ٤ ).

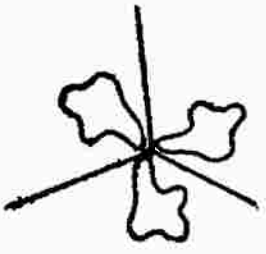



**شكل (٢ – ٤) : رسم تخطيطي يبين االتركيب البنائي لجزيء فيروس كروي ذى سيمترية مكعبة.**

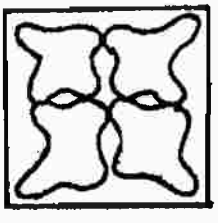
أما معرفة الشكل الذى يوجد فيه حمض النواة داخل الجزيئات الفيروسية ذات السيمترية المكعبة، فهذا غير مؤكد تمامًا، إلا أنه لابد وأن يكون حمض النواة ملتفاً بطريقة ما. أظهر هذا النظام أو الترتيب الداخلى بدراسة مستفيضة لفيروس موزيك اللفت الأصفر (TUMV) على أنه عقد Knobs موجودة فى علاقة سيمترية مع كابسوميرات الغطاء Shell وقطره ١٩٠ A° ووسط مفرغ محاط بدائرة من الحمض RNA، والذى بدوره محاط بدائرة خارجية من البروتين.



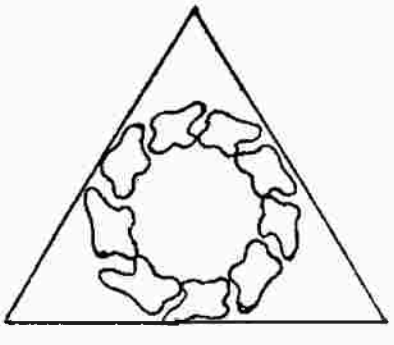
ترتيب تحت الوحدات في رؤوس المثلث



ترتيب تحت الوحدات حول القمم



ترتيب تحت الوحدات على الاوجه ( مربع )



ترتيب تحت الوحدات على أوجه المثلث Nonagons

**شكل (٢ – ٥) : الأشكال المختلفة للترتيبات الممكنة للأشياء ذوات الأوجه المثلثة أو المربعة لتكوين السيمترية المكعبة.**

وتشمل السيمترية المكعبة عدداً من الأنظمة منها: ذات أربعة أوجه Tetrahedron، وذات ١٢ وجهاً Dodecohedron، وذات عشرين وجهاً Icosahedron.

كما أن نظرية كاسبر وكلج (Casper and Klug, 1962) للأشكال المختلفة للكابسيدات ذات الأوجه فى الصور الإلكترونية، تبدأ باعتبارات بلورية Crystallographic consideration تقول بأن الأنظمة ذات السيمترية المكعبة يمكنها أن تكون أغطية متشابهة Isometric shells وذلك بواسطة وضع وحدات متشابهة فى حالة منتظمة Qui-valent على السطح Sphere، ويمثل نظام سيمترية ايكوزاهيدرال Icosahedral، وفى هذه الحالة فإن (٦٠) ستين تحت وحدة متشابهة ترتبط فيما بينها، وتوضع على سطح دائرى.

**الأغلفة Envelopes:**

قد تحاط كابسيدات بعض الفيروسات بغلاف خارجى أو أكثر، يطلق عليه الظرف En-velope وتوجد الأغلفة بصفة خاصة فى فيروسات الحيوان، وقليلاً ما توجد فى فيروسات النبات والبكتريا. وقد وجد فى كثير من الحالات أن مادة الأغلفة لها علاقة كيميائية وسيرولوجية ببعض محتويات جدار الخلية، وأظهرت صور الميكروسكوب الإلكترونى لقطاعات فى خلايا مصابة بالفيروس وجود الكبسيدات تحت جدار الخلية مباشرة.

يتكون الغلاف الخارجى من تحت وحدات مرتبة بنظام معين، وقد يكون الغلاف الخارجى مكوناً من طبقة واحدة أو أكثر.

**الفيريونات غير الكاملة Incomplete Virions:**

وجد أن كل التحضيرات للفيروسات من الخلايا المصابة تحتوى بجانب الفيريونات على محتويات أخرى لها النشاط الفيروسى. وفى معظم الحالات فإن مثل هذه المحتويات ذات علاقة مباشرة مورفولوجية وكيميائية لبعض محتويات الفيريونات. فمثلاً تحتوى النباتات

المصابة بفيروس موزيك الدخان (TMV) على بروتين X، الذى يختلف عن بروتين أ الذى يستخلص من الفيريونات الكاملة.

وفى الخلايا التى تصاب بفيروسات ذات سيمتريات مكعبة، فإنه غالباً ما تصحب بكبسيدات فارغة، كما هو الحال فى فيروس موزيك اللفت، وهذه الكابسيدات الفارغة أخف من الكابسيدات الكاملة، ويمكن فصلها بواسطة الطرد المركزى، وأحياناً ما تحتوى مثل هذه الكابسيدات على كمية قليلة من حمض النواة.

هذه الكابسيدات الفارغة ما هى إلا فيرونات فقدت حمض النواة – أو أغلفة تكونت دون الحمض أو ربما تكونت كبداية لتكوين الفيريونات.

# الفصل الثانى

## التركيب الكيميائى لفيروسات النبات

## CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

لقد دلت الدراسات بأن جميع الفيروسات التى أمكن عزلها بصورة نقية تتكون من بروتين وحامض نووى. لذا يمكن القول بأن جميع الفيروسات المتكاملة تتكون بصورة رئيسية من نوع واحد أو أكثر من البروتينات، ومن نوع واحد فقط من الحامض النووى الذى إما أن يكون من نوع RNA أو DNA.

تختلف النسبة المئوية والوزن الجزيئى للحامض النووى وللبروتين فى الفيروس الواحد باختلاف الفيروسات، ويبين الجدول التالى النسبة المئوية والوزن الجزيئى للأحماض النووية والبروتين لبعض فيروسات النبات.

**جدول ( ٢ - ١ ) : نوع الحامض النووى والوزن الجزيئى والنسبة المئوية للحامض النووى والنسبة المئوية للبروتين فى بعض فيروسات النبات.**

| الفيروس | نوع الحامض النووى | ٪ الحامض النووى | الوزن الجزيئى للحامض النووى (مليون دالتون) | ٪ بروتين |
|---|---|---|---|---|
| Cauliflower mosaic | DNA | ١٦ | ٤,٧ | ٨٤ |
| Cowpea mosaic | RNA | ٣٣ | ١,٧ | ٦٧ |
| Pea enation mosaic | RNA | ٢٩ | ١,٦ | ٧١ |
| potato X | RNA | ٦ | ١,٠ | ٩٤ |
| Tobacco mosaic | RNA | ٥ | ٢,٠٥ | ٩٥ |
| Tobacco necrosis | RNA | ٢٠ | ٦,٦ | ٨٠ |
| Tobacco ring spot | RNA | ٤٠ | ٢,٠ | ٦٠ |
| Tomato bushy stunt | RNA | ١٧ | ١,٥ | ٨٣ |
| Wild cucumber mosaic | RNA | ٣٥ | ٢,٤ | ٦٥ |
| Wound tumour | RNA | ٢٣ | ١٠,٠ | ٧٧ |

## أولاً: الحمض النووى:

تتكون الأحماض النووية للفيروسات- كمثيلاتها فى الكائنات الأخرى فى الطبيعة- من سلاسل غير متفرعة من عديد من النيوكليوتيدات Nucleotides، ويتكون كل نيوكليوتيد من جزيئ سكر وقاعدة نيتروجينية وفوسفات.

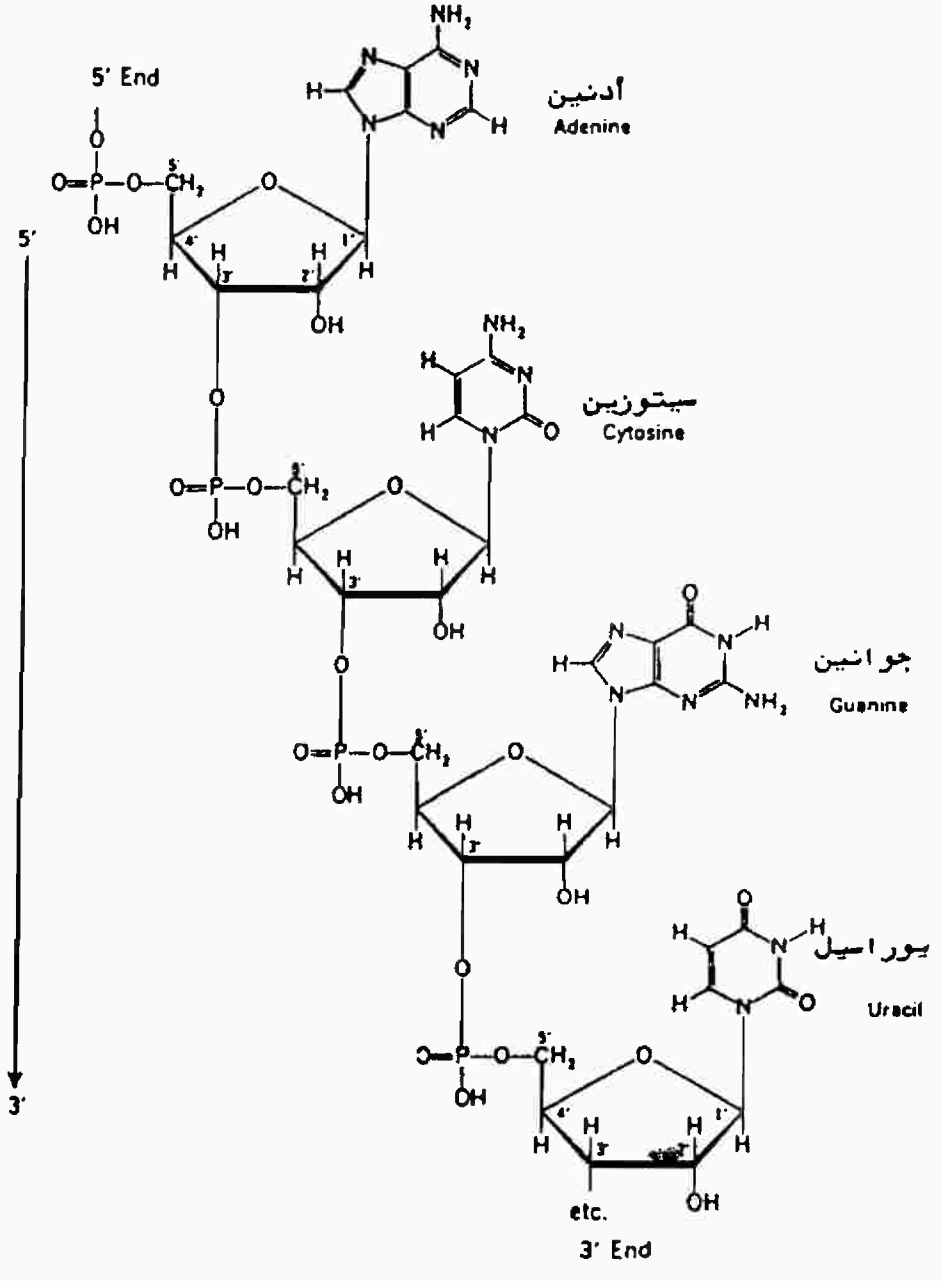
ويتكون الهيكل الأساسى لهذين النوعين من الحمضين النوويين (DNA , RNA) من سلاسل بها جزيئات فوسفات وسكر خماسى بالتبادل، ويتصل بكل جزىء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين أو البريميدين، والسكر الموجود بجزىء الحامض النووى رن ا RNA هو سكر الريبوز، بينما فى جزىء الحامض النووى دن ا DNA فإن السكر الموجود هو سكر دى - أوكسى - ريبوز Deoxyribose، وتعنى انه سكر ريبوز منزوع منه ذرة أوكسجين من ذرة الكربون رقم ٢. ويوضح الشكل (٢ - ٦ : أ، ب) التركيب البنائى لكل من الريبوز والدى- أوكسى ريبوز.

ومن الملاحظ أن الأحماض النووية تتركب من وحدات متكررة مكونة من قاعدة نيتروجينية (بيورين أو بريميدين) وسكر خماسى (ريبوز أو دى - أوكسى- ريبوز) ومجموعة فوسفات، وكل وحدة من هذه الوحدات المتكررة تسمى «نيوكليوتيد» Nucleotide، وترتبط النيوكليوتيدات الأحادية ببعضها بواسطة جزئ الفوسفات عن طريق رابطة ثنائية الإستر، مع مكان المجاميع الهيدروكسيلية الموجودة على الكربون الثالث والخامس (٣، ٥) بالسكر الخماسى، كما يظهر بوضوح فى الشكل (٦ - أ،ب) لكل من رن أ، دن ا والمركب الناتج من ارتباط النيوكليوتيدات Polynucleotides الاحادية يعرف باسم عديدات النيوكليوتيدات.

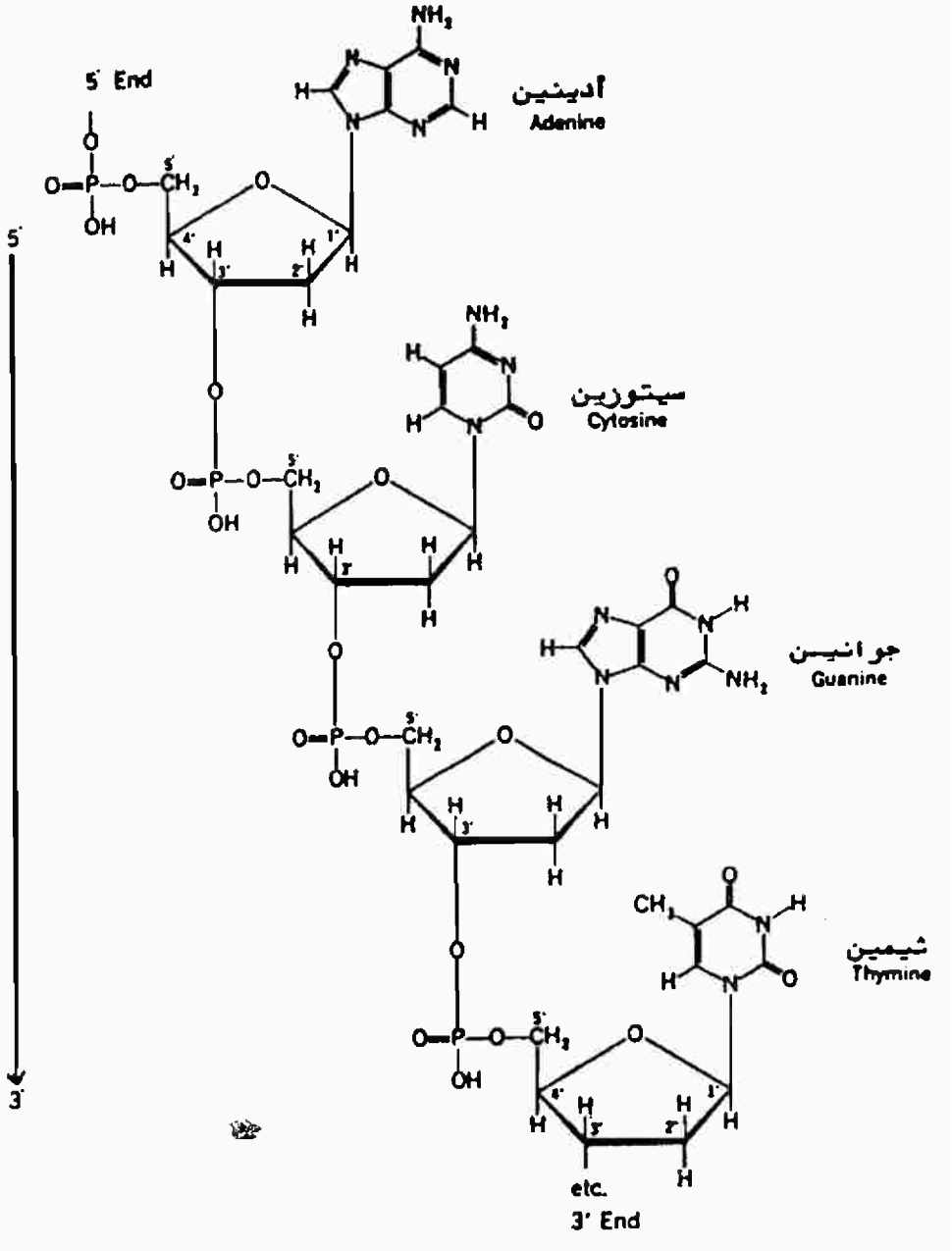
**ويختلف RNA عن DNA من حيث التركيب فى نقطتين، هما:**

١ - الاختلاف فى جزئ السكر، حيث يكون من نوع Ribose فى RNA، بينما تكون من نوع Deoxyribose فى DNA.

٢ - يحتوى كل من RNA ، DNA على أربع قواعد نتروجينية منها ثلاث الادنين والجوانين من البيورينات والسيتوزين من البيرميدينات مشتركة بين RNA ، DNA ،بينما تختلف بالنسبة للقاعدة الرابعة، حيث يحتوى DNA على الثيمين، ويحتوى RNA على اليوراسيل.




شكل (٢ : ٦ – أ): التركيب البنائي لسلسلة عديدات الريبونيوكليوتيدات لتوضيح الرابطة ثنائية الاستريين جزيئات سكر الريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات. وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الريبوز والقواعد النيتروجينية أدنين– سيتوزين– جوانين– يوراسيل.




شكل (٢ : ٦ – ب): التركيب البنائي لسلسلة عديدات الدى أوكسى ريبونيو كليوتيدات. لتوضيح الرابطة ثنائية الاستريين جزيئات سكر الدي أوكسى ريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات، وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الدي أوكسى ريبوز، والقواعد النيتروجينية أدنين- سيتوزين- جوانين- ثيمين.

ومن الحقائق المعروفة اليوم أن الحمض النووى فى الفيروسات هو المادة الوراثية لها؛ حيث يتميز بقدرته على التضاعف وإحداث العدوى، وتصنيع الغلاف البروتينى الخاص بالفيروس.

ولما كان الحامض النووى هو المادة الوراثية للفيروسات، فمن البديهى بأنه كلما زادت كتلة الفيروس والنسبة المئوية للحامض النووى فيها، كان الفيروس أعقد تركيبا.

قد يكون الحامض النووى للفيروس أحادى الخيط (Single- Stranded)، كما هو الحال فى فيروس موزيك الدخانTMV أو ثنائى(Double- Stranded) فى بعض الفيروسات، مثل فيروس تقزم الأرز Rice dwarf virus (RDV) وفيروس أورام الجروح wound tumor vi-rus، وان الحامض النووى لهذه الفيروسات هو من نوع RNA ر ن ا.

فى معظم فيروسات النبات التى درست بصورة جيدة، وجد بأن الحامض النووى فيها كان من نوع RNA، إلا أن هناك بعض الفيروسات التى وجد بأن الحامض النووى فيها كان من نوع DNA.

فقد اكتشف شبرد وزملاؤه فى عام ١٩٦٨ بأن فيروس موزايك القرنبيط Cauliflower mosaic Virus يحتوى على DNA وهو ثنائى الخيط. كما أن أحد الفيروسات التى اكتشفت على الإشنات الزرقاء- الخضراء Blue-Green algae Virus تحتوى على DNA وهو ثنائى الخيط، ووجد أن مجموعة الجيمنىGeminiviruses تحتوى على DNA أحادى الخيط ssDNA مثل فيروس تجعد أوراق الطماطم الأصفر.

ويكون موقع الحامض النووى فى داخل جزئ الفيروس ومحاطاً من جميع جوانبه بالغلاف البروتينى الذى نعتقد بأنه الغطاء الواقى للحامض النووى من تأثير الإنزيمات عليه، وبصورة خاصة إنزيمات النيوكلييز Nuclease التى تقوم بتحليل الأحماض النووية. ولأجل أن يكون هذا الغطاء الواقى فعالاً، يجب أن يكون مقاوماً للإنزيمات التى تحلل البروتينات، والتى تسمى Proteolytic enzymes المتواجدة فى خلايا الكائنات الحية. ويظهر أن الغلاف البروتينى فعلا يتميز بمقاومة هذه الإنزيمات بالنسبة لمعظم الفيروسات التى درست بصورة مفصلة، ويعتقد بأن هذا التركيب للغلاف البروتينى حدث نتيجة للانتخاب الطبيعى، أثناء نشوء وتطور الفيروسات فى الطبيعة.

## ثانياً: الغلاف البروتينى أو المحفظة Protein Coat or Capsid:

يشكل الغلاف البروتينى المعروف بالمحفظة Capsid معظم كتلة الفيريون، وخاصة فى الفيروسات الصغيرة (الفيريون Virion هو جسيمة فيروس كاملة؛ أى تحتوى على الحامض النووى والغلاف البروتينى وبقية المكونات الأخرى إن وجدت).

ونظراً لحجم الفيروسات المتناهى الصغير، والذى يترتب عليه صغر حجم مادته الوراثية Genome Size فإن الفيروسات لايمكنها أن تخصص إلا جزءاً محدوداً من مجموع مادتها الوراثية (عدد محدود من الجينات Genes) لبناء بروتين المحفظة، وعلى ذلك فإن المحفظة لابد وأن تتكون- بالضرورة- من وحدات بروتينية متشابهة Identical Protein Subunits والوحدات البروتينية التى تكون الغطاء البروتينى، تسمى الكابسومرات Capsomeres، ومفردها كابسومر Capsomere.

تتكون البروتينات بصورة عامة من سلاسل طويلة وغير متفرعة من البوليبيبتيدات Pol-ypeptides، وتتكون هذه الاخيرة من وحدت بنائية أساسية هى الأحماض الأمينية Amino acids.

وتحتوى البروتينات المختلفة على حوالى عشرين حمضاً أمينيًا مختلفًا. ويختلف ترتيب هذه الأحماض الأمينية ونسبتها فى البروتينات المختلفة. وترتبط هذه الأحماض الأمينية ببعضها فى سلسلة بواسطة روابط بيبتيدية عن طريق اتحاد مجموعة الكربوكسيل فى أحد الأحماض الآمينية بمجموعة الآمين فى الحمض الآمينى التالى له، مع فقد جزئ ماء. وعند تكوين سلسلة من عدد من الأحماض الآمينية فإنه يطلق عليها اسم سلسلة بيبتيدية. ولكل سلسلة بيبتيدية نهايتان (طرفان)، أحدهما يحتوى على مجموعة كربوكسيل غير مرتبطه وتسمى النهاية الكربوكسيلية، والطرف الثانى يحتوى مجموعة آمينية غير مرتبطة وتسمى النهاية الآمينية. وتتكون البروتينات من سلاسل بيبتيدية ذات عدد مرتفع من وحدات الأحماض الآمينية وللبروتينات مستويات مختلفة من التركيب، تتقدم بتقدم مستوى تعقيد البروتين.

وتسلسل الأحماض الآمينية فى أى بروتين يعتبر على درجة كبيرة من الأهمية. وتغير هذا التسلسل قد يؤدى إلى فقد نشاط البروتين.

## ثالثاً: مكونات أخرى Other Constituents:

بالإضافة للبروتين والحامض النووى، فقد وجد بأن بعض الفيروسات تحتوى على مكونات أخرى مثل مركبات البولى آمين Polamines والدهون Lipids، والتى أهمها -Phospholip ids، وتتميز معظم هذه الفيروسات باحتوائها على غشاء خارجى يحيط بالغلاف البروتينى ويدعى Envelope.

إن وجود هذه المركبات يكون شائعاً فى الفيروسات التى تصيب الحيوان، بينما نجدها مقتصرة على فيروسات قليلة من فيروسات النبات مثل فيروس التقزم الأصفر فى البطاطس Potato yellow dwarf virus، الذى يحتوى على ٢٠٪ مركبات دهنية، وفيروس الذبول المبقع فى الطماطم Tomato spotted wilt V.، الذى يحتوى على ١٩٪ من المركبات الدهنية، ٥٪ كربوهيدرات.

# الفصل الثالث

## الجينوم الفيروس

## VIRAL GENOME

تظهر الأحماض النووية بالفيروسات تنظيمات ملحوظة لأنواع تركيبية وتكوينية تميز كل جزئ فيروسى عن الآخر، **ويمكن القول بأنه توجد أربعة أشكال من الأحماض النووية فى الفيروسات:**

١ – حمض نواة ssRNA وحيد الضفيرة مثل معظم فيروسات النبات.

٢ – حمض نواة ssDNA وحيد الضفيرة مثل فيروس بكتريا القولون M3 q x 174.

٣ – حمض نواة ريبو ds RNA ثنائى الضفيرة مثل فيروس التدرن الجرحى (WTV) وفيروس تقزم الأرز والـ Reoviruses.

٤ – حمض نواة DNA ثنائى الضفيرة مثل بعض فيروسات الحيوان وفيروس موزيك القرنبيط (CaMV).

وتوجد جميع الأشكال الأربعة ممثلة فى فيروسات الحيوان أما فيروسات النبات فتحتوى على شكل حمض النواة ريبو ويوجد قليل جداً من الفيروسات النباتية التى تحتوى على حمض النواة DNA مثل فيروس موزيك القرنبيط.

وجد ان معظم فيروسات حمض النواة ss-RNA وزنه الجزيئى ٢ X ١٠$^{٦}$ – ٣ X ١٠$^{٦}$، وفى حالة حمض النواة ds RNA فإن الوزن الجزيئى أكبر خمس مرات تقريباً أى ١٠ X ١٠$^{٦}$، أما فيروسات حمض النواة DNA فهى ذات وزن جزيئى مرتفع، وتختلف عن فيروسات حمض النواة RNA، إلا أن هناك فيروسات يطلق عليها الفيروسات ذات المحتويات المتعددة Multicomponent، وهى تلك ذات الجزيئات العديدة أو الأجزاء المختلفة من حمض النواة، وحيث إن الجينوم المتعدد يعتبر الآن ضمن هذه الخصائص، إلا أننا سنتناول هنا

الأنظمة المتعارف عليها جيداً رغم وجود حجج قوية لانقسام الجينوم فى بعض من الفيروسات مثل فيروس الموزيك والنموات الزائدة فى البسلة ( PEMV ) وفيروس موزيك وتخطيط الشعير ( BSMV )، وتظهر هذه الأنظمة أيضاً فى بعض الفيروسات ذات حمض النواة ds DNA من فيروسات النبات أو الفطر أو البكتيريا .

## أولاً : الجينوم الثنائى Bipartite genomes :

### ١ - مجموعة توبرا فيروس Tobravirus group :

تشمل هذه المجموعة فيروسات عديدة تظهر اختلافاً فى الشكل المورفولوجى مثل فيروس القرقعة فى الدخان ( TRV )، وفيروس اللون البنى المبكر فى البسلة ( PEBV ) ويحتوى الجينوم فيهم على قطعتين غير متساويتين من حمض النواة RNA، موجودة داخل جزيئات أنبوبية وأسطوانية قصيرة أو طويلة نسبياً، وتوجد المعلومات الوراثية الخاصة بعمليات التضاعف فى الجزيئات الطويلة، وأما الجزيئات القصيرة تختص بالتركيب الفردى للبروتين Single structural of protein، لهذا فإن الجزيئات الطويلة معدية، ولكنها تؤدى إلى تكوين حمض نواة RNA غير مغلف ولكنه معدى أيضاً، أما الجزيئات الصغيرة وحمض النواه الذى بها لا يحدث العدوى ولكنها ضرورية لإنتاج الفيريون، ولا يبين تداخل الجزيئات الطويلة والقصيرة لحمض النواة RNA القدرة على إنتاج بعض الفيروسات المختلطة الهجين Hybrid والمحتوى على حمض النواة من سلالات مختلفة، ويحتاج إنتاج مثل هذا الهجين Hybrid إلى عمليات وراثية مختلفة من الإنزيم الخاص لأحماض النواة RNAs .

### ٢ - مجموعة كوموفيروس Comovirus group :

تحتوى هذه المجموعة على عديد من الفيروسات، تظهر اختلافات فى الكثافة النوعية ينظر إليها على أنها مميزة، ولكن جميعها تميز بجينوم ينقسم بين محتويين من النيوكلوبروتين ( وسطى وسفلى )، وهما جزيئات متماثلة Isometric ذات حجم واحد ولكنها تختلف فى كثافتها النوعية عند الترسيب، ويوجد أيضاً جزيئات شبيهة ولكنها فارغة وتظل فى أعلى، أما الغلاف البروتينى بالنسبة لجزيئات الأقسام متشابهة، ويقترح أن

عمليات التضاعف توزع بينهما وأن ليس لجينوم أحدهما القدرة على الإصابة وحده، وكذلك فإن هذا حقيقى لتكوين نوعى البروتين ( بروتين فارغ وآخر ممتلئ ) وتوجد بعض الوظائف تحدد النسبة بين أنواع الجزيئات، وتظهر بعض المظاهر على أنها مميزة لجينوم واحد.

**٣ - مجموعة نيبوفيروس Nepovirus group :**

يحتمل أن تحتوى كل اعضاء هذه المجموعة ذات الفيروسات المتماثلة Isometric على جينومات متشابهة مقسمة، ورغم هذا فإنه على الأقل يوجد فيروس واحد يستثنى فى أن له تكوينات من البروتين بدلاً من تركيب واحد، ففى فيروس البقع الحلقية فى الراسبرى ( RRSV )، وهو الذى درس أكثر فإن كل الجزيئات ذات حجم متماثل، ولكنها تنقسم إلى ثلاث مجاميع من ناحية الترسيب عاكسة بذلك ما تحتويه من حمض النواة $RNA_2$، فالجزء العلوى Top يحتوى على كابسيدات فارغة، والجزء الوسطى Middle RNA يحتوى على RNA الذى وزنه الجزيئى ١٫٤ X ١٠^٦ والجزء السفلى bottom يحتوى على كل من $RNA_2$ مضافاً إليه $RNA_1$ ووزنه الجزيئى ٢ X ١٠^٦ دالتون ولا يمكن $RNA_1$ أن يعدى وحده وأن $RNA_3$ ذو تأثير معدٍ ضعيف، وربما يرجع هذا التأثير الضعيف إلى التلوث، أما الحمضان فهما ضروريان للتضاعف.

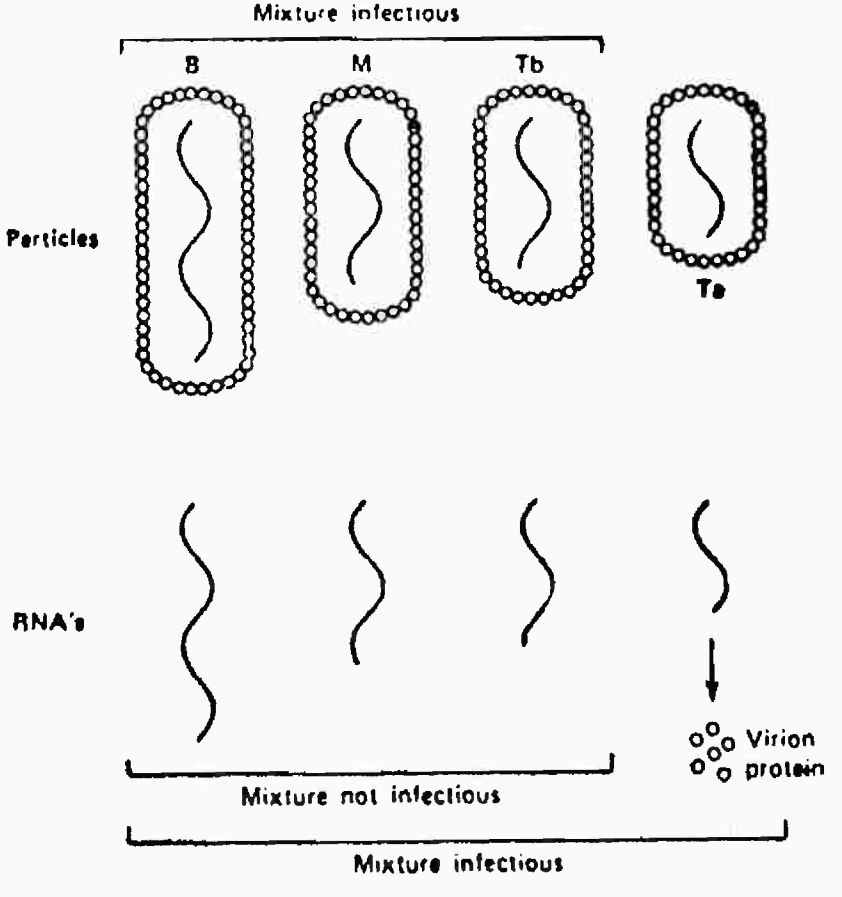
## ثانياً : الجينوم الثلاثى Tripartite genomes : وله الأشكال التالية :

**١ - فيروس موزيك البرسيم الحجازى Alfalfa Mosaic Virus (AMV) :**

وجد اختلاف فى المورفولوجى ( فى الطول ). سببت صعوبة عملية فصل هذا الفيروس إلى مجاميعه الترسيبية مشكلة فى تعرف الجينومات التى به بالضبط، ويظهر أن هناك أربعة من الجزيئات يمكن تمييزها تمييزاً بيولوجيا.

كما تحتوى جميع الأشكال على بروتين واحد ( البروتين نفسه ). وهى عصوية فى شكلها Bacilliform، ولكنها بأطوال مختلفة فهى أطول فى القاع ثم الوسط ثم القمة أ والقمة ب، وتحتوى هذه الجزيئات على كود حمض RNA لأعمال مخصصة، فالجينومات الثلاثة ذات الحمض الطويل $RNA_1$ ، $RNA_2$, $RNA_3$ تحتوى على كمية الحمض الكافية

للإصابة فهى تحتوى وراثياً على RNA أساساً ولكن لابد من أن يصاحبها $RNA_4$ الحمض النووى فى القمة أو نواتجه Translation وغلافه البروتينى حتى تحدث الإصابة، وفى كلتا الحالتين ينتج $RNA_4$، ولهذا فإن تتابع النيوكليوتيدات يكون مزدوجاً فى مكان ما فى الجينوم، ولقد اتضح عديد من وظائف الحمض $RNA_1$, $RNA_2$, $RNA_3$ ، بطريقة الترقيم Markers فى إنتاج فيروسات هجن، ولكنه غير معروف أى كود هى الخاصة بالتضاعف (شكل ٢ – ٨).




**شكل (٢ – ٨): الأشكال المختلفة لحمض RNA ووظائفها في فيروس موزيك البرسيم (الفالفا) الحجازي.**

**٢ - مجموعة فيروس التخطيط فى الدخان Tobacco streak virus :**

يمثل هذا الفيروس مجموعة من الفيروسات الكروية المتماثلة Isometric ، والتى تشتمل على فيروس موزيك التفاح ( APMV ) وفيروس تبقع أشجار الدردار ( ELm ) ريجوس الموالح ( CLRV )، كما يوجد العديد من الفيروسات الكروية المتماثلة الغير تامة والتى عزلت أولاً من النباتات الخشبية المعمرة Perennials، وينقسم الجينوم بين أقسام مختلفة من الجزيئات تمثل فيريونات ذات التركيب البروتينى الواحد ونفس نسبة الحمض إلى البروتين، ولكن يختلف الترسيب لاختلاف الحجم، ومن الصعب فصل الجزيئات المختلفة عن بعضها، وأن أقسام الحمض المختلفة يحتمل أنها لا تتمشى مع تصنيف الجزيئات والوضع المعقد لوظائف الجينوم، كما فى فيروس موزيك البرسيم الحجازى ( AMV )، وغالباً فإن الجينوم الأساسى يقسم إلى ثلاث أو أربع أصناف من الحمض النووى يطلق عليها من ١ - ٣ تبعاً لصغر الحجم، ولكن حمض $RNA_4$ أو البروتين المغلف ضرورى لعملية الإصابة، كما أن حمض الـ$RNA_4$ أو الغلاف البروتينى لفيروس التخطيط فى الدخان ( TSV ) يحل محل Substitute المحتويات المتشابهة فى نظام فيروس موزيك البرسيم الحجازى والعكس، وعلى أساس هذه القواعد فإن هذه الفيروسات ضمت إلى مجموعة فيروس موزيك البرسيم الحجازى ( AMV ) .

**٣ - مجموعة البروموفيروس والكيوكوموفيروس**

**: Bromovirus and Cucumovirus groups**

لوحظ أن نيوكليوبروتين هذه الفيروسات ذات حجم متماثل يحتوى على تكوين واحد للبروتين، ويرسب كصنف واحد، ويشمل جينومات غير متطابقة Heterogenicty، وهذا مرتبط مع المحتويات الغير موحدة من الحمض للجزيئات، وتقريباً يحتوى الجينوم الأساسى ثلاثة أصناف فقط من الحمض النووى، وهذه ترقم من ١ - ٣ طبقاً للحجم التنازلى، والحمض النووى الرابع $RNA_4$، يعمل كرسول mRNA لتكوين الغلاف البروتينى فى نظام تمثيل البروتين الحر فى الخلية، ولكن أصله غير مميز Obscure ولا يظهر أنه يتشابه فى عمله مع الحمض الرابع $RNA_4$ لفيروس موزيك البرسيم ( $AMV_2$ ) ولا مع بروتين الغلاف

الضرورى للعدوى، وأظهرت تجارب التهجين Hybridization بواسطة حمض النواة RNA من سلالات ذات قرابة أن $RNA_3$ ( وهو رسول لتكوين الغلاف البروتينى أيضاً ) يسبب Mediates تعديلات وسطية فى الغلاف البروتينى، بينما مظاهر إصابة مختلفة تتغير بواسطة حمض النواه ١، ٢، ٣، وأمكن أيضاً تخليق فيروسات مهجنة بواسطة استعمال حمض النواة من فيروسات البروموفيروس Bromoviruses، والتى لها قرابة بسيطة ولكن حدود التخصص فى التهجين غير واضحة.

مما سبق يتضح أن جينوم الفيروسات السابقة ( فيروس موزيك البرسيم AMV ) ومجموعة البروموفيروس Bromoviruses، والذى يمثلها فيروس موزيك البروم BrMV ومجموعة كيوكوموفيروس Cucumovirus، والذى يمثلها فيروس موزيك الخيار ( CMV )، وفيروس التخطيط فى الدخان ( TSV )، وفيروس ريجوس ورقة الموالح ( CLRV ) والفيروس القريب سيرولوجيًّا وهو انكسار لون ورقة الموالح ( CVV ). يتكون حمض النواة RNA لكل هذه الفيروسات من أربعة أنواع أساسية، ثلاثة ذات أوزان جزيئية تتراوح من ٠,٧ – ١,١ X $10^6$ دالتون ونوع وزنه الجزيئى حوالى ٠,٣ X $10^6$ دالتون وترتب الأحماض النووية RNA ( ١، ٢، ٣، ٤ ) فى ترتيب تنازلى بالنسبة للوزن الجزيئى، ويتكون الجينوم فى هذه الفيروسات من ١، ٢، ٣، بينما وضح أن النوع الرابع فى بعضها يحتوى على معلومات وراثية من أجل تكوين الغلاف البروتينى.

وقد وضح أن خليطاً من الحمض النووى ( ١، ٢، ٣ ) يكون معديًّا فى حالة مجموعة Bromoviruses ومجموعة فيروسات Cucumoviruses، بينما أحماض النواة ريبو من فيروس موزيك البرسيم ( AMV ) وريجوس ورقة الموالح ( CLRV ) وفيروس التخطيط فى الدخان ( TSV ) وفيروس انكسار اللون فى ورقة الموالح ( CVV ) تحتاج حتى تصبح قابلة لإحداث العدوى تحتاج إلى تنشيط بواسطة غلافها البروتينى، وأن دور الغلاف البروتينى ليس فقط لحماية حمض النواة RNA المعدى أثناء اختراقه الخلايا، حيث إن mRNA للغلاف البروتينى $RNA_1$ يمكنه أيضاً تنشيط جينوم الفيروس Translation of the RNAs of multicomponent viruses.

**عملت دراسة فى جامعة ويسكونسون كلية الزراعة والمياه، اتضح منها الآتى:**

حيث إنه من المعروف أن المعلومات الوراثية للفيروسات عديدة الجينوم تتوزع بين الأنواع المختلفة لحمض النواه RNA، فقد وجد أن أصغرها $RNA_4$، والذى لا حاجة له فى إحداث العدوى يعتبر رسول mRNA لتكوين الغلاف البروتينى، وقد وجدوا أنه بالنسبة لكل الفيروسات العديدة الجينوم، وعندما يستعمل الحمض المركب الكلى ١ – ٤، فإن أصغرها وهو سيسترون الغلاف البروتينى Monocistronic ينقل Transplanted جيداً، ويقترحوا أن حمض النواة ١، ٢ مثل كثير من الرسل لفيروسات الحيوان والثدييات ربما تكون Monocistronic.

والآن حيث عرف التركيب الكيميائى للفيروس.. فإنه من الممكن تفسير كثير من الخواص البيولوجية على المستوى الجزيئى، ويمكن القول: إن هذا الجزئ الصغير من جينوم الفيروس مجهز للقيام بكثير من العمليات، ومن العمليات المستقلة منها رسول منظم Regulated messenger وكوحدة للتضاعف Unit of replication وكمسبب مرضى معدٍ An infective pathogenic agent.

## تعرُّف الجينوم الفيروسى:

لتعرف طبيعة الحمض النووى الفيروسى سواء كان DNA أو RNA، وسواء كان وحيد الخيط ss أو ثنائى الخيط ds، وسواء كان مستديراً أو خيطيا، توجد طرق متعددة قياسية طبيعية أو كيماوية أو إنزيمية. وتقوم الطرق الكيماوية والإنزيمية بتعرف التركيب الخاص عند النهاية الخامسة أو الثالثة للحمض النووى الخيطى. كما يعطى استخدام الإليكتروفورسيس نتائج لا بأس بها فى تقدير الوزن الجزيئى للحمض النووى DNA أو RNA عند استخدامها فى صورتها النقية، كما يعطى فكرة عن عدد المناطق المختلفة فى الحجم للجينوم الفيروسى. كما تتعدد الطرق التكنولوجية الحديثة عند تعرف التركيب البنائى للجينوم الفيروسى وعن كيفية تضاعف الفيروسات، وتعتبر دراسة التركيب البنائى للجينوم الفيروسى على جانب كبير من الاهمية فى دراسة الفيروس داخل النبات، وكذا علاقة الفيروس بالفيروسات الاخرى ولكل من ذلك ناحية نظرية وأخرى عملية.

**أولاً الفيروس داخل النبات:**

من الناحية النظرية فإن معرفة الجينات الفيروسية والنواتج التى تسجلها تعتبر البداية التى توصل إلى تفهم كيف تحدث الفيروسات المرض.

ومن الناحية العملية فإن القدرة على تعريف وعزل جينوم فيروس ما وتتبعها داخل النبات العائل تعطى الفرصة لتفهم وظائف الجينوم الفيروسى وتساعد إلى حد ما فى التوصل إلى طرق مقاومة المرض الفيروسى.

**ثانياً: علاقة الفيروس بالفيروسات الأخرى:**

من الناحية النظرية فإن معرفة تتابع النيوكليتدات لعدد كبير من الجينوم الفيروسى يعتبر أمراً على جانب كبير من الأهمية فى المساعدة على تقسيم الفيروسات؛ حيث إن التتابع أو ترتيب النيوكليتدات قد يظهر علاقات غير متوقعة بين الفيروسات، كما أن هذه المعلومات تتم بداية بتفهم كيفية بناء الفيروسات، كما أن استخدام الحاسبات الآلية فى مقارنة التتابع النيوكليتيدى بين العديد من الفيروسات وبعضها الاخر، وكذا التتابع المسئول عن البروتين قد يتيح فى بعض الاحيان تعرف وظائف البروتين الفيروس.

ومن الناحية العملية فإن من الأمور الأساسية أن نكون قادرين على تعريف الفيروس وحتى السلالة الفيروسية، قبل أن نستطيع التوصل إلى طرق المقاومة الفعالة للفيروس المسبب للمرض فى محصول معين أو فى منطقة معينة، وتعريف الفيروس يستلزم خطة عمل فعالة لتقسيم الفيروسات المسئولة وسلالاتها، وكذا طرق تعريف الفيروس التى سبق الاشارة إليها، ودراسة التتابع النيوكليتيدى على جانب كبير من الاهمية فى كلا الأمرين.

**استخلاص الحمض النووى الفيروسى:**

استخلاص الحمض النووى الرايبوزى RNA من التحضيرات النقية والمنقاة جزئيًّا وفصله عن الغلاف البروتينى وغيرها من المكونات الفيروسية الأخرى مثل الليبيدات. وأغلب الأعمال الأولى التى أجريت على الحمض النووى الفيروسى أغفلت مدى تحمل جزىء RNA، ولهذا فإن الاحماض النووية التى عزلت فى ذاك الوقت تعرضت لتهدم شديد،

وحيث إنه ظهر أن الحمض النووى الفيروس هو المسئول عن العدوى، فأصبح من الضرورى فصل الحمض النووى فى صورته المعدية، أو فصل الحمض النووى بصورة أقرب ما تكون إلى الصورة الموجودة عليها فى الجسيمة الفيروسية.

وفى الوقت الحاضر أصبح من الممكن إزالة البروتين الفيروسى وفصل الحمض النووى باستخدام بعض الطرق الكيماوية، ودون أن يطرأ تغير على الحمض النووى أو قدرته على العدوى.

**وتوجد مجموعة من العوامل ذات الأهمية القصوى، عند فصل الحمض النووى المعدى، نذكر منها:**

١ – تركيز أيونات الايدروجين حيث إنه لايجب استخدام النهايات القصوى لرقم الأس الايدروجينى؛ حيث إنه من الثابت أن رقم الأس الأيدروجينى أعلى من –١ يؤدى إلى تحلل الروابط الفوسفوروای إيثير، بينما عند رقم ٣ أو أقل فإن تحرر القواعد البيورينية يتم ببطء.

٢– تأثير الإنزيمات: الحمض النووى الرايبوزى وحيد السلسلة حساس لتأثير إنزيم الرايبونيكلير حيث إنه يكفى كسر فى جزئ الـ RNA، لكى يفقد قدرته على العدوى. ولذلك من الضرورى استبعاد تأثير الإنزيمات عند فصل الحمض النووى الفيروسى. وغالباً ما توجد آثار من إنزيم الرايبونيوكليز فى التحضيرات المنقاة للفيروس، ويكون مصدرها أوراق النبات.

ومن الضرورى التخلص من هذه الآثار من المحضر الفيروسى، سواء عند التنقية أو عند استخلاص الحمض النووى، وهنا يمكن استخدام مثبطات إنزيم الرايبونيوكليز، كما يمكن تقليل تأثير هذا الإنزيم بتوفير ظروف تقلل من نشاط الإنزيم إلى أدنى حد ممكن مثل درجات الحرارة المنخفضة (صفر –٤°م)، ورقم الأس الأيدروجينى المناسب، وكذا قوة الأيون.

٣ – فى عمليات المعادن، من الصعب التخلص من الكميات الثقيلة من إنزيم النيوكليز،

ولذلك عند استخلاص الحمض النووى يجب أن يراعى استبعاد الطرق التى تحتاج إلى التحليل المائى طويل المدة، أو الطرق التى تحتاج إلى اعادة الترسيب من المحاليل المائية.

٤ – التأثيرات الهيدروديناميكية: لا تشكل هذه التأثيرات مشكلة بالنسبة للفيروسات الصغيرة، التى تحتوى على RNA وحيد السلسلة. بينما تكون أكثر تأثيراً على الفيروسات التى تحتوى على RNA ثنائى السلسلة.

٥ – القوة الأيونية: فى المحاليل ذات القوة الأيونية الضعيفة، تركيب معقد الحمض النووى الرايبوزى وحيد السلسلة، ويصبح أكثر حساسية لتأثير إنزيم النيوكليز، الذى يوجد عند عملية الاستخلاص، وغالباً تستخلص الـ RNA فى محاليل ٠,١ مول NaCl كلوريد الصوديوم.

٦ – تجهيز التحضير الفيروسى لاستخلاص الحمض النووى:

تمت المحاولات الأولى لاستخلاص الحمض النووى الفيروسى على فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV حيث إن الحمض النووى لهذا الفيروس يوجد داخل غلاف بروتينى على درجة عالية من الثبات، بينما نجد أن الحمض النووى لأغلب الفيروسات الأخرى حتى داخل الجزيئ الفيروسى غالباً ما يتعرض للتهدم، الذى يظهر بدرجات متفاوتة، مع فقد القدرة على العدوى.

وتعتمد الطريقة التقليدية لاستخلاص الحمض النووى الرايبوزى على استخدام الفينول، الا إنه ظهر أن الفينول لا يعطى نتائج مرضية بالنسبة لعديد من الفيروسات، وعند التعرض لاستخلاص الحمض النووى من فيروس غير معروف من قبل، وبمقارنة عدة طرق بغرض اختيار أنسب هذه الطرق بالنسبة لهذا الفيرس، **فيما يلى موجز لأهم هذه الطرق**:

**١ – المعاملة بالفينول:**

ولقد استخدمت هذه الطريقة بواسطة جرير وشرام لاستخلاص الحمض النووى الرايبوزى المعدى من فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV؛ حيث إن الفينول يحرر البروتين ويثبط إنزيم النيوكليز. وفى هذه الطريقة يتم خلط معلق الفيروس فى محلول منظم عند pH حوالى ٧،

والذى يحتوى عدة مليميكروجرامات من الفيروس. فى كل ١ سم$^{3}$ محلول يخلط مع حجم مساوٍ من محلول مشبع من الفينول فى الماء، ويتم فصل البروتين عن الحمض النووى باستخدام الطرد المركزى، وهنا يظل الحمض النووى فى السائل، ويمكن ترسيب الحمض النووى بعد ذلك بإضافة ضعف الحجم من الإيثانول، ثم يتم التخلص من آثار الفينول باستخدام الإيثانول، ثم يعاد التعليق فى محلول منظم، وتوجد عدة تحويرات لتلك الطريقة؛ حيث إن الطريقة التى تعتبر مناسبة لفيروس ما قد تكون عديمة الجدوى بالنسبة لفيروس آخر فعلى سبيل المثال وجد أنه عند استخلاص الحمض النووى من بعض الفيروسات، يجب استخدام طريقة الفينول ذات المرحلة الواحدة، التى تحتوى على فينول – إيثانول – ماء، أو فينول– مركب آخر للغسيل– ماء. وطريقة الفينول مفيدة عند العمل مع الكميات الضئيلة من الفيروسات؛ حيث إنه بهذه الطريقة يتم التغلب على فقد الحمض النووى فى طبقة البروتين، والذى يحدث عند استخدام طريقة الفينول ثنائى المرحلة.

## الحمض النووى الرسول mRNA:

الفيروسات النباتية ذات الجينوم المكون من DNA تؤدى إلى ظهور نشاط الحمض النووى RNA الرسول أثناء عملية التضاعف فى الخلية، وهو الذى يساعد فى إنتاج البروتين الفيروسى Viral Coded Protein، أما الفيروسات النباتية ذات الجينوم RNA وحيد الخيط ssRNA يمكنها بذاتها أن تؤدى دور الحمض النووى الرسول mRNA، ولكن عديداً منها يؤدى إلى ظهور الحمض النووى الرسول، الذى يكون صغيراً Subgenomic m RNA أثناء عملية التضاعف. بالإضافة إلى ذلك فإن الإصابة بالفيروس إما أن تؤدى إلى تنشيط أو تثبيط الحمض النووى الرسول mRNA.

## الفصل Isolation:

توجد طريقتان أساسيتان يمكن بهما فصل الحمض النووى الرسول mRNA من الخلايا. فى الطريقة الأولى يتم فصل محتوى الخلية من البولى رايبوزوم Polyribosome fraction، وهو الذى يحتوى على كل الحمض النووى الرسول mRNA، الذى يعمل حقيقة كرسول أثناء عملية الاستخلاص.

وفى الطريقة الثانية تعتمد على حقيقة أنه أغلب أو mRNA تملك قناة من المتبقيات ربما بطول ٣٠-٢٠٠ عند طرفها الثالث، وهذه يمكن إعادة الحصول عليها على عمود فصل ذى تتابع النمو Oligo (T) تلتحم مع poly (A) و RNAs المغايرة فى التتابع تغسل خلال العمود.

## النقل فى المعمل : *In Vitro translation*

توجد ثلاثة نظم واسعة الاستعمال لنقل الحمض النووى الرسول mRNA الخاص بذات النواة الحقيقية *Eukaryotic in Vitro* فى المعمل أو على الأقل تحت الظروف التى فيها يتم تمثيل أغلب أو كل البروتين بتوجيه من الحمض النووى الرسول mRNA.

**والإطار العام لتطبيق هذه النظم يتم كما يلى:**

١ – يتم تنقية الـ RNA أو mRNA المطلوبة على درجة عالية من النقاء باستخدام الطرد المركزى بتدرج الكثافة للفيروس Density gradient Centrifugation.

بينما يكون من الأنسب استخدام البولى أكريلاميد جل إليكتروفوريسيس Polyacry-lamide gel electrophoresis بالنسبة للحمض النووى الرسول mRNA:

٢ – تتم إضافة الـ RNA إلى نظام تمثيل البروتين فى وجود الأحماض الأمينية؛ بحيث يكون واحد أو أكثر منها معلماً بالإشعاع.

٣ – بعد أن يتم حدوث التفاعل يتم تصنيف البوليبيبتيدات Polypeptide، باستخدام الإليكتروفوريسيس على (SDS) سلفات دوديسيل الصوديوم، وبولى أكريلاميد جيل مع markers معروفة الحجم.

٤ – يتم وضع المنتج على الجيل بواسطة Incerpcratea radioactivity.

**والنظم الثلاثة هى ما يلى:**

١ – The rabbit reticulate System.

الخلايا التى تؤخذ من دم الأرانب بعد أن تصاب بالأنيميا تغسل بالماء، ثم تعرض للطرد

المركزى، ثم يعاد استخدام المحلول المعلق.

وهذا يعتبر نموذجاً مفيداً وذلك لغياب نشاط إنزيم RANase .

٢ – Toad oocytes يتم حقن خلايا حية لبيض Xenopus، أو Bufo بواسطة mRNA الفيروس، ويتم تحضينها فى بيئة معلمة.

٣ – The Wheat Germ System : وفى هذا النظام يتم إضافة الـ RNA الفيروس فى وجود معلم مناسب Label إلى معلق، يتم الحصول عليه من مستخلص أجنة القمح الذى أزيل منه الميتاكوندريات.

**١ – تهجين الأحماض النووية : Nucleic acid Hybridization**

فى الحمض النووى ثنائى السلسلة ds، يكون الخيطان مرتبطين ببعضهما براوبط أيدروجينية بين أزواج القواعد المتقابلة G:C وA:T بالنسبة للحمض النووى DNA وG:C، A:U بالنسبة للحمض النووى RNA ، وحينما يسخن محلول الحمض النووى ثنائى الخيط، فإن الروابط الثانوية بين القواعد تنكسر، وتنفصل الخيوط عن بعضها، ويطلق على هذه العملية عملية الإذابة Melting أو التحلل Denaturation. وعند تحضين مخلوط الخيوط المنفصل على درجة حرارة منخفضة.. فإن الخيوط الثمانية يعاد بناؤها. يطلق على درجة الحرارة التى عندها يتم انفصال ٥٠٪ من الخيوط، اسم درجة الحرارة المذيبة Melting tempretaure أو Tm. ويؤدى تحلل الأحماض النووية فى التركيب الثانى إلى ارتفاع امتصاص المحلول عند ٢٦٠ نانومتر، وهذا يمكن استخدامه لتتبع التحلل واستقرار درجة الحرارة المذيبة، وتتأثر درجة الحرارة المذيبة Tm بعدة عوامل أهمها تركيب القواعد حيث ارتفاع المحتوى من G+C يؤدى إلى رفع درجة الحرارة المئوية، كما أن تركيز الأملاح يؤدى إلى ارتفاع الـ Tm، كما يؤدى وجود العوامل التى تكسر الروابط الأيدروجينية مثل الفورماليد إلى خفض درجة الحرارة المذيبة بالنسبة لأغلب الأحماض النووية RNA ثنائية الخيط، فان درجة الحرارة المذيبة فى ٠,٣ مول كلوريد صوديوم تقع بين ٨٨ –٩٣°م. وبالنسبة لاختبار التهجين يتم اختيار الظروف الحرارية بحيث نصل إلى أقصى حد ممكن

للتزاوج بين الخيوط الشقيقة، وقد وجد ان درجة حرارة ٦٥°م هى الانسب بالنسبة لأغلب RNA الخاصة بفيروسات النباتات أى تكون أقل من درجة الحرارة المذيبة بمقدار من ٢٣–٢٨°م. ويتم التهجين بين الأحماض النووية فقط تلك التى يكون التتابع النيوكليوتيدى متشابهًا. وتتوقف درجة التقابل حتى يتم التهجين بين نظامين مختلفين على درجة حرارة التفاعل، وهناك قاعدة لذلك حيث تنخفض درجة الحرارة بمقدار درجة واحدة لكل ١٪ من عدم التشابه بين الخيوط. وفى الغالب تستخدم درجة حرارة ٦٥°م عند استخدام خيوط درجة تشابهها تتراوح بين ٧٢–٧٧٪.

ولذلك يمكن استخدام طريقة التهجين لتعرف مدى التشابه بين خيطين فرديين (S.S) من الأحماض النووية ويمكن أن يحدث التهجين إذا كان الحمضان النوويان فى صورة محلول أو عندما يكون أحدهما فى بيئة صلبة مثل أوراق أو أغشية النيتروسيليوز.

**٢ – Gel Electrophoresis:**

تعتبر طريقة الجيل اليكتروفورسيس طريقة مهمة لفصل وتحديد حجم مكونات الـDNA.

ففى هذه الطريقة يتم سريان تيار كهربائى بطول الجيل، وتوضع الجزيئات المشحونة فى السائل داخل ثقوب فى الجيل، ويتوقف معدل هجرة جزيئات DNA إلى حد كبير على حجمها (الطول). وعلى ذلك فإن الجزيئات الأقصر من DNA بدرجة أقل أثناء مرورها فى الجيل، وعلى ذلك فإنها تتحرك أسرع من الجزيئات الأطول، ويمكن إمرار جزيئات مشعة ذات أطوال معروفه فى مجرى جيل واحد، حيث يمكن فصل مكون الـDNA غير المهدم من الجيل. وهذا التكنيك له تطبيقات عديدة فى دراسة الجينوم الفيروسى والأحماض النووية على وجه العموم. وهناك أنواع مختلفة من الجيل تحتوى على الأجاروز أو البولى أكريلاميد يمكنها أن تحرر شق الأحماض النووية ذات الأحجام المختلفة، فعلى سبيل المثال.. فإنه باستخدام الجيل يمكن فصل من ٣٠٠ – ٥٠٠ جزء من حمض DNA وحيد الخيط مختلفة الأطوال فى حدود نيوكليتيدة واحدة.

**٣ - الخرائط المحددة Restricting maps :**

الإنزيمات الداخلية المحددة Restriction endonuclases تعتبر إنزيمات موجودة فى عدد من الانواع البكترية. وظيفتها فى هذه الخلايا أنها تكتشف وتهدم الـDNA الغريب مثل ذلك الذى يأتى من الفيروسات المعدية. ومن أهم خصائصها البيوكيماوية هى أن لها القدرة على اكتشاف الـ DNA فقط عند عدد محدد من النيوكلتيدات غالبا ما يكون ٤ أو ٨ نيوكلتيدات فى الطول، ويطلق على هذه الخاصية اسم Recognition Sequences وتقوم البكتريا بحماية الـ DNA الخاص بها بإضافة مجموعة الميثيل للقواعد. ولقد تم تمييز أكثر من ١٠٠ من الإنزيمات المحددة، التى تسمح بقطع الـ ds DNA فى مواقع محددة مختلفة. وباستخدام الإنزيمات المحددة التى تسمح بقطع الجينوم الفيروسى فى شكل الـDNA، أمكن اتباع عديد من الاقسام ذات الاحجام المحددة، والتى يمكن فصلها باستخدام جيل اليكتروفوريسيس، ويمكن عندئذ عمل الخريطة المحددة الخاصة بالجينوم موضحة مواقع كل قطع بالمقارنة بآخرين. ومثل هذه الخريطة التى تميز فيروس بعينه، يمكن استخدامها لإعطاء تصور تقريبى لدرجة تشابه جينوم الفيروسات المتقاربة.

**٤ - استخدام DNApolymerase :**

وكان لسهولة الحصول على هذا الإنزيم (pol 1) ومعرفة طريقة عمله الفضل فى تطوير وظهور العديد من التكنيكات الجزيئية Molecular techniques بما في ذلك تعليم العينات وترتيب النيوكليتيدات فى الحمض النووى DNA.

وقد وجد إنزيم (Pol 1) فى بكتريا E.coli وكذا تداخله فى عملية تضاعف الـDNA. وعند الأخذ فى الاعتبار دراسة الجينوم الفيروسى، فإن أهم مايميزه هو أنه يستقطب فقط deoxy nucleosade triphosphates (d NTPs)، وأنه يستطيع ان يفعل ذلك فقط عند نسخ فورمة الـDNA. ولكى تبدأ عملية التضاعف لابد من وجود البادئ Primer، والبادئ عبارة عن hydrogen -bonded Oligonucleotide مع تزاوج القواعد مع الخيط الأساسى. ومجموعة الكربوكسيل الطرفية الثالثة لابد أن تكون قادرة على التفاعل مع dNTP القادم.

النيوكليتدات لا تضاف إلى المجموعة الكربوكسيلية الخامسة الحرة، وعلى هذا يمكن القول بأن النمو الخيطى الجديد يبدأ من اتجاه ٥ إلى ٣، بالإضافة إلى ذلك فإن لدى pol 1 وظيفتين أخريين، أولهما: أن نشاط الإكسونيوكليز يدخل فى منع القواعد غير الصحيحة أثناء عملية نمو الخيط، وكذلك فإن للنشاط ٥--٣ اكسونيوكليز الذى من وظائفه فى الخلية إزالة البادئات من RNA من الـ DNA كما أن نشاط هذا الإنزيم على الحمض النووى أحادى السلسلة يؤدى إلى كسر وإزالة النيوكليتيدة الخامسة، وعند إزالتها يمكن استبدالها بواسطة القدرة الاستقطابية للإنزيم. ويترك الكسر من ٥ إلى ٣ على طول اتجاه الخيط التمثيلى، وتعرف هذه العملية باسم Nick translation، وفى التجارب يتم الكسر فى الـ DNA باستخدام DNase بوضعه فى البيئة الخاصة، ولايجب الخلط بين عمليتى Nick trans والـTranslation؛ حيث إن الأخيرة هى العملية التى تقوم بها الريبوسومات والعوائل الأخرى لتمثيل البروتين فى الخلية تحت تأثير mRNA.

**٥ - الاحماض النووية المعلمة Labeled nucleic acid probes:**

تم استخدام سلسلة من الأحماض النووية المعلمة إشعاعيًا فى عديد من الطرق لدراسة الجينوم الفيروسى، وعملية تضاعف الفيروسات. والحمض النووى المشعة من الممكن أن يكون DNA أو RNA ويمكن معالجة الحمض النووى بعدة وسائل. وفيما يلى أهم الطرق التى يشيع استخدامها لذلك الغرض.

**أ - تعليم النهاية End-Labeling:**

حيث إن إنزيم Polynuclotide Kinase وجد فى أنواع كثيرة من الخلايا التى تساعد على نقل ( ألفا ) فوسفور من الأدينوزين تراى فوسفات (ATP) إلى المجموعة الكربوكسيلية الخامسة عند النهاية رقم ٥ لجزئ DNA أو RNA ذات الأطوال المختلفة. فإذا ما تم تعليم الـ ATP بواسطة الفوسفور المشع ٣٢ فى الوضع ألفا، فإن ذلك سينتقل إلى مجموعة الكربوكسيلة الخامسة لبولى نيوكليتيدة، وبذا يتم تعليم النيوكليتيدة الخامسة من الجزئ. وإذا كان الفوسفات موجوداً أصلاً فى المجموعة الخامسة، فإن لابد من تحريكه قبل عملية التعليم باستخدام إنزيم Alkaline phosphatase حتى يمكن تحرير المجموعة الكربوكسيلية

الخامسة 5-OH.

**ب - طريقة Nick translation (النقل بالعلامة):**

وهى طريقة شائعة لتعليم الـ DNA؛ حيث يستخدم dNTPs المشع، وذلك بإضافته إلى المخلوط الذى يحتوى على الحمض النووى مع تشجيع نمو خيط الحمض النووى باستخدام DNA pol 1 وذلك للحصول على عينة مشعة.

**جـ - طريقة Random priming (التكوين العشوائى للبادئ):**

وتتضمن هذه الطريقة استخدام مخلوط من نيوكلتيدات عشوائية على الـ DNA وحيد السلسلة أو الـ RNA وحيد السلسلة، والتى يتم نسخها فى المعمل ***in vitro*** مع DNA pol-ymerase أو باستخدام Radioactive dNTPs.

**د - طريقة Strand - Specific probes العينات المميزة للخيط:**

وفى هذه الطريقة أيضًا يتم تمثيل الأحماض النووية ***in Vitro*** من الـ dNTPs المشع، وفى أغلب الأغراض يستخدم الـ DNA المعتمد على RNA polymerase (على سبيل المثال من T7 أو Sp6 بكتيريوفاج) ويستخدم الإنزيم لتمثيل الـ RNA المشع ليعطى نسخة من DNA الذى ينمو مساويًا لذلك، الذى يستخلص من بكتريوفاج Sp6 أو T7، وفى هذه الطريقة من الممكن تمثيل أو تعليم خيط واحد من الحمض النووى.

**٦ - طريقة ثازرن Southern Blotting:**

وقد سميت هذه الطريقة باسم E.M. Southern الذى ابتكر هذه الطريقة؛ حيث يتم فصل جزيئات DNA فى آجاروز جيل فى صورة حزم محددة باستخدام الاليكتروفوريسيس.

ثم بعد ذلك يوضع الجيل فوق غشاء من النيتر وسيليولوز أو النايلون. ثم يعامل بصب محلول منظم مناسب موازٍ لاتجاه الإليكتروفوريسيس وفى اتجاه الغشاء. وعملية الـ Blotting تؤدى إلى نقل الـ DNA بطريقة الأسموزية إلى الغشاء، حيث ترتبط مكونة تكرارية لحزم الـ DNA فى الجيل. كما يمكن بعدئذ تعريض عينة مشعة أو معلمة على المرشح، وحينئذ يتم

ارتباط الـDNA ذى الترتيب النيوكلتيدى المشابه مع العينة المشعة. ثم عن طريق التصوير الاوتوراديوجرافى للغشاء يمكن تمييز أى حزم الـDNA مطابقة لتلك الحزم الموجودة فى العينة، ثم يمكن تقدير أو تقييم حجم الـDNA فى الحزم المهجنة باستخدام Marker مناسب.

**٧ - طريقة Northern Blotting:**

وهو تكنيك مشابه للطريقة السابقة، استحدث للاستخدام بالنسبة للحمض النووى الرايبوزى RNA، واطلق عليه هذا الاسم للتمييز بينه وبين الطريقة السابقة Southern blot-ting. وفى هذه الحالة يتم فصل مخلوط الـRNA الخاص بالفيروس أو الخلية أو كليهما معًا، على أساس الحجم باستخدام أجاروز جيل إليكتروفوريسيس عادة تحت ظروف، لا تسمح أو تمنع تكوين قواعد ازدواجية داخل الخيوط، والتى تؤدى إلى تكوين انحناءات فى الـRNA.

وكما يحدث مع الـDNA يتم تجمع الجيل على أغشية من النايلون أو النيتروسيليولوز التى تقوم بالإمساك بالـRNA. ثم يتم تعريض الغشاء بعد ذلك لمحلول يحتوى على العينة المشعة، ثم بطريقة التصوير الاوتوراديوجرافى، يمكن تمييز أى حزم الـRNA المشابهة للعينة المشعة، وكذلك يمكن تقدير حجمها باستخدام markers فى الجيل.

**٨ - طريقة التهجين فى الموقع In Site Hybridization:**

فى العادة تتضاعف الفيروسات، وتتجمع فى مواقع محددة داخل الخلايا المصابة. ويمكن تحت ظروف مناسبة يمكن استخدام الـ RNA أو الـ DNA المشع للتهجين مع الحمض النووى للجينوم الفيروسى أو الـ RNA أو الرسول mRNA الموجود فى قطاعات دقيقة للخلايا المصابة.

ويمكن تحديد مواقع التهجين باستخدام التصوير الراديواوتوجرافى، ولو تم التعليم بصبغات فلوريسنتية فيمكن استخدام الميكروسكوب.

**٩ - تحديد ترتيب النيوكلتيدات فى الـDNA:**

**معرفة ترتيب وتعاقب النيوكلتيدات فى الجينوم الفيروسى تعتبر أساسًا لتفهم التركيب البنائى وتضاعف الجينوم وكذا علاقته بالفيروسات الأخرى، ولذلك تستخدم الطرق التالية:**

أ - **Restriction Endonucleases** :

من أهم خصائص تلك الإنزيمات هى أن بعضها لا تؤدى إلى القطع المستقيم، ولكنها تقوم بقطع متعدد فى كل سلسلة عند مواقع عدد قليل من النيوكلتيدات متباعدة، وهى القطع المختلفة التى تترك نهايات قصيرة وحيدة الخيط على جانبى كل قطعة. ويطلق على هذه النهايات اسم النهايات المتماسة أو اللاصقة Cohesive ends لأن لها القدرة على التهجين، لتكون زوجاً من القواعد الشقيقة مع نهايات أى جزىء DNA آخر التى يتم قطعها بنفس تلك الإنزيمات Restiction nuclease .

ب - **DNA Ligase** :

حينما تلتصق نهايتان من جزيئات DNA التى تم قطعها بواسطة الإنزيم القاطع Restrictian بواسطة القواعد المزدوجة فإن النهايات يمكن تحريرها بواسطة إنزيم يسمى DNA Ligase الذي يكون قاعدة فوسفودايترای بين نهايتى الحامضين النووين DNA .

جـ - **DNA Cloning تجمع الـ DNA (كلونة)** :

ولتحديد ترتيب النيوكليتدات أو لإجراء عمليات أخرى على الـDNA المنتج بواسطة الإنزيمات القاطعة، من الضرورى أن نكون قادرين على تكبير كميات هذه المشتقات، وهذا يمكن إجراؤه بإدخال الـ DNA فى بلازميد أو بكتيريوفاج، وبعد ذلك تنميتها فى البكتريا أو الخميرة. والبلازميد عبارة عن جزيئات DNA ثنائى السلسلة ds DNA صغيرة الحجم ومستديرة توجد طبيعيًا فى البكتريا والخميرة وتتضاعف داخل العائل. والـDNA الخاص بالبلازميد أصغر بكثير عن DNA الخاص بالبكتريا، ولذا يمكن فصله بسهولة منها. وحينما تستخدم البلازميدات كناقلات فنستخدم أجزاء من DNA الفيرس؛ حيث يتم إدخالها إلى DNA البلازميد .

ثم يتم إدخال جزيئات هجين الـ DNA البلازميدى إلى البكتريا العائل، ثم تترك المستعمرة البكتيرية لتنمو على بيئة صناعية. والبعض فقط من هذه المستعمرات يحتوى على الـ DNA الفيرس المطلوب. **ويتم انتخاب تلك المستعمرات التى تحتوى على DNA**

**المحقون بالطريقة التالية :**

يحقن الـ DNA الخاص بالبلازميد المستخدم بجين المقاومة للمضادات الحيوية، غالبًا الأمبيسيلين والبلازميد أيضًا يحتوى على جين يسمح بتخمير اللاكتوز. وتوجد الإنزيمات القاطعة لـ DNA مع هذا الجين. وحينما تدخل جزيئات الـDNA الخاصة بالبلازميد إلى البكتريا فإن الأخيرة يتم تنميتها على بيئة تحتوى على المضاد الحيوى، وعلى نسبه من اللاكتوز مما يعطى لوناً أزرق عند التخمر. وهنا فإن الخلايا المقاومة للمضاد الحيوى، وتحتوى على البلازميد هى وحدها، التى يكون لها القدرة على النمو لتكون مستعمرة ومعظم هذه الخلايا قد لا تحتوى على الـ DNA المطلوب، وهنا تعطى لونًا أزرق. بينما تكون أى مستعمرة بيضاء تحتوى على جين إنزيم اللاكتوز فقدت حيويتها بإدخال الـ DNA المطلوب.

وأكثر البلازميدات شيوعًا فى الاستخدام، هو للامين PBR 322 يحتوى على جين المقاومة للأمبيسلين والتتراسيكلين. ومواقع عديدة تخص الإنزيمات القاطعة .Restr nucleases تقع خلال هذه الجينات.

وحينما تدخل قطعة من DNA غريب داخل أحد هذه الجينات، فإن هذا الجين يفقد نشاطه، وحينما يتم إدخال البلازميد إلى البكتريا العائل يمكن حينئذ تعرف المستعمرات المقاومة لاحد المضادات الحيوية والحساسة لمضادات أخرى. والمستعمرات التى تحتوى على الـ DNA الغريب المطلوب تنميته فى بيئة كثيفة، ويتضاعف البلازميد مع نمو خلايا البكتريا العائل، ثم يتم تنقية الـ DNA الخاص بالبلازميد. ثم يمكن فصل نسخ من الـ DNA الأصل من البلازميد، وذلك بالمعاملة ثانية بواسطة Restr. nuclease المستخدم فى حقن الجزىء.

وهناك بعض البكتريوفاجات التى يمكن استخدامها بدلاً من البلازميد لحمل جزء من الـ DNA الغريب إلى داخل الخلية البكتيرية، مثل فاج ١١٣ الذى يصب ***E.coli*** الذى يفيد فى إكثار الـ DNA لاستخدامه فى طريقة Sanger dideoxy sequence؛ حيث إن الفاج يسمح بتكوين قالب من الـ DNA وحيد السلسلة.

**تحديد تتابع النيوكلتيدات فى الـ DNA لجينوم الفيرس:**

لقد ظهرت طريقتان أساسيتان لتحديد التتابع فى النيوكلتيدات فى الـ DNA أولهما طريقة ماكسام وجلبرت Maxam and Gilbert، التى تتضمن استخدام تحضير مشع من الـDNA عند النهاية الخامسة، ثم تقسيم المحضر إلى أربع عينات.

ثم تعامل كل عينة على حدة بلطف بمركب كيماوى، والذى يتخصص فى تحطيم نوع واحد من القواعد. مثل G أو نوعين من القواعد مثل C و T، ولكن فى موقع واحد أو مواقع قليلة بتلك القاعدة فى أى جزىء يتم دراسة مخلوط من جزيئات الـDNA حيث يحتوى كل جزىء على نوع خاص من القواعد، التى تتأثر فى موقع واحد، وتعامل كيمائيًا حيث يمكن إزالة تلك القاعدة. ثم تفصل الأجزاء المشعة بواسطة جيل إليكتروفوريسيس، وهنا يمكن تحديد ترتيب النيوكلتيدات من الصورة التى تظهر بها الحزم فى الجيل.

أما الطريقة الثانية فقد اكتشفت بواسطة فرد سانجر Fred Sanger، وتعرف بطريقة سلسلة dideoxy. وتعتبر الآن هذه الطريقة هى الطريقة المفضلة لتحديد تتابع النيوكلتيدات فى الحمض النووى الفيروسى، وأساس هذه الطريقة هو أن nucleoside tri-phosphate يحتوى على البنتوز Pentose تفتقر إلى مجموع الأيدروكسيل على كل من الموضعين ٢، ٣ (a dideoxy nucleotide) ولذلك لا تتمكن من تكوين حزمة Phospho-dist مع النيوكلتيد التى تضاف إلى السلسلة النامية فى الاتجاه الثالث. ولذلك فإن تحديد وضع الـdideoxy nucleotide فى السلسلة النامية يحدد اتساع تلك السلسلة.