الباب الخامس

تنقية فيروسات النبات
وخواصها الطبيعية والكيميائية

PURIFICATION OF PLANT VIRUSES & ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

تنقية فيروسات النبات وخواصها الطبيعية والكيميائية

PURIFICATION OF PLANT VIRUSES & ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

لدراسة التركيب وغيره من الصفات الأساسية للفيرس، فمن الضرورى الحصول عليه فى صورة نقية مع المحافظة على قدرته على العدوى. وتتفاوت الفيروسات النباتية تفاوتًا كبيرًا فيما بينها فى حدود ١٠٫٠٠٠ ضعف فى كمية الفيروس، التى يمكن استخلاصها من الأنسجة المصابة (من حوالى ٤ ر إلى ٤٠٠٠ ميكروجرام/جرام وزن طازج) كما تتفاوت الفيروسات فيما بينها تفاوتًا كبيرًا من حيث الثبات Stability أو تحمل عديد من العوامل الطبيعية والكيماوية والإنزيمية، التى يمكن أن يتعرض لها الفيرس خلال عملية الفصل والتخزين، ومن أجل ذلك لا توجد قواعد ثابتة لعملية الفصل بالنسبة لكل الفيروسات، حيث إن الطريقة التى تؤدى إلى نتائج جيدة بالنسبة لفيرس ما يمكن أن تفشل تمامًا مع فيرس آخر قد يكون متشابهًا مع الأول.

الفصل الأول

تنقيــة الفيــروس

PURIFICATION OF VIRUSES

المقصود بالتنقية أنها عملية ينتج عنها زيادة فى نشاط التحضيرات الفيروسية وهذا يترجم إلى زيادة الوحدات القادرة على الإصابة لوحدة الوزن للمادة (عادة البروتين أو النيتروجين) .

ومن المعروف أنه يتكون داخل الخلايا المصابة مواد غريبة غير الجزيئات الفيروسية أو الحاملة لصفة العدوى ، مثل :

١ – أشكال خيطية (Filamentous) وأشكال غير كاملة كما فى فيروس الأنفلونزا، حيث يظهر بها أن جزيئات الفيروس غير متماثلة Heterogenous .

٢ – جزيئات غير معدية، ولكن لها صفة الأنتجين الفيروسى Antigenic specificity .

٣ – جزيئات صغيرة تسمى أنتجينًا ذائبًا Soluble antigen لا ترسب تحت ظروف ترسيب الفيروس. وقد عرف أنها توجد فى كثير من فيروس الحيوان .

٤ – جزيئات غير معدية من حجم الفيروس نفسه، كالتى وجدت فى حالة الإصابة بفيروس موزايك اللفت Turnip yellow m.v. .

والمحتويات السابقة التى توجد فى العائل المصاب وتحتوى على بعض خواص الفيروس (صفة الانتجين) ليست لها القدرة على العدوى، وتكون ذات وضع مختلف . وتنفصل مثل هذه المواد بواسطة الطرق الطبيعية أو الكيميائية .

والتحضير النقى فى عرف الكيمياء الطبيعية عبارة عن تحضير يحتوى على مكون واحد متجانس، ويكون كل جزء فيه أو كل وحدة منه مكونة من جزيئات موحدة التركيب الكيمياوى، إلا أن مثل هذا التعريف لا يجد قبولاً عند رجال البيولوجى خاصة رجال

الوراثة إذ إنهم يعتقدون أن التحضير النقى، هو الذى لا يمكن فيه فصل صفة العدوى عن الجزيئات الموجودة، والذى لا يتميز فيه وجود المحتويات غير الفيروسية، ولكن مثل هذا التعريف يترك مجالاً للاختلافات الكيميائية الطبيعية خاصة فى مورفولوجى الفيروسات الكبيرة المعقدة وخاصة الجزيئات غير المميزة والطفرات، التى توجد بكل تأكيد فى أعداد كبيرة.

وعلى العموم فيمكن الخروج من هذا الجدل وتعريف التنقية بأنها تحضير للمادة، التى تحمل النشاط الفيروسى فى شكل خالص بقدر الإمكان من المادة التى لا تحدث إصابة.

لقد بدأ العمل الأول فى التنقية Original work على فيروس النبات، حيث إنه يمكن الحصول عليه بكميات كبيرة، وللسهولة النسبية فى فصله عن محتويات النبات. ويعتبر فيروس موزيك الدخان مثلاً لذلك، حيث استعمل بكثرة لزيادة الكمية التى يمكن الحصول عليها، وهى ١٠٪ من الوزن الجاف للنبات المصاب، ويمكن تنقيته دون انخفاض ملحوظ فى صفة العدوى، كما أنه يمكن الحصول على محلول متجانس منه.

ولقد بدأت محاولات عزل وتنقية فيروس موزيك الدخان من عصير النباتات بواسطة Mulvania, 1926, Vinson and Pirie, 1928, 1931، والذين اكتشفوا أن فيروس موزيك الدخان يمكن ترسيبه بمرسبات البروتين، دون أن يفقد قدرته على إحداث العدوى.

وقد أثار هذا الاكتشاف قليلاً من الاهتمام إلى أن جاء Stanley, 1935 وعزل فيروس موزيك الدخان TMV على هيئة بروتين متبلور. ومن هنا بدأ وضع طرق أخرى يمكن بواسطتها تنقية فيروس موزيك الدخان وعديد من الفيروسات الأخرى، ومنذ هذا الوقت احتلت دراسة التحضيرات النقية مكانة كبيرة فى أبحاث الفيروس. وتعطى هذه الطرق تحضيرات قادرة على العدوى لبعض الفيروسات.

ويمكن الوصول إلى التنقية اللازمة باتباع طرق تفصل إما المواد الغريبة وإما الفيروس من المخلوط، أو تفصل المخلوط إلى محتويات مختلفة Various fractions، والذى منها واحد أو أكثر يحتوى الفيروس.

وعمليًا فلا توجد عملية واحدة يمكن بواسطتها فصل الفيروس كلية عن المواد الأخرى من المخلوط البيولوجى.

ويمكن تلخيص عمليات التنقية بالنسبة للفيروسات المختلفة فى النقاط التالية:

١ – استخلاص المحلول الخام (العصير) المحتوى على الفيروس من نسيج العائل Extraction.

٢ – ترويق العصير Clarification.

٣ – الحصول على الفيروس Purification.

إن تكرار بعض العمليات السابقة عمل مرغوب، حيث إن المواد الغريبة يصعب فصلها عن الفيروس بإجراء العملية مرة واحدة، فاستعمال أكثر من عملية يعطى فرصة أفضل للتخلص منها.

وهناك قواعد مهمة يجب ملاحظتها عند تنقية بروتين ما، وأهمها:

١ – معرفة درجة ثبات البروتين (الفيروس) Stability لدرجات حرارة مختلفة ولدرجات pH مختلفة.

٢ – فى أى المذيبات (غير الماء) يمكن أن يترسب البروتين دون تغيير فى خواصه.

وعلى ضوء هاتين النقطتين سنناقش باختصار العمليات المختلفة Procedures لتنقية بروتين الفيروس.

أولاً: استخلاص المحلول الخام (العصير): Sap Extraction

تختلف وسائل استخلاص العصير الخام باختلاف طبيعة الإصابة الفيروسية والخلايا التى يوجد بها، وما إذا كان الفيروس موجودًا داخل خلايا فردية طليقة، مثل الملتقمات فى البكتريات، أو داخل خلايا سطحية فى الجلد أو بشرة النبات، مثل الفيروسات التى تحدث البثرات والثآليل الجلدية فى أمراض الجدرى والحصبة والحمى القلاعية، أو تلك التى تحدث أضرارًا واضحة فى أوراق النباتات.

أما إذا كانت الإصابة غائرة فى أنسجة داخلية كأمراض التبقع والإصفرار وتجعد الأوراق

فى النباتات فإن هذا يتطلب استخراج المحلول الخام من هذه الأنسجة.

يبدأ بعمل مستخلص من خلايا الأنسجة التى تحتوى على الفيروس المطلوب. ويفضل أن تتم هذه العملية على درجة حرارة منخفضة ٢-٥° م، وفيها تكسر الخلايا بطرق عدة، منها:

١ - التجميد والإذابة Freezing & Thowing حيث توضع الأوراق المصابة على درجات حرارة منخفضة تصل إلى التجميد لعدة ساعات، تعرض بعدها للجو العادى، وبهذه العملية تتهتك جدر الخلايا ويسهل استخراج العصير.

٢ - الطحن Grinding وفيها تطحن الأنسجة فى هاون معقم.

٣ - الرج مع كتل زجاجية Shaking with glass beads.

٤ - الفرم Mincing مثل الفرم بالمفرمة Meat mincer.

٥ - الفصل بواسطة الموجات الصوتية Disintergating with Sonic waves.

ويستخرج العصير بواسطة عصر الأوراق المهروسة وتصفيتها Squeeze خلال قطعة شاش Cloth bag، وقد لوحظ أن الألياف المتبقية من عملية العصر تحتوى على فيروس قد يكون أكثر مما يحتويه العصير المستخلص، وتحتاج إلى معاملات خاصة لإطلاقه. وأبسط هذه المعاملات هى إعادة طحن الألياف مع قليل من الماء أو محلول منظم ثم عصرها.

وقد وجد Bawden and Pirie, 1944 أن مستخلص الماء لألياف النباتات المصابة بفيروس TMV, Tobbaco necrosis & Tomato bushy stunt يحتوى على فيروس أكثر من الذى يوجد فى العصير المستخلص.

وقد لا يطلق الطحن كل الفيروس المتبقى بالألياف، كما أنه قد يتلف بعضها، ولذلك وجد أنه يمكن الحصول على تركيز عالٍ من الفيروس PVX أو TNV بواسطة تحضين الألياف مع إنزيم Protease or nuclease لعدة ساعات ثم إعادة طحنها خفيفًا وعصرها.

وعمومًا فإن النسبة بين الفيروس فى العصير المستخلص والفيروس المتبقى فى الألياف كبيرة وواضحة، وتختلف من فيروس لآخر، ومن طريقة استخراج إلى أخرى.

ولم توجد اختلافات فى حجم وشكل الجزيئات الفيروسية لفيروس التقزم الشجيرى فى الطماطم المستخرج من العصير وذلك المستخرج من الألياف، ولكن وجد أن مستخلص فيروس TMV من الألياف يحتوى على جزيئات أصغر حجماً وأقل فى قدرتها على العدوى من الجزيئات الأساسية للفيروس. وكذلك الحال بالنسبة لفيروس PVX.

التغيرات التى تحدث فى الفيروس أثناء استخلاصه:

يكون الفيروس الذى يستخلص من الأنسجة الداخلية بالوسائل السابقة عرضة لحدوث بعض تغييرات فى طبيعته على النحو الآتى:

١ – قد يكون العصير المستخلص مع الفيروس من خلايا الأنسجة ذا تأثير مرسب للفيروس، مثل فيروس تجعد الأوراق وفيروس اصفرار حافة الورقة فى الشليك، إذ لا يستطاع استخلاصها من العصير؛ نظراً لاحتواء العصير على كمية من حامض التنيك تكفى لترسيب أجسام الفيروس جميعها، ويرسب معها أيضًا جميع البروتين الموجود فى العصير.

٢ – قد تحتجز بعض محتويات الخلية جزيئات الفيروس أثناء استخلاصها مثل بعض جزيئات البروتين فى المحلول الخام بعد استخلاصه كما قد يدمص أيضًا جدران مسام المرشحات أثناء ترشيحه.

٣ – قد تؤثر عملية استخلاص التحضير على الفيروس نفسه فتتفتت أجسامه.

٤ – قد تحدث تغيرات كيميائية فى الفيروس أثناء استخلاصه.

٥ – قد يشمل المستخلص جزءاً فقط من الفيروس الموجود فى النسيج.

ويكون هناك اختلاف لا نعرفه بين الجزء المستخلص والجزء الباقى فى الخلايا، اختلاف فى الطبيعة والتركيب والنشاط. وقد يفقد الفيروس المستخلص قليلاً أو كثيراً من المواد التى تلازم جسمه داخل الخلية، أو قد يختلط ببعض مشتملات الخلية نفسها.

٦ – قد يشمل المحلول الخام أجسامًا أخرى غير الفيروس ذات صلة به يكون لها صفاته السيرولوجية، ولكنها غير قادرة على العدوى.

ثانياً : ترويق العصير : Clarification

يستعمل الطرد المركزى البطئ لعصير نباتات الدخان المصابة بفيروس موزيك الدخان لإنتاج سائل رائق، حيث إن أغلب مكونات العائل تترسب. ويزيد من كفاءة عملية الترويق حفظ العصير المستخلص لعدة ساعات إما على درجة حرارة المعمل أو فى الثلاجة. كما أن تسخين العصير المستخلص على درجة ٦٠°م يجمع عديداً من مكونات العصير، ويعطى تنقية جيدة، إلا أنها قد تؤثر على حيوية بعض الفيروسات، ولذلك لا تستعمل إلا للفيروسات الثابتة ذات درجة الحرارة العالية لتعيد نشاطها.

قد تستعمل بعض المذيبات العضوية التى تؤدى إلى اختزال الدهون Lipids وتحليل المواد الغريبة البروتينية، ومن هذه المواد: مادة الفلوروكربونات Fluorocarbons، بيوتانول Butanol، كلوروفورم chloroform أو مخاليط من الاثنين الأخيرين. ولا تتاثر الفيروسات البسيطة التى تحتوى على نيوكليوبروتين ولكن يحصل تجريح disruption وتثبيط inactivation للفيروسات التى تحتوى دهون Lipids.

ثالثاً : ترسيب وتجميع الفيروس : Virus Precipitation & accumilation

إن البروتين وحمض النواة المركبين الأساسيين فى تركيب الفيروس يوجدان أيضاً فى خلايا العائل بكميات أكبر آلاف المرات عن وجودهما فى الفيروس. ولذلك فإن الطرق التى تتبع يجب أن تميز بين البروتين وحمض النواة الخاص بالفيروس ومثيلهما فى خلايا العائل.

وتعطى درجة ثبات الفيروس Stability الاعتبار الأول فى هذه العملية.

بخلاف ما سبق تستعمل طرق مختلفة لترسيب الفيروس منها: ما هو كيماوى وما هو طبيعى.

أ - الطرق الكيمائية لترسيب الفيروس:

١ - التمليح Salting-out وهو عبارة عن إضافة أملاح ذائبة بتركيزات مختلفة، مثل كبريتات الأمونيوم أو أملاح الزنك وكبريتات البروتامين. وقد وجد أن الالبيومين يترسب عند تشبع ١٠٠٪ بواسطة كبريتات الأمونيوم، أما الجلوبيولين فيترسب عند

تشبع ٥٠٪.

٢ – الترسيب بواسطة الكحولات، وفيها تستعمل بعض الكحولات المنخفضة Lower al-cohols، مثل الميثانول والإيثانول.

٣ – الترسيب عند درجة التأين Isoelectric points، وبواسطتها تمكن Best 1936 من الحصول على مستخلص نقى لفيروس موزيك الدخان، واستعملها آخرون باستعمال حمض الكلورودريك.

ب – الطرق الطبيعية لترسيب الفيروس:

تتوقف عادة على أساس اختلاف حجم جزيئات الفيروسات والمواد الأخرى فى معلق العصير. وتستعمل هذه الطرق عادة لتنقية فيروسات النبات غير الثابتة unstable، والتى من السهل تأثرها بعمل الأملاح المركزة أو التغيير الواضح فى الـpH. يستعمل الطرد المركزى بدرجات مختلفة تتغير من دوران بطئ، يزيل بقايا الأنسجة أو التلوث البكتيرى إلى دوران سريع يجمع الفيروس ويكتله.

الفيروسات كبيرة الحجم يستعمل لها: دوران مركزى بطئ بمعدل ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة فى دوران أفقى، أو ٤٥٠٠ دورة/ دقيقة دوران على زاوية، أما الفيروسات صغيرة الحجم فيستعمل لها دوران مركزى سريع بجهاز يسمى Quality heads تحمل أنابيب مختلفة الحجم كبيرة، ويصلح أيضًا للتنقية Sharpless Centrifuge، والتى تترسب فيها المادة من طبقة رفيعة لسائل يغطى السطح الداخلى لأسطوانة مفرغة تدور.

كذلك يستعمل الطرد المركزى فائق السرعة Ultracentrifuge فمثلاً تنقية فيروس النقط الحلقية للدخان Tobacco ring spot virus تجرى على درجات حرارة منخفضة وبالطرد المركزى للعصير المستخلص من الأوراق المصابة، أولاً فى آلة طرد مركزى عادية لفصل الأجزاء الغريبة كبيرة الحجم، ثم بعد ذلك بالطرد المركزى ٣٠٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة تصل إلى ١ر٥ ساعة، وبذلك يرسب الفيروس على شكل راسب كثيف فى قاع الأنبوبة. يحتوى هذا الراسب أيضًا على أجزاء صبغية (صبغات يفصل عنها الفيروس باستعمال ١٠/١ ع محلول

فسيولوجى على درجة pH 7 بهذا يعلق الفيروس فى السائل، وتظل الصبغات فى حالة غير ذائبة، تفصل بواسطة الطرد المركزى المتوسط والسائل العلوى يفصل ويستعمل له الطرد المركزى ultra لمدة ساعة ونصف وهكذا يكرر الدوران البسيط ثم الدوران السريع ultra ثلاث إلى أربع مرات، وبذلك يمكن الحصول على تحضير متجانس من الفيروس.

كما تستعمل للتنقية طريقة Density gradient centrifuge حيث إن جزيئات الفيروس تتركز فى طبقات خاصة فى محلول فى الوسط بواسطة الكثافة النسبية density gradient من القمة للقاعدة؛ نتيجة تحضيرات فى محاليل السكروز أو الجليسرول glycerol تختلف كثافتها ولزوجتها، ويمكن رؤية المحتويات Fractions بواسطة الضوء.

كل هذه الطرق تؤدى إلى فصل الفيروسات التى تختلف فى حجمها عن المحتويات غير الفيروسية لمعلق العصير.

هذه الطرق ربما تسبب ضياع بعض الفيروس إذ يتكون من جزيئات مختلفة الحجم، كذلك يفقد جزء من نشاط الفيروس خاصة فى آلة الطرد المركزى لعدم الترسيب الكلى.

ويمكن ان يبلور الفيروس فى المحلول النقى الخالى من الصبغات بإضافة محلول ٥٪ من حمض الخليك إلى المخلوط، الذى يحتوى على فيروس موزيك الدخان.

المادة المنقاة بطرق مختلفة يمكن تعريضها لعدد من الاختبارات لدراسة صفاتها وعلاقتها بالنشاط الفيروسى. والمهم فى هذه الدراسة هو مقارنتها بمواد يحصل عليها بالطرق نفسها من عوائل غير مصابة.

والخطوة الأولى هى إثبات أن مثل هذه المواد يمكن عزلها من عوائل مختلفة مصابة بالفيروس نفسه، ولا يمكن عزل مواد مثلها من عوائل غير مصابة.

وعند إجراء التنقية يراعى الآتى:

أولاً: يجب أن تكون السلالة الفيروسية المستخدمة سريعة التضاعف فى العائل لتعطى تركيزاً عالياً من الجزيئات الفيروسية، وبالإضافة إلى ذلك يجب أن تكون ثابتة من الناحية الوراثية أى لا يحدث فيها طفرات قد تؤدى إلى تغييرها.

ثانيًا: يجب عند اختبار العائل المستخدم لزراعة هذه السلالة أو الفيروس أن يكون سهل الزراعة سهل العدوى متماثلاً وراثيًا، ويجب أن يكون محتواه من العصير كبيراً مناسبًا للسلالة الفيروسية المستخدمة؛ حتى يعطى أعلى تركيز من الجزيئات الفيروسية. يكون النبات خاليًا من المواد التى تؤثر على الفيروس، والتى تتعارض مع عمليات التنقية مثل الصبغات والأحماض والإنزيمات المؤكسدة. وتعتبر النباتات الخشبية عادة غير ملائمة لإكثار الفيروسات لوجود نسبة مرتفعة من هذه المواد بها. وإذا كان هناك من الضرورة استخدام هذه النباتات فيجب استخدامها فى عمر صغير أو أخذ أزهارها، حيث تعتبر الأزهار فى هذه النباتات أنسب الأنسجة لاستخلاص الفيروس بكمية كبيرة، وتستخدم غالبًا لهذا لغرض النباتات العشبية والحولية حيث تعتبر أكثر ملاءمة كمصدر لتنقية الفيروس عن النباتات الخشبية.

ثالثًا: تؤثر العوامل الجوية والبيئية على تركيز الفيروس داخل النباتات العائل، فقد لوحظ أن زيادة تركيز الفيروس فى مادة الحقن يعطى تركيزاً عاليًا من الفيروس فى النبات، كذلك لوحظ أن درجة الحرارة وكذلك الإضاءة لها تأثير كبير على محتوى النبات من الفيروس؛ فالحرارة من أهم العوامل التى تؤثر على تركيز الفيروس، فيصل أعلى تركيز عادة فى درجة الحرارة العالية، ولكنه يستمر لفترة قصيرة عنه فى حالة الحرارة المنخفضة، وكذلك يتأثر انتشار الفيروس داخل النبات بدرجة الحرارة. ففى درجات الحرارة المنخفضة يكون انتشار الفيروس بطيئًا فى النبات العائل، وينتج عن ذلك انخفاض فى تركيز الفيروس فى العائل.

رابعًا: عند استخلاص الفيروس من النبات العائل، يجب أخذ الاحتياطات الكفيلة حتى لايحدث تلف للجزيئات الفيروسية فى العصير الخام المجهز من النباتات المصابة؛ لأن الفيروس فى هذه الحالة يعتبر فى وسط مخالف لذلك الذى كان موجوداً عليه فى الخلية الحية، ومن أمثلة المواد التى توجد فى العصير الخام وتؤثر على الجزيئات الفيروسية Polyphenol oxidase، وهذه يمكن إبطال مفعولها باستخدام Sodium diethyl dithiocarbamate بتركيز ٠,٠١ مولر، وكذلك يؤثر إنزيم Nuclease الموجود فى العصير الخام على الجزيئات الفيروسية، ويمكن التقليل من تأثيره بإضافة مادة Bentonite إلى العصير الخام، حيث يوقف

تأثير RNAase.

خامساً: يجب اختيار الطريقة المناسبة للتنقية حسب طبيعة الفيروس المراد تنقيته. وبعد إتمام عملية التنقية وقبل التحليل الكيماوى يجب تقدير نقاوة الفيروس، ولا يوجد اختبار كافٍ مفرد للتأكد من هذه النقاوة، ولكننا نتأكد منها بعدة اختبارات. فيستخدم الطرد المركزى لتقدير درجة تجانس تحضير الفيروس، وعلى الأخص حجم الفيروس وكثافة الجزيئات ووجود نقطة ترسيب واحدة تبرهن على وجود نوع واحد من الجزيئات، ووجود منطقتين يدل على وجود نوعين من الجزيئات وهكذا، ومن الخصائص المهمة للنقاوة هى التجانس الكهربى الكيماوى، والذى يقدر بجهاز الهجرة الكهربائية Electrophoresis ويمكن استخدامها كدليل جيد لتجانس تحضير الفيروس.

كما يمكن استخدام الميكروسكوب الإلكترونى للاختبار المباشر للتجانس الطبيعى لتحضير الفيروس، ومن الطرق الأخرى المستخدمة فى قياس درجة النقاوة فى الفيروس هى: Constant solubility test أو Immunochemical methods.

الفصل الثانى

الخواص الطبيعية والكيميائية لفيروسات النبات

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PLANT VIRUSES

أولاً: الخواص الطبيعية للفيروس: PHYSICAL PROPERTIES OF VIRUSES

١ - شكل وحجم الفيروس Shape and size of viruses:

منذ زمن طويل والعلماء مهتمون بدراسة شكل وحجم وتركيب الفيروس، ولقد أوضح إيفانوفسكى أن مسبب مرض موزيك الدخان ذو شكل عصوى، وحاول العلماء بعد ذلك تحديد أشكال الفيروسات واستخدموا لذلك طرق عديدة يمكن ترتيبها حسب اكتشافها أو استخدامها إلى:

الترشيح - الترسيب - استخدام الميكروسكوب الضوئى - استخدام ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية - استخدام ميكروسكوب اختلاف الطور الضوئى - استخدام الميكروسكوب المقطب للضوء - استخدام الميكروسكوب الإلكترونى.

ويعتبر استخدام الميكروسكوب الإلكترونى فى وقتنا الحاضر من أهم الطرق فى تعرف شكل وحجم الفيروسات المختلفة. وتقدمت قدرة الفحص بالميكروسكوب الإلكترونى كثيراً باكتشاف وسائل جديدة لعمل مقاطع فى الخلايا المصابة بالفيروس رقيقة جداً يتراوح سمكها بين ١٠-٢٠ ملليميكرون، والتى بواسطتها أمكن معرفة شكل الفيروس فى مراحل حياته المختلفة.

شكل الفيروس Shape of Virus

أمكن بواسطة الميكروسكوب الإلكترونى تمييز أجسام فى أنسجة النباتات المصابة بأمراض فيروسية، لم ينجح فى رؤيتها داخل أنسجة النباتات السليمة. وإذا ما كان فى بعض الأحيان يلاحظ أجزاء بالخلية النباتية خيطية أو عصوية أو كروية، فإنه يمكن تمييزها بسهولة

عن الأشكال الفيروسية.

وفى عام ١٩٥٥ اعتبر ريجوكوف Rijkov أن الجزيئات الموجودة فى عصير النباتات المصابة والمنقى كيماوياً شكلاً للفيروس أطلق عليه اسم (جراثيم فيروسية Virus spores) وأطلق عليها غيره من العلماء جزيئات الفيروس.

حجم الفيروس : Size of Virus

أما مقاييس جزيئات الفيروس فتختلف اختلافًا بينًا. ويمكن تقدير هذه المقاييس بالدقة الكافية بواسطة الصور المأخوذة بالميكروسكوب الإلكترونى لتحضيرات نباتات مصابة، إلا أنه عندما يكتب الباحثون عن هذا الفيروس أو ذاك، يلاحظ أنه عادة ما يعطون مقاييس مختلفة لنوع الفيروس الواحد، ولكن من المعروف أن مقاييس جزيئات الفيروس ثابتة بالنسبة لكل نوع كما هو الحال بالنسبة للشكل.

هذا التباين فى مقاييس جزيئات الفيروس الواحد ربما يعزى سببه إلى طريقة تحضير العينات، وما تبع ذلك من تكسر لجزيئات الفيروس علاوة على ما قد يكون لعمر الفيروس من أثر فى ذلك. لهذا رأى بعض البحاث أن المقاس الذى يمثل أكبر عدد من جزيئات الفيروس يمثل طول جزىء الفيروس بصفة عامة. وقد كتب بروتسنكو وليجونكوفا Protcenko & Legonkova (١٩٦٠) أن جسيمات كثير من الفيروسات تحتفظ بشكلها فى الظروف العادية، وعملا مقارنة لشكل جسيمات فيروس موزيك الدخان، وجسيمات فيروس البطاطس الناتجين عن هرس النسيج المصاب فى هاون بمساعدة الرمل ودون مساعدة الرمل، ووجد أنه لا يوجد فرق واضح فى طول جسيمات الفيروس الواحد الناتجة عن هرس النسيج المصاب، بمساعدة الرمل أو هرسه دون استعمال الرمل.

وأصبح معروفًا أن مقاس جسيمات أو جزيئات الفيروسات يختلف اختلافًا كبيراً؛ فجزيئات فيروس نيكروزيس الدخان قطرها ١٧ نانومتر، وجزيئات فيروس اللون البرونزى فى نبات الطماطم قطرها ١٠ نانومتر. كذلك طول جزيئات فيروس موزيك الدخان ٣٠٠ نانوميتر، أما فيروس X البطاطس فطول جزيئاته ٥٠٠ نانومتر. وفيروس اصفرار البنجر طول الخيط فيه ١٢٥٠ نانوميتر، بينما طول خيط فيروس تخطيط البسلة ٥٠٠٠ نانوميتر. والجدول التالى يبين شكل ومقاس بعض فيروسات النبات.

جدول (٥ - ١) : شكل ومقاييس جزيئات بعض فيروسات النبات مقدرة باستعمال الميكروسكوب الإلكترونى.

الفيروس	شكل الجزئ	مقاس حجم الجزئ بالمليميكرون
موزيك قصب السكر	عصوى	٦٣٠ X ١٥
موزيك الدخان	عصوى	٢٨٠ X١٥
موزيك الخيار / ٢	عصوى	٢٨٠ X ١٥
X البطاطس	عصوى	٥٠٠ X ١٠
التجعد الأصفر للبطاطس	عصوى	٣٠٠ X ٥٠
موزيك الفجل	عصوى	١٠٥ X ٢٥
تخطيط البسلة	خيطى	٥٠٠٠ X ١٤
النقط الحلقية فى الدخان	كروى	١٢
الموزيك الأصفر للفت	كروى	٢٠
الموزيك الجنوبى للفاصوليا	كروى	٢٥
موزيك الكوسة	كروى	٣٠
برونز الطماطم	كروى	٩٠
موزيك الخيار / ١	كروى	٣٥

١- نقطة فقدان الفيروس لنشاطه الباثولوجى بالحرارة:

Thermal Inactivation Point

تتأثر الفيروسات وهى خارج عوائلها بالحرارة العالية بدرجات مختلفة، وتلعب حالة العصير دوراً كبيراً من هذا الموضوع (فمثلاً يفقد فيروس موزيك الدخان تأثيره عند تسخينه على درجة ٧٥°م لمدة عشر دقائق إذا كان الوسط على pH7، أما إذا كان الوسط pH 5.5، فيفقد تأثيره إذا ما عرض لحرارة ٥٩ م لمدة عشر دقائق.

وتميز الفيروسات المختلفة فيما بينها بنقطة فقدان نشاطها، وهى عبارة عن (درجة الحرارة التى إذا ما تعرض لها الفيروس لمدة عشر دقائق فقد قدرته على إحداث الإصابة).

فمثلاً يتأثر فيروس موزيك الدخان بارتفاع درجات الحرارة تأثراً تدريجيًا، ويتم التأثير

على درجة ٩٣° م لمدة ١٠ دقائق. وفيروس تيكروزيس الدخان يتأثر بدرجة حرارة منخفضة وهى عند ٥٠°م لمدة ١٠ دقائق، يتسبب له تأثير نسبى فى حين أن نقطة فقدان نشاطه الباثولوجى حوالى ٨٠°م – ومن الفيروسات ما هو مقاوم لدرجات الحرارة العالية مثل فيروس تجعد أوراق البسلة، وتصل نقطة فقدانه لنشاطه إلى ١٠٨°م.

٣- التجميد : Freezing

يتحمل عصير النبات المصاب درجات الحرارة المنخفضة، بينما تقل قدرة المستحضرات النقية للفيروس على تحمل مثل هذه الدرجات – وإذا أضيف إلى مثل هذه التحضيرات النقية جلوكوز أو أملاح، فإن ذلك يرفع من درجة مقاومتها وثبوتها.

وللوسط الموجود به الفيروس تأثير كبير؛ فالتحضير النقى لفيروس موزيك الدخان يتحمل التجميد فى الوسط المتعادل pH 7.0، ولكنه يفسد إذا تمت عملية التجميد فى وسط حامضى.

٤- التجفيف : Hydration

معظم الفيروسات النباتية تفسد بسرعة بالتجفيف العادى للأنسجة المصابة أو العصير حتى فيروس موزيك الدخان، الذى يتميز بقوة مقاومته وثباته، فإنه أمام التجفيف يفقد جزءاً ملحوظًا من نشاطه وإذا ما جففت الأوراق المصابة بسرعة على درجة ١°م، ثم حفظت الأوراق فى مكان خالٍ من الرطوبة فإنه بذلك يمكن للفيروسات الثابتة أن تحتفظ بحيويتها لبضعة أشهر، أو ربما لسنة. ومن هذه الفيروسات موزيك الخيار رقم ١ وفيروس البقع الحلقية فى الدخان وفيروس X البطاطس.

٥- تأثير الأشعة فوق البنفسجية (الالترافيوليت) : Effect of Ultraviolet

جميع الفيروسات تفسد بسرعة عند تعرضها للألترا فيوليت، ويتم فقدان هذا النشاط عند موجة ٢٦٠ ملليميكرون – هذه الأشعة تمتص بواسطة أحماض النواة، وكذلك الموجات الأقصر من ذلك، ذات تأثير قوى على نشاط الفيروس – أما الموجات الطويلة التى تزيد عن ٣٠٠ ملليميكرون فإن تأثيرها ضعيف، وتحتفظ الفيروسات الفاقدة لنشاطها بواسطة

الالترافيوليت بخواصها الطبيعية وصفاتها كأنتيجن.

بعض الفيروسات الفاقدة لنشاطها نتيجة لتعرضها للالترافيوليت يمكن أن تعود لها حيويتها، إذا ما عرضت الأنسجة المصابة للضوء العادى المرئى – وعودة النشاط لا تتم إذا ما كانت الفيروسات خارج خلايا نسيج العائل.

يختلف تأثير الأشعة الضوئية باختلاف الفيروس، ويحتمل أن لا يظهر تأثير الضوء مباشرة، ولكن بعد مرور بعض الوقت يقدر بحوالى ٣٠ دقيقة، حتى تزداد جزيئات الفيروسات، ثم يستمر التأثير لمدة ساعة بعدها يبطل. ولضمان التأثير الضوئى فيكفى تعرض الفيروس للضوء لمدة ١٠–١٥ دقيقة.

٦- الضغط : Pressure

بعض الفيروسات تظهر مقاومة كبيرة نسبيًا تحت الضغط العالى، فيفسد فيروس موزيك الدخان الموجود فى العصير إذا ما عرض لضغط ٥٠٠٠٠ جو فسادًا ضعيفًا، بينما يفسد فيروس نيكروزيس الدخان فى ضغط ٣٠٠٠ إلى ٥٠٠٠ جو، حيث إنه أقل منه مناعة.

٧- مدة حفظ الفيروس لحيويته : Ageing

يفسد الفيروس الموجود فى عصير النباتات المصابة تدريجيًا، إذا ما ترك على درجة الحرارة العادية، وذلك نتيجة لفساد المواد الموجود بها الفيروس، وكذلك عمل أكسجين الهواء. ويمكن إطالة مدة بقاء الفيروس بحالة صالحة إذا ما أضيف للعصير مواد حافظة، وتختلف الفيروسات فى مدة بقائها حافظة لنشاطها اختلافًا كبيرًا. فمثلاً فيروس موزيك الدخان يحتفظ بحيويته سنينًا طويلة، وهو فى العصير بينما يفسد فيروس برونز الطماطم خلال بضع ساعات.

٨- نقطة التخفيف النهائية : Dilution end point

لتركيز الفيروس فى محلول الحقن تأثير كبير، فعند درجة معينة من التخفيف بالماء تصبح الإصابة متعذرة، وذلك ربما يكون نتيجة لقلة جزيئات الفيروس التى تدخل الخلية، وبالتالى فالفرصة تكون بسيطة أمام الجزيئات التى تسمح لها الظروف بالتكاثر – وعلى ذلك

تتوقف الإصابة على عدد جزيئات الفيروس التى تدخل الخلية.

وتسمى درجة تخفيف الفيروس التى بعدها لايحدث أى إصابة بنقطة التخفيف النهائية Dilution end point.

ثانياً: الخواص الكيميائية للفيروس: Chemical properties of Virus

١ - ترسيب الفيروس:

يمكن ترسيب الفيروس بواسطة الكيماويات التى ترسب البروتينات مثل الأمونيوم أو الكحول.

٢ - تقدير تركيز الفيروس بالطرق الكيماوية:

ولهذا الغرض تستعمل طريقة كلداهل في تقدير النيتروجين، ومنها تقدر كمية الفيروس فى المحلول.

٣ - التكوين الكيماوى للفيروس: استعملت بعض الطرق الحديثة مثل:

أ - الالكتروفوريسس Electrophoresis

تبنى على أساس هجرة migration الجزيئات فى مجال كهربائى، وربما يتم هذا فى وسط سائل أو على ورق. وتتحرك الأجزاء او الجزيئات نحو القطب السالب أو تبقى ساكنة (وتقدير اتجاه ومسافة الحركة فى وقت حقن) طبقًا لشكل وحجم الجزىء والشحنة الكهربائية المحولة بواسطة الجزىء وقوتها ودرجة pH للوسط.

وتؤدى هذه الطريقة إلى فصل الجزيئات المختلفة الموجودة فى مخلوط، وتساعد فى تعريفها.

ب - الكروماتوجرافى: Chromatography

وهذه الطريقة تقيس حركة البروتينات والأحماض الأمينية والجزيئات الأخرى فى مجال غير كهربى، ويمكن توضيح هذه التحركات على ورق، أو فى أعمدة تحتوى على سليلوز أو Diatomacoaus earth، ووجد أن استعمال الورق Paper chromatography مفيد لفصل

وتعريف الأحماض الآمينية. ويحلل البروتين إلى أحماض آمينية، وتوضع نقطة صغيرة من محلول مائى كمخلوط الحمض الامينى على شريط ورق ترشيح قرب نهايته، الذى يغمس بدوره فى مذيب عضوى يحتوى على الماء.

ويبدأ المذيب فى التحرك إلى أعلى الورقة على النقطة المحتوية على الحمض الآمينى، وتحمل الأحماض الآمينية المختلفة بواسطة المذيب إلى أبعاد مختلفة نحو قمة ورقة الترشيح، معتمدة على درجة ذوبانها فى المذيب العضوى، مقارنة مع درجة ذوبانها فى الماء، ويمكن تقدير النقطة النهائية التى توقف عندها الحمض الآمينى باستعمال كيماويات خاصة، التى تسبب لوناً نتيجة لتفاعلها مع الحمض على الورقة. وبالرجوع إلى الأماكن السابقة لتوقف الأحماض الآمينية عندها.. فإنه من الممكن تحديد وضع الأحماض الموجودة فى مخلوط مجهول.

التحليل الكروماتوجرافى ليس قاصراً على الأحماض الآمينية، ولكن يمكن استعماله فى عزل وتعريف أنواع كثيرة من الجزيئات Moleciules.

جـ - وطريقة أخرى لفصل وتحديد مكان وتعريف المواد يمكن الوصول إليه بطريقة مختلفة عن استعمال ورق الإلكتروفوريسس Paper electrophoresis، والكروماتوجرافى، وفيها توضع قطرة من مخلوط به مواد على ورقة ترشيح بقرب نهايتها السفلى، ويستعمل التيار الكهربى. يفصل الإلكتروفوريسس الجزيئات أفقياً بين القطبين.

وتضاف بعد ذلك المذيبات العضوية فتسبب هجرة للجزيئات المختلفة فى بعض الصفات (الشحنة، الوزن... إلخ).

وتخضع طريقة Columun Chromatography للأسس نفسها مثل Chromatography وهى هجرة الجزيئات خلال عمود زجاجى، يحتوى على مادة ممتصة متجانسة Suitable absorbent ولكن باستعمال تكنيك مختلف تضاف التحضيرات الكيمائية إلى قمة الأعمدة، وتتحرك إلى أسفل العمود بقوة الجذب بواسطة مضخة خاصة. وفى أثناء هجرة التحضير تحدد مواضع المواد المختلفة المكونة للمخلوط.

٤ - اختبارات التلوين : Colour tests للبروتينات والكربوهيدرات

تستخدم تلك الاختبارات للكشف عن الفيروس ومركباته :

أ - اختبار بيوريت Bieuret reaction وهو خاص بروابط الببتيدات Peptide Linkage وفيه يضاف ٠,٥ سم٣ من فيروس نقى إلى ٠,٥ سم٣ من ١٠٪ أيدروكسيد الصوديوم ثم تضاف نقطة أو اثنتان من ١٪ محلول كبريتات النحاس، فإذا تكون لون أزرق بنفسجى فإن هذا يدل على وجود رابطة ببتيدية.

ب - تفاعل ميلون Melon test وهو الكشف عن الـ Tyrosine ويتركب محلول ميلون من ١ جزىء ٤٠٪ حامض النتريك إلى ٩ أجزاء ماء مقطر، ثم يشبع فى خلال عدة أيام بنترات الزئبق ثم يرشح- يضاف محلول فيروس نقى، ثم يسخن فى حمام مائى ساخن؛ فإذا تلون بلون أحمر فإن ذلك يدل على وجود الفيروس.

جـ- اختبار موليش Molish test، وهو الكشف عن الكربوهيدرات يضاف ١ سم٣ من حامض كبريتيك مركز إلى محلول فيروس باحتياط على جانب الأنبوبة، حتى لايختلط بالمحلول ويرسب فى القاع ويسخن فى حمام مائى. وتتكون حلقة بنفسجية بين الحامض ومحلول الفيروس.

ثالثاً: تأثير المواد الكيمائية على الفيروس

كثير من المواد الكيماوية لها القدرة على إبطال مفعول الفيروسات، ومنها المواد التى تؤثر على البروتين مثل أملاح المعادن الثقيلة والأحماض القوية وكثير من المواد الأخرى. بتعريض الفيروس إلى ٣ - ٥٪ ليزول لمدة خمس دقائق يزيد تأثير الفيروس كذلك برمنجنات البوتاسيوم تستعمل كمطهر ضد فيروس موزيك الدخان.

يؤثر الفورمالدهيدو H_2O_2 على الفيروس، والتأثير فى بعض الحالات على الفيروس يكون جزئياً وعكسياً، فمثلاً يزول تأثير الفورمالدهيد بعمل تحلل مائى لفيروس موزيك الدخان فيعود إليه نشاطه جزئياً.

لوحظ التأثير العكسى على فيروس موزيك الدخان، أثناء تعرضه لمحلول قلوى

Alkalization، وفى هذه الحالة يعود للفيروس نشاطه إذا ما عمل له تحلل مائى بواسطة الماء.

ولقد حصل أجاتوف عام ١٩٤٧ على هذه النتيجة، واقترح أنه فى هذه الحالة فإن النشاط ربما يكون مرتبطًا بمجموعة الكربوكسيل لبروتين الفيروس المقيد.

والتأثير المثبط على هذا الفيروس يسببه أيضاً التربسين، فيرتبط إنزيم التربسين بالبروتين مكوناً مركب غير نشط، وعند كسر الرابطة فى المركب فإن الإنزيم يفترق أثناء تخفيف المحلول بالماء فيعود النشاط للفيروس.

فيروس X البطاطس أقل ثباتاً عن فيروس موزيك الدخان؛ لذلك ففى حالة ارتباطه بإنزيم التربسين لايتأثر فقط، ولكنه بمرور الوقت يحدث خلل للبروتين.

من هذا يمكن القول بأنه لايوجد هناك تفسير واحد ثابت فى عمل المواد المختلفة المؤثرة على الفيروسات المختلفة، وأوضح مثل على ذلك أن الجليكوبروتين المستخلص من *Phytolaca esculenta* يؤثر بشدة على نشاط فيروس الدخان، وفى الوقت نفسه لايؤثر على البكتريوفاج.

يتوقف نشاط الفيروس بشدة على تركيز أيونات الأيدروجين، وبالمستخلصات حيث يحدث تجميع aggregation للمستخلصات عند pH10 وأعلى، مع فقد نشاطها وبعض التأثيرات يحدث عند pH8. تختلف مقاومة الفيروسات المختلفة للوسط الحامضى اختلافاً ظاهراً فمثلاً يتأثر فيروسX البطاطس كلية فى وسط أقل من pH 4,3، أما فيروس موزايك الدخان فإنه يقاوم فى أقل من pH2.

يحتفظ الفيروس بنشاطه بعد التحميض المتوسط فعند عدوى نباتات الدخان فإنه تظهر عليها مظاهر الإصابة، ولا يفترق الفيروس المتكاثر والمعزول من هذه النباتات عن الفيروس الأصلى. على أساس كل ما سبق يمكن القول بأن مجموعة الأوكسى ومجموعة الكربوكسيل تلعبان دوراً مهمّاً فى نشاط الفيروس، وكذلك بعض أجزاء من مجموعة الآمين. ولهذا يمكن اعتبار أن التركيب البيولوجى للفيروس يحدده مجموع كل خواص مكوناته الكيميائية وتركيبه الطبيعى.

رابعاً: خواص الفيروس كأنتيجين

تطلق كلمة أنتيجين على المواد التى إذا حقنت فى دم جارٍ لحيوان، يكون نتيجة لذلك تكون أجسام مضادة لها صفة الدخول معها فى تفاعل. وهناك كذلك مواد تحمل نسبة أنتيجين غير كامل أو Haptens، وهى مواد ليس من صفتها تكوين أجسام مضادة في جسم الحيوان، ولكن يمكنها الدخول فى تفاعل مع الأجسام المضادة، التى تكونت ضد الأنتيجين ويكون ذلك نتيجة لتوافق تركيبى.

والبروتينات هى مواد أنتيجينية، وتتكون الفيروسات من نيوكليوبروتين، وتحتوى على بروتين، ولذا فهى أيضاً أنتيجنات.