

الباب الثاني

التركيب البنائي والكيميائي

لفيروسات النبات

STRUCTURAL AND CHEMICAL
COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

oboeikandi.com

الفصل الأول

التركيب البنائى لفيروسات النبات

STRUCTURAL OF PLANT VIRUSES

من الضرورى جداً توافر معلومات تفصيلية عن التركيب البنائى للفيروسات لعدد 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 الإلكتروني أن الجزيئات أو الفيرونات الفيروسية تنقسم من حيث الشكل إلى ثلاث مجاميع، وهى:

- ١ - مجموعة الفيروسات عسوية 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 جزيئات كروية صغيرة متلاصقة ومن أمثلتها فيروس موزيك الخيار (CMV)، وفيروس التقزم الشجيري فى الطماطم (TBSV)، وفيروس نيكروزيس الدخان (TNV).

المجموعة الثانية:

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

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

المجموعة الثالثة:

خيضية الشكل Filament shape، وهي عبارة عن خيوط طويلة مرنة ملتوية، وقد تكون شبكة تختلف في درجة نسجها حسب طول الفيروس ومرونته، ومن أمثلتها: فيروس Y البطاطس (PVY) وفيروس موزيك الخيار رقم ٢ (CMV₂) وفيروس موزيك الخس (LMV).

وهناك تقسيم آخر لأشكال الفيروسات بصفة عامة، وهو:

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

٢ - فيروسات غير متماثلة Anisometric viruses وهي عصوية طولها عدة أضعاف عرضها، ومنها:

١ - فريونات عصوية مستديرة الطرفين Bacillus-Like bodies.

ب - فريونات مستقيمة صلبة Rigid rods.

ج - فريونات خيضية مرنة Flexible threads.

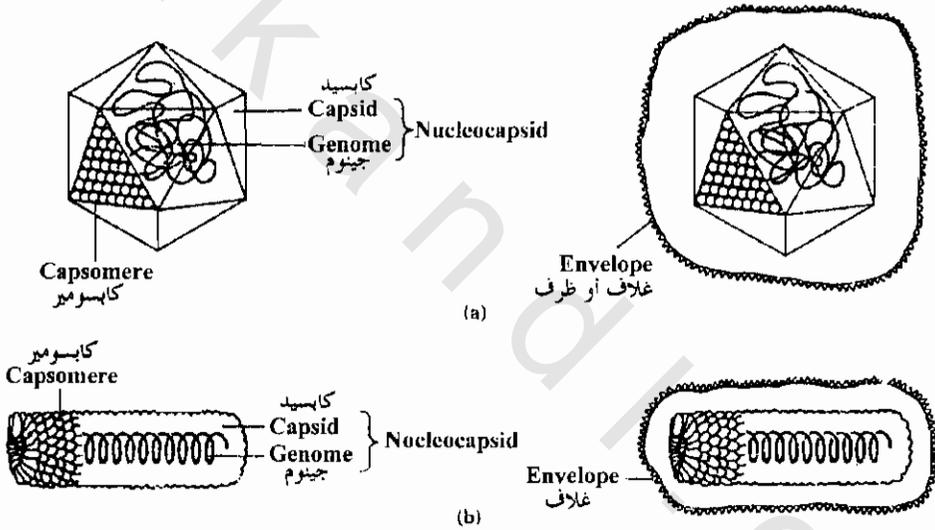
أما الفيروسات الكبيرة والتي يحيطها غلاف فيمكن وصفها في مجموعتين كالاتى:

١ - فريونات كروية Spherical، مثل: فيروس الذبول المنقط فى الطماطم (TSWV).

٢ - فريونات 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).

فيروسات النبات

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 البرونزي في الطماطم قطرها ٩٠ نانوميتر، كذلك طول جزيئات فيروس موزيك الدخان (TMV) ٣٠٠ نانوميتر، أما فيروس X البطاطس (PVX) فطول جزيئاته ٥٠٠ نانوميتر، وفيروس اصفرار البنجر خيطي 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 Naked أو بغلاف Enveloped والحمض حلزوني والكبسوميرات منسوجة بشكل حلزوني.

أظهرت الدراسات باستعمال الأشعة السينية (أشعة X) والميكروسكوب الإلكتروني أن الفيروسات تحتوى على حمض نوأة واحد، إما DNA أو RNA محاطاً بغلاف بروتيني Pro-tein shell or coat أطلق عليه اسم نيوكليوكابسيد هذا الغلاف البروتيني يتكون من وحدات بنائية يطلق عليها اسم كابسوميرات Capsomeres، وقد تحاط النيوكليوكابسيد فى بعض الفيروسات بغلاف خارجي يطلق عليه ظرف Envelope.

أوضحت التجارب السابقة أن الفيروسات تحتوى على ٥٠ - ٦٠٪ من تركيبها بروتين، والاكثر من ذلك هو إمكانية فصل الحمض النووي عن البروتين وإعادة تركيبهما معا. ولذلك أوضحت التجارب أن هناك طرقاً عديدة مختلفة يترتب بها البروتين حول حمض النوأة 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 النوأة 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 الإلكتروني.

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 النوأة يمكنه تمثيل ١/١٠ 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 جزء البروتين بمفرده كتحت وحدة Subunit كروية أو مستديرة؛ فهذا يحتاج إلى استخدام قليل من المادة الوراثية. وبذلك فليس من الضرورى أن يتركب الغلاف البروتينى بنائياً من تحت وحدات متشابهة.

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

فيروسات النباتات

النواة التي 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 الفيروسي فى المعمل ولمدة طويلة.

ويخضع نظام وضع حمض النواة وما يحيط به من بروتين إلى نظام معين أو سيمترية معينة نتيجة لتراص تحت الوحدات Subunits طبقاً لآس هندسية بسيطة نسبياً مبنية على اعتبارات فيزيائية.

وهناك نوعان من نظام التجمع للوحدات البنائية، يؤدىان إلى نوعين من السيمترية لبناء النيوكليوكابسيديات هما:

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

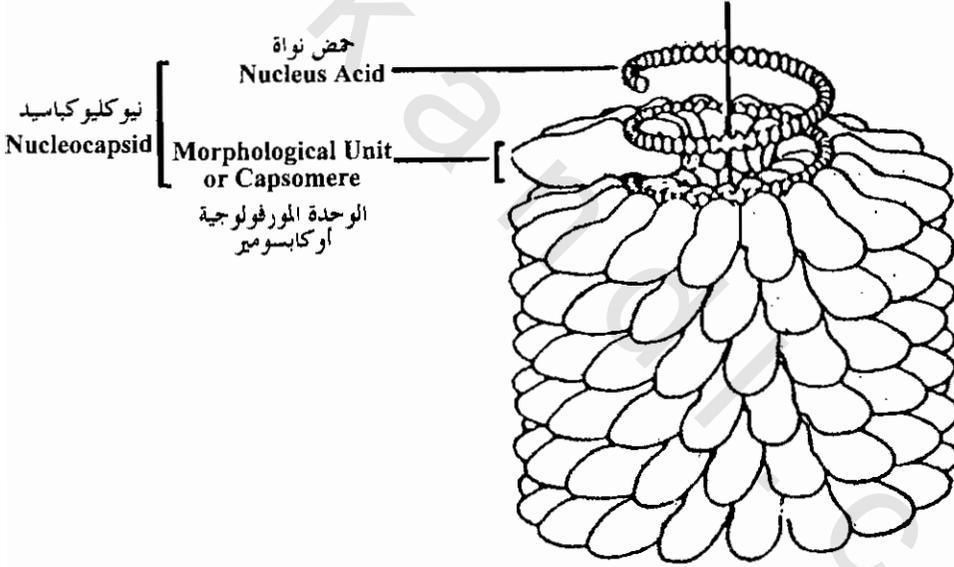
٢ - السيمترية المكعبة (C) Cubical symmetry أو ذات الأوجه المتساوية Sometric symmetry.

وقد وجد أن كل الفيروسات العصوية الشكل التى فحصت هى حلزونية السيمترية أكثر من أن تكون أسطوانية، وأن وجود حمض النواه ربما يكون هو العامل المسبب لهذا الترتيب - كما تظهر نيوكليوكابسيديات بعض هذه الفيروسات أكثر صلابة rigid كما فى فيروس موزيك الدخان (TMV)، بينما يوجد فيها ما هو رخو تقريباً 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 اثني عشر (١٢) وجهاً Dodecohedron أو عديد

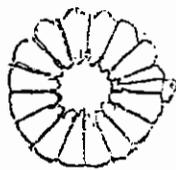
الأوجه Icosahedron ذات عشرين وجه مثلث متساوي الأضلاع Triangle face وثلاثين حافة Vertices، واثنى عشر قمة Edges وهو الشكل المميز للفيروسات الكروية ويسمى Icosahedron ايكوزاهيدرال.

وقد حظى فيروس موزيك الدخان بدراسات واسعة لتكبيبه البنائي كمثال للفيروسات ذات السيمترية الحلزونية، وقد وجد أن جزيئات الفيروس تظهر كأسطوانة قطرها ١٥ نانومتر وطولها ٣٠٠ نانومتر، وأصبحت هناك صورة واضحة حقيقية، توضح أن الأسطوانة تتكون من وحدات بروتينية (كابسوميرات) تكون مترابطة بجانب بعضها البعض، وتكرر في شكل حلزوني حول محور الجزيء بفاغ في وسطها قطرة $40^\circ A$ إنجستروم والكبسوميرات ذات شكل بيضي Ellipsoid، وتشمل كل لفة على ١٦ كبسوميرة تتكرر كل ٦٩ إنجستروم، ويصل مجموع الكبسوميرات في الفيرون إلى $2130 + 2\%$ والوزن الجزيئي للوحدة ١٧٣٠٠ دالتون.

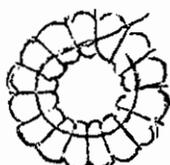


شكل (٢ - ٢): رسم تخطيطي يمثل نيوكليوكابسيد لجزيء فيروس حلزوني السيمترية (TMV).

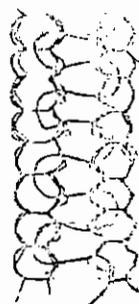
وللفيرون 39×610 دالتون، بينما الوزن الجزيئي لحمض النواه RNA هو $2,6 \times 610$ دالتون. يكون وسط الجزيء أجوف، وعلى سطحه ترتب تحت الوحدات في نظام حلزوني ولها Pitch حوالي $23^\circ A$ إنجستروم ونصف قطر Radial 75 إنجستروم (شكل ٢).



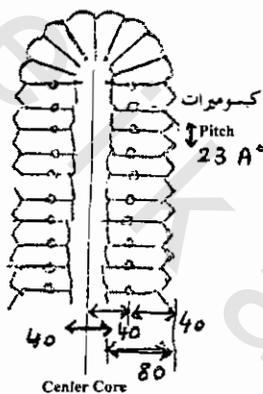
Disk
أرض الكسوميرات
في طبقات حلزونية



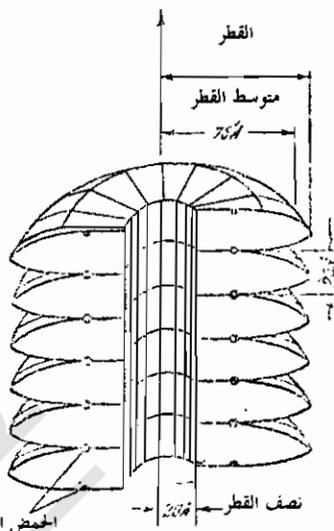
ق - ع



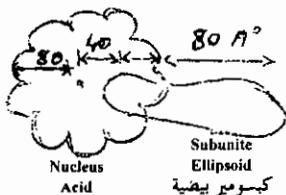
ق - ط
Naked Helical
بمترية حلزونية عارية



Center Core

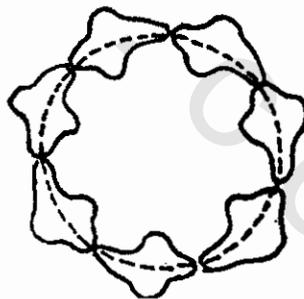


الحمض النووي



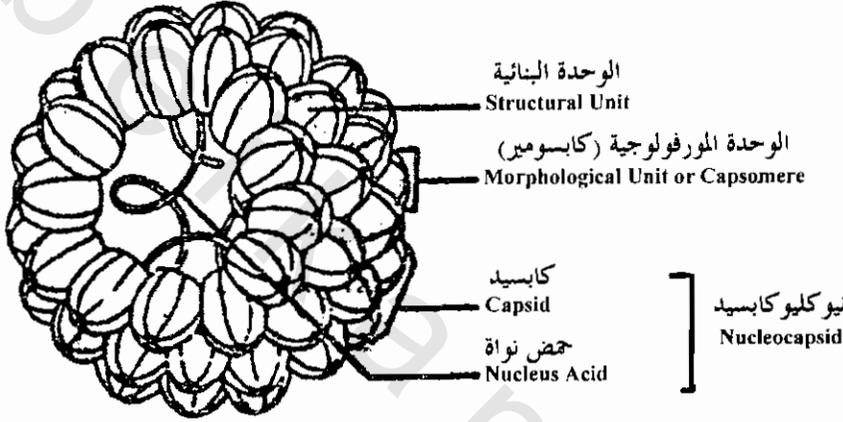
Nucleus Acid

Subunit Ellipsoid
كسومير بيضية



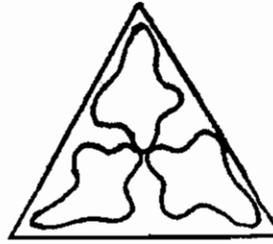
شكل (٢ - ٣): رسم تخطيطي يبين خطوات تجمع الوحدات البنائية في نظام حلزوني لإنتاج نيوكليوكابسيد فيروس (TMV) موزايك الدخان.

وبالنسبة للسيمترية المكعبة فإن كثير أمن الفيروسات ذات كابسيدات كروية -Spheri- cal، تظهر فى الميكروسكوب الإلكتروني 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، والتي هى الجزئيات البروتينية المكونة للجزء الخاص بغطاء الكابسيد Capsid shell (شكل ٢ - ٤).

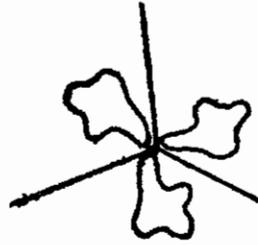


شكل (٢ - ٤): رسم تخطيطي يبين التركيب البنائي لجزء فيروس كروي ذى سيمترية مكعبة.

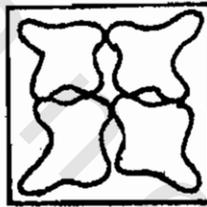
أما معرفة الشكل الذى يوجد فيه حمض النواة داخل الجزئيات الفيروسية ذات السيمترية المكعبة، فهذا غير مؤكد تماماً، إلا أنه لا بد وأن يكون حمض النواة ملتفاً بطريقة ما. أظهر هذا النظام أو الترتيب الداخلى بدراسة مستفيضة لفيروس موزيك اللفت الأصفر (TUMV) على أنه عقد Knobs موجودة فى علاقة سيمترية مع كابسوميرات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



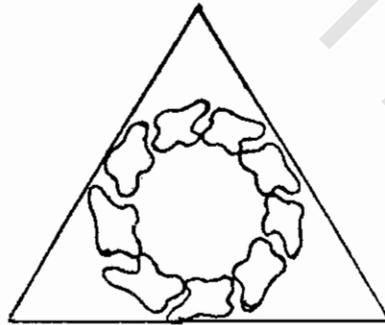
ترتيب تحت الوحدات في رؤوس المثلث



ترتيب تحت الوحدات حول القمم



ترتيب تحت الوحدات على الأوجه (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 للكاسيدات ذات الأوجه في الصور الإلكترونية، تبدأ باعتبارات بلورية Crystallographic consideration تقول بأن الأنظمة ذات السيمترية المكعبة يمكنها أن تكون أغشية متشابهة Isometric shells وذلك بواسطة وضع وحدات متشابهة في حالة منتظمة - Qui valent على السطح Sphere، ويمثل نظام سيمترية ايكوزاهيدرال Icosahedral، وفي هذه الحالة فإن (٦٠) ستين تحت وحدة متشابهة ترتبط فيما بينها، وتوضع على سطح دائري.

الأغلفة Envelopes:

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

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

الفيروسات غير الكاملة Incomplete Virions:

وجد أن كل التحضيرات للفيروسات من الخلايا المصابة تحتوي بجانب الفيروسات على محتويات أخرى لها النشاط الفيروسي. وفي معظم الحالات فإن مثل هذه المحتويات ذات علاقة مباشرة مورفولوجية وكيميائية لبعض محتويات الفيروسات. فمثلاً تحتوي النباتات

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

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

هذه الكابسيديات الفارغة ما هى إلا فيروسات فقدت حمض النوواة - أو أغلفة تكونت دون الحمض أو ربما تكونت كبداية لتكوين الفيروسات.

oboeikandi.com

الفصل الثامن

التركيب الكيميائي لفيروسات النبات

CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT VIRUSES

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

تختلف النسبة المئوية والوزن الجزيئي للحامض النووي وللبروتين في الفيروس الواحد باختلاف الفيروسات، ويبين الجدول التالي النسبة المئوية والوزن الجزيئي للأحماض النووية والبروتين لبعض فيروسات النبات.

جدول (٢ - ١): نوع الحامض النووي والوزن الجزيئي والنسبة المئوية للحامض النووي والنسبة المئوية للبروتين في بعض فيروسات النبات.

الفيروس	نوع الحامض النووي	% الحامض النووي	الوزن الجزيئي للحامض النووي (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

فيروسات النباتات أولاً : الحمض النووي :

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

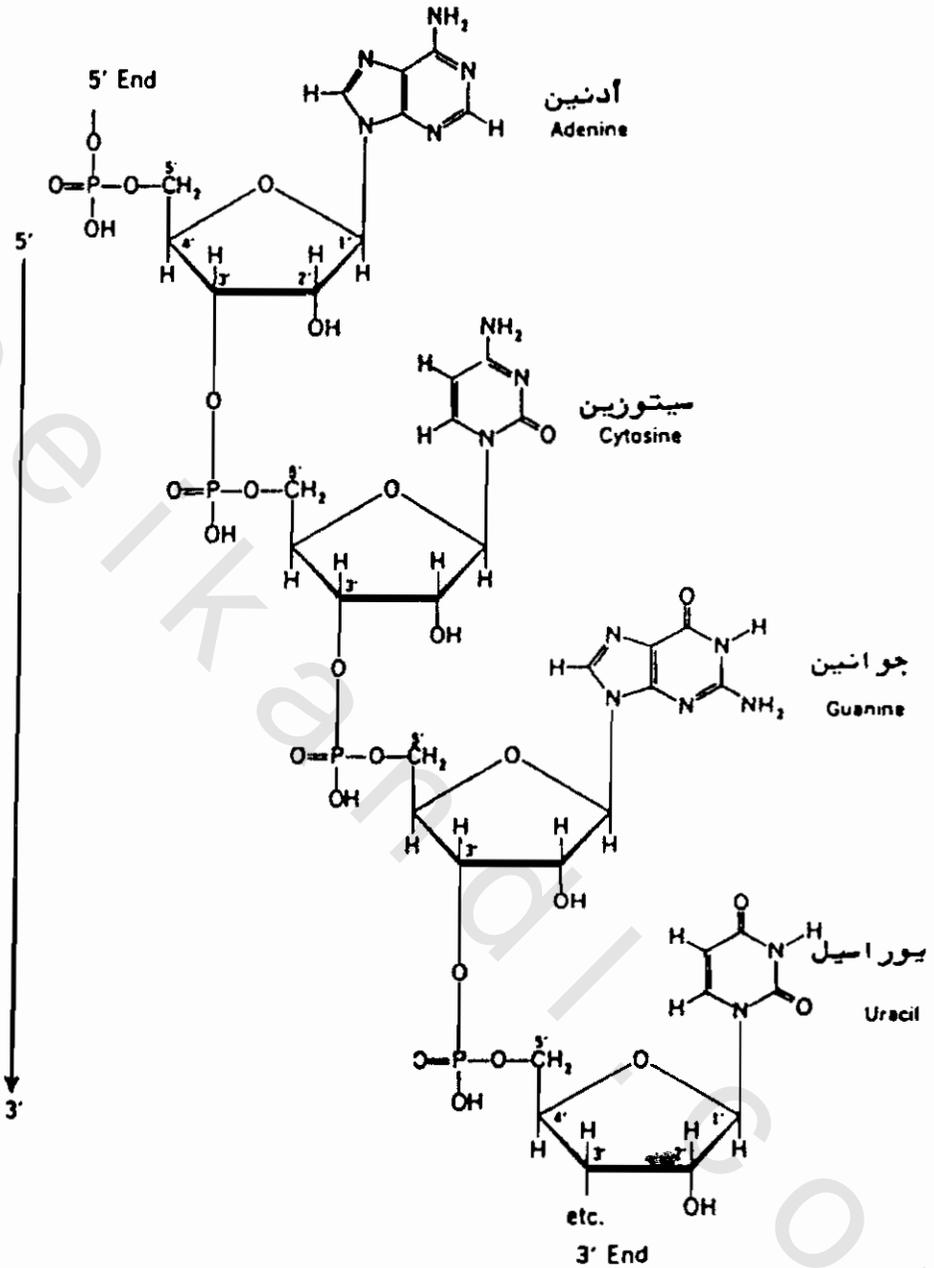
ويتكون الهيكل الاساسى لهذين النوعين من الحمضين النوويين (DNA , RNA) من سلاسل بها جزيئات فوسفات وسكر خماسى بالتبادل، ويتصل بكل جزيء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين أو البريميدين، والسكر الموجود بجزيء الحامض النووى رن ا RNA هو سكر الريبوز، بينما فى جزيء الحامض النووى دن ا DNA فإن السكر 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 الاحماض 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 الاحادية ببعضها بواسطة جزيء 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 ا، دن ا والمركب الناتج من ارتباط النيوكليوتيدات Polynucleotides الاحادية يعرف باسم عديدات النيوكليوتيدات .

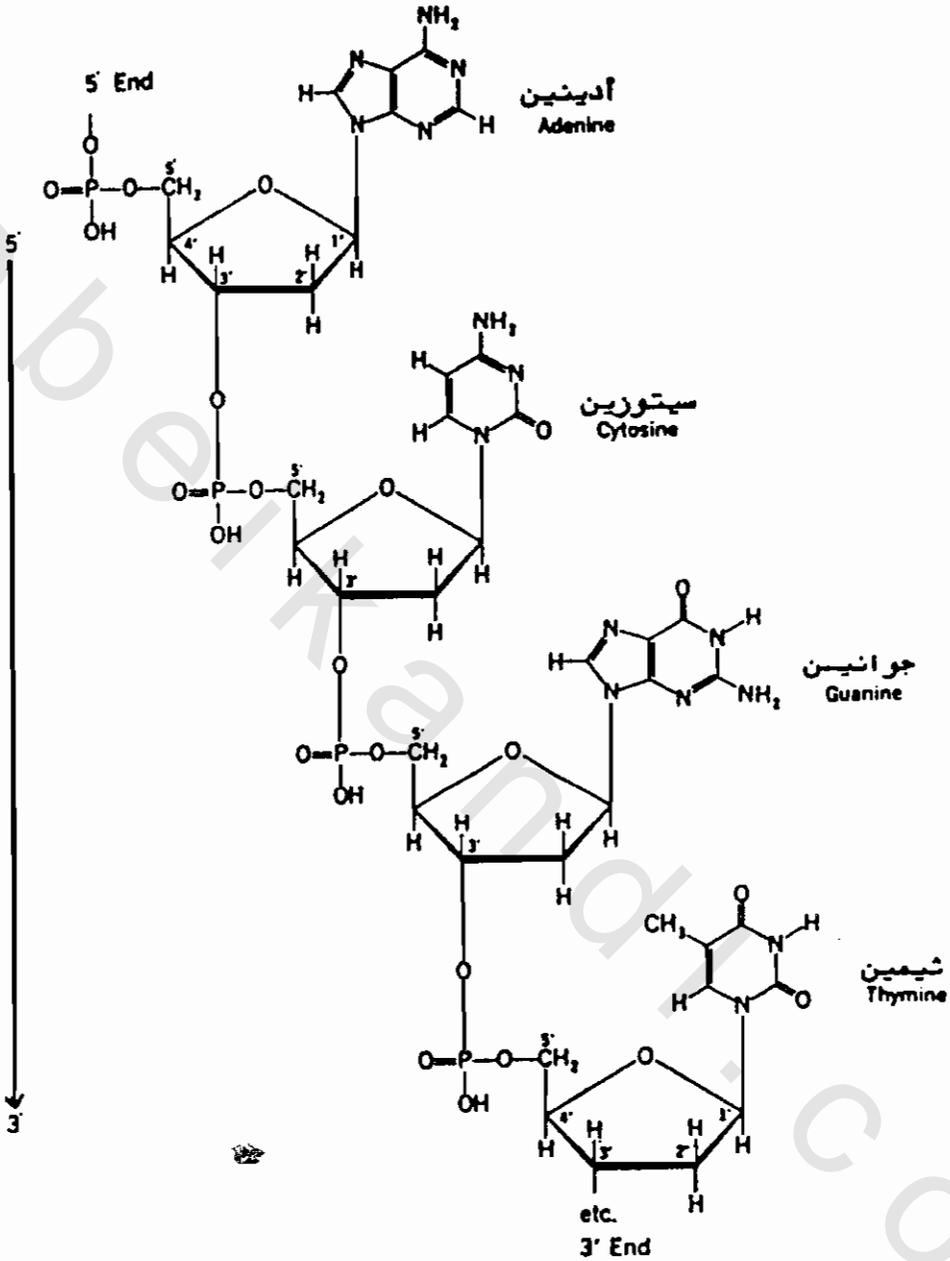
ويختلف RNA عن DNA من حيث التركيب فى نقطتين، هما :

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

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



شكل (٦:٢ - ١): التركيب البنائي لسلسلة عديدات الريبونوكليوتيدات لتوضيح الرابطة لثنائية الاستريين جزيئات سكر الريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات. وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الريبوز والقواعد النيتروجينية أدينين-سيتوزين-جوانين-يوراسيل.



شكل (٦:٢ - ب): التركيب البنائي لسلسلة عديدة الادي أوكسي ريبونيو كليوتيدات. لتوضيح الرابطة ثنائية الاستريين جزيئات سكر الذي أوكسي ريبوز بواسطة مجموعات الفوسفات، وكذلك توضيح الرابطة بين جزيئات سكر الذي أوكسي ريبوز، والقواعد النيتروجينية أدينين- سيتوزين- جوانين- ثيمين.

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

ولما كان الحامض النووي هو المادة الوراثية للفيروسات، فمن البديهي بأنه كلما زادت كتلة الفيروس والنسبة المثوية للحامض النووي فيها، كان الفيروس أعقد تركيباً.

قد يكون الحامض النووي للفيروس أحادي الخيط (Single- Stranded)، كما هو الحال في فيروس موزيك الدخان TMV أو ثنائي (Double- Stranded) في بعض الفيروسات، مثل فيروس تقزم الأرز Rice dwarf virus (RDV) وفيروس أورام الجروح wound tumor virus، وأن الحامض النووي لهذه الفيروسات هو من نوع RNA ر ن أ.

في معظم فيروسات النباتات التي درست بصورة جيدة، وجد بأن الحامض النووي فيها كان من نوع RNA، إلا أن هناك بعض الفيروسات التي وجد بأن الحامض النووي فيها كان من نوع DNA.

فقد اكتشف شبرد وزملاؤه في عام ١٩٦٨ بأن فيروس موزيك القرنبيط Cauliflower mosaic Virus يحتوي على DNA وهو ثنائي الخيط. كما أن أحد الفيروسات التي اكتشفت على الإثنيات الزرقاء- الخضراء Blue-Green algae Virus تحتوى على DNA وهو ثنائي الخيط، ووجد أن مجموعة الجيميني Geminiviruses تحتوى على DNA أحادي الخيط ssDNA مثل فيروس تجعد أوراق الطماطم الأصفر.

ويكون موقع الحامض النووي في داخل جزئ الفيروس ومحاطاً من جميع جوانبه بالغلاف البروتيني الذي نعتقد بأنه الغطاء الواقي للحامض النووي من تأثير الإنزيمات عليه، وبصورة خاصة إنزيمات النيوكلييز Nuclease التي تقوم بتحليل الأحماض النووية. ولأجل أن يكون هذا الغطاء الواقي فعالاً، يجب أن يكون مقاوماً للإنزيمات التي تحلل البروتينات، والتي تسمى Proteolytic enzymes المتواجدة في خلايا الكائنات الحية. ويظهر أن الغلاف البروتيني فعلاً يتميز بمقاومة هذه الإنزيمات بالنسبة لمعظم الفيروسات التي درست بصورة مفصلة، ويعتقد بأن هذا التركيب للغلاف البروتيني حدث نتيجة للانتخاب الطبيعي، أثناء نشوء وتطور الفيروسات في الطبيعة.

ثانياً : الغلاف البروتيني أو المحفظة Protein Coat or Capsid :

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

ونظراً لحجم الفيروسات المتناهى الصغير، والذي 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 لايد وأن تتكون- بالضرورة- من وحدات بروتينية متشابهة Identical Protein Subunits والوحدات البروتينية التى تكون الغطاء البروتيني، تسمى الكابسومرات Capsomeres، ومفردها كابسومر Capsomere .

تتكون البروتينات بصورة عامة من سلاسل طويلة وغير متفرعة من البوليبيبتيدات Polypeptides، وتتكون هذه الأخيرة من وحدات بنائية أساسية هى الأحماض الأمينية Amino acids .

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

وتسلسل الأحماض الأمينية 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 النووي، فقد وجد بأن بعض الفيروسات تحتوى على مكونات أخرى مثل مركبات البولي أمين Polamines والدهون Lipids، والتي أهمها Phospholip-ids، وتتميز معظم هذه الفيروسات باحتوائها على غشاء خارجي يحيط بالغلاف البروتيني ويدعى Envelope .

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

oboeikandi.com

الفصل الثالث

الجينوم الفيروس

VIRAL GENOME

تظهر الأحماض النووية بالفيروسات تنظيمات ملحوظة لأنواع تركيبية وتكوينية تميز كل جزئ فيروسي عن الآخر، ويمكن القول بأنه توجد أربعة أشكال من الأحماض النووية في 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 ثنائي الضفيرة مثل فيروس التدرن الجرحى (WTV) وفيروس تقزم الأرز والـ Reoviruses .
 - ٤ - حمض نواة DNA ثنائي الضفيرة مثل بعض فيروسات الحيوان وفيروس موزيك القرنيبط (CaMV) .
- وتوجد جميع الأشكال الأربعة ممثلة في فيروسات الحيوان أما فيروسات النبات فتحتمى على شكل حمض النواة ريبو ويوجد قليل جداً من الفيروسات النباتية التي تحتوى على حمض النواة DNA مثل فيروس موزيك القرنيبط .

وجد أن معظم فيروسات حمض النواة ss-RNA وزنه الجزيئى $2 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ ، وفى حالة حمض النواة ds RNA فإن الوزن الجزيئى أكبر خمس مرات تقريباً أى 10×10^6 ، 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 في بعض من الفيروسات مثل فيروس الموزيك والنموات الزائدة في البسلة (PEMV) وفيروس موزيك وتخطيط الشعير (BSMV)، وتظهر هذه الأنظمة أيضاً في بعض الفيروسات ذات حمض النواة ds DNA من فيروسات النبات أو الفطر أو البكتيريا.

أولاً: الجينوم الثنائي Bipartite genomes :

١ - مجموعة توبرا فيروس Tobravirus group :

تشمل هذه المجموعة فيروسات عديدة تظهر اختلافاً في الشكل المورفولوجي مثل فيروس القرعقة في الدخان (TRV)، وفيروس اللون البنى المبكر في 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 في الجزيئات الطويلة، وأما الجزيئات القصيرة تختص بالتركيب الفردي للبروتين Single structural of protein، لهذا فإن الجزيئات الطويلة معدية، ولكنها تؤدي إلى تكوين حمض نواة RNA غير مغلف ولكنه معدى أيضاً، أما الجزيئات الصغيرة وحمض النواه الذي بها لا يحدث العدوى ولكنها ضرورية لإنتاج الفيديون، 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 في الكثافة النوعية ينظر إليها على أنها مميزة، ولكن جميعها تتميز بجينوم ينقسم بين محتويين من النيوكلوبروتين (وسطى وسفلى)، وهما جزيئات متماثلة Isometric ذات حجم واحد ولكنها تختلف في كثافتها النوعية عند الترسيب، ويوجد أيضاً جزيئات شبيهة ولكنها فارغة وتظل في أعلى، أما الغلاف البروتيني 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 ممتلى) وتوجد بعض الوظائف تحدد النسبة بين أنواع الجزئيات، وتظهر بعض المظاهر على أنها مميزة لجينوم واحد.

٣ - مجموعة نيوفيروس **Nepovirus group** :

يحتمل أن تحتوى كل أعضاء 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 الجزئيات ذات حجم متماثل، ولكنها تنقسم إلى ثلاث مجاميع من ناحية الترسيب عاكسة بذلك ما تحتويه من حمض النوواة RNA₂، فالجزء العلوى Top يحتوى على كابسيدات فارغة، والجزء الوسطى Middle RNA يحتوى على RNA الذى وزنه الجزئى ٤ × ١٠^٦ والجزء السفلى bottom يحتوى على كل من RNA₂ مضافاً إليه RNA₁ ووزنه الجزئى ٢ × ١٠^٦ دالتون ولا يمكن RNA₁ أن يعدى وحده وأن RNA₃ ذو تأثير معدى ضعيف، وربما يرجع هذا التأثير الضعيف إلى التلوث، أما الحمضان فهما ضروريان للتضاعف.

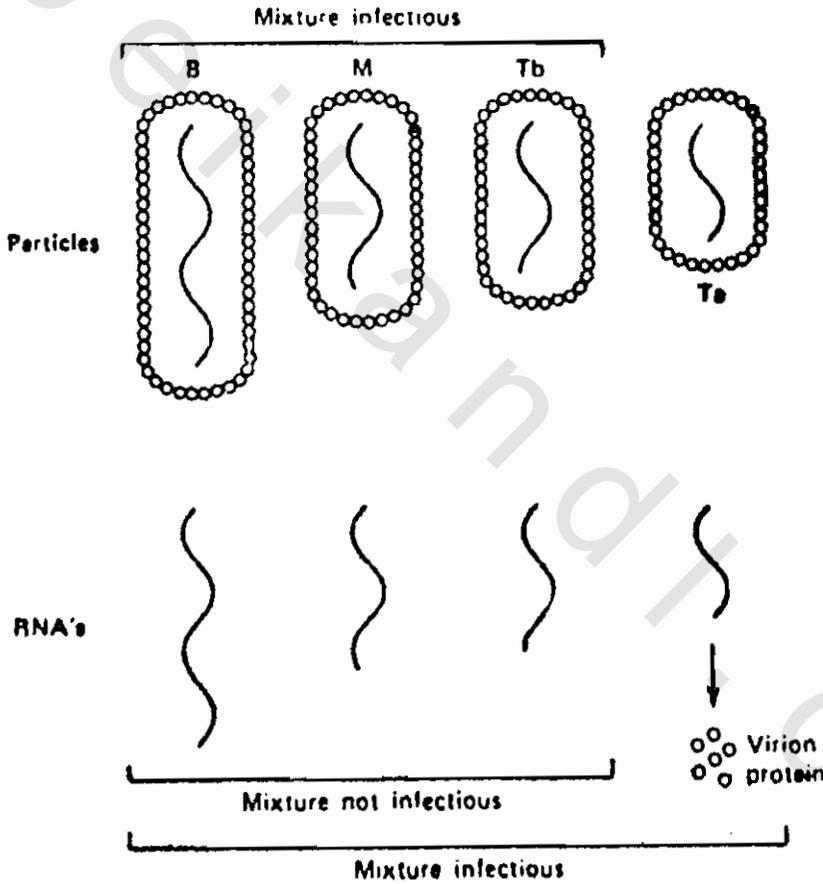
ثانياً: الجينوم الثلاثى **Tripartite genomes** : وله الأشكال التالية :

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 الجزئيات يمكن تمييزها تمييزاً بيولوجياً.

كما تحتوى جميع الأشكال على بروتين واحد (البروتين نفسه) . وهى عسوية فى شكلها Bacilliform، ولكنها بأطوال مختلفة فهى أطول فى القاع ثم الوسط ثم القمة أ والقمة ب، وتحتوى هذه الجزئيات على كود حمض RNA لاعمال مخصصة، فالجينومات الثلاثة ذات الحمض الطويل RNA₃، RNA₂، RNA₁ تحتوى على كمية الحمض الكافية

للإصابة فهي تحتوى وراثياً على RNA أساساً ولكن لا بد من أن يصاحبها RNA₄ الحمض النووى فى القمة أو نواتجه Translation وغلافه البروتينى حتى تحدث الإصابة، وفى كلتا الحالتين ينتج RNA₄، ولهذا فإن تتابع النيوكليوتيدات يكون مزدوجاً فى مكان ما فى الجينوم، ولقد اتضح عديد من وظائف الحمض RNA₁، RNA₂، RNA₃، 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 فى فيروس موزيك البرسيم (الغالفا) الحجازي.

٢ - مجموعة فيروس التخطيط في الدخان Tobacco streak virus :

يمثل هذا الفيروس مجموعة من الفيروسات الكروية المتماثلة Isometric، والتي تشتمل على فيروس موزيك التفاح (APMV) وفيروس تبقع أشجار الدردار (ELm) ريجوس الموالح (CLRv)، كما يوجد العديد من الفيروسات الكروية المتماثلة الغير تامة والتي عزلت أولاً من النباتات الخشبية المعمرة Perennials، وينقسم الجينوم بين أقسام مختلفة من الجزئيات تمثل فيريونات ذات التركيب البروتيني الواحد ونفس نسبة الحمض إلى البروتين، ولكن يختلف الترسيب لاختلاف الحجم، ومن الصعب فصل الجزئيات المختلفة عن بعضها، وأن أقسام الحمض المختلفة يحتمل أنها لا تتمشى مع تصنيف الجزئيات 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 RNA₄ أو البروتين المغلف ضرورى لعملية الإصابة، كما أن حمض RNA₄ أو الغلاف البروتيني 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 للجزئيات، وتقريباً يحتوى الجينوم الأساسى ثلاثة أصناف فقط من الحمض النووى، وهذه ترقم من ١ - ٣ طبقاً للحجم التنازلى، والحمض النووى الرابع RNA₄، يعمل كرسول mRNA لتكوين الغلاف البروتيني فى نظام تمثيل البروتين الحرفى الخلية، ولكن أصله غير مميز Obscure ولا يظهر أنه يتشابه فى عمله مع الحمض الرابع RNA₄ لفيروس موزيك البرسيم (AMV₂) ولا مع بروتين الغلاف

الضروري للعدوى، وأظهرت تجارب التهجين Hybridization بواسطة حمض النواة RNA من سلالات ذات قرابة أن RNA₃ (وهو رسول لتكوين الغلاف البروتيني أيضاً) يسبب Mediates تعديلات وسطية في الغلاف البروتيني، بينما مظاهر إصابة مختلفة تتغير بواسطة حمض النواة ١، ٢، ٣، وأمكن أيضاً تخليق فيروسات مهجنة بواسطة استعمال حمض النواة من فيروسات البروموفيروس Bromoviruses، والتي لها قرابة بسيطة ولكن حدود التخصص في التهجين غير واضحة.

مما سبق يتضح أن جينوم الفيروسات السابقة (فيروس موزيك البرسيم AMV) ومجموعة البروموفيروس Bromoviruses، والذي يمثلها فيروس موزيك البروم BrMV ومجموعة كيكوموفيروس Cucumovirus، والذي يمثلها فيروس موزيك الخيار (CMV)، وفيروس التخطيط في الدخان (TSV)، وفيروس ريجوس ورقة الموالح (CLR) والفيروس القريب سيولوجياً 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 ٦١٠ دالتون ونوع وزنه الجزيئي حوالي ٠.٣ X ٦١٠ دالتون وترتب الأحماض النووية RNA (١، ٢، ٣، ٤) في ترتيب تنازلي بالنسبة للوزن الجزيئي، ويتكون الجينوم في هذه الفيروسات من ١، ٢، ٣، بينما وضع أن النوع الرابع في بعضها يحتوى على معلومات وراثية من أجل تكوين الغلاف البروتيني.

وقد وضع أن خليطاً من الحمض النووي (١، ٢، ٣) يكون معدياً في حالة مجموعة Bromoviruses ومجموعة فيروسات Cucumoviruses، بينما أحماض النواة ريبو من فيروس موزيك البرسيم (AMV) وريجوس ورقة الموالح (CLR) وفيروس التخطيط في الدخان (TSV) وفيروس انكسار اللون في ورقة الموالح (CVV) تحتاج حتى تصبح قابلة لإحداث العدوى تحتاج إلى تنشيط بواسطة غلافها البروتيني، وأن دور الغلاف البروتيني ليس فقط لحماية حمض النواة RNA المعدى أثناء اختراقه الخلايا، حيث إن mRNA للغلاف البروتيني RNA_١ يمكنه أيضاً تنشيط جينوم الفيروس Translation of the RNAs of multicomponent viruses.

عملت دراسة في 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 RNA₄، والذي 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 الكيمىائى للفيروس . . فإنه من الممكن تفسير كثير من الخواص البيولوجية على المستوى الجزيئى، ويمكن القول : إن هذا الجزئ الصغير من جينوم الفيروس مجهزة للقيام بكثير من العمليات، ومن العمليات المستقلة منها رسول منظم Regulated messenger وكوحدة للتضاعف Unit of replication وكمسبب مرضى معدٍ . An infective pathogenic agent

تعرفُ 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 خيطياً، توجد طرق متعددة قياسية طبيعية أو كىماوية أو إنزيمية . وتقوم الطرق الكىماوية 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 الأهمية فى دراسة الفيروس داخل النبات، وكذا علاقة الفيروس بالفيروسات الأخرى ولكل من ذلك ناحية نظرية وأخرى عملية .

أولاً الفيروس داخل النبات :

من الناحية النظرية فإن معرفة الجينات الفيروسيّة والنوّاج التي تسجلها تعتبر البداية التي توصل إلى تفهم كيف تحدث الفيروسات المرض .

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

ثانياً : علاقة الفيروس بالفيروسات الأخرى :

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

ومن الناحية العمليّة فإن من الأمور الأساسية أن نكون قادرين على تعريف الفيروس وحتى السلالة الفيروسيّة، قبل أن نستطيع التوصل إلى طرق المقاومة الفعالة للفيروس المسبب للمرض في محصول معين أو في منطقة معينة، وتعريف الفيروس يستلزم خطة عمل فعالة لتقسيم الفيروسات المسئولة وسلالاتها، وكذا طرق تعريف الفيروس التي سبق الإشارة إليها، ودراسة التتابع النيوكليوتيدي على جانب كبير من الأهمية في كلا الأمرين .

استخلاص الحمض النووي الفيروسي :

استخلاص الحمض النووي الرايبوزي RNA من التحضيرات النقية والمنقاة جزئياً وفصله عن الغلاف البروتيني وغيرها من المكونات الفيروسيّة الأخرى مثل الليبيدات . وأغلب الأعمال الأولى التي أجريت على الحمض النووي الفيروسي أغفلت مدى تحمل جزيء RNA، ولهذا فإن الأحماض النووية التي عزلت في ذلك الوقت تعرضت لتهدم شديد،

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

وفي الوقت الحاضر أصبح من الممكن إزالة البروتين الفيروسي وفصل الحمض النووي باستخدام بعض الطرق الكيماوية، ودون أن يطرأ تغيير على الحمض النووي أو قدرته على العدوى.

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

١ - تركيز أيونات الأيدروجين حيث إنه لا يجب استخدام النهايات القصوى لرقم الأس الأيدروجيني؛ حيث إنه من الثابت أن رقم الأس الأيدروجيني أعلى من ١ - يؤدي إلى تحلل الروابط الفوسفورواي إيثير، بينما عند رقم ٣ أو أقل فإن تحرر القواعد البيورينية يتم ببطء.

٢ - تأثير الإنزيمات: الحمض النووي الرايبوزي وحميد السلسلة حساس لتأثير إنزيم الرايبونيكليز حيث إنه يكفي كسر في جزيء الـ RNA، لكي يفقد قدرته على العدوى. ولذلك من الضروري استبعاد تأثير الإنزيمات عند فصل الحمض النووي الفيروسي. وغالباً ما توجد آثار من إنزيم الرايبونيكليز في التحضيرات المنقاة للفيروس، ويكون مصدرها أوراق النبات.

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

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

ولذلك عند استخلاص الحمض النووي يجب أن يراعى استبعاد الطرق التي تحتاج إلى التحليل المائي طويل المدة، أو الطرق التي تحتاج إلى إعادة الترسيب من المحاليل المائية.

٤ - التأثيرات الهيدروديناميكية: لا تشكل هذه التأثيرات مشكلة بالنسبة للفيروسات الصغيرة، التي تحتوي على RNA وحيد السلسلة. بينما تكون أكثر تأثيراً على الفيروسات التي تحتوي على RNA ثنائي السلسلة.

٥ - القوة الأيونية: في المحاليل ذات القوة الأيونية الضعيفة، تركيب معقد الحمض النووي الرايبوزي وحيد السلسلة، ويصبح أكثر حساسية لتأثير إنزيم النيوكليز، الذي يوجد عند عملية الاستخلاص، وغالباً تستخلص الـ RNA في محاليل ٠.١ مول NaCl كلوريد الصوديوم.

٦ - تجهيز التحضير الفيروسي لاستخلاص الحمض النووي:

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

وتعتمد الطريقة التقليدية لاستخلاص الحمض النووي الرايبوزي على استخدام الفينول، إلا إنه ظهر أن الفينول لا يعطي نتائج مرضية بالنسبة لعديد من الفيروسات، وعند التعرض لاستخلاص الحمض النووي من فيروس غير معروف من قبل، وبمقارنة عدة طرق بغرض اختيار أنسب هذه الطرق بالنسبة لهذا الفيروس، فيما يلي موجز لأهم هذه الطرق:

١ - المعاملة بالفينول:

ولقد استخدمت هذه الطريقة بواسطة جرير وشرام لاستخلاص الحمض النووي الرايبوزي المعدى من فيروس تبرقش أوراق الدخان TMV؛ حيث إن الفينول يحرر البروتين ويثبط إنزيم النيوكليز. وفي هذه الطريقة يتم خلط معلق الفيروس في محلول منظم عند pH حوالي ٧،

والذى يحتوى عدة مليميكروجرامات من الفيروس. فى كل ١ سم^٣ 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 تحويلات 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 (T) Oligo تلتحم مع poly (A) و RNAs المغايرة فى التتابع تغسل خلال العمود.

In Vitro translation : النقل فى المعمل :

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 -Polyacrylamide gel electrophoresis بالنسبة للحمض النووى الرسول mRNA :

٢ - تتم إضافة الـ RNA إلى نظام تمثيل البروتين فى وجود الأحماض الآمينية؛ 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 *Incorporation of 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

المركزي، 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 في بيئة معلمة.

٣ - The Wheat Germ System : وفي هذا النظام يتم إضافة الـ RNA الفيروس في وجود معلم مناسب Label إلى معلق، يتم الحصول عليه من مستخلص أجنة القمح الذي أزيل منه الميتاكوندريات.

١- تهجين الأحماض النووية : Nucleic acid Hybridization

في الحمض النووي ثنائي السلسلة ds، يكون الخيطان مرتبطين ببعضهما براوابط أيدروجينية بين أزواج القواعد المتقابلة G:C و A:T بالنسبة للحمض النووي DNA و G:C، A:U بالنسبة للحمض النووي RNA، وحينما يسخن محلول الحمض النووي ثنائي 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 التي عندها يتم انفصال ٥٠٪ من الخيوط، اسم درجة الحرارة المذيبة Melting tempertaure أو Tm. ويؤدي تحلل الأحماض النووية في التركيب الثاني 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 يؤدي إلى رفع درجة الحرارة المثوية، كما أن تركيز الاملاح يؤدي إلى ارتفاع الـ Tm، كما يؤدي وجود العوامل التي تكسر الروابط الأيدروجينية مثل الفورماليد إلى خفض درجة الحرارة المذيبة بالنسبة لأغلب الأحماض النووية RNA ثنائية الخيط، فان درجة الحرارة المذيبة في ٠,٣ مول كلوريد صوديوم تقع بين ٨٨ - ٩٣م. وبالنسبة لاختبار التهجين يتم اختيار الظروف الحرارية بحيث نصل إلى أقصى حد ممكن

للتزاوج بين الخيوط الشقيقة، وقد وجد ان درجة حرارة ٦٥م هي الانسب بالنسبة لأغلب RNA الخاصة بفيروسات النباتات أى تكون أقل من درجة الحرارة المذبية بمقدار من ٢٣- ٢٨م. ويتم التهجين بين الأحماض النووية فقط تلك التى يكون التتابع النيوكليوتيدى متشابهاً. 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 ٦٥م 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 النيتروسيليلوز.

٢ - Gel Electrophoresis :

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

فى هذه الطريقة يتم سريان تيار كهربائى بطول الجيل، وتوضع الجزيئات المشحونة فى السائل داخل ثقب 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 DNA 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 نيوكليتيده واحدة.

٣ - الخرائط المحددة Restricting maps :

الإنزيمات الداخلية المحددة Restriction endonucleases تعتبر إنزيمات موجودة في عدد من الأنواع البكتيرية. وظيفتها في هذه الخلايا أنها تكتشف وتهدم الـ DNA الغريب مثل ذلك الذي يأتي من الفيروسات المعدية. ومن أهم خصائصها البيوكيماوية هي أن لها القدرة على اكتشاف الـ DNA فقط عند عدد محدد من النيوكليوتيدات غالباً ما يكون ٤ أو ٨ نيوكليوتيدات في 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، التي تسمح بقطع الـ ds DNA في مواقع محددة مختلفة. وباستخدام الإنزيمات المحددة التي تسمح بقطع الجينوم الفيروسي في شكل الـ DNA، أمكن اتباع عديد من الأقسام ذات الأحجام المحددة، والتي يمكن فصلها باستخدام جيل اليكتروفوريسيس، ويمكن عندئذ عمل الخريطة المحددة الخاصة بالجينوم موضحة مواقع كل قطع بالمقارنة بآخرين. ومثل هذه الخريطة التي تميز فيروس بعينه، يمكن استخدامها لإعطاء تصور تقريبي لدرجة تشابه جينوم الفيروسات المتقاربة.

٤ - استخدام DNAPolymerase :

وكان لسهولة الحصول على هذا الإنزيم (pol I) ومعرفة طريقة عمله الفضل في تطوير وظهور العديد من التقنيات الجزيئية Molecular techniques بما في ذلك تعليم العينات وترتيب النيوكليوتيدات في الحمض النووي DNA.

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

النيوكليوتيدات لا تضاف إلى المجموعة الكربوكسيلية الخامسة الحرة، وعلى هذا يمكن القول بأن النمو الخيطي الجديد يبدأ من اتجاه ٥ إلى ٣، بالإضافة إلى ذلك فإن لدى pol 1 وظيفتين أخريين، أولهما: أن نشاط الإكسونيوكليز يدخل في منع القواعد غير الصحيحة أثناء عملية نمو الخيط، وكذلك فإن للنشاط ٥-٣ إكسونيوكليز الذي من وظائفه في الخلية إزالة البادئات من RNA من الـ DNA كما أن نشاط هذا الإنزيم على الحمض النووي أحادي السلسلة يؤدي إلى كسر وإزالة النيوكليوتيدة الخامسة، وعند إزالتها يمكن استبدالها بواسطة القدرة الاستقطابية للإنزيم. ويترك الكسر من ٥ إلى ٣ على طول اتجاه الخيط التمثيلي، وتعرف هذه العملية باسم Nick translation، وفي التجارب يتم الكسر في الـ DNA باستخدام DNase بوضعه في البيئة الخاصة، ولا يجب الخلط بين عمليتي Nick trans والـ Translation؛ حيث إن الأخيرة هي العملية التي تقوم بها الريبوسومات والعوائل الأخرى لتمثيل البروتين في الخلية تحت تأثير mRNA.

٥ - الأحماض النووية المعلمة Labeled nucleic acid probes :

تم استخدام سلسلة من الأحماض النووية المعلمة إشعاعياً في عديد من الطرق لدراسة الجينوم الفيروسي، وعملية تضاعف الفيروسات. والحمض النووي المشعة من الممكن أن يكون DNA أو RNA ويمكن معالجة الحمض النووي بعدة وسائل. وفيما يلي أهم الطرق التي يشيع استخدامها لذلك الغرض.

أ - تعليم النهاية End-Labeling :

حيث إن إنزيم Polynucleotide Kinase وجد في أنواع كثيرة من الخلايا التي تساعد على نقل (ألفا) فوسفور من الأدينوزين تراهي 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 في الوضع ألفا، فإن ذلك سينتقل إلى مجموعة الكربوكسيلية الخامسة لبولي نيوكليوتيدة، وبذا يتم تعليم النيوكليوتيدة الخامسة من الجزئ. وإذا كان الفوسفات موجوداً أصلاً في المجموعة الخامسة، فإن لابد من تحريكه قبل عملية التعليم باستخدام إنزيم Alkaline phosphatase حتى يمكن تحرير المجموعة الكربوكسيلية

ب - طريقة Nick translation (النقل بالعلامة) :

وهي طريقة شائعة لتعليم الـ DNA؛ حيث يستخدم dNTPs المشع، وذلك بإضافته إلى المخلوط الذي يحتوي على الحمض النووي مع تشجيع نمو خيط الحمض النووي باستخدام DNA pol I وذلك للحصول على عينة مشعة.

ج - طريقة Random priming (التكوين العشوائي للبادئ) :

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

د - طريقة Strand - Specific probes العينات المميزة للخيط :

وفي هذه الطريقة أيضاً يتم تمثيل الأحماض النووية *in Vitro* من الـ dNTPs المشع، وفي 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 مساوياً لذلك، الذى يستخلص من بكتيريوفاج Sp6 أو T7، وفي هذه الطريقة من الممكن تمثيل أو تعليم خيط واحد من الحمض النووي.

٦ - طريقة نازرن 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 النيترو سيليلولوز أو النايلون. ثم يعامل بصب محلول منظم مناسب موازٍ لاتجاه الإليكتروفوريسيس وفى اتجاه الغشاء. وعملية الـ Blotting تؤدي 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 الـ DNA ذى الترتيب النيوكلتيدي المشابه مع العينة المشعة. ثم عن طريق التصوير الاوتورايدوجرافى للغشاء يمكن تمييز أى حزم الـ DNA مطابقة لتلك الحزم الموجودة فى العينة، ثم يمكن تقدير أو تقييم حجم الـ DNA 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 blotting. وفى هذه الحالة يتم فصل مخلوط الـ RNA الخاص بالفيروس أو الخلية أو كليهما معاً، على أساس الحجم باستخدام أجاروز جيل إليكتروفوريسيس عادة تحت ظروف، لا تسمح أو تمنع تكوين قواعد ازدواجية داخل الخيوط، والتي تؤدى إلى تكوين انحناءات فى الـ RNA.

وكما يحدث مع الـ DNA يتم تجمع الجيل على أغشية من النايلون أو النيتروسيلولوز التى تقوم بالإمساك بالـ RNA. ثم يتم تعريض الغشاء بعد ذلك لمحلول يحتوى على العينة المشعة، ثم بطريقة التصوير الاوتورايدوجرافى، يمكن تمييز أى حزم الـ RNA 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 الراديوأوتوجرافى، ولو تم التعليم بصبغات فلوريسنتية فيمكن استخدام الميكروسكوب.

٩ - تحديد ترتيب النيوكلتيدات فى الـ DNA :

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

أ - Restriction Endonucleases :

من أهم خصائص تلك الإنزيمات هي أن بعضها لا تؤدي إلى القطع المستقيم، ولكنها تقوم بقطع متعدد في كل سلسلة عند مواقع عدد قليل من النيوكليوتيدات متباعدة، وهي القطع المختلفة التي تترك نهايات قصيرة وحيدة الخيط على جانبي كل قطعة. ويطلق على هذه النهايات اسم النهايات المتماسمة أو اللاصقة Cohesive ends لأن لها القدرة على التهجين، لتكون زوجاً من القواعد الشقيقة مع نهايات أى جزيء DNA آخر التي يتم قطعها بنفس تلك الإنزيمات Restriction nuclease .

ب - DNA Ligase :

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

ج - DNA Cloning تجمع الـ DNA (كلونة) :

ولتحديد ترتيب النيوكليوتيدات أو لإجراء عمليات أخرى على الـ DNA المنتج بواسطة الإنزيمات القاطعة، من الضروري 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 طبيعياً فى البكتريا والخميرة وتتضاعف داخل العائل. والـ DNA الخاص بالبلازميد أصغر بكثير عن الـ DNA الخاص بالبكتريا، ولذا يمكن فصله بسهولة منها. وحينما تستخدم البلازميدات كناقلات فنستخدم أجزاء من الـ DNA الفيروس؛ حيث يتم إدخالها إلى الـ 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 الفيروس المطلوب. ويتم انتخاب تلك المستعمرات التي تحتوى على الـ DNA

يحقن الـ DNA الخاص بالبلازميد المستخدم بجين المقاومة للمضادات الحيوية، غالباً الامبيسيلين والبلازميد أيضاً يحتوى على جين يسمح بتخمير اللاكتوز. وتوجد الإنزيمات القاطعة لـ DNA مع هذا الجين. وحينما تدخل جزيئات الـ DNA الخاصة بالبلازميد إلى البكتريا فإن الأخيرة يتم تنميتها على بيئة تحتوى على المضاد الحيوى، وعلى نسبة من اللاكتوز مما يعطى لوناً أزرق عند التخمير. 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 لوناً أزرق. بينما تكون أى مستعمرة بيضاء تحتوى على جين إنزيم اللاكتوز فقدت حيويتها بإدخال الـ DNA المطلوب.

وأكثر البلازميدات شيوعاً فى الاستخدام، هو للأمين PBR 322 يحتوى على جين المقاومة للامبيسيلين 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 لأحد المضادات الحيوية والحساسة لمضادات أخرى. والمستعمرات التى تحتوى على الـ DNA الغريب المطلوب تنميتها 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 الجزيء.

وهناك بعض البكتريوفاجات التى يمكن استخدامها بدلاً من البلازميد لحمل جزء من الـ DNA الغريب إلى داخل الخلية البكتيرية، مثل فاج ۱۱۳ 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 النيوكليوتيدات فى الـ DNA لجينوم الفيروس:

لقد ظهرت طريقتان أساسيتان لتحديد التتابع فى النيوكليوتيدات فى الـ DNA أولهما طريقة ماكسام وجلبيرت Maxam and Gilbert، التى تتضمن استخدام تحضير مشع من الـ DNA 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 جزيء يتم دراسة مخلوط من جزيئات الـ DNA حيث يحتوى كل جزيء على نوع خاص من القواعد، التى تتأثر فى موقع واحد، وتعامل كيميائياً حيث يمكن إزالة تلك القاعدة . ثم تفصل الأجزاء المشعة بواسطة جيل إليكتروفوريسيس، وهنا يمكن تحديد ترتيب النيوكليوتيدات 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 النيوكليوتيدات فى الحمض النووى الفيروسى، وأساس هذه الطريقة هو أن nucleoside tri-phosphate يحتوى على البننتوز Pentose تفتقر إلى مجموع الأيدروكسيل على كل من الموضعين ٢، ٣ (a dideoxy nucleotide) ولذلك لا تتمكن من تكوين حزمة-Phospho-dist مع النيوكليوتيد التى تضاف إلى السلسلة النامية فى الاتجاه الثالث . ولذلك فإن تحديد وضع الـ dideoxy nucleotide فى السلسلة النامية يحدد اتساع تلك السلسلة .