معمل الفيروسات العام

“ 250 MIC ”

المعمل السابع

نورة الكـبيسي
Nalkubaisi@ksu.edu.sa
2016

تنقـية الفيروسات

Virus Purification

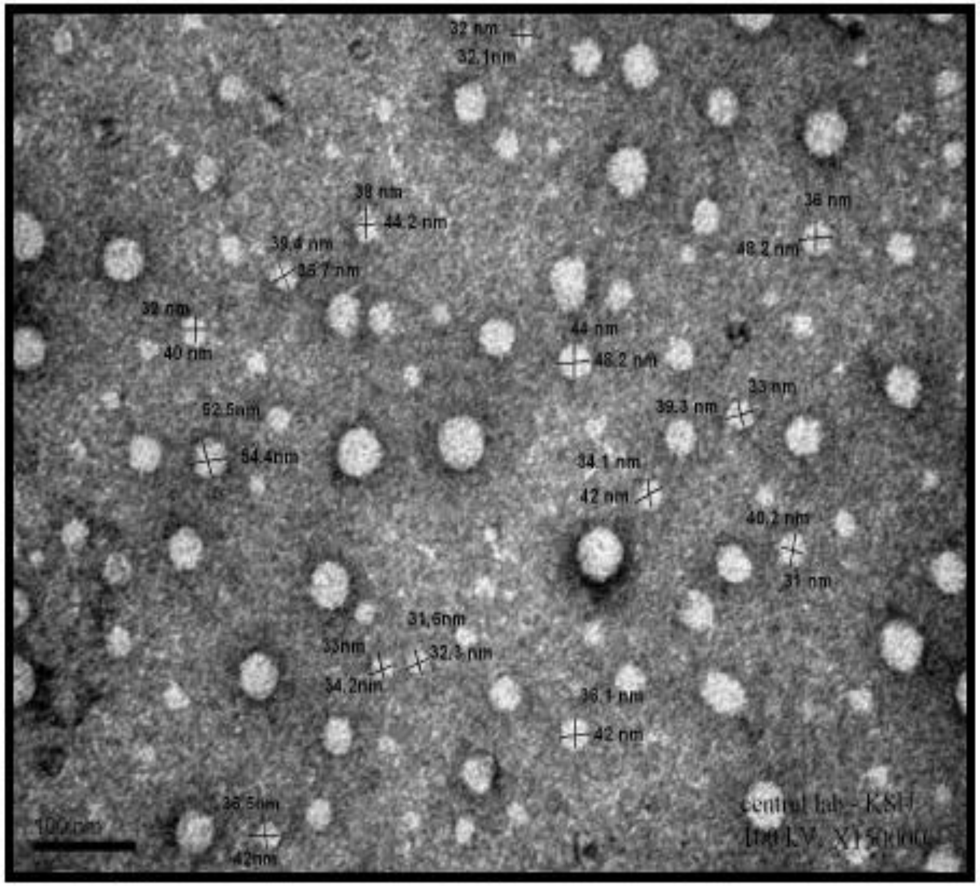
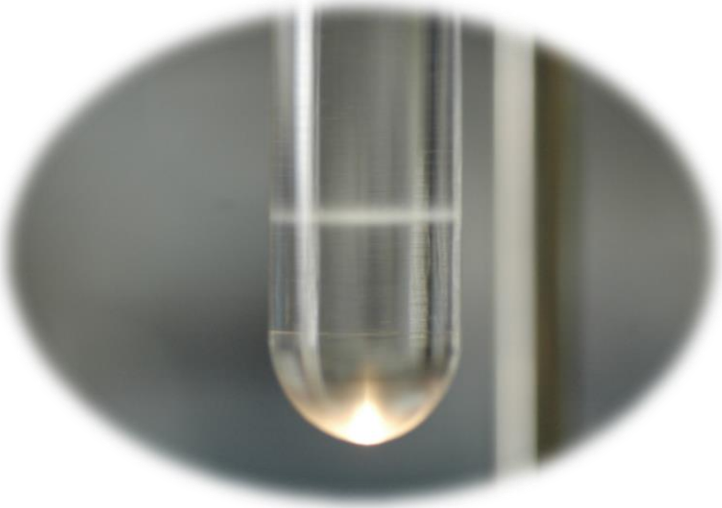
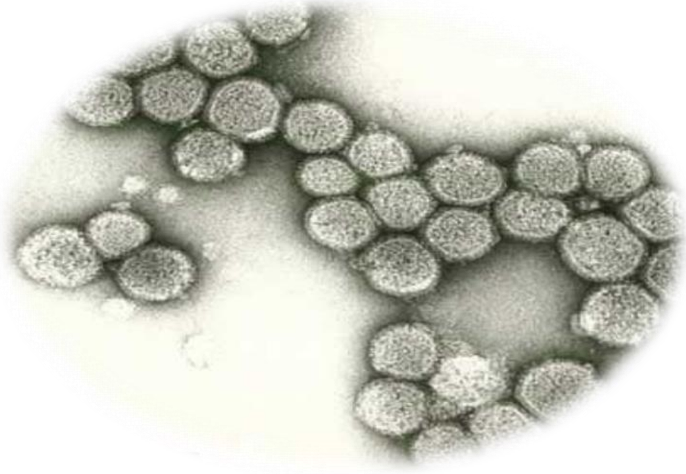


Figure (25): Calculation of Two diameters of BYDV Particles.

تنقية الفيروس





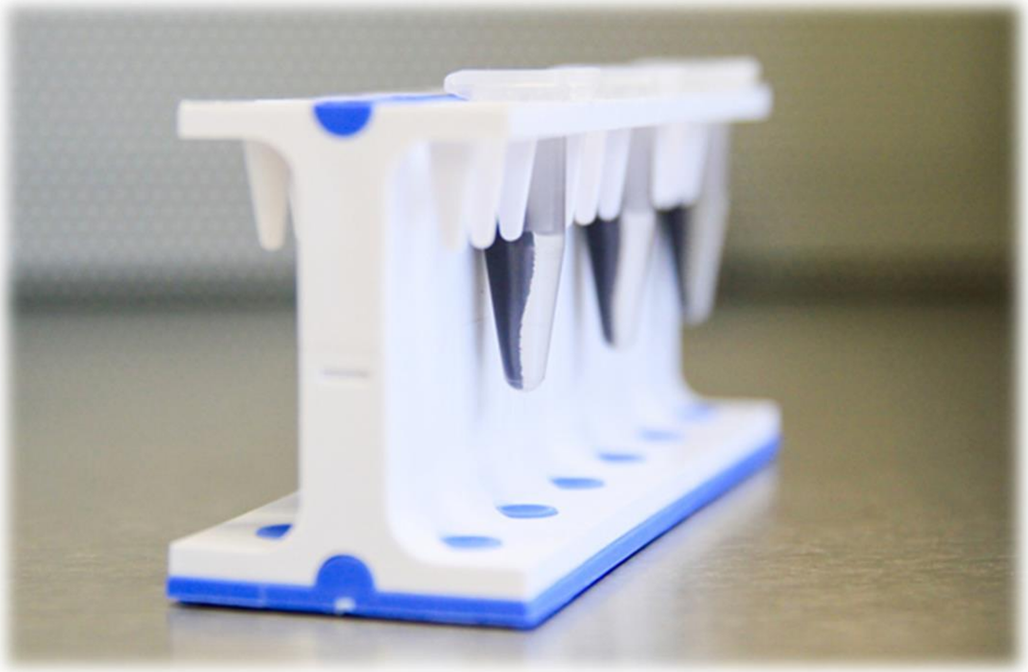
تعني عملية التنقية:

الحصول على جزيئات الفيروس

- بحالة منفردة.
- بتركيز عالي.
- أن يكون على درجة عالية من القدرة على الإصابة.

1. **نظراً لإرتباط الفيروس (الجزيئات الفيروسية) بالخلية دائماً فأنه يلزم للحصول على الفيروس استخلاصه من الخلايا النباتية في صورة معلق بالعصير النباتي.**
2. **نظراً لكثرة البروتينات والأصباغ التي تتواجد في العصير النباتي يلزم أجراء سلسلة من عمليات التنقية على العصير النباتي المحتوي على الجزيئات الفيروسية.**

الهدف من عمليات التنقية هذه هو الحصول على جزيئات الفيروس منفردة مع المحافظة على فعاليتها في الإصابة وفي شكل خالص بقدر الإمكان عن المكونات التي لا تحدث إصابة وحتى يمكن الحصول على الجزيئات الفيروسية لابد من أجراء العمليات اللازمة على المادة الفيروسية لاستنتاج خواصها الطبيعية والكيميائية.



خطوات تنقية الفيروس

أختيار الــعائل

Selection of Host Plant

أختيار الــسلالة الفيروسية

Selection of Virus Strain

أختيار طريقة التنقية المناسبة

Selection of Purification Method

لتنقية جزيئات فيروس ما يراد دراسة خواصه الطبيعية أو الكيميائية يلزم الأجراء الآتي:

1. أختيار الـ Selection of Host Plant عائل:

يجب قبل البدء في الدراسة أن يختار العائل الملائم للفيروس وذلك للحصول على العصير المحتوي على الفيروس (الجزيئات الفيروسية) التي ستجرى عليها عمليات التنقية.

اهم الشروط الواجب توفرها في العائل هي:

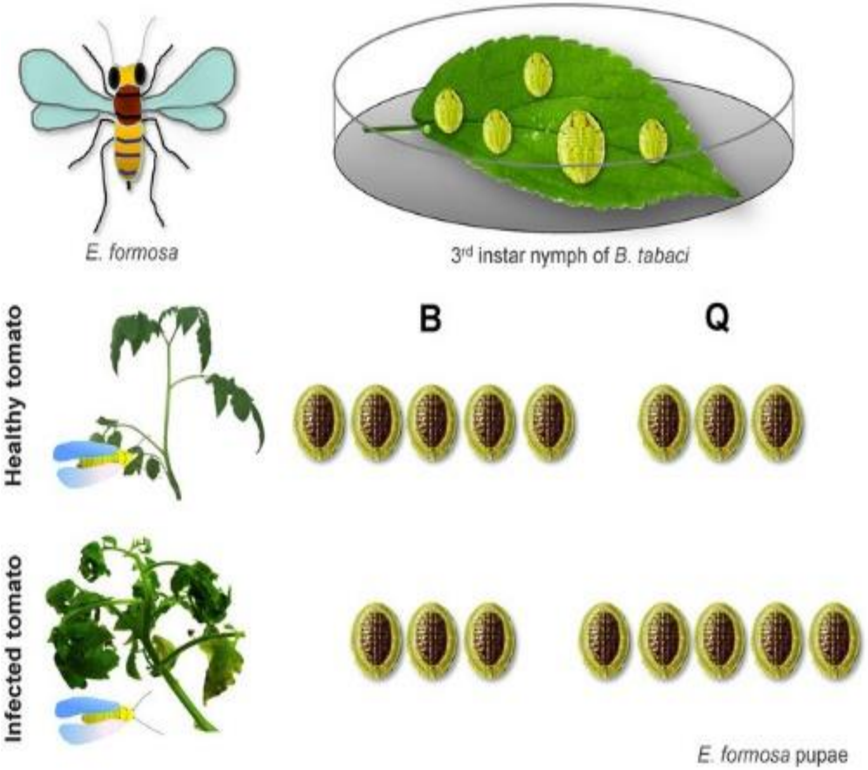
- **سهولة تكاثر النبات العائل.**
- **سهولة إجراء المعدوى فيه.**
- **وفرة المحصول الورقي.**

اهم الشروط الواجب توفرها في العائل هي:

- **زيادة محتوياته من العصير.**
- **سهولة أنتقال الفيروس داخل أنسجته المختلفة خصوصاً أنسجته الوعائية.**
- **خلوه من الصبغات القاتمة Dark pigments التي تنتشر في العصير النباتي والتي تكون كثيراً مرتبطة مع الجزيئات الفيروسية ويصعب استخلاصها.**
- **خلوه من المثبطات inhibitors التي تؤثر في نشاط الفيروس خاصة بعد خروجها واستخلاصها من الخلية.**

- خلوه بقدر الإمكان من البروتينات الغير نشطة ذات الجزئيات المتشابهة شكلا وحجما مع الجزيئات الفيروسية المراد استخلاصها مثل الريبوسومات.

- أن يحتوي على نوع واحد فقط من الفيروسات أي خالي من التلوث بفيروسات أخرى.

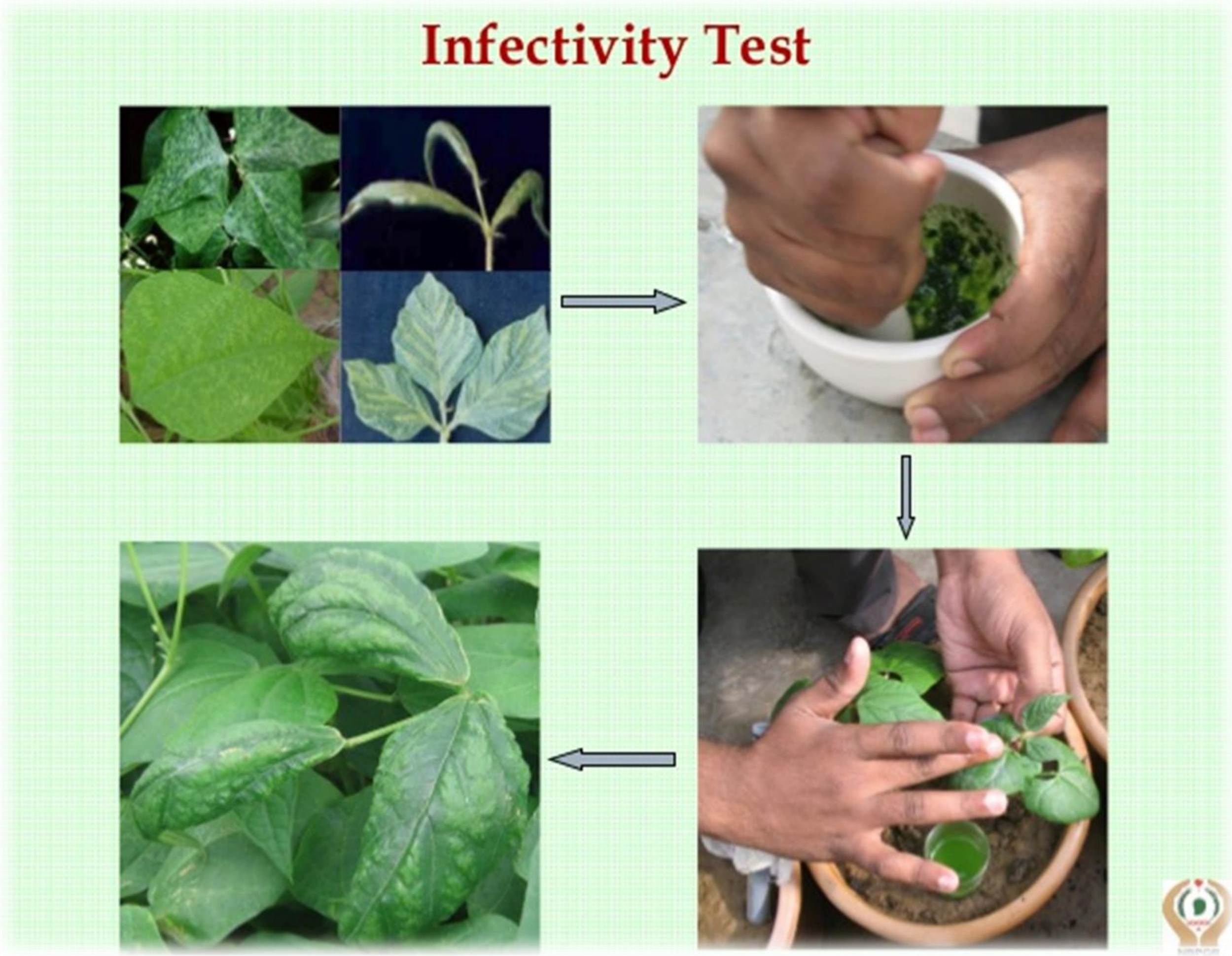


2. أختيار الـSelection of Virus Strainسلالة الفيروسية:

في حالة الفيروسات التي يكون لها أكثر من سلالة فيروسية يلزم قبل البدء في دراستها تحديد السلالة التي سيجرى عليها الدراسة.

يشترط في حالة اختيار السلالة الفيروسية توفر الشروط التالية:

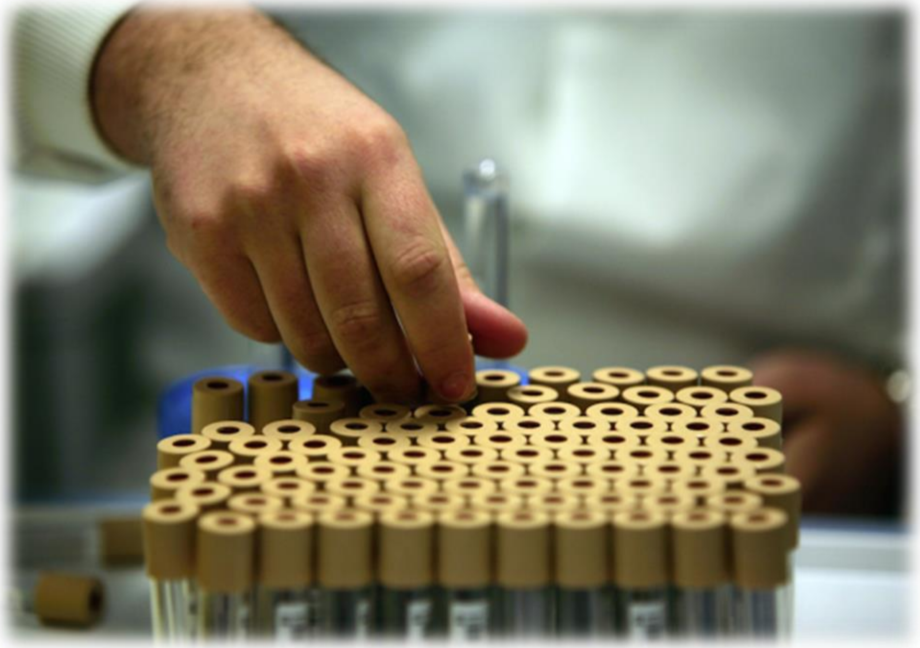
- **غزارة إنتاجها من الجزيئات الفيروسية أو بمعنى آخر سرعة تضاعفها داخل العائل النباتي حيث تختلف السلالات الفيروسية في سرعة زيادة تركيزها داخل الخلية.**
- **توفر الصفات التي تساعد على إجراء عمليات التنقية وعمليات الدارسة المختلفة عليها مثل مقاومتها للأنحلال وثبات خواصها الطبيعية.**
- **ثباتها الوراثي Geomatics stability والمقصود بذلك: قدرتها على الاحتفاظ بصفاتها الوراثية بدون تغير أو حدوث طفرات أثناء فترة التنقية والدراسة.**
- **عدم ارتباطها بالبروتينات النووية للعائل أو الريبوسومات أو بمعنى آخر سهولة تحضيرها حرة عن الجزيئات البروتينية التي لاتحتمل النشاط الفيروسي.**
- **قدرتها العالية على إصابة العوائل المختلفة وسرعة تكوينها لمظاهر الإصابة على العوائق التي تصيبها.**


Infectivity Test

agdia

3. أختيار طريقة Selection of Purification Method التنقية المناسبة:

لتنقية الفيروسات عدة طرق مختلفة تعتمد في أساسها على كيمياء البروتين للحصول على تحضير متجانس أي يحتوي على مكون واحد كل على حده فيه مكونة من جزيئات موحدة التركيب الكيميائي بإتباع طرق تفصل أما المواد الغريبة و أما جزيئات الفيروس من المخلوط أو تفصل المخلوط الى محتويات مختلفة والذي منها واحد أو أكثر يحتوي الفيروس.



تشمل عمليات التنقية للفيروسات المختلفة النقاط التالية:

- استخلاص العصير الخام المصاب المحتوي على الفيروس في نسيج العائل **Extraction**.
- ترويق العصير المصاب **Clarification**.
- الحصول على الفيروس **Purification**. (ترسي وتجميع الفيروس)

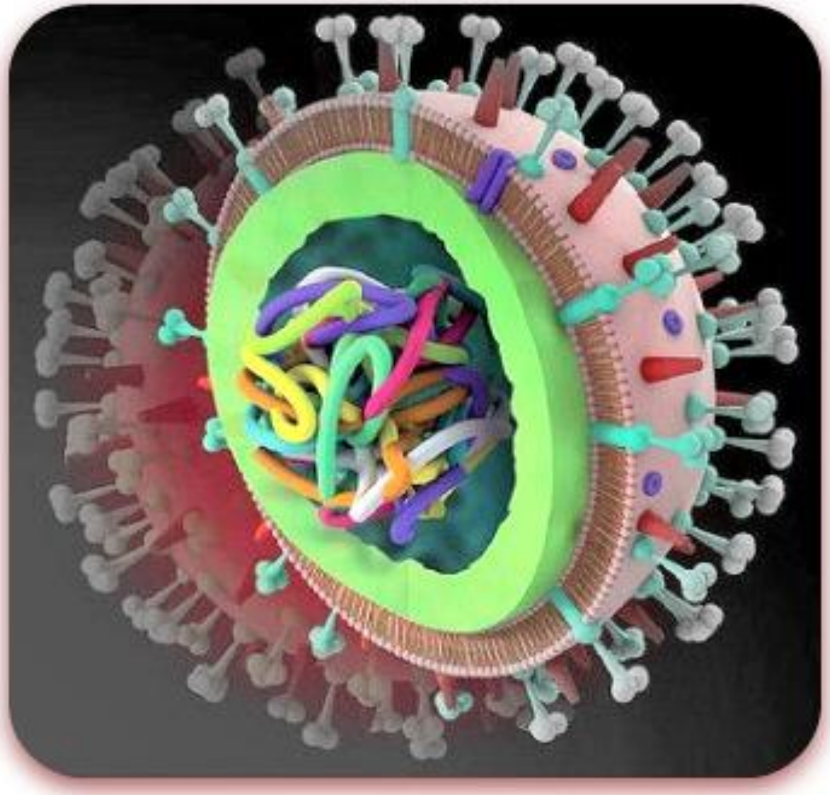
Purification

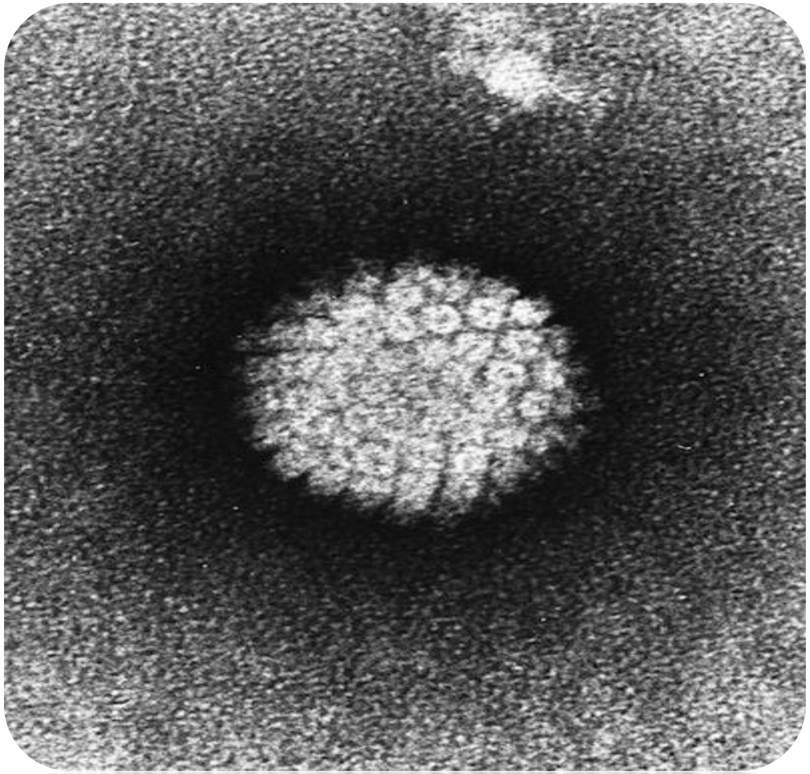
- **Extraction**
- **Clarification**
- **Purification**

هناك قواعد مهمة يجب مراعاتها عند تنقية بروتين ما (بروتين الفيروس):

- معرفة درجة ثبات البروتين (الفيروس) لدرجات الحرارة المختلفة ولدرجات ال pH المختلفة.

في أي من المذيبات (غير الماء) يمكن أن يترسب البروتين دون حدوث أي تغير في خواصه الطبيعية والكيميائية.





اولاً:

أستخلاص العصير:

1- يتم وزن 1 جم من الأوراق المصابة المثلجة ثم يضاف إليها 6 مل من المحلول المنظم وبذلك تكون النسبة (6:1).

2- تطحن الأوراق بالهاون.

يصفى العصير باستخدام الشاش المعقم ثم يوضع في أنبوبة الطرد المركزي ويراعي أن يكمل الحجم في أنبوبة الطرد الى 6 مل من المحلول المنظم.

ثانياً:

ترويق العصير:

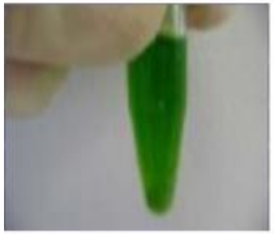
1- يتم عمل طرد مركزي للأنبوبة السابقة عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 5 دقائق.

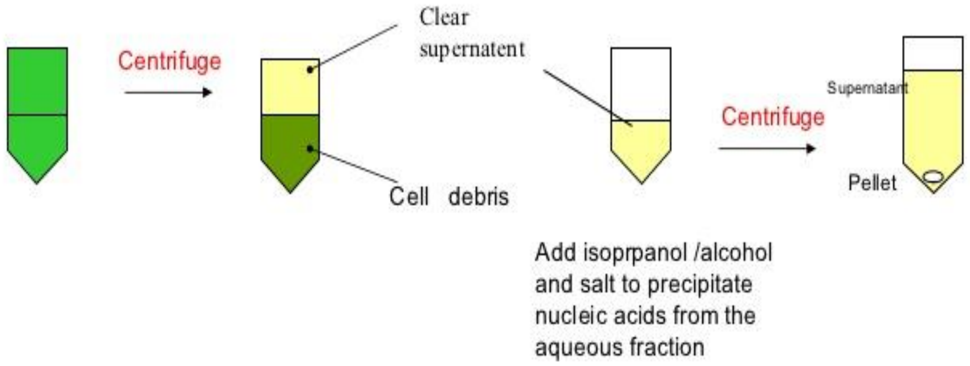
2- بإستخدام الماصة ينقل الرائق من الأنبوبة الى أنبوبة طرد أخرى ثم يضاف لها ½ مل من الكلوروفورم (مذيب عضوي) ثم يتم الرج الشديد لمدة 5 دقائق، ثم يعمل لها طرد مركزي عند 3000 لفة في الدقيقة لمدة 5 دقائق مباشرة بعد الرج.

يصفى العصير باستخدام الشاش المعقم ثم يوضع في أنبوبة الطرد المركزي ويراعي أن يكمل الحجم في أنبوبة الطرد الى 6 مل من المحلول المنظم.

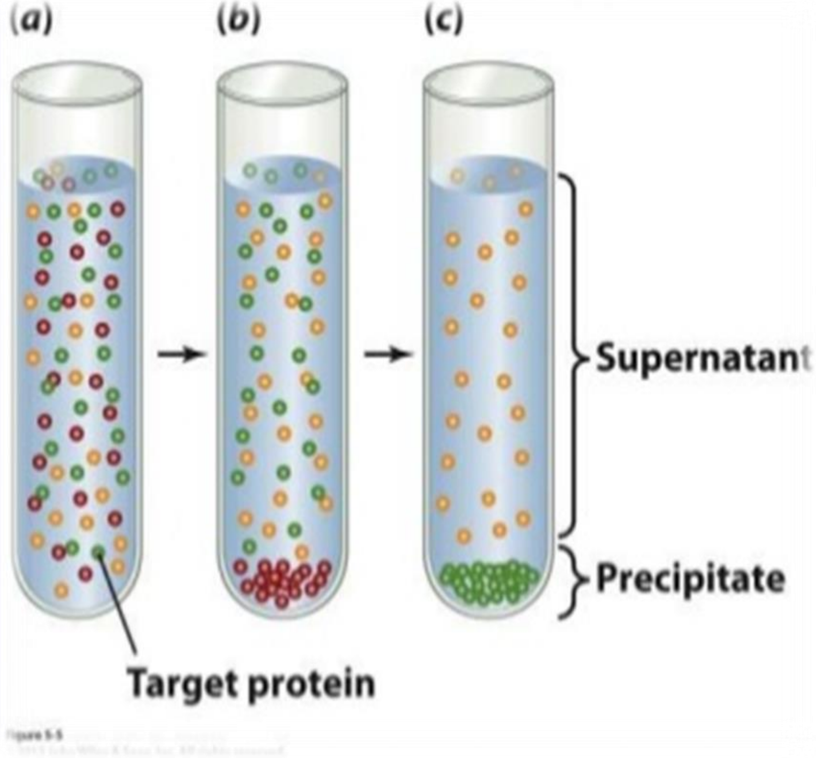
ثالثاً:ترسيب وتجميع الفيروس باستخدام أحد الطرق الكيميائية من أهمها:

Non-Phenol Chloroform based extraction of DNA for PCR detection of Citrus yellow mosaic virus and Citrus greening bacterium





طريقة التمليح (Salting Out)



ثالثاً:

ترسيب وتجميع الفيروس باستخدام أحد الطرق الكيميائية من أهمها:

طريقة التمليح (Salting Out)

أول من استخدم هذة الطريقة هو Stanly,1935 حيث تمكن من فصل فيروس موزيك الدخان على شكل بللوري باستخدام محلول كبريتات الأمونيوم 100% لما لها من تأثير طبيعي على البروتين حيث وجد أن الألبيومين يترسب عند تشبع 100%، أما الجلوبيولين فيترسب عند 50%، حيث يضاف الى الراشح المحتوي على الجزيئات الفيروسية ويقلب لمدة 15 دقيقة ثم يترك فيحدث ترسيب لجزيئات الفيروس، ثم يستبعد الراشح ويعلق الراسب في ماء ليكون محلول مرة أخرى. ثم تكرر عملية إضافة

محلول كبريتات الامونيوم فيتكرر ترسيب جزيئات الفيروس الذي يمكن إعادة تعليقة وترشيحه.

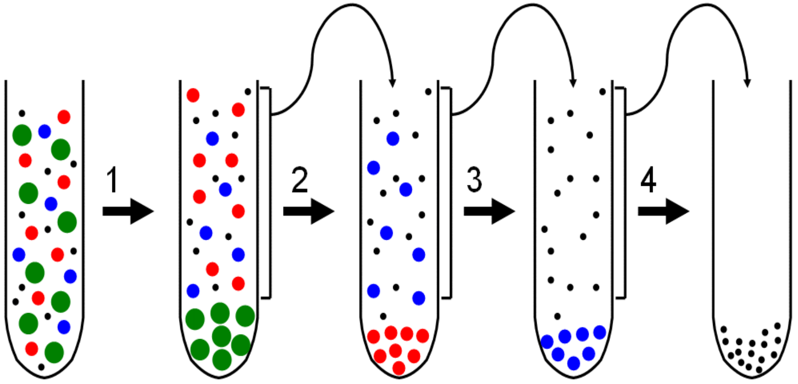
- **إضافة كبريتات الأمونيوم المشبعة:**

يتم تحضير كبريتات الأمونيوم المشبعة في حمام ثلجي.

1. بإستخدام الماصة ينقل الرائق من الأنبوبة السابقة في عملية الترويق الى أنبوبة طرد أخرى وعلى حسب حجم الرائق من العصير المصاب يضاف إلية نصف حجمه من كبريتات الأمونيوم المشبعة ثم تترك لمدة 24 ساعة في الثلاجة.
2. بعد هذة الفترة يتم عمل طرد مركزي عند 9000 لفة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة.
3. بعد ذلك يتم التخلص من الرائق أما الراسب فيضاف له المحلول المنظم بكمية معلومة ويترك فترة ساعة حتى يعاد انتشار جزيئات الفيروس مرة أخرى في المحلول بعد ادمصاصها على سطح كبريتات الامونيوم ثم يعمل طرد مركزي عند 6000 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة.

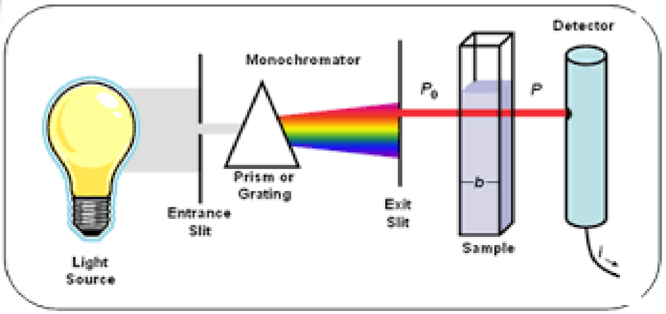
4. المحلول الرائق الناتج هو عبارة عن فيروس نقي + كمية من أملاح الكبريتات.

5. يتم التخلص منها عن طريق خاصية الأسموزية (الأنتشار خلال الأغشية الشبة منفذة في المحاليل باستخدام محلول منظم فوسفاتي ذو درجة pH متعادلة).

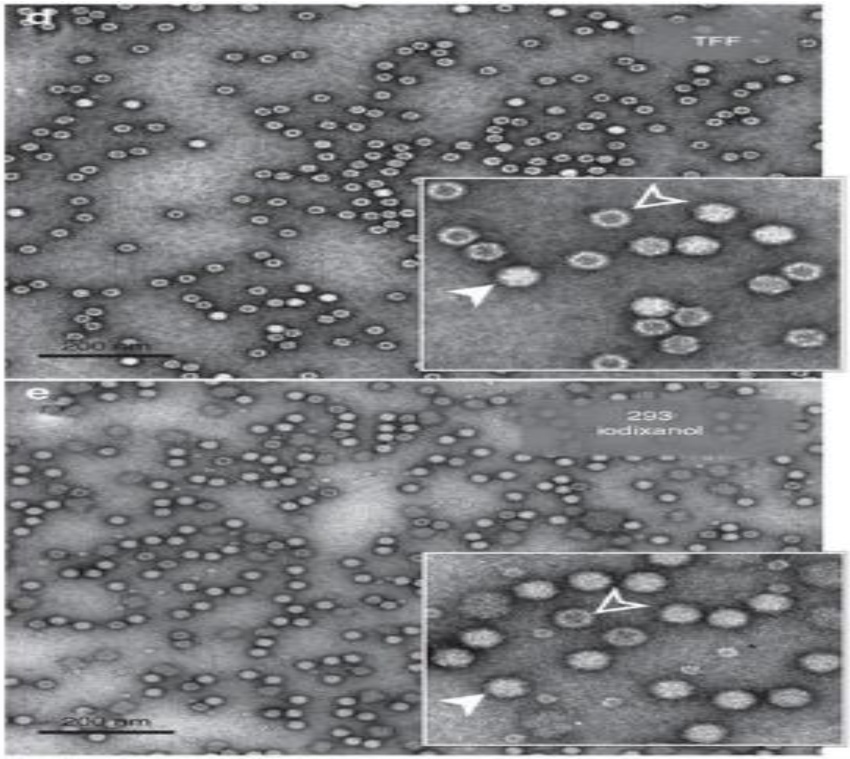


أختبار مدى كفاءة عملية التنقية في إصابة النبات:

يتم توفير العائل المناسب ثم يتم حقنة ميكانيكاً بالفيروس النقي ثم يوضع في الصوبة وتدون النتائج. هناك طرق طبيعية أخرى لترسيب جزيئات الفيروس وذلك بإستخدام أجهزة الطرد المركزي فائق السرعة والطرد المركزي ذو عمود الكثافة المتدرج من السكروز أو املاح السيزيوم.



DO NOT overfill the cuvette! (1mL max volume)



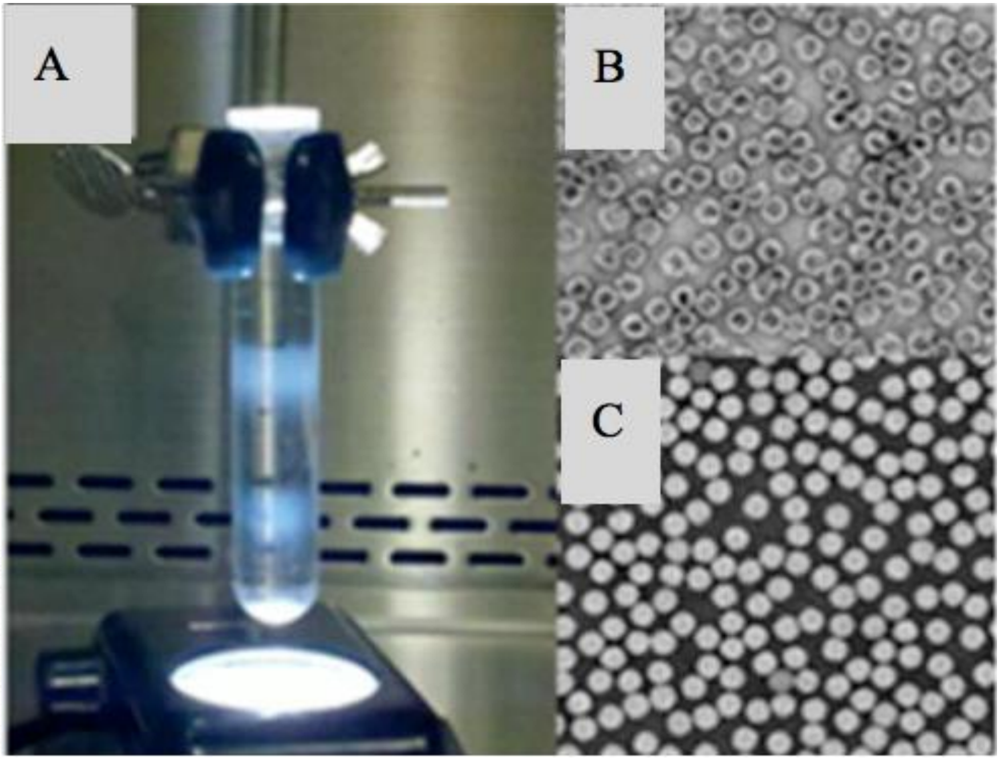


Figure1.(d,e) Electron microscopy. Negative stain images of rAAV9 purified (d) using the sodium citrate method, or (e) using discontinuous step gradient of iodixanol.8 The inserts in the lower right hand corner are close-up images of the virus capsids. Filled arrowheads point at the DNA-containing particles; empty arrowheads: at the empty capsids; black asterisk indicates proteasome; white asterisk indicates deformed AAV particle.

Figure 2. A) Two bands of virus in the tartrate gradient are visible when a small light source is placed beneath the centrifuge tube. B) The upper band contains empty capsids, which have intact VP0 whereas the lower band C) contains native infectious virus. As assayed by negative stain TEM (shown) and PAGE gel (data not shown).

نهاية المعمل السابع

☺