



معمل الفيروسات العام

“ 250 MIC ”

المعمل الخامس

نورة الكبيسي

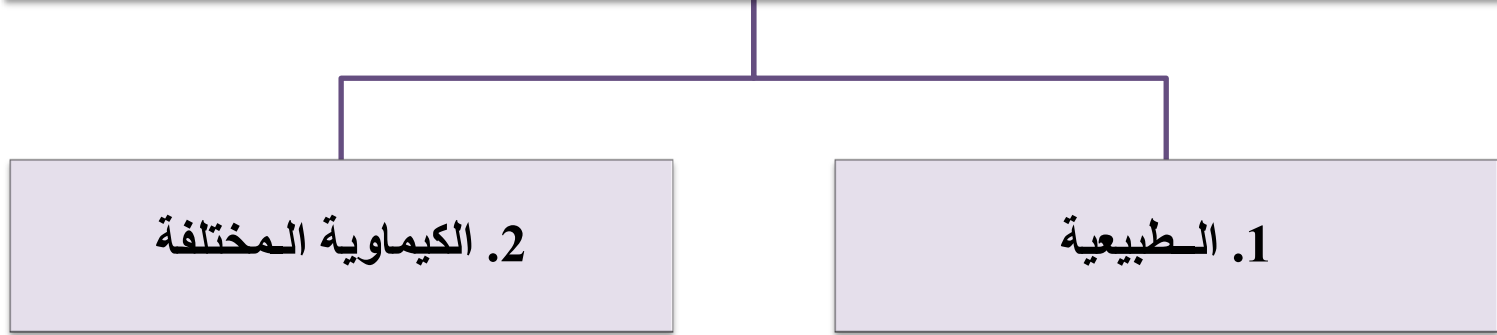
Nalkubaisi@ksu.edu.sa

2016

الخواص الطبيعية
للفيروس في العصير
المصاب



تختلف الفيروسات في العصير (*in vitro*) في درجة تحملها للعوامل

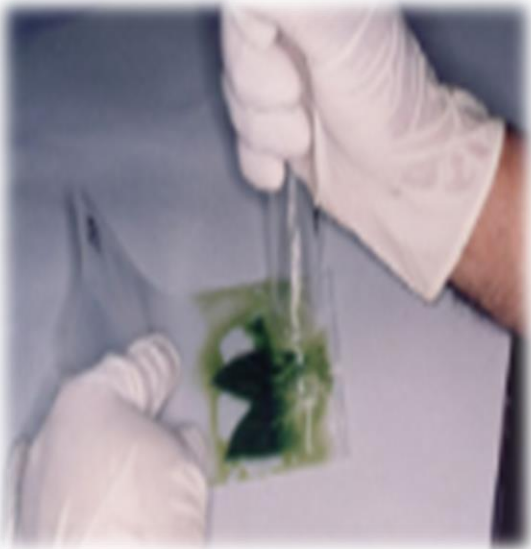


ملاحظة: قد يكون العامل الأساسي في عدم توافق التقديرات بالدقة الكافية هو :

الاختلاف في كمية جزيئات الفيروس الموجودة في العصير المصاب المحضر في:

1. الأوقات المختلفة.

2. العوائل المختلفة.





استغلت هذه الخلافات في

2. التفرقة بين الفيروسات في مخالطتها

1. تمييز الفيروسات عن بعضها

الحساسية للعوامل الطبيعية

1- أعلى نقطة تخفيف للعصير الفيروسي
المحتوي على جزيئات الفيروس .

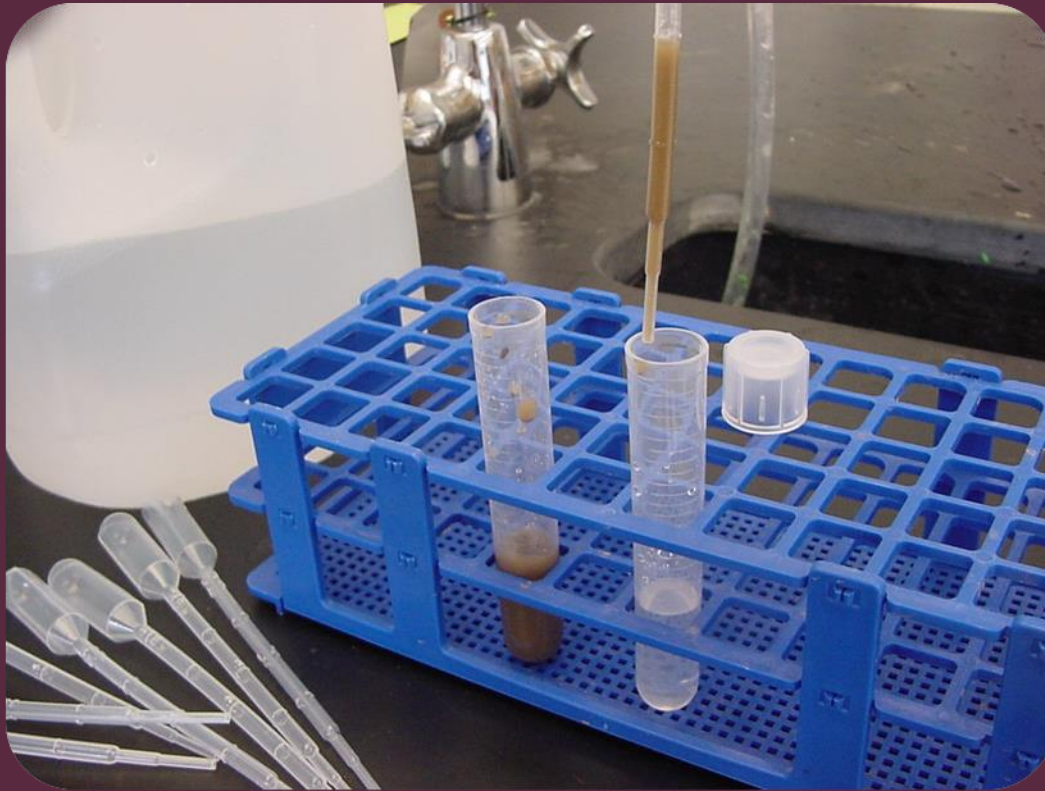
2- درجة الحرارة التي تؤثر على الفيروس
بالعصير و التي عندها تفقده القدرة على
العدوى.

3- تقدير اطول فترة زمنية الذي يظل عندها
العصير المصاب معديا عند حفظه في درجة
حرارة المعمل العادية .

التجربة الأولى

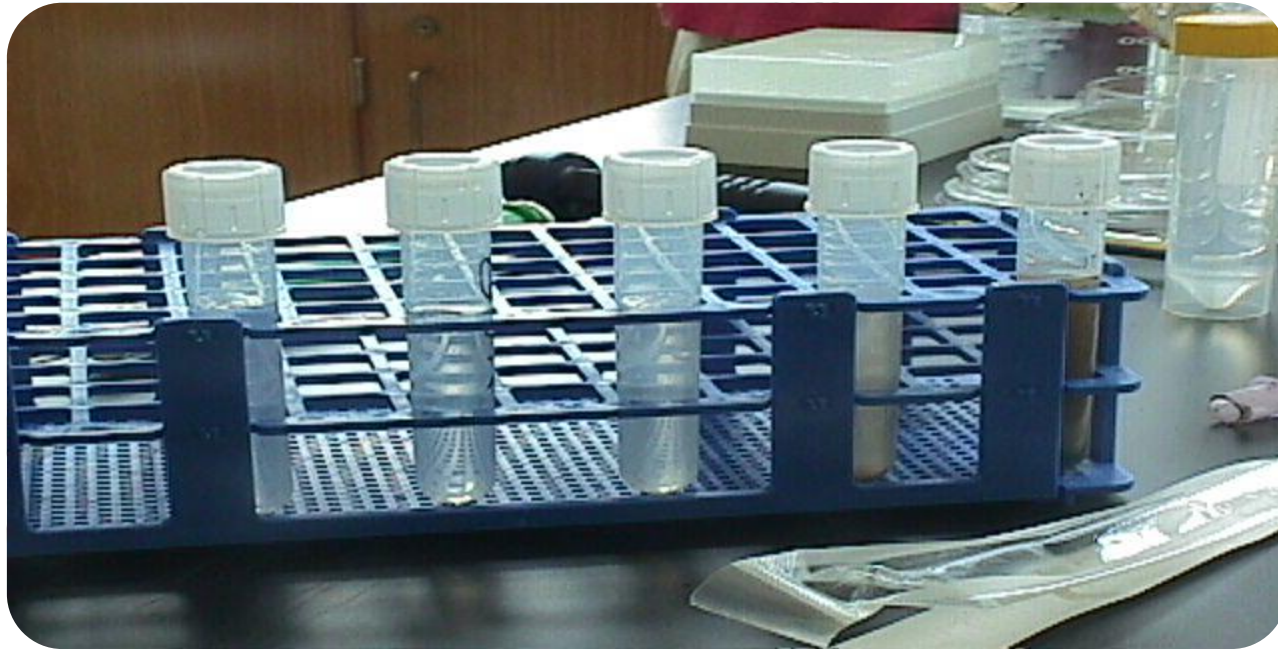
تقدير نقطة التخفيف النهائية

Determination of the dilution end point



تعريفها :

- هي درجة التخفيف النهائية للعصير الفيروسي (بالماء أو المحلول المنظم) الذي بعدة لا يعطي أي إصابة .
- حيث أن تركيز جزيئات الفيروس في العصير المصاب من العوامل المحددة للإصابة فعند درجة معينة من التخفيف بالماء أو المحلول المنظم تصبح الإصابة متعذرة و ذلك نتيجة لقلّة عدد جزيئات الفيروس التي تدخل



الخلية وتحدث العدوى.

الادوات المطلوبة

• أوراق مصابة بفيروس الدخان (TMV)

• عائل نباتي سليم (الداثوره).

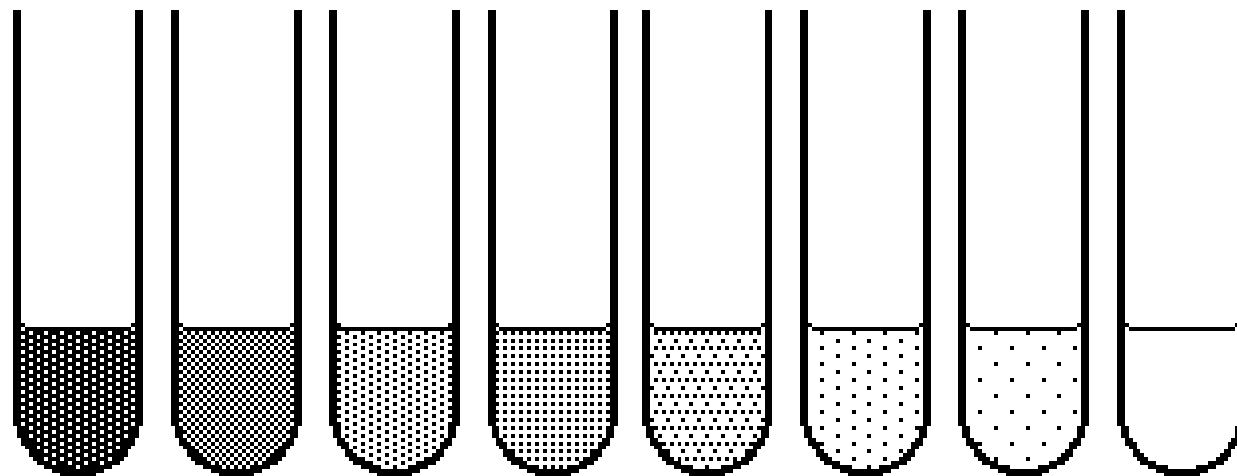
• هاون و يد هاون

• شاش

• أنابيب اختبار مدرجة

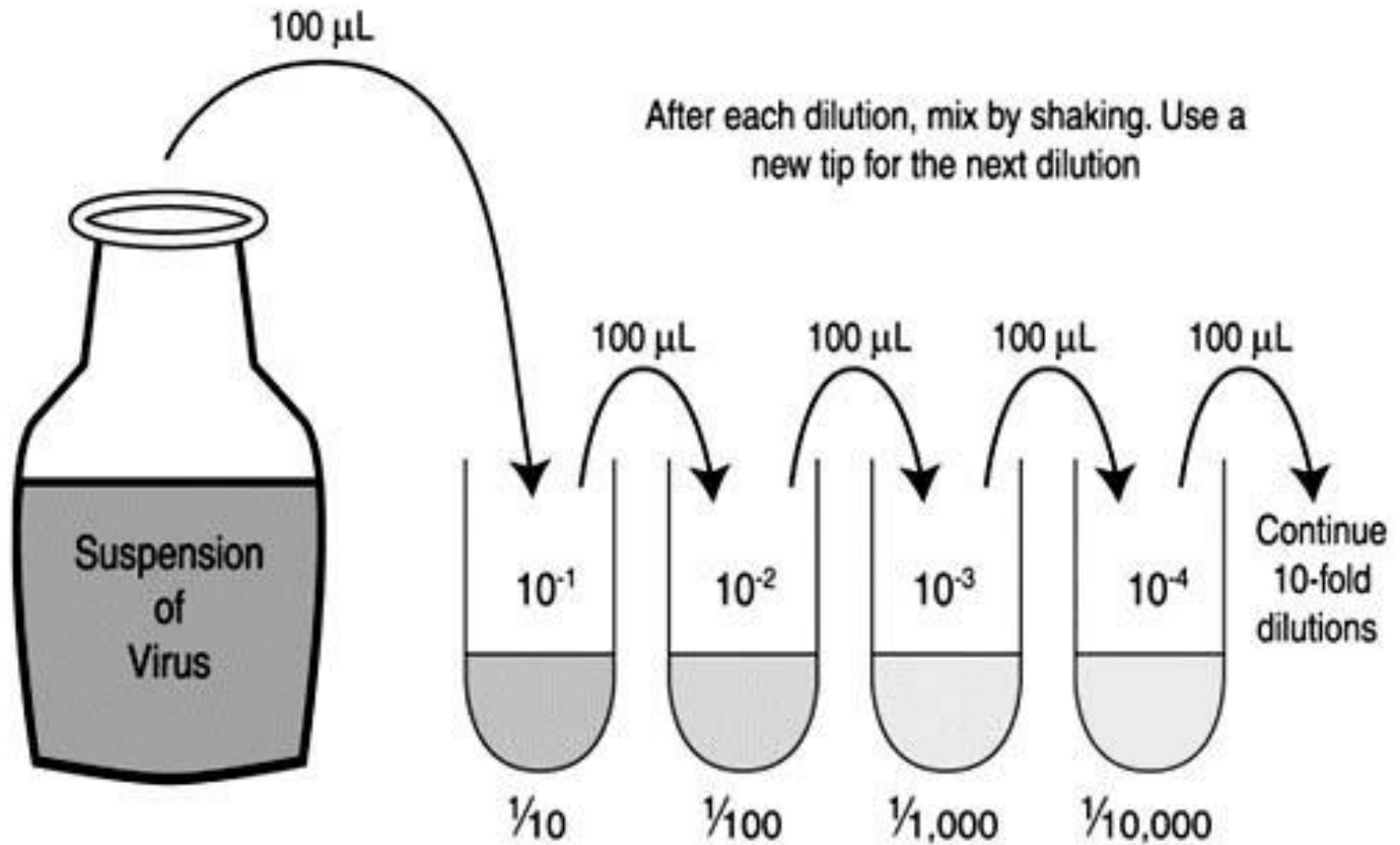
• ماصات

• محلول منظم pH =7



طريقة العمل

1. يستخلص العصير الفيروسي المصاب .
2. يتم عمل سلسلة من التخفيفات للعصير باستخدام المحلول pH المتعادل كما يلي :
 - ننقل 1 مل من العصير باستخدام الماصة الى أنبوبة مدرجة تحتوي على 9مل من المحلول المنظم وتخلط جيدا وبذلك يكون التخفيف (1:10).
 - بواسطة ماصة ثانية ننقل 1مل من الأنبوبة السابقة المخففة إلى أنبوبة تحتوي على 9مل من المحلول المنظم وبالتالي نحصل على التخفيف (100:1) وهكذا نستمر في عملية التخفيف حتى نصل الى التخفيف (1000:1).
 - نحقن النبات حقن ميكانيكي حيث كل تخفيف يحقن على ورقة من النبات العائل .
 - يوضع العائل النباتي المحقون في الصوبة .



النتيجة

- تظهر نقط محلية على الأوراق المحقونة ويختلف عددها باختلاف التخفيف .

تدون النتائج في جدول مع رسم بياني للتوضيح.

- اسم التجربة: عدد النقط المحلية في كل تخفيف

- اسم الفيروس : فيروس تبرقش التبغ

- اسم العائل : الداتوره

- تاريخ الحقن : 19 - 6 - 1437 هـ

- طريقة الحقن : ميكانيكي



جدول استعراض النتائج

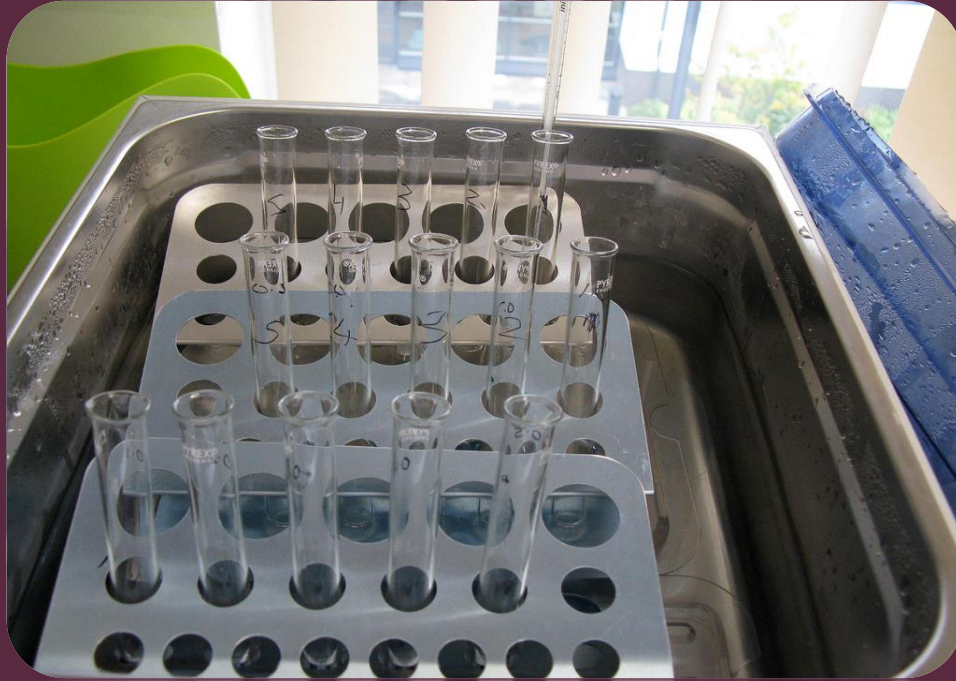
المتوسط	مجموع عدد النقط المحلية	عدد النقط المحلية 2	عدد النقط المحلية 1	التخفيف
12.5	25	15	10	1/10
6	12	7	5	1/100
4.5	9	3	6	1/1000
0	0	0	0	1/10000

نلاحظ من الجدول السابق ان نقطة التخفيف النهائية هي 1/1000

التجربة الثانية

تقدير درجة الحرارة الفارقة لتأثير الفيروس

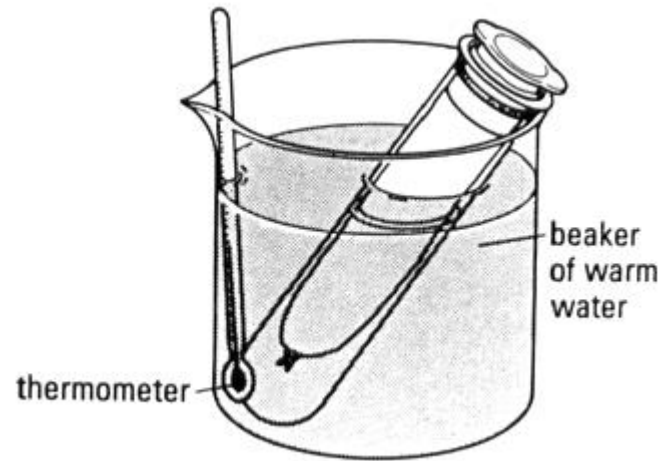
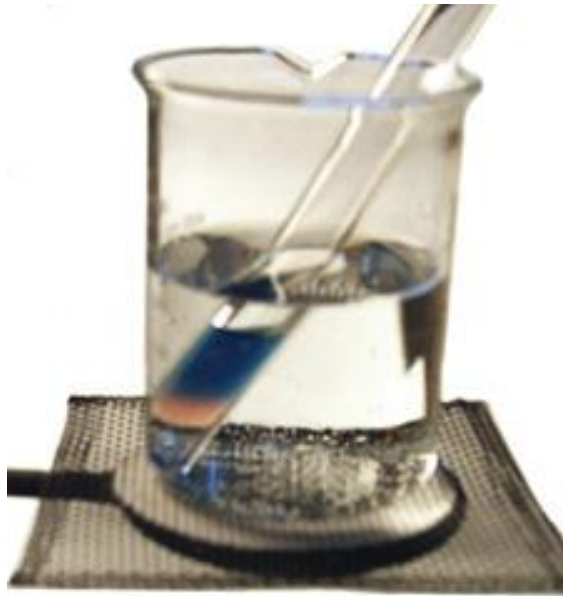
Thermal Inactivation Point



تعريفها :

- عبارة عن درجة الحرارة التي إذا ما تعرض لها الفيروس لمدة عشر دقائق فقد تأثيره على إحداث الإصابة .
- وقد لوحظ أن درجة الحرارة المثبطة لكثير من فيروسات النبات المنتقلة بواسطة الحقن الميكانيكي تقع عند

درجة حرارة بين (50-70) °م.



الادوات المطلوبة

• أوراق مصابة بفيروس الدخان (TMV)

• عائل نباتي سليم (الداثوره)

• هاون و يد هاون

• شاش

• أنابيب اختبار مدرجة

• ترمومترات

• حمام مائي



طريقة العمل

1. يتم تحضير عصير الفيروس كما سبق ذكره.
2. بواسطة الماصة يتم نقل 2 مل من العصير في 6 أنابيب اختبار .
3. تسخن الحمامات المائية وتضبط درجة الحرارة لها باستخدام الترمومتر عند (100-70-50) م°.
4. توضع كل أنبوبة في الحمام المائي ويجب ان يكون سطح العصير منخفض عن سطح الماء في الحمام المائي حتى لا يترك جزء من العصير غير معرض لنفس درجة الحرارة الذي عرض له باقي العصير في الحمام المائي .
5. تترك الأنابيب لمدة عشر دقائق وبعد هذا الزمن ترفع الأنابيب مباشرة وتبرد تحت تيار مائي حتى تستعمل لحقن العائل .
6. تحقن أوراق النباتات العائل (تحقن كل ورقة من أوراق النبات بمعاملة واحدة أو كل نبات) ثم توضع بالصوبة وتدون النتائج .

النتيجة

- تظهر نقط محلية على الأوراق المحقونة ويختلف عددها باختلاف درجة الحرارة. تدون النتائج في جدول مع رسم بياني للتوضيح.

- اسم التجربة: عدد النقط المحلية في كل درجة الحرارة

- اسم الفيروس : فيروس تبرقش التبغ

- اسم العائل : الداتوره

- تاريخ الحقن : 19 - 6 - 1437 هـ

- طريقة الحقن : ميكانيكي



جدول استعراض النتائج

المتوسط	مجموع عدد النقط المحلية	عدد النقط المحلية 2	عدد النقط المحلية 1	درجة الحرارة
12.5	25	15	10	50
0	0	0	0	70
4.5	9	3	6	100

نلاحظ من الجدول السابق ان 70 هي درجة الحرارة الفاقدة للفيروس نشاطه

التجربة الثالثة

تقدير مدة بقاء الفيروس نشاطاً

Determination of Longevity in Vitro



- تختلف الفيروسات اختلافا كبيرا في مدة بقائها نشطة وهي في العصير فبعضها يحتفظ بنشاطه في العصير إذا

- ما حفظ في المعمل لمدة عام أو اكثر بينما يفقد البعض القدرة على العدوى إذا ما حفظ لقليل من الساعات او

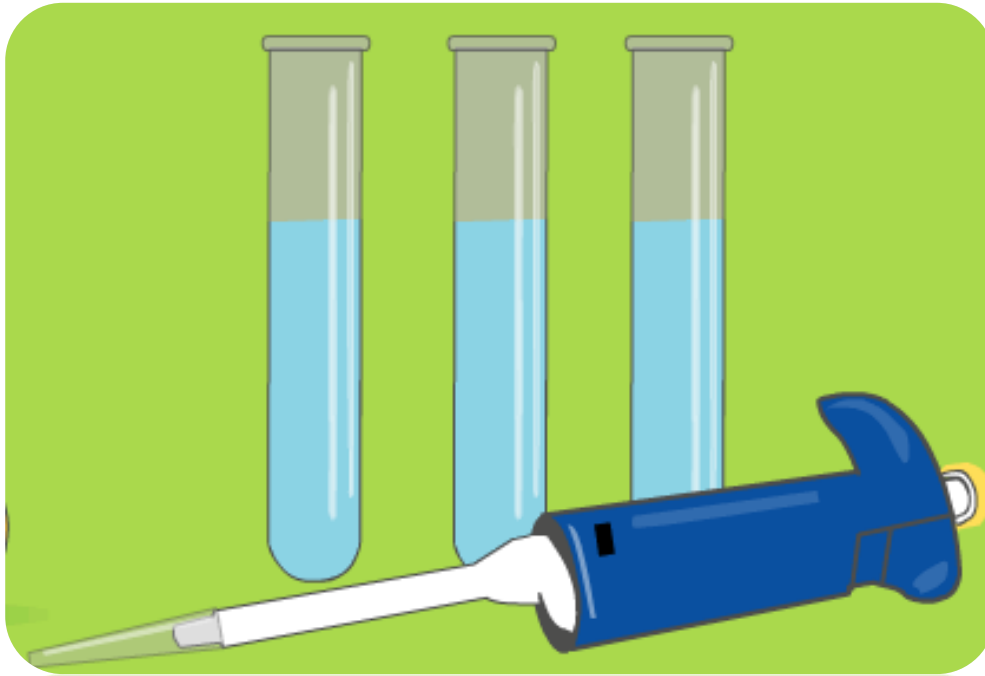
الدقائق وترجع هذه الخلافات الى حساسية الفيروس لعوامل الأوكسدة.



- يمكن إطالة مدة بقاء الفيروس نشطاً إذا ما اضيف له مواد حافظة.

الادوات المطلوبة

- أوراق مصابة بفيروس الدخان (TMV)



- عائل نباتي سليم (الداتوره)

- هاون و يد هاون

- شاش

- أنابيب اختبار مدرجة

- مواد حافظة مثل الكلورفورم وذلك لمنع نمو البكتيريا والفطريات.

طريقة العمل

1. يتم تحضير عصير الفيروس كما سبق ذكره.

2. يوضع العصير في أنبوبة ثم يضاف إليه بضع نقاط من الكلوروفورم.

3. بعد تحضير العصير مباشرة يحقن العائل من العصير المصاب، ثم بعد 24 ساعة، ثم بعد 72 ساعة، ثم بعد

120 ساعة.

4. يوضع العائل بالصوبة وتدون النتائج .



النتيجة

- وصف مظاهر الإصابة مع كتابة تاريخ فقدان الفيروس لتأثيره المعدي.

تدون النتائج في جدول مع رسم بياني للتوضيح.

المعاملة	مظاهر الإصابة
24 ساعة	
27 ساعة	
120 ساعة	

- اسم التجربة: مدة بقاء الفيروس نشطاً
- اسم الفيروس : فيروس تبرقش التبغ
- اسم العائل : الداتوره
- تاريخ الحقن : 19 - 6 - 1437 هـ
- طريقة الحقن : ميكانيكي

نهاية المعمل الخامس

