بررسیهائی در زمینه خالص کردن و تهیه آنتی‌سرم ویروس موزائیک تونجه در ایران

عزیزاله علیزاده و غلامحسین مصاحبی

در ایران اولین قدم بمنظور تهیه آنتی سرم ویروس‌های گیاهی با تصفیه ویروس موزائیک یونجه[4] برداشته شد. برای خالص کردن این ویروس ۱۰۰ گرم برگ شنبلیله آلوده با ۱۰۰ میلی‌لیتر با فرفسفات، یک گرم اسید آسکوربیک و ۳/۵ میلی لیتر محلول ۵۰% منوپتاسیم فسفات مخلوط و عصاره‌گیری شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر ازعصاره حاصل با ۱۰۰میلی‌لیتر محلول‌کلروفرم- بوتانل مخلوط وسپس بمدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول بدست آمده در اولتراسانتریفوژ بمدت سه ساعت با ۲۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل (ویروس) در بافرفسفات تعلیق گردید.

بمنظور تهیه آنتی‌سرم ویروس از روش ماتیرس (۵) پیروی گردید. بدین‌ترتیب که ویروس خالص‌شده‌در سه نوبت‌متوالی بفاصله یک هفته به ورید گوش خرگوش تزریق شد. یک هفته بعد از آخرین تزریق از ورید مشابه در گوش دیگر خون گیری شد. سرم گرفته شده با آزمون نشت در آگار اوختر‌لونی[5] مورد بررسی قرار گرفت.

مقدمه و هدف

روشهای سرولوژیکی یکی از متداولترین طریقه تشخیص ویروسها و اطمینان از عدم آلودگی گیاهان به بیماری های ویروسی میباشد. همچنین بعنوان یک متد کمی در عیارسنجی ویروسها سودمند می‌باشد.

اهمیت روشهای سرم شناسی در پزشکی موجب شد، مطالعات زیادی جهت روشن شدن مکانیسم فعل و انفعالات سرولوژیکی‌انجام شود.[۲] اما بایستی‌اذعان نمود که بسیاری از واکنشها و مسائل همچنان در پردهٔ ابهام باقی مانده است. روشهای

۱- این مقاله قسمتی از پژوهشهای پایان نامه فوق لیسانس مولف اول در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران میباشد.

۲- مربی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه جندی شاپور

۳- مربی گروه ترویج دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

4- Alfalfa mosaic virus(AMV)

5- Ouchterlony Agar Diffusion Test

سرم شناسی براساس فعل و انفعالات آنتی بادی[1] و آنتی ژن[2] استوار است. بعبارت دیگر هرگاه حیوانی بیک عامل بیماریزا از قبیل باکتری یا ویروس مبتلا شود، یکی از واکنشهای بدن نسبت به‌آلودگی، ظهور پروتئین‌هائی در گردش خون آن‌میباشد. این پروتئین ها میتوانند بطور اختصاصی با ویروس یا باکتری مربوطه ترکیب شوند. ترکیب[3] آنتی بادی و آنتی ژن در محیط خارج از بدن موجود زنده بطرق مختلفی قابل‌تشخیص‌میباشد. این‌روشها اصول مطالعات‌سرم شناسی‌گیاهی راتشکیل میدهند.

جهت تهیه آنتی سرم ویروس های گیاهی (سرم خون حاوی آنتی بادی ویروس)، عصارهٔ گیاه آلوده به ویروس را میتوان به حیوانی مانند خرگوش تزریق نمود. اما باید توجه داشت که استفاده از عصارهٔ خام معمولا" موجب ظهور آنتی بادیهای متفرقه ای خواهد شد که به مواد متشکله آنتی ژنهای میزبان مربوط می‌باشد و ناچار بنحوی از آنتی سرم تهیه شده باید حذف شوند. بعلاوه عصارهٔ خام گیاهی ممکنست در جانور آزمایشگاهی مسمومیت ایجاد نماید. لذا در مورد ویروسهائیکه پایداری کافی دارند بهتراست عصاره‌را قبل از تزریق به‌حیوان از مواد سمی و آنتی ژنهای متفرقه عاری ساخت. مطمئن ترین روش برای رفع اشکالات فوق آنست که ویروس قبل از تزریق بجانور حتی‌المقدور خالص شود.

تصفیهٔ ویروس ها نه تنها در بررسی های سرم شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد بلکه در تعیین مشخصات دیگر آنها (شکل، اندازه، وزن ملکولی و ترکیب شیمیائی) نیز بکار گرفته می‌شود. باوجود این در کارهای مختلف، میزان خلوص متفاوتی‌از ویروسها میتواند بکار رود. مثلا" جهت‌اندازه‌گیری مقداراسیدریبونوکلئیک (RNA) و یا پروتئین ویروس تعلیق فوق‌العاده خالصی‌باید موجود باشدولی برای تهیه آنتی سرم گاهی لازم نیست تا این حد ویروس خالص شود. معذالک مهمترین خاصیت حیاتی ویروسها که درعمل تصفیه نباید فراموش شود، قدرت آلوده کنندگی آنها می‌باشد.

در ایران تاکنون بمنظور بررسیهای سرم شناسی از آنتی سرمهائی استفاده میشد که قبلا" از منابع خارجی تهیه می‌گردید. بواسطهٔ استفادهٔ روزافزون از آنتی‌سرم ویروسهای گیاهی و اشکالات متعددی که در تهیه مداوم آنها پیش میآمد، مقرر گردید مطالعاتی در این زمینه آغاز شود. آنچه در این مقاله بیان می‌گردد اولین قدم درتهیه آنتی سرم ویروس موزائیک یونجه خالص شده در ایران میباشد.

1- Antibody 2- Antigen 3- Combination

بررسی نوشته ها

راس و لوفر (۴ و ۷) اولین کسانی بودند که ویروس موزائیک یونجه (AMV) را خالص نموده و دربارهٔ خواص فیزیکی و شیمیائی آن مطالعه کردند. وان اسلوگترن در سال ۱۹۵۴ با تزریق عصارهٔ آلودهٔ توتون به خرگوش، آنتی سرم ویروس را تهیه و خواص سرولوژیکی آنرا مورد مطالعه قرار داد. اخیرا" تعداد زیادی از دانشمندان با استفاده از روش استیر (کلروفرم ـ بوتانل) و ایجاد تغییراتی درآن موفق به خالص کردن و تهیه آنتی سرم ویروس موزائیک یونجه گردیده اند (۳).

مواد و روش کار

انتخاب و تشخیص ویروس. بوتهٔ یونجه آلوده به موزائیک از مزرعه دانشکده کشاورزی کرج جمع آوری و عصاره گیری شد، سپس بکمک پودر کاربوراندم در گلخانه روی گیاهان آزمون[1] مایه‌زنی گردید. ۲ تا ۳ روز بعد زخمهای موضعی[2] بقطر تقریبی یک میلیمتر دربرگهای اولیه لوبیای Bountiful ظاهر شد. ازاین زخمها برای تهیهٔ ایزولهٔ خالص از AMV و حذف آلودگی های احتمالی استفاده گردید. برای این منظور تعدادی از زخمها بکمک اسکالپل استریل از متن برگ جدا گردید و بطور مجزا روی بوته های جوان شنبلیلهٔ ورامین تلقیح شد. از شنبلیله های آلوده مایه زنی‌های برگشتی[3] برروی یونجه و سایرگیاهان مورد آزمون صورت گرفت. همراه با انجام این کارها، آزمایشهای سرولوژیکی لازم با آنتی سرمی که قبلا" از یک منبع خارجی (L. BOS) تهیه شده‌بود بعمل آمد و ثابت شد که ویروس مورد آزمایش ایزوله ای از AMV است (۱).

روش خالص کردن ویروس. ویروس موزائیک یونجه با استفاده از روش ژیلاسپی و بانکروفت (۲) خالص گردید. برای این کار ۱۰۰ گرم برگ شنبلیله آلوده با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافرفسفات (PH= 7.1,%1M)، یک گرم اسیداسکوربیک (Antioxidant) و ۳/۵ میلی‌لیتر محلول ۵۰% منوپتاسیم فسفات مخلوط و عصاره گیری شد. ۱۰۰ میلی‌لیترعصارهٔ گرفته شده با ۱۰۰ میلی‌لیترمحلول کلروفرم ـ بوتانل بمدت یکدقیقه مخلوط و آنگاه پنج دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. محلول روئی در اولتراسانتریفوژ مدل Spinco با روتور ۳۰ به مدت ۳ ساعت در ۲۷۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (ویروس خالص شده) در ۸ میلی‌لیتر بافرفسفات

1-Test plant 2- Local Lesions 3-Back inoculations

(PH = 7.1 , %1M) تعلیق گردید .

در این بررسی پس از طی هر مرحله عصاره ویروس روی لوبیا تلقیح شد و زخمهای موضعی حاصله شمارش گردید .

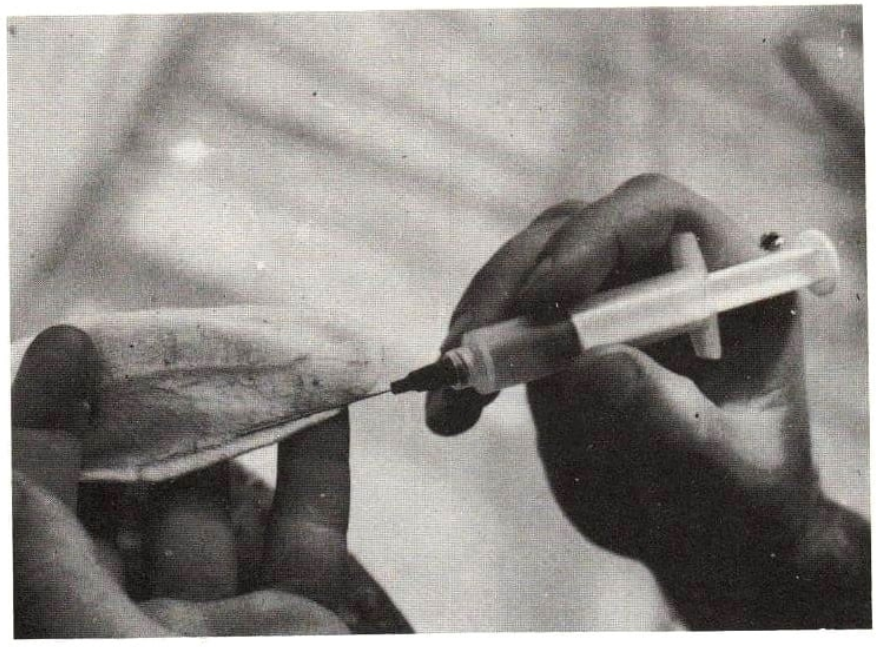
طرز تهیه آنتی سرم . برای تهیه آنتی سرم AMV از روش تزریق داخل وریدی استفاده شد (۵) . خرگوشهای مورد استفاده که درحدود ۲ الی ۲/۵ کیلوگرم وزن داشتند از موءسسه‌رازی‌دریافت شد . تزریق‌بکمک‌سرنگهای‌استریل۲/۵ میلی‌لیتر انجام گردید . تزریق در سه نوبت (بفاصله یکهفته) و در هر نوبت حدود ۱/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات حاوی ویروس در ورید گوش خرگوش تزریق شد . تزریق درورید پشت گوش و بفاصله ۳ الی ۵ سانتیمتر از لبهٔ‌عقبی انجام گردید (شکل۱) . تزریق اول در قسمت نزدیک به نوک گوش و بعدا" بتدریج با فاصلهٔ کمتری از قاعدهٔ آن صورت گرفت . محل تزریق‌قبل از موزدائی با پنبه‌آغشته به‌الکل ضدعفونی‌شد و برای جلوگیری از خون‌ریزی بمدت ۳ـ۴ دقیقه باپنبه آغشته به الکل با ملایمت نگهداری شد . جهت تهیه آنتی سرم ، یکهفته بعد از آخرین‌تزریق با استفاده از گزیلن ورید مشابه در گوش دیگر متورم و سپس بکمک اسکالپل استریل قطع گردید . پس از اخذ مقدارکافی خون ،بروش قبل از ادامهٔ‌خونریزی جلوگیری ومحل زخم‌پانسمان گردید . نمونهٔ خون درحرارت اطاق ، درون لوله باریک و عاری‌از رطوبت بمدت ۲/۵ ساعت نگهداری شد . برای تسریع در انعقاد ، میلهٔ شیشه ای استریلی را چند بار درون لوله فرو برده و سپس بمدت ۲۴ ساعت ،نمونه در حرارت ۴ـ۵ سانتیگراد قرار داده شد . سپس بکمک سرنگ استریل سرم خون از لخته جدا و جهت حذف گلبول‌های اضافی بمدت ۱۰ دقیقه در۲۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید . بعد از خاتمه عمل نمونه‌ها درون ظروف شیشه ای کوچکی به یخچال ۱۰ـدرجه سانتیگراد منتقل شدند . برای مقایسه در آزمایشات از سرم خرگوشی که مورد تزریق قرار نگرفته بود (سرم طبیعی) استفاده گردید .

روش سرولوژیکی . جهت انجام آزمایشهای سرولوژیکی از تکنیک نشت در آگار اوخترلونی استفاده گردید . برای این منظور ۸/۵ گرم نمک طعام را با ۸/۵ گرم یون آگار[1] در یک لیتر آب مقطر استریل ریخته و بمدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۲۰ درجه سانتیگراد استریل گردید . سپس ۶ گرم سدیم از ید[2] حل شده درمقدار کمی آبرا به محیط اضافه نموده آنگاه ۱۲ میلی‌لیتر از محیط تهیه شده بکمک سرنگ

1- Ion Agar

2- Sodium azide

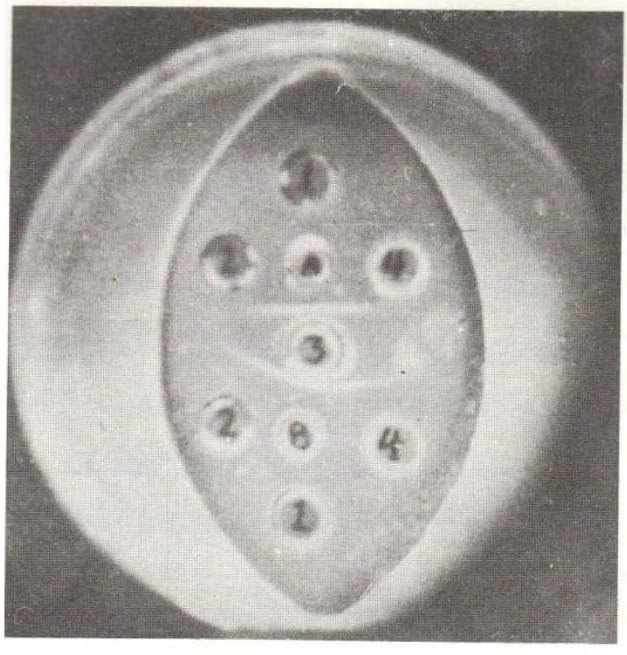
استریل درظرف پتری پلاستیکی ریخته به‌حالت سکون قرارداده شد تا منعقد گردد . چنانچه در این محیط عصارهٔ بوته آلوده به ویروس و آنتی سرم همان ویروس در حفرهٔ مجاور یکدیگرقرار گیرند ، بتدریج در محیط مجاور خود نفوذ می‌کنند . بعد از گذشت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در محل تلاقی آنها بعلت‌ترکیب دو ماده رسوب سفید هلالی شکل ظاهر می‌شود . در مواردیکه منظور بررسی واکنش چندین گیاه آلوده در مقابل یک آنتی‌سرم میباشد ، عصاره های مختلف را درون حفره های منظمی درروی محیط دایره ای بشعاع ۱/۲ سانتیمتر ریخته و آنتی سرم مربوطه در حفره مرکزی این دایره قرار داده می‌شود (شکل ۳) . در شاهد درون حفره مرکزی بجای آنتی سرم ویروسی از سرم معمولی خرگوش استفاده گردید .



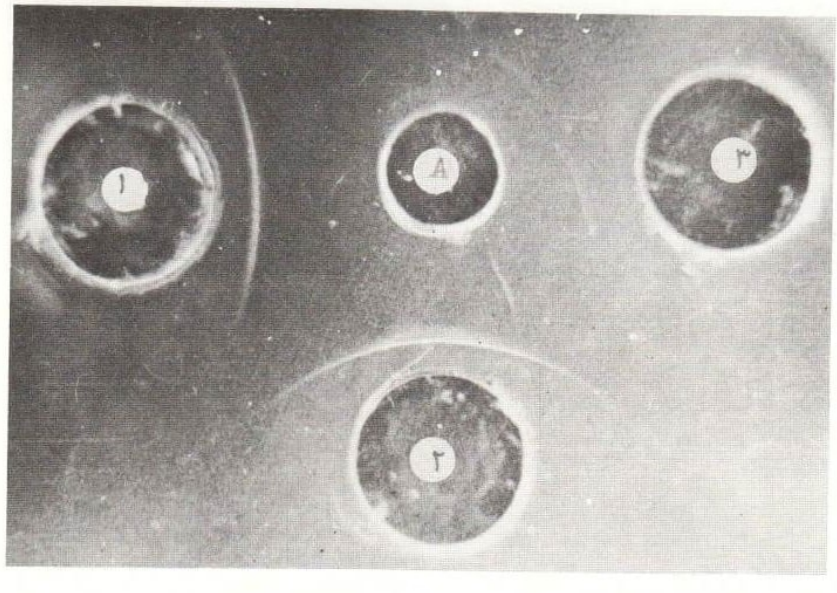
شکل ۱ــ طرز تزریق ویروس بداخل ورید گوش خرگوش همانطوریکه در عکس دیده می‌شود به موازات لبهٔ گوش انجام گردید .

نتیجه و بحث

آنتی سرم ویروس موزائیــک یونجه که به روش فوق تهیه شده بود ، طی چندین آزمایش با آنتی سرم AMV از منبع BOS مقایسه گردید . نتایج حاصله نشان داد که هر دو آنتی سرم در مقابل یونجه با آلودگی طبیعی و همچنین عصاره بوته های شنبلیله و نخودی که بطریقهٔ مکانیکی در گلخانه با این ویروس مایه‌زنی شد . واکنش کامل (بصورت هلال سفید رنگ) و تقریبا "یکسانی نشان‌دادند (شکل۲) . از طرفی بین سرم‌طبیعی خرگوش و عصاره بوته‌های یونجه و شنبلیلهٔ سالم وگیاهان



شکل ۲ــ آزمایش سرولوژیکی بروش نشت در آگار اخترلونی Ouchterlong agar diffusion جهت مقایسهٔ آنتی سرم تهیه شده در این آزمایش (A) و آنتی سرم موجود از منبع L. BOS (B) حفرهٔ (۱) عصارهٔ شنبلیلهٔ سالم ،حفرهٔ (۲) عصارهٔ یونجهٔ سالم ،حفره (۳) عصارهٔ شنبلیلهٔ آلودهٔ در حفره (۴) عصارهٔ نخود سالم ریخته شده است .



شکل ۳ــ نتیجهٔ آزمایش سرولوژیکی به طریقهٔ نشت در آگار. در حفرهٔ وسط (A) آنتی سرم ویروس موزائیک یونجه (نژاد AMVL) ، درحفرهٔ (۱) عصارهٔ شنبلیله آلوده به نژاد AMVL و در حفرهٔ (۲) شنبلیلهٔ آلوده به نژاد AMVS و در حفرهٔ (۳) عصارهٔ شنبلیله سالم ریخته شده است. برای کسب اطلاع بیشتر در مورد AMVL و AMVS به متن پایان نامه (۱) مراجعه شود.

آلوده به ویروس موزائیک خیار و ویروس موزائیک توتون عکس العملی مشاهده نگردید (۱) . بالاخره طی آزمایشات سرم شناسی روشن گردید که تعلیق های خالص شده ویروس عاری از آنتی ژنهای موجود در گیاه سالم می باشد (شکلهای ۲ و ۳) . همچنین نتایج آزمایشات نشان داد که ویروس در طول دوره خالص شدن ، خاصیت حیاتی و قدرت آلوده کنندگی خود را حفظ کرده است .

در حال حاضر می توان از این آنتی سرم جهت تشخیص آلودگی یونجه ، حبوبات و سایر گیاهان به ویروس موزائیک یونجه استفاده نمود .

تشکر

از آقای دکتر نورالدین هابیلی بخاطر مرور مقاله و ارائه پیشنهادات اصلاحی سپاسگزاری می شود .

منابع

1. ALIZADEH, A. (1975). M.SC. Thesis(in Farsi),Tehran Univ.
2. GILLASPIE, A.G. and BANCROFT, J.B.(1965). Properties of ribonucleic acid from alfalfa mosaic virus and related components. Virology 27,391-395.
3. HULL, R. (1969). Alfalfa mosaic virus. Advan. Virus Res. 15:363-428.
4. LAUFFER, M.A. and ROSS, A.F. (1960)Physical Properties of alfalfa mosaic virus. J.Am. Chem.Soec. 62,3296-3300.
5. MATTHEWS, R.E.F. (1954). Plant virus serology. Cambridge Univ. press, London.
6. MATTHEWS, R.E.F. (1970). Plant Virology, Academic press. London.
7. ROSS, A.F. (1947). Purification and Properties of alfalfa mosaic virus protein. Phytopath. 31,394-410.
8. STEERE, R.L. (1956). Purification and Properties of tobacco ringspot virus. Phytopath. 46,60-69.

A STUDY ON THE PURIFICATION AND PREPARATION OF ALFALFA MOSAIC VIRVS (AMV) ANTISERUM IN IRAN

By: A. Alizadeh and GH. Mossahebi

College of Agriculture, Jundi Shapur University, Ahwaz, Iran.
College of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran.

SUMMERY

The AMV was purified, using method similar to that described by Gillaspie Bencroft (1965). Each 100 g of infected fenugreek leaves was homogenized at 4 c^{o} with 100 ml. 0.01 M phosphate buffer pH 7.1, together with 1 g of ascorbic acid and 3.5 ml 50% K_2HpO_4 to readjust the pH to 7.1. After rehomogenizing with 100 ml of 1 : 1 chloroform-butanol for 1 min., the emulsion was broken by centrifugation for 5 min. at 5000 rpm. The aqueous phase was subjected to centrifugation at 27000 rpm. for 3 hours in R 30 rotor, and then pellet was suspended in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.1. The purified virus preparation was then injected into rabbit for the production of antiserum. Injections were made three times at 7-day intervals. Seven days after the last injection a small cut was made in the marginal vein of the ear near the base and allowed to bleed about 30 ml. The blood was collected in a tube and was left for about 3 hours to cool down at room temperature. The serum was removed and centrifuged at 2000 rpm for 10 min.

The prepared antisera were used in Ouchterlony agar gel diffusion test to compare with normal rabbit serum and AMV antisera obtained from Dr. L. Bos in Holland. Both homologous and heterologous antisera (obtained from Bos) reacted with AMV, but not with healthy plant antigens.