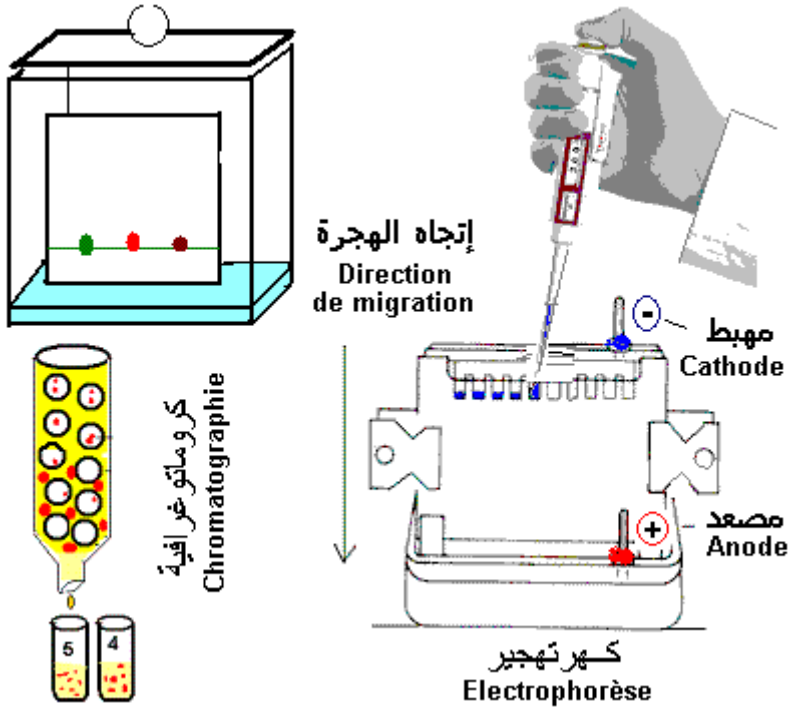


الخاصيات الجزيئية المعتمدة في تقنيات العزل و التحليل

من بين خاصيات الجزيئات المستغلة في تقنيات العزل و التحليل، يمكن أن نذكر:

- خاصية **القطبية** (Polarité) و التي تستغل في تقنيات الكروماتوغرافيا مثل الكروماتوغرافية فوق الورق (Chromatographie sur papier) وكروماتوغرافية الطبقة الرقيقة (Chromatographie sur couche mince, CCM). في غالب الأحيان، تبقى قطبية الجزيئات مرتبطة بعدد مجموعة الهيدروكسيل (OH) التي تدخل في بنيتها. على سبيل المثل، تعتبرالأحماض الأمينية كالسيرين (Ser) و التريونين (Thr) قطبية، ذات قابلية للتفاعل مع الماء، بينما تعتبر الأحماض الأمينية ذات السلسلة الكربونية الطويلة مثل اللوسين (Leu) و الإيزولوسين (Ile)، أحماضا نافرة للماء (هدروفوبية، hydrophobes).

- خاصية **التأين** (Ionicité) و التي تعطي تقنية كروماتوغرافية تدعى كروماتوغرافية التبادل الإيوني (Chromatographie d'échange ionique) و تقنية الكهرتهجير (Electrophorèse). ترتبط خاصية التأين بظهور الشحنات الكهربائية في وسط ذو رقم هيدروجيني (pH) معين.
- خاصية **الحجم** (Taille) أو **الوزن** (Poids) و التي تستغل في تقنيات كروماتوغرافية الفرز الحجمي (Chromatographie d'exclusion)، الطرد المركزي (Centrifugation) و التصفية من نوع ديناليز أو الديلزة (Dialyse). بالإمكان إضافة بعض تقنيات الكهرتهجير التي ترتكز على وزن الجزيئات بعد التيقن من غياب دور الشحنة الكهربائية و يحدث هذا في حالة الجزيئات التي تتميز بنفس الشحنة الكهربائية مثل الأحماض النووية (شحنة -) أو حالة الببروتينات المعالجة بالمنظف SDS الذي يكسبها شحنة كهربائية سالبة لا تفرق بين الجزيئات ليصبح فرز الواد يرتكز على الحجم، فقط.
- خاصية **الشكل** (Forme) و تؤدي إلى تقنية كروماتوغرافية الألفة (Chromatographie d'affinité). توجد تجاذبية التكامل الشكلي (الألفة) في العديد من أزواج الجزيئات مثل الأنزيم (Enzyme) و مثبطه التنافسي (Inhibiteur compétitif)، الجسم المضاد (Anticorps) ومولد المضاد (Antigène) و اللجند (Ligand) و مستقبله (Récepteur).

يلخص الجدول التالي أهم تقتيات عزل الجزيئات البيولوجية و الخصائص المعتمدة:

الخاصية الجزيئية Caractère moléculaire	تقنية العزل الموازية Techniques de séparation appropriées
القطبية (Polarité)	**- كروماتوغرافيا غاز-سائل** (gaz-liquide) **- كروماتوغرافيا سائل-سائل** (liquide-liquide) **- كروماتوغرافيا صلب-سائل** (solide-liquide)
التأين (Ionicité)	**- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني** (échange d'ions) **- كهرتهجير** (électrophorèse)
الحجم (Taille)	**- كروماتوغرافيا التغلغل أو الاقصاء** (exclusion) **- الترشيح أو الديناليز** (Dialyse)
الشكل (Forme)	**- الطرد المركزي عالي السرعة** (ultracentrifugation) **- كروماتوغرافيا الألفة** (affinité)

إستخلاص و تنقية DNA النبات باستغلال خاصيات ذوبان الجزيئات

Extraction et purification de l'DNA des plantes
par exploitation des critères de solubilité des molécules.

1. A l'aide d'un mortier et d'un pilon, broyer, environ 10 g du chou-fleur (*Brassica oleracea*).

2. Ajouter environ 2 g de sel (NaCl) dissout dans environ 10 ml d'eau tiède et continuer à broyer jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène.

On peut ajouter ensuite, un volume d'une cuillère à café de liquide vaisselle (détergent) afin de dissoudre les lipides et détruire les membranes des cellules.

1- بواسطة مدقة و مهراز، قم بطحن حوالي 10 غ من القرنبيط (*Brassica oleracea*)

2- أضف 2 غ من الملح (NaCl) مذاب في حوالي 10 مل من الماء الدافئ و تابع الطحن حتى الحصول على خليط في شكل عجينة.
من الممكن أن نضيف كذلك مقدار ملعقة من منظف لإذابة دهنيات غشاء الخلايا.

3. A l'aide d'un morceau de gaze (10 x 10 cm) presser le broyat et récupérer le filtrat (environ 2 ml) dans un tube à essai.
4. Ajouter au filtrat au moins 2 volumes d'éthanol (ou d'alcool à brûler). Agiter légèrement et laisser former la pelote blanche d'DNA
5. Recueillir l'DNA en l'enroulant autour d'une baguette de verre.
6. Sécher la pelote d'DNA à l'air libre pendant 10 minutes, environ afin que l'éthanol s'évapore.
7. Solubiliser l'DNA dans un tampon aqueux.

3- باستعمال قطعة من القماش المثقب (10 x 10 سم)، إضغط المسحوق بشدة و احتفظ بالصفى في أنبوب اختبار.
4- أضف إلى الصفى حجمين على الأقل من الإثانول (كحول الاحتراق) ثم حرك قليلا واترك تكون "كرة" من DNA.
5- قم بتجميع DNA بلفه حول عصا زجاجية

6- إترك كرة DNA تجف 10 دقائق حتى يتبخر الإثانول.
7- أذب DNA في منظم مائي.

La solution D'DNA (+ ARN) obtenue peut être analysée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1-2% (voir la partie relative aux techniques de séparation et d'analyses des molécules biochimiques) afin de

بالامكان القيام بعزل جزيئات DNA (+ ARN) التي توجد بمحلول الأحماض النووية المحصل عليه. يتم ذلك بواسطة الكهرتهجير فوق الأغاروز 1-2%. يظهر الكشف عن

faire une séparation selon la taille des molécules. La révélation des acides nucléiques par le bromure d'éthidium (BET), met en évidence deux bandes étalées sous forme de taches.

- La première tache de poids moléculaire élevé (supérieur à 3000 paires de bases) correspond à des fragments d'DNA.

- La deuxième tache, de poids moléculaire inférieur à 200 paires de bases, correspond à l'ARN.

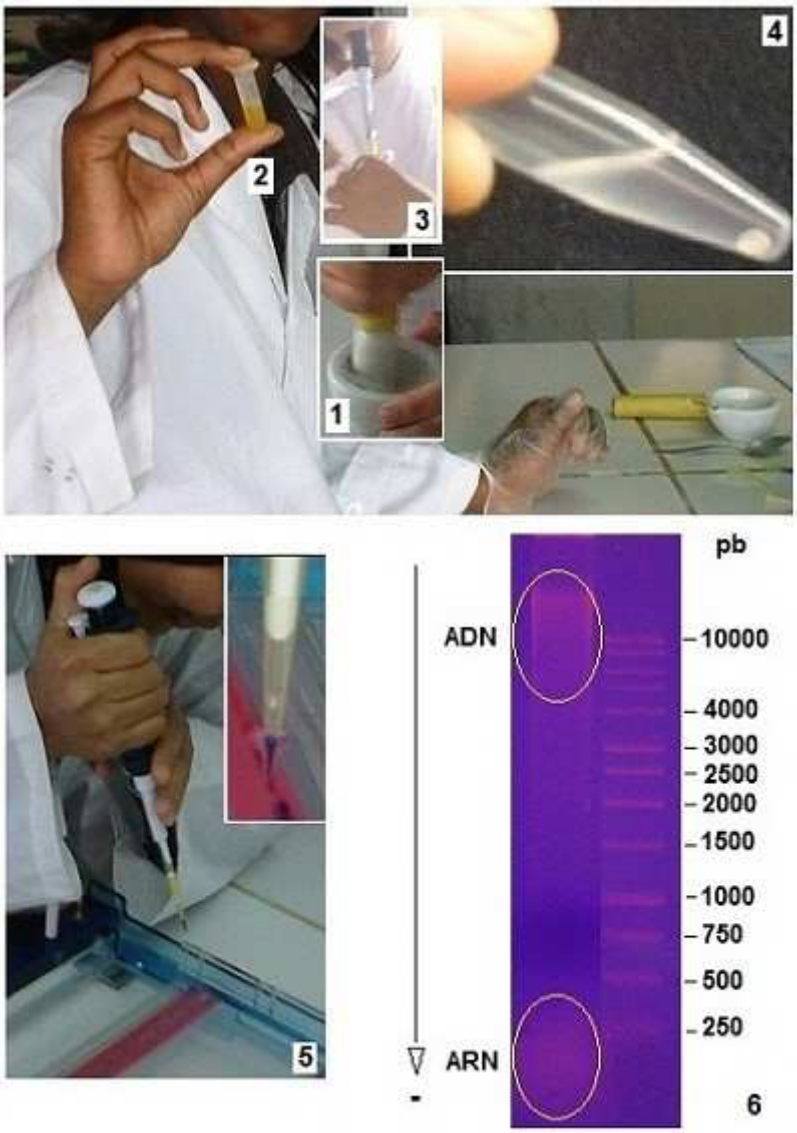
Un traitement préalable de la solution d'DNA (+ ARN) par la RNase pendant 30 minutes à 37℃, entraîne la disparition de la tache d'ARN.

الأحماض النووية بمادة برومور الإتيديوم (Bromure d'éthidium, BET) شريطين في شكل بقعتين:

- البقعة الأولى، ذات وزن مرتفع (يفوق 3000 زوج قاعدة)، تمثل أطراف DNA.
- البقعة الثانية بوزن منخفض (أقل من 200 زوج قاعدة)، تمثل ARN.

تفضي المعالجة المسبقة ب RNase لمحلول الأحماض النووية المحصل عليه (تحت 37℃ لمدة 30 دقيقة) إلى اختفاء بقعة ARN.

تلخص الصور التالية مراحل استخلاص و عزل DNA النبات.



إستخلاص، تنقية و تحليل DNA في المختبر

Extraction, purification et analyse de l'DNA au laboratoire

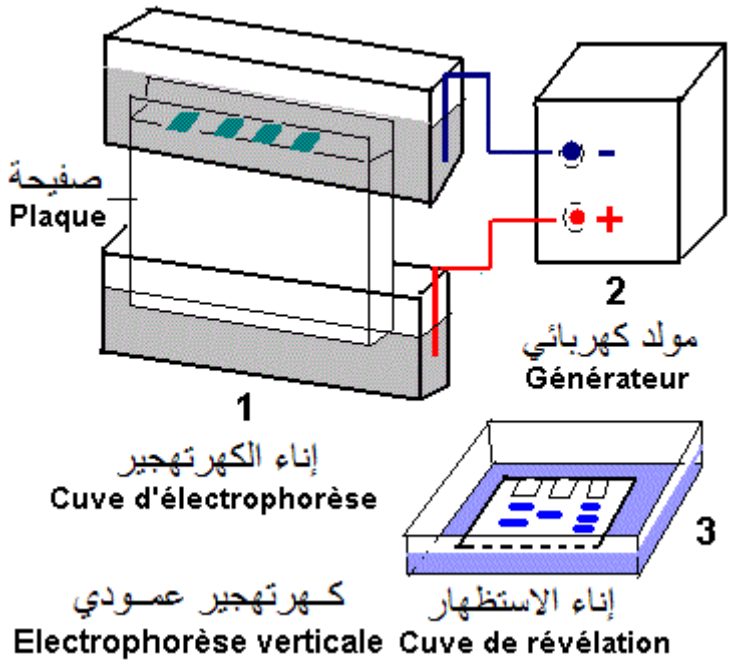
1. سحق المادة البيولوجية (Ecrasement du matériel biologique)، 2. إضافة منظم الاستخلاص (Addition du tampon d'extraction)، 3. إضافة خليط الكلوروفورم و الكحول (Addition du mélange chloroforme-alcool)، 4. ترسيب DNA و ARN (Précipitation de l'DNA et de l'ARN)، 5. تحليل DNA (+ ARN) بالكهرتهجير (Analyse de l'DNA par électrophorèse (+ARN))، 6. بقع DNA و ARN فوق هلام الأغاروز (Taches d'DNA et d'ARN sur gel d'agarose)

تقنية التهجير الكهربائي (كهرتهجير، Electrophorèse)

ترتكز تقنية التهجير الكهربائي (كهرتهجير، Electrophorèse) على استغلال خاصية التأين (Ionicité) التي تعطي شحنة كهربائية معينة للجزيئات في وسط ذو رقم هيدروجيني (pH) معين. بإمكان الكهرتهجير أن تعطي معلومات عن وزن الجزيئات في حالة تساوي الشحنات الكهربائية للمواد الخاضعة للعزل. في حالة اعتماد خاصيتين في الكهرتهجير، يمكن التدخل لاعطاء الأولوية لخاصية معينة على حساب الأخرى. يتم ذلك بمعالجة مسبقة للمستخلصات، مثل ربط كل البروتينات بالمنظف SDS سالب الشحنة الكهربائية (-) الذي يكسبهم نفس الشحنة ليتم فرزهم من خلال حجمهم، فقط.

بالامكان تقسيم تجارب الكهرتهجير إلى ثلاثة مراحل من بينها مرحلة استخلاص الجزيئات المراد عزلها و تحليلها من مصادر بيولوجية متنوعة و مرحلة تهيئ وسط العزل ثم انطلاق الكهرتهجير و المرحلة الثالثة التي تخص الاستظهار أوالتلوين (Révélation, coloration) قصد المعاينة النظرية لنواتج العزل.

تتطلب تقنية الكهرتهجير ثلاثة مستلزمات مهمة يلخصها الرسم التالي و هي:



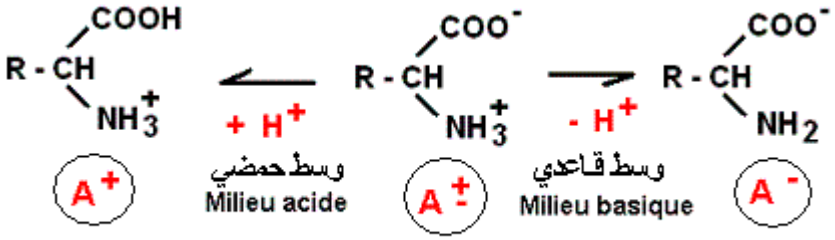
- وسط للهجرة (Support de migration) توضع فوقه المستخلصات و يغبأ داخل إناء الكهرتهجير (Cuve d'électrophorèse) بواسطة صفيحة من

الزجاج، مثلا. يتكون هذا الوسط من مواد مختلفة، مثل الورق و الأغاروز (Agarose) و النشا (Amidon) وعديد الأكريلميد (Polyacrylamide). يختلف وسط العزل حسب نوعية الجزيئات المراد فرزها بالكهرتهجير. عند ظهور التقنية، كان وسط العزل في شكل سائل أو ورق، ثم تطور بعدها إلى شكل هلام (Gel) من نشا (Amidon)، مستخلص من البطاطس، و أغاروز (Agarose) مستخلص من الطحالب، وعديد الأكريلميد (Polyacrylamide)، مزيج من مواد كيميائية تتحول من سائل إلى صلب. يمتاز كل وسط عن الآخر بدرجة الدقة في الفرز و سهولة الاستعمال. غالبا ما تستعمل مادة الأغاروز (تركيزات من 0,8% حتى 1,5%، تقريبا) في تركبة وسط عزل الأحماض النووية، زيادة عن مادة البولي أكريلميد الذي يستعمل بكثرة في حالة فرز البروتينات. عند ظهور تقنية عزل الأشباه الأنزيمية (isoenzymes, isozymes) بالكهرتهجير في 1960، استعمل بالخصوص النشا كوسط للعزل. اعتمادا على الوضعية العمودية أو الأفقية لوسط العزل، يقسم الكهرتهجير إلى كهرتهجير عمودي (Electrophorèse verticale) أو كهرتهجير أفقي (Electrophorèse horizontale)، بالتتالي.

- مولد كهربائي (Générateur de courant électrique) يزود وسط العزل بالتيار الكهربائي في صيغة جهد أو قوة للتيار بالفولت (Voltage) أو بصيغة أمبيرية (Ampérage) أي كمية التيار بالميليأمبير (Milliampere). تجرى عمليات العزل وفق قوة ثابتة بالفولت (مع ترك الأمبيرية تتغيير وفق درجة مقاومة وسط العزل لمرور التيار) أو حسب أمبيرية ثابتة (مع ترك قوة التيار تتغيير لضمان مرور عدد الميليأمبيرات المحددة).
- إناء للاستظهار (Cuve de révélation) يستعمل في نهاية العزل حيث يوضع فيه وسط العزل لاستظهار المواد المفرزة بالتلوين أو التفاعل مع مواد أخرى. تتغير طرق الاستظهار وفق نوع الجزيئات التي خضعت للعزل (بروتينات، احماض نووية، جزيئات مركبة).

كهرتهجير البروتينات

في حالة كهرتهجير البروتينات، يلعب الرقم الهيدروجيني (pH) للمحاليل دورا هاما في الكهرتهجير لكون البروتبنات مكونة من أحماض أمينية تحتوي بدورها على مجموعتي الأمين والكاربوكسيل (ثنائية القطب). و عليه فإن الأحماض الأمينية تعمل كحامض أو كقاعدة وتسمى أمفوتيرية (Amphotères) أي تفقد وتكتسب بروتونا (أنظر الرسم التالي).



تأين حمض أميني (Ionisation d'un acide aminé)

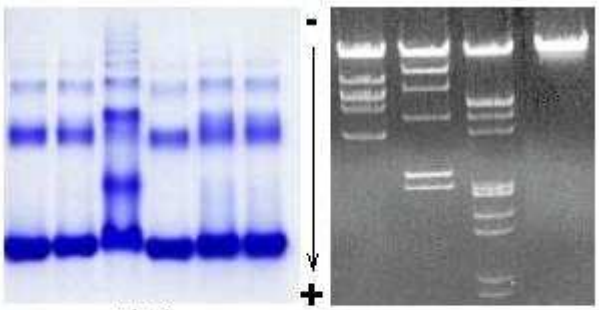
لهذا فانها اذا وضعت في محاليل حامضية قوية، تتقبل بروتونا وتشحن + (A^+) واذا وضعت في محاليل قاعدية قوية تفقد بروتونا وتشحن سالبة - (A^-)، أما في نقطة التعادل الكهربائي (Point isoélectrique, PI) أي pH الذي تتساوى فيه عدد (+) مع (-)، فمحصلة الشحنة الكهربائية تساوي صفر(وضعية $A^{\pm}$). لكل بروتين نقطة PI معينة. إذا وضع البروتين في وسط ذو pH أصغر من PI الذي يميزه، فسيشحن (+) ويهاجر نحو المهبط (Cathode, pôle -). أما إذا وضع في محلول ذو pH أكبرمن PI، فسيشحن (-) و يندفع إتجاه المصعد (Anode, pôle +).

كهرتهجير الأحماض النووية

إذا كانت جزيئات الفرز بالكهرتهجير من نوع الأحماض النووية، ستتجه كلها نحو المصعد (+) لكون شحنتها سالبة (-) نظرا لوجود الفوسفات في بنيتها. وعليه، يكون عزل الأحماض النووية وفق وزنها فقط، إلا أن هناك بعض الحالات يلعب فيها شكل الأحماض النووية، خاصة في البلاسميد، دورا لا يستهان به في عملية الفرز، حيث يتميز البلاسميد 'مرتخي' الشكل (Plasmide sous forme relâchée) بهجرة بطيئة مقارنة بهجرة البلاسميد 'عالي الالتفاف' (Plasmide superenroulé).

مرحلة الإستظهار (Révélation) **في الكهرتهجير.**

تختلف طرق استظهار (Révélation) مواد الفرز فوق وسط العزل حسب أنواع الجزيئات التي خضعت للكهرتهجير. فيما يخص البروتينات، فإنها غالبا تلون بالملون أزق كوماسي (Bleu de coomassie) الذي يرتبط خصيصا بكل ما هو بروتين. تستظهر الأحماض النووية فوق وسط العزل بإضافة المادة الكيميائية بروميد الإيتيديوم (Bromure d’éthidium) التي ترتبط معها ويكتشف المعقد عند تسليط أشعة بنفسجية (UV) على وسط العزل. تظهر للعين في الظلام أطراف الحمض النووي. تعطي الصور التالية توضيحات إيضافية في استظهار البروتينات والأحماض النووية بعد نهاية عزلهم بتقنية الكهرتهجير.



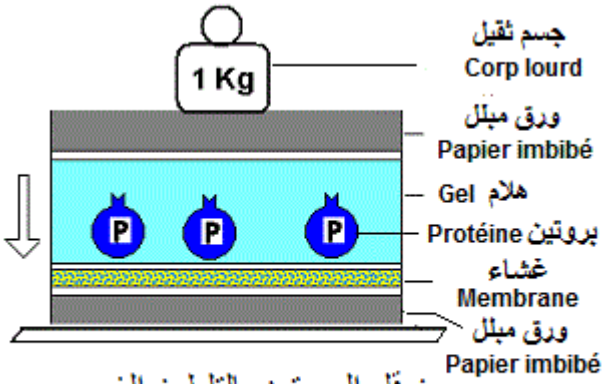
كـهرتهجير. إستظهار المواد

Electrophorèse. Révélation des produits

إذا كان البروتين يتميز بنشاط أنزيمي معين، يصبح ممكنا استظهاره بإضافة مواد الأساس (Substrats) فوق وسط العزل، حتى تعطي نواتج واضحة للعين. تدخل هذه الطريقة للاستظهار في ميدان الكشف عن الأشباه الأنزيمية (Révélation des isoenzymes). مهما أن العزل بالكهرباء يقترن بفرز للحرارة (تسخين) يتطلب تحليل الأنزيمات بالكهرتهجير الاشتغال في ظروف خاصة تتمثل في التبريد المستمر أثناء عملية العزل حفاظا على البنية الوظيفية للأنزيم كشرط أساسي للاستظهار بإضافة مواد التفاعل. تسمى طريقة الفرز هذه بالكهرتهجير في ظروف غير ماسخة (Eléctrophorèse dans des conditions non dénaturantes). تستعمل هذه الطريقة في كشف الأشباه الأنزيمية (Isoenzymes, isozymes) التي تستعمل في تقييم التنوع الوراثي لأنواع الكائنات الحية.

تجدر الإشارة إلى أن هناك طرق أخرى لاستظهار مواد العزل في كهرتهجير البروتينات و الأحماض النووية التي تتميز بخاصيات معينة، مثل توفر البروتين على محدد مستضادي (Déterminant antigénique) أو حمل DNA لمتتاليات نكيلوتيدية (Séquences nucléotidiques) معينة تشير إل مورث ما. في هذه الحالات، يصبح إلزاميا نقل محتويات وسط العزل (بروتينات أو أحماض نووية) إلى وسط من نوع آخر للتمكن من اكتشافهم. مثلا، من أجل اكتشاف البروتينات بالأجسام المضادة (Anticorps)، يتم نقلهم من الهلام (Gel) إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز (Nitrocellulose).

يتم وضع هذا الغشاء فوق الهلام، ووضع مجموعة من طبقات أوراق الترشيح فوق ذلك (أنظر الرسم). ثم يتم وضع الطبقات كلها في محلول يقوم بالتنقل إلى الأعلى عبر الأوراق، جالباً البروتينات معه إلى الغشاء. تسمى هذه الطريقة في الاستظهار ب 'التلطيخ الغربي' (بالإنجليزية: Western blotting).

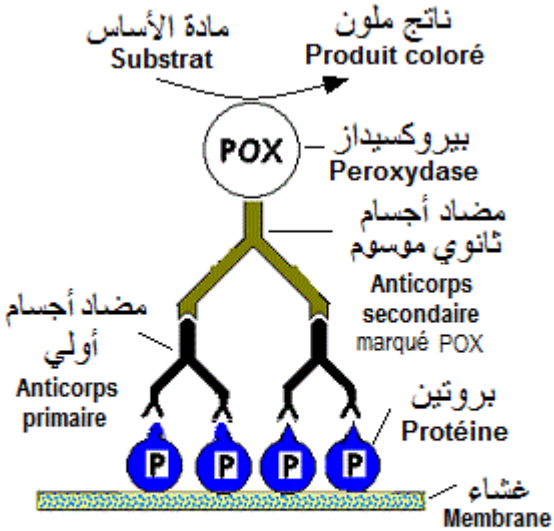


نـقل البروتين بالتلطيخ الغربي
Transfert des protéines par 'Western blotting'

يتم الكشف عن البروتينات بواسطة مضاد للأجسام مرتبط بمضاد أجسام ثانوي موسوم بأنزيم معين كالبيروكسيداز (Peroxydase, POX) الذي يفرز ناتج ملون يشير إلى موقع هجرة البروتين.

يتم الكشف عن البروتينات بواسطة مضاد للأجسام مرتبط بمضاد أجسام ثانوي موسوم بأنزيم معين كالبيروكسيداز (Peroxydase, POX) الذي يفرز ناتج ملون يشير إلى موقع هجرة البروتين.

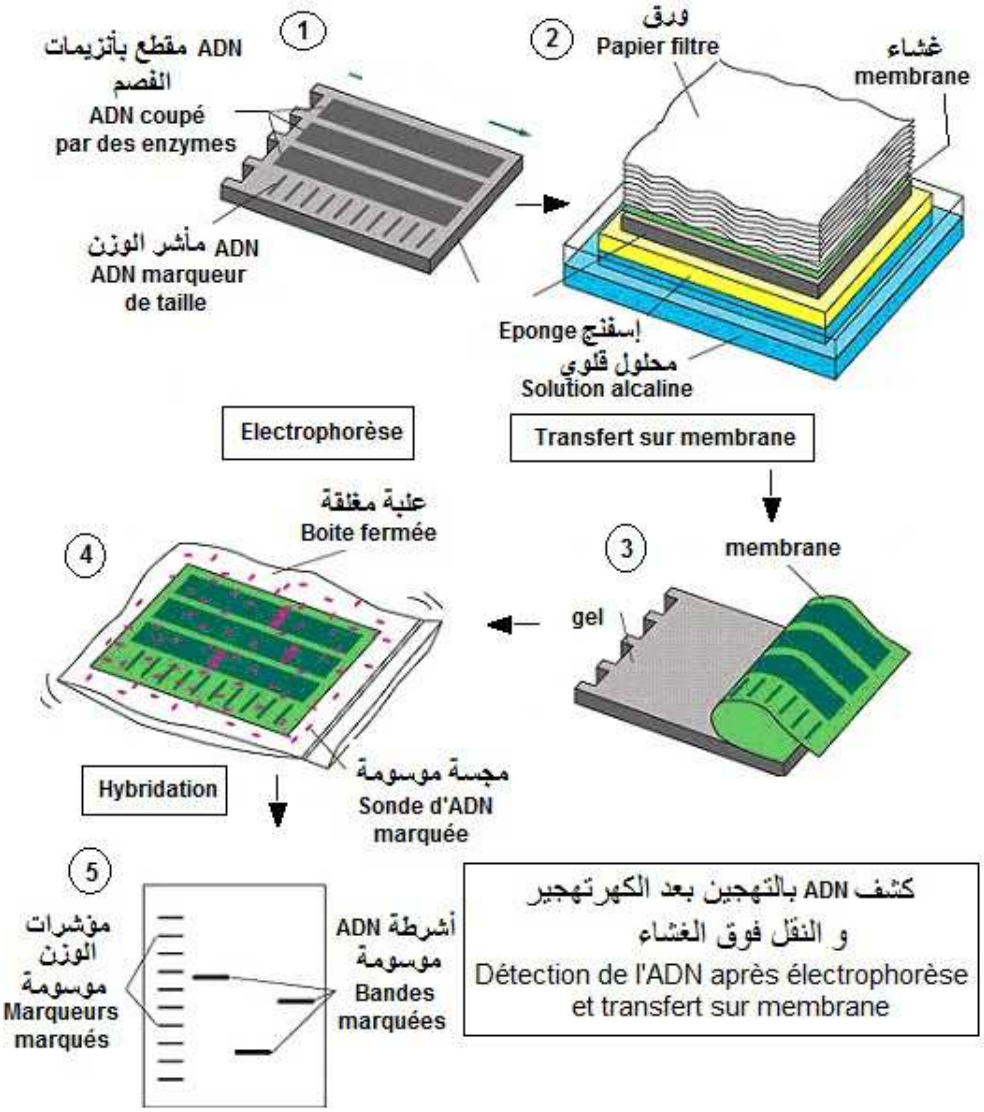
عندما يتعلق الأمر بنقل الأحماض النووية من الهلام إلى غشاء النيتروسللوز (Nitrocellulose)، تسمى العملية ب 'التلطيخ الجنوبي' (Southern blotting). تستعمل هذه التقنية لاستظهار أطراف الأحماض النووية بمجسات (Sondes) معينة موسومة.



كشف للبروتينات بمضادات أجسام خصوصية
Immunodétection des protéines par des anticorps spécifiques

في حالة الأحماض النووية، من الممكن استغلال تكامل القواعد الأزوتية لواتسون وكريك (A مع T أو A مع U و C مع G) في الكشف عن الأطراف المتكاملة التي سبق عزلها بالكهرتهجير و نقلها فوق ورقة النيتروسيليوز. تسمى هذه الطريقة في

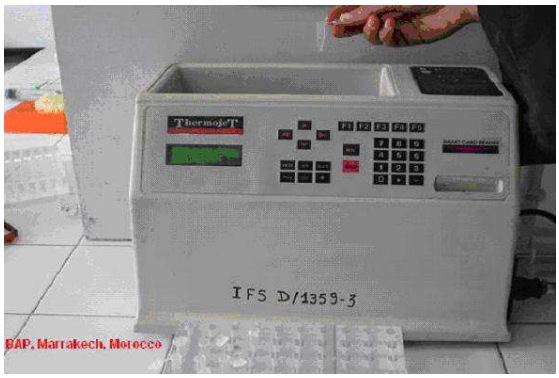
استظهار الأحماض النووية بالتهجين (Hybridation) يتطلب الكشف بالتهجين التوفر على مجسات (Sondes أو Probes، بالأنجليزية) موسومة بالأشعة أو بأنزيم مرتبط و سهل الكشف. هكذا، يتم التعرف على قطعة DNA مثلا، تحتوي على مورث مطلوب ليتم عزلها عن بقية القطع في صورة نقية. يجسد الرسم التالي أهم مراحل كشف الأحماض النووية بالتهجين.



الفحوصات الجزيئية التشخيصية (Molecular diagnosis tests)

تعتمد الفحوصات الجزيئية التشخيصية على المادة الوراثية الموجودة في DNA الكائنات الحية، حيث أنها تعتبر صفات مميزة للكائنات عن غيرها. لذلك وجب استخلاص المادة الوراثية وتنقيتها وتقطيعها ومن ثم إجراء الاختبارات والفحوصات عليها. من بين الفحوصات الجزيئية الشائعة الاستعمال، نجد تإكثار و تكثيف قطع DNA الذي يرتكز على استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل , PCR (بدون أو مع التهجينhybridization).

تفاعل البلمرة المتسلسل: PCR (Polymerase Chain Reaction)
هي تقنية تهدف إلى تضاعف أو تكاثر جزيء DNA (DNA Amplification) إلى أعداد كبيرة تصل إلى ملايين النسخ. تعتمد تقنية PCR على أنزيم DNA بوليميراز (DNA polymerase) الذي تكمن وظيفته الأساسية في تكوين الشريط الأخر لأي شريط DNA منفرد.



يستخدم في هذه عملية البلمرة جهاز يسمى ,PCR وفكرة عمله الرئيسية الرفع والخفض المتسلسل في درجات الحرارة، حيث ينفصل الشريط المزدوج إلى شريطين منفردين عند درجة حرارة معينة، ويبدأ في تكوين الشريط الآخر المكمل له عند درجة حرارة أخرى.

ويعمل هذا الجهاز على تكاثر الـ DNA على شكل زيادة أسية أو لوغارتمية، حيث يتضاعف عدد النسخ في كل دورة إلى أن يصل إلى ملايين النسخ بعد عشرات الدورات فقط.
ويستخدم القانون التالي في تحديد عدد نسخ الـ DNA بعد أي عدد من الدورات , فإذا اعتبرنا أن عدد الدورات هو n فإن عدد النسخ عند هذا العدد من الدورات يساوي 2^n.

المواد المستخدمة في PCR :

- DNA القالب (DNA template) وهو شريط الـ DNA المراد تكثيره ويجب أن يكون من نوع DNA
- انزيم البيمرة (Taq polymerase) وهو إنزيم تم استخلاصه من بكتيريا *Thermus aquaticus*وهي بكتيريا محبة للحرارة وتعيش في درجات

حرارة مرتفعة , لذلك يمتاز هذا الإنزيم بثباته وقدرته على تحمل درجات الحرارة العالية دون التعرض للتشوه (denaturation) بفعل الحرارة العالية التي تصل إلى 95℃

- النيوكليوتيدات (Nucleotides) ويرمز لها بالرمز dNTPs وهي من أربعة أنواع: dTTP, dATP, dCTP, dGTP
- MgCl2 الذي يعتبرعاملا مساعدا (cofactor) لأنزيم Taq polymerase.
- كابح (Buffer) وهو محلول ملحي منظم يوفر pH معين مناسب لعمل الأنزيم.
- البادئات (Primers) وهي التي تحدد أي جزء من DNA الذي يتم نسخه وتكثيره ، أي أنها مكملة لجزء معين من شريط الـ DNA فإذا ما وجدت هذا الجزء فإنها ترتبط به وتبدأ عملية نسخ وتكثير هذا الجزء. معنى ذلك أنه إذا لم يوجد هذا الجزء الذي يرتبط به البادئ فإن عملية البلمرة لا تتم.
وتعتبر الـ primers قطع من الـ DNA فقط وليس من الـ RNA تتكون من عدد محدود من النيوكليوتيدات (oligonucleotide) . عادة يكون عددها بين 10-30 نيوكليوتيدة (مصنعة وليست طبيعية , ويتكون من قطعتين وليس قطعة واحدة لكل شريط من شريطي الـ DNA المنفصلين قطعة , إحداهما تسمى بادئ أمامي (forward primer) والأخرى بادئ خلفي (reverse primer)

يتم وضع كل هذا المكونات معاً في أنابيب خاصة (eppendrof tubes)

خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل .

يحدث هذا التفاعل بصورة رئيسية في ثلاث خطوات وهي:

1- مسخ DNA (Denaturation) أو التشويه , وفيه يفقد جزيء الـ DNA خواصه الطبيعية حيث ينفصل شريطي الـ DNA عن بعضهما البعض.
وتتم هذه الخطوة عند درجة حرارة 95℃ فتعمل هذه الحرارة العالية على كسر الروابط الهيدروجينية بين شريطي الـ DNA , ويصبح كل منهما شريطاً منفرداً أو سلسلة منفردة تسمح بأن تكون قالباً لتكوين سلسلة أخرى تكملها لتصبح شريطاً مزدوجاً

2- ربط البادئ (Annealing) ويتم فيها خفض درجة الحرارة إلى 55℃ وفيها يلتصق كل من قطعتي الـ primer بالمكان المخصص بها والتي تكلمه.

3- إكثار (Extention) وتتم عند درجة حرارة 72℃ وفيها يقوم إنزيم Taq polymerase بربط النيوكليوتيدات على باقي الشريط المنفرد مكملاً له إلى

شريط مزدوج مطابق للنسخة الأصلية لشريط الـ DNA .

مثل تطبيقي: استخدام تفاعل PCR في تشخيص الأمراض الفيروسية النباتية: بعد أن نقوم بالعمليات اللازمة للمادة الوراثية قبل إجراء تفاعل , PCR هناك احتمال أن تكون المادة الوراثية المعزولة محتوية على المادة الوراثية الفيروسية وذلك في حالة إصابة النبات بالمرض الفيروسي , أو خلوها منها في حالة سلامة النبات من المرض

وعند إجراء التفاعل , نضيف بادئ Primer خاص بالفيروس النباتي , أي يرتبط فيه عندما تتابع معين ويعمل على تكثير هذا التتابع فإذا تم تكثير تتابع من المادة الوراثية الفيروسية فهذا يعني وجود المرض وإن لم يتم تكثير أي تتابع من المادة الوراثية المعزولة فهذا يعني خلوها من المرض .