**طرق عزل السموم الفطرية**

**طريقة عزل سموم T2 toxin**

1-اختيار العزلات التي تتميز بانتاجها للسموم ومنها عزلة *Fusarium copactum*

2-تختبر قدرة العزلات على انتاج السم باستخدام عليقة الجرذان المتكونه من ذرة صفراء وشعير وفول صويا وملح الطعام وبروتين حيواني.يتم وزن 200 غم من الوسط الزرعي وتعقيمه بجهاز الاوتوكليف وبعد التعقيم يبرد الوسط ويلقح بالفطريات المنماة على وسط PDA ثم يحضن بدرجه 37 مئوي ولمدة 21يوم وبعد انتهاء الحضن يجفف الوسط الزرعي الحاوي على النمو الفطري بدرجة 60 مئوي لمدة 24 ساعة وتتمو اجراء طرق الاستخلاص اللاحقة باستخدام 100غم اخرى من الوسط الزرعي تحت نفس الظروف السابقه لكن بدون تلقيح للمقارنه.

3-TLC تستخدم صفائح سليكا جل زجاجيه ذات ابعاد 20×20سم .

4-محاليل الفصل يتم اختيار خمسه انظمه من المذيبات لاختبار قابليتها في فصل البقع على صفائح الكروماتوكرافي وتوضع على انفراد في احواض زجاجيه مستوية القاعدة ومحكمة الغلق وكما يلي:

النظام الأول :بنزين +ميثانول وحامض الخليك بنسب 1:2:24

النظام الثاني كلوروفورم وميثانول بنسب 3:97%

النظام الثالث يتكون من تلوين وخلات الاثل بتركيز 90%وحامض الفورميك بنسب 1:3:6

النظام الرابع كلوروفورم واسيتون وايزوبروبانول بنسب 1:1:8

النظام الخامس بنزين اسيتون 2:3

**تنقية المستخلص**

باستخدام أ-كروماتوكرافي العمود الجاف وكما يلي:

1-يثبت العمود الجاف على حامل عمودي ويربط في نهاية الطبقة .2- يعدل PH الى العينات الى 7.

3- نضيف 1مل من محلول الدارئ ثم نتركه لمدة 7دقائق لاشباع وسط التنقية

4-نذيب المستخلص لكل عينه في 5مل من الكلوروفورم ثم ننقل 1مل من المحلول الى الطبقة العلوية داخل عمود التنقية ونتركه لمدة 5-10 دقائق

5- نحضر 10 مل من خليط بنزين –خلات الاثل 2:8 ونضيفه داخل العمود الى ان تتم جمع الناتج من اسفل العمود

6- نأخذ الراشح في انبوبة زجاجية ونضعه في حمام مائي بدرجة 45مئوي بوجود تيار من غاز النتروجين وتحفظ المادة الجافة في انابيب مغلقة وبعيدة عن الضوء .

ب- تجارب التسمم بالحقن .

ج- الحيوانات المختبرية وطريقة اعطاء الجرعة يتم استخدام عدد من الجرذان البيضاء بوزن 200-210 غم ثم تحضر جرع 115-250-500 مايكروكرام لكل كغم من وزن الجسم من سم T2 القياسي وباستخدام الايثانول وبطريقة الحقن في التجويف المغلق للامعاء بعد تخدير الجرذ باستخدام Diethyl either .تقسم الجرذان الى :

مجموعة سيطرة تحقن بالايثانول ومجموعة اختبار تحقن ب 250 مايكروكرام لكل كغم من وزن الجسم من سم T2 القياسي بعد 10 ايام من التعرض الأول

**تأثيرات سم T2 على مكونات دم الحيوان المختبري:**

1. فحص المكونات الدموية بسحب كمية من دم الجرذ المعامل وذلك من عضلة القلب بعد تخدير الجرذ وتوضع في انبوبة خالية من مانع التخثر .
2. تعامل المسحة بصبغة لشمان او صبغة كمزا لفحص تاثير كريات الدم الحمر وحساب العدد التفريقي لكريات الدم البيض باستخام عداد الخلايا.
3. نضع عينات الدم المسحوب بانابيب حاوية مانع تخثر ثم تحفظ بالثلاجة
4. يحسب ESRمعدل ترسيب الخلايا
5. يحسب معدل انضغاط الخلايا بجهاز هيموسايتوميتر
6. يحسب عدد كريات الدم الحمر والبيض

**الكيمياء المناعية للسموم الفطرية**

بما ان السموم الفطرية ذات وزن جزيئي صغير لذلك فهي تتصف بصفات المستضد لذا عند دخولها جسم الكائن الحي لا تحفز تكوين الاضداد لذا اصبح من الضروري ربطها كيميائيا بجزيئة ذات وزن جزيئي كبير وهو غالبا ما يكون بروتين والذي يعرف بالحامل هناك عدت طرق للربط منها يؤخذ 10 ملغم من السم مع اربعة بالعشرة من بروتين الالبومين ويضاف له 25 مل من بفر ويوضع بحمام مائي 10 ساعات بعد ذلك يسحب 10 ملغم من الخليط ويحقن بحيوان المختبر وبعد 4-5 ايام يسحب 10 مل من دم الحيوان ويمرر بجهاز الطرد المركزي ثم يفصل الراسب عن الراشح ثم يضاف مقدار متساوي من مصل الدم ثم يرج فاذا تكونت حلقة دل على تكون الاضداد.