تقانـــــة التضـــــاعف العشـــــوائي المتعـــــدد الاشـــــكال لسلســـــلة الـــــدنا

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

تعرف على انها تضاعف دنا الكائن الحي انزيمياً بأستخدام بادئ واحد عشوائي يؤدي الى الحصول على مواقع متضاعفة على الدنا الجين منتشرة بشكل عشوائي على الدنا .

يتلخص مبدأ عمل هذه التقانة على وجود قطعة من الحامض النووي الدنا المراد دراسته والذي يستخدم كقالب ويتم مضاعفة قطعة او قطع منه بمساعدة بادئ Primer مؤلف من 10 نيوكليوتيدات يرتبط بالمواقع المكملة له في دنا القالب وبمساعدة الـ PCR تتم المضاعفة . بعد ذلك تفصل النواتج المتضاعفة لقطع الدنا على هلام الاكاروز بأستخدام جهاز الترحيل الكهربائي ثم تلون الهلامة بمحلول بروميد الاثيديوم الذي يشكل مع قطع الدنا معقد يتوهج بوجود الاشعة فوق البنفسجية في جهاز التصوير الفديوي بعدها نأخذ الصور المتكونة من عدد من الحزم Bands مختلفة الوزن الجزيئي ناتجة عن التضاعف وتحول هذه الحزم الى ارقام حسابية وادخالها في برنامج احصائي لحساب درجة القرابة والبعد الوراثي .

مميزات تقانة الـ RAPD :-

1. لا تحتاج الى معرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها ومضاعفتها .
2. مفيدة في دراسة العشائر ذات الاعداد الكبيرة من الافراد.
3. لا يتطلب انجازها وقتاً طويلاً بألاضافة الى انها غير معقدة .
4. لا يتطلب استخدامها وجود مواد مشعة .

متطلبات الـ RAPD :-

1. DNA معزول ومنقى حسب الطرق السابقة الذكر .
2. بادئ Primer وهو عبارة عن قطع من الدنا تتكون من 10 نيوكليوتيدات محضرة صناعياً ويوجد العديد منها ويتم اختبار اكثر من بادئ لحين التعرف على البادئ الذي يعطي افضل تضاعف مع الدنا الذي سيرتبط به .
3. نيوكليوتيدات dNTPs .
4. محلول منظم (البفر) للحفاظ على الـ PCR
5. انزيم البلمرة DNA Polymerase .

6. جهاز التدوير الحراري PCR .
7. جهاز الترحيل الكهربائي .
8. جهاز التصوير الفديوي .

خطوات العمل :-

1. نقوم بعمل مزيج للتفاعل في انبوبة اختبار سعة 2 ملي لتر يحتوي هذا المزيج على :-

المادة	التركيز
DNA	2 مايكرولتر(µL)
dNTPs	2 مايكرولتر
Buffer(محلول منظم)	2 مايكرولتر
Primer	3 مايكرولتر
DNA Polymerase	0.2 مايكرولتر
H_2O	10.8 مايكرولتر
المجموع	20 مايكرولتر

2. التضاعف بأستخدام تقانة PCR :-

يوضع المزيج السابق في الانابيب الخاصة بجهاز التدوير الحراري لاجل ادخالها في سلسلة من الدورات وحسب البرنامج الاتي :-

يتكون البرنامج التضاعفي من (40 دورة) ، تتألف كل دورة من المراحل التالية :-

المرحلة	الوقت	درجة الحرارة	عدد الدورات	آلية التفاعل
1	4 دقيقة	94	1	لفك شريط الدنا بالكامل
2	30 ثانية	94 م°		فك شريطي الدنا والحصول على شريط مفرد كقالب
3	1 دقيقة	36 م°		ربط البادئ بشريط الدنا القالب المفرد إذ يرتبط البادئ بأكثر من مكان على الدنا
4	2 دقيقة	72 م°		يعمل انزيم DNA Polymerase بأضافة الـ dNTPs الى الدنا القالب

				بأستخدام البادئ كبداية لعمله .
5	7 دقيقة	72 م°	1	لاكمال اضافة dNTPs

تكرر الخطوات لـ (40 دورة) من المرحلة 2 الى المرحلة 4.

بعد ان تكتمل الـ (40 دورة) تترك العينات لمدة (5 دقائق) على درجة حرارة (72 م°) لكي يستقر المحلول .

3. الترحيل الكهربائي Electrophoresis :-

أ - يتم تحضير هلام الاكاروز بتركيز (1.2 %) ويوضع في جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على سائل الترحيل الالكتروني TBE .

ب - تخلط العينة الحاوية على الدنا المتضاعف مع (3 مايكرولتر) من محلول التحميل Loading Buffer (LB) الحاوي على صبغة البروموفينول الزرقاء إذ يساعد محلول LB على استقرار العينة في الحفر(Well) ويعطي مؤشر على نهاية الترحيل .

ج - يحقن مزيج (الدنا + LB) في الحفر المعمولة مسبقاً في الهلام كما يحقن في الحفرة الاولى والاخيرة(الدنا لامبدا) المعلوم الوزن الجزيئي الذي يستخدم كشاهد للمقارنة .

د - يوصل جهاز الترحيل بالتيار الكهربائي وتستغرق عملية الترحيل من (3-4 ساعات) .

4. التلوين والتصوير :-

بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي يتم اخراج الهلامة ووضعها في وعاء حاوي على صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز (0.5 مايكرو غرام / مل) وتترك لمدة نصف ساعة مع التحريك المستمر والهادئ على جهاز الهزاز الافقي . ان صبغة بروميد الاثيديوم تشكل معقد مع الدنا يتوهج بوجود الاشعة فوق البنفسجية .

بعد الانتهاء من عملية التلوين تغسل الهلامة بالماء المقطر للتخلص من بروميد الاثيديوم الزائد لتصبح جاهزة للتصوير . ثم تصور الهلامة بوجود الاشعة فوق البنفسجية UV بطول (260 نانومتر) بأستخدام جهاز التصوير الفديوي وتسحب الصور على ورق خاص .

5. تقدير الوزن الجزيئي والبعد الوراثي :-

يقدر الوزن الجزيئي لقطع الدنا بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي المتكون من الدنا لامبدا اما النسبة المئوية للبعد الوراثي Genetic Distance فتقدر من خلال تحويل نتائج الصور الى جداول توصيف ثم الى ارقام وتطبق معادلة البعد الوراثي وكالاتي :-

Genetic Distance = 1- (2 n x y / n x + n y)

إذ إنَّ :-

Genetic Distance = البعد الوراثي

n x y = تمثل عدد الحزم المشتركة بين الانموذجين x و y التي تمثل أياً من النباتات المنتخبة .

n x = عدد الحزم الكلية في الانموذج x .

n y = عدد الحزم الكلية في الانموذج y .