

تقانة تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة :-

Amplified Fragments Length Polymorphic DNA (AFLP)

تمثل تقانه AFLP بأنها قطع من DNA المضخمة (amplified) بوساطة بادئات (primers) خاصة بالهضم التحديدي (restriction digestion) لجينوم دنا النبات وبالاعتماد على اختلاف ترتيب النيوكليوتيدات ، إذ تعطي هذه التقانة البصمة الوراثية لاي دنا دون الحاجة الى معرفة مسبقة عنه .

يتم ترحيل نتائج AFLP على هلام البولي اكرل أمايد Polyacrylamide Gel وتستنمر هذه الطريقة مزايًا نوعين من مؤشرات الدنا وهي تقانتي RFLP و RAPD في آن واحد إذ استمدت مؤشرات AFLP مرحلة هضم الدنا المجيني بالانزيمات القاطعة من مؤشرات RFLP إذ تقوم هذه الانزيمات بأنتاج قطع من الدنا بأعداد كبيرة وهذا يزيد من احتمالية الحصول على تباينات بأطوال تلك القطع . واستمدت السرعة والدقة من مؤشرات RAPD .

متطلبات الـ AFLP :-

1. DNA معزول ومنقى حسب الطرق السابقة الذكر.
2. انزيمات التقيد Restriction Enzymes مثل *Pst I* ، *Tru 9I* ، *EcoR1* ، *MseI* .
3. مكيفات Adapters خاصة بالانزيمات القاطعة .
4. المحلول المنظم (الدارئ) مثل (OPA) One phore all ، (NE Buffer) Nuclear Extract Buffer
5. الانزيم اللاحم *T4-DNA Ligase* .
6. الادينوسين ثلاثي الفوسفات Adenosintriphosphate ATP
7. بادئات منتخبة لا تحتوي على قواعد اضافية مثل *Pst I* (MOO) ، *Tru 9I* (POO) (حاوية على تتابعات القطع وتتابعات المكيفات) .
8. محلول منظم (دارئ) بقوة 10 X PCR Buffer .
9. انزيم البلمرة Taq DNA Polymerase .
10. بادئات Primers (تحتوي على التتابعات المذكورة في الفقرة 7 مع قواعد اضافية [1-4]) .
11. النيوكليوسيدات منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات dNTPs .

خطوات العمل :-

تتطلب تقانة (AFLP) المرور بخطوات عدة للحصول على مؤشراتاتها وهي :-

1. مرحلة هضم الدنا Digestion of DNA :-

❖ يؤخذ (250 نانوغرام) من الدنا يتم هضمها (تقطيعها) باضافة انزيم التقييد الاول *Tru 91* ذي الموقع التعريفي ($3' \text{T-TAA}$) والانزيم الثاني *Pst I* ذي الموقع التعريفي ($3' \text{GCTGCA}$) إذ يتم تحضير مزيج الهضم بخلط المحتويات الاتية وبحجم نهائي قدره (20 مايكرو لتر) .

المادة	الكمية	التركيز النهائي
DNA	10	250 ng
Buffer (OPA)	2	10 X
<i>Tru 91</i> (10 u / ml)	0.75	10 U / μ l
<i>Pst I</i> (10 u / ml)	0.75	10 U / μ l
H ₂ O	6.5	-

❖ يوضع المزيج في حمام مائي على درجة حرارة (37 م °) ولمدة (3 ساعات) .
❖ بعد انتهاء عملية الهضم ، نأخذ (5 μ l) من الناتج ويضاف له (محلول التحميل 2 μ l L.B. + 6 μ l H₂O) ثم ترحل على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) إذ تجرى هذه الخطوة للتأكد من نجاح عملية الهضم .

2. مرحلة لحم المكيفات Adaptors Ligation :-

❖ يضاف في هذه المرحلة مكيفات adapter متخصصة وهي عبارة عن سلسلة من النيوكليوتيدات بدايتها تكمل قطع الدنا ونهايتها معلومة التسلسل النيوكليوتيدي ويتم الربط بمساعدة انزيم T₄-DNA Ligase ويستخدم المزيج الاتي لهذا التفاعل :-

المادة	الكمية	التركيز النهائي
Tru91 adapter	0.5	50 Pmol
Pst I adapter	0.5	5 Pmol
ATP	0.5	10 Mm
Buffer (OPA)	0.3	1 X
T ₄ -DNA Ligase	0.3	0.3 U
H ₂ O	0.9	-
الحجم النهائي	3.0	-

- ❖ ثم يوضع في حمام مائي على درجة حرارة (37 م °) لمدة 3 ساعات .
- ❖ حُمِل (5 µl) من الناتج بعد إضافة (محلول التحميل 2 µl L.B. + 6 µl H₂O) ثم ترحل على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) إذ تجرى هذه الخطوة للتأكد من نجاح عملية الربط بالمكيفات .

3. مرحلة التضاعف التمهيدي Pre amplification :-

- ❖ يخفف ناتج التفاعل في المرحلة السابقة بالماء المقطر بنسبة (4 : 1) ويؤخذ منه (2 µl) ويضاف إليها بادئات خاصة موجهة (directed primers) ذات تسلسل نيوكليوتيدي معروف ومخصصة لكل موقع يتم تقطيعه انزيمياً . وهكذا يكون مزيج التفاعل المستخدم كالآتي :-

المادة	الكمية	التركيز النهائي
Tru91 (MOO)	1.0	50 ng
Pst I (POO)	1.0	50 ng
dNTPs	2.0	0.2 mM
PCR Buffer (10 X)	2.0	1 X
Taq DNA	0.2	1U
H ₂ O	11.8	-
Ligated DNA	2.0	-
الحجم النهائي	20.0	-

❖ توضع الانابيب بعد ذلك بجهاز الـ PCR ويتم برمجة الجهاز حسب البرنامج الاتي :-

ت	درجة الحرارة Temp.	المدة الزمنية Time	عدد الدورات Cycle
1	94	0:30	30 دورة
2	60	0:30	
3	72	1:00	
4	72	5:00	1 دورة

❖ يتم اخراج العينات من جهاز الـ PCR ويؤخذ من كل واحدة منها (4.0 µl) ويضاف اليها (محلول التحميل 2 µl L.B. + 4µl H₂O) ثم ترحل على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) إذ تجرى هذه الخطوة لمعرفة نتائج التضاعف التمهيدي .

4. مرحلة التضاعف الانتقائي النهائي Selective amplification :-

❖ تضاف توليفة من البادئات التي تختلف عن بعضها البعض بعدد ونوع الاساس النيوكليوتيدي ثم عمل خليط تفاعل رئيسي Master mix ويتكون الخليط من المواد الاتية :-

المادة	الكمية	التركيز النهائي
Tru91 (primer)	1.0	50 ng
Pst I (primer)	1.0	50 ng
dNTPs	2.5	0.25 mM
PCR Buffer (10 X)	2.0	1 X
Taq DNA polymerase	0.25	1U
H ₂ O	11.25	-
Pre amplify. DNA	2.0	-
الحجم النهائي	20.0	-

❖ ثم تتم عملية التضخيم باستخدام جهاز الـ PCR بحسب البرنامج الاتي :-

التفاعل	عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة
Denaturation	1	2 دقيقة	94 م°
Denaturation لفصل شريطي DNA	1	30 ثانية	94 م°
Annealing لالتحام البادئ	1	30 ثانية	59.6-68 م° بمعدل تناقص مقداره (0.7 م° / دورة) ولمدة (13) دورة للحصول على Specific annealing
Extension لنمو السلاسل الجديدة	1	1 دقيقة	72 م°
وأتبعت هذه الدورات بـ (23) دورة كانت مكونة من			
Denaturation لفصل شريطي DNA	1	30 ثانية	94 م°
Annealing لالتحام البادئ	1	30 ثانية	59 م°
Extension لنمو السلاسل الجديدة	1	1 دقيقة	72 م°
Extension	1	7 دقيقة	72 م°
ثم انهي التفاعل على حرارة (4 م°) وخزنت العينات بعد ذلك بحرارة (4 م°) في الثلجة			

تحضير هلام البولي اكرل أميد Poly acrylamide gel :-

يتم تحضير هلام متعدد الاكرل أميد وبتركيز (6 %) لترحيل عينات الدنا المتضاعفة بعد اجراء تفاعل الـ AFLP :-

1. تؤخذ الصفيحتان الزجاجيتان (يختلف حجم ونوع الزجاج حسب طريقة الاستخدام) وتنظف بالايثانول (95 %) من (2-3 مرات) بأستخدام المناديل الورقية.

2. تضاف مادة (Bind Saline) الى الصفيحة الزجاجية القصيرة وهي أملاح تساعد على التصاق هلامة الاكريلاميد على اللوح القصير إذ نأخذ (3 مل) من

- المادة المذكورة بوساطة ماصة (pipe) وتوضع فوق الصفيحة ثم يتم مسحها باستخدام المناديل الورقية .
3. يوضع الكحول بنسبة (70 %) فوق طبقة (Bind Saline) إذ لا يتأثر (Bind Saline) بالكحول لأنه يدخل في تكوينه فضلاً عن إنَّ الكحول من المكونات التي تساعد على الالتصاق .
4. استبدلت القفازات المطاطية التي استخدمت عند معاملة الصفيحة الأمامية عند الشروع بمعاملة الصفيحة الخلفية الكبيرة منعاً من التصاق القفازات مع مراعاة معاملة كل لوح بشكل مستقل عن الآخر .
5. نُظِّفَت صفيحة الزجاج الخلفية الكبيرة التي تدعى بـ الصفيحة الكاملة (IPC) (Integrated Plate Chamber) بالماء المقطر (3 مرات) .
6. أُضْفِيفَ (1 مل) من (Repel Saline) على صفيحة الزجاج الخلفية وهي مادة تمنع الالتصاق إذ تمسح اللوحة بهذه المادة بوساطة المناديل الورقية .
7. مسح اللوح مرة أخرى بالماء النقي المقطر بوساطة المناديل الورقية .
8. يوضع فاصل (spacers) بسمك (5 ملم) بعد غسله وتنشيفه على جوانب أحد اللوحين إذ تعمل فسحة بين اللوحين والتي من خلالها تتم إضافة الهلام .
9. يوضع لوحا الزجاج على بعضهما (الوجهان المعاملان بالمواد نحو الداخل) وتغلق جوانب اللوحين .
10. يُحضَرُ محلول APS (Ammonium Pure Sulfate) الذي يعمل على بلورة الأكريل أمايد بتركيز (10 %) من (1 مل ddH₂O + 0.1 غرام APS) بعد إعداد الألواح إذ لا يتم تحضيره مسبقاً .
11. حُقِنَ (75 مل) من محلول الأكريل أمايد + (60 مايكرو لتر) من TEMED [tetra methyl ethylene diamine (C₆H₁₆N₂) + (600 مايكرو لتر) من (APS) بين اللوحين ثم وُضِعَ المشط لتكوين الحفر التي توضع فيها عينات الدنا ويتم إجراء هذه الخطوات بسرعة قبل تبلور محلول الأكريلاميد .
12. تركت الهلام لتجف لمدة (1-2 ساعة) على سطح مستوي لكي تتبلر الهلامة بشكل مستوي وبعد جفاف الهلامة رُفِعَ المشط الخاص بتكوين الحفر ثم وضع اللوحان في جهاز الترحيل الكهربائي العمودي (Electrophoresis) .
13. أُضْفِيفَ (4 مايكرو لتر) من (Stop Buffer) (تركيز 2 %) الى عينات الدنا المراد ترحيلها لإيقاف التفاعل ووضوح رؤية سريان العينات في أثناء الترحيل .

14. يملأ جهاز الترحيل العمودي بـ (TBE buffer 0.5 x) ثم شغل الجهاز لتسخين الجهاز لمدة (10 دقائق) قبل وضع العينات في الحفر ، ثم تضاف العينات بعد أن تصل درجة حرارة المحلول في الجهاز بحدود (40 – 45 م°) و يُطفأ الجهاز .
15. أضيف (8 مايكرو لتر) من كل عينة من عينات الدنا الى الحفر بواسطة (Pipe) ثم أضيف (8 مايكرو لتر) من (DNA Ladder) تركيز (0.5 مايكرو غرام / مايكرو لتر) في مواقع عدة ثم أوصلت أقطاب التيار الكهربائي وتم الترحيل على (1500 فولت) لمدة (3 ساعات) .
16. بعد أنتهاء عملية الترحيل الكهربائي يتم اطفاء الجهاز ثم تفصل أقطاب التيار الكهربائي ويفرغ الجهاز من المحاليل ثم يؤخذ اللوحان ويتم فصلهما بحذر عن بعض باستخدام شفرة خاصة ويؤخذ اللوح الحاوي على الهلام الى غرفة التلوين .

مرحلة تلوين الهلام :-

تم في هذه المرحلة تلوين الهلام وإظهار النتائج باستخدام محاليل التلوين (Developer) و نترات الفضة (Silver Nitrate) (AgNO₃) ، إذ يجب حفظ هذه المحاليل بعد تحضيرها في علب زجاجية غامقة اللون منعاً من تأكسد المحاليل عند تعرضها للضوء مع مراعاة حفظ محلول التطهير (Developer) بعد تحضيره في البراد عند درجة حرارة (4 م°) حفاضاً على المحلول من التلف، إذ يستخدم بارداً و مراعاة إن كل مادة توضع في الحوض الزجاج الخاص بها وكل مرحلة لها الأحواض الخاصة بها، ولا يجوز الخلط بين تلك الأحواض خلال مراحل التلوين مع مراعاة الإهتمام بنظافة الأحواض وعلى وفق الخطوات الآتية :-

1. تم تحضير محلول التطهير (Developer) من (2 لتر ddH₂O + 60 غم كاربونات الصوديوم اللامائية (Na₂CO₃) + 3 مل فورمالديهايد Formaldehyde (38 %) + 400 مايكرو لتر سلفات الصوديوم) .
2. حُضِر محلول التصبيغ (Silver Stain) من (2 لتر ddH₂O + 2 غم نترات الفضة + 3 مل فورمالديهايد Formaldehyde (38 %))
3. تم تحضير محلول التثبيت Fixer Solution من (200 مل حامض الخليك acetic acid + 1800 مل ddH₂O) .
4. أخذ اللوح القصير الحاوي على الهلام الملتصقة الى غرفة التلوين ووضع اللوح في حوض زجاج بحيث يكون الهلام الى الأعلى وتم غسله باستخدام محلول التثبيت إذ وضع

- اللوحة في هذا المحلول لمدة (20 دقيقة) مع مراعاة إجراء هذه الخطوة في الحاضنة بسبب الرائحة القوية والمضرة لحمض الخليك.
5. نُقل اللوح بعد انتهاء عملية الغسل الى حوض رجاج آخر حاوٍ على ماء مقطر ddH₂O (2 لتر) لمدة (2 دقيقة) إذ تكرر العملية (3 مرات) مع مراعاة تبديل الماء في كل مرة .
 6. أُضيف (2 لتر) من (Silver Staining) الى الحوض الرجاج الخاص به ثم وضع اللوح الصغير في الحوض وترك لمدة (30 دقيقة) مع مراعاة إطفاء الأضواء لمنع التأكسد .
 7. أخذ اللوح الصغير ووضع في حوض آخر حاوٍ على ماء مقطر (ddH₂O) لمدة (10 ثوانٍ) لغسل اللوح الصغير من محلول (Silver Staining).
 8. وضع اللوح في حوض رجاج آخر حاوٍ على محلول التطهير (Developer) (2 لتر) وتم الإنتظار لمدة (1- 5 دقائق) لحين ظهور الحزم بشكل واضح .
 9. أخذ اللوح بعد ظهور الحزم ووضع في حوض رجاج آخر حاوٍ على حامض الخليك تركيز (10 %) مع مراعاة إجراء هذه الخطوة في الهود (Hood) لرائحة حامض الخليك القوية والمضرة لمدة (5 دقائق) لتثبيت ألوان الحزم
 10. أخذ اللوح ووضع في حوض رجاج لمدة (2 دقيقة) حاوٍ على ماء مقطر (ddH₂O) لغسل اللوح من حامض الخليك ثم ترك اللوح ليجف الى اليوم التالي .
 11. يتم تصوير الهلام باستخدام جهاز الماسح الضوئي Scanner وادخال الصورة الى الكمبيوتر ثم يتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى جداول توصيف وذلك بوضع (1) عند وجود حزمة و (0) عند غيابها ثم يتم ادخالها ببرامج خاصة موجودة على الحاسبة لغرض حساب الدوال الوراثية المرغوبة كحساب البعد الوراثي بين العينات المدروسة او التشابه الوراثي او التباين الوراثي وتحليل المجاميع وايجاد مخطط الشجرة وغيرها .