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 وبالإعتماد على آختلاف ترتيب النيوكليوتيدات ، إ ذ تعطي هذه التقانة البصمة الوراثية لاي دنا دون الحاجة الى معرفة مسبقة عنه .

يتم ترحيل نتائج AFLP على هلام البولي اكرل أمايد Polyacrylamide Gel وتستثمر هذه الطريقة مزايا 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 التقييد Restriction Enzymes مثل *MseI* ، *EcoR1* ، *Tru 9I* ، *Pst I* .
3. مكيفات Adapters خاصة بالانزيمات القاطعة .
4. المحلول المنظم (الدارئ) مثل (One phore all (OPA ، (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 91*(POO) (حاوية على تتابعات القطع وتتابعات المكيفات) .
8. محلول منظم (دارئ) بقوة PCR Buffer 10 X .
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 مؤشراتها 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(5´T-TAA 3َ) والانزيم الثاني *Pst I* ذي الموقع التعريفي(5´ CTGCA – G 3´) إذ يتم تحضير مزيج الهضم بخلط المحتويات الاتية وبحجم نهائي قدره (20 مايكرولتر) .

المادة	الكمية	التركيز النهائي
DNA	10	250 ng
Buffer (OPA)	2	10 X
Tru 91 (10 u / ml)	0.75	10 U / µl
Pst I (10 u / ml)	0.75	10 U / µl
H_2O	6.5	-

❖ يوضع المزيج في حمام مائي على درجة حرارة (37 مْ) ولمدة (3 ساعات) .

❖ بعد انتهاء عملية الهضم ، نأخذ (5µl) من الناتج ويضاف له (محلول التحميل .6 µl H_2o + 2 µl L.B) ثم ترحل على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) إذ تجرى هذه الخطوة للتأكد من نجاح عملية الهضم .

2. **مرحلة لحم المكيفات Adopters 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 T_4-DNA Ligase ويستخدم المزيج الاتي لهذا التفاعل :-

التركيز النهائي	الكمية	المادة
50 Pmol	0.5	Tru91 adapter
5 Pmol	0.5	Pst I adapter
10 Mm	0.5	ATP
1 X	0.3	Buffer (OPA)
0.3 U	0.3	T_4-DNA Ligase
-	0.9	H_2O
-	3.0	الحجم النهائي

- ثم يوضع في حمام مائي على درجة حرارة (37 مْ) لمدة 3 ساعات .
- حُمل (5 µl) من الناتج بعد إضافة (محلول التحميل .L.B (6 µl H_2o + 2 µl 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 (1: 4) 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 كالاتي :-

التركيز النهائي	الكمية	المادة
50 ng	1.0	Tru91 (MOO)
50 ng	1.0	Pst I (POO)
0.2 mM	2.0	dNTPs
1 X	2.0	PCR Buffer (10 X)
1U	0.2	Taq DNA
-	11.8	H_2O
-	2.0	Ligated DNA
-	20.0	الحجم النهائي

❖ 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 L.B. µl 2 + $4\mu l\ H_2o$) 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 :-

التركيز النهائي	الكمية	المادة
50 ng	1.0	Tru91 (primer)
50 ng	1.0	Pst I (primer)
0.25 mM	2.5	dNTPs
1 X	2.0	PCR Buffer (10 X)
1U	0.25	Taq DNA polymerase
-	11.25	H_2O
-	2.0	Pre amplify. DNA
-	20.0	الحجم النهائي

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

التفاعل	عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة
Denaturation	1	2 دقيقة	94 مْ
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 °
وآتبعت 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 مْ
ثم انهي التفاعل على حرارة (4 م °) وخزنت العينات بعد ذلك بحرارة (4 م °) في الثلاجة			

تحضير هلام البولي اكرل أمايد Poly acrylamide gel :-

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

1. تؤخذ الصفيحتان الزجاجيتان (يختلف حجم ونوع الزجاج حسب طريقة الاستخدام) وتنظف بالايثانول Ethanol (95 %) من (2- 3 مرات) بآستخدام المناديل الورقية.
2. تضاف مادة (Bind Saline) الى الصفيحة الزجاجية القصيرة وهي أملاح تساعد على التصاق هلامة الاكريلاميد على اللوح القصيرإذ نأخذ (3 مل) من

المادة المذكورة بوساطة ماصة (pipe) وتوضع فوق الصفيحة ثم يتم مسحها بآستخدام 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 الإلتصاق .

4. آستبدلت 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. نُظِفت صفيحة الزجاج الخلفية الكبيرة التي تدعى بـ الصفيحة الكاملة (Integrated Plate Chamber) (IPC) بالماء المقطر (3 مرات).

6. أضيف (1 مل) من (Repel Saline) على صفيحة الزجاج الخلفية وهي مادة تمنع الإلتصاق إذ تمسح اللوحة بهذه المادة بوساطة المناديل الورقية.

7. مسح اللوح مرة أخرى بالماء النقي المقطربوساطة 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 نحوالداخل) وتغُلق جوانب اللوحين .

10. يُحضرمحلول (Ammonium Pure Sulfate) APS الذي يعمل على بلمرة ألاكريل أمايد بتركيز(10 %) من (1 مل ddH_2O + 0.1 غرام APS) بعد إعداد الألواح إذ لا يتم تحضيرهُ مُسبقاً.

11. حُقن (75 مل) من محلول ألاكريل أمايد + (60 مايكرولتر) من TEMED [tetra methyl ethylene diamine ($C_6H_{16}N_2$)] +(600 مايكرولتر) من (APS) بين اللوحين ثم وضِع المشط لتكوين الحفر التي توضع فيها عينات الدنا ويتم إجراء هذه الخطوات بسرعة قبل تبلمر محلول الأكريلاميد .

12. تركت الهلامة لتجف لمدة (1-2 ساعة) على سطح مستوي لكي تتبلمر الهلامة بشكل مستوٍ وبعد جفاف الهلامة رُفع المشط الخاص بتكوين الحفر ثم وضع اللوحان في جهاز الترحيل الكهربائي العمودي (Electrophoresis) .

13. أضيف (4 مايكرولتر) من (Stop Buffer) (تركيز 2 %) الى عينات الدنا المراد ترحيلها لإيقاف التفاعل ووضوح رؤية سريان العينات في أثناء الترحيل .

14. يمُلئ جهاز الترحيل العمودي بـ (x 0.5 TBE buffer) ثم شُغل 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 مايكرولتر) من كل عينة من عينات الدنا الى الحفر بوساطة (Pipe) ثم أضيف (8 مايكرولتر) من (DNA Ladder) تركيز (0.5 مايكروغرام /مايكرولتر) في مواقع عدة ثم أوصلت أقطاب التيار الكهربائي وتم الترحيل على (1500 فولت) لمدة (3 ساعات) .
16. بعد آنتهاء عملية الترحيل الكهربائي يتم اطفاء الجهاز ثم تفصل أقطاب التيار الكهربائي ويفرغ الجهاز من المحاليل ثم يؤخذ اللوحان ويتم فصلهما بحذر عن بعض بآستخدام شفرة خاصة ويؤخذ اللوح الحاوي على الهلامة الى غرفة التلوين .

مرحلة تلوين الهلامة :-

تم في هذه المرحلة تلوين الهلامة وإظهار النتائج بآستخدام 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 إنَّ كل مادة توضع في الحوض الرجاج 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 ddH_2O + 60 غم كاربونات الصوديوم اللامائية (Na_2CO_3) + 3 مل فورمالديهايد Formaldehyde (38 %) + 400 مايكرولتر سلفات الصوديوم).
2. حُضر محلول التصبيغ (Silver Staing) من (2 لتر ddH_2O + 2 غم نترات الفضة $AgNO_3$ + 3 مل فورمالديهايد Formaldehyde (38 %))
3. تم تحضير محلول التثبيت Fixer Solution من(200 مل حامض الخليك acetic acid (CH_3COOH) + 1800 مل ddH_2O).
4. أخذ اللوح القصير الحاوي على الهلامة الملتصقة الى غرفة التلوين ووضع اللوح في حوض رجاج بحيث يكون الهلام الى الأعلى وتم غسله بآستخدام محلول التثبيت إذ وضع

اللوح في هذا المحلول لمدة (20 دقيقة) مع مراعاة إجراء هذه الخطوة في الحاضنة بسبب الرائحة القوية والمضرة لحامض الخليك.

5. نُقل اللوح بعد آنتهاء عملية الغسل الى حوض رجاج آخرحاوٍ على ماء مقطر ddH_2O (2 لتر) لمدة (2 دقيقة) إذ تكرر العملية (3 مرات) مع مراعاة تبديل الماء في كل مرة .

6. أضيف (2 لتر) من (Silver Staning) 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(ddH_2O) لمدة (10 ثوانٍ) لغسل اللوح الصغير من محلول (Silver Staning).

8. وضع اللوح في حوض رجاج اخر 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 الوان الحزم

10. أخذ اللوح ووضع في حوض رجاج لمدة (2 دقيقة) حاوٍ على ماء مقطر (ddH_2O) لغسل اللوح من حامض الخليك ثم ترك اللوح ليجف الى اليوم التالي .

11. يتم تصوير الهلامة بأستخدام جهاز الماسح الضوئي Scanner وادخال الصورة الى الكومبيوترثم 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 .