استخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال السلسلة الدنا في الكشف عن طفيلى الأكياس العدرية Hydatid Cysts في الأبقار في مناطق مختلفة من العراق [+]

THE USING OF RANDOM AMPLIFIED POLYINORPHIC DNA FOR DETECTION OF BOVIN HYDATID CYSTS IN DIFFERENT REIGNS OF IRAQ

سلوى صبر محسن [*] غانم حسين مجيد [*] نعمت جميل عبد الباقي [**]

المستخلص:

في هذه الدراسة اعتمدت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال وتم استخدام اربعة بادئات عشوائية وهي OPF-19 , OPF-6 , OPF-13 , OPF-16 وخلال هذه التقانة تم الكشف عن التباينات الوراثية بين الدنا المعزول من طور الكيس العدري في المضيف الوسطي الأبقار من المناطق الجغرافية المختلفة من القطر وذلك عن طريق حساب عدد الحزم المتضاعفة وحساب الوزن الجزيئي لهذه الحزم . أن التباين الوراثي للعينات المدروسة يكون اما متمثلا بوجود أو عدم وجود حزم التضاعف .

أظهرت الدراسة وجود تباينات وراثية بين دنا العينات المدروسة وقدرة البادئات على تشخيص وتمييز العينات للمناطق الجغرافية المختلفة وكالآتي :-

- قدرة البادئ OPF-16 على تمييز دنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار للمناطق الوسطى بالمؤشر الوراثي OPF-16 960bp وبالمؤشر الوراثي OPF-16 800bp لدنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار للمناطق الجنوبية .
- قدرة البادئ OPF-13 على تشخيص العينات للأكياس العدرية المعزولة للمناطق الشمالية بالمؤشرات الوراثية OPF-13 790pb , 630bp , 370pb .
- قدرة البادئ OPF-6 على تشخيص دنا العينات جميعا بالمؤشرات الوراثية PF-6 800bpلدنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار من المناطق الوسطى و OPF-6 990bp لدنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار من المناطق الجنوبية. وOPF-6 460bp لدنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار من المناطق الشمالية .
- قدرة البادئ OPF-19 على تشخيص دنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من الأبقار للمناطق الجنوبية من القطر بالمؤشرين الوراثيين 750bp و1000bp OPF-19 .

Abstract:

[+] تاريخ استلام البحث : ٢٠٠٨/٦/١١ ، تاريخ قبول النشر : ٢٠٠٨/١١/١٨

[*] أستاذ مساعد/ المعهد الطبي التقني/ بغداد

[**] مدرس / كلية العلوم/ جامعة بغداد

This study depends on Random amplified polymorphic DNA, used four random primers (OPF-6 , OPF -13, OPF- 19 , OPF-16) during this Genetic analysis to detect of genetic Variation between isolated DNA from hydatid cyst collected from cows from different geographical regions .

The results have been shown Genetic variation between samples and the ability of primers to determine the samples from geographical regions as the following :-

- **Ability of OPF – 16 primer to determine two markers :-**
  OPF – 16 960bp specific for samples which was collected from cows from intermediate resigns of Iraq .
  OPF – 16 800bp specific for samples which was collected from cows from southern resigns of Iraq .
- **Ability of OPF-13 Primer to determine three genetics markers which were OPF-13 790bp , 630bp , 370bp specific for samples which were collected form cows from northern resigns of Iraq .**
- **Ability of OPF-6 primer to determine of studying samples by following genetic markers :-**
  OPF-6 800bp, 650bp specific for samples which were collected from intermediate resigns .
  OPF-6 990bp specific for samples which were collected from southern resigns .
  OPF-6 460bp specific for samples which were collected from northern resigns.
- **Ability of OPF- 19 primer to determine two genetic markers which are OPF- 19 1000bp , 750bp which were specific for samples collected from cows from southern resign of Iraq.**

المقدمة:

يعد مرض الأكياس العدرية من الأمراض الطفيلية الواسعة الانتشار في العالم اذ يصيب الإنسان والحيوان ، وتتباين نسب الاصابة من منطقة الى اخرى [١] . ويعد الإنسان المضيف الأخير لموت الطفيلي Dead – end host بسبب انقطاع دورة حياته[٢] ، بينما في الأبقار وبقية آكلات الأعشاب تكتمل الدورة بتغذي المضيف النهائي من الكلاب وبقية أفراد العائلة الكلبية (Canidae) على الأحشاء المصابة بالاكياس العدرية إذ ينمو كل رؤيس أولي Protoscolex إلى دودة بالغة قادرة على أن تبدأ دورة حياة جديدة [٣] .

تناولت هذه الدراسة استعمال إحدى الطرق الجزيئية المعتمدة على البروتينات والأنزيمات المتناظرة Isozyme analysis وذلك بإيجاد نوع من المؤشرات التي تستطيع تشخيص الأفراد ودراسة التنوع الوراثي Genetic diversity لها على مستوى المادة الوراثية DNA وبالتحديد تفاعل الـ RAPD (التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا للكشف عن التباينات الوراثية في دنا عزلات طفيلي Hydatid Cysts المعزولة من الأبقار لمناطق جغرافية مختلفة من القطر لوضع الخطط اللازمة والاستفادة من النتائج لمقاومة هذه الطفيليات [٤] ودلك من خلال انتاج سلالات مهجنة مضعفة تستخدم لاغراض التلقيح للماشي للحد من الاصابة من المرض او التقليل من شدة خطورته.

المواد وطرائق العمل:

تم عزل المادة الوراثية الـ DNA من عينات الأكياس العدرية في الاعضاء المصابة (الكبد ،والرئة) التي جمعت من المجازر في المحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق وللفترة من نيسان ٢٠٠٥الى حزيران ٢٠٠٦كما تم اجراء البحث في كلية العلوم –جامعة بغداد ومركز التقنيات الاحيائية والهندسة الوراثية– جامعة النهرين. ومن مصادر الأبقار Cows . تم أخذ ١ سم^3 من نسيج الطبقة المولدة لكل من الأكياس العدرية المستأصلة من الأبقار والمحفوظة لفترات متباينة في ٧٠% كحول أثيلي ، ووضعت على حدة في أنبوب حجم 1.5 مل ، اضيف إليها ٧٠٠ مايكروليتر من المحلولProtienase buffer [٥] . استخدم مقص معقم صغير لقطع النسيج داخل الأنبوب إلى قطع صغيرة جداً ، ثم إضيف٣٥ مايكروليتر من المحلول أنزيم Protienase – K ، وحضن بدرجة حرارة ٥٥ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك إضيف ١٠ مايكروليتر من المحلول أنزيم محلل الرنا RNAase حضن لمدة ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مئوية ،إضيف حجم مماثل من محلول فينول/ كلوروفورم /كحول الأيزواميل ورج بجهاز الرج الكهربائي لمدة دقيقة واحدة ، ثم طرد مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة.

وسحبت الطبقة العلوية الى أنبوب نظيف وكررت هذه العملية إلى أن تختفي الطبقة البيضاء الوسطية ،اضيف ٠,٦ من حجم الرائق كحول الأيزوبروبانول وترك لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ، ثم طرد مركزياً بسرعة ١٤٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق ،اهمل الرائق وغسل الراسب بالكحول الأثيلي ٧٠% مرة وبالكحول الأثيلي ٩٥% مرة أخرى وترك الأنبوب مفتوحاً ليجف تماماً من الكحول ثم إذيب دنا بإضافة ١٥٠ مايكروليتر من المحلول دارئ TE ، وحضن لمدة ساعتين بدرجة ٦٥ مئوية حتى يذوب تماماً وحفظ بعد ذلك بدرجة حرارة – ٢٠ مئوية .

وبعد أن تم توصيف الدنا Characterization of DNA وذلك بقياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته [٦] اجري تفاعل التضاعف المسمى بـ RAPD استناداً إلى [٧] والذي يشمل الخطوات الآتية :-

- حضر خليط التفاعل الرئيسي Master Mix وذلك بمزج المكونات الآتية في أنبوبة معقمة وبالتراكيز المبينة إزاء كل مادة :-

المكونات	الحجم لعينة واحدة	التركيز النهائي	٢٤
ماء مقطر	١٧,٧	–	٤٢٤,٨
محلول منظم بقوة ١٠ X	٢,٥	١X	٦٠
dNTPs	٠,٥	٢٠٠ MM	١٢
البادئ	٢	IOPMol/R	٤٨
أنزيم البلمرة	٠,٣	١,٥ u/R	٧,٢
٢٣ Ml			

+ 2Ml of DNA (50ng/Mol)

- ثم مزج المكونات جيداً باستخدام vortex لمدة ٣٠ ثانية ، وبعدها يوضع في المنبذة لمدة ٣٠ ثانية لترسيب قطرات المحلول المتعلقة على جدار الأنبوبة .
- وزعت المحتويات للإنسان 552 لكل أنبوبة من الأنابيب الصغيرة Eppendorf سعة (٠,٥ مل) معلمة بأسماء العزلات 24 قيد الدراسة .
- أضيفت ٢ مايكروليتر من دنا كل عينة ممثلة للصنف وذلك بعد إجراء التخافيف للنماذج المركزة باستخدام الماء المقطر للوصول إلى الحجم النهائي المطلوب بدء التفاعل التضاعفي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا والذي تراوح بين ١٠-٥٠ نانوغرام لكل مايكروليتر من عينة الدنا [٨] ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر .
- مزجت جيدا بالمنبذة لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوبة واضيف لكل أنبوبة من ٢٠-٢٥ مايكروليتر زيت معدني Mineral oil لمنع التبخر أثناء عملية التضاعف التي تصل فيه درجة الحرارة إلى 94 م^{o} [٩]
- نقلت الأنابيب إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermocycler لبدء التفاعل التضاعفي وفقاً للبرنامج الآتي :-

دورة واحدة لمدة ٢ دقيقة في درجة ٩٤ م^{o} للمسخ الأولي لشريط الدنا . ٤٠ دورة تضاعف كل دورة ٢ دقيقة على درجة ٩٢ م^{o} لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٣٦ م^{o} لربط البادئات بالدنا القالب ٢ دقيقة على درجة حرارة ٧٢ م^{o} لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة أخيرة واحدة للاستطالة لمدة ١٠ دقائق وعلى درجة حرارة ٧٢ م بوصفها دورة أخيرة للاستطالة النهائية .

- رفعت الأنابيب من المبلمر الحراري وسحبت العينات تحت الزيت بحجم (٢٣-٢٤) مايكروليتر ثم تخرج (٣) مايكروليتر من محلول التحميل .
- حضر هلام الأكاروز بتركيز ١,٢% وتم ترحيل العينات بالحفر مع الدليل الحجمي المتكون من دنالامبدا المقطع بأنزيم (Eco1) ولمدة ٤-٥ ساعات .
- تم فحص الهلام بعد صبغه بصفة بروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية Uv – light صور الهلام باستخدام جهاز تصوير وأقلام من نوع Black ,White Flim Type 667 Polariod
- تم تقدير الأوزان الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الأوزان المعروفة والناتجة من قطع دنا الأنزيم (Eco1) فقط التي عدت دليلاً حجمياً قياسياً .
- تم اختبار (٤) بادئ وهي :-

OPF – 06	**GGGAATTCGG**
OPF – 19	**CCTCTAGACC**
OPF – 13	**GGCTGCAGAA**
OPF – 16	**GGAGTACTGG**

من البادئات المنتجة من قبل Operon Technologies Alamed A لاستخدامها في التحاليل النهائية لتجارب الـ RAPD وتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام إلى الجداول Brinary Character وذلك

بوضع (١) عند وجود حزمة و(٠) عند غياب الحزمة وتم تقدير الأوزان الجزيئية لنواتج التضاعف موازنة مع الدليل الحجمي Eco1 فقط ولغرض تشخيص كل صنف من الأصناف المدروسة تم إيجاد مؤشر خاص لبعض العزلات Cultivar Specific marker وذلك بظهور حزمة في ذلك الصنف دون بقية الأصناف .

النتائج والمناقشة :

تم الاعتماد في تحليل تفاعلات الـ RAPD في هذه الدراسة على نتائج الدراسات الحديثة المماثلة في طريقة حساب وعرض الحزم المتضاعفة لتحديد التباينات الوراثية على هلام الاكاروز في التوصيل الكهربائي في العزلات الأربع والعشرين قيد الدراسة ولتحديد المؤشرات الوراثية فيما بينها [١٠] وكما يلي :-

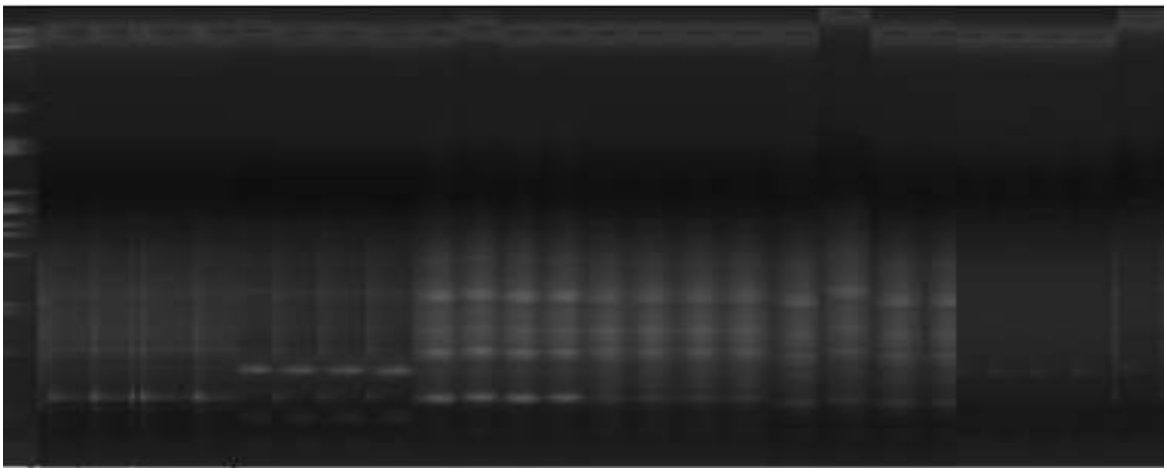
١- البادئ OPF-16 :

أظهرت مضاعفة العينات الأربع والعشرين لطفيلي الأكياس العدرية المعزول من المضيف الوسطي الأبقار من مناطق جغرافية مختلفة من القطر ، إذ أن هذا البادئ أستطاع التعرف على التتابعات المكملة في قالب الدنا " اذ يوضح الشكل (١) ظهور حزم التضاعف للعينات تراوحت مابين (٢-٥) حزم وأوزانها الجزيئية تراوحت مابين (٥٠٠-٨٩٠) زوج قاعدي ، الجدول (١) .

الحزم ذات الاوزان الجزيئية (٩٨٠ ، ٧٦٠ ، ٥٠٠) زوج قاعدي ظهرت في جميع العينات المدروسة . اما الحزمة ذات الوزن الجزيئي (٧٢٠) زوج قاعدي ظهرت في العينات المعزولة من الأكياس العدرية للمضيف الوسطي الأبقار من المناطق الوسطى والجنوبية فقط ولم تظهر في العينات الباقية المأخوذة من المناطق الشمالية من القطر .

الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٨٠٠ زوج قاعدي قد ظهرت في العينات المعزولة من الأكياس العدرية للمضائف الوسطية (الأبقار) في المناطق الجنوبية فقط ولم تظهر في باقي العينات، لذا يمكن تمييز هذه العينات باستخدام هذا البادئ OPF-16 من ظهور هذه الحزمة التي تمثل مؤشر ا وراثيا OPF -16 800bp مرتبطا بهذه العينات ويمكن استخدام هذا المؤشر دليلا لتسهيل مهمة التمييز. أما الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٩٦٠ زوج قاعدي ظهرت في دنا العينات المعزولة من الأكياس العدرية للمضائف الوسطية الأبقار المأخوذة من المناطق الوسطى في القطر وبذلك تعد هذه الحزمة مؤشر وراثي OPF -16 ٩٦٠bp لهذه العينات .

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤



NO. of samples

شكل(١): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق بأستخدام البادئ OPF-16ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (١): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة باستخدام البادئ OPF.16 للعينات المستخدمة في البحث

MW bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
٩٨٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٩٦٠	٠	٠	٠	٠	١*	٠١*	١*	٠١*	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٨٠٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠١*	٠١*	٠١*	٠١*	٠١*	٠١*	٠١*	٠١*	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٧٦٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٧٢٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٥٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠

*** تمثل حزم التضاعف المتباينة**

(١) يمثل وجود حزم التضاعف.

(٠) تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١-٨ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى.

العينات من ٩- ١٦ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الجنوبية.

العينات من ١٧-٢٤ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الشمالية.

٢- البادئ OPF -13:

أظهرت مضاعفة عينات دنا الأكياس العدرية قيد الدراسة من خلال هذا البادئ بشكل حزم عددها من (٦-١٠) حزمة شكل (٢) وتراوحت أوزانها الجزيئية بين (٣٠٠-١٨٠٠) زوج قاعدي جدول (٢) .

الحزمتين ذات الوزنين الجزئيين ١٨٠٠ ، ١٦٠٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا العينات للأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمناطق الوسطى والجنوبية من القطر فقط ولم تظهر في العينات الباقية.

أما الحزم ذات الأوزان الجزيئية (١١٠٠، ٩٠٠ ، ٧٧٠ ، ٧٥٠، ٧٣٠ ، ٥٤٠ ، ٤٩٠ ، ٣٠٠) زوج قاعدي قد ظهرت في جميع عينات الدراسة الأربع والعشرين. في حين ظهرت الحزم ذات الأوزان الجزيئية ٧٩٠ ، ٦٣٠ ، ٣٧٠ زوج قاعدي في دنا عينات الأكياس العدرية للمضائف الوسطية الأبقار للمناطق الشمالية

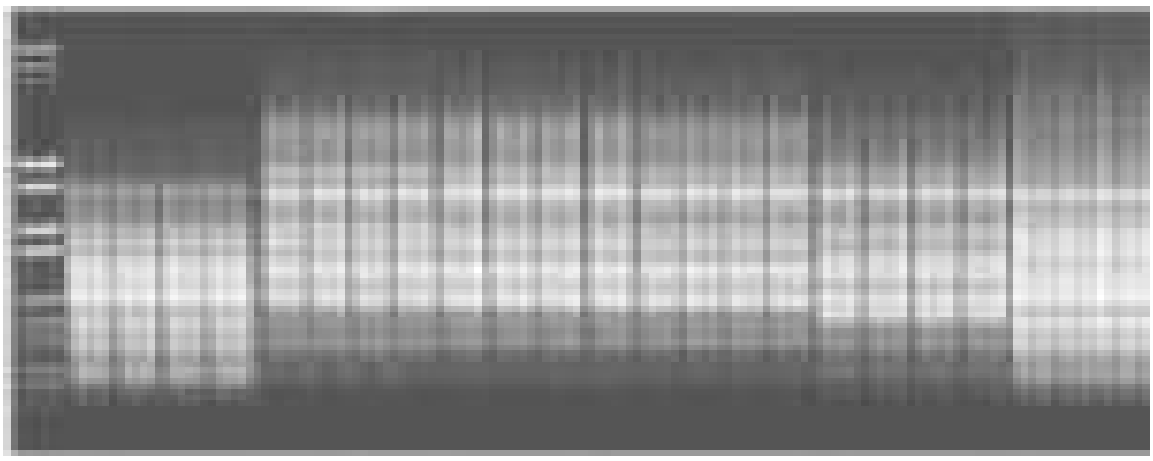
فقط ولم تظهر في باقي عينات الدراسة الأخرى وبذلك تعد مؤشرا وراثيا لهذه العينات , OPF -13 790 bp 630 bp , 370 bp. ومن خلال ملاحظة النتائج لهذا البادئ ، يمكن القول أن هذا البادئ قد تمكن من تحديد العينات المعزولة من الأكياس العدرية للأبقار من المناطق الشمالية فقط بطريقة الحزمة المؤشرة Marker band ويمكن اعتباره متخصصا في تشخيص هذه العينات وهذا راجع لوجود أكثر من موقع لهذا البادئ مكمل لتتابعات الدنا القالب في العينات للمناطق الشمالية[١١] .

٣- البادئ OPF-6

أظهر هذا البادئ حزم تضاعف يتراوح عددها من (٢-٦) حزمة شكل (٣) وتراوحت أوزانها الجزيئية من (١١٠٠ – ٤٦٠) زوج قاعدي . جدول (٣) .

الحزمتين ذات الوزن الجزيئي ١١٠٠، ٧٧٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمناطق الوسطى والشمالية من القطر فقط . والحزمتين ذات الوزن الجزيئي (١٠٠٠، ٥٤٠) زوج قاعدي قد ظهرتا في جميع العينات المدروسة . أما الحزمة ذات الوزن الجزيئي (٨٠٠) زوج قاعدي قد ظهرتا في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمناطق الوسطى فقط وبذلك تعد مؤشرا وراثيا OPF-6 800bp لهذه العينات. والحزمة ذات الوزن الجزيئي ٩٩٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة في المضائف الوسطية " الأبقار " للمناطق الجنوبية فقط ولم تظهر في باقي العينات المدروسة . فتعد مؤشرا وراثيا لهذه العينات OPF-6 990bp.

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤



NO. of samples

شكل (٢): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق بأستخدام البادئ OPF-13ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (٢): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة بأستخدام البادئ OPF.13 للعينات المستخدمة في البحث

MW bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
١٨٠٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

١٦٠٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
١١٠٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٩٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٩٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١
٧٧٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٧٥٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٣٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١
٦٣٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠
٥٤٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٤٩٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٣٧٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١
٣٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١

*** تمثل حزم التضاعف المتباينة**

(٢) يمثل وجود حزم التضاعف. تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١-٨ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى.

العينات من ٩-١٦ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الجنوبية.

العينات من ١٧-٢٤ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الشمالية.

الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٤٦٠ زوج قاعدي قد ظهرت في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمناطق الشمالية فقط وبذلك تعد مؤشرا وراثيا لهذه العينات OPF_6 460bp وبذلك يكون البادئ OPF -6 وقد استطاع تمييز دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية " الأبقار " للمناطق الوسطى الجنوبية والمالية بمؤشرات وراثية مختلفة[١٢] , [١٣] .

٤- البادئ OPF – 19

أظهرت نتائج التضاعف باستخدام هذا البادئ حزم تراوحت بين (٤-٧) حزمة شكل (٤) وتراوحت أوزانها الجزيئية (١٠٥٠ – ٥٥٠) زوج قاعدي جدول (٤) ، الحزم ذات الأوزان الجزيئية (٩٨٠ ، ٨٦٠ ، ٦٣٠ ، ٥٥٠) زوج قاعدي قد ظهرت في جميع عينات الدراسة الأربع والعشرين .

في حين ظهرت الحزمة ذات الوزن الجزيئي ١٠٥٠ زوج قاعدي في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمناطق الجنوبية والشمالية فقط ولم تظهر في باقي العينات .

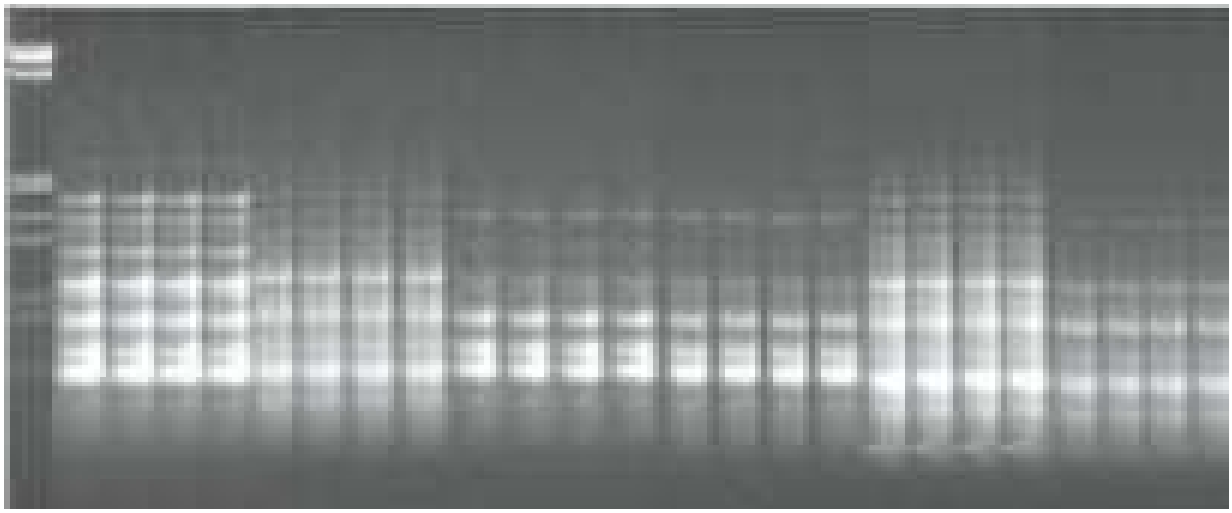
أما الحزمتين ذات الوزن الجزيئي (١٠٠٠ , ٧٥٠) زوج قاعدي قد ظهرت في دنا عينات الأكياس العدرية المعزولة من المضائف الوسطية الأبقار للمحافظات الجنوبية فقط وبذلك تعد مؤشرا وراثيا bp ٧٥٠ , ١٠٠٠ bp OPF -19 لهذه العينات فقط.

يتضح من ذلك أن البادئ OPF – 19 قد تمكن من تمييز العينات المعزولة من المناطق الجنوبية فقط بطريقة المؤشر الوراثي Marker band .

في هذه الدراسة الأولى من نوعها استطعنا تمييز دنا العينات المعزولة من الأكياس العدرية للمضائف الوسطية الأبقار في المناطق الوسطى والجنوبية والشمالية باستخدام البادئات OPF- 13 , OPF-16 , -6 OPF , OPF -19 لما تمتلكه هذه العينات من قواعد وراثية عريضة وبما أن كل حزمة تمثل موقعا [٨]

. لذا فأن معرفة هذه المواقع مهمة في الكشف عن مواقع معينة في المجين الكلي للأنــواع المختلفــة بــدون الاضطرار إلى إيجاد الخارطة الوراثية لتلك الأنواع [١٤].

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤



.

NO. of samples

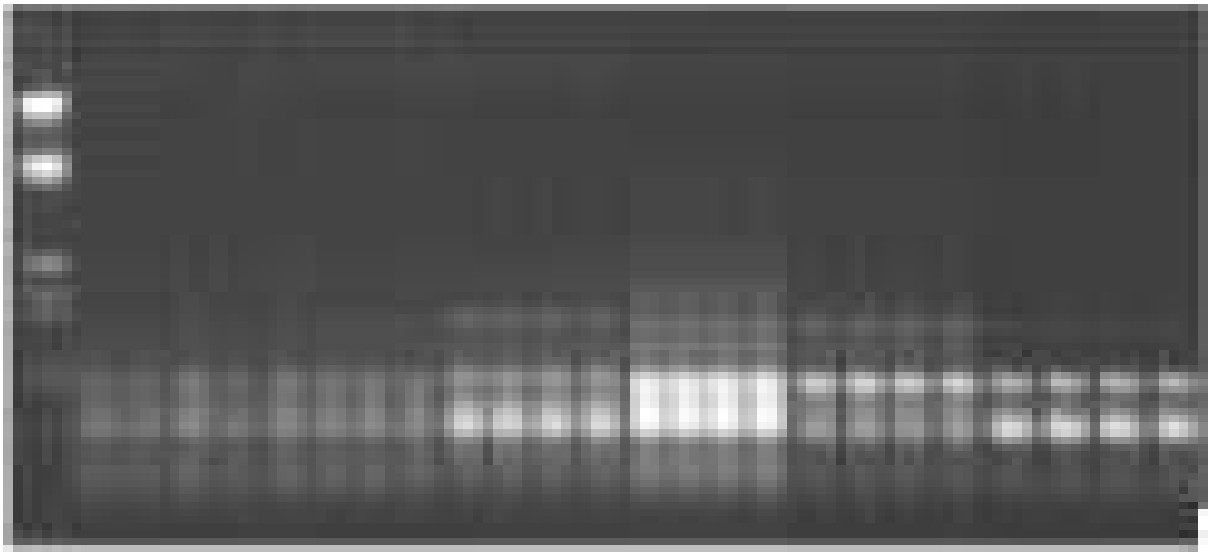
شكل (٣): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الأكياس العدرية المستأصلة من الأبقار للمحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادئ OPF-06 ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول (3): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة باستخدام البادئ OPF.6 للعينات المستخدمة في البحث

MW bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
١١٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
١٠٠٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
٩٩٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٨٠٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٧٧٠	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١
٦٥٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١
٥٤٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٤٦٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١

*** تمثل حزم التضاعف المتباينة**
(١)يمثل وجود حزم التضاعف.
(٠)تمثل عدم وجود حزم التضاعف.
العينات من ١-٨ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى.
العينات من ٩-١٦ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الجنوبية
العينات من ١٧-٢٤ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الشمالي

m	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤



NO. of samples

شكل (4): يمثل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز ١,٢% للعينات المأخوذة من الاكياس العدرية المستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى والجنوبية والشمالية من العراق باستخدام البادئ OPF-19ولمدة ٣,٥ ساعة وبفولتية مقدارها ٦٥ فولت

جدول(4): يبين طريقة حساب عدد الحزم الناتجة باستخدام البادئ OPF.19 للعينات المستخدمة في البحث

MW bp	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
١٠٥٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	٠	٠	٠	٠
١٠٠٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٩٨٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٨٦٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٧٥٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١	*١	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
٦٣٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١
٥٥٠	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١	١

*** تمثل حزم التضاعف المتباينة**

(١)يمثل وجود حزم التضاعف.

(٠)تمثل عدم وجود حزم التضاعف.

العينات من ١-٨ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الوسطى.

العينات من ٩-١٦ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الجنوبية.

العينات من ١٧-٢٤ من الاكياس العدرية مستأصلة من الابقار للمحافظات الشمالية.

المصادر :

1- FAO-UNEOWHO.Guidelines for surveillance prevention and control of echinococcosis / hydatidosis . VPH /81.28 , Geneva , 1981 .

2- Zeibig, E.A. Clinical parasitology : Apractical approach. W.B. Saunders CO., philadeliphia: 195- 202 , (1997).
3- Moro ,P.L ; Bonifacio, N.; Gilman , R.H. ; Lopera, l .; Silva B. ; Takumoto , R. ; Verastegui, M. and Cabrera , L. Field diagnosis of Echinococcus granulosus infection amony intermediake and definitive hosts in an endenuic of human cystic echinococcosis .Tran Roy. Soc . Trop .
4- Zhang, l :, Eslanu, A:, Hosseini, S.H and McManus . D.P. Indication of the presence of two distinct strains of Echinococcus granulosus in Iran by unitochondrial DNA markers . Am. J . Trop.Med. Hyg., S9 (1)): 171 -174, (1998).
5- Abraham , K. M. ; longo , N. S and Hewitt , J. A. Detection of transgene integrants and homologus recombination in mice by polymerase chain reaction In : Meltzer , S. J. (ed.) . Methods in Molecular biology, Vol . 92 : PCR in bioanalysis . Human press , Inc. N.J, 1998 .
6- Sambrook , J. ; Fritsch , E. F. and Maniatis , T. Molecular cloning : A Laboratory manual, 2nd edn. Cold spring Harbor lab. , New York .
7- Williams , J. G. K. ; Kubelik , A. R. ; Livak , K. J. ; Rafalski , J. A. andTingey , S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. 18: 6531 – 6535 , 1989 .
8- Udupa , S. M. ; Weigand , F. ; Saxena , M. C. and Kahl , G. Genotyping with RAPD micro satellite markers resolves pathtype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea . Theor. Appl. Genet ,1997 ;229-307, 1998 .
9- Weigmand , F. ; Baum , M. and udupa , S DNA molecular markers techniques : Technical manual. No. 20. Int.Cent. gric.Res. Dry Areas , Aleppo , (1993).
10- Turcekova, L.; Snabl , V. , D´ Amelio , S.; Busi ,, M . ; Dubinsky , P Morphological and genetic characterization of Echinococcus granulosus in the Slovak Republic . Acata. Trop., 85(2);223-229, 1998 .
11- Turcekova , L. ; Snabel , V. ; D´ Amelio , S. ; Busi , M. and Dubinsky , P. Genetic variants of Echinococcus granulosus in Slovakia recorded by random amplification of polymorphic DNA.Abst. 2003 .
12- Siles– Lucas , M .; Felleise , R.; Cuesta – Bandera , C.; Gottstein, B. And Eckert, J. Comparative genetic analysis of swiss and Spanish isolates of Echinococcus granulsous by southern hybridization and random amplified polymorphic DNA technique.Appl. Parasitol .,35(2);107-117,-(1994).
13- McManus D.P. Thompson R.C.A. Molecular epidemiology of cystic Echinococcosis . Cambridge Journals . onlines. Parasitology , 127;0-0,(2003).
14- Dinkel A,Njotoge EM, Zimmermann A, Waiz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackensted TU, Romig T . A PCR system for detection of species and genotypes of the Echinococcus granulosus – complex , with reference to the epidemiological situationin eastern Africa. Int J parasitol , (5): Apr ; 34645-53, (2004).