# أمكانية استبدال مركب CTAB في عملية استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين من النسيج النباتي

**عقيل هادي عبد الواحد**

**كلية الزراعة-جامعة البصرة- العراق**

**الخلاصة**

اجري البحث الحالي لبحث إمكانية استبدال المركب الكيمائي الـ (CTAB) Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide المستخدم في استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين ( DNA) من النسيج النباتي بالمركبين الكيميائيين بولي فينايل بايرودين PVP و سلفات دودسيل الصوديوم SDS، وتبين من نتائج البحث أن عملية الاستبدال كانت ناجحة باستخدام كلا المركبين وقد تفوق المركب PVP معنويا في استخلاص DND من النسيج النباتي(سعف النخيل) على المركب SDS وقد أعطى الأخير كمية DNA اقل من PVP ونوعية نقاوة اقل مقارنة مع PVP.

**المقدمة**

ان تطور علم الأحياء الجزيئي وظهور المؤشرات الجزيئية التي تدعى مؤشرات DNA (DNA Markers) وخصوصاً تلك المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA (Polymerase chain reaction PCR) تميزت بالدقة والكفاءة العالية في الكشف عن التباينات الوراثية وتحديد البصمة الوراثية والمسافة الوراثية بين أفراد أو ضروب النوع الواحد في مجال النبات. لقد تم وصف تضاعف المادة الوراثية DNA (PCR) لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام ١٩٨٥ على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من DNA المنتجة من الجينوم الكلي إنزيمياً خارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط DNA القالب (DNA Template) ( Mullis and Fallona,1987 ).

لتظهر بعد ذلك عدد من مؤشرات DNA المعتمدة على تقنية PCR مثل تقانات Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) و Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) و Simple Sequence Repeats (SSR) وغيرها، وجميع هذه التقنيات تتطلب كمية ونوعية جيدة من DNA المستخلص من النسيج النباتي. لذا ظهرت عدة طرق معروفة لاستخلاص DNA من النسيج النباتي وان اغلبها تعمل على نفس الأساس وهو تحطيم الجدار الخلوي و الغشاء البلازمي بحيث تسمح بتحرير المواد النووية بدون أن تتحطم هذه المواد وذات كمية ونوعية جيدة. ومنها طريقه المعتمدة على مركب CTAB والمحاليل المنظمة المتكونة من مجموعة من الأملاح(Doyle and Doyle,1987)

وان هذه الطرق تحتاج إلى كمية كبيرة من النسيج النباتي (بالغرام) وكما وان الطرق المعتمدة على النتروجين السائل في تحطيم الجدار الخلوي لا تسمح للمادة الوراثية بالتحرر يمكن إن تؤذي أنزيمات المحللة للجدار الخلوي لذا تبقى هذه الطريقة غير فعالة بدرجة كافية إضافة إلى أنها غير أمنة في ظل مختبراتنا الحالية(Ahmed *et al*.,2009). كما إن احتواء النسيج النباتي وخاصة نسيج أوراق النخيل من بعض المركبات الكيميائية التي تتداخل وتؤثر على استخلاص DNA مثل المواد الفينولية وعديدة السكريات قد صعبت من طريقة الاستخلاص، ولكون مركب البولي فينايل بايرودين وسلفات دودسيل الصوديوم هما من أهم المركبات التي تساعد على تقليل تأثير هذه المركبات وكذلك تعمل على تحطيم الجدار الخلوي لكون الأخير يعمل كمنظف، لذا اجري هذا البحث لبيان إمكانية استخدام بعض المحاليل مناسبة يمكن أن تؤدي هذا الغرض في تحطيم الجدار الخلوي الذي يفصل بجهاز الطرد المركزي ثم يُعمد إلى البروتينات والمواد الأخرى لتترسب بوجود الكلوفورم والقوة الطاردة المركزية ويبقى DNA في الطور المائي الذي ينقى بوجود بعض الأملاح للحصول على كمية كافية ونقية من DNA لأجراء اختبارات اللاحقة بتقنية PCR.

**المواد وطرائق العمل**

أجريت الاختبارات في مختبرات التقانات الحيوية والهندسة الوراثية/كلية الزراعة –جامعة البصرة .إذ تم جمع الأوراق حديثة التكوين من أفحل النخيل تحت الدراسة (الخكري العادي) وجفدت باستخدام تقنية التجفيف بوساطة التبريد ( Freeze-dryer technique) حيث وضعت العينات المراد تجفيدها في عبوات بلاستيكية ثم وضعت في جهاز التجفيد (Lyophilizer) نوع (Edwards) وموديل (Prianiso) وبدرجة حرارة 26-

م ولفترة زمنية معينة إلى أن يتم التخلص من الماء ، حفظ المسحوق بعد ذلك في أنابيب محكمة الغطاء ثم وضعت في المجمدة لحين استعماله فيما بعد:

**استخلاص الأحماض النووية DNA Extraction**

تم عزل DNA وفقاً لطريقة Weigand *et al.* (1993) ، وحسب الخطوات الآتية : أخذت ٠.٢ غرام من الأوراق النباتية الفتية الخضراء النظيفة والخالية من الأمراض، وضعت العينات في أنابيب اختبار بلاستيكية وجففت بجهاز Freeze Dryer أعلاه ثم طحنت بجهاز الطحن. أضيف ١مل من محلول الاستخلاص2x CTAB، المسخن إلى درجة حرارة ٦٠-٦٥ م.

(2XCTAB= 1.4M Nacl, 0.1M tris-HCL, pH= 8, 20mM DTA,2% CTAB)(CTAB)
Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide:

نقلَ سائل الاستخلاص المحتوي على مسحوق الأوراق إلى أنبوبة سعة ٢مل ثم وضعت في حمام مائي على درجة حرارة ٦٥م ولمدة ٣٠ دقيقة مع التحريك الهادئ لفصل الدهن والبروتين والبقايا النباتية عن الأحماض النووية . أخرجت العينات من الحمام المائي وأضيف إليها حجم مماثل من مزيج الكلوروفورم\أيزواميل بنسبة (٢٤:١). مزجت العينات بشكل جيد ووضعت على هزاز أفقي لمدة ١٥ دقيقة بهدف فصل المواد الدهنية التي تذوب في المذيب العضوي (الكلوروفورم) عن الأحماض النووية التي تذوب في الوسط المائي (سائل الاستخلاص). نقلت العينات إلى جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة(٥٠٠٠ دورة\دقيقة) لمدة عشرة دقائق بدرجة حرارة ٢٠م. بعد عملية الطرد المركزي نقل الوسط المائي المحتوي على الأحماض النووية (الطبقة العلوية) إلى أنبوب جديد وأضيف ما يعادل ٦٠٠-١٠٠٠ مايكرولتر من كحول

الأيزوبروبانول.مزج بهدوء ثم ترك لمدة ٣٠ دقيقة على درجة الحرارة الغرفة كي يترسب DNA، بعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (١٠٠٠٠ دورةادقيقة) لمدة ١٥ دقيقة فترسب DNA في قاع الأنبوب. استبعد الأيزو بروبانول مع مراعاة الحفاظ على DNA من الفقد (يكونان متجمع في قعر الأنبوب). أضيف ١مل من كحول الاثيلي (٧٦%) لغسل الأحماض النووية من آثار البروبانول ثم جمع الراسب عن طريق الطرد المركزي لمدة عشر دقائق على سرعة ١٠٠٠٠دورة ادقيقة. أعيدت عملية الغسل مرة ثانية بنفس الظروف ، استبعد الكحول بدقة متناهية وتركت الأنابيب بوضع مقلوب على أوراق ترشيح ثم جفف هوائيا لمدة عشر دقائق . أضيف ٣٠٠-٥٠٠ مايكرولتر من الماء المقطر والمعقم إلى الأحماض النووية المتجمعة في القاع ووضعت على الهزاز ضمن أوعية تحتوي على ثلج حتى الذوبان الكامل لمادةDNA. رفعت العينات من الحرارة وأضيف لها ٩٠ مايكرولتر خلات صوديوم (٤ ملي مول، PH=٥.٢) لترسيب وتنظيف DNA، بعدها أضيفت ٢مل من كحول الأيثانول (١٠٠%) البارد جداً لغرض تجميع DNA ووضعت في جهاز الطرد المركزي (١٠٠٠٠دورةادقيقة) لمدة ٣٠ دقيقة. بعدها أخذ الأيثانول وأعيدت عملية الغسل بالأيثانول (٧٥%)على DNA المترسب في قاع الأنبوبة .وجففت العينات في (Vacuum oven) ثم أضيف لها ١٠٠-١٥٠ مايكرولتر من الماء المقطر وحفظت في البراد باعتبارها DNA نقي لحين الاستخدام. أعيدت التجربة مرة أخرى باستبدال CTAB بـ Polyvinylpyrrolidone (PVP) بتركيز ٢% او Sodium dodecyl sulphate(SDS) بتركيز ٢% ومقارنتها بطريقة Ahmed *et al.*,(2009) الذي لم يستخدم CTAB المعتمدة على محلول الاستخلاص ( Tris-HCL, EDTA, NaCl ).

**حساب كمية DNA**

لتقدير كمية الحامض النووي DNA في العينات استخدم جهاز المطياف الضوئي نوع Spectrophotometer UV-Visible Shimadzu الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحامض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر. تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة ٢٦٠ نانومتر بحساب تركيز الحامض النووي في العينة بحيث أن كل واحد من الكثافة الضوئية Optical Density (OD) تقابل حوالي ٥٠ مايكروغرام/مل لسلاسل DNA المضاعفة، وحوالي ٣٧ مايكروغرام/مل لسلاسل DNA المفردة و٤٠ مايكروغرام/مل من RNA وحوالي٣٠ميكروغرام/مل للسلاسل المفردة من قليلات النيكليوتيدات Oligonucleotides. إن النسبة بين قراءة الموجة ٢٦٠ نانومتر إلى ٢٨٠ نانومتر (OD 260/OD280) تساعد في تقييم نقاوة الحامض النووي . ويجب أن تتراوح هذه النسبة بحدود ١.٨ في حين أن RNA تتراوح بحدود ٢ . فإذا كانت العينة تحوي الحامض النووي إضافة إلى البروتين أو الفينول فستكون النسبة أقل من الحد الطبيعي (Maniatis, *et al.*,1982). تُحمل كمية قليلة من DNA الكامل (Genomic DNA) على هلامة من الآكاروز تركيزها ١% لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطيعها . حيث يجب إن يظهر DNA على شكل حزم bands عالية الوزن الجزيئي على هلامة الآكاروز. صممت وحللت النتائج وفق تصميم العشوائي الكامل Randomized Complete Design وقورنت المتوسطات وفق تحليل اقل فرق معنوي معدل least significant difference RLSD.

**النتائج والمناقشة**

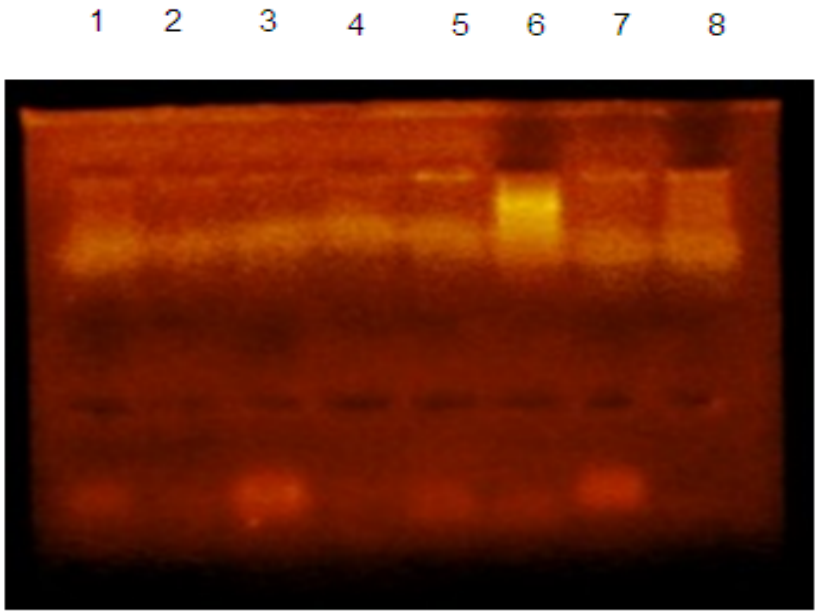
توضح النتائج المبينة في لوحة(١) أن الجينوم الكامل المستخلص من الأوراق الفتية لسعف نخيل التمر الذكري صنف الخكري العادي الخالي من الأمراض والنظيف ، حيث تم استخلاص الجينوم بأربعة طرق: طريقة Ahmed *et al*.(2009) والتي لم يستخدم بها مركب CTAB وطريقة CTAB وهذا المركب شائع الاستخدام في استخلاص DNA من النسيج النباتي بحيث أصبح يطلق على طريقة الاستخلاص باسمة، التي تعد من الطرق الكفوءة في عملية الاستخلاص، وطريقة استبدال CTAB بـ SDS ، إذ الأخير يعمل عمل المركبات المنظفة Detergent في حين CTAB يعمل على عدم تأثير DNA عند الاستخلاص بالمركبات الفينولية والسكريات المتعددة (Porebski *et al*.,1997)والتي يطابق في احد جوانبه عملة PVP إذ انه يعمل كذلك عدم تأثير المواد الفينولية في استخلاص وتنقية DNA. أظهرت النتائج انه لم يلاحظ من الناحية البصرية أي اختلاف على هلام الاكاروز في جميع الطرق المستخدمة. تم اختبار كمية DNA المستخلصة من النسيج النباتي وذلك لبيان هل بالإمكان الحصول على الكمية المناسبة للتقانات المستخدمة في الكشف عن التطابق الوراثي بطريق RAPD و AFLP و RFLP و SSR (Eujal,1998 ) كما أن اللوحة(١) توضح أن DNA المستخلص ذو كتلة عالية مما يدل على أن DNA في غاية النقاوة ولا يحتوى على أي قطع DNA أو RNA مرافقة وكان تركيز DNA في العينات المستخلصة تتراوح بين١.٦ – ٢.٣ مايكروغرام لكل لتر جدول(١)، وهذه الكمية كافية لإجراء اختبارات PCR المختلفة .

تم اختبار نقاوة DNA المستخلص من الأوراق وذلك باستخدام جهاز المطياف حيث قيس العينة المخففة من DNA على طول موجي ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر وكانت النتيجة ١.٧٨ – ١.٨٦ وهذا يدل على ان DNA

المستخلص على درجة عالية من النقاوة إذ قارب الحد الطبيعي لمؤشر النقاوة الذي يقع بين ١.٨-٢ . نستنتج من الدراسة الحالية هو أمكانية استبدال CTAB بأحد المركبين PVP او SDS مع أفضلية استخدام PVP كونه أعطى أعلى نقاوة واكبر تركيز لـ DNA المستخلص

**جدول(١) معدل قيم استخلاص DNA من سعف النخيل عند استخدام طريقة CTAB وبدائلها**

| طريقة الاستخلاص | الامتصاصية على طول موجي ٢٦٠ | النسبة بين الامتصاصية على طول موجي ٢٨٠/٢٦٠ | تركيز DNA (مايكروغرام/مل) |
|---|---|---|---|
| استخدام مركب CTAB | ٠.٤٧٧ | ١.٨٥١ | **2.385** |
| استبدال مركب CTAB بـ PVP | ٠.٤٩٩ | ١.٨٦١ | **2.495** |
| استبدال مركب CTAB بـ SDS | ٠.٤٢١ | ١.٧٨٧ | **2.105** |
| استبدال بـ ( Tris-HCL, EDTA, NaCl ). | ٠.٣٢٥ | ١.٧٨٨ | **1.625** |
| **RLSD(0.05)** | **0.110** | **0.35** | **0.092** |




**لوحة(١) نواتج ترحيل الأحماض النووية (الجينوم الكامل) المستخلصة من الأوراق الفتية لذكور نخلة التمر الخكري العادي على هلام الاكاروز ١%: العينات كررت أربع مرات (عينتان في كل عمود) ١ ، ٢ طريقة CTAB ٣ ، ٤ ( Tris-HCL, EDTA, NaCl) ٥ ، ٦ استبدال بـ PVP ٧ ، ٨ استبدال بـ SDS**

**المصادر**

Ahmed , I. A. ; Ahmed , A. W. K. and Robinson , R. K.(٢٠٠٩). Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening . Food chemistry 54 : 305 – 309.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L.(1987).A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11-15.

Eujal, I.A.M. (1998). Use of DNA markers for geneti c linkage mapping and analysis of biotic and a biotic stress in Lentil (lens. Sp). University of Helsinki.

Dep. Plant producti on secti on of crop. Hasbandry, Publicati on No. 50.

Maniatis, T. , E.F. Fritsch and J. Sambrook .(1982). Molecular cloning: laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,NY.

Mullis, K. B. and F . Fallona. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via apolymerase catalyzed chain reacti on . Methods Enzymol . 155– 335.

Porebski S.; Bailey, L. G. and Baum, B. R.(1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol. Biol. Rep. 15:8-15.

Weigand, F. ; Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20 Internati onal Research for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.

# The possibility of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) replacing in plant DNA extraction

**Aqeel H. Abdulwahid**

**University of Basra,Basrah, IRAQ**

**Summary**

This study was carried out to find out the possibility of cetyl Trimethyl ammonium bromide (CTAB) replacing in plant DNA extraction by polyvinylpyrrolidone (PVP) or sodium dodecyl sulphate (SDS). The results showed that the replacing method was succeeded by two materials (SDS and PVP). The PVP had a significant effect in DNA extraction from plant tissue (leaf of date palm) comparison with other methods, The PVP had good quality and quantity DNA extraction comparison with SDS method.