تحديد الظروف المثلى لمؤشرات الـ DAF (DAF Amplification Fingerprinting)

نعمت جميل عبد الباقي

جامعة بغداد، كلية العلوم، قسم علوم الحياة

الخلاصة

ان مؤشرات الـ DAF هي من المؤشرات التي تم تطبيقها لاول مرة مما تطلب القيام بالعديد من التجارب الاولية للوصول الى الظروف المثلى وذلك بضبط تراكيز مكونات التفاعل ومنها الانزيم المستخدم والمغنسيوم وقالب الدنا، فاظهرت الدراسة ان التركيز الامثل لقالب الدنا كان حوالي 10 نانوغرام/ تفاعل، وللبادىء هو 30 بيكومول والمغنسيوم بلغ 6 ملي مول، اما التركيز الامثل للانزيم المستحدم فهو 2.5 وحدة / تفاعل. كما تم ضبط ظروف التفاعل من ناحية الوقت المحدد لكل مرحلة وطريقة الكشف الحساسة باستخدام هلام متعدد الاكريلامايد والتصبيغ بنترات الفضة $AgNO_3$.

المقدمة

تعرف مؤشرات الـ DAF بأنها التضاعف الإنزيمي لقطع منتخبة من المجين باستخدام بادئات عشوائية مفردة قصيرة تتراوح بين (8 – 10) نيوكليوتيدات بالاعتماد على تفاعل الـ PCR ثم الكشف عن النواتج المتضاعفة باستخدام هلام متعدد الاكريلاميد وهي تعد من احد مؤشرات الـ MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling) (النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية) ، والتي طورت من قبل Caetano – Anolles وجماعته (1991) وتستخدم للكشف عن التباينات الوراثية بين الكائنات الحية وخاصةً القريبة جداً من بعضها.

يختلف النسق الناتج من تطبيق مؤشرات الـ DAF باختلاف تتابع البادئ المستخدم واختلاف الدنا القالب ، في حين يكون النسق ثابت عن استخدام نفس البادئ وقالب الدنا، وتشترك مؤشرات الـ DAF مع مؤشرات الـ RAPD بأنهما يكشفان عن التغيير في تتابع الدنا في مواقع عشوائية على طول المجين والتي تتحدد بتتابع البادئ الذي يكون مكملاً لتلك المواقع ويظهر الاختلاف في عدد الحزم وأوزانها الجزيئية الناتجة من ارتباط البادئات بمناطق الاختلاف بين الأفراد المدروسة بينما تظهر الحزم المشتركة من ارتباط بالمناطق الثابتة conserved sequences من مجين تلك الأفراد (Paterson et al., 2004) وتتميز مؤشرات الـ DAF عن بقية مؤشرات الـ MAAP بأنها تحتوي على عدد كبير نسبياً من النواتج المتضاعفة والتي يطلق عليها أحيانا Amplicon (Mullis, 1991) والناتجة من استخدام بادئات قصيرة ودرجة حرارة الارتباط الواطئة بالاقتران مع طريقة الكشف الحساسة باستخدام هلام متعدد الاكريلامايد وصبغة نترات الفضة القادرة على الكشف عن الدنا الذي يصل تركيزه إلى البيكوغرام (Bassam et al., 1992) لذلك باستخدام هذه المؤشرات يمكن الحصول وفي تفاعل واحد على بصمة دنا ومعلومات كبيرة عن طبيعة الدنا مقارنةً بالمؤشرات الأخرى والمعتمدة على الـ PCR، تستخدم في هذه المؤشرات البادئات العشرية والتي تتراوح فيها نسبة (C+G) بين (60 – 70) % في حين وجد Caetano–Anolles وجماعته (1994) انه بالإمكان الحصول على نواتج تضاعف باستخدام بادئات بطول (4–8) في حين لم يتمكن من الحصول على نواتج تضاعف باستخدام بادئات بطول 4 نيوكليوتيدات فما دون ، أما عدد الدورات المستخدمة في الـ DAF فهي كأي تفاعل للـ PCR تتضمن (35 – 45) دورة ، كل دورة تشمل كل ثلاث مراحل وهي المسخ والارتباط والاستطالة (He واخرون 1995).

في حين تمكن Bassam et al. (1992) من الحصول على نواتج تضاعف واضحة على شكل حزم باستخدام مرحلتين فقط للدورة الواحدة وذلك بدمج مرحلتي الارتباط والاستطالة معاً وذلك لصغر حجم النواتج المتضاعفة. وللدقة والحساسية العالية لمؤشرات الـ DAF فقد أصبحت لها تطبيقات واسعة في اختبارات التشخيص وتحليل العلاقة الوراثية والتطورية وفي إيجاد الخرائط الوراثية (Wang et al.,1998; Jayara et al.,1992; Lucey et al.,2000)

ولغرض تطبيق مؤشرات الـــ DAF في دراسات لاحقة يجب أولا أن نجد الظروف المثلى لإنجاحها لذا جاءت هذه الدراسة للوصول إلى تلك الظروف ولضبط كافة مكونات تفاعل الـــ DAF (Optimization) .

المواد و طرائق العمل :-

1. عزل وتنقية الدنا :

عزل دنا الرز *Oryza sativa* L. صنف (عنبر محلي) وفقاً لطريقة Weigand واخرون (1993) المعتمدة على طريقة Sahgi–maroof , (1984) والتي اعتمدت نفسها في عزل دنا أصناف الرز من قبل (Al-Judy، 2004). كما تم قياس تركيزه وتقدير نقاوته استناداً إلى Sambrook واخرون (1989) و (Al-Judy ، 2004) .

2. تحضير تفاعلات الـــ DAF :

استخدامت الطريقة المعتمدة على Caetano–Anolles واخرون (1994) في تحضير هذا النوع من التفاعلات وإجراء عدة تجارب للوصول إلى الظروف المثلى، استخدمت لذلك المحلول المنظم لإنزيم البلمرة PCR buffer بقوة 10X ويتألف من 100 ملي مولر من الترس ألحامضي tris HCl ذو الاس الهيدروجيني 8.3 و 50 ملي مولر من كلوريد البوتاسيوم KCl و 0.001% جيلاتين، النيوكليوسيدات الحراري الحلقي منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفوسفات (dNTPs) والتي تشمل (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) وبادئ اختير عشوائياً من عدة بادئات مجهزة من شركة Operon technologies وهو البادئ OPD_2 (5'GGACCCAACC3') كلوريد المغنسيوم $MgCl_2$ ، وإنزيم بلمرة الدنا Taq DNA Polymerase، وزيت معدني، إضافة إلى جهاز المبلمر Thermocycler الحراري الحلقي نوع hybrid.

3. خطوات العمل:

يتم إجراء جميع الخطوات داخل كابينة معقمة وبارتداء القفازات ووضع كافة المحاليل في حاوية تحتوي على ثلج . تتضمن خطوات العمل مايلي :-

1- تحضير خليط التفاعل الرئيسي *Master Mix* : وذلك بإضافة المكونات أدناه إلى انبوبة معقمة حجم 1.5 مل وكالاتي :-

	المكونات	الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)	التركيز النهائي
.1	ماء مقطر	15	
.2	محلول منظم القوة 10X	2.5	1X
.3	d NTPs	2.5	200 ملي مولار
.4	كلوريد المغنسيوم:	1	تم اختبار التراكيز التالية: (2 ، 4 ، 6 ، 8) ملي مولار
.5	البادئ:	3	تم اختبار التراكيز التالية: (40،30،10) بيكو مول
.6	إنزيم التضاعف:	0.2	تم اختبار التراكيز التالية: (1.5،2.5،3،4 ،1) وحدة

تمزج المكونات جيداً بخلطها بالـــ vortex لمدة 30 ثانية ثم توضع في المنبذة لعدة ثواني بعدها يضاف 1 مايكروليتر من دنا الرز صنف (عنبر محلي) بعدة تراكيز هي : (25،10،5،2.5) نانوغرام/ مايكروليتر لاختبار التركيز الأمثل، تمزج جيداً وتوضع بالمنبذة لعدة ثواني، ثم يضاف (15 – 20) مايكروليتر من الزيت المعدني وتوصد الأنابيب وتوضع في المبلمر الحراري الحلقي وفق البرنامج التالي:

دورة واحدة بدرجة 94 ْم لمدة أربعة دقائق ، ثم 40 دورة كل دورة تتضمن:

92 ْم لمدة دقيقة واحدة و 35 ْم لمدة دقيقة واحدة و 72 ْم لمدة دقيقة واحدة ثم دورة واحدة بدرجة حرارة 72 ْم لمدة 5 دقائق بعدها ترفع الأنابيب من المبلمر الحراري وتؤخذ 2–5 مايكروليتر من تحت الزيت المعدني وتمزج مع 3 مايكروليتر من محلول التحميل STR وترحيلها على هلام متعدد الاكريلامايد.

2- تحضير هلام متعدد الاكريلامايد Polyacrylamide gel preparation

وفقاً لما وصف في Technical manual الوارد من الشركة المجهزة Promga (DNA Silver staining system 1993). حضر هلام متعدد الاكريلامايد بتركيز 6 % لترحيل عينات الدنا المتضاعف بعد تفاعلات الـــ DAF اعتماداً على Bassam و آخرون (1991) وذلك بتحضير 75 مل منه باستخدام المكونات التالية :-

يوريا يوزن منها 31.5 غم وبتركيز 0.5x و 40 % اكريلامايد بتركيز 6 % تخلط جيداً هذه المكونات و تذوب بشكل كامل ثم يصب الهلام، بعدها ترحل العينات كهربائياً وباستخدام الدليل ألحجمي وهو البلازمد PGEM المهضوم بثلاثة إنزيمات قاطعة وهي *Sin* 1 , *Rsa* 1 , *Hinf* 1 منتجة 15 قطعة معروفة الحجم الجزيئي وكالاتي:
36, 45, 65, 75, 126, 179, 222, 350, 396, 460, 571, 676, 1198, 1605, 2645 زوج قاعدي. يؤخذ منه 5 مايكروليتر ويضاف إلى 2.5 مايكروليتر من محلول التحميل Blue/Orange 6x كما يضاف 2.5 مايكروليتر من محلول التحميل إلى 2.5 مايكروليتر من عينة دنا الرز الناتجة من تفاعلات الـــ DAF تنبذ لثواني لسحب المكونات إلى أسفل الانبوبة. تفصل خيوط الدنا المزدوجة وتحول إلى خيوط مفردة بواسطة تسخينها لدقيقتين على درجة 95 ْم ومباشرةً تغمر في الثلج، ثم يتم تحميل العينات بحجم نهائي يتراوح (5-6) مايكروليتر من عينات الدنا المتضخم ومحلول التحميل في الحفر، وبعد انتهاء وقت الترحيل الذي يستغرق حوالي الساعتين يتم فصل الجهاز عن الكهرباء ثم تنقل الزجاجة الحاوية على الهلام وبهدوء إلى حاوية تحتوي 2 لتر من محلول الصبغة (نترات الفضة $AgNO_3$) وتوضع على الهزاز لفترة ثلاثون دقيقة. بعدها تنقل الزجاجة إلى حاوية فيها ماء مقطر غير ايوني وترج على الهزاز لفترة عشرة ثواني ثم ترفع وتوضع مباشرة وبسرعة في محلول التظهير ولفترة من (5 – 2) دقائق لحين ظهور حزم الدليل ألحجمي وحزمة عينة الدنا تترك لساعات حتى يجف الهلام ثم يصور.

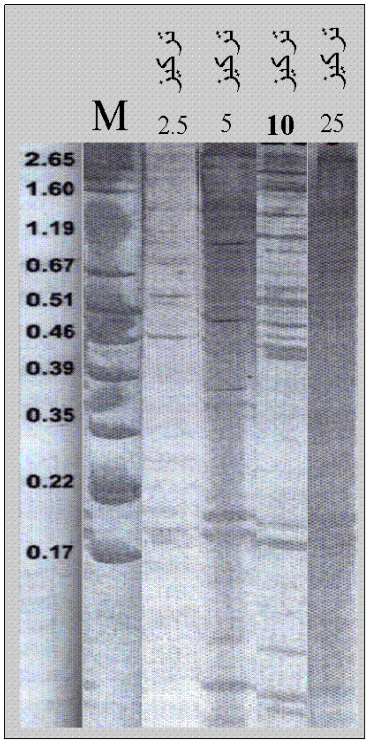
النتائج والمناقشة :

تمت في هذه الدراسة محاولات لتطويع العوامل المؤثرة على مؤشرات الـــ DAF لتطبيقها بنجاح في دراسات مستقبلية وذلك بضبط تراكيز مكونات التفاعل المتبعة بالإضافة إلى طريقة الكشف الصعبة نسبياً وتم ذلك بإعداد البرنامج الملائم وفق المتطلبات المتوفرة للوصول إلى امثل الظروف الملائمة والمتناسبة مع نوع الدنا المستخدم للحصول على النتائج التي يمكن اعتمادها في دراسة لاحقة لمؤشرات الـــ DAF في التشخيص وإيجاد البصمة الوراثية للكائنات المختلفة.

ولقد وجد Bassam واخرون (1992) و Caetano – Anolles واخرون (1994) بان تطبيق مؤشرات الـــ DAF على أي نوع من الدنا يحتاج إلى الضبط الدقيق لمكونات التفاعل للوصول إلى الظروف المثلى والذي يتناسب مع ذلك النوع من الدنا والتي يجب الوصول إليها تجريبياً وان أول هذه العوامل التي درست هي نوع الدنا المستخدم ، فللحصول على نتائج يمكن اعتمادها يجب إتباع طريقة استخلاص تضمن الحصول على نوعية دنا وبدرجة نقاوة مناسبة لتطبيق هذه المؤشرات ، ولقد حصلنا على دنا بدرجة نقاوة جيدة تراوحت مابين 1.6 – 1.8 وتعد درجة مثالية لإجراء تفاعل الـــ PCR ومن خلال ترحيل 4 مايكروليتر من الدنا المجيني لعينة الدنا على هلام الاكاروز وبتركيز 1 % تبين أن الحجم الجزيئي للدنا كان بحدود 50 كيلو زوج قاعدي بالمقارنة مع 2 مايكروليتر من دنا العاثي لامبدا غير المهضوم شكل (1).

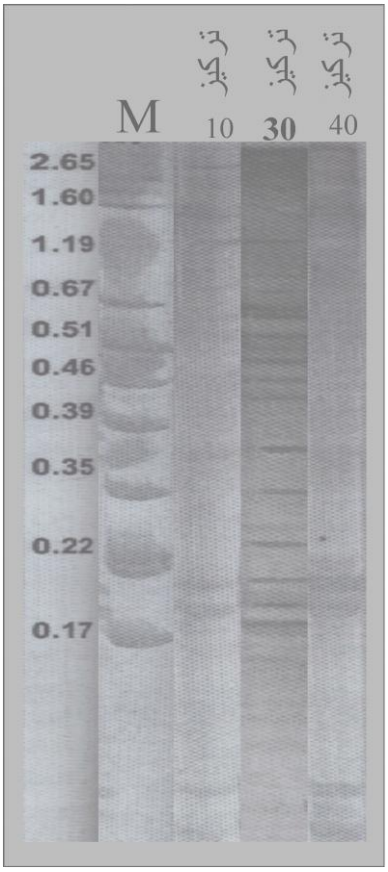
شكل (1):عينة الدنا المعزولة من الرز صنف (عنبر محلي) والمرحلة على 1 % هلام الاكاروز حيث يمثل M الدليل الحجمي القياسي المتكون من دنا لامبدا السليم بتركيز 100 نانوغرام.

أما بخصوص مؤشرات الـــ DAF فالمعروف بأنها تحتاج إلى تراكيز من الدنا اقل من تلك المستخدمة في تفاعلات الـــ RAPD ، لذا فقد تم تجربة عدة تراكيز وهي (2.5،5،10،25) نانوغرام/ تفاعل فوجد بان التراكيز (2.5،5) نانوغرام/ مايكروليتر اظهر عدد قليل من الحزم، أما التركيز (25) نانوغرام/ مايكروليتر فأدى الى الحصول على مسحة طويلة smear وعدم وضوح الحزم الرئيسية فيها وان التركيز الأمثل للدنا كان حوالي 10 نانوغرام/ تفاعل شكل (2) وهذا التركيز يماثل الدنا الذي استخدمه Wang واخرون (1998)في تطبيق مؤشرات الـــ DAF على البطاطا الحلوة في حين كان التركيز الأمثل الذي استخدمه He واخرون (1997) 2.6 نانوغرام/ تفاعل عند تطبيق هذا النوع من المؤشرات على نبات الفستق، أما Caetano – Anolles واخرون (1994) فذكر عند تطبيقه لمؤشرات الـــ DAF على البكتريا بأنه للحصول على نواتج تضاعف يمكن اعتمادها يجب أن لا يقل تركيز الدنا عن 1 نانوغرام/ مايكروليتر وان سبب قلة عدد الحزم الناتجة بتطبيق مؤشرات الـــ DAF عند تقليل تركيز الدنا يعود الى تقليل عدد مواقع الهدف وخاصة تلك المواقع التي يكون وجودها نادر لذلك لا يحدث ارتباط للبادئ بتلك المواقع وبذلك لا تتضاعف أي قطع الدنا منها مما يؤدي إلى قلة عدد الحزم الناتجة لذلك ينصح في هذه الحالة بزيادة تركيز قالب الدنا للمستوى المطلوب خاصةً في الكائنات الأقل تعقيداً كالبكتيريا



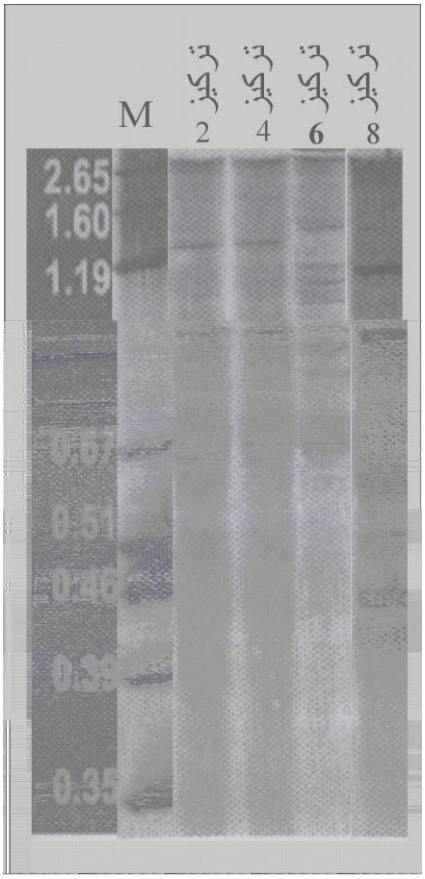
شكل (2) : يظهر النواتج المتفاعلة من دنا الرز صنف عنبر محلي باستخدام تراكيز الدنا (2.5،5،10،25) والتركيز الامثل كان (10 نانوغرام/ تفاعل) والمرحلة على هلام متعدد الاكريلامايد 6 % مع الدليل الحجمي PGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد.

أما ما يخص تركيز البادئ فقد تمت في هذه الدراسة تجربة عدة تراكيز (10–40) بيكومول وقد وجد بان التركيز الأمثل كان 30 بيكومول وان التركيز الأقل من ذلك أدى إلى تقليل واضح في عدد الحزم الناتجة أما زيادة تركيز البادئ عن 40 بيكومول فلم يكن له تأثير ملحوظ في هذه الدراسة ، وهذا يعني بان تركيز البادئ ازداد في مؤشرات الـــ DAF يرافقه تناقص في تركيز الدنا القالب، وهذا يتفق مع ما وجده Power (1997) بان التراكيز العالية للبادئ مع التركيز القليل للدنا أدت إلى الحصول على قطع متضاعفة أكثر وبأوزان جزيئية قليلة وان السبب في ذلك يعود إلى أن التركيز العالي للبادئ أدى إلى ارتباطها بعدد اكبر من المواقع على الدنا القالب وبالتالي أدت إلى زيادة عدد الحزم الناتجة.



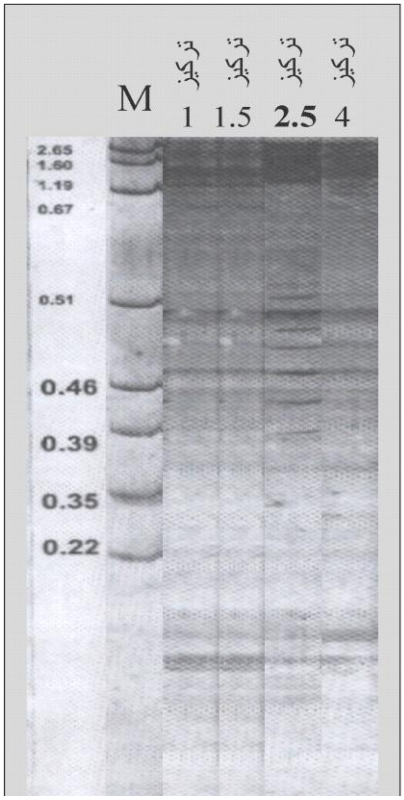
شكل (3) : يظهر النواتج المتفاعلة من دنا الرز صنف عنبر محلي باستخدام تركيز للبادئ (10 – 40) بيكومول والتركيز الامثل كان 30 بيكومول ، والمرحلة على هلام متعدد الاكريلامايد 6 % مع الدليل الحجمي PGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد مع عينة الدنا صنف عنبر محلي.

ومن العوامل الأخرى التي دُرس تأثيرها في مؤشرات الـــ DAF هو تركيز المغنسيوم إذ بعد تجربة عدة تراكيز من كلوريد المغنسيوم (2 – 8) ملي مولر وجد بان التركيز 6 ملي مولر كان الأمثل شكل(4)، إذ أن استخدام التركيز (2 – 4) ملي مولر أدى إلى قلة عدد الحزم مقارنةً بالتركيز الامثل أما التركيز 8 ملي مولر فقد سبب زيادة سمك الحزم الناتجة وهذا قد يعود إلى أن ايون المغنسيوم يساعد على فاعلية إنزيم بلمرة الدنا والذي يحتاج إلى ايون المغنسيوم لعمله وبذلك يزداد سمك الحزم الناتجة.



شكل (4) : يظهر النواتج المتضاعفة من دنا الرز صنف (عنبر محلي) باستخدام المغنيسيوم بتراكيز (2 – 8) ملي مول ، التركيز الامثل كان 6 ملي مول ، والمرحلة على هلام متعدد الاكريلامايد 6 % مع الدليل الحجمي PGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد.

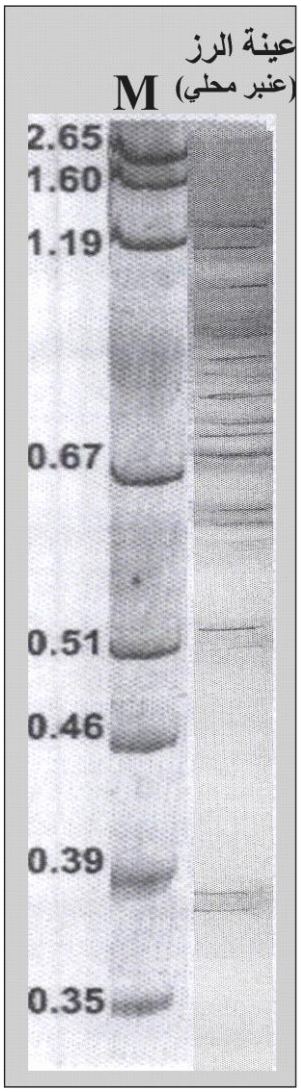
كذلك ازداد تركيز الإنزيم المستخدم في تفاعلات الـــ DAF فكان التركيز الأمثل من بين التراكيز المدروسة هو (2.5 وحدة / تفاعل) شكل (5) وهذا التركيز يماثل التركيز الذي استخدمه Bassam واخرون (1992) في تطبيقه لمؤشرات الـــ DAFعلى البكتريا في حين He وجماعته (1997) استخدم تركيز (5 وحدة/تفاعل) عند تطبيقه لهذه المؤشرات على الفستق وذلك لان وجود عدة مواقع ارتباط بين قالب الدنا والبادئ يحتاج إلى تركيز أعلى من الإنزيم ليبدأ عمله في التعرف على تلك المواقع وبالبدء بالاستطالة من جميع تلك المواقع وان زيادة تركيز الإنزيم إلى 5 وحدات / تفاعل أدى إلى زيادة سمك الحزم ووجود مسحة متصلة خلف الحزم.



شكل (5) : يظهر النواتج المتضاعفة من دنا الرز صنف (عنبر محلي) باستخدام انزيم Taq DNA poly بتراكيز (1،1.5،2.5،3،4) وحدة/تفاعل وان التركيز الامثل هو 2.5 وحدة/تفاعل، والمرحلة على هلام متعدد الاكريلامايد 6 % مع الدليل الحجمي PGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد.

ومن خلال الدراسة وجد بان العامل الأكثر أهمية في زيادة عدد الحزم مع تقليل الأوزان الجزيئية للقطع المتضاعفة باستخدام مؤشرات الـــ DAF هو زيادة تركيز البادئ المستخدم لان ذلك يؤدي إلى ارتباط البادئ بأكبر عدد ممكن من المواقع ليسمح لإنزيم التضاعف للبدء بعمله.

أما تركيز dNTPs فهو التركيز الأمثل لتفاعلات الـــ DAF حيث أشارت البحوث إلى أن التركيز الأمثل للـــ dNTPs في تفاعلات الـــ PCR هو 200 ملي مولر حيث قلة تركيزه يؤدي إلى قلة عدد الحزم المتضاعفة وقد بين Sedra وجماعته (1998) بان التراكيز العالية من dNTPs عملت على تثبيط إنزيم بلمرة الدنا كلياً ولم يتم الحصول على أية نواتج تضاعف وهذا يعود ربما لان dNTPs تعمل على سحب ايون المغنسيوم الجاهز مما يؤدي ذلك إلى تثبيط عمل الإنزيم الذي يحتاج للمغنسيوم لزيادة فعاليته ويوضح شكل(6) الظروف المثلى لتطبيق مؤشرات الـــ DAF بعد ضبط تراكيز كافة مكونات التفاعل.



شكل (6) : النواتج المتضاعفة من دنا الرز صنف (عنبر محلي) بعد ضبط الظروف المثلى لتطبيق مؤشرات الـــ DAF المرحلة على هلام متعدد الاكريلامايد 6 % مع الدليل الحجمي PGEM المقطع بثلاث انزيمات تقييد.

أما بالنسبة لطريقة فصل النواتج المتفاعلة فكان باستخدام هلام متعدد الاكريلامايد وبالرغم من فعاليته العالية بالفصل ، لكنه صعب التحضير والتداول مقارنةً بهلام الاكاروز إذ تصل قدرة الفصل له إلى إمكانية فصل قطعتي دنا يختلفان في نيوكليوتيدة واحدة لذلك يستعمل في تجارب تحديد التسلسل لقطع الدنا DNA sequencing، أن التركيز

المستخدم في هذه الدراسة كان 6 % وكان ملائماً لفصل قطع الدنا التي تراوحت أحجامها الجزيئية ضمن المدى المحدد لمؤشرات الـــ DAF كما يجب أن لا يتجاوز فترة تحميل العينات عن الـــ 20 دقيقة للمحافظة على حرارة الهلام الذي يتم رفع حرارته قبل ذلك بنصف ساعة تقريباً للمحافظة على جزيئات الدنا بشكلها المفرد الشريط كما يجب المحافظة على القدرة الكهربائية أثناء فترة الترحيل والتي تتأثر أيضا بتركيز الـــ TBE ونقاوته، كذلك يجب اخذ الاحتياطات اللازمة في جميع مراحل التصبيغ بنترات الفضة لما تمتاز به هذه الصبغة من حساسية عالية، فعلى سبيل المثال بعد تصبيغ الهلام بهذه الصبغة يتم غسل الزجاجة الحاوية على الهلام بالماء المقطر لفترة 10 ثواني فإذا تجاوزت فترة الغسل ثواني اخرى معدودة قبل إدخال الزجاجة في محلول التظهير يتلون الهلام باللون الأصفر كذلك إذا تجاوزت فترة بقاء الهلام في محلول التظهير أكثر من الوقت المحدد (2 – 5) دقائق يتلون الهلام باللون الأصفر وأحيانا باللون الأسود لان مرحلة التصبيغ حساسة جداً وأي خطأ في هذه المرحلة تؤدي إلى فشل التجربة وفشل الحصول على أية نتيجة بالرغم من نجاح التفاعل.

وبذلك وبعد ضبط جميع مراحل التفاعل بدءاً من مكونات المواد الداخلة وعملية الترحيل والتصبيغ يمكن أن نطبق مؤشرات الـــ DAF على دنا الكائنات الحية لغرض التشخيص وإيجاد البصمة الوراثية للكشف عن التباينات الوراثية، وكذلك في دراسة العلاقة الوراثية والتطورية بين تلك الكائنات.

References

[1] Al-Judy, N. J., Detecting of DNA Fingerprints and genetic relationship analysis in local and Improved Rice (Oryza sativa L.) varieties in Iraq using RAPD Markers. PH. D. A thesis, (2004). Baghdad University. College of science.

[2] Bassam, B.J., Caetano–Anolles, G. and Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting of bacteria. APPL. Microbiol. Biotech. . Vol. 38 (1992) pp: 70 – 76.

[3] Caetano – Anolles , G. , Bassam , B. J. and Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary Oligonucleotide Primers . Biotechnology. Vol. 9 (1991) , pp : 553 – 557.

[4] Caetano–Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short Primers. Plant Mol. Biol. Rep. Vol. 19 (1994) pp:18–25.

[5] He, G., Parkash, C. S. and Jarret, R.L. Analysis of genetic diversity in sweet potato (Ipomoea batatas) germplasm collection usimg DNA amplification fingerprinting. Genome. Vol. 38 (1997) pp: 938–945.

[6] He, G., Parkash, C. S. and Jarret, R. L. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (Arachis hypogaea L.). Euphytica. Vol. 97 (1997) pp:143–149.

[7] Jayara, B. M., Bassam, B. J., Caetano – Anolles, G., Gresshoff, P. M. and Oliver, S. P. subtyping streptococcus uberis by DNA amplification fingerprinting. J.clin. Microbiol. Vol. 30 (1992) pp: 1347–1350.

[8] Lucey, B., Feurer, C., Greer, P., Moloney, P. Cryan, B. and Fanning, S. The use of DAF marker to asses genetic diversity between isolated of Thermophlic campylobacter J. Appl. Microbiol. Vol. 89 (2000) pp: 727–734.

[9] Mullis, K. B. The polymerase chain reaction. In an anemic mode How to avoid cold cold oligodioxy ribonuclear Fusion. PCR Meth. Appl. Vol. 1 (1991) pp:1–4.

[10] Paterson, A. H., Tanksly, S. D. and Sorrell, M. E. DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. Vol. 46 (2004) pp: 39–90.

[11] Power, E. G. M. RAPD typing in microbiology, a technical review. J. Hosp. Infect. Vol. 34 (1997) pp: 247–265.

[12] Sahgi–Maroof, M. A, Soliman, K. M., Joragens, R. A. and Allard, R. W. Ribosmal DNA spacer length polymorphisms in barley. Proc. Natal. Acad. Sci. USA. Vol. 81 (1984) pp: 8014–8018.

[13] Sambrook, J. Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). (1989) Cold spring Harbor. N Y.

[14] Sedra, M. H., Lashermes, P. Trouslot, P., Combes, M. C. and Homan, S. Identification and genetic diversity analysis of date palm (Phoenix dactyifera L.) varietues from Morocco using RAPD markers. Euphytica. Vol. 103 (1998) pp: 75–82.

[15] Wang, J. He, G., Prakash, C. S. and Lu, S. Analysis of genetic diversity in chinese sweet potato (Ipomoea batatas L.) germplasm using DAF markers. Plant Genetic Resources. Newsletter. Vol. 113 (1998) pp: 13–16.

[16] Weigand, F., Baum, M. and Udupa, S.DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20 International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, (1993) Aleppo, Syria.

Abstract

This type of markers was conducted for the first time, Where, much time was dispensed in performing many experiments reacted to optimal conditions for the amplification parameters, These also included the template DNA, primer, Magnesium ions, and enzyme concentrations. We found that the optimum concentration for: template DNA was 10 ng / reaction, the primer was 30 Pmol, Magnesium 6 mM, enzyme was 2.5 unit/ reaction.

As well as the sensitive method use for detection of the amplified fragment by the polyacrylamide Gel electrophoresis which itself needed time for optimizing running and staining with AgNO3 conditions.