# طرائق بسيطة ومعدلة لاستخلاص الـDNA والـRNA من البيوض المتكيسة للأيمرية تينلا

د. مرشد كاسوحة [1] نور حمودة [2] د. شادي سكرية [2] د. محمود قويدر [2]

(الإيداع: 12 آذار 2018، القبول: 19 حزيران 2018)

**الملخص:**

تم في هذا العمل تقييم طريقتين لاستخلاص الـ DNA من البيوض المتكيسة للأيمرية تينلا وذلك بمقارنة كمية المادة الوراثية المستخلصة اعتماداً على الرحلان الكهربائي بالإضافة إلى تحديد مدى نجاح تفاعل البوليميراز المتسلسل على المستخلصات. حيث كانت كمية الـ DNA المستخلص في الطريقة الأولى التي اعتمدت على التحطيم الميكانيكي للبيوض المتكيسة المتبوع باستخدام إحدى العتائد التجارية أقل من الكمية التي تم الحصول عليها بالطرقة الثانية والتي استخدمت دارئة للحل ومحلول مادة CTAB، علماً أن تفاعل الـPCR الذي استهدف مورثة البيتا أكتين أنجز وبنجاح على ناتج الطريقتين.

كما تضمن هذا العمل تقييم مدى نجاح طريقة تحطيم البيوض المتكيسة ميكانيكياً المتبوع باستخدام إحدى العتائد التجارية في استخلاص الـRNA الخاص بالحيوانات البوغية وتحويله إلى DNA متمم. وأعطت تفاعلات PCR على الـDNA المتمم والتي استهدفت مورثات البيتا أكتين المرجعية وبروتين الخيط المكروي 2 نتائج إيجابية مما يدل على جودة وكفاءة هذه الطريقة في استخلاص الـRNA .

**الكلمات المفتاحية:** البيوض المتكيسة، الأيمرية، استخلاص الـDNA ، RNA.

(1) قسم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة.

(2) قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

# Simple methods of DNA, RNA extraction from *Eimeria tenella* Oocysts

**Dr. Morshed Kassouha** [1] **Nour Hammoudeh** [2] **Ass. Prof. Chdi Soukkarrieh** [2] **Prof. Mahmoud Kweider** [2]

**(Received: 12 March 2018, Accepted: 19 June 2018)**

## Abstract:

In this study, two DNA extraction methods from *Eimeria tenella* oocyst was carried out and evaluated by DNA electrophoresis and using the extracts as a template in polymerase chain reaction. The results showed that the quantity of extracted DNA by the first method that depended on mechanical destruction of the oocysts followed by using of commercial kit was less than DNA extracted by the second method, which included mechanical destruction followed by lysis buffer and CTAB solution. On the other hand, PCR reaction targeting β-Actin gene was successfully completed on the both extracted DNA.

The performance of RNA extraction method from sporulating oocyst was evaluated as well, this method included mechanical destruction followed by RNA extraction commercial kit to obtain sporozoite RNA and after that cDNA was produced. PCR reactions targeted β-actin and mic2 genes was carried out successfully on cDNA. The result indicats that this method of extraction RNA is efficient and satisfactory.

**Keywords**: Oocyst, Eimeria, DNA, RNA extraction.

(1) Department of Microbiology, Faculty of Vet. Med., Hama University.

(2) Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University.

## – مقدمة: Introduction

تمثل الطفيليات الأوالي إحدى أهم المسببات المرضية التي تنصب جهود الباحثين والعلماء على دراستها وإيجاد الحلول المناسبة لها لما تسببه من خسائر اقتصادية كبيرة ومشاكل صحية خطيرة على الصعيدين الحيواني والبشري، وأضحت الدراسات الجزيئية على مستوى المادة الوراثية (DNA,RNA) للطفيليات هي السبيل الأساس للوصول إلى الأهداف المرجوة.
تصيب طفيليات الأيمرية Eimeria المسببة لداء الأكريات Coccidiosis الظهارات المختلفة وخاصة ظهارات القناة الهضمية عند المجترات والطيور والقوارض والأسماك، وتعد من المسببات المرضية الهامة لما تسببه من أضرار وخسائر ونفوق عند الأثوياء التي تصيبها (Long, 1993)، وتتميز هذه الطفيليات بدورة حياة معقدة نسبياً تمر خلالها بمرحلة تكاثر لا جنسي تليها مرحلة التكاثر الجنسي داخل جسم الثوي، مؤدية إلى تكون البيضة المتكيسة غير المتبوغة Unsporulated oocyst والتي تُطرَح إلى الوسط الخارجي لتتبوغ في حال توفر الظروف المناسبة من حرارة ورطوبة، وبالنتيجة يتشكل داخل البيضة المتكيسة أربعة أكياس بوغية Sporocysts ويحتوي كل كيس بوغي داخله حيوانين بوغيين Sporozoite، وتعد البيضة المتكيسة المتبوغة هي الطور المعدي (الخامج) للأيمرية infective stage .(Bowmann and Lynn, 2009)
إن النقطة الأولى التي ستنطلق منها أي دراسة على المستوى الجيني عند طفيليات الأيمرية لابد أن تكون استخلاص المادة الوراثية لهذه الطفيليات والتي تضم الـDNA والـRNA ، أو حتى في بعض الحالات قد يلجأ الباحثون إلى استخلاص الـ DNA بهدف تشخيص الإصابة أو تحديد الأنواع (You, 2014) أو حتى معرفة أعداد الطفيليات في النسج المختلفة والمزارع الخلوية اعتماداً على التقانات الحديثة كتفاعل البوليميراز المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real time PCR. (Alnassan et al,, 2015; Wiedmer et al,, 2017)
يعد طور البيضة المتكيسة هو الطور الأسهل من ناحية الحصول عليه بأعداد كبيرة ونقية مقارنة مع أطوار الأيمرية الأخرى كالمتقسمات والأقسومات والعرسيات، ويمكن حفظه في المختبرات لأشهر حياً (6-12 شهراً) قادراً على إحداث العدوى، وذلك باتباع شروط حفظ بسيطة ضمن محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2.5% عند الدرجة 4 مئوية (Thabet et al,, 2017)، لكن تواجه عملية استخلاص المادة الوراثية منه العديد من الصعوبات والمشاكل التي قد تؤدي إلى الحصول على مردود قليل من المادة الوراثية المستخلصة أو تسبب في فشل مراحل العمل المخبري على المستوى الجزيئي كتفاعل PCR أو قد تؤدي إلى تدرك الـDNA .(Zhao et al,, 2001)
تتصف البيوض المتكيسة ببنية جدارها الصلبة التي تقف عائقاً كبيراً ضد معظم المحاليل الهاضمة والمفككة الإنزيمية والكيميائية التي تستخدم في عمليات استخلاص المادة الوراثية، كما أن الكيسات البوغية داخل البيوض المتكيسة تمتلك جداراً صلباً ومرناً يحمي الحيوانات البوغية وتجعل عملية الاستخلاص أكثر صعوبة (Berriatua et al,, 1995)، لذلك عادة ما تكون المرحلة الأولى في الاستخلاص هي تحطيم هذه الجدر ميكانيكياً باستخدام كرات زجاجية (خرز) Glass beads بقطر 2 ملمتر أو كرات الزركون كبديل عن الكرات الزجاجية في بعض الحالات، حيث تمزج مع البيوض المتكيسة ويتم رجهم على جهاز Vortex لفترة طويلة تتبع بعدها بالاستخلاص بالطريقة الكيميائية اعتمادا على phenol/chloroform وترسيب الـ DNA بالإيتانول البارد، ويعاب على هذه الطريقة المردود القليل من المادة الوراثية واستخدامها للفينول والكلوروفورم مما يضطر الباحثين إلى العمل تحت إجراءات حماية تقيهم من التأثيرات المسرطنة والسامة لمركب الفينول. (Kaya et al,, 2007)
اعتمدت بعض المقالات على طرائق أخرى في استخلاص المادة الوراثية تتلخص بإخراج الحيوانات البوغية Excystation (Hamidinejat et al,, 2010) وفق بروتوكولات الإخراج ( تتضمن تكسير جدر البيوض المتكيسة ووضع الكيسات البوغية في محاليل تحتوي أملاح وصفراء وتربسين عند حرارة مناسبة بهدف تحريض الحيوانات البوغية على الخروج ذاتياً) ومن ثم تنقية الحيوانات البوغية باستخدام مواد الفصل المختلفة كالبركول Percoll أو الفيكول Ficoll يلي ذلك استخلاص المادة

الوراثية باستخدام الكيتات التجارية (سواء لاستخلاص الـDNA أو الـRNA)، لكن يعاب على هذه الطريقة عدم إمكانية تطبيقها على البيوض المتكيسة الميتة أو قليلة الحيوية والمحفوظة لفترات طويلة، كما أنها تحتاج إلى وقت طويل ومواد عديدة قد لا تتوافر في العديد من المختبرات (Zhao et al,, 2001).

وللأسباب السابقة أُنجِزَت بعض الدراسات بهدف تطوير طرائق بسيطة تستخدم مواد تتوفر في معظم المخابر وذلك لاستخلاص الـDNA من البيوض المتكيسة للأيمرية، واعتمدت على مركبات منظفة Detergent ومواد تستخدم عادة في تحطيم جدر الخلايا النباتية الصلبة كالـCTAB Cetyl–Trimethyl Ammonium Bromide، وأبدت هذه الطرق فعالية جيدة في استخلاص الـ DNAمن البيوض المتكيسة. (Kaya et al,, 2007)

ونظراً للأهمية الكبيرة لطفيلي الأيمرية وما يسببه من خسائر اقتصادية لدى مربي الدواجن والمجترات، ولضرورة اعتماد طريقة ناجعة لاستخلاص الحموض النووية من طور البيضة المتكيسة لهذا الطفيلي بما يخدم الدراسات في القطر العربي السوري، فقد تمَّ في هذا العمل اختيار وتعديل بعض الطرائق المذكورة في بعض المقالات بما يناسب المواد المتوفرة في معظم المخابر وتجربتها والتأكد منها مخبرياً بتطبيق اختبار PCR على نواتج الاستخلاص.

## 2- أهداف البحث: The Aims

1-تحديد طريقة بسيطة ومناسبة وعملية لاستخلاص الـ DNAمن البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية.

2-تحديد طريقة بسيطة ومناسبة وعملية لاستخلاص الـ RNAمن البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية.

## 3- مواد البحث وطرائقه: Material and Methods

تم في هذا العمل استخلاص الـDNA من البيوض المتكيسة لطفيلي الأيمرية تينلا باتباع طريقتين مختلفتين في الاستخلاص ومقارنه كمية الـDNA التي تم الحصول عليها بالطريقتين بالرحلان الكهربائي مع إجراء تفاعل PCR على المستخلص للكشف عن مورثة بيتا أكتين Beta-Actin. كما تم استخلاص الـRNA من البيوض المتكيسة أثناء تبوغها وتم الحصول على سلسلة الـDNA المتممة cDNA وتم الكشف عن نجاح الاستخلاص بتطبيق تفاعل البوليميراز المتسلسل على الـ cDNA بهدف الكشف عن مورثة بيتا أكتين المرجعية Beta-Actin ومورثة بروتين الخيط المكروي 2 ورمزه MIC2 (Microneme protein 2) الخاص بالحيوان البوغي.

### 3-1- إكثار البيوض المتكيسة وتنقيتها:

تم إكثار عزولة نقية من الأيمرية تينلا أُخذت من مختبر الطفيليات في كلية الطب البيطري – جامعة حماة، والتي تصيب الأعورين عند الدجاج، وذلك عبر تجريع عدة طيور من دجاج اللحم (خالية من الإصابة) بعمر 40 يوماً بـ 5000 بيضة متكيسة متبوغة عن طريق الفم، وقُدِّم للطيور عليقة خالية من مضادات الأكريات. وبعد 8 أيام من الخمج تم تشرح الطيور المصابة (الشكل 1) والحصول على محتوى الأعورين وتنقية البيوض المتكيسة عن طريق التمرير عبر مصاف دقيقة ومن ثم تطبيق طريقة التعويم التركيزي باستخدام محلول ملح الطعام المشبع (ذو الكثافة 1.2) والتثفيل (2500 دورة بالدقيقة ولمدة 5 دقائق) (Bowmann and Lynn, 2009)، وجمع الجزء الطافي من العينة المُثَفَّلة ومن ثم تم تمديدها بنسبة 1 إلى 20 بالماء المقطر وأعيدت عملية التثفيل، حيث جمع الراسب وغسل عدة مرات بالماء المقطر للتخلص من آثار المحلول الملحي، وفي النهاية أضيف للراسب (البيوض المتكيسة) محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم 2.5 % وحُضِّنَت العينة على درجة 26 مئوية في محم مائي بهدف تبويغ البيوض المتكيسة (Al-Idreesi et al,, 2013; Bowmann and Lynn, 2009).

أُخذَ جزء من العينة السابقة بعد مضي 20 ساعة وقبل إتمام تبوغ البيوض المتكيسة وغسل محتواها 3 مرات بالماء المقطر عن طريق التثفيل (2500 دورة بالدقيقة ولمدة 5 دقائق) وعرفت أعدادها باستخدام شريحة Mcmaster (Bowmann and Lynn, 2009)، وذلك ليتم استخلاص الـRNA منها وتقييم نجاح عملية الاستخلاص.

بعد تبوغ البيوض المتكيسة الموجودة في ما تبقى من العينة بشكل كامل، غسلت من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم بالماء المقطر كما ذكر سابقاً وطبقت عليها طرائق استخلاص الـDNA بعد عدها.

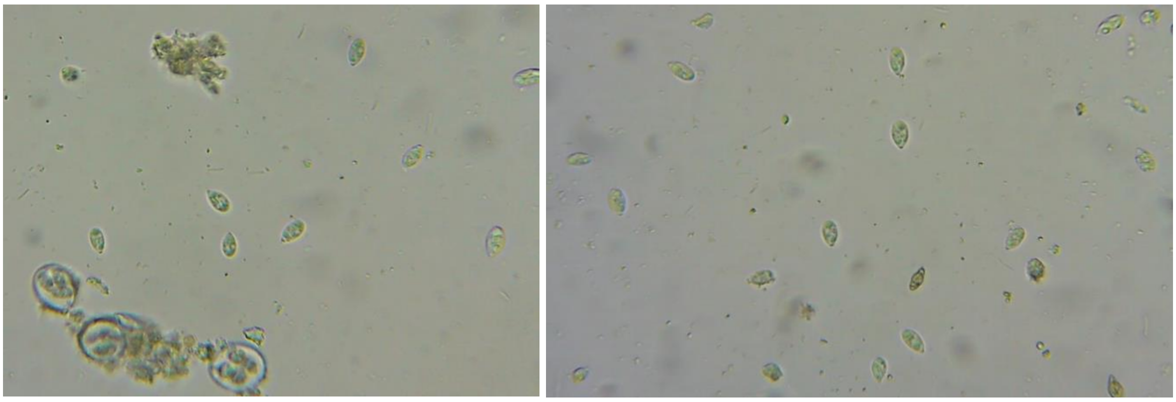
**الشكل رقم (1): أعورين مصابين بالأيمرية تينلا**

**3-2- طرائق استخلاص الـDNA:**

**3-2-1- الطريقة الأولى باستخدام التكسير الميكانيكي المتبوع باستخدام إحدى العتائد التجارية:**

وضعت $5\ X10^{6}$ بيضة متكيسة متبوغة في أنبوب سعة 2 مل وتم تعقيمها بإضافة 200 مكرولتر من هيبوكلوريت الصوديوم 6% ووضع الأنبوب في الثلج لمدة نصف ساعة (Zhao et al,, 2001)، تم بعدها غسل العينة بالماء المقطر المعقم بالتثفيل 3 مرات (2500 دورة بالدقيقة ولمدة 5 دقائق).

وضع بعد ذلك 10 كرات بلاستيكية بقطر 2ملم (بدلاً من الكرات الزجاجية أو المصنوعة من الزركون) مع البيوض المتكيسة في الأنبوب وتم رج العينة بقوة ولمدة 10 دقائق متواصلة بمساعدة جهاز Vortex حيث لوحظ أنه بعد هذه المدة تتحرر معظم الكيسات البوغية من البيوض المتكيسة وتبقي الحيوانات البوغية داخلها سليمة (الشكل 2).



الشكل رقم (2): الكيسات البوغية المتحررة من البيوض المتكيسة بعد تحطيمها ميكانيكياً مع بعض الكيسات السليمة

بعد ذلك أخرجت الكرات الزجاجية واستخدمت عتيدة تجارية تعتمد على أعمدة تحتوي جيل السيليكا **NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany)** لإكمال مراحل الاستخلاص، وطُبِّقت على العينة المراحل الموصى بها من الشركة المصنعة للعتيدة، باستثناء بعض التعديلات إذ حُضِّنَت العيّنة مع إنزيم البروتيناز ك Proteinase K ليلة كاملة على درجة حرارة 65 مئوية بدلاً من 56 مئوية لساعتين، وتم أيضاً في نهاية الاستخلاص الحصول على الـ DNA من العينة محلولاً في 60 µl من دارئة الاستخراج Elution Buffer بدلاً من 100 µl وذلك لتركيز كمية الـDNA المستخلصة وحفظت عند الدرجة -20 C° إلى حين إجراء الرحلان الكهربائي لتقدير كمية الـDNA وإنجاز اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

**3-2-2- الطريقة الثانية باستخدام التكسير الميكانيكي المتبوع بدارئة الحل ومحلول CTAB:**

طبقت هذه الطريقة على العدد ذاته من البيوض المتكيسة المتبوغة الذي اعتمد في الطريقة الأولى وتمَّ تعقيمها بنفس الطريقة أيضاً، وكسرت باستخدام الكرات البلاستيكية وباتباع الخطوات ذاتها التي اتبعت آنفاً.

بعد الانتهاء من التحطيم الميكانيكي وإزالة الكرات البلاستيكية تم استخدام دارئة حل ومحلول CTAB (Zhao et al,, 2001) مع بعض التعديلات في المواد المستخدمة والخطوات.

بداية تم إضافة 60 µlمن دارئة الحل والتي تتكون من:

(660 mM EDTA, 1.3% ***SDS***, 2 mg/ml proteinase K, pH 9.5) وحضنت مع العينة لمدة 45 دقيقة على الدرجة 65 مئوية، حيث أُدخل مركب الـSDS في تركيب هذا المحلول بدلاً من مادة *N*-lauroylsarcosine القليلة الاستخدام والتوافر في المختبرات على العكس من الـSDS.

تضمنت المرحلة التي تلت مرحلة الحل إضافة 350 µl محلول الـCTAB المكون من:

(2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2%b-mercapto-ethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS) (Zhao et al,, 2001)

وتركت على الدرجة 60 مئوية لمدة ساعة واحدة، ليتم بعدها الاعتماد على عتيدة تجارية لشركة Promega لا تعتمد على الاعمدة الرابطة للحموض النووية، بل على محاليل خاصة مرسبة للبروتين وعلى ترسيب الحموض النووية بعد ذلك باستخدام كحول الايزوبروبانول.

حيث استخدم محلول ترسيب البروتين الخاص بعتيدة **Wizard® Genomic DNA Purification Kit** الذي يمكننا من تجنب استخدام طريقة الفينول /كلوروفورم التي استخدمت في طريقة (Zhao et al,, 2001) بعد الانتهاء من التحضين مع محلول الـCTAB ، وتم في نهاية عملية الاستخلاص حل الـDNA في 150µl من الماء المقطر الخالي من إنزيمات الـDNase والـRNase (من شركة Thermo)، وحفظ عند درجة -20 مئوية حتى استخدامه.

**3-3- طريقة استخلاص الـRNA :**

استخلص الـRNA من $5X10^6$ كيسة بيضية بعد 20 ساعة من تحضينها على الدرجة 26 مئوية، أي أثناء التبوغ حيث يكون انتاج الـmRNA الخاص ببروتينات الحيوانات البوغية في مستوياتها الأعلى، حيث عقمت البيوض المتكيسة وحطمت بنفس الطريقة التي اعتمدت في طرق استخلاص الـDNA، وبعد ذلك استخدمت عتيدة تجارية من شركة vivantis الماليزية **GF-1 Total RNA Extraction Kit** مباشرة على البيوض المتكيسة المحطمة بالكرات البلاستيكية، علماً أن معظم الأبحاث والدراسات الأخرى التي قامت باستخلاص الـRNA لجأت إلى إخراج الحيوانات البوغية وتنقيتها ومن ثم استخلص منها الـRNA(Subramanian et al,, 2008; Thabet et al,, 2017).

تم بعد استخلاص الـRNA انتاج سلسلة الـDNA المتممة cDNA في نفس اليوم اعتماداً على عتيدة تجارية من شركة Thermo الأوروبية **RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit** واستخدم في هذه المرحلة إنزيم المنتسخة العكسية (RT) Reverse Transcriptase مع تسلسلات مرئسات (مشارع) متعددة التيامين Oligo (dT) primer وذلك لضمان تحويل الـmRNA إلى DNA (حيث يحتوي الرنا المرسال على ذيل متعدد الأدينين)، بعد ذلك طبق تفاعل البوليميراز المتسلسل على الـcDNA للكشف عن مورثة بروتينMIC2 (microneme2) الخاص بالحيوانات البوغية والتي يكون الرنا المرسال الخاص بها بطول 1029 bp في حين طولها مع الأنترونات الموجودة ضمن مورثتها على الـDNA الجينومي حوالي bp1647 . كما أنجز أيضاً تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن مورثة البيتا أكتين المرجعية Beta-Actin باستخدام زوجين مختلفين من المرئسات Primers.

**3-5- تفاعلات البوليميراز المتسلسل والرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز:**

تم القيام بتفاعلات PCR بهدف التأكد من نجاح عمليات استخلاص الـDNA ، والـRNA . عُرِفَ مدى نجاح مراحل استخلاص الـRNA وتحويله إلى DNA عبر تضخيم مورثة البروتين MIC2 حيث أن طول الرنا المرسال الخاص بها bp1029 وهو أقل من الطول لنفس المورثة على الـ DNA الجينومي والبالغ bp1647 بسبب احتواء هذه المورثة على إنترونات introns ومن الطول الناتج بعد التضخيم يعرف مدى نجاح الطريقة المستخدمة، كما تم الكشف أيضاً عن وجود مورثة بيتا أكتين بالاعتماد على زوجين مختلفين من المرئسات وفي كل من الـDNA الجينومي والـcDNA . ويوضح (الجدول 1) التالي تسلسلات المرئسات المستخدمة في تفاعلات PCR:

**الجدول رقم (1): تسلسلات المرئسات المستخدمة في تفاعلات البوليميراز المتسلسل واطوال الشدف الناتجة، ودرجة تشافعها.**

| المرجع | طول الشدفة | درجة التشافع | التسلسلات | المورثة |
|---|---|---|---|---|
| Wang et al,, ) (2013 | 138bp | 58° | F 5'-GGATTGCTATGTCGGCGATGA-3'<br>R 5'-ACACGCAACTCGTTGTAGAAAGTG-3' | Beta-Actin |
| Ryan et al,, ) (2000 | 407bp | | F 5'-AACGGGTCCGGAAATGTGAA-3'<br>R 5'-CGACCCGAAGAATACAGCGA-3' | Beta-Actin |
| Liu et al,, ) (2014 | 1029bp | | F 5'-ATGGCTCGAGCGTTGTCGCT-3'<br>R 5'-TCAGGATGACTGTTGAGTGTCA-3' | Mic2 |

حيث تكون مزيج التفاعـــل (50 µl) مما يلي:

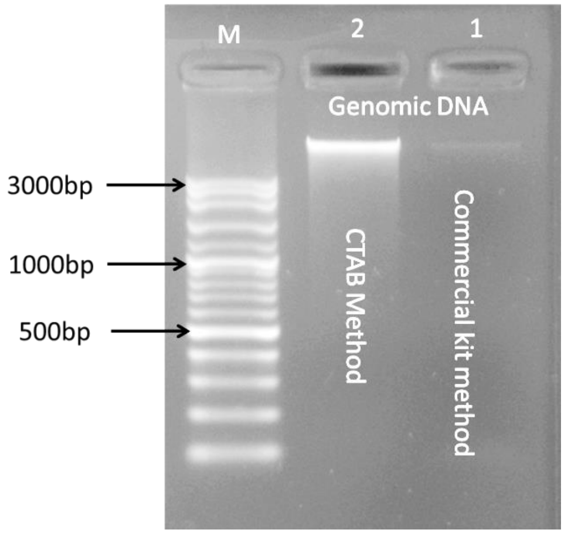
**2 µl** مـن مسـتخلص الـ DNA ، **1 µl** (10pmol/µl) لكـل مـن تسلسـلي المرئسـتين، **1 µl** (10mM) قواعـد آزوتيـة dNTPs، **5 µl** (10x) دارئـة الاختبـار Buffer PCR، **4 µl** (25mM) كلوريـد المغنيزيـوم، **0.4 µl** (5U/µl) إنـزيم التـاك **Taq DNA Polymerase (Vivantis- Malaysia)**، وتـم إكمـال المـزيج بمـاء مقطر معقم خالٍ من إنزيم الدناز حتى 50 µl .

حضرت هلامة الأغاروز بتركيز 1.5% بهدف القيام بالرحلان الكهربائي للكشف عن نواتج استخلاص الـDNA في الطريقتين المستخدمتين ومقارنة كمية المادة الوراثية المستخلصة والموجودة في 10 µl ، وكذلك للكشف عن نواتج تفاعلات الـPCR المنجزة على الـDNA الجينومي وعلى الـcDNA الناتج من RNA المستخلص.

## 4- النتائجُ والمناقشة: Results and Discussion

### 4-1- طرائق استخلاص الـDNA :

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز لمستخلصات الـDNA بطريقتين مختلفتين وجود DNA جينومي في كلا المستخلصين ولكن بكميات مختلفة، إذ سجلت الطريقة التي أتبع فيها تكسير البيوض المتكيسة باستخدام دارئة حل تحتوي إنزيم البروتيناز ك ودارئة أخرى تحتوي على مادة CTAB كميات أكبر من المادة الوراثية مقارنة بالطريقة الأخرى التي استخدمت فيها عتيدة تجارية (الشكل 3)، ولعل التفسير العملي لذلك يعود إلى بنية جدر الكيسات البوغية وحتى البيوض المتكيسة أيضاً التي تتكون أساساً من بروتينات وعديدات سكريد (Kaya et al,, 2007; Mai et al,, 2009; Walker et al,, 2016)، وبالتالي فإن المشاركة بين البروتيناز ك الذي يؤثر على البروتينات ومادة الـCTAB الي تفكك عديدات السكريد امتلكت تأثيراً فعالاً على جدر الكيسات البوغية المتحررة بعد التكسير وعلى الحيوانات البوغية، علماً أن مادة الـCTAB تستخدم في العتائد الخاصة باستخلاص الـDNA من الخلايا النباتية لتأثيرها على جدارها الخلوي.




**الشكل رقم (3): الرحلان الكهربائي لمستخلص الـDNA بالطريقتين المستخدمتين**

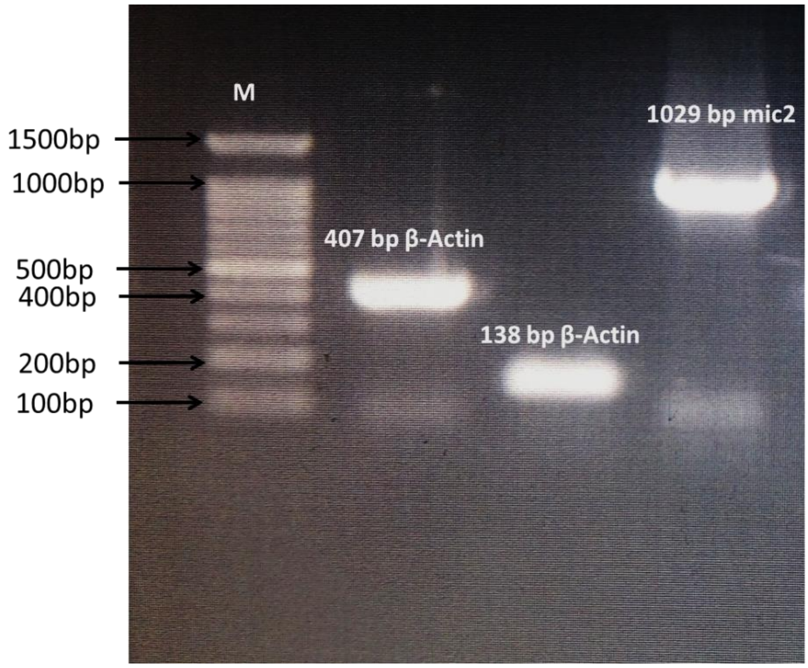
حيث: M مُعَلِّم اطوال الـDNA ، -1- الـDNA المستخلص وفق الطريقة الأولى اعتماداً على عتيدة تجارية، -2- الـDNA المستخلص وفق الطريقة الثانية اعتماداً على محلول CTAB

وبالرغم من تباين كمية الـDNA في الطريقتين إلا أن تفاعلات البوليمراز المتسلسل الخاصة بالكشف عن جينة البيتا أكتين كانت ناجحة وأعطت نواتج تضخيم واضحة وبالمكان المتوقع عندما طبقت على كلا المستخلصين حيث أخذ 2 µl منهما لكل لتفاعل.

**4-2- طريقة استخلاص الـRNA :**

بينت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل على الـcDNA والتي هدفت إلى الكشف عن مورثة البيتا أكتين المرجعية والتي تعد من جينات الخدمة Housekeeping gene، بالإضافة إلى تضخيم كامل cDNA الخاص بالـmRNA للبروتين MIC2 نجاح عملية الاستخلاص للـmRNA وتحويله لـcDNA بشكل تام.

حيث أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي في هلامة الاغاروز لنواتج تفاعلات الـPCR وجود قطع مضخمة بالأطوال المتوقعة الخاصة بمورثة البيتا أكتين (407 و138 bp)، والأهم هو نجاح تضخيم مورثة mic2 وبطول bp1029 (الشكل 4) أي أنها من دون إنترونات وناتجة عن الـRNA المرسال لهذه المورثة، أما فيما لو ظهر ناتج التضخيم بطول bp1647 فسيدل ذلك على تلوث الـRNA المستخلص بالـDNA الجينومي الخاص بالأيمرية وبالتالي ظهور ناتج تضخيم لذات المورثة ويحتوي على كل من الإكسونات والإنترونات.




**الشكل رقم (4): الرحلان الكهربائي لتفاعلات البوليميراز المتسلسل على الـcDNA الناتج عن الـRNA المستخلص، M: مُعَلِّم اطوال الـDNA .**

## 6- الاستنتاجات: Conclusions

1- نجاح الطريقتين اللتين استخدمتا في هذه الدراسة على استخلاص الـــDNA من البيوض المتكيسة المتبوغة لطفيلي الأيمرية.

2 –نتج عن الطريقة التي اعتمدت على المشاركة بين دارئة الحل المحتوية البروتيناز ك والدارئة التي تحتوي CTAB كمية أكبر من الـDNA .

3–يمكن اعتماد طريقة استخلاص RNAالتي استخدمت في هذه الدراسة للحصول على الـRNA المرسال الخاص بالحيوانات البوغية ومن دون اللجوء إلى اخراج الحيوانات البوغية وتنقيتها قبل اخضاعها لمراحل الاستخلاص.

**<u>شكر وامتنان:</u> هذا البحث ممول من صندوق دعم البحث العلمي والتطوير التقاني في وزارة التعليم العالي.**

## 7- References:

1- Al-Idreesi, S.R., Kweider, M., Katranji, M.M., 2013. Immunization of Broiler with dead sporozoites as vaccine against Eimeria tenella parasite. International Journal of Poultry Science 12, 280-288.

2- Alnassan, A.A., Thabet, A., Daugschies, A., Bangoura, B., 2015. In vitro efficacy of allicin on chicken Eimeria tenella sporozoites. Parasitology research 114, 3913-3915.

3- Berriatua, E., Gibson, W., Morgan, K., 1995. Development of DNA probes for the ovine Eimeria speciesE. crandallis andE. ovinoidalis. Parasitology research 81, 222-229.

4- Bowmann, D.D., Lynn, R. 2009. Georgis' parasitology for veterinarians (Saunders Elsevier, St. Louis).

5- Hamidinejat, H., Shapouri, M.S., Mayahi, M., Borujeni, M.P., 2010. Characterization of Eimeria species in commercial broilers by PCR based on ITS1 regions of rDNA. Iranian journal of parasitology 5, 48.

6- Kaya, G., Dale, C., Maudlin, I., Morgan, K., 2007. A novel procedure for total nucleic acid extraction from small numbers of Eimeria species oocysts. Turkiye Parazitol Derg 31, 180-183.

7- Liu, Q., Chen, Z., Shi, W., Sun, H., Zhang, J., Li, H., Xiao, Y., Wang, F., Zhao, X., 2014. Preparation and initial application of monoclonal antibodies that recognize Eimeria tenella microneme proteins 1 and 2. Parasitology research 113, 4151-4161.

8- Long, P.L., 1993. Avian Coccidosis, In: Parasitic Protozoa (Second Edition), Volume 4. Elsevier, pp. 1-88.

9- Mai, K., Sharman, P.A., Walker, R.A., Katrib, M., Souza, D.D., McConville, M.J., Wallach, M.G., Belli, S.I., Ferguson, D.J., Smith, N.C., 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 281-289.

10- Ryan, R., Shirley, M., Tomley, F., 2000. Mapping and expression of microneme genes in Eimeria tenella. International Journal for Parasitology 30, 1493-1499.

11- Subramanian, B.M., Sriraman, R., Rao, N.H., Raghul, J., Thiagarajan, D., Srinivasan, V.A., 2008. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant Eimeria tenella sporozoite antigen in birds. Vaccine 26, 3489-3496.

12- Thabet, A., Zhang, R., Alnassan, A.-A., Daugschies, A., Bangoura, B., 2017. Anticoccidial efficacy testing: In vitro Eimeria tenella assays as replacement for animal experiments. Veterinary parasitology 233, 86-96.

13- Walker, R.A., Niepceron, A., Ramakrishnan, C., Sedano, L., Hehl, A.B., Brossier, F., Smith, N.C., 2016. Discovery of a tyrosine-rich sporocyst wall protein in Eimeria tenella. Parasites & vectors 9, 124.

14- Wang, C., Han, C., Li, T., Yang, D., Shen, X., Fan, Y., Xu, Y., Zheng, W., Fei, C., Zhang, L., 2013. Nuclear translocation and accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase involved in diclazuril-induced apoptosis in Eimeria tenella (E. tenella). Veterinary research 44, 29.

15- Wiedmer, S., Alnassan, A.A., Volke, B., Thabet, A., Daugschies, A., Lendner, M., Kurth, M., 2017. Passive immunization with Eimeria tenella gametocyte antigen 56 (EtGAM56) specific antibodies and active immunization trial with the epitope containing peptide. Veterinary parasitology 247, 100-107.

16- You, M.J., 2014. Detection of four important Eimeria species by multiplex PCR in a single assay. Parasitology international 63, 527-532.

17- Zhao, X., Duszynski, D.W., Loker, E.S., 2001. A simple method of DNA extraction for Eimeria species. Journal of Microbiological Methods 44, 131-137.