ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

دراسة جزيئية مقارنة لجين الـ*aflR* بين انواع الفطريات الثلاثة *Aspergillus flavus* و*A.parasiticus* و*A.niger* المعزولة من عينات الاغذية الجافة الموجودة في الاسواق المحلية لمحافظة النجف الاشرف

أ.د.سامي عبد الرضا الجميلي ابتسام بشير كاظم الساعدي
كلية العلوم الطبية التطبيقية /جامعة كربلاء كلية العلوم /جامعة الكوفة

الخلاصة:-

بينت هذه الدراسة ان العزلات التابعة للفطر *A.flavus* والتي عددها 5 عزلات حاملة للجين المنظم لانتاج الافلاتوكسينات *aflR* كما ان عزلة الفطر *A.parasiticus* هي الاخرى حاملة لهذا الجين ،اما عزلات الفطر *A.niger* والبالغة اربعة عزلات ظهر الجين المنظم فيها ولكن بصورة خفيفة.

المقدمة:-

الافلاتوكسينات هي مجموعة من المركبات الايضية الثانوية للفطريات وينتجها عدد من الفطريات من اهمها الفطر *Aspergillus flavus* ، وقد أشارت العديد من الدراسات الى إحداث الافلاتوكسينات تشوه الأجنة وحدوث الطفرات الوراثية وضعف المناعة عند الحيوانات المختبرية المعاملة بتلك السموم فضلا عن تأثيراتها السمية في الكثير من المعايير الفسلجية والكيموحيوية في دم تلك الحيوانات (Carlile *et al.*,2001).كذلك وجد أنها تسبب وذمة الأطراف السفلى وسرطان الكبد وتثبيط عملية تكوين البروتينات (Cocker *et al.*,1984)؛بالإضافة الى أمراض أخرى مثل الالتهاب الرئوي (Pulmonar aspergillosis) ، والتهاب السحايا (Meningitis) وغيرها (Duthie and Denning, 1995 ؛ O`malley and Gillespie 2000) . أيضا تكون الافلاتوكسينات مسئولة عن إحداث تورمات الأجهزة التناسلية والإجهاض والنزف الدموي والضعف العام وتشوهات الهيكل العظمي في الإنسان والحيوان ، فضلا عن تأثيراتها السمية في الحيوانات كانخفاض الإنتاجية وزيادة الإصابة بالأمراض الفايروسية والبكتيرية نتيجة لإضعاف أو تحطم الجهاز المناعي (Bryden ,1988؛الهيتي، 1992 ؛ Smith *et al.*,1994).

استخدمت العديد من الوسائل لمنع تلوث الاغذية بالسموم الفطرية منها الفيزياوية كأستخدام درجات الحرارة لتجفيف الحبوب والبذور المستخدمة في تغذية الانسان والحيوان فضلا عن استخدام بعض المواد الكيمياوية في معالجة الاغذية الملوثة كنترات الأمونيا. تعد عملية الخزن السليم من الوسائل الضرورية في حماية الاغذية من التلوث بالسموم الفطرية ،فالدول المتقدمة تمتلك مخازن تتوفر فيها جميع الشروط الخزن الصحي ، بالمقابل يفتقر بلدنا الى مثل هذه المخازن وان توفرت فهي لاتستوعب الكميات الضخمة من الاغذية المستوردة او المحلية والتي يحتاجها شعبنا وبالتالي امكانية تلوث الاغذية في العراق واردة وبنسبة عالية . وفي هذه الدراسة تم اختبار قابلية بعض عزلات الفطريات المعزولة من الاغذية الموجودة في اسواق النجف الاشرف المحلية على انتاج الافلاتوكسينات بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسلة (P.C.R.) .

المواد وطرائق العمل :-

مستلزمات الدراسة :-

1.تحضير البوادئ Primers

تم الحصول على البوادئ primers من شركة Promega وتم تخفيفها حسب التعليمات المذكورة معها وهي كالتالي:

(ا) تحضير Stock Solution: للحصول على حجم تركيزه 100بيكامول من كلا البادئين تم إضافة 105.4 مايكروليتر من محلول TE Buffer للبادىء الاول Forward F وإضافة 102.7 مايكروليتر للبادىء الثاني R (Reverse) ، بعدها عرض للطردالمركزي بجهاز الطرد المركزي الخاص بتقنية الـP.C.R لثوانٍ قليلة لمنع التصاق قطيرة البادىء (بسبب صغر حجمها) بغطاء علبة البادىء.

(ب)تحضير Work Solution: بعد ان تم تحضير محلول الاساس Stock Solution في الخطوة السابقة وللحصول على محلول العمل Work Solution ذي التركيز 10 بيكامول ، اخذ 10مايكروليتر من Stock Solution ووضع في انبوبة اختبار جديدة ومعقمة microtube ذات سعة 1.5 مل حاوية على 90 مايكروليتر من محلول TE Buffer ثم حضن في الثلاجة لمدة ليلة كاملة Overnight على درجة حرارة 4 م° بعدها يكون جاهزا للاستخدام .

2. تخفيف المحاليل الخاصة بالكت الخاص باستخلاص الـ DNA

تم تجهيز كل محاليل العمل الخاصة باستخلاص الـ DNA الذي تم الحصول عليه من شركة BIO BASIC الكندية بشكل محاليل عمل Work Solution عدا محلولي Universal PW solution و Universal wash solution حيث تم الحصول عليها بشكل مركز Concentrates لذا وقبل الشروع في العمل يجب تخفيفهما وحسب التعليمات المرفقة مع الكت كالاتي:

(ا)للحصول على محلول العمل لـ Universal PW solution من المحلول المجهز المركز تم أضافة 12 مل من كحول الايزوبروبانول Isopropanol الى 18 مل من محلول Universal PW solution.

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

(ب) للحصول على محلول العمل للـ Universal wash solution نقوم باضافة 22.5 مل من كحول الايثانول Ethanol الى 7.5 مل من محلول Universal wash solution.

3.تخفيف محلول الترحيل TBE Buffer

تم الحصول على محلول TBE Buffer مركز بتركيز 10X ولاجل استخدامه في العمل يجب تخفيفه حسب تعليمات الشركة المصنعة Promega الامريكية الى 1X وذلك بأخذ 100مل من المحلول المركز 10X ويضاف له 900مل من الماء المقطر ليصبح التركيز 1X ويكون بذلك جاهزا للاستخدام .

طرائق العمل :-

عزل الفطريات *Aspergillus flavus*، *A.parasiticus* و *A.niger* من عينات المواد الغذائية قيد الدراسة وتشخيصها

بعد جلب العينات من الاسواق المحلية لمحافظة النجف الاشرف ،تم تعقيمها سطحيا بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم بتركيز 3% لمدة 5 دقائق ،وغسلت بعدها بماء معقم ثم زرعت في اطباق بتري معقمة وحاوية على أجار البطاطا والدكستروز (PDA) مع اضافة 48 ملغم / لتر من الكلورامفينيكول ، وذلك لمنع نمو البكتريا ، حيث وضعت خمس بذورفي كل طبق ، اربع محيطية والخامسة في منتصف الطبق . حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ ولمدة سبعة ايام (ميخائيل وبيدر ، 1982) . بعد انتهاء مدة التحضين تم تنقية عزلات الفطريات الاربعة قيد الدراسة ؛ وذلك بنقل قرص من كل مستعمرة وزرعه في طبق PDA جديد ، وكررت العملية مرات عدة ، شخصت العزلات اعتماداً على الصفات التصنيفية التي وضعها كل من(1965) Raper and Fennell .

استخلاص الـ DNA

تم تأكيد تشخيص العزلات المنتجة للافلاتوكسينات وراثيا من خلال تحديد جين *AflR* المسؤول عن عملية تنظيم انتاج الافلاتوكسينات وتضمن هذا الاختبار الخطوات التالية :

1. اخذ عينة من كل فطر من الطبق النامية عليه بواسطة ابرة معقمة لغرض الحصول على غزل فطري دون ان اخذ معه وسط زرعي قدر الامكان ثم وضع في انبوب اختبارصغيرة الحجم microtube سعة 1.5 مل معقم ثم اغلقت جيداوغطيت بشريط من نوع Parafilm على الغطاء لإحكام غلقه بعدهاوضعت في قنينة النايتروجين السائل Liquid Nitrogen لمدة 5 دقائق ثم بعدها اخرجت انبوبة الاختبار الحاوية على العينة ،ثم سحقت العينة جيدا باستخدام عود خشبي Wooden stick لمدة لاتقل عن 5 دقائق.

2.تم اضافة 180مايكروليتر من المحلول المنظم الهاضم العام (Universal digestion buffer) و 20 مايكروليتر من محلول الانزيم Proteinase K الى العينة ،ثم مزجا جيدا بواسطة المازج Vortex ،بعد ذلك حضنت في حمام مائي لمدة تتراوح من 30-60 دقيقة على درجة حرارة 56 م°.

3.اضيف100 مايكروليتر من المحلول المنظم العامPF (Universal buffer PF) الى العينة المختبرة،وتم مزجها بواسطة تقليبها يدويا وحضنت بدرجة حرارية واطئة جدا-20 م°لمدة 5 دقائق .

4.بعدها وضعت العينة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة /دقيقة لمدة 5دقائق بدرجة حرارة الغرفة ،بعد ذلك اخذ الراشح الى انبوبة microtube جديدة معقمة سعة 1.5 مل .

5.تم اضافة 200 مايكروليتر من المحلول المنظم العام BD (Universal buffer BD) ،ثم مزجت جيدا بواسطة المازج Vortex.

ملاحظة:اذا ظهرت مادة جيلاتينية في هذه الخطوة فيجب حضنه في درجة حرارة 70 م° لمدة 10 دقائق .

6. بعدها اضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول ذي التركيز 95-100 % للعينة ومزجت جيدا بواسطة المازج Vortex.

ملاحظة:اذا ظهرت مادة جيلاتينية في هذه الخطوة فيجب رج العينة بشدة او مزجها جيدا بواسطة المازج Vortex.

7. نقل المزيج من الخطوة السابقة (وبضمنه أي راسب) الى اعمدة فصل EZ-10 موضوعة في انبوب جمع سعة 2مل ،بعد ذلك وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة /دقيقة ،تم رمي الراشح المتجمع في انبوبة الجمع .

8.تم اضافة 500 مايكروليتر من المحلول المنظم PW (Universal PW solution)وعرض لطرد مركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000دورة /دقيقة ، تم رمي الراشح المتجمع في انبوبة الجمع .

9.اضيف 500 مايكروليتر من محلول الغسل العام (Universal wash solution) وطرد مركزيا لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000دورة /دقيقة ، تم رمي الراشح المتجمع في انبوبة الجمع .

10. وضع عمود الجمع الفارغ الحاوي داخله عمود الفصل EZ-10 في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين اضافيتين على سرعة 12000 دورة /دقيقة لغرض تجفيف غشاء عمود الفصل EZ-10 ،ثم يتم رمي الراشح المتجمع في انبوبة الجمع وتم نقل عمود الفصل الى انبوبة اختبار جديدة معقمة سعة 1.5مل .

ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

ملاحظة:من المهم تجفيف عمود الفصل لان الايثانول المتبقي يمكن ان يتداخل مع التفاعلات اللاحقة .وان خطوة الطرد المركزي هذه سوف تؤكد على وجود الايثانول من عدمه ايثانول في خطوة الغسل التالية.

11.تم اضافة (50-100) مايكروليتر من المحلول المنظم (TE buffer) (المجهز ضمن هذا الكت) مباشرة على الجزء المركزي من غشاء EZ-10 ،ثم طرده مركزيا لمدة دقيقة على سرعة 12000 دورة /دقيقة لغسل الـ DNA.

تضخيم الـ DNA

بعد اتمام جميع الاضافات تم وضع العينات في جهاز الطرد المركزي الخاص بتقنية P.C.R بوضعها داخل انابيب Eppendroff ومن ثم في thermal cycler وتم ضبط برنامج عمل الجهاز كالاتي:

1. Denaturation (1) وكانت عند درجة حرارة 94 م° لدورة واحدة و لمدة 5 دقائق .
2. Denaturation (2) عند درجة حرارة 94 م° لـ30 دورة لمدة دقيقة واحدة .
3. Annealing عند درجة حرارة 56 م° لـ 30 دورة لمدة دقيقة واحدة .
4. Extention (1) عند درجة حرارة 72 م° لـ 30 دورة لمدة دقيقتين.
5. Extention (2) عند درجة حرارة 72 م° لدورة واحدة لمدة 10 دقائق.

ترحيل الـ DNA

اولا: حضر الهلام الخاص بجهاز Electrophoresis Gel وفقا للخطوات التالية:

1.تم وزن 2غم من مسحوق مادة الاكاروز Agarose ووضع في دورق زجاجي نظيف معقم ثم اضيف له 100 مل من TBE Buffer تركيزه 1X .

2.سخن المزيج في جهاز المسخن ذي الموجات الدقيقة Microwave الى بداية الغليان .

3.ترك المحلول ليبرد الى مايقارب 45 م° ،ثم اضيف له 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide ورج الدورق لمزجها مع محلول الترحيل .

4.حضرت صفيحة إسناد الأكاروز Tray و ثبت مشط تكوين الحفر Comb على بعد 1 سم من أحد طرفي الصفيحة ثم صب هلام الأكاروز في الصفيحة وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة ثم رفع مشط تكوين الحفر بهدوء من الهلام المتصلب الذي بدوره نقل إلى حوض الترحيل الكهربائي Electrophoresis Tank .

5. غطي هلام الأكاروز بمحلول TBE Buffer بارتفاع 3 ملم (حتى ينغمر سطح الهلام).

ثانيا: تحضير العينات للترحيل

1.تم وضع ما مقداره 2.5 مايكروليتر من كل من البادئين ومزج مع 10 مايكروليتر من عينة الـ DNAالمستخلصة والمضخمة ووضع في انابيب اختبار microtube معقمة خاصة بتقنية P.C.R مجهزة من شركة BIO BASIC حاوية على صبغة خاصة تظهر الجين متألقا في حالة وجوده في العينة.

2. وضع الـ DNA القياسي DNA Ladder بمقدار 5 مايكروليتر مضافا له الصبغة Loading Dye بمقدار 1 مايكروليتر في احدى حفر هلام الترحيل وفي الحفر المجاورة لها وضعت عينات الـ DNA المراد الكشف عن وجود جين الـ *aflR* فيها.

ثالثا:الترحيل الكهربائي Electrophoresis

1. أجريت عملية الترحيل الكهربائي بفولتية مقدارها 80 فولت وبـ 100 ملي أمبير ولمدة 1-2 ساعة (لحين وصول الصبغة الزرقاء إلى نهاية الهلام) بعدها تم إيقاف عملية الترحيل.

2. فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 320 نانوميتر بواسطة صندوق الأشعة فوق البنفسجية (U.V Transilluminater) وتم تصوير الهلام باستخدام كاميرا Digital لملاحظة الـ DNA المتداخل مع صبغة الـ Ethidium bromide بشكل حزم برتقالية اللون .

طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسلة Multiplex Polymerase Chain Reaction

تم تنفيذ هذه التجربة في مختبر البايولوجي الجزيئي- كلية العلوم-جامعة الكوفة .

استخدمت تقنية الـ Simplex PCR لتضخيم الـ DNA المشفر لجينات aflaR-a-OHo645 و aflaR-b-OHo646 بالأعتماد على طريقة (2008) Sanio and Nilanjan واستخدمت زوجين من البادئات كما موضح في الجدول(1).

جدول (1) البادئات المستخدمة في هذه التجربة

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

البوادئ	تتابع البوادئ	الطول (base)	درجة الذوبان(TM)
aflaR-a-OHo645	5- AAC CGC ATC CAC AAT CTC AT- 3.F	20	49.6
aflaR-b-OHo646	5-GGT GCA GTT CGC TCA GAA CA -3.R	20	53.7

اجريت طريقة العمل بحجم 15مايكروليتر وحسب ما موضح في الجدول (2) اعتمادا على النشرة المرفقة مع الكت المجهز من شركة Promega الامريكية:

جدول(2) المواد الكيميائية لخليط التفاعل وحجومها

المواد الكيماوية	الحجم
Go Taq Green Master Mix	12.5مايكروليتر
Primer Forward	1مايكروليتر لكل جين
Primer Reverse	1 مايكروليتر لكل جين
DNA	5 مايكروليتر
D.W	1.5 مايكروليتر
Total	21 مايكروليتر

اما الخطوات المتبعة لتضخيم عينات الـ DNA في برنامج تقنية الـ P.C.R فهي كالتالي:

جدول (3) برنامج تقنية الـP.C.R

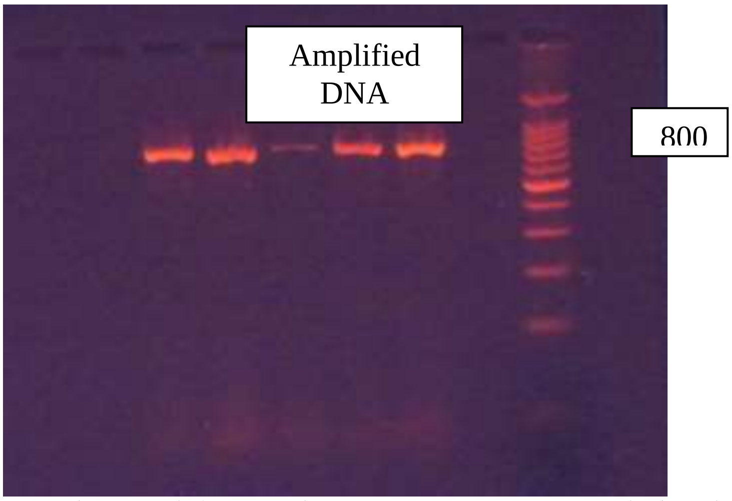
رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
1	Denaturation1	94 م	5min	1
2	Denaturation2	94 م	1min	30
3	Annealing	56 م	1min	
4	Extention 1	72 م	2min	
5	Extention 2	72 م	10min	1

الكشف عن قدرة بعض عزلات الفطريات *A.flavus* و*A.parasiticus* و *A.niger* على انتاج الافلاتوكسينات بأستخدام تقنية الـ P.C.R. :

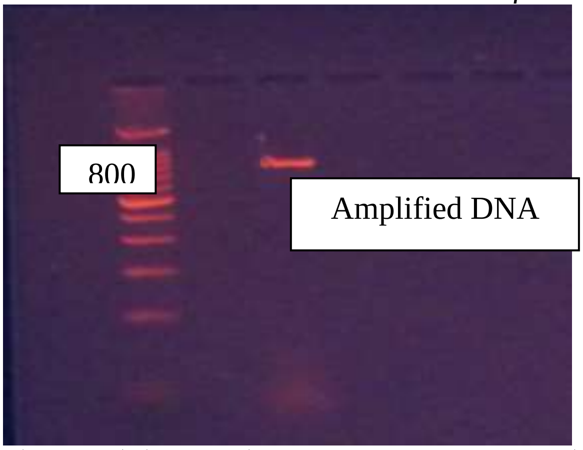
أظهرت نتائج تقنية الـ (P.C.R) قدرة العزلات الفطرية الخمسة المدروسة والتابعة للفطر *A.flavus* على انتاج الافلاتوكسينات من خلال ظهور جين *aflR* المسؤول عن عملية تنظيم تخليق الافلاتوكسينات عند الموقع 800 bp (صورة 1)كما ان الجين ذاته ظهر في عزلة الفطر *A.parasiticus* (صورة 2) وبنفس الموقع (800 bp) وهذه النتائج تتفق مع ماذكره (Shapira *et.al*, 1996) من ان الجين *aflR* ينظم عملية تصنيع الافلاتوكسينات في عزلات الفطريات الحاملة له وخاصة تلك التابعة لنوعي الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* وتتفق ايضا مع ما توصل اليه (Dehghan *et al*.,2008) من ظهور الجين *aflR* في عزلات الفطر *A.flavus* في الموقع (800bp) . كما تتفق مع ما اشارت اليه العبيدي (2011) من وجود جين *aflR* في اربعة عزلات من الفطر *A.flavus* من مجموع خمسة عزلات قامت باختبارها بتقنية(P.C.R.) .

ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

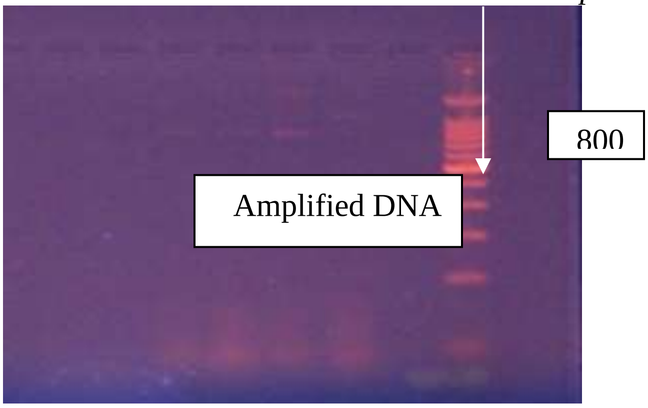
واما الفطر *A.niger* (صورة 3) فقد ظهر الجين في العزلات الاربعة له وبنفس الموقع الذي ظهر فيه الجين في عزلات الفطر *A.flavus* و*A.parasiticus* ولكن بصورة خفيفة جدا مما يعني انه غير منتج للافلاتوكسينات وهذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليها(Criso *et. al*,2001) من ان ظهور الجين *aflR* بصورة خفيفة يعني ان تلك العزلة غير منتجة للافلاتوكسينات كون ان تعبير الجين في مثل هذه الحالة يكون ضعيف ولايؤدي الى انتاج الافلاتوكسينات .



صورة رقم (1) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)لنواتج تقنية الـPCR على هلام الاكاروز بتركيز2% لخمس عزلات من الفطر *A. flavus*



صورة رقم (2) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)لنواتج تقنية الـPCR على هلام الاكاروز بتركيز2% لعزلة الفطر *A. parasiticus*



صورة رقم (3) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)لنواتج تقنية الـPCR على هلام الاكاروز بتركيز2% لاربع عزلات من الفطر *A. niger*

المصادر :-

ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

- العبيدي،اثير باسل عباس (2011).تصنيع مستحضر حيوي من البكتريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في علائق الدواجن.اطروحة دكتوراه -قسم علوم الحياة –كلية العلوم –جامعة الكوفة.
- ميخائيل ،سمير وتركي بيدر(1982).أمراض البذور ،دار الكتب للطباعة والنشر،جامعة الموصل.
- الهيتي ،اياد عبد الواحد (1992). السموم الفطرية –المفهوم العام. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي –جامعة بغداد.190صفحة.
- Bryden ,W.L.(1988). Chronic effects of mycotoxinsin animals . Mycotoxins symposium .University of Sydney , N . S . W , Australia . pp .11.
- Carlile,M.J.;Watkinson ,S.C. and Gooday ,G.W.(2001).The fungi (San Diego:Academic press).
- Cocker,R.D.;Jones,B.D.;Nagler,M.J.;Gillman,G.a.;Wallbridge ,G.A.and pangraphi ,A.G.(1984).Mycotoxin traiuning manual tropical development and research institute overseas development administration .pp 35.
- Criso,G.,Bagnara,A. and Bisiganag,G.(2001).Differentiation of aflatoxin –producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group,Lett.App.Micro .,33,29,1-5.
- Dehghan ,P. ; Zaini , F. ; Rezaei , S. ; Jebali, A. ;Kordbachen , P. ;Mahmoudi,M.(2008).Detection of *aflR* gene and toxigencity of *Aspergillus flavus* group isolated from patients with fungal sinusitis. Iranian J..Publ.Health,Vol.37,No.3,2008,pp.134-141.
- Duthie,R. and Denning ,D.W.(1995).*Aspergillus fungemia* :Report of two cases and review .Clin.Infect.Dis.20:598-605.
- Gillespie,M.B. and O'malley ,B.W.(2000).An algorithmic approach to the diagnosis and management of invasive fungal rhinosinusitis in the immunocompromised patient .Otolaryngol Clin.N.Amer.33:323-334,IX.
- Raper ,K.B. and Fennel,D.I.(1965).the genus *Aspergillus* .Williams and Wilkins company .Baltimore .pp:686.
- Sanio ,P. and Nilanjan ,R.(2008). Cloning and Characterization *Geotrichum candidum* Histidinol Dehydrogenes .International Journal of Integrative Biology .3(1):126-128.
- Shapira, R. ; Paster,N. ; Exal, O. ;Menasherov,M. and Salomon ,R.(1996).Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR ,Appl.Env.Micro.,62,3270-3.
- Smith ,J.E.;Solomons ,G.L.;Lewis,C.W. and Anderson ,J.G.(1994).Mycotoxins in human nutrition and health .Directorate-General XII Science ,Res.Develop.,300pp.

Abstract:-

This study had demonstrated that the five isolates of *A.flavus* are carrying the regulatory gene for Aflatoxins biosynthesis ,also ,the *A.parasiticus* isolate is also a carrier for this gene,whilst the *A.niger* four isolates had shown the regulatory gene lightly.

ISSN: 2073-8854
Magazin of Al-Kufa University for Biology / VOL.5 / NO.2 / year : 2013

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq