المواد و طرق العمل

منطقة الدراسة:

منطقة الدراسة تشمل الساحل الغربي الليبي الممتد من رأس أجدير غرباً وحتى مصراته شرقاً، تتجه المنطقة بشكل عام من الشمال الغربي إلى الجنوب الشرقي (الشكل 2)، بطول يبلغ حوالي 390 كيلو متراً، حيث تختلف هذه المنطقة في خصائصها ومظاهرها الطبوغرافية من مكان إلى آخر (الأعور، 1997).

الشكل 2. خريطة الساحل الليبي موضح عليها نطاق منطقة الدراسة.

الـــمواد المستخدمة:

الـــــمواد الكيميائية:

- QiAmp mini DNA extraction Kit (Qiagen, Germany)
  - ATL Buffer
  - Proteinase K
  - Ethanol
  - AW1 and AW2 Buffer
  - AE Buffer
- DNA amplification (GoTaq® Green Master Mix) Kit (Promega, USA)
  - Taq polymerase
  - Reaction Buffer
  - $MgCl_2$
  - dNTPs
- Primers (Metabion, Germany) given in Table (3)
- Ethidium bromide
- Loading dye (Promega, USA)
- Distilled water
- Agarose Gel
- TBE buffer
- DNA Ladder (Promega, USA)
- PureLink PCR Purification Kit (Invetrogen, Life Technologies, USA, Cat: K3100-01)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- BigDye® XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems)

الادوات المستخدمة:

- Dissecting microscope
- MicroPipettes1-1000 (Brand, Germany)
- Electronic Pipette (Brand, Germany)
- Multi pipette (Brand, Germany)
- Vortex (Mixer)
- Gloves
- Centrifuge
- Electrical balance
- Incubator
- Tissue Ruptor
- Refrigerator
- Fume hood
- UV transilluminator and gel documentation system .
- Thermocycler (PCR) machine (Life technologies, USA)
- Electrophoresis systems -Vertical (Bio Rad, USA)
- DNA Sequencer -ABI3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems (Life technologies, USA)

طـــــــــــرق العـــمل

تـــــجميع عينات الأسمـــاك:

تعد أفراد فصيلة Mugilidae مــن الأسماك الشاطئية السطحية التي تعيش بالقرب مــن الخلجان و البحيرات والموانئ (قاسم و آخرون، 2009). وتستهدف أسماك البوري في مثل هذه المناطق لصيدها بوسائل صيد مختلفة منها شباك الحليق (ثلاثي الطبقات - Trammel nets) ومنها حليق القد الشاطئ بارتفاع ستة عيون، حليق الرمي بارتفاع 20 ،30 و40 عين والذي يحتاج إلى قارب صيد عند استخدامه، والشباك الخيشومية (بدن 26 - 28 مم) وهي من طبقة واحدة، وشباك المرو (شباك الاحاطة) التي تستهدف جميع أنواع وأحجام الاسماك، وشباك الطراحة (26 – 28 مم) ، والخيط والسنارة (صيد هواة).

قسمت منطقة الدراسة أثناء تجميع عينات الأسماك إلى أربع مناطق رئيسية هي زوارة، الزاوية، طرابلس، مصراتة، وقسمت كل منطقة إلى مجموعة مواقع أصغر (موانى، مرافئ) وذلك لضمان تغطية كل منطقة الدراسة في التجميع، (الجدول 2). تم تجميع عينات أسماك البوري موسميا من الصيادين في الفترة من شهر يناير 2013 إلى شهر مارس 2014، وتم نقل كل العينات إلى مختبر مصائد الأسماك بمركز بحوث الأحياء البحرية لإجراء التعريف باستخدام الشكل الظاهري وتجميع عينات النسيج العضلي.

تجـــــميع عينات النسيج العضلـــــي:

جُمعت عينات النسيج العضلي من الأسماك الطازجة من منطقة الظهر بالقرب من الزعنفة الظهرية. وضعت الأنسجة في أنابيب بها الكحول الإيثيلي (96 %) ومرقمة بشكل متسلسل حسب عينات الأسماك (Shekhar et al., 2011)، ثم حفظت العينات عند - 20 °م إلى حين تجميع كل عينات الدراسة، والبالغ عددها 100 عينة. نقلت بعد ذلك العينات إلى مختبرات الهندسة الوراثية بمركز بحوث التقنيات الحيوية وذلك لغرض استخلاص الحمض النووي (DNA Extraction)، وإجراء تحليل تفاعل سلسلة البلمرة (PCR)، وتحليل تتابع المتواليات (DNA Sequencing analysis).

الجدول 2. مناطق التجميع بالدراسة

ر.ت	اسم المنطقة	الموقع	خط الطول و العرض
1	زوارة	فروة	N 33.04.73 E 11.44.15
		زوارة	N 32.55.27 E 12.07.19
2	الزاوية	زواغة	N 32.48.82 E12.26.70
		مرسى أبوبكر	N 32.48.78 E 12.70.80
		الوادي	N 32.48.12 E 12.31.38
3	طرابلس	سيدي بلال	N 32.49.39 E 12.57.30
		القصرية	N 32.52.54 E 13.06.90
		باب بحر	N 32.54.05 E 13.10.62
		النادي البحري	N 32.54.50 E 13.14.08
		الشجرة	N 32.52.04 E 13.12.21
		القره بوللي	N 32.47.18 E 13.44.30
4	مصراته	سيلين	N 32.42.36 E 14.10.37
		ميناء الخمس للصيد البحري	N 32.39.29 E 14.16.37
		زليتن	N 32.30.01 E 14.34.19
		ميناء قصر أحمد	N 32.22.45 E 15.12.04
5	تونس (مستوردة)	ميناء المحرس للصيد 16 كم جنوب صفاقس	-
6	إيطاليا (مستوردة)	-	-

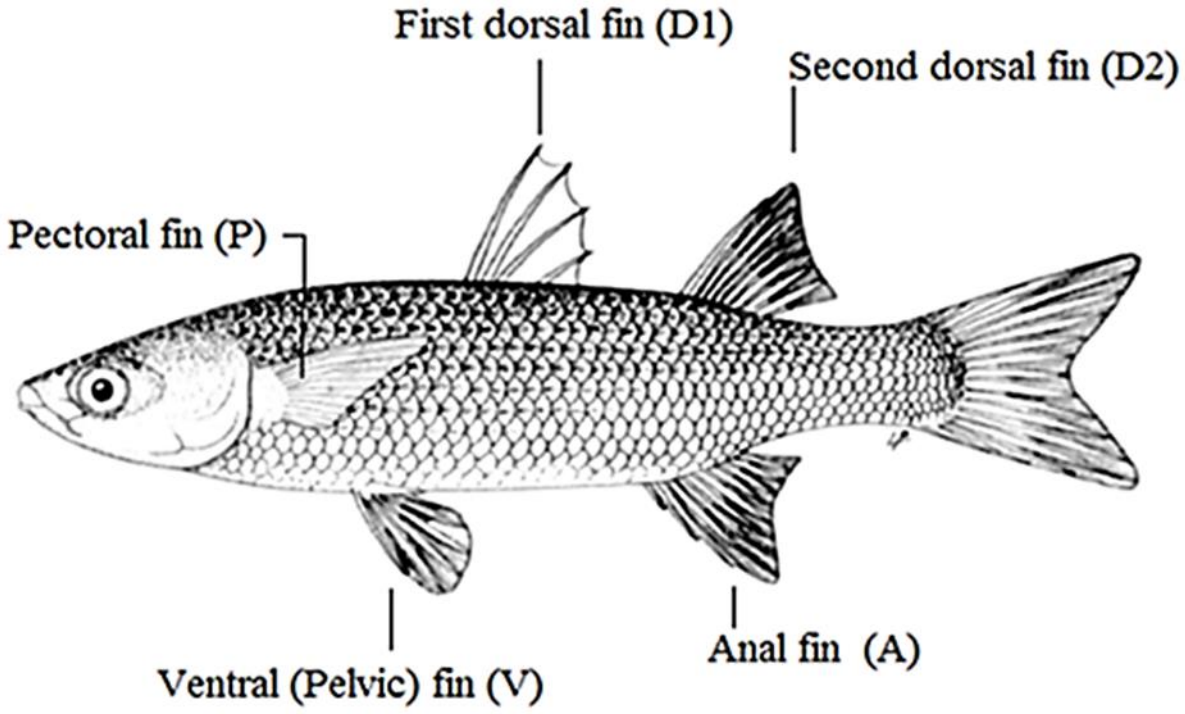
التعـــريف بالقياســـات المظهريـــة (Morphological measurements identification):

تم اختيار بعض الصفات التقسيمية الخارجية (Meristic characters) لأسماك البوري لكي يتم تعريف أنواع الأسماك بالاعتماد على المظهر الخارجي. حيث تعد طريقة التقسيم Meristic مجال خاص لِعد أجزاء معينة من السمكة كالأشواك والأشعة وفقرات العمود الفقري والقشور على الخط الجانبي وغيرها، حيث توضع أعداد الأجزاء المستخدمة في صيغة عددية مختزلة Meristic formula قابلة للمقارنة، يُعرَف ويوصف من خلالها النوع، وهي وسيلة من الوسائل المعتمدة في تعريف الأسماك (Turan et al., 2011).

تم تحديد خمسة صفات ظاهرية تتضمن عدد من الأشواك Spines والأشعة Rays تستخدم عادة في التعريف (الشكل 3)، وهي كالتالي:

- الأشواك والأشعة بالزعنفة الظهرية الأولى.
  First dorsal fin (Rays and Spines)
- الأشواك والأشعة بالزعنفة الظـهرية الثانية
  Second dorsal fin (Rays and Spines)
- الأشواك والأشعة بالزعنفة الصـــــــدرية.
  Pectoral fin (Rays and Spines)
- الأشواك والأشعة بالزعنفة الحـــــــوضية.
  Ventral (Pelvic) fin (Rays and Spines)
- الأشواك والأشعة بالزعنفة الشـــــــرجية.
  (Rays and Spines) Anal fin

وتمت الاستعانة بمجهر تشريحي Dissecting microscope لتحديد وعد الأجزاء الدقيقة التي يصعب فحصها بالعين المجردة، ووضع الأعداد بعد ذلك في الصيغة التالية D1, D2, A, P, V (Golani et al., 2006).



الشكل 3. نموذج لسمكة بوري وبعض الصفات المظهرية المستخدمة في التعريف (Fishbase.org).

استخلاص المادة الوراثية (DNA Extraction):

تعتمد كمية DNA المتحصل عليها على نوعية وكمية النسيج المعالج. تم قطع 25 مليجرام من نسيج العينة وهو حجم مناسب لاستخراج 10-30 ميكروجرام من DNA في 200 ميكرو لتر من محلول الحفظ وبذلك يكون التركيز من 50- 150 نانوجرام / ميكرو لتر، وهذا التركيز يعطي معدل النقاء 1.7- 1.9 المسموح به للحمض النووي DNA عند الطول الموجي 260 نانو متر.

تمت عملية استخراج الحمض النووي DNA من خلايا الأنسجة العضلية باستخدام طقم تجاري لاستخلاص المادة الوراثية QiAmp DNA mini extraction Kit (Qiagen, Germany). واتبعت خطوات الاستخلاص تبعا لتعليمات المصنَع وهي كالتالي:

- وضع النسيج المستخدم في إنبوب (Microcentrifuge) حجم 1.5 مليلتر، وتمت إضافة 180 ميكرو لتر من ATL Buffer و 20 ميكرو لتر من إنزيم Proteinase K وذلك لإذابة النسيج وتحرير الحمض النووي من داخل الخلايا، ثم مزجت العينة جيدا بواسطة الهزاز (Vortex)، ثم وضعت في حضان عند درجة 56°م لمدة ساعة واحدة مع اهتزاز طفيف لإذابة النسيج بشكل كامل وضمان توزيع التفاعل.
- من ثم أُضيف 200 ميكرو لتر من الإيثانول (96 %) لترسيب الحامض النووي وتكثيفه، ومزجت العينة بواسط Vortex. تم وضع الخليط بحذر في QiAmp Mini spin column، ووضع الأخير في أنبوبة تجميع collection tube حجم 2 مليلتر، ثم أغلق العمود بإحكام قبل إجراء عملية الطرد المركزي وذلك بسرعة 8000 rpm عند درجة حرارة الغرفة (15-25ْم) ولمدة دقيقة واحدة، وذلك للتخلص من كل بروتينات الخلية في أنبوب التجميع والاحتفاظ بالحمض النووي ملتصقاً بالسيلكا الموجودة في Mini spin column.
- بعد ذلك تم غسل الحمض النووي DNA في خطوتين، يضاف في كل منهما 500 ميكرو لتر من AW1، AW2 Buffers على التوالي، مع الطرد المركزي بسرعة 8000 rpm لمدة دقيقة و بسرعة 14000 rpm لمدة 3 دقائق على التوالي، في درجة حرارة الغرفة. وقد تم التخلص من محتوى أنابيب التجميع في كل خطوة.
- ثم وضع Mini spin column في أنبوب Micro centrifuge حجم 1.5 مليلتر لشطف (Elution) وتجميع الحمض النووي المستخلص بعد إضافة 200 ميكرو لتر من AE Buffer،

وتحضين العينة عند درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق، ثم الطرد المركزي بسرعة 8000 rpm في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة. بعد ذلك يتم تخزين عينة الحمض النووي المتحصل عليها في AE Buffer عند - 20 °م الى حين استخدامها في تفاعل البلمرة التسلسلي.

تـفاعل إنزيم البـلمرة المتسـلسـل Polymerase Chain Reaction (PCR):

أجري تفاعل PCR العادي لتعريف 100 عينة من أسماك البوري فصيلة Mugilidae من خلال تضخيم جزء من الجين 16S rRNA، وذلك باستخدام GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)، وهو يشتمل على خليط من: 2X (dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)), $MgCl_2$, Taq DNA Polymerase, Buffer reaction. حيث استخدمت بادئات (Primers) (Erguden et. al, 2010) (الجدول 3).

يحتوي تفاعل PCR على 2 ميكرو لتر من عينة DNA (DNA template)، (1X GoTaq® Green Master Mix)، 1ميكرو لتر(10 ميكرو مول) من البادئات (Primers) وهما البادئ 16 Fil-40 والبادئ 16 Fil-524 (Metabion, Germany) وذلك في حجم تفاعل يساوي 25 ميكرو لتر، (جدول 4). يرعى إذابة مكونات GoTaq® Green Master Mix في درجة حرارة الغرفة، ويتم إجراء الطرد المركزي لتجميع المكونات في اسفل الأنبوب، مع مراعات إضافة عينة DNA والبادئات على الثلج وذلك لتثبيط نشاط الأنزيم بشكل مؤقت.

أجريت تفاعلات سلسلة البلمرة باستخدام جهاز Thermocycler (Life technologies, USA)، ولقد تضمنت ظروف التضخيم (Amplification conditions) على دورة واحدة Denaturation أولية عند 94 °م لمدة خمسة دقائق، يلي ذلك 35 دورة متتالية تشمل كل منها ثلاثة خطوات وهي خطوة Denaturation عند 94 م° لمدة 30 ثانية لفصل الشريط المزدوج للحمض dsDNA، خطوة Annealing عنـــد 52 م° لمدة 30 ثانية لاتحاد كل بادئ مع شريط ssDNA مفرد، وخطوة Extension عند 72 م° لمدة دقيقة ونصف وذلك لتمديد البادئات. وفي النهاية دورة Elongation واحدة عند 72° م لمدة 10 دقائق وذلك لغرض استكمال الاستطالة (Erguden et. al, 2010).

الجدول 3. البادئات المستخدمة في إجراء تفاعل (PCR)، وتحليل المتواليات (DNA Sequencing analysis)(Erguden et. al, 2010)

Primer name	Sequence 5' - 3'	Product size	Application
16Fil-40 (Forward)	5'-CGCTAAGGGAAACTGCTGAAA-3'	1400bp	Amplification
16Fil-524 (Reverse)	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG-3'		
16sarL (Forward)	5′-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3′	777-799bp	Sequencing
16Fiseql-463 (Reverse)	5′-TGCACCATTAGGATGTCCRGATCCAAC-3′		

الجدول 4. الحجم والتركيز النهائي لمواد تفاعل PCR

المكونات	الحجم (Volume) (µl)	التركيز النهائي (Final Conc.)
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5	1X
البادئي الأمامي (10 ميكرو مول) Forward primer, (10µM)	1	0.4µM
البادئي الخلفي (10 ميكرو مول) Reveres primer, (10µM)	1	0.4µM
عينة الحمض النووي DNA template	2	< 250 ng
ماء معقم خالي من إنزيمات النيوكلييز Nuclease-Free Water	8.5	إلى نهاية حجم التفاعل Not applicable

الرحـــلان الكهربائي لهلام الأجروس (Agarose gel electrophoresis):

أجريت عملية الرحلان الكهربي على منتج التضخيم (PCR product) للتأكد من نجاح عملية PCR، ولبيان حجم القطع المنتجة، وذلك باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي (Electrophoresis systems) (Bio Rad, USA)، وباستخدام 3 ميكرو لتر من نواتج PCR مضاف إليه 5 ميكرو لتر من Loading buffer (Promega, USA) في 1.5 % من هلام الأجروس (Agarose gel) وباستخدام 1X TBE buffer كمحلول للرحلان. حيث تم استخدام فرن الموجات الصغرى (Microwave) عند 55° م لإذابة الأجاروس في TBE Buffer وتم تبريد الهلام لضمان ثباته. تمت إضافة 10 ميكرو جرام / مليلتر من Ethidium bromaide إلى هلام الأجروس، كما تم استخدام 5 ميكرو لتر من DNA Ladder (Promega, USA) بحجم 1Kbp كمؤشر للفصل بين أحجام منتج PCR التي تم تضخيمها. أُجريت عملية الرحلان عند 85 فولت لمدة ساعة واحدة. فحص الحمض النووي الذي تم تضخيمه على الهلام مقابل DNA Ladder. أما اختيار نسبة تركيز الإجاروس فكانت حسب حجم DNA الذي تم تضخيمه وهو 1400 bp (الجدول 5). تم تصوير نواتج PCR على الهلام بواسطة UV transilluminator، وذلك باستخدام Gel documentation system . كما تم اختيار قوة التيار الكهربائي بمقدار 1 - 10 فولت / سم وقوة إضاءة للإشاعة فوقة بنفسجية بمقدار > 2500 ميكرو وآت / سم^2 (Maniatis et al,. 1982).

الجدول 5. تركيز هلام الاجروس المناسب لفصل الأحجام المختلفة من الحمض النووي DNA (DNA fragments) (Maniatis et al,. 1982)

تركيز الاجروس (%)	أحجام DNA الذي تم تضخيمه بـ (Kb)
0.5	1 - 30
0.7	0.8 - 12
1.0	0.5 - 10
1.2	0.4 - 7
1.5	0.2 - 3

تنقية منتج عمـــــــــلية التضخيم (PCR Products Purification):

تمت عملية التنقية باستخدام الطقم التجاري PureLink PCR Purification Kit من شركة (Invitrogen, Life Technologies, USA, Cat: K3100-01) وذلك لتنقية منتج التضخيم (DNA) من المواد المستخدمة في هذه العملية والتي تؤثر على تحليل التسلسل فيما بعد. وبإتباع تعليمات المصنع أُضيفت أولاً أربعة مقادير من محلول B2 لكل مقدار من منتج التضخيم، ومزجت العينات جيداً. ثانياً وضع مزيج كل عينة على أعمدة التصفية PureLink Spin Column الموضوعة في أنابيب التجميع Collection tubes. ثم أُجريت عملية الطرد المركزي لكل العينات بسرعة 10000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة، طُرح بعد ذلك المزيج المتجمع في أنابيب التجميع، تم إعادة الأعمدة في أنابيب التجميع ثانية، تم إضافة 650 ميكرو لترمن محلول الغسل W1، أدخلت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة أخرى بسرعة 10000 دورة في الدقيقة. أفرغت الأنابيب من المحلول المصفى الناتج بعد عملية الطرد المركزي، وتم إرجاع العينات مرة أخرى في نفس أنابيب التجميع ثم في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق بسرعة 16000 دورة في الدقيقة. بعد ذلك وضعت أعمدة التصفية في أنابيب تجميع جديدة نظيفة لتجميع الحمض النووي المصفى بداخلها. حيث تم إضافة 50 ميكرو لترمن محلول الشطف Elution Buffer على وسط عمود التصفية، وترك لمدة دقيقة في درجة حرارة الغرفة. وضعت العينات بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتان وبسرعة 16000 دورة في الدقيقة. أخيراً تم تخزين العينات في درجة حرارة - 20 ° م لحين استخدامها في عملية تحليل التسلسل.

- يتم التأكد من وجود منتج التضخيم أو الحمض النووي في محلول العينة من خلال إجراء تحليل الرحلان الكهربائي لجزء من العينات على هلام الأجروس.

تحليل تسلسل الحمـــض النووي (DNA Cycle Sequencing analysis):

تم اختيار منتج التضخيم لـ 49 عينة لإجراء اختبار قراءة تسلسل النيوكليوتيدات باستخدام بادئات (Primers) خاصة (Erguden et al., 2010) الجدول (3) في كلا الاتجاهين، وذلك باستخدام الطقم التجاري BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)، حيث كان حجم التفاعل الكلي 20 ميكرو لتر، كما هو مبين بالطريقة التالية:

1- تم استخدام 6.4 ميكرو لتر من كلا البادئين.

2- تم تحضير تفاعلين منفصلين لكل عينة، يحتوي كل تفاعل على أحد البادئين فقط، مع 4 ميكرو لتر من Ready Reaction premix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle)، 2 ميكرو لتر من BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5X) مع مزج هذا المنظم وإجراء الطرد المركزي عليه وسحب الحجم المخصص من فوق قاع الانبوب بقليل، 6.4 ميكرو لتر من البادئ و لإكمال حجم التفاعل يضاف 5.6 ميكرو لتر من الماء المقطر الخالي من النيوكليز. حيث شكلت أحجام المكونات السابقة 18 ميكرو لتر.

3- حُدد عدد العينات وأُخذت أحجام المكونات السابقة حسب عدد العينات في أنبوب واحد، ثم مزج الخليط (Master mix).

4- تم توزِيع 18 ميكرو لتر من الخليط لكل عينة في Plate التفاعل ذات 96 فراغ حسب ترتيب العينات Plate of reaction (MicroAmp® 96-Well Reaction Plate) .

5- تم إضافة 2 ميكرو لتر من كل عينة (DNA template) للتفاعل حسب ترتيب الترقيم التسلسلي للعينات.

6- أُغلقت لوحة التفاعل بإحكام بغطاء لاصق adhesive film، ثم وضعت في جهاز تدوير الحرارة Thermalcycler (GeneAmp® PCR system 9700) بمقدار 25 دورة (جدول 6) .

الجدول 6. البرنامج المتبع في تفاعل دورة تحليل التسلسل Cycle DNA sequencing

الخطوة	عدد الدورات	درجة الحرارة (C°)	الزمن
المسخ الأولي للقالب Initial template denaturation	1	96	1 دقيقة
مسخ القالب Template denaturation	25	96	10 ثانية
إلصاق البادئ Primer annealing		50	5 ثانية
تمديد أو إطالة Base extension		60	4 دقائق
نقع Soak	1	4	فترة غير محددة Indefinite

تنقية نـــــواتج تفاعـــل دورة التسلسل

(Purification of Cycle sequencing products):

تمت عملية التنقية بعد دورة تحليل التسلسل Cycle sequencing للتخلص من كل المحتويات التي قد تؤثر على نقاوة النتائج عند قراءتها بجهاز تحليل التسلسل Sequencer system. حيث أجرى الطرد المركزي أولا للوحة التفاعل Reaction plate لمدة دقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي الخاص بألواح التفاعل. تمت عملية التنقية باستخدام الطقم التجاري BigDye XTerminator® Purification (Applied Biosystems) ، بإضافة المواد (Reagents) حسب توصيات الطقم التجاري وهي كالتالي:

1- تم خلط XTerminator Solution جيدا لمدة 10 ثواني على الأقل باستخدام Vortex، ثم أُضيف 20 ميكرو لتر من هذا المحلول إلى 90 ميكرو لتر من SAM Solution .
2- تأخذ كمية الكواشف السابقة حسب عدد العينات كخليط في أنبوب واحد.
3- تم تحويل ما مقداره 110 ميكرو لتر من الخليط إلى كل فراغ داخل لوحة التفاعل (Plate reaction)، مع خلط المحلول كل دقيقتين على الأقل لضمان تجانسه وعدم ترسب XTS وحصول كل العينات على نفس الكمية منه. يراعى استعمال ماصة Pipette إلكترونية تأخذ كمية تكفي من الخليط لعدد كبير من العينات في كل مرة لضمان سرعة الإضافة و تفادي عملية الترسيب.
4- تم بعد ذلك إغلاق اللوح بإحكام ووضعه في رجاج خاص بألواح التفاعل لمدة 30 دقيقة بسرعة 1800 دورة في الدقيقة.
5- بعد ذلك تمت عملية الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقتين.
6- تم أخذ ما مقداره 10 ميكرو لتر من كل عينة في اللوح بواسطة ماصة متعددة القنوات Multipipette إلى لوح جديد. تم إغلاق لوح التفاعل بواسطة غطاء مطاطي خاص، ووضع اللوح في جهاز تحليل التسلسل النيوكليتيدي (Genetic analyzer 3500xL (Biosystems Applied.

الرحلان الكهربائي الشعيري وتحليل التسلسل

:(Capillary Electrophoresis and sequencing)

تم تحديد تسلسل النيوكليوتيدات لكل عينة باستخدام طريقة سانجر Sanger sequencing method بواسطة جهاز التحليل الجيني Genetic analyzer 3500xL (Applied Biosystems) بقدرة تشغيلية تساوي 24 عينة (24 capillaries). يوصل جهاز تحليل التسلسل Sequencer machine بجهاز كمبيوتر خاص بتحليل القراءات. تتم عملية التحليل بواسطة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل تحليل التسلسل وذلك من خلال مرورها مع مواد التشغيل A, B solution عبر شعيرات Capillaries الجهاز، ويتم استشعار النيوكليوتيدات الموسمة وإظهارها كمنحنيات بواسطة برنامج Sequencher، ومن تم تحديد تسلسل الحمض النووي، وتبدء عملية التشغيل كالتالي :

- تشغيل جهاز التحليل والتأكد من سلامة كل المحتويات ووجود قدر مناسب من مواد التشغيل.
- تشغيل جهاز الكمبيوتر وتسجيل اسم التفاعل وترقيم العينات على برنامج التشغيل.
- وضع لوح التفاعل في المكان المخصص في الجهاز وبدء عملية التشغيل.

تحـــــليل البيانات (Data Analysis):

تم تحليل بيانات تسلسل العينات، حيث جمعت بيانات كل عينة في ملف مستقل لكل بادئ. تم توريد ملفات كل العينات لبرنامج Sequencher Analysis Software version 5.1 من شركة (Gene Codes Corporation, 2013) حيث تم تصفية كل التسلسلات من التداخل وعدم النقاء في أطراف كل تسلسل (بداية ونهاية التفاعل) للحصول على تسلسل ذو بيانات عالية الجودة لاستخدامها في التحاليل المختلفة. تم استخدام برنامج MEGA version 6 (Tamura et al., 2013) لإجراء عملية المحاذاة Alignment لنواتج تسلسل كلا البادئين لكل عينة ليكونا تحت تسلسل واحد مستقل، ثم أجريت محاذاة تسلسل الحمض النووي لعينات هذه الدراسة وأخرى تم تجميعها من مصرف الجينات لدراسات أجريت في البحر المتوسط، وتسلسل الحمض النووي لمجموعة خارجية (Out group)، حيث تسمح هذه المجموعة بزيادة التدقيق والتمييز بين تسلسل الحمض النووي لعينات هذه الدراسة ويمثلها النوع *Carangoides armatus* والذي ينتمي إلى فصيلة Carangidae، والذي نشر تسلسله في مصرف الجينات تحت رقم انضمام Accession number (AP 004444) (www.ncbi.nlm.nih.gov) ، كما

تم من خلال هذا البرنامج تقدير بناء شجرة التطور (Phylogenetic tree) للأنواع المدروسة وذلك بطريق Neighbor joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) وهى أكثر الطرق شيوعا. مع تطبيق طريقة Bootstrap (BP) لتقييم الاستقرار النسبي لهيكلية شجرة النسب (NJ, tree). وتعد قيمة Bootstrap قوية وتدعم التفرع بشكل قوي عندما تكون BP >70، وتكون متوسطة وتدعم التفرع بشكل معتدل عندما تكون 70 > Bp ≥ 50، وعندما يكون BP < 50 يكون التفرع ضعيف ولا يعتد به، وتعد هذه الطريقة أكثر الطرق استخداماً (La Farge et al., 2002) لإظهار الأنواع التي تتضمنها عينات الدراسة في المكان المناسب لها على الشجرة، وإظهار الأفرع الرئيسية وتحت الأفرع والمجموعات الشقيقة بين الانواع إن وجدت، وباستخدام برنامج MEGA تم أيضا تقدير المسافة الجينية Genetic distance بين الانواع (Nei, 1972). كما تم استخدام برنامج DNA SP لتحديد الانماط الفردية (h)، تنوع النمط الفردي (Hd)، التباين (S^2) بين تنوع الأنماط الفردية، الانحراف المعياري (SD) في تنوع الأنماط، تنوع النوكليوتيدات (*Pi*)، عدد المواقع متعددة الأشكال Polymorphic sites ومنها مواقع متنوعة المفرد Singleton variable sites و مواقع متنوعة المتعددة Parsimony informative sites.