

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه تبریز

دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته علوم دامی

گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

عنوان:

مطالعه سیتوژنتیکی گاو سرابی

بررسی کاریوتیپ با الگوی نواری بندی GTG

۱۳۸۱ / ۱۱ / ۲۰

از انظار هیأت آراء علمی ایران
توسط کمیسیون

ام البنین پیراهری

اساتید راهنما:

دکتر مصطفی معماریان پروفیسور یوسف آقاییف

۴۷۰۰۵

اساتید مشاور:

دکتر جلیل شجاع مهندس محمد طاهر هرگی نژاد

تابستان ۱۳۸۱



صور تجلسه دفاع پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تاییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای
ام البنین پیراهری رشته علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام تحت عنوان مطالعه سیتوژنتیکی گاو
سرابی - بررسی کاریوتیپ با الگوی نواریندی GTG

که در تاریخ ۸۱/۴/۲۳ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه زنجان برگزار گردید به شرح زیر است :

مردود

دفاع مجدد

قبول (با درجه : عالی) امتیاز: ۱۹,۲۰۵

نزد درج

۵- عالی (۲۰-۱۸)

۶- بسیار خوب (۹۹-۱۷-۱۶)

۷- خوب (۹۹-۱۵-۱۴)

۸- قابل قبول (۹۹-۱۳-۱۲)

رئیس هیأت داوران علمی این

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مصطفی معماریان	استادیار	
۲- استاد راهنما	دکتر یوسف آقاییف	دانشیار	
۳- استاد مشاور	دکتر جلیل شجاع	استادیار	
۴- استاد مشاور	مهندس محمد طاهر هرکی نژاد	مربی	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد گلچین	دانشیار	
۶- استاد ممتحن	دکتر عبدالاحد شادپرور	استادیار	
۷- استاد ممتحن	دکتر مراد پاشا اسکندری نسب	استادیار	

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه

تقدیم به :

قلب مهربان پدرم

دستان پر مهر مادرم

و

همسر فداکارم

تشکر و قدردانی

سپاس خداوند باری تعالی که با لطف و عنایت الهی اش توفیق اتمام این دوره تحصیلی را نیز با بنده عطا نمود. بر خود وظیفه می دانم از اساتید راهنمای ارجمندم آقایان دکتر معماریان و پروفسور آقایان بخاطر راهنماییهای ارزنده شان تشکر و قدردانی نمایم.

از اساتید مشاور گرامی آقایان دکتر شجاع و مهندس هرکی نژاد که در طول این مدت متحمل زحمت های زیادی شده اند صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

از آقایان دکتر شادپرور و دکتر اسکندری نسب که زحمت داوری جلسه دفاعیه را قبول فرموده اند نهایت تشکر را دارم.

از مدیر محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه زنجان جناب آقای دکتر گلچین که همواره مشوق و راهنمای بنده در طول اجرای پایان نامه بوده اند قدردانی می نمایم.

از مدیر محترم و اساتید ارجمند گروه علوم دامی بخاطر زحمات های سه سال تحصیلی سپاسگزارم.

از جناب آقای مهندس الیاسی همسر فداکارم که در اجرای این تحقیق همواره پشتیبان و غمخوار بنده بوده اند کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از سرکار خانم مهندس فرح پیراهری خواهر عزیزم که در طول این مدت از هیچ تلاشی دریغ ننموده اند صمیمانه تشکر می نمایم.

از مسؤولین محترم واحد گاوداری ایستگاه خلعت پوشان و مجتمع آزمایشگاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز آقایان مهدوی، مهندس تیشه زن و مهندس ترابی تشکر می نمایم.

از جناب آقای مهندس نومی ریاست محترم مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام قدردانی می نمایم.

از آقایان مهندس رزبان مسؤول محترم بخش فیزیولوژی باغ گیاهشناسی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام و مهندس کوراوغلی مسؤول محترم ایستگاه تحقیقاتی گاو سرابی واحد شبستر بخاطر

مساعدت های شان سپاسگزارم.

از مساعدت و یاری دوستان و عزیزانی که ذکر نام همه آنها مقدور نیست صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

چکیده

بررسی سیتوزنتیکی بر روی ۳۰ رأس از گاوهای سرابی ایستگاه تحقیقاتی گاو سرابی واقع در منطقه شبستر صورت گرفت. در این بررسی با استفاده از سرنگ‌های استریل و در شرایط کاملاً استریل خون کامل از ورید وداجی گرفته شد. حدود ۵-۶ قطره از خون کامل در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI1640 که با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (F.C.S)، ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین، ۲ درصد فیتوهم‌گلو تینین نوع M (PHA-M) و ۱ درصد هپارین لئو (Heparin- Leo) تکمیل شده بود کشت داده شد. سرم جنین گاوی و فیتوهم‌گلو تینین نوع M به ترتیب به عنوان محرک‌های رشد و تقسیم میتوز (میتوزن) مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها بمدت ۶۹-۷۱ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور کشت داده شدند. یک ساعت قبل از برداشت نمونه‌ها، کلشی سین ۰/۰۵ درصد به مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر برای هر کشت به عنوان متوقف کننده تقسیم میتوزی افزوده شد. در برداشت نمونه‌ها، سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوتونیک ۰/۰۷۵ مولار کلرید پتاسیم (KCl) قرار داده شدند. بعد از این مدت، سوسپانسیون‌های سلولی برای ۳-۴ بار در فیکساتیو کارنوی تثبیت شدند. این سوسپانسیون‌ها بر روی لام‌های سرد گسترش داده شده و در هوا خشک شدند. جهت رنگ آمیزی معمولی از محلول ۱۰ درصد رنگ گیمسا استفاده شد. اما به منظور انجام رنگ آمیزی نواری GTG لام‌ها با محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین تیمار شده و با محلول ۴ درصد رنگ گیمسا رنگ آمیزی و خشک شدند. گاو سرابی نیز همانند دیگر گونه‌های متعلق به جنس بُس دارای ۶۰ عدد کروموزوم است که از این تعداد ۲۹ جفت اتوزوم و یک جفت کروموزوم جنسی می باشد. تمام کروموزوم‌های اتوزوم آکروساتریک بوده و کروموزوم‌های جنسی ساب متاساتریک می باشند.

نواریندی GTG امکان شناسایی جفت کروموزوم‌های همولوگ را فراهم نموده است. از آنجائیکه، اکثر سانترومرهای این نژاد با این روش نواریندی رنگ نگرفته‌اند بنابراین از روش نواریندی C برای شناسایی این سانترومرها استفاده نشد.

کلمات کلیدی: سیتوزنتیک، کروموزوم، کاریوتیپ، نواریندی GTG، گاو سرابی.

فصل اول: مقدمه

۲	۱-۱- کلیات
۴	۲-۱- اهداف تحقیق

فصل دوم: بررسی منابع

۶	- سلول
۶	- چرخه سلولی
۷	۱- مرحله M
۷	۲- مرحله ایترفاز
۷	۱-۲- دوره G ₁
۷	۲-۲- دوره S
۸	۲-۳- دوره G ₂
۸	- تقسیم سلول
۸	۱- میتوز
۸	۱-۱- پروفاز
۹	۱-۲- متافاز
۹	۱-۳- آنافاز
۹	۱-۴- تلوفاز
۹	۲- تقسیم سیتوپلاسم
۱۰	- کروموزومها
۱۰	۱- تعداد کروموزومها
۱۱	۲- شکل کروموزومها
۱۱	۳- اندازه کروموزومها

۱۱	اجزاء تشکیل دهنده کروموزوم ها
۱۲	۱-DNA
۱۲	۲- پروتئین ها
۱۳	۳-RNA
۱۳	۴- یونهای معدنی
۱۴	۱- ناهنجاریهای کروموزومی
۱۴	۱- ناهنجاریهای تعدادی کروموزوم
۱۴	۱-۱- یوپلوئیدی
۱۵	۱-۲- آنوپلوئیدی
۱۵	۱-۳- میکسوپلوئیدی
۱۵	۲- ناهنجاریهای ساختاری کروموزوم
۱۶	۱-۲- معکوس شدن (inversion)
۱۶	۲-۲- تغییر مکان (Shifts)
۱۶	۲-۳- اضافه شدن (insertion)
۱۶	۲-۴- جابجایی دو طرفه یا متقابل (Reciprocal translocation)
۱۶	۲-۵- تداخل سانترومیری یا جابجایی رابرتسونی (Robertsonian translocation)
۱۷	۲-۶- تداخل انتهایی (Tandem fusion)
۱۷	۲-۷- حذف (Deletion)
۱۷	۲-۸- مضاعف شدن (Duplication)
۱۷	۲-۹- ایزوکروموزومها (Isochromosomes)
۱۷	۲-۱۰- کروموزومهای حلقوی (Ring chromosomes)
۱۸	- کشت سلول
۱۸	- شرایط محیطی برای رشد مطلوب سلول

۱۸	۱- مسأله استریل بودن مواد و وسائل.....
۲۰	۲- ظروف کشت.....
۲۱	۳- محیط کشت و مکمل ها.....
۲۲	۱-۳- محلولهای نمکی نرمال.....
۲۲	۲-۳- محیط پایه.....
۲۴	۱-۲-۳- ترکیبات محیط کشت پایه.....
۲۴	۱-۱-۲-۳- کربوهیدراتها.....
۲۵	۲-۱-۲-۳- اسیدهای آمینه.....
۲۶	۳-۱-۲-۳- پروتئین ها و پپتیدها.....
۲۷	۴-۱-۲-۳- ویتامین ها.....
۲۷	۵-۱-۲-۳- نمک ها و مواد معدنی.....
۲۸	۶-۱-۲-۳- متابولیت های مکمل.....
۲۸	۷-۱-۲-۳- هورمونها.....
۲۹	۲-۲-۳- مکمل های محیط کشت پایه.....
۲۹	۱-۲-۲-۳- سرم.....
۳۲	۲-۲-۲-۳- آنتی بیوتیک ها.....
۳۳	۳-۲-۲-۳- محرک های تقسیم میتوز (میتوزن ها).....
۳۴	۳-۳- سیستم های تامپونی.....
۳۵	۴- pH محیط کشت.....
۳۵	۵- درجه حرارت یا دمای محیط کشت.....
۳۶	۶- فشار اسمزی.....
۳۶	۷- کشش گازی محیط کشت.....
۳۶	- تهیه کاربوتیب.....

۳۸	- نمونه برداری
۳۹	- انواع سلول‌های خون کامل
۴۱	- نمونه برداری خون
۴۱	- انواع کشت سلولی از خون کامل
۴۲	- جداسازی لئوسیت‌ها
۴۲	- کشت میکروی خون کامل (کشت استاندارد لئوسیت‌ها)
۴۲	- همزمان کردن کشت سلولی برای تهیه کروموزوم‌های طویل
۴۳	- برداشت لئوسیت‌ها
۴۴	- رنگ آمیزی کروموزوم‌ها
۴۴	۱- رنگ آمیزی ساده
۴۴	۲- رنگ آمیزی نواری
۴۴	۱-۲- روش‌های نواری سازی ساختاری
۴۴	۱-۱-۲- نواریندی Q با فلورسانس با استفاده از کیناکرین (QFQ)
۴۵	۲-۱-۲- نواریندی G
۴۶	۱-۲-۱-۲- روش ASG
۴۷	۲-۲-۱-۲- روش استفاده از آنزیم تریپسین - گیمسا (GTG)
۴۸	۳-۱-۲- رنگ آمیزی نواحی سازمانده هستکی (NOR)
۴۸	۴-۱-۲- نواریندی R با حرارت با استفاده از گیمسا (RHG)
	۵-۱-۲- نواریندی C با هیدروکسید باریم با استفاده از گیمسا (CBG) یا رنگ آمیزی نواری
۴۸	هتروکروماتین ثابت
۴۹	۲-۲- روشهای نواریندی دینامیکی

مرکز اطلاعات ژنتیک انسانی
تهران

۴۹	- توسعه روشهای استاندارد تهیه کاربوتیپ گاو
۵۱	- جایگاه گاو در تقسیم بندی جانوری
۵۲	- بررسی های سیتوزنتیکی گاو
۶۱	- ناهنجاری های کروموزومی شناخته شده در گاو

فصل سوم: مواد و روشها

۶۴	- کشت سلول
۶۴	- مواد لازم برای رشد سلول
۶۴	- محیط کشت
۶۴	- مکمل های محیط کشت
۶۶	- طرز تهیه محیط کشت کامل
۶۸	- نمونه برداری
۶۸	- منشاء گاو سرابی
۶۹	- خصوصیات گاو سرابی
۷۱	- محل اجرای پایان نامه
۷۱	- محل خونگیری
۷۲	- ویژگیهای اکولوژیک شهرستان شبستر
۷۲	- موقعیت مرکز مطالعات گاو بومی (سرابی) شبستر
۷۲	- تاریخچه پیدایش مرکز مطالعات گاو بومی
۷۳	- خونگیری
۷۳	- کشت لنفوسیت های خون
۷۴	- برداشت لنفوسیت های خون

۷۷	-رنگ آمیزی کروموزوم ها
۷۸	۱-رنگ آمیزی معمولی
۷۹	۲-نواربندی G با تریپسین با استفاده از گیمسا (GTG)
۸۱	- نحوه دائمی کردن لام ها
۸۲	- مطالعه گسترش های کروموزومی
۸۲	- تهیه تصویر از گسترش های کروموزومی
۸۳	- تهیه کاربوتیپ
۸۳	۱- شاخص سانترومر
۸۴	۲- نسبت بازو
۸۴	۳- طول نسبی کروموزوم

فصل چهارم: نتایج و بحث

۸۶	- رعایت نکات ضروری در تهیه محیط کشت
۸۸	- نتایج حاصل از بررسی پلیت های کروموزومی
۹۰	- تهیه کاربوتیپ
۹۰	- کاربوتیپ جنس نر گاو سرابی
۹۳	- کاربوتیپ جنس ماده گاو سرابی
۹۵	- الگوهای نواربندی کروموزوم ها در متافاز میتوز
۹۶	- کاربرد نواربندی کروموزوم ها در تجزیه و تحلیل سیتوژنتیکی
۹۷	- نواربندی GTG
۱۰۱	- آیدیوگرام
۱۰۵	- پیشنهادات
۱۰۶	- فهرست منابع
۱۱۶	- چکیده انگلیسی

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲- تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های مختلف حیوانی	۱۰
جدول ۲-۲- ترکیبات و مشخصات انواع آنتی‌بیوتیک‌ها	۲۰
جدول ۳-۲- ترکیبات محلول‌های نمکی نرمال	۲۲
جدول ۴-۲- ترکیبات عمده سرم جنین گاوی	۳۱
جدول ۵-۲- تشابه الگوهای نواریندی ما بین کروموزوم‌های گاو، گوسفند و بز براساس استاندارد تگزاس	۵۸
جدول ۶-۲- ناهنجاریهای کروموزومی در گاو اهلی	۶۲
جدول ۱-۳- ترکیبات محیط کشت RPMI ₁₆₄₀	۶۵
جدول ۲-۳- فرمول محیط کشت کامل لنفوسیت با استفاده از RPMI ₁₆₄₀	۶۸
جدول ۱-۴- پارامترهای قابل اندازه‌گیری کروموزوم‌های جنس نرگاو سرابی (XY; ۶۰)	۹۲
جدول ۲-۴- پارامترهای قابل اندازه‌گیری کروموزوم‌های جنس ماده گاو سرابی (XX; ۶۰)	۹۴

۵۴	شکل ۱-۲- جابجائی رابرت سونی یا تداخل سانترومری در کروموزوم‌های گاو و بز.
۵۵	شکل ۲-۲- تداخل سانترومری در کروموزوم‌های بز.
۶۷	شکل ۱-۳- فیلتراسیون محیط کشت.
۶۹	شکل ۲-۳- گاو سرابی.
۸۹	شکل ۱-۴- گستره کروموزومی جنس ماده گاو سرابی (XX; ۶۰).
۸۹	شکل ۲-۴- گستره کروموزومی جنس نر گاو سرابی (XY; ۶۰).
	شکل ۳-۴- گستره کروموزومی جنس نر گاو سرابی (XY; ۶۰) مورد تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار
۹۱	کاریوتایپینگ.
۹۱	شکل ۴-۴- کاریوتیپ جنس نر گاو سرابی (XY; ۶۰).
۹۵	شکل ۵-۴- کاریوتیپ جنس ماده گاو سرابی (XX; ۶۰).
	شکل ۶-۴- کاریوتیپ هاپلوئید متشکل از الگوهای نواریندی GTG کروموزوم‌های گاو (C)، بز (G) و
۹۸	گوسفند (S) که با استاندارد ISCND (۱۹۹۰) مطابقت دارد.
۹۹	شکل ۷-۴- گستره کروموزومی جنس نر گاو سرابی (XY; ۶۰) با استفاده از نواریندی GTG.
۱۰۰	شکل ۸-۴- گستره کروموزومی جنس ماده گاو سرابی (XX; ۶۰) با استفاده از نواریندی GTG.
۱۰۰	شکل ۹-۴- کاریوتیپ جنس نر گاو سرابی (XY; ۶۰) با استفاده از نواریندی GTG.
۱۰۱	شکل ۱۰-۴- کاریوتیپ جنس ماده گاو سرابی (XX; ۶۰) با استفاده از نواریندی GTG.
	شکل ۱۱-۴- آیدیوگرام استاندارد الگوی نواریندی GTG کروموزوم‌های گاو براساس ISCND
۱۰۲	سال ۱۹۹۰.
۱۰۳	شکل ۱۲-۴- آیدیوگرام پیشنهادی گاو سرابی.

فصل اول

مقدمه
