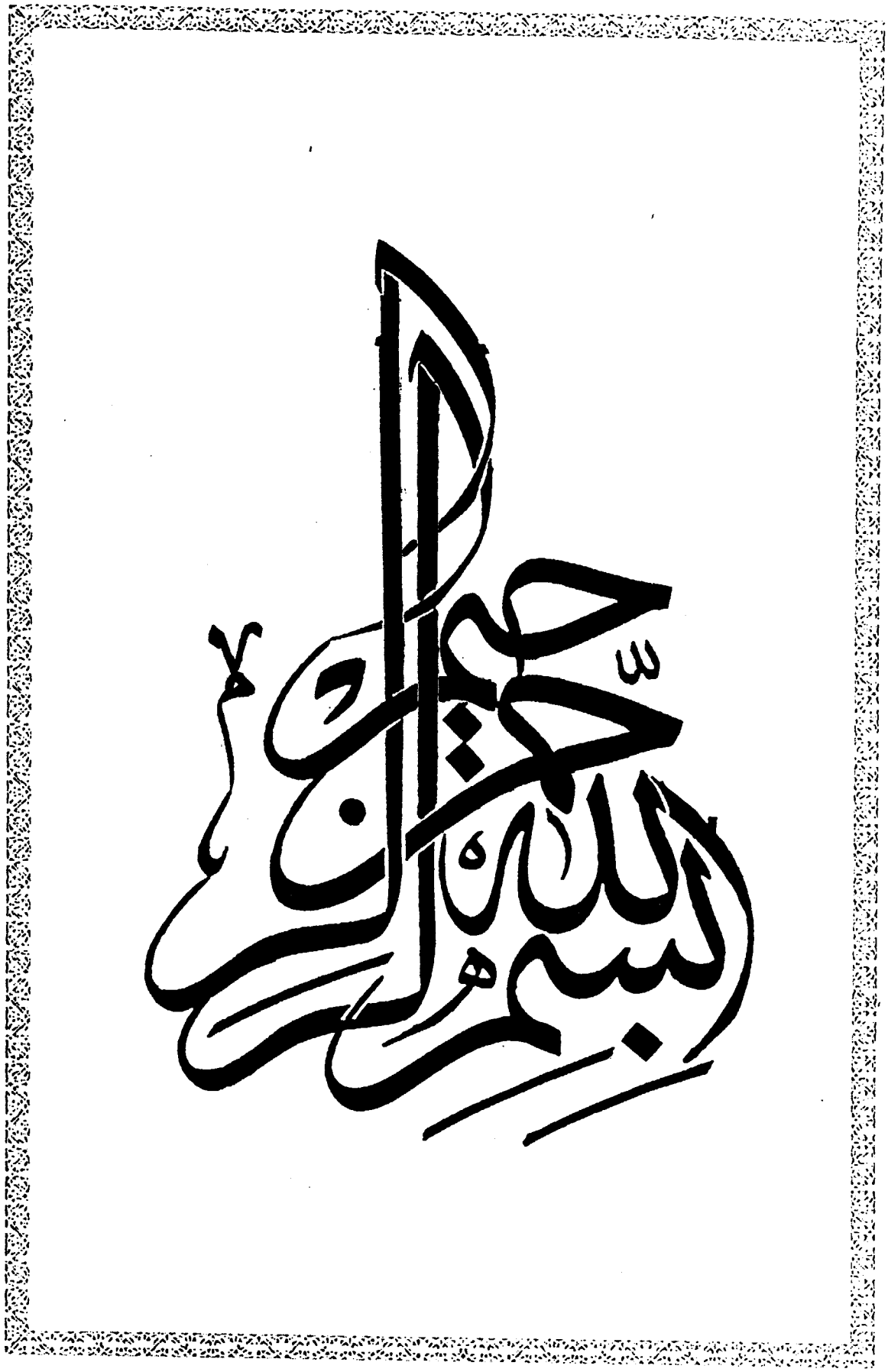


٣٠٤٣٩

مرکز اطلاعات ... علمی ایران
ثبت ...

۱۳۷۹ /۵/ ۱۵

دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان‌نامه :
برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد در رشته علوم دامی

عنوان :

مطالعه سیتوژنتیکی گوسفندان قزل، مغانی و آرخار مرینوس

بررسی کاریوتیپ با الگوی نواربندی G

اساتید راهنما :
آقای دکتر جلیل شجاع آقای دکتر محمدعلی حسین پورفیضی

استاد مشاور :
آقای دکتر غلامعلی مقدم

8110

ارائه دهنده :
محمدطاهر هرکی نژاد

شهریور ۱۳۷۸ شماره پایان‌نامه

۳۰۴۳۹

تقدیم به

همسر صبورم

تقدیر و تشکر

سپاس خداوند منان را که به فضل و قوه الهی‌اش، توفیق آن را یافته‌ام که با اتمام این پژوهش این مقطع تحصیلی را نیز به پایان برسانم. نخست وظیفه خود می‌دانم از اساتید راهنمای ارجمندم آقای دکتر پورفیضی و آقای دکتر شجاع و استاد مشاور گرامیم آقای دکتر مقدم که در مراحل مختلف انجام پژوهش از هیچگونه راهنمایی و کوششی دریغ نورزیدند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از آقای پرفسور آقایف بخاطر راهنمائیهای ارزنده‌شان در جهت عکس‌برداری میکروسکوپی و تهیه تصاویر واضح و دقیق از کار انجام شده، بسیار متشکرم.

از آقای دکتر شکیبا معاونت محترم پژوهشی دانشکده و نماینده تحصیلات تکمیلی که با مساعدت خویش امکان برگزاری جلسهٔ دفاعیه را فراهم نمودند کمال تشکر را دارم.

از آقایان جلیل پیرایش و سیامک اکبری، مسئولین محترم آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشکده علوم، بخاطر همکاری در طول مراحل انجام پایان‌نامه بسیار متشکرم.

همچنین از اعضاء هیأت علمی گروه علوم دامی بخاطر مساعدتهایشان در طول مدت تحصیل، کمال تشکر را دارم.

مساعدت و یاری آقای مهدوی مسئول بخش دامداری دانشکده کشاورزی و مهندسین گرامی آقایان احمد احمدی، قاسم جمینی، عبدالرحمن ابن‌عباسی، بابک احمدی، محمودرضا بختیاری، علی‌حسین غلامی‌نیا، حمید جعفریان، صلاح جهینی، ظریفی، عبدی و خانم امینی‌زاده و میرشمس‌الهی و تمام دوستانی که ذکر نام همه آنها در اینجا مقدور نیست، را ارج نهاده و از همگی ممنون و سپاسگزارم.

نام خانوادگی دانشجو : هرکی‌نژاد نام : محمدطاهر

عنوان پایان‌نامه : مطالعه سیتوژنتیکی گوسفندان قزل، مغانی و آرخارمرینوس

بررسی کاریوتیپ با الگوی نواربندی G

اساتید راهنما : دکتر جلیل شجاع دکتر محمدعلی حسین‌پور فیضی

استاد مشاور : دکتر غلامعلی مقدم

مقطع تحصیلی : کارشناسی ارشد رشته : علوم دامی گرایش : ژنتیک و اصلاح دام

محل تحصیل (دانشگاه) : تبریز

دانشکده : کشاورزی تاریخ فارغ‌التحصیلی : شهریور ماه ۱۳۷۸ تعداد صفحه : ۹۸

کلید واژه‌ها : کرموزوم ، کاریوتیپ ، نواربندی G

چکیده

بررسی سیتوژنتیکی بر روی ۵۳ رأس از گوسفندان قزل، مغانی و آرخارمرینوس که در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز پرورش داده می‌شدند صورت گرفت. با استفاده از سرنگ‌های استریل و هپارینه خون محیطی از وریدوداج گرفته شد. ۰/۳ میلی‌لیتر از خون کامل در ۷ میلی‌لیتر محیط کشت هام F_{12} که با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (F.C.S) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین تکمیل شده بود کشت داده شد. فیتوهماگلوتنین (pHA-M) به عنوان میتوژن مورد استفاده قرارگرفت. کشت‌ها در ۳۷°C به مدت ۷۲-۶۹ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. ۱/۳ ساعت قبل از برداشت، کلشی‌سین (۱۵۰ میکرولیتر برای هر کشت) به منظور توقف میتوز افزوده شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوتونیک (۰/۰۷۵ مولار KCl) در انکوباتور قرار داده شد و ۴-۳ بار در فیکساتیوکارنوی تثبیت گردید. سوسپانسیون نهایی بر روی لام‌های سرد و مرطوب گسترش داده شد و در هوا خشک گردید. به منظور نواربندی GTG لام‌ها با ۰/۰۵ درصد تریپسین تیمار داده شدند و با محلول ۵ درصد گیمسا رنگ‌آمیزی گردیدند.

گوسفندان قزل، مغانی و آرخارمرینوس دارای تعداد کرموزوم دی‌پلوئید ۲n=۵۴ و کاریوتیپی شامل سه جفت دو بازوی و ۲۳ جفت اکروسانتریک به عنوان کرموزومهای اتوزوم، یک کرموزوم x بزرگ اکروسانتریک و یک کرموزوم y دو بازوی و کوچک به عنوان کرموزومهای جنسی می‌باشند. نواربندی G امکان یافتن صحیح تمام زوجهای کرموزومی اکروسانتریک را فراهم نمود. سانترومر اکثر کرموزوم‌های این گوسفندان در گسترش‌های نواربندی G رنگ نگرفتند و این مورد برعکس کرموزوم‌های انسان است. سانترومر کرموزوم دوبازویی y با نواربندی G رنگ گرفت.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول : بررسی منابع

تقسیم سلول ۳

میتوز ۳

کرموزومها ۶

۱ـ تعداد کرموزومها ۶

۲ـ ریخت‌شناسی کرموزوم ۷

کشت سلول ۹

آنچه برای کشت سلول مورد نیاز است ۹

ظروف کشت ۱۰

شرایط کشت ۱۱

الف ـ دما ۱۱

ب ـ pH ۱۱

۱) سیستم بافری بی‌کربنات سدیم - CO_2 ..... ۱۱

۲) سیستم بافری هپس ۱۲

محیط کشت ۱۳

ترکیبات یک محیط کشت ۱۵

۱ـ کربوهیدراتها ۱۵

۲ـ اسیدهای آمینه ۱۶

ویتامینها و هورمونها ۱۶

مکملهای محیط کشت ۱۷

عنوان	صفحه

۱ـ سرم ۱۷

۲ـ آنتی‌بیوتیکها ۱۹

۳ـ محرکهای تقسیم میتوز ۲۰

نگهداری درازمدت سلولها ۲۲

تهیه کاریوتیپ ۲۲

نمونه‌برداری ۲۲

الف ـ نمونه‌برداری برای تهیه کاریوتیپ قبل از تولد ۲۲

ب ـ نمونه‌برداری برای تهیه کاریوتیپ بعد از تولد ۲۴

هماتولوژی پایه ۲۵

لنفوسیت‌های T ۲۶

اینترلوکین ۲ ..... ۲۶

فعال‌شدن لنفوسیت‌های T ۲۸

نمونه‌برداری خون ۲۸

کشت لنفوسیت‌های خون ۲۹

جداسازی لنفوسیت‌ها ۳۰

کشت استاندارد لنفوسیت ۳۱

همزمان کردن کشت لنفوسیت ۳۱

برداشت لنفوسیت‌ها ۳۱

رنگ‌آمیزی کروموزومها ۳۲

روشهای نواربندی ۳۲

روشهای نواربندی ساختاری ۳۳

نواربندی G یا GTG ۳۳

عنوان	صفحه

رنگ‌آمیزی نواحی اندامهای هسته‌ای (NOR) ۳۵

روشهای نواربندی دینامیکی ۳۵

توسعه روشهای استاندارد تهیه کاریوتیپ گوسفند ۳۶

بررسیهای سیتوژنتیکی در مورد گوسفند ۳۶

ایمنی کار ۴۱

اهداف تحقیق ۴۳

فصل دوم: مواد و روشها

محیط کشت ۴۴

طرز تهیه و آماده‌سازی محیط کشت ۴۴

نمونه‌برداری ۴۷

گوسفند مغانی ۴۸

گوسفند قزل ۴۸

گوسفند آرخارمرینوس ۵۰

ظروف کشت ۵۲

کشت استاندارد لنفوسیت‌های خون ۵۲

مواد لازم ۵۲

وسایل ۵۲

روش کار ۵۲

برداشت لنفوسیت‌های خون ۵۳

مواد لازم ۵۳

عنوان | صفحه

وسایل ۵۴
روش کار ۵۴
تهیه گسترش از سوسپانسیون سلولی ۵۶
رنگ‌آمیزی معمولی ۵۷
نواربندی G ۵۸
روش انجام نواربندی G ۵۹
مواد لازم ۵۹

نحوهٔ دائمی کردن لامها ۶۱
مطالعه گسترشهای کرموزومی ۶۲
تهیه تصاویر کرموزومی ۶۳
تهیه کاریوتیپ ۶۵

فصل سوم: نتایج و بحث

نتایج بررسی پلیت‌های کرموزومی ۷۰
کاریوتیپ گوسفند قزل ۷۱
کاریوتیپ گوسفند آرخارینوس ۷۵
کاریوتیپ گوسفند مغانی ۷۸
پیشنهادات ۸۵
منابع مورد استفاده ۸۶
خلاصه انگلیسی ۹۴

مقدمه

رمزهای ژنتیکی صفات یا ژنها بصورت قطعاتی از DNA در طول توالی آن قرار گرفته‌اند. مجموعه‌ای از این توالی‌ها به صورت کرماتین در داخل هسته سلول قرار دارند. در مرحله‌ای از چرخه همانندسازی (فرآیند میتوز و میوز) این توالی‌های DNA همراه با ماتریکسی از پروتئین و نوکلئوپروتئین به فشرده‌ترین حالت ممکن در می‌آیند که کروموزوم گفته می‌شود.

علم ژنتیک شاخه‌های تخصصی زیادی دارد که ژنتیک جمعیت، ژنتیک کمی، ژنتیک انسانی، ژنتیک میکروبها و ژنتیک اصلاح نژاد جانوران و گیاهان و ... از آن جمله‌اند(۸). در مورد جانوران و بخصوص دامهای اهلی به طور وسیعی از این علم استفاده شده است. هزاران سال پیش از این دامداران بهترین دامهای خود را برای ایجاد نسل بعد انتخاب می‌کردند. آنها بدون اینکه خودشان متوجه باشند کم و بیش یک کار ژنتیکی انجام می‌دادند. در سال ۱۸۶۶ قوانین اساسی وراثت توسط مندل کشف شد، اما نه در زمینه علمی و نه عملی کاربردی نیافت. در ابتدای قرن بیستم با کشف مجدد قوانین مندل کار ژنتیکی در دامپروری با تکیه بر اصول و قوانین ژنتیک به طور گسترده توسعه پیدا کرد. اما هنوز کارهای اصلاحی بر پایه مشاهدات فنوتیپی استوار بود. ارائه مدل ساختاری ملکول DNA به وسیله گریک و واتسون انقلاب عظیمی را در ژنتیک بوجود آورد. به این ترتیب از نیمه دوم سده بیستم نظرها به عمق سلول و الفبای وراثت جلب شد و در سالهای ۱۹۸۰ و بعد از آن بدلیل کشفیات جدید روند پیشرفت علم ژنتیک شتاب بیشتری یافت و تلاشها در این زمینه به بار نشست. امروزه کار بر روی کروموزومها، بندهای کروموزومی و ژنها بسیاری از رموز وراثت را کشف و کاربرد آنها را امکان‌پذیر ساخته است.

با وجود مطالعات و تحقیقات زیادی که انجام شده بود تا سال ۱۹۵۶ حتی تعداد دقیق

کرموزومهای انسانی نیز مشخص نشده بود(۱). در دهه ۹۰-۱۹۸۰ پیشرفتهای عظیمی در سیتوژنتیک صورت گرفت. برای نمونه در این دو دهه انواع روشهای نواربندی ابداع گردید، امکان هیبریداسیون کروموزومی بوجود آمد، چندین کنفرانس پژوهشی بین‌المللی برای استاندارد کردن روشهای سیتوژنتیک تشکیل گردید.

از تکنیکهای پیشرفته سیتوژنتیک در دهه ۱۹۹۰، تکنیکهای هیبریداسیون فلورسانسی insitu(FISH)[1] هستند که به منظور استفاده عملی هر آزمایشگاه برای تکمیل روشهای نواربندی پایه، ساده شده‌اند. پیشرفت جدیدی که در این فن‌آوری پایه صورت گرفته است هیبریداسیون مقایسه‌ای ژنومی[2] است، که اخیراً برای تحقیقات جنایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما بطور کلی در سیتوژنتیک تشخیصی قابلیت‌های زیادی دارد. دیگر فن‌آوری جدید در این زمینه chromosome Bar coding است. این تکنیک با دسته‌ای از شناساگرهای نواحی کوچک، در یک هیبریداسیون تک‌مرحله‌ای با ایجاد یک Bar code چندرنگی، داخل کرموزومها را به رنگهای مختلف در می‌آورد. FISH امروزه با بکارگیری شناساگرهایی در طول فیبرهای انفرادی کروماتین (Fiber FISH) برای تهیه نقشه ژنی[3] استفاده می‌شود.

تلاش در راستایی استفاده از این ابزار علمی برای بهبود ظرفیت تولیدی دامهای کشور و نیز تلاش برای همراهی با سیر پیشرفت این علم خالی از فایده نخواهد بود.

1- Flurescence In situ Hybridization= FISH 2- Comparative Geneomic Hybridization.
3- Gene mapping

فصل اول

بررسی منابع

تقسیم سلول

میتوز

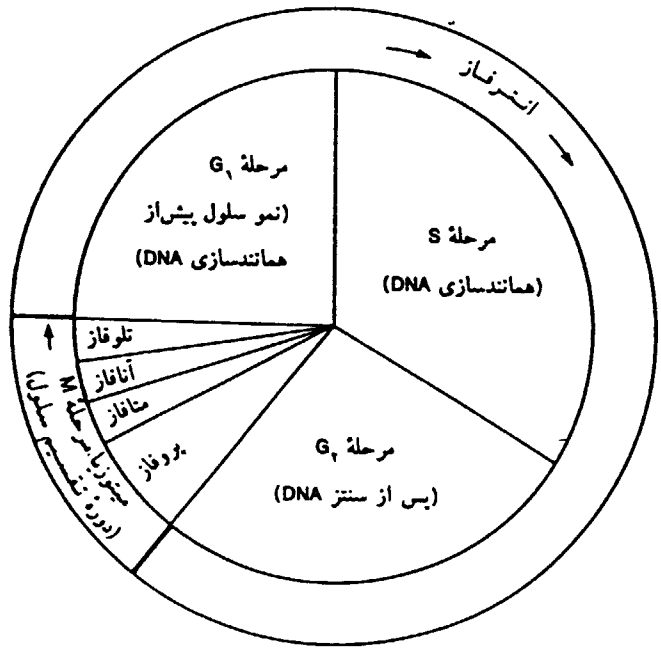
همه سلولهای پیکری[1] (همه سلولهای بدن، بجز سلولهای جنسی) یک جاندار پرسلولی طی فرآیند تقسیمی، که میتوز نامیده می‌شود، از یک سلول اصلی، یعنی سلول تخم منشاء می‌گیرند. کار تقسیم میتوز این است که از هر کروموزوم نسخه دقیقی بسازد و سپس هر یک دو دست[2] یکسان کرموزومهای حاصل از نسخه‌برداری را به وسیله تقسیم شدن سلول اصلی (مادر)، وارد یکی از دو سلول دختر[3] کند(۸). مدت زمان بین دو دور تقسیم را مرحله انترفاز می‌نامند. بطور کلی دوره تقسیم سلول شامل چهار مرحله است. در دو تای آنها سلول از لحاظ اندازه فرصت رشد پیدا می‌کند(G_1 و G_2) و در مرحله بعدی برای همانندسازی کرموزومهایش DNA سنتز می‌کند(مرحلهٔ S). مرحله چهارم که در آن سلول تقسیم می‌شود، میتوز نام دارد. در مرحله S هر یک از ملکولهای DNA همانندسازی[4] می‌کند. این فرآیند همانندسازی به پیدایش کرموزومی متشکل از دو رشته کنشی یکسان بنام کروماتید می‌انجامد. دو کروماتید یک کرموزوم به یک سانترومر متصل هستند. در این مرحله، کرموزومها بسیار باریک و بلندند و در زیر میکروسکوپ معمولی فقط بصورت دانه‌های کروماتین دیده می‌شوند(۱ و ۵۱).

1- Somatic
2- set
3- daughter
4- replicates

میتوز به طور ساده به چهار مرحله تقسیم می‌شود: پروفاز (P)، متافاز (M)، آنافاز (A) و تلوفاز (T). بنابراین سیکل سلولی را می‌توان بصورت زیر نشان داد (شکل ۱-۱):

$$G_1 \Rightarrow S \Rightarrow G_2 \Rightarrow PMAT \Rightarrow G_1 \Rightarrow S \Rightarrow G_2 \Rightarrow PMAT$$

اینترفاز اینترفاز



شکل ۱-۱- نمودار دور تولید مثل یک سلول (۸)

آغاز تقسیم سلولی همراه با شروع سنتز DNA است و در تمام موارد بجز در تقسیم دوم میوز در تشکیل گامتها این موضوع صادق است. در نتیجه تقسیم سلولی لازمه‌اش سنتز DNA است. بهرحال بایستی توجه شود که سنتز DNA لزوماً تحت تأثیر تقسیم سلولی نیست؛ لذا سلولهای پلی‌پلوئید، کرموزومهای پلی‌تن و ژنهای چند برابر شده نیز وجود دارند(۵۱ و ۷۸).

مرحله بعدی در چرخه تقسیم سلول فشرده شدن DNA و پیچیدن آن به دور خود است.

این مرحله پروفاز نام دارد و در آن کروموزومها کوتاه و ضخیم می‌شوند و بتدریج بر مقدار پروتئین‌شان افزوده می‌شود. در اواخر پروفاز ممکن است دو کروماتید همسان، «خواهر»[1] را بتوان دید. سانتریولها به دو انتهای متقابل سلول مهاجرت می‌کنند و در آنجا مراکز (یا قطبهای) میتوزی تشکیل می‌دهند که از این مراکز رشته دوک پدید می‌آیند و بسوی سانترومرها امتداد می‌یابند. غشاء هسته شروع به تحلیل رفتن می‌کند و در مرحله متافاز کاملاً ناپدید می‌شود. در این هنگام سانترومرها به مرکز سلول، یعنی محلی که سطح استوایی یا صفحه متافاز نامیده می‌شود، می‌روند و رشته‌هایی که مجموعه آنها را دستگاه دوک می‌نامند، به طور کامل شکل می‌گیرند. اکثر بررسیهای سیتوژنتیکی در این مرحله صورت می‌گیرد و سعی می‌شود چرخه تقسیم سلول در مرحله متافاز متوقف شود(۷۴).

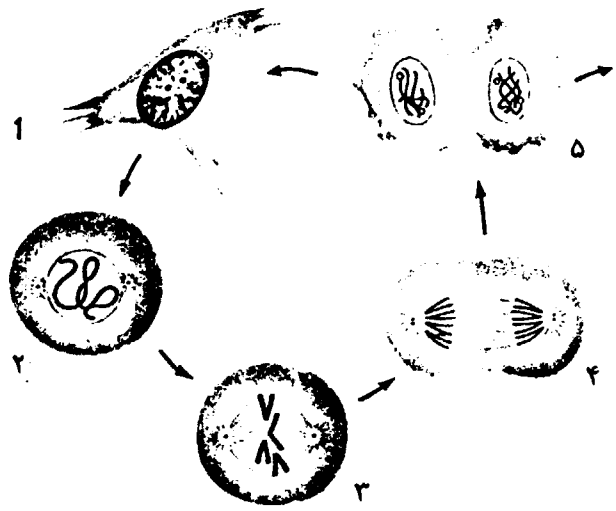
در آغاز مرحله آنافاز، کروماتیدهای خواهر هر کروموزوم در ناحیه سانترومرشان از هم جدا شده و به سوی قطبهای مخالف سلول می‌روند. کروماتیدهای قبلی و آنها که بعد از همانندسازی جدید ایجاد شده‌اند توسط تکنیک رنگ‌آمیزی خاصی قابل تشخیص هستند.

در مرحله تلوفاز، در هر قطب سلول یک دست کروموزوم همسان جمع می‌شوند. سپس پیچش این کروموزومها بتدریج باز شده و دوباره به حالت اینترفاز در می‌آیند. رشته‌های دوک حذف شده و غشاء هستک دوباره پدیدار می‌شود و سیتوپلاسم توسط فرآیندی بنام سیتوکینز (تقسیم سیتوپلاسم) دونیم می‌شود(۸ و ۶۸).

در سلول جانوری سیتوکینز به وسیله پیدایش شیار شکافنده که رفته‌رفته عمیق‌تر می‌شود و سرانجام سلول را به دو قسمت تقسیم می‌کند انجام می‌گیرد(۱).

طول زمانی که در هر یک از مراحل تقسیم میتوز سپری می‌شود کاملاً متفاوت است. در

1- sister chromatides



شکل ۲-۱- مراحل اصلی میتوز: ۱- اینترفاز، ۲- پروفاز، ۳- متافاز، ۴- آنافاز و ۵- تلوفاز (به نقل از منبع شماره ۶۳).

طول انجام فرآیند میتوز مرحله پروفاز از بقیه طولانی‌تر و متافاز از همه کوتاهتر است. دوره زندگی یک سلول پیکری [میتوز PMAT→G_2→S→G] در سلولهای مختلف بسیار متفاوت است. سلولهای لنفوسیت در کشت بافت دارای دمای ۳۷ درجه سانتیگراد معمولاً به ۱۵ تا ۲۳ ساعت برای گذراندن یک دوره زندگی نیاز دارند(۶۷).

کروموزومها

۱- *تعداد کروموزومها*

هر یک از سلولهای پیکری جانداران عالی دو دست کروموزوم همتا دارد که یک دست آنها را از مادر و دست دیگر را از پدر به ارث برده است. تعداد کروموزومهای این دو دست را عدد