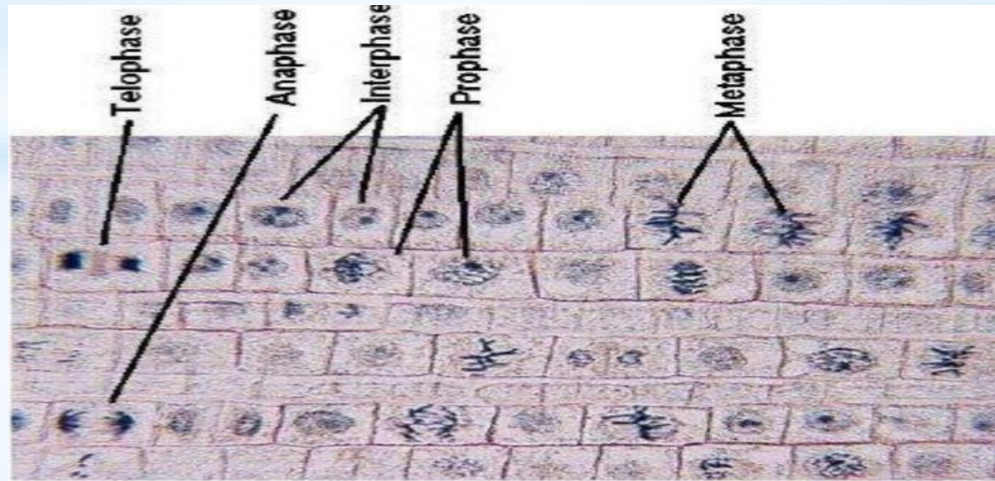




University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز (Mitosis)



اهداف

1. انتخاب سلول مناسب جهت بررسی مراحل تقسیم سلولی میتوز (Mitosis)

2. تهیه لام کروموزومی به روش اسکواش (Squash)

3. انجام تکنیک رنگ آمیزی کروموزومی به روش کریستال ویوله (Crystal violet)

4. بررسی خصوصیات سیتولوژیکی سلول ها در کلیه مراحل تقسیم سلولی میتوز

5. بررسی خصوصیات سیتولوژیکی سلول در مرحله میان تقسیم (Interphase)

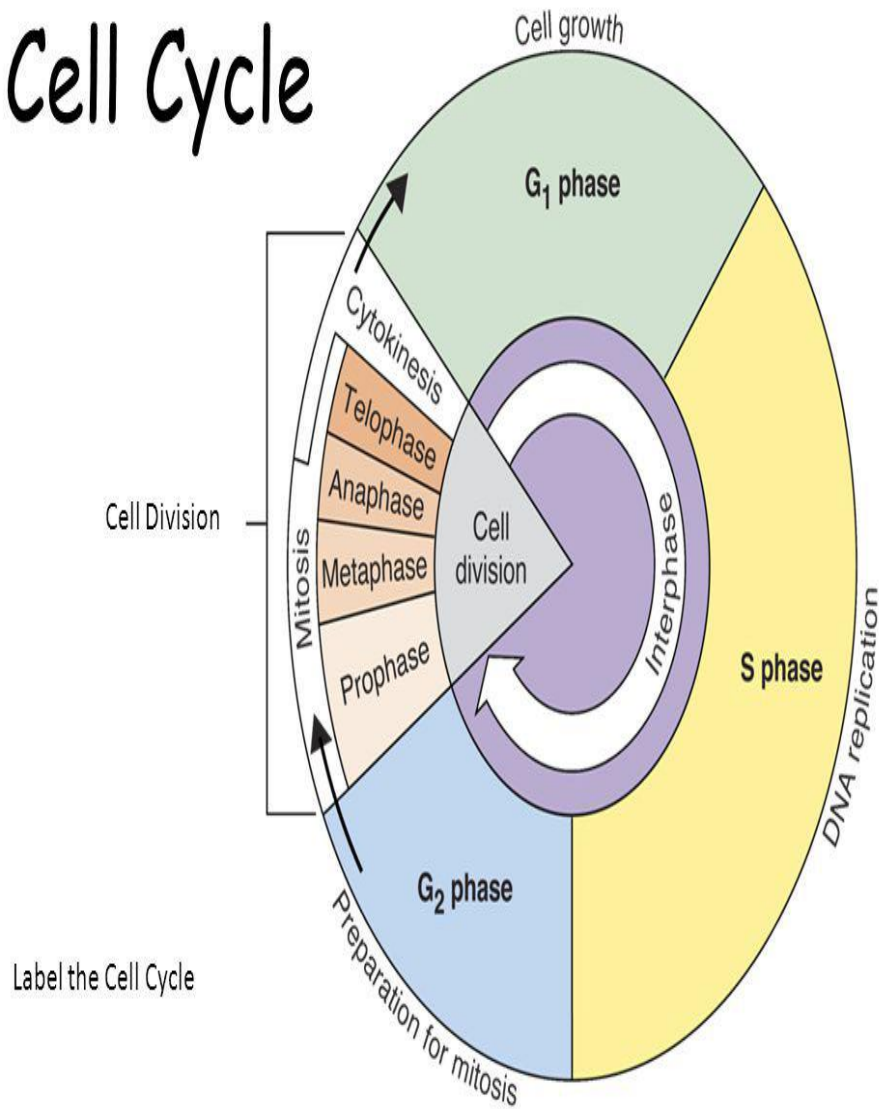
سیکل سلولی (Cell Cycle)

توانایی تکثیر یکی از ویژگی های مهم یاخته های زنده است. زمان و مجموعه تغییر و تحولاتی که از آغاز تقسیم یاخته ای تا رسیدن به شروع تقسیم متوالی بعدی بر یاخته می گذرد، چرخه یاخته ای یا سیکل سلولی Cell Cycle نام دارد.

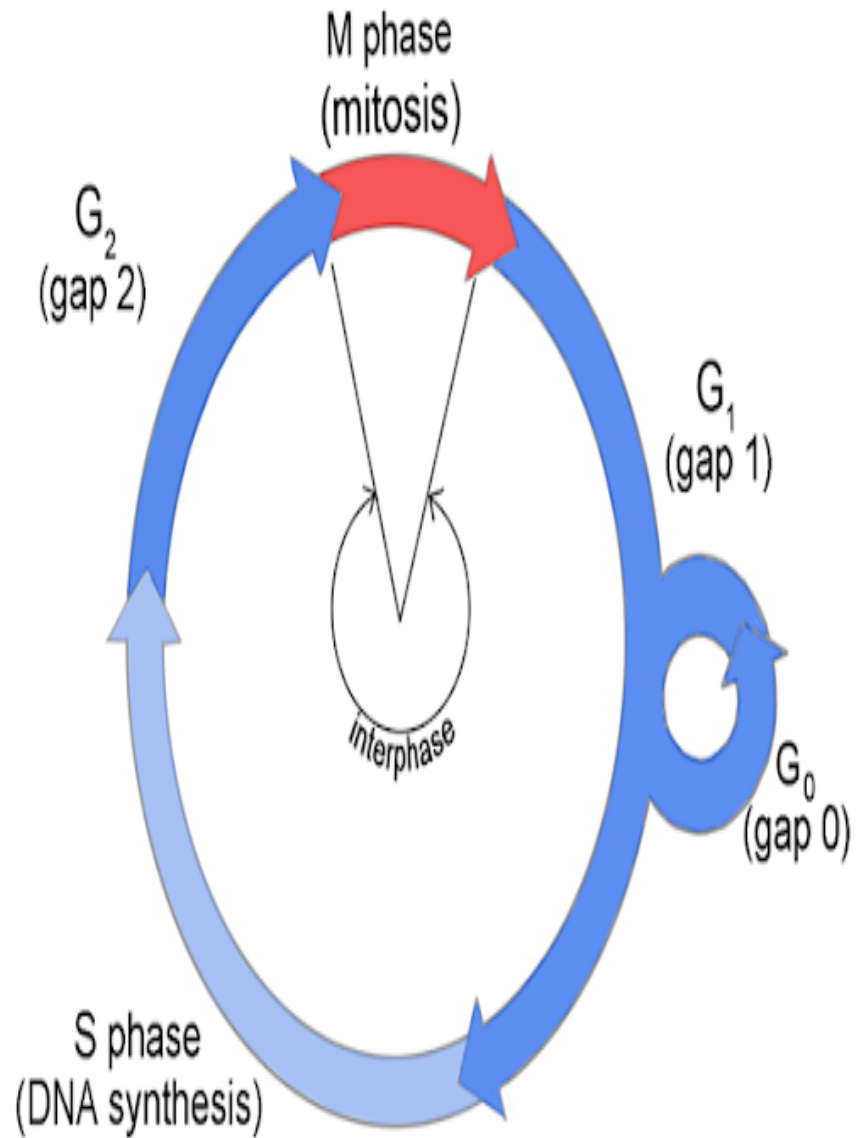
زمان چرخه یاخته ای بر حسب نوع سلول، سن سلول و شرایط محیطی سلول در موجودات مختلف متنوع است. بیشتر زمان سیکل سلولی در اینترفاز (Interphase) می گذرد که طی آن فعالیت های ماده سازی و بیوشیمیایی شدیدی صورت می گیرد و مواد لازم برای تقسیم سلولی و رشد سلولی فراهم می گردد و سپس تقسیم سلولی میتوز صورت می گیرد که طی آن هسته سلول و نهایتاً خود سلول دو تا می شود. در ابتدا با توجه به اینکه کروموزم ها به طور دقیق دو برابر می شوند، مرحله میتوز آخرین مرحله میکروسکوپی قابل مشاهده تغییراتی است که در سطح کروموزومی انجام می شود و شامل فرآیندی است که طی آن مواد ژنتیکی به طور دقیق همانندسازی شده و دوسری کروموزم جدید کاملاً مشابه با سلول والدین به وجود می آید.

در سیکل سلولی مرحله G_1 و G_2 مرحله وقفه ای است که در سنتز DNA صورت می گیرد. در فاز G_1 زمان لازم برای اینکه سلول دختری به حد سلول مادری برسد وجود دارد. در این مرحله سلول تازه تقسیم شده و DNA سازی ندارد. در فاز Synthesis در سیکل سلولی ماده ژنتیکی دقیقاً دو برابر می شود و DNA همانندسازی می شود. در فاز G_2 سلول دختری خودش را برای تقسیم میتوز بعدی آماده می کند.

Cell Cycle



Label the Cell Cycle



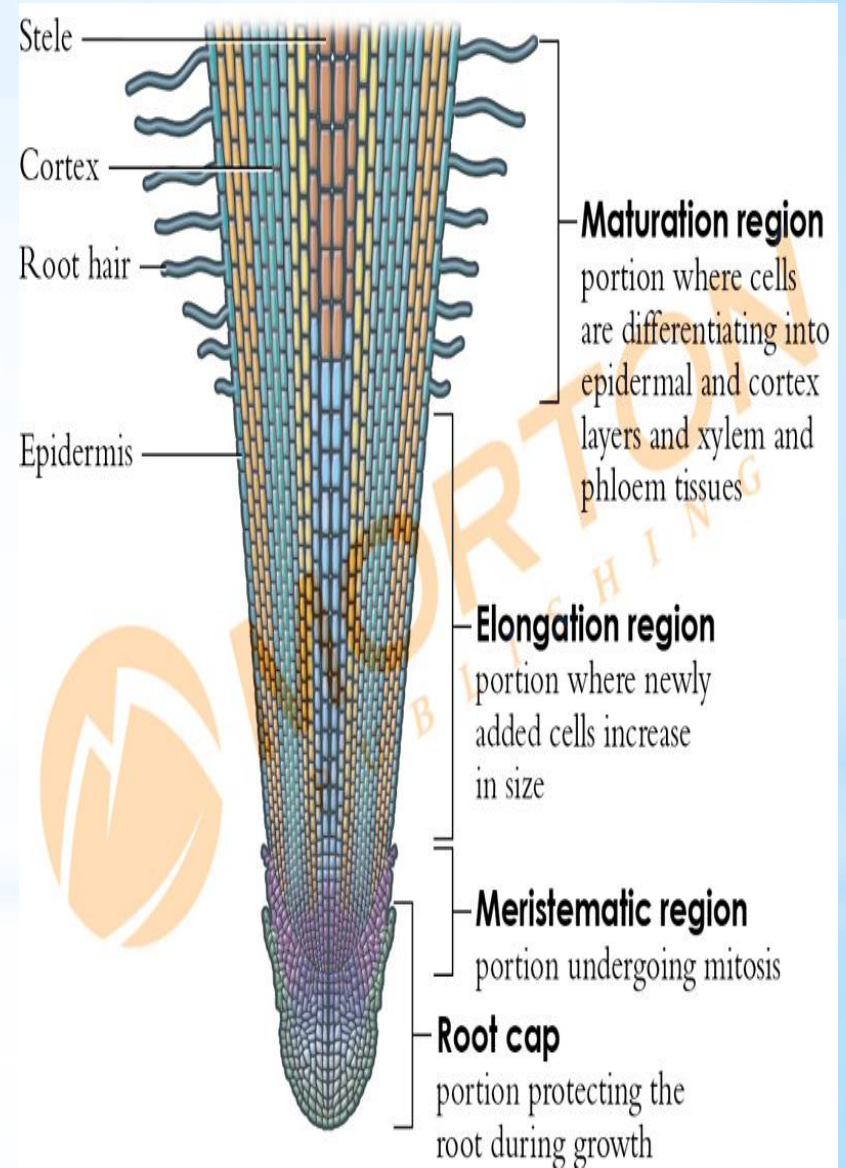
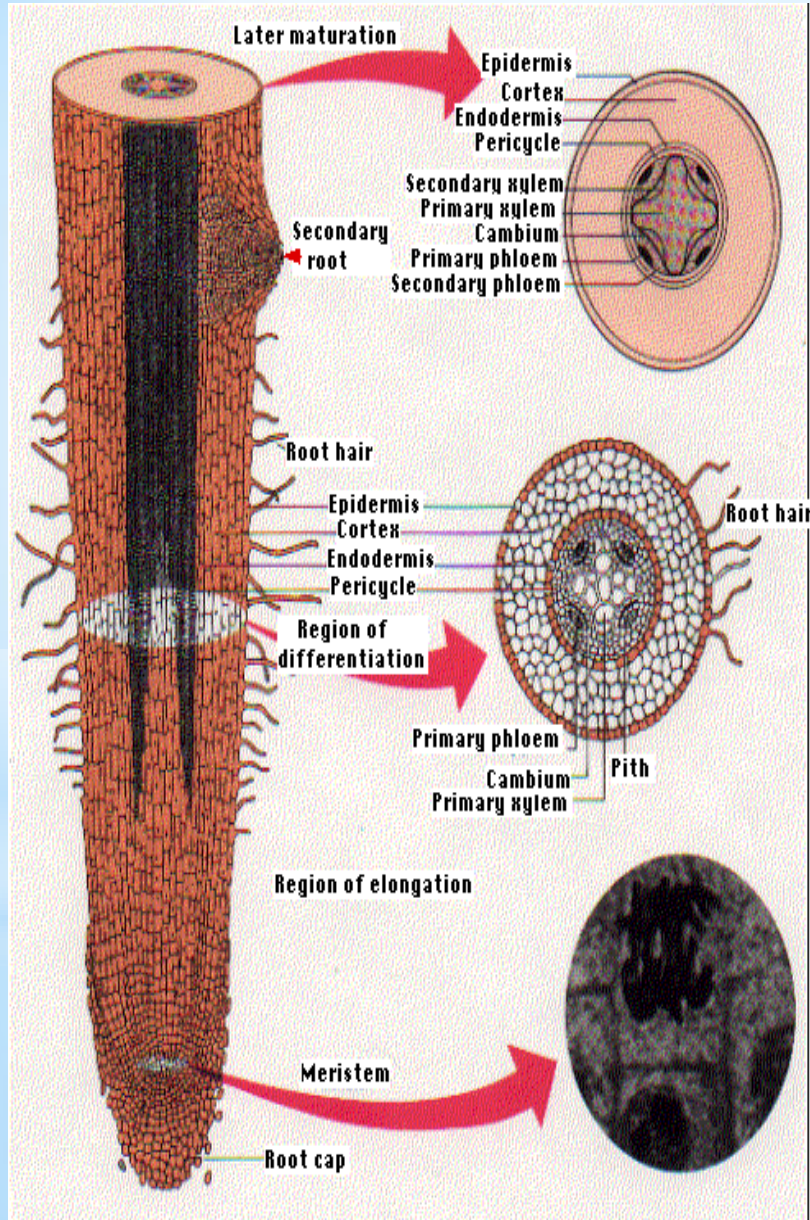
انتخاب نمونه مناسب جهت بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز در این جلسه جهت بررسی و مشاهده مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز از سلول‌های مریستمی ریشه پیاز استفاده می‌شود. ویژگی‌های مختلف این نمونه باعث می‌شود که نمونه بسیار مناسبی جهت بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز باشد. برخی از آنها بشرح زیر می‌باشد:

1. بزرگ بودن کروموزم‌ها و مشاهده نسبتاً واضح آن‌ها در میکروسکوپ نوری.
2. کم بودن تعداد مجموعه کروموزمی پیاز.
3. فعال بودن سلول‌ها در منطقه مریستمی یا زاینده تقسیم سلولی.
4. داشتن تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف پیاز.
5. در دسترس بودن آن.
6. ارزان قیمت بودن.
7. ریشه‌زایی نسبتاً سریع در صورت عدم ریشه‌زایی برخی از نمونه‌ها.

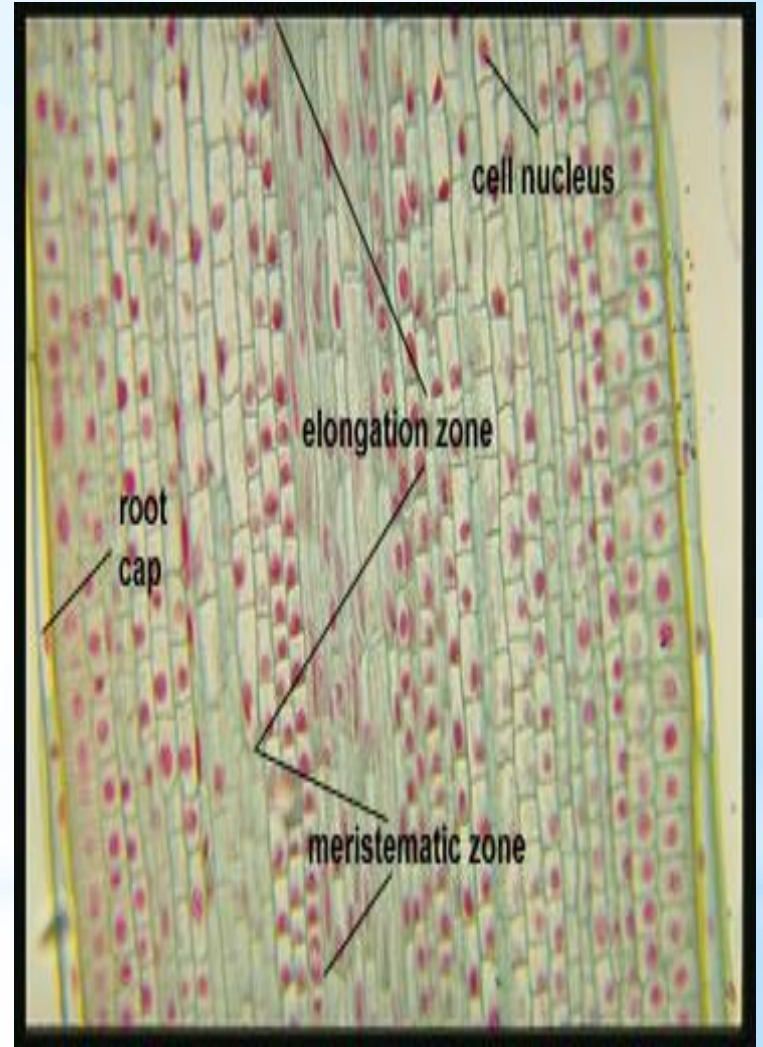
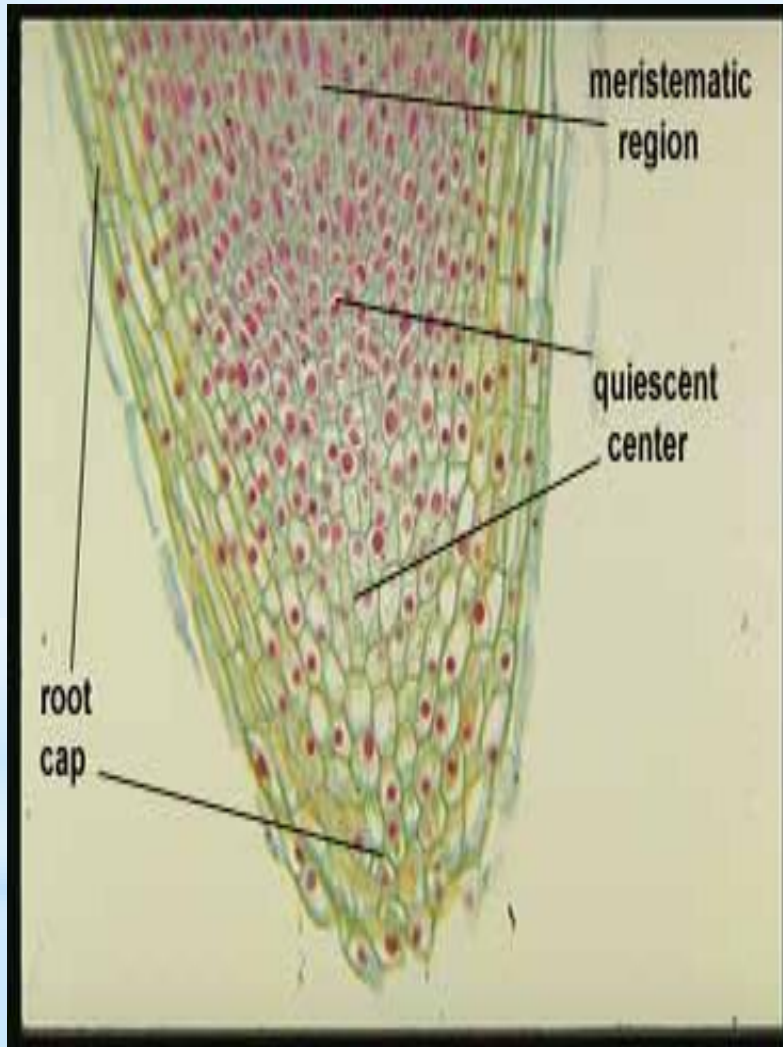
ساختار طولی ریشه

در ساختار طولی ریشه جوان از قسمت پایین به بالا در ابتدا منطقه کلاهک (Roo Cap) قرار دارد. سلولها در این ناحیه بحالت محافظتی و بدون فعالیت تقسیمی در منطقه آرام (quiescent center) می باشند. منطقه بالاتر از آن منطقه تقسیم سلولی (cell division) است که سلولها قدرت تکثیر زیادی دارند. تقسیم به صورت همزمان در بافت مریستمی وجود نداشته و هرسلول در یکی از مراحل مختلف تقسیم و سیکل سلولی به سر می برد. منطقه بالاتر از آن منطقه رشد طولی (Cell elongation) است که سلولها در این مرحله اکثراً در مرحله اینترفاز سیکل سلولی قرار دارند و بیشتر در حال رشد می باشند. منطقه بعد از آن منطقه تمایز سلولی (Cell Differentiation) است. سلولها در این منطقه به سلولهای نهایی که قرار است تبدیل شوند در حال تمایز میباشند و منطقه بافتی شکل می گیرد.

ساختار طولی ریشه

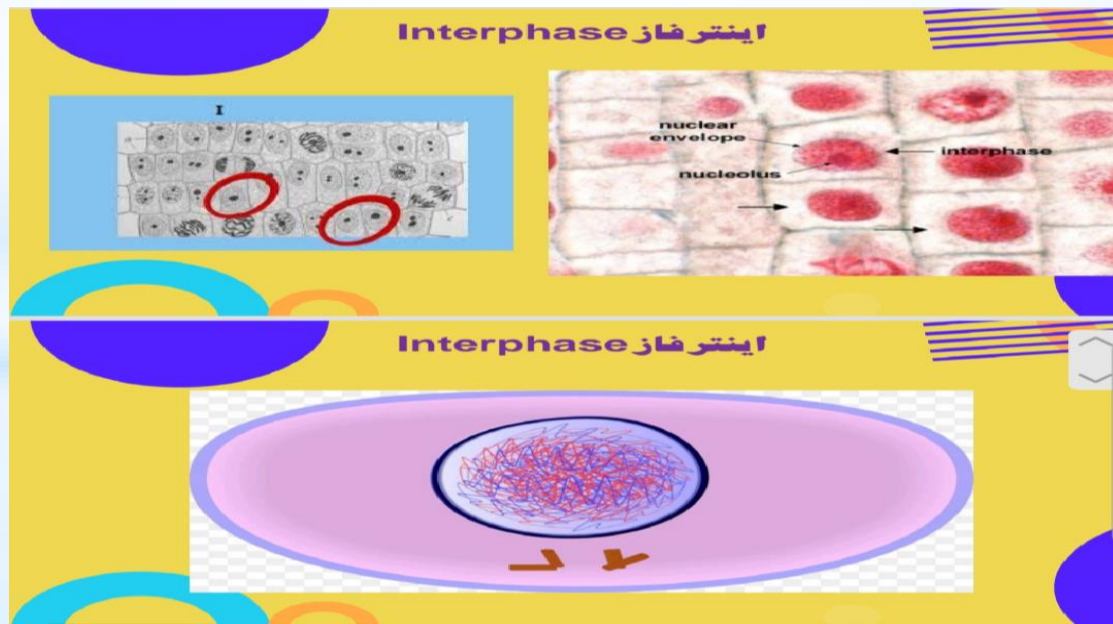


ساختر طولی میکروسکوپی ریشه



اینترفاز: Interphase

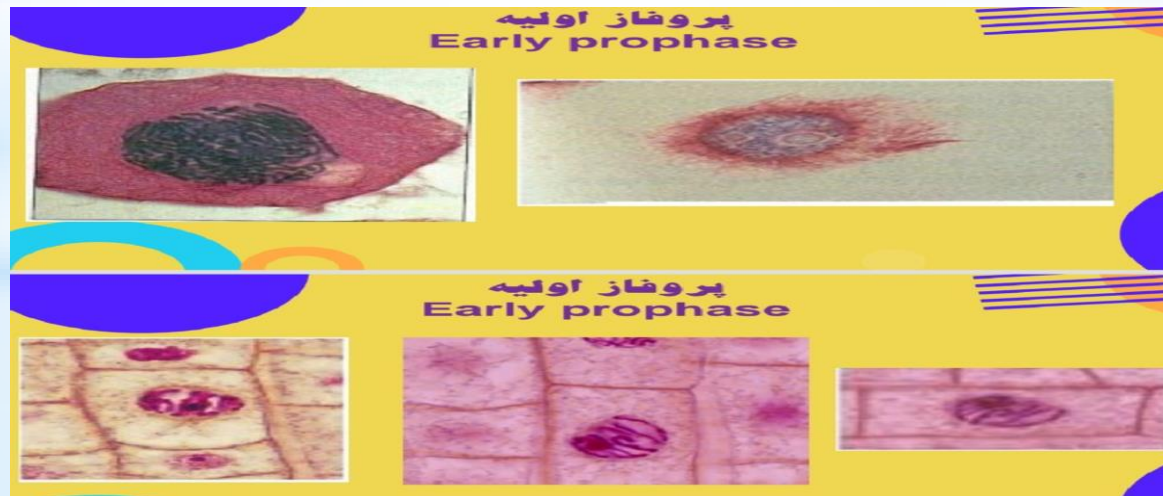
در مرحله اینترفاز یا میان تقسیم محتوای ژنتیکی به صورت رشته‌های درهم درهم مشاهده می‌شوند و غیر قابل تشخیص هستند و در واقع این مرحله فاصله میان دو تقسیم متوالی سلولی است که در ضمن آن فعالیت‌های مربوط به رشد و سنتز صورت می‌گیرد اندامک‌ها تکثیر شده و نسخه‌های جدید از دی‌ان‌ای سنتز می‌شود و همانند سازی صورت می‌گیرد. از بهترین مشخصات این مرحله وجود هستک (های) مشخص و صاف بودن سطح محتوای ژنتیکی هسته و سایز بزرگ سلول مادری در مقایسه با سلول‌های دختری حاصل از تقسیم می‌باشد.



مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز

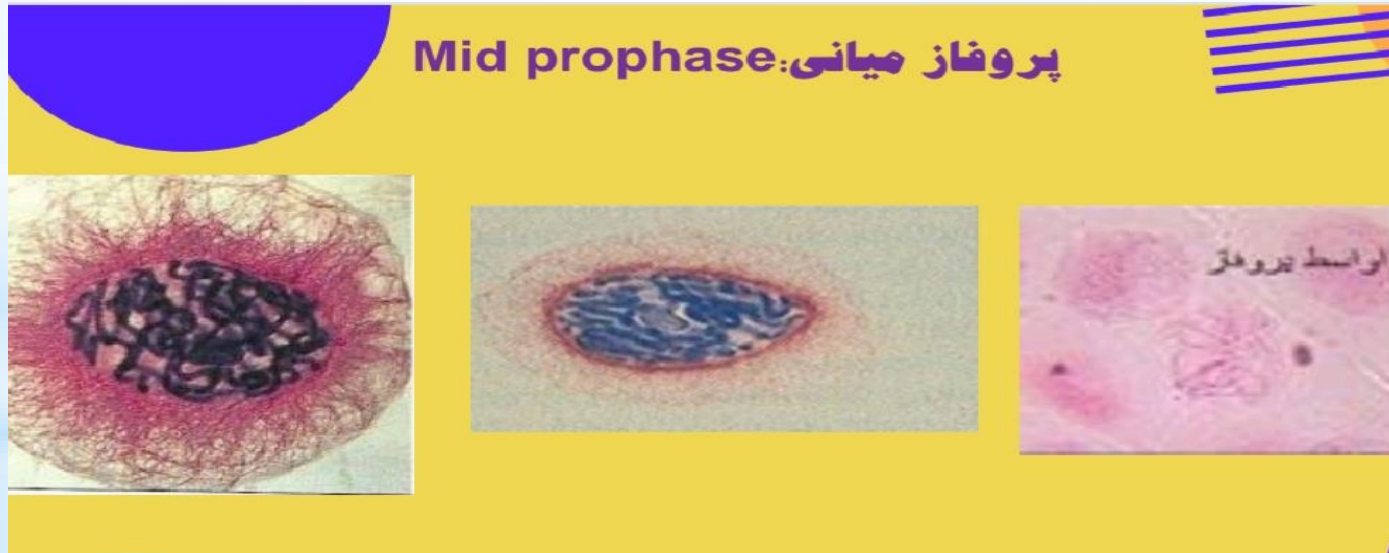
1. پروفاز اولیه Early prophase

در این مرحله کروماتینها به صورت رشته‌های دراز و پیچ خورده و درهم درهم هستند. غشای هسته nuclear envelop وجود دارد اما کم کم شروع به تحلیل رفتن می‌کند و هستک سازماندهی خود را از دست می‌دهد و قابل تشخیص به صورت یک ارگانیل منسجم شده نیست. مشخصات ظاهری سیتولوژیکی در این مرحله از تقسیم در میکروسکوپ نوری این است که هسته سلول به حالت گرد است چون هنوز توسط غشا حمایت می‌شود اما با سطحی خشن و ناصاف و دانه دانه به نظر می‌رسد.



2. پروفاز میانی Mid prophase

در این مرحله غشای هسته بیشتر تحلیل رفته و ساختار هسته تمایل به پخش شدن در سیتوپلاسم دارد. هستک بکلی محو شده و رشته‌های کروماتینی ضخیم تر و فشرده تر شده‌اند. از نظر سیتولوژیکی در زیر میکروسکوپ هسته به فرم بیضی و سطح آن خشن تر و دانه دانه تر از مرحله قبل به نظر می‌رسد.



3. پروفاز انتهایی Late prophase

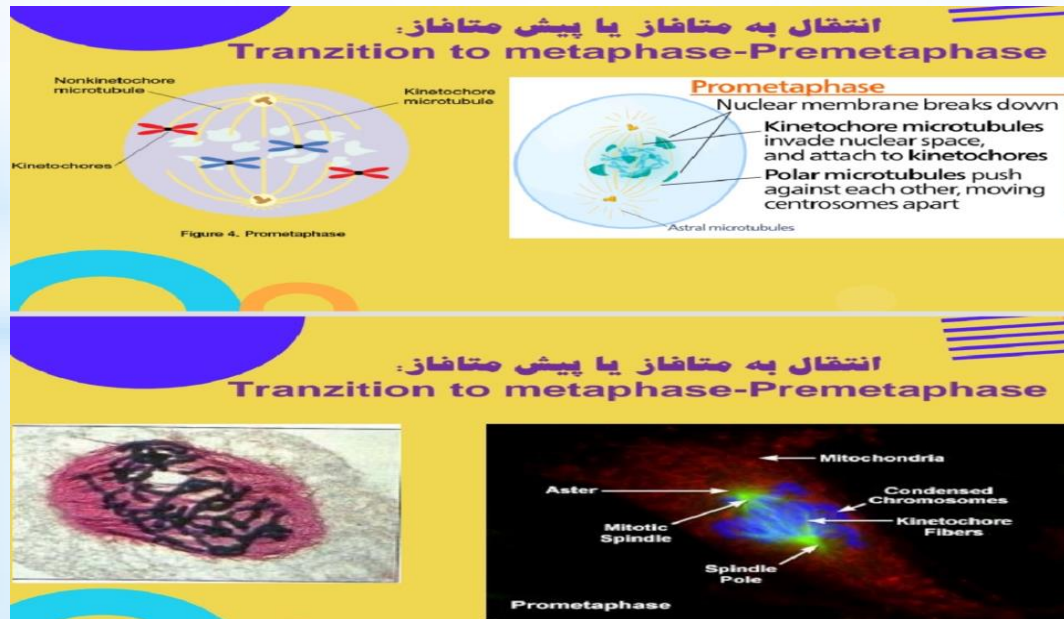
در این مرحله می‌توانیم به محتوای ژنتیکی، کروموزم اطلاق کنیم، چون ابتدا و انتهای مشخصی دارند. غشای هسته بکلی از بین رفته، شیره هسته (Nucleoplasm) با سیتوپلاسم مخلوط شده و محتوای ژنتیکی به فرم کروموزم در هر جایی از سلول پخش شده‌است.



4. انتقال به متافاز یا پیش متافاز

Tranzition to metaphasePrometaphase

در این مرحله به واسطه نظم گرفتن رشته‌های دوک، کروموزم‌ها به طرف استوای سلول هدایت می‌شوند ولی به طور نامنظم به نحوی که بازوهای کروموزوم‌ها به طرف همدیگر نمی‌باشد و هر کدام در جهتی قرار گرفته‌اند، کروموزوم‌ها در نزدیکی استوا مجتمع شده، ولی همگی دقیقاً در راستای استوای سلول قرار نگرفته‌اند.

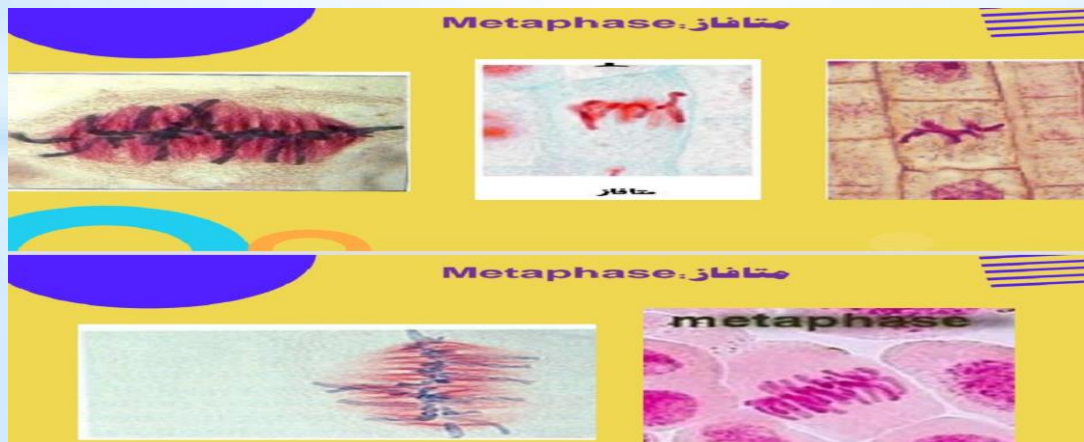


5. متافاز Metaphase

کروموزوم‌ها در این حالت کوتاه‌ترین، قطورترین و فشرده‌ترین حالت خود را دارند و از نقطه پروتئینی درون سانترومر بنام کینتوکور به دوک سیتوپلاسمی متصل هستند و دقیقاً در استوای سلول به طور منظم قرار گرفته‌اند.

متافاز هنگامی آغاز می‌شود که کروماتیدهای جفت در مرکز یاخته در یک سطح استوایی قرار بگیرند. در این مرحله کروموزوم‌ها به آسانی قابل شمارش هستند. ریزلوله‌ها که به دو طرف قطب کشیده شده‌اند، آشکارا قابل مشاهده‌اند.

زیست‌شناسان برای متوقف کردن میتوز در مرحله متافاز، از ماده‌ای به نام کلشی‌سین استفاده می‌کنند تا ساختار ریختی و تعداد کروموزوم‌ها را مطالعه کنند. این ماده مانع از کشیدگی رشته‌های دوک بطرف قطبین می‌شود و بنوعی از پیشرفت تقسیم سلولی در مرحله متافاز ممانعت می‌کند و نوعی داروی انتی‌کنسریا ضد سرطان محسوب می‌شود.



6. آنافاز اولیه Early anaphase

متافاز زمانی پایان می یابد که سانترومرهای کروماتیدهای خواهر از هم جدا شوند. کروموزوم ها در این مرحله به طور منظم از هم جدا شده به طوری که بازوهای کروماتیدهای خواهر به صورت عدد هفت و هشت دقیقاً روبروی هم قرار گرفته و سانترومر آنها نزدیک استوا است.



7. آنافاز میانی Mid anaphase

با حرکت دوک سیتوپلاسمی به سمت قطبین سلول و کوتاه شدن آن کروماتید ها بیشتر از هم فاصله گرفته و سانترومرها بین استوا و قطب سلول قرار می گیرند.



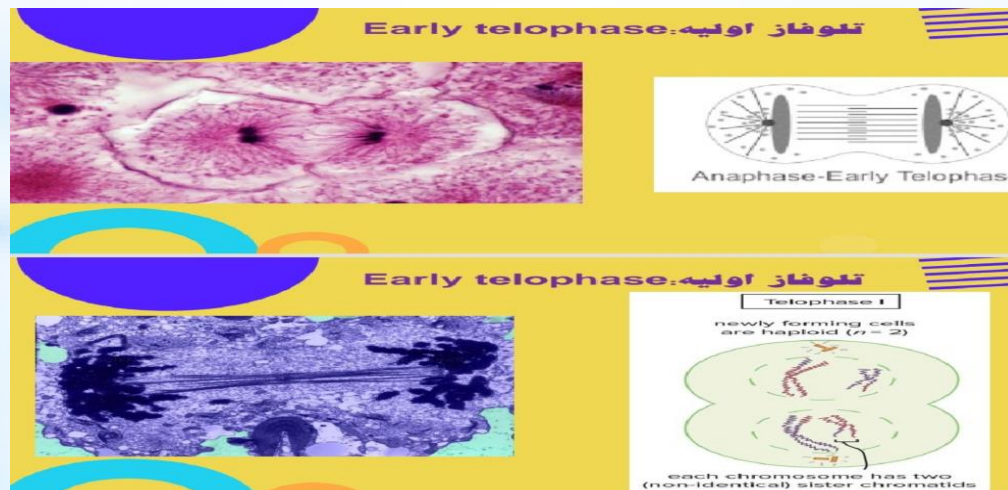
8. آنافاز انتهایی Late anaphase

سانترومرکروماتیدها در نزدیکی قطبین قرار گرفته و حداکثر کشش بر روی کروماتید های خواهر در نزدیکی قطبین وجود دارد و کشش رشته های دوک بر روی آنها بخوبی قابل تشخیص است.



9. تلوفاز اولیه Early telophase

در این مرحله که اغلب در سلول های گیاهی همزمان با شروع تقسیم سیتوپلاسم یا سیتوکیناز می باشد، بار دیگر کروماتیدها باریک شده، کم کم غشای هسته پدیدار می شود و هستک به تدریج سازماندهی می شود، اما هنوز فرم کامل خود را پیدا نکرده در زیر میکروسکوپ شروع سیتوکیناز را به صورت شکافی در کناره های سلول مشاهده می کنید. به دلیل اینکه در سلول گیاهی مانند سلول های ترکیباتی چون سلولز، همی سلولز و مواد پکتیکی مواد سازنده صفحه سلولی Cell Plate هستند و رنگ آمیزی اختصاصی انجام نشده، به نظر می رسد در کناره های سلول شکافی ایجاد می شود که شروع سیتوکیناز Cytokinesis را نشان می دهد.



10. تلوفاز میانی Mid telophase

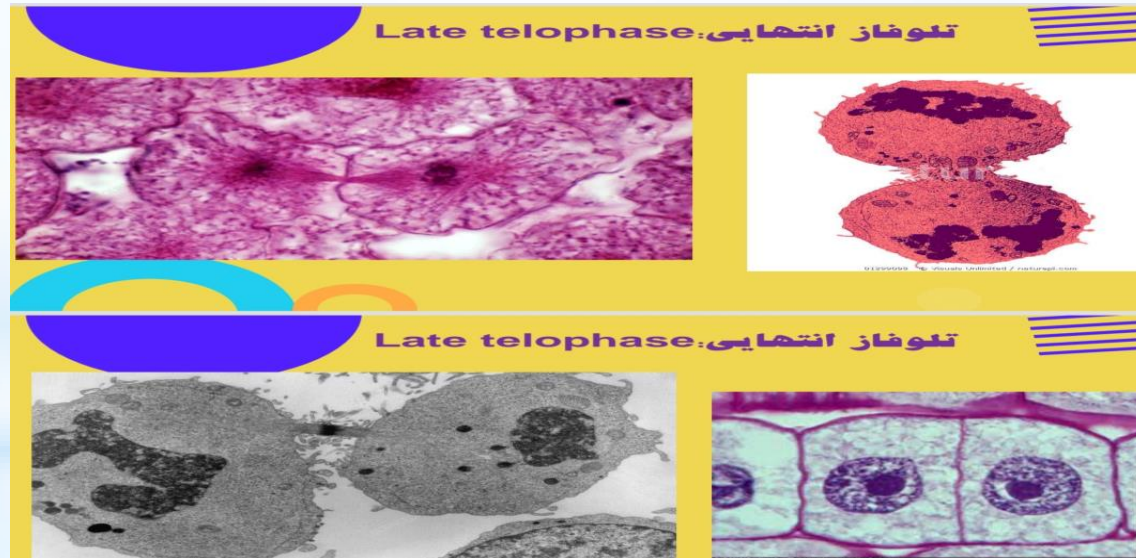
در تلوفاز میانی هسته فرم گردتر و سطح صافتری به خود می‌گیرد و تفکیک دو سلول بیشتر مشخص می‌شود. غشای هسته منسجم‌تر شده و شیره هسته از سیتوپلاسم مجزا می‌گردد.

در این مرحله، دستگاه دوک متلاشی می‌شود. ریزلوله‌ها نظم خود را از دست می‌دهند و به صورت مونرمرهای توبولین در می‌آیند و آماده استفاده مجدد در ساختار اسکلت یاخته‌ای جدید می‌شوند. غشاء هسته در اطراف هر گروه کروماتیدهای دختر شکل می‌گیرد. این کروماتیدها که هنوز به شکل کروموزوم‌اند، شروع به باز شدن می‌کنند و کاملاً کشیده می‌شوند و به صورت کروماتین تجلی می‌یابند. یکی از ژن‌هایی که در این مرحله به سرعت ظاهر می‌شود، ژن سنتز RNA ریبوزومی است که در پایان تلوفاز سبب ظهور مجدد هستک می‌گردد.



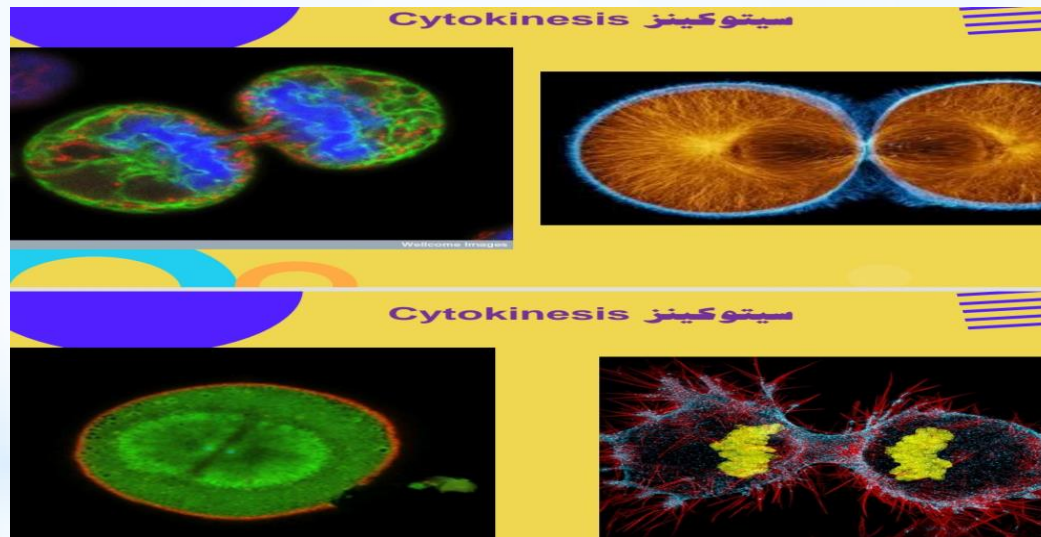
11. تلوفاز انتهایی Late telophase

در تلوفاز انتهایی دو سلول دختری کاملاً مشابه با سلول مادر ولی کوچکتر در کنار هم وبطور مجزا قابل مشاهده هستند و سیتوکیناز نیز کامل شده است.
بطور کلی مرحله تلوفاز معکوس مرحله پروفاز است و سلول در حال بازگشت به مرحله اینترفاز می باشد. دوک های سیتوپلاسمی کاملاً ناپدید می شوند و محتوای ژنتیکی به فرم کروماتین ظاهر می شود.



12. سیتوکیناز Cytokinesis

در سلول گیاهی همزمان با مراحل تلوفاز شروع و با جدا شدن دو سلول دختری از همکامل می شود .





مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1. رنگ کریستال ویوله (بنفش بلوری) یا استوکارمن یا استو اوریسئین که معرف ترکیبات ژنتیکی یا کروموزومی می باشند.
2. اسید استیک گلاسیال
3. اسید کلریدریک
4. الکل اتانل 96 درصد
5. آب مقطر
6. ریشه پیاز
7. شیشه ساعت
8. لام و لامل
9. سوزن تشریح یا سنجاق
10. میکروسکوپ

روش کار

جهت انجام این آزمایش تعدادی پیاز را چند روز (در فصل سرما حداقل 5 روز) قبل از انجام آزمایش از منطقه انتهایی در آب قرار می‌دهیم تا ریشه بزند. سپس از منطقه 2-3 میلی‌متری بالای کلاهک، ریشه‌ها را جدا کرده و برای انجام آزمایش به شرح زیر آماده کنید:

روش اول: استفاده از رنگ استوکارمن

ریشه‌ها را در پلیت حاوی رنگ استوکارمن قرار داده و ظرف را به طور غیرمستقیم روی شعله گذاشته و ریشه‌ها را به روش بن ماری بخارپز کنید تا رنگ به تدریج ضمن پخته و نرم شدن ریشه، در آن‌ها نفوذ کند. این رنگ محتوای ژنتیکی و هسته را به رنگ صورتی تا ارغوانی در می‌آورد. مدت زمان حرارت دهی 20-30 دقیقه می‌باشد. چون در غیر این صورت یا رنگ پذیری انجام نمی‌شود و یا کل سلول رنگی می‌شود. بهتر است برای تبخیر نشدن رنگ درپوشی روی ظرف محتوی رنگ و ریشه قرار داده شود.

روش دوم: استفاده از رنگ کریستال ویوله

ابتدا محلول های زیر را آماده کنید:

محلول A: شامل 1 حجم اسید کلریدریک 10 درصد و 1 حجم آب مقطر جهت نرم شدن ساختار ریشه و نفوذپذیر شدن دیواره و غشای سلولی.

محلول B: شامل 1 حجم اسید استیک خالص و غلیظ و 3 حجم الکل اتانل 96 درصد جهت تثبیت ساختار محتوای ژنتیکی سلول و رنگپذیری آنها.

محلول C: شامل 1 حجم محلول A و یک حجم محلول B

بعد از تهیه محلول های لازم، ریشه ها را بمدت 15 دقیقه در پلیت حاوی محلول C قرار دهید. در این مدت ریشه ها را به تناوب زیر و رو کرده و جهت نفوذپذیری مواد بخوبی تکان دهید و بلافاصله بمدت 20 ثانیه در پلیت حاوی محلول B غوطه ور کرده و بخوبی تکان دهید. پس از آن با کمک پنس ریشه ها را به لام منتقل کرده و به منظور نفوذپذیری بیشتر رنگ در مرحله بعدی با کمک سنجاق یا سوزن تشریح به آرامی خدشه دار کنید.

یک یا دو قطره رنگ کریستال ویوله به ریشه ها اضافه کنید و به مدت حداکثر 2 دقیقه با دقت و ظرافت با استفاده از سوزن تشریح یا سنجاق ریشه ها را بدون جابجایی زیاد، نسبت به رنگ نفوذپذیر نمایید. سپس لامل گذاری کرده نمونه ها را بدقت اسکواش نمایید و با کاغذ خشک کن در محل فیکس کنید.

لازم به ذکر است که اگر در هر کدام از مراحل آماده سازی دقت کافی اعمال نشود محتوای ژنتیکی سلول از سیتوپلاسم قابل تشخیص نخواهد بود و به طبع آن بدلیل عدم وجود کنتراست کافی و مناسب بررسی مشاهدات سیتولوژیکی سلول در هر مرحله از تقسیم امکان پذیر نمی باشد.

پس از رنگ آمیزی کریستال ویوله محتوای ژنتیکی را به رنگ بنفش در می آورد. لام کروموزومی را در زیر میکروسکوپ در بزرگنمایی 40 تنظیم کرده و پس از پیدا کردن سلول ها در منطقه تقسیم سلولی ابتدا مرحله اینترفاز و هستک های مشخص در این مرحله را بررسی کنید (سلول های پیاز معمولاً دارای 2 هستک می باشند) و سپس کلیه مراحل تقسیم سلولی را بررسی و مشاهده کنید و شکل هر مرحله را با رعایت جزییات بررسی شده رسم نمایید.

موارد استفاده کریستال ویوله

نام دیگر این رنگ قلیایی متیل ویولت یا بنفش کریستالی نیز می باشد.

موارد مصرف در پزشکی :

بهبود جراحات پوستی و درمان زخم های مزمن

بهبود التهاب بند ناف در دوران نوزادی

بهبود و درمان عفونت های قارچی پوست و دهان یا برفک و آفت دهان. از رنگ

کریستال ویوله بدلیل داشتن خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی و از بین بردن عوامل

عفونی باکتری استافیلوکوک و قارچ کاندیدا جهت تهیه محلول مخاطی دهانی ویوله

دوژانسین استفاده می گردد.

بهبود سوختگی و جلوگیری از عفونت .

ضد عفونی کننده موضعی.

برای ایجاد اثر انگشت در پزشکی قانونی.

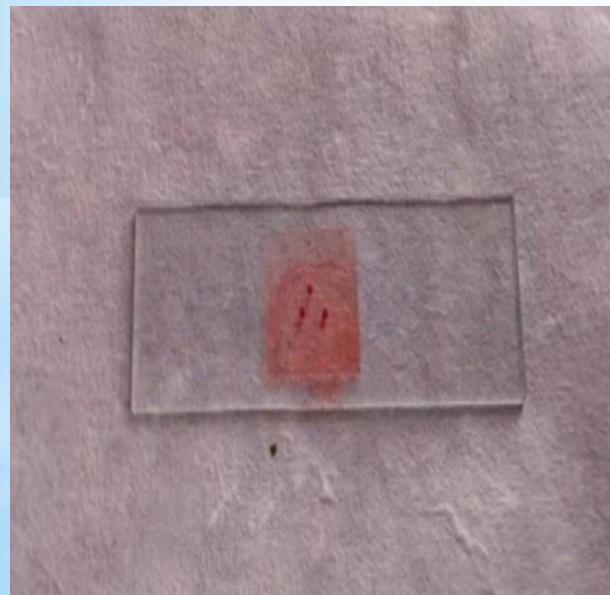
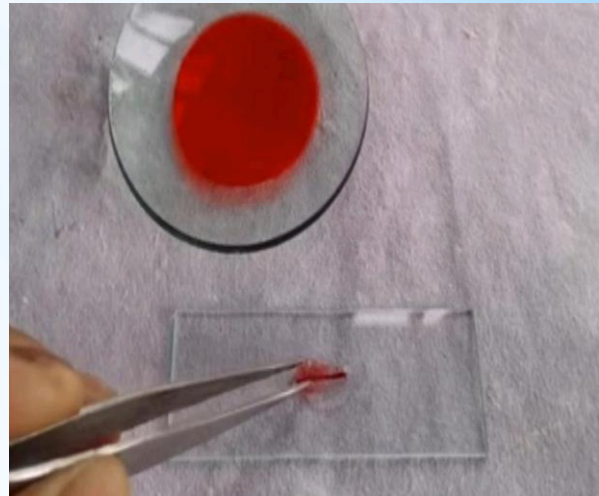
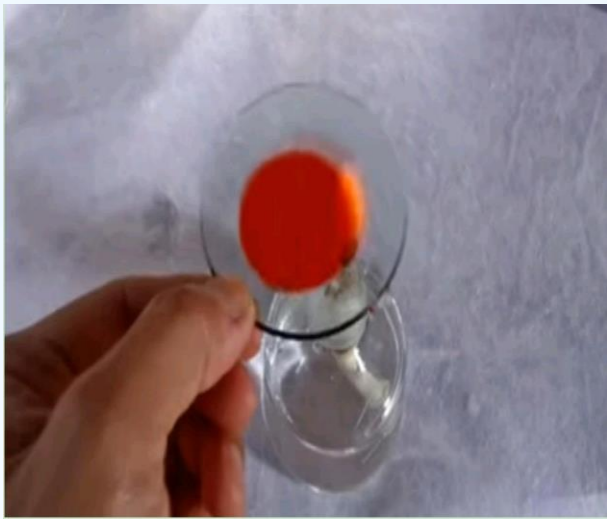
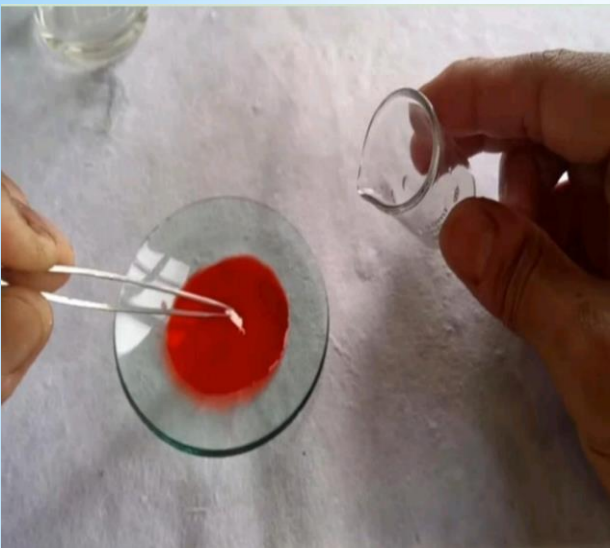
وبدلیل اثر ضد میکروبی در درمان عفونت های پوستی و چشمی در دام ها و ماهی ها.

مصرف در رنگ آمیزی های بافتی یا هیستولوژیکی و میکروبی.

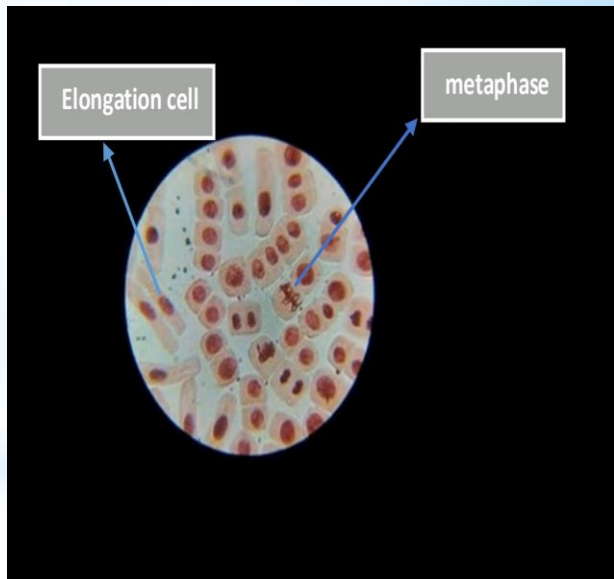
و مصارف دیگر در صنعت داروسازی، رنگرزی، نساجی و جوهرهای چاپ می باشد.

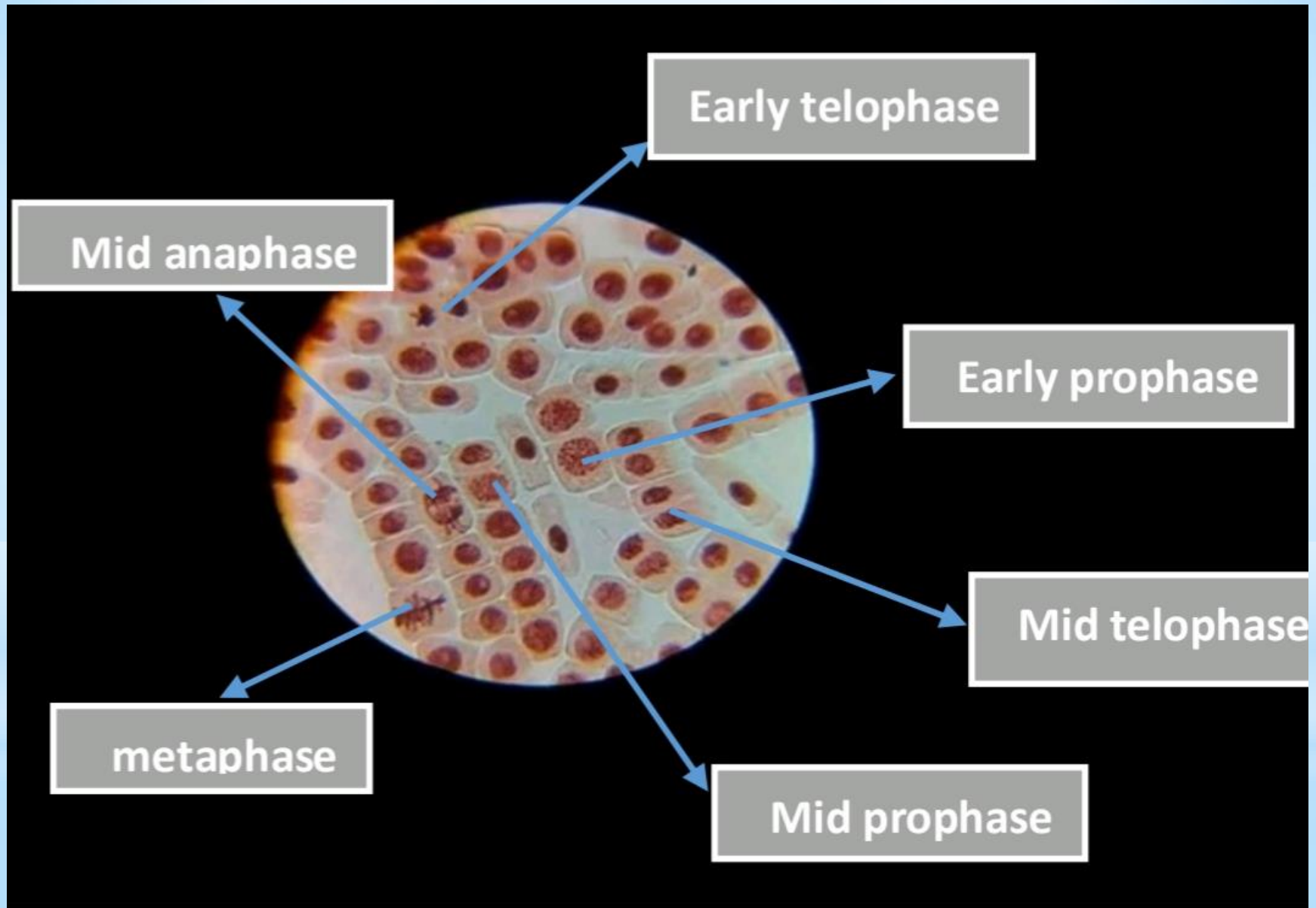
مراحل مختلف آماده سازی نمونه به روش رنگ آمیزی بالاستوکارمن

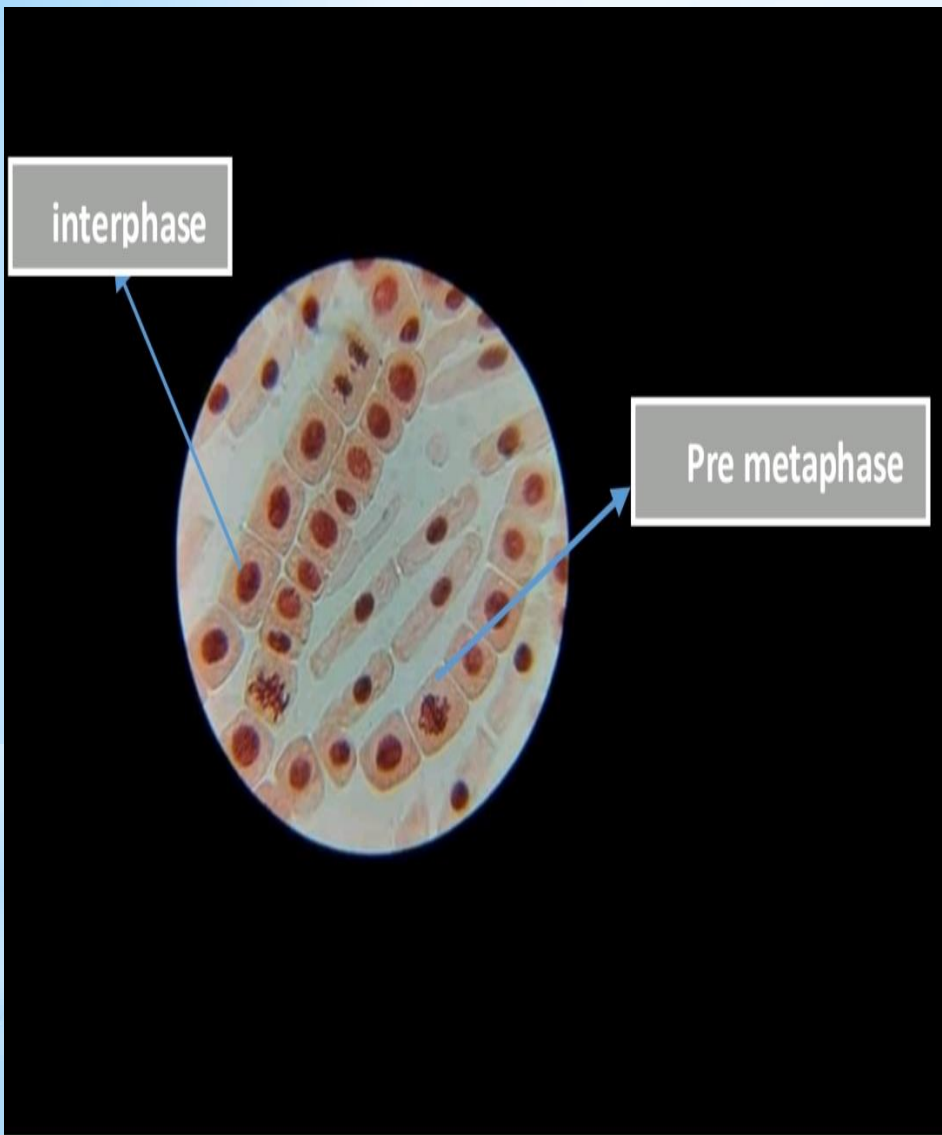




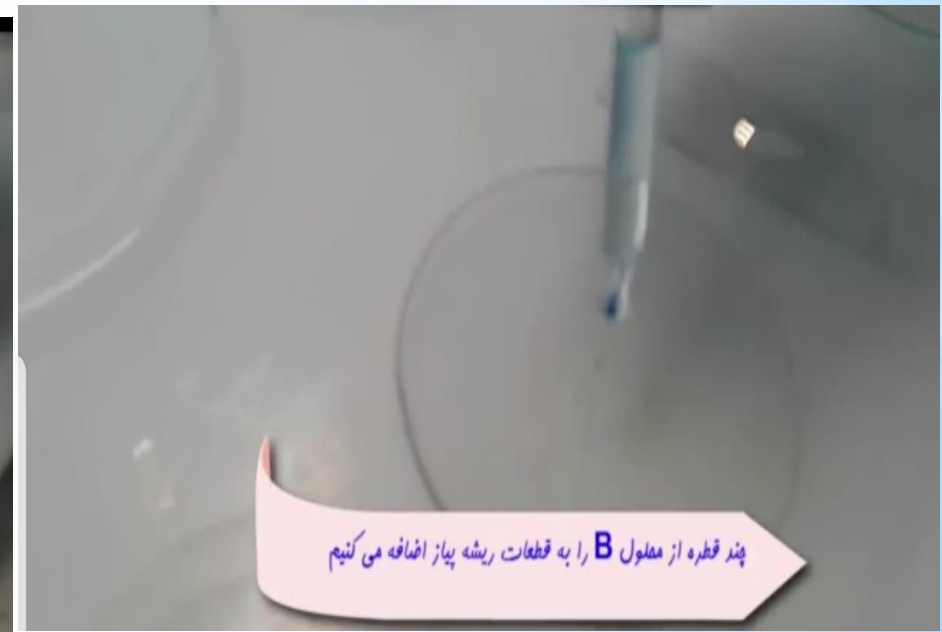
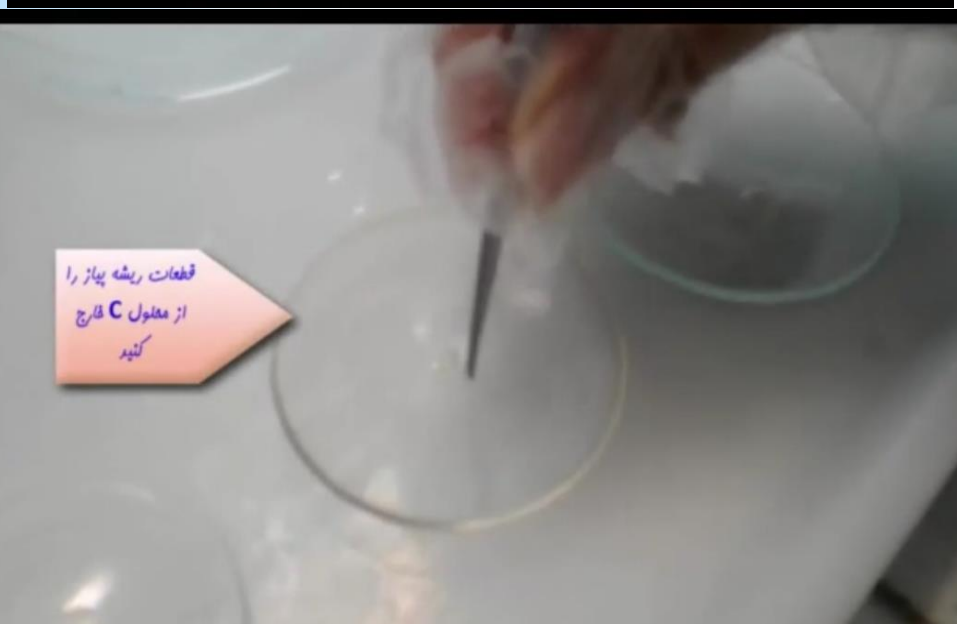
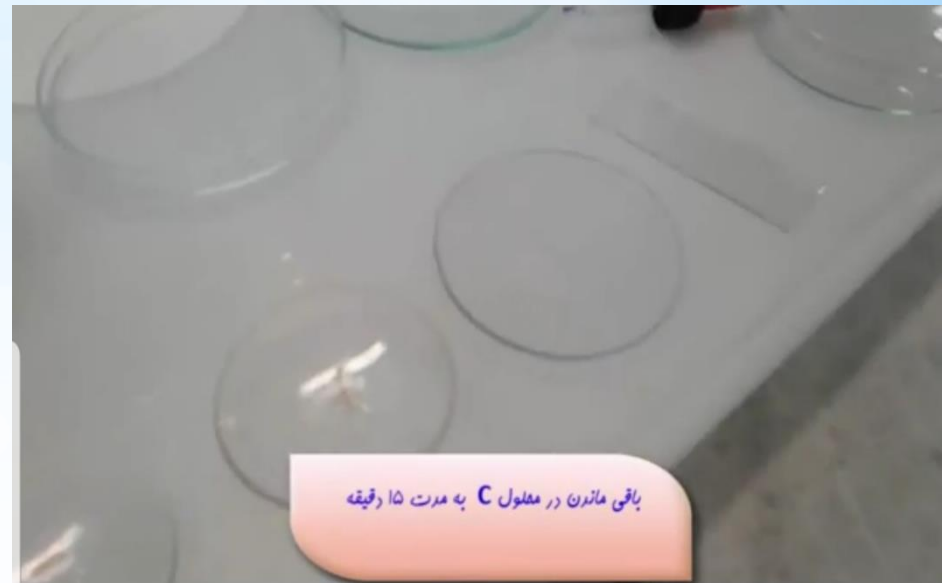
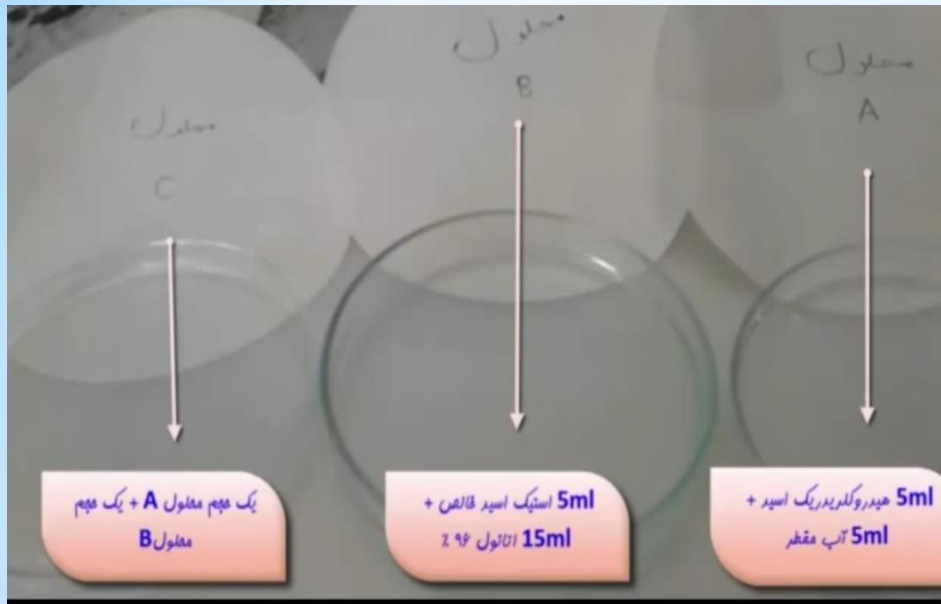
تهیه لام کروموزومی به روش اسکواش

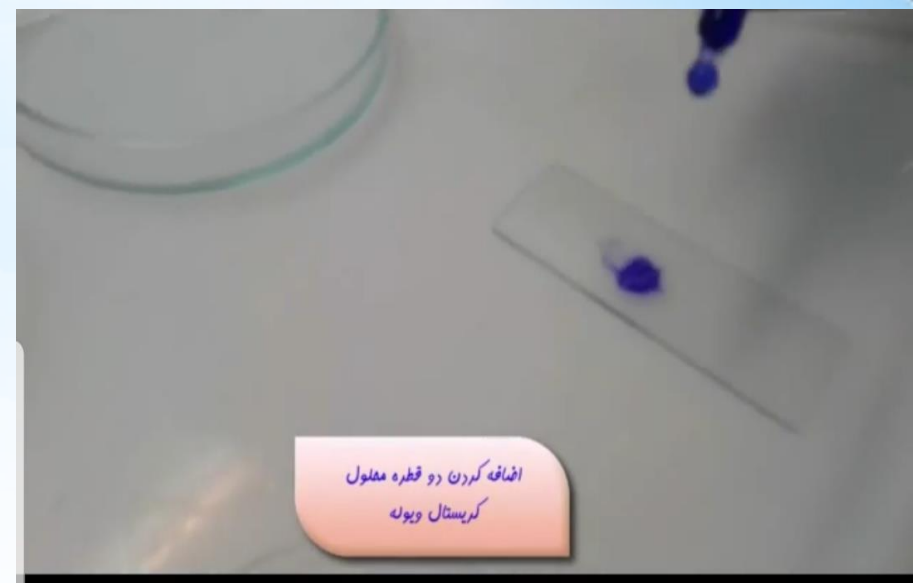






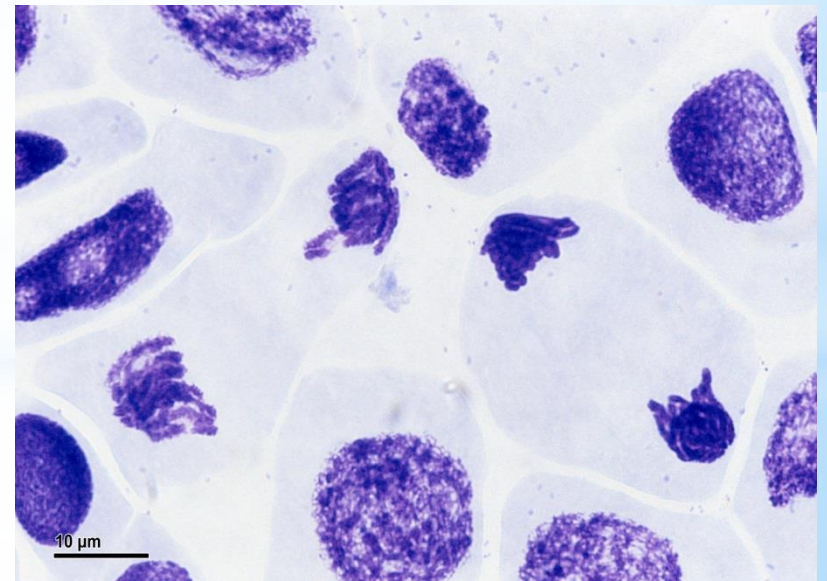
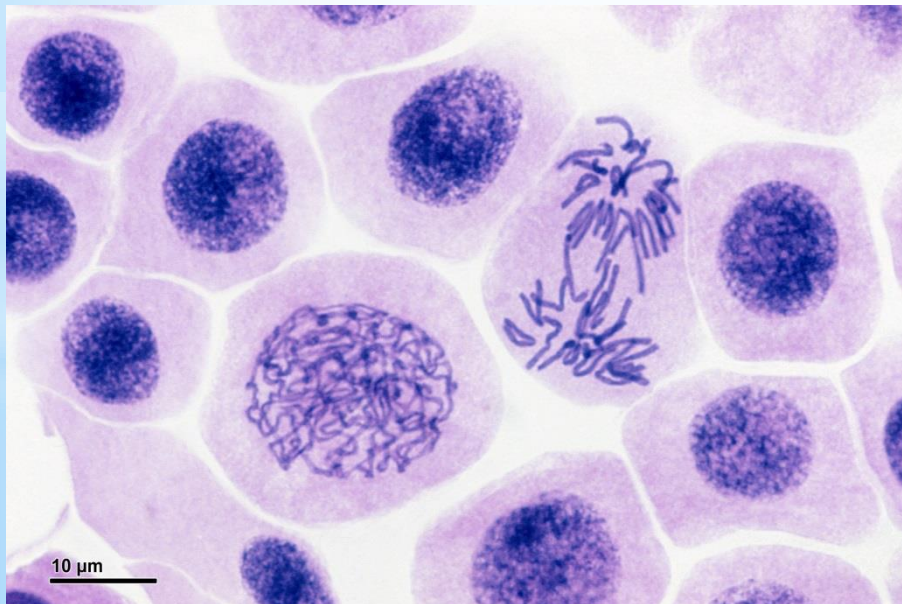
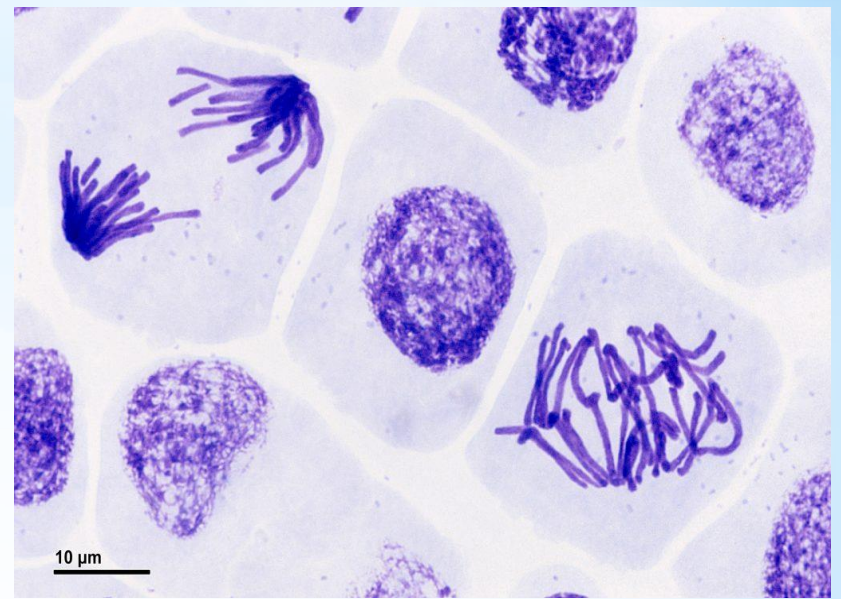
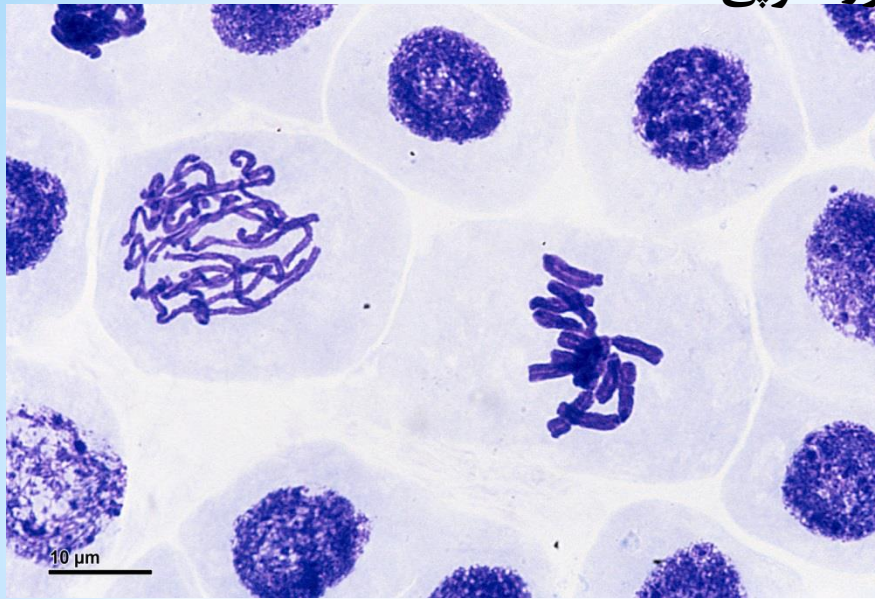
مراحل مختلف آماده سازی نمونه روش رنگ آمیزی با کریستال ویوله

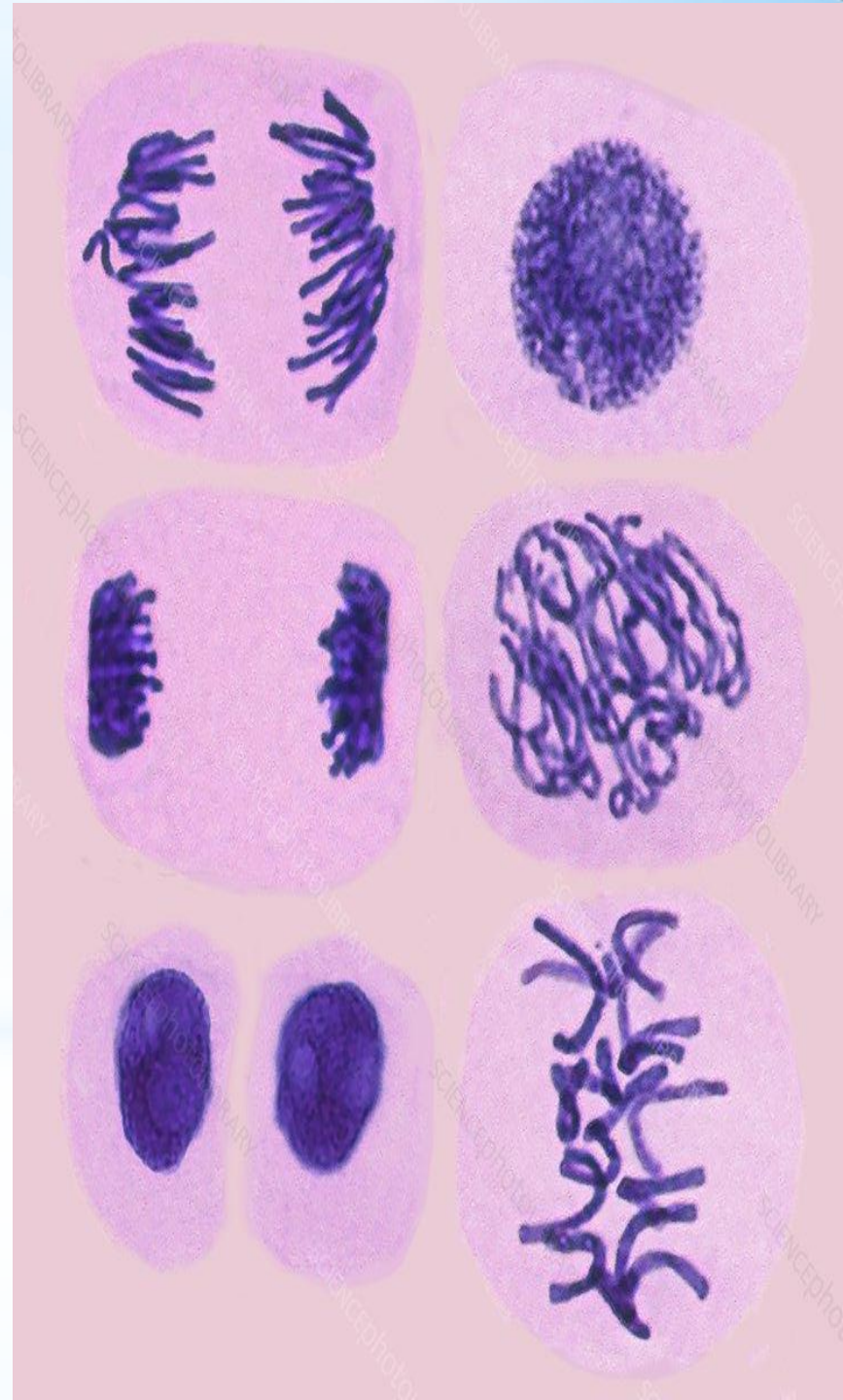
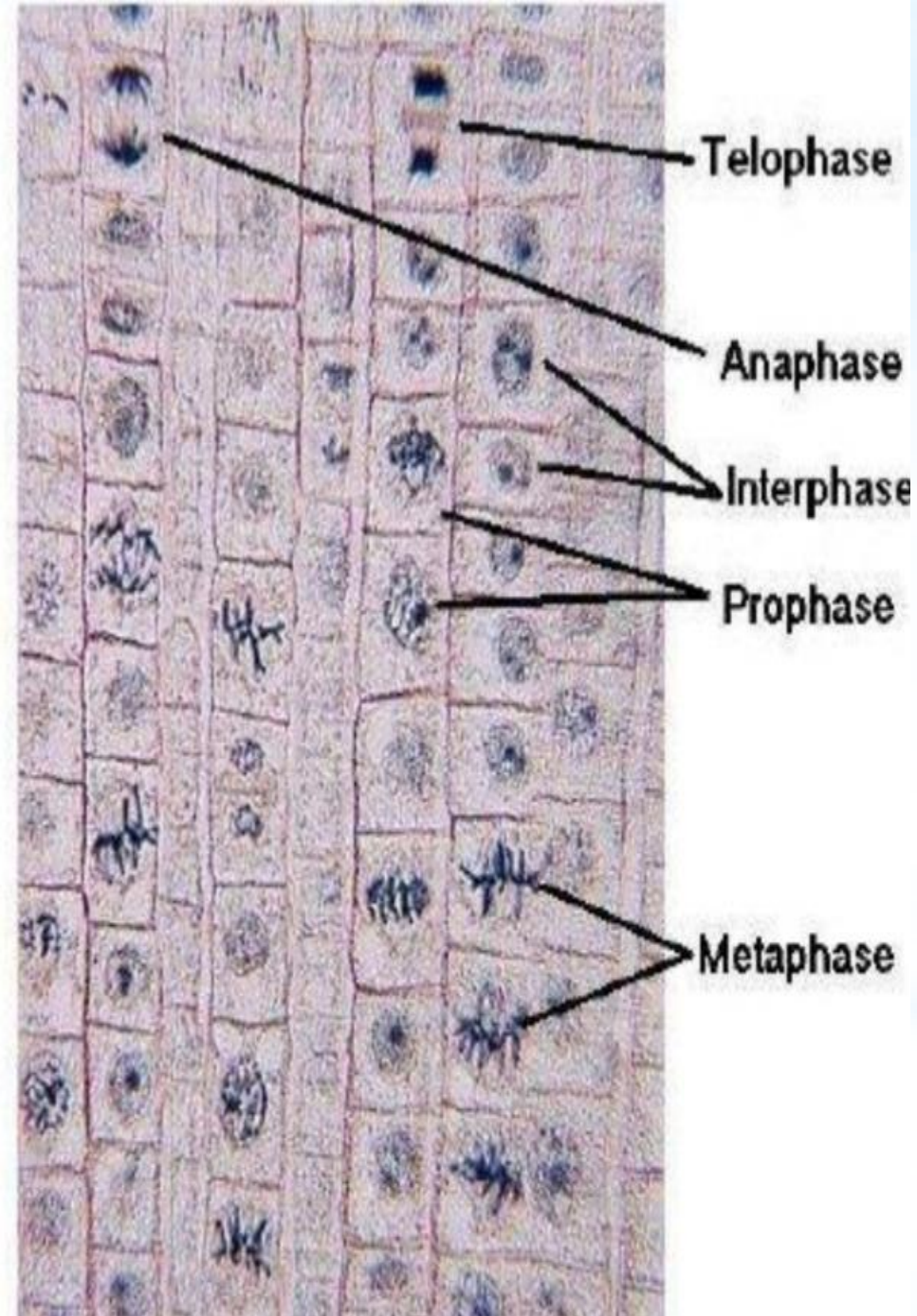




متلاشی کردن قطعات ریشه پیازیه کمک سوزن

مشاهدات میکروسکوپی





INTERPHASE

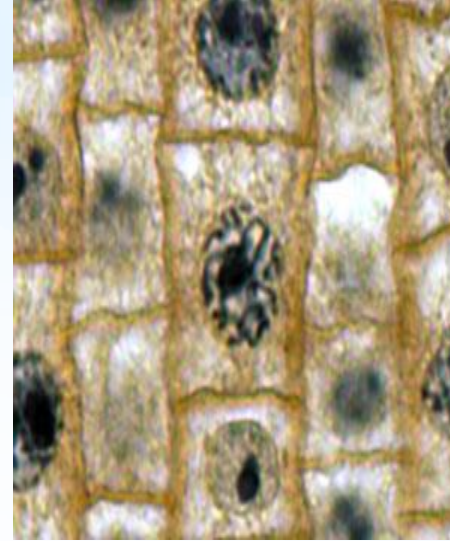


The **nucleus** of the cell is clearly stained and appears to have tiny dots and one or more dark **nucleoli** inside. What you can't see are the phases of interphase:

G₁: Period of cell growth before (G = gap); ribosomes and organelles are being duplicated.

S: DNA replication (S = synthesis; new copies of DNA are synthesized).

G₂: DNA has been replicated; cell is preparing for mitosis.



Prophase:

Chromosomes become visible and **nucleoli** disappear (DNA + associated proteins become tightly organized).

Chromosomes consist of two **sister chromatids** (DNA replicas + associated proteins) attached together at a specialized region called the **centromere**.

Nuclear membrane breaks down and the chromosomes spread out.

Spindle fibers (microtubules) appear. They radiate out to the plasma membrane at the poles in animal cells. These radiations, called **asters**, are absent in plant cells.



Metaphase:

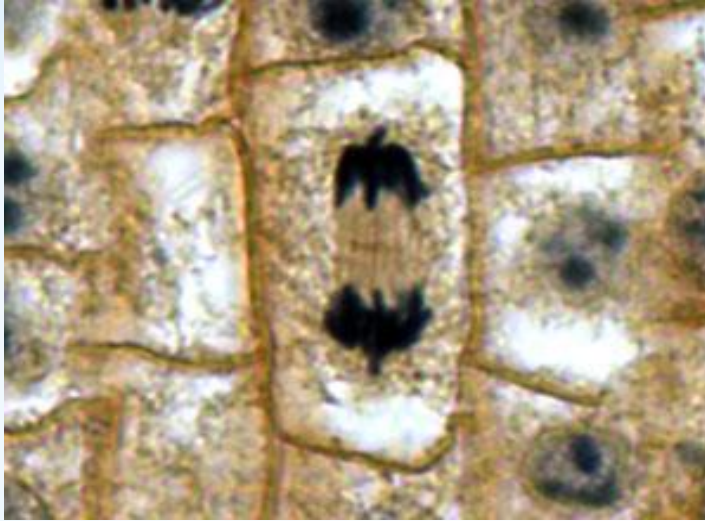
The chromosomes assemble on the **equatorial plate** (an imaginary disc that crosses the center of the 3-dimensional cell). Some part of each chromosome is on this plate.

Metaphase ends when the centromeres of each pair of chromatids split apart.



Anaphase:

Sister chromatids separate from each other and move to opposite poles of the cell. The kinetochore, a part of the centromere of each new chromosome, moves along a spindle fiber. The free ends of each chromosome trail back toward the equatorial plate and indicate movement.



Telophase & Cytokinesis:

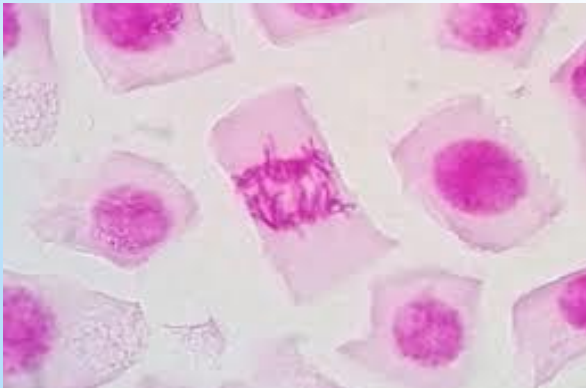
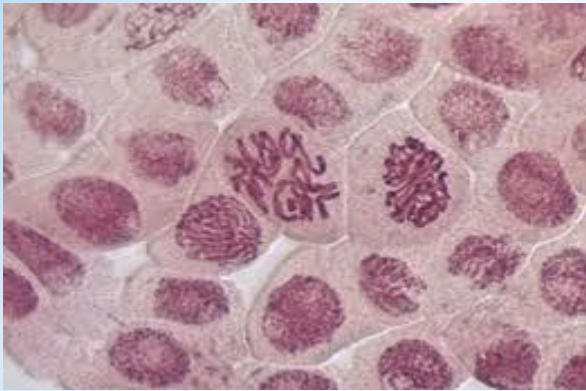
This is like the reverse of prophase—the cell is returning to interphase.

Chromosomes (now single molecules of DNA with associated proteins) have reached opposite poles of the cell. Spindle fibers disappear.

Nuclear membrane forms around the chromosome clusters. Chromosomes disappear from view as DNA re-extends, and nucleoli appear. The cell divides into two daughter cells (cytokinesis). In plant cells vesicles deposit new cell wall material along the equator to form the **cell plate**.

فعالیت

جهت ارزیابی خود کلیه مراحل تقسیم سلولی میتوز را در تصاویر زیر مشخص و نامگذاری کنید.













آزمایشگاه سلولی و مولکولی - فرزانه فروهر فر