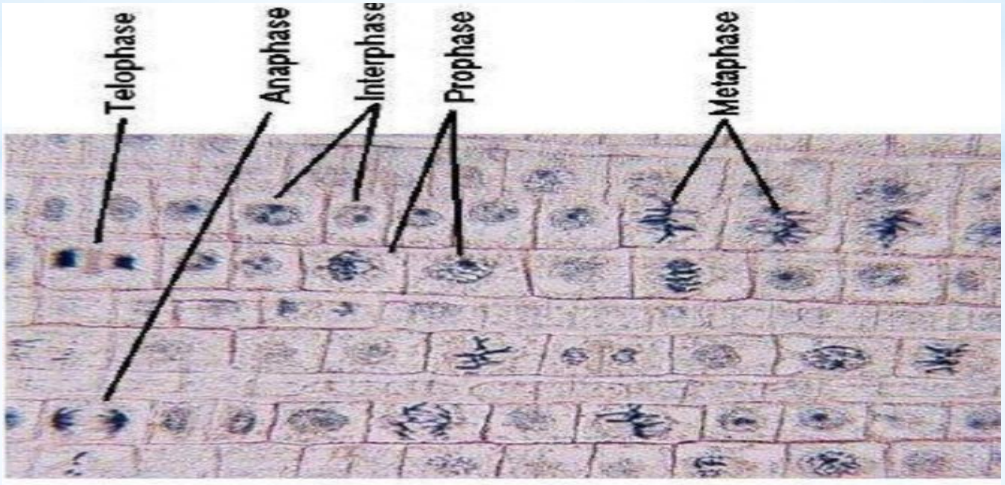


University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

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 آمیزي کروموزومي به روش کریستال ویوله (Crystal violet)

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

5.بررسي خصوصیات سیتولوژیکي سلول در مرحله میان تقسیم(Interphase)

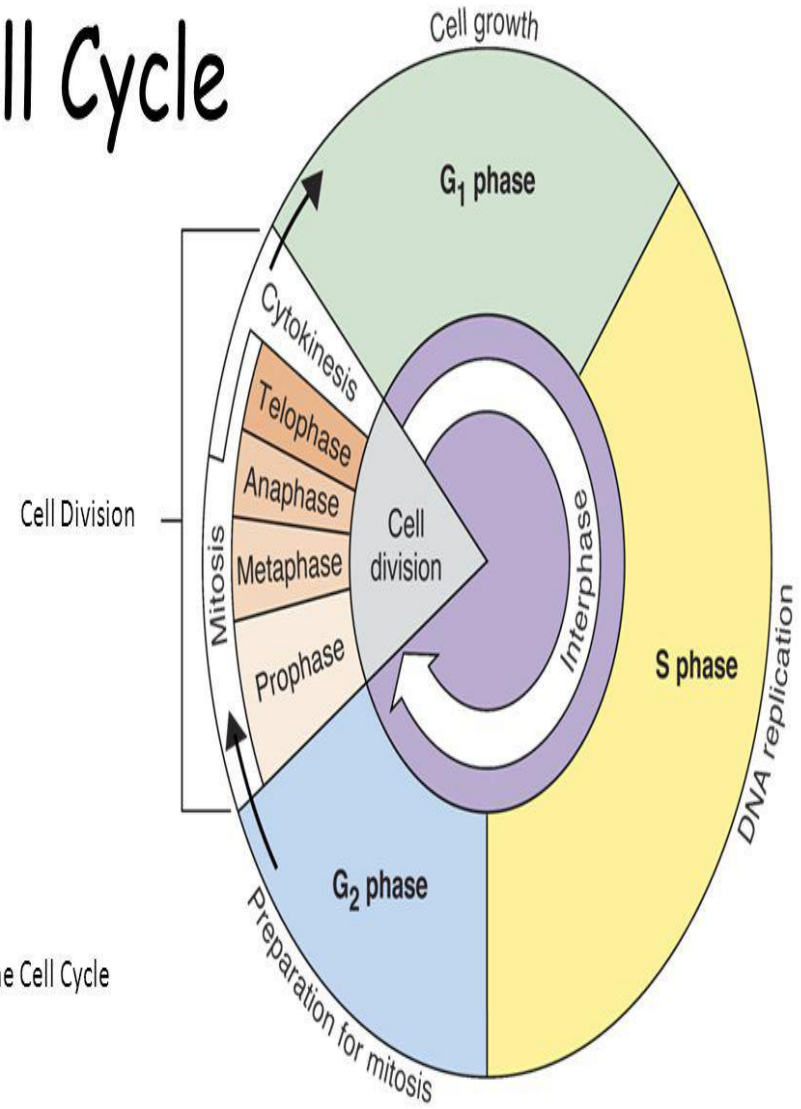
سیکل سلولي (Cell Cycle)

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

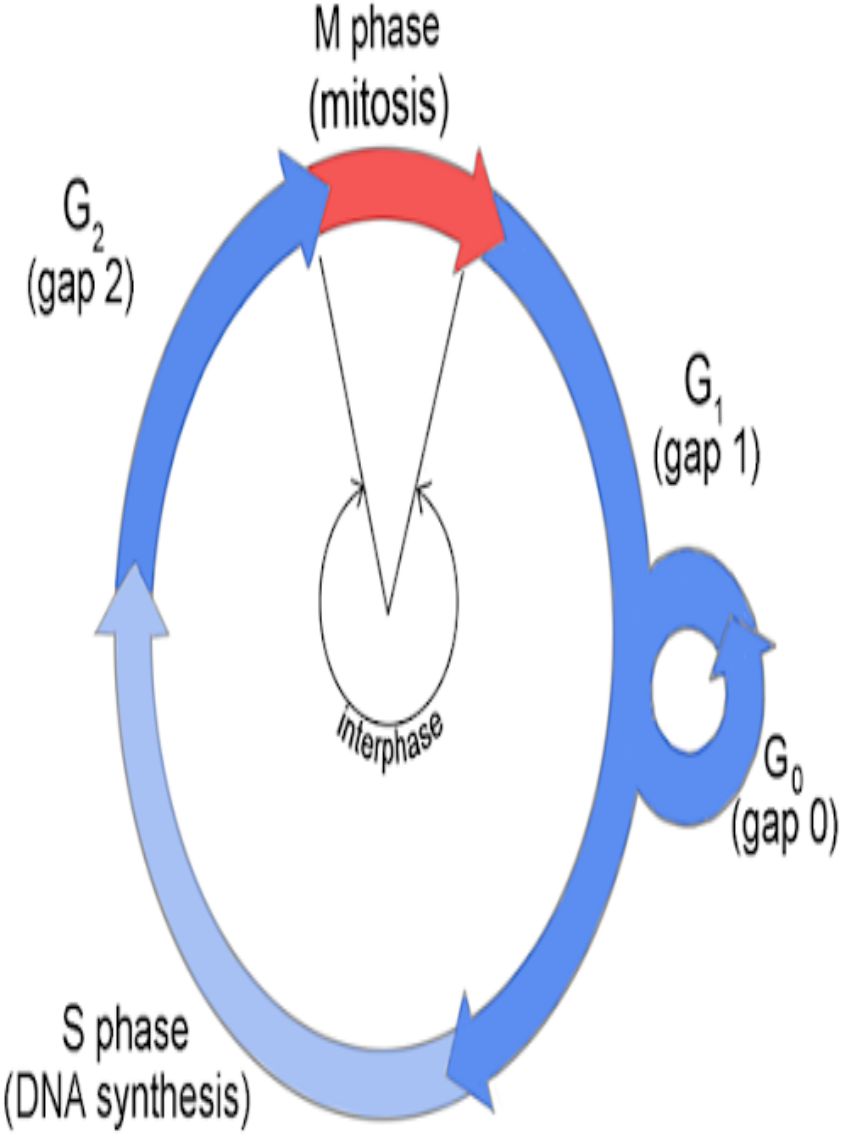
زمان چرخه یاخته‌ای بر حسب نوع سلول، سن سلول و شرایط محیطی سلول در موجودات مختلف متنوع است. بیشتر زمان سیکل سلولی دراینترفاز (Interphase)می‌گذرد که طی آن فعالیت‌های ماده سازی و بیوشیمیایی شدیدی صورت می‌گیرد و مواد لازم برای تقسیم سلولی و رشد سلولی فراهم می‌گردد و سپس تقسیم سلولی میتوز صورت می‌گیرد که طی آن هسته سلول و نهایتاً خود سلول دو تا می‌شود. در ابتدا با توجه به اینکه کروموزم‌ها به طور دقیق دو برابر می‌شوند، مرحله میتوز آخرین مرحله میکروسکوپی قابل مشاهده تغییراتی است که در سطح کروموزومی انجام می‌شود 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 می‌آید.

در سیکل سلولی مرحله G_1 و G_2 مرحله وقفه‌ای است که در سنتز DNA صورت می‌گیرد. 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 می‌شود و DNA همانندسازی مي شود. در فاز G_2 سلول دختری خودش را برای تقسیم میتوز بعدی آماده می‌کند.

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. ویژگي هاي مختلف اين نمونه باعث مي شود كه نمونه بسيار مناسبي جهت بررسي مراحل مختلف تقسيم سلولي ميتوز باشد.

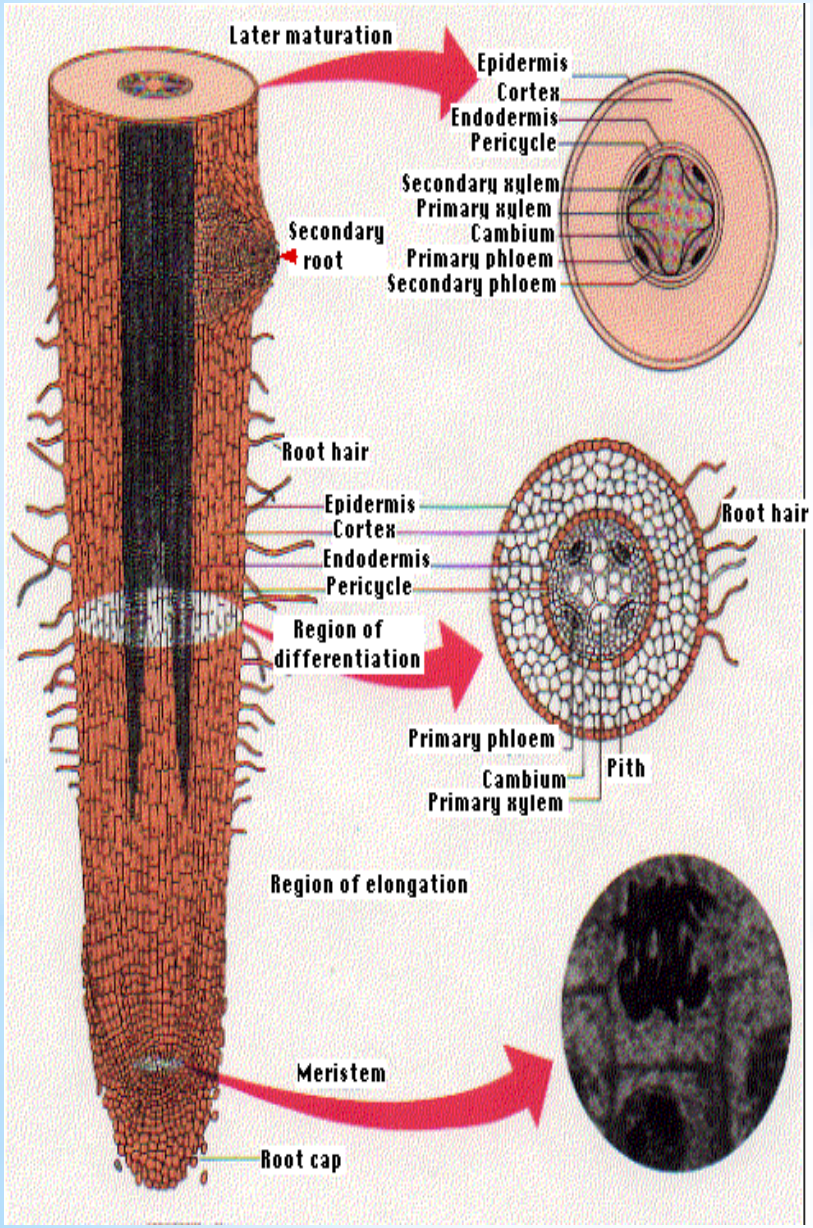
برخي از آنها بشرح زير مي باشد:

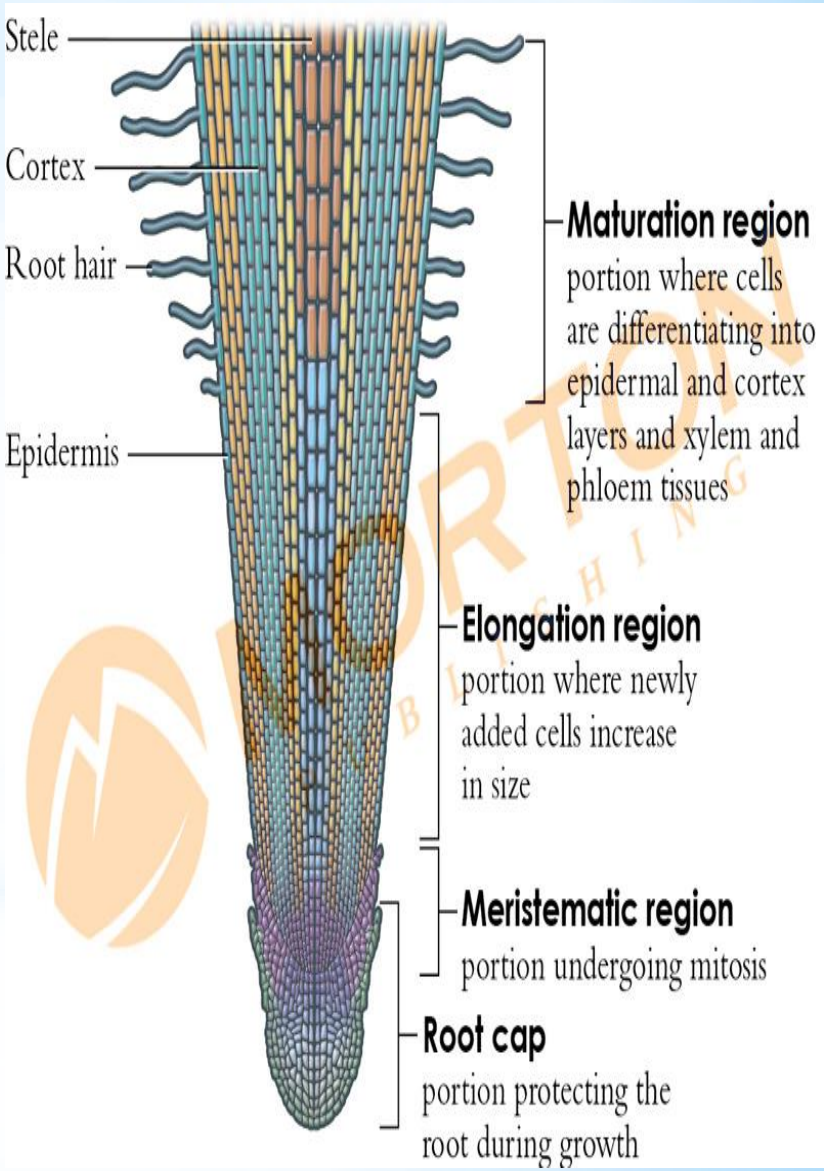
1. بزرگ بودن کروموزم‌ها و مشاهده نسبتاً واضح آن‌ها در میکروسکوپ نوری.
2. کم بودن تعداد مجموعه کروموزمی پیاز.
3. فعال بودن سلول ها در منطقه مریستمی یا زاینده تقسیم سلولی.
4. داشتن تنوع ژنتيكي در گونه هاي مختلف پياز.
5. در دسترس بودن آن.
6. ارزان قيمت بودن .
7. ريشه زايي نسبتا سريع در صورت عدم ريشه زايي برخي از نمونه ها.

ساختار طولي ريشه

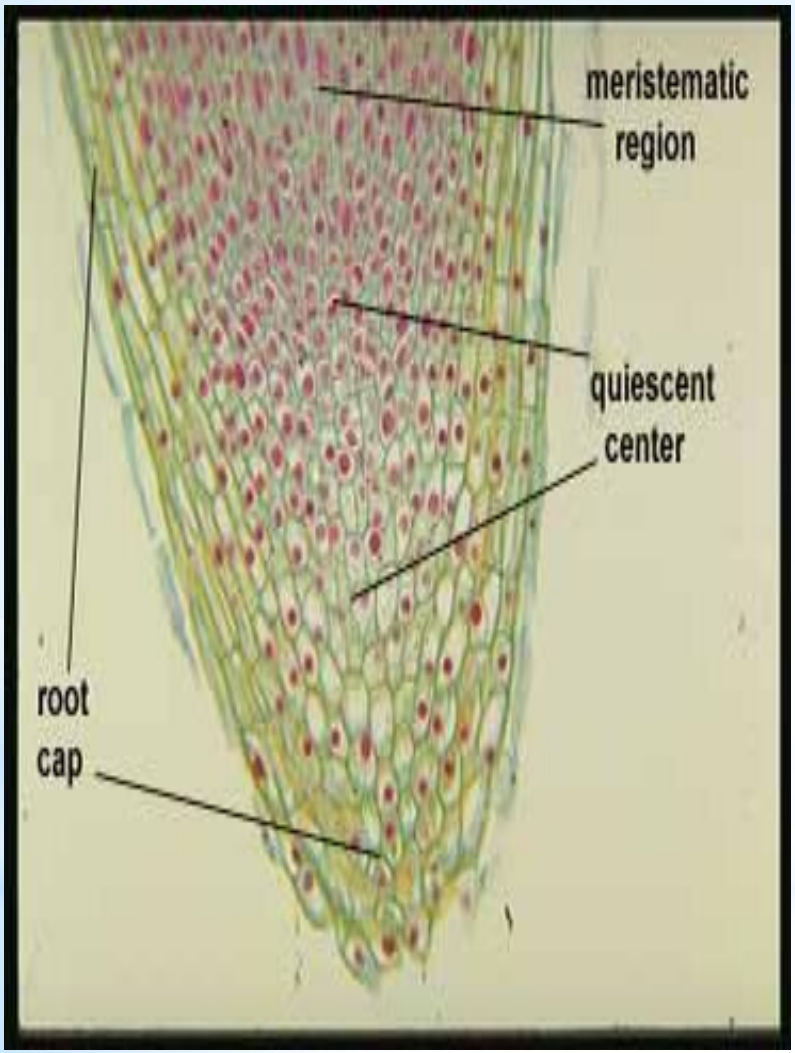
در ساختار طولی ریشه جوان از قسمت پایین به بالا در ابتدا منطقه کلاهک (Root Cap) قرار دارد. سلولها در این ناحیه بحالت محافظتي و بدون فعاليت تقسيمي در منطقه آرام (quiescent center) مي باشند.منطقه بالاتر از آن منطقه تقسیم سلولی(cell division) است که سلول‌ها قدرت تکثیر زیادی دارند. تقسیم به صورت همزمان در بافت مریستمی وجود نداشته و هرسلول در یکی از مراحل مختلف تقسیم و سیکل سلولی به سر می‌برد. 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 می‌باشند. منطقه بعد از آن منطقه تمایز سلولی (Cell Differentiation)است.سلولها در این منطقه به سلولهاي نهايي كه قرار است تبديل شوند در حال تمايز ميباشند و منطقه بافتي شكل مي گيرد.

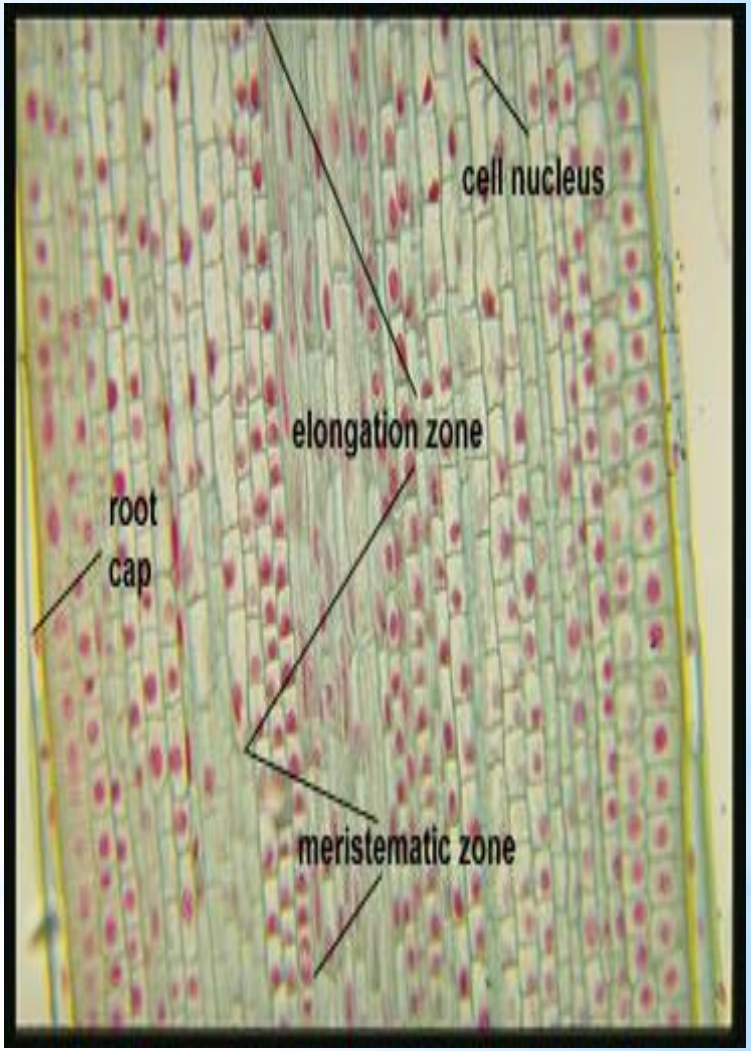
ساختار طولي ريشه





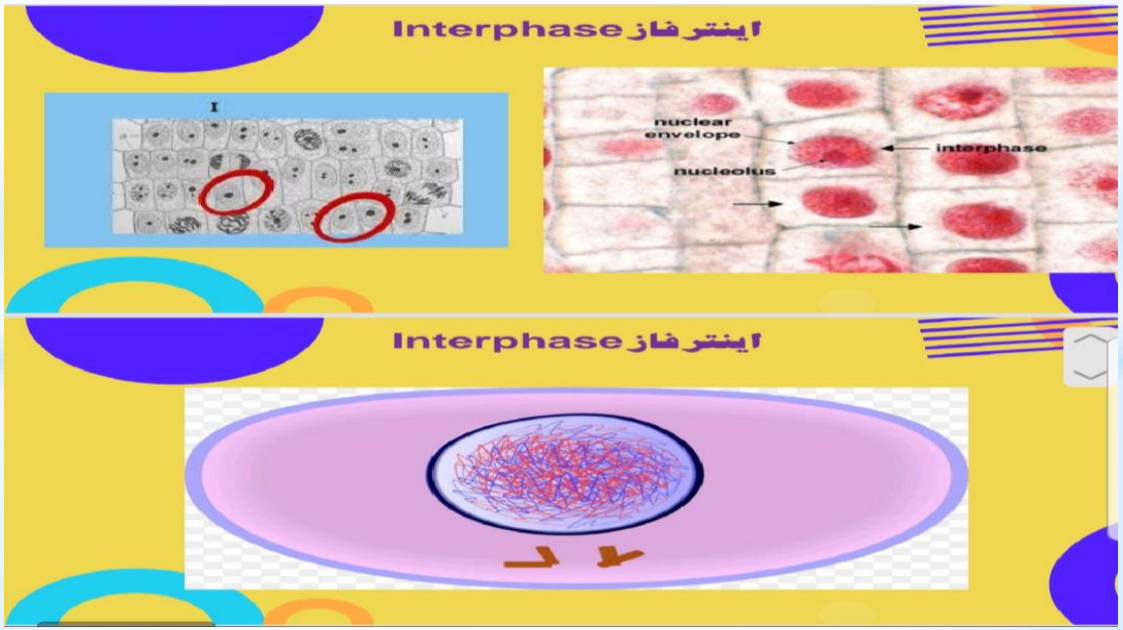
ساختار طولي ميكروسكوپي ريشه





اینترفاز: Interphase

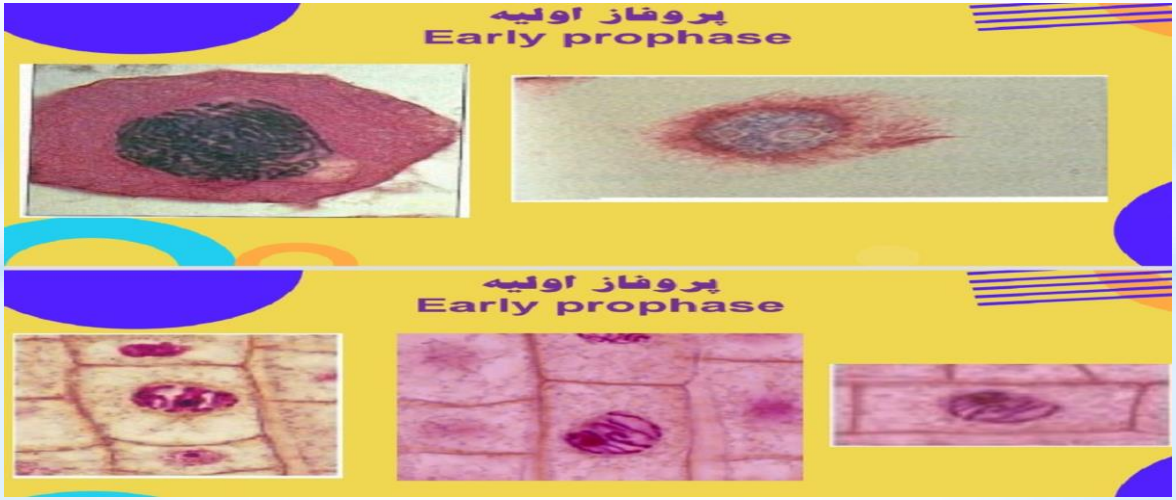
در مرحله اینترفاز یا میان تقسیم محتوای ژنتیکی به صورت رشته‌های درهم برهم مشاهده می‌شوند و غیر قابل تشخیص هستند و در واقع این مرحله فاصله میان دو تقسیم متوالی سلولی است که در ضمن آن فعالیت‌های مربوط به رشد و سنتز صورت می گیرد اندامک ها تکثیر شده و نسخه های جدید از دی ان ای سنتز می شود و همانند سازی صورت می گیرد. از بهترین مشخصات این مرحله وجود هستک (های) مشخص و صاف بودن سطح محتوای ژنتیکی هسته و سایز بزرگ سلول مادری در مقایسه با سلول های دختری حاصل از تقسیم می باشد.



مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز

1.پروفاز اولیه Early prophase

در این مرحله کروماتینها به صورت رشته‌های دراز و پیچ خورده و درهم برهم 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 ارگانل منسجم شده نیست. مشخصات ظاهری سیتولوژیکي در این مرحله از تقسیم در میکروسکوپ نوری این است که هسته سلول به حالت گرد است چون هنوز توسط غشا حمایت مي شود 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 سیتولوژیکي 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

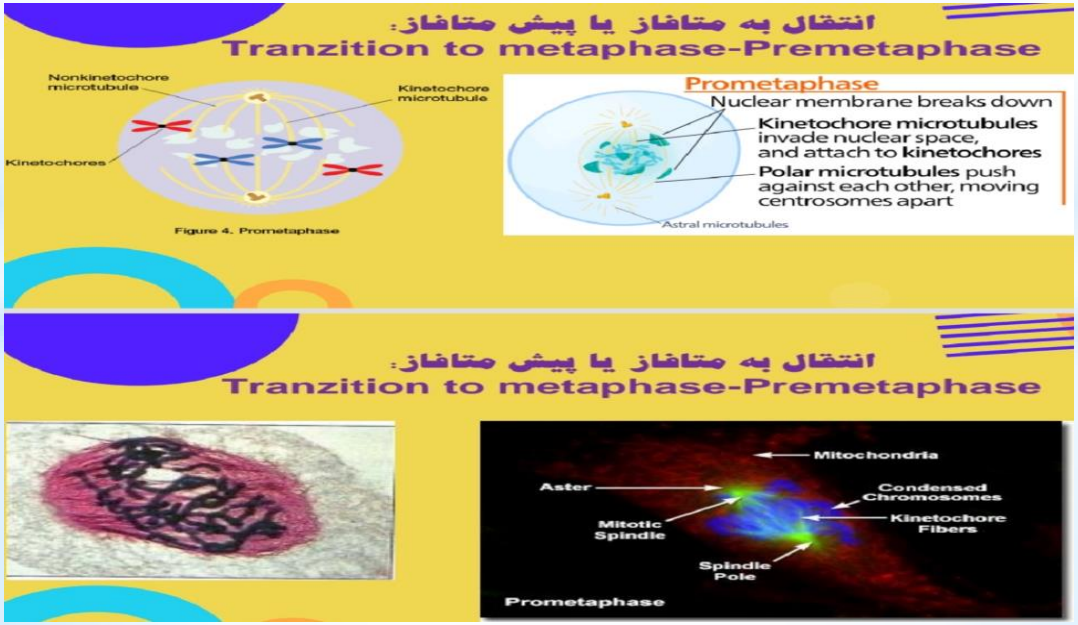
در این مرحله می‌توانیم به محتوای ژنتیکی، کروموزم اطلاق کنیم، چون ابتدا و انتهای مشخصی دارند. غشای هسته بکلی از بین رفته، شیره هسته(Nucleoplasm) با سیتوپلاسم مخلوط شده و محتوای ژنتیکی به فرم کروموزم در هر جایی از سلول پخش شده‌است.



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 کرموزوم ها به طرف همدیگر نمی‌باشد و هرکدام در جهتی قرار گرفته‌اند،کروموزوم ها در نزدیکی استوا مجتمع شده، ولی همگی دقیقاً در راستای استوای سلول قرار نگرفته‌اند.

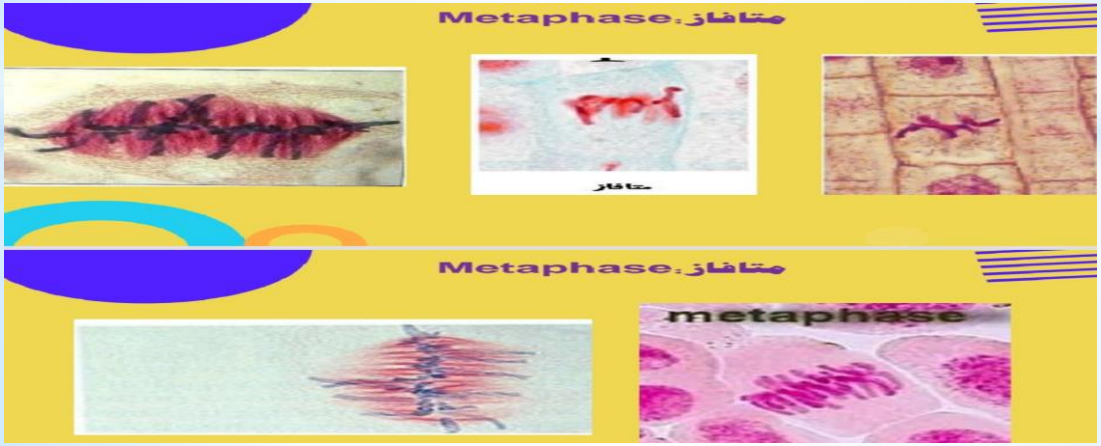


5.متافازMetaphase

کروموزوم‌ها در این حالت کوتاهترین، قطورترین و فشرده ترین حالت خود را دارند و از نقطه پروتئيني درون سانترومر بنام کینتوکور به دوک سیتوپلاسمی متصل هستند و دقیقاً در استوای سلول به طور منظم قرارگرفته‌اند.

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

زیست شناسان 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 کشیدگي رشته هاي دوک بطرف قطبین میشود و بنوعي از پیشرفت تقسیم سلولي در مرحله متافاز ممانعت میکند و نوعي داروي انتي کنسریا ضد سرطان محسوب مي شود.



6.آنافاز اولیه Early anaphase

متافاز زماني پايان مي يابد كه سانترومرهاي كروماتيدهاي خواهر از هم جدا شوند.كروموزوم ها در اين 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.



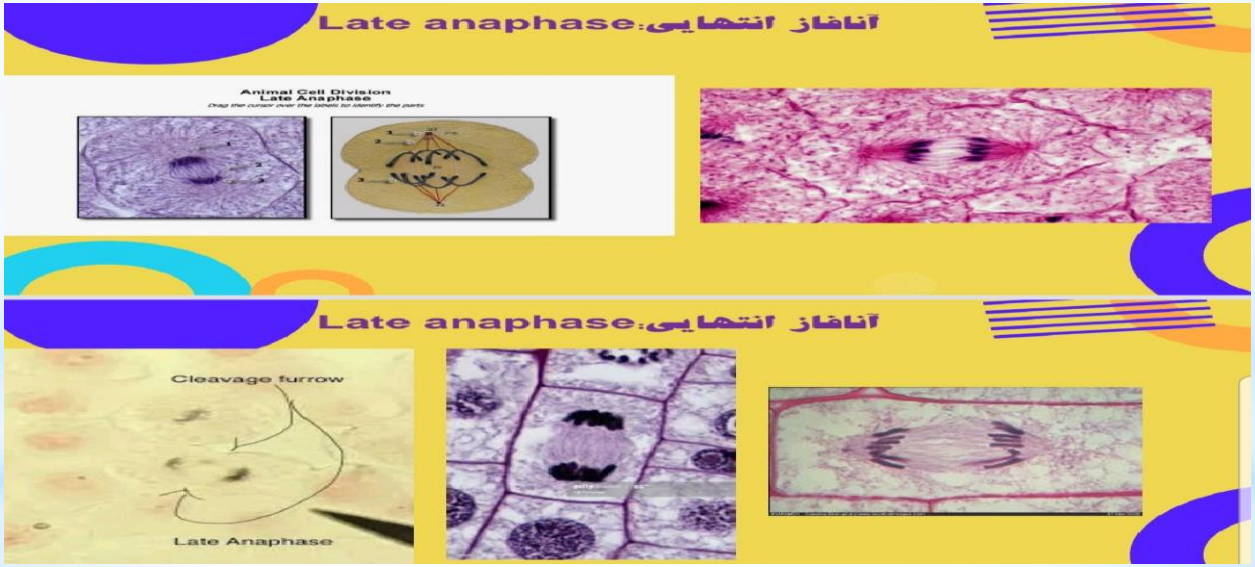
7.آنافاز میانی Mid anaphase

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 می‌گیرند.



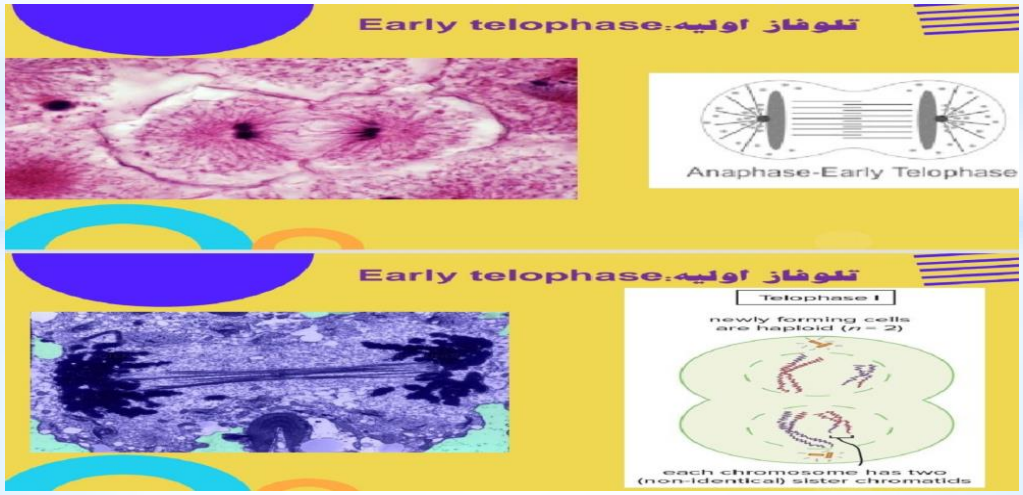
8.آنافاز انتهایی Late anaphase

سانترومرکروماتیدها در نزدیکی قطبین قرار گرفته و حداکثر کشش بر روي كروماتيد هاي خواهر در نزديكي قطبين وجود دارد و کشش رشته‌های دوک بر روی آن‌ها بخوبي قابل تشخيص است.



9.تلوفاز اولیه Early telophase

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



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.

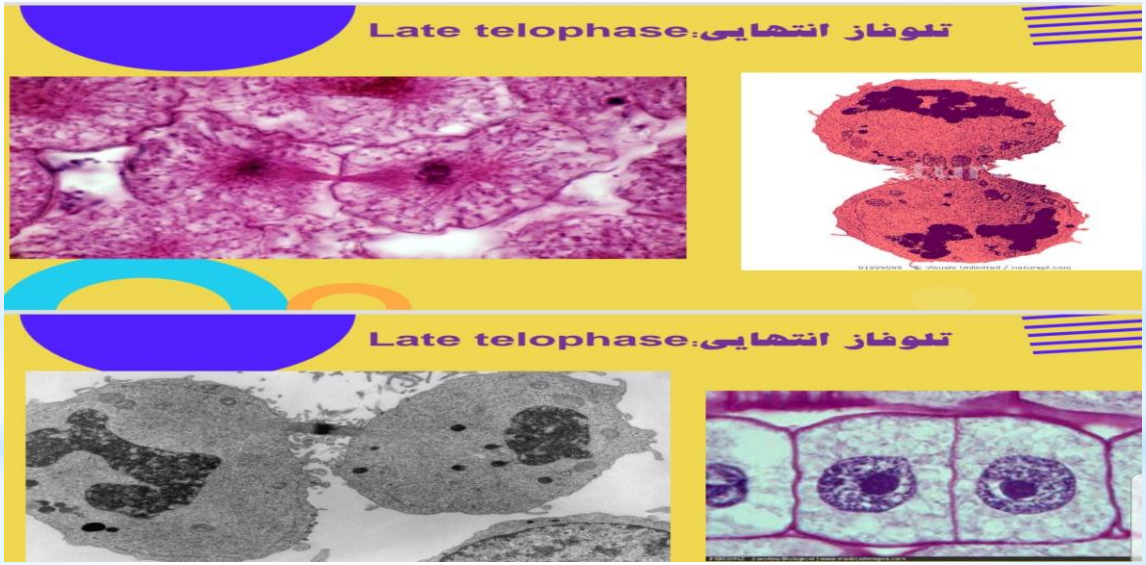
در این مرحله، دستگاه دوک متلاشی می‌شود. ریزلوله‌ها نظم خود را از دست می‌دهند و به صورت مونرمرهای توبولین در می‌آیند و آماده استفاده مجدد در ساختار اسکلت یاخته‌ای جدید می‌شوند.غشاء هسته در اطراف هر گروه کروماتیدهای دختر شکل می‌گیرد. این کروماتیدها که هنوز به شکل کروموزوم‌اند، شروع به باز شدن می‌کنند و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



11.تلوفاز انتهایی Late telophase

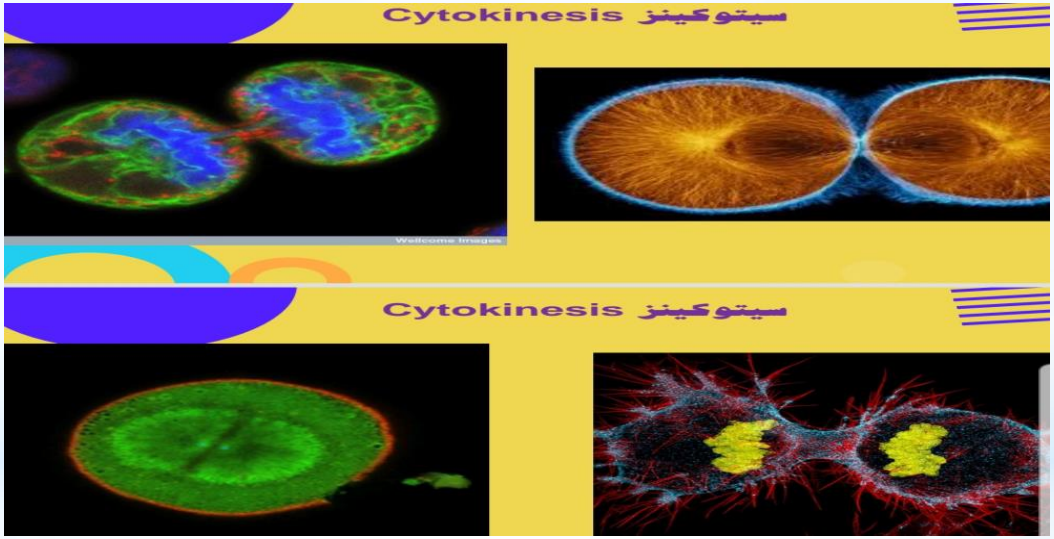
در تلوفاز انتهایی دو سلول دختری کاملاً مشابه با سلول مادر ولی کوچکتر در کنار هم وبطور مجزا قابل مشاهده هستند و سیتوکیناز نیز کامل شده است.

بطور كلي مرحله تلوفاز معكوس مرحله پروفاز است و سلول در حال بازگشت به مرحله اينترفاز مي باشد.دوک هاي سيتوپلاسمي كاملا ناپديد مي شوند و محتواي ژنتيكي به فرم كروماتين ظاهر مي شود.



12.سیتوکیناز Cytokinesis

در سلول گیاهي همزمان با مراحل تلوفاز شروع و با جدا شدن دو سلول دختري از همکامل مي شود .




مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1.رنگ کریستال ویوله (بنفش بلوري) یا استوکارمن یا استو اورسئین که معرف ترکیبات ژنتیکي یا کروموزومي مي 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، ریشه ها را جدا کرده و براي انجام آزمایش به شرح زیر آماده کنید:

روش اول:استفاده از رنگ استوکارمن

ریشه ها را در پلیت حاوي رنگ استوکارمن قرار داده و ظرف را به طور غیرمستقیم روی شعله گذاشته و ریشه ها را به روش بن ماري 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 هاي زير را آماده كنيد:

محلولA : شامل 1 حجم اسيد كلريدريک 10 درصد و 1 حجم آب مقطر جهت نرم شدن ساختار ريشه و نفوذپذير شدن ديواره و غشاي سلولي.

محلولB : شامل 1 حجم اسيد استيک خالص و غليظ و 3 حجم الكل اتانل 96 درصد جهت تثبيت ساختار محتواي ژنتيكي سلول و رنگپذيري انها.

محلولC : شامل1 حجم محلول Aو يک حجم محلول B

بعد از تهيه محلول هاي لازم، ريشه ها را بمدت 15 دقيقه در پليت حاوي محلول C قرار دهيد. در اين مدت ريشه ها را به تناوب زير و رو كرده و جهت نفوذپذيري مواد بخوبي تكان دهيد و بلافاصله بمدت 20 ثانيه در پليت حاوي محلول B غوطه ور كرده و بخوبي تكان دهيد. پس از آن با كمک پنس ريشه ها را به لام منتقل كرده و به منظور نفوذپذيري بيشتر رنگ در مرحله بعدي با كمک سنجاق يا سوزن تشريح به آرامي خدشه داركنيد.

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 جابجایي زیاد ،نسبت به رنگ نفوذپذیر نمایید. سپس لامل گذاري 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 سازي دقت کافي اعمال نشود محتواي ژنتیکي سلول از سیتوپلاسم قابل تشخیص نخواهد بود و به طبع آن بدلیل عدم وجود کنتراست کافي و مناسب بررسي مشاهدات سیتولوژیکي سلول در هر مرحله از تقسیم امکان پذیر نمي باشد.

پس از رنگ آمیزي کریستال ویوله محتواي ژنتیکي را به رنگ بنفش در مي آورد.

لام کروموزومي را در زیر میکروسکوپ در بزرگنمایی 40 تنظیم کرده و پس از پیدا کردن سلول ها در منطقه تقسیم سلولی ابتدا مرحله اینترفاز و هستک‌های مشخص در این مرحله را بررسی کنید (سلول‌های پیاز معمولا دارای 2 هستک می‌باشند) و سپس کلیه مراحل تقسیم سلولی را بررسی و مشاهده کنید و شکل هر مرحله را با رعایت جزییات بررسي شده رسم نمایید.

موارد استفاده کریستال ویوله

نام ديگر اين رنگ قليايي متيل ويولت يا بنفش كريستالي نيز مي باشد.

موارد مصرف در پزشكي :

بهبود جراحات پوستي و درمان زخم هاي مزمن

بهبود التهاب بند ناف در دوران نوزادي

بهبود و درمان عفونت هاي قارچي پوست و دهان يا برفک وآفت دهان.از رنگ كريستال ويوله بدليل داشتن خاصيت ضد باكتريايي و ضد قارچي و از بين بردن عوامل عفوني باكتري استافيلوكوک و قارچ كانديدا جهت تهيه محلول مخاطي دهاني ويوله دوژانسين استفاده مي گردد.

بهبود سوختگي و جلوگيري از عفونت .

ضد عفوني كننده موضعي.

براي ايجاد اثر انگشت در پزشكي قانوني.

وبدليل اثر ضد ميكروبي در درمان عفونت هاي پوستي و چشمي در دام ها و ماهي ها.

مصرف در رنگ آميزي هاي بافتي يا هيستولوژيكي و ميكروبي.

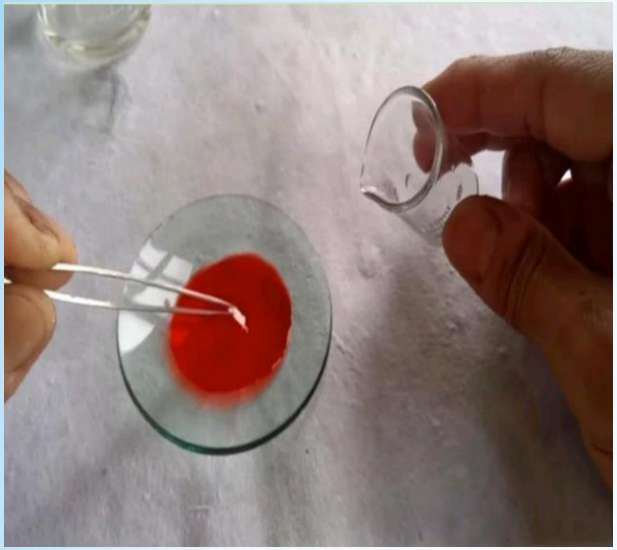
و مصارف ديگر درصنعت داروسازي، رنگرزي ،نساجي و جوهرهاي چاپ مي باشد.

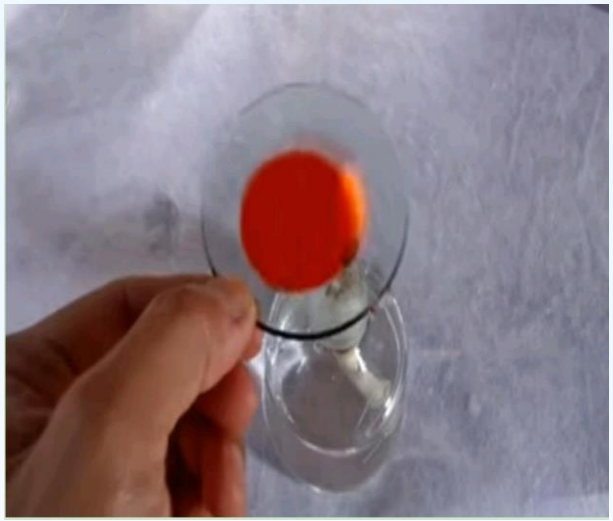
مراحل مختلف آماده سازي نمونه به روش رنگ امیزی بااستوکارمن

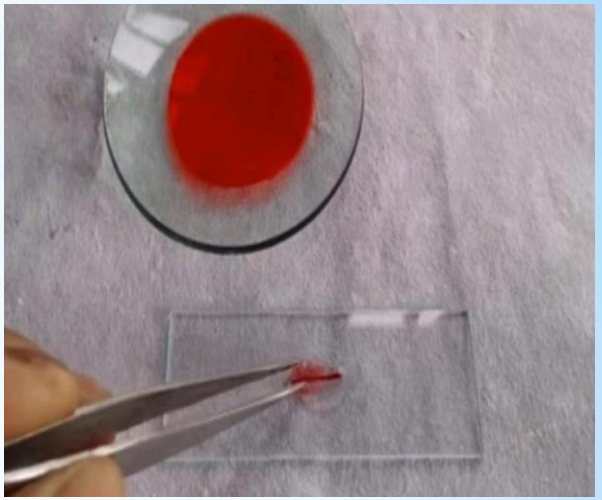


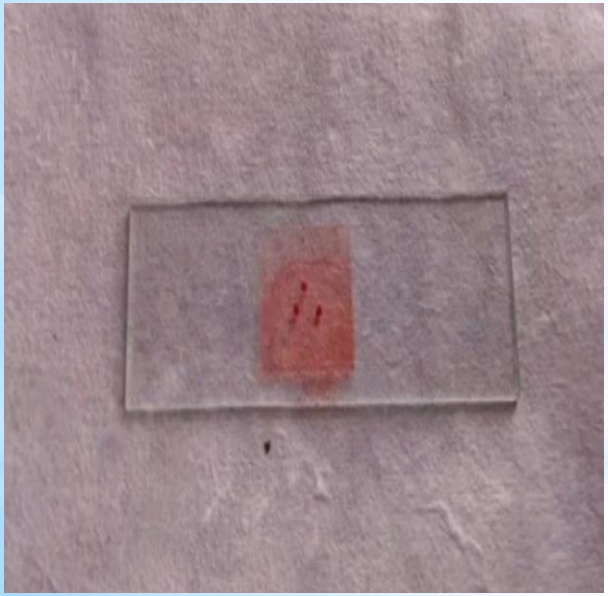




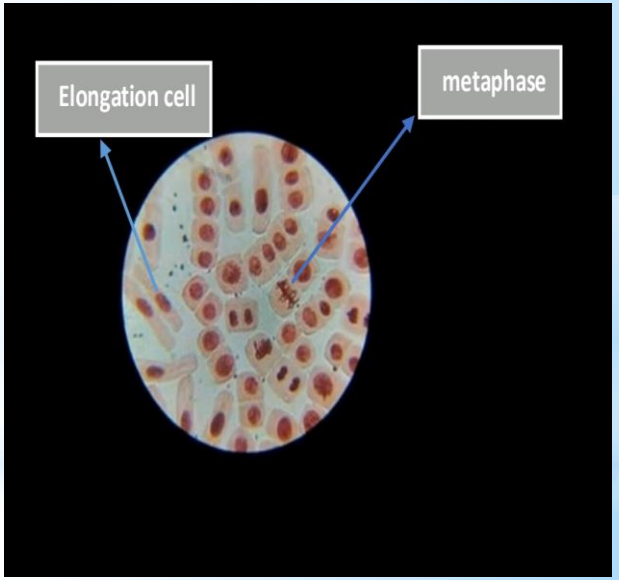




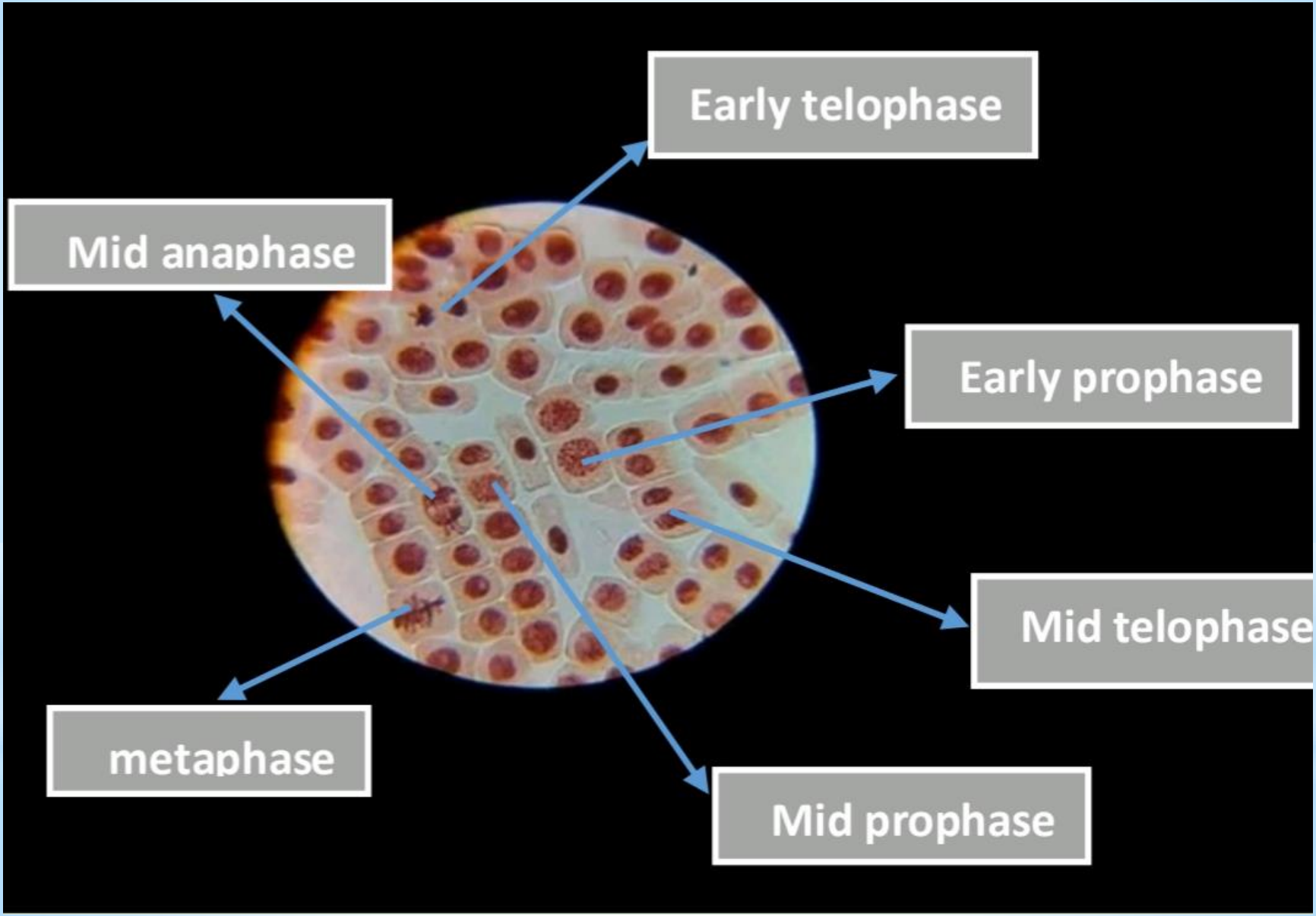


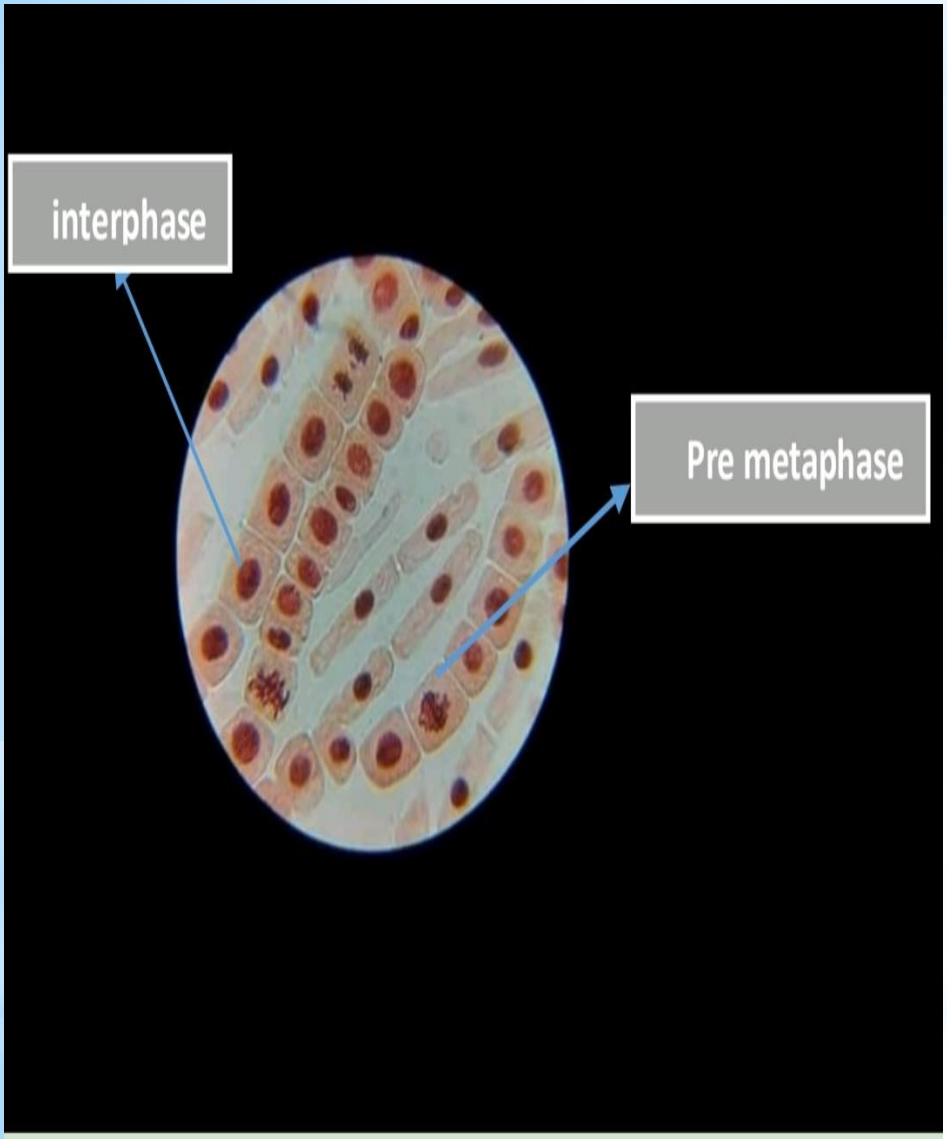


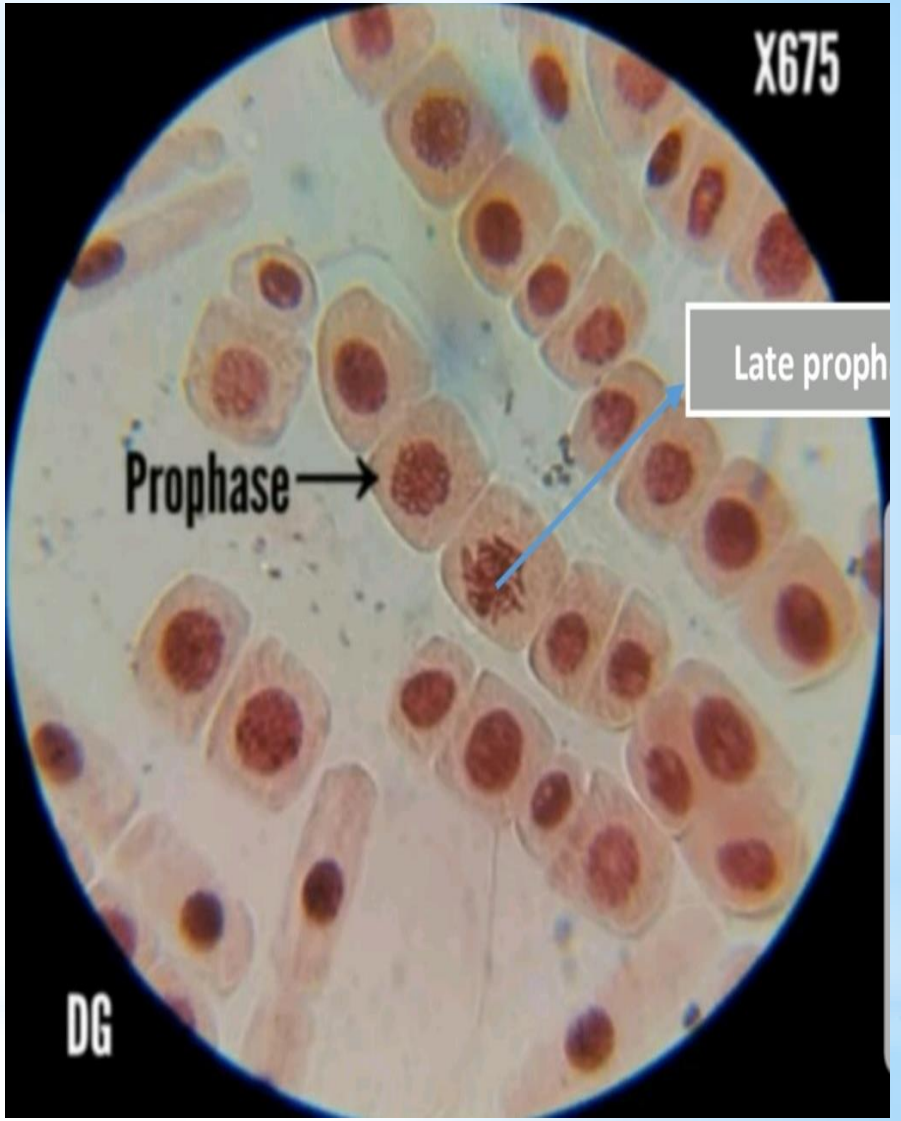

تهیه لام کروموزومی به روش
اسکواش


Elongation cell
metaphase

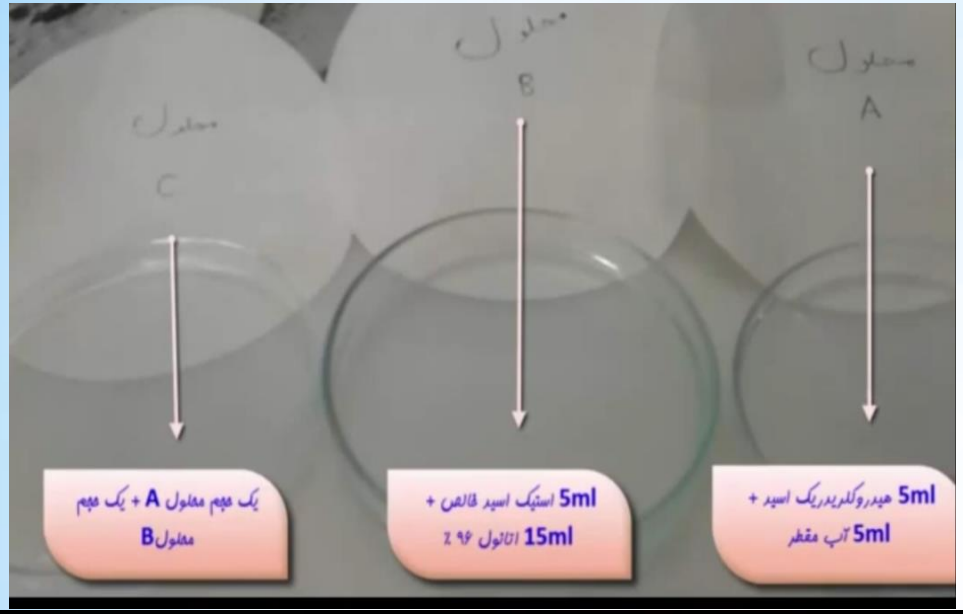
مشاهدات میکروسکوپی

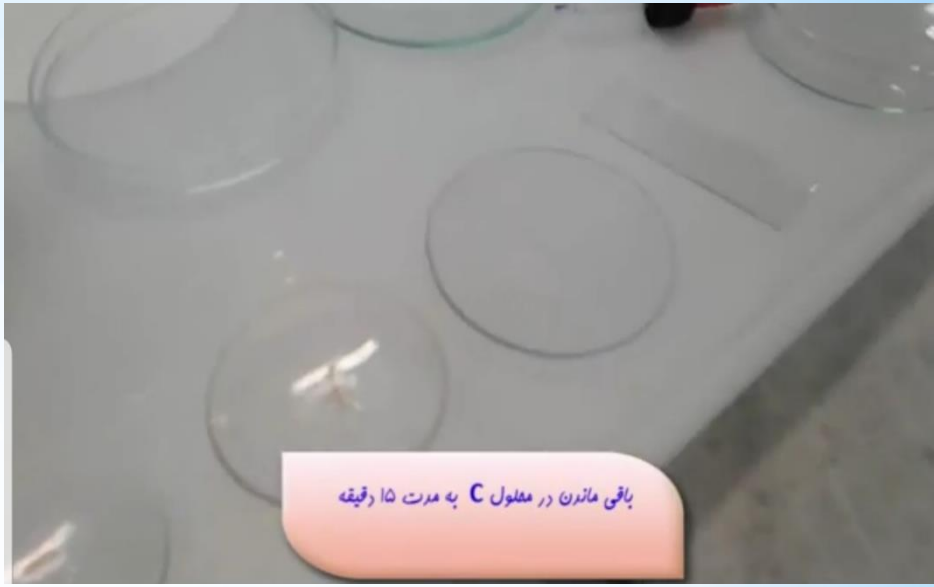


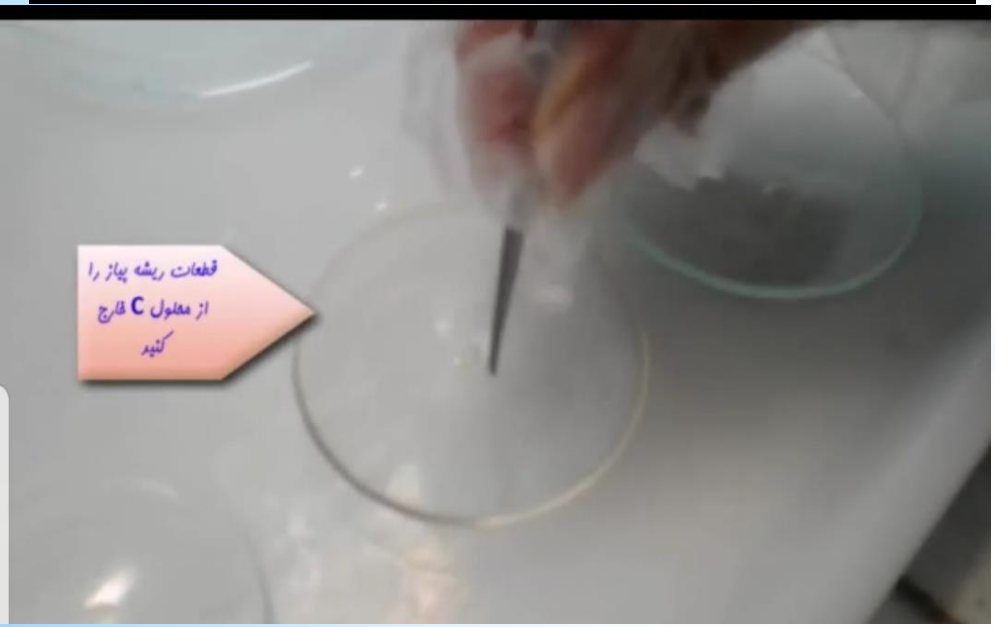

interphase
Pre metaphase

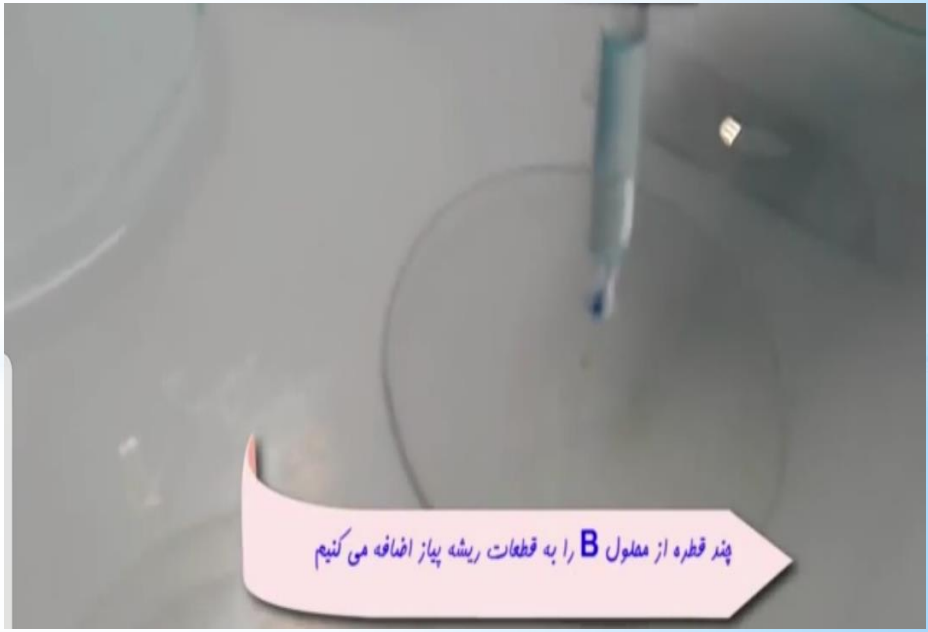

X675
Late proph
Prophase
DG

مراحل مختلف آماده سازي نمونه روش رنگ امیزی با کریستال ویوله

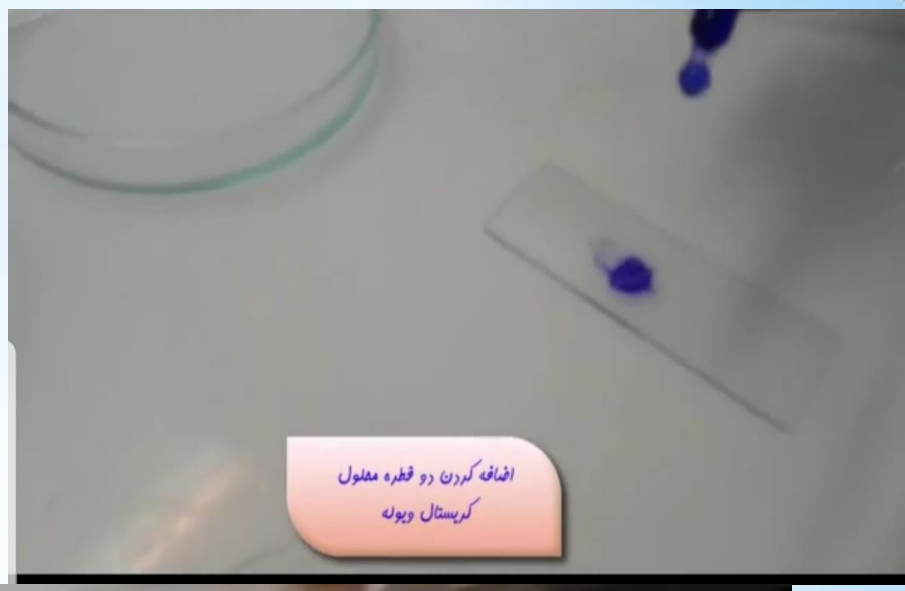






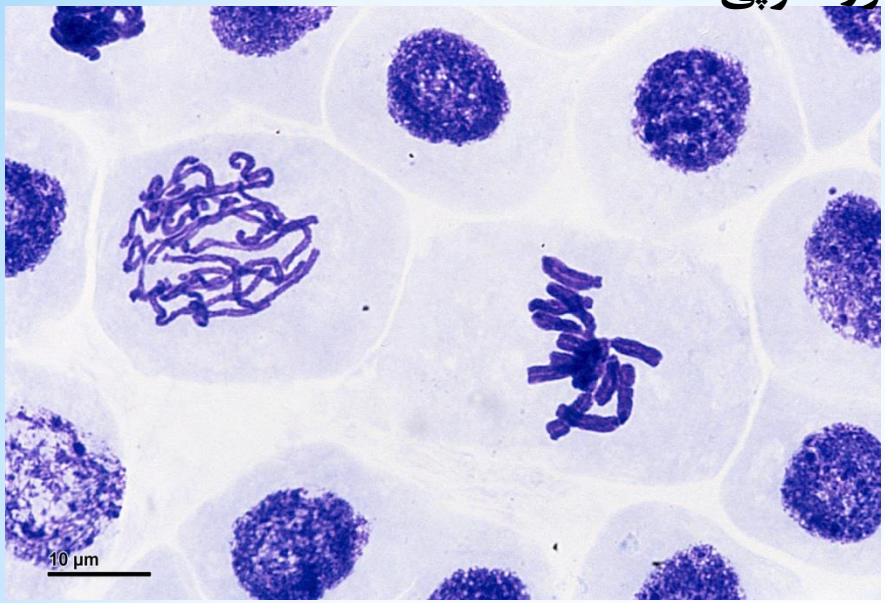


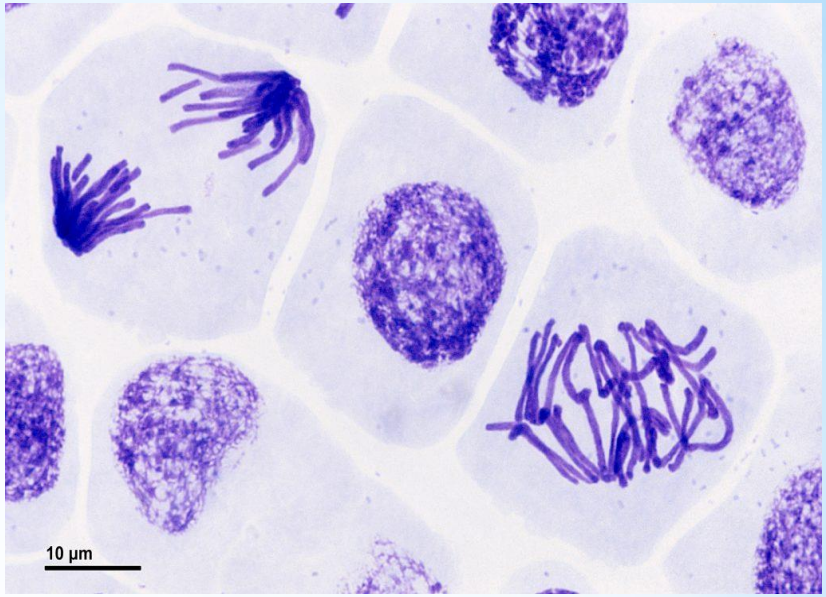

20 ثانیه

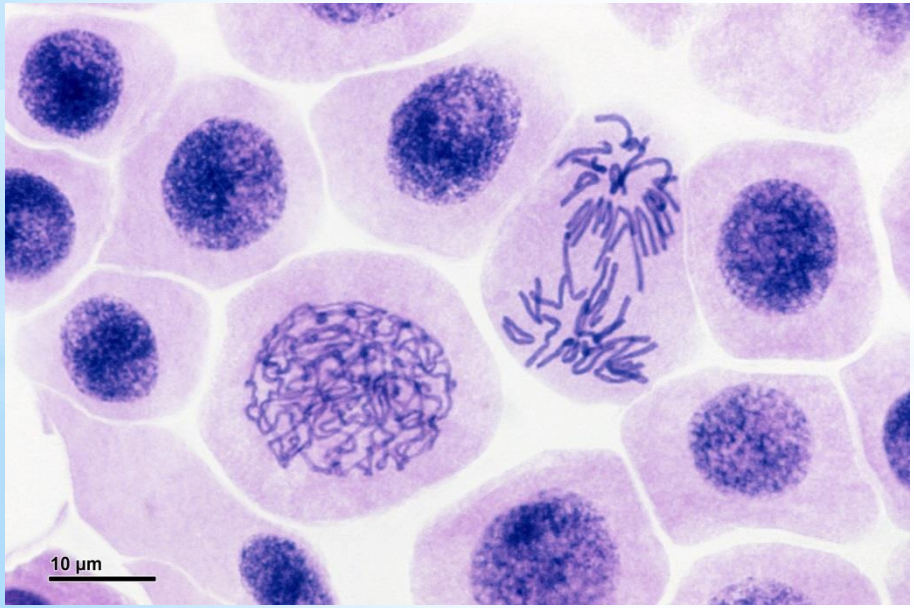

اضافه کردن دو قطره محلول
کریستال ویوله

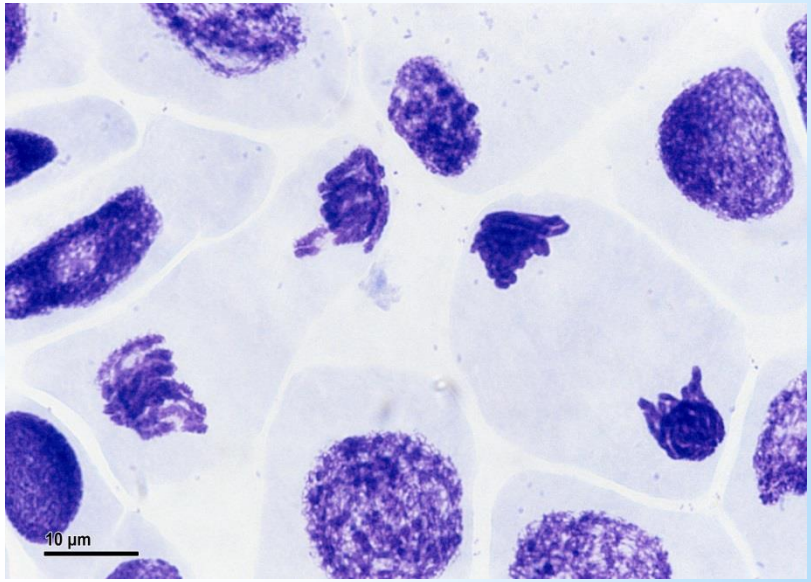

متلاشی کردن قطعات ریشه پیازبه کمک سوزن

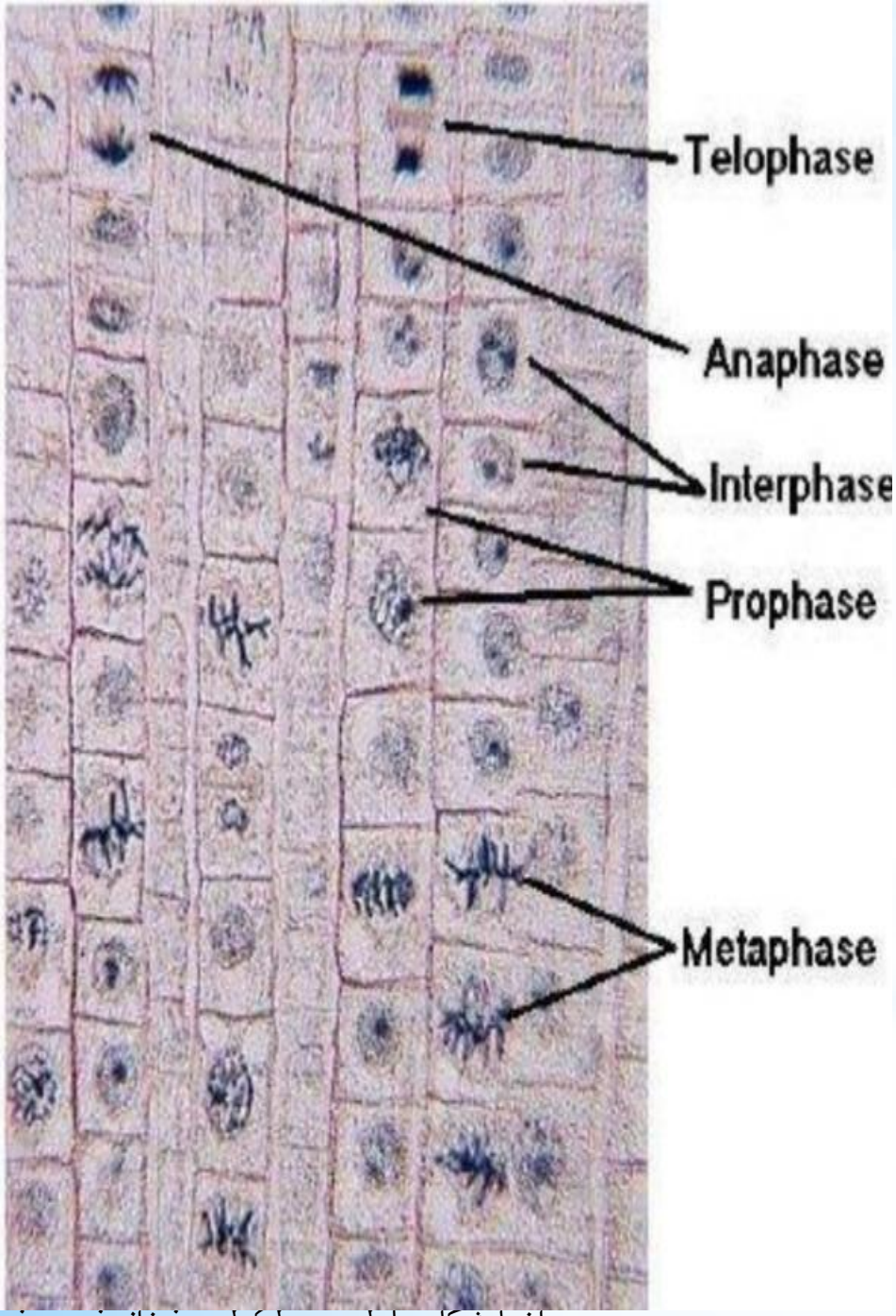
مشاهدات میکروسکوپی

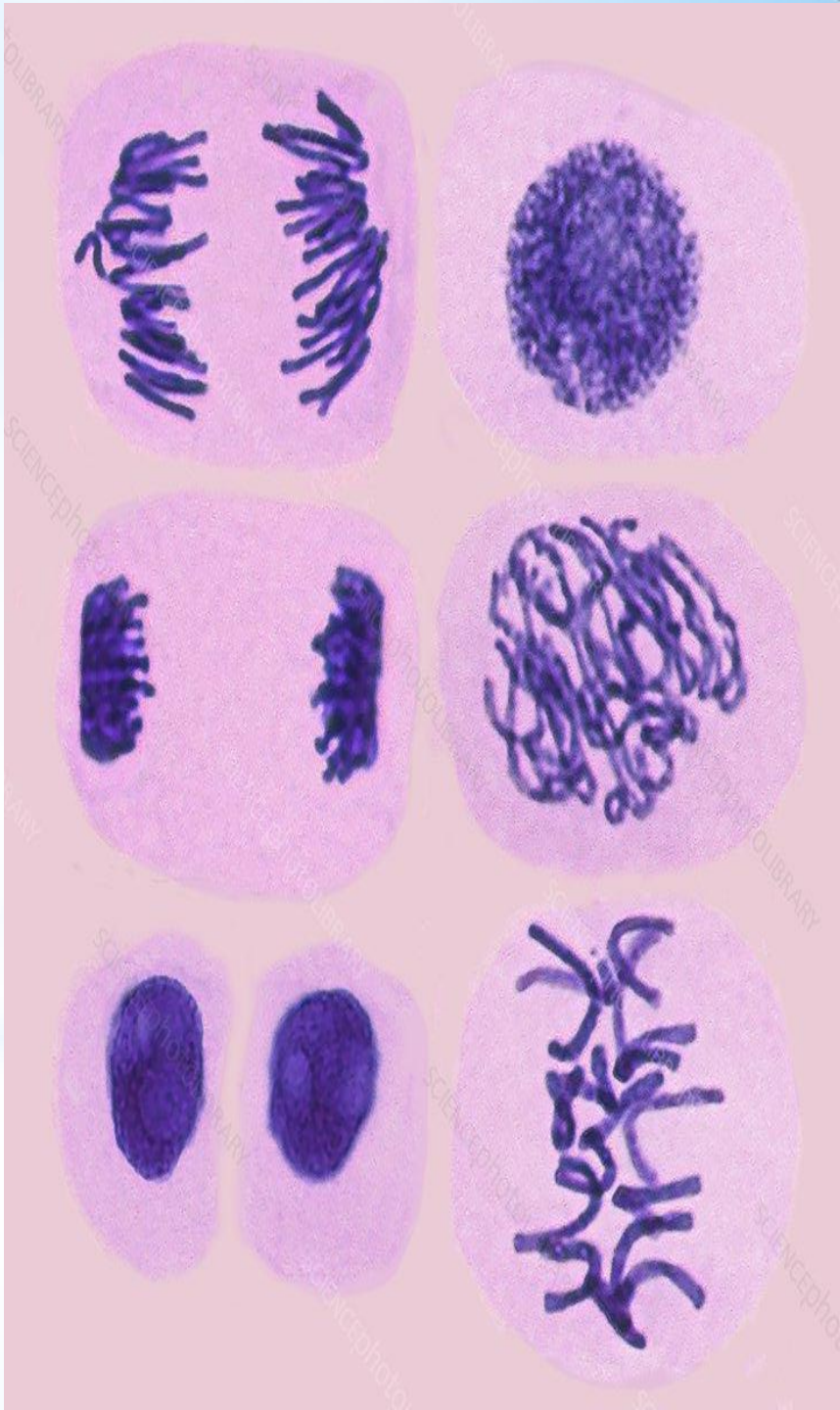




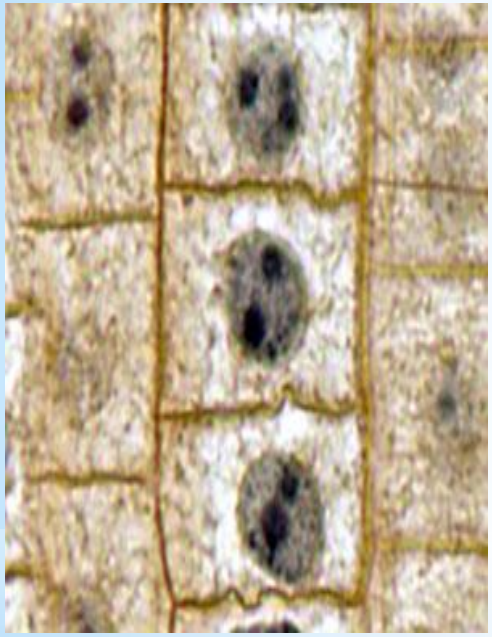





Telophase
Anaphase
Interphase
Prophase
Metaphase



INTERPHASE

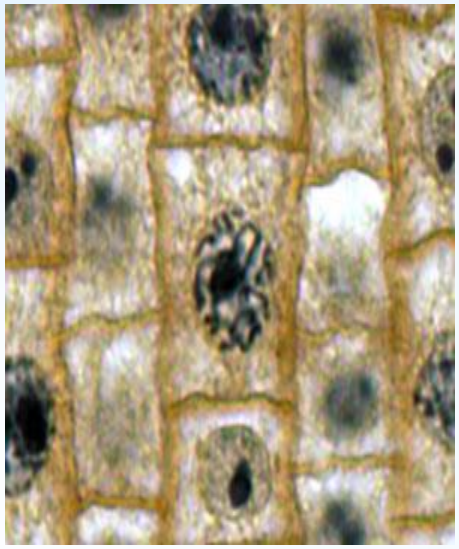


The **nucleus** of the cell is clearly stained and appears to have tiny dots and one or more dark **nucleoli** inside. What you can't see are the phases of interphase:

G_1: Period of cell growth before (G = gap); ribosomes and organelles are being duplicated.

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

G_2: 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:

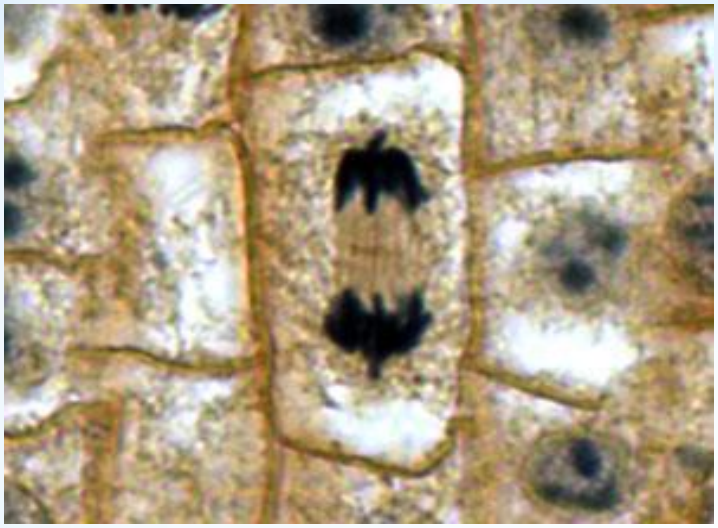
The chromosomes assemble on the **equatorial plate** (an imaginary disc that crosses the center of the 3-dimensional cell). Some part of each chromosome is on this plate. Metaphase ends when the centromeres of each pair of chromatids split apart.

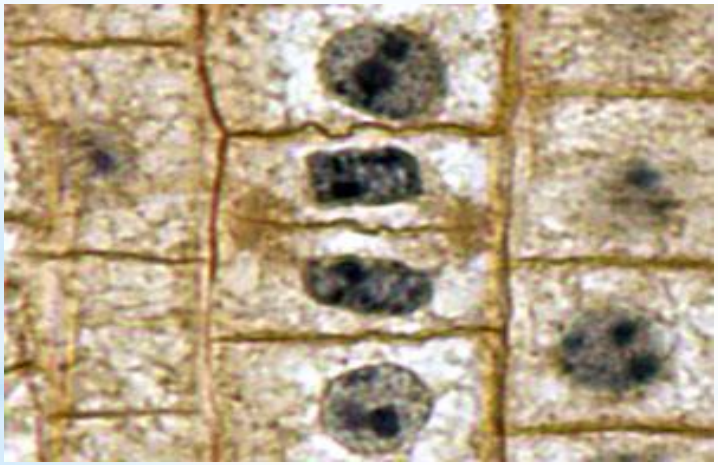




Anaphase:

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.

