سیتوژنتیک و کاربرد آن در مطالعات آبزیان

حبیب‌اله گندمکار[۱]، ابوالحسن راستیان نسب[۱]، سجاد نظری*[۱]

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

*sajadnazari13@googlemail.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹٤

چکیده

سیتوژنتیک، علم مطالعه ساختمان کروموزوم‌ها می‌باشد. در این علم کروموزوم‌ها با استفاده از تکنیک‌های باندینگ (نوارگذاری) و یا شیوه‌های سیتوژنتیک ملکولی مورد تحلیل و بررسی قرار می‌گیرند. این علم، شاخه‌ای از ژنتیک است که با مطالعه ساختار و ترکیب کروموزومی یک سلول مرتبط بوده و شامل آنالیز معمول کروموزوم‌های نواربندی G شده و سایر تکنیک‌های بندینگ و نیز سیتوژنتیک مولکولی شامل FISH و CGH است. در این مقاله گزارشی از بررسی‌های انجام شده و کاربرد سیتوژنتیک در آبزیان از جمله آبزیان زینتی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: سیتوژنتیک، آبزیان، کروموزوم، ژنتیک، تکنیک نواربندی.

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعه کروموزوم‌های ماهیان و دیگر موجودات آبزی بخش فعالی از تحقیقات ژنتیکی را در کشور به خود اختصاص داده است (Kalbasi *et al*, 2006; Pourkazemi *et al*., 2010; Khoshkholgh *et al*., 2015). مطالعه کاریولوژیکی اطلاعات پایه‌ای از لحاظ تعداد، اندازه و مورفولوژی کروموزوم‌ها را ارائه می‌دهد. همچنین می توان از نتایج آن برای اثبات موفقیت تکنیک‌های دستکاری کروموزومی، از جمله القاء پلی پلوئیدی و در صورت وجود کروموزوم‌های جنسی برای ماده‌زایی، نرزایی و تولید دورگه‌های درون و بین گونه‌ای، مطالعه سیتوژنتیکی ماهیان استفاده نمود (Iturra *et al*., 2001; Brinn *et al*., 2004; Benzaquem *et al*., 2008; Gross *et al*., 2009; Nazari *et al*., 2009).

افزایش ضریب میتوز (Mitotic Index) به منظور به دست آوردن تعداد پلاک های متافازی (Metaphase plate) بیشتر و در نتیجه انتخاب بهترین نمونه برای بررسی کاریوتیپ موجودات نقش مهمی در مطالعات سیتوژنتیکی دارد (Baruffaldi *et al*., 1992; Perazzo *et al*., 2010). در سال های اخیر محققین از مواد مختلفی برای افزایش ضریب میتوز استفاده نموده اند، از جمله می توان به استفاده از کلرید کلسیم ($Cacl_2$) و کلرید کبالت ($Cocl_2$) (Cucchi & Baruffaldi, 1989)، فنیل هیدرازین (Phenylhydrazin) (Cucchi & Baruffaldi, 1989)، فیتوهموگلوتینین (PHA) (Fan and Fox,1990; Pourkazemi *et al*., 2010; Nazari *et al*., 2011)، (Munolan) یا آنتی‌ژن‌های باکتریایی یا قارچی (Molina, 2001) اشاره نمود.

سیتوژنتیک

سیتوژنتیک علم مطالعه کروموزوم‌ها و بیماری‌های وابسته که بواسطه ناهنجاری در تعداد و یا ساختار کروموزوم‌ها ایجاد می‌شده است. بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی مربوط به ناهنجاری در تعداد و یا ساختار کروموزوم‌ها است، بنابراین بیماری‌های ژنتیکی شامل ناهنجاری‌های تعدادی[1] یا ساختاری[2] است. که این ناهنجاری‌ها در میتوژنتیک هم شناسایی می‌شوند و هم مورد بحث قرار می‌گیرند (حسینی و کلباسی،۱۳۸۱). علم سیتوژنتیک در سال ۱۹۵۹ با شناسایی بیماری سندرم دادن (مونگولیسیم یا ترنرو ۲۱) آغاز شد. در سال ۹۷۰ روش‌ها یا تکنیک‌های نواربندی[3] روی کار آمد. تکنیک‌های نواربندی، تکنیک‌های هستند که بعد از اینکه از بیماران کاریوتیپ تهیه شد، کروموزوم‌ها را رنگ می‌کنند که بعد از رنگ‌آمیزی این کروموزوم‌ها الگویی خواهند داشت که در آن یک حالت باند باند شکل خواهد گرفت که به این حالت نواربندی گفته می‌شود. انواع مختلفی از روش های نواربندی وجود دارد. کاریوتیپ پایه سیتوژنتیک قدیم[4] است و امروزه از تکنیک FISH (Fluorescent in situ Hybridization) استفاده می‌کنند.

تعریف کروموزوم

واژه کروموزم به مفهوم جسم رنگی برای نامیدن رشته‌های رنگ‌پذیر و قابل مشاهده با میکروسکوپ‌های نوری به کار می‌رود که از همانندسازی و نیز بهم پیچیدگی و تابیدگی هر رشته کروماتین اینترفازی در سلول‌های یوکاریوتی تا رسیدن به ضخامت ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر ایجاد می‌شود (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶؛Demirok and Unlu, 2001). در پروکاریوت‌ها نیز ماده ژنتیکی اغلب به حالت یک کروموزوم متراکم می‌شود. در برخی باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم اصلی که اغلب ژن‌ها را شامل می‌شود، کروموزوم کوچک دیگری که به طور معمول آن را پلاسمید می‌نامند، قابل تشخیص است گر چه تعداد کمی از ژن‌ها بر روی پلاسمید قرار دارند. یک ساختار پیچیده که درون هسته سلول واقع است و از DNA، پروتئین‌های هیستون و غیر هیستون تشکیل شده است که این ترکیبات فشرده می‌شوند و یک واحد تیپیک را ایجاد می‌کنند. اما از آنجا که در بیشتر موارد ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک‌ها بر روی آن جایگزین شده‌اند، از نظر پایداری و بقای نسل باکتری اهمیت زیادی دارد. کروماتین در ساختمان کروموزوم به شکل لوپ دیده می‌شود. لوپ‌ها توسط پروتئین‌های اتصالی به DNA که مناطق خاصی از DNA را تشخیص می‌دهند، پابرجا می‌ماند. سپس در نهایت مراحل پیچ خوردگی نوارهایی را که در کروموزوم‌های متافازی دیده می‌شود ایجاد می‌کند. هر تیپ کروموزومی یک نوع نواربندی اختصاصی را در ارتباط با نوع رنگ-آمیزی نشان می‌دهد. این رنگ‌آمیزی‌ها منجر به مشخص شدن تعداد و خصوصیات کروموزوم‌های هر گونه از موجودات زنده می‌گردد. که این خصوصیات تعدادی و مورفولوژیک کروموزوم‌ها را کاریوتیپ می‌نامند (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

سانترومتر

سانترومر محل اتصال ۲ بازوی کروموزوم است. در حقیقت سانترومر نقطه‌ای است که بر اساس آن کروموزوم را به دو بازوی کوچک (p) و بزرگ (q) تقسیم می‌کنند، عمل سانترومر در طول تقسیم سلولی متغیر می‌باشد.

[1] Numberal
[2] Stractural
[3] banding
[4] Conventional cytogenetic

تلومر

به انتهای کروموزوم‌ها تلومر گفته می شود.

وظایف تلومرها

۱- محکم چسباندن انتهای کروموزوم‌ها و حفاظت از تمامیت آنها برای جلوگیری از آسیب دیدن کروموزوم‌ها، چرا که سلول پر از آنزیم‌های مربوط به DNA می‌باشد که می‌تواند موجب تخریب کروموزوم‌ها شوند.

۲- بعضی از سلول‌ها مثل سلول‌های سرطانی یا سلول‌های بنیادی (stem cells) آنزیمی بنام تلومراز دارند که باعث افزایش طول توالی‌های تکرار شونده در انتهای کروموزوم‌ها می‌شود.

۳- به تلومرها ساعت بیولوژیک نیز گفته می‌شود، چون هر سلول یک نیمه عمر دارد و هر سلول بیش از چند بار نمی‌تواند تقسیم در هر بار تقسیم تعدادی از تکرارهای کروموزومی خود را از دست می‌دهد؛ چون سلول وقتی شروع به همانندسازی می‌کند، نمی‌تواند دقیقاً از انتهای کروموزوم شروع کرده و کل کروموزوم را همانندسازی کند. لذا در هر بار تقسیم مقداری از توالی انتها بیش از دست می‌رود پس در هر دور تقسیم طول کروموزوم کوتاه‌تر می‌شود تا یک حد خاص این کوتاه شدن برای سلول قابل تحمل است بعد از اینکه به ژن‌ها رسید و این توالی‌های تکراری‌شونده تمام شد سلول می‌میرد برای همین به آن ساعت بیولوژیک می‌گویند. پس این تلومرها در پیری و مرگ سلول‌ها حائز اهمیت هستند.

برای بررسی کروموزوم در سیتوژنتیک ابتدا باید کروموزوم‌ها را طبقه‌بندی نمود، باید دید کروموزوم‌ها چه تعداد، چه اندازه و چه شکلی دارند و بر همین اساس نیز آنها را طبقه‌بندی می‌کنند.

بر اساس موقعیت قرارگیری سانترومر کرموزوم ها به ۳ دسته: metacentric, acrocentric, Sub metacentric طبقه بندی می شوند.

در metacentric ها، سانترومر تقریباً وسط کرموزوم و کمی متمایل به بالا است. در acrocentric ها، سانترومر تقریباً در انتهای کروموزوم است یعنی نزدیک به تلومر، در sub metacentric: سانترومر به طرف انتها حرکت می کند و میل به انتها دارد. Acrocentric ها در انتهای خود ماهواره[1] دارند که در حقیقت نقاطی هستند که محل تجمع ژن‌های rRNAa یا RNA ریبوزومی است و تعدا کپی‌های آن هم زیاد است (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

نحوه تهیه گسترش کروموزومی و کاریوتیپ

برای اینکه کاریوتیپ تهیه کنند ابتدا به موجود آبزی ترکیبی به نام Phytohuemagglutinin (این ترکیب القا کننده میتوز می باشد) تزریق می‌کنند. تحت تاثیر این ماده لنفوسیت‌های خون محیطی شروع به تقسیم شدن می‌کنند، حدود ۱۰ ساعت در دمای محیط این عمل را انجام می‌دهند. سپس ترکیباتی نظیر کلسمید[2] یا کلشی سین[3] (متداول) یا به آبزی تزریق می‌کنند. این ترکیبات از تشکیل دوک تقسیم جلوگیری می‌کنند، در صورت عدم تشکیل رشته‌های دوک، سلول تقسیم شده و کروموزوم‌ها متراکم گردیده و متافاز انجام می‌گیرد؛ امّا دوک تقسیمی در دسترس نیست، لذا کروموزوم‌ها در همان مرحله متافاز متوقف می‌شوند. به این ترتیب ترکیب کلشی سین نگه داشتن کروموزوم‌ها را در متافاز انجام می‌دهد (Foresti *et al*., 1993).

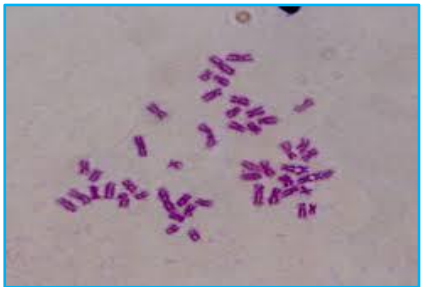
پس از متوقف شدن کرموزوم‌ها، یک محلول نمکی هیپوتونیک[4] به سلول اضافه می‌کنند. محلول هیپوتونیک، محلولی است که باعث آماس سلول می‌شود. به طور کلی محلول‌ها به ۳ دسته هیپرتونیک، هیپوتونیک و ایزوتونیک تقسیم می‌شوند. ایزوتونیک محلولی است که دقیقا مانند سلول باشد، هیپرتونیک مقدار نمک بیشتر و آب کم‌تری را داراست و هیپوتونیک آب زیاد و نمک کم‌تری دارد. اگر سلول دارد محیط یک محیط هیپوتونیک شود سلول آماس می‌کند). امّا این عمل باید بگونه‌ای صورت بگیرد که سلول نترکد و تنها آماس داشته باشد. بعد با ترکیبی از متانول و استیک اسید سلول را فیکس می‌کنیم. در محیطی که ثابت باشد، آنزیم ها کار نمی‌کنند لذا تثبیت خواهد شد. بعد سلول‌ها را با قطره چکان برداشته و از ارتفاع ۲۰ الی ۳۰ سانتی‌متری این سلول‌ها را که آماس کرده و آماده ترکیدن هستند و در مرحله متافاز نیز هستند رها و در نتیجه کروموزوم‌ها روی لام پخش می‌شوند. سپس لام را رنگ‌آمیزی می‌کنند. بسته به نوع رنگ‌آمیزی کارهای متفاوتی را می‌توان روی آن انجام داد (Hartley and Horne, 1985).

بعد از رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها آنها را زیر میکروسکوپ مشاهده می‌کنند. در این حالت یک ناحیه دایره واری زیر میکروسکوپ دیده می‌شود که کروموزوم‌ها در آن پخش شده‌اند و رنگ گرفته‌اند. برای انجام فعالیت‌های سیتوژنتیکی فرد مسئول باید ساعت‌ها زیر میکروسکوپ را نگاه کند تا بتواند یک کروموزوم اضافه، یک ناهنجاری و یا یک ریزکروموزوم را پیدا کند. امّا در صورت نیاز به یک ریکورد باید از صفحه میکروسکوپ عکس بگیریم. به این ترتیب یک دوربین روی میکروسکوپ سوار می‌شود و یک عکس گرفته و سپس از عکس پرینت می‌گیرند و کروموزوم‌ها شمرده می‌شوند. در نهایت آنها را بر اساس شکل و محل سانترومر جدا و شماره‌گذاری می‌نمایند. سپس آنها را به صورت تک تک روی یک برگه می‌چسبانند و از آن یک کپی تهیه می‌کنند و به این صورت کاریوتیپ تهیه می‌شود. شکل ۱ نمونه ای از گسترش کروموزومی ماهی سیم سفید را پس از رنگ آمیزی به روش رنگ آمیزی گیمسا نشان

[1] satellite

[2] colcemid
[3] colchicin
[4] hypotonic

می دهد. امروزه نرم‌افزارها همه‌ی این کارها را انجام می‌دهند و فایل را برای ما آماده می‌کنند. پس از آماده شدن کاریوتیپ به دنبال کروموزوم‌های جنسی و ناهنجاری تری زومی و ... می‌توان گشت. در زمان افتادن سلول‌ها بر روی لام می‌توان بسیاری از کارهای آزمایشگاهی و تشخیصی را روی کروموزوم‌ها انجام داد.



شکل ۱: گسترش کروموزومی به روش رنگ آمیزی گیمسا در ماهی سیم سفید از خانواده کپورماهیان (اقتباس از (Pourkazemi *et al.*, 2010

نواربندی کروموزوم ها

روش‌های رنگ‌آمیزی برای شناسایی کروموزوم‌ها به کار می‌رود. انواع رنگ‌آمیزی‌ها به شرح زیر می‌باشند:

G banding (Giemsa)
Q banding (Quinacrine)
R banding (Renerse)
Centromeric (Teterochromatine) (C banding)

G-banding: شایع‌ترین و معمول‌ترین روش رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها می‌باشد. در این روش کروموزوم‌ها را با Trypsin مواجه می‌کنند که موجب دناتوره شدن پروتئین‌ها می‌شود. رنگ Giemsa کرموزوم‌ها را به صورت نوارهای تیره و روشن رنگ خواهد کرد.

C-Banding: برای تشخیص سانترومر (نواحی هتروکروماتین) استفاده می‌شود. نواحی هتروکروماتینی دارای توالی‌های تکرار شونده هستند. در این روش فیبرهای کروماتین بسیار فشرده شده، سپس کروموزوم‌ها در معرض اسید و آلکالین قرار می‌گیرند و پس از آن C-Banding انجام می گیرد.

F-diagram: بعد از روی کار آمدن G-banding و مشخص شدن الگوها، یک قانون تعیین و بیان گردید که هر کروموزوم شکل خاص و الگوی نواربندی مخصوص به خود را دارد و این بصورت یک اصل درآمده است به این ترتیب که برای تعیین شماره هر کروموزوم شکل، نواربندی آن را با الگوی مقرر شده مقایسه می‌کنند و شماره کروموزوم را تعیین می نماید.

۴۰۰ باند به ازای یک ژنوم‌ها پلوئید وجود خواهد داشت. هر باند برابر با ۱۰-۵ مگا باز (Mega base) است. در تکنیک‌های با کیفیت بالا تا ۸۰۰ باند در هر هاپلوئید دیده می‌شود که کروموزوم‌ها را در مرحله پروفاز متوقف می‌کنند. برای این منظور از متوتروکسات استفاده می‌شود. درG banding نوارهای تیره فاقد ژن بوده و یا از لحاظ ژنی فقیر هستند. در این روش رنگ‌آمیزی به کروموزوم‌ها ظاهر نواربندی دارند؛ چرا که رنگ گیمسا فقط DNA را در محل غنی از باز A و Tرنگ‌آمیزی می‌کند.

مناطقی از کروموزوم که در G banding تیره دیده می‌شوند، در اواخر مرحله S از چرخه سلولی همانندسازی کرده و حاوی کروماتین فشرده‌تری می‌باشند. در حالی که مناطق روشن‌تر به طور معمول در اوایل مرحله S همانندسازی کرده و کروماتین کم‌تر فشرده شده‌ای داشته و غنی از ژن هستند (غنی از بازهای G و C نیز می‌باشند).

Q-Banding: شبیه G است و برای شناسایی چند شکلی‌ها (Polymorphisms) یا استفاده می‌شود. این روش نیازمند میکروسکوپ فلوئورسانت است.

R-Banding: برای تشخیص ناهنجاری‌های کروموزوم x به کار می‌رود. در این روش کروموزوم‌ها را پیش از رنگ‌آمیزی، گرما می‌دهند و در آن جای باندهای تیره و روشن عوض می‌شود.

R-Banding برعکس G-Banding است، که در آن کروموزوم‌ها را حرارت داده و تحت تاثیر حرارتی که داده می‌شود، الگوی نواربندی کروموزوم‌ها برعکس می‌شود.

ISCN: موسسه ISCN، موسسه‌ای است که وظیفه نام‌گذاری و تعیین کدهایی برای نقاط خاصی بین کروموزوم‌ها را بر عهده دارد.

بازوی کوتاه را با حرف p نمایش می‌دهند و بازوی بلند را با حرف q . مثلا xq یعنی بازوی بلند کروموزوم x

در ISCN برای کروموزوم‌ها، region را ناحیه تعریف می‌کنند، در هر بازویی، تعداد خاصی ناحیه وجود دارد در هر ناحیه، باند ها قرار می‌گیرند. در برخی از کروموزوم‌ها، علاوه بر باندها، sub band ها نیز وجود دارند، به این مناطق کد داده می‌شود. برای مثال بازوی بلند کروموزوم x، ناحیه ۱. band ۲- و sub band ۳- (xq1.2.3)

شماره‌گذاری مناطق کروموزوم به این صورت است که شماره‌های کم‌تر نزدیک‌تر به سانترومر هستند و شماره‌های بیشتر در راس کروموزوم و دور از سانترومر قرار می‌گیرند (Esmaeili and Piravar, 2006). در این روش از اختصاراتی برای اصطلاحات استفاده می‌شود که هر کدام نشان‌دهنده یک حالت خاص است (جدول ۱).

جدول ۱: اختصارات برای اصطلاحات متداول

اصطلاح	اختصار	اصطلاح	اختصار
Deletion (حذف)	del	Derivative مشتق از کروموزوم دیگر	der
dicentric	dic	dup lication۲ برابر شدگی	dup
fragile siteنقاط شکننده	fra	Hetro chrematic	h
isochromosome	i	insernal: قرار گیری در داخل چیزی	ins
Inversionدرجه وارونگی	inv	Maternal origin	mat
short arm بازوی کوتاه	p	Long arm	q
ring	r	translocation: جابه جایی	t

R = گاهی کروموزوم‌ها انتهایشان (Telomere) را از دست می‌دهند و دو انتهای آن بهم متصل می‌شوند که به آنها کروموزوم‌های حلقوی گفته می‌شود.

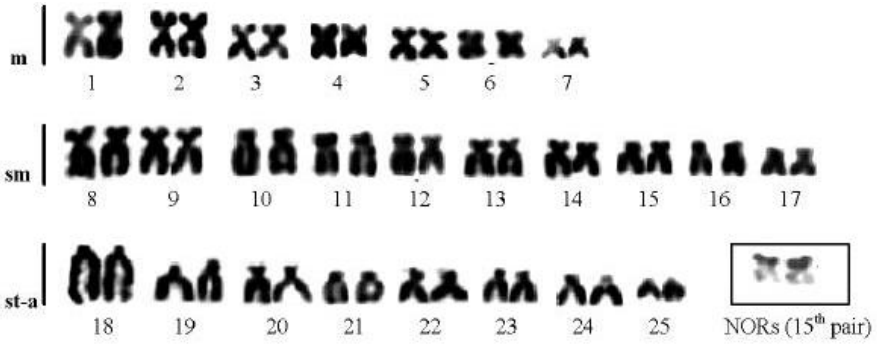
46,xx,del (5p) که به این صورت خوانده می‌شود: این کاریوتیپ مربوط به یک ژن با ۴۶ کروموزوم است، که یک deletion یا حذف بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ وی رخ داده است.

علامت « : » برای جداکردن شماره‌ی کروموزوم (chromosome number)، کروموزوم‌های جنسی (chromosome sex) به کار می‌رود. علامت « ; » زمانی که translocation و تغییرات کروموزومی بین کروموزوم‌ها باشد، این علامت استفاده می‌شود.

برای مثال: 46,xx,t(2;4) (q21;q21)

سازمان‌دهندگان هستکی (NORs)

این نواحی فرورفتگی‌های ثانویه‌ای هستند که دارای ژن‌های رمزدار کننده RNA های ریبوزومی جز rRNA5S می‌باشند و در تشکیل هستک دخالت دارند. پدیدار شدن فرورفتگی ثانویه به دلیل رونویسی بسیار فعال ژن‌های RNA های ریبوزومی است که آنها را از فرورفتگی‌های اولیه مشخص می‌سازد. در انسان سازمان دهندگان هستکی در فرورفتگی‌های ثانویه کروموزوم‌های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۲۱ و۲۲ قرار دارند که همه از کروموزم‌های آکروسانتریک و دارای ماهواره هستند. شکل ۲ کاریوتیپ ماهی کولی *(Alburnus filipii)* را نشان می دهد. در این گونه مناطق سازماندهی هستکی روی یک زوج کروموزوم ساب متاسنتریک قرار گرفته اند (شکل ۲).



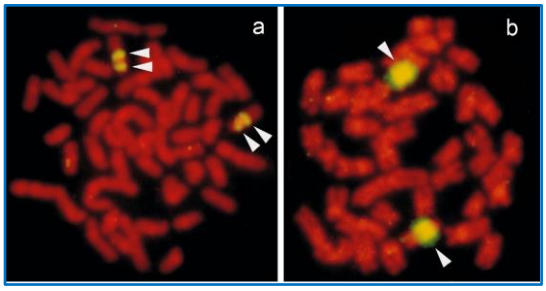
شکل ۲: کاریوتیپ ماهی کولی *Alburnus filipii* به روش رنگ آمیزی ساده و باندینگ NORs (اقتباس از Nazari *et al.*, 2009)

در سیتوژنیک مولکولی یا جدید بر اساس تکنیک‌های هیبریدیزاسیون hybridization از probe یا نشانگر استفاده می‌کنند.

پروب[1]: به توالی‌های خاص نوکلئوتیدی گفته می‌شود که مکمل یک نقطه خاص از DNA است و نشان‌دار می‌باشد. نشان‌دار کردن می‌تواند با مواد فلوئورسنت (که در FISH از آن استفاده می‌شود) صورت می‌گیرد (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶). در گذشته از ترکیبات رادیواکتیو برای این کار استفاده می‌کردند فرضاً برای بازوی بلند کروموزم x یک پروب طراحی می‌شود که دقیقاً مکمل آن است؛ مثلاً یک قطعه ۱۰۰۰۰ نوکلئوتیدی را با رنگ فلئورسنت نشان‌دار کرده‌اند حال اگر این پروب را روی یک لام کاریوتیپ اضافه

[1] Probe

کنیم، پروب به نقطه‌ای که مکمل خودش است متصل می‌شود و چون به رنگ فلوئورسنت متصل است در زیر میکروسکوپ فلئورسنت از خود نور تابش می‌کند، پس به راحتی می‌توان کروموزوم را زیر میکروسکوپ تشخیص داد (شکل ۳).در این روش نه تنها می‌توان تشخیص داد که تعدادکروموزوم‌ها تغییر یافته است، بلکه می‌توان تشخیص داد که برای یک قطعه از ژن، مونوزومی رخ داده یا حذف ژنی اتفاق افتاده است. مضاعف شدگی FISH هیبریدیزاسیون فلوئورسنت در جا (روی خود کروموزوم) اتفاق می‌افتد. این روش کمی پر هزینه است ولی روز به روز هزینه‌های آن کم‌تر شده و بیشتر در دسترس قرار می‌گیرد. این روش به خاطر نقطه ضعف‌هایی که کاریوتیپینگ دارد، مورد توجه است (Zhang *et al.*, 2005; Perazzo *et al.*, 2010). کاریوتیپینگ فقط در سلول‌های زنده و سلول‌های در حال تقسیم انجام می‌گیرد اما در مورد FISH لزومی به زنده بودن سلول نمی باشد. شکل ۳ کروموزوم های ماهیان کاراسیده را نشان می دهد که با استفاده از روش مولکولی رنگ آمیزی شده اند.



شکل ۳: رنگ آمیزی به شیوه مولکولی در ماهیان خانواده کاراسیده از ماهیان زینتی (اقتباس از Souza *et al.*, 2008)

تغییر در تلومرها

مراحل FISH (procedure)

پروب اختصاصی یک نقطه خاص در کروموزوم آماده و نشان‌دار می‌شود و به آن نقطه متصل می‌شود. یک کار جالب که در این فرایند انجام می‌دهند به نام Spectral Karyotyping (SKY) یعنی برای همه کروموزوم‌ها پروب درست می‌کنند اما با رنگ‌های فلوئورسنت مختلف. به این ترتیب اگر زیر میکروسکوپ نگاه کنیم، هر کروموزوم به یک رنگ دیده خواهد شد (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

کاربردهای FISH

از جمله کاربردهای این روش می توان به تشخیص ناهنجاری‌های تعدادی و ساختاری کروموزوم‌ها، تشخیص ناهنجاری‌های غیر قابل تشخیص با کاریوتیپ، حذف‌های نادیدنی با میکروسکوپ، تغییر حالت‌های طبیعی (Interphase FISH) aneuploidies و ... اشاره کرد. باید توجه داشت که موارد زیر را نمی‌توان به وسیله کاریوتیپینگ تشخیص داد امّا با FISH قابل تشخیص می‌باشند:

Micro deletion: ریز حذف‌ها، حذف‌های کوتاه با طول کم

Complex Translocation: جابه‌جایی‌هایی که خیلی پیچیده هستند (Xie *et al.*, 2010). به علاوه با این روش تغییرهای جهشی جدید تشخیص داده می شوند. همچنین برای یافتن ناهنجاری ها، مقایسه محتویات یک DNA نرمال و جمعیت سلول های توموری کاربرد دارد. لازم به ذکر است FISH در مدت زمان کمی انجام می گیرد، اما کاریوتیپینگ نیازمند مدت زمان طولانی در حدود ۱ هفته است. FISH هم می تواند متافازی باشد (یعنی روی لام کاریوتیپینگ انجام می گیرد) و هم می تواند اینترفازی بوده و در این حالت نیازی به تقسیم سلول نبوده و این عملیات می تواند روی کروماتین هم انجام گیرد.

پروب‌ها

- می‌توانند برای سانترومرها اختصاصی باشد و برای تشخیص aneuploidy در متافاز و اینترفاز به کار می‌رود
- می‌توانند برای یک کروموزوم تهیه شوند؛ مثل spectral karyotyping وتغییرات ساختاری کروموزوم‌ها در متافاز را مشخص می‌کند.
- می‌توانند برای یک ژن خاص اختصاصی با unique باشند، یعنی برای تشخیص یک gene خاص در مواردی مثل تشخیص باز آرایی‌ها[1]، deletion (حذف) یا amplification (تکثیر) به کار روند.
- برای متصل شدن به ناحیه sub telomeric و یا شناسایی حذف‌ها و باز آرایی‌های sub telomeric به کار می‌روند.

وقتی FISH برای یک سلول به کار می‌رود، ممکن است موارد زیر مشاهده شود:

- اگر ۲ نقطه روشن در هسته سلول مشاهده شود: سلول دیپلوئید
- اگر بیش از ۲ نقطه روشن مشاهده شود مثلا ۳ نقطه: insertion or Trisomy
- اگر کم تر از ۲ نقطه روشن (۱ نقطه) مشاهده شود: deletion یا Monoamy

منابع

حسینی، و.، کلباسی، م.، ۱۳۸۱. مطالعه کاریولوژیک ماهی انجک (*Scizothorax zarudnyi*) در منطقه زهک استان سیستان و بلوچستان. مجله علوم دریایی ایران. دوره دوم. شماره اول. زمستان ۸۱. ص ۲۱-۱۳.

[1] Rearrangments

سوانسون، ک.، مرتز، ت .، یانگ، و.، ۱۳۷۶. سیتوژنتیک، کروموزوم درحال تقسیم توارث و تکامل؛ ترجمه احمدیان تهرانی، پ. انتشارات دانشگاه تهران. ۷۲۰ صفحه.

Baruffaldi, A., lanzare, V., Cucchi, C., 1992. Utilization of Phytohemagglutinin (PHA) for in vivo karyological studies in teleost fish. Cytobios.70:49-52.

Benzaquem, D.C, Feldberg, E, Porto, J.I.R., Gross, M.C., Zuanon, J.A.S., 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (perciformes, cichlidae). Genetics and Molecular Biology 31(1): 250-255.

Brinn, M.N.A., Porto, J.I.R., Feldberg, E., 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (perciformes, cichlidae) in the amazon. Hereditas 141 (3): 252-257.

Cucchi, C. and Baruffaldi, A., 1989. A simple in vivo method for increasing mitoses in teleost fish. Cytobios, 60: 165-169.

Demirok, N.K., Unlu, E., 2001. Karyotypes of cyprinid fish *Capoeta trutta* and *Capeta capoeta umbla* (Cyprinidae) from the Tigris River. Turk.J.Zool.(25):389-393.

Esmaeili, H.R., Piravar, Z., 2006. Karyotype of Persian chub, *Petroleuciscus persidis* (Coad, 1981) (Actinopterigii: cyprinidae) from southern Iran. Turk.Zool.(30):137-139

Fan, Z, Fox, D., 1990. A new method for fish chromosome preparation. Journal of Fish Biology 37:553–561.

Foresti, F., Oliveira, C., Almeida- Toledo, L.F., 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia*. Vol.49 (9): 810-813.

Gross, M.C., Schneider, C.H., Valente, G.T, Porto, J.I.R, Martins, C, Feldberg, E. 2009. Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. Cytogenetic and Genome Research127 (1): 43-53.

Hartley, S.E., Horne, M.T., 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics. Journal of Fish Biology, Vol. 26(5). 575-582.

Iturra, P., Lam, N., De la Fuente, M., Vergara, N., 2001. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and Coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica 111: 125–131.

Kalbasi, M.R., Dorafshan, S., Tavakolian, T., Khazab, M., Abdolhay, H., 2006. Karyological analysis of endangered Caspian salmon, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Aquaculture research.vol 37. No.13.22..

Khoshkholgh, M.R., Alavi, A., Nazari, S., 2015. Karyotypic characterization of the pike (*Esox lucius*) from the south Caspian Sea basin. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* (IJAB), 11(1), 43-49.

Molina, W.F., 2001. An alternatived method of mitotic stimulation in fish cytogenetic. Chromosome science, 5(1): 149-152.

Nazari, S., Pourkazemi, M., Porto, J.I.R., 2009. Comparative cytogenetic analysis of two Iranian cyprinids *Alburnoides bipunctatus* and *Alburnus filippii* (*Cypriniformes: Ciprinidae*), with cytotaxonomic considerations. Iranian Journal of Animal Biosystematics (IJAB). Vol.5, No.2, 23-32.

Nazari, S., Pourkazemi, M., Porto, J.I.R., 2011. Chromosome description and localization of Nucleolus Organizing Regions by Ag-staining Technique *in Alburnus filippii* (Cyprinidae, Cypriniformes) of the south Caspian Sea Basin, Guilan, Iran. Iranian Journal of fisheries science Vol 10, No 2. 352-356.

Perazzo, G, Noleto, R.B., Vicari, M.R., Machado, P.C., Gava, A, Cestari, M.M., 2010. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. Reviews in Fish Biology and Fisheries 21 (3): 509-515.

Pourkazemi, M., Nazari, S., Bakhshalizade, S., 2010. Karyotype analysis in the white Bream (*Blicca bjoerkna*) from north coast of Iran. Iranian Journal of fisheries science. Vol. 9. No. 3.454-463.

Souza, IL., Santos-Silva, LK., Venere, P.C., Moreira-Filho O., 2008. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. Micron 39 (7): 1036-1041.

Xie, S., Khan, N., Ramanna, M.S., Niu, L., Marasek-Ciolakowska, A., Arens, P., van, Tuyl. J.M., 2010. An assessment of chromosomal rearrangements in neopolyploids of *Lilium* hybrids. Genome 53:439–446

Zhang, D., Yang, Q., Bao, W., Zhang, Y., Han, B., Xue, Y., Cheng, Z., 2005. Molecular cytogenetic characterization of the *Antirrhinum majus* genome. Genetics 169:325–335.