

سیتوژنیک و کاربرد آن در مطالعات آبزیان

حبيب الله گندمکار^۱، ابوالحسن راستیان نسب^۱، سجاد نظری^{*}^۱

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

*sajadnazari13@googlemail.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۴

چکیده

سیتوژنیک، علم مطالعه ساختمان کروموزوم‌ها می‌باشد. در این علم کروموزوم‌ها با استفاده از تکنیک‌های باندینگ (نوارگذاری) و یا شیوه‌های سیتوژنیک 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 باندینگ و نیز سیتوژنیک ملکولی شامل CGH و FISH است. در این مقاله گزارشی از بررسی‌های انجام شده و کاربرد سیتوژنیک در آبزیان از جمله آبزیان زینتی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

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

حالت باند باند شکل خواهد گرفت که به این حالت نواربندی گفته می‌شود. انواع مختلفی از روش‌های نواربندی وجود دارد. کاریوتیپ پایه سیتوژنیک قدیم^۴ است و امرزوze از تکنیک FISH (Fluorescent in situ Hybridization) استفاده می‌کنند.

تعريف کروموزوم

واژه کروموزوم 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). 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 گرچه 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 لوب دیده می‌شود. لوب‌ها توسط پروتئین‌های اتصالی به DNA که مناطق خاصی از DNA را تشخیص می‌دهند، پارچه‌ای می‌ماند. سپس در نهایت مراحل پیچ خورده‌گی 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 رنگ-آمیزی‌ها منجر به مشخص شدن تعداد و خصوصیات کروموزوم‌های هر گونه از موجودات زنده می‌گردد. که این خصوصیات تعدادی و مورفوژیک کروموزوم‌ها را کاریوتیپ می‌نامند (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

سانترومور

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

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; Khoshkhologh *et al.*, 2015 پایه‌ای از لحاظ تعداد، اندازه و مورفوژوژی کروموزوم‌ها را ارائه می‌دهد. همچنین می‌توان 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 دورگهای درون و بین گونه‌ای، مطالعه سیتوژنیکی 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 پلاک‌های متافازی (Metaphase plate) (Bibbster و در نتیجه انتخاب بهترین نمونه برای بررسی کاریوتیپ موجودات نقش مهمی در مطالعات سیتوژنیکی دارد (Baruffaldi *et al.*, 1992; Perazzo *et al.*, 2010) در سال‌های اخیر محققین از مواد مختلفی برای افزایش ضریب میتوز استفاده نموده اند، از جمله می‌توان به استفاده از کلرید کلسیم (CaCl₂) و کلرید کبالت (CoCl₂) (Cucchi & Baruffaldi, 1989)، فنیل هیدرازین (Cucchi & Baruffaldi, 1989) (Phenylhydrazin) Fan and Fox, 1990; Pourkazemi) (PHA (Munolan), *et al.*, 2010; Nazari *et al.*, 2011 آنتی-ژن‌های باکتریایی یا قارچی (Molina, 2001) اشاره نمود.

سیتوژنیک

سیتوژنیک 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^۱ یا ساختاری^۲ است. که این ناهنجاری‌ها در میتوژنیک هم شناسایی می‌شوند و هم مورد بحث قرار می‌گیرند (حسینی و کلباسی، ۱۳۸۱). علم سیتوژنیک در سال ۱۹۵۹ با شناسایی بیماری سندروم دادن (مونگولیسم یا ترنرو ۲۱) آغاز شد. در سال ۹۷۰ روش‌ها یا تکنیک‌های نواربندی^۳ روی کار آمد. تکنیک‌های نواربندی، تکنیک‌های هستند که بعد از اینکه از بیماران کاریوتیپ تهیه شد، کروموزوم‌ها را رنگ می‌کنند که بعد از رنگ-آمیزی این کروموزوم‌ها الگویی خواهند داشت که در آن یک

¹ Numberal

² Structural

³ banding

⁴ Conventional cytogenetic

تلومر

به انتهای کروموزوم‌ها تلومر گفته می‌شود.

وظایف تلومرها

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

۲- بعضی از سلول‌ها مثل سلول‌های سرتانی 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 انتهای بیش از دست می‌رود پس در هر دور تقسیم طول کروموزوم کوتاه‌تر می‌شود تا یک حد خاص این کوتاه‌شدن برای سلول قابل تحمل است بعد از اینکه به ژن‌ها رسید و این توالی‌های تکراری شونده 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 کروموزوم‌ها به ۳ دسته: Sub metacentric, acrocentric, metacentric می‌شوند.

در metacentric ها، سانترومر تقریباً وسط کروموزوم و کمی متمايل به بالا است. در acrocentric ها، سانترومر تقریباً در انتهای sub metacentric کروموزوم است یعنی نزدیک به تلومر، در سانترومر به طرف انتهای حرکت می‌کند و میل به انتهای دارد. Acrocentric ها در انتهای خود ماهواره^۱ دارند که در حقیقت نقاطی هستند که محل تجمع ژن‌های rRNAa یا RNA ریبوزومی است و تعداد کپی‌های آن هم زیاد است (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

نحوه تهیه گسترش کروموزومی و کاربیوتیپ

برای اینکه کاربیوتیپ تهیه کنند ابتدا به موجود آبری ترکیبی به نام Phytohaemagglutinin (این ترکیب القا کننده میتوز می‌باشد) تزریق می‌کنند. تحت تاثیر این ماده لنفورسیت‌های خون محیطی

شروع به تقسیم شدن می‌کنند، حدود ۱۰ ساعت در دمای محیط این عمل را انجام می‌دهند. سپس ترکیباتی نظیر کلسミد^۲ یا کلشی سین^۳ (متداول) یا به آبری 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؛ اما 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^۴ به سلول اضافه می‌کنند. محلول هیپوتونیک، محلولی است که باعث آماس سلول می‌شود. به طور کلی محلول‌ها به ۳ دسته هیپوتونیک، هیپوتونیک و ایزوتونیک تقسیم می‌شوند. ایزوتونیک محلولی است که دقیقاً مانند سلول باشد، هیپوتونیک 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. اما 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، آنزیم‌ها 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 مسؤول باید ساعتها زیر میکروسکوپ را نگاه کند تا بتواند یک کروموزوم اضافه، یک ناهنجاری و یا یک ریزکروموزوم را پیدا کند. اما 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 کاربیوتیپ تهیه می‌شود. شکل ۱ نمونه‌ای از گسترش کروموزومی ماهی سیم سفید را پس از رنگ‌آمیزی به روش رنگ‌آمیزی گیمسا نشان

² colcemid

³ colchicin

⁴ hypotonic

۴۰۰ باند به ازای یک ژنوم‌ها پلولید وجود خواهد داشت. هر باند برابر با 10^{-5} مگا باز (Mega base) است. در تکنیک‌های با کیفیت بالا تا 800 باند در هر هاپلوئید دیده می‌شود که کروموزوم‌ها را در مرحله پروفاز متوقف می‌کنند. برای این منظور از متوروکسات استفاده می‌شود. در G banding نوارهای تیره فاقد ژن بوده و یا از لحاظ ژنی فقیر هستند. در این روش رنگ آمیزی به کروموزوم‌ها ظاهر نواربندی دارند؛ چرا که رنگ گیمسا فقط DNA را در محل غنی از باز A و T رنگ آمیزی می‌کند.

مناطقی از کروموزوم که در G banding تیره دیده می‌شوند، در اوخر 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 شکل‌ها (Polymorphisms) یا استفاده می‌شود. این روش نیازمند میکروسکوپ فلورسانس است.

R-Banding: برای تشخیص ناهنجاری‌های کروموزوم X به کار می‌رود. در این روش کروموزوم‌ها را پیش از رنگ آمیزی، گرمایی دهنده و در آن جای باندهای تیره و روشن عوض می‌شود. R-Banding G-Banding برعکس است، که در آن کروموزوم‌ها را حرارت داده و تحت تاثیر حرارتی که داده می‌شود، الگوی نواربندی کروموزوم‌ها بر عکس می‌شود.

ISCN: موسسه ای 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. مثلاً $q\text{q}$ یعنی بازوی بلند کروموزوم X در ISCN برای کروموزوم‌ها، region را ناحیه تعريف می‌کنند، در هر بازویی، تعداد خاصی ناحیه وجود دارد در هر ناحیه، باند‌ها 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 band ۳ (xq1.2.3)

شماره‌گذاری مناطق کروموزوم به این صورت است که شماره‌های کم‌تر نزدیک‌تر به سانتروم هستند و شماره‌های بیشتر در راس کروموزوم و دور از سانتروم 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).

می‌دهد. امروزه نرم‌افزارها همه‌ی این کارها را انجام می‌دهند و فایل را برای ما آماده می‌کنند. پس از آماده شدن کاربیوتیپ به دنبال کروموزوم‌های جنسی و ناهنجاری تری زومی و ... می‌توان گشت. در زمان افتادن سلول‌ها بر روی لام می‌توان سیاری 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 کروموزوم‌ها

روش‌های رنگ آمیزی برای شناسایی کروموزوم‌ها به کار می‌رود. انواع رنگ آمیزی‌ها به شرح زیر می‌باشند:

G banding (Giemsa)

Q banding (Quinacrine)

R banding (Renerse)

Centromeric (Teterochromatine) (C banding)

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

C-Banding: برای تشخیص سانتروم (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 می‌گیرد.

F-diagram: بعد از روی کار آمدن G-banding و مشخص شدن 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 می‌نمایند.

جدول ۱: اختصارات برای اصطلاحات متداول

اختصار	اصطلاح	اختصار	اصطلاح
der	Mشتق از کروموزوم دیگر	del	(حذف) Deletion
dup	برابر شدگی duplication	dic	dicentric
h	Hetro chrematic	fra	نقاط شکننده fragile site
ins	قرار گیری در داخل چیزی: insernal	i	isochromosome
mat	Maternal origin	inv	Inversion درجه وارونگی
q	Long arm بازوی کوتاه	p	short arm بازوی کوتاه
t	translocation چابه جایی:	r	ring

سازمان دهنگان هستکی (NORs)

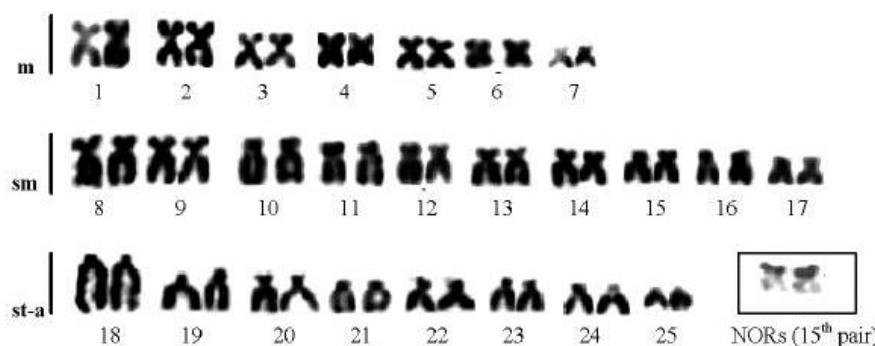
این نواحی فرورفتگی‌های ثانویه‌ای هستند که دارای ژن‌های رمزدار کننده RNA های ریبوzومی جز rRNA5S می‌باشند و در تشکیل هستک داخلت دارند. پدیدار شدن فرورفتگی ثانویه به دلیل رونویسی بسیار فعال ژن‌های RNA های ریبوzومی است که آنها را از فرورفتگی‌های اولیه مشخص می‌سازد. در انسان سازمان دهنگان هستکی در فرورفتگی‌های ثانویه کروموزوم‌های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۲۱ و ۲۲ قرار دارند که همه از کروموزوم‌های آکروسانتریک و دارای ماهواره هستند. شکل ۲ کاریوتیپ ماهی کولی (*Alburnus filipii*) را نشان می‌دهد. در این گونه مناطق سازماندهی هستکی روی یک زوج کروموزوم ساب متسانتریک قرار گرفته اند (شکل ۲).

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

شکل ۲ 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 شماره کروموزوم (chromosome number) از کروموزوم‌های جنسی (chromosome sex) به کار می‌رود. علامت «;» زمانی که تغییرات کروموزومی بین کروموزوم‌ها باشد، این علامت استفاده می‌شود.

برای مثال: 46,xx,t(2;4) (q21;q21)



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

می‌تواند با مواد فلورئسنت (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 نشان دار کرده‌اند حال اگر این پروب را روی یک لام کاریوتیپ اضافه

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

پروب^۱ به توالی‌های خاص نوکلئوتیدی گفته می‌شود که مکمل یک نقطه خاص از DNA است و نشان دار می‌باشد. نشان دار کردن

^۱ Probe

نمی‌توان به وسیله کاریوتیپینگ تشخیص داد اما 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 می‌شوند. همچنین برای یافتن ناهنجاری‌ها، مقایسه محتویات یک DNA نرمال و جمعیت سلول‌های توموری کاربرد دارد. لازم به ذکر است FISH در مدت زمان کمی انجام می‌گیرد، اما کاریوتیپینگ نیازمند مدت زمان طولانی در حدود ۱ هفته است. هم می‌تواند متافازی باشد (یعنی روی لام کاریوتیپینگ انجام می‌گیرد) و هم می‌تواند اینترفالزی بوده و در این حالت نیازی به تقسیم سلول نبوده و این عملیات می‌تواند روی کروماتین هم انجام گیرد.

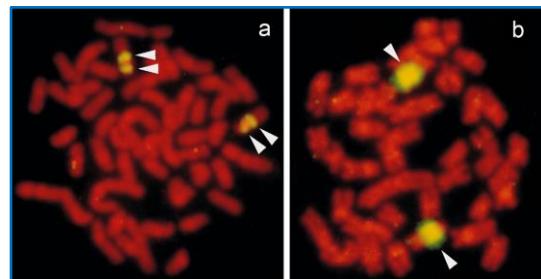
پروپوها

- می‌توانند برای سانتروم‌ها اختصاصی باشد و برای تشخیص می‌توانند برای aneuploidy در متافاز و اینترفالز به کار می‌روند
- می‌توانند برای یک کروموزوم تهیه شوند؛ مثل spectral karyotyping و تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها در متافاز را مشخص می‌کند.
- می‌توانند برای یک ژن خاص اختصاصی با unique gene خاص در مواردی مثل تشخیص باز آرایی‌ها^۱، deletion (حذف) یا amplification (تکثیر) به کار روند.
- برای مشاهده شدن به ناحیه telomeric sub 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 مثلاً ۳ نقطه: insertion or Trisomy
 - اگر کمتر از ۲ نقطه روشن (۱ نقطه) مشاهده شود: deletion
 - 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 ۱۳-۲۱ ص. ۸۱-۱۳.

کنیم، پروب به نقطه‌ای که مکمل خودش است متصل می‌شود و چون به رنگ فلئورسنت 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 تعداد کروموزوم‌ها تغییر یافته است، بلکه می‌توان تشخیص داد که قطعه از ژن، مونوزوم رخ داده یا حذف ژنی اتفاق افتاده است. مضاعف شدگی FISH هبیریدیزیاسیون فلئورسنت در جا (روی خود کروموزوم) اتفاق می‌افتد. این روش کمی پرهزینه 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 نمی‌باشد. شکل ۳ 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 (procedure) FISH

پروب اختصاصی یک نقطه خاص در کروموزوم آماده و نشان دار 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 فلئورسنت 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 می‌توان به تشخیص ناهنجاری‌های تعدادی و ساختاری کروموزوم‌ها، تشخیص ناهنجاری‌های غیر قابل تشخیص با کاریوتیپ، حذف‌های نادیدنی با میکروسکوپ، تغییر حالت‌های طبیعی (Interphase FISH) و ... اشاره کرد. باید توجه داشت که موارد زیر را aneuploidies

^۱ Rearrangements

- 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..
- Khoshkhogh, 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 alternative 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, I.L., Santos-Silva, L.K., 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.
- سوانسون، ک.، مرتن، ت.، یانگ، و.، ۱۳۷۶.** سیتوژنتیک، کروموزوم در حال تقسیم توارث و تکامل؛ ترجمه احمدیان تهرانی، پ. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۲۰ صفحه.
- Baruffaldi, A., Ianzare, 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 *Capoeta capoeta umbra* (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 *Sympphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research* 127 (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.