



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

# تهیه کاریوتیپ از سلول های خونی انسان

# مقدمه

کاریوتیپ (Karyotype) به مجموعه ای از کروموزوم ها که با توجه به تعداد، شکل، اندازه و موقعیت سانترومر آن ها و هر نوع تفاوت در ویژگی کروموزوم های غیر جنسی و جنسی منظم شده اند گفته می شود.

معمولا بزرگترین کروموزوم را در کاریوتیپ با شماره ۱ می نامند و به همین ترتیب از بزرگ به کوچک شماره کروموزوم ها افزایش می یابد. در انسان اگر ۴۶ کروموزوم برحسب شکل و اندازه ظاهری مرتب شوند مشخص می گردد که این کروموزوم ها دوتا دوتا از نظر شکل و اندازه شبیه به هم هستند و با این نظم و ترتیب می توان کاریوتیپ را در انسان تنظیم نمود. امروزه مشخص شده است که علت بسیاری از بیماری های ژنتیکی اختلال در وضعیت کروموزوم هاست. کم و زیاد شدن و یا جابجایی بین آن ها باعث ایجاد بیماری و مشکلات متعددی در انسان می شود.

# مقدمه

بنابراین تهیه کاریوتیپ و چیدمان کروموزوم ها در کنار هم و مقایسه آن ها با فرد طبیعی برای ارزیابی نرمال بودن کروموزوم ها در بعضی از موارد ضرورت دارد. برای مثال در بررسی بیماری های ژنتیکی مثل سندرم داون، کلاین فلتر با تهیه ی کاریوتیپ ناهنجاری های کروموزومی بررسی می شود. این ناهنجاری ها می تواند ناهنجاری های عددی یا ساختاری باشد. از ۲۳ جفت کروموزوم انسان ۲۲ جفت کروموزوم غیر جنسی و یک جفت کروموزوم جنسی می باشد. کروموزوم ها تنها در مرحله متافاز از تقسیم سلولی میتوز برای تهیه کاریوتیپ مناسب می باشند.



# انجام آزمایش کاریوتیپ در چه مواردی توصیه می شود

جهت تشخیص، درمان و یا پیشگیری از بروز برخی از اختلالات ژنتیکی بایستی کاریوتیپ از شخص مورد نظر تهیه شود که معمولاً شامل موارد زیر می باشد:

- ۱- وجود اختلالات کروموزومی واضح در والدین، در فرد و در بستگان درجه یک.
- ۲- تعیین جنسیت در مواردی که جنسیت فرد مورد سؤال است و ابهام جنسی دارد یا وجود اندام تناسلی غیر طبیعی .
- ۳- زوجینی که سقط های مکرر داشته اند.
- ۴- خانواده هایی که دارای یک فرزند مبتلا به ناهنجاری های کروموزومی هستند.
- ۵- افراد با داشتن سابقه نازایی.

# انجام آزمایش کاریوتیپ در چه مواردی توصیه می شود

۶- افراد با داشتن سابقه مرده زایی و یا مرگ بعد از تولد بدون دلیل.

۷- در مواردی که فرد مشکلاتی مانند کوتاهی یا بلندی قد غیر طبیعی دارد و یا اندازه و حالت دست ها و پاها و صورت و گوش و سایر اعضا بدن غیر طبیعی می باشد.

۸- در مواردی که در خانواده و بستگان نزدیک افراد کم توان ذهنی بدون دلیل شناخته شده ای وجود داشته باشد.

۹- تأخیر در رشد.

۱۰- وجود علائم ظاهری مشکوک در فرد.

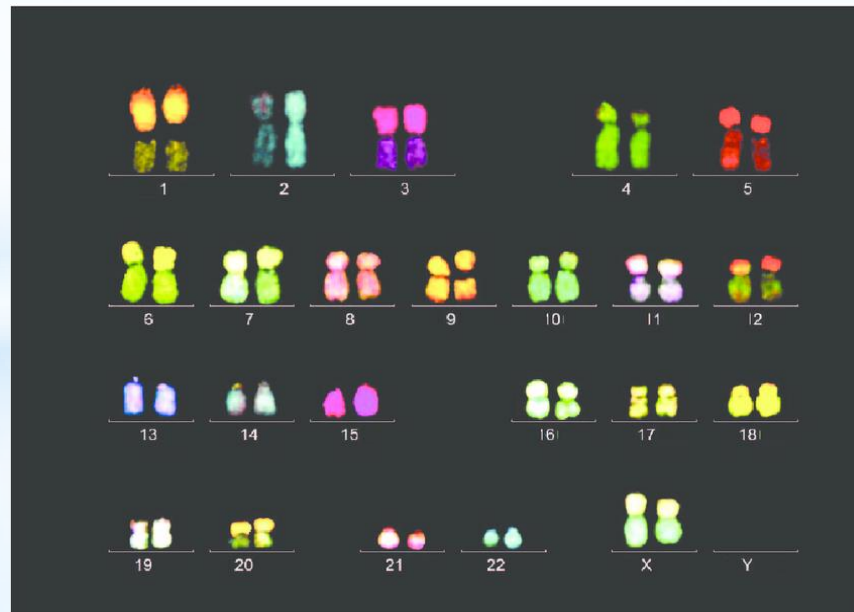
۱۱- تشخیص اختلالات در جنین قبل از زایمان.

۱۲- در موارد سرطان خون.

# انتخاب نمونه مناسب جهت انجام آزمایش کاریوتیپ

برای انجام آزمایش کاریوتیپ باید از سلول هایی استفاده شود که قابلیت رشد و تقسیم سریع داشته باشند.

مناسب ترین سلول گلبول سفید به ویژه لنفوسیت است. نمونه های دیگر مورد استفاده، مایع آمنیوتیک، مغز استخوان، عضله و دیگر سلول های زنده بدن می باشند. نمونه های خون و مایع آمنیوتیک بیشتر از سایر موارد مورد استفاده قرار می گیرند.

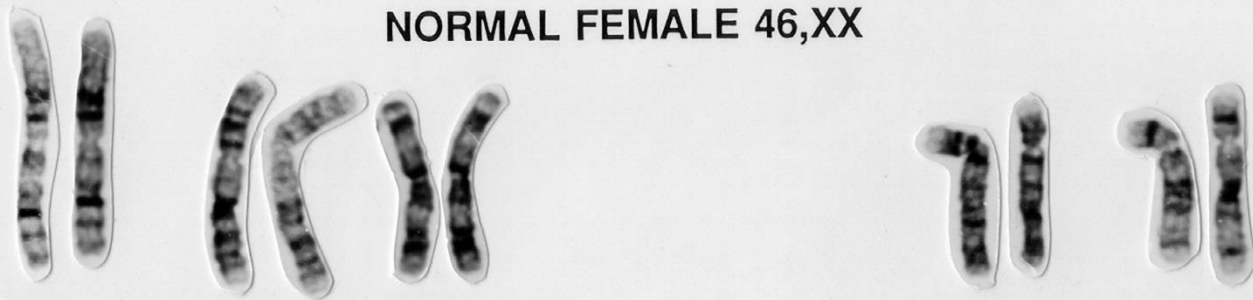




کاریوتیپ لنفوسیت که نشان می دهد کروموزوم ۸ حذف شده



**NORMAL FEMALE 46,XX**



1 2 3 4 5



6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18

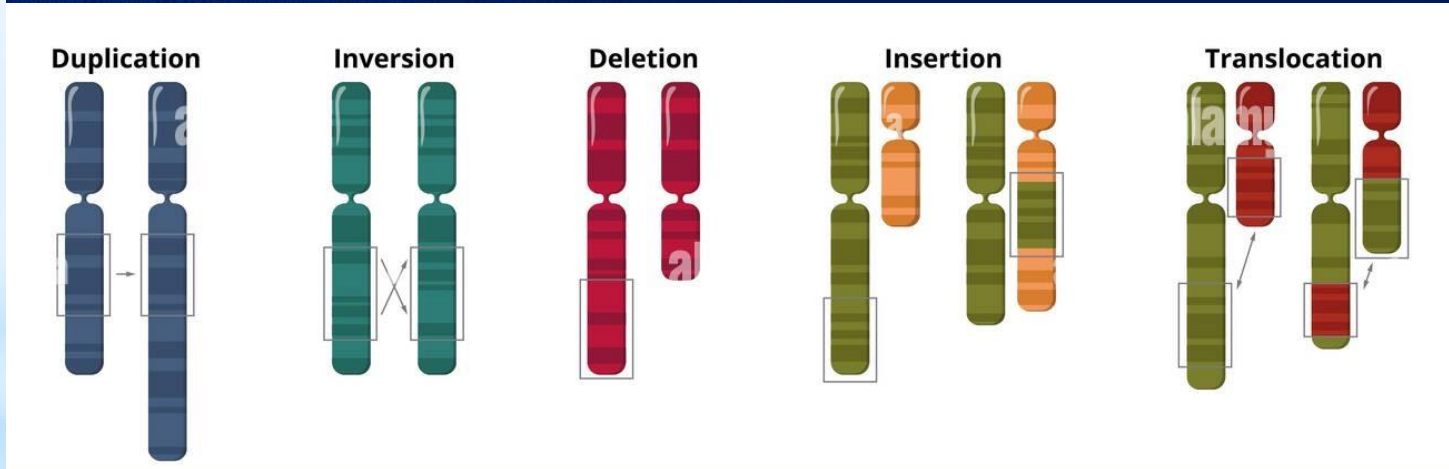
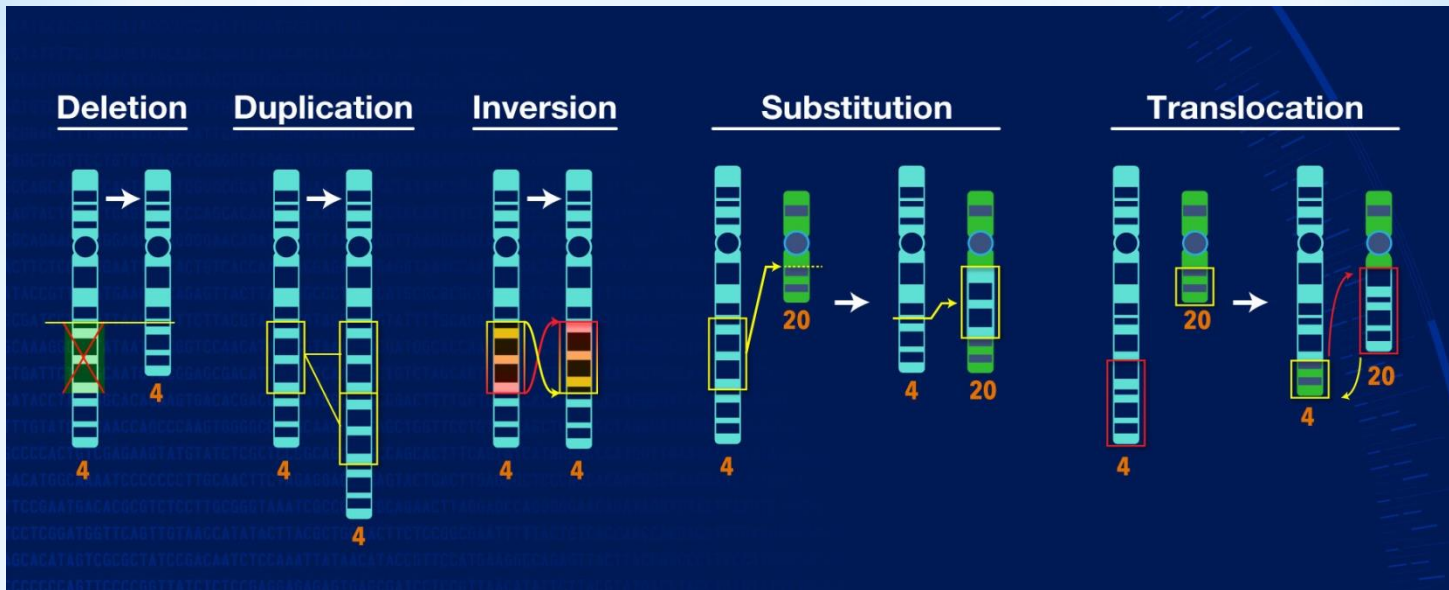


19 20 21 22 X X

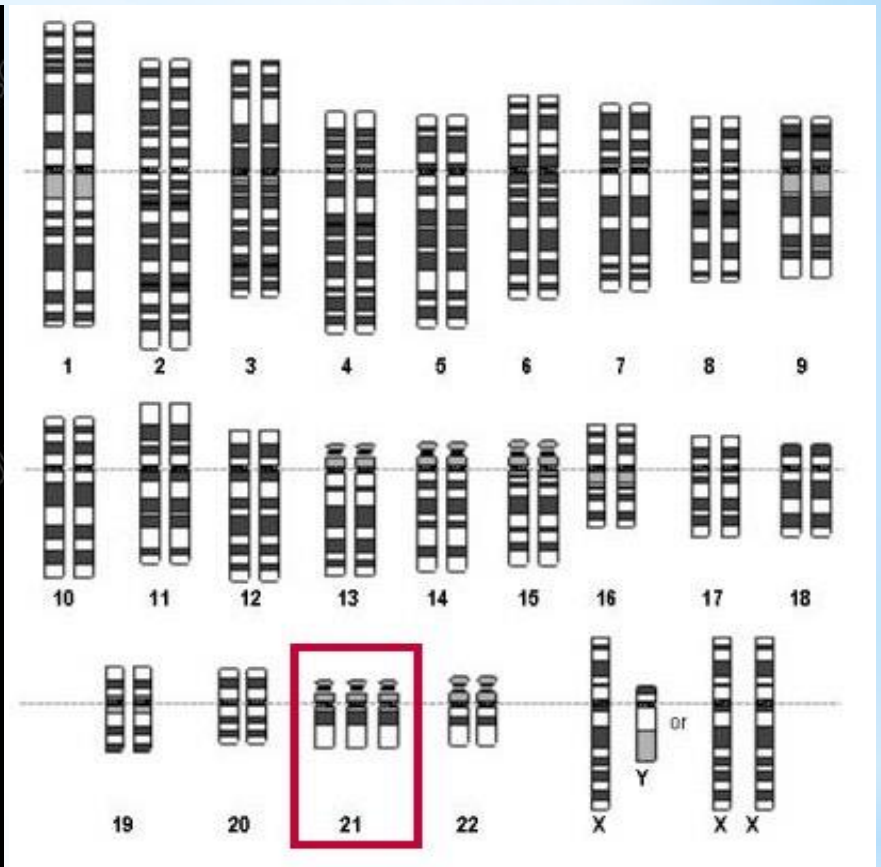
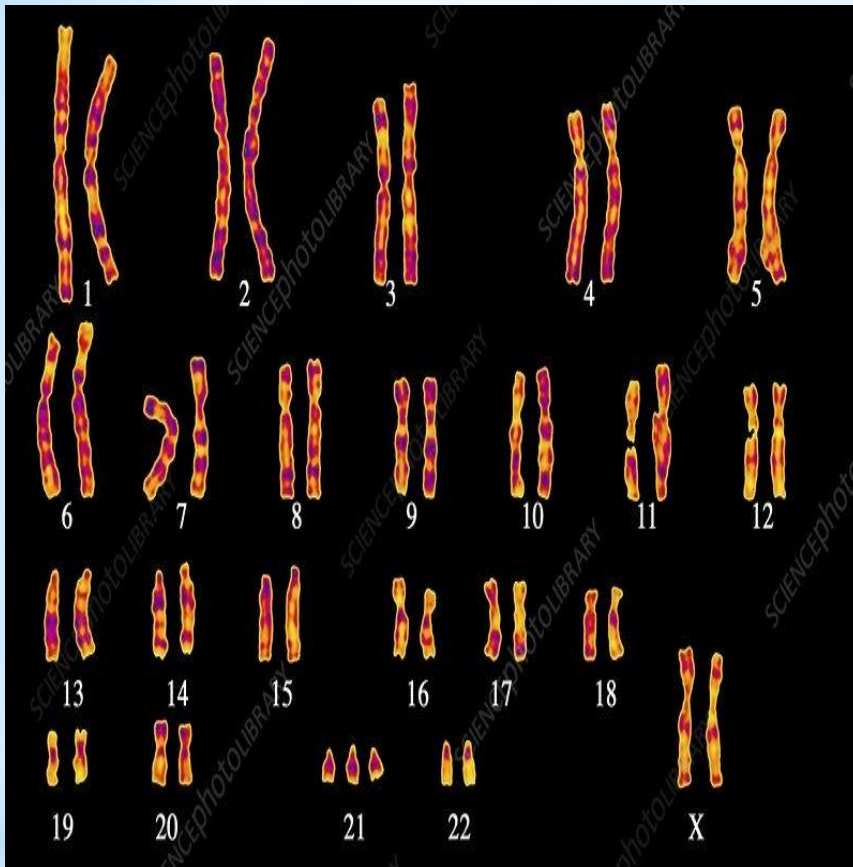
# اختلالات کروموزومی مشخص شده در آزمایشات کاریوتیپ

پس از آماده سازی کاریوتیپ در آزمایشگاه می توان آن را با کاریوتیپ فرد نرمال مقایسه کرد و اختلالات زیر را تشخیص داد:

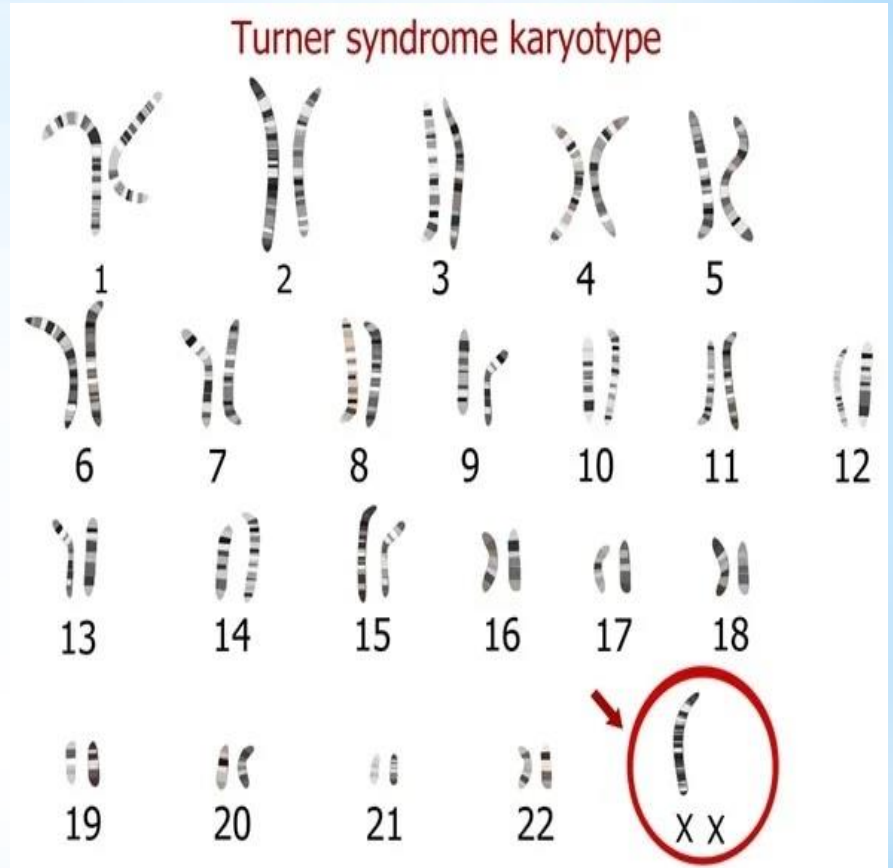
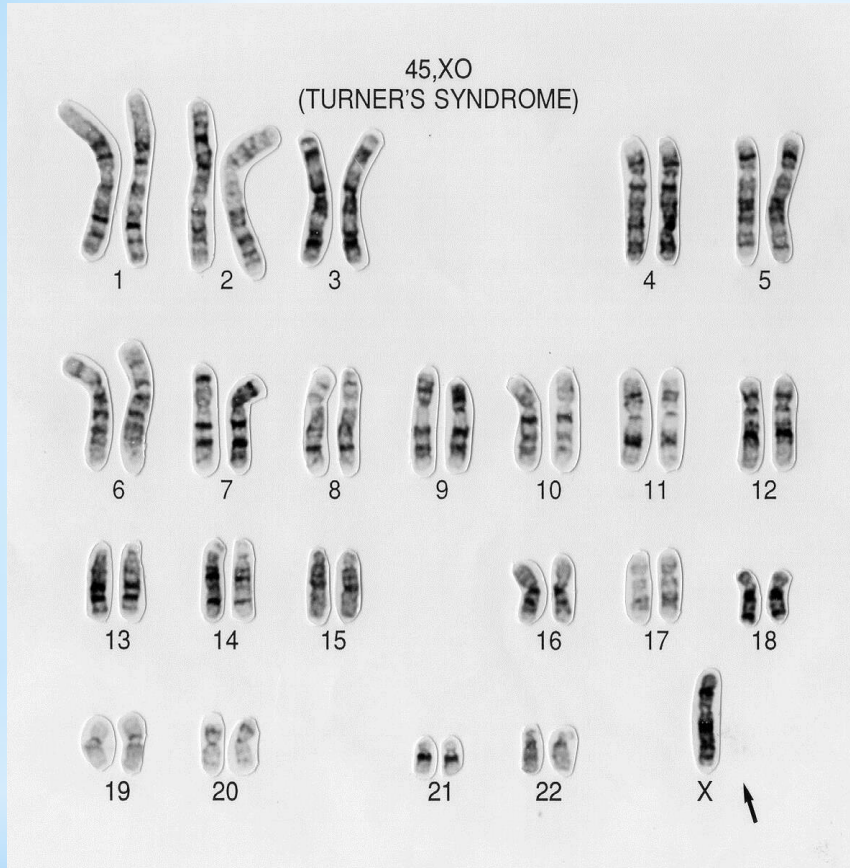
- ۱- وجود کروموزوم اضافی و تعیین شماره ی آن کروموزوم.
- ۲- کمبود کروموزوم و تعیین شماره ی آن کروموزوم.
- ۳- نبودن بخشی از کروموزوم.
- ۴- وجود بخش اضافی در کروموزوم.
- ۵- جدا شدن بخشی از یک کروموزوم و وصل شدن آن به کروموزوم دیگر.



انواع اختلالات کروموزومی



کاربوتیپ سندرم داون که یک کپی اضافه از کروموزوم ۲۱ رخ می دهد



کاریوتیپ سندرم ترنر که نوزادان دختر به جای داشتن دو کروموزوم X یک عدد دارند



مواد و وسایل مورد نیاز

# مواد و وسایل مورد نیاز

۱. خون تام
۲. محلول هیپوتونیک (Hypotonic)
۳. محلول NaCl غلیظ
۴. فیتوهماتوگلوٹین (Phytohematoglutin)
۵. هپارین (Heparin)
۶. کولسمید (Colsimid)
۷. محلول گیسما
۸. قیچی
۹. دوربین عکاسی
۱۰. لام و لامل

# روش کار

نمونه‌ای از خون وریدی را گرفته و به وسیله اضافه کردن هپارین از انعقاد آن جلوگیری کنید. نمونه را در یک محیط غلیظ NaCl قرار داده و در دور پایین سانتریفوژ کنید. در این حالت گلبول‌های قرمز و گرانولوسیت‌ها در ته لوله سانتریفوژ قرار می‌گیرند. اما سلول‌های تک‌هسته‌ای مثل آگرانولوسیت‌ها یا لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها) در رو قرار می‌گیرند.

سپس سلول‌های تک‌هسته‌ای را به مدت ۳ تا ۴ روز در یک محیط کشت حاوی یک ماده محرک تقسیم مانند فیتوهماتوگلوترین کشت دهید، تا در این محیط لنفوسیت‌ها به شدت تقسیم شوند. به این محیط کمی کولسمید نیز اضافه کنید.

در پایان مرحله کشت جمعیت زیادی از سلول‌های تقسیم‌شده وجود دارد. داروی کولسمید با تخریب دوک‌های تقسیم مانع از کامل شدن تقسیم سلول‌ها می‌شود و سلول‌ها تا مرحله متافاز پیش می‌آیند و در این مرحله متوقف می‌شوند و در این حالت جمعیت بزرگی از سلول‌های متافازی در اختیار دارید.

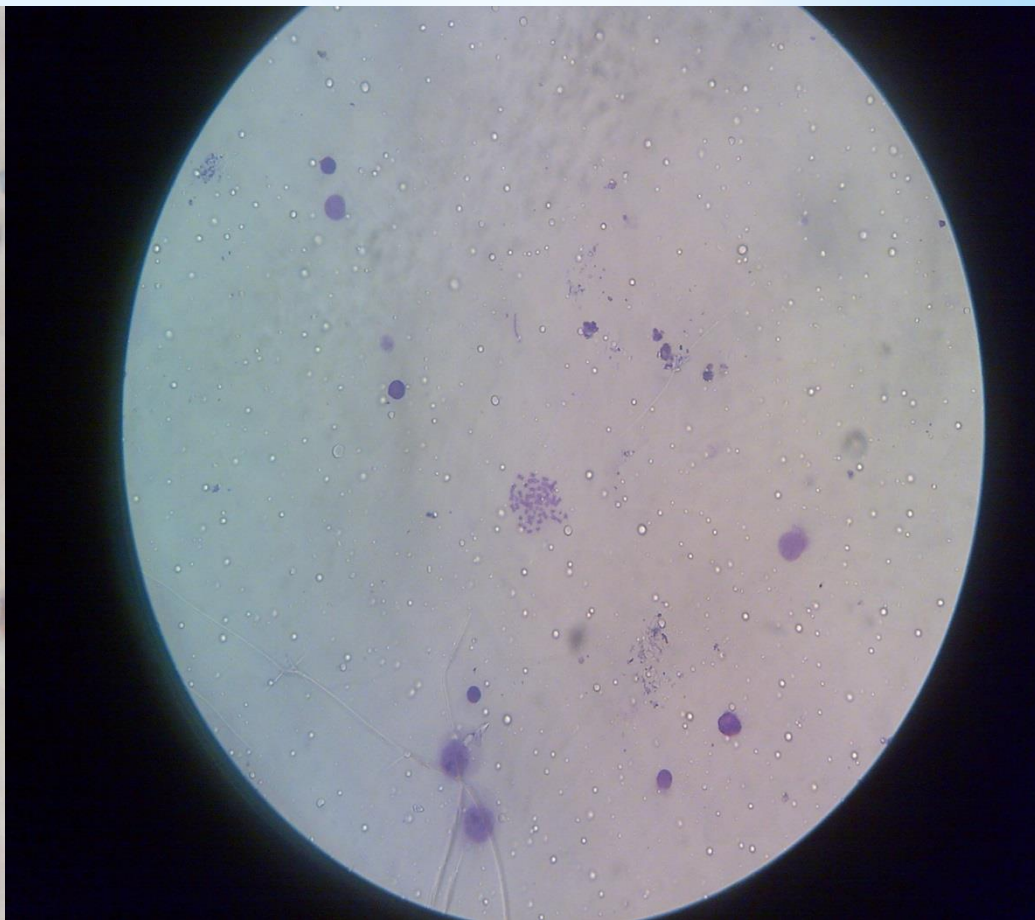
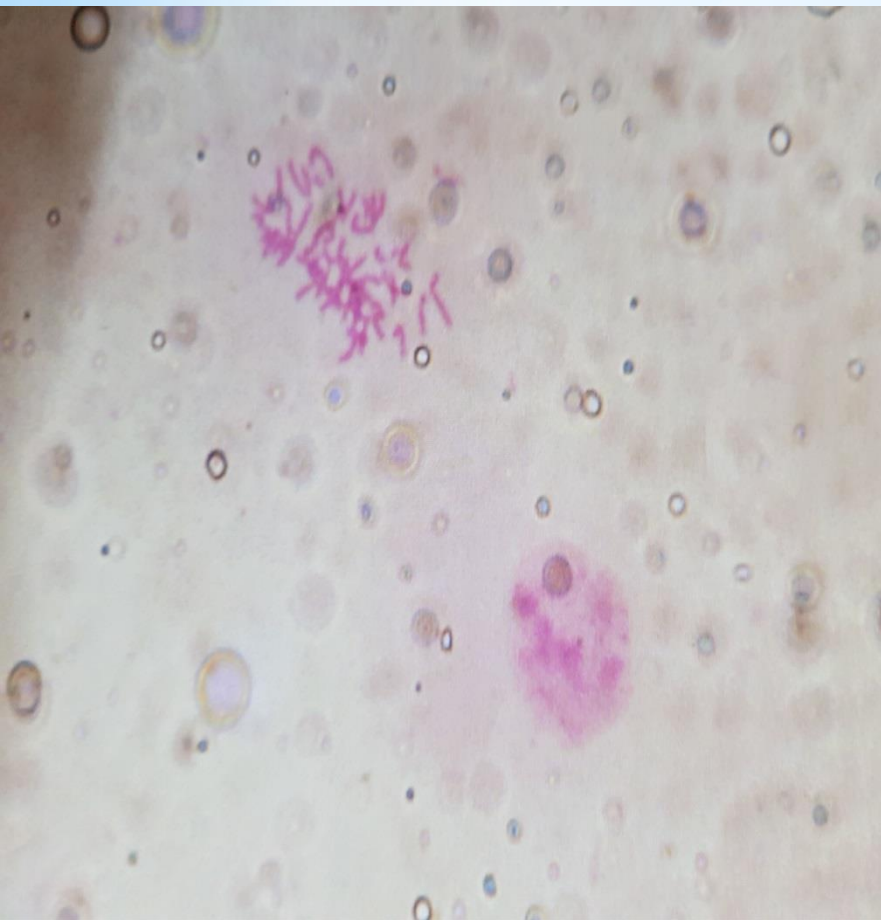


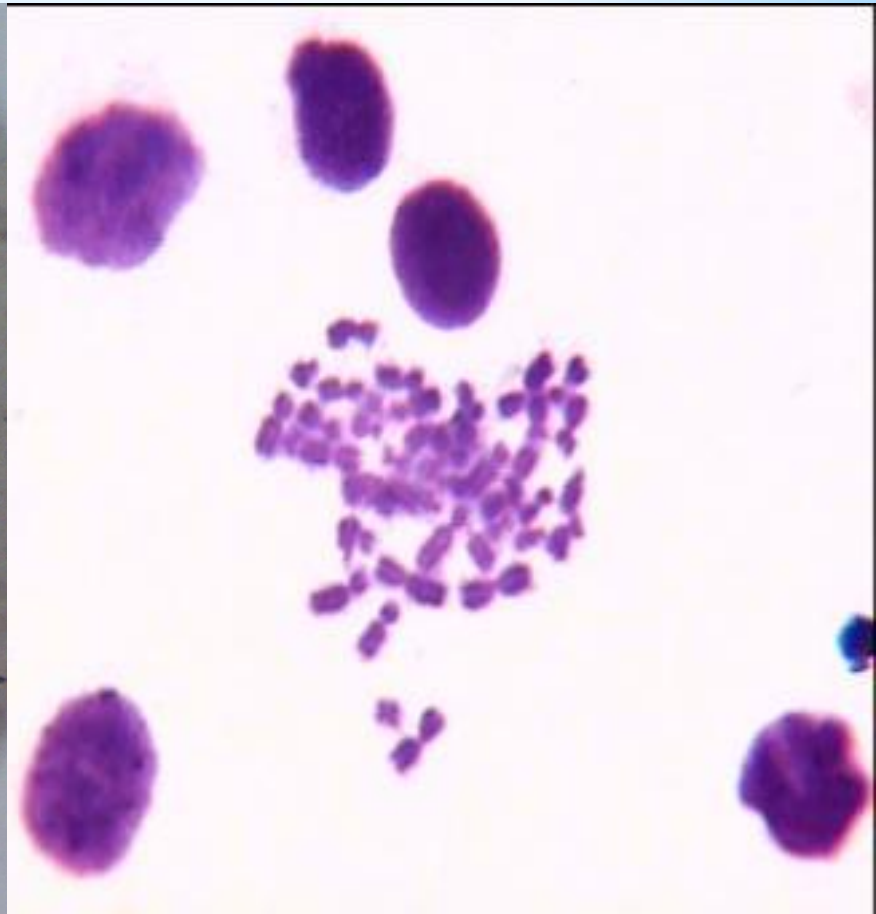
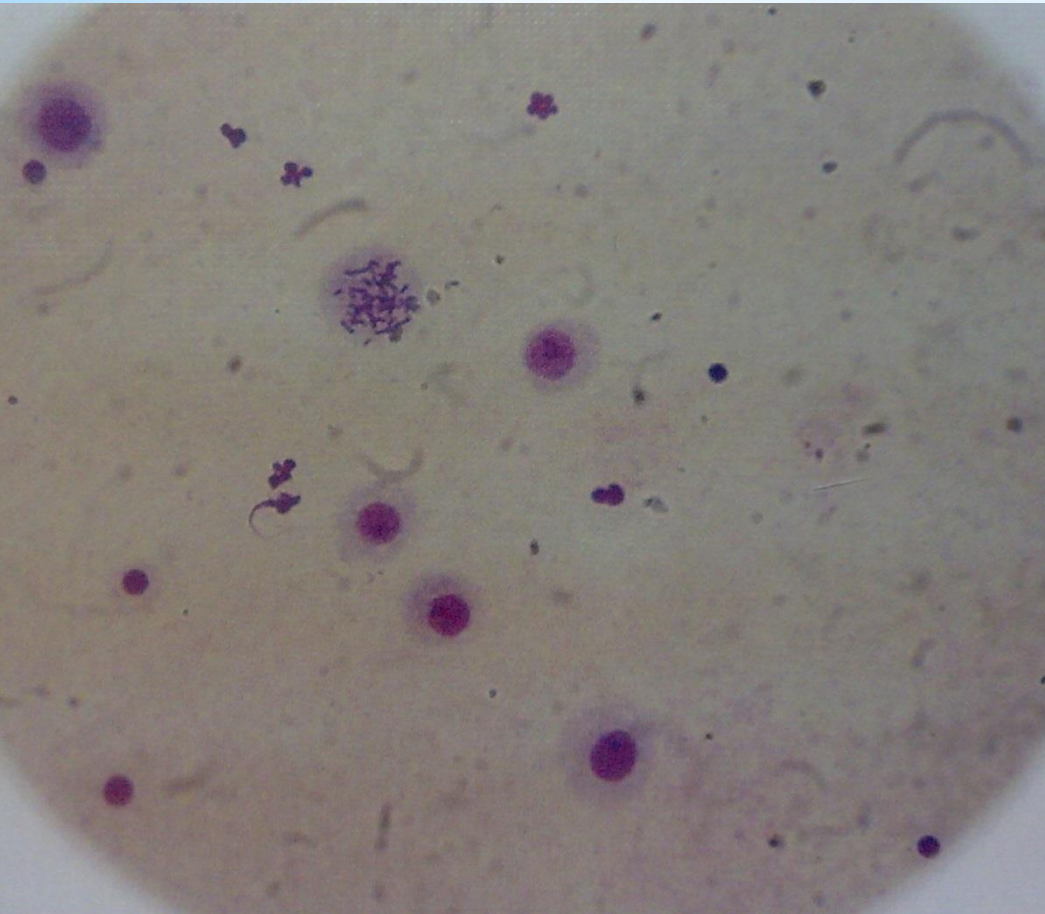
# روش کار

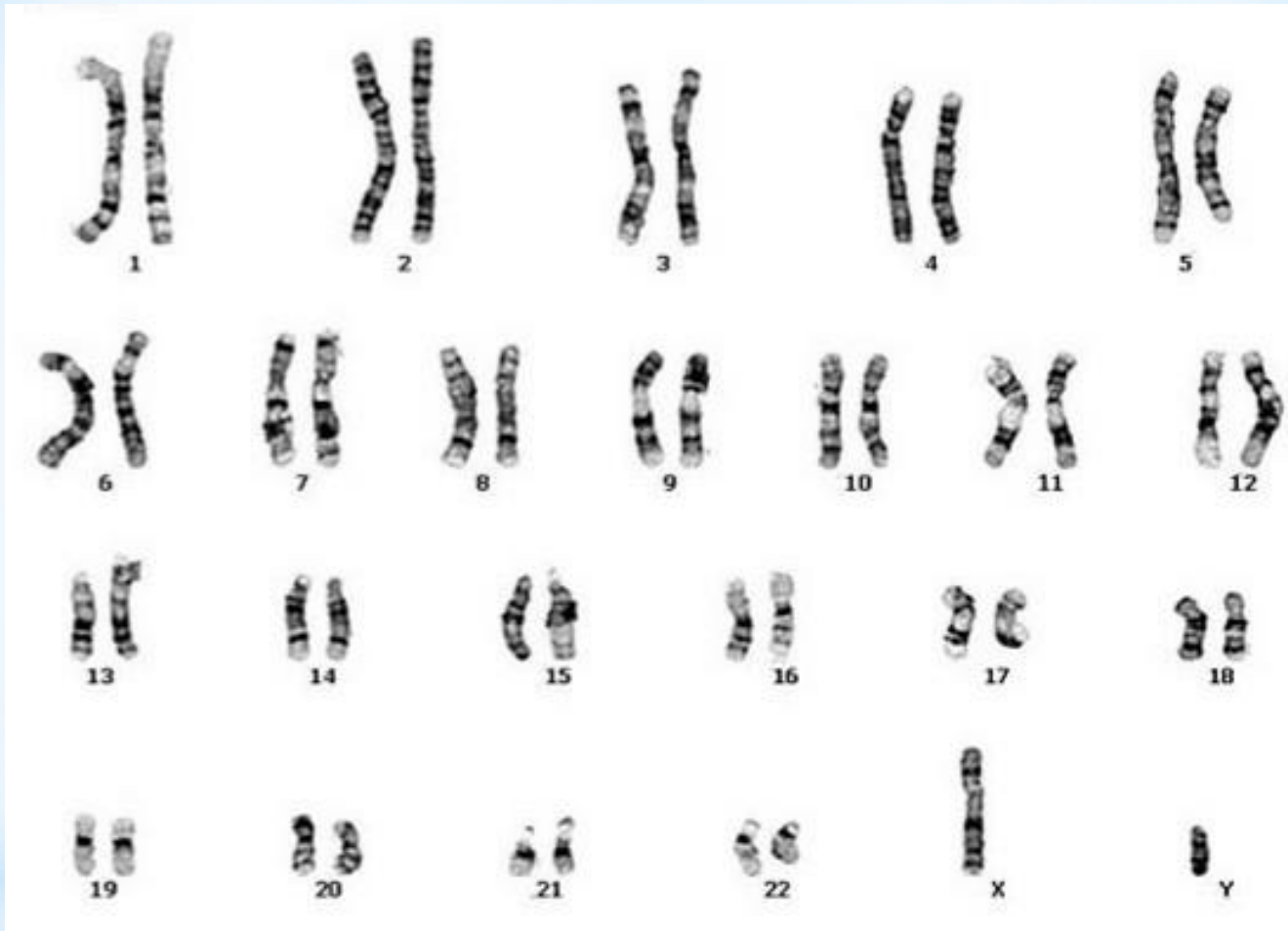
لنفوسیت‌های به وجود آمده را در یک محلول هیپوتونیک خفیف قرار دهید تا طبق پدیده اسمز، آب جذب کرده و متورم شوند. هسته‌ها نیز متورم می‌شوند، در نتیجه کروموزوم‌ها بر روی یکدیگر قرار نگرفته و از یکدیگر فاصله می‌گیرند. سلول‌های متورم را فیکس کرده و بر روی یک لام قرار داده و آن را در دمای محیط خشک کنید.

پس از خشک شدن لام، آنها را به وسیله رنگ گیمسا، رنگ آمیزی کنید. سلول‌های زیادی وجود دارد. در میان آنها دنبال سلول مناسبی بگردید تا در آن کروموزوم‌ها خوب گسترده شده باشند و نه خیلی بلند و نه خیلی فشرده و نه اینکه بر روی همدیگر افتاده باشند. در مرحله بعد از آنها عکس بگیرید. سپس تصاویر کروموزوم‌ها را قیچی کرده و آنها را مرتب کنید (امروزه این کار با کامپیوتر انجام می‌گیرد) و جفت جفت در کنار یکدیگر قرار دهید تا کاریوتیپ فرد تهیه شود.

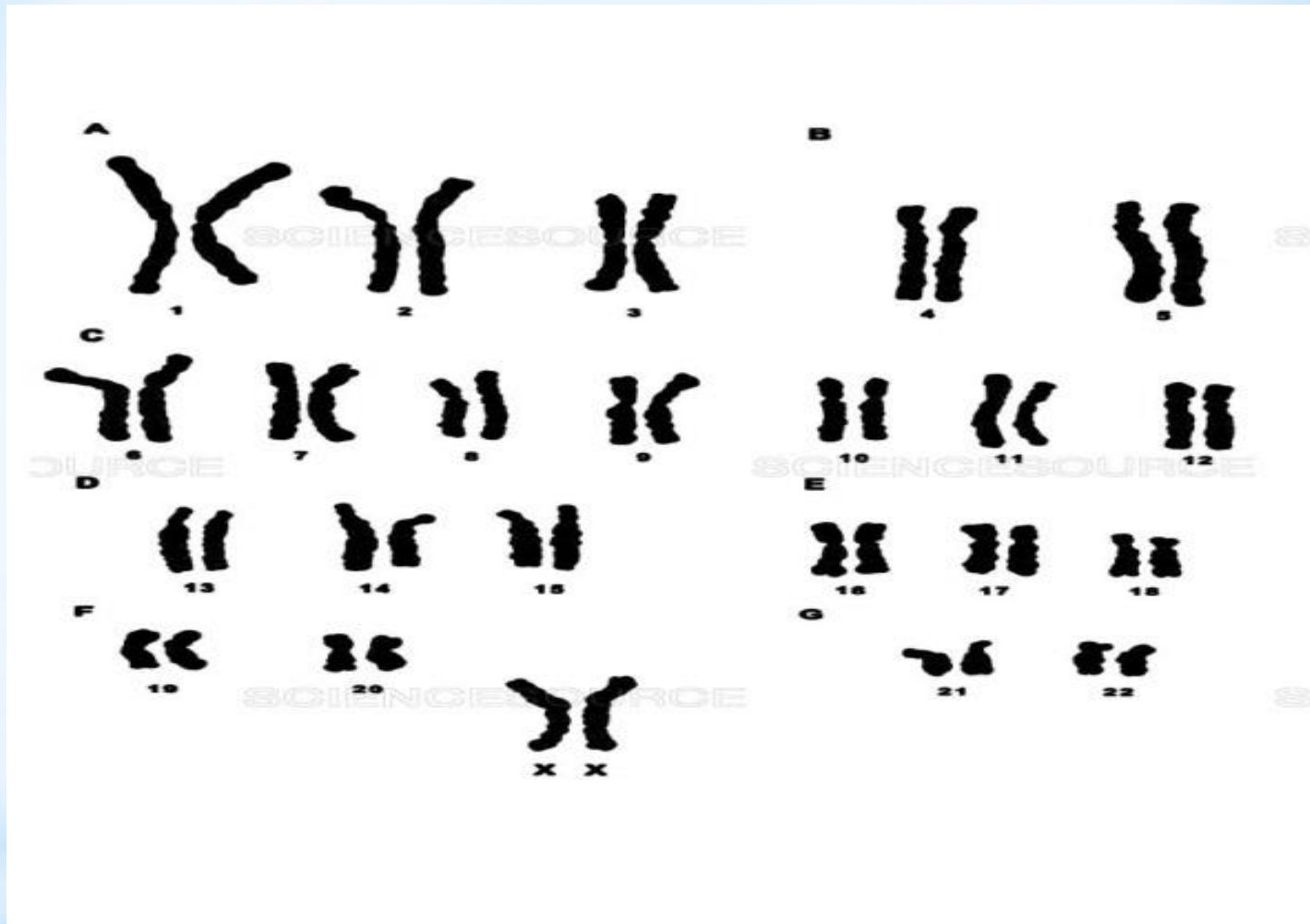
در این آزمایش از افراد مختلف خون گرفته، مراحل مختلف آزمایش را عیناً انجام دهید و سپس کاریوتیپ حاصله را با هم مقایسه کنید.







کاربوتیپ مرد نرمال



کارئوتایپ زن نرمال