University of Isfahan
Biology Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
and Microbiology
Farzaneh Forouharfar

عنوان:

بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز
Mitosis

اهداف

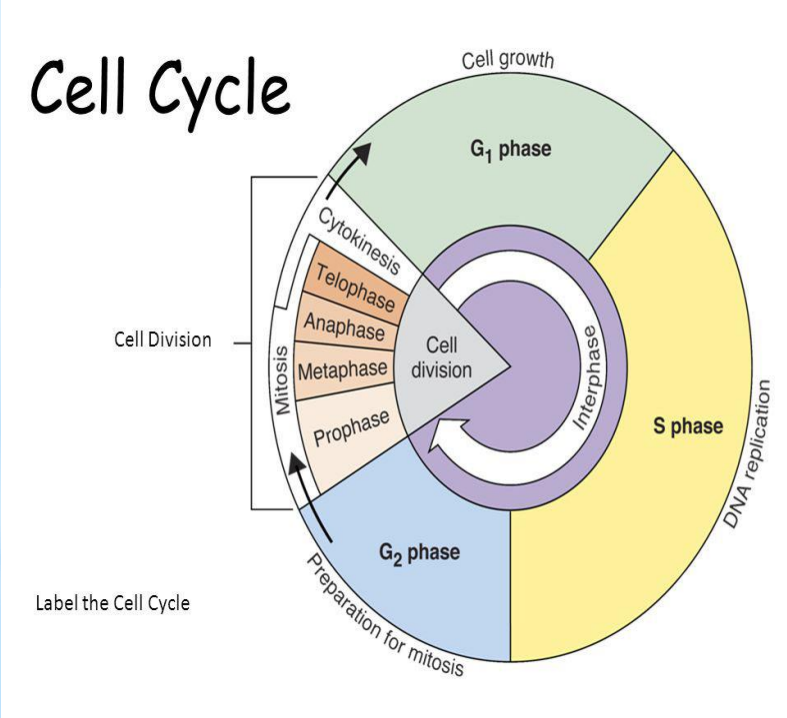
۱.انتخاب سلول مناسب جهت بررسی مراحل تقسیم سلولی میتوز

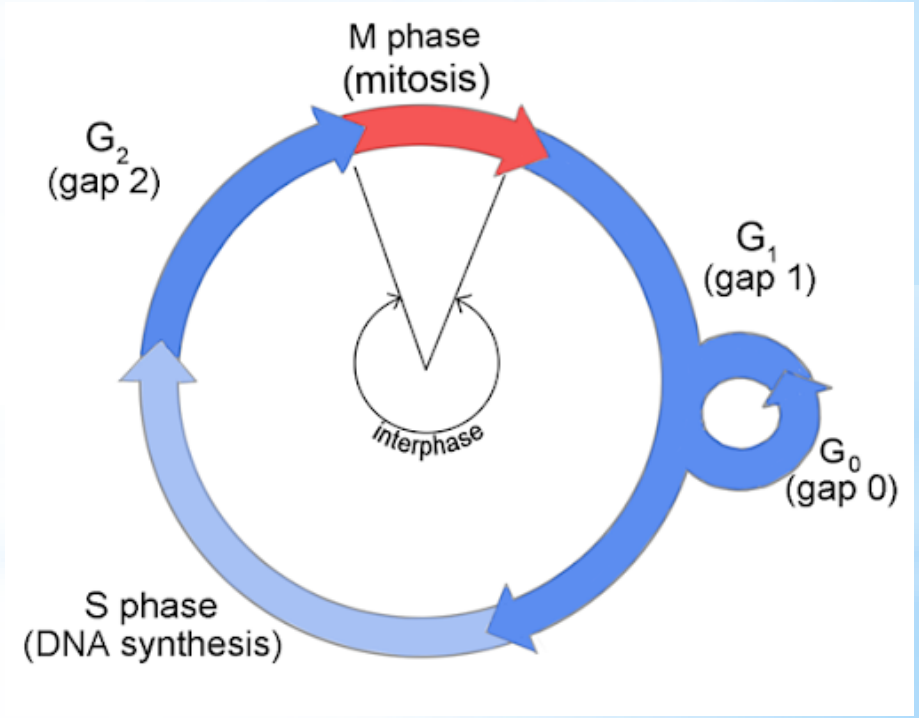
۲.تهیه لام کروموزومی به روش Squash

۳.بررسی خصوصیات سیتولوژیکی سلول ها در هر کدام از مراحل تقسیم سلولی میتوز

۴.مشاهده سلول در مرحله میان تقسیم(Interphase)

توانایی تکثیر یکی از ویژگی های مهم یاخته‌های زنده است. زمان و مجموعهٔ تغییر و تحولاتی که از آغاز تقسیم یاخته‌ای تا رسیدن به شروع تقسیم متوالی بعدی بر یاخته می‌گذرد، چرخه یاخته‌ای یا سیکل سلولیCell 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 فازSynthesis در سیکل سلولی ماده ژنتیکی دقیقاً دو برابر می‌شود و DNA همانندسازی می شود. در فاز G_2 سلول دختری خودش را برای تقسیم میتوز بعدی آماده می‌کند.

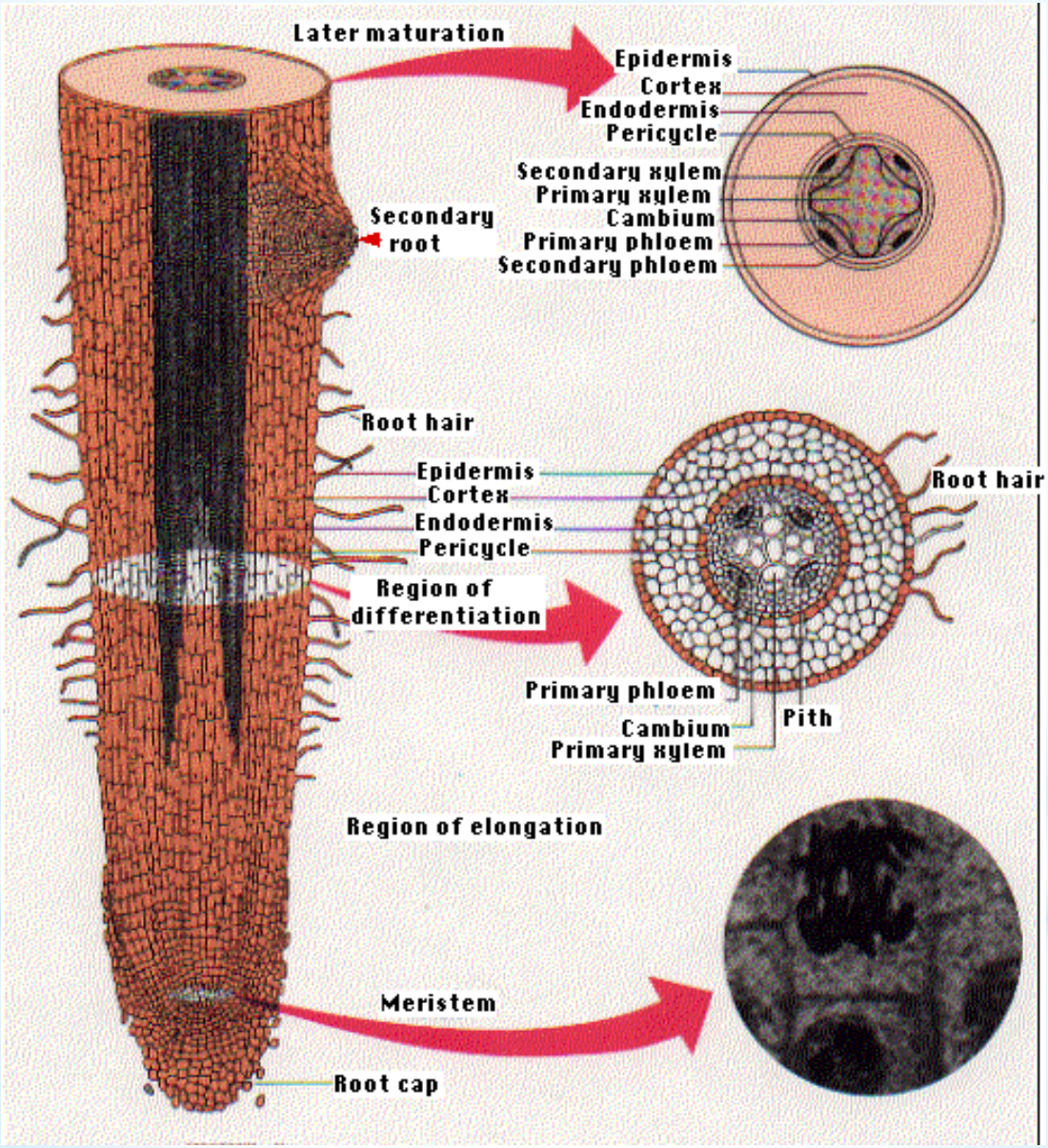
انتخاب نمونه جهت بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز

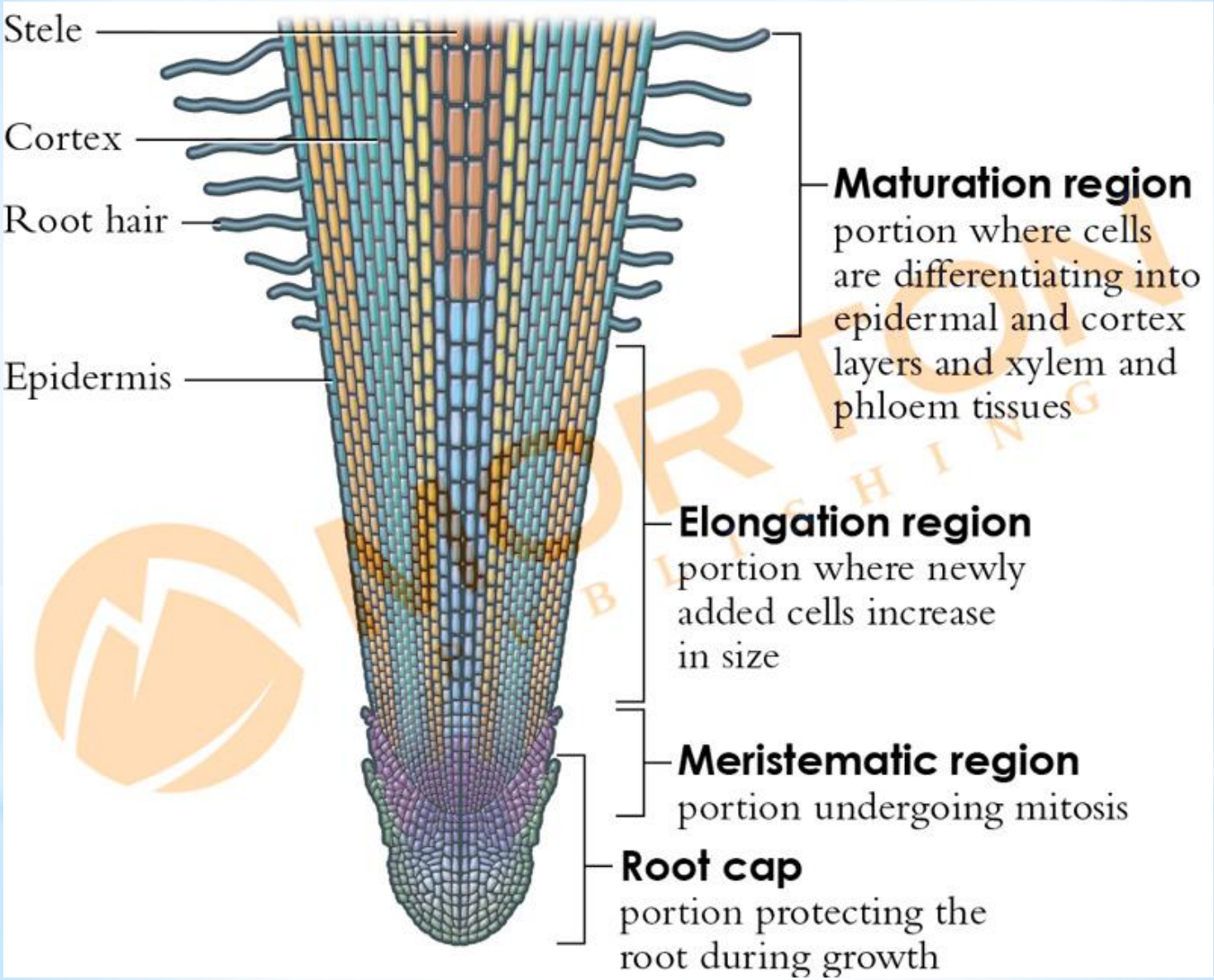
در این جلسه جهت بررسی و مشاهده مراحل مختلف تقسیم سلولی میتوز از سلول‌های مریستمی ریشه پیاز استفاده می‌شود. به چند دلیل:

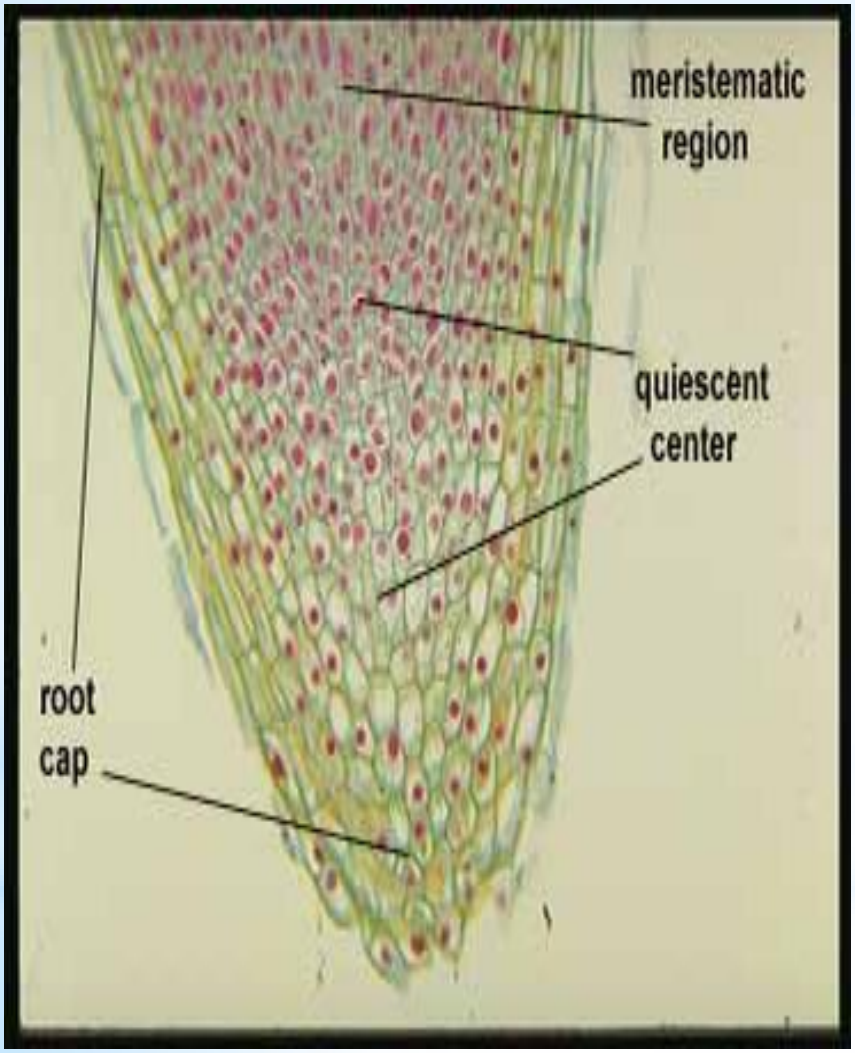
1. بزرگ بودن کروموزم‌ها و مشاهده نسبتاً واضح آن‌ها در میکروسکوپ نوری.
2. کم بودن تعداد مجموعه کروموزمی پیاز.
3. فعال بودن منطقه مریستمی یا زاینده تقسیم سلولی.

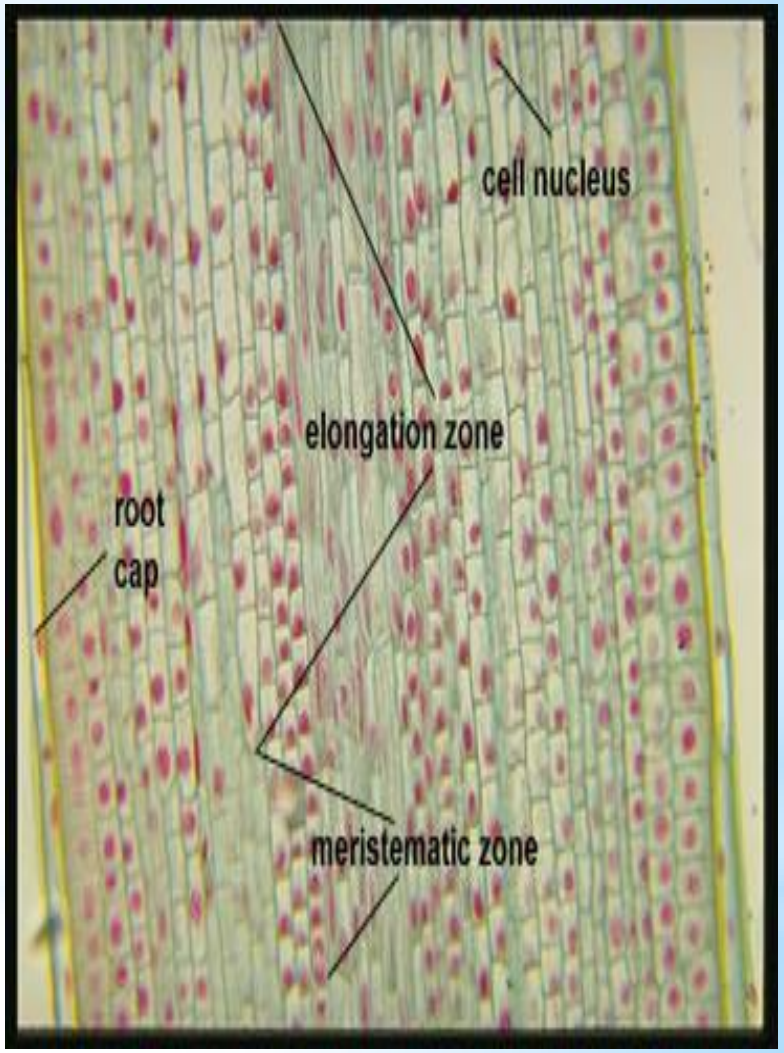
و همچنین داشتن تنوع ژنتیکی در دسترس بودن نمونه.

در ساختار طولی ریشه جوان از قسمت پایین به بالا در ابتدا منطقه کلاهک (Root Cap) قرار دارد و سلولها محافظتی و بدون فعالیت تقسیمی می باشند و منطقه آرام quiescent center در این قسمت می باشد.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 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 سلولهای نهایی که قرار است تبدیل شوند در حال تمایز میباشند.


Later maturation
Epidermis
Cortex
Endodermis
Pericycle
Secondary xylem
Primary xylem
Cambium
Primary phloem
Secondary phloem
Secondary root
Root hair
Epidermis
Cortex
Endodermis
Pericycle
Root hair
Region of differentiation
Primary phloem
Cambium
Primary xylem
Pith
Region of elongation
Meristem
Root cap

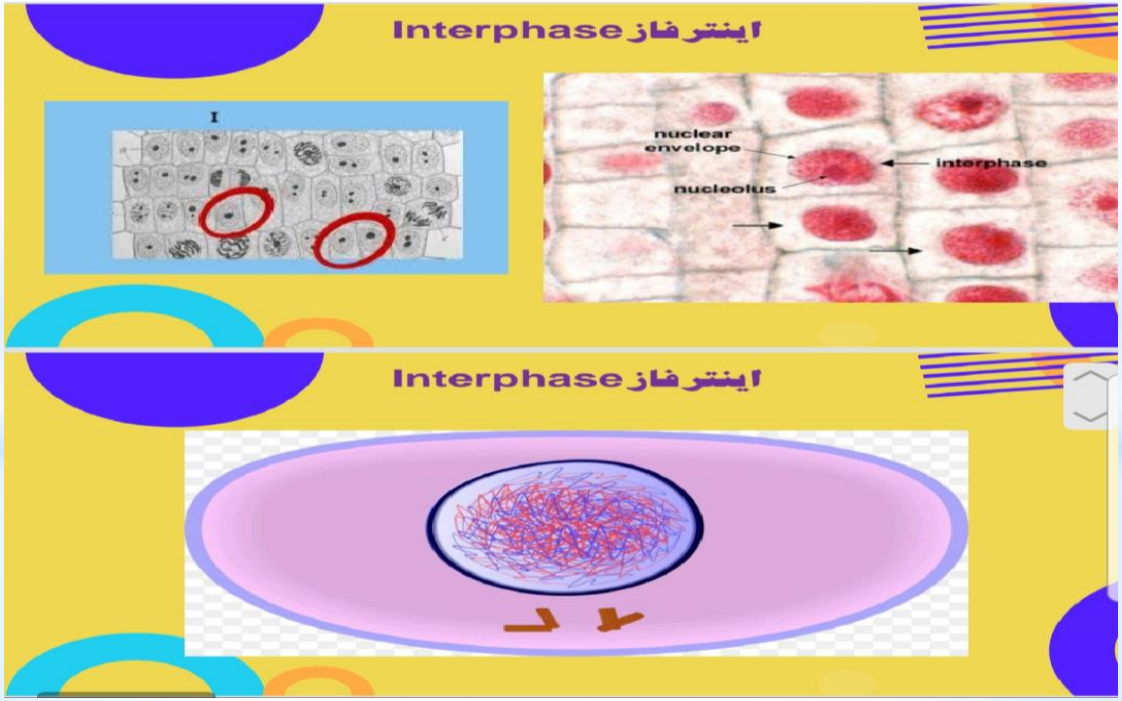

Stele
Cortex
Root hair
Epidermis
Maturation region
portion where cells are differentiating into epidermal and cortex layers and xylem and phloem tissues
Elongation region
portion where newly added cells increase in size
Meristematic region
portion undergoing mitosis
Root cap
portion protecting the root during growth


meristematic
region
quiescent
center
root
cap


cell nucleus
elongation zone
root
cap
meristematic zone

اینترفاز: Interphase

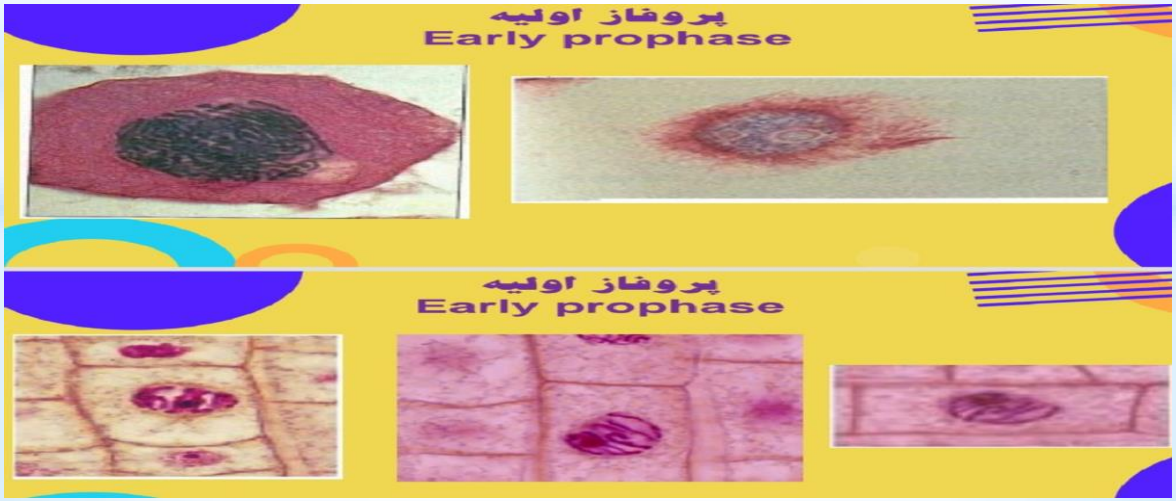
مجموعه مراحل فوق در مرحله اینترفاز یا میان تقسیم قرار دارند که کلاً در این مرحله محتوای ژنتیکی به صورت رشته‌های درهم برهم مشاهده می‌شوند و غیر قابل تشخیص هستند و در واقع این مرحله فاصله میان تقسیمات سلولی است که ضمن فعالیت‌های مربوط به رشد و سنتز صورت می گیرد. از بهترین مشخصات این مرحله وجود هستک (های) مشخص و صاف بودن سطح هسته می‌باشد.



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 وجود دارد اما کم کم شروع به تحلیل رفتن می‌کند و هستک هم سازماندهی خود را از دست می‌دهد و قابل تشخیص به صورت یک ارگانل سازماندهی شده نیست. از نظر مشخصات ظاهری سلولی که در این مرحله از تقسیم در میکروسکوپ نوری قابل تشخیص می‌باشد این است که هسته سلول آن به حالت گرد اما با سطحی خشن و ناصاف و دانه دانه به نظر می‌رسد.



۲. 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 ظاهری در زیر میکروسکوپ هسته به فرم بیضی و سطح آن خشن تر و دانه دانه تر از مرحله قبل به نظر می‌رسد.

۳. 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 جای سلول پخش شده‌است.

۴. انتقال به متافاز یا پیش متافاز

Tranzition to metaphase-Prometaphase

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.

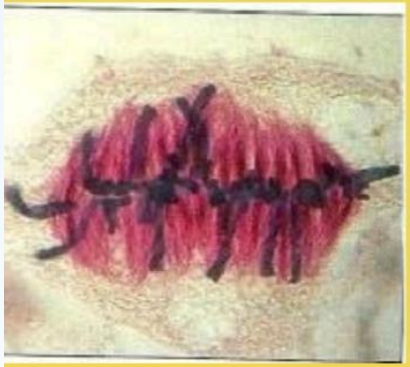
۵. متافاز Metaphase

کروموزوم‌ها در این حالت کوتاهترین، قطورترین و فشرده ترین حالت خود را دارند و از نقطه سانترومر 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 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.

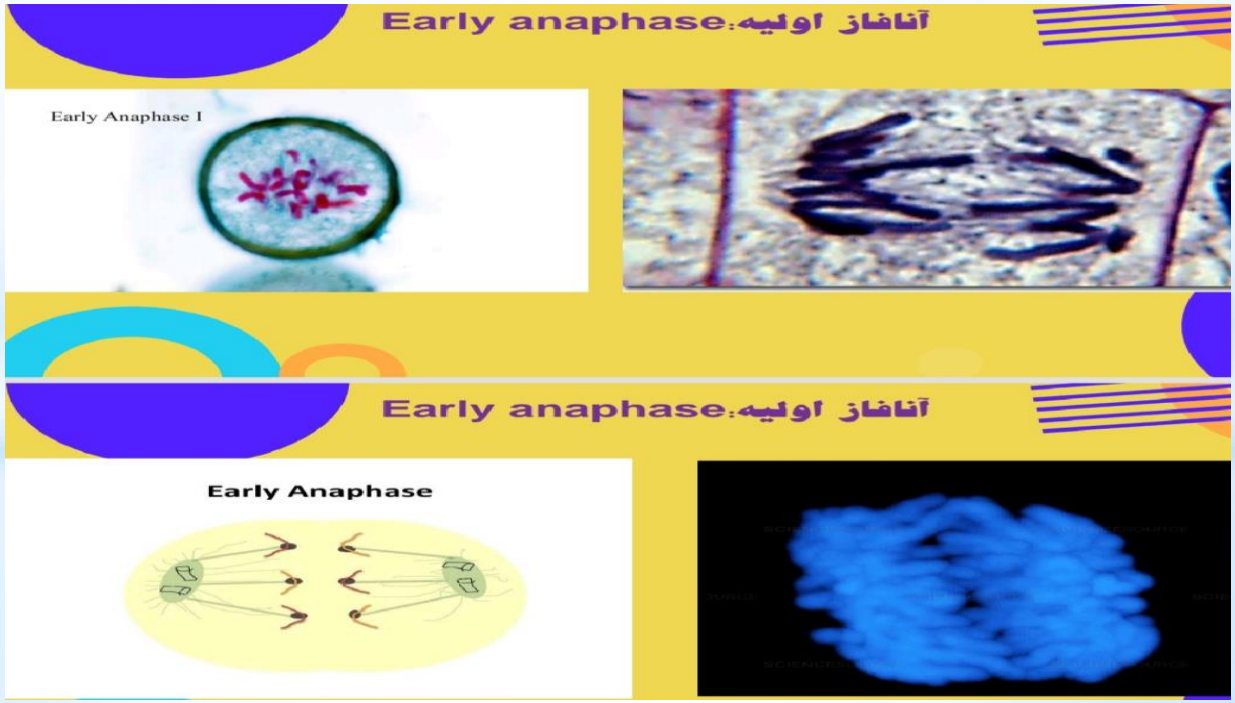
Metaphase:متافاز



Metaphase:متافاز

۶. آنافاز اولیه Early anaphase

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.



۷. آنافاز میانی Mid anaphase

با حرکت دوک سیتوپلاسمی و کوتاه شدن آن کروماتید ها بیشتر از هم فاصله گرفته و سانترومرها بین استوا و قطب سلول قرار می‌گیرد.

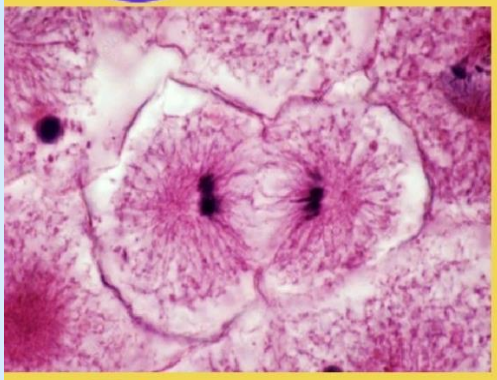
۸. آنافاز انتهایی Late anaphase

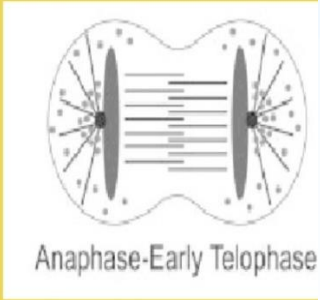
سانترومر کروماتیدها در نزدیکی قطبین قرار گرفته و دودسته کروموزم‌ها در دو قطب و به حالت کشیدگی قرار دارند و کشش رشته‌های دوک بر روی آن‌ها هنوز قابل تشخیص است.

۹. تلوفاز اولیه Early telophase

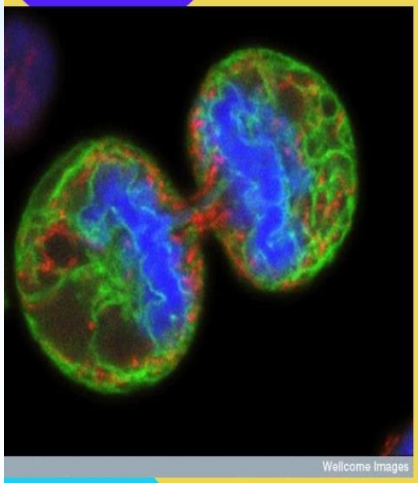
در این مرحله که همزمان با تقسیم سیتوپلاسم می‌باشد، بار دیگر کروماتیدها باریک شده، کم کم غشای هسته پدیدار می‌شود و هستک به تدریج سازماندهی می‌شود، اما هنوز فرم کامل خود را پیدا نکرده در زیر میکروسکوپ شروع سیتوکیناز را به صورت شکافی در کناره های سلول مشاهده می‌کنید. به دلیل اینکه در سلول گیاهی مانند سلول‌های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

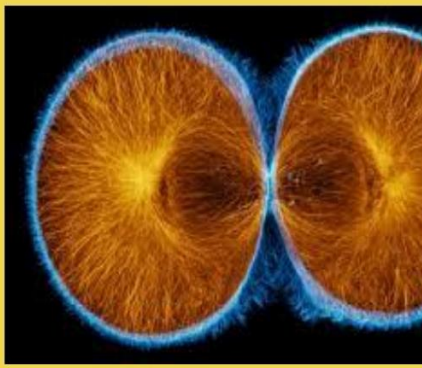
Early telophase:تلوفاز اولیه



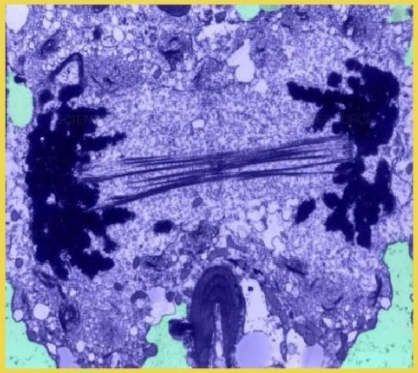


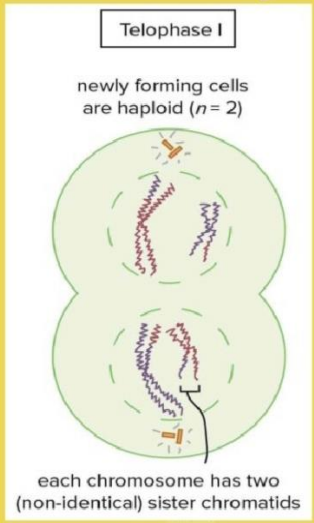
Cytokinesis سیتوکینز



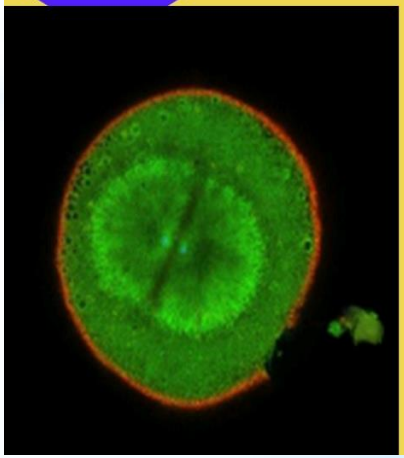


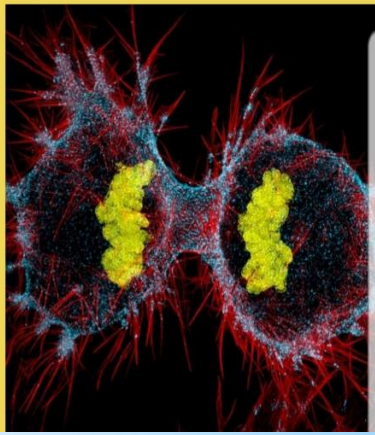
Early telophase:تلوفاز اولیه





Cytokinesis سیتوکینز





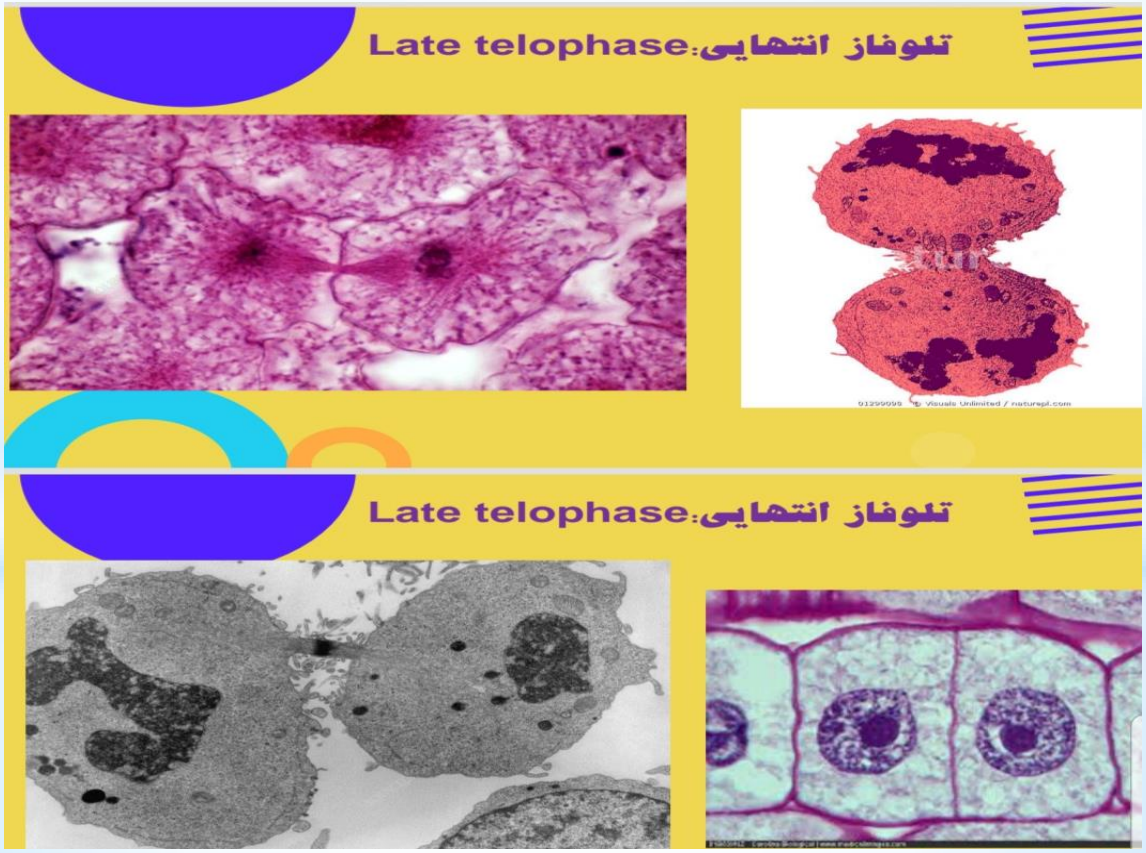
۱۰. تلوفاز میانی Mid telophase

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.غشای 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 به سرعت ظاهر می‌شود، RNA ریبوزومی است که سبب ظهور مجدد هستک می‌گردد.

۱۱. تلوفاز انتهایی Late telophase

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



مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

1. کریستال ویوله یا استوکارمن یا استو اورسئین این رنگها معرف ترکیبات ژنتیکی یا کروموزومی می باشند.
2. ریشه پیاز
3. شیشه ساعت
4. پلیت
5. میکروسکوپ
6. بشر
6. شعله
7. سوزن تشریح یا سنجاق
8. لام و لامل

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 3-2 میلی‌متری بالای کلاهک، ریشه ها را جدا کرده و برای انجام آزمایش به شرح زیر آماده کنید:

روش اول:استفاده از رنگ استوکارمن

ریشه ها را در پلیت حاوی رنگ استوکارمن قرار داده و ظرف را به طور غیرمستقیم روی شعله گذاشته و ریشه ها 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 30-20 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:

محلولA :شامل ۱ حجم اسید کلریدریک ۱۰ درصد و ۱ حجم آب مقطر جهت نرم شدن ساختار ریشه و نفوذپذیر شدن دیواره و غشای سلولی.

محلولB:شامل ۱ حجم اسید استیک خالص و غلیظ و ۳ حجم الکل اتانل ۹۶ درصد جهت تثبیت ساختار محتوای ژنتیکی سلول و رنگپذیری انها.

محلولC:شامل ۱ حجم محلول Aو یک حجم محلول B سپس ریشه ها را بمدت ۱۵ دقیقه در پلیت حاوی محلول Cو بلافاصله بمدت ۲۰ ثانیه در پلیت حاوی محلول B قرار دهید پس از آن با کمک پنس ریشه ها را به لام منتقل کرده و یک یا دو قطره رنگ کریستال ویوله اضافه کنید و با دقت و ظرافت با استفاده از سوزن تشریح یا سنجاق ریشه را نسبت به رنگ نفوذپذیر نمایید سپس لامل گذاری کرده نمونه را بدقت اسکواش نمایید و با کاغذ در محل فیکس کنید.کریستال ویوله محتوای ژنتیکی را به رنگ بنفش در می اورد.

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 که در پزشکی مصرف دارد.

موارد مصرف :

بهبود جراحات پوستی و درمان زخم های مزمن

بهبود و درمان عفونت های قارچی پوست

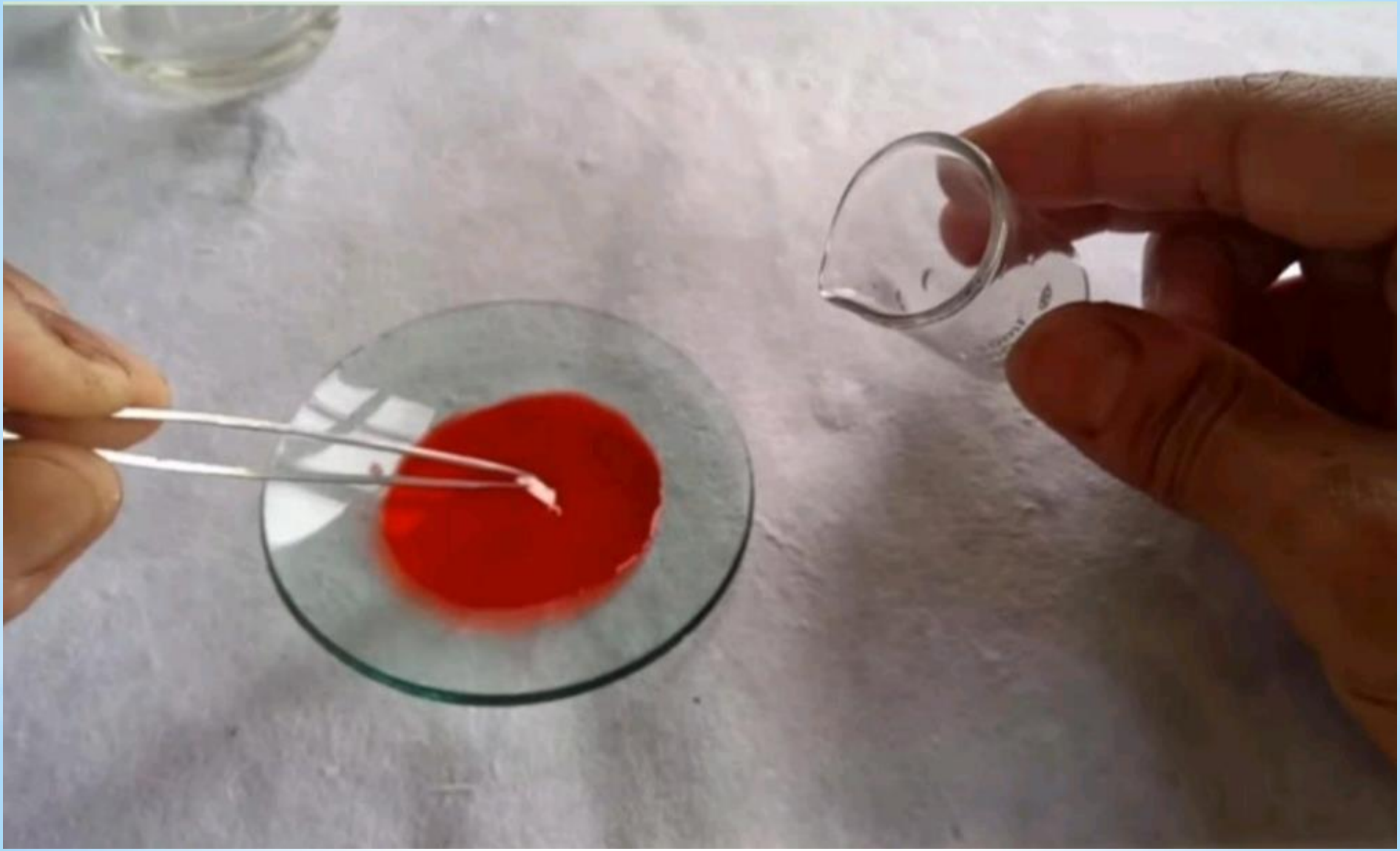
بهبود و درمان عفونت های قارچی دهان یا برفک دهان یا آفت دهان

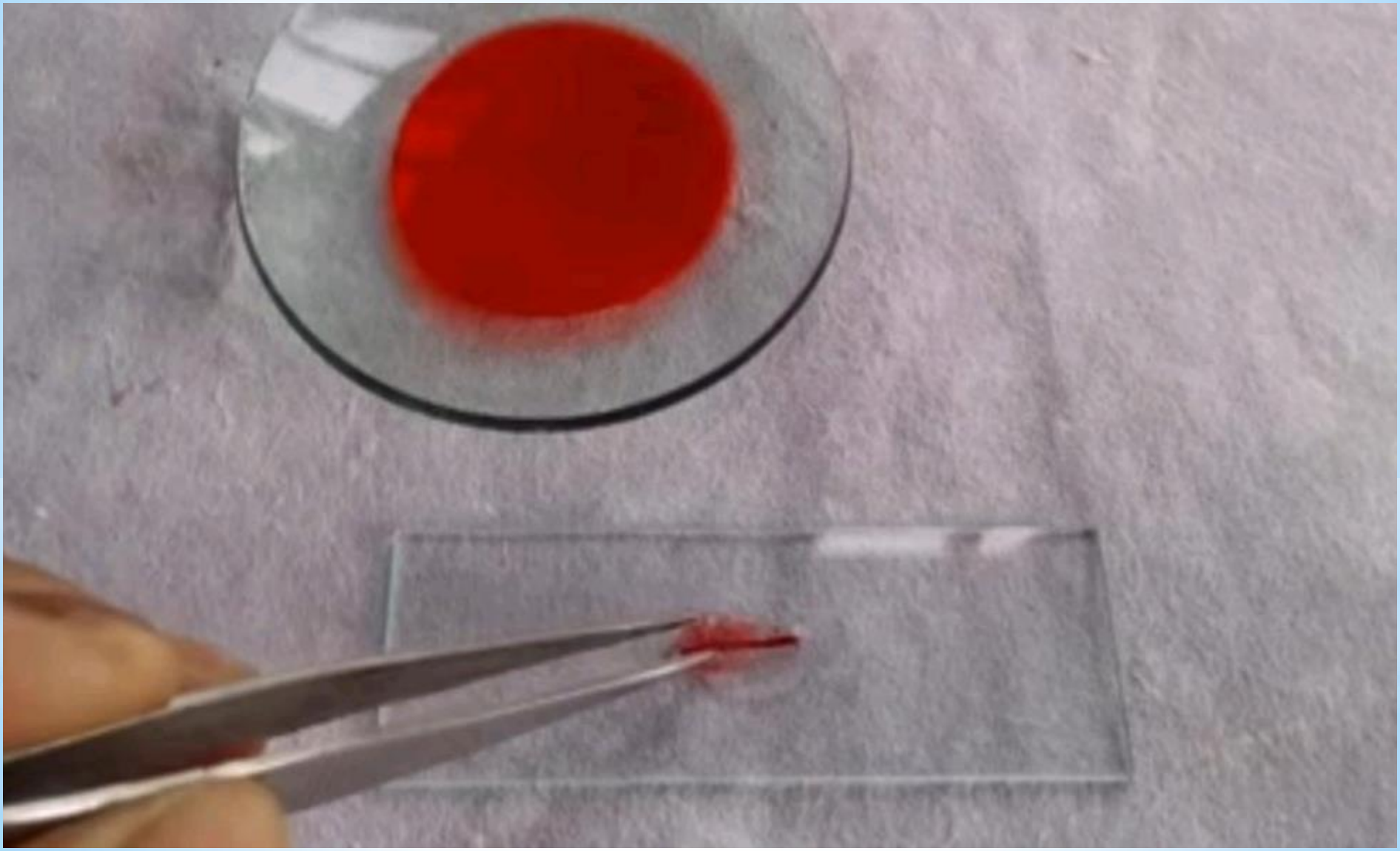
بهبود سوختگی و جلوگیری از عفونت آن

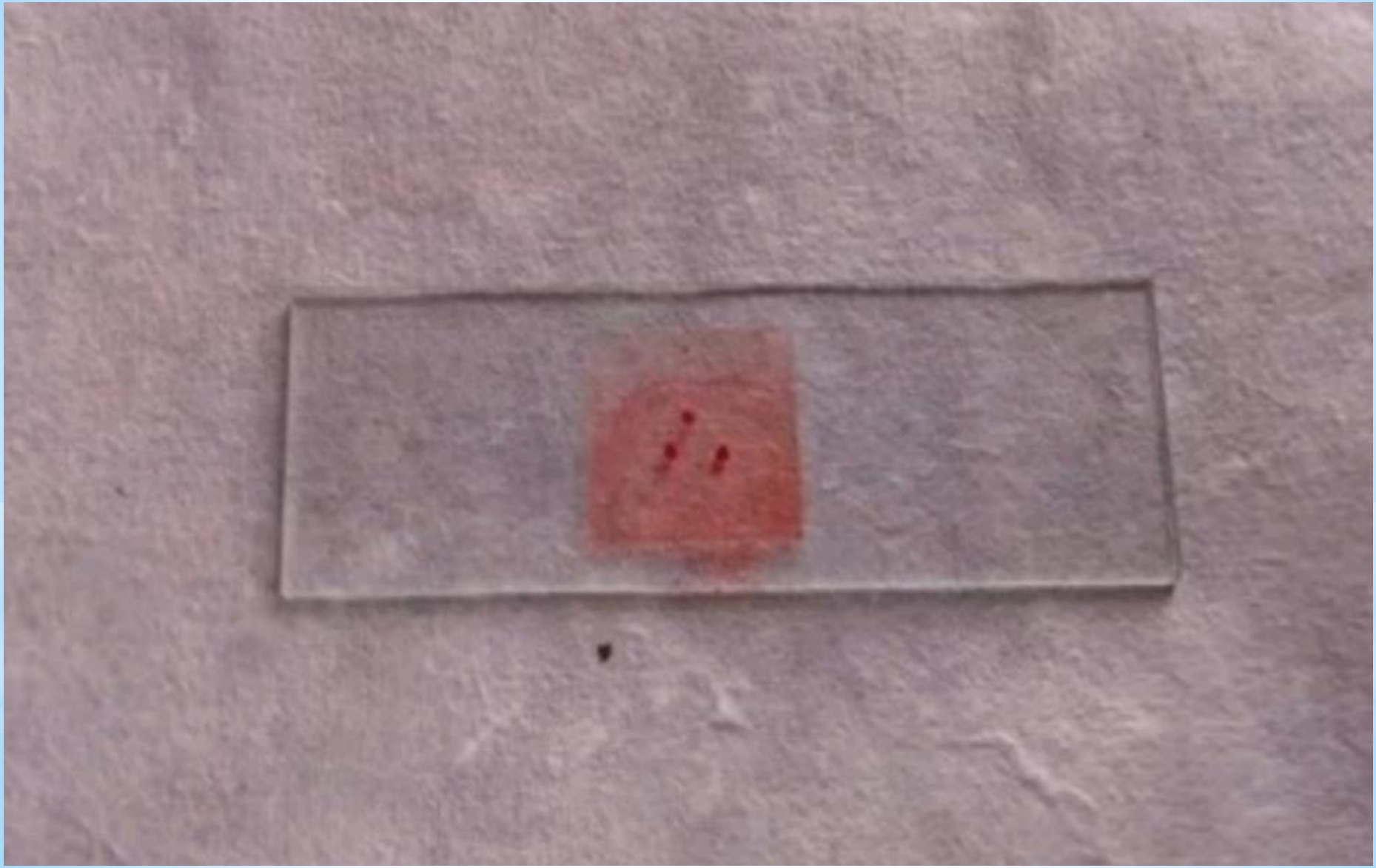
لام را در زیر میکروسکوپ در بزرگنمایی 40 تنظیم کرده و پس از پیدا کردن سلول ها در منطقه تقسیم سلولی ابتدا مرحله اینترفاز و هستک‌های مشخص در این مرحله را بررسی کنید (سلول‌های پیاز معمولا دارای 2 هستک می‌باشند). سپس کلیه مراحل تقسیم سلولی را بررسی و مشاهده کنید و شکل هر مرحله را با رعایت جزییات بررسی شده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

مشاهده مراحل مختلف تقسیم سلولی به روش رنگ امیزی بااستوکارمن

CARNDY
FLUID

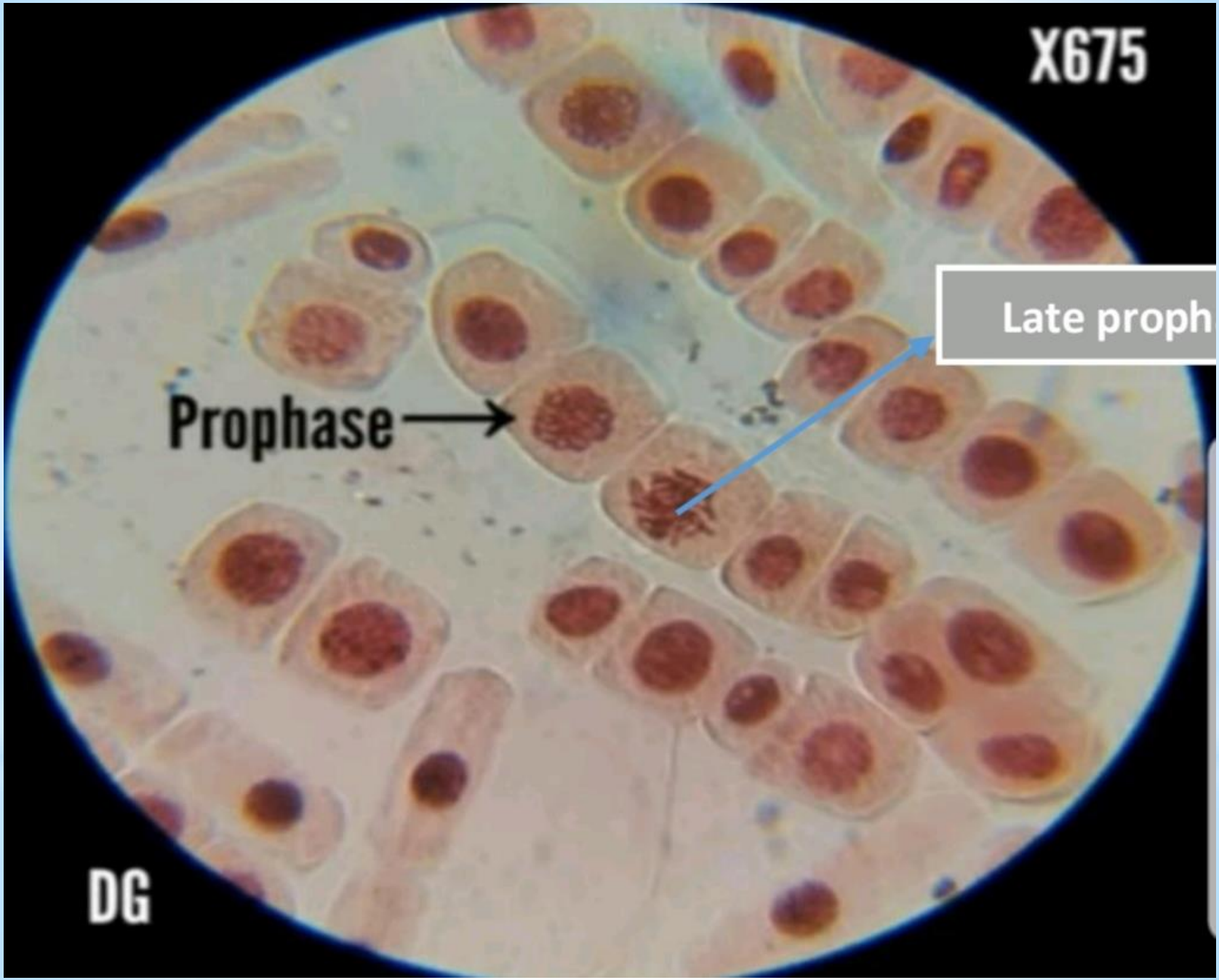


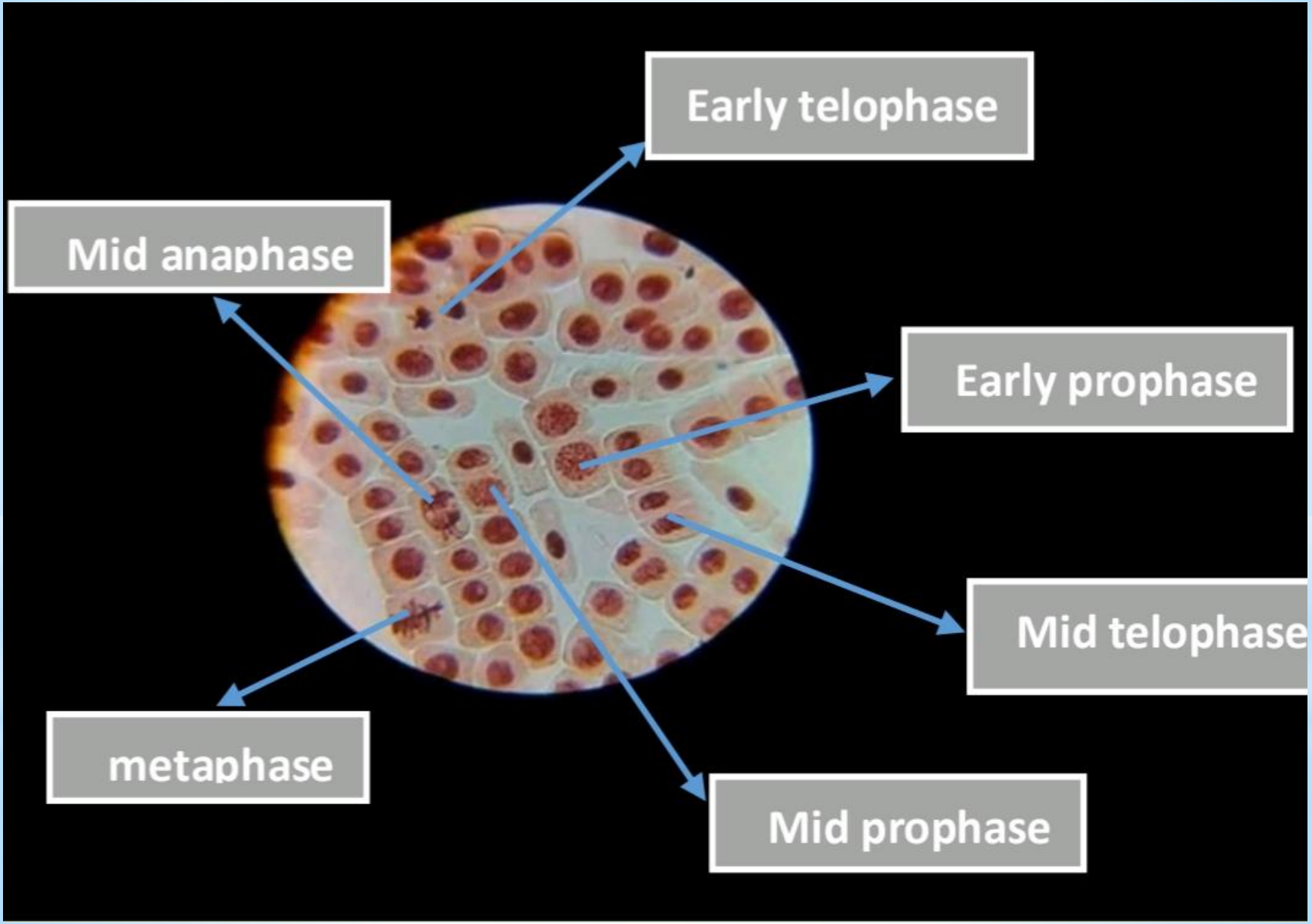


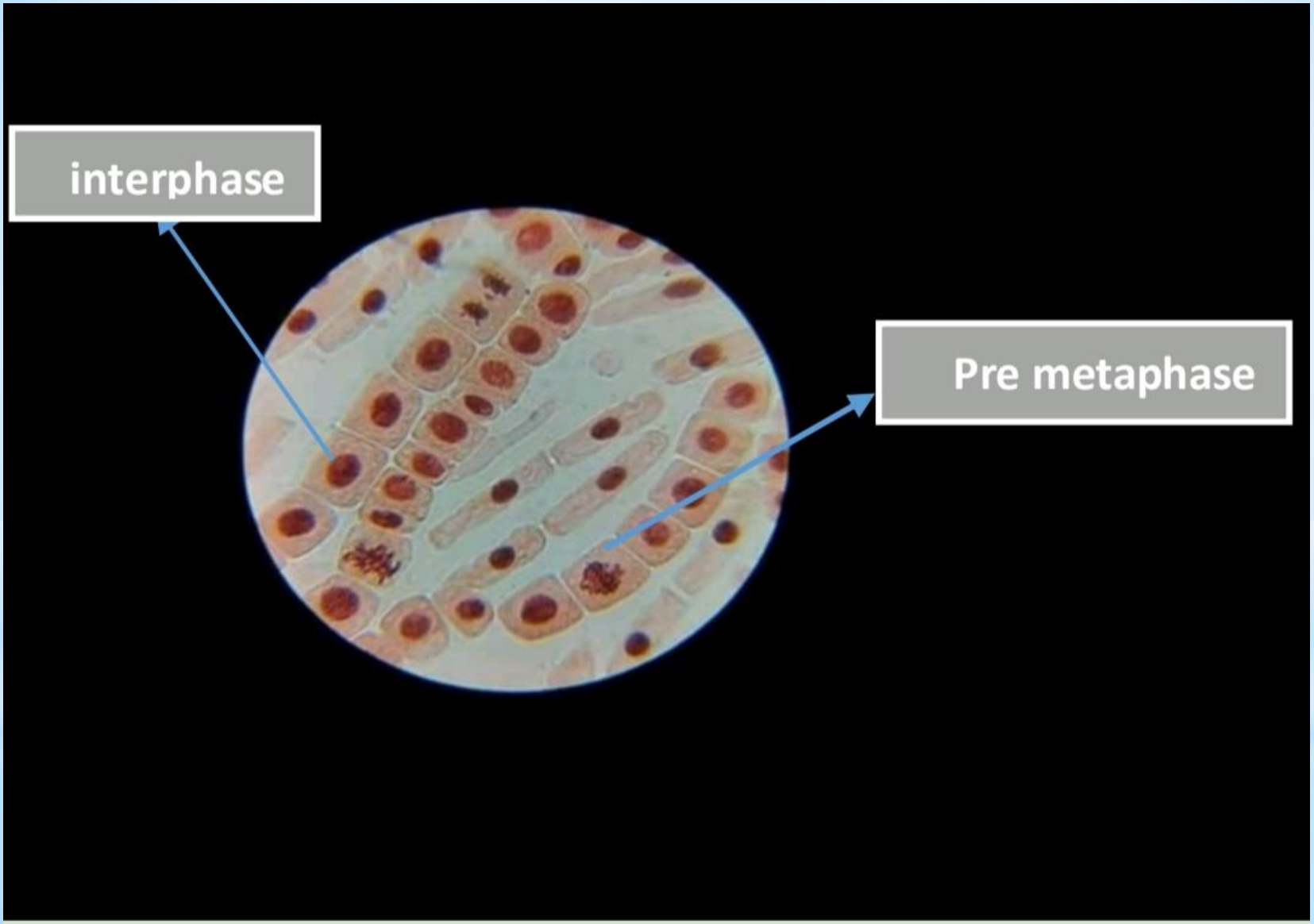


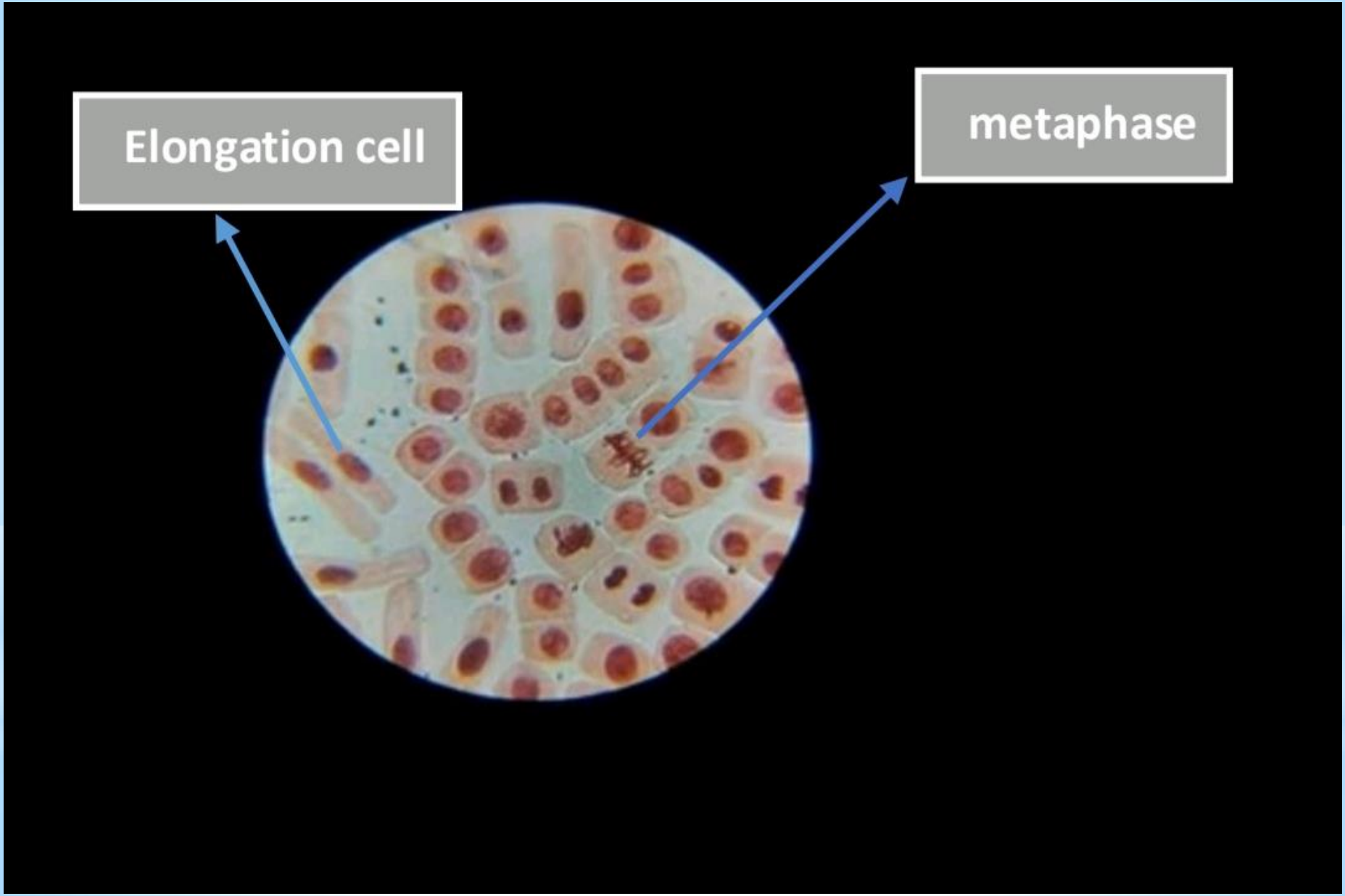
آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر

تهیه لام کروموزومی به روش
اسکواش

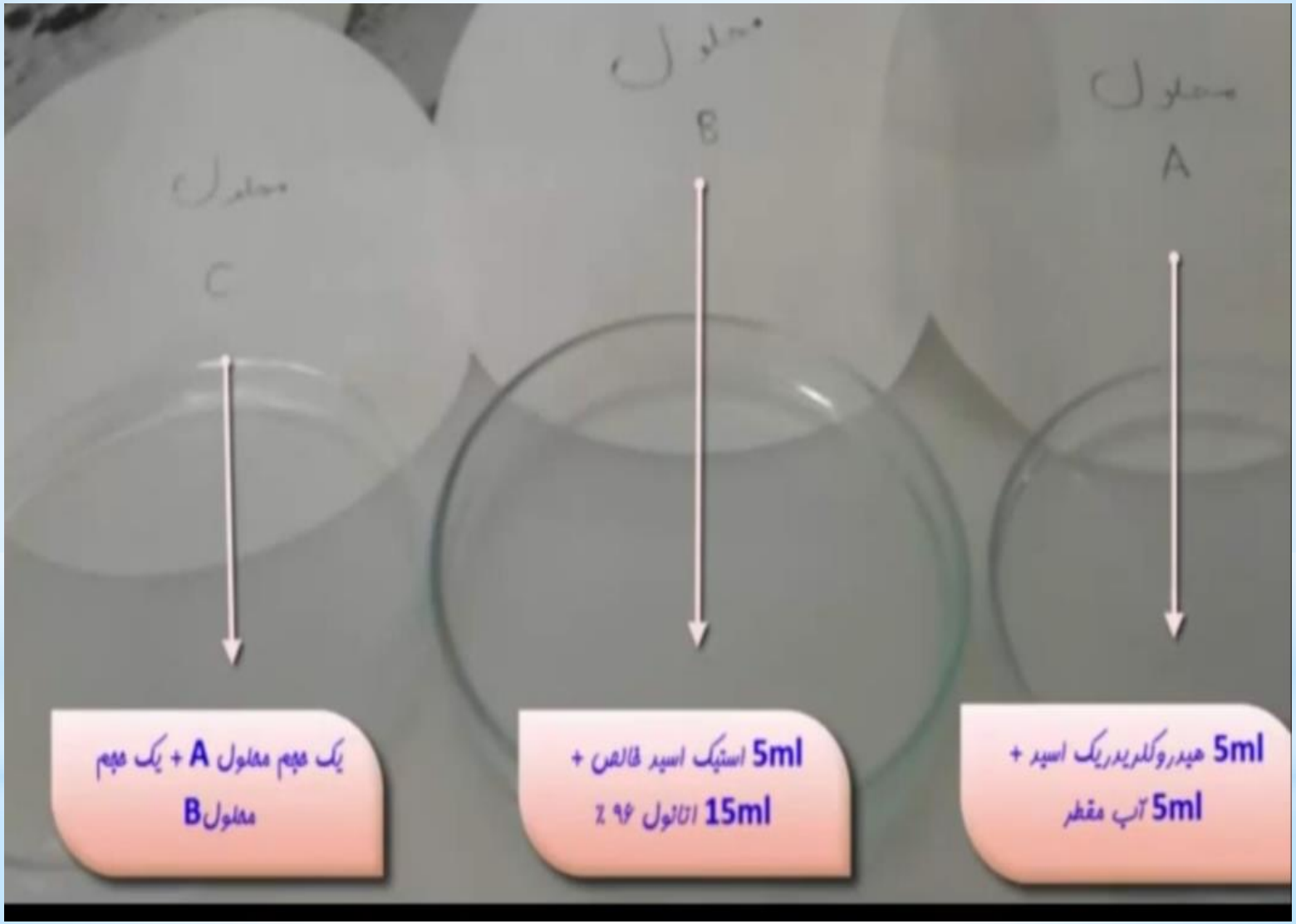

X675
Late proph
Prophase
DG

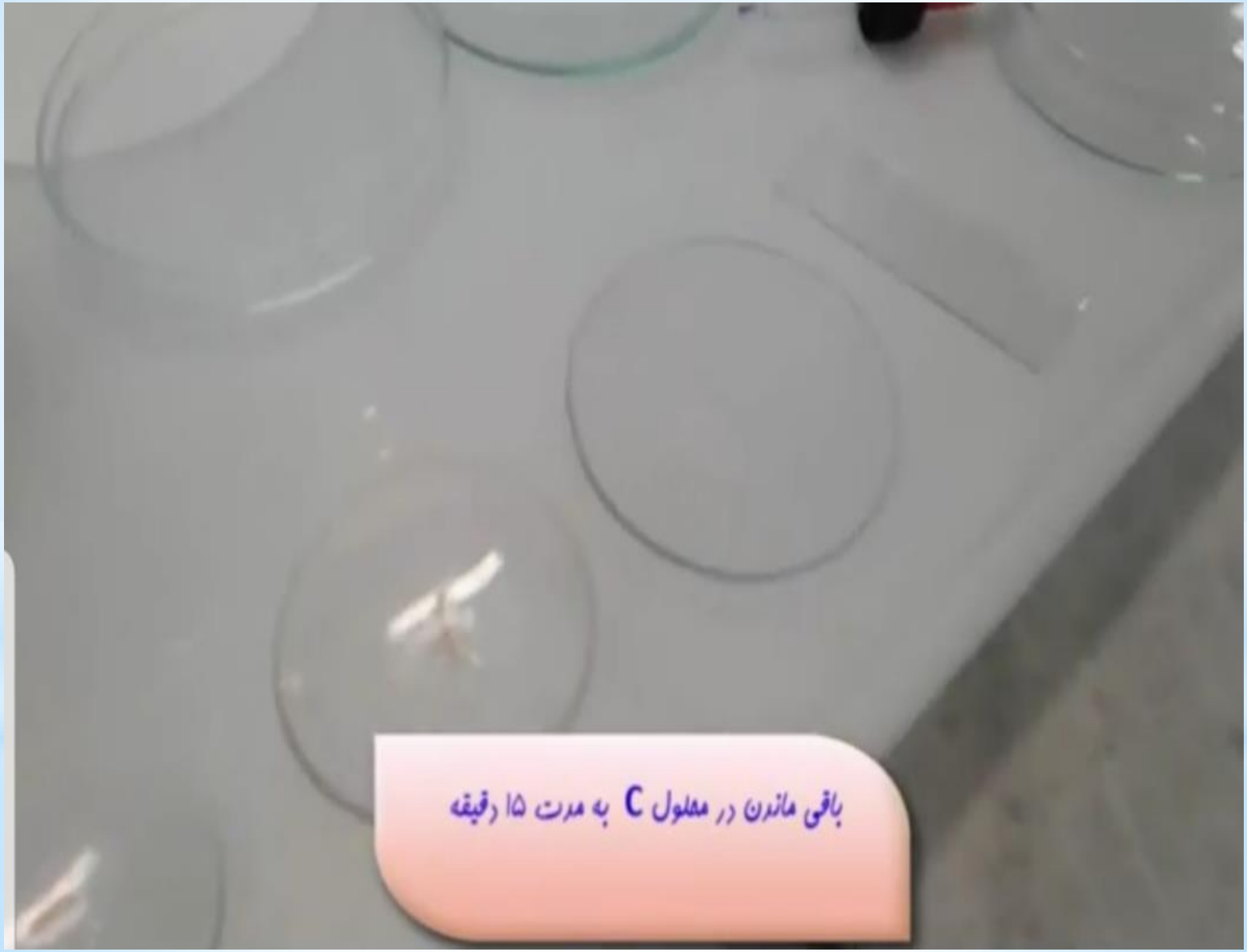

Early telophase
Mid anaphase
Early prophase
Mid telophase
metaphase
Mid prophase

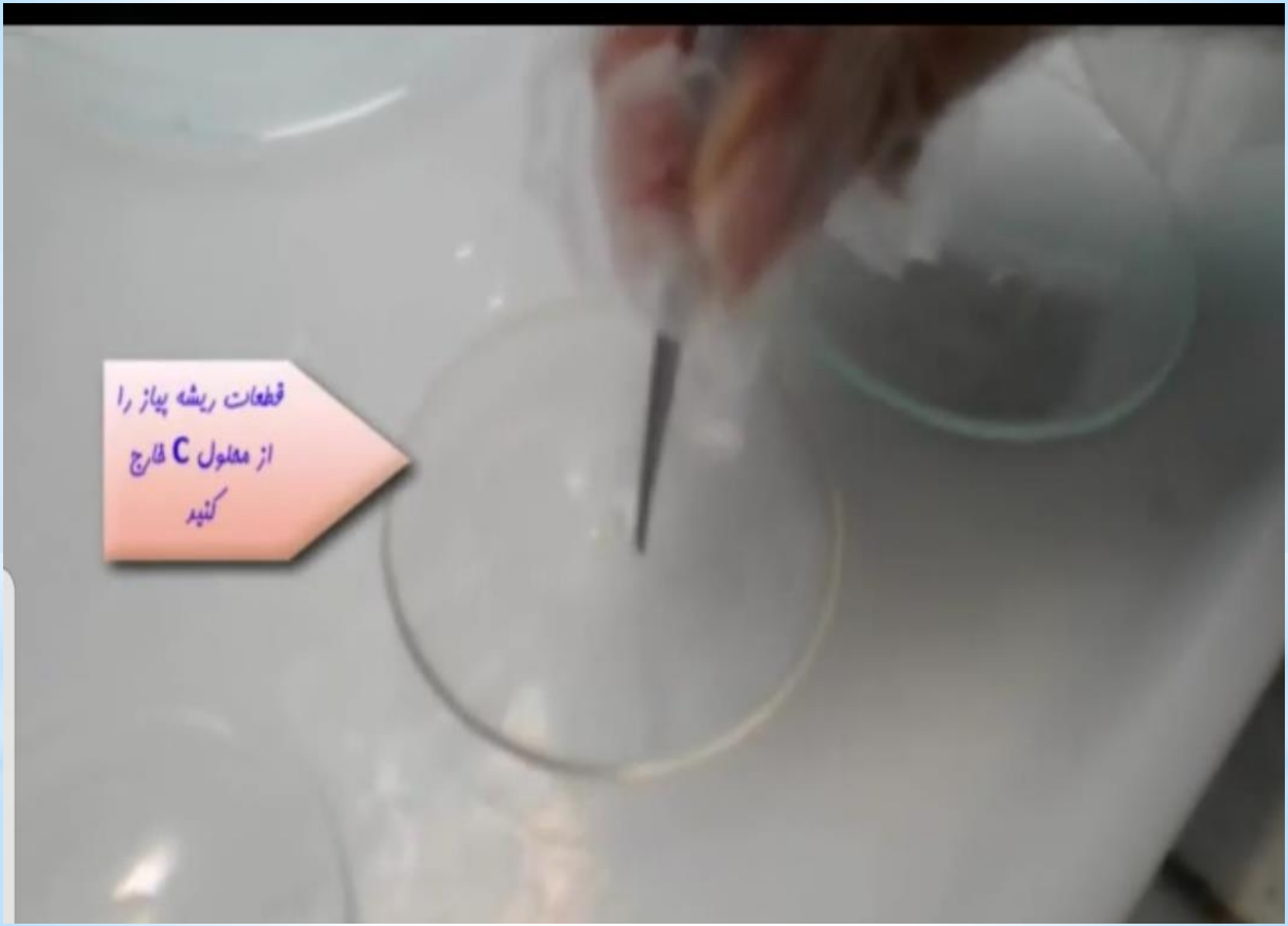

interphase
Pre metaphase

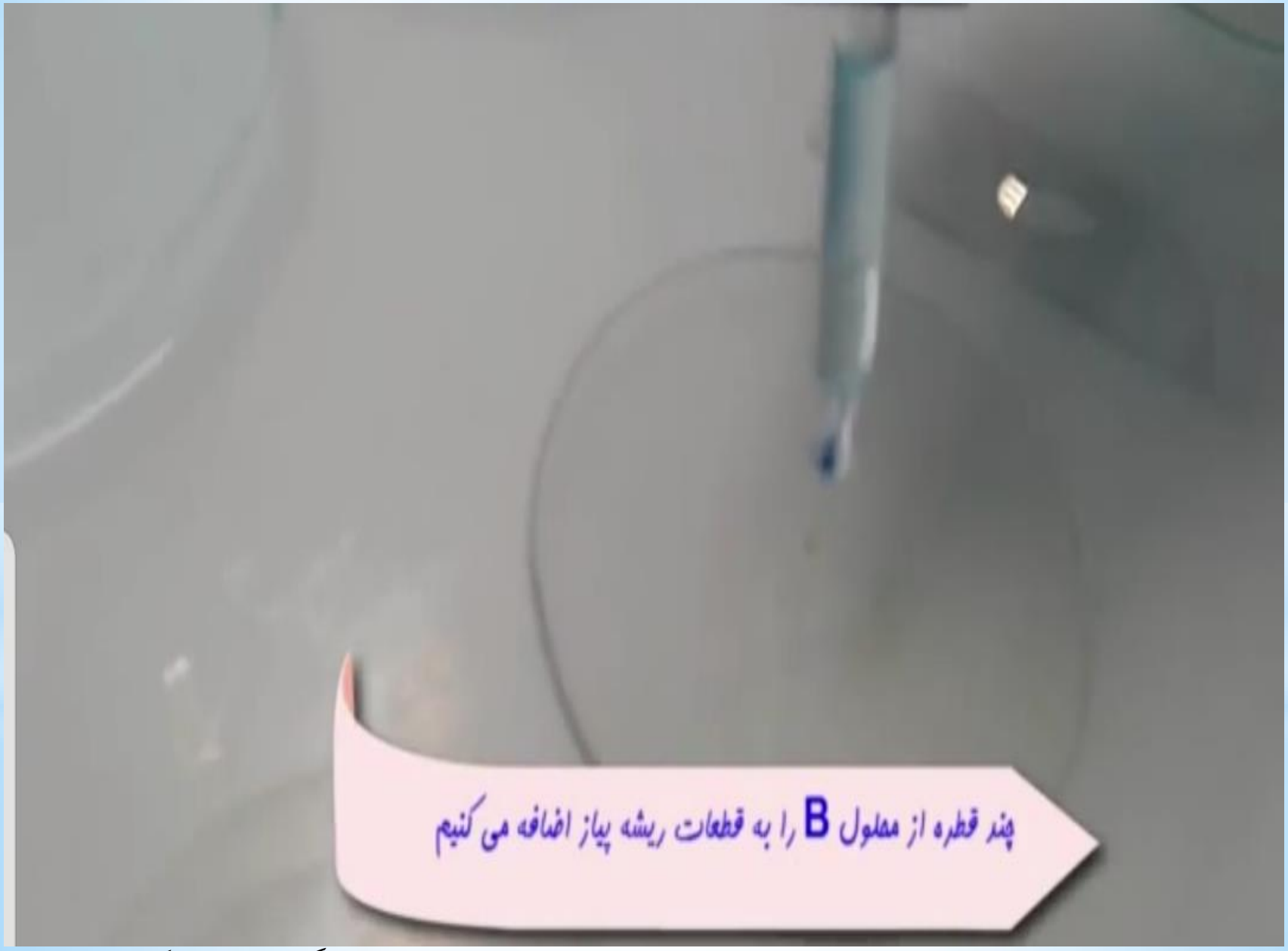

Elongation cell
metaphase

مشاهده مراحل مختلف تقسیم سلولی به روش رنگ امیزی با کریستال ویوله

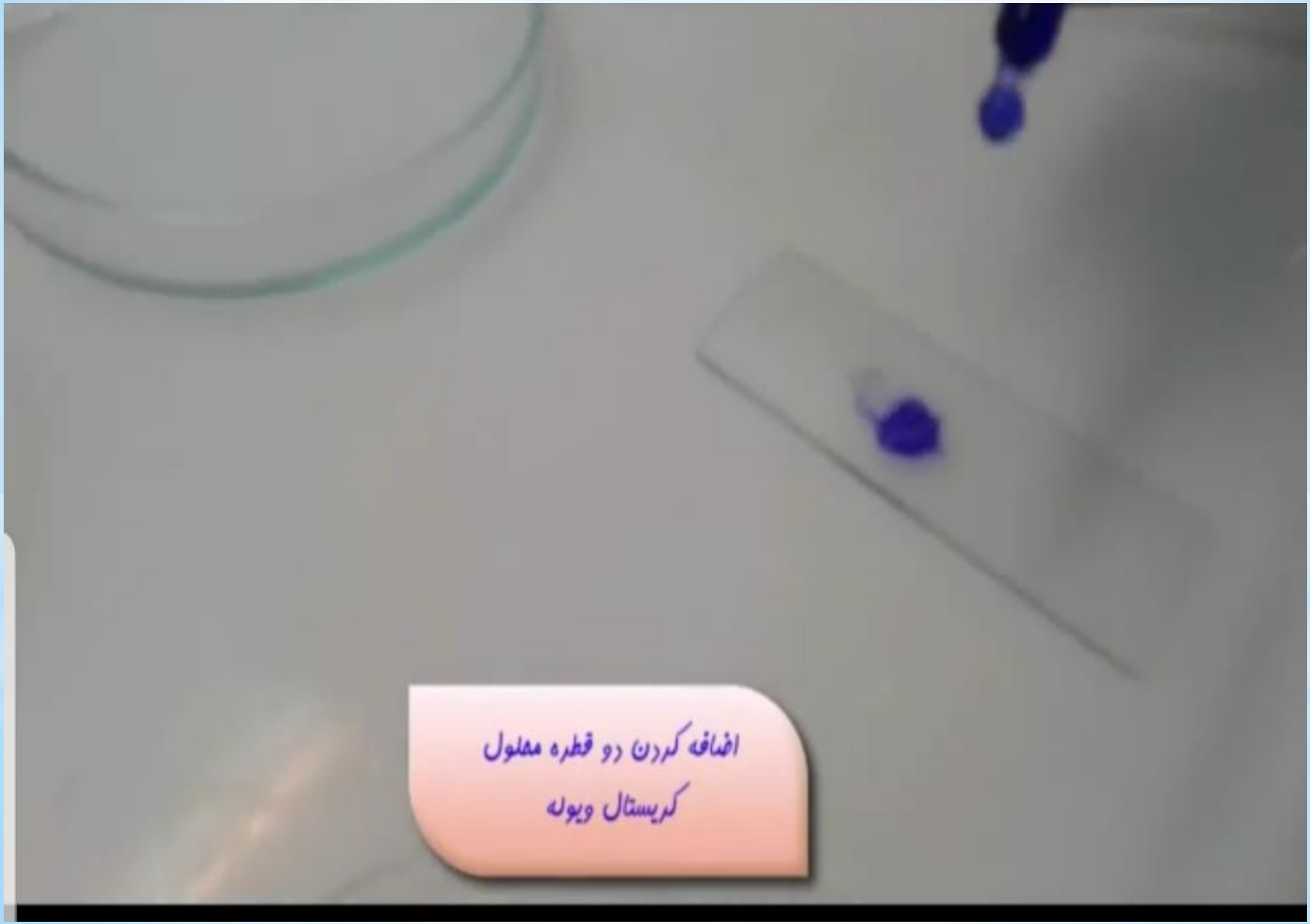

محلول
A
محلول
B
محلول
C
5ml هیدروکلریدریک اسید +
5ml آب مقطر
5ml استیک اسید خالص +
15ml اتانول ٪۹۶
یک حجم محلول A + یک حجم
محلول B


باقی ماندن در محلول C به مدت ۱۵ دقیقه

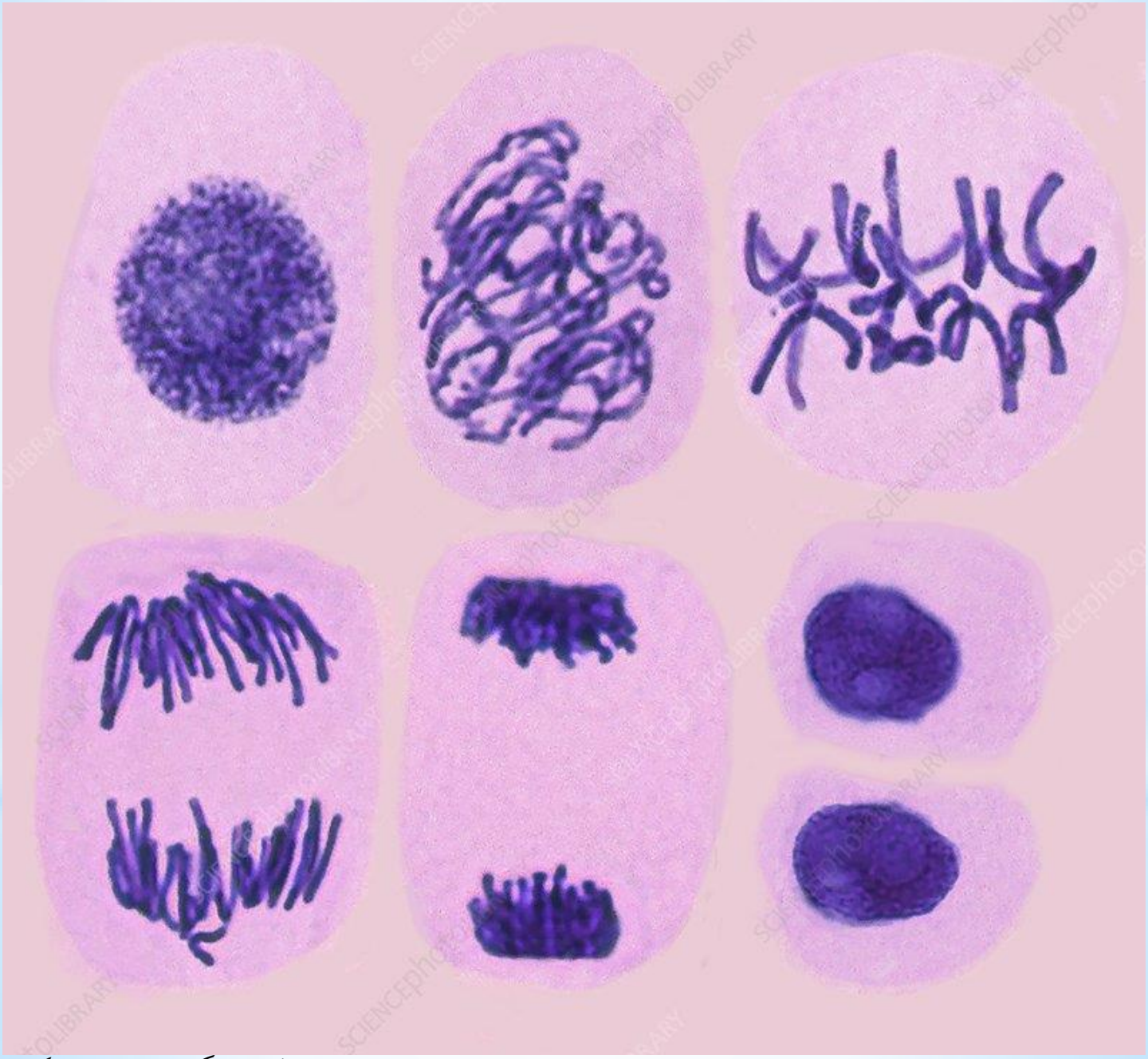

قطعات ریشه پیاز را
از محلول C خارج
کنید

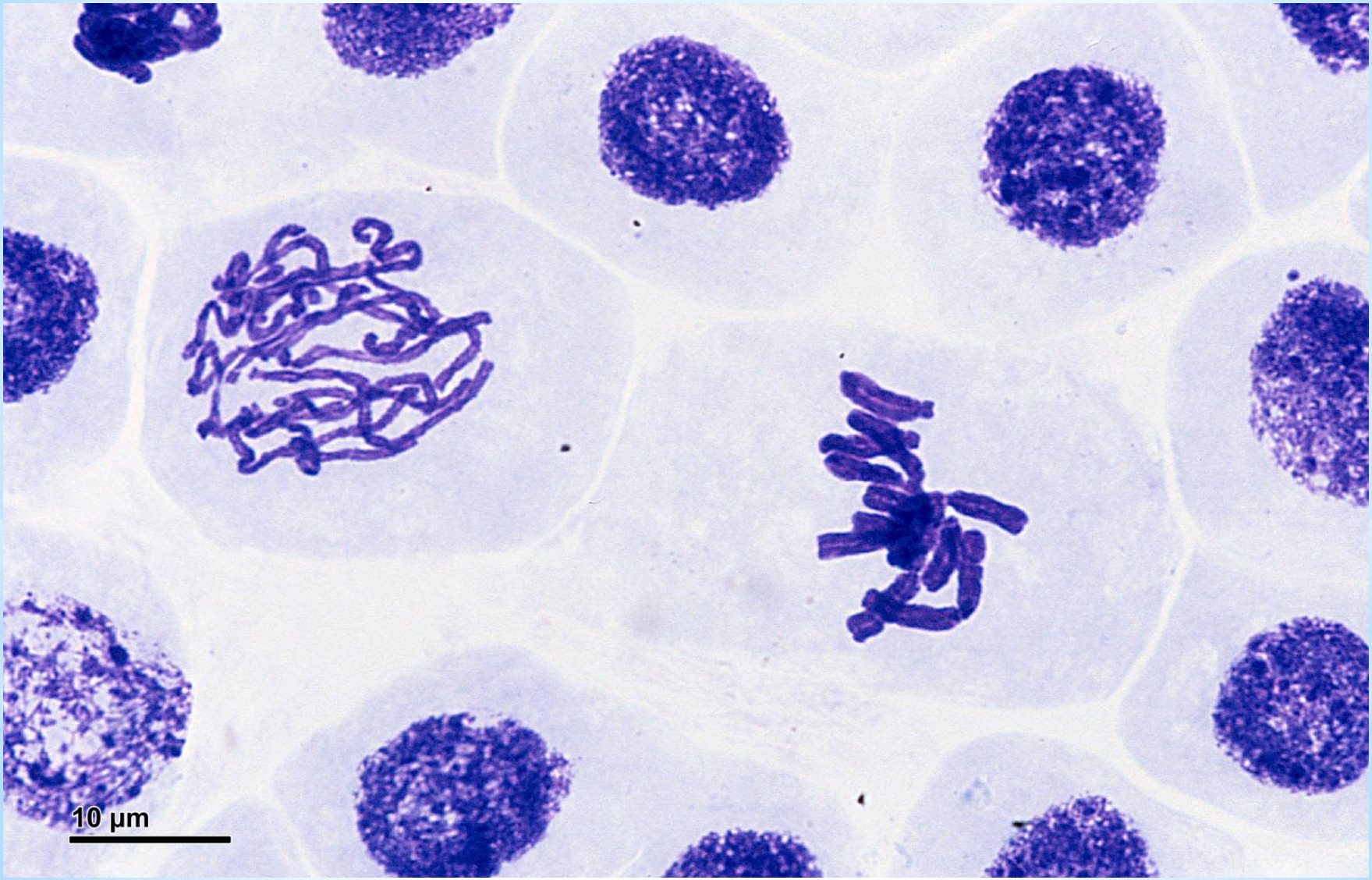

چند قطره از محلول B را به قطعات ریشه پیاز اضافه می کنیم

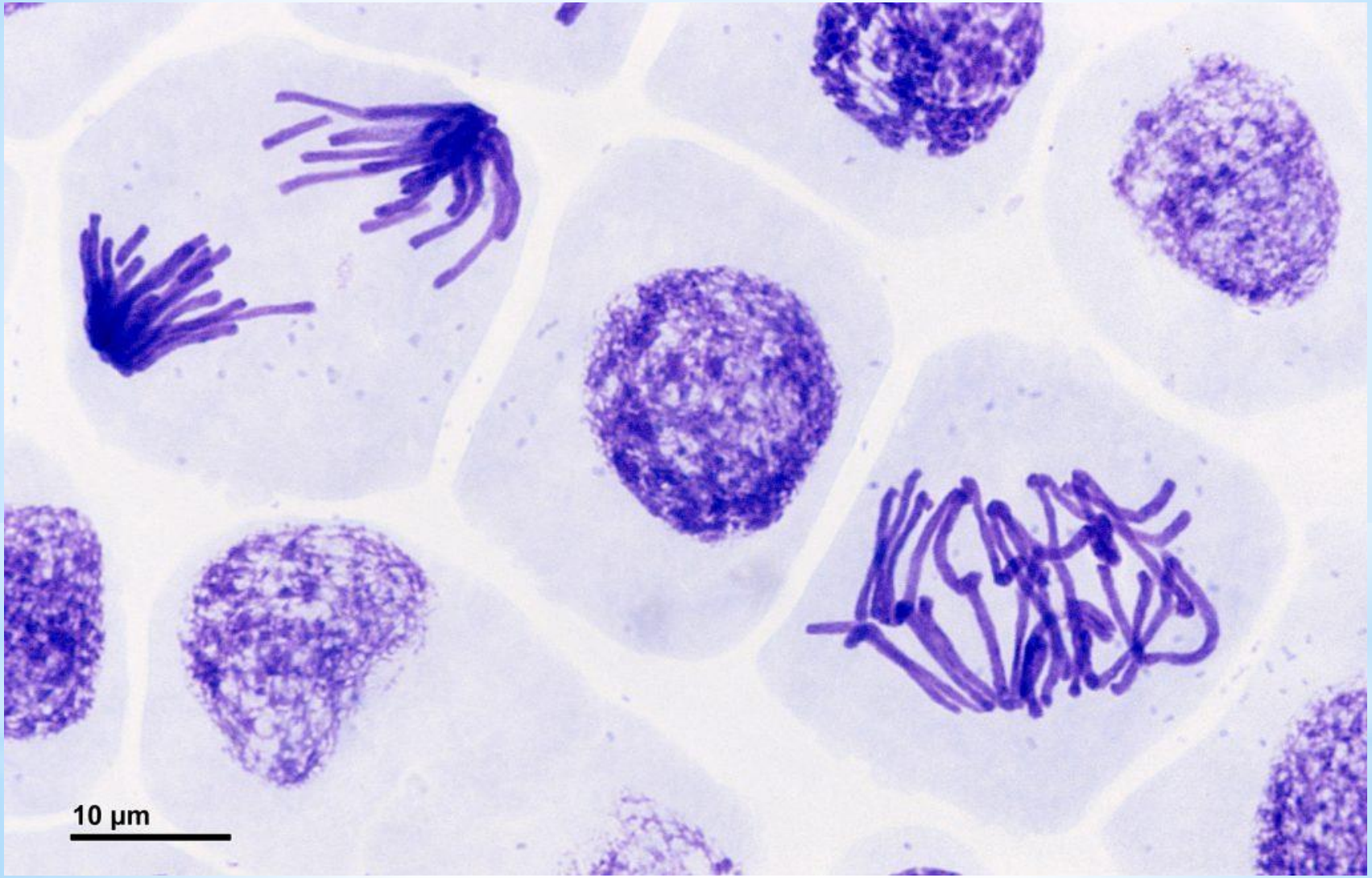
20 ثانیه

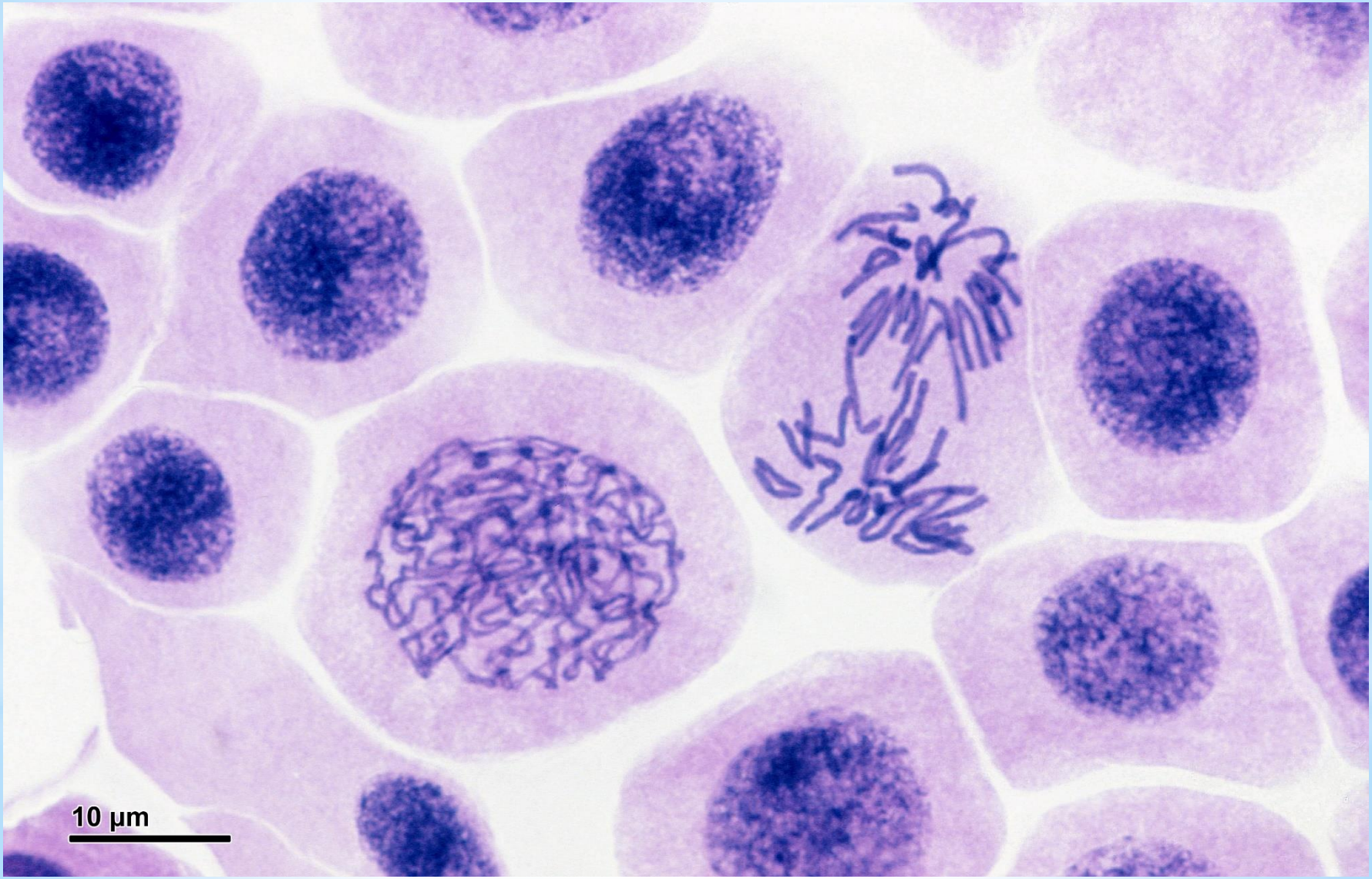

اضافه کردن دو قطره محلول
کریستال ویوله

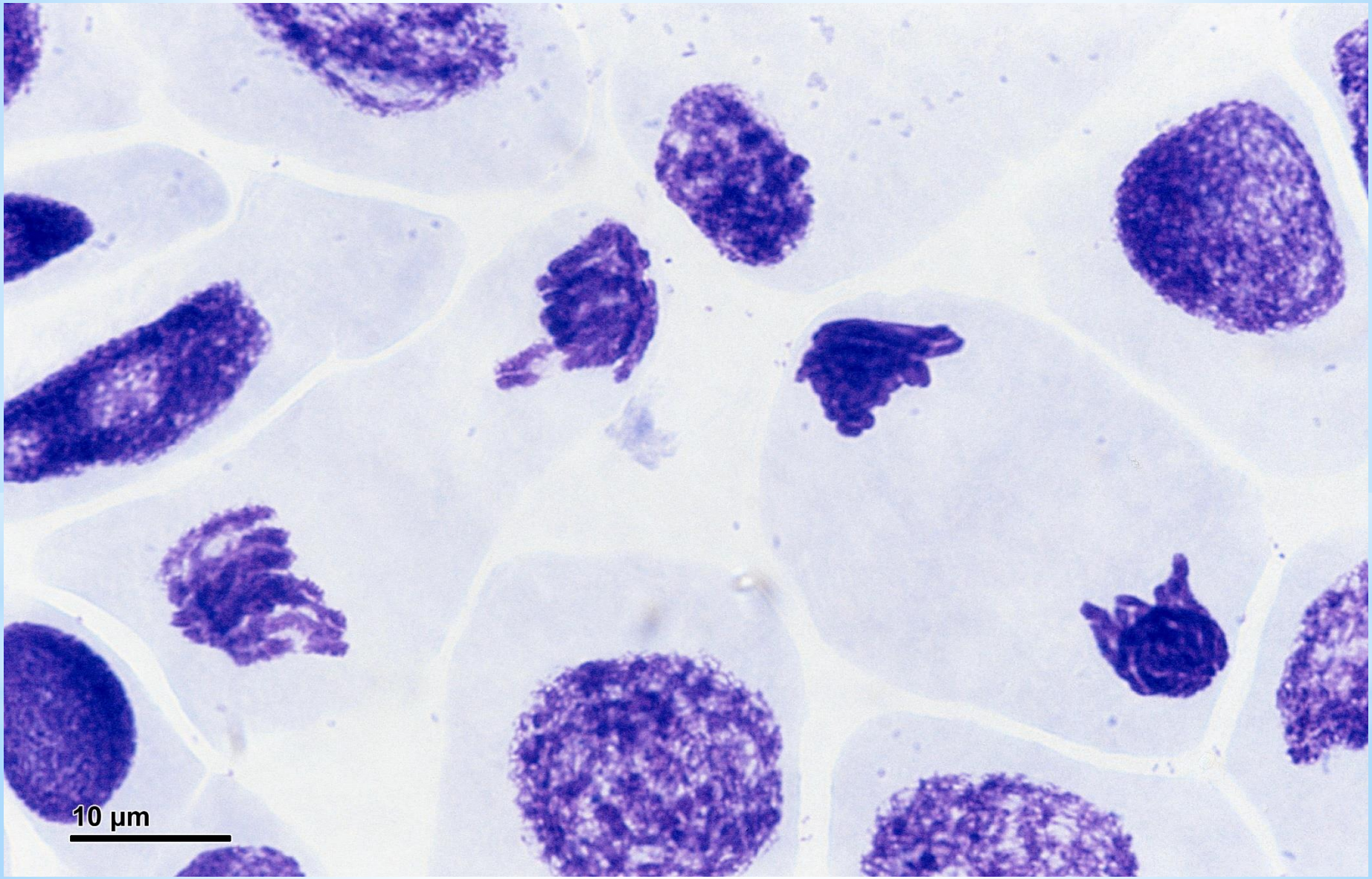
متلاشی کردن قطعات ریشه پیازبه کمک سوزن

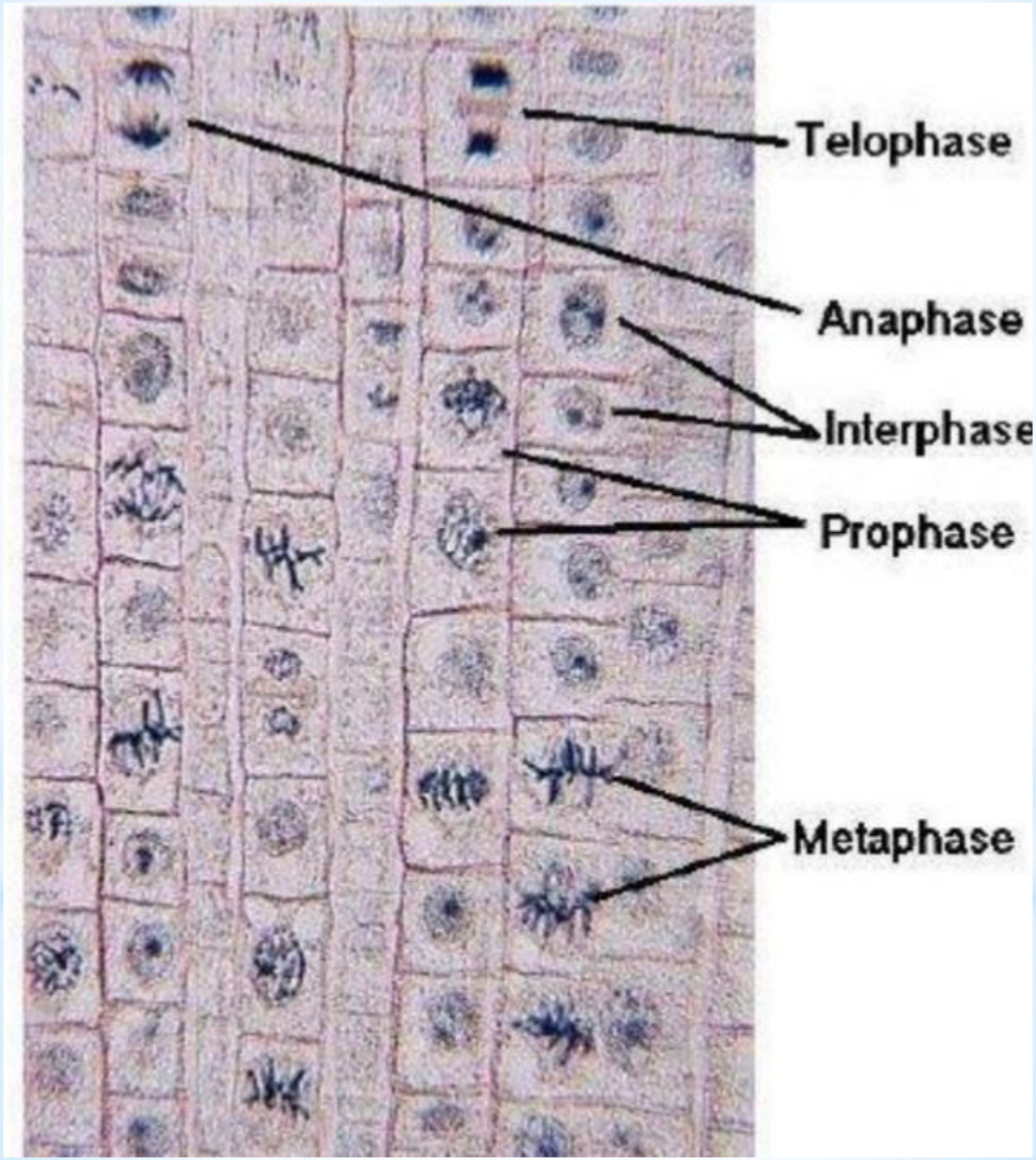



10 µm

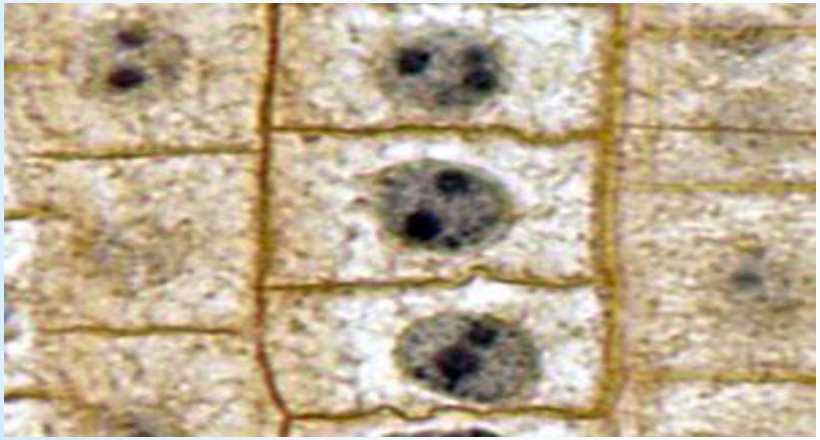

10 µm


10 µm


10 µm


Telophase
Anaphase
Interphase
Prophase
Metaphase

INTERPHASE

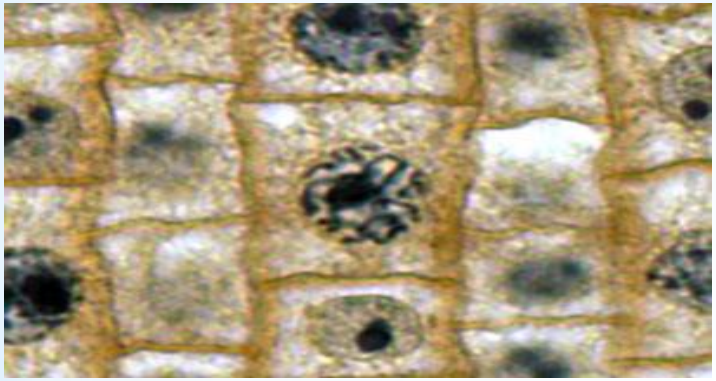


The **nucleus** of the cell is clearly stained and appears to have tiny dots and one or more dark **nucleoli** inside. What you can't see are the phases of interphase:

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.

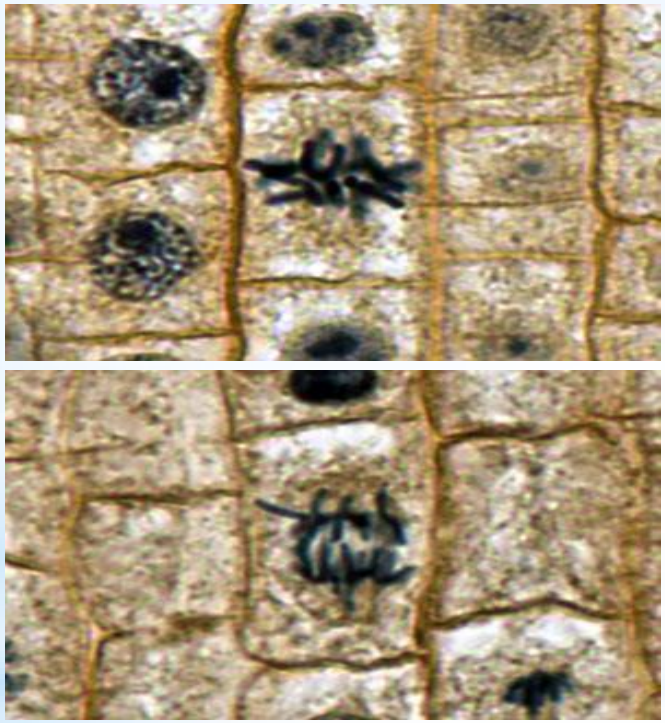


Prophase:

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.

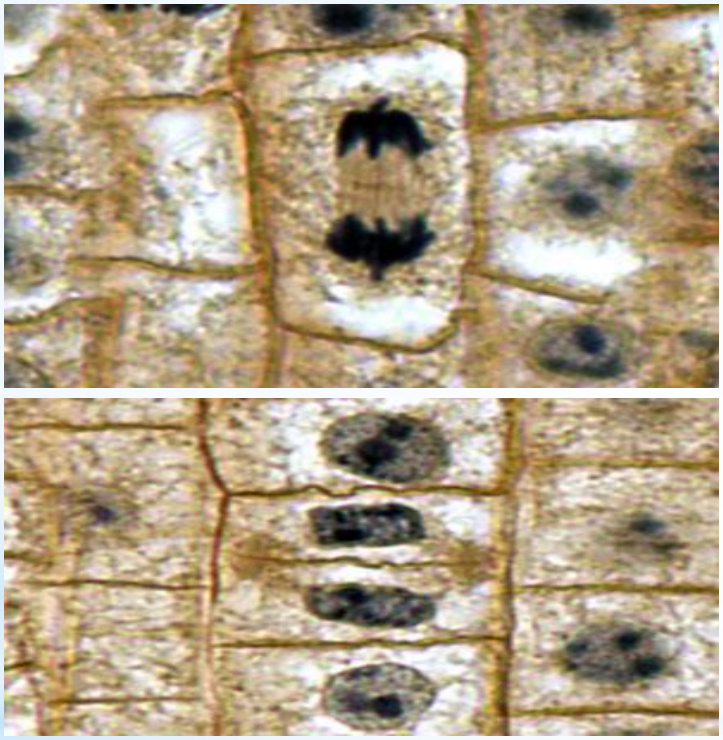
Metaphase:

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.

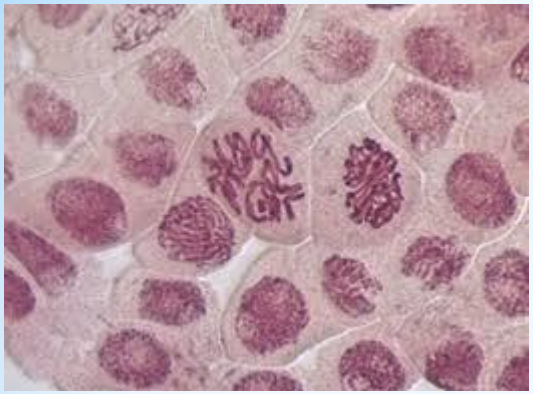


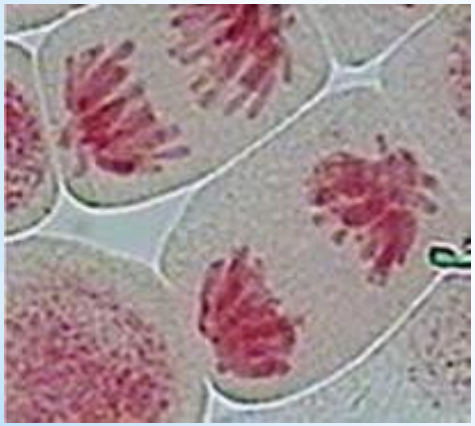
Telophase & Cytokinesis:

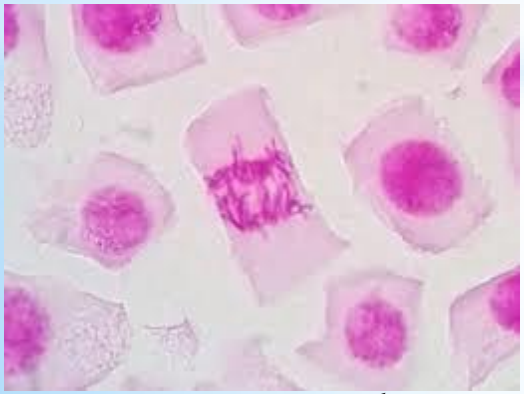
This is like the reverse of prophase—the cell is returning to interphase. Chromosomes (now single molecules of DNA with associated proteins) have reached opposite poles of the cell. Spindle fibers disappear. Nuclear membrane forms around the chromosome clusters. Chromosomes disappear from view as DNA 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**.

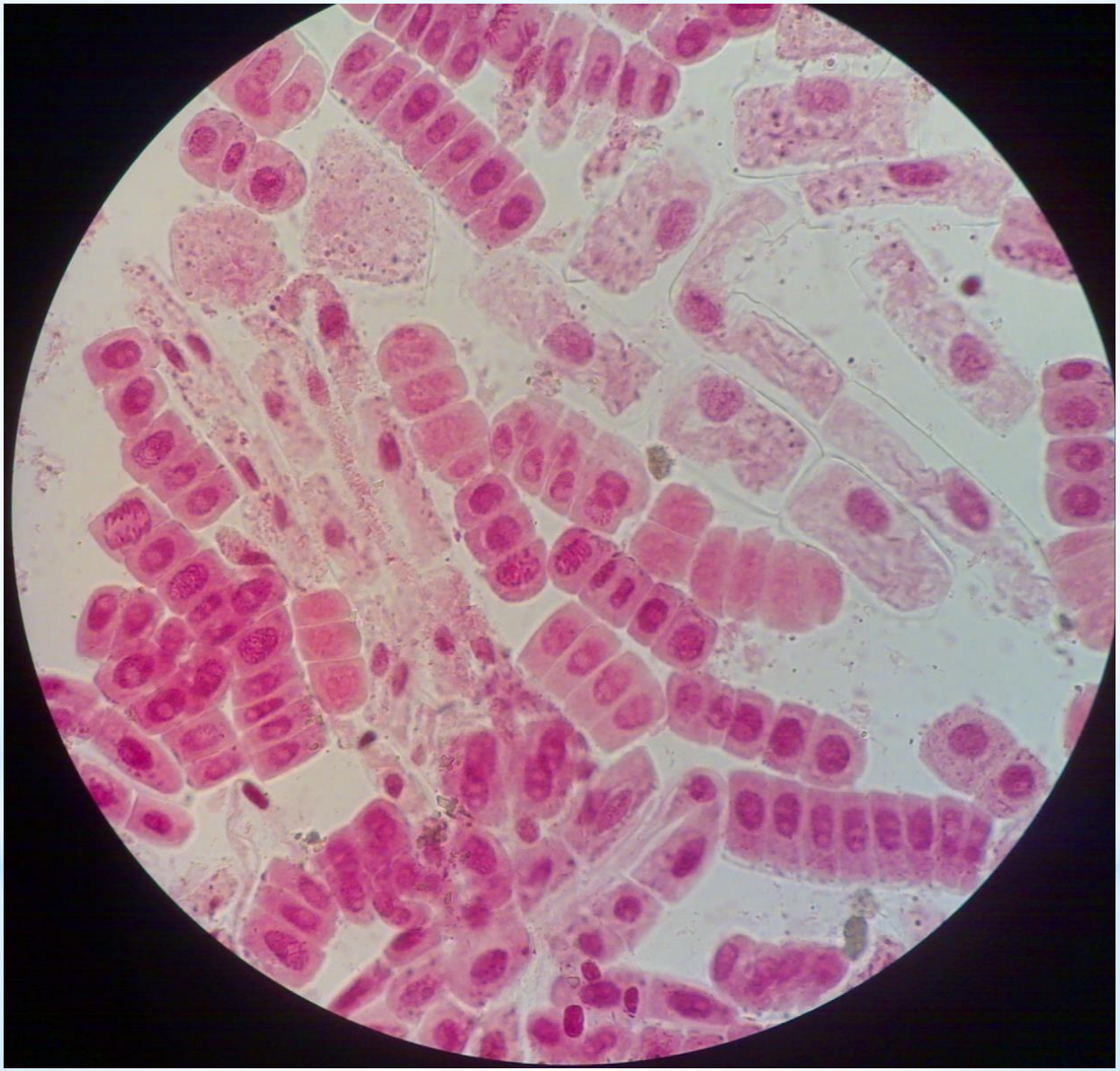
فعالیت

در میدان های مختلف دید کلیه مراحل تقسیم سلولی میتوز را مشخص و نامگذاری کنید.

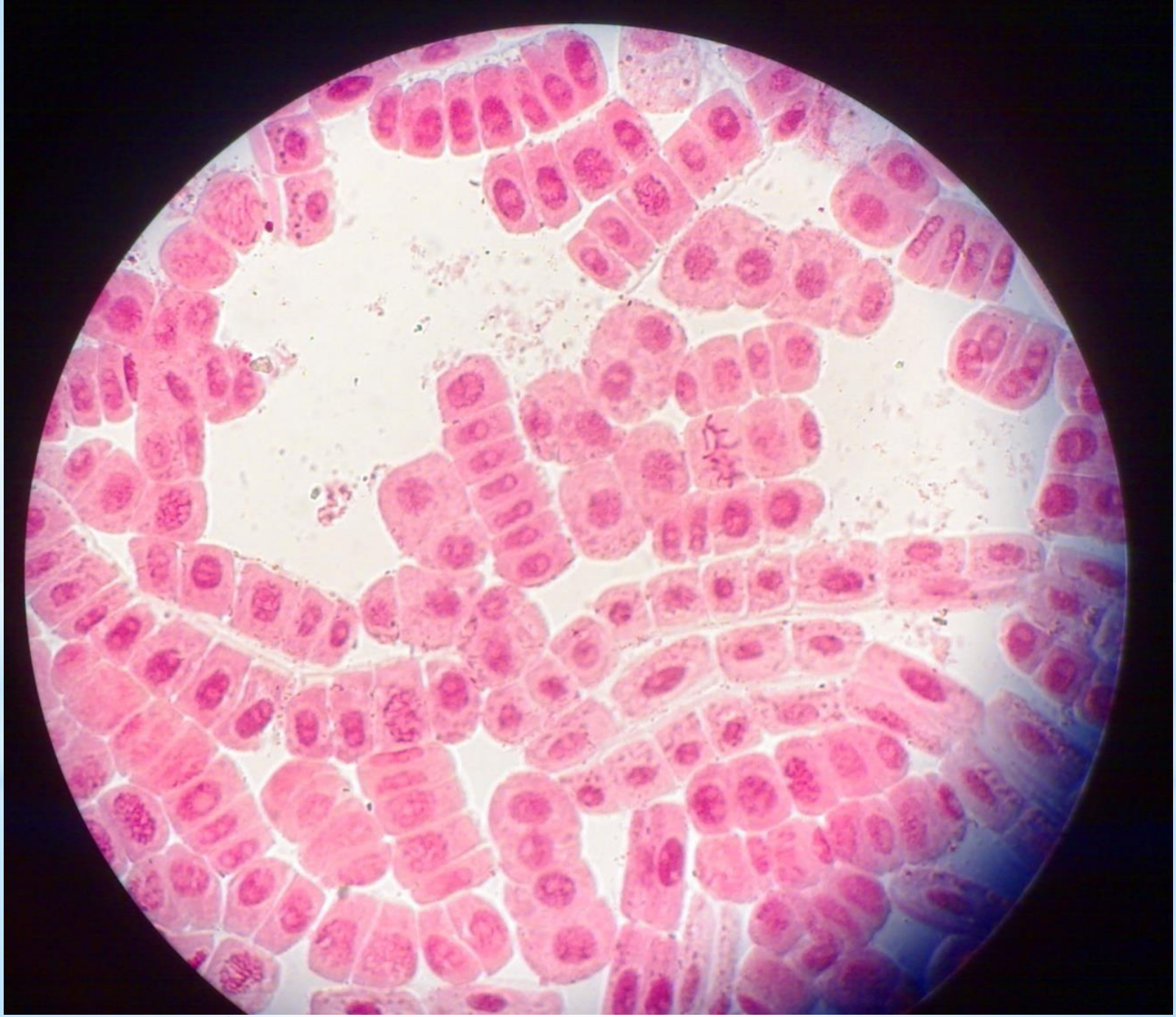






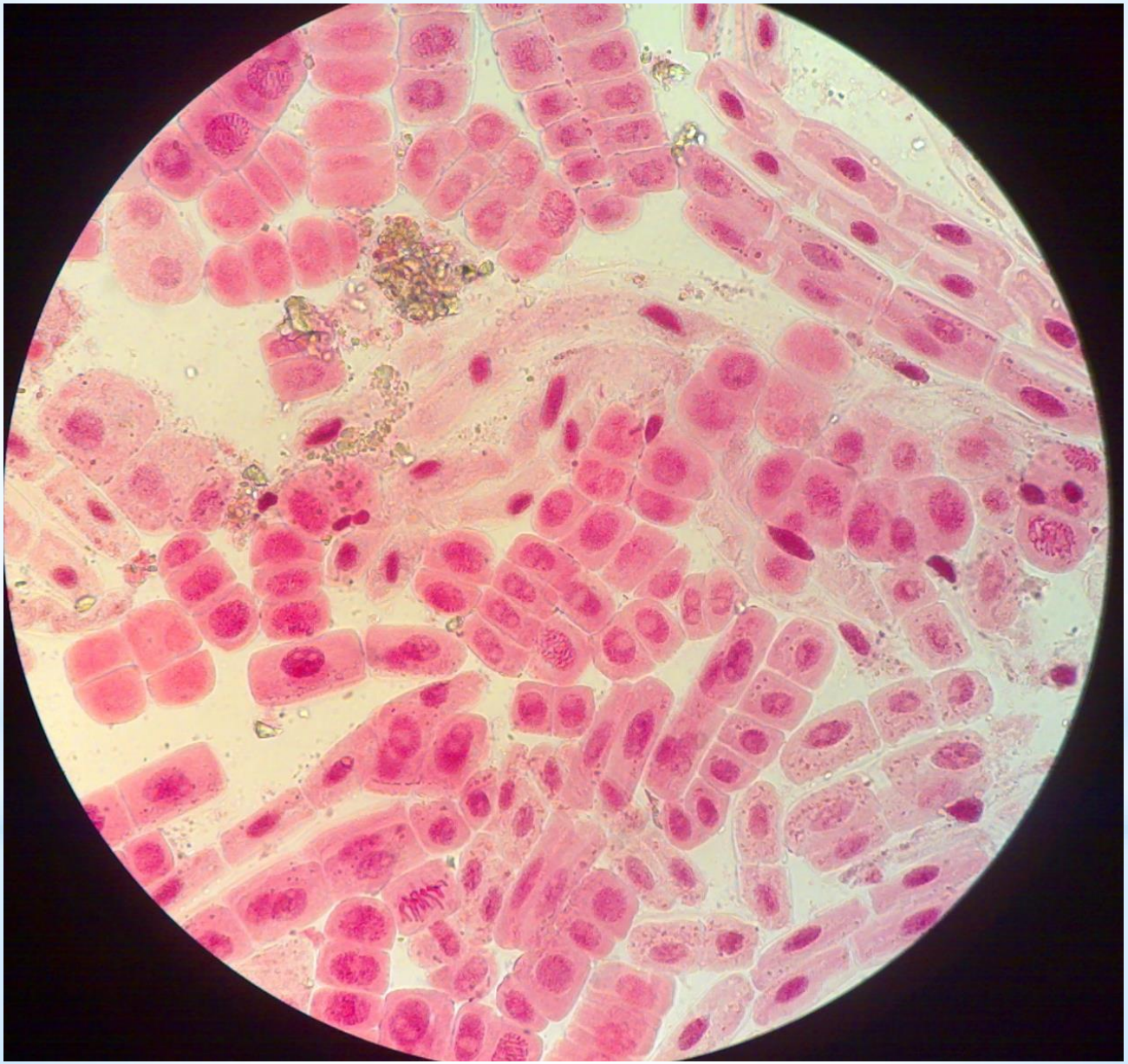


آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر

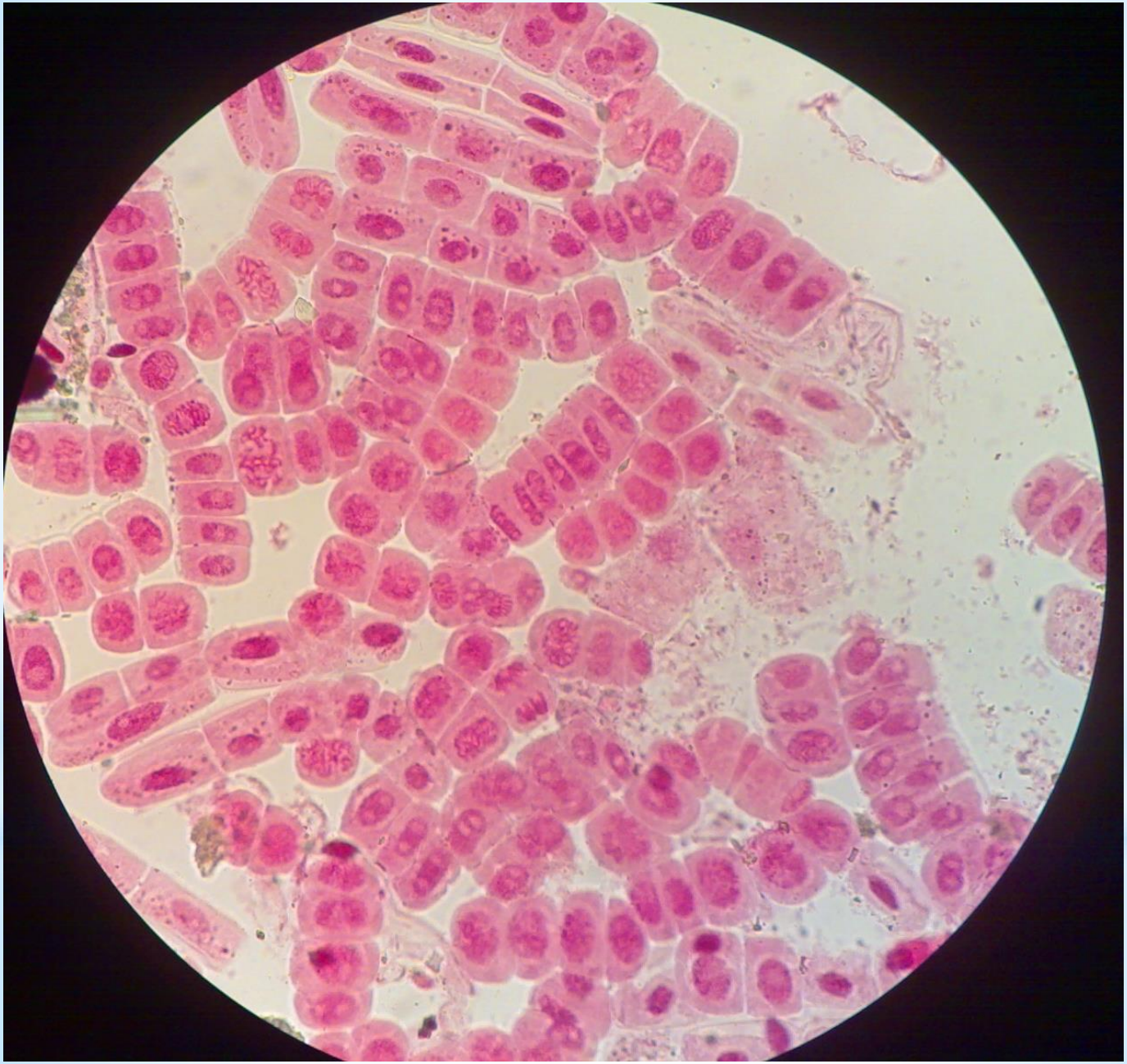


آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر

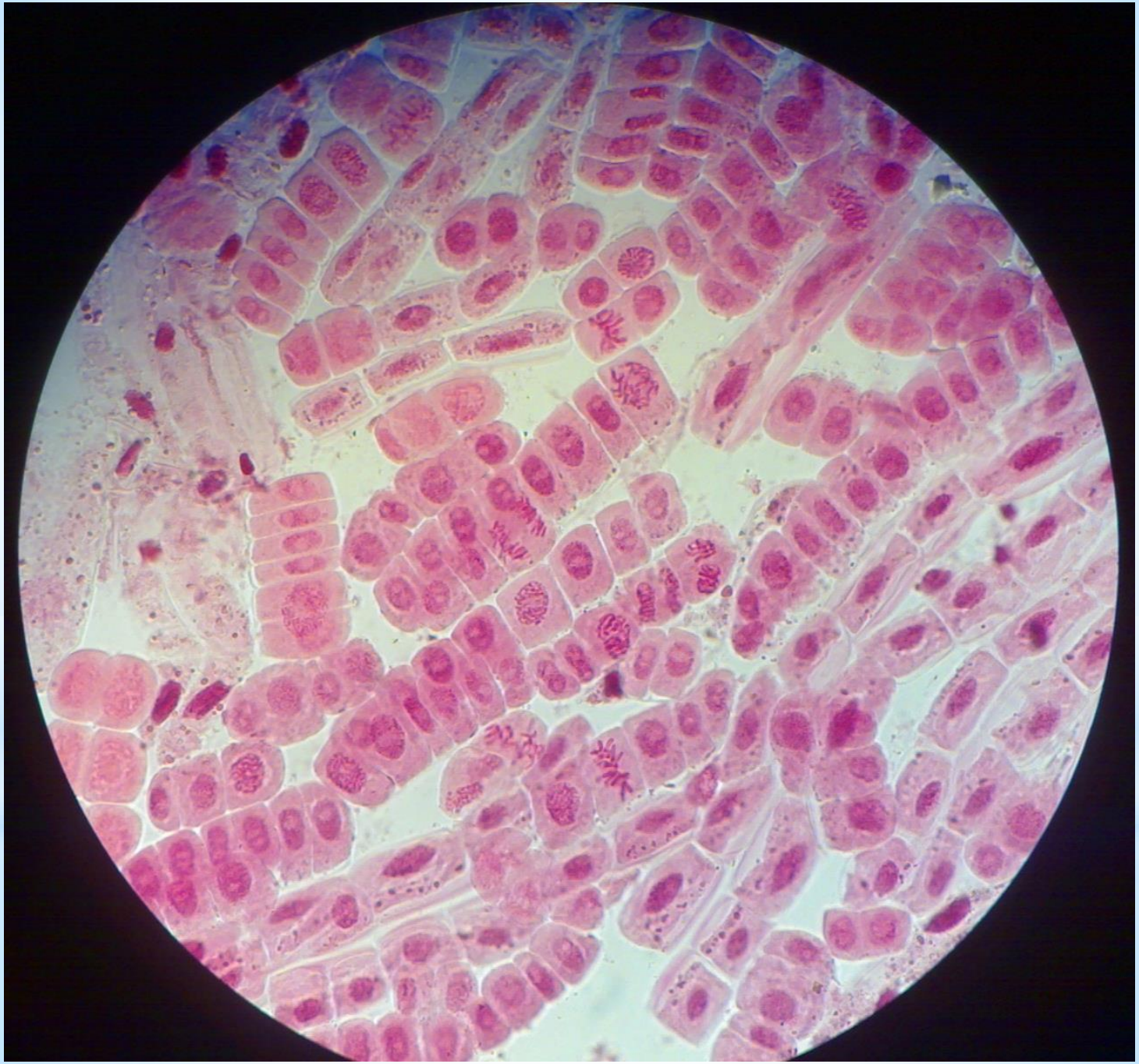
آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر

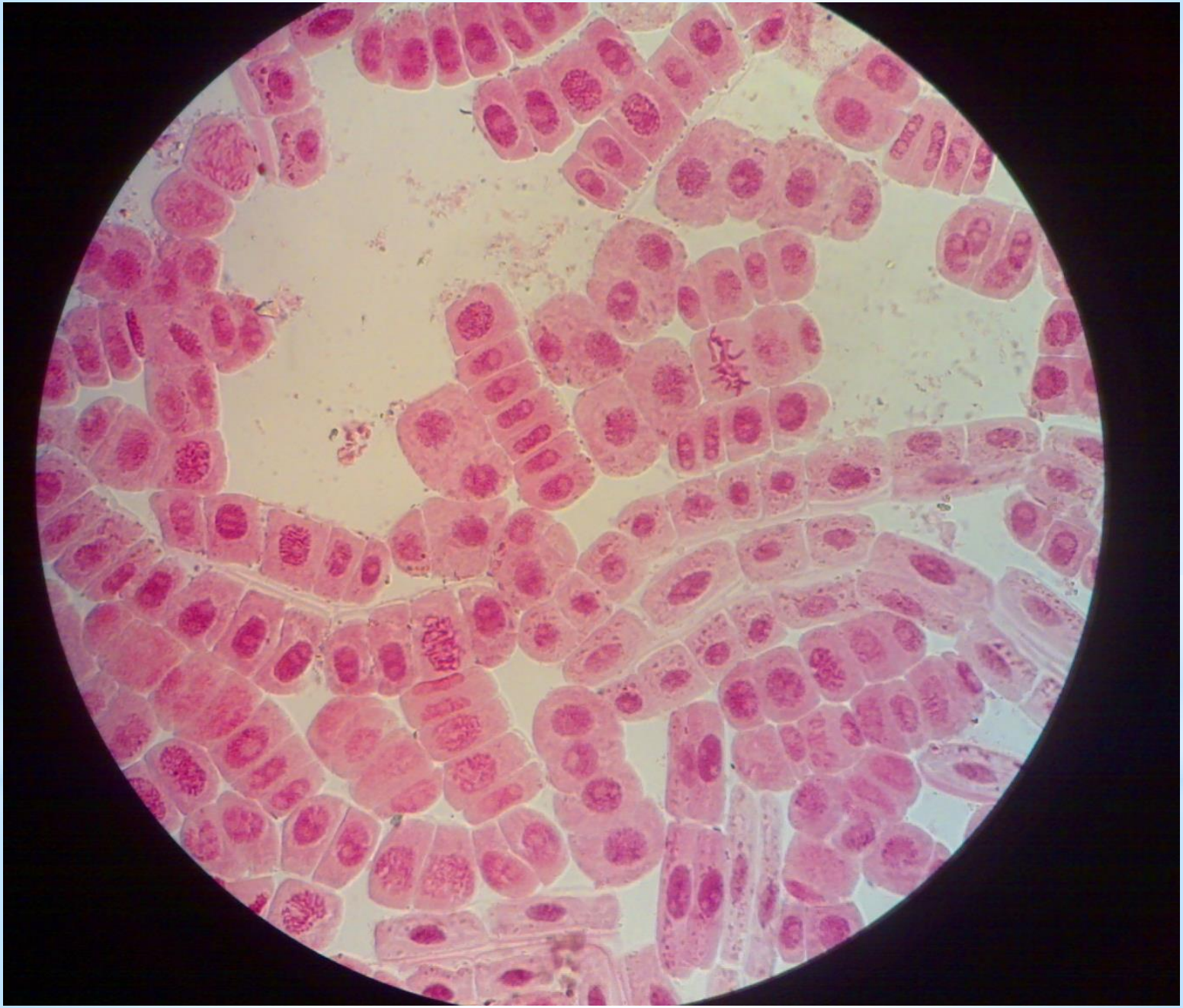


آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر

آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی- فرزانه فروهر فر