

MODERN MOLEKÜLER SİTOGENETİK

Kısmi Bir Çalışma Kılavuzu

Yazar

Ferzaneh Pordel Maragheh



© Copyright 2021

Bu kitabın, basım, yayın ve satış hakları Akademisyen Kitabevi A.Ş.'ne aittir. Anılan kuruluşun izni alınmadan kitabın tümü ya da bölümleri mekanik, elektronik, fotokopi, manyetik kağıt ve/veya başka yöntemlerle çoğaltılamaz, basılamaz, dağıtılamaz. Tablo, şekil ve grafikler izin alınmadan, ticari amaçlı kullanılamaz. Bu kitap T.C. Kültür Bakanhđı bandrolü ile satılmaktadır.

ISBN

978-625-8259-80-3

Kitap Adı

Modern Moleküler Sitogenetik

Editör

Ferzaneh Pordel Maragheh

Yayın Koordinatörü

Yasin DİLMEN

Sayfa ve Kapak Tasarımı

Akademisyen Dizgi Ünitesi

Yayıncı Sertifika No

47518

Baskı ve Cilt

Vadi Matbaacılık

Bisac Code

SCI049000

DOI

10.37609/akya.2266

GENEL DAĞITIM

Akademisyen Kitabevi A.Ş.

Halk Sokak 5 / A Yenışehir / Ankara

Tel: 0312 431 16 33

siparis@akademisyen.com

www.akademisyen.com

Ön söz

Geleceğe ışık tutabilecek bilgi ve deneyimlerimi içeren bu eser, araştırmacıların yaptığı çalışmalara farklı bir perspektif katarak yeni metodolojilerin yaygınlaştırmasına ön ayak olacaktır. Bu eserde yer alan metodolojiler Avrupa deneyimimden oluşmaktadır.

Amaç:

Bu eser, kültüre alınmış bazı bitki türlerinde, rDNA dizileri ve bantlama yöntemlerinin, karyotipleme ve kromozom tanımlama için etkili kromozom işaretçileri olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. FISH yöntemi rRNA gen bölgelerinin dağılış desenlerini, gümüş boyama ise bitki türlerinde 35S rDNA bölgelerinin transkripsiyonel aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Bununla beraber, CMA3+ ve DAPI ile çift boyama yöntemi rDNA bölgeleri ve pozitif CMA3+ bantları aradaki ilişkilerini tespit etmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- Seçilmiř bitki türlerinin sitogenetik analizi
- Hücre Kültürü
- Kromozom sayısı ve morfolojisinin tahmini
- Gümüş boyama - NOR'un görselleřtirilmesi
- DAPI / CMA3+ boyama
- 35S ve 5S rRNA genlerinin sayısı ve lokalizasyonu (F.I.S.H)

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AP	Alkali fosfataz
BCIP	Bromo-4-kloro-3-indolilfosfat
DAB	Diaminobenzidin
DIG-dUTP	Digoksygenin-11-Dutp
DS	Dextran sulfat
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GISH	Genomic in situ hybridization
ISH	in situ hybridization
NBT	Nitro-mavi tetrazolyum
NOR	nuclear organizing region
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
POD	Peroksidaz
rDNA	Recombinant DNA
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribozomal RNA
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSC	Salin sodium citrate
SWD	Steriled distilled water

İçindekiler

Kromozom Bantlama Teknikleri	1
Kromozom Morfolojisi ve Sayısı	1
ÇALIŞMADA KULLANILAN METODLAR:	5
Materyaller:	6
Hücre Kültürü:	6
G-bantlama:	9
Feulgen Boyama:.....	9
Slayt hazırlamak:.....	9
Gümüş Boyama (Silver Nucleolar Organizing Region Staining):	13
Slayt hazırlamak:.....	13
DAPI ve CMA3+:.....	18
Slayt hazırlamak:.....	18
C-bantlama:.....	20
Slayt hazırlamak:.....	20
Floresan in situ Hibridizasyonu (FISH):.....	21
Slaytların hazırlanması:.....	22
FISH analizinde:	22
<i>a. Probların hazırlanması,.....</i>	<i>22</i>
<i>b. Nükleotidlerin hazırlanması,.....</i>	<i>22</i>
<i>b.1. dATP nükleotidi,.....</i>	<i>23</i>
<i>b.2. dCTP nükleotidi</i>	<i>23</i>
<i>b.3. dGTP nükleotidi</i>	<i>23</i>

b.4. dTTP nükleotidi	23
c. Prob DNA'nın işaretlenmesi	23
d. Probe DNA 25srDNA	24
e. Probe DNA 5srDNA.....	25
f. Denaturasyon ve hibridizasyon karışımı	25
g. Yıkama işlemi	28
h. Probun immuno belirlenmesi	29
i. Slaytların görsel incelenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi:	32
Solüsyonların Hazırlanması	33
1. 8-hidroksikinolin	33
2. 5N HCl.....	34
3. Fiksasyon solüsyonu.....	34
4. 10 mM Sitrik tampon.....	35
5. Enzim solüsyonlarının hazırlanması.....	35
6. Gümüş nitrat solüsyonu	35
7. 0.01 M Borat Tamponu (pH:9).....	35
8. Mcilvanie tampon (pH:7).....	35
9. 1M Mgcl ₂	36
10. DAPI Stok solüsyon.....	36
11. DAPI (1:10) solüsyonu	36
12. DAPI+vectashield solüsyonu.....	36
13. Kromo stok solüsyonu	36
14. CMA+3 çalışma solüsyonu	36
15. 20×SSC	36
16. 2×SSC	37
17. 0.1SSC	37
18. Tween /4×SSC.....	37
19. Formamide-Sigma F-7503	37

20. % 10 SDS (sodium dodecyl sulphate)	38
21. % 50 dekstran sülfat (DS).....	38
22. Engelleme solüsyonu	38
23. RNase için tampon.....	38
24. RNase.....	39
25. 10 × PBS buffer, pH=7	39
26. FITC - conjugated anti - digoxigenin (Roche-1207741)	39
27. FITC - conjugated Anti-Sheep (Jackson immunoresearch 313-096-003)	40
Faz kontrast mikroskobu	41
Floresan mikroskobu:	41
Dijital görüntüleme mikroskobu:	42
Elektron mikroskobu :	42
Akış sitometrisi:	43
ÖZGEÇMİŞ	45
KAYNAKLAR.....	46
Metodolojik:	49
Teorik:	50

KAYNAKLAR

- Albini S., 1994. A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genome derived from synaptonemal complex analysis at prophase I of meiosis. *Plant J*, 5:665-72.
- Ambros PF, Matzke MA, Matzke AJ., 1986. Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 94:11-8.
- Brewster, J.L., Onions and Other Vegetable *Alliums*, *CAB International*, Cambridge, 2008.
- Butt, A.M., 1968. Vegetative growth, morphogenesis and carbohydrate content of the onion plant as a function of light and temperature under field- and controlled conditions. PhD Thesis, *Ain Shams University*, Netherlands, s. 35-89.
- de Jong, JH, Fransz P, Zabel P., 1999. High resolution FISH in plants - techniques and applications. *Trends Plant Sci* 4:258-263.
- Farzaneh PM, Daniel J, Magdalena , Kamil H, Bozena K., 2018. Karyotype analysis of eight cultivated *Allium* species. *Journal of Applied Genetics*, <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0474-1>.
- Federov, A. A. (ed.), 1969. *Chromosome Numbers of Flowering Plants*. Academy of Sciences of the USSR, Leningrad.
- Figuroa DM, Bass HW., 2010. A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Brief Funct Genomics* 9:95-102.
- Fransz PF, Stam M, Montijn BM., 1996. Detection of singlecopy genes and chromosome rearrangements in *Petunia hybrida* by fluorescence in situ hybridization. *Plant J*;9:767-74.
- Gall JG, Pardue ML., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378-383.
- Gall JG, Pardue ML., 1969. Formation and detection of RNADNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63:378-83.
- Gill BS, Friebe B., 1998. Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Curr Opin Plant Biol*, 1:109-15.
- Günay, A., 1992. Özel Sebze Yetiştiriciliği. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 2, 1-28, Ankara.

- Harper LC, Cande WZ., 2000. Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. *Funct Integr Genomics*, 1:89–98.
- John HA, Birnstiel MI, Jones KW., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223:582–7.
- Jiang J, Gill BS., 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49:1057–68.
- Jiang J, Gill BS., 2006. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068
- Jones RN., 1991. Cytogenetics of *Alliums*. In: Tsuchiya T, Gupta PK (eds) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, Part B. Elsevier, Amsterdam, pp 215-227.
- Jones, R. N., 1983. Cytogenetic evolution in the genus *Allium*. In: Swaminathan, M. S., Gupta, P. K. and Sinha, U. (eds). *Cytogenetics of Crop Plants*. Macmillan India, New Delhi.
- Kato A, Lamb JC, Birchler JA., 2004. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13554–9.
- Kurata N, Omura T., 1978. Karyotype analysis in rice I. A new method for identifying all chromosome pairs. *Jpn J Genet*, 54:251–5.
- Lamb JC, Birchler JA., 2006. Retroelement genome painting: cytological visualization of retroelement expansions in the genera *Zea* and *Trip-sacum*. *Genetics*, 173:1007–21.
- Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC., 1982. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4381-4385
- Lavanja UC., 1978. Differential staining and plant chromosomes—progress in cytogenetics. *Curr Sci*, 47:255–60.
- Linde-Laursen I., 1975. Giemsa C-banding of the chromosomes of “Emir” barley. *Hereditas* 81:285–9.
- Loidl, J., 1983. Some features of heterochromatin in wild *Allium* species. *Plant System Evol.* 143: 117-131.
- Loidl, J., 1979. C-band proximity of chiasmata and absence of terminalisation in *Allium flavum* (Liliaceae). *Chromosoma* 73: 45-51.

- Lysak MA, Fransz PF, Ali HBM, et al., 2001. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *PlantJ*, 28:689–97.
- Lysak MA, Pecinka A, Schubert I., 2003. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Res*;11:195–204.
- Mok DWS, Mok MC. A., 1976. modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. *JHered*, 67:187–8.
- Pardue ML, Gall JG., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *ProcNatlAcad SciUSA*, 64:600–4.
- Peacock WJ, Dennis ES, Rhoades MM., 1981. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *ProcNatl Acad SciUSA*, 78:4490–4.
- Pijnacker LP, Ferwerda MA., 1984. Giemsa C-banding of potato chromosomes. *CanJ GenetCytol*;26:415–9.
- Schweizer D., 1973. Differential staining of plant chromosomes. *Chromosoma* ;40:307–20.
- Shen DL, Wang ZF, Wu M., 1987. Gene mapping on maize pachytene chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 95:311–4.
- Suzuki HY, Futsuhara F, Takaiwa F., 1991. Localization of glutelin gene in rice chromosome by in situ hybridization. *JpnJGenet*, 66:305–12.
- Ved Brat, S., 1965a. Genetic systems in *Allium*. I. Chromosome variation. *Chromosoma* 16: 486-499.
- Vosa, C. G., 1976a. Heterochromatic patterns in *Allium*. I. The relationship between the species of the *Cepa* group and its allies. *Heredity* 36: 383-392.
- Vosa, C. G., 1976ft. Heterochromatic banding patterns in *Allium*. II. Heterochromatin variation in species of the *paniculatum* group. *Chromosoma* 57: 119-133.
- Xu J, Earle ED. 1994. Direct and sensitive fluorescence in situ hybridization of 45S rDNA on tomato chromosomes. *Genome*, 37:1062–5.
- Yu H, Liang GH, Kofoid KD. 1991. Analysis of C-banding chromosome patterns of Sorghum. *Crop Sci*, 31:1524–7.
- <http://acikerisim.baskent.edu.tr/bitstream/handle/11727/1743/38ad-83709c68e0e175e3f81e38cc8e42.ppt?sequence=2&isAllowed=y>
- <http://aves.comu.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=2&USER=805>

Metodolojik:

- Fukui K. and Nakayama S. (eds), 1996. Plant Chromosome Laboratory Methods. BocaRaton: CRC Press.
- Goodpasture C. and Bloom S. E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma (Berl.)* 53: 37--50.
- Hasterok R. and Maluszynska J., 1998. Sequential silver staining and FISH ---their use to distinguish active and inactive rRNA gene loci. Proceedings on the Symposium "Plant Cytogenetics", Cieszyn, Poland: 168--172.
- Hizume M., Sato., Tanaka A., 1980. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technology* 55(2): 87--90.
- Howell W. M. and Black D. A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014--1015.
- Sharma A. K. and Sharma A., 1994. Chromosome techniques. A manual. Harwood Academic Publishers GmbH.
- Schwarzacher T. and Heslop-Harrison P., 2000. Practical in situ hybridization. BIOS, Oxford.

Teorik:

- Chen Z. J. and Pikaard C. S., 1997. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development* 11: 2124---2136.
- Glyn M. C. P., Egertova M., Gazdova B., Kovarik A., Bezdek M., Leitch A. R., 1997. The influence of 5-azacytidine on the condensation of the short arm of rye chromosome 1R in *Triticum aestivum* L. root tip meristematic nuclei. *Chromosoma* 106: 485---492.
- Hasterok R. and Maluszynska J., 2000. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid Brassica species. *Genome* 43: 574---579.
- Hasterok R. and Maluszynska J., 2000. Different rRNA gene expression in primary and adventitious roots of *Allium cepa* L. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 38(4): 181---184.
- Mergudich D., Leyton C., Gonzales-Fernandez A., Sans J., De la Torre C., 1992. Determination of the replication time of nucleolar organizer DNA after 5-azacytidine treatment for restricted parts of the S period. *Protoplasma* 167: 43---48.
- Neves N., Heslop-Harrison J. s., Viegas W., 1995. rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo development in wheat x rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 385: 1---5.
- 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat x rye hybrids. *Genome* 33: 707---712.
- Vieira R., Queiroz A., Morais L., Barao A., Mello-Sampayo T., Viegas W. S., 1990.