

### المختبر الثالث : أشكال الخلايا

الهدف: التمييز بين أنواع الخلايا المختلفة

المحتوى: تختلف الخلايا في الكائنات الحية من حيث الشكل والحجم بما يتلاءم مع وظائفها فخلايا الجلد متناهية الصغر (لتقوم بوظيفة الحماية على أكمل وجه). والخلايا العصبية طويلة ومتفرعة (لتقوم بنقل السيال العصبي داخل الجسم بأسرع ما يمكن) وخلايا الدم مقعرة الوجهين للمساهمة بمرور الدم بالاواعية الدموية والحماية من ضغط الدم وشكل الياف العضلات يساعد على انقباضها .

الجزء العملي : مشاهدة شرائح محهرية لأشكال مختلفة من الخلايا ورسم وتدوين الملاحظات الخاصة بالمختبر وتصنيف الخلايا حسب الشكل والترتيب .

### أشكال الخلايا

يمكن ان تكون الخلية ذات شكل متغير variable حيث تتحول باستمرار الى أشكال مختلفة كالأميما وكريات الدم البيض leucocytes او الخلايا ذات الشكل الثابت او المحدد fixed وتكون كالاتي :-

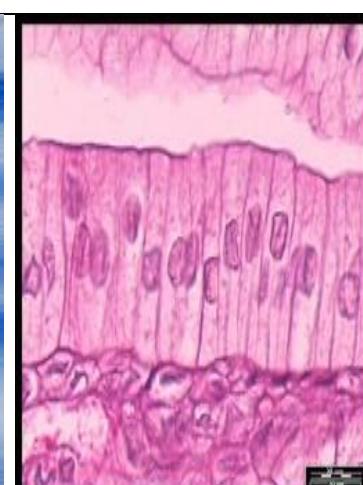
- الخلايا المسطحة flattened طبقة البشرة العليا والسفلى .
- الخلايا المكعبية cuboidal خلايا الغدة الدرقية .
- الخلايا العمودية columnar الخلايا التي تبطن الامعاء .
- الخلايا المقعرة discoidal كريات الدم الحمراء .
- الخلايا الكروية spherical بيض عدد كبير من الحيوانات .
- الخلايا المغازلية spiridal خلايا الياف العضلات الملساء .
- الخلايا الطولية elongated elongated الخلايا العصبية .
- الخلايا المتشعبية branched الخلايا الصبغية للجلد .



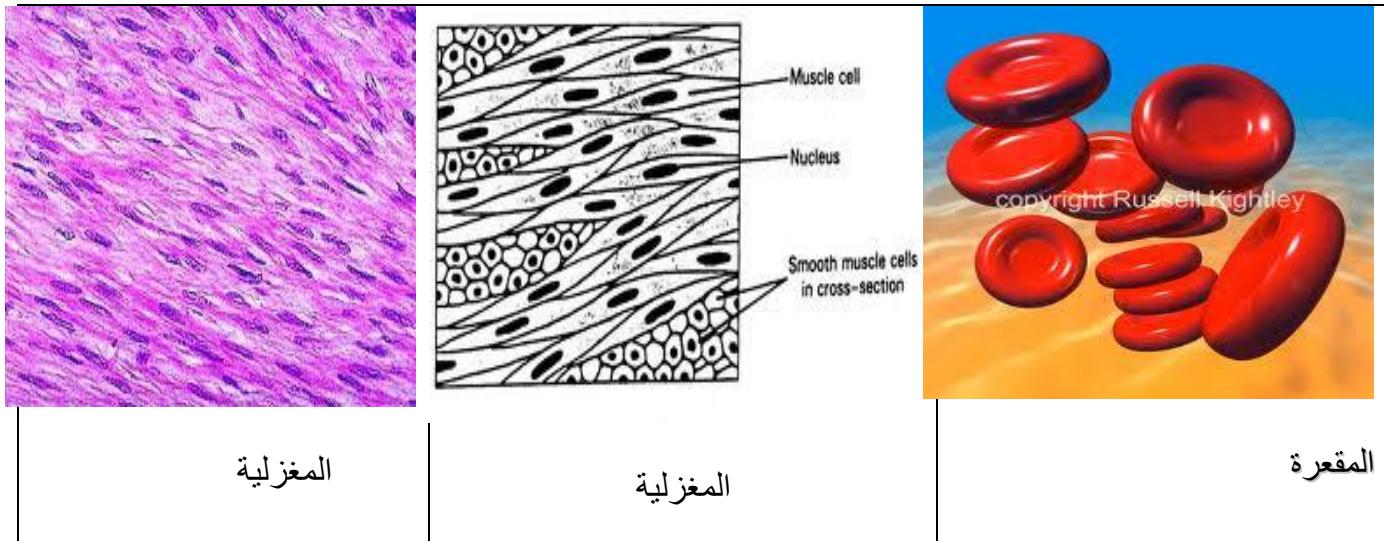
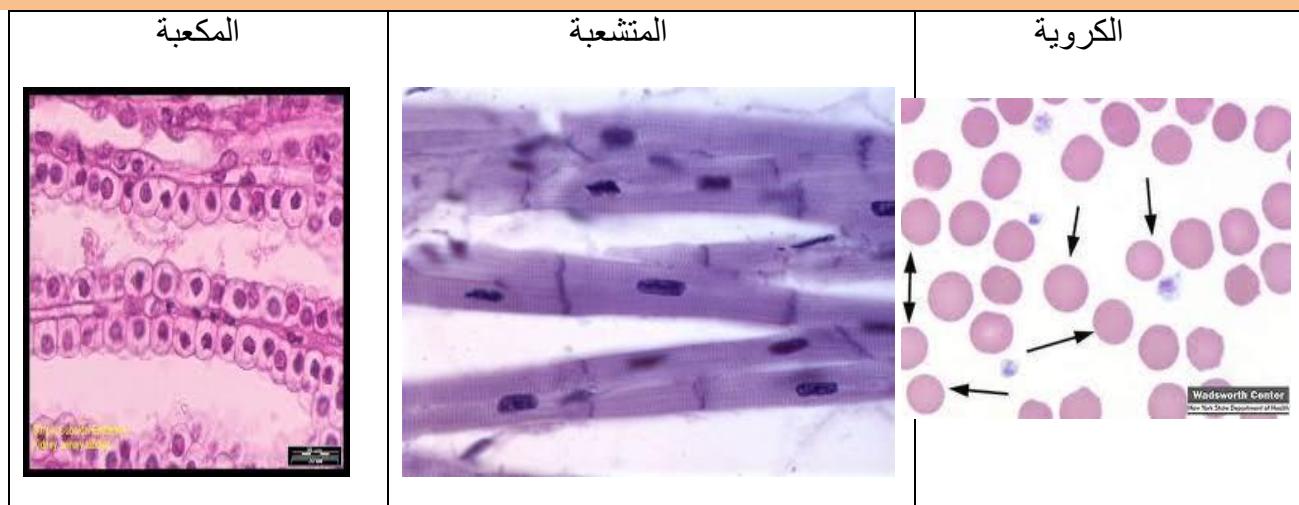
المسطحة



الطولية



العمودية



#### المختبر الرابع: البلاستيدات PLASTIDS

البلاستيدات عضيات خلوية سابحة في بروتوبلازم الخلايا النباتية الحقيقية النواة و الطحالبية يختلف عددها وشكلها حسب نوع الخلية. وظيفتها تحويل الطاقة الضوئية إلى كيميائية مخزنة في المواد الغذائية.

**الهدف :** معرفة كيفية تحضير الشرائح المجهرية الخاصة بالبلاستيدات ، التمييز بين انواع البلاستيدات والتعرف على وظيفة كل نوع .

البلاستيدات تشقق من Pro-plastids او البلاستيدات الأولية والتي تتميز إلى عدة بلاستيدات تختلف عن بعضها البعض في الوظيفة والتي تعتمد بدورها على الموقع ونجد الآتي:

##### Chromoplast

##### ا- البلاستيدات الملونة

ويحتوى على الصبغات الحمراء والصفراء والبرتقالية وتسمى صبغات الكاروتين والزانثوفيل Carotein and Xanthophyll .

##### Non pigmented plastid

##### ب- البلاستيدات عديمة اللون

##### 1 - Amyloplast:- لتخزين النشا

٢- **Leucoplast** عديمة اللون اي لا تحتوي على صبغات وتوجد في جميع الاعضاء خاصة الجذور وهي لتخزين الدهون ، البروتينات .

### ح- بلاستيدات خضراء Chloroplasts

ويرجع لونها إلى وجود أصباغ اليخصوص (الكلوروفيل) Chlorophylls بكميات متوفرة مع وجود نسبة ضئيلة من أصباغ الكاروتين والزانثوفيل والبلاستيدات الخضراء ذات شكل متعدد ففي النباتات الراقية لها شكل قرصي أو بيضوي أو كروي وعددتها من ٤٠ - ٢٠ عضية للخلية النباتية الواحدة. أما في النباتات الواطئة فتتخذ أشكال مختلفة ففي طلب Chlamydomonas شكلها كوبوي وفي الـ Spirogyra شكلها حلزوني وفي طلب zygonema تتخذ الشكل النجمي. وفي الطحلب الأخضر Synechococcus تتخذ شكل صفائح متحدة المركز هي أهم الأنواع إذ تقوم بعملية البناء الضوئي Photosynthesis.

و- **البلاستيدات الزيتية**

ي- **البلاستيدات البروتينية**

م- **البلاستيدات الـ Elaioplastids**

proteinoplastids

Sterinochloroplastids

لاتوجد هذه الانواع بصورة متكررة في الانسجة النباتية .

وتختلف البلاستيدات في حجمها وشكلها وعددتها في خلايا النباتات المختلفة ولكنها ثابتة في النوع الواحد فمثلاً توجد بلاستيدة واحدة أو اثنين في الخلية الواحدة في بعض أنواع الطحالب وأحياناً تصل إلى عشرة أو أكثر في بعض الأنواع الأخرى أما في النباتات الراقية في يوجد ٥٠ بلاستيدة خضراء أو أكثر في الخلية الواحدة.

و في النباتات الراقية تظهر البلاستيدات الخضراء تحت المجهر الصغيرة مستديرة أو بيضاوية أو قرصية قطرها يتراوح بين ٨-٥ ميكرون وسمكها ميكرون واحد وتنتمي البلاستيدات الخضراء كيميائياً من مادة البروتين واللبيدات ويوجد ٨٠٪ من البروتين في حالة غير ذاتية ومرتبطاً باللبيدات مكوناً مادة ليوبروتينية ومن أهم مكونات البلاستيدة الخضراء أصباغ اليخصوص (الكلوروفيل) كما توجد بها أيضاً نسبة ضئيلة من أصباغ الكاروتين والزانثوفيل وتحتوي البلاستيدة الخضراء على DNA و RNA وريبوسومات مثلها في ذلك مثل الميتوكوندريات وتقوم مادة الـ DNA بالتحكم في جينات وراثية معينة داخل البلاستيدة.

### التركيب الدقيق للبلاستيدة الخضراء:

- ١- تحيط بالبلاستيدة الخضراء غشائين خارجين لكل منها تركيب الوحدة الغشائية.
- ٢- ويملا فراغ البلاستيدة مادة ليوبروتينية سائلة تعرف بالحشوة Stroma matrix ويوجد بها DNA ، RNA ، ريبوسومات ، قطرات دهنية وحبوب نشوية .
- ٣- وتمتد بعرض البلاستيدة أقراص تترافق فوق بعضها تظهر كالحبوب تسمى جرانا grana، وهي التي تتم فيها عملية التمثيل الضوئي.

ثاني أكسيد الكربون + ماء أصباغ الكلوروفيل نشويات + ٤٢

طاقة ضوئية

**ملاحظة**/ البلاستيدات عضيات ممكن ان تتحول الواحدة الى الاخرى ويعتمد ذلك على مكانها وتطورها.

**الجزء العملي :**

- خذ ورقة حشائش خضراء وابدء بكشطها من أحد الوجهين.
  - واستمر بالكشط بدقة حتى تحصل على جزء رقيق جدا بالإضافة إلى أحد البشرتين.
  - خذ جزء صغير من الجزء الرقيق وانقله إلى شريحة نظيفة.
  - ضع قطرة ماء والغطاء وافحص تحت القوة  $\times 10$  وارسم ما تشاهده.
- لاحظ:-** شكل البلاستيدات الخضراء القرصية.
- خذ جزء صغير من ثمار الطماطم و اكشط قليلا من اللب الداخلي او الوسطي
  - ضع السائل على شريحة نظيفة وضع عليه قطرة الماء
  - غط الشريحة وافحص تحت القوة  $\times 10$  وارسم ما تشاهده.
- لاحظ:-** البلاستيدات الملونة وشكلها العصوي وأشكال أخرى.
- خذ جزء صغير من ثمار البطاطا و اكشط قليلا من اللب الداخلي او الوسطي
  - واستمر بالكشط بدقة حتى تحصل على جزء رقيق جدا
  - خذ جزء صغير من الجزء الرقيق وانقله إلى شريحة نظيفة.
  - ضع قطرة ماء والغطاء وافحص تحت القوة  $\times 10$  وارسم ما تشاهده.

**البلورات Crystals**

وهي عبارة عن تراكيب غير حية تكون عبارة عن مواد غير ذاتية تتكون نتيجة اتحاد الاحماض الموجودة ضمن العصير الخلوي مع املاح الكالسيوم ، فتتكون اوكسالات الكالسيوم او كاربونات الكالسيوم .  
س/ ما الغرض من تكون البلورات في الخلية النباتية ؟  
ج - هو التخلص من سمية حامض الاوكساليك عن طريق تحوله الى مركبات غير ذاتية على هيئة بلورات .  
\* اشكال البلورات :-  
١- **البلورات الابرية** : Needle crystals

وتظهر بشكل Needles ابر تجتمع مكونة حزمة تسمى Raphides مادتها الاوكزالات ، توجد في البصل او نبات لالة عباس.

٢- **البلورات الوردية** Druses crystals :- تجتمع مادة الاوكزالات على شكل نجمة او وردة توجد في الدفلة والزيفون .

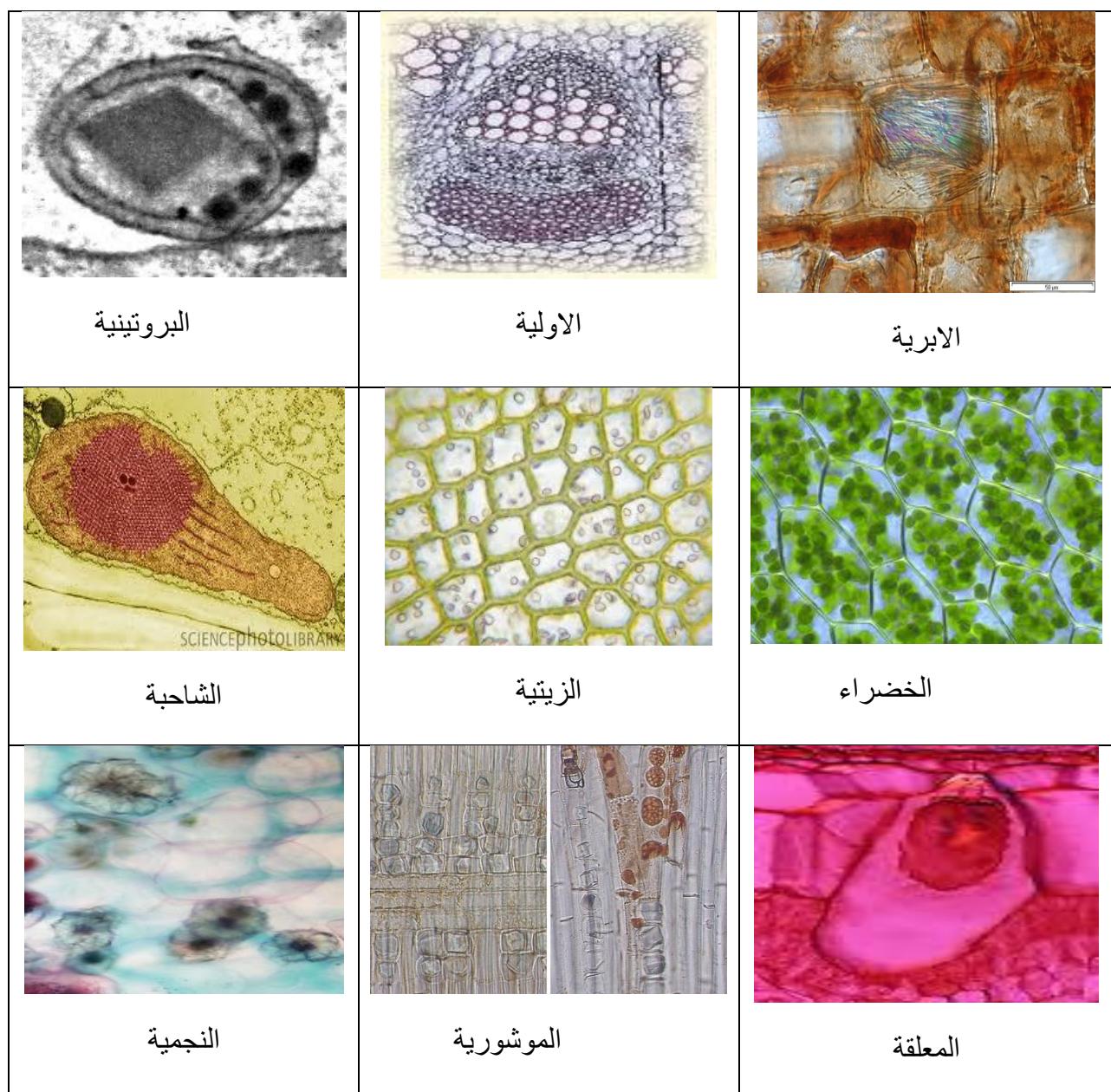
٣- **البلورات الموسوية** Prismatic crystals :- تظهر بشكل مفرد او مجموعة من الاشكال الموسوية تتكون من مادة كاربونات الكالسيوم كما في بشرة البصل .

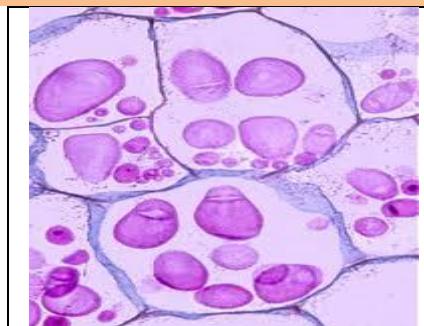
#### ٤- البلورات المعلقة :-Crystolith crystals

تتكون من العنق Stalk المكون من مادة السيلولوز وجسم البلورة المكون من مادة كarbonات الكالسيوم توجد في نصل نبات المطاط.

الجزء العملي :

- ١- حضر شريحة لبشرة ورقة نبات لاله عباس او بشرة الاوراق الحرشفية للبصل ولاحظ البلورات الابيرية داخل الخلايا.
- ٢- حضر شريحة لبشرة الاوراق الحرشفية لنبات الثوم ولاحظ البلورات الموشورية.
- ٣- افحص شريحة جاهزة في ساق نبات الزيزفون ولاحظ البلورات الوردية.



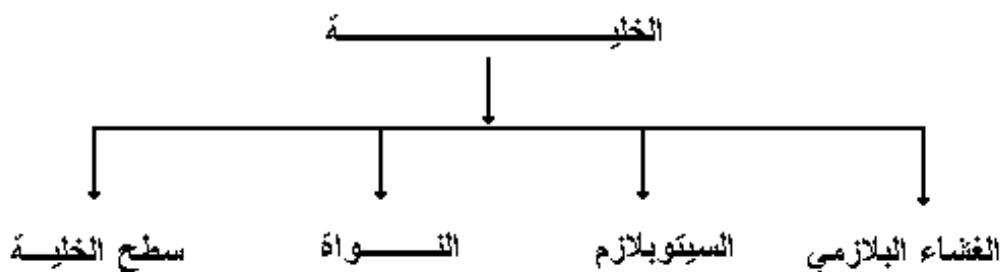


النشوية

### المختبر الخامس : نفاذية الغشاء البلازمي

**الهدف:** التعرف على خصائص الغشاء البلازمي وتركيبه.

**المحتوى:** يبين المخطط التالي تركيب الخلية :



**الغشاء البلازمي:** عبارة عن غشاء رقيق جداً يحيط بالخلية من جميع النواحي ويكون من مواد دهنية وبروتينية يعمل على:

أ- حماية الخلية بـ حفظ السايتوبلازم ج- تنظيم دخول وخروج المواد من و إلى الخلية د- وينتشر على سطح الغشاء البلازمي عدد كبير من المستقبلات التخصصية التي تقوم بالتعرف على المركبات الحيوية: مثل الهرمونات والتأثيرات العصبية وتوصيل مفعولها إلى داخل الخلية.

### التركيب الكيميائي

على الرغم من أن محاولات عدة قد بذلت للتعرف على التركيب الدقيق للغشاء البلازمي إلا أن هذا التركيب لم تتضح معالمه إلا عن طريق العالمين Singer and Nicolson حيث وضع هذان العالمان عام ١٩٧٢ نموذجاً أسمياه نموذج الفسيفساء السائل Fluid Mosaic وأنها تردد بين القطبية واللاقطبية، وتكون مغمورة كلياً أو جزئياً في طبقة مركزية سائلة من الدهن الثنائي الجزيئات، وتكون جزيئات البروتين على شكل وحدات متفرقة ومستقلة وليس على شكل طبقة مستمرة ومتصلة، أي أن هذا النموذج يصور البروتينات (السطحية أو المحيطية Peripheral Proteins والبيانية Integral Protein).

كجزيئات مطمورة أو سابحة في السائل الدهني، بحيث تسمح خاصيتها الحركة والتركيب الحبيبي لهذه الجزيئات بالقيام بالتفاعلات اللازمة لإتمام نقل جزيئات معينة خلال الغشاء البلازمي. ويعد هذا النموذج الأكثر قبولاً حتى الآن لشرح التركيب الدقيق للغشاء البلازمي.

وهناك عدة طرق يعبر بواسطتها الماء والمواد الأخرى الحواجز الغشائية وهي:

### ١- النقل عن طريق تكوين حويصلات

لاغشية بعض الخلايا القدرة على إحاطة بعض المواد وتكون حويصلات غشائية حيث عن طريقها يتم ادخال واخراج هذه المواد من والى الخلية.

#### اولا - الادخال الخلوي Endocytosis

أ- الالهام الخلوي او البلعمة Phagocytosis يمثل هضم الأجسام الصلبة من الخلية بواسطة الفعالية الطبيعية لغشاء البلازما. هذه الظاهرة يمكن ملاحظتها في الامبيا وبعض خلايا الدم البيضاء Leucocytes .

ب- الشرب الخلوي Pinocytosis يمثل الشرب الخلوي احتواء المواد السائلة إلى داخل الخلية بطريقة تشبه البلعمة حيث تمتاز المواد Adsorbed عند سطح البلازما ثم يحدث لف داخلي Infolding للغشاء ناتجاً في تكوين كيس يحتوي على الدقائق المطلوب هضمها.

ج- اللقف الخلوي Rhopheocytosis - وهذه الآلية في الإدخال الخلوي خاصة لنقل كمية كبيرة من المواد مثل السايتوبلازم مع محتوياته من خلية إلى خلية أخرى حيث تتضمن العملية تكوين فجوات في سطح الخلية دون وجود تقديرات سابقة حيث تظهر الخلية في هذه العملية كانها تشفط المواد المحيطة بها كالشرب الخلوي

### ثانياً- الإخراج الخلوي Exocytosis

أ- الإفراز الكلي Holocrine Secretion ويتضمن هذا الإفراز ملئ الخلية بالناتج الإفرازي ثم تحرر الخلية برمتها كجسم افرازي وبعدها تض محل الخلية محررة محتوياتها.

ب- الإفراز الجزئي Partial Secretion وتنتج عن هذه العملية انخفاضات مؤقتة تنشأ عند سطح الخلية وفي حالة الإفراز ينشأ خيط من فجوات مرتبطة مع بعضها البعض وبواسطة هذه الوسائل ينبع الإفراز إلى الخارج.

ج- الإفراز القمي Apocrine Secretion حيث يندفع التجويف السطحي للخلية إلى الخارج ليكون بروزات ثانوية وأشكال كروية متصلة بالخلية بواسطة سويق رفيع بعدها تكون طبقة كثيفة من السايتوبلازم على عرض الساق تفصل تدريجياً الجسم المخزون ويصبح طليقاً في التجويف .

د- الإفراز الثاني Diocrine Secretion في هذا النوع من الإفراز تتكون أجسام افرازية محاطة باغشية كما في الإفراز الجزئي ولكن بدلاً من تحررها بالغشاء البلازمي فإن الناتج الإفرازي أما ينتشر أولاً عبر غشاء الجسم الإفرازي ثم عبر الغشاء البلازمي أو تنتشر أجزاء غشاء الجسم الإفرازي والافراز المتحرر عبر السايتوبلازم القمي وغشاء البلازما.

### ٢- الانتشار الحر Free Diffusion

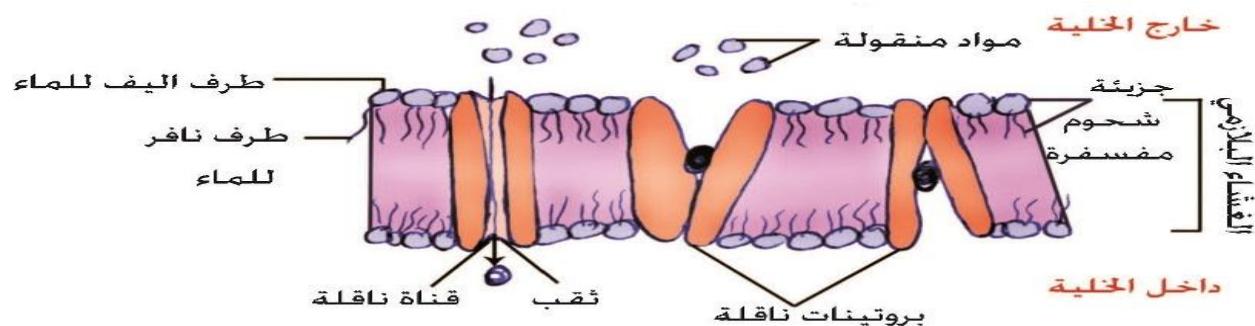
تنتقل الجزيئات مع تدرج التركيز من الأعلى ترکیزاً إلى الأقل ترکیزاً بدون نوافل وبدون طاقة .

### ٣- الانتشار الميسر واليات النقل Facilitated Diffusion and Carrier Mechanisms

تنتقل الجزيئات مع تدرج التركيز ولكن عن طريق نوافل ولا يحتاج إلى طاقة .

### ٤- النقل الفعال والضخ الايوني Active Transport and Ion Pump

حركة المادة ضد تدرج تركيزها (من التركيز الأقل إلى التركيز الأعلى). وهذا يحدث عادة مع تراكم تركيزات عالية من جزيئات التي تحتاجها الخلية، مثل الأيونات، والكلوكوز، والأحماض الأمينية. ويحتاج إلى كل من النوافل والطاقة.



### الازموزية:

هي مرور جزيئات المذيب (الماء مثلاً) عبر غشاء شبه منفذ من محلول الأقل تركيزاً (الماء الصافي مثلاً) إلى محلول الأكثر تركيزاً (ماء البحر مثلاً) وهي حالة خاصة من حالات الانتشار (Diffusion).

**الجزء العملي :** دراسة تأثير المحاليل ذات التراكيز الملحوظة على خلايا الدم الحمراء:

**المواد والأجهزة:** - أنابيب زجاجية - شرائح زجاجية - أغطية شرائح زجاجية - قطارة - أعواد خشبية - إبر وخر - مسحات كحول - مجهر ضوئي - ماء مقطر - محلول كلوريد الصوديوم ذي التركيز ٩٪ - محلول كلوريد الصوديوم ذي التركيز ٥٪

**طريقة العمل :**

- ١- ضع في ثلاثة أنابيب اختبار نظيفة كما يلي:  
الأنبوبة (أ): ٢ مل من ماء مقطر (تمثل محلول تحت الملح).  
الأنبوبة (ب): ٢ مل من محلول كلوريد الصوديوم ذي التركيز ٩٪ (تمثل محلول الملح المتعادل).  
الأنبوبة (ج): ٢ مل من محلول كلوريد الصوديوم ذي التركيز ٥٪ (تمثل محلول فوق الملح)
٢. وخر إصبع الإبهام بعد تعقيميه ببيرة وخر معقمة.
٣. ضع قطرة من دم إلى ٣ شرائح زجاجية نظيفة ، ثم بواسطة قطرة ضع قطرة من كل محلول بالتالي على شريحة زجاجية كل على حدة .
٤. امزج الخليط من الدم والمحلول على كل شريحة بأعواد خشبية لعدة ثوانٍ ثم افردها بواسطة شريحة أخرى .
٥. غطي الشرائح بواسطة أغطية الشرائح الزجاجية ، ثم افحصها تحت المجهر .

**٦. الملاحظة :**

في الحالة الأولى (أ) تتكسر خلايا الدم الحمراء حيث ينتشر الماء من الخارج إلى داخل الخلايا فتنتفخ وتتفجر في الحالة الثانية (ب) لا يحدث تغيير في خلايا الدم الحمراء نتيجة تساوي الضغط الأسموزي لأن التركيز داخل خلايا الدم مساوٍ لتركيز محلول الملح المتعادل . أما في الحالة الثالثة (ج) نلاحظ ان خلايا الدم الحمراء انكمشت و ذلك لخروج محتواها ( بسبب الخاصية الأسموزية ) من التركيز الأعلى و هو خلايا الدم إلى التركيز الأقل و هو محلول الملحى عالي التركيز.

## المختبر السادس : التجزئة الخلوية

**الهدف :** فصل المكونات الداخلية (مثل العضيات) عن بعضها البعض لنوع معين من الخلايا حيث يتم .

- ١- فصل الخلايا المراد دراستها عن الخلايا الأخرى الموجودة معها في نفس النسيج.
- ٢- تحطيم الأغشية الخلوية لهذه الخلايا حتى تتحرر مكوناتها (مثل العضيات) و تخرج منها إلى خارج الخلية.
- ٣- فصل مكونات الخلية عن بعضها البعض (مثل فصل النواة عن بقية العضيات) لتم دراسة هذه العضيات بسهولة و بدقة .

### **أهمية التجزئة الخلوية :**

- ١- لدراسة كل نوع من أنواع الخلايا المختلفة على حدة إذا وجدت في نسيج يحتوي على أنواع أخرى من الخلايا.
- ٢- لدراسة العضيات المختلفة المكونة لهذا النوع المعين من الخلايا المراد دراستها، هذه الدراسة تتضمن دراسة موقع العضيات و وظيفتها و مكوناتها.
- ٣- دراسة الجزيئات الخلوية أي الموجودة داخل الخلية مثل: دراسة الجزيئات الحيوية الكبيرة: كالأنزيمات.
- ٤- لدراسة العمليات الحيوية التي تحدث داخل الخلية.

### **عملية التجزئة تتضمن ٣ خطوات:**

- ١- فصل الخلايا المطلوب دراستها من نسيجها .

قد تكون هناك أكثر من نوع واحد من الخلايا المختلفة الموجودة في نسيج واحد و فصل أنواع هذه الخلايا عن بعضها البعض سوف يساعد على الحصول على عينة نقية تحتوي فقط على النوع المعين من الخلايا المراد دراستها.

### **٢ - الطحن Homogenization**

التحطيم الميكانيكي الخفيف للخلايا المراد دراستها أو عملية تكسير الخلايا و " فتحها " لخروج محتويات الخلايا المراد دراستها بعد أن يتم عزلها من النسيج الأم فإنه يتم تجزئتها أي تكسيرها من خلال تكسير أغشيتها الخلوية مما يؤدي إلى خروج محتويات هذه الخلايا إلى البيئة المحيطة هذه البيئة المحيطة و التي تسمى أيضا بالـ Slurry أوـ Cell Homogenate .

الـ Slurry ( هو الخليط من السائل و المواد والعضيات الخلوية و هذه نواتج عملية الطحن ) . تتم عملية الطحن في محلول Isotonic Sucrose Medium 0.2 M

- ١- تحطيم الأغشية الخلوية فقط بواسطة الضغط الأسموزي Osmotic Pressure في حين أنه يبقى الأغشية المحيطة بالعضيات سليماء و صحيحة. كما
- ٢- يعطي وسط ضغطه متعادل (مشابه) ذلك الموجود داخل العضيات و ايضا
- ٣- يسمح بتحطيم الغشاء الخلوي مع بقاء أغشية العضيات سليماء.

٤- يمنع تجمع العضيات .

٥- كما ويمنع دخول الماء إلى العضيات التي إذا دخل بها الماء انفخت وانفجرت ثم ألقت بمحتوها إلى الخارج .

خطوة ”الطحن Homogenization“ تنفذ في محلول منظم عند درجة حرارة منخفضة ( $4^{\circ}\text{C}$ ) .

### ٣. الترشيح Filtration

الترشيح هو المرحلة الثالثة من مراحل التجزئة الخلوية حيث أن محلول الخلية المجزأة يتم ترشيحه أو تتنقيته أي يخضع لعملية ترشيح Filtration للتخلص من الأنسجة أو الشوائب والجزيئات الكبيرة.

### ٤. الطرد المركزي

الهدف من الطرد المركزي هو فصل عضيات الخلية بعضها عن بعض و ذلك يتم بتعریض محلول الذي يحتوي على الخلايا المطحونة لسرعات مختلفة من دوران جهاز الطرد المركزي و على أوقات زمنية مختلفة. النتيجة النهائية لهذه المرحلة من عملية الطرد المركزي باستخدام سرعات مختلفة هو ترسيب العضيات المختلفة في الحجم والكثافة : لأن العضيات الأعلى كثافة تترسب عند سرعات بطيئة، والعضيات الأقل كثافة تترسب عند سرعات عالية (Figure 3) .

### طرائق تكسير الخلايا:-

عند وجود المواد المراد فصلها داخل الخلايا يستوجب ذلك تحطيم جدران تلك الخلايا حيث يجب مراعاة الأمور التالية :

- ١- حساسية الخلايا لطريقة التحطيم .
  - ٢- مدى ثباتية المنتوجات باتجاه طريقة التحطيم .
  - ٣- يجب أن تكون الطريقة سريعة وغير مكلفة .
  - ٤- يجب الأخذ بنظر الاعتبار الاحتياط من عدم تلف المواد بواسطة الانزيمات الخلوي .
- ومن اهم طرائق التكسير هي:

#### ١- الطرق الفيزيائية :

- أ- يستعمل لتكسير الخلايا سوائل او مواد صلبة وتكرر العملية لزيادة تكسير الخلايا كما يمكن الخلايا لتصبح بشكل صلب ثم يسلط عليها ضغط عالي .
- ب- باستعمال الرج مع المواد الكاشفة ، يضاف مواد مثل حبات الزجاج للخلايا وتحرك بسرعة عالية لغرض تكسير الخلايا وتتولد حرارة عالية بهذه العملية ولغرض تلافيها يستعمل  $\text{CO}_2$  الصلب .

ج- التجميد والإذابة :: يستعمل على نطاق ضيق لأنها تطلق المواد الخلوية بكمية قليلة وان تعرض المواد للتجميد والتجميف يؤدي إلى تكسير الخلايا وهذه الطريقة غير مفيدة لاستخلاص الانزيمات والبروتينات .

د- تكسير الخلايا بالصدمة التناافية: حيث توضع الخلايا المراد تحطيم جدرانها في محلول عالي التركيز مثل السكروز والكليسرول ثم يضاف إليها الماء بكمية كبيرة مما يؤدي إلى فرق بالضغط التناافيزي ويؤدي إلى تكسير جدران الخلايا وهذه الطريقة تستخدم على النطاق المختبري فقط.

هـ- التجفيف: من الطرق القديمة حيث توضع المواد في مجففات برميلية وترك لمدة (٢-٣) أيام وألان تستعمل هذه الطريقة مع مجففات خاصة وتضاف المواد مثل السليكا لغرض زيادة كفاءة التجفيف.

وـ- استعمال الامواج فوق الصوتية: - وهذه الطريقة مكلفة وتؤدي إلى توليد حرارة عالية ويجب التخلص منها اثناء عملية التكسير حيث تستعمل ترددات من (١٨-٢٥) كيلو هيرتز حيث يدخل مجس يلامس عالق الخلايا ثم يشغل الجهاز لغرض تكسير الخلايا وتعتمد كفاءة التكسير على كفاءة الخلايا.

## ٢- الطرق الكيميائية:- تستعمل بكثرة على المستوى التجاري وتشمل:

أـ- استعمال القواعد القوية: عندما تتحمل الخلايا مستوى حامضية (١١.٥ - ١٢.٥).

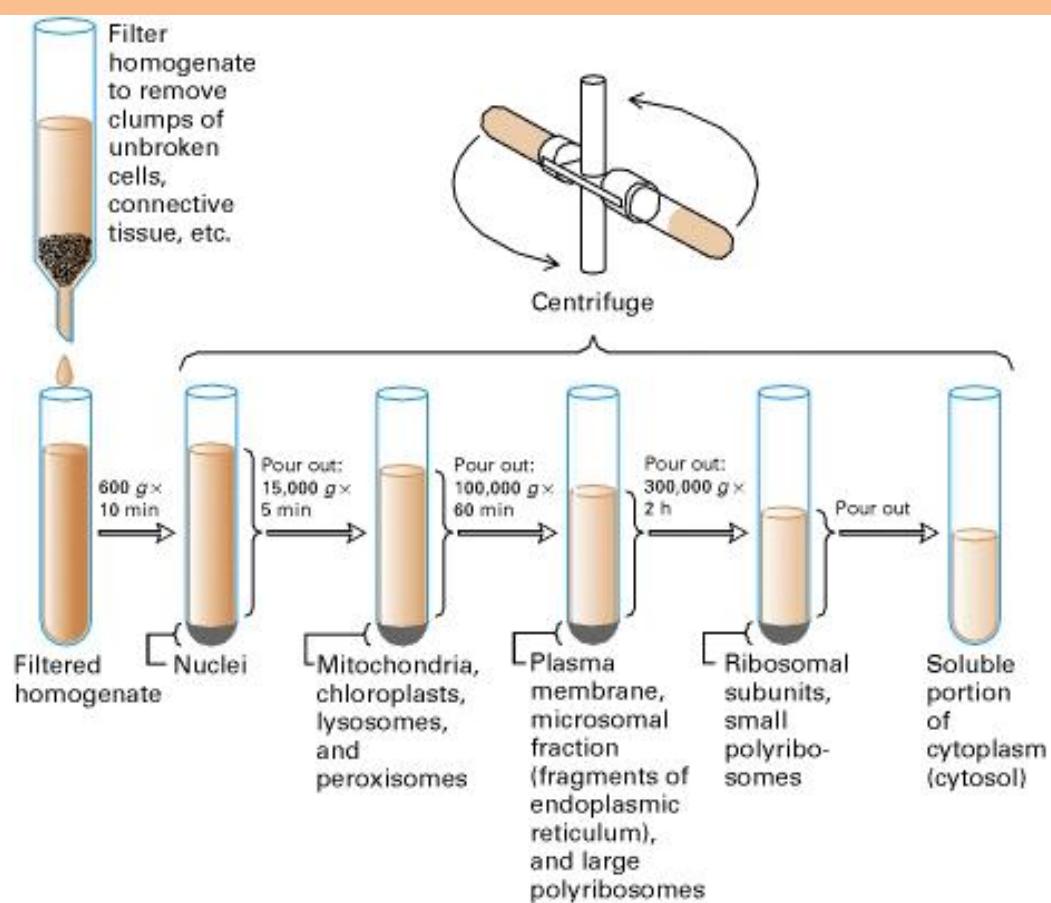
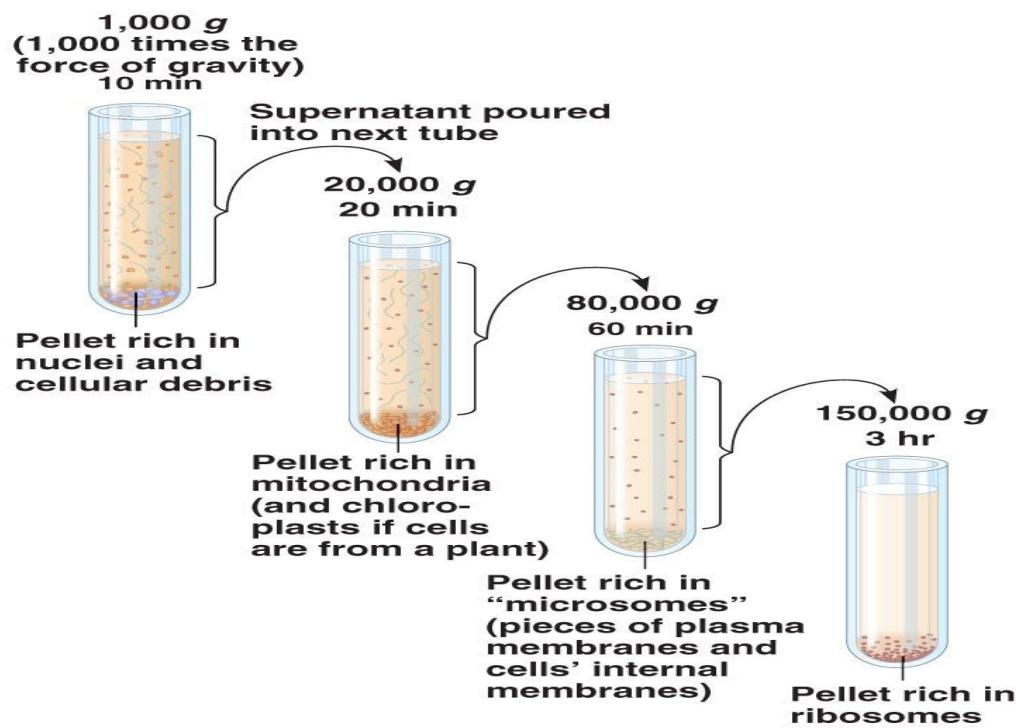
بـ- استعمال الحوامض: حيث تضاف الحوامض إلى عالق الخلايا وتخلط جيداً ثم يعادل تجانس الخلايا بعد عمليات التجزء الخلوي للناتج.

حـ- استعمال المذيبات: حيث يؤدي إلى اذابة الدهون الموجودة في الاغشية الخلوية مثل الايثيل والاسيتون بدرجة (٢٠ م).

دـ- استعمال المنضفات: حيث تعمل تحويلات في البروتينات الدهنية منها مركبات الامونيوم الرباعية وكبريتات الصوديوم.

## ٣- الطرق الحيوية :

أـ- انتاج الطفرات الوراثية: التي تؤدي إلى نقص في تكوين الجدران الخلوية خصوصاً في الخلايا النباتية والمايكروبات مثل اضافة البنسلين في المراحل الاخيرة للتخمر حيث يمنع انتاج جدران جديدة وبذلك يسهل تحطم الأغلفة المحيطة بالخلايا.

**TECHNIQUE (cont.)**

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

## المختبر السابع: Study of Living and Fixed Cells

### أولاً : الخلايا الحية

**الهدف :** دراسة الخلايا الحية وبشكل مباشر من خلال تحضير مقاطع أو شرائح وقتية Temporary Slide او (تحميل رطب) Wet mount وتنستخدم في هذا النوع من التحضيرات مجموعة من الصبغات والتي تعرف بالصبغات الحية أو vital stains كونها لا تؤثر تأثيراً مباشراً في الخلية الحية فالخلية تموت بعد ان تتعرض لتلك الاصباغ لمدة طويلة لذلك هناك وقت كاف لدراسة الخلية الحية قبل موتها ومن هذه الاصباغ Neutral red\* وتستخدم لصبغ السايتوبلازم Methylene blue\* لصبغ معقد كولجي أنتقائي \* و لصبغ المايتوكنديريا Janus green .

#### \* تحضير شريحة مؤقتة لخلايا حيوانية حية (الخلايا الظهارية الحرشفية لبطانة الفم )

**الأدوات :** أعودات تنظيف الاذن ، ماء ، شريحة زجاجية ، غطاء الشريحة الزجاجية ، مجهر مركب ، صبغة أزرق الميثيلين .

#### **الطريقة :**

- 1- حك البطانة الداخلية للفم ( السطح الداخلي لخدك ) (أعودات تنظيف الاذن).
- 2- وضع جزءاً من هذا التحضير على شريحة زجاجية وسط قطرة من الماء أو الصبغة .
- 3- غط ما حضرته بقطعة الشريحة ، وافحصه تحت المجهر باستعمال قوة التكبير الصغرى ، ثم الوسطى ، ثم الكبرى ماذا تلاحظ .

#### \* تحضير شريحة مؤقتة لخلية نباتية حية ( خلايا البصل).

**الأدوات :** - بصل ، ملقط ، شرائح زجاجية ، أغطية شرائح زجاجية ، ورق نشاف ، إبرة تشريح ، محلول اليود أو صبغة الميثيل الأزرق .

#### **الطريقة :**

- أقطع البصلة طوليًا إلى أربعة أقسام.
- 1- وضع قطرة من الماء في وسط الشريحة .
  - 2 - استخلاص باستخدام الملقط قطعة صغيرة من الغشاء الرقيق المبطن للسطح الداخلي من البصلة ووضعه فوق قطرة الماء في وسط الشريحة و أفرشه بشكل جيد .
  - 3- أمسك غطاء الشريحة من حافتيه و لتلمس الحافة الثالثة قطرة الماء و الشريحة ثم أنزلة تدريجياً باستخدام إبرة تشريح حتى يصل الغطاء إلى سطح الشريحة و احرص على أن لا يحيط الغطاء أي فقاعة هواء بينه وبين الشريحة .
  - 4 - أصبغ الشريحة بإضافة قطرة من محلول اليود أو صبغة الميثيل الأزرق إلى حافة غطاء الشريحة و يمكن نشرها تحت الغطاء باستخدام ورقة نشاف .

## ثانياً: الخلايا المثبتة

وتقى دراستها من خلال استخدام طريقة التقطيع *Sectioning Method* و تتلخص فيما يلى:

### 1- الحصول على العينة . Obtaining the specimen

### 2- تثبيت العينة Fixation

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكميابنسجية وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج و محتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة من ذلك و تقوم عملية التثبيت الناتجة Putrefaction و التعفن Disintegration بإيقاف عملية التفتت والتفسخ عن نشاط البكتيريا و الفطريات و كذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات ومن أفضل أنواع المثبتات 10% Ethyl Alcohol% 70 و Formalin

### 3- غسل العينة Washing

يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة .

### 4- نزع الماء من العينة Dehydration

وهي الطريقة التي يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل و المواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج و تتم هذه العملية بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الإيثيلي وتترواح المدة الازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاثة ساعات .

### 5- ترويق العينة Clearing

العملية التي يتم بواسطتها إحلال مادة نزع الماء حيث تقوم هذه العملية بالسماح لمادة شمع البرافين بالدخول إلى الأنسجة في الخطوة اللاحقة لأن الكحول المستخدم في نزع الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذا تستخدم مادة مروفة تذوب في الكحول وشمع البرافين وكذلك تجعل النسيج شفافا.

من أمثلة المواد المروفة الزيلول - الكلورفورم - تولوين - بنزين - زيت خشب الأرز .

### 6- تشريب العينة Infiltration

عبارة عن إحلال كامل للمادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروفة، و يعتبر شمع البرافين من أشهر المواد المستخدمة في تشريب النسيج حيث أنه يتخلل العينة بسرعة دون إحداث ضرر بتركيبها النسيجي، كما أنه يكسبها دعامة قوية لتهيئتها للقطع بالميكروتوم، و يساعد على حفظها في الظروف العادلة لفترة طويلة دون أي أذى.

### 7 - طمر العينة Embedding

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامر وتدعمها و يعد البرافين أشهر وأكثر المواد استخداما في معامل الأنسجة و كيمياء الأنسجة و شمع البرافين عبارة عن مادة هيدروكرбونية ممزوجة بمواد بلاستيكية.

**8-التشذيب Trimming**

بعد تحضير القوالب الشمعية يستحسن تشذيبها بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للقطع ب بحيث تصبح أطرافها متوازية و يمكن أن تتطبق على حافة سكين المايكروتوم.

**9-القطع Sectioning**

تثبت العينة على حامل العينة في المايكروتوم والذي يكون على انواع ويستخدم حسب طبيعة النماذج المراد فحصها وكذلك نوع الوسط المطمور فيه وتقصى بشكل شرائح رقيقة مثلاً المشراح المنزلاق sliding m. أو الدوار rotary m. و الفوقي ultra m. والقطاعات الجيدة عادة تكون على شكل أشرطة Ribbons أو سلسلة من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحة سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية.

**10- صبغ القطاعات Staining**

ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغة أو قد يلجأ الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسيلين لصبغ الأنوية وصبغ الأيوسين لصبغ السيتوبلازم.

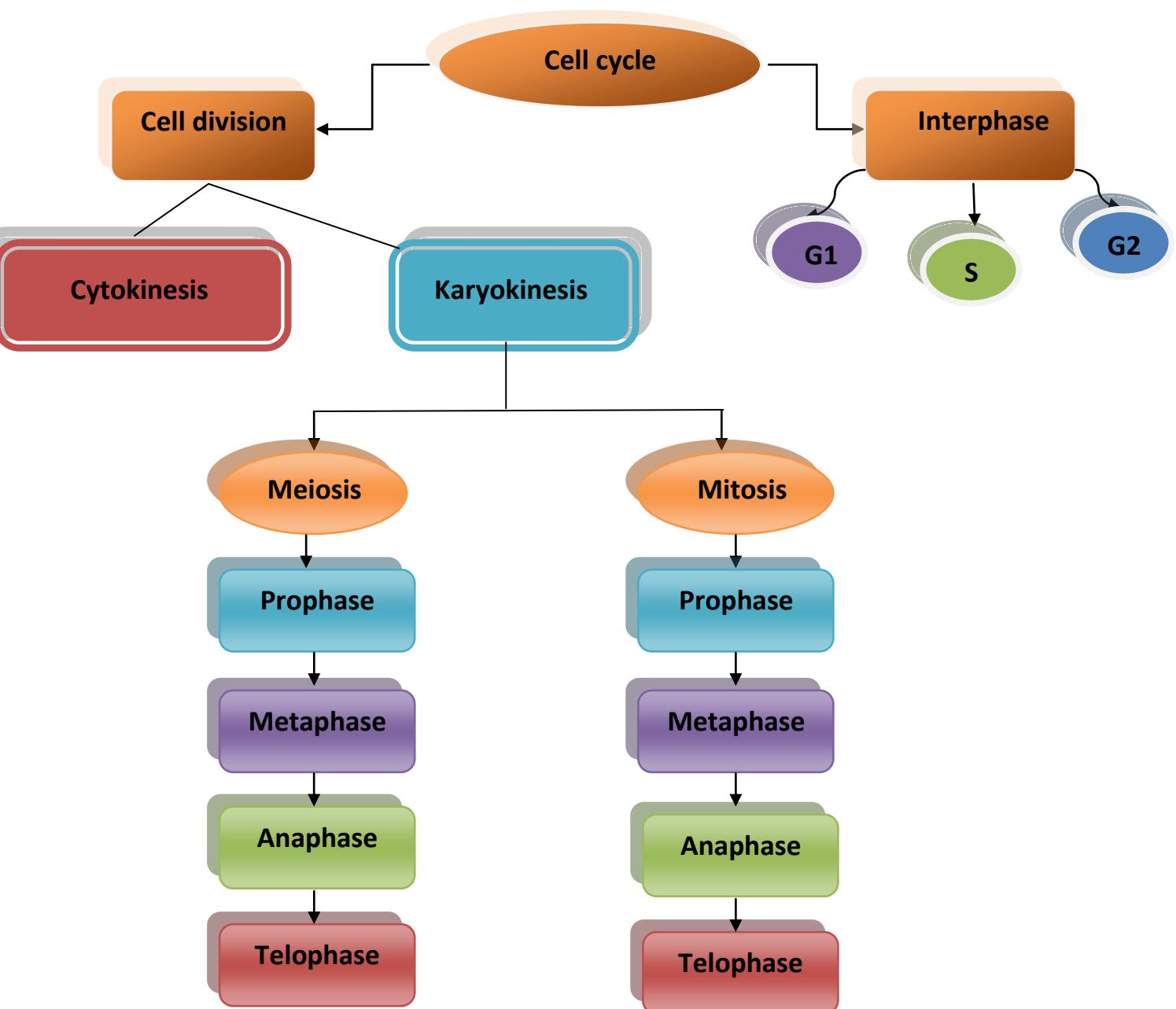
**11- تحميل القطاعات Mounting**

وضع المقطع او النموذج على شريحة زجاجية نظيفة و اضافه مادة التحميل ثم تعطينها بقطاء الشريحة وتكون معظم مواد التحميل من الصمغ resin او الراتنج gum .

**12- التعليم Labeling**

هو وضع ورقة لاصقة على الشريحة مدون عليها ماتحتوية بحيث تتماشى مع نظام معين في التعليم .

## المختبر الثامن ، التاسع : دورة حياة الخلية Cell Cycle



### دورة حياة الخلية Cell Cycle

سلسلة من المتغيرات المترابطة التي تحدثها الخلية ابتداء من بداية تشكيلها من الخلية الام وحتى اللحظة التي تنتهي فيها الانقسامات وتنتج خلايا جديدة .

تنقسم دورة الخلية الى

اولا :- المرحلة البنية Interphase

ثانيا :- مرحلة الانقسامات الخلوية Cell divisions

تأخذ المرحلة البينية حوالي ٩٠ % من زمن دورة حياة الخلية وتمايز الى ثلاث اطوار هي :-

- ❖ طور النمو الاول First Growth (G1) حيث تتضخم الخلية وتتصنع البروتينات وتزداد كمية السايتوبلازم وعدد العضيات بشكل سريع وتسمى الكروموسومات بالشبكة الكروماتينية .

- ❖ طور البناء (S Synthesis) حيث يتضاعف ال DNA وكل كروموسوم مكون من كروماتيدين متلائمين متلاصقين في منطقة السنترومير .

- ❖ طور النمو الثاني (G2) حدوث نمو سريع لكل مكونات الخلية تحضيرا للانقسام .

### مرحلة انقسام الخلية

- ❖ طور الانقسام الخطي (M) -----1 الانقسام غير المباشر او المتساوي mitosis

يحدث في الخلايا الجسدية بحيث كل خلية تنقسم وتعطي خليتين كلا منها تحوي ( $2n$ ) من الكروموسومات وتحتوي على نفس العدد والشكل من الكروموسومات التي كانت موجودة في الخلية الام .

اهميته :- النمو ، تعويض التالف من الخلايا ، كطريقة للتکاثر اللاجنسي في الكائنات الاولية . لا يحدث في الخلايا العضلية والعصبية والقلبية وكريات الدم الحمراء .

الاطوار :-

#### 1 - الطور التمهيدي :Prophase

- يتميز الطور بسمكاة وقصر الكروموسومات والمكونة من الكروماتيدات .
- تحرك الجسم المركزي (centrosome) إلى الأطراف المضادة للنواة لتكوين المغزل Spindle (تفقد خلايا النباتات العليا وبعض اللافقاريات الأجسام المركزية ولكنها تكون خيوط مغزلية ).
- اختفاء النويات وانهيار الغشاء النووي .

#### 2 - الطور الاستوائي (الانتقالى ) : Metaphase

- وفيه تبدأ الكروموسومات - التي تبدو سميكة وقصيرة- في الانتظام عند الخط المنصف للخلية لتكوين ما يسمى "الصفحة الاستوائية " Equatorial plate .

- تتصل بعض خيوط المغزل بالكريموسومات بخيوط المغزل عند السنترومير ، وبذل يكون كل كروموسوم مرتبطاً بهذه الخيوط الممتدة على جانبيه .

#### 3- الطور الإنفصالي : Anaphase

- وفيه تنكسر السنتروميرات الأخوية Sister centromeres الرابطة بين كروماتيدى كل كروموسوم، ويحدث ذلك لجميع الكروموسومات في الوقت نفسه، وبذلك ينفصل كروماتيدا كل كروموسوم أحدهما عن الآخر .
- تباعد الكروماتيدان عن بعضها ويتجه الكروماتيدان الناشئان كل منهما إلى قطب من أقطاب الخلية (بمجرد ان ينفصل الكروماتيدان عن بعضهما يدعى كلا منهما كروموسوم ) .

#### 4- الطور النهائي : Telophase

تختفي خيوط المغزل - تتضاعف السنترويلات - تكوين غلاف نووي - استطالة الكروموسومات لتكون الشبكة الكروماتينية .

ملحوظة :- مما سبق يتضح أن هذا النوع من الإنقسام يعطي خلايا جديدة بها نفس العدد الزوجي من الصبغيات الموجودة بالخلية الام ، بمعنى آخر أنه ينتج من كل خلية منقسمة خليتين مشابهتين للخلية الام تماما .

## ----- الإنقسام الإختزالى ( المنصف - الميوزى ) Meiosis 2

من المعروف أن نواة البيضة المخصبة (الزيجوت) تنشأ من اتحاد المشيخ الأنثوي (البيضة) مع نواة المشيخ الذكري (الحيوان المنوي) ولهذا فإنها تحوي مجموع عدد الكروموسومات الموجودة في الأمشاج الذكرية والأنثوية ولكن يبقى عدد الكروموسومات داخل النوع ثابتًا من جيل إلى جيل، يجب إختزال المجموعة الكروموسومية للأمشاج الذكرية والأنثوية بطريقة ما إلى العدد الأحادي وتسمى هذه العملية بالإنقسام الميوزي (الإختزالى).

في الحيوان يجري هذا الإنقسام في الغدد الجنسية أثناء عملية تكون الإسبرمات Spermatogenesis وتكوين البويبضات Oogenesis . أما في النباتات فيجري هذا الإنقسام أثناء عملية تكوين الأبواغ Sporogenesis ومع ذلك فعملية الإنقسام الميوزي متشابهة أساساً في كل من الحيوان والنبات.

**يتضمن الإنقسام الإختزالى إنقسامين متتاليين هما الإنقسام الأول والثانى :**

**الإنقسام الأول :** يتضمن هذا الإنقسام أربعة أطوار هي :

### ( ١ ) الطور التمهيدى الأول : Prophase

هذا الطور يشبه نظيره في الإنقسام الغير مباشر لكنه يمكث مدة أطول ويتميز إلى عدة مراحل أهمها /

#### Leptotene ١ - المرحلة القلادية

تبعد الصبغيات كخيوط طويلة للغاية ورقيقة تنظم عليها إنفاسات مختلفة الأحجام ، فيشبه بذلك كل صبغي شكل القلادة المرصعة بالحبات .

#### Zygotene ٢ - المرحلة الإزدواجية

تقصر الكروموسومات وتزداد كثافة وتقترب من بعضها مشكلة أزواجاً فيلتقي كل كروموسوم متماثلين مع بعضهما ، تسمى هذه العملية بالكروموسومات المزدوجة الثانية .

#### Pachytene ٣ - المرحلة الضامة ( التغاظ )

تستمر الكروموسومات بالقصر والتغاظ وتتألف حول بعضها ويظهر كل كروموسوم مكون من كروماتيدين مرتبطين بالمنطقة المركزية Centromere وعليه كل ثانى أو زوج يحتوى على أربعة كروماتيدات وتدعى بالمجموعة الرابعة Tetrads .

#### Diplotene ٤ - المرحلة الانفراجية ( التضاعفية )

تبعد الكروموسومات في الإنبعاد قليلاً عن بعضها ، فتنفصل عدا المناطق التي يحصل الالتحام فيها بين كروموسوم الأول وآخر من الكروموسوم الثاني كل نقطة اتصال بين كروماتيدين تدعى تصالب Chiasma ولمناطق الاتصال بين كروماتيدات كروموسومين متقابلين أهمية خاصة في إنقال وتتنوع التركيب الوراثي حيث تتبادل المواقع أجزاء من الكروماتيد الثاني ، وتسمى هذه العملية بـ " العبور " crossing over (c.o.) .

#### Dickens ٥ - المرحلة التنافرية أو التشتيتية

يستمر التنافر ويختفي الشكل التصالبى في هذه المرحلة وتبقى الكروموسومات الثانية قريبة من بعضها وتخفي النوية ويبدا غشاء النواة بالإختفاء وتتحرك أزواج الكروموسومات إلى منطقة إستواء الخلية وتنظم الخيوط المغزلية ممندة من قطبى الخلية .

**Metaphase I****ب - الطور الاستوائي الأول**

تتحرر الكروموسومات من داخل النواة ويكتمل تكوين خيوط المغزل وتصطف أزواج الصبغيات المتماثلة في المستوى الاستوائي للخلية.

**Anaphase I****ج - الطور الإنفصالي الأول**

في هذا الطور يأخذ كل كروموسوم من الكروموسومين المتماثلين في الإنفصال عن مثيله وتتشكل خيوط المغزل وبذلك يتجه أحد الكروموسومين إلى أحد قطبي الخلية والثاني إلى القطب الآخر وبذلك يصبح عند كل قطب من قطبي الخلية نصف عدد الكروموسومات الموجودة بالخلية الأصلية (كل كروموسوم مكون من كروماتيدين).

**Telophase I****د - الطور النهائي الأول**

في هذا الطور يتكون عند كل قطب من قطبي الخلية غشاء نووي يحيط بالصبغيات وت تكون بذلك نواتان بنويتان يحتوي كل منها على نصف عدد الصبغيات الموجودة في الخلية الأصلية ثم يتضمن السيتوبلازم حتى تكوين خلتين منفصلتين (كل صبغي يحتوي على كروماتيدين).

**الإنقسام الإختزالي الثاني :**

وهو استكمال انقسام الخلتين الناتجتين من الانقسام الإختزالي الأول إلى خلتين جديدين بطريقة مشابهة لما يحدث في الانقسام الغير مباشر حسب الأطوار الآتية :

**أ - الطور التمهيدي الثاني :**

ينقسم الجسم المركزي في كل خلية إلى إثنين يتجهان إلى قطبي الخلية حيث يبدأ تكوين خيوط المغزل ويختفي جدار النواة وتظهر الكروموسومات وهي مكونة من كروموسومات كل واحد منها مكون من زوج من الكروماتيدات مرتبطة ببعضها بسنترومير واحد.

**ب - الطور الاستوائي الثاني:**

تصطف خاللها الكروموسومات على الخط الاستوائي للخلية .

**ج - الطور الإنفصالي الثاني :**

ينشق السنترومير الذي يربط كروماتيدي كل كروموسوم بعضها ببعض ، وبذلك ينفصل الكروماتيدان ويتحركان بعيدا في اتجاه الأقطاب.

**د - الطور النهائي الثاني :**

تتجمع كل مجموعة من الكروماتيدات ( التي أصبحت الآن كروموسومات قائمة بذاتها ) عند أحد قطبي الخلية ، ثم تستطيل متحولة إلى خيوط رفيعة ملتوية ، ويكون حولها غشاء نووي ، وبذلك تتكون خليتان تحتوي على نواتان كل منها تحتوي على نصف العدد الوراثي ويكون الناتج أربعة خلايا كل منها يحتوي على نصف عدد الكروموسومات الموجود في الخلية .

**الإنقسام السيتوبلازمي – Cytokinesis**

يحدث بعد الانتهاء من الانقسام الميتوzioni أو قبل إنتهائه . في النباتات عديدة الخلايا إنقسام السيتوبلازم بين النواتين الجديدين ويحدث نتيجة لترسبات على بقايا المغزل الموجودة في المحور الوسطي للخلية مكونا ما يعرف باسم

الصفحة الخلوية – Cell plate ، وتمتد هذه الترسبات حتى تصل إلى جداري الخلية مكونة خلتين جديدين كلا منهما يحتوى على نواة جديدة . أما الانقسام السيتوبلازمي في الخلايا الحيوانية فلا يحدث نتيجة لتكوين صفيحة خلوية بل يحدث لانقسام السيتوبلازم في المنطقة الوسطية ، ويستمر هذا الانقسام حتى تنفصل الخليتان عن بعضهما .

**الجزء العملي :- تحضير شريحة مؤقتة لجذور البصل الغرض منها ملاحظة اطوار الانقسام الميتوzioni**

### الاجهزه والادوات اللازمة :-

بصلة، مجهر ضوئي مركب، شرائح زجاجية وأغطية، مشرط حاد، قطاره عدد (٣)، أنبوبة اختبار، طبق بتري، ورق تشريح، شريحة جاهزة لقمة نامية في جذر، حمض الهيدروكلوريك مخفف (%) ١٠، صبغة Aceto-carmine ، نماذج ولوحات توضح مراحل الانقسام المتساوي في الخلايا النباتية والحيوانية.

- اقطع حوالي (٢) ملم من القمم النامية للجذور الخيطية في البصل والتي تم تتميّتها بغمّر الجزء السفلي من البصلة في كأس ماء وضعها في أنبوب اختبار واغمرها في حمض الهيدروكلوريك HCl (%) ١٠.

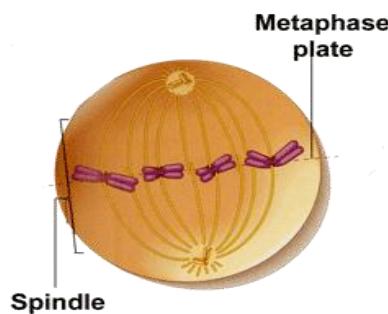
- سخن أنبوبة الاختبار في حمام مائي عند درجة ٦٠°س ، ولمدة ست دقائق.

- انقل القمم النامية إلى طبق بتري يحتوي على كمية من الصبغة ولمدة عشر دقائق، اغسل بعدها

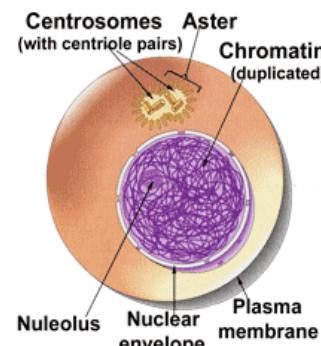
الصبغة الزائدة بغمّر القمم النامية في الماء المقطر.

- ضع أحد القمم النامية على شريحة زجاجية نظيفة، أضف فوقها قطرة ماء، وغطّها بغطاء الشريحة. ضع ورقة نشاف واضغط بلطف بإبهامك على غطاء الشريحة لهرس العينة.

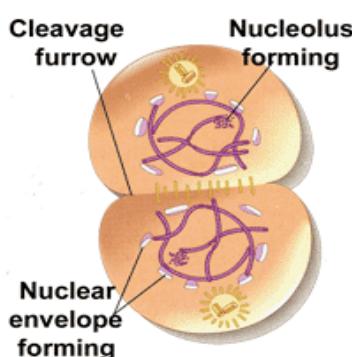
- افحص الشريحة التي حضرتها مستخدماً العدسة الشبيهة الصغرى، فالوسطى، ثم الكبرى في المجهر.



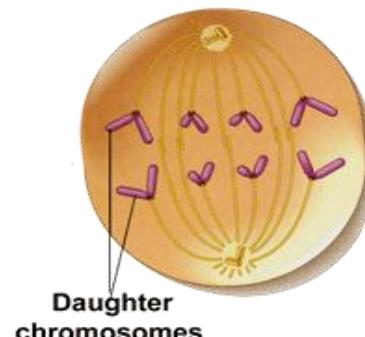
الطور الاستوائي



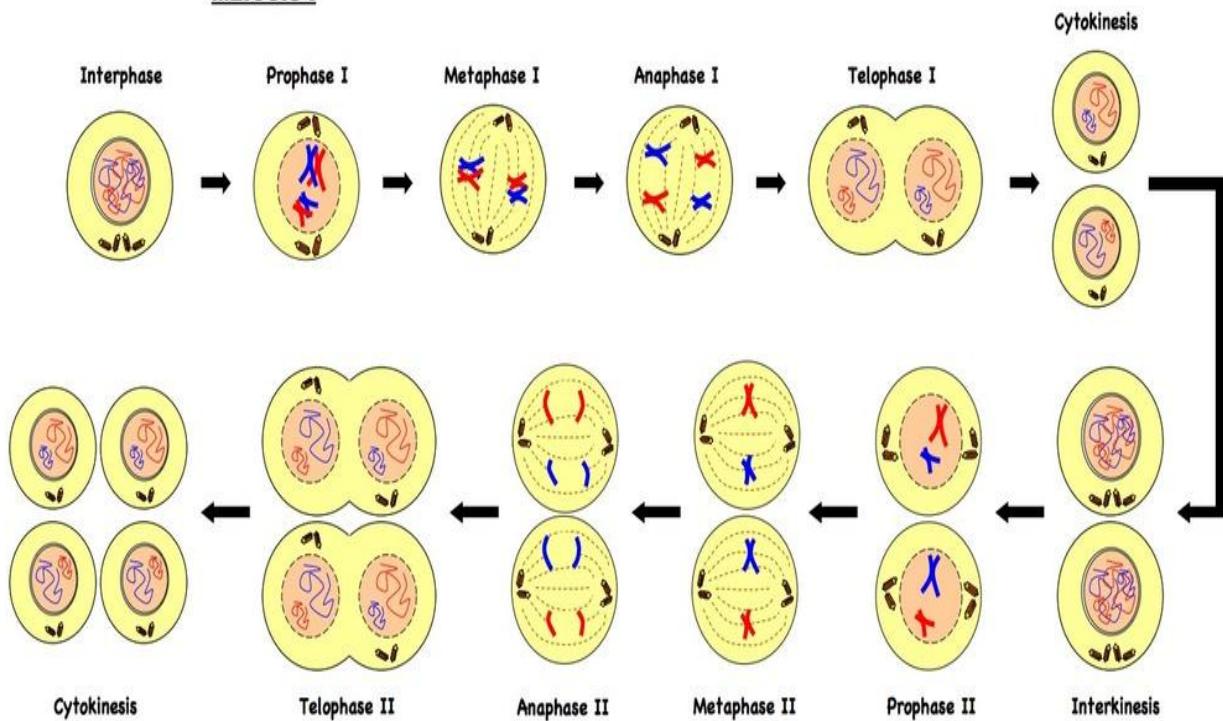
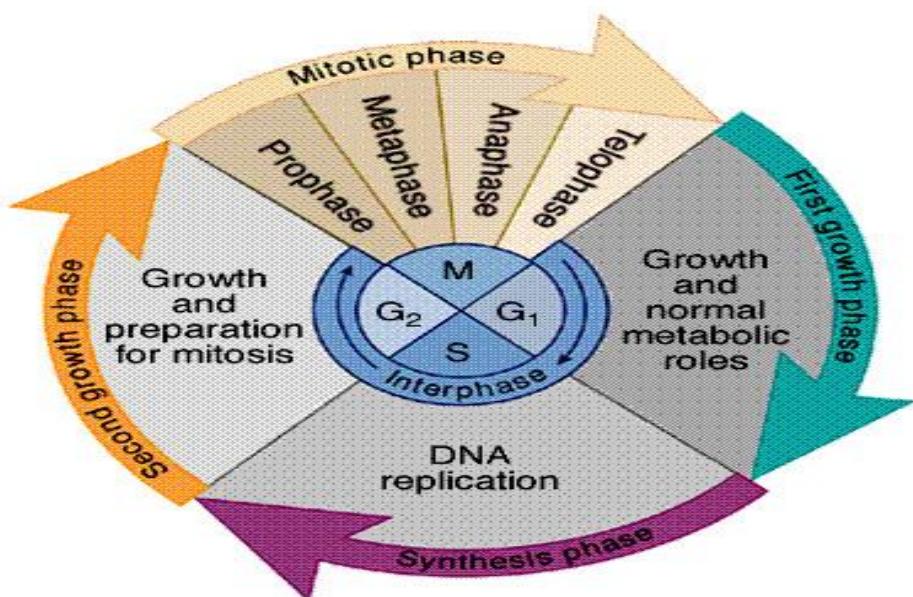
الطور التمهيدي



الطور النهائي



الطور الانفصالي

**MEIOSIS I****MEIOSIS II**

الدورة الخلوية