القسم الثاني

تجارب علمية على جنين الدجاج (الطيور)

Expermint on Chick Embryos (Aves)

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي السادس

عمل النافذة والغطاء القشري في بيضة الدجاج
Making Window and Egg Shell Cover of Chick Embryo

الهدف

يعتبر جنين الدجاج من أكثر الأجنة التي أجريت عليها التجارب المعملية سواءً لمتابعة النمو أو لدراسة تأثير المواد الكيمائية، وذلك لكبر حجم البيض وسهولة الحصول عليه وتنميته. سوف نتطرق في التجارب التالية إلى طريقة متابعة نمو جنين الدجاجة، طريقة عمل تحميل، ثم زراعة الجنين خارج البيضة وتنميته. وسوف نذكر قبل ذلك بعض العوامل التي يجب مراعاتها عند التعامل مع أجنة الطيور من حيث:

درجة الحرارة = ٣٨ مْ، الرطوبة النسبية = ٦٠٪، التهوية = ثاني أكسيد الكربون ١٪، أكسيجين ٢٠٪.

أولاً: العوامل الرئيسية لحفظ بيض الطيور (الدجاج) في المعمل وتنميته

١- حفظ البيض

تتأثر عملية نمو جنين الدجاجة ووصوله إلى مرحلة الفقس بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية التي يحفظ فيها البيض قبل التحضين.

درجة الحرارة المناسبة لحفظ البيض تتراوح مابين ٧-١٥ْم، هذا ويمكن حفظه في حالة جيدة لمدة أسبوعين.

يجب أن يؤخذ في الاعتبار أن عدم الحرص الشديد في تحريك البيض في أثناء نقله قد يقلل من فرصة نجاح نمو الأجنة.

٢- التحضين

أ) درجة الحرارة

يعتبر عامل الحرارة من العوامل الرئيسية لعميلة تحضين ونمو الأجنة، وتعتبر درجة الحرارة ٣٨°م هي الدرجة المناسبة، وقد تتراوح ما بين ٣٦-٣٩°م، ويمكن للأجنة أن تبدأ عملية النمو بدرجات أقل من ذلك، ولكن فرصة إكمالها أو وصولها لمراحل الفقس تقل بشكل كبير. ومما تجدر الإشارة إليه أنه إذا بدأت عملية التحضين فإنه يجب الاستمرار فيها وأن أي توقف بعد ذلك يمكن أن يؤدي إلى موت الأجنة، هذا ويمكن إيقاف عملية التحضين لمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة عند درجة حرارة لا تقل عن ٢٥°م، وذلك خلال الأسبوع الأول من التحضين إذ أن الأجنة الأكبر من ذلك تكون أقل مقاومة للانخفاض في درجة الحرارة.

ب) الرطوبة النسبية

تعتبر الرطوبة النسبية في أثناء تحضين البيض ثاني أهم العوامل في عملية التكوين الجنيني في الطيور، إذ تقل فرصة الفقس بزيادة أو قلة الرطوبة النسبية. معدل الرطوبة النسبية المناسبة هو ٦٠٪ عند ٣٨°م، ويمكن زيادة ذلك المعدل بزيادة عمر الجنين بحيث لا تتعدي ٧٠٪.

جـ) التهوية

المقصود بالتهوية هو الاتزان بين نسبتي كل من ثاني أكسيد الكربون والأكسيجين، ويراعى ألا تزيد نسبة ثاني أكسيد الكربون عن ١٪، إذ إن الزيادة عن ذلك تبطئ بعملية نمو الأجنة داخل البيض، كما تقدر نسبة كمية الأكسيجين ما بين ٢٠-٣٠٪ ويفضل أن يكون الحضان مزوداً بمروحة شفط صغيرة تعمل على تجديد التهوية حول البيض. يلاحظ أن الأجنة في المراحل الأولى من النمو لا تحتاج إلى تهوية أو رطوبة بشكل كبير.

د) التحريك أو تقليب البيض

يعتبر عامل التحريك من العوامل المهمة في زيادة نسبة معدل الفقس للبيض المحضن وذلك لمنع التصاق الأجنة بالقشرة الكلسية من الداخل.

التحريك المناسب هو مرة أو مرتين في اليوم الواحد، ويفضل البدء فيه في اليوم الثاني من التحضين حتى اليوم ١٨.

ثانياً: الطرق المتبعة لمشاهدة تطور (نمو) جنين الدجاج[١١]

يتم إخصاب بيض الدجاج في الطرف العلوي من قناة البيض، وبمرور الوقت تضع الدجاجة بيضها الذي يحتوي بداخله على جنين في طور التبطين المبكر والقرص الجرثومي. إن هذا البيض في ذلك الوقت لايبدي أي مشاهدات تركيبية، ولكن بعد ١٨ ساعة من التحضين ربما يشاهد الخط البدائي.ويتم فحص البيض بوضعه بين العين ومصدر الإضاءة (Candling)، (ومن المعروف أن مرور ٣٣ ساعة من بدء التحضين لا يسهل ملاحظة أي نمو داخل البيض المحضن).

وهناك طريقتان لمتابعة نمو جنين الدجاج داخل البيض

أ) طريقة عمل نافذة أو فتحة في البيضة The window method

الأدوات والمواد المستخدمة:

- شمع برافين وبيض مخصب.
- حضان درجة حرارته تتراوح ما بين ٣٧-٣٩ مْ ونسبة رطوبته ٦٠٪.
- حلقات زجاجية (بقطر ١,٥-٢سم) أغطية شرائح زجاجية مربعة صغيرة (بقطر ٢-٢,٥ سم). ومنشار صغير لعمل فتحة بالبيض.
- أدوات تشريح: مقص صغير/ مشرط /ملاقط (معقمة) / إبر تشريح أنشوطة شعرية/ فرشاة رسم.
- موقد بنزن (للتعقيم ورفع درجة حرارة مكان التجربة).
- صندوق فحص البيض المزود بمصدر إضاءة داخلية وفي قمته فتحة أقل من حجم البيضة.
- كمام طبي للأنف والفم، وورق مسحة كحول / أو كحول ٧٠٪ للتعقيم.

طريقة إجراء التجربة (الشكل رقم ٦,١)

١- عقم المكان الذي سوف تُجرى عليه التجربة وذلك بمسحة بقطعة من القطن المبلل بالكحول ٧٠٪ (أو الديتول المخفف جدا).

٢- أوقد اللهب بالقرب من المكان (لرفع درجة حرارة المكان، وكذلك للمساعدة في عملية التعقيم).

---

(١١) الحميدي وآخرون ١٤٣٢هـ، الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

٣- تأكد من أن الطور الجنيني داخل البيض أقل من ٣٣ ساعة (من بدء التحضين)، ثم ضع البيضة علي قطعة من القطن بحيث يكون طرفها المدبب على يمينك، حرك طرفها المدبب إلى أسفل محورها الطولي تدريجيا، فيتحرك القرص الجرثومي بداخلها تجاه طرفها العريض المقابل للحيز الهوائي (Air space)

٤- اترك البيضة في هذا الوضع لعدة دقائق.

٥- أمسك البيضة وهي على وضعها السابق، ثم افحصها بين العين ومصدر الإضاءة (صندوق الفحص Candling box)، لتحديد مكان القرص الجرثومي، ثم ضع علامة بالقلم المرسام على قشرة البيضة المقابلة له.

٦- أعد البيضة مرة أخرى على قطعة القطن في وضعها السابق نفسه.

٧- بواسطة ملقط (سبق غليه في الماء لتعقيمه)، خذ قطعة من القطن ثم اغمسها في ٧٠٪ كحول مضاف إليه ١٪ يود (مذاب في يوديد البوتاسيوم)، ثم امسح القشرة الكلسية للبيضة شاملا المنطقة التي يوجد تحتها القرص الجرثومي، ثم جفف القشرة بقطعة من القطن المعقم.

٨- خذ حلقة (معقمة بالكحول) مصنوعة من الزجاج قطرها لايزيد على ٢ سم، ثم ضعها على قشرة البيضة فوق منطقة القرص الجرثومي. اخدش قشرة البيضة بواسطة إبرة تشريح معقمة على طول الحافة الداخلية للحلقة الزجاجية، ثم ضع الحلقة الزجاجية بعد ذلك في ٧٠٪ كحول.

٩- بواسطة المنشار حاول أن تقص مكان الحلقة الذي حددت وذلك بشكل خفيف أو اخدش قشرة البيضة بواسطة إبرة تشريح معقمة على طول الحافة الداخلية للحلقة الزجاجية ثم بواسطة المقص الدقيق المدبب قص الدائرة دون المساس بالأغشية أسفل منها، احرص على أن لا تثقب الغشاء القشري الرقيق أسفل القشرة الكلسية.

١٠- أزل فتات القشرة الكلسية الناتج عن الخدش بواسطة الملقط تأكد دائما من أن أدوات التشريح معقمة، والأيدي نظيفة، وأن تلبس كمام يغطي الأنف والفم عندما تكون البيضة مفتوحة ولا تسمح بدخول الغبار إليها، وذلك بعمل التجربة تحت دولاب التعقيم (Hood).

١١- ارفع الحلقة الزجاجية من الكحول واتركها تجف في الهواء، ثم اغمسها في شمع برافين درجة انصهاره ٤٥°م وانقلها بعد ذلك إلى البيضة بحيث تحيط بالفتحة الموجودة بها، مع تجنب دخول الشمع إليها. ثم بواسطة فرشاة صغيرة خذ من الشمع المصهور إلى الحواف الخارجية للحلقة الزجاجية لمنع دخول الهواء أسفل منها.

١٢- قبل التخلص من الأغشية الداخلية والخارجية لقشرة البيضة، يجب أن تتأكد من أنه لايوجد عليها فتات من القشرة الكلسية ثم بعد ذلك رطب الأغشية بقطرات من محلول لوك الفسيولوجي أو من المحلول الملحي المتعادل (٠,٩٪ كلوريد الصوديوم). عقم أدوات التشريح مرة أخرى باللهب وكذلك حواف القشرة الكلسية (بالكحول). ثم بواسطة إبرة تشريح معقمة اعمل ثقبا في الجزء الجانبي من أغشية البيضة، ثم بالاستعانة بمقص حاد ومعقم، قص الأغشية موازيا لفتحة القشرة وأزلها بحرص شديد مستخدما في ذلك ملقطا دقيقا ومعقما.

١٣- خذ غطاء الشريحة الزجاجية ونظفه وامسكه بالملقط ومرر وجهي الغطاء على لهب بنزن، ثم ثبته بعد ذلك فوق الحلقة الزجاجية الموجودة على البيضة، ثم بواسطة فرشاة، انقل شمع البرافين المصهور إلى الحواف الخارجية للغطاء حتى يلتصق تماما بالحلقة.

١٤- أعد البيضة إلى الحضان بنفس وضعها السابق، وبعد ٢٤ ساعة قلب البيضة داخل الحضان، بحيث يكون الجنين والأغشية المحيطة به بعيدا عن الفتحة.

١٥- افحص البيض تحت المجهر التشريحي أو عدسة مكبرة متى ما شئت لمتابعة نمو الجنين.

الشكل رقم (٦,١). صورة بيضة تم عمل نافذة زجاجية على قشرتها الكلسية لمتابعة نمو وإجراء التجارب على جنين الطيور (حلقة زجاجية + غطاء شريحة + ورق مسحة كحول).

ب) طريقة عمل الغطاء القشري[١٢] The shell cap method

تتلخص طريقة عمل الغطاء القشري في إزالة القشرة الكلسية للطرف العريض من البيضة لتغطية الطرف العريض المعرى لبيضة أخرى. ويجب أن يزال الغطاء دوريا لمشاهدة نمو الجنين داخل البيضة من خلال فتحة أكبر من الفتحة التي ذكرت في الطريقة الأولى (النافذة) ؛ إلا أن لهذه الطريقة عيوبا يمكن إيجازها في الآتي :

- رفع الغطاء دوريا قد يعرض البيضة للتلوث البكتيري.
- عدم انتقال غازات التنفس من خلال الغطاء قد يعرض الجنين للاختناق.
- يجب في هذه الطريقة توفير نصف قشرة البيضة العريض من البيض غير المحضن

طريقة إجراء التجربه (الشكل رقم ٦,٢)

١- حدد الحيز الهوائي في الجزء العريض من البيضة، ثم ضعها في مكان بحيث يكون الطرف العريض إلى أعلى، ثم نظف الجزء العريض بقطعة من القطن المبلل بالكحول (٧٠٪) المضاف إليه اليود، ثم جفف المكان نفسه بقطعة أخرى من القطن المعقم.

٢- بواسطة إبرة تشريح أو ملقط معقم، اعمل ثقبا في وسط الجزء العريض من البيضة، ثم وسع الثقب تدريجيا بإزالة القشرة الكلسية في هذه المنطقة.

٣- اترك أغشية نصف القشرة في مكانها، وعقمها بالكحول المضاف إليه اليود، اجعل حافة القطع بالغطاء القشري (Shell cap) المستخدم ناعمة وذلك بغمسها في البرافين المصهور.

٤- ضع غطاء القشرة المعقم بالكحول واليود على الجنين المعرى في الطرف العريض من البيضة، ثم ضع البيضة في حضان بحيث يكون هذا الطرف العريض للأعلى والطرف المدبب إلى أسفل، يجب رفع نسبة الرطوبة عن ٦٠٪ لهذا البيض، لأن مساحة السطح المعرى للجنين كبيرة، وذلك لتفادي البخر الذي يحدث نتيجة لذلك.

٥- في اليوم السابع عشر من بدء التحضين، يرش الماء المعقم على قشرة البيضة مرتين يوميا.

---

(١٢) Harrison (1977).

مكونات محلول لوك الفسيولوجي Locke's solution:

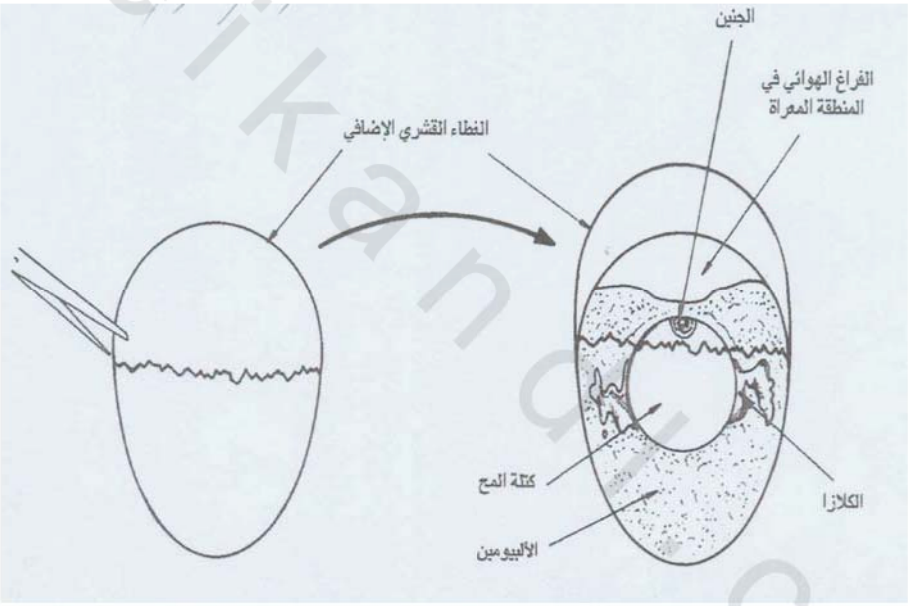
١- كلوريد الصوديوم ٠,٢٤ (NaCl 0.24g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٤ جم (KCl 0.04g).

٣- كلوريد الكالسيوم الجاف ٠,٢٤ جم ($CaCl_2$ 0.02g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٠٢ جم ($NaHCO_3$ 0.02g).

٥- ماء مقطر ١٠٠٠ مل (Distilled water 1000ml).



الشكل رقم (٦,٢). رسم توضيحي لطريقة عمل الغطاء القشري لبيضة دجاجة تم إزالة جزء من قشرتها الكلسية.

obeikandl.com

obeikandl.com

تقرير العملي السادس: عمل نافذة والغطاء القشري في بيضة الدجاج

الاسم : ..... الرقم : .....

١- سجل درجة حرارة الحضان : ..... درجة الرطوبة النسبية : .....

٢- كم كان عمر الجنين تقريبا أثناء عمل النافذة؟..... ساعة.

٣- كم بيضة عملت فيها نافذة ؟ العدد : .....بيضة.

٤- كم كان مجموع البيض الذي عمل فيه نافذة ؟عدد : .....

٥- كم جنينا بقي حيا ولم يتلوث ؟ العدد : .....

٦- كم كان عدد الأجنة التي واصلت الحياة إلى طور الفقس؟ : العدد : .....

٧- سجل بعض ملاحظاتك حول الأجنة التي تم عمل نافذة فيها ولم تكمل نموها، ثم عدد الأسباب التي تتوقعها والتي أدت إلى عدم نمو الأجنة.

.....

.....

٨- كم كان عدد البيض الذي عملت له أغطية ؟ العدد : .....

٩- كم كان عدد الأجنة التي واصلت النمو بعد ٢٤ ساعة من عمل الغطاء؟.....

١٠- سجل ملاحظاتك حول نمو الأجنة خلال متابعتك لها، وكذلك دون ملاحظاتك عن الأسباب التي أدت إلي عدم نمو الأجنة الأخرى :

.....

.....

١١- أيهما أفضل من حيث النتائج التي تم الحصول عليها طريقة عمل النافذة أم الغطاء؟

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

openkandi.com

obeikandl.com

العملي السابع

تأثير بعض المواد على التكوين الجنيني للدجاج
Effect of Some Materials on the Chick Embryo Development

تجربة تأثير بعض العوامل على نمو أجنة الدجاج

الهدف

إن طريقة النافذة في قشرة بيض الدجاج تجعل من الأجنة مادة مناسبة لدراسة تأثير العوامل المؤدية إلى التشوهات الجنينية (Teratogenic agents) مثل: المضادات الحيوية وموانع (مضادات) التمثيل الغذائي (Antimetabolites) والأشعة السينية أو أشعة إكس (X-rays) وغيرها [١٣]. لمعرفة متى وكيف تؤثر مثل هذه العوامل على الأجنة من خلال تجربتها على الأجنة قبل التحضين أو بعد التحضين بساعات (مرحلة الخط البدائي حتى ١٨ساعة تحضين) (قبل التمايز الخلوي للأجنة) أو بعد ٢٤ساعة تحضين أوبعد ٣٣ساعة تحضين (بداية تكوين الأعضاء) أو غير ذلك بعد ٧٢ساعة أو أكثر (بعد التمايز للأعضاء) لدراسة تأثير هذه العقاقير أو المواد مثل عوامل النمو على التكوين الجنيني.

يمكن عمل تجربة تأثير المواد على أجنة الطيور باتباع الخطوات التالية:

١- يتم تجهيز مجموعات من البيض المخصب (قبل التحضين ١٠ أو بعد التحضين بساعات ١٨ ساعة أو بعد التحضين ٢٤ ساعة فأكثر كل مجموعة تتكون على الأقل ١٥ بيضة ويوزن البيض لتحديد كمية الجرعة المطلوب حقنها.

---

(١٣) كريم (١٤١١هـ).

obeikandl.com

٢- ثم يتم عمل نافذة له كما في الدرس العملي السابق.

٣- يجهز تركيز العقار مثل المضاد الحيوي الأموكسيل (Amoxcil) ٥٠٠ ميكروجرام /كجم (٠,٥ لكل جرام).

٤- يحقن البيض بالجرعة المناسبة لوزن البيضة مثلا ١ ميكو جرام / جرام.

$$\text{تحديد الكمية المطلوبة للحقن} = \frac{\text{وزن البيضة (١٠٠جرام)} \times \text{تركيز المادة(٠,٥)}}{\text{الجرعة المرغوبة (١ ميكرو/جرام)}}$$

٥- يتم متابعة البيض بعد الحقن خلال فترة التحضين وتسجيل الملاحظات التي تطرأ على الأجنة نتيجة الحقن بالمادة. حسب الجدول رقم (٧,١).

الجدول رقم (٧,١) يوضح نتائج تجربة تأثير المواد على عمل التشوهات في أجنة الدجاج.

عدد البيض المحقون	عمر الأجنة	اسم المادة المحقونة	كمية الجرعة المحقونة	عدد الأجنة المشوهة٪	نوع التشوهات

obeikandl.com

تقرير العملي السابع:
تأثير بعض المواد على التكوين الجنيني للطيور

اسم الطالب : ..... الرقم الجامعي : .....

١- ما المادة المحقونة المستخدمة في التجربة؟.....

٢- كم عدد البيض الذي تم حقنه؟.....

٣- ما التركيز الذي تم حقنه في البيض؟.....

٤- كم عدد الأجنة التي نمت؟..... والأجنة التي توقفت عن النمو؟.....

٥- كم عدد أو نسبة الأجنة المشوهة؟.....٪

٥- ما التشوهات التي حدثت للأجنة؟.....

.....

أرفق صورة للأجنة المشوهة:

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

زراعة القرص الجرثومي لجنين الدجاج
Germ Disc Culture of Chick Embryo(١٤)

الهدف

تتلخص هذه الطريقة في فصل الغشاء المحي (Vitelline membrane) الحامل للجنين عن المح، ثم وضعه في وعاء مناسب للزراعة بحيث يلامس مادة الألبيومين التي يتم وضعها أسفل منه داخل الوعاء. أما القرص الجرثومي الموجود في الجهة العلوية للغشاء المحي، فيكون مطمورا في مادة الزراعة نفسها. تؤخذ الأجنة المزروعة عادة من البيض الذي يكون قد تم تحضينه من قبل لمدة ٢٢-٢٤ ساعة والتي يكون ظهر فيها الخط البدائي (Primitive streak) وثنية الرأس (Head fold) أو القطع العضلية أقل من أربعة أزواج. قبل إجراء هذه التجربة يجب تعقيم أدوات التشريح ومحلول الزراعة الذي يتكون من محلول بانت كومبتون الملحي + الجلكوز(Pannet-compton saline solution plus glucose)، ويتكون هذا المحلول من المحلولين أ، ب.

أ) المحلول الأول Stock solution A يحضر مركز هذا المحلول من الآتي:

١- كلوريد الصوديوم ٩٦,٨ جم (NaCl).

٢- كلوريد البوتاسيوم ١٢,٤ جم (KCl).

---

(١٤) New (1964).

obeikandl.com

٣- كلوريد الكالسيوم المائي ١٦,٧ جم ($CaCl_2.2\ H_2O$).

٤- كلوريد الماغنسيوم المائي ١٠,٢ جم ($MgCl_2\ 6H_2O$).

٥- ماء مقطر ٨٠٠ مل (Distilled water).

ب) المحلول الثاني Stock solution B ويحضر مركز هذا المحلول من الآتي:

١- فوسفات الصوديوم المائية ٢,٤ جم ($NaH_2PO_4.2H_2O$).

٢- فوسفات الصوديوم المائية الثنائية ٥,٦١ جم ($Na_2HPO_4.12H_2O$).

٣- ماء مقطر ١٢٠٠ مل (Distilled water).

وعند الاستعمال تخلط ١٣٥٠ مل من ١٪ جلوكوز + ٦٠ مل من محلول (١) +٩٠مل من محلول (ب) جيدا. ويفضل تعقيم كل مكون للمخلوط علي حدة لمدة ٢٠ دقيقة وتحت ضغط ٢٥ رطلا. كما يجب تعقيم الأواني الزجاجية وأطباق بتري والماصات المستخدمة.

تجربة إزالة القرص الجرثومي وزراعته
The Removal and Culturing of the Blastoderm

لإجراء ذلك يتبع التالي (الشكل رقم ٨,١):

١- يعد البيض المحضن لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٩°م للحصول على القرص الجرثومي المناسب للزراعة.

٢- قبل فتح البيضة يجب تركها حتى تأخذ درجة حرارة الغرفة، وهذا يمنع انفصال القرص الجرثومي عن الغشاء المحي أثناء المعاملات التالية.

٣- يبلل الطرف العريض من البيضة بقطعة من القطن المبلل بالكحول (٧٠٪)، لمنع حدوث التلوث أثناء فتح البيضة.

٤- تفتح البيضة بالطرق المعتادة لفصل النصف العلوي من الغشاء المحي المحمل بالقرص الجرثومي. ويكون القطع أسفل مستوى الخط المنصف للبيضة القريب

من الألبيومين، يجمع الألبيومين بواسطة قطارة معقمة، ثم يوضع في دورق مخروطي معقم له سدادة محكمة حتى لا يتلوث.

٥- يرفع الغشاء المحي الحامل للقرص الجرثومي عن المح بحرص شديد بواسطة طرفي ملقط معقم، ثم يوضع في زجاجة ساعة معقمة بها محلول بانيت كومبتون الملحي المعقم (Sterilized pannett-compton solution)، بحيث يكون الغشاء المحي إلى أسفل والقرص الجرثومي إلى أعلى.

٦- توضع الحلقة الزجاجية المعقمة (Sterilized glass ring) على الغشاء المحي بحيث يكون القرص الجرثومي في منتصف الحلقة الزجاجية تماما والحواف الخارجية للغشاء المحي خارجها.

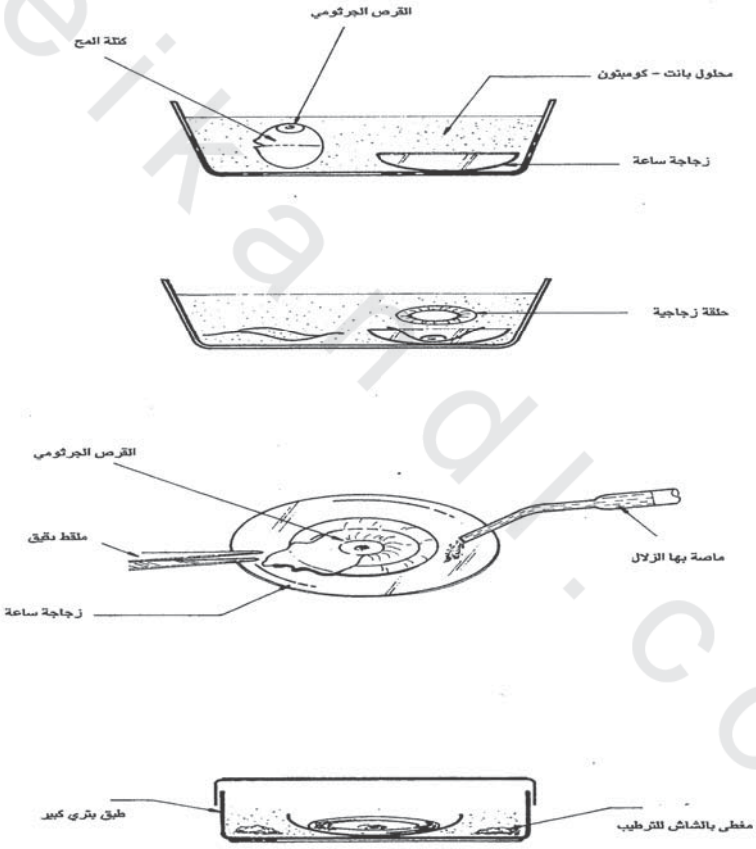
٧- تستخرج زجاجة الساعة ومحتوياتها من الحوض المستخدم في استخراج الجنين (الشكل رقم ٨,١)، ثم تزال الزيادة من المحلول الملحي بواسطة قطارة مدببة نظيفة ومعقمة، ثم تثنى حواف الغشاء المحي على جدار الحلقة الزجاجية مع تجنب شده بعنف، حتى لايتمزق ويتسرب الزلال إلى القرص الجرثومي فينمو الجنين نموا غير طبيعي، ثم يغسل القرص الجرثومي بالمحلول الملحي للتخلص من بقايا المح الموجودة به.

٨- يزال المحلول الملحي الموجود في زجاجة الساعة من فوق الجنين وأسفل الغشاء المحي، ثم يؤخذ بماصة معقمة ١ مل من الزلال الموجود في الدورق المخروطي ويوضع أسفل الغشاء المحي. توضع بضع قطرات من محلول بانيت كومبتون (Pannett Compton solution) علي سطح القرص الجرثومي لضمان بقائه رطبا في أثناء عملية التحضين.

٩- تنقل زجاجة الساعة إلى طبق بتري معقم له غطاء، ثم توضع به قطع من القطن المغطى بالشاش والمبلل بالمحلول الملحي المعقم. يغطى الطبق ثم يوضع في الحضان عند درجة حرارة ٣٩°م، ورطوبة نسبية تبلغ ٦٠٪ لمدة أربع وعشرين ساعة أخرى. وتعتبر هذه الطريقة ممتازة لمشاهدة نمو القلب والقطع العضلية وثنية الرأس

والجزر الدموية في جنين الدجاجة. يجب تجنب رفع غطاء الطبق البتري من آن إلى آخر، للحصول على رؤية جيدة حتى لا يتلوث الجنين.

تظهر شواهد التلوث بوجود مساحات بيضاء معتمة، نتيجة لتحلل الأنسجة الجنينية، والجدير بالذكر أن زلال البيضة يوجد به أنزيم الليسوزايم (Lysozyme) المضادة للنمو البكتيري (Anti Bacterial agent).



الشكل رقم (٨,١) رسم يوضح خطوات إزالة القرص الجرثومي وزراعته في طبق بتري.[١٥]

(١٥) كريم (١٤١١هـ).

تقرير العملي الثامن: زراعة القرص الجرثومي لجنين الدجاج

الاسم : ..... الرقم : .....

سجل درجة حرارة الحضان ؟.....مْ درجة الرطوبة النسبية : .....

١- كم كان عمر الجنين أثناء عمل التجربة ؟ العدد : .....

٢- ما اسم المحلول المستخدم في الزراعة ومما يتكون : .....

.....

٣ - كم كان عدد البيض الذي تم إجراء التجربة عليه ؟ العدد : .....

٤- كم جنينا بقي حيا لمدة ٢٤ ساعة بعد فصله وزراعته ؟ العدد : .....

٥- ما أقصى حد وصل إليه نمو الأجنة (العمر بالأيام أو الساعات)؟.....

٦- دوِّن ملاحظاتك في أثناء متابعتك لنمو الجنين بعد زراعته :

.....

.....

.....

.....

٧- عدد الأسباب التي أدت إلى عدم نمو الأجنة ثم إلى موتها :

.....

.....

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandi.com

obeikandl.com

العملي التاسع

تحضير الشرائح الكاملة والقطاعات لجنين الدجاج
Preparation of Whole Mount and Sections Slides of Chick Embryos (١٦)

الهدف

تهدف هذه التجربة إلي تعلم عمل التحميل الدائم للأجنة علي الشرائح، وذلك لإجراء الفحوصات بشكل أدق علي الأجنة إذا ما أجريت عليها بعض التجارب لملاحظة بعض عيوب تكوين الجنين.

المواد والأدوات المستخدمة Materials

١- بيض مخصب ومحضن لفترة معينة حسب الحاجة (١٨-٧٢) ساعة.
٢- حضان.
٣- أدوات تشريح.
٤- أطباق بتري، قطارات، زجاجيات للتثبيت والصبغ وشرائح زجاجية وأغطيتها.
٥- محلول ملحي فسيولوجي (محلول لوك الفسيولوجي).
٦- مثبت بوان أو مثبت حمض الخليك الفورمالديني (٠,٥٪ حمض الخليك +١٠٪ فورمالين).
٧- كربونات الليثيوم المذابة في كحول (٧٠٪).

---

(١٦) Harrison (1977).

obeikandl.com

٨- كحول بتراكيز مختلفة (٣٥٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٠٪، ٩٦٪، ١٠٠٪).

٩- زيت خشب السيدر (Ceder wood oil).

١٠- زيلين وشمع وجليسرين وحمض الهيدروكلوريك.

١١- صبغة الهيماتين (Hematin Stain) أو صبغة كارمين البوراكس (Borax carmine Stain).

١٢- جهاز لعمل القطاعات الشمعية للشرائح (ميكروتوم Microtome).

تحضير شريحة لجنين الدجاج بكامله

Preparation of whole mount chick embryo slide

للحصول على أجنة الدجاج يراعي الآتي:

١- يتم الحصول علي البيض من الدجاج البياض البلدي أو اللجهورن الأبيض (White leghorn)، لأن نسبة الإخصاب به تكون أعلى من أنواع الدجاج الأخرى ولأن قشرة هذا البيض الكلسية رقيقة بيضاء.

٢- أن يكون البيض مخصبا، وأفضل الأوقات للحصول عليه هو فصل الربيع (من فبراير إلى يونيو).

٣- يوضع البيض المخصب (قبل التجربة بيوم أو يومين) في حضان درجة حرارته تبلغ حوالي ٣٩°م (١٠٣ف) على المحور الطولي أو الأفقي، ويجب أن يقلب البيض بلطف من جانب إلى آخر كل ٢٤ ساعة إما آليا وأما يدويا.

٤- أن تكون نسبة رطوبة الحضان حوالي ٦٠٪.

٥- يحفظ البيض الذي لانريد تحضينه، في مكـان بارد رطب درجة حرارته ما بين ١٠°م إلى ١٥°م ولمدة أسبوع واحد فقط، حتى لانحصل على أجنة نامية نموا غير طبيعيا.

٦- للحصول على جنين عمره ٣٣ ساعة، يوضع البيض في الحضان لمدة ٣٨ ساعة (هناك فرق ٥ ساعات لكي يأخذ البيض درجة حرارة الحضان (الجدول رقم ٩,١).

٧- للحصول على الجنين وإخراجه من البيضة اتبع نفس الخطوات التي اتبعتها في إزالة القرص الجرثومي وزراعتة في العملي الثامن أو باتباع الخطوات التالية (الشكل رقم ٩,١):

أ) اكسر قشرة البيضة عند طرفها العريض وفوق الحيز الهوائي.

ب) أزل القشرة الكلسية وأغشيتها أسفل مستوى المح.

ج) أفرغ محتوى البيضة في وعاء به محلول ملحي فسيولوجي درجة حرارته ٣٩°م (١٠٣°ف) بلطف شديد (حتى لا يتمزق الغشاء المحي المحيط بالمح).

وإذا كانت التجربة للفحص فقط، فيكتفى بكلوريد الصوديوم (٠,٩٪ جرام). أزل القرص الجرثومي (Blastoderm) بواسطة مقص حاد وذلك بعمل قطع خارج المنطقة الوعائية (Vascular area) في الغشاء المحي، ثم اغمس زجاجة ساعة داخل الوعاء الذي يحتوي على الجنين الطافي والتقطه بها مع قليل من المحلول الملحي.

د) أزل الغشاء المحي (Vitelline membrane) بواسطة ملاقط مدببة الطرفين، ثم ضع القرص الجرثومي على لوح زجاجي أو مربع (١,٥×١,٥سم) من ورق الترشيح في زجاجة ساعة نظيفة لحفظه بطريقة دائمة (الشكل رقم ٩,١).

أو يمكن كسر البيضة ثم سكبها في طبق بتري يحتوي على محلول فسيولوجي، ثم اثنِ ورقة ترشيح صغيرة وقصها على شكل معين (بحجم الجنين) ثم وضعها بلطف على الجنين بحيث يبدو (الجنين) من الفتحة التي عملت، ثم تقطع أطراف الغشاء المحي الملتصق بالورقة الشفافة ونقل الجنين بها بعد ذلك.

بعد الحصول على القرص الجنيني اتبع الخطوات التالية:

١- اغسل القرص الجنيني لمدة نصف ساعة بماء الصنبور بشكل خفيف جدا للتخلص من الحبيبات المحية العالقة بالقرص الجنيني (يجب نقل الماء الجاري والتخلص منه بالقطارة دون المساس بالجنين).

٢- ثم انقل الجنين إلى تركيزات مخففة من الكحول كما هو متبع:

أ) ٥٠٪ كحول لمدة ساعة. ب) ٣٥٪ كحول لمدة ساعة.

٣- ضع الجنين في صبغة الهيماتين (Hematin Stain) لمدة ساعة [تتكون الصبغة من: ٢٥ جراما من الشب البوتاسي (Potassium alum) المذاب في ٥٠٠مل من الماء المقطر ثم أضف إليه تدريجيا (مع التحريك المستمر) نصف جرام هيماتين في ١٠ سم^3 من كحول ٩٠٪ واستمر في التحريك لعدة دقائق. اترك المحلول نصف ساعة ثم رشحه واستخدم الراشح لصبغ الجنين].

٤- اغسل الجنين بالماء الجاري (ثلاثة تغييرات، ٥ دقائق لكل تغيير).

٥- أضف ٦ قطرات من حمض الهيدروكلوريك إلى ١٠٠ سم^3 من كحول ٣٥٪ ثم يضاف على الجنين لتحويل لون الصبغ الأزرق للجنين إلى اللون الأحمر الوردي القاتم.

٦- انقل الجنين للماء الجاري عدة مرات واتركه ثلاث ساعات للتخلص من الحمض الزائد.

٧- انزع ماء العينة وذلك بتمريره على تركيزات تصاعدية من الكحول ٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪ حتى تصل إلى كحول تركيزه ١٠٠٪.

٨- انقل الجنين إلي زيت خشب السيدر أو زيت القرنفل، واتركه حتى يصبح شفافا ثم اغسله بالزيلين لمدة ٣٠ دقيقة أو أقل.

٩- حمل الجنين على شريحة زجاجية وسط كندا بلسم (Canada balsam) ثم غطه بغطاء الشريحة (الشكل رقم ٩,١).

ملاحظة: يمكن استخدام صبغة بوراكس الكارمين (Borax carmin Stain) بدلا من الهيتامين، مع عمل التمايز بواسطة الكحول المحمض (Acidic alcohol) (١سم^3 حمض Hcl+ ١٠٠سم^3 كحول ٧٠٪).

ب) تحضير شرائح لقطاعات في جنين الدجاج

لتحضير شرائح لقطاعات في جنين الدجاج للدراسة الخلوية لأجزاء الجنين اتبع الخطوتين رقم ١ و ٢ السابقتين للحصول على جنين الدجاج ثم اتبع الخطوات التالية:

التثبيت Fixation

أزل جميع السوائل من زجاجة الساعة بواسطة قطارة تاركا القرص الجرثومي مفرودا على قطعة الورق لمنع التفاف حواف القرص الجرثومي. أضف قطرات من محلول بوان (Bouin's fluid) إلى القرص الجرثومي حتى يغطى تماما. وبعد نصف ساعة تقريبا، يكون الجنين قد أصبح صلبا، فيسحب بحرص شديد من على الورقة المقواة ويترك في المثبت.

مدة التثبيت تتراوح ما بين ٤ ساعات للأجنة المبكرة، و٤٨ ساعة للأجنة التي يزداد تحضينها لمدة ٣ أيام فأكثر.

إزالة اللون Decoloration

بعد عملية التثبيت، ضع على الجنين محلولا مركزا من كربونات الليثيوم (Lithium carbonate) المذاب في كحول ٧٠٪، للتخلص من اللون الأصفر لحامض البكريك الموجود في مثبت بوان (كربونات الليثيوم تذوب ببطء شديد في الكحول) أو في ٢-٣٪ من

هيدروكسيد الأمونيوم (NH_4OH) في كحول تركيزه ٧٠٪ أثناء عملية نزع ماء العينة، حتي يصبح أبيض اللون. تستغرق هذه العملية حوالي ٢٤ ساعة مع التغيير المستمر في الأجنة المتقدمة في العمر وأقل للأجنة المبكرة.

نزع الماء Dehydration

يتم نزع الماء باستخدام تركيزات تصاعدية من الكحول (٣٥٪ – ٥٠٪ – ٧٠٪– ٩٠٪–٩٦٪ –١٠٠٪) كما يجب أن يتم ذلك ببطء حتى لايتأثر الجنين. وللتأكد من إزالة الماء تماما. يراعى أن يكون بقاء العينة في كل من التركيزات السابقة ساعة للأجنة المبكرة وساعتين تقريبا للأجنة الأكثر تقدما في العمر. إذا لم يتم التخلص من اللون الأصفر لحمض البكريك، أضف إلى التركيزات الكحولية ٧٠، ٩٠٪ كميات قليلة من كربونات الليثيوم ($LiCO_3$)، ويفضل إجراء تغيرين لكل تركيز من تركيزات الكحول.

الترويق Clearing

بعد التخلص من الكحول المطلق، يغطى الجنين جيدا بزيت خشب السيدر Cedar wood oil لمدة ٢٤ ساعة أو أكثر (حتي يصبح شفافا)، ثم يتم نقله إلي الزيلين وتركه لمدة نصف ساعة.

الطمر Embedding

اطمر الجنين في شمع درجة انصهاره ٥٦°م مضافا إليه نوعان من الشمع، ٥٪ لكل نوع بنسبة الوزن: 5% Bayberry.Wax 5% Bee wax.

تطمر الأجنة الصغيرة لمدة ساعة، أما الأجنة التي تصل أعمارها إلى ٩ أيام فأكثر فتطمر لمدة ساعتين تقريبا. بينما تطمر الأجنة المتأخرة التي تكونت بها بعض الغضاريف في مخلوط من شمع البرافين والمطاط بالتساوي (Paraffin: rubber mixture) لمدة تتراوح بين نصف ساعة وساعة واحدة.

القطيع Sectioning

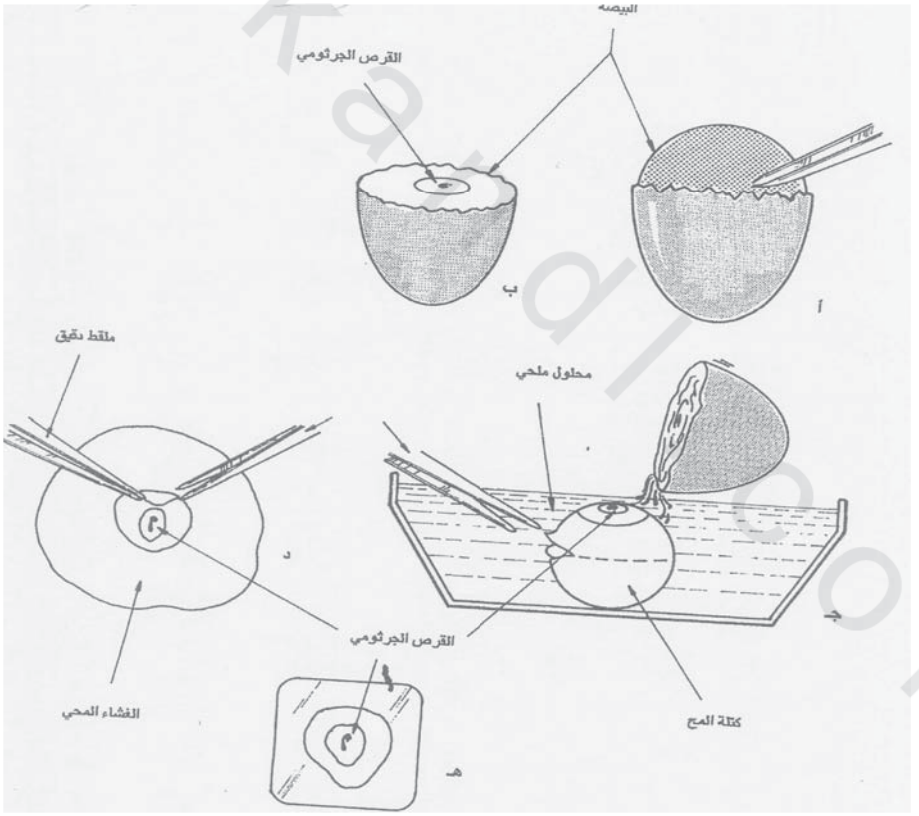
للدراسة الخلوية، يجب ألا يزيد سمك القطاعات عن ٧ ميكرون. أما بالنسبة لقطاعات الأعضاء، فيجب أن يكون سمك القطاعات حوالي ٥ ميكرون، ولكي تلتصق القطاعات جيدا بالشرائح الزجاجية النظيفة اتبع ما يلي:

أ) اغلِ قليلا من الماء المقطر ثم برده.

ب) أضف لكل ١٠سم^3 من الماء قطرة من الجليسرين والألبومين (لاصق ماير).

ج) اخلط جيدا، ثم ضع قليلا من مخلوط الألبومين والماء على الشريحة الزجاجية حتى يطفو عليه شريط القطاعات الشمعية.

د) عندما تنتهي من عمليتي فرد القطاعات وتوجيهها على الشريحة، ضعها على سخان الشرائح (درجة حرارته حوالي ٤٠°م)، لتجف ثم اسحب المخلوط السابق (الزائد منه) بواسطة قطارة أو بورق الترشيح ثم أكمل تجفيف الشريحة. بعد تجفيف الشرائح يتم صبغها بإحدى الصبغات مثل بواركس الكارمين أو أي صبغة أخرى مناسبة، ثم تجرى عليها عمليات نزع الماء ثم يتم وضع الكندا بلسم لتغطيتها بغطاء الشريحة.



الشكل رقم (٩,١). يوضح خطوات الحصول على القرص الجنيني من البيضة وتحميلة على ورقة ترشيح ثم نقله على غطاء الشريحة.

الجدول رقم (٩,١) مراحل نمو جنين الدجاج في الحضان.

أرقام مراحل النمو	العمر التقريبي للتحضين (بالساعات) عند ٣٨,٨–٣٤,٧ م°	عند ٣٩,٤ م°
منطقة الخط البدائي		
١- القرص الجرثومي.	٥–٤	٤
٢- مرحلة تكوين الخط البدائي.	٧–٦	٦
٣- مرحلة متوسطة من الخط البدائي.	١٣–١٢	١١
٤- الخط البدائي كامل التكوين (منطقة الرأس).	١٩–١٨	١٨
٥- تكوين الرأس.	٢٢–١٩	١٩
٦- ثنية الرأس.	٢٤–٢٣	٢٠
منطقة القطع الجسمية		
٧- أول زوج من القطع الميزوديرمية.	٢٦–٢٣	٢١
٨- ٤ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٢٩–٢٦	٢٤
٩- ٧ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٣٣–٢٩	٢٧
١٠- ١٠ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٣٨–٣٣	٣٠
١١- ١٣ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٤٥–٤٠	٣٣
١٢- ١٦ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٤٩–٤٥	٣٦
انثناء الجنين والتواؤه		
١٣- بداية انثناء الرأس (١٩ قطعة جسمية).	٥٢–٤٨	٤٠
١٤ - إنشاء كامل الرأس (٢٥قطعة جسمية).	٥٣–٥٠	٤٤
١٥- المخ المتوسط يصبح في المقدمة (٢٥ قطعة جسمية).	٥٥–٥٠	٤٨
١٦- مؤخرة المخ المتوسط تتقدم للأمام (٢٨ قطعة جسمية).	٥٦–٥١	٥٤
١٧- مقدمة المخ الخلفي تتقدم للأمام (٣١قطعة جسمية).	٦٤–٥٢	٦٠
١٨- بقية سقف المخ الخلفي تصبح في المقدمة (٣٥ قطعة جسمية).	٧٢	٦٥
مراحل براعم الأطراف		
١٩- طول البرعم الطرفي = ربع عرض انثناء الرأس.	٣ أيام	يومان
٢٠- طول البرعم الطرفي = نصف عرض انثناء الرأس.	٣,٥ أيام	٢,٥ أيام
٢١- طول البرعم الطرفي = عرض انثناء الرأس.	٤ أيام	٣ أيام

obeikandl.com

obeikandl.com

تقرير العملي التاسع:
تحضير الشرائح الكاملة والقطاعات لجنين الدجاج

الاسم : ..... الرقم : .....

يقدم الطالب الشريحة (أو الشرائح) التي قام بعملها خلال هذا الجزء من العملي موضحا الاتي :

١- نوع الصبغة : .....

٢- ساعات التحضين : .....

٣- عمر الجنين : .....

٤- درجة حرارة الحضان أثناء تحضين البيض : .....

٥- إذا تم أخذ صور للجنين من الشريحة فتوضح قوة التكبير.....

٦- ما مراحل تحضير الشريحة ؟ : .....

٧- ما أهمية كل مرحلة من مراحل تحضير الشريحة ؟ : .....

٨- اذكر أسماء المحاليل المستخدمة في كل مرحلة وطريقة المعاملة لها؟

.....

.....

٩- أرفق صورة للشريحة التي تم عملها لجنين الدجاج :

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com