القسم الثالث

تجارب على أجنة الثدييات (الفأر)

Experiments on Mammalian Embryos (Mouse)

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي العاشر

تأثير بعض المواد على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران

Teratological Effecets of Some Materials in Mouse Embryos.

الهدف

يهدف هذا العملي إلى معرفة أي مدى يكون هنالك تأثير للتعرض للمواد أو تناول الأدوية خلال فترة الحمل على نمو الأجنة خلال مراحل التكوين المختلفة: هل في المراحل المبكرة (مرحلة التفلج والتبطين)، أم خلال مرحلة تكوين الأعضاء (التعضي)، أم في المراحل المتأخرة (مرحلة اكتمال تكوين الأعضاء). ويتم ذلك من خلال إجراء تجربة يتلخص إجراؤها في الآتي:

تحقن مجموعة من إناث الفئران المخبرية الحوامل بأحد العقاقير الشائعة الاستعمال أو مواد مشوهة للأجنة (كالإسبرين أو أحد المضادات الحيوية أو غيرها) وعلى فترات مختلفة من الحمل، ثم تتم مراقبة عملية تكوين الأجنة لمعرفة مدى التأثير الضار لهذه العقاقير.

أ) المواد والأدوات المستخدمة

- مجموعة من إناث الفئران الحوامل ٢٠-٣٠.
- أحد العقاقير (كالإسبرين Aspirin) أو الهايكونسيل (Hiconcil)، التتراسيكلين (Tetracycline) أو الميتومايسين - ج(Mitomycin-C (MMC.
- صناديق خاصة بتربية الفئران.

obeikandl.com

• إبر للحقن وأدوات التشريح.
• حاقنات للتجريع.

ب) طريقة العمل

١- توضع مجموعة من الإناث (١٥ أنثى مثلا) مع ذكور الفئران (٣ إناث مع كل ذكر) في كل قفص لتربية الفئران ثم يتم مراقبة الحمل لكل أنثى كل يوم في الصباح الباكر عن طريقة رؤية السدادة المهبلية (Vaginal plug) وهي عبارة عن سائل منوي متجلط يسد فتحة المهبل مما يدل على حدوث الجماع والذي يعتبر اليوم الأول للحمل ولبدء التجربة على الإناث.

٢- تقسم إناث الفئران الحوامل إلى ثلاث أو أربع مجموعات (٣-٥ إناث، على الأقل، في كل مجموعة) ثم توضع كل مجموعة في صندوق خاص بها ترقم كل أنثي وذلك بتلوين الذيل على شكل حلقة حول الذيل في طرفة أو وسطة مثلا خط دائري رقم ١ أو رقم ٢ وهكذا ثم توزن.

٣- يتم تحضير تركيز معين من العقار المراد حقنه (كالإسبرين) جم أو مجم/ مل (gm or mg/ml).

٤- تحدد كمية المحلول المحتوي على العقار (بالمل) طبقا لوزن الأنثى والجرعة المعينة.

من المعادلة التالية: الكمية المطلوبة = $\frac{\text{الجرعة (مجم/كجم)} \times \text{الوزن (جم)}}{\text{تركيز العقار (مجم/ مل}}$

٥- بعد أن تحدد الجرعة (Dose) المراد إعطاؤها للإناث الفئران الحوامل يتم إيصال المادة إما عن طريق حقن الإناث الحوامل بالتجويف البريتوني للجسم أو التجويف البطني وأما عن طريق التجريع وذلك بإداخال حاقنة التجريع عن طريق جانب الفم ثم إلى تجويف البلعوم ثم المرئ مع التأكد بعدم دخول حاقنة التجريع إلى القصبة الهوائية، ويفضل استخدام جرعتين مختلفتين أو أكثر ولكل مجموعة جرعة خاصة بها.

٦- تحقن إناث المجموعة الأولى في اليوم الثاني أو الثالث من الحمل (مراحل التكوين الجنيني المبكر، التفلج) بإحدى الجرعات إما عن طريق الحقن بالأبرة بالتجويف البريتوني وأما بالتجريع عن طريق الفم بحاقنة تجريع.

٧- تحقن إناث المجموعة الثانية في اليوم السابع أو التاسع من الحمل (مراحل تأسيس تكوين الأعضاء) بالجرعة السابقة نفسها أو باستخدام جرعة أخرى.

٨- تحقن إناث المجموعة الثالثة في اليوم الحادي عشر أو الثاني عشر من الحمل (مراحل اكتمال نمو الأعضاء) إما بالجرعة نفسها أو باستخدام جرعة أخري.

٩- تحقن إناث المجموعة الضابطة (الرابعة) بالمحلول المذيب (Vehicle) (فقط بالجرعة نفسها أما الجرعات المستخدمة).

١٠- تشرح كل أنثى في اليوم التاسع عشر من الحمل، ثم تستخرج الأجنة وتعد ثم توزن و تفحص لمعرفة ما إذا كان للعقار أي تأثير تشوه خلقي أم لا وذلك بمقارنة أجنة المجموعة الضابطة بأجنة المجموعة المعالجة (الشكل رقم ١٠,١).

الشكل رقم (١٠,١). صورة توضح تأثير العقاقير (المتوميسين Mitomycine C) على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران.

الأولى توضح أجنة ممتصه في الرحم بعد ١٩ يوما من الحمل.

الصورة الثانية تأثير مادة الميتومسين سي على نمو أجنة الفئران: الجنين (أ) فيه نمو المخ خارج الجمجمة (المخ الخارجي Exencephaly) مع صغر حجم ووزن الجنين مقارنة بالجنين السليم (ب).[١٧]

---

(١٧) Abou-Tarboush, *et.al.* (1994).

ترصد البيانات المتحصل عليها من كل أنثى من المجموعات المختلفة ثم توضع في الجدول التالي:

رقم الأنثى	نوع المجموعة	الجرعة (مجم/كجم)	عدد الأجنة حي ميت امتصاص العدد الكلي				أوزن الأجنة	متوسط وزن الأجنة	عدد وزن الأجنة	التشوهات الملاحظة على الأجنة	ملاحظات أخرى

obeikandl.com

تقرير العملي العاشر:

تأثير بعض المواد على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران

الاسم : ..... الرقم : .....

يقدم الطلبة (في مجموعات) النتائج التي حصلوا عليها لكل مجموعة مع تحليل هذه النتائج وتعليلها ، كتقرير لهذا العملي.

تأثير عقار..... على أجنة فئران تم الحصول عليها في اليوم السابع عشر من الحمل.

الجرعة (مجم/كجم)	عدد الإناث المستخدمة	عدد مواقع الانغراس (المتوسط + الخط المعياري)	عدد الأجنة (المتوسط+ الخطأ المعياري)	الامتصاص %	وزن الجنين الحي المتوسط+ الخطأ المعياري)	العيوب المشاهدة

تستخدم التحاليل الإحصائية للتوصل فيما إذا كان هناك تأثير للعقار على الأجنة المتحصل عليها من أمهات عولجت بالعقار ، مقارنة بالمجموعة الضابطة.

تقطع ورقة التقرير العملي وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الحادي عشر

تحديد دورة الشبق بواسطة المسحة المهبلية للفأر

Detection of Estrous Cycle by the Vaginal Smear of Mice[١٨]

مقدمة

تعتبر الفئران المخبرية (Laboratory mice) من أكثر الحيوانات الثديية استخداما في التجارب، وذلك لسهولة الحصول عليها ورخصها وسهولة تربيتها والتعامل معها، بالإضافة إلى توافر سلالات نقية عديدة منها، وقصر فترة الحمل والحصول على أجنة عديدة منها (للمزيد عن استخدام الفئران وأهميتها يمكن الرجوع لصفحة الملحق).

في هذا العملي سوف نقوم بتحديد مراحل دورة الشبق في الفئران من خلال فحص المسحة المهبلية. تتميز إناث الثدييات بالتغيرات النسيجية لبطانة الجهاز التناسلي أثناء مراحل الدورة التناسلية والتي تكون تحت تأثير الهرمونات الجنسية.

تتكون الدورة التناسلية أو الشبق (Estrous cycle) في الفئران من أربع مراحل تستغرق ما بين ٤-٥ أيام.

مراحل الدورة التناسلية في الفأر

١- مرحلة قبل الشبق (Proestrus)

وهي المرحلة التي تسبق فترة قبول الأنثى للذكر وقبيل خروج البويضات من المبيض، وتستغرق حوالي ١٨ ساعة تقريبا. تكون الخلايا الطلائية المهبلية خلال هذه المرحلة

---

(١٨) Rugh (1968).

obeikandi.com

ذات أنوية كبيرة بالنسبة للسيتوبلازم، ويصحبها عدد قليل من كريات الدم البيضاء (متعددة أو مشكلة النواة) (انظر الشكل رقم ١١,١أ).

٢- مرحلة الشبق (Estrus)

وهي المرحلة التي تظهر فيها الأنثى قبولا للذكر، وتستغرق حوالي ٢٥ ساعة، يحصل خلالها التبويض والتلقيح بين الذكر والأنثى، ويلاحظ انتفاخ الجلد حول فتحة المهبل نوعا ما، كما أن بطانة المهبل تكون ذات خلايا قرنية حرشوفية بدأت في فقدان أنويتها (الشكل رقم ١١,١ب).

٣- مرحلة ما بعد الشبق (Metestrus)

وهي المرحلة التي تلي عملية الشبق، وتستغرق حوالي ٨ ساعات فقط، وتتميز هذه المرحلة بالآتي:

- يكون المبيض مليئاً بالأجسام الصفراء (نتيجة لخروج البويضات من الحويصلات المبيضية).
- ظهور كثير من الخلايا الدموية البيضاء في مسحة نسيج المهبل ومعها خلايا طلائية قرنية وعدد قليل من الخلايا الطلائية الحرشفية ذات الأنوية، (الشكل رقم ١١,١جـ).

٤- مرحلة نهاية الشبق أو السكون الجنسي (Diestrus)

يكبر خلال هذه المرحلة حجم الأجسام الصفراء. وتحتوي مسحة المهبل على خلايا طلائية ذات أنوية، كريات دموية بيضاء وكمية قليلة من المخاط. وتستغرق هذه المرحلة حوالي ٥٥ ساعة تقريبا (الشكل رقم ١١,١د).

طريقة عمل مسحة من المهبل لفحص مراحل الدورة التناسلية (دورة الشبق)

الأدوات والمواد المستخدمة Materials:

١- مجموعة إناث من الفئران (إما أن تكون مفصولة لمدة وأما كانت موضوعة حديثا مع الذكور).

٢- ماصة زجاجية (لأخذ مسحة من المهبل).

٣- شرائح زجاجية نظيفة وأغطية لها.

٤- كحول (تراكيز ٧٠٪-٩٠٪)

٥- صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين أو أزرق المثيلين.
٦- زيلين.
٧- أنية لصبغ الشرائح – محلول ملحي.
٨- كندا بلسم أو DPX.

طريقة عمل التجربة Methods

١- حاول أن تختار مجموعة من إناث الفئران المعزولة عن الذكور، ومن صناديق مختلفة لاستعمالها للفحص.
٢- ضع الأنثى على شبك صندوق تربية الفئران، وامسكها من ذيلها.
٣- أدخل طرف ماصة زجاجية أو الإبرة غير الحادة في المهبل وأدرها ثم اسحبها من المهبل.
٤- امسح محتويات الأنبوبة أو الإبرة على شريحة زجاجية نظيفة، ثم اتركها لمدة بسيطة لتجف.
٥- ضع قطرات بسيطة من المثبت (١ إثير: ١ كحول) على الشريحة التي عليها المسحة.
٦- اغمس الشريحة في صبغة الهيما توكسلين (Ehrlich's haematoxlyin).
٧- ثم اغسلها بماء الصنبور (بشكل خفيف).
٨- انقل الشريحة إلى كحول قاعدي لمدة دقيقة.
٩- ثم اغمسها في كحول ٩٠٪.
١٠- اصبغها بصبغة الأيوسين الكحولية (Alcoholic eosin) بغمسها لمدة دقيقة فيه.
١١- تغسل بكحول تركيزه ٩٠٪.
١٢- انقلها إلى كحول ١٠٠٪ مرتين.
١٣- روقها في الزيلين.
١٤- غط الشريحة (بعد وضع الكندا بلسم عليها) بواسطة غطاء الشريحة.

كما يمكن متابعة الدورة التناسلية للأنثى نفسها، وذلك بأخذ عينات على فترات (كل ١٢ ساعة تقريبا) وصبغها بالتلويدين الأزرق بشكل سريع لمعرفة المرحلة وطول الفترة، ثم سجل ملاحظاتك عنها.

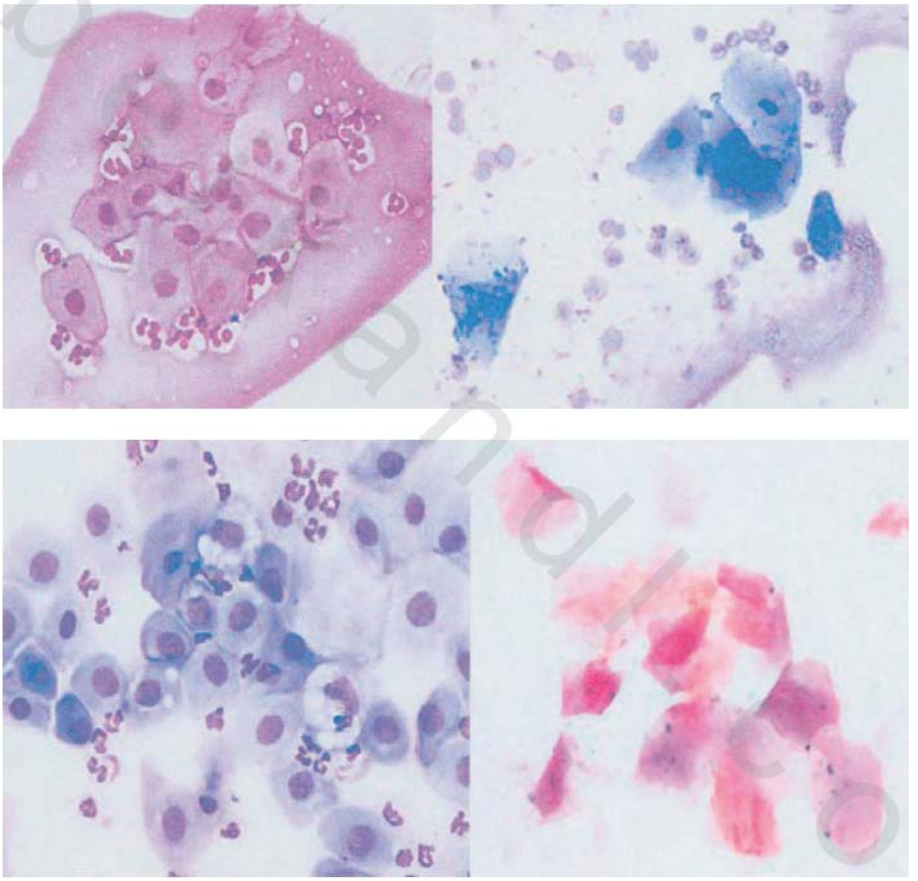
obeikandl.com

أ) ماقبل الشبق Proestrus

تكون الخلايا الطلائية المهبلية حرشوفية خلال هذه المرحلة ذات أنوية كبيرة بالنسبة للسيتوبلازم ويصحبها عدد قليل من كريات الدم البيضاء.

ج) مرحلة مابعد الشبقMeta estrus

ظهور كثير من الخلايا الدموية البيضاء في مسحة نسيج المهبل ومعها خلايا طلائية قرنية وعدد قليل من الخلايا الطلائية الحرشفية ذات الأنوية.



ب) مرحلة الشبق Estrus

بطانة المهبل تكون ذات خلايا حرشوفية بدأت في فقدان أنويتها.

د) مرحلة نهاية الشبق Diestrus

تحتوي مسحة المهبل على خلايا طلائية ذات كريات دموية بيضاء وكمية قليلة من المخاط.

الشكل رقم (١١,١). صور توضح المراحل المختلفة لخلايا بطانة المهبل في أثناء الدورة التناسلية في الفأر (صبغة أزرق التلودين). (300X).

تقرير العملي الحادي عشر:

تحديد مراحل دورة الشبق بواسطة فحص المسحة المهبلية للفأر

الاسم: ..... الرقم: .....

يقدم الطالب الشرائح التي قام بإعدادها مع تعريفها وشرح مبسط لكل واحدة منها بالترتيب الآتي:

الشريحة (أ): .....

الشريحة (ب): .....

الشريحة (جـ): .....

الشريحة (د): .....

كم أنثى تم فحص المسحة المهبلية فيها؟: .....

كيف تعرفت على المسحة للأنثى التي خارج أو نهاية الشبق Diestrous ؟

.....

ما الفروق الرئيسية التي من خلالها تتعرف على شريحة المسحة المهبلية لتحدد مرحلة الشبق للأنثى ؟

.....

.....

.....

كيف تفرق بين شريحة المسحة المهبلية التي قبل الشبق Proestrous والتي بعد الشبق Metaestrous ؟

.....

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandi.com

obeikandl.com

العملي الثاني عشر

الإخصاب الاصطناعي الخارجي وزراعة أجنة الفأر

In vitro Fertilization and Embryo Culture of Mice[١٩]

الهدف

يهدف هذا الدرس إلى تعلم عملية تنشيط المناسل في الإناث بواسطة الحقن بالهرمونات التناسلية، ثم استخراج البويضات وإخصابها خارجيا في الطبق (IVF) (*In virto* fertilization) (وهي تماثل لما يعمل في طفل الأنابيب) لمتابعة تكوين ونمو الأجنة خلال مرحلة التفلج في بيئة زراعة الأجنة خارجيا في الطبق (*In vitro*).

الأدوات والمواد المستخدمة

١- مجهر تشريحي مع أدوات تشريح.
٢- صفيحة لتسخين الشرائح (٣٧,٥مْ).
٣- أنابيب دقيقة.
٤- إبر بأحجام مختلفة.
٥- هرمونات تناسلية: (الهرمون المحفز لنمو الحويصلات FSH، هرمون التبويض أو الهرمون الأصفر LH، أو الهرمون المشمي البشري hCG).
٦- أطباق بتري صغيرة معقمة .

---

(١٩) Alhimaidi (1999).

obeikandl.com

٧- مرشحات (فلاتر) بأحجام مختلفة، ومخبار مدرج سعة ١٠٠سم^{٣}.
٨- حضان مزود بأسطوانة يحتوي على ٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون .
٩- ورق قصدير .
١٠- زيت البرافين.
١١- كحول (لتعقيم المكان).
١٢- ماء مقطر ٣ مرات (في ثلاث حاويات زجاجية للتقطير).
١٣- بيئة للإخصاب ولتنمية الأجنة، وهي إما أن تباع جاهزة مثل بيئة رقم إم ٢، إم ١٦(من شركة سيجما) بيئة البوتاسيوم المتوازنة أو على شكل بودرة مثل بيئة هام ف ١٠ (KSOM) (M2,M16 or potassium simple optimize medium) يضاف إليها مصل دم العجل فيما بعد.

إنتاج الأجنة خارجيا (في الطبق)

طريقة إجراء التجربة

تتكون التجربة من الخطوات التالية:
١- تحفيز المبايض بواسطة الهرمونات التناسلية، لإنتاج أكبر كمية من البويضات.
٢- جمع الحيوانات المنوية.
٣- جمع البويضات، ثم إجراء عملية الإخصاب خارجيا في الطبق ومتابعة نمو الأجنة.

وفيما يلي سنتناول بالشرح في كل خطوة على حدة كما يلي:

أولاً: تحفيز المبايض في الإناث لإنتاج البويضات

أ) تحقن مجموعة من الإناث (ويفضل الصغيرة العمر التي تبلغ من العمر ٦-٨ أسابيع) بالهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSH) وبكمية ١٠ وحدات دولية في التجويف البطني قبل يومين من إجراء التجربة .(حوالي الساعة الرابعة عصرا).

ب) بعد ٤٨ ساعة من الحقن تحقن نفس الإناث بالهرمون المكون للجسم الأصفر في المبايض (الهرمون الأصفر LH) بالكمية نفسها وبالطريقة السابقة نفسها، وذلك لإخراج أكبر كمية من البويضات من المبيض إلى قناة البيض.

في يوم التجربة:

جـ) تحضر البيئة الخاصة بالإخصاب، ثم تحضر البيئة اللازمة لتنمية الأجنة في صباح اليوم التالي وذلك بعد ١٤-١٦ ساعة.

١- يتم تحضير البيئة بإضافة الماء المقطر الخالي من الأيونات والمعقم بواسطة جهاز التعقيم (حسب الكمية المحتاج إليها) إلى مكونات بودرة البيئة الجاهزة (مثل هام ف ١٠ Ham F-10) ماعدا ألبيومين سيرم العجل(Bovine SerumAlbumin BSA) الذي يضاف بعد عملية التهوية. أو أن تستخدم بيئة جاهزة الصنع مثل (M2 &M16 from Sigma,or KSOM).

٢- يتم تهوية البيئة المحضرة بالمعمل وذلك بغمس أنبوبة زجاجية معقمة موصلة إلي أسطوانة تحتوي علي ٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون ٣-٥ دقائق، ثم يضاف إليها سيرم ألبيومين العجل (Bovine SerumAlbumin BSA) .

٣- تعقم البيئة بواسطة مرشح التعقيم ثم يقسم علي مجموعة من الحاويات الزجاجية المعقمة ذات الأغطية المحكمة ويؤخذ منها ماينا سب التجربة (٥٠مل مثلا) وتحفظ البقية في الثلاجة.

ثانياً: جمع الحيوانات المنوية من الذكور Sperm collection

• يتم قتل الذكور بواسطة النخنيع (أي فصل العمود الفقري عند الرقبة Cervical diloction).

• تستخرج الخصي ويجهز البربخ لكي يقطع من طرفيه (الشكل رقم ١٢,١).

• يعصر البربخ بين الإصبعين، وعلى رأس الإبرة يمكن جمع قطرة الحيوانات المنوية الخارجة من البربخ، ثم يوضع ذلك في طبق فيه قطرة دافئة من بيئة الإخصاب (٠,٥ مل) تترك الحيوانات المنوية في الحضان لمدة ١٠-١٥ دقيقة على الأقل.

ثالثاً: جمع البويضات Ova Collection

• يتم جمع البويضات من الإناث بعد ١٦ ساعة على الأقل من وقت الحقن (ومباشرة بعد جمع الحيوانات المنوية).

• يتم استخراج البويضات من الإناث عن طريق قتل الأنثى بالطريقة التي قتلت بها الذكور نفسها (الشكل رقم ١٢,١).

• تستخرج قناة البيض ثم يشق الجزء المتضخم منها (القارورة أو الأمبولا Ampulla) بواسطة إبرة دقيقة (تحت المجهر التشريحي)حيث تكون البويضات على شكل كتلة (الشكل رقم ١٢,٢).

• يتم نقل البويضات وما يحيط بها من الخلايا الحويصلية إلى بيئة أخرى (بواسطة أنبوبة ناقلة) مزودة بإنزيم الهايلورونيديز (Hyaluronidase) لمدة بسيطة (٢-٥دقائق) لتفكيك الخلايا الركامية من حولها.

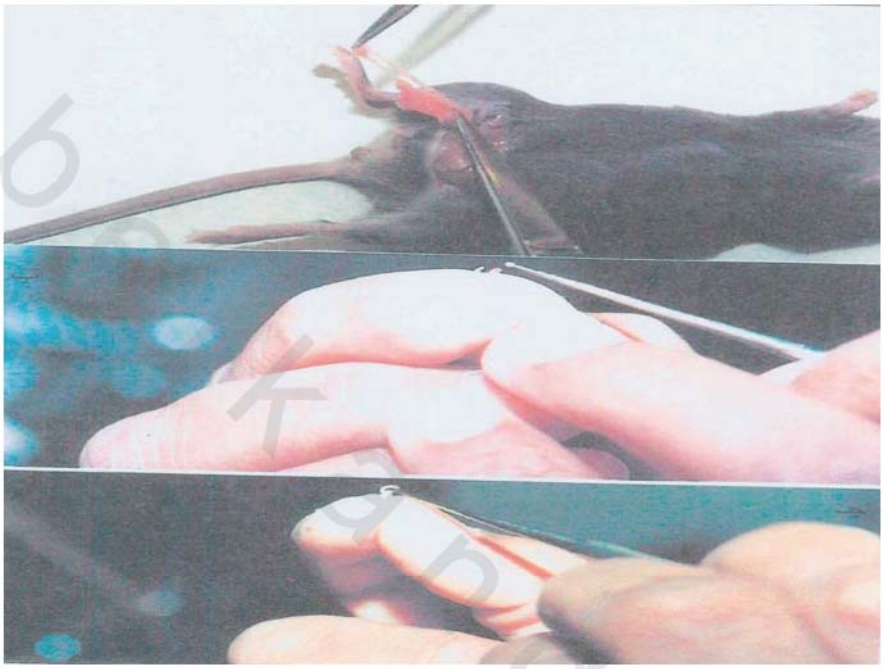
رابعاً: الإخصاب الإصطناعي الخارجي في الطبق *In vitro* fertilization (IVF)

• تنقل البويضات إلى طبق صغير فيه بيئة إخصاب (٠,٥ مل).

• تضاف الحيوانات المنوية بالتركيز المطلوب مثلا (٢×١٠^{٦}) (يتم عد الحيوانات المنوية بالطريقة نفسها التي يتم فيها عد كريات الدم الحمراء أو بواسطة جهاز عد الحيوانات المنوية) إلى طبق البويضات لمدة ١-٢ ساعة وتترك في الحضان لإخصاب البويضات.

• بعد حوالي ٢-٤ ساعات، تنقل البويضات إلى بيئة تنمية الأجنة (M16 or KSOM) ويتم متابعة نموها عن طريق مراقبتها يوميا وتسجيل الملاحظات عن نمو الأجنة وذلك بعد نقلها إلى نقاط من البيئة في طبق آخر، وتتم تغطيتها بزيت البرافين، ثم مقارنة نموها (الشكل رقم١٢,٣) وتحديد أعمارها خلال ٢٤، ٤٨ ساعة .

أ) استخراج الخصية والبربخ (قطع ذيل البربخ وجزء من الوعاء الناقل) عصر البربخ بين إصبعي اليد.



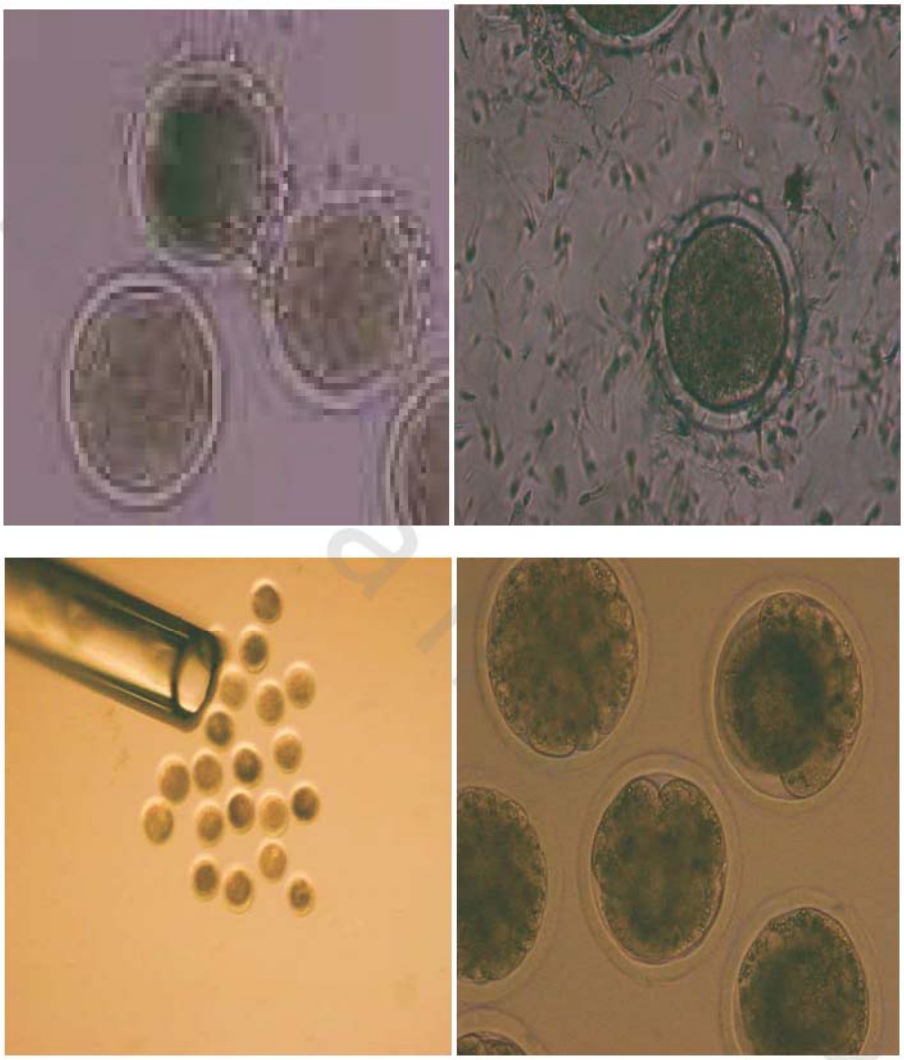
ب) الجهاز التناسلي لأنثى فأر مشرحة (قناة البيض الملتفة قرب الدبوس على اليمين).

الشكل رقم (١٢,١). صور توضح خطوات جمع الحيوانات المنوية بتشريح ذيل البربخ وجزء من الوعاء الناقل للحصول على الحيوانات المنوية (على رأس الإبرة) في ذكر الفأر.[٢٠]

(٢٠) الحميدي وآخرون (١٤١٨هـ).

الشكل رقم (١٢,٢ أ،ب). صورة توضح طريقة استخراج البويضات من قناة البيض للفأر.

حقن سائل داخل تجويف قناة البيض (بمسكها بالملقط)، أو بتنسير منطقة القارورة من قناة البيض تحت المجهر التشريحي (مشار إليه بالسهم (أ)). ثم خروج البويضات وحولها الخلايا الحويصلية في الصورة الأخرى (ب).



الشكل رقم (١٢,٣). صورة للإخصاب الإصطناعي الخارجي (IVF) ونمو الأجنة في الثدييات.

obeikandl.com

تقرير العملي الثاني عشر:
الإخصاب الاصطناعي الخارجي ونمو الأجنة في الثدييات (الفأر)

الاسم : ..... الرقم : .....

١- ما نوع البيئة التي استخدمت في التجربة؟.....

- هل هي محضرة بالمعمل : أم جاهزة التحضير (سائلة أو بودرة)؟

٢- ما الهرمونات التي استخدمت ؟

اسمها : ..... كميتها : .....

وقت الحقن : ..... موقع الحقن : .....

٣- كم كان عدد الإناث التي حقنت؟ ..... وما عدد البويضات المستخرجة؟.....

٤- كم كان عدد البويضات المخصبة؟..... وما عدد الأجنة النامية؟.....

٥- أقصى مرحلة وصلت إليها الأجنة (حدد الأطوار التي وصلت إليها):

عمـــر الجنين	بعد ( ) ساعة	عـــدد الأجنـــة
طور الخليتين	.....	.....
طور الخلايا الأربع	.....	.....
طور الخلايا الثماني	.....	.....
طور الست عشرة خلية	.....	.....
طور التوزتية	.....	.....
طور المفلجة	.....	.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الثالث عشر

جمع الأجنة ونقلها في الفأر
Embryo Collection and Transfer in Mice [٢١]

الهدف

إن الهدف من هذا العملي هو التدرب على كيفية الحصول على الأجنة ومعرفة عمر الأجنة المراد جمعها من الفئران المخبرية ثم نقلها إما بعملية جراحية أو بدون عملية جراحية في الفأر.

الأدوات والمواد المستخدمة

• إناث فئران حوامل/ مجهر تشريحي ومجهر مقلوب العدسة/محلول فسيولوجي مع بيئة تنمية (M2) الأجنة مضاف لها منظم للأس الهيدروجيني.

• **تتلخص عملية جمع الأجنة والحصول عليها من إناث الفئران فيما يلي:**

١- تُجرى عملية التزاوج بين كل من الإناث والذكور قبل بداية التجربة وعلى حسب عمر الأجنة المراد الحصول عليها وجمعها، ثم تعزل الإناث عن الذكور.

يحدث الإخصاب في الفئران في منتصف الليل غالبا (حوالي الساعة الثانية صباحا)، ويحدد برؤية السدادة المهبلية (التي تسد فتحة المهبل) والتي يمكن رؤيتها في الصباح الباكر من اليوم التالي للقاء الذكر بالأنثى (الجماع) (الشكل رقم ١٣,١-١٣,٢) وهذا اليوم يعتبر صفرا بالنسبة لعمر الأجنة (انظر الجدول رقم ١٣,١).

---

(٢١) Daniel (1971).

obeikandl.com

٢- يتم إعداد البيئة الخاصة المراد جمع الأجنة فيها في يوم إجراء التجربة، كما يجهز الحضان والأدوات الخاصة بجمع الأجنة، من إبر للتشريح وأدوات وماصات لنقل الأجنة وأطباق لجمع الأجنة.

٣- بعد تجهيز الأدوات والبيئة الخاصة بجمع الأجنة، تقتل الإناث المراد جمع الأجنة منها بواسطة التخنيع (وذلك بوضع الأنثى على غطاء القفص الخاص بتربية الفئران وبوضع طرف المقص أو الإبهام على مقدمة الرأس من أعلى وسحب الذيل من الخلف باليد الأخرى، لشل حركة الأنثى وفصل العمود الفقاري).

٤- تشرح الإناث بعد ذلك وتفصل قناة البيض، ثم توضع في البيئة الخاصة، ثم باستخدام المجهر التشريحي يتم إما حقن قناة البيض بمحلول فسيولوجي أو بمحلول بيئة أو تنسير وتقطيع القناة بواسطة إبرة التشريح أو الملقط المدبب إلى قطعة صغيرة داخل طبق التشريح المحتوي على البيئة.

٥- تُزال أجزاء قناة البيض ويفحص محتوي الطبق تحت قوة تكبير تسمح برؤية تحت المجهر التشريحي.

٦- نقل الأجنة من الطبق الذي تم فيه تقطيع القناة بواسطة الماصات الصغيرة إلى طبق أصغر يحتوي على بيئة للغسيل.

٧- تجري بعد ذلك التجارب الخاصة والمراد إجراؤها على الأجنة. توضع الأجنة تحت نقاط صغيرة من البيئة في طبق تنمية الأجنة، ثم تغطى هذه النقاط بزيت البرافين لمنع تغير البيئة وتبخرها ولسهولة متابعة الأجنة ودراستها تحت هذه النقاط (الشكل رقم ١٣,٣). ثم توضع في الحضان درجة حرارتة ٣٧ مْ والمزود بالهواء وثاني أكسيد الكربون ٥٪ (CO2 5%).

نقل الأجنة Embryos Transfer

يمكن نقل الأجنة إلى أنثى أخرى مستقبلة إما أن تكون من سلالة أخرى تختلف عن سلالة الإناث التي جمعت منها الأجنة وعمر الأجنة فيها أقل بيوم عن عمر الأجنة المنقولة، إما أن تكون ذات حمل كاذب وذلك بوضع الإناث المستقبلة قبل (٣-٤) أيام من وقت النقل مع ذكر مخصي (Vasectemized male). يتم تسجيل وقت التلقيح ورؤية السدادة المهبلية فيها، لكي تنقل إليها الأجنة.

طرق نقل الأجنة في الفأر

هناك طريقتان لنقل الأجنة في الفئران:

أ) بدون عملية جراحية (أو النقل غير الجراحي): ونسبة نجاحها ٨-١٠ ٪ تقريبا.

ب) بالعملية الجراحية (النقل الجراحي): ونسبة نجاحها ٣٠-٤٠٪ تقريبا.

أ) نقل الأجنة بدون عملية جراحية: Nonsurgical Embryo Transfer

• تستخدم الأناث (الحاضنة) التي تم عمل تلقيح كاذب لها بوضعها مع ذكر مخصي قبل عملية النقل أو (أنثى ملقحة طبيعيا لكن لابد أن تختلف من حيث السلالة عن الأنثى التي سوف تؤخذ منها الأجنة (المانحة)) بحيث يكون عمر الأجنة المراد نقلها اكبر بيوم من يوم رؤية السدادة المهبلية للأنثى المستقبلة المراد نقل الأجنة إليها (الحاضنة).

• يتم الحصول على الأجنة من الإناث الملقحة (المانحة) بعد يوم أو يومين من رؤية السدادة المهبلية بتشريح الإناث واستخراج قناة البيض ثم عمل غسيل لتجويف قناة البيض أو بتنسيرها لاستخراج الأجنة منها. كما يمكن نقل الأجنة الناتجة من تجربة التلقيح الاصطناعي الخارجي (IVF) حسب الطريقة المذكورة سابقا ثم يتم تحديد الأجنة وأعمارها واختيار الأجنة المرغوب في نقلها.

• يتم نقل الأجنة بواسطة أنبوبة ماصة زجاجية دقيقة غير حادة الطرف الأمامي متصلة بحقنة (١مل) تشفط فيها الأجنة المرغوب نقلها في كمية من البيئة المحتوية على الأجنة (٥٠ ميكرون تقريبا) بين فقاعتين من الهواء بداخل تجويف الأنبوبة الدقيقة.

• تمسك الأنثى الحاضنة (ذات الحمل الكاذب) من ذيلها وهي فوق شبك صندوق الفئران وترفع للأعلى قليلا، ثم تتم محاولة إدخال طرف الأنبوبة أو الماصة الدقيقة والتي فيها الأجنة عن طريق إدخالها عبر فتحة المهبل، ثم عبر منطقة عنق الرحم (الشكل رقم ١٣,٢)، بعد تجاوز طرف الماصة منطق عنق الرحم يتم حقن أو تفريغ الأجنة داخل تجويف الرحم.

بعدها يتم متابعة الإناث التي تم نقل الأجنة إليها وتسجيل النتائج بعد الولادة بـ١٥-١٧ يوما من بداية يوم نقل الأجنة.

ب) نقل الأجنة جراحيا Surgical embryo transfer

تتم عملية الحصول على الأجنة من الإناث المانحه حسب الطرق المذكورة سابقا ثم يتم تجهيز الأجنة في قطرة من البيئة وتتم تغطية القطرة بالزيت المعدني (Mineral oil) ثم توضع في الحضان لحين مرحلة نقلها.

تتم عملية نقل الأجنة بالعملية الجراحية بتخدير إحدى الإناث ذات الحمل الكاذب بواسطة حقنها بمادة مخدرة من مادة الكيتامدور (كيتامدور ١٠٪ Ketamador) بتركيز ١٪ وبكمية ٠,٠٥ مل في عضلة الفخذ.

يتم إزالة الشعر من أحد جانبي الظهر حول منطقة تواجد قناة البيض ويتم مسح الجلد بمسحة كحول.

يتم عمل قطع صغير في الجلد لكي يتم استخراج قناة البيض وتثبيتها على ورقة ترشيح معقمة صغيرة (الشكل رقم ١٣,٤) ثم توضع الأنثى تحت المجهر التشريحي.

يتم سحب الأجنة المراد نقلها مع كمية بسطية من البيئة (١٠ ميكرولتر) بواسطة أنبوبة زجاجية دقيقة (أو إبره نقل الأجنة غير مدببة الطرف) ثم يدخل طرف الأنبوبة من خلال فتحة قناة البيض ثم تحقن الأجنة داخل تجويف قناة البيض.

يتم عمل خياطة الجرح بواسطة خيوط الجراحة ويغلق الجلد خارجيا بواسطة تدبيس الجلد بالدبابيس الجراحية ثم يعقم الجرح بالكحول وتترك الأنثى في مكان دافئ (تحت مصباح ضوئي في الصندوق) حتى تفوق من المخدر.

بعد يومين يمكن إزالة الدبابيس من الجلد ثم تتابع الإناث المنقول إليها الأجنة لحين الولادة بعد ١٧- ١٩ يوم تقريبا.

obeikandl.com

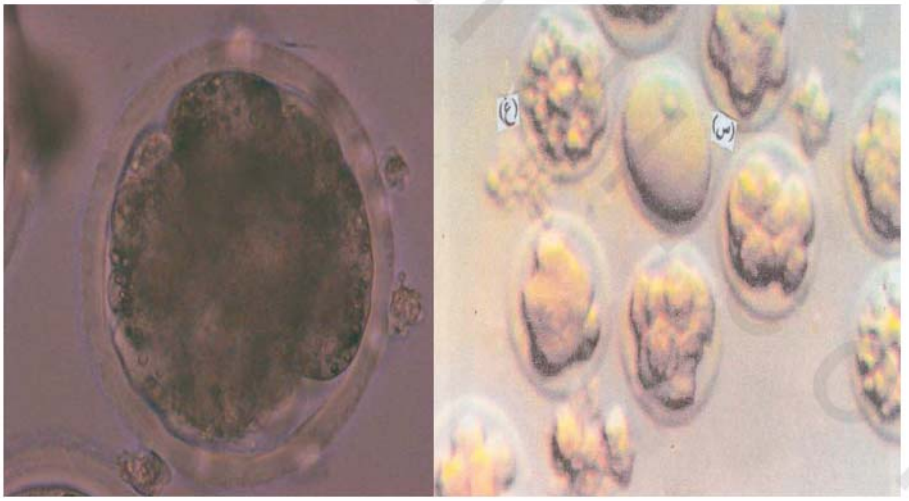
الجدول رقم (١٣,١). يوضح مراحل أعمار الأجنة المبكرة وأماكن تواجدها في الفأر والأطوار التي تمر بها منذ إخصاب البويضات داخليا إلى طور المفلجة.[٢٢]

المرحلة وأطوارها	العمر بالساعات	مكان وجود الأطوار
عملية الإخصاب وتكوين طور الخليتين	صفر-١٦ (يوم الإخصاب)	الجزء العلوي من قناة المبيض
(انقسام التفلج الأول)	٢٦-٢٤	الامبولا Ampulla
طور الخلايا الأربع	(اليوم التالي للإخصاب)	الثلث الأول من قناة البيض
(انقسام التفلج الثاني)	٣٦-٢٤	الجزء المتوسط من قناة البيض
طور الخلايا الثماني		الجزء المتوسط من قناة البيض
(انقسام التفلج الثالث)	٤٨-٢٦	الجزء الأخير من قناة البيض
طور الـ١٦خلية		الجزء الأخير من قناة البيض
(انقسام التفلج الرابع)	٦٠-٤٨	وقد يكون في بداية قرن الرحم
طور الـ٣٢خلية		
(طور التوتية المبكرة)	٧٢-٤٨ (٣أيام)	في قرن الرحم للأنثى
طور البلاستيولا	٨٦-٧٢ (٣,٥ يوما)	

الشكل رقم (١٣,١). صورة توضح طريقة الإمساك بالفأرة وفحص السدادة المهبلية.

(٢٢) الحميدي وآخرون (١٤١٨هـ).

الشكل رقم (١٣,٢). صورة توضح طريقة الإخصاب الاصطناعي الداخلي أو نقل الأجنة بدون عملية جراحية.



الشكل رقم (١٣,٣). صورة توضح الاختلافات بين الأجنة ذات النمو السليم (س) (طور التوتية)، والأجنة غير السليمة (غ) (×١٢٠). جنين في طور التوتية.

عن طريق عمل قطع صغير في الجلد حول منطقة قناة البيض ثم تستخرج قناة البيض وتثبت على ورقة ترشيح لنقل الأجنة إليها تحت المجهر التشريحي.

الشكل رقم (١٣,٤). صورة توضح طريقة نقل الأجنة بالعملية الجراحية أو جراحيا.

obeikandl.com

تقرير العملي الثالث عشر:
جمع الأجنة من الفئران المخبرية ونقلها.

الاسم : .... الرقم : ....

سجل نتائج التجربة التي قمت بإجرائها ثم قدم تقريراً مرفقاً بحيث يحتوي على :

عدد الأجنة المتحصل عليها من الإناث المانحة...

وعمرها أو مرحلة طور..

حدد نوع عملية نقل الأجنة :

بعملية جراحية.. أو بدون عملية جراحية.....................................

- عمر الأجنة المنقولة : .... عددها : ....

الأم المستقبلة متى تم رؤية السداد المهبلية فيها ؟...

- هل تم إجراء تجربة على الأجنة قبل نقلها ؟..

- ما نوع التجربة؟..

- ما النتائج التي تم الحصول عليها بعد إجراء التجربة ؟...

- وما عدد الأجنة التي تمت ولادتها؟...

- اذكر خطوات جمع ونقل الأجنة موضحا شروط نقل الأجنة ؟

....

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الرابع عشر

تحضير الشرائح لجنين الثدييات في المراحل المبكرة
Slides Prepration of Mammalian Early Embryo [٢٣]

الهدف

يهدف هذا العملي إلى تعلم طريقة تحضير الشرائح وصبغ الأجنة في الثدييات في المراحل المبكرة من النمو، مرحلة التفلج، بغرض دراسة الشكل الخارجي والتركيب الداخلي للأجنة المبكرة في الثدييات (الفأر).

طرق دراسة الشكل الخارجي لفلجات الأجنة المبكرة في الفأر (معدلة عن Daniel 1971)

جهز الأجنة المراد عمل شرائح منها، كما تم وصفه في الدرس العملي السابق من إناث تم مراقبة عملية التلقيح ورؤية السدادة المهبيلة ثم تشريح الإناث بعدها بيوم أو يومين لاستخراج الأجنة من قناة البيض، ثم بعد الحصول على الأجنة اتبع الآتي:

١- ضع الأجنة في زجاجة ساعة أو على شريحة مقعرة أو على شريحة زجاجية مثبت عليها حلقة صغيرة لتحصر قطرة الأجنة في مثبت هيدنهن سوسا (Heidenhein susa fixatine) لمدة ٥ دقائق.

٢- انقل الأجنة إلى محلول لوجول (Lugol solution) لمدة ٥ دقائق، للتخلص من كلوريد الزئبق حتى لا يتدخل مع الصبغة.

---

(٢٣) Daniel (1971).

obeikandl.com

٣- اغسل الأجنة بالماء المقطر لمدة دقيقة أو دقيقتين (بالتقطير عليها) ثم يتم سحب الماء بطرف ورقة ترشيح.

٤- ضع قطرة من زلال البيض يبلغ حجمها حوالي ٢-٣ ملم على شريحة زجاجية نظيفة وجافة، ثم احقن الأجنة داخل القطرة بقليل من الماء ثم تخلص من الألبيومين الزائد نتيجة لذلك.

ملحوظة: يجب إجراء الخطوات المرقمة من ١-٤ تحت مجهر تشريحي، كما يجب وضع المحاليل في زجاجات ساعة خاصة بالأجنة أو وضع قطرات المحاليل على لوح زجاجي، ثم نقل الأجنة من قطرة إلى أخرى بالاستعانة بماصة لها فتحة يمكن التحكم فيها ومتصلة بحقنة صغيرة.

٥- انقل الشريحة المحملة بالأجنة وسط الألبيومين إلى زجاجة خاصة بالأجنة تحتوي على كحول إثيلي ٩٦٪، لتثبيت الألبيومين بأبخرة الكحول، بعد هذه الخطوة يمكن معالجة الشريحة كما في شرائح التحضيرات النسيجية الأولية.

٦- اغمس الشريحة أولا في كحول تركيزه ٥٠٪ (يمكن حفظها ليلة كاملة).

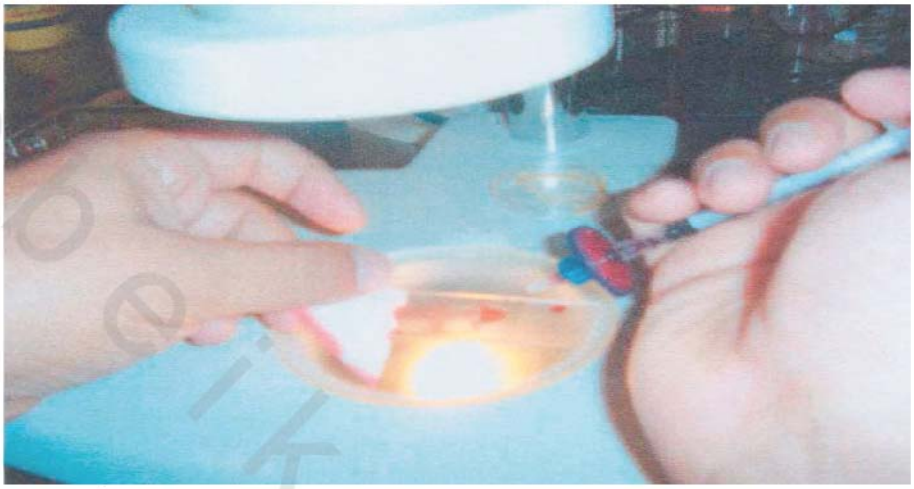
٧- اغمس الشريحة بالتتابع في الهيماتوكسلين، ثم في كحول تركيزه ٥٠٪ مضافا إليه بضع قطرات من حامض الهيدروكلوريك العياري، حتى يتحول الألبيومين إلى اللون الأبيض.

٨- اغمس الشريحة في الماء الجاري لمدة ٥ دقائق.

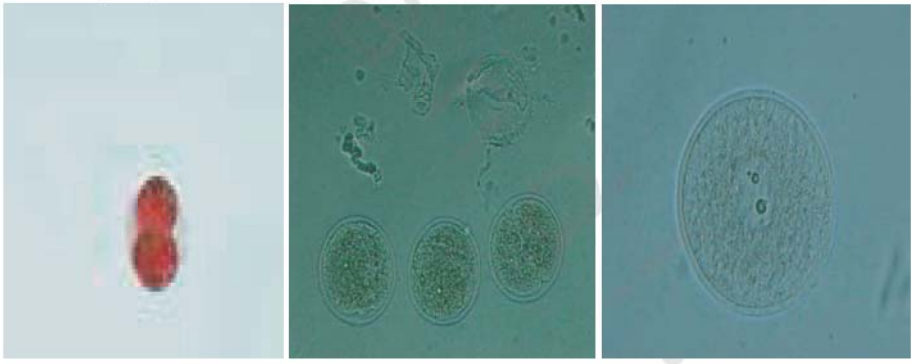
٩- انزع ماء الصبغة بتمريرها على سلسة تصاعدية من الكحولات ٥٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪ ٩٠٪، ٩٦٪، ١٠٠٪ مرتين لمدة ٥ دقائق.

١٠- روق العينة بوضعها في الزيلين مرتين لمدة ٥ دقائق.

١١- غط العينة بغطاء الشريحة بعد أن تضع عليها قطرة أو قطرتين من كندا بلسم ثم صور عينات الأجنة (الشكل رقم ١,١٤).



طور الخلية أو الزيجوت (200X)



طور الخليتين (100X)

طور الأربع خلايا (100X)

طور ٨–١٦ خلية (100X)

الشكل رقم (١٤,١). صور طريقة صبغ لشرائح الأجنة في مراحل نمو مختلفة تحت المجهر التشريحي.

obeikandl.com

تقرير العملي الرابع عشر:
تحضير الشرائح لجنين الثدييات في المراحل المبكرة

الاسم : ..... الرقم : .....

١- عدد الأجنة التي حصلت عليها : .....

أعمارها أو أطوارها : .....

٢- نوع المثبت المستخدم : .....

نوع الصبغة : .....

٣- عدد الشرائح التي تم عملها بواسطة المجموعة : .....

٤- اذكر باختصار خطوات دراسة الشكل الخارجي المبكرة في الفئران

.....

.....

.....

٥- يقدم الطالب الشرائح التي تم عملها خلال هذا العملي كجزء من تقرير العملي.

٦- أرفق صور للأجنة التي تم صبغها.

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الخامس عشر

عمل الخصي لذكور الفئران
Vasectomy of Mice Male

الهدف

يتم عمل الخصي للذكور بعدة طرق، منها تدمير الخصية للذكور الصغيرة بوخزها بالأبرة أو الكماشة المسننة أو بقطع الوعاء الناقل لكل خصية في الذكر بعملية جراحية.

والهدف من عمل الخصي للذكور هوعمل التلقيح الكاذب للإناث ومعرفة الأنثى التي في دورة الشبق وتحفيز التبويض لديها وتهيئتها فسيولوجيا بشكل طبيعي لنقل الأجنة إليها.

وفي هذا العملي سوف يتم عمل الخصي لذكور الفئران بواسطة قطع الوعاء الناقل بالعملية الجراحية.

الأدوات والمواد (الشكل رقم ١٥,١)

- مادة مخدرة (كيتامدور ١٠٪ Ketamador).
- أدوات وطبق تشريح معقمة.
- خيوط جراحية معقمة.
- إيثر للتخدير. وكحول ٧٠٪ للتعقيم.
- آلة حلاقة أو موس لحلاقة الشعر.

طريقة العمل

١- يتم تخدير الذكر بحقنة بالمادة المخدرة (٠,٢ مل) بالحقن في عضل الرجل الخلفية.

٢- بعد أن يُخَدَّر الذكر يتم تنظيف الجهة البطنية بين الرجلين الخلفيتين.

٣- ثم يتم حلاقة الشعر بين الرجلين (الشكل رقم ١٥,١).

٤- بعدها يتم عمل قطع صغير (٠,٢ سم) بالمشرط بالجلد فوق منطقة الجهاز التناسلي بعرض البطن ثم يتم بالملقط سحب إحدى الخصيتين من كيس الصفن ويتم التعرف على الوعاء الناقل بالقرب من الخصية.

٥- ثم يتم عمل عقدة حول الوعاء الناقل بخيط الخياطة الداخلية ثم تعمل عقدة أخرى بالقرب من العقدة الأولى بحيث يتم تخليص المساريقا بين الوعاء الدموي عن الوعاء الناقل.

٦- ثم يقطع الوعاء الناقل بين العقدتين بحيث يتم التأكد بعدم قطع الوعاء الدموي الملاصق للوعاء الناقل (الشكل رقم ١٥,١).

٧- يتم إعادة أو ترجع الخصية إلى داخل كيس الصفن بالملقط بشكل دقيق.

٨- ثم يتم عمل نفس الطريقة مع الخصية الأخرى.

٩- بعدها يتم خياطة الغشاء الداخلي المغطي للأحشاء بخيط الخياطة الداخلي (Catgut).

١٠- ثم يتم بعدها خياطة الجلد مكان الجرح أو يمكن استخدام دباسة الخياطة (الشكل رقم ١٥,٢).

١١- يترك الذكر لمدة أسبوع ثم يزال الخيط الخارجي أو دبابيس الخياطة.

١٢- بعدها يمكن استعمال الذكر لعمل التلقيح الكاذب في الإناث المراد نقل الأجنة إليها بحيث تكون قد تهيأت فسيولوجيا بشكل طبيعي للحمل ونقل الأجنة إليها إما بعملية جراحية وإما بدون عن طريق القسطرة.

أ – ب – ج –

الشكل رقم (١٥,١). يوضح مراحل عملية الخصي لذكر الفأر بقطع الوعاء الناقل.

أ) الأدوات المستخدمة للعملية. ب) يخدر الذكر ثم يحلق الشعر. ج) قطع الجلد فوق منطقة الجهاز التناسلي يقطع الوعاء الناقل بين العقدتين.

الشكل رقم (١٥,٢). يوضح طرق الخياطة بعد العملية الجراحية للخصي إما بالخيط وإما بالتدبيس للجرح خارجيا.

obeikandl.com

تقرير العملي الخامس عشر:
عملية الخصي لذكور الفئران

الاسم : ..... الرقم : .....

لماذا يتم عمل الخصي للذكور ؟.....

ما المادة المستخدمة لتخدير الذكر وكم كميتها التي استخدمت؟.....

ماحجم إبرة الخياطة التي استخدمت للخياطة الداخلية ؟.....

وما سمك أو مقاس خيط الخياطة الداخلية ؟..... والخارجية ؟.....

كم ذكراً تم عمل الخصي له خلال التجربة ؟.....

هل كلها فاقت بعد العملية ؟.....

متى وكيف تم فك الخيوط؟.....

هل تم استخدام الذكور والتأكد من عدم خصوبتها؟.....

ما تقييمك لهذه التجربة من حيث الأداء والدقة وأهميتها ؟

.....

.....

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandi.com

obeikandl.com

العملي السادس عشر

تجميد الحيوانات المنوية للفئران
Cryopreservation of Mice Sperm

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى تعلم كيفية حفظ الأمشاج المذكرة والأجنة بطريقة التجميد والحفظ بسائل النيتروجين.

الأدوات والأجهزة والمواد المستخدمة وطريقة العمل

أولاً: الأدوات المستخدمة

١- أدوات تشريح (ملقط، مقص، إبر تشريح).
٢- أطباق بتري بأحجام مختلفة وأنابيب دقيقة بغطاء.
٣- مرشحات (فلاتر) بأحجام مختلفة.
٤- مخبار مدرج ودوارق مختلفة الأحجام.
٥- قشات بلاستيكية حجمها ٠,٢٥مل (الشكل رقم ٢٠,١).
٦- ماصة أوتوماتيكية وإبر تشريح وصفيحة للتسخين.
٧- أوراق ترشيح أو مناديل ورقية مقواة.

ثانياً: الأجهزة المستخدمة

١- مجهر ضوئي مقلوب مزود بكاميرا وشريحة الهيموسيتوميتر.

obeikandl.com

٢- جهاز طرد مركزي بسرعة ١٠٠٠٠ لفة/ دقيقة.
٣- حضان درجة حرارته ٣٧° م مزود بهواء ٥٪ ثاني أكسيد الكربون.
٤- جهاز تبريد وتجميد السائل المنوي (الشكل رقم ١٦,١).
٥- حاوية غاز سائل النيتروجين (الشكل رقم ١٦,١).

ثالثاً: المواد المستخدمة

١- ماء مقطر.
٢- محلول الرفينوس من شركة سيجما. Rafinos from Sigma Comp.
٣- حليب منزوع الدسم.
٤- كحول لتعقيم مكان العمل.

رابعاً: خطوات العمل

١-تحضير البيئة

يذاب ١٨٪ من الرفينوس (Raffinose) و٣٪ من حليب منزوع الدسم في ١٠٠ مل من الماء المقطر عند درجة حرارة ٦٠°م.

ثم يتم عمل طرد مركزي للمحلول عند (٤٥٠٠ دورة في الدقيقة 4500 rpm in Beckman S W 28 rotor) لمدة عشرين دقيقة عند درجة ٢٢°م.

نفلتر المحلول ثم نضع منه ١٠٠ ميكرو لتر في طبق بتري صغير ونضيف عليه ١٥٠ ميكرو لتر من سكر الجلوكوز و ١٠٠ ميكرو ليتر من بيئة M2 وذلك لجمع الحيوانات المنوية فيه بواسطة أنبوبة سحب دقيقة، وفي أنابيب ذات غطاء كل واحدة تحتوي على ١٠٠-٢٠٠ ميكرو ليتر ثم نحفظها في الثلاجة عند درجة -٢٠° م تحت الصفر لحين استخدامه.

٢- طريقة جمع الحيوانات المنوية من الذكور Sperm collection

نقوم بقتل الذكور بواسطة التنخيغ (فصل العمود الفقري عن الجمجمة ثم إزالة الجلد من حول منطقة الخصيتين (الشكل رقم ١٥,١)).

استخراج الخصية وإزالة الدهون والأغشية من حولها ثم قطع البربخ من طرفيه.

obeikandl.com

تستخرج الحيوانات المنوية من البربخ إما بوضع الوعاء الناقل في قطرة من البيئة (٢٠٠- ميكروليتر) ثم تنسيرة بالمقص أو الأبرة . أو بواسطة القيام بعصر البربخ بين الإصبعين (السبابة والإبهام)، ثم على رأس إبرة التشريح الدافئة يجمع المني الخارج من البربخ. ثم يوضع المني في طبق محلول التجميد ويترك المحلول لمدة ٥-١٠ دقائق في حضان درجة حرارته ٣٧ °م مزود بهواء و٥٪ ثاني أكسيد الكربون (لكي تنتشر الحيوانات المنوية).

٣- فحص وعد الحيوانات المنوية

يتم فحص وعد الحيوانات المنوية بواسطة شريحة العد Hemocytometer بنفس طريقة عد كريات الدم، أو جهاز تحليل السائل المنوي لعد الحيوانات المنوية (Semen Analyzer) كما في الشكل رقم (١٦,١) .

بعد أن نترك محلول الحيوانات المنوية في مكان دافئ لمدة ١٠ دقائق تقريبا .

نأخذ مقدار ٥٠ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية بواسطة ماصة دقيقة Micropipette ثم نضيف هذا المحلول المحمل بالحيوانات المنوية إلى ٢٠٠ ميكرولتر من محلول الفورمالدهيد المنظم الحامضي ثم يقسم إلى أنبوبتين كل واحدة تحتوي على ٢٠٠ ميكرو ليتر .

طريقة عد الحيوانات المنوية اليدوي يكون كالتالي:

أ) وضع كمية من أحد الأنابيب (٢٥٠ ميكرون فورمالدهيد + ٥٠ ميكرولتر من محلول حيوانات منوية) على شريحة عد، ثم اختيار خمس مربعات لعد الحيوانات المنوية بواسطة جهاز العد.

ب) على الشريحة الأخرى نعمل نفس الشيء.

ج) نقسم على ٢ (تركيز المحلول) حمض الخليك الفورمالدهيد المنظم ٢٠٠ ميكرون.

د) نضرب بمعامل الضرب ١٠ × عدد المربعات (٥ مربعات).

أو يمكن استخدام جهاز تحليل السائل المنوي وذلك كالتالي :

توضع قطرة (٢٠,١٠ ميكرون) من محلول الحيوانات المنوية على الشريحة الخاصة لعد الحيوانات المنوية للفأر. ثم تحمل الشريحة على الجهاز لتفحص تحت المجهر. ثم يتم تشغيل البرنامج (انظر التعليمات مع كتيب الجهاز). سوف يعد الجهاز أربع مناطق ثم يحسب الكمية ونسبة الحركية وحتى قياس الحركية الفردية للحيوانات المنوية. كما يمكن استخدام الصبغة الخاصة لمعرفة نسبة الحي من الميت للعينة بواسطة جهاز تحليل السائل المنوي (الشكل رقم ١٦,١). منها يمكن تقدير كمية الحيوانات المنوية في المحلول، ثم يخفف محلول السائل المنوي حسب الحاجة.

٤- تعبئة المحلول في قشات بلاستيكية [٢٤]

تعبأ بواسطة أنبوبة السحب الدقيقة (الماصة الأوتوماتيكية) وتكون موصلة بالقشات وذلك لسحب ٥٠ ميكرو ليتر هواء أو فراغ ثم ٥٠ ميكروليتر سائل محلول الحيوانات المنوية ثم فراغ ٥٠ ميكروليتر مرة أخرى.

٥- إغلاق القشات البلاستيكية

يتم إغلاق طرفي القشات بواسطة الحرارة أو البودرة الخاصة بإغلاق القشات.

٦- طريقة التجميد

يعني بالتجميد خفض درجة حرارة محلول الحيوانات المنوية إلى اقل من درجة المني نفسه وذلك لحفظه لفترة طويلة . تركب القشات في حاوية جهاز التبريد والتجميد الالكتروني ثم يتم تشغيل البرنامج المناسب لتجميد الحيوانات المنوية الخاص بالجهاز ثم تترك العينة إلى نهاية البرنامج حتى تتجمد القشات تماما وفي حالة عدم توفر الجهاز الالكتروني الخاص بالتجميد يمكن عمل ذلك بترك محلول الحيوانات المنوية في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة تقريبا، ثم توضع بالثلاجة لمدة ٣٠ دقيقة ثم يتم تعريض القشات لبخار سائل النيتروجين بوضعها عند فوهة حاوية سائل النيتروجين

---

(٢٤) العيسى وآخرون (٢٠٠٩م).

لمدة ٥-١٠ دقائق حتى تكسيها البرودة تماما وحتى لا يتعرض إلى صدمة البرودة التي تؤدي إلى موت الحيوانات المنوية ثم تنزل تدريجيا في حاوية سائل النيتروجين.

٧- حفظ العينات Sample preservation

تحفظ العينات في حاوية سائل النيتروجين بعد وضع العلامات المناسبة وتاريخ الجمع بالنسبة لها على القشات.

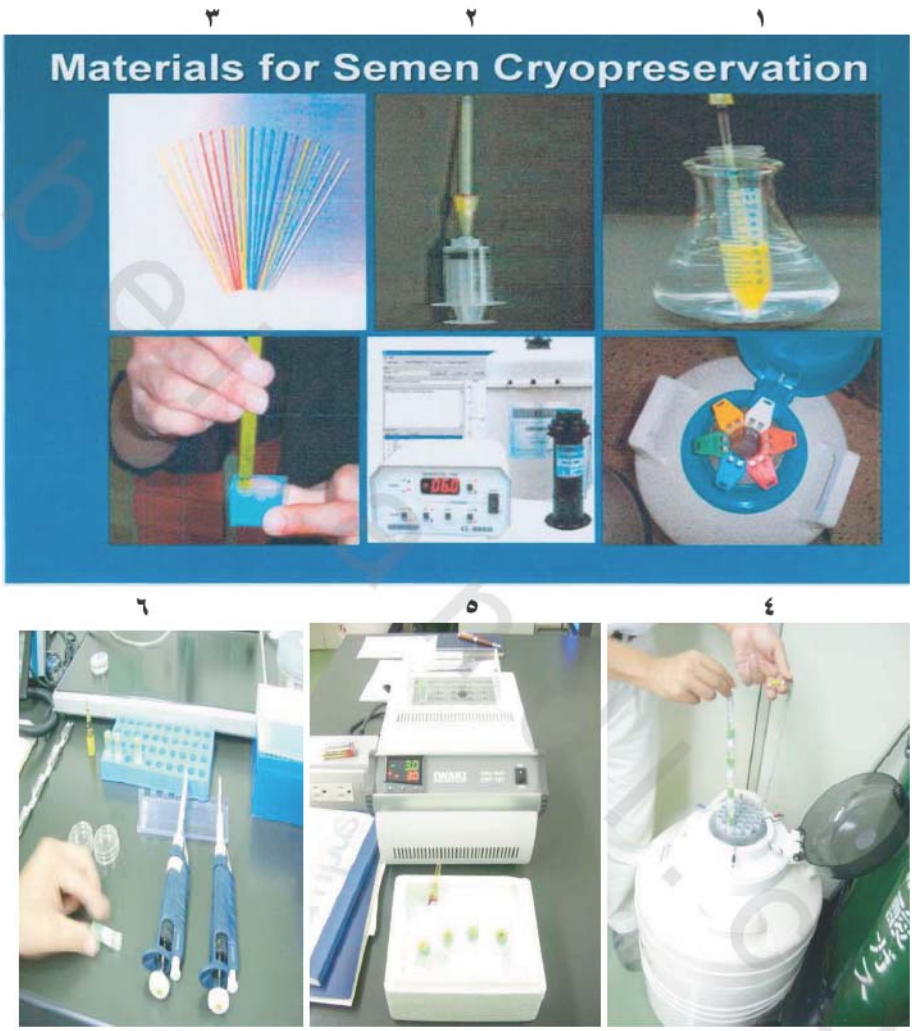
٨- طريقة التسييح أو الإسالة (التدفئة) Thowing

الإسالة أو التسييح تعني إرجاع المني المجمد من سائل النيتروجين إلى درجة حرارة ٣٧°م لاستخدامه، فطريقة التسييح تعتمد اعتمادا كبيرا على طريقة التجميد فإذا كان التجميد سريعا، وجب أن يكون التسييح سريعا أيضا والعكس صحيح.

القشات التي تحتوي على ٥٠ ميكرو ليتر من محلول المني يتم تسييح المني فيها عن طريق وضعها في حمام مائي بحرارة ٣٧ درجة مئوية مدة ٧ ثواني ف، ومن ثم تنقل إلى حمام مائي آخر بدرجة حرارة ٣٧° م لمدة لاتقل عن ٥ ثواني.

٩- طريقة إخراج السائل من القشات

تقطع القشات من أسفل (مكان الإغلاق) ويوضع طرفها المقطوع في طبق بتري دافئ (٣٧°م) ثم تقطع القشة من أعلى (جهة القطنة) حتى ينزل السائل الذي فيها أو يمكن إضافة كمية من البيئة (٠,٢ مل) لسائل القشات، كما يمكن استخدام الماصة الأوتوماتيكية في إنزال السائل من القشات ثم يفحص السائل لمعرفة حركية الحيوانات المنوية وتقديرها.



الشكل رقم (١٦,١). المواد والأجهزة المستخدمة في حفظ وتجميد الأمشاج والأجنة بسائل النيتروجين (-١٩٦°م تحت الصفر).

١- يوضع السائل المنوي في حمام مائي. ٢- ثم يعبأ بالقشات باستخدام إبرة الحقن.

٣- ألوان مختلفة للقشات. ٤- حاوية سائل النيتروجي. ٥- جهاز التجميد الآلي.

٦- طريقة إغلاق القشات بالبودرة أو وضعها بأنبوبة ابندورف قبل وضعها بجهاز التجميد.

تقرير العملي السادس عشر:
تجميد الحيوانات المنوية للفئران

الاسم : ..... الرقم : .....

١- كم عدد الذكور التي تم جمع الحيوانات المنوية منها؟.....

٢- ما مكونات وكمية المحلول الذي جمعت فيه الحيوانات المنوية ؟

.....

مكونات المحلول : .....

كمية المحلول : .....

٣- ما تركيز المحلول الذي جمعت فيه الحيوانات المنوية؟

.....

٤- ما تركيز أو عدد الحيوانات المنوية؟ ..... نسبة الحركية : .....٪.

.....

٥- كم عدد القشات التي عملت لكل ذكر؟ : ..... ومجموعها .....

٦- ما معدل التبريد المستخدم لتجميد الحيوانات المنوية؟.....

٧- كم أخذ من الوقت حتى تم تجميد الحيوانات المنوية ووضعها في سائل النيتروجين؟ .....

٨- ماهو معدل التدفئة الذي تم استخراج الحيوانات المنوية من سائل النيتروجين؟ : .....

ما نسبة الحركية للحيوانات المنوية بعد التدفئة ؟.....

١٠- ما هو تقييمك أو مدى استفادتك من التجربة؟ : منخفض ..... متوسط ..... عالي.

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

openkandil.com

obeikandl.com

العملي السابع عشر

استنساخ أجنة الأغنام
Sheep Embryo Cloning [٢٥]

الهدف

يهدف هذا العملي إلى التدرب على تقنية الاستنساخ بواسطة النقل النووي لأنوية خلايا جسدية ونقلها للبويضات لإنتاج أجنة مستنسخة في الحيوان (الأغنام).

مقدمة

تعتبر تقنية الاستنساخ من التقنيات الحديثة التي تساعد في إنتاج النباتات والحيوانات المعدلة وراثيا. كما تفيد تقنية النقل النووي والاستنساخ في تكاثر الحيوانات المرغوب بها بأعداد كبيرة وكذلك إعادة تكاثر الحيوانات المهددة بالانقراض أو المنقرضة وحماية الحياة القطرية، أو إنتاج حيوانات مقاومة للأمراض، كما تساهم التقنية حاليا بما يعرف بالاستنساخ العلاجي حيث يتم حقن خلايا جسدية في بويضات ثم تكوين أجنة في مرحلة التفلج حيث يمكن عمل خلايا جذعية من هذه الخلايا الجنينية ثم تحويل هذه الخلايا إلى خلايا عضلية أو عصبية أو بنكرياسية أو كبدية وغيرها لمعالجة الأمراض المختلفة.

---

(٢٥) Hosseini, *et.al* (2008).

obeikandl.com

الطريقة

أولاً: تجهيز الخلايا الجسدية Somatic cell preparation

يتم استخلاص خلايـا من منطقة جلد أذن أحـد الأغنام الصغيرة في السن عمـره ٣-٥ أشهر تقريبا بجلبها من الحيوانات التي تذبح بالمسلخ لتحويلها إلى خلايا جسدية حيث يتم تفكيك الخلايا بواسطة إنزيم التربسين ثم عمل الطرد المركزي وتكرير ذلك عدة مرات لتفكيك الخلايا ثم يتم غسل الخلايا وتنميتها في بيئة دليبيكو إيجل المطورة والمزودة بمصل دم العجل ١٠ ٪ Dulebeccos Modified Eagles Medium Supplemented with (FCS10%) وتمريرها (أي نقلها من طبق إلى طبق) عدة مرات كل يومين في أطباق بتري للتكاثر بوضعها في الحضان درجة حرارته ٣٩°م مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء ورطوبة نسبية (5% CO_2 in air with relative humidity).

يتم تمرير الخلايا الجسدية لأكثر من ٧ مرات تقريبا ثم تنمية مجموعة منها في بيئة محدودة العناصر الغذائية لكي تدخل فترة الكمون من دورة الخلية (G0) منخفضة في مصل أو سيرم دم العجل (FCS 0.5 %)، لكي يمكن أن يتم دمجها في البويضات.

ثانياً: جمع البويضات من مبايض الأغنام

يتم جمع المبايض من الأغنام التي تذبح في مسلخ المدينة في الصباح ثم تنقل في أطباق تحتوي على محلول فسيولوجي متعادل (PBS) دافئ، ثم في المعمل يتم استخراج وجمع البويضات من مبايض الأغنام بواسطة الشفط بالإبرة ثم غسلها ثم تنميتها في بيئة إنضاج البويضات (*In vitro* maturation medium IVM) (انظر الجدول رقم ١٧,١)، وهي تشمل بيئة زراعة الأنسجة أو الخلايا (رقم ١٩٩ -TCM من شركة سيجما) مزودة ببعض المكونات.

الجدول رقم (١٧,١). يوضح مكونات بيئة إنضاج البويضات *In vitro* maturation medium (IVM).

Ingredients	Volume
TCM 199 (Earle`s salts)	9 ml
FBS (10%)	1 ml
Gentamycin Solution (10mg / ml)	25 µl
FSH (2 AU/ml) LH(5-10 IU/ml)	100µl
E2 (1 ug/ml)	10µl
Pyruvate Stock Solution (2.2 mg / ml)	100µl

ثالثاً: التخلص من أنوية البويضات ودمج الخلايا الجسدية بالبويضات

ثم في اليوم التالي وبعد ٢٢ ساعة من فترة الإنضاج يتم التخلص من الخلايا الحويصلية من حول البويضات بواسطة تمريرها في بيئة تحتوي على إنزيم الهالورنديز لمدة ٣-٥ْم والشفط بأنبوبة دقيقة (الشكل رقم (١٧,١).

وللتخلص من أنوية البويضات يتم ترقيق غشاء البويضة الشفاف بواسطة تمريرها بمحلول يحتوي على سيتوكالسين بي لمدة ٣ دقائق (5ug/ml cytochalsin B) ثم يتم التخلص من انوية البويضات تحت المجهر التشريحي للمعالجات فائقة الدقة (Micromanipulator) حيث يتم عمل قطع في الغشاء الشفاف للبويضة وتمرير أنبوبة القطع الدقيقة (Cutting micropipette) تحت الجسم القطبي الأول للبويضة ثم دفع البويضة أعلى أنبوبة القطع بأنبوبة الحمل الدقيقة (Holding) حتى ينقطع الغشاء الشفاف كما في الشكل رقم (١٧,٢).

ولإخراج نواة البويضة يتم عصر البويضة بواسطة الضغط على منتصفها بنفس أنبوبة القطع الدقيقة فتخرج نواة البويضة والجسم القطبي، والتي يتم فصلها عن البويضة بواسطة أنبوبة الشفط وتوضع في قطرة بيئة فيها صبغة هوتش فلورسنتية (Hoechst stain) لفحصها للتأكد من خروج أنوية البويضات يفضل فحص الأنوية المزالة تحت المجهر الفلورسنتي.

رابعاً: النقل النووي (Nuclear Transfer)

لعمل الاستنساخ فإنه يتم دمج الخلايا الجسدية (الكامنة G0) تحت مجهر المعالجات الدقيقة (Micromanipulator) حيث يتم نقل الخلايا الجسدية بواسطة أنبوبة الحقن الدقيق وذلك بحقن خلية واحدة تحت الغشاء الشفاف لكل بويضة (الشكل رقم ١٧,٣.).

خامساً: الدمج الخلوي Cell fusion

يتم نقل البويضات التي تم نقل الخلايا الجسدية لها إلى بيئة دمج الخلايا (Fusion medium) في الطبق (انظر الجدول رقم ١٧,٢)، ثم يتم دمج الخلايا الجسدية بالبويضة بواسطة جهاز الدمج الخلوي بواسطة قطبي تيار كهربائي بشدة ٢,٧٢ فولت/ سم لمدة ١١ ثانية باستخدام جهاز (Electro Cell Manipulator pulses 2.72 kV/cm for 11 usec) (الشكل رقم ١٧,٤).

بعدها يتم تنشيط البويضات المدمجة بالخلايا الجسدية بواسطة تمريرها في بيئة الأينوميسين (5uM Ionomycin) ثم يتم معاملة الخلايا في بيئة تنشيط الخلايا (هي بيئة قناة

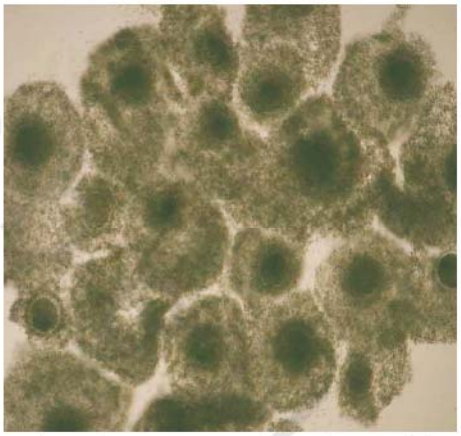
البيض المحضرة synthetic oviduct fluid medium without KH_2 PO_4 (mSOF) (10 ug./ml) لمدة ٦ ساعات في الحضان درجة ٣٩°م مزود بثاني أكسيد الكربون ٥٪ والهواء ورطوبة نسبية عالية.

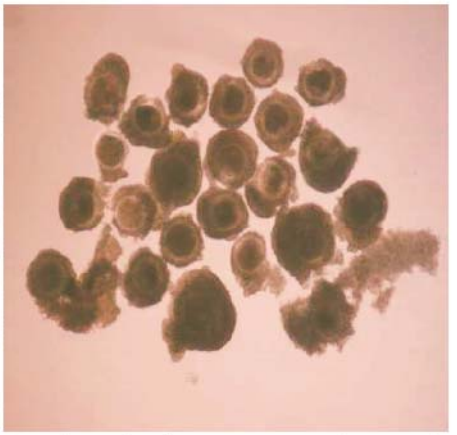
سادساً: تنمية البويضات المستنسخة

بعد التنشيط الخلوي يتم تنمية البويضات المدمجة معهما الخلايا الجسدية في بيئة تنمية الأجنة (mSOF) ويتم تغطية قطرات البيئة في الطبق بزيت البرافين وتوضع لمدة ٤٨ ساعة في الحضان (٣٩°م + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون + ٩٠٪ نيتروجين + ٥٪ أكسجين) حيث توضع في حاوية حاضنة خاصة للحفاظ على الظروف البيئة المناسبة.

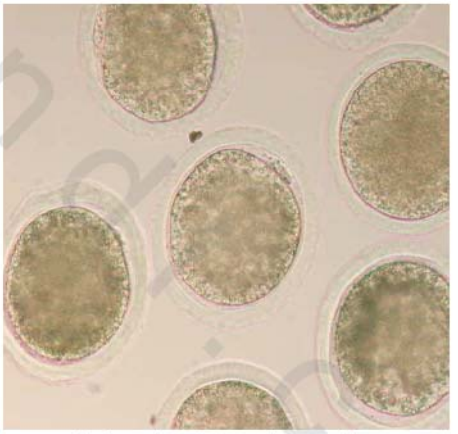
بعد يومين يتم متابعة نمو الأجنة فالأجنة التي نمت ووصلت إلى طور ٤-٨ خلايا هي الأجنة المستنسخة والتي فيما بعد يتم تنميتها إلى طور المفلجة بعد أسبوع من الاستنساخ. ثم نقلها إلى إناث مستقبلة ومهيأة فسيولوجيا للحمل (٢-٣ أجنة لكل نعجة) ثم يتم متابعة الإناث الحوامل لحين الولادة حيث تكون هي المواليد المستنسخة.

الشكل رقم (١٧,١). يوضح جمع البويضات من مبايض الأغنام.

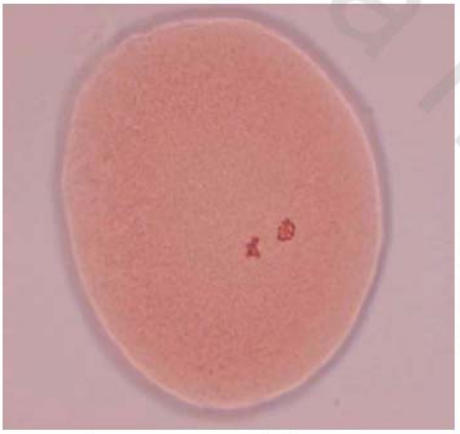




البويضات قبل الإنضاج (لاحظ الخلايا الحويصلية المحيطة بها) البويضات بعد الإنضاج وتمدد الخلايا الحويصلية.

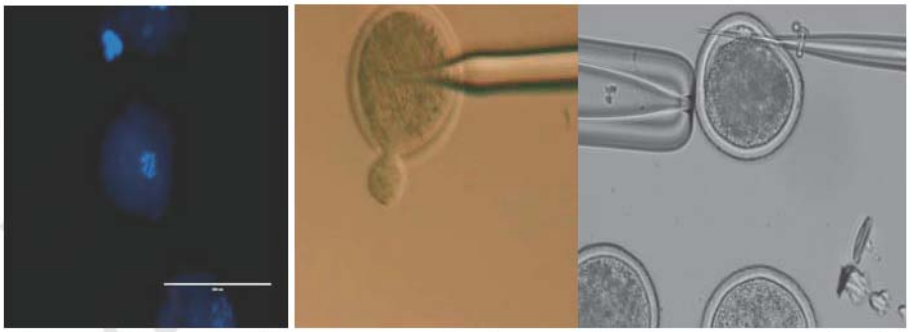


البويضات الناضجة تحتوى على الجسم القطبي.



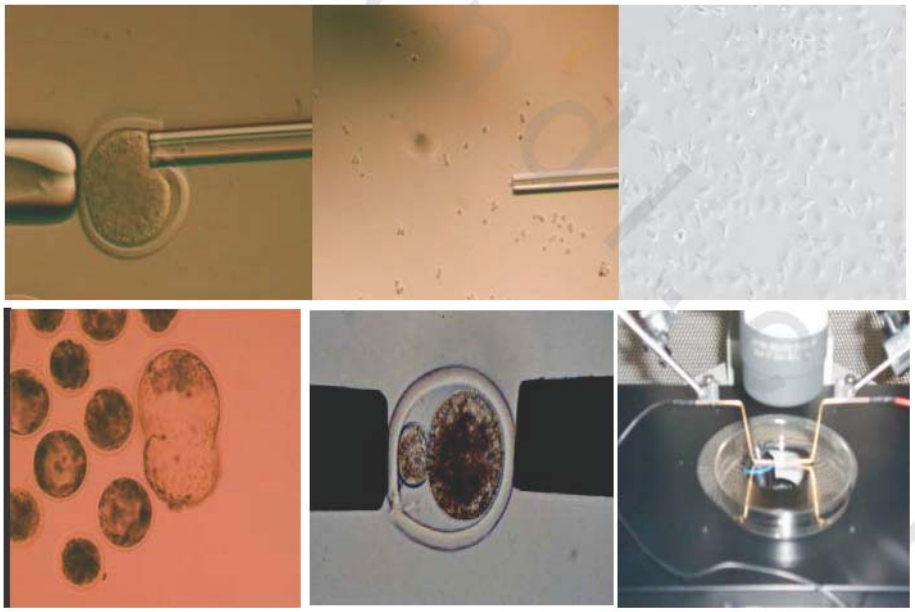
ويتم صبغ بويضة للتاكـــد من نضــوج البويضات (نوية البويضه في الطور الاستوائي الثاني للانقسام الاختزالي).

الشكل رقم (١٧,٢). إنضاج البويضات المجموعة من المبايض في بيئة إنضاج لمدة ٢٤ ساعة.



الشكل رقم (١٧,٣). يوضح طريقة التخلص من أنوية البويضات باستخدام المجهر التشريحي للمعالجات الدقيقة (Micromanipulator). حيث يتم التخلص من أنوية البويضات بعمل قطع فوق منطقة الجسم القطبي للبويضة ثم الضغط على البويضة لكي تخرج النواة والجسم القطبي ثم يتم صبغ النويات المزالة وفحصها تحت المجهر الفلورسنتي للتأكد من إزالتها من البويضة.

صورة الخلايا الجسدية سحب خلايا جسدية في مرحلة التجويع (G0) ثم نقلها للبويضة



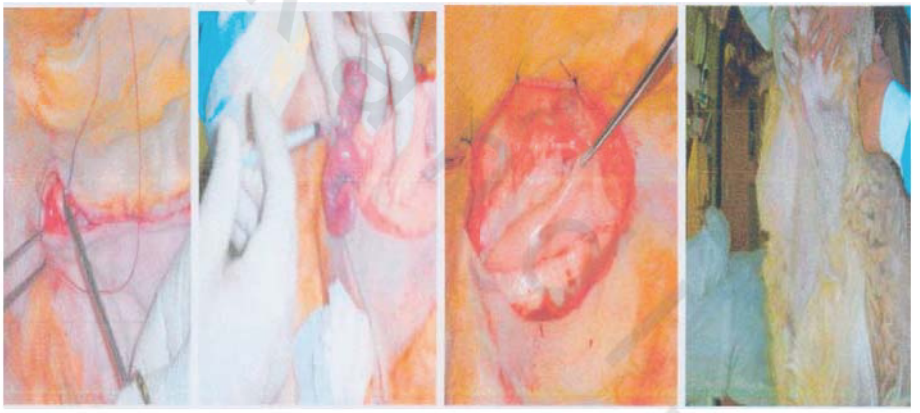
الشكل رقم (١٧,٤). يوضح طريقة دمج الخلايا الجسدية مع البويضات. وذلك بوضع خلية جسدية واحدة تحت الغشاء الشفاف لكل بويضة ثم تحت المجهر الدقيق يتم دمج الخلية الجسدية بالبويضة بواسطة جهاز الدمج الخلوي،ثم تنمية البويضات لمدة ٥–٧ ايام وتكوين اجنة مستنسخة في طور البلاستولة او المفلجة.

سابعاً: نقل الأجنة المستنسخة

بعد نمو الأجنة إلى طور المفلجة يمكن نقلها إلى أنثى مهيأة فسيولوجيا عن طريق أولا حقنها قبل ٣ أسابع من التجربة بهرمون البروستا جلاندين (Prostaglandin) (للتخلص الحمل سابق أو من الجسم الاصفر في المبيض) ثم بعد أسبوع يتم وضع أسفنجة في مهبل الأنثى قبل نقل الأجنة بأسبوعين لتنظيم الدورة التناسلية فيها.

ثم تحقن الأنثى بالهرمون التناسلي لتنشيط المبايض فيها قبل يومين من نقل الأجنة إليها ثم يمكن نقل الأجنة بعملية جراحية بالنسبة للأغنام كما في الشكل رقم (١٧,٥)، أو بدون عملية جراحية عن طريقة القسطرة.

حلاقة الصوف ثم فتح البطن ثم حقن الأجنة في قرن الرحم، ثم خياطة الجرح.



الشكل رقم (١٧,٥). مراحل نقل الأجنة في الأغنام بعملية جراحية.

الجدول رقم (١٧,٢) يوضح مختلف البيئات الخاصة بمعالجة بويضات الأغنام لعملية الأستنساخ.

بيئة زراعة الخلايا CULTURE MEDIA

يتم إضافة ماء مقطر بجهاز التقطير Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل

10x Synthetic oviductal fluid SOF (stock solution) store in 4° C for 1month

Ingredients	Weight for 200 ml	Weight for 100 ml
NaCl	12.5880 g	6.2940 g
KCl	1.068 g	0.5340 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.5028 g	0.3300 g
MgC $l_2.6H_2O$	0.1992 g	0.100 g
Phenol red	Few	0.010 g

Working SOF Solution=100 ml

Ingredients	Weight
10x SOF medium	10 ml
Na pyruvate	0.0036 g
$NaHCO_3$	0.2106 g
Glucose	0.0270 g
L-Glutamine	0.0146 g
Na – Lactate (معلق)	47 µl
MEM Non- essential amino acid(100x)	1 ml
MEM essential amino acid(50x)	2 ml
BSA	0.30 g
Gentamycin Solution	250 µl

يتم إضافة ماء مقطر بواسطة جهاز Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل.

ملاحظة: يفضل إضافة BSA بعد تكملة الحجم إلى ١٠٠ مل.

CR1aa

Stock solution A = (760 ml, 4°C for I month)

Ingredients	Weight for 200 ml
NaCl	6.7031 g
KCl	0.2311 g
Na-Pyruvate	0.0440 g
$NaHCO_3$	2.2011 g
Phenol red solution 0.5 %	2 ml

يتم إضافة ماء مقطر Milli Q–Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ٧٦٠ مل ثم يمزج جيدا ويعمل له فلترة.

Stock solution B = (200 ml, 4°C for I month).

١- Lactic acid hemicalcium salt = 0.5996 g (from sigma L2000).

٢- يتم إضافة ماء مقطر Milli Q – Water إلى المكونات إلى أن يصبح الحجم ٢٠٠ مل ثم يمزج جيدا ويعمل له فلترة.

Working solution CR1aa with 5% FBS = 50 ml

Ingredients	Weight
Stock solution A	38 ml
Stock solution B	10ml
MEM Non- essential amino acid (100x)	0.5 ml
BME essential amino acid(50x)	1 ml
L-Glutamic acid	0.5 ml
BSA (fatty acid free, sigma A7030)	0.15 g
Gentamycin Solution	125 µl
FBS	2.63 ml

كيف نحضر L-Glutamic acid

10 ml Milli Q Water + 20 mg Glutamic acid (Sigma G8415).

بيئة الإخصاب الاصطناعي الخارجي *In vitro* fertilization medium IVF

10 x B.O medium = Stock IVF media solution (100 ml, 4°C, 1 month)

Ingredients	Weight for 200 ml	Weight for 100 ml
NaCl	13.1 g	6.5500 g
KCl	0.6 g	0.300 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.66 g	0.3300 g
$MgCl_2.6H_2O$	0.2 g	0.100 g
Phenol red	Few	0.0100 g
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (NaH2PO4.H2O)	0.258 g	0.1290 g

يتم إضافة Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل.

Working solution for IVF (100 ml)

Ingredients	weight
10x BO medium	10 ml
Milli Q – Water	90 ml
Na-pyruvate	0.0138 g
$NaHCO_3$	0.3104 g
BSA	0.300 g

obeikandl.com

obeikandl.com

تقرير العملي السابع عشر:
استنساخ أجنة الأغنام

اسم الطالب : ..... رقم الطالب : .....

نوع البيئة الخاصة بزراعة الخلايا الجسدية كانت؟ .....

كم عدد المبايض التي تم جمعها من المسلخ؟ .....

كم مجموع عدد البويضات المستخلصة؟ ..... معدل كل بيضة=.....

عدد البويضات التي تم نضوجها ..... كيفية التعرف عليها.....

عدد البويضات التي تم استخراج أنويتها بشكل سليم؟ .....

نوع الخلايا الجسدية المستخدمة في الاستنساخ من أين أخذت؟ .....

كم بويضة تم نقل الخلايا الجسدية إليها؟ .....

مانوع البيئة المستخدمة في الدمج الخلوي؟.....

كيف تم تنشيط البويضات بعد دمجها بالخلايا الجسدية؟ .....

مالفرق بين بيئة الإنضاج وبيئة تنمية البويضات؟

.....

.....

هل تم وضع الأجنة عند تنميتها في حاضنة خاصة (Incubating Chamber) وما أهميتها وكيف تم عمل ذلك؟.....

.....

.....

كم عدد الأجنة التي نمت والأطوار التي وصلت إليها؟.....

طور الخليتين ..... طور الأربع خلايا ..... طور ثمان خلايا .....

طور التوتية ..... طول البلاستيولة.....

هل تم تجميد أو نقل الأجنة المتكونة؟ .....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandi.com

obeikandl.com

العملي الثاني عشر

زراعة الخلايا الليفية و السرطانية
Fibroblast and Cancer Cells Culture

الهدف

يهدف هذا العملي إلى التدرب على زراعة الخلايا الليفية أو الجسدية سواء خلايا الدم أو الجلد أو الخلايا السرطانية لعمل خطوط من المزارع الخلوية Cell lines [٢٦]. وتكمن أهمية زراعة الخلايا الجسدية في أنها يمكن أن تستخدام إما لتجربة الاستنساخ أو لدمج الخلايا الجسدية بالأجنة أو لدراسة تأثير بعض العقاقير على الخلايا السرطانية وغيرها.

المواد والأجهزة المستخدمة في التجربة

- أطباق بتري أو دوارق مسطحة لزراعة الخلايا.
- أنابيب ماصة إبندورف ١٠ ، ٥ مل وماصات دقيقة.
- بيئة إيجل لزراعة الخلايا (Dulbecco's Modified Eagles Medium DMEM or RPMI medium).
- أنزيم التربسين ٢٥٪ Trypsin enzyme
- سيرم أو مصل دم العجل أو ألبيومين سيرم الدم البقري: Fetal Calf Serum FCS .or Bovine Serum Albumin BSA
- حضان + معقم للبيئات والأدوات Autoclave and Incubator.
- كابينة زراعة خلايا Cell culture hood.
- جهاز طرد مركزي (Centrifuge).

---

(٢٦) Paul (1975).

obeikandl.com

طريقة زراعة الخلايا الليفية أو السرطانية للفأر Fibroplast or Cancer cells Culture in Mouse

١- يتم تحضير البيئة الخاصة بزراعة الخلايا مثل بيئة إيجل المطورة (Dulebeccos Modified Eagles Meduim DMEM bovine serum) إما تكون جاهزة الصنع أو بودرة. يتم تعقيم البيئة إما بفلتر ترشيح أو إذا تم تحضيرها من البودرة جاهزة الصنع فإنها تعقم في جهاز التعقيم ثم في يوم زراعة الخلايا يُضاف لها سيرم دم العجل أو الألبيومين البقري تركيزة ١٠٪ (DMEM + (10%FBS) fetal bovine serum).

٢- يتم تشريح أحد الفئران والحصول على الخلايا الجسدية إما من خلايا الدم أو قطعة من نسيج الجلد أو غيره أو إذا كان الفأر فيه ورم يمكن تشريح منطقة الورم واستخلاص قطعة من النسيج الورمي (الشكل رقم ١٨,١).

٣- يتم تفكيك النسيج بواسطة تقطيعه إلى قطع صغيرة جدا ثم تنسيرها بإبرة التشريح للتفكيك الأولي لخلايا النسيج.

٤- ثم يوضع على مستخلص النسيج أو الخلايا إنزيم التربسين (تركيزة ٢٥٪) مع البيئة وفيها ١٠٪ سيرم دم البقر في بيئة إيجل (DMEM +10%FBS) لمدة ١٠-١٥ دقيقة في الحضان درجة حرارته ٣٧مْ.

٥- بعدها تجمع خلايا النسيج في أنبوبة إبندورف ٥-١٠مل ذلك لكي يتم عمل الطرد المركزي لمستخلص الخلايا بعد وضعها في أنبوبة لمدة ١٠ دقائق ١٥٠٠د/د في درجة حرارة الغرفة، إذا لم تتفكك الخلايا يكرر ذلك عدة مرات حتى يتم تفكيكها.

٦- بعد تفكك الخلايا ثم يتم غسل الخلايا وتنميتها في طبق بتري أو دورق زراعة الخلايا (الشكل رقم ١٨,٢) يحتوي بيئة دليبيكو إيجل المطورة والمزودة بسيرم دم العجل ١٠٪ (DMEM+10%BSA or10% FCS) ثم توضع في الحضان درجة حرارته ٣٧ْم مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء 95% ورطوبة نسبية عالية (5% CO_2 in air with relative humidity).

٧- بعد يومين من زراعة الخلايا تكرر عملية التفكيك للخلايا بواسطة إنزيم التربسين ثم عمل الطرد المركزي.

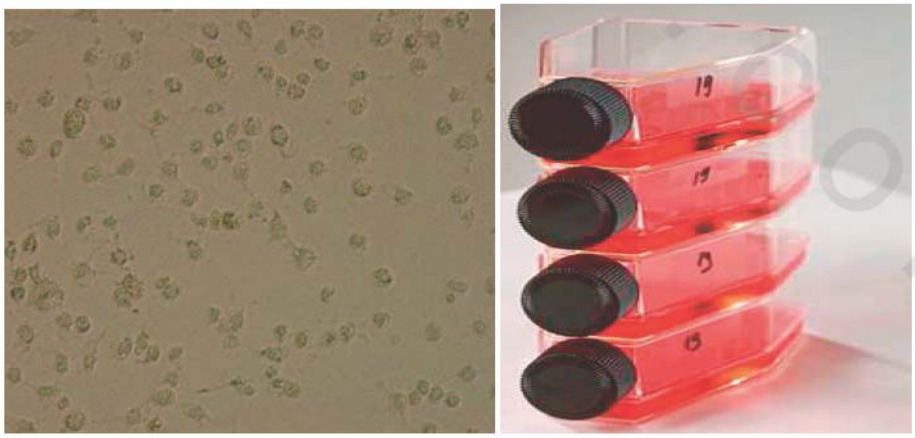
٨- بعد تفكيك الخلايا يحسب تركيز الخلايا في بيئة زراعة الخلايا بواسطة أخذ عينة من مزرعة الخلايا (١٠ ميكرولتر) ثم يتم حساب تركيزها إما بواسطة جهاز عد الخلايا

أو بواسطة شريحة العد الزجاجية التي يتم فيها عد الخلايا الدموية (Hemocytometer) إذا كان هناك تجمع للخلايا بشكل غير طبيعي تعالج بيئة الخلايا بمادة الميتوميسين س لمدة ساعتين.

٩- ثم يتم زراعة الخلايا مرة أخرى في أطباق جديدة أخرى.

١٠- بعدها يتم تمرير الخلايا Cell Passage (أي نقلها من طبق إلى طبق) عدة مرات كل يومين في أطباق بتري التي تحتوي على بيئة زراعة الخلايا للتكاثر بوضعها في الحضان درجة حرارته ٣٧°م مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء ٩٥٪ ورطوبة نسبية (CO_2 in air with relative humidity٥٪).

الشكل رقم (١٨,١). صورة لفأر فيه ورم تم استخلاص قطع من نسيج الورم منه لزراعتها.



الشكل رقم (١٨,٢). صورة لدوارق زراعة الخلايا وصورة لخلايا بعد تفكيكها وزراعتها في الطبق للفأر.

obeikandl.com

تقرير العملي الثامن عشر
زراعة الخلايا الليفية أو السرطانية

اسم الطالب : ..... رقم الطالب : .....

١- ما نوع النسيج الذي استخدمته في زاراعة الخلايا في هذا العلمي؟.....

.....

٢- ماهو نوع البيئة التي استخدمت في زراعة الخلايا؟.....

٣- كم كان عدد أو تركيز الخلايا للزراعة المستخدمة؟.....

٤- هل كان هناك تلوث لبيئة زراعة الخلايا؟ لا..... أو نعم .....

إذا كان هناك تلوث حدد أين حصلت أو حدثت مرحلة التلوث :

.....

٥- كيف يمكن تجنب التلوث في بيئات زراعة الخلايا؟

.....

.....

.....

لخص خطوات زراعة الخلايا الجسدية على شكل نقاط :

.....

.....

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

openkandil.com

obeikandl.com

العملي التاسع عشر

تكوين الخلايا الجذعية وزراعتها في الفأر
Establishment and Culture of Stem Cells of Mice

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى التدرب على إنتاج الخلايا الجذعية الجنينية وكيفية استخلاصها ثم الخطوات الواجب إتباعها لتاسيسها وزراعتها[٢٧].

المواد والأدوات المستخدمة

- إناث فئران في مراحل حمل مبكرة (مرحلة المفلجة أو البلاستولا).
- بيئات زراعة الخلايا الجذعية (Embryo stem cell culture medium ES (DMEM)).
- مضاد سيرم الفأر من الأرنب (Rabbit-anti –mouse-spleen serum).
- إنزيم البرونيز في محلول الفسفات متعادل (0.5 % pronase in PBS).
- إنزيم التربسين مع محلول إيدتا في محلول فسيولوجي (. 25% Trypsin in 0.04 Ethyl dimethyl tetra acetic (EDTA) in PBS.

- Knockout (DMEM) Dulbecco s modified Eagle s medium (GIBICO) Catt no. 10829 -018 (ES- GRO)(Invertogen)
+ 4.5 g/l. D Glu
+ Sodium Pyruvate
- L- Glutamine

---

(٢٧) الحميدي والكريم (١٤٢٨هـ).

obeikandl.com

Gibco Cat no. 25300-054

- Leucocyte inhibiting factor LIF ($10X10^7$ uints/100ul) from Chemo Com. (4C)
-Adjuvent complete freunt from DIFCO code no.0638
-Glelatin from Procrine skin type A Sigma Cat. No. G.1890 100 gm.
-Mercaptoethanol
Non –essential amino acid

مواد التجميد:

محلول بيئة حفظ بالتجميد

From Mitsubishi Kagaku Yatoron.((500ul/100mm dish $1x10^7$cell).

حاوية لتجميد الخلايا. Cell Banker

تحضير بيئة الخلايا الجذعية الجنينية Preparation of Embryo Stem ES Cell Culture Medium

بيئة تنمية الخلايا الجذعية الجنينية تحضر من الآتي:

(١٠٠مل) من شركة GIBICO) (ES- GRO) (Invertogen).

- 80 ml of Knockout DMEM (Dulbecco's modified Eagle s medium(GIBCO)
- 2ul L-Glutamine Solution (-30C)
- 20 ul knockout Serum replacement SR(-30C)
-182 ul 2-mercaptoethanol
-1 ml Non –essential amino acid
-500ul Sodium Pyruvate
-FLITTER
-Add LIF Leucocyte inhibiting factor ($10X10^7$ uints/100ul) from Chemo Com. (4C).

طريقة إنتاج الخلايا الجذعية الجنينية (الطريقة المناعية): Immunosurgery of Mouse Blastocyst

١- يتم استخراج الأجنة من الأنثى في طور المفلجة (٣,٥ أيام) بعد التلقيح بالنسبة للفأر في محلول بيئة (DMEM) وتحت المجهر التشريحي يتم عمل الخطوات التالية: أما إذا كانت المفلجة قد بزغت أو تمزق الغشاء الشفاف من حولها تنقل الأجنة إلى الخطوة رقم (٥).

٢- يتم تحضير طبق فيه ١١ قطره مغطاة بزيت البرافين (انظر الشكل رقم ١٩,١).

٣- توضع الأجنة (١٠ أجنة لكل طبق) في أول قطرة فيها محلول الفوسفات الفسيولوجي يحتوى على إنزيم البرونيز (٠,٥٪)(0.5 % Pronase in PBS) لمدة دقيقة واحدة حتى يتم التخلص من الغشاء الشفاف حول المفلجة.

٤- ثم تغسل مرتين في محلول بيئة تنمية الخلايا الجذعية (ES cell culture medium).

٥- توضع الأجنة بعد ذلك في محلول مضاد للسيرم (Rabbit-anti –mouse- spleen serum) في الحضان لمدة ٣٠دقيقة لتحرير خلايا النسيج الغذائي.

٦- تغسل الأجنة في محلول بيئة لمدة ثلاث مرات (تمرر في ٣ قطرات).

٧- توضع الأجنة في قطرة بيئة بها محلول مكمل للمضاد السيرم (Complement dilution of Rabbit-anti –mouse-spleen serum). لمدة ٣٠ دقيقة في الحضان

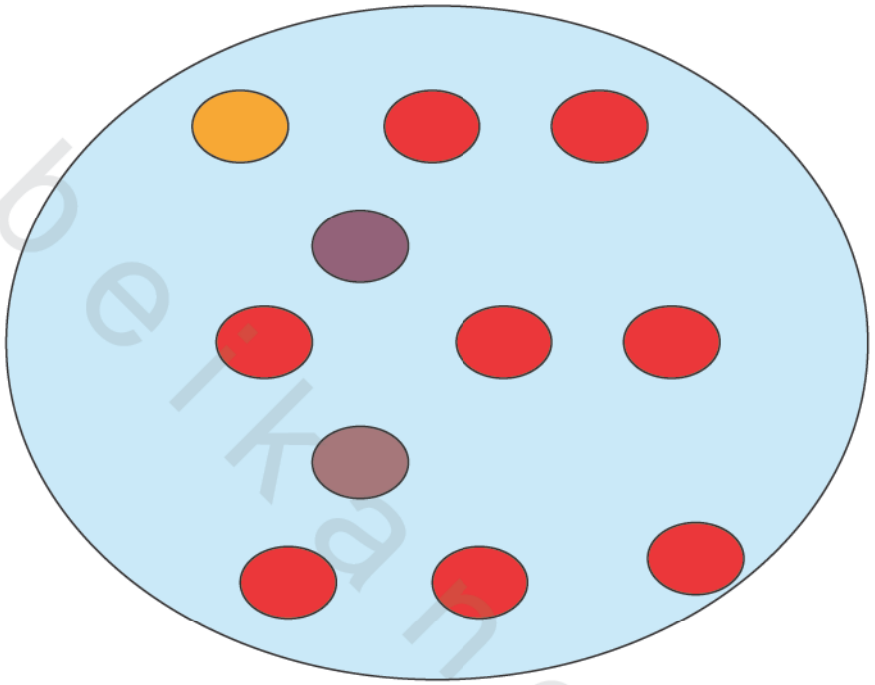
٨- تنقل الأجنة إلى أول قطرة بيئة غسيل ثم ينقل جنين واحد إلى قطرة الغسيل الثانية حيث يتم تحرير كتلة الخلايا الداخلية (Inner cell mass ICM) من خلايا النسيج الغذائي للمفلجة (Trophoblast cells) بواسطة السحب الرقيق بأنبوبة دقيقة جدا عدة مرات حتى تنفصل كتلة الخلايا الداخلية عن خلايا النسيج الغذائي ثم تنقل كتلة الخلايا الداخلية المفصولة إلى قطرة الغسيل الثالثة .

٩- تنقل كتلة الخلايا الداخلية إلى طبق بترى فيه بيئة تنمية خلايا جذعية بدون زيت البرافين للتخلص من بقايا الزيت ثم تستخدم ماصة دقيقة جديدة.

١٠- تنقل كتلة الخلايا الداخلية ICM) إلى طبق بتري فيه أربع حاويات يحتوى على خلايا مغذية (Feeder cells) ، (قد تم تجهيزه وتم تغيير البيئة فيه إلى بيئة تنمية الخلايا الجذعية غير مغطاة بزيت البرافين) (ES cell culture) بحيث توضع كل كتلة خلايا واحده في وسط الحاوية ثم تنمى لمدة ٣-٤ أيام في الحضان (الشكل رقم ١٩,٢).

١١- بعد ٣-٤ أيام يتم فحص الطبق ويؤخذ منتصف كتلة الخلايا الداخلية وتوزع لثلاث أجزاء في طبق بترى جديد فيه خلايا مغذية ، ويتم التخلص من الأطراف لكتلة الخلايا ؛ لأنها قد تكون جزءاً من خلايا نسيج غذائي بواسطة الشفط بأنبوبة شعرية جدا.

١٢- بعد ١-٢ يوم يتم أيضا تقطيع كتلة الخلايا الداخلية كل واحده ثلاث أجزاء بنفس الطبق وبذلك تكون الخلايا الجذعية الجنينية قد تكونت من كتلة الخلايا الداخلية ويتم تغيير البيئة فقط كل يوم أو يومين.



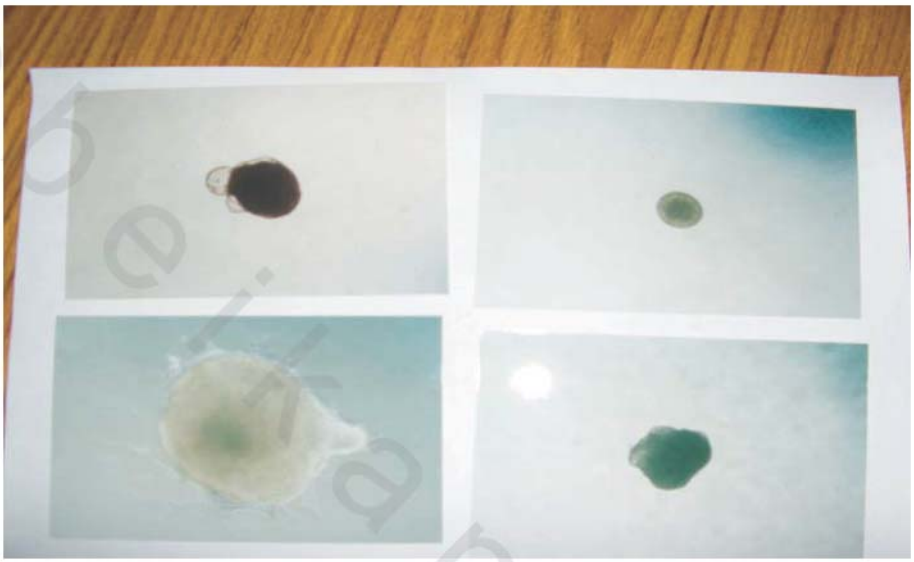
الشكل رقم (١٩,١). طبق بتري يحتوى على ١١ قطرة للتخلص من الغشاء الشفاف واستخلاص كتلة الخلايا الداخلية للمفلجة For immunosurgery of Blastocyst:

أول قطرة (القطرة الصفراء) تحتوى على إنزيم البرونيز (٠,٥٪ in PBS)

قطرة واحدة (بنفسجي فاتح) تحتوى على مضاد السيرم (Anti-serum 20 ul in 30ul ES cell culture medium) ٨ قطرات (حمراء) تحتوى على بيئة خلايا جذعية.

obeikandl.com

أ) كتلة الخلايا الداخلية محاطة بخلايا نسيج غذائي ب) مرحلة بداية تمدد الخلايا الجذعية الجنينية.



الخلايا الجذعية بعد يومين من الزراعة تكون الجسم الجنيني (Embryonic body).

الشكل رقم (١٩,٢). صور لمراحل تكون الخلايا الجذعية الجنينية.

تمرير الخلايا الجذعية للفأر Passage of mouse ES cells

ثم تتم عملية تمرير الخلايا الجذعية من طبق لآخر كل ٢-٣ أيام حسب الخطوات التالية:

• بعد تنمية الخلايا الجذعية في الطبق لمدة ٣-٤ أيام لابد من تغيير الطبق والبيئة التي تنمى بها الخلايا الجذعية (لأن الخلايا المغذية والبيئة تكون استهلكت) حسب الخطوات التالية:

١- يتم سحب البيئة من الطبق الذي فيه الخلايا الجذعية بالشفط في كابينة التعقيم.

٢- يضاف إنزيم التربسين (٠,٢٥٪)معه محلول المنظم (EDTA 0.04%) مخلوط مع محلول الفسيولوجي المتعادل (PBS) إلى طبق تنمية الخلايا الجذعية.

٣- ضع الطبق بالحضان لمدة ٣ دقائق. ثم ضع محتويات الطبق في أنبوبة.

٤- اغسل بإضافة ٢ مل من بيئة فيها سيرم العجل للأنبوبة (١٠٪) +DMEM (10%FBS)Fetal bovine serum)٥٠٠ ميكرو مل محلول السيرم، ١٠٠٠ ميكرو مل بيئة (١:٢).

٥- اعمل طرد مركزي ١٣٠٠ دورة لمدة ٥ دقائق (Centrifuge at 1300 rpm).

٦- اسحب البيئة الطافية.

٧- أضف إلى الأنبوبة ١ مل من بيئة الخلايا الجذعية .

٨- ضع في الطبق الجديد الذي توجد فيه خلايا مغذية ما يقارب ١٠ ×١٠^{٦}/ خلية لكل طبق ٣٥مم (٣٠٠٠مل بيئة تنمية الخلايا الجذعية، ٢٥٠مل من مستخلص الخلايا الجذعية بالأنبوب) .

٩- ضع الخلايا الجذعية أو الطبق بالحضان وغير إلى بيئة جديدة كل يوم.

١٠- بعد التنمية لمدة يومين يتم التأكد من كثافة مستعمرات الخلايا الجذعية (ES cells confluent condition).

إنتاج وتكوين الجسم الجنيني Embryonic body cells

إذا تركت الخلايا الجذعية لمدة أكثر من ٤ إلى ٧ أيام في الطبق فإنها تبدأ تكوِّن جسم جنيني ثم في اليوم الثامن تتمايز وتكون خلايا جسم جنيني (Embrynic body cells) يشبه البالون (الشكل رقم ١٩,٢).

١- لهضم الخلايا توضع على الخلايا في الطبق محلول إنزيم التربسين (٠,٢٥ ٪) في محلول إيدتا في محلول فسيولوجي (.25% Trypsin in 0.04 EDTA in PBS) لمدة ٣ د في الحضان.

٢- تسحب الخلايا ثم تغسل الخلايا بواسطة محلول البيئة (DMEM) في أنبوبة .

٣- توضع الأنبوبة في الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق ١٥٠٠ دورة /د (1500 rpm).

٤- توضع في البيئة لمدة يوم واحد فقط ثم تغير إلى بيئة (DMEM)تغير البيئة كل ٣ أيام.

طريقة إنتاج وتكوين الخلايا الجنينية المغذية للفأر (Mouse Feeder Cells MEF)

١- يتم تشريح أنثى حامل واستخلاص أجنة عمرها ١٣,٥ من الأم الحامل.

٢- يتم التخلص من جميع الأطراف والرأس للجنين ويستخدم جذع الجنين فقط.

٣- يوضع جذع الجنين في طبق ويتم تنسيرة وتقطيعه إلى قطع صغيرة لتكوين مستخلص.

٤- يوضع على المستخلص إنزيم التربسين مع البيئة وفيها ١٠% سيرم العجل في بيئة (10%FBS)Fetal bovine serum+ DMEM) لمدة ١٥ دقيقة في الحضان.

٥- يتم عمل طرد مركزي لمستخلص الخلايا بعد وضعها في أنبوبة لمدة ١٠ دقائق ١٥٠٠د.د درجة حرارة الغرفة.

٦- ثم ازرع الخلايا في بيئة الخلايا المغذية (10%FBS-DMED) لمدة ٢-٣ يوم.

٧- احسب تركيز الخلايا في البيئة إذا كان هناك تجمع للخلايا بشكل غير طبيعي تعالج البيئة الخلايا بمادة الميتوميسين س لمدة ساعتين.

٨- ثم تغسل بمحلول الفوسفات المتعادل الفسيولوجي (PBS) .

٩- توضع الخلايا في بيئة تنمية الخلايا المغذية (10%FBS-DMEM).

طريقة عمل وإنتاج مضاد السيرم للفأر -Anti -serum production (Rabbit anti-serum anti –mouse –spleen serum)

١- يتم تجهيز مستخلص من خلايا طحال الفأر بسحق و طحن خلايا طحال للفأر بمحلول الفوسفات الفسيولوجي (PBS).

٢- يؤخذ عدد الخلايا من مستخلص طحال الفأر تقريبا ١ × ١٠^٨/ مل ويخلط مع سائل ١ : ١(Adjuvent complete freunt from DIFCO code no.0638)

حقن المخلوط عبر الوريد الأذن الطرفي للأرنب لمدة ثلاث مرات كل أسبوعين مرة.

٤- بعد أسبوع من الحقنة الثالثة يمكن استخلاص الدم من الأرنب (حقنه بالقلب) واستخلاص السيرم من الدم والذي يحتوى على مضاد لخلايا النسيج الغذائي لمفلجة أو جنين الفأر).

يمكن أن تستخدم الأرنب مرتين أو ثلاث كل فترة حسب الحالة للأرنب.

أما بالنسبة لإنتاج المتمم (Complement) فيمكن أن يستخدم السيرم للأرنب غير المعالج ١ : ٤(١سيرم أرنب: ٤ بيئة تنمية خلايا جذعية).

طريقة حفظ وتجميد الخلايا الجذعية أوالخلايا المغذية (−٨٠ مْ):

- يتم تحرير الخلايا الجذعية بواسطة إنزيم التربسين (٠,٢٥٪) لمدة ٣ د.
- توضع المحتويات في أنبوبة و يتم عمل طرد مركزي ١٢٠٠ د/ لمدة ٥ د.
- يتم التخلص من سائل البيئة.
- يتم إضافة سائل الحفظ ٠,٥٠ ميل لكل ١٠٠ مم طبق بتري (Cell Banker from Mitsubishi Kagaku Yatoron 500ul/100mm dish $1x10^7$cell).
- يقسم المحلول وبه الخلايا على أنابيب تجميد صغيره ٥٠٠مل كل واحده.
- توضع الأنابيب في حاوية التبريد (-80 Biocell Deep freezing Vessels)
- ضع الحاوية في ثلاجة التجميد العميق (−٨٠مْ) سوف تنزل الخلايا ١ دْم/ ساعة.
- بعد يوم يمكن أن تستخرج الأنابيب وتوضع في صندوق الحفظ في التجميد العميق.

ولاستخدام الخلايا يمكن أن توضع أنبوبة الخلايا المجمدة في حاوية التجميد مرة أخرى ثم توضع في درجة حرارة الغرفة أو توضع في ماء جارى حتى يذوب الثلج.

- يعمل طرد مركزي للمحلول ويتم التخلص من السائل.
- ثم تغسل بمحلول تنمية الخلايا الجذعية ثلاث مرات للتخلص من محلول حفظ الخلايا.
- ثم تنمى الخلايا في طبق بتري.

طريقة تحضير الطبقة الليفية لأطباق بتري لتنمية الخلايا المغذية عليها:

- يوزن ٠,١ ٪ جرام من بودرة الجيلاتين ويذوب في محلول فسيولوجي (PBS).
- يفرغ محتويات محلول الجيلاتين في أطباق بتري المراد تنمية الخلايا فيها بما يغطى القاع.
- وتترك الأطباق مغطاة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة تقريبا.
- يتم سحب السائل الزائد وتترك حتى تجف الأطباق وهي مغطاة.
- عدها توضع الأطباق في درجة حرارة ٤ مْ لحين استخدامها.

طريقة استخلاص الخلايا التناسلية الأولية من الجنين

يمكن أن تستخلص الخلايا التناسلية الأولية من جنين عمره ٨,٥ يوم وتكون في النهاية الطرفية لجذع الجنين حيث يتم أخذ الجزء الطرفي لمنطقة نهاية جذع الجنين ويتم تنسيرها

ثم معالجتها بإنزيم التربسين لمدة ٣–٥ د في الحضان ثم توضع محتويات الطبق في أنبوبة للطرد المركزي ثم يغسل الراسب بمحلول البيئة ثم توضع الخلايا في طبق لتنميتها كخلايا جذعية تناسلية أو جرثومية .

obeikandl.com

obeikandl.com

تقرير العملي التاسع عشر:
تكوين الخلايا الجذعية وزراعتها في الفأر

اسم الطالب : ..... رقم الطالب : .....

١- كم عدد الأجنة المتحصل عليها من الإناث؟

.....

٢- كيف تم التخلص من الغشاء الشفاف الذي يحيط بالأجنة؟

.....

.....

٣- كم كتلة خلايا (Inner cell mass ICM) التي تم استخلاصها من الأجنة؟

.....

٤- عدد المراحل التي تمت لتحضير الخلايا الجذعية الجنينية ومتطلباتها :

أ) مرحلة .....

ب) مرحلة .....

ج) مرحلة .....

د) مرحلة .....

٥- ما الخطوات الواجب اتباعها لتجنب تلوث زراعة الخلايا الجذعية؟

.....

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

openkandil.com

obeikandl.com

العملي العشرون

الحقن المجهري للجينات في بويضات الفأر
Gene Injection in Mice Ova [٢٨]

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى إعطاء الخلفية العلمية والتقنية والتدرب على الهندسة الحيوية وتقنيات التكاثر وإنتاج أجنة معدلة وراثيا. ومع هذا الدرس العملي سوف يكتسب الطلاب الخبرة في طريقة حقن الجينات في اللاقحة باستخدام جهاز الحقن المجهري Micromanpulatore.

تكمن أهمية هذا الدرس العملي في التدخل في تقنية إنتاج الحيوانات المعدلة وراثيا في استقصاء الجينات وأدائها ومن ثم استخدامها في المعالجات لبعض الأمراض الوراثية للإنسان وفي إنتاج بعض العقاقير والتحسين الوراثي في الإنتاج الحيواني والنباتي. ثم إمكانية تسويق الحيوانات المعدلة وراثيا للأبحاث العلمية.

المواد والأجهزة المستخدمة

بيئات لتنمية البويضات والأجنة وزيت معدني (KSOM; M2with HEPS ; M16 media (Mineral oil,from Sigma com. هرمونات لتنشيط المناسل لإناث الفئران (Follicle stimulating hormone FSH, or Pregnant mare serum gonadotropine PMSG, and Lutenizing hormone LH or Human chorionic gonadotropin hCG from Sigma com.)

إبر الحقن المجهري والإمساك بالبويضة إما جاهزة الصنع (Micropipitty injection).

---

(٢٨) Heiser (2004) /Alhimaidi (2005).

obeikandl.com

• أو تصنع بالمعمل بواسطة أجهزة تصنيع الإبر الدقيقة، جهاز سحب الإبر Micropipitty Puller وجهاز ثنى الإبر (Microfuorge) وجهاز برد الإبر (Micropipitty grinder).

• مجهر تشريحي ومجهر الحقن المجهري (Micromanpulator) .

خطوات التجربة

يشتمل العملي على:

أولاً: عمل إبر الحقن المجهري Micropipitty preparation

• يمكن الحصول على أنابيب الحقن الدقيقة (Micro injection pipitty) جاهزة الصنع كما يمكن عمل الأنابيب الدقيقة والخاصة بالحقن المجهري بواسطة أجهزة عمل الأنابيب الدقيقة جهاز السحب والبرد الدقيقة (Micropipitty Puller and Grinder).

• حيث تثبت الأنبوبة الزجاجية الدقيقة على جهاز السحب Micropipitty Puller بحيث تمرر عبر منتصف فتيلة الجهاز إلى منتصفها (الشكل رقم ٢٠,١).

• يشغل الجهاز بتسخين الفتيلة (52°C) حتى تنقطع الأنبوبة الزجاجية الدقيقة.

• يؤخذ الجزء العلوي للأنبوبة الزجاجية ثم تثبت على جهاز ثني الأنابيب الدقيقة (Microfuorge) بحيث يكون طرفها مقابل فتيلة الجهاز وذلك بالنظر عبر العدسة العينية للجهاز.

• ثم تسخن الفتيلة ويوضع طرف الأنبوبة الزجاجية على طرف الفتيلة بشكل عمودي ثم يسحب بسرعة إلى الأعلى لكي يتكون طرف مدبب للأنبوبة الزجاجية الحاقنة (الشكل رقم ٢٠,١).

• لكي يسهل استخدام الأنبوبة تحت المجهر لابد من ثنى طرف الأنبوبة الدقيق بزاوية ٣٠ درجة تقريبا، وذلك بوضع الفتيلة بالقرب من أحد جانبي الأنبوبة على بعد ٥ مم من طرفها المدبب تقريبا ثم تقرب وتبعد الأنبوبة الزجاجية من الفتيلة لحين الحصول على زاوية الانحناء المطلوبة والمبينة على العدسة العينية للجهاز.

• بعد ذلك تنقل الإبرة الحاقنة إلى جهاز البرد الدقيق ويثبت طرفاها على رحاة الجهاز بشكل مائل ثم يشغل الجهاز لتدور الرحاة إلى أن يتم ملاحظة عملية البرد بواسطة العدسة العينية للجهاز.

• لتنظيف الأنبوبة الحاقنة الدقيقة توصل بطرف أنبوبة بلاستيكية متصلة مع حقنة ٥ مل ثم يشفط بواسطتها محلول مخفف من حمض الكبريتيد (١,٠٪) ثم يدفع في طبق بتري ثم تغسل مرة أخري بالماء المقطر بنفس الطريقة.

• أما أنابيب المسك الدقيقة (Holding pipettes) والتي تستخدم لمسك البويضات تحت المجهر الدقيق فإنها تعمل بواسطة سحب الأنبوبة الزجاجية الدقيقة عن طريق جهاز سحب الأنابيب بحيث تقطع الأنبوبة الزجاجية من المنتصف.

• ثم تنقل الأنبوبة إلى جهاز ثنى الأنابيب الدقيقة (Microforage) لكي يتم صنع أنبوبة المسك الدقيقة فإن طرف الأنبوبة يوضع في مواجهة الفتيلة للجهاز وذلك بالنظر عبر عدسة الجهاز ثم تسخن الفتيلة وتقرب الأنبوبة للفتيلة حتى يتم تضييق طرف تجويف الأنبوبة (الشكل رقم ٢٠,١).

ثانياً: جمع البويضات المخصبة حديثا من قناة البيض للفأر

لجمع بويضات مخصبة حديثا وبكميات كبيرة من إناث الفئران.

١- لابد من حقن الإناث قبل يومين من التجربة بكمية ١٠ وحدة دولية من الهرمون المحفز لنمو الحويصلات في المبيض (Follicle stimulating hormone FHS or PMSG).

٢- ثم بعد ٤٨ ساعة تحقن بهرمون التبويض (Lueinizing hormone LH) وبكمية ١٠ وحدة دولية.

٣- ثم يوضع ذكر مع كل أنثى حتى يتم التزاوج في المساء.

٤- تفحص الأناث في الصباح الباكر لليوم التالي، لرؤية السدادة المهبلية في الإناث التي لقحت.

٥- تُشَرَّح الإناث التي حصل لها تلقيح ثم تستخرج قناة البيض وَتُنَسَّر تحت المجهر التشريحي لاستخراج البويضات في بيئة تحتوي على منظم للأس الهيروجيني (M2 with HEPES, from sigma com.).

٦- ثم تنقل البويضات إلى قطرات من البيئة (٥٠ ميكروليتر 50ul) ثم تغطى القطرة بالزيت المعدني الخفيف (Light mineral oil) ثم توضع في الحضان لحين استخدامها للحقن.

ثالثاً: الحقن المجهري للجينات في اللاقحة بعد عملية الإخصاب

• لابد من إجراء الحقن المجهري بعد ٦-٨ ساعات من الإخصاب وقبل اندماج النوية الذكرية بالنوية الأنثوية للبويضة.

• تجهز كمية من الجين المراد حقنها في البويضات في طبق بتري وتوضع في قطرة من البيئة في طبق ثم توضع قطرة أخرى من البيئة تنقل إليها البويضات المراد حقنها وتغطى بالزيت بعد نقل البويضات إليها.

• ثم تحت مجهر المعالجات الدقيقة أو مجهر الحقن المجهري (Micromanpulator) يتم سحب كمية قليلة جدا من القطرة التي فيها الجين المراد حقنه (1-2 ul) بواسطة إبرة الحقن المجهري (Microinjection needle).

• ثم يتم الانتقال إلى قطرة البويضات ويتم الإمساك بإحدى البويضات والتي تحتوي على نويتين فقط (ذكرية وأنثوية) وذلك بواسطة أنبوبة المسك الدقيقة (Holding pipette) تحت المجهر الدقيق (الشكل رقم ٢٠,١).

• ثم يتم إدخال الحاقنة الدقيقة ذات الطرف المدبب إلى داخل البويضة ثم يتم اختراق الغشاء النووي للنوية الكبيرة (الأنثوية) بشكل خفيف ورقيق حتى تصل بطرف الإبرة إلى طرف الغشاء النووي الآخر، وعندها تلاحظ النوية كأنها انتفخت فهذا يدل على أن القطرة التي في الإبرة قد خرجت من الأنبوبة الحاقنة، وبذلك فقد تم حقن الجين إلى داخل النوية الأنثوية، ثم تسحب الإبرة الحاقنة برفق إلى الخلف. تكرر الخطوات السابقة مع بقية البويضات المراد حقنها.

رابعاً: تنمية الأجنة

• بعد حقن البويضات بالجين تنقل البويضات إلى قطرة من بيئة تنمية الأجنة (KSOM or M16) ثم تغطى بالزيت المعدني وتوضع في حضان درجة حرارتة ٣٧°م مزود بالهواء وثاني أكسيد الكربون ٥٪ لتنميتها.

• ثم في اليوم الثاني يتم فحص الأجنة تحت مجهر مقلوب العدسة وتسجيل الملاحظات عن الأجنة.

خامساً: نقل الأجنة المعدلة وراثيا جراحيا لإناث ذات حمل كاذب

• بعد عملية الحقن للجينات يتم نقل الأجنة الناميه إلى طور ٢-٤-٨-١٦ خلية ويفضل نقل الأجنة التي في طور التوتية أو المفلجة (البلاستولة) إلى أم مستقبلة مهيأة فسيولوجيا.

• حيث يتم تجهيز أنثى كما سبق شرحة في الدرس العملي السابق لنقل الأجنة بحيث تستخدم إناث ذات حمل كاذب أي لقحت بذكر مخصي قبل يوم أو يومين من عملية نقل الأجنة لها.

• يتم نقل الأجنة بواسطة العملية الجراحية عن طريق تخدير إحدى الإناث بحقنها بمادة مخدرة (Ketamdor10% ; 0.05 ml).

• ثم يتم حلق الشعر من جهة أحد جانبي الظهر حول منطقة قناة البيض ثم يتم عمل قطع في الجلد والتجويف البطني وتستخرج قناة البيض وتثبت على ورقة ترشيح صغيرة معقمة، ثم توضع الأنثى المستقبلة تحت المجهر التشريحي.

• تسحب الأجنة المراد حقنها مع كمية قليلة من البيئة ١٠ ميكرون (10 ul) بواسطة إبرة زجاجية دقيقة متصلة بأنبوبة بلاستيكة أو حقنة امل تحت المجهر التشريحي.

• ثم تحقن البويضات داخل تجويف قناة البويضة برفق إما عن طريق فوهة قناة البيض أو بواسطة اختراق جدار قناة البيض بواسطة طرف الإبرة الزجاجية.(الشكل رقم ٢٠,٢).

• يتم خياطة الجرح بواسطة خيوط الجراحة الداخلية والخارجية، ثم يتم متابعة الإناث لحين الولادة بعد ١٩ -٢٠ يوما تقريبا.

• يتم تسجيل الملاحظات على المواليد ومواصفاتها حسب الجين المحقون.

obeikandl.com

الشكل رقم (٢٠,١). يوضح خطوات عملية تجهيز وحقن الجين أو الحيوان المنوي في البويضات.

أولاً: عمل الأبر الدقيقة للحقن المجهري:

طريقة عمل أبر الحقن المجهري بإستخدام جهاز سحب الأنابيب الدقيقة ثم بردها بواسطة جهاز البرد الدقيق وتنظيفها.

الشكل رقم (٢٠,٢). يوضح الشكل عملية نقل الأجنة المعدلة وراثيا جراحيا إلى الأنثى المستقبلة.

ثانياً:الحقن المجهري للجينات داخل نويات اللاقحة باستخدام الحقن المجهري وإنتاج أجنة معدلة وراثيا.

الحقن باستخدام جهاز الحقن المجهري حقن الجين في البويضة تحت المجهر نمو البويضات المحقونة.

تقرير العملي العشرون :
الحقن المجهري للجينات في بويضات الفأر

اسم الطالب : ..... رقم الطالب : .....

١- كم أنثى تم استخراج البويضات منها؟

.....

٢- كم عدد البويضات التي جمعت من الإناث؟

.....

٣- كم بويضه كانت تحتوي على نويتين (ذكرية وأنثوية)؟

.....

٤- كم بويضة كان فيها أكثر من نويتين؟ وما هو تعليلك لها؟

.....

٥- ما الجينات أو المادة التي حقنت في البويضات؟

.....

٦- كم عدد البويضات التي حقنت؟

.....

٧- كم عدد الأجنة التي نمت إلى طور الخليتين فأكثر؟

.....

٨- كم عدد الإناث التي تم نقل الأجنة النامية إليها؟

.....

٩- كم عدد الأجنة التي تم نقلها للإناث؟

.....

١٠- كم عدد الإناث التي أكملت الحمل وأعطت مواليد؟

.....

١١- كم عدد الأجنة التي تم إنتاجها وفيها الجينات المعدلة وراثيا؟

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

obeikandl.com

obeikandl.com

العملي الحادي والعشرون

دمج الأجنة في الفأر
Chimera Formation in Mice [٢٩]

الهدف

يهدف هذا الجزء العملي إلى تعلم طرق لدمج الأجنة في مرحلة التلفج، ثم إنتاج أجنة مدمجة، حيث يمكن دمج جنينين أو أكثر لإنتاج جنين واحد له أكثر من أبوين (Tetra paternal or Hexa paternal) وهو مناسب للدراسات الوراثية والفسيولوجية.

المواد والأدوات المستخدمة في التجربة

- إبر معدنية لعمل حفر في أطباق بتري لدمج الأجنة، مع أطباق بتري صغيرة.
- إناث فئران حوامل في مرحلة مبكرة (مرحلة التفلج).
- إنزيم البرونيز في محلول الفوسفات الفسيولوجي (5% Pronase in PBS).
- بيئات لتنمية الأجنة وزيت معدني لتغطية البيئات في الطبق (Mineral oil; M16; KSOM).
- مجهر تشريحي ومجهر مقلوب العدسة (Inverted microscopy).
- جهاز الدقاق أو جهاز عمل الثقب المجهري الدقيق في الغشاء الشفاف للبويضة (Peizo injection). أو بواسطة أشعة الليز.

---

(٢٩) Austin and Short (1982).

obeikandl.com

طريقة دمج الأجنة: Chimeric embryo production, two embryos together or with embryonic stem cells (ES) injection in blastula.

يمكن دمج الأجنة بطريقتين:

١- بدمج أجنة بنفس العمر (طور الخليتين مع بعض أو طور ٤ أو ٨ خلايا أو طور التوتية.

٢- أو بحقن المفلجة: وذلك بطريقتين:

أ) بحقن البلاستولة بكتلة الخلايا الداخلية لبلاستولة جنين آخر.

ب) بحقن أو دمج خلايا جسدية أو خلايا جذعية وحقنها داخل المفلجة أو البلاستولة.

أولاً: دمج الأجنة بنفس العمر

• يتم استخراج الأجنة من الإناث مختلفة السلالة بيضاء وسوداء (Balb/c 'C57/6J DBA) في طور٢-٤- ٨- أو التوتية (بعد١- ٢,٥ يوم من التلقيح).

• يتم وضع الأجنة في قطرة بيئة الأجنة (M16 or KSOM) بطبق بتري بها إنزيم (٠,٥٪) (0.5 % pronase in PBS) وتوضع في الحضان لمدة 3-5 دقيقة تقريبا للتخلص من الغشاء الشفاف.

• تغسل الأجنة بتمريرها في ثلاث قطرات بيئة للتخلص من أثر الإنزيم.

• تُعمل حفر صغيرة في قاع طبق بتري صغير بواسطة رأس الإبرة المعدنية في كل قطرة بيئة تنمية.

• تنقل الأجنة بحيث يوضع كل جنينين مختلفين بالسلالة ولكن بنفس العمر أو مرحلة النمو في الحفرة الصغيرة (الشكل رقم ٢١,١).

ثم يوضع على كل جنين مجموعة من الخلايا الجذعية في بيئة تنمية الأجنة(KSOM)

• تترك الأجنة لمدة يوم أو إلى طور المفلجة في الحضان.

• تنقل الأجنة إلى أم مستقبلة (ذات حمل كاذب بنفس العمر للأجنة) بالعملية الجراحية.

ثانياً: دمج الأجنة بحقن المفلجة بالخلايا الجذعية أو بكتلة الخلايا الداخلية

Blastula ES injection or Inner cell mass injection (ICMI)

• يمكن جمع الأجنة من الأنثى الحامل في اليوم الثالث أو الرابع من التلقيح أو رؤية السدادة المهبلية (٢,٥- ٣,٥) Day.

openkandil.com

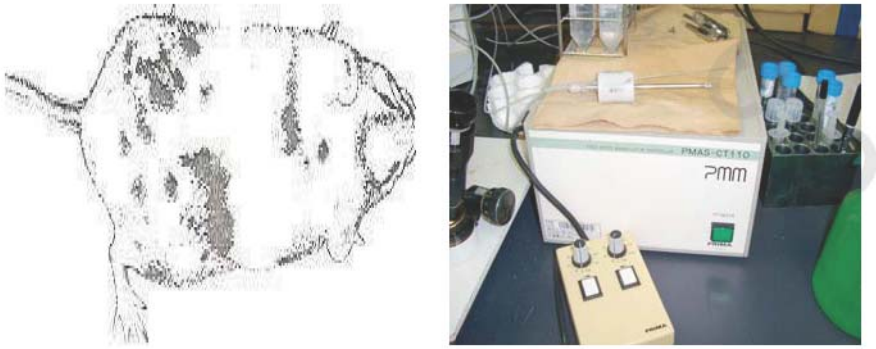
• يتم تجهيز جهاز الحقن المجهري للحقن بواسطة الثاقب الدقيق (Peizo injection) (الشكل رقم ٢١,٢).

• كما يتم تجهيز طبق فيه عدد من قطرات البيئة للأجنة وللخلايا الجذعية وقطرات للحقن والغسيل مغطاة بزيت البرافين.

• ثم تحت المجهر لجهاز الحقن المجهري يتم حقن مجموعة من الخلايا الجذعية داخل كل مفلجة.

• تترك الأجنة في قطرة البيئة في الحضان لحين نقلها لأم مستقبلة بنفس اليوم.

الشكل رقم (٢١,١). يوضح طرق دمج الأجنة بوضع الأجنة في حفرة في قاع طبق بتري، أو بحقن المفلجة.



الشكل رقم (٢١,٢). يوضح جهـــاز الدقاق أو الثقب المجهري الدقيق في الغشـــاء الشفاف للبويضة (Peizo injection) ثم صورة لجنين مدمج أبيض عن طريق حقن البلاستولة بكتلة الخلايا (أسود).

obeikandl.com

تقرير العملي الحادي والعشرون:
دمج الأجنة في الفأر

اسم الطالب : ..... رقم الطالب : .....

١- ما سلالات الفئران المستخدمة لدمج أجنتها مع بعض؟

.....

٢- كم عدد الأجنة التي تم جمعها من كل سلالة؟

السلالة ١- ..... السلالة ٢- .....

٣- ما أعمار الأجنة أو في أي طور؟

.....

٤- كم من الأجنة اندمجت في الطبق؟

.....

٥- هل نمت أجنة مدمجة؟..... إلى أي طور وصلت؟.....

٦- هل تم حقن أجنة في مرحلة المفلجة : نعم؟..... لا.....

٧- إذا كانت الإجابة نعم ما نوع الخلايا الحقونة داخل المفلجة؟

خلايا جذعية..... أو كتلة الخلايا الداخلية : .....

٨- هل تم نقل الأجنة المدمجة إلى أم مستقبلة؟.....

٩- كم جنين نقل لكل أنثى؟.....

١٠- هل ولدت أجنة مدمجة؟..... وكم عددها أو نسبتها؟.....

١١- إذا لم تتحصل على نتائج لدمج الأجنة، علل عدم الحصول على نتائج؟

.....

.....

.....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

openkanal.com

obeikandl.com

المراجع
References

أولاً: المراجع باللغة العربية

الحميدي، أحمد عثمان الدوخي؛ محمد الغندور (١٤١٨هـ). *الأساسيات في عملي أجنة الفقاريات الوصفي والتجريبي*. مطابع جامعة الملك سعود. الرياض.

الحميدي، أحمد راشد؛ صالح عبدالعزيز الكريم (١٤٢٩هـ). *الأجنة التجريبي*. مطابع جامعة الملك سعود. الرياض.

الحميدي، أحمد راشد؛ عثمان عبدالله الدوخي؛ ياسر رجب الشوا (١٤٣٢هـ). *دليل الدروس العملية لأجنة الفقاريات الوصفي*. مطابع جامعة الملك سعود.الرياض .

العيسى، محمد ، أحمد الحميدي، صالح قنديل (٢٠٠٧). *تجميد السائل المنوي لذكور غزال الرمال العربي بإستخدام بيئة التريليديل وتريس. مجلة الخليج العربي للعلوم*: العدد ٢٥ (٤): ص (١٩٩-٢٠٦). Arab Gulf. J. Scient Res.25(4)199-206).

الكريم، صالح عبدالعزيز (١٤١١هـ). *المدخل إلى علم الأجنة الوصفي والتجريبي*. دار المجتمع. جدة.

ثانياً: المراجع باللغة الأجنبية

Abou-Tarboush, F.M., Al-Himaidi A.R., and El-Banna, A.A. (1994): Long term teratogenic effects of Mitomucin-C on the second gestation in mice. J. King Saud Univ. Vol 6 Science (1). 33-40.

Alhimaidi Ahmed R. (1999): Comparison of the in vitro fertilization of ova obtained from two mouse strains (Blab/c and C57) by three different methods and cultured in four different culture media. Arab Gulf. J. Scient. Res. Arab Gulf . 17 (1), 181-198.

Alhimaidi Ahmed R.(2005): Thymoqunone treatment of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) compared to in vitro fertilization(IVF) of mice oocytes and their development in vitro. Adv.Mol.Med.1(3):119-123. www.advmolmed.com

-Austin C.R. and Short R.V. (1982): Reproduction in Mammals, Book 2"Embryonic and Fetal Development "2nd ed. Cambridge University press.Cambridge.UK.

Daniel J. (1971): Methods in Mammalian Embryology. Freeman and Co. USA.

Hamburger V. and Hamilton H.L (1951): A series of normal stages in the development of chick embryo.J.Morphol. 88:49-92.

Harrison B.M. (1977): Embryology of the chick and pig . Dubuque W.M.C.Brown company .

Heiser William C. (2004): Gene Delivery to Mammalian Cells.Methodes in molecular biology. Vol.245. Human prss Totowa, New Jersey.USA.

Hosseini, S.M. F. Moulavi, M. Foruzanfar, M. Hajian, P. Abedi[a], M. Rezazade-Valojerdi, K. Parivar, A.H. Shahverdi and M.H. Nasr-Esfahani (2008)? Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning J.Small rumres.vol 6:4

New D.A.T. (1964): The Culture of Vertebrate Embryology London .Logos press.

Paul John(1975): Cell and Tissue Culture. 5th ed. Churchhill Livingston.

Rugh, R. (1956): Laboratory Manual of Vertebrate Embryology. Minneapolis, Burgess.Press

Rugh, R. (1962): Experimental Embryology. Minneapolis, Burgess. Press

Rugh, R. (1968): The Mouse: Its reproduction and development. Minneapolis, Burgess.Press.