وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة تكريت
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

علم الخلية العملي

أعداد
م.د. حيدر مظهر عباس أ.م.د. معن حسن الياسين

نسخة 2022-2023م

مفردات الجزء العملي

ت	اسم التجربة	الصفحة
.1	المجهر الضوئي المركب	6-2
.2	التعبير عن المحاليل والتراكيز	8-6
.3	عمليات فصل عضيات ومكونات الخلية	11-8
.4	الكشف عن مكونات جدار الخلية النباتية	18-11
.5	الغشاء البلازمي	20-18
.6	النواة	24-21
.7	اشكال الخلايا	25
.8	البلورات وانواعها	27-26
.9	البلاستيدات وانواعها	32-28
.10	الكشف عن المايتوكوندريا	35_33
.11	القتل والتثبيت والتصبيغ	38-36
.12	طريقة الطلاء والهرس لدراسة الانقسام الخلوي	41-38
.13	الانقسام الاختزالي	44-42
.14	الملحق	45-43

1.المجهر الضوئى المركب

يعد المجهر من أهم الأدوات المستخدمة في علم الأحياء نظراً لاستخدامه في دراسة الأجسام الصغيرة التي لا نستطيع أن نراها بواسطة العين المجردة، إذ يمكننا من رؤية التفاصيل الدقيقة للعينة المراد الكشف عنها والنوع الأكثر استعمالاً في هذا المختبر هو المجهر الضوئي المركب **(Light compound Microscope)** .

أجزاء المجهر الضوئي المركب:

1.العدسة العينية(Ocular lens): هي العدسة التي نرى من خلالها، وتقع في الجزء العلوي من الاسطوانة الصغيرة للمجهر وقد تحوي العدسة على عقدة Knob يمكن تدويرها للداخل والخارج للتعويض عن أي تباين في تركيز الصورة بين العينين.اما قوة تكبير هذه العدسة مكتوب عليها وهي بالعادة عشر مرات 10x.

2.الاسطوانة(Body tube): هي الجزء الاسطواني في المجهر التي تحمل في أعلاها العدسة العينية.

3.العدسات الشيئية(Objective lenses): هي مجموعة من ثلاث إلى أربع عدسات متصلة بالقرص، وتكون العدسة الصغيرة منها في الغالب ذات القوة الصغرى (4x)والعدسة الشيئية المتوسطة ذات قوة التكبير (10 X)، والعدسة الشيئية الكبرى ذات قوة التكبير(40 x) ويوجد أيضاً العدسة الزيتية التي تصل قوة تكبيرها الى (X100).

ملاحظة: في حالة استخدام العدسة الزيتية يتم إضافة مادة خاصة لرؤية أوضح تسمى (immersion oil) مثل زيت السيدار أما بالنسبة لباقي العدسات تستخدم دون إضافة أية مواد.

اما المجموعة الثانية من الارقام الموجودة على العدسة الشيئية والتي تكون عادة بشكل كسور عشرية فأنها تمثل الفتحة الرقمية Numerical Aperture(*NA*) للعدسة والتي هي مقياس لقدرة العدسة الشيئية على تجميع الاشعاعات الضوئية المتشتتة بسبب مرورها خلال النموذج، فكلما زادت زاوية الاشعاعات المتجمعة كلما كان وضوح الصورة افضل.

Magnification of objective	Focal length (mm)	N A	Working distance (mm)	Diameter of field (mm)	Depth of field (μm)
10	16	0.20–0.30	4–8	1–2	*c.* 10
40	4	0.65–0.85	0.2–0.6	0.25–0.50	1–2
100 (oil)	2	1.20–1.30	0.11–0.16	0.1–0.2	0.5

جدول(1.1) بعض خصائص العدسات

بالنسبة للعدسات التي لا يستخدم معها الزيت (او قطرة من الماء) والتي تعرف بالعدسات الجافة لا تصل الفتحة الرقمية NA الى 1 بينما العدسات التي يستخدم معها الزيت تتجاوز الفتحة الرقمية الرقم 1. اما the working distance فهي مسافة العمل بين اوطئ نقطة في العدسة الشيئية وسطح غطاء الشريحة. و the depth of field مدى المسافة التي تبقى فيه الصورة واضحة الى حد ما.

4.القرص(Revolving Nosepiece): وهو جزء دائري متصل بالجزء السفلي من الاسطوانة ويستعمل لتغيير أوضاع العدسات الشيئية المتصلة به.

5.المنضدة(Stage): وهي السطح الذي نضع عليه الأجسام المراد فحصها ويوجد في مركزها فتحة صغيرة تسمح بمرور الضوء خلال الشريحة.

6.**الحجاب(diaphragm):** وهو جزء مثبت على السطح السفلي للمنضدة وبواسطته نستطيع تنظيم كمية الضوء الداخلة إلى العدسة الشيئية من خلال الشريحة.

7 .**المكثف(Condenser):** يوجد المكثف تحت فتحة المنضدة، ووظيفته تجميع أشعة الضوء حيث نستطيع التحكم بتركيز الضوء الموجه إلى الشريحة وذلك بتحريكه إلى أعلى والى أسفل بواسطة عقدة موجودة على جانب المجهر او بواسطة عتلة تخرج من موقع المكثف. ويمكن تحسين درجة وضوح الصورة من خلال تنظيم المكثف.

8.**الضابط الكبير(Coarse adjustment):** الضابط الكبير عبارة عن عجله كبيرة موجودة على جانبي المجهر، تستعمل لتنظيم المسافة بين المنضدة والعدسة الشيئية للحصول على رؤية واضحة، حيث يتم استعمالها في حال العدسة ذات قوة التكبير الصغرى (4x) أو قوة التكبير الوسطى (10x) ولا تستخدم في حال استخدام العدسة الشيئية الكبرى 40xأو العدسة الزيتية 100xلماذا؟

9. **الضابط الصغير(Fine adjustment):** الضابط الصغير عبارة عن عجلة صغيرة موجودة أيضاً على جانبي المجهر حيث تستخدم للمساعدة على رؤية العينة بصورة أوضح، ويتم استخدام الضابط الصغير في حال استخدام العدسة الشيئية الكبرى (40x) أو العدسة الزيتية (100x) لماذا؟

10. **المرآة أو المضيء(Mirror or illumination) :** وظيفة المرآة عكس وتوجيه الأشعة من مصدر خارجي إلى العدسة الشيئية مارة بالشريحة المراد تكبيرها، وللمرآة سطحان أحداهما مستو والآخر مقعر، وذلك للتحكم بكثافة الضوء المنعكس، وقد استعيض عن المرآة في المجهر الجديد بمصدر ضوئي ثابت يدعى المضي كذلك يمكن التحكم بشدة الضوء من خلال التحكم بفولتية المحولة المرتبطة بالمصدر الضوئي ويمكن السيطرة على كمية الضوء الداخلة الى العينة من خلال التحكم بالحجاب ايضاً.

11. **الضاغط (Clip):** وهناك ضاغطان على المنضدة يستعملان لتثبيت الشرائح عليها.

12. **الذراع(Arm):** هي الدعامة التي تستعمل لحمل المجهر والتي تحمل أيضاً الاسطوانة.

13. **القاعدة(Base):** هي الجزء السفلي الذي يرتكز عليه المجهر.

حساب قوة التكبير: لحساب التكبير الكلي للجسم المراد فحصه تحت المجهر اتبع الطريقة التالية:

1. لاحظ قوة تكبير العدسة العينية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو عادة (10) مرات (x 10).
2. لاحظ قوة تكبير العدسة الشيئية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو يختلف باختلاف العدسات الشيئية.

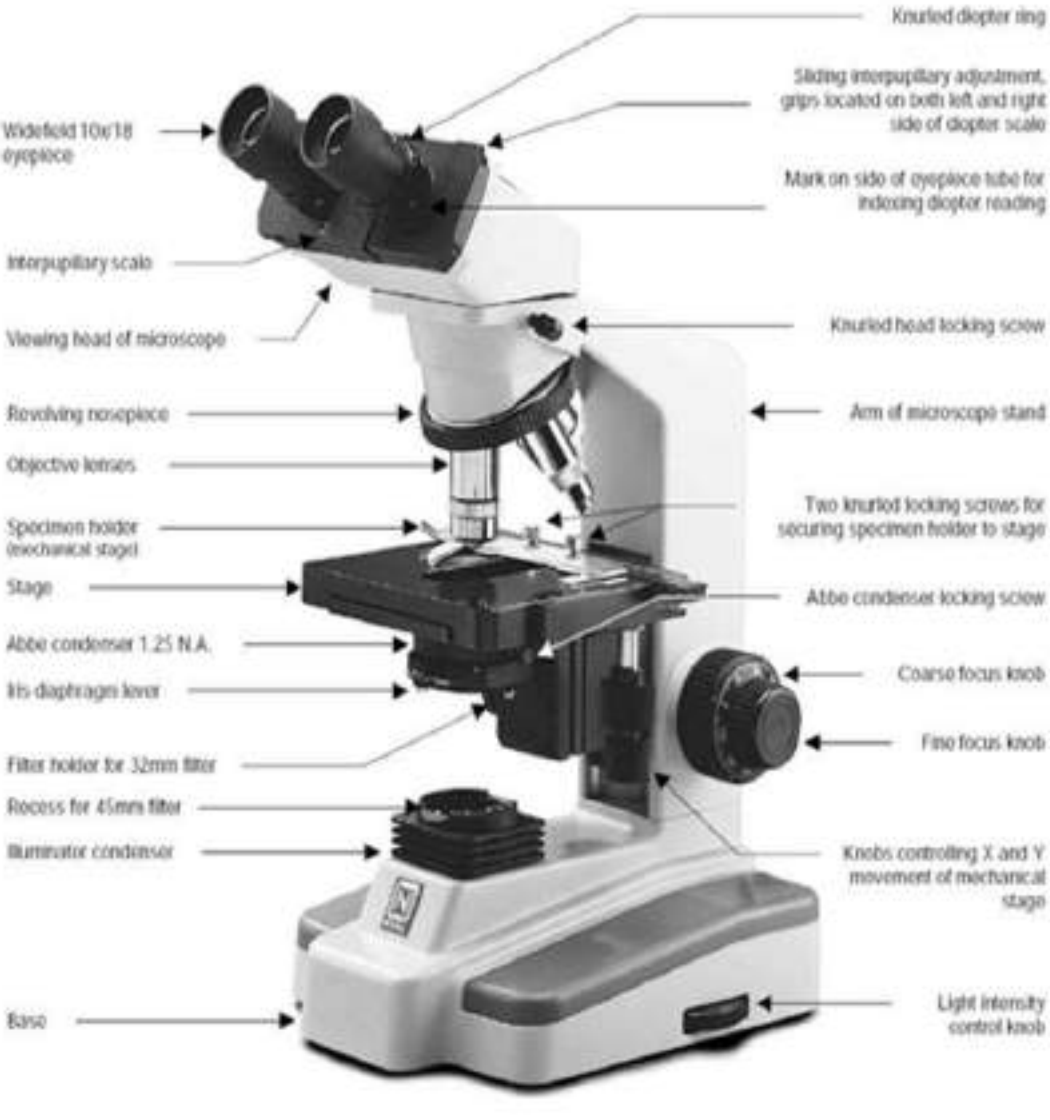
الكلية للجسم=العدسة العينية × العدسة الشيئية.

العلاقة بين قوة التكبير وقدرة الميزRelationship between Magnifying and Resolving powers: تقل قدرة الميز بزيادة قوة التكبير أي تتناسب عكسيا مع طول الموجه الضوئية لان صورة النموذج المتكونة هي صورة ناتجة عن انكسار الموجات الضوئية المارة عبر النموذج وكلما قصر طول الموجه الضوئية ازدادت إمكانية انحرافها عند اصطدامها بالأجسام الدقيقة مما يزيد من إمكانية رؤيتها وهذ يؤدي الى زيادة قدرة ميز المجهر. لكن الموجات الضوئية الطويلة لا تنحرف الا عند اصطدامها بالأجسام الكبيرة نسبيا وستمر بسهولة من خلال الاجسام الصغيرة مما يؤدي الى بقائها غير مرئية.

علما ان قدرة الميز لا تعتمد على طول الموجة الضوئية فقط وانما على مدى انحرافها فكلما ازداد بعد النموذج عن العدسة الشيئية قلت زاوية انحراف الموجات الضوئية وبالتالي ضعف قدرة الميز وكلما اقتربت العدسة الشيئية من

النموذج زادت زاوية الانحراف وبالتالي تحسن قدرة الميز.وبذلك تعرف قدرة الميز بأنها القدرة على تمييز شيئين صغيرين جداً ومتقاربين جداً على انهما جسمين منفصلين.

التباين Contrast: يمكن رؤية جسم ما تحت المجهر في حالة وجود تباين كاف بين الجسم والوسط المحيط به او بين الأجزاء المختلفة للجسم ويمكن تحسين تباين الصورة من خلال استخدام فتحة الحجاب Diaphragm.فضلا عن ذلك فان الخلايا والتراكيب الخلوية قد تحوي على صبغات طبيعية والتي تعطي تباين طبيعي يجعل من هذه التراكيب مرئية. ومن ناحية أخرى فان بعض الخلايا والاجزاء الأجزاء الخلوية تكون شبه شفافة لذلك احدى الطرائق المستخدمة في تحسين التباين في مثل هذه الحالة هو استخدام الصبغات التي تمتص الكمية الكافية من الضوء لإعطاء التباين.



شكل (2.1) أجزاء المجهر الضوئي المركب

قياس العينات المجهرية: يمكن معرفة حجم العينة من خلال استعمال المقياس العيني الدقيق (المايكرومتر العيني ocular micrometer) وهو عبارة عن قرص زجاجي صغير يحتوي على خطوط مقسمة بمسافات غير معروفة القيمة. يوضع المايكروميتر العيني داخل العدسة العينية للمجهر حيث يتم معايرتها مع مقياس المسرح الدقيق stage micrometer والذي يحتوي على خطوط ذات مسافات متساوية معروفة القيمة ولغرض معايرة المايكروميتر العيني تعتمد الطريقة التالية:

1. دور العدسة العينية الى ان تصبح خطوط المايكروميتر العيني موازية لخطوط مايكروميتر المسرح. حاول مطابقة الخطوط عند الحافة اليسرى للمايكروميتر العيني ومايكروميتر المسرح من خلال تحريك مايكروميتر المسرح.
2. احسب المسافة الحقيقية(بالمليمترات) بين خطوط المايكروميتر العيني من خلال ملاحظة عدد المسافات الموجودة في مايكرو ميتر المسرح والواقعة ضمن عدد معين من مسافات المايكروميتر العيني. ونظرا لكون أصغر مسافة على مايكروميتر المسرح تساوي 0.01 ملم لذا يمكنك معايرة المايكروميتر العيني كالاتي:

- ان عشر مسافات على المايكرو ميتر العيني تساوي تساوي المسافات (X) على مايكروميتر المسرح.
- بما ان أصغر مسافة على مايكرومتر المسرح تساوي 0.01 ملم لذا فأن عشرة مسافات على المايكروميتر العيني = المسافات (X) على مايكروميتر المسرح X 0.01 ملم.
- لذا فأن:

مسافة واحدة على المايكروميتر العيني = $\frac{\text{المسافات(X) على مايكروميتر المسرح X 0.01 ملم}}{10}$

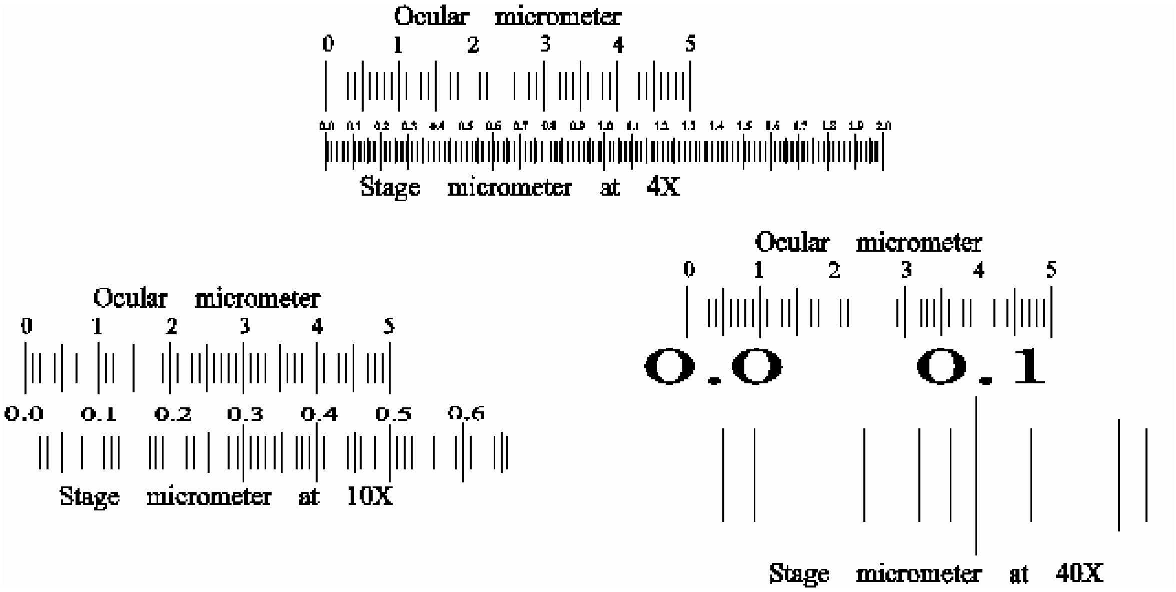
وبما ان الملمتر الواحد = 1000 مايكرومتر فأن:

مسافة واحدة على المايكروميتر العيني =$\frac{\text{(X) x 10 مايكروميتر}}{10}$

مثال:اذ كانت عشرة مسافات على المايكرو ميتر العيني تساوي ستة مسافات على مايكرو ميتر المسرح، لذا:

مسافة واحدة على المايكروميتر العيني (بالملم)= $\frac{\text{6 x 0,001 ملم}}{1}$ =0.006 ملم = 6 مايكروميتر

ملاحظة: الأرقام التي يتم الحصول عليها تمثل العدسة العينية والشيئية المستعملة في المجهر. وتتغير العدسة العينية او الشيئية في كل فترة لذا يجب معايرة المايكرو ميتر العيني.

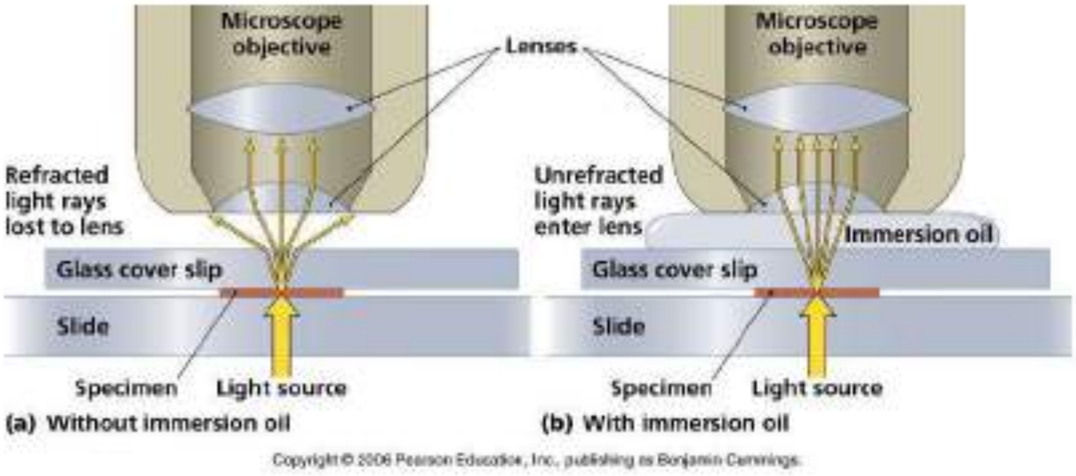


شكل (2.2) يوضح قياس العينات المجهرية

ملاحظة: لرؤية الفيديو التوضيحي عليك بزيارة الموقع التالي:

http://www.youtube.com/watch?v=ZqlJSEu0Eo4

استخدام الزيت في المجهر الضوئي (Oil immersion): يستخدم الزيت في بعض حالات الفحص المجهري والذي يوضع لملاء الفراغ بين العدسات الشيئية من جهة وبين غطاء الشريحة من جهة أخرى ويكون بذلك بدل الهواء، ويساعد بالحصول على فتحة عددية NA بالإضافة الى دقة وتألق ووضوح أكثر للصورة. الزيت المستخدم هنا لديه معامل انكسار 1.515 والزجاج لديه معامل انكسار 1.51، والتعامل مع العدسة الشيئية x 100 بوجود الزيت مشابه مع طريقة التعامل مع بقية العدسات والفرق الوحيد انه يجب التعامل بحذر أكثر وذلك لضيق المسافة بين العينة والعدسة الشيئية 100x على عكس بقية العدسات. وعند فحص العينات الدقيقة مثل البكتريا يفضل استخدام العدسة الشيئية 40x لتحديد مقع العينة ثم الفحص باستخدام العدسة 100x. شكل (2.3) يوضح عمل الـ Oil immersion



شكل (2.3) يوضح عمل الـ Oil immersion

طريقة العمل:

1. يتم تركيز العدسة العينية 40x على العينة المراد فحصها (أحيانا تستخدم العدسات الأصغر في قوة التكبير).
2. تبعد العدسة الشيئية 40xعن العينة لكن ليس الى الحد الذي تصل فيه العدسة الشيئية 100x.
3. تبقى الشريحة في مكانها على المسرح وتوضع كمية قليلة من الزيت فوق غطاء الشريحة (يمكن ايضاً استخدام قطرة من الماء) مع ملاحظة عدم وضع كمية زائدة من الزيت حتى لا ينسكب الزيت الفائض على المجهر الضوئي.
4. يتم الان وضع العدسة الشيئية 100xبحيث تلامس الزيت ولا تلامس غطاء الشريحة ويتم التركيز باستخدام المنظم الدقيق للحصول على أفضل صورة.يجب تنظيف العدسة الشيئية والشريحة من الزيت مباشرة بعد اكمال الفحص لان ترك الزيت لفترة يسبب جفافه وتكوين طبقة صلبة على العدسة والشريحة.

2.التعبيرعن المحاليل والتراكيز

المحلول عبارة عن خليط متجانس من مادتين أو أكثر لا يحدث بينهما تفاعل كيميائي، وتتأثر الذوبانية بالتغيرات في درجة الحرارة وبطبيعة المواد المكونة للمحلول والضغط، بالرغم من أن المؤثر الأخير ذو أهمية بالنسبة للغازات فقط. والمادة الموجودة بوفرة في المحلول تسمى المذيب **(solvent)** بينما الموجودة بنسبة أقل تسمى المذاب **(solute)**.

✓ **تصنيف المحاليل بناءً على حجم دقائق المادة المذابة**

عند وضع كمية من السكر في قليل من الماء ورج المخلوط فإن السكر يذوب، ولا يمكن فصله بالترشيح، ولا بترك المحلول ساكناً تحت تأثير الجاذبية الأرضية وعليه يكون حجم الدقائق (الجزيئات أو الأيونات) متناهية في الصغر ولا

يمكن فصلها ولا رؤيتها بالعين المجردة أو الميكروسكوب. يسمى مثل هذا النوع من المحاليل بالمحاليل الحقيقية (**True Solutions**).

أما إذا وضع مسحوق الطباشير في كمية من الماء ورج المخلوط فإننا نحصل على معلق من الطباشير في الماء، يمكن رؤية دقائقه إما بالعين المجردة أو الميكروسكوب. إذا ترك المخلوط ساكناً فإن دقائق الجسم الصلب المعلقة تتجمع بمرور الوقت في قاع الإناء تحت تأثير الجاذبية الأرضية وعليه يكون هذا المحلول مختلفاً من الحالة الأولى ويسمى هذا النوع من المحاليل بالعوالق أو المعلقات (المحاليل المعلقة) (**suspensions**).

بين هاتين الحالتين (محاليل حقيقية ومعلقات) توجد حالة ثالثة تسمى بالحالة **الغروية**، يكون حجم الجزيئات (الدقائق) فيها وسطاً.

✓ **طرائق التعبير عن التركيز:** هناك عدة طرائق للتعبير عن تركيز نذكر منها: -

1.المولارية (Molarity) (M) وهي وحدة التركيز الأكثر شيوعاً وتستخدم بكثرة في التحليل الحجمي، وتُعرف بأنها عدد مولات المادة المذابة في كمية من المذيب لتكوين لترٍ أو ديسيمتر مكعب من المحلول ويمكن توضيحها كالآتي:

$$\text{المولارية} = \frac{\text{عدد مولات المادة المذابة}}{\text{حجم المذيب باللتر (ديسم}^3\text{)}}$$

- وحدة المولارية هي مول / لتر أو مول / ديسم 3

مختبرياً تحضر المحاليل المولارية باستخدام الدوارق الحجمية وذلك بأخذ الكمية المناسبة من المادة المذابة ووضعها في الدورق الحجمي، ثم إضافة المذيب (وعادة ما يكون الماء) مع الرج المستمر حتى يصل مستوى المحلول العلامة الدالة على الحجم.

مثال (١): احسب مولارية محلول يتكون من إذابة 20 جرام هيدروكسيد الصوديوم في500 سم**3** من الماء؟

الحل:

$$\text{عدد مولات } NaOH = \frac{\text{الوزن}}{\text{الوزن ألجزيئي}} = \frac{20}{40} = 0.5 \text{ مول}$$

$$\text{حجم المذيب باللتر} = \frac{500}{1000} = 0.5$$

$$\text{المولارية} = \frac{\text{عدد مولات المادة المذابة}}{\text{الحجم باللتر}} = \frac{0.5}{0.5} = 1.0 \text{ مول / لتر}$$

سؤال: حضر محلول حجمه 200 مل من كلوريد الصوديوم (0.5 مولاري)؟

ج: المولارية$= \frac{1000}{\text{الحجم المطلوب}} \times \frac{\text{الوزن}}{\text{الوزن الجزيئي}}$

2.النسبة المئوية: يمكن التعبير عنها كالآتي:

اولاً: التعبير بوحدات الوزن / الحجم % (W /V %) لتحضير محلول تركيزه 1% لملح الطعام مثلاً يوضع 1 mg من الملح في 100 مل ماء مقطر.

س: حضر محلول حجمه 500 مل وتركيز nacl فيه 5%؟ الحل: 25 غرام من Nacl (كيف).

ثانيا: التعبير بوحدات الحجم / الحجم % (V /V %).

مثال: لتحضير محلول يتكون من (3:2:1 ethylene:chloroform:isoamyl alcohol) نضيف 3 احجام من المحلول الأول و2 من المحلول الثاني وحجم 1 من المحلول الثالث.

ثالثاً: التعبير بوحدات الوزن / الوزن % (W /W %)

- ✓ **تخفيف المحاليل** يهدف تخفيف المحاليل إلى التقليل من تركيزها المعلوم ويصاحب هذه العملية تغير في حجم المحلول النهائي. وتتم عملية التخفيف إما باستخدام الماء المقطر أو أي مذيب آخر أو أي محلول من نفس النوع أو أي محلول آخر.

نستخدم العلاقة التالية لحساب حجم المحلول المركز اللازم أخذه وتخفيفه إلى الحجم المطلوب.

(المحلول المخفف النهائي)$M_1V_1 = M_2V_2$ (المحلول المركز قبل التخفيف)

$$V_1 = \frac{M_2}{M_1}V_2$$

او بطريقة اخرى فمثلاً إذا اريد تحضير كحول تركيزه 40% من كحول تركيزه 90% فأن الفرق بين التركيزين يكون:

الفرق = 90 – 40 =50

أي انه 50 جزء من الماء المقطر هي الكمية المطلوب اضافتها الى 40 جزء من الكحول الاصلي الذي تركيزه 90% للحصول على كحول تركيزه 40%.

- ✓ **التركيز بوحدة عدد الأجزاء في المليون ppm:** وزن المادة المذابة بالملي غرام في كيلو غرام مذيب أو لتر مذيب. ويمكن أن نقول وزن المادة المذابة بالميكروغرام في غرام واحد مذيب أو مليلتر واحد مذيب.
- ✓ **التركيز بوحدة عدد الأجزاء في البليون ppb:** وزن المادة المذابة بالميكروغرام في كيلو غرام مذيب أو لتر مذيب.

أسئلة للمناقشة	
السؤال	**ما الغرض من تحضير بعض المحاليل بتراكيز اعلى من المطلوب بالتجربة؟**
السؤال	**لماذا يذكر الوزن الجزيئي وليس الوزن بالغرام عند وصف المواد الكيميائية المكونة لمحلول معين؟**
السؤال	**ما الفرق بين النسبة المئوية والمولارية عند وصف تراكيز المواد الكيميائية في محلول معين؟**
السؤال	**ما أهمية تحضير بعض المحاليل بدرجة pH معينة؟**

3.عمليات فصل عضيات ومكونات الخلية

Each organelle has characteristics **(size, shape and density** for example), which make it different from other organelles within the same cell. If the cell is broken open gently, each of its organelles can be subsequently isolated. The process of breaking open cells in an isotonic buffer is **homogenization** and the subsequent isolation of organelles is cellular

fractionation. Isolating the organelles requires the use of **physical chemistry techniques**, and those techniques can range from the use of **simple sieves, gravity sedimentation or differential precipitation, to ultracentrifugation of fluorescent-labeled organelles in computer generated density gradients.**

يجب اختيار النسيج الملائم عند فصل نوع معين من عضيات الخلية عن بقية أعضاء الخلية وتتم عملية فصل مكونات الخلية على ثلاث مراحل هي:

اولاً: مرحلة التجانس Homogenization: تتضمن إزالة التفاصيل المظهرية للخلية من حيث إزالة الغشاء البلازمي للخلية والجدار الخلوي بالنسبة للخلية النباتية. او هي هي عملية إزالة التفاصيل المظهرية والشكلية للخلية بحيث تتحول الى كتلة مشابهه للبروتوبلازم وتتم مرحلة التجانس من خلال:

1. تمزيق وتحطيم الغشاء البلازمي (مع جدار الخلية إذا كان النسيج نباتياً) وتحريره من العضيات.
2. المحافظة على التركيب المظهري والكيميائي لكل عضية.

وتتم عملية تمزيق وتحطيم الاغشية البلازمية (وجدران الخلية) باستخدام التقنيات التالية:

1. التقنيات الميكانيكية وتشمل (الهاون الخزفي mortar and pestle، المجس Homogenizer، جهاز الخلط الدوار Blender).
2. التقنيات الانزيمية هي التي يستخدم فيها انزيمات لتمزيق غشاء الخلية (اذكر امثلة؟).
3. تقنيات أخرى (الموجات فوق الصوتية، تجميد الخلايا ثم اذابتها).

ثانياً: مرحلة التجزئة والفصل Fractionation and Separation التي يتم فيها فصل عضيات الخلية ومكوناتها كلا على حدة. بعد ان يتم تمزيق الغشاء البلازمي للخلية باستخدام ثلاث أنواع من تقنيات الفصل (لماذا؟)

1. تقنيات الترسيب Centrifugation techniques
2. تقنيات الكروموتوكرافيا Chromatographic techniques
3. تقنيات الترحيل الكهربائي Electrophoretic techniques

ثالثاً: مرحلة فصل وتحليل المكونات: يتم فيها فحص وتحليل مكونات الخلية لمعرفة الطبيعة والنوعية والكمية العضيات ومكونات الخلية وأماكن انتشارها في الخلية. ومن هذه الطرائق:

1. تقنيات أطياف الامتصاص
2. تقنيات استعمال النظائر والمواد المشعة.

تستعمل أجهزة الطرد المركزي فائق السرعة في فصل مكونات وعضيات الخلية ويمثل الجدول ادناه السرعة اللازمة لعزل كل عضي من عضيات الخلية بوساطة الطرد المركزي.

جدول يوضح السرعة والوقت اللازم لعزل العضيات الخلوية

ت	العضي المراد عزله	السرعة اللازمة	الوقت اللازم
1	الانوية والخلايا غير المتجانسة	1000 دورة / دقيقة	20 دقيقة
2	المايتوكوندريا والكلوروبلاست	5000 دورة / دقيقة	20 دقيقة
3	الاجسام الدقيقة	10000 دورة / دقيقة	20 دقيقة
4	اللايسوسومات	50000 دورة / دقيقة	40 دقيقة
5	المايكروسومات	100000 دورة / دقيقة	
6	الرايبوسومات	120000 دورة / دقيقة	

مع العلم ان المعلومات المذكورة في الجدول أعلاه هي خطوات متسلسلة يتم الاحتفاظ بالراسب في كل خطوة وينقل الراشح الى الخطوة التالية.ويحتوي الراشح المتبقي بعد اخر خطوة على الشبكة الاندوبلازمية الحرة وبعض الياف الهيكل السايتوبلازمي.

Overview of cellular fractionation protocol

Liver

↓

Cut and Mince

↓

Homogenize

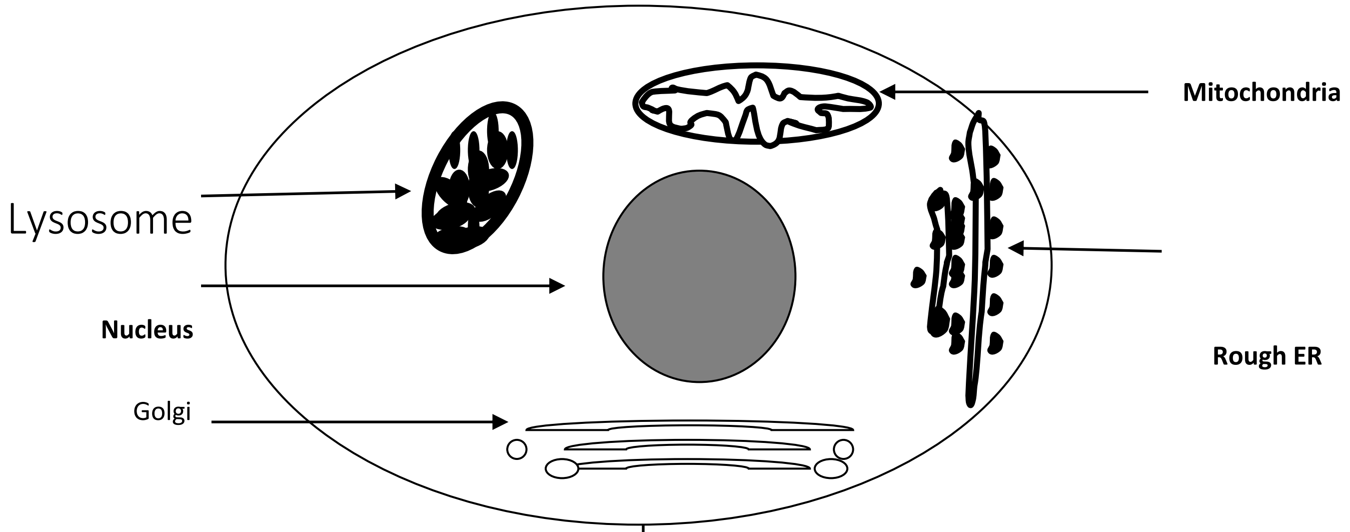
↓

Separation

↓

Take out aliquots and make slide (crude homogenate)

ALL MANIPULATIONS ON ICE!



↓

Low speed spin

Pellet (nucleus, intact cells) → **Resuspend** → **Wash and spin** → **Discard supernatant** → **Suspendnuclear pellet**

Supernatant (organelles of small diameter or low mass) → **Higher speed spin**

- **Pellet** → **resuspend** → **Mitochondria Of small diameter or low mass**
- **Supernatant** → **cytosol/organelles**

↓

Make aliquots and slides (organelle purity)

بعد الانتهاء من التجربة يمكن اجراء تجارب انزيمية للتأكد من النقاوة (**هل توجد طرائق أخرى للتأكد من العضيات المنفصلة؟**) ويوضح الجدول أدناه الانزيمات والبروتينات المرافقة لكل من المكونات والعضيات الخلوية وتعتبر ذات أهمية في التحري عن النتائج.

Organelle	Enzyme(s)
Nuclei	DNA, Histones, DNA polymerase
Mitochondria	Succinic dehydrogenase, Cytochrome oxidase
Lysosomes	Acid phosphatase, other acid hydrolases
Plasma Membranes	Acid phosphatase, other acid hydrolases
ER	Glucose-6-phosphatase, Nucleoside diphosphatase
Golgi	Glycosyl transferases

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	**اختلاف وتعدد طرائق تحطيم الخلايا؟**
السؤال الثاني	**اختلاف طرائق التحقق من وجود العضيات والمكونات المعزولة؟**
السؤال الثالث	**تتم عملية التجانس وبقية المراحل في درجة حرارة 4 م؟**
السؤال الربع	**ما العلاقة بين سرعة الترسيب وحجم العضيات؟**
السؤال الخامس	*Why do you think that the organelles obtained with this method are not pure? Can you suggest an additional or alternative method to better purify these organelles?*

4.الكشف عن مكونات جدار الخلية النباتية

جدار الخلية النباتية هو الغلاف الصلب الذي يحيط بالغشاء البلازمي للخلية النباتية من الخارج ويتراوح سمكه بين 1_3 مايكروميتر. ويتكون في المراحل الأخيرة من انقسام النواة في عملية الانقسام الخيطي Mitosis (اذكر الية تكون الجدار؟) ويتكون الجدار الخلوي من:

- الصفيحة الوسطية (يتكون من ....)
- الجدار الابتدائي (Primary wall)(يتكون من...)
- الجدار الثانوي (Secondary wall) (يتكون من....)

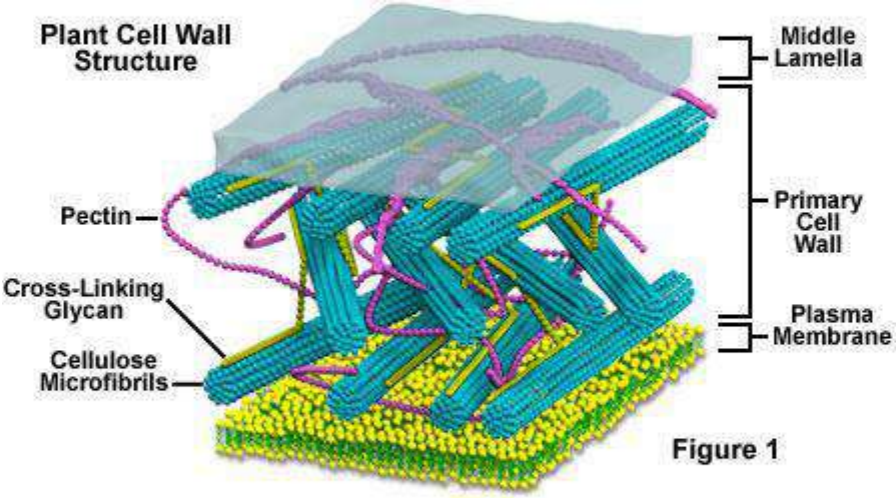


Figure 1

اولاً: ويتكون الجدار الخلوي من الهيكل السيليلوزي بشكل أساسي مع بعض المكونات الأخرى ويمكن الكشف عن المكونات بالطرائق التالية:

1. **السليلوز Cellulose**: يكون الهيكل الأساسي لجدران الخلايا وهو عبارة عن سلاسل طويلة من جزيئات سكر الكلوكوز، والسليلوز منفذ للماء والمواد الذائبة الأخرى.

يصطبغ باللون الأزرق عند معاملته باليود ثم بحامض الكبريتيك 65%. ويتم ذلك بوضع المقاطع في قطرة من محلول اليود الضعيف (0.03 غم يود+ 1.5 غم يوديد البوتاسيوم في 100 مل ماء مقطر) على شريحة زجاجية ثم ضع غطاء الشريحة لاحظ مواقع النشأ المتلون بالون الأزرق. بعد ذلك ضع قطرة من حامض الكبريتيك 75% عند احدى حافات الغطاء الزجاجي. لاحظ انتفاخ السليلوز وتلونه باللون الأزرق. اما اللون الأصفر فعند وجوده يدل على اللجنين.

2. **المواد البكينية Pectic Substance:** هي مواد تضم مادة البكتين وحامض البكتيك الذي يوجد في تركيب الجدار الاولي وفي الصفيحة الوسطى بشكل بكتات الكالسيوم والمغنيسيوم.

للكشف عن البكتين ضع بلورتين او ثلاث من صبغة احمر الروثينوم Ruthenium red في زجاجة ساعة ثم قطر عليها الماء المقطر الى ان يصبح لون المحلول وردياً محمر. اترك المقاطع في محلول الصبغة لمدة 30 دقيقة ثم اغسلها بالماء جيداً. انقلها الى الجليسرين (الغرض منه ثبات الصبغة) على شريحة زجاجية لاحظ تلون المواد البكتينية باللون الأحمر. ويمكن الكشف باستعمال صبغة ازرق المثلين التي ستصبغ هذه المواد بالون البنفسجي الا انها غير دقيقة للكشف مقارنة بصبغة احمر الروثنيوم.

3. **اشباه السيليلوز:Hemicellulose** هو مركب كاربوهيدراتي معقد مكون من خليط السكريات الخماسية والسداسية.

4. **اللكنين Lignin:** مجمعات من مركبات فينوليه توجد في الصفيحة الوسطى والجدار الاولي والجدار الثانوي للأوعية والعضيات الخشبية والخلايا السكلرنكيمية. وتتلون باللون الأصفر عند معاملتها بمحلول كبريتات الانيلين.او يمكن استخدام الطريقة التالية:

    أ- ضع مقطع عرضي من ساق نبات الطماطة او زهرة الشمس على شريحة زجاجية نظيفة.

    ب- اضف قطرة من phloroglucinol (يحضر من اذابة غرام واحد منه في 100م من محلول كحول مثيلي تركيزه 95%).

    ت- بعد تبخر ال phloroglucinol اضف قطرة من الهدروكلوريك المركز.

    ث- ضع غطاء الشريحة الزجاجية وافحص تحت المجهر لاحظ الانسجة الملكننة باللون الأحمر.

5. **السوبرين Subrin:** عبارة عن مادة شمعية، وهو غير منفذ للماء والغازات ويتلون باللون الأحمر عند المعاملة بصبغة سودان 3 (SdanIII).

6. **الكيوتين Cutin:** مادة شمعية غير منفذة للماء والغازات ويتلون باللون الأحمر عند المعاملة بصبغة سودان 3 (SdanIII).

للكشف عن السوبرين والكيوتين ضع المقاطع في محلول كحولي 70% مشبع بصبغة سودان 3 واتركها لمدة 20 دقيقة. بعد ذلك اغسلها بكحول 50% لإزالة الزائد من الصبغة ثم انقلها الى قطرة كليسيرين على شريحة زجاجية لاحظ تلون

السوبرين والكيوتين باللون الأحمر. وللتمييز بينهما وبين السليلوز استعمل قطرات من حامض الكبريتيك المركز الذي سيذيب السليلوز.

7. إضافة لمواد أخرى مثل السليكا والكايتين والجيلاتين والكالوس ومركبات التانين والراتنجات.

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	
المناقشة:	

الملاحظات:

ثانياً: عزل جدار الخلية النباتية

1. يتم سحق 60_70 ملغ من الانسجة النباتية الجافة او المجمدة سحقاً جيداُ مع كرات بحجم 5.5 ملم الاستيل المقاوم للصدئ بعد وضعها في انبوبة ابندورف حجم 2 مل وباستخدام جهاز الرجاج vortex.
2. يضاف 1.5 مل من الايثانول (70%) ويرج جيداً.
3. يطرد مركزيا على 10000 دورة لمدة 10 دقائق لترسيب المواد غير الذائبة بالكحول.
4. يتم التخلص من الرائق.
5. يضاف 1.5 من محلول كلوروفورم / ميثانول (1/1) الى الراسب ويمزج جيدا.
6. يطرد مركزيا على 10000 دورة لمدة 10 دقائق ويهمل الرائق.
7. يعاد تعليق الراسب ب 500 مايكرو ليتر من الاسيتون.
8. يتم تبخر المذيب بترك الانبوبة بدرجة حرارة 35 م حتى تجف.

   يمكن ترك حفظ العينات بدرجة حرارة الغرفة حتى استخدامها في التجارب اللاحقة.
9. لإزالة النشأ يتم تعليق الراسب ب 1.5 مل من محلول 0,1 مولاري خلات الصوديوم ذو اس هايدروجيني 5، توضع الانابيب بدرجة حرارة 80 م لمدة 20 دقيقة.
10. يبرد الرائق بالثلج ويضاف اليه المواد التالية: 35 مايكروليتر من 0,01 % من محلول أزيد الصوديوم و35 مايكروليتر من محلول الاميليز (50 مايكرو غرام / مل ماء مقطر) و17 مايكروليتر من البولونيز (18 وحدة) تغلق الانبوبة وتمزج جيداً.
11. توضع الانابيب في الحاضنة على درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. (توضع الانابيب بشكل افقي).
12. تسخن الانابيب الى 100 م ولمدة 10 دقائق لإكمال عملية الهضم.
13. يطرد مركزيا على 10000 دورة لمدة 10 دقائق، يبعد الرائق الحاوي على النشأ الذائب.
14. يغسل بقايا الراسب ثلاث مرات بإضافة 1.5 من الماء المقطر، ويرج ويطرد مركزيا ثم يبعد ماء الغسل منه.
15. يعلق الراسب ب 500 مايكرو ليتر من الاسيتون. ثم يتم تبخر المذيب بترك الانبوبة بدرجة حرارة 35 م حتى تجف. ويفضل أحيانا تحريك المكونات داخل الانبوبة باستخدام ملعقة صغيرة لضمان الجفاف بشكل جيد.
16. تمثل المواد الجافة هنا جدار الخلية والذي يعرف بهذه الحالة باسم Lignocellulose ويمكن حفظه بدرجة حرارة الغرفة لحين استخدامه لاحقا.

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:

اسم التجربة:

اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب:

1.
2.
3.
4.
5.

النتائج:

المناقشة:

الملاحظات:

Experiment: Plasmolysis in Plant Cells *(About 15 min.)*

Plant cells are surrounded by a rigid cell wall, composed primarily of the **glucose polymer, cellulose**. many plant cells have a large central vacuole surrounded by the vacuolar membrane. The vacuolar membrane is selectively permeable. Normally, the solute concentration within the cell's central vacuole is greater than that of the external environment. Consequently, water moves into the cell, creating **turgor pressure,** which presses the cytoplasm against the cell wall. Such cells are said to be **turgid.** Many nonwoody plants (like beans and peas) rely on turgor pressure to maintain their rigidity and erect stance. In this experiment, you will discover the effect of external solute concentration on the structure of plant cells.

MATERIALS

Per student:

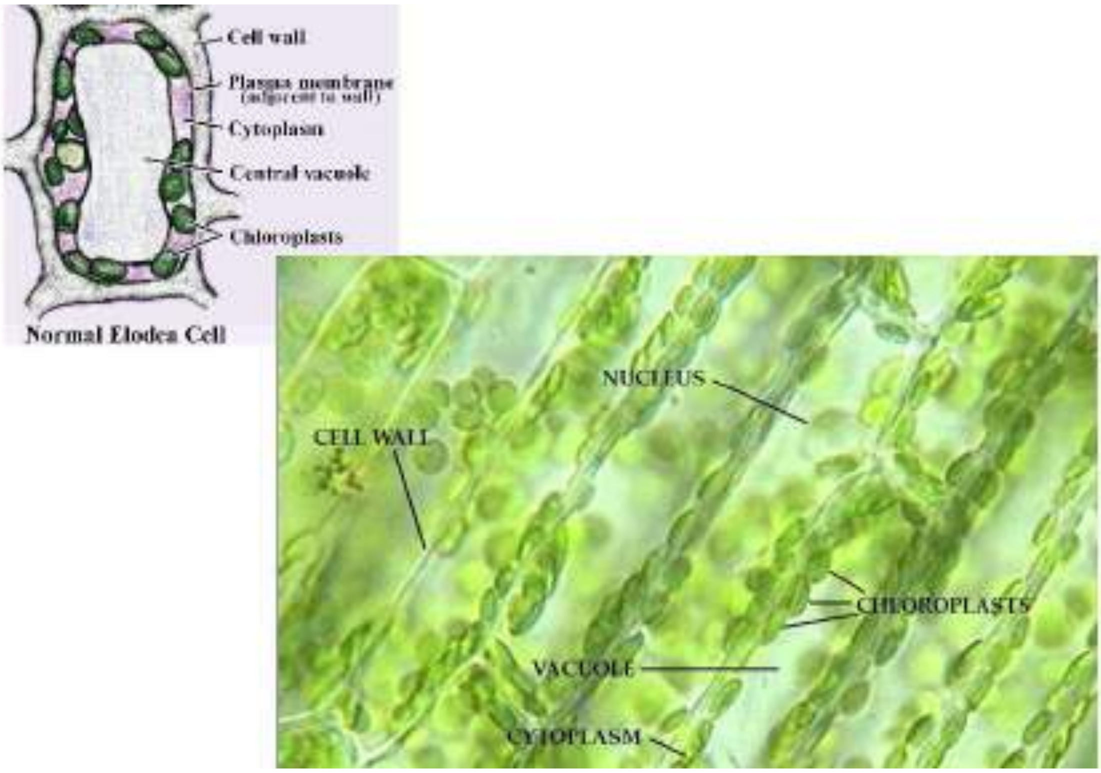
- ✓ **forceps**
- ✓ **2 microscope slides**
- ✓ **2 coverslips**
- ✓ **compound microscope**

Per student group (table):

- ✓ ***Elodea* in tap water**
- ✓ **2 dropping bottles of dH2O**
- ✓ **2 dropping bottles**

PROCEDURE

1. With a forceps, remove two young leaves from the tip of an *Elodea* plant.
2. Mount one leaf in a drop of distilled water on a microscope slide and the other in 20% NaCl solution on a second microscope slide.
3. Place coverslips over both leaves.
4. Observe the leaf in distilled water with the compound microscope. Focus first with the mediumpower objective and then switch to the high-dry objective.
5. Label the photomicrograph of turgid cells (Figure 7-3).
6. Now observe the leaf mounted in 20% NaCl solution. After several minutes, the cell will have lost water, causing it to become **plasmolyzed.** (This process is called **plasmolysis.**) Label the plasmolyzed cells shown in Figure.



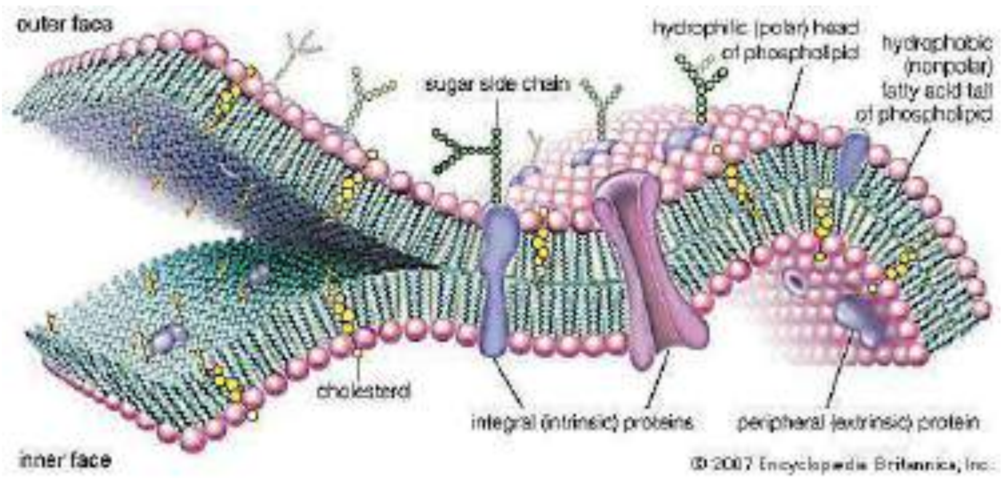
رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	
المناقشة:	
الملاحظات:	

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	وجود الجدار الابتدائي والجدار الثانوي؟
السؤال الثاني	ما الغاية العلمية من الكشف عن مكونات الجدار الخلوي؟
السؤال الثالث	ما الغاية العلمية من عزل الجدار الخلوي؟
السؤال الرابع	هل تختلف مكونات الجدار في الخلية حسب النسيج ولماذا؟
السؤال الخامس	قارن بين مكونات الخلية الحيوانية والنباتية؟

5.الكشف عن الغشاء البلازمى

Plasma Membrane Definition

The plasma membrane of a cell is a network of **lipids and proteins** that forms the **boundary** between a cell's contents and the outside of the cell. It is also simply called the cell membrane. The **main function** of the plasma membrane is to protect the cell from its surrounding environment. It is semi-permeable and regulates the materials that enter and exit the cell. The cells of all living things have plasma membranes.

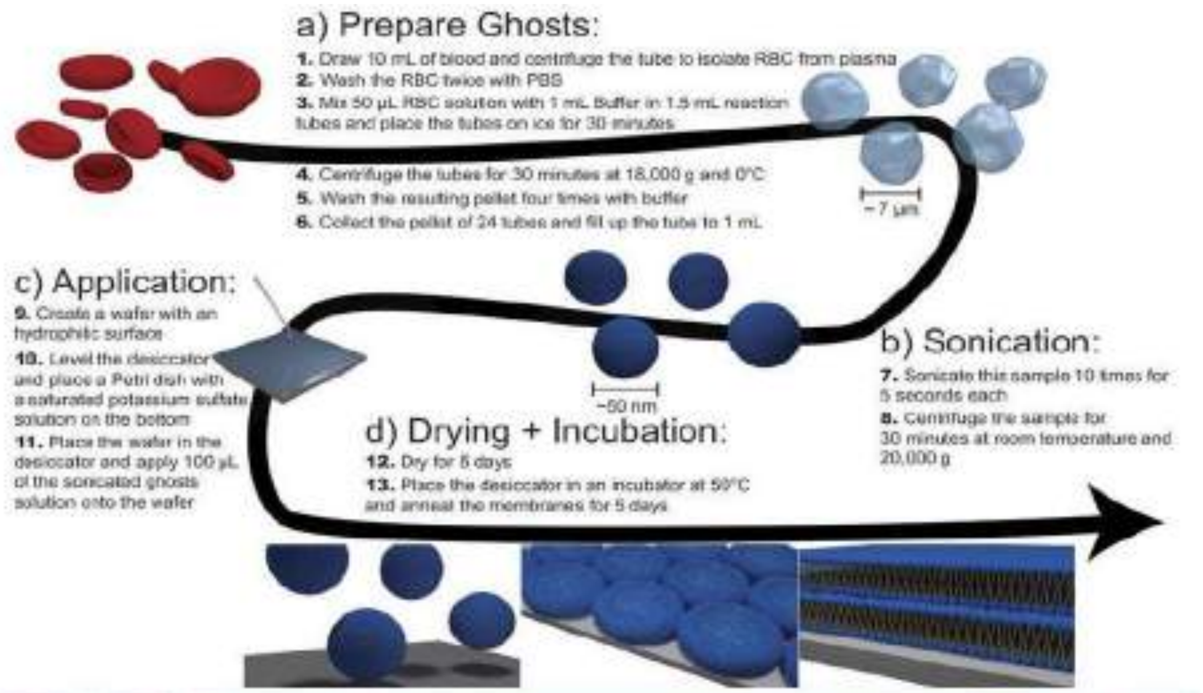


اغلب الدراسات على الغشاء البلازمي استعملت كريات الدم الحمر وذلك لسهولة الحصول عليها وبساطة محتوياتها ويتم الحصول على الغشاء البلازمي بوضع الكريات في محلول منخفض التركيز لتخرج بعدها محتويات الكرية الحمراء ويبقى ما يسمى بشبح الكرية الحمراء أي الغشاء البلازمي.

طريقة العمل:

1. يضاف 25 مل من محلول دارئ الفوسفات منخفض التوتر الى انبوبة طرد مركزي ذات حجم 50 مل وتحوي 5 مل من معلق كريات الدم الحمر، ثم تقلب الانبوبة لعدة مرات من اجل مزج المكونات.
2. تطرد الانابيب مركزياً لمدة 40 دقيقة وبسرعة 20000xg.
3. نلاحظ وجود راسب بلون احمر غامق وهو عبارة عن غشاء كريات الدم الحمر الفاقد لمحتوياته.
4. ترفع الطبقة العليا بعناية والتي تمثل سائل معلق بلون احمر مكون من الهيموغلوبين والمكونات السايتوبلازمية

5. يعاد تعليق الراسب مع المحلول الدارئ منخفض التوتر في انبوبة (25 مل) وتقلب بعناية ثم تطرد مركزيا بسرعة 20000 xg لمدة 20 دقيقة. تزال الطبقة العليا باستخدام ماصة باستور بعناية.
6. كرر الخطوة السابقة لاكثر من مرتين ولاحظ التغير في لون كل من الراسب والرائق.
7. بعد اخر غسل يتم إزالة أكبر كمية ممكنة من الرائق، ثم يعلق الراسب بمحلول الدارئ وبذلك نحصل على 2_4 مل من محلول الاغشية البلازمية المركز والذي يحفظ ب4 م. لحين للاستخدام في التجارب اللاحقة.



- تأثير المحاليل المختلفة على كريات الدم الحمر.
- طريقة العمل:

1. ضع ثلاث انابيب اختبار تحوي 2 مل من محاليل بالتراكيز التالية (ماء مقطر، محلول ملحي متعادل ذو تركيز 0,9 %، محلول ملحي ذو تركيز 5%).
2. وخز أصبع الابهام بعد التعقيم.
3. ضع قطرة من الدم على ثلاث شرائح زجاجية ثم أضف قطرة من المحلول الملحي على الشرائح الزجاجية بالتوالي.
4. امزج قطرة الدم لعدة ثواني ثم افردها بشريحة أخرى وافحصها تحت المجهر.
5. سجل النتائج وناقشها.

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	**ما أفضل نموذج لعزل الغشاء البلازمي ولماذا؟**
السؤال الثاني	**ما الغاية العلمية من الكشف عن مكونات الغشاء البلازمي؟**
السؤال الثالث	**هل تختلف مكونات الغشاء البلازمي (خصوصا البروتينات) في الخلية حسب النسيج ولماذا؟**
السؤال الرابع	**هل تتوقع اختلاف في تركيز الاغشية المعزولة ولماذا؟**

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:

اسم التجربة:

اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب:

1.
2.
3.
4.
5.

النتائج:

المناقشة:

الملاحظات:

6. الكشف عن النواة

النواة: هي إحدى أهم عضيات الخلايا حقيقية النوى ولا تتواجد في كاذبات النوى، تقوم نوى الخلايا بتنظيم التفاعلات الكيميائية الحيوية في الخلية كما تقوم بحفظ المعلومات الوراثية ضمن مورثات موجودة في المادة الصبغية الكروموسومات.في علم الأحياء الخلوي، تعد النواة عُضيًا موجوداً في جل الخلايا حقيقيات النوى، ويحتوي على الجزء الكبير من المادة الوراثية بالخلية. ولها وظيفتين أساسيتين: مراقبة التفاعلات الكيميائية بالهيولى (السيتوبلازم)، وتخزين المعلومات الضرورية لانقسام الخلية، ويتراوح قطرها ما بين 5 إلى 10 ميكرومتراً وبذلك يشكل أكبر عضي في الخلية.

1. Investigating animal cells

Cheek cells are epithelial cells that line the interior surface of our mouths. The base layer of cells in an epithelial structure are not actually cells, but a sticky layer on which the cells anchor. The other surface of the epithelial cell touches the outside world (like skin) or an open space (like the mouth). Because of their high rate of division, epithelial cells are found tightly packed together. When you stain your cheek cells, you should be able to distinguish between the nucleus, cytoplasm, cell membrane. **If you are very observant (and lucky) you may visualize the nucleolus and other organelles with in the cell**.

Procedure:

- Using a flat toothpick, very gently scrape the inside of your cheek to obtain cheek cells.
- Spread the cells on the end of the toothpick onto the microscope slide.
- Add 1 small drop of methylene blue to the sample. Methylene blue will stain the sample, allowing visualization of the nucleus, cytoplasm, and even some organelles. Note: methylene blue will stain your hands and clothing. Wear goggles, gloves and an apron.
- Place a cover slip on the sample. Press down on the coverslip and remove excess methylene blue with a paper towel.
- Using the scanning objective (4x), focus the specimen and locate cheek cells. Change the objective to low power, refocus on a few cheek cells.
- Finally, visualize your cheek cells at high power. At this point, you may need to reduce your light intensity and adjust the condenser aperture.

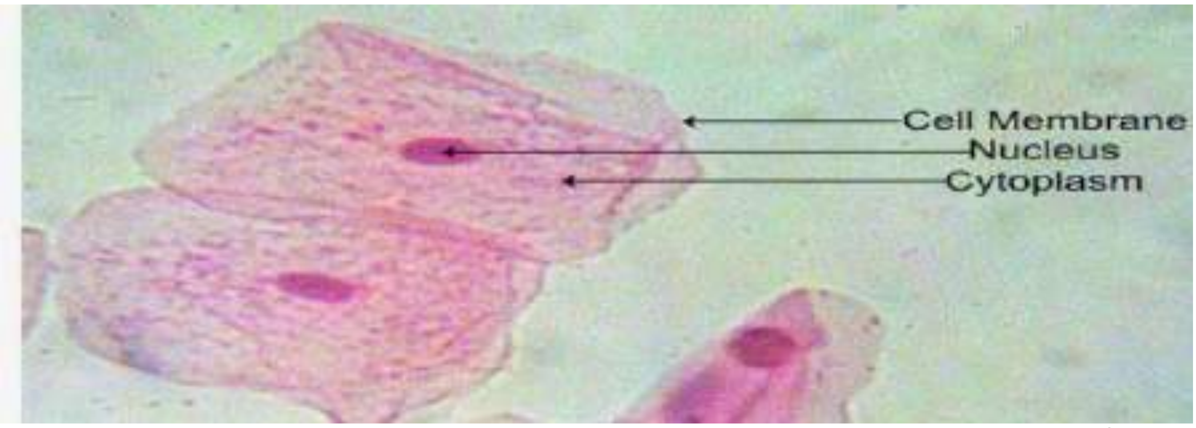


Figure. *Stained human cheek cells.* Using this very simple staining procedure, we can easily identify some of the basic structures of an animal cell. Nuclei appear as small, dark elliptical structures within the cell. If you can isolate a single cell, it will be easy to detect the boundary of the cell, the cell membrane. Between the cell membrane and nucleus is a fluid, known as the cytoplasm. Within the cytoplasm are several organelles. However, it is difficult to determine which organelles these are with this staining procedure.

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:

اسم التجربة:

اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب:

1.
2.
3.
4.
5.

النتائج:

المناقشة:

الملاحظات:

ثانياً: عزل الانوية:

مواد العمل:

- بذور النباتات (حنطة، شعير، بصل .الخ).
- اطباق بتري مع أوراق ترشيح.
- محلول المزج

- ✓ 1 M sucrose
- ✓ 50 mM Tris-HCl [pH 7.2].
- ✓ 5 mM $MgCl_2$.
- ✓ 5 mM KCl_2

طريقة العمل:

1. يتم الحصول على الأجزاء النباتية بعد تنمية البذور في طبق بتري بدرجة حرارة 20 م وتحفظ الانسجة النباتية بالثلج لمدة 1-2 ساعة لحد الاستخدام.
2. تعزل الانسجة المرستيمية من الانسجة النباتية المبردة وتقطع الى قطع صغيرة داخل طبق بتري باستخدام الة حادة وبظروف مبردة.
3. يضاف 10 ملم محلول المزج ويعاد تقطيع الانسجة المرستيمية.
4. تفصل الانوية عن بقايا المكونات الخلوية من خلال ترشيح الخليط الناتج عبر أربع طبقات من الشاش.
5. ترسب الانوية باستخدام جهاز الطرد المركزي على xg400 ولمدة 3 دقائق.
6. يتم إعادة تعليق الانوية بإضافة 10 مل من محلول المزج المبرد.
7. يضاف حجم مساو ذو تركيز 60% من الكليسيرول الى مزيج الانوية ويحفظ بدرجة حرارة -18 لحين الاستخدام.

ثانياً: رؤية النواة تحت المجهر الضوئي المركب ويتم ذلك من خلال فحص شرائح زجاجية جاهزة تحت المجهر الضوئية او تحضير وتصبيغ الأجزاء النباتية (سيتم الشرح بالتفصيل لاحقا في تجربة الانفسام الخيطي للانسجة النباتية).

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	**ما أفضل نموذج لرؤية النواة تحت المجهر الضوئي ولماذا؟ اذكر نموذج من كل من الانسان والنبات؟**
السؤال الثاني	**اختلاف طرائق عزل الانوية؟**
السؤال الثالث	**هل تتوقع اختلاف في تركيز الانوية المعزولة من نسيج معين عند إعادة التجربة؟**
السؤال الرابع	**ما الغاية العلمية من عزل الانوية من خلايا نسيج معين؟**

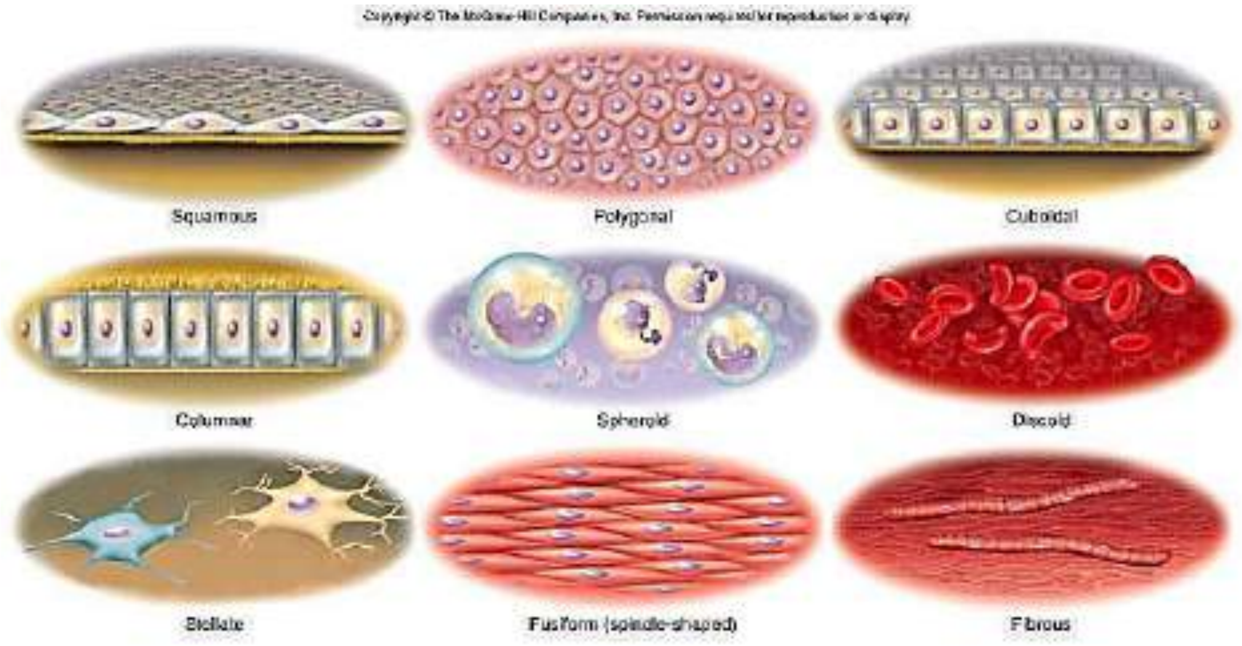
رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	
المناقشة:	
الملاحظات:	

7.اشكال الخلايا

تختلف الخلايا في الكائنات الحية من حيث الشكل والحجم بما يتلاءم مع وظائفها فخلايا الجلد متناهية الصغر (لتقوم بوظيفة الحماية على أكمل وجه). والخلايا العصبية طويلة ومتفرعة (لتقوم بنقل السيال العصبي داخل الجسم بأسرع ما يمكن). كذلك الحال ينطبق على الخلايا النباتية المختلفة.

امثلة على اشكال الخلايا:

1. متغايرة الشكل مثل الاميبا
2. قرصية الشكل مثل خلايا كريات الدم الحمر
3. بيضوية الشكل مثل خلايا البيضة
4. متفرعة الشكل مثل الخلايا العصبية
5. متطاولة الشكل مثل xylem vessel
6. مسطحة الشكل مثل طبقة الخلايا السطحية لأوراق النباتات
7. مكعبة الشكل مثل خلايا الكبد
8. مغزلية الشكل مثل الخلايا الملساء
9. عمودية الشكل مثل الخلايا الطلائية في الامعاء



أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	ما سبب اختلاف اشكال الخلايا؟
السؤال الثاني	هل هناك علاقة بين تطور الكائن الحي وتعدد اشكال الخلايا ولماذا؟
السؤال الثالث	هل دائما تتشابه جميع خلايا النسيج بالشكل ولماذا مع الامثلة؟
السؤال الرابع	ما الذي يحدد شكل الخلية؟

8.البلورات وانواعها

البلورات Crystals: توجد في العديد من الخلايا النباتية وتتركب عادة من املاح الكالسيوم (اوكزالات الكالسيوم وكاربونات الكالسيوم) وبالرغم من تعدد اشكالها الا انها جميعاً تنشأ من بلورة مفردة سرعان ما تتجمع حولها عدد من البلورات لتعطي شكلاً معيناً. ومن اشكال البلورات:

1-**البلورات الموشورية Prismatic crystals**: تكون على شكل موشور prism او هرم pyramid ويمكن ملاحظتها في **اوراق البرتقال** وفي الاوراق الحرشفية **لنبات البصل**(Allium cepa (onion . ونبات الثوم.

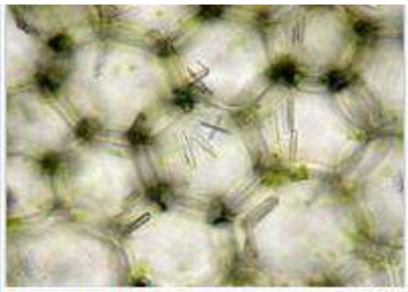
2-البلورات النجمية Druses : هي تجمعات شبه كروية لبلورات موشوريه او هرمية ويمكن ملاحظتها في النسيج المتوسط لنبات **الدفلة**Nirium و**الصفصاف**Salix .

3-البلورات الابرية Raphides: هي بلورات نحيفة وطويلة مدببة النهايات تتجمع عادة على شكل حزم ويغلب وجودها في نباتات ذوات الفلقة الواحدة ويمكن ملاحظة البلورات الابرية في اوراق نبات **العنب**Vitis.

4.الحويصلة الحجرية او البلورة المعلقة Cystolith : تتركب من كاربونات الكالسيوم ، تتكون نتيجة نمو داخلي لجدار الخلية تترسب عليه مادة كاربونات الكالسيوم ، تتألف البلورة المعلقة من عنقstalk سليلوزي يتدلى منه جسم البلورة ، تسمى الخلية الحاوية على البلورة المعلقة بالخلية الحجرية Lithocyte او كيس الحويصلة الحجرية Lithocyst وتكون اكبر حجماً من الخلايا التي حولها. كما في نبات **التين**.

طريقة العمل:

ويمكن الكشف عن البلورات بوضع قطعا من نسيج طري (جذر البصل ودرنات نبات داليا)في كحول 70% لمدة 2_4 أيام. خذ جزء صغير من هذه القطع على شريحة زجاجية ويوضع عليه غطاء الشريحة ويفحص تحت المجهر. لاحظ طبقات البلورات. أضف للمقطع قطرة من محلول Chloral hydrate(خمس أجزاء من الهايدريت hydrate الى جزئيين من الماء) أضف بعد ذلك قطرة من محلول الثايمول في الكحول (15%) وقطرة من حامض الكبريتيك المركز. ستلون البلورات بلون احمر أرجواني او احمر الكارمين.



Raphides in *Hypoestes phyllostachya*, the polka dot plant

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	ما سبب تكون البلورات؟
السؤال الثاني	هل يمكن ان نرى البلورات في الخلايا باي عمر كانت ولماذا؟
السؤال الثالث	اختلاف اشكال البلورات؟

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	
المناقشة:	
الملاحظات:	

9.البلاستيدات وانواعها

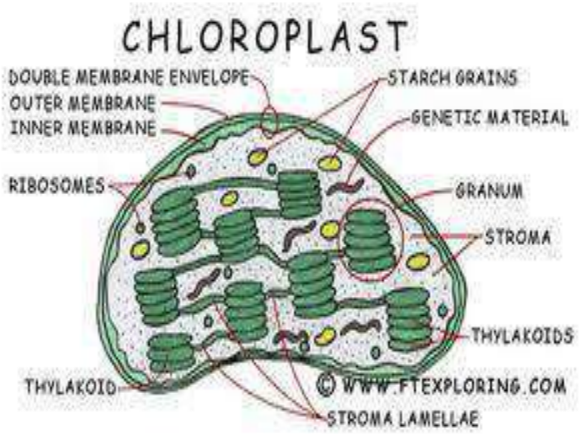
عبارة عن عضيات سايتوبلازمية حية كبيرة الحجم واضحة المعالم بالمجهر الضوئي. ويختلف عدد البلاستيدات في الخلية حسب نوعها. وفي النباتات الراقية تختلف البلاستيدات من حيث الشكل والتركيب والوظيفة ويتراوح معدل طولها بين 1_10 مايكرو ميتر.

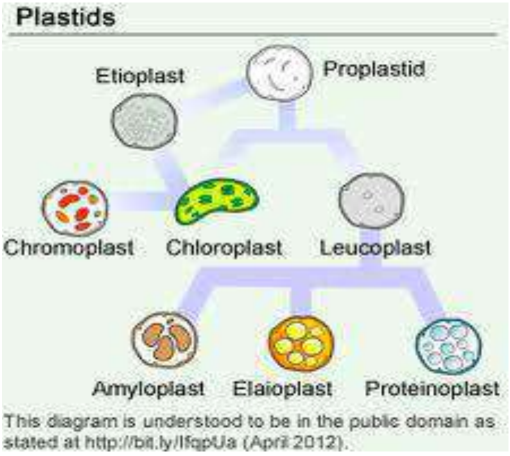
1.البلاستيدات عديمة اللون Leucoplasts : وتشمل

- البلاستيدات الأولية Proplasts:
- البلاستيدات البيض Etioplasts:
- البلاستيدات الخازنة للنشأ Amyloplasts:
- البلاستيدات الخازنة للدهون Elaioplasts:
- البلاستيدات الخازنة للبروتين Proteinplasts (or Aleuroneplasts):

2. البلاستيدات الملونة Chromoplast:

3.البلاستيدات الخضر Chloroplasts: هي البلاستيدات التي تحوي في تركيبها على صبغات الكروفيل ويختلف شكل وحجم البلاستيدة الخضراء حسب نوع النبات كذلك للعامل الوراثي تأثير على حجم البلاستيدة الخضراء (اذكر امثلة؟).





الجزء العملي:

اولاً: سوف نقوم بدراسة مثال على كل من انواع البلاستيدات بحسب احتوائها على الصبغة الضوئية ام لا.

- **البلاستيدات عديمة اللون LEUCOPLAST**: خذ جزء صغير من ثمار البطاطا واكشط قليلا من اللب الداخلي او الوسطي واستمر بالكشط بدقة حتى تحصل على جزء رقيق جدا خذ جزء صغير من الجزء الرقيق وانقله إلى شريحة نظيفة. ضع قطرة ماء والغطاء وافحص تحت القوة×10 وارسم ما تشاهده.

لاحظ: شكل البلاستيدات عديمة اللون.

- **البلاستيدات الملونة Chromoplast**: خذ جزء صغير من ثمار الطماطم واكشط قليلا من اللب الداخلي او الوسطي، ضع السائل على شريحة نظيفة وضع عليه قطرة الماء غط الشريحة وافحص تحت القوة×10 وارسم ما تشاهده.

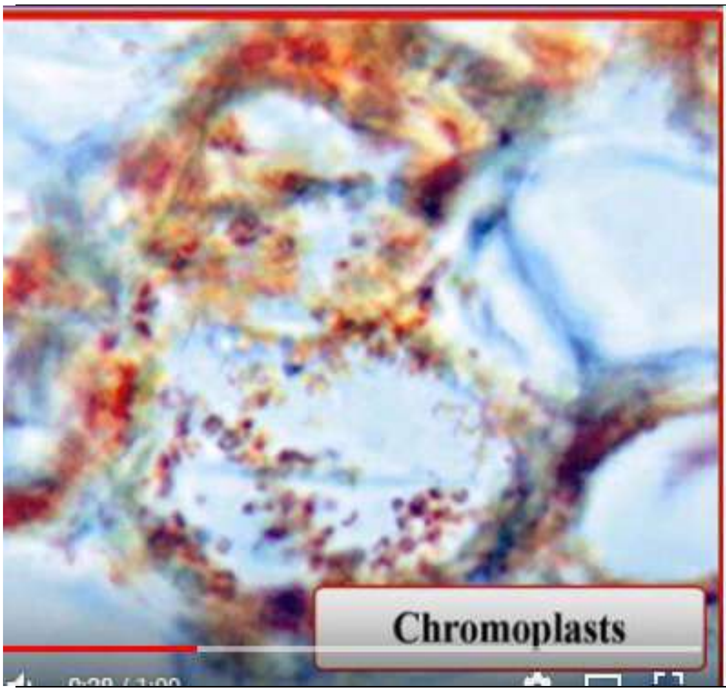
لاحظ: البلاستيدات الملونة وشكلها العصوي وأشكال أخرى.

- **البلاستيدات الخضراء: CHLOROPLAST**

1.خذ شريحة رقيقة من الفلفل الاخضر او خذ ورقة حشائش خضراء وإبداء بكشطها من أحد الوجهين. واستمر بالكشط بدقة حتى تحصل على جزء رقيق جدا بالإضافة إلى أحد البشرتين. خذ جزء صغير من الجزء الرقيق وانقله إلى شريحة نظيفة. ضع قطرة ماء والغطاء وافحص تحت القوة×10 وارسم ما تشاهده.

لاحظ: -شكل البلاستيدات الخضراء القرصية.

2.يمكن رؤية البلاستيدات الخضر بشكل مباشر وذلك بوضع ورقة من نبات Elodea على الشريحة وتوضع فوقها قطرة ماء ثم تغطى بغطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر. لماذا نبات اليلوديا؟



رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	

المناقشة:

الملاحظات:

ثانياً: عزل البلاستيدات الخضر من نبات السبانغ:

المواد:

- أوراق السبانغ الخضراء.
- محلول السحق (الهرس) ويتكون من:

- 0.33 M Sorbitol
- 10 mM Sodium pyrophosphate ($Na_4P_2O_7$)
- 4 mM MgCl2
- 2 mM Ascorbic Acid
- Adjust pH to 6.5 with HCl

- لوحة تقطيع وسكين (Chopping board and knife)
- هاون خزفي مع راس سحق (Chilled mortar and pestle)
- قطعة قماش (شاش) (Cheesecloth)
- جهاز طرد مركزي تحضيري مبرد (Refrigerated preparative centrifuge)
- شريحة لعد كريات الدم ومجهر ضوئي (Hemacytometer and microscope)

طريقة العمل:

1. قم بتحضير حمام ثلجي وقم بتبريد كل الزجاجيات التي ستستعملها.
2. اختر عدد من أوراق السبانغ وازل العروق الكبيرة منها وقم بوزن 4 غم من انسجة الأوراق الخالية من العروق.
3. قم بتقطيع الأوراق الى اقصى ما يمكن من القطع الصغيرة واضف الانسجة الى هاون خزفي يحتوي على 15 مل من محلول الهرس وقم بالهرس حتى تحصل على عجينة طرية.

4. قم بترشيح المهروس بقطعة ثنائية الطبقة من الشاش للحصول على العالق.
5. ننقل المعلق الأخضر الى انبوبة طرد مركزي 50 مل مبردة وتطرد الانابيب عند 200 xg لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة 4 م° لجمع الخلايا غير المتكسرة وقطع النسيج.
6. افصل الرائق وقم بطرد مركزي بسرعة 1000 xg لمدة 7 دقائق،ان الراسب المتكون بهذه الخطوة يحتوي على البلاستيدات الخضر .
7. نتخلص من الرائق ونعيد تعليق الراسب في 5 مل من محلول التعليق المبرد (0.035 مولاري من (Nacl)استخدم قضيب زجاجي لتفريق الراسب المتجمع الذي سيستخدم في التجارب اللاحقة .
8. غلف الانبوبة بقطعة من ورق الالمنيوم وضعة في حافظة ثلج.
9. قم بتقدير عدد البلاستيدات الخضر لكل ملل من المعلق باستخدام شريحة حساب خلايا الدم.

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	**ما سبب اختلاف اشكال البلاستيدات؟**
السؤال الثاني	**هل يختلف عدد وحجم ونوع البلاستيدات من حيث عمر ونوع الخلية ولماذا؟**
السؤال الثالث	**على ماذا يعطي مؤشر اختلاف تركيز البلاستيدات الخضر بين الخلايا؟**
السؤال الرابع	**هل تختلف تراكيز البلاستيدات المعزولة من نفس النسيج عند استخدام طرائق عمل مختلفة؟**

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: .1 .2 .3 .4 .5	
النتائج:	

المناقشة:

الملاحظات:

10.الكشف عن المايتوكوندريا

تعد المايتوكوندريا من اهم عضيات الخلية بعد النواة(لماذا؟)، ويتراوح عددها ما بين واحدة في الطحلب الأخضر وعدة مئات من الألوف في الاميبا العملاقة وقد تنعدم في بعض الخلايا (مثل...). تتخذ المايتوكوندريا اشكال مختلفة فيمكن عدها متعددة الاشكال.ويوضح الشكل ادناه الشكل العام للمايتوكوندريا.

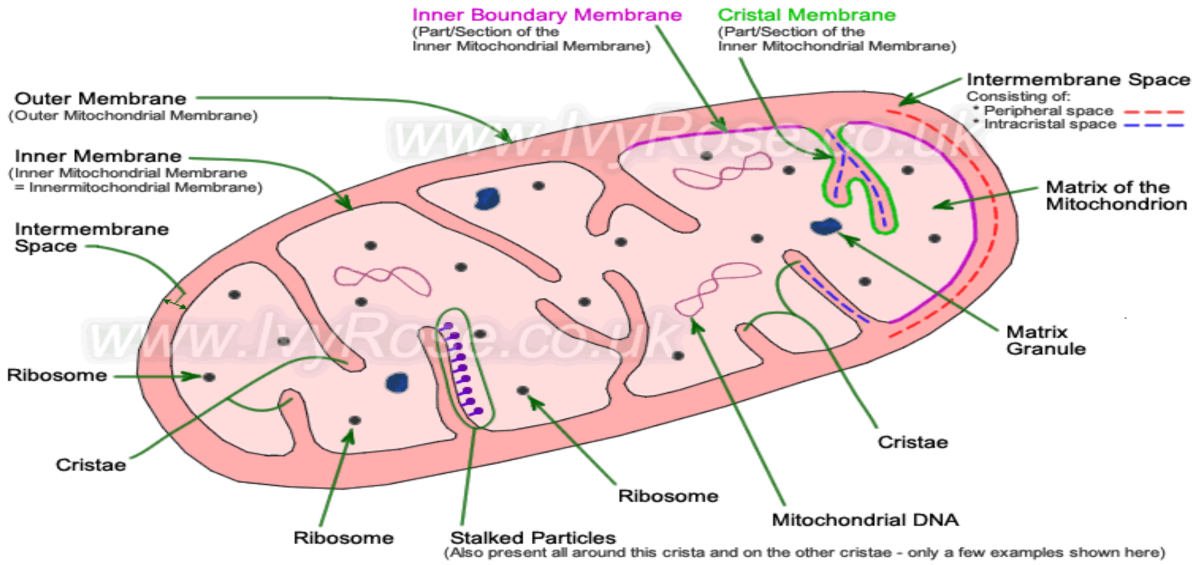


Diagram of a Mitochondrion: Copyright IvyRose Ltd., 2012.

ويمكن الكشف عن المايتوكوندريا بعزلها عن مكونات الخلية (ذكرت سابقاً) وايضاُ يمكن ايضاً صبغ المايتوكوندريا(في الخلية النباتية) لفحصها تحت المجهر حسب الخطوات التالية:

1. تثبيت العينات في المحلول الاتي الذي يجب ان يحضر قبل التجربة بيوم واحد على الأقل.

ثنائي كرومات النحاسيك cupric biochromate	5 غم
أوكسيد النحاسيك cupric oxide	1 غم
حامض الخليك(10%)	1 مل
ماء مقطر	100 مل

وتستغرق مدة التثبيت 36 ساعة الى ستة أيام.

2. تغمس العينات مرتين بالكحول 70% لمدة نصف ساعة.
3. تنكز بتراكيز بدأ بكحول 80%،90%،95%،100% للتخلص من الماء.
4. تروق وتطمر بالبارافين.
5. يزال البرافين وتميأ المقاطع بالتمرير بالتراكيز التالية من الكحول 80,90,95,100%.
6. تصبغ المقاطع بصبغة الهيماتوكسلين الحديدي.
7. تغسل الشرائح بالماء ثم تنكز وتروق وتحمل

Isolation of Mitochondria

Materials

- Rat, mouse or suitable source of fresh liver
- 0.25 M sucrose in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 (Homogenization buffer)
- 0.25 M sucrose in 10 mM HEPES, pH 7.5 + 1 mM EDTA (Suspension buffer)
- Teflon homogenizer
- Refrigerated centrifuge
- Janus Green B
- Hemacytometer and microscope

Procedure

1. Sacrifice and exsanguinate a rat that has not been fed for at least 24 hours prior to lab.
2. Remove the liver and weigh it.
3. Add the liver to a beaker, and for each gram of liver, add 9.0 ml of 0.25 M sucrose in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5. This will produce a 10% brei, a term used to indicate a homogenized suspension.
4. Add the brei to centrifuge tubes and centrifuge at 4,500 xg for 10 minutes at 4° C.
5. Decant the supernatant into clean centrifuge tubes and discard the pellet.
6. Recentrifuge the supernatant at 16,000 xg for 25 minutes at 4° C.
7. Decant and discard the supernatant. Resuspend the pelleted mitochondria in 20 ml of 0.25 M sucrose in 10 mM HEPES. Skip to step 10.

OR

Optional: *if cleaner mitochondria are desired, resuspend in 20 ml of 0.25 M sucrose in 10 mM HEPES + 1 mM EDTA and perform steps 8 and 9.*

8. Recentrifuge the suspended pellet at 16,000 xg for 25 minutes at 4° C.
9. Decant and discard the supernatant. Resuspend the washed pellet in 20 ml of fresh sucrose without EDTA and place the suspension in an ice bath until further use is required. The suspension will remain active for approximately 4-6 hours if kept cold.
10. Mix a few drops of Janus Green B solution with 0.1 ml of mitochondrial suspension. Place one drop of this mixture in a hemocytometer and determine the number of mitochondria per ml. If there are too many mitochondria to count, make serial dilutions of 1/10 to 1/1000 and recount. *Diluted mitochondria must be counted rapidly.They are not stable and will decompose if not counted within a few minutes of the dilution.*

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	ما سبب تفضيل بعض الانسجة على غيرها لعزل المايتوكوندريا؟
السؤال الثاني	لماذا لاتحوي كريات الدم الناضجة على المايتوكوندريا؟
السؤال الثالث	عمليات عزل المايتوكوندريا يجب ان تتم بدرجة حرارة منخفضة؟

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: .1 .2 .3 .4 .5	
النتائج:	

المناقشة:

الملاحظات:

11.القتل والتثبيت والتصبيغ

في الدراسات السايتولوجية لا يمكن فحص التراكيب التي يتكون منها جسم الكائن كحجم وشكل الخلايا وعدد الخلايا مثلاً ومعرفة الأجزاء والعضيات الخلوية مثل المايتوكوندرياوالبلاستيدات وغيرها الا بعد ان تكون شفافة يسهل على الضوء اختراقها او ان تكون ذات ألوان تميز جزء عن جزء اخر.وتعتبر الانسجة المرستيمية مثل القمم النامية للجذور وبراعم الأوراق والانسجة الجنينية في الحيوان أفضل المواد لدراسة الانقسام الميتوزيMitosis.بينما تعتبر الخلايا البوغية الامية في الذرة والقمح والشعير وكذلك الخصى من أفضل المواد لدراسة الانقسام الميوزي Meiosis.

ويقصد بالقتل(Killing) الانهاء الفجائي والمستديم للحياة، للكائن الحي بأكمله او نسيج او خلايا مفردة. وفي الحيوانات الكبيرة نستخدم بعض المخدرات لهذا الغرض مثل (الكلوروفورم ،إيثر، كحول مخفف ،نيكوتين).

وتعرف عملية التثبيت(Fixation) هي الحالة التي تحفظ بها بقدر الإمكان جميع محتويات الخلايا وتركيبها وعلاقتها النسبية ببعضها كما كانت عليه في الحياة. ويجب ان تتوفر في المثبت الخصائص التالية:

1. ان يخترق جميع أجزاء النسيج بأسرع وقت.
2. لا يسمح بتقليص او تمدد النسيج.
3. ان يجعل أجزاء النسيج المختلفة غير قابلة للذوبان.
4. ان يساعد النسيج على اخذ الصبغات بسهولة.

وعمليات القتل والتثبيت اما ان تتم كيميائياً او بالتجميد

امثلة على بعض المثبتات الكيميائية:

1.محلول كارنوي او محلول فارمر Carnoy solution or Farmer solution

يتكون**من** Glacial acetic acid + Ethanol (95-100%) 1:3

ويستخدم في حالة تثبيت الجذور وحبوب اللقاح ويجب تحضيره قبل الاستعمال مباشرة وتحفظ فيه المواد لمدة 24 ساعة.

2.محلول كارنوي 2 Carnoy solution

يتكونمن 6: 1:3 Glacial acetic acid +Chloroform+ Ethanol (95-100%)

ويستخدم لدراسة كروموسومات القمح.

3.محلول حامض البروبيونك والكحول

يتكون من Propionic acid + Ethanol (95-100%) 1:3

4.الفورمالين

يتألف**10** جزء من فورمالين(الفورمالين التجاري عبارة عن 40% من الفورمالدهايديذاب في الماء) +**90** جزء ماء مقطر.ويعتبر ايضاً مادة خزن او حفظ وقبل الصبغ تغسل الانسجة بالكحول.

5.محلول Erlikh fluid (Zirkles modification)

- يتركب من بيكربونات البوتاسيوم (1.25 mg)
- بيكربونات الالمنيوم (1.25 mg)
- كبريتات النحاس (1 mg)
- ماء مقطر 200 مل

6.حامض الخليك Acidic acid

يساعد على التفريق بين أجزاء النسيج لكنه قد يتلف بعض التراكيب السايتوبلازمية كالمواد الدهنية والمايتوكوندريا واجسام كولجي.لذا قد يستعمل حامض الفورمك بدلا منه.

7.الكحول Alcohol

يستعمل الكحول كمثبت إذا كان تركيزه عالي من 70 الى 80 %. وبعد عملية التثبيت تأتي عملية التصلب Hardening وتتم هذه العملية بعد وضع الانسجة في المثبتات حسب الوقت المقدر لها ثم توضع في كحول 70% لمدة 24 ساعة او بضع أيام.

وإذا اريد خزن النسيج لمدة طويلة يبدل الكحول بكحول جديد تركيزه 70% (لماذا؟).

- **التثبيت بالتجميد**

معظم الدراسات السيتو كيميائية والهستو كيميائية لا يمكن اجراؤها على انسجة مثبتة كيميائيا والسبب في ذلك ان هذه الدراسات تهدف الى العثور على وتحديد مكان مواد معينة في الخلية اذ ان التثبيت الكيميائي وعمليات إزالة الماء تغير من حالة الخلية فالبروتينات يحدث لها تغير والانزيمات تفقد نشاطها.كذلك لا يمكن دراسة توزيع وانتقال المواد القابلة للذوبان. لذا يتم الاعتماد على طرائق التثبيت بالتجميد ومنها:

1.التجميد والاحلال Freeze _substitution

2.التجميد والتجفيف Freeze_drying

وفي كلتا الطريقتين الخطوة الأولى هي تجميد النسيج بسرعة بدرجة حرارة مقاربة للنتروجين السائل اما الخطوة الثانية هي عملية إزالة الماء وتختلف بين الطريقتين:

ففي الطريقة الأولى يذاب الثلج بالكحول البارد، اما الطريقة الثانية فيزال الثلج بالتبخير بدرجة حرارة منخفضة في الفراغ.

التصبيغ: تستعمل الاصباغ لإيجاد اختلافات بين مكونات الانسجة وكذلك بين مكونات الخلية بالنسبة لقدرتها على نفاذية او امتصاص الضوء. وتتكون الصبغات من املاح تتركب من شق حامضي وشق قاعدي حسب الشق المتلون فيها وبذلك تقسم الصبغات الى:

- **اصباغ حامضية:** هي الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية ملونة تتحد مع قاعدة غير ملونة هذه القاعدة قد تكون من الصوديوم او البوتاسيوم وتذاب هذه الصبغات في الماء او الكحول اوكلاهما. مثل صبغة الايوسين Eosin.
- **اصباغ قاعدية:** صبغات حاوية على جذور قاعدية تتحد مع جذور حامضية غير ملونة كجذر الخلات او الكلوريدات او الكبريتات. وتذاب هذه الصبغات في الماء او الكحول اوكلاهما. مثل صبغة السفرانين Safranin.
- **صبغات متعادلة:** هي صبغات مركبة من اجزاء قاعدية وحامضية تتكون من الايونات السالبة والموجبة. تذوب هذه الصبغات بالكحول وربما تذوب في الماء. مثل صبغة الأحمر المتعادل Neutral red.

وتقسم الصبغات ايضاً حسب ميل أجزاء البروتوبلازم للصبغ الى:

- **صبغات نووية:** هي الصبغات التي تميل لصبغ النواة لأنها غنية بالأحماض النووية لذلك تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية.
- **صبغات سايتو بلازمية:** بما ان السيتوبلازم ذو طبيعة قاعدية فأنه يصطبغ بالصبغات الحامضية.

مع العلم ان تقسيم الصبغات الى نووية وسايتو بلازمية يراد به التعميم وليس الحصر لان الصبغات النووية قد تصبغ السيتوبلازم ولكن بدرجة اقل كذلك الحال بالنسبة للصبغات السيتوبلازم. ولصبغ الخلية بالكامل لابد من استعمال نوعي من الصبغات الحامضية والقاعدية.

ملاحظة: عندما ترد كلمة كحول يقصد بها الكحول الاثيلي.

12. طريقة الطلاء والهرس لدراسة الانقسام الخلوى

تستعمل هذه الطريقة بكثرة في الدراسات السيتولوجية العملية لسهولة اجرائها. وتستخدم اساساً في دراسة الانقسام الميتوزي Mitosis والميوزي Meiosis وفي دراسة كروموسومات الكائنات الحية ويمكن وصف طريقة العمل من خلال الخطوات التالية:

اولاً: صبغة الاسيتوكارمن: تحضر هذه الصبغة بإذابة **1 mg** من مسحوق الكارمن في **200 مل** من حامض الخليك **45%** مع الغليان بالاحتراس الشديد والاستمرار بالغليان لمدة دقيقة او دقيقتين او الى ان يتحول المحلول فجأة الى اللون الداكن. ويجب استبعاد اللهب قبل إضافة مسحوق الصبغة الى الحامض والا انسكب المحلول من شدة الغليان. بعد ذلك تبرد الصبغة وترشح وتوضع في زجاجات داكنة بعيدة عن الضوء.

ثانياً: عينات التجربة تجري غالبا دراسة الانقسام الميتوزي في خلايا القمم النامية لجذور الفول Vicia faba وعدد كروموسوماته سبعه (7) ازواج او خلايا القمم النامية لجذور البصل وعدد كروموسوماته سبعة (7) ازواج ايضاً. ويمكن تنمية البذور على ورق ترشيح مبلل او قطعة قطن مبللة في اطباق بتري ويسمح للجذور بالنمو حتى تتكون الجذور العرضية او الثانوية الى حوالي 1.5 cm او توضع الابصال في اواني زجاجية مملوءة بالماء وتترك حتى تنمو الجذور لتصل الى 1.5 cm.

ثالثاً: تحضير الانقسام الميتوزي: يتم الانقسام الميتوزي من خلال طريقتين هما:

الطريقة الأولى:

1. تقطع الجذور وتوضع في انبوبة تحوي محلول القتل والتثبيت (Carnoy 1). تترك الجذور في هذا المحلول لمدة تتراوح من 6_12 ساعة.

2. تغسل الجذور المثبتة في كحول الايثانول 75% مرتين ثم تحفظ الجذور في الثلاجة في هذا التركيز لحين الاستخدام.

3. عند الاستعمال تؤخذ العينة من الثلاجة وتترك في انبوبتها حتى يأخذ الكحول درجة حرارة الغرفة.

4. تنقل الجذور الى انبوبة تحتوي على مخلوط مكون من جزء من كحول 95% وجزء من حامض هيدروكلوريك عياري لمدة دقيقة واحدة.

5. حامض الهيدروكلوريك يسبب رخاوة للأنسجة لأنه يذيب الجدار الخلوي لذلك من الواجب تصليب العينة بعض الشيء قبل التقدم في العمليات اللاحقة وذلك بوضع العينة ثانية في محلول القتل والتثبيت المحضر انياً لمدة لا تقل عن 5 دقائق.

6. تنقل العينة الى نقطة من صبغة الكارمن على شريحة ميكروسكوبية نظيفة.

7. بواسطة مشرط نظيف يقطع الجزء المرستيمي الداكن اللون ويتخلص من الجزء الباقي.

8. يهرس الجزء المرستيمي في نقطة من الصبغة بواسطة ابرة او مقبض صدئ.

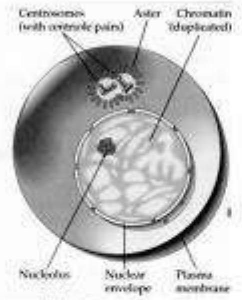
9. تغطى الشريحة بغطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر مستخدماً العدسة القوية الجافة. وإذا لم تكن الانسجة منفصلة عن بعضها البعض ترفع الشريحة من تحت المجهر ويضغط برفق على غطاء الشريحة بإبرة مدببة او بالسبابة.

10. تسخن الشريحة برفق على اللهب مع مراعاة عدم غليان محلول الصبغة. ثم بعد ذلك يضغط برفق على غطاء الشريحة تحت ورق الترشيح فيساعد ذلك على فرد الكروموسومات وجعل الخلايا في مستوى واحد تقريباً بالإضافة الى انه يزيد من التباين بين لون الكروموسومات والسيتوبلازم. ومن الملاحظ تحسن الشرائح المحملة جيداً يوم بعد يوم وعادة لا تظهر خيوط المغزل واضحة في تحضيرات صبغة الكارمن ولكنه قد تظهر في الشرائح القديمة والمحضرة من فترة طويلة.

الطريقة الثانية:

ان صبغة الكارمن تقتل وتثبت وتصبغ في نفس الوقت فأبسط طريقة للتحضير هي وضع الجذور النامية في انبوبة تحتوي على الصبغة وتغلى برفق لمدة بضع دقائق. او توضع في انبوبة مغطاة بسدادة في فرن البرافين على درجة حرارة 60 م لمدة 15 الى 20 دقيقة. ثم توضع العينة المصبوغة على شريحة زجاجية ميكروسكوبية ويقطع الجزء المرستيمي من الجذر الذي يكون داكن الصبغة ويتبعد الجزء الباقي من الجذر وإذا تطلب الامر تضاف نقطة من الصبغة على العينة ثم تكمل بعد ذلك الطريقة العامة السابقة.

MITOSIS

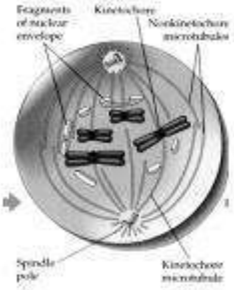


Interphase

- DNA has been replicated but
- **Chromosomes** not yet visible

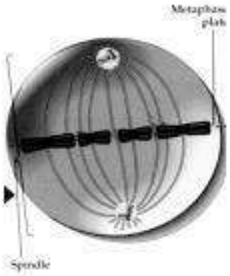
Prophase

- Chromosomes condense and thicken
- Each duplicated chromosome appear as two identical sister **chromatids**
- The **mitotic spindle** begins to form



Prometaphase

•The nuclear envelope fragments
•The **spindle fibres** become attached to the centre of each chromosome = **kinetochore**



Metaphase

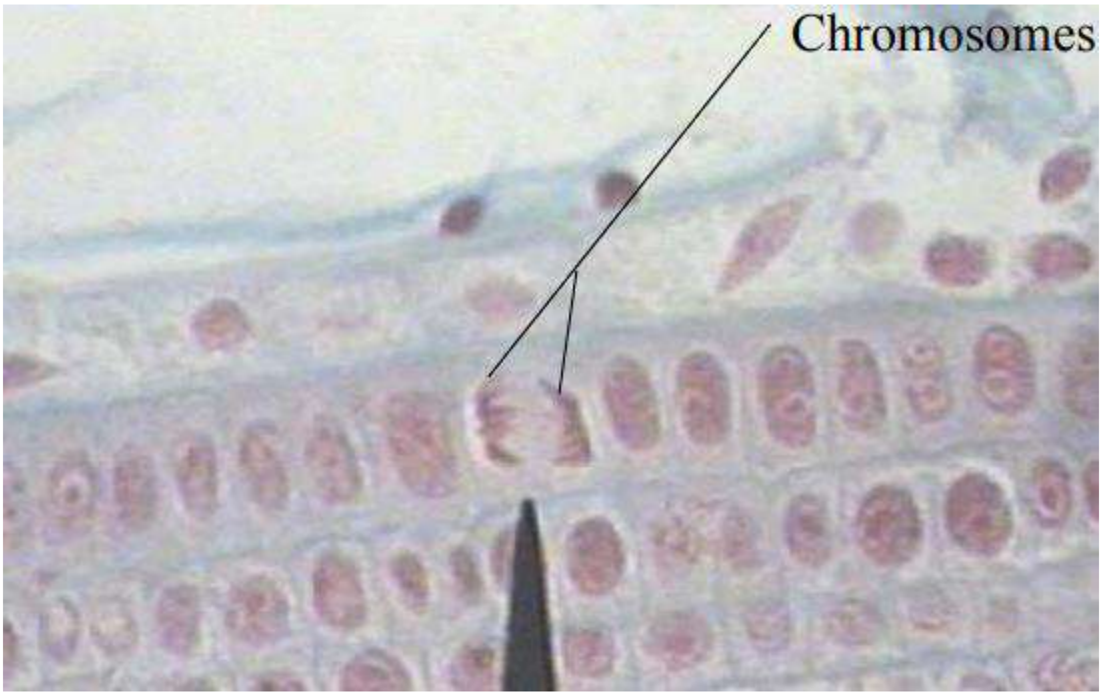
•The chromosomes assemble at the equator = **metaphase plate**

Anaphase

•The **spindle fibres** begin to contract
•This starts to pull the **sister chromatids** apart
•At the end of anaphase a complete set of **daughter chromosomes** is found each pole

Telophase and Cytokinesis

•**Nuclear envelopes** begin to form around each set of daughter chromosomes
•A cleavage furrow divides the cytoplasm in two = **cytokinesis**



رقم التجربة:	تأريخ التجربة:
اسم التجربة:	
اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب: 1. 2. 3. 4. 5.	
النتائج:	

المناقشة:

الملاحظات:

13. Preparation of Meiotic Metaphase Chromosomes

1. Flower buds of seventh and eighth developmental stages (Figure 2A-B) were collected directly from the field at 11-11:30 AM during April-May.
2. Sepals and petals were removed from the selected flower buds and the anthers were kept in 45% acetic acid for 5 min.
3. A part of the fused anthers was smeared in a drop of 2% aceto-carmine stain.
4. After 10 min, the prepared slide was slightly warmed by passing over a flame.
5. After 30 min, the stained cells were washed by adding drops of 45% acetic acid on one side of the cover glass and by drawing the access fluid from the opposite side of the cover glass with the help of a strip of blotting paper; this step is crucial for clearing the cytoplasmic background of the stained pollen mother cells.
6. Finally, the prepared slide is wrapped in a fold of blotting paper to remove access of 45% acetic acid leaving only a thin film of fluid in between slide and cover-slip.
7. Photomicrographs were taken with Leica Microscope and suitably enlarged (Figure 2C-D).

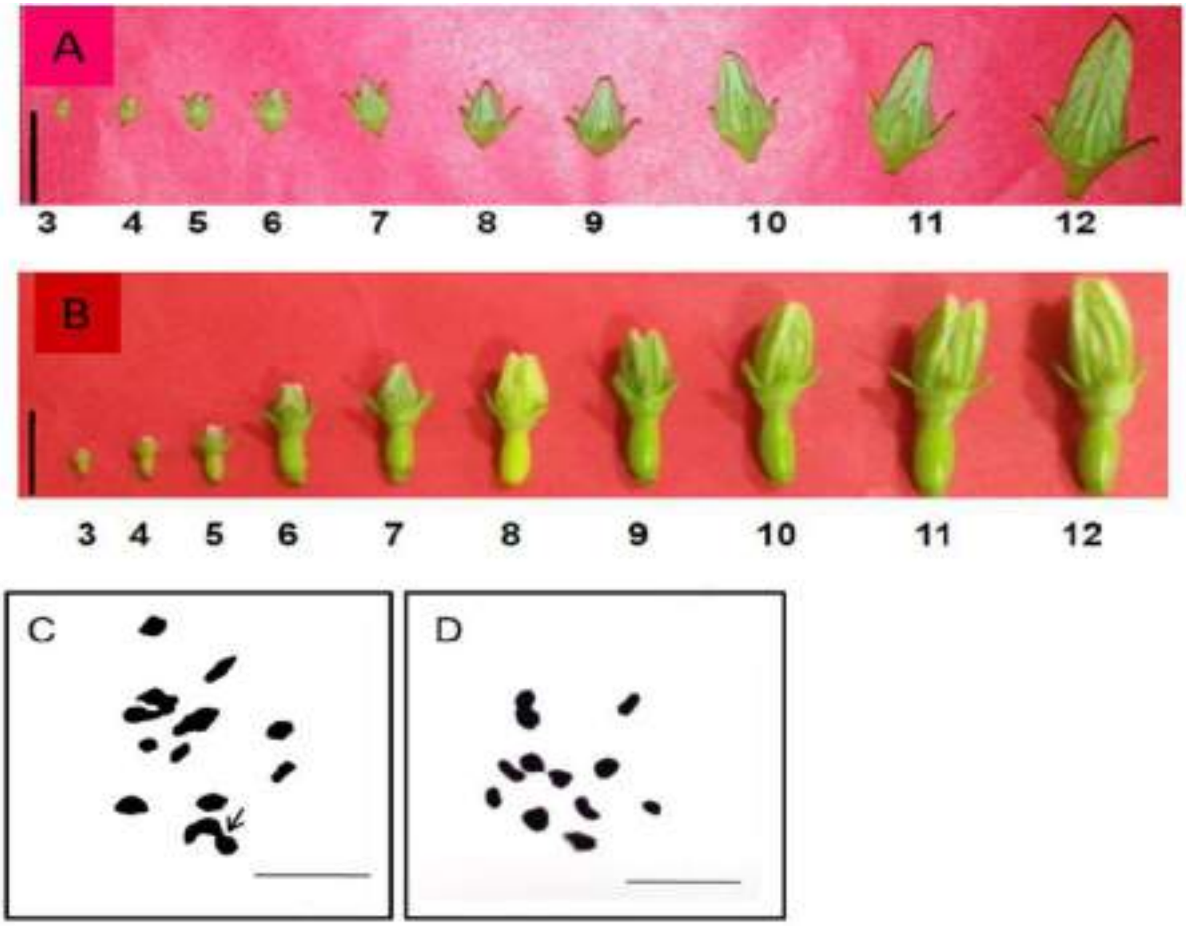
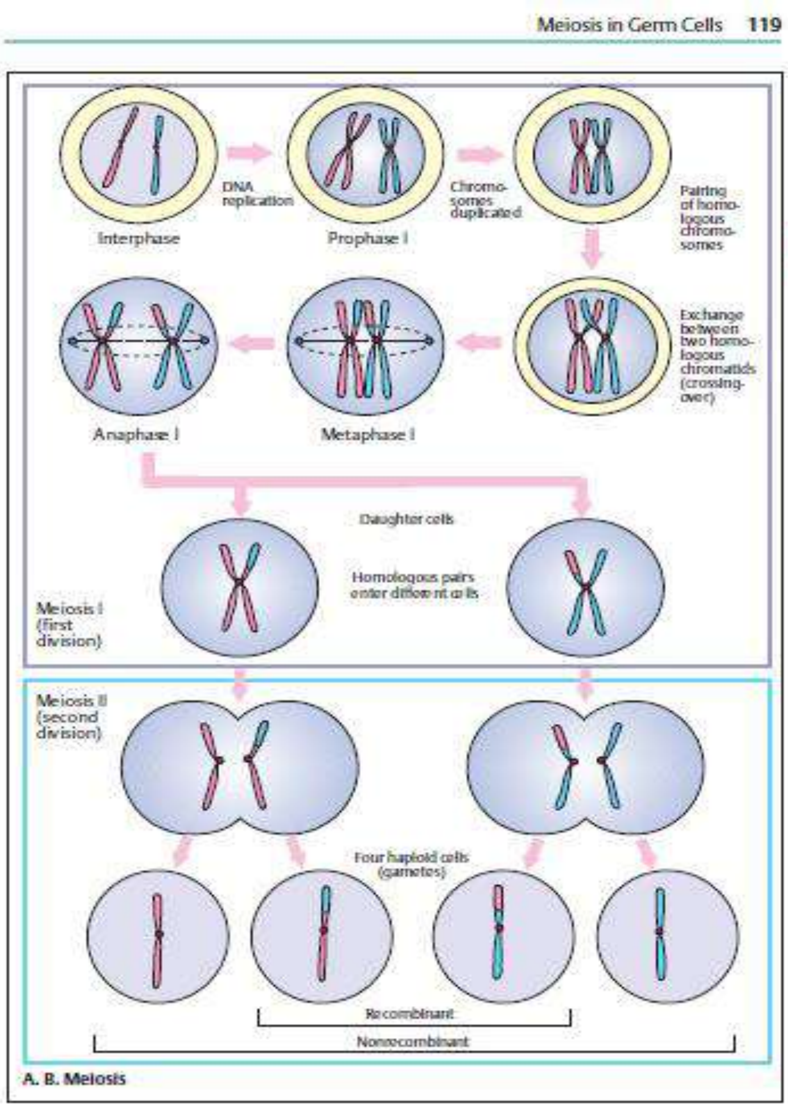


Figure 2. A. Stages of male flower buds of *Coccinia grandis* for meiotic preparation; B. Gynomonoecious hermaphrodite flower buds; C. Meiotic metaphase chromosome of male (Arrow indicates end to end pairing of X and Y chromosomes.); D. Gynomonoecious plant. Scale bar=1 cm for A and B, 5 µm for C and



Passarge, Genetics, 3rd edition © 2007 Thieme
All rights reserved. Usage subject to terms and conditions of license.

أسئلة للمناقشة	
السؤال الاول	ما أفضل نموذج لدراسة الانقسام الخيطي والاختزالي ولماذا؟
السؤال الثاني	ما النموذج الذي يمكن من خلاله مشاهدة جميع اطوار دورة الخلية ولماذا؟

رقم التجربة:	تأريخ التجربة:

اسم التجربة:

اسم الطالب او أسماء مجموعة الطلاب:

1.
2.
3.
4.
5.

النتائج:

المناقشة:

الملاحظات:

The Scientific Method: Science is a search for an understanding about the way that things work in the natural world. Scientific inquiry is based on falsifiable hypotheses. This means that there is room for any assumption about the natural world to be shown false. Science is fluid and dynamic and changes as new information is introduced, examined and the best explanations are accepted. If a hypothesis cannot be shown to be potentially false, then that hypothesis cannot be investigated using science. A scientific investigation depends on a set of procedures. These procedures or steps are known as the scientific method.

1. **Observation:** An initial observation is made about a phenomenon in the natural world.

2. **Hypothesis**: A possible explanation of the phenomenon, or answer to the question is proposed. In most studies, there is a null hypothesis (a statement of no change) and an alternative hypothesis (statement of change). Oftentimes, the scientist will make more specific predictions based on the more general hypothesis that has been proposed. It is very important that the hypothesis that is proposed is scientifically testable and potentially falsifiable. For example, the hypothesis: "Monet is the greatest painter of all time" is not scientifically testable since it is a subjective statement. However, the hypothesis could be changed to make it testable, for example: "Monet's paintings are the most valued based on auction prices."

3. **Experiment:** An experiment is designed to test the hypothesis.

4. **Results:** Data are collected in an objective manner.

5. **Conclusion:** The results are analyzed and the alternate hypothesis is accepted or rejected.

Using the rules of the scientific method ensures that an investigation will be designed so that results can be reviewed in an objective manner and the experiment replicated by others. The ability to repeat an experiment is essential to the validity of its results. If a tested hypothesis can be shown true in repeated testing, it may be that the information will be added to the general body of knowledge that is science. By the way, negating a hypothesis is often just as valuable as is accepting one to be true.

A good test isolates a single factor or variable for examination. Sometimes this is very difficult to do. A crucial step in designing experiments is to identify the variables and treatment groups.