التدريب المعملى الثامن
الوراثة السيتولوجية في الإنسان
Human Cytogenetics

تعتمد أغلب الدراسات الحالية لتحديد عدد كروموسومات الإنسان على خلايا كرات الدم البيضاء التي تؤخذ من الدم الوريدي إذ من السهل الحصول على خلايا الدم البيضاء واستحثاثها للدخول في الانقسام الميتوزى بمعاملتها بالكولشيسين ومحلول ذي تركيز أسموزى منخفض متبوعاً بالتثبيت . ويكن أن تفرد الخلايا المثبتة على شريحة وتصبغ لرؤية الكروموسومات وبفحص مثل هذه الشريحة استطاع تيجو وليفان Tijian and Levan عام (١٩٦٥) تحديد العدد الكروموسومى في الإنسان (ن = ٢٣) .

يمكن تمييز كروموسومات الإنسان على أساس طول الكر وموسوم وموضع السنترومير . وقد رتب الكروموسومات الجسمية autosomes إلى ٧ مجموعات إضافة إلى زوج الكروموسومات الجنسية Sex chromosomes كالآتي :

الكروموسومات	المجموعة
١-٣	A
٤ -٥	B
٦ – ١٢	C
١٣-١٥	D
١٦-١٨	E
١٩ و ٢٠	F
٢١ و ٢٢	G
XX أو XY	X

وعلى ضوء موقع السنترومتر (الانقباض الأولى) فإن هنالك ثلاثة أنواع من الكروموسومات في الإنسان وهى الكروموسومات وسطية السنترومير metacenteric وذات السنترومير القريب من الوسط submetacentric والقريب من الطرف acrocentric (يلاحظ أنه لا توجد في الإنسان كروموسومات طرفية السنترومير telocentric) . بالإضافة إلى ذلك فإن بعض الكروموسومات تمتلك توابعاً Satellites مميزة . ويقسم كل كروموسوم إلى (ذراع) يد قصيرة P وأخرى طويلة q وترقم كل يد بالترتيب من السنترومير إلى نهاية الذراع .

وبالرغم من أن كرومسومات الإنسان ترتب في مجموعات ولكن لا يمكن تمييز الكروموسومات الفردية داخل المجموعة بدقة ، وعليه فقد تم تطوير تقنية الحزم الكروموسومية (Banding) للتحديد القاطع لكل صبغي في المجموعة . وهنالك خمسة أنواع من التقنيات لتحديد الحزم الكروموسومية تستخدم فيها أصباغ مختلفة هي :

- حزم G (G-banding) وتظهر عند صبغ الكروموسومات الجيمسا Geimsa.
- حزم Q (Q- banding) وتظهر عند صبغ الكروموسومات بصبغة لاصفة fluorecent مثل لاكوينكرين quinacrine .
- حزم R (R-banding) وتظهر عند صبغ الكروموسومات (عكسياً) بالجيمسا Reverse بعد تسخين الكروموسومات وتظهر نماذج عكسية لحزم G.
- حزم T (T-banding) وتظهر فيها الحزم في المناطق الطرفية للكروموسوم (Telomere) .

- حزم C (C-banding) وتظهر الحزم مختلفة الكروماتين عند مناطق السنترومير constitutive hereochromatin .

الاحتياجات :

- شرائح تحتوى على كروموسومات من الإنسان .
- مجهر بعدسة زيتية .
- صور فوتوغرافية كروموسومية (Karyotypes) مختلفة من الطور الاستوائي لمزرعة كرات الدم البيضاء.

الطريقة :

١- أفحص الشرائح لتحديد عدد الكروموسومات ونوع الفرد (أنثى ، ذكر) مستخدماً العدسة الزيتية .
٢- استخدم الصور الفوتوغرافية لإجراء التمرين .

التمرين :

١- كم عدد الكروموسومات في الشريحة التي قمت بفحصها .
٢- هل الشريحة لأنثى أم لذكر؟ لماذا؟
٣- رتب الكروموسومات بالتسلسل حسب الطول وموضع السنترومير من الصور الفوتوغرافية (٧ مجموعات جسمية + مجموعة كروموسومات الجنس).
٤- أقطع الكروموسومات وجهز الهيئة الكروموسومية Karyotypeفي تقرير دراسة الكروموسومات المرفق لكل صورة على حدة مستخدماً المعلومات التي حصلت عليها مستعيناً بالجدول التالي :

رقم الصورة	الكروموسومات	الجنس	المظهر أو العرض

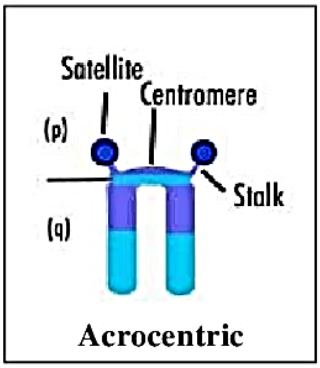
٥- بين أي شذوذ في عدد الكروموسومات أو أجزاء منها وأذكر أى شذوذ في تركيب الكرومسومات في الصور الفوتوغرافية .

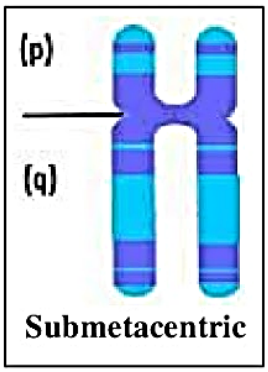
تدريب عملي اضافي
تحليل كروموسومات الإنسان

تحليل كروموسومات الإنسان

عدد الكروموسومات في الإنسان هو ٤٦ كروموسوم (٢٣ زوج) ، ٢٢ زوج متماثلة في النكر والأنثى وتدعى بالكروموسومات الجسدية Autosomal Chromosomes وزوج واحد يختلف في الذكر عنه في الأنثى ويدعى بالكروموسومات الجنسية Sex Chromosomes حيث تكون في الذكر XY بينما في الأنثى XX.

الذكر XY بينما في الانثى XX.





أشكال الكروموسومات في الإنسان:

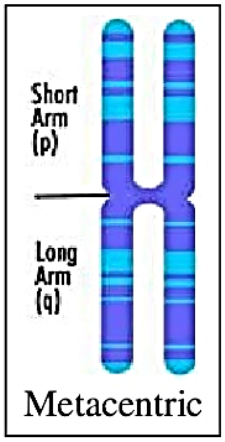
تقسم الكروموسومات حسب ما يلي:

أولاً: الحجم:

١ - كبيرة الحجم.

٢ - متوسطة الحجم.

٣ - صغيرة الحجم.



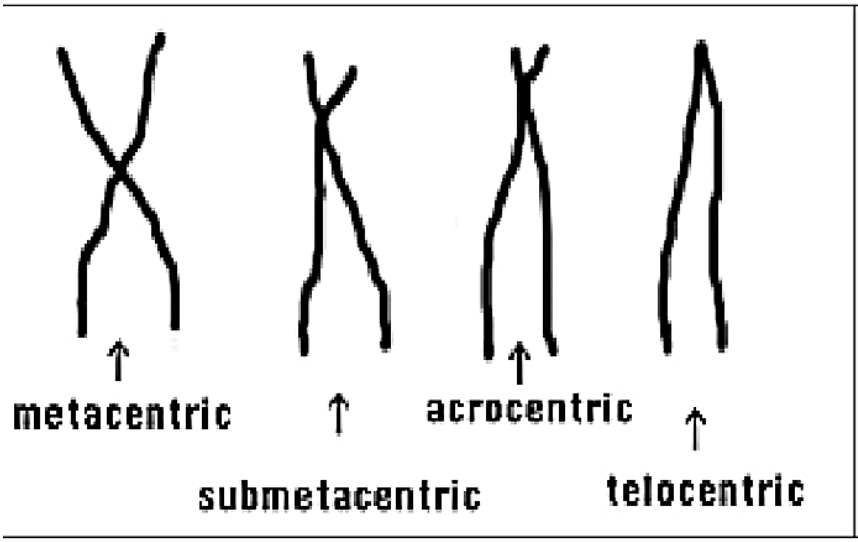
ثانياً: موقع السنترومير:

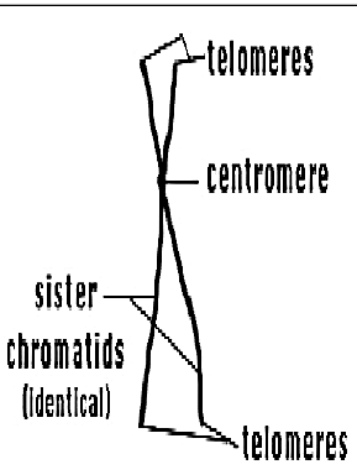
١ - وسطية السنترومير Metacentric.

٢ - شبه وسطية السنترومير Submetacentric.

٣ - شبه طرفية السنترومير Acrocentric.

٤ - طرفية السنترومير Telocentric.(لا يوجد في الإنسان)



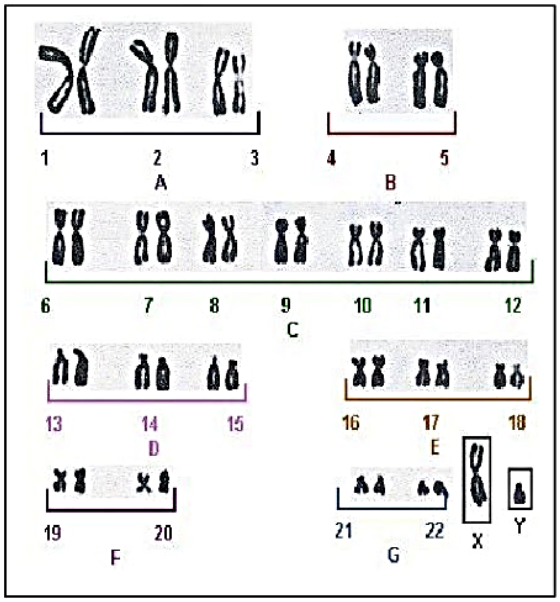


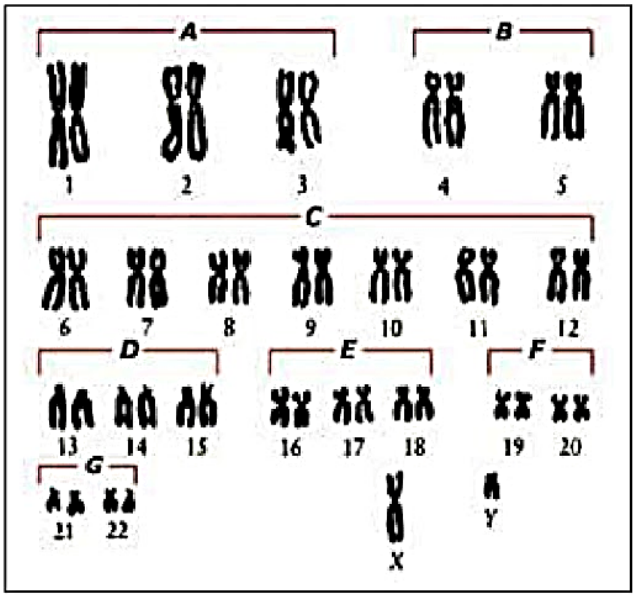
تعريف الهيئة الكروموسومية Karyotype:

هي كروموسومات الإنسان مرتبة في أزواج حسب الحجم وموقع السنترومير.

تقسم الكروموسومات الجسدية في الإنسان في ٧ مجموعات هي:

المجموعة	الكروموسومات الجسدية	العدد	الحجم	موقع السنترومير		
A	١-٣	٣	كبيرة	وسطي (١ ، ٣ ، ١٦ ، ١٩ ، ٢٠) العدد= ٥		
B	٤-٥	٢	كبيرة	شبه وسطي (٢ ، ٤ -١٢ ، ١٧ ، ١٨) العدد= ١٢		
C	٦-١٢	٧	متوسطة	شبه طرفي (١٣ -١٥ ، ٢١ ، ٢٢) العدد= ٥		
D	١٣-١٥	٣	متوسطة	**الكروموسومات الجنسية**		
E	١٦-١٨	٣	صغيرة	**الكروموسوم**	**الحجم**	**موقع السنترومير**
F	١٩-٢٠	٢	صغيرة	X	متوسط	شبه وسطي
G	٢١-٢٢	٢	صغيرة	Y	صغير	شبه طرفي





النسبة الذراعية:

هي النسبة بين طول ذراع الكروموسوم الطويل q (Long arm) إلى طول الذراع القصير p (Short arm). وهذه النسبة مهمة عندما تكون الكروموسومات متساوية في الطول.

$$\frac{\text{نسبة الذراع الطويل}}{\text{نسبة الذراع القصير}} = \frac{q}{p}$$

- ١ – ١,٥ ________ وسطي.
- ١,٦ – ٣ ________ شبه وسطي.
- ٣,١ - ∞ ________ شبه طرفي.

طريقة تحضير شريحة للكروموسومات من نخاع عظم الفخذ في الفأر

أ- إعداد الشرائح :

١- حقن الحيوان بمادة الكولشيسين تركيز ٠٥ و ٠% (١و ١٢-٠٠. مل/١٠جرام من وزن الجسم) (وذلك لإيقاف النشاط الخلوي عند المرحلة الاستوائية) قبل القتل بحوالي ساعتين (المادة تحتاج من ساعة إلى ساعتين حتى تصل إلى نخاع العظم عن طريق الدورة الدموية) .

٢ - يخدر الحيوان بالإيثر أو يقتل بالتخنيع ويشرح وتعزل عظام الفخذ.

٣- تقطع نهايتي عظمتي الفخذ ثم يشطف نخاع العظم بمحلول فسيولوجي هو (% ٠. ٩Nacl Saline (وذلك للحفاظ على حيوية الخلايا) ثم تعلق الخلايا في أنابيب طرد مركزي.

٤ - نقوم بعمل طرد مركزي لمدة ١٠ دقائق عند ١٠٠٠ لفة / دقيقة ثم يسكب الرائق مع المحافظة على الخلايا.

٥- تعامل بمحلول الHypotonic (Kcl تركيز ٠ ، ٥٦ %) حتى يحدث انتفاخ للخلايا نتيجة لدخول الماء إليها .

٦ - تحضن الخلايا في حمام مائي درجة حرارته ٣٧م لمدة ٢٠ دقيقة .

٧- نقوم بعمل طرد مركزي لمدة ١٠ دقائق عند ١٠٠٠ لفة / دقيقة .

٨ - يسكب المحلول الرائق مع المحافظة على الراسب الخلوي (. Pellet)

٩ - تثبت الخلايا الراسية بإضافة المثبت ١ : ٣ كحول ميثيلي مطلق إلى حامض الخليك الثلجي ببطء نقطة نقطة على جدار الأنبوبة (حتى لا تلتصق الخلايا مع بعضها البعض وتترك لمدة ١٠-١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

١٠ - طرد مركزي آخر ثم يسكب المثبت .

١١ - يكرر التثبيت من مرتين إلى ثلاث مرات (لتأكيد من تثبيت وتنظيف الخلايا).

١٢ - بعد الطرد المركزي الأخير / تعلق الخلايا الراسبة في كمية مناسبة من المثبت (بالإمكان خزن هذه الخلايا في الثلاجة إذا لم يسمح الوقت لذلك).

١٣ - تؤخذ شريحة نظيفة وباردة ومحفوظة في ١٠ % كحول ايثيلي .

١٤ - نقوم بعمل تنقيط (٣ – ٥) نقط من المعلق الخلوي على شريحة ممسوكة بملقط وبشكل مائل ثم نقوم بتعريض الشريحة للهب بشكل سريع للتجفيف (شريحة باردة وتعريضها للهب يؤدي إلى انفجار الخلايا وخروج الكروموسومات) .

١٥ - تترك الشرائح لتجف نهائية لمدة ٥ - ٧ أيام قبل الصبغ .

ب . طريقة الصبغ :

١.جهز الصبغة في محاليل الصبغ وهي فوسفات الصوديوم (A) وفوسفات البوتاسيوم (B) ثم نأخذ ٣ مل من المحلول + (A)٧ مل من المحلول (B) ويضاف إليها ٩٠ مل ماء مقطر، ثم تقسم إلى وعائين أحدهم يضاف إليه الجيمسا (٥ مل) صبغة ، والآخر يستخدم للشطف .

٢.تصبغ الشرائح في صبغة الجيمسا (Giemsa) تركيز ١٠ % لمدة ٣٠ – ٤٥ دقيقة ثم تشطف الشرائح في محلول الصبغة وتترك الشرائح لتجف ثم تفحص .

التحضيرات الضرورية للكروموسومات

١ - مكونات المحلول الفسيولوجي ٠,٩%:

الكمية	المادة
٠,٩ جم	كلوريد الصوديوم NaCl
١٠٠ مل	ماء مقطر

٢ - مكونات محلول الكولشسين تركيز ٠,٠٥%:

الكمية	المادة
٥٠ ملجرام	كولشسين
١٠ مل	ماء مقطر

٣ - مكونات محلول الهيبوتونيك ٠,٥٦%:

الكمية	المادة
٠,٥٦ جم	كلوريد البوتاسيوم Kcl
١٠٠ مل	ماء مقطر

٤ - مكونات محلول (A):

الكمية	المادة
١,٤٢ جم	فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4 (A)
١٠٠ مل	ماء مقطر

٥ - مكونات محلول (B):

الكمية	المادة
١,٣٦ جم	فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4 (B)
١٠٠ مل	ماء مقطر

تقرير عن دراسة الكروموسومات

مجموعة B
مجموعة A
مجموعة C
مجموعة E
مجموعة D
مجموعة G
مجموعة F

1 2 3 4 5

6 7 8 9 10 11 12

13 14 15 16 17 18

19 20 21 22 y X

رقم الوحدة ــ
الراسل ــ
العنبر أو العيادة ـ
الاسم ــ
رقم المزرعة ـ
تاريخ المزرعة ـ
الهيئة الكروموسومية-
رقم الخلايا ـ
عدد الكروموسومات ـ47 46 45

التفسير ـــــ
التوقيع ـــــ