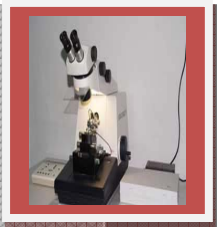


الميكروتكنيك النباتي

Plant Microtechnique

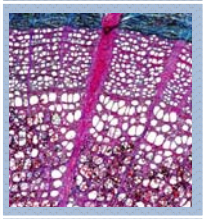
أ.د./ محمود عبدالمنعم خفاجي

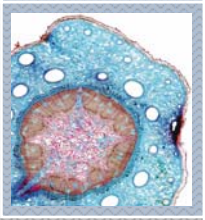
أستاذ النبات الزراعي

جامعة المنصورة

كلية الزراعة

قسم النبات الزراعي





أ.د./ محمود عبدالمنعم خفاجي

أستاذ النبات الزراعي – كلية الزراعة - جامعة المنصورة

khafagy@mans.edu.eg

الباب الأول

١.أهم التوجيهات التي يجب مراعاتها عند إعداد التحضيرات
٢.الاحتياطات الواجب اتخاذها قبل استخدام المواد الكيميائية الجديدة
٣.تجهيز المعمل
٤.أنواع الميكروتومات
٥.سكاكين الميكروتوم

١. أهم التوجيهات التي يجب مراعاتها عند إعداد التحضيرات

يجب توفر الأدوات والمواد التي سوف يتطلبها العمل حيث أن نقص احد المواد سيؤدى الي ضياع الوقت . كما إن السرعة في إجراء بعض العمليات أمر مهم جدا وان البطء الذائد قد يسبب إضرار لايمكن تلافيها.

١. أن لايلقى تحت اى ظرف من الظروف شمعا سائلا في حوض الغسيل لأنهـا سـتؤدى إلـى أضرار في عمليات الصرف .
٢. لا تلقى بمواد الترويق مثل الزيلول والكلوروفورم لأنها تذيب المجارى البلاستيكية.
٣. عدم ترك أغطية زجاجات مواد التحميل مثل بلسم كندا .....الخ مفتوحـة لأنهـا ستتصـلب ويصعب استخدامها . أو تعريض كندا بلسم للضؤ لفترة طويلة حتى لا يصبح حامض فيـؤدى إلى إتلاف الصبغات ولذلك يجب أن يكون في زجاجات محكمة
٤. الاطلاع على المعلومات المكتوبة على ظهر زجاجات المادة الكيماوية قبل التعامل معها فمنها السام ومنها الحارق ومنها ما هو سريع الاشتعال.
٥. عند تحضير اى محلول يجب كتابة اسمه مع بعض التعليمات التحذيريـة إن كانـت خطـرة والتعليمات الإرشادية وتاريخ التحضير على كل زجاجة .
٦. الالتزام بالأوقات المحددة لخطوات التجربة وعند التجاوز أو التقصير في هذه الأوقات لاشـى سبب كان، يجب تسجيل ذلك في دفتر الملاحظات لملاحظة تأثير ذلك على نتائج التجربة .
٧. التأكد دائما من وجود الأدوات الزجاجية النظيفة التي يحتاجها العمل وان تكون مرتبة علـى المنضدة حسب طريقة التحضير أو الصبغ .
٨. عند تقطيع أجزاء من اى عضو نباتي لدراسة تركيبه الداخلي يراعـى إن تكـون الأجـزاء صغيرة ٥×٥×٥مم وتكون نظيفة وخالية من اى شوائب وتوضع مباشرة في محلـول القتـل والتثبيت المجهز مسبقا.
٩. الصبغات وتركيز الصبغة واسمها وتاريخ تحضيرها يجب أن يتم تدوينها على بطاقـة ويـتم لاصقها على الزجاجة التي سوف تحفظ فيها.
١٠. الكحول المستخدم يجب أن يوضع في اوانى نظيفة وجافة مع تدوين تركيزه على بطاقة ويتم لاصقها على الإناء. إن تركيز الكحول المستخدم له أهمية قصوى في عملية إزالة الماء مـن الأنسجة كما سنذكر بعد ذلك . كما يراعى أن تكون الاوانى المحتوية على الكحول مغلقة جيدا وخاصة مع التركيزات العالية وذلك نظرا لشراهة الكحول للماء مما يـؤثر علـى تركيـزات

الكحول فيكون سببا في عدم نجاح اى عملية للحصول على تحضيرات من العينات سواء نباتية وحيوانية .

١١. عند القيام بوزن اى من المواد المستخدمة ،يراعى أن يكون الوزن دقيقا (لأقرب رقم عشري) مايجب ورقة من السلوفان الذي لاتلتصق بة المواد الكيمائية على كفة الميزان .لحمايتها .

١٢. يراعى الدقة عند استخدام الأحماض المركزة ،كما يجب اضافتة الحامض إلى الماء بحـرص شديد وان يتم إضافة الحامض بحيث ينزلق ببطء على جدران الإناء الزجـاجي الـذي يـتم التحضير فيه

١٣. احتفظ بسجلات للمواد المستخدمة في كل عملية، بالإضافة إلى سـجلات بـالمواد المتـوفرة لديك.

١٤. معظم المواد الكيمائية غير امن في استعماله بسبب ماينتج عنة من إضـرار علـى الصـحة بصفة عامة ،ولكن ثبت أن مواد مثل حامض الاوزميك اوابخرتة لها تأثير سـام ، كمـا أن كلوريد الزئبق ،الفينول ،الفورمالين تسبب حروق في اليدين ولذلك عند التعامل معها يجب إن تستعمل قفازات لليدين ونظارة للعينين .

١٥. يجب دراسة اختيار طريقة الصبغ قبل تجهيز العينة حيث سيوقف على ذلك نوع المثبت الـى سوف يتم استخدامه .

١٦. يجب كتابة طريقة العمل في ورقة مستقلة قبل القيام باى عمل ،كما يجب أن تتبع الخطـوات بكل دقة والوقت المحدد لكل خطوة .

١٧. نظم عملك ليتوافق مع الخطوات حيث يمكنك القيام بعدة عمليات فى وقت واحد .

٢. الاحتياطات الواجب اتخاذها قبل استخدام المواد الكيميائية الجديدة

١. عدم استخدام المواد التي لم تستخدم من قبل.
٢. معرفة مخاطر المادة الكيميائية قبل استخدامها.
٣. معرفة الطريقة الصحيحة لاستخدام المادة.
٤. معرفة طريقة التخلص من هذه المادة.
٥. معرفة كيفية تقليل الأضرار الناتجة عن استخدام المادة الكيميائية.

الاحتياطات الواجب اتخاذها قبل استخدام المواد الكيميائية الضارة

١. أن المادة المراد استخدامها لا يمكن استبدالها (حتمية استخدامها).
٢. توفر الإمكانية بالمعمل لاستخدامها.

القواعد العامة للتعامل مع المادة الضارة:

١. يجب كتابة البيانات على الزجاجة.
٢. عدم إلقاء المواد على ارض المعمل.
٣. يجب عدم سكب اى من المواد الكيميائية على أرضية المعمل.
٤. يجب تنظيف أرضية المعمل من المواد التي تسكب علية و تجفيفها.

٣. تجهيزات المعمل

الشرائح و الأغطية الزجاجي Slides and covers

تتكون التحضيرات المجهرية من أشياء دقيقة يراد فحصها تحت المجهر ولذلك يجب ان توضع بين شريحة زجاجية و غطائها.

الشرائح الزجاجية Slides

عبارة عن قطعة من الزجاج الرقيق، والصافي تماما، وليس من الرقيق جدا ليس خوفا من كسرها ولكن لعدم صلاحيتها مع مكثفات المجاهر.كما يجب أن تكون حوافها بيضاء، وأحيانا تبدو مخضرة .الشرائح تكون ذات سمك ١مم وإبعاد ٣ × ١ بوصة

أغطية الشرائح الزجاجية Cover slips

عبارة عن قطعة من الزجاج الرقيق جدا، والصافي تماما ، ذات حواف مستقيمة،توجد منها عدة أنواع تبعا للسمك تعرف برقم صفر ،١، ٢ ،٣ فالأغطية رقم(١) سمكها ١٥, مم وهى النموذجية وتستخدم مع التحضيرات الدقيقة ، فالأغطية رقم(صفر) سمكها ٠٩, مم وتستخدم مع العدسة الزيتية، وحاليا لايفضل استخدامها. بينما الأغطية رقم (٣,٢) وتستخدم مع العدسة الشيئية ذات القوة المنخفضة .الأغطية أما مستديرة ،مربعة أو مستطيلة. الأغطية المستديرة المربعة ابعادها١٥، ١٨، ٢٢ مم . الأغطية المستطيلة عرضها ٢٢ أو ٢٤ بينما الطول ٣٠ ،٤٠ ،٥٠ ،٦٠ مم . تستخدم الأغطية حسب رغبة القائم بالعمل وعادة يفضل الأغطية المربعة، وذلك في حالة وجود قطاع واحد على الشريحة، إما الأغطية المستديرةفى الحالات التي تتطلب عملية تحليق للقطاعات ، في حالة وجود أكثر من قطاع على الشريحة تستخدم الأغطية المستطيلة.

اوانى الصبغ Staining dishes

أوانى من الزجاج توضع بها الصبغات الخاصة بتلوين القطاعات المحملة علـى الشـرائح الزجاجيـة والتي يتم الحصول عليها بواسطة الميكرتوم حيث يتم تمرير الشرائح المحملة بالقطاعات علـى تلـك الاوانى التي تحتوى على المواد الخاصة الترويق والتجفيف والصبغ. يوجد منها نوعين :

اوانى الصبغ القائمة Coplin Jars

هذا النوع يمكن استخدامه في صبغ ٦ شرائح في وقت واحد ، ويمكن مضاعفة عدد الشـرائح بـان توضع كل شريحتين معا بحيث يكون السطح الظهري لكل شريحتين معا ، وتوضع بة الشرائح قائمة.

اوانى الصبغ صندوقية Stander dishes

هذا النوع يكون على هيئة صندوق افقى يمكن استخدامه في صبغ ١٢ شريحة اواكثر في وقت واحد وتوضع بة الشرائح راسية.كلا النوعين بغطاء يمكن نزعة بسهولة حيث يجب نقل الشرائح بسـهولة وفى نفس الوقت المحافظة على جودة المواد الكيمائية وخاصة الكحولات.يحتوى الجـدار فـي هـذه الاوانى على بروزات متقابلة على أبعاد متماثلة تحجز بينها الشرائح الزجاجية.

٤. الميكروتومات Microtomes

قديماً، كان يتم الحصول علي القطاعات في العينات النباتية أو الحيوانية يدويا باستخدام موس حاد ويتم ذلك في عينات طازجة أو محفوظة وكانت بالممارسة والخبرة وعمل العديد من التجارب كان ممكـن الحصول علي قطاعات رقيقة وشفافة من الممكـن فحصـها بـالمجهر الضـوئي. حـديثاً، ظهـرت الميكروتومات التي نستطيع بها الحصول علي قطاعات رقيقة يمكن رؤيته بـالمجهر الضـوئي (قـوة التكبير عن x١٨٠٠). نظراً لتطور المجاهر ظهور المجهر الإلكتروني التي تزيد قوة التكبير فيه عـن عدة ألآلاف ،مما يستلزم الحصول علي قطاعات دقيقة جداً Ultra thin section.وعامةً، الميكروتوم هو جهاز يستخدم لعمل قطاعات رقيقة جداً Ultra thin sections، ويتركب الميكروتوم مـن ثـلاث أجزاء رئيسية هي:

١. القاعدة (جسم الميكروتوم) Basil (Body microtome)
٢. حامل السكين والسكين Knife attachment and Knife
٣. حامل المواد أو الأنسجة Material or Tissues holder

معظم أنواع الميكروتومات تكون السكين ثابتة ويتحرك الحامل باتجاه السكين، ويمكن بواسطته عمـل عدة أنواع من القطاعات سواء كانت القطاعات طولية أو عرضية Vertical or Horizontal حيث

يتحرك حامل العينة مسافة معينه كل مره ، وهذه المسافة يتم اختيارها مسبقاً بواسطة تدريج مثبت في جسم الميكروتوم ويكون التدريج من ٠.٥ – ٥٠ ميكرون، وذلك في ميكروتومات القطاعات الرقيقة Thin sections ، أما في الميكروتومات التي يمكن الحصول منها علي قطاعات رقيقة جداً (فائقة) Ultra-thin Sections والتي يستخدم المجهر الإلكتروني لفحصها فإن التدريج يكون من ٦٠-٥٠٠ نانوميتر.

أنواع الميكروتومات:

١. الميكروتوم اليدوي

هي ميكروتومات صغيرة تتكون من أنبوبة معدنية تنتهي بمائدة مستديرة بوسطها فتحة تثبت فيها النماذج المراد تقطيعها ، ويتم تثبيتها بواسطة مسمار يوجد بالجانب أسفل فتحة وضع النموذج.كما يوجد أنبوبة معدنية من أسفل عبارة عن مقياس بالميكرون يتم به ا لتحكم في سمك القطاعات . يستخدم للتقطيع أمواس حادة حيث يتم تمرير الموس من اليمين الى اليسار فوق حافة الميكروتوم وفى كل مرة يتم تحريك النموذج بلسمك المحدد سلفا ويتكرر ذلك يمكن الحصول على عدة قطاعات . تستخدم هذه الميكروتومات لعمل قطاعات فى النماذج الرهيفة وهذة الطريقة هى اقرب إلى طريقة عمل القطاعات اليدوية.

٢. الميكروتوم الدوار Rotary microtome

يعتبر من أقدم أنواع الميكروتومات ويستخدم هذا النوع في عمل القطاعات شبه الرقيقة Semi-thin sections والرقيقة Thin sections في العينات النباتية أو الحيوانية ثم طمرها في شمع البارافين وكذلك في العينات المجمدة كما في حالة الكريوستات Cryostats ويتم فحص القطاعات بالميكروسكوب الضوئي. تتم حركة الميكروتوم بواسطة عجلة دوارة يتم تحريكها باليد ينتج عنها حركة العينة باتجاه السكين المثبتة علي جسم الجهاز وتتحرك العينة إلي أعلي وأسفل وفي كل مرة تتقدم العينة باتجاه السكين بمسافة يتم تحديدها بواسطة التدريج المثبت علي أحد جوانب الميكروتوم وينتج عن ذلك تكوين سلسلة متصلة من القطاعات تسمي Ribbon، وعادة يكون سمك القطاع في حدود ٦-١٢ ميكرون إذا كانت العينات مرقدة (مطمورة) في شمع البارافين أما إذا استخدمت مواد أخري مثل الراتنج Resin وباستخدام أنواع معينه من السكاكين المعدنية تسمي Disposable فإنه يمكن الحصول علي قطاعات بسمك واحد ميكرون.

٣. الميكروتوم المنزلق Sliding microtome

ميكروتومات مجهزة لعمل قطاعات في عينات كبيرة الحجم (عضو كامل) يـتم ترقيـدها فـي شـمع البرافين أو الراتنج ويتم فحص القطاعات باستخدام المجهر الضوئي.الميكروتوم من النوع الثقيل حتـى يعمل علي ثبات الجهاز علي المنضدة وكذلك تقليل الاهتزازات حتى لا يتسبب في إحـداث أضـرار بالعينة ، في هذا الجهاز السكين متحركة والعينة ثابتة حيث تتحرك السكين باتجاه العينة عكس مايحدث في الميكروتوم الدوار.

٤. الميكروتوم الثلجي Freezing microtome

يستخدم هذا النوع في عمل قطاعات شبه رقيقه semi-thin section في عينات طازجـة أو مجمـدة وكذلك المواد الصناعية ، البلاستيك الطري، المطاط، الفلـين والمـواد الغذائيـة.هـذا النـوع مـن الميكروتومات مجهز بمنضده stage يمكن فيها تجميد العينات في وقت قصير جداً سـواء باسـتخدام اسطوانة Co_2 أو جهاز تبريد ، في بعض الأنظمة قد يتم تجميد العينة فقط والبعض الأخر يـتم فيهـا تجميد العينة والسكين معاً.سمك القطاعات يختلف حسب حركة السكين وحامل العينة فقد تكون السكين ثابتة والحامل متحرك تجاه السكين أو العكس وكل حركة سواء للسكين أو الحامل ينتج عنهـا تكـوين قطاع بسمك معين يتم تحديده مسبقاً والقطاعات الرقيقة جداً يصعب الحصول عليها بهذا النـوع مـن الميكروتومات.

٥. الميكروتوم الفائق Ultra microtome

هذا النوع يستخدم لعمـل قطاعـات رقيقـة جـداً Ultra-thin section وذلـك لفحصـها سـواءً بالميكروسكوب الضوئي أو الألكتروني ، ويتم ترقيد العينات في أنواع صلبة من الراتنج Hard resin والتي بواسطتها يمكن الحصول علي قطاعات بسمك ١٠ نانوميتر ويستخدم في عمل القطاعات أنـواع خاصة من سكاكين الميكروتوم سواء الماسية أو الزجاجية أو الياقوت ، حيث تتحرك فيه العينه بإتجـاه السكين وتستقبل القطاعات في حمام مائي water bath يوجد عند حافة التقطيع ويتم مراقبـة عمـل القطاعات بواسطة ميكروسكوب ضوئي مركب علي الميكروتوم.

٥. سكاكين الميكروتوم Microtome knifes

١ . السكين الصلب Steel knife

هي سكاكين تصنع من مواد كربونية عالية الجودة أو مواد ذات درجـة صـلابة عاليـة و الصـلب المستخدم عادة خالي من الشوائب ويحتوي علي مواد مانعة للتآكل ومقاومة للصدأ ومن أفضل الأنواع التي تصنع من الصلب بالكامل ويضاف إليها ١٢-١٥% الكروم ولها أشكال مختلفة.

١. الشفرات جاهزة التصنيع Disposable blade

هي مجموعة من الشفرات التي تستخدم ولا يتم الأحتفاظ بها بعد الأستخدام حيث يتطلب تغييرها كـل فترة اثناء اجار عملية التقطيع، معظم الأنواع المتوفرة حالياً مصنوعة من الصلب الغير قابـل للصـدأ وتطلي حافة الشفرة بالبلاتين أو الكروم ليزيد من صلابتها وإطالة استخدامها.الشفرات المستخدمة فـي جهاز الكريوستاتCryostat microtome يتم طلائها بالـ Teflon ليقلـل مـن تفتـت القطاعـات وتمزقها ويرجع ذلك لعدم تغير درجة التبريد الناتج عن الإحتكاك بين السكين والعينـة، كمـا يسـاعد صغر حجم الشفرة ورقتها علي سرعة تبريدها في غرفة التبريد بعطس الأنواع الأخري من السكاكين التي تحتاج لمدة أطول لتبريدهاوخاصة عند تغيير السكين او تعديل درجة الحرارة وهذا النوع يحتـاج الي حامل قوي ومن نوع خاص ليمنع عملية الاهتزاز اثناء التقطيع ويتنج عن هذا النوع من السكاكين قطاعات عالية الجودة بعكس الأنواع الأخري.

٢. سكين التنجستين Tungsten carbide knife

سكاكين تصنع من مواد عالية الجودة وغير قابلة للتآكل وغير ممغنطة وتزيد درجة صلابتها ١٠٠ مره عن السكاكين المصنوعة من الصلب ولكن يجب التعامل معها بحذر شديد ويمكـن بواسـطتها عمـل قطاعات في العظام التي يتم ترقيدها في metharfate.

٣. السكين الياقوت Sapphire knife

وهي سكاكين تصنع من قطعة واحدة من الياقوت الصناعي وهي أصلب مـن التنجسـتين والزجـاج وتستخدم في عمل قطاعات ي جميع انواع العينات ويعيبها فقط ان حجم كتلة العينةBlock لايزيد عن ١١مم.

٤. السكين الماسية Diamond knife

هي تصنع من الأحجار الكريمة مثل الماس وهي غالية الثمن ولكنها طويلة العمر في الأستخدام نظـراً لصلابتها ، وتستخدم في عمل قطاعات رقيقة جداً في العينات التي سبق ترقيدها في الراتنج Resin.

٥. السكين الزجاجية Glass knife

سكاكين تصنع في المعمل وذلك بواسطة جهاز صنع السكاكين knife maker ،ويتم صناعة السـكين من لوح زجاجي glass strip يغسل بالأسيتون جيداً ثم يسـتخدم الجهـاز لعمـل قطاعـات مربعـة Square. ثم يقطع كل مربع إلي مثلثين يستخدم كل مثلث كسكين ويتم فحص حافـة السـكين knife stage تحت عدسة الميكروسكوب حيث تظهر علي شكل خط مضئ ، اي انقطاع في هذا الخط يعنـي وجود تشوه في حافة السكين ويجب تجنبها أثناء التقطيع ، كما أن اي تشوه في شكل الحافة سـتعكس الضوء المنبعث من أسفل السكين ، وعندما تزداد التشوهات يجب استعمال سكين أخر، يجـب تجنـب ملامسة حافة السكين والمنطقة أسفل الحافة المواجهة لكتلة العينـة Block لان اي تشـوه فـي هـذه المنطقة سينتج عنه خدش في العينه.

الباب الثاني

المثبتات Fixatives

المثبتات Fixatives

المقصود هو استخدام محلول يتركب من بضعه مواد كيمائية فى عملية قتل وتثبيت العينات. وبذلك يتم المحافظة علي مكونات النسيج أو الخلية بحالة مشابهة ، قدر الإمكان، لوضعها أثناء الحياة وذلك من خلال قيام المواد القتل والتثبيت بوقف لجميع العمليات الحيوية داخل العينة المراد دراستها وحيث أن مواد القتل تنفذ إلي العينة أسرع من مواد التثبيت لذلك يجب أن تحتوى المثبتات البيولوجية على مواد تستخدم في عملية قتل وأخرى في عملية التثبيت حيث أن المثبتات تقوم بما يلي:

١ ـ تلعب دورا في تثبيط إنزيمات التحال الذاتي.

٢ ـ تعمل علي إيقاف تحال النسيج النباتي الناتج عن تأثير بعض الأحياء المجهرية الدقيقة كالبكتريا.

٣ ـ تحفظ الخلايا من الانتفاخ او التقلص الأسـموزي Osmotic swelling or shrinkage نتيجـة لتعرضها للعمليات اللاحقة كالتجفيف والتشرب.

٤ ـ عند ارتباط المثبط بجزر معين في النسيج فأنه يعمل علي زيادة معامـل انكسـاره refractive index وبالتالي يمكن تمييزه بوضوح عن باقي أجزاء النسيج.

٥ ـ يزيد قدرة مكونات النسيج علي تقبل صبغة معينة أكثر من غيرها والعكس صحيح.

٦ ـ تقوية النسيج لمقاومة العمليات اللاحقة (مثل التقطيع وحرارة التشرب والطمر).

طرق التثبيت:

١ ـ التثبيت بالطرق الطبيعية (الفيزيائية) كالتخفيف في درجات الحرارة الاعتياديـة أو المنخفضـة أو بالتجميد.

٢ ـ التثبت بالطرق الكيمائية كاستعمال حامض الخليك والكحول الفورمالدهيـد – حـامض الكبرتيـك ..... الخ.

مواصفات المثبت الجيد :

١ ـ سرعة نفاذة خلال النسيج حتى تتمكن من وقف العمليات الحيوية بأسرع وقت ممكن..

٢ ـ قلة تأثيره الفيزيائي والكيمائي علي مكونات النسيج حتى لأتسبب له اى انكماش وتلف .

٣ ـ عدم تغير تركيبة بمرور الوقت.

٤ ـ سهولة استعماله.

٥ـ اعتدال سعره وخاصة بعد ارتفاع أسعار المواد الكيمائية ،حيث يعتبر السعر من العوامل المحـددة لاختيار المثبت.

٦-لايوثر في قابلية الأنسجة للصبغ بل يجب أن تساعده على قبول الصبغة .

٧-يجلط محتويات البروتوبلازم ويجعله في حالة ناعمةٍ Smooth.

٨- يكسب البروتوبلازم صلابة لتحمل العمليات المتتابعة حتى عملية الطمر.

٩- يقلل من ظهور الإشكال الغير حقيقية artifacts إثناء عملية الفحص المجهـري (تظهـر هـذه الإشكال نتيجة ارتباط بعض المواد المستخدمة بمكونات الخلية.

وعلى ذلك، لايمكن لمحلول واحد أن يتضمن جميع المميزات السابقة ، ولذلك يـتم تحضـير محاليـل التثبيت بخلط محلولين اواكثر فمثلا الكحول يقتل الخلايا وينتشر داخل الأنسجة بسرعة ولكنـة يسـبب انكماش السيتوبلازم ،أما حمض ألخليك الثلجي يمنع هذا الانكماش ، أما ثنائي كرومـات البوتاسـيوم فإنها تسبب انكماشا للعينات ولذلك يستعمل معه الفورمالدهيد الذي يقلل من هذا الضرر حيـث يعمـل على انتفاخ العينة، أما حمض رابع أكسيد الازميوم يحافظ على التراكيب الخلوية ولكنة لايحافظ علـى النواة.لذلك إن اختيار خليط مواد القتل والتثبيت بغرض المحافظة على الشكل الخـارجي والمكونـات الداخلية وكذلك التركيب النووي للعينة عملية هامة.

١- المحافظة على الشكل الخارجي Preservative of external form

قد تسبب بعض المثبتات في ضياع الشكل الخارجي حيث تفقد جزء من العينـة بسـبب الـتقلص أو الانتشار الغير متساوي للمحلول مما يسبب إلى تشويه في الفراغات الداخليـة. وعـادة تحـدث هـذه التقلصات عند اخذ العينات من الأنسجة الحيوانية.

٢- المحافظة على المكونات الخلوية Preservative of cellular components

يعتبر البروتين من أهم المكونات الخلوية التي يجب المحافظة عليها ولذلك تعرف المثبتات المستخدمة في المحافظة على البروتين بالمخثرات. ويرجع ذلك لتكون رابطة كيمائية بـين كـل مـن المثبـت وبروتين البروتوبلازم فيؤدى ذلك إلى صلابة الخلية rigidity (الروابط الكيمائيةchemical bonds تنشا من المجموعات التالية O٢ ، C، H٢o.....الخ)،ولذلك فان معظم المثبتات تحتوى على المـواد التي تتوفر بها هذه المجموعات (الفورمالدهيد الايثانول و الميثانول و حمض البكريك). كمـا يعتبـر كلوريد الزئبق كلوريد الكروميك من المواد الهامة لهذا الغرض ولكن من عيوبها إنها تكون مركبـات مع البروتين مما يؤثر في عملية الصبغ.كما أن حمض الخليك يرسب البروتين النـووي (الهسـتون) ويكون إشكال خادعة artifacts ولكنة يصلح كمثبت عام. لذلك أن اختيار المثبت يتوقف علـى نـوع العينة والغرض من الدراسة . إن نجاح بعض المثبتات لعينة ما لايعنى أنة يصلح لغيرة من العينـات

.لذلك يجب التعرف على طبيعة تركيب العينة والتراكيب التي يراد دراستها ،ولذلك فان التفكير في نوع المثبت المستخدم وتركيبة عملية هامة جدا .من الضروري، أن تحتوى جميع المثبتات على احد المواد المخثرة للبروتين. وعامة، محلول FAA ينجح في كثيرا في تثبيت العينات النباتية مثل القطاعات في السيقان والأوراق والجذور ولكنة لايصلح لعمل تحضيرات لدراسة حبوب اللقاح ،الكر وموسومات ،والميتوكندريا .

يتضح مما سبق ضرورة اختيار نوع المثبت ومعرفة طبيعة العينة المراد تثبيتها(طرية ،صلبة ،سهلة التحطيم) والغرض من الدراسة والجزء المراد دراسته .

ملاحظات مهمة في عملية التثبيت:

١ـ يجب ألا تزيد إبعاد العينة المراد تثبيتها عن ٥×٥×٥ مم لضمان وصول المثبت إلي جميع الأنسجة والخلايا بسرعة.

٢ـ يجب أن يكون حجم المثبت(حوالي عشرة أضعاف علي الأقل) أضعاف حجم النسيج قد يصل حجم إلي ٥٠ مرة إذا كانت العينات تحتوي علي كميات كبيرة من الماء وتستثني من ذلك المثبتات السامة والمرتفعة الأسعار.

٣ـ تختلف مدة التثبيت باختلاف المثبت.

٤ـ يجب اختيار مثبت مناسب للجزء المراد دراسته أذا يمتاز كل مثبت بقابليته الجيدة في تثبيت نسيج معين أو خلايا معينة أو حتى أجزاء معينة في الخلية دون الأخرى.

٥ـ النماذج التي تحتوي علي كميات كبيرة من الهواء والذي يحول دون رسوبها في المحلول المثبت (الأوراق والسيقان المجوفة) يجب استخدام المضخة الماصة لسحب الهواء من النموذج، وذلك حتي تكون عملية القتل والتثبيت سليمة، وحتى لا تطفو حينما توضع في الشمع المنصهر في الفرن، وبذلك لا تنجح عملية التشريب بالشمع وتتكسر القطاعات عند استخدام الميكروتوم.

٦ـ نظرا لتنوع المثبتات وكثرتها فمن المفضل للأشخاص المبتدئين استعمال مثبت واحد أو اثنين ويجب عليه معرفه استعمالاتهم وتأثيراتهم وبعد ذلك يمكن التوسع في استخدام المثبتات الأخرى.

المواد التي تستخدم كمثبتات للعينات

١ـ الكحول المطلق :

هي مادة رخيصة الثمن وتقوم بالتثبيت بسرعة قد لا تستغرق ساعة من الزمن ولكنه من الصعب أن يحتفظ الكحول المطلق بنقاوته وخلوه من الماء حيث أن مجرد تعرضه للهواء يمتص الرطوبة الجوية بسرعة ولذلك يتغير تركيزه ويمكن اختبار خلوة من الماء بإضافة قطرة من الزيلول إذا تعكر دل ذلك علي وجود الماء بة.

جدول المواد المستخدمة فى تجهيز الشبتات البيولوجية

خصائص المادة	النفاذية	الاكسدة	الصلابة	الغسيل		التأثيرات		
الكحول	سريع	مختزل	يزيد	الكحول	يخثر	يخلط	انكماش	تتلف	بسيط
الفورمالين	بطيء	مختزل	قوى	الماء الجاري	-	غير مخلط	-	-	يساعد
الكلوروفورم	سريع	مؤكسد	-	الماء الجاري	-	-	-	يزيلها	-
حامض الخليك	سريع	مؤكسد	ضعيف جدا	الكحول	تقلص	يحلل	يرسب الهستون	يزيب	-
حمض البكريك	سريع	مؤكسد	ليونة	الماء والكحول	يرسب	يخلط	يؤثر	لايؤثر	-
حمض الكروميك	بطيء	مؤكسد قوى	يزيد	الماء الجاري	-	يخلط	يحمى الكروموسومات	لايؤثر	-
ثنائى كرومات البوتاسيوم	سريع	مؤكسد	ضعيف جدا	الماء الجاري	-	غير مخلط	يذيب DNA	-	الصبغات الحامضية
رابع اكسيد الازميوم	بطيء	مؤكسد	قوى	الماء الجاري	-	غير مخلط	-	-	-
كلوريد الزئبق	متوسط	مؤكسد قوى	متوسط	الكحول	-	يخلط	-	-	يساعد

٢ـ كحول ايثايل ٩٥% :

هو محلول حفظ جيد ويمكن تحضير تركيزات مختلفة منه وسوف نوالي كيفية تحضـير التركيـزات المختلفة منه والعينات التي يتم تعينها في كحول ٩٥% يمكن حفظها في كحول ٧٠% لفترات طويلة.

٣ـ الفورمالين Formalin :

هو محلول الفورمالدهيد المشبع (٤٠%) وهذا المحلول يفقد قوته نتيجة لتعرضه للهواء وعندما يتحلـل يمكن معرفة ذلك بظهور رواسب بيضاء وفي هذه الحالة يصبح غير صالح للاستخدام عادة يحفظ فـي

زجاجات داكنة اللون وهو محلول حامضي التأثير ،محلول حفظ جيد يتخلل الأنسجة ببطء. الفورمالين النقي يؤدي إلي تصلب الأنسجة ولهذا يستخدم مخففا بالماء.

أنواع المثبتات البيولوجية

أولا ـ مثبتات حامض الخليك Acetic acid Fixatives

١ ـ محلول كارنوي Carney's fluid

هو محلول سريع النفازية يستخدم لمدة ١٥-٦٠ دقيقة للقمم الجذرية ولمدة ساعة في حالة حفظ المتوك . هذه المحاليل جيدة في دراسة النواة فى قمم الجذور والمتوك وهو غير صالح للدراسات السيتولوجية حيث تؤثر على السيتوبلازم ويوجد منة عدة تحضيرات :

المحلول ا

- كحول مطلق	٣سم٣
ـ حامض خليك ثلجي	٥سم٣
ـ كلوروفورم	١٥سم٣

المحلول ب

- كحول مطلق	١٥سم٣
- حامض خليك ثلجي	٥سم٣

٢ ـ محلول الفورمالين -الحامض- الكحول Formalin- aceticacid- Alcohol (F.A.A.)

يتكون من :

ـ كحول إيثيل ٥٠ أو ٧٠ %	٩٠سم٣
ـ حامض خليك ثلجي	٥سم٣
ـ فورمالدهيد(٣٧ %)	٥سم٣

هو مثبت شائع الاستعمال للنماذج النباتية وتستغرق مدة التثبيت حوالى١٨ ساعة .يمكن تغيير كمية كل من حامض الخليك الفورمالين، وذلك تبعا لنوع العينة المراد دراستها. فـي حالـة دراسـة الأنسـجة الخشبية Woody tissues، تستخدم كميات أقل من حامض الخليك وكميات أكبر من الفورمالين مثل محلول بليس، وذلك لكون الفورمالين بطئ الدخول في مثل هذه الأنسـجة ويسـتعمل محلـول FAA

كحافظ Preservative للنماذج لفترات طويلة دون أن يلحق أي ضرر بالنسيج .يفضل استخدام كحول ٥٠% في حالة النماذج الرهيفة، وكحول ٧٠% في حالة النماذج الأكثر صلابة مثل السيقان والجذور.

٣ـ محلول البروبيونيك و الفورمالين Formalin - Propionic acid – Alcohol (F.P.A)

وهو يتكون من :

ـ كحول إيثيل ٩٥ %	٥٠سم٣
ـ حامض خليك ثلجي	٥سم٣
ـ فورما لين	١٠سم٣
- ماء مقطر	٣٥ سم٣

ويفضل استخدام (F.P.A)عن(F.A.A.) فى الدراسات التشريحية حيث أنة لايفقد فاعليته بسـرعة كما فى حالة F.A.A

٤ـ محلول الكحول والحامض Methanol -Acetic acid (MAA)

يستخدم هذا المثبت فى حالة دراسة المتوك،حيث يتم هرس المتوك فىمحلول سـترات مـنظم ١و % (pH=٤.٦) ثم تنقل المتوك الى MAA ويتم تغيير المثبت مرتين كل مرة ٥ دقائق . يتم الحفظ لمـدة ٢٤ ساعة على درجة - ٢ درجة مئوية ثميتم الغسيل قبل الفحص . من عيوب هذة الطريقة انها تدمر السيتوبلازم ولكنها تحافظ على الكروموسومات.

٥- محلول بليس Bles's fluid

ـ كحول إيثيل ٧٠ %	٩٠سم٣
ـ حامض خليك ثلجي	٣سم٣
ـ فورمالين	٧سم٣

٦-محلول كليرKahle's fluid

ـ كحول إيثيل ٩٥ %	٣ سم٣
ـ فورمالين	١٢سم٣
ـ حامض الخليك ثلجى	٢ سم٣

- ماء مقطر ٦٠ سم٣

يتم تثبيت العينات فيه لمدة ٢٤ ساعة اواكثر ولا يحتاج للغسيل بمحلول خاص ويمكن استخدام جميـع الصبغات معه وهو مثبت جيدللدراسات السيتولوجية.

٧- محلول جليسون Glison's fluid

ـ كحول إيثيل ٩٥ % ٧ سم٣

ـ فورمالين ٢٩سم٣

ـ حامض الخليك ثلجى ٠.٤ سم٣

- ماء مقطر ٦١ سم٣

- حامض النتريك ١.٧ سم٣

يتم تثبيت العينات فيه لمدة ٢٤ ساعة او اكثر. يستخدم اليود فى الصبغ وهو مثبـت جيـد للدراسـات البيولوجية.

٨- محلول كارنوى وكلارك Carnoy's&Clarkes fluid

يتكون من :

ـ كحول إيثيل مطلق ٦٠سم٣

ـ حامض خليك ثلجي ١٠سم٣

ـ كلوروفورم ٣٠ سم٣

هو مثبت سريع التحلل داخل العينة وتستغرق مدة التثبيت حوالى٣٠ - ٦٠ دقيقة .ليس ضروريا غسل العينات منة ويجب وضع العينات فى كحول ٨٠% بعد وقت التثبيت وهو مثبت جيد لدراسة النواة.

ثانيا ـ مثبتات حامض الكروميك Chromic acid Fixatives

ا- محلول نافا شين Navashin's fluid

وهو يتكون من محلولين أ ، ب :-

محلول (أ) :

- حامض الكروميك ١جم.

- حامض خليك ثلجي ٧سم٣

- ماء مقطر ٩٢سم٣.

محلول (ب) :

- فورما لين متعادل ٣٠سم٣

- ماء مقطر ٧٠سم٣

- يمزج المحلول (أ) و (ب) عند الاستعمال بأحجام متساوية من كلا من المحلولين

- مدة التثبيت هي ١٢ - ٢٤ ساعة

-هذا المثبت جيد للبراعم Buds والمتوك وقمم الجذور والكروموسومات.

ب ـ مزيج حامض الكروميك والخليك الضعيف Weak chromic – acetic acid

ـ حامض الكروميك ١٠% ٢.٥سم٣

- حامض خليك مائي ١٠% ٥سم٣

ثم يكمل حجم إلي ١٠٠سم٣ بالماء المقطر وهو مثبت جيد للفطريات والطحالب الخيطية.

ج ـ مزيج حامض الكروميك والخليك القوي Strong chrom – acetic acid mixture

ـ حامض الكروميك المائي ١٠% ١سم٣

ـ حامض الخليك المائي ١٠% ١٠سم٣

يكمل الحجم إلي ١٠٠سم٣ بالماء المقطر وتضاف كمية قليلة من المالتوز.

للحصول علي نتائج أفضل يستعمل هذا المحلول لتثبيت المواد الخشبية والأوراق الصلبة.

مدة التثبيت أقل من ٢٤ .

يراعي أن تغسل بعد التثبيت بالماء عدة مرات.

يفضل تيار بطيء من الماء.

د- محلول لوبيانكو Lobianco's fluid

ويتركب من

ـ حامض الكروميك	١ سم٣
ـ حامض الخليك ثلجي	٥ سم٣
- ماء مقطر	١٠٠ سم٣

ملاحظات :

- هو مثبت جيد للأنسجة الحيوانية
- يجب تحضيره قبل الاستعمال
- تثبت العينات بة لمدة ١٢ ساعة ثم
- يتم الغسيل بالماء الجاري حتى يختفى اللون من محلول الغسيل.

د- محلول جات Gat's fluid

ـ حامض الكروميك	٠.٧ سم٣
ـ حامض الخليك ثلجى	١ سم٣
- ماء مقطر	٢٠٠ سم٣

- مثبت جيد للأنسجة النباتية وخاصة لدراسة الكروموسومات في قمم الجذور والسيقان
- يجب تحضيره قبل الاستعمال
- تثبت العينات بة لمدة ١٢ ساعة
- يتم الغسيل بالماء الجاري حتى يختفي اللون من محلول الغسيل.

هـ - محلول فليمينج Flemming's fluid

مثبت جيد للعينات الصغيرة والانسجة الضـعيفة مثـل البـراعم Buds والمتـوك وقمـم الجـذور والكروموسومات حيث انه يحمى الانوية والسيتوبلازموالميتوكندريا . وتثبت فية العينات لمدة ٤ -٢٤ ساعة حسب تركيز المحلول القوى والضعيف ويتكونكل منهم من محلولين .كمايجب غسل العينات بعد استخدامة فى ماء جارى لمدة ١٢-٢٤ ساعة ثم يحفظ فى كحول ٧٠ %

١-المحلول القوي يتكون من محلولين أ &ب

- محلول (أ) :

- حامض الكروميك ٧٥مل

- حامض خليك(١%) ٥سم٣

- محلول (ب) :

- حمض الاوزميك (٢%) ٢٠ سم٣

- يمزج المحلول (أ) و (ب) عند الاستعمال .

- مدة التثبيت هي ٤ ساعات،على ان يكون حجم المحلول من٥ -٦ مرات قدر حجم العينة

٢-المحلول الضعيف يتكون من محلولين أ &ب

- محلول (أ) :

- حامض الكروميك ٢٥مل

- حامض خليك(١%) ١٠سم٣

- ماء مقطر ٥٥سم٣

- محلول (ب) :

- حمض الاوزميك (٢%) ٢٠ سم٣

- يمزج المحلول (أ) و (ب) عند الاستعمال .

- مدة التثبيت هي ٢٤ ساعة،على ان يكون حجم المحلول ٥٠مرة قدر حجم العينة

لايعتبر محلول فلمنج مثبت عام ويجب استخدام معه صبغات خاصة

ثالثا ـ مثبتات حامض البكريك Picric acid Fixatives

أ- محلول بوين Bouin's fluid

يوجد منة نوعين احدهما قوى والاخر ضعيف

١- المحلول القوى Strong Bouin

يتكون من المكونات التالية :

- محلول مائي مشبع من حامض البكريك (١.٣%) ٧٥سم٣
- فورمالين (٣٧ -٤٠ %) ٢٥سم٣
-حامض خليك ثلجي ٥سم٣

ويستخدم لمدة ١٢-٢٤ ساعة كمثبت جيد للكروموسومات فى قمة الجذور ويمكن حفظ العينـات فـى كحول ٧٠ %لفترات طويلة .

٢- المحلول الضعيف Weak Bouin

يتكون من المكونات التالية :

- محلول مائي مشبع من حامض البكريك (٥%) ٧٥سم٣
- فورما لين (٣٧ -٤٠ %) ١٠سم٣
-حامض خليك ثلجي ٥سم٣
-ماء مقطر ٣٥ سم٣

ويستخدم لمدة ١٢-٢٤ ساعة كمثبت جيد عند دراسة الجليكوجين حيث أنة يحافظ عليها ثم يجب غسل العينات فى كحول٢٠ %(لإزالة المتبقي من حمض البكريك) ثم تتم عمليات التجفيف والطمر .عامـة هذا المثبت يوثر على الميتوكوندريا .

ب- محلول ألن Allen's fliud (محلول بوين المعدل)

يحضر محلول ألن من المكونات التالية :

- حامض البكريك ١٠ سم٣
- فورما لين ١٥سم٣
- حامض خليك ثلجي ١٠سم٣
- ماء مقطر ٧٥ سم٣

- يضاف حامض الكروميك(١جم) عند الاستعمال مع المزج جيدا ثم نسخن عند ٣٧ درجة مئوية.

-يضاف يوريا Urea ١جم (يستعمل البعض ١جم من المالتوز بدلا من اليوريا) .

- مدة التثبيت ٤ ساعات.

-يستخدم المحلول كمثبت لمدة ٢٤ ساعة للكروموسومات في الطور الاستوائي Metaphase والطور الانفصالي anaphase وكذلك لدراسة البراعم فى العديد في أنواع النباتات .

جـ- محلول برازيلBrasil's fluid

- محلول مائي مشبع من حامض البكريك (٥%)	١.٥ سم٣
- فورما لين (٣٧ - ٤٠ %)	٢٤سم٣
-حامض خليك ثلجي	٦سم٣
-كحول ايثايل ٩٥ %	٤٢ سم٣

ويستخدم لمدة ١٢-٢٤ ساعة كمثبت جيد عند للدراسات السيتولوجيةو الجليكوجين حيث أنة يحافظ عليها . ثم يجب غسل العينات فى كحول٢٠ %(لإزالة المتبقي من حمض البكريك) ثم تتم عمليات التجفيف والطمر .

رابعا- مثبتات ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium Dichromate Fixatives

أ-محلول لافدوسكى Lavdowsky ’s fluid

- ثنائي كرومات البوتاسيوم	٥جم
- كلوريد الزئبق	١٥و جم.
- حامض خليك ثلجي	٢سم٣
- ماء مقطر	١٠٠سم٣

هو مثبت جيد للانسجة النباتية نظرا لتقليل كمية كلوريد الزئبق مما يسمح ببقاء العينات لفترات طويلة فى المحلول.

ب- محلول هيلى Helly’s fluid

- ثنائي كرومات البوتاسيوم	٥و٢جم
- كلوريد الزئبق	٥ جم

- كبريتات صوديوم ٢ جم

- فورما لين ٢٠ سم٣

- ماء مقطر ١٨٠ سم٣

-هو مثبت جيد للأنسجة الحيوانية والنباتية،

- يجب تحضيره قبل الاستعمال في زجاجات غامقة ويحفظ بعيدا عن الضوء (حيـث تختـزل ثنـائي كرومات البوتاسيوم بواسطة فورما لين) ،

- تثبت العينات بة لمدة ٢٤ ساعة،

-يتم الغسيل في الظلام باستخدام فورمالين٤ %

ج-محلول هيدينهين Heidenhain 's fluid

- ثنائي كرومات البوتاسيوم ٣.٦ جم

- كلوريد الزئبق ٩ جم

- حامض خليك ثلجي ٩سم٣

- فورما لين ٢٠ سم٣

- ماء مقطر ١٨٠سم٣

- مثبت جيد للأنسجة الحيوانية ،

- يحضر محلولين احدهم يحتوى على كلوريد الزئبق حامض خليك ثلجي والثاني يحتوى على بقيـة المكونات

-يتم خلطهم قبل الاستعمال وتثبت العينات و الغسيل في الظلام

د -محلول شامبى Shampy 's fluid

- ثنائي كرومات البوتاسيوم ١٢سم٣

ـ حامض الكروميك (١%) ٣٥سم٣

-رابع أكسيد الازميوم(٢ %) ٢٠ سم٣

- ماء مقطر ٢٤ سم٣(يضاف قبل الاستخدام)

- تثبت فية العينات لمدة ٢ -٤ ساعة ثم يتم الغسيل لمدة ٤ -٢٤ ساعة فى ماء جـارى ثـم تحفـظ العينات فى كحول٥٠ % ويستخدم فىتثبيت العينات المصابة وهو مثبت جيد مع الهيماتوكسلين .

هـ -محلول سياكيو Ciaccio 's fluid

- ثنائي كرومات البوتاسيوم ٥٦جم

- حامض خليك ثلجي ١٠سم٣

- حمض الفورميك المركز ٤و سم٣

-ماء مقطر ١٨٠سم٣

- مثبت جيد لدراسة الدهون ،ويغسل بالماء الجارى .

خامسا: مثبتات الزئبقMercuric fixatives

يستعمل كلوريد الزئبق كمثبت اساسى للبروتين ولكن من عيوبه أنة يودى إلى تلف الأجهـزة حيـث يسبب تحلل الفولاذ ومن أهم محاليله:

ا- محلول جيلسون Gilson's fluid

- حمض نتريك مركز ٨و سم٣

- كحول ٩٥% ٥ سم٣

- كلوريد الزئبق ١ جم

- حامض خليك ثلجي ٢وسم٣

- ماء مقطر ٤٣سم٣

مثبت جيد للأنسجة الحيوانية. تحفظ فية العينات الكبيرة الحجم فترات طويلـة دون أن يحـدث لهـا تصلب العينات الرهيفة تقلل عدد الساعات ثم تغسل فى كحول ٧٠% وتحفظ فية . يحضـر محلـولين احدهم يحتوى على كلوريد الزئبق و حامض خليك ثلجي والثاني يحتوى على بقية المكونات ثـم يـتم خلطهم قبل الاستعمال .

٢- محلول كارنوى وليبرن Carnoy & Lebrun's fluid

ويتكون من كلوروفورم و حامض خليك ثلجي وكحول مطلق (١:١:١)

ويستخدم لحفظ النماذج الصلبة مثل البذور والعظام حيث انة يخترق النماذج بسرعة

من عيوبة انة يؤثر على بعض المكونات .

ج- محلول ورسيستر Worcester's fluid

-كلوريد الزئبق(محلول مائى مشبع)	٤٥ سم٣
-حامض خليك ثلجي١٠%	٥سم٣
-فورما لين	٢ سم٣

مثبت جيد للأنسجة النباتية التى تحتوى خلاياها على مواد متنوعة مثل الخلايا المفرزة للانزيمات فى البادرات وتثبت العينات بة لمدة ١٢ ساعة ثم يتم الغسيل فى كحول ٧٠% مضاف الية ١% يوديـد البوتاسيوم .

د- محلول زينكر Zenker's fluid

يحضر من المكونات التالية :

- كلوريد الزئبق(٧جم فى١٠٠مل)	٦٤ سم٣
- فورما لين	٢٠سم٣
- حامض خليك ثلجي	٤سم٣
- كلوريدصوديوم (١٠)	٥ سم٣
-Trichloroacetic acid	**١٠سم٣**

وهو مثبت جيد وسريع للانسجة الحيوانية وخاصة لدراسة بعض الامراض،ويجب تحضيرة بكميـات قليلة حيث انة محلول غير ثابت، ويجب اضافة حمض الخليك الثلجى قبل الاستعمال للتغلب على هـذة المشكلة، وتثبت العينات بة لمدة ٢٤ ساعة ثم يتم الغسيل بالماء الجارى لمدة ليلة حتى يختفى اللـون من محلول الغسيل ويمكن استخدامة للعينات النباتيةبتقليل كمية كلوريـد الزئبـق كمـا فـى محلـول لافدوسكى.

الباب الثالث

الصبغات Dyes

الصبغات Dyes

العينات تصبح شفافة بدرجة لايمكن رؤيتها تحت المجهر بعد اجراء العمليات السابقة ولذلك يجـب ان يتم تلوين هذة القطاعات باستخدام احد الصبغات، ولذلك تهدف عملية الصبغ إلي ايضاح تراكيب الخلية وإمكانية تمييز الأنسجة التي تتركب منها قطاعات النماذج المختلفة بالإضافة إلي التغيرات التي تحدث فيها سواء تكوين أنسجة جديدة أو تغيرات في تركيب الأنسجة أو التمييز الحادث في الخلايـا خـلال مراحل تكشفها أو دراسة زوائد البشرة المتنوعة أو أغراض أخري. تتوقف نجاح عملية الصبغ علـي نوع الصبغة المستخدمة والسائل المذيب لها، بالإضافة إلي دقة الصبغ وإزالة الصبغة الزائدة ولا توجد صبغة واحدة تصلح لجميع الإغراض والأهداف المراد التعرف عليها من مختلف الأنسجة والخلايـا . يستخدم عادة نوعين من الصبغات اواكثر لتعطى كل منهم لونا مميزا عن الأخرى وبهـذه الطريقـة يمكن التمييز بين محتويات الخلية وخاصة بين النواة والسيتوبلازم وباقي محتويات الخلية ،وقد يستخدم البعض صبغة منفردة لتلوين معظم المحتويات وهذه تكون للدراسات العامة الغير متخصصـة. لـذلك تتوقف طريقة الصبغ على الغرض من الدراسة وعلى نوعية المكونات التي يجـب تلوينهـا ليسـهل فحصها . ويرجع ظهور اللون إلى وجود مجموعات تسمى حوامل اللون Chromophore (وهـى المسئولة عن ظهور اللون مثل مجموعة النتروجين الموجودة فى الميثيل البرتقالي اومجموعةالاندمين الموجودة فى ازرق المثيلين)حيث ترتبط مع المجموعة المتأينـة بالصـبغة Auxochrome (وهـى مجموعات تحمل الشحنات السالبة والموجبة الموجودة بالصبغة). والمفروض فى الصبغة المسـتخدمة أن ترتبط بالتركيب أو المكون الخلوي المراد صبغة دون أن تتأثر بالعمليات التالية التي تجرى للعينـة .ويفسر ذلك على أساس أن الشحنة التي تحملها الصبغة ترتبط بالشحنة التي توجد على المكون الـذي يقبل الصبغ فمثلا البروتين يحمل شحنة موجبة ولذلك يقبل الصبغ بالا صباغ الحامضية مثل الايوسين (تسمى بصبغات السيتوبلازم) أما النواة تحمل شحنة سالبة ولذلك ترتبط بالا صباغ القاعديـة مثـل الأزرق المثيلين اوالهيماتوكسلين (تسمى بصبغات النواة) ،مع العلم أنة ليس pH محلول الصـبغة اى علاقة بعملية الصبغ ولكن الأساس فى عملية الصبغ هو الشحنة التي توجـد علـى Auxochrome ولذلك قد تستخدم بعض المواد التي تعرف بالمظهرات Modrants وهى مواد وسـيطة تزيـد مـن ارتباط الصبغة بالجزء المراد تلوينه .ولذلك أصبح استخدام الصبغات، وأنواعها علمـا قائمـا بذاتـه. وضعت فيه مؤلفات عديده مثل مجلة Stain Technology ويصل عدد الصبغات المستخدمة اكثـر من ٢٥٠ نوع ،ومما لا شك فيه أن الفرد الواحد لن يستطيع أن يتعرف علي هذا العدد.

أولا: الصبغات الطبيعية Natural Dyes

هى صبغات لم تنتج صناعيا حتى الان ويتم استخراجها من النباتات اوالحيوانات او الاشنات .وتعتبـر من اقدم انواع الصبغات حيث استخدامها القدماء المصريين منذ الاف السنين فى الرسم على المعابد.

١ـ البرازيلين Brasilin :

هي مادة ملونة يحصل عليها من أشجار الخشب الأحمر البرازيلـي Brasilian Red Wood وهـي صبغة مرتبطة كيميائيا بالهيماتوكسين. تستخدم هذه الصبغة في صورة محلول ½ % في كحول ايثايل ٧٠% ويجب أن تترك بعد تحضيرها لمدة أسبوع حتي تنضج (وذلك بعيدا عن الضوء). ويستخدم قبل الصبغة مظهر Mordant (مثبتات الصبغة وهي عبارة عن أملاح معادن تستخدم لإظهـار أو تثبيـت الصبغة) هو(Iron Alum) Ferric Ammonium Sulphate لفترة حوالي ½ سـاعة ثـم يـزال المظهر بالماء وتنقل في محلول كحول ٧٠% لفترة قصيرة بعدها توضع التحضـيرات فـي محلـول البرازيلين (لمدة قد تصل ١٢ ساعة).

٢ـ الهيماتوكسلين Haematoxylin :

صبغة تستخرج من خشب شجرة البقم الأسودHaematoxylon campechianum. وتوجد الصـبغة في صورة بلورات عديمة اللون أو بنية (هي المفضلة). تذوب الصبغة في الماء أو الكحول علـى ان يتم اكسدة الهيماتوكسلين ليصبح في صورة الهيماتين (هى المسئولة عن اللون) ويستخدم معها مظهـر من الحديد أو الألمونيوم(هى التى تظهر لون الصبغة). الصبغة ذات لون أحمر في وجود الأحمـاض وزرقاء في وجود القواعد.وهى صبغة ضعيفة متخصصةتستخدم فى الدراسات البيولوجية حيث تعتبر من اهم الصبغات المستخدمة فى صبغ النواة لانه يصعب ازالتها بالمذيبات المستخدمة اثنـاء عمليـات التجفيف والترويق بينما تزول من باقى المكونات. الصبغة امـا ان تسـتخدم بعـد خلطهـا بالمثبـت Modrant وتسمى بعملية الصبغ المباشر Direct staining او ان تعامل القطاعات بالمثبت اولا ثم تعامل بالصبغة ثانيا وتسمى بعملية الصبغ غير المباشر INdirect staining .وتوجـد عـدة طـرق لتحضيرهذة الصبغة وكيفية الصبغ بها تسمى عادة باسماء القائمين بتحضيرها .

طرق تحضير الصبغة:

يتطلب استخدام الصبغة ان يتم تحضير المثبت ومحلول الصبغة الاساس:

أ-المثبتات Modrants

هي عبارة عن أملاح معادن تستخدم كمظهرات اومثبتات للصبغة ومن أشهر أنواع المثبتات التي يـتم استخدامها :

١- Aluminum Ammonium Sulphat(Amonia Alum)
٢-Alum Aluminum Potassium Sulphat
٣- Tartaric acid

٤-Ferric Ammonium Sulphat (Iron Alum)
٥- Copper Sulphat
٦- Ferrous Sulphat (Iron)

ب-محلول الصبغة الأساسHematoxylin Stock Solution

ويتم تحضيره كمايلى:

١- صبغة هيماتوكسلين ١٠ جم

٢-كحول ايثايل مطلق ١٠٠ مل

تذاب الصبغة فى الكحول ويترك المحلول بعيدا عن الضوء والهواء داخل زجاجة غامقة لمـدة ٣ -٤ شهور حتى تنضج . الصبغة تتحلل في درجات الحرارة العالية ويتكون ريم علي سطحها ،وفي هـذه الحالة يعتبر المحلول غير ناضج لعملية الصبغ وكذلك يكون محلول الصبغ غيـر صـالح إذا تحـول المحلول إلي اللون البني. يمكن تحضير محلول أكثر ثباتا نسبيا بإضافة ٥سم من كحول أيثايـل ١٠% إلى ١٠٠سم Methyl cellosalve، ٥٠سم ماء مقطر ، ٥٠سم ماء عادي(لوجود مركب الكالسـيوم الذائب فيه) مع اضافة أثار من بيكربونات الصوديوم ثم يرج المحلول.وفي هذه الحاله يمكن استخدامه في الحال وهذا المحلول لا يفسد عند ارتفاع الحرارة ويحتفظ بصلاحيته للصبغ فترة أطـول. معظـم الصعوبات التي تحدث عند استخدام صبغة إليهما توكسلين تحدث خلال عمليـة إزالـة الصـبغة ، لا يستخدم نفس محلول الصبغة كمظهر ومزيل للصبغة

أ-طرق الصبغ الغير المباشر

١ ـ طريقة هيدنهين Heidenhain’s H.:

وتستخدم هذه الطريقة لصبغ الانسجة ،الطحالب ،الفطريات وفي هذه الطريقة تعامل القطاعات بالمظهر Iron Alum (٥%) لمدة ½ - ٢ ساعة. ثم تعامل بالصبغة.

يحضر محلول الصبغةكما يلى :

١- محلول الصبغة الاساس ٥ مل

٢- كحول ٩٥ % ٥مل

٣- ماء مقطر ٩٠ مل

وترشح الصبغة ويتم استخدامها .

يمكن استخدام كلوريد الحديد كمظهر أو مثبت بدلا من Iron alum حيث يستخدم محلول ٢-٥% لمدة ½ ساعة لتثبيت الصبغة ثم يزال المظهر ثم يجري الصبغة يتم تمييز الصبغة باستخدام محلول المظهر (١-٣%).ثم تغمر الشرائح بالماء ثم يتم استخدام الصبغة لمدة ½ ساعة ويعاد غمر الشرائح بالماء .لإزالة الصبغة الزائدة من القطاعات تعامل ثانية بالمظهر ولهذا فإن المظهر يعتبر مثبتا للصبغة ومزيل للصبغة الزائدة.

٢ ـ طريقة ريجاد Regaud's H.:

يحضر محلول الصبغةكما يلى :

١- محلول الصبغة الاساس	١٠مل
٢- جلسرين	١٠مل
٣- ماء مقطر	٨٠ مل

وترشح الصبغة ويتم استخدامها .

ب-طرق الصبغ المباشر

١ ـ طريقة ديلافيد Delafield's Method

في هذه الطريقة تمزج الصبغة والمظهر معا وتحضر الصبغة بطريقتين:

***الطريقة القصيرةShort method**

١- محلول الصبغة الاساس	١ مل
٢-المثبت Amonia Alum (٥ %)	١٠٠ مل

***الطريقة الكلاسيكيةClassical method**

١- محلول الصبغة الاساس	٤ مل
٢-المثبت السابق (١%)	٤٠ مل

يترك المحلول معرضا للهواء حوالي اسبوع و يضاف إلي المحلول بعد ترشيحه ١٠٠سم من الجلسرين و١٠٠سم من كحول الميثيل ويترك في الهواء حوالي ٢ شهر لينضج(حتى يصبح اللون داكن)وبعدها يمكن استخدامه في الصبغ.قبل الاستخدام مباشرة يتم تخفيف الصبغة بالماء المقطر بنسبة (١ :١).

٢-طريقة هاريز Harris's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلى :

١- محلول الصبغة الاساس	٥مل
٢- جلسرين	١٠مل
٣- ماء مقطر	٢٠٠ مل
٤- المثبت Iron Alum	٥ جم
٥- حمض خليك ثلجى	١٠ مل

٦ -اكيد الزئبقيك٢٥وجم (يضاف قبل الاستخدام بيوم واحد فى وجود حمام من الماء البارد) .

* يضاف المثبت إلى الماء مع التسخين حتى تمام الذوبان . ترشح الصبغة ويتم استخدامها .

٣-طريقة ايرليش Ehrlich's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلى :

١- محلول الصبغة الاساس	١٠مل
٢- جلسرين	١مل
٣- ماء مقطر	١٠ مل
٤- المثبت Iron Alum(٥ %)	١٠ مل
٥- حمض خليك ثلجي	١ مل
٦ -جليسرين	١٠ مل

*يضاف المثبت إلى الماء مع التسخين حتى تمام الذوبان.تخلط الصبغة والكحول والحـامض ثـم يضاف المثبت وتحفظ فى زجاجه داكنة (بعيدا عن الضوء) ثم يضاف اليها ٢و جم يوديد صوديوم قبل الاستخدام .

٤- طريقة كارزى Carazzi's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلي :

١- محلول الصبغة الأساس	١٠مل
٢- جليسرين	٥٠مل
٣- ماء مقطر	٢٠٠ مل
٤-* المثبت Iron Alum	٢٥ جم
٥- يوديد بوتاسيوم	١جم

*يضاف المثبت إلى الماء مع التسخين حتى تمام الذوبان. ترشح الصبغة ويتم استخدامها.

٥- طريقة ماير Mayer's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلي :

١- صبغة الهيماتوكسلين	١.٥ جم
٢- جليسرين	١٥٠مل
٣- ماء مقطر	٣٥٠ مل
٤- المثبت Iron Alum	٢٥ جم
٥- يوديد صوديوم	٠.٢جم
٦- حمض خليك ثلجي	١٠مل

تذاب الصبغة فى قليل من الماء ثم يضاف المثبت إلى٣٠٠ مل من الماء مع التسـخين حتـى تمـام الذوبان ثم تخلط معا ثم يستكمل الماء إلى ٣٥٠ مل ثم يضاف يوديد الصوديوم إلى المحلـول السـابق (ببطء) . يترك المحلول لمدة ٣٠ -٦٠ دقيقة ثم يرشح ويضاف إلية الحامض والجلسرين .

ويتم استخدام هذا المحلول مباشرة ويمكن استخدامه خلال شهرين من تحضيره وبعدها يفقد صلاحيته.

٦ - طريقة مالورى Mallory's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلي :

١- صبغة الهيماتوكسلين	٠.٥ جم
٢-حمض الفوسفوتنجستيك	١٠ جم

٣- ماء مقطر	٥٠٠ مل
٤- كلوريد زئبقيك الأحمر	٥ وجم
٥- فوق أكسيد الأيدروجين	٢مل

تذاب الصبغة فى قليل من الماء. ثم يذاب حمض الفوسفوتنجستيك إلى الماء مع التسخين حتى تمام الذوبان ،ثم تخلط المحلولين معا، ثم يبرد المحلول ويضاف إلية فوق أكسيد الإيدروجين . يترك المحلول لمدة أسبوع (حتى يصبح لون الصبغة بني) ويتم استخدامها .

٧- طريقة فيرهوف Verhoff's Method

يحضر محلول الصبغ كما يلي :

١- صبغة الهيماتوكسلين	٥و جم
٢-كحول مطلق	١٠ مل
٤- كلوريد حديديك (١٠ %)	٤مل
٥- محلول يود	٤مل(انظر تحضير اليود)

تضاف الصبغة إلى الكحول وتسخن ثم يتم الترشيح ويضاف إليها بقية المكونات وتستخدم الصبغة خلال ٢٤ ساعة ويستخدم كلوريد حديديك (٢%) كمثبت .

٨- طريقة ويجرWeiger's Method

و يتم تحضير المحلولين أ &ب

المحلول أ : ١- محلول الصبغة الأساس	١٠مل
٢--كحول ٩٥ %	٩٠ مل
المحلول ب : ١- كلوريد حديديك (٣٠ %)	٤مل
٢- ماء مقطر	٩٥مل
٣-Hcl مركز	١مل

يتم خلط المحلولين قبل الاستخدام بنسبة (١:١) ويمكن استخدام الصبغة خلال من٢-٤ ساعات من تحضيرها .

٣ـ الكوكينيال ومشتقاته Cochineal and derivatives :

هذه المادة عبارة عن مسحوق أحمر مصفر اللون. يحصـل عليـه مـن مطحـون أجسـام حشـرة Cochineal واستخلاص المادة الملونة منها ونظرا لتنوع طرق الاستخلاص، واختلاف الحشرات فإن مادة الكارمن Carmin وهي المادة الحمراء اللامعة التي يحصل عليها من الكوكينيال يكون متنوعـا في تركيبة.الكارمن هو مخلوط معقد، المادة الأساسية الملونة هي حـامض الكارمينيـك Carminic acid يكون مختلطا بها شوائب مختلفة أهمها الكالسيوم والألمونيوم يستخدم كل من الكارمن وحـامض الكارمينيك في الدراسات الهستولوجية بسهولة وتعطي محاليل الصبغ في أي منها نتائج متشابه. ويعتبر الكارمن شائع في عمليات الهرس Smears بواسطة Iron Acetocarmin .

الكارمن قليل الذوبان في الماء أو الكحول ولكنها تذوب بسهولة في القلويدات القوية ولهذا فإن محاليله تكون حامضية أو قلوية. حامض الكارمينيك يذوب في الماء بينما يكون قليل الذوبان في الكحول (٣% في كحول ٧٠%). ويتم استخلاص حامض الكارمينيك باذابة١٠ جم من البوركس مع ٨ جـم مـن الكارمين في ٢٥٠ مل من الماء المقطر ثم الغليان لمدة ٣٠ دقيقة ثم الترشيح ثم يتم تبخير الماء حتـى تمام الجفاف وهذا المسحوق (حامض الكارمينيك) يذوب بسهولة في الكحول ٧٠% .ويعتبر حامضـي الكروميـنيك العنصر الفعال الأساسي في محلول الصبغ.ومن طرق تحضير الصبغة مايلى :

١ - ماير كارمن Mayer’s Carmin

ويتركب المحلول مما يأتي:

١ـ صبغة الكارمن الحامضية	واحد جرام
٢ـ Aluminum Ammonium Sulphat alum	١٠ جم
٣ـ ماء مقطر	٢٠٠ سم٣
٤ـ فورما لين أو بلورة ثيمول (مادة حافظة)	١ سم٣

٢-صبغة ميسكارمن Mucicarmine Stain

١- صبغة الكارمن	١ جم
٢- ايدروكسيد الالمونيوم	١جم
٣- كلوريد الالمونيوم	٥و جم

٤- كحول ٥٠ % ١٠٠ مل

تضاف الصبغة الى ايدروكسيد الامونيوم فى دورق سعة ٥٠٠ مل ثـم يضـاف الكحـول و كلوريـد الالمونيوم وتسخن لمدة ٢ دقيقة ثم تبرد سريعا وتترك لمدة اسبوعين حتى تنضـج .تخفـف بالمـاء والكحول ٥٠% (١:١)

٣-صبغة الاسيتوكارمن Acetocarmin

صبغة شائعة الاستخدام فى الدراسات السيتولوجية وخاصة للعينات الطازجة.

صبغات الكارمن شائعة الاستخدام في الوقت الحاضر فهي ثابتة إلي درجة كبيرة، لا تصبح الصـبغة زائدة التركيز، حتى الزيادة أن حدثت يمكن إزالتها بسهولة باستخدام حامضي Hcl مخفف ٠.١%.

ثانيا : الصبغات الصناعية Artificial Dyes

(صبغات قطران الفحم Coal – Tar Dyes)

صبغات كثيرة تختلف في تركيبها الكيماوي وتأثيراتها علي الأنسجة النباتية وتستخرج من قطران الفحم Coal Tar بعض هذه الصبغات يكون حامضي وبعضها قلوي ومن هذه الصبغات ما يذوب في الماء قليلاً أو كثيرا وأخري في تركيزات من كحول الإيثايل وزيت القرنفل وغيرها.

الاختلافات في أسماء الصبغات كثير فليس هناك طريقة دولية لتسميتها. فهناك أسماء جديدة لصـبغات كانت معروفة قديما. الأمر الذي يؤدي إلي حدوث أخطاء عند الاستخدام. ومن المفضل إتباع إرشادات الهيئة الخاصة بالصبغات البيولوجية والمسماة Commisian on Biological Stain وفيمـا يلـي بعض الصبغات مرتبة حسب الحروف الإنجليزية (أبجديا) يلي ذلك الاسم المعترف بة وأحيانا أخـري غير مدعمة.وعادة يمكن تحضير هذة الصبغات بتركيز من٥و -١%فى الماء المقطر اوكحول الايثيل ٥٠ -٩٥ % .

١- الفوكسين Fuchsin

صبغة تذوب بسهولة في الماء وعبارة عن بلورات خضراء اللون ويوجد منها نوعين بالأسواق هما :

أ- الفوكسين القاعدي Basic Fuchsin :

من أهم الصبغات المستخدمة في صبغ الجدر الخلوية الملجننة والمسوبرة ، هذه الصبغة قاعدية قليلـة الذوبان في الماء (٠.٢٥%) وتذوب بنسبة ٦٠% في كحول ٧٥% ويحضر محلول الصبغة ٥% فـي كحول ٧٠% هذه الصبغة صالحة للاستخدام في صبغ النوى في الخلايا.

يمكن استخدام محلول مائي مشبع للصبغة بنجاح ويمكن إضافة قليل من أيدر وكسيد الامونيوم المركز إلي محلول الصبغة الكحولي (5% في كحول ٧٠%) حتى يصبح المحلول عديم اللون أو أصفر باهت. تغمر الشرائح في الصبغة بضعة دقائق تغسل بعدها في كحول ٩٥% أو كحول مطلـق حتـى تصـل الصبغة إلي اللون المناسب يجري الترويق باستخدام زيت القرنفل الذي يغسل بالزيلول ويجري التحميل في كندا بلسم.ومن التحضيرات لهذه الصبغة والتي تستخدم في صـبغ البكتريـا والعينـات النباتيـة والحيوانية مايلى

١ - صبغةالكربول الفوكسين carbol Fuchsin ١

١– فوكسين قاعدي	٠.٣ جم
٢- كحول ٩٥ %	١٠ مل
٣ – فينول	٥ جم
٤- ماء مقطر	٩٥ مل

تذاب الصبغة فى الكحول ثم يضاف الفينول وتترك عدة أيام وترشح قبل الاستخدام .

٢- صبغة الفوكسين لزيل Ziehl's Fuchsin

ويتم تحضير الصبغة كما يلي :

١ –فوكسين قاعدي	١ جم
٢- كحول مطلق	١٠ مل
٣ – فينول	٥ جم

حيث تتكون عجينة من خلط المكونات الثلاثة ويتم عملية غسيل العجينة بالماء المقطـر (١٠٠ مـل) على عشر مرات كل مرة ١٠ مل ، ويتم تجميع محلول الغسيل فى دورق سعته ١٠٠ مل ، تتـرك المحلول لعدة ساعات قبل ترشيحه . عادة يتم الصبغ لمدة ١٠ -٢٠ دقيقة ويستخدم حامض الخليك ١ % فى عملية تمييز الصبغة

٣-صبغة مينيفل Mineval's Stain

١– فوكسين قاعدي	٠.٥جم

٢- كلوريد حديديك	٣جم
٣ – محلول فينول مشبع	٩و٣ جم
٤- ماء مقطر	٩٥ مل
٥-حمض خليك ثلجي	٥مل

يتم تحضير الصبغة تحت دولاب الابخرة .

ب ـ الفوكسين الحامضي Acid Fuchsin :

صبغة حامضية ناتجة عن خلط الفوكسين القاعدي مع حمض السلفونيك H٢so٣ وتستخدم في صـبغ نسيجي القشرة و النخاع والجدر السليلوزية . تذوب الصبغة في الماء وبقلة في الكحول. يحضر محلول الصبغة١% في كحول ٧٠% أو ½ % في ماء مقطر. ويفضل المحلول الكحـولي. تـؤثر الصـبغة بسرعة في الأنسجة ويمكن إزالتها بالكحولات عالية التركيز. تتطلب الدراسـة المورفولوجيـة بقـاء النماذج في الصبغة حوالي ساعتين ، لذا يستخدم محلول الصبغة في ٧٠% كحـول. ويمكـن تمييـز الصبغة باستخدام محلول مشبع من حامض البكريك Picric acid في كحول ٧٠% حوالي دقيقة ثـم تغمر في كحول ٧٠% حتى يظهر اللون الأحمر اللامع بدلا من لون الحامض الأصفر. يتم التجفيـف بسرعة، وكذلك الترويق ويجري التحميل مباشرة.ومن طرق الاخرى لتحضيرهذة الصبغة طريقة Van Gieson's ويتم تحضيرها كما يلى:

١ –فوكسين حامضى (٥ و%)	١٥مل
٢- حمض البكريك	١٥ مل
٣ – ماء مقطر	٥٠مل

يضاف الى المحلول السابق ٢٥ ومل حمض Hcl اوننتريك مركز حتى يزيد من عملية التمييز .إذا ذكر اسم الفوكسين فقط دون ذكر إذا كان حامضي أو قاعدي في هذه الحالة هو الفوكسين القاعدي.

٢ـ الانيلين الأزرق Aniline Blue :

له أسماء أخري Cotton Blue, Water Blue , China Blue صـبغة حامضـية لصـبغ الجـدر السليلوزية باللون الأزرق. ويتم تحضير الصبغة

أ-يذاب من١-٢ جم من الصبغة فى١٠٠ مل من كحول ايثايل ٩٠% تزال الزائد من الصبغة باستخدام كحول ايثايل ٩٠% لفترة قصيرة ، تثبت الصبغة باستخدام كحول ايثايل ٩٥% مضاف إليـه بضـعة قطرات من حامضي Hcl ويجري الترويق باستخدام زيت القرنفل .

ب- لاكتوفينول ازرق الانيلين Lactophenol Cotton Blue

يذاب من١جم من صبغة ازرق الانيلين فى١٠٠ مل من لاكتوفينول .عند الاستخدام يضاف ٥مل مـن المحلول السابق إلى ١٠٠ مل من لاكتوفينول وتستخدم هذه الصبغة للطحالب والفطريات .

طريقة تحضير لاكتوفينول

١-فينول	**١٠ جم**
٢- ماء مقطر	**١٠ مل (تسخين حتى الذوبان)**
٣- جليسرين	١٠ مل
٤- حمض لاكتيك	**١٠ مل**

جـ يذاب من١-٢ جم من الصبغة فى١٠٠ مل من الماء المقطر ثم يضاف إليهم ٢مـل حمـض خليك الثلجي .

د- ازرق الانيلين الفينولى Phenol-aniline blue

١-فينول ٥ %	١٥ مل
٢- صبغة ازرق الانيلين ٦ %	١مل
٣- حمض خليك ثلجي	٤مل

تترك الصبغة لمدة ساعة ثم يتم ترشيحة .

٣ـ البنفسجي المتبلور Crystal Violet:

ويسمى أحياناً Gentian Violetهي صبغة قاعدية تذوب في الماء بنسـبة ١.٦٨% وفـي الكحـول بدرجة أكبر حيث تكون ١٣.٨%. ويعتبر البنفسجي المتبلور من أهم الصبغات المستخدمة في الدراسة السيتولوجية ، في كثير من الأحيان ينتج من استخدامه تحضيرات تفوق تلك التي يحصل عليهـا مـن استخدام الهيماتوكسيلين.وتحضر هذه الصبغة بإضافة ٢جم منها فى ١٠٠ مل من حامض الخليك ،كما يمكن أن تحضر هذه الصبغة في ماء مقطر بنسبة ١% ويفضل اسـتخدام محلـول الصـبغة حـديث

التحضير. ومن طرق تحضير هذه الصبغة طريقة ليللىLillie's Crystal violet حيث يتم تحضـير محلولين أ & ب كما يلي :

المحلول أ: تذاب واحد جم من كريستال فيوليت في ١٠مل كحول ٩٥ %.

المحلول ب: تذاب ٤وجم من خلات الامونيوم في ٤٠مل ماء مقطر.

ثم يتم خلطهما معا . الصبغة تزول بسرعة باستخدام كحولات التجفيف ولهذا تذاب الصبغة في زيـت القرنفل. محلول الصبغة في زيت القرنفل يمكن حفظه في زجاجات بقطاره. فهنـاك طريقـة أخـرى تضمن عمل محلول مشبع فى زيت القرنفل تضاف بضعة قطرات منه إلي أناء صبغ مملوء بالزيلول. هذا المخلوط غير ثابت وعند استخدامه يعاد إلي قوته بإضافة مزيد مـن الصـبغة إليـه بـين فتـرة وأخري.كثيرا ما يؤدي استخدام هذه الصبغة إلي زيادة تركيزها في سيتوبلازم خلايا المرستيمات القمية في البراعم والقمم الجذرية ، وللتخلص من هذه تنقل الشرائح من الماء إلي محلول مائي ٢% حـامض خليك لفترة ½ ساعة ويمكن تغيير الحامض بضعة مرات تغسل النماذج في ماء جاري لمـدة سـاعة. وتحضر الصبغة للاستخدام فى صبغ البكتريا(صبغة جرام) بالطريقة التالية:

١- كريستال فيوليت	٢جم
٢-كحول ٩٥ %	٢٠مل
٣-اكسالات الامونيوم	٨و جم
٤-ماء مقطر	٨٠ مل

تذاب الصبغة فى الكحول والاكسالات فى الماء ثم تترك لمدة ليلة اويتم تسخينها برفـق حتـى تمـام الذوبان.يتم خلط المحلولين ثم ترشح .

٤ـ الأرثروسين Erythrosine:

صبغة حامضة ، تختلف درجة ذوبانها تبعا للملح ، فهي تذوب في الماء بنسـبة ١٥و – ١١ % وفـي الكحول. الإريثروسين صبغة ممتازة وتصلح لصبغ الغلاف الجيلاتين للطحالب الخضراء المز رقـة ، يستخدم محلولا كحوليا بنسبة ١% في كحول ايثايل ٩٥% أو زيت قرنفل يجري الصـبغ حـوالي ٣ دقائق علي الأكثر ويمكن الاكتفاء بعشرة ثواني إذا كانت الصبغة في زيت القرنفـل. ويمكـن عمـل محلول يستخدم فيه الكحول وزيت القرنفل كما يلي :

١ـ أريثروسين	١ جم

٢ ـ كحول مطلق ٥ سم٣

٣ ـ زيت قرنفل ٩٥ سم٣.

تذاب الصبغة أولا في الكحول ثم يضاف زيت القرنفل.

٥ ـ الأخضر السريع Fast Green:

صبغة حامضية ثابتة تصبغ بوضوح تام الجدر السليلوزية والسيتوبلازم في فترة قصيرة ، تذوب الصبغة بمقدار ١٦% في الماء المقطر بينما في الكحول بنسبة ٣٣%. يحضر محلول الصبغة قبل استخدامه ببضعة أيام ، ولا يتعدي ١% مائي أو ٠.١% كحولي، يفضل محلول الصبغة في الكحول وزيت القرنفل ويحضر هذا المحلول علي النحو التالي :

١ ـ أخضر سريع ½ جم.

٢ ـ مقادير متساوية من كحول ايثايل مطلق، زيت قرنفل و Methyl Cellesolve حتى يصبح المحلول ١٠٠ سم٣.

محلول الصبغة الناتج يكون أخضر داكن ، ويمكن معرفة تركيز اللون بأخذ قطرة من محلول الصبغة علي شريحة زجاجية ، إذا كان المحلول زائد اللون يمكن إضافة زيت القرنفل حتى التركيز المطلوب في اللون.

يفضل عدم استخدام الأخضر السريع مع السفرانين لتمييز الصبغة الأخيرة حتى لا تصبح الأنسجة غير متميزة. يصبح لون الصبغة أزرق في المحاليل القاعدية أما في أوراق وسيقان النباتات المائية ومعظم عاريات البذور يكون اللون أخضر مزرق ونادرا أخضر.

٦ ـ الأخضر الضوئي Light Green:

صبغة حامضية تذوب بمقدار ٢.٣٥ % في الماء بينما في الكحول ٠.٨٢%. هذه الصبغة ممتازة في صبغ السيتوبلازم والجدر الخلوية السليلوزية ، وهي شائعة الاستخدام في هذا الغرض ، الأخضر السريع يفوق هذه الصبغة وهو أكثر ثباتا في بعض الطحالب الخيطية ، يستخدم الأخضر الضوئي بدلا من الأخضر السريع الذي يؤدي استخدامه إلي عتامة الصبغة لا سيما في حالة التركيزات العالية.

الأخضر الضوئي صبغة تتلاشي تدريجيا خلال فترة قصيرة بينما الأخضر السريع أكثر ثباتا. يجب ألا يزيد تركيز الصبغة عن ٠.٥% ويعتبر تركيز ٠.٢% مناسبا، الصبغ يكون سريعا يحضر محلول الصبغة في كحول ٩٥% يفضل الكثيرين إذابة الصبغة في كحول مطلق يخفف بزيت القرنفل ويحفظ

المحلول في زجاجة قطارة. هذه الصبغة تختزل غيرها من صبغات قطران الفحم لا سيما السـفرانين ولذا يجب ألا تترك لفترة طويلة.

إذا استخدم الأخضر الضوئي مع سودان ٤ يمكن تمييز الجدر المسوبرة والمكوتنة من غيرها الملجننة.

تحضر الصبغة بأحدي الطريقتين التاليتين :

الطريقة الأولى:

١ـ أخضر ضوئي	½ جم
٢ـ كحول مطلق	٢٥سم٣
٣ـ زيت قرنفل	٧٥ سم٣

الطريقة الثانية:

١ ـ أخضر ضوئي	٠.٥ جم
٢ ـ زيت قرنفل	١٠٠ سم٣

تذاب الصبغة في الكحول ثم تضاف زيت القرنفل ، يراعي الاحتراس حتى لا يحـدث خطـأ نتيجـة لاستخدام صبغة أخري مثل الأخضر السريع أو أخضـر المالاكيـت Malachite green أو أخضـر الميثيل Methyl green.

٧ـ أخضر المالاكيت Maluchite green:

أسماء بديلة (Emerald green light green) صبغة قاعدية خفيفة ، يمكن استخدامها بنسبة ٠.٥ - ٣ % في الماء أو٠.٥ % في كحول ٩٥% يستخدم أخضر مالاكيت مع السفرانين إذا اسـتخدم أخضـر مالاكيت وحدة كصبغة فتترك القطاعات بة لفترة دقيقة ، يستخدم في صبغ الجدر الخلوية ، السيتوبلازم ، النوى، الاندوديرميس ، البلاستيدات الخضراء ، النوى في الخلايا ، يمكن إذابة هذه الصبغة في زيت القرنفل.

إذا استخدم أخضر مالاكيت مع السفرانين ، تترك الشرائح في السفرانين حوالي ٢٠ دقيقة (١% مائي) ، تنقل بعدها إلي أخضر مالاكيت فترة ٢٠ ثانية ، الخشب والجدر والمكوتنة تظهر حمراء اللون بينمـا السيتوبلازم والجدر السليلوزية تكون خضراء اللون.

٨ _ ازرق السيلستين Celestine blue

صبغة قاعدية يمكن تحضيرها بطرق عديدة ومن أفضلهم طريقة جراى حيث يحضر محلولين أ & ب

المحلول أ: تذاب ٥و٢ جم من شب الحديد في ١٠٠مل ماء مقطر ثم يضاف ١٤ مل من الجلسـرين بعد تمام ذوبان شب الحديد

المحلول ب: مزج ١جم من صبغة ازرق السيلستين في ٥ومل من حمض الكبريتيك المركـز وذلـك باستخدام قضيب زجاجي وبعد تمام الفوران وتكون الكتلة الهشة يتم تحطيمها إلى أجزاء يتم نقلها كميا إلى المحلول (أ) ثم يتم التسخين على ٥٠ درجة مئوية ثم التبريد إلى درجة حرارة الغرفة مع تعـديل pH ليصبح ٨ وذلك باستخدام حمض الكبريتيك المركز .

٩ – صبغة الايوسين Eosin

صبغة حمراء تذوب فى الماء وتستخدم فى صبغ السيتوبلازم والأغشية البلازمية كما تستخدم كصبغة مضادة مع الهيماتوكسلين وفى صبغ خلايا الدم والبكتريا (صبغة جرام) ويوجد منة نوعين:

أ- الايوسين الأصفر Eosin Yellowish (Eosin Y) حيث يعطى لون اصفر٠

ب- الايوسين المزرق Eosin bluish (Eosin b)٠

ويسمى الايوسين الامبراطورى الأحمر (Imperial red) ٠

١٠ـ الأحمر المتعادل Neutral red:

قلوي ضعيف ، يذوب في الماء بنسبة حوالي ٥.٥ % بينما في الكحول بنسبة ٢.٥% الصبغة ذات لون أحمر فاتح في الوسط المتعادل، أحمر لامع في الحامضي ، أصفر في القلوي. يستخدم محلـول مائيـا بنسبة ١% توضح هذه الصبغة تفاعلاتها مع تراكيب الخلايا الحية.

١١ـ البرتقالي ج Orange G :

صبغة حامضية تذوب في الماء بنسبة ١٠.٨٦% بينما في الكحول بنسبة ٠.٢٢% تعتبر من الصبغات ذات الأهمية الكبيرة بالنسبة للسيتوبلازم، يختلف مذيب الصبغة تبعا للطريقة التي تستخدم بها، يكفـي استخدام جرام واحد من الصبغة في ١٠٠ سم٣ من المذيب المستخدم (ماء، زيت قرنفـل أو كحـول) تأثير هذه الصبغة سريع ، يمكن استخدام محلول Methyl cellesolve يجـري تخفيفـه بمـذيبات أخري.

١٢ ـ السفرانين Safranin

صبغة قاعدية تستخدم بكثرة في صبغ الأنسجة النباتية، تذوب في الماء بمقدار ٥.٤٥% وفي الكحول ٣.٤١% لا سيما في الكحولات عالية التركيز (٧٠%) توجد أنواع من السفرانين تذوب بسهولة في كل من الماء و الكحول.

السفرانين توجد منه تجاريا بضعة أنواع تختلف بدرجة كبيرة في اللون والذوبان وحتى أثارهـا علـي الأنسجة وتوجد عدة طرق لتجهيز الصبغة تتوقف على كمية الصبغة ونوع المذيب المستخدم .

طرق بتجهيز محلول السفرانين ما يأتي :

أ ـ الطريقة الأولي :

١ ـ سفرانين	١ جم
٢ ـ كحول ايثايل مطلق	١٠٠ مل
٣ ـ ماء مقطر	٢٠٠ مل

ملاحظة : يضاف الماء المقطر بعد بضعة أيام.

ب ـ محلول مشبع من السفرانين فى كحول مطلق ثم يخفف بنسبة ٥٠% بالماء المقطر

ج ـ ١ ـ سفرانين	١ جرام
٢ ـ كحول ٩٥%	١٠٠مل

يذاب السفرانين في الكحول ، يعتبر هذا المحلول أساسي ، يخفف جزء منه بآخر مماثل له من المـاء عند الصبغ وإذا وجد مركزا يخفف باستخدام كحول ٥٠%.

د ـ ١-سفرانين	١جم
٢-كحول ايثايل (٥٠-٧٠%)	١٠٠ سم٣

ويمكن تحضير صبغة لصبغ الأنسجة الحيوانية كما في طريقة جوهانسـون Johansen's safranin كمايلى:

١ – سيوسولفت الميثيل	١٠٠ مل
٢ –كحول ٩٥ %	٥٠ مل

٣- فورمالدهيد(٤٠ %)	٤ مل
٤ –خلات الصوديوم	٢ جم
٥ – صبغة السفرانين	٢ جم
٦- ماء مقطر	٥٠ مل

تذاب الصبغة فى سيوسولفت الميثيل ثم يضاف الكحول ،وتذاب خلات الصوديوم فى المـاء ويضـاف إليهم الفورمالدهيد .ثم يتم خلط المحاولين.

يمكن ترك الشرائح في محلول الصبغة لمدة ٢٤ ساعة وتزال الصبغة الزائدة باستخدام كحول ايثايـل ٥٠% مضافا إليه بضعة قطرات من حامض Hcl أو بواسطة كحول ٩٥% مضافا إليه بضعة قطرات من حمض البكريك Picric acid، تزال الصبغة الزائدة أولاً بالماء حتى لا تتبقي رواسب في الأنسجة يتعذر إزالتها.يستخدم السفرانين في الدراسات لتشريحية حيث تصبح الجدر الخلوية المكوتنة ، الملجننة ، المسوبرة وكذلك الانويه والكر وموسومات.

١٣ـ سودان ٤ Sudan٤:

صبغة حامضية ضعيفة لا تذوب في الماء بينما تذوب بنسبة ضعيفة في الكحول ، تتنوع في التركيـب الكيماوي وصفات الصبغ وتختلف عينات نفس الصنف. تذوب صبغة سودان ٤ في كحـول ٥٠% أو ٧٠% ويعتبر من أفضل الصبغات للزيوت. يستخدم محلول مشبع كحولى من الصبغة ويجرى الصـبغ حوالي ١٠ دقائق أو أقل ثم تغسل الصبغة بسرعة بالكحول وتحمل العينة في الجلسرين،يراعي ألا تبقي التحضيرات فترة أطول من اللازم في الصبغة.يمكن أن تثبت الأنسجة في محلول لا يـذيب الزيـت، الراتنجات،الشموع، الحليب النباتي، الأدمة تصبغ باللون الأحمر عند استخدام سودان ٤.يفضل استخدام سودان ٤ عن سودان ٣ حيث يصبغ الأول الزيوت بدرجة أكثر وضوحا من النوع الثاني.

١٤ـ محلول اليود Iodine Solution :

يستخدم اليود كيمائيا كمادة كاشفة عن النشا فعند خلط محلول اليود مع حبيبات النشا يتكون معقد يـود النشا (لونه ازرق) .كما تستخدم الصبغة في تلوين السيليلوز،و البروتينات، والأنيولين باللون البنـي وكل من القلويدات ، الكيوتين ، الفلين ، البكتين – الكالوز Callose يصبغها باللون الأصفر ويحضـر كما يلي :

١- يود	٢ جم
٢-يوديد بوتاسيوم	٤جم

يحضر يوديد البوتاسيوم بإذابته في ١٠٠ مل ماء مقطر ثم يضاف اليود.

هناك العديد من الصبغات التي يمكن استخدامها وعامة يمكن تلخيص أهـم الصـبغات التـي يمكـن تحضيرها واستخدامها فى الجدول التالي:

الصبغة	التركيز	المذيب		ملاحظات
		ماء	كحول	
١- الفوكسين الحامضى	٥و ١جم	ماء -----	-------- ٧٠%	
٢- ازرق المثيلين	١-٢ جم	-----	٥٠ %	
٣- التوليدين	١ جم	ماء	-------	
٤-ازرق الانيلين	٢ -٥ ١- ٢	ماء -----	--------- ٩٠ %	
٥-ازرق فيتوكسين	٥ جم	ماء	----------	٢ مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠مل صبغة
٦- الايوسين	٥ جم ٥وجم	ماء -----	-------- ٩٥%	يضاف ٢مل Hcl (١ع)
٧- الاريثروسين	١ جم	-----	٩٥ %	
٨-الأخضر السريع	٥ و جم	-----	١٠٠ %	
٩-السفرانين	١جم	ماء	٩٥ %	
١٠-البرتقالي الذهبى (ج)	١جم	ماء	٩٥ %	يضاف ٤مل Hcl(١ع)
١١-ازرق الانيلين	٢-٥ جم	ماء	٩٥ %	يضاف ٢مل حمض خليك ثلجي للمحلول المائي
١٢- احمر كونجو	٥جم	ماء	----- -	٢مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠ مل صبغة
١٣ -اخضر النفثول	٢٥ جم	ماء	----- -	يضاف ٣مل حمض كبريتيك
١٤- اخضر المالاكيت	٥و -٣ جم	ماء	---------	
١٤- البنسيو	١جم	ماء	-------	
١٥- الأخضر الضوئي	٥و - ١ جم	-	٩٥ %	
١٦ الفوكسين القاعدي	٥جم	قليلة	٧٠%	
١٧-أزرق فيتوكسين	٥جم	ماء	------ --	٢مل حمض خليك ثلجى لكل ١٠٠ مل صبغة
١٨- البنفسجي المتبلور	١ -٢ جم	قليلة	٩٥%	
١٩-احمر المتعادل	١جم	ماء	----------	
٢٠ – سودان ٣ & ٤	١ جم	ماء	٥٠ -٧٠ %	

الباب الرابع

بيئات الترقيد

بيئات الترقيد

عملية تشريب المسافات البينية فى أنسجة العينة المراد فحصها ،وكل خلية من خلاياه (حية أو مثبتة) بمادة معينة تكسبها قوة وصلابة ، وتحفظها فى حالتها الطبيعية ، لإمكان الحصول من هـذه النمـاذج على القطاعات رقيقة تحتوى على جميع المكونات الأساسية فى صورتها الطبيعية ، من بين هذه المواد الشائعة الاستخدام:

١-شمع البرافين.

٢-السيللودين.

٣- الجيلاتين.

٤-اللدائن.

تجهيز التحضيرات المجهرية:

اولا-القطاعات اليدوية

القطاعات عبارة عن شرائح رقيقة من اجزاء نباتية اوحيوانية يحصل عليهـا باسـتخدام مـوس اوشفرة حلاقة ،عامة يتم تجهيزها حسب الغرض من الدراسة .القطاعات اما ان تكون

أ- قطاعات عرضية Transverse sections

ب - قطاعات طولية ونصف قطرية Longitudinal & Radial sections

ج- قطاعات مماسية Tangicial sections

يتم عمل القطاعات اليدوية في نماذج حية ومثبتة (محفوظة في محاليل حفظ) وتحمل القطاعات علـى شريحة زجاجية في بيئة تحميل معينة أوفى الماء ثم يوضع فوقه غطاء الشريحة.أحيانـا يـتم صـبغ القطاعات قبل تحميلها لإيضاح الخلايا اوالانسجة حيث يتم الصبغ ثم إزالة الصبغة الذائدة ثم التجفيف الترويق والتحميل في البيئة المناسبة .هذه العمليات تجرى على الشريحة الزجاجيـة وتنتهـي بوضـع غطاء الشريحة فوق القطاع . القطاعات اليدوية تتوافق مع الدراسات التشريحية العامـة او لايضـاح تراكيب معينة مثل البلورات اونموات البشرة ،وكثيرا مايمكن عمل قطاعات يدوية جيدة . القطاعـات اليدوية لأتثبت باى مادة لاصقة على الشريحة الزجاجية. كثيرا ماتكون غير منتظمة في السمك حيـث يتوقف الحصول على القطاعات الجيدة على الخبرة . وعادة يتراوح سمك القطاعـات مـن ١٥ -٢٠ مبكرون، كما يفضل أن تكون العينات جامدة نوعا وليست رهيفة .وتتركز صعوبة عملية التقطيع فـي انثناء العينة عندما يصدم بموس التشريح ، وبصفة عامة يتعذر الحصول قطاعات يدوية بسمك اقـل من ١٥ -٢٠ مبكرون . من المفضل عند إجراء عملية التقطيع أن يكون موس التشريح مواجها للعينة

بزاوية ميل عريضة حتى يكون معظمة مستخدما في عملية التقطيع كما يجب ان يكون الموس خـال من اى تعرجات أو الحفر . اذاكانت العينة رهيفة توضع داخل قطعة من البطاطس اوفى قطعـة مـن ساق البيلسان بعد ان يتم عمل شق بهما كماهو موضح بالشكل التالى

يجب أثناء عملية تقطيع التمازج الطازجة أن يتم ترطيب العينة والموس بالماء ، ثم تنقـل القطاعـات بواسطة فرشاة شعر الجمل الى الشريحة الزجاجية الموضوع في منتصفها قطارة من مـادة التحميـل وأحيانا تنقل إلى طبق بتري فيه ماء ليختار أفضل القطاعات. عملية الصبغ والتجفيـف تـتم فـى زجاجات الساعة وتزال الصبغة باستخدام ماصة اوقطارة .وتستخدم الصبغات التالية فى عملية الصبغ : السفرانين –الاخضر السيع ٠-الانيلين الازرق –البنفسجى المتبلور –اليـود –الفوكسـين –التولـدين (يفضل استخدامها فى حالة توفرها).

مايجب مراعاتة عند عمل قطاعات يدوية :

١- يجب ان يكون الموس المستخدم حاد وسطحة السفلى مستوى اما سطحة العلوى يكون مقوس .كما يمكن استخدام موس خاص يتم تركيبة على حامل خاص .

٢-يجب غسل الموس فىماء الدافىءللتخاص منای مواد موجودة علية حتى لوكان الموس جديد

٣-يراعى ان تكون النماذج المراد دراستها فى حالة غضة غير ذابلة.

٤- يجب غسل العينات جيدا بلماء وازالة الاجزاء الغير مرغوب دراستها . النماذج الحقلية توضـع فى اكياس من البولي ايثيلين اوتحفظ بعد تجزئتها فى محاليل تثبيت .

٥-عند اجراء عملية التقطيع يراعى ان تكون يد الموس فى وضع عمودى . تمسك يد الموس باليـد اليمنى بين السبابة والابهام وتسند بباقى الاصابع .يمسك النموذج المراد تقطيعة باليد اليسـرى مستندا بالابهام من الامام والسبابة من الخلف .

٦- عند التقطيع يجب ان يكون سطح السكين المستوى فوق طرف العينة المراد تقطيعها ،يتم تمرير سكين الموس فوق السطح المقطوع بزاوية ٤٥ م فى اتجاة عمودى على النموذج .

٧- فحص الطاعات بعد تمام عملية التقطيع ويستبعد غير الصالح منها ،ثم يـتم نقـل القطاعـات الصالحة الى شريحة زجاجية نظيفة ويوضع عليها بضعة قطرات من الماء او الكحـول حتـى يمكن فحصها لاختبار صلاحيتها .

٨- ليس من الضرورى ان يكون القطاع كاملا طالمل ان الجزء المراد دراستة يحتوى على جميـع الانسجة .

٩-تنقل القطاعات با ستخدام فرشاة شعر الجمل وليس بالملقاط اوابرة التشريح حتى لاتحدث اضـرار بالقطاعات .

تدريب عملى :

صبغ الطاعات اليدوية بصبغة ازرق التوليدين (صبغة ممتارة لصبغ القطاعات اليدوية حيـث تصـبغ معظم المكونات الخلوية) ويتم صبغ الطاعات كمايلى :

١- ضع عدة قطرات من محلول الصبغة (نظرطريقة تحضير الصبغة ص.....) على شريحة نظيفة .

٢-انقل القطاعات الى الصبغة واتركها لمدة دقيقة ثم يتم ازالة الصبغة الذائدة باستخدام ورق ترشـيح اورق بفرة .

٣- يتم غسل القطاعات (مع المحافظة على وضع القطاع فى منتصف الشريحة)

٤- تضاف قطرة من الجلشين اوالمء الى القطاع (التحميل)

٥- يتم وضع غطاء الشريحة بحرص ويزال الذائد من مادة التحميل .

يلاحظ بعد فحص القطاع ان مكونات النسيج تظهر بالوان مختلفة حسب المكون الموجود فى القطاع :

البكتين --- الاحمر، اللجنين --- الازرق، الفينول --- الاخضر او الاخضـر المـزرق ، البارنكيما ----الاحمر ، الانابيب الغربالية والخلايا المرافقة والصفائح الوسـطى ------احمـر اواحمر ارجوانى ، الكالوز والنشا ----عديمة اللون

طريقة شمع البرافين

تعتبر طريقة شمع البرافين من اكثر الطرق شيوعا فىتحضير القطاعات مـن العينـات النباتيـة او الحيوانية ،وربما تبقى كذلك لفترات طويلة ،حتى تتوفر مواد لها مواصفات شـمع البـرافين .وذلـك لانةبتسخينة يتحول الى مادة سائلة وهذا لايتوفر فى الكثير من المواد كماانهاتمتزج بسولة بكثير مـن المذيبات ،كما انطريقة شمع البرافين تمكن معظم علماء تشريح النبات والحيوان من الحصول علـى قطاعات بسمك ٢-١٥ ميكرون وبالتالى يمكن عمل تحضيرات تظهر فيها معظم المكونـات الخلويـة اقرب ماتكون الى حالتها الطبيعية مما يسهل فحصها بالمجهر الضوئى.ورغم دقة الطريقة ولكن يواجها بعض الصعوبات . وسوف نحاول فى هذا الجزء ان نستعرض المراحل المختلفـة لعمـل الطاعـات بطريقة شمع البارافين وكيفية التغلب على معظم المشكل التى تقابل القائم بعمل التحضير وسوق يعتمد ذلك على الخبرة السخصية والملكتسبة من خلال استخدام هذة الطريقة مايقرب من ٣٥ سنة. ان عملية تححضيرالقطاعات بطريقة شمع البرافين للفحص بالمجهر الضوئى تشمل مجموعـة مـن الخطـوات المتتابعة تنتهى بنماذج مطمورة فى شمع البرافين ثم يتم تقطيعها باستخدام الميكروتوم . ولذلك يجب ان تتبع الخوات التالية بكل دقة حتى تتمكن من الحصول على قطاعات على الاقل جيدة فان ترك مرحلة

اوعدم اتمام العمل فى التوقيتات المحددة سوف تؤدى الى ضياع الكثير من الوقت والجهـد والنفقـات وتحصل على قطاعات عديمة الفائدة .

أ . جمع النماذج Collecting of materials

هي أحد الخطوات الهامة حيث أن الدقة في الاختيار تساعد علي الحصول علي افضل النتـائج عنـد الفحص في النهابة لأن الخطأ في اختيار النماذج سوف يمكن التعرف عليها بعد الانتهاء مـن معظـم العمليات والتي تستغرق كثير من الوقت والجهد وكذلك كميات كبيرة من المواد الكيماويـة التـي قـد يصعب في النهاية الحصول عليها ولذلك يجب علي الباحث ان يتبع الخطوات التالية :

١ـ تحديد نوع العضو المراد دراسته وما هو المطلوب دراسته بالتحديـد فمـثلا دراسـة التركيـب الابتدائي للساق أو الجذر لابد ان تأخذ العينات من الاجزاء التي لم يحدث بها نمو ثانوي.

٢ـ يجب ان تكون الاجزاء النباتية سليمة وغير مصابة بأي مرض او جافة ويكون ممـثلا للمرحلـة المراد دراستها. الااذا كانت الرغبة هى دراسة عينة مصابة فيجب ان تكون ممثلةللعينة.

٣ـ يعطي النموذج المراد دراستة من البداية رقم او علامة تكتب علي ورقة بالقلم الرصاص (حتي لا يذول بالماء). علي ان تدون هذه الأرقام في كراسة الملاحظات حتي يمكن الرجوع اليه مستقبلا.

٤ـ يتم غسل النموذج النباتية بالماء جيدا دون المساس بمكوناته الخارجية. اما العينة الحيوانية يفضل ان ترش موضع اخذ العينة بالمثبت المستخدممع توجيه وضع العينة حسب الرغبة من الدراسـة مـع كتابة بينات بنوع النسيج وقت اخذ العينة ونوع المثبت المستخدم.

٥ـ يوضع النموذج المراد تحضير الشرائح منه في انبوبة نظيفة ومعه الرقم الدال عليه.

ملحوظة هامة:يوجد فرق كبير عند اختيار العينة والحيوانية .فالعينة النباتيـة تختلـف حسـب البيئـة التىينمو فيها النبات حيث يخلف تركيب النبات منبيئة الى اخرى ولكن الحيوانات لايوجد فيهـا هـذا الاختلاف .

مايجب مراعاتة عنداخذ العينة الحيوانية:

أ- يجب ان تكون العينة غير سميكة بحيث لايزيد عن 5مم

ب- يجب تحديد مكان العينة بدقة (عضو ام نسيج) حيث قد تشتمل انسجة توصيل -انسجة افرازية - عضلات-اجهزةتنفسية.

جـ يجب توفير مجموعة متنوعة من المثبتات قبل اخذ العينة حيث يتطلب كل عضو اونسـيج نـوع مختلف من المثبتات ولذلك يجب اختيار المثبت الذى يعطى نتائج جيدة

د-يتطلب اخذ العينات من الحيوان ذبحة اوتخديرة للحصول على النسيج المطلوب عمل القطاعات فيه.

ب . الفتل والتثبيت

تستخدم اى من المثبتات التى تم ذكرها فى الباب الثانى ويتم اختيارها حسـب طبيعـة النمـوذج والغرض من الدراسة ونوع الصبغة التى سوف يتم استخدامها وطريقة الصبغ التى سوف يتم اتباعها .

جـ . الغسيل Washing

هي عملية إزالة المثبت الغير المتحد مع النسيج الذي يسبب بقاءه إعاقة دخول المواد الأخري مثل مواد الصبغ أو اتلاف الأنسجة كما أن بقاء بعض المثبتات في النسيج أكثر من المدة المحددة سـيؤثر علـي تركيب الخلايا.تجري عملية الغسيل بالماء او الكحول

اهم ما يجب مراعاته عند عملية الغسيل

١-المثبتات الكحولية(مثلF.A.A) فيتم غسل النماذج بالكحول وبـالتركيز نفسـه الموجـود بالمثبت (٥٠% أو ٧٠%)

٢-عندما يكون المثبت محضرا في الماء (مثل محلول تافاشين) حيث تتم عملية الغسيل بالمـاء المقطر لمدة ٣ – ٤ ساعات

٣ -إذا كان المثبت محضر في محلول منظم (كما في المثبتات المستخدمة في تحضيرات المجهر الالكتروني) فيتم الغسل بنفس المحلول المنظم.

٤-المثبتات التي تحتوى على ثنائي كرومات البوتاسيوم يجب أن تغسل العينات في ماء جـارى لمدة ١٢-١٤ ساعة قبل أن تنقل إلى الكحوليات

٥-المثبتات التي تحتوى على أملاح الفوسفات يجب أن تغسل العينات بالماء قبل الكحول٧٠% حتى لايترسب الفوسفات داخل النسيج مع التركيزات العالية من الكحوليات وبالتالي يؤثر في عمليـة الصبغ .

٦ -المثبتات التي تحتوى على حمض البكريك ولا يوجد بالمثبت كحول يجب ان تغسل العينـات فى الكحول٧٠% حتى يتم التخلص من اللون الاصفر

٧ - المثبتات التى تحتوى على حمض البكريك ويوجد بالمثبت كحول يجب ان تغسل العينـات فى الكحول٨٠-٩٠% حتى يتم التخلص من اللون الاصفر .

٨ -المثبتات التى تحتوى على اليوريا يجب ان تغسل العينات بمحلول فورمالدهيد ٤ %

٩ - المثبتات المائية التي تحتوى على كلوريد الزئبق يجب ان تغسل العينات بالماء

١٠ -المثبتات الكحولية التي تحتوى على كلوريد الزئبق يجب ان تغسل العينات بالكحول٧٠%

١١ -النماذج المثبتة فى كلوريد الزئبق و حمض البكريك و التى يتم ترقيدها فى شمع البارافين يجب ان يتم التخلص من الرواسب قبل عملية الترقيد باستخدام اى من المواد التالية :

١ -محلول لوجول Lugol's fluid

وهو محلول يتكون من :

- يوديد بوتاسيوم	١ جم
- يود	٥و جم
- ماء مقطر	٥٠ سم٣

توضع العينات فى هذا المحلول لمدة ١٢ ساعة ثم تنقل إلى كحول ٧٠% إلى أن يختفي ظهور اللـون من محلول الغسيل حيث إن حمض البكريك يكون مع البروتين مواد معقدة ذات لون اصفر ويتم إزالة اللون بإضافة كربونات الليثيوم إلى الكحول الغسيل٧٠%

٢-محلول لينوير Lenorr 's fluid

ويتركب من

- كحول ٩٥%	١٥ سم٣
- خلات الامونيوم	٥ جم
- ماء مقطر	٣٥ سم٣

حيث يستخدم هذا المحلول للتخلص من حمض البكريك الزائد.

د . التجفيف Dehydration

هذه العملية المقصود منها هو ازالة الماء تماما من الأنسجة قبل معاملتها ،وهـى عمليـة ضـرورية لتحضير العينات للفحص المجهرى قبل معاملتها بالمزيبات العضوية المختلفـة لان اغلـب المـواد المستخدمة بعد ذلك غير قابلة للامتزاج بالماء .حيث من صفات الماء كونة لا يمتزج مـع المزيبـات العضوية مثل (زيلول – كلورفورم) ،وكذلك مواد التحميل (بلسم كندا)، ومواد الترقيد (كشمع البرافين) .لذلك يجب التخلص من أى اثار للماء الموجود بالنسيج المراد دراسته قبل استخدام هذه المواد. ويجب ان يتم الانتقال التدريجى اثناء عملية التجفيف حتى لاتحدث بازمة فى خلايا نسـيج العينـة .كمـا ان الاسراع قد يسبب ان العينة تصبح هشة اذا تركت فى تركيزات الكحول اعلى من٧٠%.

١-التجفيف باستخدام كحول الايثيل

يعتبر كحول الايثيل من اهم المواد المستخدمة فى عملية التجفيف واكثرها شيوعاحيث يمكنـة ازالـة الماء من الانسجة.

تحضر التركيزات المنخفضة من الكحول من التركيزات الأعلي منها وليست بالضرورة تحضيرها عن كحول مطلق مباشرة وذلك لارتفاع ثمنه ،ولذلك يقتصر استخدام الكحول المطلق علي المرحلة الأخيرة من التجفيف .تتم عملية التحضير باتباع إحدي الطرق المذكورة سابقا.

أمثلـــــــــة :

١ ـ عند تحضير محلول ذو تركيز س % من محلول ذو تركيز أعلي وليكن ص% يؤخذ س سم٣ من محلول ص% ويكمل الحجم إلي ص سم٣ بالماء (كحول ٣٠سم٣ من كحول ٧٠% نأخذ ٣٠سم٣ مـن كحول ٧٠% ثم نكمل إلي ٧٠سم٣)

٢-استخدام جداول الخفيفات (ص)

تجري عملية التجفيف باستخدام كحول يعادل في تركيزه كحول محلول الغسيل كما يلي:

أ-اذا كان الماء هو المستخدم فى عملية الغسيل :

يبدأ بكحول الايثيل١٠% ثم يتم التدرج فى تركيزات كحوليةتزيد ١٠% عن كل تركيز سابق (٢٠% - ٣٠% - ٤٠% - ٥٠% - ٧٠%).تترك النماذج فى كل تركيز لمدة ساعتين، ويسـتخدم كحـول ٧٠% عند الرغبة في إيقاف التجربة فى حفظ العينات (مع العلم أن هذه العملية غير مرغوبة لأن بقاء النسيج لفترة طويلة في هذه التركيزات من الكحول يقلل قابلية الأنسجة للصبغ). يسـتخدم بعـد ذلـك تركيزات الكحول العالية باستخدام تركيزات تصاعدية من الكحـول٨٠% - ٩٠% - ٩٥%، وتتـرك النماذج فى كل تركيز مدة ساعتين، ثم تركيز الكحول المطلق(١٠٠%) لمدة سـاعتين، ثـم الكحـول المطلق لمدة ساعة، وذلك لضمان خلو العينات من اى اثار للماء. فى الدراسات السـيتولوجية ينصـح باستخدام تركيزات منخفضة تبدا بتركيز ٥٠% بعدها يزاد التركيز بمقدار ٥% حتى ٣٠% ثم تتلوهـا تركيزات متدرجة فى حدود ١٠% حتى ٩٠% ثم تركيز الكحول المطلق(١٠٠%) .

ب-اذا كان الكحول هو المستخدم فى عملية الغسيل

يبدا التجفيف بكحول الايثيل الذى يلى تركيزة كحول الغسيل اوكحول محلول التثبيت ان كان الكحـول احد مكوناتة. ثم يتم التدرج فى تركيزات كحوليةتزيد ١٠% عن كل تركيز سابق. مثلا اذا كان محلول التثبيت يحتوى على كحول ٥٠% تبدا عملية التجفيف بكحول ٧٠% ثم ٩٠% ثم تركيـز الكحـول المطلق(١٠٠%)وتترك العينات فى كل تركيز لمدة ساعتين مع مراعاة تغيير الكحول المطلق من ٢-٣ مرة.

٢- التجفيف باستخدام كحول البيوتيل

يعتبر كحول ثلاثى البيوتيل Tertiary Butyl من افضل المواد المستخدمة فى عملية التجفيف خاصة للمبتدئين. كمالنة يمتاز برخص ثمنه ولقابليته علي الإمتزاج مع الماء من جهة ومواد الترويق وشمع البرافين من جهة أخري اى انة يمتزج بكثير من المواد المستخدمة فى التحضيرات المجهرية.

اذا كان الماء هو المستخدم فى عملية الغسيل يبدأ بكحول ٥% ثم يتم التدرج فى تركيزات كحولية تركيزات تصاعدية من ١٠%- ٢٠% - ٣٠% - ٤٠% - ٥٠% - ٧٠%وتترك العينات فى كل تركيز لمدة ساعتين، بعد ذلك تنقل العينات الى تركيز٨٠% - ٩٠%وتترك العينات فى كل تركيز لمدة ساعة. ثم تركيز الكحول المطلق(١٠٠%) لمدة ساعتين، ثم الكحول المطلق لمدة ساعة، وذلك لضمان خلو العينات من اى اثار للماء.. اذا كان الكحول هو المستخدم فى عملية الغسيل يبدا التجفيف بكحول الايثيل الذى يلى تركيزة كحول الغسيل اوكحول محلول التثبيت ان كان الكحول احد مكوناتة. ثم يتم التدرج فى تركيزات كحولية تزيد ١٠% عن كل تركيز سابق.

العينات بعد تجفيفها فى كحول البيوتيل تصبح جاهزة لعملية التشريب فى الشمع مباشرة ويجب ان يتم الانتقال الى الشمع تدريجيا.

٣ - التجفيف باستخدام الاسيتون Acetone

تحتاج بعض تحضيرات المجهر الالكتروني إلي الأسيتون في عملية التجفيف. يبدأ بتركيز ٥% ثم يتم التدرج فى تركيزات تصاعدية من ١٠%- ٢٠% - ٣٠% - ٤٠% - ٥٠% - ٧٠% -٨٠% - ٩٠% ثم أسيتون نقى وتترك العينات فى كل تركيز لمدة ساعة او اقل (نفس تركيزات الكحول). وتجرى عملية الترويق باستخدام تركيزات الكلوروفورم المتدرجة.

٤ - التجفيف باستخدام الديوكسان Dioxan

الديوكسان مذيب يتميز بقابليته للامتزاج مع الماء ومواد الترويق (الزيلول ...) ويذيب بلسم كندا وشمع البرافين ،اى أنة يمتزج بكثير من المواد المستخدمة في التحضيرات المجهرية.التي يتم تجفيفها بة لايحدث لها بلزمة أو انكماش كما أنها لاتصبح جامدة أو هشة . لكن يعيبه أن ابخرتة سامة إذا تم استنشاقها ولذلك يجب أن يتم استخدامه في الأماكن جيدة التهوية. تنقل العينات بعد الغسيل بالماء إلى محلول الديوكسان المائي بتركيز ٦٠% ثم يتم التدرج في تركيزات تصاعدية من ٧٠% -٨٠% - ٩٠% ثم الديوكسان نقى، وتترك العينات في كل تركيز لمدة ٤ ساعات أو أكثر ،.العينات بعد تجفيفها في الديوكسان تصبح جاهزة لعملية التشريب في الشمع مباشرة ويجب أن يتم الانتقال إلى الشمع تدريجيا. يمكن استخدام الكلوروفورم أو كحول البيوتيل في إزالة اىاثار للديوكسان قبل عملية الترقيد حيث انه أثقل منهم وكل منهم اخف من شمع البرافين المنصهر .ذلك لان الديوكسان يصعب ازالتة من الأنسجة خلال عملية التشريب .

٥ - التجفيف باستخدام الجلسرين Glycerin

تنقل العينات بعد الغسيل بالماء جيدا للتخلص من اى أثار لمحلول القتل والتثبيت إلى محلول الجلسرين المائي بتركيز ٥% ثم توضع في حضان على درجة ٣٥ - ٤٠ % و يتم تبخير الماء بالتدريج (درجة غليان الجلسرين أعلى من الماء مما يسمح بتبخر الماء وطردة من العينات) . ويستمر في ذلك حتى يتم التخلص من نصف حجم محلول الجسرين و بعد تمام تبخير الماء تنقل العينات إلى كحول المطلق مع تغييره مرتين. ثم تستكمل باقي العمليات (الترويق والتشريب) . عادة يستخدم الجلسرين في تجفيف العينات الرهيفة (عند عمل تحضيرات في الطحالب والتي سبق تثبتها في محلول حمض الكروميك والخليك).

هـ. الترويق Clearing

هي عملية نزع الكحول المطلق من الأنسجة التي استخدم الكحول في نزع الماء منها. هذه العملية مهمة لان معظم الأوساط الراتنجية التي يتم الترقيد فيها لاتمتزج بالكحول أو الماء، ولذلك تستخدم مادة لها القابلية على الامتزاج بالكحول من جهة ، وبمواد التحميل ومواد الترقيد من جهة أخري (أي تذيب شمع البرافين المستخدم في عملية التشريب). والمواد المستخدمة في عملية الترويق (الزيلول- الكلوروفورم – البنزين – زيت القرنفل – زيت السيدار) لا تمتزج بالماء ولهذا يتحتم أن تكون الأنسجة جافة تماما من الماء قبل البدء في عملية الترويق. ومن أهمية عملية الترويق أن المواد التي تستخدم في عملية الترويق السابقة لها بعامل انكسار عالي مما يجعل النسيج الذي يعامل بها واضحا أو رائقا تجري عملية الترويق تدريجيا مثل التجفيف.

أهم مواد الترويق المستخدمة :

١ ـ الزيلول Xylol :

هو سائل شائع الاستعمال ولكن من عيوبه أنه يؤدي إلي زيادة انكماش وتصلب الأنسجة إذا بقيت به فترة طويلة كما أنه يجب أن تكون الأنسجة خالية تماما من الماء وكذلك الزيلول لأنه يتعكر بوجود أقل كمية، من الماء وبالتالي لا يصلح للترويق. تجري عملية الترويق الزيلول علي النحو التالي باستخدام التركيزات التالية مع الكحول.

١ ـ ٢٥% زيلول : ٧٥% كحول مطلق نصف ساعة

٢ ـ ٥٠% زيلول : ٥٠% كحول مطلق نصف ساعة

٣ ـ ٧٥% زيلول : ٢٥% كحول مطلق نصف ساعة

٤ ـ ١٠٠% زيلول (لمدة ساعة ثم يغير ويستخدم زيلول جديد لمدة ٢ - ٣ ساعة)

يراعي أن يتم التخلص من الزيلول بعد إتمام عملية التشريب في شمع البرافين حتي لا يؤدي وجـودة إلي تبلور الشمع في عملية الترقيد مما يؤدي إلي عدم صلاحية القطاعات **العوامل التى يتوقف عليهـا اختيار مادة الترويق**

١-نوع النسيج والمكونات المرغوب فى دراستها
٢- الطريقة المتبعة فى تجهيز العينة.
٣- الظروف المحيطة بعمليات الترقيد (الحرارة –الضوء .....)
٤- عوامل الامان فى استخدام مادة الترويق.
٥- سرعة نفاذة خلال النسيج.
٦- قلة تأثيره الفيزيائي والكيمائي علي مكونات النسيج.
٧- عدم تغير تركيبة بمرور الوقت.
٨- سهولة استعماله مع اعتدال سعره وتوفر عوامل الامان.
٩- يجب ان يكون معامل انكسار مادة الترويق عالى ليجعل العينات شفافة
١٠- لايوثر في قابلية الأنسجة للصبغ بل يجب ان تساعده على الصبغ .
١١- لايسبب انكماش للعينة ولذلك فعملية الترويق ليست ضرورية عند عمل تحضـيرات للانسـجة الحيوانية بسبب عدم وجود الجدار الخلوى الذى يوجد فى الخلايا النباتية والذى يقلل من عملية تقلص الخلية عند تعرضها لمواد الترويق.
١٢ -يقلل من ظهور الإشكال الغير حقيقية artifacts

كيفية اجراء عملية التشريب فى شمع البارافين كما يلي :

١ـ تضاف شرائح صغيرة من شمع البرافين إلي سائل الترويق النقي على بين فترات قصـيرة حتـي يصبح السائل مشبعا بشمع البرافين.

٢ـ يرفع غطاء أنبوبة (vial) الموجود بها النموذج وتوضع الأنبوبة علي سطح فرن شمع البرافين.

٣ـ يضاف شمع البرافين إلي المحلول وترج الأنبوبة لإذابة الشمع مع إضافة شرائح جديدة من الشمع وتستغرق العملية ٢٤ساعة .

٤ـ توضع الأنبوبة بمحتوياتها في فرن الشمع لمدة من ٣ - ٤ ساعات مع إضافة شمع جديد .

٥ـ يستبدل محلول شمع البرافين مع محلول الترويق بشمع منصهر نقي ثم يستبدل هذا الشمع من ٢ - ٣ مرات خلال ١٢ ساعة التي يوجد بها داخل الفرن وذلك للتخلص من أي أثار لمحلول الترويق حتي لا يتبلور شمع البرافين عند التقطيع أو يصبح المشع طريا.

اجراء عملية التشريب بالشمع بالطريقة السريعة التالية:-

١- تنقل العينة من محلول الترويق الي انبوبة زجاجية vial جديد يحتوي علي شمع منصهر و محلول الترويق بنسبة (٢:١) و توضع في الفرن علي درجة ٤٥ مئوية لمدة ساعة

٢- تنقل العينة الي vial جديد يحتوي علي مخلوط من الشمع ومادة الترويق (١:١) و توضع في الفرن علي درجة ٤٥ مئوية لمدة ساعة

٣- تنقل العينة الي vial جديد يحتوي علي شمع البرافين نقي و يوضع vial في فرن الشمع حتى تمام انصهار الشمع (٢-٤) ساعات .

٤- تكرر الخطوه السابقة مع تغير بشمع منصهر .

ملاحظات عامة علي عملية التشريب:-

١- يجب ان تنقل النماذج برفق اثناء عملية النقل .
٢- تعامل النموذج برفق اثناء عملية النقل .
٣- يجب معرفة درجة انصهار الشمع قبل القيام بالعمل حيث يتوقف اختيار الشمع علي نوع النسيج وسمك القطاع المطلوب .
عموما اذا كانت درجة انصهار الشمع من ٦٠-٦٢ (للقطاعات الرقيقة في الانسجةالصلبة) ودرجة انصهار الشمع من ٥٦-٥٨(للقطعات الرقيقة في الانسجة متوسطة الصلبة) . يمكن عمل القطاع فيها بسمك ٦-١٢ ميكرون .

ر. الترقيد Embedding

عملية تشريب المسافات البينية فى انسجة العينة المراد فحصها ،وكل خلية من خلاياة (حية او مثبتة) بمادة معينة تكسبها قوة وصلابة ، وتحفظها فى حالتها الطبيعية ، لامكان الحصول من هذة النماذج على القطاعات رقيقة تحتوى على جميع المكونات الاساسية فى صورتها الطبيعية ، من بين هذة المواد الشائعة الاستخدام هى شمع البرافين. هو عبارة عن خليط من مواد هيدروكربونية صلبة، درجة انصهاها بين٣٩ -٦٨ حسب الوزن الجزئى للخليط

المقصود بعملية الترقيد هي صب محتويات ما في أنبوبة النماذج من شمع ونموذج في أواني مناسبة تمهيدا لعملية التقطيع بالميكروتوم ، ثم تبريد الكتلة الشمعية بما تحوي من نماذج. والمقصود من ذلك هو إحاطة النموذج الذي تم تشريبه بشمع البرافين لتدعيمها من جميع جوانبها دون الإضرار بها حتى يمكن تقطيعها بالميكروتوم إلي شرائح رقيقة ويفضل الترقيد في شمع البرافين لسهولة إجرائها ورخص ثمنه وتوافره وبساطة تجهيزه.

مايجب توفيرة قبل إجراء عملية الترقيد في شمع البرافين :

١ـ مصباح بنزن أو موقد كحولي لتسخين ابر التشريح والملاقط التىتستخدم اثناء عملية الترقيد .
٢ـ وعاء ليوضع فيه ماء بارد أو ثلج ويجب أن يتوفر فيه السعة المناسبة لوضع اليدين.
٣ـ أبره تشريح بيد خشبية لاستخدامها في ترتيب النماذج في كتلة الشمع وحاليا توجد ابر تشريح يمكن تسخينها كهربيا.
٤ـ مصباح كهربائي يستفاد من ضوئه في ترتيب النماذج داخل كتلة الشمع.

٥ـ طبق بتري يوضع به ماء ساخن للمساعدة في ترتيب النماذج ، حيث يوضع علي سـطحه إنـاء ترقيد النماذج وما به من شمع حتى لا يتصلب الشمع بسرعة دون استكمال ترتيـب النمـاذج فتكثـر البلورات في كتلة الشمع مما يؤثر في عدم نجاح عملية التقطيع فتنكسر القطاعات.
٦ـ أواني صب شمع المناسبة

ما يجب مراعاتة عند إجراء عملية الترقيد :

١ـ أن يبرد الشمع المنصهر بسرعة حتى لا يتبلور، ولكي تظل كتلة الشمع متجانسة.إذا ترك المشـع المنصهر ليتصلب ببطء فإنه يتبلور وتصبح بذلك كتلة الشمع محتوية علي أجزاء بيضاء هشـة، وعند إجراء عملية التقطيع يتمزق ولا يمكن علاج ذلك إلا بإعادة كتلة الشمع إلي الفـرن مـرة أخري حتى ينصهر الشمع وتنقل النماذج إلي شمع منصهر جديد ثم تعاد عملية الترقيد.
٢ـ ان تلصق علي كتلة الشمع بطاقة بيانات صغيرة ويمكن وضعها في أحد أركان إناء الترقيد قبـل صب الشمع المنصهر حتى تبقي هذه البطاقة مثبته في كتلة الشمع بعد تصلبه.
٣ـ يجب أن لا توضع كتل الشمع فوق بعضها بل يجب وضع ورق مقوي بين كـل كتلتـين.يمكـن تحسين خواص الشمع باضافة بعض المواد اوعمل خليط من الشمع مع مواد اخرى

ا- بعض المواد التى تحسن من الحصول على شريط الشمع

١- حمض الاسيتارين Stearic acid (هي مادة عديمة اللون وهى مادة تشكل قوام الكثير من الدهون النباتية والحيوانية التي تستخدم في صناعة الشموع) يزيد من الصلابة .

٢- كمية من زيت الحوت (زيت العنبر) وهى مادة شمعية بيضاء تقلل درجة الانصهار.

٣- اضافة Ceresin وشمع عسل النحل تودىالى تحسين لصق القطاعات بالشمع أثناء تكـوين الشريط .

الترقيد المزدوج

١- الاجار وشمع البرافين

ويحضر بان يذاب من ٥و١-٣ جم أجار في ٩٠ سم٣ ماء مقطر في حمام مـائي ثـم يضـاف إليـة ١٠سم٣ من الفورمالدهيد (٣٧ -٤٠ %) ويخلط جيدا ثم تحفظ في الثلاجة على ٤ درجة مئوية . يتم ترقيد الأنسجة في قالب ويضاف إلية الاجار باستخدام ماصة ويوضع منة كمية على العينات ثـم يـتم عملية توجيه العينات في الاجار ويترك حتى تبرد .

٢- الرانتنج وشمع البرافين

ويمكن بة عمل قطاعات بسمك ٥-٦ ميكرون فى جميع العينات فيما عدا العينات الصلبة ويتم تحضير الخليط كما يلى

- شمع الشموع ٥ جزاء

- شمع عسل النحل ٥و١ جزء

-ترابنتين ٥و١ جزء

-شمع الكرنويل ١ جزء

- Colophony ٥و١ جزء

ويتم خلط المكونات السابقة فى فرن الشمع .ويتم التخلص من الهواء الموجود فـى العينـة بواسـطة مضخة وتترك العينات فى المخلوط لمدة ٢ ساعة قبل عملية التقطيع .

ملحوظة - يزال خليط الشمع والراتنج باستخدام Trlichloroethelen (ساخن) مع وملاحظة انها مادة سامة

٣ـ السللويدين وشمع البرافين

ز. تقطيع النماذج Section cutting

أ- العوامل التى يتوقف عليها نجاح عملية التقطيع

١- عملية التثبيت والترقيد:العينات سواء نباتية او حيوانية يسهل الحصول منها على قطاعات رقيقـة عندما تكون العينات طازجة وطرية ولكن بعد وضع العينات في المثبتات المختلفة فانة يحدث صـلابة للعينة ولذلك اختيار المثبت ونوعية بيئة الترقيد تساعد في الحصول على قطاعات جيدة .

٢-سكين الميكروتوم :حيث ان سكين الميكروتوم يتوقف عليها نجاح الحصول على قطاعات ،فيجب ان تكون السكين حادة وملساء

٣- الزاوية بين السكين وحامل القطاعات:يجب ان تكون بين ٢-٤ درجة للعينات المطمورة في شمع البرافين ،ومن٥-٧ درجة للعينات المطمورة في المواد الراتنجية اوفى حالة العينات المجمدة .

٤-صلابة مواد الترقيد : يصعب عمل قطاعات رقيقة في عينات صلبة ومواد ترقيد طريـة ،حيـث يتوقف سمك القطاع على نوع مواد الترقيد فمثلا الجيلاتين (٥٠ - ٢٠٠ ميكرون)،الجميد في الثلج (٥ -١٠ ميكرون) ،شمع البرافين (٦ – ١٥ ميكرون) ،خليط الشمع والراتنج (١-٢ ميكرون) ،الراتنج (٥و – ١ ميكرون)

ب-كيفية اجراء عملية التقطيع

عندما تكون الكتلة الشمعية Block المحتوية علي النماذج جاهزة للتقطيع بعد أن تبرد وتتصلب تماما . ثم تقطع كتلة الشمع إلي قطع صغيرة قائمة الزوايا تقريبا وتحتوي كل قطعة علي نموذج واحد أو أكثر

تبعا للغرض للدراسة وحجم النموذج. ويراعي أن يكون سطح القطعة المعرض للتقطيع بواسطة سكينة الميكروتوم مربعا أو مستطيلا حتى نتمكن من الحصول علي شـريط بـارفين Paraffin stripe).
(Ribbon ويتم تقطيع كتلة الشمع بواسطة مشرط ذو سلاح حاد ومستقيم . يتم القطع في خط مستقيم عبر كتلة الشمع، وليس عن طريق الضغط حتى لا تنكسر كتلة الشمع.

يزال الشمع الزائد من حول النموذج بواسطة المشرط حتى يصبح النموذج محاط بطبقة مـن الشـمع سمكها لا يقل عن ٢مم أما كتلة الشمع فإنها تزيد قليلا عن ذلك لإمكان تثبيت الكتلة علي حامـل كتـل الشمع الخاص بالميكروتوم كما يراعي أن تكون كتلة الشمع مناسبة لحجم النموذج حتي يسهل تقطيعها بسكين الميكروتوم.

بعد تجهز قطع الشمع المحتوية علي النموذج (كما سبق) تثبت العينات علي حامـل خـاص Block holderويتم ذلك عن طريق:

١- غمس كتلة الشمع في شمع منصهر لعمق ٢مم.

٢- تلصق مباشرة علي الحامل وتترك حتي تتصلب الشمع.

٣-يضاف بضعة قشور من شمع البرافين حول قاعدة كتلة الشمع وتستخدم إبرة تشـريح سـاخنة وذلك ليزيد من درجة تثبيتها علي الحامل حتى لا تنكسر الكتلة الشمعية عند التقطيع بالميكروتوم.

٤- تغمر الكتلة الشمعية والحامل في ماء مثلج لزيادة صلابتها

<u>مايجب مراعاتة عند تثبيت كتلة الشمع علي الحامل:</u>

١ - يجب أن تكون الكتلة الشمعية في وضع يتناسب مع الغرض من عملية التقطيع

٢- تكون مثبته في مكانها الخاص بحامل الميكروتوم

٣-يراعي عدم إدالة الشمع من حول القاعدة أو صهر جزء منها بابرة التشريح الساخنة كما يراعـي أن يكون سطح كتلة الشمع الذي سيقطع بسكين الميكروتوم أفقيا تماما.

<u>مايجب مراعاته عند استخدام الميكروتوم الدوار في عملية التقطيع :</u>

١- تثبيت حامل العينة Holder بالميكروتوم علي مسافة مناسبة من سكين الميكروتوم.

٢- تحديد سمك القطاع المراد الحصول علية بالميكرون بواسطة استخدام مؤشر الجهاز

٣- تدار يد الميكروتوم حتي يقترب السطح الأمامي من كتلة الشمع من السكين أو تلامسها.

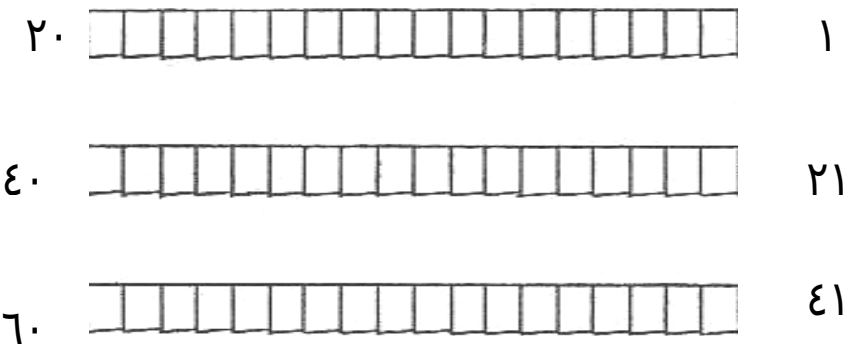
٤ـ يراعي ان تكون سكينة الميكروتوم حادة جدا واوجد بها جزء تالف او ممزق يختار جـزء مـن السكين سليم وحاد اويعاد شحذ السكين مرة اخرى حتى يمكن الحصول علي قطاعات سليمة.

٥-يراعى ان يكون النموذج الموجود داخل الكتلة الشمعية عمودى على حافة السكين .

٦ـ تعمل مقاطع ذات سمك من ٨ – ١٠ مبكرون لمعظم النماذج النباتية .

٧ـ حاول الحصول علي قطاعات متتالية من النموذج في شمع البرافين(شريط البـارافين Ribbon) خالية من العيوب حيث تلتصق نهايات

٨-عندما تحصل على قطعة مناسبة من الشريط يتم فصلها(١٠ -٢٠ قطاع) بواسطة فرشاة من شعر الجمل مبللة بالماء اوتحمل من كلتا طرفيها على ابرتى تشريح .



ترتيب القطاعات بتسلسل التقطيع

٩-توضع القطاعات على قطعة من ورق مقوى مصقول داكن اللون .

١٠- عند اصطدام السكينة بالكتلة الشمعية تتكون طاقة حرارية تؤدى الى لاصق حواف القطاعـات ممايننتج عنةتكون الشريط Ribbon .

١١- تجنب التنفس على قطعة شريط الشمع حتى لاتطير في الهواء اوتتجمع فوق بعضها .

١٢ـ يقسم الشريط البارافين الحاوي علي مقاطع متسلسلة Serial sections إلي قطـع بطـول ٦ مقاطع ويراعي الترتيب.

١٣ـ المقاطع تكون مجعدة وبالتالي فإن النسيج يكون منطوي علي بعضه لذلك تعوم المقـاطع علـي سطح حمام مائي ذو درجة حرارة أقل من درجة انصهار شمع البارفين المستعمل بـ ـ (٥-١٠ درجة مئوية)

تعويم القطاعات فى حمام مائى

١٤- بمجرد الحصول على القطاعات من الميكروتوم يجب أن يتم لصقها على الشريحة حيث تؤخذ شريحة نظيفة ويتم تحميل القطاعات الشمعية على الشرائح الزجاجية (لصق القطاعات) وتثبيتها علي الشريحة الزجاجية بطريقتين :

أ- لصق القطاعات في حالة عدم توفر المواد اللاصقة

بعد تعويم المقاطع علي سطح الحمام المائي يتم وضع الشرائح الموجود عليها شرائط الشمع على صفيحة ساخنة Hot plate لمدة ١-٢ ساعة ثم نقل الى حضانة على درجة ٤٠- ٤٥ درجة مئوية لمدة ٢٤-٤٨ ساعة للتثبيت .

ب - لصق القطاعات في حالة توفر المواد اللاصقة

أ- بعد تعويم المقاطع علي سطح الحمام المائي تغمر الشريحة المطلاة بالمادة اللاصقة في الحمام المائي ثم ترفع المقاطع علي الشريحة وتنكس قليلا لإزالة الماء.

ب- توضع قطرات من الماء المقطر علي الشريحة المطلاة بمادة لاصقة ثم ترفع المقاطع بفرشاة وتوضع علي الشريحة وتوضع الأخيرة علي صفيحة ساخنة Hot plate .

جـ- بعد ذلك تنقل الشرائح بعد اتمام أحدي الطريقين إلي حضانة عند درجة حرارة ٤٠ درجة لتجفيف (التثبيت) لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

Mounting sections on slides or section adhesives

Once the sections have been cut they should be adhered to the slide using a section adhesive.

أنواع المواد اللاصقة

١ - لاصق ماير Mayer's adhesive

١ـ زلال بيض طازج (٢-٣ بيضات).

٢ـ جلسرين مساوي لحجم زلال البيض.

*- توضع في وعاء سعة ٢٥٠سم٣ حرك المزيج جيدا

*- يتم الترشيح باستخدام صوف زجاجي glass wool أو قطن ويمكن الإسراع في عملية الترشيح بإجرائها عند درجة ٥٥ – ٦٠درجةمئوية.

*- يضاف بللورة صغيرة من ثيمول أو الفينول أو ساليسيلات الصوديوم(لمنع نمو الأحياء المجهرية).

٢- لاصق الجيلاتين لهويت Haupt's gelatine

١-جيلاتين نقي	١ جم
٢ـ جليسرين نقي	١٥ جم
٣ ـ ماء مقطر	١٠٠ سم٣
٤ـ فينول	٢ جم

* يذاب الجيلاتين في الماء علي درجة حرارة أقل من ٣٠ م ثم تضاف بلورات الفينول والجليسرين ثم يقلب المزيج جيدا ثم يرشح ، يراعي ألا يضاف الفينول ألا بعد تمام ذوبان الجيلاتين.

* توضع قطرتان من مادة Haupt اللاصقة علي شريحة زجاجية نظيفة ثم تدلك بالأصـابع علـي سطح الشريحة حتي لا تبقي منها ألا غشاء رقيق ثم تنقل قطعة شريط الشـمع علـي شـريحة وتضاف بضعة قطرات من محلول فورمالين ٣% في ماء مقطر كافية لكي يطفو شريط الشـمع علي الشريحة الزجاجية.

* لا تسخن الشريحة قبل اضافة الفورمالين.

* تسخن الشريحة علي لوح تسخين لا تزيد درجته عن ٤٠ م فمن الضروري عدم إذابـة البـرافين حيث تساعد أبخرة الفورمالين علي تجميد جيلاتين المادة اللاصقة.

* يمكن أن يساعد استخدام مشرط علي طرفة قطرة من الماء في تعديل وضع شريط الشـمع علـي طرف الشريحة الزجاجية.

* يزال الفورمالين الزائد بعد تنظيم وضع شريط الشمع علي الشريحة الزجاجية.

* لا تحرك شريط الشمع إذا كان الفورمالين أو قطرات الماء ساخنة حتي لا ينكسر شريط الشمع.

* ضع الشريحة في مكان دافئ حتي يتم التجفيف.

كما يمكن تحضيرة كمايلى

- جليسرين جيلي ٥جم، ماء ٤٥مل

* يتم التسخين حتى تمام ذوبان المادة الجيلاتينية ثم يتم تبريده.

* يتم عمل غشاء رقيق من المادة اللاصقة على هيئة فيلم رقيق على شريحة ثم يتم تعويم القطاعات في محلول فورمالين ٢ % (٥و٢ مل من الفورمالين التجاري في ٥و ٩٧ مل من الماء) يـتم تدفئة المحلول برفق حتى يتم فرد القطاعات (تسطيح القطاعات) لايتم زيادة التسخين لأنة سوف

يؤدى إلى ذوبان الشمع وتدمير القطاعات)، ثم توضع على ورق ترشيح ويتم تجفيفها علـى . ٣٧ درجة مئوية أطول فترة ممكنة بحيث لأتقل عن -٣٠ دقيقة (الحد الأدنى).

٣- لاصق بيكر Baker's adhesive

تحضير لاصق بيكركما يلى:

١ـ زلال بيض طازج ٥سم.٣

٢ـ ماء مقطر ٠ ٥سم.٣

٣–كلوريد صوديوم ٥و جم .

٤–ايدروكسى بنزوات الصوديوم ١جم

* توضع في وعاء سعة ١٠٠سم٣

* يضاف زلال بيض ثم يحرك المزيج جيدا او يوضع على جهاز طرد مركزى حتـى يصـبح المحلول رائقا .

* يتم الترشيح باستخدام صوف زجاجي glass wool أو قطن ويحفظ فى الثلاجة.

* يضاف بللورة صغيرة من ثيمول أو الفينول أو ساليسيلات الصـوديوم(لمنـع نمـو الأحيـاء المجهرية).

* كما يمكن عمل محلول مخفف باضافة ٤نقاط من المحلول السابق الى ١٠سم٣ من الماء المقطر.

٤-محلول بيكرالتجارى Commercial Baker's

١ - مادة لاصقة (التجارية) ٥و٢ سم٣

٢ - ماء مقطر ١٠٠سم٣

* يجب تدفئة المحلول على جهاز تدفئةWarming plate

* يجب خلط المحلول قبل الاستعمال .

٥-الجيلاتين Gelatin

يحضر بتركيز من ٥و -٥ % فى ماء مقطر كما يمكن قطرات من الكلورفورم . من عيوبة انة يترك خلفية على الشرائح المصبوغة ويستخدم فقد فى حالة العينات المهروسة .

٥. الصمغ Land's gum

١- الصمغ العربي ١ جم ٢- ثنائى كرومات البوتاسيوم ١جم

٣- ماء ٩٨ مل

يتم مزج الصمغ مع قليل من الماء (البارد)وازابة ثنائى كرومات البوتاسيوم في الكمية المتبقيـة مـن الماء الدافىء؛ثم يتم خلط المحلولين مع التقليب حتى تمام الذوبان ثم تترك حتى تبرد حتى حلها ، ثـم السماح لتبرد.

* توضع مسحة رقيقة من لاصقه (فيلم) على شريحة مع اتباع نفس الطريقة السابقة ولكن باسـتخدام الماء بدلا من الفورمالين.

*القطاعات يتم تعويمها في ماء دافئ على ٤٥ درجة مئوية حتى يتم فردها تماما ويتم التقاط القطاعات بواسطة شرائح تم عمل فيلم من المادة اللاصقة حيث يتم وضع الشرائح أسفل القطاعات ويـتم رفعها افقيا ، ويجب أن تكون القطاعات في منتصف الشريحة بعناية يجب التخلص من المـاء الزائد باستخدام ورق ترشيح ثم توضع على مجفف او سطح ساخن وذلك على درجة من c٣٥ إلى ٤٠ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة.

ملاحظه : من المهم المحافظة على القطاعات من الغبار اثناء عملية التجفيف.

٦- الكروموجيلاتين Chromo-gelatin

١ ـ جيلاتين ٥و١ جم.

٢ ـ ماء مقطر ١٠٠سم.٣

٣–كبريتات بوتاسيوم ٥و جم .

* توضع في المكونات فى وعاء ثم يحرك المزيج جيدا .

* يتم الترشيح باستخدام صوف زجاجي glass wool أو قطن قبل الاستخدام

* توضع الشرائح فى المحلول السابق لعدة ثوانى

* تترك لتجف على درجة حرارة الغرفة .

٧- ميثيل السليلوز Methyl cellulose

- ميثيل السليلوز ٥و -١ جم

- اثير اوكحول ١٠٠ سم٣

* تغسل الشرائح جيدا بالزيلول والكحول المطلق

* توضع الشرائح فى المحلول السابق لعدة ثوانى

* تترك لتجف على درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق

* تنقل الشرائح الى كحول ٨٠ % (لاستكمال عملية التجفيف)

* يتم غسل الشرائح بالماء .

٨- الراتنج Resin

١-الاراالديت ١٠ %

٢-اسيتون ١٠٠ سم٣

* تضاف قطرات من المحلول السابق مباشرة الى الشرائح مباشرة

* من عيوبة انة يتغير بمرور الزمن .

٩- السللودين Cellodien

ويتم تحضير السللودين بتركيز ٥و -١ % فى الاثير او الكحول

* تغسل الشرائح جيدا بالزيلول والكحول المطلق

* تغطى الشرائح بالمحلول السابق بوضع عدة قطرات من المحلول على الشـريحة -تتـرك لتجف على درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق

* تنقل الشرائح الى كحول ٨٠ % (لاستكمال عملية التجفيف) لمدة ١-٢ دقيقـة - يـتم غسـل الشرائح بالماء المقطر .

١٠-النشا Starch

تعتبر النشا مادة لاصقة جيدة افضل من لاصق ماير والجيلاتين ويتم تحضير كما يلى :

١- نشا ٣جم

٢-ماء بارد ٣٠ سم٣

* تذاب النشا فى الماء البارد ويتم التقليب جيدا

* يتم تسخين المحلول على درجة ٦٠ درجة مئوية

* يضاف 5و سم٣ من Hcl المركز

* يستكمل التسخين لمدة 5دقائق

* تضاف عدة بلورات من الثيمول بعد التبريد

* تاخذ قطرة من المحلول السابق وتوضع على الشريحة ثم توضع الشرائط على الشريحة

تقليديا Traditionally ،هناك العديدكما ذكرنا العديد من المواد اللاصقة والتي يمكن أن تستخدم في لاصق شرائط الشمع على الشرائح ولكن من المفضل استخدام محلول الفورمالدهيد المخفف لتعويم وفرد القطاعات، وهو محلول جيد جدا ولكن بحاجة إلى أن يستخدم في منطقة جيدة التهوية، وكذلك من أفضل الموادالتى يمكن استخدامها هو لاصق هوبت (Haupt's gelatine) ؛ ويفضل البعض الاخر ومنهم المؤلف ان يتم تعويم العينات في الماء وهى يفضلها ايضاالتشامبران (١٩٣٢) حيث لايحبذ استخدم الفورمالين.

الصعوبات التي تواجه عملية التقطيع

إذا كانت جميع خطوات التجفيف والترويق والترقيد قد أجريت بدقة ورغم ذلك يتعذر الحصول على قطاعات مناسبة وظهر احد العيوب التالية :

١-تكسر القطاعات وصلابة النماذج

الأسباب :

أ ـ استخدام محلول قتل وتثبيت غير مناسب لطبيعة النموذج.

ب ـ ترك العينات Vial لفترات طويلة في التركيزات العالية من الكحول.

ج ـ استخدام احد مواد الترويق التي تزيد من صلابة وانكماش الأنسجة وخاصة إذا تركت فيها النماذج فترة طويلة.

د ـ ترك أنابيب التشريب بالشمع المنصهر لفترات طويلة في فرن الشمع.

كيفية التغلب على هذة المشكلة:

أ ـ يزال جزء من كتلة الشمع حتي تتعرض أنسجة النموذج ثم تنقع في الماء لمدة يوم أو عدة أيام حسب طبيعة النموذج، يتخلل الماء أنسجة النموذج ويجعلها طرية صالحة للتقطيع بالميكروتوم. يمكن

وضع النماذج ذات الشمع القليل في ماء مثلج لبضعة دقائق مثل التقطيع بالميكروتوم كما يمكن ووضع حامل الميكروتوم مع كتلة الشمع المثبتة عليه بعد تعريض جزء من أنسجة النموذج كما سبق في مـاء دافئ قليلا فيصبح النموذج طريا نتيجة لتحال الماء في أنسجته.

ب ـ في حالة عدم نجاح الطريقة السابقة حيث تكون النماذج صلبة جدا ترجع إلي عمليـة التجفيـف والتشريب لذلك يجب استخدام أحد الطرق التالية في التشريب بدلا من شمع البرافين.

١ـ البرافين المطاط لجونستون :

يعتبر هذا الشمع من أفضل المواد التي تستخدم في حالة الأنسجة التي تصبح جامدة وهشة في البرافين المعادل ويتركب هذا النوع من البرافين كما يلي

أ ـ برافين منصهر لونه بني فاتح ٩٩ جزء بالوزن.

ب ـ مطاط هندي خام يقطع إلي قطع صغيرة ١ جزء الوزن.

يسخن المزيج إلي رجة حرارة ١٠٠ درجة مئوية لفترة تتراوح بـين ٢٤ – ٤٨ سـاعة، وإذا كانـت درجة الحرارة أقل، يجري التسخين لفترة ٧ – ١٠ أيام.

يمكن استخدام البرافين العادي مع المطاط الهندي ، يميل البرافين المطاط إلي التحال، إذا تـرك فتـرة طويلة في الفرن.

٢ـ استخدام السيرا سين Ceracin مع شمع البرافين :

حيث تؤدي إذابة كمية قليلة من مادة السيرا سين حوالي ١% إلي تحسين خـواص النمـاذج الجامـدة ويصهر المذيج بوضعه في ماء ساخن.

٣ـ استخدام طريقة كحول البوتيل Tertiary Butyl Alcohol:

حيث أن هذا١ الكحول يذوب في الماء وفي تركيزات كحول الإيثايل. كما يذيب شمع البرافين، ويمكـن أن يبقي النموذج فيه الفترات غير محددة. ويتطلب استخدامه في عملية التشريب في شـمع البـرافين فترات طويلة ويعاب علي هذه الطريقة أنها معقدة وصعبة ، ولكنها تؤدي إلي نتائج أفضل من غيرها.

٤ـ الترقيد المزدوج في السللويدين وشمع البرافين

٢- التواء القطاعات وعدم التحامها معا

الاسباب

أ_ درجة انصهار الشمع غيرمتناسبة مع درجة حرارة المعمل .

ب ـ لم يتم تسوية كتلة الشمع قبل تثبيتها علي حامل الميكروتوم.

جـ السكين المستخدمة غير حادة تماما وبها تعرجات أو حفر.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ ـ أن لا يكون شمع البرافين جامد جداً.

ب ـ أن يكون وضع السكين علي زاوية قائمة مع حامل النموذج.

جـ تقليل السمك حيث أن في كثير من الأحيان يوقف التواء القطاعات.

د ـ أن تقوم بمسك حافة القطاع بواسطة فرشاة طرفها منبسط وثم تثني هذه الحافة إلي أسـفل فـي اتجاه السكين ثم توضع القطاع علي شريحة زجاجية بحيث يكون جزئه الطرفـي إلـي أسـفل ويـتم التسخين بلطف فينفرد القطاع.

٣ـ انضغاط القطاعات

الاسباب

أ -عدم صلاحية سكين التقطيع.

ب ـ ليونة شمع البرافين فى درجة حرارة **المعمل.**

ج ـ ارتفاع درجة حرارة المعمل.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ ـ استخدام سكين حادة وصالح للتقطيع اواستعمال جزءاخر من السكين يكون حاد.

ب ـ استخدام شمع مناسب (يراجع بينات الترقيد) .

جـ يمكن فتح نوافذ الغرفة لخفض درجة الحرارة أو استخدام مروحة.

د- زيادة سمك التقطيع .

هـ - وضع الكتلة الشمعية في ماء بارد اومثلج اذا كان الجو حارا .

٤- القطاعات المجعده

الا سباب

أ- الماء المستخدم في فرد القطاعات ساخن اكثر من اللازم ولذلك تلتف القطاعات على نفسها وتلتحم بموقعها .

ب- السكين غير حاد .

ج_الماء المستعمل في فرد القطاعات بارد اوان كميتة في الحمام المائى غير كافية وبالتالى لـم تفـرد القطاع بالكامل.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

١- مراقبة الماء المستعمل في فرد القطاعات (مراجعة درجة الحرارة)

٢- اعادة شحذ السكين.

٣-تنظيف الشريحة حتى ينساب الماء فوق الشريحة بانتظام .

٥- القطاعات سميكة ورقيقة بالتبادل

الاسباب :

أ-حامل الكتلة الشمعية مازال ساخن .

ب- شمع الربط بين الكتلة الشمعية والحامل متشقق اومفكك.

ج-السكين غير محكمة الربط بحامل السكين .

د- السكين او الميكروتوم غيرصالح للعمل .

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ_ تبريد الكتلة الشمعية والحامل بوضعهم في الثلاجة بعض من الوقت .

ب- اعادة لصق الكتلة الشمعية بالحامل من جديد ثم تبريدهم .

ج- اعادة ربط السكين بحاملها وحامل الكتلة الشمعية بالميكروتوم .

د-التاكد من جفاف الشمع الموجود بين الحامل والكتلة الشمعية.

ه –يتم تغيير السكين اواعادة اصلاح الميكروتوم .

٦-بروز قطاعات العينات من وسط شريط الشمع

الاسباب

أ- وجود جزء غير حاد من السكين فىمنطقة التقطيع.

ب-عدم تبريد كتلة الشمع بالتساوى(وسطالكتلة الشمعيةغير باردتماما .

ج- العينة صلبة والشمع طرى.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ- استعمال جزءاخر من السكين يكون حاد.

ب-وضع الكتلة الشمعية في ماء مثلج.

ج- تعاد عملية الطمر في شمع من النوع الصلب.

٧-انفصال القطاعات وظهور الشمع على هيئة الطباشير

الاسباب

أ-لم تكن عملية التشريب جيدة مع وجود اثار من مواد الترويق.

ب-مواد الترويق والتجفيف غير مناسبة.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ-اعادة عملية التشريب والتخلص من موادالترويق الموجودة مع الشمع تماما.

ب-تغيير مواد الترويق والتجفيف.

٨-وجود فقاعات تحت القطاعات

السبب

لم يتم فرد القطاعات بطريقة صحيحة حيث تم حبس الهواء تحت القطاعات.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ_تعاد الشريحة فى الماء ويتم تعويم القطاعات ثم يتم تسخين الماء حتى يتم فردالقطاعات بالكامل.

ب_يتم فحص القطاعات قبل عملية تجفيف الشرائح على السطح الساخن Hot plate .

ج_يفضل ان يستعمل ماء قد سبق طرد الهواء منة بالغلى فى عملية التعويم.

٩_ المقاطع تحتوى على حبيبات سوداء

الاسباب

يرجع ذلك الى ان المثبت المستخدم كان يحتوى علىالفورمالدهيد وتم ترك العينات في المثبت لفتـرة طويلة .

كيفية التغلب على هذة المشكلة :

يجب عدم حفظ العينات لفترات طويلة في المثبت ولكن يمكن حفظها بعد ترقيدها في الشمع.

١٠- سقوط القطاعات من على الشريحةاثناء عملية الصبغ

هذة المشكلة معروفة وشائعة خاصةعند المبتدئين في عملية تجهيز الشرائح ،وعامة اذا كانت الشـرائح المستخدمة نظيفة وتركت لاتمام عملية التجفيف على السطح الساخن (Hot plate) او في الحضـان لفترة بعد عملية التعويم فسوف يؤدى ذلك الى نتائج جيدة وتقلل المشكلة.

الاسباب

أ_ذوبان الشمع اثناء عملية فرد القطاعات.

ب_ ذوبان مادة التحميل (حيث تتحرك القطاعات خلال عملية الصبغ) .

ج_القطاعات لم يتم لصقها جيدا بالشريحة .

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ _ يتم تنظيف الشرائح جيدا قبل استخدامها.

ب_ضبط حرارة ماء فرد القطاعات.

١١ – تقوس شريط الشمع

الاسباب

أ – حافة كتلة الشمع غير مستوية.

ب- نصل السكين غير منتظمة.

ج- تم الضغط على احد جوانب كتلة الشمع.

د –احد جوانب الكتلة الشمعية ساخن والاخر تم تبريدة (عدم تساوى عملية التبريد على جانبى كتلـة الشمع) .

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ –يتم اعادة تسوية حافة الكتلة الشمعية بحيث تكون قائمة الزاوية.

ب- تغيير حافة نصل سكين الميكروتوم وفحصها مجهريا.

ج- اعادة تبريد الكتلة الشمعية مع ابعاد مسببات ارتفاع درجة الحرارة.

د - فتح نوافذ المعمل لتقليل حرارة الغرفة.

١٢-انشطار الشريط

الاسباب

أ-وجود عيب في حافة السكين .

ب- الشمع غير منصهر بشكل جيد .

ج-وجود مواد صلبة مختلطة مع الشمع (رمل) .

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ- يتم تغيير حافة السكين .

ب-يتم اعاد عملية الطمر.

ج-تستخدم ابرة تشريح ساخنة لابعاد الرمال الموجودة اويعاد الطمر في شمع جديد.

١٣ –عدم تكون شريط من الشمع

حيث يلاحظ ان الشمع يتفتت ولاتلتصق القطاعات ولايتكون الشريط ولكن تكون عبارة عـن مقـاطع مفردة وتكون القطاعات ملتفة على هيئة اسطوانة .

الاسباب

أ_وجود اثار من مادة الترويق.

ب_الشمع المستخدم غير نقى اوطرى اوغير صلب بالدرجة الكافية.

ج_ الشمع صلب جدا.

د_زاوية وضع السكين بالنسبة للعينة غير مناسب.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ_اعادة عملية الترقيد والتخلص مناثار مادة الترويق.

ب_اختيار نوعية شمع مناسبة.

ج_ تحريك السكين ببطء تجاة العينة اى تقليل السرعة.

د_ ضبط زاوية وضع السكين (٤٥درجة مئوية) .

١١_الشريط غير مستقيم

الاسباب

أ ـ المنطقة المستخدمة من السكين تالفة .

ب ـ السطح السفلي والعلوي لكتلةالشمع (الموجود بها العينة) غير متوازيان.

كيفية التغلب على هذة المشكلة

أ_ يتم تحريك السكين بحيث تكون المنطقة الجديدة مناسبة للتقطيع أو تستبدل بسكين أخري.

ب_تسوية السطحان السفلي والعلوي لقطع الشمع.

الترقيد فى السيللويدين Celloidin method

وهى طريقة متبعة فى تحضير الشرائح المجهرية للأجزاء النباتية الصلبة كالسيقان والجذور الخشـبية التى لا يمكن تقطيعها باستخدام طريقة شمع البرافين، ويستخدم فـى التقطيـع الميكروتـوم المنزلـق sliding microtome حيث تقطع النماذج بسمك ١٠-٢٠ ميكرون.

١- تجرى عملية التثبيت والغسيل والتجفيف (إزالة الماء) كما فى طريقة شمع البرافين مع ضـرورة أجراء تغييريين على الأقل للكحول المطلق.

٢- تنقل العينات الى خليط الاثير و الكحول المطلق (١:١).

تنقل إلى محلول السيللويدين (٢%) فى زجاجة ذات فوهة واسعة ذات غطاء زجاجي مثبت بسـلك أو خيط قوى لكي لا ينفتح نتيجة للضغط المتولد من عملية تبخير المذيب ، ثم توضع الزجاجة فـى فرن عند ٦٠°م.

٣- تنقل إلى تركيزات تصاعدية من السيللويدين (٤%، ٨%، ١٠%) وبالطريقة نفسـها لمـدة ١-٢ ساعة بكل تركيز ، مع مراعاة تبريد الزجاجة قبل سكب التركيز السابق او اسـتبدالة بـالتركيز الجديد .

٤- تنقل العينات إلى محلول سيللويدين (١٠%) فى قالب ورقى صغير مع ترك علـى جانبـة كميـة مناسبة من السيلودين حول العينة للصق القالب بالحامل.

٥- يوضع القالب بعناية على سطح مستو كغطاء طبق بترى ثم ينقل هذا الغطاء مع القالب الى انـاء زجاجى عميق نسبياً. وذو غطاء محكم.

٦- يعرض النموذج لبخار الأثير لمدة ١-٣ ساعات وبذلك يوضع قليل من الأثير فى كاس صغير ثـم يوضع الأخير فى الإناء الزجاجى العميق ويغطى الإناء. أن هذة العملية تساعد على التخاص من الفقاعات الهوائية.

٧- يصاب النسيج بعناية بحيث يكون سطح القطع الى اسفل ويرجع الى بخار الاثير لـثلاث سـاعات اخرى.

٨- يستبدل الأثير بالكلورفورم ويترك النموذج فيه لمدة ٢٢-٤٨ ساعة ليتصاب السيلويدين ، ويصبح ذو قوام مطاطى.

٩- يعد تهذيب السيللويدين الزائد من حول العينة يلصق النموذج على حامل خشبى وذلك بـأن يغمـر سطح الحامل فى مزيد من الكحول والأثير لمدة ٥-١٠ دقائق، ثم تكسى سطح الحامـل بطبقـة سميكة من التلويدين (١٠%) ويضغط قالب السيللويدين فوقه برفق بعد غمره فى مزيج الكحول والأثير لمدة دقيقتين . ويترك ليتصاب فى الهواء أو فى بخار الكلوروفورم.

عند عدم مباشرة بالتقطيع يمكن حفظ القالب فى كحول ٧٠-٨٠% يجب ان يكـون القالـب والسـكين مبتلين بكحول ٧٠% أو ٨٠% طيلة فترة التقطيع ويتم ذلك اما بواسطة استعمال فرشاه كبيرة.

الصبغ: تنقل تدريجياً القطاعات من كحول ٧٠% إلى الماء تصبغ بصبغتى الهيماتوكسيلين والايوسين بطريقة مشابهه بطريقة صبغ القطاعات البارافينية

طريقة التجميد

تستخدم هذه الطريقة لدراسة بعض محتويات الخلية مثل الدهون أو الأنزيمات حيث أنها تختلف عـن طريق شمع البرافين من حيث أنها لا تحتاج إلي إزالة الماء (لتخفيف) او الترويـق.حيـث أن المـواد الكيمائية مثل الكحول والزيلول والبارافين تؤدي إلي تثبيط نشاط بعـض الأنزيمـات وتزيـل بعـض

محتويات الخلية مثل الدهون.تقتضي هذه الطريقة تقطيع النماذج إلي قطع متجمـد Frozen sectens وذلك باستخدام الميكروتوم الثلجي Freezing microtome ومن عيوب الميكروتوم الثلجي أنه يؤدي إلي تشوة النماذج ولا يمكن الحصول بواسطته علي نماذج رقيقة ومتسلسلة ولذلك ينحصر اسـتخدامه في الدراسات الكيميائية النسيجية وكذلك التحضيرات المجهرية التي تتطلب نتائج فورية.

طريقة تحضير الشرائح بطريقة التجميد بواسطة الميكروتوم الثلجي

١ـ قبل تثبيت العينات النباتية في محلول ملحي فورمالييني بتركيز ١٠% لمـدة ٢٤ سـاعة (يمكـن الاستغناء عن هذه الخطوة في حالة السرعة)

٢ـ بعد غسيل العينات توضع قطرات من الماء المقطر علي منطقة التجميد ثم تجمد هذه المنطقة عند درجة ٤٠م وبعد تجمد النصف السفلي للماء تغمر فيه العينة (مع ملاحظة لمس مسـرح التجميـد باليد).

٣ـ بعد تجمد العينة تضبط درجة حرارة القطع (درجة تقريبا ١٥م).

٤-تقطع النماذج بسمك ١٠ميكرون وتنقل من على السكين بفرشاه وتعوم على سطح مـاء مقطـر او محلول ملحى .

٥-تنقل القطاعات العائمة المجهزة الى صبغة مناسبة .

٦-تنقل القطاعات بعد غسلها الى شريحة نظيفة وتحمل باستخدام وسط تحميل مائى .

ويمكن وضع القطاعات بعد تقطيعها على شريحه نظيفة مغطاه بطبقة رقيقة مـن لاصـق مـاير .وتترك عند درجة حرارة ٣٧لمدة ٣-٥ دقائق –ثم تصبغ وتغسل وتحمل .

أ-تقطيع عينات مطمورة فى الجيلاتين :-

يمكن طمر العينات فى الجيلاتين ومن ثم تقطيعها بالميكرتوم الثلجى كالاتى :-

١-تغسل العينات المثبتة فى الفورمالين بالماء لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة عند درجة ٣٧م.

٢-يتم تشريب العينات بخليط الجيلاتين

يتكون خليط الجيلاتين من :-

١-مسحوق جيلاتين ٣٠جم

٢-جلسرين ٣٠سم

٣-ماء ١٤٠سم

٤-ثايمول بلورة واحدة صغيرة .

يمكن الحفاظ عليه لعدة اسابيع بوضعه فى الثلاجة عند درجة ٤م ومدة التشريب بهذا الخليط ١٢ ساعة عند درجة حرارة ٣٧م .

٣- بعض خليط الجيلاتين السائل فى طبق بترىوتلقى فيه العينات المتشربة بالخليط ويوضع الطبق فى الثلاجة عند درجة ٤م لمدة ساعة

٤- يستخرج الجيلاتين من الطبق ويقطع الى قالب على شكل مربع ويترك مساحة ٣-٥مم مـن كـل جانب .

٥- يوضع القالب فى محلول الفورمالين المتعادل ذو تركيز ٤%لليلة واحدة عند درجة ٤م تؤدى هـذه العملية الى تصلب الجيلاتين .

٦- يتم التقطيع باستخدام الميكروتوم الثلجى وتوضع القطاعات على شريحة مغطاه بطبقة رقيقة مـن لاصق ماير ، ثم تجفف الشريحة ويذاب الجيلاتين بوضع الشـريحة علـىHot plate (صـفحة ساخنة) على درجة ٤٥-٥٠م ولمدة ١٥ دقيقة .

٧- اصبغ بصبغة مناسبة .

٨- اغسل الشرائح بالماء المقطر ثم حملها بوسط تحميل مائى .

<u>ب- تقطيع عينات مطمورة فى الاجار :-</u>

يذوب الاجار على درجة ٦٠م ويتصلب فى درجة حرارة الغرفة ويتم عملية الطمر كالاتى :-

١-يثبت النموذج ويغسل جيدا بالماء .

٢-يشرب النموذج لمدة ليلة واحدة على درجة ٥٦-٦٠م بخليط الاجار ويحضر كالاتى :-

يغلى ١٠٠كم من الماء ويضاف اليه٢جم من الاجار ويرج حتى الذوبان، يحفظ الخلـيط فـى درجـة حرارة ٤م ،ويمكن استعماله خلال شهور عديدة فى حالة عدم تلونه .

يضاف ٢سم من الفورمالين كمادة حافظة ضد البكتريا .

٣-تطمر النماذج المتشربة فى الاجار .

٤-تجرى عملية التقطيع والصبغ بطريقة مماثلة للطمر فى الجيلاتين .

تحضير محلول الفورمالين المنظم المتعادل :-

١-٤جم فوسفات صوديوم احادية $NaH_2Po_4 . H_2O$

٢-٦.٥جم فوسفات صوديوم ثنائيةNa_2HPO_4

تذاب فى الماء ويكمل الحجم الى لتر .

٣-يضاف٤٠سم من الفورمالرهيد (٥٠%)

الباب الخامس

صبغ قطاعات

صبغ قطاعات

نظرا لتعدد أنواع الصبغات فإن اختيار نوع الصبغة ،وطريقة الصبغ يتوقف على الغرض من الدراسة والمكون الخلوي المراد تلوينه ليسهل التعرف علية، حيث يتوقف على ذلك معرفة الطريقة الصـحيحة لتجهيز الصبغة وكذلك الطريقة المثلى التي يمكن استخدمها فى صبغ (مفرد، مزدوج ....الخ). ولكي تتم عملية الصبغ بنجاح ويتم الحصول على قطاعات مصبوغة بطريقة جيدة لتحقق الهدف المنشود من عملية الصبغ يلزم أخذ بعض الاحتياطات .

أهم الاحتياطات التي يجب مراعاتها عند اختيار الصبغة:

أ ـ قدرة الصبغة على الارتباط بالمكونات الخلوية التى تتميز بها الخلية.

ب ـ أن يتم احتفاظ الجزء المصبوغ باللون المميز للصبغة أثناء العمليات التالية لعملية الصـبغ(مـن مواد الترويق والتحميل).

جـ ـ ثبات اللون لفترات طويلة حتى يمكننا الرجوع إلى القطاعات وفحصها مع مرور الزمن.

ويتوقف اختيار بعض أنواع الصبغات وطريقة الصبغ على نوع المثبت المستخدم فـى تثبيـت العينة مسبقا.

أهم الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء عملية الصبغ:

١ - أن يتم تجهيز الصبغات بالطريقة السليمة وبالتركيز المطلوب.

٢ – ان يتم تحديد طريقة الصبغ (مفرد ، مزدوج ،.....الخ)حسب ماسبق ذكره .

٣ -أن تكون أواني الصبغ المستخدمة نظيفة.

٤ -يجب تكتب البيانات بوضوح على أواني الصبغ المستخدمة .

٥ - أن يتم إحكام غلق أواني الصبغ وخاصة الموجود بها مذيبات.

٦ –أن يتم تغيير الكحول المطلق و المذيب كل فترة.

إذا اتخذت الاحتياطات السبق ذكرها ،فأنة يلزم لإجراء عملية الصبغ إتباع خطوات معينة يتم الالتزام بها، وعامة فان معظم طرق الصبغ تتفق معا فى الخطوات الرئيسية لعملية الصـبغ ولكـن يوجـد اختلاف فى التفصيلات الدقيقة طبقا لكلا من نوع الصبغة وطريقة الصبغ المتبعة .

الخطوات الرئيسية لإجراء عملية الصبغ :

أ ـ إعداد القطاعات للصبغ

١- إزالة شمع البرافين.

٢ـ التميوء

ب ـ اختيار طريقة الصبغ

جـ - طرق الصبغ (مفرد ،مزدوج، ثلاثي ، متعدد)

أ- إعداد القطاعات للصبغ

١ ـ إزالة شمع البرافين Deparaffinization (Dewaxing) :

قبل البدء في إجراء عملية صبغ القطاعات لإظهار مكونات النماذج المراد دراسة تركيبها الداخلي. فأنة يجب إزالة شمع البرافين الموجود في أنسجة القطاعـات وكـذلك الـذي يحـيط بالقطـاع (شـريط الشمعRibbon). فمن المعلوم، أن شمع البرافين لايمكنة الامتزاج مع محاليل المذيبة للصبغات سـواء كانت الماء أو الكحول وكذلك معظم المواد المستخدمة في تحضير الصبغات. مما ينتج عنـة عرقلـة دخول الصيغة إلي النسيج بسبب شمع البرافين الموجود بين الخلايا والـذي ترسـب أثنـاء عمليـة التشريب. ولذلك يجب استخدام بعض المذيبات التي لها القدرة على ازابة شمع البرافين الطريقـة التقليدية، أن يتم التخلص من الشمع بغمر الشرائح المحمل عليها أشرطة الشمع في زيلول نقي لفترة ٨ - ١٠دقائق مع تغير الزيلول مرتين على أن يكون مقدار الزيلول كافيا لتغطية الشريحة الزجاجية.كما يفضل وضع الشرائح قبل ذلك في فرن درجة حرارته ٦٠ م لإذابة الشمع بشكل جيد وبعد ذلك تغمـر في الزيلول ويمكن استخدام محلول hystoclear هومحلول جديد (وآمنا) بديلا عن الزيلول ويسـتخدم بنفس الطريق.

٢ ـ التميوء Hydration :

وهي عملية إدخال تدريجي للماء إلى للعينة واحلالة بدلا من الزيلول والذي استخدم فى إزالـة شـمع البرافين من العينة ويتم ذلك بمعاملة النسيج بتركيزات تنازلية من الكحول وذلك للإغراض التالية :

١ـ التخلص من الزيلول باستبداله بكحول مطلق حيث ان الزيلول يعيق دخول الصبغة.

٢ـ التدرج في ادخال الماء إلي النسيج تفاديا لحدوث انتفاخ للخلية في حالة الانتقال مباشرة مـن الكحول المطلق إلي الماء.

٣- معظم الصبغات التي سوف يتم استخدامها أما أن تكون ذائبة في الماء وفى كحول.

خطوات إجراء عملية التميؤ:

ويتم ذلك بعمل سلسلة كحول تنازلية Down series (لإضافة الماء) وتتم كمايلى: -

١ ـ تنقل الشرائح من الزيلول إلي وعاء أخر يحتوي مزيج من مقدارين متساويين مـن الزيلـول والكحول المطلق لمدة ٥ – ١٠ دقائق.

٢ ـ تنقل بعد ذلك إلي كحول مطلق لمدة ٥ دقائق.

٣ ـ تنقل الشرائح إلي تركيزات تنازليـه للكحـول (Down series) ٩٥% ، ٧٠% ، ٥٠% ، ٣٠% ثم بماء مقطر لمدة ٣ دقائق لكل تغير.إذا كانت الصبغة المستخدمة مائية ثم تنقل إلي الصـبغة، أو إلي تركيز الكحول المذابة فيه الصبغة إذا كانت الصبغة كحولية مـثلا إذا كانـت مذابـة بكحـول (٧٠%) نصل إلي تركيز ٧٠% ثم ننقل إلي الصبغة.

ب- اختيار طريقة الصبغ Selected staining method

نظرا لتعدد طرق الصبغ وأنواع الصبغات وطريقة تجهيز الصـبغة و الطـرق المتبعـة (مفـردة أو مزدوجة أو ثلاثية) ونوع الدراسة وعلى المكون المطلوب تلوينه حتى يسهل فحصـه. فـإن عمليـة اختيار طريقة الصبغ تعتبر من العمليات الهامة لنجاح العمل .وعامة، فإن عملية الصبغ وبعـد إزالـة الشمع يتم إتباع الخطوات التالية:

١- التميؤ (السلسلة التنازلية للكحول)

٢- استخدام الصبغة .

٣-التجفيف (السلسلة التصاعدية للكحول Up series) .

٤- الترويق . ٥ -التحميل والتسمية والتغطية .

١-السلسلة التنازلية للكحول Down Series Alcohol

تتكون من عدة أواني للصبغ(٨ -١٠) :

١- مذيب (مرتين). ٢- كحول مطلق. ٣- كحول ٩٥%.

٤- كحول ٧٠%. ٥- كحول ٥٠%. ٦- كحول ٣٠%.

٧- ماء مقطر.

٢ -السلسلة التصاعدية للكحول Up Series Alcohol

تتكون من عدة أواني للصبغ(٦) :

١- كحول ٣٠%. ٢- كحول ٥٠%. ٣ -كحول ٧٠%.

٤- كحول ٩٥%. ٥- كحول مطلق (مرتين).

حـ- طرق الصبغ Methods Stain

يمكن تصنيف طرق الصبغ إلى عدة أنواع وذلك حسب نوع الدراسة وتعدد المكونات المطلوب تلوينها ليسهل فحصها ومن هذه الطرق مايلى :

١- صبغ مفرد. ٢- صبغ مزدوج.

٣- صبغ ثلاثي. ٤- صبغ متعدد

سوف نستعرض فيما يلي الخطوات الرئيسية التي يمكن إتباعها في أهم الطرق الشائعة الاستخدام .

بعض الاختبارات الكيماوية الدقيقة Some micro chemical tests

ويقصد بها الطرق المستخدمة في التعرف علي المكونات الكيمائية مثل الأحماض الأمينيـة والـدهون والكربوهيدرات .. الخ يمكن الحصول علي المقاطع لأجراء الاختبارات الكيماويـة عليهـا باسـتخدام الطرق السابقة دون صبغها تفضل المقاطع السميكة التي يصل سمكها إلي ٥٠ ملليميكـرون وكـذلك يمكن استخدام أنسجة طرية .

١ـ حبيبات الأليرون Aleuron grains:

تتكون هذه الحبيبات من حشوة بروتينية (البومين) وجسم شبه بللوري وجسم كروي ويمكـن الكشـف عنها باستخدام الطريقة التالية:

١ـ ضع أجزاء من حبوب القمح أو الذرة في قطرات من محلول مكون من الكحول المطلق المشـبع بحمض البكريك وصبغة النجروسين Nigrosin

٢ـ أفحص تحت المجهر، تلاحظ تلون الحشوة باللون الأزرق، أضف قطرات من الكحول المطلـق. لاحظ تلون البلورات بلون أخضر مصفر وتظهر الأجسام الكروية عديمة اللـون.ملحوظـة : يمكـن استبدال صبغة النجروسين بصبغة الأيوسين وفي هذه الحالة تصبغ الحشوة البروتين بـاللون الأحمـر الغامق والجسم البلوري باللون الأصفر والأجسام الكروية بلون أحمر باهت.

٢ـ الكالوس callose :

١ـ ضع نسيج نباتي (ق.ط. في لحاء العنب) يحتوي علي كالوس في محلول مائي من صـبغة أزرق القطن أو أزرق الأنيلين لمدة ٣٠ دقيقة.

٢ـ أنقل النسيج بعد ذلك إلى شريحة نظيفة محلول ليفيولوز Levulose(١٠ جم لفيولوز + ٨ سم٣ ماء مقطر ساخن)

٣ـ ضع غطاء الشريحة وبعد تبخير محلول ليفيولوز أفحص ،تلاحظ تلون الكالوس باللون الأزرق.

ملحوظة : الأنسجة المصابة بالفيروسات أو الفطريات أو المايكوبلازما تكون خلاياها غنية بالكالوس.

يمكن صبغ الأنسجة المصابة الطرية بصبغة الريسورسين الأزرق resorcim blue كما يلي :

١.ضع مقاطع يدوية من النسيج على شريحة ، وتضاف إليها قطرة من الصبغة على شريحة زجاجية، ثم ضع غطاء الشريحة.تلاحظ ظهور الكالوس باللون الأزرق

تحضير صبغة الريسورسين بالأزرق:

١ـ مسحوق الصبغة ١ جم

٢ـ هيدوكسيد الأمونيوم المركز ١، سم٣

٣ـ ماء مقطر ١٠٠ سم٣.

يعرض المحلول للهواء والضوء لعدة أيام.

لتحضير شريحة دائمة للكالوس يجب اتباع الخطوات التالية :

١ـ تثبيت الشرائح في محلول كارنوى لمدة نصف ساعة

٢ـ تغسل بالكحول المطلق لمدة ١٥ دقيقة.

٣ـ تغمر في محلول نافلشين لمدة ٢٤ دقيقة.

٤ـ تغسل الأنسجة بالماء لمدة ١٢ ساعة.

٥ـ تجري عمليات التميوء والترويق والتشريب والغمر بالبارافين.

٦ـ تشبع الشرائح بالماء بعد إزالة البرافين.

٧ـ تصبغ الشرائح بمحلول البونسيو Ponceau solution .

٨ـ تغمر الشرائح في كحلول ٥٠%.

٩ـ تصبغ بالصبغة المضادة، الأخضر الباهت ١% (محضرة في الماء) لمدة ١٠ دقائق.

١٠ـ تكمل خطوات التجفيف وتروق بالزيلول، وتحمل الشرائح ببلسم كندا يظهـر الكـالوس بـاللون الاحمر شديد الوضوح.

ملحوظة :

تظهر الأنابيب الغربالية في الأنسجة المصابة ممتلئة بالكالوس بينما تظهر النماذج غير المصابة حاوية علي طبقة رقيقة منه ، أن هذه الطريقة مفيدة جدا في تشخيص أمراض النبات.

تحضير صبغة البونسيو :

١ـ كحول ٥٠%	١٠٠ سم٣
٢ـ حامض الفوسفوموليبديك	٠.٣سم٣
٣ـ حامض خليك ثلجي	٠٥سم٣
٤ـ صبغة البونسيوم	١ جم

ثانيا : يمكن استخدام foster's Tannic acid ferric chloriede لصبغ الكالوس كألاتي :

١ـ بعد إزالة البارافين يتم إجراء عملية تميوء للقطاعات

٢ـ تغمر العينات في حامض التانيك tannic acid لمدة ٥-١٠ دقائق

٣ـ تغسل ثلاث مرات بالماء المقطر.

٤ـ تنقل إلي محلول كلوريد الحديديك (٢) لمدة ٥ دقائق

٥ـ تغسل ثلاث مرات بالماء المقطر (تتلون الجدر الابتدائية بلون رمادي)

٦ـ تنقل إلي بيكربونات صوديوم (١%) (محضره في كحول ٢٥%) لمدة ٣٠ دقيقة.

٧ـ تنقل مباشرة إلي صبغة الريسورسين الأزرق لمدة ١٢-١٨ ساعة

٨ـ تنقل الشرائح إلي بيكربونات الصوديوم (١%) (محضره في كحول ٥٠%) لمدة دقيقتين.

٩ـ تجري عمليات الترويق والتحميل.

يتلون الكالوس بلون أزرق مخضر ، ويتلون السليلوز الملجنن الموجود في خلايا الخشب والاسكريدات والألياف اللحائية والقشرية باللون نفسه.

تحضير صبغة الريسورسين الأزرق:

١ ـ مسحوق الصبغة ٢٥، جم

٢ ـ كحول ٣٠% ١٠٠ سم٣

٣ ـ بيكربونات الصوديوم ١% ٢-٥ سم٣

٣ ـ السليلوز Cellulose :

١ ـ ضع مقاطع في قطرة من محلول اليود الضعيف (٠.٠٣ جم يود + ١,٥ جم يوديد البوتاسـيوم + ١٠٠ سم٣ ماء مقطر) علي شريحة زجاجية ثم ضع غطاء الشريحة.

٢ ـ لاحظ النشا تلون باللون الأزرق.

٣ ـ ضع قطرة من حمض الكبريتيك المركز ٧٥% عند أحدي حافات الغطاء الزجاجي.

٤ ـ لاحظ انتفاخ السليلوز وتلونه باللون الأزرق.

٤ ـ الكيوتين والسوبرين Cutin and suberin:

١ ـ ضع قطاع من النموذج في كحول ٧٠% مشبع بصبغة سودان ٤ واتركها لمدة ٢٠ دقيقة.

٢ ـ أغسل بكحول ٥٠% لإزالة الصبغة الزائدة.

٣ ـ ضع قطرة من الجليسرين علي الشريحة.

٤ ـ لاحظ تلون الكيوتين والسيوبرين باللون الاحمر.

للتمييز بين الكيوتين والسيوبرين في الجدر الخلوية والسليلوزية استعمل قطرات من حامض الكبريتيك التي تذيب السليولوز.

٥ ـ الدهون Oil :

* حضر صبغة سودان ٤ (يذاب ½ جم من الصبغة في ١٠٠ سم٣ من كحول ٧٠).

* ترك النماذج الغضة في الصبغة لمدة ٢٠ دقيقة.

* أغسلها جيدا بالكحول ٥٠%.

* أضف قطرة من الجليسرين

* أفحص ولاحظ اللون الأحمر للدهون.

أن الدهون تميز عن بقية المواد الملونة في الخلية من خلال وجودها علي شكل قطرات زيتية ويمكـن تمييزها عن الفجوات باستعمال صبغة الأحمر المتعادل (٠.٥جم من الصـبغة فـي ١٠٠ سـم٣ مـن الكحول ٩٥%) حيث تتلون الفجوات ولا تتلون القطرات الزيتية.

يمكن تحضير صبغة الأحمر المتعادل بإضافة ٠.١جم من الصبغة فى لتر من محلول ملحـى متعادل (٠.٠٢٤ جم كلوريد بوتاسيوم+ ٠.٠٢جم بيكربونات صوديوم + ١٠٠ مل ماء مقطر).

٦- الأنولين Anulin

١. ضع القطع من نسيج غض فى كحول ٧٠% لمدة ٢-٤ أيام.
٢. خذ جزءاً صغيراً من هذة القطع وضعة فى كحول على شريحة زجاجية.
٣. ضع غطاء الشريحة وأفحص تحت المجهر.
٤. لاحظ الطبقات فى البللورات.
٥. أضف للقطع قطرة من محلول Chloride hydrate(٥ أجزاء من الهيدرات إلى ٢ جزء مـن الماء).
٦. أضف قطرة من الثايمول فى الكحول (١٥%) وقطرة من حامض الكبريتيك المركز.

ستتلون البللورات بلون أحمر أرجوانى Purplish red أو أحمر الكارمن Carmine red.

يمكن دراسة بللورات الأنيولين فى جذور البصل ودرنات نبات الداليا Dahlia.

٧- اللجنين Lignin

تستعمل للكشف عنه صبغة أحمر الميثيل methyl red مع إضافى كمية من أحدى القواعد القلوية إلى المحلول المائى لأحمر الميثيل ٠.٠٠١% حتى يصبح لونة أصفر.بإستعمال هذة الصبغة فـإن الجـدر الملجننة ستتلون باللون البنفسجى المحمر وهو نفسة اللـون الـذى تعطيـة صـبغة الفلوروجلوسـين Phlorogulucin

طريقة صبغ اللجنين lignin هو phloroglucinol.

١- تعامل القطاعات بالصبغة الكحولية السابقة ثم تنقل الى حمض ماء حامضى (قطرة من حمـض الهيدروكلوريك تضاف الى الماء). الجدرالملجننة تصبغ باللون الاحمر. ، يمكن ان تستعمل محلـول حمض phloroglucinol (١.٠جم من المادة ١٠ جم من كحول إيثايل ٩٥% مضاف الية قطرة مـن الحامض المركز). ، وفي هذه الحاله سيكون الصبغ عبارة عن خطوة واحدة . !يجب ملاحظـة ان كلا phloroglucinol وحمض الهيدروكلوريك مواد ضاره ، يجـب عـدم ملامسـتها الجلـد. و ان يكونالعمل سريع وبطريقة نظيفة ،مع تجنب استنشاق الابخره مـن الزجاجـات. و ينصـح بارتـداء القفازات عند التعامل معها .

٨- البكتين Pectin

- توضع بلورتين أو ثلاثة من صبغة أحمر الروثينيوم ruthenium red فى زجاجة ساعة ، ثم يضاف عليها قطرات من الماء الوقطر حتى يصبح اللون وردى محمر reddish pink.
- توضع النماذج فى محلول الصبغة لمدة ٣٠ دقيقة.
- أغسل بالماء جيداً.
- أنقلها إلى الجليسرين على شريحة زجاجية.
- لاحظ تلون المواد البكتينية باللون الأحمر.

ملحوظة: يمكن الكشف عن المواد البكتينية بإستعمال صبغة أزرق الميثيل التى ستصبغ هذه المواد باللون البنفسجى. ولكنها غير دقيقة مقارنة بصبغة أحمر الروثينيوم.

٩- الأصباغ Pigments

- ضع أجزاء متساوية من ورقة خضراء فى محلول من ٢٠ جم من هيدروكسيد بوتاسيوم فى ٨٠ سم كحول ٩٥% فى أنبوبة مغلقة.
- أترك الأنبوبة ومحتوياتها فى الظلام لينفصل الكلوروفيل.
- أرفع الأجزاء (الخالية من الكلوروفيل) من لمحلول وأغسلها عدة مرات بالماء الوقطر وذلك لمدة ١٢ ساعة.
- أنقلها إلى شريحة زجاجية وضع عليها جليسرين ثم الغطاء

تلاحظ تلون بللورات الكاروتين بلون أحمر برتقالى ، والزانثوفيل باللون الأصفر. وعند المعاملة بحامض الكبريتيك المركز يذوب كل من الزانثوفيل والكاروتين ويصبح لونهما أزرق.

١٠-النشا Starch

أستعمل محلول صبغة اليود الضعيف (الذى تم تحضيرة للكشف عن السليلوز) يلون النشا باللون الأزرق. يختفى اللون بالتسخن ويعود بالتبريد.

١١- المواد الدباغية Tannins

ضع أجزاء من نسيج غض (مثل أطراف الجذور) فى محلول مائى لكلوريد الحديديك (١٠%) مع قليل من كربونات الصوديوم ولاحظ تلون المواد الدباغية بلون أزرق مخضر. هذة المواد توجد فى أوراق الشاى (١٥% من الوزن الجاف)، البلوط والمخروطيات وتستخدم هذة المواد فى دبغ الجلود.

١٢- الشمع Wax

ضع نماذج على شريحة زجاجية ثم ضع غطاء الشريحة.

أضف الأثير عند أحدى حافات الغطاء الزجاجى.

أترك الشريحة حتى يتبخر الأثير.

أفحص ولاحظ تلون بللورات الشمع الموجودة على شكل أبر needles أو صفائح Plates أو متجمع Aggregate.

١٣-الأحماض الأمينية Amino acids

لابد من تحويل الأحماض الأمينية إلى بللورات قبل القيام بالكشف عنها ويمكن عمل ذلك بوضع أجزاء من النموذج فى قطرة من كحول مطلق على شريحة وتترك القطرة لتجف. ثم يمكن بعد ذلك الكشـف عن الأحماض الأمينية.

الأسباراجين والجلوتامين Asparagine and Glutamine

بلورة الحامض المتجمعة (من الخطوة السابقة) يضاف إليها قطرة من محلول الكونيون .

الاسباراجين يتلون باللون الأحمر ثم يذوب ببطء وتنتج محلول لونه أحمر.

ولتميز بين الاسبارجسين والجلوتامين توضع النماذج في كحول مطلق ويخفف لعدة ايام فـي الفـرن. تذوب بللورات الجلوتامين عند إضافة الماء إلى النماذج.

ب ـ اللبوسين Leucine :

يضاف إلي بلورة الحامض المتجمعة بغطاء الشريحة وتسخين الشريحة حتي درجة ١٧٠م أن بلورات الليوسين تلتصق بغطاء الشريحة.

ج ـ التايروسين Tyosine:

تضاف قطرة من محلول ميلون Millon’s reagent إلـي المقـاطع المتبلـورة ،تصـبح بلـورات التايروسين حمراء اللون ثم تذوب وتنتج محلولا أحمر اللون.

تحضير محلول ميلون :

١ ـ زئبق ١ جم

٢ ـ حامض نتريك ٩ سم٣

يخفف المحلول بحجم مساوي له من الماء ، يمكن أطالة فترة فعالية هذا المحلول بإضافة قطرات مـن محلول نترات بوتاسيوم.

وهناك طريقة أخري لتشخيص التايروسين إذا تضاف قطرات من مزيج حامض الكبرتيك مـع حجـم مساوي له من الفورمالين وعند تسخين المقاطع مع المزيج فيظهر التايروسين بلون أخضر.

١٤ ـ الأنزيمات Enzymes:

أ. الأوكسيديز Oxidases

ضع مقاطع علي قطرة من ١% بنزدين Benzidinمحضر في ٦٠% كحول سيظهر التفاعل خـلال ١٥ دقيقة إذا كان النسيج حامضيا فإن الخلايا المحتوية علي الأوكسديز ستتلون بلون أزرق وإذا كانت المقاطع قاعدية فإن اللون يكون رماديا.

ب ـ الكتاليز Catalase :

تضاف قطرات من بيروكسيد الهيدروجين إلي مقاطع موضوعه في ١% من محلول الجيلاتين حيـث يقوم بتحرير الأوكسجين من البيروكسيد ويمكن ملاحظة فقاعات الأكسجين كدليل علي وجود الأنزيم.

تفكيك الأنسجة Macerated tissues

أحيانا تتطلب الدراسات التشريحية لمقارنة الشكل الخارجي للعناصر الخلوية مثل الألياف والعناصـر الناقلة والكولنكيما وغيرها ولذلك فان عملية التفكيك مهمة جدا لدراسة الخلايا حيث يتم فى هذه العملية إذابة الصفائح الوسطى Middle lamellaeالتي تربط خلايا النسيج معاً باستخدام مواد كيمائية معينة وبالتالي تحدث عملية تتفكك الخلايا عن بعضها البعض(إذالم تكن العينة قد سبق تثبيتها فسوف تـؤدى العملية إلى حدوث بلزمة فى سيتوبلازم الخلايا الرقيقة).شرائح الأنسجة المفككة هي الوسيلة الوحيـدة التي بواسطتها يمكن معرفة مورفولوجيا الخلايا التي يتركب منها الأنسجة فى هيئة طبيعيـة كاملـة فهي تختلف عن صورتها فى القطاعات.

من المحاليل المستخدمة في عملية التفكيك كمايلى :

أ- طريقة جيفري Jeffery

وهى احد الطرق المستخدمة فى عملية تفكك الأنسجة وتتم كمايلى :

١- تقطع السيقان (أجزاء من السلاميات) طولها ٢سم باستخدام موس حاد الشفرة ثم تجـزأ هـذه القطع إلى شرائح حوالي ½ مم (حجم سلاكه الأسنان) .

٢- توضع القطع في دورق بة فوق أكسيد الإيدروجين وحمض خليك ثلجـي (١: ١) حـوالي ضعف العينة ثم تجرى عملية الغليان حتى يصبح لون الأجزاء خالي من اللـون .٣- تبـرد القطـع باستخدام ماء مقطر لبضعة ساعات حتى تخلو من الهواء أو تستخدم مضخة ماصة فى هذا الغرض ثم يتم تخزين العينة في ماء مقطر وقليل من الفورمالين .

ب- يمكن إجراء عملية التفكيك باستخدام محلول يتركب من أجزاء متساوية من محلول مائي حـامض النتريك ١٠% ومحلول مائي من حامض الكروميك ١٠% . يمكن تسخين المحلول فى فرن شمع فى

حالة السيقان الخشبية الطرية وليس فى حالة السيقان العشبية وعادة فترة التسخين تختلف تبعاً لطبيعة العينة المستخدمة ومع هذا سوف تأخذ العينة فى التفكك خلال ٢٤ ساعة. ويمكن اختبار عملية التفكيك باستخدام جزء من العينة بواسطة إبرة تشريح ثم فحصها مجهريا .يمكن استخدام قضيب زجاجي طرفة مستدير للمساعدة فى تفكيك الأنسجة بلطف. إذا لم يتفكك النسيج يستبدل المحلول بأخر جديد ويتم تكرار العملية. تغسل العينة جيداً بالماء لإزالة آثار الأحماض ثم تصبغ بمحلول السفرانين ١% لفترة ٦ ساعات تغسل بعدها جيداً بالماء ويمكن استخدام Iron hematoxylin بدلاً من السفرانين، لا نتمادى فى إزالة الصبغة الزائدة التي لا تتسبب سوائل التجفيف فى إزالتها. تجفف العينة فى مجال كحول متدرجة (١٥، ٣٠، ٥٠، ٧٠%) كحول ايثايل حوالي ١٥ دقيقة فى كل تركيز . تترك العينة فى كحول ايثايل ٨٥ % لمدة ليلة كاملة بعدها تكمل الخطوات العادية وتحمل فى كندا بلسم .

ج- يمكن إجراء عملية التفكيك باستخدام مخلوط يتركب من

١- فوق أكسيد الإيدروجين ١ جزء

٢ – ماء مقطر ٤ جزء

٣- حمض خليك ثلجي ٥ جزء

- توضع القطع في زجاجة نظيفة ويضاف إليها المخلوط السابق وتترك بة العينات لمدة ١ -٤ يوم (توضع في فرن على درجة ٥٦ درجة مئوية) حسب نوع العينة . النماذج اللينة مثل ساق عباد الشمس تقريبا من ١٢ – ٢٤ ساعة . ويتم اختبار عملية التفكيك من لون المحلول (لون المحلول الشفاف) يدل على إتمام عملية التفكيك . يمكن تكرار وضع العينات لمدة أخرى حتى تحصل على اللون الشفاف الدال على تمام العملية .

<u>د- طريقة شولتز Schultez's maceration</u>

١-تقطع السيقان إلى أ جزاء من السلاميات صغيرة ٢سم باستخدام موس حاد الشفرة ثم تجزؤ هذه القطع إلى شرائح حوالي ½ مم (حجم سلاكه الأسنان) .

٢- توضع القطع في أنبوبة اختبار ويضاف إليها حمض نتريك مركز (كمية تغطى العينة) ثم يضاف إليها بضعة بلورات من كلوريد البوتاسيوم

٣- يتم تسخين الأنبوبة برفق حتى يتم طرد جميع الفقاعات وتترك على النار حتى يصبح لون العينات شفاف (حوالي من ٤ -٥ دقائق)

٤- تنقل العينات إلى طبق بتري بة كمية من الماء

٥- يتم اختبار عملية التفكيك باستخدام قضيب زجاجي والضغط على العينة .

هـ - طريقة هارلوا Harlow's maceration

حيث يتم تحضير محلولين هما :

المحلول الأول : عبارة عن ماءالكلورين Chlorine water

المحلول الثاني : كبريتات الصوديوم ٣ % (٣جم في ١٠٠ مل

في ماء مقطر)

ا – توضع العينات في المحلول الأول لمدة ٢ ساعة

٢- تنقل العينات إلى المحلول الثاني ويتم تسخين على درجة ٩٠ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة .

٣- تنقل العينات إلى المحلول الأول مرة أخرى لمدة ٢ ساعة

٤- تنقل العينات إلى المحلول الثاني مرة أخرى ويتكرر ذلك حتى لايظهـر اللـون الأحمـر للخشب عند وضعها في المحلول الثاني .

و – طريقة اكسالات الامونيوم

١- توضع العينات أو الأجزاء الصغيرة المراد فحصها لمدة ٢٤ سـاعة فـي محلـول كحـول حامضي(٣٠ مل حمض Hcl مركز تضاف إلى ١٠٠ مل من كحول ٩٥ %)

٢- تغسل العينات بالماء

٣- تنقل العينات إلى محلول اكسالات الامونيوم (٥و %) ويتم عملية الغليان لبضعة دقائق .

٤- توضع أجزاء من العينات فى بضعة قطرات من محلول اكسالات الامونيوم ويضغط عليهـا بقضيب زجاجي للمساعدة فى تفكيك عناصرها المختلفة .

ملاحظة: في جميع الطرق السابقة يتم تحميل اجزاء من النسيج المفكك على شريحة زجاجية في بضعة قطرات من الجلسرين ، واليود او احمر المتعادل ثم تغطى بغطاء الشريحة ويتم فحصها مجهريا .

حفظ النماذج بلونها الطبيعي (الأخضر)

١- يتركب أبسط محلول من فورما لين مركز مشبع بخلات النحاس (يخفف عند الاستخدام إلى ٤%).
٢- **طريقة semichan يتركب من** :

- ماء ٨ سم
- فورمالين ٤٠% ١سم

- خلات نحاس (٤% مائى)١سم .

٣- طريقة Evans يتركب محلول الحفظ من

١) فورمالين متعادل ٥% ١٠سم (يحضر باضافة Borax إلى الفورمالين حتى يعطى المحلول لونـاً أحمر مع الفينولفيثالين)
٢) خلات الخارصين ١٠% (مائى ثيمول) ١سم (بعد فترة تغسل النماذج وتحفظ فى الجلسرين).

٤- طريقة Blaydes (لحفظ التراكيب الخلوية):

١. محلول ٥% كبريتات نحاس ثم يمزج مع أى من المحلولين التاليين:

أ-٥سم فورمالين + ٥سم حامض خليك ثلجى + ٩٠ سم كحول ايثايل ٩٥%.

ب-١٠سم فورمالين +٥سم حامض خليك ثلجى +٨٥ سم كحول ايثايل ٧٠%.

٥- طريقة Keefe يتركب المحلول من :

١) كحول ٥٠% ٩٠سم.
٢) حامض خليك ثلجى ٢.٥سم.
٣) فورمالين تجارى ٥سم.
٤) جلسرين ٢.٥سم.
٥) كلوريد نحاس ١جم.
٦) نيترات يورانيوم ١.٥ جم.

للنبات ذات اللون الأخضر المصفر يخفض كلوريد النحاس إلى النصف تحتاج النماذج الرقيقة إلى ٢٥-٤٨ ساعة وغيرها إلى ٣-١٠ أيام ليثبت اللون.

إزالة السليكا

تحتوى بعض العينات النباتية على مادة ثانى اكسيد السليكون مثل النجليات ويلزم ازالـة هـذة المادة قبل اجراء عملية الترقيد حيث ان وجود هذه المادة (الرمل) تعيق عملية التقطيع وتجرى عملية ازالة السليكا كما يلى :

١- توضع العينات في محلول يتكون من حامض خليك ثلجى وكحول الايثايل (١ : ١) ثـم تجـرى عملية التسخين حتى الغليان .

٢ – تنقل العينات الى كحول الايثايل ٢٥ % ٠مع التغيير)لمدة ٥ دقائق .

٣- تنقل العينات الى محلول كلوركس (Sodium hypochlorid) حتى تصبح لون العينات بيضاء .

٤- تشطف العينات بالماء الجارى (٢ – ٣ دقائق).

القياسات المجهرية Microscopic Measurement

القياسات المجهرية لغرض إيجاد الطول الحقيقي للخلايا والأنسجة ومحتوياتها يتم إتباع إحدى الطرائق الآتية:

تفحص الشريحة تحت إحدى العدسات الشيئية ويحسب قطر حقل المجهر تحت تلك العدسة ثـم تطبـق المعادلة.

$$\text{الطول الحقيقي للخلية} = \frac{\text{قطر حقل المجهر}}{\text{عدد الخلايا الواقعة على طول القطر}}$$

نفترض أن عدد الخلايا هو ١٥ خلية بما أن القطر التجريبي لحقل المجهر فى حال اسـتعمال العدسـة الشيئية ذات قوة التكبير (١٠×) هو ١.٥ مم .

$$\therefore \text{الطول الحقيقي للخلية (حسب المثال)} = \frac{١.٥}{١٥} = ٠.١ \text{ مم}$$

يمكن قياس طول أو قطر محتويات الخلية من ميتوكوندريا وحويصلات ..... الـخ. مـن الصـور الالكترونية الدقيقة الملتقطة بالمجهر الالكتروني بإتباع المعادلة التالية.

طول الخلية الحقيقي (بالميكرون) =

يستخرج الطول بعد التكبير بقياس طول الخلية من الصورة بواسطة المسطرة (بالمليمتر) ثم يحول إلى ميكرون. أما قوة التكبير فتكون عادة معدومة:

افترض أن قطر النواه فى صورة بالمجهر الالكترونى = ١١٠ مليمتر (تم قياسها بالمسطره).

تحول الى الميكرون = ١١٠ × ١٠٠٠ = ١٠٠.٠٠٠ ميكرون

افترض أن قوة التكبير لتلك الصورة = ١٩.٠٠٠ مره

$$\therefore \text{قطر النواة} = \frac{١١٠.٠٠٠}{١٩.٠٠٠} = ٥.٨ \text{ ميكرون}$$

٣- لقياس أبعاد الخلايا الحقيقية والأنسجة والأحياء المجهرية بالمجهر الضوئي تستخدم قطعتين من الأدوات هما:

١) الشريحة الميكرومترية Slide micrometer

هي شريحة زجاجية مقسمة إلى تدرجات معروفة الأبعاد ومقسمة إلى عدد من الأقسام (١٠٠ قسم).

يمكن عن طريق المقياس المحدد المكتوب على يسار الشريحة ١ ٠و ١- ومم (حيث يكتب عادة قيمة كل خط صغير من التقسيم بالمليمتر إلى يسار الشريحة المدرجة) أن يتم حساب طول كل قسم بالميكرون وهى إما ٠.٠١ ، ٠.١ مم.

مثال : إذا كان طول المقياس ١ ٠و فان طول كل قسم = ١ ميكرون

إذا كان طول المقياس ١ و فان طول كل قسم = ١٠ ميكرون

٢) العدسة العينية الميكرومترية Ocular micrometer

هي قرص زجاجي قطرة يتناسب مع اتساع قطر اسطوانة العدسة العينية محفور او مطبوع فيه خطوط مدرجة من صفر إلى ١٠٠ غير معروفة الأبعاد لأنها تتغير تبعاً لتغير العدسة الشيئية .

عملية المعايرة والتقنين Calibration

يقصد بها معرفة طول كل قسم من أقسام العدسة العينية الميكرومترية عند استخدام مجموعة بصرية معينة ، حيث يختلف طول كل قسم تبعا لنوع المجهر وقوة تكبير العدسة الشيئية والعينية وطول أنبوبة جسم الميكروسكوب ولذلك يجب إجراء عملية المعايرة أوالتقنين ولذلك يجب أجراء عملية المعايرة مع تغيير المجهر المستخدم . كيفية أجراء عملية المعايرة أو التقنين (استخراج قيمة كل خط صغير فى ميكرومتر العدسة العينية) كمايلى تستبدل العدسة العينية العادية بالعدسة العينية الميكرومترية ثم توضع الشريحة الميكرومترية على مسرح المجهر ويتم تثبيته بحيث يكون المقياس في منطقة متوسطة من فتحة العدسة.

تحرك أنبوبة المجهر باستخدام الضابط الكبير حتى يمكن رؤية أقسام الشريحة الميكرومترية ثم تدار العدسة العينية الميكرومترية حتى تصبح خطوط كل من الميكرومترين متوازيين تماما مع بعضهما يختار خطان من خطوط العدسة العينية الميكرومترية مع خطين من الشريحة الميكرومترية متطابقين تماما ثم تحدد عدد الأقسام التي تقع بن خطين من ميكرومتر العدسة العينية وتلك التي تتطابق معها تماما في ميكرومتر الشريحة (كما في الشكل التالي).

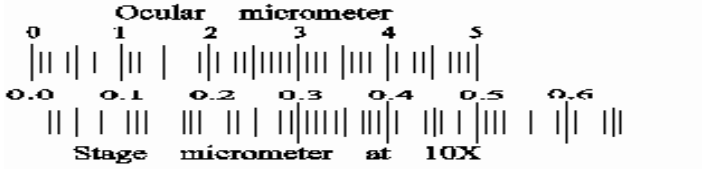
٤-تحسب قيمة كل خط صغير من العدسة الميكرومترية تحت العدسات الشيئية المختلفة بدأ بالقوة الصغرى ٤×.

نلاحظ أن كل ميكرون للشريحة الميكر ومترية يقابل عد معين من الخطوط الصغيرة فى العدسة الميكر ومترية ،لان قيمة الشريحة الميكر ومترية معلومة (كما سبق وأن ذكرنا).

يقدر طول كل قسم من أقسام ميكر ومتر العدسة العينية بالنسبة لطول القسم الواحد من ميكـر ومتـر الشريحة المجهرية ، ناتج القسمة هو قيمة كل خط صغير من العدسة الميكر ومترية وذلك كما يلي :

طول القسم =طول عدد أقسام الشريحةالميكرومترية ÷ عدد أقسام ميكرومتر العدسة

يتم تسجيل معايرة لكل قوة عدسة شيئية مستخدمة ويسجل نوع المجهر وطول انبوبة المجهر في سجل خاص .وعند اجراء قياس لابعاد القطاع او اى مكون من مكونات الخلية يتم استخدام نفس العدسـات الشيئية مع نفس العدسة العينية الميكر ومترية حيث ان طول القسم الواحد في ميكرومتر العدسة العينيـة يتغير



المرجع

١- Lillie RD. (١٩٤٧): Histological technique and practical histochemistry. New York; McGraw-Hill Book Company.

٢- Walter F. (١٩٨٠): The microtome manual of the technique of preparation and of section cutting. Germany; Ernst Leitz Wetzlar GMBH.

٣- Culling CFA.(١٩٥٧): Handbook of Histopathological Technique. London; Butterworths.

٤ - Gordon K; Bradbury P.(١٩٩٠) : Microtomy and Paraffin sections. In Bancroft JD and Stevens A ed. Theory and Practice of Histological Techniques, ٣rd edition. London; Churchill Livingstone.

٥- McDowell AM; Vassos GA.(١٩٤٠) :Comparison of starch paste and albumin mixture as agents for routine mounting of paraffin sections. Arch Pathol; ٢٩: ٤٣٢.

٦- Chew S. A (١٩٨٢) : method for cutting resin sections for histology. Tissue Talk; ٢:, ٣

٧- Lane BP; Europa DL. (١٩٦٥) : Differential staining of ultra thin sections of epon-embedded tissues for light microscopy. J Histochem Cytochem; ١٣: ٥٧٩-٥٨٢

٨- Horobin RW. (١٩٨٢) : Histochemistry. Stuttgart: Gustav Fischer.

٩- Baker JR.(١٩٥٨) :Principles of biological microtechnique. London: Methuen.