الفصل الثاني: طرق دراسة الخلية
الحصة التوجيهية رقم 2: تقنيات تحضير المقاطع النسيجية

1- تحضير المقاطع للملاحظة بالمجهر الضوئي [شكل 1]

بالنسبة للدراسة النسيجية الكلاسيكية، يتم تحضير المقاطع الرقيقة في عدة خطوات:

أ) أخذ العينة (Prélèvement)

- يجب أخذ العينة من العضو بعناية لتجنب تمزق خلايا الأنسجة.
- بمجرد الحصول على هذه العينة، يجب غمرها مباشرة في حجم كبير من سائل التثبيت.

ب) التثبيت (Fixation)

- الهدف من التثبيت هو الحفاظ على البنيات وتصلب القطع.
- يمكن أن يتم عن طريق سائل التثبيت أو عن طريق التجميد
- سوائل التثبيت الأكثر استعمالا هي الفورمول و سائل بوين Bouin (خليط من الفورمول وحمض البيكريك).
- تختلف مدة التثبيت وحجم المثبت المستخدم حسب حجم العينات. يوصى بحجم من المثبت يساوي 5 أضعاف حجم العينة.

ج) نزع ماء (Déshydratation)

- الهدف من هذه المرحلة هو إزالة الماء الموجود في العينة.
- يتم إزالة الماء عن طريق تمرير العينة في حمامات كحول ذات تراكيز متزايدة (من كحول ذي 50° إلى كحول مطلق 100°) ثم في حمامات xylène أو التولوين. تعتبر هذه الخطوة تحضيرا لعملية التضمين ، لأن البارافين كاره للماء.

د) التضمين أو الطمر(Inclusion ou enrobage)

- الهدف من الطمر هو جعل العينة صلبة تسمح بإنجاز مقاطع رقيقة و منتظمة
- وسط الطمر المستعمل هو شمع البارافين ، الذي يسمح بتصلب العينة.
- غمر القطعة في البرافين السائل محفوظ في حضانة مضبوطة على 56°م
- بعد 4 ساعات من التضمين ، يُسكب البارافين السائل في قالب معدني صغير "قضبان Leuckart". بعد التبريد ، نحصل على كتلة صلبة من البرافين تحوي بداخلها القطعة (العينة) المأخوذة

ه) القطع (Coupe)

- تقطع كتلة البرافين بواسطة المقطاع المجهري (microtome) الذي يسمح بالحصول على شرائح رقيقة يترواح سمكها بين 2 إلى 5 ميكرون مرتبة في سلسلة منتظمة على شكل شرائط.
- يتم جمع المقاطع على شرائح زجاجية.

و) نزع البرافيين (Déparaffinage)

- توضع الشرائح الزجاجية على صفيحة ساخنة (عند 45-60 درجة مئوية) لمدة 15 دقيقة ، من أجل إذابة البرافين.
- ينزع البرافين بتمرير الشرائح في حمامات التولوين أو الزيلين (xylène)

ز) إعادة الماء (Réhydratation)

- يسمح إعادة الماء بإزالة البارافين الداخل خلوي عن طريق غمر الشرائح في حمامات كحول ذات درجات متناقصة (من كحول مطلق ذي 100° إلى كحول ذي 50°) ، ثم غمرها في الماء المقطر.

UFMC - SNV-TC-1ère LMD - 2021-2022

ح) التلوين (Coloration)

- تسمح عملية التلوين برفع التباين الذي يؤدي إلى التمييز بين المكونات الخلوية المختلفة.
- يتم التلوين بإستعمال أنواع مختلفة من الملونات. تستخدم الملونات المناسبة للدراسة.

ط) التركيب والملاحظة المجهرية (Montage et observation microscopique)

- يتم تثبيت المقاطع الملونة بين الشريحة والساترة بإستخدام الراتنج الصناعي "بلسم كندا" الذي يكون معامل انكساره قريبًا من ذلك الخاص بالزجاج. بذلك يتم الحصول على محضر نسيجي جاهز لفحصه بالمجهر الضوئي.

2- تحضير المقاطع للملاحظة بالمجهر الإلكتروني [شكل 2]

تسلسل المعالجة مشابه لما تم عرضه في الفحص بالمجهر الضوئي.

.

أ) التثبيت (Fixation)

- يتم عادة بإستعمال glutaraldéhyde، يليه تثبيت لاحق بحمض الأوسميك (رباعي أكسيد الأوزميوم OsO4).

ب) نزع الماء (Déshydratation)

- يتم تمرير العينات في تراكيز متزايدة من الإيثانول ثم في أكسيد البروبيلين.

ج) التضمين أو الطمر (Inclusion ou enrobage)

- يتم تضمين العينات في مادة صمغية résine (araldite) التي تسمح للعينة بالتصلب عن طريق البلمرة.

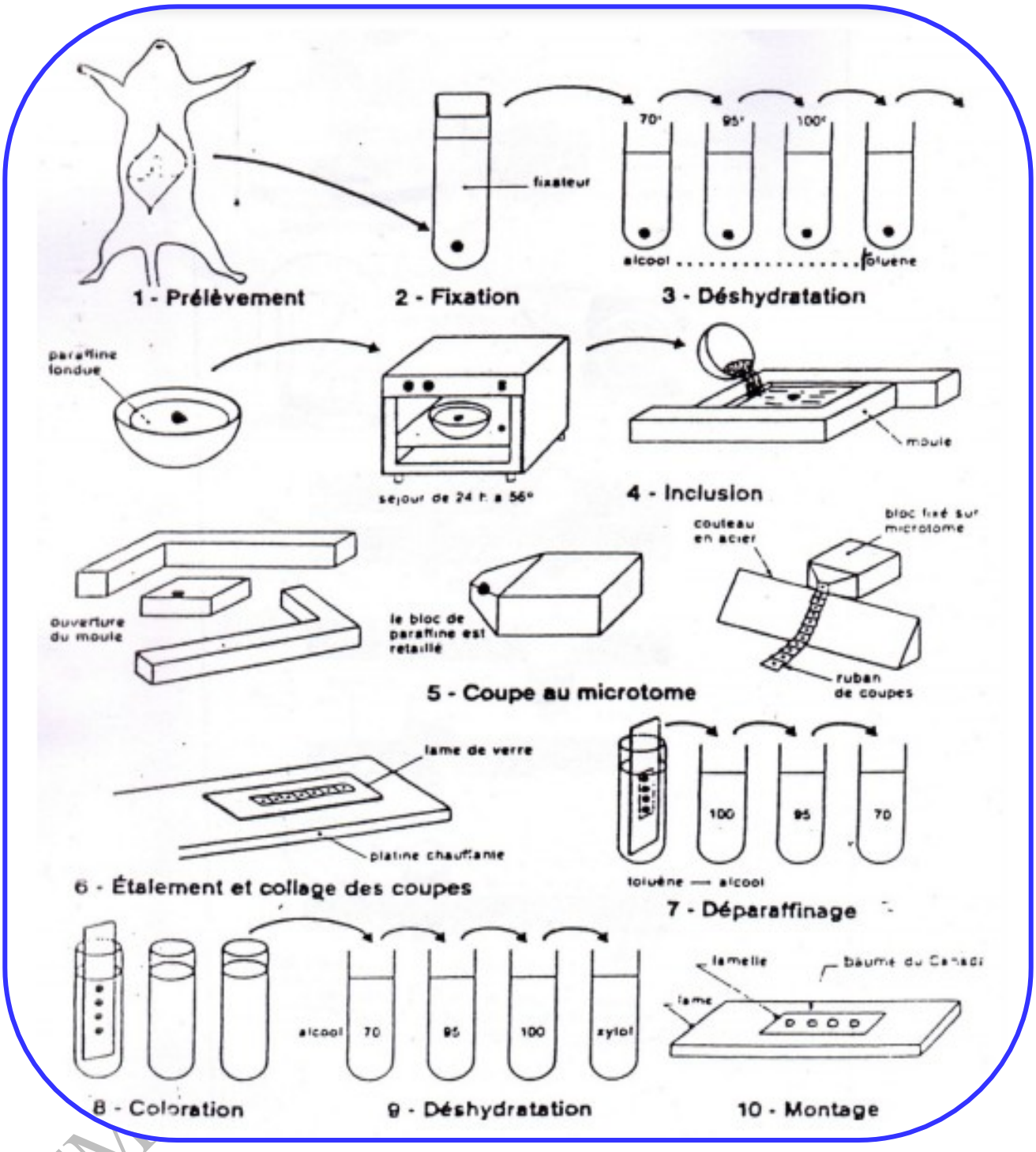
د) القطع (Coupe)

- يتم قطع كتل résine التي تحتوي على العينة بإستخدام ما فوق المقطاع المجهري (Ultramicrotome) المزود بسكين زجاجي أو ماسي يسمح بالحصول على مقاطع فائقة الدقة يبلغ سمكها حوالي 80 نانومتر

هـ) التباين (Contraste)

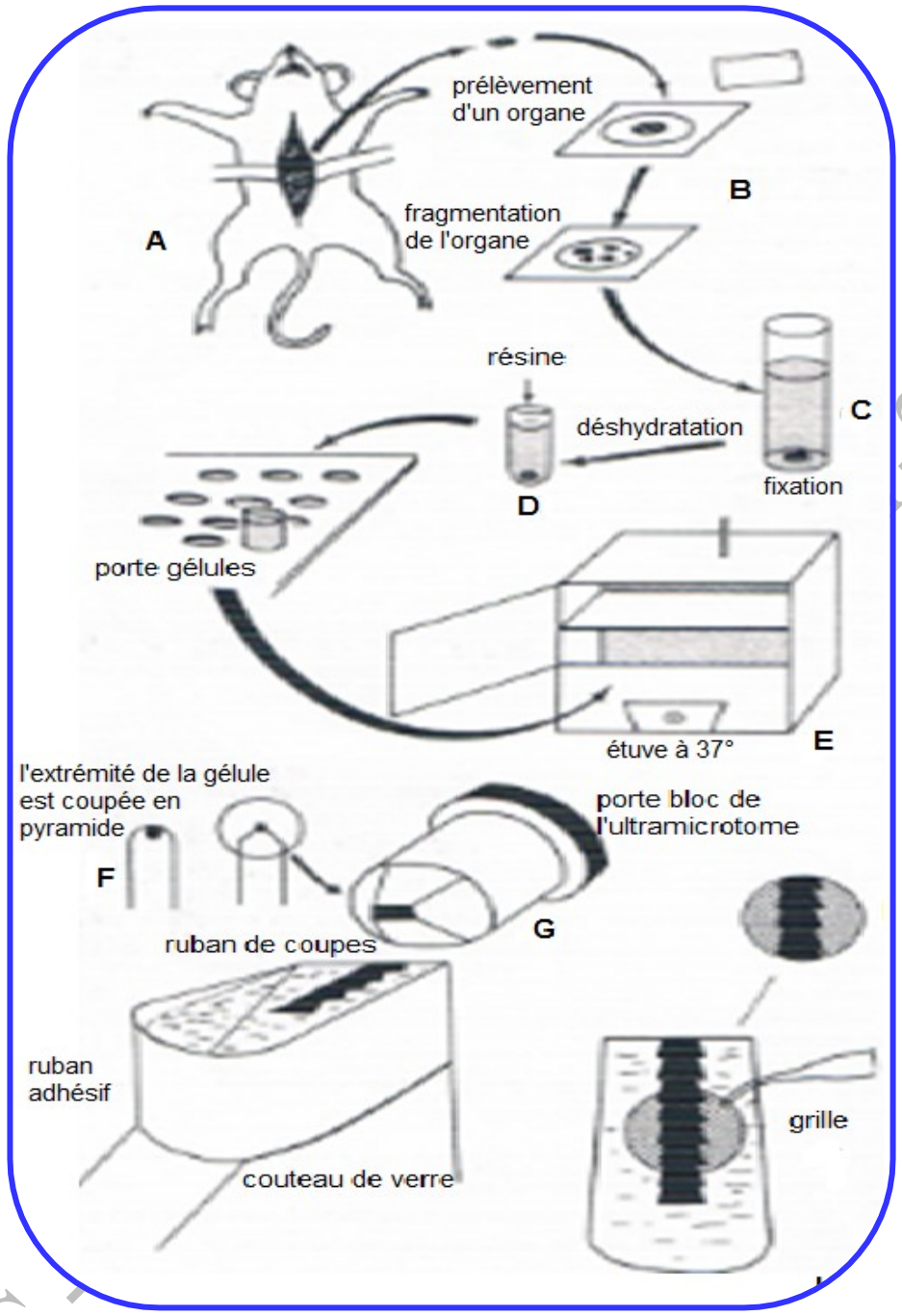
- وضع المقاطع الخلوية على شبكة نحاسية.
- غمر الشبكة في محلول من المعادن الثقيلة (أسيتات اليورانيل وسيترات الرصاص) لتغميق البنيات الخلوية وزيادة التباين.
- يتم بعد ذلك إدخال الشبكة في المجهر الإلكتروني النافذ (MET) للفحص.

UFMC - SNV-TC-1ère LMD - 2021-2022



شكل 1 : تحضير المقاطع للفحص بالمجهر الضوئي

UFM



شكل 2 : تحضير المقاطع للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ (MET)

UFMC - 2022