تحضيرات مجهرية

الجزء العملي

تحضير الشرائح المجهرية

التحضيرات المجهرية :يقصد بالتحضيرات المجهرية بأنها تلك الخطوات أو العمليات التي تستعمل فيها معدات أو أجهزة علمية وطرق تحضير دقيقة تسهل على الدارس معرفة ماهية التراكيب الخلوية لجسم الكائن الحي .

الهدف من تحضير الشرائح المجهرية : دراسة التركيب الداخلي أو الخارجي في بعض الكائنات الحية أو جزء منها والتعرف على خصائصها وصفاتها.

- إن عملية التحضيرات المجهرية رغم أنها غاية في التعقيد والدقة إلا أنها ذات أهمية كبيرة في الحياة العملية والبحثية والتشخيصية ,فهي تعتبر الأساس الأول لتشخيص المرض بواسطتها يمكن دراسة التراكيب الخلوية المكونة لجسم الكائن الحي والتي لا ترى بالعين المجردة أو أجزاء منها أو أعضاء من الجسم باستخدام أجهزة ومعدات خاصة لهذا الغرض
- التحضيرات المجهرية هو علم يتكون من ثالث نشاطات متداخلة مع بعضها هي تحضير العينة للدراسة المجهرية واالستعمال الصحيح للمجهر وما يتعلق به من أجهزة مساعدة لتفسير ودراسة العينة وتدوين ورسم النتائج
- يشمل علم التحضيرات المجهرية
  - تحضيرات مجهرية نباتية
  - تحضيرات مجهرية حيوانية
  - تحضيرات مجهرية طبية
- تنقسم التحضيرات المجهرية إلى قسمين
  - تحضيرات لا مقطعية لا يمكن عمل مقاطع فيها مثل أنسجة الدم
  - تحضيرات مقطعية تخص المجهر الضوئي والالكتروني.

طرق اعداد التحضيرات المجهرية:

1. **التحميل الكلي (Whole mount)**

حيث يتم وضع العينة بأكملها على الشريحة للفحص مثل الدودة الكبدية و القمل و منها نوعان:

- التحميل الكلي المؤقت
- التحميل الكلي الدائم.

2. عمل مسحات (Smearing Method)

وهي من أسرع الطرق التحضيرية الخاصة بالأنسجة الرخوة مثل الخصى الحيوانية والسوائل الحيوية مثل الدم والبلغم.

3. النثر أو النشر (Teasing Method)

تستخدم لدراسة أجزاء من نسيج ما كالعضلة مثال حيث تؤخذ قطعة صغيرة من العضلات ثم بواسطة إبرة تشريح يتم تفكيكها إلى الوحدات التركيبية مثل الألياف العضلية حيث يمكن لضوء الميكروسكوب أن يخترقها.

4. السحق أو الهرس (Squashing Method)

تسخدم لهرس العينات الرخوة وتحويلها من الحالة النسيجية إلى الحالة الخلوية على الشريحة الزجاجية مثل دراسة مراحل الأنقسام الخلوي و مشاهدة الكر وموسومات.

5. الطريقة المباشرة (Direct Method)

تستخدم للدراسة السريعة للعينات الحية ولوقت قصير جدا كما في فحص الخلايا الحرشفية للفم والأميبا و البراميسيوم.

6. التقطيع (Sectioning Method)

وهي الأهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي و الخلوي والغرض منها الحصول على قطاع نسيجي رقيق جدا ,و هناك ثلاث طرق رئيسية تستخدم لعمل المقاطع النسيجية:

- تقنية البرافين
- تقنية السللودين
- تقنية التجميد

الدرس العملي الأول

المجهر الضوئي المركب (The Light Compound microscope)

يتركب الميكروسكوب الضوئي من عدة أجزاء ميكانيكية وأخرى ضوئية كما يلي:

أولا: الأجزاء الميكانيكية:

- القاعدة Base: وهو الجزء الذي يرتكز عليه الجهاز ويأخذ أشكال مختلفة حسب الشركة المنتجة.
- الذراع Arm: هو الجزء الذي يحمل أنبوبة الميكروسكوب ويتصل بالمسرح، والضوابط.
- المسرح Stage: هو جزء قابل للحركة في أكثر من اتجاه عن طريق ضوابط جانبية، وتثبت عليه الشريحة الميكروسكوبية عن طريق الماسك Holder.
- الضوابط Adjustments وهى نوعين:
  - ضابط تقريبي كبير Coarse Adjustment: يستعمل لإظهار الصورة.
  - ضابط تقريبي صغير: Fin Adjustment : يستعمل لضبط البعد البؤري بدقة.

ثانيا: الأجزاء البصرية:

1- الجزء العيني Eye piece للميكروسكوب، يتكون من:

- **العدسة العينية Ocular lens** : وهى مثبتة في اعلي أنبوبة الميكروسكوب ،يتراوح تكبيرها من 6-10 مرات,

2- الجزء الأنفي Nose piece للميكروسكوب, يتكون من:

- العدسات الشيئية Objective lenses : وهى مثبته في الجزء السفلى من أنبوبة الميكروسكوب بالقرب من المسرح, على قرص دائري متحرك.

ويوجد ثلاثة أنواع من العدسات الشيئية:

- العدسة الصغرى Low power قوة تكبيرها 4X or10x .
- العدسة الكبرى High power قوة تكبيرها 40x .
- العدسة الزيتية Oil lens: قوة تكبيرها 100x.(تستعمل لفحص البكتيريا) مع إضافة زيت يسمى السيدر Immersion oil , والغرض الأساسي من استعمال نقطة الزيت هو زيادة الإضاءة.

3- المكثف Condenser : يوجد المكثف أسفل المسرح.

- يتركب من مجموعة من العدسات مرتبة بطريقة خاصة، تعمل على تجميع الأشعة الضوئية.

- يمكن التحكم فيه بواسطة ضابط جانبي، لإدخال أكبر كمية من الإضاءة على العينة أو لتقليل كمية الإضاءة. فكلما زاد تكبير العدسة الشيئية، نحتاج كمية إضاءة أكبر فيضبط على أعلى أوضاعه.

4- **الحجاب Diaphragm**: يوجد أسفل المكثف ويتكون من صفائح رقيقة تتداخل مع بعضها،وبواسطتها يمكن التحكم في كمية الإضاءة التي تمر للعينة.

5- **مصدر الإضاءةLight source :**لمبة لإصدار الضوء، ويمكن التحكم في شدته.

طريقة استعمال المجهر الضوئي:

1- توضع العينة المحضرة على الشريحة في المسرح ثم يحرك المسرح يمينا ويسارا حتى تتوسط العينة فتحة المسرح.

2- تشغيل المصدر الضوئي.

3- الفحص المبدئي باستخدام القوة الصغرى.

4- يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر العينة بوضوح.

5- إذا أريد الفحص بالعدسة الكبرىx40 تحرك القطعة الأنفية إلى العدسة الكبرى. ثم يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر بوضوح

6- إذا أريد فحص العينة بالعدسة الزيتية x100 توضع نقطة زيت سيدر على العينة وتحرك القطعة الأنفية إلى العدسة الزيتية. ثم يستعمل الضابط الدقيق حتى تظهر بوضوح.

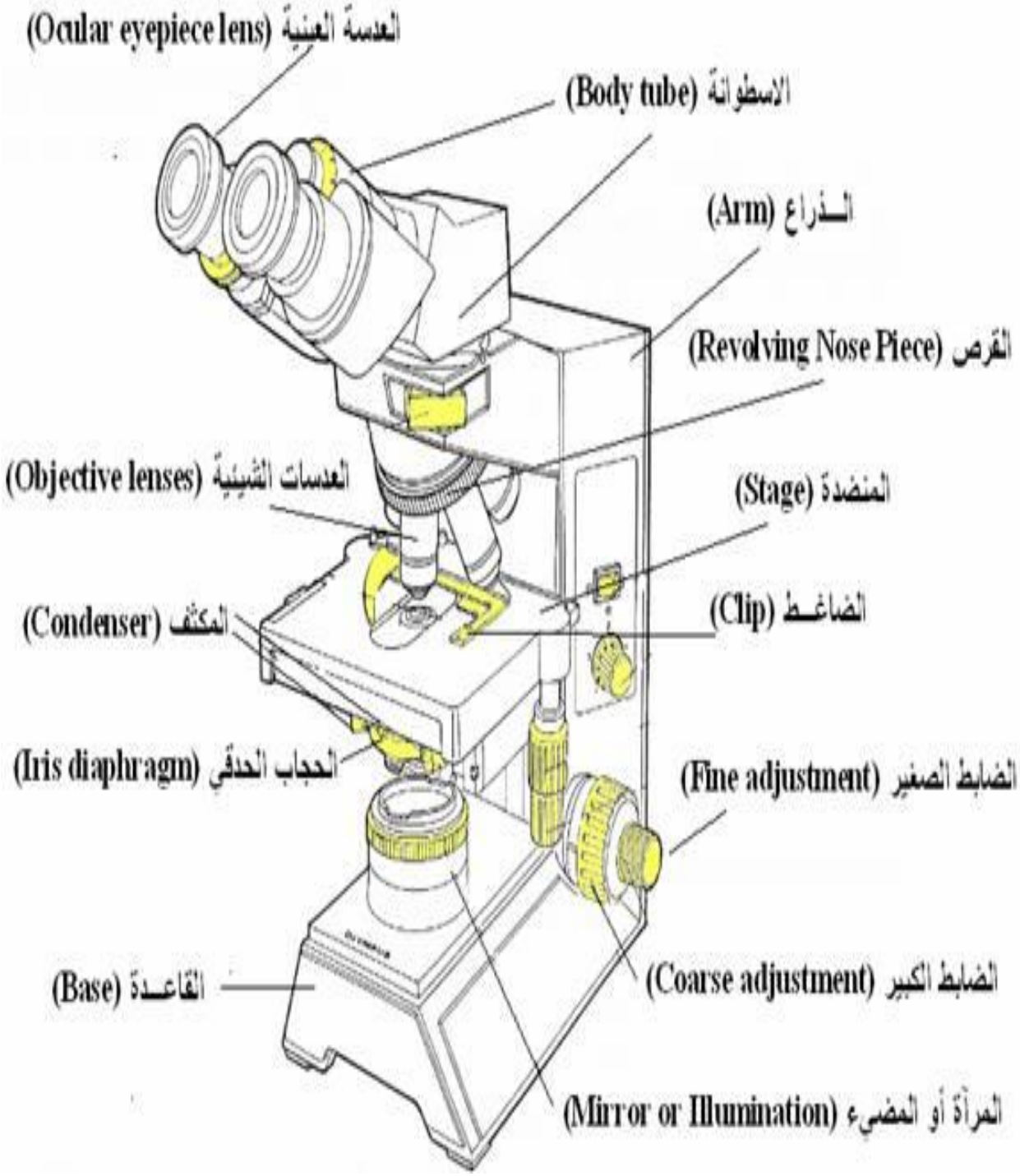
حساب قوة التكبير :

1- أكتب قوة تكبير العدسة العينية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو عادة (10X).
2- أكتب قوة تكبير العدسة الشيئية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو يختلف باختلاف العدسة الشيئية .
3- فلو فرضنا انك استخدمت عدسة عينية فوة تكبيرها (10X) وعدسة شيئية ذات قوة تكبير (40X) فتحسب قوة التكبير الكلية من حاصل = قوة العدسة العينية X قوة العدسة الشيئية

$$400\ X = 40\ X\ 10$$

الحفاظ على الميكروسكوب:

- مسح الزيت من على العدسة الزيتية بعد الاستعمال بواسطة الورق الخاص بتنظيف العدسات، إذا جف الزيت استخدام الورق المبلل بقليل من الزيلول، مع مراعاة عدم الإكثار منه لأنه قد يتسبب بإذابة المواد اللاصقة للعدسات.
- يجب الاحتفاظ بالمسرح نظيفا وجافا على الدوام.
- احمل المجهر بعناية عند نقله من مكان لآخر، ضع إحدى يديك أسفل القاعدة وباليد الأخرى امسك ذراع المجهر.
- عند عدم استعمال المجهرنقوم بتغطية المجهر.


(Ocular eyepiece lens) العدسة العينية
(Body tube) الاسطوانة
(Arm) الـذراع
(Revolving Nose Piece) القرص
(Objective lenses) العدسات الشيئية
(Stage) المنضدة
(Condenser) المكثف
(Clip) الضاغـط
(Iris diaphragm) الحجاب الحدقي
(Fine adjustment) الضابط الصغير
(Base) القاعـدة
(Coarse adjustment) الضابط الكبير
(Mirror or Illumination) المرآة أو المضيء

تحضير شرائح مجهرية لخلايا نباتية وحيوانيّة وفحصها بالمجهر الضوئي

المواد اللازمة:

يلزم للقيامِ بهذا النّشاط الاتى:

- مجهر ضوئي مركب (Light compound microscope).
- شرائحمجهرية(Slides).
- أغطية شرائح (Cover slip).
- ملقط(Forceps).
- أعواد تنظيف الأسنان وأعواد قطن تنظيف الأذن.
- قطارة ماء (Water dropper)
- محلول اليود (Iodine solution).
- صبغةأزرق الميثلين (Methylene blue).
- بصل (Onion).

1- خطواتتحضير شريحةمن خلايا البصل(خلايا نباتية) :

نتبع الخطوات التالية:

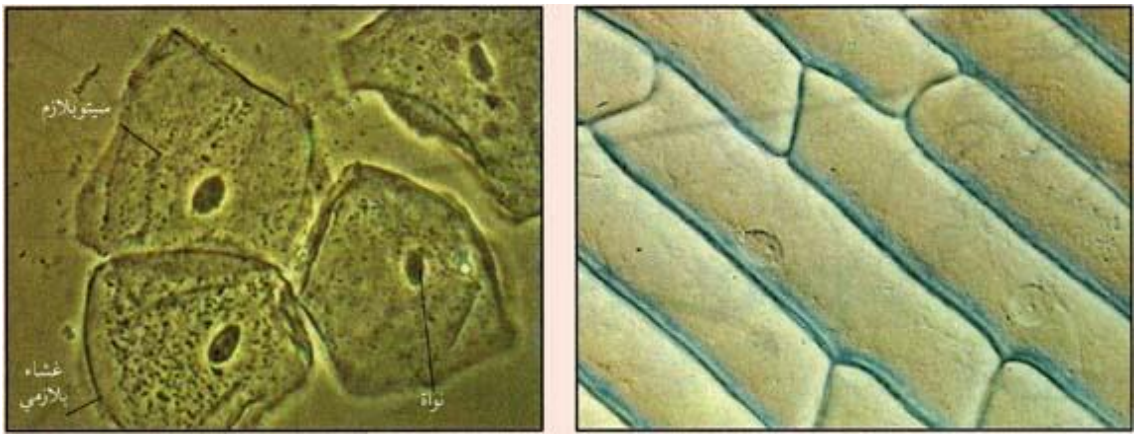
- تقطيع البصل الي أربع أجزاء.
- انزع حرشفة من حراشيف أحد الأجزاء المقطوعة ونقوم بنزع بشرتها الخارجية(Epidermis).
- انزع البشرة الخارجية بحرص باستخدام ملقط.
- ضع جزءاًمن البشرة على شريحة نظيفة عليها قطرة ماء وقطرة من محلول اليود.
- ضع غطاء نظيف للشريحة الزجاجية بحرص حتى لا تتكون فقاعات هوائية.
- نضع الشريحة المحضرة تحت الميكروسكوب ونفحصها باستعمال قوي التكبير المختلفة.
- ارسم ما تشاهده في الشريحة في دفترك. (قارن بالصورة التي أمامك)
- احسب قوة التكبير للعينة التي تراها بوضوح.

2- خطوات تحضير شريحةمن خلايا تجويف الفم (خلايا حيوانية) :

نتبع الخطوات التالية:

- مرر عود نظيف من أعواد تنظيف الأسنان أو عود قطن تنظيف الأذن بباطن الخد أو يمرر على اللثة برفق.
- نضع ما تم تجميعه على الأعواد في قطرة ماء موضوعة على شريحة نظيفة.
- نضع قطرة من صبغة أزرق الميثيلين لزيادة توضيح مكونات الخلية.
- ضع غطاء نظيف للشريحة الزجاجية بحرص حتى لا تتكون فقاعات هوائية.
- نضع الشريحة المحضرة تحت الميكروسكوب ونفحصها باستعمال قوي التكبير المختلفة.
- ارسم ما تشاهده في الشريحة في دفترك. (قارن بالصورة التي أمامك)
- احسب قوة التكبير للعينة التي تراها بوضوح.

النتائج :



الخلية النباتية Plant cell

الخلية الحيوانية Animal cell

الدرس العملي الثاني

تحضير عينة بطريقة التحميل الكلي (Whole mount preparation)

التحميل الكلي Whole mounting: يتم وضع العينة بأكملهاعلى الشريحة للفحص دون الحاجة الى تقطيعها مثل الدودةالكبدية والقمل و العينات الفطرية وهونوعان:

أ- التحميل الكلي المؤقت.

ب- التحميل الكلي الدائم.

أ ـ تحضير عينة لفطر بطريقة التحميل الرطب الكلي المؤقت

Preparation a whole wet mount specimen such as Fungi

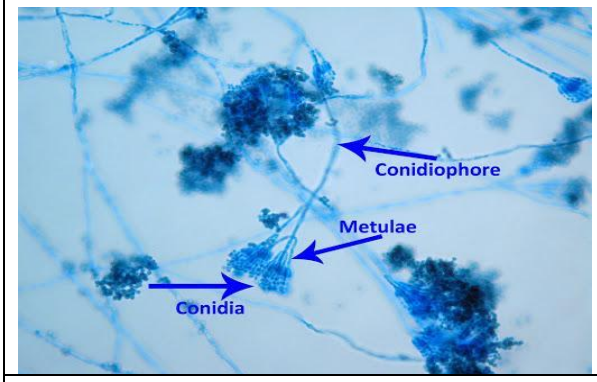
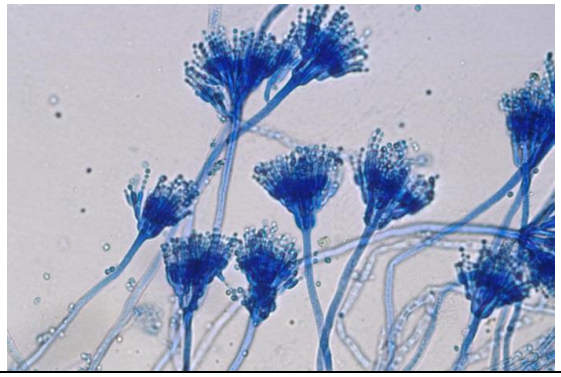
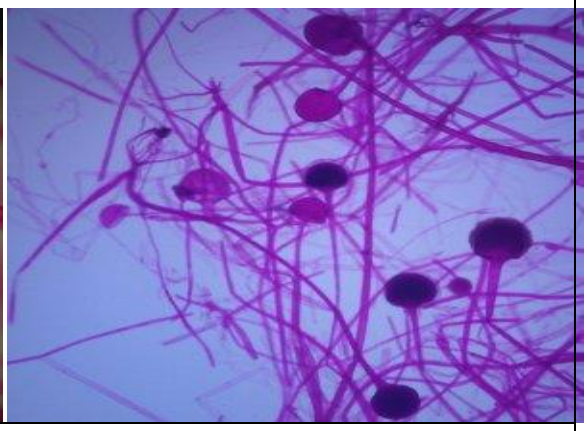
الأدوات المستخدمة للنشاط:

1. مجهر ضوئي مركب Light compound microscope.
2. شرائح زجاجية Microscope slides
3. غطاء شرائح Cover slips
4. أبره تلقيح Inoculating needle
5. مزرعة فطرية Fungal culture
6. صبغة أزرق الميثيلين Methylene blue stain

خطوات العمل:

1. ضع قطرة من الصبغة على شريحة زجاجية نظيفة.
2. ضع عينة الفطر في قطرة الصبغة مستخدما أبره فطريات معقمة.
3. غطي الشريحة.
4. أفحص الشريحة باستخدام المجهر الضوئي المركب. وارسم ما تشاهده بدفترك

النتائج:

	
Penicilium	*Aspergillus*
	
Rhizopus	*Rhizopus*

ب - تحضير عينة بطريقة التحميل الكلي الدائم

Preparation a whole mount specimen such as insect

هو تحميل العينة كاملة أو جزء منها مثل أجزاء فم الحشرات أو الجناح أو قرون الاستشعار أو الأرجل

الأدوات المستخدمة للنشاط:

1. **مجهر ضوئي مركب Light compound microscope.**
2. **شرائح زجاجية Microscope slides**
3. **غطاء شرائح Cover slips**
4. **فورمالين**
5. **كحول إثيلي Ethyl alcohol**
6. **زيلين Xzylene**
7. **كندا بلسم**

خطوات العمل:

1- **التثبيت Fixation : توضع العينة في 10% فورمالين أو 70% كحول .**
2- **نزع الماء Dehydration_ :توضع العينة في تركيزات متدرجة من الكحول الإيثيلي 30% ، 50% ،70% ،90% ،100% على أن يتم وضع العينة لمدة 10ق في كل تركيز .**
3- **الترويق Clearing: توضع العينة في الزايلين Xylene لمدة 5 دقائق**
4- **عملية التحميل : توضع العينة على شريحة زجاجية ويوضع عليها مادة كندا بلسم وتغطى بالغطاء الزجاجي وتترك لمدة 24 ساعة حتى تجف**
5- **فحص العينة بالميكروسكوب .**

الدرس العملي الثالث

طريقة تحضير شريحة مجهرية بالطريقة المباشرة (Direct method)

تستخدم للدراسة السريعة للعينات الحية ولوقت قصير جدا كما في فحص الخلايا الحرشفية للفم والأميبا و البراميسيوم.

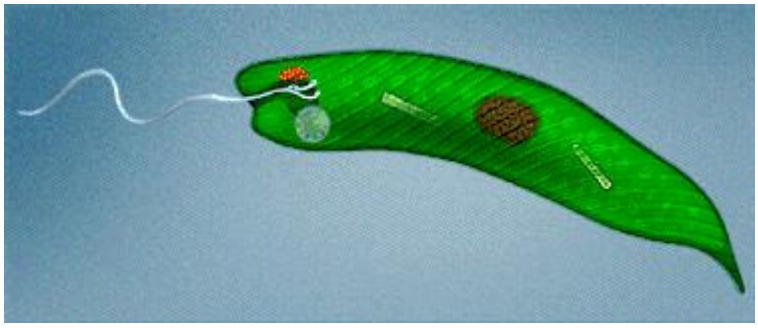
الأدوات المستخدمة:

1. مجهر ضوئي مركب Light compound microscope.
2. شرائح زجاجية Microscope slides
3. غطاء شرائح Cover slips
4. أبره تلقيح Inoculating needle
5. عينة مياه راكدة Water sample
6. صبغة اليود Iodine solution

خطوات العمل:

1. خذ عينات من مياه عذبة راكدة من مصادر مختلفة ومعها بعض الطين الموجودة في القاع واخلطيها معها في حوض به بعض النباتات المتحللة.
2. ضع الحوض في مكان دافئ مدة ثالث أيام
3. خذ قطرة من الريم الذي يتكون على سطح الماء في المزرعة السابقة مستعملا أنبوبة مسحوبة الطرف و ضعيها على شريحة زجاجية و ضع عليها الغطاء الزجاجي و افحصيها تحت المجهر.
4. -افحص الحيوانات ألولية الموجودة تحت القوة الكبرى.
5. أضف قطرة من محلول اليود لتظهر ألجزاء المختلفة بوضوح.

النتائج:



Euglena sp.

Paramecium sp.

الدرس العملي الرابع

طريقة تحضير شريحة مؤقتة لدراسة مراحل الانقسام الميتوزي للبصل

Preparation and study of mitosis in Onion root tips

طريقة السحق أوالهرس (Squashing Method)

تستخدم لهرس العينات الرخوة وتحويلها من الحالة النسيجية إلى الحالة الخلوية على الشريحة الزجاجية مثل دراسة مراحل الانقسام الخلوي ومشاهدة الكروموسومات.

خطوات العمل:

1- **مرحلة انبات العينة المراد فحصها (Cultivation).**

نقوم بزراعة نبات البصل بدرجة حرارة الغرفة ونتركه حتى يصل الجذر الي 3سم تقريباً.

2- **مرحلة التثبيت (Fixation).**

- نقوم بقطع المناطق الطرفية (النسيج المرستيمي) للجذور النامية (تقطع الجزء الطرفي بطول 0.5 الي 1 سم تقريباً. ونضعها في مثبت كحولي مكون من (كحول ايثيلي Ethyl alcohol+ حمض الخليك الثلجي Glacial acetic acid) بنسبة 1:3 لمدة 24 ساعة.
- الغرض الأساسي من عملية التثبيت هو القتل المفاجئ للنسيج بدون أي تشويه لمكونات الخلية المراد فحصها بمعني وقف العمليات الحيوية داخل الخلية.

3- **غسل العينة 3 مرات بالماء** (ويمكن حفظ العينة بالثلاجة لحين الاستخدام بكحول 70%).

4- **مرحلة التحلل المائي (Hydrolysis).**

تعامل الجذور بحمض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid (1 عياري) بحمام مائي في درجة حرارة 60 درجة مئوية (5-6 دقائق) حيث تقوم هذه العملية بتفكيك الروابط البروتوبلازمية وتلين الجدار الخلوي للنسيج فيسهل عملية الهرس.

5- **مرحلة الصبغ (Staining).**

وضع القمة النامية المعالجة على شريحة نظيفة ونضع عليها قطرة من محلول الصبغ المحضر مسبقاً (Aceto-carmine) من 10-15 دقيقة.

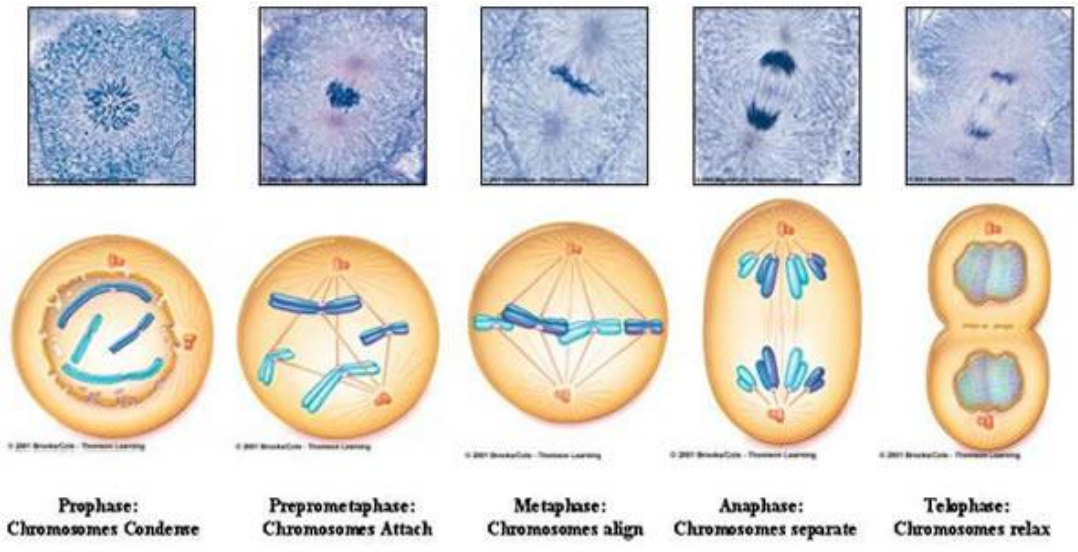
6- **مرحلة الهرس (Squashing).**

نهرس الجزء المريستيمي ونخلطه بالصبغة ونقوم بتغطية الشريحة بغطاء للشريحة برفق لطرد فقاعات الهواء.

7- **مرحلة الفحص (Examination).**

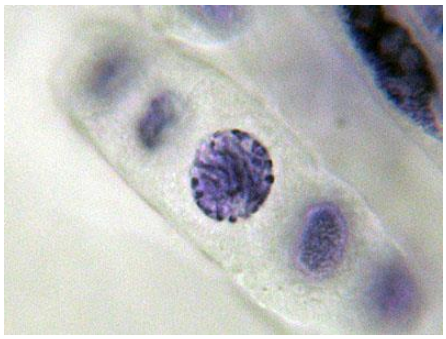
نقوم بفحص الشريحة تحت الميكروسكوب باستخدام قوي التكبير المختلفة الصغرى ثم القوي الكبرى، ونحدد الأطوار المختلفة للانقسام الغير مباشر

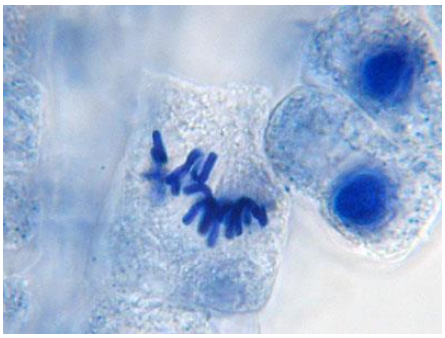
Mitosis division consists of four stages (Prophase - Metaphase – Anaphase – Telophase)

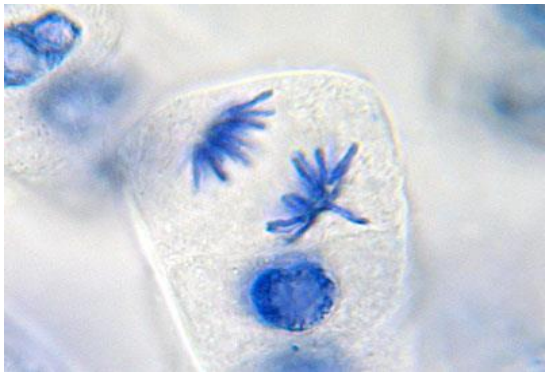


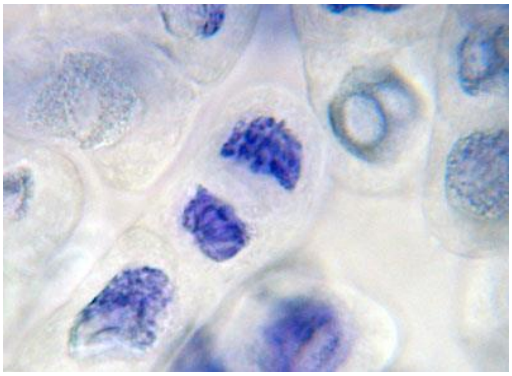
المشاهدة والنتائج:

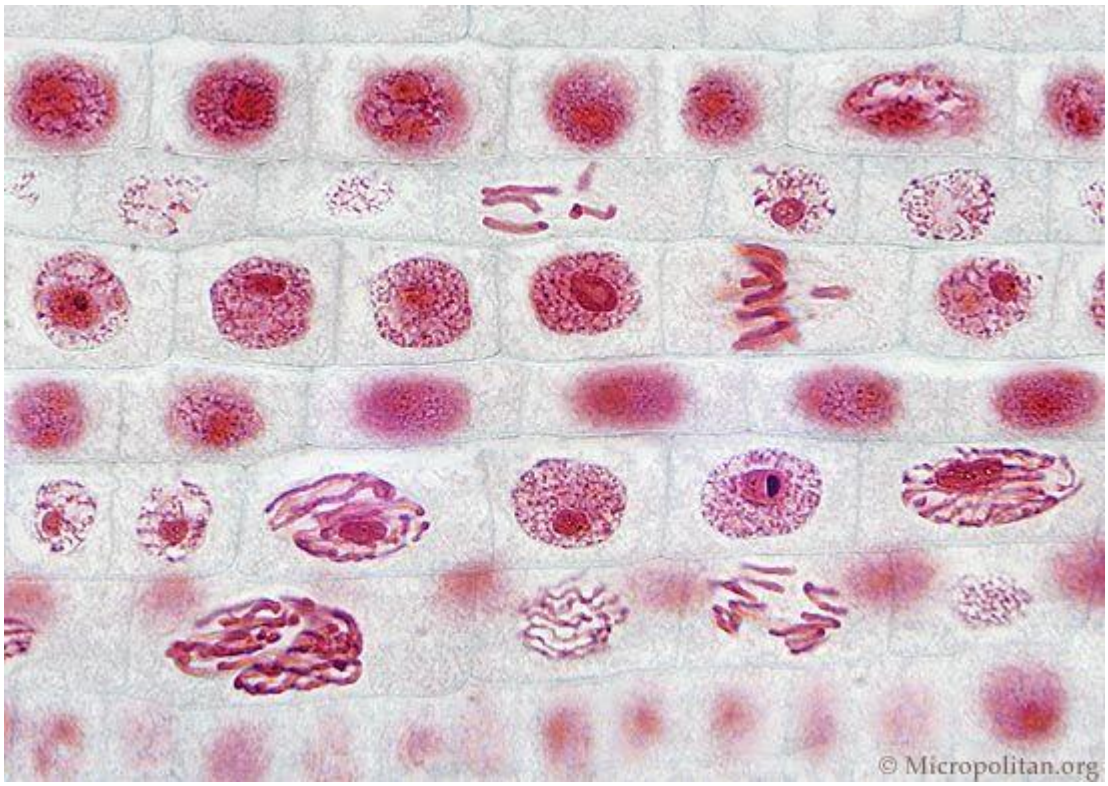
-تعرف على الأطوار المختلفة للانقسام











Mitosis in onion cells

الدرس العملي الخامس

تحضير شريحة مجهرية لعينة الدم بطريقة المسحات

Preparation of blood sample using Smears Method

المسحات Smear :

وهي من أسرع الطرق التحضيرية الخاصة بالأنسجة الرخوة مثل الخصى الحيوانية والسوائل الحيوية مثل الدم والبلغم والسائل المهبلي والحيوانات المنوية كما تستخدم للمحاليل البكتيرية.

الهدف من التجربة:

1- فحص عينات الدم والتعرف على اشكال وأنواع الخلايا.
2- تشخيص بعض الأمراض المتعلقة بالدم.
3- فحص الدم لتشخيص بعض حالات الطفيليات مثل الملاريا.

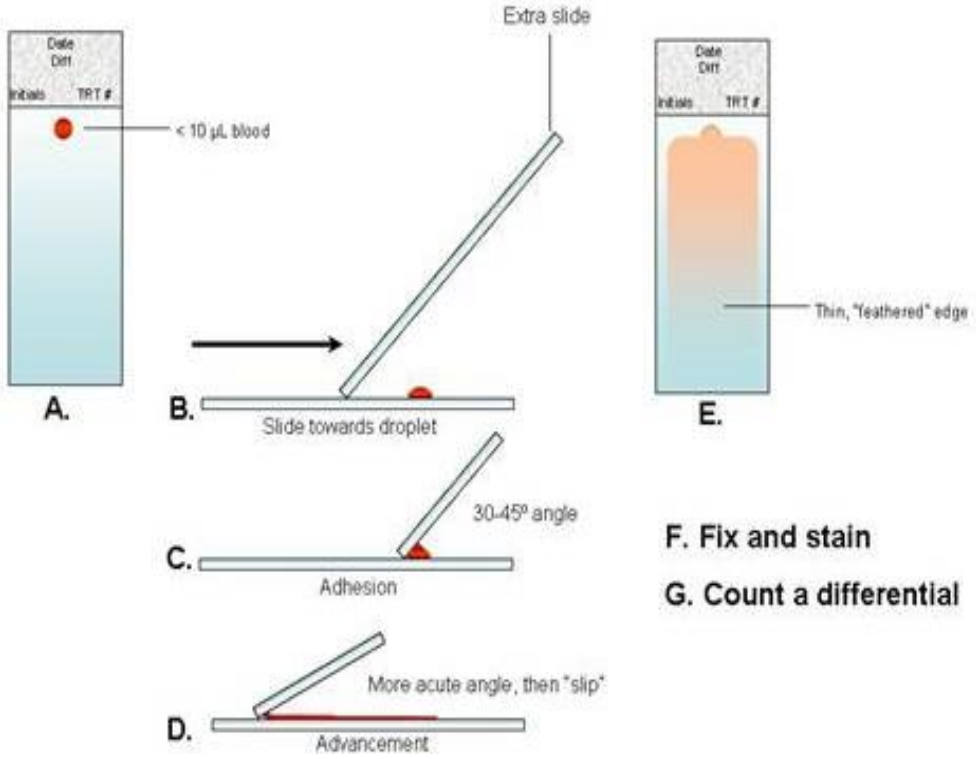
الأدوات المستخدمة للنشاط:

1. مجهر ضوئي مركبLight compound microscope.
2. شرائح زجاجيةMicroscope slides.
3. زيت سيدر Cedar oil.
4. عينة دم Blood sample.
5. صبغة من صبغات الدم مثل صبغ ليشمان (Leishman's stain) Blood stains.

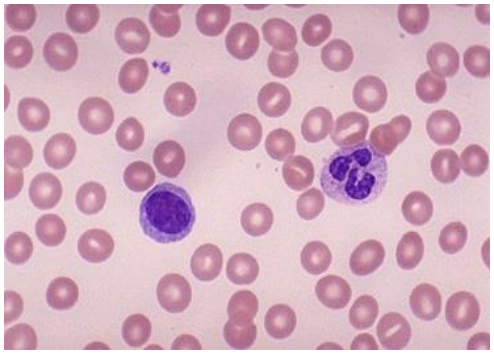
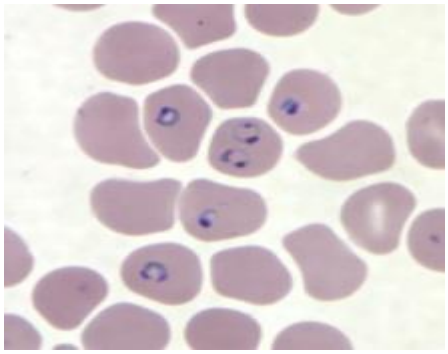
خطوات العمل:

1- قطرة دم صغيرة على سطح شريحة زجاجية نظيفة بالقرب من الحافة القصيرة اليمني للشريحة.
2- ضع إحدى الحافتين القصيرتين لشريحة زجاجية ثانية على يسار قطرة الدم بزاوية 30 درجة تقريباً.
3- أسحب الشريحة الثانية إلياليمين حتى تلامس قطرة الدم، وعندها ستنتشرقطرة الدم على حافة الشريحة الثانية.
4- أدفع الشريحة الثانية يسارا وبسرعة حتى النهاية اليسرى للشريحة الأولى (دفع الشريحة الثانية ببطء قد يؤدي إلى تركيز كريات الدم البيضاء على حواف الشريحة).
5- اترك مسحة الدم لتجف.
6- من الممكن تثبيت العينة قبل الصباغة ونتركها الي وقت آخر للفحص بوضعها في (محلول التثبيت الكحول الميثيلي Methyl Alcohol) من 3-5 دقائق.
7- نضع الفيلم المراد صباغته على حامل الصبغ ونغمر الشريحة بصبغة ليشمان لمدة 30 ثانية ثم نخفف الصبغ بإضافة الماء المقطر للشريحة تقريبا ضعف كمية الصبغ مع الحرص بعدم فقد أي جزء من الصبغة الموجودة على الشريحة المراد صبغها (مع التقليب لمدة دقيقة).
8- نترك الشريحة بالصبغ من 8-10 دقائق ثم نغسل بالماء المقطر.

9- جفف الشريحة وافحصها بالعدسات الزيتية.



المشاهدة والنتائج:

	
شكل كريات الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء	فيلم دم لشخص مصاب بالملاريا

الدرس العملي السادس

تحضير شريحة مجهرية لبكتريا وصبغها بالصبغ التفريقي (صبغ جرام)

Bacterial slide preparation using Gram Stain

الهدف من التجربة:

التمييز بين البكتريا موجبة وسالبة الجرام والتعرف على شكل البكتريا.

الأدوات المستخدمة للنشاط:

1. مجهر ضوئي مركبLight compound microscope.
2. شرائح زجاجيةMicroscope slides.
3. زيت سيدر Cedar oil.
4. عينة لمحلول مزرعة بكتيرية Bacterial culture.
5. لهب بنزن Bunsen burner.
6. ابرة حقن للبكتيريا Inoculating loop.
7. صبغة جرام (Gram stain).

مكونات صبغ جرام:

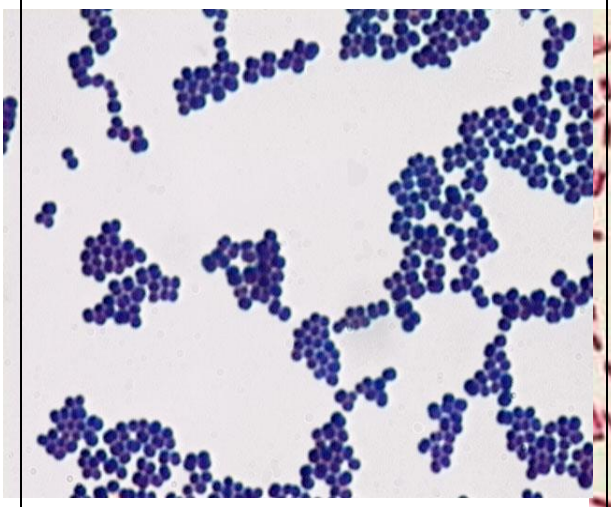
- محلول البنفسج البلوري (Crystal Violet) : تستخدم مصبغة أولية Primary stain .
- محلول اليود (Iodine solution (Lugol's Iodine: يستخدم كمثبت Mordant.
- الكحول الايثيلي(Ethyl Alcohol): يستخدم كمزيل للصبغةDecolorizer.
- الصفرانين (Safranin) : تستخدم كصبغة مضادةCounter satin.

خطوات العمل:

1. حضر فيلم / مسحة بكتيرية على الشريحة الزجاجية مستخدما المحلول البكتيري.
2. ثبت الفيلم / المسحة باستخدام اللهب (لا تحرق البكتريا).
3. غطي الفيلم بصبغة Crystal violet لمدة 30 ثانية.
4. ضف قطرات من محلول اليود واتركه لمدة 30 ثانية.

5. أغسل الفيلم بالماء ثم بالكحول الايثيلي حتى يزول اللون من الشريحة.
6. غطي الفيلم بصبغة الصفرانين لمدة 30 ثانية ثم اغسله بالماء.
7. أترك الفيلم ليجف ثم افحص بالمجهر الضوئي المركب.

المشاهدة والنتائج:

	
Gram Positive Cocci	Gram Negative bacilli

- البكتيريا سالبة صبغ جرام تظهر باللون الأحمر **Cells appear Red**.
- البكتيريا موجبة صبغ جرام تظهر باللون الأزرق أو البنفسجي **Cellsappear Violet/Blue.**

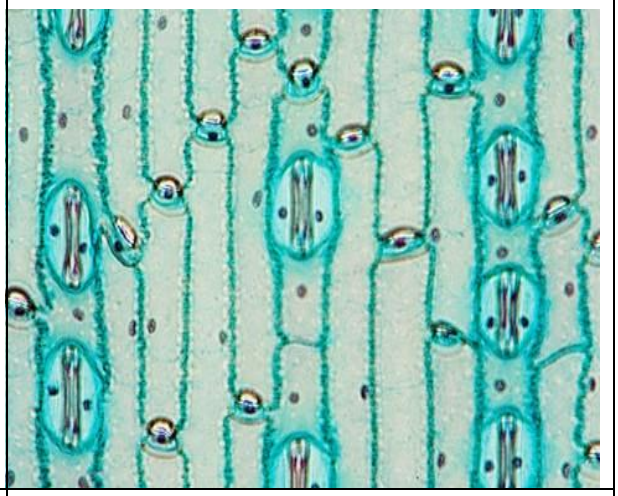
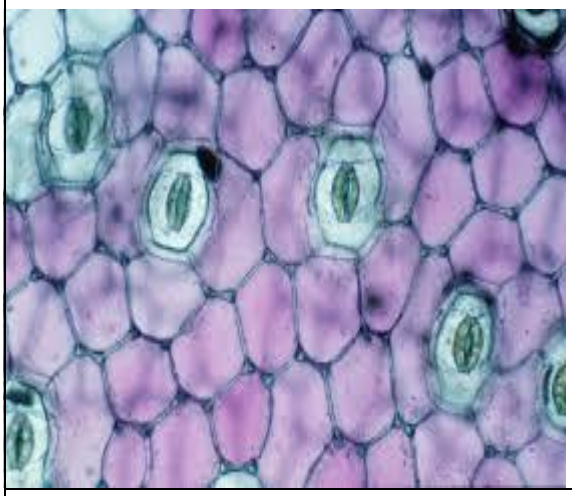
الدرس العملي السابع

الثغور في النبات Plant Stomata

الهدف من التجربة :

التمييز بين النباتات ذات الفلقة و ذات القلقتين من خلال التعرف علي نوع الثغور.

- الثغر عبارة عن زوج من الخلايا الحارسة بينهما فتحة.
- الثغور في الأوراق تسمح بتبادل الغازات وتبخر الماء من سطح الورقة (عملية النتح)
- الخلايا الحارسة قد تكون محاطة بأربع خلايا و التي تختلف عن باقي خلايا البشرة و تلك الخلايا يطلق عليها الخلايا المرافقة وهي المتحكمة بفتح واغلاق الثغر.
- الثغور في ورق نبات الفلقة الواحدة (Monocot plant) متوزعة بشكل منتظم ومتوازي علي سطح الورقة.
- الثغور في ورق نبات ذات الفلقتين (Dicot plant) متوزعة بشكل عشوائي علي سطح الورقة.

	
Stomata in monocot leaves	Stomata in dicot leaves

أنواع الثغور :

ثغور ذوات الفلقة الواحدة:

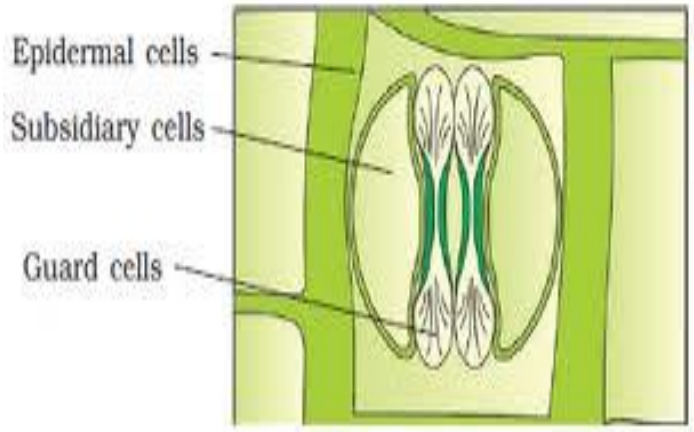


Figure 6.4 Diagrammatic representation:
(b) stomata with dumb-bell shaped guard cell

ا

الثغور في ذوات الفلقتين:

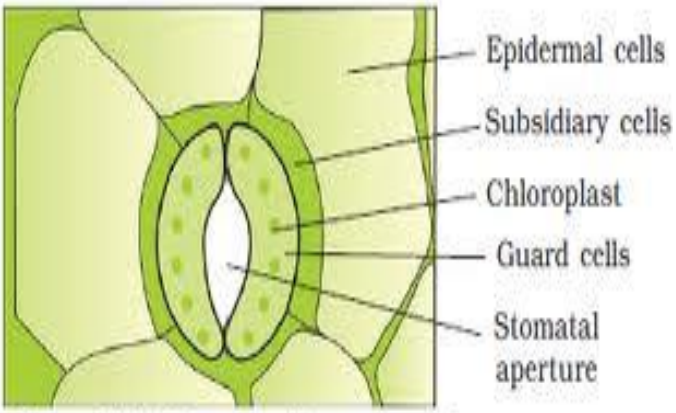


Figure 6.4 Diagrammatic representation:
(a) stomata with bean-shaped guard cells

خطوات التجربة :

1. امسك وريقة النبات بإبهام وسبابة اليد اليسرى.
2. امسك ملقط بإبهام وسبابة اليد اليمنى.
3. انزع البشرة السفلى لوريقة نبات.
4. ضع البشرة المنزوعة بسرعة في كحول وذلك للاحتفاظ بالثغر مفتوح.
5. التقط التحضير من الكحول بفرشاة تلوين.
6. ضع التحضير في منتصف شريحة زجاجية نظيفة.

7. افرد التحضير على الشريحة بفرشاة.
8. لتوضيح العينة ضع قطرة من محلول اليود على التحضير.
9. ضع غطاء الشريحة بحذر حتى لا تتكون فقاعات هوائية.
10. افحص الشريحة باستخدام المجهر الضوئي ولاحظ شكل الثغر وهل الثغر مفتوح أم لا.

النتائج:

ارسم ما تراه تحت المجهر وعلق في ضوء ما درست

الدرس العملي الثامن – التاسع – العاشر – الحادى عشر

تقنية البرافين (The Paraffin Technique)

ويستخدم فيها شمع البرافين المنصهر والصلب و فيما يلي الخطوات المتبعة لعمل قطاعات نسيجية:

- الحصول على العينة
- تثبيت العينة
- غسل العينة
- نزع الماء من العينة
- ترويق العينة
- تخليل أو تشريب العينة
- طمر العينة
- القطع
- تحميل القطاعات على الشريحة
- صبغ القطاعات
- عمل شريحة مستديمة.

الحصول على العينة

- **العينات الحيوانية** : حيث يتم الحصول على العينة من الحيوان بعدة طرق (الذبح – التخنيع – ضرب مؤخرة الرأس – التخدير)
  - **الذبح** وهي من أسهل العمليات وأسرعها وتطبق على معظم الحيوانات الفقارية إذا استثنينا الاسماك منها وتستخدم سكين حادة جدا وتتم عملية الذبح بقطع أوردة وشرايين الرقبة مع القصبة الهوائية والبلعوم.
  - **التخنيع** ويقصد بها شل الحيوان شلل كامل وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي وبذلك لا يحس الحيوان بالالم أثناء عملية التشريح وتتم عملية التخنيع بغرز إبرة التشريح الحادة فيما بين الفقرة الاولى من الفقرات العنقية والجمجمة حتى تصل إلى الحبل الشوكي ثم تحرك هذه الابرة يمنة ويسرة حتى

نضمن الانفصال التام للحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي وكثيرا ما يطبق على الضفادع.

- **ضرب مؤخرة الرأس** وتهدف إلى ارتجاج مخي مفاجئ بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة تامة تتم هذه العملية بالامساك الجيد بالحيوان بحيث تكون الناحية البطنية باتجاهك مع ترك منطقة العنق والرأس حرة الحركة ثم يضرب بمؤ خرة الرأس الخلفية و يشكل سريع ومفاجئ على أي جسم صلب مثل الطاولة ويجب أن يتم الارتجاج المخي بضربة واحدة فقط بدون تردد أو خوف والا تألم الحيوان ويعرف نجاح العملية في حالة الفار بخروج الدم من فتحتي الانف) هذه الطريقة تناسب الفئران والضفادع.

- **العينات النباتية** يجب مراعاة الملاحظات التالية عند جمع العينات النباتية:
  - أن يكون الجامع على دراية بطبيعة النباتات والعينات.
  - يجب اختيار العينة النباتية الصالحة واستبعاد التالفة.
  - قتل وتثبيت العينة مباشرة في إحدى المثبتات التي تتلاءم وطبيعة العينة.
  - اختيار العينات المصابة إذا كان الهدف من جمع العينة هو دراسة الامراض النباتية.
  - عند قطع الاوراق أو الوريقات من العنق استخدام شفرة حادة دون الضغط عليها أو جرها للمحافظة على الانسجة من التمزق .
  - عند عدم استعمال الاوراق أو السيقان أو الازهار مباشرة للتحضير المجهري حفظها في محلول كحول ايثيلي (70%).
  - عند جمع الجذور يجب مراعاة عدم احتكاك الجذر وفروعه بحبيبات التربة حتى لا تتمزق الانسجة.

اعداد الشرائح المجهرية المستديمة:

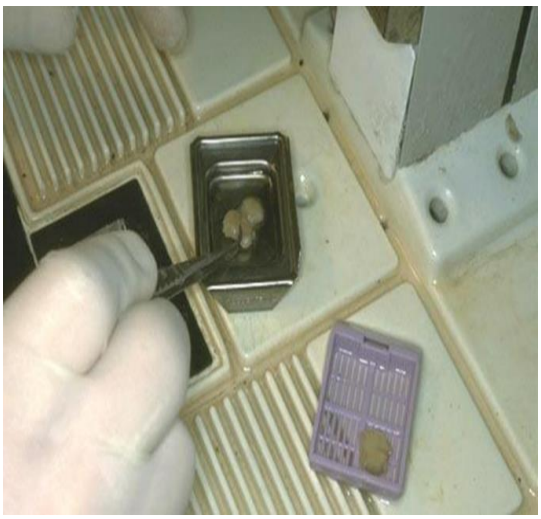
تحضير الشريحة المستديمة :إلعداد لعمل القطاعات في العينة

- **قتل الحيوان** : للحصول على العينة
- عند نزع العضو من الحيوان يراعى الاتي :
  - غسله في المحلول الفسيولوجي لازالة الدم العالق.
  - عدم الضغط علي العضو أثناء الأمساك به.

- الا يسمح أبدا بجفاف العضو.
- أن يستخدم مشرط حاد لقطع العضو إلى أجزاء مناسبة بحيث لا يزيد سمك الجزء عن 0.5 سم.

- **تثبيت العينة** :

- وذلك لحفظ المكونات الخلوية ثابتة دون أن يصيبها تغير أو تلف نتيجة للتحلل الذاتي بفعل بعض اﻷنزيمات أو نشاط عدد من الكائنات الحية الدقيقة ومن أهم محاليل التثبيت محلول الفورمالين الكحولي.
- عند تثبيت العينات النسيجية يراعى الاتي:
  - اختيار نوع المثبت ومدة التثبيت التي تتناسب مع طبيعة العينة.
  - أن يكون المثبت سريع التخلل والنفاذ.
  - الاسراع فى وضع النسيج داخل المثبت.
  - استخدام كمية مناسبة من المثبت لا تقل عن 20 ضعف حجم العينة.
  - رج زجاجة المثبت عدة مرات أثناء فترة التثبيت ضمانا لتخلل المثبت لجميع أجزاء العينة.
- **غسل العينة** : بعد إتمام عملية التثبيت ويجب التخلص من آثار المثبت المتبقية في العينة حيث تغسل العينات بالماء أو المحلول المناسب للتخلص من آثار المثبت.
- **تحفظ العينة** في 70% كحول ايثيلي .



Tissue Fixation Tissue Dehydration

- **نزع الماء من العينة** :
  - الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذلك يجب التخلص من الماء الموجود في النسيج الخلوي حتى تسهل عملية نفاذ البرافين المصهور إلى داخل الانسجة وتتم عملية نزع الماء بتمرير العينة على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الايثيلي وتتراوح المدة الازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاث ساعات كحد أقصى ويفضل أن تمرر العينة في مراحلها الاخيرة من خطوات نزع الماء على محلولين منفصلين من الكحول المطلق وذلك لزيادة التأكيد من تمام نزع الماء من العينة.
  - عندد تحضير سلسلة كحول متدرجة التركيز يفضل استخدام كحول ايثيلي (95%) بدلا من الكحول المطلق ومنه تعمل التركيزات المطلوبة باستخدام المعادلة الاتية

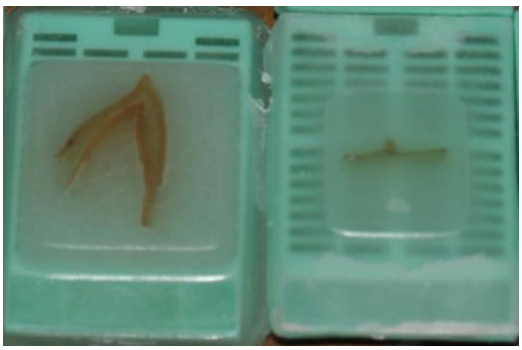
$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

(V_1)حجم المحلول المركز (C_1) تركيز المحلول المركز

(V_2)حجم المحلول المخفف (C_2) تركيز المحلول المخفف

- **ترويق العينة** :
  - الكحول لا يمتزج مع شمع البرافين لذا يعتبر محلول الزيلول من أنسب المحاليل المروقة لسهولة امتزاجه مع البرافين والكحول كما أنه يقوم بجعل الانسجة شفافة وتتراوح مدة الترويق ما بين 3-5 دقائق لكل خطوة. وهناك مواد يمكن استخدامها كمروقات مثل التولوين والبنزين والكلوروفورم.
  - يمكن أن يستدل على عدم اكتمال إزالة الماء من الانسجة بظهور طبقة رقيقة من راسب أبيض عند وضعها في محاليل الترو يق.
- **تخليل أو تشريب العينة** :المقصود من تخليل العينة هو تشبع العينة بالبرافين حيث يتم إحلال الشمع محل محلول الترويق داخل النسيج مما يؤدي إلى تدعيمه حتى يتحمل النسيج عملية

التقطيع وتتم العملية بتمرير العينة على مزيج متساوى من الزيلول و البرافين ثم تنقل العينة في شمع البرافين المنصهر داخل الفرن وتكرر هذه العملية من مرتين إلى خمس مرات.



Tissue embedding

Tissue Clearing

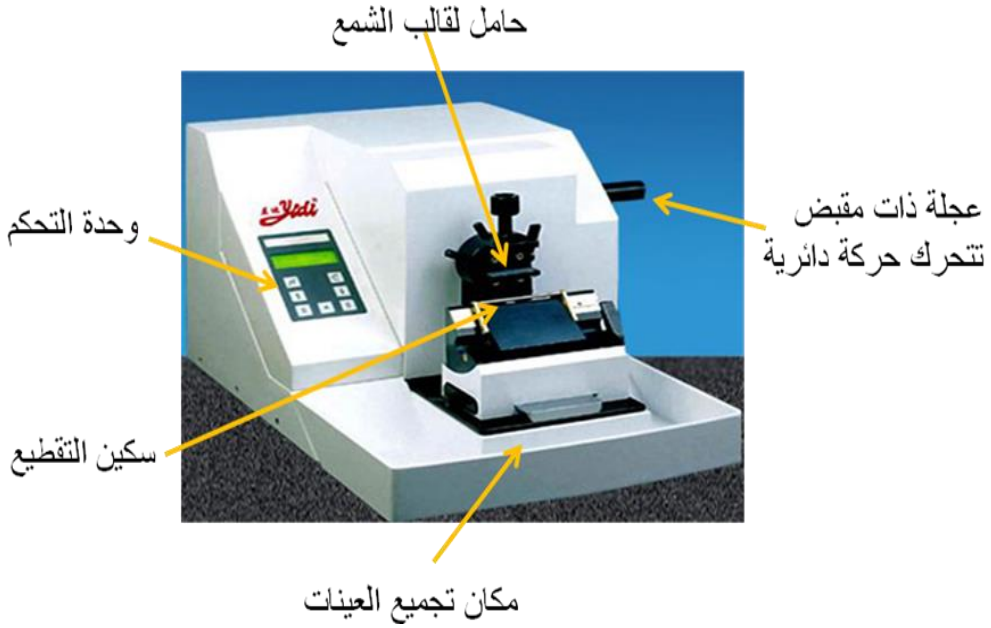
- **طمر العينة** :
  - الطمر بالشمع وهو عبارة عن وضع العينة بكيفية معينة في قوالب خاصة تملأ بالشمع المنصهر لاحاطة العينة به لجعلها كتلة متماسكة ثم تقطيعها
  - يستخدم في العينات الصلبة شمع البرافين الصلب والذي تتراوح درجة انصهاره بين 56-58 ^{0}C أما العينات اللينة فيستخدم لها شمع البرافين الرخو والذي تتراوح درجة انصهاره بين 51-52 ^{0}C ويستخدم لعملية الطمر صندوق مفتوح الجهتين (علبة كبريت فارغة) ويفضل أن تدهن حواف القالب أو الصندوق الداخلية بمدادة الجلسدرين حتى لا يلتصق شمع البرافين بحوافه وتتم العملية كما يلي:
    - ضع قالب الطمر على لوح زجاجي رقيق
    - اسكب شمع البرافين المنصهر في القالب المفتوح من الجهتين
    - ضع العينة مباشرة بملقط وسط الشمع المنصهر
    - حرك العينة قليلا بإبرة تشريح ساخنة حتى تضمن عدم تكون فقاعات هوائية
    - أغمر القالب بعد تجمد الطبقة الخارجية للشمع في ماء بارد (11 - 15 درجة مئوية) حتى يتصلب البرافين.

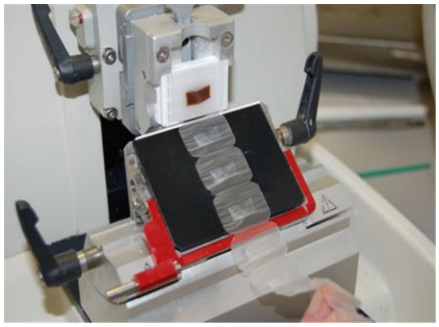
- يراعى في عملية الطمر :
  - اختيار نوع البرافين الجيد والتأكد من عدم وجود شوائب.
  - اختبار للشمع لمعرفة درجة انصهاره.
  - تفادي ظهور الفجوات الهوائية.
  - تجنب تصلب الشمع قبل ضبط وضع النسيج.
  - دهن جميع أجزاء القالب من الداخل بمادة الجلسرين قبل صب الشمع حتى يسهل نزع القالب الشمعي منها.
- تقليم القالب الشمعي بحيث نبقي على الكمية اللازمة من الشمع حول النسيج ويتم ذلك باستعمال شفرة حادة ويجب أن يكون طرفا القالب العلوي والسفلي متوازيين لأن ذلك يساعد على تكوين شريط مستقيم من المقاطع.
- **تقطيع العينة** :
- ثبت العينة جيدا على حامل العينة في الميكروتوم حدد سمك القطاع المرغوب فيه وتكون القطاعات الجيدة على شكل سلسلة متصلة من القطاعات.
- عند تقطيع الأنسجة في القوالب الشمعية بواسطة الميكروتوم يجب التأكد من التالي :
  - اختيار سمك القطاعات المطلوبة بالميكرومتر.
  - الوضع الصحيح للسكين (زاوية القطع).
  - أن يكون وضع العينة متعامد على السكين وليس المكعب الشمعي.
- بعض القطاعات الناتجة قد تكون مجعدة أو ملتوية وللتغلب على ذلك توضع القطاعات على شريحة مبللة بالماء ويضغط عليها قليلا حتى تصبح منبسطة.
- عند فرد القطاعات و وضع القطاع النسيجي على الشريحة المجهرية يمكن فرد القطاعات الشمعية أما باستعمال حمام مائي ساخن يوضع علية شبكة أو باستعمال سطح ساخن مع التنبه للوقت المناسب للتسخين حتى لا يحدث تشوه في القطاع.

الميكروتوم الدوار Rotary microtome

- يتميز بأن السكين في وضع ثابت والكتلة الشمعية تتحرك إلى أعلى وإلى أسفل في اتجاه عامودي على السكين.

- يستخدم في تحضير القطاعات الشمعية البرافينية عند سمك من 4-5 ميكرومتر و تكون السكين مصنوعة من الفولاذ.
- **مكونات الميكروتوم :**
  - حامل لقالب الشمع
  - وحدة التحكم
  - عجلة ذات مقبض تتحرك حركة دائرية
  - سكين التقطيع
  - مكان تجميع العينات





- **تحميل القطاعات** : ويقصد بهذه العملية وضع القطاع النسيجي على الشريحة المجهرية وتتم بإحدى الطريقتين التاليتين:
  - **الطريقة الاولى**

ضع القطاع في حمام مائي درجة حرارته (40 - 45 درجة مئوية) ويترك القطاع يطفو على سطح الماء دقيقة أو دقيقتدين ثم مرر الشريحة المجهرية تحت القطاع بحيث يكون في وسط الشريحة مع عدم تكون فقاعات هوائية بين القطاع والشريحة ثم تجفف الشريحة في درجة حرارة (45 درجة مئوية) لمدة 24 ساعة.

- **الطريقة الثانية**

ينقل القطاع مباشرة إلى شريحة مجهرية عليها قطرة من الماء المقطر ثم توضع الشريحة على مجفف الشرائح (45 درجة مئوية) وتترك حتى تتبخر القطرة المائية ويلتصق القطاع جيدا على الشريحة.

- **الاعداد لصبغ القطاعات**

- لا تستطيع الاصباغ النفاذ في الانسجة الخلوية ما دامت محاطة بشمع البرافين لذلك يجب أن يذاب الشمع منها تماما بالزيلول ويجب التخلص من الزيلول لانه غير مناسب للاصباغ ويدتم التخلص منه بالكحول المطلق ثم تنقل القطاعات إلى بيئة مشابهة للبيئة الذائبة فيها الصبغة.
- مثال : إذا كانت الصبغة مذابة في الماء يجب تميؤ القطاعدات وذلك بتمريرها على سلسلة تركيزها متدرج الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل إلى الماء. وبنفس الطريقة إذا كانت الصبغة مذابة في تركيدز معين من الكحول . تستخدم صبغة الهيماتوكسلين لصبغ أنويه الخلايا وصبغة الايوسين لصبغ مادة السيتوبلازم ويغسل الزائد من الصبغة بالماء المقطر.

- **التحميل**

- بعد الانتهاء من عملية الصباغة تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للتحضير المستديم وذلك باستخدام مادة شمعية أو بلاستيكية مثل مادة بلسم كندا.

- التجميل هو الوسط الذي يحفظ فيه التحضير كمرحله نهائية بعد عملية الصبغ وبناء على اختلاف أوساط التحميل فأنه لابد من مراعاة التالي :
  - في الأنواع التي تمتزج بالماء في هذه الحالة فإن إزالة الماء من القطاعات أو العينات ليسدت ضرورية
  - في الأوساط التي لا تمتزج مع الماء يجب إزالة الماء من القطاعات قبل مرحلة التحميل بهذه االوساط
- معظم المواد الحافظة المستخدمة في عمل الشرائح المستديمة لا تذوب في الماء أو الكحول لذلك يجب التخلص من الماء والكحول الموجودة في القطاعات المصبوغة وتتم عملية التخلص بتمرير القطاعات على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الايثيلي
- يتم التخلص من الكحول الايثيلي بتمرير القطاعات على محاليل نقية من الزيلول ثم يضاف قطرة من محلول بلسم كندا المذاب في الزيلول على القطاع مباشرة ثم يوضع غطاء الشريحة بحذر حتى لا تتكون فقاعات هوائية بين الشريحة والغطاء
- **هناك عوامل يجب توفرها في وسط التحميل:**
  - أن يكون معامل انكساره قريبا من معامل انكسار الزجاج.
  - أن يكون قابل للامتزاج مع وسط الترويق.
  - أن لا يتفاعل مع مكونات النسيج أو الصبغة.
  - أن لا يسبب تشويها لتراكيب العينة المصبوغة.
  - عدم إزالة لون الصبغة .
- تجفف الشريحة لمدة 24 سداعة على مجفف الشرائح لكي يجف بلسم كندا وتكون جاهزة للفحص تحت المجهر.