الفصل الخامس

تحضير وصباغة الخلايا الحية
Staining of Living Cells

يعتبر فحص الخلايا والحيوانات الدقيقة وهى حية من الطرق المفيدة فى دراسة هذه الخلايا والكائنات. وتشمل هذه التحضيرات غالبا الحيوانات الأولية وأجنة اللافقاريات واليرقات والحيوانات اللافقارية الصغيرة مثل الديدان المفلطحة والديدان الخيطية، وكذلك الحيوانات المنوية وبعض أنواع الخلايا المعزولة. وتفحص هذه الخلايا فترة محدودة من الوقت. وعادة ما تفحص الطرز المائية من الحيوانات فى الماء العذب أو الماء المالح حسب طبيعة بيئتها الأصلية. أما الطرز الطفيلية والخلايا المعزولة فتفحص فى محلول فسيولوجى ملحى. وعادة ما تفحص العينات دون صبغها.

الصبغات الحيوية:

وجد أن بعض مكونات الخلايا الحية تصبغ اختياريا بصبغات معينة مما يجعلها ترى بوضوح عند فحصها بالميكروسكوب الضوئى العادى، ومثال ذلك صباغة **الحبيبات السبحية** Mitochondria بواسطة **صبغ الجانس جرين** Janus Green وتعرف تلك الأصباغ باسم **الصبغات الحيوية** Vital stains. ومن أشهرها صبغ النيوترال رد Neutral Redورودامين ١٢٣ (Rhodamine 123) وتسمى طريقة الصباغة هنا بالصباغة الحيوية. وهناك أسلوبان معروفان يمكن تطبيقهما فى هذا الصدد:

الطريقة الأولى: وهى بحقن الصبغ فى الحيوان الحى ثم يجرى تشريح الحيوان ويؤخذ منه العضو الذى تمت صباغته لفحصه وتسمى هذه الطريقة **صباغة حيوية داخلية** Intravital Staining (تمرين ١٦).

والطريقة الثانية: يؤخذ فيها العضو من الحيوان أولا ثم تجرى عملية صباغته بعد ذلك وتسمى هذه الطريقة **صباغة حيوية ظاهرية** Supravital staining (تمرين ١٧). ويمكن صباغة الحيوانات وحيدة الخلية أو الحيوانات الصغيرة عديدة الخلايا بغمرها فى محلول الصمغ (تمرين ١٨).

تمرين ١٦: صباغة خلايا أحد الأنسجة بحقن الحيوان الحى (صباغة حيوية داخلية)
Intravital Staining:

١ – احقن محلول الصبغ داخل جسم الحيوان اما تحت الجلد أو داخل تجويف الجسم أو داخل أحد الأوردة (محلول الصبغ يحضر بتركيز ١٪ فى محلول ملحى فسيولوجى مناسب ويجب استخدامه بسرعة قبل ترسب الصبغ بسبب وجود الملح). وتحدد كمية الصبغ المحقونة بحيث يكون التركيز النهائى للصبغ فى جسم الحيوان ٠,٠٠١ جم من الصبغ لكل جرام من وزن الجسم وبهذا مثلا فإن

٠,١ سم٣ من محلول صبغ تركيزه ١٪ تحقن لكل ١ جم من وزن جسم الحيوان.

٢ – اترك الحيوان لمدة ساعة ثم شرحه للحصول على العضو المطلوب بسرعة وعموما تعتمد فترة ترك الحيوان بعد الحقن على التجربة الشخصية.

٣ – ضع العضو فى محلول ملحى مناسب فى طبق بترى. ثم تفكيك خلايا أنسجة هذا العضو بإحدى الطرق الآتية:

(أ) التنسيل Teasing:

ضع قطعة صغيرة من النسيج المفصول فى قطرة من محلول الفحص على شريحة زجاجية، ثم بمساعدة ابرتى تشريح فكك هذه القطعة إلى وحداتها البنائية. وتصلح هذه الطريقة مع بعض التراكيب مثل العضلات والأعصاب والأنسجة الليفية.

(ب) السحق Squashing:

ضع قطعة صغيرة جدا من النسيج المفصول على شريحة زجاجية فى قطرة من محلول الفحص ثم غطها بغطاء زجاجى ثم اضغط على الغطاء بإبهامك حتى يتم هرس قطعة النسيج إلى طبقة رقيقة يمكن فحص مكوناتها بالميكروسكوب.

(جـ) فحص الفتات Impressing:

ضع قطرة من محلول الفحص على شريحة زجاجية ثم امسك بقطعة النسيج وضعها فى هذه القطرة من المحلول ثم اهرسها وأزلها من فوق الشريحة وبذلك سيتبقى بعض الفتات من النسيج فوق الشريحة. وتصلح هذه الطريقة مع بعض التراكيب مثل الطحال ونخاع العظم.

٤ – غط التحضير بغطاء زجاجى.

تمرين ١٧: صباغة خلايا النسيج الحى بعد فصله من الحيوان Supravital staining:

حضر محلولا مركز (٠,٢٥٪) من صبغ جانس جرين ثم خففه إلى ٠,٠١٪ قبيل الاستعمال باستخدام محلول ملحى مناسب.

١ – شرح الحيوان وخذ قطعة صغيرة من العضو المطلوب وضعها فى كمية من المحلول المخفف للصبغ.

٢ – نسل Tease قطعة النسيج جزئيا فى محلول الصبغ واتركها فيه لمدة ٥ – ٣٠ دقيقة (الزمن يعتمد على نوع النسيج). وإذا لم يتم صبغ مكونات النسيج فى مدى ساعة من الزمن كرر التجربة باستخدام صبغ ذى تركيز أكبر.

٣ – كرر الخطوات ٣، ٤ من التمرين السابق (تمرين ١٦).

تمرين ١٨: صباغة الأوليات الحية المتطفلة على النمل الأبيض:

١ – غط سطح شريحة زجاجية نظيفة بمحلول صبغ نيوترال رد (١–١٠٠٠ فى كحول مطلق) أو

بخليط من النيوترال رد، جانس جرين (نقطتين من محلول مائى مشبع من الجانس جرين إلى ١٠ سم^{٣} من محلول النيوترال رد) - اترك الشريحة لتجف تماما.

٢ - امسك بنملة بالملقط وضعها على ظهرها فوق الشريحة الزجاجية ثم شرح القناة الهضمية. أضف كمية من محلول ٠,٠٨٧٪ كلوريد صوديوم إلى الأمعاء ثم افتح المعى الخلفى لتخرج الطفيليات الأولية فى المحلول الملحى على الشريحة.

٣ - غط التحضير بغطاء زجاجى ثم الحم حواف الغطاء مع الشريحة بالشمع لمنع سرعة البخر. ضع التحضير تحت الفحص بالميكروسكوب لمدة نصف ساعة مع غلق وفتح قزحية الميكروسكوب ومتابعة الصباغة. لاحظ أن لون الصباغة يتغير عند موت أفراد العينة.