كلية العلوم

القسم : **علم الحياة**

السنة : **الثالثة**

المادة : كيمياء النسج

المحاضرة : الرابعة/عملي/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

عن بعض المواد الكيميائية لمختلف النسج النباتية

أولاً: تحضير العينة:

يجب أن تقطع العينة النباتية بوساطة مشرط حاد، وأن تؤخذ بدقة منعاً لتخريب النسيج وموته. يجب أن تكون العينة صغيرة الحجم ورقيقة ولا تتجاوز ثخانتها (5-8) مم حتى يكون تثبيتها كافياً. بعد ذلك تغمر العينة بسرعة في عبوة تحتوي على كمية كافية من السائل المثبت. يلصق على العبوة ورقة صغيرة مكتوب عليها بقلم رصاص المعلومات اللازمة.

ثانياً: التثبيت:

هو عمل يتم به قتل الخلايا بسرعة دون تخريب بنيتها، مع الحفاظ "قدر الإمكان" على حالتها الأصلية التي كانت عليها قبل التثبيت. تعتبر هذه المرحلة من أهم مراحل التقنية المجهرية؛ لأنه عندما يكون التثبيت جيداً، تكون العمليات اللاحقة ناجحة وصحيحة، ويكون دخول المثبت إلى العينة سريعاً ومتجانساً، ولا يؤدي إلى انكماش النسيج (أي يحافظ على شكل النسيج).

القواعد العامة في التثبيت:

- ✓ يجب أن يتم التثبيت بعد أخذ العينة مباشرةً، كي لا يطرأ عليها تغيرات نسيجية.
- ✓ يجب أن يكون التثبيت سريعاً.
- ✓ يجب أن يكون حجم المثبت كافياً، أي أكبر بـ 30-40 مرة من حجم القطعة المثبتة، حتى يسمح بحدوث تبادلات سهلة بين الوسط الخارجي (المثبت) والوسط الداخلي (النسيج النباتي).
- ✓ يمكن وضع العينة كاملة ضمن المثبت، أو تقطيعها بوساطة مشرط حاد إلى قطع صغيرة.
- ✓ مدة التثبيت: تتراوح بين 2-24 ساعة وأحياناً تمتد لأيام، وهذا يتعلق بحجم القطعة المثبتة و"بشكل خاص" طبيعة المثبت المختار أي سرعة دخوله واختراقه النسيج النباتي.
- ✓ غسل القطع النباتية: يجب أن تغسل القطع النباتية جيداً، من أجل إيقاف عمل المثبت وإزالة آثاره. يتم الغسل عادة بالماء العادي بالنسبة للقطع المثبتة في السوائل التي تحتوي على (حمض الكروم أو ثنائي الكرومات)، أما إذا كان المثبت يحتوي على حمض البيكريك أو الكحول أو ثلاثي كلور الخل فيجب تجنب الغسل بالماء لأن ذلك سيؤدي إلى انتفاخ البروتينات وحدوث خلل في عملية التثبيت، وفي هذه الحالة يجب أن تغسل القطع بالكحول بتركيز 70، وبعد الغسل تنقل القطع المثبتة إلى حمامات تحتوي على كحولات متزايدة التركيز حتى نصل إلى الكحول المطلق (ذي التركيز 100) وذلك لتخليص العينة من الماء.

أنواع المثبتات الأساسية:

يوجد العديد من المثبتات المستخدمة مثل (الفورمول، الكحول، FAA، بوان .....الخ)، ولكن سنستخدم في جلساتنا مثبت F.A.A والذي يتألف من: F: فورمول، A: حمض الخل، A: كحول بتركيز 95.

يعد مثبت F.A.A مثبتاً عاماً للجذور والسوق والأوراق، وتتراوح مدة التثبيت فيه من 2-4 ساعة وحتى أياماً.

تحضير(100ml) من مثبت F.A.A:

- كحول 90 ml
- حمض الخل 5 ml
- فورم ألدهيد (فورمول) 5 ml

ملاحظة هامة: تغسل العينات النباتية بالماء قبل التثبيت من أجل إزالة الأتربة والأوساخ العالقة بها، ويوضع المثبت مع العينات ضمن علبة محكمة الإغلاق منعاً لتطاير الكحول وتغير تركيز المثبت.

ثالثاً: التشريب والتضمين بالبارافين:

يعتبر البارافين الوسيلة العامة للتشريب، وهو مزيج من الفحوم الهيدروجينية المشبعة الصلبة. يستخرج البارافين من الزيوت البترولية، ويعد مادة لا تنحل في الماء، ولكنها تنحل في الكزايلول. من أجل أن تتشرب القطع بالبارافين؛ يجب تخليص القطع المثبتة سابقاً من الماء أولاً بوساطة الكحول، ثم تنقل إلى وسط حال للبارافين ثانياً، قبل نقلها إلى البارافين المنصهر ثالثاً، وذلك على الشكل التالي:

1. تخليص القطع النباتية المثبتة من الماء:

- تتم هذه المرحلة بعد عملية التثبيت والغسيل بالماء، وذلك بتمرير القطع وبشكل متسلسل في أحواض صغيرة محكمة الإغلاق تحتوي على كحولات متزايدة التركيز بشكل تدريجي حتى نصل إلى الكحول الإيتيلي المطلق (70- 80- 95- 100).
- تختلف مدة بقاء القطع المثبتة في حمام الكحول تبعاً لثخانة القطعة، وتتراوح المدة "بشكل عام" بين 15-30 دقيقة، أما إذا احتوى المثبت على الكحول فيجب أن تنقل القطع النباتية المثبتة مباشرةً إلى كحول تركيزه يماثل تركيز الكحول المستخدم في المثبت، ومن ثم تنقل هذه القطع إلى الكحول الإيتيلي المطلق.

خطوات تخليص القطع المثبتة من الماء:

- **← بعد التخلص من المثبت، يضاف كحول بتركيز 95 إلى العينات المثبتة لمدة 30 دقيقة.**
- **← تنقل العينات "بعد التخلص من كحول 95" إلى حمامين من الكحول المطلق (مدة كل حمام 30 دقيقة).**
- **← تنقل العينات "بعد التخلص من كحول 95" إلى حمام ثالث من الكحول المطلق ليلة كاملة (24ساعة).**

ملاحظة هامة:

- **يمكن وضع القطع النباتية المثبتة ضمن أنابيب اختبار أو ضمن بياشر صغيرة.**
- **عند استخدام الكحول، يجب تغطية الأنابيب أو البياشر بسدادة قطنية أو بورق قصدير (سلوفان) منعاً لتبخر (تطاير) الكحول؛ لأن الكحول درجة غليانه وانصهاره منخفضة.**

2. استخدام سائل وسطي حال للبارافين:

الكحول لا يحل البارافين، لذلك يجب استبداله بسائل وسطي قابل للانحلال في الكحول وفي البارافين، وفي هذه الحالة يتم إخراج (طرد) الكحول من القطع النباتية التي جرِدت من الماء. من السوائل الأكثر استخداماً في هذه المرحلة هي: الكزايلول أو الكلوروفورم أو الإيتر.

خطوات التشريب بالبارافين:

بعد التخلص من آخر حمام كحول إيتيلي مطلق، تنقل العينات إلى حمامات تتألف من:

- **الحمام الأول: 3 حجم كحول إيتيلي مطلق + 1 حجم كزايلول (مدة 30 دقيقة).**
- **الحمام الثاني: 2 حجم كحول إيتيلي مطلق + 2 حجم كزايلول (مدة 30 دقيقة).**
- **الحمام الثالث: 1 حجم كحول إيتيلي مطلق + 3 حجم كزايلول (مدة 30 دقيقة).**
- **3 حمامات كزايلول فقط (مدة كل حمام 30 دقيقة).**
- **تنقل العينات من آخر حمام كزايلول إلى بيشر يحتوي على بارافين سائل، مع تغيير البارافين كل 24 ساعة لمدة 3 أيام، مع بقاء البياشر ضمن محم درجة حرارته 55-60 درجة.**
- **نقوم بعدها بصب العينات ضمن قوالب معدنية مخصصة لهذا الغرض وهذه المرحلة سندرسها في الجلسة القادمة.**

الدراسة العملية:

1. حضر مثبت F.A.A.
2. جهز العينات النباتية، وقطعها باستخدام مشرط حاد، وثبتها، مع إضافة لصاقة تعريفية على العبوة.
3. طبق مرحلة التشريب والتضمين بالبارافين، وذلك بتخليص العينات المثبتة بالماء ومن ثم التشريب بالبارافين، باستخدام المحاليل والخطوات المذكورة سابقاً.
4. صور الخطوات السابقة مراعياً ترتيب المراحل، وانقلها إلى دفترك.

انتهت الجلسة الرابعة