جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة التاسعة

الصبغات وطرائق التصبيغ

Stains and Staining

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة التاسعة

الصبغات وطرائق التصبيغ Stains and Staining

اذا فحصت المقاطع قبل صبغها فلا يتضح منها الا تفاصيل قليلة بأستثناء النواة وحدود الخلية، أن الغرض من الصبغ هو جعل اجزاء الخلايا او الأنسجة اكثر وضوحا . فعند فحص النماذج او المقاطع المثبتة غير المصبوغة فان الاجزاء التي يمكن تمييزها عن بعضها البعض هي التي تكون ذات معاملات انكسار مختلفة . اما الاجزاء التي تكون ذات معاملات انكسار متشابهة فلا يمكن تمييزها . ولكن بعد صبغها بصبغة واحدة أو أكثر فان لون الصبغة سوف يزيد في تمييز الأجزاء ذات الانكسارات المختلفة ، كذلك تقوم الصبغات بتلوين الاجزاء ذات الانكسارات المتشابهة بألوان مختلفة أو بدرجات متفاوتة اللون لنفس الصبغة وذلك بسبب اختلاف المكونات الكيميائية أو الفيزيائية لتلك الأجزاء وبالتالي تظهر اكثر وضوحا.

نظريات الصبغ

قدمت نظريتان لتفسير قواعد صبغ الأنسجة :

١-**النظرية الكيماوية** أعلنها ايرلخ Ehrilch عام ١٨٨٠ وتقول أن الصبغ عبارة عن تفاعل كيماوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين الشق الموجب Cation أو الشق السالب Anion للصبغة وبين مجموعات كيمياوية معينة في الخلية او النسيج وعلى هذا الاساس تكون الأنسجة إما محبات للحامض Acidophilic وتحتوي مجموعات قاعدية ، وفي هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي ، أو تكون محبات للقاعدة Basophillic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغات القاعدية .

٢-**النظرية الطبيعية** ترتكز هذه النظرية على افتراضات تقول بأن الصبغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص ، والإدمصاص ، والخاصية الشعرية والانتشار والأوزموزية . والشعور السائد في الوقت الحاضر هو أن الصبغ ينتج عن عمليات كيماوية وطبيعية في آن واحد .

العوامل المؤثرة على طبيعة الصبغ

١ -قوة الصبغة

٢ - سرعة تأين كل من الأنسجة البروتينية والصبغات .

٣ -الأس الهايدروجيني (pH) لمحلول الصبغة وكذلك للأنسجة البروتينية

٤ - نوع المثبت المستخدم

٥ -٥- نوع محلول الصبغة كحوليا أم مائيا

٦ -اذا كانت الصبغة مفردة single أم مزدوجة double او متعددة multiple

٧ -تركيز الصبغة في المحلول ضعيفا كان أم قوياً .

تصنيف الصبغات Classification of Stains

الصبغات عبارة عن مواد عضوية ملونة تكون في الغالب املاحا ، وتمتلك من الخواص بحيث تستطيع الأنسجة مسكها بثبات ولا يمكن ازالتها منها حتى عند استخدام مذيبات نفس المادة العضوية . ان جميع الصبغات يجب أن تكون حاوية على مجموعتين أساسيتين هما :

١- مجموعة ذرية مرتبطة باللون تدعي حاملات اللون chromophores

٢ - مجموعة لها القابلية على ربط المركبات الكيميائية للصبغات مع الأنسجة وتعرف ماسكات اللون auxochromes .

وتقسم الصبغات بطرق مختلفة تبعا للأسس المعتمدة في التقسيم وفيما يلي بعض النماذج من تقسيم الصبغات :

اولاً ـ تقسم الصبغات تبعا لتركيز الأس الهايدروجيني للصبغة وعلى هذا الاساس يمكن تميز ثلاثة أنواع منها :

١-**الصبغات القاعدية basic stains** وذلك عندما تكون الصبغة حاوية على قاعدة عضوية ملونة تتحد مع الجذور الحامضية غير الملونة للأنسجة كجذر الخلات او الكلوريدات أو الكبريتات . هذه الصبغات اما ان تذوب في الماء أو في الكحولات أو بكليها ومن أمثلتها صبغة السفرانين O (Safranin O) وصبغة الهيماتوكسلين haematoxylin.

٢-**الصبغات الحامضية acid stains** هي تلك الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع قاعدة معدنية metalic base غير ملونة للأنسجة وتكون عادة من الصوديوم او البوتاسيوم . هذه الصبغات ايضا اما ان تذوب في الماء او الكحولات او بكليها ومن امثلتها الصبغة الخضراء الباهتة .S.F المصفرة light green S.F. yellowish وصبغة الإيوسين Y eosin Y.

٣-**الصبغات المتعادلة neutral stains** وتكون مركبه من صبغات حامضية وقاعدية والتي تكون فيها كل من الأيونات الموجبة والسالبة حاوية على مجاميع من حاملات اللون chromophores . تذوب هذه الصبغات عادة في الكحولات وربما تذوب في الماء وكثيرا ما تكون محاليل غروية ومن امثلتها الأحمر المتعادل neutral red.

ثانياً- تقسيم الصبغات حسب طبيعة حاملات اللون

لا يعتمد هذا التقسيم على لون حاملات اللون بل يعتمد على مدى تشابه التركيب الكيميائي لها وتقسيمها إلى مجاميع عديدة أهمها :

١. مجموعة صبغات النايتروزو nitroso stains ومن امثلتها صبغة اخضر النفثول B (naphthol green B)
٢. مجموعة صبغات النايترو nitro stains ومن امثلتها صبغة اصفر النفثول (naphthol S (yellow S .
٣. مجموعة صبغات الأزو azo stains ومن أمثلتها الصبغة البرتقالية G(orange G).
٤. مجموعة صبغات الميثان ارايل aryl methane ومن امثلتها صبغة الاخضر الثابت F.C.F (fast green F.C.F)

٥. مجموعة صبغات الاكردين acridine ومن امثلتها صبغة برتقالي الاكردين acridine orange.

٦. مجموعة صبغات الزانثين xanthen ومن امثلتها الايوسين eosin.

٧. مجموعة صبغات كينون – أمين quinine–imine ومن امثلتها صبغة السفرانين O (Safranin O).

ثالثاً– تقسيم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها لذلك يمكن تمييز نوعين من الصبغات :

١. **الصبغات النووية nuclear stains** هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ النواة وبما أن النواة غنية بالحوامض النووية لذا تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية basic stains . توصف النواة وجميع اجزاء الخلية ذات الطبيعة الحامضية بأنها سريعة الميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية وتدعى بالاجزاء القعدة basophil ولدى معاملة هذه الأجزاء بصبغات قاعدية فان الحوامض سوف تتحد مع الاجزاء القاعدية الملونة للصبغات مكونة أملاحاً ملونة غير ذائبة لذا فان الصبغات النووية هي صبغات قاعدية .

٢. **الصبغات السايتوبلازمية cytoplasmic stains** هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم و نظراً لكون السايتوبلازم ذو طبيعة قاعدية لذا فأنه يميل للاصطباغ بالصبغات الحامضية . وتوصف جميع الاجزاء السايتوبلازمية ذات الطبيعة القاعدية بأنها سريعة الاصطباغ بالصبغات الحامضية وتدعى بالاجزاء الحمضة acidophil . عند معاملة هذه الاجزاء بالصبغات الحامضية فان الاجزاء القاعدية منها سوف تتحد مع الجذور الحامضية الملونة للصبغة لتكوين أملاح ملونة غير ذائبة . ومن هنا يمكن القول بأن الصبغات السايتوبلازمية هي صبغات حامضية.

رابعاً– تصنيف الصبغات حسب مصدرها

١.الصبغات الطبيعية Natural Dyes

يتم الحصول على الصبغات الطبيعية ، كما يدل اسمها ، إما من مصدر حيواني او نباتي وتستعمل خمسة أنواع من الصبغات الطبيعية في التحضيرات المجهرية بشكل واسع وهي : قرمز Cochineal وكارمين Carmine وهيماتوكسلين Hematoxylin وأورسين Orcein ، و سافرون Saffron .

أ.القرمز والكارمن Cochineal & Carmine : تستخرج هذه الصبغات من جسم حشرة صغيرة اسمها *Coccus Cacti* تعيش على نبات الصبار ، وتوجد الصبغة على شكل رحيق أرجواني في إناث هذه الحشرة . فإذا جمعت الإناث وجففت ، فإن القرمز ينتج على شكل مسحوق ، وان لم يضاف مرسخ Mondant للصبغة ، كالحديد أو الألومنيوم ، فلا يكون للقرمز اي ميل للأنسجة . وشب القرمز Alum Cochineal صبغة جيدة للنواة . وغلي القرمز مع ملح الشب ينتج راسبا لا يذوب في الماء يدعى كارمين carmine . ولا يستعمل هذا الراسب كصبغة إلا بعد اذابته بمحلول حامض الخليك Acetic Acid حيث يتكون كارمين خليك Acetocarmine الذي يستعمل كصبغة شائعة للنواة .

ب. الهيماتوكسلين Hematoxylin : هذه الصبغة واحدة من أكثر الصبغات شيوعا في التحضيرات المجهرية ، وتستخرج من خشب شجرة بقولية صغيرة اسمها *Hematorylin campechianum* تزرع في امريكا الجنوبية والوسطى . وتستخلص الصبغة بمعاملة الجذوع ب الإيثر Ether ، ثم تجفف وتذوب في الماء ، وبعد ذلك تصفى وتبلور . ولأن هذه الخطوات طويلة ومكلفة ، يعتبر الهيماتوكسلين من الصبغات غالية الثمن . ولا يستعمل هيماتوكسلين كصبغة نظرا لعدم ميله للأنسجة ، إلا بعد أكسدته ليكون هيماتين Hematein . ونتيجة لهذه الأكسدة فإن الهيماتوكسلين يفقد ذرتي هيدروجين. تكون أكسدة الهيماتوكسلين طبيعية وتتم بوسط كحولي أو مائي ، وتستغرق من ثلاثة إلى أربعة أشهر ، وتسمى هذه العملية التعتيق Ripening . ويمكن أن تتم هذه الأكسدة صناعياً وبسرعة وذلك بإضافة عوامل أكسدة مثل فوق اكسيد الهيدروم H_2O_2 ، وأكسيد الزئبق HgO ، وايودات البوتاسيوم KIO_4 ، وبيرمنجنات البوتاسيوم KMNO4 .

ج.اورسين Orcein : تستخلص من أشن (lichen) يسمى *Rocella* ويحضر بغلي الأشن في الماء ، مما يسبب انفساخ حامض ليكانوريك Locanoric acid إلى اورسينول Orceinol

الذي يكون الأورسين عند إضافة الأمونيا بوجود الاوكسجين الجوي وتصبغ هذه الصبغة الالياف المرنة elastic fiber في الانسجة الضامة.

ء.سفرون Saffron : يستخلص من مياسم نبات الزعفران Crocus .

هـ.نيلة Indigo : تستخرج من نباتات تنتمي للجنس Indigofera

٢.الصبغات المصنعة Synthetic Dyes

هذه مركبات عضوية تشتق من البنزين ، وقد اصبحت متوفرة في منتصف القرن التاسع عشر عندما وجد بيركن Perkin طريقة لعمل صبغات الأنيلين . ولعمل صبغة مشتقة من البنزين فإنه يجب ربط مجموعات كيماوية معينة تسمي حاملات الألوان Chromophores بحلقة البنزين . وتكون حلقة البنزين وحامل اللون مادة تدعى مولد اللون Chromogen . تجدر الإشارة هنا إلى أن مولد اللون لا يقوم بدور الصبغة وليس له أية قابلية لصبغ النسيج ولكي يقوم بهذا الدور ، يجب أن يحتوي مولد اللون مكونا قاعدياً وآخر حامضياً ، ويكون له بالتالي قدرة على تكوين ملح . وتدعى مجموعات الشق الكيماوي التي تضيف هذه الخاصية لمولد اللون مساعدات اللون Auxochromes ، ومنها : مجموعات هيدروكسيل OH– وأمينو NH_2– ، و كاربوكسيل COOH– ، وسلفونيك SO– .

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.