جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة العاشرة

الصبغ

Staining

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة العاشرة

الصبغ Staining

مرسخ الألوان (مثبت الألوان) Mordant

يظهر ما تقدم بأن عملية الصبغ سواء كانت ظاهرة فيزيائية أو عملية كيميائية أو ظاهرة كيميائية فيزيائية فان لون الصبغات يتحد بصورة مباشرة مع اجزاء الأنسجة او الخلايا وهذا ما يحدث فعلا مع معظم الصبغات الا ان هناك بعض الصبغات لا يمكنها الاتحاد بثبات وبصورة مباشرة مع اجزاء الأنسجة او الخلايا الا بوجود بعض المواد الوسطية وعادة تكون أملاح معدنية مثل أملاح الألمنيوم Al والكروم Cr والحديد Fe والباريوم Ba والبوتاسيوم K والاوزميوم Os والتي تعمل على زيادة اتحاد الوان الصبغات بالانسجة ويطلق على مثل هذه المواد بمرسخات الألوان mordants وعلى العملية بالترسيخ mordanting . عند معاملة الانسجة او الخلايا بمرسخات الألوان فسوف تتحد مع اجزاء الأنسجة او الخلايا من جهة وكذلك يعتقد بأن الوان الصبغات تمدص adsorb على سطوح المرسخات من جهة أخرى وبذلك يكون عمل المرسخ وسط بين لون الصبغات والأنسجة المصبوغة .

هناك ثلاث طرق لمعاملة الأنسجة بالمرسخات :

١. معاملة الأنسجة بمرسخات الألوان قبل عملية الصبغ ، وتتم باضافة المرسخ الى المثبت fixative المستخدم فمثلا تكون الوان صبغات الأنيلين واضحة جدا عندما تكون الأنسجة مثبتة بمثبت يدخل في تركيبه واحدا من المرسخات ، كالاوزميوم أو البكريك .

٢. معاملة الأنسجة بالمرسخات وذلك بمزجه مع الصبغة كما في حالة استخدام شب الحديد iron alum كمرسخ لصبغة هيماتوكسين هايدنهين Heidenhain's haematoxylin.

٣. معاملة الأنسجة بمرسخات الألوان بعد عملية الصبغ وهذه المعاملة قليلة الاستخدام كما في حالة استخدام اليود كمرسخ لألوان صبغات الانيلين حيث يفضل استخدامه عندما تكون الصبغد داخل الانسجة.

تخصص الصبغات وطرق الصبغ Specificity and methods of staining

تمتاز بعض الصبغات بتأثيرها الخاص حيث تصبغ فقط انسجة معينة أو أجزاءها وتعرف هذه الظاهرة بالتخصص specificity ومن أمثلة الصبغات المتخصصة specific هي صبغة ويكرت Weigert حيث تصبغ فقط الالياف الصفر المطاطة بلون ازرق الى اسود كذلك تقوم كل من صبغة الفلوروكلوسينول phloroglucinol وصبغة كلوريد الأنيلين بصبغ جميع الأنسجة الملكننة بلون احمر براق في الصبغة الاولى وبلون اصفر براق في الصبغة الثانية ، كما يصبغ محلول شولتز Schultze السليلوز بلون أزرق . بصرف النظر عن الصبغ التخصصي الذي يستخدم لاغراض معينة هناك طرق عامة للصبغ والتي تشكل جزءا من التحضيرات التخصصية وهي :

١.**الصبغ المتزايد Progressive staining** تعتمد طريقة الصبغ المتزايد على حقيقة أن بعض الصبغات كصبغة الكارمين carmine وصبغة الهيماتوكسلين haematoxylin تصبغان اولا النواة ثم بعدها السايتوبلازم ويتم ذلك بوضع الانسجة في محلول مخفف للصبغة ثم توضع بعدها في زجاجة ساعة وتفحص وتراقب تحت القوة الصغرى للمجهر الى ان يتم الحصول على شدة اللون المطلوب لصبغ النواة اولا ثم بعدها يصبغ السايتوبلازم، تستخدم هذه الطريقة لجميع الصبغات السايتوبلازمية وكذلك مع الصبغات المضادة counter stains . يفضل اتباع هذه الطريقة في الصبغ مع الطلبة المبتدئين وذلك لسهولتها.

٢. **الصبغ المتناكص (المتناقص) Regressive staining** تتلخص هذه الطريقة بوضع الأنسجة المراد صبغها في محاليل الصبغ الاساسية stock solutions المركزة الى ان يتم الحصول على افراط في الصبغ overstain لأجزاء الأنسجة ثم بعدها تبدأ عملية التمييز differentiation او ازالة الصبغات الزائدة باستخدام عوامل معينة . تستخدم هذه الطريقة لجميع

الصبغات النووية ولا يفضل اتباعها للمبتدئين وذلك لصعوبة الحكم على شدة التمييز المطلوب اثناء فحص اجزاء الأنسجة تحت المجهر .

٣. **الصبغ الصبغ المضاد Counterstaining** غالبا ما تستخدم ظاهرة الصبغ التخصصي في عمليات الصبغ المضاد counterstain وذلك عندما يصبغ جزء من نسيج او خلية بصيغة ملائمة ثم تصبغ بعدها الأجزاء الأخرى باستخدام صبغات ذات الوان مضادة ، ويجب أن نعلم بأن معظم عمليات الصبغ المضاد تتضمن احلال الصبغات الواحدة محل الاخرى في المواقع الأكثر ملائمة لها . فمثلا عند صبغ نسيج ما بصبغة السفرانين O اولا فان الصبغة سوف تصبغ جميع اجزاء الأنسجة بلون احمر ، وعند استخدام الصبغة الثانية المضادة ولتكن صبغة هيماتوكسلين ديلافيلد والتي تصبغ ايضا جميع اجزاء الأنسجة فإن الصبغتين تعملان مع بعضهما البعض وبطريقة الأزاحة التفاضلية differential displacement الى ان يتم في النهاية صبغ جميع الأجزاء السليلوزية بلون الصبغة المضادة وهي صبغة الهيماتوكسلين الزرقاء.

٤. **الصبغ المباشر Direct Staining** هذه هي الحالة التي يكون فيها صبغ الأنسجة كاف عندما توضع في محلول مائي او كحولي من الصبغة مثل أزرق ميثلين أو إيوسين دون الحاجة إلى وسيط.

٥. **الصبغ غير المباشر Indirect Staining** لا تصطبغ الأنسجة بكثير من الصبغات إلا بوجود وسيط يسمى المرسخ Mordant كما في الهيماتوكسين . وتستعمل الصبغة والمرسخ معا كما في هيماتوكسلين إيرليخ ، حيث يضاف إليه شب البوتاسيوم ، أو يستعمل المرسخ منفصلا عن الصبغة ، كما في هيماتوكسلين هايدنهين ، حيث يمرر النسيج أولا في شب الحديد.

التمييز Differentiation

يقصد بالتمييز زيادة التفريق في شدة درجات الصبغ لاجزاء الخلايا او الأنسجة المختلفة وكذلك لازالة الصبغات الزائدة و يجري التمييز عادة خلال عملية الصبغ المتناقص ومن اكثر

العوامل المستخدمة في التمييز هو الكحول المحمض acid alcohol والمحضر من ٧٠ % كحول مضافا اليه ١ % حامض الخليك او ٠,٥ % م للخلا حامض النتريك او الهايدروكلوريك المركز، ان الكحول المحمض ليس هو الوحيد المستخدم في التمييز بل تستخدم في بعض الاحيان عوامل مميزة تختلف باختلاف الصبغات فمثلا يستخدم زيت القرنفل clove oil لتمييز صبغة البنفسجي البلوري crystal violet و محلول شب الحديد iron–alum لتمييز صبغة الهيماتوكسلين الحديدية iron haematoxylin. تتم عملية التمييز بوضع النماذج في زجاجة ساعة مملوءة بالمحلول المميز الى ان يتم الحصول على افضل لون للصبغة ، أما في حالة المقاطع الملصوقة على الشرائح فيمكن امرارها في قناتي كوبلن مملوءة بالمحلول المميز وتفحص المقاطع بين حين وآخر تحت القوة الصغرى للمجهر ، بعدها تغسل ب ٧٠ % كحول ثم تصبغ بالصبغة المضادة اذا دعت الحاجة لذلك ثم يجرى الانكاز في كحول ٩٦% و ١٠٠% ثم تروق وتحمل.

التحول اللوني Metachromasia

تمتاز بعض الصبغات القاعدية بقدرتها على صبغ التركيب الخلوية والنسيجية المختلفة بألوان مختلفة وبنفس الصبغة وتعرف مثل هذه الحالة بظاهرة التبدل اللوني metachromasia وتعتبر هذه من الظواهر المهمة في الدراسات النسيجية ، فمثلا صبغة السفرانين تصبغ السايتوبلازم بدرجات مختلفة من اللون الأحمر وتصبغ أرضية الغضاريف cartilage matrix بلون أصفر ، كذلك صبغة الثايونين thionin تصبغ الكروماتين بلون ازرق وتصبغ المواد المخاطية mucus وارضية الغضاريف وحبيبات الخلايا البدينة mast cells بلون احمر ، وتفسير ذلك هو ان الصبغة في محلولها المائي تظهر لونين الأول لونها الاعتيادي الأزرق والثاني اللون المتبدل الأحمر metachromatic red ، يوجد هذان اللونان معا ويكون اللون الأحمر بشكل مبلمر للون الأزرق . يظهر اللون الأزرق عند زيادة درجات الحرارة او خفض الأس الهايدروجيني او تقليل تركيز الصبغة او اضافة الاملاح او الكحول ، بينما يظهر اللون الأحمر عند انخفاض درجات الحرارة أو زيادة الأس الهايدروجيني او زيادة تركيز الصبغة كذلك وجود بعض الأملاح العضوية للكبريت التي لها اوزان جزيئية عالية تزيد في ظهور اللون الأحمر فالمادة المخاطية وارضية الغضاريف والمواد الحبيبية للخلايا البدينة مثلا تمتلك هذه الطبيعة

لذلك فهي تظهر التبدل اللوني، ومن الصبغات الاخرى التي تمتاز بهذه الظاهرة هي صبغة المثيلين البنفسجية وصبغة الأزور A (azure A) والأزور B (azure B) وصبغة أزرق التولودين toluidine blue . أن أكثرية الصبغات لا تظهر التبدل اللوني بل تصبغ بصورة مباشرة وبنفس لون صبغها وتعرف مثل هذه الصبغات بالصبغات سوية اللون orthochromatic. يجب أن نذكر هنا بأن ظاهرة التبدل اللوني metachroming يجب أن تميز عن ظاهرة تعدد الألوان polychroming حيث أن الأخيرة تظهر تعدداً في الوان الصبغة وبصورة تلقائية spontaneously فمثلا صبغة أزرق المثيلين في المحلول تتأكسد إلى واحد أو أكثر من مركبات المثيل ذات درجات تنازلية في التميثل methylation لذلك يطلق على مجاميع ازرق المثيلين بأزرق المثيلين المتعددة الألوان polychrome methylene blue.

حالات صبغ العينات

تصبغ العينات البيولوجية كمقاطع ، أو كنماذج كاملة ، أو كمسحات او هرسات .

١. **صبغ المقاطع Section Staining** هذه طريقة تقليدية لصبغ التحضيرات المجهرية ، وتستعمل لصبغ مقاطع من أنسجة نباتية أو حيوانية . وعادة ما يزال البرافين من المقاطع باستخدام الزايلين ، ثم يزال الزايلين باستخدام كحول مطلق . وتمرر الشرائح الحاملة للمقاطع بعد ذلك في تدرج كحولي هابط حتى تصل إلى تركيز كحولي مساو لقوة تركيز الكحول الذي تكون الصبغة مذابة فيه . أما إذا كانت الصبغة مذابة أصلا في الماء فلا بد من تمرير الشرائح هبوطا في التدرج الكحولي الكامل (مطلق ، ثم ٩٥ ٪ و ٧٠ ٪ و ٥٠ ٪ و ٣٠ %) ثم تنقل الشرائح إلى ماء مقطر وذلك قبل نقلها إلى محلول الصبغ المائي .

٢. **صبغ النماذج الكاملة Whole Mount Staining** تستخدم هذه الطريقة لصبغ النماذج الكاملة التي قد تكون حيوانات مجهرية أو اجزاء نباتية أو أجنة صغيرة ، ولكن نادرا ما يكون توزيع الصبغ متساوياً في مختلف اجزاء العينة . وتستخدم هذه الطريقة لصبغ الأجنة قبل تحضير مقاطع منها حتى يسهل تمييزها في قالب الشمع ، وتجري جميع عمليات الصبغ وما يتبعها في صحن زجاجي صغير او صحن سيراكوز Syracuse dish وبطبيعة الحال تكون العنيات المصبوغة كنماذج كاملة غير معرضة لعمليات التشريب والطمر والقطع .

٣. **صبغ المسحات والهرسات Smear & Squash Staining** تشبه هذه الطريقة تلك التي تستخدم في صبغ المقاطع ، ولكن لا توجد حاجة لأزالة الشمع لأنه ليس موجودة على الشرائح أصلا . وإذا اريد جعل هذه التحضيرات دائمة فإنه يجب تجفيف العينات المصبوغة وترويقها وتغطيتها ببلسم كندا ثم بالغطاء الزجاجي . ومن العينات التي تصبغ كمسحات : البول والدم وسقف الحلق . ومن أمثلة العينات التي تصبغ كهرسات الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة والقمم النامية من جذور وسيقان النبات .

بعض الصبغات المختارة، طرق تحضيرها واستعمالها:

أ. الصبغات المفردة Single stains مثل

١.صبغة بوراكس – كارمين borax–Carmine من الصبغات المتعادلة neutral stain التي تستخدم بصورة عامة لصبغ المقاطع وكذلك النماذج الكاملة الصغيرة حيوانية كانت أم نباتية مثل جنين الدجاج chick embryo والعضلات muscles وطحلب fucus وتحضر هذه الصبغة من : ٤ غم من مسحوق البوركس + ٣ غم من صبغة الكارمين +١٠٠سم^{٣} ماء مقطر يسخن المزيج ثم يضاف ١٠٠ سم^{٣} كحول ٧٠ % يترك لمدة يومين ثم يرشح المحلول .

٢.السفرانين O (Safranin O) من الصبغات القاعدية المهمة جدا وخصوصا بالنسبة للأنسجة النباتية حيث تصبغ جميع الاجزاء الملكننة والمسوبرة والمكيتنة والكروموسومات والنواة والاجسام المركزية والفطريات والصفائح المنخلية والأوعية الخشبية وكذلك تصبغ الأنسجة الحيوانية حيث تصبغ الألياف المرنة والحيوانات وحيدة الخلية والخلايا النطفية. تحضر هذه الصبغة من اذابة : ١ غم من الصبغة في ١٠٠ سم^{٣} من كحول مطلق تخفف بالماء المقطر بنسبة ١:١قبل استعمالها للصبغ، تعتمد فترة الصبغ على طبيعة النماذج وتتراوح بين ٢–٤٨ ساعة.

ب. الصبغات المزدوجة مثل

صبغة مان Mann's stain من الصبغات المزدوجة الجيدة والتي تستخدم بصورة عامة لصبغ المقاطع تحضر هذه الصبغة بمزج :

٣٥ سم^{٣} من ازرق المثيل تركيز ١ %

٣٥سم^{٣} من الأيوسين Y المصفر تركيز ١ %

١٠٠سم^{٣} ماء مقطر

ت. الصبغات الثلاثية Triple stains

ومن أمثلتها صبغة مالوري الثلاثية Mallory's triple stain آن صبغة مالوري الثلاثية تعطي نتائج جيدة خاصة بعد تثبيت النماذج في محلول زنكز وتنكز في الكحولات وهي جيدة لصبغ كل من الاسكارس والغضاريف والانسجة الرابطة بلون ازرق والسايتوبلازم والأمعاء والغدد اللمفاوية والاعصاب ونوى الخلايا والمبايض والبنكرياس والغدد النخامية والغدد اللعابية والخصى والغدد الدرقية بلون احمر. تحضر المحاليل الثلاثة التالية كالآتي :

محلول (أ) ويحضر من : ٠,١ غم من صبغة فيوكسن الحامضية

١٠٠ سم^{٣} ماء مقطر

محلول (ب) ويتألف من : ١٠٠ سم^{٣} من حامض المولبيديك الفوسفوري Phospho – molybdic acid

محلول (ج) يتكون من : ٠,٥ غم من صبغة ازرق الأنيلين

٢ غم من الصبغة البرتقالية G

٢ غم حامض الاوكزاليك

١٠٠ سم^{٣} ماء مقطر

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.