Al-Mustaqbal University
جامعة المستقبل
College of Agriculture Techniques
كلية التقنيات الزراعية

Department of medicinal plant technologies and natural product

قسم تقنيات النباتات الطبية و النواتج الطبيعية

المرحلة الأولى

الفصل الدراسي الثاني

((تشريح النبات العملي))

رقم المحاضرة: 4

اسم المحاضرة

إعداد الشرائح الزجاجية الدائمة

أستاذة المادة

م.م. هيمن وليد

إعداد الشرائح الزجاجية الدائمة

المقدمة

تُستخدم الشرائح الزجاجية الدائمة في الدراسات الميكروسكوبية طويلة الأمد ، حيث يتم تحضير العينة و تثبيتها بمواد حافظة تمنع تحللها أو تلفها ، مما يسمح بفحصها مرات عديدة دون أن تتغير خصائصها .

تُعد هذه الطريقة أساسية في مجالات تشريح الأنسجة النباتية ، حيث توفر عينات جاهزة للفحص في أي وقت.

أولًا : تعريف الشريحة الزجاجية الدائمة

هي عبارة عن شريحة تُعد من خلال تثبيت العينة و معالجتها بمواد كيميائية للحفاظ عليها لفترة طويلة ، ثم تغطيتها بوسط تثبيت شفاف وغطاء زجاجي لمنع التلف ، مما يسمح بفحصها تحت المجهر مرارًا دون الحاجة إلى إعادة تحضيرها .

ثانيًا : الأدوات و المواد اللازمة لإعداد الشريحة الزجاجية الدائمة

1. الأدوات الزجاجية و تشمل :

* **شريحة زجاجية** : لوضع العينة .
* **غطاء شريحة زجاجي** : لتغطية العينة و حمايتها .

2. الأدوات المساعدة

* **ملقط أو إبرة تشريحية** : لنقل العينة بدقة .
* **ماصة أو قطّارة :** لإضافة المحاليل اللازمة .
* **فرشاة دقيقة** : لنقل العينات الدقيقة مثل الأنسجة الرقيقة .

3. المواد الكيميائية المستخدمة

أ. المواد المثبتة و تشمل :

* **الفورمالين (Formalin - 10%) :** يُستخدم لتثبيت الأنسجة و منع تحللها .

* **الكحول الإيثيلي (Ethanol - 70% أو 95%) :** يُستخدم لتثبيت و حفظ العينات .

* **الجلوتارالدهيد (Glutaraldehyde - 2%) :** يُستخدم لتثبيت العينات للدراسات الميكروسكوبية المتقدمة .

ب. محاليل الصبغ

* **صبغة اليود** : تُستخدم لتحديد النشا والهياكل الخلوية في الخلايا النباتية .

* **الهيماتوكسيلين و الإيوزين**

* **الميثيلين الأزرق**

ج. الوسط المثبت

* **بلسم كندا :** مادة شفافة تُستخدم لتثبيت الغطاء الزجاجي و منع دخول الهواء .

* **DPX Medium :** مادة تركيبية شفافة تُستخدم كبديل لبلسم كندا .

* **جليسرين - جيلاتين :** يُستخدم لتثبيت بعض العينات الحساسة .

ثالثًا : خطوات إعداد الشريحة الزجاجية الدائمة

1. تحضير العينة

* تُؤخذ العينة النباتية المطلوبة .

* تُقطّع العينة إلى شرائح رقيقة جدًا باستخدام مشرط أو جهاز الميكروتوم (Microtome) للحصول على مقاطع واضحة .

2. تثبيت العينة بالمحلول المثبت

* تُوضع العينة في محلول الفورمالين أو الكحول لبضع دقائق او لساعات و ذلك حسب نوعها .
* تُغسل بالماء لإزالة بقايا المثبت .

3. صبغ العينة (عند الحاجة)

* تُغمر العينة في محلول الصبغة المناسبة لفترة محددة (عدة دقائق إلى ساعات حسب نوعها) .
* تُغسل العينة لإزالة الصبغة الزائدة ، ثم تُجفف بلطف .

4. إزالة الماء (Dehydration)

* تُغمر العينة في محاليل كحولية متدرجة (50%، 70%، 95%) لإزالة الماء تمامًا .
* تُستخدم مادة الزايلين (Xylene) في المراحل الأخيرة لضمان الجفاف الكامل .

5. وضع العينة على الشريحة الزجاجية

* تُوضع العينة الجافة في منتصف الشريحة الزجاجية .
*و تضاف لها قطرة من الوسط المثبت إما بلسم كندا أو DPX .

6. تغطية العينة بالغطاء الزجاجي

* يُمسك الغطاء الزجاجي بحذر و يوضع بزاوية 45 درجة لتجنب فقاعات الهواء .
* يُضغط عليه برفق لضمان توزيع الوسط المثبت بالتساوي .

7. تجفيف و تثبيت الشريحة

* تُترك الشريحة في مكان جاف لمدة 24 ساعة حتى يتصلب الوسط المثبت تمامًا .
* تُخزّن في علبة مخصصة لحمايتها من الغبار و الرطوبة .

رابعًا : مميزات و عيوب الشرائح الزجاجية الدائمة .

المميزات

1- تحافظ على العينة لفترات طويلة دون تلف .

2- توفر تفاصيل دقيقة عند الفحص المجهري .

3- تُستخدم كمرجع للدراسات المستقبلية .

4- لا تحتاج إلى إعادة تحضير العينة في كل مرة .

العيوب

1- تتطلب وقتًا أطول للتحضير مقارنة بالشرائح المؤقتة .

2- تحتاج إلى مواد كيميائية و التي قد تكون سامة في حال لم يتم استخدامها بحذر .

3- تتطلب مهارة و دقة لتجنب تكوّن الفقاعات أو تلف العينة .

خامسًا : التطبيقات العملية للشرائح الزجاجية الدائمة

* **التشريح المرضي :** فحص عينات الأنسجة المصابة لتشخيص الأمراض .

* **علم النبات** : تحليل الهياكل الخلوية للنباتات .

سادسًا : إجراءات السلامة أثناء تحضير الشرائح الزجاجية الدائمة

1- ارتداء القفازات و النظارات الواقية عند التعامل مع المواد الكيميائية .

2- العمل في مكان جيد التهوية عند استخدام المواد المثبتة مثل الفورمالين .

3- تجنب ملامسة المواد الكيميائية للجلد وغسل اليدين جيدًا بعد العمل .

تحضير الشرائح الزجاجية الدائمة

لتحضير شرائح زجاجية دائمة للعينات النباتية نتبع الخطوات التالية بعد الحصول على المقاطع بإحدى الطرق التي اشير اليها في تحضير الشرائح المؤقتة :

1. انقل المقاطع على حافة الة القطع الى طبق بتري او وعاء كوبلن يحتوي على ماء مقطر ثم حضر شريحة مؤقتة لعدد منها كما سبق توضيح ذلك لانتقاء المقاطع الجيدة منها .

2. انقل المقاطع الجيدة الى طبق بتري او وعاء كوبلن آخر يحتوي كحول اثيلي بتركيز 30 % و اتركها لمدة 15 دقيقة ثم الى كحول اثيلي بتركيز 50 % و اتركها لمدة 15 دقيقة أيضا .

3. اصبغ المقاطع بإحدى الصبغات الآنفة الذكر حسب هدف تحضير الشرائح و تستعمل في تصبيغ المقاطع النباتية عادة صبغة السفرانين و الأخضر السريع .
* اصبغ أولا بصبغة السفرانين و اتركها في الصبغة لمدة (30 - 45) دقيقة ، ثم اغسل المقاطع ثلاث مرات باستعمال كحول اثيلي بتركيز 50 % لإزالة الصبغة الزائدة .

4. انقل المقاطع بعد ذلك الى كحول بتركيز 70 % ثم كحول بتركيز 80 % ثم الى كحول بتركيز 95 % و اتركها في كل تركيز لمدة 15 دقيقة .

5. اصبغ المقاطع بصبغة الأخضر السريع و اتركها في الصبغة لمدة دقيقة واحدة .

6. انقل المقاطع ثلاث مرات في كحول اثيلي مطلق لمدة دقيقة واحدة في كل مرة و ذلك لإزالة الصبغة الزائدة و مواصلة عملية سحب الماء من المقاطع .

7. انقل المقاطع بعد ذلك ثلاث مرات في زايلول مطلق و لمدة دقيقة واحدة في كل مرة و ذلك لاكمال عملية سحب الماء و توضيح الصبغتين في المقاطع .

8. ضع المقطع على الشريحة الزجاجية بواسطة الفرشاة ثم ضع قطرة او قطرتين من مادة التحميل (بلسم كندا) ثم غلفها بغطاء الشريحة .

9. اذا لوحظ تلون المقطع بلون حليبي او ضبابي بعد وضع غطاء الشريحة فيجب ارجاع المقطع الى المرحلة الأولى من الكحول المطلق لاتمام عملية سحب الماء و الاستمرار في الخطوات اللاحقة .

10. توضع بعد ذلك الشرائح على صفيحة ساخنة بدرجة 40 م° و لمدة 24 ساعة لاتمام عملية تجانس توزيع مادة كندا بلسم و التخلص من الفقاعات الهوائية ان وجدت .

11. يتم بعد ذلك تنظيف الشريحة من الكمية الزائدة من بلسم كندا باستعمال الزايلول و الفرشاة .

12. توضع علامة على الشريحة تتضمن كافة البيانات المطلوبة لتمييز تلك الشريحة .