



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و
مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروب ۲

رنگ آمیزی فلاژل



زمینه ی نظری

- بسیاری از پروکاریوت‌ها به وسیله‌ی شنا کردن حرکت می‌کنند، و این عمل به ساختاری به نام تاژه (جمع آن Flagella) وابسته است.
- تاژه‌های باکتریایی زوائد بلند و نازکی هستند که در یک انتها آزاد و در انتهای دیگر به سلول اتصال یافته‌اند. تاژه‌های باکتریایی به قدری نازک هستند (۲۰-۵ نانومتر)، که یک تاژه تکی تنها زمانی با میکروسکوپ نوری قابل رویت می‌شود که با رنگ‌های ویژه‌ای که قطر آن را افزایش می‌دهد، رنگ آمیزی شود. با وجود این، تاژه‌ها به راحتی با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده هستند.



2

زمینه ی نظری

- فلاژل وسیله حرکتی باکتری است که به صورت زائده ای از جسم سلولی به سمت خارج گسترش یافته است.
- منشا فلاژل غشای سیتوپلاسمی است. فلاژل از پروتئینی بنام فلاژلین ساخته شده که واحد های پروتئینی آن فلاژنوم نام دارد. فلاژلین در سیتوپلاسم ساخته می شود. از خصوصیات پروتئین فلاژلین این است که در ساختمانش تعداد اسید آمینه های آروماتیک خیلی کم است و در عوض تعداد اسید آمینه های آسپارتیک و گلوتامین خیلی زیاد است. از خصوصیات منحصر به فرد فلاژلین این است که سیستئین ندارد.



3

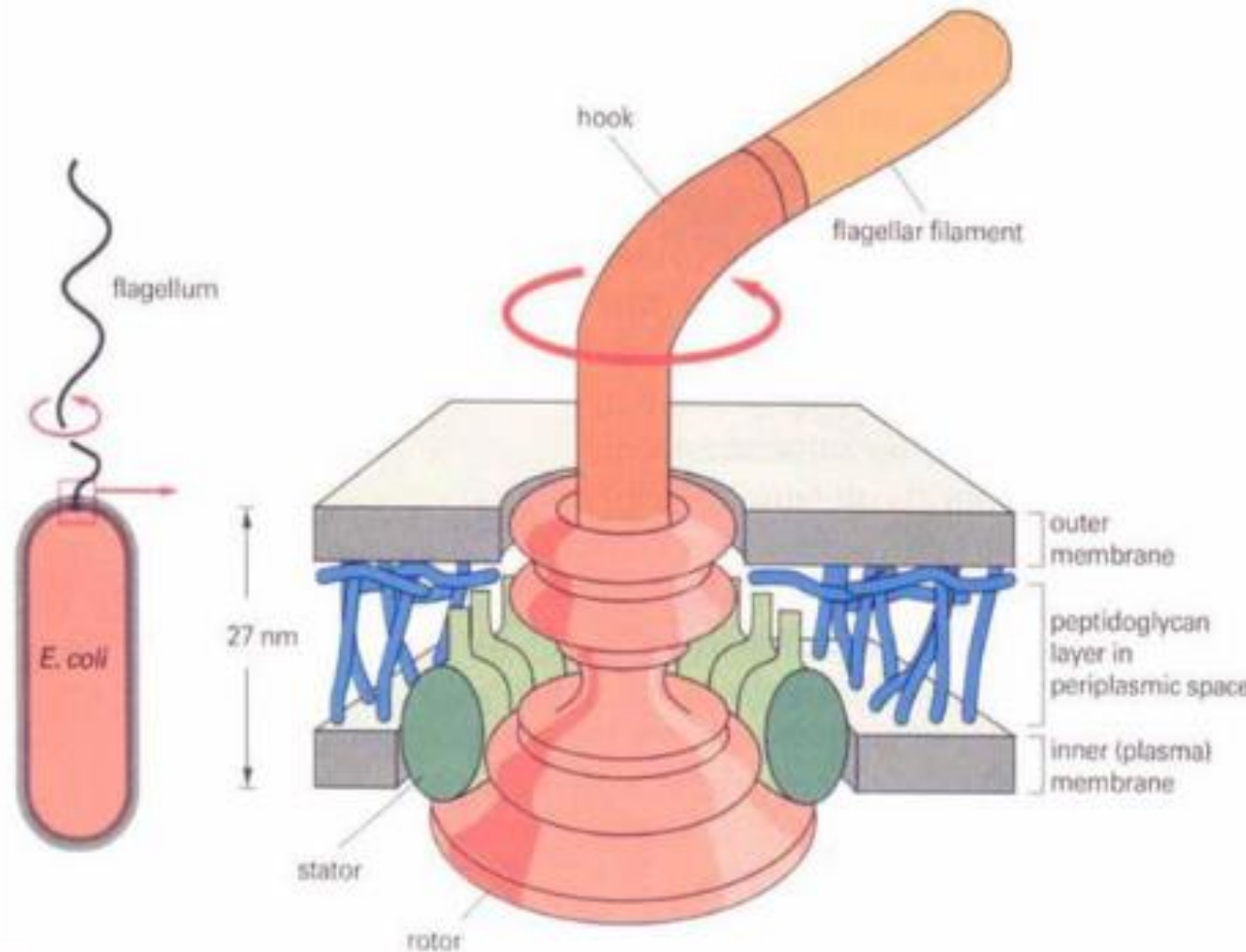
ساختمان فلاژل

فلاژل از سه بخش تشکیل شده است:

۱- جسم پایه

۲- قلاب

۳- رشته



تهیه کننده: سهیلا عباسی

- اندازه ی تاژک ده تا بیست نانومتر است.

- مکانیسم حرکت فلاژل برمتیلاسیون و دمتیلاسون پروتئین های سطح غشای سیتوپلاسمی است.

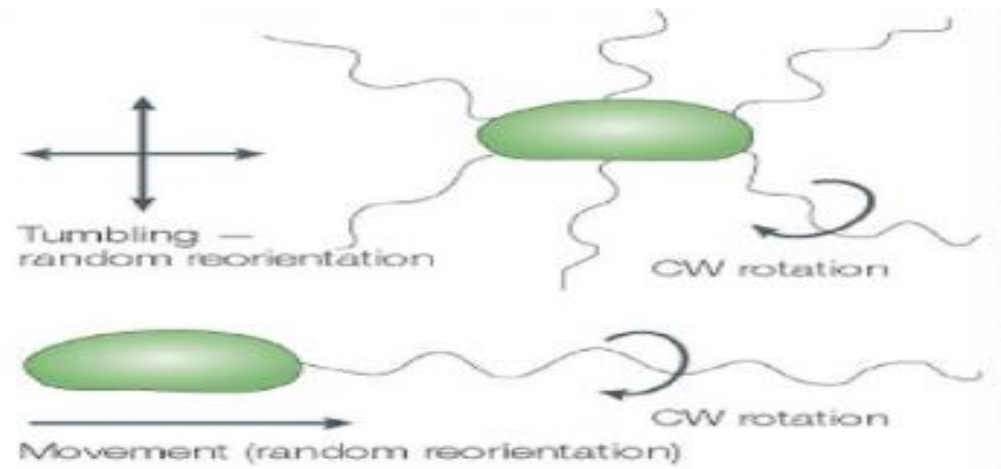
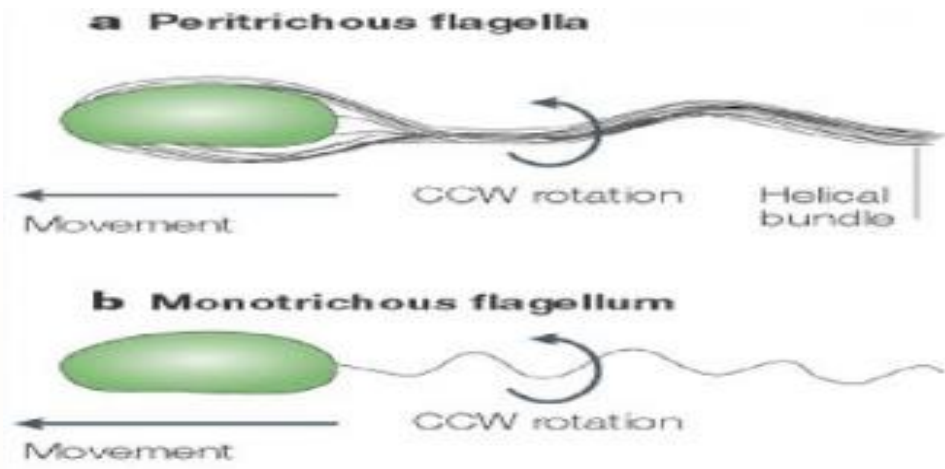
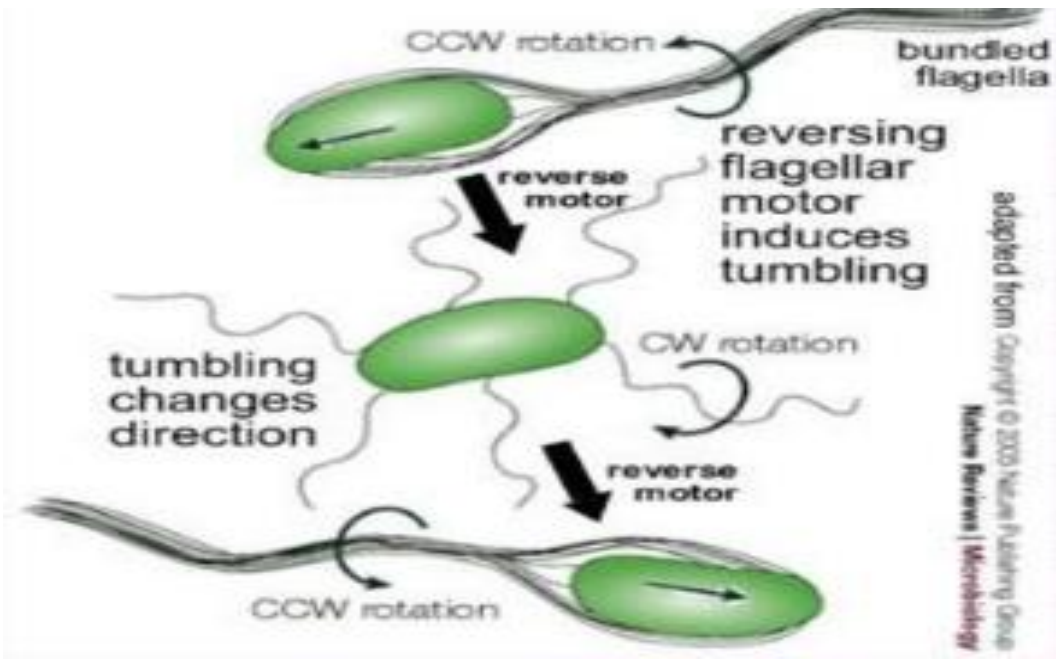
- دلیل حرکت باکتری ها به دست آوردن غذا است.

- فلاژل های باکتریایی بسیار نازکند از این رو به زحمت دیده می شوند و برای مشاهده آنها لازم است از روش های خاصی استفاده شود.



5

شنا کردن و هماهنگی حرکت فلاژل ها



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

- تاژک باکتری علاوه بر عامل حرکت از نظر ایمونولوژیکی نیز حائز اهمیت است. زیرا دارای آنتی ژن تاژکی یا H است. آنتی ژن H به حرارت حساس است. اختلاف این آنتی ژن در باکتری‌ها به تفاوت اسیدهای آمینه موجود در آن مربوط است.

- تاژه‌ها مستقیم نیستند و در واقع به شکل مارپیچ هستند. تاژه‌ها هنگامی که مسطح شوند، فاصله‌ی ثابتی را بین پیچش‌های مجاور نشان می‌دهند، که طول موج نامیده می‌شود، و این طول موج برای تاژه هر گونه معین اختصاصی است.

- علاوه بر باکتری‌ها، حرکت تاژه‌ای در میان گونه‌های آرکی‌ها نیز گسترش دارد. اما برخلاف باکتری‌ها، که در آن‌ها یک نوع پروتئین، رشته تاژه را تشکیل می‌دهد، چندین پروتئین فلاژلین مختلف در آرکی‌ها شناخته شده‌اند.

7

تاژه‌ها می‌توانند در نقاط مختلفی به سلول متصل شوند. در تاژه‌های قطبی، تاژه‌ها به یک یا هر دو انتهای سلول متصل هستند.

گاهی اوقات، گروهی از تاژه‌ها (که یک دسته نامیده می‌شوند) ممکن است در یک انتهای سلول ظاهر شوند. اغلب می‌توان دسته‌های تاژه‌ها را در سلول‌های رنگ آمیزی نشده به کمک میکروسکوپ زمینه تاریک یا فازکنتراست مشاهده کرد.



تعداد فلاژل ها و محل قرار گرفتن آنها در باکتری های مختلف متفاوت است و بدین وسیله می توان باکتریهای مختلف را از همدیگر جدا نمود.

لافسون (Leifson) چهار نوع متفاوت تاژک را متمایز کرده است که عبارتند از:

۱- فلاژل منوتریش: **(MONOTRICHES)** یک فلاژل در یک سر باکتری قرار می گیرد.

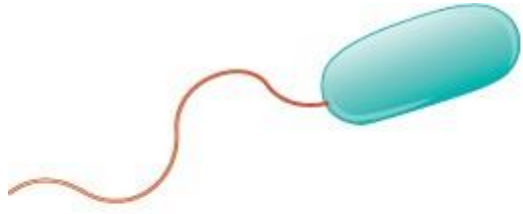
۲- فلاژل آمفی تریش: **(AMPHITRICHES)** یک فلاژل در هر سر باکتری قرار میگیرد.

۳- فلاژل لوفوتریش: **(LOPHOTRICHES)** دسته ای از فلاژل ها در یک سر یا دو سر باکتری ها قرار میگیرد.

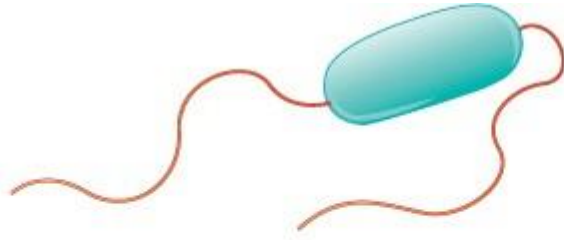
۴- فلاژل های پری تریش: **(PERITICHES)** فلاژل ها دور تا دور باکتری قرار می گیرد.



9



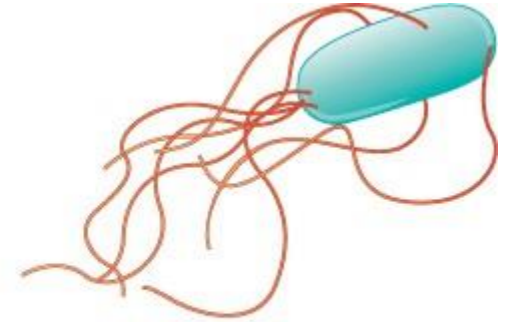
monotrichous



amphitrichous



lophotrichous



peritrichous

10

مشاهده فلاژل در میکروب زنده:

از طریق تهیه یک سوسپانسیون میکروبی در سرم فیزیولوژی می توان حرکت میکروب را مشاهده نمود ولی نمی توان فلاژل ها را با میکروسکوپ نوری دید لیکن به کمک میکروسکوپ الکترونی- میکروسکوپ زمینه سیاه-میکروسکوپ فازکنتراست-فلاژل ها را به وضوح دید.

رنگ آمیزی فلاژل

فلاژل باکتریایی دارای ضخامت بسیار کمی بوده و به همین جهت به سختی میتوان آنرا زیر میکروسکوپ مشاهده کرد. پس باید ابتدا برای فلاژل ضخامت کافی ایجاد کنیم. این امر با استفاده کردن از فوشین و اسید تانیک ممکن خواهد شد.

به منظور رنگ آمیزی فلاژل بایستی کشت باکتری مورد نظر تازه و غنی باشد. معمولاً کشت ۱۲-۲۴ ساعته در سطح اگر جهت این آزمایش مناسب است. همچنین برای این آزمایش از گونه های مختلف پروتئوس استفاده می کنیم که یک باکتری پری تریش بوده و مشاهده فلاژل های آن امکان پذیر می باشد.



12

مشاهده فلاژل با استفاده از روشهای مخصوص و رنگ آمیزی

- برای دیدن فلاژل ها باید قطر آنها را افزایش داد و این عمل با استفاده از پوشاندن سطح آنها توسط یک محلول کلوئیدی موردانت انجام می شود. این رسوب اجازه می دهد که مواد رنگی دیگری روی آن ثابت شوند و ساختمان نخ مانند فلاژل بعد از رنگ آمیزی قابل رویت شود. رنگ آمیزی فلاژل بستگی به تازه و موثر بودن رنگ دانه یا موردانت دارد. رنگ های موردانت رنگ های حد واسط اند. این رنگ ها روی اندام مورد نظر را می پوشانند تا رنگ اصلی روی آن قرار بگیرد. به عبارت دیگر یک لایه حساس به رنگ ایجاد میکند و یا تاثیر رنگها بر آن اندام را بیشتر میکند. به دلیل کم بودن قطر فلاژلها آنها را نمی توان با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد.

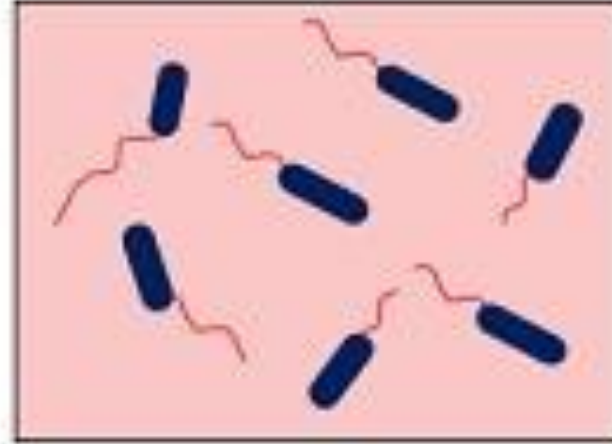


تاژک ها به حدی نازک هستند که نمی توان آنها را به طور مستقیم با میکروسکوپ زمینه روشن مشاهده کرد. برای مشاهده آنها بایستی از تکنیک های خاص رنگ آمیزی استفاده نمود که موجب افزایش ضخامتشان گردد؛ به این صورت که ابتدا با کمک یک ماده تثبیت کننده دندانیه ای نظیر اسید تانیک، آلومینیوم پتاسیم سولفات (آلوم) و رنگ آمیزی آنها با کربول فوشین (روش گری)، پاراروزائیلین (روش لیفسون)، نیترات نقره (روش وست)، و یا کریستال ویوله (روش دیفکو)، ضخامت تاژک ها را افزایش می دهند تا در زیر میکروسکوپ نوری قابل رؤیت گردند.

RESULT INTERPRETATION OF FLAGELLA STAINING



**WET MOUNT
STAINING**



**LEIFSON'S
STAINING**

15

وسایل مورد نیاز:

- کشت ۱۸ ساعته از یکی از گونه های پروتئوس

- پی پت پاستور استریل

- تشتک رنگ آمیزی

- میکروسکوپ و روغن ایمرسیون

- محلول های رنگ آمیزی فلاژل

- اب مقطر استریل

- لام

- ابفشان

آماده سازی محلول A:

۵۰ میلی لیتر محلول آبی اشباع شده سولفات پتاسیم آلومینیوم

۱۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰٪ اسید تانیک

۱۰ میلی لیتر کلرید آهن ۵٪

این محلول تا زمان مصرف بایستی در یک بطری فویل پیچیده در دمای ۵ درجه سانتی گراد نگهداری شود

آماده سازی فلاژل B:

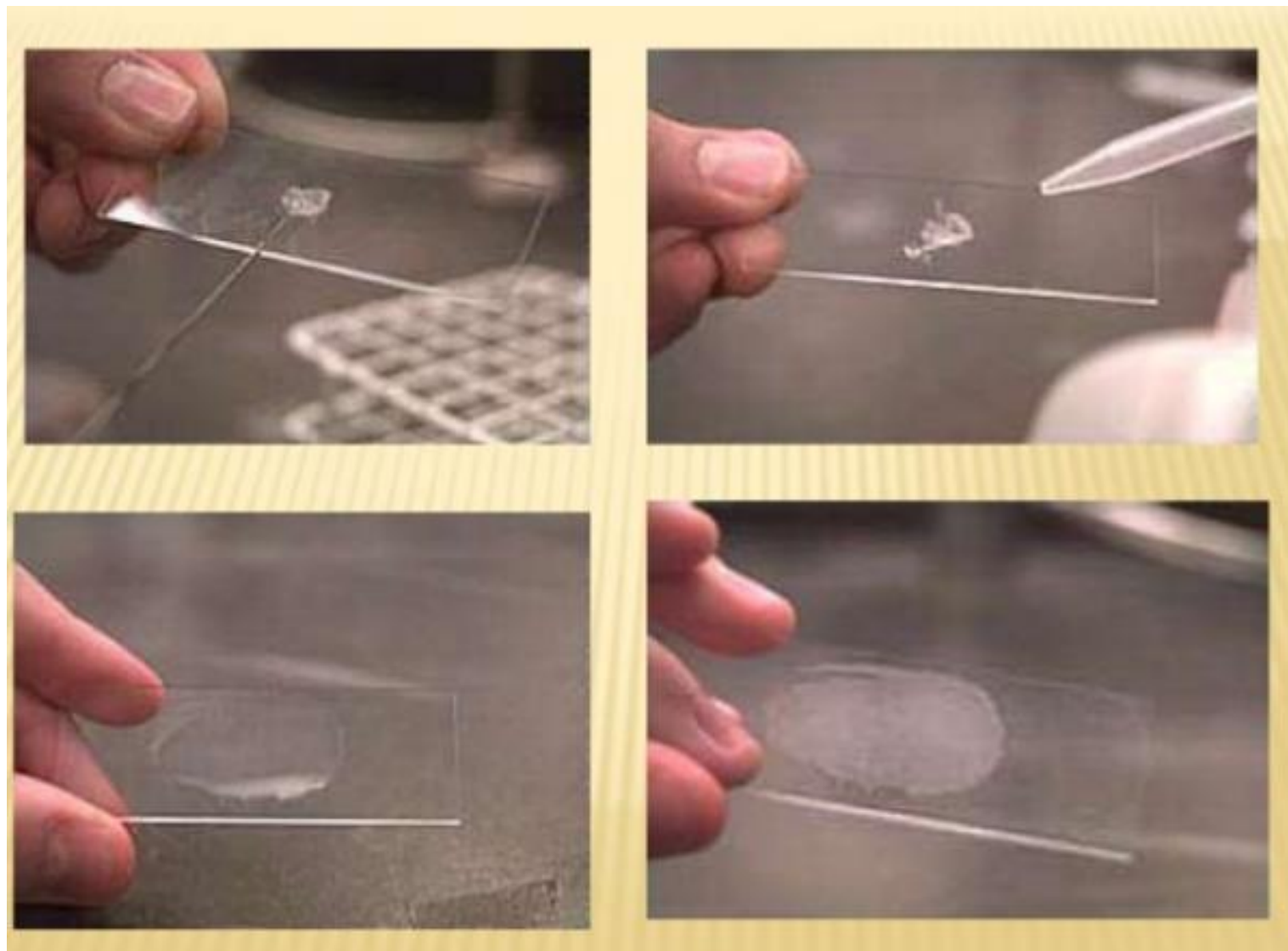
۵ گرم نیترات نقره را در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل کرده بعد ۱۰ سی سی از آن را برداشته کنار می گذاریم و به باقیمانده آن قطره قطره آمونیاک اضافه می کنیم تا قهوه‌ای شود و بعد اضافه کردن آمونیاک را قطره قطره ادامه داده تا رنگ قهوه‌ای از بین رفته و دوباره شفاف شود و بعد به آن از ۱۰ سی سی کنار گذاشته شده نیترات نقره قطره قطره اضافه می کنیم تا رنگ قهوه‌ای کم رنگ به دست آید وقتی می خواهیم روی لام بریزیم گرم کرده و وقتی بخار بلند شد روی لام می ریزیم.

شرح آزمایش

- روش Rodes: در این روش از اسید تانیک به عنوان رنگ دندان استفاده می‌شود که روی فلاژل قرار می‌گیرد تا قطر آن بیشتر شود و همچنین نقش چسباندن باکتری روی لام را دارد.
- جهت انتخاب باکتری از پروتئوس میرابلیس (از خانواده آنتروباکتریاسه‌آ) استفاده می‌شود که باکتری میله‌ای گرم منفی با فلاژل پیرامونی و پری‌تریش می‌باشد. تعداد زیادی فلاژل دارد و چون سوارمینگ دارد، در حالت سوارمینگ فلاژل بلند دارد و به دلیل پخش شدن کلنی روی پلیت ما روی پلیت تک کلنی نمی‌بینیم.
- روی محیط کشت باکتری فلاژل را جمع و به یک طرف حرکت می‌کند. بنابراین جهت رنگ آمیزی باید ابتدا باکتری را به حالت ایستا درآوریم که فلاژل‌ها از هم باز شود و بعد رنگ آمیزی را شروع کنیم.



20



- ۱- پتری دیش را کج کرده و یک قطره آب اضافه می‌کنیم و کج می‌گیریم تا طول پلیت را طی کند و در پایین آن جمع شود. بعد آن را درون آب مقطر استریل ریخته و ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار می‌دهیم.
- ۲- یک قطره از نمونه را بر می‌داریم و روی یک لام تمیز قرار می‌دهیم و اجازه می‌دهیم طول لام را طی کند. بعد آن را روی تشتک رنگ آمیزی قرار داده تا خشک شود.
- ۳- محلول فلاژل A را ۱۰ دقیقه روی لام می‌ریزیم.
- ۴- لام را کج کرده و با آب مقطر آن را می‌شوئیم.

ادامه روش کار:

۵- محلول فلاژل B را اضافه می‌کنیم و ۱۰ دقیقه صبر می‌کنیم. (محلول فلاژل B باید قبل از رنگ آمیزی، همان موقع آماده شود)

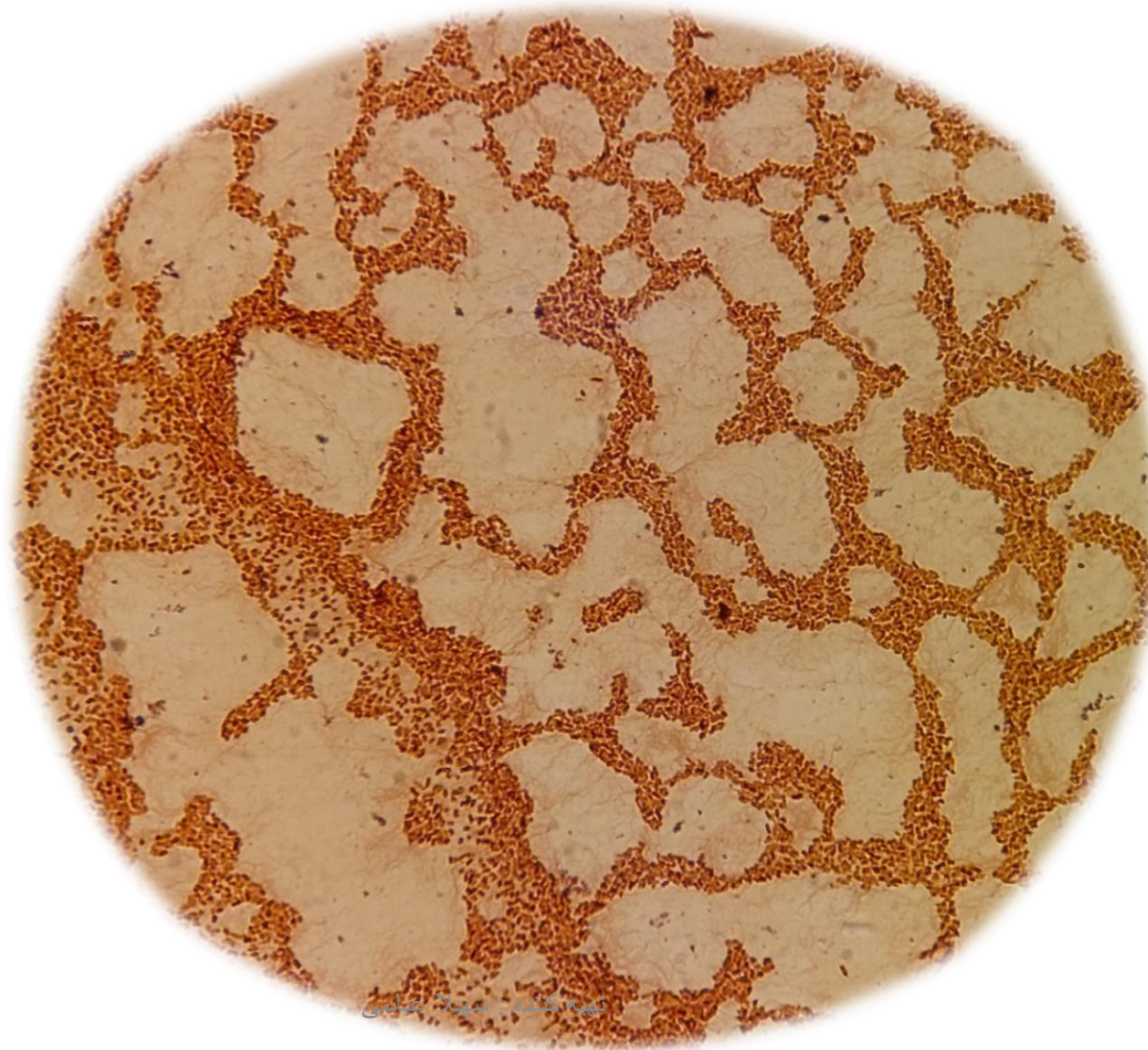
۶- لام را شستشو می‌دهیم و خشک می‌کنیم.

۷- برای دیدن فلاژل‌ها از عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون استفاده می‌کنیم.

هرچه کار ظریفتر انجام شود فلاژل‌ها بهتر دیده می‌شوند.

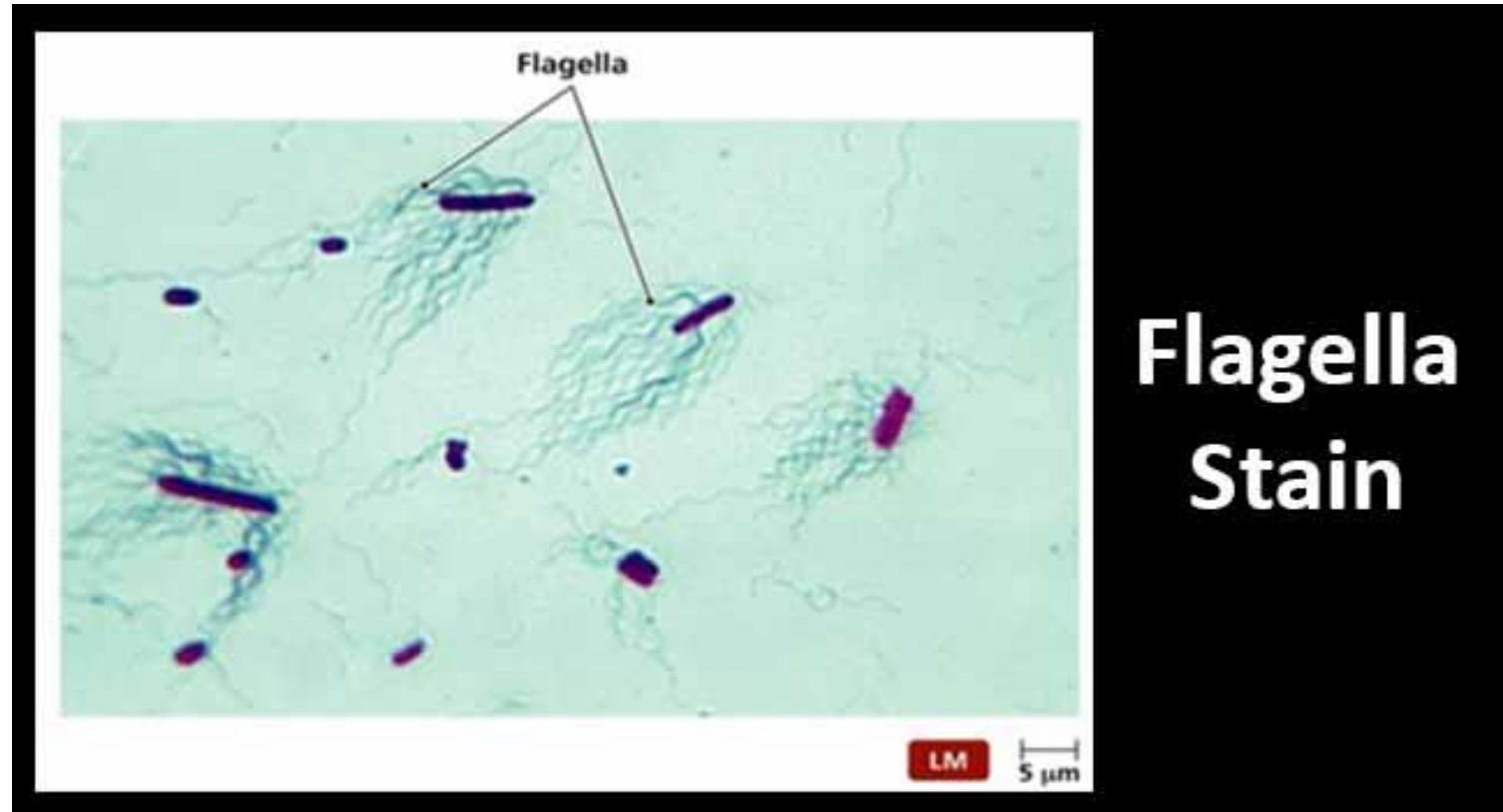
نتیجه: باکتری به رنگ قهوه‌ای تیره و تاژک به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شود.

نتیجہ گیری :



پروفیسر سید علی

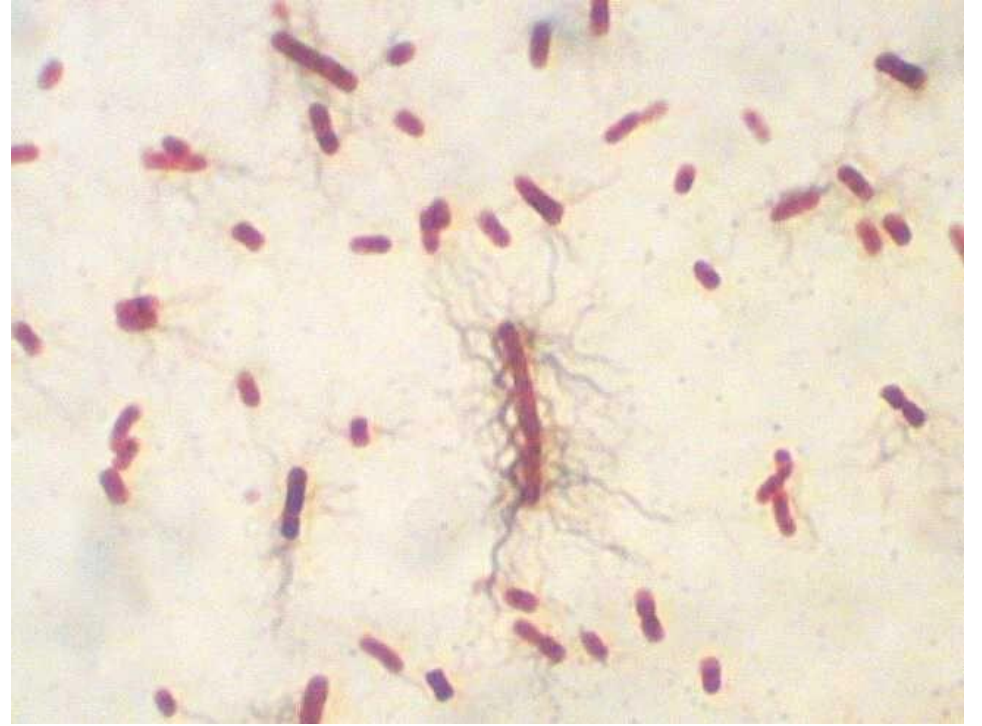
23



24



شکل (الف)

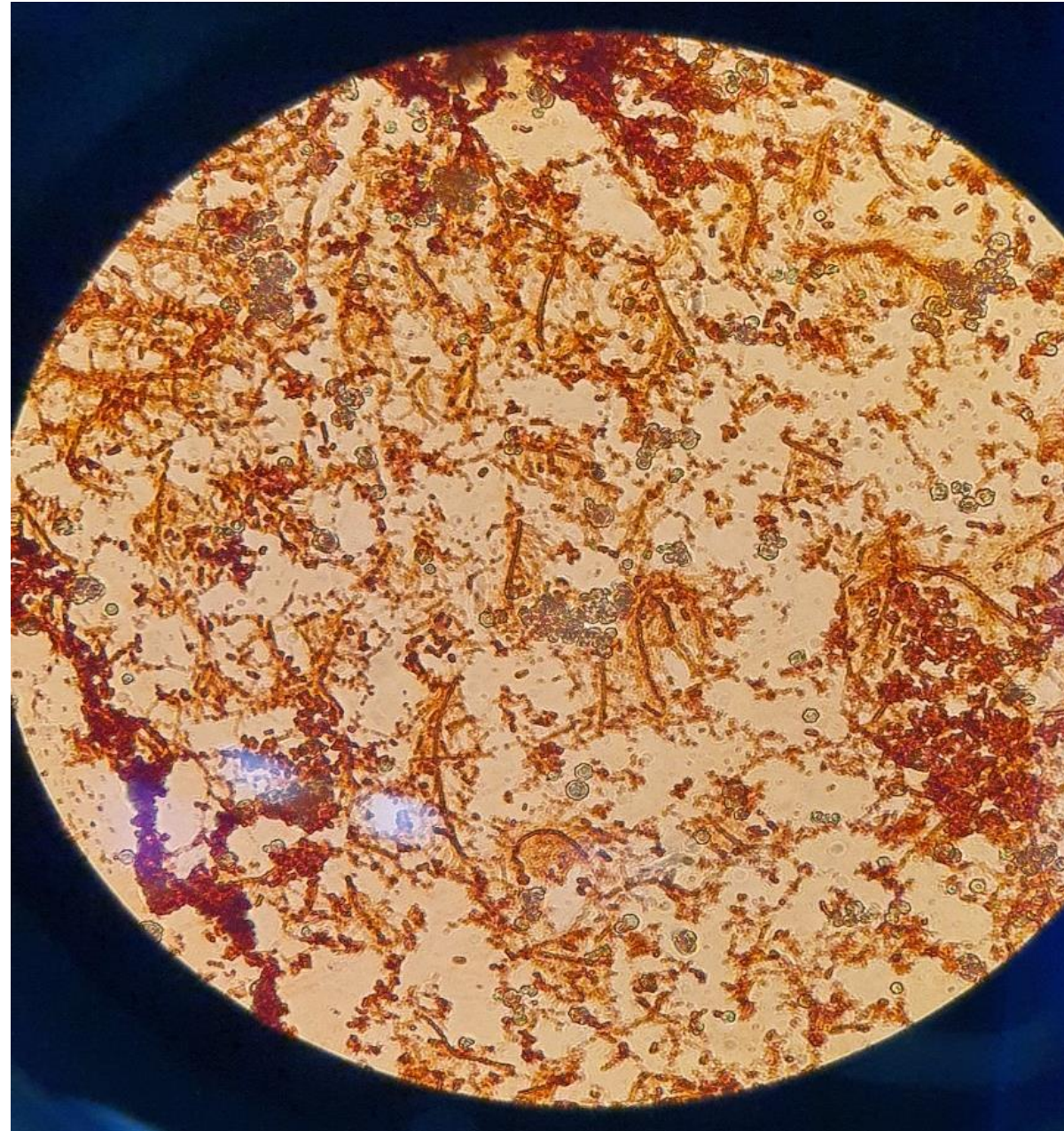


شکل (ب)

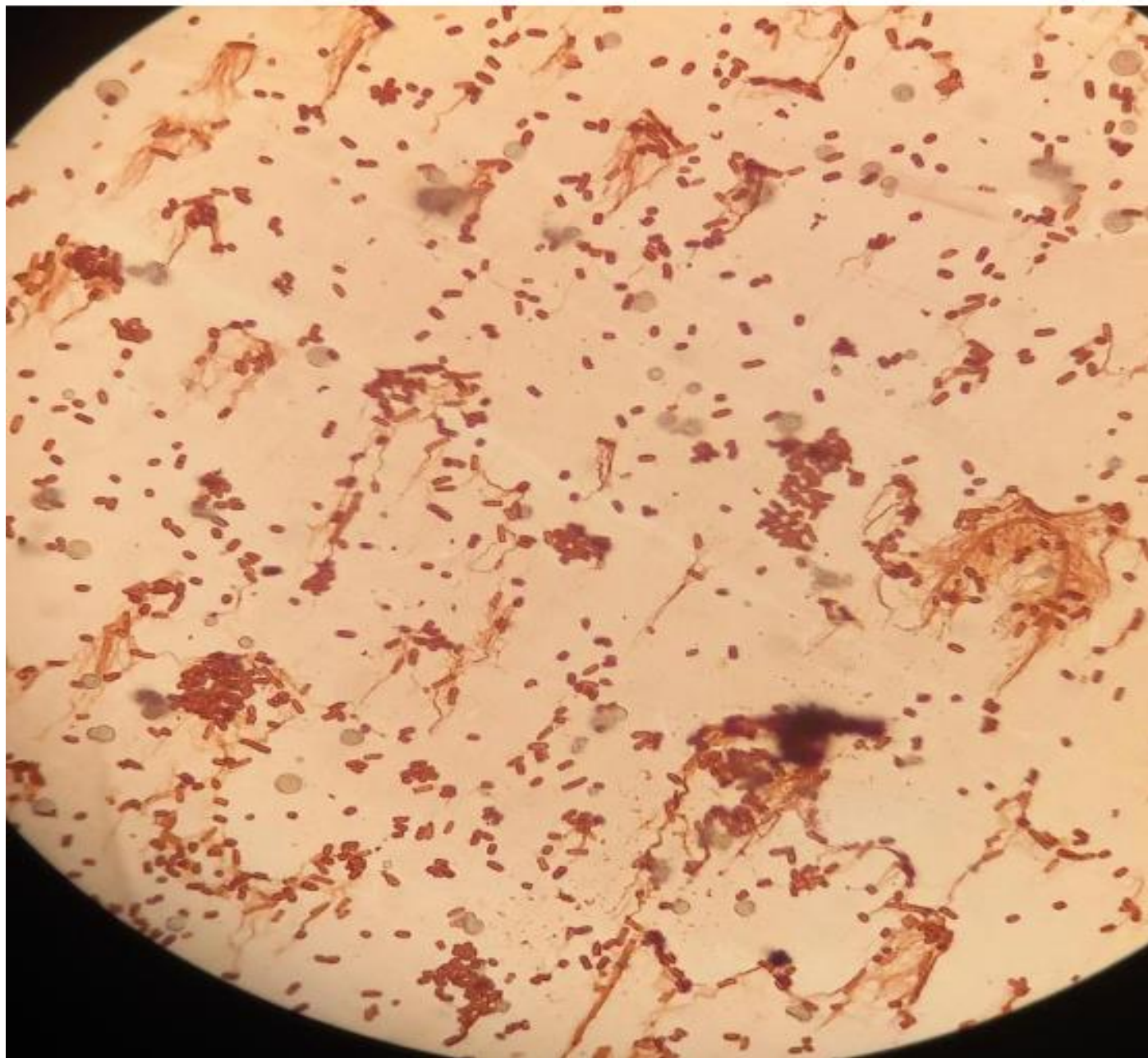
25

نکات

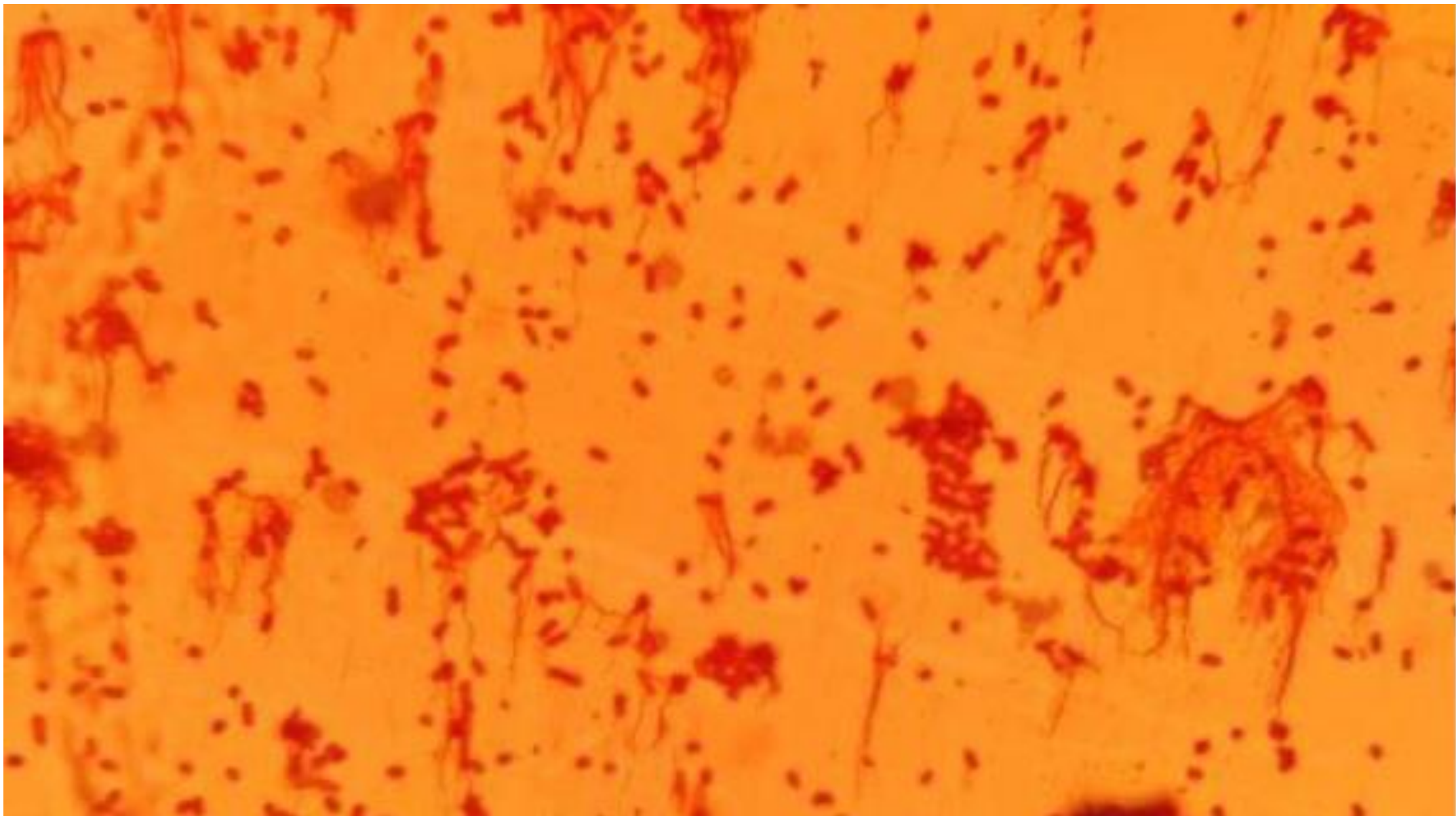
- غیر دائمی بودن تولید تازک و اینکه تحت کنترل حرارت، مواد غذایی و مرحله رشد باکتری است.
- در اثر تکان خوردن محیط کشت و یا پیپت کردن ممکن است کفده شوند.
- دمای بالای ۶۰ درجه، اسیدیته ($pH=4$)، اوره، حلال های آلی و بازها می تواند موجب دیپلمریز شدن تازک به منوعرها شود.



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



از حسن توجه شما سپاسگزارم

تهیه کننده : سهیلا عباسی