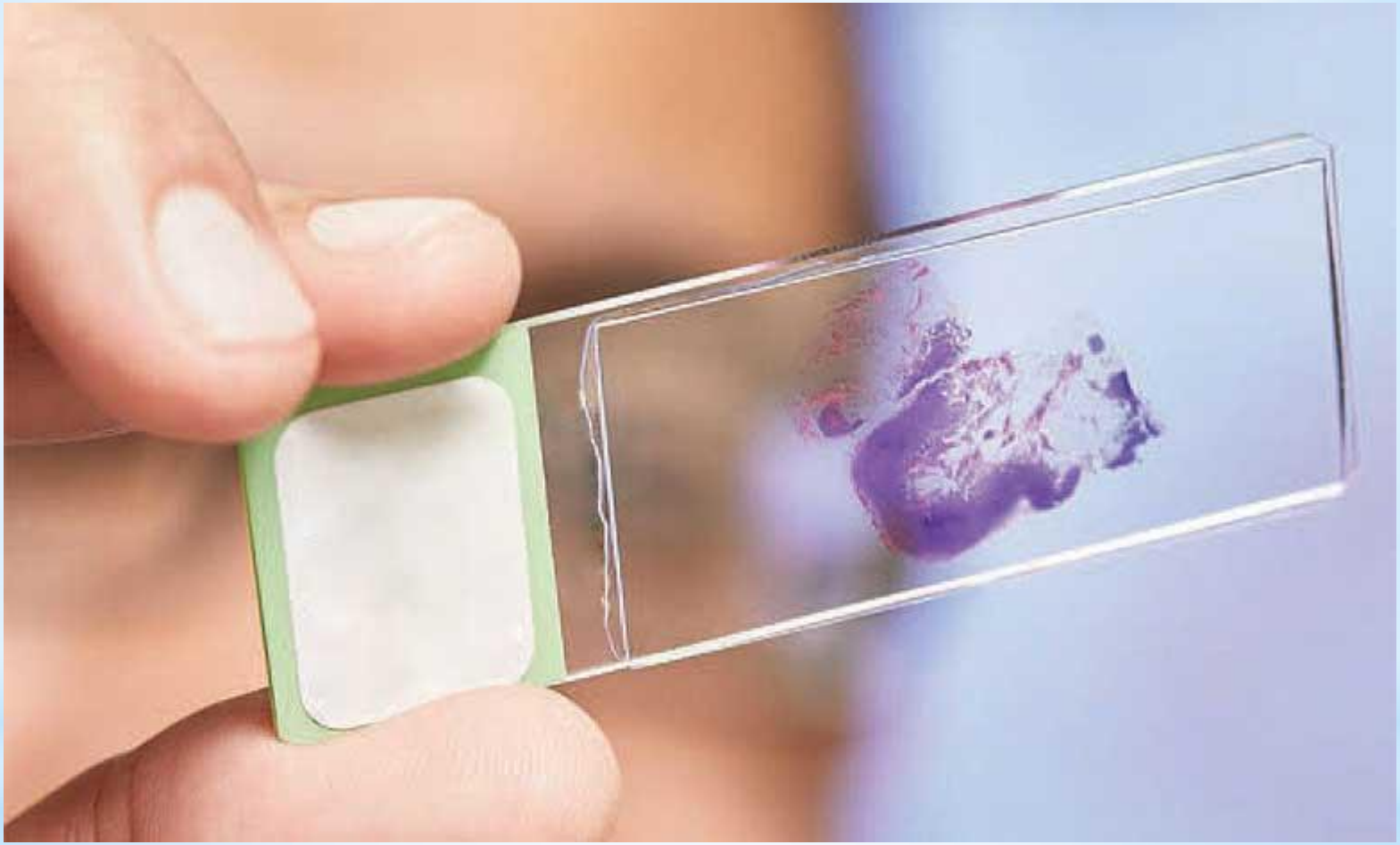
University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

آماده سازی و تثبیت بافت ها و تهیه لام های دائمی



مقدمه

جهت مطالعه و بررسی سلول ها و بافت ها دو روش اصلی وجود دارد. یا سلول ها و بافت ها را به حالت زنده توسط میکروسکوپ زمینه متضاد و یا با میکروسکوپ نوری پس از رنگ آمیزی حیاتی می توان مطالعه کرد و یا اینکه نمونه های میکروسکوپی را ابتدا تثبیت کرد و سپس مراحل تهیه لام دائم را انجام داد که در این حالت نمونه ضمن اینکه شکل ظاهری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خود را حفظ می کند، بی جان و مرده می باشد.

هنگام مشاهده نمونه ها ی میکروسکوپی بایستی ضخامت آن ها به اندازه ای باشد که نور از آن ها عبور کند.مراحل آماده سازی و تثبیت نمونه های بافتی و تهیه لام دائم جهت مشاهدات میکروسکوپی آماده سازی بافتی نام دارد که به ترتیب مورد بررسی قرار می گیرند.

Tissue Processing
Dehydration
Clearing
Dehydrants
Infiltration And Impregnation

نمونه برداری

جهت مشاهدات ساختاری میکروسکوپی نمونه های بافتی ابتدا بایستی آن هارا به ابعاد۲-۱سی سی تقسیم کرده و سریعا برای انجام مراحل بعدی اقدام کنید.

تثبیت کردن (Fixation)

تثبیت کردن به معنی کشتن ناگهانی و همزمان اجزاء بافتی و سلولی است به نحوی که حتی الامکان شکل و ترکیب آن ها نسبت به زمان حیات تغییر نکند و در واقع هدف اصلی تثبیت پروتئین ها،چربی ها،کربوهیدرات ها و نمک های آلی و کانی بدون حل کردن ،متلاشی کردن وتغییر ساختار آن ها است.ضمن اینکه نمونه در این مرحله در برابر تاثیر عوامل مختلف هنگام آماده سازی ،مقاوم می شود و از تجزیه ی خود به خودی (Autolyse) آن جلوگیری می شود.در این مرحله تفاوت ضریب شکست نور نیز در قسمت های مختلف بافت ایجاد می شود و برای پذیرش رنگ های ویژه که در مراحل بعدی مورد استفاده قرار می گیرند،آماده می شود.

انتخاب نوع ماده تثبیت کننده به عوامل مختلفی بستگی دارد که می توان به نفوذ پذیری و درجه سختی نمونه،ساختار و ترکیبات عمومی نمونه و روش رنگ آمیزی مورد استفاده اشاره کرد.مواد تثبیت کننده ترکیبات شیمیایی آلی و غیر آلی می باشند که می توان از ترکیبی از آن ها نیز استفاده کرد تا در صورت نقص در عملکرد یکی،توسط دیگری جبران گردد.

شست وشوی بافت (Washing)

این مرحله به منظور خارج کردن موادی است که باعث اختلال درانجام مراحل بعدی می شوند. اگر ترکیبات تثبیت کننده در نمونه باقی بماند ممکن است با الکل یا مواد استفاده شده در بقیه مراحل واکنش داده و رسوب ایجاد کنند.

شست و شو توسط آب یا بافر در مدت زمان طولانی بایستی انجام شود.

آبگیری (Dehydration)

بافت ها به طور طبیعی دارای مقداری آب هستند که اگر از بافت خارج نگردند مانع نفوذ برخی از مواد در مراحل بعدی مانند پارافین به داخل بافت می شوند.در این مرحله به منظور خارج کردن آب از قسمت های مختلف نمونه از ترکیباتی مثل الکل اتیلیک یا استون در غلظت های مختلف ،مرحله به مرحله و تدریجی می توان استفاده کرد تا آب بافت در نهایت با الکل یا استون جایگزین شود.

شفاف کردن (Cleaning)

به دلیل اینکه عوامل آب گیرنده با مواد مورد استفاده در مراحل بعدی نمی توانند ترکیب شوند،در این مرحله باید از ترکیبی به عنوان حلال حد واسط بین مرحله آبگیری و قالب گیری به عنوان مواد شفاف کننده استفاده شود. ضریب شکست بالای این مواد باعث شفافیت برش های بافتی می شوند.متداول ترین شفاف کننده ها گزیلول(Xylol)،تولوئن (Toluene)،اتر ،بنزن و کلروفرم (Chloroform) می باشند.

قالب گیری (Embedding)

نمونه آغشته شده به پارافین در این مرحله درون قالب پر از پارافین مذاب قرار می گیرد و ضمن انعقاد پارافین نمونه داخل آن مستحکم شده و آماده برش گیری می شود.

برش گیری (Sectioning)

برای برش گیری از دستگاهی به نام میکروتوم (Microtome) استفاده می شود. برای این کار بلوک پارافینی حاوی نمونه را به شکل ذوزنقه پایه داری درآورده و در محل خاصی در دستگاه میکروتوم قرار داده می شود و با تنظیم زاویه و درجه برش گیری برش های ۱۰-۲میکرومتری از نمونه گرفته می شود.برش های گرفته شده که به صورت نواری و دنبال هم قرار می گیرند با قلم مو جهت باز شدن چروک های آن به حمام بن ماری منتقل می شوند.

چسباندن (Mounting)

در این مرحله برش ها روی لام حاوی ژلاتین با آلبومین قرار داده میشوند تا به لام بچسبند.

پارافین زدایی (Deparafin)

به دلیل اینکه اکثر رنگ های مورد استفاده محلول در آب هستند،بایستی نمونه های برش گیری شده بایستی ابتدا پارافین زدایی شوند و سپس توسط مولکول های آب جایگزین گردند.محلول مورد استفاده در این مرحله گزیلول می باشد.

آب دهی (Hydration)

در این مرحله پارافین خارج شده از برش های بافتی با آب جایگزین می شود تا تمام منافذ آن توسط آب پر شود و آماده پذیرش رنگ در مرحله رنگ آمیزی شود.

رنگ آمیزی (Staining)

مرحله آخر آماده سازی بافتی رنگ آمیزی است.ساده ترین و متداول ترین نوع رنگ آمیزی که در اکثر آزمایشگاه ها انجام می شود رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین(Hematoxilin-Eosin) می باشد.هماتوکسیلین یک ماده رنگی بازی می باشد و ساختار بازوفیلی که با آن رنگ می گیرند به رنگ آبی تا بنفش دیده می شوند.ائوزین یک ماده رنگی اسیدی است و ساختار اسیدوفیل که با آن رنگ می گیرند به رنگ قرمز دیده می شوند.به عنوان مثال هسته بازوفیل و سیتوپلاسم اسیدوفیل می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز

۱-نمونه بافتی(گیاهی یا جانوری)

۲-فرمالدئید ۱۰درصد

۳-آب شیر یا بافر فسفات

۴- پارافین مذاب

۵- سفیده تخم مرغ

۶- هماتوکسیلین

۷- اسید کلریدریک ۵/۰-۲/۰درصد در الکل ۹۵درصد

۸- آمونیاک ۲/۰درصد در الکل۹۵درصد

۹- درصد مختلف الکل اتیلیک(۱۰۰-۹۵-۸۵-۷۰-۵۰درصد)

۱۰- گلسیرین

۱۱-ائوزین

۱۲-آب مقطر

۱۳- گزیلول

۱۴- آون

۱۵-کانادا بالزام Canada)
balsam)

مواد و وسایل مورد نیاز

روش کار

-ابتدا نمونه بافتی مورد نظر را آماده کرده و به قطعات کوچک۲-۱سی سیی تقسیم کنید.

۲-جهت تثبیت نمونه ها را سریعا در فرمالدئید۱۰درصد به مدت۴۸-۲۴ساعت قرار دهید.

۳-نمونه های تثبیت شده را چندین بار به دقت توسط آب شیر یا بافر فسفات شست وشو و به مدت ۲۴ ساعت در محلول شست و شو قرار دهید.

۴-جهت آبگیری قطعات بافتی را به ترتیب در درجات۱۰۰-۹۵-۸۵-۷۰-۵۰درصد الکل اتیلیک در فواصل زمانی معین هر کدام به مدت ۴۵ دقیقه قرار دهید.

۵-در این مرحله به منظور نفوذ تدریجی ماده قالب گیری به درون بافت و فضای بین سلولی ،نمونه ها را به مدت ۴۵ دقیقه در درصد های مختلف پارافین در درجه حرارت۵۰درجه سانتی گراد قرار دهید.

۶-جهت قالب گیری نمونه ها در پارافین، حدود۳-۲ ساعت نمونه ها رادر پارافین مذاب در قالب های مناسب و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۷-پس از خارج کردن قالب های پارافینی حاوی نمونه،برش های نازک

۸-۲میکرومتری توسط دستگاه برش گیری میکروتوم تهیه کنید.این مرحله نیاز به تجربه و مهارت زیادی دارد.بدین ترتیب که ابتدا بایستی به وسیله تیغ قالب ها را به شکل ذوزنقه های پایداری توسط تیغ در آورد و سپس روی جایگاه مخصوص چسباند و پس از تنظیم زاویه تیغه با قالب پارافین ابتدا برش های ضخیم تهیه کنید تا پارافین اضافی روی سطح نمونه برداشته شود و سپس برش هایی با ضخامت مورد نظر را تهیه کنید.برش های نواری گرفته شده را با قلم مو به حمام بن ماری با حرارتملایم منتقل کنید تا چروک های آن ها باز شود.

۹-برش های گرفته شده را روی لام های آلبومینه بچسبانید.جهت تهیه لام آلبومینه گلسیرین و سفیده تخم مرغ را به نسبت حجمی مساوی مخلوط کرده و با انگشت یا قلم مو روی لام تمیز بکشید و پس از خشک شدن برش ها را روی آن قرار دهید.

۱۰-جهت پارافین زدایی لام های حاوی نمونه را به منظور حل شدن پارافین در ظرف های زیلول ۲ دفعه هر بار به مدت ۳-۲ دقیقه قرار دهید.

۱۱-به منظور آب دهی به نمونه ها به ترتیب لام حاوی نمونه به مدت ۲-۱دقیقه در الکل اتیلیک۱۰۰درصد،۱دقیقه در الکل۹۵درصد،۱دقیقه در الکل۷۰درصد و ۵دقیقه در آب مقطر قرار دهید.نمونه ها را می توان تا زمان رنگ آمیزی به مدت دلخواه در آب مقطر قرار داد

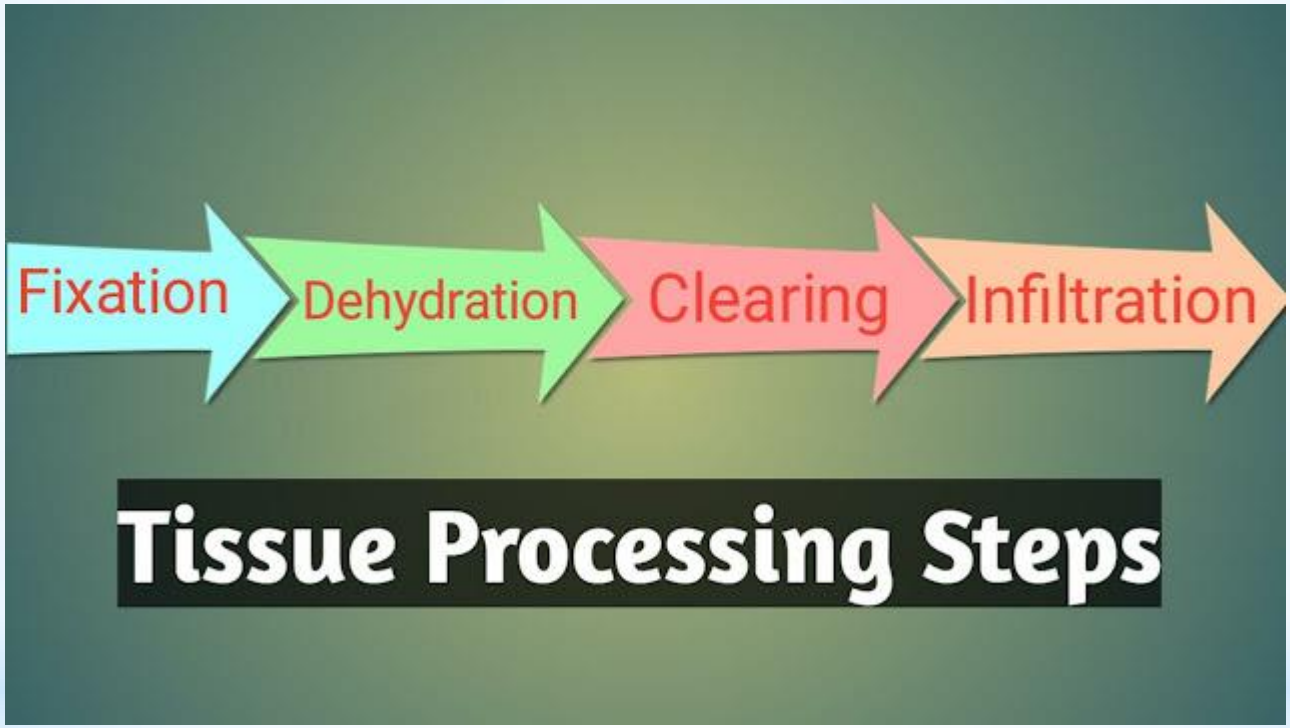
۱۲-در مرحله رنگ آمیزی برش ها را به مدت ۱۵دقیقه در محلول رنگی هماتوکسیلین قرار دهید تا هسته ها رنگ شوند.

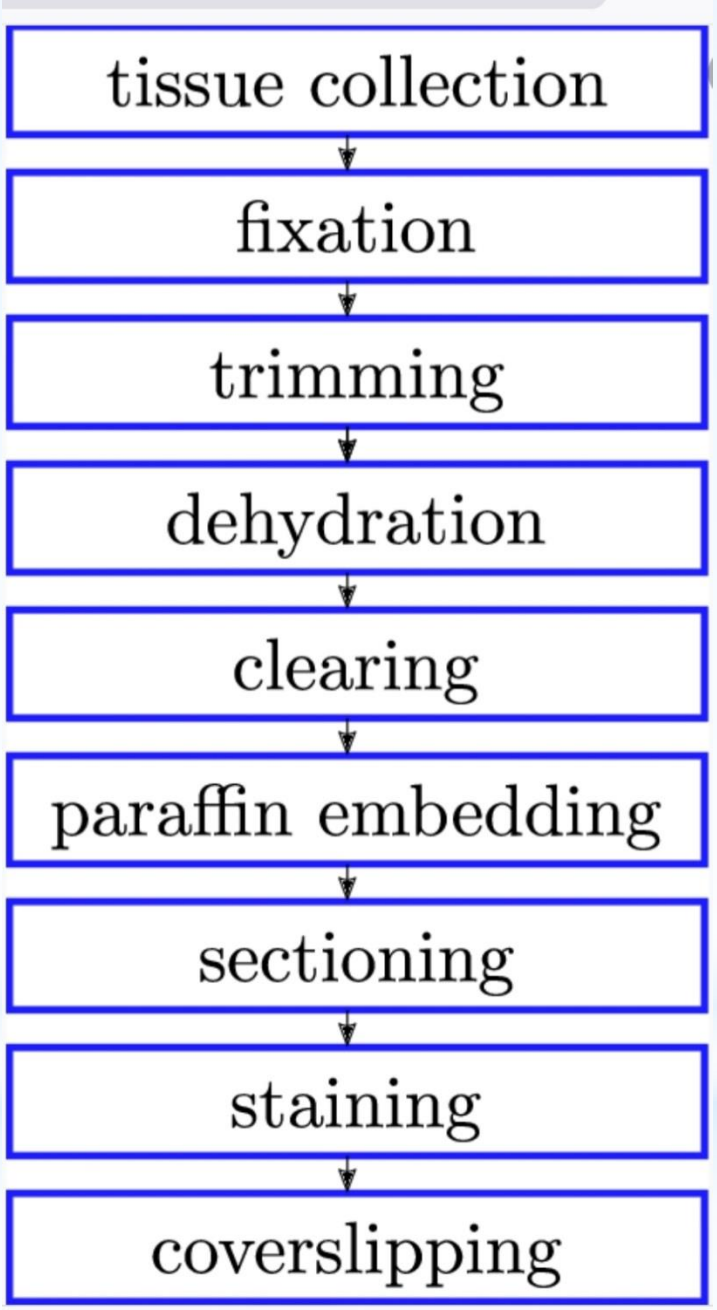
۱۳-برش ها را با آب شیر و سپس با آب مقطر به آرامی شست و شو دهید.

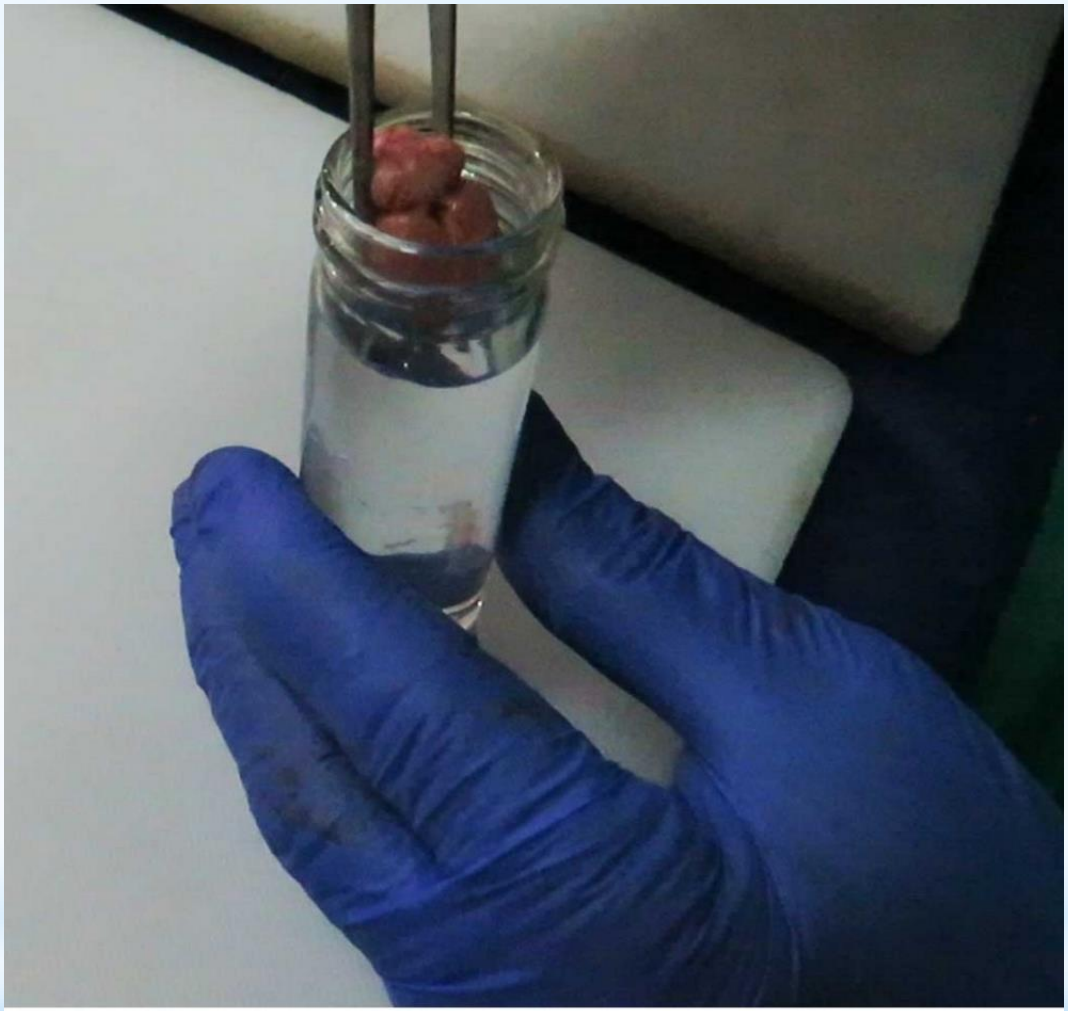
۱۴-برش ها راحدود۳۰ ثانیه در محلول۰/۵-۰/۲درصد اسیدکلریدریک در الکل ۹۵ درصد جهت آماده سازی مرحله بعد قرار دهید.

۱۵-جهت تمایز سیتوپلاسم رنگ اسیدی ائوزین ، برش ها را در محلول۰/۲درصد آمونیاک در الکل ۹۵درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار دهید.

۱۶-پس از خشک شدن نمونه ها ،بر روی آن هایک قطره کانادا بالزام ریخته،لامل گذاری کنید و به مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی گراد قرار دهید.سپس آن ها را در زیر میکروسکوپ مشاهده کنید و به تمایز قسمت های مختلف آن دقت کنید.


Fixation
Dehydration
Clearing
Infiltration
Tissue Processing Steps


tissue collection
fixation
trimming
dehydration
clearing
paraffin embedding
sectioning
staining
coverslipping

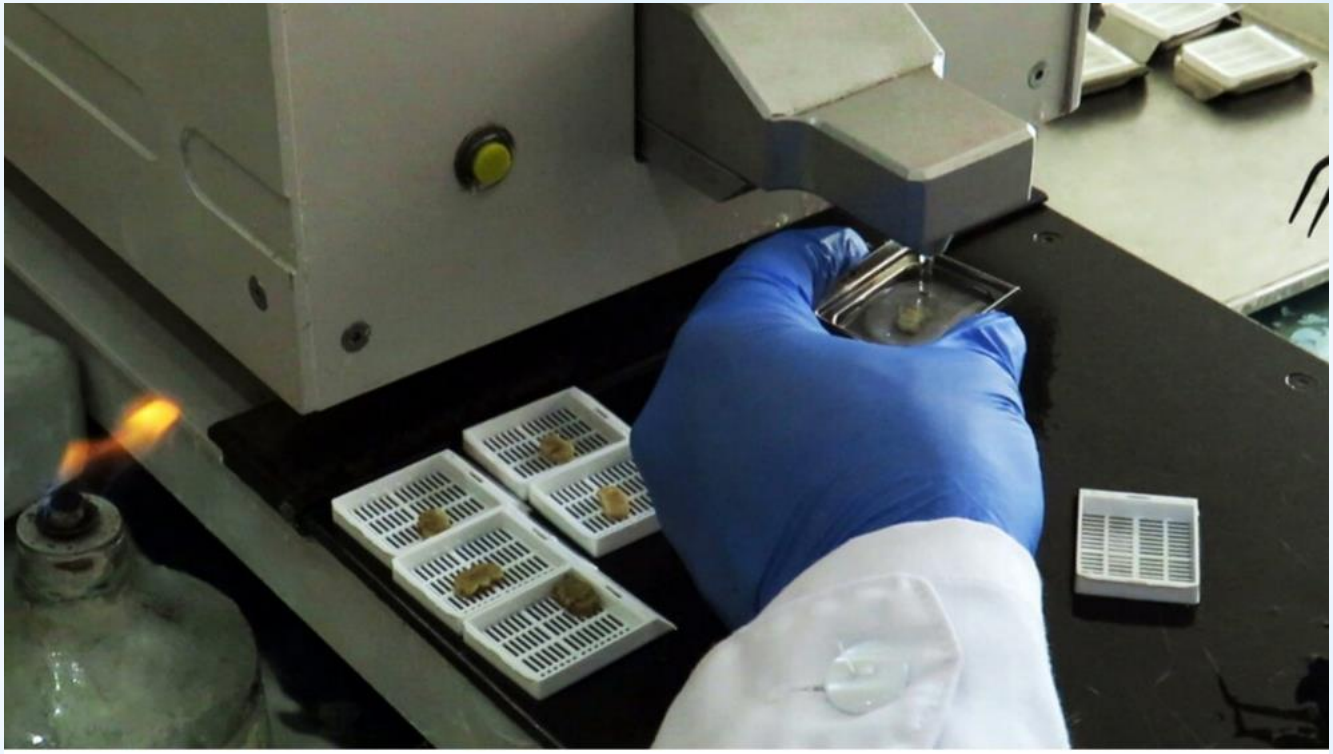


بافت مغز برای فیکس کردن (Fixation) در فرمالین ۱۰%

بافت ها در بسکت بافت شناسی در حال فیکس شدن با فرمالین

فیکس کردن بافت به روش فروزن در نیتروژن مایع

مرحله آبگیری در آماده سازی لام از بافت ها



مراحل قالب گیری در آماده سازی لام از بافت ها

تهیه مقاطع بافتی به وسیله ی میکروتوم

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

خلاصه مراحل آماده سازی لام

۱- تشریح حیوان ۲- جداسازی بافت مورد نظر ۳- تقسیم بافت به قطعات کوچک

۴- شستشوی قطعات بافت با آب ۵- تهیه فیکساتور مناسب ۶- قرار دادن بافت در فیکساتور

۷- آبگیری نمونه های بافت

۸- نفوذ پارافین ذوب شده در آب گرم به داخل بافت

۹- چرب کردن داخل قالب با گلیسرین

۱۰- قرار دادن نمونه در قالب

۱۱-خروج قالب پارافینی

۱۲- حذف پارافینهای اضافه و ایجاد سطح مقطع ذوزنقه ای

۱۳- چسباندن قالب روی تکیه گاه توسط پارافین مذاب

۱۴- قرار دادن قالب از محل تکیه گاه در میکروتوم
۱۵-تنظیم برشگیری با ضخامت ۵ تا ۷ میکرون به صورت پشت سر هم
۱۶- انتقال برشها روی آب گرم
۱۷-باز شدن چروکهای برشها
۱۸-استفاده از چسب آلبومین مایر روی سطح لام تمیز
۱۹- جمع کردن برشها از روی سطح آب توسط لام چسب خورده

۲۰- خشک شدن لام در دمای محیط ۲۱- آبدهی ۲۲- رنگ آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین

۲۳-آبگیری ۲۴- مونتاژ ۲۵- مطالعه میکروسکوپی ۲۶-نمونه با بزرگنمایی۱۰*