

آماده سازی بافت ها جهت مطالعه ی میکروسکوپی

تثبیت ساختار بافتی نمونه های جدا شده

بعد از مرگ یا جدا سازی بافت فعالیت آنزیم های درون سلولی باعث فاسد شدن و تخریب ساختمان سلولی و بافتی می گردد. بنابراین برای جلوگیری از این تغییرات، نمونه بافتی بایستی بلافاصله در ترکیبات ثابت کننده^۱ قرار گیرد. محلول های ثابت کننده ضمن پیوند با پروتئین ها، باعث تخریب آنزیم ها شده و از انهدام ساختمان سلول ها و بافت ها، جلوگیری می کنند. تنوع محلول های فیکساتیو بسیار زیاد است، اما معمولی ترین محلول برای استفاده در آزمایشگاه های آسیب شناسی و بافت شناسی فرمالین ۱۰ درصد می باشد .

آماده سازی فرمالین ۱۰٪:

مواد تهیه ی فرمالین ۱۰٪

فرمالین تجاری	۱۰۰ میلی لیتر
Na ₂ HPO ₄	۶/۵ گرم
NaH ₂ PO ₄	۴ گرم
آب مقطر	۹۰۰ میلی لیتر

ابتدا ۴ گرم NaH₂PO₄ و ۶/۵ گرم Na₂HPO₄ در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس فرمالین تجاری به این محلول اضافه شده، حجم آن به وسیله ی آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد.

شست و شو با آب^۲ و کلسیم گیری^۳

این فرایند شامل قرار دادن بافت ها در زیر آب جاری به مدت یک شبانه روز است که این مرحله باعث جایگزینی آب با ماده ی ثابت ساز موجود در بافت می شود سپس نمونه ها به مدت چند هفته (تا زمانی که نمونه ها نرم شوند) در محلول

^۱ Fixative

^۲ , Washing out

EDTA ۱۴٪ قرار گرفتند.

آب گیری^۴ و شفاف سازی^۵

آب موجود در بافت با استفاده از محلول های الکلی با غلظت فزاینده (از غلظت ۵۰٪ تا ۱۰۰٪) از نمونه ها خارج شد. سپس یک حلال آلی به نام زایلن که قابلیت آمیزش با الکل و محیط سفت کننده را دارد، جایگزین الکل گشت. این مرحله باعث شفاف تر شدن بافت ها شده و شفاف سازی نام دارد. در نهایت بافت ها در پارافین مذاب قرار داده شد. این مرحله توسط دستگاه هیستوکینت انجام شد.

قالب گیری^۶

بافت در یک قالب کوچک محتوی پارافین مذاب قرار داده شد، بافت ها در این محیط جامد می شوند تا تهیه ی برش از آن ها آسان گردد.

برش دهی^۷

قالب های پارافینی حاصله تراشیده می شوند تا بافت را برای تهیه ی برش توسط میکروتوم نمایان کنند. بدین منظور قالب های سخت شده در میکروتوم قرار داده شده و برش هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد.

رنگ آمیزی^۸

نمونه ها جهت مطالعه ی میکروسکوپی باید رنگ آمیزی شوند چرا که بیشتر سلول ها و ماده ی خارج سلولی کاملاً بی رنگ هستند. روش های رنگ آمیزی قسمت های متفاوت بافتی را مشخص می کنند، تا تفکیک این اجزا از هم میسر باشد. اغلب رنگ های مورد استفاده ترکیبات اسیدی یا بازی هستند. اجزای سلولی آنیونی که بار منفی دارند با رنگ های بازی راحت تر

³. Decalcification

⁴. Dehydration

⁵. Clearing

⁶. Blocking

⁷. Sectioning

⁸. Staining

رنگ می گیرند مانند اسیدهای هسته‌ای و این اجزا بازوفیل^۹ نامیده می‌شوند، اجزای کاتیونی مثل پروتئین‌ها تمایل به رنگ-های اسیدی دارند و اسیدوفیل نامیده می‌شوند.

در میان تمام روش‌های رنگ‌آمیزی، ترکیب هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) از پر کاربردترین ترکیبات است. در این روش رنگ آمیزی، هماتوکسیلین باعث ایجاد رنگ آبی تیره یا ارغوانی در هسته و سایر ساختمان‌های اسیدی می‌شود. در مقابل ائوزین سایر اجزای سیتوپلاسم و کلاژن را صورتی رنگ می‌کند.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

برش‌های تهیه شده به وسیله میکروتوم به روی سطح آب داخل بن‌ماری منتقل شدند تا چروک آن‌ها باز شود. برش‌های مناسبتر با استفاده از لام از سطح آب برداشته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه خشک شدند. جهت شفاف سازی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در گزیل (زایلن) غوطه‌ور شدند. در ادامه، لام‌ها برای حذف گزیل اضافی روی تامپون قرار داده شدند. به منظور حذف باقی مانده گزیلول لام‌ها، از الکل با درجه‌های افزایشی غلظت استفاده شد.

ترتیب و مدت زمان لازم برای پاک کردن گزیل اضافی از سطح مقاطع بافتی

ظرف ۱	ظرف ۲	ظرف ۳	ظرف ۴	ظرف ۵	ظرف ۶
محتوی الکل	محتوی الکل	محتوی الکل	محتوی الکل	محتوی الکل	محتوی آب-مقطر
۹۶ درصد	۹۶ درصد	۹۰ درصد	۸۰ درصد	۷۰ درصد	
به مدت ۲ دقیقه	به مدت ۲ دقیقه	به مدت ۱ دقیقه	به مدت ۱ دقیقه	به مدت ۱ دقیقه	به مدت ۱ دقیقه

در مرحله بعدی، لام‌ها به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در جار رنگ‌آمیزی در هماتوکسیلین غوطه‌ور شده سپس با آب جاری به مدت ۱۰ دقیقه شست و شو شدند. پس از آن به مدت ۵-۳ دقیقه در ائوزین قرار داده شدند و زیر آب شست‌وشو داده شدند تا رنگ اضافی حذف شود. بعد از آن لام‌ها مطابق جدول ۳-۱۲ در ظروف محتوی الکل با سیر صعودی غلظت قرار داده شدند.

^۹ . Asophilic

^۱ . Acidophilic

گزارش خدمات تخصصی شرکت آوین بنیان ژن
تهیه مقاطع بافتی



سیر صعودی الکل مصرفی پس از رنگ آمیزی لامها با همتوکسیلین و اتوزین

ظرف ۴	ظرف ۳	ظرف ۲	ظرف ۱
الکل ۹۶ درصد به مدت ۲۰ ثانیه	الکل ۹۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه	الکل ۸۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه	الکل ۷۰ درصد به- مدت ۲۰ ثانیه

در مرحله ی آخر لامها به مدت ۵ دقیقه داخل گزلیل قرار گرفتند. بعد از خارج کردن لامها از گزلیل اجازه دادیم تا خشک شوند و در نهایت با استفاده از چسب انتلان لامل گذاری انجام شد.