

خطوات تشريح النسيج النباتي

1- عملية التثبيت FIXATION

لتشريح العينة النباتية تؤخذ قطع صغيرة منها وتوضع في المحلول المثبت Formaline Aceto Alcohol (FAA) لغرض حفظ هذه النماذج وتثبيتها ويتكون كل 100 مل من هذا المحلول من 90 مل من الكحول الأثيلي تركيز 70 % و 5 مل من حامض الخليك الثلجي و 5 مل من الفورمالين . تركت النماذج في المحلول لمدة 24-48 ساعة .

2- عملية الغسل والحفظ Washing and Preservation

غسلت بالكحول الأثيلي تركيز 70% مرتين أحدهما لمدة ساعة والأخرى لمدة 18 ساعة وذلك للتخلص من آثار المحلول المثبت . وهنا يمكن حفظ العينات لفترات طويلة بالكحول الأثيلي تركيز 70% او الاستمرار بالعمل .

3- عملية الانكاز Dehydration

مررت الاجزاء المقطوعة بسلسلة متصاعدة من الكحول الأثيلي (70-80-90-95) % لمدة ساعة في كل منها ثم وضعت في كحول ائيلي مطلق 100% لمدة ليلة كاملة .

4- عملية الترويق Clearing

وضعت النماذج في مزيج مكون من كحول ائيلي مطلق وزايلين بنسب 1:3 و 1:1 و 3:1 و زايلين نقي لمدة 30 دقيقة في كل منها .

5- عملية التشريب Infiltration

بعدها نقلت إلى خليط (حجم إلى حجم) من الزايلين وشمع البارافين في فرن بدرجة حرارة 60 م° لمدة 4 ساعات ، ثم في شمع البارافين لمدة ليلة كاملة وبدرجة الحرارة نفسها.

6- عملية الطمر Embedding

صب بارافين نقي بنفس درجة الحرارة في مكعبات معدنية ووضعت فيها العينات وعلمت وتركت لتبرد تحت الماء الجاري لمدة ليلة كاملة لتصبح جاهزة للتقطيع .

7- عملية القطع Cutting

هيئت القوالب الحاوية على النماذج بشكل مكعبات منظمة تحتوي على النموذج في مركزها وتم تثبيت القالب في المكان المخصص له في جهاز التقطيع الدقيق (Microtome) نوع MSE ، وأجريت عملية

التقطيع الدقيق بسمك 10-15 مايكرومتر للشريحة الواحدة. تم ترتيب الأشرطة المتكونة من عملية التقطيع حسب التسلسل وجرى تقطيع هذه الأشرطة إلى قطع بأطوال 5 سم .

8- عملية لصق الشريط Affixing the Ribbon

ولغرض تثبيت المقاطع على الشرائح الزجاجية ، وضعت قطرة من زلال ماير (Myer's albumin) على الشريحة الزجاجية وجرى توزيعها بشكل جيد على الشريحة من خلال مسحها بإصبع اليد . وضعت بضع قطرات من الماء المقطر فوق طبقة الزلال ونقلت الأشرطة إلى الشريحة لتطفو فوق طبقة الماء ، ووضعت الشرائح على صفيحة حارة (Hot plate) بدرجة حرارة 35 °م وجرى تنظيم الأشرطة على سطح الشريحة ، وتركت الشرائح الزجاجية على الصفيحة الحارة لحين تبخر الماء تماماً والتصاق النماذج على الشرائح.

لغرض التخلص من الشمع تم وضع الشرائح في مخبار كوبلن Coplin jar مملوء بالزايلين لمدة ساعة حيث كررت هذه العملية ثلاث مرات للتأكد من إزالة الشمع تماماً، ولإعادة الماء إلى النماذج وضعت الشرائح الزجاجية في مخبار كوبلن يحتوي على كحول ايثيلي بتركيز تنازلية ابتداءً من الكحول المطلق وحتى الكحول ذي التركيز 50% وكالاتي: (100, 95, 90, 80, 70, 50) % ولمدة 15 دقيقة لكل تركيز.

9- عملية التصيبغ Staining

بعد ذلك جرى نقل الشرائح إلى مخبار كوبلن يحتوي على صبغة السفرانين (المحضر بإذابة 1 غم من الصبغة في 100 مل من الكحول الايثيلي تركيز 70 %) وتركت الشرائح في الصبغة لمدة 30-60 دقيقة . ولأجل إزالة الصبغة الزائدة نقلت الشرائح إلى مخبار كوبلن يحتوي على كحول ايثيلي بتركيز 50% ثم وضعت في صبغة الأخضر السريع Fast green (المحضرة بإذابة غرام واحد من الصبغة في 100 مل من الكحول الايثيلي المطلق) لمدة 15 ثانية ، غسلت بعدها جيدا بكحول مطلق ثم مررت بالزايلين ثلاث مرات متتالية مدة 5 دقائق في كل مرة ثم تركت 5 دقائق لتجف .

10- عملية التحميل Mounting

استخدمت مادة التحميل DPX (Distrene Plasticizer Xylene) بوضع قطرة منها على الشريحة ووضع غطاء الشريحة برفق ونقلت إلى صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 60 م لعدة ساعات ، أصبحت بعدها جاهزة للفحص .