الفصل الثاني: طرق دراسة الخلية
TD N°3: الطرق الكيميائية النسيجية و الكيميائية الخلوية

-

طرق تسمح بتحديد طبيعة المكونات الكيميائية للخلية و تموضعها. من بين هذه الطرق المستخدمة:

- التجزئة الخلوية
- التصوير الإشعاعي الذاتي
- الطرق المناعية (المناعية الخلوية)
- الطرق الأنزيمية

1- طرق التجزئة الخلوية

تتمثل طرق التجزئة الخلوية في فصل المكونات المختلفة للخلية بعد تخريب الغشاء البلازمي، وذلك لدراسة بنيتها ووظيفتها.

1-1- مراحل التجزئة الخلوية

تتم عملية التجزئة الخلوية في مرحلتين:

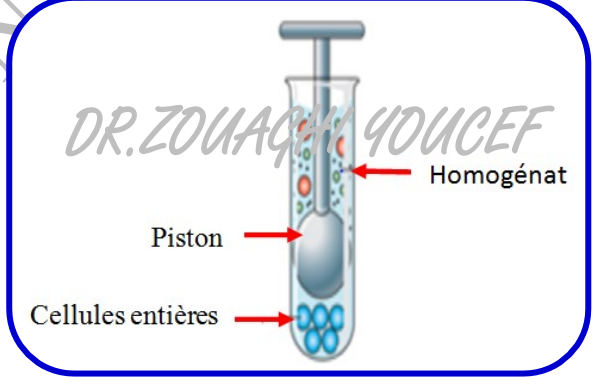
- المجانسة (Homogénéisation) : سحق الخلايا
- التنقية (Purification) : فصل العضيات الخلوية بواسطة الطرد المركزي أو ما فوق الطرد المركزي.

1-1-1-- المجانسة أو الطحن (Homogénéisation ou broyage) [شكل1]

تتضمن عملية المجانسة تخريب الغشاء البلازمي (بالإضافة إلى الجدار الخلوي في حالة الخلايا النباتية والفطرية).
تؤدي هذه الخطوة إلى الحصول على مسحوق خلوي متجانس (homogénat) يحتوي على جميع مكونات الخلية.
للحصول على مسحوق خلوي متجانس، توضع الخلايا في أنبوب إختبار به محلول متساوي التوتر(isotonique) و يتم تجزئة هذا المعلق بإحدى المعالجات التالية:

- ميكانيكيا: سحق بواسطة مكبس.
- فيزيائيا : بواسطة الموجات فوق الصوتية أو الضغط العالي.
- كيميائيا : بواسطة منظفات (أحماض أو قواعد) أو بواسطة إنزيمات.

يجب أن يفي وسط الطحن بالمتطلبات الكيميائية و الأوسموزية : له درجة حموضة (pH) متعادلة و تركيبه الأيوني أقرب ما يمكن إلى السيتوبلازم . يعتبر محلول سكروز تركيزه 0.25 مول وسط متساوي التوتر إتجاه معظم العضيات الحويصلية.



شكل 1: طحن ميكانيكي بواسطة مكبس

1-1-2- التنقية (Purification)

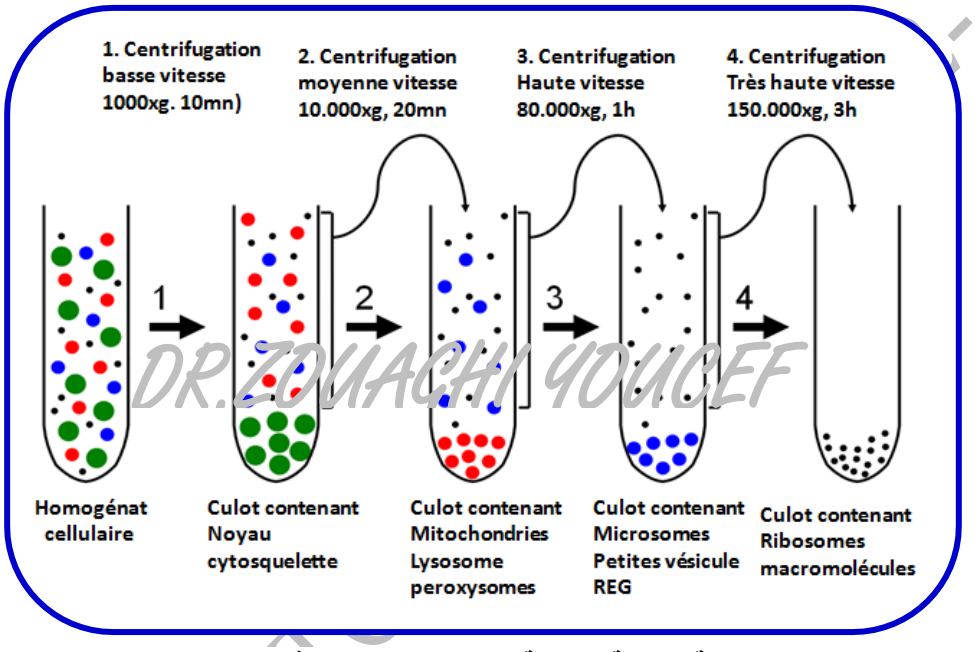
تتمثل عملية التنقية في فصل البنيات الخلوية إلى أجزاء نقية بواسطة تقنية الطرد المركزي (أو ما فوق الطرد المركزي).
هناك نوعان من الطرد المركزي:

UFMC - SNV-TC-1ère LMD - 2022-2023

- الطرد المركزي التفاضلي
- الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة

➢ الطرد المركزي التفاضلي [شكل2]

- يخضع المسحوق الخلوي المتجانس إلى سلسلة من عمليات الطرد المركزي ذات أزمنة و سرعات متزايدة.
- يتم تجزئة المستخلص الأولي إلى سلسلة من الرواسب (culots) والسوائل الطافية (surnageants).
- تتوقف سرعة ترسيب الجسيمات (عضيات ، جزيئات ضخمة،...) على حجمها، شكلها و كثافتها ، بحيث تشكل الجسيمات الأكبر حجما والأكثر كثافة في المستخلص الخلوي أول راسب (le premier culot).
- تحدد سرعة الترسيب بواسطة معامل الترسيب المعبر عنه بوحدة (S) Svedberg.

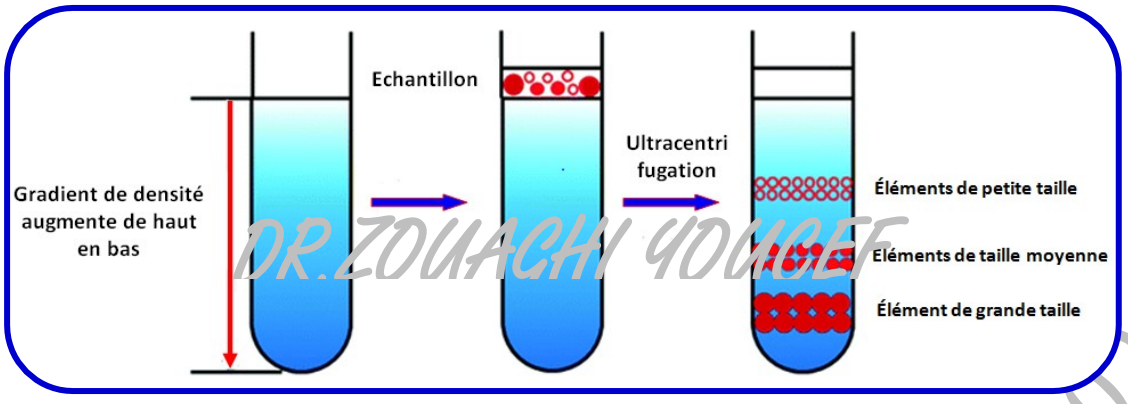


شكل 2 : التجزئة الخلوية بواسطة الطرد المركزي و ما فوق الطرد المركزي

➢ الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة [شكل3]

- تسمح تقنية ما فوق الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة، بفصل في مرة واحدة العضيات الخلوية وحتى الجسيمات البيولوجية الصغيرة التي لها سرعات ترسيب متقاربة جدا.
- يتمثل الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة، في وضع طبقة رقيقة من المسحوق الخلوي فوق محلول سكروز الذي يختلف تركيزه بانتظام ويتناقص من أسفل إلى أعلى.
- بعد إجراء الطرد المركزي، يترسب كل عنصر من العينة في منطقة من الأنبوبة تكون كثافتها مساوية لكثافة العنصر، بذلك يتم الحصول على أشرطة مختلفة (تكون الطبقة الأكثر كثافة في الأسفل).

UFMC - SNV - 2023



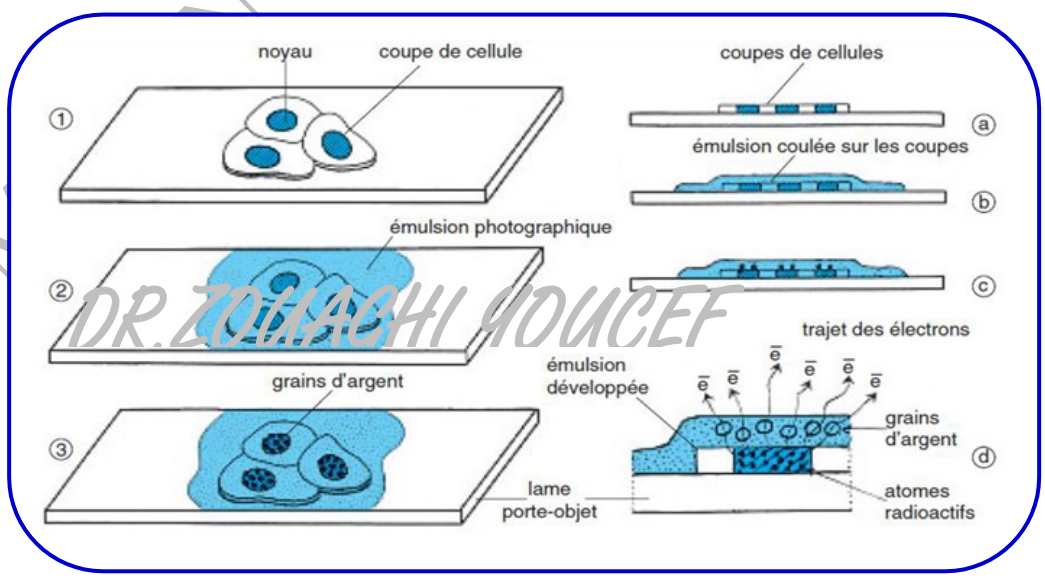
شكل 3: التجزئة الخلوية بواسطة ما فوق الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة

2- التصوير الإشعاعي الذاتي (Autoradiographie) [شكل 4]

تعتمد تقنية التصوير الشعاعي الذاتي على استخدام مادة استقلابية طلائعية معلمة بنظير مشع (مادة أيضية تحتوي على ذرة مشعة) ، والتي ترسل إشعاعات يكشف عنها بواسطة مستحلبات فوتوغرافي.
تسمح هذه التقنية بتحديد مقر تشكل جزيئة ما و متابعة مسارها أو تحولاتها داخل الخلية.

➢ المراحل

- حقن مادة مشعة (تحتوي عادة على C14 أو H3 = تريتيوم) في العضوية أو عضو معزول. يمكن كذلك حضن خلايا في وسط به هذه المادة المشعة.
- قتل الحيوان و إنجاز مقاطع في الأنسجة المراد دراستها ، أو أخذ خلايا مزروعة. تثبت العينة و يتم التخلص من المادة المشعة غير المدمجة عن طريق الغسل.
- تغطية العينة بمستحلب فوتوغرافي (خليط من الجيلاتين وبلورات بروموز الفضة « BrAg»). يتم الاحتفاظ بالعينة المعاملة لعدة أيام أو عدة أسابيع في الظلام. خلال هذه الفترة، يقوم الإشعاع المنبعث من العناصر المشعة؛ بتحويل BrAg إلى Ag (فضة معدنية),
- بعد تحميض الفيلم ، يلاحظ بالمجهر وجود حبيبات داكنة تقع فوق البنيات الحاوية على العنصر المشع (تحديد موقع الجزيئات التي أدمجت العنصر المشع).



شكل 4 : مبدأ التصوير الإشعاعي الذاتي

DR.ZOUAGHI YOUCEF
UFM - SNV-TC-1ère LMD - 2022-2023

في الشكل 4 ، طبقت تقنية التصوير الإشعاعي الذاتي على مقاطع محضرة للفحص بالمجهر الضوئي . الخلايا المدروسة قبل معالجتها، قامت بإدماج مادة سابقة (précurseur) مشعة تدخل في بناء الـ ADN (thymidine tritiée) ، بحيث تظهر الأنوية فقط معلمة (marqués) بعد تحميض المستحلب الفوتوغرافي (développement de l'émulsion). (1) مقاطع من خلايا معلمة تم لصقها على شريحة زجاجية. (2) صب مستحلب فوتوغرافي على القاطع في الظلام. (3) هيأة مقاطع الخلايا بعد تحميض المستحلب. (a) ، (b) و (c): المظهر المقطعي للمستحضرات 1 ، 2 و 3 ؛ (d): منطقة مكبرة من (c).

3- الطرق المناعية Méthodes immunologiques

تعتمد التقنيات المناعية على تفاعل مولد- جسم مضاد. تستخدم هذه التقنيات لإبراز بدقة مواضع الجزيئات المختلفة على مستوى الخلية.

تعلم الأجسام المضادة بواسطة جزيئات تسمح بتحديد موضعها داخل الخلية. قد تكون هذه المعلمات (marqueurs):

- ملونات مفلورة (fluorescéine أو rhodamine)
- نظائر المشعة
- انزيمات (phosphatase alcaline أو peroxydase)

اعتمادًا على المعلمات المستخدمة ، هناك 3 أنواع من التقنيات المناعية:

3-1- تقنية المناعة الإنزيمية (Immunoenzymologie)

تعرف باسم ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). في هذا التفاعل، يعلم مولد الضد أو الجسم المضاد بواسطة إنزيم، الذي يسمح بتحويل مادة تفاعل (substrat) غير ملونة إلى ناتج (produit) ملون.

3-2- تقنية المناعة الإشعاعية (Radio-immunologie)

تعرف أيضًا باسم RIA (Radio-Immuno-Assay) تعتمد على إستعمال معلم مشع (marqueur radioactif). تطبق هذه التقنية بشكل أقل بسبب أن إستخدامها من طرف البيولوجيين يتطلب حصولهم على إعتمادا وبسبب مشكلة النفايات المشعة.

3-3- تقنية التفلور المناعي (Immunofluorescence) [شكل 5]

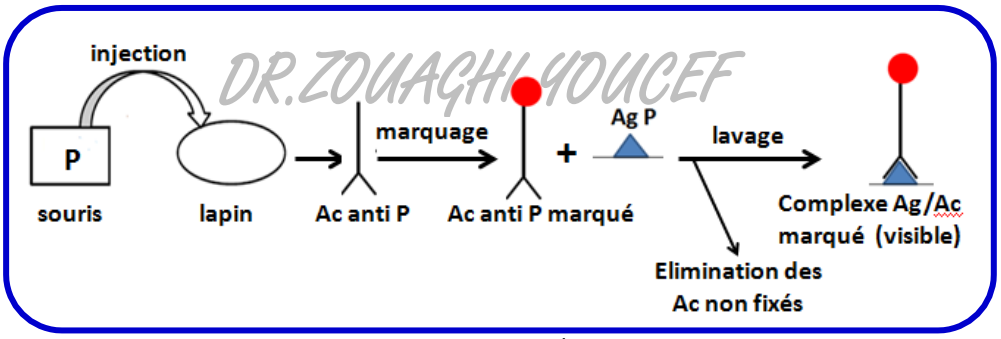
تستعمل تقنية التفلور المناعي أجساما مضادة نوعية و ملونات مفلورة (fluorochromes) لإظهار الجزئيات البيولوجية في المستحضرات الخلوية أو النسيجية. تتطلب الدراسة إستعمال المجهر المفلور (MO à fluorescence) [شكل5]

➢ المراحل

للكشف عن المادة P في الخلية ، يجب اتباع الخطوات التالية:

- أخذ بروتين P من فأر و حقنه في حيوان آخر (أرنب) لإنتاج أجسام مضادة لـ P.
- تثبيت مادة مفلورة (fluorescéine) على الجسم المضاد لـ P
- بعد إضافة الأجسام المضادة المفلورة للمحضر الخلوي، تتثبت على مولد الضد P مشكلة معقد مولد ضد – جسم مضاد مفلور.
- تسمح الملاحظة تحت الأشعة فوق البنفسجية للمجهر الضوئي المفلور، تحديد موضع P ، بفضل الفلورة المنبعثة من الـ fluorescéine.

UFMC - SNV-TC-1ère LMD - 2022-2023



شكل 5: المبدأ العام للتفلور المناعي

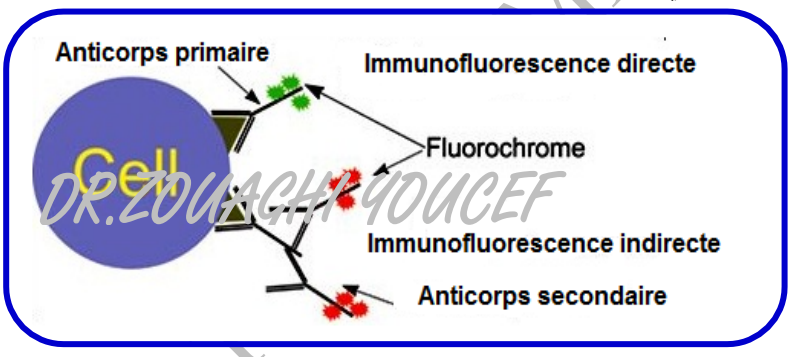
يمكن أن تكون تقنية التفلور المناعي مباشرة أو غير مباشرة [الشكل 6].

- ✓ **الطريقة المباشرة:**

في هذه الطريقة ، الجزيئة المراد الكشف عنها، تقترن مباشرة بالجسم المضاد المعلم.

- ✓ **الطريقة غير المباشرة:**

يتم ربط المعلم (le marqueur) بجسم مضاد ثان (جسم مضاد ثانوي) خاص بالجلوبيولينات المناعية للنوع المنتج للجسم المضاد الأولي.



الشكل 6: مبدأ الفلورة المناعية المباشرة و غير المباشرة

UFMC - SNV - LMD - 2022-2023