الفصل الثاني: طرق دراسة الخلية
TD N°3: التجزئة الخلوية، التصوير الإشعاعي الذاتي و التفلور المناعي

1- التجزئة الخلوية Cellular fractionation

تتمثل تقنية التجزئة الخلوية في فصل المكونات المختلفة للخلية، من أجل تحليل بنيتها و وظيفتها. تتم في مرحلتين:

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

1-1- المجانسة أو الطحن Homogenization or grinding [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 (cell homogenate) يحتوي على جميع مكونات الخلية.

> مسحوق خلوي متجانس = عضيات معلقة + بقايا خلوية (بقايا البنيات التحتية) + مكونات بيوكيميائية في محلول.

للحصول على مسحوق خلوي متجانس، توضع الخلايا في أنبوب إختبار به محلول متساوي التوتر(isotonic) 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.

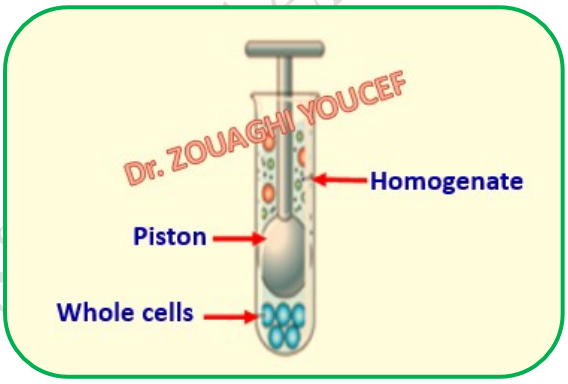

Figure 1 : Mechanical homogenization by a piston
شكل 1: طحن ميكانيكي بواسطة مكبس

2-1- 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:

- الطرد المركزي التفاضلي
- الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة

➢ الطرد المركزي التفاضلي Differential centrifugation [شكل2]

- يخضع المسحوق الخلوي المتجانس إلى سلسلة من عمليات الطرد المركزي ذات أزمنة و سرعات متزايدة.

UFMC1 - SNV - 1ère EMD - 2024-2025

- يتم تجزئة المستخلص الأولي إلى سلسلة من الرواسب (Pellets) والسوائل الطافية (supernatants).
- تتوقف سرعة ترسيب الجسيمات (عضيات، جزيئات ضخمة،...) على حجمها، شكلها و كثافتها، بحيث تشكل الجسيمات الأكبر حجما والأكثر كثافة في المستخلص الخلوي أول راسب (the first pellet).
- تحدد سرعة الترسيب بواسطة معامل الترسيب المعبر عنه بوحدة Svedberg (S).

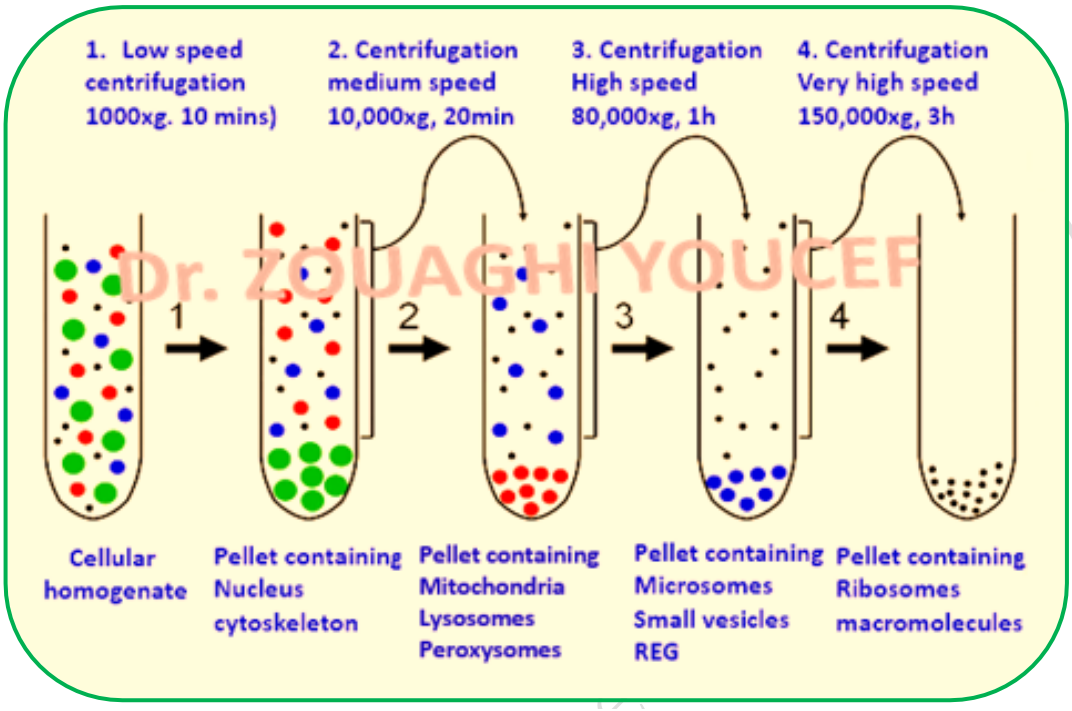

Figure 2: Cell fractionation by differential centrifugation and ultracentrifugation
شكل 2 : التجزئة الخلوية بواسطة الطرد المركزي و ما فوق الطرد المركزي

➢ الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة Density gradient centrifugation [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 و يتناقص 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).

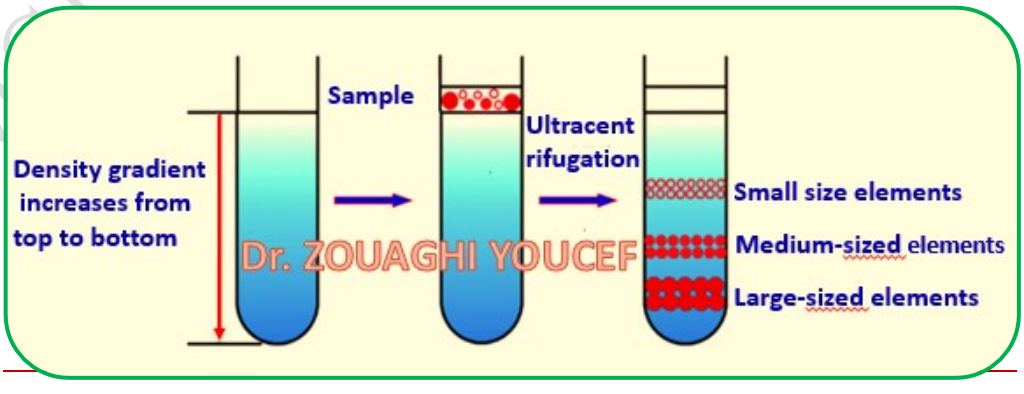

Figure 3: Cell fractionation by density gradient ultracentrifugation
شكل 3: التجزئة الخلوية بواسطة ما فوق الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة

2- التصوير الإشعاعي الذاتي Autoradiography [شكل 4]

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

➢ المراحل The steps

- 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 برومور 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 المستحلب ، يلاحظ بالمجهر وجود حبيبات داكنة تقع فوق البنيات الحاوية على العنصر المشع (تحديد موقع الجزيئات التي أدمجت العنصر المشع).

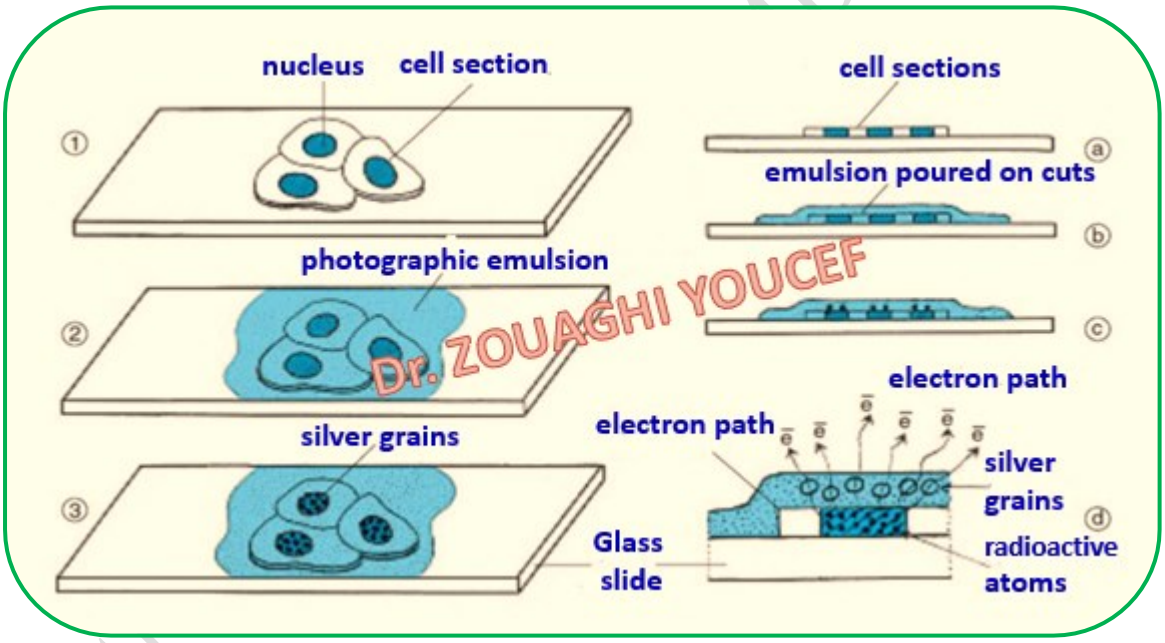

Figure 4 : Principle of autoradiography
شكل 4: مبدأ التصوير الإشعاعي الذاتي

في الشكل 4 ، طبقت تقنية التصوير الإشعاعي الذاتي على مقاطع محضرة للفحص بالمجهر الضوئي . الخلايا المدروسة قبل معالجتها، قامت بإدماج مادة سابقة (precursor) مشعة تدخل في بناء الـ DNA (tritiated thymidine) ، بحيث تظهر الأنوية فقط معلمة (marked) بعد تحميض المستحلب الفوتوغرافي (development of the emulsion). (1) مقاطع من خلايا معلمة تم لصقها على شريحة زجاجية. (2) صب مستحلب فوتوغرافي على المقاطع في الظلام. (3) هيئة مقاطع الخلايا بعد تحميض المستحلب. (a) ، (b) و (c): المظهر المقطعي للمستحضرات 1 ، 2 و 3 ؛ (d): منطقة مكبرة من (c).

3- التفلور المناعي Immunofluorescence

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

➢ المبدأ العام General principle [شكل 5]

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 (fluorescein) 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 fluorescein.

يمكن أن تكون تقنية التفلور المناعي مباشرة [شكل 6] أو غير مباشرة [شكل 7].

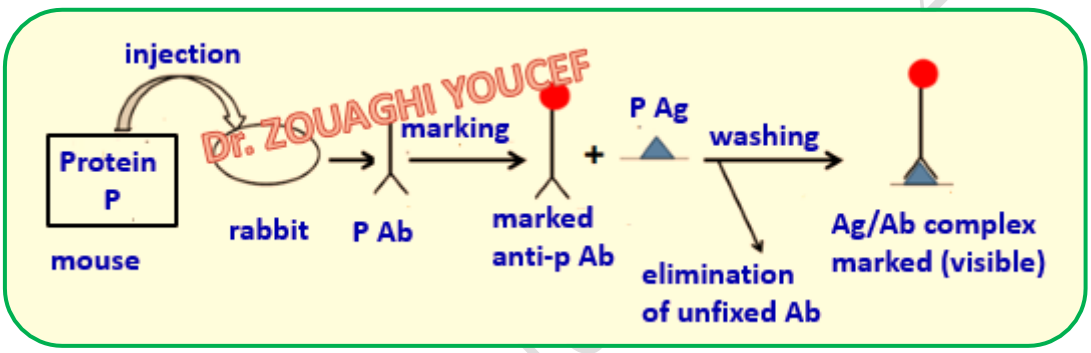

Figure 5 : General principle of immunofluorescence
شكل 5: المبدأ العام للتفلور المناعي

التفلور المناعي المباشر Direct immunofluorescence [شكل 6]

- يعرف الجسم المضاد النوعي لمولد الضد بالجسم المضاد الأولي.
- يتم التفاعل في خطوة واحدة.
- تستخدم هذه الطريقة المباشرة إذا كانت كمية مولد الضد في المقطع أو الخلايا معتبرة.

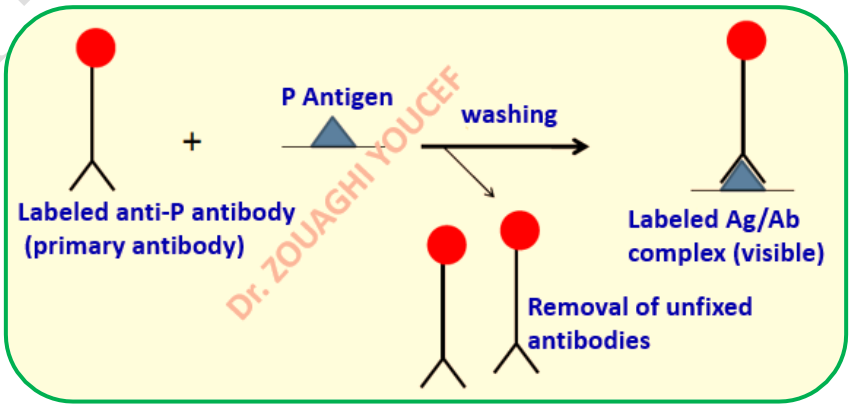

Figure 6: Principle of direct immunofluorescence
الشكل 6: مبدأ الفلورة المناعية المباشرة

UFMC1 - SNV TC - 2024-2025

التفلور المناعي غير المباشر Indirect immunofluorescence [شكل 7]

- في هذه الطريقة يستخدم على التوالي إثنان من الأجسام المضادة.
- الجسم المضاد الأولي الذي يرتبط بمولد الضد لا يكون معلما.
- يكشف عن الجسم المضاد الأولي بواسطة الجسم المضاد الثانوي الذي يكون معلما.
- أهمية هذه الطريقة هو السماح بتضخيم التعليم (amplification of marking). جزيئة واحدة من الجسم المضاد الأولي، تتعرف عليها العديد من جزيئات الجسم المضاد الثانوي المعلمة.

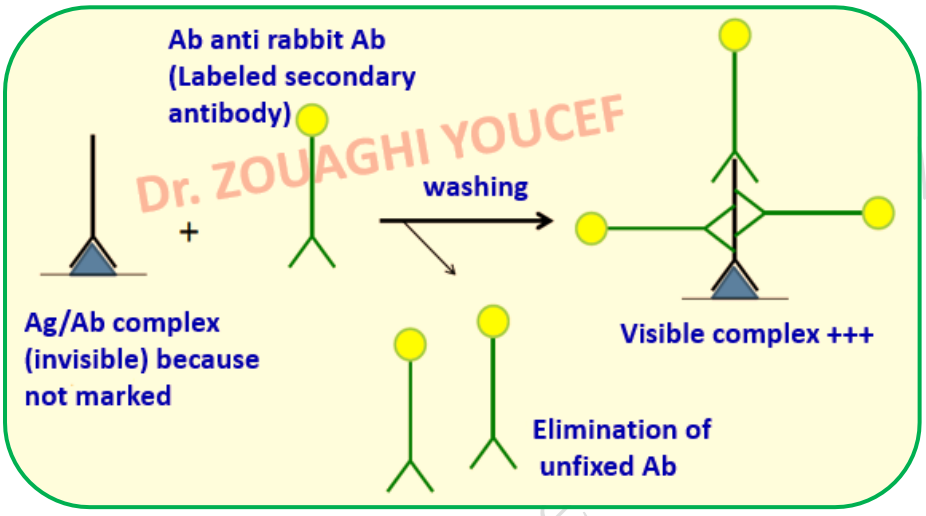

Figure 7: Principle of indirect immunofluorescen

الشكل 7: مبدأ الفلورة المناعية غير المباشرة

Dr. ZOUAGHI YOUCEF
UFMC1 - SNV-TC-1ère 24-2025