

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

### 1- التجزئة الخلوية

- 1- تتمثل تقنية التجزئة الخلوية من فصل المكونات المختلفة للخلية، من أجل تحليل بنيتها ووظيفتها. تتم في مرحلتين:
- المجانسة (Homogénéisation): سحق الخلايا
  - التنقية (Purification): فصل العضيات الخلوية بواسطة الطرد المركزي أو ما فوق الطرد المركزي.

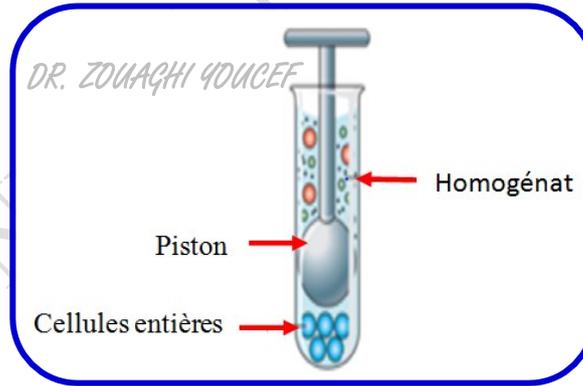
#### 1-1- المجانسة أو الطحن (Homogénéisation ou broyage) [شكل 1]

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 cellulaire) 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 (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 السيترولازم. يعتبر محلول سكروز تركيزه 0.25 مول وسط متساوي التوتر إتجاه معظم العضيات الحويصلية.



شكل 1: طحن ميكانيكي بواسطة مكبس

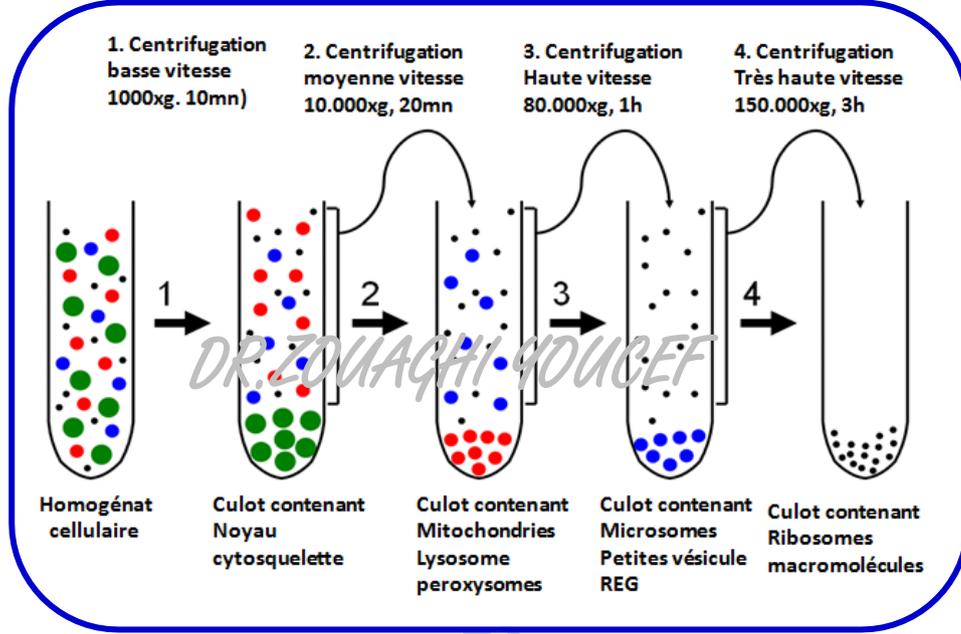
#### 2-1- التنقية (Purification)

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 [شكل 2]**

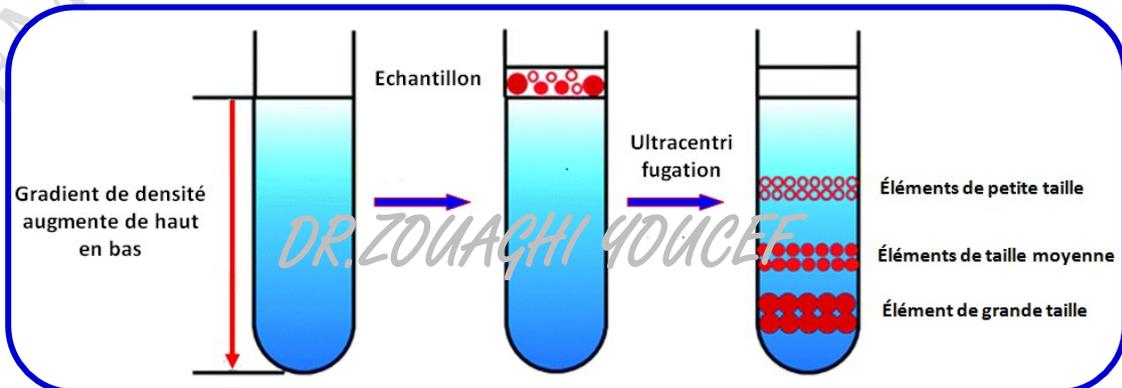
- يخضع المسحوق الخلوي المتجانس إلى سلسلة من عمليات الطرد المركزي ذات أزمنة و سرعات متزايدة.
- يتم تجزئة المستخلص الأولي إلى سلسلة من الرواسب (culots) والسوائل الطافية (surnageants).
- تتوقف سرعة ترسيب الجسيمات (عضيات ، جزيئات ضخمة،...) على حجمها، شكلها و كثافتها ، بحيث تشكل الجسيمات الأكبر حجما والأكثر 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 [شكل 3]**

- 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).



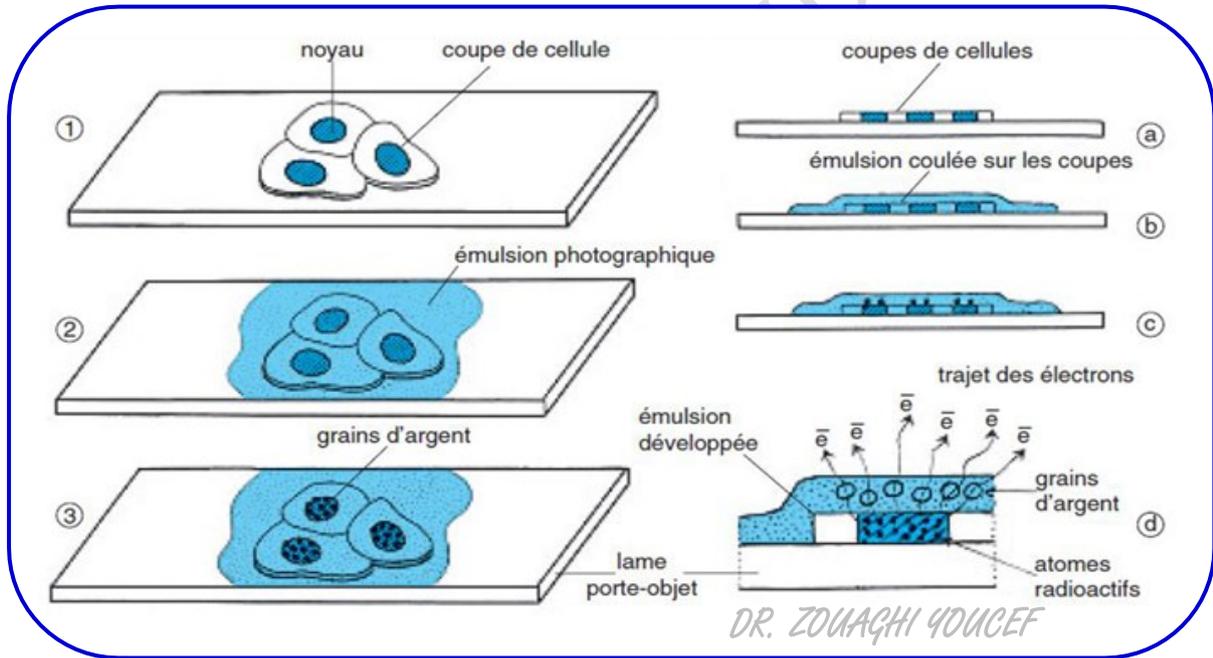
شكل 3: التجزئة الخلوية بواسطة ما فوق الطرد المركزي على وسط متدرج الكثافة

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

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

### المراحل

- حقن مادة مشعة (تحتوي عادة على  $C^{14}$  أو  $H^3$  = تريتيوم) في العضوية أو عضو معزول. يمكن كذلك حضان خلايا في وسط به هذه المادة المشعة.
- قتل الحيوان وإنجاز مقاطع في الأنسجة المراد دراستها ، أو أخذ خلايا مزروعة. تثبت العينة ويتم 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 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

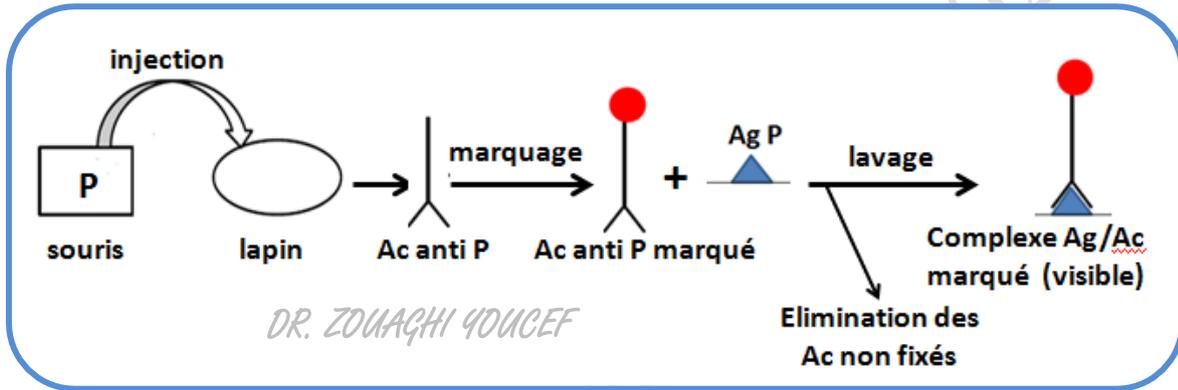
في الشكل 4 ، طبقت تقنية التصوير الإشعاعي الذاتي على مقاطع محضرة للفحص بالمجهر الضوئي . الخلايا المدروسة قبل معالجتها، قامت بإدماج مادة سابقة (précurseur) مشعة تدخل في بناء الـ ADN (thymidine tritiée) ، بحيث تظهر الأنوية فقط معلمة (marqués) بعد تحميض المستحلب الفوتوغرافي ( développement de l'émulsion ). (1) مقاطع من خلايا معلمة تم لصقها على شريحة زجاجية. (2) صب مستحلب فوتوغرافي على القاطع في الظلام. (3) 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) [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) [شكل 5]

#### 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، تثبت 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.

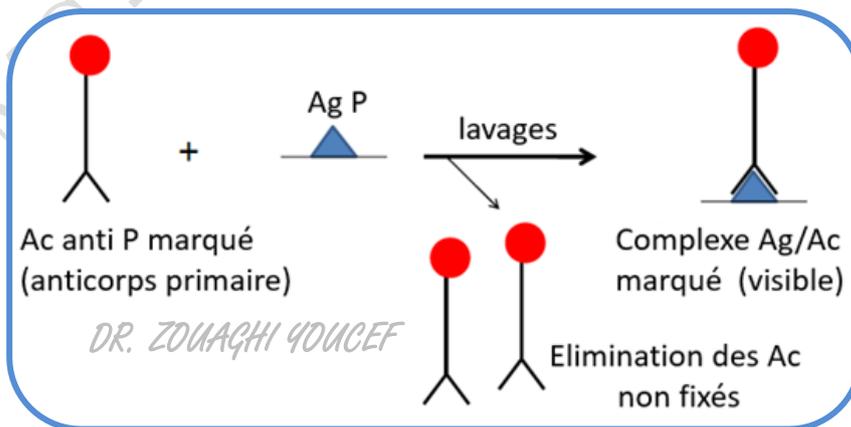


شكل 5: المبدأ العام للتفلور المناعي

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

#### التفلور المناعي المباشر: [شكل 6]

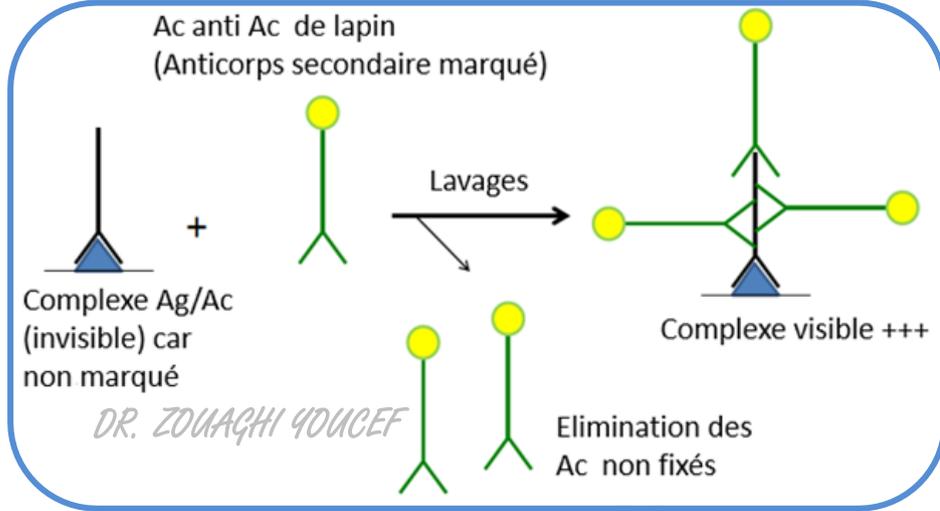
- يعرف الجسم المضاد النوعي لمولد الضد بالجسم المضاد الأولي.
- يتم التفاعل في خطوة واحدة.
- تستخدم هذه الطريقة المباشرة إذا كانت كمية مولد الضد في المقطع أو الخلايا معتبرة.



الشكل 6: مبدأ الفلورة المناعية المباشرة

✓ **التفلور المناعي غير المباشر:** [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 du marquage). جزيئة واحدة من الجسم المضاد الأولي، تتعرف عليها العديد من جزيئات الجسم المضاد الثانوي المعلمة.



الشكل 7: مبدأ التفلور المناعية غير المباشرة