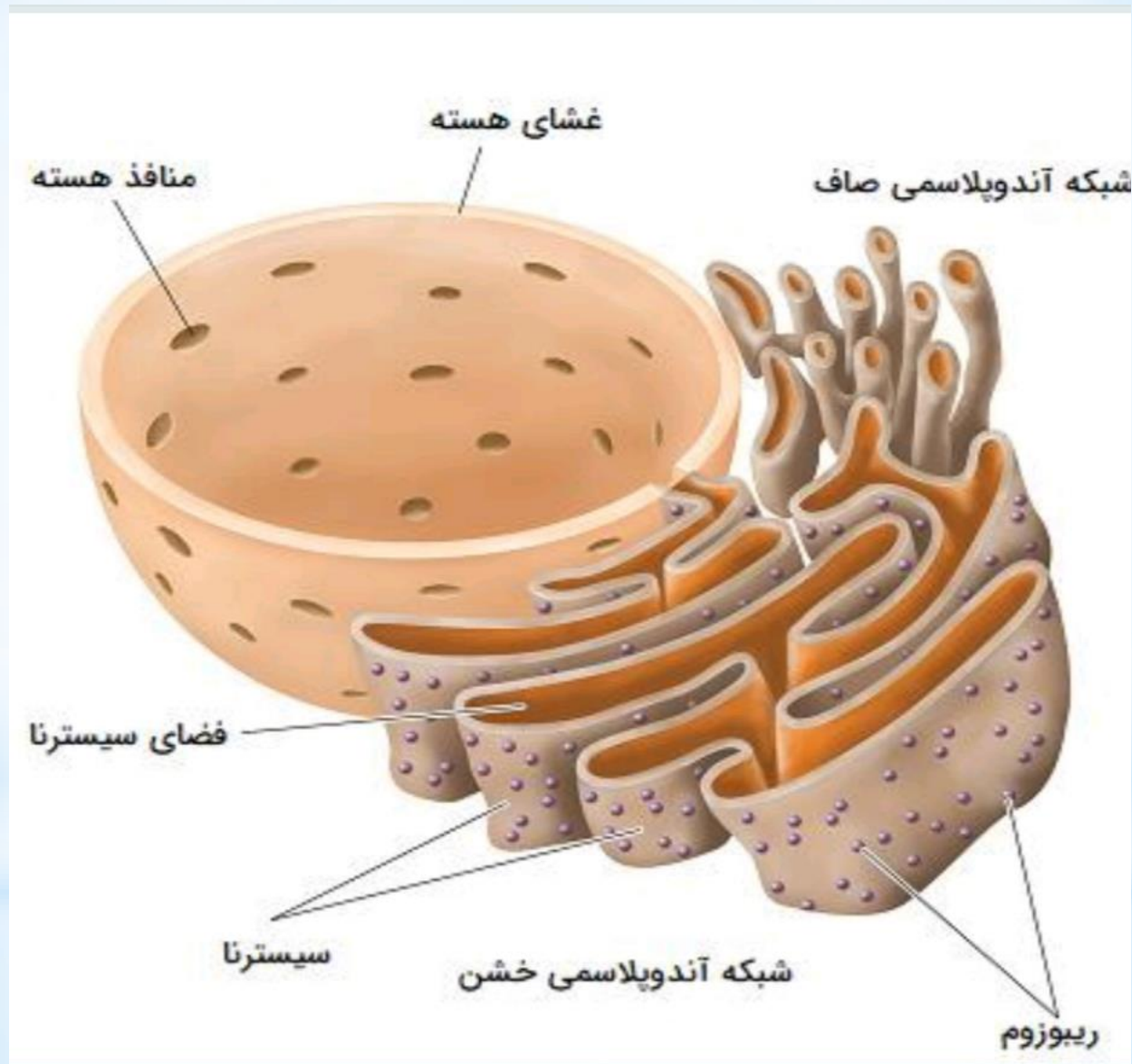




University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

مشاهده غیر مستقیم شبکه آندوپلاسمیک خشن (Rough Endoplasmic Reticulum)



اهداف

شناسایی سلول مناسب جهت مشاهده غیر

مستقیم RER

آماده سازی سلول جهت مشاهده غیر مستقیم

جایگاه RER

شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار یا خشن

شبکه آندوپلاسمی بزرگترین اندامک داخل سلولی محسوب میشود. فضای داخل شبکه آندوپلاسمی لومن نام دارد این فضا اغلب همگن و از ماده زمینه‌ای سیتوپلاسمی، تراکم کمتری دارد.

غشای خارجی هسته با شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار در ارتباط است. غشای شبکه آندوپلاسمی شباهت زیادی به غشای سیتوپلاسمی دارد. با این اختلاف که ضخامت کمتری داشته و مقدار پروتئین آن بیشتر از مقدار لیپید است. استخراج لیپیدهای غشای پلاسمایی موجب در هم ریختن ساختمان پلاسمالما می‌گردد. ولی استخراج لیپیدهای غشای شبکه آندوپلاسمی موجب در هم ریختن آن نمی‌شود.

ساختار دانه مانند متصل به RER، ریبوزوم‌ها هستند. که در سنتز پروتئین‌ها بخصوص پروتئین‌های ترشحی و در پردازش بعدی آنها دخالت دارند. سلول‌های ترشحی در جانوران، شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار توسعه یافته‌ای دارند در حالیکه در سلول‌های گیاهی این شبکه گسترش کمتری دارد.

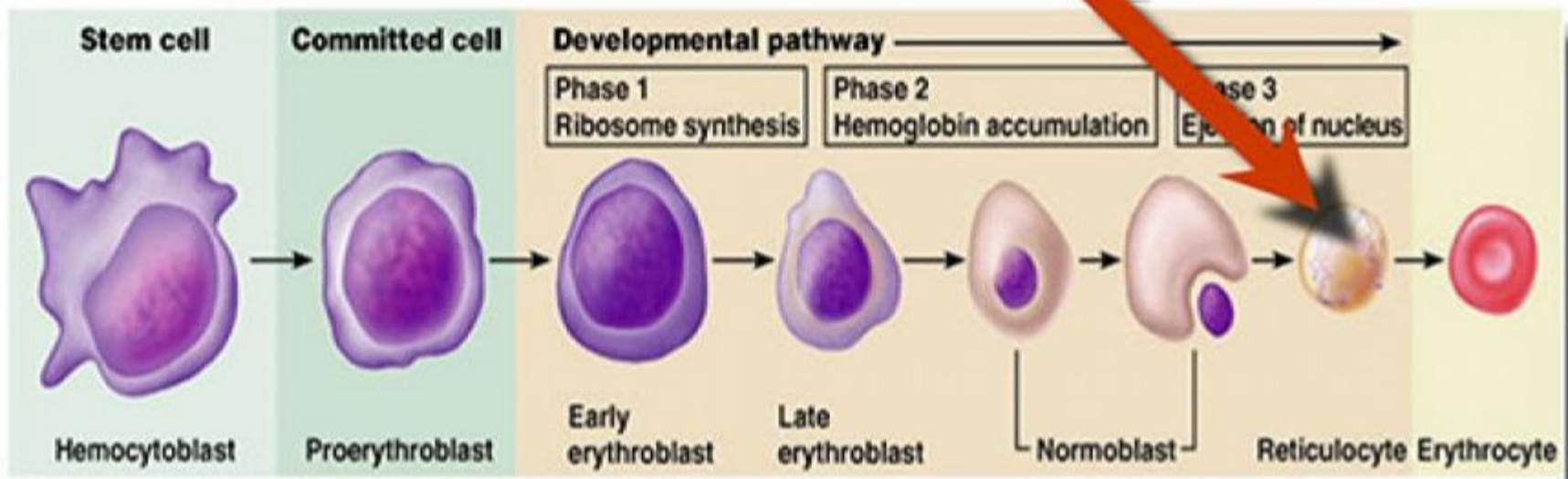
به دلیل بالا نبودن میزان قدرت تفکیک میکروسکوپ‌های نوری نمی‌توان شبکه آندوپلاسمیک خشن را به طور مستقیم در این میکروسکوپ‌ها شناسایی و مشاهده کرد. بنابراین با استفاده از تکنیک‌های رنگ آمیزی حیاتی به طریقی جالب و سیتولوژیک ساختار این اندامک سیسترنی را رنگ آمیزی و جایگاه آن را مشاهده خواهید کرد.

انتخاب سلول مناسب جهت مشاهده RER

اگر سلول‌های بافت خونی را بررسی کنیم طبیعتاً حدس می‌زنید که این ساختار باید در گلبول‌های سفید بررسی شوند، اما به دلیل بزرگی هسته‌این سلول‌ها و محدود بودن سیتوپلاسم و تراکم بالای اندامک‌های درون‌سلولی، گلبول‌های سفید جهت انجام این آزمایش مناسب نیستند. سلول‌های رتیکولوسیت (Reticulocyte) سلول‌های مناسب جهت بررسی ساختار شبکه آندوپلاسمیک خشن به صورت غیرمستقیم می‌باشند. این سلول‌ها گلبول‌های قرمز نابالغی هستند که یک مرحله قبل از پایان تکامل گلبول‌های قرمز بالغ قرار دارند و هنوز بقایای اندامک‌های درون‌سلولی در آنها وجود دارد. این سلول‌ها دارای قطری معادل ۹ میکرون بوده و کمی از گلبول‌های قرمز بزرگ‌ترند و حاوی تعدادی میتوکندری، دو عدد سانتریول، بقایای دستگاه گلژی، پلی‌ریبوزوم‌ها و بقایای شبکه آندوپلاسمیک خشن می‌باشند. بنابراین تراکم اندامکی نسبتاً کمی دارند.

اگر بتوانیم به طریقی پروتئین‌های موجود در ریبوزوم که موسوم به ریبونوکلوپروتئین (Ribonucleoprotein) در rRNA هستند را رسوب دهیم، به طور غیرمستقیم می‌توانیم به محل استقرار شبکه آندوپلاسمیک خشن پی ببریم و جایگاه آن‌ها را در سطح میکروسکوپ نوری شناسایی کنیم.

This is a reticulocyte



میزان سلول‌های رتیکولوسیت در افراد بالغ ۰.۵ تا ۱.۵ درصد و در افراد نابالغ و نوزادان ۲.۵ تا ۶ درصد می‌باشد. لازم به ذکر است که در صدمات منجر به جراحات و خونریزی این میزان تا ۳۵ درصد افزایش می‌یابد. جهت شمارش دقیق رتیکولوسیت‌ها آن‌ها را در ۱۰۰۰ گلبول قرمز شمرده و سپس درصد می‌گیرند. در هر میلی‌متر مکعب خون تعداد این سلول‌ها در خون تام حدود ۶۰۰۰۰ تا ۹۰۰۰۰ می‌باشد. شمارش این سلول‌ها اهمیت فوق العاده‌ای در دانستن فعالیت مغز استخوان در تولید سلول‌های گلبول قرمز دارد و گاهی ممکن است توسط پزشک برای فرد آزمایش شمارش رتیکولوسیت درخواست شود.

روش محاسبه درصد سلول‌های رتیکولوسیت:

$$\text{درصد رتیکولوسیت} = \frac{\text{تعداد رتیکولوسیت}}{\text{تعداد کل اریتروسیت یا RBC}} \times 100$$

رنگ مورد استفاده در این آزمایش کریزل آبی درخشان (Brilliant Cresyle blue) است. این رنگ یک رنگ حیاتی است و از آنجایی که rRNA ها حاوی ریبونوکلوپروتئین هستند، خاصیت اسیدی داشته و بازوفیل یا باز دوست می‌باشند و به دلیل غنی بودن از اسیدهای نوکلئیک با کریزل آبی درخشان واکنش داده و رسوب آبی تیره به صورت رشته‌های آبی یا گرانول‌های آبی ایجاد می‌کنند. برحسب این که رتیکولوسیت در کدام مرحله از تمایز باشد، میزان رسوب کمتر یا بیشتری خواهند داشت و از مشاهده محل رسوب می‌توان به محل و جایگاه شبکه آندوپلاسمیک خشن در سلول پی برد.

غیر از رنگ فوق رنگ دیگری به نام نیو متیلن بلو (New methylen blue) از دیگر معرف‌های شبکه آندوپلاسمیک خشن می‌باشد.

رنگ کریزل آبی درخشان به صورت ۱ درصد یعنی ۱ گرم پودر آن در ۱۰۰ سی سی NaCl ۹ در ۱۰۰۰ ساخته می‌شود.

NaCl ۹ در ۱۰۰۰ همان سرم فیزیولوژیک است که با حل شدن ۹ گرم نمک طعام در ۱۰۰۰ سی سی یا ۰.۹ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر بدست می‌آید. از سیترات سدیم نیز میتوان در ترکیب رنگ استفاده کرد که در این صورت از ۸۰ سی سی سرم فیزیولوژیک و ۲۰ سی سی سیترات سدیم استفاده میشود.

ساخت رنگ رتیلولوسیت

برلیانت کرزیل بلو ۱ گرم + ۲۰ سی سی تری سیترات سدیم ۳ درصد
+ ۸۰ سی سی کلور سدیم ۰.۹ درصد که بعد از صاف کردن آماده
استفاده است

یا

نیو متیلن بلو ۱ گرم + محلول سیترات سالین ۱۰۰ سی سی (۲۰ سی
سی سیترات سدیم ۳۰ گرم درصد + ۸۰ سی سی کلور سدیم ۰.۹
درصد یا ۹ گرم در لیتر)

روش = دو قطره محلول + دو قطره خون که ۲۰ دقیقه ۳۷ درجه قرار
داده و تهیه اسلاید و دیدن لام



مواد و وسایل

انکوباتور یا حمام بخار ۳۷ درجه

رنگ کریزل آبی درخشان

خون تام

لام و لامل

سرنگ

میکروسکوپ

لوله خونگیری حاوی ضد انعقاد

لوله آزمایش

پارافیلیم جهت بستن درب لوله آزمایش

روش کار

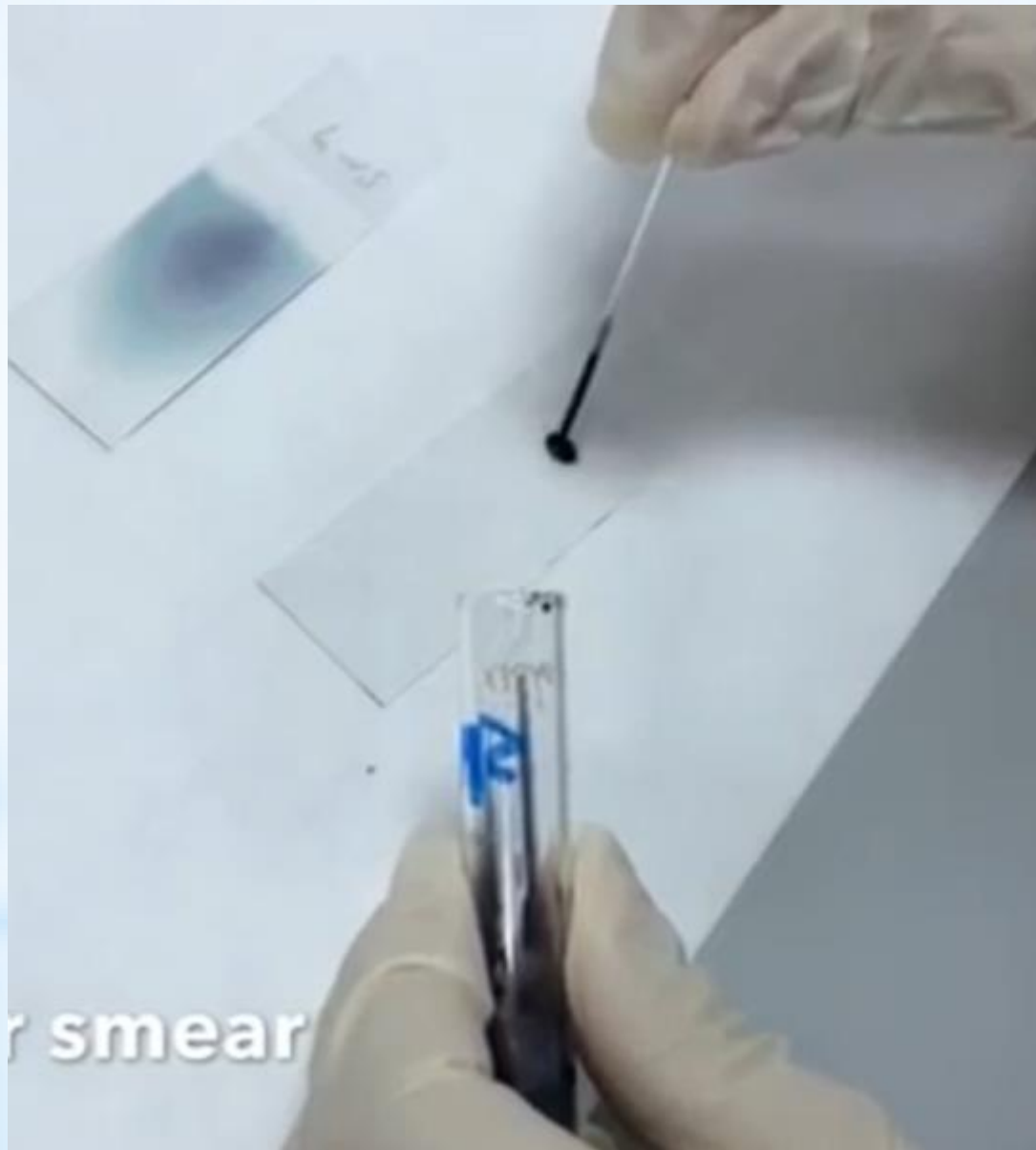
برای شناسایی سلول رتیکولوسیت و مشاهده بقایای جایگاه شبکه اندوپلاسمی خشن حدود ۱-۳ میلی لیتر خون از فرد بالغ گرفته میشود. خون استفاده شده در این آزمایش بایستی تازه باشد و اجزاء آن از هم جدا نشده باشند. یک قطره خون و یا در موارد کم خونی دو قطره خون با دو قطره رنگ کریزل آبی درخشان به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به آرامی مخلوط شود. در این مدت واکنش بین رنگ و ریبونوکلئوپروتئین های موجود در ریبوزوم ها صورت می گیرد و رسوب پروتئینی آبی رنگی بوجود می آید. یک قطره از مخلوط خون و رنگ را بر روی گوشه لام گذاشته و گستره یا اسمیر نازکی تهیه کنید. پس از خشک شدن لام در منطقه مناسبی که سلولها

تک تک قرار گرفته اند با استفاده از روغن ایمرسیون و با استفاده از عدسی ۱۰۰X سلول های رتیکولوسیت را که حاوی رسوب آبی تیره می باشند، شناسایی کنید. ضمن مشاهده آثار شبکه اندوپلاسمیک خشن در این سلول ها که بر حسب سن بلوغی و تمایز آن ها به سمت گلبول های قرمز بالغ متفاوت می باشد، میتوانید در صورت لزوم درصد سلول های رتیکولوسیت را در نمونه خون مورد بررسی محاسبه کنید.

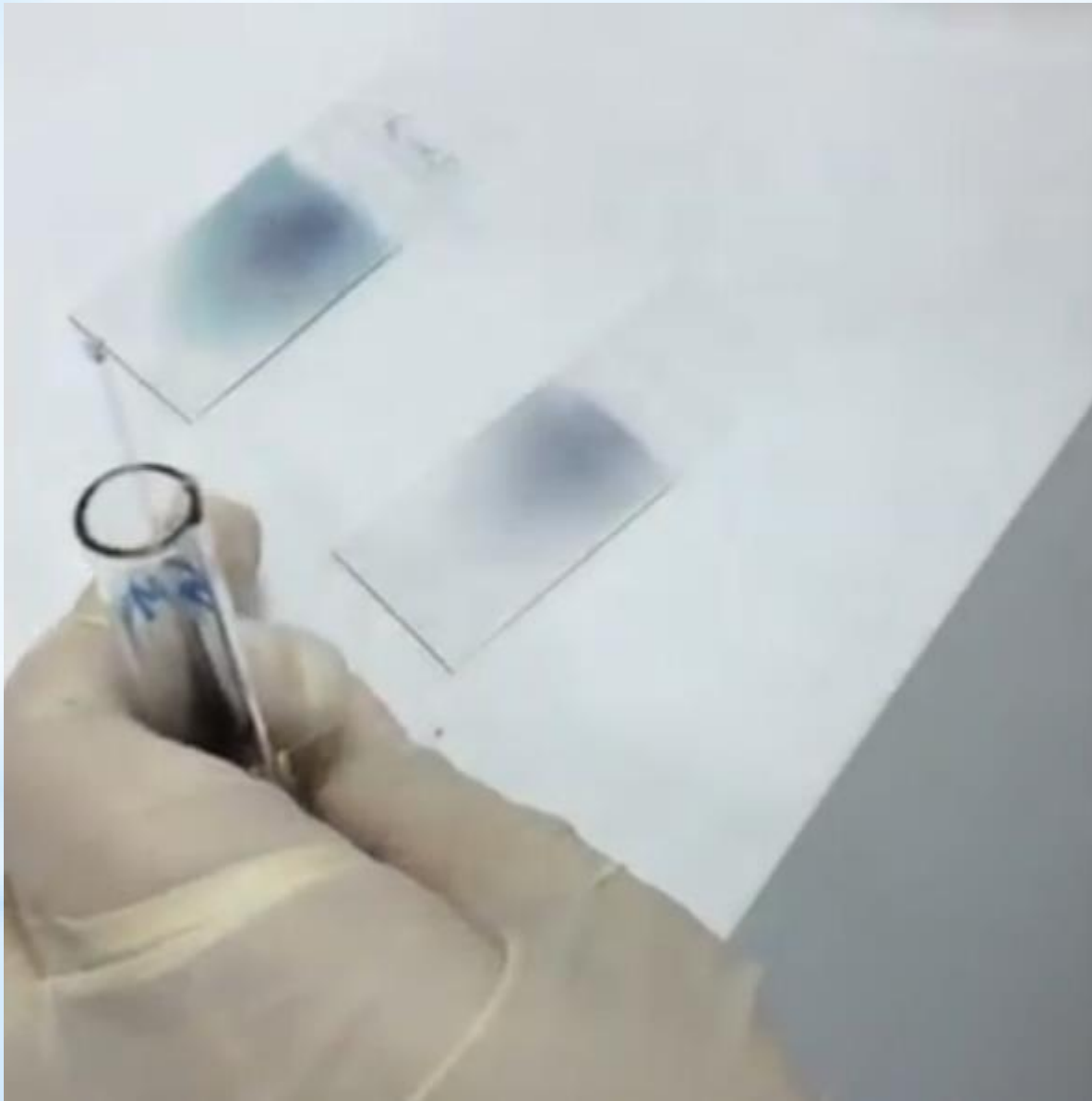




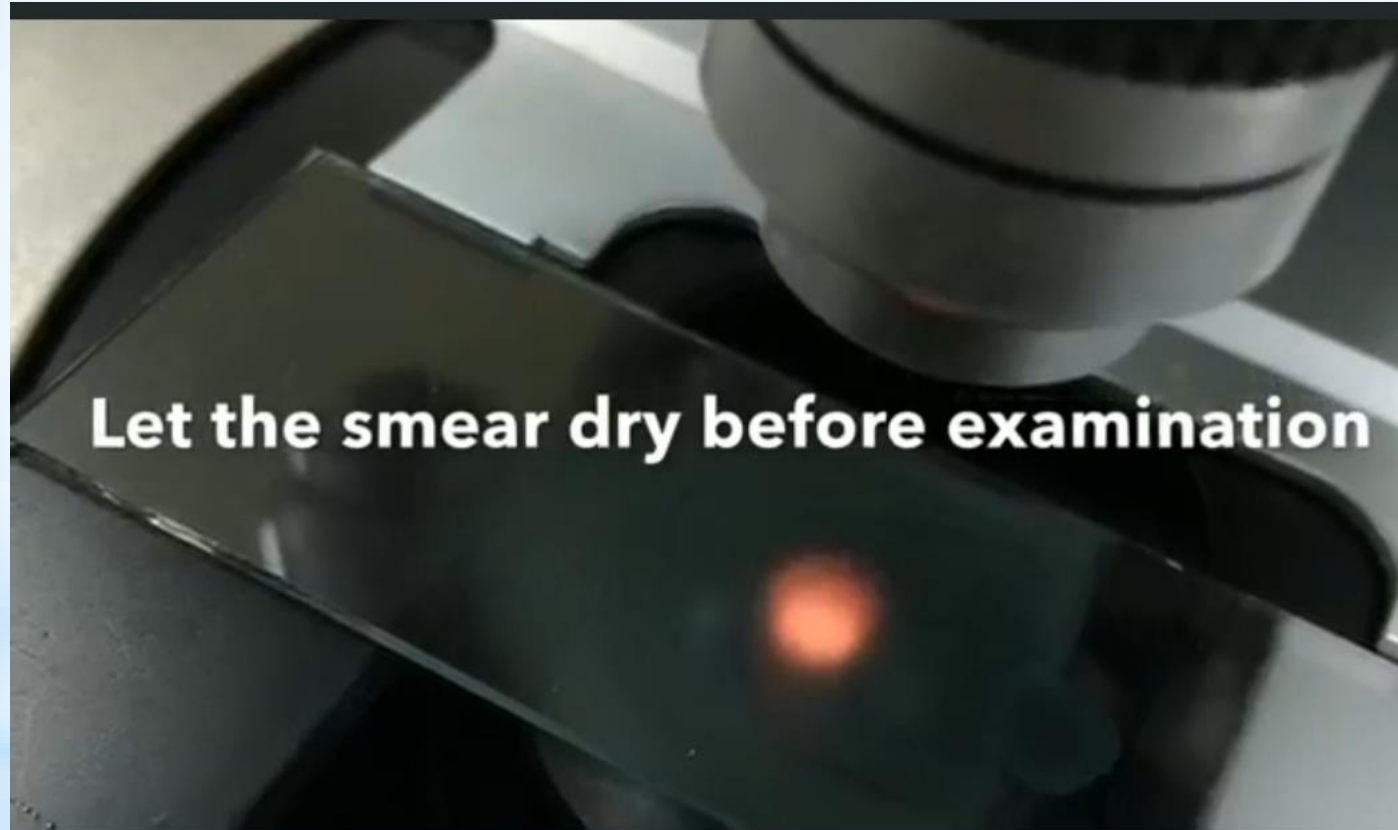


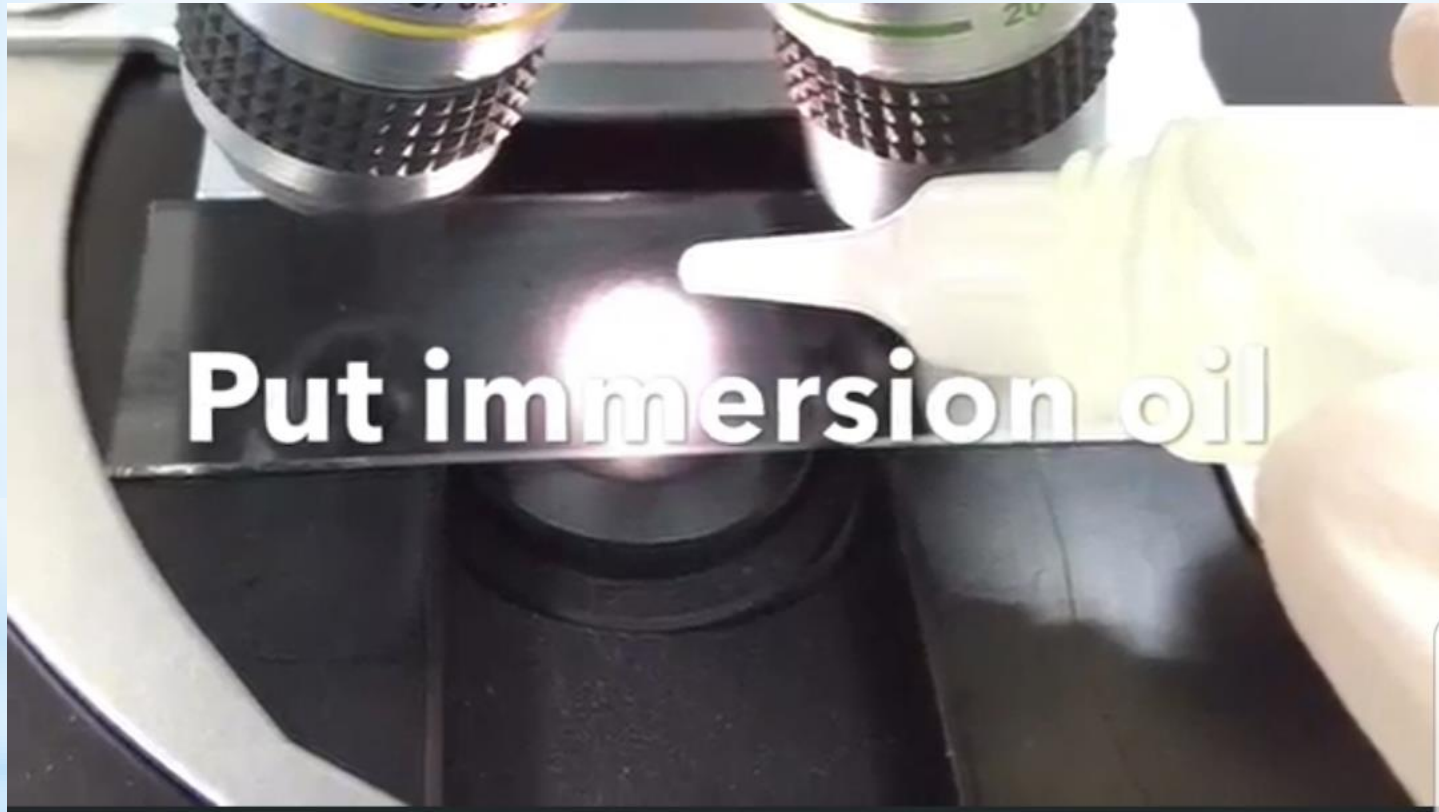


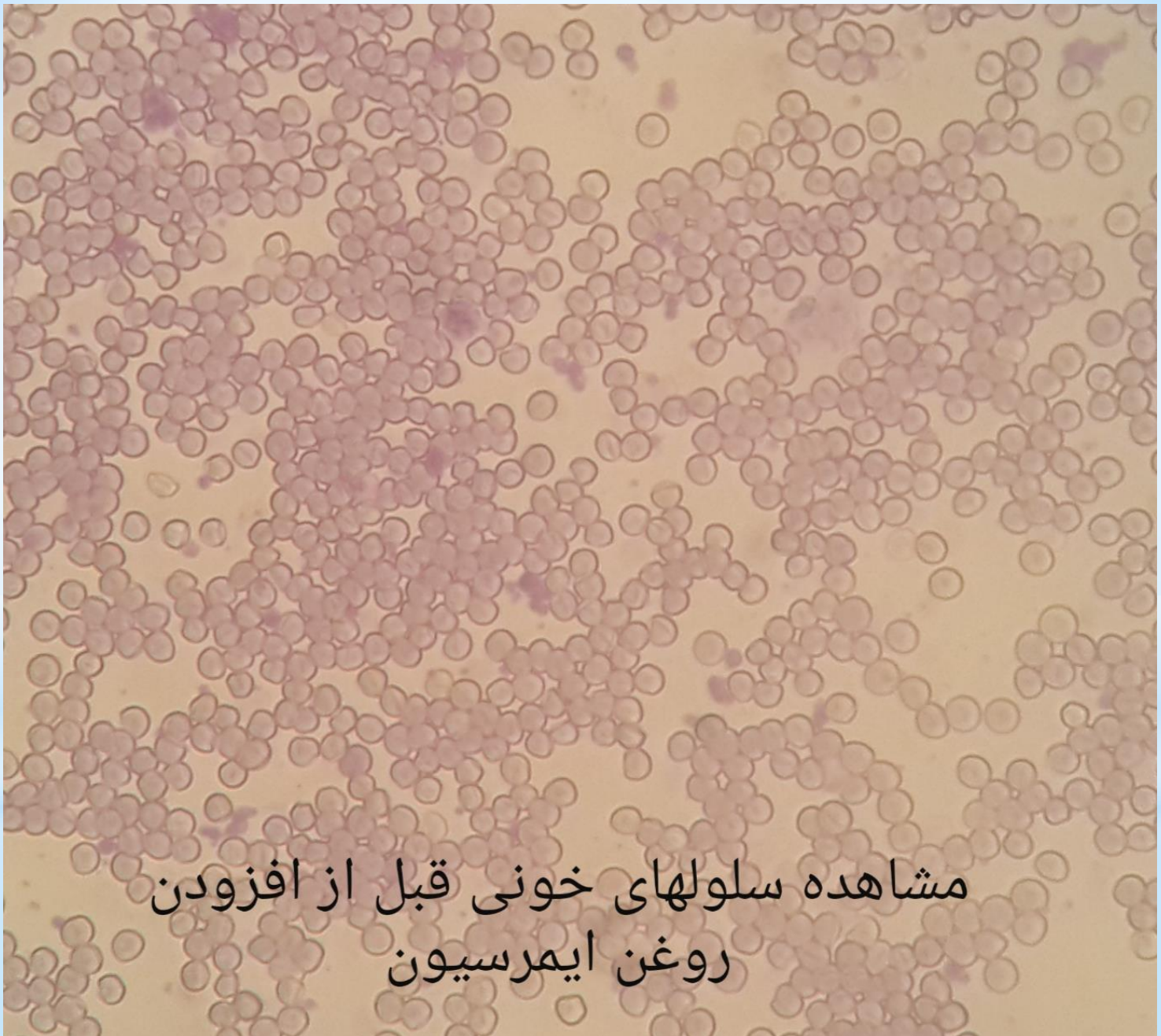




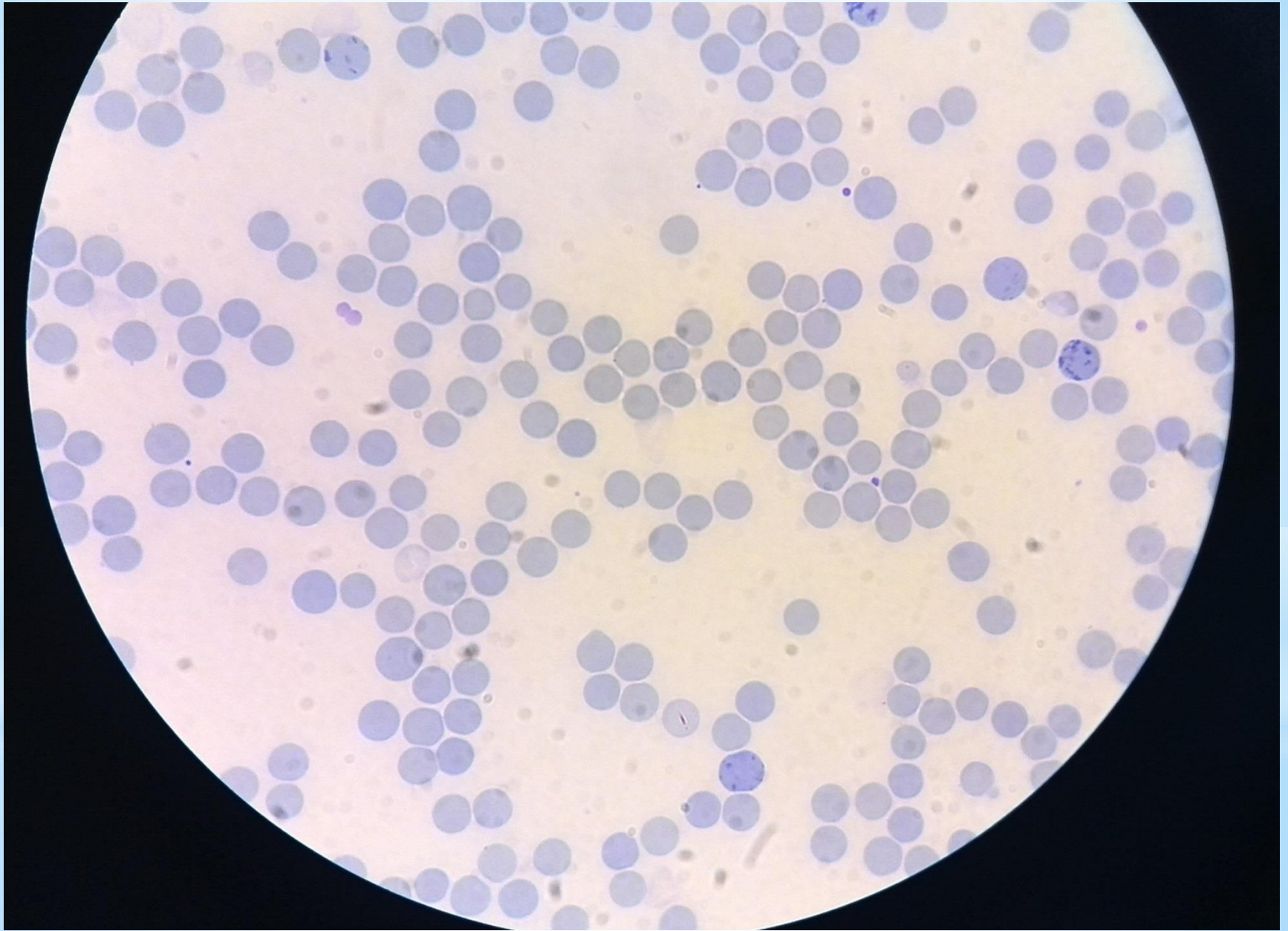




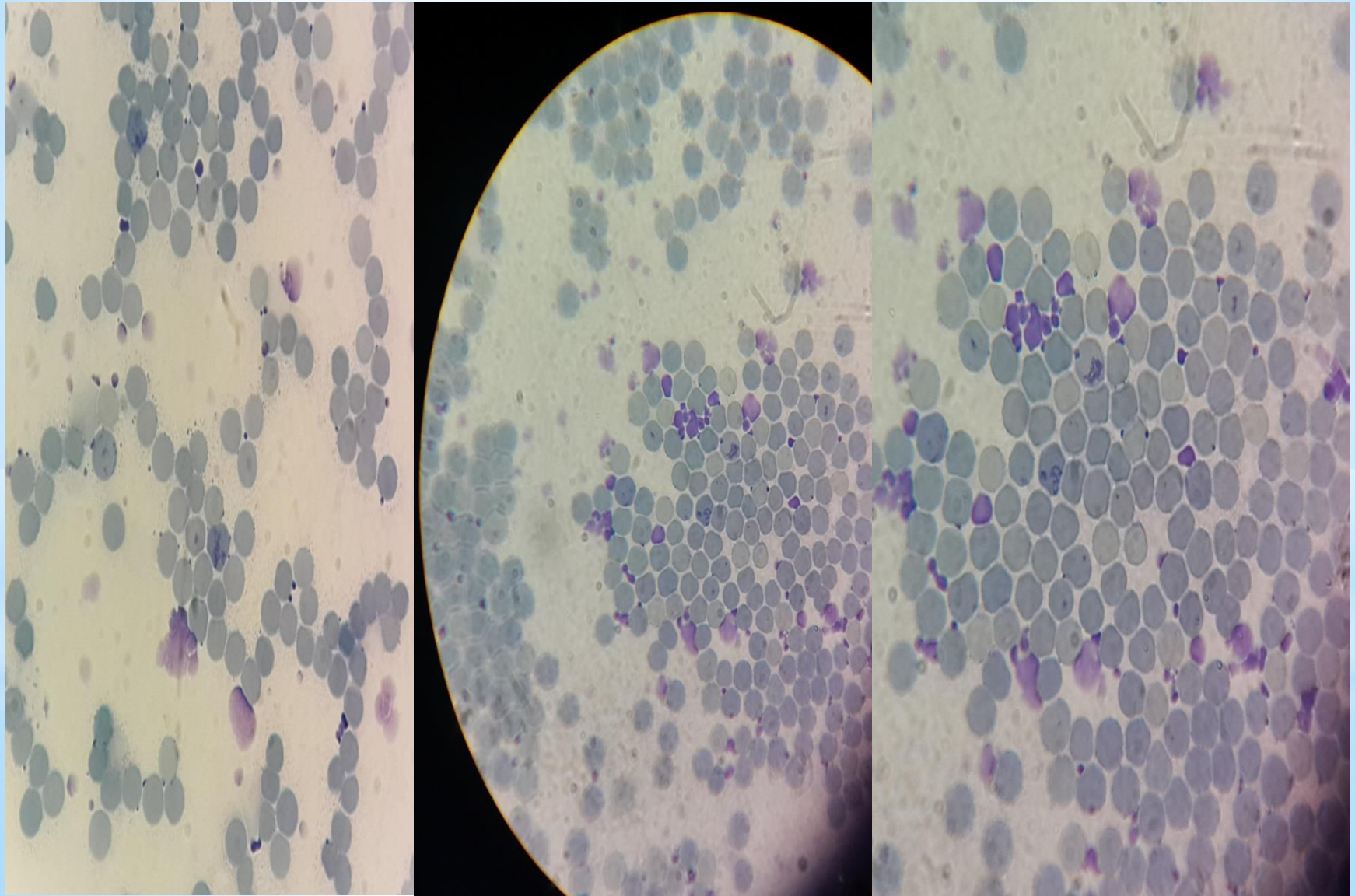




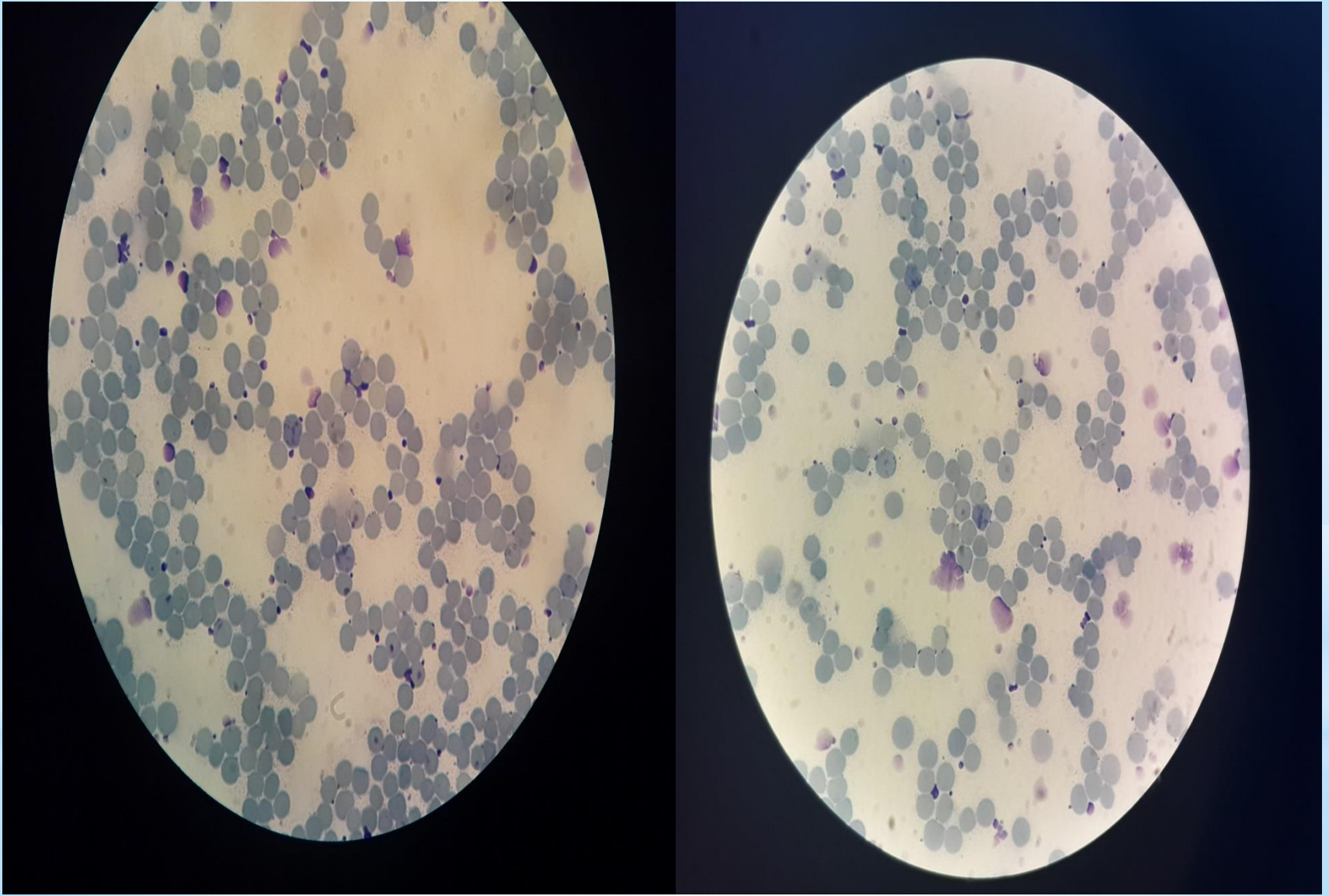
مشاهده سلولهای خونی قبل از افزودن
روغن ایمرسیون

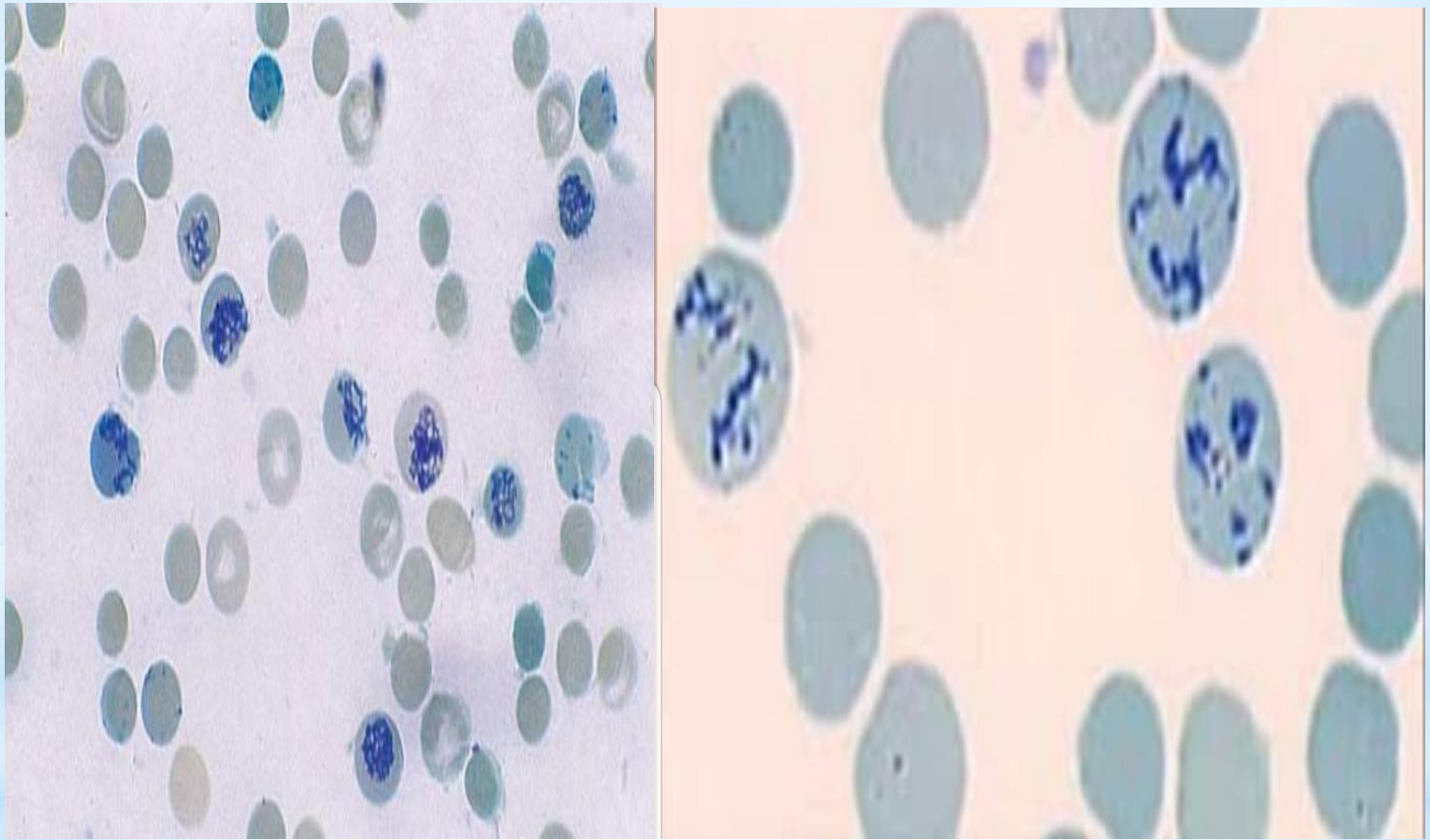


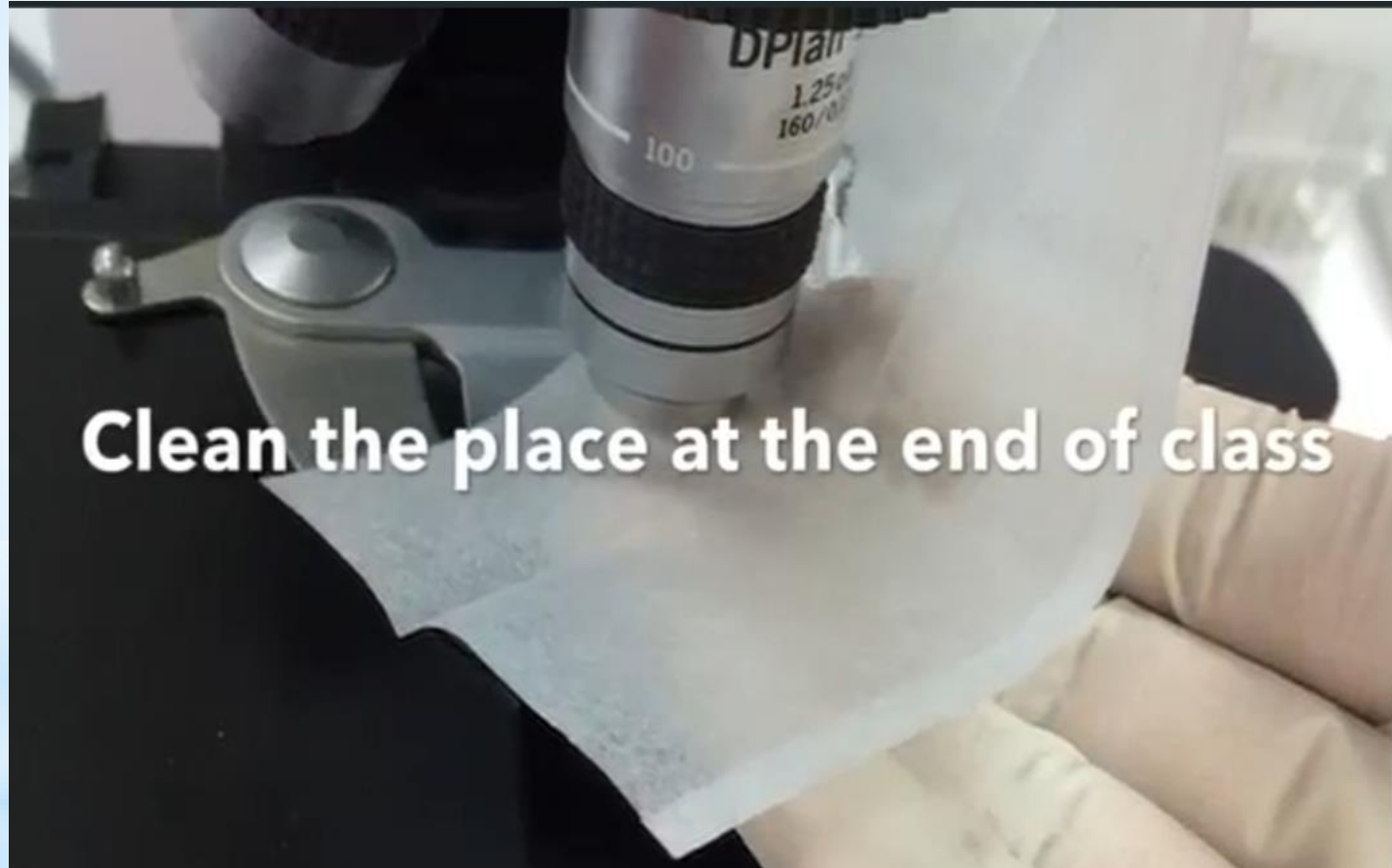
آزمایشگاه سلولی مولکولی - فرزانه فروهر فر



آزمایشگاه سلولی مولکولی - فرزانه فروهر فر







Clean the place at the end of class