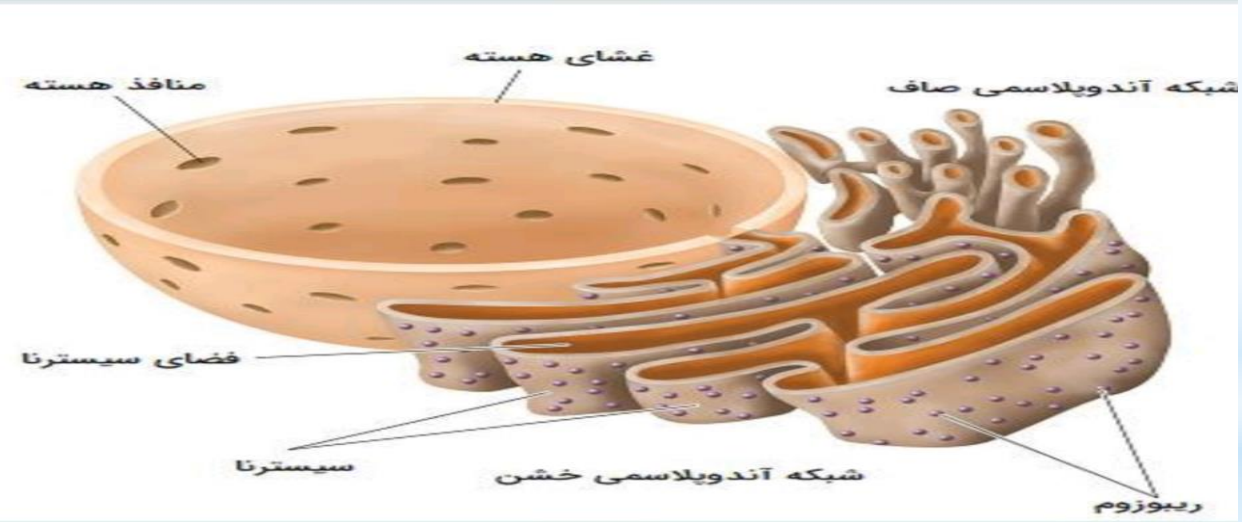


University of Isfahan
Biology Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology
Farzaneh Forouharfar

عنوان
مشاهده غیرمستقیم شبکه آندوپلاسمیک خشن
(Rough Endoplasmic Reticulum)
RER



اهداف

-شناسایی سلول مناسب جهت مشاهده غیر مستقیم شبکه اندوپلاسمیک خشن با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی (Supravital Staining)

-شناسایی گلبول‌های قرمز نابالغ (رتیکولوسیت‌ها) در خون محیطی از طریق مشاهده شبکه RNA باقی‌مانده در سیتوپلاسم آن‌ها

-آماده سازی سلول جهت مشاهده غیر مستقیم جایگاه RER

-این آزمایش به بررسی میزان پاسخ مغز استخوان به خونریزی یا کم خونی کمک می‌کند.

-دقت شود در این آزمایش در حال دیدن "ردپای RNA" هستیم نه مشاهده مستقیم ساختار شبکه آندوپلاسمی خشن

مقدمه

شبکه اندوپلاسمی خشن (RER)

شبکه اندوپلاسمی خشن Rough Endoplasmic Reticulum یا به اختصار RER یکی از ساختارهای حیاتی و بسیار مهم در سلول‌های یوکاریوتی و بزرگترین اندامک داخل سلولی محسوب میشود.

ساختار این شبکه از مجاری پهن و کیسه‌های تخت تشیل شده که در داخل سیتوپلاسم قرار دارد. ویژگی اصلی آن، پوشیده شدن سطح خارجی آن با ریبوزوم‌ها است. وجودِ ریبوزوم‌ها باعث می‌شود که در مشاهدات میکروسکوپی، سطح آن "دانه دانه" یا "خشن" به نظر برسد.

فضای داخل شبکه آندوپلاسمی لومن نام دارد.غشای خارجی هسته با شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار درارتباط است ضمن اینکه 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.ساختار دانه مانند متصل به RER، ریبوزوم‌ها هستند که در سنتز پروتئین ها بخصوص پروتئین‌های ترشحی و در پردازش بعدی آنها دخالت دارند. سلول-های ترشحی در جانوران، شبکه آندوپلاسمی دانه دار توسعه یافته‌ای دارند در حالیکه در سلول‌های گیاهی این شبکه گسترش کمتری دارد.

وظایف اصلی این شبکه عبارتند از:

1-سنتز پروتئین (Protein Synthesis) : وظیفه اصلی RER تولید پروتئین‌هایی است که قرار است به خارج از سلول ترشح شوند یا در غشا سلول قرار بگیرند. ریبوزوم‌ها روی سطح آن، پروتئین‌ها را می‌سازند و سپس آن‌ها را به داخل مجرای RER هدایت می‌کنند.

2- تا خوردن پروتئین (Protein Folding): در فضای داخل RER، پروتئین‌های تازه ساخته شده به شکل سه بعدی صحیح خود تا می‌خورند. اگر پروتئین درست تا نخورد، عملکرد صحیحی نخواهد داشت.

3-اصلاح پروتئین (Protein Modification): انجام فرآیندهایی مثل گلیکوزیلاسیون (اضافه کردن زنجیره‌های کربوهیدرات به پروتئین برای ساخت گلیکوپروتئین‌ها).

4-کنترل کیفیت(Quality Control): RER پروتئین‌های ناقص یا اشتباه را شناسایی کرده و آن‌ها را برای تخریب می‌فرستد.

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.

شناسایی RER در آزمایشگاه (روش‌های مشاهده و شناسایی)

برای شناسایی این ساختار از روش‌های مختلفی استفاده می شود که به چند مورد از مهمترین انها اشاره می شود:

الف) میکروسکوپ الکترونی (Electron Microscopy)

روش اصلی و تنها روشی است که ساختار دقیق RER را نشان می‌دهد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره یا عبوری (TEM): با استفاده از پرتو الکترون، تصویر مقطعی از سلول را ارائه می‌دهد. در این حالت، RER به صورت صفحات تخت و موازی دیده می‌شود که سطح آن‌ها با نقاط ریز تیره (ریبوزوم‌ها) پوشیده شده است.

میکروسکوپ الکترونی اسکن یا روبشی (SEM): بیشتر برای بررسی سطح و اطلاعاتی از توپوگرافی سطحی غشاها می باشد.

ب) رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی و فلورسنس (Fluorescence Microscopy)

امروزه در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی، از روش"ردیابی" RER استفاده می‌شود:برچسب‌گذاری با پروتئین‌های فلورسنت مثل (GFP) گرین فلورسنت پروتیین : یک پروتئین خاص (مثلاً یک پروتئین که همیشه به RER می‌چسبد) را به یک پروتئین درخشان مثل GFP متصل کرده و وقتی سلول را زیر میکروسکوپ فلورسنس می‌بینیم، بخش‌هایی که می‌درخشند، همان شبکه اندوپلاسمی خشن هستند.

انتخاب سلول مناسب جهت مشاهده RER

اگر سلول‌های بافت خونی را بررسی کنیم طبیعتاً حدس می زنید که این ساختار باید در گلبول‌های سفید بررسی شوند، اما به دلیل بزرگی هسته این 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.

رتیکولوسیت (Reticulocyte)

این سلول‌ها گلبول‌های قرمز نابالغی هستند که یک مرحله قبل از پایان تکامل گلبول‌های قرمز بالغ قرار دارند و تقریبا تازه از مغز استخوان خارج شده‌اند. در حین فرآیند بلوغ، این سلول‌ها ارگانل‌های خود از جمله هسته را از دست می‌دهند. با این حال، مقداری از RNA ریبوزومی (rRNA) در سیتوپلاسم آن‌ها باقی می‌ماند و هنوز بقایای اندامک‌های درون‌سلولی در آن‌ها وجود دارد. این سلول‌ها دارای قطري معادل 9 میکرون بوده وکمی از گلبول‌های قرمز بزرگترند و حاوی تعدادی میتوکندری، دو عدد سانتریول، بقایای دستگاه گلژی، پلی ریبوزوم ها و بقایای شبکه آندوپلاسمیک خشن می‌باشند. بنابراین تراکم اندامکی نسبتاً کمی دارند.

اگر بتوانیم rRNA 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.

تعیین درصد رتیکولوسیت Reticulocyte Percentage

میزان درصد سلول‌های رتیکولوسیت در افراد بالغ 0.5 تا 1.5 درصد و در افراد نابالغ ونوزادان 2.5 تا 6 درصد می‌باشد.در صدمات منجر به جراحات و خونریزی این میزان تا 35 درصد افزایش می یابد. این اعداد بسته به آزمایشگاه و سن فرد تا حدودی متفاوت است.

محاسبه درصد و شمارش این سلول‌ها اهمیت فوق العاده ای در دانستن فعالیت مغز استخوان در تولید سلولهای گلبول قرمز دارد و گاهي ممكن است توسط پزشک براي فرد، آزمایش شمارش رتیکولوسیت درخواست شود چون شمارش و محاسبه درصد دقیق رتیکولوسیت‌ها یکی از شاخص‌های کلیدی در هماتولوژی برای ارزیابی میزان تولید گویچه‌های قرمز توسط مغز استخوان است.

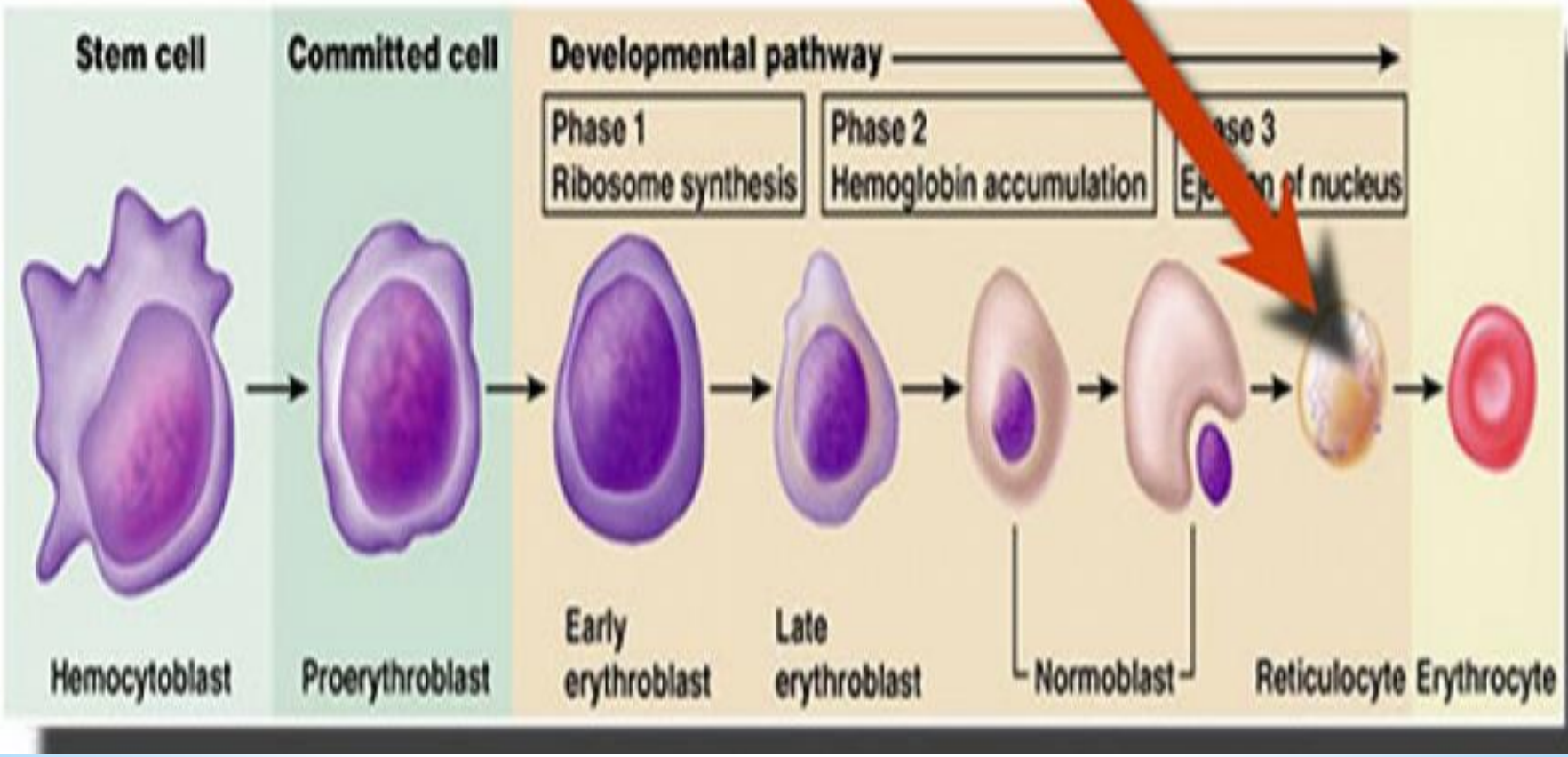
روش محاسبه درصد سلول‌های رتیکولوسیت:

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

افزایش درصد رتیکولوسیت‌ها نشان دهنده افزایش فعالیت مغز استخوان (مثلاً پس از خونریزی یا همولیز) است.

این ارزیابی، ظرفیت و میزان فعالیت و پاسخ دهی مغز استخوان را تعیین می‌کند که آیا کارخانه تولید خون (مغز استخوان) به اندازه کافی فعال است یا خیر.

This is a reticulocyte



مکانیسم رنگ‌آمیزی

رنگ مورد استفاده در این آزمایش کریزل آبی درخشان (Brilliant Cresyle blue) است. رنگ کریزل آبی درخشان به صورت 1 درصد یعنی 1 گرم پودر آن در 100 سی سی سرم فیزیولوژیک NaCl 9 در 1000 ساخته می‌شود.

NaCl 9 در 1000 یا سرم فیزیولوژیک است با حل شدن 9 گرم نمک طعام در 1000 سی سی یا 0.9 گرم در 100 سی سی آب مقطر بدست می اید.از سیترات سدیم نیز میتوان در ترکیب رنگ جهت ایجاد محیط ایزوتونیک و عدم ایجاد لخته های ریزاستفاده کرد که در این صورت از 80 سی سی سرم فیزیولوژیک و 20 سی سی سیترات سدیم استفاده میشود.

این رنگ یک رنگ حیاتی بازی است که با گروه‌های فسفات درزنجیره‌های RNA پیوند برقرار کرده و باعث می‌شود RNA به صورت رشته‌های آبی‌رنگ قابل مشاهده شود.از آنجایی که rRNA،خاصیت اسیدی داشته و به دلیل غنی بودن از اسیدهای نوکلئیک بازوفیل یا باز دوست می‌باشند 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.رنگ بازی دیگری به نام نیو متیلن بلو(New methylen blue)از دیگر معرف های شبکه آندوپلاسمیک خشن می‌باشد وبه شدت با اسیدهای نوکلئیک (RNA) پیوند برقرار می‌کند.

نیومتیلن بلو (New Methylene Blue) "نسخه بهبود یافته" متیلن بلو است که برای کاربردهای خاص زیستی اصلاح شده است.
تفاوت این رنگ با با متیلن بلو: نیومتیلن بلو معمولاً حلالیت بهتر و پایداری بیشتری دارد. همچنین در برخی کاربردهای زیستی، تمایل (Affinity) بیشتری به ساختارهای سلولی خاص دارد و قدرت نفوذ به داخل سلول و رنگ‌آمیزی شبکه RNA را در حالت حیاتی (Supravital) بهتر از متیلن بلو معمولی انجام می‌دهد. یعنی می‌تواند بدون کشتن سلول، به داخل آن نفوذ کند وRNA را در سلول‌های زنده (بدون آسیب رساندن به آن‌ها) با دقت بالا متمایز کند.در سلول شناسی و هماتولوژی نیومتیلن بلو و برلیانت کریزل بلو دقت بسیار بالایی در متمایز کردن رشته‌های RNA دارند و Reticulocyte count stainمی باشند





ساخت رنگ رتیکولوسیت

برلیانت کرزیل بلو ۱ گرم +۲۰ سی سی تری سیترات سدیم ۳ درصد +۸۰ سی سی کلرور 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 کلرور 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 یا دماي 37 درجه سانتیگراد

رنگ کریزل آبی درخشان یا نیومتیلن بلو با غلظت استاندارد

خون تام

لام و لامل

سرنگ

میکروسکوپ

لوله خونگیری حاوی ضد انعقاد

لوله ازمایش و پارافیلم جهت بستن درب لوله ازمایش

یا لوله های فالکون درب آبی

روغن ایمرسیون (Immersion Oil)

دقت شود:چون رسوب ایجاد شده بسیار ریز است و در ابعاد میکرومتری قرار دارد، بدون استفاده از روغن ایمرسیون، شکست نور باعث می‌شود که شما نتوانید آن را به صورت مجزا از بقیه سیتوپلاسم تشخیص دهید. روغن باعث افزایش قدرت تفکیک (Resolution) می‌شود تا بتوانید آن را بصورت "نقاط آبی" متمایز از سایر ذرات ببینید.

روش کار

برای شناسایی سلول رتیکولوسیت و مشاهده بقایای جایگاه شبکه اندوپلاسمی خشن حدود 3-1 میلی لیتر خون از فرد بالغ گرفته میشود.خون استفاده شده در این آزمایش بایستی تازه باشد و تام یعنی اجزاء آن از هم جدا نشده و حاوی ضد انعقاد باشد.یک قطره خون و یا در موارد کم خوني دو قطره خون با میزان مساوی رنگ کریزل آبی درخشان به مدت 15 الی 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد به ارامی مخلوط شود. این دما دمای فیزیولوژیک بدن است. در این دما، فعالیت‌های شیمیایی و حرکت مولکولی (Diffusion) در بالاترین حد خود در حالت طبیعی است که اجازه می‌دهد رنگ به سرعت و به طور یکنواخت به داخل ساختارهای سلولی نفوذ کند و به نقاط هدف برسد.

در این مدت واکنش بین رنگ و rRNA موجود در ریبوزوم ها صورت می گیرد و رسوب پروتئيني ابي رنگي (Color Precipitation) بوجود مي اید.

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 عدسی 100x سلول های رتیکولوسیت را که حاوی رسوب آبی تیره می باشند، شناسایی کنید.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 باشددر صورت لزوم میتوانید درصد سلول های رتیکولوسیت را در نمونه خون مورد بررسی محاسبه و ارزیابی کنید.

یادآوری:رنگ‌آمیزی حیاتی (Supravital Staining)

در رنگ‌آمیزی معمولی:

(مانند رنگ‌آمیزی گرم در باکتری‌شناسی)، ابتدا سلول را بصورت گستره یا اسمیر (Smear)، روی لام تثبیت (Fix) کرده که این کار باعث مرگ سلول می‌شود و بعد رنگ آمیزی می‌کنیم.

اما در رنگ‌آمیزی حیاتی:

- **سلول زنده باقی می‌ماند و رنگ را مستقیماً به سلول‌های زنده اضافه می‌کنیم (بدون مرحله تثبیت یا Fixation).**
- **رنگ به داخل سلول‌های زنده نفوذ کرده و با اجزای داخلی آن‌ها (مثل RNA) واکنش می‌دهد، در حالی که سلول هنوز زنده است.**
- **این روش زمانی استفاده می‌شود که بخواهیم فرآیندهای بیولوژیکی یا ساختارهای داخل سلولی را در حالی که سلول هنوز "فعال" هستند مشاهده کنیم. در مورد رتیکولوسیت‌ها، ما می‌خواهیم ببینیم در لحظه خروج از مغز استخوان، چه مقدار RNA در سلول زنده باقی مانده است.**
- **خطاهای احتمالی در آزمایش: عدم رعایت زمان انکوباسیون یا استفاده از نمونه خون قدیمی می‌تواند باعث عدم تشخیص دقیق شود.**

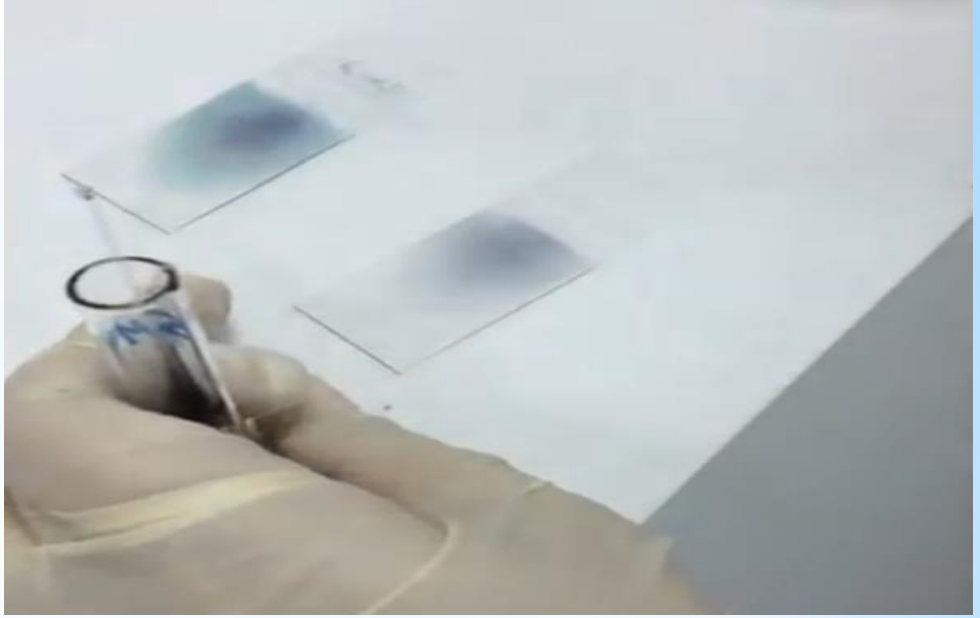




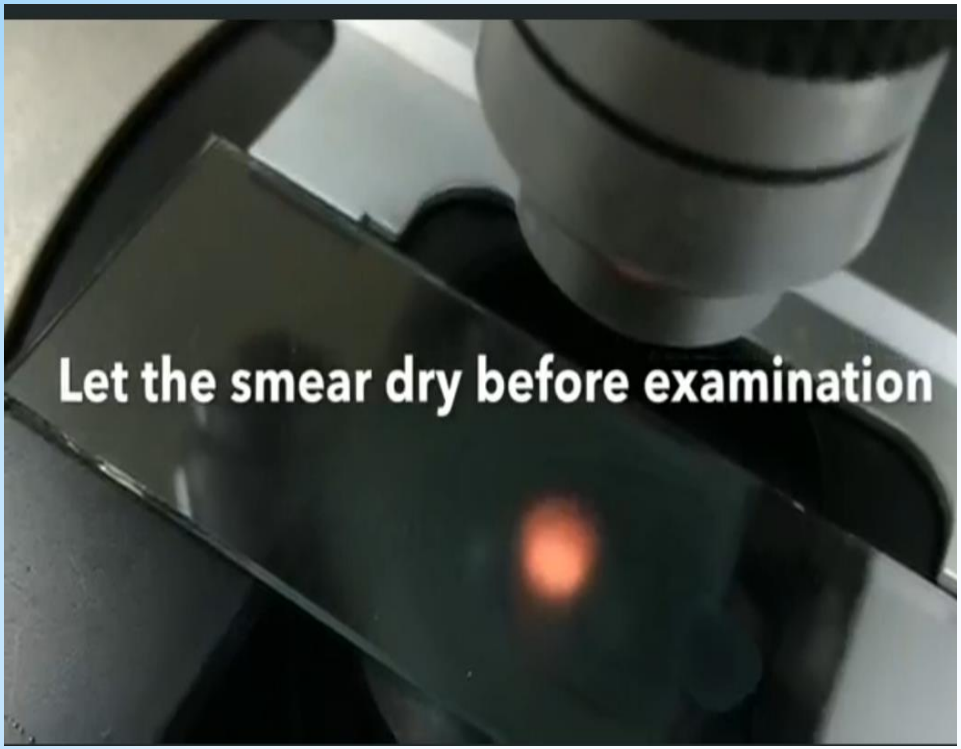

PLACE IT IN THE INCUBATOR FOR 15MIN


smear

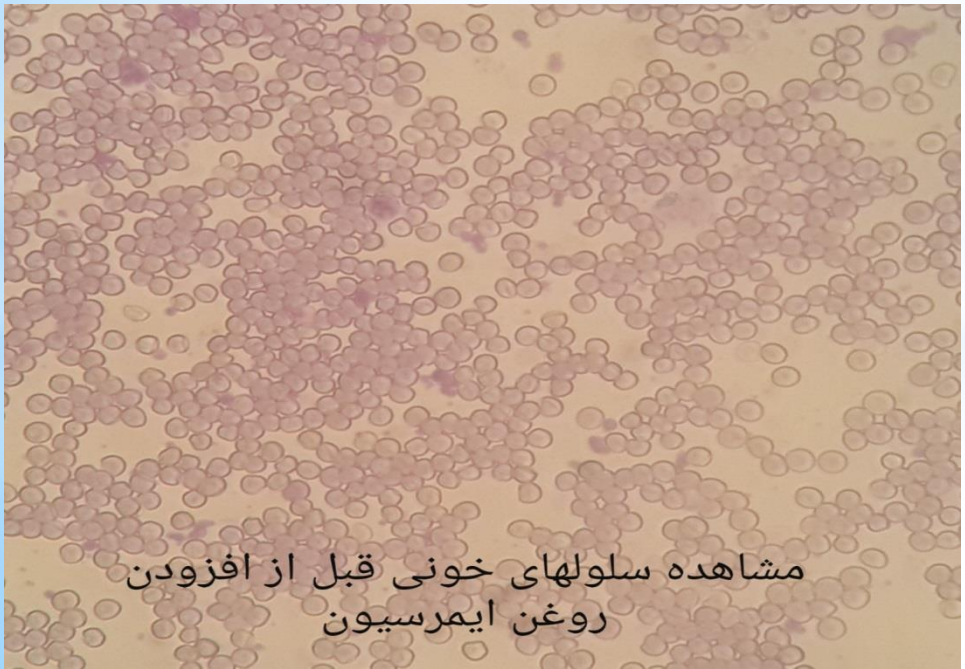

smear

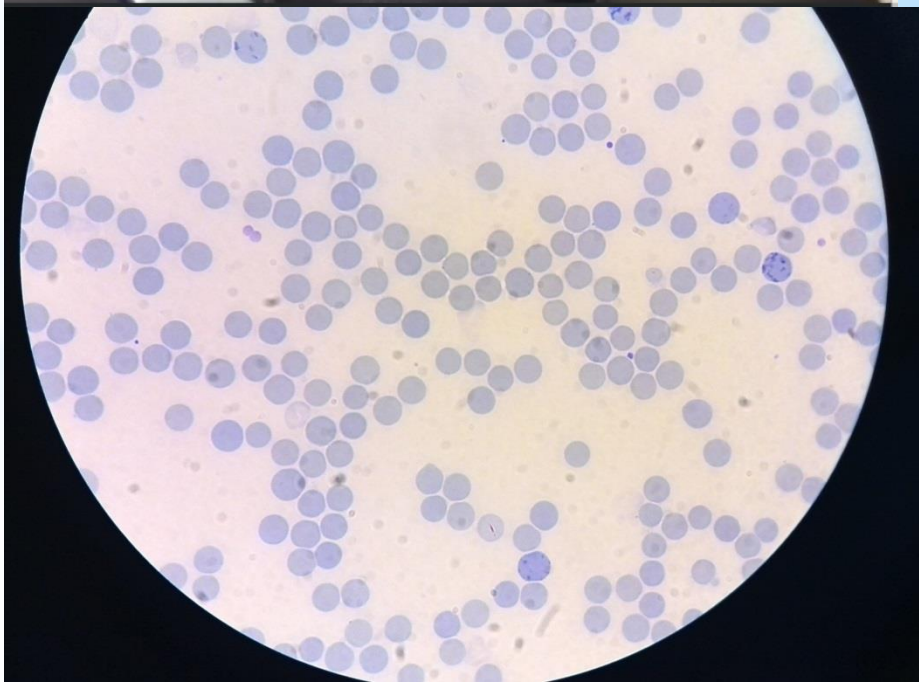


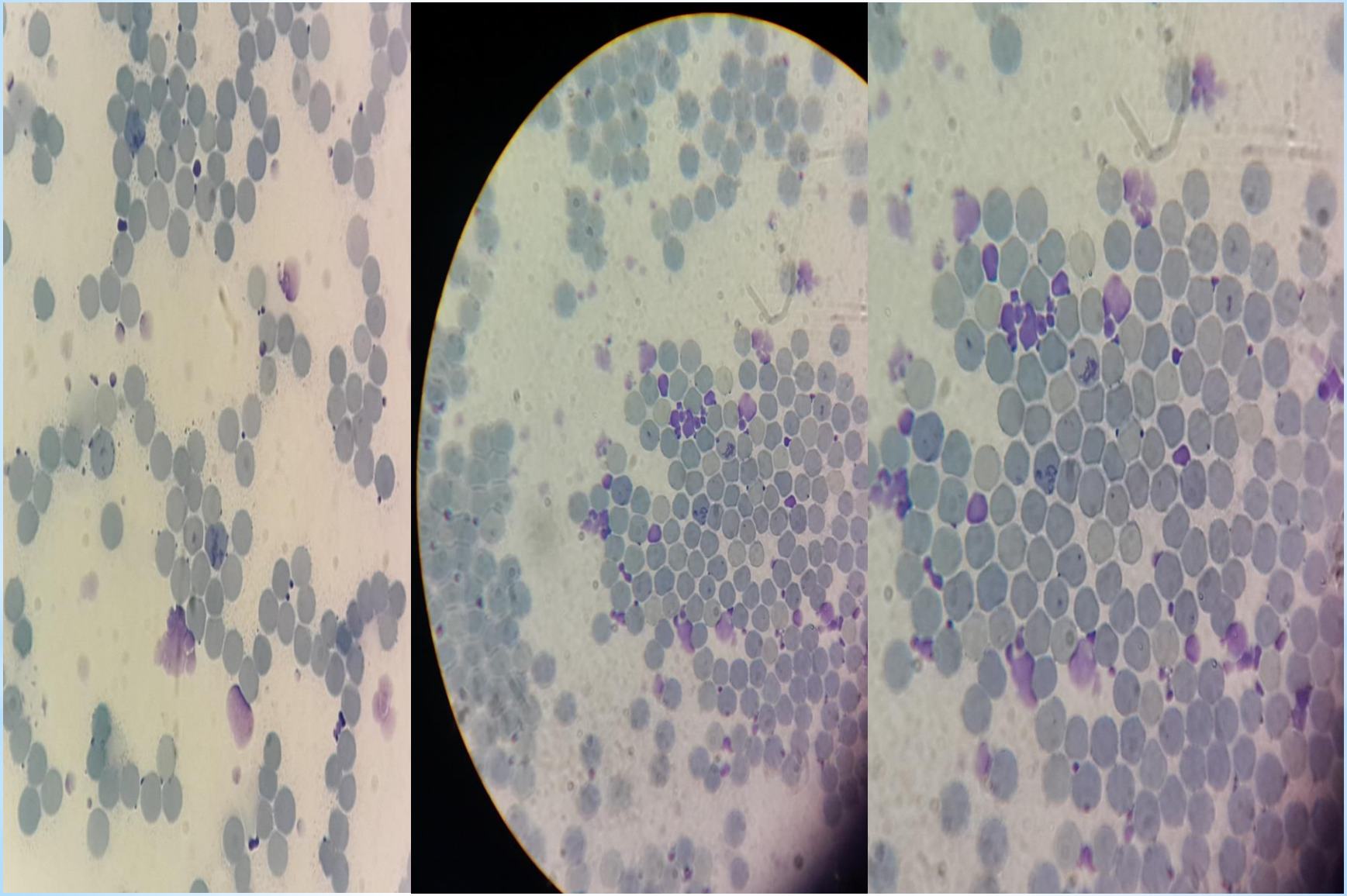



Let the smear dry before examination

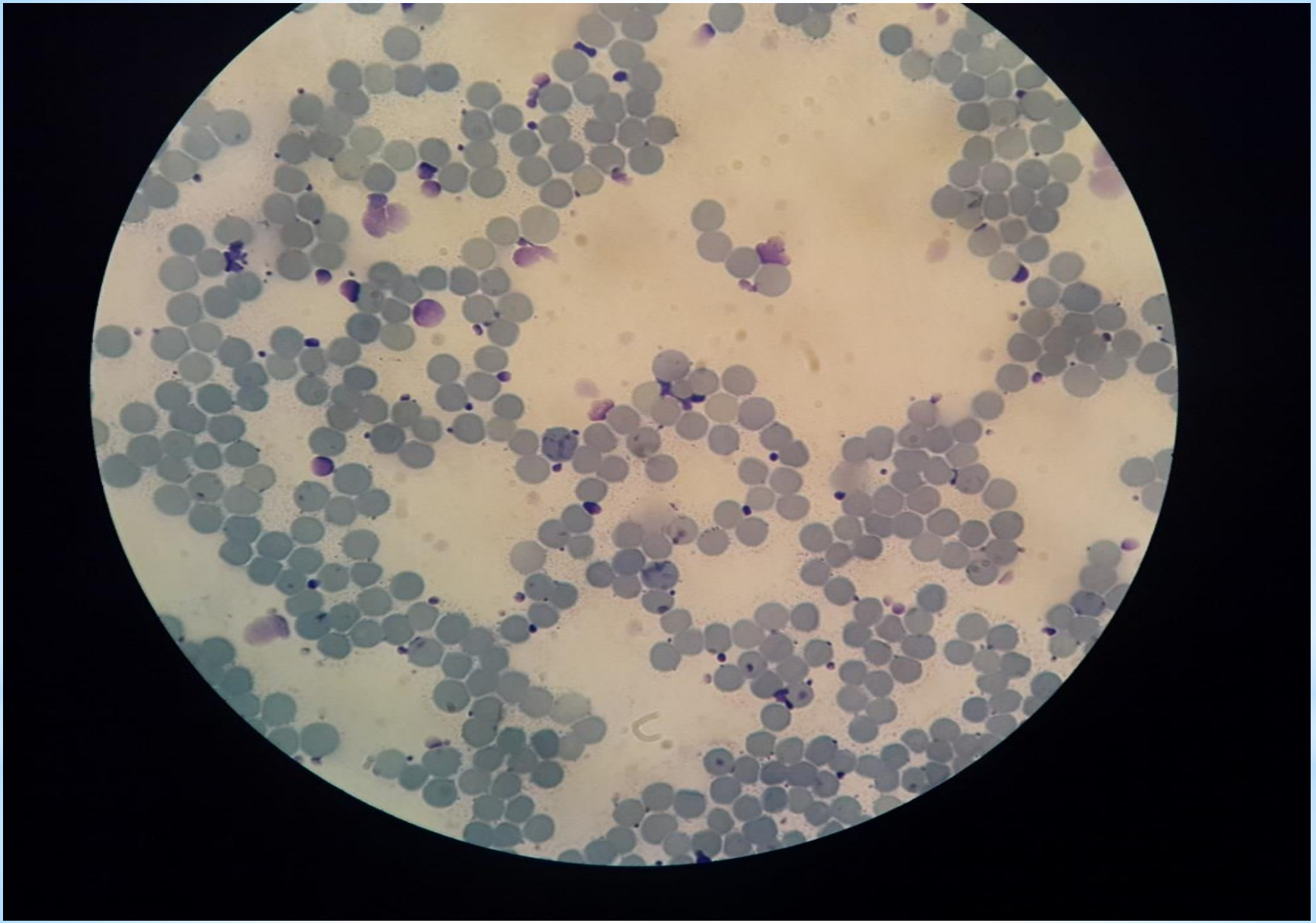

Put immersion oil


مشاهده سلولهای خونی قبل از افزودن
روغن ایمرسیون

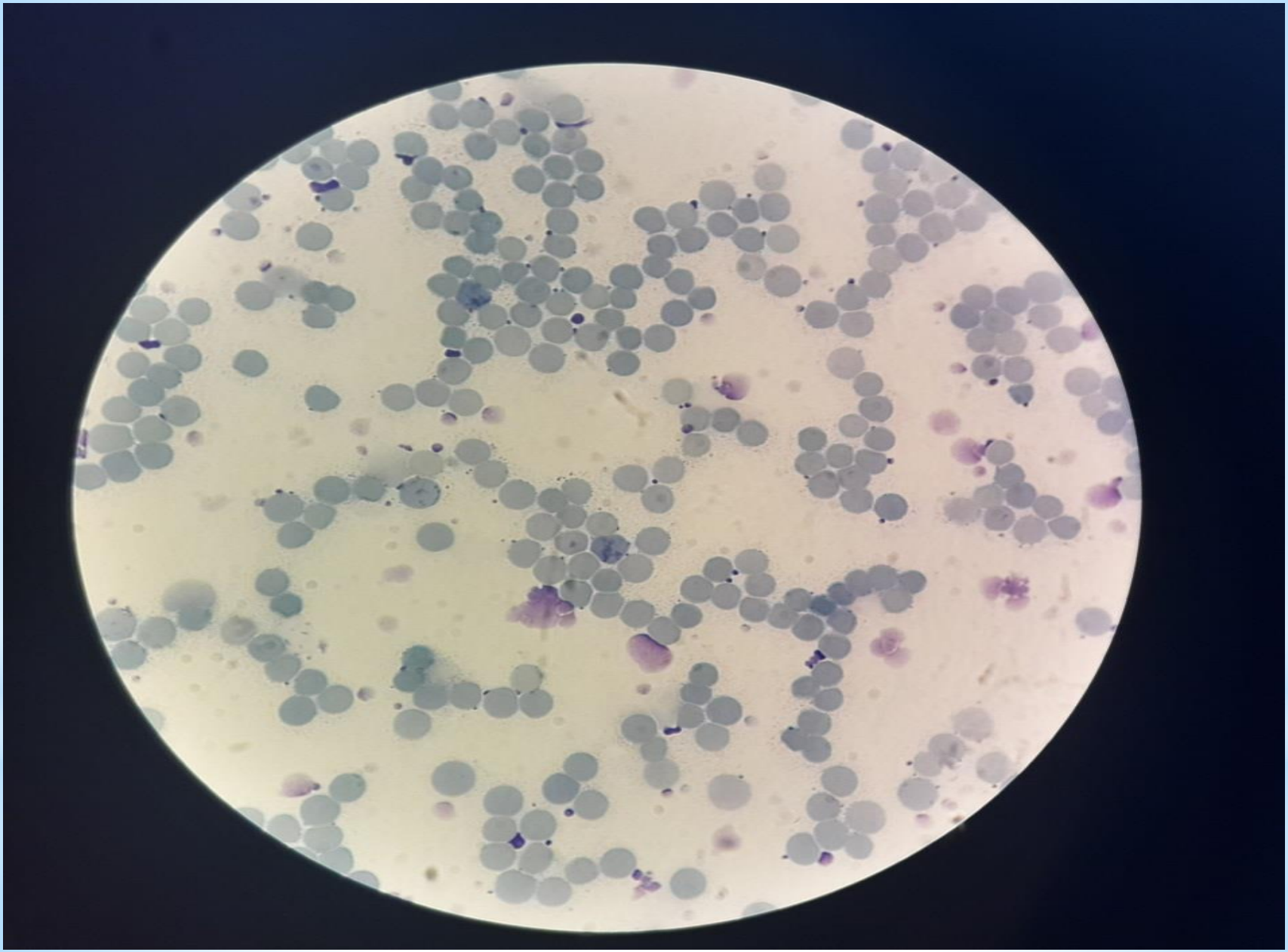




آزمايشگاه سلولي مولكولي-فرزانه فروهرفر



آزمایشگاه سلولي مولكولي-فرزانه فروهرفر



آزمايشگاه سلولي مولكولي-فرزانه فروهرفر


Clean the place at the end of class