

Plant Microtechnique

BOT 213

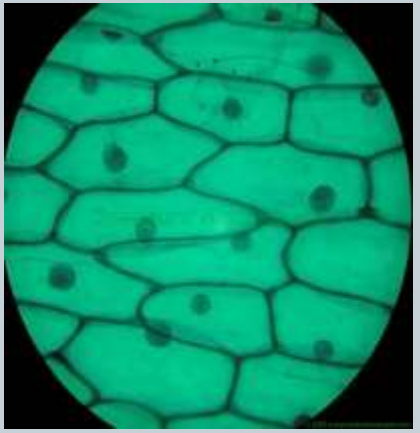


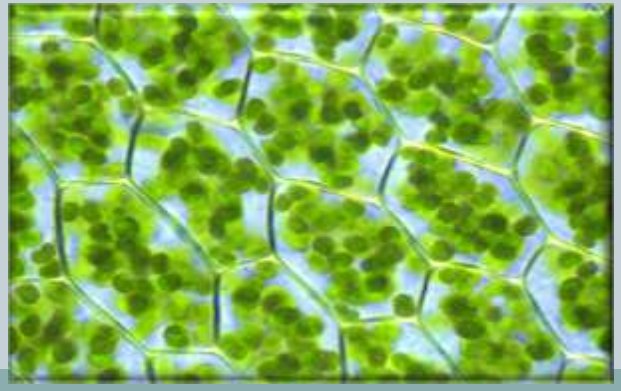


التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 8





Embedding Methods &Microtomy

الطمر والتقطيع

Embedding الطمر

الطمر هو دفن العينات النباتية المراد قطعها بجهاز التقطيع بكمية من وسط الطمر ، لتصبح على هيئة قالب صلب يجعلها صلبة متماسكه اثناء مرورها على سكين القطع كما انها تساعد في تثبيت العينة على حاملها عند استخدام جهاز التقطيع او بمعنى آخر هي تخلل واحاطة او تغليف العينات باوساط الطمر المختلفة لجعلها اكثر تماسكاً اثناء عملية التقطيع.

Embedding Methods

A wide variety of Embedding media is available to suit every sample type and application:

1 - Paraffin Wax Embedding Method
2 - Celloidin Embedding Method
3 - Carbowax Embedding Method
4 - Gelatin Embedding Method
5 - Paraplast Embedding Method

طرق الطمر عديدة وتختلف تبعاً لنوع مادة الطمر، ولكن الشائع منها ما يلي:

1. طريقة شمع البرافين
2. طريقة السيلويدين
3. طريقة الشمع الكربوني
4. طريقة الطمر بالجلاتين
5. طريقة نظير البلاستيك

Paraffin Infiltration:

Paraffin wax is the most common infiltration and embedding medium. Paraffin wax is miscible with xylene as well as isopropanol, but is not miscible with alcohols or aqueous fixatives. A wide variety of infiltration media is available to suit every sample type and application. During Microtomy, factors such as wax hardness, stickiness, and brittleness should be considered with the technique and tissue in mind. Most common paraffins have a melting point between 55-58° C and the paraffin is typically kept at 2-4° C above melting point on the processor. During this last processing step. Heat and vacuum are both utilized for optimal infiltration of paraffin. Too much heat and time in liquid paraffin may harden sample tissues and create Microtomy problems. As with the previous processing steps, the optimal infiltration time for each sample type/size must be determined for optimal results.

شمع البارافين هو الوسيلة الأكثر شيوعًا للطمر . شمع البارافين قابل للامتزاج مع الزيلين وكذلك الأيزوبروبانول ، ولكنه لا يمتزج بالكحول أو المثبتات المائية. تتوفر مجموعة متنوعة من وسائط الطمرلتناسب كل نوع. أثناء عملية التقطيع الميكروتومي ، يجب مراعاة عوامل مثل صلابة الشمع والالتصاق والهشاشة مع وضع التقنية والأنسجة في الاعتبار. تحتوي معظم البارافينات الشائعة على نقطة انصهار بين 55-58 درجة مئوية ،ويتم الاحتفاظ بالبارافين عادة عند 2-4 درجات مئوية فوق نقطة الانصهار في المعالج. خلال خطوة المعالجة الأخيرة هذه. يتم استخدام كل من الحرارة والفراغ من أجل الطمر الأمثل للبارافين. قد تؤدي الحرارة المرتفعه وطول فترة الطمر في البارافين السائل إلى تصلب أنسجة العينة وخلق مشاكل في الميكروتومي. كما هو الحال مع خطوات المعالجة السابقة ، يجب تحديد وقت الطمر الأمثل لكل نوع / حجم عينة للحصول على أفضل النتائج.

الطمر هو دفن العينات النباتية المراد قطعها بجهاز التقطيع بكمية من وسط الطمر ، لتصبح على هيئة قالب صلب يجعلها صلبة متماسكة اثناء مرورها على سكين القطع كما انها تساعد في تثبيت العينة على حاملها عند استخدام جهاز التقطيع او بمعنى آخر هي تخلل وأحاطه او تغليف العينات بأوساط الطمر المختلفة لجعلها أكثر تماسكا اثناء عملية التقطيع.

إن طرق الطمر عديدة وتختلف تبعا لنوع مادة الطمر، ولكن الشائع منها :

1 - طريقة شمع البرافين Paraffin Wax Method
2 - طريقة السيلويدين CelloidenMethod
3 - طريقة الشمع الكربوني CarboWax Method
4 - طريقة الطمر بالجلاتين Gelatin Method
5 - طريقة الطمر بالراتنجات الصناعية Synthetic Resins
6 - طريقة نظير البلاستيك Paraplast

1 - Paraffin wax Embedding :

The actual embedding takes place when the paraffin- infiltrated plant samples is placed in fresh paraffin and the latter allowed to cool. It is important to remember that the xylol and other solvents will dissolve the fats of the sample tissues unless they are fixed by some special chemical such as osmic acid.

الطمر بشمع البرافين:

يحدث الطمر الفعلي عندما يتم وضع عينات النبات في البارافين الطازج والسماح له ان يبرد ويتصلب . من المهم أن تتذكر أن الزيلول والمذيبات الأخرى ستذيب دهون أنسجة العينة ما لم يتم تثبيتها بواسطة مادة كيميائية خاصة مثل حمض الأوسميك .

يعتبر شمع البرافين أحد مشتقات البترول الخام الذي يتالف من سلسلة طويلة مشبعة لهيدروكربون الميثان.

كيف يتم تنقية الشمع؟

إن شمع البرافين لايذوب في الماء او الكحولات بانواعها المختلفة اوالجلسرين، ولهذا فإنه عند تنقيته يفضل صهره بالماء الساخن عن طريق استخدام حمام مائي فتترسب الشوائب الى أسفل المزيج ومن ثم يسهل فصلها ويصبح الشمع نقيا بعد التبريد.

ان استخدام شمع البرافين في طمر العينات النباتية يكون من أفضل اوساط الطمر سواء كان ذلك في الوقت الماضي او الحاضر، وايضا من اكثرها شيوعا لما له من المميزات التالية :

(1 سهولة الحصول عليه من مصادر عديدة.
(2 سهولة مزجة بشمع العسل والراتنجات الصناعية الاخرى.
(3 رخص ثمنه بالمقارنة بالمواد الاخرى.
(4 يمكن اعادة استخدامه عدة مرات دون تغير في خواصه الطبيعية والكيميائيه، بعكس اللدائن الصناعية الاخرى.
(5 يمكن حفظ قوالب الشمع المحتوية على العينات في ثلاجة او اماكن الباردة مدةويله.

6- يمكن الحصول على شريط شمعي-عند عملية التقطيع - يحتوي على سلسلة طويلة من القطاعات الشمعية متصلة مع بعضها البعض ، ومن ثم فصلها وفردها بالاعداد المناسبة من القطاعات ، مما يسهل تتبع سير الابحاث والأعمال التجريبية.

7 - سهولة الحصول على السمك المطلوب للقطاعات المختلفة بدءاً من سمك واحد ميكرومتر.

8 - سهولة إجراء بعض المعاملات المترتبة على استخدامه سواء أثناء فرد القطاعات او تثبيتها على الشرائح الزجاجية او ازالته من العينة بمذيبات معينة.

9 - غير قابل للعطب او التفتت.

10- سهولة تنقيته من الشوائب والمواد العالقة به.

2 - Celloidin Embedding

Celloidin is dissolved in equal parts of absolute alcohol and ether. The samples are dehydrated in alcohol in the same way as for paraffin except that it is transferred from absolute alcohol to a dilute solution of celloidin. As the alcohol and ether evaporate, they are replaced by more concentrated celloidin. It is finally hardened in chloroform and stored in 80 percent alcohol. It is a much longer process than paraffin but causes much less shrinkage and distortion. It is rarely used in plant sample embedding.

Celloidin -2 يتم حل سيلويدين في أجزاء متساوية من الكحول المطلق والأثير. يتم تجفيف العينات في الكحول بنفس الطريقة كما هي في البارافين إلا أنه يتم نقله من الكحول المطلق إلى محلول مخفف من السليلويدين. ثم يبخر الكحول والأثير، ويتم استبداله بسيلويدين بتركيز أكبر. وأخيرا يتم تصلبه في الكلوروفورم وتخزينه في الكحول 80 في المئة. وهي عملية أطول بكثير من البارافين ولكنها تسبب تقلصا وتشوه أقل بكثير. ونادرا ما تستخدم في طمر عينات النبات.

3 - Carbowax method:

Carbon wax is an alcohols out of 18-22 carbon atom, including polyethylene. Solid stiff material despite the low temperature ranging between 47 – 54º. Do not cause any distortion of the sample. It can get thin sections and good at low temperature may reach 20 to 17º. It also gives strength and rigidity to the tissues like young leaves , roots and stems, as well as some parts of aquatic plants.

3 - **طريقة Carbowax**: الشمع الكربوني هو الكحول المكون من 18-22 ذرة الكربون، بما في ذلك البولي ايثيلين. مادة صلبة على الرغم من انخفاض درجة الحرارة تتراوح بين 47 – 54 درجة مئوية وهي لا تسبب أي تشويه للعينة. يمكن أن تحصل على قطاعات رقيقة وجيدة في درجة حرارة منخفضة قد تصل إلى 20 إلى 17 . كما أنه يعطي قوة وصلابة للأنسجة مثل الأوراق الصغيرة والجذور والسيقان، وكذلك بعض أجزاء من النباتات المائية.

4 - Gelatin Embedding

Gelatin is a translucent, colorless, brittle (when dry). Flavorless food derived from collagen obtained from various animal body parts.

Some plant samples tend to fragmentation during sectioning. So gelatin can be used for infiltration and Embedding samples.

4- الجيلاتين:- الجيلاتين شفاف، عديم اللون، هش (عندما يجف). وهو عبارة عن الكولاجين يتم الحصول عليها من مختلف أجزاء جسم الحيوان.

بعض العينات النباتية في الجيلاتين تميل إلى التفتيت أثناء التقطيع . لذا يمكن استخدام الجيلاتين لتشريب وغمر العينات النباتية.

5 - Paraplast Embedding Method:

Paraplast is a mixture of paraffin wax and polymer plastics. Its melting point between 56 and 57 c^{o}. This homogeneous material cold slowly during the Embedding allowing to get a long Ribbons. It also facilitates the process of cutting large samples. It can follow the steps of paraffin wax Embedding when using Paraplast.

Paraplast -5

بارابلاست هو مزيج من شمع البارافين والبلاستيك البوليمر. نقطة انصهاره بين 56 و57 . هذه المادة متجانسة وتبرد ببطء خلال الطمر للحصول على أشرطة طويلة. كما أنه يسهل عملية قطع عينات كبيرة. ويمكن اتباع خطوات شمع البارافين للطمر عند استخدام بارابلاست.

6 - Synthetic resins:

Epoxy Gums e.g. Araldite, and Acrylic gums such as Ethyl and methyl and butyl methacrylate, and polyester gums. Such material is used for infiltration and embedding samples, especially for the preparation of samples to be examined under the Electron Microscope. These materials become very solid when polymerize, and that they help in getting very thin sections, reaching few nanometers. These materials do not make any distortion of the samples, this method is not used for sectioning examined under a light microscope.

6- الراتنجات الصناعيه : مثل صمغ الايبوكسي ، صمغ الأرالدايت والأكريليك ، صمغ الإيثيل والميثيل والبيوتيل ميثاكريلات والبوليستر.

تُستخدم هذه المواد في طمر العينات، خاصةً لإعداد العينات التي سيتم فحصها تحت المجهر الإلكتروني. تصبح هذه المواد صلبة جدًا عند البلمرة ، وتساعد في الحصول على قطاعات رقيقة جدًا ، تصل إلى بضعة نانومترات. هذه المواد لا تُحدث أي تشويه للعينات ، ولا تُستخدم هذه الطريقة للقطاعات التي يتم فحصها تحت المجهر الضوئي

Sectioning by Microtome التقطيع بالمشراح

Microtomy is the technique of cutting sample in very thin sections embedded in paraffin wax and then cut using a microtome (a machine) to get thin sections. These sections are stained with appropriate dyes and observed under the light microscope.

الميكروتوم Microtomy جهاز التقطيع (المشراح)

التقطيع هي تقنية قطع العينة في قطاعات رفيعة جدًا مدمجة في شمع البارافين ثم تقطيعها باستخدام مشراح (آلة) للحصول على مقاطع رقيقة. هذه القطاعات مصبوغة بأصباغ مناسبة ويتم ملاحظتها تحت المجهر الضوئي.

Microtome:

An instrument used in Microtomy, Mechanical device for cutting thin uniform section of plant samples

أداة المستخدمة في ميكروتومي، جهاز ميكانيكي لتقطيع عينات النبات لقطاعات رقيقة منتظمة



Types of Microtomes: •

1-Hand Microtome
2-Table Microtome
3 - Rocking Microtome
4 - Rotary Microtome
5 - Sliding Microtome
6 - Freezing Microtome

1- جهاز التقطيع اليدوي
2- جهاز التقطيع المنضدي
3- جهاز التقطيع الهزاز
4- جهاز التقطيع الدوار
5- جهاز التقطيع المنزلق
6- جهاز التقطيع الثلجي



1-Hand Microtome
2- Table Microtome



Hand & Table Microtome is used to cut thin sections of Microscopic materials, such as specimen parts of plants and animals. It is considered as the basic form of a microtome permitting microtomic cuts by hand in a quick and accurate way. The microtome is suitable for practical courses in microscopy, for field work during excursions, for school education and for a serious amateur (الهاوي) of biology.



يستخدم (المشراح) الميكروتوم اليدوي لقطع أجزاء رقيقة من المواد المجهرية، من النباتات اوالحيوانات. ويعتبر الشكل الأساسي من الميكروتوم الذي يسمح بالتحكم في الميكروتوميك باليد بطريقة سريعة ودقيقة. الميكروتوم اليدوي مناسب للدورات العملية المجهرية وللعمل الميداني خلال الرحلات وللتعليم المدرسي وللهواة خطيرة لعلم الأحياء.

1-جهاز التقطيع اليدوي : Hand Microtome

هو جهاز بسيط التركيب يتكون من ماسك للعينة التي توضع داخل قطعة من الجزر حتى لا تتعرض للضغط المباشر الناتج من الماسك، كما يزود بلولب جانبي لتحريك الماسك عند تثبيت العينه او نزعها

ومزود بماسك ايضا يقع أسفل الجهاز لتثبيته على الطاولة. كما ان هناك انواعا اخرى خفيفة الوزن تمسك باليد عندإجراء عملية التقطيع ذات مقبض يتلاءم مع طبيعة عمل هذا الجهاز.

□وقد يكون الجهاز مزودا بتدريج ميكرومتري لتعيين سمك القطاع يدار آليا او باليد، وتستخدم لعملية التقطيع في هذا النوع شفرة حلاقة عادية ذات حد واحد وبقليل من التمرين يمكن الحصول على قطاعات رقيقة معروفة السمك .



Rocking Microtome

Rocking Microtome is used to cut the thin sections of wax-embedded Plant material. Sample is fitted in its arm. It runs repeatedly as rocking motions while moves towards a fixed knife.

It can produce 6-20 micron thin paraffin sections.

2- يستخدم الميكروتوم الهزاز لقطع قطاعات رقيقة من المواد النباتية المطمورة بالشمع. يتم تركيب العينة في ذراعه. ليتحرك حركات اهتزازية امام سكين ثابت. يمكن أن ينتج قطاعات رقيقة من شمع البارافين بسماكة 6-20 ميكرون.



2-جهاز التقطيع الهزاز : Rocking Microtome

ويعتبر هذا الجهاز سهل الستعمال لاحتوائه على قليل من الاجزاء المتحركة، مما يسهل ايضا عملية الصيانة، وقد يكون هذا الجهاز غير مناسب لتقطيع العينات الكبيرة والصلبة ، ولكن يمكن الحصول على قطاعات جيدة لعينات صغيرة مطمورة في شمع البرافين. ومن عيوب هذا الجهاز انه يميل الى الانزلاق و التأرجح اثناء عملية التقطيع نظرا لخفة وزنه، وقد يعالج ذلك بوضع الجهاز على مرتبة او وسادة من الفلين او المطاط لمنع الانزلاق.



Rotary microtome

Rotary microtome Most widely used, also called Minot microtome, after its inventor Professor Minot. The by the rotary action of the hand wheel Suitable for paraffin embedded sections.

Advantages

Ideal for cutting serial sections. Heavier, so more stable

Heavier knife is used, so less vibration. Cutting angle(Tilt) of knife is adjustable. Ability to cope with harder tissue. Can cut Celloidin-embedded section by using a special holder to set the knife obliquely.

Manual or electrically driven rotary microtome are successfully used in cryostats.



3- المشراح الدوار الأكثر استخداما، وتسمى أيضا مشراح مينوت، نسبة لمخترعه أستاذ مينوت. يعمل بعجلة يدوية دوارة مناسبة ويتم الحصول منه على قطاعات من العينات المطمورة بشمع البارافين.

المزايا:

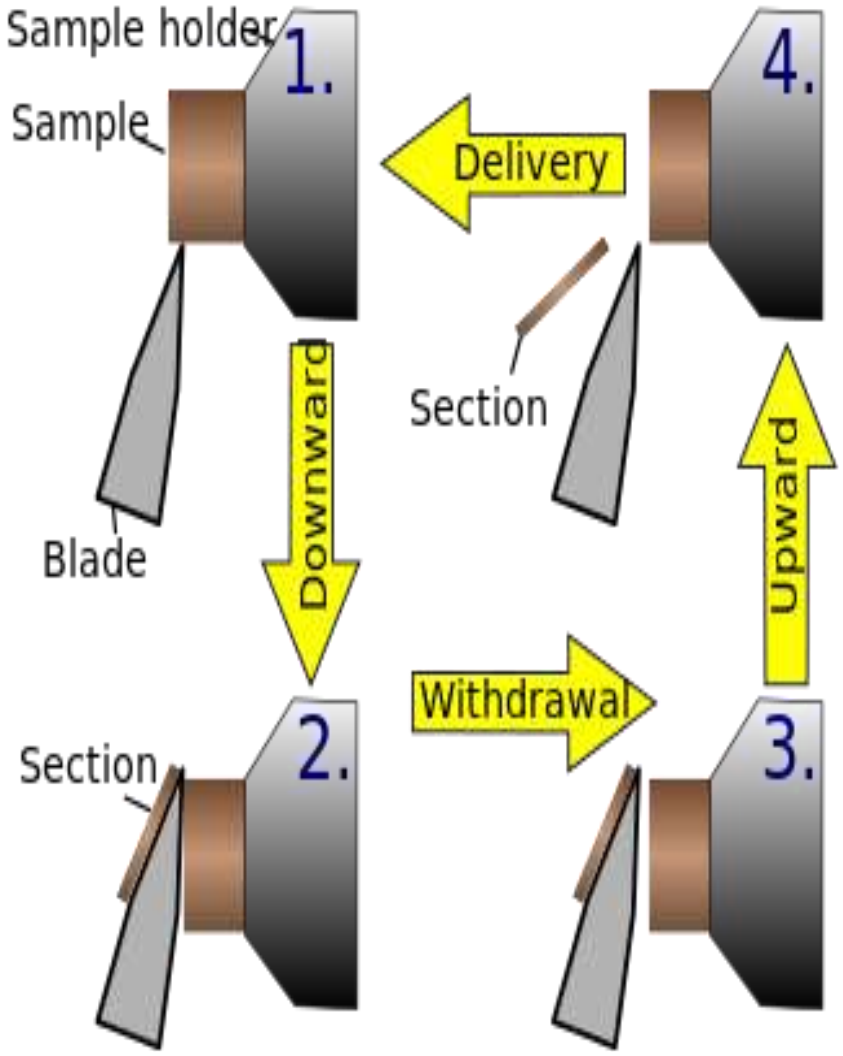
زاوية القطع (الميل) للسكين قابلة للتعديل. قادر على التعامل مع الأنسجة الصلبة. يمكنه قطع سيلويدين والحصول على قطاعات باستخدام حامل خاص لضبط السكين بشكل غير مباشر. يمكن استخدامه يدويا أو كهربائيا بنجاح كما يستخدم في الميكروتوم الثلجي.

3- جهاز التقطيع الدوار : Rotary Microtome

يشبه هذا الجهاز جهاز التقطيع المنزلق ولكنه يختلف في وضع السكين حيث تكون السكين ثابته والعينة متحركة دائما.

ويستخدم هذا الجهاز للاغراض العامة والدروس العملية والمختبرات الطبية ، ويجب ان تكون العينات مطمورة بشمع البرافين ومثبتة ايضا على حامل العينة بالشمع نفسه ، وقد تستبدل مادة الشمع بنترات السليولوز اوالبلاستيك.




Sample holder
Sample
1.
Blade
Downward
2.
Section
Withdrawal
3.
Upward
Section
4.
Delivery

Sliding Microtome



This machine is unusual because in this type the knife is mode horizontally against a fixed block.
It was developed mainly for cutting celloidin embedded blocks of plant samples.
It can also be used for paraffin wax embedded sections.

4- جهاز التقطيع المنزلق : له عدة أشكال

هذا الجهاز غير معتاد لأنه في هذا النوع تكون السكين في الوضع الأفقي مقابل كتلة ثابتة. تم تطويره بشكل أساسي لقطع كتل السيلويدين المضمنة في عينات النباتات. يمكن استخدامه أيضًا للعينات المدفونه االمطمورة في شمع البارافين.

4- جهاز التقطيع المنزلق Sledge (sliding) Microtome :

يتالف هذا الجهاز من سكين متحركة ترتكز على دعامة ثابتة حيث تنزلق السكين على العينة المثبتة على حامل والمطمورة في نترات السليولوز او البلاستيك وتكون السكين اعرض واطول .



ولهذا الجهاز استخدامات كثيرة واسعة الانتشار ، حيث يكون مناسبا لقطع العينات المطمورة في البلاستيك او نترات السليولوز ويستخدم لتقطيع العينات الكبيرة و الصلبة ، كما يمكن استبدال حوامل صغيرة او كبيرة لقوالب شمع البرافين المختلفة

، ويستخدم في مختبرات علوم الحياة وعلم المراض حيث تكون العينات كبيرة وصلبة مثل العظام والاسنان،، كما يمكن تحضير قطاعات رقيقة في عينات صغيرة مطمورة في شمع البرافين مثل الاجنه وغيرها. كما يمكن عمل قطاعات رقيقة في اجزاء من الخشب بعد تنقيعهاو تطريتها.

Freezing Microtome:

It is used for sectioning fresh frozen Plant materials which are suitable for sectioning.

It is motorized or manual Freezing microtome with a unique refrigeration system for independent specimen and knife cooling.

It facilitates applications in both the histology and research labs.

It is used for sectioning fresh frozen tissues without embedding procedures.



جهاز التقطيع الثلجي :

يتم استخدامه لتقطيع المواد النباتية المجمدة الطازجة.

إنه مشراح تجميد آلي أو يدوي مع نظام تبريد فريد للعينة المستقلة وتبريد السكين. يستخدم في مختبرات البحث. يتم استخدامه لتقطيع الأنسجة المجمدة الطازجة دون إجراءات الطمر .

5- جهاز التقطيع الثلجي : Freezing Microtome

يشبه هذا الجهاز جهاز التقطيع المنزلق وخاصة في حركة السكين ويختلف عنها في ان قاعدة حامل العينة تكون متصلة بوحدة تبريد وذلك لتبريد العينة والسكين معا بسرعة .

وهذا الجهاز يستخدم للحصول على قطاعات فردية للعينة غير معاملة باي نوع من المواد الكيميائية التي لها تاثير على الخلايا والنسجة، وبعبارة أخرى عينات غير مثبته او مطمورة .

وقد تكون عينات طازجة او محفوظة بالمواد الحافظة، كما انه يستعمل في المختبرات الطبية لعمل قطاعات لغرض التشخيص الفوري للحالت المرضية.

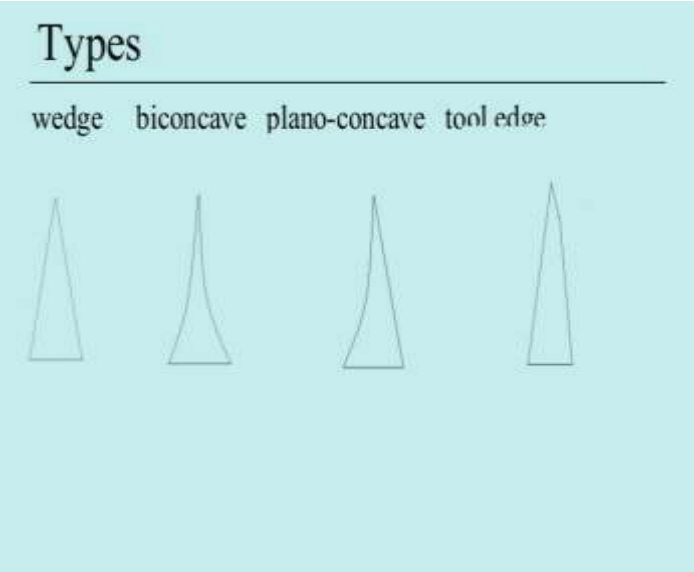
Types of Microtome knives

1 - Plane-wedge – good rigidity, used for all types of sections on any microtome, for ordinary paraffin section cutting.

2 - Biconcave- for rocking and sledge type microtome, easy to sharpen but less rigid and prone to vibration.

3 - Planoconcave edge- for sledge type microtome and some rotary ones.

4 - Tool edge-for hard tissues



ثانيا :شفرات او سكاكين جهاز القطع

1 . مستوية الحافتين Plane :

وتستخدم لتقطيع العينات المطمورة بشمع البرافين أو بنترات السيليولوز والعينات المطمورة بالثلج أو بالمواد الراتنجية (البلاستيك).

2. مقعرة الحافتين Biconcave :

وتستعمل لتقطيع العينات المطمورة بشمع البرافين .

3 . مقعرة الحافة Plano-concave:

وتستخدم لتقطيع العينات المطمورة بالسيلويدين وبالمواد البلاستيكية.

وهذه الأنواع المختلفة من السكاكين سابقة الذكر تستخدم بصورة رئيسية مع أجهزة التقطيع.

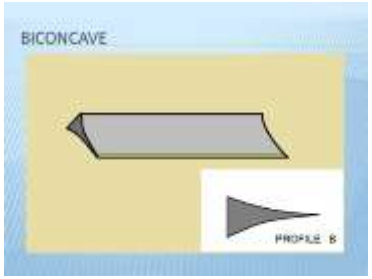
4– شفرات الحلاقة.

سكاكين اجهزة التقطيع

تصنع سكاكين القطع من الحديد الصلب الذي لايصدأ ، وخاصة سكاكين اجهزة التقطيع المستخدمة للفحص الضوئي .

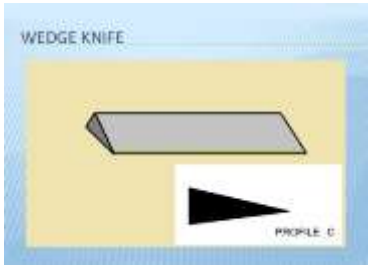
بينما تصنع سكاكين اجهزة التقطيع الدقيق من الزجاج او الالماس .

وتصنع السكاكين بأشكال مختلفة حسب نوع جهاز التقطيع ومادة الطمر المستخدمة في طمر العينات . ومن اهمها :



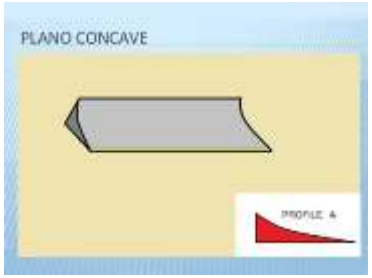
مقعرة الحافتين : Biconcave

وتستعمل لتقطيع العينات المطمورة بشمع البرافين



مستوية الحافتين : Wedge knife

وتستعمل لتقطيع العينات المطمورة بشمع البرافين او بنترات السليلوز والعينات المطمورةبالثلج او مواد الراتنج



مقعرة الحافة : Plano-concave

وتستعمل لتقطيع العينات المطمورة بالسيلويدين وبالمواد البلاستيكية .

شفرات الحلاقة :

وتستعمل لتقطيع العينات والحصول على قطاعات رقيقة وهي مقتصرة على جهاز التقطيع اليدوي .

knife sharpener

It needs two honing techniques – coarse and fine – to resharpen microtome c-profile steel microtome knives up to 22 cm in length.

The knife is resharpened by clamping it in the knife holder at a fixed angle. Microtome knives can be sharpened in the laboratory, safely, quickly and efficiently.



مبراة السكين تحتاج إلى تقنيتين شحذ - خشن ودقيق - لإعادة شحذ سكاكين مشراح .
فولاذية ذات شكل C يصل طولها إلى 22 سم.يتم إعادة شحذ السكين بتثبيته في حامل السكين بزاوية ثابتة. يمكن شحذ سكاكين المشراح في المختبر ، بأمان وسرعة وكفاءة

- Made up of steel

- Parts – blade
  - -knife carrier
  - -handle if knife
  - -bevel



Disposable Blade & blade holder

Disposable Blade is a heavy duty disposable blade.
It features a special steel coating to avoid any compression of sections.
It comes in a package of 10 blades with a cutting angle of 45°.
The blade is 157 mm long x 14 mm wide x 0.8 mm thick.
Suited to the disposable **blade holder**



Disposable Blade

حامل الشفره و شفرة تستخدم لمرة واحدة.
تتميز بطلاء صلب خاص لتجنب الضغط على القطاعات.
ويأتي في مجموعة من 10 ريش او شفرات بزاوية قطع 45 درجة.
وطول 157 مم × 14 مم × 0.8 مم.
وهي مناسبة للحامل المستخدم للتركيب في الميكوتوم.



Disposable Blade Razor Holder for Rotary Microtome - HLS EHS