الفصل الثانى

الأجهزة والطرق المستخدمة فى دراسات الخلية

Instruments and Methods in The Field of Cell Biology.

أضاف الربع الأخير من القرن التاسع عشر إلى القرن العشرين الكثير من الاكتشافات الأساسية والنظريات الهامة .ويعتبر القرن الحالى محظوظا لما صاحبه من اكتشاف الكثير من الأجهزة العلمية الدقيقة والمتقدمة ووسائل التقنية الحديثة والمتطورة ، وبذلك أصبحت وسائل فحص التراكيب الدقيقة للخلايا والأنسجة تتم بواسطة أنواع مختلفة من الميكروسكوبات صممت بحيث تعمل على زيادة القوة التحليلية للميكروسكوب وكذلك زيادة الفروق بين معدلات الإنكسار الضوئى للتراكيب الخلوية وبذلك يسهل مشاهدتها والتفريق بينها .

الميكروسكوب الضوئى "Light microscopy"

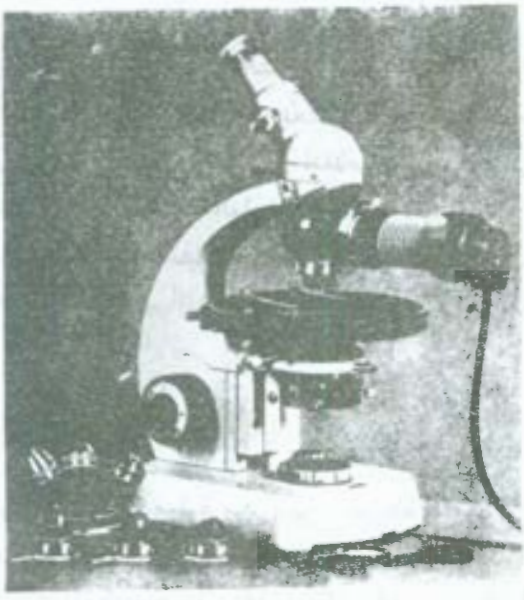
تتدرج الميكروسكوبات الضوئية من الأنواع بسيطة التركيب إلى الأنواع المعقدة . وتعتمد هذه الميكروسكوبات بصورة أساسية ، على استخدام العدسات الزجاجية والضوء المرئى . وتستخدم تلك الميكروسكوبات على نطاق واسع بواسطة الطلاب وفى المعامل البيولوجية (شكل ٢ ، ٦).

ميكروسكوب التباين "Phase contrast microscopy "

يستخدم ميكروسكوب التباين بصورة أساسية لدراسة الخلايا الحية غير المثبتة . وهو يعمل على زيادة الفروق بين معدلات الإنكسار الضوئى للتراكيب الخلوية المختلفة (شكل٣ ، ٤ ، ٥ ، ٧) ، وبذلك يمكن مشاهدتها والتفريق بينها بسهولة . ويستخدم هذا المجهر فى فحص الخلايا الحية التى لم تتعرض لتأثير أية عمليات مثل التثبيت والتجفيف (انتزاع الماء) والصباغة التى كثيرا ما تؤدى إلى ظهور تغيرات مورفولوجية وكيميائية فى أجزاء الخلية . كما يستخدم لدراسة تأثير بعض العوامل الكيمائية والفيزيقية المختلفة وكذلك للكشف عن التراكيب أو الصور غير الحقيقة التى قد تظهر نتيجة للتثبيت والصباغة .

ميكروسكرب التداخل "Interference microscopy "

بنيت فكرة كل من ميكروسكوب التباين وميكروسكوب التداخل على أساس أنه على الرغم من أن التراكيب البيولوجية بالغة الشفافية بالنسبة للضوء المرئى إلا أنها تحدث تغيرات تباينية فى الإشعاعات النافذة (شكل ٨ ، ٨ أ).



(شكل ٨ أ) ميكروسكوب التداخل Interferance Microscope

ويمكن متابعة هذه التغيرات التباينية فى معامل الإنكسار وكذلك فى سمك الأجزاء المختلفة . ويمكن بواسطة ميكروسكوب التداخل تحديد الاختلاف الضوئى التباينى بالنسبة لجميع الأجزاء الخلوية وبذلك يمكن معرفة أوزانها الجافة . بالإضافة إلى ذلك فإنه من الممكن متابعة التغيرات الطفيفة والكبيرة فى معامل الانكسار . وعلى ذلك فإن لميكروسكوب التداخل ميزة أساسية وهى إعطاء تحاليل كمية للخلايا الحية وتأثير المواد الكيماوية والعوامل الأخرى عليها .

ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية "Ultraviolet microscopy"

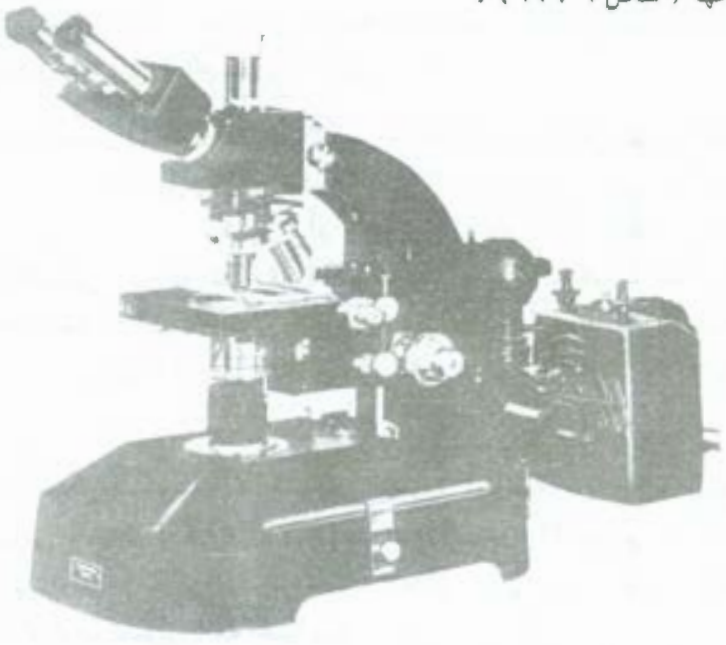
تقع منطقة الضوء المرئى فى الطيف بين ٦٥٠٠ انجستروم (الأحمر) ، ٤٥٠٠ انجستروم (البنفسجى). أما الموجات الضوئية الأقصر من ٤٠٠٠ انجستروم فيطلق عليها فوق البنفسجية (Ultraiolet) . وفى هذه المنطقة تمتص بعض مكونات الخلية ، مثل الأحماض النووية ، موجات ذات أطوال معينة ؛ وعلى ذلك

يستخدم هذا النوع من الميكروسكوبات لقياس محتويات الخلية من الأحماض النووية (شكل ٨ ب)هذا وقد تم الاستفادة من هذا الميكروسكوب فى تصميم جهاز جديد يسمى جهاز " **القياس الضوئى الخلوى** " - سيتوفوتوميتر (Cytophotometer) .(شكل ١٢) مزود بشاشة معينة ويمكن بواسطة تحديد كمية المحتويات الكيميائية (خاصة الاحماض النووية) داخل الخلية .

ميكروسكوب **الاستقطاب الضوئى** (Polarization microscope) هذا الميكروسكوب يعطى صورا (شكل ١١)

الميكروسكوب الفلورى (أو الفلوريسنتى) "Fluorescent microscope"

لبعض المواد الكيمائية خاصية معينة وهى أنه عند إشعاعها بواسطة الأشعة فوق البنفسجية فإنها تمتص هذا الإشعاع وتصدر ضوءا مرئياً ، ولذلك نجد فى الخلايا الحية أن المحتويات الخلوية التى تمتص هذه المواد الكيميائية يمكن مشاهدتها وهى (تضوى) بطريقة معينة أو يصدر عنها هذا الضوء الفلورى عند إضاءتها بواسطة الأشعة فوق البنفسجية . وتتميز هذه الطريقة بدقتها البالغة وتستخدم بصورة خاصة لتوضيح كيفية دخول الجزئيات إلى الخلايا أو ادمصاصها على أسطحها (شكل ٩ ، ٩أ) .



(شكل ٩ أ) ميكروسكوب الفلورسنتى Fluorescent Microscope

ميكروسكوب الإعتام "Dark field microscopy"

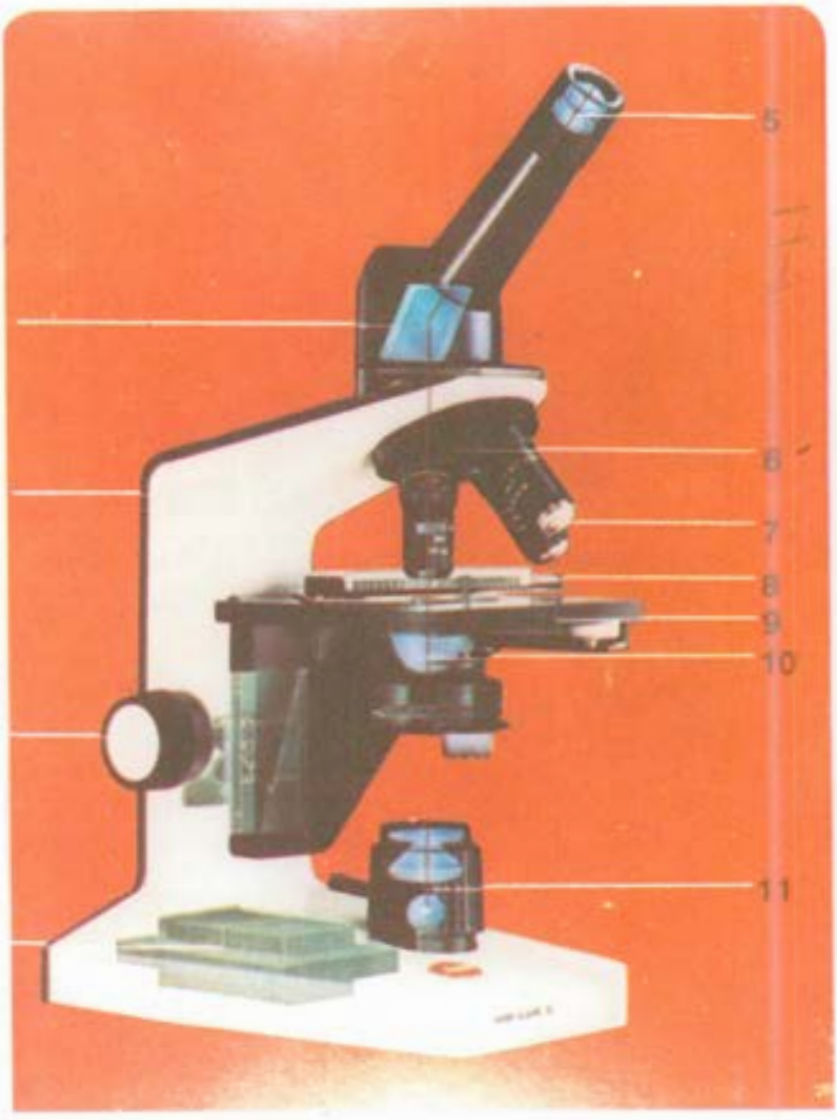
يستخدم هذا الميكروسكوب (شكل ١٠ ، ١٠ أ) لدراسة الخلايا الحية . وتعتمد النظرية التى بنى عليها على أن الضوء ينتشر عند حواف الجسيمات الصغيرة التى يكون لها معاملات انكسار ضوئية مختلفة . وهذا الميكروسكوب مزود بمكثف معين يعمل على إضاءة الجسم المراد فحصه بطريقة مائلة وبذلك لا يدخل الضوء المباشر إلى العدسة الشيئية . ونتيجة لذلك تبدو الأجسام الخلوية لامعة نتيجة للتشتت الضوئى عند حوافها ، بينما تكون الأرضية المحيطة بها معتمة وهو يستخدم على نطاق واسع فى فحص الدياتومات والراديولاريا (المشعات) والتراكيب المدببة .

الميكروسكوب الإلكترونى النفاذ "Transmission electron microscopy"

يستعمل الميكروسكوب الالكترونى TEM (شكل ١٣ ، ١٤ ، ١٦ ، ١٥) لدراسة التركيب الدقيق للمكونات الخلوية ، فالمعروف ان قوة التكبير فى الميكروسنكوب العادى تعتمد على الشيئية والعينية ، ويمكن الحصول على قوة تكبير ما بين ٥٠٠ ، ١٥٠٠ وذلك تبعا لقوة كل من العدستين المستخدمتين أما بالنسبة للميكروسكوب الإلكترونى ، حيث تستخدم حزمة من الإلكترونات ذات السرعة الفائقة والتى تتحكم فيها عدسات كهرومغناطيسية ، فإنه يمكن أن يصل إلى درجة عالية من تحليل الأشياء ، وقد تصل قوة التحليل هذه إلى ٥ انجستروم (شكل ١٥) .

وقد بات من الميسور الحصول على قوة تكبير فى الميكروسكوباتالالكترونية الحديثة تصل الى حوالى ١٦٠ر٠٠٠ مرة . ويمكن تكبير الصور الفوتوغرافية ، التى يتم الحصول عليها ، الى حوالى ١ر٠٠٠ر٠٠٠ مرة أو أكثر . وبذلك تمكن العلماء بواسطة الميكروسكوب الالكترونى من رؤية أشياء فى الخلية لم تكن معروفة من قبل ، كما أمكنهم معرفة التفاصيل الدقيقة للتراكيب الخلوية الاخرى . وقد تم أخيرا تصميم ميكروسكوب جديد يصل مداه فى التكبير اكثر من ذلك ويعمل على توضيح الذرات والجزيئات فى التراكيب الخلوية .

ويتكون الميكروسكوب الالكترونى بصورة أساسية من حجرة تفريغ ، والعمود الالكترونى للميكروسكوب الذى يوجد فيه المصدر الالكترونى (القذيفة الالكترونية) التى تولد حزمة من الالكترونات ، وجهاز ضوئى يوضح صورة الأجسام على شاشة فلورية او لوحة تصوير بالغة الحساسية .



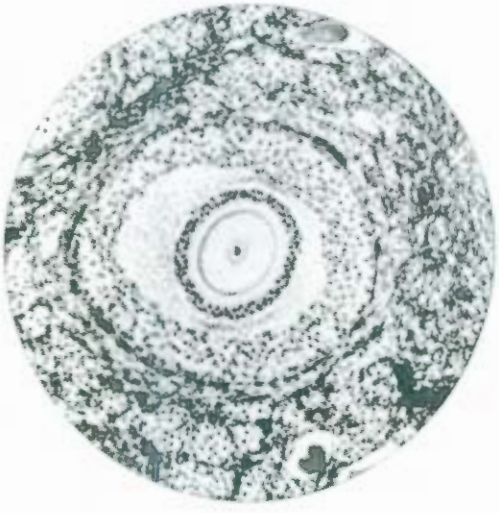
(شكل ٢) الميكروسكوب الضوئى المعتاد

١ – القاعدة
٢ – مسمار الضبط
٣ – الذراع
٤ – انبوبة الميكروسكوب
٥ – عدسة عينية
٦ – القطعة الانفية
٧ – عدسة شيئية
٨ – مسمار التثبيت
٩ – المنصة
١٠ الحاجز الضوئى
١١ – مصدر الاضاءة

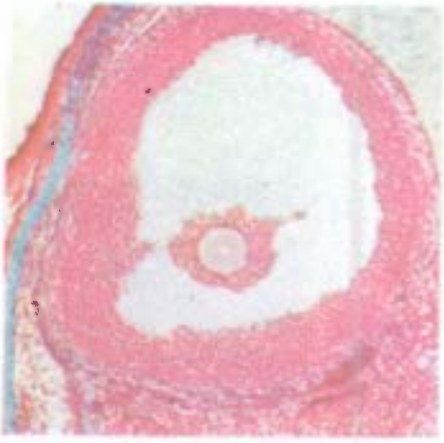
(شكل ٤) ميكروسكوب التضاد (التباين)
(بحالته الكاملة)

الجزء الاساسى لميكروسكوب التضاد او التباين

(شكل ٥)
خلية حية كما تظهر بميكروسكوب التضاد



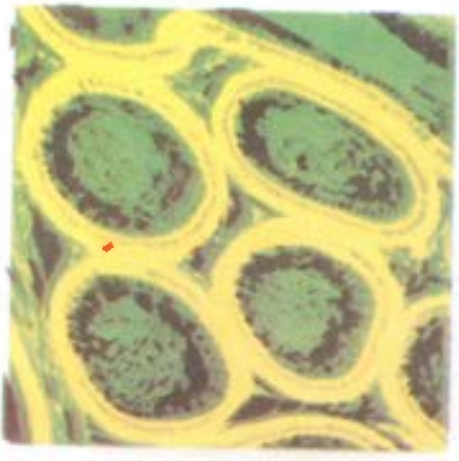
(شكل ٦)
حوصلة جراف (فى المبيض)
بميكروسكوب التضاد او التباين



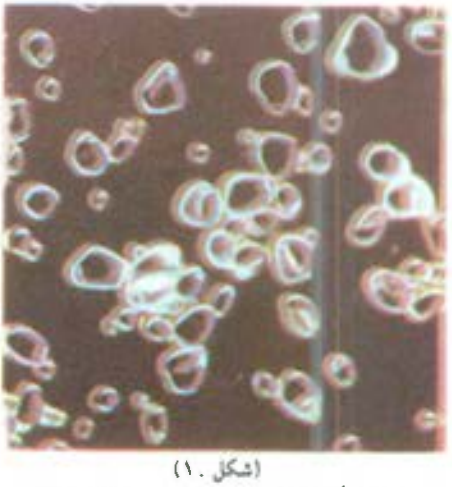
(شكل ٣) حوصلة جراف (فى المبيض)
بالميكروسكوب الضوئى المعتاد

(شكل ٧) إحدى رواسب أو حصوات الكلية
بميكروسكوب التضاد أو التباين

(شكل ١٨)
مرحلة انقسام بميكروسكوب التداخل



(شكل ٩) الحوصلات المنوية فى الخصية
بالميكروسكوب الفلوروسنتى



(شكل ١٠)
بعض أنواع البكتيريا بالميكروسكوب الاظلامى

(شكل ١١)
بلورات متنوعة بميكروسكوب الاستقطاب

(شكل ١٢)

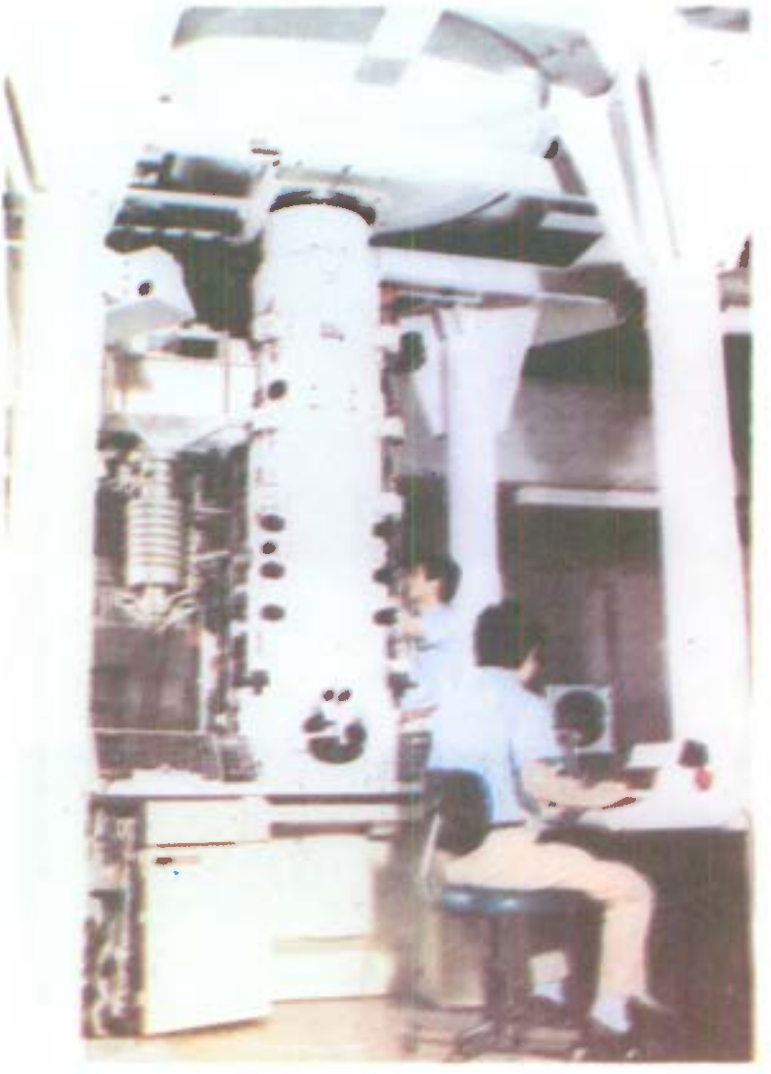
جهاز القياس الضوئى الخلوى (سيتوموتوميتر) (للدراسات السيتوكيميائية الكمية)

(شكل ١٣)

ميكروسكوب اليكترونى

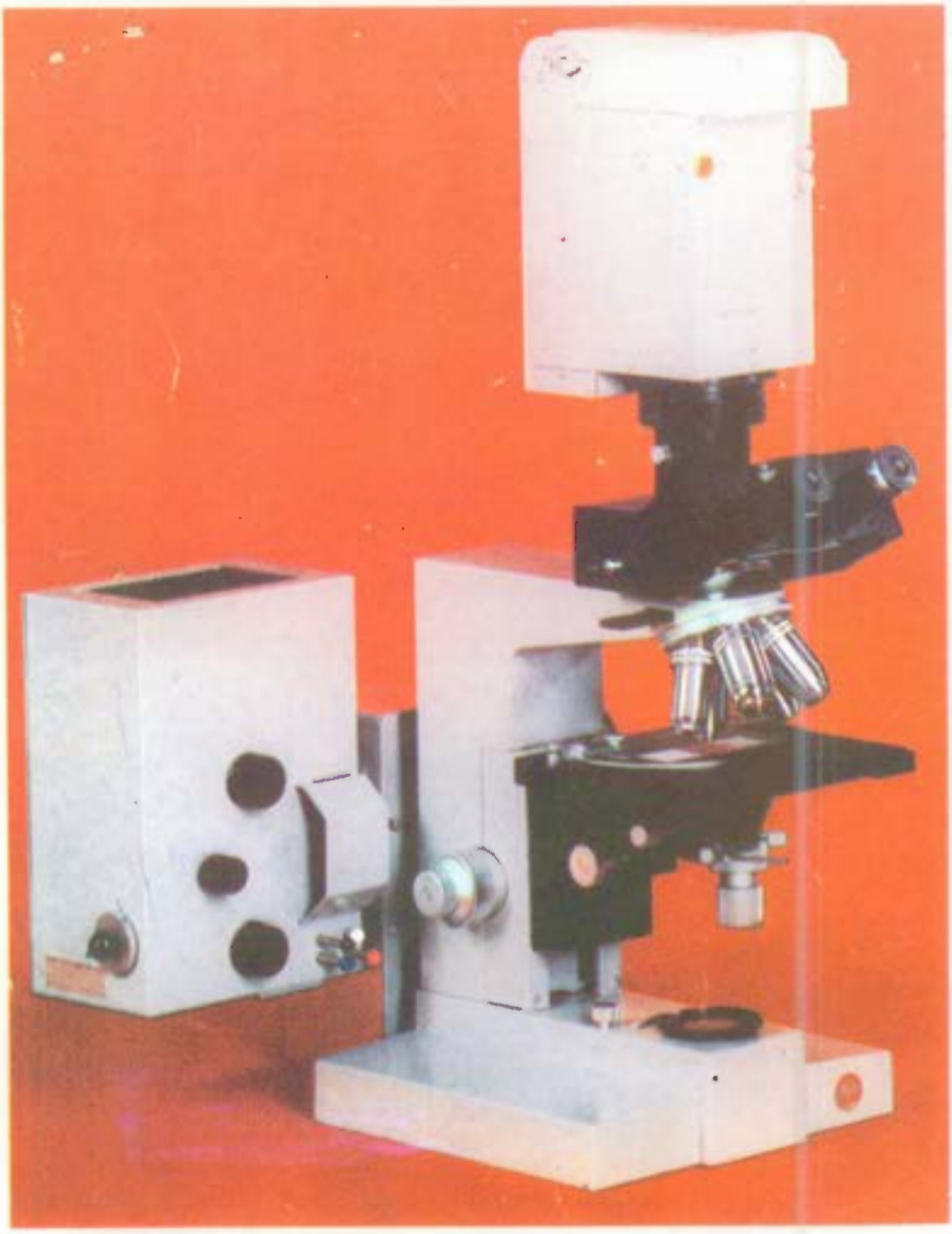
(شكل ١٤)

جزء مكبر من قاعدة ميكروسكوب اليكترونى



(شكل ١٦)

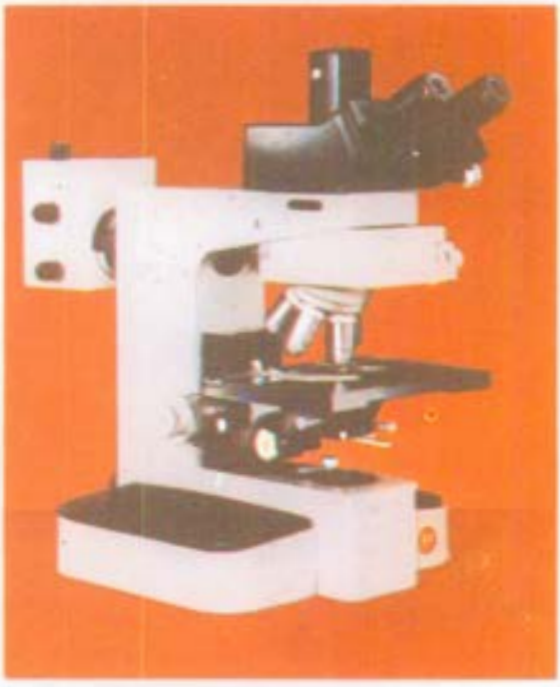
أحدث الميكروسكوبات الالكترونية (هيتاشى ١٩٨٨)



(شكل ٨ ب)

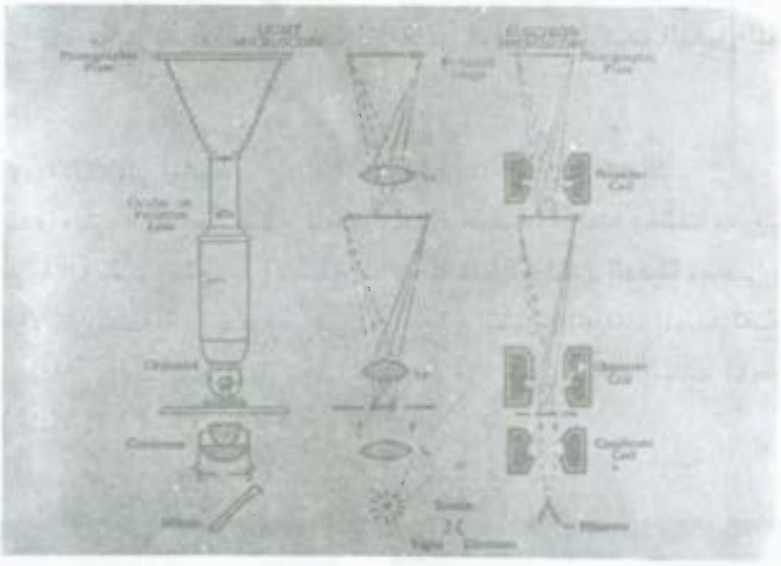
ميكروسكوب الاشعة فوق البنفسجية

Ultraviolet Microscopy



(شكل ١٠ أ)
ميكروسكوب الحقل (الحيز) المظلم
Dark Field Microscope

(شكل ١٦ أ)
أحدث الميكروسكوبات
الاليكترونية الماسحة
Ultramodern Scanning
Electon Microscope



شكل (١٥) مرور الأشعة الضوئية فى الميكروسكوبين الضوئى والاليكترونى

ويتم الحصول على حزمة الالكترونات بتسخين سلك من التنجستين مثلا - وهو خيط الكاثود (القطب الموجب) . ويتم تنشيط أو اسراع الالكترونات بواسطة قوة الفولت المرتفعة المنشطة والتى توضع بين الكاثود والأنود (القطب السالب) . وتتم المحافظة على القطب السالب عند معدل الجهد الأرضى بينما يكون القطب الموجب عند جهد سالب مرتفع . ويتم العزل الكهربى بين القطب الموجب وبقية الميكروسكوب بواسطة الخزف أو الزجاج .

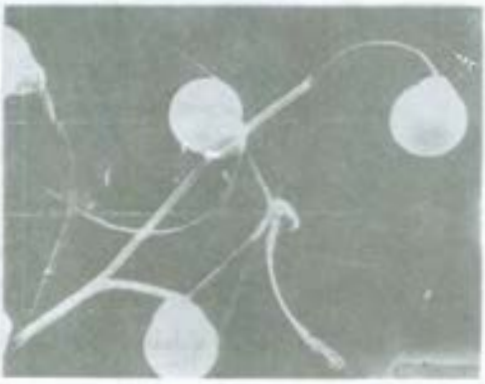
ويشتمل الجهاز الضوئى فى الميكرسكوب على عدسة تكثيف مغناطيسية تعمل على تركيز حزمة الالكترونات فى العينة والعدسة الشيئية وعدسة العرض التى تعمل جميعها على تكوين صورة مكبرة للعينة على الشاشة الفلورية أو الشريحة التصويرية . ويجب أن تمر حزمة الالكترونات فى الميكروسكوب الالكترونى خلال مسافة مفرغة تفريغا جيدا حتى لا تتشتت الالكترونات .

وبصورة عامة فإن الميكروسكوب الالكترونى يستخدم كمصدر للاضاءة حزمة من الالكترونات بدلا من الضوء العادى . وتخترق هذه الالكترونات العينية ثم تقع على

شريحة تصويرية مكونة صورة مكبرة للعينة . وواضح ان للميكروسكوب الالكترونى - بما ينتجه من قوة تكبير مرتفعة - أهمية بالغة فى توضيح التركيب الدقيق للمكونات الخلوية .

الميكروسكوب الالكترونى الماسح Scanning Electron Microscope

وهو مبنى أساسا على نفس الفكرة السابقة ولكنه يختلف جذريا عنه من ناحية انه يقوم بتصوير الاسطح الخارجية فقط للتراكيب الدقيقة ومعنى ذلك أن الأشعة الالكترونية التى تستخدم فى الأضاءة لا تخترق العينات إنما تقع عليها من أعلى هذا ، بالطبع بجانب اختلاف اساسى فى طرق اعداد العينات للفحص فى الحالتين (اشكال ١٦ أ ، ١٦ ب ، ١٦ ج ، ١٦ د)



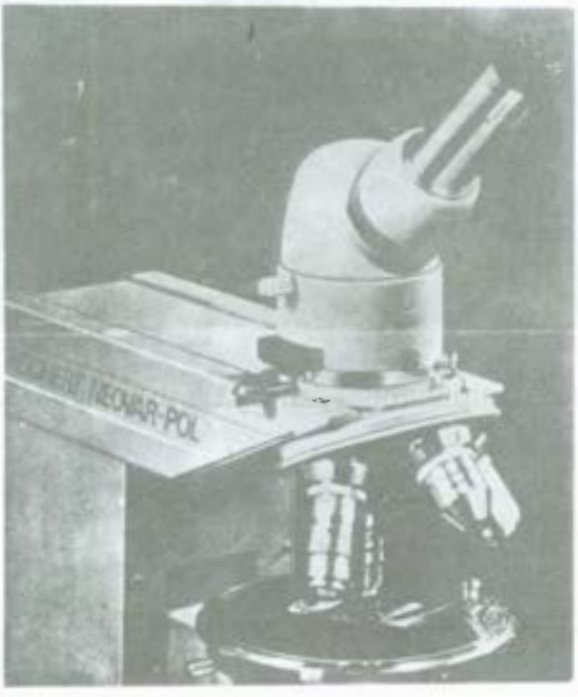
(١٦ ب) حيوانات منوية

(١٦ جـ) أحد أنواع البكتيريا

(١٦ د) خلية دم حمراء

ميكروسكوب الضوء المستقطب (Polarized microscope)

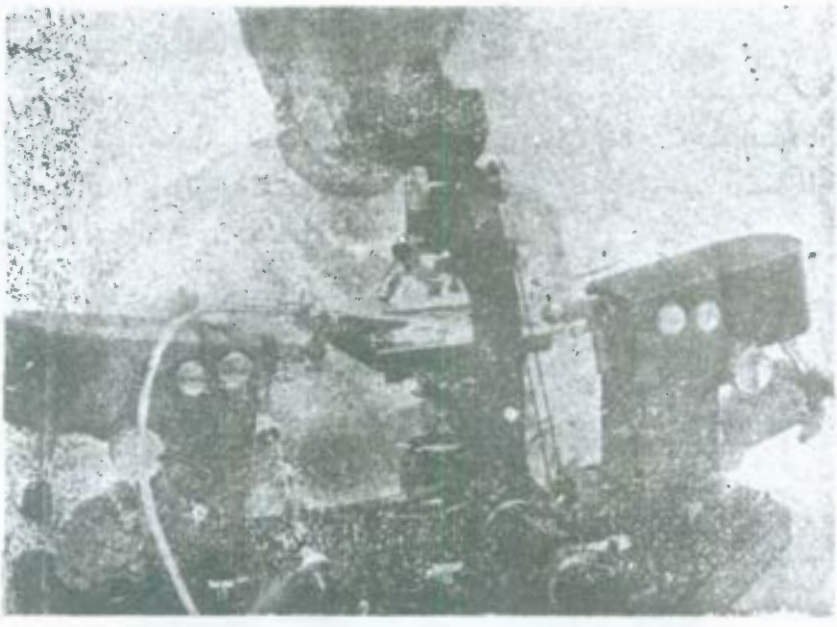
وهو اوسع استخداما بالنسبة للبلورات والمعادن عنه فى الاغراض البيولوجية وهو يختلف بصورة اساسية عن الميكروسكوب العادى فى احتوائه على تصميمين اضافين ، يعمل احدهما على استقطاب الضوء ويعمل الآخر على تحليل الضوء . وعند استخدامه فى فحص العينات البيولوجية فان ذلك يتوقف على نمط ظهورها بهذا الضوء المستقطب (أشكال ١١ ، ١١ أ)



شكل (١١ أ) ميكروسكوب الضوء المستقطب Palarization Microscope

جهاز التشريح الميكروسكوبى "Micromanipulator"

يستخدم جهاز التشريح الميكروسكوبى على نطاق واسع فى الدراسات التجريبية فى الخلايا (شكل ٥) . وهو ميكروسكوب ضوئى مزود بإبر دقيقة وشفرات رفعية حادة وحقن دقيقة وبذلك يمكن إدخال إبرة داخل الخلية وحقنها بمواد معينة أو قطع أجزاء منها لمعرفة أثر ذلك على تراكيب الخلية ومناشطها الحيوية .



(شكل ١١ ب) جهاز التشريح الخلوى Micromanipulator

طرق دراسة الخلية

Methods for studying cells

توجد طرق خاصة لدراسة الخلية ومحتوياتها وتركيبها الكيميائى . وهناك مسلكان رئيسيان يتبعان فى دراسة الخلايا :

(١) الطرق الحيوية (فحص الخلايا وهى حية) .

(٢) فحص الخلايا المثبتة بالمثبتات المختلفة .

فحص الخلايا الحية: Examination of living cells

الفحص الحيوى وفوق الحيوى : "Vital and supra-vital examination"

حيث يتم صباغة الخلايا الحية داخل الجسم أو خارجه بصبغات متخصصة مثل أخضر جانس (Janus green) والأحمر المتعادل (Neutral red) .

كذلك ، فإن طرق زراعة الأنسجة (tissue culture) لها أهميتها البالغة فى دراسة تركيب الخلية . وهذه الطرق فى تقدم ملحوظ حتى أن مزرعة للخلايا الليفية ظلت فى حالة الحياة لأكثر من ثلاثين عاما .

المثبتات المستخدمة فى بيولوجيا الخلية :Fixatives used in cell biology

يطلق على العملية التى تستخدم للمحافظة على الخلايا والأنسجة فى حالة أقرب ما تكون لحالتها الحية **التثبيت** (Fixation) ، وهى عملية كيمائية تستعمل فيها مواد معينة تسمى **المثبتات** (Fixatives) . ويعتمد اختيار المثبت على طبيعة الدراسة والغرض منها . فعلى سبيل المثال ، إذا كان المطلوب دراسة النواة والكروموسومات ، تستخدم عادة المثبتات الحمضية بينما يستخدم الأسيتون والفورمالديهيد مثلا لدراسة الإنزيمات ، وهى مواد تعمل على المحافظة على نشاط الإنزيمات وفاعليتها . وعلى أية حال ، فإن اختيار المثبتات يجب أن يكون بطريقة تؤدى إلى ترسيب البروتينات فى أدق صورها حتى لا يحدث أى تغير فى مظهر الخلية . وأفضل المبثبتات البروتينية هى التالية :

الفورمالين (الفورمالديهيد) : "Formalin "formaldehyde

يتفاعل الفورمالين مع بروتينات الأنسجة بطرق عديدة ومعقدة وذلك لأنه يستطيع الاتحاد بالعديد من المواد التى تترسب فى الخلايا والأنسجة . وجدير بالذكر أن الكثير من تلك التفاعلات عكسية ، وتتم تحت تأثير عوامل بسيطة مثل الغسيل.

وأهم تفاعلات الفورمالين هى التى يتم فيها تحول أحد المركبات الذى يحتوى على ذرة هيدروجين فعالة (أى شديدة التفاعل) إلى مجموعة هيدروكسيل .

$$RH + CH_2O \text{ ---------- } R.CH_2(OH)$$

ومركب الهيدروكسيل فعال أيضا ويمكن أن يتكاثف مع ذرة هيدروجين أخرى لتكوين وصلة ميثيلين metyylene bridge (-CH2-)

$$R.CH_2(OH) + Hr \text{ ---------- } R\text{-}CH_2\text{ - }R + H_2O$$

وتتمزق هذه الوصلات الميثيلينية بالتميؤ أو التحلل المائى . وقد تتكون الوصلات الميثيلينية بين مجموعتين متماثلتين مثل مجموعتين أمينيتين NH_2 ، أو بين مجموعة أمينية NH_2 وثنائى ببتيد أو مجموعة أمينية ، NH_2 .

يتفاعل الفورمالين مع الكيراتين (Keratin) بين الأس الهيدروجينى ٦ ، ٨ (والكيراتين هو أحد المكونات الرئيسية فى الجلد والشعر) ، وذلك دون التأثير فى رابطات الكبريت S-S فى السيستين . غير أنه فى الوسط الأكثر قلوية يعمل على اختزال مجموعة ثنائى الكبريت (S-S) إلى مجموعتى كبريت هيدروجينى SH ، وينجم عن ذلك تفاعله معهما مكونا ، فى بعض الأحيان ، وصلة ميثلينية ($S-CH_2-S$) فى المكان الأصلى لرابطة الكبريت الهيدروجينى المزدوج .

تشمل المجموعات التى تدخل فى عمليات تثبيت البروتينات على الببتيدات (Peptides) ومجموعة الهيدروكسيل ومجموعة الكربوكسيل وكذلك البروتينات الكبريتية .

ويمكن ازالة معظم الفورمالين الذى يبقى مرتبطا بالبروتين بعد عملية التثبيت بواسطة الغسيل بالماء الجارى لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة . وعلى الرغم من ذلك تظل آثار بعض الفورمالين باقية فى الانسجة . وقد يمنع هذا الفورمالين المتبقى إعداد الأنسجة بطريقة جيدة ، ولهذا يتحتم غسل العينات المثبتة فى الفومالين غسلا كافيا بالماء المقطر وذلك للتخلص من بقايا الفورمالين الموجود في الأنسجة .

وقد عرفت تأثيرات الفورمالين على مكونات الأنسجة لأول مرة عن طريق الصباغة وصناعات الصوف حيث أن الكولاجين والريتيكولين (الألياف البروتينية الشبكية) مادتان هامتان فى هذا المجال . وقد تمت بعض البحوث تحت ظروف هستولوجية لا بأس بها (على سبيل المثال عند توفر أس هيدروجينى يتراوح بين ٤ ، ١٠ فى درجات حرارة مختلفة) ؛ وقد وجد أن الفورمالين المرتبط بالبروتينات المختلفة قد نقص بشكل واضح عندما ارتفع الأس الهيدروجينى إلى ١٠ ؛ ويستخدم الفورمالين دائما فى الدراسات الهستولوجية والسيتولوجية فى محاليل محايدة عند نقطة التعادل أو فوقها ويؤدى ذلك الى زيادة فاعلية الفورمالين ويعزى ذلك إلى أن التركيب المتبلمر للفورمالين يوجد فى الماء على صورة مميئة فى هيئة جليكول الميثيلين $(CH_2(OH_2)$ mathylene glycol

وترجع أهمية تلك الملاحظات بالنسبة للأعمال السيتولوجية والهستوكيمائية الى أن معاملة البروتينات بواسطة الفورمالين ، والذى يعقبه غسل العينات غسلا كافيا بالماء المقطر جدير بأن يجعل البروتينات فى حالة تمكنها من التفاعل بكفاءة مع أى صبغة أو أى مادة كيماوية .

الكحول والأسيتون Alcohol and acetone

يعمل الكحول والأسيتون على ترسيب البروتينات . ويستخدمان على نطاق واسع فى الدراسة الهستوكيميائية للإنزيمات . وعلى الرغم من التغيرات الشكلية التى يحدثها كل من المركبين فى الخلايا إلا أنهما لا يحدثان أى تغيير فى المجموعات الإنزيمية وفاعليتها على أنه يتعين الإشارة إلى أن تفاعلات الكحول والأسيتون على البروتينات تفاعلات عكسية ، ويمكن للبروتينات أن تستعيد خواصها الأصلية عند ابعاد العوامل المؤثرة (الكحول أو الاسيتون) عنها .

الأيونات والمركبات المعدنية Metallic ions and complexes:

يتركز اهتمام العاملين فى مجال الخلايا والأنسجة بصفة خاصة على كل من الكروم والزئبق والأوزميوم .

الكـــروم : "Chromium"

لمثبتات الكروم خاصية تكوين مركبات معينة مع الماء ، وتتحد تلك المركبات مع المواد البروتينية مكونة مركبات أخرى شبيهة بالتى تتكون تحت تأثير الفورمالين . ويعتمد تفاعل الكروم إلى حد كبير على الأس الهيدروجينى لوسط التفاعل فقد وجد انه عندما يتراوح الأس الهيدروجينى بين ١ ، ٤ تزداد كمية الكروم المرتبطة بالكولاجين ؛ كما وجد أيضا أن كمية الكروم التى ترتبط بزلال البيض ترتفع بشكل كبير عندما يتغير الأس الهيدروجينى من ٤ الى ٧ وبصورة عامة فقد استقر الرأى على أن الأس الهيدروجينى للوسط الذى يستخدم فيه الكروم يكون عند درجة أقل من ٢ر٩ .

والملاحظ أن المثبتات التى تحتوى على الكروم تعطى نتائج حسنة فى حالة الجليكوجين والدهون (Lipids) والأحماض النووية وكذلك فى تثبيت الميتوكندريا والحفاظ عليها .

الزئبـــق : "Mercury"

تســتخدم أمــلاح الزئــبق علــى نطاق واسع فى إعداد العينات الهستولوجية والسيتولوجية للأغراض العادية . وتكون المركبات الناتجة عن تفاعل الزئبق مع البروتينات اكثر ثباتا من مثيلاتها التى تتكون من تفاعل المعادن الأخرى مع البروتينات .

ويتخلف عن التثبيت بواسطة المثبتات الزئبقية رواسب زئبقية تبدو واضحة فى

الخلايا والأنسجة ، ولكن يمكن التخلص من تلك الرواسب باستخدام محلول الأيودين ، الذى يعقبه غسيل كاف بمحلول ثيوسلفات الصوديوم (الهيبو) الذى يعمل بدوره على إزالة ما يتواجد من بلورات الأيودين . وفى النهاية يتم التخلص من محلول الهيبو بغسل العينات غسلا كافيا بالماء المقطر .

وبالنسبة لدور الزئبق وتأثيره على الأنسجة وبخاصة على محتوياتها البروتينية يجب أن تعرف أن أيونات الزئبق Hg^{++} تشبه فى سلوكها سلوك الأيونات المعدنية الأخرى من ناحية اتحادها بالمجموعات الحمضية للبروتينات وبخاصة مجموعات الكربوكسيل والهيدروكسيل وحامض الفسفوريك الموجود فى المركبات البروتينية النووية .

ويختلف الزئبق عن الكروم فى أنه لا يستطيع تكوين مركبات لها القدرة على ربط السلاسل البروتينية المتجاورة ، كما يختلف عن معظم المعادن الأخرى فى قابليته للارتباط بمجموعات الهيدروجين الكبريتية SH . فإذا وجدت كمية ، مهما كانت طفيفة من هذه المركبات ، فإنها تتفاعل مع الزئبق وتكون الرابطة الناتجة عن هذا الاتحاد أقوى منها فى حالة الاتحاد بين الزئبق وأية مجموعات أخرى . وقد أمكن لبعض الباحثين إعداد جزء من المصل الزلالى يحتوى على مجموعة هيدروجينية كبريتية واحدة فى الجزئ . وعندما ترك هذا ليتفاعل مع ملح الزئبق ، وجد أن البروتين الناتج يحتوى على نصف ذرة زئبق لكل جزئ من الزلال . ويمكن توضيح التفاعل الحادث فى هذه الحالة كالاتى :

$$RSH + Hg\,Cl_2 \text{ ---------- } RSHgCl + HCl$$

(Protein mercaptide)

$$RSHgCl + R.SH \text{ ---------- } (RS)_2\,Hg + HCl.$$

والتفاعل الثانى بطئ . وكلا التفاعلين عكسيان ، وبينما يمكن عكس التفاعل الثانى بأى تفاعل وينتج عن ذلك مركب زئبقى غير متحلل ، إلا أن التفاعل الأول يعكس فقط بواسطة مواد كاشفة (مثل السستيين Cysteine) الذى يكون مشتقات زئبقية ثابتة . وتجدر الإشارة إلى أنه فى حالة التحضيرات المحتوية على بروتينات فليست جميع مجموعات الهيدروجين الكبريتية الموجودة تستعمل فى التفاعل . وفى الدراسات المتعلقة بكيمياء الخلية يبرز سؤال على درجة كبيرة من الأهمية وهو : هل تفاعل الزئبق مع المجموعات البروتينية المختلفة قابل للإنعكاس بالعمليات المعتادة مثل الطمر فى الشمع

والغسيل وازالة الرواسب الزئبقية بواسطة الأيودين والهيبو ؟ والواقع أن الدراسات الخاصة بتلك النواحى لم تتم بعد وإن كان من المؤكد أن بعضا من الزئبق يبقى مـرتبطا بالمجموعات الحمضية فى البروتينيات النووية ، ومن المحتمل أيضا أن بعضه يبقى مرتبطا مع مجموعات الكبريتيات الهيدروجينية . وعلى ذلك فمن المستحسن تحاشى استخدام المثبتات الزئبقية فى تحضيرات كيمياء الخلية عندما يراد دراسة الأحماض النووية أو مجموعات الكبريتات الهيدروجينية بدقة تامة . ويمكن فى هذه الحالة استخدام تفاعلات بروتينية أخرى مثل ميلون (Millon) وساجوشى (Saguchi) وملح تترازوليوم .

الأوزميـــــوم "Osmium"

يستخدم عادة حامض الأوزميك (رباعى الأوزميوم OSO_4) كمثبت سيتولوجى وبخاصة لتوضيح جهاز جولجى والميتوكندريا . ولكن استخدامه فى الدراسات الهستولوجية (دراسة الأنسجة) محدود جدا لبطء اختراقه للتراكيب الداخلية ، غير أنه يلقى الأن اهتماما شديدا بسبب استخدامه فى تحضير العينات المطلوبة للفحص بالميكروسكوب الالكترونى .

وبالنسبة لدور الأوزميوم فى التثبيت فيعتقد أن الدهون غير المشبعة تختزل رباعى الأوزميوم مكونة مركبات داكنة اللون تحتوى على الأوزميوم أو هيدروكسيده . وقد يرجع السبب فى ذلك إلى أكسدة الروابــط المزدوجة (double bonds) بين درات الكربون المتجاورة .

```
------ CH    O            ------ CH ------- O
+         OSO2  ----            OSO2
-------- CH               ------- CH ------- O
(colourless)                  (Black)
```

وقد وجه **پورتر** (Porter) فى عام ١٩٥٣ أن نسبة ٢ ٪ من حامض الأوزميك تكون مركبات جيلاتينية مع الزلال (الألبومين) والجلوبيولين والفيبرينوجين . وتعتبر المادة الجيلاتينية الواضحة التى تتكون ببطء نسبى مع الألبومين دليلا على ارتباط خيطى (miceller) او ارتباط وحيد الجزئ . ويعتقد **ولمان** "Wolman" (١٩٥٥) أن

اطالة وقت التثبيت ينتج عنه تلف واضح لارتفاع معدل الأكسدة ، كذلك فإنه من المعروف تماما أن الكحول يمكن أن يستخلص الأغشية الميلينية التى تحيط كلية بالألياف العصبية ، ولكن هذا لا يحدث إذا سبق معاملة الأنسجة بحامض الأوزميك . وقد فسر ذلك على أنه نتيجة للارتباط التام الذى يحدث بين الدهون (الليبيدات) والبروتينات .