Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

Basic Medical Sciences Research Center Histogenotech Co., Tehran, Iran

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

آموزش جامع رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن (Feulgen)
در آزمایشگاه بافت‌شناسی

❋آنچه در این مطلب خواهید خواند **صفحه**

❋مقدمه ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در بافت‌شناسی ۳

❋تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن ۳

❋انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در بافت شناسی ۴

❋نگاهی اجمالی به DNA رنگ شده با فولگن..... ۵

❋انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن..... ۶

❋پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی فولگن در بافت‌شناسی..... ۶

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی فولگن..... ۷

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی فولگن..... ۷

❋تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی فولگن..... ۸

❋تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی فولگن..... ۹

❋ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در آزمایشگاه بافت شناسی..... ۱۰

❋جمع‌بندی..... ۱۱

❋سوالات متداول..... ۱۱

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در بافت‌شناسی

رنگ آمیزی فولگن یا فولژن (Feulgen) می تواند DNA را در بخش های بافتی و سلول ها رنگ و شناسایی کند. فولگن پرکاربردترین رنگ‌آمیزی برای رنگ‌آمیزی DNA در بافت شناسی است. اساس و پایه رنگ‌آمیزی فولگن این است که دو رشته DNA را از طریق هیدرولیز با محلولی از HCl که پیوند بازهای پورینی را از بین می برد، جدا می‌کند. جدا کردن بازهای پورینی DNA با هیدروکلریک اسید، دسترسی به دئوکسی ریبوزها را فراهم کرده تا فوشین (Fuchsin) بتواند با گروه‌های آلدئید واکنش نشان دهد. سپس معرف شیف با عوامل کاهنده واکنش داده و یک رسوب قرمز تشکیل می دهد. بنابراین DNA به رنگ قرمز رنگ می شود. این رنگ‌آمیزی بسته به درجه مارپیچی شدن کروماتین کم و بیش شدید است و بنابراین به ویژه برای نشان دادن کروموزوم‌های هسته در طول میتوز مناسب است.

تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن

یواخیم ویلهلم روبرت فولگن (Joachim Wilhelm Robert Feulgen) ، پزشک و شیمیدان آلمانی که در سال ۱۹۱۴ روشی را برای رنگ‌آمیزی DNA (که اکنون به عنوان رنگ آمیزی Feulgen شناخته می شود) ابداع کرد و همچنین کشف کرد که DNA هسته‌ای گیاهی و حیوانی (تیمونوکلئیک اسید) وجود دارد. فولگن تیمونوکلئیک اسید را با محلول یک نرمال HCl به مدت ده دقیقه تیمار کرده تا با از دست دادن پورین‌ها هیدرولیز و به آپورینیک اسید (apurinic acid) تبدیل شود. آپورینیک اسید نیز Thyminic یا Nuclealic acid نیز نامیده می‌شود که شامل بازهای پیریمیدین تیمین و سیتوزین متصل به گروه قندی هستند. فولگن از معرف فوشین (Fuchsin sulfurous acid؛ FSA) برای رنگ استفاده نمود تا رنگ ارغوانی حاصل شد و تیمونوکلئیک اسیدهای هیدرولیز نشده رنگی تولید نکردند. فولگن این رنگ‌آمیزی را برای ماده ژنتیکی چند موجود دیگر نیز انجام داد و به این نتیجه دست یافت که RNA به عنوان ماده ژنتیکی موجود زنده با این روش، رنگ آمیزی نمی‌شود.

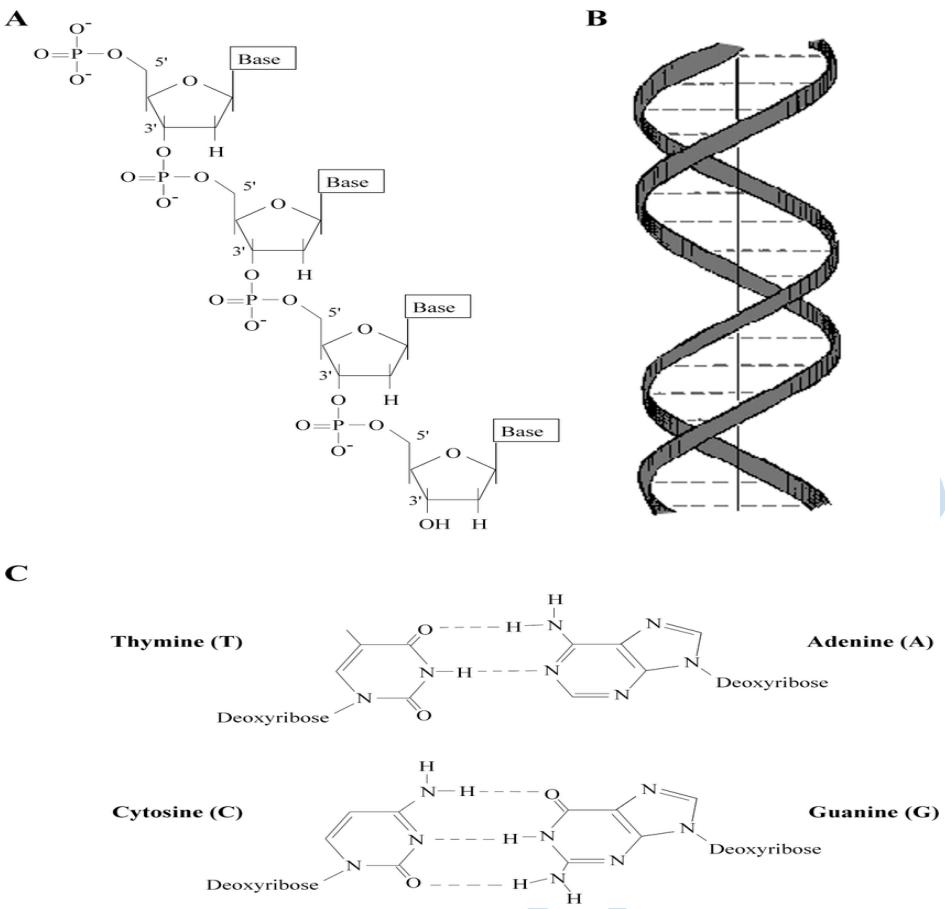
شکل ۱: ویلهلم روبرت فولگن ، پزشک و شیمیدان آلمانی

انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در بافت‌شناسی

عمده کاربرد رنگ‌آمیزی فولگن مربوط به تعیین کمیت DNA در هسته سلولی توسط سیتومتری (Cytometry) تصویر برای ارزیابی پلوئیدی در آسیب شناسی انواع تومورهای بافت های بدن موجود زنده مانند تومور مجاری صفراوی، کولون، ملانوما، حفره دهان و دهانه رحم است. در انواع مختلف بافت ها، ایجاد بدخیمی هم در ضایعات سنگفرشی (squamous) و هم در ضایعات غده ای (glandular lesions) پیش‌بینی شده است. تعیین مقدار دقیق و وضعیت DNA هسته برای تشخیص و درمان تومورهای بدخیم بسیار مهم است. از نقطه نظر مورفولوژیکی، نمایش اختصاصی DNA در ساختارهای سلولی در سطح میکروسکوپی نوری امروزه بسیار کم استفاده می‌شود. از سوی دیگر، استفاده از رنگ فولگن در میکروسکوپ الکترونی اخیراً اجازه داده است که روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی DNA برای مطالعه سازمان‌دهی ساختاری DNA در محل (In Situ) ایجاد شود.

نگاهی اجمالی به DNA رنگ شده با فولگن

ساختار دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA)، از نوکلئوتید تا کروموزوم، نقش مهمی در عملکرد بیولوژیکی آن ایفا می‌کند. توانایی DNA برای عملکرد به عنوان ماده‌ای که اطلاعات ژنتیکی از طریق آن ذخیره و منتقل می شود، نتیجه مستقیم ساختار ظریف آن است. واتسون و کریک (Watson and Crick) از دو جنبه ساختار DNA را توصیف کردند: جفت کردن بازهای نوکلئوتیدی به صورت مکمل (مانند آدنین با تیمین و سیتوزین با گوانین) و ماهیت مارپیچی DNA. یک مولکول DNA از دو زنجیره بلند پلی نوکلئوتیدی تشکیل شده است که از زیر واحدهایی به نام نوکلئوتید تشکیل شده است. یک نوکلئوتید شامل یک باز نیتروژن‌دار، یک قند پنتوز و حداقل یک گروه فسفات است (شکل ۲). در DNA، قند ۲'–دئوکسی ریبوز است و بنابراین هیچ گروه هیدروکسیل متصل به کربن ۲' خود ندارد. یک گروه فسفات با پیوند کووالانسی به کربن ۵' ۲'–دئوکسی ریبوز متصل می شود. از آنجایی که ۲'–دئوکسی ریبوز و گروه فسفات همیشه وجود دارند، نوع گروه بازی، چهار نوکلئوتید DNA را متمایز می‌کنند. یک نوکلئوتید می تواند چهار باز نیتروژنی اصلی را در خود جای دهد که دو باز پورین و دو نوع دیگر پیریمیدین هستند. هم پورین ها و هم پیریمیدین ها ترکیبات آروماتیک هتروسیکلیک هستند، زیرا در حلقه کربنی خود حاوی اتم‌های نیتروژن هستند که برای پیوند هیدروژنی که دو رشته مولکول DNA را در کنار هم نگه می دارد ضروری است. در حالی که پیریمیدین ها حلقه‌های شش کربنی هستند، پورین ها از یک حلقه پنج کربنه تشکیل شده‌اند. دو پیریمیدین موجود در DNA تیمین (T) و سیتوزین (C) هستند، در حالی که دو پورین آدنین (A) و گوانین (G) هستند.



شکل ۲: ساختار DNA. A. ترکیب شیمیایی backbone قند- فسفات. B. ساختار مارپیچ دوگانه (Double Helix). C. پیوندهای هیدروژنی بین بازهای آلی پورین و پیریمیدین.

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن

انواع نمونه های بافتی سالم و بیمار موجود زنده مانند طحال، پستان، رحم، معده، روده، دهان، کبد و غیره بصورت فریز یا فیکس شده می توان با رنگ آمیزی فولگن مطالعه نمود.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در بافت‌شناسی

یکی از پروتکل های رنگ‌آمیزی فولگن به عنوان روش گلد استاندارد را در این مقاله توضیح می‌دهیم. در این پروتکل می توان از محلول فوشین تجاری استفاده یا اینکه در آزمایشگاه تهیه کنیم. معرف شیف با اضافه کردن ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر در حال جوش روی ۱ گرم فوشین بازی تهیه می شود. سپس کاملاً ترکیب را کاملا تکان می‌دهیم و تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد

محلول را خنک نموده و با استفاده از کاغذ صافی فیلتر کرده و ۳۰ میلی لیتر HCL یک نرمال اضافه می کنیم و اجازه می‌دهیم تا در دمای اتاق محلول خنک شود و نهایتا ۱ گرم متابیسولفیت پتاسیم ($K2S2O5$) اضافه می کنیم. محلول نهایی معرف شیف می بایست صورتی کم رنگ باشد و در ظرف تیره و در دمای یخچال نگهداری می کنیم.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی فولگن

۱. پس از جدا نمودن بافت موردنظر، جهت جلوگیری از فعالیت آنزیمی، بافت‌ها را در فرمالین ده درصد یا بصورت فریز شده فیکس می‌کنیم.
۲. در مرحله بعد که پردازش بافتی است، بافت ها را در تیشوبسکت‌ها قرارداده و نام یا کد نمونه‌ها را روی تیشو بسکت‌ها می نویسیم.
۳. آبگیری نمونه بافتی: اکنون می بایست آب موجود در نمونه‌های بافتی را حذف نموده، بنابراین از غلظت‌های افزایشی اتانول استفاده می‌شود یعنی اتانول جایگزین آب در بافت می‌گردد.
۴. قالب‌گیری بافت: بلوک‌های پارافینی از نمونه‌های بافتی با پارافین جامد و طبق دستورالعمل‌های دستگاه پارافین دیسپنسر و دستگاه تیشو امبدینگ تهیه می کنیم.
۵. برش‌گیری از بلوک پارافینی: پس از قالب‌گیری پارافینی نمونه بافتی، در این مرحله از نمونه فیکس شده در پارافین با دستگاه میکروتوم برش‌های نازک در حد ۵ الی ۱۰ میکرومتر آماده می کنیم.
۶. اکنون لام های آماده شده را طبق پروتکل رنگ‌آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی فولگن

۱. اسلایدهای میکروسکوپی را در محلول HCL یک نرمال که از قبل تا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم شده است، انکوبه می‌کنیم.
۲. بدون آبکشی لامها، آنها را مستقیماً در جار رنگ آمیزی حاوی فوشین (Schiff's Reagent) به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای اتاق قرار می‌دهیم. این مرحله را سه مرتبه تکرار می‌کنیم تا برش های بافتی بنفش پررنگ شوند.
۳. لام‌ها را در محلول Sulfurous acid به مدت ۳ دقیقه انکوبه می‌کنیم. این مرحله را دو بار انجام می دهیم.
۴. لام‌ها را ده ثانیه در محلول فست گرین (Fast Green %۰،۲) جهت رنگ آمیزی سیتوپلاسم قرار می‌دهیم.

۵. ۳ بار با آب مقطر شستشو می دهیم و با اتانول مطلق به مدت یک دقیقه نمونه‌های بافتی را دهیدراته می‌کنیم این مرحله را دوبار با اتانول تازه انجام می‌دهیم.

۶. در این مرحله عمل شفاف‌سازی نمونه‌های بافتی را با انکوبه در زایلین به مدت یک دقیقه انجام می‌دهیم.

۷. لام ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتا پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی فولگن، لام‌های آماده شده را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی فولگن

مواد مورد نیاز

- فوشین بازی
- فرمالین
- آب مقطر
- HCL
- متابیسولفیت پتاسیم ($K_2S_2O_5$)
- زایلین
- Sulfurous acid
- اتانول
- چسب انتلان

تجهیزات مورد نیاز

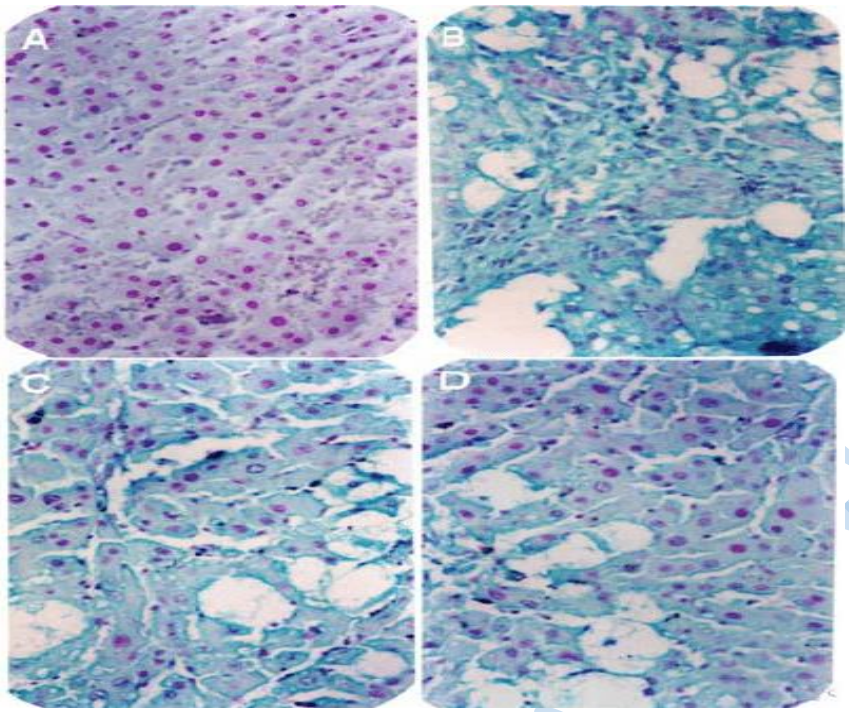
- میکروسکوپ نوری
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- میکروتوم

- پارافین دیسپنسر
- تیشو امبدینگ
- حمام آب
- تیشوبسکت
- کاغذ صافی

جهت مطالعه بیشتر، تجهیزات عمومی و تخصصی در آزمایشگاه بافت شناسی را کلیک کنید.

تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی فولگن

در رنگ‌آمیزی فولگن، هیدرولیز اسیدی، بازهای پورین را از DNA حذف می کند و در نتیجه گروه های آلدهیدی آزاد می‌شوند. سپس گروه‌های آلدهیدی با معرف شیف واکنش داده که منجر به ایجاد رسوبی با رنگ ارغوانی می‌شود. RNA با تیمار HCl هیدرولیز نمی‌شود و بنابراین، این تکنیک اختصاصی DNA است. این رنگ‌آمیزی بسته به درجه مارپیچی شدن کروماتین کم و بیش شدید است و بنابراین به ویژه برای برجسته کردن کروموزوم‌های هسته در طول میتوز مناسب است. باندهای صورتی نواحی حاوی ژن‌ها و باندهای روشن مربوط به نواحی بین‌ژنی هستند. شدت رنگ آمیزی متناسب با غلظت DNA است. در برخی از تحقیقات از رنگ فولگن جهت بررسی اثر دارو یا ماده شیمیایی بر محتوای DNA سلولهای انواع بافت ها استفاده می کنند. در مطالعه‌ای جهت اثر Biphenyldimethyl-dicarboxylate (DDB) برای درمان رت های هپاتیتی با ماده تتراکلراید کربن (CCl4) ، بخشی از تحقیقات روی محتوی DNA هپاتوسیت‌های کبد رت و میزان فیبروزی بودن بافت کبدی را با رنگ آمیزی فولگن نشان داده اند. شکل ۳ کبد رنگ شده با رنگ آمیزی فولگن نشان دهنده DNA در هپاتوسیت ها است. A. رت کنترل (طبیعی). B. رت تیمار با CCl4: کاهش محتوی DNA C. رت مبتلا به هپاتیت درمان شده با DDB با دوز ۳۷۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم: بهبود میزان DNA D. رت بیمار درمان شده با دوز ۷۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم: بهبودی اندک در میزان DNA هپاتوسیت ها را نشان می دهد.



شکل۳ :کبد کنترل و بیمار رت رنگ آمیزی شده با فولگن.

در این رنگ آمیزی، هسته با رنگ های قرمز–صورتی یا ارغوانی مشاهده می شود و اگر از رنگ آمیزی فست گرین استفاده شده باشد، سیتوپلاسم سبز رنگ می شود.

ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن در آزمایشگاه بافت شناسی

بافت‌شناسی، سیتولوژی و سایر رشته‌های علمی مرتبط، آناتومی میکروسکوپی بافت ها و سلول ها را مطالعه می‌کنند. برای دستیابی به ساختار بافتی و سلولی، نمونه‌ها باید به روش صحیح، رنگ‌آمیزی شوند. یکی از انواع رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی نمونه‌های بافتی، رنگ‌آمیزی اختصاصی انواع الاستین در بافت های موجود زنده از جمله حیوان آزمایشگاهی به نام رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن است.

در آزمایشگاه بافت‌شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، برش‌های میکرونی از نمونه‌های بافتی مختلف، تهیه و با تکنیک‌های رنگ‌آمیزی عمومی و اختصاصی از جمله خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی فولگن رنگ نموده و نهایتا به بررسی و مطالعه نمونه بافتی انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیمار و سالم تعریف شده در طرح‌های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می پردازد.

جمع‌بندی

واکنش فولگن توسط Robert Feulgen و Heinrich Rossenbeck برای شناسایی DNA تقریبا صد سال پیش پیشنهاد شده است. رنگ‌آمیزی فولگن یکی از متداول‌ترین روش‌های سیتوشیمیایی مورد استفاده برای تعیین نیمه کمی DNA در نمونه های بافت شناسی و سیتولوژی است. تعیین مقدار دقیق و وضعیت DNA هسته برای تشخیص و درمان تومورهای بدخیم بسیار مهم است.

سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی فولگن (Feulgen) در بافت شناسی چه کاربردی دارد؟

رنگ‌آمیزی فولگن تکنیکی برای رنگ نمودن DNA در نمونه های بافتی مورد مطالعه می باشد.

۲. کدام نمونه‌های بافتی مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی فولگن قرار می‌گیرد؟

انواع نمونه‌های بافتی سالم و توموری از انسان و حیوانات آزمایشگاهی مانند کبد، کلیه، قلب، طحال و غیره با رنگ‌آمیزی فولگن بررسی می‌شود.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com
www.histogene.ir
www.histogene.co
۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱