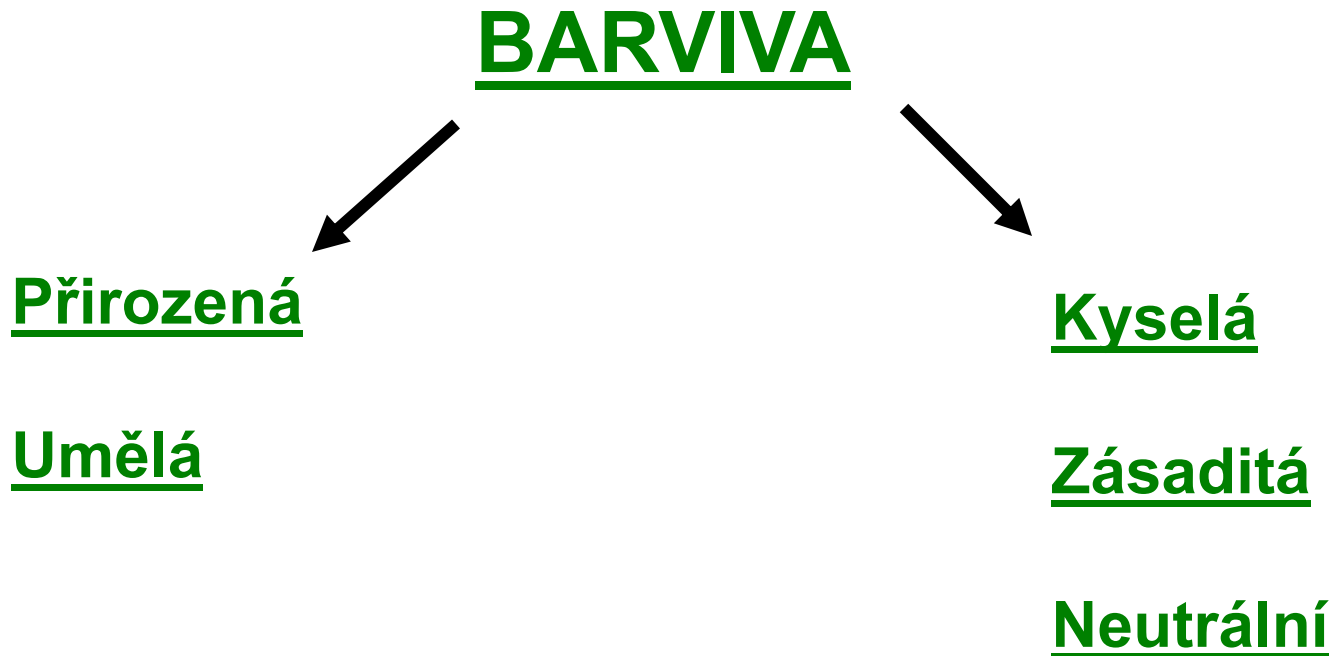


BARVENÍ TRVALÝCH PREPARÁTŮ

je biochemická metoda, kterou se přidá k objektu specifická barvicí látka (barvivo). V biologii slouží k prokázání výskytu (kvalifikaci) nebo množství (kvantifikaci) specifické látky ve zkoumané tkáni nebo k obarvení celých struktur a objektů.



Přirozená barviva:

hematoxylin - extrakt z kampešky čínské (*Haematoxylon campechianum*)

- bazické barvivo (barví jádra buněk)

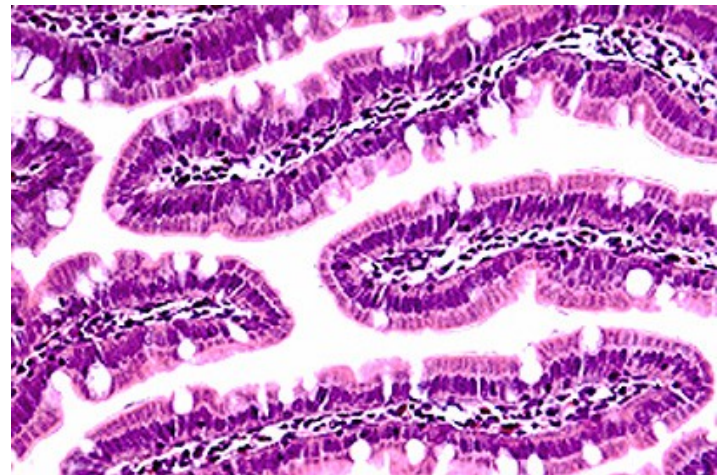
- Král histologických barviv
- po nabarvení nutno vypírat ve vodovodní vodě
- fialová barva objektů
- krátká doba barvení histologických řezů – přibližně 10'
- nebarví přímo, ale až po oxidaci na hematein
- samovolně na vzduchu „zraje“ několik týdnů až měsíců
- přidávají se oxidační činidla (jodičnan sodný)
- hematein má slabou afinitu ke tkáním, proto se musí použít mořidla (soli AL, Fe) – různé druhy hematoxylinů
- barví barevný lak hemateinu



Kamencové hematoxyliny (síran hlinito-draselný) - např. Harrisův, Mayerův

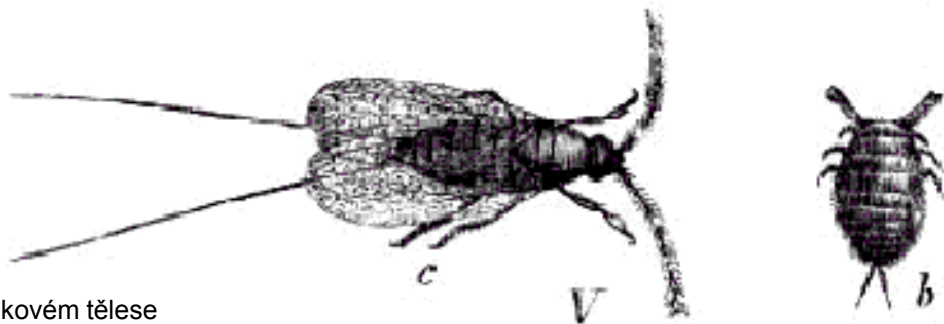
Železité hematoxyliny (síran železito-amonný) – např. Heidenhainův,

Kampeškové dřevo je barevné dřevo tropických stromů čeledi sapanovité. Z vnějšku je modročené, uvnitř červenohnědé. Dřevo obsahuje až 12 % hematoxylinu.



Přirozená barviva:

- **karmín** - extrakt ze samic nopálovce karmínového - *Dactylopius coccus* (synonymum červená nopálová - *Coccus cacti*) - bezické barvivo, košenila



V tukovém tělese

K barvení totálních preparátů – až 12 hodin

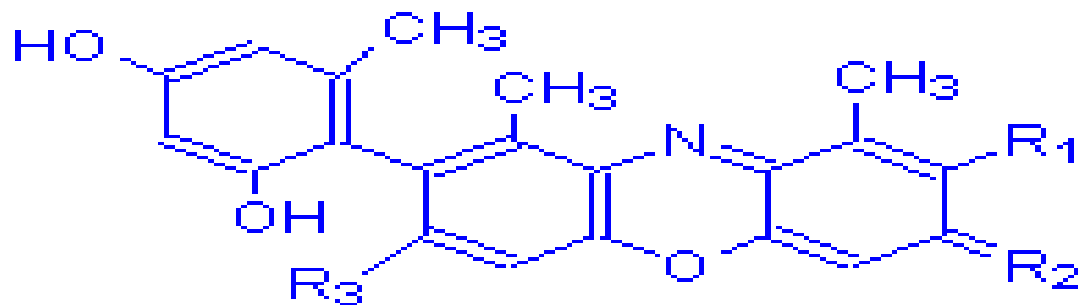
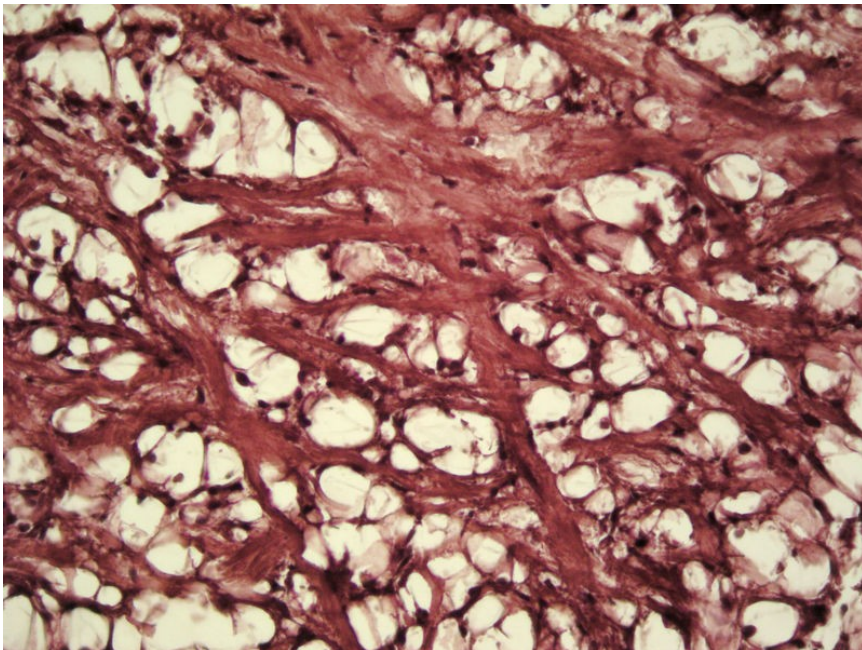


HEJDACT

- Karmínové barvivo neboli košenila se získává ze sušených těl samic červce nopálového.
- Původním domovem červce nopálového je Peru. Tam bylo objeveno i tajemství výroby košenily. Dnes se tento červec pěstuje i v Mexiku, Guatemale, Chile, Bolívii a dalších jihoamerických zemích.
- V roce 1532 bylo do španělského Cádizu dovezeno osm opuncí i s koloniemi červců nopálových (Hernán Cortéz). Krátce poté dostal Cádiz zvláštním královským dekretem povolení k výrobě košenily. V polovině devatenáctého století se červec nopálový rozšířil na Kanárské ostrovy, zejména na Lanzarote, kde jsou pro opuncie i červce velmi vhodné klimatické podmínky. V roce 1870 se už exportovalo z Kanárských ostrovů 3000 tun košenily. Přírodní karmínové barvivo je dodnes žádaným zbožím na celém světě, i když ho stále více nahrazují barviva uměle vyráběná. Používá se v parfumerii (rtěnky nejlepších značek, pudry, lesk), v potravinářství (E120) pro přibarvování nápojů zejména alkoholických (například červeného martini), cukrovinek, jogurtů, ve farmacii (homeopaticky se červci předepisují při kašli, astmatu a bronchitidě) a také v textilním průmyslu.
- Získat košenilu není jednoduché. Jsou k tomu třeba doslova lány vzrostlých opuncí (*Nopalea coccinellifera*), které jsou schopny přežít útoky mnoha generací červců. Vývoj červců je třeba pozorně sledovat a ve vhodnou dobu samičky sbírat štětkou na dlouhé násadě do plátěných sáčků. Jsou jich miliony.
- Hlavním barvivem, které samičky červce obsahují, je **kyselina karmínová**. Ta tvoří až dvacet procent jejich hmotnosti. Barvivo může být nejrůznějších odstínů a je velmi kvalitní. Sesbíraný hmyz se okamžitě suší, protože jen tak si uchová výrazné karmínové barvivo. Prodává se buďto sušený k dalšímu zpracování, nebo jako už zpracované barvivo.

Přirozená barviva:

- **orcein** - extrakt z některých lišejníků



Přirozená barviva:

- **šafrán** - extrakt z blizen šafránu (*Crocus sativus*)
- kyselé barvivo - na kolagen



Přirozená barviva:

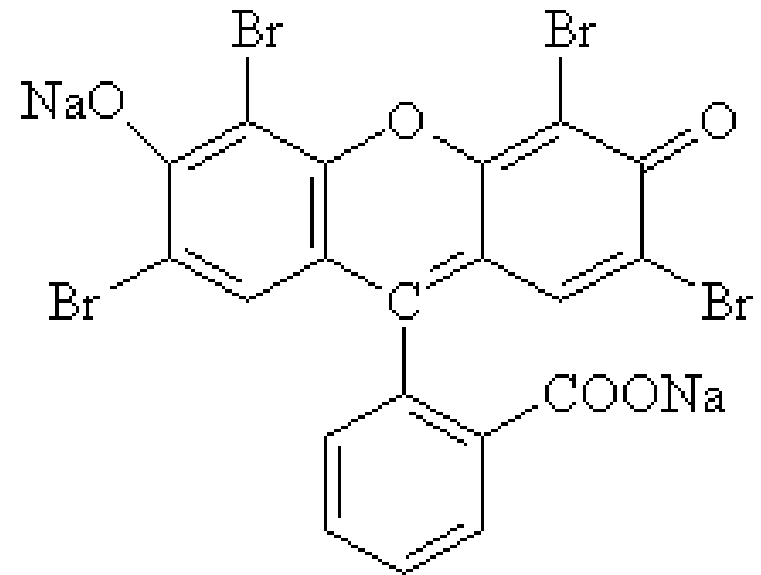
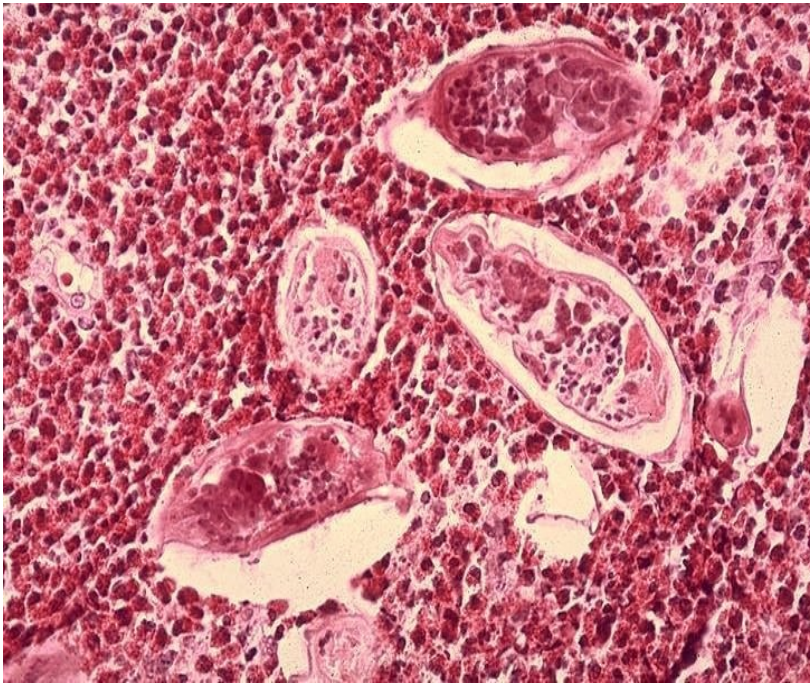
V minulosti bylo užíváno více přirozených barviv, např.:

- indigokarmín (z kořenů tropického keře indigovníku)
- berberin - kyselé barvivo (žluté, dřevitá)
- brazilin - bazické barvivo podobné hematoxylinu (ze dřeva Caesalpinia)

Umělá barviva:

A/ XANTINOVÉ DERIVÁTY

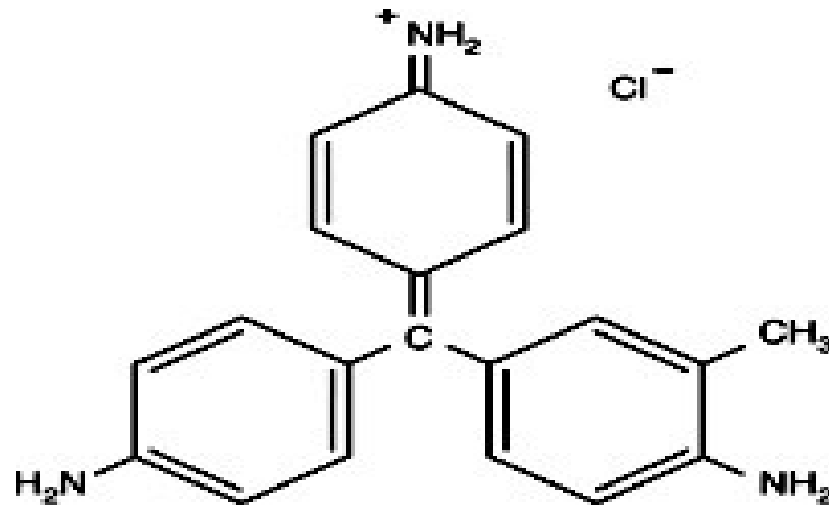
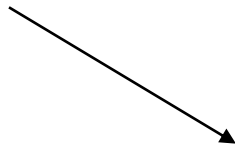
- **eosin** (tetrabrom fluorescein)
 - barví acidofilní složky tkání



Umělá barviva:

B/ TRIFENYLMETANOVÁ BARVIVA

- **bazický fuchsin** - základ i pro další barviva jako jsou Schiffovo reagens, rezorcifuchsin a aldehydfuchsin



- **anilínová modř, světlá zeleň a kyselý fuchsin** - kyselá barviva

Umělá barviva:

C/ THIAZINOVÁ BARVIVA

- thionin, toluidinová a methylenová modř - bazická barviva

D/ AZOBARVIVA

- Janusova zeleň - např. pro supravitální barvení mitochondrií
- olejová červeň a sudanová čerň - barviva na tuky

- **Kyselá**, barvicí plasmu (též plasmatická) - eosin, světlá zeleň, oranž G, kyselý fuchsin,...
- **Zásaditá, basická**, barvicí jádro (též jaderná barviva) - toluidinová modř, metylová zeleň, basický fuchsin, **hematoxylin (vypírání ve vodovodní vodě)**
karmín
- **Neutrální** - např. eosinát methylenové modři.

TYPY BARVENÍ:

progresivní - barvíme až je dosaženo žádaného zbarvení,
regresivní - napřed tkáň přebarvíme, pak přebytečné barvivo odstraňujeme

sukcedánní - několik barviv po sobě,

simultánní - více barviv současně.

- v obou případech musí každé barvivo barvit jinou část tkáně

substantivní - tkáň barvíme přímo barvivem,

adjektivní - barvení prostřednictvím mořidla, které se váže na tkáň

Vitální barvení

Využití mikrovln pro barvení

železitý acetokarmín (IAC, Iron Aceto Carmine)– barvíme motolice (totální preparáty)

regresivní způsob barvení (přebytečné barvivo se odstraní diferenciací v kyselém alkoholu)

1. **Vyprat fixáž v destilované vodě (30‘) – jen v případě, že se nefixovalo 70% alkoholem**
2. **Vložit do barviva (IAC) nejlépe přes noc**
3. **Kyselý alkohol (70% alk. : HCl, poměr 99 : 1)
(odbarvování, parenchym musí být světle růžový, doba individuální, pozorovat pod stereoskopem)**

Vzestupná alkoholová řada

4. **70% alkohol (zastaví odbarvování, odvodňuje) – 5 minut**
5. **96% alkohol (odvodňuje) 10 – 15 minut**
6. **Karbol-xylen (odvodňuje, projasňuje) – 5 minut**
7. **Xylen (odvodňuje, projasňuje) – 5 minut**
8. **Kanadský balzám – nejdřív kapka na podložní sklo, rychle přenést objekt, přikrýt krycím sklíčkem)**

IAC – 1. 45ml kyselina octová ledová, 55ml dest. voda, 0.5g karmínu, vařit

- 2. 0.3g železných pilin, 1ml kys. octová ledová – k bodu varu

smíchat roztoky 1 + 2, naředit 1:1 se 70% etanolem, zfiltrvat

Důležité – pracujeme pod mikroskopem !!!!!

Foraminifera – na podložní sklo do kapky KB, odstranit kamínky, krycí sklo potřít KB nebo xylenem a přiklopit

Larva komára – je fixovaná 70% alkoholem – pokračujeme ihned alkoholovou řadou

96% alk. - 10´

karbol -xylen - 5´

xylen - 5´

KB

Lutztrema attenuatum (žlučník kosa) – barveno IAC, Astra Blue
Benedeniella, rejnok, IAC, Gomori trichrome

přeneseno do 70% alk.

odbarvit v kyselém alkoholu

70% - 5´

96% - 10´

Karbol - xylen - 5´

xylen – 5´

kanadský balzám

larvu komára a motolici můžete převádět najednou v jedné misce