

Histologické techniky II.

Barvení

Botanická mikrotechnika 2024

Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

Postup při podvojném sukcesivním barvení: alcianová modř - jaderná červeň stálá (Kernechtrot, nuclear fast red)

1. odparafínování řezů (xylen)
2. převedení řezů do vody
3. vlastní barvení:
 - a) 3% roztok kyseliny octové 10 min.
 - b) barvení buněčných stěn - 1% alcianová modř
v 1% kyselině octové 10 min.
 - c) opláchnutí 3% kyselinou octovou
 - d) praní v tekoucí vodě 10 min.
 - e) barvení buněčných jader - 0,1% jaderná červeň stálá
v 5% roztoku $Al_2(SO_4)_3$, 5 - 15 min.
4. opláchnutí destilovanou vodou
5. odvodnění alkoholovou řadou
6. převod do xylenu
7. uzavření do syntetické pryskyřice Eukitt®

Skleněné a porcelánové kyvety s víčkem



Hellendahl



Coplin



na 6 skel



Schieferdecker



Dóza s držákem skel



Sada plastových kyvet na barvení



Barvivo

- ne všechny barevné sloučeniny mohou být barvivem
- **barvivo** = barevná sloučenina, která může být navázána na substrát
- **barvivo histologické** - barví různé složky pletiv, používá se na základě empirických znalostí, chemismus reakce často není známý
- **histochemické barvení** - barvicí proces je vysoce specifický, je známá jeho chemická podstata

Typy barviv

Chromoforová teorie barevnosti: **chromofor** - má charakteristické uspořádání atomů, které je zodpovědné za absorpci světla v určité části spektra, **auxochrom** - část molekuly, která zodpovídá za vazbu na substrát

a) kyselé radikály: $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ **anionická barviva** Kyselá barviva (acidická, eosinofilní)

b) bazické radikály: $-NH_2$ **kationická barviva**

Zásaditá barviva (bazická)

Dělení barviv podle původu

- přírodní

karmín - červec nopálový

orcein - lišejníky (*Lecanora*, *Roccella*)

hematoxylin - dřevo kampešky (*Haematoxylon campechianum*)

brasilin - dřevo druhů rodu *Caesalpinia* (*Caesalpinia sappan*, *C. brasiliensis*)

indigo - *Indigofera tinctoria*, *Isatis tinctoria*

juglon - listy, kořeny, kůra *Juglandaceae*

- syntetická

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **Barvení progresivní:** barvíme do žádané intenzity zbarvení
- **Barvení regresivní:** preparát přebarvujeme a pak postupně odbarvujeme (diferencujeme), podle afinity struktur k barvivu se některé odbarví zcela, jiné zůstanou zbarvené (**Heidenheinův železitý hematoxylin, safranin**)

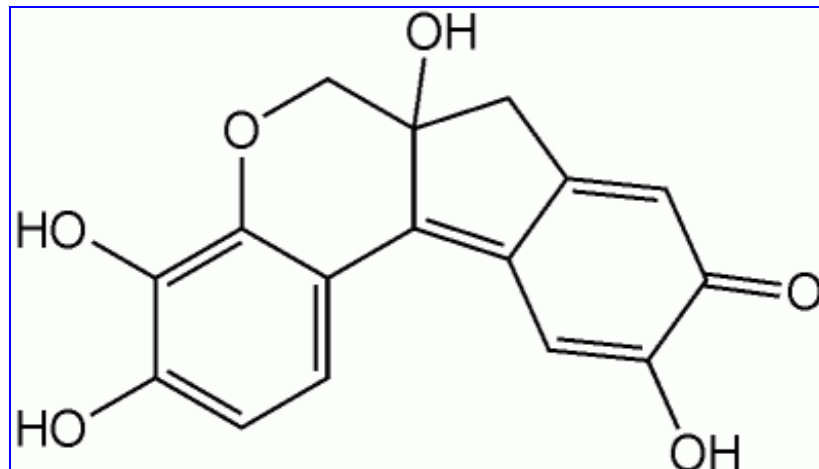
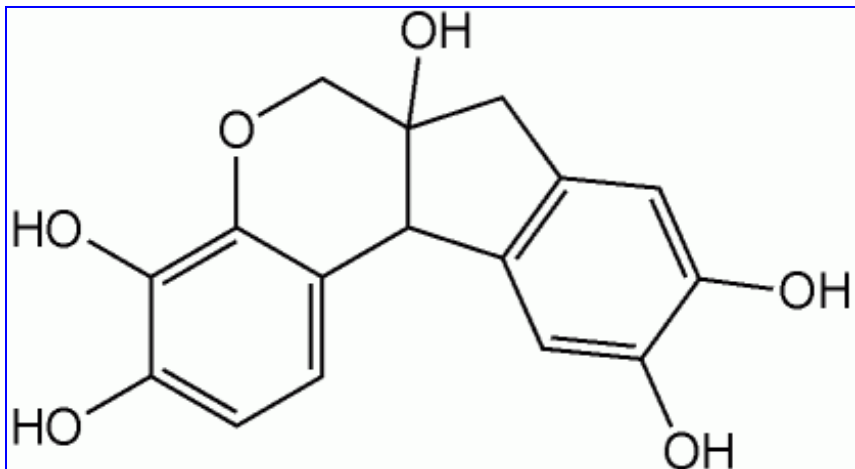
Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **barvení simultánní**: směs barviv v jednom roztoku (složky nesmějí spolu reagovat) (**Alexanderova směs**)
- **barvení sukcedánní** (sukcesivní): dvě barviva po sobě, doplňují se barevné tóny, každé barvivo barví jiné struktury (**alcianová modř - pravá jaderná červeň, safranin - Fast Green, bazický fuchsin - pikroindigo karmín /Cajal - Brožkova metoda/**)

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **barvení substantivní:**
barvení samotným barvivem ve vodném nebo etanolovém roztoku
- **barvení adjektivní:**
použití **mořidel** (soli kovů = kamence, tanin)

Hematoxylin a hematein



hematoxylin = sloučenina tmavě modrofialové barvy ze dřeva
Haematoxylon campechianum

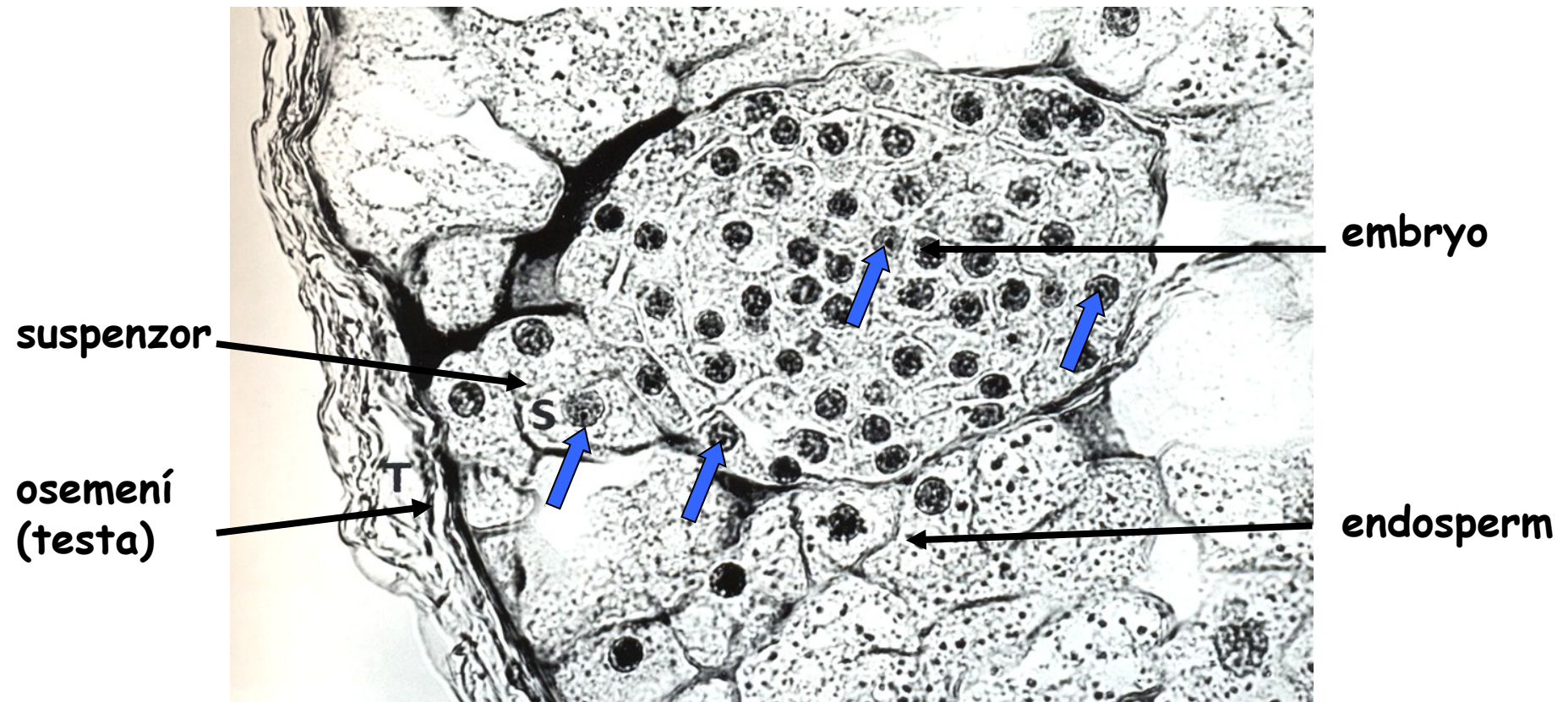
používá se s **mořidly** - nejčastěji Fe^{3+} nebo Al^{3+}

Natural Black 1 nebo **C.I. 75290**

barví teprve jeho **oxidovaná forma** = **hematein**

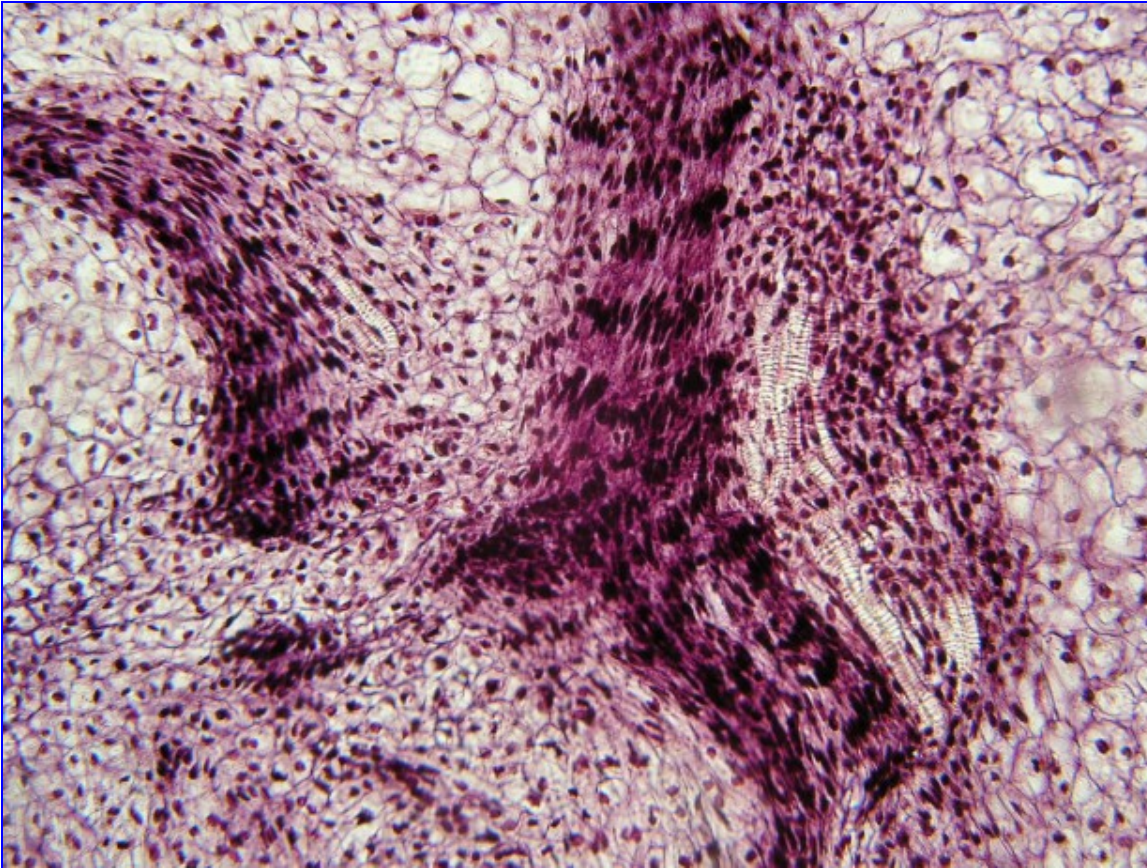
Ize barvit **regresivní** i **progresivní** metodou - záleží na formě aplikace mořidla

Podélný parafínový řez semenem sněženky *Galanthus nivalis* L.



regresivní barvení **Heidenheinovým železitým hematoxylinem**
optimální diferenciaci = v jádách buněk embrya i endospermu
jsou patrná tmavěji zbarvená jádérka, Fe^{3+} jako mořidlo

Parafínový řez poupětem máku, *Papaver somniferum*

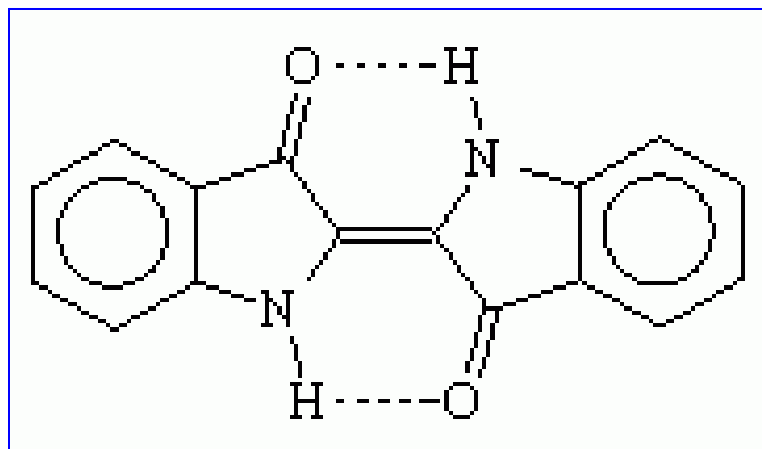


Delafieldův
hematoxylin,
progresivní barvení,
Al³⁺ jako mořidlo

kanadský balzám



Indigo



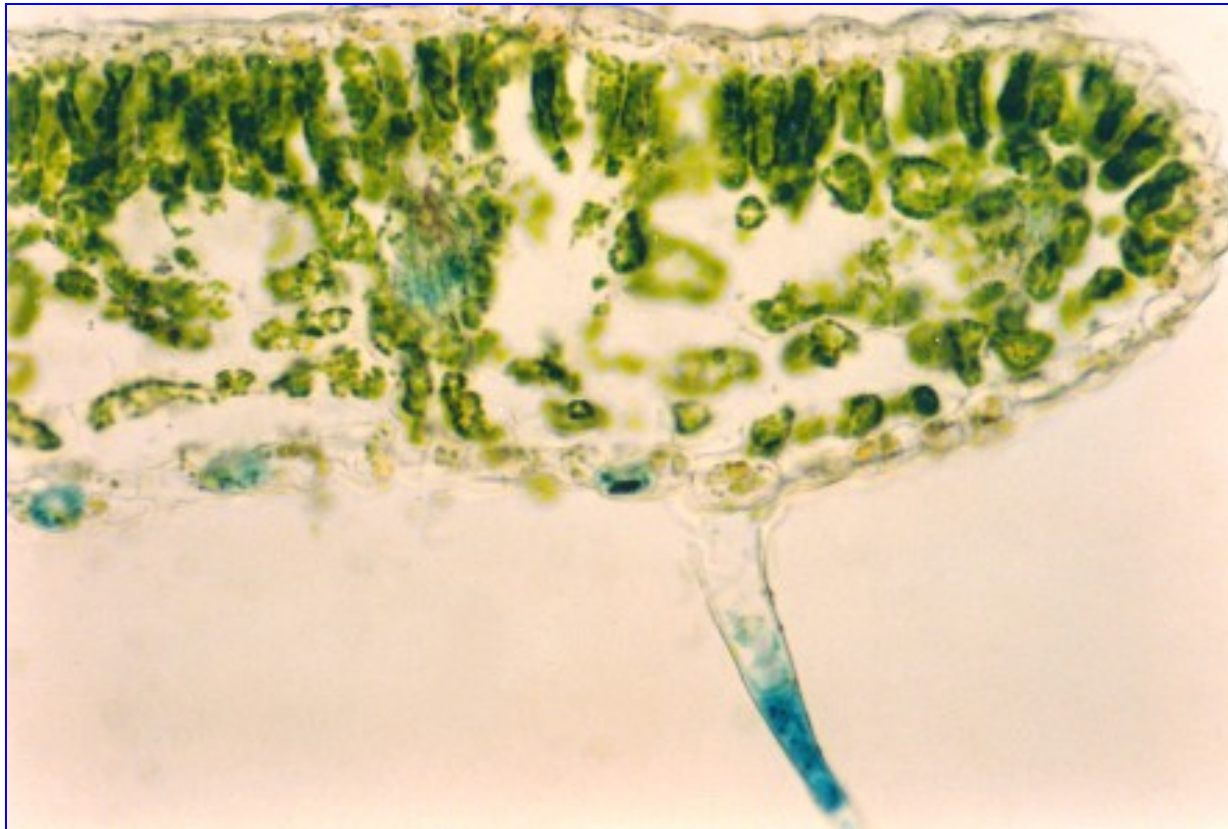
Indigofera tinctoria
Isatis tinctoria

dnes již vyráběné
synteticky

pro vlastní barvení řezů se nepoužívá, ale v histochemii jsou často používány tzv. **indigogenní metody**

Kryostatový řez listem tabáku

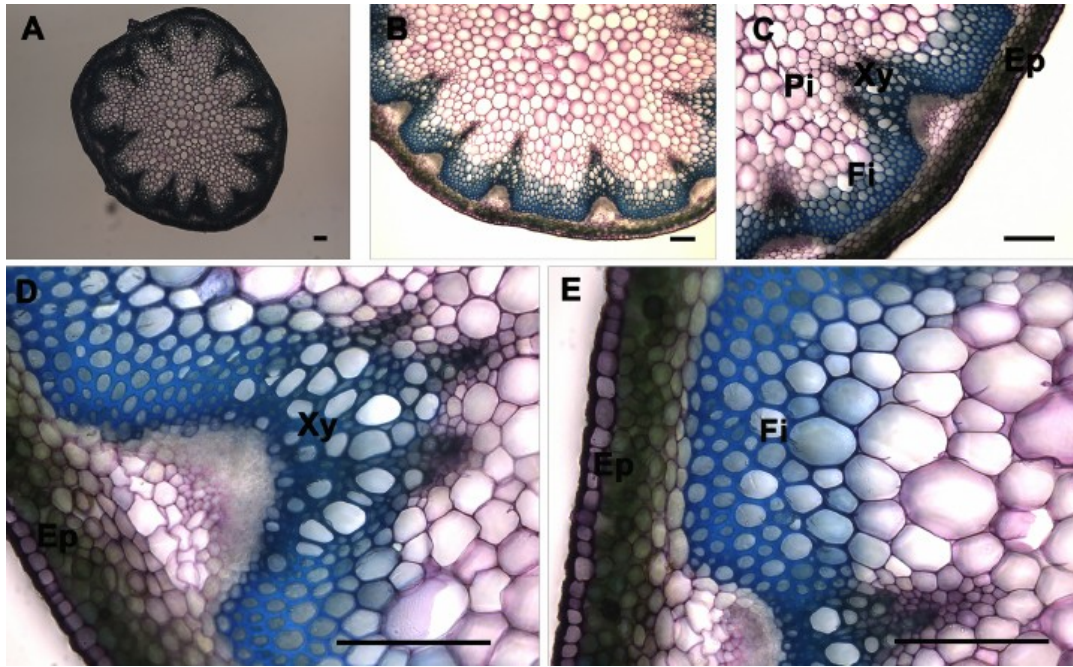
tloušťka řezu 30 μ m



Indigogenní metoda detekce aktivity β -glukosidasy se substituovaným indoxyl glukosidem jako substrátem

Dělení barviv podle účelu

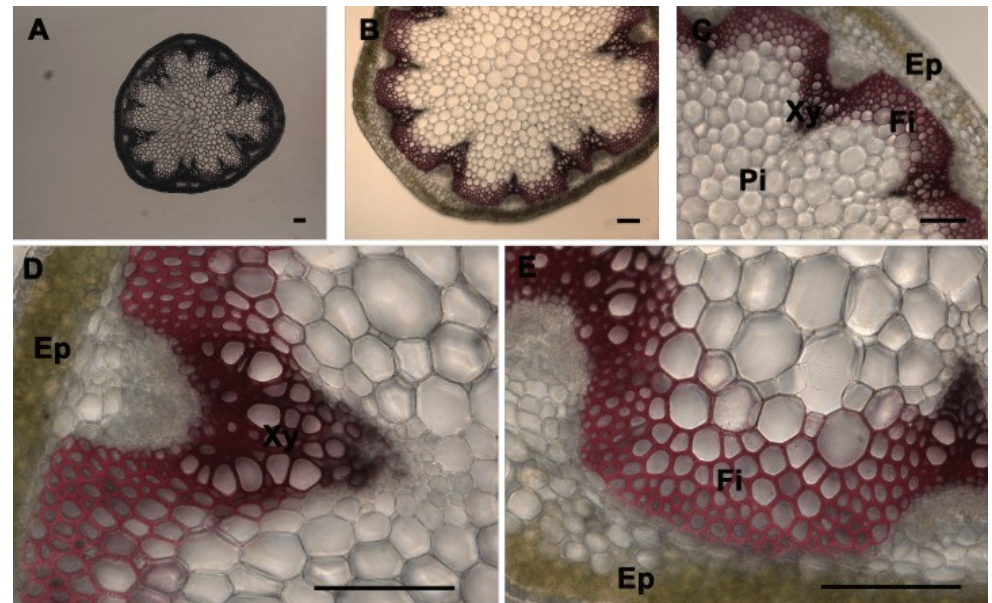
1. **Obecná barviva:** toluidinová modř (BS, cytoplasma a jádro modře, jádérko a lignifikované BS zeleno-modře), akridinová oranž (pektin, kutinizované stěny a RNA červeně, lignin žlutě, DNA zeleně), haematoxylin (jádra tmavě modře, BS světle modře)
2. **Buněčná stěna:** rutheniová červeně (pektin červeně), kalkofluor (celulóza stříbrno-modře), fluoroglucinol (lignin jasně červeně), anilinová modř (kalóza žluto-zeleně), resorcinová modř (kalóza modře)
3. **Karbohydráty a šrob:** fuchsin v Schiffově činidle (polysacharidy a škrob červeno-fialově), jodid draselný (škrob modře, celulóza červeno-hnědě)
4. **Lipidy:** Sudan IV (lipidy červeně) nebo Sudan Black B (lipidy černě), Nilská modř (acidické lipidy modře, neutrální lipidy červeně)
5. **DNA, RNA:** methylová zeleň a pyronin (RNA červeně, DNA zeleně), DAPI (DNA modře), propidium jodid (DNA červeně)
6. **Životaschopnost:** FDA, propidium jodid

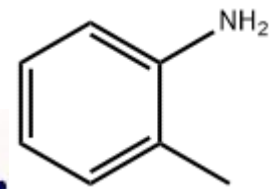
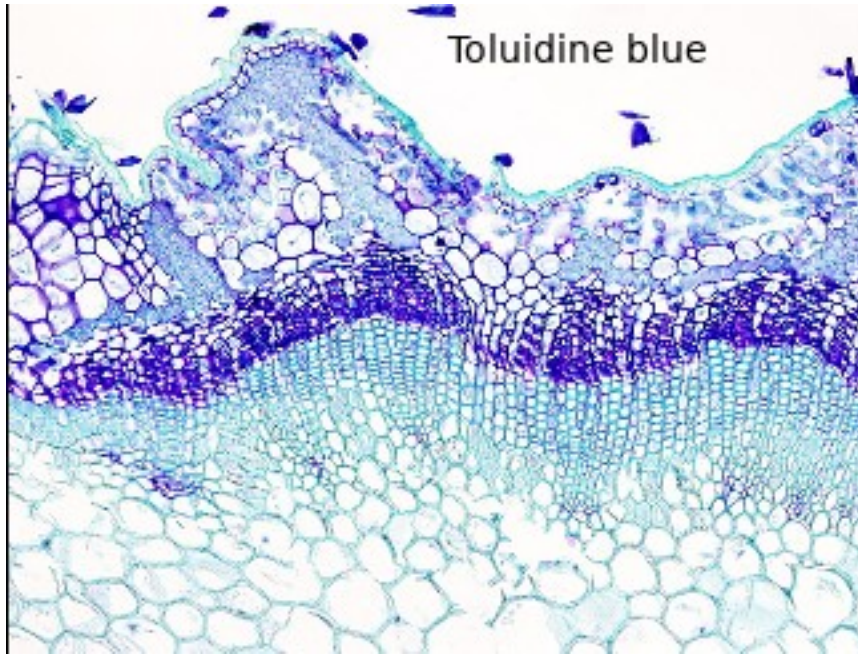


Toluidine blue O staining of *A. thaliana* stem cross-sections. Toluidine blue O staining of a wild type *A. thaliana* stem section showing the normal lignin deposition in the walls of interfascicular fibers and xylem cells (A - E). The positions of the epidermis and cortex (Ep), interfascicular fibers (Fi), pith (Pi), and xylem (Xy) are indicated. Magnifications: Panel A : 5X; Panel B : 10X; Panel C : 20X; Panels D and E : 40X. Bar = 100 μ m.

Mitra et Loqué 2014

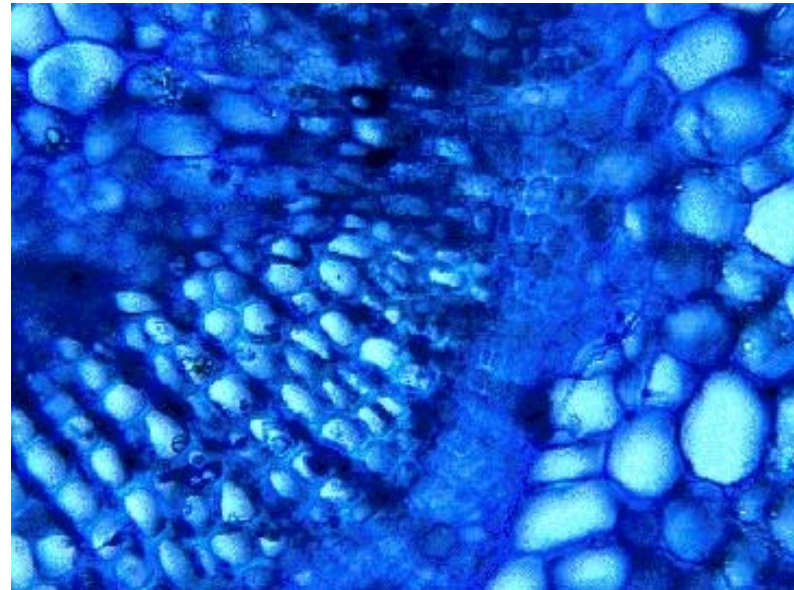
Phloroglucinol-HCl staining of *A. thaliana* stem cross-sections . Phloroglucinol-HCl staining (pink or fuchsia color) of a wild type *A. thaliana* stem section showing the normal lignin deposition in the walls of interfascicular fibers and xylem cells (A - E). The positions of the epidermis and cortex (Ep), interfascicular fibers (Fi), pith (Pi), and xylem (Xy) are indicated. Magnifications: Panel A : 5X; Panel B : 10X; Panel C : 20X; Panels D and E : 40X. Bar = 100 μ m.





Metachromatické barvení

Ortochromatické barvení



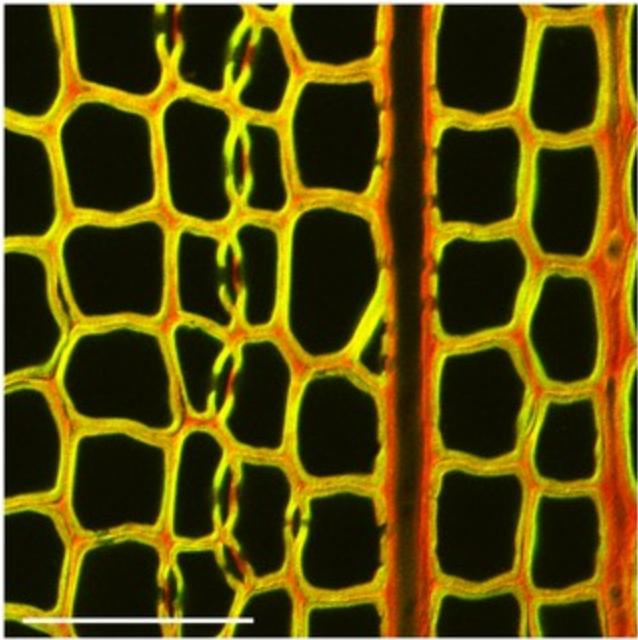
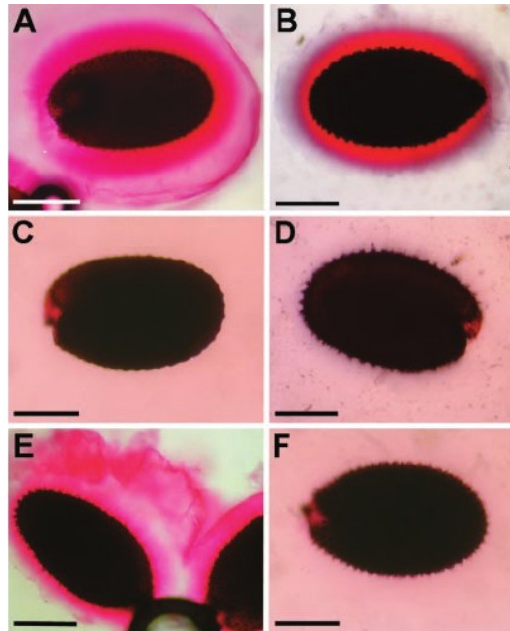


Fig 2. Combined red and green channel confocal images of **acridine orange**-stained spruce early wood. The staining conditions were 50 $\mu\text{mol/L}$ acridine orange in phosphate buffer, pH 7. The scale bar is 100 μm .

Houtman et al. 2016



Ruthenium red staining of wild-type and mutant seeds.

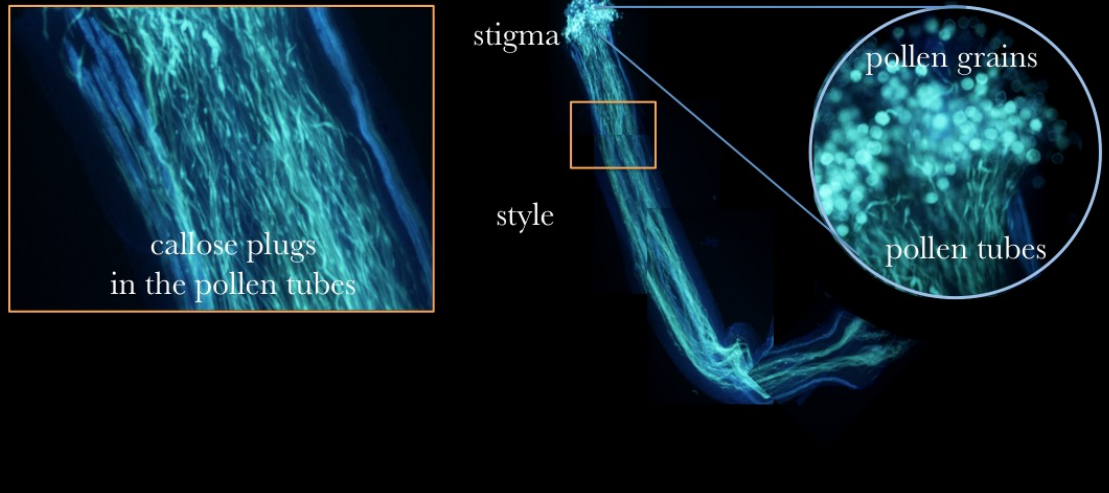
Western et al 2001



Cross-section of the *Pteridium aquilinum* leaf, stained with **Calcofluor White** (confocal microscope).

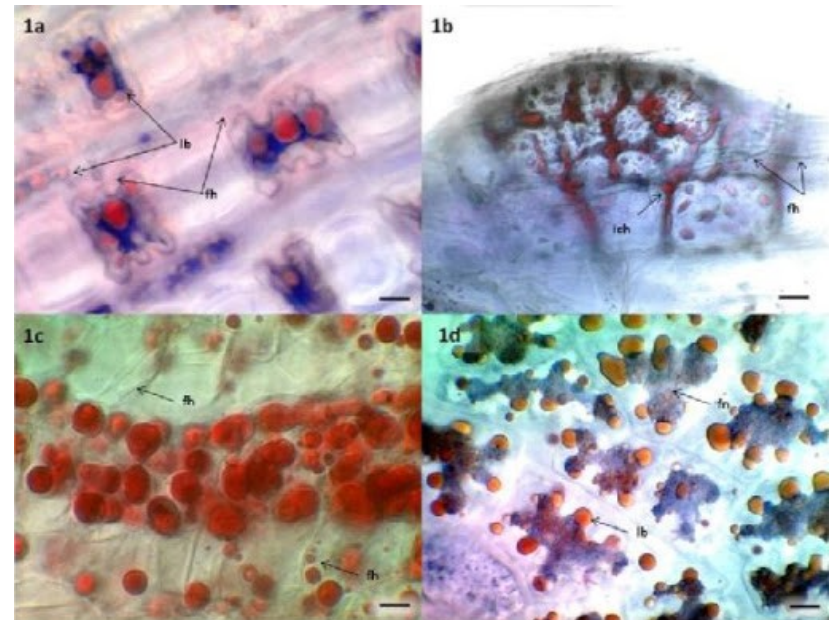
(Wikipedia)

S. lycopersicum
Tomato



Anilinová modř - kalóza, fluorescence

Sudan IV – lipidová tělíska
červeně



Postup při podvojném sukcesivním (sukcedánním) barvení:

alcianová modř - jaderná červeň stálá (Kernechtrot, nuclear fast red)

1. odparafínování řezů (xylén)
2. převedení řezů do vody
3. vlastní barvení:
 - a) 3% roztok kyseliny octové 10 min.
 - b) barvení buněčných stěn - 1% alcianová modř
v 1% kyselině octové 10 min.
 - c) opláchnutí 3% kyselinou octovou
 - d) praní v tekoucí vodě 10 min.
 - e) barvení buněčných jader - 0,1% jaderná červeň stálá
v 5% roztoku $Al_2(SO_4)_3$, 5 - 15 min.
4. opláchnutí destilovanou vodou
5. odvodnění alkoholovou řadou
6. převod do xylenu
7. uzavření do syntetické pryskyřice Eukitt®

Podvojné barvení sukcedánní:
alcianová modř - pravá jaderná červeň



parafínový řez listem kosatce *Iris* sp.
tloušťka řezu 15 μ m