Botanická mikrotechnika 2024

**Barvení preparátů – ruční a parafínové řezy**

**Barviva**:

*Toluidinová modř* (1 % roztok v destilované vodě – 1 g/100 ml) , je možné i jiné koncentrace

*Safranin O* ve vodě (1% (w/v) – 1 g/100 ml)

*Safranin/Fast Green* – safranin (1 g/l ve vodě), Fast Green (0.1 g v 100 ml 96% ethanolu)

*Safranin + alciánová* modř

 Safranin: 0.35g safraninu v 35 ml 50% EtOH

Alcian Blue: 0.65g Alcian Blue (alciánová modř) v 65 ml destilované vody,

Oba roztoky nechat míchat magnetickou míchačkou cca. 1 hodinu, pak slít dohromady, promíchat a zfiltrovat.

*Safranin + astrablue*

 Safranin: 0,8 g safraninu ve 100 ml destilované vody

 Astrablue: 0,5 g astrablue ve 100 ml destilované vody + 2 ml kyseliny octové

 Oba roztoky rozmíchat samostatně, pak slít dohromady. Označit. (díky kyselině je barvička stabilní)

**Materiál:**

Šáchor, stonek (na ruční řezy)

Řapíkatý celer, řapík (ruční řezy)

**Postupy barvení:**

1. **Toluidinová modř**
2. Žiletkou vytvoříme tenké řezy a ihned je umístíme do kapky vody.
3. Odsajeme pipetou nebo filtračním papírem vodu a ihned zakápneme několika kapkami barvičky. Necháme působit **max. 1 minutu**.
4. Odsajeme barvičku filtračním papírem a ihned zakápneme *vodovodní* vodou. Odsajeme vodu se zbytkem barvičky a opakujeme zakápnutí a odsátí vody ještě jednou nebo do té doby, dokud se voda barví modře.
5. Nakonec zakápneme vodou/50% glycerolem, přikryjeme krycím sklem a pozorujeme.
6. **Safranin/Fast Green – sukcesivní**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Roztok** | **Čas\*** |
| 1 | 50% ethanol | 5 min |
| 2 | 1 g/l safranin (vodný roztok) | **10 min** |
| 3 | 50% ethanol | 2x5 min |
| 4 | 75% ethanol | 5 min |
| 5 | Fast Green (0,1% v 96% ethanolu) | **4 min** |
| 6 | 96% ethanol  | 5 min\*\* |
| 7 | 100% ethanol (E) | 5 min |
| 8 | E:X 1:1 | 5 min |
| 9 | Xylén (X) | 5 min |
| 10 | Montování do Eukittu |  |

\*časy barvení jsou orientační, záleží na druhu preparátu, vhodné vyzkoušet (preparační mikroskop pro kontrolu)

\*\*v tomto bodě stačí opláchnout 96% ethanolem a pak zakápnout 50% glycerolem, přikrýt krycím sklíčkem a pozorovat

1. **Safranin + alciánová modř – simultánní**

Pokud řezy v ethanolu, tak rehydratovat ve vodě po dobu **5 min**. Ruční řezy rovnou barvit.

5 min………směs safranin+alciánová modř

2x………….opláchnout v destilované vodě

Pozorovat

(nebo trvalý preparát:

2 min……....50% EtOH

2 min……....75% EtOH

2 min……....96% EtOH

1x………….opláchnout v 100% EtOH

1x………….opláchnout v 100% xylenu

Namontovat na sklíčko do Eukittu.)

1. **Safranin + astrablue – simultánní**
2. Žiletkou vytvoříme tenké řezy a ihned je umístíme do kapky vody.
3. Odsajeme pipetou nebo filtračním papírem vodu a ihned zakápneme několika kapkami barvičky. Necháme působit **3-5 minut**.
4. Odsajeme barvičku filtračním papírem a ihned zakápneme destilovanou vodou. Odsajeme vodu se zbytkem barvičky a opakujeme zakápnutí a odsátí vody ještě jednou nebo do té doby, dokud než je voda čirá.
5. Nakonec zakápneme vodou/50% glycerolem, přikryjeme krycím sklem a pozorujeme.

**V. Safranin (1%)** – sejně jako I., ale barvit 5 minut, pak důkladně propláchnout destilovanou vodou.