

# 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  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , 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**)



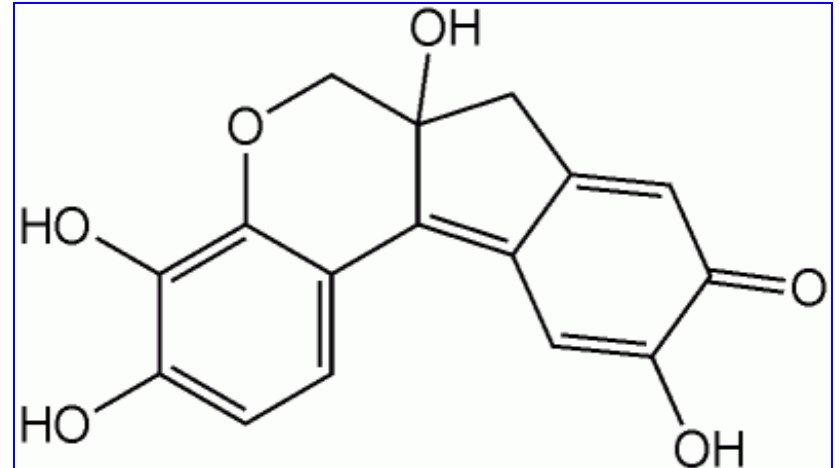
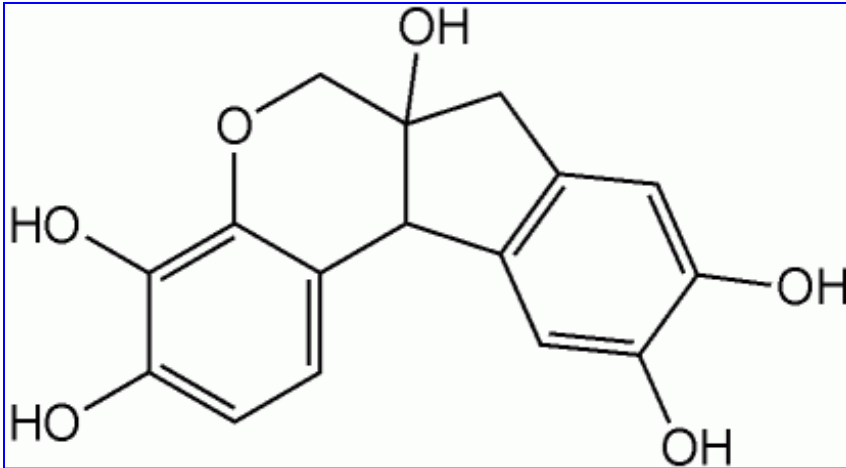
# Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **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*

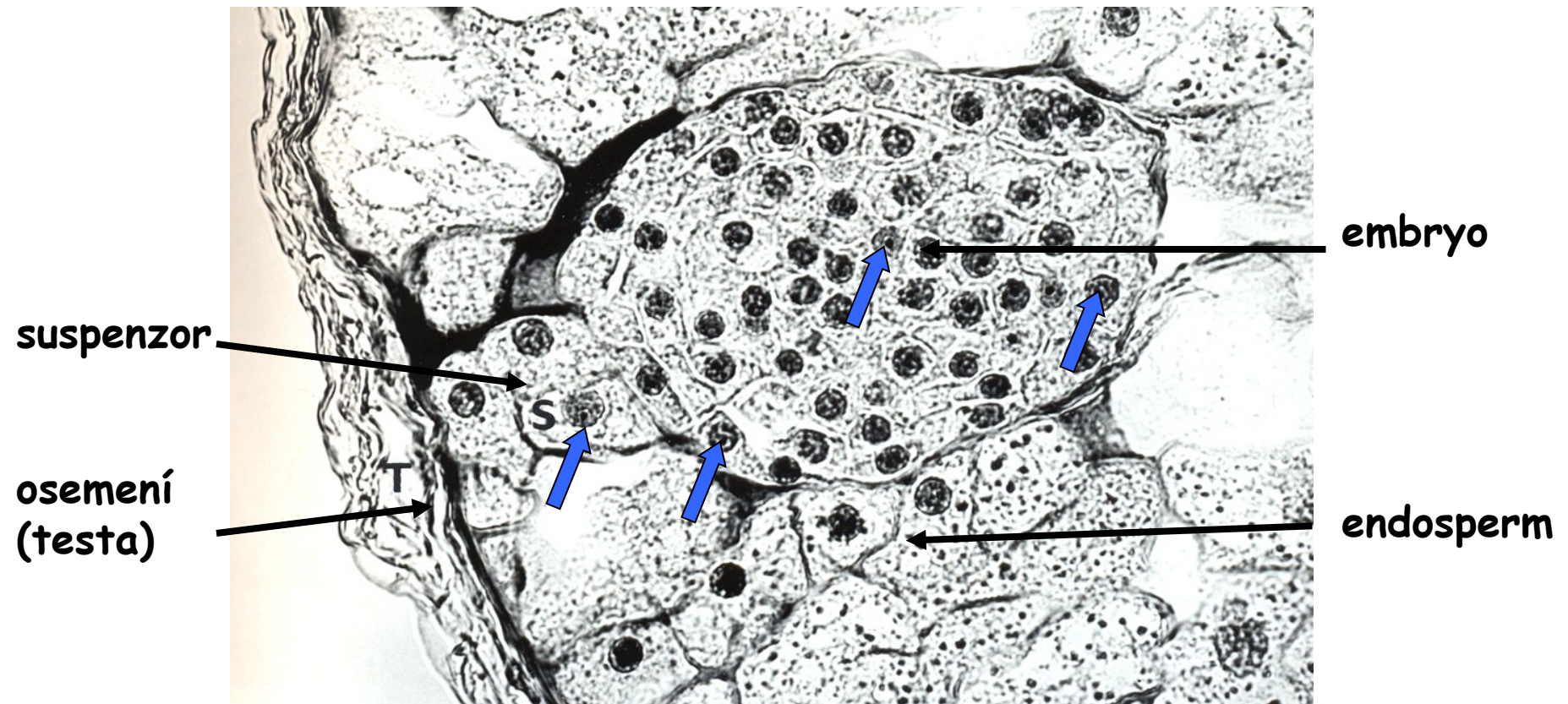
používá se s **mořidly** - nejčastěji  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Al}^{3+}$

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

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

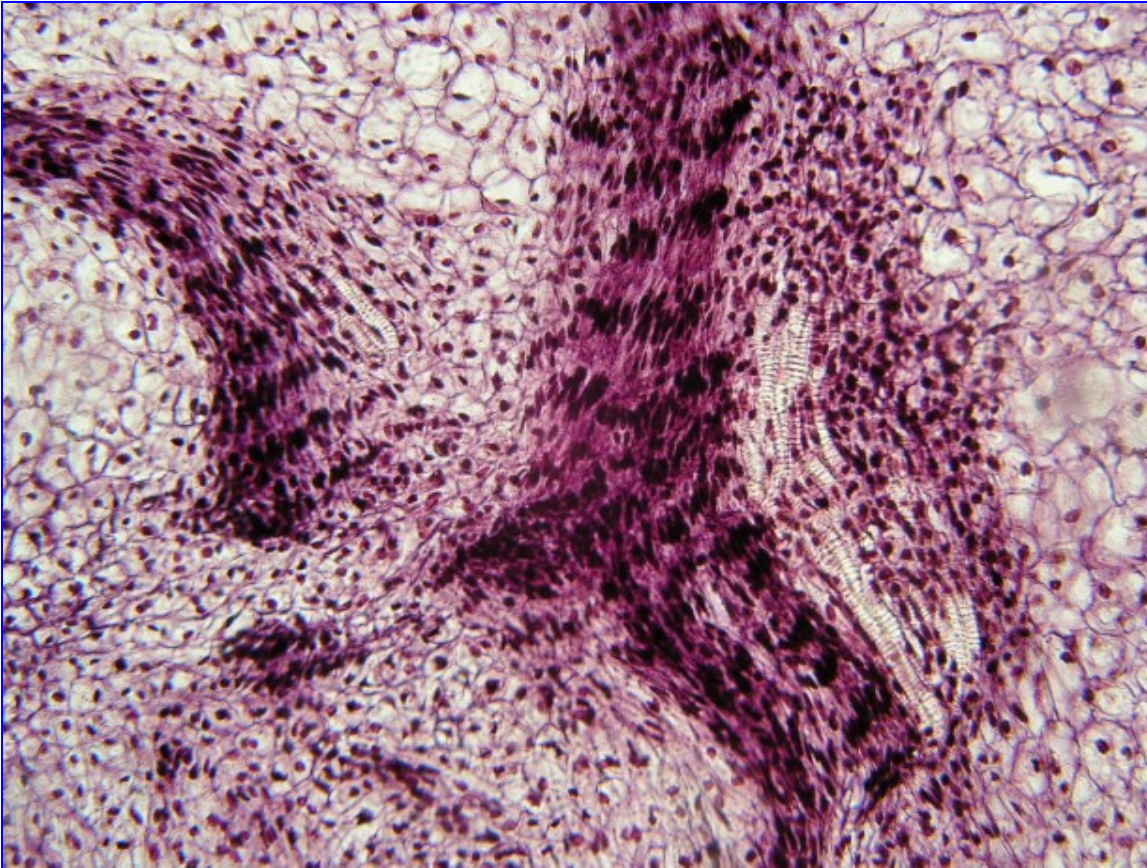
Ize barvit **regresivní** i **progresivní** metodou - záleží na formě aplikace mořidla

# Podélný parafínový řez semenem sněženky *Galanthus nivalis* L.



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

# Parafínový řez poupětem máku, *Papaver somniferum*

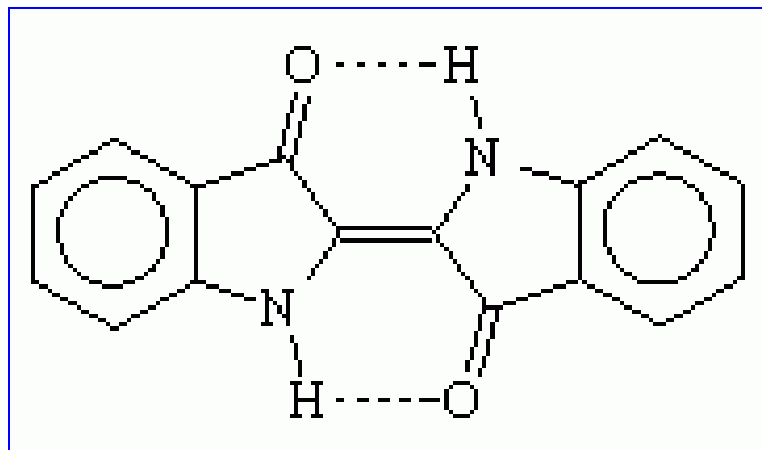


Delafieldův  
hematoxylin,  
progresivní barvení,  
Al<sup>3+</sup> jako mořidlo

kanadský balzám



# Indigo



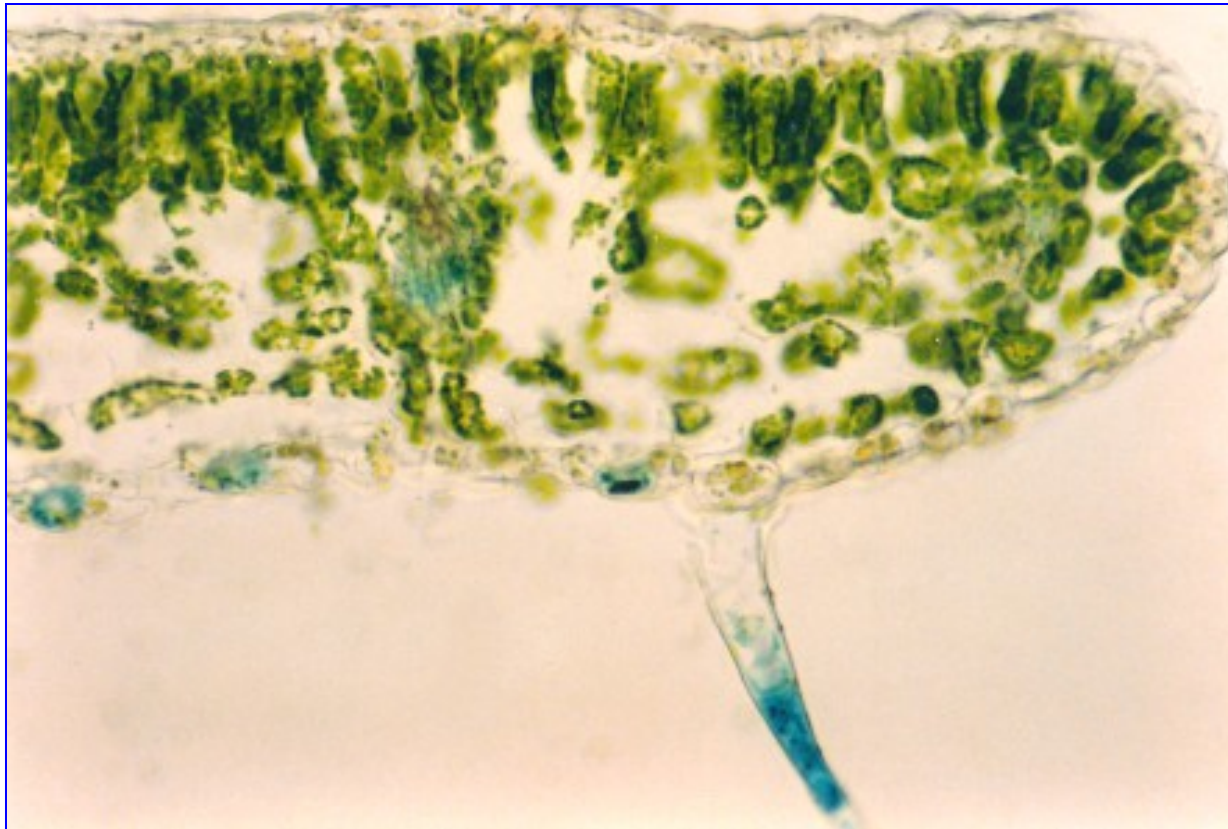
*Indigofera tinctoria*  
*Isatis tinctoria*

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 $\mu$ m

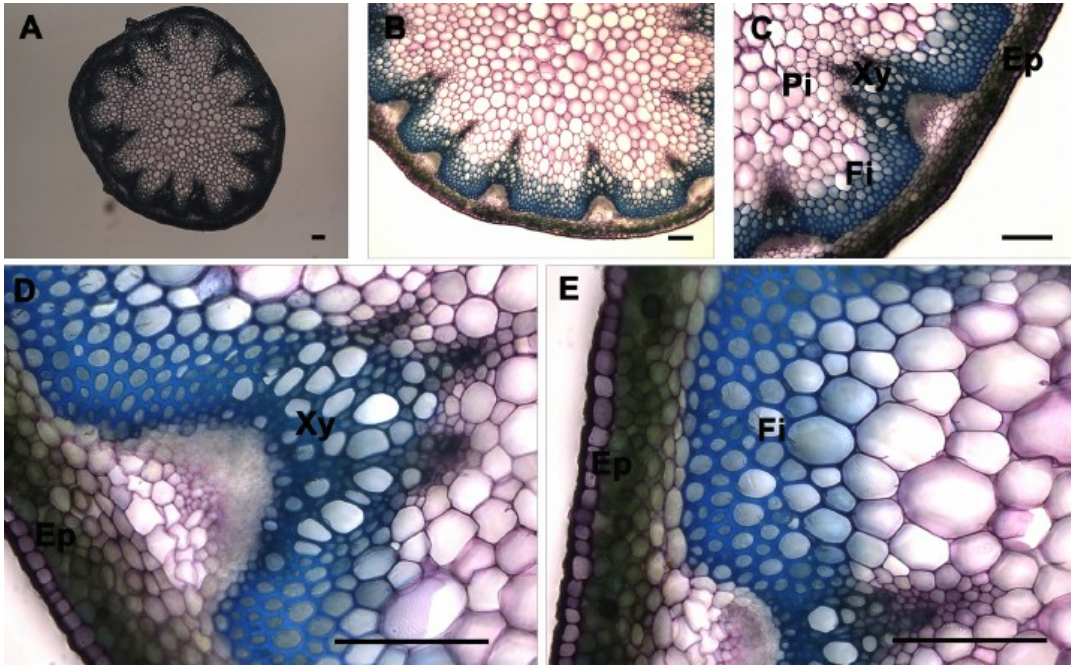


**Indigogenní metoda** detekce aktivity  $\beta$ -glukosidasy se substituovaným indoxyl glukosidem jako substrátem

# 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

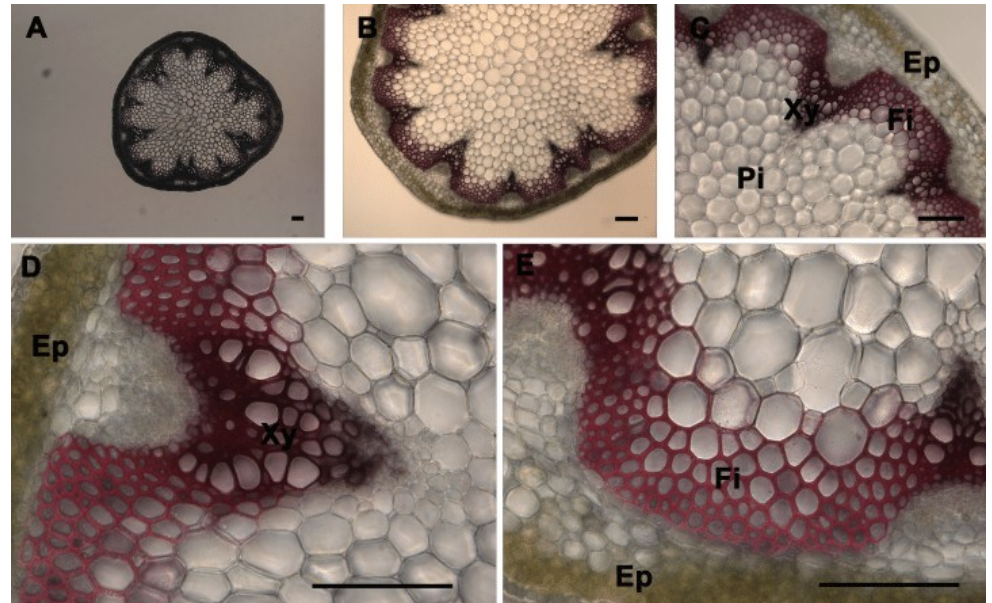


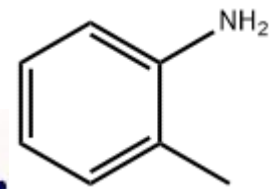
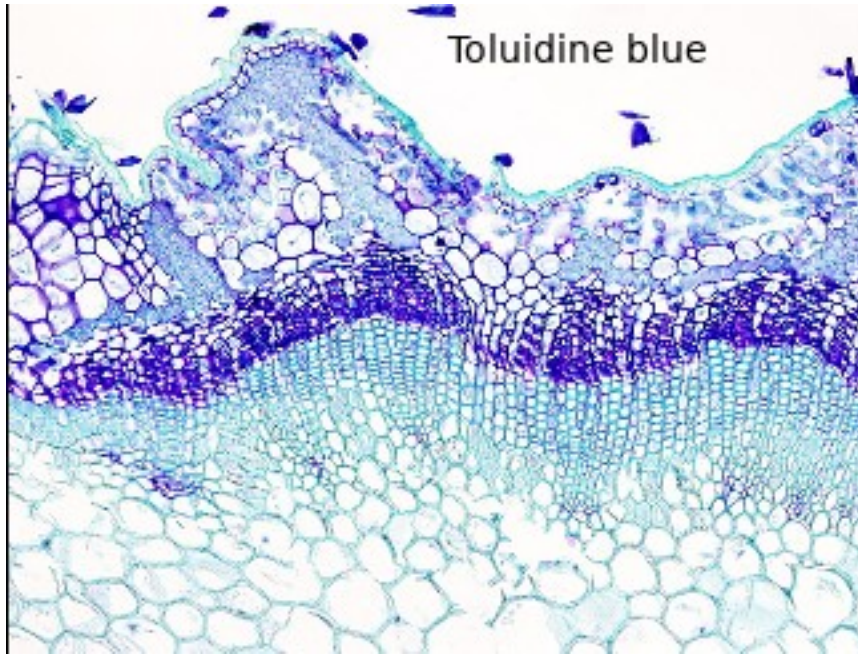


**Toluidine blue O** staining of *A. thaliana* stem cross-sections. Toluidine blue O staining of a wild type *A. thaliana* stem section showing the normal lignin deposition in the walls of interfascicular fibers and xylem cells ( A - E ). The positions of the epidermis and cortex (Ep), interfascicular 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  $\mu$ m.

Mitra et Loqué 2014

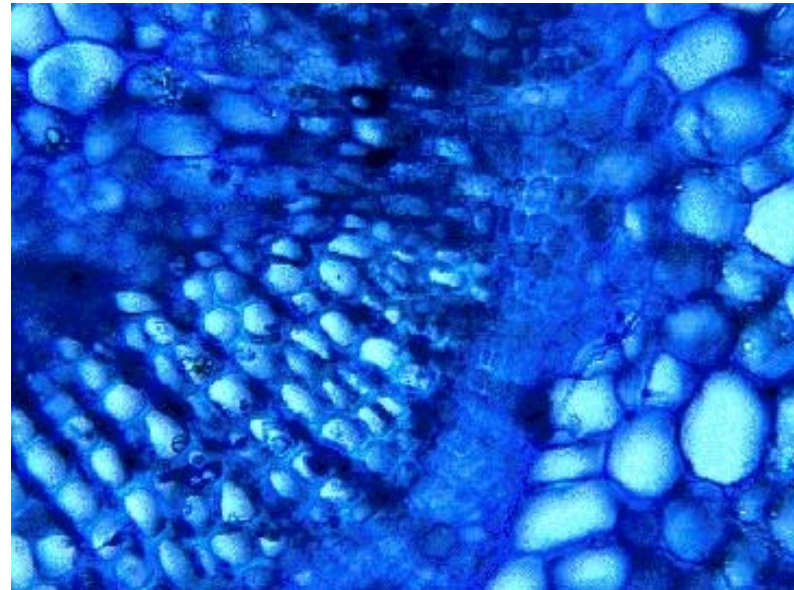
**Phloroglucinol-HCl** staining of *A. thaliana* stem cross-sections . Phloroglucinol-HCl staining (pink or fuchsia color) of a wild type *A. thaliana* stem section showing the normal lignin deposition in the walls of interfascicular fibers and xylem cells ( A - E ). The positions of the epidermis and 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  $\mu$ m.





**Metachromatické barvení**

**Ortochromatické barvení**



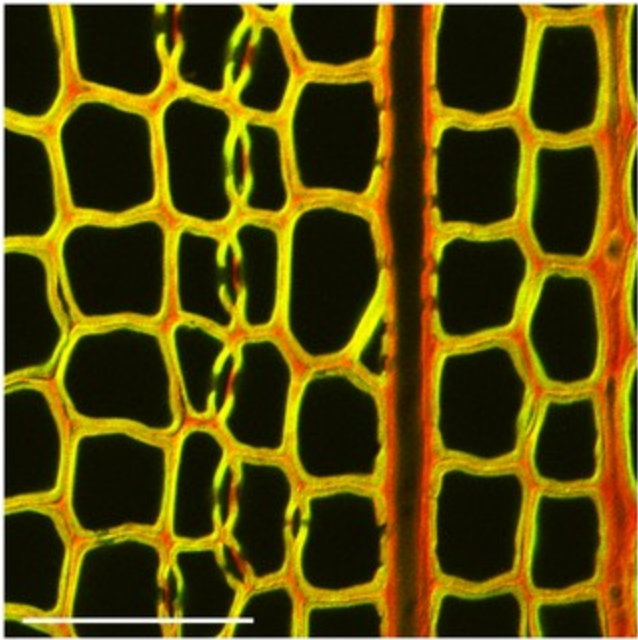
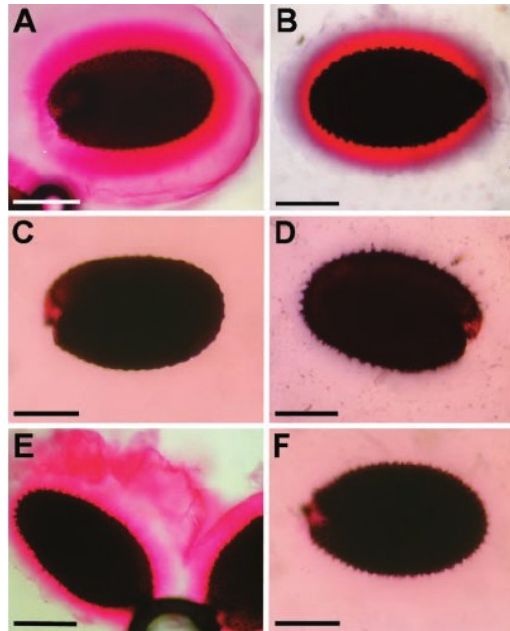


Fig 2. Combined red and green channel confocal images of **acridine orange**-stained spruce early wood. The staining conditions were 50  $\mu\text{mol/L}$  acridine orange in phosphate buffer, pH 7. The scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

Houtman et al. 2016



**Ruthenium red** staining of wild-type and mutant seeds.

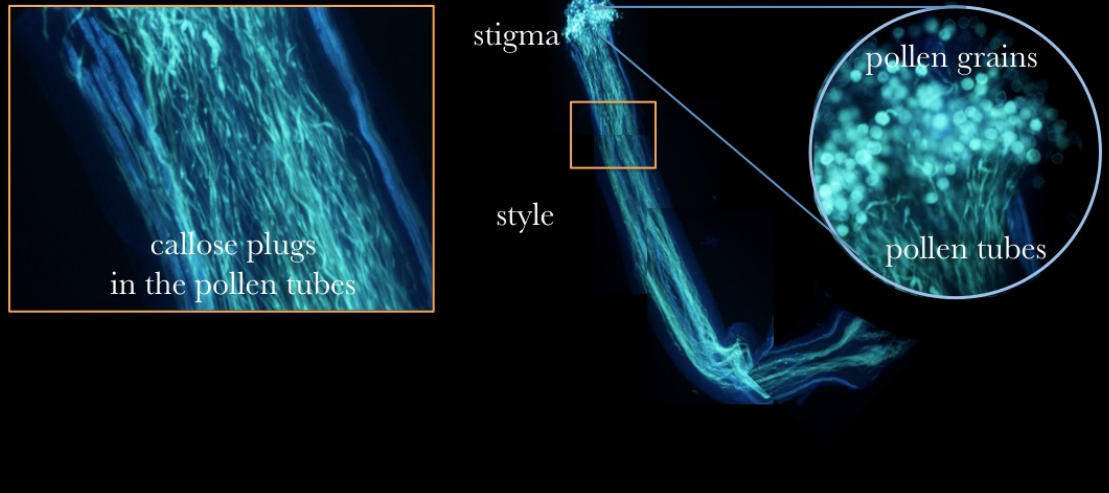
Western et al 2001



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

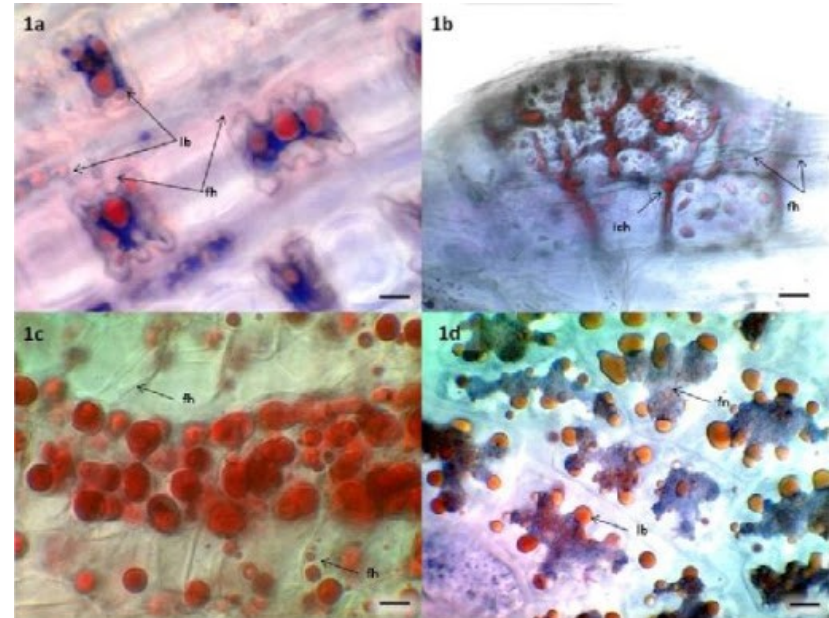
(Wikipedia)

*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 (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®

**Podvojné barvení sukcedánní:**  
alcianová modř - pravá jaderná červeň



parafínový řez listem kosatce *Iris* sp.  
tloušťka řezu 15 $\mu$ m