٨ . الصبغ
Staining

لا تتمكن العين البشرية من تمييز المحتويات المختلفة بالخلية بسهولة لعدم وجود قدر كاف من التميز بينها ، لذلك كان لزاماً صبغ القطاعات بصبغات مختلفة حتى يمكن فحص الخلايا والأنسجة مجهرياً فى سهولة ويسر .

لا توجد صبغة معينة تصلح لجميع الأغراض وتعطى المعلومات اللازمة عن مختلف الخلايا والأنسجة ، ويستعمل عادة للفحص العام نوعين من الصبغات تعطى كل منهما لوناً متميزاً عن الأخرى Stain and counterstain يمكن بواسطتهما التمييز بين النواة والسيتوبلازم ، وقد يستعمل البعض صبغة مفردة أو توافيق معينة من الصبغات للحصول على معلومات محددة تتعلق بخصائص كيميائية أو تركيبية خاصة .

ويلزم قبل استخدام أى صبغة الوقوف بقدر الإمكان على الخصائص المميزة لها ، ومازال فعل الكثير من الصبغات غير معلوم ، وإن وجد البعض الآخر الذى تحددت خصائصه فالكثير من الصبغات لها Auxochrome ، وهو الجزء الفعال من الجزئ الذى يتحد مع مكونات الأنسجة ، كما يوجد للصبغة Chromophore وهو الجزء المسئول عن اللون المميز للصبغة .

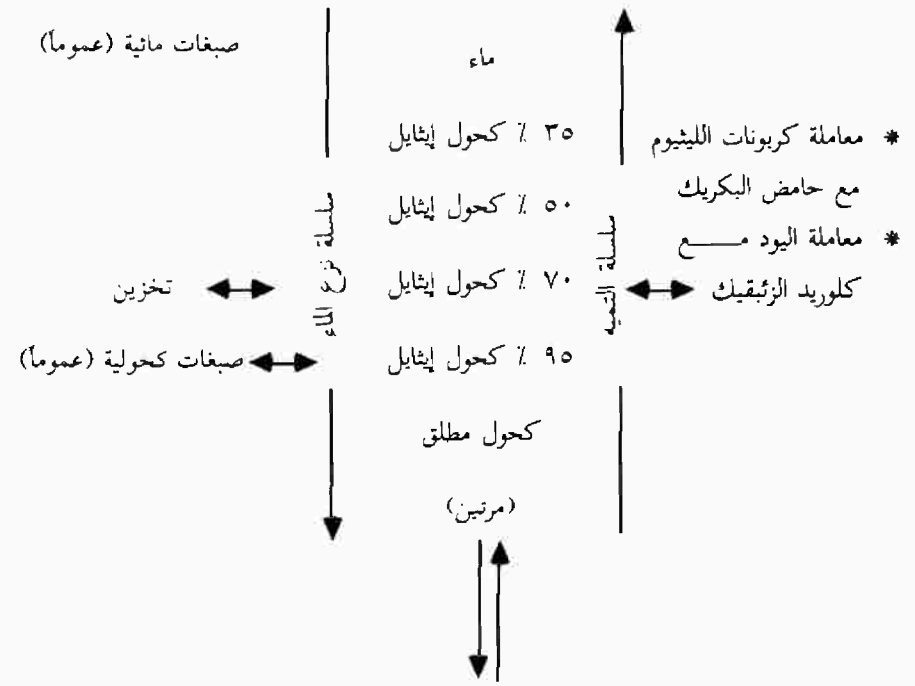
قد يتحد Auxochrome مباشرة مكوناً ملحًا مع محتوى معين من الخلية أو نتيجة الامتصاص أو بكليهما ، بعض الصبغات مثل الهيماتوكسلين Hematoxylin وهى ضعيفة جداً بمفردها يلزم لها وسيط يساعدها على الاتحاد مع الخلايا ، وهو ما يسمى بالمظهر Mordant الذى يكوّن رابطة مع مكونات الخلايا ، بينما صبغات أخرى مثل Sudan Black B تذوب مباشرة فى محتويات الخلية .

تجرى عملية الصبغ فى أوانٍ زجاجية نظيفة لعل أفضلها Coplin jars ، وفى حالة القطاعات غير المحملة مثل قطاعات الميكروتوم الثلجى أو السللويدن فيتم صبغها فى أطباق صغيرة Stender dishes أو زجاجات مماعة .

يراعى كتابة البيانات اللازمة على الأوانى وإحكام الغطاء عليها على الدوام ، وتنظف الأوانى من أى صبغات تلوثها من الخارج ، وإذا ما لزم إجراء فحص مجهرى سريع أثناء

الصبغ يراعى وضع حوض زجاجى صغير أسفل الشريحة المطلوب فحصها Lantern-slide glass حماية للمجهر من التلوث ، ويراعى عدم تعرض القطاعات للجفاف حتى يتم تغطيتها بعد وضع بيئة التحميل .

يلخص الشكل التخطيطى جدول (٨-١) الخطوات المتتابعة التى تعامل بها القطاعات أثناء الصبغ .



شرائح عليها ← زيلول نقى ← زيلول وكحول مطلق ← زيلول نقى ← تحميل وتغطية الشرائح
قطاعات بارافين (مرتين) (مرتين)

جدول (٨-١) : مخطط يوضح عمليتى التميه Hydration ، ونزع الماء Dehydration ، خلال الخطوات المتتابعة التى تعامل بها القطاعات فى عملية الصبغ.

تنقسم الصبغات تبعاً للأصل الذى تشتق منه إلى صبغات طبيعية وأخرى صناعية ، وفيما يلى شرح لكل من هاتين المجموعتين :

أولاً : الصبغات الطبيعية Natural dyes

توجد ثلاث صبغات طبيعية تستعمل مع الأنسجة النباتية ، وهذه الصبغات لم يمكن حتى الآن تحضيرها صناعياً ، وهى ذات أهمية خاصة فى الدراسات السيتولوجية ، هذه الصبغات هى :

(١) صبغة الهيماتوكسلين Hematoxylin

تستخرج هذه الصبغة من نبات . *Hematoxylin campechianum* L وتستعمل فى الدراسات الهستولوجية ، وهى من أهم الصبغات على الإطلاق ، تحضر هذه الصبغة بطريقتين أساسيتين تبعاً للغرض من استخدامها ، وهما كالتالى :

الطريقة الأولى :

يحتوى المحلول فى هذه الطريقة على الصبغة والمظهر (المثبت) Mordant والعامل المؤكسد ومادة حافظة ، ويستعمل هذا المحلول غالباً فى الأغراض التشريحية ، ويسمى المحلول باسم من حضّره لأول مرة ، وتوجد منه ثلاثة أنواع تسمى كالتالى :

(1) Mayer's Hematoxylin

(2) Harris's Hematoxylin

(3) Delafield's Hematoxylin

وتعرف الصبغة فى هذه الحالة بأنها ذاتية المظهر Self mordant ويشار إليها عادة بالمصطلح Hemalum .

طريقة تحضير صبغة Delafield's Hematoxylin

يذاب ٤ جم هيماتوكسلين فى ٢٥ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪ ثم يضاف إلى المحلول :

٣٦ جم Ammonium alum (NH_4 Al $(SO_4)_2$.$12H_2O$)

٤٠٠ مل ماء مقطر

يترك المحلول بعد ذلك لمدة أسبوع معرضاً للضوء ، مع وضع غطاء غير محكم ، ويرشح المحلول ثم يضاف ما يلى :

١٠٠ مل جلسرين

١٠ مل كحول الميثايل ١٠٠ ٪

يترك المحلول لمدة ٦ أسبوع لينضج ، يحتفظ المحلول الأساسى للصبغة بصلاحيته لما لانهاية .

الطريقة الثانية :

لا يخلط المظهر فى هذه الطريقة مع الصبغة فى محلول واحد ، بل يعامل النموذج أولاً بالمظهر (مثل شب الحديد Iron alum) ثم يتبع بالصبغة ، ومن أمثلتها :

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وتحضر كما يلى :

(أ) يجهز محلول أساسى Stock solution من الهيماتوكسلين بالتركيز التالى :

١٠ جم صبغة هيماتوكسلين

١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

يترك المحلول الأساسى للصبغة لفترة لا تقل عن ٣ شهور قبل استعماله حتى ينضج ، ثم يخفف بنسبة :

١ محلول أساسى : ٩ ماء مقطر ، ويرشح .

(ب) يتركب المظهر من شب الحديد

Iron alum (Ferric ammonium sulphate, $Fe\,NH_4\,(SO_4)_2\,.12H_2O$

وتستخدم البللورات البنفسجية فقط حيث تتحلل البلورات البنية ، ويجهز المحلول بالتركيز التالى :

- المظهر Mordant ٤ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر .
- للتمييز Differentiator ٢ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر.

ويرشح المحلول قبل الاستعمال .

(٢) صبغة البرازيلين Brazilin

يمكن الحصول على هذه الصبغة من مجموعة أشجار مختلفة ، تعرف بغابات البرازيل Brazilwood وإن كانت تستخرج أساساً من نبات *Caesalpinia crista* أو *C. echinata* وتستعمل حالياً بكثرة لصبغ تحضيرات الدهك Smears .

تستعمل صبغة البرازيلين عادة بتركيز ٠ر٥ ٪ فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ ، وتخزن لنحو أسبوع قبل الاستعمال لتنضج ، والبرازيلين ليست صبغة بذاتها ، وإنما ينتج تأثيرها عقب تفاعلها مع المظهر شب الحديد Ferric ammonium sulphate .

(٣) صبغة الكوشينيل Cochineal

تستعمل أيضاً مشتقاتها Derivatives الكارمين Carmine وحمض الكارمينيك Carminic acid ويمكن الحصول عليها بعد طحن الأجسام المجففة لإناث حشرة الكوشينيل حيث ينتج مسحوق لونه أحمر مصفر ، ويمكن الحصول على الكارمين ذى اللون الأحمر اللامع بعد إضافة محلول الشب إلى الكوشينيل . وللكارمين أهمية فى الدراسات السيتولوچية كما فى حالة الأسيتوكارمين Aceto-carmine .

ثانياً: الصبغات الصناعية Coal-tar dyes

تستخرج كل صبغات هذه المجموعة من قار الفحم Coal-tar وهى كثيرة العدد جداً وسيكون مجال اهتمامنا بهذه المجموعة فيما يستخدم منها فى الأغراض النباتية . وتحضر صبغات هذه المجموعة باستخدام أحد المذيبات المذكورة بجدول (٨-٢) ، وعادة ما تحضر الصبغات بالتركيزات التالية :

(١) ٥ر٠ - ١ ٪ فى الماء المقطر .

(٢) ٥ر٠ - ١ ٪ فى كحول الإيثايل ٥٠ ٪ أو ٧٠ ٪ أو ٩٥ ٪ .

(٣) محلول مشبع فى زيت القرنفل أو فى حجوم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق (أى بنسبة ١ : ١) ، وقد يستبدل الكحول بالميثايل سيلوزولف Methyl cellosolve أو فى حجوم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق والميثايل سيلوزولف .

جدول (٨-٢) : المذيبات الأساسية (×) التى تستخدم فى تحضير الصبغات الصناعية المستعملة فى الأغراض النباتية

الصبغة		المذيب		
		ماء مقطر	كحول إيثايل ٪	زيت قرنفل
١ - الفوكسين الحامضى	Acid Fuchsin (acid)	×	٪ ٧٠	
٢ - أزرق الأنيلين	Anilin Blue (acid)	×	٪ ٥٠	
٣ - أزرق القطن	Cotton Blue (acid)	×	٪ ٥٠	
٤ - بنى البسمارك	Bismarck Brown Y (basic)		٪ ٧٠	
٥ - البنفسجى المتبلور	Crystal Violet (basic)	×		×
٦ - الإيوسين	Eosin Y (acid)		٪ ٩٥	
٧ - الإرثروسين	Erythrosin (acid)		٪ ٩٥	×
٨ - الأخضر السريع	Fast Green (acid)		٪ ٩٥	×
٩ - البرتقالى الذهبى	Golden Orange (acid)		٪ ١٠٠	×
١٠- السفرانين	Safranin O (basic)	×	٪ ٩٥ - ٥٠	×

الاستعمالات النباتية الاساسية للصبغات الشائعة

The principal botanical uses for the common stains

(١) الجدر السيليولوزية Cellulose cell walls

- الهيماتوكسلين ذاتية المظهر Hematoxylin (self-mordanting type) (زرقاء اللون)
- الأخضر السريع .Fast green FCF
- أزرق الأنيلين Anilin blue
- بنى البسمارك .Bismarck brown Y
- الفوكسين الحامضى Acid fuchsin

- أحمر الكونغو Congo red

- الأخضر الضوئى Light green

(٢) الجدر الملجننة للخلايا Lignified cell walls

- السفرانين Safranin (حمراء اللون)

- البنفسجى المتبلور Crystal violet

(٣) الجدر المكوتنة للخلايا Cutinized cell walls

- السفرانين Safranin

- البنفسجى المتبلور Crystal violet

- الإرثروسين Erythrosin (قرنفلية اللون)

(٤) الصفيحة الوسطى Middle lamella

- الهيماتوكسلين (غير ذاتية المظهر) Iron Hematoxylin

- أحمر الروثينيوم Ruthenium red (material cut fresh)

(٥) الكروموسومات Chromosomes

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin

- السفرانين Safranin

- الكارمين Carmine (for acetocarmine smears) (حمراء اللون)

(٦) الميتوكوندريا Mitochondria

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin

(٧) السيتوبلازم Cytoplasm

- أيوسين Eosin Y.

- الإرثروسين Erythrosin B.

- الأخضر السريع Fast green FCF
- البرتقالى الذهبى Orange G

(٨) هيفات الفطر فى أنسجة العائل Filamentous fungi in host tissues

- الهيماتوكسلين Iron Hematoxylin
- السفرانين Safranin
- الأخضر السريع Fast green FCF

(٩) الكالوز Callose

- أزرق الأنيلين Anilin blue
- الريزوكرين الأزرق (متخصصة) Resocrin blue

يُحمل اللون بالشق القاعدى بالصبغة القاعدية (basic) وبالشق الحامضى بالصبغة الحامضية (Acid) ، وكقاعدة عامة تستعمل الصبغة القاعدية فى صبغ التراكيب النووية Nuclear structures وفى بعض الحالات الجدر الملجننة . أما الصبغات الحامضية فتستعمل فى صبغ السيتوبلازم والجدر غير الملجننة .

ويستعمل بعد الصبغ بعض المروقات مثل زيت القرنفل Clove oil وزيت السيدر Cedar oil وزيت البرجموت Bergamot oil وزيت أخضر الشتاء Wintergreen oil وتستعمل هذه الزيوت عادة مركزة كما تشترى أو تخفف بقليل من الزيلول Xylene . كما يستعمل المروق Carbol xylene وهو رخيص الثمن ويقوم بالعملية على أحسن وجه ويتكون من حجم من الفينول المنصهر مخلوطاً بثلاثة أو أربعة حجوم من الزيلول .

صبغ قطاعات شمع البارافين Staining paraffin sections

تصبغ القطاعات باستعمال صبغة مفردة ، أو مزدوجة ، وأحياناً تستعمل ثلاث أو أربع صبغات ، وفيما يلى بعض الأمثلة لهذه الأنظمة من الصبغات ، مع وجود جدول يوضح الخطوات المتتالية لكل طريقة للصبغ ، ينصح بتكبيره ووضعه أمامك على جدران المعمل للاستعانة به أثناء إجراء عملية الصبغ .

أولاً: الصبغة المفردة

مثال ذلك صبغة الهيماتوكسلين سواء كانت ذاتية المظهر أو منفصلة المظهر ، وفيما يلى طريقة استخدام كل منهما :

(أ) صبغة الهيماتوكسلين (ذاتية المظهر) Mayer's Hemalum Hematoxylin

يستعمل فى هذه الحالة صبغة من التى يوجد المظهر مختلطاً بها Self-mordanting type (جدول ٨-٣ أ و ب) وهى تستعمل أساساً فى صبغ الجدر السليولوزية والبكتين وميسيليوم الفطريات وتستخدم أيضاً فى صبغ النوايات فى طور السكون كما يمكن أن تستعمل منفردة فى صبغ الأنسجة المرستيمية أو التى بدأت فى التميز .

يتحول لون الأنسجة بعد صبغها بالهيماتوكسلين وغمسها فى ماء الحنفية من اللون الإرجوانى Purple إلى الأزرق Blue وتعطى لونًا إرجوانيًا محمرًا ، إذا غمست فى ماء حامضى ، وأزرق إذا غمست فى ماء قلوى . ويفضل اللون الأزرق ، وإذا لم يظهر هذا اللون بعد غمس الشرائح فى ماء الحنفية فيمكن استعمال ١ر٠ ٪ من كربونات الصوديوم لإظهار هذا اللون .

يراعى عند فحص الشرائح أن تكون النوايات ذات لون أسود مزرق ، والجدر السليولوزية لونها أسود ، أما الجدر الملجننة فتكون عديمة اللون تقريباً ، والبلاستيدات بلون أزرق خفيف إلى أسود مزرق والسيتوبلازم رمادى مزرق .

إذا فحصت الشريحة وهى فى الماء بعد صبغها ، ولم تظهر الألوان سابقة الذكر تعاد الشريحة إلى الصبغة لفترة أخرى حتى تأخذ الألوان المطلوبة ، وإذا تركت الشريحة أكثر من اللازم فى الصبغة ، وصار لونها أسود ، فمن الممكن إزالة الزائد من الصبغة بغمسها فى محلول حامضى خفيف (٥ر٠ ٪ حامض هيدروكلوريك أو ١ ٪ حامض ستريك ، أو محلول مائى مشبع لحامض البكريك) ثم تغسل بالماء ، وتغمس فى محلول قلوى للتعادل وتفحص .

جدول (٨ - ٣ أ) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر .

م	المحلول	المدة بالدقيقة
(١)	زيلول نقى	٢ - ٥
(٢)	زيلول وكحول مطلق (١ : ١)	٢ - ٥
(٣)	كحول مطلق (١)	٢ - ٥
(٤)	كحول مطلق (٢)	٢ - ٥
(٥)	كحول ٩٥ ٪	٢ - ٥
(٦)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(٨)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(٩)	ماء مقطر	١ - ٢
(١٠)	صبغة الهيماتوكسلين	٢ - ٣٠
(١١)	ماء مقطر	١
(١٢)	ماء الصنبور لإزالة الزائد من الصبغة	١
(١٣)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(١٤)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(١٥)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(١٦)	كحول ٩٥ ٪	٥ - ١٠
(١٧)	كحول مطلق (١)	٥ - ١٠
(١٨)	كحول مطلق (٢)	٥ - ١٠
(١٩)	زيت قرنفل (مروق)	٥ - ١٠
(٢٠)	زيلول (١)	٥
(٢١)	زيلول (٢)	٥
(٢٢)	زيلول (٣)	٥
(٣٣)	التحميل والتغطية (يستخدم فى التحميل كندا بلسم أو أى بيئة تحميل أخرى)	

STAINING CHART

Progressive Hemalum

Xylene
2-5 min
(de-waxing)
↓
absolute
(anhydrous)
alcohol
2-5 min
↓
95 %
alcohol
2-5 min
↓
70 &
alcohol
2-5 min
↓
50 %
alcohol
2-5 min
↓
30 %
alcohol
2-5 min
↓
distilled
water
1-2 min
↓
Hemalum
2-30 min
↓
distilled
water
1 min
↓
Tap water
→

resin and
Cover glass
↑
xylene III
5 min
↑
xylene II
5 min
↑
xylene I
5 min
↑
carbol-
xylene
5-10 min
↑
absolute
alcohol II
5-10 min
↑
absolute
alcohol I
5-10 min
↑
95 %
alcohol
5-10 min
↑
70 %
alcohol
5-10 min
↑
50 %
alcohol
5-10 min
↑
30 %
alcohol
2-5 min

جدول (٨-٣ ب) خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر Mayer's Hemalum Hematoxylin (ساس Sass ١٩٦١) .

(ب) صبغة الهيماتوكسلين (منفصلة المظهر)

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وهى من أهم الصبغات المستخدمة فى الأغراض السيتولوجية . كما تعد أيضاً من أكثر الصبغات استعمالاً فى طريقة السللويدن (جدول ٨-٤) .

خطوات الصبغ :

	المحلول	المدة بالدقيقة
(١)	زيلول نقى	٢ - ٥
(٢)	زيلول وكحول مطلق (١ : ١)	٢ - ٥
(٣)	كحول مطلق	٢ - ٥
(٤)	كحول مطلق	٢ - ٥
(٥)	كحول ٩٥ ٪	٢ - ٥
(٦)	كحول ٧٠ ٪	٢ - ٥
(٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ - ٥
(٨)	كحول ٣٠ ٪	٢ - ٥
(٩)	ماء مقطر	١ - ٢
(١٠)	٤ ٪ شب الحديد (مظهر)	٦٠(إلى اليوم التالى)
(١١)	ماء مقطر (٥ تغييرات)	١
(١٢)	١٠ ٪ صبغة هيماتوكسلين	٦٠(إلى اليوم التالى)
	(تترك العينات بالصبغة نفس فترة وجودها بالمظهر)	
(١٣)	ماء مقطر (٣ تغييرات)	١
(١٤)	٢ ٪ شب الحديد (التمييز)	

تترك الشرائح ٥ دقائق ، تأخذ القطاعات لونًا اسود رماديًا ، تتابع القطاعات بالفحص المجهرى حتى يصبح لون السيتوبلازم رمادياً والنوايات سوداء ، تترك القطاعات مغمورة فى محلول شب الحديد . ولعنصر الوقت دور هام فى هذه الخطوة حيث تتميز الأنسجة بسرعات مختلفة ، لذلك تلزم دقة الملاحظة ، وعموماً يلزم لغالبية الشرائح نحو ١٠ دقائق للتميز ، وإذا كان تميز الخلايا سريعاً يستعمل محلول ١ ٪ شب الحديد .

(١٥)	ماء صنبور لإزالة شب الحديد ، يعطي وجوده لوناً باهتاً للقطاعات	٥
(١٦)	كحول ٣٠ ٪	٢ – ٥
(١٧)	كحول ٥٠ ٪	٢ – ٥
(١٨)	كحول ٧٠ ٪	٢ – ٥
(١٩)	كحول ٩٥ ٪	٥ – ١٠
(٢٠)	كحول مطلق (١)	٥ – ١٠
(٢١)	كحول مطلق (٢)	٥ – ١٠
(٢٢)	زيت قرنفل (مروق)	٥
(٣٣)	زيلول نقى (١)	٥
(٢٤)	زيلول نقى (٢)	٥
(٢٥)	زيلول نقى (٣)	٥
(٢٦)	التحميل والتغطية	

ملحوظة : يمكن أن تطلب الأمر استخدام صبغ مزدوج إضافة صبغة البرتقالى الذهبى Golden orange عقب خطوة الكحول ٩٥ ٪ وتتركب من :

١ جم صبغة البرتقالى الذهبى

١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

٤ مل حامض هيدروكلوريك (0.1 N) .

STAINING CHART

Iron Hematoxylin

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى
صبغة الهيماتوكسلين

	resin and cover glass
	↑ xylene III
	↑ xylene II
4% iron alum	↑ xylene I
4 hr.	↑ carbol-xylene
↓ dist. water	↑ absolute alcohol II
5 changes	↑ absolute alcohol I
1 min. intervals	↑ 95% alcohol
↓ hematoxylin	↑ 70% alcohol
4 hr.	↑ 50% alcohol
↓ dist. water	↑ 30% alcohol
3 changes	
↓ destaining reagent until differentiated	
↓ dist. water	
3 changes	
↓ running tap water	
5 min. ——————→	

جدول (٨-٤) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين منفصلة المظهر
Heidenhain's iron alum Hematoxylin
الفترات الزمنية كما في جدول (٨-٣)
(ساس Sass ١٩٦١) .

ثانياً: الصبغ المزدوج

يقصد به استعمال صبغتين تقوم كل منهما بتلوين نسيج أو أكثر ، وبذا تظهر كل الأنسجة بوضوح وتصبح الدراسة وتمييز التركيب أمراً يسيراً . وتوجد طرق عديدة لكثرة مايوجد من صبغات ، ولكن سنقتصر على ذكر أكثرها شيوعاً مثل :

(١) صبغة الهيماتوكسلين والإرثروسين Hemalum and Erythrosin

تستعمل صبغة الإرثروسين في هذه الطريقة كصبغة مضادة Counterstain وهي تساعد على التمييز بين الأنسجة وبعضها البعض لوجود تفاوت في اللون بينهما ، ويجب ملاحظة

أن الصبغة المضادة لا تكون من الصبغات عالية التخصص بل تكون محدودة التخصص ، وتساعد على الرؤيا نتيجة لاختلاف اللون بالنسبة للصبغة الأساسية ، تتلون الخلايا الملجننة والنوايات باللون الأسود بينما تتلون الجدر السليولوزية باللون الأحمر الوردى أو القرنفلى . يمكن فى هذه الطريقة الاستعاضة عن الإرثروسين بالصبغات الآتية : Fast green - Eosin - Golden orange - Light green مع بقاء الهيماتوكسلين كصبغة أساسية .

خطوات الصبغ

تستعمل الخطوات السابق ذكرها فى طريقة الصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر حتى نصل إلى صبغة الهيماتوكسلين ، وتوضع الشرائح فى هذه الصبغة المدة اللازمة ثم تنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم إلى كحول ٥٠ ٪ ثم إلى كحول ٧٠ ٪ ثم إلى كحول ٩٥ ٪ ثم إلى صبغة الإرثروسين (٥ر٠ ٪ فى كحول ٩٥ ٪ أو يمكن استعمال ٥ر٠ ٪ فى زيت القرنفل) ثم تنقل إلى كحول مطلق (تغييرتين) ثم إلى كاربول زيلين Carbole xylene ثم إلى زيلول (تغييرتين) مع مراعاة نفس الفترات بالخطوات المتتالية ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٥) .

تتبع الخطوات سالفة الذكر حتى الوصول إلى صبغة الهيماتوكسلين

STAINING CHART

Hemalum With "General" Counterstain

Hemalum to correct intensity	resin and cover glass
↓	↑
30% alcohol	xylene III
↓	↑
50% alcohol	xylene II
↓	↑
70% alcohol	xylene I
↓	↑
95% alcohol	carbol xylene
↓	↑
erythrosin	absolute alcohol II
⟶	↑
	absolute alcohol I

جدول (٨-٥) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين والإرثروسين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨ - ٣) (ساس Sass ١٩٦١).

(٢) صبغة الهيماتوكسلين والسفرانين Hemalum and Safranin

تأخذ الخلايا الملجنة لونًا أحمر رائقًا وواضحًا ، أما الخلايا غير الملجنة فيكون لونها أزرق فى نهاية عملية الصبغ وقبل التحميل ، وقد تأخذ البلاستيدات الملونة اللون الأزرق أو البنفسجى أو الأحمر . إذا ظهر أن لون السفرانين أقل مما يجب أو أكثر مما يجب فيمكن إعادة الشريحة إلى السفرانين لزيادة اللون أو إزالة الزائد من السفرانين بالإذابة فى أحد التركيزات العالية للكحول (وجد أن كحول ٩٠ ٪ و ١٠٠ ٪ ذات قدرة ضعيفة على إزالة الصبغة) ، إذا كان لون السفرانين أكثر من الحد المطلوب يمكن ترك الشريحة فى خليط من الزيلوفينول لمدة تتراوح بين ٤ إلى ١٢ ساعة ، فقد ثبت أن هذا المحلول له تأثير بسيط جداً فى إزالة الزائد من السفرانين ، ولذا نترك الشريحة فيه مدة طويلة دون خوف من اختفاء الصبغة (جدول ٨-٦) .

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى
صبغة الهيماتوكسلين

STAINING CHART

Hemalum and "Specific" Counterstain

Hemalum to correct intensity	resin and cover glass
↓	↑
safranin 1–12 hr.	xylene III
↓	↑
wash	xylene II
↓	↑
30% alcohol	xylene I
↓	↑
50% alcohol	carbol-xylene
↓	↑
70% alcohol	absolute alcohol
↓	↑
95% alcohol ⟶	absolute alcohol

جدول (٨-٦) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين والسفرانين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).

خطوات الصبغ

بعد الوصول بالشريحة إلى صبغة الهيماتوكسلين توضع فيها للمدة اللازمة ، ثم تنقل الشريحة بعد ذلك إلى السفرانين (١ ٪ فى الماء) لمدة ١-١٢ ساعة ، تنقل بعدها إلى الماء (غسيل) ثم إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية .

(٣) صبغة السفرانين والأخضر السريع Safranin and Fast green

وهى الطريقة القياسية Standard method والأكثر استخداماً مع الأنسجة النباتية للتمييز بين الأجزاء الملجننة والسليولوزية من جدر الخلايا ، وتجرى بتمرير الشريحة فى أوانى الصبغ المختلفة حتى الوصول إلى الماء ثم تنقل إلى السفرانين المائى (١ ٪ فى الماء المقطر) لمدة ١-١٢ ساعة ثم تنقل الشريحة إلى الماء أو تترك مع تغيير الماء حتى يصبح الماء غير ملون ، ثم تنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم إلى الأخضر السريع (١ ٪ فى كحول ٩٥ ٪) وتترك لمدة ٥ - ٣٠ ثانية ، تنقل بعد ذلك إلى كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم إلى زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٧).

تتأثر كل من الصبغتين المستعملتين بالكحول أثناء التجفيف وذلك لقابليتهما للذوبان فى الكحول . كما تؤثر كل منهما على الأخرى ، ولذا فطريقة الصبغ بهاتين الصبغتين تحتاج إلى دقة ومران وخبرة كافية . وفى النهاية يجب أن تكون الخلايا الملجننة والكروماتين والنوية وأحياناً الكيوتين ذات لون أحمر لامع والبلاستيدات الخضراء قرنفلية اللون إلى حمراء والجدر السليولوزية والسيتوبلازم ذات لون أخضر .

إذا كان الأخضر السريع يزيل لون السفرانين نتيجة لتركيزه الزائد فيمكن تخفيف محلول الصبغة بنسبة ١ : ٥ من الكحول ٩٥ ٪ . وإذا كان لون السفرانين لازال فى الجدر السليولوزية رغم صبغة الأخضر السريع فيمكن إعادة الشريحة إلى الأخضر السريع ومضاعفة المدة السابقة ثم تجفيفها . إذا ظهر بعد الفحص أن السفرانين ضعيف يعاد صبغ الشريحة من البداية كأنها لم تصبغ من قبل .

تتبع الخطوات سالفة الذكر

حتى الوصول إلى الماء

STAINING CHART

Safranin-Fast Green

Aqueous safranin 1–12 hr.	resin and cover glass
↓	↑
water, change until colorless	xylene III
↓	↑
30% alcohol	xylene II
↓	↑
50% alcohol	xylene I
↓	↑
70% alcohol	carbol-xylene
↓	↑
95% alcohol	absolute alcohol III (optional)
↓	↑
fast green in 95% alcohol 5–30 sec. ⟶	absolute alcohol II
	↑
	absolute alcohol I

جدول (٨-٧) : خطوات الصبغ بالسفرانين والأخضر السريع

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).

يمكن أن يحل محل الأخضر السريع الصبغات الآتية : الأخضر الضوئى - أخضر المالاكيت - أو صبغة مضادة زرقاء مثل أزرق الأنيلين أو البنفسجى المتبلور أو أزرق الميثيلين وكل هذه الصبغات تذوب فى كحول ٩٥ ٪ أو فى كحول ٥٠ ٪ أو فى زيت القرنفل وتدرج ضمن الخطوات السابق ذكرها فى الموضع المناسب لتركيز المذيب .

وتحضر المحاليل المستعملة كما يلى :

صبغة السفرانين :

يذاب ١ جم صبغة سفرانين فى ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪ ، وعند الاستعمال يخفف المحلول بالماء المقطر (١:١) .

صبغة الأخضر السريع :

٠ر٥ جم صبغة أخضر سريع

٥٠ مل زيت قرنفل

٥٠ مل كحول مطلق

محلول الترويق :

٥٠ مل زيت قرنفل

٢٥ مل كحول مطلق

٢٥ مل زيلول نقى

(٤) صبغة الإرثروسين والبنفسجى المتبلور Erythrosin and Crystal violet

تفضل هذه الطريقة إذا كان نسيج الخشب حديثاً أو ضعيف التلجنن . تمرر الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم ينقل إلى البنفسجى المتبلور (١ ٪ فى الماء) لمدة ١٥ دقيقة ثم تغسل فى الماء وتنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم إلى كحول مطلق ثم تنقل إلى صبغة الإرثروسين لمدة ١-٢ دقيقة ثم تنقل إلى ٥٠ ٪ زيلول ثم إلى زيلول نقى ٢-٣ مرات ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٨) .

تحضر صبغة الإرثروسين بإذابة ٢ جم من الصبغة فى ٢٥ مل كحول مطلق ثم يضاف إلى المحلول ٧٥ مل زيت قرنفل .

هذه الطريقة تحتاج إلى ملاحظة ودقة فائقة والفحص بعد الصبغ بالإرثروسين حيث يحل محل البنفسجى المتبلور فى الأنسجة الملجننة . ونتيجة الصبغ تكون الخلايا الملجننة ذات لون بنفسجى لامع والجدر السليولوزية ذات لون أحمر وردى . ويراعى التخلص تماماً من آثار زيت القرنفل حتى لا يتأثر لون الأنسجة ويزول مع الوقت ، فضلاً عن ظهور نقط زيتية عند فحص الشريحة .

STAINING CHART
Crystal violet - Erythrosin

تتبع الخطوات سالفة الذكر
حتى الوصول إلى الماء

aqueous	resin and
Crystal violet	
15 min	cover glass
↓	↑
rinse	
in water	xylene III
↓	↑
30 % alcohol	
↓	xylene II
50 % alcohol	↑
↓	
70 % alcohol	xylene I
↓	↑
95 % alcohol	
↓	clove oil
absolute	
alcohol	+
↓	xylene
erythrosin	
1-2 min	↑
⟶	clove oil

جدول (٨-٨) : خطوات الصبغ بالإرثروسين والبنفسجى المتبلور

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١) .

(٥) صبغة البنفسجى المتبلور والأيودين Crystal Violet-Iodine

تعرف بطريقة نيوتن Newton وهى من الصبغات الهامة التى تستعمل فى الأغراض السيتولوجية (جدول ٨-٩) . فى هذه الطريقة تمرر الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم ضع الشريحة فى محلول اليود (IKI) لمدة ١٥ دقيقة ، بعد ذلك تنقل إلى الماء لفترة بسيطة ثم تنقل الشريحة إلى البنفسجى المتبلور (٢٥ر٠ - ٥ر٠ ٪ فى الماء) لمدة ١-٤ ساعات . تغسل الشريحة فى الماء ثم تنقل إلى محلول يود آخر لمدة ١٥ دقيقة ثم تشطف فى الماء ، تنقل الشريحة إلى حامض البكريك فى كحول ٥٠ ٪ (شبع ٥٠ ٪ كحول بحامض البكريك) لمدة

٣٠ ثانية ، ثم تنقل إلى كحول ٩٥ ٪ لمدة ١٠-٦٠ ثانية ، ثم كحول مطلق لمدة ٣٠ ثانية مرتين ، ثم تنقل الشريحة إلى إناء يحتوى على كحول مطلق وزيلول وزيت السيدر بنسبة الثلث لكل منهم لمدة ٣٠ - ٦٠ ثانية. تختبر الشريحة ثم تنقل إلى زيلول مرتين، ثم تحمل وتغطى. فى هذه الطريقة تصبغ الكروموسومات باللون الأزرق المسود فى وسط غير ملون .

يحضر الأيودين بوتاسيوم أيوديت (IKI) كما يلى :

١٠٠ مل ماء + ١ جم يودور بوتاسيوم + ١ جم يود

تخصص أوانى التجفيف فى هذه الطريقة ؛ أى لا تستعمل الكحولات المختلفة فى غرض أخر حتى لا يحدث تلوث بصبغة أخرى فتضر بالعملية . عند الوصول إلى الكحول ٩٥ ٪ يجب الإسراع طالما كانت الصبغة لا تلون الخطوات التالية بشكل واضح . يستعمل زيت السيدر حتى يقلل التبخير أثناء الفحص . إذا ظهر لون أزرق فى السيتوبلازم تعاد الشريحة إلى الكحول وإذا ظهرت الكروموسومات بلون باهت يعاد صبغها من البداية .

STAINING CHART

Crystal (Gentian) Violet-Iodine

تتبع الخطوات سالفة الذكر حتى الوصول إلى الماء

IKI
15 min.
↓
rinse in water
↓
crystal violet
1–4 hr.
↓
rinse
↓
IKI
15 min.
↓
rinse
↓
50% alcohol
picric acid
30 sec.
↓
95%
alcohol
10–60 sec.
→
absolute
alcohol I
30 sec.
↑
absolute
alcohol II
30 sec.
↑
⅓ absolute alcohol
⅓ xylene
⅓ cedar oil
30–60 sec.
↑
examine
↑
xylene I
↑
xylene II
↑
xylene III
↑
resin and
cover glass

جدول (٨-٩) : خطوات الصبغ بالبنفسجى المتبلور والأيودين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس Sass ١٩٦١).