

# رنگ آمیزی Staining

- **هدف:** متمایز نمودن سلول ها، اجزای سلولی و عناصر تشکیل دهنده بافت از نظر نوری توسط تغییرات در رنگ آن ها برای مطالعه میکروسکوپی.
- **واکنش های رنگ آمیزی** بر سه اساس حلالیت، جذب و آغشتگی بنا شده است.
  - حلالیت:** رنگ با درجات مختلف در مواد گوناگون حل می شود
  - جذب:** ذرات رنگ داخل سلول نفوذ کرده و با اجزای سلول ترکیب می شوند.
  - آغشتگی:** قرار گرفتن املاح فلزات سنگین در اطراف سلول.
- **منشا رنگ ها:** طبیعی ( گیاهی و حیوانی ) - مصنوعی ( رنگ های آنیلین که از بنزن مشتق شده ).
  - طبیعی:**
    - هماتوکسیلین. از مغز درختی به نام همتوکسیلین کامپکیانوم بدست می آید و قبل از عمل کردن باید اکسید شده و به هماتین تبدیل شود
    - اورسئین. از گیاه گل‌سنگ بدست می آید.
    - زعفران. از گیاه زعفران بدست می آید.
  - مصنوعی:** مثل متیلن ویوله- متیلن گرین- تولوئیدین بلو- متیلن بلو
- **رنگ های اسیدی:** ریشه اسیدی دارند و عناصر قلیایی را رنگ می کنند مثل سیتوپلاسم سلول.
- **رنگ های قلیایی:** ریشه قلیایی دارند و عناصر اسیدی مثل هسته را رنگ می کنند.
- **رنگ های خنثی:** محلول در الکل بوده و از مخلوط کردن رنگ اسیدی و قلیایی حاصل می شوند. هم عناصر اسیده و هم عناصر قلیایی را رنگ می کنند. مثل رنگ گیمسا

# روش رنگ آمیزی

- **رنگ آمیزی مستقیم:** فقط از رنگ استفاده می شود.
- **رنگ آمیزی غیر مستقیم:** از مواد **تسریع کننده** (موادی که علیرغم عدم پیوند با رنگ باعث افزایش قدرت رنگ آمیزی می شوند) یا **مردانت** (موادی که باعث می شوند برخی واکنش های رنگ آمیزی از طریق پیوند بین بافت و رنگ انجام شود یعنی شبیه کاتالیست در واکنش شیمیایی عمل می کنند) استفاده می شود.
- **رنگ آمیزی پروگرسو:** رنگ به کار رفته احتیاج به شستشویا رنگ زدائی ندارد.
- **رنگ آمیزی رگرسو:** به دلیل شدت رنگ آمیزی احتیاج به **متمایز کردن** (شستشوی رنگ زیادی تا یک ماده خاص از بافت اطراف خود به طور افتراقی رنگ شود) رنگ زیادی دارد.

# آماده کردن برش ها برای رنگ آمیزی

• 1- از بین بردن مواد مختلف:

الف- حذف فرمالین: محلول اشباع الکی اسید پیکریک 1 ساعت

ب- حذف فرمالین و پارافین: به ترتیب گزیلول- الکل مطلق یک و دو به مدت 1 تا 2 دقیقه- محلول الکی اسید پیکریک نیم تا 2 درصد به مدت چند دقیقه- شستشو با آب روان 10 تا 15 دقیقه

ج- حذف مواد جیوه ای: محلول 3 تا 5 درصد تیوسولفات سدیم و یا یدلوگل برای چند دقیقه

د- حذف پارافین: برش ها در محلول گزیلول 2 تا 3 دقیقه و سپس دو ظرف الکل مطلق 1 تا 2 دقیقه قرار می گیرند

ه- حذف مواد جیوه ای و پارافین: گزیلول (2 تا 3 دقیقه)- الکل مطلق اول و دوم (1 تا 2 دقیقه)- الکل 50 درصد و شستشو در آب روان (1 تا 2 دقیقه)- یدلوگل (2 تا 3 دقیقه)- شستشو در آب- تیوسولفات سدیم تا بی رنگ شود و سپس شستشو در آب روان 10 تا 15 دقیقه.

• 2- آبیگری بعد از ظرف رنگ: 4 حمام الکل به ترتیب دو الکل 95 و دو الکل 100 برای 1 تا 2 دقیقه

• 3- شفاف کردن بعد از ظرف رنگ: دو حمام گزیلول به مدت 1 تا 2 دقیقه

## خلاصه مراحل رنگ آمیزی

بعد از خشک شدن برش ها مراحل زیر انجام می شود:

- گزیلول 2:1 دقیقه
- گزیلول 1:2 دقیقه
- الکل مطلق: 1 دقیقه
- الکل مطلق: 1 دقیقه
- الکل 90 درصد: 30 ثانیه
- الکل 70 درصد: 30 ثانیه
- آب
- برش ها وارد ظرف حاوی رنگ می شوند برای سایر مراحل

# هماتوکسیلین & ائوزین

- **هماتوکسیلین هاریس:** 1 گرم هماتوکسیلین در 100 سی سی الکل مطلق- 20 گرم آلوم پتاسیم در 200 سی سی آب مقطر. دو محلول فوق تا نقطه جوش حرارت داده شده و به آن نیم گرم اکسید مرکوریک اضافه می شود. پس از سرد شدن به آن 8 سی سی اسید استیک گلاسیال اضافه می شود.
- **هماتوکسیلین ارلیش:** 80 گرم هماتوکسیلین در 2400 سی سی الکل مطلق و 240 گرم آلوم پتاسیم را با 1200 سی سی گلیسرین و 1200 سی سی آب مقطر حرارت داده می شود تا حل شوند. دو مخلوط فوق به آرامی با یکدیگر مخلوط و 120 سی سی اسید استیک گلاسیال به آن اضافه می شود.
- **هماتوکسیلین کارازی- وایگرت- هایدن هاین** از جمله هماتوکسیلین های دیگر می باشد.
- **ائوزین یا اریتروزین:** 1 گرم ائوزین با 100 سی سی آب مقطر مخلوط و چند دانه تیمول و چند قطره اسید استیک نیز به آن اضافه می شود.

# روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین

برش ها تا آب آورده شده

1- هماتوکسیلین هاریس (10 تا 15 دقیقه)- هماتوکسیلین ارلیش (45 دقیقه)

2- شستشو در آب روان 5 دقیقه

3- دیفرانشیت در اسید الکل (1 درصد اسید کلریدریک در الکل 70 درصد) 10 تا 15 ثانیه  
برای جدا کردن رنگ اضافه سیتوپلاسم

4- آب روان 5 تا 10 دقیقه. گاهی اوقات از کربنات لیتیوم برای ثابت کردن رنگ هسته استفاده می شود.

5- ائوزین 3 تا 5 دقیقه

6- الکل 50 درصد 2 تا 3 دقیقه

7- آبگیری: 4 حمام الکل (2 الکل 95 و 2 الکل 100)

8- شفاف کردن: 2 حمام گزیلول 1 تا 2 دقیقه

9- چسباندن لامل بر روی لام

# چسباندن لامل

درحین رنگ آمیزی ممکن است برش از اسلاید جدا شود که به دلیل چرب بودن لام و عدم خشک شدن کافی در انکوباتور می تواند باشد. ضمناً بعد از رنگ آمیزی اگر نمونه بیش از اندازه در الکل بماند رنگ آن ممکن است از بین برود.

## مراحل چسباندن لامل:

**انواع چسب مورد استفاده:** چسب کانادابالزام- دی پی اکس- ژله گلیسرین

**خصوصیات:** دوچسب اول باید به صورت خنثی استفاده شود که با اضافه کردن کمی سنگ آهک به ظرف حاوی چسب خنثی خواهد شد- چسب رنگ را از بین نبرد- حجم بیشتری استفاده شود چون وقتی خشک می شوند حجم آن ها کم می شود.

- 1- پاک کردن مواد اضافه اطراف مقطع
- 2- ریختن یک یا دو قطره چسب روی مقطع تا کل مقطع را بگیرد
- 3- لامل بدون چربی با زاویه 45 درجه طوری روی لام قرار می گیرد که حبابی بین لامل و مقطع و چسب باقی نماند سپس به آهستگی لامل بر روی مقطع فشار داده شود.
- 4- پاک کردن چسب اضافه اطراف لامل

# رنگ آمیزی مجدد مقاطع

- لامل جدا شود: 1- خیساندن اسلاید در گزیلول به مدت 1 تا 3 روز 2- گرم کردن اسلاید تا زیر لامل حباب ایجاد شده و سپس برداشت لامل با نوک اسکالپل یا سوزن تشریح
- انجام مراحل تا آب
- قرار دادن مقطع در پرمنگنات پتاسیم نیم درصد به مدت 5 تا 10 دقیقه
- شستشو با آب لوله
- مقطع در اسید اگزالیک 5 درصد به مدت 5 دقیقه قرار گیرد تا سفید شود
- شستشو در آب جاری 5 دقیقه
- انجام مرحله رنگ آمیزی