

Plant Microtechnique



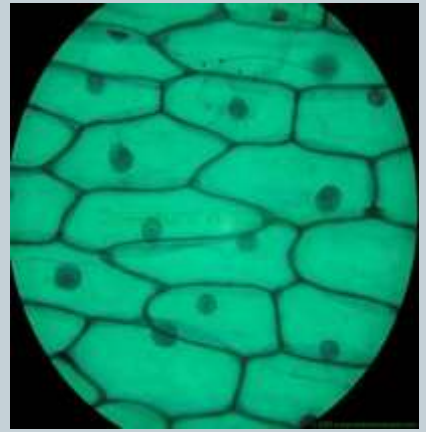
BOT 213

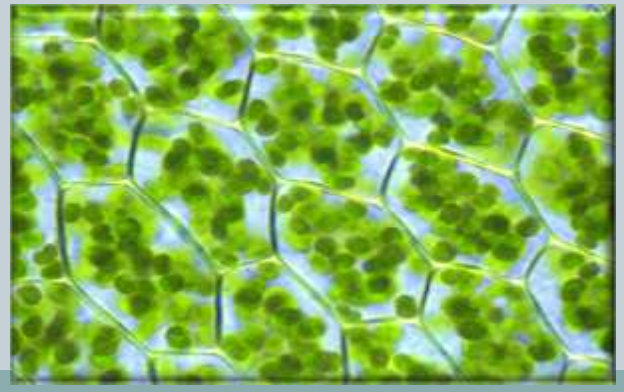


التحضيرات المجهرية النباتية

213 نبت

محاضره 9





Dyes (Stains) الصبغ

Mounting and its Media اوساط التحميل &

Staining:

Staining is the use of dyes or Stains to render distinct colours to different constituents of the tissues under investigation. Some of the stain or dyes used in biological studies are given in the Table (Important Stains and their properties).

الصبغ :

هو استخدام الأصباغ أو التلوين لمكونات الأنسجة المختلفة المراد فحصها ودراستها.

تعريف الصبغة:

ان الصبغات الجيدة هي ما كان تأثيرها ثابتاً على المواد المصبوغة، ولا يزول لونها عند معاملة العينات بالمحاليل الكيميائية المختلفة اثناء عملية التحضير او بمرور الزمن.

ولقد جرت عدة مناقشات بين العلماء القدام حول عملية الصبغ: فمنهم من يفترض ان عملية الصبغ هي ظاهرة فيزيائية تعتمد على عوامل منها الادمصاص والامتصاص والخاصية الشعرية والانتشار وغيرها من العوامل الفيزيائية. اما البعض االخر فيفترض انها عملية كيميائية حيث تحدث تفاعلات كيميائية بين جزيئات الصبغات وبين المكونات الكيميائية للانسجة. والواقع ان عملية الصبغ تعتمد على العوامل الفيزيائية والكيميائية معاً. حيث تلعب العوامل الفيزيائية دوراً كبيراً في عملية الصبغ، تعقبها في معظم الحاالت التفاعالت الكيميائية.

ان الصبغات عموما تقسم حسب إعطاء اللون الى ما ياتي :

1- صبغات مباشرة: للعينات المعاملة وهي الصبغات التي تعطي ألوانا (المصبوغة) بها بمجرد غمرها فيها لمدة معينة.

2-صبغات غير مباشرة: وهي الصبغات التي لا تكسب العينات المصبوغة ألواناً مباشرة عند معاملتها بمجرد غمرها فيها ،بل يجب تعريض العينة لتأثير مادة اخرى عليها تعرف بمرسخ اللون ،والتأثير المتكامل لكل من الصبغة والمرسخ على العينة ينشأ عنه ظهور اللون.

أنواع الصبغات: تقسم الصبغات الى مجموعتين هنا:

أ- الصبغات الطبيعية :

يقصد بالصبغات الطبيعية تلك التي لم تصنع في المصانع، بمعنى انها لم تجمع من مواد كيميائية ولكنها ذات أصل حيواني (حشري)أو أصل نباتي تستخرج من الفصيلة البقمية ، ومنها 3 او 4 صبغات فقط مازالت تستعمل من قبل المهتمين بعلم التحضيرات المجهرية، لصبغ العينات النباتية وهي:

1 - صبغة البرازيلين

2 - صبغة الهيماتوكسيلين

3 - صبغة القرمز ومشتقاتها

ب- الصبغات الصناعية : :

هي مركبات عضوية تستخلص من قطران الفحم ،ومشتقة من المركب البنزين الحلقي وقد تسمى أيضاً بصبغات الانلين.

الصبغات الصناعية الشائعة:

1- الصفرانين Safranin O(C_{18} H_{15} ClN_4)

هي صبغة قاعدية وزنها الجزيئي 232 محبه للانسجه والخلايا النباتيه فهي تصبغ الجدر الملجننة ، والمسبورة ، والمكوتنه، والكروموسومات ، والنواة واالجسام المركزية، وكذلك الصفائح الغربالية. وهي صبغة قليلة الذوبان في الماء ولكنها تذوب في الكحول الايثيلي.

2- الاخضر الخفيف Light Green (C_{23} H_{25} ClN_4) : وهي صبغة حامضية وزنها الجزيئي 391 تذوب في الماء والكحولات محبه للانسجه والخلايا النباتيه

3- الاخضر الثابت : Fast Green (C_{23} H_{25} ClN_2)

صبغة حامضية وزنها الجزئيي365تذوب في الماء اسرع من ذوبانها بالكحول محبه للانسجه والخلايا النباتيه وتستخدم لصبغ السيتوبلازم وخيوط المغزل

4-واي االيوسين Eosin Y(C_{20} H_6 Br_4 Na_2 O_5):

وهي صبغة حامضية وزنها الجزيئي692 تذوب في الماء اسرع من ذوبانها في الكحول ، وهي تستعمل لصبغ حبيبات الاليرون.

5-الحامضية الفيوشين- Acid Fuchsin (C_{20} H_{17} N_3 Na_2 O_9 S_3):

وهي صبغة حامضية وزنها الجزيئي (586) تذوب في الماء المقطر او الكحول ، وهي تصبغ االجسام السبحية (الميتوكوندريا).

6-المثلين أزرق Methylene Blue (C_{16} H_{18} ClN_3S):

وهي صبغة قاعدية وزنها الجزيئي319 تذوب في الماء والكحول وتستعمل لصبغ مادة الكالوز في العناصر الغربالية لنسيج اللحاء.

7- الانيلين أزرق ($C_6 H_7N$) Aniline Blue:

وهي صبغة حامضية قوية وزنها الجزيئي(93) تذوب في الكحول الاثيلي وتستخدم لصبغ الجدر السليولوزية للخلايا والياف المغزل.

8- البنفسج البلوري($C_{25} H_{30} N_3 Cl$) Crystal Violet:

وهي صبغة قاعدية وزنها الجزيئي (408) وتستعمل لصبغ النواة في العينات الطازجة واظهار الكروموسومات ،حيث تعطي لوناً اسود مزرق في خلفية من الخاليا عديمة اللون.

9- سودان3 ($C_{22} H_{16} ON_4$) Sudan III:

هي صبغة حامضية ضعيفة وزنها الجزيئي352 ، وتذوب في الكحول الايثيلي، وتستعمل لصبغ جميع المواد الدهنية في الخلايا النباتية، والقنوات الراتنجية، واللبن النباتي، والجدر المسوبرة او المكوتنه ، والبلاستيدات الخضر، ومثلها صبغة سودان 4 لكنها ذات وزن جزيئي مختلف 380.

10-الاحمرالمتعادل ($C_{15} H_{17} CIN_4$) Neutral Red:

وهي قاعدية وزنها الجزيئي(289)تذوب في الماء والكحول الايثيلي ، تستخدم لدراسة التفاعلات الحية في الخلية النباتية كما تستعمل لاظهار الدهون.

Orange G ($C_{18} H_{14}N_3 NaO_3 S$)-11:

وهي صبغة حامضية وزنها الجزيئي (375) تذوب في الماء او الكحول الاثيلي ،وتستعمل لصبغ سيتوبلازم الخلايا .

12- كارمين بوراكس- Borax Carmine:

تتكون هذه الصبغة من مزج كمية من البوراكس مع الكارمين بكمية من الماء المقطر ، تستخدم لصبع العينات النباتية الصغيرة والشفافة.

13-صبغة اخضر ميثيلي Green Methyl

صبغة قاعدية تستخدم لصبغ النواة، تذوب في الماء وحمض الخليك.

14-صبغة أزرق الريسورسين-Blue Resorcin

وهي صبغة قاعدية تستخدم للكشف عن مادة الكالوز في جدر الخلايا النباتية.

15-ليفسون صبغة-Leifson,s Stain:

تستخدم صبغة ليفسون لصبغ الخلايا البكتيرية واسواطها باللون االحمر.

Table 6.1. Important stains and their properties

S.No.	Stain	Colour	Properties
1.	Acetocarmine	Bluish-red	It stains chromosomes.
2.	Acid fuchsin	Brilliant magenta	It stains cortex, cellular walls and also mitochondria.
3.	Aniline blue	Blue magenta	It used to stain fungal hyphae and spores.
4.	Basic blue	Magenta red	It is a nuclear dye and also used to stain mucin and cellulose.
5.	Crystal violet	Violet	It is a good bacterial stain used in gram staining.
6.	Eosine	Pink	It is a good cytoplasmic stain for animal tissues.
7.	Fast green	Green	It is used to stain cellulose and lignified cell walls.
8.	Fuelgen's stain	Purple of red	Used to stain DNA and for observing chromosomes during cell division.
9.	Hematoxylin	Violet or blue	Used to stain cellulose cell wall.
10.	Iodine solution	Blue	It stain starch grains.
11.	Janus green	Greenish Blue	Used to stain fungi and mitochondria.
12.	Methylene Blue	Blue	It stain golgi complex and yeasts.
13.	Phloroglucinol + HCH	Red	It stain lignified walls.
14.	Ruthenium Red	Red	It stains Pectin of middle lamellae.
15.	Safranin	Red	It stains lignified Tissues as well as nuclei.
16.	Sudan (II) or (IV)	Red	It stain oil, cutin and suberin
17.	Sudan black	Black	It is a specific stain for fatty substances.
18.	Toludine blue	Blue	Used to stain RNA.

Mounting:

Stained section of the Plant material is required to mounted to glass slides for investigation under the microscope. A drop of mounting medium is put on sections and gently cover slip is lowered on the sample with the help of tweezers.
Air bubbles trapped on the material is gently removed when cover slip is on the material.
Extreme care should be taken when handling newly covered slides as it is easy for cover slip to dislodge and damage the tissue.
Freshly covered slides should not be examined with microscope, as is possible to get a drop of "wet" mounting media on the objective.

التحميل :

بعد صبغ القطاعات النباتية يتم تحميلها على الشرائح الزجاجية للدراسة والفحص تحت المجهر. توضع قطرة من وسط التحميل وتغطى بلطف باستخدام الملاقط.

يتم إزالة فقاعات الهواء من العينة بعد وضع غطاء الشريحة.

ينبغي توخي الحذر الشديد عند التعامل مع الشرائح المغطاة حديثا فقد ينزلق الغطاء ةيتسبب في تلف الأنسجة.

لا ينبغي فحص الشرائح المغطاة حديثا تحت المجهر، لكي لا يتسبب ذلك في وصول مادة التحميل للعدسة الشيئية وتلفها.

Mounting media

The mounting medium is the solution in which the specimen is embedded, generally under a cover glass. Simple liquids like water or glycerol can be considered mounting media, though the term generally refers to compounds that harden into a permanent mount. Properties of a good mounting medium include:

1 - Having a refractive index close to that of glass (1.518).

2 - Non-reactivity with the specimen.

3 - Stability over time without crystallizing.

4 - Darkening, or changing refractive index.

5 - Solubility in the medium the specimen was prepared in (either aqueous or non-polar).

6 - not causing the specimen stain to fade or leach.

وسط التحميل هو المحلول الذي يتم فيه تحميل العينة، بشكل عام تحت غطاء زجاجي. السوائل البسيطة مثل الماء أو الجلسرين. خصائص الوسط الجيد تشمل:

1 – لها معامل انكسار قريب من معامل انكسار الزجاج (1.518).

2 - عدم التفاعل مع العينة.

3 - الثبات مع مرور الوقت دون بلورة.

4 -، عدم السواد او تغيير معامل الانكسار.

5 - الذوبان في الوسط تم تحضير العينة في وسط (مائي أو غير قطبي).

6 - لا تسبب تلون للعينة أو تصبح باهتة.

Examples of mounting media

Mounting media Aqueous

Popularly used in immunofluorescent cytochemistry where the fluorescence cannot be archived. The temporary storage must be done in a dark moist chamber. Common examples are:

1. Glycerol-PBS (9:1) with antiquench e.g. any of the following 1.p-phenylenediamine

2. propyl gallate

3. 1,4-Diazabicyclo (2,2,2)-octane (DABCO) (very popular)

4. Ascorbic acid

5. Mowiol or Gelvatol

6.Gelatin

7. Mount™

8. Vectashield

9. Prolong Gold

10. CyGEL / CyGEL Sustain (to immobilize living, unfixed cells and organisms)

Examples of mounting media

Mounting media Aqueous

1. **Glycerol-PBS** (9:1) with antiquench e.g. any of the following 1.p-phenylenediamine
2. **propyl gallate**
3. 1,4-Diazabicyclo (2,2,2)-octane (DABCO) (very popular)
4. **Ascorbic acid**
5. Mowiol or Gelvatol
6.Gelatin
7. Mount™
8. Vectashield
9. **Prolong Gold**
10. **CyGEL** / CyGEL Sustain (to immobilize living, unfixed cells and organisms) (لشل حركة الخلايا والكائنات الحية غير المثبتة)

أمثلة على اوساط التحميل

اوساط التحميل مائيه:

يُستخدم هذا المنتج على نطاق واسع في الكيمياء الخلوية المناعية الفلورية حيث لا يمكن حفظ الفلورة. يجب تخزينه مؤقتًا في حجرة مظلمة ورطبة. ومن الأمثلة الشائعة على ذلك:

Mounting media Non-Aqueous (permanently mounted)

Slide of 60-year-old holotype specimen of a flatworm (Lethacotyle fijiensis) permanently mounted in Canada balsam

Used when a permanent mount is required

1.Canada balsam

2.DPX (Distrene 80 - a commercial polystyrene, a Plasticizer e.g. dibutyl phthalate and Xylene)

لا مائية : اوساط التحميل الدائمه

توجد انواع عديدة من اوساط التحميل المستديم ، وهي مواد عضوية اغلبها صموغ ،اما طبيعية او مصنعه ،ومن أهمها:

1- كندابلسم - Canada Balsam

2- يوبرال- euparal

3-وسط دي بي اكسDPX

Canada Balsam:

This is a natural mounting medium obtained from the balsam fir tree (*Abies balsamea*). The optical properties are nearly identical with those of glass. For this reason, Canada Balsam was used for many years as a kit to hold optical lenses in place. Meanwhile, synthetic lens kits have replaced Canada Balsam, it is still used as a mounting medium for microscopy, however. Canada Balsam has the advantage that its optical properties do not deteriorate with age. Permanent slides mounted with Canada Balsam have been stored for a century and are still useful.

كندا بلسم :

هذه وسيلة (وسط تحميل) طبيعية تم الحصول عليها من شجرة التنوب البلسم Abies balsamea تتشابه خصائصه تقريبًا مع خصائص الزجاج. حلت مجموعات العدسات الاصطناعية محل Canada Balsam، ومع ذلك لا تزال تستخدم كوسيلة للتركيب المجهري.

لدى Canada Balsam ميزة.

مميزاته :

معامل انكساره قريب جداً من معامل انكسار الزجاج ، كما انه شفاف ويذوب في الزايلين ،كما انه يجف دون تكوين شقوق او شكل حبيبي.

أن خصائصها لا تتدهور مع تقدم العمر. يتم تخزين الشرائح الدائمة التي تم اعدادها مع كندا بلسم مع منذ قرن وما زالت مفيدة

Disadvantage of Canada balsam

The disadvantage of Canada balsam is, that the specimen must be placed into xylene (toxic!) before embedding. Wet specimens must first be dehydrated in alcohol and then transferred to xylene. Transferring specimens directly from alcohol to Canada balsam won't work, because the alcohol won't dissolve the Canada balsam.

Summary: The advantage of Canada balsam is the long storage ability of the slides. Other, modern, mounting media may have a similar storage ability, but with Canada balsam there is historic experience. A disadvantage is the need for toxic solvents when preparing the specimen. Apparently, it is also not very cheap to obtain.

العيوب

كندا البلسم هو أنه يجب وضع العينة في الزيلين قبل التحميل. حيث يجب أولاً تجفيف العينات المبللة بالكحول ثم نقلها إلى الزيلين. لن ينجح نقل العينات مباشرة من الكحول إلى بلسم كندا ، لأن الكحول لا يحل بلسم كندا.كما انه يعمل على شحوب الصبغات ويسود مع الزمن.

ملخص: إن ميزة بلسم كندا هي القدرة التخزينية الطويلة للشرائح. قد تتمتع وسائط التخزين الحديثة بقدرة تخزين مماثلة ، ولكن مع وجود بلسم كندا ، هناك تجربة طويله .
العيب هو الحاجة إلى المذيبات السامةمثل الزيلين عند إعداد العينة. كما أنها ليست رخيصة جدا للحصول عليها.

Euparal: This mounting medium was invented in 1904 by Prof. G. Gilson, Professor of Zoology at Louvain University, Belgium. It contains the substances sandarac, eucalyptol, paraldehyde, camphor, and phenyl salicylate. Euparal possesses a nice odor (but don't smell it anyway), due to the natural oils that are included. Euparal is commonly used to mount histological specimens and insects. One big advantage of Euparal is, that the specimens can be transferred directly from the alcohol in which they are stored. Do not embed specimens which contain water, this may result in a clouding of the mounting medium.

Summary: Advantages of Euparal include the possibility to directly transfer specimens from alcohol to Euparal without the need of toxic solvents. A disadvantage is the relatively long drying time of a few days to weeks.

Euparal:

اخترع وسط التحميل هذا في عام 1904 من قبل البروفيسور ج. جيلسون ، أستاذ علم الحيوان في جامعة لوفان ، بلجيكا.
يحتوي على مواد sandarac، الأوكالبتول ، بارالديهايد ، الكافور ، وساليسيلات فينيل.
Euparal له رائحة لطيفة، بسبب الزيوت الطبيعية فيه. يستخدم Euparal عادة لتحميل العينات **النسيجيّة والحشرات**.

المميزات :

ممتازة Euparalهي أنه يمكن نقل العينات مباشرة من الكحول الذي يتم تخزينها فيه. ينبغي أن لانقوم بتحميل عينات تحتوي على ماء ، فقد يؤدي ذلك إلى عكارة وسط التركيب.

ملخص: تشمل مزايا Euparal إمكانية نقل العينات مباشرة من الكحول إلى Euparal دون الحاجة إلى مذيبات سامة كالزيلين

العيوب :

هو وقت التجفيف الطويل نسبيا من بضعة أيام إلى أسابيع.

Eukitt and other resin-based media: Eukitt is a very fast drying general-purpose resin-based mounting medium. Eukitt will solidify within about 20 minutes. The specimens must be free of water and placed first in alcohol and then in xylene prior to mounting. The use of xylene is a disadvantage, as it is harmful when inhaled. Eukitt itself can also be diluted by xylene to adjust it viscosity.

Eukitt ووسائط أخرى مستندة إلى الراتنج: Eukitt عبارة عن وسط تحميل سريع التجفيف للأغراض العامة. سوف يتصلب يوكيت في غضون 20 دقيقة. يجب أن تكون العينات خالية من الماء وتوضع أولاً في الزيلين قبل التحميل. يعتبر استخدام الزيلين عيبًا ، لأنه ضار عند الاستنشاق. يمكن أيضًا تخفيف مادة الأوكيت نفسها بواسطة الزيلين لتعديلها.

Besides Eukitt, a range of other resin-based mounting media are commercially available, such as Diatex, Entellan, Malinol, Rhenohistol and Depex. They differ in their refractive index. All of these mounting media require the specimen to be first dehydrated in alcohol and then transferred to xylene. Some of these resins shrink significantly during the drying process.

Summary: The advantage of Eukitt is that it is a fast drying mounting medium. The disadvantage is the need for toxic solvents to prepare the specimen.

إلى جانب Eukitt، تتوفر مجموعة من وسائط التحميل الأخرى المستندة إلى الراتنج على المستوى التجاري ، مثل Diatex و Entellan و Malinol و Rhenohistol و Depex. . أنها تختلف في معامل الانكسار. تتطلب كل هذه الوسائط أن يتم تجفيف العينة أولاً في الكحول ثم نقلها إلى الزيلين. بعض هذه الراتنجات يتقلص بشكل كبير خلال عملية التجفيف.

المميزات : في أنه وسيلة تحميل سريعة الجفاف.

العيوب : هو الحاجة إلى المذيبات السامة مثل الزيلين لإعداد العينة.

Clear nail polish: Nail polish can be used to seal the sides of the coverslip when using aqueous mounting media. It can also be used directly as a mounting medium. The specimens must first be dehydrated in alcohol and can then be directly mounted (without xylene) in nail polish.

Summary: The advantage of nail polish is, that it is readily available and that it avoids the use of toxic organic solvents to treat the specimens. One disadvantage is, that it seems to shrink a lot when making very thick mounts (such as whole insects).

طلاء أظافر شفاف:

يمكن استخدام طلاء الأظافر لختم جوانب الغطاء عند استخدام وسائط تحميل مائية. يمكن أيضًا استخدامه مباشرة كوسيط تحميل. يجب أولاً تجفيف العينات في الكحول ويمكن بعد ذلك تحميلها مباشرة (بدون زيلين) في طلاء الأظافر.

المميزات: طلاء الأظافر أنه متوفر بسهولة وأنه يتجنب استخدام المذيبات العضوية السامة لمعالجة العينات.

العيوب: هو أنه يبدو أنه يتقلص كثيرًا عند العينات الكبيره والسميكة جدًا (مثل الحشرات الكاملة)

Glycerol jelly: The advantage of Glycerol jelly is that it s water-based and that this avoids the need of alcohol dehydration (which possibly deforms the specimens), and other toxic organic solvents. Some specimens can only be satisfactorily mounted in Glycerol jelly. It also does not shrink. The disadvantages include the need for a potentially toxic antiseptic in the jelly, the difficulty of mounting the specimens and the need to seal the cover slip with nail polish.

هلام الجلسرين:

المميزات: في أنه ذو أساس مائي وأن هذا يمنع الحاجة إلى تجفيف بالكحول (الذي قد يشوه العينات) ، والمذيبات العضوية السامة الأخرى. لا يمكن تحميل بعض العينات بشكل مرضٍ إلا في هلام الجلسرين. كما أنه لا يتقلص.

العيوب: ، صعوبة تحميل العينات ، والحاجة إلى ختم الغطاء باستخدام طلاء الأظافر.

Glycerol: It is possible to make a permanent mounts by embedding the specimen either in pure liquid glycerol or a specified glycerol-water mixture. The glycerol-water mixture can be adjusted to an appropriate refractive index. Adding more water lowers the refractive index. It is also possible to use pure water alone (for some delicate algae, for example).

Algae and other water organisms can be embedded this way. Algae that are embedded in pure glycerol may shrink because the glycerol withdraws water from the cells. If the algae shrink too much, then the glycerol should be more diluted with water. A high concentration of glycerol should be maintained, however, otherwise there is a risk of fungal growth in the medium.

الجلسرين:

من الممكن إجراء حفظ دائم عن طريق تحميل العينة إما في الجلسرين السائل النقي أو في مزيج محدد من الجلسرين والماء. يمكن ضبط خليط الجلسرين المائي على مؤشر الانكسار المناسب. إضافة المزيد من الماء يقلل من معامل الانكسار. من الممكن أيضًا استخدام المياه النقية وحدها (لبعض الطحالب الحساسة).

يمكن أن تحمل الطحالب وغيرها من الكائنات المائية بهذه الطريقة. قد تتقلص الطحالب الموجودة في الجلسرين النقي لأن الجلسرين يسحب الماء من الخلايا. إذا تقلصت الطحالب أكثر من اللازم ، يجب تخفيف الجلسرين بالماء. يجب الحفاظ على تركيز عالٍ من الجلسرين ، وإلا فهناك خطر نمو الفطريات في الوسط.

The advantage of glycerol **is, that fungi and algae do not shrink as much as with other mounting media. It is also not necessary to treat the specimens with alcohol or organic solvents, which may introduce artifacts and remove pigments. The disadvantage is, that it is difficult to prepare slides that are truly permanent in nature. A proper sealing of the cover slip corners is absolutely necessary if one wants to store the slides over extended periods.**

المميزات الجلسرين : أن الفطريات والطحالب لا تتقلص بنفس القدر مع وسائط التحميل الأخرى. كما أنه ليس من الضروري معالجة العينات بالكحول أو المذيبات العضوية التي تزيل الصبغات.

العيوب: هو أنه من الصعب إعداد شرائح دائمة في الطبيعة. يعد الختم المناسب لزوايا الغطاء ضروريًا للغاية إذا أراد المرء تخزين الشرائح لفترات طويلة.