# 5 - Sectioning Method or Microtomy

Preparation of large botanical specimens that can not be examined directly under Light Microscope must be cut into small pieces, involve to schedules appropriate time, and use of certain solvents, according to the nature of these samples. It is the first step to prepare a slide of the plant material for microscopic investigation. Fresh or preserved materials are cut into thin sections at suitable plane. It is essential to cut section thin enough to observe the details at the required level. Hand sectioning is carried out with sharp razor. Uniform section of given thickness can be obtained by special Machines called Microtome. Prior to microtome sectioning, material is processed which involves, fixation, dehydration and embedding of the tissue material in Paraffine wax or other embedding media.

1 – fixation. 2 – dehydration.

3 – embedding 4 – Sectioning

5 – Staining 6 - Mounting

# خامساً : طريقة التقطيع Microtomy :

يعتمد تحضير العينات النباتية الكبيرة التي لا يمكن فحصها مباشرة تحت المجهر الضوئي، والتي يجب تقطيعها إلى أجزاء صغيرة، على الالتزام بجداول زمنية مناسبة، ومعينة مع استخدام محاليل ذات نسب معينة أيضاً من المواد الأولية تتلاءم وطبيعة تلك العينات. وللحصول على قطاعات ذات نوعية جيدة من عينات مطمورة بشمع البرافين أو أي وسط طمر آخر، فإن هذه العملية لا تتم آلياً أو بسهولة، ولكنها تمر بخطوات ذات تنظيم معين.

وما النتائج السيئة التي تبرز أثناء فحص العينة تحت المجهر بعد التقطيع إلا نتيجة للتقنيات الضعيفة، واستعمال أجهزة تقطيع غير فعالة، أثناء مرحلة التقطيع. وأثناء محاولة الحصول على قطاعات جيدة وعديدة لعينات محفوظة إما بالتجفيف أو بمواد حافظة، فإنه يحدث تفتت وتلف لهذه العينات، وتعطي عند الفحص تحت المجهر نتائج مضللة وغير واقعية، وذلك بسبب عدم إتباع الخطوات اللازمة للتحضير أو التهاون في إتباع بعضاً

# FIXATION

# التثبيت

# Aims of Fixation :

1. It should prevent autolysis & putrefaction of the cell.
2. It should penetrate evenly and rapidly.
3. It should harden the tissues
4. Increase the optical density
5. Should not cause shrinkage or swelling of the cells
6. Must not react with the receptor sites & thus must not interefere with the staining procedure.
7. It must be cheap and easily available.

## أهداف التثبيت Fixation

أ - يعرف التثبيت بأنه العملية التي يتم فيها فصل وقتل الأنسجة وحفظها قدر الإمكان على الحالة التي كانت عليها أثناء الحياة.

ب – التثبيت يحفظ المكونات الخلوية ثابتة دون أن يصيبها أي تغير أو تلف.

ج - أفضل المثبتات Fixatives هو ما تكون له القدرة على تخلل الأنسجة والخلايا بسرعة قبل حدوث عمليات التغير التي تحصل نتيجة للتحلل الذاتي Autolysis بفعل بعض الإنزيمات أو نشاط عدد من الكائنات الحية الدقيقة.

د - حقيقة التثبيت هي التخثر السريع أو التجلط البروتيني لمكونات الأنسجة والخلايا فيحفظها على الحالة التي كانت عليها قبل موتها، كما يمنع التغيرات التي تتعرض لها الخلايا والأنسجة بعد موتها،

**TYPES OF FIXATIONS**:

There are three common ways of classifying fixation: **acidic fixation** vs. **basic**, **coagulant** vs. **non-coagulant**, and **additive** vs. **non-additive**.

**TYPES OF FIXATIVES**:

1 - **Acidic fixation:** preserves **chromosomes**, **Nucleoli**, and the **spindle apparatus**, while dissolving Nucleoplasm and Mitochondria.

2 -**Basic fixation:** preserves **Nucleoplasm**, **Mitochondria** and dissolves **Chromatin** and **Spindle apparatus**.

.

**تصنيف المثبتات :**

**١ Acid and basic fixatives: - المثبتات الحمضية والقاعدية**

**أ- المثبتات الحمضية : وتستعمل لتثبيت وحفظ الكروموسومات والأنوية والخيوط المغزلية ( أي تستعمل لتثبيت وقتل الأجسام الحمضية )، كما أنها تذيب البلازما النووية والأجسام السبحية.**

**ب- المثبتات القاعدية : وتستعمل لتثبيت الأجسام القاعدية مثل الأجسام السبحية والبلازما النووي وأحياناً النويات.**

**2 - Coagulant fixatives** cause cytoplasm to become opaque (غير شفاف )and congeal into a netlike structure. such as : Ethanol, Methanol, Picric acid, Mercuric chloride, Acetone, and Chromium trioxide.

**Non-coagulant fixatives** do not disrupt the cytoplasm put transform it into a transparent gel. Examples of fixatives of this kind are glutaraldehyde, formaldehyde, acrolein, potassium dichromate, acetic acid and osmium tetraoxide.

**Non-coagulant fixatives** very often stabilize tissues to such an extent that they are protected from disruption by the use of subsequent coagulant reagents during post-fixation or dehydration.

**٢ - المثبتات المخثرة وغير المخثرة : Coagulant and Non-coagulant fixatives :**

**أ- المثبتات المخثرة : Coagulant fixatives** وهي التي تسبب تخثر بروتين البروتوبلازم وتحويله إلى تركيب شبكي يسمح للشمع بالنفاذ وإعطاء العينة صلابة كافية عند التقطيع، كما أنه يقوم بتقوية الروابط البروتينية والمحافظة عليها من التكسر، ومع ذلك فهو يعطي بعض الحقائق المصطنعة للعينة المثبتة، وهي ذات أعداد كثيرة ومنها الأيثانول ( الكحول الأثيلي )، والمثانول، والكروميوم، وحمض الكبريتيك، وكلوريد الزئبق، والأسيتون.

**ب - المثبتات غير المخثرة Non-coagulant fixatives** وهي التي لا تسبب تخثراً شبكياً للبروتين ولكنها تثبته بشكله الطبيعي، ومنها الفورمالدهيد، والجلوترالدهيد، والأكرولين، وأكسيد الأزميوم، وحمض الخليك، وثاني كرومات البوتاسيوم، وبعض هذه المثبتات تذيب الخلايا والأنسجة والمقاومة للتخثر، وتُخثر مواداً أخرى خلال زيادة التثبيت والعمليات المتتالية معطية بذلك تثبيتاً مزدوجاً.

# 3 - Additive and Non-additive fixatives:

**Additive Fixatives :** cross-link with proteins in cells, strengthening cell structure and insuring tissue preservation. Examples of additive fixatives are the aldehydes. **Non Additive Fixatives** that react with the tissue, but do not add onto or combine with the tissue in order to act on it. The non-additive or denaturing fixatives act primarily by dissociating water molecule from the tissue proteins resulting in a change in the tertiary structure. For example, methyl and ethyl alcohol coagulate protein but are not added to the tissue. This causes water- soluble proteins to become insoluble, a process that is largely irreversible. Because of the complexity of fixation and the great variety of agents used, the terms additive and non additive are not now commonly used

**ـ مثبتات إضافية أو غير إضافية :**

**Additive and Non-additive fixatives**

**المثبتات الإضافية : هي مركبات تتحد مع التراكيب الخلوية خاصة البروتينات وتصبح جزءاً منها، مثل الألدهيدات، وذلك عن طريق تكوين روابط تتصل بالمجموعات الجانبية لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المكونة للبروتين. أما Covatent bonds أو تساهمية Ionic bondsأيونية حرة من جزيئات الماء، Active groupsالمثبتات غير الإضافية : فهي تعمل على نزع جزيئات الماء من البروتين مما يجعل المجموعات الفعالة مما يتيح لها تكوين روابط مع بعضها البعض تعمل على تخثر البروتين.**

# Properties of an Ideal Fixative

- Avoid excessive hardness of tissue.
- Allows enhanced staining of tissue.
- Should be non-toxic and non-allergic for user.
- Should not be very expensive.

**خصائص المثبت:**

1. أن يكون سريع التخلل والنفاذ إلى الخلايا والأنسجة.
2. أن يكون المثبت سريع القتل للخلايا ولكن يكون التخثر للبروتين معتدلاً كي لا تكون العينة شديدة التفتت عند التقطيع.
3. أن يتصف المثبت بالحامضية.
4. أن يكون المثبت من المواد المتداولة ومتوسطة الثمن.

# Properties of an Ideal Fixative

- ✓ Prevents autolysis and bacterial decomposition.
- ✓ Preserves tissue in their natural state and fix all components.
- ✓ Make the cellular components insoluble to reagent used in tissue processing.
- ✓ Preserves tissue volume.

# Contin….

- ✓ No fixative will penetrate a piece of tissue thicker than 1 cm.
- ✓ For dealing with specimen thicker than this, following methods are recommended:

**1.Solid organ:**

Cut slices as necessary as but not thicker than 5 mm.

# Continu….

**2.Hollow organ:**

Either open or fill with fixative or pack lightly with wool soaked in fixative.

# Contin…..

- ✓ Good fixative is most important factors in the production of satisfactory results in histopathology.

❖ Following factors are important:

- ✓ Fresh tissue
- ✓ Proper penetration of tissue by fixatives
- ✓ Correct choice of fixatives

# Factors affecting fixation:-

**1 - Temperature**

- Affects the morphology of the tissue.
- For electron microscopy and some histochemical procedures, the temperature for fixation is usually 0-4 C.
- It will increase the rate of penetration
- It will also increase the rate of autolysis and diffusion of cellular components.

**ثانياً ـ العوامل المؤثرة على التثبيت :**

**هناك العديد من العوامل التي تؤثر على فعالية المثبت لتثبيت العينة، ومنها :**

**١ ـ درجة الحرارة Temperature :**

**يُجرى التثبيت في الغالب عند درجة حرارة الغرفة العادية، ولكن يجب أن لا تزيد عن ٤٠ °م في معظم المثبتات. إنه عندما تجرح أو تخدش الخلايا فإن قوامها الداخلي يتحلل طارداً عدداً كبيراً من الإنزيمات المائية من بعض العضيات داخل الخلايا، وهذه الإنزيمات سرعان ما تحلل تركيب البروتوبلازم إذا لم تغسل أو تمنع من التفاعل، ويزداد هذا التحلل بازدياد درجة الحرارة. ولهذا فإن تثبيت العينة عند درجة ٤ °م يعني تثبيتاً أفضل للعينة، كما وُجد أن استعمال مثبت ( F.A.A ) المبرد يكون أفضل تثبيتاً من كونه يُجرى في درجة الغرفة العادية لبعض العينات**

2 - Size

- Ideal size of the tissue should be 3mm. 1-2cm

3 - Volume ratio

- Volume of fixative is at least 15 to 20 times greater than volume of tissue.

4 – Time

- Minimum fixation time for 5mm tissue is 12hrs.

2 حجم السائل المثبت - Volume ratio : تجدر الإشارة إلى أنه من الأهمية بمكان أن يبقى السائل القاتل والمثبت ثابت التركيز بقدر الإمكان طوال فترة القتل والتثبيت. ولضمان ذلك يجب استخدام كمية كبيرة من المحلول قد تصل إلى عشرة أضعاف حجم العينة، كما يجب تحريك أو هز العينة حتى نضمن وصول المثبت إلى جميع أجزائها، وخاصة الجزء الملامس لقاع أو جوانب الزجاجة المستخدمة.

3 حجم العينة - Size ١ - ٢ : يعتمد حجم العينة على نوعية المحلول المثبت وسرعة تخلله فيها، ويتراوح حجم العينة للمثبتات المتداولة والمعروفة في الوقت الراهن بين سم، أما إذا زاد عن تلك الحجم فإن المثبت لا يستطيع أن يتخلل العينة، وخاصة الأجزاء الوسطية منها، ولهذا فإنها لا تحصل على تثبيت تام إلا ببطء مما ينعكس على النتائج النهائية للعينة، ولهذا كلما كانت العينات صغيرة الحجم، كلما كانت عملية القتل والتثبيت سريعة وفعالة وذات نتائج إيجابية.

4 مدة التثبيت -Time : تختلف مدة التثبيت حسب طبيعة المثبت واختلاف خلايا وأنسجة العينة. فبعض المثبتات يمكن ترك العينة فيها لمدة طويلة أو لحين الحاجة إليها دون إلحاق أي ضرر بها. وبعضها يجب عدم ترك العينة فيها أكثر من المدة اللازمة لعملية التثبيت، وخصوصاً تلك المثبتات التي تحتوي على حمض الخليك أو حمض الأوزميك، نظراً لأنها تلحق الضرر بالعينة، حيث تصبح العينة هشة قابلة للتفتيت مما له أثر سلبي للحصول على قطاعات جيدة.

## 5 – pH

The pH should be kept in the physiological range of les than7

**5الرقم الهيدروجيني - )pH : (**

**يميل الرقم الهيدروجيني للعينات النباتية إلى الحامضيةأقل من الرقم ٧، ولهذا يجب مراعاة هذه الظاهرة عند استعمال المثبتات الموجودة في المراجع.**

## 6 - Autolysis:

**In biology, autolysis, more commonly known as self-digestion, refers to the destruction of a cell through the action of its own enzymes. It may also refer to the digestion of an enzyme by another molecule of the same enzyme.**

**In Plant cell There are some organelles called Microbodies when exposed to the decomposition produces some Enzimes known as Cathepsins which starts reverse its activity after the death of a cell, where it breaks down and analyze the protein molecules and convert it to amino acids and then distort cell components.**

**6 التحلل الذاتي - Autolysis:**

**التي عند تعرضها للتحلل تفرز بعض الإنزيمات المعروفة بمجموعة Microbodiesيوجد بالخلية النباتية بعض العضيات منها الأجسام الدقيقة التي يبدأ نشاطها العكسي بعد موت الخلية، حيث تقوم بتكسير وتحليل جزيئات البروتين وتحويله إلى أحماضه الأمينية، Cathepsinالكاثبسين وبهذا تعمل على تحليل العضيات الخلوية ومن ثم تعمل على تشويه مكوناتها عما كانت عليه قبل موتها.**

## 7 - Permeability

Permeability rate plays an important role on the effectiveness of the fixative solution, Penetration (refers to the ability of the solution to diffuse into the tissue) the more quick Penetration of fixative solution has a good effect on the killing of the sample and short fixation, and gave positive results.

## ٧- معدل النفاذية :

يلعب معدل النفاذية دوراً كبيراً على فعالية المحلول المثبت، فكلما كان معدل النفاذية سريعاً كلما كان المحلول المثبت ذو تأثير جيد على قتل العينة وتثبيتها بوقت قصير، وأعطى نتائج إيجابية.

# 8 - Osmolality

- The addition of a buffer to the fixative solution may alter the osmotic pressure exerted by the solution.

- Hypertonic solutions give rise to cell shrinkage whereas hypotonic and isotonic fixatives result in cell swelling and poor fixation.

**8 الأزموزية -Osmolality:**

**إذا تركت العينة في محلول ذو تركيز معين فسوف تخضع مكوناتها لظاهرة الانتفاخ أو التقلص الأزموزي. ولهذا يجب أن يكون المحلول متعادل الأزموزية أو يحتوي على محاليل أولية منها ما يعمل على انتفاخ العينة والآخر يعمل على تقلصها وانكماشها، ومن ثم يحصل اتزان أزموزي ذو تأثير متكافئ على حجم العينة.**

# Chemical Fixatives

## Simple Fixatives

- ✓ Formaline
- ✓ Mercuric chloride
- ✓ Osmic acid
- ✓ Picric acid
- ✓ Acetone
- ✓ Ethyle alchohol
- ✓ Osmium tetroxide
- ✓ Osmic acid

## Compound Fixatives

**Microanatomical**
Formal Saline
Neutral buffer Formaline
Zenker's fluid
Bouin's fluid

**Cytological**

**Nuclear**
Carnoy's Fluid

**Cytoplasmic**
Champy's Fluid

**Histochemical**
Cold acetone
Ethanol

# Simple Fixatives

❖ **Formalin**

- ✓ The most commonly used fixative is Formalin .
- ✓ It is prepared by mixing 40 % Formaldehyde gas in 100 w/v of distilled water.
- ✓ The resultant mixture is 100 % Formalin.
- ✓ Routinely, 10 % formalin is used which is prepared by mixing 10 ml of 100 % formalin in 90 ml of distilled water.

# MECHANISM OF ACTION

- ✓ It forms cross links between amino acids of proteins thereby making them insoluble.

## ❖ ADVANTAGES :

1. Rapid penetration
2. Easy availability & cheap
3. Does not overharden the tissue
4. Fixes lipids for frozen sections
5. Ideal for mailing

## ❖ DISADVANTAGES:

1. Irritant to the nose,the eyes and mucous membranes
2. Formation of precipitate of paraformaldehyde which can be prevented by adding 11- 16 % methanol.
3. Formation of black formalin pigment , Acid formaldehyde hematin.

# Other Simple Fixatives

- ✓ Glutaraldehyde
- ✓ Osmium Tetraoxide
- ✓ Pottasium Dichromate
- ✓ Mercuric Chloride

# Other Simple Fixatives (contd.)

- ✓ Picric acid
- ✓ Zenker's fluid
- ✓ Zenker’s Formal (Helly’s Fluid)
- ✓ Bouin’s Fluid

## 3 - Simple fixatives:

## ثالثاً ـ المحاليل الأولية للمثبتات :

1 - Glacial Acetic Acid:

Glacial Acetic acid (CH3 COOH) is a simple coagulant fixative, it penetrates fast to the sample parts, but when it used as a single fixative causes swelling of the sample, It always mixed with other primary fluids to form a compound fixative . Preparation of 1% Glacial acetic acid: taken 10 ml of concentric Glacial acetic acid and added to 990 ml of water, and Preparation of 10% Glacial acetic acid in the same method.

**١Glacial Acetic Acid - حمض الخليك الثلجي :**

**) الثلجي ( المركز ) من المواد الأولية غير المخثرة، فهو سريع النفاذ إلى أجزاء العينة، ولهذا فهو يستعمل $CH_3$ COOHحمض الخليك ( للعينات سريعة الانكماش، ولكن استعماله كمثبت منفرد يسبب انتفاخاً للعينة، لذا فهو دائماً يخلط مع مواد أولية أخرى لتكوين مثبت مركب. ولتحضير ١ ٪ حمض خليك ثلجي يؤخذ ١٠ مل من حمض الخليك الثلجي المركز وتضاف إلى ٩٩٠ مل من الماء، كما يمكن عمل ١٠ ٪ حمض خليك ثلجي بالطريقة نفسها.**

## 2 - Ethyl alcohol (Ethanol):

Ethyl alcohol (C2 H5 OH) of the initial solutions, and moderately penetrate to sample parts, It characterized by not to form artifacts. There him a commercial type of focus and 95% of this type is used in many plant installers, and the other type focus 100% divorced, often used in the final stages of the withdrawal of water from the sample, to ensure they are free of water. It notes that the ethyl alcohol dissolves the objects streptococcus, as well as fatty droplets.

**2 الكحول الإثيلي - Ethyl Alcohol (Ethanol)**

**( من المحاليل الأولية، وسرعة النفاذ إلى أجزاء العينة معتدلة، ويتميز الكحول الإثيلي بعدم تكون حقائق $C_2 H_5 OH$ الكحول الإيثيلي ) مصطنعة. يوجد منه نوع تجاري تركيزه ٩٥ ٪ وهذا النوع يستخدم في كثير من المثبتات النباتية، والنوع الآخر تركيزه ١٠٠ ٪ مطلق يستخدم غالباً في المراحل النهائية لسحب الماء من العينة، لضمان خلوها من الماء. يلاحظ أن الكحول الإثيلي يذيب الأجسام السبحية وكذلك القطرات الدهنية**

**ثالث أكسيد الكروم - ٣Chromium trioxide:**

## 3 – Chromic acid :

**1 %**Chromic acid (H2 CrO4).Dissolve 1o g Chromic anhydride crystals per liter of water.. But it is rarely used alone, preferably mixed with acetic acid or Osmic acid. It penetrate the sample parts slowly and does cause sample hardness. It should be washed from the sample after the fixation process, so as not to leave the green color, since it  reduced to chromium oxide Cr2O3 during the sample pass on various concentrations of alcohol.

**- ١% حمض الكروميك:3**

**بالماء ويستعمل بتركيز ٥ ٪ وهو من المحاليل الأولية $CrO_3$ ) أثناء ذوبان ثالث أكسيد الكروم $H_2\ CrO_4$يحصل على حمض الكروميك ( الجيدة للبروتين. ولكنه نادراً ما يستخدم لوحده، ويفضل مزجه بحمض الخليك أو حمض الأزميك. وينفذ إلى أجزاء العينة ببطء ولا يعمل على صلابة أثناء تمرير العينة على تراكيز $Cr_2O_3$العينة، ويجب غسله من العينة بعد عملية التثبيت حتى لا يترك لوناً أخضر، نظراً لاختزاله إلى أكسيد الكروم الكحول المختلفة.**

## 4 - Formaldehyde:

Formaldehyde ($CH_2O$) is a toxic colorless gas, is produced from the oxidation of methanol. It can be prepared by approximately (3- 5%) of paraformaldehyde powder in water at a temperature of 15 -22 c. Add 1 N of sodium hydroxide(Na OH) drop by drop until the fluid clears. The solution must be used fresh. non-coagulant fixative.

## Formalin:

Formalin is the trade name used for an aqueous solution of formaldehyde containing 35 -40% formaldehyde gas by weight.

## 5 - Picric acid :

Picric acid (C6H2 (NO2) 3 OH) semple coagulant solution, slow penetration through the sample parts and cause strong shrinking of the sample. So it mixed with other solution. Crystalline Picric acid highly explosive, and therefore should not be placed or stored on shelves, even if for a short time, while its solution almost safe consequences (usually used as a saturated aqueous solution with a concentration of 0.9- 1.2%), and must be washed off the sample after fixation by 70 % ethyl alcohol.

**5 حمض البكريك -Picric Acid:**

**( من المحاليل الأولية المخثرة للبروتين، وهو بطئ النفاذ خلال أجزاء العينة ويسبب تقلصاً ( $C_6 H_2 (NO_2)_3 OH$ حمض البكريك ( انكماشا ) شديداً للعينة، لذا يمزج مع مواد أولية أخرى. المادة المتبلرة منه شديدة الانفجار، ولهذا يجب عدم وضعه أو تخزينه على الأرفف حتى ولو لوقت قصير، بينما المحلول منه تقريباً مأمون العواقب ( يستخدم عادة بشكل محلول مائي مشبع ذو تركيز ٠,٩ - ١,٢ ٪ )، ويجب غسله من العينة بعد التثبيت بكحول إثيلي تركيزه ٧٠٪ .**

## 6- Potassium dichromate:

Potassium dichromate (K2 Cr2 O7) simple non-coagulant solution of protein. An orange crystals dissolve in water, so it is used as an aqueous solution of about 1.5%. It soften sample tissues are difficult to cut, and must be washed off with water after fixation process to prevent the residual of chromic oxide formation within the sample tissue.

**6 ثاني كرومات البوتاسيوم - Potassium dichromate:**

**( من المحاليل الأولية غير المخثرة للبروتين، وهو بلورات برتقالية تذوب في الماء، لذا يستخدم كمحول $K_2 Cr_2 O_7$ ثاني كرومات البوتاسيوم مائي بتركيز حوالي ١,٥٪. وهو يجعل الأنسجة طرية يصعب قطعها، ويجب غسله بالماء بعد الانتهاء من عملية التثبيت لمنع تكوين راسب من أكسيد الكروميك في داخل العينة.**

## 7- Mercuric Chloride:

Mercuric chloride (Hg Cl2) simple solutions coagulase to the protein, which is colorless needle crystals dissolved in ethyl alcohol, a poisonous, medium penetrating to sample parts, but it gives rigidity and does not make shrinking or distorting. It must be washed from the sample after fixation process with iodine solution then ethyl alcohol to dissolve any residual Mercuric chloride.

**كلوريد الزئبقيكMercuric Chloride:**

**( من المحاليل الأولية المخثرة للبروتين، وهو على شكل بلورات إبرية عديمة اللون يذوب في الكحول الإثيلي $Hg\ Cl_2$كلوريد الزئبقيك ) وهو سام، ذو نفاذية متوسطة إلى أجزاء العينة، لكنه يكسبها صلابة ولا يعمل على انكماشها أو تشويهها، ويجب غسله من العينة بعد التثبيت بمحلول اليود ثم بكحول إيثيلي لإذابة أي ترسبات من كلوريد الزئبقوز.**

## 8 - Osmium Tetroxide:

**Osmium Tetroxide** (OSO4) yellow crystals, and when it dissolves in water become Osmic acid, a weak simple solutions is coagulase to the protein. It characterized by slow penetration to the sample parts, it also makes the sample soft is difficult to cut. It does not cause shrinking to the sample, it must be removed from the sample after the fixation process by washed with running water. It used as 1% aqueous solution.

**8 رابع أكسيد الأوزميوم -Osmium Tetroxide :**

**( من بلورات صفراء، وعند ذوبانها بالماء تكون حمض الأوزميك، وهو حمض ضعيف ومن المحاليل $OSO_4$ يتكون رابع أكسيد الأزميوم الأولية غير المخثرة، ويتميز ببطء نفاذه إلى أجزاء العينة، كما أنه يجعلها طرية يصعب قطعها، ولا يسبب انكماش العينة، ويجب إزالته من العينة بعد التثبيت بغسله بالماء الجاري، ( وهو يستعمل كمحلول مائي بتركيز ١٪ ).**

| *Fixing agent* | *Additive* | *Coagulant* |
|---|---|---|
| Acetic acid | No | No |
| Acetone | No | Yes |
| Chromium trioxide | Yes | Yes |
| Ethanol | No | Yes |
| Formaldehyde | Yes | No |
| Glutaraldehyde | Yes | No |
| Mercuric chloride | Yes | Yes |
| Methanol | No | Yes |
| Osmium tetroxide | Yes | No |
| Picric acid | Yes | Yes |
| Potassium dichromate | Yes | No |
| Trichloracetic acid | Yes | Yes |

## Notes :

1 - There is no **one substance** that will successfully fix all components of a cell or tissue equally.

2 - It is necessary to combine fixatives in such a way so as to minimize the shrinking or swelling action of the various ingredients and to stabilize the various cell structures.

3 - Any fixation schedule should be regarded as a starting point from which the best method of fixation for a specimen will be developed.

## Fixative Fluids

1. Formalin-aceto-alcohol ( FAA )
2. Navaschin’s fluid
3. Bouin’s fluid
4. Carnoy’s Fluid
5. Zenker’s Fluid
6. Zirkle’s Fluid
7. Chromic-acetic mixture
8. Acetic ethanol
9. Formaldehyde
10. Flemming without acetic
11. Allen’s Fluid
12. Formalin and Alcohol
13. Sanfelice’s Fluid

## رابعاً ـ محاليل التثبيت وطرق تحضيرها واستعمالاتها :

المثبتات إما مفردة تتكون من مادة أولية واحدة، أوغالباً محاليل مركبة ، مكوناتها ذات نسب ثابتة أو مختلفة حسب طبيعة العينة. كما يمكن تحضير بعض المثبتات واستعمالها عند الحاجة، بينما بعضاً منها لا يمكن تحضيره إلا وقت الإستعمال فقط، ومن هذه المثبتات المعروفة والشائعة الاستعمال لقتل وتثبيت العينات النباتية ما يلي:

ل الفورمالين الكحولي Formalin-aceto-alcohol ( FAA )

محول نفاشين ـ ٢Navaschin’s fluid

محلول بوين ـ ٣Bouin’s fluid

محلول كارنوي ـ ٤Carnoy’s Fluid :

محلول زنكر ـ ٥Zenker’s Fluid

محلول زركل ـ ٦Zirkle’s Fluid

7 مخلوط حمض الكروميك الثلجي ـChromic-acetic mixture:

( مثبت فارمر ) الكحول الإثيلي الخلي ـ ٨Acetic ethanol

الفورمالدهايد ـ ٩Formaldehyde

محلول فلمنج بدون خل ـ ١٠Flemming without acetic

محلول ألن ـ ١١Allen’s Fluid

محلول الفورمالين والكحول ـ ١٢Formalin and Alcohol

محلول سانفيليس ـ ١٣Sanfelice’s Fluid

# 1 -Formalin– Acitic acid–Alcohol: FAA

Formalin–acetic acid–alcohol (FAA) is good general-purpose fixative. Compared to other fixatives. Sample penetration is not particularly fast . Due to the presence of alcohols, shrinkage may occur. You may vary the amount of acetic from 2 to 6% to modulate shrinkage and better preserve chromatin structure. Increase concentration of acetic  to induce greater tissue swelling and to counteract alcohol shrinkage. Generally, tissues are killed and hardened within 18–24 h. The fixative is stable and does not induce hardening, so tissues may be stored in this solution indefinitely.. FAA loses effectiveness with storage.

| FAA | |
|---|---|
| Ethanol (95%) | 50 |
| Glacial acetic acid | 5 |
| Formalin (37% formaldehyde) | 10 |
| DI | 35 |

## ١ Formalin-Acetic acid-Alcohol ( FAA ) : - محول الفورمالين الكحولي

يستعمل هذا المثبت للعينات النباتية التي تحتوي على العناصر الخشبية كالساق والجذر والورقة وأجزاء الزهرة، ويعتبر من أفضل المحاليل المثبتة وأكثرها شيوعاً، وأنسبها لهذه الأجزاء من النبات، وتختلف مدة ترك العينة في هذا المثبت من عينة إلى أخرى، فالعينات الطرية كالورقة وأجزاء الزهرة التي لا تحتوي على كمية كبيرة من العناصر الخشبية تظل في المثبت لمدة ١٢ ساعة ولا تزيد عن ذلك، لأن زيادة الوقت قد تجعل العناصر الخشبية أكثر صلابة من الخلايا الأخرى المجاورة في العينة، مما يسبب ظهور بعض الصعوبات عند عملية التقطيع، كتمزق تلك الخلايا المجاورة أو انضغاطها وتشويه أشكالها. أما العينات النباتية ذات العناصر الخشبية كالسيقان والجذور الحديثة فالمدة المناسبة لبقاء العينة في المحلول حوالي ٢٤ ساعة، أما الأجزاء الخشبية كالسيقان والجذور المسنة فإن مدة التثبيت تكون أسبوعاً.

ويحضر هذا المحلول بمزج المحاليل الأولية التالية:

| | |
|---|---|
| ٩٠ مل من الكحول الإثيلي تركيز ٥٠٪ أو ٧٠٪ | Ethyl alcohol |
| ٥ مل من الفورمالين تركيز ٤٠٪ | Formalin |
| ٥ مل من حمض الخليك الثلجي | Glacial acetic acid |

يستعمل تركيز ٥٠٪ كحول إثيلي مع العينات الطرية، بينما يستعمل تركيز ٧٠٪ كحول إيثيلي مع العينات النباتية المتخشبة.

بعد عملية التثبيت يجب غسل العينات مرتين إلى ثلاث مرات بكحول إيثيلي تركيز ٥٠٪ أو ٧٠٪ حسب تركيز الكحول الإثيلي المستعمل في المثبت.

## 2 - Carnoy's fixative:

Carnoy's fixative is a chloroform-containing fixative. It penetrates tissues extremely rapidly and can fix small tissue pieces in minutes rather than the hours required for other fixatives (Chamberlain, 1932; Sass, 1958). Delicate tissues can be damaged when transferred from aqueous solutions to this fixative, due to the extreme hydrophobicity of chloroform and resultant rapid tissue dehydration. Reserve Carnoy's for more hearty samples. This fixative has traditionally been used for cytological structures.

Fix small tissue pieces approximately 1 h, wash several times in absolute ethanol, infiltrate, and embed immediately. (Sass, 1958; Golubovskaya, 1994).

| | |
|---|---|
| EtOH (100%) | 60 |
| Glacial acetic acid | 10 |
| Chloroform | 30 |

## 2 محلول كارنوي - Carnoy’s Fluid :

من المحاليل المهمة في الدراسات السيتولوجية وخاصة دراسة الكروموسومات، ولكن شدة سحبه للماء قد تسبب تشويهات سيتوبلازمية أو نسيجية، ولكن نفاذيته إلى الخلايا والأنسجة لها أهمية في الدراسات التشريحية للتراكيب الناعمة أو الراتنجية أو غير المنفذة التي يجب حفظها كاملة، ويتركب من المحاليل الأولية التالية :

| | |
|---|---|
| ٦٠ مل من الكحول الإثيلي المطلق | Ethyl alcohol |
| ٣٠ مل من الكلوروفورم | Chloroform |
| ١٠ مل من حمض الخليك الثلجي | Glacial acetic acid |

فتحتاج إلى Anthers أن المدة اللازمة لبقاء العينة النباتية في هذا المحلول ( كالقمم النامية للجذور ) حوالي ١٥ دقيقة، أما المتوك ساعة واحدة، ثم بعد الانتهاء من التثبيت تغسل العينة بالكحول الإثيلي المطلق.

**Fixation of samples in Carnoy's fluid**:

- In a fume hood pour 60ml of ethanol into a suitable container
- Add 30ml choloroform
- Add 10ml glacial acetic acid to give a total volume of 100ml
- Place tissue into fixative for 1-3 hours
- Process fixed tissues immediately or transfer to 80% alcohol for storage

## 3 - Farmer’s fixative:

**Farmer’s fluid** is an anhydrous fixative solution that causes rapid dehydration and fixation. As with Carnoy’s fixative, the rapid exchange of tissue water for fixative can cause extreme cellular disruption. However, this fixative is excellent for cytological investigations (Sass, 1958; Golubovskaya, 1994).

| | |
|---|---|
| EtOH (100%) | 75 |
| Glacial acetic acid | 25 |

# 4 - Bouin's Fixative

**Bouin's solution is a popular fixative for embryonic studies eg. Root and shoot apes, embryo sacs. Due to its excellent preservation of nuclei and chromosomes. Bouin's is very compatible with the trichrome stain due to its mordanting effect on the tissue. Tissues fixed in Bouin's solution should be changed to 70% ethanol after 4-48 hours of fixation *(less than 24 hours is optimal)*. If the tissues are fixed longer than this they tend to become brittle and difficult to section. *(NOTE: long term storage in 70% ethanol can lead to shrinkage of the tissue)***

**٣Bouin's fluid - محلول بوين :**

يستعمل هذا المثبت للعينات النباتية والحيوانية، والعينات النباتية التي تعطي نتيجة أفضل مع استعمال هذا المثبت هي قمم الجذور الإنشائية وكذلك الأكياس الجنينية، وهذا المحلول ثابت ويمكن تحضيره وخزنه إلى وقت الحاجة، أو اصطحابه إلى مكان العينة سواء ويجب أن تظل العينة في هذا المحلول ١٢ ساعة في الأقل للعينات الطرية في الحقل أو غيره. الرقيقة من قمم الجذور السميكة فيمكن أن تظل العينة في المثبت لمدة ٤٨ ساعة، بعد ذلك ويتكون من المواد تغسل العينة في ٢٠٪ كحول إثيلي ومن ثم تنقل إلى مرحلة سحب الماء. الأولية التالية :

٧٠ مل حمض البكريك ( مائي مشبع ) Pecric acid

٢٥ مل فورمالين Formalin

٥ مل حمض خليك ثلجي Glacial acetic acid

وهناك ثلاث أنواع أخرى من محلول بوين ( أنظر الجدول رقم ٣ ).

| المواد الأولية | أنواع مثبت بوين | | |
|---|---|---|---|
| | ١ | ٢ | ٣ |
| ١٪ حمض كروميك | ٥٠ | ٥٠ | ٢٥ |
| ١٠٪ حمض خليك | ٢٠ | - | ٤٠ |
| حمض خليك ثلجي | - | ٥ | - |
| فورمالين | ١٠ | ١٠ | ١٠ |
| حمض بكريك ( مائي مشبع ) | ٢٠ | ٣٥ | ٢٥ |

جدول رقم (٣) أنواع مثبت بوين *

* عن بيرلين وميكسكي ١٩٧٦م.

## ٢ Navaschin’s fluid - محول نفاشين:

يستعمل هذا المثبت للأنسجة النباتية وخاصة القمم النامية وتحضير أطوار الانقسام غير المباشر وتوضيح الكروموسومات، ويتكون هذا المحلول من المواد الأولية التالية:

Chromic acid ٧٥ مل من ١٪ حمض كر

Glacial acetic acid ٥ مل حمض خليك

Formalin ٢٠ مل فور

وهناك عدة أنواع لهذا المحلول تختلف باختلاف ال

وإضافة مواد جديدة كما في ال

| المواد الأولية | أنواع محلول نفاشين ( كراف ) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ١ | ٢ | ٣ | ٤ | ٥ |
| ١٪ حمض كروميك | ٢٠ | ٢٠ | ٣٠ | ٤٠ | ٥٠ |
| ١٪ حمض خليك | ٧٥ | - | - | - | - |
| ١٠٪ حمض خليك | - | ١٠ | ٢٠ | ٣٠ | ٣٥ |
| فورمالين | ٥ | ٥ | ١٠ | ١٠ | ١٥ |
| ماء | - | ٦٥ | ٤٠ | ٢٠ | - |

جدول رقم (٢) أنواع مثبت نافاشين *

* عن بيرلين وميكسكي ١٩٧٦م.

## Fixation of histological samples with Bouin's fluid

- Prepare 75ml saturated aqueous solution of picric acid
- Add 25ml formalin (40% aqueous solution of formaldehyde) to give 100ml total volume
- Add 5ml glacial acetic acid
- Fix tissue by submersion in Bouin's fluid for 6 hours
- Transfer fixed tissue to 70% alcohol

## 5 - Zenker's fluid fixation:

Contributed by Martin Fitzpatrick, University of Birmingham, United Kingdom

Fixation with Zenker's fluid

- Add 950ml distilled water to a suitable container
- Add 25g potassium dichromate
- Add 50g mercuric chloride
- Add 50g glacial acetic acid
- Mix thoroughly to dissolve
- Fix samples for 4-24 hours
- Following fixation wash samples overnight in running tap water prior to processing

## 5 محلول زنكر -Zenker’s Fluid:

يمتاز هذا المحلول بسرعة نفاذ معتدلة ويستعمل للدراسات النسيجية ويتكون من المواد الأولية التالية :

| | |
|---|---|
| Water | ١٠٠ مل ماء مقطر |
| Potassium bichromate | ٥ جم ثاني كرومات البوتاسيوم |
| Mercuric chloride | ٠,١٥ جم كلوريد الزئبقيك |
| Glacial acetic acid | ٢ مل حمض الخليك الثلجي |

والمدة اللازمة لبقاء العينة النباتية في هذا المحلول حوالي ٢٤ ساعة ثم تغسل العينة بماء الصنبور الجاري لمدة ١٢ ساعة، ويفضل تحضير هذا المحلول قبل الاستعمال بوقت قصير لأنه محلول غير ثابت.

## 6 - Zirkle 's Fluid:

This is a good routine fixative giving excellent morphological preservation, although it is not used as much as it was in the past due to the mercuric chloride content . It consists of:

- 400 ml of distilled Water
- 2.5 g Potassium bichromate
- 2.5 g Ammonium bichromate
- 2 g of Crupper sulphate

The sample should be placed in this solution for 24 to 48 hours and then washed subsequently with water several times and then washed with water.

## ٦ Zirkle’s Fluid : - محلول زركل

وهو مثبت قاعدي جيد لفحص العينات تحت المجهر الضوئي، وهو يثبت الأجسام السبحية وما يشابهها من الناحية التركيبية والكيميائية. ويتكون من المواد الأولية التالية :

| | |
|---|---|
| ٤٠٠ مل ماء مقطر | Water |
| ٢,٥ جم ثاني كرومات البوتاسيوم | Potassium bichromate |
| ٢,٥ جم ثاني كرومات الأمونيوم | Ammonium bichromate |
| ٢ جم كبريتات النحاس | Cupper sulphate |

ويجب أن توضع العينة في هذا المحلول لمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة ثم تغسل بعد ذلك بالماء عدة مرات وتنقل بعدها إلى عملية سحب الماء.

# Chromic-acetic mixture

It consists of two solutions one weak used to fix algae, fungi, mosses, and the other is the average concentration solution is used to fix the roots and ovaries (Table 4), and the sample should remain in this fisative for 24 hours and then washed with running water. It consists of substances found in Table 4, chromic acid, Glacial acetic acid, distilled water at different rates, see Table 4 .

| المواد | المحلول الضعيف | المحلول المتوسط |
|---|---|---|
| حمض الكروميك<br>حمض الخليك<br>ماء مقـطر | ٢,٥مل<br>٥ مل<br>٩٢,٥ مل | ٧ مل<br>١٠ مل<br>٨٣ مل |

جدول رقم (٤)مخلوط حمض الكروميك الخلي الضعيف والمتوسط

**٧Chromic-acetic mixture: ـ مخلوط حمض الكروميك الثلجي**

ويتكـون مـن محلـولين أحـدهما ضـعيف التركيـز ويسـتعمل لتثبيـت الطحالب والفطريات والحزازيات، والآخر محلول متوسط التركيز ويستعمل لتثبيت قمم الجذور والمبايض والبويضات (جدول رقم ٤ )، ويجب أن تظل العينة في هذا المثبت لمدة ٢٤ ساعة ثم تغسل بالماء الجاري. ويتكون من المواد الموجودة في جدول رقم ٤ ، حمض الكروميك، حمض الخليك الثلجي، ماء مقطر بنسب مختلفة، انظر جدول رقم (٤).

8 - **Formaldehyde**:

Trade name for this fixative is formalin, which consists of 40% aqueous solution of formaldehyde gas, it should also alleviate this solution to reach the ratio to 5% formalin, and can also be used as a preservative solution

9 **الفورمالدهايد -Formaldehyde**:

الاسم التجاري لهذا المثبت هو الفورمالين الذي يتكون من ٤٠٪ محلول مائي لغاز الفورمالدهايد، ويجب أن يخفف هذا المحلول أيضاً إلى أن تصل النسبة إلى ٥ ٪ فورمالين، ويمكن أن يستعمل أيضاً كمادة حافظة.

## 9 - Flemmingwithout acetic:

Flemming without **acetic** used to fix thin plant tissue. Due to the slow penetration to the sample parts. It consists of the following simple solutions :

1 - 15 ml of 10% Chromic acid

2 - 4 ml of 1% Osmic acid

Fixation vary depending on the duration of plant samples or cellular components are ranging between 1 - 24 hours, the sample should be washed with tap water after Fixation.

## 9 محلول فلمنج بدون خل - Flemming without acetic:

يستخدم محلول فلمنج بدون الخل للأنسجة النباتية الرقيقة نظراً لبطء نفاذه إلى أجزاء العينة، ويتكون من المادتين التاليتين :

| | |
|---|---|
| **Chromic acid** | ١٥ مل من ١٠٪ حمض كروميك |
| **Osmic acid** | ٤ مل من ١٪ حمض الأزميك |

وتختلف مدة التثبيت حسب العينات النباتية أو المكونات الخلوية فهي تتراوح ما بين ١ ـ ٢٤ ساعة، ويجب غسل العينة بعد التثبيت بماء الصنبور الجاري.

# 10 - Acetic alcohol fixative

Acetic alcohol (Farmer) : It uses for cytological studies especially chromosomes, consisting of absolute alcohol and glacial acetic acid of 3: 1, respectively, for example:

75 ml of absolute Ethyl alcohol.

25 ml Glacial acetic acid.

And placed the sample for 24 hours chromosomes appears clear, but non-existent or fade cytoplasmic organelles.

**Acetic alcohol fixation:**

Contributed by Martin Fitzpatrick, University of Birmingham, United Kingdom.

Fixative for smears..

- Add 3ml glacial acetic acid to 100ml 95% methanol.
- Fix section in solution for 1 minute.
- Rinse section in distilled water prior to staining.

## 11 Allen Fluid's fixative:

This solution uses as a fixative to most plant tissues that do not contain a large proportion of the wooden elements, particularly the floral buds and developing apexes. It consists of the following simple materials:

75 ml saturated aqueous solution of picric acid Pecric acid

1 -25 ml Formalin

2 - 5 ml Glacial acetic acid

3 - 1.5 ml Chromic acid

4 - 2 g of urea (urine)

The sample must remain in this solution between 4 to 16 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol, several times until the yellow color of picric acid disappeared, preferably prepared when to be use due to the speed damaged.

## ١١ - محلول ألن Allen’s Fluid:

يستعمل هذا المحلول المثبت لمعظم الأنسجة النباتية التي لا تحتوي على نسبة كبيرة من العناصر الخشبية، وخاصة البراعم الزهرية والقمم النامية. ويتكون من المواد الأولية التالية :

| | |
|---|---|
| ٧٥ مل محلول مائي مشبع لحمض البكريك | Pecric acid |
| ٢٥ مل فورمالين | Formalin |
| ٥ مل حمض الخليك الثلجي | Glacial acetic acid |
| ١,٥ مل حمض كروميك | Chromic acid |
| ٢ جم يوريا ( البول ) | |

يجب أن تظل العينة في هذا المحلول ما بين ٤ - ١٦ ساعة، ثم تنقل إلى كحول إثيلي تركيز ٧٠٪ ، ثم يستبدل الكحول لعدة مرات حتى يزول اللون الأصفر لحمض البكريك، ويفضل تحضيره عند الاستعمال نظراً لسرعة تلفه.

## 12 - Formalin and Alcohol Fluid:

This fixative is used when studying the pollen tubes in the plant material, and consists of the following simple solutions:

1 - 100 ml Formalin

2 - 900 ml of 70% Ethyl alcohol

The fixation period ranging between 3 and 6 hours. Samples can be saved in this solution for a long time, and therefore it can be considered as a preservative solution.

## 12 محلول الفورمالين والكحول -Formalin and Alcohol :

يستعمل هذا المثبت عند دراسة أنابيب حبوب اللقاح في الأنسجة النباتية، ويتكون من المادتين التاليتين :

**Formalin** ١٠٠ مل فورمالين

**Ethyl alcohol** ٩٠٠ مل كحول الإثيلي تركيز ٧٠٪

وتتراوح مدة التثبيت ما بين ٣ ـ ٦ ساعات، كما يمكن حفظ العينات في هذا المحلول لمدة طويلة، ولذا يمكن اعتباره مادة حافظة للعينات.

## 13 - Sanfelice Fluid:

This fixative is used to study the chromosomes in the cell divisions. It is not stable. So it should prepared in two groups :

Group A:

1 - 100 mL of 2% aqueous Chromic acid

2 - 60 ml 2% Glacial acetic acid

group (b):

1 - 100 ml Formalin

2 - 60 ml of distilled water

Then mixed equal size of the two groups (A, B) before directly use, and leave the sample in the new solution for an hour, then the sample washed with tap water for one hour, then the sample is passed on upward concentrations of ethyl alcohol starting of 30% to 70% , and then it can be saved in the final concentration (70%) at 4 ° C.

## ١٣Sanfelice’s Fluid : - محلول سانفيليس

يستعمل هذا المثبت لدراسة الكروموسومات في الإنقسامات الخلوية، وهو مثبت غير ثابت لذا يحضر في الأول على شكل مجموعيتن هما :

مجموعة (أ) :

| | | |
|---|---|---|
| ١٠٠ مل من ٢٪ حمض كروميك | مائي | Chromic acid |
| ٦٠ مل ٢٪ حمض الخليك الثلجي | | Glacial acetic acid |

مجموعة (ب) :

| | |
|---|---|
| ١٠٠ مل فورمالين | Formalin |
| ٦٠ مل ماء مقطر | Water |

ثم يمزج حجم متساو من المجموعتين ( أ ، ب ) قبل الاستعمال مباشرة، وتترك العينة في المحلول الجديد لمدة ساعة، ثم تغسل العينة بماء الصنبور الجاري لمدة ساعة، بعد ذلك تمرر العينة على تراكيز تصاعدية من الكحول الإثيلي ابتداء من تركيز ٣٠٪ إلى ٧٠٪ ، وعندها يمكن حفظها في التركيز الأخير (٧٠٪ ) عند درجة ٤ °م.