الفصل الثالث

الأصباغ البيولوجية وكيفية عملها

Biological Stains and Nature of Staining Action

هناك طرق متعددة لتلوين الأنسجة الجسمية حتى يسهل فحصها بالميكروسكوب. غير أن الطرق المستخدمة لا تؤدى جميعها إلى صباغة حقيقية للنسيج ومحتوياته فمثلا هناك طريقة التخلل Impregnation بأملاح الفضة التى تترسب على المكونات ثم يتم اختزالها مما يظهر هذه المكونات باللون البنى الداكن، وهناك طرق أخرى تستخدم فيها مواد عديمة اللون ولكن يتفاعلها مع مكونات خاصة فى النسيج ينتج لون يمكن تمييزه. وسوف نستعرض هنا الطرق المختلفة التى تستخدم لتلوين الأنسجة.

١ - صباغة الأنسجة الحية Vital Staining :

يمكن صباغة الأنسجة الحية بإحدى طريقتين:

(أ) **الصباغة داخل النسيج الحى Intravital Staining :** وفيها يتم حقن أحد الأصباغ مثل تريبان بلو Trypan blue والحبر الهندى Indian Ink داخل أحد الأوردة الكبيرة لحيوان حى. وفى هذه الحالة فإن بعض الخلايا مثل تلك الخاصة بالجهاز الطلائى الشبكى تبتلع هذه الأصباغ إلى داخلها مما يؤدى إلى إظهار هذه الخلايا ملونة عند الفحص الميكروسكوبى.

(ب) **الصباغة بغمر الخلايا فى الصبغ Supravital Staining :** وفيها يتم تفكيك الخلايا وغمرها فى محلول الصبغ. وفى هذه الحالة أيضا تلتقط الخلايا الأصباغ إلى داخلها مما يؤدى إلى ظهور محتويات الخلايا ملونة بألوان مختلفة حسب نوع الصبغ، ويتضح ذلك عند الفحص الميكروسكوبى.

ويلاحظ أن أنوية الخلايا لا يمكن صباغتها فى الأنسجة الحية وذلك لأن الغشاء النووى غير منفذ لمثل هذه الأصباغ.

وباستخدام طرق صباغة الأنسجة الحية يمكن صباغة بعض المحتويات الخلوية صباغة حقيقية مثل حالة صباغة الحبيبات السبحية بصبغة جانس جرين Janus green وصبغة رودامين ١٢٣ Rhodamine 123.

٢ - الصبغ بالذوبان Staining by Solution :

تعرف المواد التى تذوب فى الأنسجة باسم الملونات المحللة Lysochromes ومعظم هذه المواد تذوب فى الدهون ولذا فإنها تستخدم لإظهار الدهون فى قطاعات الأنسجة. وعلى ذلك

فإن قطرات الدهن يمكن أن تتلون بأصباغ ذائبة فى محلول من الكحول (٧٠ ٪ عادة) إذا ما كان الصبغ يذوب فى الدهون بدرجة أكبر من ذوبانه فى الكحول. وتعتمد كمية الصبغ التى تؤخذ بواسطة الدهون فى النسيج على المكافئ التجزئى Partition coefficient الواقع على الصبغ فى وجود المذيبات، فإذا كان هذا المكافئ لصالح الدهن فإن كمية الصبغ التى سيأخذها ستكون أكبر.

٣ - الصبغ بتكوين مواد ملونة فى النسيج بطريقة كيميائية

: Staining by chemical production of coloured substances in tissues

تستخدم فى بعض طرق الصباغة محاليل باهتة أو عديمة اللون تتفاعل مع المكونات النسيجية لينتج عن ذلك مواد ملونة يمكن تمييزها بالميكروسكوب. وقد يكون المركب الملون الناتج عبارة عن صبغة حقيقية أو منتج كيمياوى ملون ولكنه ليس صبغة بالمعنى الحقيقى. ومن أمثلة الطراز الأول الطريقة التى يعطى فيها محلول شف Schiff's reagent عديم اللون (أو ذو اللون الأصفر الباهت) فيظهر صبغ ذو لون قرمزى فى وجود مجموعة الألدهيدات Aldehydes فى النسيج وذلك فى الطريقة الخاصة بصباغة المواد عديدة التسكر، أو طريقة فولجن Feulgen's method الخاصة بصباغة ح د ن D N A. ومن أمثلة الطراز الثانى الطرق المستخدمة فى إظهار الإنزيمات فى الأنسجة حيث يعمل الإنزيم الموجود فى النسيج على مركب كيمياوى مناسب له هو الركيزة Substrate يجهز ويضاف النسيج إليه. ويعمل هذا التفاعل على تحويل المركب الكيماوى المشار إليه إلى مادة ملونة تظهر فى مكان نشاط الإنزيم أو أن ينتج مركب غير ملون يمكن إستبداله بآخر ملون عن طريق إجراء تفاعل آخر.

٤ - التلوين بالتخلل والترسيب المعدنى (الفضة) Metallic Impregnation and Argentaffin Reaction أو بالقابلية للتفاعل مع الفضة

فى كلتا الطريقتين تتكون مادة ملونة داخل النسيج فى أماكن معينة منه، ولكن هذا اللون الناتج لا يعتبر صبغة بالمعنى الحقيقى. ففى طريقة التلوين بالتخلل والترسيب المعدنى يوضع النسيج فى المحلول الملحى وعندئذ يترسب المعدن غير المختزل (الفضة) فى صورة غروية على بعض التراكيب (مثل الليفات العصبية وجهاز جولجى) التى لها قابلية لهذا المعدن ثم ينقل النسيج بعد ذلك إلى محلول مختزل من ذلك النوع المستخدم فى التصوير (الفورمالين) وبذلك يختزل المعدن إلى حالته العنصرية فى صورة راسب أسود بنى غامق. ويلاحظ هنا أن النسيج ذاته لم يختزل المعدن ولكن تم الاختزال عن طريق استخدام محلول خارجى. ويطلق على هذه التراكيب التى يمكن اظهارها بهذه الطريقة وصف «قابلة للفضة» Argyrophil structures وهناك بعض المواد الكيمياوية التى تستخدم كمعجلات عند التلوين بالتخلل والترسيب المعدنى مثل كلورال هيدريت Chloral hydrate حيث أنها تزيد كثافة التلوين وتعطى له اختيارية أفضل. وفى طريقة التلوين بالقابلية للتفاعل مع الفضة Argentaffin فإن بعض المواد مثل حمض الأسكوربيك تتفاعل مع الفضة باختزالها، وبذلك ينتج لون اسود - بنى غامق - دون حاجة إلى استخدام أية محاليل اختزالية خارجية.

٥ - الصباغة باستخدام أصباغ طبيعية أو تخليقية

: Staining with Natural and Synthetic dyes

تقع الغالبية العظمى من طرق الصباغة تحت هذا النوع، وإن كانت ميكانيكية الصباغة مازالت غير مفهومة تماما على وجه الدقة.

ويمكن تقسيم الأصباغ المستخدمة فى علم الأنسجة إلى نوعين رئيسيين هما:

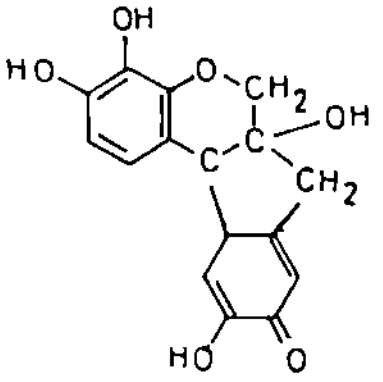
(أ) **الأصباغ الطبيعية Natural dyes** مثل الكارمين والهيماتوكسيلين والأورسين.

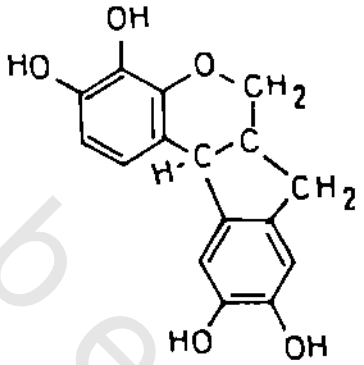
الكارمين: وجد أن الخلايا الدهنية فى أنثى حشرة **Dactylopius cacti** التى تعيش أصلا فى أمريكا الوسطى على عصارة نبات اسمه **Nopalea coccinellifera** تحتوى على مادة صبغية وأنه يمكن استخلاص مادة الكارمين أو **حمض الكارمنك** Carminic acid من أجسام الإناث المجففة (يشكل الحمض ٥٦٪ من الكارمين).

وكان جوبرت وكون Goeppert & Cohn عام ١٨٤٩ أول من استخدما الكارمين فى التحضيرات المجهرية. ويكتسب الكارمين قدرته على الصباغة بإضافة بعض المعادن مثال الحديد أو الألومنيوم.

الهيماتوكسلين: هو أكثر الصبغات استخداما فى مجال علم الأنسجة بهدف صباغة أنوية الخلايا غالبا. وهو يستخلص من خشب شجرة صغيرة إسمها **Haematoxylen campechianum** موجودة الآن فى جنوب المكسيك وجاميكا. والمادة المستخلصة هنا تكتسب قدرتها على الصباغة بعد أكسدتها إلى هيماتين **Hematein** وذلك أما طبيعيا بتعريضها إلى الهواء لمدة تتراوح بين ثلاثة وستة أسابيع كما فى حالة هايدن هان هيماتوكسيلين أو اكسدتها صناعيا باستخدام بعض الكيماويات مثل أكسيد الزئبقيك ـ ثانى أكسيد الهيدروجين ـ أيودات الصوديوم ـ برمنجنات البوتاسيوم ـ ميتابيرو وايودات الصوديوم، ١٪ يود فى محلول كحولى أو بعض المواد المؤكسدة الأخرى، وذلك كما فى حالة هاريس هيماتوكسيلين. والمحلول المؤكسد الذى له قدرة على الصباغة يطلق عليه وصف أنه (محلول ناضج) Ripe solution وعموما فإنه من المستحسن (انضاج) جزء فقط من الهيماتوكسيلين صناعيا ثم يترك الباقى حتى ينضج على مهل تلقائيا بالطريقة الطبيعية بالتعرض للهواء. وهذا يسمح بالإستخدام السريع للصبغ مع إطالة مدة استخدامه لأطول فترة ممكنة طوال فترة استكمال النضج الطبيعى وذلك لأن المحلول كامل النضج معرض للتحول إلى مركب غير فعال عن طريق الأكسدة مما يقلل من الفترة التى يمكن استخدامه فيها بفاعلية.

وخلال عملية أكسدة المحلول الأساسى Stock Solution لهذا الصبغ فإن لونه يتحول من أرجوانى فاتح إلى بنفسجى زاهى إلى بنفسجى غامق إلى أحمر إلى أحمر برتقالى إلى برتقالى يميل إلى البنى وفى النهاية إلى اللون البنى. ويعتبر المحلول مناسبا جدا للصباغة وهو فى مرحلة اللون البنفسجى وتقل كفاءة محلول الصبغ وهو فى مرحلة اللون الأحمر. أما إذا كان المحلول لونه بنى فإنه لا يصلح لصباغة الأنسجة. وقد لوحظ أن مدة صلاحية المحاليل الكحولية أطول خمس مرات من مدة صلاحية المحاليل المائية.


هيماتين


هيماتوكسيلين

أنواع أصباغ الهيماتوكسلين:

بناء على الأسس السابقة فإن لدينا عدة محاليل لصبغ الهيماتوكسيلين بمكونات مختلفة، منها **ديلافيلد** Delafield's، **وايرلش** Ehrlich's **وهاريس** Harris **ومايير** Mayer's وغيرها.

ويمكن الصباغة بالهيماتوكسيلين مباشرة أو أن يستخدم مرسخ Mordant قبل الصباغة يربط بين مكونات النسيج وصبغ الهيماتوكسيلين. وفى حالات استخدام الصبغ مباشرة فإن المرسخ يكون ضمن مكونات محلول الصبغ. وبصفة عامة فإن لدينا أربع مجموعات لمعادلات مكونات الصبغ وذلك حسب نوع المرسخ المضاف إلى محلول الصبغ:

١ - فى المجموعة الأولى يستخدم الحديد كمرسخ وذلك مثل حالة **ويجرت هيماتوكسيلين الحديدية** Weigert's iron haematoxylin وهى تستخدم فى إظهار بعض مكونات الجهاز العصبى فى القطاعات الميكروسكوبية.

٢ - فى المجموعتين الثانية والثالثة لأصباغ الهيماتوكسيلين المباشرة يستخدم **الشب** Alum أو **الشب المحمض** Acid alum على التوالى كمرسخ وذلك كما فى حالة معادلات الهيماتوكسيلين الخاصة بمحاليل ديلافيلد وهاريس ومايير وايرلش وهناك بعض الاختبارات لإيضاح مدى صلاحية الصبغ الذى تستخدم فى هذه المرسخات للاستعمال، منها:

(أ) رائحة الصبغة الجيدة تكون مثل رائحة الخل ولونها بنفسجى غامق - أحمر.

(ب) إذا أضفت بضع قطرات من الصبغ إلى كأس زجاجى يحتوى كمية من ماء الصنبور فإن لونها يصبح أزرقا داكنا إذا كانت جيدة. أما الصبغ غير تام النضج أو الصبغ القديم فإنه سيحتفظ بلونه المائل إلى الحمرة.

(جـ) عند وضع بضع قطرات من الهيماتوكسيلين على قطعة من ورق الترشيح فإن اللون الناتج عن انتشار الصبغة على الورق سيكون كستنائيا ذا حافة بنفسجية قاتمة. وإذا لم يكن قد تم نضج الصبغ بعد فإن الحافة البنفسجية لن تظهر.

ويلاحظ تكون طبقة مترسبة من الصبغ المؤكسدة فى زجاجة صبغ الهيماتوكسيلين، ولذا فأنه يجب ترشيح الصبغ قبل الاستعمال وإلا ظهر راسب أزرق داكن على سطح القطاع المصبوغ.

٣ – أما المجموعة الرابعة لصبغات الهيماتكسيلين المباشرة فإنها تشمل تركيبات تضاف إليها مرسخات معدنية أخرى بالإضافة إلى الحديد والشب. ومن أمثلة هذه الأصباغ: **هيماتوكسيلين الكروم (جوموري كروم ـ هيماتوكسيلين بالشب)** لصباغة خلايا معينه فى البنكرياس والغده النخامية. **هيماتوكسيلين فوسفوموليبدك (طريقة لندر توماس لألياف الكولاجين)، هيماتوكسيلين فوسفوتنجستك** لصباغة الكولاجين.

وعادة ما تجرى عملية تمييز لصبغ الهيماتوكسيلين باستخدام محلول من حامض الهيدروكلوريك الذى يزيل الزائد من الصبغ فى القطاع ويراعى عند إجراء هذه الخطوة فحص الشريحة بالميكروسكوب على فترات متفاوتة حتى لا يزيل الحمض من الصبغ ما هو أكثر من اللازم. ويعتقد أن الحمض يؤدى وظيفته كمميز لصبغ الهيماتوكسيلين، وذلك بكسر الرابطة بين النسيج والمرسخ أكثر منه كسر الرابطة بين المرسخ والصبغ.

(ب) الأصباغ التخليقية Synthetic Dyes:

يشمل هذا القسم عددا كبيرا من المركبات العضوية المشتقة من البنزين. ومن الناحية الكيماوية، يتكون الصبغ من ثلاثة مكونات:

(أ) مسببات أو حاملات اللون Chromophores: وهى التى على أساسها يسمى الصبغ. وبصفة عامة تعرف ثلاثة طرز من حاملات اللون:

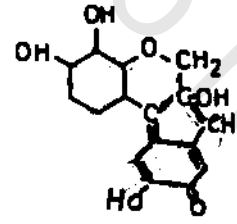
١ – مركبات مشتقة من حلقة الكينون يتصل بها مجموعات كيماوية فى وضع بارا، وأحيانا فى وضع أورتو، ومن امثلتها الفوكسين القاعدى والفوكسين الحامضى، كريستال فيوليت ـ أزيلين بلو ـ ايوسين ـ مثيلين بلو ـ نيوترال رد ـ الهيماتين.

٢ – الازدواجات النيتروجينية The azo-coupling:

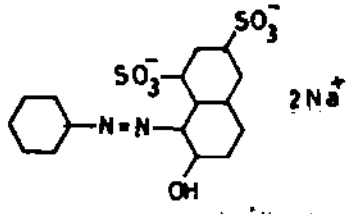
ومن أمثلتها أصباغ الأورانج ج، كونجورد – تريبان بلو

(azo - dye) – N = N –

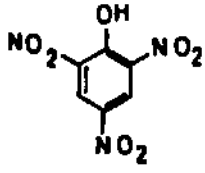
٣ – مجموعات النيترو. ومن أمثلتها حمض البكريك والأورانشيا.



١ – الهيماتين
صبغة مشتقة
من الكينون



٢ – الأورانج ج
صبغة ذات ازدواج
نيتروجينى



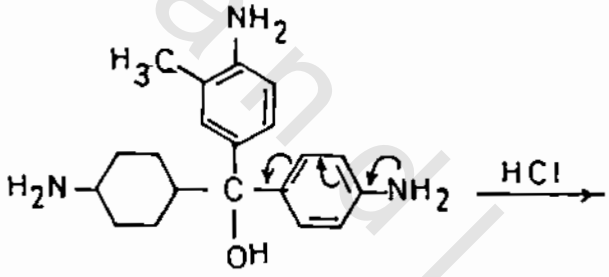
٣ – حمض البكريك
من مجموعة النيترو

وحاملات اللون فى حد ذاتها لا لون لها، إلا إذا توفر معها مقويات اللون ومولدات اللون، كما أنه كلما طالت سلسلة الكروموفور انتقل اللون من منطقة الطيف فوق البنفسجية إلى منطقة الطيف تحت الحمراء لزيادة طول الموجة الضوئية (حيث أن فرق الطاقة ΔE لانتقال الإلكترونات يقل مع ازدياد التبادل Conjugation ويقل أيضا مع ازدياد طول الموجة الضوئية).

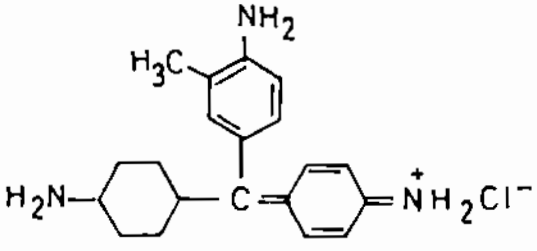
(ب) **مولدات اللون Chromogens**: وهى المركبات التى تحتوى على حاملات اللون ضمن مكوناتها، ومن أمثلة ذلك اتصال حاملات اللون بحلقة بنزين مثلا ليكونا معا ما يسمى مولدات اللون.

(جـ) **مقويات اللون auxochromes**: مثل مجموعة OH أو مجموعة NH_2، وهى مجاميع معطية للالكترون حتى تزيد من التبادل Conjugation (أى تبادل الروابط المزدوجة والأحادية) فى حاملات الألوان حتى ينتج اللون. ويشكل حمض البكريك مثالا بسيطا للمقويات الصبغ.

وفيما يلى مثال لكيفية تحويل مادة عديمة اللون إلى مادة ملونة بفضل مقويات اللون التى تعطى إلكترونات.



وهذا المركب Benzenoid structure لا لون له. وعند إضافة HCl له فإن الهيدروجين فى الحامض يتحد مع مجموعة OH بالمركب فيتكون الماء وتنتج عن ذلك سلسلة من حركات متتابعة للالكترونات (كما هو موضح بالرسم) تؤدى إلى خلق روابط متزاوجة Conjugated وينتج أخيرا ما يسمى quinonoid structure.



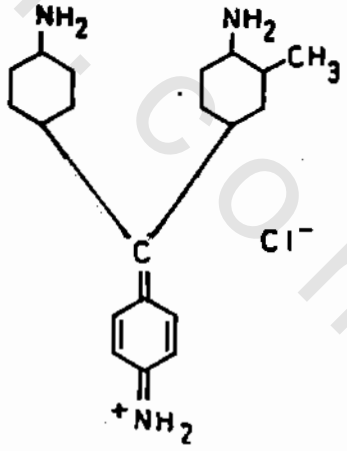
وواضح أن مقويات اللون NH_2 هى التى أعطت الالكترون وخلقت بذلك روابط متزاوجة conjugation. أو بمعنى آخر خلقت تركيب quinonoid =⋹= أى حامل للون Chromophore.

الصبغات القاعدية والحمضية والمتعادلة Basic, Acidic and Neutral Stains:

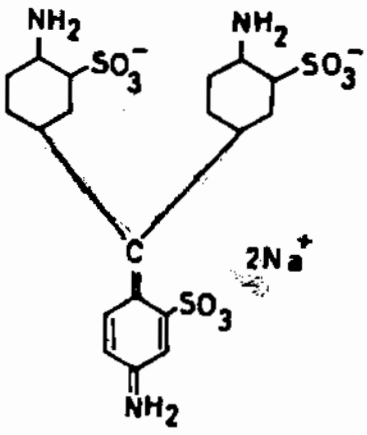
إن معظم الأصباغ التى تستخدم فى علم الأنسجة عبارة عن أملاح ذات شقين: حامضى وقاعدى. ولكى تؤدى الصبغة مفعولها فلابد أولا من تفككها فى وسط مائى إلى **شق حامضى** Acid radicle **وشق قاعدى** Base radicle.

الصبغ القاعدى هو الذى يكون فيه الشق القاعدى ملونا ومتحدا مع شق حامضى عديم اللون مثل الكلور أو الكبريتات. ومن أمثلة الأصباغ القاعدية: **الفوكسين القاعدى Basic fuchsin**: وفيه يمثل الروزانيلين الملون الشق القاعدى، ويكون الشق الحامضى هو الكلور عديم اللون. والأصباغ القاعدية تصبغ المحتويات الحمضية فى النسيج مثل أنوية الخلايا، بلون بنفسجى يميل إلى الزرقة وغالبا ما تذوب هذه الأصباغ فى كل من الماء والكحول.

والصبغ الحامضى هو الذى يكون فيه الشق الحامضى ملونا ومتحدا مع شق قاعدى عديم اللون مثل الصوديوم. ومن أمثلة الأصباغ الحامضية. **الفوكسين الحامضى Acid fuchsin**: والأصباغ الحمضية تصبغ التراكيب الحامضية (مثل سيتوبلازم الخلايا) بلون قرمزى – أحمر وهذه الأصباغ غالبا ما تذوب فى كل من الماء والكحول.



فوكسين قاعدى



فوكسين حمضى

openkandil.com

أما الصبغ المتعادل فانه ينتج من تفاعل صبغ حامضى مع آخر قاعدى وبهذا فإن جزىء الصبغة يحتوى على شقين كلاهما لصبغة ملونة. ومحاليل الأصباغ المتعادلة غروية غالبا طالما أنها تتكون من اتحاد جزئيات كبيرة فى الأصل. والصبغ المتعادل له خاصية صباغة كلا من التراكيب الحمضية والتراكيب القاعدية فى الخلايا. وهذه الأصباغ تذوب فى الكحول ونادرا ما تذوب فى الماء.

ومن الواضح أن الجزء الأعظم من المادة المصبوغة فى القطاعات تكون مادة بروتينية عادة. وتحتوى السلاسل الجانبية لبعض الأحماض الأمينية مجموعات تتأين لتعطى أحماضا، بينما تحوى السلاسل الجانبية أحماضا أمينية أخرى مجموعات تعطى قواعد عند تأينها. وتختلف البروتينات فيما بينها، فيما تحتويه من الأحماض الأمينية التى تتأين إلى أحماض وتلك التى تتأين إلى قواعد. وهذه نقطة هامة تحدد نوعية الصباغة التى تصبغ التراكيب النسيجية بها. فالبروتينات التى تسود فيها المجموعات الحامضية تميل إلى أن تصبغ جيدا بالصبغات القاعدية. وعلى العكس من ذلك فإن البروتينات التى تسود فيها المجموعات القاعدية تميل إلى أن تصبغ جيدا بالصبغات الحامضية.

الصبغات المركبة متعددة الألوان Polychromasia:

هناك بعض الأصباغ المركبة التى تحوى مكونات ذات ألوان مختلفة وذلك مثل صبغ الجمسا Giemsa التى هى عبارة عن صبغة مركبة من صبغين هما الثيازين Thiazine الزرقاء والأيوسين Eosin الحمراء. وبذلك فإنه عند استخدام صبغة الجمسا فى صباغة قطاع فى الحبل الشوكى مثلا فإن أجسام نسل فى الخلايا العصبية ستصبغ باللون الأزرق بينما ستأخذ الألياف العصبية اللون الأحمر. وكذلك عند استخدام الجمسا فى صبغ كرات الدم الحمراء فإن السيتوبلازم يأخذ اللون الأحمر القرمزى بينما تصبغ أنوية الخلايا باللون الأزرق أو البنفسجى.

الصبغات مخالفة التلوين (ميتاكروماسيا) Metachromasia:

الصبغة مخالفة التلوين هى صبغة نقية تعطى النسيج المصبوغ بها ألوانا متعددة. فهناك تراكيب معينة فى النسيج تتحد مع الصبغ لتعطى لونا يختلف عن لون الصبغ نفسه وأيضا يختلف عن اللون الناتج فى بقية النسيج وكمثال لذلك، إذا صبغ تحضير لنسيج ضام بالتلويدين بلو Toluidine blue فإن الخلايا الصارية mast cells ستصبغ باللون الأحمر البنفسجى (صباغة مخالفة للون (Metachromatic) بينما ستصبغ بقية مكونات التحضير باللون الازرق (صباغة متوافقة التلوين (Orthochromatic). ومن أهم الصبغات مخالفة التلوين: تلويدين بلو أو Toluidine blue O ثيونين Thionine، ميثيلين بلو Methylene blue آزور أ، ب، جـ Azures A, B, C كريزيل فيوليت Cresy violet، سليستين بلو Celestine blue، جالوسيانين Gallocyanin بسمارك براون Bismark brown ميثيل فيوليت Methyl violet صفرانين أو Safranin O.

ومن أكثر الأنسجة والمكونات النسيجية اصطباغا بالألوان المخالفة هى النسيج الضام

Connective tissue والمواد عديدة التسكر المخاطية الكبريتية Sulphated mucopolysaccharides.

وقد لوحظ أن نزع الماء بواسطة الكحول بعد استخدام هذه الصبغات غالبا ما يؤدى إلى فقد اللون الناتج من الاصطباغ مخالف التلوين.

تسمية الأصباغ Nomenclature of Stains:

لا يوجد نظام واحد لتسمية الأصباغ، فأحيانا يلاحظ أن تسمية الصبغ تعتمد على اللون، مثال ذلك Orange G, Methyl green, Martius yellow. وإذا وجد حرف أو رقم يلى أسم الصبغ، فهذا يعنى تمييز الصبغ عن صبغ شبيه به مثال ذلك Sudan III, IV. وإذا ميز اسم الصبغ بالحرف B فهذا يعنى أنه يميل إلى اللون الأزرق أما الحروف Y أو G فتعنى أن الصبغ يميل لونه إلى الأصفر. أما حرفا WS فيعنيان أن الصبغ يذوب فى الماء. كما تستخدم الحروف A, B, C لتمييز أنواع صبغات الأزور Azures.

وعلى المستوى العالمى، لم يكن هناك ما يضمن جودة ونقاوة الأصباغ المستعملة فى المجالات البيولوجية، وكانت أول محاولة جدية لمراقبة المنتج من هذه الأصباغ بواسطة الألمانى جروبلر Grubler ولكن لم تستمر هذه المحاولة طويلا وتكونت فى الولايات المتحدة بعد ذلك لجنة تقييم الأصباغ البيولوجية "Commission on Standardization of Biological Stains" عرفت بعد ذلك باسم «لجنة الأصباغ البيولوجية "Biological Stain Commission" وهى تعمل بالتعاون مع الجهات المنتجة حيث تمدهم بمواصفات الأصباغ التى يحتاج إليها البيولوجيون ثم تختبر هذه اللجنة المنتج وتعطى شهادة صلاحية Stamp of the Commission مبين فيها رقم معامل اللون Color Index (C.I.). وقد يكتب على عبوات المنتج الحرفان (C.C.) بمعنى أن الصبغ أجيز بواسطة اللجنة المذكورة "Commission Certified".

وتساعد المعرفة بدرجة ذوبانية Solubility الصبغ فى تحضير المحاليل المشبعة للأصباغ. ويوضح الجدول الآتى درجة ذوبانية بعض الأصباغ فى الماء والكحول الاثيلى المطلق عند درجتى حرارة ١٤°م، ٢٦°م. كما يوضح الجدول ما إذا كانت محاليلها حامضية (a) أو قاعدية (b) وكذلك رقم معامل اللون (C.I.) لكل صبغ.

Stain	In water (percent)		In absolute ethyl alcohol (percent)		Basic or acidic	C.I. number
	26°C	15°C†	26°C	15°C†		
Acid fuchsin	–	45.0	–	3.0	a	42685
Acridine orange	–	5.0	–	0.75	b	46005
acridine yellow	–	0.5	–	0.75	b	46025
alcian blue 8 GX	–	9.5	–	6.0	b	74240
alizarine red S	7.69	6.5	0.15	0.15	a	58005
aniline blue WS	–	50.0	–	0.0	a	–
aurantia	O.O	0.1	0.33	0.55	a	10360
azocarmine G	–	1.0	–	0.1	a	50085
basic fuchsin	0.26-0.39	1.0	5.93-8.16	8.0	b	42500
Bismarck brown Y	1.26	1.5	1.08	3.0	b	21000
brilliant cresyl blue	–	3.0	–	2.0	b	21010
celestin blue B	–	2.0	–	1.5	b	51050
Chlorazol blacke E	–	6.0	–	0.1	a	30235
chromotrope 2R	19.3	19.0	0.17	0.15	a	16570
Congo red	–	5.0	0.19	0.75	a	22120
cresylviolet (cresylecht violet)	0.38	9.5	0.25	6.0	b	–
Crystal violet (methyl violet 10B)	1.68	9.0	13.87	8.75	b	42555
eosin B	39.11	10.0	0.75	3.0	a	45400
eosin (S) alc. sol. (ethyl eosin)	0.03	0.0	1.13	1.0	a	45386
eosin Y, WS	44.20	44.0	2.18	2.0	a	45380
erythrosin B	11.10	10.0	1.87	5.0	a	45430
erythrosin Y	–	8.5	–	4.5	a	45425
fast green FCF	16.04	4.0	0.35	9.0	a	42053
gallocyanin (bisulfite)	–	3.0	–	0.5	b	51030
gallocyanin (hypochlorite)	–	0.5	–	1.25	b	51030
hematein	–	1.5	–	7.5	b	75290
hematoxylin	1.75	10.0	60.0	10.0	b	75290
Janus green B	5.18	5,0	1.12	1.0	b	11050
light green SF yellowish	20.35	20.0	0.82	4.0	a	42095
Luxol fast blue MBS	–	0.0	–	3.0	a	–
malachite green	–	10.0	–	8.5	b	42000
martius yellow	4.57	1.0	0.16	0.0	a	10315
methyl blue	–	50.0	–	0.0	a	42780
methyle violet 2 B	2.93	–	15.21	–	b	42535
methyl violet 6B	–	4.7	–	9.5	b	42535
methylene blue	3.55	9.5	1.48	6.0	b	42015
naphthol yellow S	–	12.5	–	0.65	a	10316
neutral red	5.64	4.5	2.45	1.8	b	50040
Nile bule sulfate	–	6.0	–	5.0	b	51180
oil red O	–	0.0	–	0.5	a	26125

Stain	In water (percent)		In absolute ethyl alcohol (percent)		Basic or acidic	C.I. number
	26°C	15°C+	26°C	15°C+		
orange G	10.56	8.0	0.22	0.22	a	16230
orcin	–	2.0	–	4.2	b	–
phloxine B	–	10.5	–	5.0	a	45410
picric acid	1.18	1.2	8.96	9.0	a	10305
ponceau 2R	–	5.0	–	0.1	a	16150
ponceau S	–	1.35	–	1.2	a	27195
ponceau de xylidine	–	5.0	–	0.1	a	16150
pyronin B	–	10.0	–	0.5	b	45010
pyronin Y	8.96	9.0	0.6	0.5	b	45005
rhodamin B	0.78	2.0	1.47	1.75	b	45070
rhodamin 6G	–	1.5	–	6.5	b	45160
safranin O	8.45	4.5	8.41	3.5	b	50240
Sudan black B	–	0.0	–	0.25	a	26150
Sudan III	0.0	0.0	0.15	0.25	a	26100
Sudan IV	0.0	0.0	0.09	0.5	a	26105
thionin	0.25	1.0	0.25	1.0	b	52000
toluidine blue O	3.82	3.25	0.57	1.75	b	52040
trypan blue	–	1.0	–	0.02	a	23850

oneilandl.com

طرق تحضير بعض الأصباغ البيولوجية
Preparation of Some Biological Stains

يتضمن الجزء التالى طرق تحضير بعض الصبغات الأساسية مثل الهيماتوكسيلين والأيوسين. أما باقى الأصباغ فسوف نذكر طرق تحضيرها عند الحديث عن طرق الصباغة المختلفة.

أولا: الهيماتوكسيلين Hematoxylin:

يعتبر الهيماتوكسيلين كما سبق القول أشهر صبغ على الإطلاق، ويستخدم عموما لصبغ أنوية الخلايا. وهو يدخل فى عمل محاليل صبغية تنميز إلى محاليل مفردة وأخرى ثنائية.

(أ) المحاليل المفردة Single Solutions:

١ – ديلافيلد هيماتوكسيلين Delafield's Haematoxylin:

يذاب ٤ جم من الهيماتوكسيلين فى ٢٥ سم^3 من كحول إثيلى مطلق Absolute ethyl alcohol. يتم تحضير ٤٠٠ سم^3 من محلول مائى مشبع من الأمونيا ألم NH_4 Al Ammonia alum $(SO_4)_2$. $12H_2O$ (جزءمن الألم + ١١ جزء من الماء المقطر تقريبا).

أضف بالتدريج محلول الهيماتوكسيلين إلى محلول الامونيا ألم واترك الناتج فى قارورة معرضة للضوة ومسدودة بسدادة قطنية لمدة تتراوح بين ٣–٥ أيام.

رشح، وأضف إلى الرشيح ١٠٠ سم^3 من الجلسرين، ١٠٠ سم^3 من الكحول المثيلى.

اترك المحلول لمدة ستة أسابيع حتى يتم نضجه قبل الاستعمال. وهذا المحلول صالح لعدة سنوات إذا ما تم حفظه فى زجاجة محكمة الغلق.

٢ – إيرلش هيماتوكسيلين Ehrlich's Hematoxylin:

* هيماتوكسيلين	hematoxylin	٢ جم
* أمونيا ألم	ammonia alum	٣ جم
* كحول إثيلى أو ميثيلى	ethyl or methyl alcohol	١٠٠ سم^3
* جلسرين	glycerin	١٠٠ سم^3
* ماء مقطر	distilled water	١٠٠ سم^3
* حمض خليك ثلجى	glacial acetic acid	١٠ سم^3

ذوب الهيماتوكسيلين فى الكحول ثم أضف الحمض والجلسرين والماء.

ويتم نضج هذا المحلول بعد فترة من ٦–٨ أسابيع، ولكن إذا أريد استعماله فى الحال، أضف ٢,٤ جم من أيودات الصوديوم Sodium Iodate لينضج المحلول بسرعة.

٣ - هارس هيماتوكسيلين Harris Hematoxylin:

ذوب ١ جم هيماتوكسيلين فى ١٠ سم٣ كحول اثيلى.

ذوب ٢٠ جم:

* بوتاسيوم ألم $Al_2(SO_4)\ K_2\ SO_4 \cdot 24H_2O$ Potash alum
* أو أمونيا ألم $NH_4Al(SO_4)_2.12H_2O$ ammonia alum

فى ٢٠٠ سم٣ ماء وسخن حتى تغلى أضف محلول الهيماتوكسيلين للمحلول السابق وأغلى لمدة نصف دقيقة.

أضف $\frac{1}{2}$ جم أكسيد زئبقيك mercuric oxide ثم برد بسرعة.

أضف قطرات قليلة من حمض الخليك الثلجى glacial acetic acid لتحسين صفات الصبغ. لا تستمر صلاحية هذا الصبغ إلا لشهر واحد أو اثنين على الأكثر.

٤ - ماير هيماتوكسيلين Mayer's Hematoxylin:

أضف ١ جم هيماتوكسلين إلى لتر واحد من الماء المقطر وسخن على لهب هادئ، ثم أضف ٢ جم أيودات الصوديوم Sodium Iodate، ٥٠ جم بوتاسيوم ألم $AL_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O$ Potash alum.

سخن حتى تمام الذوبان وأضف ١ جم حمض ستريك Citric acid، ٥٠ جم كلورال هيدريت Chloral hydrate.

يتم نضج هذا المحلول خلال ٦-٨ أسابيع ولكن يمكن استعماله بعد أسبوعين من تحضيره.

٥ - هيماتوكسيلين حمض الفوسفوتنجستك Hematoxylin phosphotungstic Acid:

* حمض الفوسفوتنجستك	Phosphotungstic acid	١٠ جم
* هيماتوكسيلين	Hematoxylin	٠,٠٥ جم
* أوكسيد الزئبقيك الأحمر	Red mercuric oxide	٠,٠٥ جم
* ثانى أكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide	٢ سم٣
* ماء مقطر	Distilled water	٥٠٠ سم٣

أذب الهيماتوكسيلين فى قليل من الماء مع التسخين.

ذوب حمض الفوسفوتنجستك فى كمية الماء الباقية مع التسخين، ثم أضف إليه محلول الهيماتوكسيلين ثم إغله.

بعد ذلك أضف باحتراس أكسيد الزئبقيك، وبرد ثم أضف فوق أكسيد الهيدروجين.

يتم نضج هذا المحلول خلال أسبوع واحد، ويجب أن يكون لونه أحمر يميل إلى البنى.

openkandil.com

٦ - مالورى حمض فوسفومولبدك - هيماتوكسيلين

Mallory's phosphotungstic acid-hamatoxylin stain:

* هيماتوكسيلين	Hamatoxylin	١ جم
* حمض فوسفومولبدك	phosphomolybdic acid	٢ جم
* مـاء مقطـر	distilled water	١٠٠ سم^3

يحتاج الصبغ إلى عدة أسابيع حتى ينم نضجه، ولكن يمكن أن يستعمل فى الحال إذا ما أضيف إليه ٥ سم^3 من ١٪ برمنجنات البوتاسيوم **Pot. permengnate**.

٧ - مالورى حمض فوسفوتنجستك - هيماتوكسيلين

Mallory's phosphotungstic acid-hamatoxylin stain:

* هيماتوكسيلين	Hamatoxylin	١ جم
* حمض فوسفوتنجستيك	phosphotungstic acid	٢ جم
* مـاء مقطـر	distilled water	١٠٠٠ سم^3

أذب الهيماتوكسيلين وحمض الفوسفونتجستك فى كمية من الماء كل على حدة. سخن محلول الهيماتوكسيلين حتى يتوقف التغير فى اللون.

برد المحلول حتى تصل درجة حرارته إلى درجة حرارة الغرفة ثم أضف إليه محلول حمض الفوسفوتنجستك. أضف بعد ذلك ٠,١٧٧ جم من برمنجنات البوتاسيوم. يستعمل هذا المحلول بعد شهر من تاريخ تحضيره.

(ب) المحاليل الثنائية **Double Solutions:**

١ - ويجرت أيرن هيماتوكسيلين **Weigert's iron hamatoxylin:**

محلول (أ):

* كلوريد الحديد	$FeCl_2$ Iron Chloride (٢٩٪ مائى)	٤ سم^3
* مـاء مقطـر	Distilled Water	٩٥ سم^3
* حمض هيدروكلوريك كثافته ١,٨٨-١,٩٢	Hydrochloric acid (٣٧-٣٨٪ قـوتـه)	١ سم^3

محلول (ب):

* هيماتوكسيلين	Hamatoxylin	١ جم
* ٩٥٪ كحول اثيلى	Ethyl alcohol	١٠٠ سم^3

عند كل استعمال أضف كميات متساوية من المحلولين (أ)، (ب) ويمكن أن تستمر صلاحية المحلولين المضافين معا لمدة أسبوع.

obeikandl.com

٢ - هايدن هان أيرن هيماتوكسيلين Heidenhain's iron hematoxylin:

محلول (أ):

* فيرك ألم $FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$ Ferric alum ٤ جم
* ماء مقطر Distilled Water ١٠٠ سم^3

إحفظه فى الثلاجة حتى تمنع ترسبه على جدران الزجاجة بسرعة.

محلول (ب):

* هيماتوكسيلين Hematoxylin ١٠ جم
* ٩٥٪ كحول اثيلى Ethyl alcohol ١٠٠ سم^3

اترك هذا المحلول لمدة ٥ شهور حتى يصبح لونه أحمرا داكنا كالنبيذ.

عند الاستعمال، خذ ٥ سم^3 من المحلول ب وأكملها إلى ١٠٠ سم^3 بالماء المقطر، ثم أضف ٣ قطرات من محلول مشبع من كربونات اللثيوم Lithium carbonate.

لا تضف المحلول (أ) إلى (ب) أبدا.

عند الصباغة توضع الشرائح أولا فى المحلول أ لفترة من الوقت ثم تغسل بالماء المقطر ثم توضع فى المحلول ب.

يستخدم هذا الصبغ عادة لصباغة الميتوكوندريا.

اختبار انتهاء صلاحية محاليل الهيماتوكسيلين:

- أضف عدة قطرات من محلول الهيماتوكسيلين إلى كمية من ماء الصنبور (وليس الماء المقطر).
- إذا تحول اللون فى الحال إلى بنفسجى يميل إلى الزرقة فذلك يعنى أن محلول الهيماتوكسيلين لازال صالحا.
- أما إذا تحول اللون ببطء أو كان اللون يميل إلى الحمرة أو البنى فذلك يعنى أن المحلول أصبح ضعيفا أو تحلل، وعلى ذلك يجب عدم استعماله والتخلص منه.

ثانيًا: جالوسيانين Gallocyanin:

وهو يستعمل بديلا عن الهيماتوكسيلين. وإن كان لا يستعمل لصباغة الغمد الميلينى مثل الهيماتوكسلين وهو لا يحتاج إلى تمييز بعد الصباغة. وأفضل مثبت يستخدم معه هو الأسيتوفورمال Aceto-formol وزنكر والفورمالين. ويحضر الصبغ كما يلى:

* جالوسيانين Gallocyanin ٠,١٥ جم
* ٥٪ كروم ألم
$Cr_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O$ Chrome alum فى الماء ١٠٠ سم^3

– أغلى لمدة دقيقتين ثم رشح، الصبغ صالح للإستعمال لمدة أسبوع واحد ويمكن استعمال ٥٪ أيرن ألم بدلا عن الكروم ألم. هذا الصبغ يصبغ الأنوية باللون الأزرق.

ثالثًا: هيماتين (هيم ألم) (Hematein (Hemalum):

● هيماتين	Hematin	٠,٥ جم
● ٩٥٪ كول اثيلى	Ethyl alcohol (95%)	١٠ سم^3

– اطحن الهيماتين مع الكحول ثم أضف ٥٠٠ سم^3 من ٥٪ بوتاسيوم ألم · $Al_2(SO_4)\,3K_2SO_4$ Potash, alum $24H_2O$، والمحلول يمكن استعماله فى الحال. وهذا الصبغ يصبغ الأنوية باللون الأزرق.

رابعًا: الإيوسين Eosin stain:

● ايوسين	Eosin Y (C.I. 45380)	١ جم
● ٧٠٪ كحول اثيلى	Ethyl alcohol (70%)	١٠٠٠ سم^3
● حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	٥ سم^3

– عند الاستعمال، خذ كمية من هذا المحلول وأضف إليها كمية مماثلة من ٧٠٪ كحول إثيلى وقطرتين من حمض الخليك. والصبغ حامضى ويراعى إجراء نزع الماء من القطاعات بعد الصباغة بسرعة فى ٩٥٪ كحول ثم الكحول المطلق.

خامسًا: أيوسين أورانج ج Eosin-Orange G:

● ١٪ أيوسين	Eosin Y (C.I. 45380) فى ٩٥ كحولى أثيلى	١٠ سم^3
● أورانج ج	Orange G (C.I. 16230) مشبعة فى ٩٥٪ كحول اثيلى	
	($\frac{1}{2}$ جم لكل ١٠٠ سم^3 تقريبا)	١٠٠ سم^3
● ٩٥٪ كحول اثيلى	Ethyl alcohol	٤٥ سم^3

سادسًا: صبغ فان جيسون (المعدل) Van Gieson (modified):

● فوكسين حامض	Acid fuchsin (C.I. 42685)	٠,٠١ جم
● حمض بكريك	Picric acid	٠,٠١ جم
● مـاء مقـطر	Distilled water	١٠٠ سم^3

سابعًا: صبغ بكروبنكو Picro-ponceau:

● ١٪ بونكو	Ponceau S (C.I. 27195)	١٠ سم^3
● حمض بكريك مائى مشبع	Picric acid	٨٦ سم^3
● ١٪ حمض خليك	Acetic acid	٤ سم^3

openanal.com

ثامنًا: سلستين بلو – فيرك (هيم ألم) Celestin blue-Ferric (Haem) alum:

أضف ٠,٢٥ جم من سلستين بلو (C.I. 51050) إلى ٥٠ سم٣ من محلول ٥٪ شب الحديديك (فيرك ألم) وأغلى لمدة ثلاث دقائق برد ثم رشح وأضف إلى الرشيح ٧ سم٣ جلسرين. هذا الصبغ صالح للاستعمال لعدة شهور.

تاسعًا: صبغ مالورى الثلاثى Mallory Triple Stain:

يتكون من ثلاثة محاليل:

مالورى ١ Mallory I:

* فوكسين حامضى	Acid Fuchsin	١ جم
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ سم٣

محلول حمض الفوسفوموليدك:

* حمض فوسفوموليدك	Phosphomolybdic acid	١ جم
* ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣

مالورى ٢ Mallory II:

* أنيلين بلو	Aniline blue	٠,٥ جم
* أورانج ج	Orange G	٢,٥ جم
* ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣
* حمض أوكساليك	Oxalic acid	٢ جم

وعند استخدام هذا الصبغ فإن الأنيلين بلو يصبغ النسيج الضام والغضروف، ويصبغ الأورانج ج كرات الدم والغمد النخاعى للألياف العصبية والعضلات ويقوم الفوكسين بصبغ باقى التراكيب بالنسيج بما فى ذلك أنوبة الخلايا.

عاشرا: صبغ ماسون الثلاثى Masson Trichrome Stain:

ماسون (أ) Masson A:

* ١٪ فوكسين حامضى	Acid Fuchsin (C.I. 42685)	١٠ سم٣
* ١٪ زيليدين بونكو	Ponceau de xylidine (C.I. 16150)	٩٠ سم٣
* حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	١ سم٣

obeikandi.com

ماسون (ب) Masson B:

* ١٪ حمض فوسفوموليدك	Phosphomolybdic acid	٥٠ سم٣
* ١٪ حمض فوسفوتنجستك	Phosphotungstic acid	٥٠ سم٣

ماسون (جـ) Masson C:

* فاست جرين	Fast green FCF (C.I. 42053)	٢,٥ جم
* ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣
* حمض خليك ثلجي	Glacial acetic acid	٢,٥ سم٣

هيماتوكسيلين:

ويمكن تحضير طراز ديلافيلد Delafield's أو ما شابه ذلك. وعند استعمال هذا الصبغ نجد أن الأنوية تتلون باللون الأزرق الذى يميل إلى الاسوداد. ويصبغ الكولاجين والمخاط باللون الأزرق أو الأخضر. وتصبغ المحتويات السيتوبلازمية والعضلات والكيراتين باللون الأحمر.

حادى عشر: تحضير المحلول الأساسى لصبغ جمسا Stock solution of Giemsa stain:

* صبغ جمسا	Giemsa stain	٠,٠٥ جم
* جلسرين	Glycerin	٣٣ سم٣

سخن لمدة ساعتين فى فرن درجة ٦٠°م. ثم أضف ٣٣ سم٣ كحول مثيلى (متعادل خال من الأسيتون).

ويجب حفظ صبغ جمسا فى زجاجة داكنة اللون حيث أن ضوء الشمس يتسبب فى إتلافها.

وعند الاستعمال يخفف الصبغ بالماء المقطر بنسبة ١ : ١٠ أو بإضافة محلول منظم فوسفاتى دوأس هيدروجينى يتراوح من ٦,٤-٧,٢.

ويلاحظ أن صبغ جمسا ذاته صبغ مركب حيث أنه يحتوى على ايوسين Eosin Y آزورات Azures ومثيلين بلوكلورايد Methylene blue chloride.

ثانى عشر: تحضير المحلول الأساسى لصبغ لشمان Leishman's stain:

* صبغ لشمان	Leishman's stain	٠,١٥ جم
* كحول مثيلى نقى	Methyl alcohol	١٠٠ سم٣

ويستحسن إضافة المحلول إلى الصبغ على دفعات مع الصحن حتى يتم إذابة الصبغ ويستحسن كذلك عدم استعمال الصبغ قبل حوالى أسبوعين من التحضير.

ثالث عشر: الكاشف شف Schiff's reagent:

١ - أحضر زجاجة سعتها من ١٥٠ سم٣-٣٣٠ سم٣وضع فيها ٨٥ سم٣ ماء مقطر و١ جم فوكسين قاعدى (C.I. 42500)، ١,٩ جم صوديوم ميتابا يسلفيت ١٥ سم٣، حمض يد كل

عيارى (٩١٤,١ سم٣ ماء مقطر + ٨٥,٩ سم٣ حمض يد كل كثافته النوعية ١,١٧٨٩ ونسبته ٣٦٪).

٢ - رج الزجاجة على فترات خلال مده من ٢-١٢ ساعة.

٣ - أضف ٣٠٠ ملليجرام فحم نباتى نشط.

٤ - رج الزجاجة لمدة دقيقتين ثم رشح. الرشيح يجب أن يكون عديم اللون أو أصفرا باهتًا. فإذا لم يكن كذلك فإن السبب قد يكون ناتجا عن قدم الفحم المستعمل. وفى هذه الحالة استخدم فحم نباتى من مصدر آخر ورشح من جديد.

٥ - يحفظ الكاشف فى الثلاجة عند درجة ٤°م فى زجاجة محكمة القفل بها أقل حيز هوائى فوق المحلول.

(هناك طرق أخرى لتحضير هذا الكاشف إلا أن هذه الطريقة سريعة ولا تحتاج إلى مصدر حرارى).

رابع عشر: الكارمين Carmine:

يدخل الكارمين فى عمل محاليل صبغية لصياغة التحضيرات الكاملة Whole mounts حيث أنه يصبغ أنوبه الخلايا. ومن أمثلة هذه المحاليل جرناشر بوراكس كارمين Grenacher's Broax جرناشر ألم كارمين Grenacher's alum carmine كما أنه يدخل فى محلول صبغ بست كارمين Best's carmine لصياغة الجليكوجين فى الأنسجة وكذلك الفيبرين والمخاطيات المتعادلة Neutral mucin.

صبغ جرناشر بوراكس كارمين Grenacher's Borax carmine:

* كارمين	Carmine	٢,٠ جم
* بوراكس	Borax	٤,٠ جم
* ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣

اخلط هذه المواد معا ثم اتركها لعدة أيام مع الرج يوميا، ويمكنك أن تغليها للإسراع فى عملية التحضير.

أضف ١٠٠ سم٣ من ٧٠٪ كحول وأترك الصبغ لعدة أيام مع الرج يوميا رشح المحلول قبل الاستعمال.

يميز الصبغ فى ٠,١٪ حمض يد كل فى ٧٠٪ كحول.

صبغ جرناشر ألم كارمين Grenacher's alum carmine:

* كارمين	Carmine	١ جم
* كبريتات الأمونيا الألومونيومية	Aluminium ammonium sulphate	٣ جم

* ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣

- اخلط هذه المكونات معا.
- اغلى لمدة ١٥ دقيقه أو حتى يذوب الكارمين ثم رشح.
- يميز الصبغ فى محلول ضعيف من حمض يد كل فى ٧٠٪ كحول.

صبغ بست كارمين Best's carmine:

المحلول الأساسى:

كارمين	Carmine	٢ جم
كربونات البوتاسيوم	Potassium Carbonate	١ جم
كلوريد بوتاسيوم	Potassium chloride	٥ جم
ماء مقطر	Distilled water	٦٠ سم٣

- اغل هذه المواد على نار هادئة فى قارورة كبيرة (لتجنب آثار الفوران) لمدة خمس دقائق ثم برد.
- أضف ٢٠ سم٣ من أمونيا مركزة.
- رشح وخزن الرشيح فى وعاء داكن اللون عند درجة ٤°م.
- المحلول صالح لمدة من شهر إلى شهرين.

المحلول الذى سيستعمل فى الصباغة Working Solution:

المحلول الأساسى	Stock solution	١٥ سم٣
أمونيا مركزة	Conc. Ammonia	١٢,٥ سم٣
كحول مثيلى	Methyl Alcohol	١٢,٥ سم٣

محلول تمييز بست Best's differentiator:

وهو يستخدم بعد الصباغة لإزالة الزائد من الصبغ فى القطاعات. وهو يحضر كما يلى:

كحول مثيلى	Methyl alcohol	٤٠ سم٣
كحول اثيلى	Ethyl alcohl	٨٠ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣

ويلاحظ أن فترة الصباغة بمحلول بست كارمين والمذكور فى طرق الصباغة هو للكارمين المحضر حديثا، وكلما مرت فترة على وقت تحضير المحلول الأساسى وجب زيادة فترة الصباغة.

صبغ ماير كارم ألم Mayer's Caralum:

هو صبغ يصبغ أنوية الخلاية بلون قرمزى وعادة ما يستخدم كصبغ إضافى مع التحضيرات

obeikandi.com

التى تصبغ فيها مكونات سيتوبلازمية بصبغات متخصصة ويلاحظ أن محلول الصبغ يفقد صلاحيته بعد مرور أسبوعين من تحضيره.

ويحضر الصبغ بالطريقة الآتية:

حمض كارمنك	Carminic acid	١ جم
كبريتات الألومنيوم البوتاسيومية	Aluminum Potassium Sulphate	١٠ جم
مـــاء مقطر	Distilled water	٢٠٠ سم^{٣}

سخن الخليط حتى يغلى ثم اتركه ليبرد حتى تصل درجة حرارته إلى درجة حرارة الغرفة. رشح ثم أضف ١ سم^{٣} فورمالين.

خامس عشر: فاست جرين Fast Green:

صبغ الفاست جرين حامضى ويستعمل أساسا فى تحضيرات التحميل الكامل لعمل أرضية مع صبغ الكارمين، كما يدخل هذا الصبغ فى تحضير محاليل أصباغ معينة.

يحضر محلول الصبغ عادة بتركيز ٠,١٪ أو ٠,٢٪ وذلك فى الماء أو فى ٩٥٪ كحول.

بعد الصباغة يجرى تمييز الصبغ فى المذيب.

يمكن تغيير اللون الأخضر للصبغ إلى الأزرق إذا ما غمست الشرائح فى كحول قلوى (كحول مذاب فيه بعض من كربونات اللثيوم).

سادس عشر: أورانج ج Orange G:

صبغ الأورانج ج حامضى ويستعمل أساسا فى تحضير التحميل الكامل لعمل أرضية للصباغة، كما يدخل هذا الصبغ فى تحضير محاليل أصباغ معينة.

يحضر الصبغ بتركيز ٢-٣٪ فى الماء أو كمحلول مشبع فى ٩٥٪ كحول.