

# **VOORSCHRIFTEN:**

Laboratorium voor

## **PATHOLOGISCHE-ANATOMIE**

- 1 = Alcianblue - P A S
- 2 = Alcianblue
- 3 = Amyloid kleuring
- 4 = Azan
- 5 = Bodian voor Neurofibrillen
- 6 = Congorood Amyloid
- 7 = Elastine kleuring (recept: Weigertse Elastine opl.)
- 8 = Feulgen
- 9 = van Gieson kleuring
- 10 = Glycogeen kleuring vlgs Best
- 11 = Gomori reticulinevezels
- 12 = Gomori trichroom
- 13 = Gram keratine of hoornkleuring
- 14 = Holzer gliavezels
- 15 = Kluver mergschdekkeuring
- 16 = van Kossa kalkkleuring
- 17 = Lendrum-Masson spierweefselkleuring
- 18 = Mallory dwarsspiervezels
- 19 = Mallory's P T A H methode voor fibrine
- 20 = Masson bindweefselkleuring
- 21 = Mayer haematoxiline-eosine kleuring
- 22 = Methyleenblauw
- 23 = Methylgroen-Pyroninekleuring
- 24 = Methylgroen-Pyronine vlgs Trevan
- 25 = Methylviolet Amyloid
- 26 = Mucicarmijn slijmkleuring
- 27 = P A S
- 28 = P.A.S.M. vlgs Jones
- 29 = Vetkleuring met Oil Red O
- 30 = Vetkleuring met Sudan III
- 31 = Toluidineblauw
- 32 = IJzerkleuring vlgs Perls
- 33 = Ziehl-Neelsen vlgs Schmorl

34 = Tellyesnicky fixatief

35 = Het invriezen van weefsels voor immunofluorescentie  
en histochemie

22 pag.

FIXATIEMETHODEN blz. 5 - 6

|                                            |      |   |
|--------------------------------------------|------|---|
| Neutrale gebufferde formaline              | blz. | 5 |
| Tellyesnicky fixatie                       | "    | 5 |
| Zenker- Formol- Trichloorazijnzuur fixatie | "    | 6 |
| Carnoy fixatie                             | "    | 6 |

KLEURINGEN blz. 7 - 22

|                                       |      |       |
|---------------------------------------|------|-------|
| Haematoxyline-Azofloxine              | blz. | 7     |
| Feulgen                               | "    | 8     |
| Giemsa voor coupes                    | "    | 9/10  |
| Van Gieson-elastine                   | "    | 11/12 |
| Gomori reticulinevezels               | "    | 13/14 |
| Gomori trichroom                      | "    | 15    |
| Methylgroen-pyronine = M.G.P.         | "    | 16    |
| Oil Red O voor vet kleuring           | "    | 17    |
| P.A.S.                                | "    | 18    |
| Perls, haemosiderine                  | "    | 19    |
| P.T.A.H. = Phosphotungstic Acid Haem. | "    | 20/21 |
| Toluidineblauw                        | "    | 22    |

36 = Dissociatie van sera

37 = Bepaling antistoffen glomerulaire basaalmembraan

Alcianblue -PAS

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq. dest
- 2 30 min. Alcian blue
- 3 spoelen in water
- 4 aq. dest
- 5 10 min. perjoodzuur 0,5%
- 6 spoelen in water
- 7 30 min. Schiff
- 8 15 min. spoelen in stromend water
- 9 Alcohol 80%, 96% abs. xylol

Bereiding

|          |       |
|----------|-------|
| IJsazijn | 3 ml  |
| aq. dest | 97 ml |
| alc.blue | 1 g   |

(pH 2,7 - 3)

Resultaat

zure mucopolisacchariden = blauw

neutrale (glyco + mucoproteiden) = magenta

kraakbeen en de meeste epitheliale mucines = purper-blauw

fungi = rood

Alcianblue

=====

30 min. alcianblue

even spoelen in water

5 min. kernechtrood

even spoelen in water

alcohol 80%, 96% abs. xylol, malinol

Bereiding

aq. dest      97 ml

ijsazijn      3 ml

alc.blue      1 g

(pH 2,7 - 3)

Amyloid kleuring

=====

- 1 voorbehandeling
- 2 in waterige methylviolet opl.  $\frac{1}{2}$  min.
- 3 water
- 4 differentieren in azijnzuur 1%
- 5 contrôleren met microscoop
- 6 water
- 7 druppel glycerinewater (glyc.water = 1:1)
- 8 dekglas
- 9 omranden met paraffine

Resultaat

Amyloid = rood

rest = blauw

Azan

====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2  $\frac{1}{2}$  uur in 56% stoof in azocarmijn
- 3 spoelen in water
- 4 + 1 uur in phosphorwolfraamzuur
- 5 spoelen in water
- 6 + 15 min. anilineblauw-oranje g
- 7 kort afspoelen in water
- 8 goed ontwateren, xylol, balsem

Bereiding

Azocarmijn: 0,1 g azocarmijn G in 100 ml aq.dest  
kort koken  
filtreren na afkoelen  
bij filtraat: 1 ml ijsazijn

Aniline-blauw-oranje G: 0,5 g anilineblauw (in H<sub>2</sub>O op1.6)  
2 g oranje G  
100 ml aq.dest  
8 ml ijsazijn  
koken, na afkoelen filtreren  
voor gebruik 1 op 3 verdunnen

Resultaat

Collagene vezels = blauw  
reticulair bindweefsel = blauw  
chromatine = rood  
spierweefsel = roodoranje  
ery's = rood  
gliaweefsel = rood  
slijm = blauw

# Bodian voor Neurofibrillen

=====

Beste fixatie: 5 ml formaline  
 5 ml ijsazijn  
 90 ml 80% alc.

- 1 ontparaffineren t/m aq. dest
- 2 24-48 uur in protargol A bij 37°
- 3 paar sec. in water
- 4 2-3 min. opl. B (tot geelwit)
- 5 goed spoelen in water
- 6 ± 3 min. opl. C (tot wit)
- 7 spoelen in water
- 8 10-15-30 min. in 20% oxaalzuur (vaal-violet)
- 9 3 x aq. dest
- 10 5 min. 5% Na thiosulfaat (blauw-violet)
- 11 water, alc., xylol, balsem

## Bereiding

Oplossing A: 1 g protargol in 10 ml aq. dest  
 Het protargol op het water strooien en juist voor het gebruik 5 g metallisch koper toevoegen (niet schudden)

Oplossing B: 1 g hydrochinon  
 5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   
 100 ml aq. dest

Oplossing C: 1%  $\text{AuCl}_3$  met op 100 ml 3 druppels ijsazijn

## Resultaat

Vezels = blauw, iets bruin-violet, protoplasma = idem,  
 kernen = ongekleurd, nucleolus = blauwzwart, myeline schede = ongekleurd



Congorood Amyloid

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq. dest
- 2 15 sec. lithiumcarbonaat
- 3 10-30 min. in 1% waterige congorood
- 4 15 sec. lithiumcarbonaat (opgieten, afgieten, opgieten)
- 5 ontkleuren in 80% alc. tot rode kleurstofslierten aflopen
- 6 15 min. stromend water
- 7 5 min. haematoxiline
- 8 blauwen in water
- 9 ontwateren, xylol, balsem

Resultaat

Amyloid = rood

Elastine kleuring

=====

- 1 voorbehandeling
- 2 Weigertse elastine opl. 10 min
- 3 spoelen in water
- 4 ontkleuren in alc. 96%
- 5 nakleuren in eosine
- 6 spoelen in water
- 7 alcohol 96%, 96%
- 8 carbol xylol, xylol
- 9 canadabalsem, dekglas

Recept: Weigertse Elastine oplossing

- 1 4 g Fuchsine
- 2 8 g Resorsine
- 3 400 cc H<sub>2</sub>O
- 4 koken 3 min.
- 5 toevoegen 50 cc ijzerchloride 66,6%
- 6 even laten koken: afkoelen  
filtreren en filtraat oplossen in 200 ml alc. 96%
- 7 koken filtreren en aanvullen tot 400 cc alc. 96%  
na toevoeging van 8 ml HCl

Resultaat

Elastische vezels = zwart  
rest = rood

## Feulgen

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq. dest
- 2 1 uur hydrolyseren in 1 N HCl
- 3 aq. dest
- 4 2 uur Schiff
- 5 30 min. water spoelen
- 6 aq. dest
- 7 10 min. alc. lichtgroen
- 8 afspoelen en differentieren in 96% alc.
- 9 alc.abs., xylol, balsem

Oplossing Schiff's reagens: zie PAS

lichtgroen: 0,25 g

alc. 70% 10 ml

## Resultaat

DNA = rood

overige weefsel = groen

Van Gieson kleuring  
=====

- 1 voorbehandeling
- 2 haematoxiline 6 min.
- 3 water tot diep blauw
- 4 van Gieson opl. (15 tellen)
- 5 water even
- 6 alcohol 96% en absoluut
- 7 afwerken

Recept: van Gieson oplossing

225 ml verz. pikrine zuur opl.  
25 ml zuur Fuchsine 1%

Resultaat

Bindweefsel = rood  
kernen = blauw  
spieren in bloed = geel

# Glycogeen kleuring vlgs Best

=====

- |    |                                                                                             |   |                              |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------|
| 1  | stukjes direct in alc. 96% 2 dagen                                                          | } | paraffine<br>ook<br>mogelijk |
| 2  | 2 dagen alc. aether                                                                         |   |                              |
| 3  | 2 dagen celloidine (dunne)                                                                  |   |                              |
| 4  | dikke celloidine                                                                            |   |                              |
| 5  | coupes in water met wat alc. 50%                                                            |   |                              |
| 6  | 5 min. haematoxiline 10 min.                                                                |   |                              |
| 7  | blauwen in water                                                                            |   |                              |
| 8  | alc. 70% (opgieten, afgieten, opgieten, 10 min.)                                            |   |                              |
| 9  | 10 min. Best oplossing 20 min.                                                              |   |                              |
| 10 | even differentieren in differentiatievloeistof<br>vlgs Best tot celloidinerand ontkleurd is |   |                              |
| 11 | alc. 96%, carbol-xylol, xylol, balsem                                                       |   |                              |

## Bereiding

Bestoplossing: 2 delen gefiltreerd carmijn (stamopl.)  
 3 delen 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$   
 3 delen methylalc. vers maken

Best differentiatievloeistof: 4 ml methylalc.  
 8 ml abs. alc.  
 10 ml aq. dest

Stamoplossing Best carmijn: 2 g carmijn (opt. rubr. Grüber)  
 1 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$   
 5 g KCl  
 60 ml aq. dest

Voorzichtig koken. Na afkoeling 20 ml 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  toevoegen  
 Vóór gebruik filtreren

## Gomori Reticulinevezels

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 1-2 min.  $\text{KMnO}_4$  0,5%
- 3 spoelen met water
- 4 1 min. K metabisulfiet 1-3% tot wit
- 5 goed afspoelen met water
- 6 1 min. ijzerammoniumsulfaat 2%
- 7 3-5 min. spoelen met water
- 8 3 x spoelen met aq.dest
- 9 1 min. ammoniakzilveropl. (precies!)
- 10 10 sec. in 2 bakjes aq.dest
- 11 5 min. neutrale formaline
- 12 spoelen met water
- 13 10 min.  $\text{AuCl}_3$  0,1-0,2%
- 14 spoelen met water
- 15 1 min. 1-3% K metabisulfiet
- 16 niet afspoelen met water!
- 17 1 min.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1%
- 18 water
- 19 ontwateren, xylol, balsem

Bereiding Ammoniakale zilveroplossing:10 ml 10%  $\text{AgNO}_3$ 

2 ml 10% KOH

druppelsgewijs sterke  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% toevoegen. Na iedere druppel schudden. Doorgaan tot neerslag bijna verdwenen is. Dan druppelsgewijs 10%  $\text{AgNO}_3$  toevoegen tot weer neerslag ontstaat (blijvend). Dan 1 x verdunnen.

Neutrale formaline: 10 ml formaline 40%

10 ml  $\text{CaCl}_2$  10%

80 ml aq.dest

Op de bodem van de fles  $\text{CaCO}_3$ 

Bij gebruik 1:10 verdunnen

Resultaat

Reticulinevezels = zwart

Gomori trichroom

=====

- 1 Ontparaffineren etc.
- 2 Bouin 1 uur bij 60°C
- 3 spoelen in stromend water tot kleurloos
- 4 Haematoxiline vlgs Mayer 10 min.
- 5 stromend water 15 min.
- 6 Trichroom-oplossing 5-10 min.
- 7 ev. azijnzuur 0,5%, kort
- 8 grondig afspoelen, ontwateren, afwerken

|                            |                        |        |
|----------------------------|------------------------|--------|
| <u>Trichroomoplossing:</u> | Chromotroop 2R         | 600 mg |
|                            | anilineblauw           | 300 mg |
|                            | phosphorwolframaamzuur | 800 mg |
|                            | azijnzuur              | 1 ml   |
|                            | aq.dest                | 100 ml |

Resultaat

Spiervezels = rood  
collageen = blauw  
kernen = paars  
erythrocyten = felrood  
strepen in dwarsgestreepte spier duidelijk zichtbaar

Gram Keratine of hoornkleuring

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 5 min. kernechtrood
- 3 3-5 min. carbol. gentiaanviolet
- 4 vlug afspoelen met aq.dest
- 5 drogen met filtreerpapier
- 6 3 min. lugol
- 7 drogen met filtreerpapier
- 8 kort differentieren in HCl alc., dan  
in alc.abs. tot geen kleurstof meer afloopt
- 9 ontwateren in schone alc.abs., xylol, balsem

Resultaat

Kernen = rood

Hoorn = diepviolet



## Holzer Gliavezels

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 3 min. in: (10 ml 0,5% waterige oplossing van vers bereide  
phosphormolybdeenzuur en 20 ml 96% alc.)
- 3 coupe afdrogen met filtreerpapier (voorzichtig!)
- 4 2 min.: (10 ml abs. alc.  
(40 ml chloroform
- 5 30 sec. in:( 8 ml abs. alc.  
( 32 ml chloroform  
( 2 g kristalviolet
- 6 vlug in alc. chloroform aa
- 7 in abs.alc., alc. 96% t/m aq.dest
- 8 1 min. 10% KBI
- 9 aq.dest
- 10 goed afvloeien met fijn filtreerpapier
- 11 differentieren in (18 ml anilineolie  
(27 ml chloroform
- 12 2 x xylol, balsem

Bereiding

Alle oplossingen van te voren klaar zetten in kleine cuvetjes.  
Hoe sneller deze kleuring verloopt, hoe beter. Zo min mogelijk  
met deze coupe in de lucht. De kleuring mislukt meestal, als de chloroform  
verdamp of niet zuiver is. 50% mislukt altijd, dus altijd in duplo werken.  
Het differentieren gebeurt onder microscopische kontrôle.

# Kluver Mergschedekleuring

=====

- 1 ontparaffineren in xylol 15 min.
- 2 2 x even in alc.abs.
- 3 2 x even in alc. 96%
- 4 oplossing A filtreren
- 5 16-24 h. 57°C in opl. A (goed afsluiten)
- 6 overmaat kleurstof verwijderen in alc. 96%
- 7 aq.dest
- 8 5 sec. differentieren in 0,05% lith.carbonaat, 8 ml - 200 ml
- 9 dan in verse portie alc. 70% tot duidelijk contrast tussen  
grijze en witte stof (niet overdifferentieren!)
- 10 aq.dest
- 11 5 sec. differentieren in 0,05% lith.carbonaat
- 12 aq.dest
- 13 6-10 min. in opl. B
- 14 differentieren in alc. 96%
- 15 xylol, balsem

## Bereiding

Oplossing A: 1 g luxol fas Blue opl. 1 ltr alc. 96%  
5 ml 10% CH<sub>3</sub>COOH

Oplossing B: 0,3% waterige oplossing van cresyl echtviolet  
+ 5 druppels 10% CH<sub>3</sub>COOH per 30 ml oplossing

## Resultaat

cellen = paars,  
myeline scheden = blauwe bundels of ringen tegen een ongekleurde  
achtergrond.

Lukt altijd.

## v. Kossa kalkkleuring

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2  $\frac{1}{2}$  uur in 5%  $\text{AgNO}_3$  sterk belichten
- 3 spoelen in aq.dest
- 4 paar min. in pyrogallolopl. 1%
- 5 spoelen in aq.dest
- 6 3-5 min. Na thiosulfaat 1%
- 7 spoelen met water
- 8 5 min. kernechtrood
- 9 spoelen met water
- 10 ontwateren, xylol, balsem

Resultaat

Kalk = zwart

kernen = rood

Lendrum-Masson      Spierweefselkleuring

=====

- 1    ontparaffineren t/m aq.dest
- 2    10 min. celestine blauw
- 3    spoelen in water
- 4    10 min. haematoxiline
- 5    blauwen in water
- 6    5-10 min. lissaminerood bij 56°C
- 7    afdrogen
- 8    5 min. phosphormolybdeenzuur 1% bij 56°C  
phosphormolybdeenzuur eerst 5 min. voorverwarmen
- 9    uitspoelen in 1% CH<sub>3</sub>COOH ± 10 sec.
- 10   tartrazine ± 10 sec.
- 11   alc. 70%, 96% abs., xylol, balsem

Bereiding

Celestine blauw:    5 g ijzeraluin in 100 ml aq.dest  
1 dag laten oplossen.  
daarna: 0,5 g celestine blauw  
3 min. koken, afkoelen, filtreren  
toevoegen 7 ml glycerine

Lissamine rood:    1 g    lissaminerood in 100 ml  
1½%    CH<sub>3</sub>COOH

Tartrazine        :    1,5 g    tartrazine in 100 ml  
1,5%    CH<sub>3</sub>COOH

Resultaat

Spierweefsel = rood

bindweefsel    = geel



Mallory's P T A H methode voor fibrine

- 1 breng de coupes in water. Verwijder de kwikbestanddelen met jodium, verwijder jodium met alcohol.
- 2 breng in  $K_2Cr_2O_7$  - 3% 3 dln  
HCl - 10% 1 dl
- 3 was in water
- 4 differentieer 1 min. in zure  $KMnO_4$  1 min.  
(47,5 ml 0,5%  $KMnO_4$  met 2,5 ml 3%  $H_2SO_4$ )
- 5 was in water
- 6 1% oxaalzuur tot wit
- 7 spoel in water en breng in P T A H (12-24 uur)
- 8 laat kleurstof eraf lopen (niet in water; dit verwijdert het rood)
- 9 alcohol 99% (het blauw wordt gedifferentieerd)
- 10 xylol, malinol

Resultaat

Fibrine = blauw

erythrocyten = donker blauw

kernen = licht blauw

**Masson      Bindweefselkleuring****=====**

- 1    ontparaffineren t/m aq.dest
- 2    5 min. ijzerhaematoxiline toevoegen vlgs Weigert A + B aa
- 3    afspoelen in water
- 4    1-5 min. Ponceau de xylidine
- 5    spoelen in water
- 6    5-10 min. 1% phosphormolybdeenzuur bij 56°C
- 7    direct in lichtgroen 1 min.
- 8    afspoelen in water
- 9    alc., xylol, balsem

Bereiding

Ponceau de xylidine:    0,9 g    ponceau de xylidine  
                              0,1 g    zuurfuchsine  
                              1 ml     $\text{CH}_3\text{COOH}$   
                              100 ml aq.dest

Lichtgroen:               0,15 g    lichtgroen  
                              0,2 ml     $\text{CH}_3\text{COOH}$   
                              100 ml    aq.dest

Mayer    haematoxiline-eosine kleuring  
 =====

- 1 xylol
- 2 3 x alcohol 96% + 1 min.
- 3 water + 1 min.
- 4 haematoxiline 8 à 10 min.
- 5 blauwen in H<sub>2</sub>O + 20 min.
- 6 eosine 10 à 15 sec.
- 7 even in H<sub>2</sub>O
- 8 alcohol 96% 3 x
- 9 carbol xylol
- 10 xylol
- 11 afwerken

Recept

1 liter H<sub>2</sub>O 80°C  
 50 g aluin  
 1 g haematoxiline

Haematoxiline: 200 mg Jodas natrium  
                   25 g chloral hydraat  
                   ½ g citroen zuur

Eosine: 2 g eosine op 1 ltr H<sub>2</sub>O

Resultaat

Kernen = blauw  
 rest = rood



Methyleenblauw

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 1 min. Löffler's methyleenblauw
- 3 kort spoelen in water
- 4 alc. 80%, alc. 96%, alc.abs.
- 5 xylol, balsem

Oplossing: methyleenblauw (Löffler)

30 ml verzadigde alc. methyleenblauw opl.  
99 ml aq. dest  
1 ml KOH 1%

Verzadigde alc. methyleenblauw opl.

0,2 g methyleenblauw  
100 ml alc. 96%

Methylgroen-Pyroninekleuring

=====

I    Fixatie:    Zenker 1 uur; 24 uur spoelen in kraanwater

II   Lugol's opl.   spoelen water -  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$   
                             spoelen in water

- 1   half uur kleuren
- 2   wassen in water
- 3   afvloeien
- 4   aceton
- 5   aceton-xylol (gelijke delen) 1:1
- 6   xylol
- 7   balsem

Depjes:   kleuren, water, drogen, insluiten

Resultaat

R N A = rood

D N A = groen

Methylgroen pyronine vlgs Trevan

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 contrôlecoupe 1 uur bij 37°C in ongefiltreerd, tot 65°C verwarmd  
pancreassap
- 3  $\pm \frac{1}{2}$  uur in Trevan oplossing
- 4 4-6 sec. aq.dest
- 5 (afvloeien) kan eventueel weggelaten worden
- 6 aceton
- 7 aceton - xylol 1:1
- 8 aceton - xylol 1:9
- 9 xylol, balsem

Recept:

60 mg methylgroen in 3 ml A D (eventueel uitschudden met chloroform)  
175 mg pyronine opl. 53,5 ml A D

Resultaat

ribonucleinezuren (RNA) = rood  
in pancreassap - ribonuclease - RNA in  
contrôlecoupe ontleed en niet meer aanwezig

# Methylviolet    Amyloid

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 enkele seconden methylviolet
- 3 afspoelen met water
- 4 differentieren in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1%
- 5 afspoelen onder de kraan
- 6 drogen met filtreerpapier
- 7 afdekken met fructosestroop

## Bereiding

methylvioleto<sub>1</sub>.    + 0,5% methylviolet (mespunt) in 100 ml aq.dest  
(fructosestroop is in de handel)

## Resultaat

Amyloid = rood  
rest      = blauw

Mucicarmijn                      slijmkleuring  
=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 5 min. haematoxiline
- 3 blauwen
- 4 5-10 min. mucicarmijnoplossing
- 5 afspoelen
- 6 ontwateren, xylol, balsem

Bereiding

Stamoplossing mucicarmijn:    1 g    carmijn  
                                         0,5 g  $\text{AuCl}_3$  + 2 ml aq.dest  
                                         voorzichtig koken (+ 2 min.) tot kleur  
                                         helrood tot donkerrood is. Bij hete oplossing  
                                         al roerend 400 ml alc. 50% toevoegen.  
                                         Na 24 uur filtreren

Voor gebruik

1 deel mucicarmijn  
10 delen aq.dest

P A S

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 15 min. 0,5% perjoodzuur
- 3 aq.dest
- 4 30 min. Schiff
- 5 30 min. stromend water
- 6 2 min. haematoxiline
- 7 blauwen in water
- 8 alcohol 80%, alcohol 96%, alcohol abs.
- 9 xylol, balsem

#### Oplossing

- 1 g pararosaniline in 30 ml 1 N HCl
  - 1 g K Metabisulfiet in 170 ml aq.dest
  - 24 uur laten staan; schudden met Norit, filtreren
- Moet helder worden

#### Resultaat

Polysacchariden = lila-rood  
kernen = blauw

P.A.S.M. vlgs Jones

=====

Coupes mogen niet dikker zijn dan 1  $\mu$

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 15 min. perjoodzuur 0,5%
- 3 minstens 3 x omspoelen met aq.dest
- 4 zilvermethenamine (voorverwarmd) op 60°C, 30-60 min.  
na ca. 10 min. de coupes om de 10 min. microscopisch controleren
- 5 goed naspoelen met aq.dest
- 6 goudchloride 0,2% tot zuiver grijs, geen bruine tint  
spoelen in water
- 7 natriumthiosulfaat 5% 5 min.
- 8 afspoelen en tegenkleuren: a. PTAH 1 nacht of  
b. Haematoxiline vlgs Harris 2 min,  
stromend water 5 min.  
azophloxine 10-30 sec.  
even afspoelen, ontwateren, insluiten

|                    |                   |    |       |
|--------------------|-------------------|----|-------|
| Zilvermethenamine: | Methenamine       | 3% | 95 ml |
|                    | AgNO <sub>3</sub> | 5% | 5 ml  |
|                    | Borax             | 5% | 12 ml |

### Resultaat

Basale membranen=zwart

Vetkleuring met Oil Red O

=====

- 1 vriescoupes in water
- 2 15 min. Oil Red O- oplossing
- 3 spoelen in water
- 4 5 min. haematoxiline
- 5 spoelen in water
- 6 op glaasje vissen, voorzichtig afvloeien
- 7 insluiten met glycerine-gelatine

Oplossing

Stamoplossing Oil Red O:

0,5 g O.R.O. oplossen in 100 ml 98% isopropanol

Voor het gebruik: 6 ml stamopl.

4 ml water

10 min. laten staan. filtreren

Enige uren houdbaar

Resultaat

Vet = helrood

kernen = blauw



### Vetkleuring met Sudan III

- 1 vriescoupe in water
- 2 10 sec. alcohol 50%
- 3 15-20 min. in gefiltreerd Sudan III
- 4 even in alcohol 50%
- 5 voorzichtig spoelen in water
- 6 5 min. haematoxiline
- 7 blauwen in water
- 8 op glaasje vissen, voorzichtig afvloeien
- 9 glycerine-gelatine

### Oplossing

200-300 mg Sudan III, overgieten met 100 ml alcohol 70%  
paar uur in stoof van 56°C  
Filtreren vóór gebruik

### Resultaat

Vet = rood-oranje  
kernen = blauw

Toluidineblauw  
=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 + 15 sec. toluidineblauw
- 3 kort spoelen in water
- 4 even in alc. 96%, alc.abs.
- 5 door toluol I en toluol II
- 6 balsem

Oplossing

Toluidineblauw:

0,1 - 0,2 g toluidineblauw  
100 ml aq.dest

Resultaat

Metachromatisch weefsel = rood  
rest = blauw

IJzerkleuring vlgs Perls

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 10 min. ijzerkleuringsmengsel
- 3 aq.dest
- 4 5 min. kernechtrood
- 5 alcohol 80%, alcohol 96%, alcohol abs.
- 6 xylol, balsem

Oplossing: IJzerkleuringsmengsel: 2% K ferrocyanide  
4% (of 1 N) HCl  
gelijke delen in reageerbuis  
verwarmen en heet op de coupe doen

Kernechtrood: 0,1 g in 100 ml 5% waterige  
ammoniumsulfaat, oplossing onder  
verhitting en goed roeren. Oplossen.  
na afkoelen filtreren

Resultaat

Fe = blauw  
kernen = rood

# Ziehl-Neelsen      vlgs Schmorl

=====

- 1 ontparaffineren t/m aq.dest
- 2 10 min. haematoxiline
- 3 blauwen
- 4 1 uur 37°C carbol-fuchsine
- 5 even HCl-alc. 2,5%
- 6 differentieren in 70% alc.
- 7 verzadigde lithiumcarbonaat
- 8 water
- 9 ontwateren, xylol, balsem

## Bereiding      Zoutzure alc. 5%:

|      |     |        |
|------|-----|--------|
| HCl  | 38% | 25 ml  |
| alc. | 70% | 175 ml |

## Zoutzure alc. 2,5%:

|      |     |          |
|------|-----|----------|
| HCl  | 38% | 62,5 ml  |
| alc. | 70% | 937,5 ml |

|      |     |        |
|------|-----|--------|
| HCl  | 25% | 50 ml  |
| alc. | 70% | 450 ml |

## Resultaat

Bacteriën = rood  
weefsel    = blauw

Tellyesniczsky fixatief

=====

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ethanol 96%         | 737 ml |
| buffer              | 63 ml  |
| aqua dest           | 200 ml |
| formaldehyde 35-40% | 100 ml |
| ijsazijn            | 50 ml  |

Buffer

|                                                    |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4,6 g   |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                          | 10,8 g  |
| aqua dest                                          | 1000 ml |

Fixatietijden

|                  |            |
|------------------|------------|
| Naaldbiopsie     | 2 - 4 uur  |
| Open biopsie     | 4 - 24 uur |
| Stukjes 5x5x5 mm | 24 uur     |

Doorvoeren (voor stukjes van 5x5x5 mm)

Alcohol: max.  $2\frac{1}{2}$  uur totaal, in 3 porties

Toluol, 10% aceton ca 30 min.

Xylol 2x 30 min.

Paraffine bij  $60^{\circ}\text{C}$  3-4 uur in 2 porties.

## INLEIDING

Wanneer we een weefsel als onderzoekmateriaal willen bewaren, moeten we het conserveren. De werking van de eigen enzymen moet worden stopgezet, en bacteriën mogen geen kans krijgen.

Dit kan gebeuren op twee manieren:

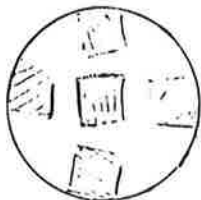
- I Bevriezen en bij temperatuur ver onder  $0^{\circ}$  bewaren;
- II Fixeren en daarna insluiten in paraffine.

### I Bevriezing

Wanneer we een weefsel zo snel mogelijk bevriezen, liefst in vloeibare stikstof, dan blijven samenstelling en structuur behouden.

We bewaren het bij voorkeur beneden de  $-30^{\circ}\text{C}$ , daar boven deze grens een langzame ijskristal vorming optreedt, waardoor op den duur het weefsel ernstig kan worden beschadigd.

## HET INVRIEZEN VAN WEEFSELS VOOR IMMUNOFLUORESCENTIE EN HISTOCHEMIE



Het weefsel wordt in blokjes gesneden van 4 tot 5 mm lang, breed en dik. Deze blokjes worden ingevroren door ze, los van elkaar, op de bodem van een aluminium blikje te leggen (b.v. een filmkokertje), dit dicht te schroeven en onder te dompelen in vloeibare stikstof, met behulp van een korentang of een zeer groot pincet, totdat de stikstof niet meer kookt.



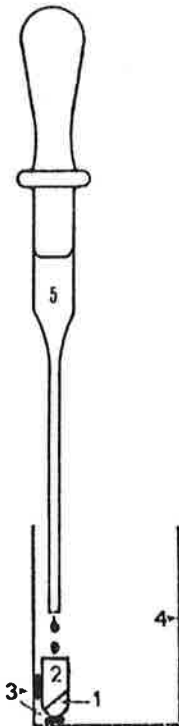
Bij gebrek aan stikstof kan men aceton gebruiken, die gekoeld is met behulp van koolzuursneeuw (koudijs):

Bekerglas niet meer dan half vol aceton, weinig koolzuursneeuw tegelijk toevoegen en telkens wachten tot het niet meer heftig kookt, temperatuur steeds kontroleren met thermometer. Voordat weefsel wordt ingevroren moet de vloeistof minstens  $-70^{\circ}\text{C}$  zijn.

### Opmerkingen:

- A. Hoe sneller een weefsel bevriest, hoe minder kans op beschadiging door ijskristalvorming.
- B. Wanneer het weefsel zelf direkt in aanraking komt met de vloeibare stik-

- stof, resp. aceton, veroorzaakt dit sterke beschadiging door uitdroging.
- C. Opslag en vervoer in ieder geval beneden  $-30^{\circ}\text{C}$ , bij voorkeur beneden  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ook bij verplaatsing over kortere afstanden moet men zorgen, dat de temperatuur in ieder geval nooit stijgt boven de  $-30^{\circ}\text{C}$ .



#### BIOPSIEËN EN ANDERE ZEER KLEINE STUKJES

Inbedden in gelatine (Difco) 10% in gebufferde fysiologische zoutoplossing.

Het meest praktisch, vooral voor naaldbiopsieën, is een gelatinekapsule (Eli Lilly and Company Ltd, Basingstoke, England, nummer 3) waar men de biopsie onder een hoek in plaatst (zie tekening 3), hierna plakt men de kapsule vast aan bodem en zijkant van het blikje met behulp van een druppeltje gelatine, vult aan met gelatine en bevriest dan zo snel mogelijk, maar zonder dat stikstof resp. aceton bovenin het blikje loopt. Dan draait men zo snel mogelijk het deksel erop en dompelt het nog eens geheel onder.

## II A. Fixatie

Fixatieven hebben altijd tijd nodig om in een weefsel door te dringen, waarbij binnenin de enzymatische afbraak (autolyse) voortgaat, terwijl zeer kleine weefselstukjes moeilijk vast te houden zijn zonder dat men ze fijnknijpt. Men is dus bij het uitsnijden van gedeelten van organen of tumoren gebonden aan een boven- en een ondergrens. Het meest praktisch zijn:

of: blokjes ter grootte van een erwt, middelfijn

of: plakken, die wat langer en breder mogen zijn, niet dikker dan 2 geldstukken.

Er bestaan verschillende bewaarvloeistoffen voor weefsels, die diverse neveneigenschappen hebben:

- ze maken de weefseleiwitten, of althans de meeste, onoplosbaar in water;
- ze beïnvloeden de stevigheid;
- ze beïnvloeden de doorlaatbaarheid, zie punt II B;
- en tenslotte is er een sterke invloed van het fixatief, i.v.m. de chemische geschiktheid, op de kleuringen die men later kan doen.

Er zijn kleuringen waarvoor maar één fixatief geschikt is, en geen enkel fixatief is geschikt voor alle kleuringen.

Het oudste en nog steeds het meest gebruikte fixatief is de 10% formaline die gebufferd moet zijn op een pH tussen  $6\frac{1}{2}$  en  $7\frac{1}{2}$ .

Uit formaline (HCOH) wordt nl. door oxydatie tijdens het bewaren mierenzuur (HCOOH) gevormd, zodat de pH daalt. Mede hierdoor zijn in ongebufferde formaline de weefselconservering en kleurbaarheid vaak beneden alle peil, bovendien wordt bij aanwezigheid van bloedafbraakprodukten een lelijk bruin pigment gevormd.

Bij ons wordt ook veel toegepast het mengsel van Tellyesnicksky, dat een veel betere morfologie geeft; één van de nadelen van dit mengsel is, dat men het weefsel er niet langer dan 24 uur in mag laten, terwijl het in formaline zeer lang bewaard kan worden.

Voor noodgevallen, zoals onverwacht overlijden van een proefdier in het weekend, is ook alcohol 70% heel bruikbaar.

## II. B.

Het tweede wat we moeten doen, is het weefsel hard maken: van een materiaal dat meegeeft, kan men geen dunne plakjes snijden. Bij het bevriezen van weefsel gaat dit in één moeite door; gefixeerd weefsel moet van water worden ontdaan en worden geïmpregneerd met een stof die we hard kunnen laten worden. De meest gebruikte is paraffine of een variant daarvan.

Dit gebeurt door achtereenvolgens:

1. Het water te onttrekken door het weefsel enige tijd te laten verblijven in stijgende percentages alcohol, ieder een half tot één uur, afhankelijk van de grootte.
2. Het daarna te doen in xylol, 2 porties, elk een half tot één uur.



3. Vervolgens enkele uren (4 tot 16 uur) in gesmolten paraffine, ook 2 porties op  $58^{\circ}\text{C}$ .
  4. Tenslotte giet men paraffine in een geschikt bakje, legt het weefsel erin met een verwarmd pincet, en laat dan het blok met het weefsel erin stollen. Na enig bijsnijden worden dunne coupes gesneden (1 tot 6  $\mu$ ) op een microtoom; met een geschikt plakmiddel worden de coupes op een objectglas geplakt. Meestal neemt men hiervoor een oplossing van ca 0,5% eialbumine. Dit kleeft minder goed dan vele andere eiwitten, maar heeft het grote voordeel, dat het zeer weinig kleurstof opneemt. Neemt men een plakmiddel, dat duidelijk gekleurd wordt, dan ligt er later een gekleurde waas over het preparaat of er zijn storende gekleurde randen.
- Voor we gaan kleuren, nadat de coupes minstens 10 minuten gedroogd zijn onder lichte verwarming, wordt de paraffine weer verwijderd:
- xylol-xylol-alcohol 96%-alcohol 96%-alcohol 96%, ieder een kwart tot een halve minuut, daarna water.

FIXATIEMETHODENNeutrale gebufferde formaline

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Formaldehyde 37 to 40% | 100 ml |
| Stock fosfaatbuffer    | 100 ml |
| Aqua dest.             | 800 ml |

Fosfaatbuffer 0,01 M      pH 7,2

10 x geconcentreerd, voor 600 ml

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ | 8,5 g  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                        | 1,64 g |
| NaCl                                            | 52,5 g |
| Aqua dest. tot                                  | 600 ml |

Indien pH te hoog, bijstellen met  $\text{H}_3\text{PO}_4$  geconcentreerd.Tellyesnicksky fixatie

|                    |        |                                |
|--------------------|--------|--------------------------------|
| Ethanol 96%        | 737 ml |                                |
| Buffer (zie onder) | 63 ml  |                                |
| Aqua dest.         | 200 ml |                                |
| Formaldehyde 40%   | 100 ml | <u>Fixatie 24 uur maximaal</u> |
| IJsazijn           | 50 ml  |                                |

Buffer

|                                                    |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4,6 g   |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                          | 10,8 g  |
| Aqua dest.                                         | 1000 ml |

Doorvoeren (zo snel mogelijk) Voor weefsels van ca 5 mm:

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| alc. 96%           | 1 uur                    |
| alc.abs.           | 1 uur                    |
| xylol + 10% aceton | $\frac{1}{2}$ -1 uur     |
| xylol              | $\frac{1}{2}$ -1 uur     |
| paraffine 60°C     | 2-4 uur, in twee porties |

Zenker- Formol- Trichloorazijnzuur fixatie

Speciaal voor de M.G.P. -kleuring; meeste andere kleuringen worden slecht.

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Aan Zenker toevoegen voor gebruik per | 90 ml |
| formaldehyde 38-40%                   | 5 ml  |
| trichloorazijnzuur                    | 5 ml  |

Fixatie van stukjes ca 1 uur per mm dikte, daarna spoelen in stromend water, minstens 1 nacht.

Zenker

|                                               |         |
|-----------------------------------------------|---------|
| HgCl <sub>2</sub>                             | 50 g    |
| K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | 25 g    |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>               | 10 g    |
| aqua dest.                                    | 1000 ml |

In dit fixatiemengsel ontstaan in het weefsel kwikkristallen, deze moeten uit de coupes worden verwijderd, nadat men ze heeft ontparaffineerd en voordat men gaat kleuren. Dit gebeurt met Lugol, b.v. 5 minuten 1%, daarna ontkleurd met 5% natriumthiosulfaat.

Lugol

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Kwik-jodide                      | 2 g |
| Oplossen in hoogstens 5 ml water |     |

Hierin oplossen 1 gram jodium; pas wanneer dit geheel is opgelost, aanvullen met aqua dest. tot 100 ml.

Carnoy fixatie

|            |       |
|------------|-------|
| Methanol   | 75 ml |
| Chloroform | 20 ml |
| IJsazijn   | 5 ml  |

Voor uitstrijken, waarin men de witte cellen wil zien en de erythrocyten onbelangrijk zijn, en voor cryostaatcoupes die bestemd zijn voor de M.G.P. kleuring.

Haematoxyline-Azofloxine

1. Ontparaffineren enz. tot water
2. Mayer's haematox. 10 minuten
3. Stromend water 15 minuten
4. Azofloxine 10-30 sec.
5. Even afspoelen, ontwateren en afwerken

Resultaat:

Kernen blauw

Cytoplasma rose tot rood

Bereiding:Mayer's haematoxyline

|                |       |
|----------------|-------|
| haematoxyline  | 1 g   |
| aqua dest      | 1 l   |
| Na-jodaat      | 0,2 g |
| aluminiumaluin | 50 g  |
| citroenzuur    | 1 g   |
| chloralhydraat | 50 g  |

In deze volgorde oplossen bij 80°C

Goed houdbaar

Azofloxine

|            |        |
|------------|--------|
| azofloxine | 2,0 g  |
| aqua dest  | 1 l    |
| ijsazijn   | 5,0 ml |

FEULGEN KLEURING

1. Ontparaffineren enz. tot water
2. 10 vol. % formaldehyde in methanol 1 nacht
3. Spoelen met aqua dest. 3 x
4. 1 uur HCl 5N
5. Aqua dest 3 x
6. Schiff 2 uur
7. Stromend water 30 minuten
8. Eventueel kort tegenkleuren met lichtgroen
9. Ontwateren en afwerken

Resultaat:

DNA rood

Achtergrond eventueel groen

GIEMSA voor coupes

Fixatie vriescoupes: methanol, Carnoy

1. Ev. ontparaffineren, tot alcohol
2. 5 minuten methanol
3. 5-6 minuten Jenner  
Niet afspoelen!
4. Direkt in Giemsa, verdund 1:20, 30-45 minuten
5. Afspoelen en differentiëren in 1% azijnzuur onder  
microscopische controle
6. Snel afspoelen en ontwateren in:  
    aceton  
    aceton + xylol ca 3 : 1  
    xylol  
    malinol

Resultaat:

Kernen blauw  
Cytoplasma blauw of rose  
bakteriën blauw

Bereiding:Jenner, stock:

|          |        |
|----------|--------|
| Jenner   | 1,0 g  |
| methanol | 400 ml |

Jenner, gebruikoplossing:

|            |       |
|------------|-------|
| stock      | 25 ml |
| aqua dest. | 25 ml |

Kan herhaaldelijk gebruikt worden en blijft lang goed.

Giemsa

Voor gebruik 1:20 verdunnen, water uit de kraan

Verdunning 1 x te gebruiken

Wordt kant en klaar geleverd

Azijnzuur 1%

ijsazijn            1 ml

aqua dest.        99 ml

Slechts één keer gebruiken.

Van GIESON-ELASTINE KLEURING

1. Ontparaffineren enz. tot in alcohol
2. Direkt van alcohol in Lawson, 10-15 minuten
3. Afspoelen in water, ontkleuren in alcohol, afspoelen in water
4. Mayer's haematox. 10 minuten
5. Blauwen ca 15 minuten
6. Van Gieson 5 minuten
7. Kort afspoelen en snel ontwateren en afwerken

Resultaat:

Elastine: donkerpaars tot zwart  
 Kernen bruin  
 Collageen bindweefsel rood  
 Hyaliene  
 Galpigmenten vaak grasgroen (Lillie p.396)

Bereiding:

Lawson (vrij naar WG-voorschrift pag. 51)

- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| 1. Gentiaanviolet BDH | 2 g    |
| Resorcine             | 4 g    |
| aqua dest.            | 100 ml |

Dit 3 minuten doorkoken

2. Toevoegen onder roeren:  
 15 ml  $\text{FeCl}_3$  29%

weer 3 minuten doorkoken

3. Toevoegen:  
 basische fuchsine (Grübler) 2 g  
 $\text{FeCl}_3$  29% 15 ml  
 aqua dest. 50 ml

drie minuten doorkoken



4. Filtreren - filtraat I, bewaren, en neerslag I
5. Neerslag I en gebruikte bekerglas drogen in de stoof
6. Toevoegen:

|             |        |
|-------------|--------|
| alcohol 96% | 150 ml |
|-------------|--------|

Aan de kook brengen en drie minuten doorkoken, daarna filtreerpapier eruit vissen, eventuele niet opgeloste neerslag eraf krabben en in de vloeistof doen.

7. Filtreren - filtraat II en neerslag II
8. Filtraat II met alcohol 96% aanvullen tot 150 ml  
toevoegen 4,5 ml geconcentreerd HCl
9. Neerslag II, filtraten I en II samen in hetzelfde bekerglas,  
aan de kook brengen
10. Toevoegen 4 g resorcine
11. Doorkoken en filter verwijderen als onder 6
12. Filtreren dit filtraat is kleurstof.

GOMORI Reticulinevezels KLEURING

1. Ontparaffineren tot aqua dest.
2.  $\text{KMnO}_4$  0,5% 1 minuut  
Afspoelen met water
3. K-metabisulfiet 2,5% 1 minuut  
Afspoelen met water
4. IJzeraluin 2% 1 minuut  
Afspoelen met aqua dest.
5. Ammoniakaal zilver 1 minuut  
Afspoelen met aqua dest., grondig maar snel
6. Neutrale formaline 5 minuten  
Afspoelen met aqua dest.
7. Goudchloride 0,2% 5 minuten  
Afspoelen in water
8. K-metabisulfiet 1 minuut  
Niet afspoelen! Alleen afgieten
9. Na-thiosulfaat 1% 1 minuut
10. Afspoelen, ontwateren en afwerken

Resultaat:

Reticulinevezels zwart

Eventueel kan men de kernen tegenkleuren met kernecht rood

Bereiding:

$\text{KMnO}_4$  : 500 mg in 100 ml aqua dest.

Houdbaar; mag meer dan eens gebruikt worden.

K-metabisulfiet: 2,5 g in 100 ml aqua dest

idem.

IJzeraluin: 2 g in 100 ml aqua dest.

idem.

Na-thiosulfaat: 1 g in 100 ml aqua dest.

Ammoniakaal zilver:

Iedere keer vers maken. Gemorste vloeistof meteen opvegen,  
de ingedroogde rest is soms explosief

|                   |     |       |
|-------------------|-----|-------|
| AgNO <sub>3</sub> | 10% | 10 ml |
| KOH               | 10% | 2 ml  |

Hieraan langzaam NH<sub>4</sub>OH toevoegen, tot de neerslag net opgelost  
is; vooral geen overmaat NH<sub>4</sub>OH!

Nu weer zilvernitraat 10% toevoegen tot de opnieuw gevormde  
neerslag net niet meer helemaal verdwijnt.

Tenslotte 1 op 1 verdunnen met aqua dest.

Neutrale formaline:

|                  |       |
|------------------|-------|
| Formaldehyde 40% | 10 ml |
| aqua dest.       | 40 ml |

In principe wel houdbaar, maar als het niet vaak gebruikt  
wordt is het verstandiger om het vers te maken i.v.m. het  
gehalte: formaline is een gas!

GOMORI TRICHROOM KLEURING

1. Ontparaffineren enz. tot in water
2. 1 uur Bouin bij 60°C
3. Spoelen in stromend water tot kleurloos
4. Mayer's haematoxyline 10 minuten
5. Trichroom kleurmengsel 10-20 minuten
6. Afspoelen onder de kraan, eventueel even differentiëren in azijnzuur ½%
7. Ontwateren en insluiten

Resultaat:

Kernen paars  
erythrocyten helderblauw  
fibrine rood  
meeste eiwitneerslagen in nierweefsel: diverse tinten rood  
myoide cellen, dwarsgestreepte spier: paars, eventueel  
rood met blauw gestreept

Bereiding:

Mayer: zie HA kleuring

Trichroom:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| chromotoop 2R                | 600 mg |
| anilineblauw (of lichtgroen) | 300 mg |
| fosforwolframzuur            | 800 mg |
| ijsazijn                     | 1 ml   |
| aqua dest.                   | 100 ml |

METHYLGROEN - PYRONINE = M.G.P. KLEURING

Beste fixatie voor weefsels: Zenker-formol-trichloorazijnzuur

(4-5 uur voor weefsels 4-5 mm, nacht stromend water)

Uitstrijken voor bloed of cellen: Carnoy ca 10 minuten

1. Ontparaffineren enz. bij Z.F.T.-fixatie pigment verwijderen
2. Lugol 5 minuten, afspoelen in water, Na-thiosulfaat 5% tot wit
3. M.G.P.-mengsel 5-30 minuten
4. Even afspoelen en ontwateren via:
  - aceton
  - aceton
  - aceton + xylol 9 + 1
  - xylol

Resultaat:

R.N.A. rood

D.N.A. groen tot groenpaars

Bereiding:

|             |                 |
|-------------|-----------------|
| Methylgroen | $\frac{1}{2}$ g |
| Pyronine    | $\frac{1}{2}$ g |
| Methanol    | 50 ml           |

Na oplossen toevoegen:

|            |        |
|------------|--------|
| aqua dest. | 100 ml |
|------------|--------|

Uitstekend houdbaar.

In allerlei boeken staan mooie ingewikkelde recepten, om de kleurstof te bereiden zodat D.N.A. echt groen wordt, maar het maakt weinig uit. De fixatie is hoofdzaak.

OIL RED O voor vet KLEURINGVriescoupes

1. Oil Red O, enkele seconden tot enkele minuten. Oppassen voor indrogen, geeft lelijke kristallen. (Het meest praktisch is om het trechtertje met het filtreerpapier, waarin de kleurstof, boven de coupe te houden, die plat boven de gootsteen ligt; men laat even kleurstof op de coupe druppelen, spoelt hem af door er met de andere hand koud water over te gieten, dan weer kleurstof erop en weer afspoelen enz.; dit ca 5 x)
2. Haematoxyline ca 10 minuten, blauwen, ev.  $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$  sec.  
Fast Green FCF
3. Afwerken met glycerine jelly, oppassen dat deze niet te warm is.

Resultaat:

Kernen blauw  
vetten oranje tot rood

Bereiding:Oil Red O, stock:

Oil Red O verzadigd in isopropylalcohol, d.i. ca 3%

Voor gebruik:

|                                                    |      |
|----------------------------------------------------|------|
| Stock                                              | 6 ml |
| aqua dest.                                         | 4 ml |
| 5-10 minuten laten staan en op de coupes filtreren |      |

Fast Green FCF:

|            |        |
|------------|--------|
| Fast green | 100 mg |
| aqua dest. | 100 ml |
| ijsazijn   | 0,2 ml |

P.A.S. KLEURING

1. Ontparaffineren tot water, spoelen in aqua dest.
2. Perjoodzuur  $\frac{1}{2}$  % 15 minuten
3. Goed spoelen met aqua dest
4. Schiff 30 minuten
5. Spoelen in stromend water minstens 20 minuten
6. Kernen kleuren in Mayer's haematoxyline 5 minuten
7. Stromend water 15 minuten
8. Ontwateren en afwerken

Resultaat:

Kernen blauw

Rood: basale membranen, glycogeen indien aanwezig, mucine, reticuline, fibrine, colloid, hyaliene thrombi, schildkliercolloid, amyloid e.a. Zie Lillie, pag. 198-202, 303-305

Bereiding:Schiff:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| a. Pararosaniline  | 1 g    |
| HCl 1 N            | 30 ml  |
| b. K-metabisulfiet | 1 g    |
| aqua dest.         | 170 ml |

a en b samenvoegen, 1 nacht in het donker laten staan, in een dichte fles of pot. Toevoegen een mespunt absorberende kool, even schudden en filtreren. Moet kleurloos zijn en blijven.

Perjoodzuur:

|              |       |
|--------------|-------|
| voorraad 50% | 1 ml  |
| aqua dest.   | 99 ml |

of:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| perjoodzuur, kristallen | 0,5 g  |
| aqua dest.              | 100 ml |

PERLS, haemosiderine KLEURING

1. Ontparaffineren enz. tot water
2. Goed spoelen en eventueel een poosje laten staan in aqua dest.
3. IJzerkleuringsmengsel 10 minuten
4. Aqua dest.
5. Kernecht rood 5 minuten
6. Ontwateren en afwerken

Resultaat:

haemosiderine en ander driewaardig Fe: Pruisisch blauw  
 kernen rood  
 cytoplasma rose

Bereiding:

|                |         |
|----------------|---------|
| K-ferrocyanide | mespunt |
| aqua dest.     | 4 ml    |
| HCl, 1N        | 4 ml    |

Opwarmen, maar niet laten koken. Heet op de coupe gooien. De exacte temperatuur schijnt onbelangrijk te zijn, zolang het maar boven kamertemperatuur en beneden kookpunt is; een temperatuur in graden wordt in geen enkel boek opgegeven!

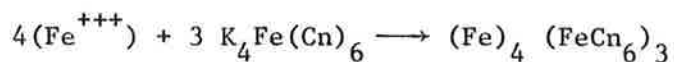
Kernecht rood:

|                  |        |
|------------------|--------|
| Aluminiumsulfaat | 5 g    |
| Aqua dest.       | 100 ml |

Hierin onder verwarming oplossen:

|              |       |
|--------------|-------|
| Kernechtrood | 0,1 g |
|--------------|-------|

Jaren houdbaar.

Reactie:

Dit is pruisisch blauw; Berlijns blauw is ferroferricyanide



P.T.A.H. = Phosphotungstic Acid Haematoxylin Kleuring

1. Ontparaffineren enz. tot water
2. K-bichromaat 3% met 5 vol.% ijsazijn, 1 uur bij 60°C
3. Spoelen in stromend water tot kleurloos (ca 10 min.)
4. 0,5%  $\text{KMnO}_4$  met 5 vol. %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3%, 1 minuut
5. Flink afspoelen
6. Oxaalzuur 1% tot kleurloos, afspoelen
7. PTAH 1 nacht, minstens. Langer kleuren is nooit schadelijk.  
Wanneer men haast heeft, mag het op hogere temperatuur door de kleurpot in de stoof te zetten, maar er is dan enig risico dat de coupe los laat van het objectglas.
8. Ontwateren en afwerken

Resultaat:

Kernen blauw

Fibrine, banden van dwarsgestreepte spier, soms erythrocyten:  
donkerblauwBereiding:K-bichromaat:

|              |        |
|--------------|--------|
| K-bichromaat | 3 g    |
| aqua dest.   | 100 ml |

Mag verwarmd worden.

Lang houdbaar.

K-permanganaat:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| $\text{KMnO}_4$ | 0,5 g  |
| aqua dest.      | 100 ml |

Koud oplossen

Redelijk houdbaar; na aanzuren slechts 1 x te gebruiken

Oxaalzuur:

|            |        |
|------------|--------|
| Oxzaalzuur | 1 g    |
| aqua dest. | 100 ml |

Koud oplossen

Goed houdbaar; kan herhaaldelijk gebruikt worden.

PTAH

|                    |    |   |
|--------------------|----|---|
| Haematoxyline      | 1  | g |
| fosforwolfraamzuur | 20 | g |
| aqua dest.         | 1  | l |

Ca 1 maand laten rijpen, liefst met wattenprop i.p.v. stop in de hals.

Jaren houdbaar, wordt steeds beter.

**TOLUIDINEBLAUW KLEURING**

1. Ontparaffineren enz.; vriescoupes kunnen ongefixeerd worden gekleurd
2.  $\frac{1}{2}$  tot enkele minuten kleuren in toluidineblauw 0,1%
3. Ontwateren via:
  - aceton 2 x
  - aceton + xylol ca 1 + 1
  - xylol
  - insluiten in malinol

**Resultaat:**

**Kernen blauw**

**metachromatische elementen paars, d.i. mestcellen, kraakbeen e.a.**

# DISSOCIATIE VAN SERA

=====

Serum in dialyseslang (1 cm breed) in citraatbuffer pH 3.2

1 nacht roeren op een magneetroerder bij +4°C

+ 3 uur roeren bij kamertemperatuur.

Het dissocieerde serum uit de slang in een Rose-test buisje doen.

In agglutinatieschaaltje: 2 druppels gedissocieerd serum

20 min. bestralen met UV-licht  
(germicideal lamp 20.000erg/mm<sup>2</sup>)

Toevoegen na bestraling: 1 druppel KaUVDNA

7 druppels boraatbuffer pH 8.3

In een Rose-test buisje doen

1 uur laten staan bij 37°C

Incuberen op normale rattelevercoupes; het ongedissocieerde serum

1:10 verdunnen met PBZ en ook incuberen op normale rattelevercoupes.

## BUFFERS : citraatbuffer pH 3.2

|                      |                                                    |
|----------------------|----------------------------------------------------|
| 2.101 gr citroenzuur | 12.6 ml eruit halen en vervangen door              |
| 100 ml aqua dest.    | 12.6 ml Na-citraat (0.1M=2.941gr/100ml aqua dest.) |

pH stellen op 3.2

aanlengen tot 500 ml

## boraatbuffer pH 8.3

6.184 gr boorzuur

9.536 gr borax                      oplossen in 1 liter aqua dest.

4.384 gr NaCl

pH stellen op 8.3

BEPALING ANTISTOFFEN GLOMERULAIRE BASAALMEMBRAAN (Passieve haemagglutina-  
===== natietechniek)

0 ery's 3x wassen in fysiologisch zout (PBZ)

4% suspensie maken (48 dr PBZ + 2 dr packed cells)

50 druppels tannine opl. toevoegen (5 mg/100 ml PBZ)

10 min. incuberen bij kamertemperatuur.

2x wassen in PBZ

Sol. BM antigeen 1:10 verdunnen in PBZ

1 deel packed cells + 3 delen antigeenoplossing

20 min. schudden bij kamertemperatuur

2x wassen in PBZ

De nu gecoate cellen oplossen in PBZ zodat een 4% suspensie verkregen wordt.

Deze suspensie testen met KaHGBM (van 1:2 tot 1:1024), voordat de cellen met patiëntensera worden geïncubeerd; door in een agglutinatieschaaltje 15 min. bij kamertemperatuur te schudden. Macroscopisch aflezen.

Ter kontrôle de sera incuberen met getanneerde ongecoate cellen.