

# 제12장. 염색 (Staining)

보통 2종류의 염색약으로 염색하는데 이를 2중 염색법(double staining)이라 하며 각각 염기성 색소, 산성색소를 사용한다. 식물조직은 일반적으로 safranin과 fast green을 사용하는데, 세포질이 충실한 조직은 hematoxylin과 eosin을 사용하기도 한다.



- Xylene I (5 min) -- Xylene II (5 min) -- 100% Alc. (2-5 min) -- 95% Alc. (2-5 min) -- 70% Alc (2-5 min) -- 50% Alc. (2-5 min) -- 30% Alc. (2-5 min) -- D. W. (1-2 min) -- Aqueous Safranin (1-12 hr) -- Washing -- 30% Alc. (2-5 min) -- 50% Alc. (5-10 min) -- 70% Alc. (5-10 min) -- 95% Alc. (5-10 min) -- Fast Green in 95% Alc. (5-30 sec) -- 100% Alc. I (5-10 min) -- 100% Alc. II (5-10 min) -- Carbol-Xylene (5-10min) (phenol:xylene=1:3) -- Xylene I (5 min) -- Xylene II (5 min) -- Xylene III (5 min)



## (1) 탈파라핀 (Deparaffin)

절단된 재료가 부착된 slide glass를 Xylene 용액속에 5~10분간 담가두면 파라핀이 제거되고, 이어서 Xylene을 제거하기 위해서 무수 알코올을 사용하며 수용성 염색을 하기 위해서 고농도에서 점점 낮은 농도의 알코올에 처리한다.

## (2) 가수

염색을 하기 위한 전처리 과정으로서 수용성 염색액을 사용할 경우에 필요하며 만약 염색용액이 수용액이 아니라면 가수를 할 필요가 없다. 파라핀이 제거된 세포안에 염색을 위한 물을 넣어주는 단계이다.

- (3) 염색 ; 수용성 염색액(Safranin)으로 1차 염색한다
- (4) 수세 ; 과잉의 염색액을 세척하는 단계로서 수세시간은 대개 10~20분이 적당하다.
- (5) 탈수;수용성 염색 후 세포 속의 물을 제거하는 과정
- (6) 염색; 2차 염색액인 Fast Green 으로 2차 염색한다
- (7) 투명화 ; 염색액으로 지지분해된 Slide glass를 깨끗하게 하는 단계
- (8) 파라핀 제거; 마지막으로 식물 재료 속에 남아 있는 paraffin을 완전히 제거하는 단계



- 가끔 파라핀 절편이 slide glass에서 떨어지는 경우가 있는데 그 이유는
  - 1) slide glass 에 지방질이 묻어 있을때
  - 2) 건조가 불충분할때
  - 3) 알부민 용액이 부패 또는 변질되었을 때
  - 4) 절편이 두텁고 소형일때
  - 5) 조직이 단단하며 완전히 slide glass에 붙지 않았을 때
  - 6) 갑자기 다른 시약으로 교환 할 때 등이다



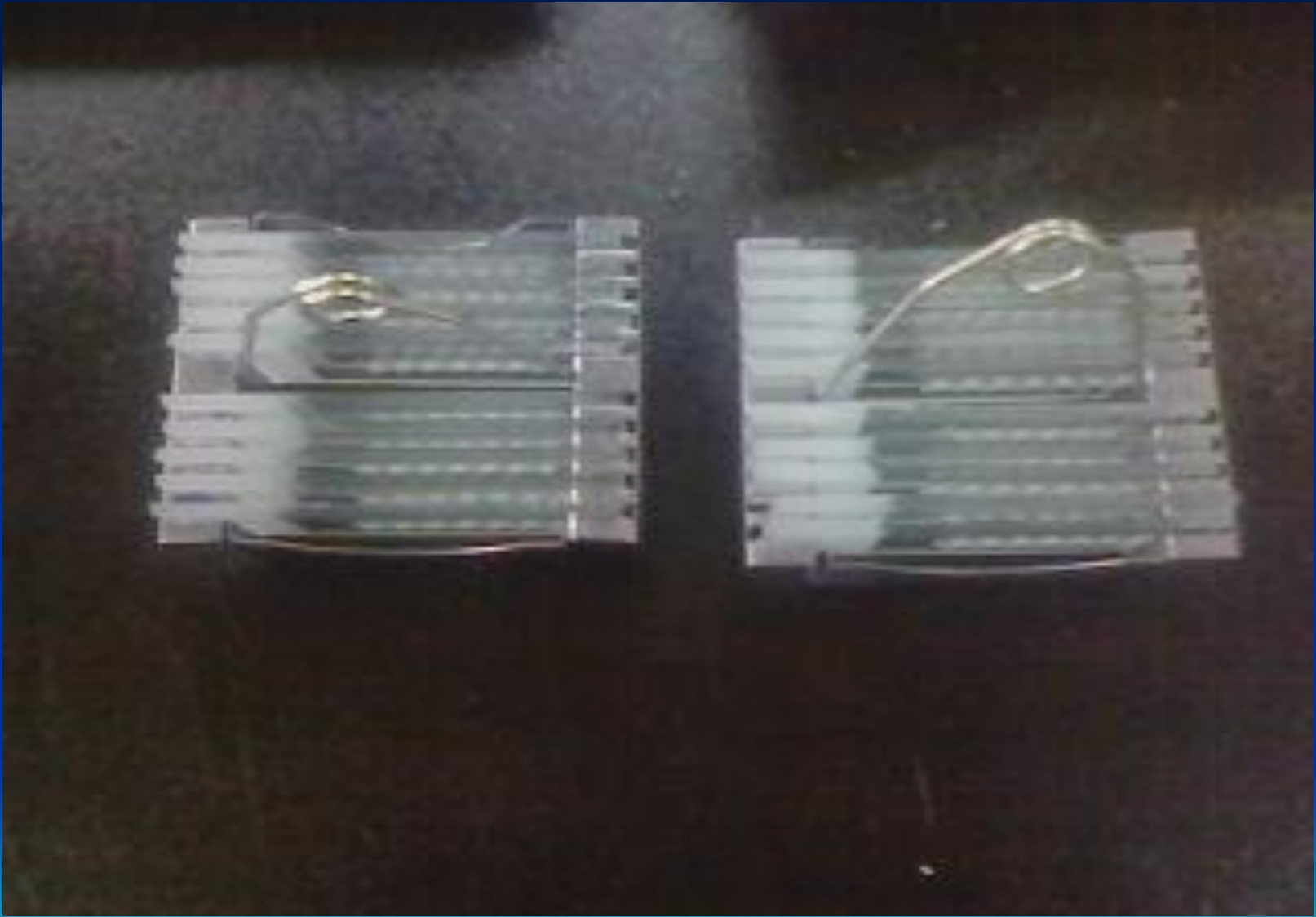
## <Staining>

\* William S. Sakai (Dept. of Botany, Univ. of Hawaii, Stain Technology, 48:247-249, 1973)

1. The slides are placed in 0.05% toluidine blue O in D.W. for 20-30 min.
2. Rinsed in water for 1 min and allowed to air dry
3. The paraffin is removed with 2 changes of xylene and the cover slip is mounted

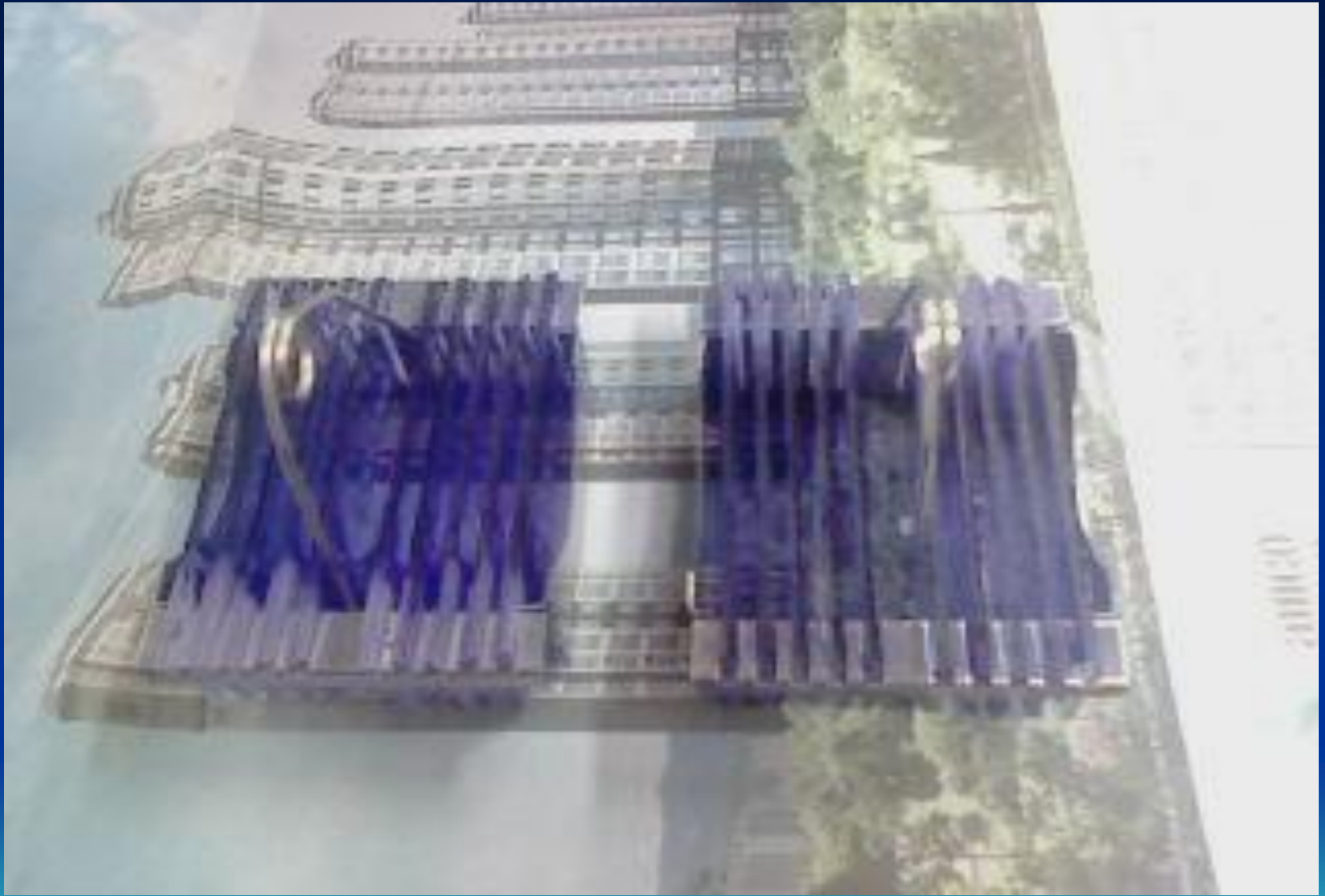














# Dye(염료)의 종류

- 1) natural dye (천연색소) ; hematoxylin, carmin 등
- 2) artificial dye (인조색소) ; 최초 aniline으로 부터 유도되었기 때문에 일명 aniline 색소라고도 부른다. 오늘날 많은 색소가 aniline 이외에 coaltar 생산물에서 제조되기 때문에 coal tar 색소라고도 부른다.



# 염색의 종류

- 1) Progressive staining : 조직 또는 세포를 점진적으로 적당한 시간에 (적당한 정도에서) 염색을 중지시키는 방법.
- 2) Regressive staining : 미리 강하게 염색시켜 놓고 후에 적당한 정도까지 염료를 탈색시키는 방법.
- 3) Simultaneous staining : 염색시 2종이상의 염료를 혼합하여 동시에 작용시키는 방법.
- 4) Double staining : 2종의 염료를 각각 작용시키는 방법.
- 5) Triple staining : 3종의 염료를 각각 작용시키는 방법.
- 6) Contrast staining : 염색 후에 타 염료를 염색하고, 후 염색하는 방법.





## Common stain을 위한 principie use.

- 1) cellulose cell wall : hematoxylin, fast green, FCF, aniline blue, acid fuchsin etc.
- 2) lignified cell wall : safranin, orystal violet, astrazone, red FG.
- 3) cutinized cell wall : safranin, crystal violet, erythrosine.
- 4) middle lamella : iron hematoxylin, ruthenium red.
- 5) chromosome : iron hematoxylin, safranin, crystal violet, carmine, orcein, basic fuchsin.
- 6) mitochondria : iron hematoxylin.
- 7) achromatic figure : crystal violet, fast green FCF.
- 8) cytoplasm : eosin Y, erythrosin B, fast green FCF, orange G, gold orange.
- 9) nucleoli : chlorazol black E.

# 이중염색하는 방법

- Safranin-fast green법
- a) safranin(working solution) ; 1~24 hr
- safranin (stock solution) ; safranin 1 g + 95% Alcohol 99 ml ; 이 stock solution을 만들어 두고 사용직전에 증류수와 1 : 1로 희석한 용액이 working solution 이다.
- b) 수세 (Washing) ; 흐르는 물에서 실시하며 불필요한 여분의 염색약과 slide glass 표면에 묻은 염색액을 제거시키기 위한 과정이다.

- c) 탈수 (Dehydration) ; 다음 과정은 fast green 염색으로서 이 염색액에는 물이 들어있지 않기 때문에 재료에서 물을 제거시킨 후 염색을 실시해야 한다.
- 70% Alcohol 1 min -- 95% Alcohol 1 min -- 100% Alcohol 1 min -- 100% Alcohol 1 min
- 이 과정에서 시간이 짧은 이유는 알코올에 의해서 safranin이 녹을 수 있기 때문이다. 그렇기 때문에 단시간에 이 과정을 실시하도록 한다.





- d) fast green ; 30 sec ~ 4 min  
fast green 1g + clove oil 100ml + Absolute Alcohol 100 ml
- e) Differentiation ; 5 ~ 15 min  
clove oil 100 ml + Absolute Alcohol 50 ml + Xylene 50 ml
- \* Differentiation 은 5~ 15 분씩 3번 처리해야 한다.
- f) 투명화 ; Xylene I 5 min -- Xylene II 5 min -- Xylene III 5 min

