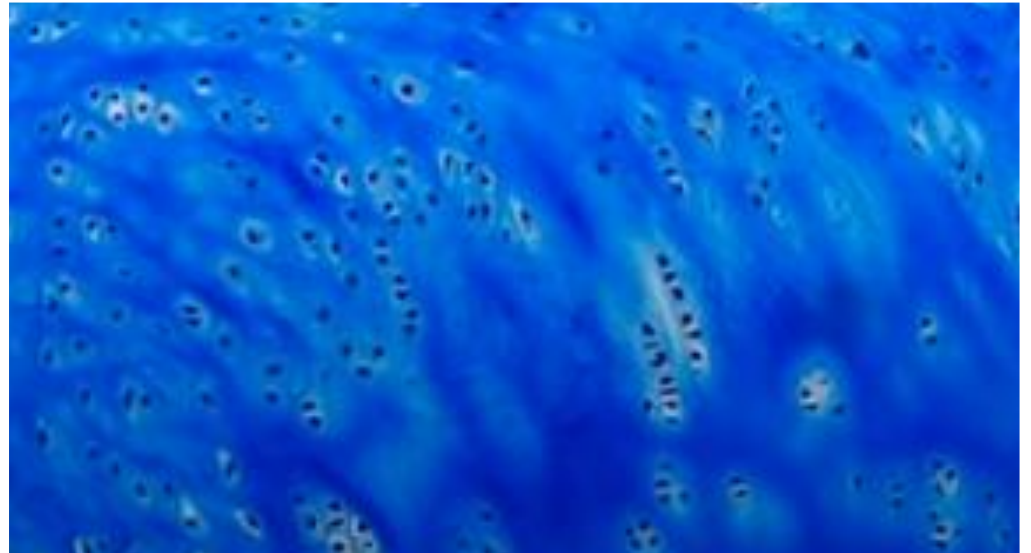
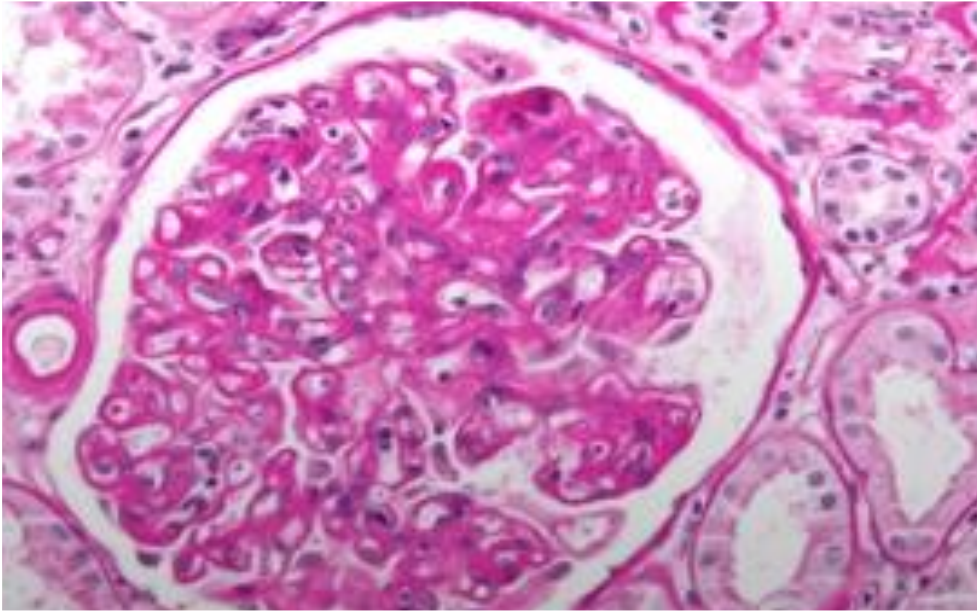
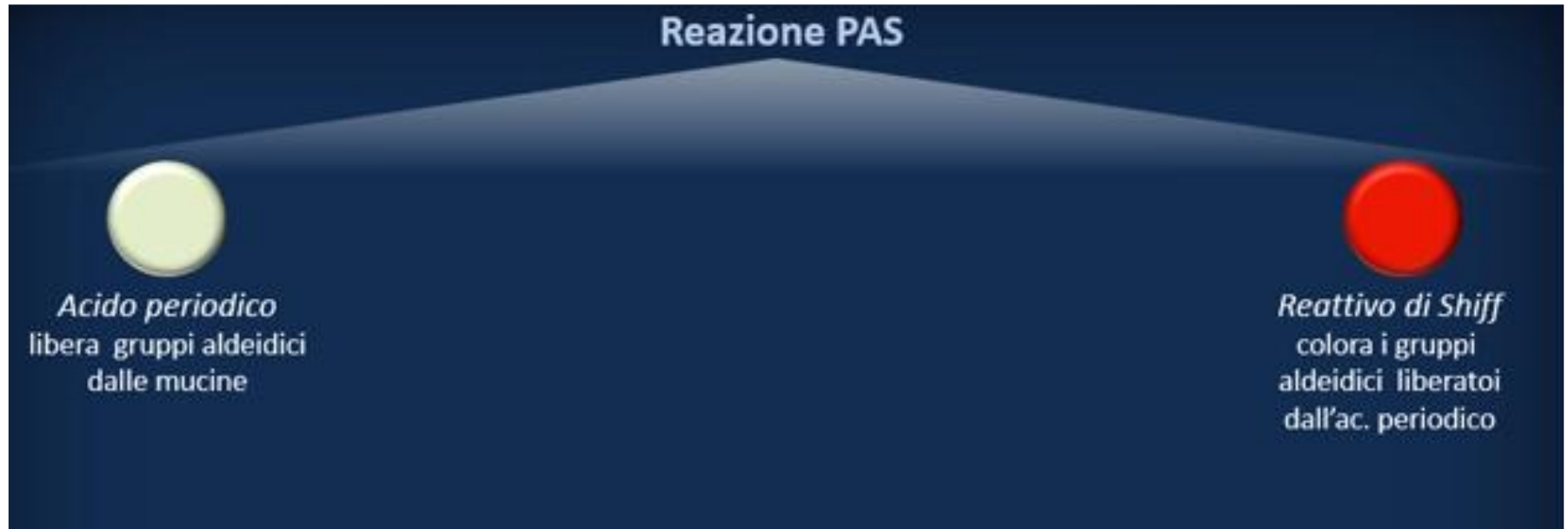


COLORAZIONI PAS E ALCIAN



COLORAZIONE PAS (Periodic Acid-Schiff)



La reazione PAS (Periodic Acid-Schiff) è uno dei metodi chimici più utilizzati in istologia.

Questa è una reazione specifica per la rilevazione delle **mucine neutre** in tessuti come gli epiteli secernenti, le ghiandole endocrine, il sistema nervoso.

Viene impiegato un **ossidante**, in questo caso **l'acido periodico**, che attacca selettivamente il gruppo funzionale amminico primario o quello -OH, provocando la liberazione di un gruppo aldeidico rivelato poi dal reattivo di Schiff.

COLORAZIONE PAS (Periodic Acid-Schiff)

Principio

Con la reazione PAS, il materiale istologico viene innanzitutto trattato con acido periodico che ossida i gruppi 1,2-glicol in gruppi aldeidici. Aggiungendo il reattivo di Schiff (leucofucsina) in una seconda fase, gli aldeidi assumono una colorazione rosso magenta o porpora.

Di conseguenza, la reazione PAS produce una colorazione specifica con polisaccaridi non sostituiti, mucopolisaccaridi neutri, muco e glicoproteine e glico e fosfolipidi.

COLORAZIONE PAS (Periodic Acid-Schiff)

Materiale d'esame

Come materiale iniziale vengono utilizzate sezioni incluse in paraffina (con spessore di 3 - 4 μm) e fissate in formalina oppure strisci cellulari.

Colorazione PAS Esecuzione

-Sparaffinare e riportare le preparati istologici all'acqua attraverso una serie discendente di alcoli come di consueto.

-Colorazione in appositi portavetrini di colorazione

-I vetrini vanno fatti sgocciolare accuratamente dopo le singole fasi della colorazione, in modo da evitare il trascinarsi (carry-over) delle soluzioni.

Per ottenere un risultato ottimale si dovrebbero rispettare i tempi indicati.

Protocollo di colorazione PAS per la rilevazione di aldeide e mucosostanze

Portaoggetti con preparato istologico

Acqua distillata	risciacquare
------------------	--------------

Reattivo 1 (soluzione acido periodico)*	5 minuti
---	----------

Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
-----------------------------	----------

Acqua distillata	risciacquare
------------------	--------------

Reattivo 2 (reagenti di Schiff)	15 minuti
---------------------------------	-----------

Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
-----------------------------	----------

Acqua distillata	risciacquare
------------------	--------------

Soluzione d'ematossilina modificata secondo Gill III**	2 minuti
--	----------

Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
-----------------------------	----------

Etanolo 70 %	1 minuto
--------------	----------

Etanolo 70 %	1 minuto
--------------	----------

Etanolo 96 %	1 minuto
--------------	----------

Etanolo 96 %	1 minuto
--------------	----------

Etanolo 100 %	1 minuto
---------------	----------

Etanolo 100 %	1 minuto
---------------	----------

Xilene o Neo-Clear®	5 minuti
---------------------	----------

Xilene o Neo-Clear®	5 minuti
---------------------	----------

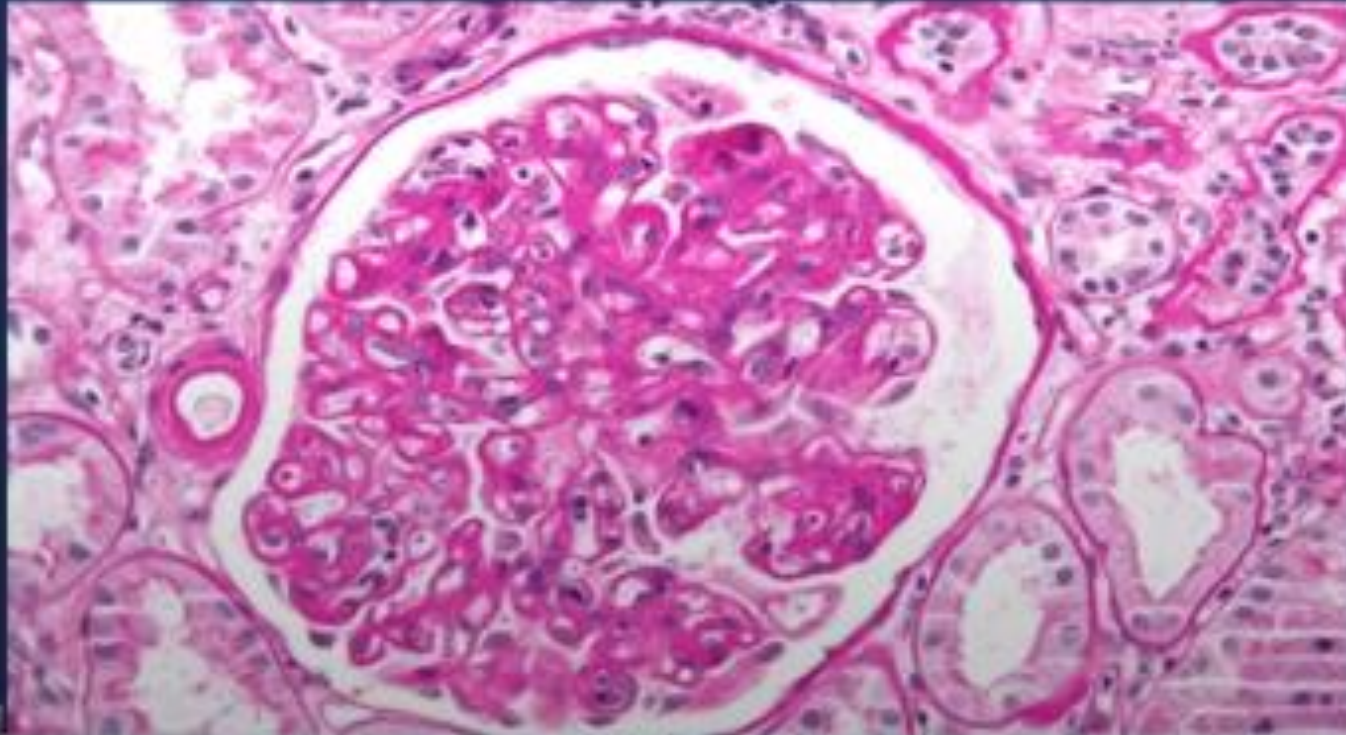
Montare i preparati inumiditi con Neo-Clear® con Neo-Mount® o i preparati inumiditi con xilene con per es. Entellan® Neo e coprioggetto.

- Per ottenere una colorazione con maggiore ed ottimale specificità, il tessuto - una volta reagito con acido periodico - va trattato con acqua al solfito (3 x 2 minuti). Per la preparazione dell'acqua trattata al solfito sono necessari innanzi tutto 10 ml di soluzione di sodio disolfito (10 %) e 10 ml di acido cloridrico (1 mol/l) che vanno quindi miscelati in soluzione con 200 ml di acqua di di fonte.
- Per una rappresentazione ancora più brillante e ricca di contrasti delle strutture PAS positive si consiglia l'impiego di Ematossilina soluz. modificata Gill II.

Dopo la disidratazione (con serie alcolica a concentrazione ascendente) i preparati istologici possono essere chiarificati con xilene o Neo-Clear®, montati con mezzi di montaggio anidri (per esempio, Neo-Mount®, Entellan®, DPX Neo o Entellan® Neo), coperti con un vetrino coprioggetti e conservati.

Per l'analisi dei preparati colorati con ingrandimento al microscopio >40x, si consiglia di utilizzare olio di immersione.

COLORAZIONE PAS (Periodic Acid-Schiff)



Glomerulo renale (glomerulonefrite membrano-proliferativa)

Risultato

-Nuclei cellulari

blu

-Polisaccaridi, glicogeno, mucopolisaccaridi neutri, muco e glicoproteine, glico e fosfolipidi, membrana basale, collagene

porpora

COLORAZIONE ALCIAN



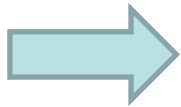
mette in evidenza le **mucine acide** e **glicosamminoglicani**

COLORAZIONE ALCIAN

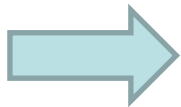
METODO ALCIAN

Portare all'acqua le sezioni.

-Lavare in una soluzione acquosa al 3% di acido acetico.

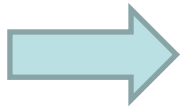


-Colorare per 30 minuti in una soluzione all'1% di Alcian blu 8 GX in acido acetico al 3%.



-Sciacquare brevemente in acqua distillata e poi in acido acetico al 3% per 3-5 minuti, acqua corrente e acqua distillata.

-Si immerga in emallume per 2 minuti.

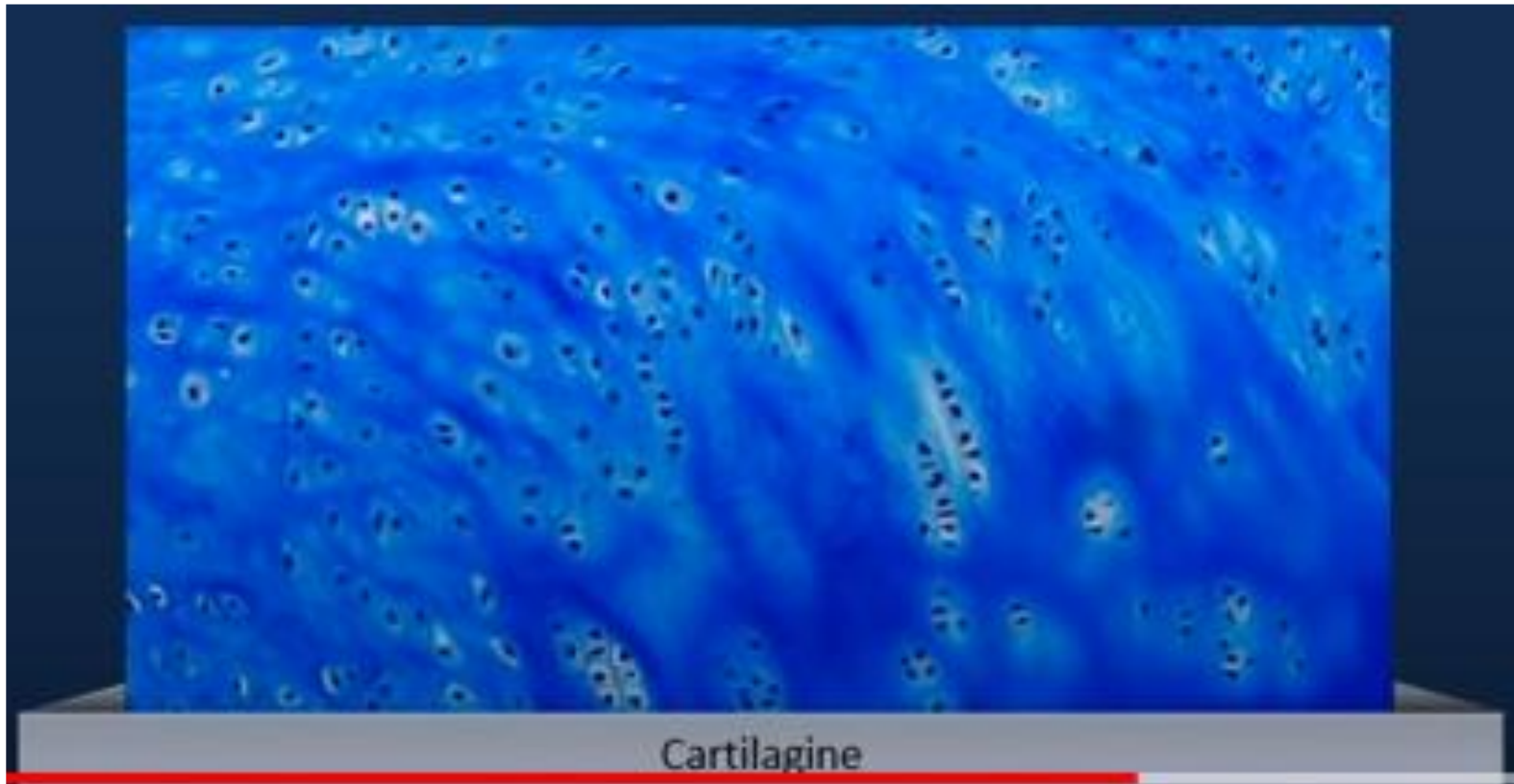


-Si sciacqui in acqua corrente per 2 minuti (viraggio del colore al blu).

-Lavaggio in acqua distillata.

-Disidratare, chiarificare e montare.

COLORAZIONE ALCIAN



Risultato

- Nuclei cellulari
- Mucosostanze acide

blu
blu chiaro

La combinazione della **reazione PAS** con la colorazione **Alcian Blu** utilizzata per mettere in evidenza

le mucosostanze neutre, acide e i glicosaminoglicani.

Reazione PAS-Alcian blu



Acido periodico



Reattivo di Schiff

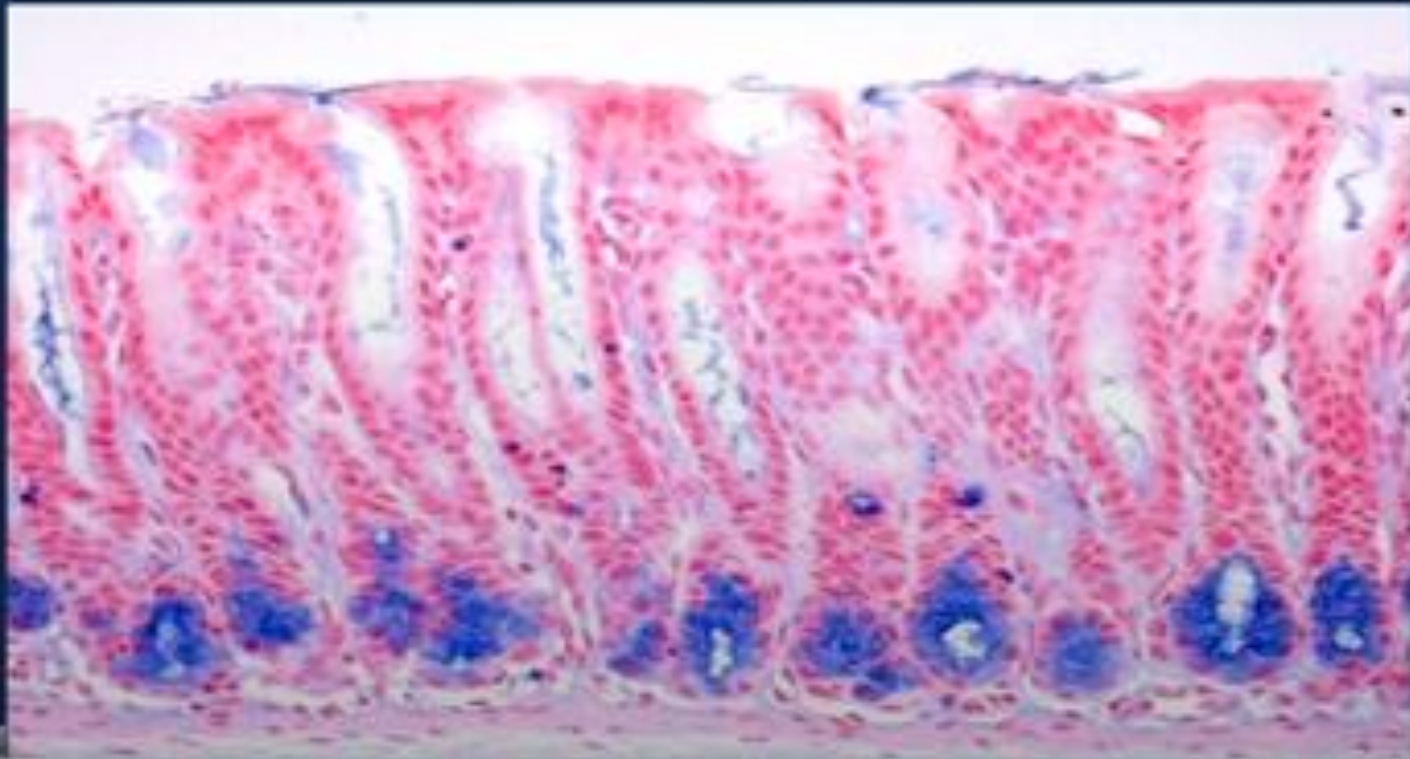


Alcian blu

Protocollo di Colorazione Alcian Blu-PAS

Portaoggetti con preparato istologico		
	Acqua distillata	risciacquare
→	Soluzione di blu alcian	5 minuti
→	Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
	Acqua distillata	risciacquare
→	Reattivo 1 (soluzione acido periodico)*	10 minuti
→	Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
	Acqua distillata	risciacquare
→	Reattivo 2 (reagenti di Schiff)	15 minuti
→	Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
	Acqua distillata	risciacquare
→	Soluzione d'ematossilina modificata secondo Gill III**	20 secondi
→	Acqua di rubinetto corrente	3 minuti
	Etanolo 70 %	1 minuto
	Etanolo 70 %	1 minuto
	Etanolo 96 %	1 minuto
	Etanolo 96 %	1 minuto
	Etanolo 100 %	1 minuto
	Etanolo 100 %	1 minuto
	Xilene o NEO-CLEAR®	5 minuti
	Xilene o NEO-CLEAR®	5 minuti
Montare i preparati inumiditi con NEO-CLEAR® con Neo-Mount® o i preparati inumiditi con xilene con per es. Entellan® Neo e coprioggetto.		

Colorazione Alcian Blu-PAS



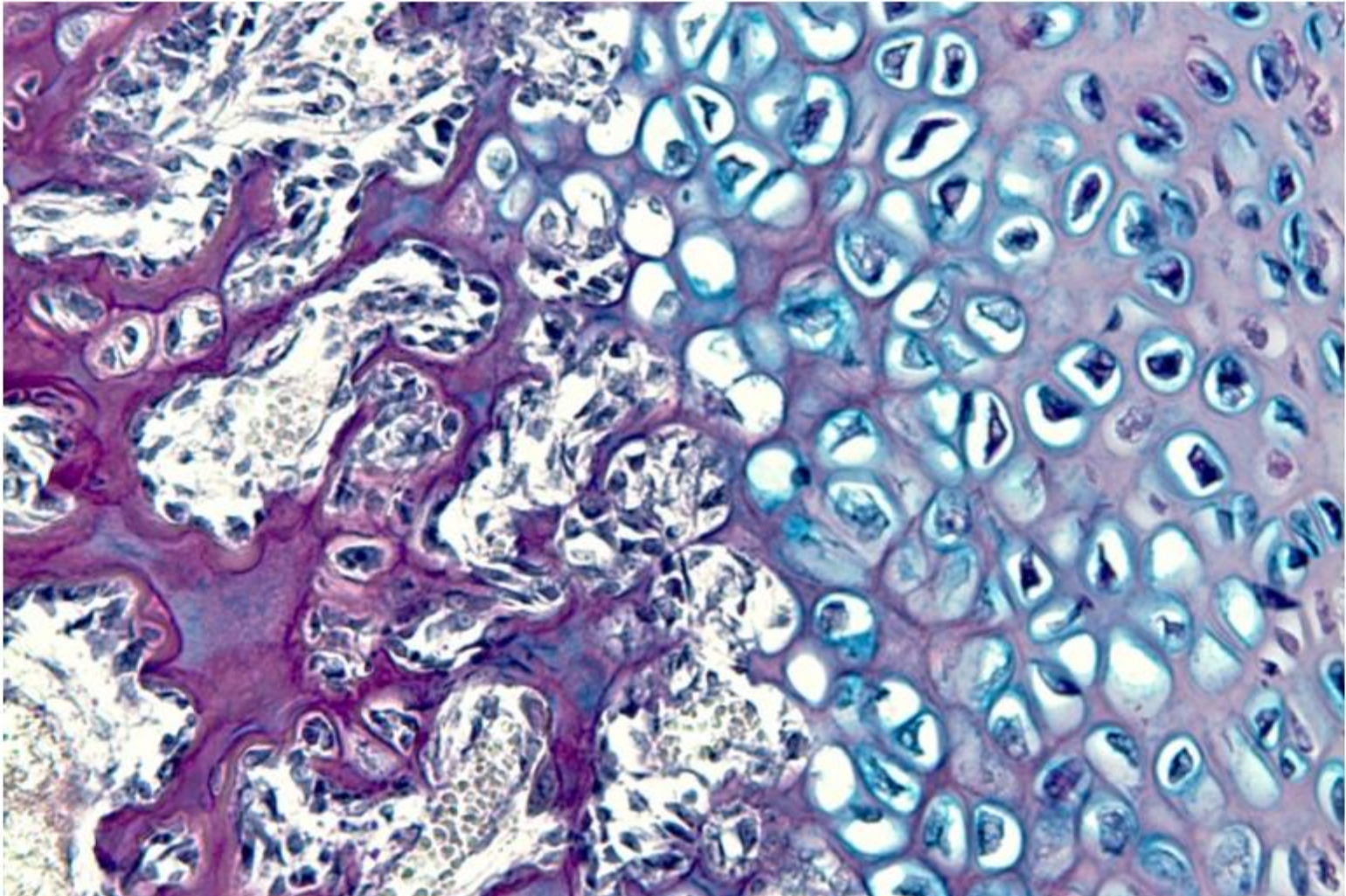
Stomaco (antro)

Risultato

- Nuclei cellulari
- Mucosostanze acide
- Polisaccaridi, mucopolisaccaridi neutri

blu
blu chiaro
porpora

Protocollo di Colorazione Alcian Blu-PAS



Orecchio interno di embrione umano. Ossificazione indiretta. Il tessuto osseo è colorato in magenta per la forte presenza, come in tutti i connettivi, di glicosaminoglicani neutri. La cartilagine, anche se in degenerazione, è invece colorata in blu per il forte contenuto di glicosaminoglicani acidi. *Alcian-Pas 100x*

REAZIONE DI FEULGEN

E' una reazione istochimica che **mette in evidenza il DNA** con un colore magenta.

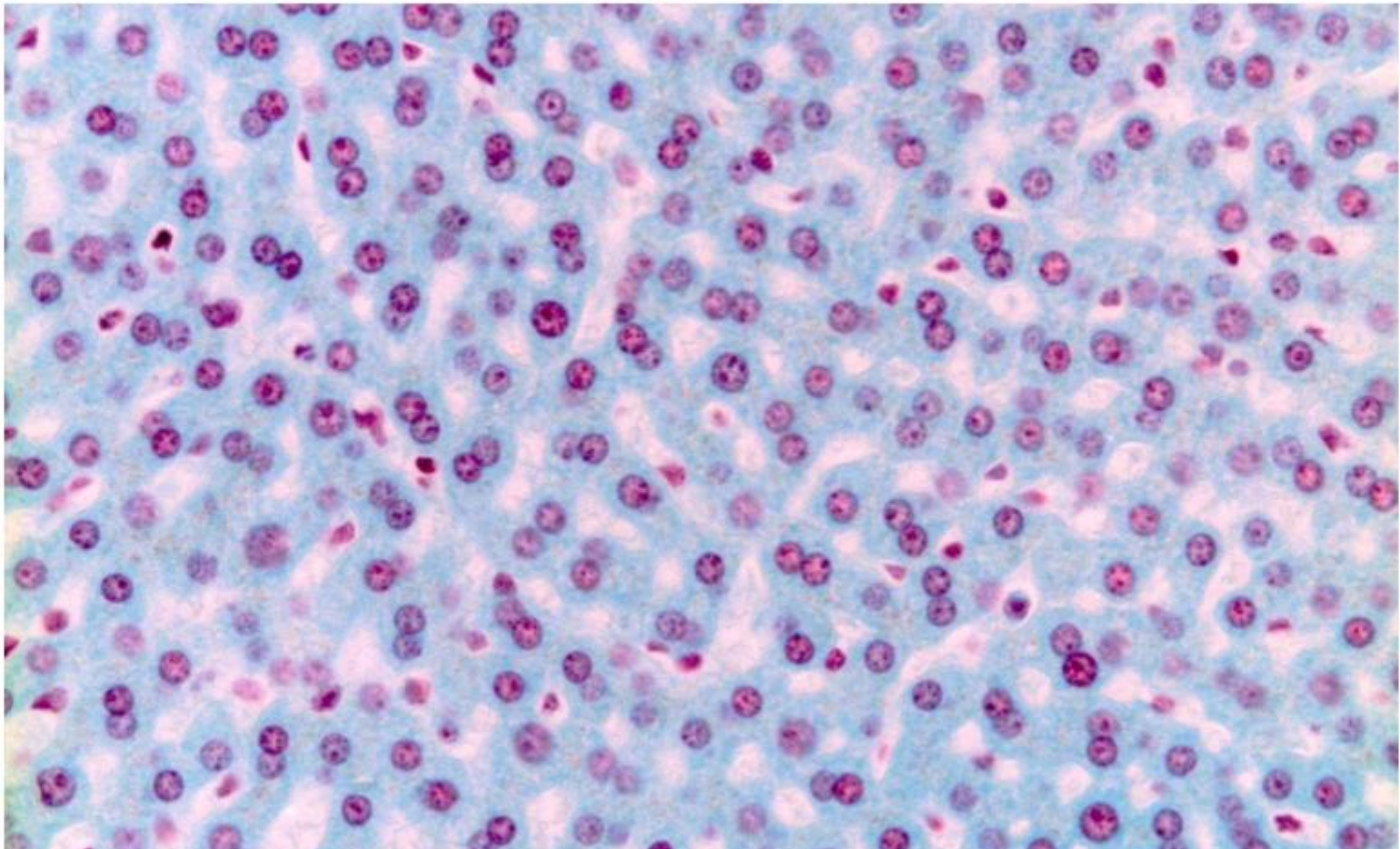
L'idrolisi, in stufa a 60°C, avviene con HCl 1N e la sua durata varia a seconda del fissativo precedentemente usato, dal tipo di tessuto e dalla specie animale.

Questo è, infatti, il punto critico della reazione perchè con l'idrolisi a caldo si verifica la separazione delle basi puriniche, con conseguente formazione di gruppi aldeidici, colorati con il reattivo di Schiff in magenta.

Se l'idrolisi viene prolungata oltre il tempo ottimale vengono allontanati anche gli istoni e gli acidi apurinici aumentando così la reazione nel liquido di idrolisi e facendo apparire i cromosomi sempre meno colorati.

*Questa **reazione è altamente specifica** perchè non si conosce nessun'altra sostanza cellulare, in queste condizioni, capace di formare un composto colorato con il reattivo di Schiff.*

REAZIONE DI FEULGEN



Fegato di topo. Reazione di Feulgen per lo smascheramento del DNA. *Feulgen 100x*