

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
«Институт биологии, экологии и природных ресурсов»

Реферат

По дисциплине «цитология»

На тему: «Методы фиксации и окрашивания клеток и тканей»

Выполнил(а):

Студент(ка) группы Б-171

Муסיнова А.А.

Тарасова А.Е.

Проверила:

Доцент

Мейер Алина Викторовна

Фиксация

- обработка, направленная на стабилизацию внешнего вида клеточных структур, расположения компонентов и даже молекул.

Фиксация предохраняет эти структуры от:

- посмертных изменений;
- действия химических веществ;
- растворения в водных и спиртовых растворах красителей.

Химическая фиксация

В качестве фиксаторов применяют растворы, действие которых направлено на быстрое осаждение белков и образование с ними нерастворимых ковалентных соединений.

В качестве химических фиксаторов часто используют 4% формальдегид и другие альдегиды, спирты, кислоты, а также смеси на их основе.

Химические
фиксаторы,
применяющиеся для
фрагментов ткани.

4% Формальдегид



Этиловый спирт

- Используют для гистохимических реакций по выявлению гликогена, железа и др..
- Недостатком спирта как фиксатора являются: разрушение липидов, сморщивание ткани.
- Фиксацию этанолом проводят при +5 градусах по Цельсию.

Смесь Карнуа

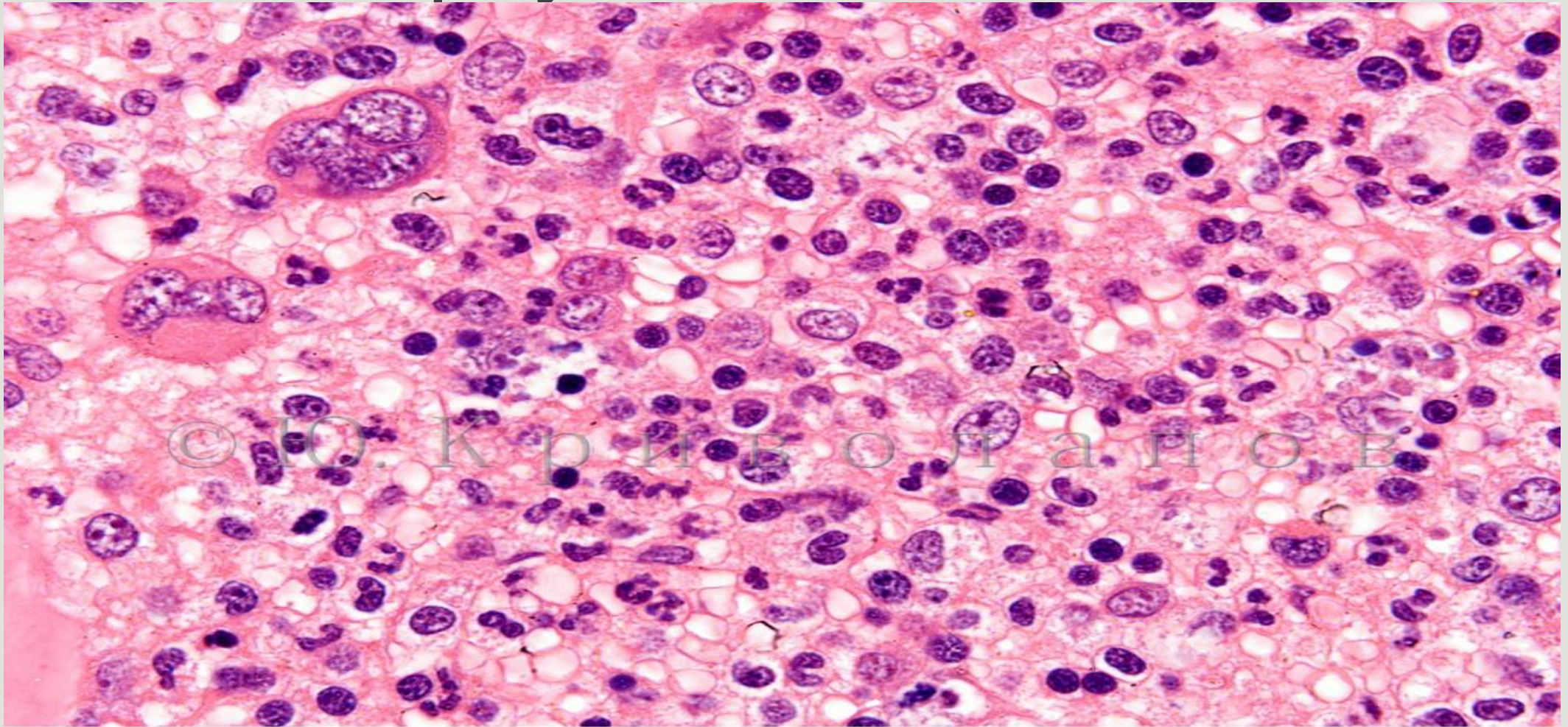


Рис. 1.8. Трепанобиоптат костного мозга после фиксации и декальцинации в жидкости Карнуа. Отсутствует дифференцированное окрашивание (базофилия, эозинофилия) цитоплазмы клеток

Жидкость Буэна

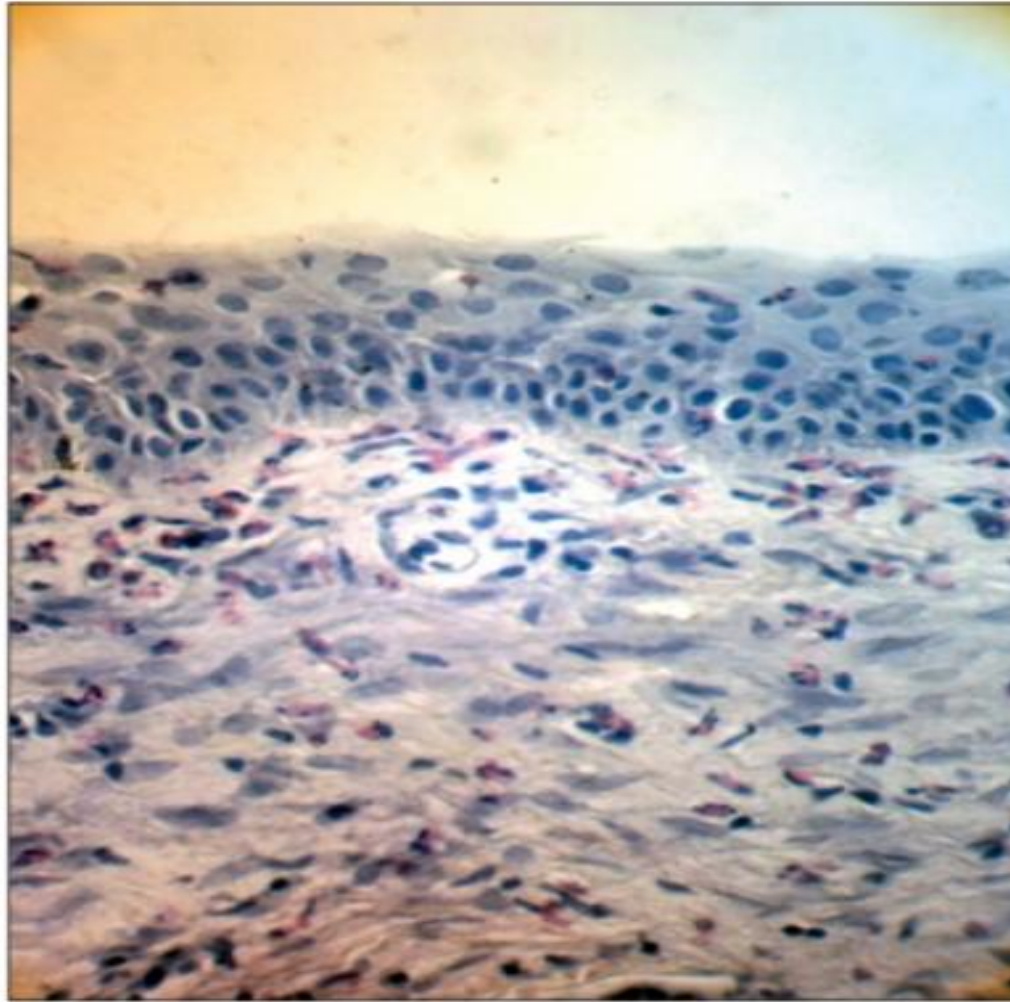


Рис. 60. Фрагмент роговицы кролика № 20 через 7 суток эксперимента. Эпителиальный регенерат. Фиксация: жидкость Буэна. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Увеличение об. 40, ок. 10

Смесь Альтмана

Препарат №3

Название: Митохондрии в эпителиоцитах почечных канальцев
Окраска: по Альтману Увеличение: X400



Физические методы фиксации

Применяются в специальных задачах гистохимии, в отдельных методах электронной микроскопии.

Например, быстрое замораживание ткани до температуры ~ -160 градусов Цельсия, но и это имеет свои минусы, происходит кристаллизация воды.

Один вариант решения проблемы - лиофильная сушка. Материал выдерживают в вакууме при температуре $-70 - -35^{\circ}\text{C}$.

После сушки перенос в комнатную температуру не приводит ни к повреждению структуры, ни к перераспределению водорастворимых компонентов.

Лиофильная сушка



Основные компоненты лиофильной сушилки

Сушильная камера
Для размещения образцов
(например, в колбах или на полках)

Траектория пара
Водяной пар перемещается в
сторону более низкого давления

Блок управления
Регулировка давления и
температуры

Ледовый конденсор
Водяной пар превращается в лед
и скапливается в конденсоре

Вакуумный насос
Поддерживает очень низкое
давление в системе



Окрашивание фиксированных препаратов

Окрашивание - весьма сложный процесс, в котором играют роль как химические, так и физические факторы. Следует учитывать не только полярность красителя и субстрата, но и такие явления как адсорбция красящего вещества на поверхностях субстрата.

Виды красителей

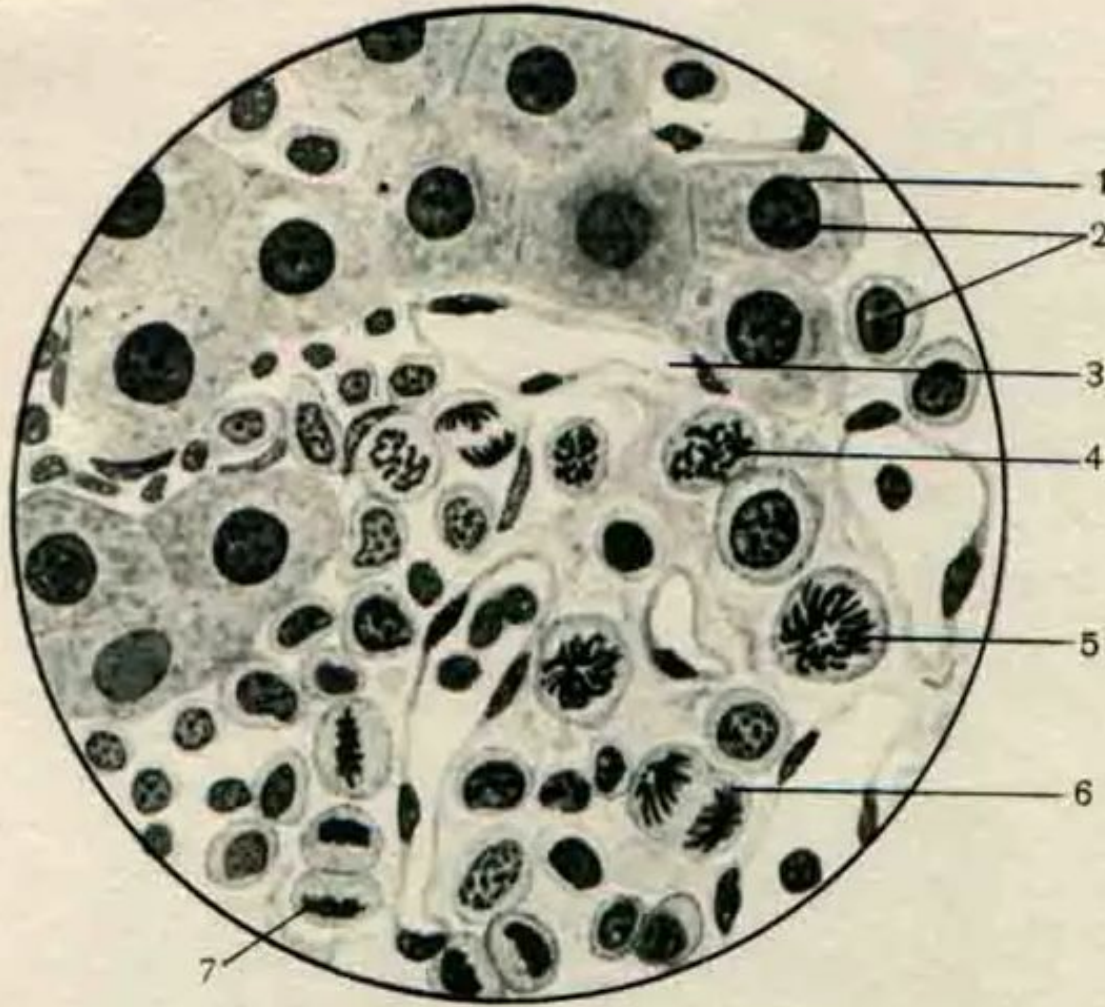
1. Основные, или ядерные красители

- это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными (гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый).

Также гематоксилин и кармин называют аджективными красителями.

- это красители (или цветное соединение, не являющееся красителем) с протравой (обычно – оксид трехвалентного металла: хром, железо, медь) образуют окрашенный стабильный комплекс (лак). Металл в составе протравы влияет на цвет комплекса.

Адъективные красители

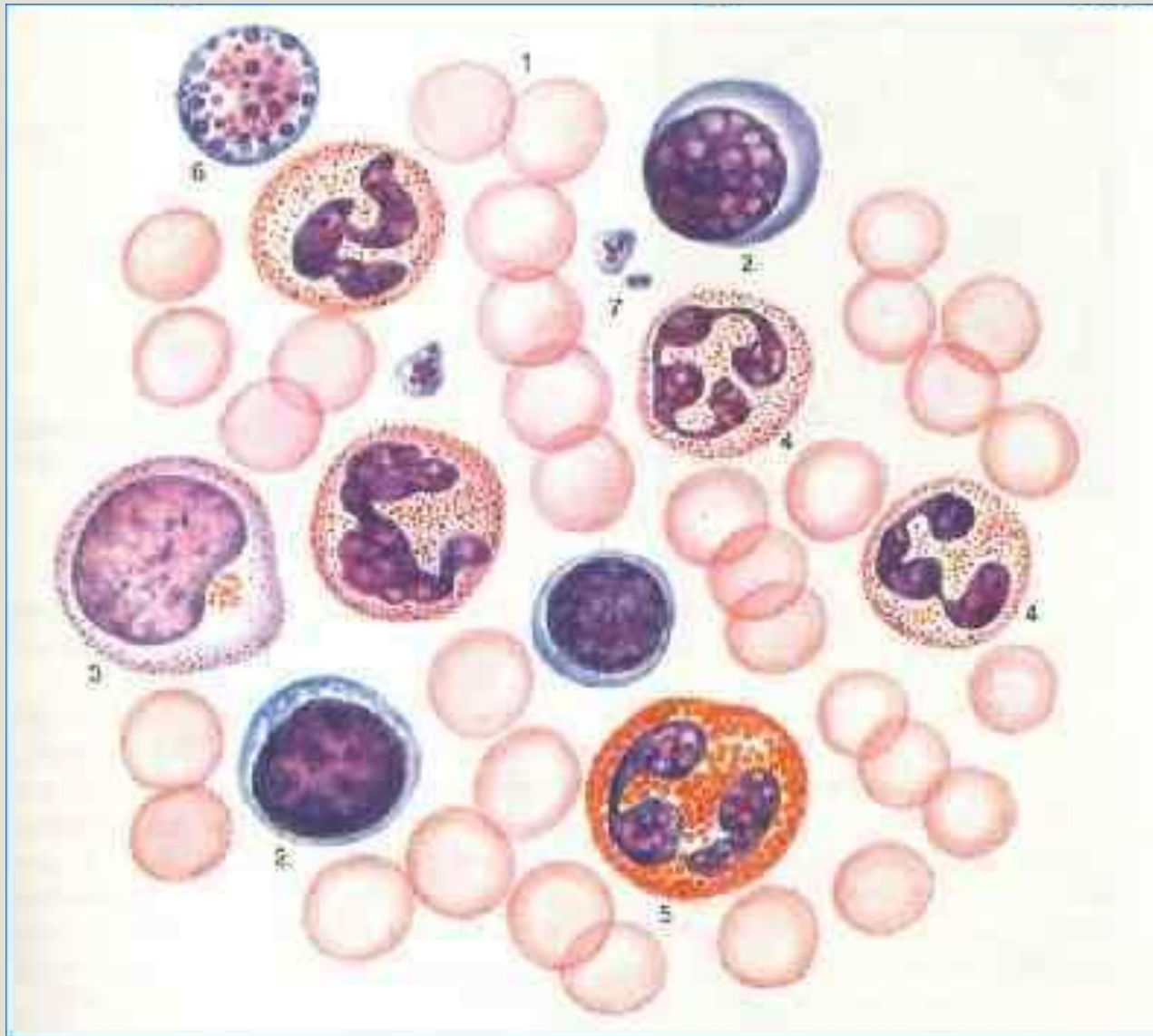


39. Митотическое деление животных клеток. Гистологический препарат печени аксолотля. Окраска железным гематоксилином. Увеличение: об. 90, ок. 5.
1—печеночные клетки; 2—интерфазные ядра; 3—синусоидный капилляр; 4—профаза; 5—метафаза; 6—анафаза; 7—телофаза.

Виды красителей

2. Кислотные красители

- это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, конго красный (конгорот), эритрозин.



Окраска основными и кислыми красителями. Базофильные и оксифильные структуры клеток крови.

Рис.1. Мазок периферической крови взрослого человека (Общий вид), Окраска: Гематоксилин-Эозин.

1. Эритроциты
2. Лимфоциты
3. Моноцит
4. Нейтрофильные гранулоциты.
5. Эозинофильные гранулоциты.
6. Базофильные гранулоциты.
7. Тромбоциты.

Виды красителей

3. Нейтральные красители

Часто используются эозинаты основных красителей (метиленового синего и фиолетового, метиленазура, толуидинового синего).

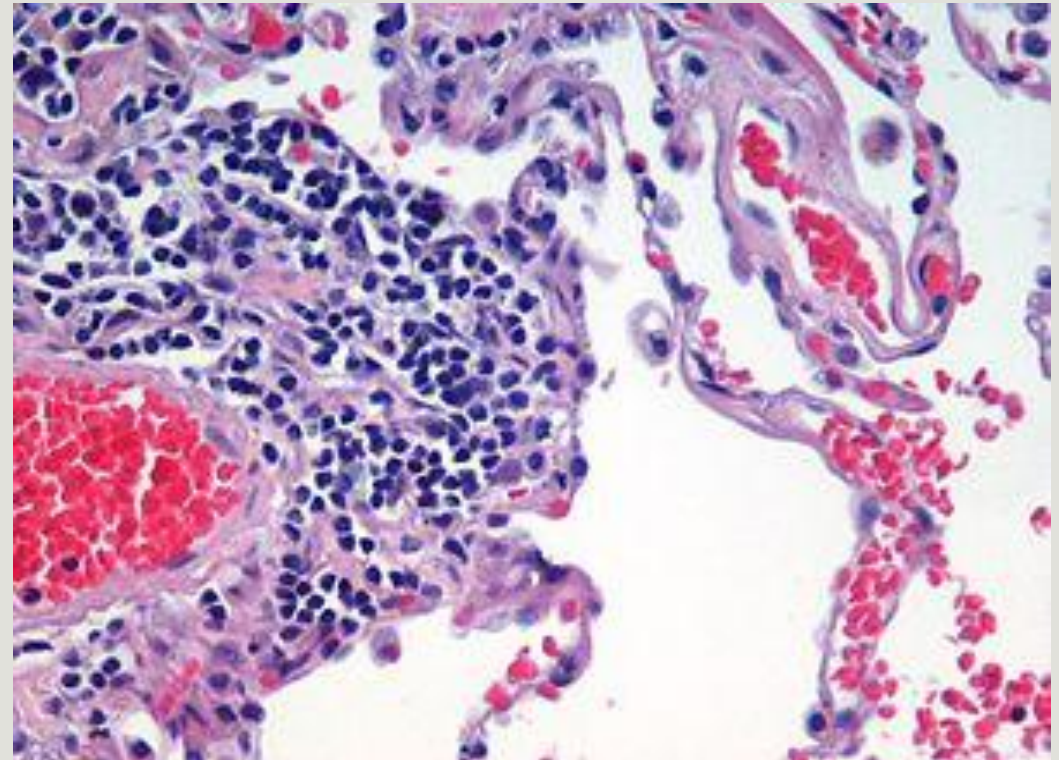
Пример - специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах.

Общие методы окраски

1. Окраска гематоксилин-эозином.

- Сочетает основной и кислый красители. Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры.
- Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма - желтовато-розовый цвет.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ ОБРАЗЕЦ
ЛЁГОЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА,
ОКРАШЕННЫЙ ГЕМАТОКСИЛИН-
ЭОЗИНОМ.

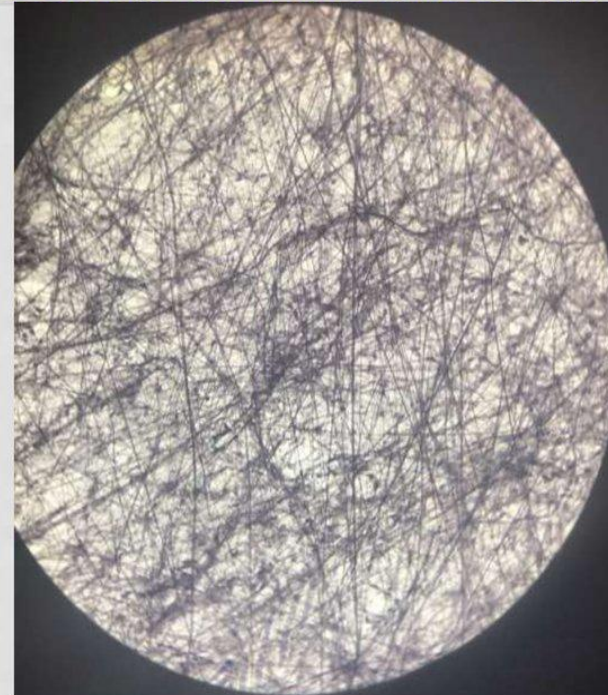


Общие методы окраски

2. Окраска железным гематоксилином.

- Структуры приобретают коричневато-серый цвет.
- Хорошо выявляются структуры ядра, границы клеток, мышечные волокна.

**РЫХЛАЯ ВОЛОКНИСТАЯ
СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ.
ОКРАСКА ЖЕЛЕЗНЫМ ГЕМАТОКСИЛИНОМ.**



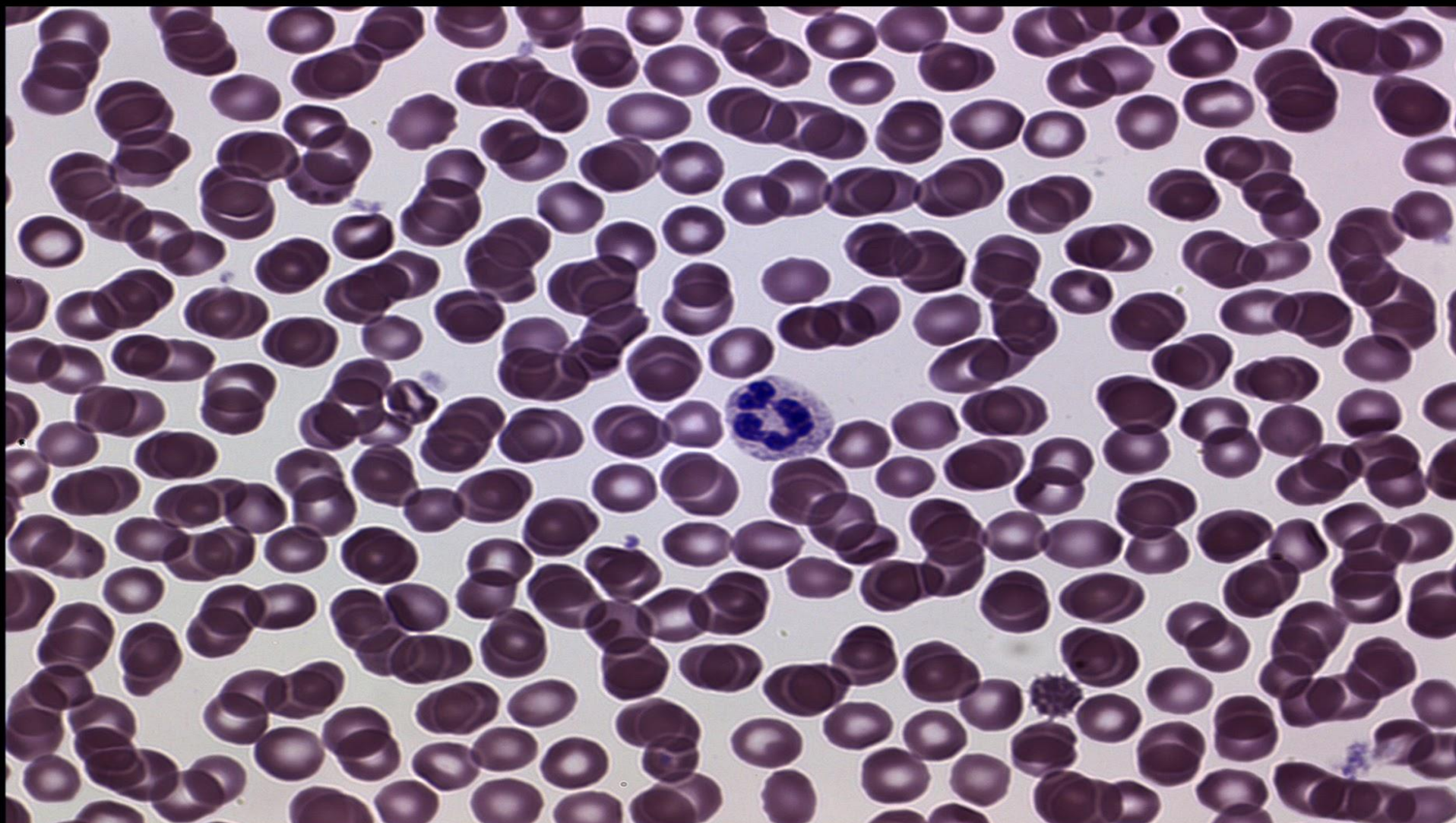
Окраска клеток соединительной ткани и крови

1. Окраска азур 2 – эозином.

- Базофильные элементы окрашиваются азуром 2 в тёмно-синий.
- Оксифильные - в светло-красный цвет.

2. Окраска мазков по методу Романовского.

- Краситель - тот же, что и в предыдущем случае (азур 2 – эозин).
- Эритроциты приобретают бледно-красный цвет, цитоплазма лейкоцитов - голубой или синий цвет, цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы.



Человеческая кровь
Увеличение: 1000x
Окраска Азур-Эозином по Романовскому. В центре - нейтрофил, на фоне - эритроциты
Автор: Яблоков Станислав

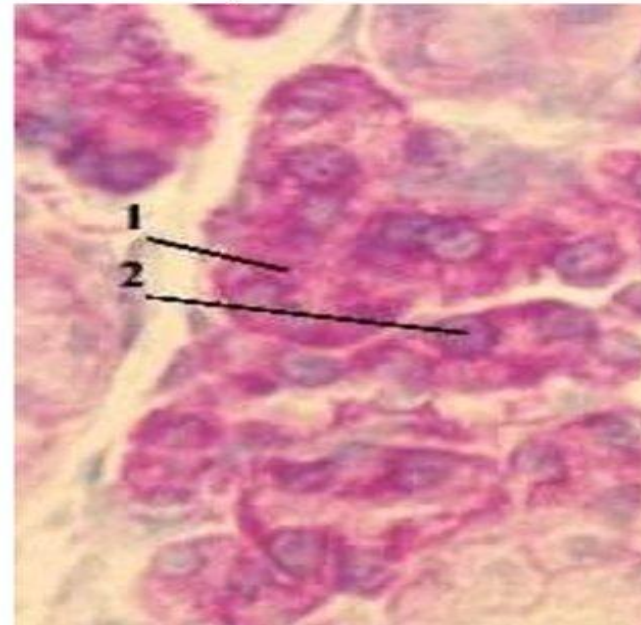
Гистохимические методы исследования

Реакция Браше – на РНК

- 1. Реактив – смесь двух красителей: метилового зелёного и пиронина.
- 2. Пиронин окрашивает **структуры, богатые РНК**, в малиновый цвет. **Другие структуры** – зелёные.
- 3. Чтобы проверить специфичность окраски, делают контрольный препарат, который перед окрашиванием обрабатывают рибонуклеазой.

Препарат - срез поджелудочной железы.

В малиновый цвет окрашены **цитоплазма (1)** и **ядрышки (2)** секреторных клеток – из-за высокого содержания в них **РНК** (в составе рибосом и их предшественников).

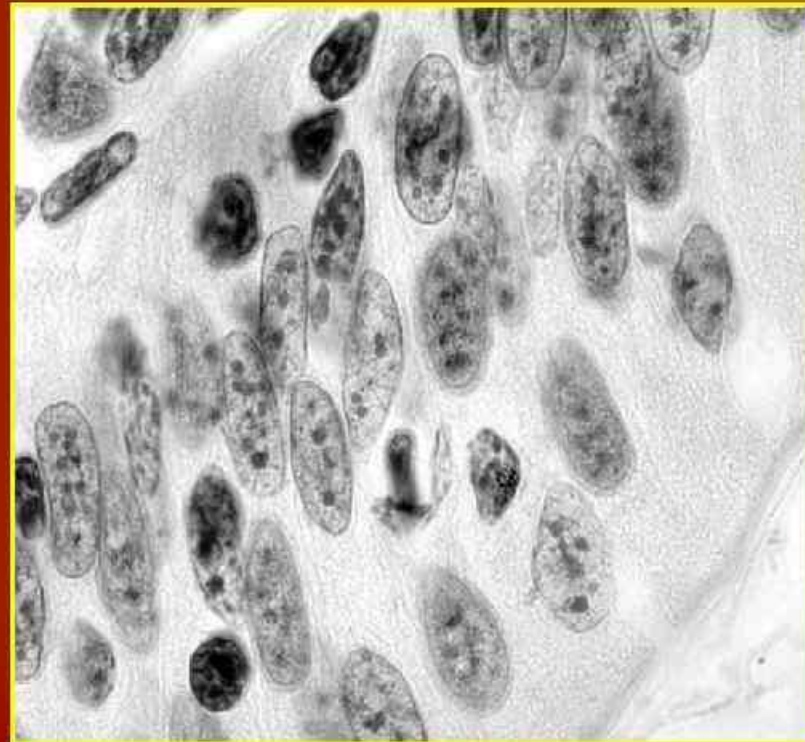


Гистохимические методы исследования

2. ОКРАСКА ДНК. РЕАКЦИЯ ФЁЛЬГЕНА.

ДНК-содержащие структуры окрашиваются в пурпурно-красный цвет.

ДНК. Реакция Фельгена.
Клетки кишечника мыши.
увеличение 100х



Гистохимические методы исследования

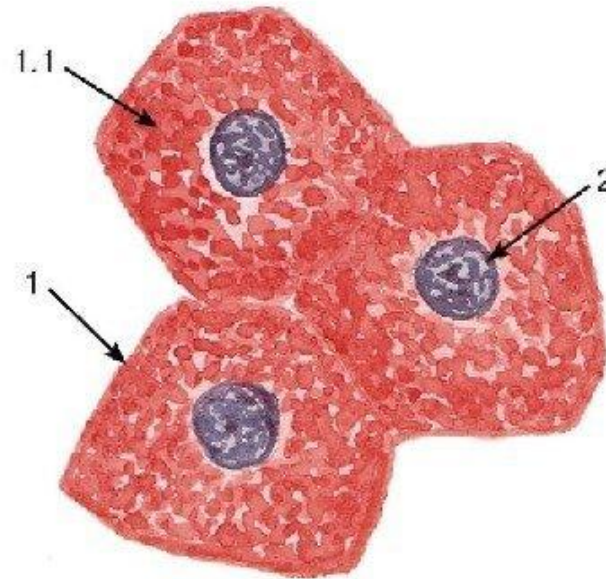
3. Окраска белков.

- Используются различные реакции; в том числе: с бромфеноловым синим (у белков - тёмно-фиолетовая окраска); со смесью нингидрин-реактив Шиффа (белки приобретают красный цвет).

Гистохимические методы исследования

4. Окраска полисахаридов. ШИК-реакция.

- На препарате ШИК-положительные компоненты (например, гранулы гликогена) имеют тёмно-красный цвет.



Включения гликогена

(в клетках печени - гепатоцитах)

Окраска: ШИК-реакция и гематоксилин

1 - цитоплазма гепатоцита: 1.1 - гранулы гликогена;

2 - ядро

Гистохимические методы исследования

5. Окраска нейтральных жиров. Реакция с суданом III.

- Капли жира в жировой клетке окрашиваются в яркий оранжево-красный цвет благодаря растворению в них красителя.

**Жировая дистрофия печени
(окраска судан III)**



Заключение

1. Фиксация сохраняет структуру клеток, тканей и органов, предотвращает их бактериальное загрязнение и ферментное переваривание, стабилизирует макромолекулы путем химического их сшивания.
2. Окрашивание производят для увеличения контрастности изображения отдельных структур при рассматривании их в микроскопе.

Спасибо за
внимание!