
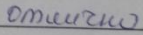


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт медицины, экологии и физической культуры  
Экологический факультет  
Кафедра биологии, экологии и природопользования

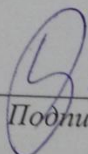
**Отчет по учебной практике**  
по теме  
«ТЕХНИКА ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ»

Выполнил:  
студент группы БМ-О-16/1,  
направление 06.01.04 Биология (уровень магистратуры)  
Юрова Елена Валерьевна

 17.06.17  
Подпись, дата

  
Оценка

Руководитель практики:  
к.м.н., главный врач ГУЗ УОСПК  
Хапман М.Э

 18.06.17  
Подпись, дата

Ульяновск, 2017

## Содержание

Введение .....	3
1. Прямые и косвенные методы приготовления препаратов .....	4
2. Методика приготовления временных препаратов.....	4
3. Приготовление препарата «раздавленная капля» и «висячая капля» .....	6
4. Методика приготовления постоянного препарата .....	8
5. Методика изготовления мазка-отпечатка .....	14
6. Мазки крови для исследования лейкоцитарной формулы .....	14
Список использованной литературы .....	16

## Введение

Микропрепарат – препарат исследуемого объекта, подготовленный на предметном стекле с целью его дальнейшего изучения под микроскопом [3].

В зависимости от характера исследуемого объекта, используются различные типы препаратов[1].

1. Тотальные препараты. Приготавливаются из мелких организмов или небольших их частей. Часто требуют дополнительной обработки в просветляющих растворах. Обезвоженные тотальные препараты могут заключаться в постоянные среды.
2. Мазки. Применяются в гематологии при изучении крови, для изучения бактерий и простейших. Могут приготавливаться из тканевых элементов.
  - а. Влажные мазки фиксируют, не давая исследуемому материалу высохнуть. Затем препарат готовят так же, как наклеенные на стекло срезы.
  - б. Сухие мазки высушивают не фиксируя.
3. Срезы изготавливаются из фиксированных и залитых в пластический материал (парафин, акрил) объектов на микротоме. Для быстрого получения срезов без длительной процедуры обезвоживания применяют замораживающий микротом.
4. Шлифы приготавливаются из материалов, не поддающихся резке на микротоме. Используются преимущественно в петрографии. [5]

## 1. Прямые и косвенные методы приготовления препаратов

Различают прямые и косвенные методы приготовления препаратов. При прямых методах исследуемый материал наносят на ультратонкую пленку-подложку, предварительно помещенную на опорную металлическую сеточку, содержащую до 100 ячеек в 1 мм. Используют органические или неорганические пленки-подложки из коллодия, формвара, углерода, кварца и др. При электронной микроскопии эти пленки не должны обнаруживать собственной структуры и при этом быть достаточно прочными, чтобы выдержать облучение электронами. В биологических исследованиях применяют коллоидные пленки толщиной порядка 10-20 нм [1].

Широкое распространение получил метод выращивания различных микроорганизмов непосредственно на коллодиевых пленках, находящихся на поверхности питательной среды, и серийного их исследования в электронном микроскопе.

При косвенном методе на объект наносят тонкий слой какого-либо вещества (коллодий, кварц, углерод, разнообразные пластмассы) и делают отпечаток-реплику структуры его поверхности. Приготовленный таким образом препарат изучают в электронном микроскопе [5].

## 2. Методика приготовления временных препаратов

Подготовка материала для временных препаратов включает фиксацию и окраску.

Препараты для микроскопирования готовят из крови, колоний бактерий, тканей животных и растений и др. В некоторых случаях приготовление препаратов несложно, в других — требует специальной техники.

Наиболее просто готовят так называемые нативные препараты, т. е. объекты в естественном их виде. В этом случае материал наносят на предметное стекло и покрывают тонким покровным стеклом. Иногда его смешивают с изотоническим раствором хлорида натрия или глицерином для разжижения, осветления и предохранения от высыхания.

Широко распространен метод окраски препаратов для микроскопирования. Способ окраски зависит от особенностей исследуемого материала и цели исследования [2].

#### Методика приготовления временных препаратов

Временные препараты так называются потому, что не сохраняются долго. После ознакомления с микрообъектом временный препарат смывается с предметного стекла. Приготовление микропрепарата - один из обязательных видов умений, формируемых в курсе биологии, начиная с 6 класса школьной программы.

Для изучения живых клеток микроорганизмов применяют препараты «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток», «агаровая пленка» («микрокультура»). Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. Препараты, работа с которыми уже закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Микропрепараты позволяют проводить широкий ряд опытов. Они предназначены для детального изучения микроскопических структур под микроскопом [4].

#### Способы приготовления временных микропрепаратов.

1. Взять предметное стекло и, держа его за боковые грани, положить на стол.

2. Положить в центр стекла объект исследования (тонкие волокна ваты).

3. В пипетку набрать немного воды из стаканчика и нанести на препарат 1-2 капли.

4. Взять за боковые грани покровное стекло и положить его сверху на предметное стекло.

5. Если жидкости много, и она вытекает из-под покровного стекла, удалить ее при помощи фильтровальной бумаги. Если же под покровным стеклом остались места, заполненные воздухом, то добавить жидкость, поместив ее каплю рядом с краем покровного стекла, а с противоположной стороны фильтровальную бумагу

6. Препарат готов.

7. Поместить его на предметном столике микроскопа и рассмотреть его вначале при малом увеличении, а затем при большем [3].

### 3. Приготовление препарата «раздавленная капля» и «висячая капля»

Для определения формы клеток и подвижности микроорганизмы исследуют в препаратах «раздавленная» или «висячая» капля. [7]

Раздавленная капля — это метод приготовления препаратов для микроскопического изучения живых объектов. Применяется при исследовании бактерий, клеток культуры тканей, простейших, ряда водорослей и других мелких организмов.

Для приготовления препаратов по методу раздавленной капли на поверхность чистого сухого предметного стекла наносят каплю воды,

физиологического раствора или культуральной жидкости. Стеклой палочкой или бактериологической петлей в каплю вносят небольшое количество исследуемой культуры и осторожно распределяют ее в жидкости для получения однородной взвеси. При работе с культурой тканей на предметное стекло наносят каплю суспензии клеток в культуральной жидкости. Если суспензия клеток слишком густая, предварительно готовят рабочее разведение культуры. Для этого обычно к 4,5 мл воды, физиологического раствора или среды для роста добавляют 0,5 мл суспензии клеток и тщательно перемешивают. Этим достигается десятикратное разбавление исходной суспензии. При необходимости можно получить более высокие разведения (1:100—1:1000 и т. д.); приготовленную каплю накрывают покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха. Если часть жидкости выступает за края покровного стекла, излишек среды можно отсосать узкой полоской фильтровальной бумаги.

Готовые препараты рассматривают в сухих и иммерсионных системах. Для получения наибольшего контраста применяют темнопольную или фазово-контрастную микроскопию. Так как при этом чаще всего необходима двойная иммерсия (объектива и конденсора), толщина препарата не должна превышать 1,1—1,3 мм. Неокрашенные организмы выглядят под микроскопом обведенными светлой или темной (в зависимости от фокусировки) полоской (линия Векке), возникающей на границе преломления среды и тела.

Помимо изучения неокрашенных бактерий, простейших и т. д., метод раздавленной капли позволяет применять методы прижизненной окраски. В качестве красителя широко используют 0,1% водный раствор нейтрального красного [3].

#### 4. Методика приготовления постоянного препарата

Обязательным условием для долгосрочного хранения препарата из растительного или животного материала является его фиксация.

Фиксация – это процесс быстрой консервации клеточных структур, при котором все физиолого-биохимические процессы останавливаются, а водорастворимые вещества переходят в нерастворимое состояние. Следовательно, фиксация позволяет сохранить внутриклеточные структуры в неизменном виде на длительное время. Однако при фиксации в клетках могут появляться артефакты – новые структуры, которые отсутствуют в живой клетке, например, разнообразные вакуоли. Для предотвращения появления артефактов необходимо использовать специально подобранные химические растворы – фиксаторы, а сама фиксация должна проводиться в определенных условиях [3].

Распространенными фиксаторами являются: формальдегид, этиловый и метиловый спирт, ацеталкоголь, Фиксатор Карнуа (состав – абсолютный спирт – 10 см<sup>3</sup>; хлороформ – 3 см<sup>3</sup>; уксусная кислота – 1 см<sup>3</sup>). Срок фиксации 1-3 часа), фиксаторы, содержащие пикриновую кислоту, например, смесь Буэна (15 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты: 5 частей формалина: 1 часть ледяной уксусной кислоты. Этот фиксатор готовят непосредственно перед употреблением. Время фиксации от 1 до 24 часов), Фиксаторы, содержащие сулему, осмий.

Окрашивание позволяет выявлять внутриклеточные структуры, обладающие повышенным сродством к определенным красителям. Красители – это относительно низкомолекулярные органические вещества, обладающие повышенным сродством к определенным химическим компонентам клетки. Существует множество красителей, которые используются для различных целей. Нужно иметь в виду, что выбор



красителя связан с характером фиксации и различными методами предварительной обработки клеток [5].

Чтобы сделать временный препарат, срез, вынув из водного раствора красителя, промывают и заключают в глицерин. Приготовить постоянный препарат несколько сложнее: необходимо покрыть срезы покровным стеклом, заключив их в прозрачную затвердевающую среду. Можно, ополоснув срезы дистиллированной водой, капнуть на них разогретый раствор желатины. Но большую сохранность и лучшее качество препаратов можно получить, заключив их в канадский бальзам (прозрачную смолу пихты с показателем преломления  $n=1,535$ ). Поскольку канадский бальзам не смешивается с водой, но растворим в ксилоле (толуоле, бензоле), создается необходимость провести препарат по «проводке» для срезов, но в направлении, противоположном тому, в которое стекла велись для удаления парафина и подготовке к окраске. При этом нужно помнить, что даже незначительное присутствие воды в срезе делает препарат мутным, непригодным для изучения. Поэтому переносить срезы по проводке от воды к толуолу надо медленно, погружая стекло в стаканчик со спиртом или толуолом на 2—3 мин. Схема проведения срезов может быть следующей:

дистиллированная вода — ополоснуть,

спирт 70%-ный — 2 мин,

96%-ный — 2 мин,

100%-ный — 3 мин,

Ксилол I — 2 мин,

Ксилол II — 3—5 мин.

Итак, задача, которая стоит при подготовке препарата для монтирования его под покровное стекло, состоит в том, чтобы, не вымыв красителя,

добиться полного обезвоживания среза. Достигается это проводкой по спиртам возрастающей крепости, вплоть до 100%. Обработка срезов ксилолом имеет двойное значение: с одной стороны, в нем достигается просветление препарата, усиливается его прозрачность (краситель при этом из препарата не вымывается), с другой стороны, создаются благоприятные условия для дальнейшего пропитывания среза канадским бальзамом, который растворим в ксилоле. Само заключение среза под покровное стекло осуществляется быстро, пока на препарате не испарился ксилол. Капля бальзама наносится на покровное стекло (оно должно быть чистым и сухим), и покровное стекло быстро переворачивается над срезом. Можно капать бальзам на предметное стекло на поверхность среза и быстро покрывать его покровным стеклом. Канадский бальзам должен иметь консистенцию растительного масла (или гуще). Через 1—2 дня бальзам застывает.

Вместо канадского бальзама можно использовать синтетическую среду на основе полистирола.

Для этого берут 25г бесцветного полистирола, 5 мл дибутилфталата (пластификатор может быть любой) и доливают ксилолом до 100 мл. Раствор должен иметь консистенцию меда. Заключение среза под покровное стекло не отличается, от выше описанного.

Несомненным плюсом синтетического бальзама это инертность и более лучшая сохранность красителей.

#### Этапы приготовления постоянного микропрепарата

1) Изучаемый объект помещают в раствор из 1 части формидрона с 2 частями воды на несколько дней. Для мазков это время ограничивается 15 минутами и формидрон разводить не следует. В случае использования этилового спирта время фиксации составляет 15-20 мин.

2) После фиксации объект следует отмыть от фиксатора, для этого его помещают на несколько часов в проточную воду. Для удержания объекта при отмывке удобно поместить его в ситечко-шарик для заваривания чая. Исследуемый объект переносят в батарею спиртов с целью удаления воды.

Мазки ополаскивают в проточной воде в течение 3-5 минут. Струя воды должна быть не сильной, мазок сушат.

3) Далее если необходимо препарат может быть окрашен одним из доступных вам красителей.

4) После окраски препарат готовят к заключению в монтирующую среду.

Приготовить батарею (ряд флаконов) растворов спиртов возрастающей крепости для удаления воды.

Последовательно наливаем в лабораторные стаканчики этанол или изопропанол в концентрациях 50%, 70%, 96%, 99%.

Объект помещают в стаканчик, начиная с 50% этанолом на 10 минут. Затем перемещают объект в стаканчики с все более высокой концентрацией спирта, выдерживая в каждом по 10 минут. В процессе такого перемещения этанол будет плавно вытягивать воду из объекта. Помещать объекты сразу в концентрированный этанол нельзя, так как в этом случае, быстро выходящая из клеток вода может повредить клеточные оболочки

Для мазков столь долгое пребывание в спиртах не требуется, достаточно 30-60 секунд, так как некоторые красители могут вымываться из мазка.

5) Если Вы хотите заключить препарат в канадский бальзам, обезвоженный материал переносят в уайт-спирит или ксилол на 5-6 часов, Канадский бальзам можно заменить раствором канифоли в уайт-спирите (ксилоле), по консистенции напоминающий сироп.

б) Если препарат заключается в глицерин-желатиновую смесь, то объект переносят не уайт-спирит, а в глицерин на несколько часов (глицерин, аптечный)

Заключение объекта в глицерин-желатин.

Последний готовится следующим образом. Чистый желатин (7 г) размачивают в течение 2—3 ч в 42 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляют 50 г глицерина и 0,5 г кристаллической карболовой кислоты. Все вместе нагревается при помешивании на водяной бане, фильтруется и охлаждается. При появлении осадка тщательно профильтровать через стекловату. Готовый «глицерин-желатин» хранить в герметичном сосуде. При комнатной температуре глицерин-желатин застывает.

Небольшой кусочек глицерин-желатина иглой или скальпелем переносят на предметное стекло. Последнее слегка нагревают на пламени спиртовки, глицерин-желатин расплавляется. В него из глицерина переносится объект и покрывается покровным стеклом.

Мазок заключают следующим образом, кусочек глицерин-желатина помещают на покровное стекло, последнее слегка нагревают на спиртовке, глицерин-желатин расплавляется, объект покрывается покровным стеклом.

Пространство между предметным и покровным стеклом заполняется монтирующей средой, которая, закрепляет покровное и предметное стекла и консервирует объект. Самым главным требованием к монтирующей среде является соответствие ее коэффициента преломления света к аналогичному показателю стекла.

7) Заключение объекта в канифоль или канадский бальзам

На покровное стекло по центру наносят каплю или, если стекло длинное, две капли жидкого раствора канифоли. Покровное стекло помещают каплей вниз и слегка прижимают

Края покровного стекла не следует вытирать ватой или марлей, смоченной ксилолом, так как при этом часть смолы может растечься по чистой поверхности покровного стекла. Засыхая, она образует неровности, которые мешают наблюдению под микроскопом и от которых очень трудно избавиться.

В результате неполного обезвоживания в окрашенных заключенных препаратах часто образуются непрозрачные или мутные зоны. Под микроскопом в таком участке среза и над ним обнаруживаются многочисленные мелкие капельки воды, окраска сильно выцветает. Чтобы избавиться от этого, снимают покровное стекло, смывают ксилолом синтетическую смолу или бальзам, обезвоживают срез в 100%-ном спирте, ацетоне или изопропиловом спирте, просветляют в смеси ксилола с обезвоживающим агентом и в 2-3 сменах свежего ксилола и вновь заключают.

Синтетическая монтирующая среда на основе полистирола.

Полистирол (бесцветный)-25г. (можно использовать пищевые стаканчики)

Дибутилфталат-5мл (любой доступный пластификатор, если не добавлять, полистирол трескается после высыхания)

Ксилол до 100 мл.

Растворение происходит в течение нескольких дней, раствор должен иметь консистенцию меда[3].

## 5. Методика изготовления мазка-отпечатка

Различают «сухие» и «влажные» мазки. Первые имеют ограниченное применение и используются почти исключительно при изучении крови и кровепаразитов. «Влажные» мазки применяются часто главным образом при изучении паразитических простейших, а также и в других случаях. Мазки изготавливаются следующим образом. Пинцетом берут тот орган, из которого предполагается сделать мазок, и «намазывают» на покровное стекло. Мазок должен быть равномерным и одинаковой толщины на всем покровном стекле. Если этого достигнуть сразу не удалось, то при помощи препаровальной иглы можно частично исправить мазок.

Не давая подсохнуть мазку, покровное стекло опускают мазком вниз на теплый этиловый спирт, предварительно налитый в часовое стекло или солонку. Происходит быстрая коагуляция тканевых элементов, и мазок плотно пристает к стеклу. Дальнейшая обработка мазка та же, что и тотальных препаратов. После фиксатора следуют промывка в 70° спирте, вторичная промывка в спирте, перенос в воду, окраска, отмывка в воде; спирты возрастающей крепости, ксилол, бальзам (полистирол) [1].

## 6. Мазки крови для исследования лейкоцитарной формулы

Поместить небольшую каплю венозной крови на предметное стекло, с помощью стеклянной капиллярной пипетки, или непосредственно из места укола пальца перенесите выступившую каплю крови на конец стерильного предметного стекла. Избегайте при этом всякого контакта между проколотым участком кожи и стеклом. Оставляют стекло в горизонтальном положении.

Размазывают каплю крови по стеклу с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом  $45^\circ$ ; коротким ребром, подождав, пока вся кровь расплывется по нему

Как только кровь растеклась по ребру, быстрым движением от капли проводят по предметному стеклу. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови.

После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска. Подсушить мазок можно, подержав его над абажуром лампы или помахав им в воздухе. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой».

Густо-розовые и красноватые мазки непригодны для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток [4].

## Список использованной литературы

- 1) Акмаев, И.Г. Руководство по гистологии [Текст] / И.Г. Акмаев и др.; под ред. Р.К. Данилова. – 2-е изд., исп. и доп. – СПб.: СпецЛит. - Том 1. – 2010. – 673 с.
- 2) Зачиняев, Я.В. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие. / Я.В. Зачиняев, А.В. Зачиняева. Режим доступа: <https://novainfo.ru/book/1#6>
- 3) Золотарев, А. Г Световая микроскопия микроорганизмов. Практическое руководство [Текст] А.Г.Золотарев, Е.В. Пименов, Д.А. Девришов. – Москва: Издательство «Агровет». – 2013. – 293с.
- 4) Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.medical-enc.ru/>
- 5) Микроскопическая техника в биологии [электронный ресурс]. - Режим доступа:<http://labx.narod.ru/documents/micropreparaty.html>
- 6) Практикум по микробиологии [Текст] : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
- 7) Роскин, Г.И. Микроскопическая техника [Текст] / Г.И. Роскин. – Рипол Классик. – 1951. – 447с.