

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра биохимии

БОЛЬШОЙ СПЕЦПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ.

РАЗДЕЛ «ГИСТОХИМИЯ»

*Методические указания
для студентов 4 курса дневного отделения,
специализация биохимия*

Составитель Е.В. Писарева

Самара
Издательство «Универс-групп»
2006

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Самарского государственного университета*

Рецензент

доктор биол. наук, профессор С.А. Сачков

Большой спецпрактикум по биохимии. Раздел «Гистохимия» : методические указания для студентов 4 курса дневного отделения, специализация биохимия / сост. Е.В. Писарева. – Самара : Изд-во «Универс-групп», 2006. – 12 с.

Методические указания предназначены для студентов дневного отделения биологического факультета, специализирующихся на кафедре биохимии. Представлены разработки для практических занятий по разделу «Гистохимия», являющегося частью «Большого спецпрактикума по биохимии». В раздел «Гистохимия» включены занятия по освоению техники работы на микротом-криостате, приготовлению срезов тканей и гистохимическому выявлению ряда ферментов (ЛДГ, СДГ, АТФ-аза). Основная цель лабораторных работ данного раздела – изучение химического состава тканей и клеток, установление локализации химических веществ в определенных компонентах тканей и типах клеток; формирование у студентов умений и навыков работы на микротом-криостате, приготовления криостатных срезов тканей, освоения гистохимических методик окрашивания, а также анализа полученных результатов с использованием накопленных знаний. Предлагаются разработки к 4 лабораторным занятиям, рассчитанным на 32 аудиторных часа по дисциплине специализации в соответствии с учебной программой для студентов-биологов. К каждому занятию приводится перечень заданий для студентов, необходимые материалы и оборудование, реактивы, ход работы, принцип методов, контрольные вопросы. Также приводится список основной и дополнительной литературы и темы для самостоятельной работы студентов.

Занятие 1.

Тема. Этапы приготовления гистохимических срезов. Устройство и принцип работы микротом-криостата. Способы приготовления гистохимических препаратов. (8 часов)

Цель работы. В результате выполнения лабораторной работы студент должен иметь представление об основных этапах приготовления гистохимических препаратов, знать устройство и принцип работы микротом-криостата, уметь делать гистохимические срезы тканей, владеть навыками работы на микротом-криостате и методами приготовления гистохимических препаратов.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, скелетная мышца крысы.

Раздаточные материалы: паспорт на микротом-криостат, инструкция о правилах и порядке работы на микротом-криостате.

Основные этапы работы на криостате и правила приготовления гистохимических срезов

1. Установите на столик микротом и закрепите его винтами и шайбами.
2. Внесите столик с микротомом в камеру, установите его на стойки и закрепите винтами.
3. Ребристый патрон датчика-реле установите в боковых пазах кронштейна.
4. В верхних пазах кронштейна установите термометр.
5. Подсоедините к штуцеру узла подачи углекислоты хвостик трубопровода.
6. Установите на микротом лоток.
7. Контейнер с объектодержателем и коробку с влагопоглотителем (защитная пленка должна быть снята), внесите в камеру и расположите с левой стороны. Контейнер подвесьте на трубе испарителя.
8. Подключите микротом-криостат к электрической сети. Люки для рук плотно закройте диафрагмами.
9. Установите на шкале датчика-реле температур (поворачивая маховичок датчика) температурный режим -25°C (температурный режим ниже -25°C устанавливать не рекомендуется, т.к. это может повлечь за собой выход из строя холодильного агрегата) и, нажатием на клавишу пульта управления, включите холодильный агрегат.
10. Проверьте работу освещения камеры.
11. После опробования работы холодильной системы и освещения можете приступить к работе на микротоме аппарата.
12. Микрогайку микротомы установите в крайнее верхнее положение.

13. Лимб микротомы установите в положение соответствующее для получения необходимой толщины срезов.

14. Подготовьте объектодержатели, которые будут использованы в работе, для примораживания объектов и установите их в контейнер, подвешенный на трубке испарителя.

15. Внесите в камеру (через люки для рук) все необходимые приспособления для получения срезов (кисточки, предметные стекла и др.).

16. Люки для рук плотно закройте диафрагмами.

17. Установите на датчике-реле температуры необходимый температурный режим и проследите за достижением заданной температуры воздуха в камере аппарата.

18. Кусочки ткани, подлежащие резанию на микротоме, приморозьте к объектодержателям (*Внимание!!! В зависимости от размера кусочка выберите объектодержатель с малой или большой площадкой. Для удобства приготовления срезов лучше брать кусочки небольшого размера 5-7 мм.*)

19. Объектодержатель с исследуемой тканью установите на рычаге микротомы.

20. Внесите в камеру нож, установите его в ножедержателе и зафиксируйте замком.

21. На свободный конец ножа оденьте защитную оправу и закрепите её.

22. Установленный на рычаге объектодержатель приблизьте к ножу так, чтобы кусочек ткани касался ножа, и зафиксируйте замком. Можно приступать к резанию ткани. Перед производством среза охлаждайте нож. *Внимание!!! Движения ножа должны быть плавными и быстрыми, чтобы получаемые срезы были одинаковой толщины и не крошились. В противном случае срезы будут некачественными (рваными, складчатыми, разной толщины), что негативно повлияет на процесс дальнейшего окрашивания, микроскопии и анализа полученных данных.*

23. Нанесите срез на охлажденное предметное стекло и расправьте охлажденной кисточкой. Для оттаивания среза прижмите палец к нижней стороне предметного стекла.

24. В случае применения углекислоты для охлаждения ножа, подсоедините баллон с углекислотой с помощью гибкого шланга к штуцеру, расположенному на правой боковой стенке камеры. Закройте кран узла подачи углекислоты на нож и приоткройте вентиль баллона.

25. После окончания работы снимите нож и вынесите его из камеры, закройте вентиль баллона с углекислотой, вынесите из камеры использованные объектодержатели и лоток с неиспользованными срезами.

Задание для студентов.

1. Изучить устройство микротом-криостата и правила работы на нем.
2. Освоить основные этапы приготовления гистохимических срезов криостатным способом

3. Приготовить гистохимические срезы скелетной мышечной ткани крысы.

4. Оформить лабораторный журнал (указать тему работы, кратко описать устройство криостата, микротомы и основные этапы приготовления гистохимических срезов).

5. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем и показать лабораторный журнал.

6. После выполнения заданий для закрепления материала ответить на контрольные вопросы.

Контрольные вопросы.

1. Назовите основные части криостата.
2. Расскажите каково устройство микротомы и порядок работы на нём.
3. Опишите основные этапы приготовления криостатных срезов.
4. Какие криостатные срезы считаются качественными?
5. Какие условия необходимо соблюдать, чтобы приготовить качественный гистохимический препарат?

Занятие 2.

Тема. Гистохимическое определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ). (8 часов)

Цель работы. В результате выполнения лабораторной работы студент должен получить представление о локализации фермента (ЛДГ) в структуре скелетно-мышечной ткани крысы, знать принцип метода гистохимического определения ЛДГ в тканях, уметь проводить все этапы получения гистохимических препаратов (изготовление среза, инкубирование, промывка, окраска, заливка, микроскопия), владеть навыками анализа полученных данных с применением микроскопии.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, воздушный термостат на 37°C , предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, мышечная ткань крысы, световой микроскоп, реактивы.

Реактивы:

1. НАД⁺;
2. NaOH (0,2M);
3. Молочная кислота (0,2M) – *(4,5 мл 40 % -й кислоты довести дист. водой до 10 мл, раствор должен быть коричневатым!!!);*
4. Фенолфталеин (1% спиртовой раствор);
5. К-Na фосфатный буфер (0,2 M, pH 7,2);
6. Нитро-СТ (2,5 мг/мл);

7. Глицерин-желатина.

Состав инкубационной среды: 6 мг НАД⁺; H₂O дистил. 0,5 мл; К-На фосфатного буфера (0,2 М, рН 7,2) 0,4 мл; нитро-СТ 0,4 мл; 0,5 мл субстрата (лактат Na).

Приготовление глицерин-желатины: К 41 мл H₂O дистиллированной добавить 7 г мелко нарезанной пищевой желатины и оставить набухать 3 часа. Затем добавить 50 мл глицерина и 1 г фенола, нагревать на плитке в течение 10-15 минут, постепенно помешивая, после чего профильтровать через вату. Хранить в термостате при 37⁰ С, иначе быстро застывает. Застывшую глицерин-желатину растапливают в термостате при 60⁰ С (водяную баню лучше не использовать, так как при этом образуются пузырьки воздуха, которые мешают при микроскопировании препарата).

Приготовление лактата Na: К 0,2 М NaOH добавить 2 капли фенолфталеина и титровать по каплям 0,2 М молочной кислотой до исчезновения розовой окраски (раствор должен быть светло-коричневым или прозрачным).

Принцип метода: Дегидрогеназы (ЛДГ и СДГ), катализируя окислительно-восстановительные реакции, отщепляют от субстрата H⁺, акцептором которого являются соли тетразолия (краситель нитро-СТ). Они превращаются в водонерастворимый окрашенный формазан, маркирующий места активности фермента.

Ход работы.

1. Приготовить криостатные срезы толщиной 10-12 мкм и подсушить их на воздухе.
2. Пипеткой нанести на срезы инкубационную смесь и инкубировать в термостате при 37⁰ С от 10 - 30 мин в зависимости от ткани.
3. Слить инкубационную среду, ополоснуть в буферном растворе.
4. Поместить на 10 мин в 10% формалин.
5. Ополоснуть в буферном растворе.
6. Поместить на 5 мин. в дистиллированную воду.
7. Заключить в глицерин-желатину.

Результат: Места активности фермента маркируются кристаллами формазана тёмно-фиолетового цвета, красно-фиолетовый цвет зёрен на таком же фоне – артефакт, сплошное окрашивание препарата (отсутствие зёрен) – тоже артефакт.

Задание для студентов:

1. Приготовить гистохимический препарат ЛДГ из скелетной мышцы крысы.
2. Провести микроскопирование полученного препарата при увеличении объектива 40х.

3. Оформить лабораторный журнал (указать тему работы, описать ход работы, зарисовать полученный препарат, сделать описание препарата, анализируя полученный результат).

4. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем и показать лабораторный журнал.

5. После выполнения заданий для закрепления материала ответить на контрольные вопросы.

Контрольные вопросы.

1. Из каких этапов складывается приготовление гистохимического препарата ЛДГ.

2. В чём заключается принцип гистохимического определения ЛДГ.

3. Какова роль ЛДГ в метаболизме мышечной ткани.

Занятие 3.

Тема. Гистохимическое определение сукцинатдегидрогеназы (СДГ). (8 часов)

Цель работы. В результате выполнения лабораторной работы студент должен получить представление о локализации фермента (СДГ) в структуре скелетно-мышечной ткани крысы, знать принцип метода гистохимического определения СДГ в тканях, уметь проводить все этапы получения гистохимических препаратов (изготовление среза, инкубирование, промывка, окраска, заливка, микроскопия), владеть навыками анализа полученных данных с применением микроскопии и имеющихся теоретических знаний.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, воздушный термостат на 37⁰С, предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, мышечная ткань крысы, световой микроскоп.

Реактивы:

1. Сукцинат Na (0,2М)
2. Формалин (10% раствор)
3. К-Na фосфатный буфер (0,2 М, рН 7,6)
4. Нитро-СТ (1 мг/мл)
5. Глицерин-желатина

Состав инкубационной среды: 3мл К-Na фосфатного буфера (0,2 М, рН 7,6), 3мл сукцината Na (0,2М), 6 мл нитро –СТ (1мг/мл).

Приготовление глицерин-желатины, принцип метода и результат: см. Занятие 2.

Ход работы:

1. Приготовить криостатные срезы толщиной 10-12 мкм и подсушить их на воздухе.
2. Пипеткой нанести на срезы инкубационную смесь и инкубировать в термостате при 37⁰ С от 10 - 30 мин в зависимости от ткани.
3. Слить инкубационную среду, ополоснуть в буферном растворе.
4. Поместить на 10 мин в 10% формалин.
5. Ополоснуть в буферном растворе.
6. Поместить на 5 мин. в дистиллированную воду.
7. ЗаклЮчить в глицерин-желатину

Задание для студентов:

1. Приготовить гистохимический препарат ЛДГ из скелетной мышцы крысы.
2. Провести микрофотографирование полученного препарата при увеличении объектива 40х.
3. Оформить лабораторный журнал (указать тему работы, описать ход работы, зарисовать полученный препарат, сделать описание препарата анализируя полученный результат).
4. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем и показать лабораторный журнал.
5. После выполнения заданий для закрепления материала ответить на контрольные вопросы.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается принцип гистохимического определения СДГ.
2. Перечислите основные этапы приготовления гистохимического препарата СДГ.
3. Какова внутриклеточная локализация изучаемого фермента? Значение СДГ в метаболизме мышечной ткани.

Занятие 4.

Тема. Гистохимическое определение АТФ-азы. (8 часов)

Цель работы. В результате выполнения лабораторной работы студент должен получить представление о локализации фермента (АТФ-азы) в структуре скелетно-мышечной ткани крысы, знать принцип метода гистохимического определения АТФ-азы в тканях, уметь проводить все этапы получения гистохимических препаратов (изготовление среза, инкубирование, промывка, окраска, заливка, микрофотография), владеть навыками анализа полученных данных с применением микрофотографии.

Материалы и оборудование: микротом-криостат, воздушный термостат на 37°C , предметные и покровные стекла, ножи, держатели для ткани, скальпель, кисточка, лоток для срезов, планшетка для предметных стёкол, мышечная ткань крысы, световой микроскоп.

Реактивы:

1. АТФ (натриевая соль)
2. Формалин (10% раствор)
3. Трис-малеатный буфер (0,2 М; pH 7,2)
4. Нитро-СТ (1 мг/мл)
5. MgSO_4 (0,1 М)
6. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (2%)
7. Глицерин-желатина

Состав инкубационной среды: H_2O дист. 10 мл; 12 мг АТФ; 60 мл трис-малеатного буфера (0,2 М); 2,5 мл MgSO_4 (0,1 М), 20 мг $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Приготовление глицерин-желатины: см. Занятие 2.

Принцип метода: высвобождающаяся под действием фермента фосфорнаф кислота сначала осаждается находящимися в инкубационной среде ионами металла, затем образовавшаяся соль металла переводится в бурый осадок сульфида металла.

Результат: осадок сульфида свинца маркирует места ферментативной активности

Ход работы:

1. Кусочки ткани предварительно фиксировать в 10% нейтральном формалине не больше суток в холодильнике.
2. Промыть проточной водой 30 мин.
3. Приготовить криостатные срезы толщиной 10-12 мкм и подсушить их на воздухе.
4. Пипеткой нанести на срезы инкубационную смесь и инкубировать 1 час в термостате при 37°C .
5. Слить инкубационную среду, быстро промыть в нескольких порциях дистиллированной воды.
6. Поместить в 0,5-1% раствор сульфида аммония или сульфида натрия на 30 сек – 1 мин.
7. Промыть проточной водой.
8. ЗаклЮчить в глицерин-желатину.

Задание для студентов:

1. Приготовить гистохимический препарат АТФ-азы из скелетной мышцы крысы.

2. Провести микроскопирование полученного препарата при увеличении объектива 40х.
3. Оформить лабораторный журнал (указать тему работы, описать ход работы, зарисовать полученный препарат, сделать описание препарата анализируя полученный результат).
4. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем и показать лабораторный журнал.
5. После выполнения заданий для закрепления материала ответить на контрольные вопросы.

Контрольные вопросы.

1. Назовите класс ферментов, к которому относится АТФ-аза. Какова роль фермента в организме, и в частности, в метаболизме мышечной ткани?
2. Из каких этапов складывается приготовление гистохимического препарата АТФ-азы.
3. Каков принцип гистохимического определения АТФ-азы.

Темы для самостоятельной работы студентов

1. Исторические этапы развития гистохимии.
2. Принципы приготовления гистохимических препаратов.
3. Виды красителей и способы окрашивания, применяемые в гистохимии.
4. Предварительные этапы подготовки тканей к изготовлению срезов.
5. Применение электронного микроскопа в гистохимических исследованиях.
6. Цитофотометрия, как метод количественной оценки результатов в гистохимии.
7. Гистохимическое определение белков.
8. Гистохимическое выявление углеводов.
9. Определение нуклеиновых кислот с помощью гистохимических методов.
10. Иммуногистохимия.

Литература

Основная

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М. : Медицина, 1998. – 586 с.
2. Введение в количественную гистохимию ферментов / под ред. Т.Б. Журавлевой и Р.Д. Почуханова. – М. : Медицина, 1978. – 238 с.
3. Древаль В.А., Тумаков С.А. Методические разработки к большому практикуму и спецпрактикуму по биологической химии. – Куйбышев : Куйбышевский государственный университет, 1980. – 70 с.
4. Луппа Х. Основы гистохимии / под ред. Н.Т. Райхлина. – М. : Мир, 1980. – 342 с.
5. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. – М. : Мир, – 1993.
6. Мецлер Д. Биохимия. – М. : Мир, 1980. – Т. 1; 2.
7. Практикум по гистологии, цитологии и эмбриологии / под ред. Н.А. Южной, А.И. Радостиной. – М. : Изд-во УДН, 1989. – 253 с.
8. Технический паспорт устройства «Микротом-криостат».

Дополнительная

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. – М. : Мир, 1989. – 358 с.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия. – М. : Мир, 1974. – 488 с.
3. Гистохимия и электронная микроскопия в клинической и экспериментальной онкологии / под ред. Н.А. Краевского [и др.]. – М. : Медицина, 1975. – 296 с.
4. Гистохимические методы в диагностике опухолей / под ред. Н.А. Краевского. – М. : Медицина, 1968. – 296 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М. : Мир, 2002. – 234 с.
6. Лойд З. Гистохимия ферментов. – М. : Мир, 1982. – 326 с.
7. Луцик А.А. Лектины в гистохимии. – Львов : В. шк., Изд-во при Львовском университете, 1989. – 140 с.
8. Шубникова Е.А. Функциональная морфология тканей. – М. : Изд-во. МГУ, 1981. – 328с.
9. Шубникова Е.А. Лекции по гистологии. - М.: Изд-во. МГУ, 1974. - 272 с.

Печатается в авторской редакции
Компьютерная верстка, макет В.И. Никонов

Подписано в печать 02.03.06
Гарнитура Times New Roman. Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.
Усл.-печ. л. 0,75. Уч.-изд. л. 0,46. Тираж 100 экз. Заказ № 401
Издательство «Универс-групп», 443011, Самара, ул. Академика Павлова, 1

Отпечатано ООО «Универс-групп»