

Лабораторная работа №2

Тема 2.

Способы взятия крови у
рыб

Оборудование и реактивы:

- - шприц с инъекционными иглами - стерильные,
- - пастеровские пипетки - стерильные,
- - часовое стекло,
- - 5% раствор натрия цитрата или 0,2% раствор гепарина (1.000 ЕД/мл),
- - анестетики,
- - спирт,
- - марля, вата.

- Кровь берут у голодной рыбы, выдержанной в хорошо аэрированной воде в течение 5 - 10 минут после отлова. Если это невозможно, то пойманную рыбу следует сразу помещать в ведро с водой из водоема в соотношении 1:10, содержащей релаксирующую концентрацию одного из анестетиков:
- пропаксат (0,6 - 0,8 мг/л), хиалдин (25 - 30 мг/л), серный эфир (1 - 1,5%) и др. Вода, в которой находится анестезированная рыба, должна постоянно аэрироваться.
- В зависимости от размера объекта и необходимого количества крови кровь берут несколькими способами: из сердца, жаберной вены, хвостовой артерии, отсечением хвоста.

- Место пункции после снятия чешуи обрабатывают 70° спиртом и высушивают ватным тампоном для удаления слизи. Для взятия крови чаще используют шприц с инъекционной иглой либо пастеровскую пипетку. Инструменты предварительно обрабатывают водным раствором антикоагулянтов: цитрата натрия или гепарина. Место взятия крови нельзя сжимать во избежание попадания тканевой жидкости, искажающей результаты. Повторно брать кровь из одного и того же места не рекомендуется.
- Анализируемая кровь должна быть свежей, жидкой. Во избежание разрушения эритроцитов (гемолиза) кровь берут в подготовленные пробирки (или часовое стекло), сливая осторожно по стенке.

Приготовление и окраска мазков крови

1. Подготовка предметных стекол:

- - один конец стекла размером в 1 - 1,5 см шлифуют на наждаке для надписи простым карандашом,
- - стекла кипятят в 1%-ном растворе двууглекислой соды - 10 мин.,
- - охлаждают и промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой - 5 мин.,
- - стекла помещают в слегка подкисленный соляной кислотой раствор дистиллированной воды на 2- 3 мин.; затем дважды промывают дистиллированной водой, высушивают на воздухе или в сушильном шкафу и хранят в смеси спирта с эфиром 1:1. Перед употреблением их вынимают, насухо вытирают чистой салфеткой или фильтровальной бумагой. Они готовы к использованию.

2. Приготовление рабочего раствора краски азур-эозина:

- 5,5 мл концентрированной краски азур-эозина помещают в 250 мл нейтральной дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

3. Ход работы

- Кровь после взятия (см. п. 2) наносят в виде небольшой капли на заранее подготовленное обезжиренное предметное стекло на расстоянии 1,5 - 2 см от его шлифованного края.
- Большим и указательным пальцами правой руки берут шлифованное стекло за боковые ребра, ставят на предметное стекло под углом 45° и подвигают тыльной стороной к капле, которая от соприкосновения растекается. Скользящим движением продвигают шлифованное стекло вперед.
- Кровь должна равномерно распределяться по предметному стеклу в виде мазка. От каждой рыбы готовят не менее двух мазков. После приготовления мазка его высушивают на воздухе в течение 10 - 15 минут.

- Подсохшие мазки без фиксации окрашивают по Паппенгейму (Романовскому - Гимза). Первый этап
- - окрашивание и фиксация одновременно раствором Май-Грюнвальда в течение 5 минут, затем промывают нейтральной дистиллированной водой.
- Второй этап - докрасивание в рабочем растворе Романовского 30 - 40 минут. Качество окраски клеток контролируют под малым увеличением микроскопа.
- Окрашенные мазки промывают водопроводной водой и высушивают на воздухе.