

АНАЛИЗ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

Культивирование лимфоцитов
периферической крови и приготовление
препаратов метафазных хромосом

Методы получения препаратов хромосом

Прямые:
клетки
делятся
in vivo



- ✓ костный мозг
- ✓ селезенка
- ✓ семенник
- ✓ кишечный эпителий
- ✓ соединительная ткань
- ✓ хорион (плацента)

Непрямые:
клетки
делятся
in vitro

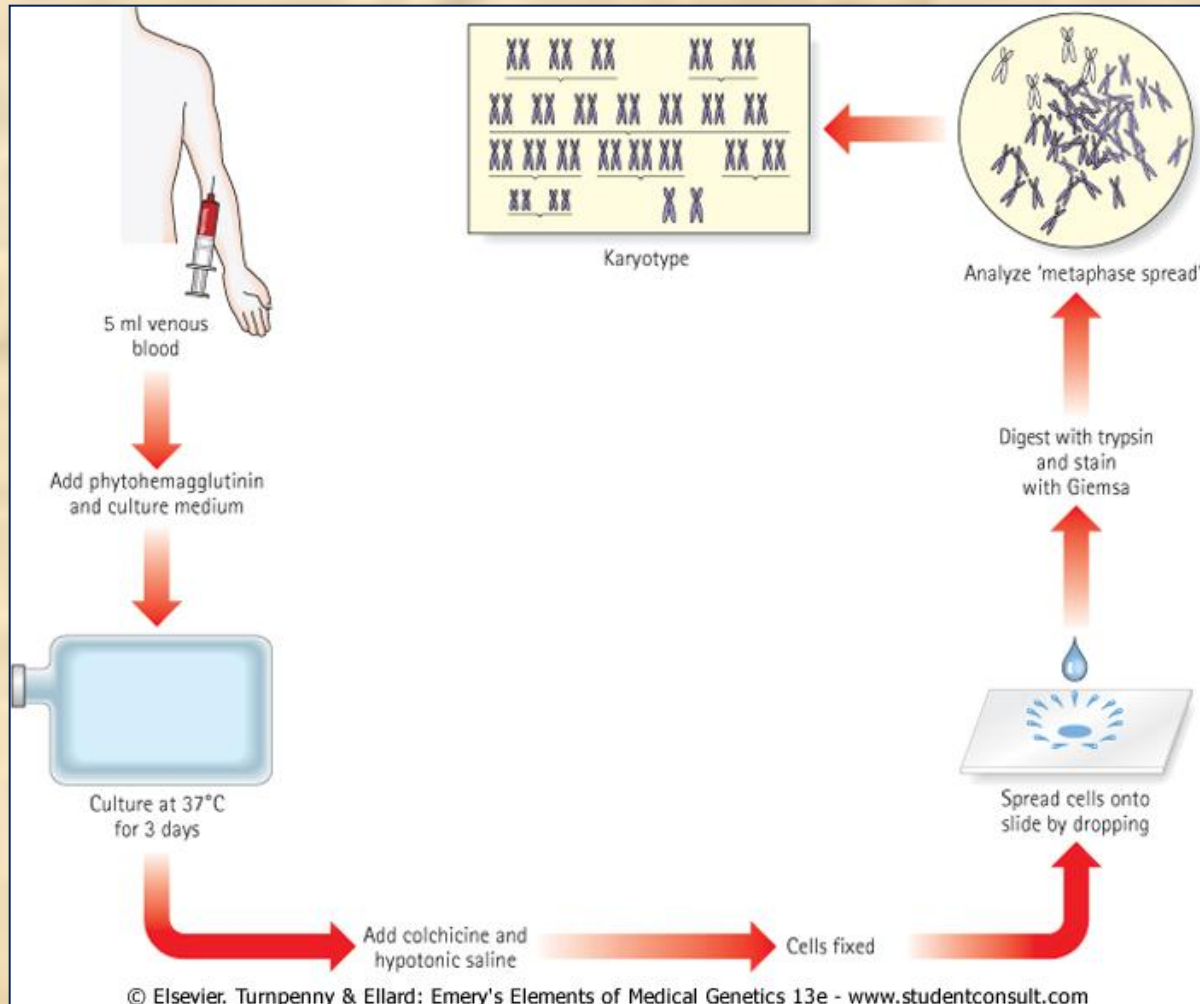


- ✓ лимфоциты периферической крови
- ✓ амниоциты
- ✓ фибробласты кожи

Методы получения препаратов хромосом

Метод	Преимущества	Недостатки
Прямой	<ul style="list-style-type: none">•Скорость получения результата•Экономичность•Нет индуцированных изменений кариотипов	<ul style="list-style-type: none">•Низкий митотический индекс•Сложность получения биологического материала
Непрямой	<ul style="list-style-type: none">•Доступность получения биологического материала•Высокий митотический индекс	<ul style="list-style-type: none">•Возможность изменений кариотипа клеток в процессе культивирования•Увеличение сроков проведения диагностики•Увеличение стоимости исследования

Культивирование лимфоцитов периферической крови



Требования к биологическому материалу:

1. *Использование антикоагулянта (гепарина)*
2. *Стерильность*

Культура лимфоцитов:

- *Кратковременная (72 ч)*
- *Митоген (ФГА)*
- *Цитостатик (колхицин)*
- *Гипотоническая обработка клеток*
- *Фиксация клеток*
- *Приготовление препаратов*

Оборудование

- Помещение для работы в стерильных условиях, оснащенное ламинарным боксом;
- Лабораторная комната, оснащенная вытяжным шкафом;
- Термостат или СО₂-инкубатор;
- Холодильник;
- Весы аналитические;
- Центрифуга;
- Микроскоп, оснащенный фазовым контрастом

Расходные материалы и реактивы

- ✓ Стерильные флаконы или пробирки для культивирования клеток
- ✓ Комплект дозаторов и стерильные наконечники на разные объемы
- ✓ Одноразовые шприцы (1-2 мл, 10 мл, 20 мл) при необходимости
- ✓ Стерильные флаконы для смешивания среды для культивирования клеток
- ✓ Штативы для пробирок
- ✓ Пинцеты, ножницы, маркеры
- ✓ Спиртовка, зажигалка
- ✓ Центрифужные конические пробирки
- ✓ Ватные или марлевые тампоны, стерильные перчатки
- ✓ Спирт этиловый (70°) для обеззараживания поверхностей и инструментария
- ✓ Питательная среда для культивирования клеток
- ✓ Сыворотка крови эмбрионов коров
- ✓ Антибиотики
- ✓ Митоген
- ✓ L-глутамин
- ✓ Калий хлористый
- ✓ Спирт этиловый (95°) для приготовления фиксатора для клеток
- ✓ Ледяная уксусная кислота для приготовления фиксатора для клеток
- ✓ Флаконы для приготовления гипотонического раствора и фиксатора
- ✓ Предметные стекла
- ✓ Стакан для стекол

Реактивы для культивирования клеток

♦ Питательная среда (Игла MEM, 199, RPMI 1640, Ham F-12 и др.)

Для разных типов клеток предпочтительны разные среды.

Питательная среда для культивирования содержит почти все (или необходимые) аминокислоты, витамины, некоторые предшественники нуклеиновых кислот, соли, источники липидов и углеводов и другие компоненты. Модификации сред определяются составом и количеством компонентов.

pH среды – 7,2 – 7,4. Для контроля pH в среды добавляют цветной индикатор (фенол-фталеин).

Газовая среда при культивировании – воздух или CO₂ (5%).

Реактивы для культивирования клеток

❖ Сыворотка (крови коров, крови плодов коров)

1. Обеспечение гормональными факторами, стимулирующими рост клеток и их функции. Факторы роста (несколько нг/мл) могут быть специфическими и неспецифическими, действуют как митогены. Гормоны (инсулин, глюкокортикоиды, эстрогены, андрогены)
2. Обеспечение факторами прикрепления и распластывания клеток (создание биоматрикса) – фибронектин, коллаген.
3. Обеспечение транспортными белками, переносящими гормоны, (альбумин, трансферрин), минеральными веществами (Cu, Zn, Co, Mn, Mo, Va, Se - выполняют разные функции, в том числе активация ферментов), липидами (простагландины, холестерин, линолевая кислота) и т.д.

Недостатки:

- не для всех клеток это физиологическая среда, возможна цитотоксичность
- изменчивость свойств сыворотки в зависимости от партии препарата
- может не содержать достаточного количества ростовых факторов

Реактивы для культивирования клеток

❖ Антибиотики (пенициллин, стрептомицин, гентамицин)

Предохраняют среду от заражения микроорганизмами.

Недостатки:

- нестойкость в растворе пенициллина и стрептомицина
- токсичность в эффективных концентрациях

❖ Митогены



1



3



2

1. ФГА – фитогемагглютинин (Т-лимфоциты)
2. Конканавалин А (Т-лимфоциты)
3. РWM - pokeweed mitogen (Т- и В-лимфоциты)

Митогены способны стимулировать синтез хромосомной ДНК и вступление неделящихся в норме клеток в митотический цикл.

Методы культивирования

Макрометод:

используют плазму с лимфоцитами
4 – 8 мл среды для культивирования

Полумикрометод:

0,5 мл цельной крови
6 мл среды для культивирования
1 – 1,5 мл сыворотки

Микрометод:

<0,5 мл цельной крови (0,2)
2 мл среды для культивирования
0,75-1 мл сыворотки

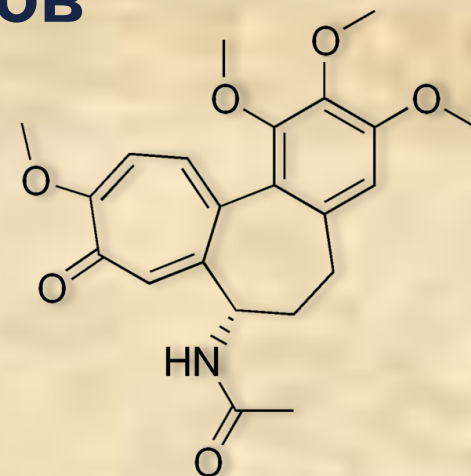
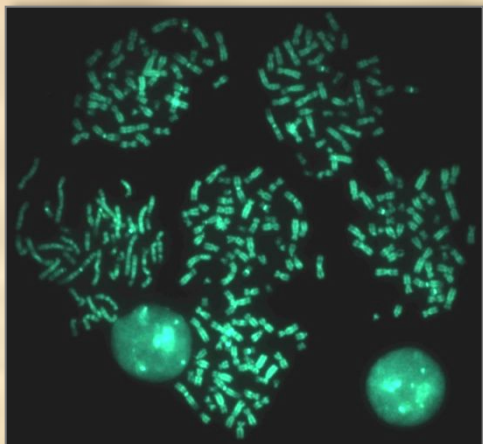
Наша модификация:

- 9 мл среды для культивирования
- 1 мл эмбриональной сыворотки крс
 - 0,75 мл цельной крови
 - 25-50 мкг/мл гентамицина
 - L-глутамин
- 12 мкг/мл ФГА (120 мкл раствора 1мг/мл)

Условия культивирования:

в термостате при 37°C в течение 72 часов в герметично закрытых флаконах

Накопление клеток на стадии метафазы с помощью цитостатиков



Колхицин (колцеמיד) - алкалоид из растений рода *Colchicum*, препятствует сборке нитей веретена деления, и как следствие приводит к «аресту» делящейся клетки на стадии метафазы.

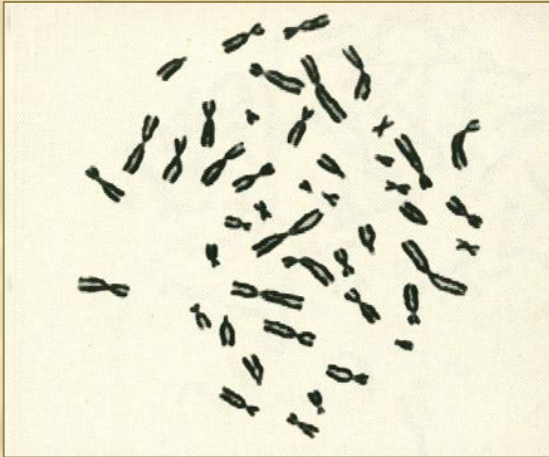
Концентрации колхицина – 0,4 – 8 мкг/мл, время инкубации клеток 40-60 мин.

Время обработки важнее концентрации. «К-митозы»

Наша модификация:

Из раствора колхицина (1мг/мл) взять 70 мкл и добавить в культуру клеток (в пробу 10 мл, конечная концентрация 7 мкг/мл). Инкубировать в течение последних 35-40 мин культивирования.

Гипотоническая обработка клеток



Цель обработки клеток гипотоническим раствором – получение метафазных пластинок с наименьшим числом налеганий отдельных хромосом друг на друга.

В качестве таких растворов могут быть использованы водные растворы солей (KCl, цитрат Na), смесь сыворотки крови с водой.

В процессе гипотонической обработки происходит набухание клетки, разжижение цитоплазмы, нарушение межхромосомных связей.

Избыточное время гипотонии	Недостаточное время гипотонии
<ul style="list-style-type: none">✓ Неполные метафазы (потери отдельных хромосом)✓ Диспергирование хроматина	<ul style="list-style-type: none">✓ Плохой разброс хромосом в метафазной пластинке

Наша модификация:

По окончании времени культивирования содержимое флакона перелить в центрифужную пробирку и центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удалить, осадок хорошо встряхнуть и залить гипотоническим раствором (5 мл 0,56% водного раствора KCl). Время гипотонической обработки 25 мин при комнатной температуре.

Фиксация клеток

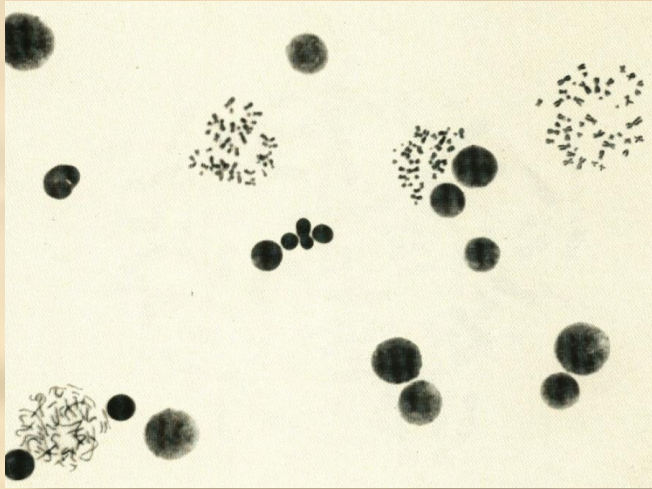
При фиксации клетки происходит:

коагуляция клеточных компонентов без разрушения внутренней структуры; затверждение коагулированной массы; протравливание клетки, дающее возможность её последующего окрашивания.

В качестве фиксирующего раствора часто используется смесь спирта (этанола или метанола) с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1 (фиксатор Карнуа). Уксусная кислота быстро проникает в клетки и вызывает коагуляцию, спирт уплотняет клеточные компоненты. При фиксации клеток в суспензии разрушается клеточная оболочка лимфоцита, сохраняется структура хромосом и интерфазных ядер. Фиксацией удаляются обломки клеток и кислоторастворимые белки.

Наша модификация: По окончании времени гипотонии в пробирку добавить 0,5 мл свежеприготовленного охлажденного фиксатора Карнуа, пробирку закрыть крышкой и содержимое перемешать переворотом. Этот этап является префиксацией, которая позволит избежать последующего «створаживания» клеточной массы при фиксации. Пробирку центрифугировать (1000 об/мин, 6-10 мин), надосадочную жидкость удалить, осадок тщательно перемешать и добавить 5 мл охлажденного (+4-0°C) фиксатора. Пробирку поместить в холодильник (+4°C) на 20 мин. Провести еще две смены фиксатора. На этапе фиксации клетки могут храниться продолжительное время при температуре -20 °C.

Приготовление препаратов хромосом



Сухо-воздушный метод приготовления препаратов митотических хромосом: Суспензия фиксированных клеток наносится на предметное стекло, в результате чего на его поверхности происходит распластывание метафазных пластинок и интерфазных ядер. Наиболее частая модификация - нанесение суспензии с высоты 30-50 см на охлажденное мокрое покровное стекло, что обеспечивает достаточную влажность для максимального распластывания клеток и удаления цитоплазмы.

Наша модификация: Достаточная влажность воздуха является критическим моментом при раскапывании клеток, поэтому при необходимости следует использовать водяную баню с горячей водой, на которую укладываются стеклянные «рельсы». Предметные стекла поместить в стакан с дистиллированной водой, охладить в холодильнике (+4°C) до использования. Предметное стекло с ровным мениском воды на поверхности положить на рельсы и с помощью пастеровской пипетки или дозатора нанести 3-4 капли суспензии с высоты 20 -30 см, равномерно распределив их по всей поверхности стекла. Стекло высушить на воздухе и провести предварительную оценку качества получившегося препарата с помощью фазового контраста.