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)*

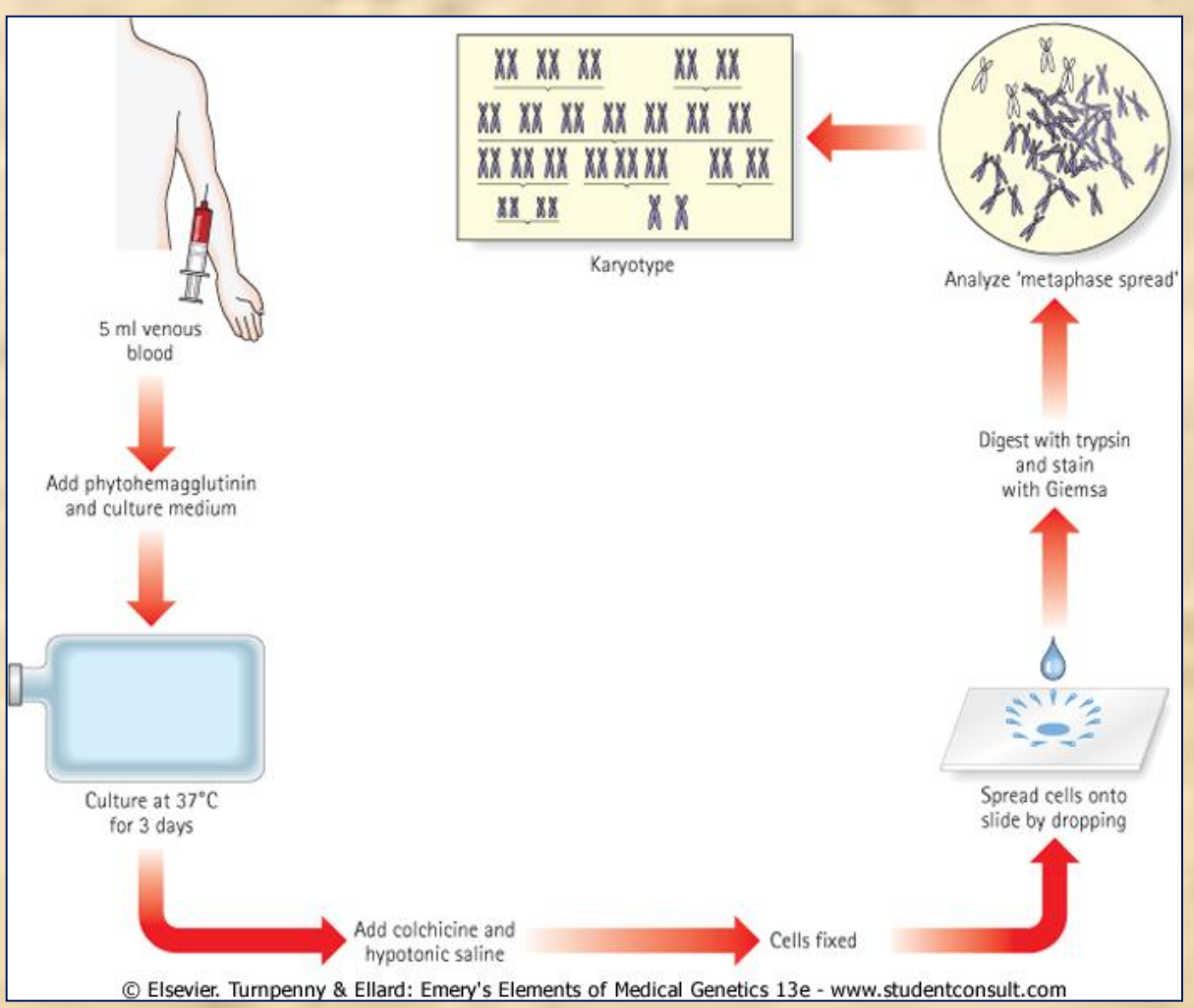
Непрямые:
клетки делятся *in vitro*

- ✔ *лимфоциты периферической крови*
- ✔ *амниоциты*
- ✔ *фибробласты кожи*

Методы получения препаратов хромосом

Метод	Преимущества	Недостатки
Прямой	•Скорость получения результата •Экономичность •Нет индуцированных изменений кариотипов	•Низкий митотический индекс •Сложность получения биологического материала
Непрямой	•Доступность получения биологического материала •Высокий митотический индекс	•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 CO_2-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 (70^0) для обеззараживания поверхностей и инструментария
✔Питательная среда для культивирования клеток
✔Сыворотка крови эмбрионов коров
✔Антибиотики
✔Митоген
✔L-глутамин
✔Калий хлористый
✔Спирт этиловый (95^0) 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 CO_2 (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

3

2

1

1. ФГА – фитогемагглютинин (Т-лимфоциты)
2. Конканавалин А (Т-лимфоциты)
3. PWM - 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

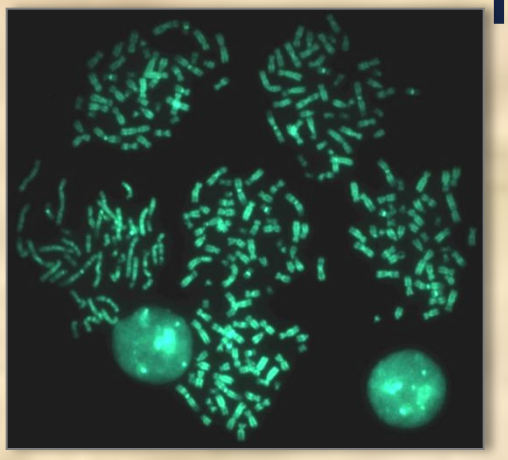
Полумикрометод:
0,5 мл цельной крови
6 мл среды для культивирования
1 – 1,5 мл сыворотки

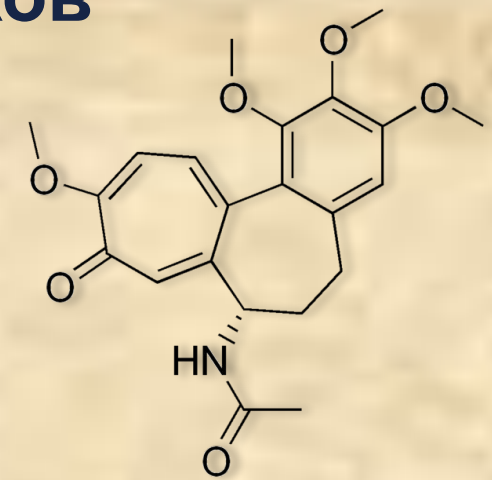
Микрометод:
<0,5 мл цельной крови (0,2)
2 мл среды для культивирования
0,75-1 мл сыворотки

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°С в течение 72 часов в герметично закрытых флаконах

Накопление клеток на стадии метафазы с помощью цитостатиков





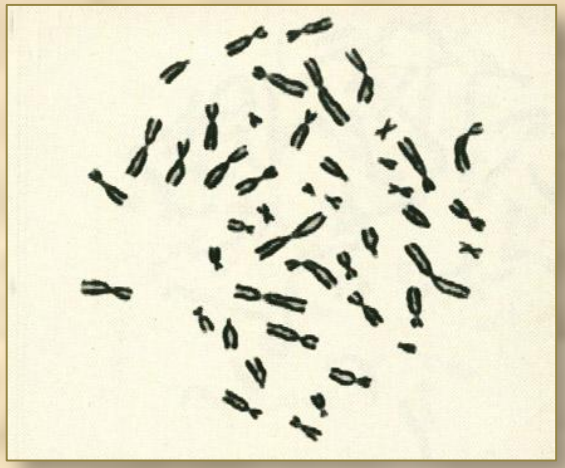
Колхицин (колцемид) - алкалоид из растений рода Colchicum, препятствует сборке нитей веретена деления, и как следствие приводит к «аресту» делящейся клетки на стадии метафазы.

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
✔ Неполные метафазы (потери отдельных хромосом) ✔ Диспергирование хроматина	✔ Плохой разброс хромосом в метафазной пластинке

Наша модификация:

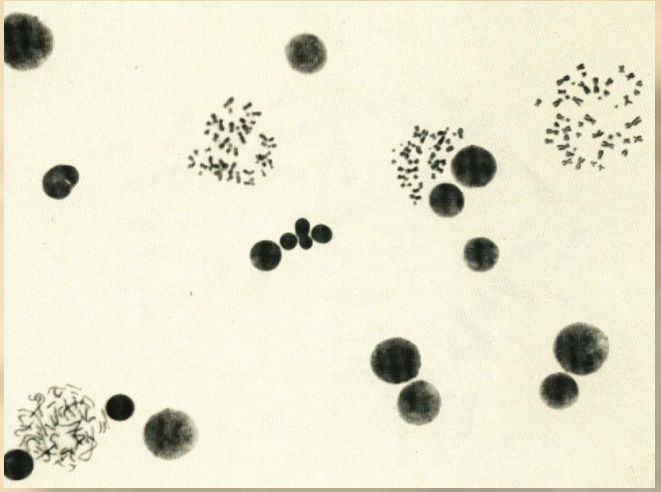
По окончании времени культивирования содержимое флакона перелить в центрифужную пробирку и центрифугировать при 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удалить, осадок хорошо встряхнуть и залить гипотониче-ским раствором (5 мл 0,56% водного раствора KCl). Время гипотонической обработки 25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

Фиксация клеток

При фиксации клетки происходит:
коагуляция клеточных компонентов без разрушения внутренней структуры; затвердение 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^{0}С) фиксатора. Пробирку поместить в холодильник (+4^{0}С) на 20 мин. Провести еще две смены фиксатора. На этапе фиксации клетки могут храниться продолжительное время при температуре -20 ^{0}С.

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°С) 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.