

Descripción

Este kit contiene los materiales y reactivos necesarios para la obtención de metafases para el análisis citogenético convencional de cromosomas humanos o de otros mamíferos.

Almacenamiento:

Refrigere entre los 4-8 °C.

Medidas de seguridad:

Se debe tener especial cuidado con los compuestos volátiles como: Metanol: inflamable, tóxico y peligroso por aspiración. Ácido Acético: inflamable y corrosivo.

Componentes del kit

5 jeringas x 3 mL, 5 tubos con heparina de sodio, 5 frascos de cuello inclinado con 9 mL de medio RPMI-1640 completo estéril, 5 pipetas pasteur, 5 porta objetos, 5 cubreobjetos, 5 tubos cónicos de 15 mL, solución hipotónica para 5 cultivos, Buffer fosfato pH 6,8, colorante Giemsa concentrado, colcemid y solución de colchicina.

Modo de Uso:

Para realizar los cultivos se requieren de 1.5 a 4 mL de sangre con heparina. En un frasco de cultivo que contiene 9 mL de RPMI 1640 completo listo para cultivos de linfocitos, se agregan 30 gotas de jeringa u 800 µL de sangre por cada cultivo esto debe realizarse en condiciones de esterilidad preferiblemente en cámara de flujo. Homogenizar e incubar a 37°C por 72 horas.

Cosecha:

1. Una vez cumplidas las 72 horas de incubación de los cultivos, disponer de tubos falcon de 15 ml nuevos para el procesamiento de los cultivos debidamente marcados.
2. Agregar 55 µL de solución de colchicina (a una concentración de 25 µg/mL) a cada cultivo. Mezclar suavemente e incubar por 25 minutos a 37°C.
3. Preparar la solución fijadora carnoy la cuál debe estar fría (en congelador a -20°C) para el momento de uso: esta solución se prepara mezclando Metanol y ácido acético en proporción 3:1 por un total de las muestras que se van a preparar.
4. Pasados los 25 minutos transferir cada cultivo al tubo falcon correspondiente para cada muestra y centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante por inversión. Tener cuidado de no ir a perder el pellet por ningún motivo. Tapar el tubo y resuspender suavemente hasta aflojar el pellet completamente.
6. Agregar 12 mL de solución hipotónica (esta debe estar a 37°C al momento de usarla) y agitar suavemente por inversión para homogenizar la muestra.
7. Incubar durante 15 minutos a 37°C.
8. Retirar la(s) muestra(s) de la incubadora y aforar hasta 14 mL con solución fijadora fría (la fijadora debe tener como máximo una hora de ser preparada). Resuspender suavemente por inversión del tubo.

9. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
10. Descartar el sobrenadante por inversión, teniendo cuidado de no perder el pellet. Resuspender suavemente el pellet celular.
12. Adicionar 5 mL más de solución fijadora fría.
13. Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
14. Desechar el sobrenadante por inversión, resuspender el pellet suavemente con golpes suaves con los dedos.
15. Agregar 5 mL de solución fijadora fría y resuspender completamente invirtiendo suavemente el tubo y guardar en la nevera.
16. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
17. Finalmente descartar el sobrenadante por inversión y resuspender el pellet. Agregar 5 mL de Carnoy, centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm, descartar, secar y resuspender. Ajustar el volumen de acuerdo a la turbidez (la solución de células deben presentar un aspecto lechoso y un haz de luz).
18. Gotear el material en láminas portaobjetos perfectamente limpios que deben posicionar en un ángulo de más o menos 45° y posteriormente flamear. Nunca olvidar marcar las láminas con el código de la muestra.
19. Es muy importante revisar las láminas al microscopio a 10X para ver si hay metafases.

Tinción con Giemsa:

1. Preparar la solución coloreadora haciendo uso del buffer fosfato pH 6,8 y el colorante Giemsa. Se recomienda mezclar 100 µL de colorante por cada 3 mL de buffer; en este caso tome el criovial que contiene el colorante y viértalo completamente en el recipiente que contiene el buffer mezclando hasta homogenizar así obtendrá la solución de tinción.
2. Ubicar la lámina en la bandeja de coloración y añadir la tinción Giemsa con pipeta pasteur cubriéndola completamente durante 3 minutos.
3. Retirar el exceso de colorante lavando con agua corriente (grifo), pasar por acetona 1 segundo y dejar secar la lámina.
4. Pegar cubreobjetos con entellan y dejar secar por 2 o 3 días.
5. Almacenar las láminas en las cajas de lectura de cariotipos y observar al microscopio a 100X.