# DBIOS_finale.jpegUniversità degli Studi di Torino

### DIPARTIMENTO di SCIENZE DELLA VITA E

### BIOLOGIA DEI SISTEMI



**Laboratorio PLS di CARIOLOGIA E CITOGENETICA**

**Parte 1: Allestimento coltura linfociti**

**Materiale:**

- Fiaschette per colture cellulari

- Terreno di coltura RPMI 1640

- Siero bovino fetale (FCS)

- Fitoemoagglutinina (PHA)

- Penicillina e streptomicina

- *Colcemid* (colchicina)

- Sangue venoso

**Procedimento:**

All'interno di fiasche sterili da 25 mL vengono introdotti, nell'ordine:

1. 6 mL di terreno RPMI 1640. Esso garantisce condizioni ottimali di proliferazione linfocitaria in un sistema chiuso.
2. 2 mL di Siero Bovino Fetale.
3. 0,2 mL di Fitoemoagglutinina: questa mucoproteina, estratta dal *Phaseolus vulgaris*, è uno stimolante della mitosi. Per i linfociti il picco di mitosi si ha attorno alla 72ma ora.
4. 0,1 mL di Antibiotico (100-200 UI di penicillina; 50 µg di streptomicina per ml di coltura).
5. 8 gocce (corrispondenti a circa 0,3 mL) di sangue venoso periferico eparinato.
6. Le fiasche vengono incubate a 37°C, temperatura ottimale per la crescita *in vitro* dei linfociti umani, per 72 ore.
7. 1 ora prima della fissazione occorre aggiungere 0,1 mL di *Colcemid* /coltura (0,10 ug/mL). Il *Colcemid*, o colchicina, è un alcaloide ricavato dai semi del *Colchicum* che arresta la mitosi allo stadio di metafase.

**Parte 2: Fissazione**

**Materiale:**

- Centrifuga

- Provette per centrifuga

- Pipette *pasteur*

- Bagno termostatato

- Soluzione ipotonica (75 mM KCl)

- Fissativo (metanolo / acido acetico in proporzione 3/1)

**Procedimento:**

1. Risospendere delicatamente le cellule in coltura e trasferirle in provette da centrifuga.
2. Centrifugare per 10 minuti a 800-1000 rpm.
3. Aspirare il surnatante, lasciandone solo un po’ a ricoprire il *pellet* di cellule, e risospendere manualmente.
4. Aggiungere circa 10 mL di soluzione ipotonica preriscaldata a 37°C. La soluzione ipotonica ha una concentrazione salina inferiore a quella del citoplasma cellulare. Questo provoca il richiamo di acqua all’interno della cellula, determinando l’emolisi degli eritrociti (eliminati con il surnatante nel passaggio successivo) e il rigonfiamento della membrana citoplasmatica dei linfociti. La soluzione ipotonica non altera la struttura del cromosoma e non ne compromette la successiva colorazione.
5. Incubare i campioni in bagnomaria a 37°C per 10 minuti: questo passaggio facilita l'azione dell'ipotonico.
6. Centrifugare per 10 minuti a 800-1000 rpm.
7. Eliminare il surnatante.
8. Aggiungere circa 10 mL di fissativo, il quale serve a disidratare le cellule e a denaturare permanentemente le proteine, fissandole.
9. Centrifugare per 10 minuti a 800-1000 rpm.
10. Ripetere altre 2 volte le operazioni dei punti 7-9, per un totale di 3 passaggi in fissativo.
11. Aspirare il surnatante e risospendere i linfociti in un po’ di fissativo preparato sul momento (la quantità si valuta “a occhio” in funzione della dimensione del *pellet* di linfociti)
12. Con l’utilizzo di una pipetta *pasteur* si aspirano alcune gocce del preparato e se ne fanno cadere, da una certa altezza, due o tre (*splash*) su un vetrino pulito con alcool, asciugato e opportunamente siglato. Quando la goccia di preparato tocca il vetrino, la membrana citoplasmatica dei linfociti si rompe, permettendo così la dispersione dei cromosomi.
13. Lasciare asciugare qualche minuto e procedere con l'osservazione al microscopio a contrasto di fase delle piastre.
14. Eventualmente mettere i vetrini in termostato a 37°C e il giorno dopo procedere alla colorazione.

**Parte 3: Colorazione**

**Materiale:**

- Recipienti per colorazione vetrini

- Soluzione di Sörensen (9,465 g di Na2HPO4 + 9,08 g di KH2PO4 in 1 litro di acqua sterile)

- Colorante Giemsa

- Acqua distillata

- Pipette *pasteur*

**Procedimento:**

1. Colorare i vetrini con Giemsa al 5% in Soluzione Sörensen per 10 minuti (95 mL di Sörensen + 5 mL di Giemsa).
2. Sciacquare i vetrini prima in Soluzione Sörensen e poi in acqua distillata.
3. Lasciare asciugare.
4. Osservare al microscopio

**Parte 4: Ricostruzione cariotipo umano**

**Materiale:**

- Fotografia di una piastra metafasica

- Una scheda per il cariogramma

- Forbici, nastro adesivo o colla.

**Procedimento:**

1. Ritagliare i singoli cromosomi e ordinarli sulla scheda in base ai criteri adottati nella convenzione di Denver.

Ricostruire le corrette coppie di cromosomi omologhi sulla base del loro bandeggio.



