

ELABORACIÓ D'UN CARIOTIP HUMÀ

MATERIAL

El material del qual haureu de disposar és el següent:

Material:

Auto-Clix.
Llancetes estèrils.
Pipetes Pasteur.
Tub de 15ml. amb Tap.
Gradetes.
Cubeta a 37°C.
Centrifugadora.

Solucions:

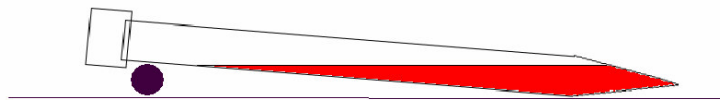
NaOH o Lleixiu
Medi complet amb Fito-
hemaglutinina.
Solució KCl 0.074 M.
Solució Fixadora
Etanol:Acetic.(3:1)
Colorant Giemsa.

Material Personal (optatiu):

Pinces punta fina.
Tisores.
Adhesiu en stick.
Cartulina DIN A4
Rotolador permanent.

METODE

- 1 Rentar-se les mans amb sabó i alcohol. Colocar la llanceta en l'Auto-Clix i treure el cap. Carregar i punxar. Pressionar suaument sobre la yema del dit per que surti una gota de sang. Depositar la gota en la boca d'un tub de 15 mL que contè 5 mL de medi de cultiu. Tapar el tub i barrejar el contingut. Col·locar el tub sobre una superfície plana de manera que aquest quedi lleugerament inclinat.



El medi contè entre d'altres components fitohemaglutinina com a agent mitogènic a fi d'induir la proliferació dels limfòcits

- 2 Incubeu el cultiu a 37°C durant 2-3 dies per tal de que es produeixin les divisions mitòtiques.
- 3 Un cop acabada la incubació afegiu 0.24 ml. de la solució de Colxicina (Colcemid). La presència de colxicina produïra una aturada a metafase de les cèl·lules en l'estadi de màxima condensació dels cromosomes.

L'exposició a la Colxicina no ha de ser inferior a 3 hores ni superior a 5 hores.

- 4 Un cop hagi passat aquest temps centrifugueu a la posició 5 de la centrífuga durant 6-8 minuts a fi de recollir les cèl·lules. Seguidament enretireu amb molta cura el líquid sobrenedant deixant uns 0.1 mL per tal de no emportar-vos les cèl·lules que estàn a la base del tub.

Heu d'abocar el sobrenedant en un recipient amb lleixiu, que destruirà les cèl·lules que hagin quedat al sobrenedant.

- 5 Fer una resuspensió suau de les cèl·lules amb el 0.1 ml. de medi. Seguidament afegiu en el tub 4 ml. de la solució hipotònica (KCl 0.075 M) poc a poc tot fent-lo girar suaument. Deixar el tub en un bany a 37°C durant 4 minuts (no més temps).
- 6 Torneu a centrifugar a la posició 5 durant 8 minuts. Enretireu amb molta cura gairebé tota la solució hipotònica.

Entre els 4 minuts que es deixa reposar i els 8 de la centrifugació fan 12 minuts que no es bo sobrepassar per evitar un xoc que podria fer esclatar totes les cèl·lules

- 7 Amb agitació constant del tub, afegiu 4 ml. de fixador; en aquest cas una solució metanol/acetic amb 3 parts de metanol per cada 1 d'acètic, que haureu preparat just abans de utilitzar-la. Deixar-ho a temperatura ambient durant 10 minuts.
- 8 Tot seguit heu de tornar a centrifugar, ara a la posició 8, durant 6-8 minuts
- 9 Enretireu la major part del fixador i afegiu 4 mL de fixador nou. Torneu a repetir el pas 8.
- 10 Finalment enretireu la major part del fixador deixant 0.5 ml. i resuspeneu les cèl·lules. Ara la solució ja està llesta per fer les preparacions.

PREPARACIO DELS PORTAOBJECTES

- 1 Agafeu el portaobjectes netegeu-lo amb alcohol i embafeu-lo. Lanceu-hi un parell de gotes de la solució de cèl·lules amb fixador, des d'una alçada considerable.
- 2 Deixeu el portaobjectes sobre una superfície plana fins que s'hagi evaporat tot el líquid.

TINCIO DE LES PREPARACIONS

La tinció es pot fer amb Giemsa, orceïna o altres colorants. el procediment que emprarem és el *Giemsa Stain*.

- 1 Diluïu un ml de solució estoc de Giemsa amb 9 ml. de tampò fosfat pH 6,8. Aquesta solució de colorant només serveix per a un dia.

- 2 Cobriu els portaobjectes amb la solució colorant durant 10 minuts. Un cop passat aquest temps netegeu els portaobjectes amb aigua destil·lada i deixeu-los assecar a l'aire. Un cop secs ja els podeu observar.

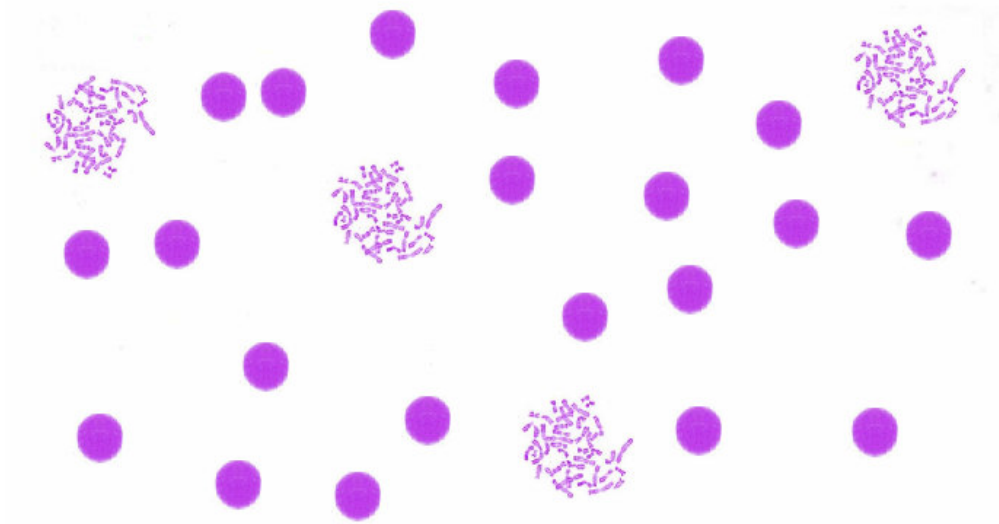


Figura 1. Imatge a baixa resolució (10X) d'una preparació de cromosomes humans tenyits per tinció homogenia de Giemsa.

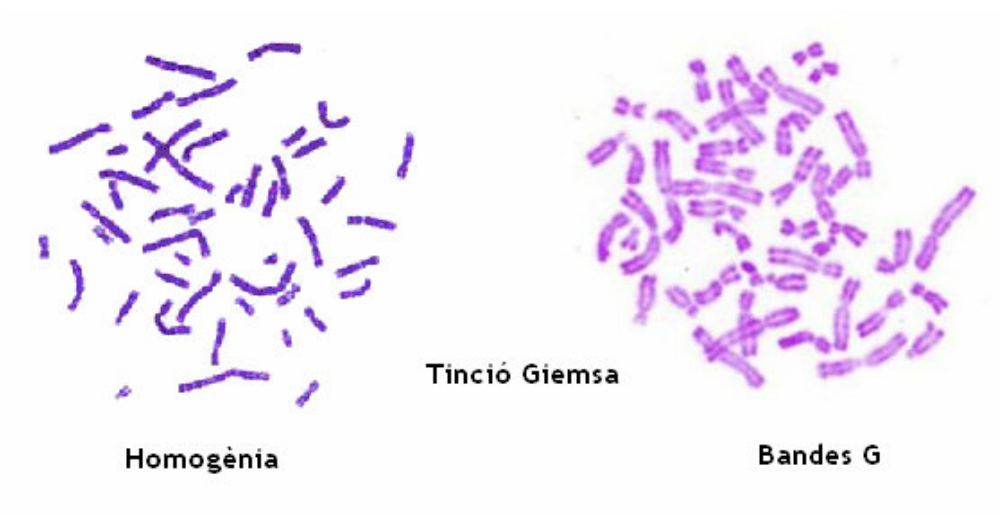


Figura 2. Cromosomes humans amb tinció homogenoa de Giemsa i tinció per Bandes G

OBSERVACIÓ

- a) Observeu els cromosomes i els diferents graus de compactació. Mireu de trobar preparacions on es vegin cromosomes amb dues cromàtides i d'altres on només es veu una.
- b) Feu-ne un esquema d'un dels cariotips observats.

El cariotip humà consta de 46 cromosomes: 22 parells d'autosomes i 2 gonosomes que a la dona són XX i a l'home XY.

Això ho expresarem de la següent manera

46,XX (femelle normal)

46,XY (mascle normal)

A partir de la conferència de Denver (1960) els autosomes són numerats de l'1 al 22 i s'apleguen en 7 grups: A, B, C, D, E, F i G, seguint diferents criteris morfològics.

Grup A: Comprén els cromosomes dels parells 1, 2 i 3. Són els cromosomes metacèntrics més grans, diferenciables entre ells per la posició del centròmer. El cromosoma 1 presenta una constricció secundària.

el més gran del grup. Aquest grup, és en el que la identificació dels cromosomes sense tècniques de bandes, presenta més dificultat. El cromosoma 9 es pot diferenciar per la constricció secundària.

secundària. Els cromosomes 17 i 18 són submetacèntrics petits.

Grup E: Comprén els parells 19 i 20. Són els cromosomes metacèntrics més petits.

Grup B: Comprén els parells 4 i 5. Són els cromosomes sub-metacèntrics més grans, molt difícils de diferenciar entre ells amb tinció uniforme.

Grup D: Comprén els cromosomes dels parells 13, 14 i 15. Són els cromosomes acrocèntrics més grans i tenen satèl.lits.

Grup G: Comprén els parells 21 i 22 i el cromosoma Y. Són els cromosomes acrocèntrics més petits amb satèl.lits. El cromosoma Y és sobretot identificable amb bandes

Grup C: Comprén els parells del 6 al 12 i el cromosoma X. El cromosoma X és

Grup E: Comprén els parells 16, 17 i 18. El cromosoma 16 és quasi metacèntric i presenta una constricció

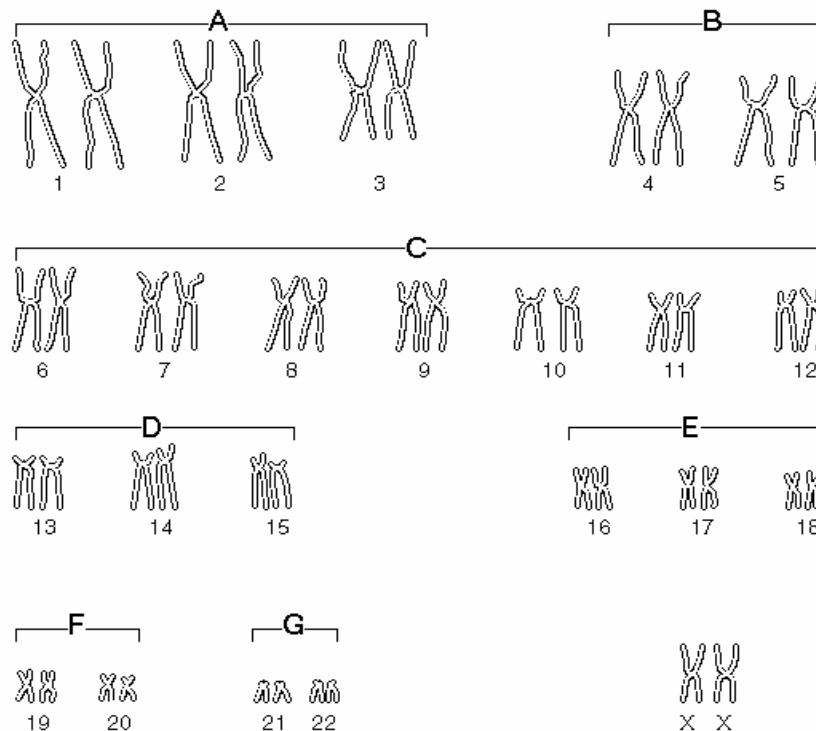


Figura 3.- Agrupació dels cromosomes segons característiques morfològiques i posició del centròmer.

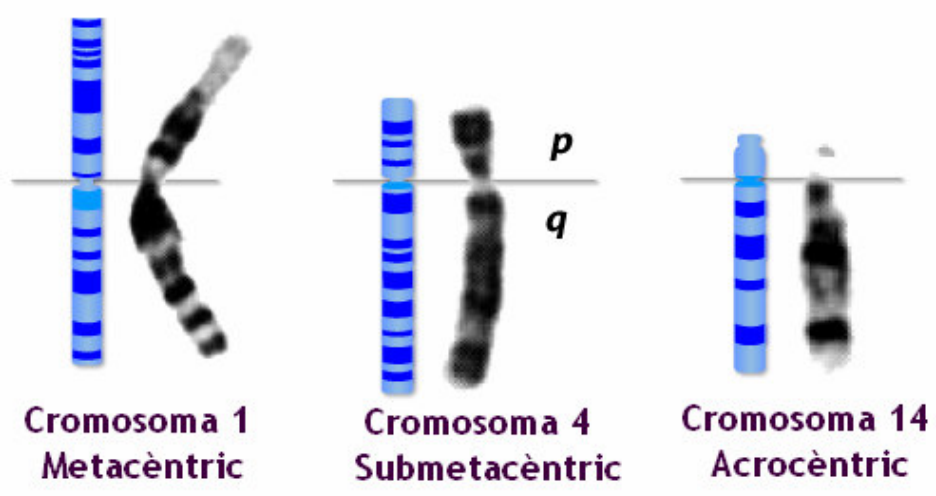
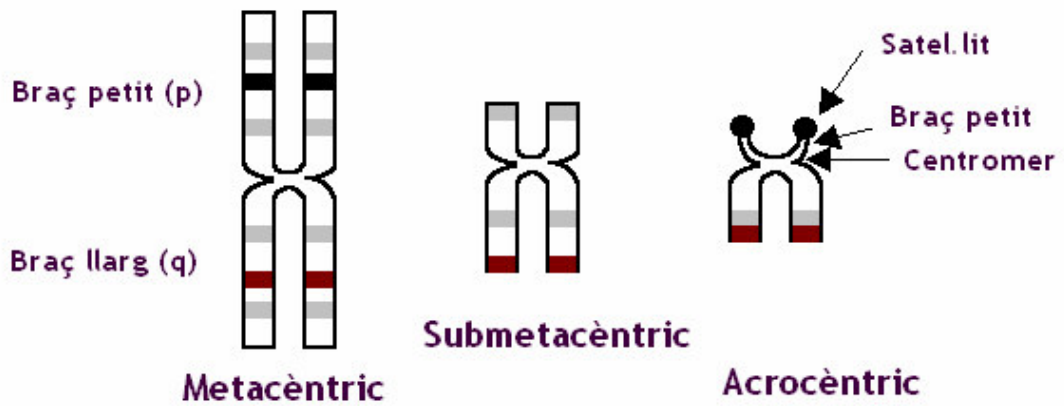


Figura 4.- Classificació dels cromosomes humans segons la posició del centromer

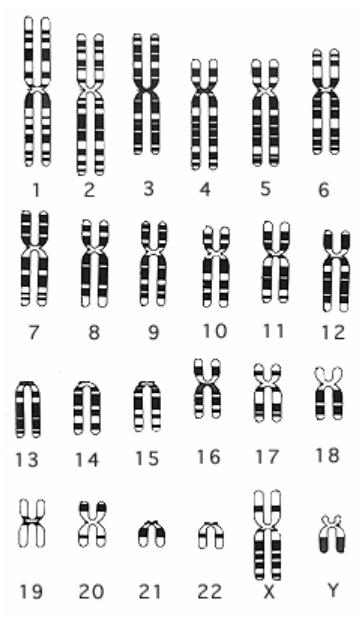
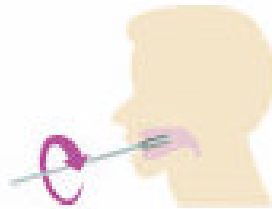


Figura 5. Idiograma del complement cromosòmic humà segons s'observa amb una tinció per Bandes G

MÈTODES

Obtenció de DNA de cèl.lules de la mucosa bucal



- Girar mentres desplaceu el raspall per l'interior de les galtes

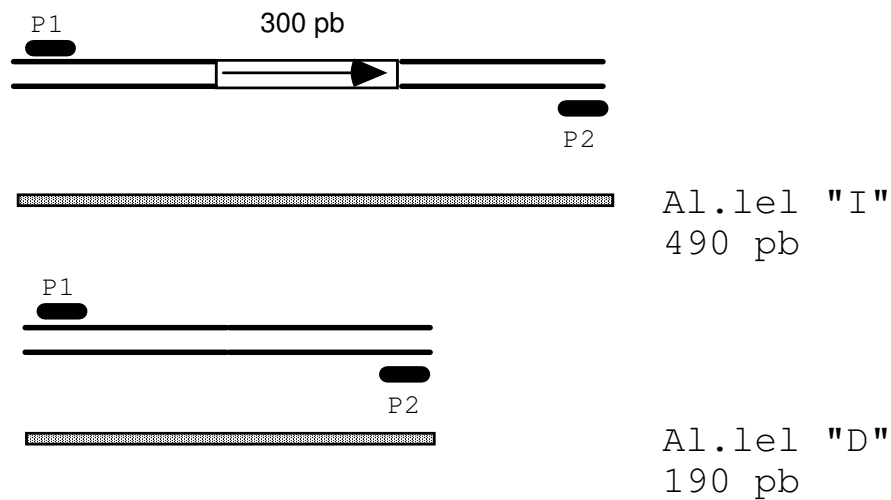


- Posar el raspall en el tub amb la solució i girar varies vegades.
- Escurar be i treure el raspall.
- Remenar enèrgicament durant 30 segons
- Escalfar 30 min a 65°C
- Remenar enèrgicament durant 30 segons
- Escalfar 10 min a 98°C
- Remenar enèrgicament durant 30 segons
- Escalfar 10 min a 98°C



Mostra llesta per PCR

Anàlisi del polimorfisme d'inserció/deleció del locus ACE per PCR



Preparació de la reacció de PCR

- 1 Afegir en un tub de 0,5 ml els següents reactius en aquest ordre:

Solució STOC de PCR 20 micrl.

Solució dNTPs	2,5 micrl.
Primers (Oligos)	0,1 micrl. (de cada)
Tampó PCR 10X	2,5 micrl.
Taq polimerasa	0,25 micrl. (1,25 units)
Aigua dest.	14,4 micrl.

Solució DNA 5 micrl.

- 2 Posar els tubs en l'aparell i iniciar la reacció de PCR d'acord amb el següent esquema:

"hot start": 2 min a 96 °C		X 35
CICLE 30 sec. a 94 °C		
30 sec. a 63 °C		
60 sec. a 72 °C		
Extensió 5 min a 72 °C		

- 3 Treure els tubs de l'aparell i deixar-los a 4°C

Separació de les bandes amplificades en gels d'agarosa

- 1 Preparar un gel d'agarosa al 0,8% en tampó TAE
- 2 Una vegada gelificat posar el gel en la cubeta que contè tampó TAE. (Els pous han de quedar en el cantó del pol negatiu) Aplicar les mostres en els pous utilitzant una micropipeta.
- 3 Conectar un voltatge constant de 105 V durant 1 h
- 4 Treure el gel i posar-lo en una solució de bromur d'etidi (ATENCIÓ: EL BROMUR D'ETIDI ES ALTAMENT CANCERIGEN) durant uns 10 min
Fer una fotografia del gel una amb exposició a la llum UV.

RESULTATS