PROTOCOLOS DE TINCIONES DIFERENCIALES

Bandas G con tripsina

Las preparaciones deben llevarse hechas varios días (más de 15 días a temperatura ambiente).

La tinción se realiza a temperatura ambiente (20°C aprox.).

- a) Sumergir las preparaciones en una solución de tripsina al 0.1% en PBS durante unos segundos (el tiempo depende del grado de envejecimiento de la preparación).
- b) Lavar en PBS dos veces.
- c) Sumergir las preparaciones en solución GIEMSA al 3% en tampón fosfato a pH 6.7 durante 5 - 10 min. controlando la tinción al microscopio (para que la preparación no se pegue a la platina debe secarse cuidadosamente la cara inferior, ¡OJO! no secar la cara donde está el material). (Si se utiliza el objetivo 40X; limpiarlo con papel suave inmediatamente después de cada uso; con este objetivo no se consiguen imágenes nítidas si se seca el área de observación).
- d) Lavar con agua abundante y secar.
- e) Montar las preparaciones con ENTELLAN o similar.

Bandas C con (OH)2Ba

Como cuestiones previas, la solución de (OH)2Ba debe prepararse con varias horas de antelación y dejarla reposar; la temperatura de 60°C se consigue mediante baño termostático (baño maría).

Las preparaciones deben ser lo más recientes posible.

- a) Sumergir las preparaciones en HCl 0.2 N previamente calentado a 60°C durante 2 min.
- b) Lavar enérgicamente en agua destilada (o del grifo si es buena).
- c) Sumergir las preparaciones en una solución saturada de (OH)2Ba durante 3-5 min. a temperatura ambiente.
- d) Lavar enérgicamente en agua.
- e) Sumergir las preparaciones en 2xSSC a 60°C durante una hora.
- f) Lavar con agua.
- g) Sumergir las preparaciones en una solución de GIEMSA al 3% en tampón fosfato a pH 6.7.
- h) Controlar la tinción al microscopio.
- i) Lavar con agua abundante y secar.
- j) Montar las preparaciones con ENTELLAN o similar

SOLUCIONES

20xSSC.- NaCl=175.5g; citrato sódico=88.2g; agua destilada hasta un litro.

PBS.- NaCl=16g.; KCl=0.4g.; KH₂PO₄=0.4g.; Na₂HPO₄=2.3g.; Agua destilada 1600c.c.

Tampón de fosfatos.-

Solución PHOS 1.-9.46g. de Na₂HPO₄ en 1 litro de agua destilada.

Solución PHOS 2.-9.07g. de KH₂PO₄ en 1 litro de agua destilada.

100c.c. de tampón con pH 6.7 = 43c.c. de PHOS 1 + 57c.c. de PHOS 2