CULTIVO DE LEUCOCITOS; PREPARACION DE CELULAS EN MITOSIS

Medio de cultivo:

-Suero fetal de ternera	15 ml
-Medio RPMI 1640	100 ml
-L-glutamina 200mM	0.5 ml
-Penicilina-estreptomicina	2 ml
-Phitohemoaglutinina	0.7 ml
-Hepes buffer	1.5 ml
-TOTAL	119.7 ml

(Si la sangre no se recoge en tubo heparinizado añadir a este total 0.5 ml de heparina sódica)

Bien mezclado se puede guardar en nevera hasta un máximo de 14 días.

Para su utilización se distribuye en tubos a razón de 8 ml. por tubo. (El total se distribuye en 15 tubos).

Extracción de sangre y cultivo:

Si se trata de extracción por pinchazo en la yema del dedo, el medio de cultivo debe estar heparinizado y por cada 8 ml. deben añadirse no menos de 6 gotas de sangre.

Si se dispone de personal especializado se puede tomar la muestra en vena con recipiente Vacutainer PST gel and lithium heparin hasta 2.5 ml de sangre. En este caso luego se sembrarán 0.5 ml de sangre en 8 ml de medio de cultivo que no tiene que estar heparinizado.

Incubación:

La mezcla de medio y sangre se mantiene a 37ºC durante 72 horas, removiendo cada 12 aproximadamente.

Una hora y media antes de hacer las preparaciones se añaden 100 microlitros (4 rayas de jeringa de insulina) de colchicina al 1% en cada tubo.

Obtención de un botón celular:

1-Sacar los tubos de la estufa de cultivo y centrifugar a 1500 rpm durante 5-6 min. (Así se separan las células del medio de cultivo).
2-Decantar con pipeta pasteur dejando aproximadamente 1 c.c. (Así se elimina la mayoría del medio de cultivo).
3-Añadir 5 c.c. de KCl 75 mM. previamente calentado a 37ºC. (Se trata de la solución hipotónica).
4-Resuspender suavemente con pipeta pasteur.
5-Mantener en estufa durante 8 min. (Se produce la rotura de las membranas plasmáticas por choque hipotónico).
6-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 8 min. (Se separan los núcleos de células en interfase y en profase del resto).
7-Decantar con pipeta pasteur dejando menos de 0.5 c.c.
8-Añadir gota a gota, a la vez que se resuspende con ayuda de un agitador de tubos, 6 c.c. de solución CARNOY (metanol: acético 3:1) fría y recién preparada. Se puede añadir más rápidamente cuando el resuspendido vira al color marrón. (De esta forma se fijan los núcleos anteriormente separados del resto).
9-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 8 min. (Se obtiene un botón celular con bastantes restos celulares).
10-Decantar con pipeta dejando 0.5 c.c.
11-Añadir con agitación (o resuspender posteriormente) hasta 4 c.c. de CARNOY. (Así se resuspenden los núcleos para obtener una mejor fijación y lavado con eliminación de restos celulares).
12-Resuspender con pipeta.
13-Centrifugar a 1200-1500 rpm durante 8 minutos.
14-Decantar de golpe sin sacudir.
15-Añadir hasta 2 c.c. de CARNOY.
16-Resuspender con pipeta.
17-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 5min. (Se obtiene un botón celular sificientemente purificado y se puede conservar en nevera a 4ºC tapado con parafilm durante varios días).

Extensión en preparaciones:

1-En primer lugar deben limpiarse escrupulosamente los portaobjetos frotando con alcohol etílico al 70%.
2-A continuación (si se había dejado en la nevera durante un tiempo, se centrifuga de nuevo como en anteriores ocasiones) se decanta con pipeta el botón celular dejando la menor cantidad de fijador posible . Luego se resuspende el botón celular en 0.5 c.c. de CARNOY recién preparado.
3-Saturar de vaho mediante el aliento la superficie del portaobjetos y, antes de la evaporación bombear dos o tres gotas del resuspendido celular.
4-Dejar secar al aire y marcar con lápiz de diamante.
5-Las preparaciones pueden observarse mediante contraste de fases.
6-La tinción para bandeo C debe hacerse no muchas horas después de hacer las preparaciones.
7-La tinción para bandeo G debe hacerse después de dejar "envejecer" las preparaciones al menos 15 días.