Guida alle esercitazioni di citologia ed istologia per gli studenti del corso di laurea in Biologia

a cura di Angelini Francesco, Fabio M. Guarino, Gaetano Odierna. Modificato da Roberto Gualtieri, Valentina Costanzo e Maria De Falco

Premessa

Il presente manualetto intende fornire allo studente le linee guida alle esercitazioni di laboratorio sul microscopio ottico e alcune delle più comuni tecniche utilizzate per lo studio morfologico di cellule e tessuti.
Per approfondire gli argomenti affrontati, oltre che ovviamente cominciare ad acquisire la manualità di laboratorio, è indispensabile la partecipazione dello studente alle esercitazioni.

INDICE GENERALE

Esercitazione n° 1: il microscopio ottico

- Le parti del microscopio ottico composto in campo chiaro, contrasto di fase e modulazione di ampiezza secondo Hoffmann.
- Principi sul funzionamento delle diverse modalità di microscopia ottica.

SCHEDA TECNICA 1: ALCUNI CONSIGLI PRATICI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

Esercitazione n° 2: affettatura al microtomo di un campione biologico incluso in paraffina. N.B.: gli studenti osserveranno tale procedura che verrà eseguita dal docente e/o dal tecnico.

SCHEDA TECNICA 2: SEZIONAMENTO DI UN BLOCCHETTO DI PARAFFINA, ADESIONE E DISTENSIONE DELLE SEZIONI ("TECNICA DELLE FETTE")

Esercitazione n° 3: colorazione di sezioni di campioni inclusi in paraffina. N.B.: gli studenti osserveranno tale procedura che verrà eseguita sotto cappa chimica dal docente e/o dal tecnico.

SCHEDA TECNICA 3: COLORAZIONE EMALLUME-EOSINA

Esercitazione n° 4: marcatura di cellule della mucosa buccale con arancio di acridina. Principi della microscopia in epifluorescenza e osservazione dei preparati. N.B.: gli studenti osserveranno la procedura di marcatura che verrà eseguita sotto cappa chimica dal docente e/o dal tecnico sulle proprie cellule di sfaldamento della mucosa buccale e potranno osservare direttamente al microscopio i preparati allestiti.

SCHEDA TECNICA 4: COLORAZIONE DI CELLULE DELLA MUCOSA BUCCALE CON ARANCIO DI ACRIDINA

Esercitazione n° 5 colorazione e osservazione di uno striscio di sangue per lo studio degli elementi figurati. N.B.: gli studenti osserveranno tale procedura che verrà eseguita dal docente e/o dal tecnico su strisci di sangue essiccati allestiti precedentemente. Usando una goccia di colorante rosso verrà mostrato agli studenti come si effettua uno striscio.

SCHEDA TECNICA 5: ALLESTIMENTO E COLORAZIONE CON MAY GRUNWALD-GIEMSA DI UNO STRISCIO DI SANGUE

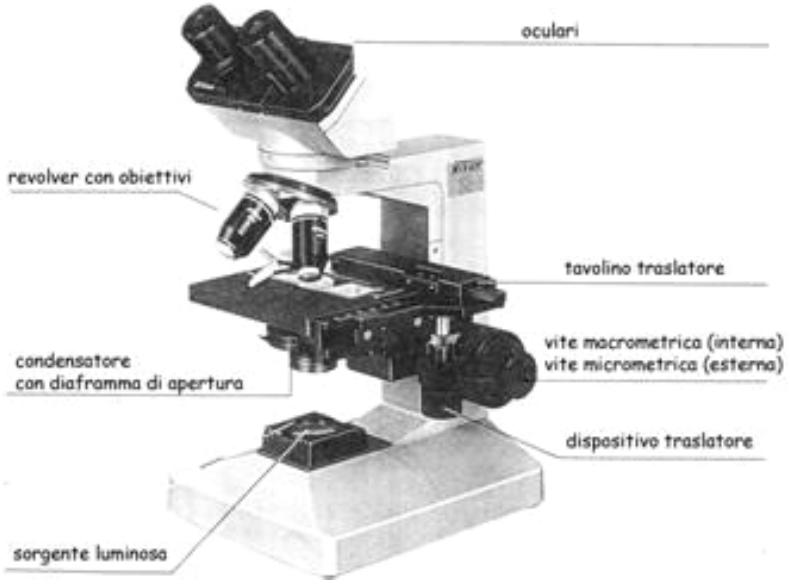
Esercitazione n° 6 allestimento e colorazione di un cariotipo. N.B.: gli studenti osserveranno vetrini allestiti precedentemente e verrà loro illustrata la relativa procedura di preparazione.

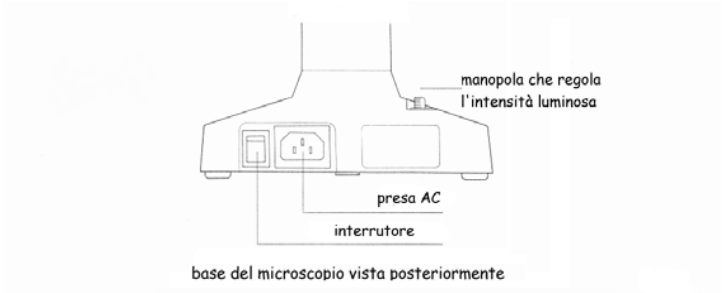
SCHEDA TECNICA 6: Allestimento di un cariotipo

Esercitazione n° 7 osservazione di vetrini istologici. N.B.: vetrini di differenti tessuti verranno precedentemente posizionati sui microscopi e gli studenti a rotazione potranno osservare e imparare a riconoscere i diversi tessuti.

ESERCITAZIONE N° 1

Le principali parti del microscopio ottico composto in campo chiaro



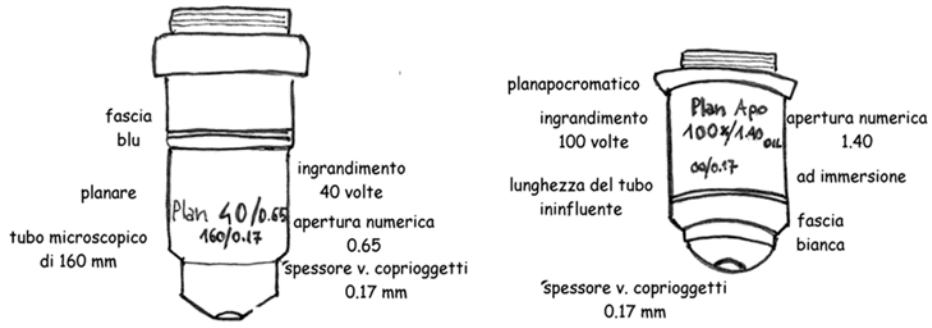


base del microscopio vista posteriormente

Il microscopio ottico composto a luce ordinaria trasmessa

OBIETTIVI

Su ogni obiettivo sono sempre indicate diverse informazioni sulle sue caratteristiche tecniche; tra queste: ingrandimento, apertura numerica, lunghezza del tubo, spessore del vetrino coprioggetto, tipo di correzione applicata nei confronti dei fenomeni di aberrazione ottica, tipo di obiettivo (a secco o ad immersione; adatto per l'osservazione in contrasto di fase).
Tutti questi dati sono riportati in modo vario sul corpo dell'obiettivo a seconda della casa costruttrice.
In fig. sono riportati alcuni esempi di obiettivi.



esempi di obiettivi e relativa simbologia

Alcune definizioni:

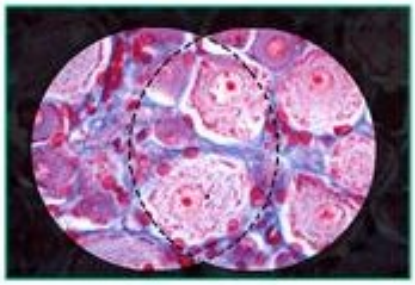
obiettivi acromatici: in essi coincidono i piani focali di due colori (in genere rosso e blu, corrispondenti ala sensibilità massima dell'occhio umano).
obiettivi apocromatici: in essi coincidono i piani dei tre colori (rosso, verde e blu).
obiettivi planari: sono corretti verso le aberrazioni della curvatura di campo, per cui il campo d'immagine microscopica è completamente spianato: sono particolarmente utili per effettuare fotografie o acquisizioni digitali al microscopio.

Un obiettivo può presentare correzioni sia verso le aberrazioni cromatiche che verso la curvatura di campo. I migliori, e più costosi, ovviamente sono i **planapocromatici.**

Alcune sigle che possono essere riportate sugli obiettivi:

Ph seguito da un numero, ad esempio Ph 2: è un obiettivo per contrasto di fase per diaframma 2 del microscopio a contrasto di fase (vedi microscopio a contrasto di fase).
Oil: è un obiettivo per immersione a olio; per usare tale obiettivo (solitamente 100x) occorre frapporre fra il preparato e la lente frontale dell'obiettivo una goccia di olio da immersione.
W: obiettivo per immersione in acqua; utile per le colture cellulari.

Oculari



I due oculari devono essere posizionati in base alla propria distanza interpupillare, in modo da avere un unico campo visivo e non due separati (come nella foto)

Sopra ogni oculare sono riportate varie sigle. Il numero seguito dal segno x indica il potere di ingrandimento dell'oculare

Ingrandimento utile al microscopio ottico:

INGRANDIMENTO DELL'OCULARE × INGRANDIMENTO DELL'OBIETTIVO

Formula di Abbe :

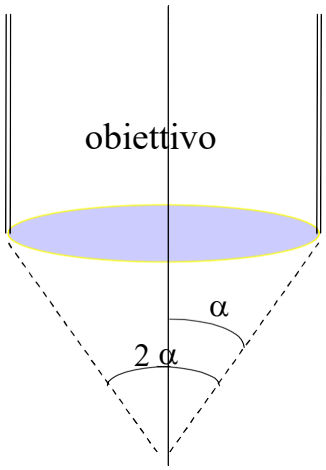
Potere di Risoluzione = $\dfrac{\lambda}{2\ n\ \text{sen}\ \alpha}$

Apertura numerica (A.N.)= $n\ \text{sen}\ \alpha$

λ = lunghezza d' onda della sorgente luminosa

n= indice di rifrazione del mezzo interposto tra l'oggetto e l'obiettivo

α = semiangolo del cono di luce che penetra nell'obiettivo



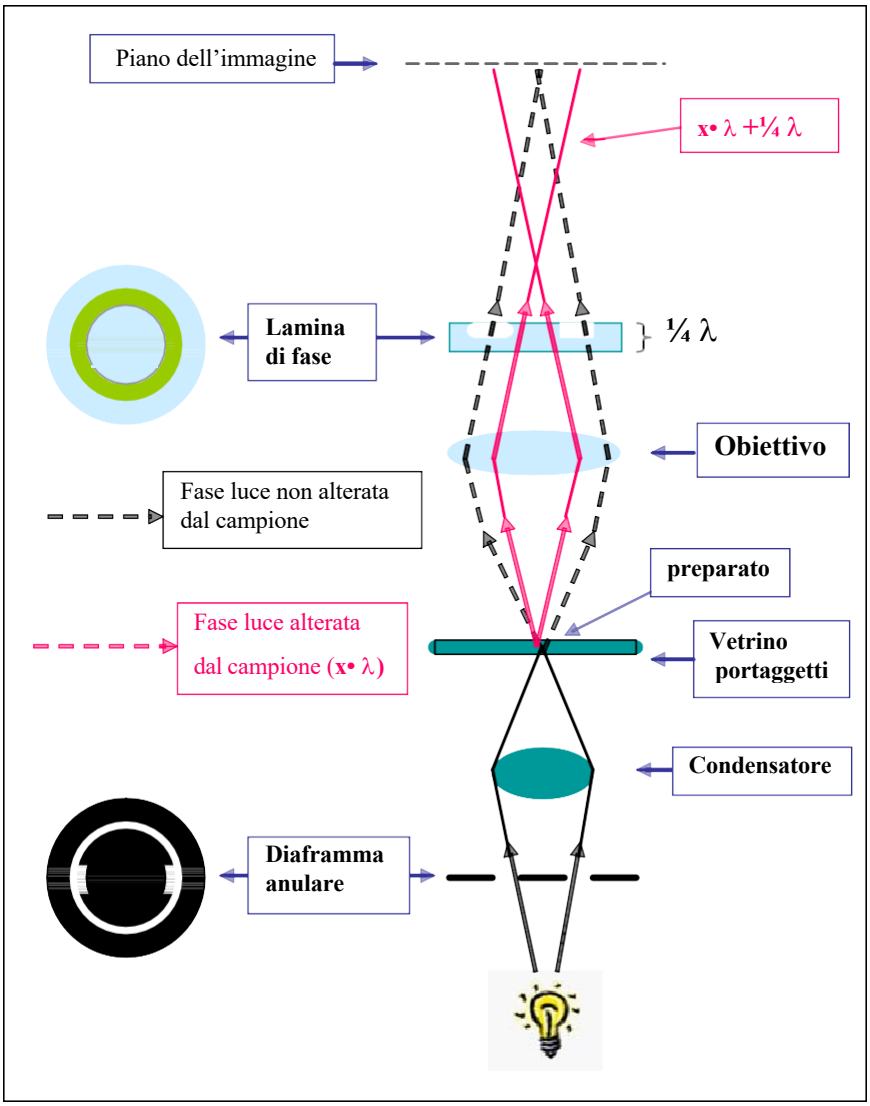
λ = 400 - 700 nm (v.m. 550nm circa)

n = 1, 53 (olio immersione)

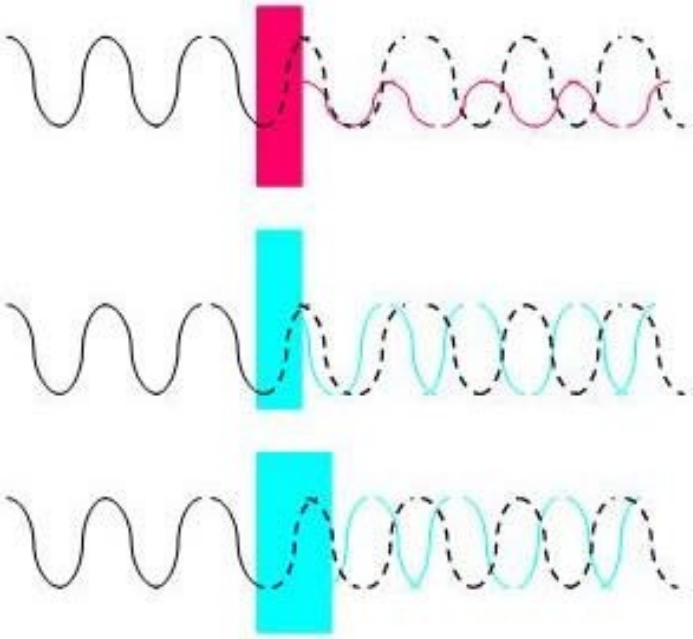
α = 70 °

P.R. = $\dfrac{550\ \text{nm}}{2 \times 1.53 \times \text{sen}\ 70} = \dfrac{550\ \text{nm}}{2{,}75} \cong 200\ \text{nm}$

Principio di funzionamento del microscopio a contrasto di fase



Modalità di interferenza tra le onde



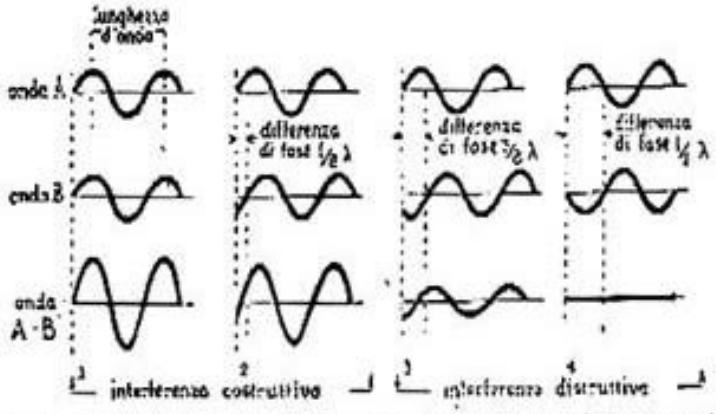
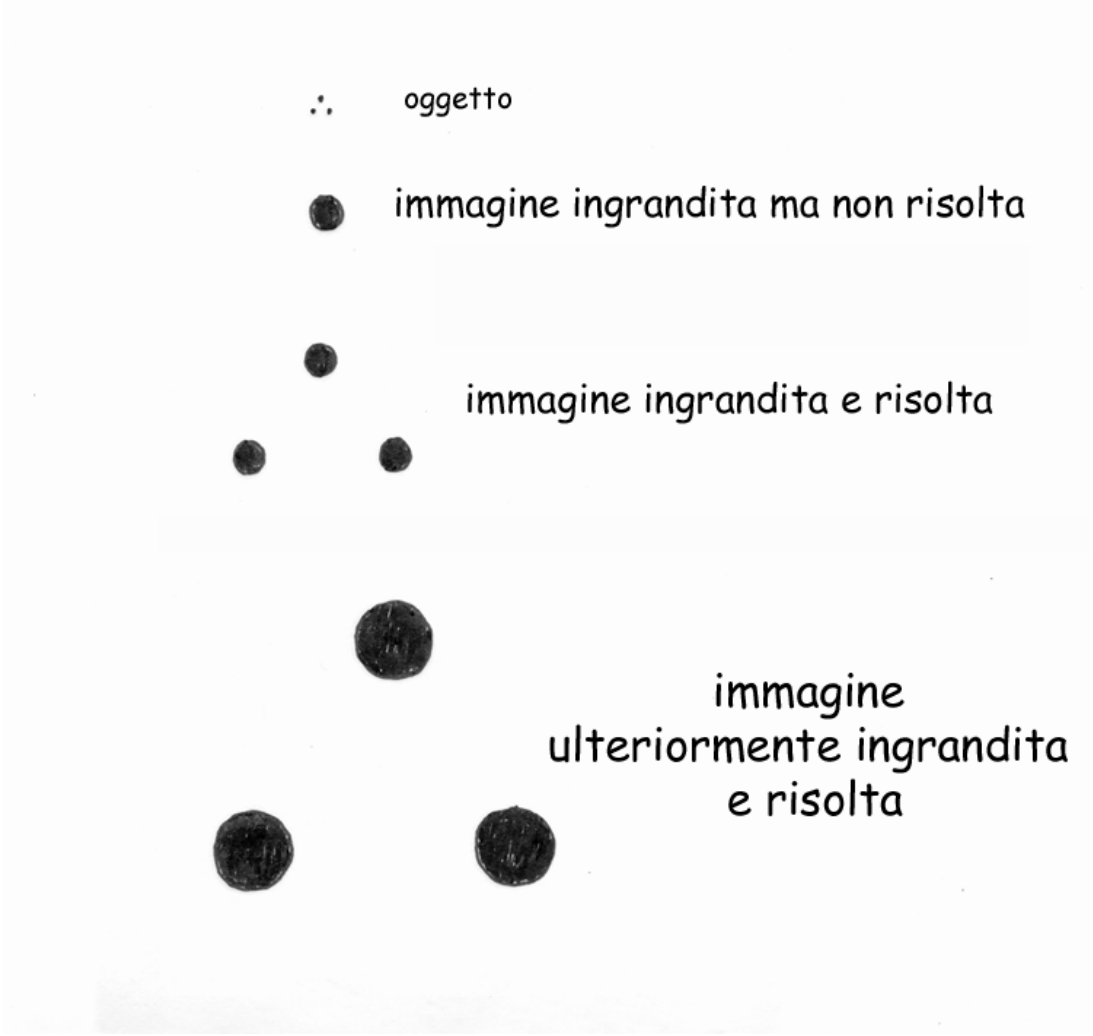


Fig. 4-11. Schema che mostra come le onde luminose possono interferire le une con le altre aumentando o diminuendo l'ampiezza delle onde risultanti.



Risoluzione e ingrandimento

SCHEDA TECNICA 1: ALCUNI CONSIGLI PRATICI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

1. Accendere il microscopio.
2. L'interruttore è solitamente posizionato sulla base dello stativo, ma la localizzazione è diversa a seconda delle case costruttrici e del tipo di microscopio. Esso agisce variando la tensione elettrica di un trasformatore.
3. Abbassare il tavolino portapreparato.
4. Inserire l'obiettivo a più piccolo ingrandimento a disposizione (solitamente 4x).
5. Porre il vetrino sul tavolino, facendo in modo che il preparato da osservare sia sopra il foro del tavolino ed attraversato dal fascio luminoso.
6. Alzare il tavolino portaoggetti, fino a che l'obiettivo si trovi ad una distanza di circa 1.5 cm dal preparato.
7. Regolare l'intensità luminosa in modo che non dia fastidio alla vista.
8. accostare gli occhi agli oculari e servendosi della vite macrometrica, innalzare lentamente il tavolino sino a che si raggiunge una visione nitida (anche se probabilmente priva di significato per il neofita) del preparato.
9. È importante, in questa fase, che gli oculari siano posizionati in modo da darci la visione di un unico campo microscopico e non di due campi parzialmente sovrapposti. In questo secondo caso, occorrerà, prima di proseguire le osservazioni, regolare la distanza degli oculari di modo che coincida con la propria distanza interpupillare.
10. È importante anche sottolineare che l'obiettivo 4x con cui iniziamo le osservazioni serve unicamente a posizionare il preparato e a trovarne la prima messa a fuoco, che ci tornerà molto utile per il prosieguo delle osservazioni. Infatti, nei moderni microscopi, anche quelli semplici di laboratorio, gli obiettivi hanno caratteristiche ottiche tali da renderli parafocali. Pertanto, diversamente da quanto accadeva molti anni fa, una volta messo a fuoco il preparato con l'obiettivo a più basso ingrandimento, passando ai successivi, è sufficiente una lieve regolazione con la vite micrometrica per trovare subito il fuoco.
11. Una volta focalizzata l'attenzione su una particolare area, è possibile osservarla nel dettaglio utilizzando obiettivi a più forte ingrandimento. Per non correre il rischio di far urtare la lente dell'obiettivo sul preparato, occorre avere l'avvertenza di passare gradualmente da un obiettivo a quello immediatamente successivo in quanto a fattore di ingrandimento.
12. Ottimizzare la qualità dell'osservazione.
13. La buona osservazione dipende da numerosi fattori. Anzitutto, passando da un obiettivo ad un altro, occorre regolare l'intensità luminosa, agendo sulla manopola (non sui diaframmi!). Inoltre, se si osserva un preparato intensamente colorato, conviene utilizzare forti quantità di luce ed aprire quasi al massimo il diaframma di apertura. Nel caso, invece, di preparati a fresco o debolmente colorati, conviene abbassare l'intensità luminosa e chiudere il diaframma di apertura.

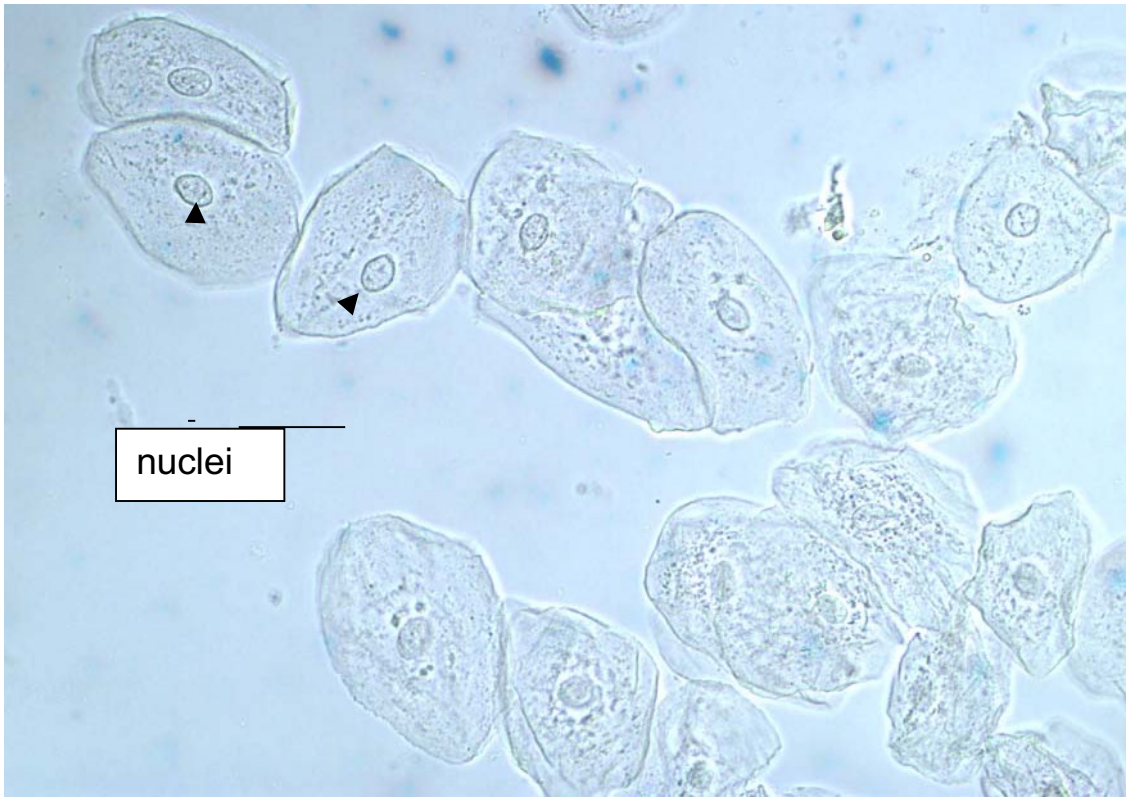
14. La luce deve essere ben centrata. Nel caso dei semplici microscopi da laboratorio, in cui il condensatore è fisso e non è presente un diaframma di campo, bisogna provvedere unicamente alla centratura della lampada. Per verificare la posizione della lampada, è sufficiente porre un foglio di carta diamantata sopra la sorgente luminosa (non a diretto contatto con la lampada) ed osservare come appare il campo illuminato. Se la lampada è ben centrata, si osserverà un campo circolare uniformemente illuminato. È consigliabile fare questa operazione di verifica ed eventuale centratura della luce prima di cominciare le osservazioni.

Nota bene
Nel caso dei microscopi dotati di regolazione del condensatore (più costosi), l'ottimizzazione della visione è un po' più complessa. Oltre alla centratura della lampada, essa prevede una serie di operazioni che complessivamente sono anche dette "**metodo di Kohler"**, dal nome del microscopista tedesco della Zeiss che lo introdusse.

Osservazione al microscopio al contrasto di fase di striscio di mucosa buccale

1. Il docente o il tecnico recupera con un tampone sterile le proprie cellule di sfaldamento della mucosa buccale e le depone su un vetrino portaoggetto coprendolo con un vetrino coprioggetto.
2. Accendere il microscopio.
3. Selezionare un obiettivo a piccolo ingrandimento e impostare l'anello di fase (sul condensatore) corrispondente: ad esempio per l'obiettivo 10x, che ha lamina di fase Ph 1 occorre impostare l'anello di fase 1.

Nota bene
Preliminarmente all'osservazione in contrasto di fase occorre verificare che ogni obiettivo sia "centrato" con il corrispondente anello di fase del condensatore (operazione detta di "centratura"). In pratica, si toglie un oculare (solitamente il destro) e si inserisce il cosiddetto cannocchiale di centratura. Quindi si sceglie un obiettivo, ad esempio 10x, che riporta la sigla Ph 1, e si seleziona sul condensatore il corrispondente anello di fase. Tramite le apposite viti del condensatore, si sovrappone l'anello di fase con quello dell'obiettivo. La centratura va verificata ogni qual volta si cambia obiettivo. In assenza di allineamento tra l'anello di fase del condensatore e la lamina di fase dell'obiettivo il preparato apparirà come se fosse osservato in campo chiaro.



Striscio di mucosa buccale a fresco.
I nuclei ed i mitocondri appaiono particolarmente contrastati

ESERCITAZIONE N° 2 e 3

Affettatura al microtomo di un campione biologico incluso in paraffina e colorazione dei vetrini

PREMESSA:

L'allestimento di un preparato biologico da osservare al microscopio ottico, eseguito mediante le tecniche istologiche di routine, richiede vari giorni.
Di conseguenza, nell'arco di un'esercitazione che duri una mezza giornata non è possibile seguire direttamente tutte le fasi della preparazione, dal prelievo al montaggio del vetrino.
La tecnica delle fette mediante inclusione in paraffina, tra le più adoperate, prevede i seguenti passaggi:

- ✓ Prelievo del tessuto
- ✓ Fissazione
- ✓ Lavaggio
- ✓ Disidratazione
- ✓ Chiarificazione
- ✓ Inclusione in paraffina
- ✓ Affettatura al microtomo
- ✓ Distensione dei nastri di paraffina

L'esperienza di laboratorio è stata organizzata per poter seguire due momenti fondamentali dell'allestimento di un vetrino microscopico:
- il sezionamento di un blocchetto di paraffina contenente un tessuto campione mediante microtomo (Scheda 2);
- colorazione di un vetrino campione mediante ematossilina-eosina (scheda 3).

SCHEDA TECNICA 2:
Sezionamento di un blocchetto di paraffina, adesione e distensione delle sezioni ("tecnica delle fette")

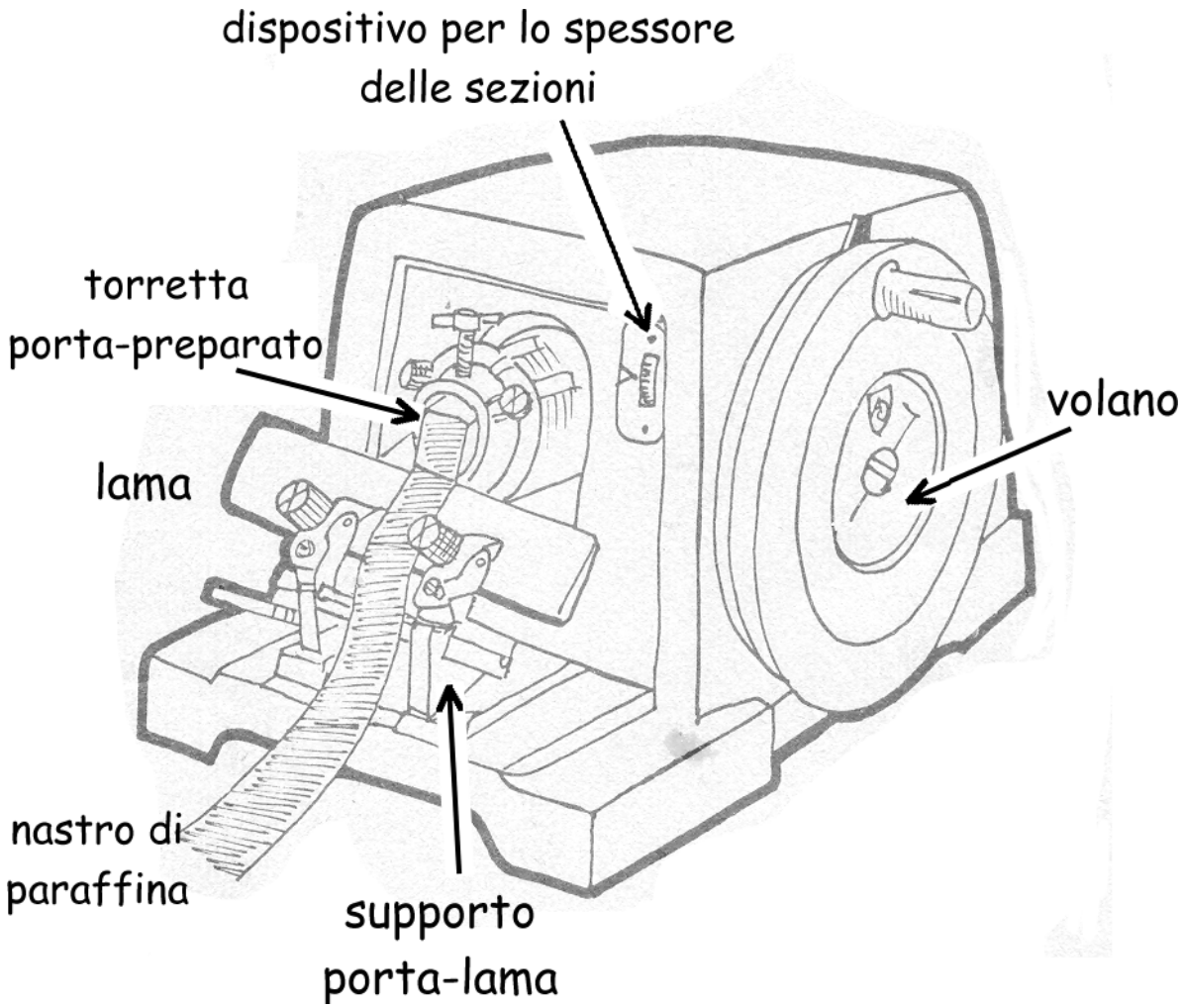
Materiale occorrente:

- blocchetto di paraffina
- supporto su cui montare il blocchetto (portablocchetto)
- becco bunsen o spiritiera
- spatolina
- 2 pennellini
- lametta a dorso manicato
- un cartoncino scuro
- beuta da 250 cc
- soluzione acquosa di albumina glicerinata (1 goccia di a.g. per ogni 10cc di acqua)
- piastra termostatatabile
- stufa termostatata (regolata a 37°C)
- microtomo rotativo
- lame monouso per microtomo
- vetrini portaoggetti (76 x 26 mm)
-matita o vetrografica

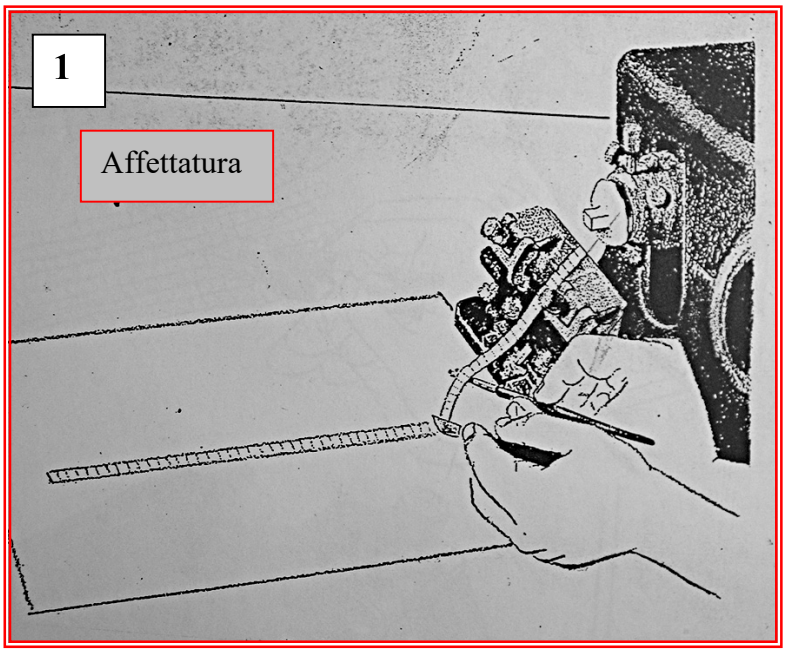
Procedura:

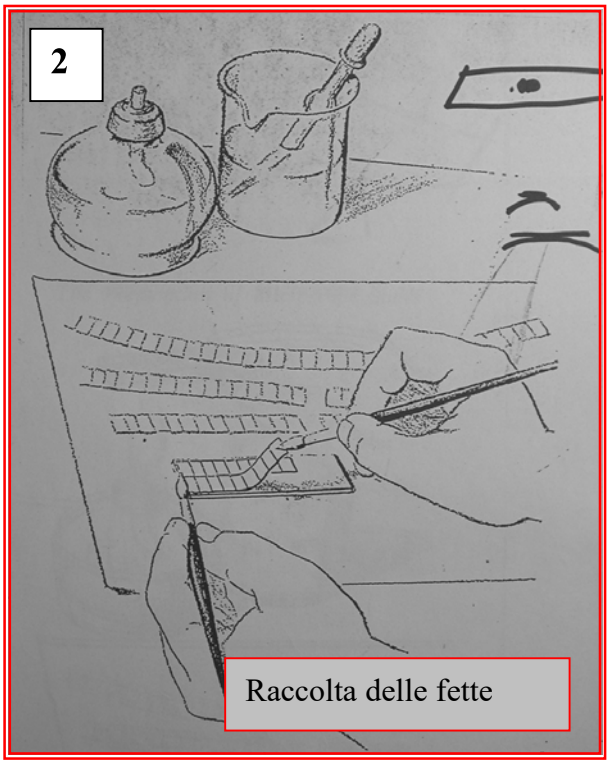
1. Dopo aver riconosciuto nel blocchetto la superficie secondo la quale si desidera affettare il campione, e dopo aver tolto l'eccesso di paraffina, si monta il blocchetto sul portablocchetto facendolo aderire con un po' di paraffina fusa grazie alla spatolina riscaldata sul becco bunsen.
2. Si sagoma, con la spatolina, il blocchetto di paraffina in modo da completare la sua saldatura al portablocchetto.
3. Dopo che si è raffreddato, il blocchetto si alloggia nell'apposita torretta portapezzo del microtomo.
4. Si alloggia la lama nel supporto apposito del microtomo.
5. Si avvicina la torretta con il preparato al filo della lama, facendo dapprima uso dei comandi meccanici che regolano gli spostamenti grossolani (ad esempio facendo scorrere il supporto portalama verso il preparato), quindi facendo uso dei comandi elettrici. Con tali manovre si intende avvicinare il pezzo da tagliare al filo della lama. Una volta ottenuto ciò, si completa l'avanzamento mediante rotazione del volano.
6. Dopo aver ottenuto le prime "fette", soprattutto se si è vicino al pezzo incluso nel blocchetto, ci si arresta. A questo spunto si squadra la superficie di taglio del blocchetto e si regola lo spessore delle sezioni. I blocchetti di paraffina generalmente si affettano bene ad uno spessore di 6 micrometri.
7. In assenza di problemi (che possono essere numerosi), a seguito del movimento del volano si ottiene un nastro diritto che successivamente potrà essere, con l'ausilio dei pennellini, staccato dal filo della lama e poggiato sul cartoncino scuro (fig. da Motta)

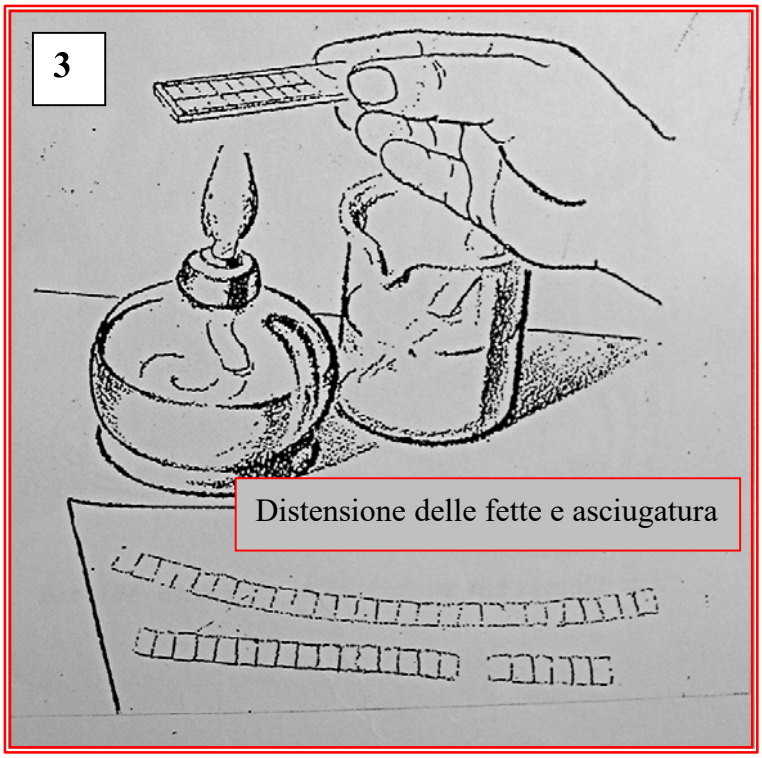
8. I nastri, raccolti in modo ordinato in modo da rispettare la seriazione delle fette, vengono suddivisi in tanti segmenti con l'ausilio della lametta.
9. Si etichettano i vetrini sulla parte smerigliata, con un codice che riporta dati sul pezzo che si sta affettando (organo, trattamento sperimentale, etc.) e su ognuno di essi si pone la soluzione adesiva di albumina glicerinata.
10. Si adagia, con l'ausilio dei pennellini, uno o più segmenti (dipende dagli scopi del nostro studio) del nastro di paraffina sul vetrino recante albumina glicerinata.
11. Si adagia il vetrino recante i nastri di paraffina sulla piastra termostatabile, facendo attenzione che la temperatura della piastra non superi mai la temperatura di fusione della paraffina utilizzata per l'inclusione (è preferibile, anzi, qualche grado centigrado in meno). Per effetto del calore, l'acqua della soluzione adesiva si distende e con essa anche i nastri di paraffina che vi galleggiano sopra (per tensione superficiale).
12. Ottenuta una valida distensione (il nastro di paraffina deve apparire traslucido e il preparato deve essere ben evidente) si allontana la soluzione acquosa per cui le fette aderiscono al vetrino.
13. I vetrini vengono posti nella stufa a 37°C affinché si asciughino completamente. Dopo un giorno di permanenza in stufa potranno essere sparaffinati e colorati o conservati in apposite scatole per vetrini.



Schema del microtomo rotativo







Principali tappe
dell'allestimento
di un preparato istologico
(a partire dal sezionamento)

SCHEDA TECNICA 3:
Colorazione emallume-eosina

Materiale occorrente:

- vetrini con nastri di paraffina già adesi
- serie completa di vaschette (14) per colorazioni istologiche
- histolemon (Carlo Erba)
- etanolo a varia gradazione (100°, 95°, 75°, 50)
- acqua distillata
- ematossilina già preparata per l'uso
- eosina giallastra in soluzione acquosa allo 0.5%
- pinzetta a punte piatte
- vetrini coprioggetto
- montante resinoso tipo Histovitrex (Carlo Erba) o analogo

Procedura N.B. Le operazioni con i solventi organici saranno effettuate sotto cappa.
Operare in successione i seguenti passaggi:

Sparaffinatura e passaggi nella serie discendente degli alcooli:

- histolemon I (5 min)
- histolemon II (5 min)
- Etanolo 100° (2 min)
- Etanolo 95° (2 min)
- Etanolo 75° (2 min)
- Etanolo 50° (2 min)
- Lavaggio in acqua distillata

Colorazione dei nuclei:

- Colorare con Emallume acido di Mayer (almeno 5 min)
- Lavaggio in acqua distillata
- Viraggio dei nuclei in acqua di fonte (almeno 5 min)
- Lavaggio in acqua distillata

Colorazione del citoplasma:

- Colorare con eosina giallastra 0.5% acidificata con a. acetico 1/1000
- Eliminare l'eosina in eccesso con carta da filtro
- Differenziare l'eosina con passaggi rapidi in alcooli 75° e 95°
- Arresto del differenziamento in alcool 100°

Montaggio del vetrino

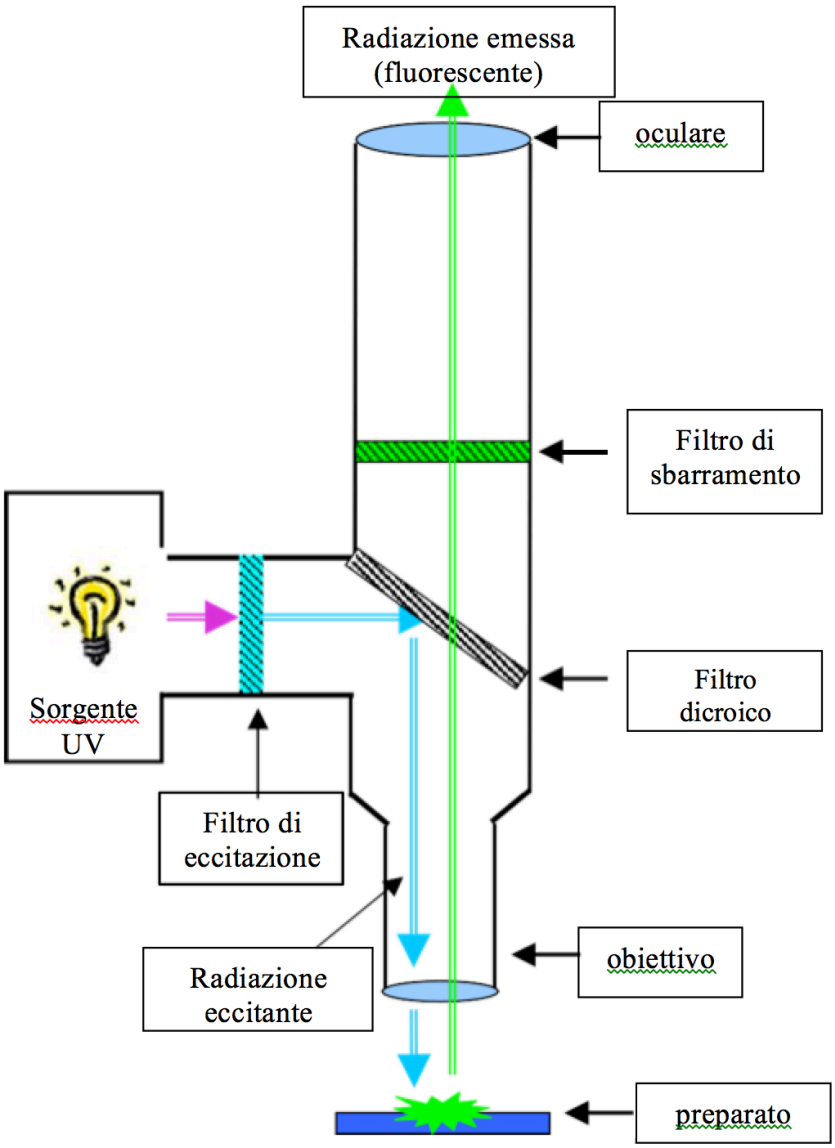
- Operare due passaggi di etanolo 100 (2 min ciascuno)
- Histolemon I (2 min)
- Histolemon II (2 min)
- Montaggio in histovitrex

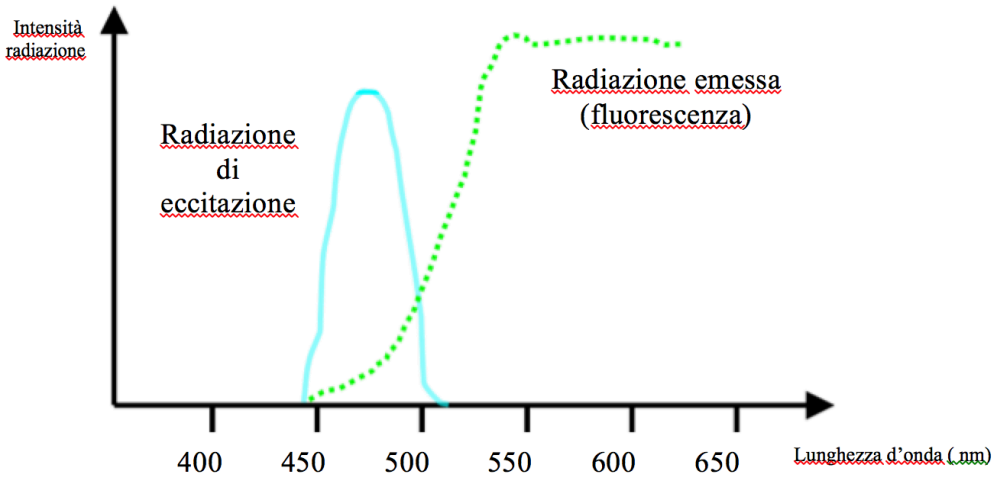
N.B. fra parentesi è indicato il tempo medio di permanenza dei vetrini (con le fette adese) all'interno di ciascuna vaschetta.

Un esempio di colorazione con <u>Emallume-eosina</u>.
Sezione di ovidutto di *Chalcides chalcides* (rettile, viviparo).
I nuclei appaiono bruni; i territori extranucleari (citoplasma e territori interstiziali) appaiono in rosa, con varia gradazione
(NB I nuclei possono apparire viola scuro, in dipendenza anche della ematossilina usata)

ESERCITAZIONE N.4

PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO DI UN MICROSCOPIO AD EPIFLUORESCENZA





Spettri di eccitazione e di emissione della fluoresceina

SCHEDA TECNICA 4
Osservazione di striscio di mucosa buccale colorato con arancio di acridina al microscopio a fluorescenza

1. Preparare uno striscio di mucosa buccale (vedi scheda 1) e colorarlo con arancio di acridina.
2. Accendere il microscopio.
3. Selezionare il filtro di eccitazione per l'arancio di acridina.
4. Localizzare il preparato con obiettivo a piccolo ingrandimento; successivamente utilizzare obiettivo a maggior ingrandimento per osservare i dettagli.

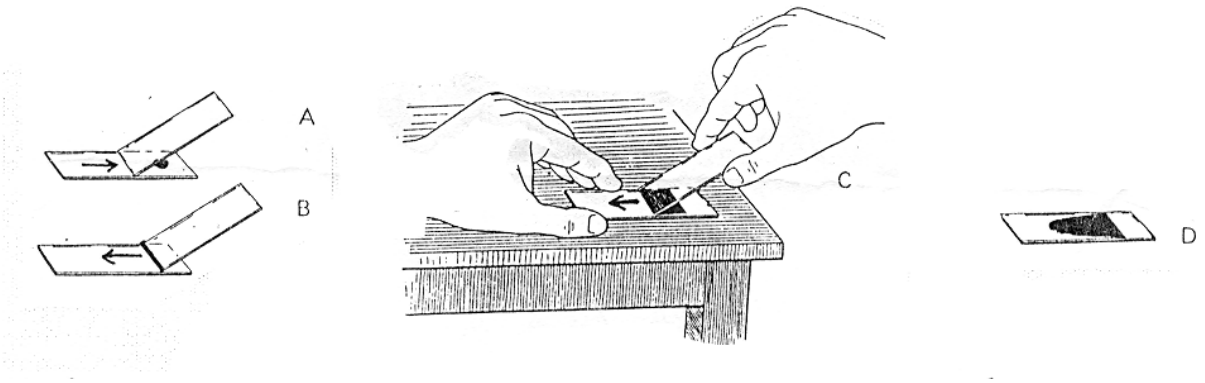
Nota bene
Molti fluorocromi decadono rapidamente per effetto dell'irraggiamento dei raggi UV. Di conseguenza, o si acquisisce (fotografa) in breve tempo il preparato che si sta osservando oppure, per evitare che la fluorescenza decada rapidamente, è opportuno sbarrare il percorso dei raggi UV con apposito filtro affinché essi non eccitino continuamente il preparato.

ESERCITAZIONE N° 5

Colorazione con metodo May-Grunwald-Giemsa per lo studio degli elementi figurati ematici

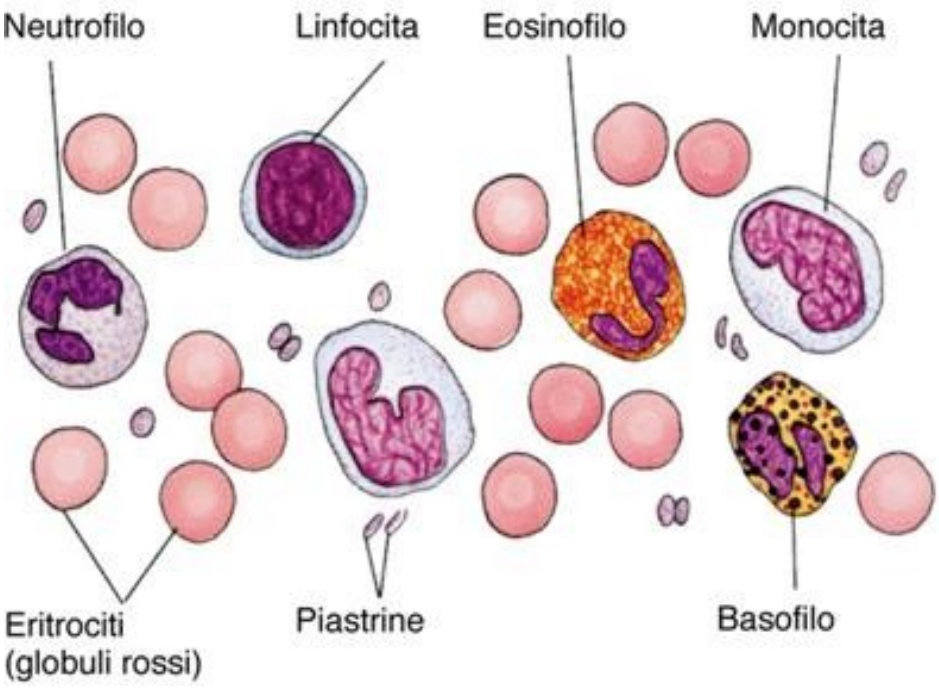
SCHEDA TECNICA 5

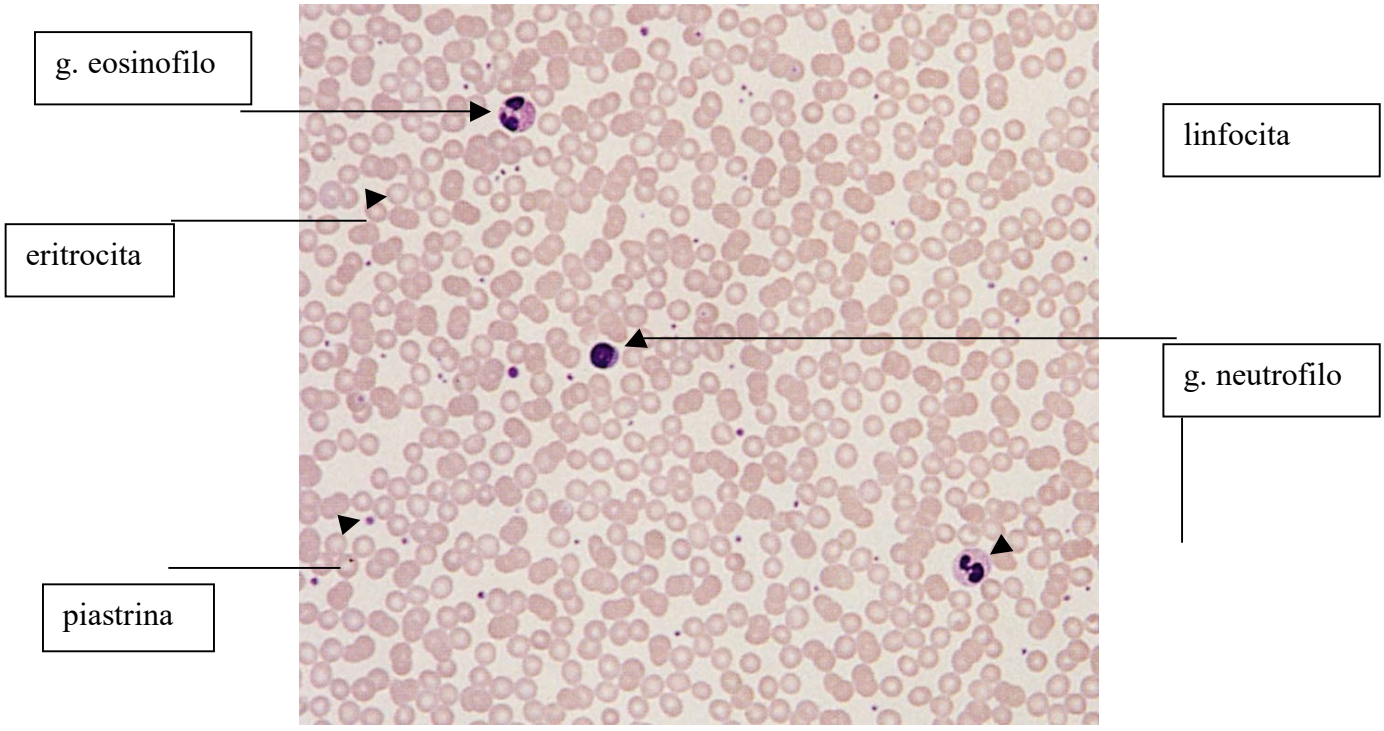
1. Si pone una goccia di sangue su un vetrino portaoggetto ben pulito. **N.B.: Il docente o il tecnico utilizza una goccia di colorante per illustrare agli studenti come si esegue uno striscio di sangue.**
2. Si prende un altro vetrino portaoggetto (possibilmente molato agli angoli) e si pone inclinato, con il suo lato corto, di circa 45° rispetto al vetrino portaoggetto su cui vi è la goccia di sangue; il vetrino inclinato deve essere posto davanti alla goccia di sangue (Fig. A), fatto scivolare delicatamente all'indietro fino a raggiungere la goccia: a questo punto il sangue si distende per tutta la lunghezza del lato corto del vetrino (Fig. B).
3. Si muove in avanti (" si striscia") il vetrino inclinato, uniformemente e rapidamente, per tutta la lunghezza del vetrino (Fig. C).
4. Si fa prosciugare all'aria il sottile strato di sangue ottenuto (Fig. D).



5. Si versano 3-4 gocce di colorante May-Grunwald (MG) in modo che tutta la superficie del vetrino rimanga coperta e si lascia per 3 min circa (Composizione MG: polvere di eosina e blu di metilene disciolta in alcool metilico).
6. Si aggiunge acqua distillata a gocce in rapporto di 2:1 rispetto al MG (5-6 min).
7. Breve lavaggio in acqua distillata
8. Si colora con Giemsa (G) in concentrazione di 2 gocce/ml di acqua distillata (10 min) (Commposizione G: eosina + azzurro II, disciolti in glicerina pura, a cui si aggiunge alcool metilico). È opportuno cambiare il G ogni 2-3 min.
9. Lavaggio con acqua distillata e prosciugamento con carta da filtro.
10. La fase di montaggio in DPX è facoltativa.

11. **A fine colorazione: gli eritrociti appariranno in rosa intenso; il nucleo dei leucociti dovrà apparire in violetto intenso**; i granuli dei granulociti neutrofili in rosa pallido; quelli dei granulociti eosinofili in rosa intenso; quelli dei granulociti basofili in bleu.





Striscio di sangue di mammifero colorato con May-Grunwald Giemsa (250x)

ESERCITAZIONE N° 6

Allestimento e colorazione di un cariotipo

PREMESSA.

In generale, ciascuna specie è caratterizzata da un numero fisso di cromosomi aventi una morfologia peculiare. Il cariotipo di una specie è la determinazione del numero e della descrizione dei suoi cromosomi, ordinati per dimensione, forma ed altre caratteristiche.
Come per l'allestimento di preparati biologici mediante la tecnica delle fette, anche l'allestimento del cariotipo di una specie richiede vari giorni. Di conseguenza durante l'esercitazione potranno essere eseguite direttamente solo le fasi finali del protocollo sperimentale qui proposto.

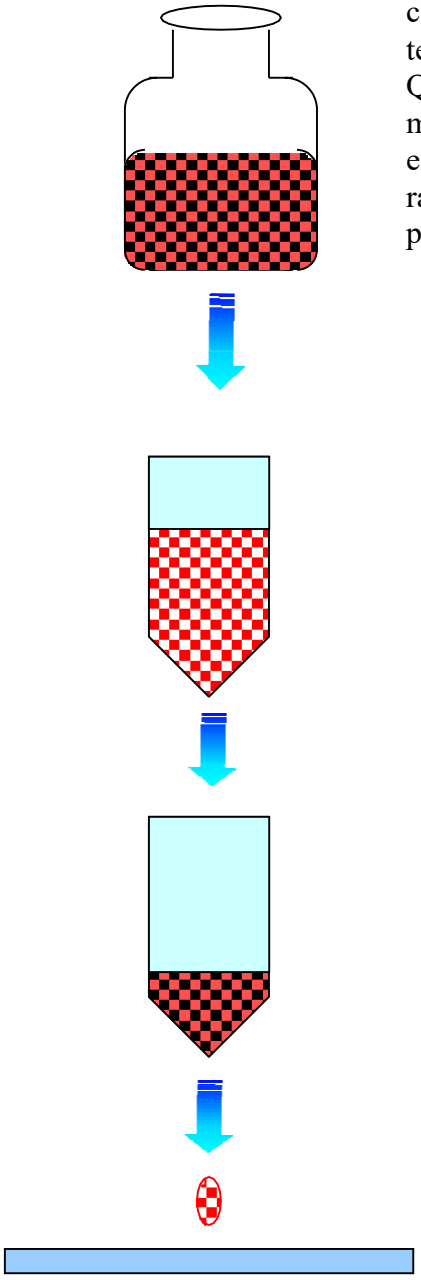
SCHEDA TECNICA 6. Cromosomi da colture di sangue

Materiale occorrente:
Terreno coltura MEM- Calf serum - Soluzione penicillina 10.000 U/ml+ streptomicina 10.000 ug/ml- eparina 25.000U/ml - soluzione madre fitoemagglutinina – Colchicina 10 µg/ml- Provette, Aghi e Pipette sterili - Vetrini portaoggetti – Soluzione ipotonica (KCl 0.075 M) – Alcool metilico – Acido acetico glaciale - Colorante di Giemsa.

Protocollo completo
N.B. durante l'esercitazione si eseguiranno le fasi a partire dal punto 13.

1- Prelevare sterilmente tre gocce di sangue.
2- Incubare il sangue in 3 ml di terreno di coltura (80% MEM+ antibiotici (penicillina 100 U/ml+ streptomicina 100 ug/ml)+ 3% fitoemagglutinina (PHA) + 20% Calf serum).
3- Dopo 72 ore, arrestare la crescita aggiungendo 30 µl di colchicina a 10 µg/ml.
4- Dopo 3 ore centrifugare per 1 min a 1000 rpm.
5- Eliminare il supernatante e lavare il sedimento con 3 ml di liquido di Hanks o di soluzione fisiologica.
6- Centrifugare per 10min a 1000 rpm. Eliminare il supernatante e aggiungere la soluzione ipotonica (5 ml di KCl 75 mM a 37° C).
7- Dopo 30 min, centrifugare per 10 min a 1000 rpm.
8- Prelevare 0,5 ml del surnatante.
9- Aggiungere goccia a goccia 5 ml di fissativo (Alcool metilico + acido acetico glaciale, 3:1). Lasciare agire per 30 min, agitando la sospensione ogni 10 minuti.
10- Centrifugare per 10 minuti a 1000 rpm.
11- Rinnovare il fissativo e dopo 10 minuti centrifugare per 10 min a 1000 rpm.
12- Allontanare il supernatante e aggiungere, agitando, nuovo fissativo al sedimento fino ad ottenere una sospensione cellulare opalescente.
13- Far cadere da circa 20 centimetri al centro di un vetrino pulito e sgrassato 20 µml di sospensione cellulare.
14- Lasciare il vetrino all'aria senza smuoverlo per circa 10 min.
15- Assicurarsi che il vetrino sia ben asciutto.
16- Colorare per 10 minuti in Giemsa 5% in tampone pH 7 (può essere usata l'acqua di fonte).
17- Lavare in acqua distillata.
18- Asciugare all'aria.
19- Osservare i cromosomi immediatamente o montare in balsamo se si desidera conservare il preparato successivamente.
20 – Acquisire una piastra cromosomica con l'ausilio di un sistema di analisi di immagine e ricostruire il cariotipo, ritagliando ed appaiando i cromosomi omologhi in base alle dimensioni, forma e posizione del centromero e disponendo le varie coppie in ordine decrescente di dimensione.

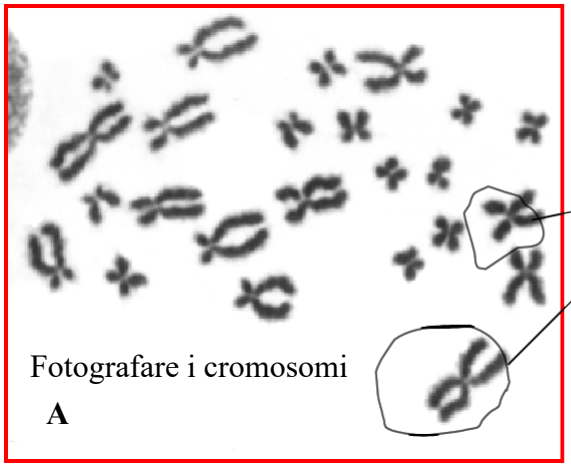
ALLESTIMENTO CROMOSOMI: MICROMETODO



Incubare il sangue per 72 ore in una provetta contenente 5 ml di terreno di coltura. Quindi, aggiungere 20 microlitri di colchicina e dopo 3 ore raccogliere le cellule per centrifugazione

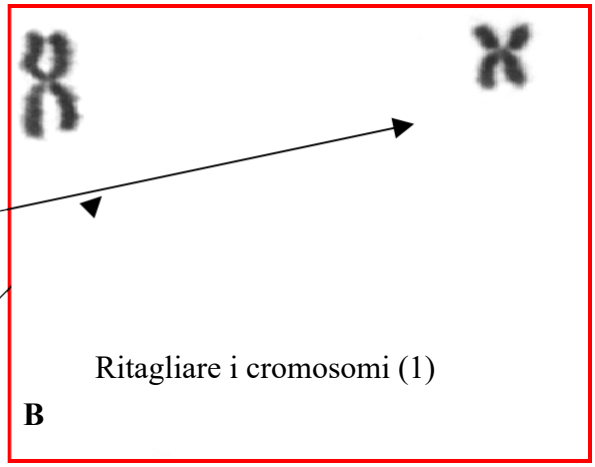
Lavare le cellule con soluzione di Hanks o soluzione fisiologica. Centrifugare al sedimento aggiungere 10 ml di soluzione ipotonica. Dopo 30 minuti, centrifugare e al sedimento aggiungere il fissativo (alcool metilico+acido acetico,3:1). Dopo 30 minuti, centrifugare e risospendere il sedimento cellulare in un piccolo volume (100 microlitri) di fissativo. Far cadere 20 microlitri di sospensione cellule su un vetrino portaoggetti pulito. Far asciugare all'aria senza smuovere. Colorare per 10 minuti in soluzione di Giemsa al 5%. Far asciugare all'aria e ricercare i cromosomi al microscopio

Ricostruzione del cariotipo



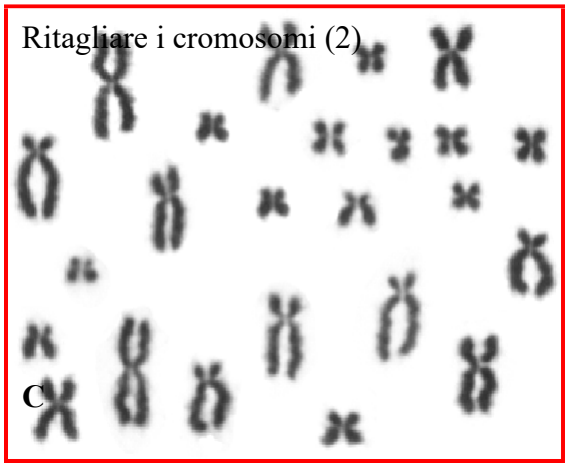
Fotografare i cromosomi

A



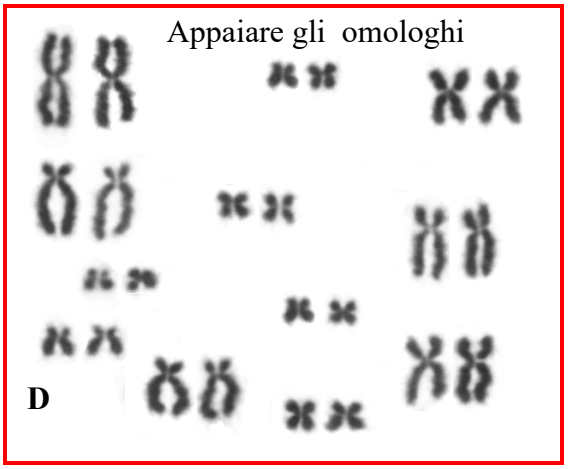
Ritagliare i cromosomi (1)

B



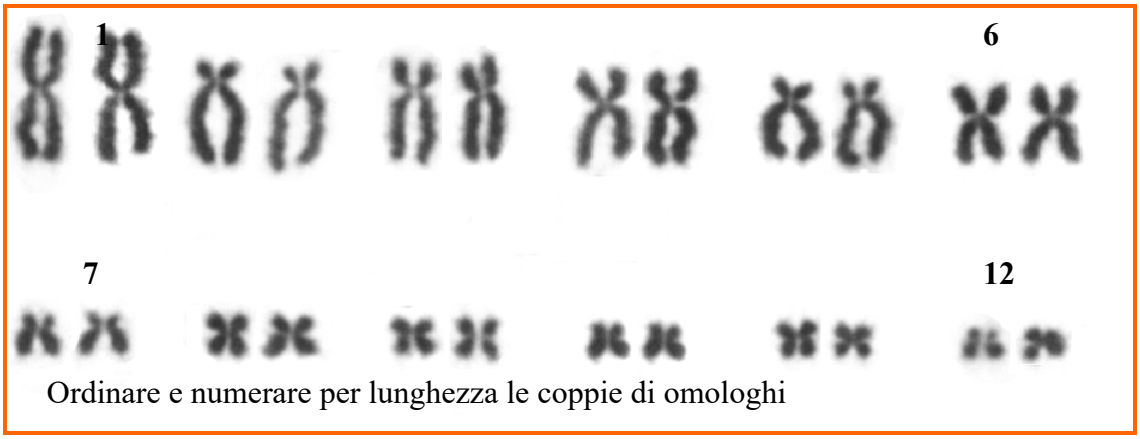
Ritagliare i cromosomi (2)

C



Appaiare gli omologhi

D



Ordinare e numerare per lunghezza le coppie di omologhi