

## Stanovení karyotypu z periferní krve

### PRINCIP:

Ide o vyšetření karyotypu lymfocytů z periferní krve. Působením phytohemaglutininu (PHA) se T-lymfocyty přeměňují zpět na mladší formy-lymfoblasty, které jsou schopny dělení. Kultivace trvá 72 hodin při 37 °C.

### BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

3 ml periferní krve a 0,3 ml heparinu.

### CHEMIKÁLIE:

Medium (RPMI 1640, bovinní serum, NaHCO<sub>3</sub>, glutamin, penicilin, PHA, redestilovaná voda), kolchicin, KCl, kyselina octová, metanol, barva Giemsa-Romanovski, Sorensenův puří, trypsin, heparin.

### PRACOVNÍ POSTUP:

- 0,6 ml krve a 7 ml media
- kultivace 72 hod. při 37 °C v CO<sub>2</sub> termostatu
- blokáda mitotického dělení kolchicinem 40 min \*
- centrifugace 10 min.
- hypotonie 0,075 M KCl – 25 min.
- centrifugace 10 minut
- fixace 3x kyselinou octovou a metanolem (3 : 1)
- příprava preparátů – 1 kapka suspenze na mokré podložní sklo
- pruhování preparátů

### HODNOCENÍ:

- 20 mitóz diferencovat

## Stanovení karyotypu z kostní dřevě (onkocytogentika)

### PRINCIP:

Jde o vyšetření karyotypu blastů v kostní dřevě, kultivace trvá 24 hod., nebo se provádí přímé zpracování tj. bez kultivace.

### BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

1 ml kostní dřevě v 5 ml PBS pufru (transportní médium) a 0,5 ml heparinu.

### CHEMIKÁLIE:

Medium PANSERIN – 411, kolchicin, KCl, kyselina octová, metanol, barva Giemsa-Romanovski, Sorensenuv pufr, trypsin, heparin, PBS pufr.

### PRACOVNÍ POSTUP:

- 1 ml kostní dřevě a 12,5 ml PANSERINU, kultivace 24 hod. při 37 °C v CO<sub>2</sub> termostatu nebo bez kultivace...
- blokáda mitotického dělení kolchicinem (1 ml, 90 min.)
- centrifugace 10 min.
- hypotonie 0, 075 M KCl – 25 min.
- přidat 10 kapek fixačního roztoku a 5 min. nechat stát
- centrifugace 10 minut
- fixace 3x kyselinou octovou a metanolem (3 : 1)
- příprava preparátů – 6 kapek suspenze na namražená podložní skla
- pruhování preparátů

### HODNOCENÍ:

- 20 mitóz diferencovat

## Základní pruhovací techniky

### G-pruhování

- a) Barví se nakapaná skla stará nejméně 24 hodin
- b) Zapečení skel 20 minut při 80° C
- c) Připravít 3 roztoky do histologických kyvet:
  1. kyveta: roztok trypsinu – 0,5 mg trypsinu naředit 5 ml Sorensenova pufru. Z tohoto roztoku připravit 0,5 % - 1 % - 8 % dle kvality preparátu
  2. kyveta: roztok Sorensenova pufru
  3. kyveta: roztok Giemsova barviva – 2 ml Giemsy do 70 ml Sorensenova pufru
  4. kyveta destilovaná voda

### Vlastní barvení:

Použít několik zkušebních skel pro různé časy

- a) Preparát ponořit do roztoku trypsinu (1. kyveta) asi na 5 – 15 vteřin
- b) Rychle opláchnout v Sorensenově pufru (2. kyveta)
- c) Okapat a barvit Giemsou (3. kyveta) asi 1 – 2,5 minuty
- d) Opláchnout destilovanou vodou
- e) Prohlédnout v mikroskopu a upravit časy barvení a denaturace