

Relazione di laboratorio di genetica

Analisi di metafasi umane da coltura di linfociti

L'esperimento prevede l'analisi al microscopio ottico 100x di metafasi umane derivate da una coltura di linfociti di sangue periferico e la ricostruzione del cariotipo dopo colorazione con Giemsa.

Sono impiegati linfociti per la loro facile reperibilità, dal sangue di donatori non infetto, e per la semplicità della coltura, in condizioni analoghe a quelle fisiologiche. Per l'allestimento della coltura di linfociti, da propagare per 72 ore, si utilizza un terreno completo con la seguente composizione:

- terreno RPMI 1640, specifico per linfociti, contenente nutrienti quali amminoacidi, zuccheri e vitamine. Questo terreno è di norma conservato in frigorifero a 4°C e occorre porlo a temperatura ambiente 2 ore prima dell'utilizzo per non sottoporre le cellule in coltura a shock termico.
- 10% BSA (siero fetale bovino), per favorire la proliferazione cellulare; venduto in bottiglie da 500 mL, viene scomplementato trattandolo a 56°C per 30 minuti.
- 1,5% fitoemagglutinina, sostanza di origine vegetale con il duplice ruolo di:
 - a) stimolare la proliferazione dei linfociti e il loro passaggio dalla fase G₀ di cellule quiescenti, non soggette a divisione cellulare, alla fase G₁ di duplicazione del DNA;
 - b) causare l'agglutinazione dei globuli rossi, anch'essi presenti nel sangue in percentuale variabile 46-49% (contro lo 0,1% dei leucociti).
- 1% antibiotici ad ampio spettro, quali streptomina e ampicillina, per impedire la proliferazione batterica. Inoltre per prevenire la contaminazione microbica si allestiscono le colture in cappa sterile a flusso laminare e in materiale sterile. Per la sterilizzazione si utilizzano vari metodi in base al materiale:
 - per la vetreria si ricorre alla sterilizzazione a calore secco, a temperature di 160-180°C;
 - per la plastica, più termosensibile, si utilizza l'autoclave (calore umido) a 120°C.

Inoltre alcol e candeggina sono usati come disinfettanti.

Per prevenire la contaminazione dell'ambiente, lo smaltimento del materiale a contatto col sangue avviene negli ospedali mediante incenerimento o nei laboratori procedendo alla sterilizzazione in autoclave prima di conferirlo come rifiuto ordinario.

Dato il breve tempo di propagazione della coltura (72 ore), il rischio di contaminazione è ridotto; nel caso di colture cellulari occorre adottare ulteriori precauzioni.

Prepariamo il terreno in dosi per 20; occorrono quindi:

- 81,5 mL RPMI (80 mL misurati col cilindro + 2*750 µL con la P1000);
- 10 mL BSA (prelevati col pipettatore; le pipette sierologiche esistono in vari formati - 2,5,10,25,50 mL);
- 1 mL antibiotici;
- 1,5 mL fitoemagglutinina.

La preparazione avviene sotto cappa; poi, sempre sotto cappa, preleviamo 4,7 mL di terreno completo e lo trasferiamo in una provetta da coltura sterile, e aggiungiamo 300 µL di sangue intero dopo averlo risospeso. Agitiamo delicatamente per omogeneizzare la sospensione.

Successivamente la coltura di linfociti è posta in appositi tubi in agitazione, siccome i linfociti sono cellule circolanti, all'interno di un termostato alla temperatura ottimale di 37°C.

Alla 69^a ora si aggiungono 50 µL di Colcemid, agente che blocca i linfociti in metafase impedendo la formazione delle fibre del fuso mitotico; dopo 4-6 ore la coltura viene interrotta. Da ora non è più necessario lavorare in condizioni di sterilità.

Dopo una centrifuga, si rimuove dai tubi di crescita quasi tutto il surnatante; il pellet della parte corpuscolata del sangue viene risospeso e si procede all'aggiunta di una soluzione ipotonica di acqua e KCl 0,075 M. Essa provoca il richiamo di acqua all'interno delle cellule e il loro rigonfiamento fino a lisi nel caso degli eritrociti, che essendo anucleati ne internalizzano di più; i linfociti invece non si lisano. Per omogeneizzare la soluzione ed evitare la formazione di ammassi cellulari, la soluzione ipotonica è aggiunta goccia a goccia, fino a ripristinare il volume iniziale di soluzione (5 mL).

Si aggiungono quindi 0,4 mL di prefissativo, composto da 5 parti di acido acetico e 3 di metanolo, per fortificare le membrane dei linfociti prima della centrifugazione. Dopo l'aggiunta del prefissativo, la soluzione si colora di marroncino perché l'acido acetico ossida l'emoglobina.

Dopo centrifuga e rimozione del surnatante, si porta a volume con metanolo. I tubi sono infine posti a -20°C . Tutte le centrifugazioni sono a 2000 rpm per 5 minuti.

Prima della gocciolatura, vengono effettuati due lavaggi in fissativo. Il fissativo, necessario a fissare il preparato sul supporto, presenta un rapporto metanolo-acido acetico invertito rispetto al prefissativo, che va da 3:1 a 1:1 a seconda dell'umidità, perché questa influenza la velocità d'evaporazione del metanolo; nel nostro caso usiamo 2:1. Tale dosaggio deve soddisfare le due condizioni per la leggibilità delle metafasi:

- 1) Le singole metafasi devono essere ben separate e distinguibili; se in eccesso, l'acido acetico corrode le membrane e i cromosomi, sebbene distesi, sono sparsi e non riconducibili ad una sola metafase;
- 2) I cromosomi di una singola metafase non devono essere sovrapposti; ciò avviene se permane una quantità eccessiva di citoplasma, a fronte di una carenza di acido acetico.

Prima della colorazione, i vetrini si osservano al microscopio a contrasto di fase per verificare la presenza di metafasi leggibili. Una metafase si considera leggibile quando i cromosomi sono adeguatamente distesi, non contratti né accartocciati su se stessi, e con nessuna o poche sovrapposizioni.

Il colorante Giemsa è sensibile alla luce, perciò occorre coprire con la stagnola la vaschetta di colorazione in cui i vetrini restano immersi per 10 minuti, al termine dei quali si procede a lavaggio e asciugatura.

Le metafasi sono lette in immersione con olio da microscopia, pertanto è necessario fissare col montante il vetrino coprioggetto sul portaoggetto in modo da non asportare il preparato durante la pulizia.

Una volta individuata una metafase leggibile, la ricostruzione del cariotipo prevede, nell'ordine:

- 1) conteggio dei cromosomi, aiutandosi con il loro raggruppamento sul vetrino;
- 2) appaiamento degli omologhi, riconosciuti grazie alle loro similarità;
- 3) ordinamento delle coppie di omologhi secondo la convenzione.

La colorazione con Giemsa, non abbinata alla bandeggiatura, permette di riconoscere solo alcuni cromosomi in virtù della loro morfologia caratteristica:

- del gruppo A, si riconoscono tutte le coppie di omologhi, identificabili per le loro dimensioni reciproche e la posizione del centromero:
 - 1, metacentrico, con bracci p e q identici, inizialmente ritenuto il più grande;
 - 2, submetacentrico (braccio p più piccolo, q più lungo) e il più grande in assoluto;
 - 3, metacentrico e più piccolo dell'1.
- dei gruppi D (cromosomi 18, 19, 20) e G (cromosomi 21, 22) si riescono a contare i cromosomi, che sono piccoli e acrocentrici: 6 del gruppo D e, nel gruppo G, 4 nella donna e 5 nel maschio, perché il cromosoma Y presenta una morfologia simile a quelli del gruppo G. Tuttavia non è possibile distinguere le singole coppie di omologhi. Nel mio vetrino, erano presenti 4 cromosomi del gruppo G, pertanto ho dedotto che i linfociti provenivano da una donna.

Si riescono inoltre a contare tutti i 46 cromosomi del cariotipo umano.