کیت همزمان سازی لنفوسیتی برای آنالیز سیتوژنتیک با وضوح بالا
فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-2002

توصیـف محصـول

روش کاریوتایپینگ سلول‌های خونی، برای آگاهی بیشتر از ناهنجاری‌های کروموزومی توسعه یافت. سلول‌های لنفوسیتی به طور طبیعی تحت تقسیم سلولی قرار نمی گیرند. اما در حضور یک ماده میتوژن، لنفوسیت‌ها تحریک شده و با تکثیر DNA وارد تقسیم میتوزی می‌شوند. پس از ۷۲–۴۸ ساعت، یک مهارکننده متیوزی به کشت اضافه می‌شود تا در مرحله متافازی، تقسیم میتوزی را متوقف کند. پس از تیمار با محلول هایپوتونیک، فرایند تثبیت، و نیز رنگ آمیزی، می‌توان کروموزوم‌ها را بصورت میکروسکوپی مشاهده کرده و از نظر ناهنجاری مورد ارزیابی قرار داد. تکنیک آنالیز با وضوح بالا، یک دستکاری ویژه از روش کاریوتایپینگ معمول خون است که برای ایجاد تعداد زیاد حالت‌های میتوزی در اواخر پروفاز یا پرومتافاز طراحی شده است. در این مرحله از تقسیم میتوزی، کروموزوم‌ها متراکم‌ترند. پس از G-banding، کروموزوم‌ها وضوح باند بالاتری را نشان می‌دهند که در آنالیز معمول دیده نشده و این وضوح بالا باعث آنالیز دقیق‌تر کاریوتایپ می‌گردد. سپس می‌تواند کشت‌ها را با افزودن متوترکسات (MTX) بعنوان یک مهار کننده بیوسنتز تیمیدین که سلول‌ها را در فاز S (سنتز DNA) چرخه سلولی متوقف می‌کند، هماهنگ و همزمان کرد. پس از ۱۸–۱۶ ساعت، بیشتر سلولهای تقسیم شونده در کشت، در فاز S قرار دارند. اگر تیمیدین به کشت اضافه شود، مهار ناشی از متوترکسات متوقف شده و سلول‌ها بطور همزمان به میتوز خود ادامه می‌دهند که در آن نقطه کلشی سین ممکن است اضافه شود. در هنگام بررسی حذف یا نوآرایی‌های کوچک، یک تیمار کوتاه با کولشی سین در کنار این تکنیک می‌تواند برای تولید کروموزوم‌های پرومتافازی کشیده بکار رود.

محتویات کیت

محیط لیمفوپلاس (BI-1103، محیط کامل بهینه شده برای کشت لنفوسیت): یک بطری ۱۰۰ میلی لیتری
متوترکسات، 10^{-5} مولار در HBSS: ۱ ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر.
تیمیدین، 10^{-3} مولار در آب مقطر: ۱ ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر.

روش استفاده

پس از دریافت کیت، لطفاً تمام محتویات را در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد نگه دارید.

۱. محلول لنفوپلاس را دفریز کنید (۴ درجه سانتیگراد، به مدت یک شب).
۲. تقریباً ۰/۵ میلی لیتر خون کامل هپارینه تازه را داخل یک لوله شیشه‌ای یا پلاستیکی حاوی ۵–۳ میلی لیتر محیط لنفوپلاس تلقیح کنید. از EDTA برای هپارینه کردن استفاده نکنید.
۳. کشت را به مدت ۷۲ ساعت انکوبه کنید (CO_2 و دمای انکوباتور را چک کنید).
۴. پس از ۴۸ ساعت، ۰/۱ میلی لیتر محلول متوترکسات به هر لوله اضافه کرده و به دقت مخلوط کنید. توصیه می‌شود متوترکسات را بعد از ظهر اضافه کنید (برای انکوباسیون شبانه به مدت ۱۷ ساعت). از آنجا که متوترکسات سمی است، این زمان انکوباسیون را افزایش ندهید.
۵. بعد از ۱۷ ساعت، ۰/۱ میلی لیتر محلول تیمیدین را با ورتکس مداوم به هر لوله اضافه کرده و برای ۴/۵ تا ۵ ساعت انکوبه کنید. توجه داشته باشید که مدت زمان مرحله G_2 برای لنفوسیت‌ها تنها ۴/۵ تا ۵ ساعت است. بنابراین، اگر زمان انکوباسیون را افزایش دهید، سلول‌ها از مرحله متافاز عبور کرده و شما سلول‌های میتوتیک را از دست خواهید داد.
۶. بعد از ۴/۵ تا ۵ ساعت، ۰/۱ میلی لیتر محلول کولشی سین به هر لوله کشت اضافه کنید. اگر کروموزوم‌های طولانی پرومتافاز مد نظر هستند، پس از ۱۰ تا ۲۰ دقیقه هاروست کنید. اگر شاخص متیوتیک بالایی مورد نظر است، پس از ۵۰–۳۰ دقیقه انکوباسیون هاروست نمایید.
۷. کشت را به یک لوله سانتریفوژ منتقل کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۸. محلول رویی را دور بریزید و سلول‌ها را در ۱۰–۵ میلی لیتر محلول هایپوتونیک KCl (0.075 M) حل کنید. سپس به مدت ۱۲–۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید.

۹. با دور g ۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۱۰. محلول رویی را دور بریزید، رسوب را به شدت تکان دهید و بصورت قطره قطره، ۵ تا ۱۰ میلی لیتر محلول فیسکاتیو تازه سرد (حاوی ۱ قسمت اسید استیک و ۳ قسمت متانول) اضافه کنید. برای ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد قرار دهید.

۱۱. مراحل ۹ و ۱۰ را تکرار کنید. با دور g ۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۱۲. رسوب سلولی را در حجم کم ۱–۰/۵ میلی لیتر از فیکساتیو تازه حل کنید. یک قطره آن را روی یک اسلاید تمیز بگذارید تا در مجاورت هوا خشک شود.

۱۳. در این مرحله، می‌توان پرپوراسیون را رنگ آمیزی کرد.

مهار کننده‌ها

- عوامل شلاته کننده فلزات مانند سیستئین، EDTA یا O–فنانترولین (اما نه دی ایزوپروپیل فلوروفسفات) باعث مهار آن می‌شوند. همچنین توسط آلفا–ماکروگلوبولین (یک گلیکوپروتئین بزرگ پلاسمایی) نیز مهار می‌شود.

توجه

- محلول‌ها باید بصورت یخ زده و دور از نور نگهداری شوند. در صورت نگهداری مناسب، محلول‌ها برای حداقل ۱۸ ماه از زمان آماده سازی پایدار هستند.

هشدار!

- متوترکسات می‌تواند اثرات نامطلوب بر تولید مثل و جنین انسان ایجاد کرده و باعث آسیب چشم، پوست و دستگاه تنفس شود.
- متوترکسات می‌تواند باعث اختلالات خونی و آسیب‌های ژنتیکی قابل انتقال شود.

منـابع

1. Kelly, T.E., 1986. Clinical genetics and genetic counselling.
2. Knutsen, T., 1992. International Cytogenetic Laboratory Directory. Association of Cytogenetie Technologists, Burbank, California.
3. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.T. and Hungerford, D.A., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental cell research, 20(3), pp.613-616.
4. Barch, M.J., The association of cytogenetic technologists' laboratory manual. New York: Act.
5. Nowell, P.C., 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer research, 20(4), pp.462-466.