**Лабораторная работа 2.**

**Опыт 1. Кариотипирование хромосом человека методом рутинной окраски.**

1. Культивирование лимфоцитов периферической крови осуществляют добавлением к 0,4 мл цельной крови 4 мл питательной среды для культивирования лимфоцитов крови человека (во флакон с готовой сухой средой добавляют 4 мл стерильной деионизованной воды).

*Состав питательной среды для культивирования лимфоцитов крови человека:*

* *1260 мл питательной среды RPM1-1640,*
* *5,8 г HEPES-буфера,*
* *125 мл жидкой стерильной сыворотки крови КРС,*
* *30 мл 3% -ного раствора L-глутамина,*
* *бензилпенициллина натриевая соль в концентрации 90 ед/мл,*
* *канамицина сульфат 0,045 мг/мл,*
* *стрептомицина сульфат 0,09 мг/мл*
* *17 мг ФГА, растворенного в 15 мл стерильной деионизованной воды.*

*Перемешивают в течение 15 - 20 мин до полного растворения и подвергают стерилизующей фильтрации через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм.*

1. Культивируют при (37±1)oC в течение 52 ч, что соответствует первому клеточному делению.
2. Добавляют к культуральной суспензии раствор колхицина (0.2 мкг/мл), тем самым останавливают клеточное деление на стадии метафазы, инкубировать 2,5 ч.
3. Центрифугируют, 1000 об/мин, 15 мин.
4. Осадок ресуспендируют в 0.56%-ном растворе KCl в течение 15 мин.
5. Наносят пробу на предметное стекло, высушивают и фиксируют в смеси из метанола и ледяной уксусной кислоты 3 : 1 в течение 5 сут.
6. Окрашивают красителем Гимза-Романовского.

Краска Романовского-Гимзы состоит из смеси азура, эозина и метиленовой сини. Перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды (рН 7,0) прибавляют 10 капель исходного раствора краски.

* на фиксированный мазок наливают приготовленную краску на 1 час.
* раствор сливают, препарат промывают дистиллированной водой, высушивают, микроскопируют.
1. Изучение хромосом проводят при увеличении 10×100. Метафазные пластинки с хромосомными нарушениями и с ассоциациями акроцентриков фотографируют при помощи цифровой фотокамеры, установленной на тубус светового микроскопа.
2. Полученные цифровые фотографии переносят в компьютер и идентифицируют.

**Опыт 2. Кариотипирование хромосом человека с окраской флюорохромами.**

1. Культивирование лимфоцитов периферической крови осуществляют добавлением к 0,4 мл цельной крови 4 мл питательной среды для культивирования лимфоцитов крови человека (во флакон с готовой сухой средой добавляют 4 мл стерильной деионизованной воды).

*Состав питательной среды для культивирования лимфоцитов крови человека:*

* *1260 мл питательной среды RPM1-1640,*
* *5,8 г HEPES-буфера,*
* *125 мл жидкой стерильной сыворотки крови КРС,*
* *30 мл 3% -ного раствора L-глутамина,*
* *бензилпенициллина натриевая соль в концентрации 90 ед/мл,*
* *канамицина сульфат 0,045 мг/мл,*
* *стрептомицина сульфат 0,09 мг/мл*
* *17 мг ФГА, растворенного в 15 мл стерильной деионизованной воды.*

*Перемешивают в течение 15 - 20 мин до полного растворения и подвергают стерилизующей фильтрации через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм.*

1. Культивируют при (37±1)oC в течение 52 ч, что соответствует первому клеточному делению.
2. Добавляют к культуральной суспензии раствор колхицина (0.2 мкг/мл), тем самым останавливают клеточное деление на стадии метафазы, инкубировать 2,5 ч.
3. Центрифугируют, 1000 об/мин, 15 мин.
4. Осадок ресуспендируют в 0.56%-ном растворе KCl в течение 15 мин.
5. Наносят пробу на предметное стекло, высушивают и фиксируют в смеси из метанола и ледяной уксусной кислоты 3 : 1 в течение 5 сут.
6. Окрашивают флюорохромами.
7. Изучение хромосом проводят при увеличении 10×100. Метафазные пластинки с хромосомными нарушениями и с ассоциациями акроцентриков фотографируют при помощи цифровой фотокамеры, установленной на тубус светового микроскопа.
8. Полученные цифровые фотографии переносят в компьютер и идентифицируют.

**Результаты оформляют в виде фотографий в рабочей тетради.**