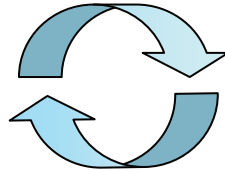


## Karyotypanalyse

### Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 8](#)



### Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 5](#)

### Versuchsprinzip:

Menschliche Lymphozyten aus dem peripheren venösen Blut eignen sich besonders gut zur Chromosomendarstellung. Durch bestimmte Kultivierungsmaßnahmen (Stimulation durch ein Mitogen sowie Spindelgiftbehandlung) erhält man sog. Metaphaseplatten, die zur Karyotypanalyse herangezogen werden können.

Außerdem stellen periphere Lymphozyten ein empfindliches System dar um sowohl in vivo als auch in vitro induzierte Chromosomenveränderungen zu erfassen. Änderungen in der Chromosomenstruktur stellen einen Hinweis auf eine Schädigung des genetischen Materials dar und sind somit ein Indikator für das mutagene Potential einer Substanz oder einer Strahlenbehandlung.

### Materialien:

- Venöses Blut (Abnahme beim Werkarzt)
- Medium: Mc Coy' s 5A mit Glutamax
- FCS (Fetal Calf Serum)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung
- Phytohämagglutinin (Mitogen)
- Na-Heparin beschichtete Röhrchen
- Kulturröhrchen
- Colcemid
- 0.075 mol/L KCl-Lösung
- Methanol
- Essigsäure
- Giemsa-Lösung
- PBS

**Durchführung:**

- Ansetzen von zwei Standardleukozytenkulturen pro Person. Eine Kultur besteht aus:
  - 4 mL Medium
  - 0,5 mL FCS
  - 0,05 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung
  - 0,12 mL Phytohämagglutinin
  - 0,4 mL venösem Blut
- Alle Bestandteile mit Ausnahme des Blutes können für die gesamte Gruppe angesetzt werden. Jeder Azubi entnimmt sich anschließend das entsprechende Volumen für zwei Kulturen in zwei Röhrchen und gibt das eigene Blut hinzu. Dieser erste Schritt sollte am ersten Kurstag um ca. 13.00 Uhr abgeschlossen sein
- Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zum Vormittag des vierten Kurstages
- Um ca. 9.30 Uhr des vierten Kurstages wird Colcemid bis zu einer Endkonzentration von 0,08 µg/mL (Stammlösung 10µg/mL) mittels einer Einwegspritze, mit der man den Deckel des Kulturgefäßes durchsticht, zugegeben
- Nochmalige Inkubation der Kulturen für weitere 3,5h bei 37°C
- Kulturen gut aufschütteln
- Kulturen für 10 Minuten zentrifugieren (g=150)
- Überstand vorsichtig absaugen und verwerfen
- Hypotoner Schock: Zellen vorsichtig in 3 mL vorgewärmter KCl-Lösung resuspendieren und anschließend für 10 – 15 Minuten bei 37°C inkubieren
- Zentrifugieren wie oben, Überstand absaugen und verwerfen
- Fixierung: Zellen in 3 mL frisch hergestelltem und vorgekühltem Methanol-Essigsäure-Gemisch (1 + 3) resuspendieren.  
Achtung! Beim ersten Fixierungsvorgang Fixativ tropfenweise unter ständigem Schütteln der Kultur hinzugeben
- Zentrifugieren wie oben, Überstand absaugen und verwerfen
- Zellsediment erneut in Fixativ resuspendieren
- Zentrifugieren wie oben, Überstand absaugen und verwerfen
- Zugabe von Fixativ und Zentrifugation so oft wiederholen bis der Überstand klar ist
- Zentrifugieren wie oben, Überstand absaugen und verwerfen
- Zellen in 0,3 mL Fixativ resuspendieren
- Zellsediment aus einem Röhrchen mittels einer Pasteurpipette auf zwei saubere, eisgekühlte Objektträger aufbringen, anschließend diese mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme ziehen, bis die Präparate getrocknet sind
- Giemsa-Färbung: Die Präparate werden für 5 – 10 Minuten in Giemsa-Lösung (5g/100mL) (Lösungsmittel: Leitungswasser/PBS 4 + 1) gefärbt und anschließend zweimal kurz mit Leitungswasser gespült. Nach dem Trocknen können sie mikroskopiert werden