

SACRIFICIO CELULAR.

Sacrificio. Paso 1.

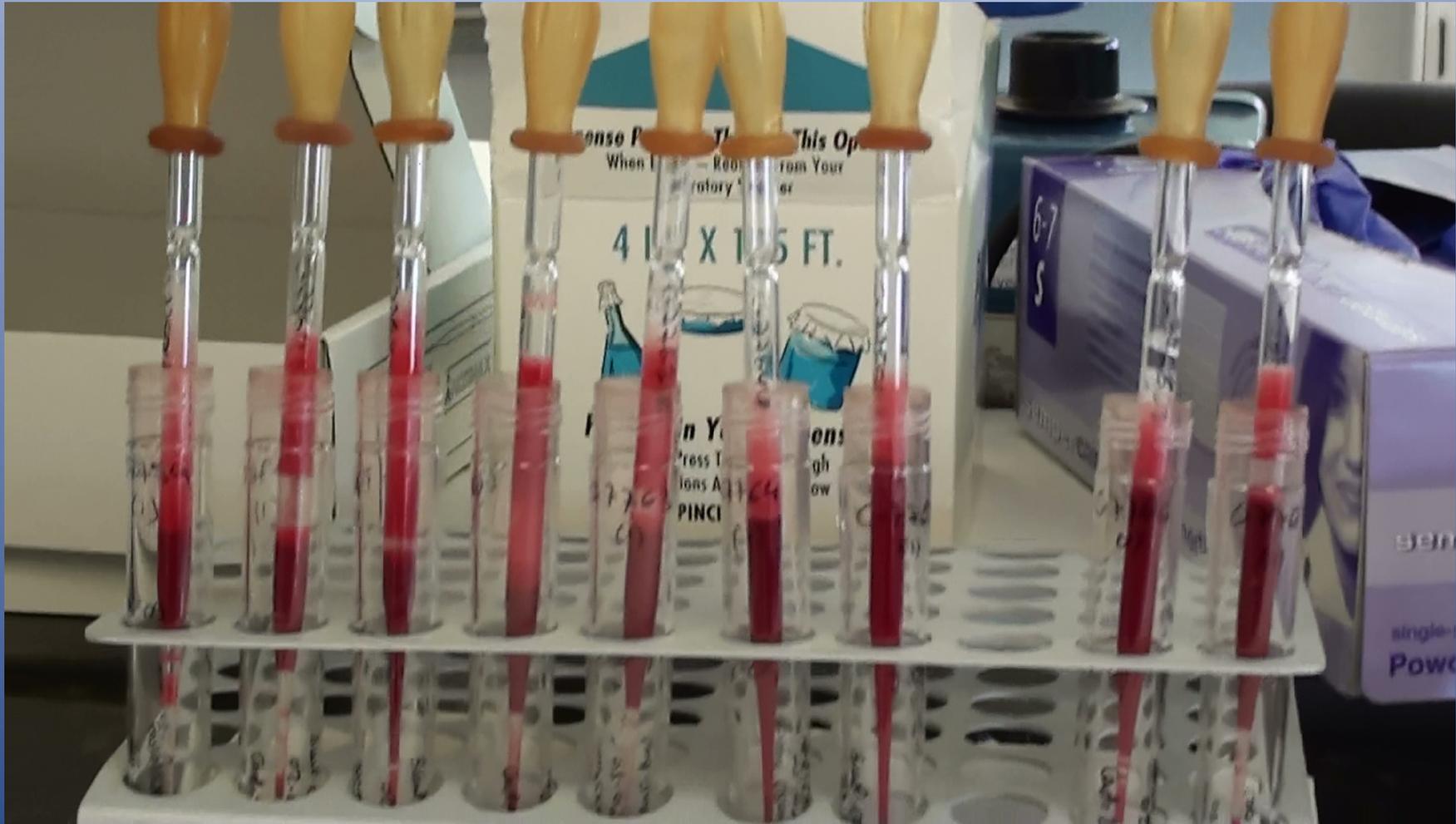
- Transfiere el cultivo a un tubo de centrífuga y centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.



- Tras la centrifugación, utilizando una pipeta Pasteur, decanta el sobrenadante dejando aproximadamente un dedo del mismo en el tubo.

- Resuspende el sedimento (botón) con la pipeta Pasteur en el sobrenadante, mezclándolo bien.





- Al finalizar la resuspensión deja el contenido del tubo en el interior de la pipeta.

Sacrificio. Paso 2.

- Añade 5 ml de choque hipotónico (cloruro de potasio 0,075M) y mézclalos bien con la pipeta Pasteur.



Sacrificio. Paso 3.

- Incuba los tubos cerrados en la estufa a 37 °C durante 8 minutos.



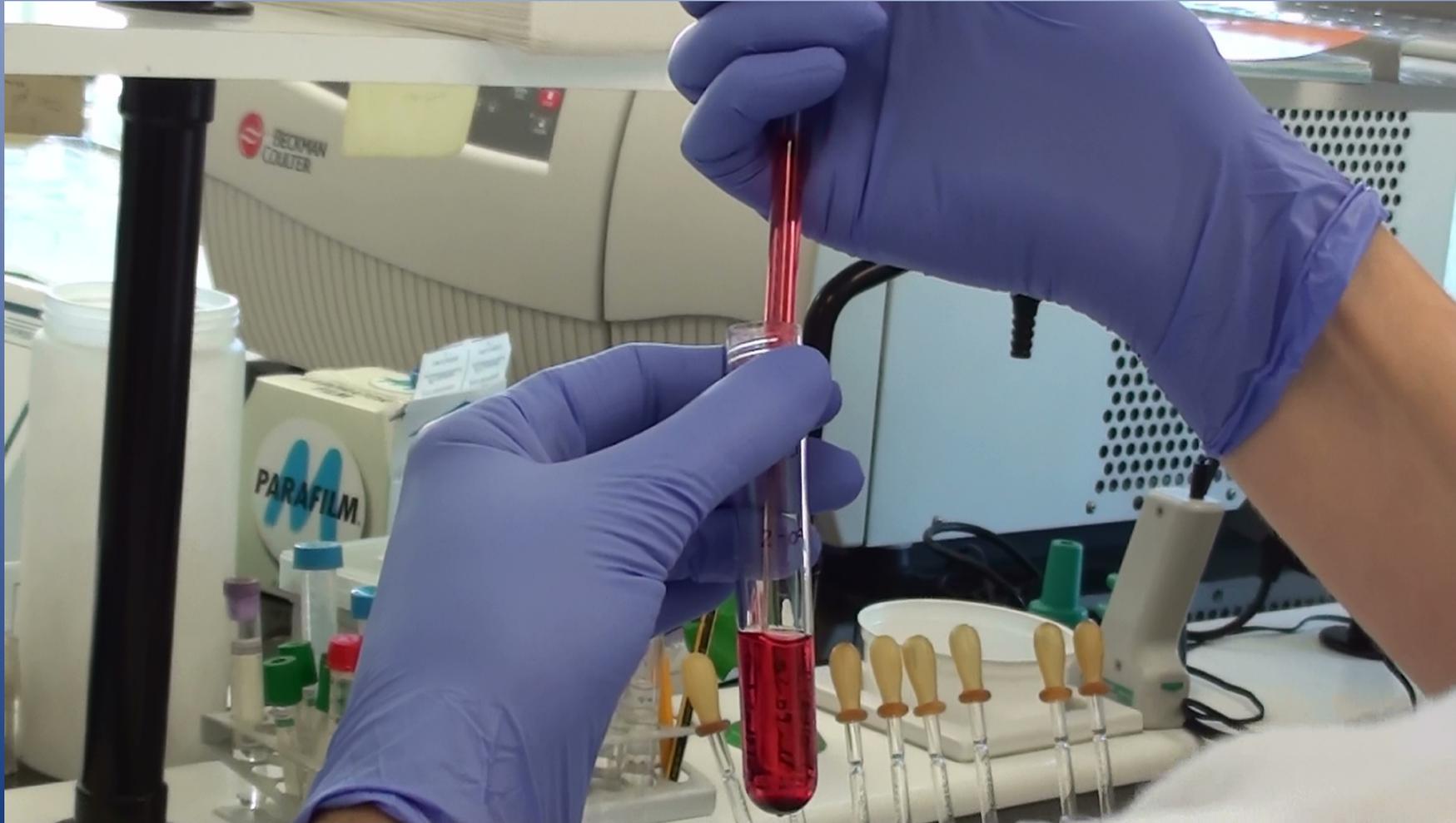
Sacrificio. Paso 4.

- Pasado el tiempo de incubación, centrifuga los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos.

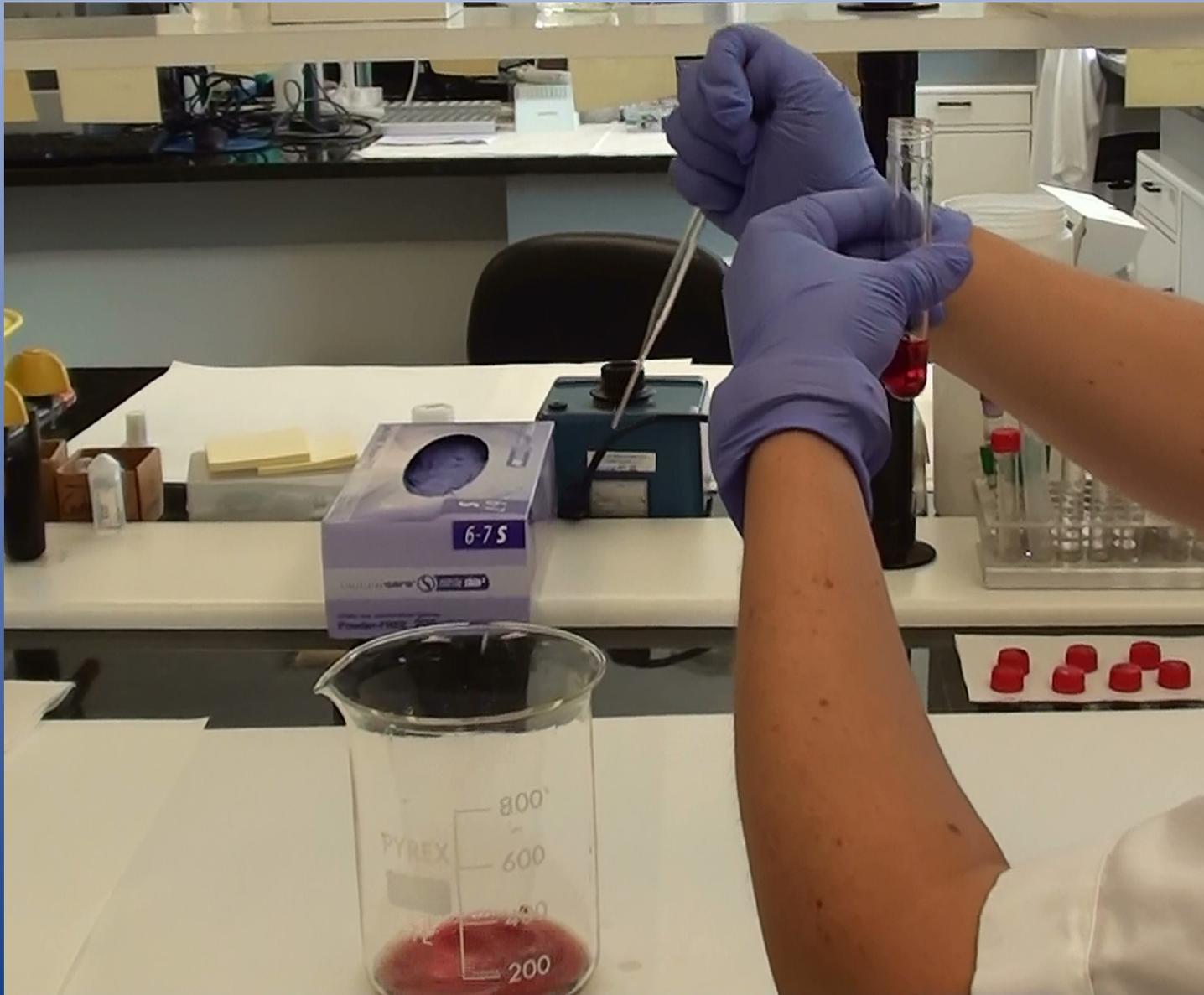


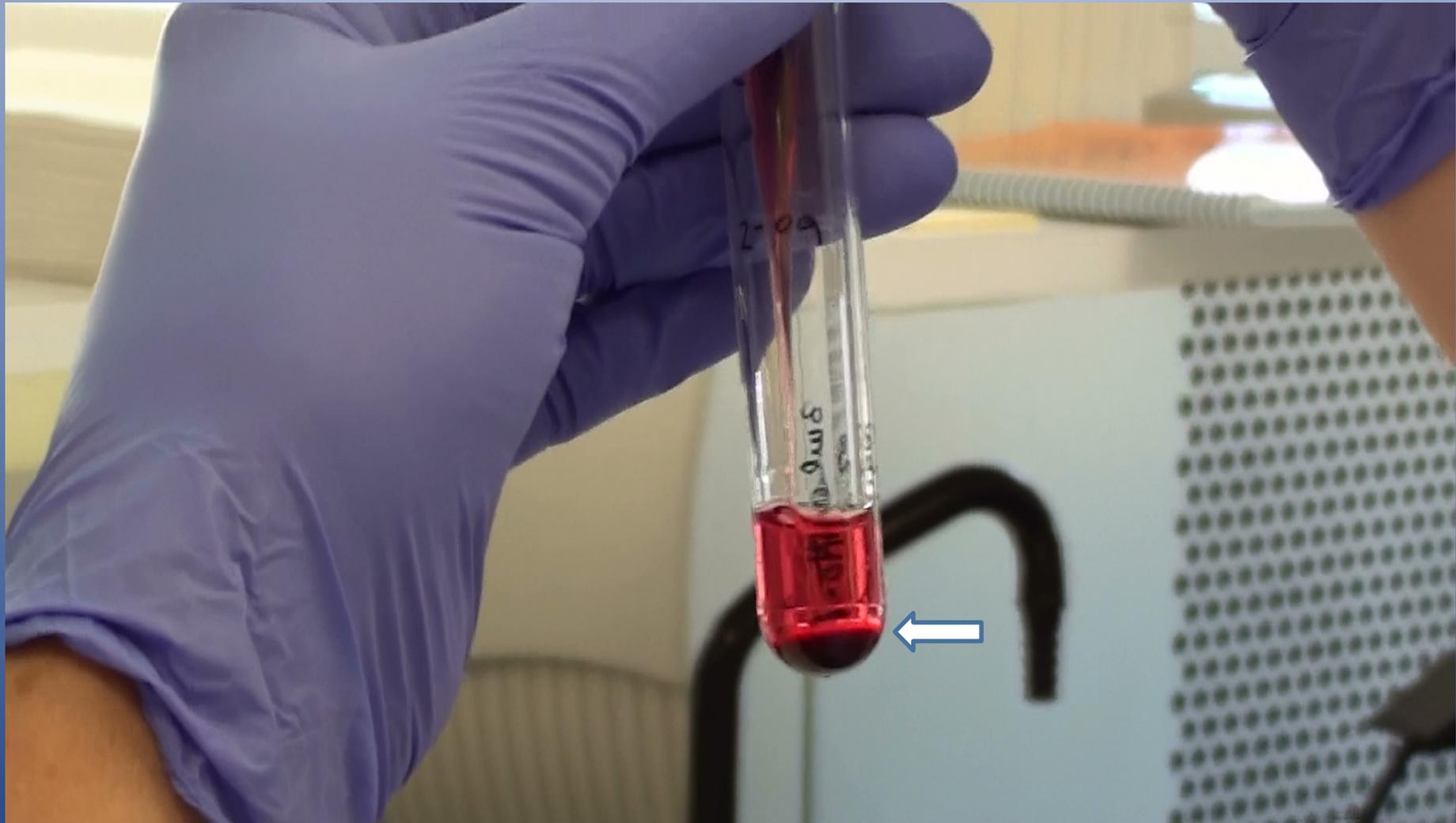
Sacrificio. Paso 5.

➤ Tras la centrifugación retira el sobrenadante de los tubos con cuidado de no distorsionar el botón. Si esto ocurre será necesario volver a centrifugar la muestra.



- Descarta el sobrenadante con cuidado en un contenedor apropiado.





Observa la capa de leucocitos situada por encima de los eritrocitos, esas son las células en las que vamos a realizar el estudio.



➤ Como en el primer paso, deja un poco de sobrenadante para poder resuspender el botón.

Ya tienes las muestras preparadas para la fijación.



Sacrificio. Paso 6.

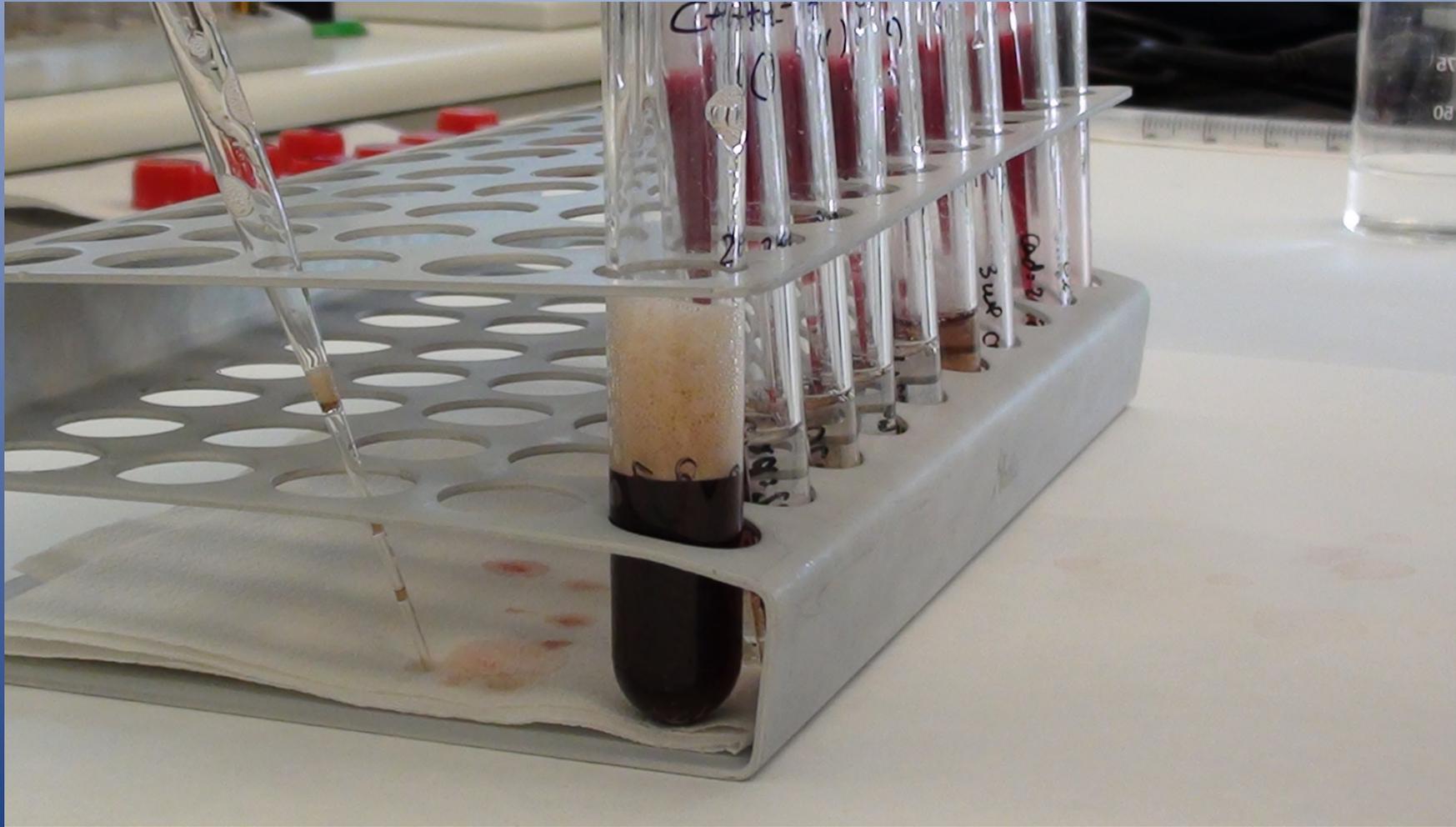
- Añade a los tubos 3 ml de **fijador I**, compuesto por metanol al 3% y un 5% de ácido acético en agua destilada.



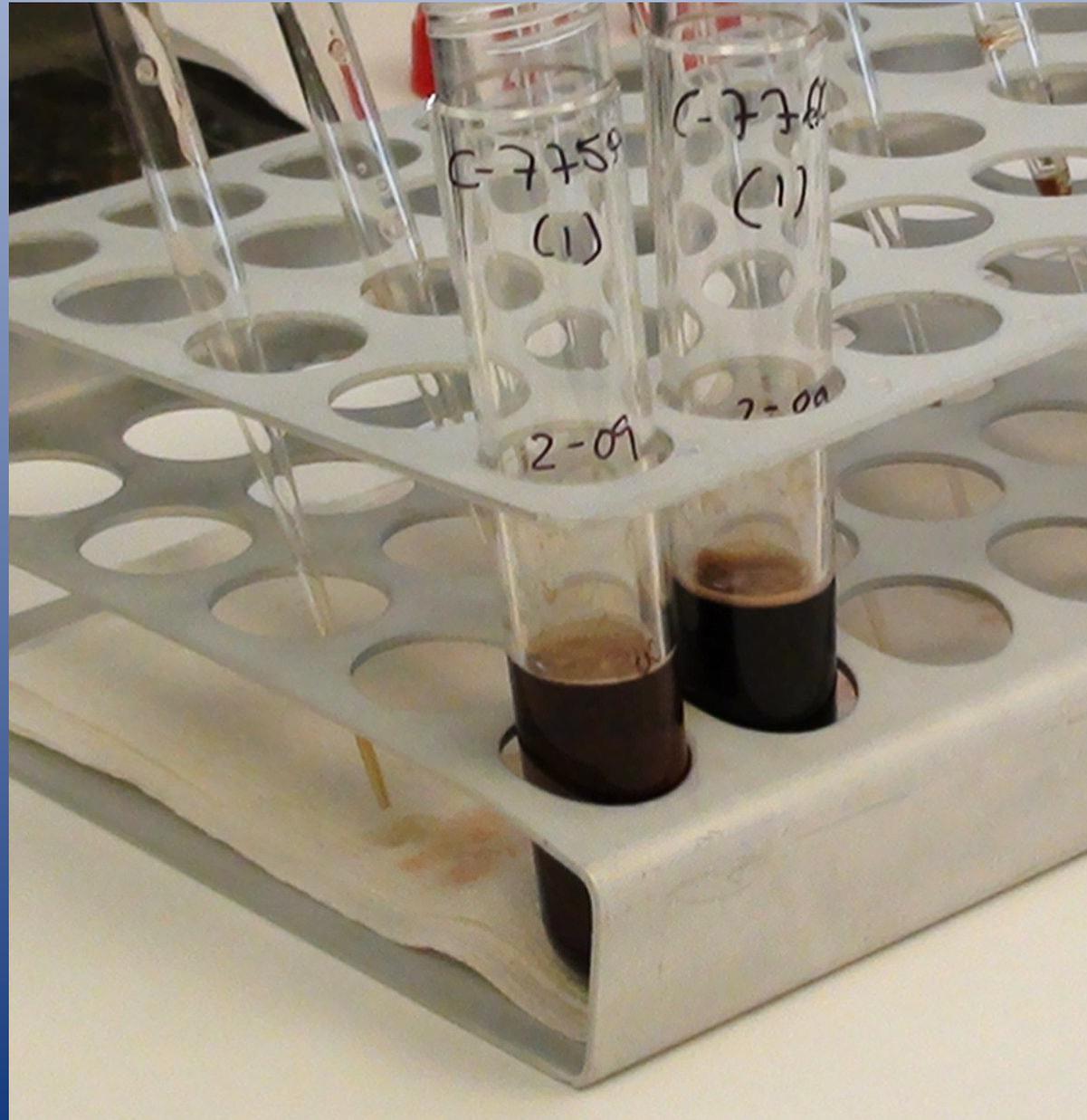
➤ Con una pipeta coloca el fijador en el tubo de esta manera.



➤ Mezcla las células con el fijador utilizando la pipeta de forma firme y constante hasta que el color del líquido sea oscuro. En el procedimiento se formará espuma.



➤ Este es el aspecto que muestran los tubos tras el primer paso de fijación.



Sacrificio. Paso 7.

- Centrifuga los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos.



- Tras la centrifugación retira de nuevo el sobrenadante, resuspende el botón y déjalo en el interior de la pipeta.



Sacrificio. Paso 8.

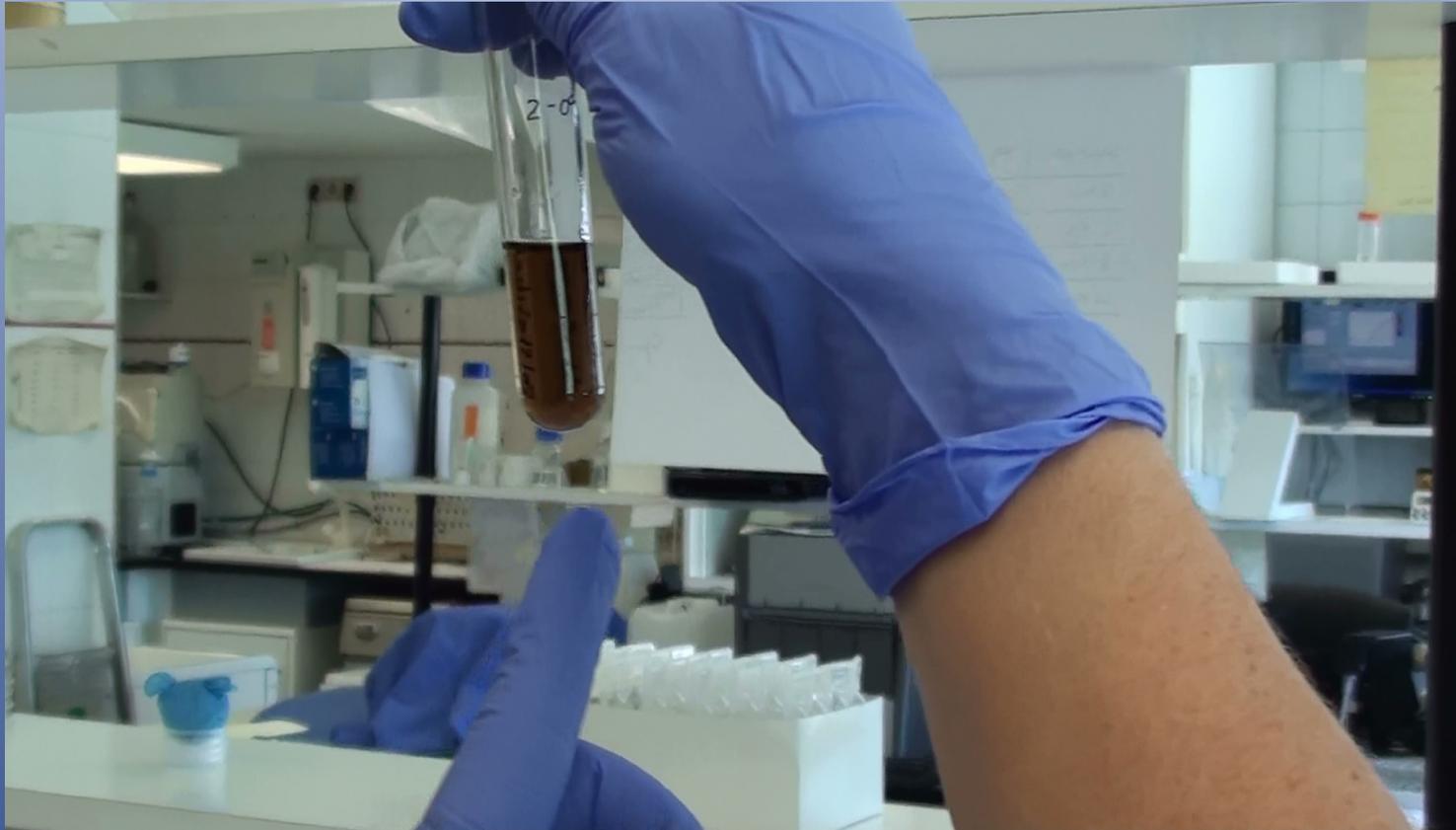
➤ Añade 3 ml de **fijador II**: Metanol.



➤ Resuspende con la pipeta de forma firme y constante hasta que el color oscuro de la suspensión se torne más claro.

Sacrificio. Paso 9.

➤ Centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

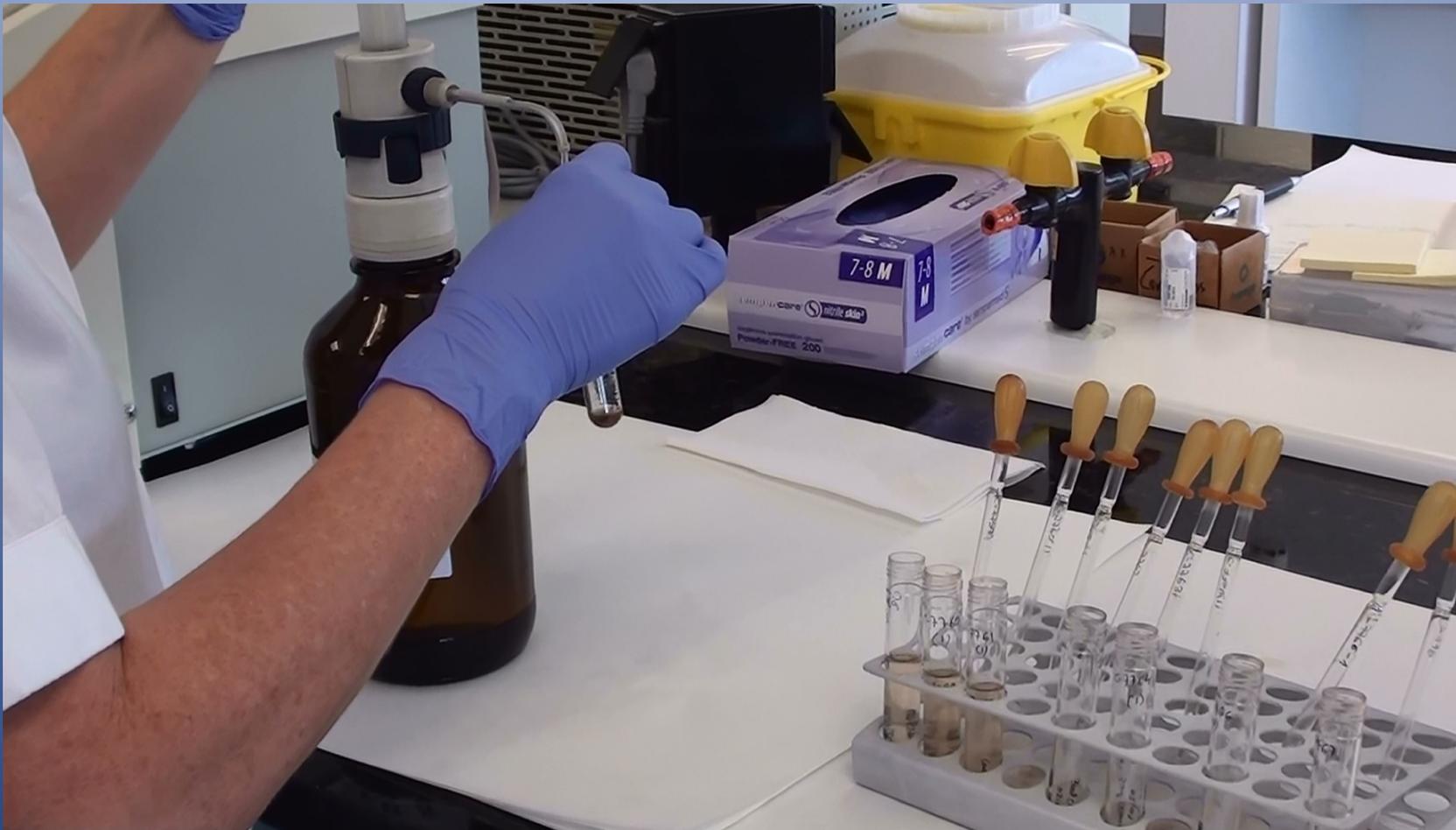


Después de centrifugar el color del sobrenadante es más claro. En el fondo del tubo se puede apreciar el botón de blancos.

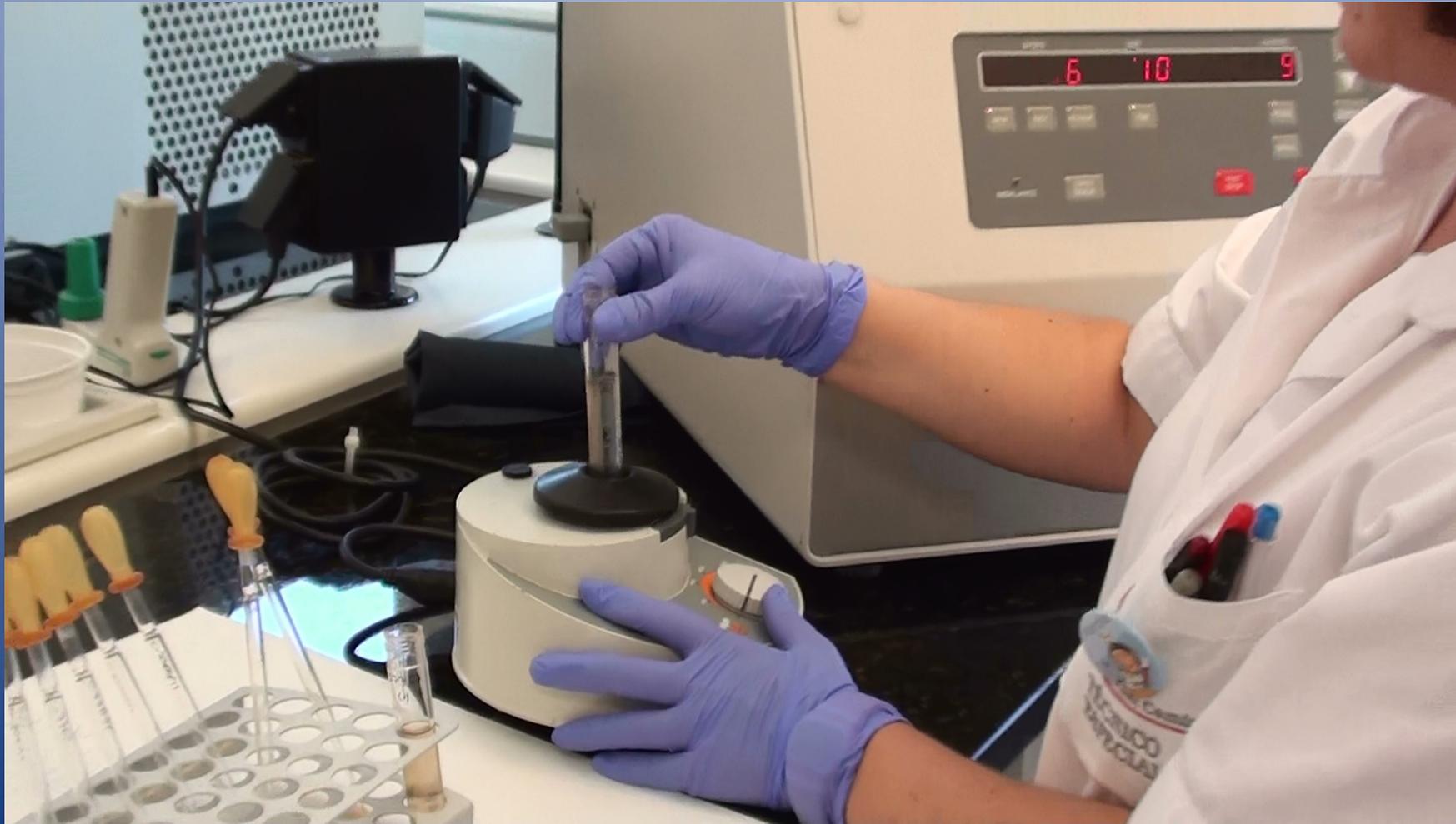
➤ Decanta el sobrenadante dejando 1 ml, resuspende el botón y vuelve a colocar la mezcla de células y fijador en el interior de la pipeta.

Sacrificio. Paso 10.

- Añade el tercer pase de fijado, 6 ml de **Fijador III (Carnoy)** que consta de Metanol : Acético (3 : 1).



- Mezcla bien las células con el fijador utilizando la pipeta. Coloca el tubo en el vórtex a una velocidad media. Cuando se haya mezclado bien coloca los tubos en la centrífuga.



Sacrificio. Paso 11.



- Tras la centrifugación retira el sobrenadante.
- Resuspende el precipitado.
- **Vuelve a añadir fijador**
- Agita la suspensión en el vórtex.

- Deja este último pase de fijador hasta el día siguiente, en el frigorífico a 4 °C.