



## CHROMOSOME KIT M et MEDIUM M

### Milieu complet pour la culture des cellules de la moelle osseuse

Références : EKAMTB-100M – 100ml

EKAMT – 200M – 20 x 5ml

EKAMT – 500M – 50 x 5ml

**Composition :** Chromosome Kit M et Medium M est un milieu complet prêt à l'emploi contenant :

RPMI 1640

20% SVF

L-glutamine,

Tampon HEPES

Aucun supplément est nécessaire.

CKey-Mix (Haematopoietic Growth supplement)

Héparine

Gentamicine

**Présentation et Conservation :** Milieu complet, stérile, présenté dans des bouteilles de 100ml ou tubes prêts à l'emploi de 5ml. Le milieu est expédié à +4°C et doit être stocké à -20°C. Il se conserve 2 semaines à +4°C. Ne pas décongeler et congeler plus de 2 fois.

### Protocole pour la culture des cellules de la moelle osseuse :

Concentration nécessaire pour la culture de cellules :  $1 \times 10^6$  cell/ml de culture

1. Décongeler le milieu **Chromosome Kit M ou Medium M** à température ambiante ou à 37°C.
2. Ajouter stérilement jusqu'à 1ml de moelle par tube (le volume peut varier selon la concentration des cellules dans la moelle)
3. Fermer le tube
4. Bien mélanger, puis mettre dans l'étuve horizontalement à 37°C, sur une surface plane (il n'est pas nécessaire de mettre en atmosphère CO<sub>2</sub>, la composition du milieu donne les conditions optimales à la prolifération cellulaire en système fermé).
5. Incuber pendant 12, 24 ou 48 heures.
6. Après incubation, ajouter 4 à 5 gouttes de Colcemid (0,05µg/ml de concentration final) et incuber

#### Préparation chromosomique

7. Après l'incubation, centrifuger 3-4 minutes à 2000 rpm. (enlever le bouchon).
8. Enlever le surnageant (laisser environ 0,5ml de culot)

#### Choc hypotonique :

9. Verser 5ml de solution hypotonique (KCl 0,075M)

La solution doit être distribuée énergiquement vers le fond du tube afin d'obtenir une suspension homogène.

11. Incuber 5 minutes à température ambiante.
12. Arrêt du choc par centrifugation à 2000 rpm pendant 3-4 minutes.
13. Enlever le surnageant comme l'étape n°8 et homogénéiser le surnageant restant dans le tube.

Fixation :

13. Remettre les cellules en suspension dans le liquide du choc
14. Rajouter 2,5ml de fixateur (3 :1 méthanol - acide acétique glacial)
15. Centrifuger à +4°C 10min à 1500t/min
16. Retirer le surnageant et remettre en suspension dans 5ml de fixateur
17. Centrifuger immédiatement 10min à 1500t/min à +4°C
18. Recommencer les fixations jusqu'à ce que le culot cellulaire soit propre (3 fixations minimum à +4°C)

-Etallement-

sur lames sèches (dégraissées à l'alcool) qui sont ensuite posées sur buvard humide

19. Laisser sécher une nuit à température ambiante
20. Dénaturer le lendemain
21. Conserver le culot au congélateur

Produit par :

**EUROCLONE spa**

Via Lombardia, 12 - 27010 Siziano – Italy

Tel : +39 02 38195378 – Fax : +39 02 38195248

e-mail : [info@euroclone.net](mailto:info@euroclone.net)

Distribué par :

**AMPLITECH SARL**