

Chromosome *synchro P*

Protocollo di utilizzo
Protocole d'utilisation
Benutzungsprotokoll
Protocol of use
Protocolo de utilización
Protocolo de utilização
Πρωτόκολλο χρήσης

- PER COLTURADI CELLULE
- POUR LA CULTURE DES CELLULES
- FÜR ZELLKULTUREN
- FOR CELL CULTURE
- PARA CULTIVO DE CÉLULAS
- PARA CULTURA DE CÉLULAS
- ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Kit per coltura e sincronizzazione di cellule da sangue periferico.

Materiale fornito

EK AMTSY 20 (20 test)

- Chromosome Synchro P, 20 tubi da coltura
- 2 vial di kit di sincronizzazione - solution A
- 2 vial di kit di sincronizzazione - solution B

EK AMTSY 50 (50 test)

- Chromosome Synchro P, 50 tubi da coltura
- 4 vial di kit di sincronizzazione - solution A
- 4 vial di kit di sincronizzazione - solution B

EK AMTBSY 100.2 (circa 40 test)

- Chromosome Synchro P, 2 bottiglie da 100 ml
- 4 vial di kit di sincronizzazione - solution A
- 4 vial di kit di sincronizzazione - solution B

EK AMTBSY 100.5 (circa 100 test)

- Chromosome Synchro P, 5 bottiglie da 100 ml
- 8 vial di kit di sincronizzazione - solution A
- 8 vial di kit di sincronizzazione - solution B

EK AMTBSY 500 (circa 100 test)

- Chromosome Synchro P, 1 bottiglia da 500 ml
- 8 vial di kit di sincronizzazione - solution A
- 8 vial di kit di sincronizzazione - solution B

Italiano

Conservazione e stabilità

Chromosome Synchro P viene trasportato a +4°C. Una volta ricevuto il prodotto deve essere conservato a -20 ± 2°C. La shelf life del prodotto è di 12 mesi.

Il medium, una volta scongelato, deve essere conservato tra i +2°C e +8°C per un massimo di 30 giorni. In kit di sincronizzazione può essere scongelato e ricongelato senza alterarne la funzionalità.

Protocollo di utilizzo

Allestimento coltura

1. Scongellare Chromosome Synchro P a temperatura ambiente o a +37 ± 2°C.
2. In sterilità aggiungere fino a 0,5 ml di sangue ad un tubo da coltura o porre 5 ml di medium in una fiasca T-25 e aggiungere il campione.
3. Chiudere il tappo del tubo da coltura o della fiasca.
4. Risospendere adeguatamente la sospensione e incubare a +37 ± 2°C ponendo il tubo orizzontalmente (sulla porzione piatta). Aggiunta di CO₂ non è necessaria.

Sincronizzazione coltura

1. Dopo 48 - 72 ore di coltura, aggiungere 0.1 ml di solution A e incubare overnight.
2. Dopo l'incubazione, aggiungere 0.1 ml di solution B e incubare per 5 ore (non è necessario lavare le cellule).
3. Aggiungere 20 µl di Colcemid (10 µg/ml) ed incubare a 37 ± 2°C per 1 ora circa. L'incubazione può essere ridotta a 15 minuti per ottenere un alto numero di prometafasi.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino

1. Dopo l'incubazione, se necessario trasferire la sospensione in un tubo da 15 ml e centrifugare 3 - 4 minuti a 2.000 rpm (alta velocità di centrifugazione non danneggia le cellule).
2. Rimuovere il surnatante, ponendo attenzione a non perdere parte del pellet cellulare (si raccomanda di conservare circa 0.5 ml di sospensione nel tubo).
3. Risospendere vigorosamente il pellet.
4. Aggiungere 5 ml di soluzione ipotonica (H₂O distillata, 0,56% KCl) e risospendere adeguatamente.
5. Incubare per almeno 7 minuti a temperature ambiente.
6. Centrifugare per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
7. Rimuovere il surnatante come nel punto 2.
8. Risospendere vigorosamente il pellet.
9. Aggiungere 5 ml di soluzione di Ibraimov (H₂O distillata, 5% acido acetico) e risospendere adeguatamente.
10. Centrifugare immediatamente per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
11. Rimuovere il surnatante come nel punto 2.
12. Risospendere vigorosamente il pellet.
13. Aggiungere 5 ml di soluzione fissativa (metanolo:acido acetico, 3:1) e risospendere adeguatamente.
14. Ripetere step 10-13.
15. Centrifugare immediatamente per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
16. Con attenzione rimuovere la maggior parte del surnatante.
17. Risospendere il pellet in qualche goccia di soluzione fissativa fresca, per ottenere un'adeguata concentrazione cellulare.
18. Gocciolare una piccola aliquota di sospensione cellulare su di un vetrino pulito e bagnato.
19. Procedure all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa mediante l'impiego di Optichrome (cod. EKAMH950).

Kit pour la culture et la synchronisation de cellules de sang périphérique.

Matériel fourni

- EK AMTSY 20 (20 tests)**
- Chromosome Synchro P, 20 tubes de culture
 - 2 vial de kit de synchronisation - solution A
 - 2 vial de kit de synchronisation - solution B
- EK AMTSY 50 (50 tests)**
- Chromosome Synchro P, 50 tubes de culture
 - 4 vial de kit de synchronisation - solution A
 - 4 vial de kit de synchronisation - solution B
- EK AMTBSY 100.2 (environ 40 tests)**
- Chromosome Synchro P, 2 bouteilles de 100 ml
 - 4 vial de kit de synchronisation - solution A
 - 4 vial de kit de synchronisation - solution B
- EK AMTBSY 100.5 (environ 100 tests)**
- Chromosome Synchro P, 5 bouteilles de 100 ml
 - 8 vial de kit de synchronisation - solution A
 - 8 vial de kit de synchronisation - solution B
- EK AMTBSY 500 (environ 100 tests)**
- Chromosome Synchro P, 1 bouteille de 500 ml
 - 8 vial de kit de synchronisation - solution A
 - 8 vial de kit de synchronisation - solution B

Français

Conservation et stabilité

Chromosome Synchro P est transporté à +4°C. Une fois le produit reçu, il doit être conservé à -20 ± 2°C. La shelf life du produit est de 12 mois.

Le medium, une fois décongelé, doit être conservé entre +2°C et +8°C pendant 30 jours maximum. Le kit de synchronisation peut être décongelé et recongelé sans en altérer la fonctionnalité.

Protocole d'utilisation

Aménagement culture

1. Décongeler le Chromosome Synchro P à une température ambiante o à +37 ± 2°C.
2. En stérilité, ajouter jusqu'à 0,5 ml de sang dans un tube de culture ou mettre 5 ml de medium dans une fiole T-25 et ajouter l'échantillon.
3. Fermer le bouchon du tube de culture ou de la fiole.
4. Resuspendre de façon adéquate la suspension et incuber à +37 ± 2°C en mettant le tube horizontalement (sur la portion plate). L'ajout de CO₂ n'est pas nécessaire.

Synchronisation culture

1. Après 48 - 72 heures de culture, ajouter 0.1 ml de solution A et incuber overnight.
2. Après l'incubation, ajouter 0.1 ml de solution B et incuber pendant 5 heures (il n'est pas nécessaire de laver les cellules).
3. Ajouter 20 µl de Colcemid (10 µg/ml) et incuber à 37 ± 2°C pendant environ 1 heure. L'incubation peut être réduite à 15 minutes pour obtenir un nombre élevé de prométaphases.

Fixation des chromosomes et préparation de la lame

1. Après l'incubation, si nécessaire, transférer la suspension dans un tube de 15 ml et centrifuger 3 - 4 minutes à 2.000 rpm (une haute vitesse de centrifugation n'endommage pas les cellules).
2. Enlever le surnageant, en faisant attention de ne pas perdre une partie du pellet cellulaire (il est conseillé de conserver environ 0.5 ml de suspension dans le tube).
3. Resuspendre vigoureusement le pellet.
4. Ajouter 5 ml de solution hypotonique (H₂O distillée, 0,56% KCl) et resuspendre de façon adéquate.
5. Incuber pendant au moins 7 minutes à température ambiante.
6. Centrifuger pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
7. Le surnageant comme au point 2.
8. Resuspendre vigoureusement le pellet.
9. Ajouter 5 ml de solution d'ibrainov (H₂O distillée, 5% acide acétique) et resuspendre de façon adéquate.
10. Centrifuger immédiatement pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
11. Enlever le surnageant comme au point 2.
12. Resuspendre vigoureusement le pellet.
13. Ajouter 5 ml de solution fixative (méthanol : acide acétique, 3:1) et resuspendre de façon adéquate.
14. Répéter les steps 10-13.
15. Centrifuger immédiatement pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
16. Enlever soigneusement la plupart du surnageant.
17. Resuspendre le pellet dans quelques gouttes de solution fixative fraîche, pour obtenir une concentration cellulaire adéquate.
18. Laisser couler une petite quantité de suspension cellulaire sur une lame propre et mouillée.
19. Effectuer le séchage dans des conditions adéquates et constantes de température et d'humidité relative en utilisant Optichrome (cod. EKAMH950).

Ausrüstung für die Kultivierung und Synchronisierung von Zellen aus peripherem Blut.

Mitgeliefertes Material

EK AMTSY 20 (20 Tests)

- Chromosome Synchro P, 20 Kultivierungsröhrchen
- 2 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung A
- 2 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung B

EK AMTSY 50 (50 Tests)

- Chromosome Synchro P, 50 Kultivierungsröhrchen
- 4 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung A
- 4 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung B

EK AMTBSY 100 (zirka 40 Tests)

- Chromosome Synchro P, 2 Flaschen mit 100 ml
- 4 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung A
- 4 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung B

EK AMTBSY 500 (zirka 100 Tests)

- Chromosome Synchro P, 1 Flasche mit 500 ml
- 8 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung A
- 8 Fläschchen mit der Synchronisierungsausrüstung Lösung B

Deutsche

Konservierung und Stabilität

Chromosome Synchro P wird bei +4°C befördert. Nach dem Erhalt muss das Produkt bei $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ konserviert werden. Die Lagerfähigkeit des Produktes beträgt 12 Monate.

Das Medium muss nach dem Abtauen bei +2°C und +8°C für eine Höchstdauer von 30 Tagen konserviert werden. Die Synchronisierungsausrüstung kann abgetaut und erneut eingefroren werden, ohne seine Wirkung zu verlieren.

Benutzungsprotokoll

Zubereitung einer Kultur

1. Chromosome Synchro P bei Raumtemperatur oder bei $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ auftauen.
2. In steriler Umgebung bis zu 0,5 ml Blut zu einem Kultivierungsröhrchen hinzufügen oder 5 ml des Mediums in eine Flasche T-25 und eine Probe hinzufügen.
3. Den Pfropfen des Kultivierungsröhrchens oder der Flasche verschließen.
4. Die Suspension erneut angemessen suspendieren und bei $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ bebrüten, wobei sich das Röhrchen horizontal (zum flachen Abschnitt) befindet. Eine Zugabe von CO_2 ist nicht erforderlich.

Synchronisierung einer Kultur

1. Nach 48-72 Stunden der Kultivierung 0,1 ml der Lösung A hinzufügen und über Nacht bebrüten.
2. Nach der Bebrütung 0,1 ml der Lösung B hinzufügen und für 5 Stunden bebrüten (das Waschen der Zellen ist nicht notwendig).
3. 20 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen und bei $37 \pm 2^\circ\text{C}$ für zirka 1 Stunde bebrüten. Die Bebrütung kann auf 15 Minuten verkürzt werden, um eine hohe Anzahl an Prometaphasen zu erhalten.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers

1. Nach der Bebrütung, falls es notwendig ist, die Suspension in ein Röhrchen von 15 ml übertragen und 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM (hohe Geschwindigkeit schädigt die Zellen nicht) schleudern.
2. Den oben schwimmenden Bestandteil entfernen, wobei darauf geachtet werden muss, nicht den Teil des Zellenpellets zu verlieren (es empfiehlt sich, zirka 0,5 ml der Suspension im Röhrchen zu konservieren).
3. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
4. 5 ml hypotonischer Lösung (H_2O destilliert, 0,56% KCl) hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
5. Für mindestens 7 Minuten bei Raumtemperatur bebrüten.
6. Für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
7. Den oben schwimmenden Bestandteil wie in Punkt 2 entfernen.
8. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
9. 5 ml Ibramov-Lösung (H_2O destilliert, 0,5% Essigsäure, 0,3% Methanol) hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
10. Sofort für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
11. Den oben schwimmenden Bestandteil wie in Punkt 2 entfernen.
12. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
13. 5 ml Methanol hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
14. Step 10-13 wiederholen.
15. Sofort für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
16. Vorsichtig den größten Teil des oben schwimmenden Bestandteils entfernen.
17. Das Pellet in einigen Tropfen der frischen Fixierlösung erneut suspendieren, um eine angemessene Zellenkonzentration zu erlangen.
18. Eine kleine Aliquote der Zelllösung auf einen sauberen und befeuchteten Objektträger tropfeln.
19. Die Trocknung zu angemessenen und konstanten Bedingungen hinsichtlich der Temperatur sowie der relativen Feuchtigkeit mittels der Verwendung von Optichrome (Cod. EKAMH950) vornehmen.

Kit for culture and synchronization of peripheral blood cells

Material supplied

EK AMTSY 20 (20 tests)

- Chromosome Synchro P, 20 culture tubes
- 2 vials of synchronization kit - solution A
- 2 vials of synchronization kit - solution B

EK AMTSY 50 (50 tests)

- Chromosome Synchro P, 50 culture tubes
- 4 vials of synchronization kit - solution A
- 4 vials of synchronization kit - solution B

EK AMTBSY 100.2 (nearly 40 tests)

- Chromosome Synchro P, 2 bottles 100 ml
- 4 vials of synchronization kit - solution A
- 4 vials of synchronization kit - solution B

EK AMTBSY 100.5 (nearly 100 tests)

- Chromosome Synchro P, 5 bottles 100 ml
- 8 vials of synchronization kit - solution A
- 8 vials of synchronization kit - solution B

EK AMTBSY 500 (nearly 100 tests)

- Chromosome Synchro P, 1 bottle 500 ml
- 8 vials of synchronization kit - solution A
- 8 vials of synchronization kit - solution B

English

Product stability

Chromosome Synchro P is shipped at 4°C. Once received, the product has to be stored at $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. The product shelf life is 12 months. Once thawed, the medium may be stored between 2°C and 8°C for a maximum of 30 days. Repeated freezing / thawing cycles of synchronization kit will not affect performances.

Protocol of use

Culture preparation

1. Thaw Chromosome Synchro P culture tube or bottle at room temperature or at $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Aseptically add up to 0.5 ml of whole blood to one test tube or dispense 5 ml of bottled medium in a T-Flask and add the sample.
3. Replace the cap of the culture tube.
4. Mix the culture tube (or the T-Flask) contents and incubate at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ placing the tube horizontally (on its flat surface). Addition of CO_2 is not necessary as the medium composition is designed for optimal lymphocyte proliferation in a closed system.

Lymphocyte culture synchronization

1. After 48 - 72 hours of culture, add 0.1 ml of solution A and incubate overnight.
2. After the incubation add 0.1 ml of solution B and incubate for 5 hours (it is not necessary to wash the cells).
3. Add 20 μl of Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and incubate at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ for 60 minutes (approx.). This last incubation time may be reduced to 15 minutes if the aim is obtaining a higher number of prometaphases.

Chromosome fixation and slide preparation

1. After incubation, transfer the culture in a tube, if necessary, and centrifuge for 3 - 4 minutes at 2.000 rpm (higher speeds will not damage the cells).
2. Discard the supernatant, taking care not to lose part of the cell pellet (it is recommended to leave approximately 0.5 ml of material in the tube).
3. Vigorously resuspend the pellet.
4. Add 5 ml of hypotonic solution (distilled H_2O , 0,56% KCl) and mix adequately.
5. Incubate for at least 7 minutes at room temperature.
6. Centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
7. Discard the supernatant according to step 2.
8. Vigorously resuspend the pellet.
9. Add 5 ml of Ibraimov solution (distilled H_2O , 5% acetic acid) and mix adequately.
10. Immediately centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
11. Discard the supernatant according to step 2.
12. Vigorously resuspend the pellet.
13. Add 5 ml of fixative solution (methanol : acetic acid, 3 : 1) and mix adequately.
14. Repeat steps 10-13.
15. Immediately centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
16. Carefully discard almost all the supernatant.
17. Add a few drops of freshly prepared fixative, taking into consideration that the number of drops should be appropriate to the cell concentration in the pellet.
18. Drop a small aliquot of the cell suspension onto a clean and wet microscope slide.
19. Evaporate under constant condition of right temperature and relative humidity into Optichrome (Ref. EKAMH950).

Kit para cultivo y sincronización de células de sangre periférica.

Material suministrado

EK AMTSY 20 (20 test)

- Chromosome Synchro P, tubos de cultivo
- 2 vial de kit de sincronización – solución A
- 2 vial de kit de sincronización – solución B

EK AMTSY 50 (50 test)

- Chromosome Synchro P, 50 tubos de cultivo
- 4 vial de kit de sincronización – solución A
- 4 vial de kit de sincronización – solución B

EK AMTBSY 100.2 (aproximadamente 40 test)

- Chromosome Synchro P, 2 botellas de 100 ml
- 4 vial de kit de sincronización – solución A
- 4 vial de kit de sincronización – solución B

EK AMTBSY 100.5 (aproximadamente 100 test)

- Chromosome Synchro P, 5 botellas de 100 ml
- 8 vial de kit de sincronización – solución A
- 8 vial de kit de sincronización – solución B

EK AMTBSY 500 (aproximadamente 100 test)

- Chromosome Synchro P, 1 botella de 500 ml
- 8 vial de kit de sincronización – solución A
- 8 vial de kit de sincronización – solución B

Español

Conservación y estabilidad

Chromosome Synchro P se transporta a +4°C. Una vez recibido el producto tiene que conservarse a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. La shelf life del producto es de 12 meses.

El medium, una vez descongelado, tiene que conservarse entre +2°C y +8°C durante un máximo de 30 días. En kit de sincronización puede descongelarse y recongelarse sin que se altere la funcionalidad.

Protocolo de utilización

Disposición cultivo

1. Descongelar Chromosome Synchro M a temperatura ambiente o a $+37 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. En esterilidad añadir hasta 0,5 ml de sangre a un tubo de cultivo o poner 5 ml de medium en un matraz T-25 y añadir el muestra.
3. Cerrar la tapa del tubo de cultivo o del matraz.
4. Resuspender adecuadamente la suspensión e incubar a $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ poniendo el tubo horizontalmente (en la porción lisa). No se necesita añadir CO_2 .

Sincronización cultivo

1. Después de 48 - 72 horas de cultivo, añadir 0.1 ml de solución A e incubar toda la noche.
2. Después de la incubación, añadir 0.1 ml de solución B e incubar durante 5 horas (no es necesario lavar las células).
3. Añadir 20 μl de Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 hora aproximadamente. La incubación se puede reducir a 15 minutos para obtener un alto número de prometafases.

Fijación cromosomas y preparación cristal

1. Después de la incubación, si necesario transferir la suspensión en un tubo de 15 ml y centrifugar 3 - 4 minutos a 2.000 rpm (alta velocidad de centrifugación no daña las células).
2. Retirar el surnatante, prestando atención a no perder parte del pellet celular (se recomienda conservar aproximadamente 0.5 ml de suspensión en el tubo).
3. Resuspender enérgicamente el pellet.
4. Añadir 5 ml de solución hipotónica (H_2O destilada, 0,56% KCl) y resuspender adecuadamente.
5. Incubar durante al menos 7 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
7. Retirar el surnatante como en el punto 2.
8. Resuspender enérgicamente el pellet.
9. Añadir 5 ml de solución de Ibramov (H_2O destilada, 5% ácido acético).
10. Centrifugar inmediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
11. Retirar el surnatante como en el punto 2.
12. Resuspender enérgicamente el pellet.
13. Añadir 5 ml de solución de fijación fresca (metanol: ácido acético, 3:1) y resuspender adecuadamente.
14. Repetir puntos 10-13.
15. Centrifugar inmediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
16. Con atención retirar la mayor parte del surnatante.
17. Resuspender el pellet en algunas gotas de solución de fijación fresca, para obtener una concentración celular adecuada.
18. Echar algunas gotas en una pequeña parte de suspensión celular en un cristal limpio y húmedo.
19. Proceder al secado en condiciones adecuadas y constantes de temperatura y humedad relativa empleando Optichrome (cod. EKAMH950).

Kit para cultura e sincronização de células de sangue periférico.

Material fornecido

EK AMTSY 20 (20 testes)

- Chromosome Synchro P, 20 tubos de cultura
- 2 vias de kit de sincronização - solução A
- 2 vias de kit de sincronização - solução B

EK AMTSY 50 (50 testes)

- Chromosome Synchro P, 50 tubos de cultura
- 4 vias de kit de sincronização - solução A
- 4 vias de kit de sincronização - solução B

EK AMTBSY 100.2 (cerca de 40 testes)

- Chromosome Synchro P, 2 embalagens da 100 ml
- 4 vias de kit de sincronização - solução A
- 4 vias de kit de sincronização - solução B

EK AMTBSY 100.5 (cerca de 100 testes)

- Chromosome Synchro P, 5 embalagens da 100 ml
- 8 vias de kit de sincronização - solução A
- 8 vias de kit de sincronização - solução B

EK AMTBSY 500 (cerca de 100 testes)

- Chromosome Synchro P, 1 embalagem da 500 ml
- 8 vias de kit de sincronização - solução A
- 8 vias de kit de sincronização - solução B

Português

Conservação e estabilidade

O Chromosome Synchro P é transportado a +4°C. Uma vez recebido, o produto deve ser conservado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. O período limite de armazenagem do produto é de 12 meses.

O meio, uma vez descongelado, deve ser conservado entre +2°C e +8°C durante um máximo de 30 dias. O kit de sincronização pode ser descongelado e recongelado sem alteração da sua funcionalidade.

Protocolo de utilização

Preparação da cultura

1. Descongelar Chromosome Synchro P à temperatura ambiente ou a $+37 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Em ambiente estéril, acrescentar até 0,5 ml de sangue a um tubo de cultura ou colocar 5 ml de meio de cultura num frasco T-25 e acrescentar a amostra.
3. Fechar a tampa do tubo de cultura ou do frasco.
4. Suspender de novo, de forma adequada, a suspensão e incubar a $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ pondo o tubo na horizontal (sobre a parte plana). Não é necessário acrescentar CO_2 .

Sincronização da cultura

1. Após 48 - 72 horas de cultura, acrescentar 0.1 ml de solução A e incubar durante uma noite.
2. Depois da incubação, acrescentar 0.1 ml de solução B e incubar durante 5 horas (não é necessário lavar as células).
3. Acrescentar 20 µl de Colcemid (10 µg/ml) e incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cerca de 1 hora. A incubação pode ser reduzida para 15 minutos para obter um alto número de prometafasas.

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina

1. Após a incubação, se necessário transferir a suspensão para um tubo de 15 ml e centrifugar 3 - 4 minutos a 2.000 rpm (a alta velocidade de centrifugação não danifica as células).
2. Retirar o sobrenadante, tendo cuidado para não perder parte do pellet celular (é aconselhável conservar cerca de 0.5 ml de suspensão no tubo).
3. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
4. Acrescentar 5 ml de solução hipotónica (H_2O destilada, 0,56% KCl) e suspender de novo, de forma adequada.
5. Incubar durante, pelo menos, 7 minutos à temperatura ambiente.
6. Centrifugar durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
7. Retirar o sobrenadante como no ponto 2.
8. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
9. Acrescentar 5 ml de solução hipotónica (H_2O destilada, 5% ácido acético) e suspender de novo, de forma adequada.
10. Centrifugar imediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
11. Retirar o sobrenadante como no ponto 2.
12. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
13. Acrescentar 5 ml de solução fixadora (metanol: ácido acético, 3:1) e suspender de novo, de forma adequada.
14. Repetir step 10-13.
15. Centrifugar imediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
16. Com cuidado, retirar a maior parte do sobrenadante.
17. Suspender de novo o pellet em algumas gotas de solução fixadora fresca, para obter uma concentração celular adequada.
18. Gotejar uma pequena alíquota de suspensão celular numa lâmina limpa e molhada.
19. Secar em adequadas e constantes condições de temperatura e humidade relativa, utilizando Optichrome (cód. EKAMH950).

Kit για καλλιέργεια και συγχρονισμό ζυτάρων περιφερειακού αίματος.

Παρεχόμενο υλικό

- EK AMTSY 20 (20 test)
- Chromosome Synchro P, 20 σωλήνες καλλιέργειας
- 2 vial του kit συγχρονισμού - solution A
- 2 vial του kit συγχρονισμού - solution B
- EK AMTSY 50 (50 test)
- Chromosome Synchro P, 50 σωλήνες καλλιέργειας
- 4 vial του kit συγχρονισμού - solution A
- 4 vial του kit συγχρονισμού - solution B
- EK AMTBSY 100.2 (περίπου 40 test)
- Chromosome Synchro P, 2 φιάλες των 100 ml
- 4 vial του kit συγχρονισμού - solution A
- 4 vial του kit συγχρονισμού - solution B
- EK AMTBSY 100.5 (περίπου 100 test)
- Chromosome Synchro P, 5 φιάλες των 100 ml
- 8 vial του kit συγχρονισμού - solution A
- 8 vial του kit συγχρονισμού - solution B
- EK AMTBSY 500 (περίπου 100 test)
- Chromosome Synchro P, 1 φιάλη των 500 ml
- 8 vial του kit συγχρονισμού - solution A
- 8 vial του kit συγχρονισμού - solution B

Διατήρηση και σταθερότητα

Το Chromosome Synchro P μεταφέρεται σε +4°C. Μετά τη παραλαβή το προϊόν πρέπει να διατηρηθεί σε $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. Η shelf life του προϊόντος είναι 12 μήνες.

Το medium, αφού ξεπαγώσει και μετά, πρέπει να διατηρηθεί μεταξύ των +2°C και +8°C για 30 ημέρες το μέγιστο. Σε kit συγχρονισμού μπορεί να ξεπαγώσει και ξαναπαγώσει χωρίς να αλλοιωθεί η λειτουργικότητά του.

Προτόκολλο χρήσης

Προετοιμασία καλλιέργειας

1. Ξεπαγώστε το Chromosome Synchro P σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή σε $+37 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Υπό συνθήκες αποστείρωσης προσθέστε έως 0,5 ml αίματος σε ένα σωλήνα καλλιέργειας ή βάλτε 5 ml του medium σε μία φιάσκα T-25 και προσθέστε το δείγμα.
3. Κλείστε το πόμα του σωλήνα καλλιέργειας ή της φιάσκας.
4. Ανακινήστε κατάλληλα το εναώρημα και υποβάλλετε το ίδιο σε επώαση στους $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ τοποθετώντας τον σωλήνα οριζόντια (επάνω στο πλατύ τμήμα). Η προσθήκη του CO_2 δεν είναι απαραίτητη.

Συγχρονισμός καλλιέργειας

1. Μετά από 48 - 72 ώρες καλλιέργειας, προσθέστε 0.1 ml του solution A και υποβάλλετε σε επώαση overnight.
2. Μετά την επώαση, προσθέστε 0.1 ml του solution B και υποβάλλετε σε επώαση για 5 ώρες (δεν είναι απαραίτητο να πλύνετε τα κύτταρα).
3. Προσθέστε 20 μl του Colcemid (10 μg/ml) και υποβάλλετε σε επώαση στους $37 \pm 2^\circ\text{C}$ για 1 ώρα περίπου. Η επώαση μπορεί να μειωθεί στα 15 λεπτά για να αποκτήσετε ένα υψηλό αριθμό προμετάφασης.

Σταθεροποίηση χρομοσωμάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου

1. Μετά την επώαση, είναι απαραίτητο να μεταβιβάσετε το εναώρημα σε ένα σωλήνα των 15 ml και να το υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm (η υψηλή ταχύτητα φυγοκέντρησης δεν καταστρέφει τα κύτταρα).
2. Αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα, προσέχοντας ώστε να μην χαθεί μέρος του κυτταρικού pellet (συνιστάται να διατηρήσετε περίπου 0.5 ml εναωρήματος στον σωλήνα).
3. Αναδεύστε ζωηρά το pellet.
4. Προσθέστε 5 ml υποτονικού διαλύματος (H_2O αποσταγμένο, 0,56% KCl) και αναδεύστε κατάλληλα.
5. Υποβάλλετε σε επώαση για τουλάχιστον 7 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
7. Αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα όπως στο σημείο 2.
8. Αναδεύστε ζωηρά το pellet.
9. Προσθέστε 5 ml διαλύματος του Ibraimon (H_2O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ) και αναδεύστε κατάλληλα.
10. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση αμέσως για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
11. Αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα όπως στο σημείο 2.
12. Αναδεύστε ζωηρά το pellet.
13. Προσθέστε 5 ml φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος (μεθανόλη: οξικό οξύ, 3:1) και αναδεύστε κατάλληλα.
14. Επαναλάβετε σημείο 10-13.
15. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση αμέσως για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
16. Αφαιρέστε προσεκτικά το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου διαλύματος.
17. Αναδεύστε το pellet σε μερικές σταγόνες φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος, για να αποκτήσετε μια κατάλληλη κυτταρική συμπίκνωση.
18. Στάξετε ένα μικρό μέρος κυτταρικού εναωρήματος επάνω σε ένα καθαρό και βρεγμένο γυάλινο πλακίδιο.
19. Προχωρήστε στο στέγνωμα με κατάλληλες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας με τη χρήση του Optichrome (cod. EKAMH950).

Chromosome synchro P



EuroClone S.p.A.

Via Figino 20/22

20016 Pero (MI) - Italy

Phone +39.02.38195.1

Fax +39.02.38195248

e-mail: info@euroclone.it

www.euroclone.it

EuroClone
serving science through innovation

PRINTED IN ITALY - ed1/01/09/47_Chromosome Synchro P

EuroClone S.p.A. has a Quality System certified in compliance
with UNI EN ISO 9001:2000 and UNI EN ISO 13485:2003