

RECOMENDACIONES PARA EL CULTIVO DE MEDULA UTILIZANDO CHROMOSOME M MEDIUM:¹

Chromosome M Medium es un producto Ready to Use por lo que no deberá ser suplementado con ningún reactivo adicional.

CULTIVO CON CHROMOSOME M MEDIUM

Para el cultivo de linfocitos en medula ósea es recomendable utilizar tubos T (de base truncada para conseguir la inclinación del cultivo y favorecer los resultados) Si no disponeis de tubo T basta con utilizar tubos de ensayo cilíndricos y una gradilla inclinada 45°.

1. En condiciones de esterilidad añadir 1 ml de sangre al tubo, apretar la tapa y mezclar (El volumen de muestra a utilizar dependerá de la concentración de células presente)

Nota: La concentración óptima de células nucleadas es de 1×10^6 células/mL de cultivo.

2. Añadir 6 mL de Chromosome M medium.

2. Incubar horizontalmente a 37 °C durante 48-72 horas en incubador de CO₂

3. Añadir 1-2 gotas de Colcemid a una concentración final de 0.05µg/mL e incubar (el tiempo de incubación debe decidirse de manera empírica)

4. Centrifugar a 2000 rpm de 3-4 minutos.

5. Eliminar el sobrenadante, dejar alrededor de 0.5 ml con el pellet

6. Resuspender vigorosamente

7. Añadir 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M* - Esperar 5 minutos a temperatura ambiente.

8. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante (dejar 0.5 mL aprox) y resuspender

9. Añadir 5 ml de Solución Ibraimov modificada *^ y agitar vigorosamente
(92 ml H₂O + 5 ml ácido acético + 3 ml metanol)

10. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante (dejar 0.5 mL aprox) y resuspender

11. Añadir 5 ml de metanol puro. *

12. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante

13. Añadir 5 ml de la solución de fijación de Carnoy*
(3:1 metanol-Ácido acético glacial)

14. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.

15. Añadir 5 mL de solución de fijación de Carnoy (En este punto se puede parar el proceso y guardar las muestras a 4°C)

¹ Este documento es un resumen del protocolo propuesto por Euroclone SPA para el cultivo y sacrificio de muestras de medula ósea, por lo que será referido siempre al documento original. Contiene además recomendaciones adicionales a tener en cuenta, fruto de la experiencia en la utilización de los productos utilizados.

Nota importantísima:

Cuando se saquen las muestras con Carnoy del frigorífico al día siguiente, es un punto crucial del proceso centrifugar y añadir nuevo Carnoy totalmente fresco. Si no, la calidad de las extensiones se verá realmente afectada)

16. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.

17. Resuspender el sedimento con pocas gotas de solución de fijación de preparación **fresca** (muy recientemente preparada)

18. Aplicar por goteo sobre un porta limpio, húmedo y en condiciones de humedad y temperatura controlada utilizando Optichrome.

Notas:

* La solución hipotónica debe aplicarse de manera enérgica para asegurar la mejor uniformidad de la suspensión celular.

^ La formación de espuma y un color pardo homogéneo indicará que este paso se realizado correctamente.