

INNOVATIVE TOOLS FOR

cytogenetics

*Chromosome
kit and medium M*

EK AMT-200M
EK AMT-500M
EK AMTB-100M
EK AMTB-500M

**INSTRUCTION
FOR USE**

CE

IVD

Euro  **clone**[®]

English	pag. 2
Français	pag. 3
Deutsche	pag. 4
Español	pag. 5
Italiano	pag. 6
Português	pag. 8
Greek	pag. 9

CHROMOSOME KIT M : INSTRUCTIONS FOR USE

1. Aseptically add up to 1 ml of bone marrow to the tube (the volume is determined considering the cell density of the sample); tighten the cap and mix
2. Incubate horizontally at $37 \pm 2^\circ \text{C}$ for 12, 24 or 48 hours (CO_2 not required)
3. Add 4-5 drops of Colcemid and incubate (time must be decided empirically)
4. Centrifuge at 2000 rpm for 3-4 minutes
5. Discard supernatant, leaving about 0.5 ml of pellet material
6. Resuspend vigorously (vortexing is recommended)
7. Add 5 ml of hypotonic solution KCl 0.075M* - Wait 10 minutes at RT (Room Temperature).
8. Repeat steps 4), 5), 6)
9. Add 5 ml of modified Ibraimov's solution*[^] (92 ml H_2O +5 ml acetic acid+3 ml methanol)
10. Repeat steps 4), 5), 6)
11. Add 5 ml of fresh Carnoy's fixative solution* - Wait 10 minutes at RT (3:1 methanol-glacial acetic acid)
12. Repeat steps 4), 5)
13. Add 5 ml of Carnoy's fixative solution*
14. Repeat step 4) and discard supernatant almost completely
15. Resuspend the pellet with a few drops of freshly prepared fixative
16. Drop onto clean, wet slides under climatically controlled conditions^o

Notes:

* Dispensing must be done energetically in order to ensure better uniformity of the cell suspension

[^] An homogeneous brownish colour and foam formation will indicate that this step has been performed correctly

^o The following procedure is strongly suggested to obtain optimal conditions:

- a) allow one drop to evaporate and then observe the slide using a phase contrast microscope; if the chromosomes appear well spread, with sharp, clear edges and no cytoplasmic residues, then proceed with the final preparation dispensing three drops on the slide;
- b) should you see metaphases with lack of chromosomes ("broken" metaphases) this is due to an excess of humidity: it is advisable to place your slides under a normal lamp turned on, in order to reduce humidity;
- c) if, viceversa, the chromosomes are dense and retaining cytoplasm all around, this is because the environment is too dry: you can obviate simply by means of an humidity source, such as a water bath.

CHROMOSOME KIT M: INSTRUCTIONS D'USAGE

TECHNIQUE POUR LA MISE EN CULTURE DES CELLULES DE LA MOELLE

1. Décongeler le milieu à température ambiante ou à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Ajouter stérilement jusqu'à 1 ml de moelle (le volume dépend de la concentration cellulaire de l'échantillon).
3. Refermer le tube en revissant parfaitement le bouchon.
4. Bien mélanger, puis mettre dans l'étuve à $37 \pm 2^\circ\text{C}$, sur une surface plane (il n'est pas nécessaire de mettre en atmosphère CO_2 , la composition du milieu donne les conditions optimales à la prolifération cellulaire en système fermé).
5. Après l'incubation (12, 24 ou 48 h), ajouter 4 à 5 gouttes de colchicine et remettre à $37 \pm 2^\circ\text{C}$, le temps jugé nécessaire.

PREPARATION CHROMOSOMIQUE

1. Après l'incubation, centrifuger 3 à 4 minutes à 2000 rpm (une vitesse un peu plus élevée ne détériore pas les cellules).
2. Enlever le surnageant en laissant environ 0,5 ml.
3. Resuspendre le culot énergiquement (au Vortex).
4. Verser 5 ml de solution hypotonique (KCI 0,075 M).
La solution doit être distribuée énergiquement vers le fond du tube afin d'obtenir une suspension homogène.
5. Incuber 10 minutes soit à température ambiante, soit à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
6. Centrifuger 3 à 4 minutes à 2000 rpm.
7. Enlever le surnageant comme à l'étape 2.
8. Remettre en suspension le culot énergiquement.
9. Distribuer énergiquement (voir étape 4), 5 ml de mélange d'Ibraimov (95 ml d'eau distillée + 5 ml d'acide acétique glacial).
La coloration marron qui se développera de façon homogène et la mousse qui se formera à la surface, indiqueront la bonne réalisation de la réaction. Sinon fermer le tube et agiter énergiquement.
10. Centrifuger immédiatement pour 3 à 4 minutes à 2000 rpm.
11. Enlever le surnageant.
12. Remettre en suspension énergiquement.
13. Distribuer (voir étape 4) 5 ml de fixateur frais (méthanol/acide acétique 3:1) et laisser agir 10 minutes.
14. Centrifuger 3 à 4 minutes à 2000 rpm.
15. Enlever le surnageant.
16. Répéter l'opération étape 13.
17. Centrifuger à 2000 rpm.
18. Enlever le surnageant complètement.
19. Ajouter quelques gouttes de fixateur fraîchement préparé (<1h).
Le volume dépend de la concentration cellulaire du culot.
20. Déposer 3 gouttes sur une lame mouillée, laisser évaporer (utiliser les lames lavées, dégraissées, de façon à retenir un film d'eau à leur surface).
L'évaporation du fixateur peut être obtenue en passant rapidement la lame sur une flamme.

P.S.: Pour conserver le culot cellulaire, le resuspendre avec le fixateur et garder le tube bien fermé à + 2-8°C.

CHROMOSOME KIT M : ARBEITSANLEITUNG

1. Pipettieren Sie bis zu 1 ml Ihrer Knochenmarkprobe steril in das Kulturröhrchen. (Das Probenvolumen richtet sich nach der Zelldichte der Probe.); Kulturröhrchen verschließen und mischen.
2. Inkubieren Sie das Röhrchen in horizontaler Lage bei $37 \pm 2^\circ \text{C}$ für 12, 24 oder 48 Stunden (CO_2 Atmosphäre wird nicht benötigt)
3. Geben Sie 4-5 Tropfen Colchicin hinzu und inkubieren Sie weiter. (Die Inkubationszeit sollte empirisch bestimmt werden.)
4. Zentrifugation bei 2000 rpm für 3-4 Minuten
5. Überstand verwerfen, Sie erhalten ca. 0,5 ml Zellsediment.
6. Resuspendieren, vortexen wird empfohlen.
7. Zugabe von 5 ml der hypotonischen KCl-Lösung (0,075M)*; Inkubation für 10 Minuten bei RT.
8. wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5), 6)
9. Zugabe von 5 ml modifizierter Ibraimov's Lösung*[^] (92 ml H_2O +5 ml Essigsäure +3 ml Methanol)
10. wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5), 6)
11. Zugabe von 5 ml einer frisch zubereiteten Carnoy's Fixierungslösung* (3:1 Methanol-Eisessig); Inkubation 10 Minuten bei RT.
12. wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5)
13. Zugabe von 5 ml Carnoy's Fixierungslösung
14. wiederholen Sie den Arbeitsschritt 4) und verwerfen Sie den Überstand komplett!
15. Resuspendieren Sie das Sediment mit einigen Tropfen frisch zubereiteter Carnoy's Fixierungslösung
16. Tropfen Sie die Probe auf gereinigte, feuchte Objektträger (unter kontrollierten klimatischen Bedingungen^o)

Hinweise:

* Bitte beachten Sie eine gut Durchmischung Ihrer Probe mit diesen Lösungen, um eine einheitliche Zellsuspension zu erhalten.

[^] eine homogene braune Farbe und Schaumbildung zeigen an, dass dieser Arbeitsschritt korrekt durchgeführt wurde.

^o um optimale Ergebnisse zu erhalten wird folgendes Protokoll empfohlen:

a) Kontrollieren Sie die Spreitung der Chromosomen mit dem ersten Tropfen ihrer Probe nach dem Trocknen unter dem Mikroskop. Wenn die Chromosomen eine gute Spreitung und einen scharfen Rand zeigen und keine zytoplasmatischen Rückstände zu sehen sind, können Sie mit dem Auftropfen auf die Objektträger (3 Tropfen/Objektträger) fortfahren.

b) Sollten die Metaphasen zu wenige Chromosomen zeigen ("broken" Metaphasen), ist die Luftfeuchtigkeit zu hoch. Es wird hier empfohlen die Objektträger unter einer brennenden Glühbirne (höhere Temperatur) zu trocknen, anstatt die Feuchtigkeit zu verringern.

c) Zeigen die Chromosomen dagegen eine schlechte Spreitung und viele zytoplasmatische Rückstände wird empfohlen, die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen (z.B. durch Trocknung in der Nähe eines Wasserbades), um auch hier bessere Ergebnisse zu erhalten

CHROMOSOME KIT M : PROTOCOLO DE USO

1. En condiciones de esterilidad añadir 1 ml de médula ósea al tubo (El volumen viene determinado considerando la densidad celular de la muestra); Apretar la tapa y mezclar.
2. Incubar horizontalmente a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 12, 24 ó 48 horas (No requiere CO_2)
3. Añadir 4-5 gotas de Colchicina e incubar (el tiempo de incubación debe decidirse de manera empírica).
4. Centrifugar a 2000 rpm de 3-4 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante dejando alrededor de 0.5 ml del material sedimentado.
6. Resuspender vigorosamente (se recomienda vortex)
7. Añadir 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M* - Esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Repetir los pasos 4), 5), 6)
9. Añadir 5 ml de solución Ibraimov modificada *^
(92 ml H_2O +5 ml ácido acético +3 ml metanol)
10. Repetir los pasos 4), 5), 6)
11. Añadir 5 ml de solución Carnoy de fijación de preparación fresca * - Esperar 10 minutos a temperatura ambiente.(3:1 metanol-ácido acético glacial)
12. Repetir los pasos 4), 5)
13. Añadir 5 ml de solución Carnoy de fijación*
14. Repetir el paso 4) y eliminar el sobrenadante completamente.
15. Resuspender el sedimento con unas pocas gotas de solución de fijación de preparación fresca.
16. Aplicar la muestra por goteo en un porta limpio, húmedo y bajo condiciones de temperatura y humedad controladas.°

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.

° Los siguientes pasos son ampliamente recomendados para optimizar las condiciones:

- a. Permitir la evaporación de una gota y observar la preparación en porta utilizando un microscopio de contraste de fase, si los cromosomas aparecen correctamente extendidos, con nitidez, bordes bien definidos y sin restos citoplásmicos, pasar a la preparación final añadiendo tres gotas sobre la muestra.
- b. Se podrían ver metafases con pérdida de cromosomas (metafases "rotas") lo que se produce por un exceso de humedad: es aconsejable colocar la muestra bajo una lámpara normal encendida para tratar de reducir la humedad.
- c. Si por contra, los cromosomas aparecen comprimidos o retenidos entre residuos citoplásmicos, suele deberse a que durante el protocolo, la muestra se ha secado demasiado y se puede solucionar con una fuente de humedad como un baño de agua.

CHROMOSOME KIT M: PROTOCOLLO D'USO

Il midollo osseo viene utilizzato per l'analisi cromosomica soltanto in casi di malattie correlate ad un'abnorme proliferazione del tessuto emopoietico. Data la presenza spontanea di mitosi non è necessaria una coltura in vitro, ma solo una breve incubazione che ha il vantaggio di non essere selettiva nei confronti delle linee cellulari che possiedono un eventuale corredo cromosomico anormale. Prima di allestire la coltura è utile procedere alla conta delle cellule nucleate presenti nel campione di sangue midollare (la concentrazione ottimale di cellule seminate è di 1×10^6 per ml di coltura).

Conteggio delle cellule

Portare 0,1 ml di campione non diluito ad un volume complessivo di 2 ml con soluzione di Turk.

Prelevare una goccia della soluzione così diluita e porla in camera di Burker.

Contare le cellule presenti in 4 quadranti (delimitati da tre righe).

Dividere il numero osservato per 4 e moltiplicare per 2×10^5 (=n° di cellule per ml).

Protocollo per l'allestimento delle colture

1. Scongela la provetta del Chromosome Kit M a temperatura ambiente o a 37 ± 2 °C;
2. Aggiungere sterilmente fino a 1 ml di midollo osseo (il volume dipende dalla densità cellulare del campione);
3. Richiudere la provetta avendo cura di avvitare molto bene il tappo;
4. Agitare accuratamente la provetta e quindi collocarla in termostato a 37 ± 2 °C appoggiandola sulla parte piatta. Non occorre la presenza di CO₂: la composizione del mezzo di coltura permette condizioni ottimali di proliferazione linfocitaria in un sistema chiuso;
5. Al termine dell'incubazione (12, 24 o 48 ore), aggiungere quattro-cinque gocce di Colcemid (concentrazione finale :0.05µg/ml) e mantenere in termostato per il tempo ritenuto opportuno.

Protocollo per la preparazione cromosomica

1. Al termine dell'incubazione, centrifugare per 3-4 minuti a 2.000 rpm (velocità anche più elevate non danneggiano le cellule);
2. Scartare il sovrantante facendo attenzione a non eliminare anche parte del pellet cellulare (poiché la provetta ha un fondo arrotondato, si consiglia di lasciare in provetta circa 0,5 ml di materiale);
3. Risospendere il pellet con energia (anche su vortex);
4. Dispensare 5 ml di soluzione ipotonica (KCl 0,075 M). La soluzione deve essere pipettata con energia verso il fondo della provetta in modo da ottenere una sospensione cellulare omogenea (l'uso di pipettatori consente di dosare meglio l'immissione del liquido ottimizzando la risospensione);
5. Mantenere le cellule in soluzione ipotonica per almeno 5 minuti a temperatura ambiente;
6. Centrifugare a 2.000 rpm per 3-4 minuti;
7. Scartare il sovrantante con le modalità del punto 2;
8. Risospendere il pellet con energia;

9. Dispensare con energia (come al punto 4) 5 ml di miscela di Ibraimov (95 ml H₂O distillata, + 5 ml di Acido Acetico glaciale);
10. Centrifugare immediatamente a 2.000 rpm per 3-4 minuti;
11. Scartare il sovrnatante con le modalità del punto 2;
12. Risospendere il pellet con energia;
13. Dispensare con energia (come al punto 4) 5 ml di Alcool Metilico puro (Korthof G., 1986);
14. Centrifugare immediatamente a 2.000 rpm;
15. Scartare il sovrnatante con le modalità del punto 2;
16. Dispensare con energia (come al punto 4) 5 ml di fissativo fresco (Alcool Metilico - Acido Acetico 3:1);
17. Centrifugare immediatamente a 2.000 rpm;
18. Scartare il sovrnatante accuratamente cercando di eliminarlo in modo completo;
19. Aggiungere alcune gocce di fissativo fresco (preparato da non più di un'ora) tenendo conto che la quantità di gocce da aggiungere dipende dalla concentrazione delle cellule nel pellet;
20. Far cadere tre gocce della sospensione cellulare su di un vetrino bagnato e lasciare evaporare (utilizzare vetrini lavati e sgrassati, in grado cioè di trattenere il film di acqua sulla loro superficie). L'evaporazione del fissativo, all'occorrenza, può essere ottenuta passando rapidamente il vetrino sopra una fiamma.

N.B.: E' stato osservato che le condizioni ambientali più adatte per ottenere preparazioni cromosomiche di ottima qualità prevedono una temperatura di circa 20° - 25°C e di un'umidità di circa 40 - 50 % (Lundsteen C., 1985).

N.B.: Per conservare il pellet cellulare, occorre risospenderlo in fissativo fresco e quindi centrifugare a 2000 rpm. Mantenere in freezer ($\leq -18^{\circ}\text{C}$) con la provetta ben chiusa.

CHROMOSOME KIT M : INSTRUÇÕES PARA UTILIZAÇÃO

1. Em condições de assepsia adicionar até 1 ml de medula óssea ao tubo (o volume é determinado considerando a densidade celular da amostra); fechar bem a tampa e misturar
2. Incubar horizontalmente a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 12, 24 ou 48 horas (não é necessário CO_2)
3. Adicionar 4 - 5 gotas de Colchicina e incubar (o tempo deverá ser decidido de um modo empírico)
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 3 - 4 minutos
5. Descartar o sobrenadante, deixando cerca de 0.5 ml de "pellet"
6. Ressuspender com vigor (recomenda-se a utilização do vórtex)
7. Adicionar 5 ml de solução hipotónica KCl 0.075M* - Esperar durante 10 minutos à TA (Temperatura Ambiente).
8. Repetir os passos 4), 5), 6)
9. Adicionar 5 ml de solução modificada de Ibraimov *[^] (92 ml H_2O + 5 ml ácido acético+3 ml metanol)
10. Repetir os passos 4), 5), 6)
11. Adicionar 5 ml de solução fixadora de Carnoy' preparada de fresco * - Esperar 10 minutos à TA. (3:1 metanol - ácido acético glacial)
12. Repetir os passos 4), 5)
13. Adicionar 5 ml de solução fixadora de Carnoy*
14. Repetir o passo 4) e descartar quase completamente o sobrenadante
15. Ressuspender o "pellet" em algumas gotas de fixador preparado de fresco
16. Preparar as montagens em lâminas limpas e humidificadas, sob condições ambientais controladas °

Notas:

* A homogeneização deverá ser efectuada de um modo enérgico de modo a assegurar uma melhor uniformidade da suspensão celular

[^] Uma cor acastanhada homogénea e a formação de espuma irão indicar que este passo foi efectuado correctamente

° Sugere-se o seguinte procedimento para a obtenção de condições óptimas:

a) permitir a evaporação de uma gota e observar a lâmina utilizando um microscópio de contraste de fase; se os cromossomas parecerem bem separados, com margens claras e marcadas e sem resíduos citoplasmáticos, continuar então com a preparação final, dispensando três gotas na lâmina;

b) caso sejam observadas metafases com falta de cromossomas (metafases "quebradas") esta situação decorre de um excesso de humidade: aconselha-se colocar as lâminas sob uma lâmpada vulgar ligada, de modo a reduzir a humidade;

c) se, pelo contrário, os cromossomas forem densos e o citoplasma se encontrar retido à periferia, isto decorre de um ambiente demasiado seco: poderá corrigir esta situação com uma fonte de humidade, tal como um banho-maria.

CHROMOSOME KIT M

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

- 1) Προσθέστε σε ασεπτικές συνθήκες ως 1ml μυελού των οστών στον σωλήνα. (ο όγκος καθορίζεται έχοντας υπόψη την πυκνότητα των δειγμάτων στο δείγμα). Κλείστε το καπάκι και αναμίξτε.
- 2) Επωάστε σε οριζόντια θέση στους $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ για 12, 24 ή 48 ώρες (επώαση σε κλίβανο CO_2 δεν είναι απαραίτητη).
- 3) Προσθέστε 4-5 σταγόνες κολχικίνης και επωάστε (ο χρόνος επώασης πρέπει να καθορισθεί εμπειρικά)
- 4) Φυγοκεντρίστε στα 2000 rpm για 3-4 λεπτά
- 5) Πετάξτε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 0,5 ml μαζί με το ιζήμα
- 6) Αναδιαλύστε καλά (συνιστάται η χρήση αναμικτή [vortex])
- 7) Προσθέστε 5 ml υποτονικού διαλύματος KCL 0,075M*. Περιμένετε 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 8) Επανάληψη των βημάτων 4, 5 και 6
- 9) Προσθέστε 5 ml τροποποιημένου διαλύματος Ibraimov's*#
(92 ml H_2O + 5 ml οξικό οξύ + 3ml μεθανόλη)
- 10) Επανάληψη των βημάτων 4, 5 και 6
- 11) Προσθέστε 5 ml φρέσκου διαλύματος μονιμοποίησης Carnoy's *. Αφήστε 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (3:1 μεθανόλη / κρυσταλλικό οξικό οξύ)
- 12) Επανάληψη των βημάτων 4, 5
- 13) Προσθέστε 5 ml διαλύματος μονιμοποίησης Carnoy's* (3:1 μεθανόλη / κρυσταλλικό οξικό οξύ)
- 14) Επανάληψη του βήματος 4 και πέταγμα του υπερκείμενου σχεδόν τελείως
- 15) Αναδιάλυση του ιζήματος με λίγες σταγόνες φρέσκου διαλύματος μονιμοποίησης



Euroclone S.p.A. - Life Sciences Division
Via Lombardia, 12 - 27010 Siziano (PV) Italy
Customer Service: info@euroclone.net
Technical Service e-mail:cytogenetics@euroclone.net
Tel. +39.02.38195378
Fax : +39.02.38195248

www.euroclone.net