

INNOVATIVE TOOLS FOR

*cytogenetics*

*Chromosome  
kit and medium  $\Phi$*

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

**INSTRUCTION  
FOR USE**

CE

IVD

**Euro**  **clone**<sup>®</sup>

|           |        |
|-----------|--------|
| English   | pag.2  |
| Français  | pag.3  |
| Deutsche  | pag.5  |
| Español   | pag.6  |
| Italiano  | pag.7  |
| Português | pag.9  |
| Greek     | pag.10 |

## CHROMOSOME KIT P :INSTRUCTIONS FOR USE

1. Aseptically add 0.5 ml of whole blood to the tube; tighten the cap and mix
2. Incubate horizontally at  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  for 72 hours (CO<sub>2</sub> not required)
3. Add 1-2 drops of Colcemid and incubate for 4 hours
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 7 minutes at RT (room temperature).
8. Repeat steps 4), 5), 6)
9. Add 5 ml of modified Ibraimov's solution\*^ (92 ml H<sub>2</sub>O+5 ml acetic acid+3 ml methanol)
10. Repeat steps 4), 5), 6)
11. Add 5 ml of pure methanol\*
12. Repeat steps 4), 5)
13. Add 5 ml of Carnoy's fixative solution\* (3:1 methanol-glacial acetic acid)
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°

### *Notes:*

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

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

° 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 P:INSTRUCTIONS D'USAGE

### TECHNIQUE POUR LA MISE EN CULTURE DES CELLULES DU SANG

Technique en tubes prêt-à-l'emploi

1. Décongeler le milieu à température ambiante ou à  $37 \pm 2$  °C.
2. Ajouter stérilement 0.5 ml de sang total.
3. Refermer le tube en revissant parfaitement le bouchon.
4. Bien mélanger, puis mettre dans l'étuve horizontalement à  $37 \pm 2$  °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 72 heures.
6. Après incubation, ajouter 1 à 2 gouttes de colchicine et remettre pendant 4 heures à  $37 \pm 2$  °C.

### PREPARATION CHROMOSOMIQUE

7. Après l'incubation, centrifuger 3 à 4 minutes à 2000 rpm (une vitesse un peu plus élevée ne détériore pas les cellules).
8. Enlever le surnageant en laissant environ 0,5 ml de culot.
9. Resuspendre le culot énergiquement (au Vortex).
10. Verser 5ml de solution hypotonique (KCI 0,075 M).  
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. Répéter les étapes 7), 8), 9).
13. Ajoute 5ml de solution d'Ibraimov modifiée (92 ml H<sub>2</sub>O + 5 ml d'acide acétique + 3 ml de méthanol). 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.
14. Répéter les étapes 7), 8), 9).
15. Ajouter 5ml de méthanol pur. La solution doit être distribuée énergiquement vers le fond du tube afin d'obtenir une suspension homogène.
16. Répéter les étapes 7), 8), 9).
17. Ajouter 5ml de la solution de fixation Carnoy (3:1 méthanol - acide acétique glacial).
18. Centrifuger à 2000 rpm pendant 3-4 minutes et enlever le surnageant presque complètement.
19. Resuspendre le culot avec quelques gouttes de fixateur frais.
20. Déposer quelques gouttes sur une lame mouillée, sous des conditions de température et humidité contrôlés.  
La procédure suivante donne d'excellents résultats:  
a) Déposer une goutte et laisser évaporer.  
Observer le dépôt sous un microscope à contraste de phase; si les chromosomes sont bien étalés, avec les bords nets et pas de résidu cytoplasmique, finaliser l'étalement en ajoutant 3 gouttes sur la lame.

- b) Si l'on observe les métaphases avec des chromosomes manquants (métaphases "cassées"), c'est dû à un excès d'humidité: il faut placer la lame sous une lampe afin de réduire l'humidité.
- c) Si, au contraire, les chromosomes sont denses et il y a présence de cytoplasme au tour, c'est que l'air est trop sec: il faut humidifier l'air à l'aide, par exemple, d'un bain marie.

## CHROMOSOME KIT P :ARBEITSANLEITUNG

1. Pipettieren Sie 0,5 ml Vollblut steril in das Kulturröhrchen. Kulturröhrchen verschließen und mischen.
2. Inkubieren Sie das Röhrchen in horizontaler Lage bei  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  für 72 Stunden ( $\text{CO}_2$  Atmosphäre wird nicht benötigt)
3. Geben Sie 1-2 Tropfen Colchicin hinzu und inkubieren Sie für weitere 4 Stunden
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 5 Minuten bei RT.
8. Wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5), 6)
9. Zugabe von 5 ml modifizierter Ibraimov's Lösung\*<sup>^</sup> (92 ml H<sub>2</sub>O + 5 ml Essigsäure + 3 ml Methanol) .
10. Wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5), 6)
11. Zugabe von 5 ml Methanol (100%)
12. Wiederholen Sie die Arbeitsschritte 4), 5)
13. Zugabe von 5 ml Carnoy's Fixierungslösung (3:1 Methanol-Eisessig)
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<sup>°</sup>)

### Hinweise:

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

<sup>^</sup> eine homogene braune Farbe und Schaumbildung zeigen an, dass dieser Arbeitsschritt korrekt durchgeführt wurde.

<sup>°</sup> 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 P :PROCOLO DE USO.

1. En condiciones de esterilidad añadir 0.5 ml de sangre al tubo, apretar la tapa y mezclar.
2. Incubar horizontalmente a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 72 horas (No requiere  $\text{CO}_2$ )
3. Añadir 1-2 gotas de colchicina e incubar durante 4 horas.
4. Centrifugar a 2000 rpm de 3-4 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante, dejar alrededor de 0.5 ml del material sedimentado.
6. Resuspender vigorosamente (se recomienda la utilización de vortex).
7. Añadir 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M\* - Esperar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Repetir los pasos 4), 5), 6)
9. Añadir 5 ml de Solución Ibraimov modificada \*<sup>^</sup>  
(92 ml  $\text{H}_2\text{O}$  +5 ml ácido acético +3 ml metanol)
10. Repetir los pasos 4), 5), 6)
11. Añadir 5 ml de metanol puro. \*
12. Repetir pasos 4), 5)
13. Añadir 5 ml de la solución de fijación de Carnoy\*  
(3:1 metanol-Ácido acético glacial)
14. Repetir el paso 4) y eliminar completamente el sobrenadante.
15. Resuspender el sedimento con pocas gotas de solución de fijación de preparación fresca.
16. Aplicar por goteo sobre un porta limpio, húmedo y en condiciones de humedad controlada.

### Notas:

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

<sup>^</sup> La formación de espuma y un color pardo homogéneo indicará que este paso se realizó 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 P: PROTOCOLLO D'USO

Il tessuto più comunemente impiegato per l'analisi cromosomica postnatale è il sangue intero. Mediante un prelievo di sangue periferico che può essere di appena 0,2-0,5 ml si può allestire una coltura in sospensione dalla quale si ottiene un numero di mitosi sufficiente per studiare il cariotipo di un individuo.

I piccoli linfociti T presenti nel sangue sono le cellule nelle quali si può indurre attività mitotica in vitro, mediante l'aggiunta al mezzo di coltura di fitoemoagglutinina (PHA), una sostanza capace di trasformare entro alcune ore questi elementi cellulari in blasti, cellule cioè capaci di un'attiva proliferazione.

### Protocollo per l'allestimento delle colture

1. Scongellare la provetta del Chromosome Kit P a temperatura ambiente o a  $37 \pm 2$  °C;
2. Aggiungere sterilmente 0,5 ml di sangue intero;
3. Richiudere la provetta avendo cura di avvitare molto bene il tappo;
4. Agitare accuratamente la provetta e quindi collocarla in termostato a  $37 \pm 2$  °C appoggiandola sulla parte piatta. Non occorre la presenza di CO<sub>2</sub>: la composizione del mezzo di coltura permette condizioni ottimali di proliferazione linfocitaria in un sistema chiuso;
5. Dopo circa 72 ore di incubazione (48 o 96 se necessario) aggiungere una o due gocce di Colcemid (concentrazione finale: 0.05 µg/ml) e mantenere in termostato per altre 2 ore.

### Protocollo per la preparazione cromosomica: metodo "rapido"

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 sovrnatante 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. Risospingere 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 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 sovrnatante con le modalità del punto 2;
8. Risospingere il pellet con energia;
9. Dispensare con energia 5 ml di miscela di Ibraimov modificata (92 ml H<sub>2</sub>O distillata + 5 ml di Acido Acetico glaciale e 3 ml di Alcool Metilico);
10. Centrifugare immediatamente a 2.000 rpm per 3-4 minuti;
11. Scartare il sovrnatante con le modalità del punto 2;
12. Risospingere 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 sovrinatante 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 una goccia 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);
21. Osservare il vetrino al microscopio in contrasto di fase. Se i cromosomi appaiono ben sparpagliati, con rifrangenza netta e senza residui di citoplasma attorno, si può procedere lasciando cadere tre gocce su ogni vetrino. Se invece le metafasi appaiono incomplete per la perdita di cromosomi (mitosi "rotte") significa che c'è un eccesso di umidità nell'ambiente; occorre perciò ridurla ricorrendo ad accorgimenti quali quello di collocare i vetrini, durante l'evaporazione finale, presso una lampada accesa, in modo da ridurre l'umidità circostante.  
Se, al contrario, i cromosomi appaiono poco sparpagliati e con residui di citoplasma attorno, significa che l'umidità circostante è insufficiente; in questo caso, occorre collocare i vetrini durante l'evaporazione accanto a sorgenti di umidità, ad esempio accanto o sopra un bagnomaria a  $37 \pm 2$  °C.

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 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 P : INSTRUÇÕES PARA UTILIZAÇÃO

1. Em condições de assepsia adicionar 0.5 ml de sangue total ao tubo; fechar bem a tampa e misturar
2. Incubar horizontalmente a  $37 \pm 2^\circ$  C durante 72 horas (não é necessário  $\text{CO}_2$ )
3. Adicionar 1 - 2 gotas de Colchicina e incubar durante 4 horas
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 3 - 4 minutos
5. Descartar o sobrenadante, deixando cerca de 0.5 ml de "ellet"
6. Ressuspender com vigor (recomenda-se a utilização do vórtex)
7. Adicionar 5 ml de solução hipotónica KCl 0.075M\* - Esperar durante 5 minutos à TA (Temperatura Ambiente).
8. Repetir os passos 4), 5), 6)
9. Adicionar 5 ml de solução modificada de Ibraimov \* ^  
(92 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 5 ml ácido acético + 3 ml metanol)
10. Repetir os passos 4), 5), 6)
11. Adicionar 5 ml de metanol puro\*
- 12, Repetir os passos 4), 5)
13. Adicionar 5 ml de solução fixadora de Carnoy\*  
(3:1 metanol - ácido acético glacial)
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 efectuada 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") isto 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 P

### ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

- 1) Προσθέστε 0,5 ml ολικού αίματος στο σωλήνα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Κλείστε καλά το καπάκι και ανακατέψτε.
- 2) Επώαση σε οριζόντια θέση στους  $37 \pm ^\circ \text{C}$  για 72 ώρες (η επώαση με  $\text{CO}_2$  δεν θεωρείται αναγκαία).
- 3) Προσθέστε 1-2 σταγόνες κολχικίνης και επώαστε για 4 ώρες.
- 4) Φυγοκεντρήστε στα 2000 rpm για 3-4 λεπτά
- 5) Πετάξτε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 0,5 ml στο υλικό του ιζήματος
- 6) Αναδιαλύστε καλά (συνιστάται η χρήση vortex)
- 7) Προσθέστε 5 ml υποτονικού διαλύματος KCL 0,075M\*. Περιμένετε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 8) Επανάληψη των βημάτων 4, 5 και 6
- 9) Προσθέστε 5 ml τροποποιημένου διαλύματος Ibraimon's\*#  
(92 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 5 ml οξικό οξύ + 3ml μεθανόλη)
- 10) Επανάληψη των βημάτων 4, 5 και 6
- 11) Προσθέστε 5 ml καθαρής μεθανόλης\*
- 12) Επανάληψη των βημάτων 4, 5
- 13) Προσθέστε 5 ml διαλύματος Carnoy\*  
(3:1 μεθανόλη / κρυσταλλικό οξικό οξύ)



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

[www.euroclone.net](http://www.euroclone.net)