










Chromosome kit 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

Legenda dei simboli utilizzati

Symbols used in the labelling

 REF	Codice del prodotto <i>Catalogue Number</i>		Limiti temperatura di conservazione <i>Temperature Limitation</i>
 IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>		Contenuto sufficiente per n test <i>Sufficient For n tests</i>
 LOT	Numero di lotto <i>Batch Code</i>		Leggere le istruzioni d'uso <i>Consult Instructions For Use</i>
	Data di scadenza <i>Use By</i>		Conforme ai requisiti della Direttiva 98/79/CE <i>Compliant to the 98/79/CE Directive</i>
	Fabbricante <i>Manufacturer</i>		



Terreno completo per coltura di cellule da sangue periferico.

Materiale fornito

EKAMTP, 10 x 5 ml tubi da coltura
EK AMTB 100, 1 bottiglia da 100 ml
EK AMTB 500, 1 bottiglia da 500 ml

Conservazione e stabilità

Chromosome Kit e Medium P viene trasportato a +2/+8°C. Una volta ricevuto, il prodotto deve essere conservato a +2/+8°C. La validità del prodotto è di 12 mesi dalla data di produzione.

Italiano

Protocollo di utilizzo

Allestimento coltura

1. 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.
2. Chiudere il tappo del tubo da coltura o della fiasca.
3. Risospendere adeguatamente la sospensione e incubare a $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ ponendo il tubo orizzontalmente (sulla porzione piatta). Aggiunta di CO_2 non è necessaria.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino

1. Dopo 72 ore di coltura, aggiungere 50 μl di Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ed incubare a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ per 90 minuti circa. L'incubazione può essere ridotta a 15 minuti per ottenere un alto numero di prometafasi.
2. 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).
3. Rimuovere il surnatante, ponendo attenzione a non perdere parte del pellet cellulare (si raccomanda di conservare circa 0.5 ml di sospensione nel tubo).
4. Risospendere vigorosamente il pellet.
5. Aggiungere 5 ml di soluzione ipotonica (H_2O distillata, 0,075M KCl) e risospendere adeguatamente.
6. Incubare per almeno 7 minuti a temperature ambiente.
7. Centrifugare per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
8. Rimuovere il surnatante come nel punto 3.
9. Risospendere vigorosamente il pellet.
10. Aggiungere 5 ml di soluzione di Ibramov (H_2O distillata, 5% acido acetico) e risospendere adeguatamente.
11. Centrifugare immediatamente per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
12. Rimuovere il surnatante come nel punto 3.
13. Risospendere vigorosamente il pellet.
14. Aggiungere 5 ml di soluzione fissativa (metanolo: etanolo: acido acetico, 3:1) e risospendere adeguatamente.
15. Ripetere step 11-14.
16. Centrifugare immediatamente per 3 - 4 minuti a 2.000 rpm.
17. Con attenzione rimuovere la maggior parte del surnatante.
18. Risospendere il pellet in qualche goccia di soluzione fissativa fresca, per ottenere un'adeguata concentrazione cellulare.
19. Gocciolare una piccola aliquota di sospensione cellulare su di un vetrino pulito e bagnato.
20. Procedere all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa mediante l'impiego di Optichrome (cod. EKAMH950).



Medium complet pour culture de cellules de sang périphérique.

Matériel fourni

EKAMTP, 10 x 5 ml tubes de culture
EK AMTB 100, 1 bouteille de 100 ml
EK AMTB 500, 1 bouteille de 500 ml

Conservation et stabilité

Chromosome Kit and Medium P est transporté à +2/+8°C. Une fois le produit reçu, il doit être conservé à +2/+8°C. La durée de vie du produit est de 1 ans à partir de la date de fabrication.

Français

Protocole d'utilisation

Aménagement culture

1. 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.
2. Fermer le bouchon du tube de culture ou de la fiole.
3. 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.

Fixation des chromosomes et préparation de la lame

1. Après 72 heures de culture, ajouter 50 µl de Colcemid (10 µg/ml) et incuber à 37 ± 2°C pendant environ 90 minutes. L'incubation peut être réduite à 15 minutes pour obtenir un nombre élevé de prométaphases.
2. 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).
3. 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).
4. Resuspendre vigoureusement le pellet.
5. Ajouter 5 ml de solution hypotonique (H₂O distillée, 0,075M KCl) et resuspendre de façon adéquate.
6. Incuber pendant au moins 7 minutes à température ambiante.
7. Centrifuger pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
8. Enlever le surnageant comme au point 3.
9. Resuspendre vigoureusement le pellet.
10. Ajouter 5 ml de solution d'Ibraimov (H₂O distillée, 5% acide acétique) et resuspendre de façon adéquate.
11. Centrifuger immédiatement pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
12. Enlever le surnageant comme au point 3.
13. Resuspendre vigoureusement le pellet.
14. Ajouter 5 ml de solution fixative (méthanol ou éthanol: acide acétique, 3:1) et resuspendre de façon adéquate.
15. Répéter les steps 11-14.
16. Centrifuger immédiatement pendant 3 - 4 minutes à 2.000 rpm.
17. Enlever soigneusement la plupart du surnageant.
18. Resuspendre le pellet dans quelques gouttes de solution fixative fraîche, pour obtenir une concentration cellulaire adéquate.
19. Laisser couler une petite quantité de suspension cellulaire sur une lame propre et mouillée.
20. Effectuer le séchage dans des conditions adéquates et constantes de température et d'humidité relative en utilisant Optichrome (cod. EKAMH950).



Vollständiger Nährboden für Zellkulturen aus peripherem Blut.

Mitgeliefertes Material

EKAMTP, 10 x 5 ml Kultivierungsröhrchen
EK AMTB 100, 1 Flasche mit 100 ml
EK AMTB 500, 1 Flasche mit 500 ml

Konservierung und Stabilität

Chromosome Kit and Medium P wird bei +2/+8°C befördert. Nach dem Erhalt muss das Produkt bei +2/+8°C konserviert werden. Die Lagerfähigkeit des Produktes beträgt 12 Monate.

Deutsche

Benutzungsprotokoll

Zubereitung einer Kultur

1. 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.
2. Den Pfropfen des Kultivierungsröhrchens oder der Flasche verschließen.
3. Die Suspension erneut angemessen suspendieren und bei +37 ± 2°C bebrüten, wobei sich das Röhrchen horizontal (zum flachen Abschnitt) befindet. Eine Zugabe von CO₂ ist nicht erforderlich.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers

1. Nach 72 Stunden der Kultivierung 50 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen und bei 37 ± 2°C für zirka 90 Minuten bebrüten. Die Bebrütung kann auf 15 Minuten verkürzt werden, um eine hohe Anzahl an Prometaphasen zu erhalten.
2. 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.
3. 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).
4. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
5. 5 ml hypotonischer Lösung (H₂O destilliert, 0,075M KCl) hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
6. Für mindestens 7 Minuten bei Raumtemperatur bebrüten.
7. Für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
8. Den oben schwimmenden Bestandteil wie in Punkt 3 entfernen.
9. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
10. 5 ml Ibraimov-Lösung (H₂O destilliert, 5% Essigsäure) hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
11. Sofort für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
12. Den oben schwimmenden Bestandteil wie in Punkt 3 entfernen.
13. Das Pellet kraftvoll erneut suspendieren.
14. 5 ml der Fixierlösung (Methanol oder Äthanol: Essigsäure, 3 : 1) hinzufügen und angemessen erneut suspendieren.
15. Step 11-14 wiederholen.
16. Sofort für 3 - 4 Minuten bei 2.000 RPM schleudern.
17. Vorsichtig den größten Teil des oben schwimmenden Bestandteils entfernen.
18. Das Pellet in einigen Tropfen der frischen Fixierlösung erneut suspendieren, um eine angemessene Zellenkonzentration zu erlangen.
19. Eine kleine Aliquote der Zelllösung auf einen sauberen und befeuchteten Objektträger tropfeln.
20. Die Trocknung zu angemessenen und konstanten Bedingungen hinsichtlich der Temperatur sowie der relativen Feuchtigkeit mittels der Verwendung von Optichrome (Cod. EKAMH950) vornehmen.



Complete medium for culture of peripheral blood cells

Material supplied

EKAMTP, 10 x 5 ml culture tubes
EK AMTB 100, 1 bottle 100 ml
EK AMTB 500, 1 bottle 500 ml

Product stability

Chromosome Kit and Medium P is shipped at +2/+8°C. Once received, the product has to be stored at +2/+8°C. The product shelf life is 12 months from manufacturing date.

English

Protocol of use

Culture preparation

1. 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.
2. Replace the cap of the culture tube.
3. Mix the culture tube (o 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.

Chromosome fixation and slides preparation

1. After 72 hours of culture, add 50 μl of Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and incubate at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ for 90 minutes (approx.). This last incubation time may be reduced to 15 minutes if the aim is obtaining a higher number of prometaphases.
2. 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).
3. Discard the supernatant, taking care not to loose part of the cell pellet (it is recommended to leave approximately 0.5 ml of material in the tube).
4. Vigorously resuspend the pellet.
5. Add 5 ml of hypotonic solution (distilled H_2O , 0,075M KCl) and mix adequately.
6. Incubate for at least 7 minutes at room temperature.
7. Centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
8. Discard the supernatant according to step 3.
9. Vigorously resuspend the pellet.
10. Add 5 ml of Ibraimov solution (distilled H_2O , 5% acetic acid) and mix adequately.
11. Immediately centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
12. Discard the supernatant according to step 3.
13. Vigorously resuspend the pellet.
14. Add 5 ml of fixative solution (methanol ot ethanol: acetic acid, 3 : 1) and mix adequately.
15. Repeat steps 11-14.
16. Immediately centrifuge at 2.000 rpm for 3 - 4 minutes.
17. Carefully discard almost all the supernatant.
18. 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.
19. Drop a small aliquot of the cell suspension onto a clean and wet microscope slide.
20. Evaporate under constant condition of right temperature and relative humidity into Optichrome (Ref. EKAMH950).



Terreno completo para cultivo de células de sangre periférica.

Material suministrado

EKAMTP, 10 x 5 ml tubos de cultivo
EK AMTB 100, 1 botella de 100 ml
EK AMTB 500, 1 botella de 500 ml

Conservación y estabilidad

Chromosome Kit and Medium P se transporta a +2/+8°C. Una vez recibido el producto tiene que conservarse a +2/+8°C. Validez : 12 meses de la producción

Español

Protocolo de utilización

Disposición cultivo

1. 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.
2. Cerrar la tapa del tubo de cultivo o del matraz.
3. 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

Fijación cromosomas y preparación cristal

1. Después de 72 horas de cultivo, añadir 50 μl de Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$) e incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 90 minutos aproximadamente. La incubación se puede reducir a 15 minutos para obtener un alto número de prometafases.
2. 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).
3. Retirar el surnatante, prestando atención a no perder parte del pellet celular (se recomienda conservar aproximadamente 0.5 ml de suspensión en el tubo).
4. Resuspender enérgicamente el pellet.
5. Añadir 5 ml de solución hipotónica (H_2O destilada, 0,075M KCl) y resuspender adecuadamente.
6. Incubar durante al menos 7 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
8. Retirar el surnatante como en el punto 3.
9. Resuspender enérgicamente el pellet.
10. Añadir 5 ml de solución de Ibraimov (H_2O destilada, 5% ácido acético) y resuspender adecuadamente.
11. Centrifugar inmediatamente durante 3 -4 minutos a 2.000 rpm.
12. Retirar el surnatante como en el punto 3.
13. Resuspender enérgicamente el pellet.
14. Añadir 5 ml de solución de fijación (metanol o etanol: ácido acético, 3:1) y resuspender adecuadamente.
15. Repetir step 11-14.
16. Centrifugar inmediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
17. Con atención retirar la mayor parte del surnatante.
18. Resuspender el pellet en algunas gotas de solución de fijación fresca, para obtener una concentración celular adecuada.
19. Echar algunas gotas en una pequeña parte de suspensión celular en un cristal limpio y húmedo.
20. Proceder al secado en condiciones adecuadas y constantes de temperatura y humedad relativa empleando Optichrome (cod. EKAMH950).



Meio completo para cultura de células de sangue periférico.

Material fornecido

EKAMTP, 10 x 5 ml tubos de cultura
EK.AMTB 100, 1 embalagem da 100 ml
EK.AMTB 500, 1 embalagem da 500 ml

Conservação e estabilidade

O Chromosome Kit and Medium P é transportado a +2/+8°C. Uma vez recebido, o produto deve ser conservado a +2/+8°C. O período limite de armazenagem do produto é de 12 meses.

Português

Protocolo de utilização

Preparação da cultura

1. 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.
2. Fechar a tampa do tubo de cultura ou do frasco.
3. Suspender de novo, de forma adequada, a suspensão e incubar a +37 ± 2°C pondo o tubo na horizontal (sobre a parte plana). Não é necessário acrescentar CO₂.

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina

1. Após 72 horas de cultura, acrescentar 50 µl de Colcemid (10 µg/ml) e incubar a 37 ± 2°C durante cerca de 90 minutos. A incubação pode ser reduzida para 15 minutos para obter um alto número de prometafases.
2. 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).
3. Retirar o sobrenadante, tendo cuidado para não perder parte do pellet celular (é aconselhável conservar cerca de 0.5 ml de suspensão no tubo).
4. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
5. Acrescentar 5 ml de solução hipotónica (H₂O destilada, 0,075M KCl) e suspender de novo, de forma adequada.
6. Incubar durante, pelo menos, 7 minutos à temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
8. Retirar o sobrenadante como no ponto 3.
9. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
10. Acrescentar 5 ml de solução de Ibraimov (H₂O destilada, 5% ácido acético) e suspender de novo, de forma adequada.
11. Centrifugar imediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
12. Retirar o sobrenadante como no ponto 3.
13. Suspender de novo o pellet, vigorosamente.
14. Acrescentar 5 ml de solução fixadora (metanol ou álcool etílico: ácido acético, 3:1) e suspender de novo, de forma adequada.
15. Repetir step 11-14.
16. Centrifugar imediatamente durante 3 - 4 minutos a 2.000 rpm.
17. Com cuidado, retirar a maior parte do sobrenadante.
18. Suspender de novo o pellet em algumas gotas de solução fixadora fresca, para obter uma concentração celular adequada.
19. Gotejar uma pequena alíquota de suspensão celular numa lâmina limpa e molhada.
20. Secar em adequadas e constantes condições de temperatura e humidade relativa, utilizando Optichrome (cód. EKAMH950).



Greek

Πλήρες υλικό για καλλιέργεια κυττάρων περιφερειακού αίματος.

Παρεχόμενο υλικό

EKAMTP, 10 x 5 ml σωλήνες καλλιέργειας
EK AMTB 100, 1 φιάλη των 100 ml
EK AMTB 500, 1 φιάλη των 500 ml

Διατήρηση και σταθερότητα

Το Chromosome Kit and Medium P μεταφέρεται σε +2/+8°C. Μετά τη παραλαβή το προϊόν πρέπει να διατηρηθεί σε +2/+8°C. Η διάρκεια ζωής του προϊόντος είναι 12 μήνες από την ημερομηνία της παρασκευής.

Προτόκολλο χρήσης.

Προετοιμασία καλλιέργειας

1. 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.
2. Κλείστε το πόμα του σωλήνα καλλιέργειας ή της φιάσκας.
3. Ανανιψίστε κατάλληλα το εναώρημα και υποβάλλετε το ίδιο σε επώαση στους +37 ± 2°C τοποθετώντας τον σωλήνα οριζόντια (επάνω στο πλατύ τμήμα). Η προσθήκη του CO₂ δεν

Σταθεροποίηση χρωμοσωμάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου

1. Μετά από 72 ώρες καλλιέργειας, Προσθέστε 50 μl του Colcemid (10 μg/ml) και υποβάλλετε σε επώαση στους 37 ± 2°C για 90 λεπτά. Η επώαση μπορεί να μειωθεί στα 15 λεπτά για να αποκτήσετε ένα υψηλό αριθμό προμετάφασης.
2. 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).
3. Αφαιρέστε το υπερχείμνο διάλυμα, προσέχοντας ώστε να μην γαθεί μέρος του κυτταρικού pellet (συνιστάται να διατηρήσετε περίπου 0,5 ml εναωρήματος στον σωλήνα).
4. Αναδεύστε ζοηρά το pellet.
5. Προσθέστε 5 ml υποτονικού διαλύματος (H₂O αποσταγμένο, 0,075M KCl) και αναδεύστε κατάλληλα.
6. Υποβάλλετε σε επώαση για τουλάχιστον 7 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
7. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
8. Αφαιρέστε το υπερχείμνο διάλυμα όπως στο σημείο 3.
9. Αναδεύστε ζοηρά το pellet.
10. Προσθέστε 5 ml διαλύματος του Ibramov (H₂O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ) και αναδεύστε κατάλληλα.
11. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση αμέσως για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
12. Αφαιρέστε το υπερχείμνο διάλυμα όπως στο σημείο 3.
13. Αναδεύστε ζοηρά το pellet.
14. Προσθέστε 5 ml φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος (μεθανόλη ή αιθανόλη : οξικό οξύ, 3:1) και αναδεύστε κατάλληλα.
15. Επαναλάβετε σημείο 11-14.
16. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση αμέσως για 3 - 4 λεπτά στις 2.000 rpm.
17. Αφαιρέστε προσεκτικά το μεγαλύτερο μέρος του υπερχείμνου διαλύματος.
18. Αναδεύστε το pellet σε μερικές σταγόνες φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος, για να αποκτήσετε μια κατάλληλη κυτταρική συμπύκνωση.
19. Στάξτε ένα μικρό μέρος κυτταρικού εναωρήματος επάνω σε ένα καθαρό και βρεγμένο γυάλινο πλακίδιο.
20. Προχωρήστε στο στέγνωμα με κατάλληλες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετική υγρασία με τη χρήση του Orichrome (cod. EKAMH950).

EuroClone®
serving science through innovation



EuroClone®
serving science through innovation

EuroClone S.p.A.

Via Figino 20/22 - 20016 Pero (MI) Italy

☎ +39 02 38195.1 📠 +39 02 38101465

✉ info@euroclone.it 🌐 www.euroclone.it