ClearLine	Fiche technique	Réf : 509033 Date de sortie : 18/07/2022

Colcémide 10µg/ml dans PBS (Démécolcine)

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Conditions de stockage : +2°C à +8°C

Durée de conservation : 24 mois

Composition : Affiché sur le site web et dans le catalogue ; également disponible sur demande

Couleur : Solution incolore et claire

pH : 7,2 ± 0,3

Osmolalité : 295 mOsm/kg ± 10 %

Endotoxine : < 10 UE/ml

Tests de stérilité :
- Bactéries dans des conditions aérobies et anaérobies
- Champignons et levures

Test de croissance cellulaire : Sans objet

Autres tests : Sans objet

Utilisation recommandée :
- Respecter les conditions de conservation du produit
- N'utilisez pas le produit après sa date de péremption
- Conservez le produit dans un endroit à l'abri de la lumière (ce qui n'est pas nécessaire pour les solutions salines).
- Manipuler le produit dans des conditions aseptiques (ex : sous flux d'air laminaire)
- Porter des vêtements adaptés à la manipulation du produit pour éviter la contamination (ex : gants, masque, casquette d'hygiène, combinaison...)

Le produit est destiné à être utilisé in vitro pour la recherche ou la fabrication ultérieure uniquement et non à être utilisé comme ingrédient pharmaceutique actif ou comme aliment pour animaux.

Utilisation :
L'une des applications de la solution Colcémide est la suivante : Récolte de lymphocytes cultivés pour des métaphases d'hybridation in situ
La procédure de récolte se déroule en 3 étapes :

- Les cellules en division sont arrêtées en mitose à l'aide de colcémide. Le colcémide empêche la formation de l'appareil fusiforme responsable de la division cellulaire, permettant ainsi une accumulation de métaphases. Remarque : Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes peuvent également être préparées pour l'analyse chromosomique, car la morphologie des cellules lymphoblastoïdes est comparable à celle des lymphocytes préparés à partir d'échantillons de sang entier.

- L'ajout de la solution hypotonique, le chlorure de potassium (KCl), entraînera une ruée d'eau dans les cellules en raison du gradient de concentration causé par la concentration moins que physiologique à l'extérieur des cellules. Les cellules vont gonfler et les membranes cytoplasmiques vont s'étirer. Les cellules ressemblent à un ballon d'eau avec des chromosomes suspendus à l'intérieur.
- Avec l'ajout de fixateur (1:3 : méthanol : acide acétique), chaque cellule est conservée dans sa forme gonflée. Les changements chimiques font durcir la cellule (pas aussi fragile que chez l'hypotonique), mais restent un sac gonflé de chromosomes en suspension.

Temps nécessaire :
2-3 heures lors de la récolte de 8-12 tubes de culture le jour 4 de la préparation des chromosomes (les jours 1-3, les lymphocytes sont stimulés pour se diviser dans le milieu de culture).

Procédure:

1. Le jour 4, ou 72 heures après le début de la culture, préchauffer 0,075 M KCl à 37 °C et refroidir une bouteille de 500 ml de méthanol à 4 °C.
2. Après 72 heures d'incubation de la culture, ajouter 0,25 ml de colcémide (10 µg/ml) avec une seringue de 1 cc dans chaque tube de 15 ml. Retournez les tubes plusieurs fois pour mélanger. Remettez les cultures dans l'incubateur à 37 °C pendant 10 à 20 minutes. Remarque : La longueur des chromosomes dépend de la concentration de colcémide et du moment de l'arrêt mitotique. Plus la concentration de colcémide est élevée et plus le temps d'arrêt mitotique est long, plus les chromosomes seront courts. Par conséquent, il est préférable de maintenir la concentration de colcémid et le temps d'exposition au minimum. Colcemid continuera d'être actif jusqu'à l'ajout de fixateur. Les cultures stimulées par la phytohémagglutinine (PHA) nécessitent une très courte période d'exposition (10 à 30 minutes) au colcémide, car ce sont des cellules qui se divisent rapidement.
3. Remettez les cellules en suspension en inversant les tubes et les cultures de centrifugation pendant 8 minutes à 1200 tr/min dans la centrifugeuse Beckman TJ-6 (par exemple).
4. Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette pasteur stérile reliée à un appareil à vide. Remettre les cellules en suspension à l'aide d'une pipette pasteur. Ajouter lentement 1 à 3 ml de solution hypotonique chaude. Continuez à ajouter 1 à 3 ml petit à petit, jusqu'à ce que 10 ml de KCl aient été ajoutés. Soufflez de l'air dans la suspension à l'aide d'une pipette après chaque ajout de solution de KCl. Incuber les tubes pendant 18 minutes à 37°C.
5. Ajouter 1 ml de fixateur à froid fraîchement préparé (1:3 : méthanol, 4°C : acide acétique) à chaque culture **très lentement** (goutte à goutte). Faites des bulles d'air à travers la suspension après chaque chute. Cela fixera rapidement les cellules dans une forme gonflée et commencera à lyser les globules rouges.
6. Centrifugez les cellules pendant 8 minutes à 1200 tr/min dans la centrifugeuse TJ-6 (par exemple).
7. Aspirez le surnageant (contient des globules rouges lysés et des débris cellulaires). Remettez en suspension la suspension cellulaire en faisant bouillonner l'air à travers la pastille et ajoutez 1 à 3 ml de fixateur. Continuez à laver les cellules avec un fixateur, jusqu'à ce qu'un total de 10 ml de fixateur ait été ajouté.
8. Répétez les étapes 6 et 7 trois fois de plus ou jusqu'à ce que tous les globules rouges soient lysés et qu'une pastille de globules blancs soit observée.
9. Déposez les métaphases récoltées dans les microlames rincées à l'éthanol absolu (voir la procédure de préparation des microlames). Pour de meilleurs résultats, cette étape

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

:

ClearLine	Fiche technique	Réf : 509033 Date de sortie : 18/07/2022

doit être effectuée immédiatement après la récolte des cellules en métaphases. Si les microlames ne peuvent pas être préparées immédiatement, les suspensions cellulaires peuvent être conservées dans la solution fixatrice à 4°C pendant 24 heures.

Solutions:
Préparez le fixateur en mélangeant 75 ml de méthanol à 4 °C avec 25 ml d'acide acétique glacial. Le fixateur doit être frais avant chaque utilisation, car il peut absorber l'eau au repos et le pH change avec le temps.

Références:
Monteleone, P., Département de génétique, Hôpital pour enfants Cardinal Glennon. 24 Avril 1990
L'association des technologues en cytogénétique Manuel de laboratoire de cytogénétique ; Université de Californie, San Francisco, Californie 94143
Yunis, J.J., et Chandler M.E., Cytogénétique, chapitre 26

Utilisations : Sans objet

Signes de détérioration : Sans objet

Remarques : Sans objet

DOMINIQUE DUTSCHER SAS