

Colcemid 10µg/ml in PBS (Demecolcin)

N° de catalogue : L0040

pH théorique : 7.2 ± 0.3

Osmolarité : 295 mOsm/l ± 10%

Couleur : incolore, solution claire

Conditions de stockage : +4°C

Durée de vie : 24 mois

Tests de Stérilité :

- Bactéries dans des conditions aérobies et anaérobies
- Levures et champignons

Endotoxin : <10 EU/ml (<1ng/ml)

Composition : Diffusé sur le site internet, également disponible sur demande.

Recommandation d'utilisation :

Manipuler ce milieu dans des conditions aseptiques.

Le produit est destiné à usage in vitro en laboratoire uniquement, ne pas en faire un usage médicamenteux, humain ou vétérinaire.

Applications :

Une application de la solution de Colcemide est la collecte de lymphocytes en métaphases pour l'hybridation In-Situ

Il y a 3 étapes dans la procédure de collecte :

- Les cellules en division sont stoppées en mitose avec l'utilisation de la Colcemide. La colcemide prévient la formation de l'axe responsable de la division cellulaire, et de ce fait, permet une accumulation des cellules en métaphases. Note : les lignées lymphoblastoïdes peuvent aussi être préparées pour une analyse chromosomique, parce que la morphologie des cellules lymphoblastoïdes est comparable aux lymphocytes préparés à partir des échantillons de sang.
- L'addition d'une solution hypotonique de chlorure de potassium (KCl), va permettre l'entrée d'eau dans les cellules due au gradient de concentration causé par la solution hypotonique. Les cellules vont gonfler et les membranes cytoplasmiques vont s'agrandir. Les cellules ressembleront à un ballon d'eau avec les chromosomes en suspension à l'intérieur.
- Avec l'addition d'un fixatif (1 :3 : méthanol, acide acétique), chaque cellule est maintenue dans sa forme gonflée. Les changements chimiques rendent la cellule moins fragile, la membrane reste gonflée, les chromosomes en suspension.

Temps requis :

2 à 3 heures pour la collecte de 8 à 12 tubes de culture en jour 4 de la préparation des chromosomes (jours 1 à 3, les lymphocytes sont stimulés pour se diviser dans le milieu de culture).

Procédure :

1. Jour 4, ou 72 heures après que la culture ait été initiée, pré-chauffer 0.075 M KCl à 37°C et refroidir une bouteille de méthanol de 500ml à 4°C.
2. Après 72 heures d'incubation, ajouter 0.25 ml de colcemide (10µg/ml) avec une seringue 1cc à chaque tube de 15ml. Agiter les tubes plusieurs fois pour mélanger. Replacer les cultures dans l'incubateur à 37°C pendant 10 à 20 minutes. Note : la longueur des chromosomes est dépendante de la concentration de colcemide et du temps d'arrêt en phase mitotique. Plus la concentration de colcemide est importante et plus le temps d'arrêt mitotique est long, plus les chromosomes seront courts. Il est préférable de garder la concentration de colcemide et le temps d'exposition à un minimum. La colcemide continuera à être active jusqu'à l'addition du fixatif. Les cultures stimulées de phytohemagglutinine (PHA) demande un temps très court d'exposition (10 à 30 minutes) à la colcemide parce qu'elles se divisent rapidement.
3. Re-suspendre les cellules en agitant les tubes et centrifuger les cultures pendant 8 minutes à 1200 rpm dans une centrifugeuse Beckman TJ-6 (par exemple).
4. Aspirer le surnageant avec une pipette pasteur stérile connectée à une pompe à vide. Re-suspendre les cellules avec une pipette pasteur. Ajouter lentement 1 à 3 ml de solution hypotonique tiède. Continuer à ajouter 1 à 3 ml petit à petit, jusqu'à ce que 10ml de KCl ait été ajouté. Mettre de l'air dans la suspension à l'aide d'une pipette après chaque addition de solution KCl. Incuber les tubes pendant 18 minutes à 37°C.
5. Ajouter 1 ml de fixatif froid fraîchement préparé (1 :3 : méthanol, 4°C : acide acétique) à chaque culture **très lentement** (goutte par goutte). Faire des bulles d'air dans la suspension après chacune des gouttes. Ceci fixera rapidement les cellules sous une forme gonflée et commencera à lyser les globules rouges.
6. Centrifuger les cellules pendant 8 minutes à 1200 rpm dans la centrifugeuse TJ-6 (par exemple).
7. Aspirer le surnageant (contient les globules rouges et des débris cellulaires). Re-suspendre la suspension cellulaire en mettant de l'air dans le culot et ajouter 1 à 3 ml de fixatif. Continuer de laver les cellules avec le fixatif, jusqu'à ce qu'un total de 10ml de fixatif ait été ajouté.
8. Répéter l'étape 6 et 7, 3 autres fois ou jusqu'à ce que tous les globules rouges soient lysés et qu'un culot cellulaire blanc soit observé.
9. Déposer goutte à goutte les cellules métaphasiques collectées, sur les 'microslides' rincées au méthanol absolu (se référer à la procédure de préparation des 'microslides') <http://hg.wustl.edu/hdk-lab-manual/cam/cam3.html>. Pour de meilleurs résultats, cette étape doit être faite immédiatement après que les cellules en métaphase soient récoltées. Si les 'microslides' ne peuvent pas être préparées immédiatement, les suspensions de cellules peuvent être stockées dans la solution fixative à 4°C pendant 24 heures.

Solutions :

Préparer le fixatif en mélangeant 75ml de méthanol à 4°C avec 25ml d'acide acétique glacial. Le fixatif doit être préparé extemporanément, parce qu'il peut absorber l'eau avec le temps et le pH varie aussi.

Références :

Monteleone, P., Department of Genetics, Cardinal Glennon Children's Hospital. April 24, 1990
The association of Cytogenetic Technologists Cytogenetic laboratory manual ; University of California, San Francisco, California 94143
Yunis, J.J., and Chandler M.E., Cytogenetics, chapter 26