

Phytohaemagglutinin-M (PHA-M) liquide

N° de catalogue : L3010

Conditions de stockage : Conserver le milieu congelé à -20°C

Après décongélation, le PHA-M est stable au moins 1 mois à +2 / +8°C. La PHA-M peut apparaître trouble à +2 / +8°C, mais cette turbidité n'a aucun effet sur l'activité du produit.

Durée de vie : 36 mois

Composition : Après décongélation, chaque ml de solution contient 5 à 10 mg de protéines.

Recommandation d'utilisation:

- Respecter les conditions de stockage du produit
- Ne pas utiliser le produit après sa date de péremption
- Stocker le produit dans un endroit sec
- Porter des vêtements adaptés à la manipulation du produit pour éviter la contamination (ex: gants, masque, bonnet d'hygiène, combinaison...)
- Protéger le produit de toute forme d'humidité
- Utiliser en une fois, après ouverture, la totalité de la quantité de produit du récipient, sans faire de solution concentrée (pour éviter la formation de précipités). Si ce n'est pas possible, fermez le récipient immédiatement après avoir prélevé la quantité de poudre requise.
- Des compléments peuvent être ajoutés avant la filtration stérile du milieu ou introduits de manière aseptique dans du milieu stérile (respecter la concentration finale du milieu). La nature des suppléments peut affecter les conditions de stockage et la durée de conservation du milieu.

Le produit est destiné à être utilisé *in vitro*, en laboratoire uniquement. Ne l'utilisez pas dans des applications thérapeutiques, humaines ou vétérinaires.

Application:

La phytohémagglutinine est une lectine extraite des haricots rouges (*Phaseolus vulgaris*). La protéine se compose de deux espèces moléculaires : une leucoagglutinine (PHA-L) et une érythroagglutinine (PHA-E). Chacune des protéines contient une famille de cinq isolectines, chacune étant un tétramère maintenu ensemble par des forces non covalentes. PHA-M est la forme mucoprotéine et est un extrait brut utilisé pour la stimulation de la prolifération cellulaire en culture lymphocytaire. Le PHA-M possède également une puissante propriété érythroagglutinante et il était à l'origine utilisé pour séparer les leucocytes du sang total.

Instructions de préparation :

- 1) Ajoutez 2 à 4 ml de PHA-M pour 100 ml de votre milieu de caryotypage.
- 2) Inoculer environ 0,5 ml de sang total hépariné dans un tube en verre ou en plastique avec 10 ml de milieu (ou 106 cellules viables par ml).
- 3) Incuber la culture pendant 72 heures.
- 4) Ajouter 0,1-0,2 ml de solution de Colcemid (réf: L0040) dans chaque tube de culture.
- 5) Incuber la culture pendant 15 à 30 minutes.
- 6) Transférer la culture dans un tube à centrifuger et essorer à 500 g pendant 5 minutes.
- 7) Retirer le surnageant et remettre les cellules en suspension dans 5 à 10 ml de KCl 0,075 M hypotonique (réf: L0643).
- 8) Incuber à 37 ° C pendant 10 à 12 minutes.
- 9) Essorez à 500 g pendant 5 minutes.

- 10) Retirer le surnageant, agiter le sédiment cellulaire et ajouter goutte à goutte 5 à 10 ml de fixateur frais et glacé composé de 1 partie d'acide acétique pour 3 parties de méthanol.
- 11) Laisser à 4 ° C pendant 10 minutes.
- 12) Répétez les étapes 10, 11 et 12.
- 13) Essorez à 500 g pendant 5 minutes.
- 14) Remettre en suspension le culot cellulaire dans un petit volume de 0,5 à 1 ml de fixateur frais, déposer sur une lame propre et laisser sécher à l'air.
- 15) A ce stade, la préparation peut être colorée avec Orecin ou Giemsa. Le cerclage de Giemsa est devenu la technique la plus utilisée. La méthode la plus courante pour obtenir cette coloration consiste à traiter les lames avec Trypsin-EDTA 10X (réf: X0930).

Signes de détérioration :

Le milieu doit être exempt de particules et de matières flocculantes.

N'utilisez pas ce milieu s'il contient un précipité.

D'autres signes de détérioration peuvent inclure un changement de couleur ou une dégradation des caractéristiques physiques ou de performance.