

CULTIVO DE SANGRE PERIFERICA UTILIZANDO CHROMOSOME P MEDIUM:¹

Chromosome P Medium es un producto Ready to Use por lo que no deberá ser suplementado con ningun reactivo adicional.

Para el cultivo de linfocitos en sangre periférica es recomendable utilizar tubos T (de base truncada para conseguir la inclinación del cultivo y favorecer los resultados) Si no disponeis de tubo T basta con utilizar tubos de ensayo cilindricos y una gradilla inclinada 45°.

1. En condiciones de esterilidad añadir 0.5 ml de sangre al tubo, apretar la tapa y mezclar.
2. Incubar horizontalmente a 37 °C durante 72 horas en incubador
3. Añadir 1-2 gotas de Colcemid (0.05µg/ml en PBS) e incubar durante 2 horas.
4. Centrifugar a 2000 rpm de 3-4 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante, dejar alrededor de 0.5 ml con el pellet
6. Resuspender vigorosamente
7. Añadir 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M* - Esperar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante (dejar 0.5 mL aprox) y resuspender
9. Añadir 5 ml de Solución Ibraimov modificada *^
(92 ml H₂O + 5 ml ácido acético + 3 ml metanol)
10. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante (dejar 0.5 mL aprox) y resuspender
11. Añadir 5 ml de metanol puro. *
12. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), eliminar sobrenadante
13. Añadir 5 ml de la solución de fijación de Carnoy*
(3:1 metanol-Ácido acético glacial)
14. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.
15. Añadir 5 mL de solución de fijación de Carnoy (En este punto se puede parar el proceso y guardar las muestras a 4°C)

¹ Este documento es un resumen del protocolo propuesto por Euroclone SPA para el cultivo y sacrificio de linfocitos en sangre periférica, por lo que será referido siempre al documento original. Contiene además recomendaciones adicionales a tener en cuenta, fruto de la experiencia en la utilización de los productos mencionados.

Nota importantísima:

Cuando se saquen las muestras con Carnoy del frigorífico al día siguiente, es un punto crucial del proceso centrifugar y añadir nuevo Carnoy totalmente fresco. Si no, la calidad de las extensiones se verá realmente afectada)

16. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.

17. Resuspender el sedimento con pocas gotas de solución de fijación de preparación **fresca** (muy recientemente preparada)

18. Aplicar por goteo sobre un porta limpio, húmedo y en condiciones de humedad y temperatura controlada. (Por ahora realizad las extensiones tal y como las vengais haciéndolo hasta el momento)

Notas:

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

^ La formación de espuma y un color pardo homogéneo indicará que este paso se realizado correctamente.