

**CULTIVO DE SANGRE PERIFERICA UTILIZANDO CHROMOSOME P MEDIUM CON O SIN SINCRONIZACIÓN:<sup>1</sup>**

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

**CULTIVO CON CHROMOSOME P MEDIUM + SYNCHROSET:**

1. En condiciones de esterilidad añadir 0.5 ml de sangre al medio, apretar la tapa y mezclar.
2. Incubar horizontalmente a 37 °C
3. Tras 48-56 horas, añadir 0,1 ml de Solución "A" de Synchronset; Incubar de 12 a 16 horas. (añadir la solución A antes de terminar la jornada de trabajo e incubar durante la noche)
4. Añadir 0,1 ml de Solución "B" e incubar unas 5 horas (a la mañana siguiente según se llegue añadir la solución B) No es necesario lavar las células.

Tened cuidado de elegir un día en el que no se entorpezca el proceso por el fin de semana, por ejemplo cultivar el lunes, el miercoles solución A, el jueves la B, colcemid y sacrificio, si no da tiempo, el viernes se sigue sin problema.

Otra sugerencia es el viernes, dejar el cultivo el fin de semana completo y el lunes aplicar solución A, el martes solución B y así hasta el sacrificio.

5. Añadir 1-2 gotas de colcemid (10µg/mL) e incubar 90 minutos\*.

\* Si en este tiempo de incubación se produce la sincronización del cultivo en la última fase de la mitosis (metafase tardia y/o anafase), se recomienda disminuir el tiempo de incubación a 30, 45 ó 60 minutos para determinar el tiempo óptimo de obtención de cromosomas prometafásicos.

6. Centrifugar a 2000 rpm de 3-4 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante, dejar alrededor de 0.5 ml del material sedimentado.
8. Resuspender vigorosamente
9. Añadir 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M\* - Esperar 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 2000 rpm, descartar sobrenadante (dejar 0.5 mL aproximadamente) y resuspender.
11. Añadir 5 ml de Solución Ibraimov modificada <sup>^</sup>  
(92 ml H<sub>2</sub>O+5 ml ácido acético+3 ml metanol)

---

<sup>1</sup> 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 utilizados.

12. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min), descartar sobrenadante (dejar 0.5 mL aproximadamente) y resuspender.
13. Añadir 5 ml de metanol puro. \*
14. Centrifugar a 2000 rpm, descartar sobrenadante
15. Añadir 5 ml de la solución de fijación de Carnoy\*  
(3:1 metanol-Ácido acético glacial)
16. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.
17. Añadir 5 ml de la solución de fijación de Carnoy\* (En este punto se puede parar el proceso y guardar las muestras a 4°C)

***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)***

18. Centrifugar a 2000 rpm (3-4 min) y eliminar el sobrenadante.
19. Resuspender el sedimento con pocas gotas de solución de fijación de preparación fresca.
20. Aplicar por goteo sobre un porta limpia, húmedo y en condiciones de humedad controlada.  
(Por ahora realizad las extensiones tal y como vengais haciéndolo hasta el momento)