

INNOVATIVE TOOLS FOR

cytogenetics

*Synchro
set*

EK AMTS008

INSTRUCTION
FOR USE

CE

IVD

Euro  **clone**[®]

English	pag. 2
Français	pag. 3
Deutsche	pag. 4
Español	pag. 5
Italiano	pag. 6
Português	pag. 7
Greek	pag. 8

SYNCHROSET: INSTRUCTION FOR USE

The "Synchroset" reagents perform very well with any lymphocyte culture protocol commonly used; anyway, much better results can be expected when they are used in combination with Euroclone's "Chromosome Kit" test tube.

These instructions are specifically designed for "Chromosome kit", but they will apply also to different procedures.

Lymphocytes culture

1. Aseptically add 0.5 ml of whole blood to the tube; tighten the cap and mix
2. Incubate at $37 \pm 2^{\circ} \text{C}$ (CO_2 not required)
3. After 48-56 hours, add 0,1 ml of Solution "A"; incubate overnight
4. The next morning, simply add 0,1 ml of Solution "B" and incubate for further five hours (it is not necessary to wash the cells)
5. Add 1-2 drops of Colchicin and incubate for 90 minutes*

* Should this incubation time result in a synchronization of cell cycle in a late phase of mitosis (late metaphase and/or anaphase), then we recommend to decrease the incubation time to 30, 45 or 60 minutes in order to determine the optimal period which will provide prometaphasic chromosomes.

PREPARATION OF SLIDES

Slides for chromosome observation can be now conveniently prepared following the Chromosome kit "fast protocol".

Recommendations

Unused aliquots of both Solutions "A" and "B" must be stored at $\leq -18^{\circ} \text{C}$, in the dark; repeated freezing and thawing will not alter the functionality of these reagents.

Chromosome which have undergone synchronization may need longer trypsinization times in order to obtain proper GTG or RHG banding.

SYNCHROSET:INSTRUCTIONS D'USAGE

TECHNIQUE POUR LA SYNCHRONISATION DES CULTURES DE LYMPHOCYTES

Les réactifs Synchroset peuvent être utilisés avec tous les protocoles de culture de lymphocytes mais les meilleurs résultats sont obtenus avec les milieux Chromosome kit P en tubes prêt-à-l'emploi.

Ce protocole est adapté aux tubes Chromosome kit P mais il peut être appliqué avec d'autres milieux.

CULTURE DES LYMPHOCYTES

1. Décongeler le tube Chromosome kit P à température ambiante ou à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
2. Ajouter stérilement 0.5 ml de sang total. Refermer le tube en revissant parfaitement le bouchon et bien mélanger.
3. Incuber à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (le CO_2 n'est pas nécessaire).
4. Après 48-56 heures, ajouter 0,1 ml de la solution "A"; incuber pendant la nuit.
5. Le lendemain matin ajouter simplement 0,1 ml de la solution "B" et incuber pendant 5 heures (il n'est pas nécessaire de laver les cellules).
6. Après incubation, ajouter 1 à 2 gouttes de colchicine et incuber pendant 90 minutes*.

* Si ce temps d'incubation résulte en une synchronisation du cycle cellulaire dans une phase tardive de la mitose (métaphase tardive et/ou anaphase), il est recommandé de diminuer le temps d'incubation à 30, 45 ou 60 minutes afin de déterminer le temps optimal pour l'obtention de chromosomes prométaphasiques.

Préparation des lames

Suivre le protocole du Chromosome kit ou votre protocole standard.

Recommandations

Les tubes des solutions "A" et "B" doivent être stockés à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité; la décongélation et recongélation des solutions n'altère pas la qualité des produits.

Les chromosomes soumis au traitement de synchronisation peuvent avoir besoin d'un temps plus long de trypsinisation afin d'obtenir les bandes GTG ou RHG.

SYNCHROSET: ARBEITSANLEITUNG

Die "Synchroset" Reagenzien können mit jedem Standardprotokoll für Lymphozytenkulturen verwendet werden. Dennoch werden bessere Ergebnisse erzielt wenn sie in Kombination mit den "Chromosome Kit" Proberöhrchen von EUROCLONE verwendet werden. Diese Arbeitsanleitung ist speziell für die Verwendung mit dem "Chromosome Kit" erstellt worden, kann aber auch für jedes andere Verfahren verwendet werden.

Lymphozyten Kulturen:

1. Pipettieren Sie 0,5 ml Vollblut steril in das Kulturröhrchen. Kulturröhrchen verschließen und mischen.
2. Inkubation bei $37 \pm 2^\circ \text{C}$ (CO_2 Atmosphäre wird nicht benötigt)
3. Nach 48 - 56 Stunden, Zugabe von 0,1 ml der Lösung "A"; Inkubation über Nacht
4. Am nächsten Morgen Zugabe von 0,1 ml der Lösung "B" und weitere Inkubation für 5 Stunden (die Zellen müssen nicht gewaschen werden)
5. Zugabe von 1 - 2 Tropfen Colchicin und Inkubation für weitere 90 Minuten *

* Sollte diese Inkubationszeit mit der Synchronisation der Zellen in einer späten Phase der Mitose (späte Metaphase und/oder Anaphase) enden, empfehlen wir die Inkubationszeit auf 30, 45 oder 60 Minuten zu verkürzen, um den optimalen Zeitpunkt für den Erhalt von Chromosomen in der Pro-Metaphase zu bestimmen.

PRÄPARATION DER OBJEKTTRÄGER

Die Objektträger zur Chromosomenanalyse können nun nach der „Chromosome Kit“ Arbeitsanleitung hergestellt werden.

Empfehlungen

Nicht verwendete Aliquote der Lösungen "A" und "B" müssen bei -18°C im Dunkeln gelagert werden; wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Reagenzien hat keinen Einfluß auf deren Funktionalität.

Chromosomen, die mit diesem Synchronisationsprotokoll behandelt wurden, können längere Trypsinisierungszeiten benötigen, um eine geeignete GTG oder RHG Bänderung zu erhalten.

SYNCHROSET: PROTOCOLO DE USO

Synchroset ofrece resultados óptimos con cualquiera de los protocolos habitualmente utilizados para cultivos de linfocitos; además estos resultados mejoran cuando se utilizan en combinación con los "Kits de Cromosomas" de Euroclone.

Estas instrucciones están específicamente diseñadas para los "Kit de Cromosomas", si bien pueden aplicarse sobre diferentes técnicas.

Cultivo de Linfocitos.

1. En condiciones de esterilidad, añadir 0.5 ml de sangre al tubo; apretar la tapa y mezclar.
2. Incubar a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ (No requiere CO_2)
3. Tras 48-56 horas, añadir 0,1 ml de Solución "A"; Incubar de 12 a 16 horas.
4. Añadir 0,1 ml de Solución "B" e incubar más de 5 horas (No es necesario lavar las células).
5. Añadir 1-2 gotas de colchicina e incubar 90 minutos*.

* Si en este tiempo de incubación se produce la sincronización del cultivo en la última fase de la mitosis (metafase tardía 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.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las preparaciones en porta para la observación de cromosomas se pueden preparar de manera adecuada siguiendo el "protocolo rápido" del Kit de Cromosoma.

Recomendaciones.

Las alícuotas no utilizadas de las soluciones "A" y "B" deben conservarse a -18°C , en oscuridad; la congelación y descongelación no altera la funcionalidad de estos reactivos.

Los cromosomas que se obtienen a partir de bajos niveles de sincronización pueden necesitar un periodo de tripsinización más largo para generar un bandeo GTG o HRG adecuado.

SYNCHROSET: PROTOCOLLO D'USO

Per ottenere preparati cromosomici caratterizzati da un alto numero di metafasi di eccezionale qualità, nell'ambito della normale routine, è consigliabile abbinare al Chromosome Kit P e/o M, il Synchroset.

Con le due soluzioni, "A" e "B", fornite all'interno del Kit e grazie ad un protocollo estremamente semplice, è possibile sincronizzare il ciclo cellulare sia di cellule linfocitarie sia di cellule midollari.

Il Synchroset può essere inoltre utilizzato per produrre un elevato numero di prometafasi con cromosomi adatti alle tecniche di bandeggio ad alta risoluzione. Con tali preparazioni, le singole bande, rivelate dai metodi standard, possono essere ulteriormente suddivise in sottobande fino a un numero di 850- 1000 per set aploide.

Questo metodo è utile per una identificazione più precisa dei punti di rottura e delle piccole aberrazioni come le microdelezioni, causa spesso di gravi patologie plurimalformative.

Stabilità del prodotto

Il Synchroset è costituito da 4 vials da 1,5 ml di Soluzione "A" e 4 vials da 1,5 ml di Soluzione "B". Le Soluzioni "A" e "B" si conservano a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.

Ripetuti scongelamenti non ne alterano la funzionalità.

I test effettuati hanno dimostrato che il prodotto, opportunamente conservato, risulta stabile per almeno sei mesi dalla data di produzione.

Utilizzo del Synchroset nelle colture di linfociti

1. Dopo 48-56 ore di coltura dei linfociti (la sera, prima di lasciare il laboratorio), dispensare 0,1 ml di Soluzione "A" e quindi incubare "overnight";
2. La mattina seguente, aggiungere alla coltura 0,1 ml di Soluzione "B" e riporre in termostato per 5 ore (non occorre lavare le cellule);
3. Aggiungere quindi una o due gocce di Colcemid e mantenere le provette in termostato per circa 60 minuti.
Quest'ultimo periodo di incubazione può essere ridotto fino a 15 minuti se si vuole ottenere un maggior numero di prometafasi.
4. Si procede quindi alla preparazione cromosomica secondo il protocollo

Utilizzo del Synchroset nelle colture da midollo osseo

1. La sera stessa del prelievo di midollo osseo (o la sera successiva) dispensare 0,1 ml di Soluzione "A" e quindi incubare "overnight";
2. La mattina seguente, aggiungere alla coltura 0,1 ml di Soluzione "B" e riporre in termostato per ulteriori 6-8 ore (non occorre lavare le cellule);
3. Aggiungere quindi una o due gocce di Colcemid durante l'ultima ora di incubazione;
4. Si procede quindi alla preparazione cromosomica secondo il protocollo

N.B.: I preparati cromosomici, dopo sincronizzazione cellulare, richiedono tempi di trattamento con tripsina più lunghi per ottenere un adeguato bandeggio GTG o RHG.

SYNCHROSET: INSTRUÇÕES PARA UTILIZAÇÃO

Os reagentes "Synchroset" têm um excelente desempenho com qualquer protocolo de cultura de linfócitos utilizado em laboratório; no entanto devem esperar-se melhores resultados quando estes são utilizados em conjunto com o produto da Euroclone "Chromosome Kit".

Estas instruções de cultura são desenhadas especificamente para o "Chromosome kit", mas também se podem aplicar a protocolos diferentes.

Cultura de linfócitos

1. Em condições de assepsia adicionar 0.5 ml de sangue total ao tubo; fechar bem a tampa e misturar
2. Incubar horizontalmente a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ (não é necessário CO_2)
3. Após 48 - 56 horas, adicionar 0,1 ml de Solution "A"; incubar de um dia para o outro ("overnight")
- 4) Na manhã seguinte, adicionar 0,1 ml de Solution "B" e incubar durante mais cinco horas (não é necessário lavar as células)
- 5) Adicionar 1 - 2 gotas de Colchicina e incubar durante 90 minutos*

* Caso este tempo de incubação resultar numa sincronização do ciclo celular numa fase tardia da mitose (metafase tardia e/ou anafase), recomenda-se então a diminuição do tempo de incubação para 30, 45 ou 60 minutos com vista a determinar o período óptimo de tempo para a obtenção de cromossomas pró-metafásicos.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

AS lâminas para a observação dos cromossomas podem agora ser preparadas convenientemente seguindo o protocolo rápido ("fast protocol") do Chromosome kit.

Recomendações

As alíquotas não utilizadas das Solutions "A" e "B" deverão ser armazenadas a $\leq -18^\circ \text{C}$, à escuras; o congelamento e descongelamento repetido, não irá alterar o desempenho destes reagentes.

Os cromossomas que tenham sofrido sincronização poderão necessitar tempos de digestão com tripsina mais longos de modo a obter bandeamentos GTG ou RHG adequados.

SYNCHROSET

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Τα αντιδραστήρια «Synchroset» μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία με οποιοδήποτε πρωτόκολλο καλλιέργειας λεμφοκυττάρων. Βέβαια αναμένονται καλύτερα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα "Chromosome Kit" της Euroclone. Οι οδηγίες αυτές σχεδιάστηκαν ειδικά για το "Chromosome Kit" αλλά μπορούν να εφαρμοστούν και με διαφορετικά πρωτόκολλα.

Καλλιέργεια λεμφοκυττάρων

- 1) Προσθέστε 0,5 ml ολικού αίματος στο σωλήνα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Κλείστε καλά το καπάκι και ανακατέψτε.
- 2) Επώαση στους $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ για 72 ώρες (περιβάλλον CO_2 δεν είναι απαραίτητο).
- 3) Μετά από 48-56 ώρες προσθέστε 0,1 ml Διάλυμα "Α" και επώατε όλη τη νύχτα.
- 4) Το επόμενο πρωί απλά προσθέστε 0,1 ml Διάλυμα "Β" και επώατε για άλλες 5 ώρες (δεν είναι απαραίτητο να ξεπλυθούν τα κύτταρα).
- 5) Προσθέστε 1-2 σταγόνες κολχικίνης και επώατε για 90 λεπτά*

* αν ο συγκεκριμένος χρόνος επώασης έχει σαν αποτέλεσμα τον συγχρονισμό του κυτταρικού κύκλου σε μια προς το τέλος φάση της μίτωσης (τέλος μετάφασης και / ή ανάφαση) τότε συστήνουμε την μείωση του χρόνου επώασης στα 30, 45 ή 60 λεπτά για



Euroclone S.p.A. - Life Sciences Division
Via Lombardia, 12 - 27010 Siziano (PV) Italy
Customer Service: info@euroclone.net
Technical Service e-mail:cytogenetics@euroclone.net
Tel. +39.02.38195378
Fax : +39.02.38195248

www.euroclone.net