IrvineScientific

CHANG Marrow Bone Marrow Culture Medium

with Gentamicin

Catalog No. 91031 **100mL,500mL**

For *in vitro* diagnostic use.
Zur *In-vitro*-Diagnostik.
Solo per uso diagnostico *in vitro*.
Para uso diagnóstico *in vitro*.
Pour diagnostics *in vitro*.
Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
Για in vitro διαγνωστική χρήση.
Pro diagnostické použití in vitro.
Til in vitro-diagnostik.
In vitro -diagnostikkaan.
Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
Siltsuiteid voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
Do diagnostyki *in vitro*.
Pentru uz diagnostic *in vitro*.
För *in vitro*-diagnostik.
In vitro diagnostiliseks kasutamiseks.
In vitro diagnosztikai alkalmazáshoz.
Skirta *in vitro* diagnostikai.
In vitro diagnostik kullanım için.
Na diagnostické použitie *in vitro*.
За *in vitro* диагностична употреба.
Za uporabo u *in vitro* diagnostici.
Ghal użu dijanjostiku *in vitro*.
Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Glossary of Symbols*:

REF — Catalog Number
LOT — Lot Number
STERILE A — Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)
Expiration: Year - Month - Day
Caution, consult accompanying documents
Consult instructions for use
-10°C — Storage Temperature store below -10°C
2 STERILIZE — Do not resterilize
Do not use if package is damaged
Manufacturer
CE — CE Mark
EC REP — Emergo Europe - Westervoortsedijk 60 6827 AT Arnhem The Netherlands

*Symbol Reference - EN ISO 15223-1, Medical devices – Symbols to be used with medical device labels, labeling.

ENGLISH

INDICATION FOR USE

CHANG Marrow is intended for use in primary culture of clinical Human Bone Marrow Cultures for karyotyping and other genetic testing of various hematological disorders.

DEVICE DESCRIPTION

CHANG Marrow is a ready-to-use medium consisting of IMDM, with FBS, HEPES buffer, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, Recombinant Human GM-CSF and Gentamicin Sulfate. CHANG Marrow has been optimized to support efficient growth of bone marrow cells for cytogenetic analysis. No addition of any components prior to culturing bone marrow is required. CHANG Marrow contains Gentamicin Sulfate (50 mg/L). Additional antibiotics may be added if desired.

COMPONENTS

Amino Acids	Proteins, Hormones, and Growth Factors	Energy Substrates
Alanine	Fetal bovine serum (FBS)	Glucose
Arginine	hrGM-CSF	Pyruvate
Asparagine		Inositol
Aspartic Acid		
Cystine		Antibiotic
Glutamic Acid		Gentamicin Sulfate
Glutamine		
Glycine	Salts & Ions	Other
Histidine	Sodium chloride	Biotin
Isoleucine	Sodium selenite	Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM)
Leucine	Calcium chloride	
Lysine	Choline chloride	
Methionine	Potassium chloride	
Phenylalanine	Potassium nitrate	Vitamins and trace elements
Proline	Magnesium sulfate	Folic acid
Serine	Sodium phosphate	Nicotinamide
Threonine		Riboflavin
Tryptophan	Buffers	Thiamine
Tyrosine	Sodium bicarbonate	Pantothenic acid
Valine	HEPES	Cobalamin
		Pyridoxine
		Water
		WFI Quality

QUALITY ASSURANCE

Several factors including source of specimens, culture conditions and selection of reagents can influence the result obtained. Users are advised to run each new batch of reagent in parallel with reference material of known suitable activity before adoption in routine use. Each lot of CHANG Marrow has been performance tested on Clinical Bone Marrow Cultures at an independent Clinical Cytogenetics Laboratory compared to a control medium. Results are reported on a lot specific Certificate of Analysis.

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Plastic Sterile Centrifuge Tubes and Culture Flasks
2. CO_2 Incubator at 37°C
3. Bench Centrifuge
4. Vortex Mixer
5. Colcemid Stock Solution, 10 µg/mL
6. Potassium Chloride Solution, 0.075 M
7. Fixative Solution, Methanol:Acetic Acid (3:1)

PREPARATION FOR USE

Thaw overnight in the refrigerator (2 - 8°C), then gently mix to ensure homogeneity. Aseptically dispense 10 mL of medium into sterile culture flasks and equilibrate to 37°C for immediate use.

DIRECTIONS FOR USE

I. Sample Preparation:
Use 0.5 to 1.0 mL of sodium heparinized bone marrow aspirate. Lithium heparin, EDTA, or citrate anticoagulants are unsuitable for cytogenetic studies.

- If more than 5 mL of bone marrow aspirate is received, the sample may be hemodilute. Spin the specimen down at 1,200 rpm for 8 minutes to isolate the bone marrow fraction.
- If the specimen arrives in transport medium, spin the sample down at 1,200 rpm for 8 minutes and remove the transport medium (supernatant). Inoculate using the remaining spun-down fraction in the bottom of the tube.

For additional details on the use of these products, each laboratory should consult its own laboratory procedures and protocols which have been specifically developed and optimized for your individual medical program.

II. Bone Marrow Culture:
Label all culture vessels with patient name, specimen number, and culture type.

1. Before inoculation of specimen bring CHANG Marrow to ambient temperature.
2. Inoculate each culture with the appropriate amount of sample to achieve an optimal concentration of $1x10^6$ cells/mL or 10×10^6 cells per 10 mL culture.
3. Each individual laboratory should determine the number of cultures to set up depending on the clinical indication of the patient. Additional growth factors may be added if desired.
4. Incubate cultures at 35 - 39°C, 5–8% CO_2 atmosphere until ready for harvest.

Harvesting the Cultures:

1. Remove the culture ready for harvest from the incubator and gently swirl flask to re-suspend cells.
2. Transfer the contents of each flask to a 15 mL centrifuge tube.
3. Add 40 µL of stock Colcemid (10µg/mL) to each culture tube. Tightly cap tubes and mix gently by inverting.
4. Incubate tubes at 35-39°C, for 45 minutes.
5. After incubation, centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm.
6. Carefully aspirate supernatant from each tube using a vacuum aspirator, with solvent trap. Be careful to not aspirate pellet.
7. Resuspend cell pellet by tapping bottom or side of each tube with finger.
8. Initiate a 20 minute timer.
9. Add 3 - 4 mL dropwise, of prewarmed (35 - 37°C) hypotonic solution (0.075M Potassium Chloride).
10. Tightly cap tube and mix gently by tapping bottom or side of the tube with finger.
11. Add 5 - 6 mL dropwise, of prewarmed (35 - 37°C) hypotonic solution. Tightly cap tube and invert tube.
12. Repeat Steps 9 - 11 for each tube.
13. Using a water bath, allow tubes to stand at 35 - 37°C. Invert tubes once at midpoint of 20 minute timer.
14. At the end of the 20 minute timer, remove tubes from water bath and add 1 mL of fresh 3:1 Carnoy's Fixative to each tube. Tightly cap and invert each tube. (This is the Pre-Fixative step)
15. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm.
16. Aspirate supernatant from each tube, leaving about 1 mL above the cell pellet. Carefully to not aspirate cell pellet. Resuspend cell pellet.
17. Add fix, up to 7 mL. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm. (Second fixative step).
18. Repeat steps 22 - 23. (Third fixative step).
19. At this point, fixed cells pellets can be used immediately for slide preparation according to the laboratory standard protocol or stored in the refrigerator (2 -8°C) or freezer for future use.

STORAGE AND STABILITY
CHANG Marrow should be stored frozen below –10°C until ready to use. CHANG Marrow is stable until the expiration date shown on the bottle label when stored frozen. After thawing, any unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen for later use, or tightly capped and stored at 2 - 8°C for up to 30 days. Protect from fluorescent light.

PRECAUTIONS AND WARNINGS
This device is intended to be used by staff trained in procedures that include the indicated application for which the device is intended.

CHANG Marrow contains FBS and GCT conditioned medium and should be handled with universal laboratory precautions. The medium contains an antibiotic (gentamicin sulfate) to reduce the potential of bacterial contamination, but aseptic techniques should always be used when dispensing the medium. Do not use any medium that is not red in color.

DEUTSCH

INDIKATIONEN

Das CHANG Marrow ist für die Verwendung in der Primärkultivierung klinischer humaner Knochenmarkkulturen für die Karyotypisierung und andere Gentests auf verschiedene hämatologische Erkrankungen vorgesehen.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das CHANG Marrow ist ein gebrauchsfertiges Medium, bestehend aus IMDM mit FBS, HEPES-Puffer, L-Glutamin, konditioniertem Riesenzelltumormedium (GCT), rekombinantem Human-GM-CSF und Gentamicinsulfat. Das CHANG Marrow ist für effizientes Wachstum von Knochenmarkzellen für die zytogenetische Analyse optimiert. Für die Kultivierung des Knochenmarks ist keine vorherige Zugabe zusätzlicher Stoffe erforderlich. CHANG Marrow enthält Gentamicinsulfat (50 mg/l). Bei Bedarf können zusätzliche Antibiotika hinzugefügt werden.

INHALTSSTOFFE

Aminosäuren	Proteine, Hormone und Wachstumsfaktoren	Antibiotikum
Alanin	Fetales Kälberserum (FBS)	Gentamicinsulfat
Arginin	hrGM-CSF	
Asparagin		Andere
Asparaginsäure	Salze und Ionen	Biotin
Cystin	Natriumchlorid	Riesenzelltumor-konditioniertes Medium (GCT-CM)
Glutaminsäure	Natriumselenit	
Glutamin	Natriumnitrat	
Glycin	Natriumsulfat	Vitamine und Spurenelemente
Histidin	Natriumsulfat	
Isoleucin	Kaliumchlorid	Folsäure
Leucin	Kaliumnitrat	Nicotinamid
Lysin	Kaliumsulfat	Riboflavin
Methionin	Magnesiumsulfat	Thiamin
Phenylalanin	Natriumhydrogenphosphat	Pantothensäure
Prolin		Cobalamin
Serin	Puffer	Pyridoxin
Threonin	Natriumbicarbonat	
Tryptophan	HEPES	
Tyrosin		Wasser
Valin		Wasser für Injektionszwecke (WFI)
	Energiesubstrate	
	Glukose	
	Pyruvat	
	Inositol	

QUALITÄTSSICHERUNG

Das resultierende Ergebnis kann durch mehrere Faktoren wie unter anderem durch Probenherkunft, Kulturbedingungen und Auswahl der Reagenzien beeinflusst werden. Es wird empfohlen, jede neue Reagenzcharge vor dem Einsatz im Routinebetrieb parallel mit Referenzmaterial bekannter geeigneter Aktivität zu analysieren. Die Leistungsdaten jeder Charge CHANG Marrow wurden mittels klinischer Knochenmarkkulturen in einem unabhängigen Labor für klinische Zytogenetik gepruft und einem Kontrollmedium gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind auf einem chargenspezifischen Analysezertifikat angegeben.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)

1. Sterile Zentrifugenröhrchen und Kulturflaschen aus Kunststoff
2. CO_2-Inkubator bei 37 °C
3. Tischzentrifuge
4. Vortexmischer
5. Colcemid-Ansatzlösung, 10 µg/ml
6. Kaliumchloridlösung, 0,075 M
7. Fixierlösung, Methanol: Essigsäure (3:1)

VORBEREITUNG

Über Nacht im Kühlschrank (2–8 °C) auftauen und anschließend zur Gewährleistung von Homogenität behutsam mischen. Unter Anwendung aseptischer Techniken 10 ml Medium in sterile Kulturflaschen geben und zur sofortigen Verwendung auf 37 °C erwärmen.

GEBRAUCHSANWEISUNG

I. Probenvorbereitung:
0,5 bis 1,0 ml natriumheparinisiertes Knochenmarkaspirat verwenden. Lithium-Heparin-, EDTA- oder Citrat-Antikoagulanzien sind für zytogenetische Studien nicht geeignet.

- Wurden mehr als 5 ml Knochenmarkaspirat erhalten, ist die Probe möglicherweise hämodiluiert. Die Probe 8 Minuten bei 1.200 U/min herunterzentrifugieren, um die Knochenmarkfraktion zu isolieren.
- Wenn die Probe in einem Transportmedium geliefert wurde, die Probe 8 Minuten bei 1.200 U/min herunterzentrifugieren und das Transportmedium (Überstand) entfernen. Mit der am Röhrchenboden verbliebenen herunterzentrifugierten Fraktion beimpfen.

Weitere Einzelheiten zum Gebrauch dieser Produkte sind den Verfahren und Vorschriften des jeweiligen Labors zu entnehmen, die eigens für das jeweilige medizinische Programm entwickelt und optimiert wurden.

II. Knochmarkkultur:
Alle Kulturgefäße mit Patientennamen, Probennummer und Kulturtyp beschriften.

1. CHANG Marrow vor der Beimpfung mit Probe auf Umgebungstemperatur bringen.
2. Jede Kultur mit einer geeigneten Probenmenge beimpfen, um eine optimale Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml oder $10x10^6$ Zellen pro 10 ml Kultur zu erhalten.
3. Jedes Labor ist selbst für die Bestimmung der Anzahl der anzusetzenden Kulturen in Abhängigkeit von der klinischen Indikation des Patienten zuständig. Bei Bedarf können zusätzliche Wachstumsfaktoren hinzugefügt werden.
4. Kulturen bis zur Entnahme bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO_2-Atmosphäre inkubieren.

Kulturentnahme:

1. Die zur Entnahme bereite Kultur aus dem Inkubator nehmen und die Flasche zur Resuspendierung der Zellen leicht schwenken.
2. Den Inhalt jeder Flasche in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.
3. In jedes Kulturröhrchen 40 µl Colcemid (10 µg/ml) geben. Die Röhrchen fest verschließen und durch Umdrehen behutsam mischen.
4. Die Röhrchen 45 Minuten lang bei 35–39 °C inkubieren.
5. Die Röhrchen im Anschluss an die Inkubation 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
6. Anhand eines Absauggeräts mit Lösemittelfalle vorsichtig den Überstand von jedem Röhrchen absaugen. Darauf achten, dass kein Pellet abgesaugt wird.
7. Den Boden oder die Seite jedes Röhrchens mit dem Finger antippen, um Zellpellet zu resuspendieren.
8. Einen 20-Minuten-Zeitgeber starten.
9. Tropfenweise 3–4 ml vorgewärmter (35–37 °C) hyptononer Lösung (0,075 M Kaliumchlorid) zugeben.
10. Das Röhrchen fest verschließen und zum behutsamen Mischen mit dem Finger am Boden oder an der Seite antippen.
11. Tropfenweise 5–6 ml vorgewärmter (35–37 °C) hyptononer Lösung zugeben. Das Röhrchen fest verschließen und umdrehen.
12. Die Schritte 9–11 für jedes Röhrchen wiederholen.
13. Die Röhrchen in einem Wasserbad bei 35–37 °C stehen lassen. Nach Ablauf der Hälfte des 20-Minuten-Zeitgebers die Röhrchen einmal umdrehen.
14. Nach Ablauf des 20-Minuten-Zeitgebers die Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen und jedem Röhrchen 1 ml frisches 3:1-Carnoy-Fixiermittel zusetzen. Jedes Röhrchen fest verschließen und umdrehen. (Dies ist der Schritt zur Vorbereitung der Fixierung.)
15. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
16. So viel Überstand von jedem Röhrchen absaugen, dass oberhalb des Zellpellets 1 ml zurückbleibt. Darauf achten, dass kein Pellet abgesaugt wird. Auf Fasermaterial achten, das möglicherweise nach der Zentrifugation vom Zellpellet in den Überstand hinaufragt. Die letzten Milliliter Überstand müssen eventuell von Hand mit einer Pasteurpipette entfernt werden (ohne Vakuumaspiration), um zu verhindern, dass das ganze Zellpellet in den Abfallbehälter gesaugt wird.
17. Das Zellpellet wie in Schritt 7 beschrieben resuspendieren.
18. Tropfenweise 3–4 ml frisches 3:1-Carnoy-Fixiermittel zugeben.
19. Restliches Fixiermittel auf bis zu 7 ml zugeben.
20. Die Schritte 16–19 für jedes Röhrchen wiederholen.
21. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen. (Dies ist der erste Fixierungsschritt.)
22. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
23. So viel Überstand absaugen, dass etwa 1,0 ml über dem Pellet verbleibt. Das Zellpellet resuspendieren.
24. Fixiermittel auf 7 ml zugeben. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren. (Dies ist der zweite Fixierungsschritt.)
25. Schritte 22–23 wiederholen. (Dies ist der dritte Fixierungsschritt.)
26. An diesem Punkt können fixierte Zellpellets sofort für die Objektträgerpräparation gemäß dem Standardprotokoll des Labors verwendet oder zur späteren Verwendung im Kühlschrank (2–8 °C) oder Gefrierschrank aufbewahrt werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT
Das CHANG Marrow sollte bis zur Verwendung unter -10 °C tiefgekühlt gelagert werden. Bei Tiefkühllagerung ist das CHANG Marrow bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Auftauen kann jegliches unbenutzte Produkt in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren oder fest verschlossen und bei 2–8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden. Keinem Fluoreszenzlicht aussetzen.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE
Das Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in Verfahren geschult ist, die den für das Produkt vorgesehenen Anwendungsbereich umfassen.

Das CHANG Marrow enthält FBS- und GCT-konditioniertes Medium und muss unter Einhaltung der in Laboren universell geltenden Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Das Medium enthält ein Antibiotikum (Gentamicinsulfat), um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu verringern. Bei der Abgabe des Mediums sollten jedoch immer aseptische Techniken angewendet werden. Keine Medien verwenden, die nicht rot sind.

ITALIANO

INDICAZIONI PER L'USO

CHANG Marrow è indicato per l'uso in colture primarie di cellule di midollo osseo umano di classe clinica per la determinazione del cariotipo e altri test genetici relativi a vari disturbi ematologici.

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

CHANG Marrow è un terreno pronto all'uso composto da IMDM (terreno Iscove modificato Dulbecco), con l'aggiunta di siero bovino fetale, tampone HEPES, L-glutammina, terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT), fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagiche (GM-CSF) ricombinante umano e gentamicina solfato. CHANG Marrow è stato ottimizzato per favorire un'efficace crescita di cellule di midollo osseo per l'analisi citogenica. Non è necessario aggiungere alcun altro componente prima di avviare la coltura delle cellule di midollo osseo. CHANG Marrow contiene gentamicina solfato (50 mg/l). È possibile aggiungere ulteriori antibiotici, se lo si ritiene necessario.

COMPONENTI

Aminoacidi	Proteine, ormoni e fattori di crescita	Antibiotico
Alanina	Siero bovino fetale (FBS)	Gentamicina solfato
Arginina	GM-CSF umano ricombinato	
Asparagina		Altro
Acido aspartico		Biotina
Cistina		Terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT-CM)
Acido glutammico	Sali e ioni	
Glutamina	Cloruro di sodio	
Glicina	Selenito di sodio	
Istidina	Cloruro di calcio	
Isoleucina	Cloruro di colina	
Leucina	Cloruro di potassio	Vitamine ed elementi in tracce
Lisina	Nitrato di potassio	Acido folico
Metionina	Solfato	Nicotinamide
Fenilalanina	Solfato di magnesio	Riboflavina
Prolina	Fosfato di sodio	Tiamina
Serina		Acido pantotenico
Treonina	Tamponi	Cobalamina
Triptofano	Bicarbonato di sodio	Piridossina
Tirosina	HEPES	
Valina		Acqua
		Qualità WFI (acqua per iniezioni)
	Substrati energetici	
	Glucoso	
	Piruvato	
	Inositolo	

GARANZIA DI QUALITÀ

Diversi fattori, tra cui l'origine dei campioni, le condizioni di coltura e la scelta dei reagenti, possono influenzare il risultato ottenuto. Quando si introduce un nuovo lotto di reagenti, prima di adottarlo nell'uso di routine, è consigliabile usarlo in parallelo a materiale di riferimento avente idonea attività nota. Ogni lotto di CHANG Marrow è stato valutato ai fini delle prestazioni su colture di midollo osseo di classe clinica presso un laboratorio di citogenetica clinica indipendente in confrontandolo con terreno di controllo. I risultati sono riportati nel Certificato di analisi specifico di ogni lotto.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Provette di plastica sterili per centrifuga e fiasche per coltura
2. Incubatore con CO_2 a 37 °C
3. Centrifuga da banco
4. Miscelatore Vortex
5. Soluzione stock di Colcemid, 10 µg/ml
6. Soluzione di cloruro di potassio, 0,075 M
7. Soluzione fissativa: metanolo:acido acetico (3:1)

PREPARAZIONE PER L'USO

Scongelare il terreno per una notte in frigorifero (2-8 °C) e poi miscelarlo delicatamente per renderlo omogeneo. Dispensarne in condizioni di sterilità 10 ml in fiasche per coltura sterili e portare a 37 °C per l'uso immediato.

ISTRUZIONI PER L'USO

I. Preparazione del campione
Usare da 0,5 a 1,0 ml di aspirato midollare in eparina sodica. La litio eparina, l'EDTA o gli anticoagulanti con citrato non sono indicati per studi citogenetici.

- Qualora si utilizzino più di 5 ml di aspirato midollare, il campione può essere emodiluito. Centrifugare il campione a 1.200 giri/min per 8 minuti per isolare la frazione di midollo osseo.
- Se il campione arriva in un terreno di trasporto, centrifugarlo a 1.200 giri/min per 8 minuti per farlo depositare e rimuovere il terreno di trasporto (sumatante). Inoculare usando la frazione depositata restante sul fondo della provetta.

Per ulteriori dettagli sull'uso di questi prodotti, il laboratorio deve consultare le procedure e i protocolli specificamente sviluppati e ottimizzati per il proprio programma medico.

II. Coltura di midollo osseo
Etichettare tutti i contenitori colturali con il nome del paziente, il numero del campione e il tipo di coltura.

1. Prima di inoculare il campione, portare CHANG Marrow a temperatura ambiente.
2. Inoculare ogni coltura con la quantità di campione appropriata a ottenere la concentrazione ottimale di 1×10^6 cellule/ml o 10×10^6 cellule per 10 ml di coltura.
3. Ogni laboratorio dovrà determinare il numero di colture da predisporre, in funzione delle indicazioni cliniche del paziente. È possibile aggiungere ulteriori fattori di crescita, se lo si ritiene necessario.
4. Incubare le colture a 35-39 °C, in atmosfera al 5-8% di CO_2, finché non sono pronte per la raccolta.

Raccolta delle colture

1. Rimuovere dall'incubatore la coltura pronta per la raccolta e fare roteare delicatamente il contenuto della fiasca per risospendere le cellule.
2. Trasferire il contenuto di ogni fiasca in una provetta per centrifuga da 15 ml.
3. Aggiungere 40 µl di Colcemid soluzione stock (10 µg/ml) a ogni provetta contenente la coltura. Chiudere bene le provette e miscelare capovolgendole.
4. Incubare le provette a 35-39 °C per 45 minuti.
5. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
6. Aspirare con attenzione il surnatante da ogni provetta mediante una pompa a vuoto, con un filtro per il solvente. Prestare attenzione a non aspirare il pellet.
7. Risospendere il pellet cellulare battendo con il dito sul fondo o sul lato di ogni provetta.
8. Avviare un intervallo di 20 minuti su un cronometro.
9. Aggiungere, goccia a goccia, 3-4 ml di soluzione ipotonica (cloruro di potassio 0,075 M) preriscaldata (35-37 °C).
10. Chiudere bene la provetta e agitare delicatamente battendo con il dito sul fondo o sul lato della stessa.
11. Aggiungere, goccia a goccia, 5-6 ml di soluzione ipotonica preriscaldata (35-37 °C). Chiudere bene la provetta e capovolgerla.
12. Ripetere i passaggi 9-11 per ogni provetta.
13. Lasciare le provette in un bagno d'acqua a 35-37 °C. Capovolgerle a metà dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro.
14. Alla fine dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro, estrarle dal bagno d'acqua e aggiungere 20 ml di fissativo di Carnoy 3:1 appena preparato a ciascuna provetta. Chiudere bene la provetta e capovolgerla. (Questo è il passaggio preliminare dell'uso del fissativo.)
15. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
16. Aspirare il supernatante da ciascuna provetta, lasciando circa 1 ml sopra il pellet cellulare. Fare attenzione sia a non aspirare il pellet che al materiale fibroso che potrebbe estendersi dal pellet nel surnatante dopo la centrifugazione. Potrebbe essere necessario rimuovere gli ultimi ml di surnatante mediante una pipetta Pasteur (non usare la pompa a vuoto) per evitare di aspirare tutto il pellet nel contenitore di scarto.
17. Risospendere il pellet cellulare come descritto al punto 7.
18. Aggiungere, goccia a goccia, 3-4 ml di fissativo di Carnoy 3:1 appena preparato.
19. Aggiungere il fissativo rimanente sino a raggiungere il volume di 7 ml nella provetta.
20. Ripetere i passaggi 16-19 per ogni provetta.
21. Lasciare riposare per 10 minuti a temperatura ambiente (questo è il primo passaggio dell'uso del fissativo).
22. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
23. Aspirare il supernatante lasciando circa 1 ml sopra il pellet. Risospendere il pellet.
24. Aggiungere il fissativo sino a 7 ml. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min (secondo passaggio dell'uso del fissativo).
25. Ripetere i passaggi 22-23 (terzo passaggio dell'uso del fissativo).
26. A questo punto, i pellet cellulari fissati possono essere adoperati immediatamente per preparare il vetrino secondo il protocollo standard del laboratorio oppure conservati in frigorifero a 2-8 °C o nel congelatore per essere utilizzati successivamente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ
CHANG Marrow deve essere conservato congelato a temperatura inferiore a -10 °C fino al momento dell'uso. Se conservato congelato, è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone. Dopo lo scongelamento, il prodotto non utilizzato può essere dispensato in aliquote idonee all'utilizzo e ricongelato per utilizzarlo successivamente, oppure chiuso bene e conservato a 2-8 °C fino a 30 giorni. Proteggere da luce fluorescente.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE
Questo prodotto è destinato all'uso da parte di personale addestrato nelle procedure che comprendono l'applicazione prevista del prodotto stesso.

CHANG Marrow contiene terreno condizionato da GCT e siero bovino fetale e deve essere maneggiato secondo le normali precauzioni di laboratorio. Il terreno contiene un antibiotico (gentamicina solfato) per ridurre la potenziale contaminazione da batteri, tuttavia è necessario usare sempre tecniche in asepsi mentre si dispensa il terreno. Non utilizzare il terreno qualora non si presenti di colore rosso.

ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

El CHANG Marrow está diseñado para utilizarse en cultivos clínicos de médula ósea humana para cariotipado y otras pruebas genéticas de diversos trastornos hematológicos.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Marrow es un medio listo para usar que se compone del IMDM con FBS, tampón HEPES, L-glutamina, medio acondicionado con tumor de células gigantes (GCT), GM-CSF humano recombinante y sulfato de gentamicina. El CHANG Marrow se ha optimizado para fomentar un crecimiento eficiente de las células de la médula ósea sometidas a análisis citogenético. No es necesario añadir ningún componente antes de cultivar la médula ósea. El CHANG Marrow contiene sulfato de gentamicina (50 mg/l). Se pueden añadir antibióticos si se desea.

COMPONENTES

Aminoácidos	Proteínas, hormonas y factores de crecimiento	Antibiótico
Alanina	Suero bovino fetal (FBS)	Sulfato de gentamicina
Arginina	hrGM-CSF	
Asparagina		Otros
Ácido aspártico	Sales e iones	Biotina
Cistina	Cloruro sódico	Medio acondicionado con tumor de células gigantes (GCT-CM)
Ácido glutámico	Selenito sódico	
Glutamina	Cloruro cálcico	
Glicina	Cloruro de colina	Vitaminas, oligoelementos
Histidina	Cloruro potásico	
Isoleucina	Nitrato potásico	Ácido fólico
Leucina	Sulfato magnésico	Nicotinamida
Lisina	Fosfato sódico	Riboflavina
Metionina		Tiamina
Fenilalanina	Sistemas tampón	Pantotenato cálcico
Prolina	Bicarbonato sódico	Cobalamina
Serina	HEPES	Piridoxina
Treonina		
Triptófano		Agua
Tirosina	Energías/substratos	Calidad de agua para inyectables
Valina	Glucosa	
	Piruvato	
	Inositol	

GARANTÍA DE CALIDAD

Diversos factores, entre ellos la fuente de las muestras, las condiciones de cultivo y la selección de los reactivos, pueden influir en el resultado obtenido. Se aconseja a los usuarios que procesen cada nuevo lote de reactivo en paralelo con un material de referencia de actividad idónea y conocida antes de su adopción sistemática. El rendimiento de cada lote del CHANG Marrow se ha analizado frente a un medio de control en cultivos clínicos de médula ósea en un laboratorio de citogenética clínica independiente. Los resultados se notifican en un certificado de análisis específico del lote.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Tubos de centrifuga estériles de plástico y frascos de cultivo
2. Incubadora de CO_2 a 37 °C
3. Centrifuga de mesa
4. Agitador vórtex
5. Solución madre Colcemid, 10 µg/ml
6. Solución de cloruro potásico, 0,075 M
7. Solución fijadora, metanol: ácido acético (3 : 1)

PREPARACIÓN PARA EL USO

Descongelar durante la noche en el frigorífico (2-8 °C) y luego mezclar con suavidad para garantizar su homogeneidad. Dispensar en condiciones asépticas 10 ml del medio en frascos de cultivo estériles y equilibrar a 37 °C para su uso inmediato.

INSTRUCCIONES DE USO

I. Preparación de la muestra:
Utilizar de 0,5 a 1,0 ml de médula ósea aspirada en un tubo de heparina sódica. La heparina de litio, el EDTA y los anticoagulantes de citrato no resultan adecuados para estudios citogenéticos.

- Si se reciben más de 5 ml de aspirado de médula ósea, la muestra podría estar hemodiluida. Centrifugar la muestra a 1200 rpm durante 8 minutos para aislar la fracción de médula ósea.
- Si la muestra llega en un medio de transporte, centrifugarla a 1200 rpm durante 8 minutos y eliminar el medio de transporte (sobrenadante). Inocular la fracción centrifugada que permanece en el fondo del tubo.

Para más detalles sobre la utilización de estos productos, consultar los protocolos y los procedimientos de su propio laboratorio, que se habrán desarrollado y optimizado específicamente de acuerdo con su programa médico particular.

II. Cultivo de médula ósea:
Etiquetar todos los recipientes de cultivo con el nombre del paciente, el número de la muestra y el tipo de cultivo.

1. Antes de inocular la muestra, dejar que el CHANG Marrow alcance la temperatura ambiente.
2. Inocular cada cultivo con la cantidad apropiada de muestra para lograr una concentración óptima de $1x10^6$ células/ml o $10x10^6$ células por cada 10 ml de cultivo.
3. Cada laboratorio determinará el número requerido de cultivos dependiendo de la indicación clínica de paciente. Se pueden añadir otros factores de crecimiento si se desea.
4. Incubar los cultivos a 35-39 °C en una atmósfera con 5-8 % CO_2, dokud nebudou připraveny ke sběru.

Sběr kultur:
1. Vyjměte kulturu připravenou ke sběru z inkubátoru a jemným zakroužením lahví resuspenduje buňky.
2. Přeneste obsah každé lahve do 15ml centrifugační zkumavky.
3. Do každé kultivační zkumavky přidejte 40 µl zásobního roztoku Colcemid (10 µg/ml). Zkumavky těsně zazátkujte a převracením jemně promíchejte.
4. Inkubujte zkumavky 45 minut při teplotě 35–39 °C.
5. Po inkubaci zkumavky odstřeďte po dobu 8 minut na 1 000 ot./min.
6. Opatrně z každé zkumavky aspirujte supernatant; použijte podtlakový aspirátor s odlučovačem rozpouštědla. Dbejte, abyste neaspirovali pellet.
7. Poklepáním na stěnu nebo dno zkumavky prstem buněčný pelet resuspenduje.
8. Spusťte časovač na 20 minut.
9. Po kapkách přidejte 3–4 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného).
10. Zkumavku těsně zazátkujte a poklepáním prstem na stěnu nebo dno jemně promíchejte.
11. Po kapkách přidejte 5–6 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku. Zkumavku těsně zazátkujte a převraťte.
12. Opakujte kroky 9–11 u každé zkumavky.
13. Nechte zkumavky odstát při 35–37 °C ve vodní lázni. V polovině 20 minut měřených časovačem zkumavky jednou převraťte.
14. Až časovač odměří 20 minut, vyjměte zkumavky z vodní lázně a přidejte do každé zkumavky 1 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1). Každou zkumavku těsně zazátkujte a převraťte. (Toto je předfixační krok.)
15. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.
16. Z každé zkumavky aspirujte supernatant; ponechte přitom přibližně 1 ml nad buněčným peletem. Dbejte, abyste neaspirovali pelet. Věnujte pozornost vláknitému materiálu, který po centrifugaci může z peletu zasahovat do supernatantu. Posledních několik ml supernatantu může být nutné odstranit ručně Pasteurovou pipetou (nikoli podtlakovou aspirací), abyste zabránili nasátí celého buněčného peletu do odpadní nádoby.
17. Resuspenduje buněčný pelet podle popisu v kroku 7.
18. Po kapkách přidejte 3–4 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1).
19. Doplňte zbývajícím fixačním roztokem do 7 ml.
20. Opakuje kroky 16–19 u každé zkumavky.
21. Nechte 10 minut odstát při pokojové teplotě. (Toto je první fixační krok.)
22. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.
23. Aspirujte supernatant, ponechte přibližně 1 ml nad buněčným peletem. Resuspenduje buněčný pelet.
24. Doplňte fixačním roztokem do 7 ml. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min. (Druhý fixační krok.)
25. Opakuje kroky 22–23. (Třetí fixační krok.)
26. V této chvíli lze fixované buněčné pelety ihned použít k přípravě sklíček podle standardního protokolu laboratoře nebo uložit do chladničky (2–8 °C) či mrazničky k budoucímu použití.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA
CHANG Marrow je třeba do použití uchovávat zmrazené při teplotě nižší než –10 °C. Pokud je skladováno zmrazené, CHANG Marrow je stabilní do data exspirace uvedeného na štítku lahve. Po rozmrazení lze všechen nespotřebovaný výrobek rozdělit na díly použivatelné při zpracování a znovu zmrazit k pozdějšímu použití nebo pevně uzavřít a skladovat po dobu až 30 dní při teplotě 2–8 °C. Chraňte před fluorescenčním světlem.

**BEZPEČNOS

EESTI KEEL

NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

CHANG Marrow on mõeldud kasutamiseks primaarsetes kliinilistes inimese luuüdi kultuuriks karoütüüpimise ja muude geneetiliste, erinevate hematoloogiliste häirete testimise eesmärgil.

SEADME KIRJELDUS

CHANG Marrow on kasutusvalmis söötme, mis koosneb IMDM-ist koos FBS-iga ja sisaldab TIBPES (GCT) L-glutamiini, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Mediumi, Recombinant Human GM-CSF-i ja gentamitsiinsulfaadi. CHANG Marrow on optimeeritud toetama luuüdi rakkude efektiivset kasvu tsütogeneetilise analüüsi eesmärgil. Enne luuüdi kultuurimist ei ole vaja lisada muid komponente. CHANG Marrow sisaldab gentamitsiinsulfaati (50 mg/l). Vajaduse korral võib lisada antibiootikume.

OSAD

Aminohapped	Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid	Antibiootikum
Alanin	Veiseloote päritolu serum (FBS)	Gentamiitsinsulfaat
Arginiin	hrGM-CSF	Muu
Asparagiin	Soolad ja ioonid	Biotiin
Asparagiinhape	Naatriumkloriid	Hiidrakulise kasvaja põhine söötme (GCT-CM)
Tsüstiin	Naatriumsulfaat	
Glutamiinhape	Kaltsiumkloriid	Vitamiinid ja mikroelemendid
Glütsiin	Kloinkloriid	
Histidiin	Kaaliumnitraat	Foolhape
Isoleutsiin	Magneesiumsulfaat	Nikotiinamiid
Leutsiin	Naatriumfosfaat	Riboflaviin
Lüsiin		Tiamiin
Metoniin	Puhvrid	Pantoteenhape
Fenüülalaniin	Naatrium-vesinikkarbonaat	Kobalamiin
Prolüin		Püridoksiin
Seriin	Pufre	
Treoniin	hydrogenüülitsen sooli	Vesi
Trüptofaan	HEPES	
Türosiin		WFI kvaliteet
Valiin	Energiatõkestajad	
	Glükoos	
	Püruvaat	
	Inositol	

KVALITEETI TAGAMINE

Saavutatavat tulemust võivad mõjutada mitmed tegurid, sh proovide päritolu, kultuurimistingimused ja reaktiivide valik. Kasutajatel soovitatakse igat uut reaktiivipartiid paralleelselt analüüsida teadaolevalt sobiva aktiivsusega võrdlusmaterjaliga, enne kui see võetakse rutiinsisse kasutusse. Iga CHANG Marrow partii jõudlust on testitud kliinilistel luuüdikultuuridel sõltumatus kliinilises tsütogeneetikalaboris ja võrreldud kontrollsöötmega. Tulemused on esitatud partiispetsiifilises analüüsisertifikaadis.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID

1. Plastist steriilsed tsentrifuugikatsutid ja rakukultuuri pudelid
2. CO_2 inkubaator temperatuuril 37 °C
3. Laminaarvool
4. Vortex-mikser
5. Colcemid Stock Solution, 10 µg/ml
6. Potassium Chloride Solution, 0,075 M
7. Fixative Solution, Methanol:Acetic Acid (3 : 1)

ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

Jätke õppevaks külmkuses (2–8 °C) sulama ja segelast segage taaskesi, kuni kõik on ühtlaselt segunenud. Jaotage 10 ml sõödet aseptiliselt steriilsestese kulturi rakupudelitesse ja ekvilibreerige temperatuurini 37 °C, misjärel on sõöde valmis koheseks kasutamiseks.

KASUTUSJUHEND

I. Proovi ettevalmistamine

Kasutage 0,5 kuni 1,0 ml naatriumhepariniseeritud luuidi aspiraati. Tsütogeneetilisteks uuringuteks ei sobi liitumehpariin, EDTA ega tsitraatantikoagulandid.

- Kui võetakse üle 5 ml luuidi aspiraati, võib proov olla hemodilueeritud. Luuüdi fraktsiooni isoleerimiseks tsentrifuugige 1200 p/min 8 minutit.
- Kui proov jõuab transportsidöötmesse, tsentrifuugige proovi 8 minutit 1200 p/min juures ja eemaldage transpordisöödme (supernatant). Inokuleerige ülejäänud tsentrifuugitud fraktsioon katsuti põhjas.

Lisateabe saamiseks nende toodete kasutamise kohta peavad laborid tutvuma oma protseduuride ja protokolliidega, mis on välja töötatud ja optimeeritud spetsiaalselt nende individuaalse meditsiinieprogrammi jaoks.

II. Luuidi kultuur

Sildistage kõik kultuurianumad patsiendi nime, proovi numbri ja kultuuri tüübiga.

1. Enne proovi okuleerimist tehke CHANG Marrow ümbristeva keskkonna temperatuurini.
2. Okuleerige igat kultuuri sobiva proovi kogusega, et saavutada optimaalne kontsentratsioon, milleks on 1 × 10^6 rakku/ml või 10 × 10^6 rakku 10 ml kultuuri kohta.
3. Iga laboratoorium peab kindlaks määrama kultiveeritavate kulturide arvu olenevalt patsiendi kliinilisest näidustusest. Vajaduse korral võib lisada lisakasvufaktoreid.
4. Kultuure inkubeerige kultuure temperatuuril 35–39 °C, 5–8% CO_2 atmosfääris, kuni need on valmis kogumiseks.

Kultuuride kogumine

1. Eemaldage inkubaatorist kogumiseks valmis olev kultuur ja loksutage tasakesi rakupudelit, et rakke uuesti suspendeerida.
2. Viige iga rakupudeli sisu üle 15 ml tsentrifuugikatsutisse.
3. Lisage igasse katseklaasi 40 µl koltsemidi põhilahust (10 µg/ml). Sulegse tihkelt katsutite korgid ja loksutage neid tasakesi korduvalt ümber pöörates.
4. Inkubeerige katsuteid 45 minutit temperatuuril 35–39 °C.
5. Pärast inkubeerimist tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
6. Aspireerige supernatant ettevaatlikult igast katsutist lahusti püüdurga vaakumpipeti abil. Olge ettevaatlik, et mitte rakupelletit aspireerida.
7. Suspendeerige rakupelletit uuesti, koputades sõrmega iga katsuti põhjale või küljele.
8. Käivitage 20-minutiline taimer.
9. Lisage tihkelaval 3–4 ml eelsoojendatud (35–37 °C) hipotoonilist lahust (0,075 M kaaliumkloriid).
10. Sulegse tihkelt katsuti kork ja loksutage seda tasakesi, koputades sõrmega katsuti põhjale või küljele.
11. Lisage tihkelaval 5–6 ml eelsoojendatud (35–37 °C) hipotoonilist lahust. Sulegse tihkelt katsuti kork ja pöörake katsuti ümber.
12. Korrake samme 9–11 iga katsuti puhul.
13. Laske katsutistel 35–37 °C juures veevannis seista. Pöörake katsutid 20-minutilise perioodi keskel üks kord ümber.
14. 20-minutilise perioodi möödudes võtke katsutid veevannist välja ja lisage igasse katsutisse 1 ml värske segu Carnoy's Fixative (metanooli ja äädikhappe segu suhtega 3 : 1). Sulegse tihkelt katsutite korgid ja pöörake need ümber. (Tegemist on eelkinnistava samma.)
15. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
16. Aspireerige supernatant igast katsutist, jättes rakupelletti peale umbes 1 ml. Olge ettevaatlik, et mitte rakupelletit aspireerida. Olge ettevaatlik fibroosse materjaliga, mis võib pärast tsentrifuugimist ulatuda rakupelletist üles supernatandi sisse. Viimased paar ml supernatanti võib olla vajalik eemaldada käsitsi, kasutades Pasteuri pipetti (mitte vaakumpipettimise teel), et vältida kogu rakupelleti aspireerimist jäätmenõusse.
17. Suspendeerige rakupelletit uuesti, nagu on kirjeldatud sammus 7.
18. Lisage tilkhaaval 3-4 ml värsket segu Carnoy's Fixative (metanooli ja äädikhappe segu suhtega 3 : 1).
19. Lisage ülejäänud segu, kuni katsuti täitub tasemeni 7 ml.
20. Korrake samme 16–19 iga katsuti puhul.
21. Laske 10 minutit toatemperatuuril seista. (Tegemist on esimese kinnistava sammuga.)
22. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
23. Aspireerige supernatant, jättes rakupelletti peale umbes 1 ml. Suspendeerige rakupelletit uuesti.
24. Lisage segu, kuni katsuti täitub taasemni 7 ml. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures. (Tegemist on teise kinnistava sammuga.)
25. Korrake samme 22-23. (Tegemist on kolmanda kinnistava sammuga.)

Kultuuride kogumine

1. Kultüür pripravené na zber vyberte z inkubátora a jemne zavirte fľaštičkou, aby sa bunky resuspendovali.
2. Obsah každej fľaštičky preneste do 15 ml skúmavky na odstredovanie.
3. Do každej skúmavky na kultíváciu pridajte 40 µl kmeťového Colcemidu (10 µg/ml). Na skúmavky natesno nasadte vrchnáky a premiešajte prevrátením.
4. Skúmavky inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C 45 minút.
5. Po inkubácii skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.
6. Z každej skúmavky pozorne aspirujte supernatant pomocou vákuového aspirátora s fľašou na zachytávanie rozpúšťadla. Dajte pozor, aby ste neodsali pelety.
7. Bunkovú peletu resuspenzujte poklopkaním prstom na dno alebo bok každej skúmavky.
8. Nastavte časovač na 20 minút.
9. Po kvapkách pridajte 3 – 4 ml zahriatého (35 °C – 37 °C) hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného).
10. Na skúmavky natesno nasadte vrchnáky a zľahka premiešajte poklopkaním prstom na dno alebo bok skúmavky.
11. Po kvapkách pridajte 5 – 6 ml zahriateho (35 °C – 37 °C) hypotonického roztoku. Na skúmavku natesno nasadte vrchnák a prevráťte ju.
12. Kroky 9 – 11 zopakujte pre každú skúmavku.
13. Použite vodný kúpeľ a skúmavky nechajte postáť pri teplote 35 °C – 37 °C. Uprostred 20-minútového časovania skúmavku raz prevráťte.
14. Na konci 20-minútového časovania vyberte skúmavky z vodného kúpeľa a do každej skúmavky pridajte 1 ml čerstvého fixačného roztoku Carnoy 3:1. Natesno nasadte vrchnák a každú skúmavku prevráťte. (Toto je krok pred fixáciou.)
15. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.
16. Z každej skúmavky aspirujte supernatant a ponechajte asi 1 ml nad bunkovou peletou. Dajte pozor, aby ste neodsali pelety. Dávajte pozor na viškrítý materiál, ktorý môže trčať z bunkovej pelety do supernatantu po odstredení. Posledných pár ml supernatantu môže byť potrebné odstrániť ručne Pasteurovou pipetou (bez použitia vákuového odsávania), aby sa odpadovej nádoby neaspirovala celá bunková peleta.
17. Bunkovú peletu resuspendujte tak, ako je popísané v kroku 7.
18. Po kvapkách pridajte 3 – 4 ml čerstvého fixačného roztoku Carnoy 3:1.
19. Pridajte zvyšný fixačný roztok do 7 ml.
20. Kroky 16 – 19 zopakujte pre každú skúmavku.
21. Nechajte postáť 10 minút pri izbovej teplote. (Toto je prvý fixačný krok.)
22. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.
23. Aspirujte supernatant, pričom ponechajte asi 1,0 ml nad peletou. Resuspenzujte bunkovú peletu.
24. Pridajte fixačný roztok do 7 ml. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu. (Druhý fixačný krok.)
25. Zopakujte kroky 22 – 23. (Tretí fixačný krok.)
26. V tomto bode môžu zariadenie bunkové pelety okamžite použiť na prípravu sklíčok podľa štandardného protokolu laboratória alebo uchovať v chladničke (2 °C – 8 °C) alebo mrazničke na budúce použitie.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

CHANG Marrow sa má uchovávať pri teplote pod –10 °C, až kým nebude pripravené na použitie. CHANG Marrow bude stabilné až do dátumu exspirácie vytlačeného na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazené. Po rozmrazení všetok nepoužitý roztok môžu nadávkovať do pracovných alikvót a znovu zmrazit na neskoršie použitie, alebo tesne nasadiť vrchnák a uchovávať pri teplote 2 °C – 8 °C do 30 dní. Chráňte pred fluorescenčným svetlom.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA

Toto zariadenie je určené na použitie personálom vyškolených na procedúry, ktoré zahŕňajú aplikáciu, na ktorú je toto zariadenie určené.

CHANG Marrow obsahuje médium upravené pomocou FBS a GCT a musí sa s ním manipulovať s použitím všeobecných laboratórnych bezpečnostných opatrení. Médium obsahuje antibiotikum (gentamicinsulfát) na zníženie možnosti bakteriálnej kontaminácie, no pri dávkovaní média sa vždy musia použiť aseptické techniky. Nepoužívajte žiadne médium, ktoré nemá červenú farbu.

NEOBHODNÍMI MATERIÁLMI A OBORUDBANE, KOITO NE CA DOSTAVENI

1. Plastmasosan, sterilnim, centrifuoznim epruvetkim in sklaščkom za kulturo
2. CO_2 inkubator 37 °C
3. Asztali centrifuga
4. Vortex keverő
5. Kolcemid törzsoldat, 10 µg/ml
6. Kálium-klorid oldat, 0,075 M
7. Fixálóoldat, metanol:ecetsav (3:1)

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Egy éjszakán át hűtőszekrényben (2–8 °C) kell felolvasztani, majd óvatosan összeforgatni, hogy a homogenitás biztosítása érdekében. Aszeptikusan adagoljon 10 ml médiumot a steril tenyésztőflaskákba, és ekvilibrálja 37 °C-ra az azonnali felhasználáshoz.

MAGYAR

FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A CHANG Marrow klinikai humán csontvelőtenyészetek elsődleges tenyészközeg való alkalmazásra szolgál, kariotípus meghatározásához és más genetikai vizsgálatokhoz különböző hematológiai rendellenességek esetén.

TERMÉKISMERTETÉS

A CHANG Marrow egy azonnal használható médium, amely FBS-t, HEPES-puffert, L-glutamint, óriássejtes tumor (giant cell tumor, GCT) kondicionált médiumot, rekombináns humán GM-CSF-et és gentamicin-szulfátot tartalmazó IMDM-ből áll. A CHANG Marrow médiumot úgy optimalizáltk, hogy támogassa a csontvelősejtek hatékony növekedését a citogenetikai elemzéshez. A csontvelő tenyésztése előtt semmilyen összetevő hozzáadása nem szükséges. A CHANG Marrow gentamicin-szulfátot (50 mg/l) tartalmaz. Szükség esetén további antibiotikumokat is hozzáadhat.

ÖSSZETEVŐK

Aminosavak	Fehérjék, hormonok és növekedési faktorok	Antibiotikum
Alanin		Gentamicin-szulfát
Arginin	Magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS)	Egyéb
Aszparagin		Biotin
Aszparaginsav		Ürdősejtes tumor kondicionált médium (giant cell tumor conditioned medium, GCT-CM)
Cisztin		
Glutaminsav		
Glutamin	hrGM-CSF	
Glicin		
Hisztidin	Sók és ionok	Vitaminok és nyomelemek
Izoleucin	Nátrium-klorid	
Leucin	Nátrium-szelenit	
Lizin	Kálium-klorid	Folsav
Metionin	Kálium-klorid	Nikotinamid
Fenilalanin	Kálium-nitrát	Riboflavin
Prolin	Magnézium-szulfát	Tiamin
Szerin	Nátrium-foszfát	Pantoténsav
Treonin		Kobalamin
Triptofán	Pufferek	Piridoxin
Tirozin	Nátrium-bikarbonát	
Valin	HEPES	
	Energiaszubsztrátok	Víz
	Glükóz	minőségű víz
	Pirovát	
	Inozitol	

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

A kapott eredményt számos tényező befolyásolhatja, beleértve a minták forrását, a tenyészközeg körülményeit és a reagensek kiválasztását. Javasoljuk, hogy a felhasználók minden új reagenstételt ismert, megfelelő aktivitású referenciaanyaggal párhuzamosan futtassanak a rutinszerű használat előtt. A CHANG Marrow minden egyes tételét klinikai csontvelő-tenyészetekben tesztelték egy kontrollmédiumban összehasonlítva, független klinikai citogenetikai laboratóriumban. Az eredményekről jelentés készül egy tételspecifikus analitikai bizonylaton.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS

1. Műanyag, steril centrifugacsövek és tenyésztőflaskák
2. CO_2-inkubátor, 37 °C-on
3. Asztali centrifuga
4. Vortex keverő
5. Kolcemid törzsoldat, 10 µg/ml
6. Kálium-klorid oldat, 0,075 M
7. Fixálóoldat, metanol:ecetsav (3:1)

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Egy éjszakán át hűtőszekrényben (2–8 °C) kell felolvasztani, majd óvatosan összeforgatni, hogy a homogenitás biztosítása érdekében. Aszeptikusan adagoljon 10 ml médiumot a steril tenyésztőflaskákba, és ekvilibrálja 37 °C-ra az azonnali felhasználáshoz.

LIETUVIŲ K.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

„CHANG Marrow" terpė yra skirta pirminėms kliinikinėms žmogaus kaulų čiulpų ląstelių kultūroms auginti atlikiant kariotipavimo ir kitus genetinius hematologinių patologijų tyrimus.

ĮTAISO APRAŠYMAS

„CHANG Marrow" – tai paruošta naudoti terpė, kurios sudėtyje yra IMDM terpės su FBS, HEPES buferiniu tirpalu, L-glutamino, kondicionuotos terpės iš gigantinių ląstelių naviko (GCT) linijos, rekombinantiniu žmogaus GM-CSF ir gentamicino sulfato. „CHANG Marrow" terpė yra optimizuota palaikyti efektyvų kaulų čiulpų ląstelių augimą kultivuojant citogenetinės analizės skirtas kultūras. Prieš kultivuojant kaulų čiulpų pasėlius, nereikia pridėti jokių kitų sudėtinių medžiagų. „CHANG Marrow" terpės sudėtyje yra gentamicino sulfato (50 mg/l). Prireikus galima pridėti papildomų antibiotikų.

SUDEDAMOSIOS DALYS

Aminorūgštys	Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai	Antibiotikas
Alaninas	Jaučio embrono kraujo serumas (FBS)	Gentamicino sulfatas
Argininas	hrGM-CSF	
Asparaginas		Kita
Asparto rūgštis	Druskos ir jonai	Biotinas
Cistinas	Natrio chloridas	Kondicionuota terpė iš gigantinių ląstelių naviko (GCT-CM)
Glutamo rūgštis	Natrio selenitas	
Glutaminas	Natrio nitratas	
Glicinas	Natrio sulfatas	Vitaminai ir elementai su tragoviais
Histidinas	Natrio selenitas	
Izoleucinas	Kalcio chloridas	Folna rūgšties
Leucinas	Cholino chloridas	Nikotinamidas
Lizinas	Kalio chloridas	Riboflavinas
Metoninas	Kalio nitratas	Tiaminas
Fenilalaninas	Magnio sulfatas	Pantotenės rūgšties
Prolinas	Natrio fosfatas	Kobalaminas
Serinas		Piridoksinas
Treoninas	Buferiai	
Triptofanas	Natrio bikarbonatas	Vanduo
Tirozinas	HEPES	Injekcinio vandens kokybė
Valinas	Energetiniai substratai	
	Gliukozė	
	Pirovatas	
	Inozitolis	

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

Gautiems rezultatams (takos gali turėti kelietas veiksnių, įskaitant mėginių šaltinius, kultūrą, auginimo sąlygas ir reagentų pasirinkimą. Rekomenduojama prieš pradedant kiekvieno naujos partijos reagentus naudoti reguliarius, juos pirmiausia išbandyti lyginant su tuo pat metu tiriamais pamatinės žinomo tinkamo aktyvumo medžiagos bandiniais. Kiekvienos partijos „CHANG Marrow" terpių veikimas buvo išbandytas auginant klinikines kaulų čiulpų ląstelių kultūras nepriklausomoje klinikinių citogenetinių tyrimų laboratorijoje ir lyginant su kontroline terpe. Rezultatai pateikiami atskirome partijoms parengtuose analizės sertifikatuose.

REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

1. Sterilūs plastikiniai centrifuginiai mėginuvėliai ir kultivuimo flakonai
2. CO_2 inkubatorius 37 °C temperatūroje
3. Staliné centrifuga
4. Sūkurinė maišyklė
5. Kolcemido pradinis tirpalas, 10 µg/ml
6. Kalio chlorido tirpalas, 0,075 M
7. Fiksatyvo tirpalas, metanolis: acto rūgštis (3:1)

PARUOŠIMAS NAUDOTI

Per naktį atitirpinkite šaldytuve (2–8 °C), po to atsargiai sumaišykite iki vienalytės konsistencijos. Laikydamiesi aseptikos reikalavimų, po 10 ml terpės supilstykite į sterilius pasėlio flakonus ir, nusistovėjus iki 37 °C būsenos, tuoj pat naudokite.

NAUDOJIMO NURODYMAI

I. Mėginių ruošimas

Mėginius ruoškite iš 0,5–1,0 ml kaulų čiulpų aspirato, heparinizuoto natrio heparinu. Ličio heparinas, EDTA ar citratinisi antikoagulantai citogeneticinams tyrimams netinka.

- Jei paima daugiau kaip 5 ml kaulų čiulpų aspirato, mėginys gali būti paveiktas hemodiliucijos. Mėginį 8 min. centrifuguokite esant 1200 aps./min atskiramai kaulų čiulpų frakcijai.
- Jei mėginys pristatomas transportavimo terpėje, mėginį 8 min. centrifuguokite 1200 aps./min. greičiu ir nusiurbkite transportavimo terpę (viršnuosėdinį skystį). Pasėlį uždėkite po centrifugavimo mėginuvėlio dugne nusėdusia frakcija.

Išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi ieškoti savo vidaus darbo tvarkos taisyklėse ir metodiniuose nurodymuose, atsižvelgiai parengtuose ir optimizuotuose pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

II. Kaulų čiulpų ląstelių kultūra

Ant visų kultivavimo indų pažymėkite paciento pavardę, mėginio numerį ir kultūros tipą.

1. Prieš mėginio inokuliavimą sušildykite „CHANG Marrow" iki aplinkos temperatūros.
2. Inokuliarti savaku kultūrai odgovarajućom količinom uzorka kako bi se postigla optimalna koncentracija od 10^6 stanica/ml iii 10^6 stanica po 10 ml kulture.
3. Svaki laboratorij mora utvrditi broj kultura koje mora pripremiti ovisno o kliničkim indikacijama pacijenta. Po želji se mogu dodati dodatni čimbenici rasta.
4. Inkubirati kulture pri 35 – 39 °C, u atmosferi od 5– 8% CO_2 dok ne budu spremne za prikupljanje.

Prikupljanje kultura:

1. Ukloniti kulturu spremnu za prikupljanje iz inkubatora i lagano zavrtiti čepom kako bi se obnovila suspenzija stanica.
2. Prenijeti sadržaj svake tikvice u epruvetu od 15 ml za centrifugu.
3. U svaku epruvetu kulture dodati 40 µl temeljne standardne otopine kolcemida (10 µg/ml). Čvrsto začepiti epruvete i miješati prevrtanjem.
4. Inkubirati epruvete 45 minuta pri 35 – 39 °C.
5. Nakon inkubacije centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
6. Pažljivo aspirirati supernatant iz svake epruvete s pomoću vakuumskog aspiratora proizvodom za ekstrakciju otapala. Pripazite da ne aspirirate talog.
7. Obnoviti suspenziju taloga stanica tapkanjem prstom po dnu ili sa strana svake epruvete.
8. Pokrenite 20-minutni brojač vremena.
9. Dodati kap po kap 3 – 4 ml predhodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotoničke otopine (0,075 M kalijev klorid).
10. Čvrsto začepiti epruvetu i lagano promiješati tapkanjem prstom po dnu ili sa strana epruvete.
11. Dodati kap po kap 5 – 6 ml predhodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotoničke otopine. Čvrsto začepiti i prevrnuti epruvetu.
12. Ponoviti 9. – 11. korak za svaku epruvetu.
13. Pustiti da epruvete odstoje u vodenoj kupelji na 35 – 37 °C. Prevrnuti epruvete jedanput na polovici vremena 20-minutnog brojača.
14. Po isteku vremena 20-minutnog brojača, ukloniti epruvete iz vodene kupelji i dodati 1 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa u svaku epruvetu. Čvrsto začepiti i prevrnuti svaku epruvetu. (ovo je korak prije fiksativa)
15. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
16. Aspirirati supernatant iz svake epruvete, ostavljajući oko 1 ml iznad taloga stanica. Pripazite da ne aspirirate talog. paziti na vlaknasti materijal koji se može protezati iz taloga stanica u supernatant nakon centrifuge. Možda će biti potrebno ručno ukloniti posljednjih nekoliko ml supernatanta koristeći se Pasteurovom pipetom (ne vakuumskom aspiracijom) da ne bi došlo do aspiracije čitavog taloga stanica u spremnik za otpad.
17. Obnoviti suspenziju taloga stanica kako je opisano u 7. koraku.
18. Dodati kap po kap 3 – 4 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa.
19. Dodati preostali fiksativ do 7 ml.
20. Ponoviti 16. – 19. korak za svaku epruvetu.
21. Neka odstoji 10 minuta pri sobnoj temperaturi. (ovo je prvi korak fiksativa)
22. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
23. Aspirirati supernatant i ostaviti otprilike 1 ml iznad taloga. Obnoviti suspenziju taloga stanica.
24. Dodati fiksativ do 7 ml. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min. (drugi korak fiksativa)
25. Ponoviti 22. – 23 korak (treći korak fiksativa)
26. Sada se fiksirane taloge stanica može odmah upotrijebiti za pripremu stakalaca u skladu sa standardnim protokolom laboratorija ili im se može pohraniti u hladnjaku (2 – 8 °C) ili zamrzivaču za upotrebu u budućnosti.

POHRANA I STABILNOST

Medij CHANG Marrow mora se čuvati zamrznut na temperaturi manjoj od -10 °C dok ne bude spreman za upotrebu. Medij CHANG Marrow stabilan je do isteka roka valjanosti koji je naveden na oznaci boce kada je se čuva u zamrznutom stanju. Nakon odmrzavanja bi se neiskorišten proizvod može se raspodijeliti u alikvote odgovarajuće veličine za rad i ponovno zamrznut za kasniju upotrebu ili ga se može čvrsto začepiti i čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 30 dana. Zaštitite od fluorescentnog svjetla.

MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Predviđeno je da se ovom proizvodom koristi osoblje osposobljeno za postupke koji uključuju primjenu za koju je namijenjen ovaj proizvod.

Medij CHANG Marrow sadrži FBS i kondicioniranu medij GCT-a i njime se mora rukovati primjenjujući univerzalne laboratorijske mjere opreza. Medij sadrži antibiotik (gentamicinsulfat) kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije bakterijama, no u radu s medijem uvijek se uvijek primjenjivati aseptičke metode. Ne upotrebljavati medij koji nije crvene boje.

TÜRKÇE

KULLANIM ENDİKASYONU

CHANG Marrow çeşitli hematolojik bozuklukların karyotiplemesi ve diğer genetik testler için yapılan klinik İnsan Kemik İliği Kültürlerinde primer kültür için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

CİHAZ TANIMI

CHANG Marrow, FBS, HEPES tamponu, L-glutamin, Dev Hücreli Tümör (GCT) Koşullandırılmış Vasat, Rekombinant İnsan Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF) ve Gentamisin Sülfatlı IMDM'den oluşan, kullanıma hazır bir vasattır. CHANG Marrow sitogenetik analiz için kemik iliği hücrelerinin etkin üremesini desteklemek üzere optimize edilmiştir. Kemik iliği kültüründün yapılmasından önce herhangi bir bileşen eklenmesi gerekmez. CHANG Marrow, Gentamisin Sülfat (50 mg/L) içerir. İsteniirse ek antibiyotikler eklenebilir.

BİLEŞENLER

Amino Asitler	Proteinler, Hormonlar ve Büyüme Faktörleri	Antibiyotik
Alanin	Fetal bovine serum (FBS)	Gentamisin Sülfat
Arginin	hrGM-CSF	
Asparagin		Diğer
Aspartic Acid	Tuzlar ve İyonlar	Biyotin
Aspartik Asit	Sodyum klorür	Giant cell tumor conditioned midyum (GCT-CM)
Sistin	Sodyum selenit	
Glutamic Acit	Kalsiyum klorür	Vitamin, mikroelementler
Glutamin	Kolin klorür	
Glisin	Potasyum klorür	Folik asit
Histidin	Potasyum nitrat	Nikotinamide
Isoleucine	Magnesium sulfate	Riboflavin
Leucine	Sodium phosphate	Tiamin
Lysine		Pantothenic acid
Methionine	Sodyum fosfat	Cobalamin
Phenylalanine		Pyridoxine
Proline	Tamponlar	
Serine	Sodyum bikarbonat	Su
Threonine	HEPES	Enjeksiyonluk Su
Tryptophan		Kalite
Tyrosine	Substrat tel.	WFI kalite
Valine	Enerjiya	Ilma (Ilma shall-Injezjonijet)
	Glucose	
	Pyruvate	
	Inositol	

KALİTE GÜVENCE

Tamamlanan kültür koşulları ve reaktiflerin seçimi dahil birkaç faktör elde edilen sonucu etkileyebilir. Kullanıcıların rutin kullanıma sokmadan önce her yeni reaktif partisini bilinen uygun aktiviteye sahip referans materyal birlikte çalışmaları öneriliir. Her CHANG Marrow lotu bağımsız bir Klinik Sitogenetik Laboratuvarda bir kontrol vasatıyla karşılaştırılarak Klinik Kemik İliği Kültürlerinde performans testinden geçmiştir. Sonuçlar lota özel bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

GEREKLİ AMA SAĞLANMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN

1. Plastik Steril Santrifüj Tüpleri ve Kültür Flaskları
2. 37°C'de CO_2 İnkübatörü
3. Tezgah Santrifüjü
4. Vorteks Karıştırıcı
5. Colcemid Stok Solüsyonu, 10 µg/mL
6. Potasyum Klorür Solüsyonu, 0,075 M
7. Fiksatif Solüsyon, Metanol: Asetik Asit (3:1)

KULLANIM HAZIRLIĞI

Bir buzdolabında (2 - 8°C) gece boyunca çözün ve sonra homojeniliği sağlamak üzere yavaşça karıştırın. Steril kültür flasklarına aseptik olarak 10 mL vasat koyun ve hemen kullanım için 37°C'ye dengeleyin.

KULLANMA TALİMATI

I. Örnek Hazırlama:

0,5 - 1,0 mL sodyum heparinize kemik iliği aspiratı kullanın. Lityum heparin, EDTA veya sitrat antikoagulanları sitogenetik çalışmalar için uygun değildir.

- 5 mL üzerinde kemik iliği aspiratı alınırsa örnekte hemodilüsyon olabilir. Kemik iliği fraksiyonunu izole etmek için numuneyi 8 dakika boyunca 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
- Numune eğer transfer vasatında gelirse örneği 1200 devir/dk hızında 8 dakika santrifüjleyip transfer vasatını (süpernatan) alın. Tüpün altında kalan santrifüje edilmiş fraksiyonu kullanarak inokülasyon yapın.

Bu ürünlerin kullanımı hakkında ek ayrıntılar açısından her laboratuvar kendi ayrı tıbbi programınız için özel olarak geliştirilmiş ve optimize edilmiş, kendi laboratuvar işlemleri ve protokollerine başvurmalıdır.

II. Kemik İliği Kültürü:

Tüm kültür kaplarını hasta adı, numune numarası ve kültür tipiyle etiketleyin.

1. Numune inokülasyonundan önce CHANG Marrow ürününü ortam sıcaklığına getirin.
2. Her kültüre 1x10^6 hücre/mL veya 10 mL kültür başına 10x10^6 hücre şeklinde optimum bir konsantrasyon elde etmek üzere uygun miktarda örnek inokülasyonu yapın.
3. Her ayrı laboratuvar hastanın klinik endikasyonuna göre kurulacak kültür sayısını belirlemelidir. İsteniirse ek büyüme faktörleri eklenebilir.
4. Toplamaya hazır oluncaya kadar kültürleri 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.

Kültürlerden Toplama:

1. Toplamaya hazır kültürü inkübatörden çıkarın ve hücrelerin tekrar süspansiyonu için flaskı yavaşça çevirin.
2. Her flaskın içeriğini bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.
3. Her kültür tüpüne 40 µL stok Colcemid (10 µg/mL) ekleyin. Tüplerin kapağını sıkıca kapatın ve ters düz ederek yavaşça karıştırın.
4. Tüpleri 35°C - 39°C'de 45 dakika inkübe edin.
5. İnkübasyondan sonra tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
6. Her tüpten süpernatanı sovtest tuzaklı bir vakumlu aspiratör kullanarak dikkatle aspire edin. Peletli aspire etmemeye dikkat edin.
7. Hücre peletini her tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak tekrar süspansiyon haline getirin.
8. 20 dakikalık bir zamanlayıcı başlatın.
9. 3 - 4 mL önceden ısıtılmış (35° - 37°C) hipotonik solüsyon (0,075 M Potasyum Klorür) ekleyin.
10. Tüpün kapağını sıkıca kapatın ve tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak yavaşça karıştırın.
11. 5 - 6 mL önceden ısıtılmış (35 - 37°C) hipotonik solüsyonu damla damla ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp tüpü ters düz edin.
12. Her tüp için 9 - 11. adımları tekrarlayın.
13. Bir su banyosu kullanarak tüpleri 35 - 37°C'de dik tutun. 20 dakikalık zamanlayıcının orta noktasında tüpleri bir kez ters düz edin.
14. 20 dakika zamanlayıcı bittiğinde tüpleri su banyosundan çıkarın ve her tüpe 1 mL taze 3:1 Carnoy's Fixative ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp her tüpü ters düz edin. (Bu Prefiksatif adımdır)
15. Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
16. Her tüpten süpernatanı aspire edip hücre peletinin üzerinde yaklaşık 1 mL bırakın. Peletli aspire etmemeye dikkat edin. Santrifüjlemeden sonra hücre peletinden yukarıya süpernatan içine uzanabilecek fibröz materyal açısından dikkatli olun. En son birkaç mL süpernatanın tüm hücre peletinin atık kabına aspirasyonundan kaçınmak üzere bir Pasteur pipetiyle (vakum aspirasyonu kullanmadan) alınması gerekebilir.
17. Hücre pe