**ООО «БиолоТ»**

**Среда для лимфоцитов крови - LIMKAR-Biol**

**Инструкция**

Среда для культивирования лимфоцитов периферической крови поставляется в нескольких вариантах:

- в виде разлитых по 5 мл пробирок с питательной средой по 16 штук в наборе (LIMKAR-Biol 05 на 16 тестирований)

- по 100, 200 или 500 мл питательной среды в отдельных флаконах (LIMKAR-Biol 100, 200 и 500 соответственно на 20, 40 и 100 тестирований)

Для забора периферической крови рекомендуется использовать вакуумные пробирки Na/гепарин или Li/гепарин без геля. До использования кровь рекомендуется хранить при температуре плюс 2-8˚С и использовать в течение суток. В этом случае обеспечивается наилучшее качество хромосомных препаратов. Допускается хранение крови до трех дней, но при этом может снижаться митотический индекс среды.

Перед использованием среду, разлитую во флаконы по 100, 200 и 500 мл, необходимо разморозить в течение ночи в холодильнике, после чего сразу же разлить в конические центрифужные пробирки (объемом 15 мл) по 5 мл и заморозить на минус 18-20˚С. Не рекомендуется проводить размораживание и замораживание среды более двух раз. После размораживания среду перед использованием рекомендуется хранить в холодильнике и использовать в течение 24 часов.

**Протокол приготовления хромосомных препаратов.**

1. В стерильных условиях добавить к 5 мл размороженной питательной среды по 0,5 мл образца крови, плотно закрутить крышку пробирки. Перед добавлением кровь в пробирке перемешать, переворачивая несколько раз, чтобы получить однородную суспензию без комков.
2. Поставить пробирку в термостат при температуре +37˚С. Во время инкубации смеси ежедневно несколько раз в день пробирки со средой и кровью перемешивать переворачиванием, чтобы на дне не образовывался плотный слой клеток, где часть клеток погибает из-за недостатка кислорода, а также образуется кольцо, плохо разбиваемое после инкубации смеси в течение 72 часов.
3. Через 72 часа добавить в пробирку 10 мкл стерильного раствора колхицина (исходная концентрация раствора колхицина 0.1 мг/мл, Арт. 1.4.06.1. в каталоге БиолоТ) на 3-4 часа. В зависимости от предпочтений пользователя время инкубации может подбираться экспериментально.
4. Параллельно инкубации смеси с колхицином готовится гипотонический раствор и фиксатор:
   1. Гипотонический раствор: растворить 0.56 г хлористого калия (Арт. 1.4.007. в каталоге БиолоТ) в 100 мл дистиллированной воды (возможны навески на 200 и более мл воды). Расход гипотонического раствора – 8 мл на одно тестирование. Необходимое количество раствора поместить до использования в баню на +37˚С. Остальной раствор хлорида калия можно хранить в холодильнике до использования в течение месяца.
   2. Фиксатор (не поставляется компанией БиолоТ): приготовить необходимый объем фиксатора – 3 части 96% этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты, Расход фиксатора - около 14 мл на одно тестирование. Приготовленный фиксатор герметично закрыть и поставить за 2 часа до использования в холодильник.
5. После инкубации в термостате смеси с колхицином, пробирки центрифугировать при комнатной температуре в течение 8 минут при 1000 об/мин.
6. Отобрать надосадочную жидкость так, чтобы над осадком осталось примерно 0.2 мл жидкости и сделать отметку маркером на уровне верхней части осадка (необходимо для того, чтобы в дальнейшем не отобрать клеточный осадок с надосадочной жидкостью).
7. Тщательно перемешать каждую пробу, разбивая осадок трансфер пипеткой или пипеткой Пастера, добившись однородной суспензии.
8. Предварительно нагретый до +37˚С раствор KCl добавить по 8 мл в каждую пробу. Тщательно перемешать, разбив осадок.
9. Убрать пробы в термостат ( температура +37˚С) на 30 минут.
10. Через 30 минут пробирки с пробами центрифугировать в течение 8 минут при 1000 об/мин. Отобрать супернатант, оставив сверху количество надосадочной жидкости, равное количеству осадка. Тщательно перемешать, разбив осадок.
11. В каждую пробу аккуратно по стеночке добавить по 0.5 мл холодного фиксатора. Тщательно перемешать.
12. Далее добавить холодный фиксатор в пробы, доводя общий объём содержимого в пробирке до 4 мл. Тщательно перемешать. Образуется чёрный непрозрачный раствор.
13. Поместить пробы в центрифугу и центрифугировать в течение 8 минут при 1000 об/мин (первое центрифугирование с фиксатором). Отобрать надосадочную жидкость, оставить столько же на дне в пробирке, сколько было изначально осадка (по отметке на пробирке). Довести холодным фиксатором объём в пробирке до 3 мл и тщательно перемешать, разбив осадок.
14. Поместить пробы в центрифугу и центрифугировать в течение 8 минут при 1000 об/мин (второе центрифугирование с фиксатором). Отобрать надосадочную жидкость до осадка. Довести фиксатором объём до 3 мл в пробирке, тщательно перемешать, разбив осадок. Постепенно раствор светлеет после каждой открутки в центрифуге.
15. Поместить пробы в центрифугу и центрифугировать в течение 8 минут при 1000 об/мин (третье центрифугирование с фиксатором). Должен получиться прозрачный раствор и светлый осадок (обычно для получения прозрачного раствора достаточно трех центрифугирований и добавления фиксатора). Если раствор получился недостаточно прозрачным, а осадок тёмным, провести ещё одну дополнительную процедуру добавления фиксатора и открутки на центрифуге. Отобрать надосадочную жидкость, оставив примерно 0,4 мл над осадком. Если получилась слишком густая смесь, то её разбавить необходимым количеством фиксатора (несколько капель). Тщательно перемешать, разбив осадок
16. Для приготовления хромосомных препаратов, на предварительно смоченную водой и охлаждённую в холодильнике салфетку выложить чистые предметные стёкла, на них нанести по 15 мкл полученной клеточной смеси в фиксаторе и оставить на 15-20 минут, чтобы высох фиксатор. Через 24 часа препараты можно красить.
17. Перед окрашиванием препаратов приготовить свежую смесь из красителя Гимза (Азур-Эозин по Романовскому, Арт.1.4.05. в каталоге БиолоТ) и дистиллированной воды, разведя краситель водой в 30 раз, добавив к 27 мл дистиллированной воды 900 мкл красителя (достаточно для окрашивания 10 препаратов). Допускается использование других методик окрашивания с использованием красителя Гимзы и буферных растворов.
18. Приготовленный раствор красителя по 3 мл нанести на 10 минут на каждый препарат, покрыв поверхность стекла, или полностью поместив стекло в ёмкость с раствором, после чего смыть краситель дистиллированной водой.
19. Оставить препарат на 24 часа при комнатной температуре до полного высыхания.