

## MethoCult™ GF H84535

### Methylcellulose Medium with Recombinant Cytokines

REF 84535

100 mL

#### ENGLISH

### INTENDED USE

MethoCult™ GF H84535 is intended for use in colony-forming unit (CFU) assays to detect and quantify human hematopoietic progenitor cells in bone marrow (BM), mobilized peripheral blood (MPB), peripheral blood (PB), and cord blood (CB) samples using CFU assays. It is recommended for CD34+ enriched cells, mononuclear cells, and cells isolated by other purification methods.

### PRODUCT DESCRIPTION

MethoCult™ GF H84535 has been formulated to support optimal growth of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM, CFU-M, CFU-G).

#### Components include:

- Iscove's MDM
- Methylcellulose
- Fetal bovine serum
- Bovine serum albumin
- 2-Mercaptoethanol
- Recombinant human (rh) stem cell factor
- rh GM-CSF
- rh G-CSF
- rh Interleukin 3
- rh Interleukin 6

### QUALITY CONTROL

MethoCult™ methylcellulose-based media are manufactured using aseptic technique, tightly controlled processes, and extensively pre-screened components.

Each batch of MethoCult™ is sterility tested according to USP methods and Quality Control performance tested in CFU assays using human BM, CB, or PB samples. A Certificate of Analysis is available upon request.

### STABILITY AND STORAGE

Store at -15 to -25°C. Product stable at -15 to -25°C until expiry date on label.

Do not repeatedly freeze and thaw.

If product is received partially thawed, place immediately at -20°C or thaw and aliquot as described in Handling and Directions for Use.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For professional use only.
2. This product is for in vitro diagnostic use.
3. This product should be handled by trained personnel observing good laboratory practices.
4. This product contains material of animal origin and should be handled as a potential carrier and transmitter of disease. Handling of reagents and disposal of waste should observe all local, state, or national regulations.
5. This product is a potential irritant to eyes, respiratory system, and skin. This product may also be harmful if ingested. Avoid exposure through skin, eye contact, inhalation, and ingestion. May cause allergic reaction in sensitized individuals.

## SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

### Equipment

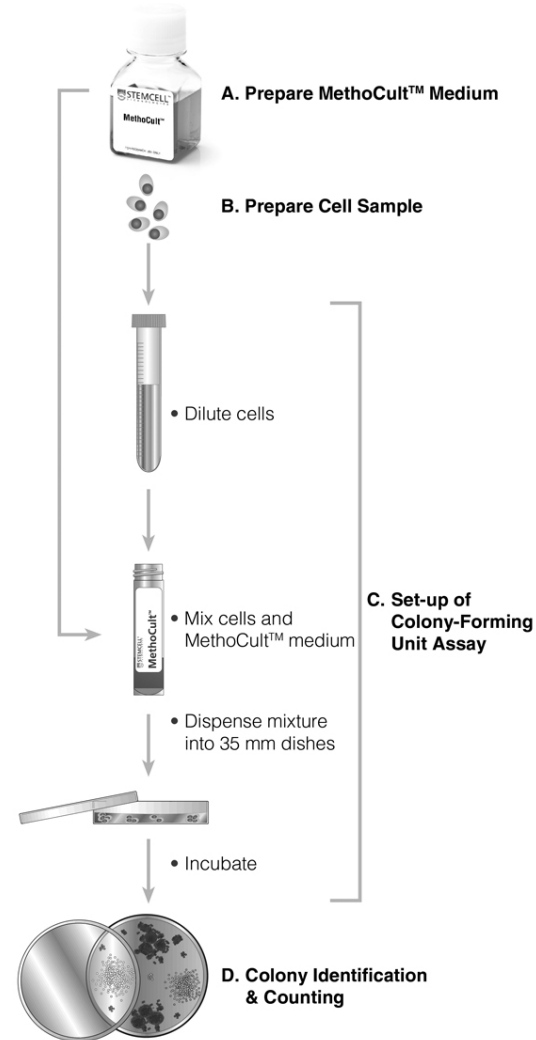
- Biohazard Safety Cabinet certified for Level II handling of biological materials. *All procedures for cell processing and setup of CFU assays should be performed using sterile technique and universal safe handling precautions.*
- Incubator set at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in air and ≥ 95% humidity. *Use of water-jacketed incubators with a water pan placed in the chamber is recommended.*
- Inverted Microscope. *Use of a quality inverted microscope equipped with a 10X or 12.5X eyepiece objective, 2X, 4X, and 10X planar objectives, and a blue filter is recommended.*
- The STEMvision™ instrument for automated imaging and counting of hematopoietic colonies may be used in place of a microscope to count colonies. See [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) for more details.
- Equipment for cell processing and cell counting as required.

### Reagents and Materials

- MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalog #87700)
- 16 Gauge Blunt-End Needles (Catalog #28110)\*
- 35 mm Culture Dishes (Catalog #27100)\* or SmartDish™ 6-well culture plates (Catalog #27370)
- 60 mm Gridded Scoring Dish (Catalog #27500)\* or STEMgrid™-6 counting grid (Catalog #27000)
- Syringes (Luer lock): 3 mL (Catalog #28230), 6 mL
- Sterile pipettes and sterile polystyrene tubes
- 100 mm culture dishes (e.g. Treated Tissue Culture Dishes, Catalog #27125)
- 245 mm x 245 mm square culture dishes (e.g. 245 mm x 245 mm Square Treated Tissue Culture Dishes, Catalog #27140) or 150 mm culture dishes
- Sterile distilled water
- Cell processing and cell counting reagents and materials as required

\*Use of STEMCELL Technologies products with the indicated Catalog numbers is recommended (see Notes).

## HANDLING AND DIRECTIONS FOR USE



### A. Prepare MethoCult™ Medium

1. Thaw MethoCult™ methylcellulose medium under refrigeration (2 - 8°C) overnight or at room temperature (15 - 25°C).
2. Once thawed, shake vigorously for 1 - 2 minutes and then let stand for at least 5 minutes to allow bubbles to rise to the top before aliquoting.
3. Using a 3 or 6 mL Luer lock syringe attached to a 16 Gauge Blunt-End Needle, aliquot 3 mL per tube for 1.1 mL duplicate cultures or 4 mL per tube for 1.1 mL triplicate cultures. Tubes can be used immediately or stored at -20°C for later use. *Do not use a standard pipette to aliquot methylcellulose as the volume dispensed will not be accurate. Use blunt-end needles for dispensing to prevent needle-stick injuries.*

### B. Prepare Cell Sample

1. The human cell source and cell sample processing method used is dependent on individual laboratory requirements.
2. It is recommended that cell samples are washed and diluted in MethoCult™ Cell Wash Medium.

 STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)

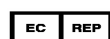
Document #1000006883

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)



MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



Version 01

2021

3. The following are examples of suitable cell processing techniques:

- a. **Mononuclear cell suspensions** or light density cells prepared by density separation using reagents such as Lymphoprep™ (Catalog #07801).
- b. **Mobilized peripheral blood collections** prepared using an apheresis machine.
- c. **Red blood cell (RBC)-depleted cell suspensions** prepared by lysis or sedimentation of RBCs.
- d. **CD34+ enriched cells** prepared by methods including immunomagnetic cell separation and fluorescence-activated cell sorting (FACS).

Lymphoprep is a trademark of Alere Technologies.

4. Count nucleated cells using a hemacytometer after diluting with 3% Acetic Acid With Methylene Blue (Catalog #07060) or using an automated cell counter. *Methods to assay viable cells (e.g. Trypan Blue [Catalog #07050] dye exclusion) should be used for cell preparations where a decrease in cell viability may be expected (e.g. cryopreserved cells).*

### C. Setup of CFU Assays

1. Thaw tubes under refrigeration (2 - 8°C) overnight or at room temperature (15 - 25°C).
2. **Dilute cells:** Prepare a 10X concentrated cell suspension (see Table 1 and Notes) of cells in MethoCult™ Cell Wash Medium. For example, prepare a sample of  $5 \times 10^5$  cells/mL in MethoCult™ Cell Wash Medium for a plating concentration of  $5 \times 10^4$  cells per dish.
3. Add 0.3 mL of cells to 3 mL of MethoCult™ for duplicate cultures, or 0.4 mL of cells to 4 mL of MethoCult™ for triplicate cultures.

*This 1:10 v/v ratio of cells:medium gives the correct medium viscosity to ensure optimal CFU growth and morphology.*

4. Vortex tube to mix contents thoroughly and then let stand for 2 - 5 minutes to allow bubbles to rise to the top before dispensing.
5. **Dispense:** Using a 3 mL syringe attached to a 16 gauge blunt-end needle, dispense 1.1 mL of the MethoCult™ mixture containing cells into 2 (or 3) 35 mm dishes. Gently tilt and rotate each dish to distribute methylcellulose evenly.
6. **Add 3 mL** of sterile water to an additional uncovered 35 mm dish. For duplicate assays, place all three dishes into a 100 mm culture dish. For triplicate assays, place 35 mm dishes in cultureware with a loose-fitting lid (e.g. 150 mm culture dishes, 245 mm x 245 mm square culture dishes).

*Always provide water dishes to maintain humidity.*

7. **Incubate** at 37°C, in 5% CO<sub>2</sub>, with  $\geq 95\%$  humidity for 14 - 16 days. Proper culture conditions are critical for optimal CFU growth.

*Use of water-jacketed incubators with water pan in chamber and routine monitoring of temperature and CO<sub>2</sub> levels is recommended (see Notes).*

### D. Colony Identification and Counting

Counting and classification of human colonies is performed after 14 - 16 days in culture.

#### Colony Counting Overview

Use a high-quality inverted microscope equipped with 2X, 4X, and 10X planar objectives and stage holder for a 60 mm Gridded Scoring Dish. First scan the dish on low power (2X objective, 20 - 25X magnification) to evaluate the relative distribution of colonies. Count CFU-GM, CFU-G, and CFU-M on low power. Use high power (4X objective, 40 - 50X magnification) to confirm colony type as required.

### COLONY DESCRIPTIONS

**CFU-GM:** Colony-forming unit-granulocyte, macrophage produces a colony containing > 40 granulocyte and macrophage cells.

**CFU-G** and **CFU-M:** Colonies contain > 40 granulocytes and macrophages, respectively.

### NOTES

- Syringes and large bore blunt-end needles should be used for accurate dispensing of viscous methylcellulose medium and to prevent needle-stick injuries.
- Important to use Petri dishes that have been pre-screened for low cell adherence because excessive cell adherence can inhibit CFU growth or interfere with colony recognition.
- Important to routinely monitor incubator temperature and CO<sub>2</sub> and humidity levels to ensure proper culture conditions.
- Fresh or cryopreserved cell samples can be used.
- Suitable cell processing procedures must be established in each laboratory. For example, fresh cord blood samples depleted of RBCs by sedimentation using HetaSep™ (Catalog #07806) may contain residual RBCs, which can interfere with colony detection and identification.
- Sufficient cells should be added to yield approximately 25 to 120 colonies per 35 mm dish (1.1 mL culture). Each laboratory should establish appropriate plating concentrations by setting up test cultures at two to four different cell concentrations.
- To facilitate identification and counting of colonies, assays may be set up in SmartDish™ cultureware instead of 35 mm dishes. STEMvision™ may then be used for automated counting. Alternatively, STEMgrid™-6 may be used to assist with manual counting.
- For additional assistance on hematopoietic colony recognition and counting, refer to the references listed below and the Technical Manual: Human Colony - Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (Document #10000005589; English only), available at [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

**Table 1. Recommended Cell Plating Concentrations**

CELL SOURCE	CELLS PER 35 mm DISH
BM, ammonium chloride-treated	5 x 10 <sup>4</sup> (2 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>5</sup> )
BM, light density	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
CB, light density	1 x 10 <sup>4</sup> (5 x 10 <sup>3</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> )
CB, RBC-depleted	5 x 10 <sup>4</sup> (2 - 6 x 10 <sup>4</sup> )
PB, light density	2 x 10 <sup>5</sup> (1 - 2 x 10 <sup>5</sup> )
MPB, light density	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
Lin-depleted (CD34+ enriched BM, CB, MPB)	1000 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )
CD34+ cells (BM, CB, MPB)	500 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )

## RELATED PRODUCTS

For related products, including specialized culture and storage media, supplements, antibodies, cytokines, and small molecules, visit [www.stemcell.com/HSPCworkflow](http://www.stemcell.com/HSPCworkflow) or contact us at [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com). For available fresh and cryopreserved peripheral blood, cord blood, and bone marrow products in your region, visit [www.stemcell.com/primarycells](http://www.stemcell.com/primarycells).

## REFERENCES

1. Eaves C. (1995) Assays of hematopoietic progenitor cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS & Kipps TJ (Eds.). Williams Hematology Fifth Edition (pp. L22–6). New York: McGraw-Hill Inc.
2. Wognum B et al. (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. In: Helgason CD & Miller CL (Eds.). Basic Cell Culture Protocols (pp. 267–83). Clifton, New Jersey: Humana Press Inc.
3. Eaves C & Lambie K. (1995) Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Vancouver: STEMCELL Technologies Inc. Available in English only (Catalog #28700).
4. Nissen-Druey C et al. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. Basel, Switzerland: S. Karger Medical and Scientific Publishers. Available in English only (Catalog #28760).






## TECHNICAL ASSISTANCE

For technical support please contact us by email at [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com) or call either **+1.604.877.0713** or the European Toll-Free number 00800 7836 2355. For more information please visit [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

If you require a printed copy or a translated version of this document in a certain language please contact technical support.

**EC REP** MDSS GmbH

Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany

<b>REF</b> Catalog or reference number	<b>LOT</b> Batch code	 Use by: YYYY-MM
 Caution, consult accompanying documents	<b>IVD</b> In Vitro Diagnostic Medical Device	 For storage within temperature limits
 CE Mark	 Manufacturers identification (name & address)	<b>EC REP</b> Authorized EC representative in the European Community

 **STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)**

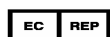
Document #1000006883

**For Technical Assistance**

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)



**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



Version 01

2021

**MethoCult™ GF H84535**

Medium Méthylcellulose avec des  
Cytokines Recombinantes

REF **84535****100 mL****UTILISATION CONSEILLÉE**

Le MethoCult™ GF H84535 est destiné au test des colony-forming unit (CFU) qui permet la détection et la quantification des progéniteurs hématopoïétiques dans les échantillons de moelle humaine (BM), de sang périphérique mobilisé (MPB), de sang périphérique (PB), et de sang de cordon ombilical (CB). Cela est recommandé pour les cellules enrichies en CD34+, les cellules mononucléées, et les cellules isolées par d'autres méthodes de purification.

**COMPOSITION**

La composition du MethoCult™ GF H84535 permet une croissance optimale des progéniteurs myéloïdes, granulocytes, macrophages (CFU-GM, CFU-M, CFU-G).

**Le MethoCult™ GF H84535 contient:**

- Iscove's MDM
- Méthylcellulose
- Sérum bovin fœtal
- Sérumbumine bovine
- 2-Mercaptoéthanol
- Humaine recombinante (rh) stem cell factor
- rh GM-CSF
- rh G-CSF
- rh Interleukine 3
- rh Interleukine 6

**CONTRÔLE DE LA QUALITÉ**

Les milieux de méthylcellulose MethoCult™ sont préparés en utilisant des techniques aseptiques grâce à des procédés strictement contrôlés et avec des composants prétestés.

La stérilité de chaque lot de MethoCult™ est vérifiée selon les méthodes USP et les performances sont évaluées sur les tests de CFU à partir de BM, CB, ou PB humains. Un certificat d'analyse est disponible sur demande.

**CONSERVATION ET STABILITÉ**

Conserver entre -15 et -25°C. Produit stable entre -15 et -25°C jusqu'à la date d'expiration sur l'étiquette.

Ne pas répéter les cycles de congélation et de décongélation.

Si le produit est partiellement décongelé à sa réception, le placer immédiatement à -20°C ou le décongeler et l'aliqoter comme indiqué dans la section Manipulation et Mode d'Emploi.

**MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS**

1. Utilisation strictement réservée à des professionnels.
2. Réservé à un usage de diagnostic in vitro.
3. Ce produit doit être manipulé par des personnes formées, observant les règles des bonnes pratiques de laboratoire.
4. Ce produit contient des matières d'origine animale et doit être traité comme un vecteur potentiel et le transmetteur de la maladie. La manipulation des réactifs et l'élimination des déchets doivent suivre la réglementation en vigueur localement ou au niveau national.
5. Ce produit peut être irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau. Ce produit peut être dangereux s'il est ingéré. Éviter toute exposition de la peau, tout contact avec les yeux, l'inhalation ou l'ingestion. Le produit peut engendrer des réactions allergiques chez les sujets sensibilisés.

# MATERIEL SPECIAL NÉCESSAIRE NON FOURNI

## Équipement

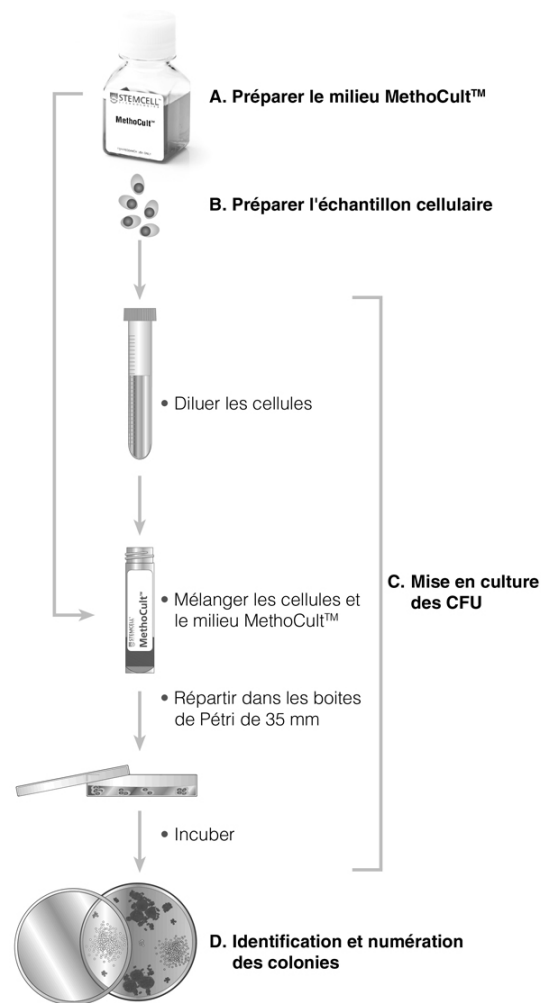
- Hotte à flux laminaire certifiée pour la manipulation des prélèvements biologiques de niveau II. *Toutes les procédures de préparation et de mises en culture des CFU doivent être réalisées en utilisant une technique stérile et avec toutes les précautions d'usage.*
- Incubateur à CO<sub>2</sub> réglé à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans l'air et une humidité ≥ à 95%. *L'utilisation d'incubateurs à jaquette d'eau avec un récipient rempli d'eau placé dans la chambre est recommandée.*
- Microscope inversé. *Il est recommandé d'utiliser un microscope de qualité, équipé d'oculaires de grossissement 10X ou 12,5X et d'objectifs plans de grossissement 2X, 4X, et 10X ainsi que d'un filtre bleu.*
- L'instrument STEMvision™ pour l'imagerie et la quantification automatiques des colonies hématopoïétiques peut être utilisé à la place d'un microscope pour quantifier les colonies. Consulter le site [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) pour de plus amples informations.
- Équipement pour la manipulation des cellules et leur comptage.

## Réactifs et Matériels

- MethoCult™ Cell Wash Medium (Référence N° 87700)
- Aiguilles à bout franc de 16G (Référence N° 28110)\*
- Boîtes de Pétri de 35 mm (Référence N° 27100)\* ou plaques de culture à 6 puits SmartDish™ (Référence N° 27370)
- Boîtes quadrillées de comptage de 60 mm (Référence N° 27500)\* ou grille de comptage STEMgrid™-6 (Référence N° 27000)
- Seringues (Luer lock): 3 mL (Référence N° 28230), 6 mL
- Pipettes stériles et tubes polystyrène stériles
- Boîtes de Pétri de 100 mm (p. ex. boîtes de Pétri traitées pour culture de tissu, Référence N° 27125)
- Boîtes de Pétri carrées de 245 mm x 245 mm (p. ex. boîtes de Pétri carrées traitées pour culture de tissu, Référence N° 27140) ou boîtes de Pétri de 150 mm
- Eau distillée stérile
- Réactifs et matériels destinés à la manipulation des cellules et leur comptage.

\*L'utilisation des produits STEMCELL Technologies qui sont suivis d'une référence catalogue est recommandée (voir Notes).

# MANIPULATION ET MODE D'EMPLOI



## A. Préparation du Milieu MethoCult™

1. Décongeler le milieu de méthylcellulose MethoCult™ à froid (2 à 8°C) pendant une nuit ou à température ambiante (15 à 25°C).
2. Après décongélation, agiter vigoureusement le flacon pendant 1 à 2 minutes, puis laisser reposer pendant au moins 5 minutes pour que les bulles disparaissent avant d'aliqoter.
3. À l'aide d'une seringue Luer lock de 3 ou de 6 mL dotée d'une aiguille à bout franc de 16G (1,8 mm), aliqoter 3 mL par tube pour des cultures en double de 1,1 mL ou de 4 mL par tube pour des cultures en triple de 1,1 mL. Les tubes peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure. *Ne pas utiliser de pipettes pour aliqoter la méthylcellulose car le volume dispensé ne sera pas précis. L'utilisation d'aiguilles à bout tronqué limite les risques de blessure par piqûre.*

## B. Préparation de l'Échantillon Cellulaire

1. L'origine des cellules et la méthode de préparation varient selon les impératifs de chaque laboratoire.
2. Il est recommandé de laver et de diluer les cellules avec le MethoCult™ Cell Wash Medium.
3. Les procédures ci-dessous sont particulièrement adaptées à la préparation des cellules:
  - a. **Suspensions de cellules mononucléées** préparées par centrifugation sur gradient de densité comme le Lymphoprep™ (Référence N° 07801).
  - b. **Sang périphérique mobilisé** collecté sur des appareils de cytophèrese.
  - c. **Suspensions cellulaires déplétées des globules rouges** par lyse ou par sédimentation.
  - d. **Cellules enrichies en CD34+** par séparation immunomagnétique ou par tri par FACS.

Lymphoprep est une marque commerciales de Alere Technologies.
4. Compter les cellules nucléées à l'aide d'un hématimètre après dilution avec de l'acide acétique à 3% de bleu de méthylène (Référence N° 07060) ou à l'aide d'un compteur automatique de cellules. *Les techniques permettant d'évaluer le nombre de cellules viables (par ex. : l'exclusion au bleu trypan [Référence N° 07050]) doivent être utilisées lorsqu'une diminution de la viabilité est possible pour une préparation cellulaire (par ex. : les cellules cryoconservées).*

## C. Mise en Culture des CFU Humaines

1. Décongeler complètement les tubes de MethoCult™ à froid (2 à 8°C) pendant une nuit ou à température ambiante (15 à 25°C).
2. **Diluer les cellules:** Préparer une suspension cellulaire 10X concentrée (voir Tableau 1 et Notes) dans le MethoCult™ Cell Wash Medium. Ex: préparer une suspension à  $5 \times 10^5$  cellules/mL pour une concentration finale d'ensemencement de  $5 \times 10^4$  cellules par boîte de Pétri.
3. Ajouter 0,3 mL of suspension cellulaire à 3 mL de MethoCult™ pour les cultures en double ; ou ajouter 0,4 mL de cellules à 4 mL de MethoCult™ pour les cultures en triple.  
*Ce ratio de 1 volume de cellules pour 10 volumes de milieu donnera une viscosité correcte pour une croissance et une morphologie optimale des CFU.*
4. Centrifuger le tube pour mélanger parfaitement, puis laisser reposer 2 à 5 minutes jusqu'à disparition des bulles avant de procéder à la mise en culture.
5. **Répartition:** À l'aide d'une seringue de 3 mL dotée d'une aiguille à bout franc de 16G (1,8 mm), répartir 1,1 mL du mélange cellules et MethoCult™ dans chacune des 2 ou 3 boîtes de Pétri de 35 mm. Incliner délicatement la boîte afin de répartir uniformément toute la méthylcellulose.
6. **Placer 3 mL** d'eau stérile dans une boîte 35 mm, ne pas mettre de couvercle. Pour les cultures en double, placer les 3 boîtes dans une boîte de culture de 100 mm. Pour les cultures en triple, placer les boîtes de 35 mm dans une boîte de culture comme les boîtes de Pétri carrées de 245 mm x 245 mm ou les boîtes de Pétri de 150 mm munies d'un couvercle non hermétique.

*Il est très important d'ajouter des boîtes contenant de l'eau pour assurer une bonne humidité*

7. **Incuber** à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, avec une d'humidité  $\geq 95\%$  pendant 14 à 16 jours. Conditions de culture appropriés sont essentiels pour la croissance optimale des CFU.

*Il est recommandé d'utiliser des incubateurs à jaquette d'eau avec un récipient rempli d'eau placé dans la chambre et de vérifier régulièrement la température et le niveau de CO<sub>2</sub>. Voir Notes.*

## D. Identification et Numération des Colonies

Les colonies sont identifiées et comptées après 14 à 16 jours de culture.

### Numération

Utiliser un microscope inversé de qualité équipé d'objectifs plans 2X, 4X, et 10X ainsi que d'une platine porte-objet pour boîte de 60 mm. Scanner d'abord la boîte au faible grossissement (objectif 2X, grossissement 20 à 25X) pour évaluer la répartition des colonies. Puis compter les colonies CFU-GM, CFU-G, et CFU-M avec l'objectif au faible grossissement. Si nécessaire, utiliser le fort grossissement (objectif 4X, grossissement 40 à 50X) pour confirmer le type d'une colonie.

## DESCRIPTION DES COLONIES

**CFU-GM:** La Colony-forming unit-granulocyte, macrophage donne une colonie comprenant plus de 40 granulocytes et macrophages.

**CFU-G** et **CFU-M:** Les colonies contiennent respectivement > 40 granulocytes et macrophages.

## NOTES

- Des seringues et des aiguilles de large diamètre et émoussées doivent être utilisées pour permettre de distribuer des volumes précis de méthylcellulose visqueuse et pour éviter tout risque de blessure.
- Il est important d'utiliser des boîtes de Pétri qui ont été sélectionnées pour leur faible adhérence cellulaire, car une adhérence excessive peut inhiber la croissance des CFU ou gêner l'identification des colonies.
- Il est important de vérifier régulièrement la température, le taux de CO<sub>2</sub> et l'humidité de l'incubateur afin d'assurer des conditions de culture optimales.
- Il est possible d'utiliser des échantillons de cellules fraîches ou congelées.
- Les protocoles de préparation des cellules doivent être optimisés par chaque laboratoire. Par exemple, des échantillons de sang de cordon ombilical frais déplétés des globules rouges par sédimentation via HetaSep™ (Référence N° 07806) peuvent contenir des globules rouges résiduels pouvant gêner la détection et l'identification des colonies.
- Un nombre approprié de cellules doit être ajouté pour obtenir environ 25 à 120 colonies par boîte de 35 mm (culture de 1,1 mL). Chaque laboratoire doit déterminer des

concentrations d'ensemencement adéquates en réalisant des cultures à différentes (2 à 4) concentrations.

- Afin de faciliter l'identification et la quantification des colonies, on peut préparer les cultures dans une boîte de culture SmartDish™ au lieu des boîtes de 35 mm. Pour une numération automatique, on peut ensuite utiliser STEMvision™. Autrement, on peut utiliser STEMgrid™-6 pour aider dans la numération manuelle.
- Pour plus d'informations sur la numération et l'identification des colonies hématopoïétiques, se référer à la bibliographie citée ci-après et au Manuel Technique: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (Document N° 10000005589 ; disponible en anglais uniquement).

**Tableau 1. Concentrations d'Ensemencement Recommandées**

SOURCE CELLULAIRE	CELLULES PAR BOÎTE DE 35 MM
BM, traitée par chlorure d'ammonium	5 x 10 <sup>4</sup> (2 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>5</sup> )
BM, cellules mononucléées issues de centrifugation sur gradient de densité	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
CB, cellules mononucléées issues de centrifugation sur gradient de densité	1 x 10 <sup>4</sup> (5 x 10 <sup>3</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> )
Sang de cordon ombilical, déplété des globules rouges	5 x 10 <sup>4</sup> (2 - 6 x 10 <sup>4</sup> )
PB, cellules mononucléées issues de centrifugation sur gradient de densité	2 x 10 <sup>5</sup> (1 - 2 x 10 <sup>5</sup> )
MPB, cellules mononucléées issues de centrifugation sur gradient de densité	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
BM, CB ou MPB déplété en cellules de lignées (enrichi en CD34+)	1000 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )
Cellules CD34+ (BM, CB, MPB)	500 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )

## PRODUITS ASSOCIÉS

Pour produits associés, incluant milieux de culture et de conservation spécialisés, suppléments, anticorps, cytokines, et petites molécules, visitez [www.stemcell.com/HSPCworkflow](http://www.stemcell.com/HSPCworkflow) ou écrivez-nous par courriel à [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com). Pour produits offerts frais ou cryopréservés de sang périphérique, de sang de cordon ombilical, et de moelle humaine dans votre région, visitez [www.stemcell.com/primarycells](http://www.stemcell.com/primarycells).

## RÉFÉRENCES

1. Eaves C. (1995) Assays of hematopoietic progenitor cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS & Kipps TJ (Eds.). Williams Hematology Fifth Edition (pp. L22-6). New York: McGraw-Hill Inc.
2. Wognum B et al. (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. In: Helgason CD & Miller CL (Eds.). Basic Cell Culture Protocols (pp. 267-83). Clifton, New Jersey: Humana Press Inc.
3. Eaves C & Lambie K. (1995) Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Vancouver: STEMCELL Technologies Inc. *Disponible en anglais uniquement (Référence N° 28700).*
4. Nissen-Druey C et al. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. Basel, Switzerland: S. Karger Medical and Scientific Publishers. *Disponible en anglais uniquement (Référence N° 28760).*

## ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour joindre l'assistance technique, veuillez nous contacter par email à l'adresse : [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com) ou par téléphone au numéro: **+1.604.877.0713**, ou le numéro sans frais européenne: **00800 7836 2355**.






Pour de plus amples informations, veuillez visiter le site: [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

Si vous avez besoin d'un duité en une certaine langue de ce document, veuillez contacter l'assistance technique.

**EC REP MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

<b>REF</b> Référence du catalogue	<b>LOT</b> Numéro de lot	 Utiliser avant: YYYY-MM
 Attention: voir notice d'instructions	<b>IVD</b> Dispositif médical de diagnostic in vitro	 Limites de températures
 Marquage CE	 Fabriquant (nom et adresse)	<b>EC REP</b> Représentant autorisé dans la Communauté Européenne

 **STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)**

Document #10000006883

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)

**EC REP**

**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany

 **IVD**

Version 01

2021



**MethoCult™ GF H84535**

Medio de Metilcelulosa con Citoquinas Recombinantes

**REF 84535**

**100 mL**

**USO PREVISTO**

MethoCult™ GF H84535 ha sido concebido para ser usado en ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU) para detectar y cuantificar células progenitoras hematopoyéticas humanas en muestras de médula ósea (MO), sangre periférica movilizada (SPM), sangre periférica (SP), y sangre de cordón umbilical (SC) por medio de ensayos con CFU. Es adecuado para células enriquecidas en CD34+, células mononucleares, y células aisladas por otros métodos de purificación.

**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

MethoCult™ GF H84535 ha sido formulado para favorecer el crecimiento óptimo de progenitores de granulocitos y macrófagos, (CFU-GM, CFU-M, CFU-G).

**Los componentes incluyen:**

- Iscove's MDM
- Metilcelulosa
- Suero fetal bovino
- Albúmina sérica bovina
- 2-Mercaptoetanol
- Recombinante humano (rh) stem cell factor
- GM-CSF rh
- G-CSF rh
- Interleucina 3 rh
- Interleucina 6 rh

**CONTROL DE CALIDAD**

Los medios MethoCult™ basados en metilcelulosa son fabricados mediante técnicas asépticas, procesos estrictamente controlados y componentes previamente testados de forma exhaustiva.

La esterilidad de cada lote de MethoCult™ es comprobada de acuerdo con los métodos USP. El control de calidad de su funcionamiento se realiza con ensayos de CFU usando muestras humanas de MO, SC, o SP. Está disponible un certificado de análisis bajo previa solicitud.

**ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD**

Almacenar entre -15 y -25°C. El producto permanece estable a una temperatura de entre -15 y -25°C hasta la fecha de caducidad en la etiqueta.

No congelar y descongelar repetidamente.

Si el producto se recibe parcialmente descongelado, colóquelo inmediatamente a una temperatura de -20°C o descongélelo y alicuótelo tal como se describe en la sección Manejo e instrucciones de uso.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

1. Sólo para usuarios profesionales.
2. Este producto está para uso diagnóstico in vitro.
3. Este producto deberá ser manipulado por personal formado y respetando las buenas prácticas de laboratorio.
4. Este producto contiene material de origen animal y debe manipularse como un potencial portador y transmisor de la enfermedad. La manipulación de los reactivos y la eliminación de los residuos deberán realizarse de acuerdo con las normas locales, estatales o nacionales.
5. Este producto es potencialmente irritante para ojos, sistema respiratorio y piel. Este producto puede también ser peligroso si es ingerido. Debe evitarse la exposición al producto a través de la piel, el contacto con los ojos, su inhalación e ingestión. Puede provocar reacciones alérgicas en individuos sensibilizados.

# MATERIALES ESPECIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

## Equipo

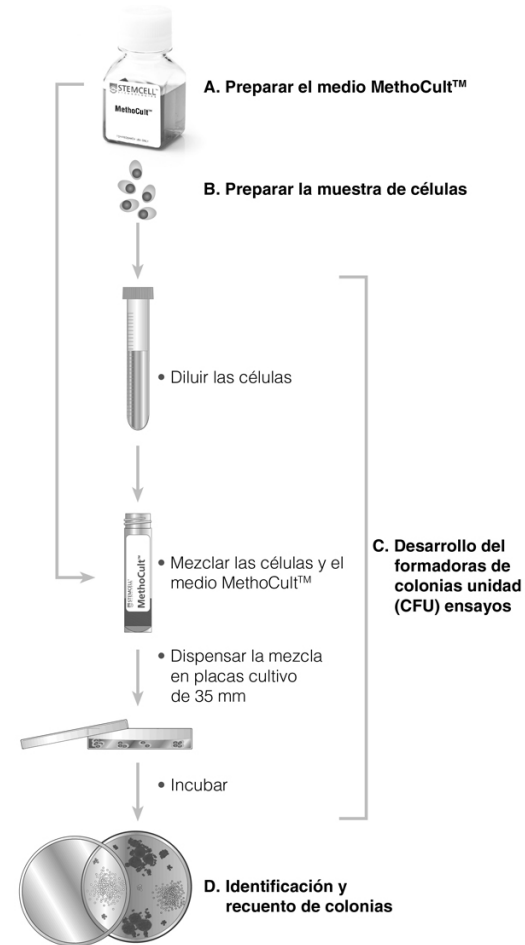
- Cabina de bioseguridad certificada para manipulación de materiales biológicos Nivel II. *Todos los procedimientos para procesamiento de células y desarrollo de ensayos de CFU deberán ser llevados a cabo usando técnicas estériles y precauciones universales de bioseguridad.*
- Incubadora a 37°C con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y ≥ 95% de humedad. *Se recomienda el uso de incubadoras que contengan un recipiente con agua en su interior.*
- Microscopio invertido. *Se recomienda el uso de un microscopio invertido de calidad, equipado con un objetivo ocular de 10X ó 12,5X, objetivos planos de 2X, 4X, y 10X, y filtro azul.*
- El instrumental STEMvision™ para la obtención automática de imágenes y cuantificación de colonias hematopoyéticas se puede usar en lugar de un microscopio para cuantificar colonias en el ensayo de CFU. Visite [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) para más información.
- Equipos para procesamiento de células y recuento celular según sea necesario.

## Materiales y Reactivos

- MethoCult™ Cell Wash Medium (n.º de catálogo 87700)
- Agujas de punta roma, de calibre 16 (n.º de catálogo 28110)\*
- Placas de cultivo de 35 mm (n.º de catálogo 27100)\* o placas de cultivo de 6 pocillos SmartDish™ (n.º de catálogo 27370)
- Placa cuadrada para Recuento de 60 mm (n.º de catálogo 27500)\* o STEMgrid™ con 6 cuadrículas de recuento (n.º de catálogo 27000)
- Jeringas Luer lock: 3 mL (n.º de catálogo 28230), 6 mL
- Pipetas estériles y tubos de poliestireno estériles
- Placas de cultivo de 100 mm (p. ej. placas tratadas para el cultivo de tejidos, n.º de catálogo 27125)
- Placas de cultivo cuadradas de 245 mm x 245 mm (p. ej. placas cuadradas tratadas para el cultivo de tejidos de 245 mm x 245 mm, n.º de catálogo 27140) o placas de cultivo de 150 mm
- Agua destilada estéril
- Reactivos y materiales para procesamiento y recuento de células, según sea necesario

\*Se recomienda el uso de productos de STEMCELL Technologies con los números de catálogo que se indican (ver Notas).

# MANIPULACIÓN E INSTRUCCIONES DE USO



## A. Preparación del Medio MethoCult™

1. Descongele el medio de metilcelulosa de MethoCult™ mediante refrigeración (2 - 8°C) de un día para otro o a temperatura ambiente (15 - 25°C).
2. Una vez descongelado, agite vigorosamente durante 1 - 2 minutos y deje reposar el medio durante al menos 5 minutos para que las burbujas suban a la superficie antes de alicuotar.
3. Con una jeringa Luer lock de 3 ó 6 mL, con una aguja de punta roma de calibre 16, preparar alícuotas de 3 mL por tubo para realizar cultivos de 1,1 mL por duplicado, o de 4 mL por tubo para realizar cultivos de 1,1 mL por triplicado. Los tubos podrán ser utilizados de inmediato, o podrán ser almacenados a -20°C para su uso posterior. *No utilice una pipeta estándar para alicuotar la metilcelulosa, puesto que el volumen dispensado no será preciso. Utilice agujas de punta roma para la dispensación a fin de evitar lesiones con las puntas de las agujas.*

## B. Preparación de la Muestra de Células

1. La procedencia de las células humanas y el método de procesamiento de la muestra dependen de las necesidades de cada laboratorio.
  2. Se recomienda que las muestras celulares sean lavadas y diluidas con el MethoCult™ Cell Wash Medium.
  3. A continuación se exponen ejemplos de técnicas apropiadas de procesamiento celular:
    - a. **Suspensiones de células mononucleares** o células de baja densidad obtenidas por separación por gradiente de densidad usando reactivos tales como Lymphoprep™ (n.º de catálogo 07801).
    - b. **Sangre periférica movilizada** preparada usando un equipo de aféresis.
    - c. **Suspensiones celulares con depleción de glóbulos rojos**, preparadas por lisis o sedimentación de los glóbulos rojos.
    - d. **Células enriquecidas en CD34+** preparadas por métodos que incluyen la separación celular inmunomagnética y la separación de células activadas por fluorescencia (FACS).
- Lymphoprep es una marca comercial de Alere Technologies.
4. Cuento las células nucleadas usando un hemocitómetro después de diluirlas con ácido acético al 3% junto con azul de metileno (n.º de catálogo 07060) o utilice un contador automático de células. Se deben emplear métodos para analizar las células viables (p. ej. exclusión mediante tinte azul de tripano [n.º de catálogo 07050]) para las preparaciones de células en caso de que se prevea una menor viabilidad de las células (p. ej. células crioconservadas).

## C. Desarrollo del Formadoras de Colonias Unidad (CFU) Ensayos

1. Descongelar tubos de MethoCult™ durante la noche en el refrigerador (2 - 8°C) o a temperatura ambiente (15 - 25°C).
2. **Diluir las células:** Preparar una suspensión celular concentrada 10X (ver Tabla 1 y Notas) en MethoCult™ Cell Wash Medium. Por ejemplo, preparar una muestra de  $5 \times 10^5$  células por mL para sembrar  $5 \times 10^4$  células en cada placa.
3. Agregar 0,3 mL de células a 3 mL de MethoCult™ para cultivos duplicados, o 0,4 mL de células a 4 mL de MethoCult™ para cultivos triplicados.

*Esta relación 1:10 v/v de células: medio proporciona una viscosidad apropiada a dicho medio para asegurar un crecimiento y morfología óptimos de las CFU.*
4. Agite bien el tubo para mezclar completamente el contenido y déjelo reposar durante 2 - 5 minutos para que las burbujas suban a la superficie antes de la dispensación.
5. **Dispensación:** Utilizando una jeringa de 3 mL con una aguja de punta roma de 16 G, dispense 1,1 mL de la mezcla de MethoCult™ que contiene células en 2 (o 3) placas de 35 mm. Inclinar y girar suavemente cada placa para distribuir la metilcelulosa de forma homogénea.
6. **Agregar 3 mL** de agua estéril a una placa de 35 mm a la que ha quitado la cubierta. En los ensayos por duplicado, colocar las tres placas en una placa de cultivo de 100 mm. Para

ensayos triplicados, coloque las placas de 35 mm en un instrumental de cultivo con una tapa suelta (p. ej., placas de cultivo de 150 mm, placas de cultivo cuadradas de 245 mm x 245 mm).

*Usar siempre placas hidratadas para mantener la humedad.*

7. **Incube** a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> con un  $\geq 95\%$  de humedad durante 14 - 16 días. Para lograr un crecimiento óptimo de las CFU es esencial mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.

*Se recomienda el uso de incubadoras con camisa de agua, con una bandeja con agua en la cámara. Se recomienda también el monitoreo continuo de la temperatura y los niveles de CO<sub>2</sub> (ver Notas).*

## D. Identificación y Recuento de Colonias

El recuento y la clasificación de colonias humanas se lleva a cabo una vez transcurridos de 14 a 16 días de cultivo.

### Descripción del recuento

Usar un microscopio invertido de alta calidad, equipado con objetivos planos de 2X, 4X, y 10X, y platina para placas de 60 mm. Primero barrer la placa con objetivo de bajo aumento (objetivo 2X, aumento 20 - 25X) para evaluar la distribución relativa de las colonias. Contar las CFU-GM, CFU-G, y CFU-M con bajo aumento. Usar gran aumento para confirmar el tipo de colonia cuando sea necesario.

## DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS

**CFU-GM:** La unidad productora de colonias de la serie granulocito-macrófago produce una colonia que contiene > 40 granulocitos y macrófagos.

**CFU-G** y **CFU-M:** Colonias que contienen > 40 granulocitos y macrófagos, respectivamente.

## NOTAS

- Para dispensar con precisión el medio viscoso de metilcelulosa deberán usarse jeringas y agujas de gran calibre de punta roma, que además evitarán la producción de heridas por pinchazo con las agujas.
- Es importante usar placas de Petri cuya baja adherencia celular haya sido previamente comprobada, porque una excesiva adherencia celular puede inhibir el crecimiento de las CFU o dificultar el reconocimiento de las colonias.
- Es importante monitorear continuamente la temperatura y los niveles de CO<sub>2</sub> y humedad de la incubadora para asegurar unas condiciones de cultivo apropiadas.
- Pueden usarse muestras de células frescas o congeladas.
- Cada laboratorio deberá establecer los procedimientos de procesamiento de células adecuados. Por ejemplo, las muestras de sangre fresca del cordón umbilical que hayan sido privadas de eritrocitos mediante sedimentación utilizando HetaSep™ (n.º de catálogo 07806) pueden contener eritrocitos residuales, que pueden interferir en la detección e identificación de colonias.
- Deberá agregarse suficiente cantidad de células para obtener aproximadamente de 25 a 120 colonias por placa de 35 mm (cultivo de 1,1 mL). Cada laboratorio deberá establecer las

concentraciones apropiadas de siembra, llevando a cabo pruebas de cultivos a dos o cuatro diferentes concentraciones celulares.

- Para facilitar la identificación y cuantificación de las colonias se pueden preparar ensayos con un instrumental de cultivos SmartDish™ en lugar de en placas de 35 mm. Entonces, STEMvision se puede utilizar para el recuento automatizado. Por otra parte, se puede utilizar STEMgrid™ de 6 cuadrículas como ayuda para la cuantificación manual.
- Si desea obtener más información acerca del reconocimiento y la cuantificación de las colonias hematopoyéticas, consulte la bibliografía que se muestra a continuación, así como Manual Técnico: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (n.º de documento 1000005589; disponible solo en inglés).

**Tabla 1. Concentraciones Celulares Recomendadas para Sembrar**

PROCEDENCIA DE LAS CÉLULAS	CÉLULAS POR PLACA DE 35 MM
MO, tratadas con cloruro de amonio	5 x 10 <sup>4</sup> (2 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>5</sup> )
MO, baja densidad	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
SC, baja densidad	1 x 10 <sup>4</sup> (5 x 10 <sup>3</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> )
SC, con depleción de glóbulos rojos por sedimentación	5 x 10 <sup>4</sup> (2 - 6 x 10 <sup>4</sup> )
SP, baja densidad	2 x 10 <sup>5</sup> (1 - 2 x 10 <sup>5</sup> )
SPM, baja densidad	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
MO, SC, SPM con depleción linfocitaria (enriquecidas en CD34+)	1000 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )
Células CD34+ (MO, SC, SPM)	500 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )

## PRODUCTOS RELACIONADOS

Para productos relacionados, incluyendo medios de cultivo y de almacenamiento especializados, suplementos, anticuerpos, citoquinas, y moléculas pequeñas, visite [www.stemcell.com/HSPCworkflow](http://www.stemcell.com/HSPCworkflow) o contáctenos por correo electrónico a [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com). Para productos frescos o criopreservados disponibles de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, y de médula ósea en su región, visite [www.stemcell.com/primarycells](http://www.stemcell.com/primarycells).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Eaves C. (1995) Assays of hematopoietic progenitor cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS & Kipps TJ (Eds.). Williams Hematology Fifth Edition (pp. L22-6). New York: McGraw-Hill Inc.
2. Wognum B et al. (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. In: Helgason CD & Miller CL (Eds.). Basic Cell Culture Protocols (pp. 267-83). Clifton, New Jersey: Humana Press Inc.
3. Eaves C & Lambie K. (1995) Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Vancouver: STEMCELL Technologies Inc. *Disponible solo en inglés (n.º de catálogo 28700)*.
4. Nissen-Druey C et al. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. Basel, Switzerland: S. Karger Medical and Scientific Publishers. *Disponible solo en inglés (n.º de catálogo 28760)*.

## ASISTENCIA TÉCNICA

Si necesita asistencia técnica, envíenos un correo electrónico a [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com) o llame al **+1.604.877.0713**, o llame al número gratuito Europea **00800 7836 2355**.





Para más información, entre en [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

Si necesita una copia impresa o una versión de este documento traducido a un determinado idioma, no dude en ponerse en contacto con el servicio de asistencia técnica.

**EC REP MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

<b>REF</b> Número de catálogo o de referencia	<b>LOT</b> Código de lote	 Usar hasta: AAAA-MM
 Precaución, consultar los documentos adjuntos	<b>IVD</b> Equipo médico para diagnóstico in vitro	 Conservar dentro del rango de temperaturas
<b>CE</b> Marca CE	 Identificación del fabricante (nombre y domicilio)	<b>EC REP</b> Representante autorizado para la Comunidad Europea

 **STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)**

Document #1000006883

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)

**EC REP**

**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany

**CE IVD**

Version 01

2021

**MethoCult™ H84535**

Media Metilcellulosa con Citochine Ricombinanti

**REF 84535****100 mL****UTILIZZO**

Il MethoCult™ GF H84535 è utilizzato nei test colony-forming unit (CFU) per determinare e quantificare i progenitori ematopoietici umani in campioni di midollo osseo (BM), sangue periferico mobilizzato (MPB), sangue periferico (PB), e sangue di cordone ombelicale (CB). È consigliato per cellule arricchite CD34+, cellule mononucleate, e cellule isolate con altri metodi di purificazione.

**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

MethoCult™ GF H84535 ha una composizione ottimale per supportare la crescita dei progenitori di granulociti e macrofagi (CFU-GM, CFU-M, CFU-G).

**Componenti Presenti:**

- Iscove's MDM
- Metilcellulosa
- Siero bovino fetale
- Albumina sierica bovina
- 2-Mercaptoetanolo
- Ricombinante umano (rh) stem cell factor
- rh GM-CSF
- rh G-CSF
- rh Interleuchina 3
- rh Interleuchina 6

**CONTROLLI DI QUALITÀ**

I terreni in metilcellulosa MethoCult™ sono prodotti utilizzando una tecnica asettica, processi rigorosamente controllati e componenti accuratamente selezionati.

Ogni lotto di MethoCult™ è testato per la sterilità secondo i metodi USP e sottoposto a controlli di qualità per verificare le performance di crescita mediante saggi clonogenici su campioni umani di BM, CB, o PB. Il Certificato di analisi è disponibile su richiesta.

**CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

Conservare a temperature comprese tra -15 e -25°C. Prodotto stabile a -15 e -25°C fino alla data di scadenza sull'etichetta.

Non congelare e scongelare ripetutamente.

Qualora il prodotto ricevuto si presenti parzialmente scongelato, porlo immediatamente a -20°C o congelarlo e aliquotarlo come descritto nella sezione Manipolazione e Istruzioni per l'Uso.

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

1. Solo per utilizzatori professionisti.
2. Questo prodotto è da utilizzare per diagnostica in vitro.
3. Questo prodotto deve essere maneggiato da personale esperto che osservi le norme procedurali di laboratorio.
4. Questo prodotto contiene materiale di origine animale e deve essere trattato come un potenziale vettore e trasmettitore della malattia. Per l'utilizzo dei reagenti e il loro smaltimento si devono osservare tutte le direttive locali o nazionali.
5. Questo prodotto è potenzialmente irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la pelle. Può essere nocivo se ingerito. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi, l'inalazione e l'ingestione. Può causare reazioni allergiche in individui sensibili.

# MATERIALI SPECIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

## Strumentazione

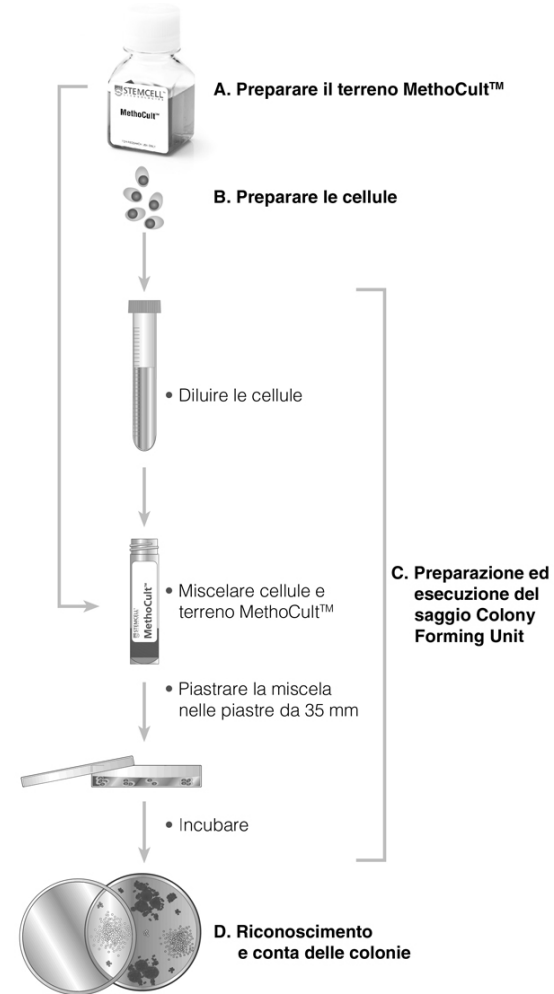
- Cappa di sicurezza Biohazard certificata a Livello II per la manipolazione di materiali biologici. *Tutte le procedure di manipolazione delle cellule e dei saggi CFU devono essere eseguite in sterilità ed in condizioni di sicurezza per l'operatore.*
- L'incubatore deve essere impostato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> e umidità superiore al 95%. *Si consiglia un incubatore a camicia d'acqua con vasca d'acqua all'interno della camera.*
- Microscopio invertito. *Si consiglia l'uso di un microscopio invertito di qualità, con obiettivi oculari 10X o 12,5X e obiettivi planari 2X, 4X, e 10X. Si raccomanda un filtro blu.*
- STEMvision™, per l'imaging automatizzato e il conteggio delle colonie ematopoietiche, può essere utilizzata al posto del microscopio per contare le colonie nel saggio CFU. Per maggiori dettagli, consultare il sito [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).
- Strumenti richiesti per processare e contare le cellule.

## Materiali e Reagenti

- MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalogo #87700)
- Aghi a punta piatta da 16 gauge (Catalogo #28110)\*
- Piastre di coltura da 35 mm (Catalogo #27100)\* oppure piastre di coltura a 6 pozzetti SmartDish™ (Catalogo #27370)
- Piastre grigliate per la conta da 60 mm (Catalogo #27500)\* oppure griglia per la conta STEMgrid™-6 (Catalogo #27000)
- Siringhe (Luer lock): da 3 mL (Catalogo #28230), 6 mL
- Pipette e provette in polistirene sterili
- Piastre di coltura da 100 mm (ad esempio piastre di coltura per tessuti trattati, Catalogo #27125)
- Piastre di coltura quadrate 245 mm x 245 mm (ad esempio piastre di coltura quadrate per tessuti trattati da 245 mm x 245 mm, Catalogo #27140) oppure piastre di coltura da 150 mm
- Capsule Petri usa e getta da 100 mm
- Acqua distillata sterile
- Reagenti e materiali richiesti per processare e contare le cellule.

\*Si raccomanda l'uso di prodotti STEMCELL Technologies con i numeri di Catalogo indicati (vedere Note).

# INDICAZIONI DI UTILIZZO



## A. Preparazione del Terreno MethoCult™

1. Scongela il terreno in metilcellulosa MethoCult™ refrigerandolo il giorno prima (2 - 8°C) oppure tenendolo a temperatura ambiente (15 - 25°C).
2. Una volta scongelato, agitare vigorosamente per 1 - 2 minuti e quindi lasciar riposare per almeno 5 minuti per consentire alle bolle d'aria di dissolversi prima della suddivisione in aliquote.
3. Mediante una siringa da 3 o 6 mL Luer lock con ago a punta piatta da 16 gauge, aliquotare 3 mL per provetta per colture in doppio di 1,1 mL, oppure 4 mL per provetta per colture in triplo di 1,1 mL. Le provette possono essere utilizzate subito oppure conservate a -20°C per un uso successivo. *Non utilizzare pipette standard per aliquotare la metilcellulosa in quanto il volume dispensato non sarà accurato. Utilizzare aghi a punta piatta per la dispensazione in modo da prevenire i danni da puntura.*

## B. Preparazione delle Cellule

1. Il campione di partenza ed il metodo per processare le cellule variano e dipendono dal laboratorio.
2. Si consiglia di lavare e diluire le cellule nel MethoCult™ Cell Wash Medium.
3. Esempi di campioni idonei:
  - a. **Sospensione di cellule mononucleate** o cellule a bassa densità, isolate tramite separazione su gradiente, es. Lymphoprep™ (Catalogo #07801).
  - b. **Sangue periferico mobilizzato** isolato tramite aferesi.
  - c. **Sospensione cellulare privata degli eritrociti** tramite lisi o sedimentazione degli stessi.
  - d. **Popolazione arricchita di cellule CD34+** ottenuta tramite separazione immunomagnetica o sorter citofluorimetrico (fluorescence-activated cell sorting - FACS).  
Lymphoprep è un marchio di fabbrica di Alere Technologies.
4. Contare le cellule nucleate utilizzando un ematocitometro dopo diluizione con acido acetico al 3% contenente blu di metilene (Catalogo #07060) o utilizzando un contacellule automatico. *Quando si lavora su preparazioni cellulari dove sia prevista una riduzione della vitalità delle cellule (ad esempio cellule crioconservate), è buona norma saggiare la vitalità delle cellule (ad esempio con l'esclusione del colorante blu tripano [Catalogo #07050]).*

## C. Preparazione ed Esecuzione del Saggio Colony-Forming Unit

1. Scongela le provette di MethoCult™ mettendole il giorno prima a 2 - 8°C oppure a temperatura ambiente 15 - 25°C.
2. **Diluizione delle cellule:** preparare una sospensione cellulare 10X (vedere Tabella 1 e Note) di cellule nel MethoCult™ Cell Wash Medium. Ad esempio, preparare un campione di cellule  $5 \times 10^5$ /mL per una concentrazione di  $5 \times 10^4$  cellule per ogni piastra.
3. Aggiungere 0,3 mL di cellule a 3 mL di MethoCult™ per colture in doppio oppure 0,4 mL di cellule a 4 mL di MethoCult™ per colture in triplo.  
*Questo è un rapporto 1:10 v/v di cellule: il terreno così raggiunge una corretta viscosità che assicura una crescita ottimale delle CFU ed una loro corretta morfologia.*
4. Vorticare la provetta per mescolare il contenuto con cura e lasciare, quindi, riposare per 2 - 5 minuti per consentire alle bolle d'aria di dissolversi prima della dispensazione.
5. **Dispensazione:** Utilizzando una siringa da 3 mL collegata a un ago a punta piatta da 16 gauge, dispensare 1,1 mL di miscela MethoCult™ contenente cellule in 2 (o 3) piastre da 35 mm. Ruotare e inclinare delicatamente ogni capsula per distribuire omogeneamente la metilcellulosa.
6. **Aggiungere 3 mL** di acqua sterile ad una piastra da 35 mm senza coperchio. Per i test in duplicato, posizionare tutte e 3 le piastre in una capsula per coltura da 100 mm. Per i test in triplo, posizionare le piastre da 35 mm in una piastra con coperchio appoggiato (ad esempio piastre da 150 mm, piastre di coltura quadrate 245 mm x 245 mm).

*In ogni caso è indispensabile aggiungere una capsula con acqua per mantenere una corretta umidità.*

7. **Incubare** a 37°C, al 5% di CO<sub>2</sub>, con  $\geq$  umidità al 95% per 14 - 16 giorni. Le corrette condizioni di coltura sono un fattore critico per la crescita ottimale delle CFU.

*Si consiglia un incubatore a camicia d'acqua con vasca d'acqua all'interno della camera ed un controllo frequente della temperatura e del livello di CO<sub>2</sub> (vedere Note).*

## D. Classificazione e Conta delle Colonie

La conta e la classificazione delle colonie umane si effettuano dopo 14 - 16 giorni di coltura.

### Consigli per la conta

Si consiglia l'uso di un microscopio invertito di qualità, con obiettivi planari 2X, 4X, e 10X ed un adattatore per piastre da 60 mm. Osservare prima la piastra a basso ingrandimento (obiettivo 2X, ingrandimento 20 - 25X) per valutare la distribuzione delle colonie. Contare le CFU-GM, CFU-G, e CFU-M a basso ingrandimento. Utilizzare l'alto ingrandimento (obiettivo 4X, ingrandimento 40 - 50X) per confermare il tipo di colonie come richiesto.

## DESCRIZIONE DELLE COLONIE

**CFU-GM:** la Colony-forming unit-granulocyte, macrophage produce una colonia contenente più di 40 granulociti e macrofagi.

**CFU-G e CFU-M:** Le colonie contengono, rispettivamente, > 40 granulociti e macrofagi.

## NOTE

- Si consiglia di usare siringhe e aghi larghi a punta piatta per una dispensazione accurata del terreno viscoso in metilcellulosa e per prevenire ferite con materiale potenzialmente infetto.
- È molto importante utilizzare capsule Petri che siano testate per una bassa aderenza cellulare al fine di non inibire la crescita delle CFU o interferire con il riconoscimento delle colonie.
- È importante monitorare costantemente la temperatura dell'incubatore, il livello di CO<sub>2</sub> e l'umidità per assicurare le corrette condizioni di coltura.
- Si possono utilizzare sia campioni di cellule fresche che congelate.
- La procedura idonea per processare le cellule deve essere stabilita dal laboratorio. Ad esempio, i campioni di sangue cordonale fresco purificato da globuli rossi attraverso la sedimentazione con HetaSep™ (Catalogo #07806) possono contenere globuli rossi residui che interferiscono con la ricerca e l'identificazione delle colonie.
- Si deve aggiungere un numero sufficiente di cellule per ottenere approssimativamente da 25 a 120 colonie per piastra da 35 mm (1,1 mL di coltura). Ogni laboratorio dovrebbe stabilire le concentrazioni appropriate da piastrare eseguendo delle colture di prova a 2 - 4 diverse concentrazioni.

- Per facilitare l'identificazione automatica e la conta delle colonie i saggi devono essere impostati nelle capsule SmartDish™ e non nelle piastre da 35 mm. Per la conta automatica STEMvision™ può essere utilizzata. In alternativa, può essere utilizzata STEMgrid™-6 per assistere con la conta manuale.
- Per ulteriori informazioni tecniche sul riconoscimento e la conta delle colonie ematopoietiche, fare riferimento alle pubblicazioni di seguito citate e al Manuale Tecnico: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (Documento #10000005589; disponibile solo in inglese).

**Tabella 1. Concentrazioni Raccomandate di Cellule da Piastrare**

CAMPIONE DI PARTENZA	CELLULE PER PIASTRA 35 mm
BM, trattato con ammonio cloruro	5 x 10 <sup>4</sup> (2 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>5</sup> )
BM, bassa densità	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
CB, bassa densità	1 x 10 <sup>4</sup> (5 x 10 <sup>3</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> )
CB, RBC-depleto per sedimentazione	5 x 10 <sup>4</sup> (2 - 6 x 10 <sup>4</sup> )
PB, bassa densità	2 x 10 <sup>5</sup> (1 - 2 x 10 <sup>5</sup> )
MPB, bassa densità	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
Lin-depleto (BM, CB, MPB arricchiti di cellule CD34+)	1000 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )
Cellule CD34+ (BM, CB, MPB)	500 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )

## PRODOTTI CORRELATI

Per prodotti correlati come terreni di coltura e terreni di congelamento, supplementi, anticorpi, citochine e 'small molecules', consultare [www.stemcell.com/HSPCworkflow](http://www.stemcell.com/HSPCworkflow) o contattarci a [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com). Per disponibilità di prodotti di sangue periferico, sangue di cordone ombelicale, midollo osseo nella vostra regione, consultare [www.stemcell.com/primarycells](http://www.stemcell.com/primarycells).

## BIBLIOGRAFIA

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Wognum B, Yuan N, Lai B, Miller CL: Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. Methods Mol Biol 946:267-283, 2013.
3. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Disponibile solo in inglese (Catalogo #28700).*
4. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Disponibile solo in inglese (Catalogo #28760).*

## ASSISTENZA TECNICA









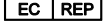
Per assistenza tecnica, contattarci per e-mail all'indirizzo [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com) o telefonare al numero **+1.604.877.0713**, o al numero verde europeo **00800 7836 2355**. Per ulteriori informazioni visitare [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

Se avete bisogno di una copia stampata oppure di una versione tradotta di questo documento in una certa lingua, contattate il supporto tecnico.

 **MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

 Numero di catalogo o di riferimento	 Lotto	 Usare prima: AAAA-MM
 Attenzione, consultare i documenti allegati	 Dispositivo medico diagnostico in vitro	 Conservare entro limiti di temperatura
 Marchio CE	 ID del produttore (nome e indirizzo)	 Rappresentante autorizzato EC dalla Comunità Europea

 **STEMCELL Technologies Canada Inc.** | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)

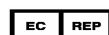
Document #1000006883

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)



**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



Version 01

2021



**MethoCult™ H84535**

Methylcellulose-Medium mit rekombinanten Zytokinen

**REF 84535****100 mL****VERWENDUNG**

MethoCult™ GF H84535 ist für den Nachweis und zur Quantifizierung von humanen hämatopoietischen Vorläuferzellen in Knochenmark (KM), mobilisiertem Peripherblut (MPB), Peripherblut (PB), und Nabelschnur-blutproben (NSB) mittels koloniebildender Zell-Ansätze (CFU-Assays) vorgesehen. Es wird für mononukleäre Zellen, CD34+ angereicherte Zellen, und Zellen die anders aufgereinigt wurden empfohlen.

**PRODUKTBESCHREIBUNG**

MethoCult™ GF H84535 wurde zur optimalen Wachstumsförderung von Granulozyten-Makrophagen Vorläufern (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) entwickelt.

**Bestandteile umfassen:**

- Iscove's MDM
- Methylcellulose
- Fötale Kälberserum
- Rinder Serumalbumin
- 2-Mercaptoethanol
- Rekombinant Human (rh) Stammzell Faktor
- rh GM-CSF
- rh G-CSF
- rh Interleukin 3
- rh Interleukin 6

**QUALITÄTSKONTROLLE**

MethoCult™ Methylcellulose-basierte Medien werden unter aseptischen Bedingungen und in streng kontrollierten Fertigungsabläufen und unter Verwendung von umfangreich vorgetesteten Bestandteilen hergestellt.

Jede Lot MethoCult™ wird gemäß USP Verfahrensweisen auf Sterilität getestet. Die Qualität wird mit Hilfe von CFU-Assays mit humanen KM-, NSB-, oder PB-Proben geprüft. Ein Analysezertifikat ist auf Anfrage erhältlich.

**LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Bei -15 bis -25°C lagern. Produktstabilität bei -15 bis -25°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum.

Nicht wiederholt auftauen und einfrieren.

Wenn das Produkt teilweise aufgetaut empfangen wird, sofort bei -20°C einfrieren oder auftauen und wie unter Handhabung und Anwendungshinweise beschrieben aliquotieren.

**WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Nur für qualifizierte Anwender.
2. Dieses Produkt ist Zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
3. Dieses Produkt sollte nur von ausgebildetem Personal unter Beachtung von GLP Bestimmungen angewandt werden.
4. Dieses Produkt enthält Material tierischen Ursprungs und sollte als potentieller Träger und Sender der Krankheit behandelt werden. Behandeln Sie in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften und Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung und Entsorgung.
5. Dieses Produkt kann zu Reizungen von Augen, Atemwegen und Haut führen. Es kann bei Einnahme auch gesundheitsschädlich sein. Kontakt mit Augen und Haut vermeiden, nicht einatmen oder schlucken. Kann bei empfindlichen Personen zu allergischen Reaktionen führen.

## ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES MATERIAL

### Ausrüstung

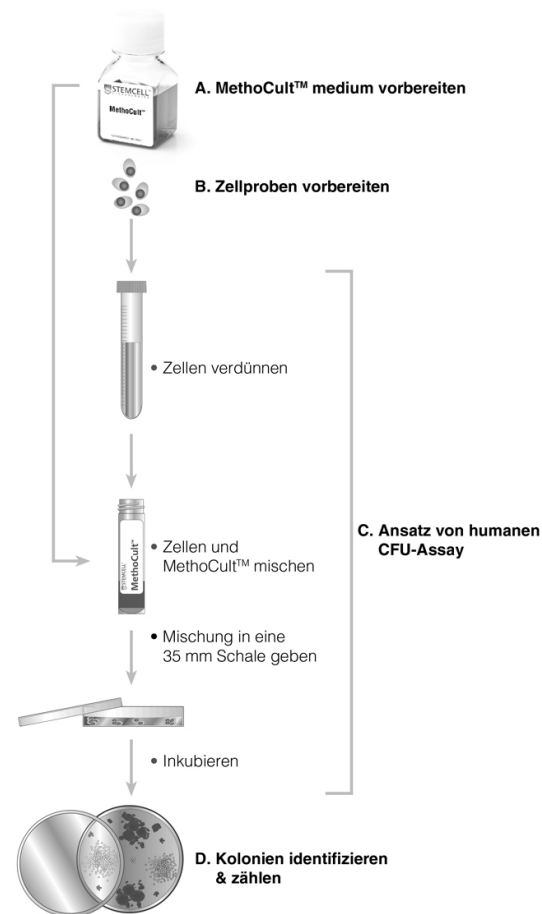
- Sicherheitswerkbank der Klasse II für biologische Materialien. *Alle Zell-verarbeitungsprozesse und Ansätze von CFU-Assays sollten aseptisch und unter Beachtung globaler Sicherheitsvorschriften durchgeführt werden.*
- Inkubator eingestellt auf 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und ≥ 95% Luftfeuchtigkeit. *Der Gebrauch eines Wassermantel-Inkubators mit Wasserpfanne in der Kammer wird empfohlen.*
- Inversmikroskop. *Der Gebrauch eines Inversmikroskops guter Qualität mit 10X oder 12,5X Okular und 2, 4, und 10X Planar-Objektiven und einem Blaufilter wird empfohlen.*
- Das STEMvision™-Instrument zur automatisierten Bildgebung und Auswertung von hämatopoetischen Kolonien kann anstelle eines Mikroskops für die Auswertung von Kolonien verwendet werden. Weitere Informationen unter [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).
- Ausrüstung für Zellverarbeitung und Zellzählung.

### Reagenzien und Materialien

- MethoCult™ Cell Wash Medium (Katalognr. 87700)
- 16 Gauge Blunt-End (stumpfe) Kanülen (Katalognr. 28110)\*
- 35 mm Petrischalen (Katalognr. 27100)\* oder SmartDish™ 6-Well-Kulturplatten (Katalognr. 27370)
- 60 mm gradierte Kultur Schalen (Katalognr. 27500)\* oder STEMgrid™-6 Zählraster (Katalognr. 27000)
- Spritzen (Luer lock): 3 mL (Katalognr. 28230), 6 mL
- Sterile Pipetten und sterile Polystyrol Röhrchen
- 100-mm-Kulturschalen (z. B. Kulturschalen für behandeltes Gewebe, Katalognr. 27125)
- Viereckige Kulturschalen, 245 mm x 245 mm (z. B. Kulturschalen für behandeltes Gewebe, 245 mm x 245 mm, Katalognr. 27140) oder 150-mm-Kulturschalen
- Steriles, destilliertes Wasser
- Ausrüstung für Zellverarbeitung und Zellzählung

\*Die Verwendung von STEMCELL Technologies Produkten mit den angegebenen Katalognummern wird empfohlen (siehe Anmerkungen).

## HANDHABUNG UND GEBRAUCHSANLEITUNG



### A. MethoCult™ Medium Vorbereiten

1. Das Methylcellulose-basierte Medium MethoCult™ über Nacht im Kühlschrank (2 - 8°C) oder bei Raumtemperatur (15 - 25°C) auftauen.
2. Nach dem Auftauen für 1 - 2 Minuten kräftig schütteln und dann vor dem Aliquotieren mindestens 5 Minuten stehen lassen, damit Bläschen an die Oberfläche steigen können.
3. Mit Hilfe einer 3 oder 6 mL Luer lock Spritze mit 16 Gauge Blunt-End Kanüle, 3 mL pro Röhrchen aliquotieren für 1,1 mL Doppelansätze oder 4 mL pro Röhrchen für 1,1 mL Dreifach-Ansätze. Röhrchen können sofort verwendet oder bei -20°C für spätere Verwendung gelagert werden. *Zum Aliquotieren von Methylcellulose keine Standardpipette verwenden, da die abgefüllten Volumina ungenau sind. Stumpfe Nadeln zum Ausplattieren verwenden, um Nadelstichverletzungen zu vermeiden.*

### B. Zellprobe Vorbereiten

1. Die Art und Aufbereitungsmethode der humanen Zellprobe hängt von den individuellen Laboranforderungen ab.
2. Es wird empfohlen, Zellproben mit MethoCult™ Cell Wash Medium zu waschen und zu verdünnen.

 STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)

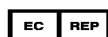
Document #1000006883

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)



MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



Version 01

2021

3. Nachfolgend einige Beispiele für geeignete Techniken der Zellverarbeitung:

- Mononukleäre Zellsuspensionen** oder Zellen nach Ficoll gewonnen durch Dichtegradienten-zentrifugation mit Reagenzien wie Lymphoprep™ (Katalognr. 07801).
- Mobilisierte Peripherblutproben** gewonnen mit einem Zellseparator.
- Erythrozyten-depletierte Zellsuspensionen** gewonnen durch Lyse oder Sedimentation der roten Blutzellen.
- CD34+ angereicherte Zellen** gewonnen durch Methoden wie immunomagnetische Zellseparation oder fluoreszenzaktivierte Zellsortierung.

Lymphoprep ist ein eingetragenes Warenzeichen von Alere Technologies.

4. Nukleäre Zellen nach Verdünnung mit 3% iger Essigsäure mit Methylenblau (Katalognr. 07060) mit einem Hämazytometer oder einem automatisierten Zellzähler zählen. *Testmethoden für lebensfähige Zellen (z. B. Trypanblau-Ausschluss [Katalognr. 07050]) sollten zu Zellpräparationen verwendet werden, bei denen eine Abnahme der Zellvitalität zu erwarten ist (z. B. kryopräservierte Zellen).*

### C. Ansatz von Humanen CFU-Assays

- MethoCult™ Röhrcchen über Nacht im Kühlschrank (2 - 8°C) oder bei Raumtemperatur auftauen (15 - 25°C).
- Zellen verdünnen:** Eine 10-fach konzentrierte Zellsuspension (siehe Tabelle 1 und Anmerkungen) in MethoCult™ Cell Wash Medium herstellen. Zum Beispiel eine Zellprobe von  $5 \times 10^5$  pro mL herstellen, um eine Aussaatdichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 35mm Petrischale zu erreichen.
- 0,3 mL Zellen in 3 mL MethoCult™ oder für Dreifachansätze 0,4 mL Zellen in 4 mL MethoCult™ hinzugeben.

*Dieses 1:10 v/v Verhältnis von Zellen: Medium ergibt die richtige Mediumviskosität, um optimales CFU-Wachstum und Morphologie zu gewährleisten.*

- Das Röhrcchen durch Vortexen gründlich vermischen und vor dem Ausplattieren dann 2 - 5 Minuten stehen lassen, damit die Bläschen an die Oberfläche steigen können.
- Ausplattieren:** Mit einer an einer stumpfen Nadel Größe 16 angebrachten 3-mL-Spritze 1,1 mL MethoCult™-Mischung mit den Zellen in 2 (oder 3) 35 mm-Schalen geben. Jede Schale vorsichtig kippen und schwenken, um die Methylzellulose gleichmäßig zu verteilen.
- 3 mL** steriles Wasser in eine offene 35 mm Kulturschale geben. Für Doppel-Ansätze alle drei Schalen in eine 100 mm Kulturschale stellen. Für Dreifachansätze die 35 mm-Schalen in Kulturschalen mit locker aufliegendem Deckel (z. B. 150-mm-kulturschalen, viereckige kulturschalen, 245 mm x 245 mm) geben.

*Immer mit Wasser gefüllten Schalen für Feuchtigkeit sorgen.*

- Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und  $\geq 95\%$  Feuchtigkeit für 14 - 16 Tage inkubieren. Korrekte Kulturbedingungen sind wichtig für optimales CFU-Wachstum.  
*Ein Wassermantel-Inkubator mit Wasser- pfanne in der Kammer und die regelmäßige Überwachung von Temperatur und CO<sub>2</sub> Gehalt wird empfohlen (siehe Anmerkungen).*

### D. Identifikation und Zählung der Kolonien

Das Zählen und Klassifizieren der humanen Kolonien erfolgt nach 14 - 16 Tagen in Kultur.

#### Auswertung Überblick

Für die Auswertung ein hochqualitatives Inversmikroskop mit 2X, 4X, und 10X Planar-Objektiven und einer Halterung für 60 mm Schalen benutzen. Die Schale zuerst mit geringer Vergrößerung (2-fach Objektiv, 20 - 25 fache Vergrößerung) anschauen, um die ungefähre Verteilung der Kolonien festzustellen. Die CFU-M, CFU-G, und CFU-M Kolonien mit geringer Vergrößerung auszählen. Mit starker Vergrößerung (4-fach Objektiv, 40 - 50-fache Vergrößerung) die Kolonietypen, falls nötig, bestätigen.

### BESCHREIBUNGEN DER KOLONIEN

**GFU-GM:** (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage) bildet eine Kolonie mit > 40 Granulozyten und Makrophagen.

**CFU-G** und **CFU-M:** Kolonien enthalten > 40 Granulozyten bzw. Makrophagen.

### ANMERKUNGEN

- Spritzen mit dicken blunt-end Kanülen sollten zum akkuraten Verteilen von viskosem Methylzellulosemedium und zur Vermeidung von Stichverletzungen benutzt werden.
- Die Verwendung von Petrischalen mit geringer Adhärenz ist wichtig, da übermäßige Zelladhärenz das CFU-Wachstum behindern oder beim Erkennen der Kolonien stören kann.
- Um ordnungsgemäße Zellkulturbedingungen zu gewährleisten, ist es wichtig, die Temperatur, den CO<sub>2</sub> Gehalt und die Feuchtigkeit regelmäßig zu überwachen.
- Die verwendeten Zellproben können frisch oder cryokonserviert sein.
- In jedem Labor müssen geeignete Zellverarbeitungsverfahren festgelegt werden. Beispiel: Frische Nabelschnurblutproben, die durch Sedimentation mit HetaSep™ (Katalognr. 07806) Erythrozyten-depletiert wurden, könnten Rest-Erythrozyten enthalten, was den Nachweis und die Identifikation von Kolonien beeinträchtigen könnte.
- Um ungefähr 25 bis 120 Kolonien pro 35 mm Schale (1,1 mL Kultur) zu erhalten, sollten ausreichend Zellen angesetzt werden. Jedes Labor sollte durch 2 - 4 Testansätze mit jeweils unterschiedlicher Zellzahl adäquate Aussaatdichten etablieren.
- Um die Identifikation und Auswertung von Kolonien zu vereinfachen, können die Assays in SmartDish™ Kulturschalen anstatt in 35-mm-Schalen angesetzt werden. Zur automatisierten Zählung kann STEMvision™ dann verwendet werden. Alternativ kann STEMgrid™-6 zur Unterstützung bei der manuellen Zählung verwendet werden.
- Zusätzliche Hinweise beim Erkennen und Zählen von humanen hämatopoietischen Kolonien sind in den untenstehenden Referenzen und in der Technical Manual: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (Dokument #10000005589; nur in Englisch verfügbar).

**Tabelle 1. Empfohlene Zellaussaatdichten**

PROBENMATERIAL	ZELLEN PRO 35 MM PETRISCHALE
KM, NH <sub>4</sub> Cl-lysiert	5 x 10 <sup>4</sup> (2 x 10 <sup>4</sup> - 1 x 10 <sup>5</sup> )
KM, nach Ficoll	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
NSB, nach Ficoll	1 x 10 <sup>4</sup> (5 x 10 <sup>3</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> )
NSB, RBC-depletiert durch Sedimentation	5 x 10 <sup>4</sup> (2 - 6 x 10 <sup>4</sup> )
PB, nach Ficoll	2 x 10 <sup>5</sup> (1 - 2 x 10 <sup>5</sup> )
MPB, nach Ficoll	2 x 10 <sup>4</sup> (1 - 5 x 10 <sup>4</sup> )
Lin-deplet. (CD34+ angereichertes KM, NSB, MPB)	1000 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )
CD34+ Zellen (KM, NSB, MPB)	500 (500 - 2 x 10 <sup>3</sup> )

## ÄHNLICHE PRODUKTE

Für verwandte Produkte, einschließlich spezialisierter Kultur- und Kryokonservierungsmedien, Medienzusätzen, Antikörpern, Zytokinen und kleinemolekularen Proteinen, besuchen Sie uns bei [www.stemcell.com/HSPCworkflow](http://www.stemcell.com/HSPCworkflow) oder kontaktieren Sie uns unter [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com). Für frisches und kryokonserviertes peripheres Blut, Nabelschnurblut und Knochenmarkprodukte in Ihrer Region finden Sie unter [www.stemcell.com/primarycells](http://www.stemcell.com/primarycells).

## REFERENZEN

1. Eaves C. (1995) Assays of hematopoietic progenitor cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS & Kipps TJ (Eds.). Williams Hematology Fifth Edition (pp. L22–6). New York: McGraw-Hill Inc.
2. Wognum B et al. (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. In: Helgason CD & Miller CL (Eds.). Basic Cell Culture Protocols (pp. 267–83). Clifton, New Jersey: Humana Press Inc.
3. Eaves C & Lambie K. (1995) Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Vancouver: STEMCELL Technologies Inc. *Nur in Englisch verfügbar (Katalognr. 28700).*
4. Nissen-Druey C et al. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. Basel, Switzerland: S. Karger Medical and Scientific Publishers. *Nur in Englisch verfügbar (Katalognr. 28760).*

## TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Weitere technische Unterstützung erhalten Sie, indem Sie eine E-Mail an [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com) senden, oder telefonisch unter **+1.604.877.0713**, oder der Europäischen gebührenfreie Telefonnummer **00800 7836 2355**.

Weitere Informationen finden Sie unter [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).






Wenn Sie ein gedrucktes Exemplar oder eine übersetzte Version dieses Dokuments in einer bestimmten Sprache benötigen, wenden Sie sich bitte an die technische Unterstützung.

**EC REP**

**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

<b>REF</b> Katalog oder Referenznummer	<b>LOT</b> Lotnummer	 Verbrauch bis: JJJJ-MM
 Vorsicht, beiliegende Dokumentation beachten	<b>IVD</b> In Vitro Diagnostisches Medizinprodukt	 Für Lagerung innerhalb der Temperaturgrenzen
 CE Zeichen	 Hersteller Identifikation (Name & Adresse)	<b>EC REP</b> Autorisierter Händler innerhalb der EU

 **STEMCELL Technologies Canada Inc. | 1618 Station Street, Vancouver, BC | V6A 1B6 | Canada | [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)**

Document #1000006883

**For Technical Assistance**

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: [techsupport@stemcell.com](mailto:techsupport@stemcell.com)

**EC REP**

**MDSS GmbH**

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



Version 01

2021