

MethoCult™ GF H84545

Methylcellulose Medium with
Recombinant Cytokines

Catalog #84545

24 x 3 mL

PRODUCT DESCRIPTION

MethoCult™ GF H84545 is used 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. It is recommended for CD34+ enriched cells, mononuclear cells, and cells isolated by other purification methods.

MethoCult™ GF H84545 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.

SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Equipment

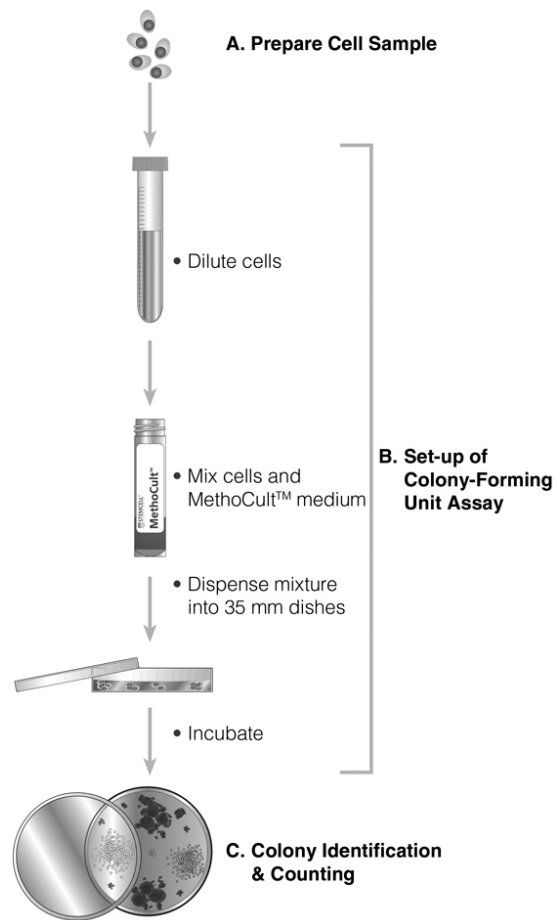
- Biohazard Safety Cabinet certified for Level II handling of biological materials. *All procedures for cell processing and setup of CFU assays should be performed using sterile technique and universal safe handling precautions.*
- Incubator set at 37°C with 5% CO₂ in air and ≥ 95% humidity. *Use of 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.stemvision.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 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.
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).
4. Count nucleated cells using a hemocytometer 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).*

Lymphoprep is a trademark of Alere Technologies.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #10000007074

Version 02

Page 2 of 20

B. 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 5×10^5 cells/mL in MethoCult™ Cell Wash Medium for a plating concentration of 5×10^4 cells per dish.
3. Add 0.3 mL of cells to 3 mL of MethoCult™.
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 two 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% CO₂, 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 CO₂ levels is recommended (see Notes).

C. 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 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.
- It is 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.
- It is important to routinely monitor incubator temperature and CO₂ 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.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #10000007074

Version 02

Page 3 of 20

Table 1. Recommended Cell Plating Concentrations

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

TECHNICAL ASSISTANCE

For technical support, contact us by email at techsupport@stemcell.com, or call either **+1.604.877.0713** or the European toll-free number 00800 7836 2355. For more information visit www.stemcell.com.

If you require a printed copy or a translated version of this document in a certain language, contact us at techsupport@stemcell.com.

RELATED PRODUCTS

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

REFERENCES

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. *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)*.

PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY AND NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES UNLESS OTHERWISE STATED. FOR ADDITIONAL INFORMATION ON QUALITY AT STEMCELL, REFER TO WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 by STEMCELL Technologies Inc. All rights reserved including graphics and images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, MethoCult, SmartDish, STEMgrid, and STEMvision are trademarks of STEMCELL Technologies Canada Inc. All other trademarks are the property of their respective holders. While STEMCELL has made all reasonable efforts to ensure that the information provided by STEMCELL and its suppliers is correct, it makes no warranties or representations as to the accuracy or completeness of such information.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

MethoCult™ GF H84545

Medium Méthylcellulose avec des
Cytokines Recombinantes

Référence N° 84545**24 x 3 mL****DESCRIPTION DU PRODUIT**

Le MethoCult™ GF H84545 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.

La composition du MethoCult™ GF H84545 permet une croissance optimale des progéniteurs myéloïdes, granulocytes, macrophages (CFU-GM, CFU-M, CFU-G).

Le MethoCult™ GF H84545 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'aliquoter comme indiqué dans la section Manipulation et Mode d'Emploi.

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 cellules doivent être réalisées en utilisant une technique stérile et avec toutes les précautions d'usage.*
- Incubateur à CO₂ réglé à 37°C, 5% CO₂ 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.stemvision.com pour de plus amples informations.
- Équipement pour la manipulation des cellules et leur comptage.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

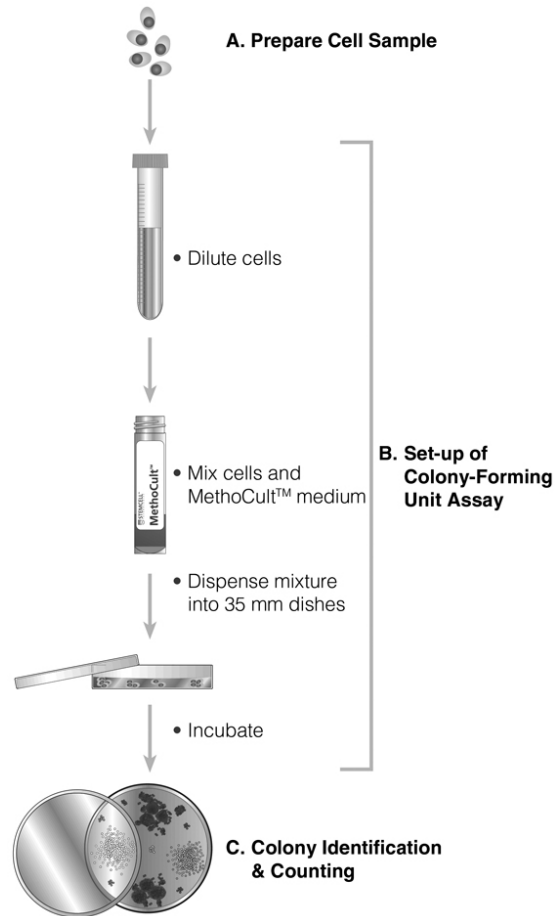
Page 5 of 20

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 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 cytophérèse.
 - 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.
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).*

Lymphoprep est une marque commerciale de Alere Technologies.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 6 of 20

B. 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 x 10⁵ cellules/mL pour une concentration finale d'ensemencement de 5 x 10⁴ cellules par boîte de Pétri.
3. Ajouter 0,3 mL of suspension cellulaire à 3 mL de MethoCult™.
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 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% CO₂, avec une d'humidité ≥ 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 CO₂. Voir Notes.

C. 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 CO₂ 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° 1000005589; disponible en anglais uniquement).

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 7 of 20

Tableau 1. Concentrations d'Ensemencement Recommandées

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

ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour joindre l'assistance technique, veuillez nous contacter par email à l'adresse : 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.

Si vous avez besoin d'un duité en une certaine langue de ce document, veuillez nous contacter par email à l'adresse : techsupport@stemcell.com.

PRODUITS ASSOCIÉS

Pour produits associés, incluant milieux de culture et de conservation spécialisés, suppléments, anticorps, cytokines, et petites molécules, visitez www.stemcell.com/HSPCworkflow ou écrivez-nous par courriel à 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.

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)*.

LES PRODUITS SONT À USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT ET NON DESTINÉS À DES USAGES DIAGNOSTIQUES OU THÉRAPEUTIQUES HUMAINS OU ANIMAUX, SAUF INDICATION CONTRAIRE. POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LA QUALITÉ CHEZ STEMCELL, CONSULTEZ WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 par STEMCELL Technologies Inc. Tous droits réservés, y compris les graphiques et les images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, MethoCult, SmartDish, STEMgrid et STEMvision sont des marques de commerce de STEMCELL Technologies Canada Inc. Toutes les autres marques de commerce sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. Bien que STEMCELL ait fait tous les efforts raisonnables pour s'assurer que les informations fournies par STEMCELL et ses fournisseurs sont correctes, elle ne fait aucune garantie ou représentation quant à l'exactitude ou l'exhaustivité de ces informations.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 8 of 20

MethoCult™ GF H84545**Medio de Metilcelulosa con Citoquinas Recombinantes****n.º de catálogo 84545 24 x 3 mL****DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

MethoCult™ GF H84545 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). El producto está recomendado para células enriquecidas en CD34+, células mononucleares, y células aisladas por otros métodos de purificación.

MethoCult™ GF H84545 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.

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% CO₂ 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.stemvision.com para más información.
- Equipos para procesamiento de células y recuento celular según sea necesario.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

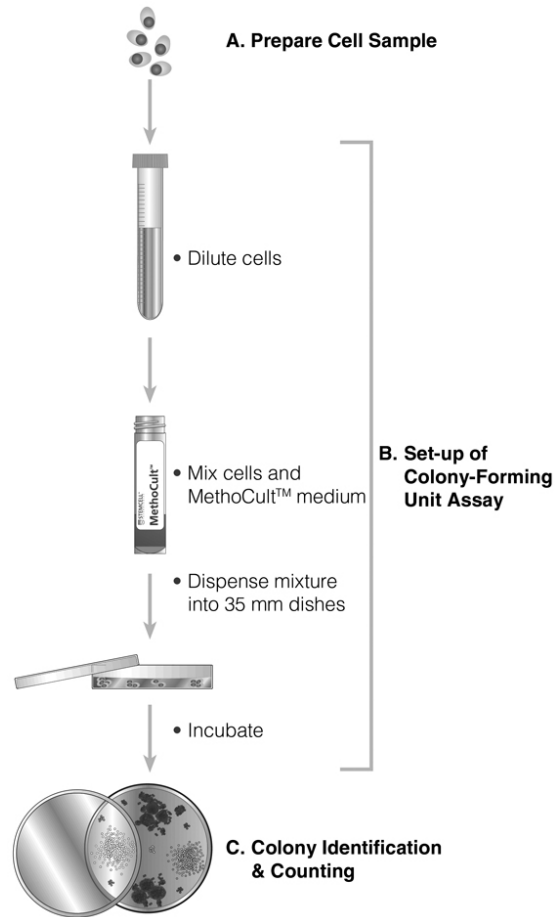
Page 9 of 20

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 cuadrículada 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 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. Cuente 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*

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 10 of 20

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).

B. 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 5×10^5 células por mL para sembrar 5×10^4 células en cada placa.
3. Agregar 0,3 mL de células a 3 mL de MethoCult™.
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 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% CO₂ 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 CO₂ (ver Notas).

C. 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 CO₂ 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 Technical Manual: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™ (n.º de documento 10000005589; disponible solo en inglés).

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 11 of 20

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 ⁴ (2 x 10 ⁴ - 1 x 10 ⁵)
MO, baja densidad	2 x 10 ⁴ (1 - 5 x 10 ⁴)
SC, baja densidad	1 x 10 ⁴ (5 x 10 ³ - 2 x 10 ⁴)
SC, con depleción de glóbulos rojos por sedimentación	5 x 10 ⁴ (2 - 6 x 10 ⁴)
SP, baja densidad	2 x 10 ⁵ (1 - 2 x 10 ⁵)
SPM, baja densidad	2 x 10 ⁴ (1 - 5 x 10 ⁴)
Lin-empobrecido (MO enriquecidas en CD34+, SC, SPM)	1000 (500 - 2 x 10 ³)
Células CD34+ (MO, SC, SPM)	500 (500 - 2 x 10 ³)

PRODUCTOS RELACIONADOS

Para productos relacionados, incluyendo medios de cultivo y de almacenamiento especializados, suplementos, anticuerpos, citoquinas, y moléculas pequeñas, visite www.stemcell.com/HSPCworkflow o contáctenos por correo electrónico a 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.

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, o llame al **+1.604.877.0713**, o llame al número gratuito Europea **00800 7836 2355**.

Para más información, entre en www.stemcell.com.

Si necesita una copia impresa o una versión de este documento traducido a un determinado idioma, envíenos un correo electrónico a techsupport@stemcell.com.

LOS PRODUCTOS SON PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN Y NO ESTÁN DESTINADOS A USOS DIAGNÓSTICOS O TERAPÉUTICOS HUMANOS O ANIMALES A MENOS QUE SE INDIQUE LO CONTRARIO. PARA OBTENER INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE LA CALIDAD EN STEMCELL, CONSULTE WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 de STEMCELL Technologies Inc. Todos los derechos reservados, incluidos gráficos e imágenes. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, MethoCult, SmartDish, STEMgrid y STEMvision son marcas comerciales de STEMCELL Technologies Canada Inc. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. Si bien STEMCELL ha realizado todos los esfuerzos razonables para garantizar que la información proporcionada por STEMCELL y sus proveedores sea correcta, no ofrece garantías ni representaciones en cuanto a la precisión o integridad de dicha información.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 12 of 20

MethoCult™ H84545

Media Metilcellulosa con Citochine
Ricombinanti

Catalogo #84545**24 x 3 mL****DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il MethoCult™ GF H84545 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.

MethoCult™ GF H84545 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-Mercaptoetanololo
- 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.

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 CO₂ 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.stemvision.com.
- Strumenti richiesti per processare e contare le cellule.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

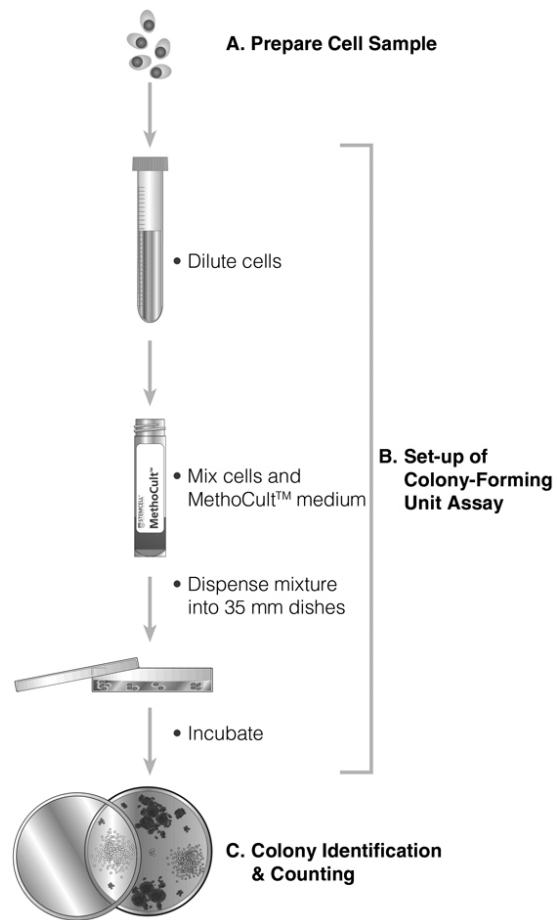
Page 13 of 20

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 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 (fluorescent 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 tripiano [Catalogo #07050]).*

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 14 of 20

B. Preparazione ed Esecuzione del Saggio Colony-Forming Unit

1. Scongellare 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 5×10^5 /mL per una concentrazione di 5×10^4 cellule per ogni piastra.
3. Aggiungere 0,3 mL di cellule a 3 mL di MethoCult™.
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 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 CO₂, 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 CO₂ (vedere Note).

C. 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 CO₂ 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 piastrire 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).

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 15 of 20

Tabella 1. Concentrazioni Raccomandate di Cellule da Piastrare

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

ASSISTENZA TECNICA

Per assistenza tecnica, contattarci per e-mail all'indirizzo 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.

Se avete bisogno di una copia stampata oppure di una versione tradotta di questo documento in una certa lingua, contattarci per e-mail all'indirizzo techsupport@stemcell.com.

PRODOTTI CORRELATI

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

BIBLIOGRAFIA

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. *Disponibile solo in inglese (Catalogo #28700).*
4. Nissen-Druey C et al. (2005) Human hematopoietic colonies in health and disease. Basel, Switzerland: S. Karger Medical and Scientific Publishers. *Disponibile solo in inglese (Catalogo #28760).*

I PRODOTTI SONO SOLO PER UTILIZZO DI RICERCA E NON DESTINATI AD USI DIAGNOSTICI O TERAPEUTICI UMANI O ANIMALI SE NON DIVERSAMENTE INDICATO. PER ULTERIORI INFORMAZIONI SULLA QUALITÀ PRESSO STEMCELL, FARE RIFERIMENTO A WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 di STEMCELL Technologies Inc. Tutti i diritti riservati inclusi grafica e immagini. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, MethoCult, SmartDish, STEMgrid e STEMvision sono marchi di STEMCELL Technologies Canada Inc. Tutti gli altri marchi sono di proprietà dei rispettivi titolari. Sebbene STEMCELL abbia compiuto tutti gli sforzi ragionevoli per garantire che le informazioni fornite da STEMCELL e dai suoi fornitori siano corrette, non fornisce alcuna garanzia o dichiarazione in merito all'accuratezza o alla completezza di tali informazioni.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 16 of 20

MethoCult™ H84545**Methylcellulose-Medium mit rekombinanten Zytokinen****Katalognr. 84545****24 x 3 mL****PRODUKTBESCHREIBUNG**

MethoCult™ GF H84545 ist für den Nachweis und zur Quantifizierung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen in Knochenmark (KM), mobilisiertem Peripherblut (MPB), Peripherblut (PB), und Nabelschnurblutproben (NSB) mittels koloniebildender Zell-Ansätze (CFU-Assays) vorgesehen. Es wird für mononukleäre Zellen, CD34+ angereicherte Zellen, und Zellen die anders aufgereinigt wurden empfohlen.

MethoCult™ GF H84545 wurde zur optimalen Wachstumsförderung von Granulozyten-Makrophagen Vorläufern (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) entwickelt.

Bestandteile umfassen:

- Iscove's MDM
- Methylzellulose
- 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™ Methylzellulose-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.

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% CO₂ 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 2X, 4X, und 10X Planar-Objektiven, und einem Blaufilter wird empfohlen.*
- Das STEMvision™-Instrument zur automatisierten Bildgebung und Auswertung von hämatopoetischen Kolonien kann im anstelle eines Mikroskops für die Auswertung von Kolonien verwendet werden. Weitere Informationen unter www.stemvision.com.
- Ausrüstung für Zellverarbeitung und Zellzählung.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

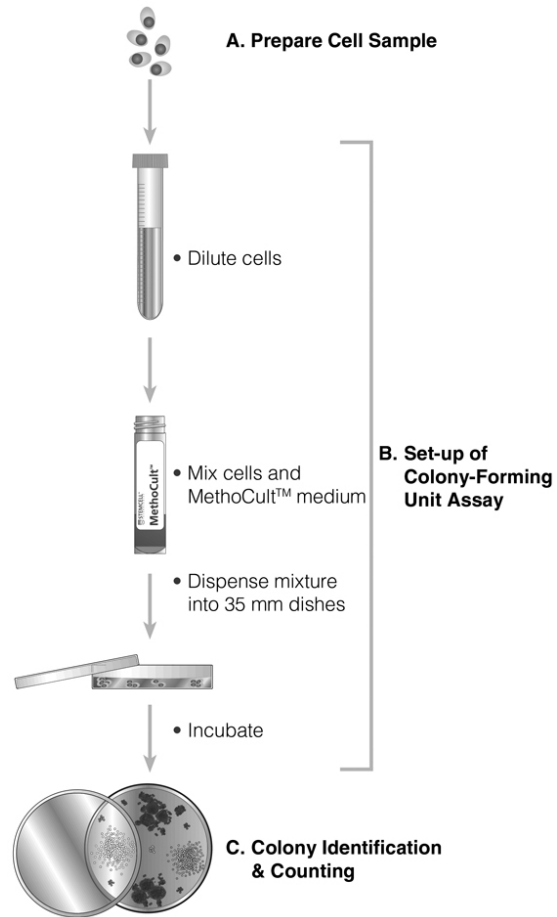
Page 17 of 20

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. 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.
3. Nachfolgend einige Beispiele für geeignete Techniken der Zellverarbeitung:
 - a. **Mononukleäre Zellsuspensionen** oder Zellen nach Ficoll gewonnen durch Dichtegradienten-zentrifugation mit Reagenzien wie Lymphoprep™ (Katalognr. 07801).
 - b. **Mobilisierte Peripherblutproben** gewonnen mit einem Zellseparator.
 - c. **Erythrozyten-depletierte Zellsuspensionen** gewonnen durch Lyse oder Sedimentation der roten Blutzellen.
 - d. **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).*

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 18 of 20

B. Ansatz von Humanen CFU-Assays

1. MethoCult™ Röhrcchen über Nacht im Kühlschrank (2 - 8°C) oder bei Raumtemperatur auftauen (15 - 25°C).
2. **Zellen verdünnen:** Eine 10-fach konzentrierte Zellsuspension (siehe Tabelle 1 und Anmerkungen) in MethoCult™ Cell Wash Medium herstellen. Zum Beispiel eine Zellprobe von 5×10^5 pro mL herstellen, um eine Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen pro 35 mm Petrischale zu erreichen.
3. 0,3 mL Zellen in 3 mL MethoCult™ aufnehmen.
Dieses 1:10 v/v Verhältnis von Zellen: Medium ergibt die richtige Mediumviskosität, um optimales CFU-Wachstum und Morphologie zu gewährleisten.
4. Das Röhrcchen durch Vortexen gründlich vermischen und vor dem Ausplattieren dann 2 - 5 Minuten stehen lassen, damit die Bläschen an die Oberfläche steigen können.
5. **Ausplattieren:** Mit einer an einer stumpfen Nadel Größe 16 angebrachten 3-mL-Spritze 1,1 mL MethoCult™-Mischung mit den Zellen in 2 x 35 mm-Schalen geben. Jede Schale vorsichtig kippen und schwenken, um die Methylzellulose gleichmäßig zu verteilen.
6. **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.
7. Bei 37°C, 5% CO₂ 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 CO₂ Gehalt wird empfohlen (siehe Anmerkungen).

C. 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 CO₂ 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).

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 19 of 20

Tabelle 1. Empfohlene Zellaussaatdichten

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

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Weitere technische Unterstützung erhalten Sie, indem Sie eine E-Mail an 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.

Wenn Sie ein gedrucktes Exemplar oder eine übersetzte Version dieses Dokuments in einer bestimmten Sprache benötigen, senden Sie eine E-Mail an techsupport@stemcell.com.

ÄHNLICHE PRODUKTE

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

REFERENZEN

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. *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)*.

DIE PRODUKTE SIND NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE UND NICHT FÜR DIE DIAGNOSTISCHE ODER THERAPEUTISCHE ZWECKE BEIM MENSCH ODER TIER BESTIMMT, SOFERN NICHT ANDERS ANGEGBEN. WEITERE INFORMATIONEN ZUR QUALITÄT BEI STEMCELL FINDEN SIE AUF WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE.

Copyright © 2021 von STEMCELL Technologies Inc. Alle Rechte vorbehalten, einschließlich Grafiken und Bilder. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, MethoCult, SmartDish, STEMgrid und STEMvision sind Marken von STEMCELL Technologies Canada Inc. Alle anderen Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. Obwohl STEMCELL alle zumutbaren Anstrengungen unternommen hat, um sicherzustellen, dass die von STEMCELL und seinen Lieferanten bereitgestellten Informationen korrekt sind, gibt STEMCELL keine Garantien oder Zusicherungen hinsichtlich der Richtigkeit oder Vollständigkeit dieser Informationen ab.

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

European toll-free number: 00800 7836 2355

e-mail: techsupport@stemcell.com

Document #1000007074

Version 02

Page 20 of 20