

Amnio dish

Protocollo di utilizzo
Protocole d'utilisation
Benutzungsprotokoll
Protocol of use
Protocolo de utilización
Protocolo de utilização
Πρωτόκολλο χρήσης

- PER COLTURADI CELLULE
- POUR LA CULTURE DES CELLULES
- FÜR ZELLKULTUREN
- FOR CELL CULTURE
- PARA CULTIVO DE CÉLULAS
- PARA CULTURA DE CÉLULAS
- ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Capsula Petri con vetrino sterile, per coltura e successiva analisi di amniociti e villi coriali

cod. EK AMN 240 240 test

Materiale fornito

Ogni scatola contiene 40 confezioni pronte per l'uso, per un totale di 240 Amniodish.

Dimensioni vetrino: 32 mm diametro, 0,13-0,16 mm spessore.

Validità: 2 anni.

Protocollo per coltura in situ di amniociti

Nota: scongelare Amniomed Plus (cod. EKAMG200) in un bagnetto termostato a 37°C, agitando adeguatamente prima dell'uso. Non richiede aggiunta di L-Glutamina, antibiotici o siero.

1. Porre delicatamente 0,5 ml di sospensione cellulare sopra il vetrino all'interno di Amniodish.
2. Incubare a 37°C, 5% CO₂ per 6 - 12 ore, evitando i disturbi meccanici.
3. Aggiungere 2 ml di Amniomed Plus fresco.
4. Al giorno 6 cambiare completamente il terreno di coltura con 2,5 ml di Amniomed Plus fresco.
5. Al giorno 7 / 8 valutare la crescita mediante microscopio invertito. Quando l'area di crescita mostra un numero di cellule in mitosi pari a 3 - 4 per campo (100X), aggiungere 30 µl di Colcemid (10 µg/ml).
6. Incubare a 37°C, 5% CO₂ per 60 - 90 minuti.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo manuale

1. Rimuovere completamente il terreno.
2. Gocciolare 3 ml di soluzione ipotonica (H₂O distillata, 0,6% sodio citrato, 0,1% KCl) e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
3. Rimuovere la soluzione ipotonica e gocciolare 3 ml di soluzione di Ibraimov (H₂O distillata, 5% acido acetico), incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Rimuovere la soluzione di Ibramov modificata e gocciolare 3 ml di soluzione fissativa fresca (metanolo : acido acetico, 4 : 1) a temperatura ambiente. Il tempo di questa incubazione, non influenza il risultato finale.
5. Ripetere due volte il punto 4.
6. Rimuovere il vetrino e procedure all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa, mediante l'impiego di Optichrome (cod. EKAMH950).

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo automatizzato

1. Porre Amnioslide in Autochrome (cod. EKAMH1001).
2. Scegliere il programma adeguato.
3. Ultimato il processo rimuovere il vetrino da Amnioslide e procedure all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa mediante l'impiego di Optichrome.

Protocollo per coltura di campioni di villi coriali (CVS)

1. Porre la biopsia in una Petri da 60 mm, contenente 5 ml di RPMI 1640.
2. Lavare i villi con medium fresco per rimuovere i residui di sangue.
3. Mediante microscopio invertito rimuovere delicatamente i coaguli e i residui di decidua.

Cultura in situ

1. Traferire i villi in un tubo da 15 ml, contenente 1 ml di Pronase E (4*10⁶ PU/g) e incubare a temperatura ambiente per 4 - 6 minuti.
2. Aggiungere 3 - 5 ml di Hank's Balanced Salts Solution fredda (circa +4°C).
3. Centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm e rimuovere il surnatante.
4. Aggiungere 2 ml di Collagenase type II sterile (1 mg/ml) e incubare a 37°C per 10 minuti.
5. Aggiungere 3 - 5 ml di HBSS fredda (circa +4°C).
6. Centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm e rimuovere il surnatante.
7. Aggiungere 2 - 3 ml di Amniomed Plus e risospendere il pellet.
8. Preparare da 6 Amniodish, a seconda del quantitativo di cellule. Aggiungere 2 ml di Amniomed Plus ad ogni Amniodish.
9. Gocciolare circa 500 µl di sospensione cellulare per Amniodish.
10. Incubare a 37°C, 5% CO₂.
11. Al giorno 5 cambiare completamente il terreno di coltura con 2,5 ml di Amniomed Plus fresco.
12. Al giorno 6 / 7 valutare la crescita mediante microscopio invertito. Quando l'area di crescita mostra un numero di cellule in mitosi pari a 3 - 4 per campo (100X), aggiungere 15 µl di Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubare a 37°C, 5% CO₂ per 4 - 6 ore.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo manuale o automatizzato

Vedi il protocollo per trattamento di amniociti.



Italiano

Capsule Petri avec lame stérile, pour culture et analyse d'amniocytes et de villosités choriales

cod. EK AMN 240 240 tests

Matériel fourni

Chaque boîte contient 40 confections prêtes à l'emploi, pour un total de 240 Amniodish.

Dimensions de la lame : 32 mm diamètre, 0,13-0,16 mm d'épaisseur.

Validité : 2 ans.

Protocole pour culture in situ d'amniocytes

Note : décongeler Amniomed Plus (cod. EKAMG200) dans un bain thermostaté à 37°C, en agitant de façon adéquate avant l'emploi. L'ajout de L-Glutamine, d'antibiotiques ou de sérum n'est pas nécessaire.

1. Mettre délicatement 0,5 ml de suspension cellulaire sur la lamelle à l'intérieur d'Amniodish.
2. Incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 6 - 12 heures, en évitant les dérangements mécaniques.
3. Ajouter 2 ml d'Amniomed Plus frais.
4. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 2,5 ml d'Amniomed Plus frais.
5. Le 7/8ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand l'aire de croissance montre un nombre de cellules en mitose égal à 3 - 4 par champ (100X), ajouter 30 µl de Colcemid (10 µg/ml).
6. Incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 60 - 90 minutes.

Fixation des chromosomes et préparation de la lame, méthode manuelle

1. Enlever complètement le terrain.
2. Faire couler 3 ml de solution hypotonique (H₂O distillée, 0,6% sodium citrate, 0,1% KCl) et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
3. Enlever la solution hypotonique et faire couler 3 ml de solution d'Ibramov (H₂O distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Enlever la solution d'Ibramov modifiée et faire couler 3 ml de solution fixative fraîche (méthanol : acide acétique, 4 : 1) à température ambiante. Le temps de cette incubation n'influence pas le résultat final.
5. Répéter deux fois le point 4.
6. Enlever la lamelle et effectuer le séchage dans des conditions adéquates et constantes de température et d'humidité relative, en utilisant Optichrome (cod. EKAMH950).

Fixation des chromosomes et préparation de la lame, méthode automatisée

1. Mettre Amniodish en Autochrome (cod. EKAMH1001).
2. Choisir le programme adéquat.
3. Une fois le processus terminé, enlever la lamelle d'Amnioslide et effectuer le séchage dans des conditions adéquates et constantes de température et d'humidité relative en utilisant Optichrome.

Protocole pour la culture d'échantillons de villosités choriales (CVS)

1. Mettre la biopsie dans une Petri de 60 mm, contenant 5 ml de RPMI 1640.
2. Laver les villosités avec un medium frais pour enlever les résidus de sang.
3. Avec le microscope inversé, enlever délicatement les caillots et les résidus de déciduale.

Culture in situ

1. Transférer les villosités dans un tube de 15 ml, contenant 1 ml de Pronase E (4*10⁶ PU/g) et incuber à température ambiante pendant 4 - 6 minutes.
2. Ajouter 3 - 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution froide (environ +4°C).
3. Centrifuger pendant 5 minutes à 1500 rpm et enlever le surnageant.
4. Ajouter 2 ml de Collagenase type II stérile (1 mg/ml) et incuber à 37°C pendant 10 minutes.
5. Ajouter 3 - 5 ml de HBSS froide (environ +4°C).
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 1500 rpm et enlever le surnageant.
7. Ajouter 2 - 3 ml d'Amniomed Plus et resuspendre le pellet.
8. Préparer de 6 Amniodish, selon la quantité de cellules. Ajouter 2 ml d'Amniomed Plus à chaque Amnioslide.
9. Faire couler environ 500 µl de suspension cellulaire pour Amniodish.
10. Incuber à 37°C, 5% CO₂.
11. Le 5ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 2,5 ml d'Amniomed Plus frais.
12. Le 6/7ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand l'aire de croissance montre un nombre de cellules en mitose égal à 3 - 4 par champ (100X), ajouter 15 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 4 - 6 heures.

Fixation des chromosomes et préparation de la lame, méthode manuelle ou automatisée

Voir le protocole pour le traitement d'amniocytes.



Français



Deutsche

Petri-Kapsel mit sterilem Objektträger für die Kultur und anschließende Analyse von Amniocyten und Chorionzotten

Cod. EK AMN 240 240 Tests

Geliefertes Material

Jede Schachtel enthält 40 gebrauchsfertige Packungen mit insgesamt 240 Amnioidish.
Maße des Objektträgers: 32 mm Durchmesser, 0,13-0,16 mm Dicke.
Haltbarkeit: 2 Jahre.

Protokoll für die Kultivierung in situ von Amnionzellen

Bemerkung: Amniomed Plus (Cod. EKAMG200) in einem Bad mit Temperaturregelung auf 37°C abtauen, worauf es vor dem Gebrauch angemessen geschüttelt wird. Es ist keine Zugabe von L-Glutamin, Antibiotikum oder Serum notwendig.

1. Vorsichtig 0,5 ml der Zellsuspension auf den Objektträger im Inneren von Amnioidish geben.
2. Bei 37°C, 5% CO₂ für 6-12 Stunden bebrüten, wobei mechanische Störungen vermieden werden sollten.
3. 2 ml frisches Amniomed Plus hinzufügen.
4. Am Tag 6 den Nährboden mit 2,5 ml frischem Amniomed Plus vollständig auswechseln.
5. Am Tag 7/8, oder bei angemessenem Wachstum 15 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen.
6. Bei 37°C, 5% CO₂ für 60-90 Minuten bebrüten.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers, manuelle Methode

1. Den Boden vollständig entfernen.
2. 3 ml hypotonische Lösung (H₂O destilliert, 0,6% Natriumzitat, 0,1% KCl) tröpfeln und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bebrüten.
3. Die hypotonische Lösung entfernen und 3 ml Ibraimov-Lösung (H₂O destilliert, 5% Essigsäure) tröpfeln, bei Raumtemperatur für 5 Minuten bebrüten.
4. Die modifizierte Ibraimov-Lösung entfernen und 3 ml frische Fixierlösung (Methanol:Essigsäure, 4:1) bei Raumtemperatur tröpfeln. Der Zeitraum dieser Bebrütung beeinflusst nicht das Endresultat.
5. Zweimal den Punkt 4 wiederholen.
6. Den Objektträger entfernen und die Trocknung zu angemessenen und konstanten Bedingungen hinsichtlich der Temperatur sowie der relativen Feuchtigkeit mittels der Verwendung von Optichrome (Cod. EKAMH950) vornehmen.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers, automatisierte Methode

1. Amnioidish in Autochrome (Cod. EKAMH1001) geben.
2. Das angemessene Programm auswählen.
3. Nach Beendigung des Vorgangs den Objektträger aus Amnioidish entfernen und die Trocknung zu angemessenen und konstanten Bedingungen hinsichtlich der Temperatur sowie der relativen Feuchtigkeit mittels der Verwendung von Optichrome vornehmen.

Protokoll für die Kultivierung von Zottenproben (CVS)

1. Die Biopsie in eine Petrischale von 60 mm, welche 5 ml RPMI 1640 enthält, geben.
2. Die Zotten mit einem kühlen Mittel abwaschen, um Blutreste zu entfernen.
3. Mittels eines gestürzten Mikroskops vorsichtig die Blutgerinnsel sowie die Siebhautreste entfernen.

Kultivierung in situ

1. Die Zotten in ein Rohr von 15 ml übertragen, welches 1 ml Pronase E (4*10⁶ PU/g) enthält und bei Raumtemperatur für 4-6 Minuten bebrüten.
2. 3-5 ml kalte Hank's Balanced Salts Solution (zirka +4°C) hinzufügen.
3. Für 5 Minuten bei 1500 RPM schleudern und den oben schwimmenden Bestandteil entfernen.
4. 2 ml Collagenase Typ II steril (1 mg/ml) hinzufügen und bei 37°C für 10 Minuten bebrüten.
5. 3-5 ml kalte HBSS (zirka +4°C) hinzufügen.
6. Für 5 Minuten bei 1500 RPM schleudern und den oben schwimmenden Bestandteil entfernen.
7. 2-3 ml Amniomed Plus hinzufügen und das Pellet wieder herausnehmen.
8. Vorbereitung von 6 Amnioidish, je nach Anzahl der Zellen. 2 ml Amniomed Plus auf jeden Amnioidish hinzufügen.
9. Zirka 500 µl der Zellolösung für Amnioslide tröpfeln.
10. Bei 37°C, 5% CO₂ bebrüten.
11. Am Tag 5 den Nährboden vollständig mit 2,5 ml frischem Amniomed Plus auswechseln.
12. Am Tag 6/7 das Wachstum mittels gestürztem Mikroskop bewerten. Sobald die Wachstumsfläche eine Zellenanzahl in Mitose aufweist, welche mit 3-4 pro Feld (100X) übereinstimmt, 15 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen.
13. Bei 37°C, 5% CO₂ für 4-6 Stunden bebrüten.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers, manuelle und automatisierte Methode

Siehe Protokoll für die Behandlung der Amnionzellen.

Sterile Petri dish with glass slide for culture and analysis of amniocytes and chorionic villi

Ref. EK AMN 240 240 tests

Material supplied

Each box contains 40 packages ready for use, for a total of 240 Amniodish.

Slide dimensions: 32 mm diameter, 0.13-0.16 mm thickness.

Validity: 2 years.

Amniocyte culture in situ protocol

Note: thaw the Amniomed Plus (ref. EKAMG200) in a 37°C water bath and mix well by swirling prior to use. Addition of L-Glutamine, antibiotics and serum are not necessary since these components are already present.

1. Place 0,5 ml of cell suspension gently onto each Amniodish, on the glass slide.
2. Incubate at 37°C, 5% CO₂ for 6 - 12 hours, with minimal mechanical disturbance.
3. Add 2 ml of fresh Amniomed Plus.
4. On Day 6, replace the culture medium with 2,5 ml of fresh Amniomed Plus.
5. On Day 7 / Day 8 check for progress of growth using an inverted microscope. When the areas of growth show a number of cells in mytosis equal to three to four microscope fields (100X), add 30 µl of Colcemid (10 µg/ml).
6. Incubate at 37°C, 5% CO₂ for 60 - 90 minutes.

English

Chromosome preparation, manual method

1. Suck the medium up completely.
2. Drop 3 ml of hypotonic solution (distilled H₂O, 0,6% sodium citrate, 0,1% KCl) and incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Suck the hypotonic solution up and drop 3 ml of Ibraimov solution (distilled H₂O, 5% acetic acid), incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Suck the Ibraimov modified solution up and drop 3 ml of fresh fixative mixture (methanol : acetic acid, 4 : 1) at room temperature. The time for this wash has no influence on final results.
5. Repeat 4) twice.
6. Remove the glass slide and dry under constant condition of right temperature and relative humidity into Optichrome (ref.EKAMH950).

Chromosome preparation, automated method

1. Put Amniodish in Autochrome (ref. EKAMH1001).
2. Chose the proper program.
3. At the end of the automated process remove the glass slide and dry under constant condition of temperature and relative humidity into Optichrome.

Chorionic villi sampling (CVS) culture protocol

1. Transfer the specimen into a 60 mm Petri dish containing 5 ml of RPMI 1640.
2. Wash villi with fresh medium to remove blood cells.
3. Using the inverted microscope, carefully dissect any remaining clots or decidual fragments.

In situ culture

1. Transfer the villi in a 15 ml sterile centrifuge tube containing 1 ml of Pronase E (4*10⁶ PU/g) and incubate at room temperature for 4 - 6 minutes.
2. Add 3 - 5 ml of cold Hank's Balanced Salts Solution (kept at +4°C).
3. Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant.
4. Add 2 ml of sterile Collagenase type II (1 mg/ml) and incubate at 37°C for 10 minutes.
5. Add 3 - 5 ml of cold HBSS (kept at +4°C).
6. Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant.
7. Add 2 - 3 ml of Amniomed Plus and resuspend the pellet.
8. Prepare 6 Amniodish, depending on the number of cells. Add 2 ml of Amniomed Plus medium to each Amniodish.
9. Drop about 500 µl of the cell suspension on each Amniodish.
10. Incubate at 37°C in 5% CO₂.
11. On Day 5 replace the culture medium with 2,5 ml of fresh Amniomed Plus.
12. On Day 6 / Day 7 check for progress of growth using an inverted microscope. When the areas of growth show a number of cells in mytosis equal to three to four microscope fields (100X), add 15 µl of Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubate at 37 °C, 5% CO₂ for 4 - 6 hours.

Chromosome preparation, manual or automated method

See protocol chromosome preparation of Amniotic fluid.

Cápsula Petri con vidrio estéril, para cultivo y sucesivos análisis de amniocitos y vellosidades coriónicas

cód. EK AMN 240 240 test

Material suministrado

Cada caja contiene 40 envases listos para usar por un total de 240 Amniodish.

Dimensiones vidrio: 32 mm diámetro, 0,13-0,16 mm espesor.

Validez: 2 años

Protocolo para cultivo in situ de amniocitos

Nota: descongelar envases preparados para el uso Amniomed Plus (cód. EKAMG200) en un baño caldeado a 37°C, agitando adecuadamente antes del uso. No requiere añadir L-Glutamina, antibióticos o suero.

1. colocar suavemente 0,5 ml de suspensión celular en el vidrio en el interior de los Amniodish.
2. incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 6 - 12 horas, evitando molestias mecánicas.
3. añadir 2 ml de Amniomed Plus fresco.
4. al 6º día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 5 ml de Amniomed Plus fresco.
5. al 7º / 8º, o a crecimiento adecuado, añadir 15 µl Colcemid (10 µg/ml).
6. incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 60 - 90 minutos.

Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual

1. retirar completamente el terreno.
2. echar en gotas 3 ml de solución hipotónica (H₂O destilada, 0,6% sodio citrato, 0,1% KCl) e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. retirar la solución hipotónica echar en gotas 3 ml de solución de Ibramov (H₂O destilada, 5% ácido acético), incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. retirar la solución de Ibramov modificada echar en gotas 3 ml de solución de fijación fresca (metanol: ácido acético, 4:1) a temperatura ambiente. El tiempo de esta incubación, no influye el resultado final.
5. repetir dos veces el punto 4.
6. retirar el vidrio y proceder al secado en adecuadas y constantes condiciones de temperatura y humedad relativa, empleando Optichrome (cód. EKAMH950).

Fijación cromosomas y preparación cristal, método automatizado

1. colocar Amniodish en Autochrome (cód. EKAMH1001).
2. seleccionar el programa adecuado.
3. finalizado el proceso retirar el vidrio de Amnioslidre y proceder al secado en adecuadas y constantes condiciones de temperatura y humedad relativa mediante empleando Optichrome.

Protocolo para cultivo de muestra de vellosidades coriónicas (CVS)

1. poner la biopsia en una Petri de 60 mm que contenga 5 ml de RPMI 1640.
2. lavar los villi con médium fresco para retirar los residuos de sangre.
3. usando microscopio invertido retirar delicadamente los coágulos y los residuos de decidua.

Cultivo in situ

1. transferir las villa a un tubo de 15 ml con 1 ml de Pronase E (4*10⁶ PU/g) e incubar a temperatura ambiente durante 4 - 6 minutos.
2. añadir 3 - 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution fría (aproximadamente +4°C).
3. centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm y retirar el surnatante.
4. añadir 2 ml de Collagenase type II estéril (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 10 minutos.
5. añadir 3 - 5 ml de HBSS fría (aproximadamente +4°C).
6. centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm y retirar el surnatante.
7. añadir 2 - 3 ml de Amniomed Plus y resuspender el pellet.
8. preparar de 6 Amniodish, en función de la cantidad de células. Añadir 2 ml de Amniomed Plus a cada Amniodish.
9. echar algunas gotas aproximadamente 500 µl de suspensión celular por Amniodish.
10. incubar a 37°C, 5% CO₂.
11. al quinto día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 2,5 ml de Amniomed Plus fresco.
12. al 6º / 7º día valorar el crecimiento con microscopio invertido. Cuando el área de crecimiento muestra un número de células en mitosis equivalente a 3 - 4 por campo (100X), añadir 15 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 4 - 6 horas.

Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual o automatizado

Ver el protocolo para tratamiento de amniocitos.



Español



Português

Cápsula de Petri com lâmina estéril, para cultura e posterior análise de amniócitos e vilosidade coriônica

cód. EK AMN 240 240 testes

Material fornecido

Cada caixa contém 40 embalagens prontas a usar, num total de 240 Amniodish.

Dimensões da lâmina: 32 mm diâmetro, 0,13-0,16 mm espessura.

Validade: 2 anos.

Protocolo para cultura in situ de amniócitos

Nota: descongelar Amniomed Plus (cód. EKAMG200) num banho termostático a 37°C, agitando bem antes de usar. Não necessita de adição de L-Glutamina, antibióticos ou soro.

1. Colocar delicadamente 0,5 ml de suspensão celular sobre a lâmina no interior do Amniodish.
2. Incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 6 - 12 horas, evitando as perturbações mecânicas.
3. Acrescentar 2 ml de Amniomed Plus fresco.
4. No 6º dia mudar completamente o meio de cultura com 2,5 ml de Amniomed Plus fresco.
5. No 7º / 8º dia ou com o crescimento certo, acrescentar 15 µl Colcemid (10 µg/ml).
6. Incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 60 - 90 minutos.

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina, método manual

1. Retirar completamente o meio.
2. Gotejar 3 ml de solução hipotónica (H₂O destilada, 0,6% citrato sódico, 0,1% KCl) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Retirar a solução hipotónica e gotejar 3 ml de solução de Ibraimov (H₂O destilada, 5% ácido acético), incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Retirar a solução de Ibraimov modificada e gotejar 3 ml de solução fixadora fresca (metanol:ácido acético, 4:1) à temperatura ambiente. O tempo desta incubação não influencia o resultado final.
5. Repetir duas vezes o ponto 4.
6. Retirar a lâmina e secar em adequadas e constantes condições de temperatura e humidade relativa, utilizando Optichrome (cód. EKAMH950).

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina, método automatizado

1. Colocar o Amniodish em Autochrome (cód. EKAMH1001).
2. Seleccionar o programa adequado.
3. Terminado o processo, retirar a lâmina do Amniodish e secar em adequadas e constantes condições de temperatura e humidade relativa, utilizando Optichrome.

Protocolo para cultura de amostras de vilosidade coriônica (CVS)

1. Colocar a biópsia numa Petri de 60 mm, contendo 5 ml de RPMI 1640.
2. Lavar as vilosidades com meio fresco para retirar os resíduos de sangue.
3. Com microscópio invertido, retirar delicadamente os coágulos e os resíduos de decidua.

Cultura in situ

1. Transferir as vilosidades para um tubo de 15 ml, contendo 1 ml de Pronase E (4*10⁶ PU/g) e incubar à temperatura ambiente durante 4 - 6 minutos.
2. Acrescentar 3 - 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution fria (cerca de +4°C).
3. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e retirar o sobrenadante.
4. Acrescentar 2 ml de Collagenase type II estéril (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 10 minutos.
5. Acrescentar 3 - 5 ml de HBSS fria (cerca de +4°C).
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e retirar o sobrenadante.
7. Acrescentar 2 - 3 ml de Amniomed Plus e suspender de novo o pellet.
8. Preparar entre 6 Amniodish, de acordo com a quantidade de células. Acrescentar 2 ml de Amniomed Plus a cada Amniodish.
9. Gotejar cerca de 500 µl de suspensão celular por Amnioslide.
10. Incubar a 37°C, 5% CO₂.
11. No 5º dia mudar completamente o meio de cultura com 2,5 ml de Amniomed Plus fresco.
12. No 6º / 7º dia, avaliar o crescimento com microscópio invertido. Quando a área de crescimento mostra um número de células em mitose igual a 3 - 4 por campo (100X), acrescentar 15 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 4 - 6 horas.

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina, método manual ou automatizado

Ver protocolo para tratamento de amniócitos.



Greek

Τρυβλίο Petri με αποστειρωμένο γυάλινο πλακίδιο, για καλλιέργεια και επόμενη ανάλυση αμνιακών κυττάρων και χοριακών λαχνών
cod. EK AMN 240 240 test

Παρεχόμενο υλικό

Κάθε κουτί περιέχει 40 συσκευασίες έτοιμες για χρήση, συνολικά 240 Amniodish. Διαστάσεις γυάλινου πλακιδίου: 32 mm διάμετρος, 0,13-0,16 mm πάχος. Ισχύς: 2 έτη.

Πρωτόκολλο για καλλιέργεια in situ αμνιακών κυττάρων

Σημείωση: ξεπαγώστε το Amniomed Plus (cod. EKAMG200) σε ένα υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C, αναδεύοντας κατάλληλα πριν από τη χρήση. Δεν απαιτεί τη προσθήκη της L-Glutamina, αντιβιοτικών ή ορού.

1. Βάλτε προσεκτικά 0,5 ml κυτταρικού εναωρήματος επάνω στο γυάλινο πλακίδιο στο εσωτερικό του Amniodish.
2. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO₂ για 6 - 12 ώρες, αποφεύγοντας τις μηχανικές διαταραχές.
3. Προσθέστε 2 ml φρέσκου Amniomed Plus.
4. Στην ημέρα 6 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 2,5 ml φρέσκου Amniomed Plus.
5. Στην ημέρα 7 / 8 ή σε κατάλληλη ανάπτυξη, προσθέστε 15 μl Colcemid (10 μg/ml).
6. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO₂ για 60 - 90 λεπτά.

Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, χειρωνακτική μέθοδος

1. Αφαιρέστε τελείως το μέσο.
2. Στάξτε 3 ml υποτονικό διάλυματος (H₂O αποσταγμένο, 0,6% κιτρικό νάτριο, 0,1% KCl) και υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά.
3. Αφαιρέστε το υποτονικό διάλυμα και στάξτε 3 ml τροποποιημένου διαλύματος του Ibramov (H₂O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ), υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά.
4. Αφαιρέστε το τροποποιημένο διάλυμα του Ibramov και στάξτε 3 ml φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος (μεθανόλη : οξικό οξύ, 4 : 1) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο χρόνος αυτής της επώασης, δεν υπερβαίνει το τελικό αποτέλεσμα.
5. Επαναλάβετε δύο φορές το σημείο 4.
6. Αφαιρέστε το γυάλινο πλακίδιο και προχωρήστε στο στέγνωμα με κατάλληλες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετική υγρασία με τη χρήση του Orpichrome (cod. EKAMH950).

Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, αυτοματοποιημένη μέθοδος

1. Βάλτε τον Amniodish σε Autochrome (cod. EKAMH1001).
2. Επιλέξτε το κατάλληλο πρόγραμμα.
3. Μετά τη λήξη της διαδικασίας αφαιρέστε το γυάλινο πλακίδιο από τον Amniodish και προχωρήστε στο στέγνωμα σε κατάλληλες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετική υγρασία με τη χρήση του Orpichrome.

Πρωτόκολλο για καλλιέργεια δειγμάτων χοριακών λαχνών (CYS)

1. Βάλτε τη βιοψία σε ένα Petri των 60 mm που περιέχει 5 ml του RPMI 1640.
2. Κάνετε τη πλύση των λαχνών με φρέσκο medium για να αφαιρέσετε τα υπόλοιπα αίματος.
3. Με ανεστραμμένο μικροσκόπιο αφαιρέστε προσεκτικά τους θρόμβους και τα υπόλοιπα φθαρτού υμένα.

Καλλιέργεια in situ

1. Μεταφέρετε τους λαχνούς σε ένα σωλήνα των 15 ml που περιέχει 1 ml του Pronase E (4*10⁶ PU/g) και υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 - 6 λεπτά.
2. Προσθέστε 3 - 5 ml του Hank's Balanced Salts Solution κρύα (περίπου +4°C).
3. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα.
4. Προσθέστε 2 ml του Collagenase type II αποστειρωμένο (1 mg/ml) και υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
5. Προσθέστε 3 - 5 ml του HBSS κρύα (περίπου +4°C).
6. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα.
7. Προσθέστε 2 - 3 ml του Amniomed Plus και αναδεύετε το pellet.
8. Προετοιμάστε από 6 Amniodish, ανάλογα με τη ποσότητα των κυττάρων. Προσθέστε 2 ml του Amniomed Plus σε κάθε Amniodish.
9. Στάξτε περίπου 500 μl κυτταρικού εναωρήματος για κάθε Amniodish.
10. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO₂.
11. Στην ημέρα 5 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 2,5 ml φρέσκου Amniomed Plus.
12. Στην ημέρα 6 / 7 υπολογίστε την ανάπτυξη με ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Όταν η περιοχή ανάπτυξης δείχνει ένα αριθμό κυττάρων σε μίτωση ίσο με 3 - 4 για κάθε πεδίο (100X), προσθέστε 15 μl του Colcemid (10 μg/ml).
13. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO₂ για 4 - 6 ώρες.

Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, χειρωνακτική ή αυτοματοποιημένη μέθοδος

Βλέπε το πρωτόκολλο για επεξεργασία αμνιακών κυττάρων.

Amnio *dish*



EuroClone S.p.A.

Via Figino 20/22

20016 Pero (MI) - Italy

Phone +39.02.38195.1

Fax +39.02.38195248

e-mail: info@euroclone.it

www.euroclone.it

EuroClone
serving science through innovation