



Amniomed *plus*

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

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





Italiano

Terreno completo per coltura di amniociti e villi coriali

Materiale fornito

EK AMG 200, 1 bottiglia da 100 ml
EK AMG 600, 1 bottiglia da 500 ml

Conservazione e stabilità

Amniomed Plus deve essere conservato a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. Scongela Amniomed Plus in un bagnetto termostato a 37°C , agitando adeguatamente prima dell'uso. Non richiede aggiunta di L-Glutamina, antibiotici o siero. Una volta scongelato, deve essere conservato tra i $+2^\circ\text{C}$ e $+8^\circ\text{C}$ per un massimo di 8 giorni. La shelf life del prodotto è di 2 anni.

Protocollo di utilizzo

NB: i protocolli di coltura in situ si riferiscono all'impiego di Amnioslide. Per l'impiego di Amnidish fare riferimento ai valori tra parentesi quadre.

AMNIOCITI - Trattamento campione

1. Trasferire il liquido amniotico in tubi sterili e centrifugare 10 minuti a 1000 rpm.
2. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 2 – 3 ml di Amniomed Plus.

Coltura in situ

1. Porre delicatamente 1 ml [0,5 ml] di sospensione cellulare sopra il vetrino all'interno di Amnioslide. Incubare a 37°C , 5% CO_2 per 6-12 ore, evitando i disturbi meccanici.
2. Aggiungere 4 ml [2 ml] di Amniomed Plus fresco.
3. Al giorno 6 cambiare completamente il terreno di coltura con 5 ml [2,5 ml] di Amniomed Plus.
4. Al giorno 7/8 valutare la crescita mediante microscopio invertito. A crescita ottimale, aggiungere 30 μl [15 μl] di Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubare a 37°C , 5% CO_2 per 60-90 minuti.

Coltura in fiasca

1. Preparare da 2 a 4 fiasche sterili da 25 cm^2 . Aggiungere 4 ml di Amniomed Plus ad ogni fiasca.
2. Aggiungere 0,5 ml di sospensione e incubare a 37°C , 5% CO_2 .
3. Al giorno 6 cambiare completamente il terreno di coltura con 5 ml di Amniomed Plus.
4. Al giorno 7 / 8 o a crescita adeguata, aggiungere 30 μl Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubare a 37°C , 5% CO_2 per 60 – 90 minuti.

VILLI CORIALI (CVS) - Trattamento campione

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.
4. Trasferire i villi in un tubo da 15 ml, contenente 1 ml di Pronase E (4×10^6 PU/g) e incubare a temperatura ambiente per 4 - 6 minuti.
5. Aggiungere 3 - 5 ml di Hank's Balanced Salts Solution fredda ($+4^\circ\text{C}$).
6. Centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm e rimuovere il surnatante.
7. Aggiungere 2 ml di Collagenase type II sterile (1 mg/ml) e incubare a 37°C per 10 minuti.
8. Aggiungere 3 - 5 ml di HBSS fredda (circa $+4^\circ\text{C}$).
9. Centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm e rimuovere il surnatante.
10. Aggiungere 2 - 3 ml di Amniomed Plus e risospendere il pellet.

Coltura in situ

1. Preparare da 2 a 6 Amnioslide, a seconda del quantitativo di cellule. Aggiungere 4,5 ml [2 ml] di Amniomed Plus ad ogni Amnioslide.
2. Gocciolare 500 μl di sospensione cellulare per Amnioslide e incubare a 37°C , 5% CO_2 .
3. Incubare a 37°C , 5% CO_2 .
3. Al giorno 5 cambiare completamente il terreno di coltura con 5 ml [2,5 ml] di Amniomed Plus fresco.
4. Al giorno 6/7 valutare la crescita mediante microscopio invertito. A crescita ottimale, aggiungere 30 μl [15 μl] di Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubare a 37°C , 5% CO_2 per 4-6 ore.

Coltura in fiasca

Vedi protocollo per coltura in fiasca di amniociti. Variare le tempistiche dei punti 3. e 4. in accordo con il protocollo per coltura in situ di CVS, punti 3. e 4.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino da coltura in situ

1. Rimuovere completamente il terreno.
2. Gocciolare 6 ml [3 ml] di soluzione ipotonica (H_2O distillata, 0,6% sodio citrato, 0,1% KCl) e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
3. Rimuovere la soluzione ipotonica e gocciolare 6 ml [3 ml] di soluzione di Ibraimov (H_2O distillata, 5% acido acetico), incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Rimuovere la soluzione di Ibraimov modificata e gocciolare 6 ml [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 procedere all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa, mediante l'impiego di Optichrome (cod. EKAMH950).



Terrain complet pour culture d'amniocytes et de villosités chorales

Matériel fourni

EK AMG 200, 1 bouteille de 100 ml
EK AMG 600, 1 bouteille de 500 ml

Conservation et stabilité

Amniomed Plus doit être conservé à $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Décongeler Amniomed Plus 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. Une fois décongelé, il doit être conservé entre $+2^{\circ}\text{C}$ et $+8^{\circ}\text{C}$ pendant un maximum de 8 jours. La shelf life du produit est de 2 ans.

Protocole d'utilisation

NB: les protocoles de culture in situ se réfèrent à l'utilisation d'Amnioslide. Pour l'utilisation d'Amniodish, se référer aux valeurs entre parenthèses.

Français

AMNIOCYTES - Traitement échantillon

1. Transférer le liquide amniotique dans des tubes stériles et centrifuger pendant 10 minutes à 1000 rpm.
2. Éliminer le surnageant et resuspendre le pellet dans 2 – 3 ml d'Amniomed Plus.

Culture in situ

1. Mettre délicatement 1 ml [0,5 ml] de suspension cellulaire sur la lame à l'intérieur d'Amnioslide. Incuber à 37°C , 5% CO_2 pendant 6-12 heures, en évitant les dérangements mécaniques.
2. Ajouter 4 ml [2 ml] d'Amniomed Plus frais.
3. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 5 ml [2,5 ml] d'Amniomed Plus frais.
4. Le 7/8ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand la croissance est optimale, ajouter 30 μl [15 μl] de Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incuber à 37°C , 5% CO_2 pendant 60-90 minutes.

Culture en fiole

1. Préparer de 2 à 4 fioles stériles de 25 cm^2 . Ajouter 4 ml d'Amniomed Plus à chaque fiole.
2. Ajouter 0,5 ml de suspension et incuber à 37°C , 5% CO_2 .
3. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 5 ml d'Amniomed Plus.
4. Le 7/8ème jour ou lorsque la croissance est adéquate, ajouter 30 μl Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incuber à 37°C , 5% CO_2 pendant 60 – 90 minutes.

VILLOSITÉS CHORIALES (CVS)-Traitement échantillon

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.
4. 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.
5. Ajouter 3-5 ml de Hank's Balanced Salts Solution froide (environ $+4^{\circ}\text{C}$).
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 1500 rpm et enlever le surnageant.
7. Ajouter 2 ml de Collagenase type II stérile (1 mg/ml) et incuber à 37°C pendant 10 minutes.
8. Ajouter 3 - 5 ml de HBSS froide (environ $+4^{\circ}\text{C}$).
9. Centrifuger pendant 5 minutes à 1500 rpm et enlever le surnageant.
10. Ajouter 2 - 3 ml d'Amniomed Plus et resuspendre le pellet.

Culture in situ

1. Préparer de 2 à 6 Amnioslides, selon la quantité de cellules. Ajouter 4,5 ml [2 ml] d'Amniomed Plus à chaque Amnioslide.
2. Faire couler environ 500 μl de suspension cellulaire pour Amnioslide.
3. Incuber à 37°C , 5% CO_2 .
4. Le 5ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 5 ml [2,5 ml] d'Amniomed Plus frais.
5. Le 6/7ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand la croissance est optimale, ajouter 30 μl [15 μl] de Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
6. Incuber à 37°C , 5% CO_2 pendant 4 - 6 heures.

Culture en fiole

Voir le protocole pour la culture en fiole d'amniocytes. Modifier les temps des points 3. et 4. conformément au protocole pour culture in situ de CVS, points 3. et 4.

Fixation des chromosomes et préparation de la lame de culture in situ

1. Enlever complètement le terrain.
2. Faire couler 6 ml [3 ml] de solution hypotonique (H_2O distillée, 0,6% sodium citrate, 0,1% KCl) et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
3. Enlever la solution hypotonique et faire couler 6 ml [3 ml] de solution d'Ibramov (H_2O distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Enlever la solution d'Ibramov modifiée et faire couler 6 ml [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 lame et effectuer le séchage dans des conditions adéquates et constantes de température et d'humidité relative, en utilisant Optichrome (cod. EKAMH950).



Deutsche

Vollständiger Nährboden für Kulturen von Amniocyten und Chorionzotten

Geliefertes Material

EK AMG 200, 1 Flasche mit 100 ml
EK AMG 600, 1 Flasche mit 500 ml

Aufbewahrung und Haltbarkeit

Amniomed Plus muss bei $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden. Amniomed Plus 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. Nach dem Auftauen muss es zwischen $+2^\circ\text{C}$ und $+8^\circ\text{C}$ maximal 8 Tage lang aufbewahrt werden. Die Lagerfähigkeit des Produkts beträgt 2 Jahre.

Benutzungsprotokoll

MERKE: die in situ-Protokolle der Kulturen beziehen sich auf die Verwendung von Amnioside. Für die Verwendung von Amnidish gelten die Werte in den eckigen Klammern.

AMNIOCYTEN - Behandlung der Probe

1. Die Fruchtwasserflüssigkeit in sterile Reagenzgläser geben und 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
2. Die überschüssige Flüssigkeit entfernen und den Satz in 2 – 3 ml Amniomed Plus wieder aufmischen.

in situ-Kultur

1. Vorsichtig 1 ml [0,5 ml] der Zellsuspension auf den Objektträger im Inneren von Amnioside geben. Bei 37°C , 5% CO_2 für 6-12 Stunden bebrüten, wobei mechanische Störungen vermieden werden sollten.
2. 4 ml [2 ml] frisches Amniomed Plus hinzufügen.
3. Am Tag 6 den Nährboden mit 5 ml [2,5 ml] frischem Amniomed Plus vollständig auswechseln.
4. Am Tag 7/8, oder bei angemessenem Wachstum 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzufügen.
5. Bei 37°C , 5% CO_2 für 60-90 Minuten bebrüten.

Kultur in Flaschen

1. Bereiten Sie 2 bis 4 sterile Flaschen mit 25 cm^2 vor. Geben Sie 4 ml Amniomed Plus in jede Flasche.
2. Fügen Sie 0,5 ml Suspension hinzu und inkubieren Sie bei 37°C , 5% CO_2
3. Am 6. Tag vertauschen Sie den Nährbodenvollständig gegen 5 ml Amniomed Plus aus
4. Am Tag 7 / 8 oder nach geeignetem Wachstum fügen Sie 30 μl Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzu.
5. Inkubieren Sie bei 37°C , 5% CO_2 für 60 – 90 Minuten.

CHORIONZOTTEN (CVS) - Behandlung der Probe

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 gestützten Mikroskops vorsichtig die Blutgerinnsel sowie die Siebhautreste entfernen.
4. Die Zotten in ein Rohr von 15 ml übertragen, welches 1 ml Pronase E (4×10^6 PU/g) enthält und bei Raumtemperatur für 4-6 Minuten bebrüten.
5. 3-5 ml kalte Hank's Balanced Salts Solution (zirka $+4^\circ\text{C}$) hinzufügen.
6. Für 5 Minuten bei 1500 RPM schleudern und den oben schwimmenden Bestandteil entfernen.
7. 2 ml Collagenase Typ II steril (1 mg/ml) hinzufügen und bei 37°C für 10 Minuten bebrüten.
8. 3-5 ml kalte HBSS (zirka $+4^\circ\text{C}$) hinzufügen.
9. Für 5 Minuten bei 1500 RPM schleudern und den oben schwimmenden Bestandteil entfernen.
10. 2-3 ml Amniomed Plus hinzufügen und das Pellet wieder herausnehmen.

in situ-Kultur

1. Von 2 bis zu 6 Amnioside vorbereiten, je nach Anzahl der Zellen. 4,5 ml [2 ml] Amniomed Plus auf jeden Amnioside hinzufügen.
2. Zirka 500 μl der Zelllösung für Amnioside tröpfeln.
3. Bei 37°C , 5% CO_2 bebrüten.
4. Am Tag 5 den Nährboden vollständig mit 5 ml [2,5 ml] frischem Amniomed Plus auswechseln.
5. Am Tag 6/7, oder bei angemessenem Wachstum 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzufügen.
6. Bei 37°C , 5% CO_2 für 4-6 Stunden bebrüten.

Kultur in Flaschen

Siehe Protokoll für die Kultur der Amniocyten in Flaschen. Ändern Sie die Zeiten der Punkte 3. und 4. übereinstimmend mit dem Protokoll für in situ-Kultur von CVS, Punkte 3. und 4.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers für die in situ Kultur

1. Den Boden vollständig entfernen.
2. 6 ml [3 ml] hypotonische Lösung (H_2O destilliert, 0,6% Natriumzitat, 0,1% KCl) tröpfeln und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bebrüten.
3. Die hypotonische Lösung entfernen und 6 ml [3 ml] Ibraimov-Lösung (H_2O destilliert, 5% Essigsäure) tröpfeln, bei Raumtemperatur für 5 Minuten bebrüten.
4. Die modifizierte Ibraimov-Lösung entfernen und 6 ml [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.



English

Complete medium for culture of amniocytes and chorionic villi

Material supplied

EK AMG 200, 1 bottle of 100 ml
EK AMG 600, 1 bottle of 500 ml

Storage and stability

Amniomed Plus must be stored at $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. Thaw the Amniomed Plus 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. Once thawed, it must be stored at a temperature between $+2^\circ\text{C}$ and $+8^\circ\text{C}$ for maximum 8 days. The shelf life of the product is 2 years.

Protocol of use

NB: In situ culture protocols refer to the use of Amnioslide. With regards to the use of Amniodish refer to the values in brackets.

AMNIOCYTES - Sample treatment

1. Transfer the amniotic fluid into sterile tubes and centrifuge 10 minutes at 1000 rpm.
2. Remove the supernatant and resuspend the pellet in 2-3 ml of Amniomed Plus.

In situ culture

1. Place 1 ml [0,5 ml] of cell suspension gently onto each Amnioslide, on the microscope slide. Incubate a 37°C , 5% CO_2 for 6- 12 hours, with minimal mechanical disturbance.
2. Add 4 ml [2 ml] of fresh Amniomed Plus.
3. On Day 6, replace the culture medium with 5 ml [2,5 ml] of fresh Amniomed Plus.
4. On Day 7/Day 8 check for progress of growth using an inverted microscope. At the optimal cell growth, add $30 \mu\text{l}$ [15 μl] of Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubate at 37°C , 5% CO_2 for 60 - 90 minutes.

Flask culture

1. Prepare 2 to 4 sterile flasks of 25 cm^2 . Add 4 ml of Amniomed Plus to each flask.
2. Add 0.5 ml of suspension and incubate at 37°C , 5% CO_2 .
3. On the 6th day, completely change the culture medium with 5 ml of Amniomed Plus.
4. On the 7th/8th day or when suitable growth has been reached, add $30 \mu\text{l}$ Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubate at 37°C , 5% CO_2 for 60 - 90 minutes.

CHORIONIC VILLI (CVS) – Sample treatment

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.
4. Transfer the villi in a 15 ml sterile centrifuge tube containing 1 ml of Pronase E (4×10^6 PU/g) and incubate at room temperature for 4-6 minutes.
5. Add 3-5 ml of cold Hank's Balanced Salts Solution (kept at $+4^\circ\text{C}$).
6. Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant.
7. Add 2 ml of sterile Collagenase type II (1 mg/ml) and incubate at 37°C for 10 minutes.
8. Add 3-5 ml of cold HBSS (kept at $+4^\circ\text{C}$).
9. Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant.
10. Add 2 ml of Amniomed Plus and resuspend the pellet.

In situ culture

1. Prepare 2 to 6 Amnioslide, depending on the number of cells. Add 4,5 ml [2 ml] of Amniomed Plus medium to each Amnioslide.
2. Drop about 500 μl of the cell suspension on each Amnioslide.
3. Incubate at 37°C in 5% CO_2 .
4. On Day 5 replace the culture medium with 5 ml [2,5 ml] of fresh Amniomed Plus.
5. On Day 6 / Day 7 check for progress of growth using an inverted microscope. At the optimal cell growth, add $30 \mu\text{l}$ [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
6. Incubate at 37°C , 5% CO_2 for 4 - 6 hours.

Flask culture

See protocol for the amniocytes culture in flask. Change the timing of points 3 and 4 according to the in situ CVS culture protocol, points 3 and 4.

Chromosomes fixation and slide preparation from in situ culture

1. Suck the medium up completely.
2. Drop 6 ml [3 ml] of hypotonic solution (distilled H_2O , 0,6% sodium citrate, 0,1% KCl) and incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Suck the hypotonic solution up and drop 6 ml [3 ml] of Ibramov solution (distilled H_2O , 5% acetic acid), incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Suck the Ibramov modified solution up and drop 6 ml [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 microscope slide and dry under constant condition of right temperature and relative humidity into Optichrome (ref. EKAMH950).



Español

Terreno completo para cultivo de amniocitos y vellosidades coriónicas

Material suministrado

EK AMG 200, 1 botella da 100 ml
EK AMG 600, 1 botella da 500 ml

Conservación y estabilidad

Amniomed Plus tiene que ser conservado a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, descongelar envases preparados para el uso Amniomed Plus en un baño caldeado a 37°C , agitando adecuadamente antes del uso. No requiere añadir L-Glutamina, antibióticos o suero. Una vez descongelado tiene que ser conservado entre $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 8 días. La shelf life del producto es de 2 años.

Protocolo de utilización

NB: los protocolos de cultivo in situ se refieren al empleo de Amnioslide. Para el empleo de Amniodish consultar los valores entre paréntesis cuadros.

AMNIOCITOS - Tratamiento muestra

1. Transferir el líquido a tubos estériles y centrifugar 10 minutos a 1000 rpm.
2. Retirar el surnatante y resuspender el pellet en 2-3 ml de Amniomed Plus.

Cultivo in situ

1. Colocar suavemente 1ml de suspensión celular en el cristal en el interior de los Amnioslide. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 6-12 horas, evitando molestias mecánicas.
3. Añadir 4 ml [2 ml] de Amniomed Plus fresco.
3. Al 6º día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 5 ml [2,5 ml] di Amniomed Plus fresco.
4. Al 7º / 8º, o a crecimiento adecuado, añadir 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
5. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 60-90 minutos.

Cultivo en matraz

1. Preparar de 2 a 4 matraces estériles de 25 cm^2 . añadir 4 ml de Amniomed Plus en cada matraz.
2. Añadir 0,5 ml de suspensión e incubar a 37°C , 5% CO_2
3. El día 6 cambiar completamente el terreno de cultivo con 5 ml de Amniomed Plus
4. El día 7 / 8 o a crecimiento adecuado, añadir 30 μl Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
5. Incubar a 37°C , 5% CO_2 per 60-90 minutos.

VELLOSIDADES CORIÓNICAS (CVS) - Tratamiento muestra

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.
4. Transferir las villa a un tubo de 15 ml con 1 ml de Pronase E (4×10^6 PU/g) e incubar a temperatura ambiente durante 4-6 minutos.
5. Añadir 3-5 ml de Hank's Balanced Salts Solution fría (aproximadamente $+4^{\circ}\text{C}$).
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm y retirar el surnatante.
7. Añadir 2 ml de Collagenase type II estéril (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 10 minutos.
8. Añadir 3-5 ml de HBSS fría (aproximadamente $+4^{\circ}\text{C}$).
9. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm y retirar el surnatante.
10. Añadir 2-3 ml de Amniomed Plus y resuspender el pellet.

Cultivo in situ

1. Preparar de 2 a 6 Amnioslide, en función de la cantidad de células. Añadir 4,5 ml [2 ml] de Amniomed Plus a cada Amnioslide.
2. Echar algunas gotas aproximadamente 500 μl de suspensión celular por Amnioslide.
3. Incubar a 37°C , 5% CO_2 .
4. Al quinto día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 5 ml [2,5 ml] de Amniomed Plus fresco.
5. Al 6º / 7º, o a crecimiento adecuado, añadir 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
6. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 4 - 6 horas.

Cultivo en matraz

Ver protocolo para cultivo en matraz de amniocitos. Variar los tiempos de los puntos 3. y 4. de acuerdo con el protocolo para cultivo in situ di CVS, puntos 3. y 4.

Fijación cromosomas y preparación vidrio de cultivo in situ

1. Retirar completamente el terreno.
2. Echar en gotas 6 ml [3 ml] de solución hipotónica (H_2O destilada, 0,6% sodio citrato, 0,1% KCl) e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Retirar la solución hipotónica echar en gotas 6 ml [3 ml] de solución di Ibraimov (H_2O destilada, 5% ácido acético), incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Retirar la solución de Ibramov modificada echar en gotas 6 ml [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 cristal y proceder al secado en adecuadas y constantes condiciones de temperatura y humedad relativa, empleando Optichrome (cód. EKAMH950).



Português

Terreno completo para cultura de amniócitos e vilosidade coriônica

Material fornecido

EK AMG 200, 1 embalagem de 100 ml
EK AMG 600, 1 embalagem de 500 ml

Conservação e estabilidade

O Amniomed Plus deve ser conservado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. Descongelar Amniomed Plus num banho termostático a 37°C , agitando bem antes de usar. Não necessita de adição de L-Glutamina, antibióticos ou soro. Uma vez descongelado, deve ser conservado entre $+2^\circ\text{C}$ e $+8^\circ\text{C}$ por um período máximo de 8 dias. O período limite de armazenagem do produto é de 2 anos.

Protocolo de utilização

NB: os protocolos de cultura in situ referem-se ao emprego de Amnioslide. Para o emprego de Amniodish, consultar os valores entre parêntesis quadrados.

AMNIÓCITOS - Tratamento da amostra

1. Transferir o líquido amniótico para tubos estéreis e centrifugar 10 minutos a 1000 rpm.
2. Retirar o sobrenadante e suspender de novo o pellet em 2-3 ml de Amniomed Plus.

Cultura in situ

1. Colocar delicadamente 1 ml [0,5 ml] de suspensão celular sobre a lâmina no interior do Amnioslide. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 6-12 horas, evitando as perturbações mecânicas.
2. Acrescentar 4 ml [2 ml] de Amniomed Plus fresco.
3. No 6º dia mudar completamente o meio de cultura com 5 ml [2,5 ml] de Amniomed Plus fresco.
4. No 7º / 8º dia ou com o crescimento certo, acrescentar 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 60-90 minutos.

Cultura em frasco

1. Preparar 2 a 4 frascos estéreis de 25 cm^2 . Adicionar 4 ml de Amniomed Plus a cada frasco.
2. Adicionar 0,5 ml de suspensão e incubar a 37°C , 5% CO_2 .
3. Ao 6º dia, mudar completamente o terreno de cultura com 5 ml de Amniomed Plus
4. Ao 7º/8º dia ou com o crescimento adequado, adicionar 30 μl Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
5. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 60-90 minutos.

VILOSIDADE CORIÓICA (CVS) - Tratamento da amostra

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.
4. Transferir as vilosidades para um tubo de 15 ml, contendo 1 ml de Pronase E (4×10^6 PU/g) e incubar à temperatura ambiente durante 4-6 minutos.
5. Acrescentar 3 - 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution fria (cerca de $+4^\circ\text{C}$).
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e retirar o sobrenadante.
7. Acrescentar 2 ml de Collagenase type II estéril (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 10 minutos.
8. Acrescentar 3 - 5 ml de HBSS fria (cerca de $+4^\circ\text{C}$).
9. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e retirar o sobrenadante.
10. Acrescentar 2 - 3 ml de Amniomed Plus e suspender de novo o pellet.

Cultura in situ

1. Preparar entre 2 a 6 Amnioslides, de acordo com a quantidade de células. Acrescentar 4.5 ml [2 ml] de Amniomed Plus a cada Amnioslide.
2. Gotejar cerca de 500 μl de suspensão celular por Amnioslide.
3. Incubar a 37°C , 5% CO_2 .
4. No 5º dia mudar completamente o meio de cultura com 5 ml [2,5 ml] de Amniomed Plus fresco.
5. No 6º / 7º dia ou com o crescimento certo, acrescentar 30 μl [15 μl] Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$).
6. Incubar a 37°C , 5% CO_2 durante 4 - 6 horas.

Cultura em frasco

Ver protocolo para cultura em frasco de amniócitos. Alterar os tempos dos pontos 3. e 4. de acordo com o protocolo para cultura in situ de CVS, pontos 3. e 4.

Fixação de cromossomas e preparação da lâmina da cultura in situ

1. Retirar completamente o meio.
2. Gotejar 6 ml [3 ml] de solução hipotónica (H_2O destilada, 0,6% citrato sódio, 0,1% KCl) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Retirar a solução hipotónica e gotejar 6 ml [3 ml] de solução de Ibraimov (H_2O destilada, 5% ácido acético), incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Retirar a solução de Ibraimov modificada e gotejar 6 ml [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).



Greek

Πίληρες υλικό για καλλιέργεια αμνιακών κυττάρων και χοριακών λαχνών

Παρεχόμενο υλικό

EK AMG 200, 1 φιάλη των 100 ml

EK AMG 600, 1 φιάλη των 500 ml

Διατήρηση και σταθερότητα

Το Amniomed Plus πρέπει να διατηρηθεί στους $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ξεπαγωστέ το Amniomed Plus σε ένα υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C , αναδεύοντας κατάλληλα πριν από τη χρήση. Δεν απαιτεί τη προσθήκη της L-Glutamina, αντιβιοτικών ή ορού. Αφού ξεπαγωσεί και μετά, πρέπει να διατηρηθεί μεταξύ των $+2^{\circ}\text{C}$ και $+8^{\circ}\text{C}$ για 8 ημέρες το μέγιστο. Η shelf life του προϊόντος είναι 2 έτη.

Πρωτόκολλο χρήσης

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: τα πρωτόκολλα καλλιέργειας in situ αναφέρονται στη χρήση του Amnioslide. Για τη χρήση του Amniodish αναφερθείτε στις αξίες που υπάρχουν μεταξύ των τετραγωνικών παρενθέσεων.

ΑΜΝΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ - Επεξεργασία δείγματος

1. Μεταφέρετε το αμνιακό υγρό σε αποστειρωμένους σωλήνες και υποβάλλετε σε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 1000 rpm.
2. Αφαιρέστε το υπερκείμενο υλικό και αναδεύστε το pellet σε 2-3 ml του Amniomed Plus.

Καλλιέργεια in situ

1. Βάλτε προσεκτικά 1 ml [0,5 ml] κυτταρικού εναιωρήματος επάνω στο γυάλινο πλακίδιο στο εσωτερικό του Amnioslide.
- Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 , 5% CO_2 , για 6 - 12 ώρες, αποφεύγοντας τις μηχανικές διαταραχές.
2. Προσθέστε 4 ml [2 ml] φρέσκου Amniomed Plus.
3. Στην ημέρα 6 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 5 ml [2,5 ml] φρέσκου Amniomed Plus.
4. Στην ημέρα 7 / 8 ή σε κατάλληλη ανάπτυξη, προσθέστε 30 μl Colcemid [15 μl] (10 μg/ml).
5. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 για 60 - 90 λεπτά.

Καλλιέργεια σε φιάσκα

1. Προετοιμάστε από 2 έως 4 αποστειρωμένες φιάσκες των 25 cm^2 . Προσθέστε 4 ml Amniomed Plus σε κάθε φιάσκα.
2. Προσθέστε 0,5 ml εναιωρήματος και υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2
3. Στην ημέρα 6 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 5 ml Amniomed Plus
4. Στην ημέρα 7 / 8 ή σε κατάλληλη ανάπτυξη, προσθέστε 30 μl Colcemid (10 μg/ml).
5. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 για 60 - 90 λεπτά.

ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΔΑΧΝΕΣ (CVS) - Επεξεργασία δείγματος

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 αναστραμμένο μικροσκόπιο αφαιρέστε προσεκτικά τους θρόμβους και τα υπόλοιπα φθαρτού υμένα.
4. Μεταφέρετε τους λαχνούς σε ένα σωλήνα των 15 ml που περιέχει 1 ml του Pronase E ($4^{\circ}\text{10}^{\circ}$ PU/g) και υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 - 6 λεπτά.
5. Προσθέστε 3 - 5 ml του Hank's Balanced Salts Solution χρύα (περίπου $+4^{\circ}\text{C}$).
6. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα.
7. Προσθέστε 2 ml του Collagenase type II αποστειρωμένο (1 mg/ml) και υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
8. Προσθέστε 3-5 ml του Hank's Balanced Salts Solution χρύα (περίπου $+4^{\circ}\text{C}$).
9. Υποβάλλετε σε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπερκείμενο διάλυμα.
10. Προσθέστε 2-3 ml του Amniomed Plus και αναδεύστε το pellet.

Καλλιέργεια in situ

1. Προετοιμάστε από 2 έως 6 Amnioslide, ανάλογα με τη ποσότητα των κυττάρων. Προσθέστε 4,5 ml [2 ml] του Amniomed Plus σε κάθε Amnioslide.
2. Στάξτε περίπου 500 μl κυτταρικού εναιωρήματος για κάθε Amnioslide.
3. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 .
4. Στην ημέρα 5 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 5 ml [2,5 ml] φρέσκου Amniomed Plus.
5. Στην ημέρα 6 / 7 ή σε κατάλληλη ανάπτυξη, προσθέστε 30 μl Colcemid [15 μl] (10 μg/ml).
6. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 για 4-6 ώρες.

Καλλιέργεια σε φιάσκα

Βλέπε το πρωτόκολλο για καλλιέργεια σε φιάσκα αμνιακών κυττάρων. Αλλάξτε τα χρονικά διαστήματα των σημείων 3. και 4. σύμφωνα με το πρωτόκολλο για καλλιέργεια in situ του CVS, σημεία 3. και 4.

Σταθεροποίηση γρηγοσωμάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου καλλιέργειας in situ

1. Αφαιρέστε τελείως το μέσο.
2. Στάξτε 6 ml [3 ml] υποτονικού διαλύματος (H_2O 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 6 ml [3 ml] τροποποιημένο διάλυμα του Ibraimov (H_2O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ), υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά.
4. Αφαιρέστε το τροποποιημένο διάλυμα του Ibraimov και στάξτε 6 ml [3 ml] φρέσκου σταθεροποιητικού διαλύματος (μεθανόλη : οξικό οξύ, 4 : 1) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο χρόνος αυτής της επώασης, δεν επηρεάζει 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).

Amniomed Plus



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