

# *Amniomed* *plus*

**Protocollo di utilizzo**

**Protocole d'utilisation**

**Benutzungsprotokoll**

**Protocol of use**

**Protocolo de utilización**

**Protocolo de utilização**

**Πρωτόκολλο χρήσης**

- 
- PER COLTURA 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  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Scongelare Amniomed Plus in un bagnetto termostatato a  $37^\circ\text{C}$ , 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 Amnioidish 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  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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  $\mu\text{l}$  [15  $\mu\text{l}$ ] di Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  per 60–90 minuti.

#### Coltura in fiasca

1. Preparare da 2 a 4 fiasche sterili da 25  $\text{cm}^2$ . Aggiungere 4 ml di Amniomed Plus ad ogni fiasca.
2. Aggiungere 0,5 ml di sospensione e incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
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  $\mu\text{l}$  Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 (circa  $+4^\circ\text{C}$ ).
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  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  di sospensione cellulare per Amnioslide e incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
3. Incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$
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  $\mu\text{l}$  [15  $\mu\text{l}$ ] di Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubare a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 ( $\text{H}_2\text{O}$  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 ( $\text{H}_2\text{O}$  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 procedure all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa, mediante l'impiego di Optichrome (cod. EKAMH950).



# 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<sub>2</sub>, 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 µg/ml).
5. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 60-90 minutes.

### **Culture en fiole**

1. Préparer de 2 à 4 fioles stériles de 25 cm<sup>2</sup>. Ajouter 4 ml d'Amniomed Plus à chaque fiole.
2. Ajouter 0,5 ml de suspension et incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
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 µg/ml).
5. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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\*10<sup>6</sup> 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°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°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<sub>2</sub>.
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 µg/ml).
6. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O 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'Ibraimov (H<sub>2</sub>O distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Enlever la solution d'Ibraimov 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

## **in situ-Kultur**

1. Vorsichtig 1 ml [0,5 ml] der Zellsuspension auf den Objekträger im Inneren von Amnioslide geben. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 µg/ml) hinzufügen.
5. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 60-90 Minuten bebrüten.

## **Kultur in Flaschen**

1. Bereiten Sie 2 bis 4 sterile Flaschen mit 25 cm<sup>2</sup> 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<sub>2</sub>.
3. Am 6. Tag vertauschen Sie den Nährboden vollständig gegen 5 ml Amniomed Plus aus.
4. Am Tag 7/8 oder nach geeignetem Wachstum fügen Sie 30 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzu.
5. Inkubieren Sie bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 gestürzten Mikroskops vorsichtig die Blutgerinnsel sowie die Siebautreste entfernen.
4. Die Zotten in ein Rohr von 15 ml übertragen, welches 1 ml Pronase E (4\*10<sup>6</sup> PU/g) enthält und bei Raumtemperatur für 4-6 Minuten bebrüten.
5. 3-5 ml kalte Hank's Balanced Salts Solution (zirka +4°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°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 Amnioslide vorbereiten, je nach Anzahl der Zellen. 4.5 ml [2 ml] Amniomed Plus auf jeden Amnioslide hinzufügen.
2. Zirka 500 µl der Zellsuspension für Amnioslide tröpfeln.
3. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 µg/ml) hinzufügen.
6. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 4-6 Stunden bebrüten.

## **Kultur in Flaschen**

Siehe Protokoll für die Kultur der Amnioscyten 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 Objekträgers für die *in situ* Kultur**

1. Den Boden vollständig entfernen.
2. 6 ml [3 ml] hypotonische Lösung (H<sub>2</sub>O destilliert, 0,6% Sodiumzitrat, 0,1% KCl) tröpfeln und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bebrüten.
3. Die hypotonische Lösung entfernen und 6 ml [3 ml] Ibraimov-Lösung (H<sub>2</sub>O 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 Objekträger 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  $37^\circ\text{C}$  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 Amnioidish 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  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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  $\mu\text{l}$ ] of Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubate at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  for 60 - 90 minutes.

#### Flask culture

1. Prepare 2 to 4 sterile flasks of  $25\text{ cm}^2$ . Add 4 ml of Amniomed Plus to each flask.
2. Add 0.5 ml of suspension and incubate at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
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  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 ( $4 \times 10^6$  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  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  of the cell suspension on each Amnioslide.
3. Incubate at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ .
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  $\mu\text{l}$ ] of Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
6. Incubate at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}$ , 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 Ibraimov solution (distilled  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% acetic acid), incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Suck the Ibraimov 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 coriônicas

### 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  $37^\circ\text{C}$ , 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 Amnioidish 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  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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] de Amniomed Plus fresco.
4. Al 7º / 8º, o a crecimiento adecuado, añadir 30  $\mu\text{l}$  [15  $\mu\text{l}$ ] Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  durante 60-90 minutos.

#### Cultivo en matraz

1. Preparar de 2 a 4 matraces estériles de  $25\text{ cm}^2$ . añadir 4 ml de Amniomed Plus en cada matraz.
2. Añadir 0,5 ml de suspensión e incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
3. El dia 6 cambiar completamente el terreno de cultivo con 5 ml de Amniomed Plus
4. El dia 7 / 8 o a crecimiento adecuado, añadir 30  $\mu\text{l}$  Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
5. Incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 ( $4 \times 10^6$  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  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  de suspensión celular por Amnioslide.
3. Incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
4. Al quinto dia 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  $\mu\text{l}$  [15  $\mu\text{l}$ ] Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
6. Incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 en 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 ( $\text{H}_2\text{O}$  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 de Ibraimov ( $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 5% ácido acético), incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Retirar la solución de Ibraimov 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

## 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<sub>2</sub> 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 µg/ml).
5. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 60-90 minutos.

## Cultura em frasco

1. Preparar 2 a 4 frascos estéreis de 25 cm<sup>2</sup>. Adicionar 4 ml de Amniomed Plus a cada frasco.
2. Adicionar 0,5 ml de suspensão e incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
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 µg/ml).
5. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 60-90 minutos.

## VILOSIDADE CORIÓNICA (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<sup>6</sup> 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°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°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<sub>2</sub>.
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 µg/ml).
6. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 hipotônica (H<sub>2</sub>O destilada, 0,6% citrato sódio, 0,1% KCl) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Retirar a solução hipotônica e gotejar 6 ml [3 ml] de solução de Ibraimov (H<sub>2</sub>O 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).

## 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 ± 2°C. Descongelar Amniomed Plus num banho termostatado 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°C e +8°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 Amniodesh, 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.



## Greek

### **Καλλιέργεια in situ**

1. Βάλτε προσεπικά 1 ml [0.5 ml] κυτταρικού εναιωρήματος επάνω στο γυάλινο πλακίδιο στο εσωτερικό του Amnioslide. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> για 60 - 90 λεπτά.

### **Καλλιέργεια σε φλάσκα**

1. Προστιμάστε από 2 έως 4 αποστειρωμένες φλάσκες των 25 cm<sup>2</sup>. Προσθέστε 4 ml Amniomed Plus σε κάθε φλάσκα.
2. Προσθέστε 0.5 ml εναιωρήματος και υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
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 [15 μl] (10 µg/ml).
5. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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. Κάντε τη πλόνη των λαγών με φρέσκο medium για να αφαιρέστε τα υπόλοιπα αίματος.
3. Με ανεστραμμένο μαρούσικό αφαιρέστε προσεκτικά τους θορύβους και τα υπόλοιπα φθαρτού νυμένα.
4. Μεταφέρετε τους λαγνούς σε ένα σωλήνων των 15 ml που περιέχει 1 ml του Pronase E (4\*10<sup>6</sup> PU/g) και υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 - 6 λεπτά.
5. Προσθέστε 3 - 5 ml του Hank's Balanced Salts Solution κρύα (περίπου +4°C).
6. Υποβάλλετε σε φυγοσέντρηση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπεροχείμενο 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 κρύα (περίπου +4°C).
9. Υποβάλλετε σε φυγοσέντρηση για 5 λεπτά σε 1500 rpm και αφαιρέστε το υπεροχείμενο διάλυμα.
10. Προσθέστε 2-3 ml του Amniomed Plus και αναδεύστε το pellet.

### **Καλλιέργεια in situ**

1. Προστιμάστε 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<sub>2</sub>.
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<sub>2</sub> για 4-6 ώρες.

### **Καλλιέργεια σε φλάσκα**

Βλέπε το πρωτόκολλο για καλλιέργεια σε φλάσκα 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 χρωμοσωμάτων και προστιματία γυάλινου πλακιδίου καλλιέργειας in situ**

1. Αφαιρέστε τελείως το μέσο.
2. Στάξτε 6 ml [3 ml] υποτονικό διάλυματος (H<sub>2</sub>O 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] τριποτομημένο διάλυματος του Ibraimov (H<sub>2</sub>O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ), υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά.
4. Αφαιρέστε το τριποτομημένο διάλυμα του Ibraimov και στάξτε 6 ml [3 ml] φρέσκου σταθεροποιητικού διάλυματος (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 χοήση του Optichrome (cod. EKAMH950).





**EuroClone®**  
serving science through innovation



**BIOAIR®**

**EuroClone®**

serving science through innovation

**EuroClone S.p.A.**

Via Figino 20/22 - 20016 Pero (MI) Italy

① + 39 02 38195.1 ② + 39 02 38101465

✉ info@euroclone.it ➡ www.euroclone.it

EuroClone S.p.A. has a Quality System certified in compliance  
with UNI EN ISO 9001:2008 NF EN ISO 13485:2004