

# *Amnio* slide

**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 ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ





Italiano

## Supporto sterile per coltura e successiva analisi di amniociti e villi coriali

cod. EK AMS 60 60 test  
cod. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 test

### Materiale fornito

Ogni scatola contiene 30 confezioni pronte per l'uso, per un totale di 60 Amnioslide.  
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 1 ml di sospensione cellulare sopra il vetrino all'interno di Amnioslide.
2. Incubare a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 6 - 12 ore, evitando i disturbi meccanici.
3. Aggiungere 4 ml di Amniomed Plus fresco.
4. Al giorno 6 cambiare completamente il terreno di coltura con 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% CO<sub>2</sub> per 60 - 90 minuti.

### Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo manuale

1. Rimuovere completamente il terreno.
2. Gocciolare 6 ml di soluzione ipotonica (H<sub>2</sub>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 di soluzione di Ibramov (H<sub>2</sub>O distillata, 5% acido acetico), incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Rimuovere la soluzione di Ibramov modificata e gocciolare 6 ml di soluzione fissativa fresca (metanolo : acido acetico, 4 : 1) a temperature 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).

### Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo automatizzato

1. Porre Amnioslide in Autochrome (cod. EKEKAMH1001).
2. Scegliere il programma adeguato.
3. Ultimato il processo rimuovere il vetrino da Amnioslide e procedere 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 of Pronase E (4\*10<sup>6</sup> 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. Aggingere 2 - 3 ml di Amniomed Plus e risospendere il pellet.
8. Preparare da 2 a 6 Amnioslide, a seconda del quantitativo di cellule. Aggiungere 4.5 ml di Amniomed Plus ad ogni Amnioslide.
9. Gocciolare circa 500 µl di sospensione cellulare per Amnioslide.
10. Incubare a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
11. Al giorno 5 cambiare completamente il terreno di coltura con 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 30 µl di Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubare a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 4 - 6 ore.

### Fissazione cromosomi e preparazione vetrino, metodo manuale o automatizzato

Vedi il protocollo per trattamento di amniociti.



Français

## Support stérile pour culture et analyse successive d'amniocytes et de villosités choriales

cod. EK AMS 60 60 tests  
cod. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 tests

### Matériel fourni

Chaque boîte contient 30 confections prêtes à l'emploi, pour un total de 60 Amnioslides.

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 1 ml de suspension cellulaire sur la lame à l'intérieur d'Amnioslide.
2. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 6 - 12 heures, en évitant les dérangements mécaniques.
3. Ajouter 4 ml d'Amniomed Plus frais.
4. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 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% CO<sub>2</sub> pendant 60 - 90 minutes.

### Fixation des chromosomes et préparation de la lame, méthode manuelle

1. Enlever complètement le terrain.
2. Faire couler 6 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 de solution d'Ibramov (H<sub>2</sub>O distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Enlever la solution d'Ibramov modifiée et faire couler 6 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).

### Fixation des chromosomes et préparation de la lame, méthode automatisée

1. Mettre Amnioslide en Autochrome (cod. EKEKAMH1001).
2. Choisir le programme adéquat.
3. Une fois le processus terminé, enlever la lame 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\*10<sup>6</sup> 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 2 à 6 Amnioslides, selon la quantité de cellules. Ajouter 4.5 ml d'Amniomed Plus à chaque Amnioslide.
9. Faire couler environ 500 µl de suspension cellulaire pour Amnioslide.
10. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
11. Le 5ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 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 30 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 4 - 6 heures.

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

Voir le protocole pour le traitement d'amniocytes.



Deutsche

## Steriler Support für die Kultivierung und nachfolgende Analyse von Amnionzellen und Zotten

Cod. EK AMS 60 60 Tests  
Cod. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 Tests

### Mitgeliefertes Material

Jede Schachtel enthält 30 Packungen für den Sofortgebrauch mit insgesamt 60 Amnioslide.

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 1 ml der Zellsuspension auf den Objektträger im Inneren von Amnioslide geben.
2. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 6-12 Stunden bebrüten, wobei mechanische Störungen vermieden werden sollten.
3. 4 ml frisches Amniomed Plus hinzufügen.
4. Am Tag 6 den Nährboden mit 5 ml frischem Amniomed Plus vollständig auswechseln.
5. Am Tag 7/8, oder bei angemessenem Wachstum 30 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen.
6. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 60-90 Minuten bebrüten.

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

1. Den Boden vollständig entfernen.
2. 6 ml hypotonische Lösung (H<sub>2</sub>O destilliert, 0,6% Natriumzitat, 0,1% KCl) tröpfeln und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bebrüten.
3. Die hypotonische Lösung entfernen und 6 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 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. Amnioslide in Autochrome (Cod. EKEKAMH1001) geben.
2. Das angemessene Programm auswählen.
3. Nach Beendigung des Vorgangs den Objektträger aus Amnioslide 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\*10<sup>6</sup> 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. Von 2 bis zu 6 Amnioslide vorbereiten, je nach Anzahl der Zellen. 4,5 ml Amniomed Plus auf jeden Amnioslide hinzufügen.
9. Zirka 500 µl der Zelllösung für Amnioslide tröpfeln.
10. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bebrüten.
11. Am Tag 5 den Nährboden vollständig mit 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, 30 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzufügen.
13. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 4-6 Stunden bebrüten.

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

Siehe Protokoll für die Behandlung der Amnionzellen.



English

## Sterile chamber for culture and analysis of amniocytes and chorionic villi

Ref. EK AMS 60 60 tests

Ref. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 tests

### Material supplied

Each case contains 30 ready to use trays, 60 chambers.

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 1 ml of cell suspension gently onto each Amnioslide, on the microscope slide.
2. Incubate at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 6 - 12 hours, with minimal mechanical disturbance.
3. Add 4 ml of fresh Amniomed Plus.
4. On Day 6, replace the culture medium with 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 mitosis equal to three to four microscope fields (100X), add 30 µl of Colcemid (10 µg/ml).
6. Incubate at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 60 - 90 minutes.

### Chromosome preparation, manual method

1. Suck the medium up completely.
2. Drop 6 ml of hypotonic solution (distilled H<sub>2</sub>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 of Ibramov solution (distilled H<sub>2</sub>O, 5% acetic acid), incubate at room temperature for 5 minutes.
4. Suck the Ibramov modified solution up and drop 6 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).

### Chromosome preparation, automated method

1. Put Amnioslide in Autochrome (ref. EKEKAMH1001).
2. Chose the proper program.
3. At the end of the automated process remove the microscope 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\*10<sup>6</sup> 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 ml of Amniomed Plus and resuspend the pellet.
8. Prepare 2 to 6 Amnioslide, depending on the number of cells. Add 4,5 ml of Amniomed Plus medium to each Amnioslide.
9. Drop about 500 µl of the cell suspension on each Amnioslide.
10. Incubate at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.
11. On Day 5 replace the culture medium with 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 mitosis equal to three to four microscope fields (100X), add 30 µl of Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubate at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 4 - 6 hours.

### Chromosome preparation, manual or automated method

See protocol chromosome preparation of Amniotic fluid.



Español

## Soporte estéril para cultivo y sucesivos análisis de amniocitos y vellosidades coriónicas

cód. EK AMS 60 60 test  
cód. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 test

### Material suministrado

Cada caja contiene 30 dispuestas para el uso, de un total de 60 Amnioslide.  
Validez: 2 años

### Protocolo para cultivo in situ de amniocitos

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

1. colocar suavemente 1 ml de suspensión celular en el cristal en el interior de los Amnioslide.
2. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 6 - 12 horas, evitando molestias mecánicas.
3. añadir 4 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 30 µl Colcemid (10 µg/ml).
6. incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 60 - 90 minutos.

### Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual

1. retirar completamente el terreno.
2. echar en gotas 6 ml de solución hipotónica (H<sub>2</sub>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 de solución de Ibraimov (H<sub>2</sub>O destilada, 5% ácido acético), incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. retirar la solución de Ibraimov modificada echar en gotas 6 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).

### Fijación cromosomas y preparación cristal, método automatizado

1. colocar Amnioslide en Autochrome (cód. EKEKAMH1001).
2. seleccionar el programa adecuado.
3. finalizado el proceso retirar el cristal de Amnioslide 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 2 a 6 Amnioslide, en función de la cantidad de células. Añadir 4.5 ml de Amniomed Plus a cada Amnioslide.
9. echar algunas gotas aproximadamente 500 µl de suspensión celular por Amnioslide.
10. incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
11. al quinto día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 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 30 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 - 6 horas.

### Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual o automatizado

Ver el protocolo para tratamiento de amniocitos.



Português

## Suporte estéril para cultura e posterior análise de amniócitos e vilosidade coriônica

cód. EK AMS 60 60 testes

cód. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 testes

### Material fornecido

Cada caixa contém 30 embalagens prontas a usar, num total de 60 Amnioslides.

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 1 ml de suspensão celular sobre a lâmina no interior do Amnioslide.
2. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 6 - 12 horas, evitando as perturbações mecânicas.
3. Acrescentar 4 ml de Amniomed Plus fresco.
4. No 6º dia mudar completamente o meio de cultura com 5 ml de Amniomed Plus fresco.
5. No 7º / 8º dia ou com o crescimento certo, acrescentar 30 µl Colcemid (10 µg/ml).
6. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 60 - 90 minutos.

### Fixação de cromossomas e preparação da lâmina, método manual

1. Retirar completamente o meio.
2. Gotejar 6 ml de solução hipotónica (H<sub>2</sub>O destilada, 0,6% citrato sódico, 0,1% KCl) e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Retirar a solução hipotónica e gotejar 6 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 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 Amnioslide em Autochrome (cód. EKEKAMH1001).
2. Selecionar o programa adequado.
3. Terminado o processo, retirar a lâmina do Amnioslide 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 decídua.

### 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 2 a 6 Amnioslides, de acordo com a quantidade de células. Acrescentar 4.5 ml de Amniomed Plus a cada Amnioslide.
9. Gotejar cerca de 500 µl de suspensão celular por Amnioslide.
10. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
11. No 5º dia mudar completamente o meio de cultura com 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 30 µl de Colcemid (10 µg/ml).
13. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 - 6 horas.

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

Ver protocolo para tratamento de amniócitos.





Greek

### **Αποστειρωμένη βάση για καλλιέργεια και μεταγενέστερη ανάλυση αμνιακών κυττάρων και χοριακών λαχνών**

cod. EK AMS 60 60 test  
cod. EK AMS 60F SuperFrost®, 60 test

#### **Παρεχόμενο υλικό**

Κάθε κουτί περιέχει 30 συσκευασίες έτοιμες για χρήση, συνολικά 60 Amnioslide. 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 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος επάνω στο γυάλινο πλακίδιο στο εσωτερικό του Amnioslide.
2. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 6 - 12 ώρες, αποφεύγοντας τις μηχανικές διαταραχές.
3. Προσθέστε 4 ml φρέσκου Amniomed Plus.
4. Στην ημέρα 6 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 5 ml φρέσκου Amnio med Plus.
5. την ημέρα 7 / 8 ή σε κατάλληλη ανάπτυξη, προσθέστε 30 µl Colcemid (10 µg/ml).
6. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 60 - 90 λεπτά.

#### **Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, χειρωνακτική μέθοδος**

1. Αφαιρέστε τελείως το μέσο.
2. Στάξτε 6 ml υποτονικού διαλύματος (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 τροποποιημένου διαλύματος του Ibrainom (H<sub>2</sub>O αποσταγμένο, 5% οξικό οξύ), υποβάλλετε σε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά.
4. Αφαιρέστε το τροποποιημένο διάλυμα του Ibrainom και στάξτε 6 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 Optichrome (cod. EKAMH950).

#### **Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, αυτοματοποιημένη μέθοδος**

1. Βάλτε τον Amnioslide σε Autochrome (cod. EKEKAMH1001).
2. Επλέξτε το κατάλληλο πρόγραμμα.
3. Μετά τη λήξη της διαδικασίας αφαιρέστε το γυάλινο πλακίδιο από τον Amnioslide και προχωρήστε στο στέγνωμα σε κατάλληλες και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και σχετική υγρασία με τη χρήση του Optichrome.

#### **Πρωτόκολλο για καλλιέργεια δειγμάτων χοριακών λαχνών (CYS)**

1. Βάλτε τη βιονία σε ένα Petri των 60 mm που περιέχει 5 ml του RPMI 1640.
2. Κάνετε τη πύση 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\*10<sup>6</sup> PU/g) και υποβάλλετε σε b 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 Hank's Balanced Salts Solution 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 αναδεύστε το pellet.
8. Προετοιμάστε από 2 έως 6 Amnioslide, ανάλογα με τη ποσότητα των κυττάρων. Προσθέστε 4.5 ml του Amniomed Plus σε κάθε Amnioslide.
9. Στάξτε περίπου 500 µl κυτταρικού εναιωρήματος για κάθε Amnioslide.
10. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
11. Στην ημέρα 5 αλλάξτε τελείως το μέσο καλλιέργειας με 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 μίσηση ίσο με 3 - 4 για κάθε πεδίο (100X), προσθέστε 30 µl του Colcemid (10 µg/ml).
13. Υποβάλλετε σε επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 4 - 6 ώρες.

#### **Σταθεροποίηση χρομοσομάτων και προετοιμασία γυάλινου πλακιδίου, χειρωνακτική ή αυτοματοποιημένη μέθοδος**

Βλέπε το πρωτόκολλο για επεξεργασία αμνιακών κυττάρων.

# *Amnio* --- *slide*



**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](mailto:info@euroclone.it)

[www.euroclone.it](http://www.euroclone.it)

**EuroClone**  
serving science through innovation