

INNOVATIVE TOOLS FOR

*cytogenetics*

*Amnio*® **Plus**  
*med*

EK AMG-200  
EK AMG- 600

INSTRUCTION  
FOR USE

CE

IVD

**Euro**  **clone**®

English	pag. 2
Français	pag. 5
Deutsche	pag. 8
Español	pag. 11
Italiano	pag. 13
Português	pag. 16
Greek	pag. 19

## **Amniocyte Culture "In situ" Protocol**

This protocol provides a guide for human amniocyte culture using **Amniomed® Plus**. It can be used to replace either part or the whole of existing protocols for amniocyte culture at the user's discretion.

### **"In situ" Cell Culture**

- a) Transfer the amniotic fluid sample (about 20 ml ) in 2 sterile centrifuge tubes and spin at 1200 rpm for 10 minutes
- b) Decant the supernatant for Alpha-fetoprotein analysis, leaving about 1 ml in each tube.

*Please Note: Thaw the **Amniomed® Plus** in a  $37\pm 2$  °C waterbath and mix well by swirling prior to use. Addition of L-Glutamine, antibiotics and serum are not necessary since these components are already present.*

- c) Prepare 4- 6 sterile Petri dishes (35 mm diameter) containing round glass slide (AMNIODISH cod. EK AMN-240)
- d) Distribute cell suspension into Petri dishes.
- e) Add 2 ml of **Amniomed® Plus** to each Petri dish.
- f) Put the cultures in a  $37\pm 2$  °C at 5% CO<sub>2</sub> incubator.
- g) On the 5<sup>th</sup> day observe carefully the cell growing condition and then replace the medium with 2 ml of fresh one.
- h) One or two days later observe the cultures and if the cell colony growth is adequate add Colcemid solution at the final concentration of 0.05µg/ml.

Maintain in incubator for 2-4 additional hours before chromosome preparation.

### **Flask method culture**

(Use the same procedure as for the above "in situ" culture with the following adaptation)

- a) Distribute cell suspension into 2-4 flasks.
- b) Add to each flask 4-5 ml of **Amniomed® Plus**.

c) Place cap loosely on the flask and put the cultures in a  $37\pm 2$  °C at 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### ***Chromosome preparation***

a) Decant the medium completely by tilting the plate and suctioning from the corner.

b) Add 3.0 ml of hypotonic solution in each Petri dish and maintain at room temperature for 10 minutes

c) Add 0.5 ml of fixative mixture (3:1 methanol – acetic acid) directly to the hypotonic solution and leave for 5 minutes.

d) Suction off the supernatant and immediately add 3.0 ml of fresh fixative.

e) Repeat twice to remove carefully any trace of residual water present in the Petri dishes. (The duration of these washings has no influence on final result).

f) Remove coverslip from the dish and immediately put it to dry in OPTICHROME device (Optichrome cod. EK AMH-950) at right condition of temperature and relative humidity.

### **Chorionic Villus Sampling (CVS) Culture Protocol**

a) Transfer the specimen from the transport tube to a 60 mm Petri dish containing 5 ml of RPMI 1640

b) Wash Villi with fresh medium to remove the blood cells

c) Using the inverted microscope, carefully dissect and remove any remaining clots or decidua from Chorionic Villi.

d) Wash carefully Villi in Hank's Balanced Salt Solution without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>.

### **Long-term cultures**

a) Transfer the Villi in a sterile centrifuge tube containing 2 ml of Pronase E (Meerk, 4.000.000 PU/g) \* and incubate for 4-6 minutes at room temperature, gently shaking from time to time.

b) Add 3 - 5 ml of cold HBSS (without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>) to stop enzyme action.

c) Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant

- d) Add 2 ml of sterile Collagenase type II (Sigma, 1 mg/ml) and incubate at 37 °C for 10 minutes
- e) Add 3 - 5 ml of cold HBSS to stop the enzyme action.
- f) Centrifuge for 5 minutes at 1500 rpm and discard the supernatant
- g) Add 2 ml of **Amniomed® Plus** and resuspend the pellet.
- h) Prepare 2 to 6 Petri dishes (Amniodish) depending on the volume of cell pellet. Add 2 ml of **Amniomed® Plus** medium to each Petri dish and distribute the cell suspension.
- i) Incubate at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.
- l) After 4 days of culture, check for progress of growth using an inverted microscope
- m) When the areas of growth show a number of cells in mitosis, add one drop of Colcemid to each Petri dish (at a final concentration of 0.05 µg/ml ) and keep in incubator for additional 4 - 6 hours.

### **Chromosome preparation**

Follow the same procedure described in "Chromosome preparation" for Amniotic Fluid cell culture.

\* Dissolve 25 mg of Pronase E in 25 ml of HBSS without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>. Filter with a 0.2 µm membrane. Aliquot and put in deep freezer (≤ - 18°C).

## **Protocole de culture *in situ* pour les amniocytes**

Ce protocole constitue un guide pour la culture d'amniocytes humains avec **Amniomed® Plus**. Il peut être utilisé en remplacement de protocoles existants pour la culture des amniocytes.

### **Culture *in situ***

- a) Transférer l'échantillon de fluide amniotique (20 ml) dans deux tubes à centrifugation stériles et centrifuger à 1200 rpm pendant 10 minutes
- b) Décanter le surnageant pour l'analyse de l'alpha-fétoprotéine, laisser environ 1 ml par tube

*A noter: décongeler **Amniomed® Plus** dans un bain Marie à  $37\pm 2$  °C et bien mélanger par retournement avant utilisation. L'addition de L-Glutamine, d'antibiotiques et de sérum n'est pas nécessaire puisque ces composants sont déjà présents dans le milieu.*

- c) Préparer 4-6 boîtes de Pétri rondes stériles (35 mm de diamètre) contenant une lamelle de verre (AMNIODISH Réf. EK AMN-240)
- d) Distribuer la suspension cellulaire dans les boîtes de culture
- e) Ajouter 2 ml d'**Amniomed® Plus** dans chaque boîte  
Mettre en culture dans un incubateur à  $37\pm 2$  °C sous atmosphère 5% CO<sub>2</sub>
- g) Le 5<sup>o</sup> jour de culture, observer les cellules et la qualité du milieu, et remplacer le milieu par 2 ml de milieu frais
- h) Le 6<sup>o</sup> ou 7<sup>o</sup> jour (1 ou 2 jour après le changement de milieu), observer la culture et, si la pousse des colonies cellulaires est correcte, ajouter la Colcémide (concentration finale de 0.05µg/ml)

Maintenir dans l'incubateur pendant 2-4 heures supplémentaires avant la préparation des chromosomes

### **Méthode de culture en Flask**

utiliser le même protocole décrit dans la section *in situ* avec les adaptations suivantes :

- a) Répartir la suspension cellulaire dans 2-4 flasks
- b) Ajouter 4-5 ml d'**Anniomed® Plus** dans chaque Flask
- c) Replacer les bouchons sans les visser complètement sur les Flasks et mettre en culture dans un incubateur à  $37 \pm 2$  °C sous atmosphère 5% CO<sub>2</sub>

### **Préparation des chromosomes**

Décanter complètement le milieu en inclinant la boîte et aspirer en s'appuyant sur le bord

Ajouter 3 ml de solution hypotonique dans chaque boîte de Petri et maintenir à température ambiante 10 min

c) Ajouter 0,5 ml de fixateur (3:1 méthanol – acide acétique) directement dans la solution hypotonique et laisser 5 min

Aspirer le surnageant et ajouter immédiatement 3 ml de fixateur frais

e) Répéter l'opération deux fois pour enlever toute trace d'eau dans la boîte de Petri (la durée de ces lavages n'a aucune influence sur le résultat final)

f) Oter la lamelle de la boîte et placer immédiatement à sécher dans l'Optichrome dans les conditions optimales de température et d'humidité (Optichrome cod. EK AMH-950)

### **Protocole pour la culture des villosités choriales (CVS)**

a) Transférer le prélèvement du tube de transport dans une boîte de Pétri de 60 mm contenant 5 ml de RPMI 1640

b) Laver l'échantillon avec du milieu frais pour enlever les cellules sanguines

Utiliser le microscope inversé, disséquer précautionneusement et ôter les caillots

d) Laver le prélèvement chorial avec une solution saline de Hank sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup>

### **Cultures à long terme**

a) Transférer la villosité dans un tube à centrifuger stérile contenant 2 ml de Pronase E (Meerk, 4.000.000 PU/g) \* et incubé 4-6 minutes à température ambiante, en agitant plusieurs fois

b) Ajouter 3 - 5 ml de HBSS froid (sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup>) pour

stopper la réaction enzymatique

c) Centrifuger 5 minutes à 1500 rpm et jeter le surnageant

d) Ajouter 2 ml de Collagenase type II stérile (Sigma, 1 mg/ml) et incuber à 37 °C pendant 10 minutes

Ajouter 3 - 5 ml de HBSS froid pour stopper la réaction enzymatique

f) Centrifuger pendant 5 minutes à 1500 rpm et éliminer le surnageant

Ajouter 2 ml d'**Amniomed® Plus** et resuspendre le culot

h) Préparer 2 à 6 boîtes de Petri (Amniodish) en fonction du volume du culot cellulaire. Ajouter 2 ml d'**Amniomed® Plus** dans chaque boîte et distribuer la suspension cellulaire

i) Incuber à 37 °C dans un incubateur sous 5% CO<sub>2</sub>

j) Après 4 jours de culture, vérifier la progression de la pousse cellulaire sous un microscope inverse

k) Quand les aires de pousse présentent suffisamment de cellules en mitose, ajouter une goutte de Colcémide dans chaque boîte (concentration finale de 0,05 µg/ml ) et garder dans l'incubateur 4 - 6 heures supplémentaires

## **Préparation des chromosomes**

Suivre la même procédure décrite au paragraphe « Préparation des chromosomes pour les cultures de cellules amniotiques »

Dissoudre 25 mg de Pronase E dans 25 ml de HBSS sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup>. Filtrer sur membrane 0,2 µm. Aliquoter et congeler à ≤ - 18°C

## Protokoll "in situ" Amniozytenkultur

Dieses Protokoll ist ein Leitfaden für eine humane Amniozytenkultur unter Verwendung von **Amniomed® Plus**. Je nach Entscheidung des Anwenders kann es entweder teilweise oder vollständig existierende Protokolle für die Amniozytenkultur ersetzen.

### **"in situ" Zellkultur**

a) Probe (Amnionflüssigkeit, ca. 20 ml) auf 2 sterile Zentrifugenröhrchen verteilen und bei 1200 RPM 10 Minuten zentrifugieren

b) Überstand dekantieren und für die Alpha Fetoprotein-Analyse verwenden, ca. 1 ml in jedem Röhrchen belassen

*Bitte beachten: **Amniomed® Plus** in einem  $37\pm 2$  °C Wasserbad auftauen und vor Gebrauch durch aufwirbeln gut mischen. Zugabe von L-Glutamin, Antibiotika und Serum ist nicht nötig da das Medium diese Komponenten bereits enthält.*

c) 4-6 sterile Petrischalen (Durchmesser 35 mm) vorbereiten, die runde Glasobjekträger enthalten (AMNIODISH Prod.-Nr. EK AMN-240).

d) Zellsuspension auf Petrischalen verteilen.

e) Zu jeder Petrischale 2 ml **Amniomed® Plus** zugeben.

f) Kulturen bei  $37\pm 2$  °C und 5% CO<sub>2</sub> in einen Inkubator stellen.

g) Am 5. Tag sorgfältig das Zellwachstum beobachten und das alte Medium durch 2 ml frisches Medium ersetzen.

h) 1-2 Tage später Kulturen begutachten und bei geeignetem Wachstum der Zellkolonien Colcemidlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,05 µg/ml zugeben.

Vor der Chromosomenpräparation noch einmal für 2-4 Stunden im Inkubator belassen.

### **Kultur in Zellkulturflaschen**

(Gleiches Protokoll wie für „in situ“ Kultur verwenden aber die folgenden Abweichungen beachten)

a) Zellsuspension auf 2-4 Zellkulturflaschen verteilen.

- b) Jeder Flasche 4-5 ml **Amniomed® Plus** zugeben.  
c) Verschlusskappe nur lose aufsetzen und Zellkulturflaschen bei  $37 \pm 2$  °C und 5% CO<sub>2</sub> in einen Inkubator stellen.

### **Chromosomenpräparation**

- a) Medium vollständig dekantieren; dabei Schale schräg halten und Medium in der Ecke absaugen.  
b) Zu jeder Petrischale 3 ml hypotonische Lösung zugeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen  
c) 0,5 ml Fixativ (3:1 Methanol - Eisessig) direkt der hypotonischen Lösung zugeben und 5 Minuten stehen lassen.  
d) Überstand absaugen und sofort 3 ml frisches Fixativ zugeben.  
e) Zweimal wiederholen um vorsichtig jede Spur von Wasser aus der Petrischale zu entfernen (die Dauer dieser Waschschriffe hat keinen Einfluss auf das Endergebnis).  
f) Objektträger aus Schale nehmen und zum trocknen sofort in OPTICHRON-Gerät (Optichrom Prod.-Nr. EK AMH950) legen; geeignete Temperatur und rel. Feuchte wählen.

### **Protokoll für die Kultur von Chorionzotten (CVS)**

- a) Proben aus dem Transportröhrchen in eine 60 mm Petrischale mit 5 ml RPMI 1640 überführen  
b) Chorionzotten mit frischem Medium waschen um Blutzellen zu entfernen  
c) Unter einem Inversmikroskop vorsichtig noch verbliebene Blutgerinnsel und Decidua von den Chorionzotten entfernen.  
d) Sorgfältig in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> waschen.

### **Langzeitkulturen**

- a) Chorionzotten in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Pronase E (Merck, 4.000.000 PU/g)\* überführen und 4-6 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, ab und zu vorsichtig schütteln.  
b) 3-5 ml kalte HBSS (ohne Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup>) hinzugeben um die Enzymreaktion abzustoppen.  
c) 5 Minuten bei 1.500 RPM zentrifugieren und Überstand

dekantieren.

d) 2 ml sterile Kollagenase Typ II (Sigma, 1 ml) zugeben und bei  $37\pm 2$  °C für 10 Minuten inkubieren.

e) 3-5 ml kalte HBSS zugeben um die Enzymreaktion abzustoppen.

f) 5 Minuten bei 1.500 RPM zentrifugieren und Überstand dekantieren.

g) 2 ml **Amniomed® Plus** zugeben und Pellet resuspendieren.

h) Abhängig vom Volumen des Zellpellets 2 bis 6 Petrischalen (Amniodish) vorbereiten. 2 ml **Amniomed® Plus** in jede Petrischale geben und Zellsuspension darauf verteilen.

i) Bei  $37\pm 2$  °C und 5% CO<sub>2</sub> in einen Inkubator stellen.

l) Nach 4 Tagen Wachstumsfortschritt mit einem Inversmikroskop überprüfen

m) Wenn in den Ausschnitten, in denen Wachstum stattfindet, einige mitotische Zellen zu sehen sind zu jeder Petrischale einen Tropfen Colcemid zugeben (Endkonzentration 0,05 µg/ml) und für weitere 4 – 6 Stunden in den Inkubator stellen.

### ***Chromosomenpräparation***

Gleiches Protokoll wie für die Chromosomenpräparation für Amniozytenkultur verwenden.

\* 25 mg Pronase in 25 ml HBSS ohne Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> lösen. Durch ein 0,2 µm Membranfilter filtrieren. Aliquotieren und bei ( $\leq - 18^{\circ}\text{C}$ ) einfrieren.

## Protocolo de cultivo "in situ" de Aminocitos

Este protocolo proporciona una guía para el cultivo de aminocitos humanos mediante la utilización de **Aminomed® Plus**. Este protocolo es capaz de reemplazar una buena parte de los protocolos utilizados por los usuarios para cultivo de aminocitos.

### Cultivo de células "in situ"

Transfiera la muestra de líquido amniótico (20 ml aproximadamente) en dos tubos de centrifugación estériles y centrifugue a 1200 rpm durante 10 minutos.

Decante el sobrenadante para el análisis de Alfa-fetoproteína, depositando 1 ml aproximadamente en cada tubo.

*Nota importante: Atempere **Aminomed® Plus** en un baño de agua a 37°C y mézclelo bien antes de su utilización.*

*La adición de L-Glutamina, antibióticos y el suero no es necesaria ya que estos componentes están presentes.*

Prepare de 4 a 6 placas Petri, de 35 mm de diámetro, estériles que contengan cubre (AMNIODISH cod. EK AMN-240)

Reparta la suspensión de células sobre las placas Petri.

Añada 2 ml de **Aminomed® Plus** en cada una de las placas

Introduzca los cultivos en un incubador a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>

Al 5º día revise cuidadosamente el crecimiento de los cultivos y renueve el medio con 2 ml de medio fresco.

Uno o dos días después revise los cultivos y si el crecimiento de la colonia de células es el adecuado, añada una solución de Colcemid a una concentración final de 0.05µg/ml.

Mantengase en el incubador de 2 a 4 horas más antes de la preparación de cromosomas.

### Método de cultivo en Flask

(Utilice el mismo procedimiento que el cultivo "in situ", con las siguientes adaptaciones)

Reparta la suspensión en 2-4 Flasks

Añada a cada botella 4-5 ml de **Aminomed® Plus**

Tape ligeramente los flasks e introduzca en incubadora a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Preparación de cromosomas**

Decante completamente el medio destapando la placa y succionando desde el borde.

Añada 3.0 ml de solución hipotónica en cada placa Petri y manténgalos a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Añada 0.5 ml de mezcla fijadora (3:1 metanol-ácido acético) directamente a la solución hipotónica y deje reposar durante 5 minutos.

Succione el sobrenadante e inmediatamente después vierta 3.0 ml de solución fijadora fresca.

Repita dos veces para separar cuidadosamente cualquier traza de agua residual que pudiera estar presente en la placa Petri. (la duración de estos lavados no implica cambios en el resultado final) Retire la tapa de la placa e inmediatamente colóquela en un dispositivo OPTICHROME seco (Optichrome cod. EK AMH-950) bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

## Protocollo per colture di cellule del liquido amniotico "in situ"

Il protocollo descritto qui di seguito è ritenuto ottimale da molti Laboratori; altri invece preferiscono le tradizionali metodiche perché richiedono un minore numero di operazioni manuali.

**Amniomed® Plus** funziona comunque in modo eccellente qualunque sia la tecnica adottata sia per le colture *in situ* come per le colture in fiasca.

Generalmente ad ogni paziente si prelevano circa 20 ml di liquido amniotico che vengono distribuiti in due provette coniche da 15 ml Centrifugare le provette contenenti il liquido amniotico per 10 minuti a 1000 -1500 giri

Prelevare con una pipetta sterile il liquido soprannatante per la determinazione delle alfa-fetoproteine lasciando 0,5 - 1 ml di liquido amniotico in ciascuna provetta

Risospendere accuratamente i due pellet cellulari ed unirli in una sola provetta

Per ogni campione preparare 6 capsule Petri sterili (Ø 35 mm) contenenti un vetrino portaoggetti rotondo anch'esso sterile (**Amniodish** cod. EK AMN-240)

Dispensare la sospensione cellulare in ognuna delle 6 capsule di Petri (è conveniente appoggiare la pipetta direttamente sul vetrino all'interno della capsula e appoggiare la goccia al centro dello stesso)

Aggiungere 2 ml di **Amniomed® Plus** ad ogni capsula di Petri Incubare il campione nelle capsule in termostato a  $37\pm 2$  °C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%

Al 4°- 5° giorno di incubazione controllare le colture al microscopio rovesciato e sostituire completamente o parzialmente il terreno di coltura con terreno fresco

Incubare il campione per ulteriori 24 - 48 ore sempre in termostato a  $37\pm 2$  °C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%

Trascorso questo tempo controllare le colture al microscopio rovesciato e nel caso si osservi una vivace attività mitotica, aggiungere ad ogni capsula la soluzione Colcemid alla concentrazione finale di 0,05 ìg/ml

Mantenere in termostato le colture per altre 2 - 4 ore prima di procedere all'allestimento dei preparati cromosomici

## **Colture in Fiasca**

Seguire il protocollo sopra riportato con le seguenti modifiche:

Dispensare la sospensione cellulare in 2 – 4 fiasche sterili (25 cm<sup>2</sup>)  
Aggiungere 4 –5 ml di **Amniomed® Plus** ad ogni fiasca  
Incubare il campione nelle fiasche in termostato a 37±2 °C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%

## **Allestimento dei preparati cromosomici**

Dopo aver rimosso completamente il terreno di coltura, mettere in ciascuna capsula 3 ml di soluzione ipotonica (0,6 gr. di Na<sub>3</sub>Citrato + 0,1 gr.di KCl sciolti in 100 ml di acqua distillata) e lasciare per 10 minuti a temperatura ambiente  
Eliminare la soluzione ipotonica e aggiungere 3 ml di soluzione di Ibraimov (96 ml di acqua distillata + 4 ml di acido acetico glaciale) e mantenere per circa 5 minuti a temperatura ambiente  
Eliminare accuratamente la soluzione di Ibraimov e aggiungere 3 ml di fissativo fresco (4:1 alcool metilico - acido acetico)  
Ripetere il lavaggio in fissativo fresco (la durata di questi lavaggi è ininfluenza sul risultato finale)  
Estrarre il vetrino dalla capsula e fare evaporare in condizioni di temperatura e umidità controllate nella macchina **Optichrome** (cod. EK AMH-950)

## **Protocollo per colture dei villi coriali a lungo termine**

Trasferire il campione di villi coriali in una capsula di Petri (Ø 60 mm) contenente 5 ml di terreno RPMI 1640  
Lavare i frammenti di villo in modo da rimuovere il sangue eventualmente presente nel terreno di raccolta  
Utilizzando un microscopio rovesciato, selezionare i villi sia per quantità sia per qualità (allontanare cioè i frammenti di decidua eventualmente presenti) e trasferirli in una capsula di Petri (Ø 35 mm) contenente 3 ml di soluzione salina di Hank's (HBSS) senza Ca<sup>++</sup>- Mg<sup>++</sup>  
Lavare accuratamente i villi in questa soluzione  
Trasferire il materiale in una provetta sterile contenente 2 ml di

Pronase E (Merk, 4.000.000 PU/g) ed incubare a temperatura ambiente a 4-6 minuti

Aggiungere al campione 3-5 ml di soluzione salina di Hank's senza  $Ca^{++}$ -  $Mg^{++}$  fredda (+4°C) e centrifugare 5 minuti a 1500 rpm  
Rimuovere il soprannatante e aggiungere al campione 2 ml di Collagenase tipo II (Sigma, 1 mg/ml) ed incubare a  $37\pm 2$  °C per 10 minuti

Aggiungere al campione 3-5 ml di soluzione salina di Hank's senza  $Ca^{++}$ -  $Mg^{++}$  fredda (+4°C) e centrifugare 5 minuti a 1500 rpm  
Rimuovere accuratamente il soprannatante, aggiungere 1-2 ml di

**Amniomed® Plus** e risospendere

Distribuire i frammenti di villo in 2 -4 capsule Amniodish e aggiungere ad ogni capsula 2 ml di **Amniomed® Plus**

Incubare il campione in termostato a  $37\pm 2$  °C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5%

Dopo 4 giorni di coltura osservare la crescita al microscopio rovesciato e nel caso sia presente una attiva proliferazione cellulare, aggiungere ad ogni capsula la soluzione Colcemid alla concentrazione finale di 0,05 ìg/ml

Mantenere in termostato le colture per altre 4 - 6 ore prima di procedere all'allestimento dei preparati cromosomici

### **Allestimento dei preparati cromosomici**

Seguire la stessa metodica utilizzata per le colture di cellule amniotiche "in situ" (pag. )

#### **N.B.**

Per ottenere preparati cromosomici di buona qualità occorre immettere il Colcemid quando le aree di crescita sono ancora piccole. La durata del trattamento con Colcemid deve essere molto più lunga (4 - 6 ore) rispetto alle colture di liquido amniotico. Infatti, il ciclo cellulare dei fibroblasti del mesenchima è lento. Con brevi trattamenti di Colcemid c'è il rischio di raccogliere solo cellule già entrate in metafase i cui cromosomi sono troppo condensati e perciò poco adatti all'analisi.

## **Protocolo para Cultura de Amniócitos "In situ"**

Este protocolo constitui-se como um guia para a cultura de amniócitos humanos com a utilização do meio **Anniomed® Plus**. Pode ser utilizado para substituir parte ou a totalidade dos protocolos existentes para a cultura de amniócitos, por determinação do utilizador.

### ***Cultura de Células "In situ"***

- a) Transferir a amostra de líquido amniótico (cerca de 20 ml) para 2 tubos estéreis de centrifuga e centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos;
- b) Decantar o sobrenadante para a análise da alfa-fetoproteína, deixando cerca de 1 ml em cada tubo.

*Nota: Descongelar o meio **Anniomed® Plus** em banho maria a  $37\pm 2$  °C e misturar bem por agitação rotacional, antes da sua utilização. A adição de L-Glutamina, antibióticos e soro não é necessária uma vez que estes componentes já estão presentes.*

- c) Preparar 4 - 6 caixas de Petri estéreis (35 mm de diâmetro) contendo uma lâmina de vidro circular (AMNIODISH cod. EK AMN-240)
- d) Distribuir a suspensão de células nas caixas de Petri.
- e) Adicionar 2 ml de meio **Anniomed® Plus** a cada caixa de Petri.
- f) Colocar as culturas a  $37\pm 2$  °C num incubador com 5% CO<sub>2</sub>.
- g) No 5<sup>o</sup> dia observar cuidadosamente as condições do crescimento celular e substituir o meio de cultura por 2 ml de meio fresco.
- h) Um ou dois dias depois observar as culturas. Caso o crescimento das colónias de células seja adequado, adicionar Colcemida a uma concentração final de 0.05µg/ml.

Manter num incubador de CO<sub>2</sub> durante 2-4 horas adicionais antes da preparação dos cromossomas.

### **Método de Cultura em Frasco**

(Utilizar o mesmo procedimento indicado acima para a cultura "in

situ", com as seguintes adaptações)

- a) Distribuir a suspensão de células para 2-4 frascos.
- b) Adicionar 4-5 ml de meio **Amniomed® Plus** a cada frasco.
- c) Colocar a tampa no frasco sem fechar completamente e colocar as culturas a  $37\pm 2$  °C num incubador com 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Preparação dos cromossomas***

- a) Decantar o meio completamente, inclinando a caixa de Petri e retirando o líquido por sucção pela margem;
- b) Adicionar 3.0 ml de solução hipotónica a cada caixa de Petri e manter à temperatura ambiente durante 10 minutos;
- c) Adicionar 0.5 ml de mistura fixadora (3:1 metanol – ácido acético) directamente à solução hipotónica e deixar repousar durante 5 minutos.
- d) Remover o sobrenadante por sucção e adicionar imediatamente 3.0 ml de fixador fresco.
- e) Repetir duas vezes para remover cuidadosamente quaisquer traços de água residual presente nas caixas de Petri (a duração destas lavagens não tem qualquer influência no resultado final).
- f) Remover a tampa da caixa de Petri e colocar imediatamente a caixa em secagem no equipamento OPTICHROME (Optichrome cod. EK AMH-950) nas condições de temperatura e humidade relativa adequadas.

### Protocolo de Cultura de Amostras de Vilosidades Coriónicas (CVS)

- a) Transferir a amostra do tubo de transporte para uma caixa de Petri de 60 mm, contendo 5 ml de meio RPMI 1640
- b) Lavar as vilosidades com meio fresco para remover as células sanguíneas
- c) Utilizando um microscópio invertido, dissecar cuidadosamente e remover das vilosidades coriónicas quaisquer coágulos ou tecidos epiteliais do endométrio remanescentes.
- d) Lavar cuidadosamente as vilosidades em Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) sem Ca<sup>++</sup> e sem Mg<sup>++</sup>.

### **Culturas de Longa Duração**

- a) Transferir as vilosidades para um tubo de centrífuga estéril

contendo 2 ml de Pronase E (Merk, 4.000.000 PU/g) \* e incubar durante 4-6 minutos à temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

b) Adicionar 3 - 5 ml de HBSS frio (sem  $\text{Ca}^{++}$  e sem  $\text{Mg}^{++}$ ) para parar a reacção enzimática.

c) Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.

d) Adicionar 2 ml de Colagenase tipo II (Sigma, 1 mg/ml) estéril e incubar a 37 °C durante 10 minutos

e) Adicionar 3 - 5 ml de HBSS frio para parar a reacção enzimática.

f) Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante

g) Adicionar 2 ml de meio **Amniomed® Plus** e re-suspender o sedimento.

h) Preparar 2 a 6 caixas de Petri (Amniodish) dependendo do volume de sedimento celular. Adicionar 2 ml de meio **Amniomed® Plus** a cada caixa de Petri e distribuir a suspensão de células.

i) Incubar a 37 °C num incubador com 5%  $\text{CO}_2$ .

l) Após 4 dias de cultura, verificar o progresso do crescimento, utilizando um microscópio invertido.

m) Quando as áreas de crescimento exibirem células em mitose, adicionar uma gota de Colcemida a cada caixa de petri (a uma concentração final de 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) e manter no incubador por um período adicional de 4 - 6 horas.

## **Preparação dos cromossomas**

Seguir o mesmo procedimento descrito em "Preparação dos Cromossomas " para a cultura de células do fluido amniótico.

\* Dissolver 25 mg de Pronase E em 25 ml de HBSS sem  $\text{Ca}^{++}$  e sem  $\text{Mg}^{++}$ . Filtrar com uma membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ . Aliquotar e congelar ( $\leq -18^\circ\text{C}$  ).

## **ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΜΝΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ‘in situ’**

Το πρωτόκολλο αυτό παρέχει οδηγίες για την καλλιέργεια ανθρώπινων αμνιακών κυττάρων χρησιμοποιώντας το ‘Amniomed Plus’. Αυτό το καλλιεργητικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντικαθιστώντας όλα ή μέρος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνταν ως τώρα στο εργ/ριο για την καλλιέργεια αμνιοκυττάρων.

### **Καλλιέργεια Κυττάρων ‘in situ’**

- Μεταφέρουμε περίπου 20 ml δείγματος αμνιακού υγρού σε 2 αποστειρωμένους σωλήνες και φυγοκεντρώμε σε 1200 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, για να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της α-εμβρύνινης πρωτεΐνης ( a- fetoprotein ), αφήνοντας περίπου 1 ml σε κάθε σωλήνα

Σημείωση : Ξεπαγώνουμε το Amniomed plus σε υδατόλουτρο στους 37° C και αναμιγνύουμε καλά πριν από την χρήση. Η προσθήκη αντιβιοτικών, L- γλουταμίνης και ορού δεν είναι απαραίτητη αφού τα συστατικά αυτά υπάρχουν ήδη μέσα στο προϊόν

- Ετοιμάζουμε 4-6 αποστειρωμένα τριβλία Petri ( διαμέτρου 35 mm ) που να περιέχουν στρογγυλή γυάλινη αντικειμενοφόρο ( AMNIODISH κωδικός EK AMN-240 )
- Κατανέμουμε το κυτταρικό εναιώρημα στα τριβλία Petri
- Τοποθετούμε τα τριβλία στους 37° C σε κλίβανο CO<sub>2</sub> με 5% διοξείδιο του άνθρακα
- Την 5<sup>η</sup> μέρα παρατηρούμε προσεκτικά τον τρόπο ανάπτυξης των κυττάρων και αντικαθιστούμε το καλλιεργητικό μέσο προσθέτοντας από 2 ml φρέσκου ‘Amniomed plus ‘
- Μια με δύο μέρες, αργότερα, παρατηρούμε τις καλλιέργειες και αν η ανάπτυξη των κυτταρικών αποικιών είναι η κατάλληλη προσθέτουμε διάλυμα κολχικίνης σε τελική συγκέντρωση 0,05 µg/ml . Αφήνουμε στον επωαστικό κλίβανο 2-4 ώρες επιπλέον πριν αρχίσει το χρωμοσωμικό παρασκεύασμα.

### **Καλλιέργεια σε φλάσκες**

( ακολουθείστε την ίδια διαδικασία όπως στο παραπάνω πρωτόκολλο της καλλιέργειας “ in situ “ με τις παρακάτω τροποποιήσεις )

1. Διανείμετε το κυτταρικό αιώρημα σε 2-4 φλάσκες
2. Προσθέστε σε κάθε φλάσκα 4-5 ml ‘Amniomed plus’
3. Βάλτε το καπάκι χωρίς να κλείσετε σφικτά και τοποθετείστε τις καλλιέργειες σε κλίβανο διοξειδίου στους 37° C με 5 % διοξείδιο του άνθρακα

### **Χρωμοσωμικό παρασκεύασμα**

1. Αφαιρέστε τελείως το καλλιεργητικό μέσο από τα τριβλία. Αν χρειαστεί κάνετε αναρρόφηση από τις άκρες της φλάσκας ή του τριβλίου.
2. Προσθέστε 3 ml υποτονικού διαλύματος σε κάθε τριβλίο Petri και αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
3. Προσθέστε 0,5 ml μίγματος μονιμοποίησης ( 3 : 1 μεθανόλη – οξικό οξύ ) κατευθείαν στο υποτονικό διάλυμα και αφήστε για 5 λεπτά
4. Απομακρύνετε με αναρρόφηση το υπερκείμενο και προσθέστε αμέσως 3 ml φρέσκου μονιμοποιητικού μίγματος

5. Επαναλάβετε δυο φορές ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα νερού στα τριβλία Petri. ( Η διάρκεια αυτών των πλυσιμάτων δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα )
6. Απομακρύνετε την αντικειμενοφόρο από το τριβλίο και αμέσως τοποθετήστε την για στέγνωμα στο OPTICHROME ( κωδικός EK AMH – 950 ) στις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας.

### **Πρωτόκολλο καλλιέργειας χοριακής λάχνης**

1. Μεταφέρετε το δείγμα από τον σωλήνα μεταφοράς του σε τριβλίο Petri [διαμέτρου 60 mm] που περιέχει 5 ml RPMI 1640
2. Ξεπλύνετε τις λάχνες με φρέσκο καλλιεργητικό μέσο για να απομακρυνθούν τα ερυθροκύτταρα
3. Παρατηρώντας σε ανάστροφο μικροσκόπιο, κόψτε προσεκτικά και απομακρύνετε όλα τα υπολείμματα
4. Ξεπλύνετε προσεκτικά με HBSS χωρίς  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$

### **Καλλιέργειες μακράς διάρκειας**

1. Μεταφέρουμε τις λάχνες σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης που περιέχει 2 ml Pronase E ( Merk 4.000.000 PU/g)\* και επωάζουμε για 4-6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ανακινώντας ελαφρά.
2. Προσθέτουμε 3-5 ml κρούου HBSS ( χωρίς  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  ) για να σταματήσουμε την ενζυματική δράση
3. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 1500 rpm και πετάμε το υπερκείμενο
4. Προσθέτουμε 2 ml αποστειρωμένης Κολλαγενάσης τύπου II ( SIGMA, 1 mg/ml) και επωάζουμε στους 37° C για 10 λεπτά
5. Προσθέτουμε 3-5 ml κρούου HBSS για να σταματήσουμε την ενζυματική δράση
6. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 1500 rpm και πετάμε το υπερκείμενο
7. Προσθέτουμε 2 ml 'Amniomed plus' και επαναδιαλύουμε το ίζημα
8. Ετοιμάζουμε 2 με 6 τριβλία Petri ( Amniodish ) ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος. Προσθέτουμε 2 ml 'Amniomed plus' σε κάθε τριβλίο και διανέμουμε το κυτταρικό αιώρημα.
9. Επωάζουμε στους 37° C σε κλίβανο διοξειδίου με 5% CO<sub>2</sub>
10. Μετά από 4 ημέρες, ελέγχουμε την πρόοδο της καλλιέργειας με την χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου
11. Όταν οι περιοχές αύξησης δείχνουν κάποιο αριθμό κυττάρων σε μίτωση προσθέτουμε μια σταγόνα κολχικίνης σε κάθε τριβλίο (σε τελική συγκέντρωση 0,05 mg/ml ) και αφήνουμε τις καλλιέργειες στον κλίβανο διοξειδίου για 4-6 ώρες επιπλέον.

### **Χρωμοσωμικό παρασκεύασμα**

Ακολουθούμε την ίδια ακριβώς διαδικασία όπως περιγράφηκε ήδη στην καλλιέργεια αμνιακών κυττάρων

\* Διαλύουμε 25 mg Pronase E σε 25 ml HBSS χωρίς  $Ca^{++}$  και  $Mg^{++}$  . Φιλτράρουμε σε φίλτρο με μεμβράνη πόρου 0,2 μm . Χωρίζουμε το διάλυμα σε διάφορα σωλανάκια και τα τοποθετούμε σε βαθιά κατάψυξη



Euroclone S.p.A. - Life Sciences Division  
Via Lombardia, 12 - 27010 Siziano (PV) Italy  
Customer Service: [info@euroclone.net](mailto:info@euroclone.net)  
Technical Service e-mail: [cytogenetics@euroclone.net](mailto:cytogenetics@euroclone.net)  
Tel. +39.02.38195378  
Fax : +39.02.38195248

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

INNOVATIVE TOOLS FOR

*cytogenetics*

*Amnio*® **Plus**  
*med*

EK AMG-200  
EK AMG- 600

INSTRUCTION  
FOR USE

CE

IVD

**Euro**  **clone**®