

Cell Culture Slide

1 well and 2 well

REF 101307, 101308

INTENDED USE

In situ culture of amniocytes and chorionic villi derived cells for prenatal cytogenetic diagnosis.

INTRODUCTION

- SPL Cell Culture Slide is a polystyrene chamber with cover, assembled to a borosilicate microscope glass slide by a slide holder.
- At the end of insitu culture, the chamber is removed from the slide for further necessary experiment.
- To determine chromosomal or genetic disorders in the fetus, some prenatal cytogenetic techniques such as chorionic villus sampling or aminocentesis have been performed.

MATERIAL SUPPLIED

- Each box contains 2 sterile packages ready for use, for a total of 12 cell culture slide.
- Slide dimension: 76 x 26 mm
- Culture area : 11.2cm² for 1 well, 10.4cm² for 2 well
- Validity: 3 years

MATERIAL SUPPLIED BUT NOT PROVIDED

- Cell culture media for amniocytes and chorionic villi derived cells
- Adjustable, automatic micropipettes with disposable tips

PROTOCOL CELL CULTURE SLIDE

English

Code 101307 - CULTURE SLIDE 1 WELL

Amniocytes- Culture preparation

1. Centrifuge the amniotic fluid sample at 2000 rpm for 10 min, discard the supernatant, leaving 2 ml of liquid and resuspend the pellet. Place 0.5 ml of cell suspension in the middle of the well, and add 2-2.5 ml of fresh culture medium.
2. Incubate at 37°C , 5% CO²
3. At day 6° completely change the culture medium with 2.5-3 ml of fresh culture medium, and incubate.
4. On day 7° check the growth through an inverted microscope. When the growth areas show a sufficient number of cells in mitosis add Colcemid to a final concentration of 0.05 ug/ml .
5. Incubate at 37°C , 5% CO² for about 3 hours.

Chromosome fixation and slide preparation

1. Remove completely the medium and remove the slide from the chamber.
2. Dip the slides in a Coplin jar containing: 40 ml of hypotonic solution 1% Sodium Citrate and 40 ml of hypotonic solution 0.3% NaCl; incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Dip the slides in a Coplin jar containing 80 ml of Ibraimov solution (distilled H₂O, 5% acetic acid), incubate at room temperature for 10 minutes.
4. Dip the slides in a Coplin jar containing 80 ml of fixative solution (methanol:acetic acid, 3:1) at room temperature.
The time of this incubation does not influence the final result.
5. Repeat step 4 twice. For the last wash the fixative must be prepared shortly before use.
6. Proceed and adequate drying in constant conditions of temperature and relative humidity (25°C , 35% RH).

CHORIONIC VILLI (CVS) – Culture preparation

1. Transfer the specimen into a 60 mm Petri dish containing 5 ml of Hank's (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺.
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 and centrifuge for 2 minutes at 2000 rpm; discard the supernatant and add 1 ml of Pronase E(4*106PU/g); incubate at room temperature for 10 minutes on a shaker.
5. Add 5 ml of cold Hank's (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺(kept at +4°C).
6. Centrifuge for 5 minutes at 2000 rpm and discard the supernatant.
7. Add 2 ml of Collagenase type II (1 mg/ml) and incubate at 37°C for 10 minutes.
8. Add 3-5 ml of cold (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺(kept at +4°C).
9. Centrifuge for 5 minutes at 2000 rpm and discard the supernatant.
10. Repeat points 8 and 9.
11. Add 1 ml of complete medium for villi and resuspend the pellet.

In situ culture

1. Prepare the Cell Culture Slide, seed 5 drop of the cell suspension on each Slide and check the concentration of the cells. Add 2,5-3 ml of complete medium for villi to each Slide.
2. Incubate at 37°C in 5% CO²
3. On Day 6 replace the culture medium with 2,5-3 ml of complete medium for villi.
4. On Day 7 check for progress of growth using an inverted microscope.
At the optimal cell growth, add Colcemid (10 µg/ml) at the final concentration of 0,05ug/ml.
5. Incubate at 37 °C, 5% CO² for 4 - 6 hours.

Follow the protocol of "Chromosome fixation and slide preparation" for Amniocytes.

Code101308- CULTURE SLIDE 2 WELLS

Amniocytes- Culture preparation

1. Centrifuge the amniotic fluid sample at 2000 rpm for 10 min, discard the supernatant, leaving 2 ml of liquid and resuspend the pellet. Place 0.5 ml of cell suspension in the middle of the well, and add 1,5 ml of fresh culture medium.
2. Incubate at 37 ° C , 5 % CO²
3. At day 6° completely change the culture medium with 1,5 ml of fresh culture medium, and incubate.
4. On day 7° check the growth through an inverted microscope. When the growth areas show a sufficient number of cells in mitosis add Colcemid to a final concentration of 0.05 ug/ml .
5. Incubate at 37 ° C , 5 % CO² for about 3 hours.

Chromosome fixation and slide preparation

1. Remove completely the medium and remove the slide from the chamber.
2. Dip the slides in a Coplin jar containing: 40 ml of hypotonic solution 1% Sodium Citrate and 40 ml of hypotonic solution 0.3% NaCl; incubate at room temperature for 10 minutes.
3. Dip the slides in a Coplin jar containing 80 ml of Ibraimov solution (distilled H₂O, 5% acetic acid), incubate at room temperature for 10 minutes.
4. Dip the slides in a Coplin jar containing 80 ml of fixative solution (methanol:acetic acid, 3:1) at room temperature.
The time of this incubation does not influence the final result.
5. Repeat step 4 twice. For the last wash the fixative must be prepared shortly before use.
6. Proceed and adequate drying in constant conditions of temperature and relative humidity (25°C , 35% RH).

CHORIONIC VILLI (CVS) – Culture preparation

1. Transfer the specimen into a 60 mm Petri dish containing 5 ml of Hank's (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺.
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 and centrifuge for 2 minutes at 2000 rpm; discard the supernatant and add 1ml of Pronase E (4*106PU/g); incubate at room temperature for 10 minutes on a shaker.
5. Add 5 ml of cold Hank's (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺ (kept at +4°C).
6. Centrifuge for 5 minutes at 2000 rpm and discard the supernatant.
7. Add 2 ml of Collagenase type II (1 mg/ml) and incubate at 37°C for 10 minutes.
8. Add 3-5 ml of cold (HBSS) without Ca²⁺-Mg²⁺ (kept at +4°C).
9. Centrifuge for 5 minutes at 2000 rpm and discard the supernatant.
10. Repeat points 8 and 9.
11. Add 1 ml of complete medium for villi and resuspend the pellet.

In situ culture

1. Prepare the Cell Culture Slide, seed 3 drops of the cell suspension on each Slide and check the concentration of the cells. Add 1,5 ml of complete medium for villi to each Slide.
2. Incubate at 37°C in 5% CO²
3. On Day 6 replace the culture medium with 1,5 ml of complete medium for villi.
4. On Day 7 check for progress of growth using an inverted microscope. At the optimal cell growth, add Colcemid (10 µg/ml) at the final concentration of 0,05ug/ml.
5. Incubate at 37 °C, 5% CO² for 4 - 6 hours.

Follow the protocol of "Chromosome fixation and slide preparation" for Amniocytes.

Codice 101307- CULTURE SLIDE 1 WELL Amniociti- Allestimento colture

1. Centrifugare il campione di liquido amniotico a 2000 rpm per 10 min; eliminare il surnatante lasciando 2 ml di liquido e risospendere il pellet; prelevare 0,5 ml di sospensione cellulare, metterla al centro del pozzetto e aggiungere 2-2,5 ml di terreno di coltura per amniociti.
2. Incubare a 37°C, 5% CO².
3. Al giorno 6° cambiare completamente il terreno di coltura con 2,5-3 ml di terreno di coltura fresco e porre in incubatore.
4. Al giorno 7° valutare la crescita mediante microscopio rovesciato. Quando l'area di crescita mostra un sufficiente numero di cellule in mitosi aggiungere Colcemid alla concentrazione finale di 0,05ug/ml.
5. Incubare a 37°C, 5% CO² per circa 3 ore.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino

1. Rimuovere completamente il terreno e togliere la chamber dalla slide.
2. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 40 ml di soluzione ipotonica Sodio Citrato 1% e 40 ml di soluzione ipotonica NaCl 0,3%; incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
3. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 80 ml di soluzione di Ibramov (H₂O distillata, 5% acido acetico), incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
4. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 80 ml di soluzione fissativa(metanolo:acido acetico, 3:1) a temperatura ambiente. Il tempo di questa incubazione, non influenza il risultato finale.
5. Ripetere due volte il punto 4. Per l'ultimo lavaggio il fissativo deve essere preparato poco tempo prima dell'uso.
6. Procedere all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa (25°C, 35%RH).

Allestimento colture- VILLI CORIALI (CVS)

1. Porre la biopsia in una Petri da 60 mm, contenente 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺
2. Lavare i villi per rimuovere i residui di sangue.
3. Mediante microscopio rovesciato rimuovere delicatamente i coaguli e i residui di decidua.
4. Trasferire i villi in un tubo da 15 ml e centrifugare per 2 minuti a 2000 rpm, eliminare il surnatante e aggiungere 1 ml of Pronase E (4*106 PU/g);

- incubare a temperatura ambiente per 10 minuti sull'agitatore rotante.
5. Aggiungere 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺ fredda (circa +4°C).
6. Centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm e rimuovere il surnatante.
7. Aggiungere 2 ml di Collagenasi tipo II (1 mg/ml) e incubare a 37°C per 30 minuti.
8. Aggiungere 3 - 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺ fredda (circa +4°C).
9. Centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm e rimuovere il surnatante.
10. Ripetere il punto 8 e 9.
11. Aggiungere 1 ml di terreno di coltura per villi e risospendere il pellet.

Coltura in situ

1. Preparare le Cell Culture Slide, seminare in ciascuna Slide 5 gocce della sospensione e controllare al microscopio la concentrazione cellulare.
Aggiungere 2.5-3 ml di terreno di coltura per villi in ciascuna Slide.
2. Incubare a 37°C, 5% CO²
3. Al giorno 6, se le colture non fossero pronte, cambiare completamente il terreno di coltura con 2,5-3 ml di terreno fresco e incubare a 37 °C, 5% CO²
4. Al giorno 7 valutare la crescita mediante microscopio invertito.
A crescita ottimale, aggiungere Colcemid (10 µg/ml) alla concentrazione finale di 0,05ug/ml.
5. Incubare a 37°C, 5% CO² per 4-6 ore.

Seguire il protocollo di fissazione dei liquidi amniotici.

Codice 101308- CULTURE SLIDE 2 WELLS Amniociti- Allestimento colture

1. Centrifugare il campione di liquido amniotico a 2000 rpm per 10 min; eliminare il surnatante lasciando 2 ml di liquido e risospendere il pellet; prelevare 0,5 ml di sospensione cellulare, metterla al centro di ciascun pozzetto e aggiungere 1,5 ml di terreno di coltura per amniociti.
2. Incubare a 37°C, 5% CO².
3. Al giorno 6° cambiare completamente il terreno di coltura con 1,5 ml di terreno di coltura fresco e porre in incubatore.
4. Al giorno 7° valutare la crescita mediante microscopio rovesciato. Quando l'area di crescita mostra un sufficiente numero di cellule in mitosi aggiungere Colcemid alla concentrazione finale di 0,05ug/ml.
5. Incubare a 37°C, 5% CO² per circa 3 ore.

Fissazione cromosomi e preparazione vetrino.

1. Rimuovere completamente il terreno e togliere la chamber dalla slide.
2. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 40 ml di soluzione ipotonica Sodio Citrato 1% e 40 ml di soluzione ipotonica NaCl 0,3%; incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
3. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 80 ml di soluzione di Ibramov (H₂O distillata, 5% acido acetico), incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
4. Immergere la slide in una Coplin jar contenente 80 ml di soluzione fissativa(metanolo:acido acetico, 3:1) a temperatura ambiente. Il tempo di questa incubazione, non influenza il risultato finale.
5. Ripetere due volte il punto 4. Per l'ultimo lavaggio il fissativo deve essere preparato poco tempo prima dell'uso.
6. Procedere all'asciugatura in adeguate e costanti condizioni di temperatura ed umidità relativa (25°C, 35%RH).

VILLI CORIALI (CVS)- Allestimento colture

1. Porre la biopsia in una Petri da 60 mm, contenente 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺
2. Lavare i villi per rimuovere i residui di sangue.
3. Mediante microscopio rovesciato rimuovere delicatamente i coaguli e i residui di decidua.
4. Trasferire i villi in un tubo da 15 ml e centrifugare per 2 minuti a 2000 rpm, eliminare il surnatante e aggiungere 1 ml of Pronase E (4*106 PU/g); incubare a temperatura ambiente per 10 minuti sull'agitatore rotante.
5. Aggiungere 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺ fredda (circa +4°C).
6. Centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm e rimuovere il surnatante.
7. Aggiungere 2 ml di Collagenasi tipo II (1 mg/ml) e incubare a 37°C per 30 minuti.
8. Aggiungere 3 - 5 ml di Hank's (HBSS) senza Ca²⁺-Mg²⁺ fredda (circa +4°C).
9. Centrifugare per 5 minuti a 2000 rpm e rimuovere il surnatante.
10. Ripetere il punto 8 e 9.
11. Aggiungere 1 ml di terreno di coltura per villi e risospendere il pellet.

Coltura in situ

1. Preparare le Cell Culture Slide, seminare in ciascun pozzetto della Slide 3 gocce della sospensione e controllare al microscopio la concentrazione cellulare.
Aggiungere 1.5 ml di terreno di coltura per villi in ciascuna pozzetto della Slide.
2. Incubare a 37 °C, 5% CO²
3. Al giorno 6, se le colture non fossero pronte, cambiare completamente il terreno di coltura con 1,5 ml di terreno fresco e incubare a 37 °C, 5% CO²
4. Al giorno 7 valutare la crescita mediante microscopio invertito.
A crescita ottimale, aggiungere Colcemid (10 µg/ml) alla concentrazione finale di 0,05µg/ml.
5. Incubare a 37°C, 5% CO² per 4-6 ore.

Seguire il protocollo di fissazione dei liquidi amniotici.

German

Code 101307 - CULTURE SLIDE 1 WELL

Herstellung der Zellkultur

1. Fruchtwasser bei 2000 rpm für 10 min zentrifugieren, Überstand bis auf 2 ml entfernen, Pellet in den verbleibenden 2 ml resuspendieren. 0,5 ml der Zellsuspension in der Mitte eines Wells platzieren und 2-2,5 ml frisches Kulturmedium dazugeben.
2. Bei 37°C und 5% CO² inkubieren
3. An Tag 6 das alte Medium durch 2,5-3 ml frisches Zellkulturmedium ersetzen und inkubieren.
4. An Tag 7 Wachstum der Kultur mittels inversem Mikroskop überprüfen. Wenn die Wachstumsbereiche eine ausreichende Zahl von Zellen im Mitosestadium zeigen, Colcemid in einer Konzentration von 0,05 µg/ml dazugeben.
5. Bei 37°C und 5% CO² inkubieren für 3 Stunden.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers

1. Medium komplett entfernen und Objektträger aus der Kammer nehmen.
2. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 40 ml einer hypotonischen Lösung 1% Natriumzitrat und 40 ml einer hypotonischen Lösung 0,3% NaCl enthält; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 80 ml Ibraimov-Lösung enthält (dest. H₂O, 5% Essigsäure); 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 80 ml Fixierungslösung enthält (Methanol: Essigsäure, 3:1) bei RT; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Schritt 4 zweimal wiederholen. Vor dem letzten Waschschrift muss das Fixative frisch hergestellt werden.
6. Ablauf und adäquates Trocknen bei konstanter Temperatur (25°C) und relativer Luftfeuchtigkeit (35%).

Chorionzotten (CVS) - Kultur Vorbereitung

1. Die Probe in eine 60 mm Petrischale mit 5 ml Hanks (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ überführen.
2. Darmzotten mit frischem Medium waschen, um die Blutzellen zu entfernen.
3. Unter dem inversen Mikroskop sorgfältig die verbleibenden Gerinnsel oder dezidualen Fragmente sezieren.
4. Zotten in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen und für 2 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren, den Überstand verwerfen und 1 ml Pronase E (4 *106PU/g) hinzufügen; Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten auf einem Schüttler.
5. 5ml kalten Hanks-Puffer (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ (bei +4°C gelagert) hinzufügen.
6. Für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
7. 2ml Collagenase Typ II (1 mg / ml) hinzufügen und bei 37°C für 10 Minuten inkubieren.
8. 3-5 ml kalten Hanks-Puffer (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ (bei +4°C gelagert) hinzufügen.
9. Für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
10. Punkt 8 und 9 wiederholen.
11. 1 ml Vollmedium für Zotten hinzufügen und das Pellet resuspendieren.

In-situ- Kultur

1. Cell Culture Slide vorbereiten, indem 5 Tropfen der Zellsuspension auf das Slide gegeben werden und die Konzentration der Zellen überprüfen.
Pro Slide 2,5-3 ml Komplettmedium für Zotten hinzufügen.
2. Bei 37 ° C in 5% CO² inkubieren

3. An Tag 6 Kulturmedium durch 2,5-3 ml Komplettmedium für Zotten ersetzen.
4. An Tag 7 Wachstum mit einem inversen Mikroskop überprüfen. Bei optimalem Zellwachstum Colcemid (10 µg/ml) in einer Endkonzentration von 0,05 µg/ml hinzufügen.
5. Bei 37 ° C, 5 % CO² für 4 - 6 Stunden inkubieren.

Folgen Sie dem Protokoll des " Chromosome Fixierung und Objektträgervorbereitung " für Amniozyten .

Code101308- CULTURE SLIDE 2 WELLS

Herstellung der Zellkultur

1. Fruchtwasser bei 2000 rpm für 10 min zentrifugieren, Überstand bis auf 2 ml entfernen, Pellet in den verbleibenden 2 ml resuspendieren. 0,5 ml der Zellsuspension in der Mitte eines Wells platzieren und 1,5 ml frisches Kulturmedium dazugeben.
2. Bei 37°C und 5% CO² inkubieren.
3. An Tag 6 das alte Medium durch 1,5 ml frisches Zellkulturmedium ersetzen und inkubieren.
4. An Tag 7 Wachstum der Kultur mittels inversem Mikroskop überprüfen. Wenn die Wachstumsbereiche eine ausreichende Zahl von Zellen im Mitosestadium zeigen, Colcemid in einer Konzentration von 0,05 µg/ml dazugeben.
5. Bei 37°C und 5% CO² inkubieren für 3 Stunden.

Fixierung der Chromosomen und Vorbereitung des Objektträgers

1. Medium komplett entfernen und Objektträger aus der Kammer nehmen.
2. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 40 ml einer hypotonischen Lösung 1% Natriumzitrat und 40 ml einer hypotonischen Lösung 0,3% NaCl enthält; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 80 ml Ibraimov-Lösung enthält (dest. H₂O, 5% Essigsäure); 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Objektträger in einen Färbetrog (nach Coplin) eintauchen, der 80 ml Fixierungslösung enthält (Methanol: Essigsäure, 3:1) bei RT; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Schritt 4 zweimal wiederholen. Vor dem letzten Waschschrift muss das Fixative frisch hergestellt werden.
6. Ablauf und adäquates Trocknen bei konstanter Temperatur (25°C) und relativer Luftfeuchtigkeit (35%).

Chorionzotten (CVS) - Kultur Vorbereitung

1. Die Probe in eine 60 mm Petrischale mit 5 ml Hanks (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ überführen.
2. Darmzotten mit frischem Medium waschen, um die Blutzellen zu entfernen.
3. Unter dem inversen Mikroskop sorgfältig die verbleibenden Gerinnsel oder dezidualen Fragmente sezieren.
4. Zotten in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen und für 2 inuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren, den Überstand verwerfen und 1 ml Pronase E (4 *106PU/g) hinzufügen; Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten auf einem Schüttler.
5. 5 ml kalten Hanks-Puffer (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg²⁺ (bei +4 ° C gelagert) hinzufügen.
6. Für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
7. 2 ml Collagenase Typ II (1 mg / ml) hinzufügen und bei 37°C für 10 Minuten inkubieren.
8. 3-5 ml kalten Hanks-Puffer (HBSS) ohne Ca²⁺/ Mg² (bei +4°C gelagert) hinzufügen.
9. ür 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
10. Punkt 8 und 9 wiederholen.
11. 1 ml Vollmedium für Zotten hinzufügen und das Pellet resuspendieren.

In-situ- Kultur

1. Cell Culture Slide vorbereiten, indem 3 Tropfen der Zellsuspension auf das Slide gegeben werden und die Konzentration der Zellen überprüfen.
Pro Slide 1,5 ml Komplettmedium für Zotten hinzufügen.
2. Bei 37 ° C in 5% CO² inkubieren
3. An Tag 6 Kulturmedium durch 1,5 ml Komplettmedium für Zotten ersetzen.
4. An Tag 7 Wachstum mit einem inversen Mikroskop überprüfen. Bei optimalem Zellwachstum Colcemid (10 µg / ml) in einer Endkonzentration von 0,05 µg / ml hinzufügen.
5. Bei 37 ° C, 5 % CO² für 4 - 6 Stunden inkubieren.

French

Code 101307 - CULTURE SLIDE 1 CHAMBRE

Protocole pour culture in situ d'amniocytes

1. Centrifuger le prélèvement de liquide amniotique à 2000 RPM pendant 10 minutes, enlever le surnageant en laissant 2 ml de liquide et resuspendre le culot. Déposer 0,5 ml de suspension cellulaire au centre de la chambre de culture, ajouter 2-2,5 ml de milieu de culture frais.
2. Incuber à 37°C, 5% CO².
3. Le 6ième jour, changer le milieu de culture avec 2,5-3 ml de milieu frais et replacer dans l'incubateur.
4. Le 7ième jour, évaluer la croissance cellulaire sous un microscope inversé. Lorsque la densité de la culture est optimale et la lame riche en mitoses, ajouter la Colcémide à la concentration finale de 0,05 µg/ml.
5. Incuber à 37°C, 5% CO² pendant approximativement 3 heures.

Fixation des chromosomes et préparation des lames

1. Enlever complètement le milieu de culture et sortir la lame de son compartiment.
2. Immerger les lames dans une jar Coplin contenant : 40 ml de solution hypotonique à 1% citrate de sodium et 40 ml de solution hypotonique à 0,3% NaCl; incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
3. Immerger les lames dans une jar Coplin contenant 80 ml de solution d'Ibraimov (eau distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
4. Plonger les lames dans une jar Coplin contenant 80 ml de solution de fixation (méthanol:acide acétique, 3:1) à température ambiante. Le temps d'incubation n'influence pas le résultat final.
5. Répéter deux fois l'étape 4. Pour le dernier lavage, le fixateur doit être préparé extemporanément.
6. Procéder à l'étape de séchage des lames dans les conditions de température et d'hygrométrie adéquates (ex : 25°C, 35% d'humidité relative).

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

1. Mettre la biopsie dans une Petri de 60 mm, contenant 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution sans Ca²⁺/ Mg²⁺.
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*106PU/g) et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
5. Ajouter 3-5 ml de Hank's Balanced Salts Solution sans Ca²⁺/ Mg²⁺ froide (environ +4°C).
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 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 sans Ca²⁺/ Mg²⁺ froide (environ +4°C).
9. Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 rpm et enlever le surnageant.
10. Répétez les étapes 8 et 9.
11. Ajouter 1 ml de terrain de culture et resuspendre le pellet.

Culture in situ

1. Préparer le Cell Culture Slide, selon la quantité de cellules. Ajouter 5 gouttes de suspension de cellules à chaque Slide et ajouter 2,5-3 ml de terrain de culture à chaque slide.
2. Incuber à 37°C, 5% CO².
3. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 2,5-3 ml de terrain de culture frais.
4. Le 7ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand la croissance est optimale, ajouter Colcemid (10 µg/ml) à la concentration finale de 0,05µg/ml.
5. Incuber à 37°C, 5% CO² pendant 4 - 6 heures.

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

Voir le protocole pour le traitement d'amniocytes

Code101308 - CULTURE SLIDE 2 CHAMBRES

Mise en culture - Aminocute

1. Centrifuger le prélèvement de liquide amniotique à 2000 RPM pendant 10minutes, enlever le surnageant en laissant 2 ml de liquide et resuspendre le culot. Déposer 0,5 ml de suspension cellulaire au centre de la chambre de culture, ajouter 1,5 ml de milieu de culture frais.
2. Incuber à 37° C, 5% CO².
3. Le 6ième jour, changer le milieu de culture avec 1,5 ml de milieu frais et replacer dans l'incubateur.
4. Le 7ième jour, évaluer la croissance cellulaire sous un microscope inversé. Lorsque la densité de la culture est optimale et la lame riche en mitoses, ajouter la Colcémide à la concentration finale de 0,05 µg/ml.
5. Incuber à 37°C, 5% CO² pendant approximativement 3 heures.

Fixation des chromosomes et préparation des lames

1. Enlever complètement le milieu de culture et sortir la lame de son compartiment.
2. Immerger les lames dans une jar Coplin contenant : 40 ml de solution hypotonique à 1% citrate de sodium et 40 ml de solution hypotonique à 0,3% NaCl; incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
3. Immerger les lames dans une jar Coplin contenant 80 ml de solution d'Ibraimov (eau distillée, 5% acide acétique), incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
4. Plonger les lames dans une jar Coplin contenant 80 ml de solution de fixation (méthanol:acide acétique, 3:1) à température ambiante. Le temps d'incubation n'influence pas le résultat final.
5. Répéter deux fois l'étape 4. Pour le dernier lavage, le fixateur doit être préparé extemporanément.
6. Procéder à l'étape de séchage des lames dans les conditions de température et d'hygrométrie adéquates (ex : 25°C, 35% d'humidité relative).

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

1. Mettre la biopsie dans une Petri de 60 mm, contenant 5 ml de Hank's Balanced Salts Solution sans Ca²⁺/ Mg²⁺.
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*106PU/g) et incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Sur un shaker.
5. Ajouter 3-5 ml de Hank's Balanced Salts Solution sans Ca²⁺/ Mg²⁺ froide (environ +4°C).
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 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 sans Ca²⁺/ Mg²⁺ froide (environ +4°C).
9. Centrifuger pendant 5 minutes à 2000 rpm et enlever le surnageant.
10. Répétez les étapes 8 et 9.
11. Ajouter 1 ml de terrain de culture et resuspendre le pellet.

Culture in situ

1. Préparer le Cell Culture Slide, selon la quantité de cellules. Ajouter 3 gouttes de suspension de cellules à chaque Slide et ajouter 1,5 ml de terrain de culture à chaque Amnioslide.
2. Incuber à 37°C, 5% CO².
3. Le 6ème jour, changer complètement le terrain de culture avec 1,5 ml de terrain de culture frais.
4. Le 7ème jour, évaluer la croissance à l'aide du microscope inversé. Quand la croissance est optimale, ajouter Colcemid (10 µg/ml) à la concentration finale de 0,05µg/ml.
5. Incuber à 37°C, 5% CO² pendant 4 - 6 heures.

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

Voir le protocole pour le traitement d'amniocytes.

espanol

01307- CULTURE SLIDE 1 WELL

Protocolo para cultivo de de amniocitos

1. Centrifugar la muestra de líquido amniótico a 2000 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante, dejando 2 ml de líquido y resuspender el precipitado; retirar 0,5 ml de suspensión celular, se puso en el centro del pozo y añadir 2-2,5 ml de medio cultura de amniocitos.
2. Incubar a 37 ° C, 5 % de CO².
3. Al día 6 ° cambiar completamente el medio de cultivo con 2,5 a 3 ml de medio de cultivo fresco y se pusieron en una incubadora.

- El día 7 ° evaluar el crecimiento a través de un microscopio invertido. Cuando el área de crecimiento muestran un número suficiente de células en la mitosis añadir Colcemid a una concentración final de 0,05 ug / ml.
- Incubar a 37°C , 5 % de CO² durante aproximadamente 3 horas.

Cromosomas de fijación y preparación de los portaobjetos

- Eliminar completamente el suelo y retire la tapa de la cámara.
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 40 ml de solución hipotónica de sodio Citrato 1% y 40 ml de solución hipotónica de NaCl 0,3%; incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 80 ml de solución Ibraimov (H₂O destilada , ácido acético al 5%), se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 80 ml de solución de fijación (metanol:ácido acético, 3:1) a temperatura ambiente. El tiempo de esta incubación, no influye en el resultado final.
- Repita el paso 4 dos veces. Para el último lavado el fijador tienen que prepararse poco antes de su uso.
- Procedimientos y secado adecuado en condiciones constantes de temperatura y humedad relativa (25 °C, 35% HR).

Protocolo para cultivo de muestra de vellosidades coriónicas (CVS)

- Poner la biopsia en una Petri de 60 mm que contenga 5 ml de Hank (HBSS) sin Ca²⁺ Mg²⁺
- Lavar los villi con médium fresco para retirar los residuos de sangre.
- Usando microscopio invertido retirar delicadamente los coágulos y los residuos de decidua.
- Transferir las villa a un tubo de 15 ml con 1ml de Pronase E (4*106PU/g) e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en un agitador rotatorio.
- Añadir 5 ml de HBSS sin Ca²⁺ Mg²⁺ fría (aproximadamente +4°C).
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm y retirar el surnatante.
- Añadir 2 ml de Collagenase type II (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 3 - 5 ml de HBSS sin Ca²⁺ Mg²⁺ fría (aproximadamente +4°C).
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm y retirar el surnatante.
- Repita los pasos 8 y 9 .
- Añadir 1 ml de medio de cultivo para las vellosidades y resuspender el pellet.

Cultivo in situ

- Preparar de Cell Culture Slide, en función de la cantidad de células. Añadir 5 gotas cada Slide y añadir 2,5-3 ml de medio de cultivo de las vellosidades en cada Slide.
- incubar a 37°C, 5% CO².
- al 6º día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 2,5-3 ml de medio de cultivo fresco.
- al 7º día valorar el crecimiento con microscopio invertido. Cuando el área de crecimiento muestra un número óptimo, añadir Colcemid (10 µg/ml) a una concentración final de 0,05 ug / ml .
- Incubar a 37°C, 5% CO² durante 4 - 6 horas.

Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual o automatizado

Ver el protocolo para tratamiento de amniocitos.

101308- CULTURE SLIDE 2 WELL

Protocolo para cultivo de de amniocitos

- Centrifugar la muestra de líquido amniótico a 2000 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante, dejando 2 ml de líquido y resuspender el precipitado; retirar 0,5 ml de suspensión celular, se puso en el centro del pozo y añadir 1,5 ml de medio cultura de amniocitos.
- Incubar a 37°C, 5 % de CO².
- Al día 6 ° cambiar completamente el medio de cultivo con 1,5 ml de medio de cultivo fresco y se pusieron en una incubadora.
- El día 7 ° evaluar el crecimiento a través de un microscopio invertido. Cuando el área de crecimiento muestran un número suficiente de células en la mitosis añadir Colcemid a una concentración final de 0,05 ug / ml.
- Incubar a 37°C , 5 % de CO² durante aproximadamente 3 horas.

Cromosomas de fijación y preparación de los portaobjetos

- Eliminar completamente el suelo y retire la tapa de la cámara.
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 40 ml de

- solución hipotónica de sodio Citrato 1% y 40 ml de solución hipotónica de NaCl 0,3%; incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 80 ml de solución Ibraimov (H₂O destilada , ácido acético al 5 %), se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Sumergir los portaobjetos en un tarro Coplin que contiene 80 ml de solución de fijación (metanol:ácido acético, 3:1) a temperatura ambiente. El tiempo de esta incubación, no influye en el resultado final.
- Repita el paso 4 dos veces. Para el último lavado el fijador tienen que prepararse poco antes de su uso.
- Procedimientos y secado adecuado en condiciones constantes de temperatura y humedad relativa (25 °C, 35% HR).

Protocolo para cultivo de muestra de vellosidades coriónicas (CVS)

- Poner la biopsia en una Petri de 60 mm que contenga 5 ml de Hank (HBSS) sin Ca²⁺ Mg²⁺
- Lavar los villi con médium fresco para retirar los residuos de sangre.
- Usando microscopio invertido retirar delicadamente los coágulos y los residuos de decidua.
- Transferir las villa a un tubo de 15 ml con 1 ml de Pronase E (4*106PU/g) e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en un agitador rotatorio.
- Añadir 5 ml de HBSS sin Ca²⁺ Mg²⁺ fría (aproximadamente +4°C).
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm y retirar el surnatante.
- Añadir 2 ml de Collagenase type II (1 mg/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 3 - 5 ml de HBSS sin Ca²⁺ Mg²⁺ fría (aproximadamente +4°C).
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm y retirar el surnatante.
- Repita los pasos 8 y 9 .
- Añadir 1 ml de medio de cultivo para las vellosidades y resuspender el pellet.









Cultivo in situ

- Preparar de Cell Culture Slide, en función de la cantidad de células. Añadir 3 gotas cada Slide y añadir 1,5 ml de medio de cultivo de las vellosidades en cada Slide.
- incubar a 37°C, 5% CO².
- al 6º día cambiar totalmente el terreno de cultivo con 1,5 ml de medio de cultivo fresco.
- al 7º día valorar el crecimiento con microscopio invertido. Cuando el área de crecimiento muestra un número óptimo, añadir Colcemid (10 µg/ml) a una concentración final de 0,05 ug / ml .
- Incubar a 37°C, 5% CO² durante 4 - 6 horas.

Fijación cromosomas y preparación cristal, método manual o automatizado

Ver el protocolo para tratamiento de amniocitos.

TABLE OF SYMBOLS

Symbol	Meaning
	European conformity
	Catalog number
	In vitro diagnostic medical device
	Batch code
	Do not reuse
	Manufacturer
	Use by YYYY-MM-DD- or YYY-DD
	Authorised* Representative in the European Community

	 SPL Life Sciences Co., Ltd 26, Geumgang-ro 2047 beon-gil, Naecheon-Myeon, Pocheon-si, Gyeonggi-do 487 835, Korea
	 EUROCLONE S.p.A. Via Figino, 20/22 - 20016 Pero (MI) Italy