



Příbalový leták

Amniopan

Kompletní médium pro kultivaci a cytogenetickou analýzu lidských buněk plodové vody a vzorků biopsie choriových klků

Výrobek	Popis	Katalogové číslo	Množství
Amniopan	Kompletní médium pro kultivaci a cytogenetickou analýzu lidských buněk plodové vody a vzorků choriových klků	P04-70100 P04-70500	100ml 500ml

Popis výrobku

Médium Amniopan bylo speciálně vyvinuto pro prenatální in vitro diagnostické použití, pro kultivaci buněk získaných z plodové vody resp. choriových klků (CVS). Složení média bylo optimalizováno na lidských buňkách z plodové vody a CVS, se zvláštním důrazem na rychlé napojení buněk k buněčné kultuře substrátu a efektivní buněčný růst.

Obecné informace

Médium Amniopan je specificky určené pro prenatální analýzu a optimalizováno pro založení primárních kultur lidské plodové vody (AFC) a vzorků choriových klků (CVS), které budou následně použity pro karyotypizaci, fluorescenční in situ hybridizaci nebo jiné cytogenetické metody. Před uvedením do oběhu prochází každá šarže média kontrolou kvality.

Skladovací podmínky

Skladování: -20°C ve tmě

Stabilita: 2 roky

Velikost balení: 100ml, 500ml, jiná velikost na vyžádání

Složení

Amniopan se dodává zmrazený jako kompletní médium, připravené k použití ve formátu 100 ml nebo 500 ml. Je vyrobeno na bázi alfa-MEM a obsahuje antibiotika, L-glutamin, fetální bovinní sérum (FBS), hormony a růstové faktory. Tento výrobek je vyráběn pod přísně kontrolovaným systémem kvality v souladu s požadavky ISO 9001/EN a ISO 13485 (lékařské produkty a in vitro diagnostika).

Vhodnost

Amniopan je vysoce účinné kompletní médium (připravené k použití) pro kultivaci lidských fetálních buněk ze vzorků plodové vody a choriových klků.

POUZE PRO VÝZKUM A IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ!

Není schváleno pro terapeutické postupy u lidí nebo zvířat.

Návod k použití

Amniopan se dodává připravený k použití. Není nutná žádná další suplementace, protože antibiotika, L-glutamin a fetální bovinní sérum (FBS), hormony a růstové faktory jsou již v médiu obsaženy. Amniopan je pufrován pomocí NaHCO₃ a jako indikátor pH obsahuje fenolovou červeň. Složení média, které je připravené k použití, snižuje riziko technických chyb a kontaminace kultur.

Amniopan je kompletní médium dodávané ve sterilním zmrazeném stavu. Dodatečná filtrace není doporučena. Rozmražený Amniopan lze používat až 2 týdny, pokud je uchováván při teplotě 2-8°C. Je potřeba se vyvarovat opakovanému zahřívání, ochlazování a vystavení světlu.

Rozmrazování

Amniopan je připraven k použití a lze jej použít ihned po rozmrazení ve vodní lázni při 37°C, jemně krouživým pohybem baňky během procesu rozmrazování se dosáhne homogenní směsi a zabrání se tvorbě sraženin. Alternativně lze Amniopan rozmrazit v inkubátoru s CO₂ – fumigací; mírné otevření - doporučuje se odšroubovat uzávěr (1/4 otáčky), aby došlo k vyrovnání pH.

Kontrola pH

Amniopan je při dodání upraven na správnou hodnotu pH 6,9 až 7,1. Z důvodu přepravy na suchém ledu popř. skladování po delší dobu, může dojít k odchylce původně nastavené hodnoty pH. Níže uvedené pokyny pomohou znovu upravit pH Amniopanu.

Amniopan obsahuje fenolovou červeň jako indikátor pH: Tmavě červená označuje vysokou hodnotu pH (základní). Fenolově červená barva je tmavě červená při pH 7,4. Médium je příliš zásadité a pH lze upravit ekvilibrací. Šroubovací uzávěr by měl být mírně otevřen (1/4 otáčky) a láhev by měla být umístěna v atmosféře 5% CO₂ (např. kultivačním inkubátoru) po dobu 1 hodiny. Žlutá barva označuje hodnotu pH, která je příliš nízká. Fenolová červeň se změní na žlutou při pH 6,7. Žluté médium je příliš kyselé a lze jej upravit, jak je popsáno výše, pro příliš zásaditý Amniopan.

Alternativně může být kultivační láhev fumigována. V tomto případě 5% CO₂ – fumigace za sterilních podmínek – tyto podmínky jsou nutné. Barvu lze opticky porovnat s čerstvou, nově rozmraženou lahví a určit správnou barvu.

Metody pro kultivaci

V následující kapitole naleznete některá doporučení pro kultivaci AFC a CVS při použití média Amniopan. Tyto metody mohou být nahrazeny jinými, upraveny nebo částečně zaměněny, v závislosti na dostupnosti optimalizovaných nebo jiných postupů. Většina cytogenetických laboratoří má své vlastní postupy a používá médium pro kultivaci buněk v rámci těchto metod a podmínek.

Většina běžných metod kultivace buněk je založena na tzv. otevřeném systému.

Otevřené systémy versus uzavřený systém

Definice otevřeného systému: Kultury rostou v miskách s ventilovanými kryty nebo v baňkách s uvolněnými nebo odvětrávanými uzávěry v atmosféře 5% CO₂ (inkubátor s fumigací), aby byla umožněna výměna plynů.

Definice uzavřený systém: Kultury rostou v uzavřeném systému ve standardním suchém inkubátoru bez fumigace směsí vzduch – CO₂. V tomto případě musí být provedeno vhodné pufrování kultivačního média.

Doporučení pro použití v otevřeném systému:

1. Stočte buňky plodové vody centrifugací při nízké rychlosti (např. 120-150 g).
2. Opatrně odstraňte 90-95 % supernatant a resuspendujte peletu ve zbývajícím objemu plodové vody. Zřed'te buněčnou suspenzi médiem Amniopan, abyste dosáhli objemu nanesení 0,5 ml na krycí sklíčko (celkem 4 krycí sklíčka) nebo 2 ml na baňku.
3. Inkubujte kultury při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.
4. Druhý den přidejte 2 ml Amniopanu do každé kultury.
5. Po 4 až 5 dnech zkontrolujte, zda kultury rostou. Pokud je zajištěn buněčný růst, opatrně odsajte médium a nahrad'te jej 2 ml čerstvého média Amniopan. Postup opakujte každé dva dny.
6. Jakmile lze pozorovat dostatečný počet kolonií (přibližně 5. den a déle), odeberte kultury.
7. Pro dosažení nejlepších výsledků vyměňte Amniopan den před sklizní. Tento postup spustí vlnu dělení a produkuje velké množství mitóz.

Doporučení pro použití v uzavřeném systému:

Médium Amniopan lze používat v uzavřených systémech, pokud je hodnota pH udržována na fyziologické úrovni (pH = 6,9 až 7,4). Utěsněné systémy jsou závislé na adekvátní vyrovnávací kapacitě média. Uzavřený systém funguje nejlépe při klonovacích postupech s nízkým počtem buněk, protože vyšší hustota buněk produkuje více metabolitů kyselin, které mohou snížit hodnotu pH v médiu do nefyziologického rozmezí.

Doporučení pro udržování kultur při fyziologickém pH v uzavřeném systému:

Metoda 1: Přidejte 2 % (v/v) sterilního 1,0 M zásobního roztoku HEPES do Amniopanu. Ph roztoku HEPES musí být upraveno na 7,0 při 20 °C se sterilním 1,0 M NaOH. Buňky se přidávají k HEPES-doplněnému médium a inkubují se v uzavřené kultivační lahvi při 37 °C.

Metoda 2: Před utěsněním baňku obsahující Amniopan s buňkami předem ekvilibrujte v 5% CO₂ inkubátoru po dobu 1 hodiny a kultivujte při 37 °C.

Metoda 3: Každá jednotlivá baňka s Amniopanem a buňkami se propláchne v 5% CO₂-95% směsí vzduchu pomocí sterilní pipety (se sterilním filtrem) po dobu 20-30 sekund. Systém uzavřete a inkubujte při 37 °C.

Odstraňování problémů při nesprávném růstu buněk

Porucha růstu buněk může záviset na několika faktorech:

- Počet buněk je příliš nízký
- Objem plodové vody je příliš nízký
- Časová prodleva mezi vzorkováním a kultivací buněk je příliš dlouhá
- Špatná kvalita buněčných kultur s kontaminací buněčnými zbytky nebo erytrocyty.

Pokud je vzorek plodové vody již viditelně krvavý, může vysoký počet erytrocytů značně narušit buněčný růst. V případě zhoršeného buněčného růstu v důsledku kontaminace erytrocyty se osvědčil následující postup: kompletní výměna média při první výměně a úplná výměna média včetně promytí DPBS (bez Mg²⁺/Ca²⁺) při druhé výměně.

Opatření

Nepoužívejte produkt, pokud se zdá, že obal je narušený nebo pokud je pozorována viditelná sraženina nebo produkt je přijat rozmrazený. Vyhněte se dlouhodobému vystavení světlu. Protože Amniopan obsahuje FBS, mohou vzniknout vločkovité zbytky při rozmrazování a skladování.

Omezení

Pro diagnostické postupy in vitro by si každá laboratoř měla stanovit postupy a pravidelně provádět interní kvalitu těchto postupů, zejména při volbě nových buněčných kultivačních médií nebo použití nových šarží médií před uvolněním tyto do klinické rutiny.

Pouze pro diagnostické použití in vitro pomocí kultivace a růstu lidských fetálních buněk z plodové vody nebo choriových klků. Není určeno pro terapeutické použití u lidí nebo zvířat.

Technická podpora

V případě jakýchkoliv dotazů nebo nejasností se prosím obraťte na zákaznický servis PAN Biotech GmbH nebo na autorizovaného místního zástupce.

Pro technickou podporu, dotazy nebo připomínky kontaktujte svého místního partnera PAN-Biotech nebo technického pracovníka oddělení PAN-Biotech prostřednictvím e-mailu (info@pan-biotech.com) nebo telefonu +49-8543-601630.

Literatura

Bartalini, G., Margollicci, M.A., Balestri, P., and Fois, A. Evaluation of lysosomal enzymes in uncultured and cultured chorionic villi and amniocytes. *J. Inher. Metab. Dis.* 11, Suppl. 2, 263 (1988)

Chang, H., Jones, O.W. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: Suitability for prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4795 (1982)

Epstein, C.J. The use of growth factors to stimulate the proliferation of amniotic fluid cell. *Meth. Cell Biol.* 26, 269 (1982)

Gravel, R.A., Leung, A., Tsui, F., Koldny, H. A micromethod for the detection of arylsulfatases A and B in cultured fibroblasts and amniocytes. *Anal. Biochem.* 119, 360 (1982)

Hecht, F., Peakman, D.C., Kaiser-McCaw, B., Robinson, A. Amniocyte clones for prenatal cytogenetics. *Amer. J. Med. Genet.* 10, 51 (1981)

Kleijer, W.J., First trimester diagnosis of genetic metabolic disorders. *Contr. Gynecol. Obstet.* 15:80. (1986)

Priest, R.E., Marimuthu, K.M., Priest J.H. Origin of human amniotic fluid cultures. *Lab. Invest.* 39, 106 (1978)

Renlund, M., and Aula P. Prenatal detection of Salla disease based upon Increased free sialic acid in amniocytes. *Amer. J. Hum. Genet.* 28, 377 (1987)

Sarkar, S., Chang, H., Porreco, R.P., Jones, O.W. Neural origin of cells in amniotic fluid. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 136, 67 (1980)

Steele, M.W. and Breg, W.R. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* 1, 383 (1966)

Výrobce

PAN-Biotech GmbH

Am Gewerbepark 6 + 13

D - 94501 Aidenbach

Germany

Tel: +49 8543 6016-30

Fax: +49 8543 6016-49

E-Mail: info@pan-biotech.com

Web: www.pan-biotech.com

