



Vorbereitung von Einzelzellen für eine Analyse mittels Array-CGH

Die Anleitung ist für die Aufbereitung folgender Einzelzellen geeignet:

- Polkörper
- Embryobiopsien aus der frühen Teilungsphase oder im Blastozystenstadium

Anmeldung einige Tage vorher notwendig

Dokumente: Begleitdokumentation, GenDG, Daten

Befundmitteilung: Das Ergebnis liegt innerhalb von 3 Tagen vor.

Für die Aufbereitung der Einzelzellen ist folgendes Zubehör erforderlich:

- Waschpuffer (PBS ohne Calcium und Magnesium, mit 0,1 % w/v Polyvinylalkohol)
- Sterile 0,2 ml Reagenzröhrchen
- Ständer für 0,2 ml Reagenzröhrchen
- Sterile Petri-Schalen
- Mikropipetten für den Transfer der biopsierten Zellen

Der Waschpuffer kann bei Raumtemperatur, gekühlt oder gefroren aufbewahrt werden.

Die Ständer sollten mit UV-Licht dekontaminiert und kontaminationsfrei aufbewahrt werden.

PBS-Waschpuffer und 0,2 ml Reagenzröhrchen werden zur Verfügung gestellt.

Vorbereitungen:

Einzelzellen müssen nach der Biopsie sorgfältig gemäß Anleitung gewaschen werden, um eine optimale Vorbereitung für den Einsatz in der Array-CGH-Analytik zu gewährleisten. Bei Embryobiopsien oder Polkörperpräparationen sollten mittels Hyaluronidase die Cumuluszellen auf der Zona pellucida entfernt werden, um Kontaminationen mit mütterlicher DNA zu vermeiden.

Für den Nachweis von Aneuploidien oder unbalancierten Rearrangements ist die vorherige Anwendung der ICSI-Methode erforderlich. Sind die Embryonen nach einer regulären IVF entstanden, müssen die Waschschriffe besonders sorgfältig durchgeführt werden, da sich überschüssige Spermien in die Zona pellucida einbetten und somit die Gefahr einer paternalen DNA-Kontamination besteht.

Allgemeine Hinweise:

- Die Reagenzgefäße müssen kontaminationsfrei aufbewahrt werden.
- Die Überführung der biopsierten Zellen müssen unter sterilen Bedingungen erfolgen.
- Für die Array-CGH-Analyse werden der 1. und 2. Polkörper als Pool in einem Reagenzgefäß zusammengeführt.
- Transferierte Zellen bis zum Abschluss der Aufbereitung gekühlt aufbewahren.
- Während der gesamten Aufbereitung müssen zur Vermeidung von Kontaminationen Handschuhe getragen werden.

Protokoll

Waschen der biopsierten Einzelzellen

- in eine frische sterile Petrischale mehrere Tropfen Waschpuffer (ca. 10 µl pro Tropfen) pipettieren
- eine Einzelzelle in den ersten Waschtropfen überführen
- Pipette mit Waschpuffer durch drei- bis viermaliges Auf- und Abpipettieren reinigen
- Pipette mit einigen Mikrolitern frischem Waschpuffer füllen und vorsichtig über die Zelle pipettieren
- Zelle in einem kleinen Volumen an Waschpuffer aufnehmen und in den zweiten Tropfen überführen
- Pipette wie beschrieben reinigen und die Waschschriffe insgesamt dreimal wiederholen
- nach dreimaligem Waschen die Zellen in die vorbereiteten Reagenzgefäße überführen

Transfer der gewaschenen Einzelzellen

- 0,2 ml Reagenzgefäß pro Transfer mit einem Tiefkühlmarker beschriften
- Probenständer auf Eis oder ein gefrorenes Kühlakku stellen
- Überführung jeder Einzelzelle bzw. bei einem Polkörperpool, den 1. und 2. Polkörper zusammen, in ein separates Reagenzgefäß (die Probe sollte weniger als 1 µl Waschpuffer enthalten)
- Probe luftblasenfrei auf den Boden des Reagenzgefäßes pipettieren, Gefäß sofort verschließen und ggf. in einer Mikrozentrifuge kurz abzentrifugieren
- Proben bis zum Abschluss der Prozedur in den gekühlten Probenständer stellen
- Konservierung der Proben bei mind. -20°C

Bei Rückfragen kontaktieren Sie uns gerne unter 0211 27101-117.