



SIGMA-ALDRICH®

SEPARACE LUKOCYTŮ

(Postup č. 1119)

POUŽITÍ

Přípravky Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1119 a HISTOPAQUE® - 1077 jsou nesterilní přípravky určené k izolaci mononukleárních buněk a granulocytů pro histologické vyšetření. Reagencie HISTOPAQUE® - 1119 jsou určeny pro „diagnostické použití in vitro“. Tento materiál bez další filtrace není vhodný ke kultivaci separovaných buněk. Pro buněčnou kulturu specificky platí, že přípravek HISTOPAQUE® - 1119 není určen k diagnostickým účelům in vitro.

Roztoky používané pro tyto účely obsahují polysacharózu a radiopákní médium. HISTOPAQUE®-1077 je takovýto roztok upravený na hustotu 1,077. Po navrstvení krve na HISTOPAQUE®-1077 a po odstředění na centrifuzě, mononukleární buňky se drží na rozhraní plazmatu HISTOPAQUE®, zatímco erytrocyty a granulocyty spadají na dno. Ukazuje se jako potřebné vynalézt systém, který by umožňoval postupem o jednom kroku sběr buněk myeloidních řad. HISTOPAQUE®-1119 byl vyvinut za tímto účelem a je založen na pozorováních Englishe a Andersena.¹

Podle postupu Sigma-Aldrich se vytváří dvojitý gradient pomocí vrstvení stejného množství HISTOPAQUE®-1077 přes HISTOPAQUE®-1119. Celá krev je opatrně rozprostřena nahoru na látku HISTOPAQUE®-1077 médium. Zkumavky jsou pak centrifugovány při 700 x g na 30 minut. Buňky granulocytických řad byly prokázány v 1077/1119 interfázi, přičemž lymfocyty, další mononukleární buňky a destičky byly prokázány na plazmatu/1077 interfázi.

REAGENCIE

HISTOPAQUE®-1119, katalogové č. 1119-1
Polysacharózy, 6,0 g/dl a diatrizoat sodný, 16,7 g/dl.

ULOŽENÍ A STABILITA:

HISTOPAQUE®-1119 uchovávejte v lednici (2-8 °C). Chraňte před světlem. Štítek reagencie uvádí datum použitelnosti.

ZHORŠENÍ:

Výskyt zakalení indikuje zhoršení účinnosti produktu.

PŘÍPRAVA:

HISTOPAQUE®-1119 je připraveno k okamžitému použití. Před použitím zahřejte na 18-26 °C.

Pokud zamýšlené použití separovaných buněk zahrnuje následnou kultivaci, musí být před separací buněk HISTOPAQUE®-1119 sterilně filtrován. Pro použití, při němž je nutná sterilita, filtr HISTOPAQUE®-1119 před použitím vysterylizujte.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Při kontaktu s částmi lidského těla je třeba považovat všechny reagenty a zařízení jako potenciálně biologicky nebezpečné. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztoky HISTOPAQUE® 1077-1 a 1119-1 jsou ŠKODLIVÉ. Mohou způsobit precitlivlost vdechnutím a při kontaktu s pokožkou. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Krev.

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztoky HISTOPAQUE® 1077-1 a 1119-1 jsou ŠKODLIVÉ. Mohou způsobit precitlivlost vdechnutím a při kontaktu s pokožkou. Nevdechujte výpary. Používejte vhodné ochranné oděvy a rukavice. V případě nehody, pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc (pokud možno, ukažte tento štítek).

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Žilní krev, 6 ml, odebírejte heparinem bez konzervačního prostředku nebo pomocí EDTA.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

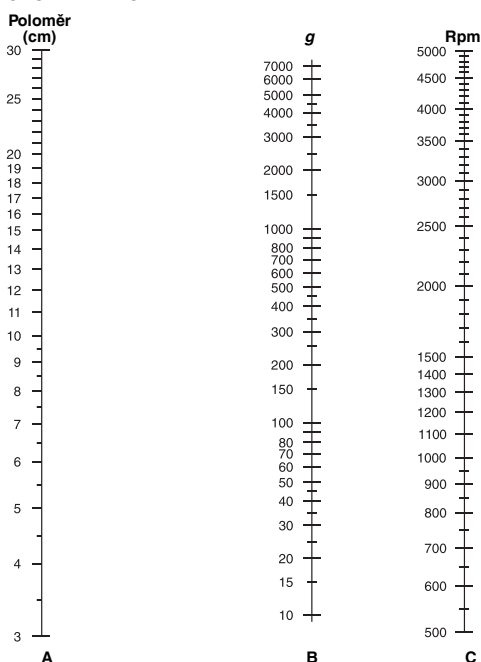
HISTOPAQUE®-1077, katalogové č. 1077-1, polysacharózy, 5,7 g/dl a diatrizoat sodný, 9,0 g/dl.
Centrifuga (s otočným lopátkovým kolem) schopná výkonu

700 x g
Odstředivkové nádoby, 15-mL, plastové, kónické

POZNÁMKY:

- Pokud zamýšlené použití separovaných buněk zahrnuje následnou kultivaci, musí být před separací buněk HISTOPAQUE®-1119 sterilně filtrován. Pro použití, při němž je nutná sterilita, musí být HISTOPAQUE®-1119 před použitím sterilně přefiltrován. Tento produkt je pouze pro „Použití in vitro“. Buňky izolované pomocí roztoku HISTOPAQUE® nesmí být používány v postupu „in vivo“.
- Lze použít odstředivky o velikosti 50 ml. Změna stanoveného postupu použitím 12 ml HISTOPAQUE®-1077, 12 ml HISTOPAQUE®-1119 a 24 ml celé nebo zředěné krve.
- Pokud je potřeba, lze krev ředit v poměru 1:2 nebo 1:4, v závislosti na absolutním počtu buněk. Existuje možnost zahlcení.
- Nepoužívejte rukavice s práškovou přísadou. Prášek z rukavic aktivuje monocyty a tím snižuje účinnost.
- Nepoužívejte vysokovazebné plasty, například polystyreny. Polystyren může vázat buňky na stěny nádob centrifugy.
- Gradient připravujte těsně před použitím. Příprava gradientu dopředu způsobuje objevení difúze a má za následek špatnou regeneraci buněk.
- Podložení HISTOPAQUE®-1119 rovněž vytvoří přijatelný gradient.
- Mohou být použity jiné antikoagulanty; je však třeba upozornit, že výběr antikoagulantu má vliv na regeneraci buněk. Regenerace klesá se stářím krve.
- Tato část postupu využívá izotonní fyziologický roztok pufovaný fosfátem jako ředící roztok a promývací tekutinu. Lze použít i jiná reagenty, například buněčné médium RPMI 1640 obohacené fetálním bovinním sérem.
- Popisovaný postup slouží izolování buněk ze 6 ml celé krve. Množství lze podle potřeby snížit nebo zvýšit.
- Doporučuje se použít tkáň z „normálního“ pacienta jako kontrola každého cyklu.

NOMOGRAM PRO STANOVENÍ RELATIVNÍ Odstředivé síly:



K nastavení rpm centrifugy lze použít nomogram. Jak nastavit požadovaný rpm k zabezpečení 700 x g pro Postup č. 1119.

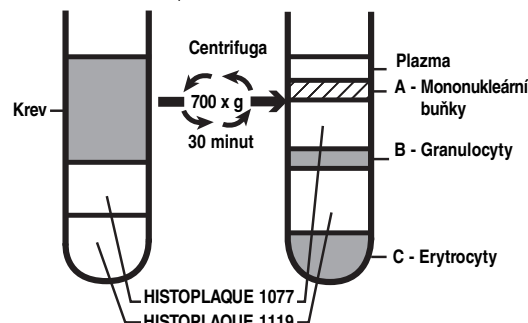
- Změřte poloměr (cm) ze středu hřídele centrifugy na konec nosiče zkumavek. Označte tuto hodnotu na stupnici A.
- Označte relativní odstředivou sílu (např. 700) na stupnici B.
- Pomocí pravítka spojte body sloupce A a B přímkou, protněte sloupec C. Výsledek v sloupci C je nastavení rpm pro centrifugu.

POSTUP:

- Přidejte 3 ml HISTOPAQUE®-1119 do kónické odstředivky o velikosti 15 ml.
- Opatrně udělejte vrstvu 3 ml HISTOPAQUE®-1077 na HISTOPAQUE®-1119.
- Opatrně navrstvěte 6 ml celé krve na horní gradient ve zkumavce z kroku 2.
- Centrifugujte při 700 x g na 30 minut při pokojové teplotě (18-26 °C). Odstředování při nižších teplotách, například při 4 °C, může způsobit shlukování buněk a špatnou regeneraci.

POZNÁMKA: Požadované rpm pro výkon 700 x g lze vypočítat pomocí nomogramu v tomto návodu.

- Opatrně vyjměte odstředivkové zkumavky. Měli byste vidět dvě odlišné opákové vrstvy (vrstvy A a B na obrázku níže).



- Aspirujte a odstraňte tekutinu na 0,5 cm vrstvy A. Přeneste buňky z vrstvy do zkumavky označené „mononukleární“.
- Aspirujte a odstraňte zbývající tekutinu na 0,5 cm vrstvy B. Přeneste buňky z vrstvy do zkumavky označené „granulocyty“.
- Promyjte buňky přidáním 10 ml izotonního fyziologického roztoku pufovaného fosfátem do zkumavky. Centrifugujte 10 minut při 200 x g. Odstraňte supernatant a zlikvidujte.
- Resuspendujte buňky opatrným aspirováním Pasteurovou pipetou.
- Opakujte dvakrát kroky 8 a 9.
- Resuspendujte buňky ve správném objemu izotonního fyziologického roztoku pufovaného fosfátem.

Od tohoto bodu lze provádět různé testy. Postupy se volí podle individuálního posouzení.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Erytrocyty a granulocyty musí granulovat na dně odstředivky. Granulocyty by měly vytvářet pás na rozhraní mezi HISTOPAQUE®-1119 a HISTOPAQUE®-1077. Mononukleární buňky by měly vytvářet pás na rozhraní mezi HISTOPAQUE®-1077 a plazmatem.

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

- English D, Andersen BR: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 5:249, 1974

HISTOPAQUE je registrovanou ochrannou známkou společnosti Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO USA

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 1119
Předchozí revize: 2009-11
Revidováno: 2010-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Velká Británie

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
314-771-5765

Technické služby: 800-325-0250
nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-3010
nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo
49-7329-970