



# SIGMA-ALDRICH® ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077

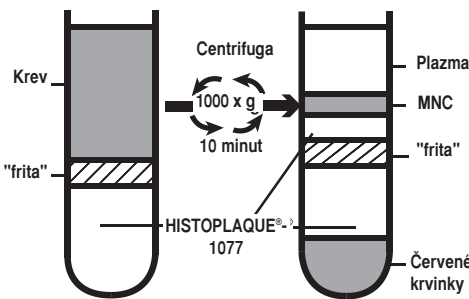
(Postup č. A 6929 / A 7054 / A 0561)

## POUŽITÍ

Sigma-Aldrich ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 je určen k izolování lymfocytů a dalších mononukleárních buněk. Reagencie ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 jsou určeny k použití v "diagnostice in vitro".

Separace lymfocytů a dalších mononukleárních buněk (MNC) z celé krve a kostní dřeně použitím HISTOPAQUE®-1077 je založena na metodě, která byla poprvé popsána Boyumem v roce 1968. Separáční médium, HISTOPAQUE®-1077, je vodný roztok polysacharidů o vysoké molekulové hmotnosti a diatrizoatu sodného, jodační neiontové sloučeniny, upravený na hustotu  $1,077 \pm 0,001$ .

Zkumavka ACCUSPIN™ je speciálně vyrobena se dvěma komorami oddělenými porézní přepážkou z polyetylénu o vysoké denzitě ("frita"). Antikoagulovaná celá krev může být přidána do horní komory zkumavky bez rizika, že se promíchá s HISTOPAQUE®-1077 ve spodní komoře pod fritou. Na centrifuzi klesá celá krev skrz "fritu" a dostává se do kontaktu s HISTOPAQUE®-1077. Částice s vyšší hustotou přemístí obsah HISTOPAQUE®-1077 nad "fritu" a poskytnou čistou separaci krevních částic. Erytrocyty agregují a granulocyty se stávají lehce hypertonické, zvýšením svého sedimentačního poměru, což má za následek tvorbu destiček na dně zkumavky ACCUSPIN™. Lymfocyty a ostatní mononukleární buňky, tj. monocyty, zůstávají na rozhraní plazma-HISTOPAQUE®-1077. Hustý pás mononukleárních buněk lze odebrat slítím obsahu horní komory nebo pipetovacím nástrojem. Kontaminaci erytrocyty zabraňuje bariéra mezi komorami.



ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077

## REAGENCIE

ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077, katalogová č. A 6929, A 7054 a A 0561

Polypropylénová zkumavka sterilizovaná radiací a vybavená polyetylénovou bariérou s vysokou denzitou ("frita") se asepticky naplní HISTOPAQUE®-1077.

HISTOPAQUE®-1077 obsahuje polysacharózu, 5,7 g/dl a diatrizoat sodný, 9,0 g/dl. Asepticky filtrováno. Hustota 1,077 při 25 °C.

### ULOŽENÍ A STABILITA:

Skládajte v lednici (2-8 °C). Chraňte před světlem. Štítek reagentie uvádí datum použitelnosti.

### ZHORŠENÍ:

Výskyt zakalení indikuje zhoršení účinnosti produktu.

### PŘÍPRAVA:

Reagencie ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 jsou připraveny k okamžitému použití. Před použitím zahřejte na 18-26 °C.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagentii. Při kontaktu s částmi lidského těla je třeba považovat všechny reagentie 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 jsou ŠKODLIVÉ. Mohou způsobit přecitlivělost vdechutím a při kontaktu s pokožkou. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Krev.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztoky HISTOPAQUE®-1077-1 jsou ŠKODLIVÉ. Mohou způsobit přecitlivělost vdechutím 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.

Lze používat čerstvou krev, ochuzenou o fibrin nebo antikoagulovanou (EDTA nebo heparin bez konzervačního činidla). Aby bylo dosaženo optimálních výsledků, je třeba zpracovat krev během 2 hodin.

### POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Zkumavky k odstředování pro promývání mononukleárních buněk

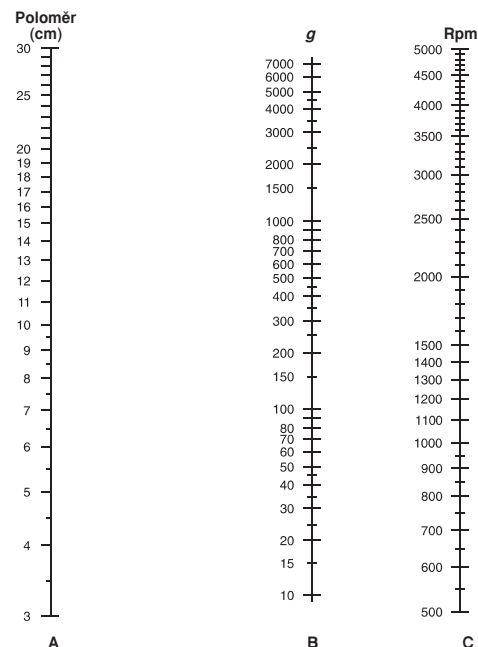
Izotonní fyziologický roztok puřovaným fosfátem (PBS) nebo vyvážený solný roztok

Centrifuga (s otočným lopatkovým kolem) schopná výkonu 100 až 1000 x g, udržující teplotu 18-26 °C

### POZNÁMKY:

- Lze použít 3 až 6 ml předem naředěné krve s katalogovým č. A 6929 nebo 15 až 30 ml předem naředěné krve s katalogovými č. A 7054 a A 0561. Krev lze ředit přímo v horní komoře zkumavky ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077. To je vhodné pro vzorky s hematokrity nad normální hodnotou.
- Odstraňování přebytečného množství HISTOPAQUE®-1077 s mononukleárním pásem zvyšuje kontaminaci granulocytů ze zbytků granulocytů které mohly zůstat mononukleárním rozhraní (Tabulka I).
- Odstraňování přebytečného množství supernatantu mononukleárním pásem může způsobit kontaminaci plazmatickými proteiny.
- Použití jiných než doporučených objemů předem naředěné nebo celé krve může vést ke snížení regenerace.
- K odstranění všech kontaminujících destiček lze provést druhou centrifugaci ve 4 až 20 % gradientu sacharózy naneseného přes HISTOPAQUE®-1077. Gradient sacharózy účinně izoluje destičky, zatímco mononukleární buňky penetrují do vrstvy HISTOPAQUE®-1077.
- Pokud ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 není přenesen do pokojové teploty, může být stávající regenerace mononukleárních buněk omezena.
- Může se příležitostně stát, že se přepážka frity během odstředování uvolní. Pokud se tak stane, neslévejte obsah zkumavky ke sběru mononukleárních buněk. Namísto toho opatrně vyjměte fritovou přepážku sterilizovanými kleštěmi nebo sklopte pipetou přepážku frit a odeberte mononukleární buňky.
- Tato část postupu popisuje oddělování mononukleárních buněk použitím izotonního fyziologického roztoku puřovaného fosfátem jako ředící roztok a promývací tekutinu. Za jistých okolností je lépe použít vyvážený solný roztok nebo kultivační buněčné médium, například RPMI 1640, doplněné fetálním bovinním sérem.
- 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 dosažení výkonu 1000 or 800 x g pro Postupy č. A 6929 / A 7054 / A 0561.

- Změřte poloměr (cm) ze středu hřídele centrifugy na konec nosiče zkumavek. Označte tuto hodnotu na stupnici A.
- Označte relativní odstředivou sílu (např. 1000 nebo 800) 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:

- Přeneste potřebný počet zkumavek do prostoru s pokojovou teplotou. Chraňte před světlem. Je-li před použitím nad přepážkou "frit" HISTOPAQUE®-1077, centrifugujte při 1000 x g na 30 sekund při pokojové teplotě.
- Označte zkumavku(y) etiketou.
- Naplňte do plna 3,0 až 6,0 ml čerstvé celé krve ochuzené o fibrin nebo antikoagulované do horní komory každé předem naplněné zkumavky ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077, katalogové č. A 6929.  
NEBO  
Naplňte do plna 15,0 až 30,0 ml čerstvé celé krve ochuzené o fibrin nebo antikoagulované do horní komory každé předem naplněné zkumavky ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077, katalogová č. A 7054 nebo A 0561.
- Centrifugujte při 1000 x g, udržte teplotu 18-26 °C, po dobu 10 minut.  
NEBO  
Centrifugujte při 800 x g, udržte teplotu 18-26 °C, po dobu 15 minut.
- Po odstředění opatrně aspirujte vrstvu plazmatu Pasteurovou pipetou do 0,5 cm opakního rozhraní obsahujícího mononukleární buňky. Odpovídajícím způsobem odstraňte plazmatickou vrstvu.
- Opatrně přeneste Pasteurovou pipetou mononukleární pás do čisté odstředivky.
- Promyjte mononukleární pás přidáním 10 ml izotonního PBS nebo vyváženého solného roztoku a resuspendujte buňky opatrně aspirováním Pasteurovou pipetou. Centrifugujte při 250 x g, udržte teplotu 18-26 °C, po dobu 10 minut.
- Opakujte dvakrát krok 7, resuspendujte granule v 5 ml izotonního PBS.
- Resuspendujte mononukleární granule v příslušném médiu v závislosti na způsobu dalšího použití buněk.

## CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Erytrocyty a granulocyty musí granulovat na dně zkumavky ACCUSPIN™. Mononukleární buňky musí vytvořit pás na rozhraní mezi HISTOPAQUE™-1077 a plazmatem.

Níže uvedená tabulka představuje výsledky analýzy mononukleárního buněčného pásu z krevních vzorků zdravého člověka separovaného paralelně systémem ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE™-1077 a HISTOPAQUE™-1077.

### TABULKA I

#### ACCUSPIN™ SYSTEM-

	HISTOPAQUE™-1077		HISTOPAQUE™-1077	
	Střední hodnota ±SD		Střední hodnota ±SD	
% Regenerace <sup>1</sup>	70,0	13,3	53,6	8,9
% Životaschopnost <sup>2</sup>	98,0	1,1	95,0	2,7
% Lymfocyty <sup>3</sup>	87,6	4,3	89,8	3,5
% Monocyty <sup>3</sup>	9,1	3,8	8,3	3,0
% Granulocyty <sup>3</sup>	3,0	2,7	2,3	1,8
% Erytrocyty <sup>3</sup>	5,0	2,0	5,0	2,0
% Destičky <sup>3</sup>	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Stanoveno hemacytometrem a diferenciálním výpočtem Wrightova barvení.
2. Stanoveno vylučovacím testem pomocí barvení trypanovou modří.
3. Stanoveno diferenciálním výpočtem Wrightova barvení mononukleární frakce.

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

## REFERENCE

1. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):77, 1968
2. Lightbody J: Use of the Cell-mediated Lympholysis Test in Transplantation Immunity. IN Manual of Clinical Immunology. NR Rose, H Friedman, Editors, American Society for Microbiology, Washington (DC), 1976, pp 851-857
3. Amos DB, Pool P: HLA Typing. Ibid, pp 797-804
4. Winchester RJ, Ross G: Methods For Enumerating Lymphocyte Populations. Ibid, pp 64-76
5. Hofman FM, Kanesberg B, Smith D, et al: Stability of T and B-cell numbers in human peripheral blood. Am J Clin Pathol 77:710, 1982
6. Brown L: Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, pp 33-39
7. Eisen SA, Weaner HJ, Parker CW: Isolation of pure human peripheral blood lymphocytes using nylon wool columns. Immunol Commun 1:571, 1972
8. Wysocki LJ, Sato VL: Panning for lymphocytes. A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA 75:6, pp 2844-2848, 1978
9. Hunt SV: Separation of Lymphocyte Subpopulations. IN Handbook of Experimental Immunology, Vol 2, Cellular Immunology, DS Weir, Editor. 24:13, 3rd ed., Blackwell Scientific Publications, 1978
10. Madsen M, Johnson HE, Wendelboe I, Hansen P, Christiansen SE: Isolation of human T and B lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation. Characterization of the isolated subpopulations. J Immunol Methods 33:323, 1980
11. Loken MR, Stall AM: Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. J Immunol Methods 50:R85, 1982
12. Ting A, Morris PJ: A technique of lymphocyte

preparation from stored heparinized blood. Vox Sang 20:561, 1971

13. Fotino M, Merson EJ, Allen FH: Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci 1:131, 1971

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. A 6929 / A 7054 / A 0561

Předchozí revize: 2003-04

Revidováno: 2003-09



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](mailto:clintech@sial.com)  
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

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