



SIGMA-ALDRICH®

LEUKOCYT-ADSKILLELSE

(Procedurenr. 1119)

TILSIGTET ANVENDELSE

Sigma-Aldrich HISTOPAQUE®-1119 og HISTOPAQUE®-1077 er et sterilt præparat, der er beregnet til isolering af mononukleare celler og granulocytter til histologisk undersøgelse. HISTOPAQUE®-1119-reagenser er til in vitro diagnostisk brug. **Uden yderligere filtrering er dette materiale ikke egnet til dyrkning af separerede celler. Specifikt i forhold til celledyrkning er HISTOPAQUE®-1119 ikke til in vitro diagnostiske formål.**

Opløsninger til dette formål består af en polysukrose og et røntgenfast medie. HISTOPAQUE®-1077 er en sådan opløsning, justeret til en densitet på 1,077. Når blod anbringes i lag på HISTOPAQUE®-1077 og udsættes for centrifugalkræfterne, fastholdes de mononukleare celler på HISTOPAQUE® plasma-grænsefladen, mens erythrocytter og granulocytter falder til bunden. Det skulle være muligt at lave et system, hvorved celler i myeloide serier også kan høstes ved anvendelse af en et-trins-procedure. HISTOPAQUE®-1119 er udviklet til dette formål og baseret på observationer af English og Andersen.¹

I henhold til Sigma-Aldrich-proceduren dannes der en dobbelt gradient ved lagdeling af en lige mængde HISTOPAQUE®-1077 over HISTOPAQUE®-1119. Fuldblod lægges forsigtigt på det øverste HISTOPAQUE®-1077-medie. Reagensglassene centrifugeres derefter ved 700 x g i 30 minutter. Celler i den granulocytiske serie findes ved 1077/1119-grænsefladen, mens lymfocytter, andre mononukleare celler og trombocytter befinder sig ved plasma/1077-grænsefladen.

REAGENS

HISTOPAQUE®-1119, katalognr. 1119-1
Polysukrose, 6,0 g/dl, og natriumdiatrizoat, 16,7 g/dl.

OPBEVARING OG STABILITET:

HISTOPAQUE®-1119 skal opbevares i køleskab (2–8 °C). Skal beskyttes mod lys. Udløbsdatoen fremgår af reagensetiketten.

FORRINGELSE:

Et uklart udseende er tegn på forringelse af produktet.

KLARGØRING:

HISTOPAQUE®-1119 er klar til brug. Skal opvarmes til 18–26 °C før brug.

Hvis den tilsigtede brug af de separerede celler involverer efterfølgende dyrkning, skal HISTOPAQUE®-1119 være filteret sterilt inden celleseparation. Sterilisér filteret HISTOPAQUE®-1119 før brug ved anvendelse, hvor sterilitet er påkrævet.

FORHOLDSREGLER:

De normale forholdsregler ved håndtering af laboratoriereagenser skal følges. Ved kontakt med humane kildestoffer skal alle reagenser og alt udstyr behandles som potentielt biologisk risikomateriale. Ved kassering af affald skal alle lokale og nationale bestemmelser overholdes. Der henvises til materialesikkerhedsdatabladet for opdaterede oplysninger om risici, fare eller sikkerhed.

Amerikanske risiko- og sikkerhedserklæringer

HISTOPAQUE®1077-1- og 1119-1-opløsninger er SUNDHEDSSKADELIGE. Kan give allergi ved indånding og hudkontakt. Bær passende beskyttelsesbeklædning. Målorgan: Blod.

Risiko- og sikkerhedserklæringer for EU

HISTOPAQUE®1077-1- og 1119-1-opløsninger er SUNDHEDSSKADELIGE. Kan give allergi ved indånding og hudkontakt. Undgå indånding af dampe. Bær passende beskyttelsesdragt og -handsker. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten hvis det er muligt).

PROCEDURE

PRØVEINDSAMLING:

Det anbefales, at prøveindsamling sker i henhold til NCCLS-dokumentet M29-A2. Der er ingen kendt testmetode, som kan give fuldstændig sikring af, at blodprøver eller væv ikke overfører infektion. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver behandles som potentielt infektiøse.

Der indsamles 6 ml venedblod i heparin eller EDTA uden konserveringsmiddel.

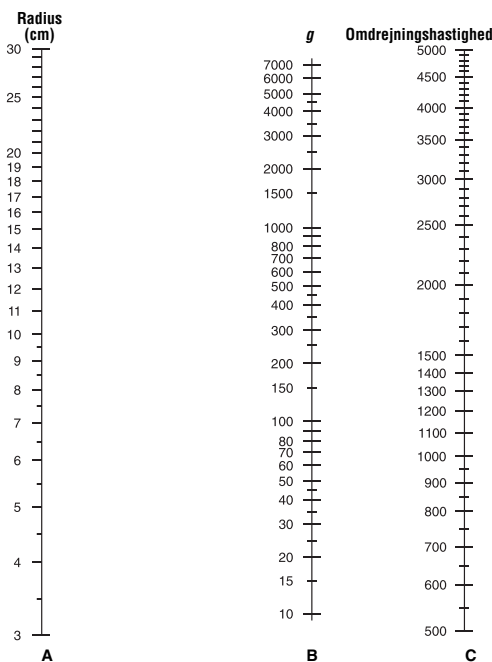
SÆRLIGE NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER:

HISTOPAQUE®-1077, katalognr. 1077-1, polysukrose, 5,7 g/dl, og natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl.
Centrifuge (svingende spandrotor) der kan generere 700 x g

Centrifugerør, 15 ml, plast, konisk

BEMÆRKNINGER:

- Hvis den tilsigtede brug af de separerede celler involverer efterfølgende dyrkning, skal HISTOPAQUE®-1119 være filteret sterilt inden celleseparation. Sterilisér filteret HISTOPAQUE®-1119 før brug ved anvendelse, hvor sterilitet er påkrævet. Dette produkt er kun til in vitro-brug. Celler, der isoleres med HISTOPAQUE®, må ikke bruges til in vivo-procedurer.
- 50 ml centrifugerør kan anvendes. Den angivne procedure ændres ved anvendelse af 12 ml HISTOPAQUE®-1077, 12 ml HISTOPAQUE®-1119 og 24 ml fuldblod eller fortyndet blod.
- Det kan lejlighedsvis være nødvendigt at fortynde blod i forholdet 1:2 eller 1:4 afhængigt af det absolutte celleantal. Der er risiko for overbelastning af gradienten.
- Undgå brug af handsker, der er behandlet med talkum. Talkum til handsker aktiverer monocytter og resulterer i lavere udbytte.
- Undgå brug af plast med høj binding, som f.eks. polystyren. Polystyren kan binde celler til centrifugens reagensglasvægge.
- Klargør gradienten umiddelbart før brug. Klargøring af gradient på forhånd kan medføre diffusion og forringet cellerestituering.
- Underlag af HISTOPAQUE®-1119 kan også skabe en acceptabel gradient.
- Der kan anvendes andre antikoagulanter, men valget heraf kan påvirke cellerestitueringen. Når blod ældes, falder niveauet af cellerestituering.
- I proceduren gøres der brug af isotonisk fosfatbufferet saltvand som fortynder og vaskevæske. Der kan anvendes andre reagenser, såsom cellemediet RPMI 1640, suppleret med føtal bovint serum.
- Den beskrevne procedure gælder for isolering af celler fra 6 ml fuldblod. Volumen kan forøges eller reduceres efter behov.
- Brug af en "normal" patient anbefales som kontrol af hver kørsel.



NOMOGRAM TIL FASTLÆGGELSE AF DE RELATIVE CENTRIFUGALKRÆFTER:

Der anvendes et nomogram til at bestemme omdrejningshastigheden for centrifugering.

Sådan indstilles omdrejningshastigheden til 700 x g for procedurenr. 1119.

- Mål radius (cm) fra centrum af centrifugens spindel til enden af reagensglasets bærer. Marker denne værdi på skala A.
- Marker den relative centrifugalkraft (f.eks. 700) på skala B.
- Med en lineal trækkes der en lige linje fra punkterne på kolonne A og B, som føres videre til den skærer kolonne C. På kolonne C aflæses omdrejningshastigheden for centrifugering.

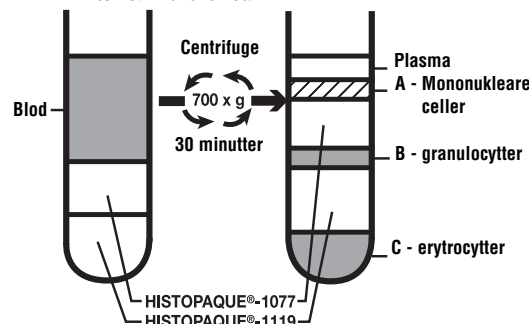
PROCEDURE:

- Tilsæt 3 ml HISTOPAQUE®-1119 til et 15 ml konisk centrifugerør.
- Anbring forsigtigt 3 ml HISTOPAQUE®-1077 i et lag på HISTOPAQUE®-1119.
- Anbring forsigtigt 6 ml fuldblod i et lag på den øvre gradient af reagensglasset fra trin 2.

- Centrifuger ved 700 x g i 30 minutter ved stuetemperatur (18–26 °C). Centrifugering ved lavere temperaturer, såsom 4 °C, kan medføre celleklumper og ringe restituering.

BEMÆRK: Den påkrævede omdrejningshastighed til generering af 700 x g kan beregnes ved anvendelse af nomogrammet i denne indlægsedel.

- Fjern forsigtigt centrifugerørene. To tydelige ugenomsigtige lag (lag A og B i figuren herunder) bør fremkomme.
- Aspirer og kasser væske til en afstand af 0,5 cm fra lag A. Overfør cellerne herfra til reagensglasset mærket "mononuklear".



- Aspirer og kasser den resterende væske til en afstand af 0,5 cm fra lag B. Overfør cellerne herfra til reagensglasset mærket "granulocytter".
- Vask cellerne ved at tilsætte 10 ml isotonisk fosfatbufferet saltvand til reagensglassene. Centrifuger i 10 minutter ved 200 x g. Supernatanten fjernes og kasseres.
- Cellerne resuspenderes ved forsigtig aspiration med en Pasteur-pipette.
- Gentag trin 8 og 9 to gange.
- Resuspender cellerne i en passende mængde isotonisk fosfatbufferet saltvand.

Der kan nu udføres en række forskellige analyser. Der vælges procedure afhængigt af individuelle skøn.

RESULTATKARAKTERISTIKA

Erythrocytter skal bundfældes i centrifugerørene. Granulocytter skal binde ved grænsefladen mellem HISTOPAQUE®-1119 og HISTOPAQUE®-1077. Mononukleare celler bør binde ved grænsefladen mellem HISTOPAQUE®-1077 og plasmaet.

Hvis de observerede resultater afviger fra de forventede, skal Sigma-Aldrich Technical Service kontaktes for yderligere hjælp.

HENVISNINGER

- 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 er et registreret varemærke, der tilhører Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA.

Sigma-Aldrich, Inc. garanterer, at dets produkter stemmer overens med de oplysninger, som er indeholdt i denne og andre publikationer fra Sigma-Aldrich. Det påhviler køber at fastlægge produktets/produkternes egnethed til deres specifikke anvendelse. Yderligere vilkår og betingelser kan være gældende. Se bagsiden af faktura eller pakkeseddel for yderligere vilkår og salgsbetingelser.

Procedurenr. 1119
Tidligere revision: 2009-11
Revideret: 2010-01



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

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
+1 314 771 5765

Teknisk service: +1 314 771 3122
eller e-mail til clintech@sial.com
Bestilling: +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

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