



# SIGMA-ALDRICH®

## LEUKOZYTENSEPARATION

(Verfahren Nr. 1119)

### VERWENDUNGSZWECK

Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1119 und HISTOPAQUE® - 1077 sind nicht sterile Präparate, die zur Trennung mononukleärer Zellen und Granulozyten für eine histologische Untersuchung entwickelt wurden. HISTOPAQUE® -1119 Reagenzien sind für die „In-vitro-Diagnostik“ bestimmt. **Diese Substanz ist ohne weitere Filtration nicht zur Kultivierung abgetrennter Zellen geeignet. HISTOPAQUE® - 1119 ist im Hinblick auf Zellkulturen nicht für die In-vitro-Diagnostik geeignet.**

Die für diesen Zweck verwendeten Lösungen bestehen aus Polysaccharose und einem radioopaken Medium. HISTOPAQUE®-1077 ist eine solche Lösung, eingestellt auf eine Dichte von 1,077. Wenn Blut auf HISTOPAQUE®-1077 geschichtet und Zentrifugalkräften ausgesetzt wird, werden mononukleäre Zellen an der Plasma-HISTOPAQUE® Grenzfläche festgehalten, während Erythrozyten und Granulozyten schwerkraftbedingt zu Boden sinken. Es wäre machbar, ein System zu entwickeln, durch das Zellen aus der Myeloidreihe ebenfalls mit einem Ein-Schritt-Verfahren gewonnen werden könnten. HISTOPAQUE®-1119 wurde zu diesem Zweck entwickelt und basiert auf den Beobachtungen von English und Andersen.<sup>1</sup>

Nach dem Sigma-Aldrich-Verfahren wird ein doppelter Gradient durch Schichtung gleicher Volumina von HISTOPAQUE®-1077 über HISTOPAQUE®-1119 gebildet. Vollblut wird vorsichtig auf das obere Medium HISTOPAQUE®-1077 geschichtet. Die Röhren werden dann bei 700 x g 30 Minuten zentrifugiert. Zellen der Granulozytenreihe sind in der 1077/1119-Grenzfläche zu finden, während sich Lymphozyten, andere mononukleäre Zellen und Thrombozyten in der Plasma/1077-Grenzfläche befinden.

### REAGENZ

**HISTOPAQUE®-1119**, Bestell-Nr. 1119-1  
Polysaccharose, 6,0 g/dl, und Natriumdiatrizoat, 16,7 g/dl.

#### AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

HISTOPAQUE®-1119 im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Vor Licht schützen. Das Verfallsdatum ist auf dem Reagenzienetikett angegeben.

#### PRODUKTVERFALL:

Ein trübes Aussehen zeigt den Verfall des Produkts an.

#### VORBEREITUNG:

HISTOPAQUE®-1119 ist gebrauchsfertig. Vor der Verwendung auf 18–26 °C erwärmen.

Wenn die abgetrennten Zellen anschließend kultiviert werden sollen, muss HISTOPAQUE®-1119 vor der Zellabtrennung aseptisch gefiltert werden. Für Anwendungen, bei denen Sterilität erforderlich ist, muss HISTOPAQUE®-1119 vor Gebrauch aseptisch gefiltert werden.

#### VORSICHTSMASSNAHMEN:

Bei der Handhabung von Laborreagenzien sollten normale Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Bei Kontakt mit menschlichem Quellmaterial alle Reagenzien und Ausrüstungsgegenstände als potenziell biogefährlich behandeln. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen, staatlichen und nationalen Vorschriften befolgen. Aktuelle Hinweise zu Risiken, Gefahren und Sicherheitsmaßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

#### US-Gefahren- und Sicherheitsangaben

HISTOPAQUE®-1077-1 und -1119-1 Lösungen sind **SCHÄDLICH**. Beim Einatmen oder Kontakt mit der Haut kann es zu einer Sensibilisierung kommen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Zielorgan: Blut.

#### EU-Gefahren- und Sicherheitsangaben

HISTOPAQUE®-1077-1 und -1119-1 Lösungen sind **SCHÄDLICH**. Beim Einatmen oder Kontakt mit der Haut kann es zu einer Sensibilisierung kommen. Dämpfe nicht einatmen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfällen oder Unwohlsein sofort einen Arzt konsultieren (dabei möglichst das Produktetikett vorzeigen).

### VERFAHREN

#### PROBENNAHME:

Es wird empfohlen, die Probenahme gemäß NCCLS-Dokument M29-A2 durchzuführen. Keine bekannte Testmethode kann mit vollständiger Sicherheit garantieren, dass Blutproben oder Gewebe keine Infektion übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebeproben als potenziell infektiös behandelt werden.

6 ml venöses Blut in konservierungsmittelfreies Heparin oder EDTA entnehmen.

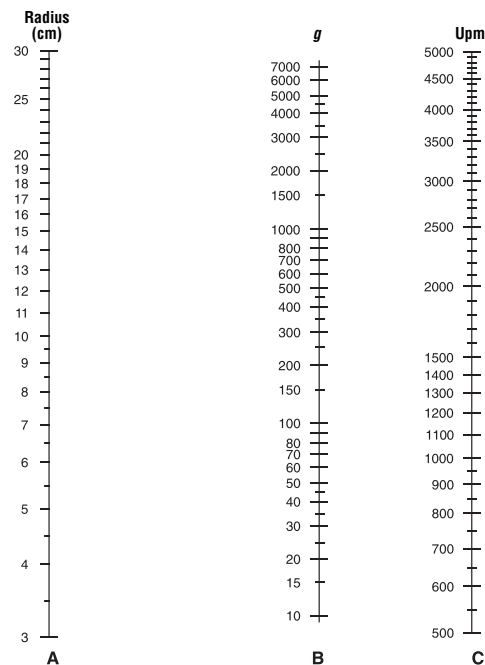
#### SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN:

HISTOPAQUE®-1077, Bestell-Nr. 1077-1, Polysaccharose, 5,7 g/dl, und Natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl.  
Zentrifuge (Pendelbecherröhrer) mit Kapazität von 700 x g Zentrifugenröhren, 15-ml Kunststoff, konisch

#### HINWEISE:

- Wenn die abgetrennten Zellen anschließend kultiviert werden sollen, muss HISTOPAQUE®-1119 vor der Zellabtrennung aseptisch gefiltert werden. Für Anwendungen, bei denen Sterilität erforderlich ist, muss HISTOPAQUE®-1119 vor Gebrauch aseptisch gefiltert werden. Dieses Produkt ist nur für in vitro-Gebrauch; mit HISTOPAQUE® isolierte Zellen sollten nicht für in-vivo-Prozeduren eingesetzt werden.
- 50 ml Zentrifugenröhren können verwendet werden. Das angegebene Verfahren kann durch Verwendung von 12 ml HISTOPAQUE®-1077, 12 ml HISTOPAQUE®-1119 und 24 ml Vollblut oder verdünntem Blut abgeändert werden.
- Es kann gelegentlich erforderlich sein, Blut abhängig von absoluten Zellzahlen 1:2 oder 1:4 zu verdünnen. Es besteht die Möglichkeit der Überbelastung des Gradienten.
- Keine gepuderten Handschuhe verwenden. Handschuhpuder aktiviert Monozyten und verursacht niedrigere Ergebnisse.
- Keine stark bindenden Kunststoffe wie etwa Polystyrol verwenden. Polystyrol kann Zellen an die Zentrifugenröhrenwände binden.
- Den Gradienten unmittelbar vor der Verwendung vorbereiten. Eine frühere Vorbereitung der Gradienten ermöglicht Diffusion und führt zu schlechter Zellerholung.
- Ein Unterlegen des HISTOPAQUE®-1119 ergibt ebenfalls einen akzeptablen Gradienten.
- Es können andere Antikoagulantien verwendet werden; die Wahl des Antikoagulans kann jedoch die Zellerholung beeinträchtigen. Mit der Alterung von Blut fällt die Zellerholung ab.
- Der Abschnitt Verfahren dieser Produktinformation sieht die Verwendung von isotoner phosphatgepufferter Kochsalzlösung als Verdünnungs- und Waschlösung vor. Andere Reagenzien wie etwa Zellmedium RPMI 1640, ergänzt durch fetales Rinderserum, können verwendet werden.
- Das beschriebene Verfahren bezieht sich auf die Isolierung von Zellen aus 6 ml Vollblut. Die Volumina können nach Bedarf erhöht oder reduziert werden.
- Für jeden Durchlauf wird die Verwendung eines „normalen“ Patienten als Kontrolle empfohlen.

#### NOMOGRAMM ZUR BESTIMMUNG RELATIVER ZENTRIFUGENKRÄFTE:



Zur Ableitung der Einstellung der Umdrehungszahl Ihrer Zentrifuge wird ein Nomogramm verwendet.

Ermittlung der erforderlichen Umdrehungszahl für 700 x g für Verfahren Nr. 1119.

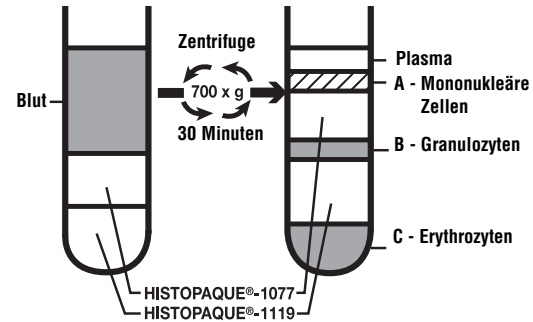
- Den Radius (cm) vom Zentrum der Zentrifugenspindele zum Ende des Teströhrenträgers messen. Diesen Wert auf Skala A markieren.
- Die relative Zentrifugalkraft (z.B. 700) auf Skala B markieren.
- Mit einem Lineal die beiden Punkte auf Skala A und B verbinden und diese Linie zu Skala C verlängern. Der abgelesene Wert auf Skala C ist die Einstellung der Umdrehungszahl für die Zentrifuge.

#### VERFAHREN:

- 3 ml HISTOPAQUE®-1119 in ein 15 ml konisches Zentrifugenröhren geben.
- Vorsichtig 3 ml HISTOPAQUE®-1077 auf das HISTOPAQUE®-1119 schichten.
- Vorsichtig 6 ml Vollblut auf den oberen Gradienten des Röhrens aus Schritt 2 schichten.
- Bei 700 x g 30 Minuten bei Raumtemperatur (18–26 °C) zentrifugieren. Ein Zentrifugieren bei niedrigeren Temperaturen wie etwa 4 °C kann zu einer Verklumpung der Zellen und schlechten Erholung führen.

**HINWEIS:** Die für 700 x g erforderliche Umdrehungszahl kann mit dem Nomogramm in dieser Produktinformation berechnet werden.

- Zentrifugenröhren vorsichtig herausnehmen. Es sollten zwei deutlich abgegrenzte opake Schichten zu sehen sein (Schichten A und B in der Abbildung unten).
- Flüssigkeit bis innerhalb 0,5 cm von Schicht A aspirieren und verwerfen. Zellen aus dieser Schicht in ein mit „mononukleär“ markiertes Röhren übertragen.



- Verbleibende Flüssigkeit bis innerhalb 0,5 cm von Schicht B aspirieren und verwerfen. Zellen aus dieser Schicht in ein mit „Granulozyten“ markiertes Röhren übertragen.
- Zellen durch Zugabe von 10 ml isotoner phosphatgepufferter Kochsalzlösung in die Röhren waschen. 10 Minuten bei 200 x g zentrifugieren. Überstand entfernen und verwerfen.
- Zellen durch vorsichtiges Aspirieren mit einer Pasteur-Pipette resuspendieren.
- Die Schritte 8 und 9 zwei Mal wiederholen.
- Zellen in einem geeigneten Volumen isotoner phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendieren.

Nun kann eine Reihe verschiedener Assays durchgeführt werden. Die Verfahren werden nach eigenem Ermessen gewählt.

### LEISTUNGSMERKMALE

Erythrozyten sollten am Boden des Zentrifugenröhrens ein Pellet bilden. Granulozyten sollten an der Grenzfläche zwischen dem HISTOPAQUE®-1119 und dem HISTOPAQUE®-1077 ein Band bilden. Mononukleäre Zellen sollten an der Grenzfläche zwischen dem HISTOPAQUE®-1077 und dem Plasma ein Band bilden.

Falls sich die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen unterscheiden, bitte den technischen Kundendienst von Sigma-Aldrich verständigen.

### LITERATURANGABEN

- 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 ist ein eingetragenes Warenzeichen von Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO USA

Sigma-Aldrich, Inc. gewährleistet, dass ihre Produkte mit den Angaben in dieser und anderen Sigma-Aldrich-Publikationen übereinstimmen. Der Anwender entscheidet selbst über die Eignung des Produkts für den jeweiligen Einsatzzweck. Es können zusätzliche Geschäftsbedingungen gelten. Weitere Informationen zu den Verkaufsbedingungen finden Sie auf der Rückseite der Rechnung oder des Lieferscheins.

Verfahren Nr. 1119  
Vorherige Ausgabe: 2009-11  
Revidiert: 2010-01

CE EC REP AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Großbritannien

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

Technischer Kundendienst: R-Gespräch  
+1 314 771 3122

oder Email an [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
Postfach 1120, 89552 Steinheim, Deutschland  
49-7329-970