



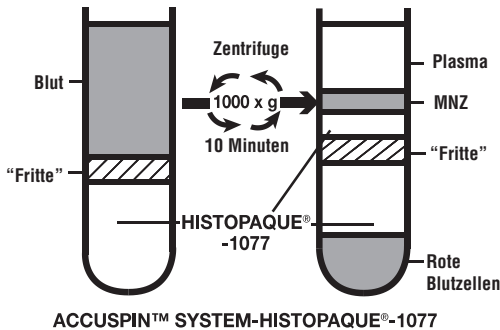
SIGMA-ALDRICH™
ACCUSPIN™
SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077
 (Verfahren Nr. A 6929 / A 7054 / A 0561)

VERWENDUNGSZWECK

Das ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 von Sigma-Aldrich dient der Isolierung von Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen. ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 Reagenzien sind für die "In-vitro-Diagnostik" bestimmt.

Die Trennung von Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen (MNZ) aus Vollblut und Knochenmark mit HISTOPAQUE®-1077 beruht auf einer Methode, die erstmals von Boyum¹ im Jahr 1968 beschrieben wurde. Das Trennmedium, HISTOPAQUE®-1077, ist eine wässrige Lösung aus einem Polysaccharid mit hohem Molekulargewicht und Natriumdiatrizoat, einem jodierten nicht-ionischen Bestandteil, eingestellt auf eine Dichte von 1,077 ± 0,001.

Das ACCUSPIN™ Röhrchen wurde speziell mit zwei Kammern konzipiert, die durch eine poröse Barriere aus hochdichtem Polyethylen ("Fritte") abgetrennt werden. In die obere Kammer des Röhrchens kann antikoaguliertes Vollblut gegeben werden, ohne dass es sich mit dem HISTOPAQUE®-1077 in der unteren Kammer unterhalb der Fritte mischt. Beim Zentrifugieren gelangt das Vollblut durch die "Fritte" hindurch in Kontakt zum HISTOPAQUE®-1077. Die Elemente größerer Dichte verdrängen einen Teil des HISTOPAQUE®-1077 oberhalb der Fritte, was zu einer klaren Trennung der Blutbestandteile führt. Die Erythrozyten aggregieren, und die Granulozyten werden leicht hypertonsch, was ihre Sedimentierungsrate erhöht und zur Bildung von Pellets am Boden des ACCUSPIN™ Röhrchens führt. Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen, d.h. Monozyten, bleiben an der Plasma-HISTOPAQUE®-1077 Grenzfläche. Dieses dichte Band mononukleärer Zellen kann durch Abgießen des Inhalts der oberen Kammer oder mit einer Pipette entnommen werden. Die Erythrozytenkontamination wird durch die Barriere zwischen den beiden Kammern vermieden.



ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077

REAGENZ

ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077, Bestell-Nr. A 6929, A 7054 und A 0561

Ein strahlensterilisiertes Röhrchen aus Polypropylen mit einer Barriere ("Fritte") aus Polyethylen hoher Dichte mit aseptisch eingefülltem HISTOPAQUE®-1077.

HISTOPAQUE®-1077 enthält Polysaccharose, 5,7 g/dl und Natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl. Aseptisch gefiltert. Dichte 1,077 bei 25 °C.

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

Lagerung im Kühlschrank bei (2–8 °C). Vor Licht schützen. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der Verpackung angegeben.

PRODUKTVERFALL:

Ein trübes Aussehen zeigt den Verfall des Produkts an.

VORBEREITUNG:

ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 Reagenzien sind gebrauchsfertig. Vor Gebrauch auf 18–26 °C vorwärmen.

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 Lösungen sind SCHÄDLICH. Bei 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 Lösungen sind SCHÄDLICH. Bei 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 Testmethode kann eine absolute Gewähr dafür liefern, dass Blut- und Gewebepollen keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebepollen als potenziell infektiös behandelt werden.

Es kann defibriniertes oder antikoaguliertes (EDTA oder konservierungsmittelfreies Heparin), frisches Vollblut verwendet werden. Für optimale Ergebnisse sollte Blut innerhalb von 2 Stunden verarbeitet werden.

SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN:

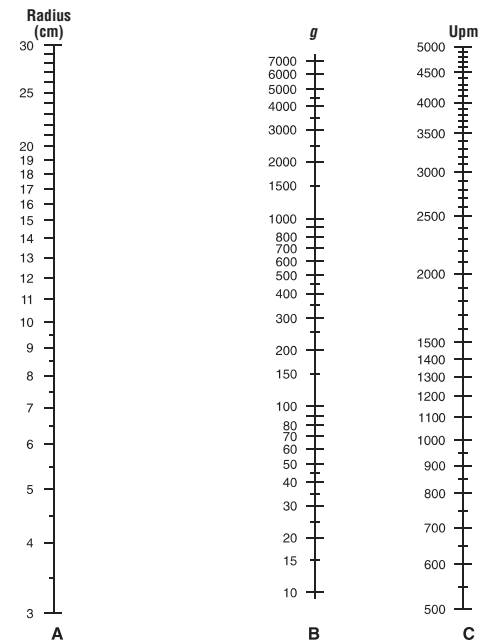
Zentrifugenröhrchen zum Waschen mononukleärer Zellen. Isotone phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) oder eine balancierte Salzlösung. Zentrifuge (Pendelbecherrotor) mit einer Kapazität von 100 bis 1000 x g, bei Aufrechterhaltung von 18–26 °C

HINWEISE:

- Drei bis 6 ml vorverdünntes Blut können mit Bestell-Nr. A 6929 oder 15 bis 30 ml vorverdünntem Blut mit Bestell-Nummern A 7054 und A 0561 verwendet werden. Das Blut kann direkt in der oberen Kammer des ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 Röhrchens verdünnt werden. Das ist für Proben mit einem Hämatokritwert oberhalb des Normalwerts angebracht.
- Die Entfernung großer Mengen von HISTOPAQUE®-1077 mit dem mononukleären Band erhöht die Granulozytenkontamination durch übriggebliebene Granulozyten, die unter der Grenzfläche verbleiben können (Tabelle I).
- Die Entfernung großer Mengen von Überstand mit dem mononukleären Band kann die Kontaminierung durch Plasmaproteine begünstigen.
- Die Verwendung anderer als der empfohlenen Volumina von verdünntem oder Vollblut kann zu einer verringerten Erholung führen.
- Zur Entfernung aller kontaminierenden Thrombozyten kann ein zweites Zentrifugieren ein einem 4 bis 20 % Saccharose-Gradienten durchgeführt werden, der über HISTOPAQUE®-1077 geschichtet wird. Der Saccharose-Gradient isoliert die Thrombozyten wirkungsvoll, während die mononukleären Zellen in die HISTOPAQUE®-1077 Schicht eindringen.
- Wenn das ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 nicht auf Raumtemperatur gebracht wird, kann dies zu einer eingeschränkten Erholung der mononukleären Zellen führen.
- Es kann gelegentlich vorkommen, dass während der Zentrifugierung eine Fritte verrutscht. In einem solchen Fall sollte nicht versucht werden, den Röhrcheninhalt abzugießen, um mononukleäre Zellen zu sammeln. Die Fritte sorgfältig mit einer sterilen Zange entfernen oder mit einer Pipette kippen und dann die mononukleären Zellen auffangen.

- Der Verfahrensabschnitt dieser Packungsbeilage beschreibt die Trennung von mononukleären Zellen mit isotoner phosphatgepuffert Kochsalzlösung als Verdünnungs- und Waschlösung. In vielen Fällen werden balancierte Salzlösungen oder ein Zellkulturmedium wie RPMI-1640, ergänzt durch fetales Rinderserum, bevorzugt.
- 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 kann ein Nomogramm verwendet werden.

Ermittlung der erforderlichen Umdrehungszahl für 1.000 oder 800 x g für die Verfahren Nr. A 6929 / A 7054 / A 0561.

- Den Radius (cm) vom Zentrum der Zentrifugenspindel zum Ende des Teströhrchenträgers messen. Diesen Wert auf der Skala A markieren.
- Die relative Zentrifugalkraft (d.h. 1.000 oder 800) auf der Skala B markieren.
- Mit einem Lineal eine gerade Linie zwischen den Punkten der Skala A und B ziehen und diese Linie zur Skala C verlängern. Der abgelesene Wert auf der Skala C ist die Einstellung der Umdrehungszahl für die Zentrifuge.

VERFAHREN:

- Die gewünschte Anzahl Zentrifugenröhrchen auf Raumtemperatur bringen. Vor Licht schützen. Falls sich vor dem Gebrauch HISTOPAQUE®-1077 oberhalb der "Fritte" befindet, 30 Sekunden mit 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren.
- Röhrchen mit einem Etikett versehen.
- 3,0 bis 6,0 ml frisches defibriniertes oder antikoaguliertes Vollblut in die obere Kammer jedes vorgefüllten ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 Röhrchens geben, Bestell-Nr. A 6929.
 ODER
 15,0 bis 30,0 ml frisches defibriniertes oder antikaguliertes Vollblut in die obere Kammer jedes vorgefüllten ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 Röhrchens geben, Bestell-Nr. A 7054 oder A 0561.
- Mit 1000 x g unter Aufrechterhaltung von 18–26 °C 10 Minuten zentrifugieren.
 ODER
 Mit 800 x g unter Aufrechterhaltung von 18–26 °C 15 Minuten zentrifugieren.
- Nach dem Zentrifugieren die Plasmaschicht mit einer Pasteur-Pipette sorgfältig bis 0,5 cm innerhalb der opaken Grenzfläche aspirieren, die mononukleäre Zellen enthält. Die Plasmaschicht ordnungsgemäß entsorgen.
- Das mononukleäre Band vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette in ein sauberes Zentrifugenröhrchen übertragen.

- Das mononukleäre Band durch Hinzugabe von 10 ml isotoner Phosphatpufferter Kochsalzlösung oder ausgewogener Salzlösung waschen und durch behutsames Aspirieren mit einer Pasteur-Pipette resuspendieren. Mit 250 x g unter Aufrechterhaltung von 18–26 °C 10 Minuten zentrifugieren.
- Schritt 7 zwei Mal wiederholen, das Zellpellet in 5 ml isotoner PBS resuspendieren.
- Das mononukleäre Zellpellet in einem für die Anwendung bei diesen Zellen geeigneten Medium resuspendieren.

LEISTUNGSMERKMALE

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

Die Tabelle unten zeigt die Ergebnisse einer Analyse des mononukleären Zellbands von gesunden menschlichen Blutproben, die gleichzeitig mit dem ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 und dem HISTOPAQUE®-1077 getrennt wurden.

TABELLE I

**ACCUSPIN™
SYSTEM-**

	HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Mittelwert ± SD		Mittelwert ± SD	

% Erholung ¹	70,0	13,3	53,6	8,9
% Lebensfähigkeit ²	98,0	1,1	95,0	2,7
% Lymphozyten ³	87,6	4,3	89,8	3,5
% Monozyten ³	9,1	3,8	8,3	3,0
% Granulozyten ³	3,0	2,7	2,3	1,8
% Erythrozyten ³	5,0	2,0	5,0	2,0
% Thrombozyten ³	< 5,0	2,0	< 5,0	2,0

- Anhand der Zählkammermethode und dem Differenzialblutbild der Wrightfärbung bestimmt.
- Anhand des Trypan-Blau-Ausschlusstests bestimmt.
- Anhand des Differenzialblutbilds der Wrightfärbung mononukleärer Fraktionen bestimmt.

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

LITERATURANGABEN

- Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):77, 1968
- 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

- Amos DB, Pool P: HLA Typing. Ibid, pp 797–804
- Winchester RJ, Ross G: Methods For Enumerating Lymphocyte Populations. Ibid, pp 64–76
- 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
- Brown L: Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, pp 33–39
- Eisen SA, Weaner HJ, Parker CW: Isolation of pure human peripheral blood lymphocytes using nylon wool columns. Immunol Commun 1:571, 1972
- Wysocki LJ, Sato VL: Panning for lymphocytes. A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA 75:6, pp 2844–2848, 1978
- 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
- 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
- Loken MR, Stall AM: Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. J Immunol Methods 50:R85, 1982
- Ting A, Morris PJ: A technique of lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang 20:561, 1971
- Fotino M, Merson EJ, Allen FH: Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci 1:131, 1971

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. A 6929 / A 7054 / A 0561
Vorherige Ausgabe: 2003-04
Revidiert: 2003-09



EC REP

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

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
Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

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