



# SIGMA-ALDRICH®

## ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

(Αρ. Διαδικασίας 1119)

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1119 και το HISTOPAQUE® - 1077 είναι μη αποστειρωμένα σκευάσματα που προορίζονται για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων και κοκκιοκυττάρων για ιστολογική εξέταση. Τα αντιδραστήρια HISTOPAQUE® - 1119 προορίζονται για "in vitro" διαγνωστική χρήση. Αυτό το υλικό χωρίς περαιτέρω διήθηση δεν είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια διαχωρισμένων κυττάρων. Ειδικά στην κυτταρική καλλιέργεια, το HISTOPAQUE® - 1119 δεν προορίζεται για διαγνωστική χρήση in vitro.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό αποτελούνται από ένα μέσο πολυσακχαρόζη και ένα ακτινοσκιερό μέσο. Το HISTOPAQUE®-1077 είναι διάλυμα ρυθμισμένο σε πυκνότητα 1,077. Όταν τοποθετηθεί στρώση αίματος πάνω στο HISTOPAQUE®-1077 και υποβληθεί σε φυγόκεντρο δύναμη, τα μονοπύρηνια κύτταρα παραμένουν στη διαχωριστική επιφάνεια του πλάσματος-HISTOPAQUE® ενώ τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα καθίζουν στον πυθμένα. Θα ήταν ισως ερικό να κατασκευαστεί ένα σύστημα όπου τα κύτταρα μελεοδοūs σεράς να μπορούσαν να συλλεχθούν χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ενός βήματος. Το HISTOPAQUE®-1119 αναπτύχθηκε για την επίτευξη αυτού του σκοπού και βασίζεται στις παρατηρήσεις των English και Andersen.<sup>1</sup>

Σύμφωνα με τη διαδικασία της Sigma-Aldrich, απαιτείται διπλή διαβάθμιση με τοποθέτηση ίσου όγκου HISTOPAQUE®-1077 πάνω από το HISTOPAQUE®-1119. Συνολικό αίμα τοποθετείται προσεκτικά πάνω στο ανώτερο στρώμα του μέσου HISTOPAQUE®-1077. Στη συνέχεια οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στα 700 x g επί 30 λεπτά. Τα κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής σειράς ανευρίσκονται στη διαχωριστική επιφάνεια 1077/1119 ενώ τα λεμφοκύτταρα, άλλα μονοπύρηνια κύτταρα και τα αιμοπετάλια βρίσκονται στη διαχωριστική επιφάνεια πλάσματος/1077.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ

**HISTOPAQUE®-1119**, Αρ. Καταλόγου 1119-1  
Πολυσακχαρόζη, 6,0 g/dl και διατρίζοικό νάτριο, 16,7 g/dl.

#### ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ:

Το HISTOPAQUE®-1119 φυλάσσεται σε ψυγείο (2 έως 8 °C). Προστατέψτε από το φως. Οι ετικέτες αντιδραστηρίων φέρουν ημερομηνία λήξης.

#### ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ:

Θολή εμφάνιση υποδηλώνει αποσύνθεση του προϊόντος.

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ:

Το HISTOPAQUE®-1119 είναι έτοιμο για χρήση. Θερμάνετε στους 18 έως 26 °C πριν τη χρήση.

Αν η προοριζόμενη χρήση των διαχωρισμένων κυττάρων περιλαμβάνει στη συνέχεια καλλιέργεια, το HISTOPAQUE®-1119 πρέπει να αποστειρώνεται με φίλτρο πριν από το διαχωρισμό των κυττάρων. Για εφαρμογές κατά τις οποίες απαιτείται αποστείρωση, το HISTOPAQUE®-1119 πρέπει να αποστειρώνεται με φίλτρο πριν από τη χρήση.

#### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνθησιμένες προφυλάξεις που εφαρμόζονται στο χειρισμό αντιδραστηρίων στο εργαστήριο. Κατά την επαφή με ουσίες ανθρώπινης προέλευσης, πρέπει να μεταχειρίζεστε όλα τα αντιδραστήρια και τον εξοπλισμό ως πιθανά βιολογικά επικίνδυνα. Απορρίψτε τα απόβλητα λαμβάνοντας υπόψη όλους τους τοπικούς, κρατικούς, επαρχιακούς ή εθνικούς κανονισμούς. Ανατρέξτε στο Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας Υλικού για οποιοδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνου, ατυχήματος ή ασφάλειας.

Κίνδυνοι και Δηλώσεις Ασφαλείας στις Η.Π.Α

Τα διαλύματα HISTOPAQUE®1077-1 και 1119-1 είναι ΒΛΑΒΕΡΑ. Είναι πιθανόν να προκαλέσουν ευαισθητοποίηση αν τα εισπνεύσετε και κατά την επαφή με το δέρμα. Να φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό. Όργανα στόχοι: Αίμα.

Κίνδυνοι και Δηλώσεις ασφαλείας στην ΕΕ

Τα διαλύματα HISTOPAQUE®1077-1 και 1119-1 είναι ΒΛΑΒΕΡΑ. Είναι πιθανόν να προκαλέσουν ευαισθητοποίηση αν τα εισπνεύσετε και κατά την επαφή με το δέρμα. Μην εισπνεύετε τις αναθυμιάσεις. Να φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό και γάντια. Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν δεν αισθάνεστε καλά, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείτε την ετικέτα όπου είναι δυνατό).

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ:

Συνιστάται η συλλογή δειγμάτων να διεξάγεται σύμφωνα με το έγγραφο M29-A2 του NCCLS. Καμία γνωστή μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να προσφέρει απόλυτη διαβεβαίωση ότι τα δείγματα αίματος ή ιστού δεν μεταδίδουν λοιμώξεις. Επομένως, όλα τα παράγωγα αίματος ή δείγματα ιστών πρέπει να θεωρούνται ενδεχομένως λοιμώδη.

Συλλέξτε 6 mL φλεβικού αίματος σε ηπαρίνη ή EDTA χωρίς συντηρητικά.

**ΕΙΔΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ:** HISTOPAQUE®-1077, Αρ. Καταλόγου 1077-1, Πολυσακχαρόζη, 5,7 g/dl, και διατρίζοικό νάτριο, 9,0 g/dl.

Φυγόκεντρος (ρόττας αιωρούμενων υποδοχών, swing) με δυνατότητα παραγωγής 700 x g

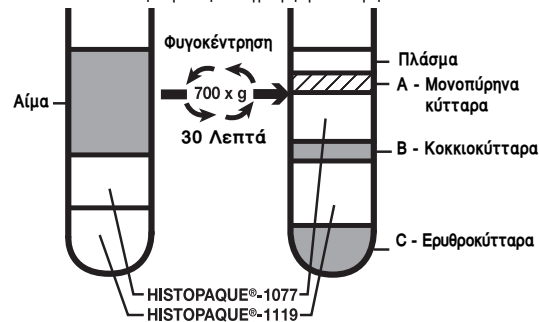
Σωλήνες φυγοκέντρησης, 15 mL πλαστικοί, κωνικοί

#### ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

1. Αν η προοριζόμενη χρήση των διαχωρισμένων κυττάρων περιλαμβάνει στη συνέχεια καλλιέργεια, το HISTOPAQUE®-1119 πρέπει να αποστειρώνεται με φίλτρο πριν από το διαχωρισμό των κυττάρων. Για εφαρμογές κατά τις οποίες απαιτείται αποστείρωση, το HISTOPAQUE®-1119 πρέπει να αποστειρώνεται με φίλτρο πριν από τη χρήση. Το προϊόν αυτό προορίζεται μόνο για χρήση in vitro. Τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί με HISTOPAQUE® δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για διαδικασίες "in vivo".
2. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σωλήνες φυγοκέντρου 50 mL. Μεταβάλετε την διαδικασία που αναφέρεται χρησιμοποιώντας 12 mL από το HISTOPAQUE®-1077, 12 mL από το HISTOPAQUE®-1119 και 24 mL συνολικό ή αραιωμένου αίματος.
3. Υπάρχει περίπτωση να απαιτείται το αίματος 1:2 ή 1:4, ανάλογα με τους απόλυτους αριθμούς κυττάρων. Υπάρχει πιθανότητα υπερφόρτωσης της διαβάθμισης.
4. Αποφύγετε τη χρήση γαντιών με πούδρα. Η πούδρα των γαντιών ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και προκαλεί μείωση της απόδοσης.
5. Αποφύγετε τη χρήση πλαστικών υψηλής πρόσδεσης όπως πολυστυρένιο. Το πολυστυρένιο μπορεί να προσδέσει κύτταρα στα τοιχώματα των σωλήνων φυγοκέντρησης.
6. Παρασκευάστε τη διαβάθμιση αμέσως πριν τη χρήση. Η παρασκευή των διαβαθμίσεων από πριν επιτρέπει διάχυση και επιφέρει χαμηλή ανάκτηση κυττάρων.
7. Η τοποθέτηση του HISTOPAQUE®-1119 από κάτω παράγει επίσης μια αποδεκτή διαβάθμιση.
8. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιπηκτικά, ωστόσο, η επιλογή του αντιπηκτικού μπορεί να επηρεάσει την ανάκτηση κυττάρων. Καθώς το αίμα παλινώνει η ανάκτηση κυττάρων μειώνεται.
9. Η Ενότητα της Διαδικασίας στο παρόν ένθετο περιγράφει τη χρήση ιστονομικού ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ως αραιωτικού και υγρού εκπλύσεως. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιδραστήρια όπως το κυτταρικό μέσον RPMI 1640 συμπληρωμένο με εμβρυικό βόειο ορό.
10. Η διαδικασία που περιγράφεται είναι για απομόνωση κυττάρων από 6 mL συνολικό αίματος. Αν απαιτείται οι όγκοι μπορούν να αυξηθούν ή να μειωθούν.
11. Συνιστάται η χρήση ενός "κανονικού" ασθενούς ως μάρτυρα για κάθε εκτέλεση.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Τα rpm που απαιτούνται για την παραγωγή 700 x g μπορούν να υπολογιστούν με τη χρήση του νομογράμματος που υπάρχει σε αυτό το ένθετο.

5. Αφαιρέστε προσεκτικά τους σωλήνες φυγοκέντρησης. Πρέπει να υπάρχουν δύο διακριτά αδιαφανή στρώματα (στρώματα Α και Β στην παραπάνω Εικόνα).
6. Αναρροφήστε και απορρίψτε το υγρό μέχρι 0,5 cm από το στρώμα Α. Μεταφέρετε τα κύτταρα από αυτό το στρώμα σε σωλήνα με την επιγραφή "μονοπύρηνια".



7. Αναρροφήστε και απορρίψτε το υπόλοιπο υγρό μέχρι 0,5 cm από το στρώμα Β. Μεταφέρετε τα κύτταρα από αυτό το στρώμα σε ένα σωλήνα με την επιγραφή "κοκκιοκύτταρα".
8. Ξεπλύνετε τα κύτταρα με προσθήκη 10 mL ιστονομικού ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών στους σωλήνες. Φυγοκεντρήστε επί 10 λεπτά στα 200 x g. Αφαιρέστε το υπερκείμενο και απορρίψτε το.
9. Επαναωρήστε τα κύτταρα με ήπια αναρρόφηση με πιπέτα Pasteur.
10. Επαναλάβετε τα Βήματα 8 και 9 δύο φορές.
11. Επαναωρήστε τα κύτταρα σε κατάλληλο όγκο ιστονομικού ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

Σε αυτό το σημείο μπορούν να πραγματοποιηθούν ποικίλες δοκιμασίες. Οι διαδικασίες επιλέγονται σύμφωνα με την προσωπική σας κρίση.

### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Τα ερυθροκύτταρα πρέπει να καθίζανουν στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης. Τα κοκκιοκύτταρα πρέπει να σχηματίζουν ζώνη στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του HISTOPAQUE®-1119 και του HISTOPAQUE®-1077. Τα μονοπύρηνια κύτταρα πρέπει να σχηματίσουν ζώνη στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του HISTOPAQUE®-1077 και του πλάσματος.

Αν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν αποκλίνουν από τα αναμενόμενα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Εξυπηρέτηση της Sigma-Aldrich για βοήθεια.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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

Το HISTOPAQUE είναι σήμα κατατεθέν της Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO ΗΠΑ

Η Sigma-Aldrich, Inc. εγγυάται ότι τα προϊόντα της συμμορφώνονται με τις πληροφορίες που περιέχονται σε αυτή και σε άλλες εκδόσεις της Sigma-Aldrich. Ο αγοραστής πρέπει να καθορίζει την καταλληλότητα του(ων) προϊόντος(ων) για τη συγκεκριμένη χρήση τους. Πιθανόν να ισχύουν πρόσθετοι όροι και συνθήκες. Βλ. αντίστροφη πλευρά του τιμολογίου ή της ταμίας συσκευασίας για επιπλέον όρους και συνθήκες πώλησης.

Αρ. Διαδικασίας 1119  
Προηγούμενη αναθεώρηση: 2009-11  
Αναθεωρημένη: 2010-01

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

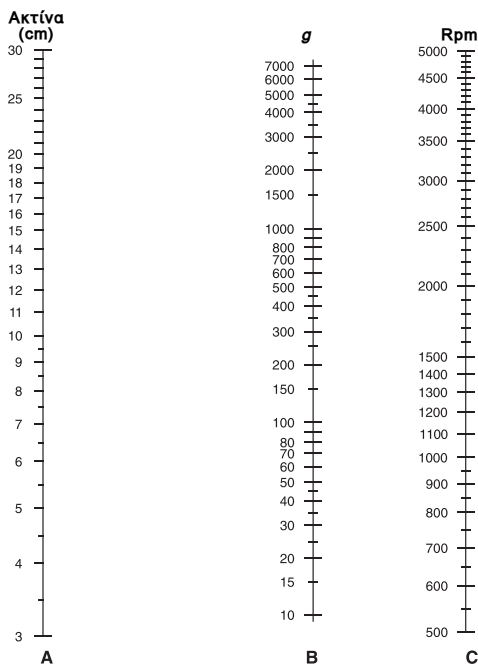
Τεχνική υπηρεσία: χρωστική κλήση  
+1 314 771 3122

ή αποστολή e-mail στο clintech@sial.com

Για παραγγελία: χρωστική κλήση  
+1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

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



#### ΝΟΜΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ:

Για την ανεύρεση της ρύθμισης rpm της φυγοκέντρου σας χρησιμοποιείται ένα νομογράμμο.

Τρόπος προσδιορισμού των rpm που απαιτούνται για την επίτευξη 700 x g για τη Διαδικασία Αρ. 1119.

1. Μετρήστε την ακτίνα (σε cm) από το κέντρο του άξονα της φυγοκέντρου μέχρι το άκρο του φορέα του δοκιμαστικού σωλήνα. Σημειώστε αυτή την τιμή στην κλίμακα Α.
2. Σημειώστε τη σχετική φυγόκεντρο δύναμη (π.χ. 700) στην κλίμακα Β.
3. Με ένα κανόνα, τραβήξτε μια ευθεία γραμμή μεταξύ των σημείων στις στήλες Α και Β, προεκτείνοντάς την ώστε να συναντήσει τη στήλη C. Η τιμή στην στήλη C είναι η ρύθμιση rpm για τη φυγόκεντρο.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

1. Προσθέστε 3 mL HISTOPAQUE®-1119, σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρησης 15 mL.
2. Τοποθετήστε προσεκτικά 3 mL HISTOPAQUE®-1077, πάνω από το HISTOPAQUE®-1119.
3. Τοποθετήστε προσεκτικά 6 mL συνολικού αίματος πάνω στην ανώτερη διαβάθμιση του σωλήνα από το Βήμα 2.
4. Φυγοκεντρήστε στα 700 x g επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C). Η φυγοκέντρηση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, όπως στους 4 °C, μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση των κυττάρων και μειωμένη ανάκτηση.