



SIGMA-ALDRICH™

**ΣΥΣΤΗΜΑ ACCUSPIN™
HISTORAPQUE®-1077**

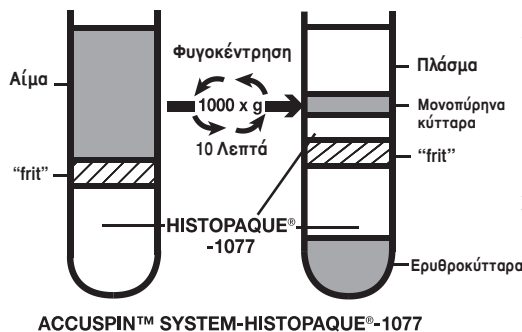
(Αρ. Διαδικασίας A 6929 / A 7054 / A 0561)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το σύστημα ACCUSPIN™-HISTORAPQUE®-1077 της Sigma-Aldrich προορίζεται για χρήση σε απομόνωση λεμφοκυττάρων και άλλων μονοπύρηνων κυττάρων. Τα αντιδραστήρια ACCUSPIN™-HISTORAPQUE®-1077 προορίζονται για "In Vitro Διαγνωστική Χρήση".

Ο διαχωρισμός λεμφοκυττάρων και άλλων μονοπύρηνων κυττάρων (MNC) από συνολικό αίμα και μυελό των οστών με χρήση του HISTORAPQUE®-1077 βασίζεται σε μέθοδο που περιγράφηκε κατ' αρχήν από τον Boyum¹ το 1968. Το μέσον διαχωρισμού HISTORAPQUE®-1077 είναι ένα υδατικό διάλυμα πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους και διατριζοϊκού νατρίου, μιας μη ιοντικής ιωδιωμένης χημικής ένωσης, ρυθμισμένο σε πυκνότητα 1,077 ± 0,001.

Ο Σωλήνας ACCUSPIN™ είναι ειδικά σχεδιασμένος και περιέχει δύο θαλάμους χωρισμένους από ένα πορώδες πολυαιθυλενικό φράγμα υψηλής πυκνότητας ("frit"). Συνολικό αίμα με αντιπηκτικό μπορεί να προστεθεί στον ανώτερο θάλαμο του σωλήνα χωρίς κίνδυνο ανάμιξης με το HISTORAPQUE®-1077 στον κατώτερο θάλαμο κάτω από το frit. Κατά τη φυγοκέντρηση, το συνολικό αίμα κατεβαίνει μέσα από το "frit" για να έρθει σε επαφή με το HISTORAPQUE®-1077. Τα στοιχεία με μεγαλύτερη πυκνότητα εκτοπίζονται ένα όγκο HISTORAPQUE®-1077 πάνω από το "frit" παρέχοντας σαφή διαχωρισμό των συστατικών του αίματος. Τα ερυθροκύτταρα συσσωματώνονται και τα κοκκιοκύτταρα γίνονται ελαφρώς υπέρτονα, αυξάνοντας τον ρυθμό καθίζησής τους, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα του Σωλήνα ACCUSPIN™. Τα λεμφοκύτταρα και άλλα μονοπύρηνων κύτταρα, δηλ. τα μονοκύτταρα, παραμένουν στη διαχωριστική επιφάνεια πλάσματος-HISTORAPQUE®-1077. Αυτή η πυκνή ζώνη μονοπύρηνων κυττάρων μπορεί να συλλεχθεί με απομάκρυνση του περιεχομένου του ανώτερου θαλάμου ή με μια πιπέτα. Η μόλυνση από ερυθροκύτταρα αποφεύγεται εξαιτίας του φράγματος μεταξύ των θαλάμων.



ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ

Σύστημα ACCUSPIN™-HISTORAPQUE®-1077,

Αρ. Καταλόγου A 6929, A 7054 και A 0561

Ένας πολυπροπυλενικός σωλήνας αποστειρωμένος με ακτινοβολία με προσαρμοσμένο ένα πολυαιθυλενικό φράγμα υψηλής πυκνότητας ("frit"), σσηπτικά συμπληρωμένος με HISTORAPQUE®-1077.

Το HISTORAPQUE®-1077, περιέχει πολυσακχαρόζη, 5,7 g/dL και διατριζοϊκό νάτριο, 9,0 g/dL. Ασηπτικά φιλτραρισμένο. Πυκνότητα 1,077 στους 25 °C.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ:

Φυλάσσεται σε ψυγείο (2-8 °C). Προστατέψτε από το φως. Η ετικέτα στο κουτί φέρει ημερομηνία λήξης.

ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ:

Θολή εμφάνιση υποδηλώνει αποσύνθεση του προϊόντος.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ:

Τα αντιδραστήρια του συστήματος ACCUSPIN™-HISTORAPQUE®-1077 είναι έτοιμα για χρήση. Θερμάνετε στους 18 έως 26 °C πριν τη χρήση.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Πρέπει να ακολουθούνται οι συνηθισμένες 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 οποιεσδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνου, ατυχήματος ή ασφάλειας.

Κίνδυνοι και Δηλώσεις Ασφαλείας στις Η.Π.Α

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

Κίνδυνοι και Δηλώσεις ασφαλείας στην ΕΕ

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

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί φρέσκο συνολικό αίμα απινωδογονωμένο ή με αντιπηκτικό (EDTA ή ηπαρίνη χωρίς συντηρητικό). Για καλύτερα αποτελέσματα, το αίμα πρέπει να υφίσταται την επεξεργασία μέσα σε 2 ώρες.

ΕΙΔΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ:

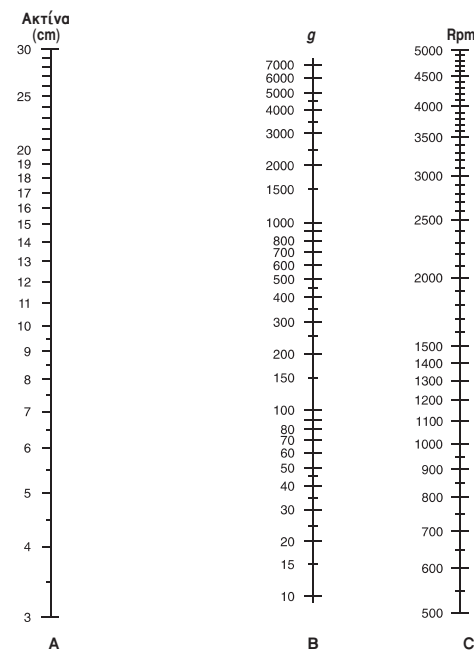
Σωλήνες φυγοκέντρησης για πλύσιμο των μονοπύρηνων κυττάρων
Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ή ισορροπημένο διάλυμα αλάτων
Φυγόκεντρος (ρότορας αιωρούμενων υποδοχών, swing) με δυνατότητα παραγωγής από 100 έως 1000 x g, διατηρώντας 18-26 °C

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν 3 έως 6 mL προαραιωμένου αίματος με Αρ. Καταλόγου A 6929 ή 15 έως 30 mL προαραιωμένου αίματος με Αρ. Καταλόγου A 7054 και A 0561. Το αίμα μπορεί να αραιωθεί απευθείας στον ανώτερο θάλαμο του σωλήνα του συστήματος ACCUSPIN™-HISTORAPQUE®-1077. Αυτό είναι κατάλληλο για δείγματα με αιματοκρίτη πάνω από το φυσιολογικό.
- Η αφαίρεση περίσσειας HISTORAPQUE®-1077 με τη ζώνη των μονοπύρηνων αυξάνει τη μόλυνση με κοκκιοκύτταρα από τα υπολειπόμενα κοκκιοκύτταρα τα οποία μπορεί να παραμείνουν στη διαχωριστική επιφάνεια με τα μονοπύρηνων (Πίνακας 1).
- Η αφαίρεση περίσσειας υπερκείμενου με τη ζώνη των μονοπύρηνων μπορεί να επιφέρει μόλυνση με πρωτεΐνες πλάσματος.
- Η χρήση όγκων προ-αραιωμένου ή συνολικού αίματος εκτός αυτών που συνιστώνται μπορεί να προκαλέσει μείωση της ανάκτησης.

- Για να αφαιρέσετε όλα τα αιμοπετάλια που προκαλούν μόλυνση, μπορεί να γίνει δεύτερη φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση σακχαρόζης 4 έως 20 % τοποθετημένη πάνω από HISTORAPQUE®-1077. Η διαβάθμιση σακχαρόζης απομονώνει αποτελεσματικά τα αιμοπετάλια ενώ τα μονοπύρηνων κύτταρα διεισδύουν στο στρώμα του HISTORAPQUE®-1077.
- Αν το -HISTORAPQUE®-1077 Σύστημα ACCUSPIN™ δεν βρεθεί σε θερμοκρασία δωματίου μπορεί να προκληθεί περιορισμένη ανάκτηση μονοπύρηνων κυττάρων.
- Υπάρχει περίπτωση το frit να εκτοπιστεί κατά τη φυγοκέντρηση. Αν συμβεί αυτό, μην επιχειρήσετε να αδειάσετε το περιεχόμενο του σωλήνα για να συλλέξετε τα μονοπύρηνων κύτταρα. Αντίθετα, αφαιρέστε απαλά το frit με αποστειρωμένη λαβίδα ή γύρετε το frit με μια πιπέτα και μετά συλλέξτε τα μονοπύρηνων κύτταρα.
- Η ενότητα της διαδικασίας αυτού του ένθετου περιγράφει τον διαχωρισμό μονοπύρηνων κυττάρων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ως αραιωτικό και υγρό έκπλυσης. Σε πολλές περιπτώσεις, προτιμώνται ισορροπημένα διαλύματα αλάτων ή θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας όπως RPMI -1640 συμπληρωμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό.
- Συνιστάται η χρήση ενός "κανονικού" ασθενούς ως μάρτυρα για κάθε εκτέλεση.

ΝΟΜΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ ΠΡΟΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ:



Για την ανεύρεση της ρύθμισης rpm της φυγοκέντρου σας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα νομόγραμμα.

Τρόπος προσδιορισμού των rpm που απαιτούνται για την επίτευξη 1000 ή 800 x g για την Διαδικασία Αρ. A 6929 / A 7054 / A 0561.

- 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.
- Σημειώστε τη σχετική φυγόκεντρο δύναμη (π.χ. 1000 ή 800) στην κλίμακα Β.
- 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:

- Αφήστε να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου οι απαιτούμενοι σωλήνες. Προστατέψτε από το φως. Αν υπάρχει HISTORAPQUE®-1077 πάνω από το "frit" πριν από τη χρήση, φυγοκεντρώστε στα 1000 x g για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Βάλτε ετικέτες στους σωλήνες.
3. Χύστε ελεύθερα 3,0 έως 6,0 mL φρέσκο συνολικό αίμα απινωδογονωμένο ή με αντιπηκτικό στον ανώτερο θάλαμο του κάθε προ-πληρωμένου σωλήνα συστήματος ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077, Αρ. Καταλόγου A 6929.
Ή
Χύστε ελεύθερα 15,0 έως 30,0 mL φρέσκο συνολικό αίμα απινωδογονωμένο ή με αντιπηκτικό στον ανώτερο θάλαμο του κάθε προ-πληρωμένου σωλήνα συστήματος ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077, Αρ. Καταλόγου A 7054 ή A 0561.
4. Φυγοκεντρήστε στα 1000 x g, διατηρώντας 18-26 °C, για 10 λεπτά.
Ή
Φυγοκεντρήστε στα 800 x g, διατηρώντας 18-26 °C, για 15 λεπτά.
5. Μετά τη φυγοκέντρηση, αναρροφήστε προσεκτικά το στρώμα πλάσματος, με πιπέτα Pasteur, μέχρι το 0,5 cm από την αδιαφανή διαχωριστική επιφάνεια που περιέχει τα μονοκύτταρα. Απορρίψτε κατάλληλα το στρώμα του πλάσματος.
6. Μεταφέρετε προσεκτικά τη ζώνη των μονοκύτταρων, με πιπέτα Pasteur σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρου.
7. Πλύνετε τη ζώνη των μονοκύτταρων προσθέτοντας 10 mL ισοτονικού PBS ή ισορροπημένου διαλύματος αλάτων και επαναωρήστε τα κύτταρα με ήπια αναρρόφηση με πιπέτα Pasteur. Φυγοκεντρήστε στα 250 x g, διατηρώντας 18-26 °C, για 10 λεπτά.
8. Επαναλάβετε το Βήμα 7 δύο φορές, επαναωρήστε το ίζημα σε 5 mL ισοτονικού PBS.
9. Επαναωρήστε το ίζημα μονοκύτταρων στο κατάλληλο μέσο με βάση την εφαρμογή αυτών των κυττάρων.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Τα ερυθροκύτταρα και κοκκιοκύτταρα πρέπει να καθιζάνουν στον πυθμένα του σωλήνα ACCUSPIN™. Τα μονοκύτταρα κύτταρα πρέπει να σχηματίζουν ζώνη στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του HISTOPAQUE®-1077 και του πλάσματος.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει αποτελέσματα από ανάλυση ζώνης μονοκύτταρων κυττάρων από δείγματα αίματος υγιών ατόμων που διαχωρίστηκαν παράλληλα με το σύστημα ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 και το HISTOPAQUE®-1077.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

	ΣΥΣΤΗΜΑ ACCUSPIN™		-	
	HISTOPAQUE®-1077 Μέσος όρος ±SD	HISTOPAQUE®-1077 Μέσος όρος ±SD	HISTOPAQUE®-1077 Μέσος όρος ±SD	HISTOPAQUE®-1077 Μέσος όρος ±SD
% Ανάκτηση ¹	70,0	13,3	53,6	8,9
% Βιωσιμότητα ²	98,0	1,1	95,0	2,7
% Λεμφοκύτταρα ³	87,6	4,3	89,8	3,5
% Μονοκύτταρα ³	9,1	3,8	8,3	3,0
% Κοκκιοκύτταρα ³	3,0	2,7	2,3	1,8
% Ερυθροκύτταρα ³	5,0	2,0	5,0	2,0
% Αιμοπετάλια ³	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Προσδιορίστηκε με αιμοσφαιριόμετρο και διαφορική καταμέτρηση χρώσης Wright's.
2. Προσδιορίστηκε με δοκιμασία αποκλεισμού χρωστικής Trypan blue.
3. Προσδιορίστηκε με διαφορική καταμέτρηση χρώσης Wright's του κλάσματος των μονοκύτταρων.

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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 ταινίας συσκευασίας για επιπλέον όρους και συνθήκες πώλησης.

Αρ. Διαδικασίας A 6929 / A 7054 / A 0561
Προηγούμενη αναθεώρηση: 2003-04
Αναθεωρημένη: 2003-09



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 στείλτε e-mail στην clintech@sial.com

Για παραγγελίες: χρωστική κλήση +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany 49-7329-970