SIGMA-ALDRICH®

LEUKOCYTE SEPARATION

(Eljárás száma: 1119)

FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1119 és a HISTOPAQUE® - 1077 nem steril preparátumok, amelyek a mononukleáris sejtek és a granulociták hisztológiai vizsgálathoz szükséges izolálására javalltak. A HISTOPAQUE® - 1119 reagensek in vitro diagnosztikai felhasználásra javalltak. **Ez az anyag további filterezés nélkül nem alkalmas szeparált sejtek tenyésztésére. A sejttenyészet-specifikus HISTOPAQUE® - 1119 nem javallt in vitro diagnosztikai célra.**

Az erre a célra használt oldatok egy poliszukrózt és egy sugár át nem eresztő közeget tartalmaznak. A HISTOPAQUE®-1077 egy olyan oldat, melynek sűrűségét 1,077-re állították be. Amikor a vért a HISTOPAQUE®-1077-re rétegezik és centrifugális erőnek teszik ki, a mononukleáris sejtek a plazma HISTOPAQUE® köztifázisban maradnak, míg az eritrociták és a granulociták az aljára gravitálnak. Megvalósíthatónak tűnne egy olyan rendszer megtervezése, mely által a mieloid sorozatú sejtek is begyűjthetőek lennének egy lépéses eljárásban. A HISTOPAQUE®-1119-et e célból fejlesztették ki és English és Andersen megfigyelésein alapul.[1]

A Sigma-Aldrich eljárás szerint egy dupla gradiens képződik az egyenlő térfogatú HISTOPAQUE®-1077 HISTOPAQUE®-1119 fölé rétegzésével. Az egész vért óvatosan a felső HISTOPAQUE®-1077 közegre rétegzik. Ezután a csöveket 700 x g-on 30 percig centrifugálják. A granulocita sorozat sejtjei az 1077/1119 interfázisban találhatók, mivel a limfociták, az egyéb mononukleáris sejtek és vérlemezkék a plazma/1077 interfázisban vannak.

REAGENS

HISTOPAQUE®-1119, Katalógus szám: 1119-1
Poliszukróz, 6,0 g/dl és nátrium-diatrizoát, 16,7 g/dl.

TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

A HISTOPAQUE®-1119 hűtőszekrényben (2–8 °C) tárolandó. Fénytől védjék. A reagens címkéjén feltüntették a lejárati időt.

MEGROMLÁS:

A zavaros megjelenés a termék megromlását jelzi.

ELŐKÉSZÍTÉS:

A HISTOPAQUE®-1119 használatra kész. Használat előtt 18–26 °C-ra melegítendő.

Ha a felhasználási cél a szeparált sejteknél utólagos tenyészetet jelent, akkor a HISTOPAQUE®-1119-t sterilen kell filterezni a sejtek szeparálása előtt. Azoknál az alkalmazásoknál, amelyek megkövetelik a sterilitást, a HISTOPAQUE®-1119 sterilt filtert kell előzetesen használni.

ÓVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagensekkel történő munka során a szokásos óvintézkedéseket be kell tartani. Mivel humán származású anyagokkal érintkeznek, az összes reagenst és berendezést kezeljék potencionálisan bio-veszélyesként. A hulladékot az összes helyi, állami, tartományi vagy nemzeti szabály figyelembevételével kell megsemmisíteni. A friss kockázati, veszély vagy biztonsági információk az anyagbiztonsági adatlapban találhatók.

Az Amerikai Egyesült Államok kockázati és biztonsági mondatai

A HISTOPAQUE®1077-1 és 1119-1 oldatok ÁRTALMASAK. Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáció)! Megfelelő védőruházatot kell viselni. Célszerv: Vér.

Az Európai Unió kockázati és biztonsági mondatai

A HISTOPAQUE®1077-1 és 1119-1 oldatok ÁRTALMASAK. Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáció)! A keletkező gőzt nem szabad belélegezni. Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni. Baleset vagy rosszullét esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.

ELJÁRÁS

MINTA BEGYŰJTÉSE:

Javasolt a minta begyűjtését az M29-A2. sz. NCCLS dokumentum szerint végezni. Semmilyen ismert módszer nincs, mely teljesen biztosítja, hogy a vérminták vagy a szövet ne terjesszen fertőzést. Ezért, minden vér származékot vagy szövetet lehetségesen fertőzőnek kell tekinteni.

A 6 ml vénás vért tartósítószer-mentes heparinban vagy EDTA-ban gyűjtsék.

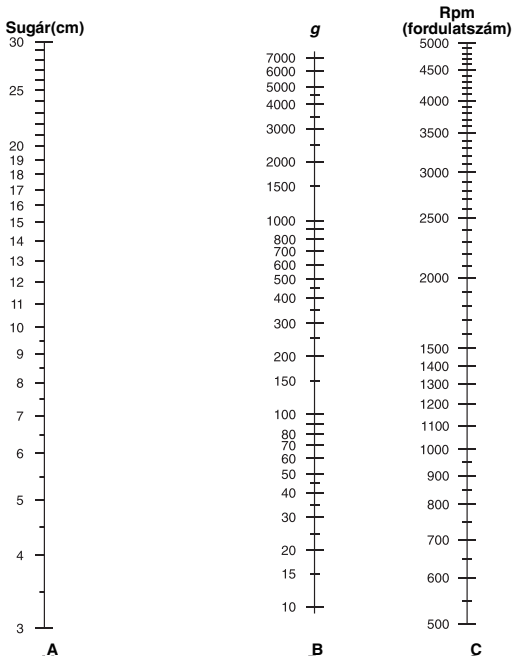
SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK:

HISTOPAQUE®-1077, katalógus szám: 1077-1, poliszukróz, 5,7 g/dl, és nátrium-diatrizoát, 9,0 g/dl.
700 x g generálására képes centrifuga (forgó kosaras rotor)
Centrifuga csövek, 15 ml-es műanyag, kúpos

MEGJEGYZÉSEK:

1. **Ha a felhasználási cél a szeparált sejteknél utólagos tenyészetet jelent, akkor a HISTOPAQUE®-1119-t sterilen kell filterezni a sejtek szeparálása előtt. Azoknál az alkalmazásoknál, amelyek megkövetelik a sterilitást, a HISTOPAQUE®-1119 sterilt filtert kell előzetesen használni. A termék kizárólag „in vitro" használatra készült. A HISTOPAQUE® használatával izolált sejteket nem szabad „in vivo" eljárásoknál használni.**
2. 50 ml-es centrifuga csövek használhatók. Módosítsák a megállapított eljárást, 12 ml HISTOPAQUE®-1077, 12 ml HISTOPAQUE®-1119 és 24 ml egész vagy hígított vér használatával.
3. Bizonyos okokból szükség lehet a vér 1:2 vagy 1:4 arányú hígítására az abszolút sejtszám függvényében. A gradiens túlterhelésének lehetősége fennáll.
4. Kerüljék a púderezett kesztyűk használatát. A kesztyű púder aktiválja a monocitákat és alacsonyabb kitermelést okoz.
5. Kerüljék a polisztirol féle nagy kötő műanyagok használatát. A polisztirol a centrifuga cső falához kötheti a sejteket.
6. A gradienst közvetlenül használat előtt készítsék el. A gradiens előre elkészítése diffúzió előfordulását teszi lehetővé és alacsony sejt visszanyerést eredményez.
7. A HISTOPAQUE®-1119 alárétegzése szintén elfogadható gradienst produkál.
8. Egyéb antikoagulánsok használhatók, azonban az antikoaguláns kiválasztása befolyásolhatja a sejt visszanyerést. A vér öregedésével a sejt visszanyerés csökken.
9. Jelen kiadvány eljárási része izotón foszfát pufferelt sóoldat használatát alkalmazza oldószerként és mosófolyadékként. Egyéb reagensek (pl. magzati szarvasmarha szérummal kiegészített RPMI 1640 sejtközeg) is használhatók.
10. A leírt eljárás 6 ml egész vér sejt izolálására javallt. A térfogatok szükség szerint növelhetők vagy csökkenthetők.
11. A „normál" beteg használata javasolt kontrollként minden vizsgálatnál.

NOMOGRAM A RELATÍV CENTRIFUGÁLIS ERŐK MEGHATÁROZÁSÁHOZ:



Nomogram használható a centrifuga fordulatszámának beállításához.

Hogyan vezessék be a 700 x g -hoz szükséges fordulatszámot az 1119. sz. eljárás során.

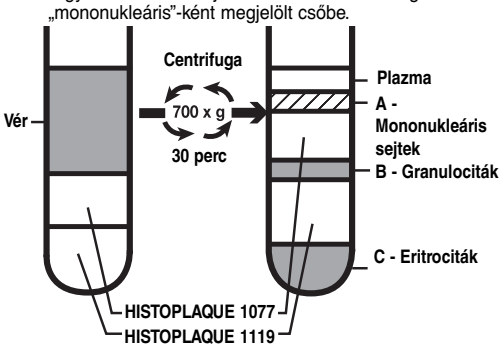
1. Mérjék meg a centrifuga orsójának középpontjától a vizsgálati cső tartójának végéig a sugarat (cm)! Jelöljék ezt az értéket az A skálán.
2. Jelöljék a relatív centrifugális erőt (pl. 700) a B skálán.
3. Vonalzóval húzzanak egyenes vonalat az A és B oszlopon lévő pontok közé, keresztezve a C oszlopot. A C oszlopon leolvasható érték a centrifuga fordulatszám beállítása.

ELJÁRÁS:

1. Tegyenek 3 ml HISTOPAQUE®-1119-t egy 15 ml-es kúpos centrifuga csőbe.
2. Óvatosan rétegezzenek 3 ml HISTOPAQUE®-1077-t a HISTOPAQUE®-1119-re.
3. Óvatosan rétegezzenek 6 ml egész vért a cső, 2. lépésből származó felső gradiensére.
4. Centrifugálják 700 x g-n 30 percig szobahőmérsékleten (18–26 °C). Alacsonyabb hőmérsékleten (pl: 4 °C) a centrifugálás sejt összetapadást és gyenge visszanyerést eredményezhet.

MEGJEGYZÉS: A 700 x g generálásához szükséges fordulatszám a kiadványban található nomogrammal kiszámítható.

5. Óvatosan vegyék ki a centrifuga csöveket. Két különböző átlátszatlan réteget kell megfigyelni (A és B réteg az alábbi ábrán).
6. Szívják le és semmisítsék meg az A réteg 0,5 cm-t. Vigyék át a sejteket ebből a rétegből a „mononukleáris"-ként megjelölt csőbe.



7. Szívják le és semmisítsék meg a B réteg 0,5 cm-n maradó folyadékot. Vigyék át a sejteket ebből a rétegből a „granulociták"-ként megjelölt csőbe.
8. Mossák a sejteket 10 ml izotónos foszfát pufferelt sóoldattal a csővekben. Centrifugálják 10 percig 200 x g-n. Távolítsák el a szupernatánst és semmisítsék meg.
9. Függesszék vissza a sejteket óvatosan szívva Pasteur pipettával.
10. Ismételjék meg a 8. és 9. lépéseket kétszer.
11. Függesszék vissza a sejteket megfelelő térfogatú izotóniás foszfát pufferelt sóoldatban.

Ezen a ponton sokféle vizsgálat elvégezhető. Az eljárásokat egyéni megfontolás alapján választják ki.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Az eritrociták gömböcskéket kell, hogy képezzenek a centrifuga cső alján. A granulociták sávokat kell, hogy képezzenek a HISTOPAQUE®-1119 és a HISTOPAQUE®-1077 közötti határfelületen. A mononukleáris sejtek sávokat alkotnak a HISTOPAQUE®-1077 és a plazma határfelülete között.

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várt eredményektől, kérjük, vegyék fel a kapcsolatot a Sigma-Aldrich műszaki szolgálatával.

IRODALOMJEGYZÉK

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

A HISTOPAQUE a Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO USA bejegyzett védjegye.

A Sigma-Aldrich, Inc. garantálja, hogy termékei megfelelnek az ebben és egyéb Sigma-Aldrich publikációkban megjelent információknak. A vevő köteles meghatározni, hogy az adott felhasználásra megfelel-e (megfelelnek-e) a termék(ek). További kikötések és feltételek alkalmazhatók. Kérjük megnézni a számla vagy csomagolóanyag hátsó oldalát az árusítás további kikötései és feltételei véget.

Eljárás száma: 1119
Korábbi felülvizsgálat: 2009-11
Átdolgozva: 2010-01

CE EC REP **AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság**

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
314-771-5765
Műszaki szolgálat: 800-325-0250 vagy hívják 314-771-3122 vagy küldjenek e-mailt a clintech@sial.com-ra
Megrendelés: 800-325-3010 vagy hívják 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

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