



SIGMA-ALDRICH®

ACCUSPIN™ TUBES

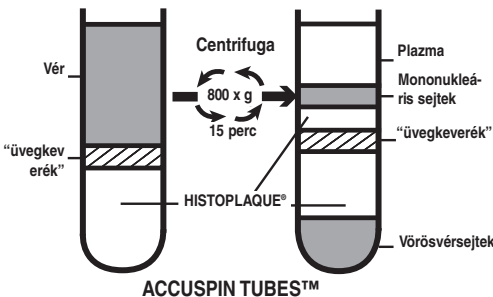
(Eljárás száma: AST-1)

FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich ACCUSPIN™ Tubes limfociták és egyéb mononukleáris sejtek izolálására használható. Az ACCUSPIN™ Tubes in vitro diagnosztikai felhasználásra javallt.

A limfociták és egyéb mononukleáris sejtek (MNC) egész vérből és csontvelőből HISTOPAQUE®-1077-tel történő kiválasztása az először Boyum¹ által 1968-ban leírt módszeren alapul. A szétválasztó közeg, a HISTOPAQUE®-1077, egy nagy molekulatípusú poliszacharid és nátrium-diatrizoát, egy jódzott nem-ionos vegyület vizes oldata, melynek sűrűségét 1,077±0,001-re állították be.

Az ACCUSPIN™ Tube-t speciális két fülkésre tervezték, melyeket egy porózus, nagy sűrűségű polietilén válaszfalal ("üvegkeverék") választottak külön. Az ACCUSPIN™ Tube-hoz további HISTOPAQUE®-1077-t adva, egy rövid centrifugálás áthelyezi a HISTOPAQUE®-t az üvegkeverék alá. További centrifugáláskor az egész vér leszáll az "üvegkeverék" keresztül és érintkezik a HISTOPAQUE®-1077-tel. A nagyobb sűrűségű elemek a HISTOPAQUE®-1077 térfogatát áthelyezi az "üvegkeverék" fölé a vér összetevőinek tiszta szétválasztását eredményezve. Az eritrociták aggregálódnak, a granulociták pedig enyhén hipertóniásak lesznek növelve az ülepedési arányt és az ACCUSPIN™ Tube alján szemcséket eredményezve. A limfociták és egyéb mononukleáris sejtek (pl. monociták) a plazma-HISTOPAQUE®-1077 határfelületben maradnak. A mononukleáris sejtek ilyen sűrű sávja a felső fülke tartalmának leöntésével vagy pipettával összegyűjthető. Az eritrocita szennyeződés a fülkék közötti válaszfalal kerülendő el.



REAGENSEK

ACCUSPIN™ TUBES*

Nagy sűrűségű polietilén válaszfalal ("üvegkeverék") szerelt polipropilén csövek.

SUGÁRZÁSSAL STERILIZÁLT, Katalógus szám: A 1805 és A 2055

NEM STERIL, Katalógus szám: A 1930

TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

Az ACCUSPIN™ Tubes szobahőmérsékleten (18-26 °C) tárolandó. Ha a sugárzással sterilizált cső (katalógus szám: A1805/A2055) integritását megsértették (pl. repedt vagy laza kupak), a sterilitás nem garantált.

ELŐKÉSZÍTÉS:

Az ACCUSPIN™ Tubes használatra kész.

ÖVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagensekkel történő munka során a szokásos óvintézkedéseket be kell tartani. Mivel humán származású anyagokkal érintkeznek, az összes reagenst és berendezést kezeljék potenciálisan bio-veszélyesként. A hulladékokat 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 mondai

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

Az Európai Unió kockázati és biztonsági mondai

A HISTOPAQUE®-1077-1 oldatok ÁRTALMASAK. Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáció)! A keletkező gőzt nem szabad belélegezni Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni. Baleset vagy rosszullet 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.

Defibrinált vagy antikoagulált friss egész vér használható. A legjobb eredmények érdekében, a vért 2 órán belül fel kell dolgozni. Heparin vagy EDTA használható antikoagulánsként. Az antikoaguláns legyen tartósítószer-mentes.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK

HISTOPAQUE®-1077, katalógus szám: 1077-1
250-800 x g generalálására és 18-26 °C fenntartására képes centrifuga (forgó kosaras rotor)

MEGJEGYZÉSEK:

1. Ha a felhasználási cél a szeparált sejteknél utólagos tenyészetet jelent, akkor a HISTOPAQUE®-1077-t sterilén kell filterezni a sejtek szeparálása előtt. Azoknál az alkalmazásoknál, amelyek megkövetelik a sterilítást, a HISTOPAQUE®-1077 steril filtert kell előzetesen használni. A termék kizárólag „in vitro” használatra készült. A HISTOPAQUE® használatával izolált sejteket nem szabad „in vivo” eljárásoknál használni.

2. Fontos az AST-1. sz. eljáráshoz a 800 x g eléréséhez szükséges fordulatszámot a centrifugán beállítani. A következő nomogram használható a fordulatszám beállításához.

- Mérjék meg a centrifuga orsójának középpontjától a vizsgálati cső tartójának végéig a sugarat (cm)! Jelöljék ezt az értéket a nomogram A skáláján (2. oldal).
- Jelöljék a relatív centrifugális erőt (pl. 800) a B skálán.
- 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.

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 püderezett kesztyűk használatát. A kesztyű püder aktiválja a monocitákat és alacsonyabb kitermelést okoz.

5. Egyéb antikoagulánsok használhatók, azonban az antikoaguláns kiválasztása befolyásolhatja a sejt visszanyerést. A vér korának növekedésével a sejt visszanyerések csökkennek.

6. A kiadvány eljárási része leírja a mononukleáris sejtek szétválasztását foszfát pufferelt sóoldatot használva oldószerként és mosófolyadéként. Sok esetben, az egyensúlyban lévő sóoldatok (pl. Hank féle) vagy a magzati szarvasmarha szerűmaggal kiegészített sejt kultúra közeg (pl. RPMI 1640) javasoltak.

7. Hígított vér, 3-6 ml vagy 15-30 ml, használható. A vér közvetlenül hígítható az ACCUSPIN™ Tubes (katalógus szám: A1805 vagy A1930/A2055) felső fülkéjében. Ez megfelel a normál feletti hematokritos mintákhoz.

8. A HISTOPAQUE®-1077 felesleges mennyiségének eltávolítása a mononukleáris sávval növeli a granulocita szennyeződést a maradék granulocitáktól, mely a mononukleáris határfelületnél marad.

9. A szuperatáns felesleges mennyiségének mononukleáris sávval történő eltávolítása elősegítheti a plazma proteinek szennyeződését.

10. A javasoltól eltérő hígított vagy egész vér térfogatának használata csökkentheti a visszanyerést.

11. Az összes szennyező vérelemzők eltávolításához a HISTOPAQUE®-1077 fölé rétegezett 4-20 % szukróz gradiensben való második centrifugálást lehet végrehajtani. A szukróz gradiens hatékonyan izolálja a vérelemekéket, míg a mononukleáris sejteket áthatolnak a HISTOPAQUE®-1077 rétegen.

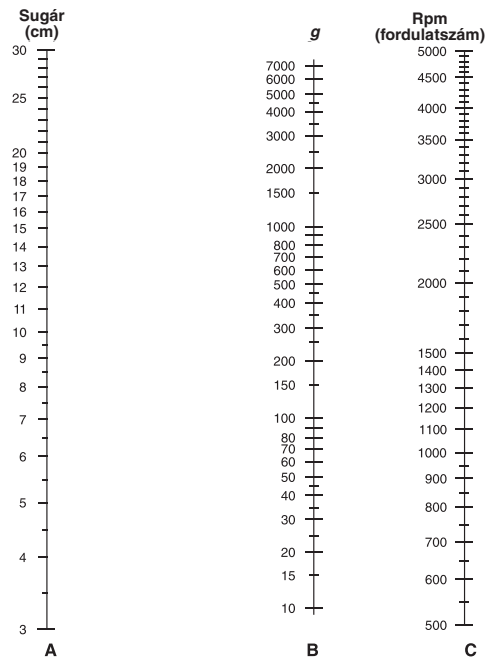
12. Ha a HISTOPAQUE®-1077 nem szobahőmérsékletű, akkor korlátozott mononukleáris sejt visszanyerés lehet.

13. Centrifugálás során az ideiglenes üvegkeverék kiszabadulhat. Ha ez történik, ne próbálják a cső tartalmát leönteni a mononukleáris sejtek összegyűjtéséhez. Helyette, óvatosan távolítsák el az üvegkeveréket steril

csipesszel vagy billentsék meg az üvegkeveréket egy pipettával, majd gyűjtsék össze a mononukleáris sejteket.

14. A "normál" beteg használata javasolt kontrollként minden vizsgálatnál.

NOMOGRAM A RELATÍV CENTRIFUGÁLIS ERŐK MEGHATÁROZÁSÁHOZ:



ELJÁRÁS:

1. Melegítsék a HISTOPAQUE®-1077-t szobahőmérsékletűre. Fénytől védjék.

2. a. Pipetázzanak 3,0 ml HISTOPAQUE®-1077-t az ACCUSPIN™ Tube (katalógus szám: A 1680 vagy A 1805) felső fülkéjébe.

VAGY

b. Pipetázzanak 15,0 ml HISTOPAQUE®-1077-t az ACCUSPIN™ Tube (katalógus szám: A 1930 vagy A 2055) felső fülkéjébe.

3. Centrifugálják 800 x g-n 30 másodpercig szobahőmérsékleten. A HISTOPAQUE®-1077 most az "üvegkeverék" alatti fülkében van.

4. a. Szabadon öntsenek 3,0-6,0 ml friss defibrinált vagy antikoagulált egész vért mindegyik ACCUSPIN™ Tube felső fülkéjébe (katalógus szám: A1805).

VAGY

b. Szabadon öntsenek 15,0-30,0 ml friss defibrinált vagy antikoagulált egész vért mindegyik ACCUSPIN™ Tube felső fülkéjébe (katalógus szám: A1930 vagy A2055).

5. Centrifugálják 800 x g-n 18-26 °C-on 15 percig.

6. Centrifugálás után óvatosan szivják le Pasteur pipettával a plazma réteget a mononukleáris sejteket tartalmazó átlátszatlan határfelület 0,5 cm-ig. Megfelelően semmisítsék meg a plazma réteget.

7. Óvatos vigyék át a mononukleáris sávot egy Pasteur pipettával egy tiszta centrifuga csőbe.

8. Mossák a mononukleáris sávot 10 ml izotóniás PBS vagy egyensúlyban lévő sóoldat hozzáadásával és függesszék vissza a sejteket óvatosan szivva Pasteur pipettával. Centrifugálják 250 x g-n 18-26 °C-on 10 percig.

9. Ismételjék meg a 8. lépést kétszer, a szemcsét újra lebegtetve 5 ml izotóniás PBS-sel.

10. Lebegtessék újra a mononukleáris szemcsét megfelelő közegben a sejtek alkalmazásán alapulva.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Az eritrociták és granulociták gömböcskéket kell, hogy képezzenek az ACCUSPIN™ cső alján. A mononukleáris sejtek sávokat alkotnak a HISTOPAQUE®-1077 és a plazma határfelülete között.

Az alábbi adatok mutatják az egészséges vérmintákból a mononukleáris sejtsávok elemzésének eredményeit, melyeket HISTOPAQUE®-1077-tel izoláltak (1) ACCUSPIN™ Tubes-ban és (2) szokásos centrifuga csövekben. A leválasztások párhuzamosan történtek. A visszanyerést (%) hemacitóméterrel és Wright festés differenciál számításal határozták meg. Az életképességet (%) trypan kék festék kirekesztéses vizsgálattal határozták meg. A vér összetevőket (%) a mononukleáris sejt frakció Wright festés differenciál számításával határozták meg.



	ACCUSPIN™ Tube		Standard Centrifuga cső	
	Átlag	±SD (standard szórás)	Átlag	±SD (standard szórás)
Visszanyerés	70,0	13,3	53,6	8,9
Életképesség	98,0	1,1	95,0	2,7
Limfociták	87,6	4,3	89,8	3,5
Monociták	9,1	3,8	8,3	3,0
Granulociták	3,0	2,7	2,3	1,8
Eritrociták	5,0	2,0	5,0	2,0
Vérlemezkék	<5,0	2,0	<5,0	2,0

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

Az ACCUSPIN a Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO USA védjegye a HISTOPAQUE pedig a bejegyzett védjegye.

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: AST-1
Korábbi felülvizsgálat: 2003-09
Átdolgozva: 2009-11

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság

IRODALOMJEGYZÉK

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 Lymphocytes 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

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 e-mail: clintech@sial.com

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