



# SIGMA-ALDRICH®

## LEUKOCYTSEPARERING

(Procedurnummer 1119)

### AVSEDD ANVÄNDNING

Sigma-Aldrich HISTOPAQUE®-1119 och HISTOPAQUE®-1077 är en icke steril beredning som är avsedd för isolering av mononukleära celler och granulocyter för histologisk undersökning. HISTOPAQUE®-1119 reagenser är avsedda för "in vitro-diagnostik". **Utan ytterligare filtrering är detta material inte lämpligt för odling av separerade celler. När det gäller cellodling är HISTOPAQUE®-1119 inte avsedd för in vitro-diagnostiska syften.**

De lösningar som används för detta ändamål består av en polysackaros och ett radiopakt medium. HISTOPAQUE®-1077 är en sådan lösning, justerad till en densitet på 1,077. När blod skiktas på HISTOPAQUE®-1077 och utsätts för centrifugalkrafter, kvarhålls mononukleära celler i plasma HISTOPAQUE®-interfasen, medan erythrocyter och granulocyter graviterar till botten. Det borde vara möjligt att uppfinna ett system där celler i myeloidserierna även skulle kunna skördas med användning av en procedur i ett steg. HISTOPAQUE®-1119 utvecklades i detta syfte och är baserad på observationer av English och Andersen.<sup>1</sup>

Enligt Sigma-Aldrichproceduren bildas en dubbel gradient genom att skikta en lika volym HISTOPAQUE®-1077 över HISTOPAQUE®-1119. Helblod skiktas varsamt på det övre HISTOPAQUE®-1077-mediet. Rören centrifugeras sedan vid 700 x g i 30 minuter. Celler i granulocytserierna finns i 1077/1119-interfasen medan lymfocyter, andra mononukleära celler och trombocyter finns i plasma/1077-interfasen.

### REAGENS

**HISTOPAQUE®-1119**, katalognummer 1119-1  
Polysackaros, 6,0 g/dl och natriumdiatrizoat, 16,7 g/dl.

#### FÖRVARING OCH STABILITET:

Förvara HISTOPAQUE®-1119 i kylskåp (2–8°C). Skydda mot ljus. Reagensens etikett visar utgångsdatum.

#### FÖRSÄMRING:

Ett grumligt utseende anger försämring av produkten.

#### BEREDNING:

HISTOPAQUE®-1119 är bruksfärdig. Värm till 18–26°C före användning.

Om de separerade cellerna även ska användas för odling måste HISTOPAQUE®-1119 sterilfiltreras innan separeringen. För program där det krävs sterilfiltrering måste HISTOPAQUE®-1119 användas före.

#### FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Normala försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser ska iaktas. Vid kontakt med substanser av humant ursprung, behandla alla reagenser och utrustning som en potentiell bioterror. Kassera avfall enligt lokala lagar och bestämmelser. Se Faktblad om materialsäkerhet för uppdaterad information om risker, faror eller säkerhet.

#### Amerikanska risk- och säkerhetsbestämmelser

HISTOPAQUE®-lösningar 1077-1 och 1119-1 är FARLIGA. Kan orsaka sensibilisering vid inandning och hudkontakt. Använd lämpliga skyddskläder. Målorgan: Blod.

#### Risk- och säkerhetsbestämmelser enligt EU

HISTOPAQUE®-lösningar 1077-1 och 1119-1 är FARLIGA. Kan orsaka sensibilisering vid inandning och hudkontakt. Undvik inandning av ångor. Använd lämpliga skyddskläder och skyddshandskar. Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.

### PROCEDUR

#### PROVTAGNING:

Provtagning bör utföras i enlighet med NCCLS dokument M29-A2. Ingen känd testmetod ger fullständig garanti för att blodprov eller vävnad inte överför infektion. Alla blodderivat eller vävnadsprov bör därför anses vara potentiellt smittsamma.

Insamlas 6 ml venöst blod i heparin eller EDTA som är fritt från konserveringsmedel.

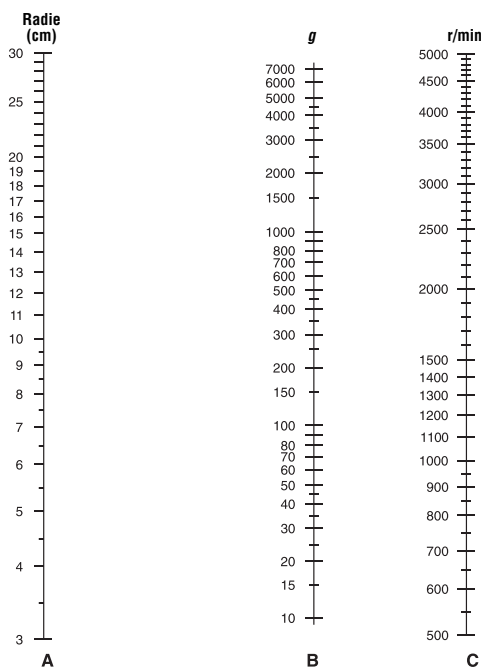
#### SPECIELLA MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE MEDFÖLJER:

HISTOPAQUE®-1077, katalognummer 1077-1, polysackaros, 5,7 g/dl, och natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl.  
Centrifug (med svängrotor) som kan generera 700 x g  
Centrifugrör, 15 ml, av plast, koniska

#### ANMÄRKNINGAR:

- Om de separerade cellerna även ska användas för odling måste HISTOPAQUE®-1119 sterilfiltreras innan separeringen. För program där det krävs sterilfiltrering måste HISTOPAQUE®-1119 användas före. Denna produkt är endast till för in vitro-användning. Celler som isolerats med HISTOPAQUE® ska inte användas i in vivo-procedurer.
- 50 ml centrifugrör kan användas. Ändra den angivna proceduren genom att använda 12 ml HISTOPAQUE®-1077, 12 ml HISTOPAQUE®-1119 och 24 ml helblod eller utspätt blod.
- Ibland kan det vara nödvändigt att späda blod 1:2 eller 1:4, beroende på absolut cellantal. Det finns en risk att gradienten överbelastas.
- Undvik att använda pudrade handskar. Handskpunder aktiverar monocyter och orsakar lägre avkastning.
- Undvik att använda plaster med hög bindning, som t.ex. polystyren. Polystyren kan binda celler till centrifugrörets väggar.
- Bered gradienten omedelbart före användning. Beredning av gradienterna i förväg gör att diffusion kan förekomma och resultera i dålig cellåterhämtning. Underlägg med HISTOPAQUE®-1119 ger också en acceptabel gradient.
- Andra antikoagulanter kan användas, valet av antikoagulant kan emellertid påverka cellåterhämtning. Cellåterhämtningen minskar när blod åldras.
- Proceduravsnittet i detta produktblad använder isotonfosfatbuffrad saltlösning som spädningsmedel och tvättvätska. Andra reagenser, som t.ex. cellmedium RPMI 1640, kompletterat med fetalt bovins serum, kan användas.
- Den beskrivna proceduren är avsedd för isolering av celler från 6 ml helblod. Volymen kan ökas eller minskas efter behov.
- Användningen av ett prov från en "normal" patient rekommenderas som en kontroll för varje körning.

#### NOMOGRAM FÖR BESTÄMNING AV RELATIV CENTRIFUGALKRAFT:



Ett nomogram används för att bestämma varvtalsinställningen för centrifugen.

Så här fastställs det varvtal som krävs för att erhålla 700 x g för procedurnummer 1119.

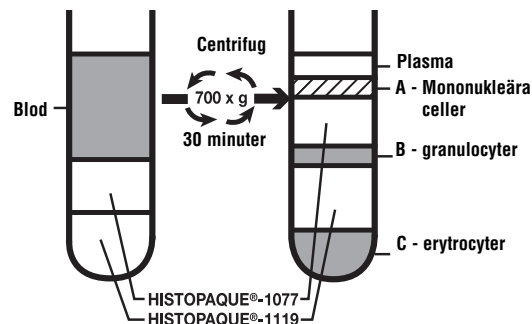
- Mät radien (cm) från centrifugaxelns mitt till provrörshållarens ände. Markera detta värde på skala A.
- Markera den relativa centrifugalkraften (t ex 700) på skala B.
- Dra med hjälp av en linjal en rät linje mellan punkterna på kolumn A och B och vidare så att den korsar kolumn C. Avläsningen på kolumn C är varvtalsinställningen för centrifugen.

#### PROCEDUR:

- Tillsätt 3 ml HISTOPAQUE®-1119 till ett 15 ml koniskt centrifugrör.
- Skikta varsamt 3 ml HISTOPAQUE®-1077 på HISTOPAQUE®-1119.
- Skikta varsamt 6 ml helblod på rörets övre gradient från steg 2.
- Centrifugera vid 700 x g i 30 minuter vid rumstemperatur (18–26°C). Centrifugering vid lägre temperaturer, som t.ex. 4°C, kan resultera i cellklumpning och dålig återhämtning.

**OBS:** Det varvtal som krävs för att generera 700 x g kan beräknas med användning av nomogrammet i detta produktblad.

- Avlägsna försiktigt centrifugrören. Två tydliga, ogenomskinliga skikt bör synas (skikt A och B i figuren nedan).
- Aspirera vätska till inom 0,5 cm av skikt A och kassera. Överför celler från detta skikt till ett rör som märkts "mononukleära".



- Aspirera återstående vätska till inom 0,5 cm av skikt B och kassera. Överför celler från detta skikt till ett rör som märkts "granulocyter".
- Tvätta cellerna genom tillsats av 10 ml isotonfosfatbuffrad saltlösning till rören. Centrifugera 10 minuter vid 200 x g. Avlägsna supernatanten och kassera.
- Resuspendera cellerna genom varsam aspirering med en Pasteur-pipett.
- Upprepa steg 8 och 9 två gånger.
- Resuspendera cellerna i lämplig volym isotonfosfatbuffrad saltlösning.

Vid denna tidpunkt kan en mängd olika analyser utföras. Proceduren väljs enligt personliga önskemål.

### PRESTANDAEGENSKAPER

Erythrocyter bör pelletera till botten av centrifugröret. Granulocyter bör bilda band i interfasen mellan HISTOPAQUE®-1119 och HISTOPAQUE®-1077. Mononukleära celler bör bilda band i interfasen mellan HISTOPAQUE®-1077 och plasman.

Om observerade resultat skiljer sig från förväntade resultat, kontakta Sigma-Aldrich tekniska service för assistans.

### REFERENSER

- 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

HISTOPAQUE är ett registrerat varumärke som tillhör Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO USA

Sigma-Aldrich, Inc. garanterar att deras produkter överensstämmer med informationen i denna och andra Sigma-Aldrich-publikationer. Kunden måste avgöra produktens (produkternas) lämplighet för deras speciella användning. Ytterligare villkor kan gälla. Se baksidan av fakturan eller packsedeln för ytterligare försäljningsvillkor.

Procedurnummer 1119  
Föregående revidering: 2009-11  
Reviderad: 2010-01



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

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
314-771-5765

Teknisk service:  
mottagaren betalar samtalet:  
+1 314-771-3122  
eller e-mail till: clintech@sial.com  
För beställning:  
mottagaren betalar samtalet:  
+1 314-771-5750  
www.sigma-aldrich.com

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