



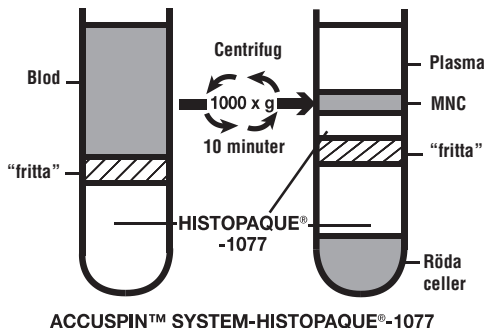
**SIGMA-ALDRICH®**  
**ACCUSPIN™**  
**SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077**  
 (Procedurnummer A 6929 / A 7054 / A 0561)

**AVSEDD ANVÄNDNING**

Sigma-Aldrich ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 är avsett för användning för isolering av lymfocyter och andra mononukleära celler. ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 reagenser är avsedda för "in vitro-diagnostik".

Separation av lymfocyter och andra mononukleära celler (MNC) från helblod och benmärg med användning av HISTOPAQUE®-1077 är baserat på en metod som först beskrevs av Boyum<sup>1</sup> 1968. Separationsmediet, HISTOPAQUE®-1077, är en vattenhaltig lösning av en polysackarid och ett natriumdiatrizoat med hög molekylvikt, en jodiserad nonjonaktiv förening, justerad till en densitet på 1,077 ± 0,001.

ACCUSPIN™-röret är speciellt utformat med två kammare, skilda åt av en porös, polyetylenbarriär med hög densitet ("fritta"). Antikoagulerat helblod kan tillsättas rörets övre kammare utan risk för blandning med HISTOPAQUE®-1077 i den nedre kammaren under frittan. Vid centrifugering sjunker helblodet genom "frittan" och kommer i kontakt med HISTOPAQUE®-1077. Ämnena med högre densitet förflyttar en volym HISTOPAQUE®-1077 över "frittan", vilket ger en tydlig separation av blodkomponenterna. Erytrocytaggregatet och granulocyterna blir något hyperton, varvid deras sedimenteringshastighet ökar, vilket resulterar i pellettering på botten av ACCUSPIN™-röret. Lymfocyter och andra mononukleära celler, dvs. monocyter, förblir i plasma-HISTOPAQUE®-1077-interfasen. Detta täta band av mononukleära celler kan uppsamlas genom att hålla av innehållet i den övre kammaren eller med hjälp av en pipett. Erytrocytkontamination undviks tack vare barriären mellan kamrarna.



**REAGENS**

**ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077**, katalognummer A 6929, A 7054 och A 0561

Ett strålsteriliserat polypropylenrör, försett med en polyetylenbarriär med hög densitet ("fritta"), aseptiskt fyllt med HISTOPAQUE®-1077.

HISTOPAQUE®-1077, polysackaros, 5,7 g/dl och natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl. Aseptiskt filtrerat. Densitet 1,077 vid 25 °C.

**FÖRVARING OCH STABILITET:**

Förvaras i kylskåp (2–8 °C). Skydda mot ljus. Förpackningens etikett visar utgångsdatum.

**FÖRSÄMRING:**

Ett grumligt utseende anger försämring av produkten.

**BEREDNING:**

ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 reagenser är bruksfärdiga. Värm till 18–26 °C före användning.

**FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:**

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

**Amerikanska risk- och säkerhetsbestämmelser**

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

**Risk- och säkerhetsbestämmelser enligt EU**

HISTOPAQUE®-1077-1 lösningar 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:**

Provtagningen 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.

Defibrinerat eller antikoagulerat (EDTA eller heparin utan konserveringsmedel) färskt helblod kan användas. För bästa resultat bör blodet behandlas inom 2 timmar.

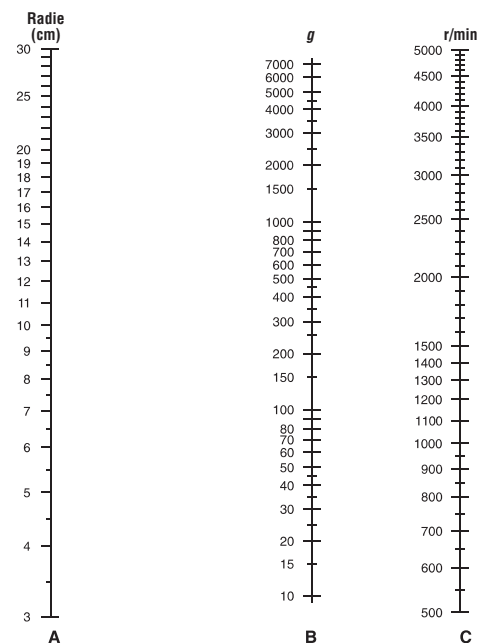
**SPECIELLA MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE MEDFÖLJER:**

Centrifugrör för tvättning av mononukleära celler. Isotonfosfatbuffrad saltlösning (PBS) eller balanserad saltlösning (med svängrotor) som kan generera 100 till 1000 x g och bibehålla 18–26 °C

**ANMÄRKNINGAR:**

- Tre till 6 ml förutspätt blod kan användas med katalognummer A 6929 eller 15 till 30 ml förutspätt blod med katalognummer A 7054 och A 0561. Blod kan utspädas direkt i den övre kammaren i ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-röret. Detta rekommenderas för prov med hematokriter över normala värden.
- Avlägsnande av överflödiga mängder HISTOPAQUE®-1077 med det mononukleära bandet ökar granulocytkontaminationen från resterande granulocyter, som kan finnas kvar i den mononukleära interfasen (tabell I).
- Avlägsnande av överflödiga mängder supernatant med det mononukleära bandet kan främja kontamination av plasmaproteiner.
- Användning av andra volymer av förutspätt blod eller helblod än de som rekommenderats, kan resultera i minskad återhämtning.
- För att avlägsna alla kontaminerande trombocyter kan en andra centrifugering i 4 till 20% sackarosgradient, skiktad över HISTOPAQUE®-1077, utföras. Sackarosgradienten kommer effektivt att isolera trombocyterna medan de mononukleära cellerna penetrerar till HISTOPAQUE®-1077-lagret.
- Underlåtenhet att värma ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 till rumstemperatur kan innebära begränsad återhämtning av mononukleära celler.
- Frittan kan ibland kan rubbas under centrifugeringen. Om detta inträffar, försök inte hålla av rörets innehåll för att samla upp mononukleära celler. Avlägsna i stället försiktigt frittan med steriliserad tång eller vicka på frittan med en pipett och samla sedan upp de mononukleära cellerna.
- Proceduravsnittet i detta produktblad beskriver separation av mononukleära celler med användning av fosfatbuffrad saltlösning som spädningsmedel och tvättvätska. Under många förhållanden föredras balanserade saltlösningar eller cellkulturmedium, som t.ex. RPMI-1640, kompletterat med fetalt bovins serum.
- Användningen av en "normal" patient rekommenderas som en kontroll för varje körning.

**NOMOGRAM FÖR BESTÄMMNING AV RELATIV CENTRIFUGALKRAFT:**



Ett nomogram används för att bestämma varvtalsinställningen för centrifugen.

Så här fastställs det varvtal som krävs för att erhålla 1000 eller 800 x g för procedurnummer A 6929 / A 7054 / A 0561.

- Mät radien (cm) från centrifugaxelns mitt till provrörshållarens ände. Markera detta värde på skala A.
- Markera den relativa centrifugalkraften (t.ex. 1000 eller 800) 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:**

- Värm önskat antal rör till rumstemperatur. Skydda mot ljus. Om HISTOPAQUE®-1077 är ovanför "frittan" före användning, centrifugera vid 1000 x g i 30 sekunder vid rumstemperatur.
- Märk röret(en).
- Håll fritt 3,0 till 6,0 ml färskt defibrinerat eller antikoagulerat helblod i den övre kammaren i varje förfyllt ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-rör, katalognummer A 6929.  
**ELLER**  
 Håll fritt 15,0 till 30,0 ml färskt defibrinerat eller antikoagulerat helblod i den övre kammaren i varje förfyllt ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-rör, katalognummer A 7054 eller A 0561.
- Centrifugera vid 1000 x g, medan 18–26 °C bibehålls, i 10 minuter.  
**ELLER**  
 Centrifugera vid 800 x g, medan 18–26 °C bibehålls, i 15 minuter.
- Efter centrifugering, aspirera varsamt det övre skiktet med en Pasteur-pipett till inom 0,5 cm av den ogenomskinliga interfasen som innehåller mononukleära celler. Kassera plasmaskiktet på lämpligt sätt.
- Överför försiktigt det mononukleära bandet med en Pasteur-pipett till ett rent centrifugrör.
- Tvätta det mononukleära bandet genom att tillsätta 10 ml isoton-PBS eller balanserad saltlösning och resuspendera cellerna genom varsam aspirering med en Pasteur-pipett. Centrifugera vid 250 x g, medan 18–26 °C bibehålls, i 10 minuter.
- Upprepa steg 7 två gånger, resuspendera pelleten i 5 ml isoton-PBS.
- Resuspendera den mononukleära pelleten i lämpligt medium, baserat på tillämpningen för dessa celler.

## PRESTANDAEGENSKAPER

Erytrocyter och granulocyter bör pellettera till botten av ACCUSPIN™-röret. Mononukleära celler bör bilda band i interfasen mellan HISTOPAQUE®-1077 och plasman

Tabellen nedan representerar resultaten från analyser av det mononukleära bandet från friska, humana blodprov, som parallellseparerats med ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 och HISTOPAQUE®-1077.

### TABELL I

#### ACCUSPIN™ SYSTEM-

	HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Medel	±SD	Medel	±SD
% återhämtning <sup>1</sup>	70,0	13,3	53,6	8,9
% lymfocyter <sup>2</sup>	87,6	4,3	89,8	3,5
% granulocyter <sup>3</sup>	3,0	2,7	2,3	1,8
% trombocyter <sup>3</sup>	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Fastställt med hemacytometer och Wrights färg differentialräkning.
2. Fastställt med Trypanblått färgexklusionstest.
3. Fastställt med Wrights färgdifferentialräkning av mononukleär fraktion.

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

## REFERENSER

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

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 A 6929 / A 7054 / A 0561

Föregående revidering: 2003-04

Reviderad: 2003-09



EC REP

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

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Teknisk service: mottagaren betalar samtalet: +1 314 771 3122

eller e-post till [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

För beställningar: mottagaren betalar samtalet: +1 314 771 5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Tyskland +49-7329-970