



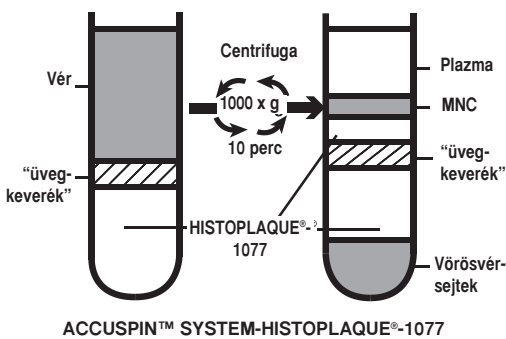
SIGMA-ALDRICH®
ACCUSPIN™
SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077
 (Eljárás száma: A 6929 / A 7054 / A 0561)

FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 limfociták és egyéb mononukleáris sejtek izolálására használható. Az ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 reagens 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 molekulású 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. Antikoagulált egész vér adható a cső felső fülkéjében az üvegkeverék alatti alsó fülkében lévő HISTOPAQUE®-1077-tel való összekeveredés kockázata nélkül. Centrifugálásor az egész vér leszáll az "üvegkeverék" keresztül és érintkezik a HISTOPAQUE®-1077-tel. A nagyobb sűrűségű elemek a HISTOPAQUE®-1077 térfogatát elmozdítják az "üvegkeverék" fölé és a vér összetevőit egyértelműen szétválasztják. Az eritrociták aggregálódnak, a granulociták pedig enyhén hipertónikusak lesznek megnövelve az ülepedési arányukat és gömböcskéket képeznek az ACCUSPIN Tube alján. A limfociták és egyéb mononukleáris sejtek, pl. monociták a plazma-HISTOPAQUE®-1077 határfelületen maradnak. A mononukleáris sejtek ilyen sűrű sávja a felső fülke tartalmának leöntésével vagy pipettával összegyűjthető. Az eritrocita szennyeződés elkerülhető a fülkék közötti válaszfalal.



ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPLAQUE®-1077

REAGENS

ACCUSPIN SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077, Katalógus szám: A 6929, A 7054 és A 0561

Egy nagy sűrűségű polietilén válaszfalal ("üvegkeverék") szerelt sugárással sterilizált polipropilén csövet aszeptikusan töltenek HISTOPAQUE®-1077-tel.

A HISTOPAQUE®-1077 5,7 g/dl poliszukrózt és 9,0 g/dl nátrium-diatrizoátot tartalmaz. Aszeptikusan szűrt. Sűrűsége 1,077 25 °C-on.

TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

Hűtőszekrényben (2-8 °C) tárolandó. Fénytól védjék. A doboz címkéjén feltüntették a lejárató időt.

MEGROMLÁS:

A zavaros megjelenés a termék megromlását jelzi.

ELŐKÉSZÍTÉS:

Az ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 reagens használatra kész. Használat előtt 18-26 °C-ra melegítendő.

ÖVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagensekkel történő munka során a szokásos övintézkedéseket be kell tartani. Mivel humán származású anyagokkal érintkeznek, az összes reagenst és berendezést kezeljék potenciálisan 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 oldatok ÁRTALMASAK. Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáció)! Megfelelő védőruházatot kell viselni. Céliszerv: Vér.

Az Európai Unió kockázati és biztonsági mondatai

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 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 terjedjen fertőzést. Ezért, minden vér származékot vagy szövetet lehetségesen fertőzőnek kell tekinteni.

Defibrinált vagy antikoagulált (EDTA vagy tartósítószermentes heparin) friss egész vér használható. A legjobb eredmények érdekében, a vért 2 órán belül fel kell dolgozni.

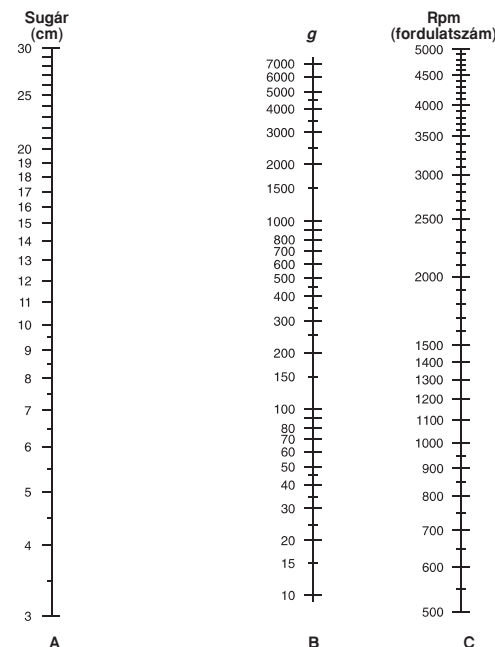
SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK

Centrifuga csövek a mononukleáris sejtek mosásához. Izotóniás Phosphate Buffered Saline (PBS) vagy egyensúlyba lévő sóoldat. 100-1000 x g generálására és 18-26 °C fenntartására képes centrifuga (forgó kosaras rotor)

MEGEGYZÉSEK:

- 3-6 ml hígított vér használható A6929. katalógus számmal vagy 15-30 ml hígított vér A7054 és A0561 katalógus számmal. A vér közvetlenül az ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 cső felső fülkéjében hígítható. Ez megfelelő a normál feletti hematokrites mintákhoz.
- A HISTOPAQUE®-1077 felesleges mennyiségének mononukleáris sávokkal való eltávolítása növeli a granulocita szennyeződést a maradék granulocitákból, melyek a mononukleáris határsávnál maradhatnak meg (l. táblázat).
- A szupernatáns felesleges mennyiségének mononukleáris sávval történő eltávolítása elősegítheti a plazma proteinek szennyeződését.
- A javasoltól eltérő térfogatú hígított vagy egész vér használata csökkentheti a visszanyerést.
- Az összes szennyező vérelemzke eltávolításához egy 4-20 % HISTOPAQUE®-1077-re rétegzett szukróz gradiens második centrifugálását lehet elvégezni. A szukróz gradiens hatékonyan izolálja a vérelemzkeket, míg a mononukleáris sejtek áthatolnak a HISTOPAQUE®-1077 rétegen.
- Ha az ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 nem lesz szobahőmérsékletű, korlátozott mononukleáris sejt visszanyerés lehetséges.
- 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.
- A kiadvány eljárási része leírja a mononukleáris sejtek szétválasztását foszfát pufferrel sóoldatot használva oldószerként és mosófolyadéként. Sok körülmény esetén, egyensúlyban lévő sóoldatok vagy magzati szarvasmarha szérummal kiegészített sejt kultúra közeg (pl. RPMI-1640) javasolt.
- A "normál" beteg használata javasolt kontrollként minden vizsgálatnál.

NOMOGRAM A RELATÍV CENTRIFUGÁLIS ERŐK MEGHATÁROZÁSÁHOZ:



Nomogram használható a centrifuga fordulatszámának beállításához.

Hogyan állapítsák meg az 1000 vagy 800 x g-hez szükséges fordulatszámot az A6929 / A7054 / A0561 sz. eljárás esetén.

- Mérjék meg a centrifuga orsójának középpontjától a vizsgálati cső tartójának végéig a sugarat (cm)! Jelöljék ezt az értéket az A skálán.
- Jelöljék a relatív centrifugális erőt (pl. 1000 vagy 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.

ELJÁRÁS:

- Melegítsék a kívánt számú csövet szobahőmérsékletre. Fénytől védjék. Ha a HISTOPAQUE®-1077 az "üvegkeverék" felett van használat előtt, akkor centrifugálják 1000 x g-n 30 másodperc szobahőmérsékleten.
- Lássák el címkével a csöve(ke)t.
- Szabadon öntsenek 3,0-6,0 ml friss defibrinált vagy antikoagulált egész vért mindegyik előre megtöltött ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 cső felső fülkéjébe (katalógus szám: A6929).
VAGY
 Szabadon öntsenek 15,0-30,0 ml friss defibrinált vagy antikoagulált egész vért mindegyik előre megtöltött ACCUSPIN System-HISTOPAQUE®-1077 cső felső fülkéjébe (katalógus szám: A7054 vagy A0561).
- Centrifugálják 1000 x g-n 18-26 °C-on 10 percig.
VAGY
 Centrifugálják 800 x g-n 18-26 °C-on 15 percig.
- Centrifugálás után óvatosan szívják le Pasteur pipettával a plazma réteget a mononukleáris sejteket tartalmazó átlátszatlan határfelület 0,5 cm-ig. Megfelelően semmisítsék meg a plazma réteget.
- Óvatosan vigyék át a mononukleáris sávot egy Pasteur pipettával egy tiszta centrifuga csőbe.
- Mossák a mononukleáris sávot 10 ml izotóniás PBS vagy egyensúlyban lévő sóoldat hozzáadásával és függesszék vissza a sejteket óvatosan szívva Pasteur pipettával. Centrifugálják 250 x g-n 18-26 °C-on 10 percig.
- Ismételjék meg a 7. lépést kétszer, a szemcsét újra lebegtetve 5 ml izotóniás PBS-sel.
- 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 táblázat mutatja a mononukleáris sejt-sáv elemzésének eredményeit egészséges humán vérmintából az ACCUSPIN System-HISTOPAQUE[®]-1077-tel és HISTOPAQUE[®]-1077-tel párhuzamosan leválasztva.

I. TÁBLÁZAT

	ACCUSPIN SYSTEM-HISTOPAQUE [®] -1077		HISTOPAQUE [®] -1077	
	Átlag	±SD (standard szórás)	Átlag	±SD (standard szórás)
% Visszanyerés ¹	70,0	13,3	53,6	8,9
% életképesség ²	98,0	1,1	95,0	2,7
% limfociták ³	87,6	4,3	89,8	3,5
% monociták ³	9,1	3,8	8,3	3,0
% granulociták ³	3,0	2,7	2,3	1,8
% eritrociták ³	5,0	2,0	5,0	2,0
% vérlemezkék ³	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Hemacitóméterrel és Wright festés differenciál számítással meghatározva.
2. Trypan kék festék kirekesztéses vizsgálattal meghatározva.
3. A mononukleáris frakció Wright festés differenciál számítással meghatározva.

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

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 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

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: A 6929 / A 7054 / A 0561

Korábbi felülvizsgálat: 2003-04

Átdolgozva: 2003-09



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 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