



SIGMA-ALDRICH®

HISTOPAQUE®-1077

(Procedurnummer 1077)

AVSEDD ANVÄNDNING

Sigma-Aldrich HISTOPAQUE®-1077 är avsett för isolering av mononukleära celler. HISTOPAQUE®-1077 är avsett för "in vitro-diagnostik".

1968 beskrev Boyum¹ metoder för isolering av mononukleära celler från cirkulerande blod och benmärg.

I allmänhet använde dessa procedurer blandningar av polysackarid och ett radiopakt kontrastmedium. HISTOPAQUE®-1077 är en lösning av polysackaros och natriumdiatrizoat, justerat till en densitet på $1,077 \pm 0,001$ g/ml. Detta medium främjar snabb återhämtning av viabla, mononukleära celler från små blodvolym. HISTOPAQUE®-1077-proceduren är lämplig för att studera cellmedierad lymfoly² och för typning av humant lymfocytantigen (HLA).³ Det kan även användas som ett initialt isoleringssteg före uppräknings av T-, B- och null-lymfocyter.⁴

Antikoagulerat venöst blod skiktas på HISTOPAQUE®-1077. Under centrifugering samlas erythrocyter och granulocyter genom polysackaros och sedimenterar hastigt, varigenom lymfocyter och andra mononukleära celler förblir i plasma-HISTOPAQUE®-1077-interfasen. Erythrocytkontamination är obetydlig. De flesta främmande trombocyter avlägsnas genom centrifugering vid låg hastighet under tvättningsstegen.

REAGENS

HISTOPAQUE®-1077, katalognummer 1077-1

Polysackaros, 5,7 g/dl och natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl. Aseptiskt filtertrat.

FÖRVARING OCH STABILITET:

Förvara HISTOPAQUE®-1077 i kylskåp (2–8 °C). Skydda mot ljus. Reagensens etikett visar utgångsdatum.

FÖRSÄMRING:

Ett grumligt utseende anger försämring av produkten.

BEREDNING:

HISTOPAQUE®-1077 är bruksfärdig. Värm till 18–26 °C före användning.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Normala försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser ska iaktas. 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.

PROCEDURE

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.

Insamla venöst blod i heparin eller EDTA som är fritt från konserveringsmedel. För bästa resultat bör blodet behandlas inom 2 timmar. Se Anmärkning 2 och 3 i avsnittet "Procedurbegränsningar" för ytterligare information om stabilitet.

SPECIELLA MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE MEDFÖLJER:

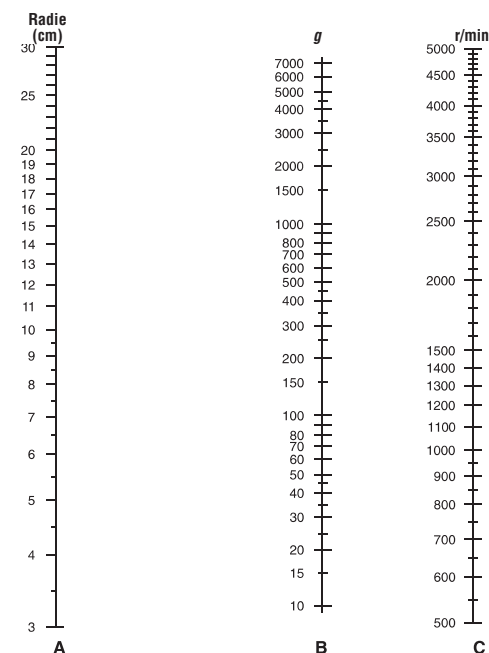
Centrifug (med svängrotor) som kan generera 400 x g Isotonfosfatbuffrad saltlösning eller lämpligt vävnadskulturmedium

Centrifugrör, 15 ml, av plast, koniska

ANMÄRKNINGAR:

- 50 ml centrifugrör kan användas. Ändra den angivna proceduren genom att använda 15 ml HISTOPAQUE®-1077-1 och 15 ml helblod eller utspätt blod.
- Ibland kan det bli 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.
- Andra antikoagulanter kan användas, valet av antikoagulant kan emellertid påverka cellåterhämtning. Cellåterhämtningen minskar när blod åldras.
- Procedur beskriver en separation av mononukleära celler, med användning av isotonfosfatbuffrad saltlösning som spädningssmedel och tvättvätska. Under många förhållanden föredras balanserade saltlösningar som t.ex. Hanks eller cellkulturmedium, som t.ex. RPMI 1640, kompletterat med fetalt bovins serum.
- Den renhet hos cellpopulationen, som erhållits med denna procedur, kan bestämmas med en Romanowsky-färgning (t.ex. Wright-färgning) på en film eller ett cytocentrifugerat objektglas av material från steg 10. Viabilitet kan bestämmas genom behandling med trypanblått.
- Om cellviabiliteten är < 80 %, kan ersättning av fosfatbuffrad saltlösning med ett vävnadskulturmedium, som t.ex. RPMI 1640 förstärkt med fetalt bovins serum, 5% av den totala RPMI 1640-volymen, vara användbart.
- Om T- och B-cellsuppräknings skall utföras, bör blodet inte lagras mer än några timmar.⁵ Tillsats av blod till vissa vävnadskulturmedier kan möjliggöra lagring upp till 72 timmar utan förändring av T- eller B-cellsvärden.⁵
- Förutspätt blod kan användas med denna procedur. Blod kan spädas med fosfatbuffrad saltlösning eller annat lämpligt medium, rekommenderad proportion 1 del blod till 1 del medium. Lika volymer HISTOPAQUE®-1077 och blod bör användas för att optimera mononukleär cellåterhämtning. Spädning är lämplig för prov med hematokriter över normala värden.
- Avlägsnande av överflödiga mängder HISTOPAQUE®-1077 med det mononukleära bandet ökar granulocytkontamination från resterande granulocyter, som kan finnas kvar under den mononukleära interfasen.
- Avlägsnande av överflödiga mängder supernatant med det mononukleära bandet kan främja kontamination av plasmaproteiner och trombocyter.
- 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 medföra begränsad återhämtning av mononukleära celler.
- Användningen av prov från en "normal" patient rekommenderas som en kontroll för varje körning.

NOMOGRAM FÖR BESTÄMNING AV RELATIV CENTRIFUGALKRAFT:



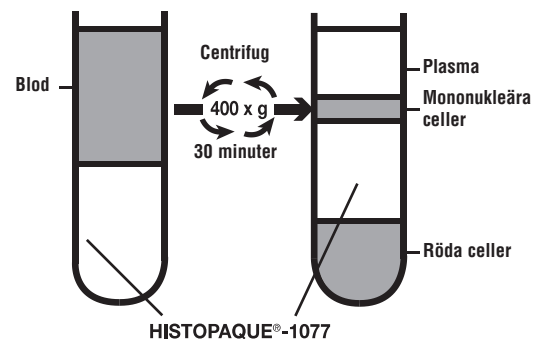
Ett nomogram används för att bestämma varvtalsinställningen för centrifugen.

Så här fastställs det varvtal som krävs för att erhålla 400 x g för procedurnummer 1077.

- Mät radien (cm) från centrifugaxelns mitt till provrörshållarens ände. Markera detta värde på skala A.
- Markera den relativa centrifugalkraften (t.ex. 400) 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.

PROCEDURE:

- Till ett 15 ml koniskt centrifugrör tillsätts 3,0 ml HISTOPAQUE®-1077 och detta värms till rumstemperatur.
- Skicka varsamt 3,0 ml helblod på HISTOPAQUE®-1077. Centrifugera vid 400 x g i exakt 30 minuter vid rumstemperatur. Centrifugering vid lägre temperaturer, som t.ex. 4 °C, kan resultera i cellklumpning och dålig återhämtning.
- 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 det övre skiktet.
- Överför försiktigt det ogenomskinliga skiktet med en Pasteur-pipett till ett rent, koniskt centrifugrör.



- Till detta rör tillsätts (steg 4) 10 ml isotonfosfatbuffrad saltlösning och detta blandas genom varsam aspirering.
- Centrifugera vid 250 x g i 10 minuter.
- Aspirera och kasta supernatanten.

8. Resuspendera cellpelleten med 5,0 ml isotonfosfatbuffrad saltlösning och blanda genom varsam aspirering med en Pasteur-pipett.
9. Centrifugera vid 250 x g i 10 minuter.
10. Upprepa stegen 7, 8 och 9, kassera supernatanten och resuspendera cellpelleten i 0,5 ml isotonfosfatbuffrad saltlösning.

PRESTANDAEGENSKAPER

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

I en jämförelsestudie isolerades 42 parade hepariniserade blodprov simultant på Sigma-Aldrich HISTOPAQUE®-1077 och en konkurrentprodukt enligt respektive procedurer. Återhämtning av lymfocyter beräknades från det ursprungliga antalet som skiktats på gradienterna, jämfört med antalet som syntes i plasmagradients interfas. Exklusion med trypanblått användes för att fastställa cellviabilitet. De två produkterna gav liknande resultat, vilket visas av följande data:

	Viabilitet		
	Lymfocyter i interfasen	Återhämtning av lymfocyter	(Trypan blått)
HISTOPAQUE®-1077	84 ± 14%	68 ± 13%	98 ± 4%
Konkurrentprodukt	83 ± 14%	60 ± 13%	98 ± 4%

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

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 1077
Föregående revidering: 2003-02
Reviderad: 2003-09

  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
För beställningar: mottagaren betalar samtalet: +1 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

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