Gebrauchsanleitung Leucosep™

(Art.-Nr. 163288, 163289, 163290, 227288, 227289, 227290)

Das Verfahren

Leucosep™ wurde zur optimierten Separation von Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (sog. PBMCs) aus humanem Vollblut und Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation entwickelt. Das besondere Merkmal von Leucosep™ ist die poröse Trennscheibe aus Polyethylen, die in die Zentrifugenröhrchen aus hochtransparentem Polypropylen eingesetzt ist. Durch diese Trennscheibe entfällt das zeitaufwändige und mühselige Überschichten des Probenmaterials. Antikoaguliertes Blut oder Knochenmark kann einfach direkt aus dem Blutabnahmeröhrchen in die Leucosep™ Röhrchen gegossen werden. Eine Durchmischung mit dem Separationsmedium wird durch die Trennscheibe verhindert. Während der Zentrifugation werden Lymphozyten und PBMCs aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten separiert und in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert. Nach erfolgter Separation wird durch die Trennscheibe die Rekontamination der angereicherten Zellfraktion mit Erythrozyten und Granulozyten während der Ernte vermieden.

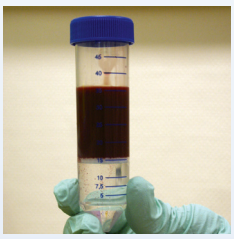
Vorbereitung

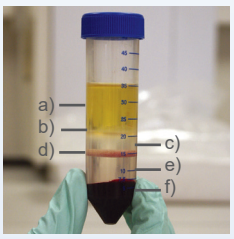
- Separationsmedium auf Raumtemperatur (RT) erwärmen, dabei vor Licht schützen.
- Befüllen der Leucosep™ Röhrchen mit Separationsmedium: 3 ml bei Verwendung der Röhrchen Art.-Nr. 163289 oder 163290; 15 ml bei Verwendung der Röhrchen Art.-Nr. 227289 oder 227290.
- Befüllte Röhrchen mit Schraubverschluss verschließen und 30 Sekunden bei 1000 x g und RT zentrifugieren. Das Separationsmedium befindet sich nun unterhalb der Trennscheibe.
- Bei Verwendung von Röhrchen, die bereits mit Separationsmedium vorbefüllt sind (Art.-Nr. 163288 oder 227288) entfallen die vorgenannten Schritte. Die Röhrchen müssen lediglich vor der Benutzung auf RT erwärmt werden.
- Die Röhrchen können nun mit antikoaguliertem Blut oder Knochenmarksaspirat befüllt werden. Eine Verdünnung des Probenmaterials mit physiologischer Kochsalzlösung muss nicht erfolgen, kann aber dazu beitragen, das Separationsergebnis zu verbessern. Für Blut ist eine Verdünnung von 1:2, für Knochenmark von 1:4 empfehlenswert.

Arbeitsablauf

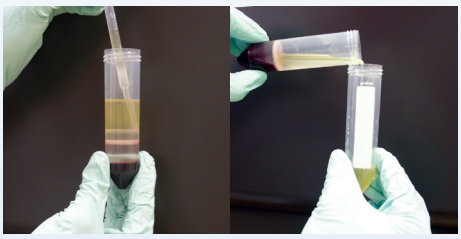


1) Befüllen mit Probenmaterial


2) Vor der Zentrifugation



3) Nach der Zentrifugation


4) Ernte mittels Pasteurpipette oder durch Ausgießen in ein neues Zentrifugenröhrchen

1. Antikoaguliertes Probenmaterial (Blut oder Knochenmarksaspirat, gegebenenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt) direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen vorsichtig in das Leucosep™ Röhrchen gießen: 3–8 ml Probenmaterial bei Verwendung der Röhrchen Art.-Nr. 163288, 163289 oder 163290; 15–30 ml Probenmaterial bei Verwendung der Röhrchen Art.-Nr. 227288, 227289 oder 227290.
2. 10 Minuten bei 1000 x g und RT oder 15 Minuten bei 800 x g und RT im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugieren.
3. Folgende Schichtung von oben nach unten ergibt sich nach der Zentrifugation: a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten / PBMCs) – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten).Die Plasmafraktion bis auf eine Schichtdicke von 5 bis 10 mm abheben und verwerfen.
4. Ernte der angereicherten Zellfraktion (Lymphozyten / PBMCs) mit Hilfe einer Pasteur-Pipette oder durch Ausgießen aus dem Leucosep™ Röhrchen in ein frisches Zentrifugenröhrchen. Eine Rekontamination mit den abgereicherten Erythrozyten und Granulozyten wird durch die Trennscheibe verhindert.
5. Wäsche der angereicherten Zellfraktion (Lymphozyten / PBMCs) mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 10 Minuten bei 250 x g zentrifugieren.
6. Waschschritt zweimal wiederholen, dabei das Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendieren.

Anmerkungen

Biologische Proben und alle zur Blutabnahme erforderlichen Nadeln oder Blutentnahmesets sind in Übereinstimmung mit den Methoden und Verfahrensweisen ihrer Bestimmung bzw. mit denen der jeweiligen Einrichtung zu handhaben. Im Falle einer Kontamination mit Blut oder anderen biologischen Proben (z. B. durch Stichverletzung) müssen umgehend geeignete medizinische Maßnahmen ergriffen werden, da solches Material immer als potenziell infektiös mit HBV, HCV (Hepatitis), HIV (AIDS) oder anderen Infektionserregern eingestuft werden muss.

Für weitere Informationen und/oder Musterbestellungen besuchen Sie unsere Webseite www.gbo.com oder sprechen Sie uns an:

Deutschland (Zentrale): info@de.gbo.com I **Österreich:** office@at.gbo.com I **Belgien:** info.be@gbo.com I **Brasilien:** office@br.gbo.com I **China:** info@cn.gbo.com
Frankreich: accueil@gbo.com I **Italien:** office@it.gbo.com I **Japan:** info.JP@gbo.com I **Niederlande:** info.nl@gbo.com
Portugal: info@vacuette.pt I **Spanien:** info@es.gbo.com I **UK:** info.uk@gbo.com I **Ungarn:** office@hu.gbo.com I **USA:** office@us.gbo.com

www.gbo.com

Revision 01: Februar 2019 - F071043

Instruction Manual Leucosep™

(order no. 163288, 163289, 163290, 227288, 227289, 227290)

The Method

Leucosep™ has been developed for optimal separation of lymphocytes and peripheral mononuclear cells (so-called PBMCs) from human whole blood and bone marrow by means of density gradient centrifugation. The key feature of Leucosep™ is the porous barrier incorporated into the centrifuge tube made of highly transparent polypropylene. This barrier consists of high-grade polyethylene. It does away with the time-consuming and laborious overlaying of the sample material. Anticoagulated blood or bone marrow can simply be poured directly from the blood sampling tube into the Leucosep™tube. The porous barrier prevents mixture of the sample material with the separation medium. During centrifugation, lymphocytes and PBMCs are separated from unwanted erythrocytes and granulocytes on the basis of their buoyant density, and enriched in an interphase above the separation medium. When separation is complete, the barrier prevents recontamination of the enriched cell fraction during harvest.

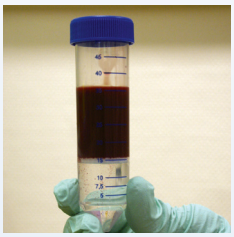
Preparation

- Warm up separation medium to room temperature (RT) protected from light.
- Fill the Leucosep™ tube with separation medium: 3 ml when using tubes order no. 163289 or 163290; 15 ml when using tubes order no. 227289 or 227290.
- Close the tubes containing the separation medium with the screw-cap and centrifugate for 30 seconds at 1000 x g and RT. The separation medium is now located below the porous barrier.
- When using tubes that are prefilled with separation medium (order no. 163288 or 227288) the aforementioned steps can be cancelled. Simply warm up the tubes to RT.
- The tubes are now ready for filling with anticoagulated blood or bone marrow aspirate. Dilution of the sample material with balanced salt solution is not implicitly necessary, but it can help to improve the result of the separation. For blood a dilution ratio of 1:2, for bone marrow a ratio of 1:4 is recommended.

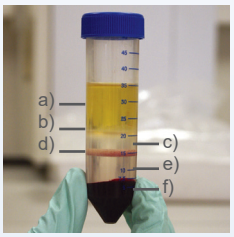
Procedure



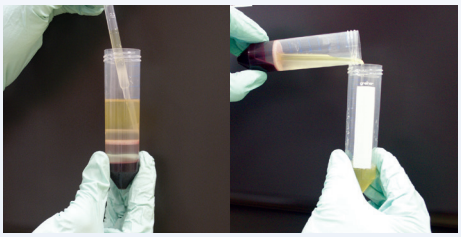
1) Filling with sample material



2) Before centrifugation



3) After centrifugation



4) Harvest by means of a Pasteur pipette or by decanting into another centrifugation tube

1. Pour the anticoagulated sample material (blood or bone marrow aspirate, diluted with balanced salt solution if necessary) directly from the blood sampling tube carefully into the Leucosep™ tube: 3–8 ml of sample material when using tubes order no.163288, 163289 or 163290; 15–30 ml of sample material when using tubes order no. 227288, 227289 or 227290.
2. Centrifugate 10 minutes at 1000 x g and RT or 15 minutes at 800 x g and RT in a swinging bucket rotor. Switch off brakes of the centrifuge.
3. After centrifugation the sequence of layers occurs as follows (seen from top to bottom): a) Plasma – b) enriched cell fraction (interphase consisting of lymphocytes / PBMCs) – c) separation medium – d) porous barrier – e) separation medium – f) pellet (erythrocytes and granulocytes). Collection and discarding of the plasma layer fraction up to a minimum remnant of 5 to 10 mm above the interphase helps to prevent contamination of the enriched cells with platelets.
4. Harvest the enriched cell fraction (lymphocytes / PBMCs) by means of a Pasteur pipette or by pouring the supernatant above the porous barrier from the Leucosep™ tube into another centrifugation tube. The porous barrier effectively avoids recontamination with pelleted erythrocytes and granulocytes.
5. Wash the enriched cell fraction (lymphocytes / PBMCs) with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS), subsequently centrifugate for 10 minutes at 250 x g.
6. Repeat washing step twice, resuspend the cell pellet with 5 ml of PBS.

Caution

Handle all biological samples and blood collection lancets, needles, and blood collection sets in accordance with the policies and procedures of your facility.
In case of any exposure or contamination with blood or other biological samples (e.g. accidental puncture injury) initiate appropriate medical treatment as such material has to be considered potentially infective with HBV, HCV (hepatitis), HIV (AIDS), or other infective agents.

Revision 01: Februar 2019 - F071043

Für weitere Informationen und/oder Musterbestellungen besuchen Sie unsere Webseite www.gbo.com oder sprechen Sie uns an:

Deutschland (Zentrale): info@de.gbo.com I **Österreich:** office@at.gbo.com I **Belgien:** info.be@gbo.com I **Brasilien:** office@br.gbo.com I **China:** info@cn.gbo.com
Frankreich: accueil@gbo.com I **Italien:** office@it.gbo.com I **Japan:** info.JP@gbo.com I **Niederlande:** info.nl@gbo.com
Portugal: info@vacuette.pt I **Spanien:** info@es.gbo.com I **UK:** info.uk@gbo.com I **Ungarn:** office@hu.gbo.com I **USA:** office@us.gbo.com

www.gbo.com