

FICHE TECHNIQUE UNI-SEP et UNI-SEP_{MAXI}
U-02, U-04, U-10, U-16
SEPARATION DES LYMPHOCYTES PAR GRADIENT DE DENSITE

INTRODUCTION

La centrifugation de sang dilué sur un milieu constitué par du polysucrose-métrizoate de sodium est la méthode de choix pour la séparation des lymphocytes. Le succès de cette méthode, c'est à dire la récupération de lymphocytes viables avec la proportion la plus basse possible de granulocytes ou d'érythrocytes contaminants, dépend dans une large mesure de la façon dont le sang est déposé au dessus du polysucrose, et du maintien d'une surface de séparation très nette entre les deux phases, avant la centrifugation.

Le tube UNI-SEP a été mis au point afin d'atteindre facilement cet objectif. Il permet de verser directement l'échantillon de sang dans le tube, sans aucune précaution visant à éviter le mélange avec le polysucrose. Ceci permet le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons, d'autant plus que le mécanisme permet une réduction du temps de centrifugation nécessaire à la séparation des lymphocytes.

PRINCIPE

Les UNI-SEP et UNI-SEP_{MAXI} sont des tubes à centrifuger avec membranes plastiques stériles contenant dans le fond du tube un milieu de séparation des lymphocytes (5.6% de polysucrose et 9.6% de métrizoate de sodium, densité de 1.077 g/ml et osmolarité de 280 mOsm). Le sang, versé normalement sur la membrane, ne perturbe pas la surface de la couche de polysucrose métrizoate.

Pendant la centrifugation, la membrane s'ouvre pour permettre le mélange polysucrose-cellules sanguines. Les globules rouges s'agrègent et les granulocytes sédimentent au fond du tube, tandis que les globules blancs migrent vers la surface de séparation du plasma et de la couche de polysucrose. Ainsi, ils peuvent être immédiatement identifiés puisqu'ils apparaissent sous la forme d'un anneau blanc au dessus de la membrane.

INSTRUCTIONS

1. Les tubes UNI-SEP et UNI-SEP_{MAXI} sont stériles et prêts à l'emploi. Les ouvrir dans des conditions aseptiques.
 2. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une séparation à 18-20°C.
 3. Utiliser un sang défibriné ou traité avec un anti-coagulant, à diluer éventuellement dans un volume égal de solution saline stérile ou dans un tampon isotonique.
- Ajouter le sang dilué ou non dilué directement dans le tube, selon la *table 1*. Centrifuger pendant 20 minutes à 1000g à une température comprise entre 18 et 20°C. (Si la température est inférieure, il faudra alors augmenter le temps de centrifugation).

Table 1

Sang dilué au 1/2	Sang total	Tube	Code	
4 - 8 ml	2 - 4 ml	Tube de 15 ml avec 2 ml de MSL*	U-02	UNI-SEP
4 - 11 ml	2 - 5.5 ml	Tube de 15 ml avec 3 ml de MSL*	U-04	UNI-SEP+
20 - 35 ml	10 - 17.5 ml	Tube de 50 ml avec 10 ml de MSL*	U-10	UNI-SEP MAXI
36 ml	18.5 - 25 ml	Tube de 50 ml avec 15 ml de MSL*	U-16	UNI-SEP MAXI+

*MSL = Milieu de séparation des lymphocytes

Erythrocytes, cellules mortes et MNs (leucocytes polynucléaires ou granulocytes) migrent vers le fond du tube tandis que les lymphocytes se retrouvent au dessus de la membrane, où le gradient de sucrose est le plus important.

4. Retirer le plasma riche en plaquettes en le versant dans un autre tube
5. Prélever la couche de lymphocytes à l'aide d'une pipette ou bien éliminer le contenu du tube se trouvant au-dessus de la membrane et centrifuger afin de récupérer le culot de lymphocytes.

NOTE

Dans des conditions de transport normales, le polysucrose-métrizoate se maintient sous la membrane. Cependant, des fuites peuvent parfois survenir dans la partie supérieure du tube. Le centrifuger pendant 1 minute à 400g afin de replacer la totalité du liquide sous la membrane.

Stocker dans le carton entre 4 et 25°C, à l'abri de la lumière. La détérioration du polysucrose-métrizoate est révélée par l'apparition d'une couleur jaune ou de particules en solution.

