

Percoll 细胞分离液

产品简介

Percoll 是一种适用性广且操作灵活简单的低密度梯度分离液，可用来分离细胞，亚细胞颗粒，细菌，病毒，甚至实现受损细胞及其碎片与完整活细胞的分离。

Percoll 主要由表面包被单层乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone, PVP) 的硅胶颗粒组成，直径 15-30 nm，游离 PVP 的含量仅占 1-2%。PVP 涂层使得 Percoll 完全无毒且为生物材料分离的理想产品，PVP 以单分子层紧紧粘附在硅胶颗粒表面。由于颗粒大小的异质化，离心过程以不同的速率沉淀，自发产生一个匀质化且等渗的梯度，密度在 1.0-1.3 g/ml 之间。大部分沉淀系数 >60S 的生物颗粒都可以用 Percoll 实现分离。

产品组成

名称	编号	FS1142	Storage
Percoll 细胞分离液		100ml	4℃
使用说明书		1 份	

产品特征

- 1) Percoll 形成的梯度密度范围在 1.0-1.3 g/ml 之间，整个梯度体系都是等渗的；
- 2) 无细胞毒性，化学惰性，不会粘附到细胞膜上；
- 3) 可调节至生理离子强度和 pH；
- 4) 温和条件分离细胞，亚细胞颗粒和较大病毒（低至~70S），可保持其活力和形态完整性；
- 4) 只需角转头中速离心即可实现预成梯度或者自发形成梯度分离；
- 5) Percoll 粘度低 (10 ± 5 cP at 20°C)，能够快速形成梯度和颗粒分离；采用预制梯度分离低速离心力 ($200-1000 \times g$) 仅需数分至数十分钟即可达到满意的分离结果；
- 6) Percoll 稳定性高，未开封的产品室温保存 5 年有效；开封的产品室温无菌保存至少 2 年有效；
- 7) Percoll（未稀释）可重新高压灭菌， 120°C ，30min；

产品参数：

Appearance	Colorless to slightly yellow Liquid/Suspension
Physical Form	Colloidal solution of silica coated with polyvinylpyrrolidone (PVP)
Osmolality	< 25 mOsm/kg
Viscosity Max.	15 cP
Conductivity	<100 mS/m

pH Range	8.5–9.5
Density Max.	1.135 g/ml
Application	Used in balanced salt solutions, physiological saline or 0.25 M sucrose. Used for basic research applications. Used for density gradient centrifugation of cells, viruses and subcellular particles. Used for formation of gradients either by the use of convenient gradient mixers or by high speed centrifugation.
Estimated Shelf Life from Manufacture Date	5 years
Storage Conditions	4–30°C
Stability	Percoll is provided as solution which is stable for at least 5 yr when stored between 4°C and 30°C

使用方法

1.不同密度 Percoll 溶液的制备

【注意】：Percoll 最好稀释于缓冲液，生理盐水或 0.25 M 蔗糖溶液中。细胞样本可用缓冲液如 PBS 来进行梯度分离；而亚细胞颗粒，可能会在盐离子存在的条件下聚集在一起，建议使用蔗糖溶液（终浓度 0.25 M）来进行梯度分离。

1.1 等渗 Percoll 溶液（SIP）的制备

取 9 份 Percoll (v/v) 加入 1 份 1.5 M NaCl, 10×浓缩培养基, 1.5 M PBS 或 2.5 M 蔗糖溶液混匀即可。可通过加入盐离子或者蒸馏水来调整渗透压到最后需要的值。细胞密度取决于渗透压, 因此, SIP 溶液的渗透压常规来说需要用渗压计来调整以确保实验间结果的可重复性。通过以下公式来计算 SIP 溶液的密度,

$$V_x = V_0 \frac{(p_0 - p_i)}{(p_i - p_{10})} \quad \text{thus } p_i = \frac{(V_0 p_0 + V_x p_{10})}{(V_x + V_0)}$$

此公式中, V_x = volume of diluting medium (ml); V_0 = volume of undiluted Percoll (ml)

p_0 = density of Percoll (1.130+0.005g/ml);

p_{10} = density of 1.5M NaCl=1.058g/ml(minor differences for other salts);

density of 2.5M sucrose=1.316g/ml(minor differences for other additives)

ρ_i = density of SIP solution produced(g/ml)

Thus, for SIP in saline, $\rho_i=1.123\text{g/ml}$ and for SIP in sucrose, $\rho_i=1.149\text{g/ml}$, assuming $\rho_0=1.130\text{g/ml}$.

1.2 稀释 SIP 溶液到需要密度

直接使用 0.15 M NaCl 或 1×细胞培养液（正常渗透压）稀释 SIP 到需要的密度，用于细胞分离；直接使用 0.25 M 蔗糖溶液稀释 SIP 用于亚细胞或者病毒分离。通过以下公式来计算调整 SIP 到需要的密度，

$$V_y = V_i \frac{(\rho_i - \rho)}{(\rho - \rho_y)}$$

此公式中， V_y = volume of diluting medium in ml; V_i = volume of SIP in ml;

ρ_i = density of SIP in g/ml; ρ = density of diluted solution produced in g/ml;

ρ_y = density of diluting medium in g/ml

(density of 0.15M NaCl is $\sim 1.0046\text{g/ml}$)

(density of 0.25M sucrose is $\sim 1.032\text{g/ml}$)

注意：以上公式调整得到的实际密度仅仅与预定密度非常接近，并不能保证完全相同。因为加入体积和稀释液密度的微小变化都会影响最终结果。要想知道实际密度，建议使用密度计或折射仪来测定。

2. 不连续 (Discontinuous) 密度梯度的制备

2.1 根据以上公式将 SIP 溶液稀释到需要的一系列不同密度；

2.2 先将试管壁用牛血清湿润，除去多余血清，这种预处理可使逐层叠加的 Percoll 液平稳沿管壁流下，使形成满意的界面。使用枪头或者宽口针头的注射器按照高密度向低密度逐层放置的先后顺序，紧贴管壁，任液体自然慢慢流下，确保上层溶液不会溅入下层或者混入分界处。

3. 装样

样品体积和细胞浓度根据不同细胞而异，一般加样体积不宜过大，细胞浓度也不可过高，否则会影响细胞的分离和回收。

4. 离心

一般采用离心力为 $400 \times g$ ，时间 20~25min。由于多层 Percoll 之间密度差别不大，因此离心机加速、降速时要慢，要平稳。

5. 取样

当所要分离的细胞绝大部分在两层的界面时，可逐层去除 Percoll 液后收集界面部位的细胞；有时大部分细胞位于 Percoll 层中，则需要逐层收集。

6. 清洗

Percoll 由于没有细胞毒性，且不会粘附在细胞膜上，通常来说没有必要去除。细胞可

直接转入培养体系，病毒可直接进行感染，细胞器可直接用于代谢功能研究等。也可以根据以下方法来进行清洗去除 percoll。

6.1 细胞样本的低速清洗（可选）

收获含有 Percoll 液的活细胞层，用生理盐水或者 PBS 缓冲液按照 5:1 的体积比清洗 2~3 次，每次用 $200 \times g$ 离心 2-10 min 回收细胞；

6.2 病毒或者亚细胞的高速清洗（可选）

病毒或者亚细胞由于太小难以用低速离心收集获得，可在吊篮式转头或角转头离心机中高速离心分离这些样本。收获含有 Percoll 液的分离层放入离心管内，以吊篮式转头 $100,000 \times g$, 2 h 或者角转头 $100,000 \times g$, 90 min 的条件离心沉淀 Percoll 颗粒。需要的生物样本保留在上层溶液。

注意事项

1) Percoll 分离推荐使用聚碳酸酯 (PC) 离心管；Percoll 离心后常有二氧化硅颗粒聚集在管底，或者分层时聚集在管壁上。干燥后这些沉淀较难去除，因此建议使用后立即用水冲洗所用设备。

2) Percoll 在 pH 5.5-10 之间性能不受任何干扰。但低于 pH 5.5 会发生胶凝。二价阳离子也会引起胶凝，而温度升高会加剧此现象发生。

3) 只有不含盐离子或蔗糖的 Percoll (原液) 才能高压灭菌。因为盐离子会引起胶凝，而蔗糖会引起焦糖化。高压灭菌过程尽量减少与空气接触，避免在 percoll/空气层间形成固体颗粒，可通过将 percoll 装在窄口瓶内来避免。如果颗粒已经形成，通过过滤或者低速离心的方式去除。灭菌后溶液的损失可加入相应体积的蒸馏水补足，密度不会受影响。Percoll 不可用滤膜除菌。

4) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。