

percoll 细胞分离液

产品编号: MB3011

质量标准: 生物级

包装规格: 100mL

产品形式: 液体

简介: Percoll 细胞分离液是一种经充分验证的细胞、病毒及亚细胞颗粒密度梯度离心介质。Percoll 由胶体二氧化硅构成, 表面包被有聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。Percoll 通过使用便捷的梯度混合器或高速离心机离心后, 由于介质中颗粒大小的异质性, 会自发形成密度梯度, 样品可与介质预混合, 然后在原位形成的梯度上进行分离。通过这种方式, 可在单次操作中实现梯度形成和样品分离。

物理性状及指标:

外观: 无色至淡黄色液体

密度: $1.130 \pm 0.005 \text{ g/mL}$

渗透压: $\text{max. } 25 \text{ mOsm/kg}\cdot\text{H}_2\text{O}$

电导率: $\text{max. } 100 \text{ mS/m}$

pH: 9.0 ± 0.5

粘度: $\text{max. } 15 \text{ cP}$

产品用途: 科研试剂, 广泛应用于细胞生物学等科研方面, 严禁用于人体。percoll 可根据密度梯度离心原理, 对血液或组织样品进行细胞、细胞器、病毒、核酸等生物样本的分离、纯化与富集。其具有以下特性:

- 低渗透压可实现对生理条件的精确调节, 且不会对培养基产生显著干扰。
- 与活细胞及病毒相容, 可实现完整、完全活性系统的分离与回收。
- 对生物膜具有不可渗透性, 因此在离心过程中颗粒的浮力密度不会发生改变。
- 离心过程中自发形成的梯度, 使得离心管中可混合大体积样本。
- 低粘度导致梯度快速形成及颗粒分离。

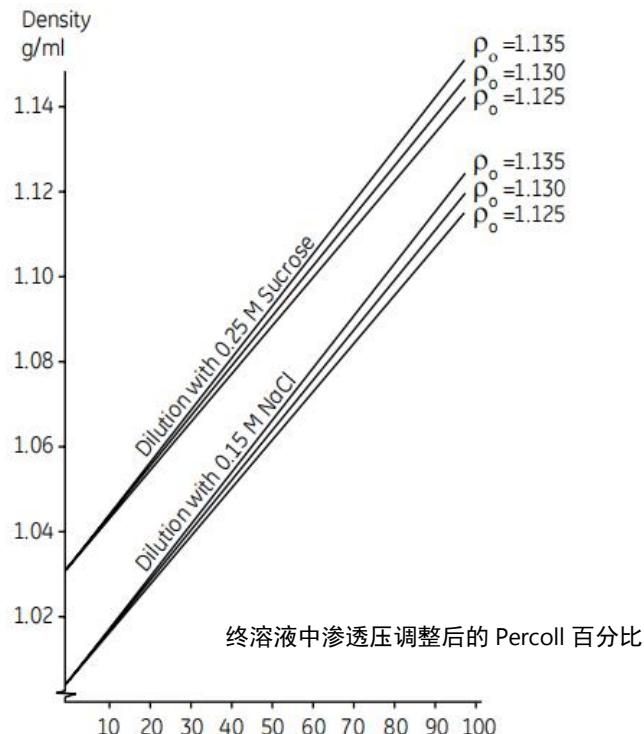


图 1. 用生理盐水或蔗糖溶液稀释经渗透压调节的 Percoll (340mOsm/kg·H₂O) 储备液。 ρ_0 为 Percoll 的密度。



使用方法：（仅供参考）
1. 梯度的制备

本实验基于密度梯度离心，即依靠不同细胞或颗粒在不同密度的溶液中沉降速度不同进行分离，所以目标工作液的密度必须非常精确。但确保最终分离溶液密度的同时，必须维持好一定的渗透压，以保护分离的对象。

Percoll 最佳使用于平衡盐溶液、生理盐水或 0.25 M 蔗糖溶液中。细胞可在平衡盐溶液、细胞培养液或 NaCl 溶液配制的梯度中分离；而亚细胞组分或病毒在盐离子条件下容易聚集，因此建议使用蔗糖溶液配制的梯度分离。

【注】制备梯度时可直接按照步骤 1.1 计算出的体积值，取相应体积的各溶液直接混合为相应密度的分离液，然后按照步骤 1.3 制备梯度。也可以按照步骤 1.2，预先配制好等渗溶液（Stock isotonic Beyocoll, SIB, 约 340mOsm/kg·H₂O），再根据所需的密度对等渗溶液进行稀释，然后按照步骤 1.3 制备梯度。

1.1 一步法配制工作液（直接配制目标工作液）：

(1) 根据所需密度，可按以下公式计算出配制目标工作液所需的 Percoll、稀释液和蒸馏水体积。

$$V_0 = V \times (\rho - 0.1\rho_{10} - 0.9) / (\rho_0 - 1)$$

其中 V_0 为 Percoll 体积(mL), V 为目标工作液总体积(mL), ρ 为目标工作液密度(g/mL), ρ_0 为 Percoll 密度(1.130g/mL), ρ_{10} 为稀释液密度(1.5M NaCl 溶液的密度为 1.058g/mL; 2.5M 蔗糖溶液的密度为 1.316g/mL)。

(2) 根据公式计算出 V_0 后，量取 $V/10$ 的稀释液(1.5M NaCl 溶液或 2.5M 蔗糖溶液)，将 Percoll 和稀释液混合，并需要使用蒸馏水补足至 V 。例如，制备 100mL 密度为 1.07g/mL 的目标工作液，稀释液为 1.5M NaCl 溶液时： $\rho=1.07\text{g/mL}$, $\rho_0=1.130\text{g/mL}$, $\rho_{10}=1.058\text{g/mL}$, $V=100\text{mL}$ ，代入公式： $V_0=100 \times (1.07-0.1 \times 1.058-0.9) / (1.130-1)=49.4\text{mL}$ 。因此，可取 49.4mL Percoll 和 10mL 1.5M NaCl 溶液混合，并用蒸馏水补足至 100mL。

1.2 两步法配制工作液（先配制等渗溶液，再稀释）：

(1) 等渗溶液的配制：对于细胞样品，将 Percoll 与 1.5M NaCl 溶液、10×PBS 按照体积比 9:1 的比例进行配制。对于亚细胞颗粒或病毒样品，将 Percoll 与 2.5M 蔗糖溶液按照体积比 9:1 的比例进行配制。

(2) 将等渗溶液稀释到需要的一系列密度。可按以下公式计算出配制目标工作液所需的等渗溶液和稀释液的体积。对于细胞样品，可采用 0.15M NaCl 溶液、1×细胞培养液或 1×PBS 稀释等渗溶液至所需密度。对于亚细胞颗粒或病毒样品，可采用 0.25M 蔗糖溶液稀释等渗溶液至所需密度。

$$\rho_{SIB} = (9 \times \rho_0 + 1 \times \rho_1) / 10$$

$$V_{SIB} = V \times (\rho - \rho_2) / (\rho_{SIB} - \rho_2)$$

$$V_2 = V - V_{SIB}$$

其中 ρ_{SIB} 为等渗溶液密度(g/mL), ρ_0 为 Percoll 密度(1.130g/mL), ρ 为目标工作液密度(g/mL), ρ_1 为等渗溶液稀释液密度(1.5M NaCl 溶液的密度为 1.058g/mL; 2.5M 蔗糖溶液的密度为 1.316g/mL), ρ_2 为目标工作液稀释液密度(0.15M NaCl 溶液和 0.25M 蔗糖溶液的密度为 1.00g/mL), V_{SIB} 为等渗溶液体积(mL), V 为目标工作液体积(mL), V_2 为目标工作液稀释液体积(mL)。

(3) 确定目标工作液体积和目标工作液密度后，根据公式计算出 V_{SIB} 和 V_2 后，量取等渗溶液和稀释液，混合后即为目标工作液。例如，制备 100mL 密度为 1.07g/mL 的目标工作液，稀释液为 0.15M NaCl 溶液时： $\rho_0=1.130\text{g/mL}$, $\rho_1=1.058\text{g/mL}$, 代入公式： $\rho_{SIB}=(9 \times 1.130 + 1 \times 1.058) / 10 = 1.123\text{g/mL}$; $V=100\text{mL}$, $\rho=1.07\text{g/mL}$, $\rho_2=1.00\text{g/mL}$, $\rho_{SIB}=1.123\text{g/mL}$, 代入公式： $V_{SIB}=100 \times (1.07-1) / (1.123-1)=56.91\text{mL}$; $V=100\text{mL}$, $V_{SIB}=56.91\text{mL}$, 代入公式： $V_2=100-56.91=43.09\text{mL}$ 。因此，可取 56.91mL 等渗溶液和 43.09mL 0.15M NaCl 溶液混合，即为目标工作液。

1.3 制备密度梯度：

按照高密度向低密度逐层放置的先后顺序，用吸头或注射器，紧贴管壁，自然缓慢流下液体，确保上层溶液(高密度)不会溅入下层(低密度)或者混入分界处，形成梯度。

【注】可先将管壁用 FBS 湿润，然后除去多余血清，这种预处理可使逐层叠加的分离液平稳沿管壁流下，使形成满意的界面。

2. 密度梯度离心

在密度梯度离心过程中，可根据实验目标选择不同的离心方式。

2.1 角转头高速离心（形成自发梯度）：


Percoll 将在约 $10,000\times g$ (0.15 M 生理盐水) 或 $25,000\times g$ (0.25 M 蔗糖溶液) 离心 15 分钟后, 自发形成从管底至管顶的连续密度梯度。在此方法中, 样品可在离心前直接与 Percoll 均匀混合。离心开始后, 样品颗粒将在自发形成的梯度中按其密度大小进行分布, 并最终在与其自身密度相等的位置聚集, 形成清晰的等密度区带。本方法适用于亚细胞颗粒或病毒样品的高效分离。

2.2 水平转头低速离心 (依赖预制梯度) :

对于完整的活细胞等对剪切力敏感的样品, 推荐使用水平转头进行低速离心 (如 $400\times g$)。该方法通常依赖于预先制备的连续或不连续密度梯度。离心时需设置较慢的升、降速程序 (如离心 20–30 分钟), 本方法能有效维持梯度结构的稳定性, 并避免已分离的细胞区带因流体扰动而重新混合, 从而确保细胞能够温和地迁移至其等密度位置, 并获得更高的细胞活性和回收率。

3. 取出样品

离心后会形成一个连续密度梯度(约 1.0-1.3g/mL), 每种颗粒或细胞都会漂浮或沉降到其自身密度(即浮力密度或漂浮密度, Buoyant density)相等的等密度区带, 随后小心吸取目标区带, 即可获得目标组分。Percoll 分离的典型细胞与亚细胞组分的密度与分布位置请参考下表(仅供参考, 不同物种可能有一些区别)。

样品类型		浮力密度 (g/mL)	分离后位置	备注
细胞	血小板(Platelet)	<1.04	上层或漂浮液体表面	最轻, 常漂浮于液面
	淋巴细胞(Lymphocyte)	1.055–1.065	中层(界面)	常在透明带处聚集
	单核细胞(Monocyte)	1.060–1.068	中下层	位于淋巴细胞之下
	嗜中性粒细胞(Neutrophil)	1.080–1.090	下层	紧贴红细胞上方
	红细胞(Erythrocyte)	>1.09	底部沉淀层	密度最高, 完全沉底
亚细胞组分	细胞质(Cytoplasm)	<1.05	上层或漂浮	最轻的可溶性组分
	微粒体(Microsome)	1.09–1.12	中层	分布较广
	溶酶体(Lysosome)	1.12–1.15	中下层	常位于线粒体之上
	线粒体(Mitochondria)	1.17–1.20	下层	主要集中于较高密度区
	细胞核(Nucleus)	>1.20	最底部	核密度最高

4. 清洗

Percoll 由于没有细胞毒性, 且不会粘附在细胞膜上, 通常可不必去除, 细胞可直接进行培养, 病毒可直接进行感染, 细胞器可直接用于功能性研究。如有必要, 也可以根据以下方法来进行清洗以去除。

(1) 细胞样品: 用预冷、5 倍体积的 PBS 或生理盐水轻柔洗涤, $200-500\times g$ $4^{\circ}C$ 离心 8-10 分钟, 弃上清, 如有必要可以再重复洗涤 2-3 次, 收集细胞沉淀。

(2) 亚细胞组分: 用预冷、5 倍体积的 PBS 或者生理盐水轻柔洗涤后, $10,000-20,000\times g$ $4^{\circ}C$ 离心 10-30 分钟。小心弃上清, 收集沉淀。

【注】具体的离心力取决于目标亚细胞组分。

(3) 对于病毒、外泌体或更小的颗粒: 未稀释的样品, $100,000\times g$ $4^{\circ}C$ 离心 120 分钟(水平转子)或 90 分钟(角转子)以沉淀 Percoll 中的介质, 收集上清。

(4) 凝胶过滤、离子交换色谱法、超滤管离心和透析等方法进行洗涤。

5. 参考数据: Percoll 梯度的密度测定



使用折射仪可以轻松测量梯度分馏后 Percoll 溶液的密度。折射率与 Percoll 溶液的密度呈线性相关。有关 20℃ 下蔗糖和氯化钠溶液中 Percoll 稀释系列的密度和折射率信息，请参见表和图 2。

蔗糖中的Percoll		氯化钠中的Percoll	
密度 (g/mL)	折射率	密度 (g/mL)	折射率
1.0345	1.3457	1.0085	1.3350
1.0484	1.3478	1.0243	1.3372
1.0618	1.3499	1.0403	1.3399
1.0765	1.3518	1.0558	1.3423
1.0903	1.3541	1.0713	1.3449
1.1040	1.3561	1.0869	1.3470
1.1180	1.3582	1.1029	1.3493
1.1319	1.3600	1.1189	1.3519
1.1461	1.3626	1.1305	1.3534
1.1547	1.3638	1.1513	1.3569

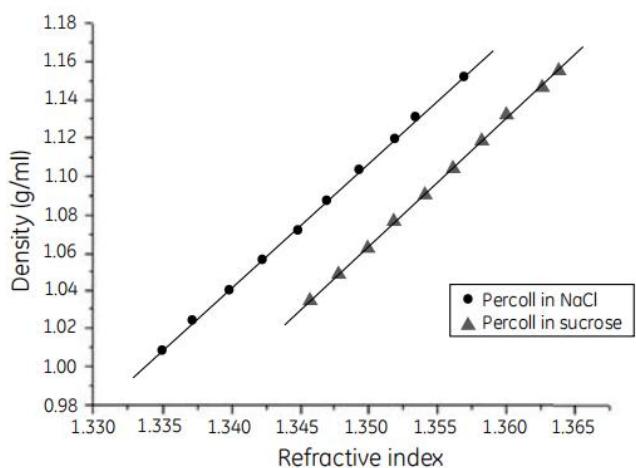


图 2. 氯化钠和蔗糖溶液中 Percoll 在 20℃时折射率与密度的相关性。直线通过最小二乘线性回归获得。Percoll 在氯化钠和蔗糖中的拟合优度 (R^2) 均为 0.9995。

储存条件：室温下未开封储存长达 5 年。开启后应储存于 2~8℃环境中。

运输条件：常温运输。

【注意】

- 含二氧化硅的溶液通常会在离心管底部形成沉淀，并在用于分馏的管壁上沉积二氧化硅。这些沉积物在干燥状态下可能难以清除，因此建议所有设备在使用后立即彻底清洗。Percoll 的溢出物可通过水洗方式清除。
- 所有硅胶胶体在长期储存时形成聚集体是一种固有趋势。这些聚集体可能在某些批次的 Percoll 中观察到，表现为管底的轻微沉淀物或密度为 1.04 至 1.05 g/mL 的淡白色条带。该条带可能在离心机形成梯度时或预形成梯度的低速离心过程中形成。聚集的硅胶不会干扰生物颗粒的分离，且几乎所有细胞和细胞器在 Percoll 中的浮力密度均大于 1.05 g/mL。对于大多数细胞、病毒和细胞器的分离，从梯度材料中带出的任何二氧化硅聚集体均可忽略不计。
- 在特定实验中，可能需要去除聚集体；这可通过在离心前使用深层过滤器过滤 Percoll 来实现。
- 本产品为无菌包装，请注意无菌操作，防止污染。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 部分产品我司仅能提供部分信息，我司不保证所提供信息的权威性，仅供客户参考交流研究之用。

S251201

