

# 细胞分离的前奏：密度梯度离心



密度梯度离心 (density gradient centrifugation) 是用一定的介质在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度, 将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部, 通过重力或离心力场的作用使细胞分离。这种分离又可分为速率沉降和等密度沉降两种。速率沉降 (velocity sedimentation) 主要用于分离密度相近而大小不等的细胞或细胞器。等密度沉降 (isopycnic sedimentation) 在离心后细胞沉降于密度梯度液中与自身密度相同的密度平衡点, 适用于分离密度不等的颗粒。

沉降介质应当是无毒的, 可在需要的密度范围内形成梯度, pH 值和渗透压可以调节, 在高密度时也不粘稠, 并能保持细胞或颗粒的完整性。

常用的沉降介质有哪些? 你是不是马上就想到了 Ficoll 和 Percoll, 没错, 那可是 GE 的明星产品之一, 已经畅销几十年了。Ficoll 是聚蔗糖, 常用的 Ficoll-400, 分子量为 40kD, 具有高密度、低渗透压、无毒性的特点。高浓度的 Ficoll 溶液粘性高, 易使细胞聚集, 故通常使用 60g/L 的低浓度溶液, 密度为 1.020, 添加比重为 1.200 的泛影酸钠以增加密度, 就形成了平时常用的 Ficoll-Paque PLUS。Percoll 是一种经聚乙烯吡咯酮涂层(PVP)处理的硅胶颗粒, 对细胞无毒性。利用 Percoll 液经高速离心后形成一个连续密度梯度的原理, 将密度不等的细胞分离纯化。该法是纯化细胞、亚细胞颗粒和大的病毒的一个较好的方法, 但操作流程较长, 手续较多。下面我们就对这些介质进行详细的介绍:

## Ficoll™ PM400

Ficoll PM400 是中性、亲水的蔗糖聚合物, 平均分子量为 40kD。一直以来它都被用于形成密度梯度, 来分离和提取真核细胞、细胞器和细菌细胞, 以及分离淋巴细胞的稳定剂

和分离介质。它还可以用于制备培养基、核酸杂交、电泳和免疫研究。Ficoll PM400 的渗透压性质比蔗糖好, 浓度达到 50% 时密度可以达到 1.2 g/ml。因为它的分子量高, 且可透析物质含量低, 所以 Ficoll PM400 通常不会渗透细胞膜。

在离心时, 大家通常会调整培养基的密度和粘度, 让颗粒以合适的速度沉降。合适浓度的蔗糖则渗透压太高, 会伤害细胞。而如果你换用蔗糖聚合物 Ficoll, 你就可以得到想要的密度, 也不会显著增加渗透压。这样你就能够保持细胞完整, 并维持细胞活力。因此 Ficoll 取代了蔗糖用于密度梯度离心, 并主要用于常规的细胞分离。Ficoll 还是分离淋巴细胞的主要原料。

## Ficoll-Paque PLUS

Ficoll-Paque PLUS 就是我们经常说的淋巴细胞分离液, 在市场上销售了 30 多年, 从事免疫学研究的人估计都不会陌生。Ficoll-Paque PLUS 是无菌的、即用型的 Ficoll-泛影酸钠, 有着合适的密度、粘度和渗透压, 能够简单快速地从人外周血、骨髓和脐带血中分离淋巴细胞。它的内毒素水平非常低, 小于 0.12EU/ml。

除去了纤维蛋白或抗凝剂处理过的血液

加入 Ficoll-Paque PLUS 溶液中并离心。离心中的差异迁移就导致了溶液的分层,每层包含了不同的细胞类型。最底层包含 Ficoll 聚集的红细胞以及沉淀物。紧挨着上面的

Ficoll-Paque PLUS 一层包含了大部分粒细胞。淋巴细胞因为密度低,最终停留在血浆和 Ficoll-Paque PLUS 的中间层。这一层还有其他沉淀慢的颗粒,如血小板和单核细胞。吸取中间层,用平衡盐溶液短暂洗涤,以除去血小板、Ficoll-Paque PLUS 和血浆,就可以得到单个核细胞。且分离所得的细胞中  $95\pm 5\%$  为单个核细胞,细胞存活率  $> 90\%$ ,回收率为  $60\pm 20\%$ 。

由于这种方法还可以稍作变动用于很少的血液,因此 Ficoll-Paque PLUS 还特别适合从有限的血液(如来源于尸体或小孩)中分离淋巴细胞。

### **Ficoll-Paque™ PREMIUM 系列**

Ficoll-Paque PREMIUM 系列产品为无菌、即用型的密度梯度介质,可用于分离单个核细胞。所有的 Ficoll-Paque PREMIUM 产品内毒素含量很低 ( $< 0.12$  EU/ml),并在严格控制的环境下加工生产,生产条件符合 ISO 13485:2003 标准和 GMP 认证。

Ficoll-Paque PREMIUM 包括 1.073、1.077、1.084 g/ml 的不同密度梯度产品,可用于从外周血、骨髓和脐带血分离不同密度制备的单个核细胞。

经典的密度为 1.077 g/ml 的 Ficoll-Paque PREMIUM 是由 Ficoll-Paque PLUS 发展而来。唯一的不同之处在于, Ficoll-Paque PREMIUM 的生产加工过程符合 ISO 13485:2003 标准、GMP 认证以及美国药典推荐的用于生产加工细胞治疗相关产

品的标准。

Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 可用于分离较高密度的人单个核细胞,还可用于分离小鼠和大鼠的血细胞,因为啮齿动物的淋巴细胞密度比人的稍大。Ficoll-Paque PREMIUM 1.073 则用于分离较低密度的人单核细胞,如基质细胞和单核细胞。

### **Percoll & Percoll PLUS**

Percoll 是一种硅胶介质,用于密度梯度离心分离细胞。该介质的硅颗粒表面有一层聚乙烯吡咯酮涂层 (PVP),从而使其渗透压和粘度降低。用 Percoll 分离细胞时,应在温和的条件下进行,这样有助于多种细胞、亚细胞颗粒和病毒的分离。它渗透压低,很容易用生理盐水、其他平衡盐溶液或细胞培养基调整,在 1.0 至 1.3 g/ml 的密度范围内可以形成等渗 Percoll 梯度。该密度范围经最优化设计旨在用于分离那些在 Percoll 中浮力密度为 1.0 至 1.2 g/ml 的大多数细胞,亚细胞颗粒和小至 70S 的病毒。

Percoll PLUS 与 Percoll 类似,但内毒素水平更低(最高 2 EU/ml),非常适合在各种临床研究应用中进行细胞分离。文献中描述的应用 Percoll 的所有实验都可以用 Percoll PLUS 进行。Percoll PLUS 可用于建立预形成梯度、连续梯度或不连续梯度。在中等离心力作用下,由 Percoll PLUS 组成的胶粒沉淀形成平滑、连续的密度梯度。密度梯度的形成可使用离心机固定角度离心转头和悬垂转头。Percoll PLUS 介质也很适用于需要高速离心的应用。在这种情况下,标本可以与介质预混合,随后在原地 (in situ) 形成的连续梯度上进行分离。这样,就可以一步完成梯度形成和标本分离。[反馈表链接](#)

密度梯度离心作为最古老的细胞分离技术，也在不断更新。它与标记技术相结合，能更快地分离目的细胞。StemCell Technologies 公司就提供了这样的分离方法，叫做 RosetteSep®。这种专利技术是在四聚体抗体复合物（TAC）的基础上发展起来的。RosetteSep 将全血中不需要的细胞通过 TAC 与红细胞偶联。标记之后，将样品铺在沉降介质如 Ficoll 中，通过离心，标记的细胞就与红细胞一起沉淀，而想要的非标记细胞就

可以从中间层中回收。RosetteSep 能够应用于淋巴细胞和髓样细胞的富集，AIDS 研究中 T 细胞的分离等很多方面。这种方法非常快，而且目的细胞未标记任何东西，是未触碰的（untouched）。所以很受研究者欢迎。

但是，如果你想从淋巴细胞中进一步分离 B 细胞和 T 细胞，恐怕离心就无能为力了，那么就把这个任务交给磁珠分选或流式分选吧。（待续）(生物通 余亮)