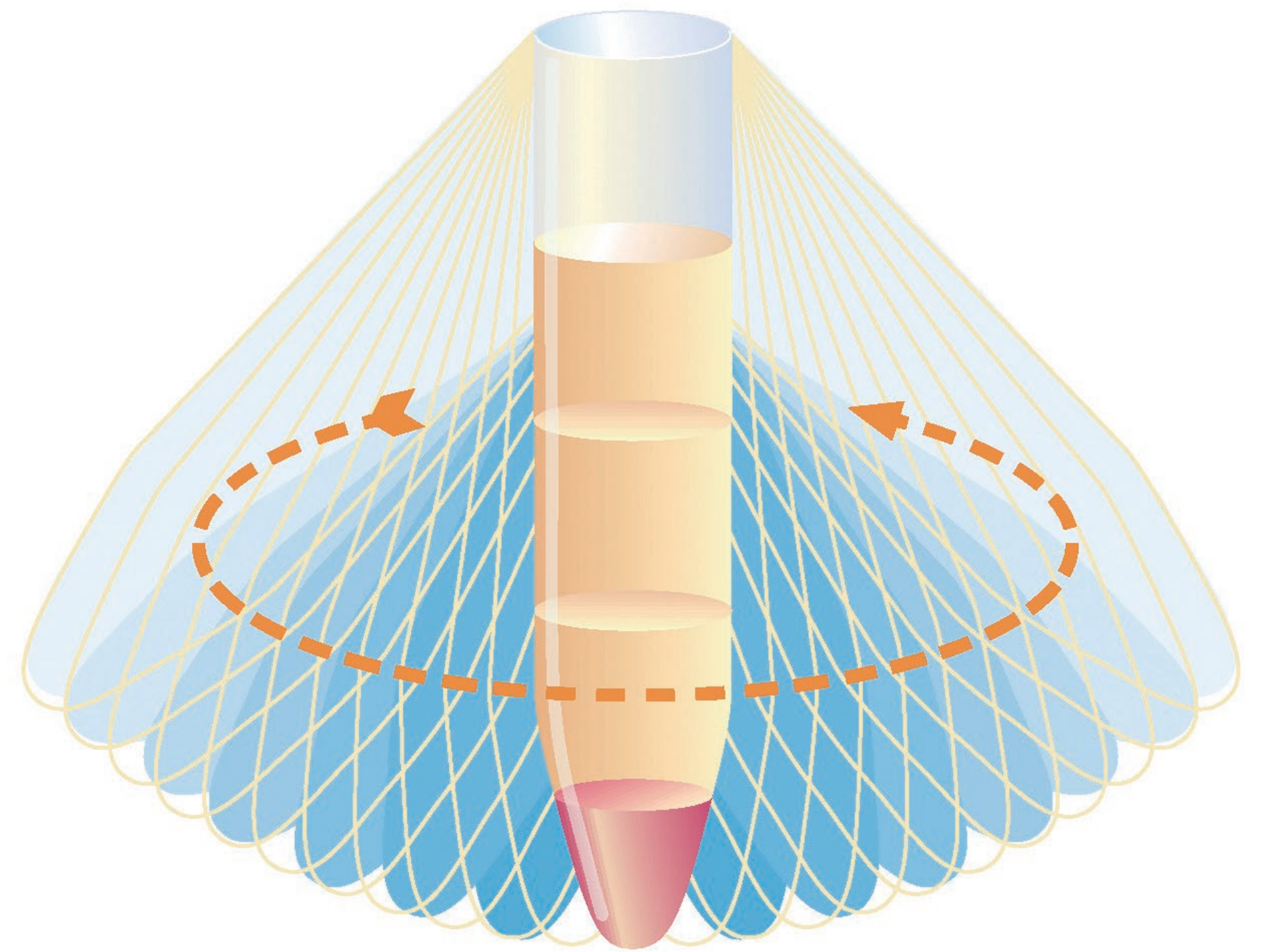


细胞分离介质

方法学和应用



目录

介绍	3	如何分离和分析Percoll 梯度	22	应用	31
密度梯度离心原理	5	应用Density Marker Beads 的密度测定	22	血细胞	31
通过密度分离(等密度离心法)	6	Density Marker Beads – 性质	22	应用 – 血细胞	32
通过大小分离(速率区带离心法)	6	离子强度和蔗糖浓度对Density Marker Beads 密度的影响	23	应用 – 其他细胞类型	41
Percoll – 物理性质	7	使用Density Marker Beads	23	应用 – 微生物	51
颗粒大小和组成	7	测定密度的其他方法	24	应用 – 亚细胞颗粒	53
粘度	8	梯度分离	24	附录 – 简要方法图	61
密度	8	细胞分选和计数	25	附录 – 简要方法图	61
pH 和渗透压	8	蛋白质测定和酶分析	25	方案1. 在Percoll 梯度上分离细胞	61
溶胶行为	9	离心后Percoll 的去除	26	方案2. 在Percoll梯度上分离亚细胞颗粒和一些病毒	61
如何制备和使用Percoll 梯度	10	清洗	26	预定信息	62
配制和稀释Percoll 的储存溶液	10	高速离心	26	用于分离和细胞培养的产品	76
稀释储存液到更低的密度	11	其他的方法	27	RNA 纯化产品	76
一步法稀释Percoll	12	实用注意	28	cDNA 合成试剂盒	76
稀释Percoll 到需要的渗透压	13	设备的护理和清洗	28		
渗透压对细胞和亚细胞颗粒表观浮力密度的影响	16	Percoll 的储存	28		
影响梯度形成和形状的因素	17	Percoll 溶液的灭菌	28		
不连续(阶段) 梯度	19	硅颗粒聚集	28		
连续线性和非线性梯度	19	Percoll PLUS – 低内毒素	29		
预制的自动生成梯度	20	物理性质	29		
原位形成梯度	20	组成	29		
最大样品上样量	21	渗透压	29		
标准化条件的模型实验	21	密度	29		
		内毒素活性	30		
		梯度	30		
		实用注意	30		

介绍

自从1977 年推出以来，二氧化硅胶体Percoll™ 已经成为全世界数以千计的研究人员对密度梯度介质的选择。其近乎完美的物理特征方便它应用在细胞、细胞器、病毒和其他亚细胞颗粒的分离。Percoll作为细胞群富集的第一步尤其有用，然后再有更精细的分辨率或提取核酸。人们认识到在进行其他的这些方法前先使用Percoll进行分离可以节省大量的时间和资源。

对于生物学颗粒，理想的密度梯度离心介质应具有以下特征(79):

- 涵盖了所有感兴趣的生物颗粒的等密度(图1) 带范围
- 拥有生理离子强度和pH
- 在全部梯度中是等渗的
- 低粘度
- 无毒性
- 不会渗透生物膜
- 无菌且可以重复灭菌
- 在适度的离心力下将自动形成梯度
- 和生物材料兼容
- 很容易从被纯化的材料中去除
- 不影响分析程序

Percoll在现有的介质中是非常特殊的，它符合上述所有的标准，并且提供以下附加的优点：

- 它能形成连续梯度和不连续的两种梯度。
- 梯度的稳定性意味着梯度可以预制以提供可重复性的结果。
- 使用带颜色的Density Marker Beads可以简单地分析梯度 (Cospheric LLC, USA 提供)。
- Percoll 不影响被分离的材料进一步的研究。
- Percoll参考文献列表中记录了数以千计的研究人员的成功。

这本再次发行的手册提供了制作和使用Percoll 梯度的基本方法学，并包括了关于Percoll PLUS 的信息，它是一种新的二氧化硅胶体介质，优化用于临床研究应用的细胞分离。此外，手册后面部分的Application Tables应用表格提供了很多使用Percoll分离不同的细胞、微生物、细胞器和亚细胞颗粒的参考文献。在文献中描述的所有的使用Percoll 的实验也能够用Percoll PLUS 进行。

密度梯度离心原理

当颗粒悬浮液被离心时，颗粒的沉降速率和使用的离心力是成比例的。溶液的物理性质也会影响沉降速率。在一个固定的离心力和液体粘度下，沉降速率和颗粒大小以及它自身密度与周围介质密度之间的差别成比例。

离心时颗粒的沉降方程为：

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \times g$$

- v = 沉降速率
- d = 颗粒直径(流体力学等效球体)
- ρ_p = 颗粒密度
- ρ_l = 液体密度
- η = 介质粘度
- g = 离心力

从这个方程中，可以观察到下列关系：

- 颗粒沉降速率和它的大小成比例。
- 沉降速率和它自身密度与周围介质密度之间的差别成比例。
- 当颗粒密度等于周围培养基密度时，沉降速率为0。
- 沉降速率随着介质粘度的增加而降低。
- 沉降速率随着离心力的增加而增加。

通过密度分离 (等密度离心法)

在这个技术中，梯度离心介质的密度范围包含了样品颗粒的所有密度。每种颗粒将沉降到梯度中的平衡位置，在这个位置梯度密度等于颗粒密度(等密度位置)。因此，在此类分离中，颗粒基于不同的密度而被单独分离，与颗粒大小无关。

图1显示两种类型的梯度分离(见下面的速率区带离心法)。当使用Percoll时，通常是以等密度分离颗粒，而不是基于尺寸大小差异(但两种技术都使用时，参见31 页的图19)。

备注: 当考虑生物颗粒时，切记介质的渗透压能够明显地改变膜结合颗粒的大小和表观浮力密度。一个高的渗透压能够导致膜结合颗粒收缩而培养基低的渗透压将导致结合颗粒的膨胀。

图2 显示在生理条件下(280 到320mOsm/kg H2O) 使用Percoll梯度离心的颗粒比用蔗糖或甲泛葡胺离心的颗粒有低得多的表观浮力密度(见16 页表1)。

通过大小分离 (速率区带离心法)

在这类技术中，颗粒之间的大小差别与颗粒的密度一起影响分离。正如前述的方程所示，大颗粒在整个梯度中比小颗粒移动更快，因此选择密度范围以便在整个分离期间的所有的位置上的颗粒密度大于介质密度(图1)。被分离的区带到达管底部(或者它们的平衡位置) 之前运行结束。

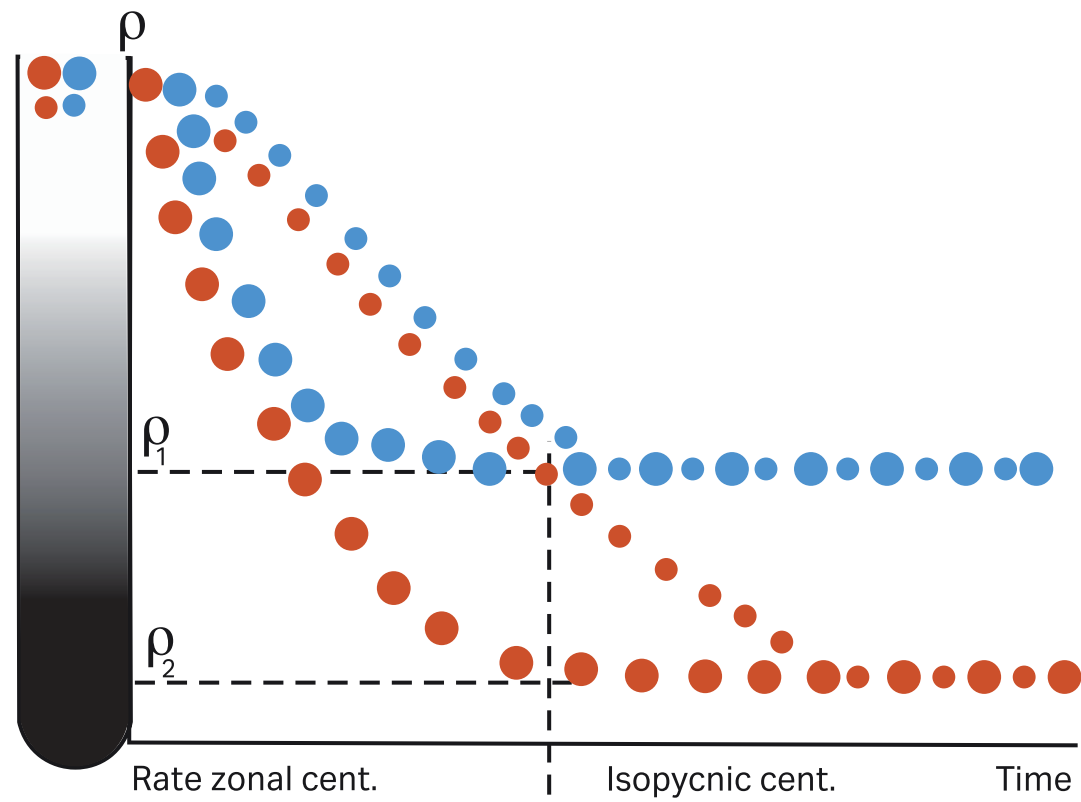


图1. 速率区带离心法和等密度离心法图示。
 ρ_1 = 较小密度颗粒(蓝色) 的浮力密度 ρ_2 = 较大密度颗粒(红色) 的浮力密度
(图像引用引用经过H. Pertoft 允许)。

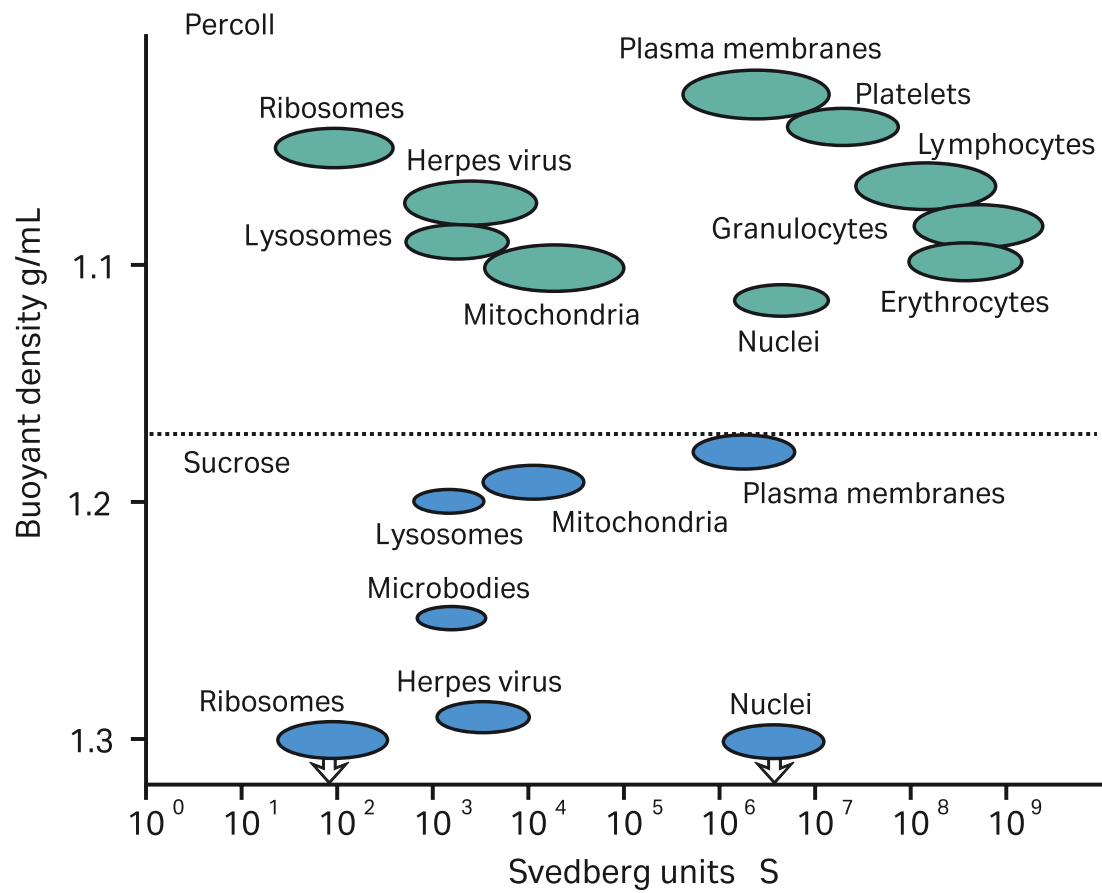


图2 . 大鼠肝脏匀浆、疱疹病毒和人红细胞在Percoll 梯度(绿色) 和蔗糖梯度 (红色) 比较中颗粒的大约沉降速率和等密度条带密度。Svedberg 单位 = 沉降系数，1S = 10^{-13} s。
(27，图像引用引用经过作者和出版商允许)。

Percoll – 物理性质

Cytiva 现提供 Percoll。

组成	带有不可降解的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 涂层的二氧化硅溶胶
密度	1.130 ± 0.005 g/ml
电导率	1.0 mS/cm
渗透压	< 25 mOsm/kg H2O
粘度	20 °C 下10 ± 5 cP
pH	20 °C 下9.0 ± 5 cP
折射指数	20 °C 下1.3540 ± 0.005

Percoll 是无毒的。

颗粒大小和组成

Percoll 的物理性质已经被Laurent 等 (45, 46, 47) 广泛研究。电子显微镜观察 (图3) 显示二氧化硅以多分散性溶胶形式存在，组成的颗粒大小为15 到 30 nm，平均颗粒直径为21 到 22 nm。流体力学测定 (粘度测定和沉降测定) 显示，Percoll 在 0.15 M NaCl 和水中的平均颗粒尺寸分别是 29 到30 nm 和 35 nm，表明颗粒表面的水合层在低离子强度下更明显。

Percoll 在Sephacrose™ 4B 上的层析 (22) 已经表明只有 1% 到 2% 的游离 PVP。洗脱液中含有 PEG 并不能导致硅胶上 PVP 的任何损失，表明 PVP 的结合是牢固的。基于胶体氮含量的计算显示 PVP 涂层是一种单分子层。

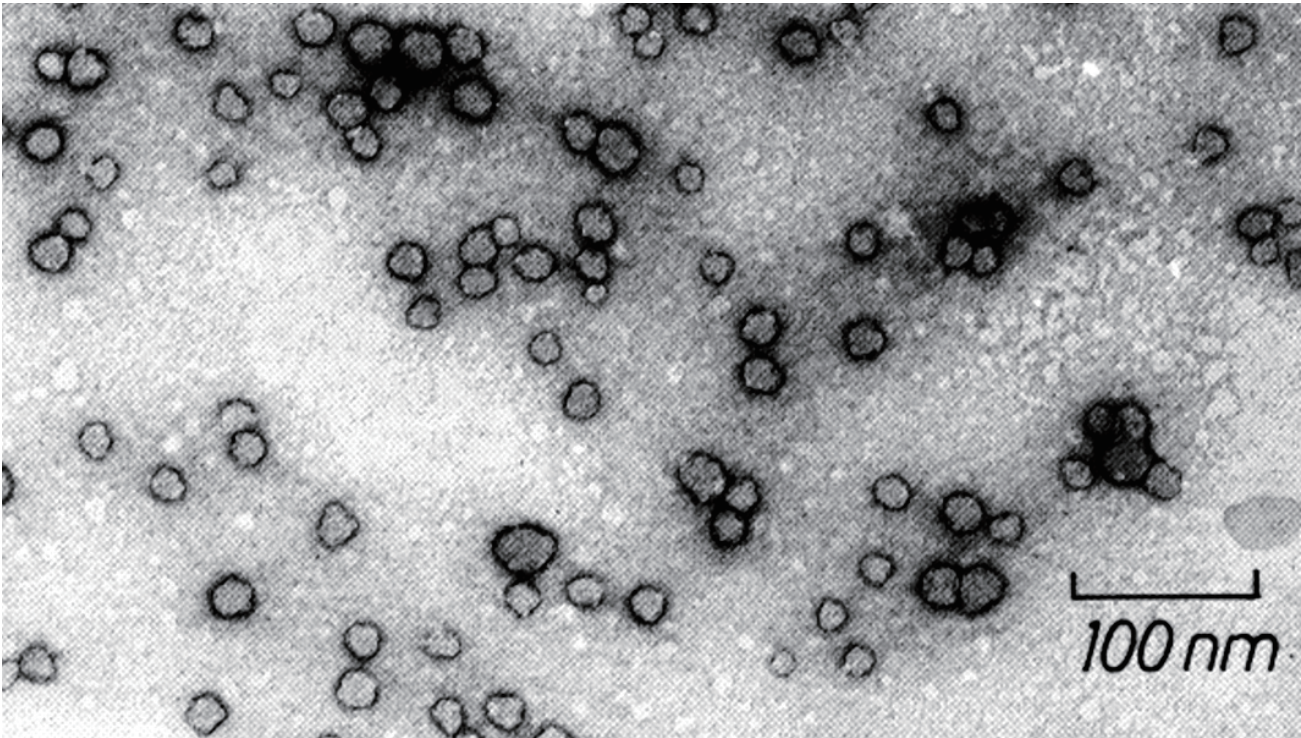


图3. Percoll 颗粒电子显微镜图。用1%的乙酸铀酰做为阴性对照。(21，图像引用经过作者和出版商允许)。

粘度

Percoll 的粘度是一种离子强度的作用，在生理离子强度 (如0.15 M NaCl) 的盐溶液中比在水中或0.25 M 蔗糖 (22) 中更低。溶液在相同条件下离心 (第18 页) 在 0.15 M NaCl 中形成梯度比在 0.25 M 蔗糖更快有一定的影响。在工作条件下，Percoll 溶液的粘度是1 到15 cP，有利于在 Percoll 梯度中非常快速地形成颗粒区带。

密度

Percoll 是以23% (w/w) 的胶体水溶液提供的，密度为 1.130 ± 0.005 g/ml。

按照本手册其他地方描述的方法离心可以获得1.0 到1.3 g/ml 的梯度范围。所有沉降系数值大于60S 的生物学颗粒都能够在Percoll 梯度上成功地形成区带，且在Percoll 中(图2) 大多数的浮力密度小于 1.13 g/ml。

图3. Percoll 颗粒电子显微镜图。用1%的乙酸铀酰做为阴性对照。(21，图像引用经过作者和出版商允许)。

pH 和渗透压

Percoll 的 pH 大约为 9.0，在不改变任何性质下可调节为5.5 到10.0。如 果pH 降低到 5.5 以下，可能发生胶凝作用。在存在二价阳离子时也会导致凝胶作用，升高温度会加剧这种作用。

Percoll 拥有非常低的渗透压 (< 25 mOsm/kg H2O)，并因此能够形成密度梯度而没有产生任何自身明显的渗透压梯度。这使它能够和密度梯度一起工作，密度梯度是等渗的且能够始终调整为生理条件。这对于获得具有非常高的细胞粘度 (23) 和完整的细胞形态 (31) 的细胞制备是非常重要的。由于这个事实，Percoll 梯度也为观察渗透压对细胞和亚细胞颗粒的表观浮力密度的影响提供机会 (见第 17 页和参考文献 27)。

溶胶的性能

Percoll 颗粒有一个硅内核,密度非常大 ($r= 2.2\text{ g/ml}$), 且在 0.15 M NaCl 中含水的颗粒尺寸为 $29\text{ 到 }30\text{ nm}$, 在水中为 35 nm (46)。因此当一种 Percoll 溶液 (在 0.15 M 盐溶液或 0.25 M 蔗糖中) 在角度转头离心机中以大于 $10\,000\times\text{g}$ 离心时, 被包被的二氧化硅的颗粒开始沉降。这导致颗粒的不均匀分布, 并因此形成密度梯度。由于 Percoll 是一种多分散性溶胶, 它的组成颗粒将以不同的速率沉降, 产生一个非常平滑的梯度。在角度转头离心机中通过高转速离心产生的梯度用电子显微镜分析显示更大颗粒的材料大量富集在管底部 (Pertoft, 个人交流)。在起始密度周围形成等渗的梯度 (即较小密度在顶部, 较大密度在底部) 且随着时间平均逐渐变得陡峭 (图 4)。在高离心力下延长离心时间会导致所有的溶胶沉淀形成坚硬的颗粒 (见 “Percoll 的去除 ”, 第 27 页)。必须注意的是如果 Percoll 梯度在水平转子中以大于 $10\,000\times\text{g}$ 离心时, 溶胶将很快沉淀形成颗粒小球且不再形成适当的梯度。

溶胶随着时间推移并没有产生明显的扩散, 因此形成非常稳定的梯度。所以, 可以提前几周制备不连续的和连续的梯度, 在一个实验的过程中提供极好的重现性。

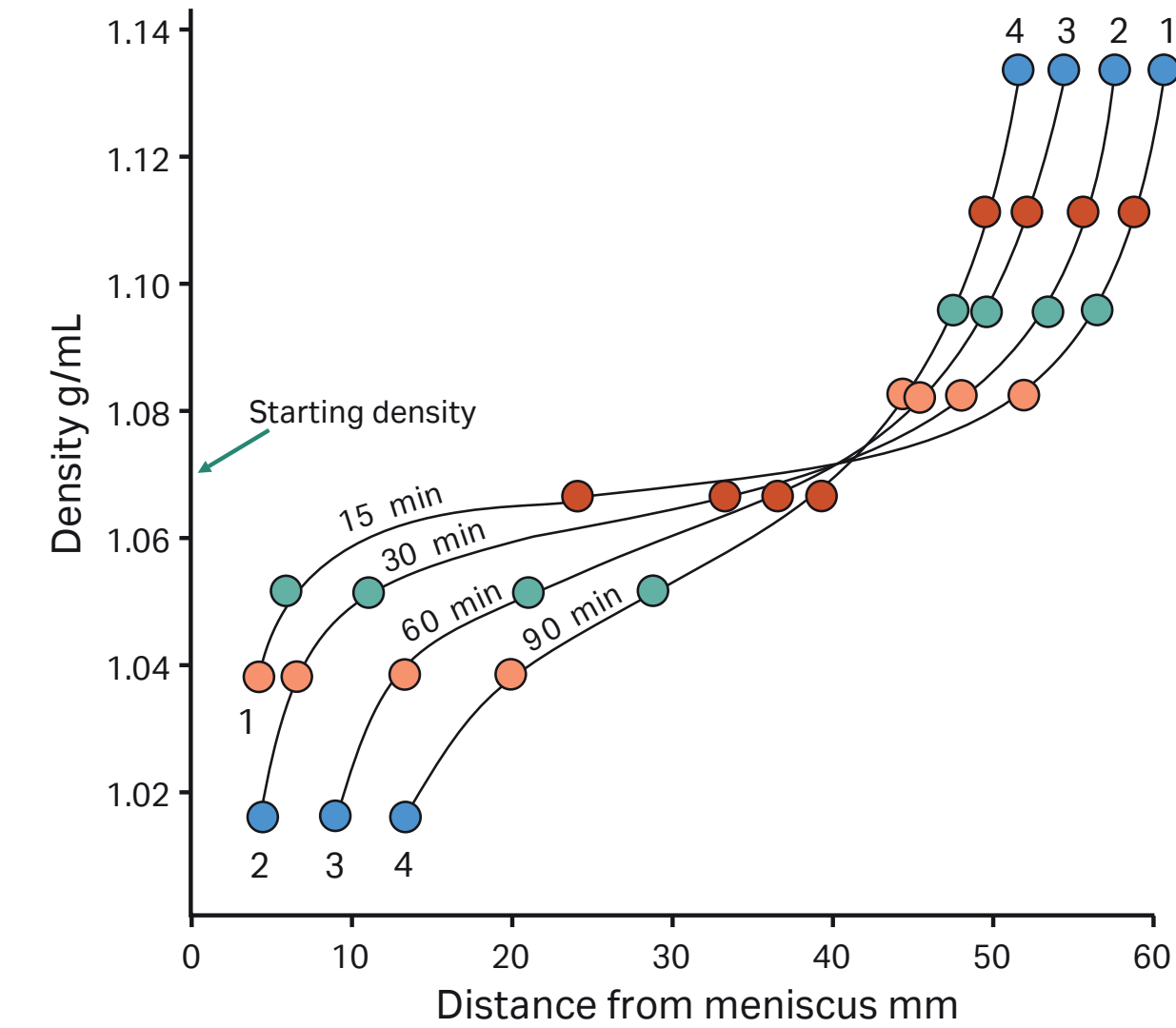


图4. Percoll在角度转头中形成等距梯度, $8\times14\text{ ml}$ (MSE 超速离心机), 在 0.15 MNaCl 中起始密度为 1.07 g/ml 。运行条件: $20\,000\times\text{g}$ 离心15、30、60 和90 分钟。梯度密度利用带颜色的Density Marker Beads (图12) 监测 (来自Cytiva Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden的工作)。

如何配制和使用 Percoll 梯度

配制和稀释 Percoll 的储存溶液

为了配制 Percoll 梯度,必须首先用盐或细胞培养基来调节微稀释的 Percoll 的渗透压,以获得与生理盐浓度相同渗透压的 Percoll。加 9 份 (v/v) 的 Percoll 到 1 份 (v/v) 的 1.5 M NaCl 或 10 x 浓缩培养基中是制备 Stock Isotonic Percoll (SIP) 溶液的简单方法。通过添加盐或蒸馏水可以最终调节到所需要的渗透压。细胞密度依赖于渗透压 (图 5); 正因为如此,储存液的渗透压应该使用渗压计常规检查以确保实验之间的重复性。对于在有盐存在时会发生聚集的亚细胞颗粒,可以通过加 9 份 (v/v) 的 Percoll 到 1 份 (v/v) 的 2.5 M 蔗糖中制备 Stock Isotonic Percoll (SIP)。SIP 溶液的密度可以通过下列公式进行计算:

$$V_x = V_o \frac{(\rho_o - \rho_i)}{(\rho_i - \rho_{10})} \quad \text{thus } \rho_i = \frac{V_o \rho_o + V_x \rho_{10}}{V_x + V_o}$$

V_x = 稀释介质的体积 (ml)

V_o = 未稀释 Percoll 的体积 (ml)

ρ_o = Percoll 密度 (1.130 + 0.005 g/ml*)

ρ_{10} = 1.5 M NaCl 的密度 = 1.058 g/ml (对于其他盐类有较小的差别)
2.5 M 蔗糖的密度 = 1.316 g/ml (对其他添加物有较小的差别)

ρ_i = 产生的 SIP 溶液的密度 (g/ml)

因此,对于盐溶液中的 SIP, ρ_i = 1.213 g/ml,对蔗糖中的 SIP, ρ_i = 1.149 g/ml,假定的 ρ_o = 1.130 g/ml。

* 准确的密度如分析证书 COA 所述,可以在 www.cytiva.com. 的 “Literature” 中找到。

配制和稀释 Percoll 的储存溶液

Stock Isotonic Percoll 溶液 (SIP) 被简单地稀释为更低的密度,用于细胞分离时可以添加 0.15 M NaCl (或正常的细胞培养基),用于亚细胞颗粒或病毒则分离时添加 0.25 M 蔗糖。

下列公式能够被用于计算获得所需要密度的溶液需要的体积。

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

V_y = 稀释培养基的体积 (ml)

V_i = SIP 体积 (ml)

ρ_i = SIP 密度 (g/ml)

ρ_y = 稀释培养基的密度 (g/ml)
(0.15 M NaCl 的密度大约为 1.0046 g/ml)*
(0.25 M 蔗糖的密度大约为 1.032 g/ml)*

ρ = 产生的被稀释溶液的密度 (g/ml)

实例：为了稀释 55 ml SIP 到终密度 1.07 g/ml,计算需要的 0.15 M NaCl 的体积。

$$\begin{aligned} \text{需要的 0.15 M NaCl 的体积} &= 55 \times \frac{1.123 - 1.07}{1.07 - 1.0046} \\ &= 44.6 \text{ mL} \end{aligned}$$

上述的公式对于获得非常接近于实际需要的密度十分有用。然而， 稀释培养基体积和密度的微小的改变将影响最终的密度。为了测定实际的密度,我们推荐使用比重计或折射计 (见第 24 页) 测定 Percoll 溶液的最终密度。

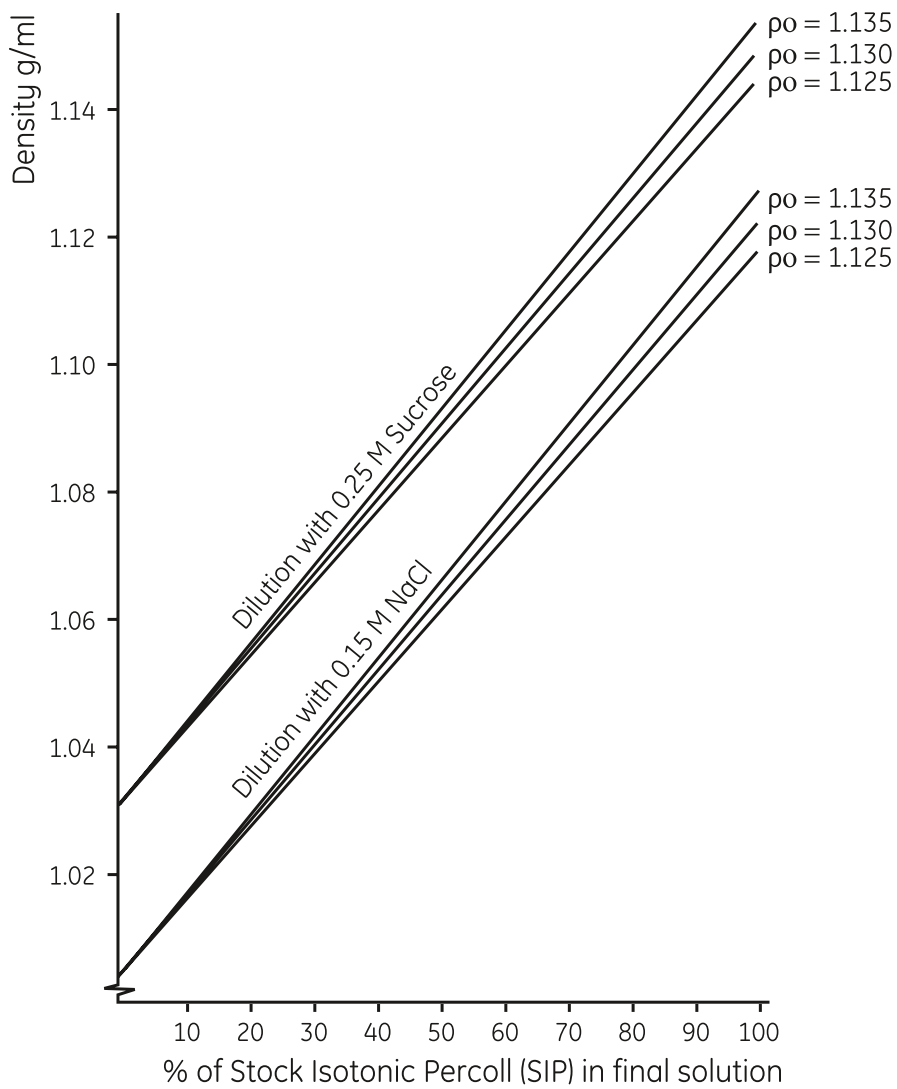


图 5. Stock Isotonic Percoll (SIP) 用等渗的盐或蔗糖的稀释。Po 是 Percoll (未稀释) 的密度。SIP 如第 12 页所述配制。显示的标准直线仅作为指导。对于准确的密度测定 , 参考文中的公式 (Cytiva Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)。

注释：图 5 中曲线图也能够被用作通过使用 0.15 M 盐或 0.25 M 蔗糖溶液稀释 SIP 产生的溶液密度测定的经验指南。这个曲线图涉及 SIP 的稀释，这里的 SIP 是 90% (v/v) 未稀释的 Percoll 通过添加 10% (v/v) 的盐或蔗糖调节渗透压配制而成。为了避免混淆，因此最好参考工作溶液的实际密度 (或者规定 % SIP) 而不是以在等渗的盐或蔗糖中的 Percoll 的百分比参考溶液。这在下面描述的使用一步稀释程序时尤其重要, 通过用蒸馏水稀释含有浓缩的盐或蔗糖的 Percoll (未稀释) 到最终体积获得已知密度的工作溶液。

* 来自CRC Handbook of Chemistry and Physics，第67 版(1986-1987)，CRC Press，D253 和D262。

一步法稀释 Percoll

Percoll (未稀释) 可以通过下列步骤直接稀释以配制已知密度的最终工作溶液。在一个量筒中, 添加 1/10 最终所需要的体积的 1.5 M NaCl 或 2.5 M 蔗糖 (例如最终体积为 100 ml 工作溶液则添加 10 ml1.5M NaCl 或 2.5M 蔗糖溶液)。然后, 添加的 Percoll (未稀释) 体积。最后用蒸馏水补加到最终体积。

下列公式能够被用于计算获得所需要密度的溶液需要的体积。

$$V_o = V \frac{\rho - 0.1\rho_{10} - 0.9}{\rho_o - 1}$$

- V_o = 未稀释 Percoll 的体积 (ml)
- V = 最终工作溶液体积 (ml)
- ρ = 最终溶液的密度 (g/ml)
- ρ_o = Percoll 密度 (未稀释) (g/ml)
(准确密度见分析证书 COA)
- ρ_{10} = 1.5 M NaCl 的密度 = 1.058 g/ml
(对于其他盐类有较小的差别)
2.5 M 蔗糖的密度 = 1.316 g/ml
(对其他添加物有较小的差别)

实例：制备 100 ml 在 0.15 M NaCl 中密度为 1.07 g/ml 的 Percoll 工作溶液。对 10 ml 1.5 M NaCl, 加需要的 Percoll 体积

下列公式能够被用于计算获得所需要密度的溶液需要的体积。

$$\begin{aligned} &= 100 \times \frac{1.07 - 0.1058 - 0.9}{0.13} \\ &= 49.4 \text{ ml (如果 Percoll 密度是 1.130 g/ml)} \\ &\text{用蒸馏水补加到 100 ml。} \end{aligned}$$

上述的公式对于获得非常接近于实际需要的密度十分有用。然而，稀释介质体积和密度的微小的改变将影响最终的密度。为了测定高度准确的密度，我们推荐使用比重计或折射计 (见第 24 页) 测定 Percoll 溶液的最终密度。

可以作出类似于图 5 显示的 Percoll (未稀释) 体积和最终密度的关系曲线图。

稀释 Percoll 到需要的渗透压

为了配制与大多数哺乳动物细胞等渗的 Percoll 溶液,通常用 1 份 (v/v) 的 1.5 M NaCl 或 2.5 M 蔗糖溶液稀释 9 份 (v/v) 的 Percoll (未稀释)。然后这种 Stock Isotonic Percoll(SIP) 根据需要进一步用生理缓冲液稀释。虽然这种方法被证明是成功的,但是它过分简单且没有考虑固体二氧化硅颗粒存在的影响 (即 100 ml 的 Percoll 储存液含有一定体积的固定二氧化硅,使得总水溶液体积小于 100 ml)。由于二氧化硅占有体积,储存溶液中的电解液比在生理盐溶液中具有更高的有效浓度,用这种方法制备的 SIP 有高的渗透压。因此总是推荐测定 SIP 的实际渗透压。

Vincent 和 Nadeau (555) 很好的讨论了这个问题并得出一个方程,它可以用于计算应该被加到 1 份 10x 浓缩生理盐缓冲液中以获得任何所需要渗透压 SIP 的 Percoll 的份数。作者测定了一种 Percoll 储存液总体积中二氧化硅所占有的份数,并因此测定了水溶液体积与总 Percoll 储存液体积的比例。

$$V_p = V_c \frac{O_c - O_f}{R(O_f - O_p)}$$

- V_p = 添加的 Percoll 的份数
- V_c = 添加的溶解质浓缩物 (如 1.5 M NaCl) 的份数
- O_c = 溶解质浓缩物的渗透压 (如 1.5 M NaCl = 2880 mOsm)
- O_f = 需要的渗透压
- R = 水溶液体积与 Percoll 总体积的比例 (代表性的比例是对于 NaCl 为 0.85,对于蔗糖为 0.80)。
- O_p = 未稀释 Percoll 的渗透压 (见分析证书 COA)

方程中的关键变量是 R,它测定 Percoll 溶液中的真实的水溶液体积。R 的值是 Percoll 颗粒占有的流体动力体积的一个函数。这反过来也是培养基离子强度的函数；即随着离子强度的增加,流体动力体积降低。因此,1.5 M NaCl 和 2.5 M 的蔗糖的 R 值是有差别的。

为了获得一个 SIP 渗透压 = 320 mOsm/kg H2O 的 SIP,用 1.5 M NaCl (即 10x 浓缩的生理盐溶液) 调节

$$V_p = 1 \frac{2880 - 320}{0.85 (320 - 20)} = 10.04$$

假设： 2880 = 1.5 M NaCl 的渗透压
(10x 浓缩的生理盐溶液)

20 = 未稀释 Percoll 的渗透压

因此获得一个 320 mOsm/kg H2O 的 SIP,加 10 份的 Percoll 到 1 份的 1.5 M NaCl 中。

对 SIP 浓缩的溶解质溶液的比例称为 Rx：

$$R_x = \frac{V_c}{V_p + V_c}$$

使用这个公式能够计算出所需要的 Percoll (未稀释) 的量以制备已知密度和渗透压的最终工作溶液。

$$V_o = V \frac{\rho - R_x \rho_{10} - (1 - R_x)}{\rho_o - 1}$$

V_o = Percoll (未稀释) 的体积 (ml)

V = 最终工作溶液体积 (ml)

ρ = 最终工作溶液需要的密度 (g/ml)

R_x = 溶解质浓缩物总体积份数 (如 1.5 M NaCl 等)

ρ_o = Percoll 密度 (未稀释) (g/ml)
(见分析证书 COA)

ρ_{10} = 1.5 M NaCl 的密度 (1.058 g/ml) , 2.5 M 蔗糖的密度 (1.316 g/ml) , 等

因此, 对于 100 ml SIP 渗透压 = 320 mOsm/kg H2O , 用 1.5 M NaCl 调节 , 且密度为 1.07 g/ml :

$$V_o = 100 \frac{1.07 - 1/11 \times 1.058 - (1 - 1/11)}{1.13 - 1} = 49.8 \text{ mL}$$

终溶液中含有 9.1 ml 1.5 M NaCl (1/11 x 100 = 9.1) , 49.8 ml 未稀释的 Percoll 和 41.1 ml
(即 100 - 58.9 = 41.1) 蒸馏水。

渗透压对细胞和亚细胞颗粒表观浮力密度的影响

Percoll 非常低的渗透压有利于研究分离培养基的渗透压与颗粒表观浮力密度之间的相互关系。图 6 显示鼠肝脏匀浆在渗透压分别为 200、300 和 400 mOsm/kg H2O 的 Percoll 梯度中的区带作用。由于从细胞中去除水,细胞表观浮力密度随着渗透压的增加而增加。用线粒体 (图 7) 和溶酶体 (表 1) 可以观察到相同的作用。甚至渗透压有小的变化也能导致这些细胞器表观浮力密度的大改变。因此,与颗粒在蔗糖或其他离心介质中形成区带时相比较,在生理渗透压下 Percoll 梯度中形成区带的颗粒其真实记录的表观浮力密度更可能与体内的表观密度一致。

表1. 在血清白蛋白中孵育后的溶酶体浮力密度的改变。

孵育介质		介质 渗透压 (mOm/l)	溶酶体平均密度 (g/ml)
白蛋白%	蔗糖 %		
-	8.5	284	1.045
2.5	8.5	288	1.058
5	8.5	292	1.074
7.5	8.5	300	1.078
10	8.5	310	1.091
20	8.5	374	1.110
30	8.5	503	1.148
40	8.5	800	1.177

从密度为 1.0 到 1.05 的 Percoll/0.25 M 蔗糖梯度中回收获得大鼠肝实质细胞的溶酶体组分,并在 37°C 下在如表 1 所示的介质中孵育 1 小时。然后在 Percoll/0.25 M 蔗糖梯度中重新测定浮力密度 (27, 图像引用经过作者和出版商允许)。

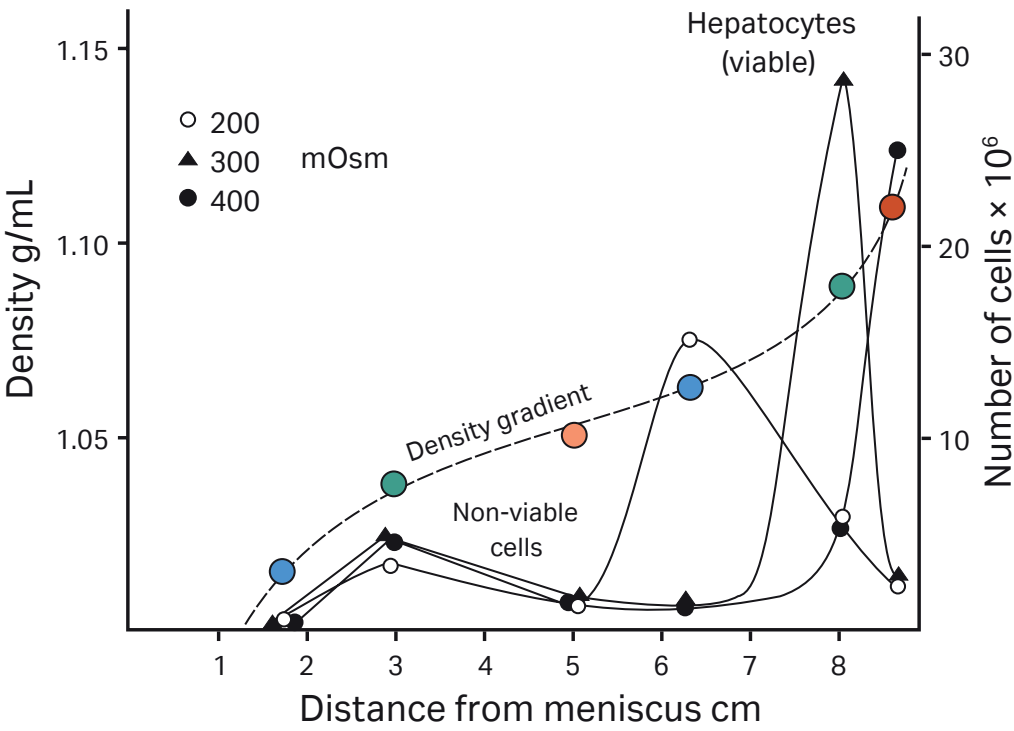


图 6. 在自动生成的 Percoll 梯度 (8 ml 溶液, 密度为 1.065g/ml) 上对大鼠肝实质细胞 (2 ml 体积中有 35 x 10⁶ 细胞) 进行分离。Percoll 溶液的渗透压通过添加 NaCl 到 200 mOsm、300 mOsm 和 400 mOsm 而变化。在 Beckman 转头 30.2 上进行离心, 4°C 下 35000 x g 离心 15 分钟。使用 Density Marker Beads 测定密度梯度 (见 22 页) (27, 图像引用经过作者和出版商允许)。

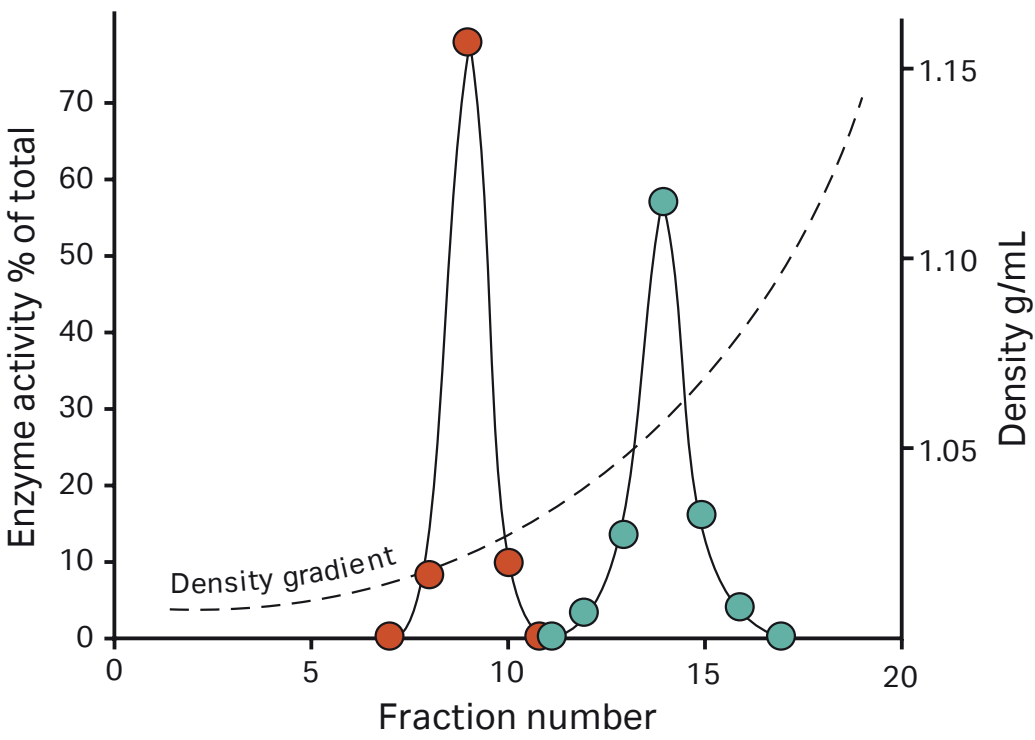


图 7. 在等渗缓冲液 (红色) 和含有 17.5% 白蛋白的缓冲液 (绿色) 中孵育后的大鼠肝脏细胞的线粒体密度分布。在 Beckman 转头 65 上进行离心, 40000 x g 离心 30 分钟。(59, 图像引用经过作者和出版商允许)。

影响梯度形成和形状的因素

虽然 Percoll 颗粒的含水体积在 0.15 M NaCl 时比在 Percoll/0.25 M 蔗糖中小,但由于 Percoll 在盐溶液中呈现更低的粘度,颗粒的沉降速率更快。因此,当 Percoll 用终浓度 0.15 M 盐溶液或具有相同离子强度的组织培养基制造等渗时,它自动生成梯度的速度比用终浓度为 0.25 M 蔗糖制造等渗 Percoll 溶液快 2 到 3 倍。

离心力和时间是相关的,即总的 (离心力) x (时间) 决定了梯度的形状。Percoll 在 0.15 M 盐溶液最低使用大约 10000xg,在 0.25 M 蔗糖中最低使用大约 25000xg,以便在角度转头中自动生成梯度。如图 8 所示在一定的条件下转头的几何形状对梯度的形状有明显的影响。随着角度变成垂直,形成梯度的路径变得更短且梯度形成更快。图 9 和 10 表明 Percoll 的初始浓度对形成的梯度的形状有一些影响。

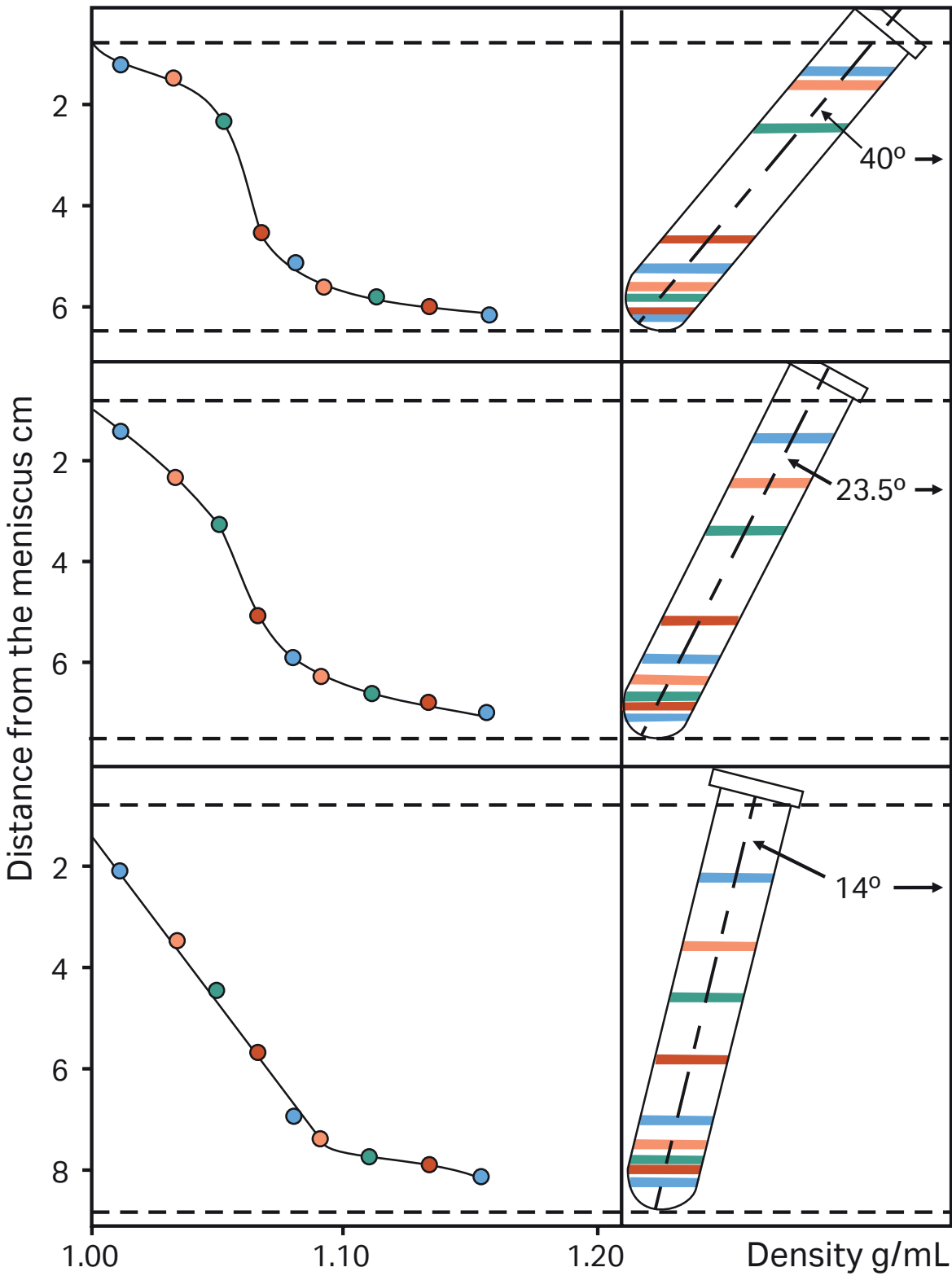


图 8. 转头角度对使用 Percoll 形成梯度的影响。在 0.15 M NaCl 中的起始密度为 1.065 g/ml。运行条件：30000 xg, 14 分钟。有颜色的线条指示有颜色的 Density Marker Beads 的位置 (45, 图像复制经过作者和出版商允许)。

在垂直转头中离心将非常快速地形成 Percoll 梯度。然而必须非常小心以确保在高速离心下可能形成的 Percoll 紧密颗粒不污染分离过程中的梯度。

由于较长的路线长度和沿着管壁的不平衡的离心力,不推荐使用吊桶式转头自动生成梯度。然而,Jenkins 等 (个人交流,参考文献 87) 报道了使用这类型转头在肝脏细胞器亚细胞分离中的一些优点。

区带转头能够用于在原位形成 Percoll 梯度。区带转头中形成的梯度具有与在角度转头中生成的梯度相同的特征。由于它们的大的样品体积,推荐在放大为区带转头之前按照经验确定非区带转头的分离条件。区带转头已经被用于大规模的病毒纯化 (21) 和溶酶体的亚分离 (24)。

当用自动生成的梯度开始工作时,最好先用带颜色的 Density Marker Beads 进行模型实验 (见第 21 页),在已知条件下生成一系列标准曲线,这是角度转头被用于随后的实验的特征。

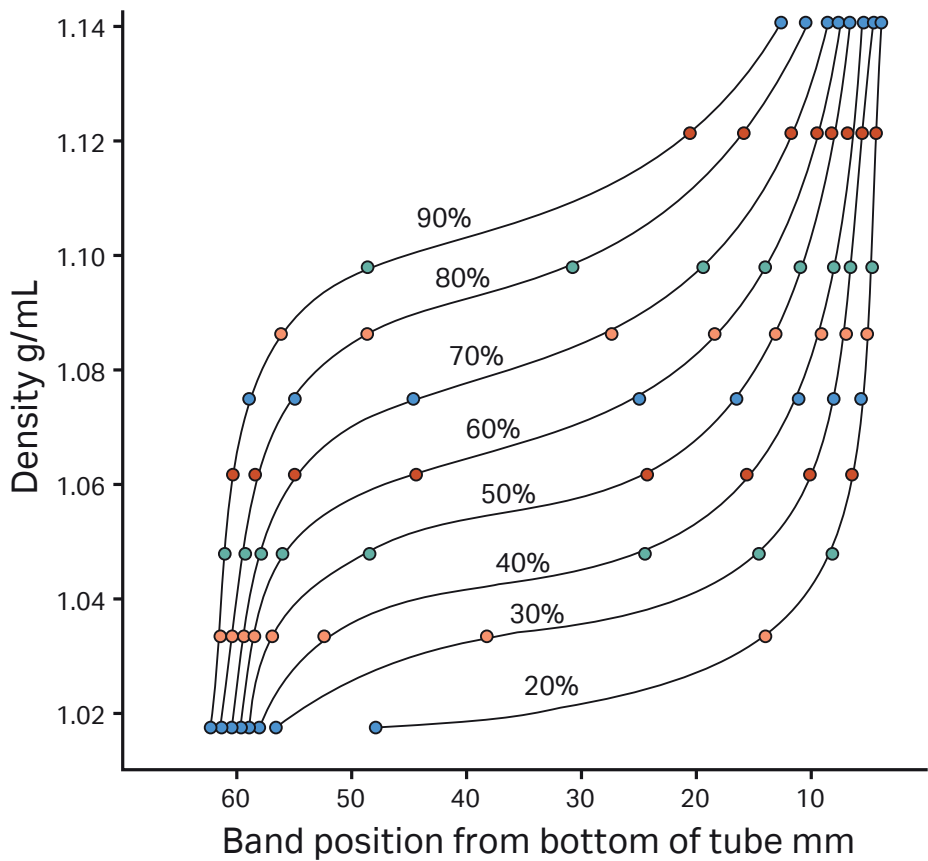


图 9. 使用带颜色的 Density Marker Beads 显示梯度形状。从在 0.15 M NaCl 中从 90% 到 20% 变化的 Stock Isotonic Percoll 的溶液中形成梯度。运行条件：23°C, 角度转头, 30000 x g, 15 分钟 (Cytiva Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)。

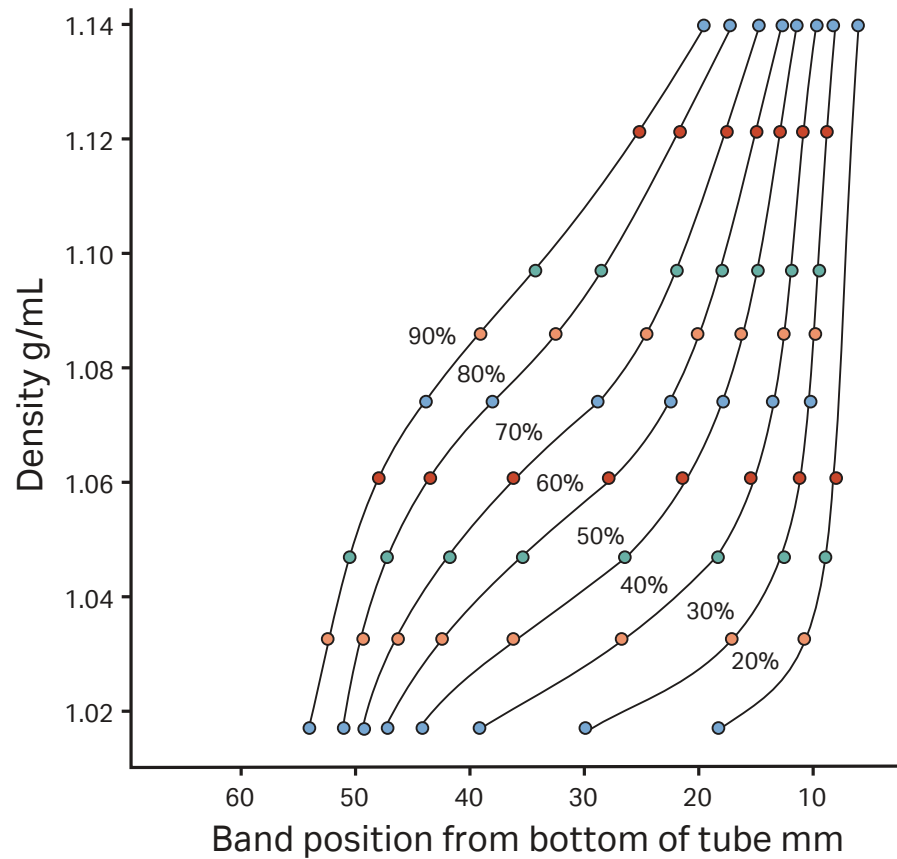


图 10. 使用带颜色的 Density Marker Beads 显示梯度形状。如图 9 所示稀释 Percoll。运行条件：23°C, 角度转头, 60000 x g, 15 分钟。通过更大的离心力形成更陡峭的梯度。(Cytiva Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)。

不连续（阶段）梯度

不连续的梯度提供了很大的灵活性和易用性。通常，只需要一个 Percoll 缓冲液或一个单独的步骤就可以实现对目标细胞类型的富集或分离。例如使用不连续梯度 (66, 69) 能够富集大多数的血细胞 (图 11)。

为了形成不连续的梯度, SIP 如第 12 页所示被稀释成一系列不同的密度。然后不同密度的溶液按照一个加上一个的密度顺序小心地分层, 以在管的底部为最大密度开始。使用移液器或装有大孔针头的注射器是相对方便来操作的。重要的是要保持仪器的尖端紧贴液体表面上方的管壁, 以避免 “飞溅 ” 和界面混合。只有在密度急剧变化的情况下, 才会在界面处形成明显的细胞带。

使用相对温和的条件进行离心, 例如用台式离心机 400 x g 离心 15 到 20 分钟。这些温和条件使细胞在对应的界面上形成等密度区带。低的 g 条件和短的离心时间将不会引起 Percoll 的沉降且不会以任何方式影响梯度。

连续线性和非线性梯度

连续梯度的特征是密度从管的顶部到底部密度的平滑变化。与不连续梯度中明显的存在界面不同, 连续梯度可以被认为含有不确定数量的界面。因此细胞的等密度区带在细胞的准确密度区出现。

为了形成这样的梯度, SIP 首先被稀释以产生在所需要的限制范围内已知密度的两种溶液, 然后使用双腔梯度仪混合 (例如 Cytiva Gradient Mixer GM-1)。然后形成了一个跨越两个起始极限范围的线性梯度。单通道蠕动泵 (例如 Cytiva Peristaltic Pump P-1) 结合梯度混合器能够被用于产生线性、凸起和凹入的梯度, 这取决于所使用管的相对直径。可以形成从梯度顶部到底部的非常的密度范围, 以实现活细胞的最大的分辨率。更重的细胞通常会形成团块, 而死细胞被发现在梯度的顶部。例如如果梯度底部的密度不超过 1.08 g/ ml , 则红细胞将会聚集成团块。Density Marker Beads 可以用作试管中的外部标记物, 该试管包含与样品试管中相同的梯度。

获得分离所必需的离心条件和那些不连续梯度的条件相同。在连续的梯度上进行分离的实例包括 Leydig 细胞 (31)、催乳素细胞 (19)、骨髓细胞 (52)、肠上皮细胞 (18)、海洋微藻类 (28, 60) 和叶绿体 (49, 58, 76, 88, 109) 的纯化。

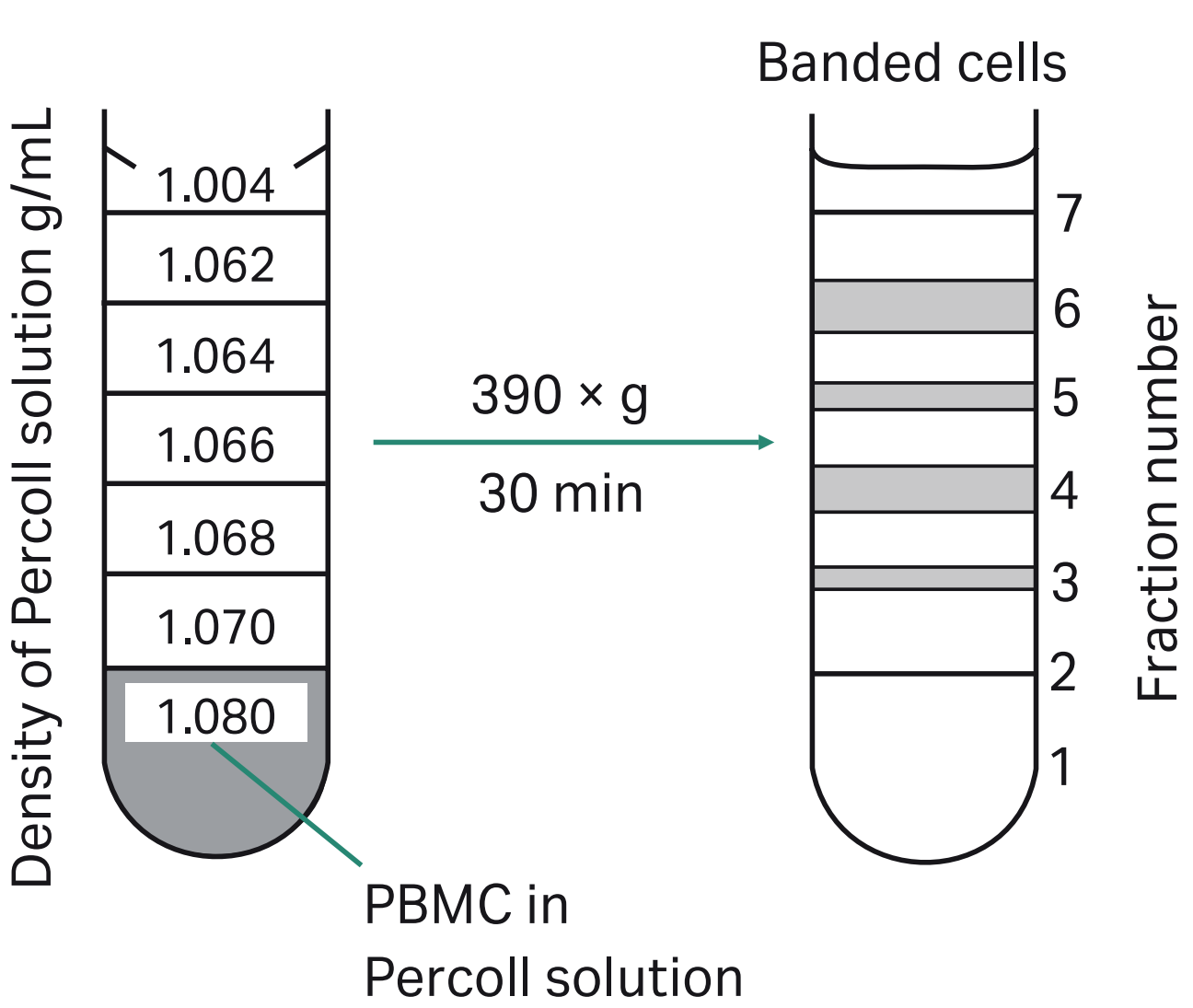


图 11. 通过 Percoll 中的不连续密度离心法分离淋巴细胞和单核细胞。在 Ficoll-Paque™ 上分离的 1.5 到 2.0 x 10⁷ PBMC (外周血单核细胞) 被混合在 11.25 ml 含有 1% HEPES 的 Hanks BSS 的 Percoll 中 (密度 = 1.08 g/ml), 然后下沉到图中显示的梯度之下 (69, 图像引用经过作者和出版商允许)。

预制的自动生成梯度

通过离心预制梯度能够方便替代使用梯度标记或泵。正如之前描述，当施加显著的g 离心力时Percoll将会沉积 (即 $> 10000 \times g$)。当预制梯度时，SIP被稀释为需要最大分辨率范围中间的一个密度。两个离心管中加入梯度材料 (一个用于实验而另一个含有Density Marker Beads)。第二个管既可以作为平衡管又可以作为检测梯度的外部方法。管在角度转头上离心 (例如 $30000 \times g$ 离心 15 分钟)，在起始密度周围形成等体积的梯度 (图4)。梯度中相对“平”的区域应该包括目标细胞最大分辨率所需要的范围。这可以通过观察含有Density Marker Beads的管中梯度的形状得到证实。梯度随着离心时间增加会变得日益陡峭。已经显示梯度的形状与离心的总g 力和时间成近似线性相关 (22)。

形成梯度后，细胞等密度区带能够通过 $400 \times g$ 低速离心15 到20 分钟完成。如果需要估计细胞密度，与细胞悬液体积相等的悬液在含有Density Marker Beads的管的顶部分层。这既可以作为一种估算细胞密度的方法也可以作为一个平衡管。

原位形成梯度

亚细胞颗粒和病毒的沉降系数通常太低以至于不能在低离心力下在预制梯度中形成区带。因此，方便的做法通常是把生物颗粒和Percoll混合，且在梯度的原位形成颗粒区带。通过离心形成的Percoll梯度是亚稳定的 (即它们在高速离心时将不断地改变)。溶胶的沉降速率缓慢，足以让“S”值大于60S的小病毒和细胞器区带在原位形成梯度。

用于在原位形成梯度的常规方法是制备SIP，把 9 份Percoll加到 1 份的 2.5 M的蔗糖中。然后使用0.25 M蔗糖把SIP稀释为所需要的密度。(虽然通常用蔗糖来制备原位梯度，也可以使用细胞培养基)。当把样品和梯度材料直接混合时，对Percoll——溶液密度的影响可以通过第11 页的公式进行计算。当需要准确测定颗粒浮力密度时，把样品和梯度材料预混合是方便的。然而，最好是使实验样品在梯度材料的顶部分层，特别是在需要从可溶性蛋白中分离亚细胞颗粒时。可溶性蛋白将保持在梯度上部的缓冲液层中，而亚细胞颗粒将在Percoll梯度的原位进行分离。

离心必须在角度转头中进行。替代实验样品的含有Density Marker Beads的平衡管被用于监测梯度。应该首先进行一个类似于第21 页描述的适当的模型实验，以建立被使用转头的梯度形成的特征。

最大样品上样量

对于在 Percoll 梯度上能够分离的细胞或亚细胞的最大量,没有任何标准规定。对于亚细胞分离,在 10 ml 的梯度材料上 0.5 ml 样品体积中总上样 1 到 5 mg 蛋白能够得到成功的分离 (Pertoft, 个人交流)。

标准化条件的模型实验

在离心期间形成的梯度的准确的形状和范围受所使用的转头的模式和角度的影响,且受离心管尺寸的影响。设计下列实验使你能够建立对特定的转头和离心管的一系列梯度曲线,且可以做为将来实验的一种参考。

实验能够使用 Percoll 在 0.25 M 的蔗糖中重复进行; 在这种情况下,运行条件应该是 50000 x g 离心 25 分钟后再 100000x g 离心 25 分钟。

选择的例子是 10 ml 的梯度, 但这也可以放大到大离心管。

- 1. 混合 49.5 ml Percoll和 5.5 ml 1.5 M NaCl以制备SIP。
- 2. 用0.15 M NaCl混合第一步中的SIP, 以制备一系列如下表所示的10 ml实验样品 (总离心管大小= 13.5 ml):

管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Percoll (SIP) (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
0.15 M NaCl (ml)	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9

- 3. 根据包装中提供的说明书每管加 10 µl 每种类型的Density Marker Beads悬浮液。
- 4. 配平并盖上管, 颠倒几次混合。
- 5. 把管放置在角度转头中 (如果只有 8 个空间, 省略 1 和 10 号)。
- 6. 30000 x g 离心 15 分钟。
- 7. 小心移出管, 用毫米方格纸从管底部测量每个区带, 在距离每个区带最近距离为0.5 mm 处测量。
- 8. 用每个Mark Bead的准确浮力密度校准每条区带, 然后描绘每管的梯度形状。
- 9. 颠倒重新混合每管并重新离心, 这次使用 60000 x g 离心 15 分钟。
- 10. 测定梯度并如上描绘结果。应用公式计算稀释液的准确密度 (见第11页)。图 9 和10 显示的典型的例子是使用Percoll在 0.15 M NaCl中产生的一系列曲线。

如何分离和分析 Percoll 梯度

应用 Density Marker Beads 的密度测定

Density Marker Beads 是 Sephadex™ 带颜色的衍生物。有 10 种颜色编号的 BeadsBeads 类型,每种都有特殊的密度。它们已经被特异地阐明在 Percoll 梯度中使用且不和其他介质一起使用。使用 Density Marker Beads 做为一种外部标记有利于检测梯度形状和范围。在使用预制的梯度进行分离前,能够被准确地定位梯度内细胞和细胞器的位置 (73,83)。Density Marker Beads 的密度包括绝大多数在 Percoll 梯度中分离的细胞和细胞器的浮力密度。除了为密度测定提供非常快速和简单的方法外,使用 Density Marker Beads 比其他方法提供更准确的数据,因为完全避免了在分析之前由于分离导致的梯度变形。

Density Marker Beads 对于在进行真正的实验前的标准化运行条件也是非常有用的,使用前面描述的模型实验来生成特定对应于特殊转头和管类型的一系列梯度曲线。

Density Marker Beads – 性质

每个小瓶都含有冻干的交联葡聚糖珠,在 Percoll 中经过准确测定的密度。10 种 BeadsBeads 类型中有 9 种可以被用于含有 0.15 M NaCl 或 0.25 M 蔗糖的 Percoll 梯度。第 5 号瓶被专门用于含有 0.15 M NaCl 的 Percoll,而第 10 号瓶只用于含有 0.25 M 蔗糖的 Percoll 梯度。

在水中 BeadsBeads 的膨胀体积: 0.7 ml/ 瓶

每种 Beads 类型的密度:	校准为 ± 0.0005 g/ml
总密度范围包括:	对于含有 0.15 M NaCl 的 Percoll, 1.017 - 1.142 g/ml
	对于含有 0.25 M 蔗糖的 Percoll 梯度, 1.037 - 1.136 g/ml

每种 Beads 的准确密度特定对应于每个生产批号,且打印在每个盒子的标签上。

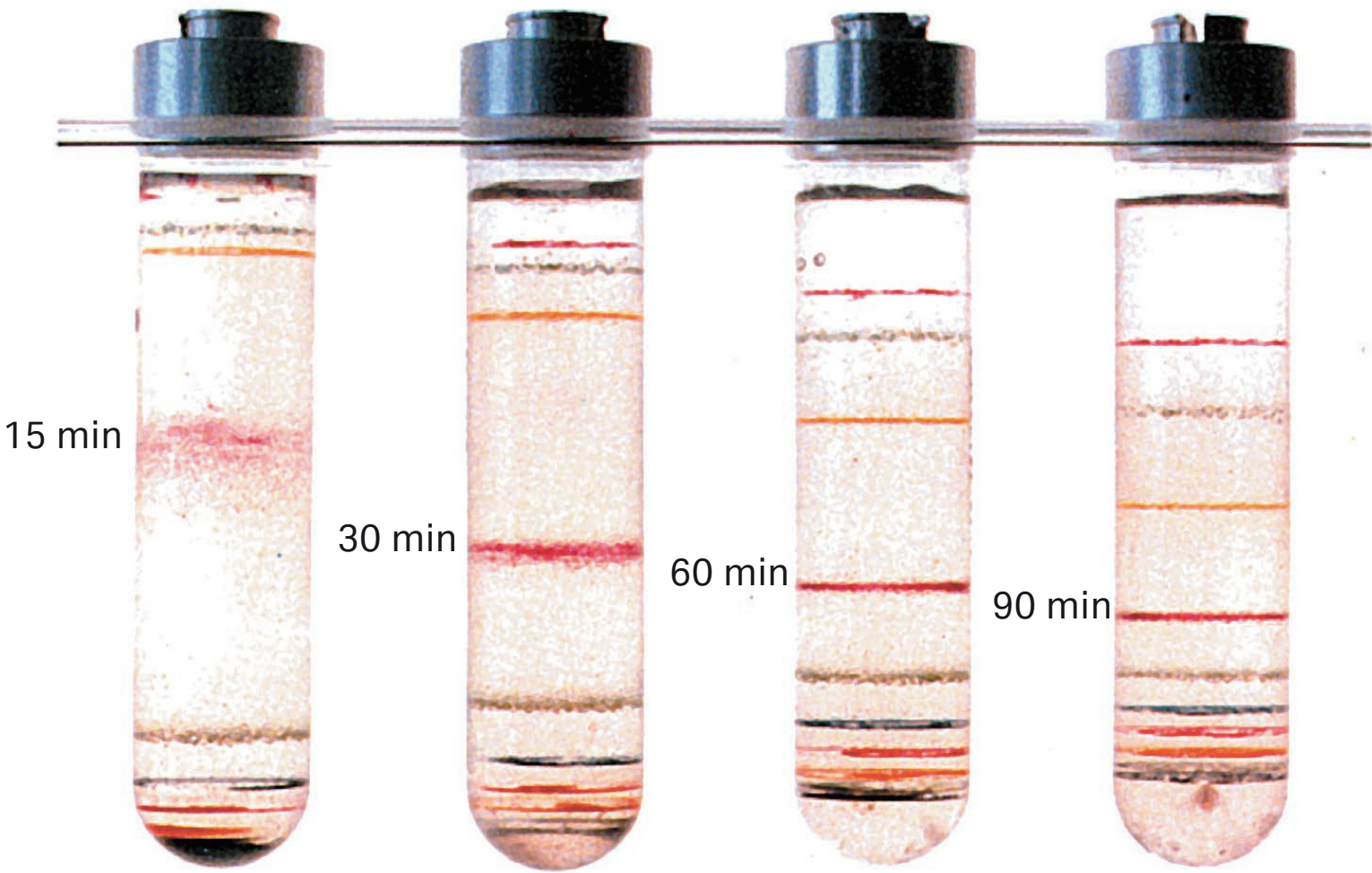


图 12. Density Marker Beads在Percoll梯度中的区带， 如图 4 所述 (Cytiva Bio-Sciences AB, 乌普萨拉, 瑞典)。

离子强度和蔗糖浓度对Density Marker Beads 密度的影响

打印在每个盒子的标签上的 Density Marker Beads的密度是那些在最广泛使用条件下的记录 (即当Percoll用生理盐水或0.25 M蔗糖等压配制)。Beads的真正浮力密度将随着离子强度或蔗糖浓度(渗透压) 的改变而轻微改变。图13显示密度随着离子强度而改变，而图14显示密度随着蔗糖浓度而改变。当用超出正常范围的离子强度或渗透压的系统工作时，这些图可以做为Beads密度校准的指南。

图15 显示用Density Marker Beads校准的密度和用数字比重计测定的密度之间的相关性。后一种方法可以做为Percoll 在超出正常生理条件的系统中工作时反复核对。

使用 Density Marker Beads

BeadsBeads在使用前必须先用水溶；10 ml无菌水被加到每个瓶中并溶胀过夜。为了在水中长期保存Beads，建议添加防腐剂如 Merthiolate™ (0.01% w/v)。

每个实验所需要的Beads的量取决于离心管的大小，但是10 到15µl 的Beads悬浮液就足够用于10 ml 的Percoll。当用微量移液器吸取Beads时，剪掉一次性塑料取样头可以防止Beads堵塞取样头。

Density Marker Beads很小，能够顺利通过管路、检测设备等。Density Marker Beads被用于在区带离心转头中监测Percoll梯度。

Density Marker Beads被用作外部标记，在含有与实验相同的梯度材料的管中。它们不能和细胞样品一起混合。Density Marker Beads被添加到对照管中，然后被做为离心时转头的平衡管。梯度的形状按照第 22 页的模型实验所述被测定。

使用的详细说明包含在每盒的Density Marker Beads中。

注释：Density Marker Beads仅用于校准Percoll梯度。打印在标签上的密度不能被用于其他填料的梯度。

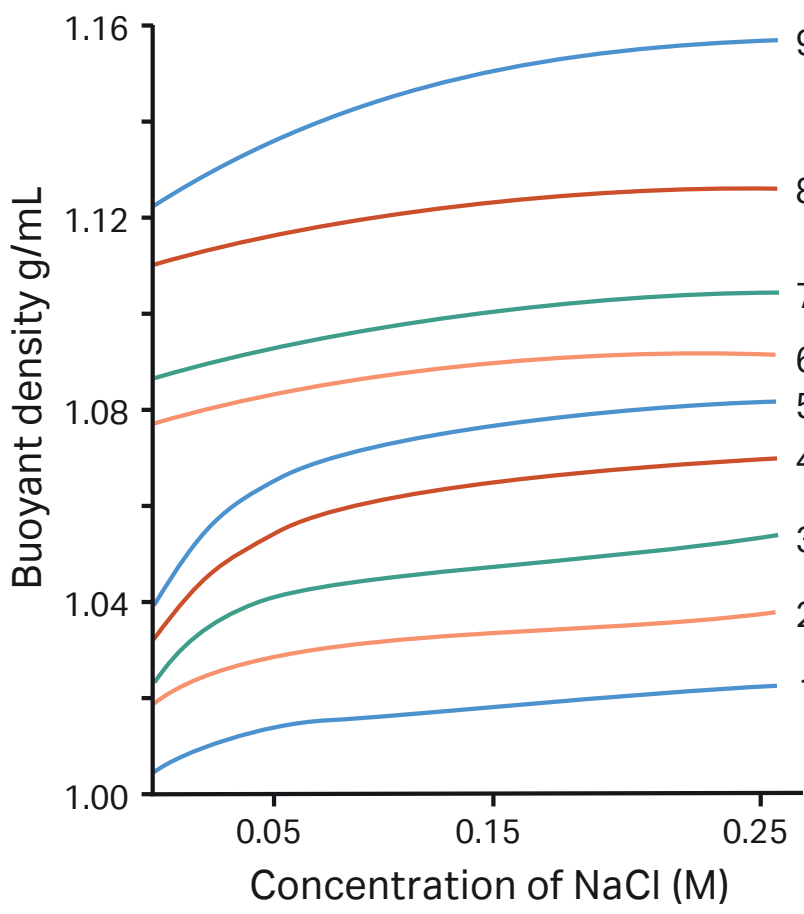


图 13. 盐浓度对 Percoll 梯度中 Density Marker Beads记录密度的影响。编号是指不同的Beads 类型，特定批号的准确密度打印在盒子的标签上 (Cytiva Bio-Sciences AB，乌普萨拉，瑞典)。

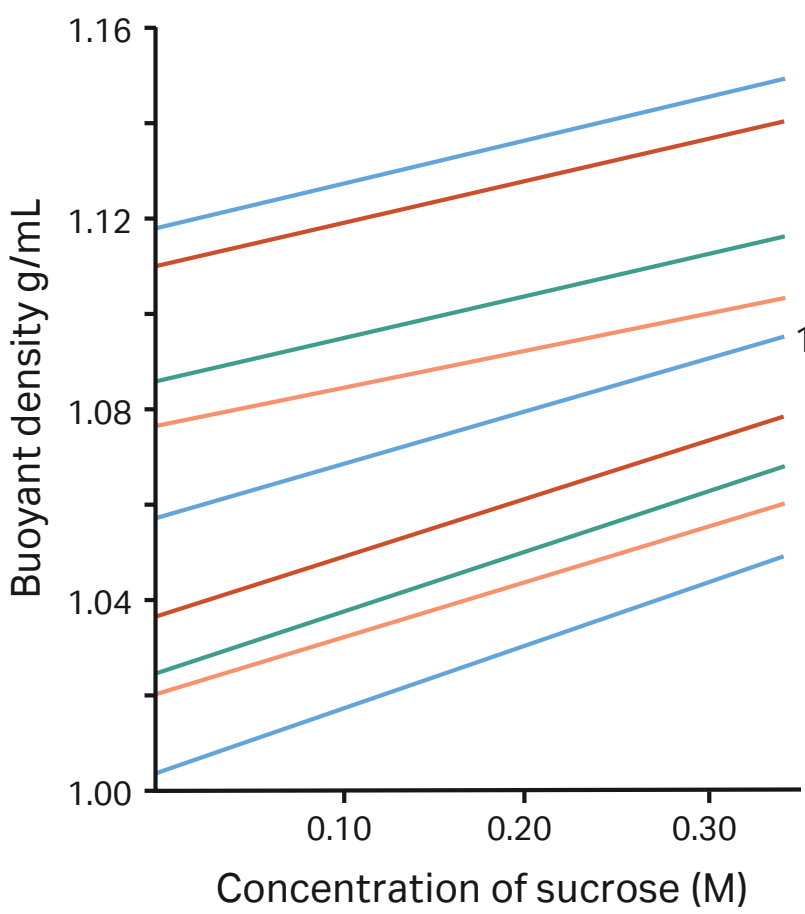


图 14. 蔗糖浓度对Percoll梯度中Density Marker Beads记录密度的影响。编号是指不同的Beads 类型，特定批号的准确密度打印在盒子的标签上 (Cytiva Bio-Sciences AB，乌普萨拉，瑞典)。

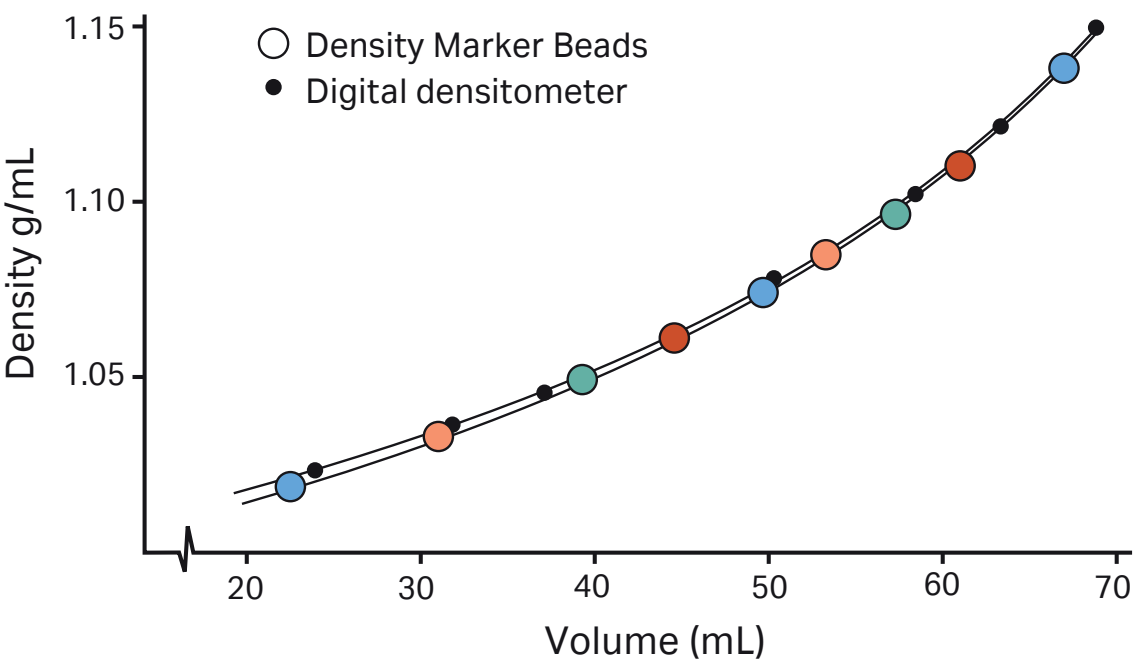


图 15. 使用Density Marker Beads和数字比重计 (DMA 46, Anton Paar A.G). 在 0.15 M NaCl中的Percoll 梯度记录密度的相关性。组分体积2.64 ml，离心机为Superspeed 75，转头 10 x 100 ml，角度 18°，40 000 x g 离心 60 分钟 (Cytiva Bio-Sciences AB，乌普萨拉，瑞典)。

测定密度的其他方法

许多技术被用于检测分离后 Percoll 溶液的密度。称重空的和满的玻璃微移液器的方法准确但繁琐。也可能在由非水溶液有机液体产生的预校准梯度中测量样品的等密度平衡点 (12)。折射系数和 Percoll 溶液的密度线性相关, 如图 16 所示。使用比重计直接测定 (例如 DMA 3 ,Anton Paar A.G). 是替代使用 Density Marker Beads 的准确的选择 (图 15)。

梯度分离

离心后，梯度能够通过刺破管底部并分部收集流出物得到分离，或通过一些其他的技术分离 (1,28)。一种简单而方便的方法是通过用稠密的介质如未稀释的Percoll或 60到65%的蔗糖溶液置换后从管的顶部收集组分。把稠密的材料泵到管的底部后， 可以从管的顶部分部排出组分。带状转头可以通过把稠密的溶液泵到转头的末端而被排空，并从中心开始收集组分。

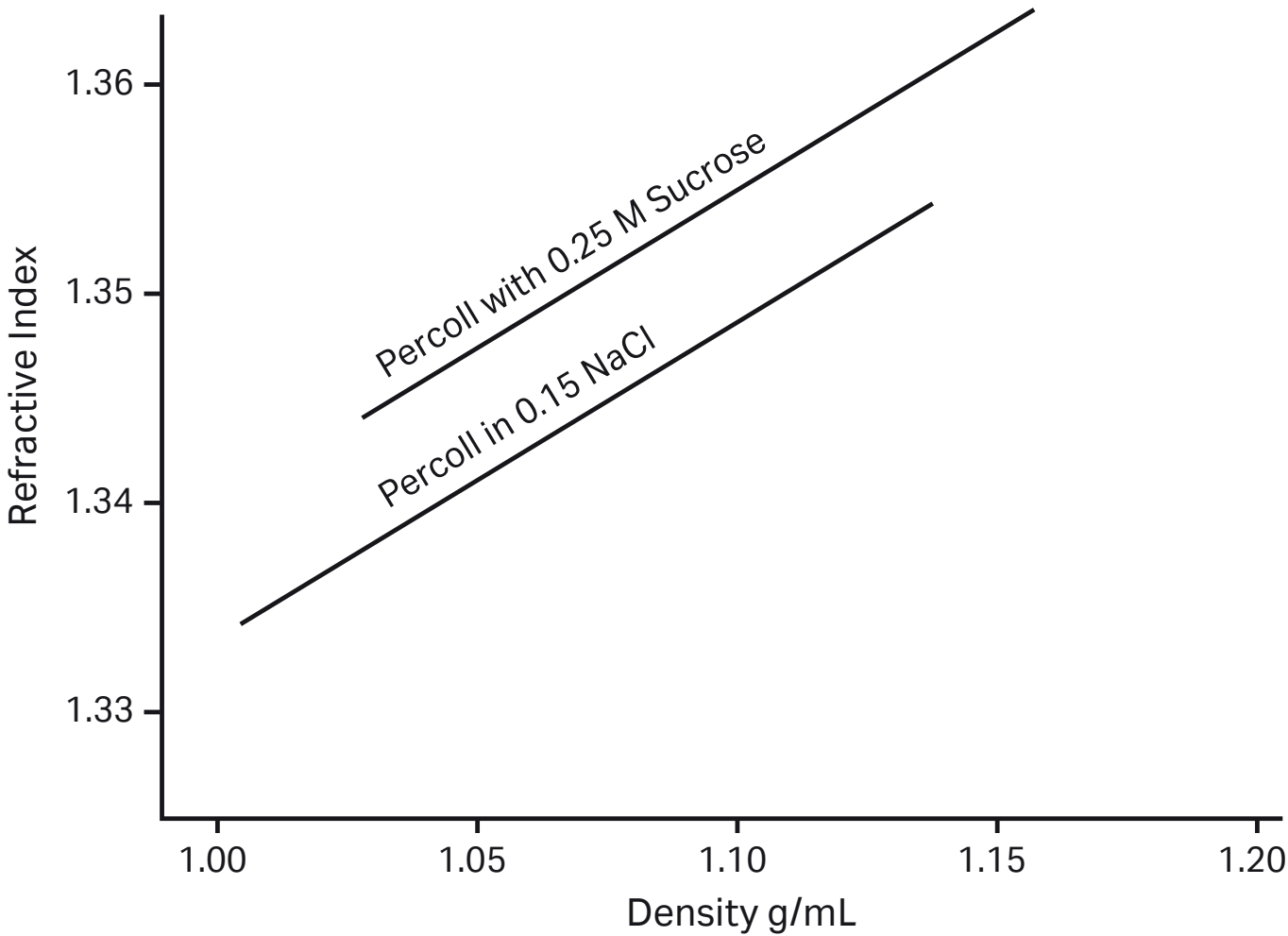


图 16. 折射系数做为Percoll梯度密度的函数 (Cytiva Bio-Sciences AB，乌普萨拉，瑞典)。

细胞分选和计数

Percoll 不会干扰流式细胞分选 (FACS) (911, 1042) 或电子计数设备 (12)。梯度的 DNA 含量也能够被用于测定细胞数量 (12)。

蛋白质测定和酶分析

Percoll 在用 Folin-Ciocalteu 和 Lowry 试剂时会产生背景颜色，因此的测定方法应该使用 Percoll 溶液做为空白。使用缩二脲反应测定的蛋白浓度更高。Terland 等 (89) 建议用 Bradford 的 Coomassie™ Blue 法 (90)，因为 Percoll 不会干扰颜色的形成。Vincent 和 Nadeau (518) 曾经报道了一种 Bradford 的改良方法，它包括 Percoll 在 NaOH Triton™ X-100 中沉淀。

细胞器通常主要通过特定酶的存在来识别。在 Percoll 存在时能够无干扰地进行许多酶的分析。Pertoft 和 Laurent (21) 描述了一个实验，鼠肝脏匀浆中的 5'-核苷酸酶 (质膜)、葡萄糖-6-磷酸酶 (微粒体)、 β -葡糖苷酸酶 (溶酶体) 和琥珀酸脱氢酶在 Percoll 存在时被分析。在所有的实例中，在 Percoll 中的酶活性和在对照中的活性是一样高的，表明活性测定不受介质的影响。不稳定的琥珀酸脱氢酶活性被 Percoll 稳定。芳香硫酸酯酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、N-乙酰- α -D-氨基葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶在 Percoll 存在时 also 已经被分析，没有收到来自培养基的干扰 (21)。由于 Percoll 存在的轻度散射，在酶学分析时最好采用荧光而不是吸光率来测定酶活性。有关在 Percoll 中酶测定的详细信息，见参考文献 13、43、53、54、78 和 89。

离心后 Percoll 的去除

由于 Percoll 对生物材料是无毒性的且不会粘附到膜上，通常不必从被纯化的制备物中去除 Percoll。细胞可以直接转移到细胞培养系统中 (23, 57)，病毒的传染性不受影响 (21)，细胞器能够被用于代谢研究 (21)，梯度材料没有产生任何影响。

下列方法能够在需要时用于 Percoll。

清洗（低速离心）

活细胞能够通过用生理盐水清洗而从 Percoll 介质中得到分离 (5 体积的生理盐水对 1 体积的 Percoll 细胞悬浮液)。清洗可以重复 2 到 3 次，每次清洗后 $200 \times g$ 离心 2 到 10 分钟。用放射性标记的 Percoll (表 2) 进行的研究已经表明没有可检测到的残留 Percoll 黏附在以这种方式清洗后的细胞上。Enerbäck 等 (9) (图 17) 和 Schumacher 等 (31) 的电子显微镜图显示细胞制备物中没有可见的来自离心介质中的污染颗粒。

清洗（高速离心）

对于病毒和亚细胞颗粒由于太小按上述低速离心时不能形成颗粒沉淀团块，生物材料能够在吊桶式转头或角度式转头中通过高速离心与覆盖二氧化硅的颗粒分离。第一次离心获得的未稀释组分被放置在离心管中，然后在吊桶式转头中 $100000 \times g$ 离心 2 小时或在角度转头中离心 90 分钟 ($100000 \times g$) 以形成 Percoll 颗粒团块。生物材料保持在坚硬的 Percoll 小球上 (12, 39)。

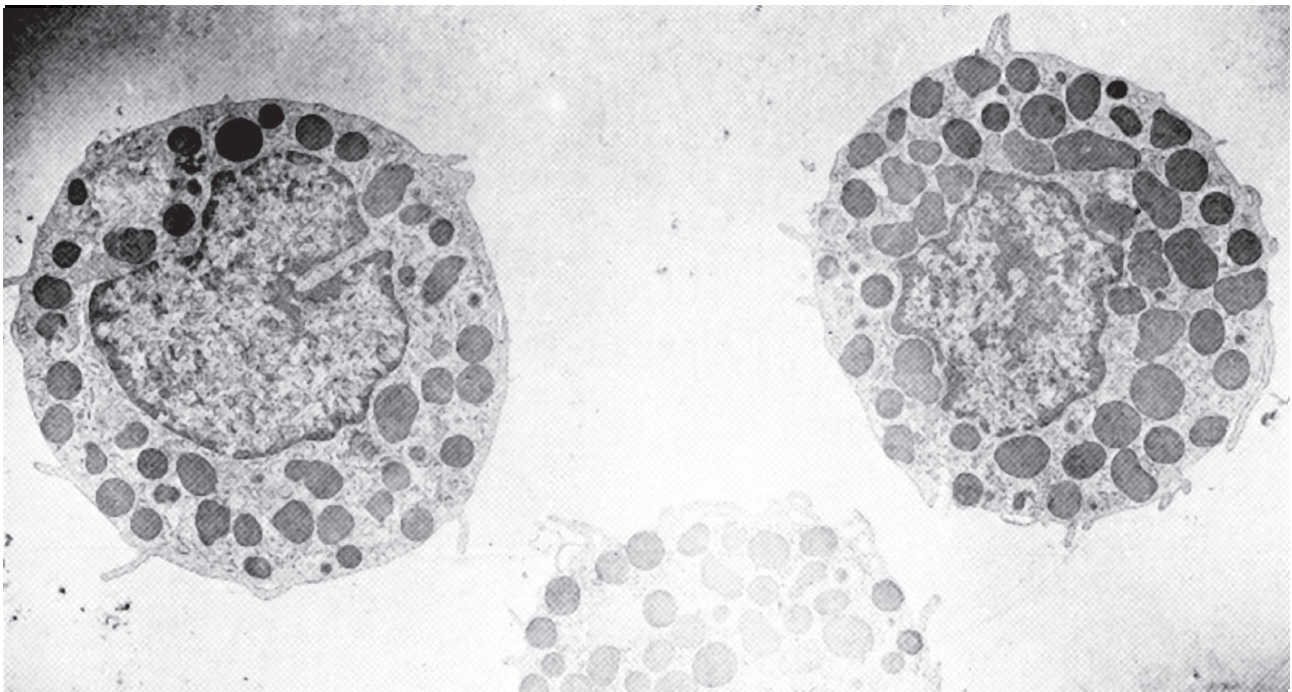


图 17. Percoll 梯度离心分离获得的肥大细胞的电子显微照片 (9, 图像引用经过作者和出版商允许)。

表 2. 从鼠肝脏匀浆中去除 Percoll。125I 标记的 Percoll 用于在 Eagle's MEM 中以 1.07 至 1.09 g/mL 的密度分离肝细胞(125I 的格式要和英文的匹配)	
在 Percoll 中的 5 ml 初始细胞悬浮液	35 680
细胞团 (来自在 Percoll 中的 5 ml 初始细胞悬浮液) 用 80 ml 的 Eagle's MEM 清洗并 $200 \times g$ 离心 10 分钟	71
重复清洗一次	0
2 ml 细胞悬浮液中的细胞被接种在 6 cm 的 Petri 皿中, 有 80% 的细胞附着在皿上。用 5 ml Eagle's MEM 经过 4 次清洗后, 细胞用 0.01% 胰酶加 0.25% EDTA 消化分开	0

其他的方法

在 Sephacry™ S-1000 Superfine 上的凝胶过滤层析将把 Percoll 与更大颗粒分离 (如亚细胞颗粒), 它在空体积时被洗脱。已经有通过 Sephacry S-1000 Superfine 凝胶过滤把 Percoll 从微囊中去除的报道 (275)。作者通过分析微囊标记酶 NADPH- 细胞色素还原酶追踪洗脱模式 (图 18)。结果得到的微囊组分通过电子显微镜进行检测并发现几乎完全无 Percoll (与初始样品相比低于 0.5%)。

已经有使用电泳把溶酶体和病毒与 Percoll 分离的初步实验的报道 (21), 但是这种方法很难而且结果不可预测 (Per-toft, 个人交流)。

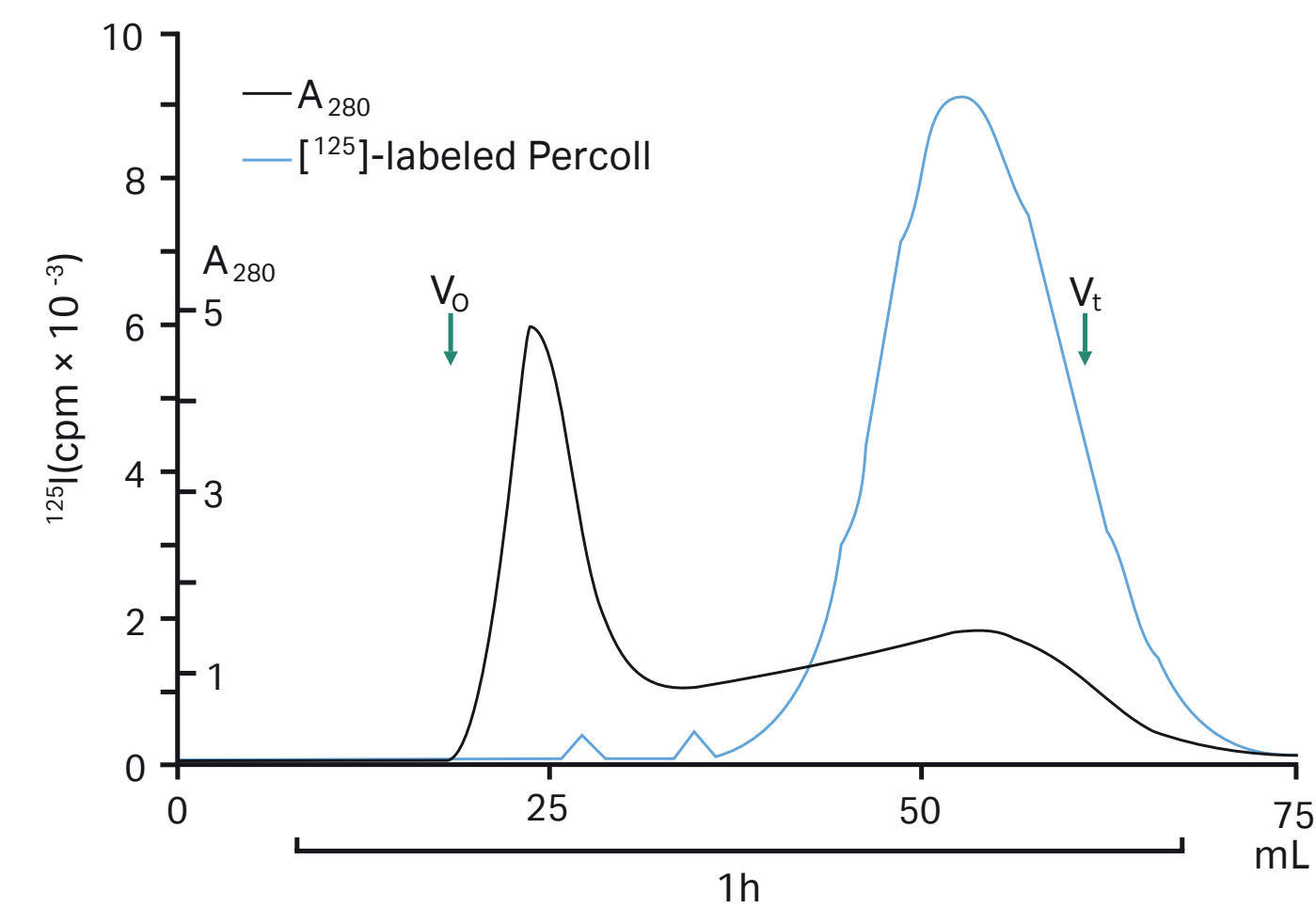


图 18. 从 ^{125}I 标记的 Percoll 梯度中获得的微粒体在 Sephacry S-1000 Superfine 上的凝胶过滤图。 V_0 = 外水体积, V_t = 总体积 (275, 图像引用经过作者和出版商允许)。

实用注意

设备的护理和清洗

聚碳酸酯管可以和 Percoll 一起使用, 因为颗粒不会粘附在这些管的壁上。Percoll 溶液通常在离心后会在管的底部产生一些颗粒状的紧密的硅小球, 并沉淀在用于分离等操作的管路的壁上。这些沉淀变干后很难清除。因此建议所有的设备在使用后马上清洗。溢出的 Percoll 可以用水清洗去除。

Percoll 的储存

Percoll 是在没有被打开时在室温下可以保存 5 年。当打开后, 应该被保存在 + 8 °C 以下。如果在非无菌条件下打开, Percoll 可以冷冻保存在 -18°C 中 6 个月以避免微生物的生长 (要有足够的顶部空间以适应膨胀)。如果保存在 -18°C, 在融化时会形成梯度, 在使用前必须混合瓶中的内含物。假如梯度是无菌的且不被破坏, 预制梯度可以保存几周而不改变梯度的形状。

Percoll 溶液的灭菌

提供的 Percoll 是无菌的, 且可以用高压锅在 120 °C 灭菌 30 分钟, 重新灭菌不改变任何性质。Percoll 溶液的高压灭菌必须在没有盐和蔗糖时进行 (即不能高压灭菌 SIP)。当高压灭菌未稀释的 Percoll 时, 建议维持其尽可能少地接触空气以避免颗粒在 Percoll/ 空气界面聚集。这可以通过在高压灭菌时使用细颈瓶来完成。如果形成了这些颗粒, 它们可以通过低速离心去除。如果在高压灭菌时有任何明显的蒸发发生, 体积应该用无菌水重新补充以便密度不受影响。

硅颗粒聚集

不管是在高压灭菌期间还是在长期的保存期间, 所有硅溶胶的固有倾向是形成聚集物。这些聚集物可以在一些批次的 Percoll 中可以被观察到, 它们或者是做作为一种轻微的沉淀物, 或者是密度为 1.04 到 1.05 g/ml 的模糊的白色区带。这个区带可能在离心中或预制梯度的低速离心期间形成梯度时形成。聚集的硅颗粒并没有干扰生物颗粒的分离, 因为几乎所有的细胞和细胞器在 Percoll 中的浮力密度都大于 1.05 g/ ml。

Percoll PLUS - 低内毒素

物理性质

组成	带共价交联硅烷的硅溶胶溶液	pH	9.4±0.5， 20℃
渗透压	< 30 mOsm/kg H ₂ O	干燥残留物中的碳含量	4.0-5.5%
密度	1.130 ± 0.005 g/ml	内毒素活性 (最大)	2 EU/ml
粘度	< 15 cP， 20 °C	保存期限	5 年

组成

Percoll PLUS是基于硅的溶胶介质，用于通过密度梯度离心法的细胞制备。它提供Percoll的所有的优点，并且能够被整合到现有的使用Percoll梯度进行多种人类细胞类型制备的程序中。Percoll Plus的硅颗粒共价覆盖硅烷，提供更大的产品稳定性、更低的渗透压、毒性和粘度。

渗透压

Percoll PLUS的渗透压很低，< 30 mOsm/kg H₂O，且很容易用生理盐水、其他稳定的盐溶液或细胞培养基调节以提供等渗梯度并在全部过程中被调节到生理条件。

密度

Percoll PLUS拥有的密度为 1.130 ± 0.005 g/ml。调节后，Percoll PLUS在密度范围1.0 到 1.3 g/ml 内形成等渗梯度。这个密度范围被优化用于大多数细胞、亚细胞颗粒和更大的病毒的分离，它们在Percoll PLUS中的浮力密度为 1.0 到 1.2 g/ml。

内毒素活性

Percoll PLUS有很低的内毒素水平 (< 2 EU/ml)。低毒性提高了安全性，使得Percoll PLUS非常适合临床研究应用的细胞分离。

梯度

在中等的离心力下，Percoll PLUS中的凝胶颗粒沉淀形成光滑、连续的密度梯度，且这种性质能够在固定角度或垂直角度的转头中被应用。

Percoll PLUS也完全适合要求高速离心时的应用。在这种情况下，样品能够和Percoll Plus预先混合，然后在原位形成的连续梯度中被分离。因此梯度的形成和样品的分离能够在一步中完成。

关于离心条件以及在Percoll梯度中离心的细胞、亚细胞和病毒的浮力密度的进一步的信息可以在本手册的其他地方找到。

实用注意

储存

见第 28 页的Percoll“实用注意”。

应用

血细胞

血液中的细胞类型的全部谱图能够在 Percoll 预制梯度中被解析。Pertoft 等 (55) (图 19) 描述的方法应用了速率区带 (通过大小分离) 和等密度技术 (通过密度分离)。稀释的血液添加到在预制的自动生成的梯度的顶部并在 400 x g 下离心 5 分钟。在此期间,血小板 (比血液中的其他细胞略小) 并没有渗透到梯度中。

含有血小板的血浆层被去除并用盐水替代,继续在 800 x g 下离心 15 分钟,结果形成单个核细胞 (淋巴细胞和单核细胞)、多形核细胞和红血球的等密度区带。细胞带的位置和密度可以应用包含在第二个离心管中具有相同梯度的 Density Marker Beads 监测。

虽然上述方法阐明了应用 Percoll 分离全血细胞,但大多数血细胞可以通过简单的一步梯度而略微富集。简单的一步梯度通常为下游处理提供令人满意的产量和纯度。下面的应用表格含有许多应用不同类型的梯度纯化血细胞和其他类型细胞的例子。

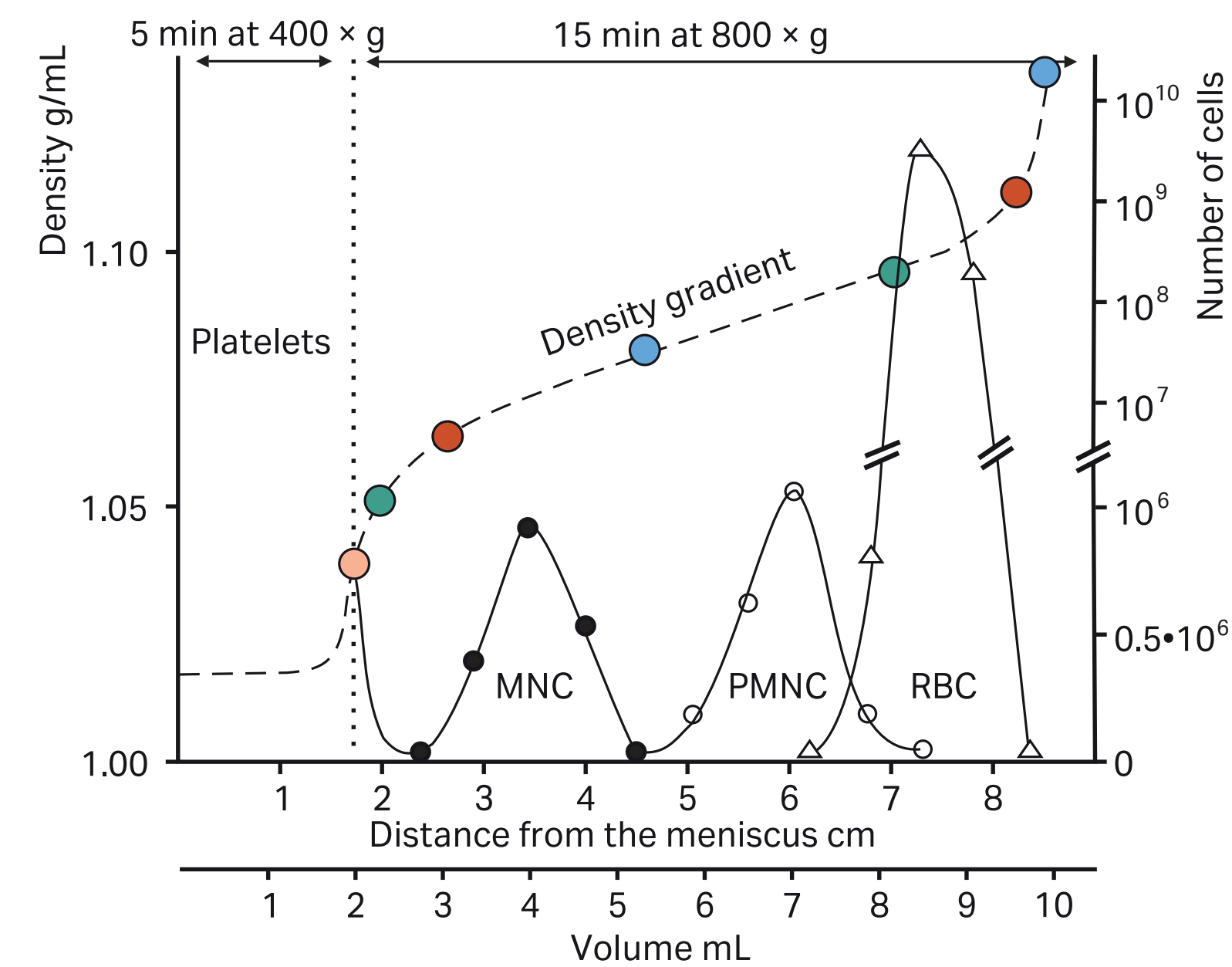


图 19. 人血细胞在一种 Percoll 梯度中的分离。管中充入 10 ml 含有 70% Percoll(v/v) 的 0.15 M NaCl (p = 1.086 g/ml), 梯度通过在 14°转头中 20000 x g 离心 15 分钟产生。使用注射器从管底部去除 2 ml 梯度材料。1 ml 肝素处理的血液加 1 ml 0.15 M NaCl 稀释后在梯度顶部分层。如图所示进行离心。使用 Density Marker Beads 监测密度。MNC = 单个核细胞, PMNC= 多形核细胞, RBC = 血红细胞 (55, 图像引用经过作者和出版商允许)。

应用一血细胞

淋巴细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	血液	Percoll 密度离心法导致L-选择素表面反应性的显著下调。	免疫荧光法	891
人类	连续	扁桃体	Percoll 密度梯度用于分离大（ 高密度 ）体内活化细胞和小（ 高密度 ）静息细胞。	细胞培养、FACS、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)测定和Northern 印迹	892
人类	连续	脾脏、扁桃体	通过Percoll 梯度离心法获得的扁桃体大B 淋巴细胞（ 体内活化细胞 ）显示出比静息细胞更高的IL-4R 水平。	细胞培养、Northern 印迹、FACS	893
人类	连续	外周血	Percoll 用于分离增殖细胞和非增殖细胞。	氘化胸腺嘧啶掺入	11
人类	连续	扁桃体， 外周血	这个过程产生获得了90% 以上活细胞， 并被证明对更新过度生长的培养物很有帮助。	增殖和细胞毒性试验	16
人类	连续	血液	Percoll 用于从淋巴细胞中分离单核细胞。	细胞培养、凝血活性、免疫放射测定	40
人类	不连续（ 3 层 ）	肠道	淋巴细胞在66.7 和44% Percoll 之间的界面中富集。使用磁珠进行进一步纯化。	流式细胞仪分析、免疫过氧化物酶程序、细胞培养	894
人类	不连续（ 6 层 ）	外周血	Percoll 用于从外周单核细胞中分离出大颗粒淋巴细胞(LGL)。	在LGL 群体中检测CD5 ^{LOW+}	895
人类	不连续	扁桃体	Percoll 梯度用于分离小（ 高密度 ）和大（ 低密度 ）细胞。	细胞培养、细胞凋亡检测、G-CSF 免疫检测、GM-CSF 生物检测、Northern 印迹分析	896
人类	不连续	肠道		细胞增殖实验、细胞毒性测量、H1 受体结合研究	897
人类	不连续	外周血	Percoll 用于分离低密度细胞。	FACS、免疫荧光法、非特异性酯酶染色法	898
人类	不连续	外周血	从低密度Percoll 组分中回收淋巴细胞。	新鲜分离的单核细胞对NK 细胞增殖的抑制作用	899
人类	不连续	扁桃体	Percoll 用于分离滤泡树突细胞(FDC)。	细胞分选、FDC 的B 细胞增殖	900
人类	不连续	骨髓	Percoll 用于从骨髓中分离白血病细胞。	建立白血病细胞系	901

淋巴细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续	外周血	在Percoll 上分离后，得到了几乎纯的活化细胞群，这根据是否存在4F2 标记物和转铁蛋白受体进行估计。	免疫荧光法和磷脂代谢的测定	902
人类	不连续（ 1 级 ）	血液	淋巴细胞的纯度大于99%，单核细胞群被富集82% 至90%。	淋巴因子(IL-2) 激活的杀伤(LAK) 细胞活性的诱导和测定	903
人类	不连续（ 4 层 ）	血液	Percoll 用于从T 细胞中分离出大颗粒淋巴细胞(LGL) 细胞。	吉姆萨染色，用白细胞介素-2 (IL-2) 激活细胞	904
人类	不连续（ 4 层 ）	扁桃体	Percoll 用于B 细胞富集。	流式细胞仪	905
人类	不连续（ 5 层 ）	血液	大颗粒淋巴细胞(LGL) 是从低密度组分收集，而T 细胞则位于高密度的底部组分中。	FACS、细胞培养、细胞毒性试验	906
人类	不连续（ 5 层 ）	血液	单核细胞的纯度高达90%，淋巴细胞的纯度大于99%。	细胞计数（血细胞计数器）和细胞培养试验	69
人类	不连续（ 7 层 ）	外周血		细胞毒性试验、流式细胞仪分析和补体依赖性裂解	907
人类	自生	外周血	Percoll 用于分离活细胞和非活细胞。与Ficoll-Isopaque 相比，使用Percoll 的产量略高，红细胞污染略低。	细胞毒性试验	83
犬类	连续	血液	Percoll 用于抗体阳性细胞的富集和去除。	反向溶血空斑测定和细胞介导的淋巴溶解	908
犬类	不连续（ 4 步， 2 层 ）	全血	纯化的淋巴细胞通过45/50% Percoll 梯度浓度最终把自然杀伤(NK) 活性富集成单个淋巴细胞带。	NK 活性的测量	909
小鼠	连续（ 3 层 ）	肠道	尼龙毛过滤后，富集度从44.1%（单次过滤）增加到52.4%（多次过滤），Percoll 组分后富集度则从70.3%（单次过滤）增加到82.8%（多次过滤）。	流式细胞仪	910
小鼠	连续（ 5 层 ）	脾脏	Percoll 用于分离原始T 细胞和记忆T 细胞。	细胞增殖试验，FACS	911
小鼠	不连续（ 3 层 ）	脾脏	Percoll 用于分离B 细胞。	蛋白质磷酸化试验	912
小鼠	不连续（ 3 层 ）	肠道	Percoll 用于分离肠上皮内淋巴细胞(IEL)。	通过流式细胞仪、mRNA-cDNA 斑点印迹、PCR 进行DNA 分析	913
小鼠	不连续（ 4 层 ）	脾脏	Percoll 用于分离小的静息B 细胞。	通过流式细胞仪进行细胞周期分析	914
牛	不连续	乳腺	纯化的细胞纯度大于80%。	瑞氏-吉姆萨染色，细胞培养	915

单核细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续（小梯度）	外周血	使用Percoll 小梯度，在骨髓移植(BMT) 后的所有时间点，可以从患者样本上获得90-100% 的细胞。	细胞遗传学分析	916
人类	连续	血液	分离的单核白细胞(MNL) 组分中> 80% 的细胞对α-萘乙酸酯酶(α-NAE) 呈阳性反应。	细胞培养	917
人类	连续	外周血	Percoll 用于分离单核细胞，纯度> 85% 和活力> 95% 。	用细胞因子进行细胞培养	918
人类	连续	血液	事实证明，Percoll 对于从血液中分离单核细胞以及从腹水和滑膜液中分离巨噬细胞非常实用。	细胞培养	34
人类	连续	血液	Percoll 梯度用于从淋巴细胞中分离单核细胞。	细胞培养	40
人类	连续	血液	采用一步法获得纯度为20% 的高产单核细胞悬液，培养前不需要洗涤。两步法以较低的分离获得高于90% 的纯单核细胞。	细胞计数、Fc 受体存在性和吞噬作用试验	57
人类	连续	外周血	用Percoll 将MNL 分离成两组分：一组分主要由单核细胞组成，另一组分由淋巴细胞组成。	真菌(Coccidioides immits) 杀伤试验	919
人类	不连续	血液	单核细胞的纯度为95%。	细胞培养	920
人类	不连续	全血	Percoll 梯度用于富集造血祖细胞。	菌落形成试验	921
人类	不连续	血液		RNA 分离、Northern 印迹分析和RT-PCR	922
人类	不连续	骨髓		DNA 杂交研究	923
人类	不连续（1 层）	血液	淋巴细胞的纯度大于99%，单核细胞群被富集82% 至90%。	淋巴因子(IL-2) 激活杀伤(LAK) 活性的诱导和测定	903
人类	不连续（1 层）	外周血	单核细胞的纯度≥ 95%。	Northern 印迹分析、核径流实验、S1 保护试验	925
人类	不连续（4 层）	外周血	从65% 至75% 界面获得的细胞中99%是粒细胞。	分析和蛋白质印迹分析、基因组DNA 分离和PCR	926
人类	不连续（1 层）	外周血	使用1 级梯度，单核细胞的纯度为93% 至96%。	吉姆萨染色和细胞培养	927

单核细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续（5 层）	外周血	通过瑞氏-吉姆萨染色法鉴定Percoll 分离的单核细胞/巨噬细胞。	单核细胞/巨噬细胞与血管平滑肌细胞之间的相互作用	928
人类	不连续（5 层）	血液	单核细胞的纯化率高达90%，淋巴细胞的纯化率达到99%。	细胞回收计数和细胞培养试验	69
人类	不连续	外周血		使用库尔特计数器、RNA 分离和Northern 印迹分析进行细胞计数	929
马	不连续（1 层）	外周血	所有的MNC 都在Percoll 梯度上回收，没有任何中性粒细胞的污染。	细胞恢复试验	930

红细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	全血	Percoll 用于分离年轻和年老的红细胞。	补体受体1 型(CR1) 和CD59 的免疫荧光分析，CR1 在体内的蛋白水解裂解情况	931
人类	连续	血液	Percoll 用于分离恶性疟原虫寄生的红细胞和非寄生的红细胞。	红细胞膜的分离、脂质过氧化反应、维生素E 和跨膜还原系统分析	932
人类	连续	血液	描述了一种通过Percoll 密度梯度离心法对人红细胞进行年龄分化的快速方法。	火焰光度法、酶测定法	77
人类	不连续（4 层和8 层）	血液	描述了一种使用Percoll 根据年龄精细分离红细胞的快速方法。	衰老红细胞酶活性下降分析	933
人类	不连续（4 层）	血液		酶联免疫吸附试验(ELISA)、膜的蛋白消化作用	934
人类	不连续（4 层）	血液	密度标记珠的位置用于收集密度< 1.00 g/cm3 或> 1.119 g/cm3的细胞。	屈服应力实验：细胞的敏感指标：镰状细胞脱氧悬浮液的细胞粘附	935
人类	不连续	血液	Percoll 梯度用于将红细胞分成4 个密度组分。	血小板活化因子(PAF) 乙酰水解酶活性和膜流动性	936

红细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续	血液	使用低透析过程将负载L-天冬酰胺酶的红细胞分成八个组分。	L-天冬酰胺酶活性	937
人类	不连续	血液	1.080 到1.115 g/cm³ 的不连续梯度， 每层密度相差0.005 g/mL， 产生9 个细胞组分。	酶测定	66
人类	不连续（ 5 层 ）	血液		研究红细胞的变形性和细胞年龄	938
人类	不连续（ 8 层 ）	血液	Percoll 用于通过反向渗透裂解对负载肌醇六磷酸酯(IHP) 的红细胞进行密度分离。	血红蛋白分布， IHP 浓度分布	939
人类	不连续（ 9 层 ）	血液	通过监测红细胞在Percoll 密度梯度上的分布模式， 对肌醇六磷酸酯的两种细胞负载技术进行了详细比较。	氧亲和力、血液学参数和有机磷酸盐含量测量	940
多乳鼠类	连续	血液	Percoll 用于分离伯氏疟原虫寄生的红细胞和非寄生的红细胞。	红细胞中的cAMP 水平	941
小鼠	连续（ 自形成 ）	血液	红细胞的精细分离产生了五个不同的群体， 在第二梯度的最近一次离心中保持其密度。	脂质的跨边运动和平衡分布	942
小鼠	连续	外周血	Percoll 用于化学诱导红细胞的密度梯度分离。	对多染微核(MPCE) 和非染色微核(MNCE) 红细胞进行固定、染色和流式细胞仪分析	943
小鼠	不连续	外周血	红细胞中只有0.001% 的有核细胞被污染。	葡萄糖磷酸酯异构酶(GPI) 测定	944
大鼠	不连续	全血	Percoll 用于分离被伯氏疟原虫感染的红细胞。	氧解离分析	945
兔子	不连续（ 7 层 ）	血液	兔子红细胞被可重复地精细分离为不同成熟阶段的群体。	胞质蛋白酶活性的测量	946
鳟鱼	不连续	血液	在45% 到65% Percoll 区域的梯度产生了三种红细胞组分， 这是由于血红蛋白成分的多重性造成的。	抗氧化剂酶活性和膜流动性分析	947

自然杀伤 (NK) 细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续	外周血	Percoll（预培养）步骤促进了静息细胞与较大淋巴细胞的密度分离。	NK 和T 细胞活化，免疫荧光法	948
人类	不连续	血液	粘附在NK 细胞上的K562 细胞被一起分离。NK 细胞的富集率为71.3%。	细胞毒性研究，形态学特征分析	61
人类	不连续（2 层）	外周血	使用了低密度组分（42.5 至47.5% 的Percoll），该组分显示了4 倍的NK 活性富集。	NK 活性和动力学常数的测定，测量二价阳离子对NK 活性的影响，以及ATP 对NK 细胞表面标记物的影响	949
人类	不连续（6 层）	血液	使用磁珠进一步纯化，得到了纯正的制剂。	细胞毒性试验	950
人类	不连续（8 层）	外周血	回收率> 80%，而通过台盼蓝排除法判断的活力> 95%。	NK 细胞的刺激作用，通过免疫荧光进行表型评估	951
小鼠	不连续（3 层）	肺	50/55%界面处的细胞是NK 细胞活性最丰富的细胞。	通过转移来重建NK 缺失小鼠的NK 活性	952
小鼠	不连续（6 层）	脾脏	NK 细胞富集在密度较低的Percoll 组分中，而天然细胞毒性T 细胞(NCT) 则分布在较高和较低密度的组分中。	测量了NK 细胞的细胞毒性	953
小鼠	不连续（6 层）	肝脏	所有NK 活性均高于1.08 g/mL 密度。在1.04 和1.06 的界面上，NK 祖细胞的富集程度为2 倍。	PCR、蛋白质印迹分析和细胞毒性试验	954

中性粒细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续（1 层）	全血	中性粒细胞在1.077 g/mL 的缓冲液中富集。	FACS 分析， 细胞内Ca++和超氧阴离子测量	955
人类	不连续（2 层）	全血		通过免疫荧光法、粘附试验和超氧化物试验对多形核中性粒细胞(PMN) 进行标记	956
人类	不连续（4 层）	外周血	Percoll 用于分离单核细胞和淋巴细胞。	免疫荧光法和流式细胞仪	957
人类	不连续（4 层）	全血	葡聚糖沉淀后分离嗜酸性粒细胞和中性粒细胞。	流式细胞仪和乳铁蛋白释放量的测量	958
人类	不连续	血液	将细胞制备物分层到Percoll 缓冲液上，以去除单核细胞。红细胞裂解后，主要是中性粒细胞， 其余细胞主要是嗜酸性粒细胞。	免疫荧光研究	959
人类	不连续	血液	中性粒细胞的纯度> 95%。	间接免疫荧光法、免疫电子显微镜和FACS 分析、氧气消耗量	960
人类	连续，非线性（2 层）	血液	Percoll 用于对嗜天青颗粒、特定颗粒、明胶酶颗粒、细胞膜和分泌囊泡进行亚细胞精细分离。	NGAL、明胶酶、乳铁蛋白和骨髓过氧化物酶的ELISA 检测	961
小鼠	连续	腹膜	使用Percoll 获得了约97% 纯度的多形核中性粒细胞(PMN) 制剂。	电泳分析、GM-CSF 测定以及细胞形态和计数	70

嗜酸性粒细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续	外周血	使用Percoll 梯度纯化嗜酸性粒细胞，然后使用免疫磁珠进行纯化。通过这一程序，嗜酸性粒细胞的纯度> 95%，活力> 98%。	FACS 分析、嗜酸性粒细胞迁移试验、Ca++ 测量	962
人类	不连续（2 层）	血液	嗜酸性粒细胞的回收率为40% 至60%，经台盼蓝排除法测试，活力> 98%，纯度> 85%。	趋化性和细胞内Ca++ 测量	963
人类	不连续（2 层）	血液	嗜酸性粒细胞的纯度大于95%，而且该方法没有诱发嗜酸性粒细胞的活化。	血清处理的酵母聚糖(STZ) 结合和胎盘激活因子(PAF) 的测定	964
人类	不连续（2 层）	血液	嗜酸性粒细胞的纯度> 85%，回收率在40% 到60% 之间。活力> 98%。	趋化性试验	965
人类	不连续（3 层）	外周血	嗜酸性粒细胞的纯度为95% 至99%，使用台盼蓝的活力> 98%，回收率为40% 至60%。	密度分布分析、细胞培养	966
人类	不连续（4 层）	全血	分析了葡聚糖沉淀对中性粒细胞和嗜酸性粒细胞密度的影响。	流式细胞仪和乳铁蛋白释放量的测量	958

嗜碱性粒细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	外周血	通过Percoll 密度梯度分离和细胞分选对嗜碱性粒细胞进行纯化。该程序产生了95% 的纯度，总产量估计在5% 至28% 之间。	流式细胞仪、组胺释放、电子显微镜	967
人类	连续	骨髓	低密度组分(< 1.063 g/mL) 中嗜碱性粒细胞的纯度通常> 75%。	组胺含量和释放	968
人类	不连续	外周血	通过Percoll 梯度获得高度纯化的嗜碱性粒细胞， 然后使用流式细胞仪进行阴性选择。	细胞因子对人体嗜碱性粒细胞趋化性的影响	969
人类	不连续（2 层）	血液	大多数嗜碱性粒细胞位于1.070 至1.080 界面。该组分的纯度为36% 至63%。	使用免疫磁珠通过阴性选择进一步纯化	970
人类	不连续（2 层）	血液	通过Percoll 梯度获得高度纯化的嗜碱性粒细胞， 然后使用流式细胞仪进行阴性选择。	组胺释放试验、趋化试验	971
人类	不连续（3 层）	全血	使用Percoll 梯度将嗜碱性粒细胞纯化至> 80%，然后用单克隆抗体处理以去除污染物。	流式细胞仪， 以及钙离子载体刺激后白三烯C4 的产生	972
人类	不连续（3 层）	外周血	使用Percoll 的嗜碱性粒细胞纯度为85% 至96%。	细胞刺激和介质释放试验	973
大鼠	不连续	血液		通过免疫磁珠、免疫荧光、电子显微镜进一步纯化	974

应用 — 其他细胞类型

肝细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	肝脏	在Percoll 密度梯度上纯化冻存肝细胞，将存活细胞的百分比从55% 提高到87%。	原代细胞培养、电子显微镜、活力测定放射性标记的蛋白质合成、分泌测定、代谢研究、毒理学研究	975
大鼠	连续	肝脏	Percoll 提供了一种获得富集的枯否细胞群的好方法。回收率为82%，活力为87%，纯度为67%。	过氧化反应	20
大鼠	连续	肝脏	Percoll 梯度用于分离肝细胞细胞膜和线粒体膜。	相差显微镜、细胞结合实验	33
大鼠	连续	肝脏	大鼠肝脏细胞提供密度为1.07 至1.09 g/mL 的实质细胞（肝细胞）和密度为1.04 至1.06 g/mL 的非实质细胞（主要是枯否细胞）的亚群。	细胞培养	55
大鼠	不适用	肝脏	根据台盼蓝排除法判断，最终制剂含有少于5% 的非存活细胞。	细胞培养	71
大鼠	连续	肝脏	Percoll 梯度用于将非实质细胞精细分离成枯否细胞、星状细胞和内皮细胞。	光学和荧光显微镜、羧酸酯酶和谷胱甘肽巯基转移酶(GST) 活性	976
大鼠	不连续（2 层）	肝脏	Percoll 为大鼠肝窦内皮细胞(LEC) 的分离、纯化和培养提供了一种简单、低成本、快速有效的方法。	电子显微镜、细胞培养、台盼蓝排除法	977
大鼠	不连续（2 级）	肝脏	Percoll 梯度用于将贮脂细胞(FSC) 从肝脏内皮细胞(LEC) 和枯否细胞(KC) 中分离。	细胞培养	978
大鼠	连续	肝脏	用Percoll 离心法去除受损细胞后，通过台盼蓝排除法测试，冻存肝细胞的平均活力为88.6% (±1.3%)。	细胞活力和异物代谢的研究	979
大鼠	连续	肝脏	Percoll 用于去除冻存细胞中的死细胞。在Percoll 步骤后，细胞活力为88±1%。	细胞活力和异物代谢的研究	980

肝细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
大鼠	连续	肝脏	冻存细胞解冻后若经Percoll 离心法进行纯化，其酶活性与新鲜分离的实质细胞没有明显区别，活力为86%。	洛瑞蛋白测定、细胞色素测定、酶测定	981
大鼠	连续	肝脏	通过Percoll 分离得到的冻存细胞，其活力和代谢能力与新鲜分离的细胞没有明显的区别。	睾酮和苯并芘(BaP) 的蛋白质测定、酶测定和代谢情况	982
大鼠	不连续（2 层）	肝脏	使用Percoll 两级梯度来分离枯否细胞(KC) 和肝内皮细胞(LEC)。枯否细胞的纯度为85% 到92%，而肝内皮细胞的纯度至少为95%。	光学显微镜、电子显微镜和过氧化物酶染色	983
大鼠	不连续（5 层）	肝脏、脾脏	Percoll 梯度用于分离脾脏细胞和肝脏细胞。脾脏和肝脏细胞的活力超过95%。	台盼蓝活力试验、细胞培养	984
大鼠	连续	肝活组织检查	Percoll 用于分离肝细胞和非实质细胞，以及进行精细份化。	使用库尔特计数器进行细胞计数、免疫细胞化学、DNA 提取、Southern 印迹分析、标记酶和亚细胞组分中蛋白质的测定、电子显微镜。	985

间质细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	睪丸	根据3β-羟基类固醇脱氢酶染色测定，Percoll 纯化的间质细胞纯度为70% 至80%。	细胞培养， 刺激睪酮生成	986
人类	连续	睪丸	根据3β-羟基类固醇脱氢酶染色测定，Percoll 纯化的间质细胞纯度为80% 至90%。	载脂蛋白E (apoE) 的免疫细胞化学定位	987
人类	不连续（ 4 层 ）	睪丸	Percoll 梯度用于分离人间质细胞前体细胞。	细胞培养	988
人类	不连续（ 5 层 ）	睪丸	Percoll 梯度离心法允许分离出两种间质细胞组分。	细胞培养	989
小鼠	连续（ 线性 ）	睪丸	得到两组： 第一组的密度为1.0667 至1.0515 g/mL； 第二组的密度为1.0514 至1.0366 g/mL。	体外睪酮生成， 电子显微镜， 体视学	990
猪	不连续	睪丸	间质细胞的纯度> 85%。	氢化可的松(HS) 和促肾上腺皮质激素(ACTH) 对睪酮生成的影响	991
大鼠	连续	睪丸	使用淘析和Percoll 梯度离心法从睪丸中对大鼠间质细胞进行纯化。	细胞培养， 人绒毛膜促性腺激素(hCG) 对其基因调控和蛋白质分泌的影响	992
大鼠	连续	睪丸		细胞培养， 生长激素释放激素(GHRH) 对间质细胞类固醇生成的影响	993
大鼠	连续	睪丸	使用淘析和Percoll 梯度离心法从睪丸中对大鼠间质细胞进行纯化。第2 段（ 共3 段 ）含有>95% 的间质细胞（ 平均密度为1.075 g/mL ）。	在 ¹²⁵ I-标记的hCG、睪酮和cAMP 生成的情况下进行细胞培养	994
大鼠	连续	睪丸	对不同密度的间质细胞进行了比较。	活力染色， 细胞培养	995
大鼠	连续	睪丸		活力染色， 体外睪酮生成， SDS-PAGE 电泳	996
大鼠	连续	睪丸	通过Percoll 梯度分离， 完全保留了形态和生物的完整性， 纯度为90-95%。	人绒毛膜促性腺激素(hCG) 存在下的细胞培养、相差显微镜、光学显微镜和电子显微镜	31
大鼠	不连续（ 2 级 ）	睪丸		白细胞介素1 (IL-1) 存在下的细胞培养	997
大鼠	连续（ 自生 ）	睪丸	在Percoll 梯度上分离出了间质细胞前体细胞和纯(96%) 间质细胞。	人绒毛膜促性腺激素(hCG) 存在下的细胞培养	998
大鼠	不连续	睪丸	间质细胞的纯度在90% 到95% 之间。	人绒毛膜促性腺激素(hCG) 存在下的细胞培养	999
大鼠	不连续和连续	睪丸	在不连续梯度中， 最密集的组分含有高比例的间质细胞， 而较薄的组分主要含有非间质细胞。	¹²⁵ I-标记的碘脱氧尿苷掺入	1000

精子

种类	梯度类型	注释	下游应用	文献编号
牛	不连续	Percoll 被认为可以改善精液并保持精子顶体的完整性。	顶体显微镜评估	1024
仓鼠	连续	分离出比重为1.10 – 1.12 g/mL 的附睾头部精子，未受到其他细胞的污染。	脂质提取和精细分离电子显微镜	1025
猕猴	连续	Percoll 分离导致精子与透明带的结合增加，但不影响与透明带结合的顶体反应精子的百分比，也不影响悬浮液中的运动百分比和顶体反应精子的百分比。	透明带结合实验、顶体反应、运动试验	1026

骨髓细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
正常人	不连续（2 层）	骨髓	巨核细胞处于1.020 g/mL 和1.050 g/mL 之间的界面。	使用磁珠进一步纯化，流式细胞仪	1027
正常人	不连续	血液	回收的B 细胞纯度至少为95%。Percoll可以非常有效地去除了B 细胞原始细胞。	流式细胞仪	1028
感染艾滋病毒患者、正常人和免疫性血小板减少性紫癜患者	不连续（2 层）	骨髓	在1.020/1.050 界面的10 倍富集巨核细胞，而在1.050/1.070 界面的细胞是未成熟细胞。	从未成熟的细胞中制备的巨核细胞培养物用于原位杂交	1029
正常人	不连续（2 层）	骨髓	Percoll 密度精细分离可以去除超过95% 的总骨髓细胞，巨核细胞比例则从约0.05% 增加到3% 至7%。	RNA 的制备和随后的PCR、流式细胞仪	1030
正常人和关节炎患者	不连续（3 层）	骨髓	制备的细胞适合细胞培养。	菌落斑块试验、免疫荧光、流式细胞仪、蛋白质菌落印迹、RNA 菌落印迹	1031
正常人和白血病患者	不连续（4 层）	外周血	对移植后和移植前的低密度细胞进行分离以便后续分析。	使用磁珠进一步纯化，PCR	1032
正常人	不连续（7 层）	骨髓	与Ficoll™相比，使用Percoll 获得的T 细胞在骨髓细胞的高密度组分富集了约2 倍，而在最低密度组分则去除了约4-5倍。	流式细胞仪、混合淋巴细胞反应试验、自然杀伤细胞试验、细胞培养	1033
正常人	不连续（1 层）	骨髓	使用Percoll 去除红细胞来制备骨髓细胞。	使用大豆凝集素涂层培养瓶、祖细胞试验和流式细胞仪分离CD34+ 细胞	1034
狨猴	不连续（1 层）	骨髓	可以使用Percoll从接受和未接受白细胞介素-6 (IL-6) 治疗的动物的骨髓中分离获得巨核细胞。	流式细胞仪	1035
灵长类动物	不连续（1 层）	骨髓	对正常猴子和接受白细胞介素-6 (IL-6) 治疗的猴子的骨髓进行了分离。	细胞计数、FACS、数字成像显微镜和电子显微镜	1036

骨髓细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
猴子	不连续（1层）	骨髓外周和血液	用60%的Percoll从抽吸物中分离获得了低密度细胞。	细胞培养和各种菌落类型的鉴定	1037
小鼠	不连续（1层）	骨髓	用一次70%的Percoll 缓冲液从骨髓制剂中去除红细胞。	造血前体细胞的培养、白细胞介素-10 (IL-10) 对增殖的影响、碱性磷酸酶活性、胶原蛋白合成试验、骨钙素、RNA 的制备以及电子显微镜检查	1038
小鼠	不连续（3层）	骨髓	骨髓祖细胞适合培养。	白细胞介素3 (IL-3) 和细菌释放内毒素(LPS) 对培养细胞的影响	1039
小鼠	不连续（3层）	骨髓	通过加入单克隆抗体和补体，将制备的细胞中的淋巴细胞和巨噬细胞系细胞去掉。	FACS 分析、造血祖细胞培养、致死性辐照小鼠的重组	1040
小鼠	不连续（3层）	骨髓	Percoll 用于将主要含有原始细胞和淋巴细胞的骨髓组分与含有高水平集落形成单位-脾脏(CFU-S) 计数的骨髓组分分开。	FACS 分析、趋化性试验、脾脏集落形成单位(CFU-S) 试验	1041
小鼠	不连续（3层）	经蛋白酶处理的颅骨切片	根据各种测定结果，Percoll 梯度给出了不同的细胞亚群。	原代细胞培养、流式细胞仪、胰岛素样生长因子I (IGF-I) 测定、表皮生长因子结合、碱性磷酸酶测定	1042
小鼠	不连续（4层）	骨髓	分离后维持正常的抑制细胞活性。	抑制性细胞活性测定	1043
小鼠	不连续（4层）	骨髓	在随后的研究中使用了密度为1.06/1.07 g/mL 的细胞。	致死性辐照动物的重组	1044
小鼠	不连续（5层）	骨髓，脾脏		流式细胞仪，致死性辐照小鼠的重组	1045
小鼠	不连续（3层）	骨髓	在1.063 和1.082 g/mL Percoll 之间的组分中回收了约75% 的输入CFU-巨核细胞(CFU-MK)。CFU-MK 仅在这一密度组分中富集。	造血祖细胞的培养	1046
兔子	连续	骨髓		植入体内的扩散室、细胞化学染色和电子显微镜	38
猫科动物	不连续（1层）	骨髓	分离了猫免疫缺陷病毒感染的猫和正常猫的骨髓单核细胞。	造血祖细胞的培养	1047

巨噬细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续	肺	使用不连续的Percoll 梯度从污染的粒细胞中纯化肺泡巨噬细胞。	超氧化物(SO) 释放	1048
人类	不连续（ 4 层 ）	支气管肺泡灌洗术	Percoll 梯度分离获得的肺泡巨噬细胞(AM) 的纯度大于95%。	细胞活力测定， 光学显微镜	1049
人类	不连续（ 4 层 ）	肺	使用Percoll 可从其他细胞中几乎完全分离纯化肺泡巨噬细胞(AM)。	超氧化物(SO) 阴离子释放	1050
人类	不连续（ 4 层 ）	蜕膜组织	当用Percoll 进一步纯化细胞时， CD-14 阳性细胞的百分比增加了52%。	血小板活化因子(PAF) 乙酰水解酶的分泌	1051
人类	不连续	肺	在以前的研究中， 组分1 至4 中> 97% 的细胞（ 4 层 ）被证明是肺泡巨噬细胞(AM)。	非特异性酯酶染色， 流式细胞仪DNA 分析	1052
人类	不连续（ 4 层 ）	肺	研究肺泡巨噬细胞(AM) 的异质性。在哮喘病患者中发现的低密度AM 的数量增加， 不太可能是由于这种分离程序造成的。	细胞活力、酯酶和过氧化物酶活性测定、电子显微镜、超氧阴离子和血栓素B2 的产生	1053
人类	不连续（ 5 层 ）	外周血	从顶层收获Percoll 分离的单核细胞/巨噬细胞， 经瑞氏-吉姆萨染色鉴定， 常规含有75%/90% 的单核细胞/巨噬细胞。	单核细胞/巨噬细胞与血管平滑肌细胞之间的相互作用	928
小鼠	连续和不连续	腹膜	细胞总得率为100.0% ±0.8%， 经台盼蓝排除试验测定， 细胞活力完全保留。	光学显微镜、台盼蓝排除法、酯酶活性测定、过氧化物酶活性测定、细胞免疫表型分析、细菌吞噬试验	1054
小鼠	不连续（ 4 层 ）	培养的细胞	Percoll 对培养的巨噬细胞的细胞溶解活性或其活力没有可检测到的影响。	吞噬细胞和细胞溶解试验	30
小鼠， 大鼠	连续和不连续	腹膜	根据细胞群的实际密度， 先后使用连续梯度和不连续梯度分离出所有细胞群。分离获得了高活力的细胞， 并保留了关键细胞功能。	台盼蓝排除法	1055
大鼠	不连续（ 5 层 ）	肺	Percoll 组分按密度增加的顺序被指定为I 至IV， 各层中细胞分布的百分比分别为约5%、15%、50% 和30%。细胞活力> 95%。	荧光显微镜	1056

巨噬细胞（续）

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
大鼠	不连续（5 层）	肺	通过台盼蓝排除法，细胞活力> 95%。通过吉姆萨和非特异性酯酶染色，未精细分离和已精细分离的细胞中> 95% 细胞被确定为肺泡巨噬细胞(AM)。	肺表面活性剂和蛋白A 对吞噬作用的影响，光学显微镜	1057
大鼠	连续	支气管肺泡灌洗术	在几乎所有情况下，各种组分都由大约90% 至99% 的巨噬细胞组成。	酯酶活性，通过免疫过氧化物技术对Ia 抗原进行表面扩张	1058

肥大细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
小鼠	不适用	腹膜	经Memacolor 快速染色检查，肥大细胞的纯度几乎为100%。	定性和定量PCR 分析	1059
小鼠	连续	腹膜	从含有4% 肥大细胞的腹膜细胞群中获得了纯度高达95% 的肥大细胞。	电子显微镜和超微结构细胞化学	8
大鼠	不连续	腹膜	使用Percoll分离获得的肥大细胞纯度为> 95%。	肥大细胞和非肥大细胞之间的直接相互作用，组胺释放试验	1060
大鼠	连续	腹膜	在Percoll 梯度上纯化的肥大细胞经甲苯胺蓝染色显示纯度超过90%，经台盼蓝排除法试验，其活力大于98%。	测量组胺释放的荧光测定法	1061
大鼠	连续	腹膜	通过在Percoll 梯度上离心，可以分离出高产量和高纯度的肥大细胞。	光学和电子显微镜，流式细胞仪	9
大鼠	连续（顺序）	腹膜	通过测量嗜酸性粒细胞过氧化物酶对肥大细胞过氧化物酶活性的贡献，评估通过连续Percoll 梯度纯化的肥大细胞的纯度。	组胺释放和过氧化物酶活性	1062

胸腺细胞

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
小鼠	不连续（5 层）	胸腺	Percoll 用于分离未成熟的胸腺细胞。	有丝分裂原的体外刺激、细胞核的分离、DNA 的分离和凝胶电泳、酶测定	1063
大鼠	不连续	胸腺	Percoll 用于分离正常和凋亡的胸腺细胞。	流式细胞仪	1064
大鼠	不连续（4 层）	胸腺	Percoll 用于分离具有与凋亡相关的特征性浓缩核染色质的细胞和明显正常的胸腺细胞。	电子显微镜、库尔特计数器分析、流式细胞仪、DNA 分析	1065
大鼠	不连续（4 层）	胸腺	Percoll 用于分离凋亡前胸腺细胞的过渡群体。	DNA 分析、细胞核分离和DNA 自消化、光学和电子显微镜	1066
大鼠，小鼠	不连续（3 层）	胸腺	Percoll 用于分离大小胸腺细胞。保持了极高的活力。	相差显微镜和放射自显影	62

杂项细胞

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
胰岛细胞	人类，小鼠	连续	胰腺	使用Percoll 消除了高粘度、不需要的渗透性等问题，在某些情况下还有毒性作用。	密度测定和胰岛素分泌	5
内皮细胞	人类	连续线性梯度	全血	内皮细胞的最终回收率为91.6%。	免疫荧光法	1067
滋养层细胞	大鼠	连续	胎盘	Percoll 梯度离心法从绒毛膜胎盘的迷路和交界区的消化组织中有效地分离出大鼠胎盘催乳素-II (rPL-II) 的生成细胞。	大鼠胎盘滋养层细胞体外培养系统的研发	1068
各种各样				本文比较了不同的细胞分离方法。据作者介绍，通常来说Percoll 是对大多数细胞进行密度离心的最有用的密度梯度离心介质。	无	1069

杂项细胞（续）

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
活性与非活性细胞	人类，大鼠	不连续（2层）	各种肿瘤组织	界面显示活性> 90%，但如果不立即处理组织切除，则活性细胞的产量会急剧下降。	台盼蓝活力试验、2-D PAGE	1070
凋亡	人类	不连续（7层）	早幼粒细胞白血病细胞系	所用的不连续梯度产生了三个主要的细胞带和一个细胞团，细胞团中的凋亡细胞非常多（85%至90%）。	DNA 分离	1071
淋巴母细胞	人类	连续	全血	使用含有细胞松弛素B的Percoll 梯度对淋巴母细胞进行去核。	电熔	1072
脑毛细血管内皮细胞	大鼠	连续预制	大脑	随后的Percoll 梯度离心产生了均匀的毛细血管内皮细胞群，它们能够附着在胶原蛋白上并掺入氙化胸苷。	细胞培养、光学显微镜、电子显微镜	170
神经元	兔子	不连续，速率区带	背根神经节	分离出的神经元活力为80%，纯度为90%以上。	细胞培养、光学和电子显微镜	480
非肌源性与肌源性分离	鸡	不连续	胸部肌肉	从胚胎肌肉中分离出的细胞可用于直接分析细胞特异性蛋白，而不需要进行细胞培养。	细胞培养、显微镜、DNA/蛋白质分析	680
巨核细胞	人类	不连续	骨髓	巨核细胞的分离在Percoll 中的重现性比在BSA 中好。	Ficoll 400 离心法进一步纯化，补体受体测定	155
软骨细胞	大鼠	不连续	骨髓	细胞活力> 95%，而产率因细胞聚集而异。	细胞培养、蛋白聚糖和胶原蛋白的定量	629
噬精细胞	火鸡	不连续	精子	除了线粒体数量明显增加外，Percoll 分离后立即固定的精子细胞与新鲜射出精液中的精子细胞相似。	光学和电子显微镜，细胞培养	1073
不适用	人类	连续	甲状旁腺	使用各种密度梯度培养基测量甲状旁腺的密度。对于> 1.0 g/mL 的密度，Percoll 被证明优于所研究的任何其他梯度介质。	腺体密度测定	2

应用 — 微生物

微生物

种类	类型	梯度类型	宿主组织	注释	下游应用	文献编号
拟杆菌属	细菌	不连续（ 4 层 ）	不适用	Percoll 用于评估在三种不同培养基中生长的12 种拟杆菌属菌株的包膜程度。	光学显微镜	1074
埃里希氏体	细菌	连续	培养的细胞	Percoll 用于从被感染的小鼠巨噬细胞系(P388D) 中对埃里希氏体进行纯化。	二氧化碳生成试验、考马斯亮蓝染料结合试验	1075
里氏埃里希氏体	细菌	连续	培养的细胞	从感染的小鼠巨噬细胞系(P388D) 中纯化出里氏埃里希氏体。	二氧化碳生成试验、考马斯亮蓝染料结合试验	1076
牙龈卟啉单胞菌	细菌	连续	不适用	Percoll 用于分离未结合的细胞与唾液包被的珠子(SHAP) 结合的细胞。	结合和结合抑制试验	1077
梅毒螺旋体	细菌	连续	不适用	Percoll 纯化感染5 天的密螺旋体比感染7 天和8 天的纯化的密螺旋体的固定化速度明显要慢。	不同血清对Percoll 纯化梅毒螺旋体体外固定化的影响	1078
羊泰勒虫	细菌	不连续（ 2 层 ）	牛红细胞	开发了一种从泰勒虫感染的牛红细胞中纯化病毒的方法。	光学和电子显微镜以及一维和二维聚丙烯酰胺凝胶电泳	1079
双芽巴贝虫	原生动物	连续和不连续（ 4 层 ）	牛红细胞	通过Percoll 和Percoll-Renografin 密度梯度， 双芽巴贝虫感染的红细胞被成功浓缩了至少20 倍。	酶学研究和淀粉凝胶电泳	1080
马巴贝西虫	原生动物	连续	马红细胞	通过裂解受感染的马红细胞和Percoll 密度梯度离心法对马巴贝西虫的梨浆虫进行了纯化。	马巴贝西虫梨浆虫的蛋白质表征	1081
伯氏疟原虫和P. chabundi	原生动物	连续	小鼠血液	Percoll 用于分离宿主红细胞膜和疟原虫。红细胞膜的回收率约为65% 至70%，而疟原虫的回收率为80% 至90%，相对纯度约为85% 至90%。	电子显微镜、电泳、免疫印迹、标记酶分析和脉冲追踪分析	1082
牛巴贝虫	原生动物	连续	牛红细胞	65% 的Percoll 浓度被认为是分离牛巴贝虫裂殖子（ 即成熟的红细胞外期 ）的最佳浓度。100% Percoll 原液是富集感染红细胞的最好选择。	寄生虫活力测定	1083

微生物（续）

种类	类型	梯度类型	宿主组织	注释	下游应用	文献编号
溶组织内阿米巴	原生动物	不连续（2层）	粪便囊肿	Percoll 纯化提供了一个很好的产量，即使是来自单一粪便样本中的中度粪便囊肿负荷。	溶组织内阿米巴用作抗原	1084
变形微孢虫	原生动物	连续	毛虫	Percoll 用于纯化孢子。40% 的原始孢子被回收，几乎所有的孢子都是折光的（90% 或更多）。没有看到污染性细菌。	培养细胞的感染	1085
水稻暂黄病毒 (RTYV)	病毒	连续	水稻植物叶	典型的纯化过程中，每100 g 受感染的材料中大约有140 至850 mg 的纯化病毒。	Lowry 蛋白测定、电子显微镜、SDS-PAGE、ELISA、蛋白质印迹	1086
风疹病毒属（风疹病毒）	病毒	连续	培养的细胞	比较用于纯化风疹的Percoll 和蔗糖梯度，Percoll 的收率为72%，而蔗糖梯度的收率为8.6%。	血凝滴度测定法	1087
单纯疱疹病毒	病毒	连续	不适用	Percoll 用于纯化单纯疱疹病毒。	无	56
甲藻、硅藻、蓝绿细菌	海洋微藻	连续	不适用	大多数回收的海洋物种处于可以直接测量光合作用、呼吸作用、离子吸附和特定生长率的生理状况。	光学显微镜、运动试验、光合作用试验	60
类菌原体(MLO)	不适用	不连续	生菜（莴苣）	电子显微镜显示有高浓度的MLO，其细胞结构保存良好。	电子显微镜、ELISA	1088

应用一 亚细胞颗粒

细胞膜

种类	梯度类型	组织/细胞类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续（自生）	血小板	描述了一种快速分离血小板细胞膜的方法，该方法基于使用 [3H]-伴刀豆球蛋白A 作为膜标记物和Percoll 的自生梯度。	放射性示踪剂研究、酶和蛋白质测定	54
大鼠，人类	连续	肝活组织检查	细胞膜酶标记物和膜转运测定表明分离的膜保留了其功能完整性。	膜酶测定和膜泡氨基酸转运的测量	1089
大鼠	连续	子宫	细胞膜标记物、5'-核苷酸酶和胆固醇在靠近梯度顶部的组分中富集，而肌质网标记酶、对鱼藤酮不敏感的NADH-细胞色素-c 还原酶则在下部。	Ca++ 摄取和释放测定、酶测定、胆固醇和孕酮测定以及蛋白质印迹	1090
大鼠	连续（3 层）	大脑	通过Ficoll 和Percoll 密度梯度制备突触细胞膜。	磷脂酶C 测定、标记酶测定	1091
大鼠	不连续（2 层）	培养的细胞	通过Percoll 梯度精细分离获得两种亚细胞组分，一种组分富含细胞膜，另一种组分富含内质网膜。	电子显微镜、酶标记物的测定、酶活性、钙的吸收和释放	1092
大鼠	连续	肝脏	细胞膜标记物5'-核苷酸酶富集，而胞浆（内质网）酶葡萄糖6-磷酸酶缺乏，表明囊泡纯度。	囊泡氨基酸转运试验	1093
大鼠	连续	肝脏	Percoll 梯度用于分离肝细胞、细胞膜和线粒体膜。	相差显微镜、细胞结合实验	33
大鼠	连续	肝脏	使用Percoll 进行低速核沉淀，导致细胞膜标记物和Ins (1,4,5)P3 结合活性一起被纯化。	标记酶测定、Ins (1,4,5)P3 结合、Bradford 蛋白测定、SDS-PAGE	1094
大鼠	连续	肝脏	Percoll 纯化的肝细胞膜用于检测氨基酸的转运。	精氨酸转运活性，酶标记测定	1095

细胞膜（续）

种类	梯度类型	组织/细胞类型	注释	下游应用	文献编号
牛	连续	培养的主动脉内皮细胞	用微量的[3H]-胆固醇标记细胞膜，并在蔗糖和Percoll 梯度上精细分离细胞匀浆。	酶测定和SDS-PAGE/配体印迹	1096
牛	不连续（3 层）	肾上腺	该程序提供了富含细胞膜的组分。	细胞膜的增溶、亲和层析、细胞膜的放射性标记、酶测定	78
羊	连续（自生）	肾周脂肪细胞	分析了细胞膜的脂肪酸含量。	使用气相层析法分析脂肪酸	1097
中国仓鼠	连续（自生）	培养的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞	通过该程序得到了富集3 倍且几乎不含溶酶体的细胞膜组分；也得到了纯内质网(ER) 和线粒体组分。	脂质分析、酶分析	1098
鳐科 (Raja erinacea)	连续（自生）	肝脏	标记酶研究表明，用Percoll 梯度分离的细胞膜在肝脏细胞膜的基底域高度富集，并且基本上不受细胞内细胞器或小管膜的污染。	酶测定、荧光各向异性测量、丙氨酸转运、蛋白质和脂质测定	1099
真菌（产黄青霉菌）	连续	不适用	通过Percoll 不连续梯度去除了大部分污染膜。	酶测定、电子显微镜、膜融合、转运研究、Lowry 蛋白测定	1100
真菌（圆弧青霉菌）	连续	不适用	使用两相分配法和Percoll 梯度法制备右旋细胞膜囊泡。	ATP 酶活性、电子显微镜	1101

溶酶体

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	连续	培养的成纤维细胞	只有溶酶体沉淀在30% 到40% Percoll 密度梯度的底部三分之一处。	腺苷脱氨酶和N-乙酰-b-己糖胺酶测定	1102
人类	连续	培养的成纤维细胞	将成纤维细胞的线粒体溶酶体粗制剂精细分离成高密度组分（溶酶体标记物）和低密度组分（线粒体标记物）。	酶测定、SDS-PAGE 电泳、免疫印迹法	1103
小鼠	连续	肝脏	均质化后，溶酶体在Percoll 梯度的致密区域达到平衡。	电子显微镜、Bradford 蛋白测定、酶测定	1104
小鼠	连续	培养的肝细胞	分离获得的溶酶体组分用于测定溶酶体膜糖蛋白从细胞表面到溶酶体的内吞转运。	溶酶体膜糖蛋白的纯化、Lowry 蛋白测定、蛋白-辣根过氧化物酶测定	1105
小鼠	连续（自生）	肝脏	对相关标记酶的分析显示，在1.04 至1.11 g/mL 的密度范围内，溶酶体颗粒的纯度相当高。	Lowry 蛋白测定、酶测定、自由等电聚焦	24
大鼠，水牛	连续（微分和等密度）	肾	该方法使溶酶体标记酶富集25 至40 倍，线粒体和过氧化物酶标记物的污染率< 0.5%。	膜囊泡的制备、电子显微镜、蛋白质测定	1106
猪	连续	培养的肾上皮细胞	使用该方法可相对容易地制备内涵体和溶酶体的富集组分。	液泡H ⁺ ATP 酶的分布和结构、放射性标记检测、氨基己糖苷酶活性和碱性磷酸酶活性	1107

线粒体

种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
植物	不连续	黄化组织和绿叶组织	对于黄化的组织线粒体，去除了约90% 的过氧化氢酶污染。对于绿叶线粒体，去除了约95% 的叶绿素、80% 的过氧化氢酶和65% 的乙醇酸氧化酶。	细胞色素c 氧化酶(CCO) 活性、膜活性、呼吸控制和底物氧化的测定	12
植物	不连续（3 层）	黄化组织和绿叶组织	在等渗条件下，可在相对较短的时间内分离线粒体与叶绿体材料。	叶绿素、细胞色素c 氧化酶和乙醇酸氧化酶活性	43
兔子，猪	不连续	心脏	Percoll 特别适用于对正常和病变心脏的线粒体进行体外研究。	电子显微镜，酶活性	1108
大鼠	不连续	肝脏	分离的大鼠肝脏线粒体在应用于Percoll 梯度时被分成三个密度组分。	线粒体种群染色、流式细胞仪	1109
伯氏疟原虫（原生动物）	不连续	不适用	在密度为1.05 g/mL 的界面上获得了纯化的线粒体。	线粒体标记酶测定、相差和电子显微镜	1110
火鸡	不连续（3 层）	精子	机械破碎、超声处理和Percoll离心是分离线粒体的有效方法。	荧光和电子显微镜、细胞色素氧化酶测定、耗氧量、线粒体DNA 分离	1111

颗粒剂

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
人类	不连续 （ 3 层 ）	全血	中性粒细胞	在三层Percoll 梯度上分离特异性和明胶酶颗粒。	髓过氧化物酶、碱性磷酸酶、乳铁蛋白、明胶酶、B12 结合蛋白、β2 微球蛋白、细胞色素b558 和 CD116 检测	1112
人类	不连续 （ 2 层 ）	全血	中性粒细胞	亚细胞精细分离产生一条含有明胶酶和特定颗粒的条带以及一条含有细胞膜和分泌血管的条带。	受体定位、酶标记测定	1113
人类	不连续 （ 2 层 ）	全血	中性粒细胞	Percoll 梯度离心的结果是底部的带状物含有嗜天青颗粒，顶部的带状物含有细胞膜和分泌囊泡，而透明的上清液含有胞质溶胶。	标记酶测定法，ELISA	1114
人类	不连续 （ 2 层 ）	全血	中性粒细胞	Percoll 用于对细胞膜、特定颗粒和嗜天青颗粒进行亚细胞精细分离。	髓过氧化物酶、碱性磷酸酶和维生素B12 结合蛋白的亚细胞定位	1115
人类	连续	全血	原代培养淋巴细胞	Percoll 梯度用于分离大颗粒淋巴细胞(LGL) 的细胞质颗粒。	巨噬细胞杀瘤试验	1116
小鼠	连续	肥大细胞瘤	肥大细胞	在Percoll/0.25 M 蔗糖中进行密度梯度离心。	小鼠腹腔巨噬细胞对肥大细胞颗粒的摄取和降解	17
小鼠	连续	腮腺		使用差分法和Percoll 梯度离心法分离出一个分泌颗粒组分(SG) 和一个富含细胞膜的组分(PM)。	酶的测定，SG 与PM 的相互作用	1117
牛	不连续 （ 3 层 ）	肾上腺		使用Percoll 分离嗜铬颗粒并没有增加产量，但它确实消除了分离过程中将颗粒暴露于极端高渗条件下的需求。	电子显微镜，戊二醛固定法制备亲和柱	78
普通海胆 （ 海胆 ）	不连续 （ 2 层 ）			裂解分子包含在可以通过Percoll 梯度分离的小（ 0.1 至0.25 mm ）颗粒（ 溶细胞颗粒 ）中。	溶血和酶活性	1118

植物细胞器

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
线粒体	蓖麻子	连续	种子（ 胚乳 ）	使用Percoll 梯度获得高度纯化的线粒体。	线粒体胞苷转移酶试验	1119
线粒体	向日葵	连续	种子	在颗粒分离物中未发现细胞器污染。	Lowry 蛋白测定、NADP 依赖性异柠檬酸脱氢酶(NADP-IDH) 的表征、SDS-PAGE 和天然凝胶电泳、凝胶过滤、电子显微镜	1120
线粒体	玉米、蚕豆、小麦、烟草、甜菜	不连续	种子	纯化的完整线粒体表现出较高的呼吸控制和P/O 比率，并清除了大部分叶绿素。	线粒体蛋白合成产物的体外放射性标记及其SDS-PAGE 分析	1121
叶绿体	烟草(Nicotiana tabacum)	不连续	种子	Percoll 梯度的产量为4.63 ×107 个叶绿体/g 叶绿素/叶绿体。	叶绿体蛋白的提取、Bradford 蛋白测定、SDS-PAGE、蛋白印迹和免疫学反应	1122
叶绿体	豌豆(Pisum sativum) 和菠菜(Spinacea oleracea)	连续	种子	纯化的叶绿体能够进行光依赖性的蛋白质合成， 其速率与以前报道的速率相当。	蛋白质转运的体外重组和叶绿体基质蛋白的精细分离	76
叶绿体	菠菜(Spinacea oleracea)	连续线性梯度	叶子	维持高光合作用活性的完整叶绿体发生了明显的分离。	酶测定、光合二氧化碳固定和氧气演化	88
细胞质	各种各样	不连续	叶子	通过在Percoll 梯度上离心分离叶片原生质体获得细胞质。	细胞质染色， 激光显微镜， 细胞质： 原生质体融合	1123
原生质体	大麦	不连续（ 4 层 ）	种子（ 糊粉层 ）	经过Percoll 梯度， 获得的原生质体产量相对较高， 并显示出良好的活力。	转染大麦原生质体对CAT 活性的瞬时表达	1124
细胞核	胡萝卜	不连续（ 3 层 ）	悬浮细胞	这种方法从2 g 悬浮培养的细胞（ 大约2 ×10 ⁶ 个细胞 ）中平均得到 2 ×10 ⁵ 个细胞核。超过80% 的细胞核在Percoll 梯度后显得整体完好。	细胞色素c 氧化酶和还原酶测定， 以及体外RNA 合成	1125
质体	大麦、豌豆、玉米	连续	叶子和种子胚乳	使用Percoll 获得的质体表现出很高的完整度（ 89.1% 及以上 ）和纯度。	淀粉合成、酶测定	1126

杂项细胞器（续）

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
各种各样	人类	连续（自生）	血液	Percoll-蔗糖梯度用于纯化亚细胞组分以测定过氧化氢酶。	间接免疫荧光显微镜、超微结构免疫金、酶活性测定	1133
细胞质、溶酶体、高尔基体		连续（自生）	培养的单核细胞系	Percoll 梯度用于将亚细胞器分离成不同的组分。	标记酶测定	1134
微体	枝孢菌（真菌）	不连续	整个有机体	使用不连续的Percoll 梯度可以获得最好的结果，该梯度产生了富含微体的组分和富含线粒体的组分。	过氧化氢酶和细胞色素氧化酶测定	1135
亚细胞精细分离	人类	连续（自生）	培养的HL-60 细胞	通过Percoll 离心可实现有效的精细分离并保留酶活性。	过氧化物酶、β-葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶测定	727
脂质囊泡	太平洋电鳐	连续（自生）	电板组织	分离出了完整的囊泡。	磷酸盐测定	392

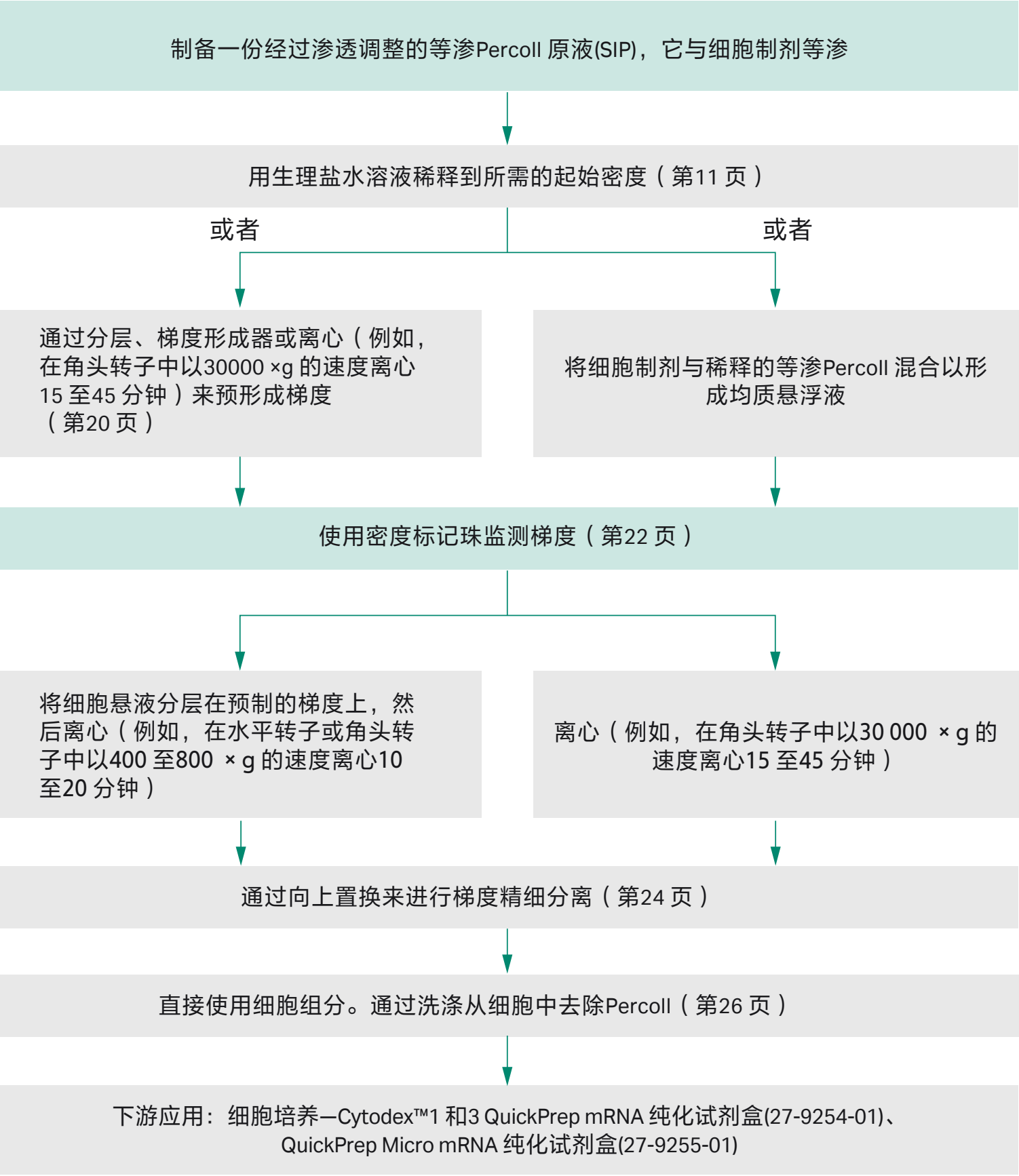
杂项细胞器（续）

细胞类型	种类	梯度类型	组织类型	注释	下游应用	文献编号
各种各样	人类	连续（自生）	血液	Percoll-蔗糖梯度用于纯化亚细胞组分以测定过氧化氢酶。	间接免疫荧光显微镜、超微结构免疫金、酶活性测定	1133
细胞质、溶酶体、高尔基体		连续（自生）	培养的单核细胞系	Percoll 梯度用于将亚细胞器分离成不同的组分。	标记酶测定	1134
微体	枝孢菌（真菌）	不连续	整个有机体	使用不连续的Percoll 梯度可以获得最好的结果，该梯度产生了富含微体的组分和富含线粒体的组分。	过氧化氢酶和细胞色素氧化酶测定	1135
亚细胞精细分离	人类	连续（自生）	培养的HL-60 细胞	通过Percoll 离心可实现有效的精细分离并保留酶活性。	过氧化物酶、β-葡萄糖醛酸酶和酸性磷酸酶测定	727
脂质囊泡	太平洋电鳐	连续（自生）	电板组织	分离出了完整的囊泡。	磷酸盐测定	392

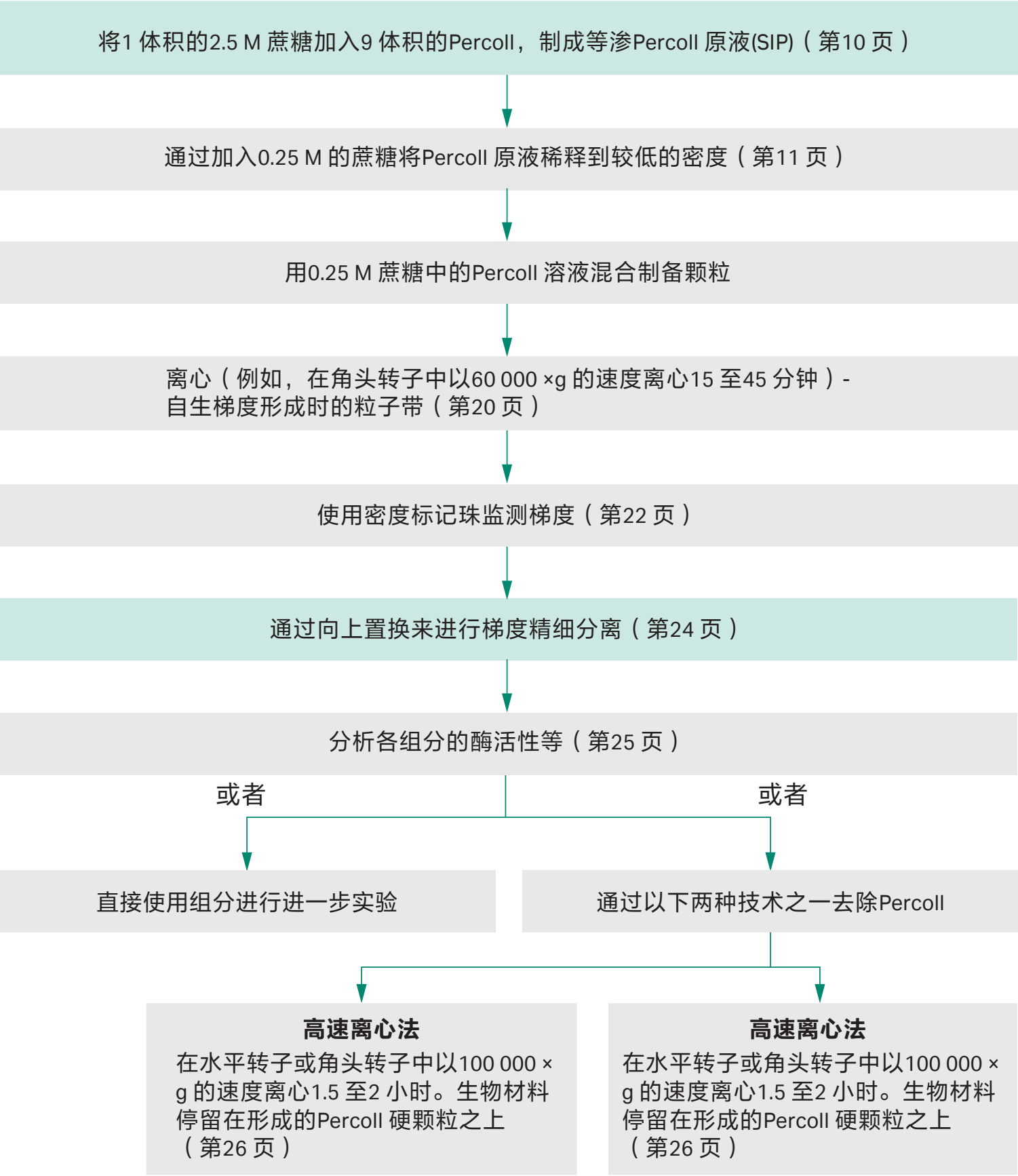
附录

简要方法图

方案1. 在Percoll 梯度上分离细胞



方案2. 在Percoll 梯度上分离亚细胞颗粒和一些病毒



References

Note: In portions of the list of references below, the numbering is not sequential. This is due to the way in which the list was constructed. All references with numbers lower than 891 have been extracted from the original Percoll Reference List (1992), and the numbering used in that List was maintained in this Manual. All references higher than 891 are new and are sequential.

1. Parenchymal cell mass determinations in human parathyroid glands. Åkerström, G., Johansson, H. *et al.*, *Presented at Société International de Chirurgie, San Francisco* (August 1979).
2. Density determinations of human parathyroid glands by density gradients. Åkerström, G., Pertoft, H., Grimelius, L. *et al.*, *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A*. **87**, 91–96 (1979).
3. Estimation of parathyroid parenchymal cell mass using density gradients. Åkerström, G., Grimelius, L., Johansson, H. *et al.*, *Am. J. Pathol.* **99**, 685–694 (1980).
5. Rapid isolation of pancreatic islets from collagenase digested pancreas by sedimentation through Percoll at unit gravity. Buitrago, A., Gylfe, E., Henriksson, C. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 823–828 (1977).
6. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. Björntorp, P., Karlsson, M., Pertoft, H. *et al.*, *J. Lipid Res.* **19**, 316–324 (1978).
7. Presence of alloreactive Ia antigens on murine intestine epithelial cells. Curman, B., Kämpe, O., Rask, L. *et al.*, *Scand. J. Immunol.* **10**, 11–15 (1979).
8. Separation of lymphoid cells, mast cells and macrophages on Percoll density gradient. Courtoy, R., Simar, L.J. and Delrez, M. *Presented at a Meeting of the Belgian Society of Immunology*. (December 1978).
9. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. Enerbäck, L. and Svensson, I. *J. Immunol. Methods*. **39**, 135–145 (1980).
10. Distribution of Ia-antigen-like molecules on non-lymphoid tissues. Forsum, U., Klareskog, L. and Peterson, P.A. *Scand. J. Immunol.* **9**, 343–349 (1979).
11. Separation of human lymphocytes on the basis of volume and density. Hutchins, D. and Steel, C.M. *In Separation of Cells and Subcellular Elements* (Peeters, H., Ed.) Pergamon Press, Oxford and New York (1979).
12. Separation of chloroplasts from mitochondria utilising silica sol gradient centrifugation. Jackson, C., Dench, J.E., Halliwell, B. *et al.*, *Presented at The Wolffson Conference, University of Surrey* (July 1978).
13. Simple analytical subcellular fractionation of liver biopsies with Percoll. Jenkins, W.J., Clarkson, E., Milson, J. *et al.*, *Clin. Sci.* **57**, 29P (1979).
14. Coloured beads as density markers in isopycnic centrifugation. Kågedal, L. and Pertoft, H. *Abstracts, 12th FEBS Meeting, Dresden* (1978).
15. Separation of blood cells from healthy and leukemic donors in Percoll gradients. Rogge, H., Christ, H., Grosshans, E. *et al.*, *Abstracts, 12th FEBS Meeting, Dresden* (1978).
16. Long term growth *in vitro* of human T cell blasts with maintenance of specificity and function. Kurnick, J.T., Grönvik, K.-O., Kimura, A.K. *et al.*, *J. Immunol* **122**, 1255–1260 (1979).
17. Uptake and degradation of mast cell granules by mouse peritoneal macrophages. Lindahl, U., Pertoft, H. and Seljelid, R. *Biochem. J.* **182**, 189–193(1979).
18. Purification and steroidogenic responses of isolated rat luteal cells. McNamara, B.C., Booth, R. and Stansfield, D.A. *Presented at International Union of Biochemistry Meeting Toronto* (1979).
19. Separation of lactotrophs from hyperplastic rat adenohypophysis using Percoll density gradients. Milligan, J.V. *Abstracts, Canad. Fed. Biol. Sci. Meeting, Vancouver* (1979).
20. Isolation and characterization of hepatocytes and Küpffer cells. Page, D.T. and Garvey, J.S. *J. Immunol. Methods* **27**, 159–173 (1979).
21. Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloidal silica gradients. Pertoft, H. and Laurent, T.C. *In Methods of Cell Separation* Vol. **1**. (Catsimpoolas, N., Ed.) Plenum Press, New York 25–65 (1977).
22. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated polyvinylpyrrolidone (Percoll). Pertoft, H., Laurent, T.C., Låås, T. *et al.*, *Anal. Biochem.* **88**, 271–282 (1978).
23. The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll. Pertoft, H., Rubin, K., Kjellén, L. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **110**, 449–457 (1977).

24. Heterogeneity of lysosomes originating from rat liver parenchymal cells. Metabolic relationship of subpopulations separated by density gradient centrifugation. Pertoft, H., Wärmegård, B. and Höök, M. *Biochem. J.* **174**, 309–317 (1978).
25. Characterization of rabbit sperm by equilibrium sedimentation in Percoll during frequent ejaculation. Oshio, S., Kaneko, S. and Mohri, H. *Arch. Androl.* **17**, 189–194 (1986).
26. A two-step procedure for the purification of hepatitis B surface antigen (HbsAg). Einarsson, M., Kaplan, L. and Pertoft, H. *Vox Sanguinis* **41**, 91–97 (1981).
27. The use of density gradients of Percoll for the separation of biological particles. Pertoft, H., Laurent, T.C., Seljelid, R. *et al.*, *In Separation of Cells and Subcellular Elements*, (Peeters, H., Ed.) Pergamon Press Oxford and New York 67–72 (1979).
28. Collection of dinoflagellates and other marine microalgae by centrifugation in density gradients of a modified silica sol. Price, C.A., Reardon, E.M. and Guillard, R.R.L. *Limnol. Oceanogr.* **123**, 548–553 (1978).
29. Adhesion of rat hepatocytes to collagen. Rubin, K., Oldberg, Å., Höök, M. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **117**, 165–177 (1978).
30. Macrophage functional heterogeneity: evidence for different antibody-dependent effector cell activities and expression of Fc-receptors among macrophage subpopulations. Serio, C., Gandour, D.M and Walker, W.S. *J. Reticuloendothelial Soc.* **25**, 197–216 (1979).
31. Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. Schumacher, M., Schäfer, G., Holstein, A.F. *et al.*, *FEBS LETT.* **91**, 333–338 (1978).
32. Epithelial rat liver cells have cell surface receptors recognizing a phosphorylated carbohydrate on lysosomal enzymes. Ullrich, K., Mersmann, G., Fleischer, M. *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1591–1598 (1978).
33. Specific binding of rat liver plasma membranes by rat liver cells. Öbrink, B., Wärmegård, B. and Pertoft, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 665–670 (1977).
34. Liberation of a fibrogenic factor from human blood monocytes, ascites cells, cultured histiocytes and transformed mouse macrophages by treatment with SiO₂. Aalto, M., Kulonen, E., Rönnemaa, T. *et al.*, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 205–214 (1979).
35. Parenchymal cell mass determinations in human parathyroid glands and its application in a material of hyperparathyroidism. Åkerström, G., Grimelius, L., Johansson, H. *et al.*, *World. J. Surg.* **5**, 555–563 (1981).
36. In vitro induction of self reactive T lymphocyte memory in cultures of syngeneic peanut agglutinin-negative mouse thymocytes and spleen cells. Born, W. and Wekerle, H. *Immunobiol.* **156**, 243–244 (1979).
37. Characteristics of cultured brain capillaries. Bowman, P.D., Betz, A.L. and Goldstein, G.W. *J. Cell Biol.* **83**, 95a (1979).
38. Characterization of bone marrow osteoprogenitor cell lines. Budenz, R.W. and Bernard, G.W. *J. Cell Biol.* **83**, 32a (1979).
39. Isolation, characterization and cultivation of human trophoblastic cells. Calaminus, J.M., Brüggén, J. and Sorg, C. *Immunobiol.* **156**, 287 (1979).
40. Characterization of procoagulant activity produced by cultures of human monocytes and lymphocytes separated in colloidal silica-polyvinylpyrrolidone gradients. Giddings, J.C., Piovella, F., Ricetti, M. *et al.*, *Clin. Lab. Haematol.* **2**, 121–128 (1980).
41. Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of Percoll. Gutierrez, C., Bernabe, R.R., Vega, J. *et al.*, *J. Immunol. Methods* **29**, 57–63 (1979).
42. Production of Ficoll, Percoll and albumin gradients by the freeze-thaw method. Haff, L.A. *Prep. Biochem.* **9**, 149–156 (1979).
43. Isolation of intact higher-plant mitochondria. Jackson, C. and Moore, A.L. *Plant Organelles, Methodological Surveys (B) Biochemistr*, Vol. **9**, (Reid, E., Ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, West Sussex, UK 1–12 (1979).
44. Human MLC activated suppressor cells — enrichment on discontinuous density gradients. Kabelitz, D., Fink, U. and Reichert, A. *Immunobiol.* **156**, 218 (1979).
45. Physical chemical characterization of Percoll. I. Particle weight of the colloid. Laurent, T.C., Pertoft, H. and Nordli, O. *J. Colloid Interface Sci.* **76**, 124–132 (1980).
46. Physical chemical characterization of Percoll. II. Size and interaction of colloidal particles. Laurent, T.C., Ogston, A.J.G., Pertoft, H. *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.* **76**, 133–141 (1980).
47. Physical chemical characterization of Percoll. III. Sodium binding. Laurent, T.C. and Pertoft, H. *J. Colloidal Interface Sci.* **76**, 142–145 (1980).
48. Peanut agglutinin. IV. A tool for studying human mononuclear cell differentiation. London, J., Perrot, J.Y., Berrih, S. *et al.*, *Scand. J. Immunol.* **9**, 451–459 (1979).
49. Conversion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid into homogentisic acid at the thylakoid membrane of *Lemna gibba*. Löffelhardt, W. and Kindl, H. *FEBS LETT.* **104**, 332–334 (1979).
50. Further purification of rat spermatogenic cells by density centrifugation. Meistrich, M.L., Longtin, J.L. and Brock, W.A. *J. Cell Biol.* **83**, 226a (1979).

51. Protozoan parasite-induced proliferative response of primed T lymphocytes. Moedder, E., Engers, H. and Louis, J. *Immunobiol.* **156**, 205 (1979).
52. *In vitro* evidence suggests a direct action of adjuvants on myeloid precursor cells in the bone marrow. Monner, D.A.L. and Mühlradt, P.F. *Immunobiol.* **156**, 189–190 (1979).
53. Regulation of peroxisomal fatty acid oxidation. Osmundsen, H. and Neat, C.E. *FEBS LETT.* **107**, 81–85 (1979).
54. Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation. Perret, B., Chap, H.J. and Douste-Blazy, L. *Biochim. Biophys. Acta* **556**, 434–446 (1979).
55. Cell separations in a new density medium, Percoll. Pertoft, H., Hirtenstein, M. and Kågedal, L. Cell Populations, *Methodological Surveys (B) Biochemistry* Vol. **9**. (Reid, E., Ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, West Sussex, UK 67–80 (1979).
56. Purification of herpes simplex virus using Percoll. Pharmacia Fine Chemicals, Pertoft, H. *Separation News* **3** (1980).
57. Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. Pertoft, H., Johnsson, A., Wärmegård, B. *et al.*, *J. Immunol. Methods* **33**, 221–230 (1980).
58. Isolation of chloroplasts in silica-sol gradients. Price, C.A., Bartolf, M., Ortiz, W. *et al.*, Plant Organelles, *Methodological Surveys (B) Biochemistry* Vol. **9**. (Reid, E., Ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, West Sussex, UK 25–33 (1979).
59. Fractionation of subcellular components by centrifugation in Percoll density gradients. Pertoft, H. and Hirtenstein, M. *Presented at The Wolfson Conference*, University of Surrey, Guildford, UK (July 1978).
60. Harvesting of marine microalgae by centrifugation in density gradients of Percoll. Reardon, E.M., Price, C.A. and Guillard, R.R.L. Cell Populations, *Methodological Surveys (B) Biochemistry* Vol. **9**. (Reid, E., Ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, West Sussex, UK (1979).
61. Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. Saksela, E., Timonen, T., Ranki, A. *et al.*, *Immunological Rev.* **44**, 71–123 (1979).
62. A rapid method for the separation of large and small thymocytes from rats and mice. Salisbury, J.G., Graham, J.M. and Pasternak, C.A. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1**, 341–347 (1979).
63. Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and lysosomes by density gradient centrifugation. Seale, T.W. *In Manual of Procedures for the Seminar on Biochemical Hematology*, (Sunderman, F.W., Ed.) The Institute for Clinical Science Inc., Philadelphia, PA 355–367 (1979).
64. Disaggregation and separation of rat liver cells. Seglen, P.O. Cell Populations, *Methodological Surveys (B) Biochemistry* Vol. **9**. (Reid, E., Ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, West Sussex, UK 25–46 (1979).
65. Separation of cell populations from embryonic chick neural retina. Sheffield, J.B., Lynch, M. and Pressman, D. *J. Cell Biol.* **83**, 34a (1979).
66. The effect of erythrocyte aging on some vitamin and mineral dependent enzymes. Spooner, R.J., Percy, R.A. and Rumley, A.G. *Clin. Biochem.* **12**, 289–290 (1979).
67. Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. Timonen, T., Saksela, E., Ranki, A. *et al.*, *Cell. Immunol.* **48**, 133–148 (1979).
68. Recognition of human urine ~-N-acetylglucosaminidase by rat hepatocytes. Involvement of receptors specific for galactose, mannose-6-phosphate and mannose. Ullrich, K., Basner, R., Gieselmann, V. *et al.*, *Biochem. J.* **180**, 413–419 (1979).
69. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll as gradient medium. Ullmer, A.J. and Flad, H.-D. *J. Immunol. Methods* **30**, 1–10 (1979).
70. Isolation and surface labeling of murine polymorphonuclear neutrophils. Watt, S.M., Burgess, A.W. and Metcalf, D. *J. Cell Physiol.* **100**, 1–22 (1979).
71. Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. Voss, B., Allam, S., Rauterberg, J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1348–1354 (1979).
72. *In vitro* characterization of anti-tumor effector mechanisms in rats bearing spontaneous tumors. Zöller, M. and Matzku, S. *Immunobiol.* **156**, 276 (1979).
73. Percoll methodology. Pharmacia Biotech. *Separation News* **1** (1979).
74. Fractionation of blood cells. *In Centrifugation: A Practical Approach*. Jurd, R.D. and Rickwood, D. (Rickwood, D., Ed.) Information Retrieval Ltd, 1 Falconberg Court, London W1V 5FG, UK 143–152 (1978).
75. Choice of media for centrifugal separations. *In Centrifugation: A Practical Approach*. Jurd, R.D. and Rickwood, D. (Rickwood, D., Ed.) Information Retrieval Ltd, 1 Falconberg Court, London W1V 5FG, UK 15–31 (1978).
76. Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. Chua, N.-H. and Schmidt, G.W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 6110–6114 (1978).

77. Human erythrocyte fractionation in Percoll density gradients. Rennie, C., Thompson, S., Parker, A. *et al.*, *Clin. Chim. Acta* **98**, 119–125 (1979).
78. Isolation of a protein from the plasma membrane of adrenal medulla which binds to secretory vesicles. Meyer, D. and Burger, M. *J. Biol. Chem.* **254**, 9854–9859 (1979).
79. Techniques of preparative, zonal, and continuous flow ultracentrifugation. Beckman™ Instruments Inc. Spinco division, USA, Griffith, O.M.
80. Cytophysical studies on living normal and neoplastic cells. Mateyko, G.M. and Kopac, M.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **105**, 185–218 (1963).
81. The use of gradients of colloidal silica for the separation of cells and subcellular particles. Pertoft, H. and Laurent, T.C. *Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles* Vol. **2**. (Gerritsen, T., Ed.) Wiley Interscience, John Wiley & Sons, New York and London 71–90 (1968).
82. The separation of cells and subcellular particles by colloidal-silica density centrifugation. Wolff, D.A. *In Methods in Cell Biology* Vol. **10**. (Prescott D.M., Ed.) Academic Press New York and London 85–104 (1975).
83. A rapid method for the separation of functional lymphoid cell populations of human and animal origin on PVP-silica (Percoll) density gradients. Kurnick, J.T., Österberg, L., Stegagno, M. *et al.*, *Scand. J. Immunol.* **10**, 563–573 (1979).
84. A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. Weigele, M., DeBarnardo, S.L., Teng, J.D. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5927–5928 (1972).
85. Application of the Weichselbaum biuret reagent to the determinations of spinal fluid protein. Ditterbrandt, M. *Am. J. Clin. Pathol.* **18**, 439–441 (1948).
86. Isolation of highly purified rat liver mitochondria for the study of the biotransformation of drugs. Blume, H. (Article in German). *Archiv der Pharmazie* **312**, 561–572 (1979).
87. Subcellular distribution of liver copper in normal subjects, patients with primary biliary cirrhosis and Wilson's disease. Jenkins, W.J., Evans, S. and Epstein, O. *Clin. Sci.* **58**, 14 (1979).
88. Isolation of intact chloroplasts from spinach leaf by centrifugation in gradients of modified silica Percoll. Tahabe, T., Nishimuru, M. and Akazawa, T. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2137–2142 (1979).
89. Isolation and characterization of noradrenalin storage granules of bovine adrenal medulla. Terland, O., Flatmark T. and Kryvi, T. *Biochim. Biophys. Acta* **553**, 460–468 (1979).
90. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Bradford, M. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
91. A parapoxvirus isolated from nasal secretion of a calf with respiratory disease. Moreno-López, J. and Lif, I. *Vet. Microbiol.* **4**, 85–88 (1979).
92. Isolation of rat mast cell granules with intact membranes. Krüger, P.G., Lagunoff, D. and Wan, H. *Exp. Cell Res.* **129**, 82–93 (1980).
93. Long term maintenance of HLA-D restricted T cells specific for soluble antigens. Kurnick, J., Altevogt, P., Lindblom, J. *et al.*, *Scand. J. Immunol.* **11**, 131–136 (1980).
94. A rapid centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of Percoll. Segal, A., Fortuno, A. and Herd, T. *J. Immunol. Methods* **32**, 209–214 (1980).
95. Isolation of blood monocytes by use of Percoll. Seljelid, R. and Pertoft, H. *In Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*. (Edelson, P., Koren, H. and Adams, D.O., Eds.) Academic Press, London and New York (1980).
96. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. Timonen, T. and Saksela, E. *J. Immunol. Methods* **36**, 285–291 (1980).
97. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). Gärtner, I. *Immunology* **40**, 133–136 (1980).
98. Separation of human bone marrow cells in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). Olofsson, T., Gärtner, I. and Olsson, I. *Scand. J. Haematol.* **24**, 254–262 (1980).
99. Improved separation of human peripheral T cells using PVP-coated colloidal silica particles (Percoll). Feucht, H.E., Hadam, M.R., Frank, F. *et al.*, *In Separation of Cells and Subcellular Elements*. (Peeters, H., Ed.) Pergamon Press, Oxford and New York 73–76 (1979).
100. Surface markers of a purified peritoneal eosinophil population from Mesocricetus cordi-infected BALB/c male mice. Hogarth, P.M., Cruise, K.M., McKenzie, I.F.C. *et al.*, *J. Immunol.* **124**, 406–411 (1980).
101. Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous Percoll gradient. Gmelig-Meyling, F. and Waldmann, T.A. *J. Immunol. Methods*, **33**, 1–9 (1980).
102. Collagenase — Percoll isolation and intraportal transplantation of pancreatic islets in the mouse. Henriksson, C. and Soome, A. *Presented at Société Internationale de Chirurgie*, San Francisco (August 1979).
103. Calcium uptake and release by skeletal-muscle mitochondria. Mickelson, J.R. and Marsh, B.B. *Cell Calcium* **1**, 119–128 (1980).
104. Rapid separation of rat peritoneal mast cells with Percoll. Németh, A. and Rölich, P. *Eur. J. Cell Biol.* **20**, 272–275 (1980).

105. Maximal steroidogenic capacity of mouse Leydig cells. Kinetic analysis and dependence on protein kinase activation and cAMP accumulation. Schumacher, M., Schäfer, G., Lichtenberg, V. *et al.*, *FEBS LETT.* **107**, 398–402 (1979).
106. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. Jackson C., Dench, J.E., Hall, D.O. *et al.*, *Plant Physiol.* **64**, 150–153 (1979).
107. Human parathyroid cells *in vitro* - the occurrence of an autonomous cell population in adenomas and uremic hyperplasias. Ljunghall, S., Åkerström, G. And Rudberg, C. In 15th European Symposium on Calcified Tissues, Helsinki (1980), (Kaitila, I. and Penttinen, O., Eds.) *Springer International, supplement to Calcified Tissue International* **31**, 88 (1980).
108. A Percoll gradient for the separation of malaria infected erythrocytes from low parasitized blood. Biochemical studies of malaria parasites in a Plasmodium vinckei/ NMRI-mouse system. Kientsch, R., Engel, W.D., Ziegler, A. *et al.*, *Submitted to Mol. Biochem. Parasitol* (1980).
109. A rapid method for isolation of purified, physiologically active chloroplasts, used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. Mills, W.R. and Joy, K.W. *Planta* **148**, 75–83 (1980).
110. Use of a novel rapid preparation of fat-cell plasma membranes employing Percoll to investi-gate the effects of insulin and adrenaline on membrane protein phosphorylation within intact fat cells. Belsham, G. J., Denton, R.M. and Tanner, M.J.A. *Biochem. J.* **192**, 457–467 (1980).
111. A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, C. *et al.*, *Biochem. J.* **186**, 177–181 (1980).
112. Induction of peroxisomal b-oxidation in rat liver by high fat diets. Neat, C.E., Thomassen, M.S. and Osmundsen, H. *Biochem. J.* **186**, 369–371 (1980).
113. Isolation of bacteria from yogurt on gradients of Percoll generated *in situ*. Standard course experiment. Pharmacia Fine Chemicals.
155. Human megakarayocytes. I. Characterization of the membrane and cytoplasmic components of isolated marrow megakaryocytes. Rabellino, E.M., Nachmann, R.L., Williams, N. *et al.*, *J. Exp. Med.* **149**, 1273–1287 (1979).
170. Primary culture of capillary endothelium from rat brain. Bowman, P.D., Betz, A.L., Ar, D *et al.*, *In Vitro* **17**, 353–362 (1981).
246. Conidiobolus obscurus in arable soil: a method for extracting and counting azygospores. MacDonald, R.M. and Spokes, J.R. *Soil. Biol. Biochem.* **13**, 551–554 (1981).
275. Removal of Percoll from microsomal vesicles by gel filtration on Sephacryl S-1000 Superfine. Hjorth, R. and Pertoft, H. *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 1–4 (1982).
392. Investigation of liposomes and vesicles reconstituted with acetylcholine receptor employing Percoll density gradient centrifugation. Spillecke, F. and Neumann, E. **Symposium on Neuroreceptors, Berlin, Neuroreceptors** 243–252 (1981).
480. Pure population of viable neurons from rabbit dorsal root ganglia, using gradients of Percoll. Goldenberg, S.S.S. and DeBonis, U. *J. Neurobiol.* **14**, 195–206 (1983).
518. A micromethod for the quantitation of cellular proteins in Percoll with the Coomassie brilliant blue dye-binding assay. Vincent, R. and Nadeau, D. *Anal. Biochem.* **135**, 355–362 (1983).
547. Lymphocyte transformation test in diagnosis of nickel allergy. Nordlind, K. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **73**, 151–154 (1984).
555. Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles. Vincent, R. and Nadeau, D. *Anal. Biochem.* **141**, 322–328 (1984).
597. Processing and lysosomal localization of a glycoprotein whose secretion is transformation stimulated. Gal, S., Willingham, M.C. *et al.*, *J. Cell. Biol.* **100**, 535–544 (1985).
677. Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. *Exp. Cell Res.* **173**, 85–98 (1987).
680. Skeletal muscle cell populations. Yablonka-Reuveni, Z. and Nameroff, M. *Histochem.* **87**, 27–38 (1987).
727. Biochemical and ultrastructural effects of monensin on the processing, intracellular transport, and packaging of myeloperoxidase into low and high density compartments of human leukemia (HL-60) cells. Akin, D.T. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 451–463 (1987).
832. Isolation of transcriptionally active nuclei from striated muscle using Percoll density gradients. Hahn, C, C. and Covault, J. *Anal. Biochem.* **190**, 193–197 (1990).
891. Down-regulation of L-selectin surface expression by various leukocyte isolation procedures. Stibenz, D. and Buhrer, C. *Scand. J. Immunol.* **39**, 59–63 (1994).
892. Production of hematopoietic growth factors by human B lymphocytes: mechanisms and possible implications. Pistoia, V., Corcione, A., Baldi, L. *et al.*, *Stem Cells* **11**, (suppl.2) 150–155 (1993).
893. Differential expression of IL-4 receptors in human T and B lymphocytes. Mozo, L., Rivas, D., Zamorano, J. *et al.*, *J. Immunol.* **150**, 4261–4269 (1993).

894. Isolation of functionally active intraepithelial lymphocytes and enterocytes from human small and large intestine. Lundqvist, C., Hammarstrom, M.-L., Athlin, L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* **152**, 253–263 (1992).
895. The presence of CD5LOW+NK cells in normal controls and patients with pulmonary tuberculosis. Ishiyama, T., Watanabe, K., Fukuchi, K. *et al.*, *Immunol. Lett.* **37**, 139–144 (1993).
896. Spontaneous production of granulocyte colony-stimulating factor *in vitro* by human B-lineage lymphocytes is a distinctive marker of germinal center cells. Corcione, A., Baldi, L., Zupo, S. *et al.*, *J. Immunol.* **153**, 2868–2877 (1994).
897. Intestinal mucosal lymphocytes have H1 receptors: H1 antagonists reduce their proliferation and cytotoxicity. Roberts, A.I., Leone, V.M. and Ebert, E.C. *Cell. Immunol.* **156**, 212–219 (1994).
898. The number of CD1a+ large low-density cells with dendritic cell features is increased in the peripheral blood of HIV+-patients. Ree, H.J., Liau, S., Yancovitz, S.R. *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **70**, 190–197 (1994).
899. Cell-to-cell mediated inhibition of natural killer cell proliferation by monocytes and its regulation by histamine H2-receptors. Hellstrand, K. and Hermodsson, S. *Scand. J. Immunol.* **34**, 741–752 (1991).
900. Follicular dendritic cells inhibit human B lymphocyte proliferation. Freedman, A.S., Munro, J.M., Rhyhart, K. *et al.*, *Blood* **80**, 1284–1288 (1992).
901. Constitutive expression and role in growth regulation of interleukin-1 and multiple cytokine receptors in a biphenotypic leukemic cell line. Cohen, A., Grunberger, T., Vanek, W. *et al.*, *Blood* **78**, 94–102 (1991).
902. Monoclonal anti-CD23 antibodies induce a rise in $[Ca^{2+}]_i$ and polyphosphoinositide hydrolysis in human activated B cells. Kolb, J.-P., Renard, D., Dugas, B. *et al.*, *J. Immunol.* **145**, 429–437 (1990).
903. Interleukin-2-inducible killer activity and its regulation by blood monocytes from autologous lymphocytes of lung cancer patients. Sone, S., Kunishige, E., Fawzy, F. *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 716–723 (1991).
904. Lymphokine-activated killer cell regulation of T-cell mediated immunity to *Candida albicans*. Wei, S., Blanchard, D.K., McMillen, S. *et al.*, *Infect. Immun.* **60**, 3586–3595 (1992).
905. Coregulation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule-1 (CD54) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center B cells and in follicle center and mediastinal B-cell lymphomas. Moller, P., Henne, C., Leithauser, F. *et al.*, *Blood* **81**, 2067–2075 (1993).
906. Interleukin-2 activated T cells (T-LAK) express CD16 antigen and are triggered to target cell lysis by bispecific antibody. Nitta, T., Nakata, M., Yagita, H. *et al.*, *Immunol. Lett.* **28**, 31–38 (1991).
907. Antitumor activity, growth, and phenotype of longterm IL-2 cultures of human NK and T lymphocytes. Fuchshuber, P.R., Lotzová, E., Pollock, R.E. *Lymphokine and Cytokine Res.* **10**, 51–59 (1991).
908. Functional characterization of canine lymphocyte subsets. Hotzl, C., Kolb, H.J., Holler, E. *et al.*, *Ann. Hematol.* **63**, 49–53 (1991).
909. Measurement of NK activity in effector cells purified from canine peripheral lymphocytes. Knapp, D.W., Leibnitz, R.R., DeNicola, D.B. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **35**, 239–251 (1993).
910. A rapid method for isolating murine intestine intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. Mosley, R.L. and Klein, J.R. *J. Immunol. Meth.* **156**, 19–26 (1992).
911. Differential sensitivity of virgin and memory T lymphocytes to calcium ionophores suggests a buoyant density separation method and a model for memory cell hyporesponsiveness to Con A. Miller, R.A., Flurkey, K., Molloy, M. *et al.*, *J. Immunol.* **147**, 3080–3086 (1991).
912. Characterization of protein phosphorylation by 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-para-dioxin in murine lymphocytes: indirect evidence for a role in the suppression of humoral immunity. Snyder, N.K., Kramer, C.M., Dooley, R.K. *et al.*, *Drug and Chem. Toxicol.* **16**, 135–163 (1993).
913. Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Yamamoto, M., Fujihashi, K., Beagley, K.W. *et al.*, *J. Immunol.* **150**, 106–114 (1993).
914. The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor activity by enhancing B cell Ia expression and differentiation. McCabe, Jr., M.J. and Lawrence, D.A. *J. Immunol.* **145**, 671–677 (1990).
915. Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2- J. Sordillo, L.M., Campos, M. and Babiuk, L.A. *Dairy Sci.* **74**, 3370–3375 (1991).
916. Use of probe to repeat sequence of the Y chromosome for detection of host cells in peripheral blood of bone marrow transplant recipients. Przepiorka, D., Thomas, E.D., Durnamn, D.M. *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* **95**, 201–206 (1991).
917. Differences in "antioncogene" p53 expression in human monocytes and lymphocytes *in vitro*. Osipovich, O.A., Sudarikov, A.B., Kolesnikova, T.S. *et al.*, *Biull. Eksp. Biol. Med.* **113**, 638–640 (1992).
918. Regulation of tumor necrosis factor-alpha production and gene expression in monocytes. Kohn, F.R., Phillips, G.L. and Klingemann, H.-G. *Bone Marrow Transplantation* **9**, 369–376 (1992).

919. Killing of *Coccidioides immitis* by human peripheral blood mononuclear cells. Ampel, N.M., Bejarano, G.C. and Galgiani, J.N. *Infect. Immun.* **60**, 4200–4204 (1992).
920. Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebroside with superoxide generation. Liel, Y., Rudich, A., Nagauker-Shriker, O. *et al.*, *Blood* **83**, 2646–2653 (1994).
921. Effect of human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein on *in vitro* hematopoiesis of umbilical cord blood. Sugiura, K., Oyaizu, N., Pahwa, R. *et al.*, *Blood* **80**, 1463–1469 (1992).
922. Point mutations in the beta-subunit of cytochrome b558 leading to X-linked chronic granulomatous disease. Bolscher, B.G.J.M., de Boer, M., de Klein, A. *et al.*, *Blood* **77**, 2482–2487 (1991).
923. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation. Malinen, T., Palotie, A., Pakkala, S. *et al.*, *Blood* **77**, 2435–2440 (1991).
924. Expression of c-jun protooncogene in human myelomonocytic cells. Bertani, A., Polentarutti, N., Sica, A. *et al.*, *Blood* **74**, 1811–1816 (1989).
925. Expression of a heat-inducible gene of the HSP70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. Fincato, G., Polentarutti, N., Sica, A. *et al.*, *Blood* **77**, 579–586 (1991).
926. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. MacKinnon, S., Barnett, L., Heller, G. *et al.*, *Blood* **83**, 3409–3416 (1994).
927. Expression of C-myb and B-myb, but not A-myb, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. Golay, J., Capucci, A., Castellano, M. *et al.*, *Blood* **77**, 149–158 (1991).
928. Interactions between the monocyte/macrophage and the vascular smooth muscle cell. Zhang, H., Downs, E.C., Lindsey, J.A. *et al.*, *Arteriosclerosis and Thrombosis* **13**, 220–230 (1993).
929. Splice site mutations are common cause of X-linked chronic granulomatous disease. de Boer, M., Bolscher, B.G.J.M., Dinauer, M.C. *et al.*, *Blood* **80**, 1553–1558 (1992).
930. Isolation of equine peripheral blood mononuclear cells using Percoll. May, S.A., Hooke, R.E. and Lees, P. *Res. Vet. Sci.* **50**, 116–117 (1991).
931. Proteolytic cleavage of CR1 on human erythrocytes *in vivo*: evidence for enhanced cleavage in AIDS. Pascual, M., Danielsson, C., Steiger, G. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **24**, 702–708 (1994).
932. Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. Simoes, A.P.C.F., van den Berg, J.J.M., Roelofsen, B. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 651–657 (1992).
933. Clinical utility of fractionating erythrocytes into Percoll density gradients. Mosca, A., Paleari, R., Modenese, A. *et al.*, *Red Blood Cell Aging* 227–238 (1991).
934. A monoclonal antibody monitoring band 3 modifications in human red blood cells. Giuliani, A., Marini, S., Ferroni, L. *et al.*, *Molec. Cell. Biochem.* **117**, 43–51 (1992).
935. Deoxygenation-induced changes in sickle cell-sickle cell adhesion. Morris, C.L., Rucknagel, D.L. and Joiner, C.H. *Blood* **81**, 3138–3145 (1993).
936. Density-associated changes in platelet-activating factor acetylhydrolase activity and membrane fluidity of human of human erythrocytes. Yoshida, H., Satoh, K., Ishida, H. *et al.*, *Ann. Hematol.* **69**, 139–146 (1994).
937. Density gradients separation of L-asparaginase-loaded human erythrocytes. Garin, M.I., Kravtsoff, R., Chestier, N. *et al.*, *Biochem. Mol. Biol. International* **33**, 807–814 (1994).
938. Determinations of red blood cell deformability in relation to cell age. Bosch, F.H., Werre, J.M., Schipper, L. *et al.*, *Eur. J. Haematol.* **52**, 35–41 (1994).
939. Density gradient separation of inositol hexaphosphate loaded in red blood cells in various preparation conditions. Bourget, G., Boucher, L. and Ropars, C. *In The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors*. (Magnani, M. and DeLoach, J.R., Eds.) Plenum Press, NY 27–33 (1992).
940. IHP entrapment into human erythrocytes: comparison between hypotonic dialysis and DMSO osmotic pulse. Mosca, A., Paleari, R., Russo, V. *et al.*, *In The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors*, (Magnani, M. and DeLoach, J.R., Eds.) Plenum Press, NY 19–26 (1992).
941. Cyclic, AMP level in red blood cells of *Plasmodium berghei*-infected *Mastomys natalensis*. Khare, S. and Ghatak, S. *Experientia* **47**, 236-238 (1991).
942. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Connor, J., Pak, C.C. and Schroit, A.J. *J. Biol. Chem.* **269**, 2399–2404 (1994).
943. Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly- and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. Cao, J., Beisker, W., Nusse, M. *et al.*, *Mutagenesis* **8**, 533–541 (1993).
944. Temporal replacement of donor erythrocytes and leukocytes in nonanemic W44J/W44J and severely anemic W/W+ mice. Barker, J.E., Greer, J., Bacon, S. *et al.*, *Blood*. **78**, 1432–1437 (1991).
945. Oxygen transport properties in malaria-infected rodents — a comparison between infected and noninfected erythrocytes. Schmidt, W., Correa, R., Boning, D. *et al.*, *Blood* **83**, 3746–3752 (1994).

946. Multicatalytic and 26S ubiquitin/ATP-stimulated proteases in maturing rabbit red blood cells. Di Cola, D., Pratt, G. and Rechsteiner, M. *FEBS* **280**, 137–140 (1991).
947. Biochemical characterization of density-separated trout erythrocytes. Falcioni, G., Grelloni, F., Bonfigli, A.R. *et al.*, *Biochem. International* **28**, 379–384 (1992).
948. Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells. Warren, H.S. and Skipsey, L.J. *Immunol.* **74**, 78–85 (1991).
949. Negative modulation of human NK cell activity by purinoreceptors: Effect on exogenous adenosine triphosphate. Krishnaraj, R. *Cell. Immunol.* **141**, 306–322 (1992).
950. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. Rossi, A.R., Pericle, F., Rashleigh, S. *et al.*, *Blood* **83**, 1323–1328 (1994).
951. Natural killer-stimulatory effect of combined low-dose interleukin-2 and interferon beta in hairy-cell leukemia patients. Liberati, A.M., De Angelis, V., Fizzotti, M. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* **38**, 323–331 (1994).
952. Mouse hypersensitivity pneumonitis: depletion of NK cells abrogates the spontaneous regression phase and leads to massive fibrosis. Denis, M. *Exp. Lung Res.* **18**, 761–773 (1992).
953. Natural cytotoxic T cells responsible for anti-CD3-induced cytotoxicity in mice. Yanagita, Y., Nishimura, T., Goa, X. *et al.*, *Immunol. Lett.* **31**, 137–142 (1992).
954. Generation of natural killer cells from both FcγRII/III+ and FcγRII/III- murine fetal liver progenitors. Moingeon, P., Rodewald, H.-R., McConkey, D. *et al.*, *Blood* **82**, 1453–1462 (1993).
955. Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. Arnould, T., Michiels, C. and Remacle, J. *Blood* **83**, 3705–3716 (1994).
956. Platelet-activating factor-induced polymorphonuclear neutrophil priming independent of CD11B adhesion. Read, R.A., Moore, E.E., Moore, F.A. *et al.*, *Surgery* **114**, 308–313 (1993).
957. Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation. Conway, E.M., Nowakowski, B. and Steiner-Mosonyi, M. *Blood* **80**, 1254–1263 (1992).
958. Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. Berends, C., Dijkhuizen, B., de Monchy, J.G.R. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* **167**, 183–193 (1994).
959. Intracellular localization of glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored CD67 and FcRIII (CD16) in affected neutrophil granulocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Jost, C.R., Gaillard, M.L., Fransen, J.A.M. *et al.*, *Blood* **78**, 3030–3036 (1991).
960. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. Kuijpers, T.W., Tool, A.T.J., van der Schoot, C.E. *et al.*, *Blood* **78**, 1105–1111 (1991).
961. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengelov, H. *et al.*, *Blood* **83**, 799–807 (1994).
962. RANTES- and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils: effects of priming with interleukin-5. Schweizer, R.C., Welmers, B.A.C., Raaijmakers, J.A.M. *et al.*, *Blood* **83**, 3697–3704 (1994).
963. Human platelets secrete chemotactic activity for eosinophils. Burgers, J.A., Schweizer, R.C., Koenderman, L. *et al.*, *Blood* **81**, 49–55 (1993).
964. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 greatly enhance the interaction of human eosinophils with opsonized particles by changing the affinity of complement receptor type-3. Blom, M., Tool, A.T.J., Kok, P.T.M. *et al.*, *Blood* **83**, 2978–2984 (1994).
965. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. Warrings, R.A.J., Koenderman, L., Kok, P.T.M. *et al.*, *Blood* **77**, 2694–2700 (1991).
966. Migration of primed human eosinophils across cytokine-activated endothelial cell monolayers. Moser, R., Fehr, J., Olgiati, L. *et al.*, *Blood* **79**, 2937–2945 (1992).
967. Purification of human basophils by density and size alone. Kepley, C., Craig, S. and Schwartz, L. *J. Immunol. Meth.* **175**, 1–9 (1994).
968. Purification of normal human bone-marrow-derived basophils. Arock, M., Mossalayi, M.D., Le Goff, L. *et al.*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **102**, 107–111 (1993).
969. Effects of cytokines on human basophils chemotaxis. Tanimoto, Y., Takahashi, K. and Kimura, I. *Clin. Exper. Allergy* **22**, 1020–1025 (1992).
970. Purification of human blood basophils by negative selection using immunomagnetic beads. Bjerke, T., Nielsen, S., Helgestad, J. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* **157**, 49–56 (1993).
971. Purification of human blood basophils using negative selection by flow cytometry. Tanimoto, Y., Takahashi, K., Takata, M. *et al.*, *Clin. Exper. Allergy* **22**, 1015–1019 (1992).
972. Purification of human blood basophils and leukotriene C4 generation following calcium ionophore stimulation. Mita, K., Akiyama, K., Hayakawa, T. *et al.*, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **49**, 783–788 (1993).

973. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. Bischoff, S. and Dahinden, C.A. *Blood* **79**, 2662–2669 (1992).
974. Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induces normal increase of basophils in mast cell-deficient Ws/Ws rats with a small deletion of the kinase domain of c-kit. Kasugai, T., Okada, M., Morimoto, M. *et al.*, *Blood* **81**, 2521–2529 (1993).
975. Thawed human hepatocytes in primary culture. Dou, M., de Sousa, G., Lacarelle, B. *et al.*, *Cryobiol.* **29**, 454–469 (1992).
976. The distribution of non-specific carboxylesterases and glutathione S-transferases in different rat liver cells. Gad, M.Z. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 139–144 (1994).
977. Methods in laboratory investigation: assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. Braet, F., De Zanger, R., Sasaoki, T. *et al.*, *Lab. Invest.* **70**, 944–952 (1994).
978. Differential expression of platelet-derived growth factor **a**- and **b**-receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver. Heldin, P., Pertoft, H., Nordlinger, H. *et al.*, *Exper. Cell Res.* **193**, 364–369 (1991).
979. Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. Zaleski, J., Richburg, J. and Kauffman, F.C. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 111-116 (1993).
980. Inhibition of biotransformation of xenobiotic p-nitroanisole after cryopreservation of isolated rat hepatocytes. Petrenko, A.Y. and Mazur, S.P. *Cryobiol.* **30**, 158-163 (1993).
981. A method for the cryopreserved rat liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. Diener, B., Utesch, D., Beer, N. *et al.*, *Cryobiol.* **30**, 116–127 (1993).
982. Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes. Utesch, D., Diener, B., Molitor, E. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **44**, 309–315 (1992).
983. *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Küpffer cells and multiply intracellularly. Nnalue, N.A., Shnyra, A., Hultenby, K. *et al.*, *Infect. Immun.* **60**, 2758–2768 (1992).
984. Erythroid colony formation by fetal rat liver and spleen cells *in vitro*: inhibition by a low relative molecular mass component of fetal spleen. Nagel, M.-D. and Nagel, J. *Development* **114**, 213–219 (1992).
985. Fate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprocin receptor-mediated endocytosis *in vivo*. Chowdhury, N.R., Wu, C.H., Wu, G.Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**, 11265–11271 (1993).
986. Epidermal growth factor stimulates testosterone production of human Leydig cells *in vitro*. Syed, V., Khan, S.A. and Nieschlag, E. *J. Endocrinol. Invest.* **14**, 93–97 (1991).
987. Immunocytochemical localization and endogenous synthesis of apolipoprotein E in testicular Leydig cells. Schleicher, R.L., Zheng, M. and Zhang, M. *Biol. Reprod.* **48**, 313–324 (1993).
988. Isolation of human Leydig cell mesenchymal precursors from patients with the androgen insensitivity syndrome: testosterone production and response to human chorionic gonadotropin stimulation in culture. Chemes, H., Cigorraga, S., Bergada, C. *et al.*, *Biol. Reprod.* **46**, 793–801 (1992).
989. Enhancement of testosterone secretion by normal adult human Leydig cells by co-culture with enriched preparations of normal adult human Sertoli cells. Lejeune, H., Skalli, M., Sanchez, P. *et al.*, *International. J. Androl.* vol **4**, 27–34 (1993).
990. Heterogeneity of adult mouse Leydig cells with different buoyant densities. Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L. and De Kretser, D.M. *J. Androl.* **13**, 274–282 (1992).
991. Effect of cortisol on testosterone production by immature pig Leydig cells. Li, P.S. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **38**, 205–212 (1991).
992. Insulin-like growth factor-binding protein-2: the effect of human chorionic gonadotropin on its gene regulation and protein secretion and its biological effect in rat Leydig cells. Wang, D., Nagpal, M.L., Lin, T. *et al.*, *Mol. Endocrinol.* **8**, 69–76 (1994).
993. Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone-like factor. Srivastava, C.H., Collard, M.W., Rothrock, J.K. *et al.*, *Endocrinol.* **133**, 83–89 (1993).
994. Separation and characterization of Leydig cells and macrophages from rat testes. Dirami, G., Poulter, L.W. and Cooke, B.A. *J. Endocrinol.* **130**, 357–365 (1991).
995. **D5-3b**-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in two distinct density Leydig cells from immature rats. Differences in responsiveness to human chorionic gonadotropin or 8-bromoadenine 3',5'-monophosphate. Murono, E.P. and Washburn, A.L. *Biochem. Biophys. Acta* **1091**, 55–62 (1991).
996. A possible role for a low molecular weight peptide in regulation of testosterone production by rat Leydig cells. Ramaraj, P., Subbarayan, V.S.R. and Jagannadha, R.A. *Indian J. Biochem. Biophys.* **28**, 536–540 (1991).
997. Interleukin-1**a**-induced changes in androgen and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate release in adult rat Leydig cells in culture. Moore, C. and Moger, W.H. *J. Endocrinol.* **129**, 381–390 (1991).

998. Enhanced stimulation of 5 α -reductase activity in cultured Leydig cell precursors by human chorionic gonadotropin. Murono, E.P., Washburn, A.L. and Goforth, D.P. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **48**, 377–384 (1994).
999. Rat seminiferous tubular culture medium contains a biological factor that inhibits Leydig cell steroidogenesis; its purification and mechanism of action. Zwain, I.H. and Cheng, C.Y. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**, 213–227 (1994).
1000. In vitro DNA synthesis in Leydig and other interstitial cells of the rat testis. Moore, A., Findlay, K. and Morris, I.D. *J. Endocrinol.* **124**, 247–255 (1992).
1024. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy techniques. Steinholt, H.C., Chandler, J.E. and Tirado, V. *J. Dairy Sci.* **74**, 3822–3826 (1991).
1025. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. Awano, M., Kawaguchi, A. and Mohri, H. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 375–383 (1993).
1026. Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida. Vandevoort, C.A., Tollner, T.L. and Overstreet, J.W. *Mol. Reprod. Dev.* **37**, 299–304 (1994).
1027. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. Avraham, H., Vannier, E., Cowley, S. *et al., Blood* **79**, 365–371 (1992).
1028. Interferon- α downregulates the abnormal intracytoplasmic free calcium concentration of tumor cells in hairy cell leukemia. Genot, E., Bismuth, G., Degos, L. *et al., Blood* **80**, 2060–2065 (1992).
1029. Infection of megakaryocytes by human immunodeficiency virus in seropositive patients with immune thrombocytopenic purpura. Louache, F., Bettaieb, A., Henri, A. *et al., Blood.* **78**, 1697–1705 (1991).
1030. Fibrinogen γ -chain mRNA is not detected in human megakaryocytes. Lange, W., Luig, A., Dolken, G. *et al., Blood* **78**, 20–25 (1991).
1031. Growth and detection of human bone marrow B lineage colonies. McGinnes, K., Keystone, E., Bogoch, E. *et al., Blood* **76**, 896–905 (1990).
1032. Myeloid and lymphoid chimerism after T cell-depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. MacKinnon, S., Barnett, L., Bourhis, J.H. *et al., Blood* **80**, 3235–3241 (1992).
1033. T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow. Schmidt-Wolf, I.G.H., Dejbakhsh-Jones, S., Ginzton, N. *et al., Blood* **80**, 3242–3250 (1992).
1034. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. Watt, S.M., Williamson, J., Genevier, H. *et al., Blood* **82**, 2649–2663 (1993).
1035. Long-term interleukin-6 administration stimulates sustained thrombopoiesis and acute-phase protein synthesis in a small primate - the marmoset. Ryffel, B., Car, B.D., Woerly, G. *et al., Blood* **83**, 2093–2102 (1994).
1036. Effect of human interleukin-6 on megakaryocyte development and thrombocytopoiesis in primates. Stahl, C.P., Zucker-Franklin, D., Evatt, B.L. *et al., Blood* **78**, 1467–1475 (1991).
1037. Studies of an improved Rhesus hematopoietic progenitor cell assay. Winton, E.F., Jacobs, P.C., Rozmiarek, S.K. *et al., Exp. Hematol.* **20**, 401–404 (1992).
1038. Interleukin-10 inhibits the osteogenic activity of mouse bone marrow. Van Vlasselaer, P., Borremans, B., Van Den Heuvel, R. *et al., Blood* **82**, 2361–2370 (1993).
1039. Interleukin-3 and lipopolysaccharide interact to inhibit proliferation of mouse bone marrow cells. Silva, Z.Z.A., Furlanetto, M.P., Marques, E.K. *et al., Immunol. Lett.* **40**, 55–58 (1993).
1040. Separation of hematopoietic stem cells into two populations and their characterization. Ogata, H., Taniguchi, S., Inaba, M. *et al., Blood* **80**, 91–95 (1992).
1041. Production of hematopoietic stem cell-chemotactic factor by bone marrow stromal cells. Cherry, B., Yasumizu, R., Toki, J. *et al., Blood* **83**, 964–971 (1994).
1042. Characterization of bone cells isolated on discontinuous Percoll gradients: distribution in sequentially derived populations. Wong, G.L., Ng, M.C., Calabrese, D.W. *et al., J. Bone and Mineral Res.* **6**, 969–976 (1991).
1043. LPS activation of bone marrow natural suppressor cells. Holda, J.H. *Cell. Immunol.* **141**, 518–527 (1992).
1044. Enrichment and functional characterization of Sca-1+WGA+, Lin-WGA+, Lin-Sca-1+, and Lin-Sca-1+WGA+ bone marrow cells from mice with an Ly-6a haplotype. Jurecic, R., Van, N.T. and Belmont, J.W. *Blood* **82**, 2673–2683 (1993).
1045. Different subsets of T cells in the adult mouse bone marrow and spleen induce or suppress acute graft-versus-host disease. Palathumpat, V., Dejbakhsh-Jones, S., Holm, B. *et al., J. Immunol.* **149**, 808–817 (1992).
1046. Purification of rat megakaryocyte colony-forming cells using a monoclonal antibody against rat platelet glycoprotein IIb/IIIa. Miyazaki, H., Inoue, H., Yanagida, M. *et al., Exp. Hematol.* **20**, 855–861 (1992).
1047. Hematopoiesis in asymptomatic cats infected with feline immunodeficiency virus. Linenberger, M.L., Shelton, G.H., Persik, M.T. *et al., Blood* **78**, 1963–1968 (1991).

1048. Enhanced reactive oxygen species metabolism of air space cells in hypersensitivity pneumonitis. Calhoun, W.J. *J. Lab. Clin. Med.* **117**, 443–452 (1991).
1049. Alveolar macrophage subpopulations in patients with active pulmonary tuberculosis. Kuo, H.-P. and Yu, C.-T. *Chest* **103**, 1773–1778 (1993).
1050. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. Calhoun, W.J., Reed, H.E., Moest, D.R. *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 317–325 (1992).
1051. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase by human decidual macrophages. Narahara, H., Nishioka, Y. and Johnston, J.M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1258–1262 (1993).
1052. Airway macrophages from patients with asthma do not proliferate. Chanez, P., Vago, P., Demoly, P. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 869–877 (1993).
1053. Increased numbers of hypodense alveolar macrophages in patients with bronchial asthma. Chanez, P., Bousquet, J., Couret, I. *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 923–930 (1991).
1054. Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients. Plasman, N. and Vray, B. *Res. Immunol.* **14**, 151–163 (1993).
1055. Separation of murine peritoneal macrophages using Percoll density gradients. Vray, B. and Plasman, N. *J. Immunol. Meth.* **174**, 53–59 (1994).
1056. Fluorescence demonstration of cathepsin B activity in fractionated alveolar macrophages. Sakai, K., Nii, Y., Ueyama, A. *et al.*, *Cell. Molec. Biol.* **37**, 353–358 (1991).
1057. Effects of pulmonary surfactant and surfactant protein A on phagocytosis of fractionated alveolar macrophages: relationship to starvation. Sakai, K., Kweon, M.N., Kohri, T. *et al.*, *Cell. Molec. Biol.* **38**, 123–130 (1992).
1058. The effects of asbestos inhalation on the distribution and enhancement of immunoassociated antigen expression of alveolar macrophage subpopulation. Inamoto, T., Georgian, M.M., Kagan, E. *et al.*, *J. Vet. Med. Sci.* **54**, 829–836 (1992).
1059. Immunoglobulin E plus antigen challenge induces a novel intercrine/chemokine in mouse mast cells. Kulmburg, P.A., Huber, N.E., Scheer, B.J. *et al.*, *J. Exp. Med.* **176**, 1773–1778 (1992).
1060. Potentiation of antigen-induced histamine release from rat peritoneal mast cells through a direct interaction between mast cells and non-mast cells. Inagaki, N., Kawasaki, H., Ueno, M. *et al.*, *Life Sci.* **54**, 1403–1409 (1994).
1061. Effect of phospholipase A2 inhibitor ONA-RS-082, on substance P-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. Kurosawa, M., Hisada, T. and Ishizuka, T. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **97**, 226–228 (1992).
1062. Eosinophil peroxidase accounts for most if not all of the peroxidase activity associated with isolated rat peritoneal mast cells. Rickard, A. and Lagunoff, D. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**, 365–369 (1994).
1063. Sensitivity in vitro of mature and immature mouse thymocytes to dexamethasone cytotoxicity and its correlation to poly ADP-ribosylation. Hoshino, J., Beckmann, G. and Kroger, H. *Biochem. International* **27**, 105–116 (1992).
1064. Dexamethasone and etoposide induce apoptosis in rat thymocytes from different phases of the cell cycle. Fearnhead, H.O., Chwalinski, M., Snowden, R.T. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1073–1079 (1994).
1065. Characterization of apoptosis in thymocytes isolated from dexamethasone-treated rats. Sun, X.-M., Dinsdale, D., Snowden, R.T. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **44**, 2131–2137 (1992).
1066. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step to apoptosis in thymocytes. Cohen, G.M., Sun, X.-M., Fearnhead, H. *et al.*, *J. Immunol.* **153**, 507–516 (1994).
1067. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. Sbarbati, R., de Boer, M., Marzilli, M. *et al.*, *Blood* **77**, 764–769 (1991).
1068. Stimulation of rat placental lactogen-II (rPL-II) secretion by cultured trophoblasts by insulin: development of a rat placental cell culture system and effects of peptide hormones on rPL-TT secretion in vitro. Kishi, K., Itoh, M., Kanemori, S. *et al.*, *J. Reprod. Fertil.* **99**, 519–527 (1993).
1069. Sedimentation for the separation of cells. Pretlow, T.G. and Pretlow, T.P. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **2**, 183–191 (1991).
1070. Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Franzen, B., Linder, S., Okuzawa, K. *et al.*, *Electrophoresis* **14**, 1045–1053 (1993).
1071. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. Martin, S.J., Bradley, J.G. and Cotter, T.G. *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 448–453 (1990).
1072. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T-G(ATP6) point mutation associated with the Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. Trounce, I., Neill, S. and Wallace, D.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8334–8338 (1994).

1073. Morphological observations of turkey (*Meleagris galopavo*) spermioophages maintained in tissue culture. Perez, B.S., Derrick, Jr, F.C., Korn, N. and Thurston, R.J. *Poultry Sci.* **73**, 1597–1606 (1994).
1074. The influence of growth medium on serum sensitivity of *Bacteroids* species. Allan, E. and Poxton, I.R. *J. Med. Microbiol.* **41**, 45–50 (1994).
1075. Inhibition of binding, entry, or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*E. risticii* serum, immunoglobulin G, or Fab fragment. Messick, J.B. and Rikihisa, Y. *Infect. Immun.* **62**, 3156–3161 (1994).
1076. Inhibition of infection of macrophages with *Ehrlichia risticii* by cytochalasins, monodansylcadaverine, and taxol. Rikihisa, Y., Zhang, Y. and Park, J. *Infect. Immun.* **62**, 5126–5132 (1994).
1077. Synthetic peptides analogous to the fimbrillin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*. Lee, J.-Y., Sojar, H.T., Bedi, G.S. *et al.*, *Infect. Immun.* **60**, 1662–1670 (1992).
1078. The influence of different sera on the *in vitro* immobilisation of Percoll purified *Treponema pallidum*, Nichols strain. Engelkens, H.J.H., Kant, M., Onvlee, P.C. *et al.*, *Genitourin. Med.* **68**, 20–25 (1992).
1079. Preliminary biochemical characterization of veil structure purified from *Theileria sergenti*-, *T. buffeli* and *T. orientalis*-infected bovine erythrocytes. Sugimoto, C., Kawazu, S., Sato, M. *et al.*, *Parasitol* **104**, 207–213 (1992).
1080. Concentration and enzyme content of *in vitro*-cultured *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. Vega, C.A., Buening, G.M., Rodriguez, S.D. *et al.*, *J. Protozool.* **33**, 514–518 (1986).
1081. Protein characterization of *Babesia equi* piroplasms isolated from infected horse erythrocytes. Ali, S., Sugimoto, C., Matsuda, M. *et al.*, *Parasitol. Res.* **79**, 639–643 (1993).
1082. Rapid transport of the acidic phosphoproteins of *Plasmodium berghei* and *P. chabaudi* from the intra-erythrocytic parasite to the host membrane using a miniaturized fractionation procedure. Wiser, M.F. and Lanners, H.N. *Parasitol. Res.* **78**, 193–200 (1992).
1083. *Babesia bovis*: purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. Rodriguez, S.D., Buening, G.M., Vega, C.A. *et al.*, *Exp. Parasitol.* **61**, 236–243 (1986).
1084. Improved method for the concentration and purification of faecal cysts of *Entamoeba histolytica* for use as antigen. Jyothi, Foerster, B., Hamelmann, C. *et al.*, *J. Trop. Med. and Hygiene* **96**, 249–250 (1993).
1085. *Vairimorpha necatrix*: infectivity for and development in a lepidopteran cell line. Kurtti, T.J., Munderloh, U.G. and Noda, H. *J. Inv. Pathol.* **55**, 61–68 (1990).
1086. Purification and partial characterization of rice transitory yellowing virus. Chiu, R.-J., Yau-Heiu, H., Chen, M.-J. *et al.*, *Am. Phytopathol. Soc.* **80**, 777–783 (1990).
1087. Purification of rubella virus by isopycnic gradients: continuous Percoll versus discontinuous sucrose. Bustos, J., Zamora, P., Mejia, E. *et al.*, *Arch. Virol.* **118**, 285–288 (1991).
1088. Purification of mycoplasma-like organisms from lettuce with aster yellows disease. Jiang, Y.P. and Chen, D.A. *Am. Phytopathol. Soc.* **77**, 949–953 (1987).
1089. Growth hormone regulates amino acid transport in human and rat liver. Pacitti, A.J., Inoue, Y. and Plumley, D.A. *Ann. Surg.* **216**, 353–362 (1992).
1090. Oxytocin pretreatment of pregnant rat uterus inhibits Ca²⁺ uptake in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum. Magocsi, M. and Penniston, J.T. *Biochem. Biophys. Acta* **1063**, 7–14 (1991).
1091. Lysophosphoinostide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes. Tsutsumi, T., Kobayashi, T., Ueda, H. *et al.*, *Neurochem. Res.* **19**, 399–406 (1994).
1092. Pharmacological characterization of inositol 1,4,5-triphosphate binding sites: relation to Ca²⁺ release. Mouillace, B., Devilliers, G. and Jard, S. *Eur. J. Pharmacol.* **225**, 179–193 (1992).
1093. Influence of fasting on glutamine transport in rat liver. Espat, N.J., Copeland, E.M. and Souba, W.W. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **17**, 493–500 (1993).
1094. Inositol 1,4,5-triphosphate binding sites copurify with the putative Ca-storage protein calreticulin in rat liver. Enyed, P., Szabadkai, G., Krause, K.-H. *et al.*, *Cell. Calcium* **14**, 485–492 (1993).
1095. Stimulation of hepatocyte system y⁺-mediated L-arginine transport by an inflammatory agent. Pacitti, A.J., Copeland, E.M. and Souba, W.W. *Surgery* **11**, 403–411 (1992).
1096. Cellular localization and characterization of proteins that bind high density lipoprotein. Hokland, B., Mendez, A.J. and Oram, J.F. *J. Lipid Res.* **33**, 1335–1342 (1992).
1097. Dietary soybean oil changes lipolytic rate and composition of fatty acids in plasma membranes of ovine adipocytes. Jenkins, T.C, Thies, E.J. and Fotouhi, N. *J. Nutr.* **124**, 566–570 (1994).
1098. Isolation of the plasma membrane and organelles from Chinese hamster ovary cells. Cezanne, L., Navarro, L. and Tocanne, J.-F. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 205–214 (1992).
1099. Isolation of *Raja erinacea* basolateral liver plasma membranes: characterization of lipid composition and fluidity. Smith, D.J. and Ploch, S.A. *J. Exp. Zool.* **258**, 189–195 (1991).

1100. Structural and functional properties of plasma membranes from the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Hillenga, D.J., Versantvoort, H.J.M., Driessen, A.J.M. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **224**, 581–587 (1994).
1101. Preparation of right-side-out plasma membrane vesicles from *Penicillium cyclopium*: a critical assessment of markers. Ugalde, U.O., Hernandez, A., Galindo I. *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2205–2212 (1992).
1102. Demonstration of adenosine deaminase activity in human fibroblast lysosomes. Lindley, E.R. and Pisoni, R.L. *Biochem. J.* **290**, 457–462 (1993).
1103. Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). Kominami, E., Ezaki, J., Muno, D. *et al.*, *J. Biochem.* **111**, 278–282 (1992).
1104. Effect of pH and ATP on the equilibrium density of lysosomes. Mayorga, L.S., De Veca, M.G., Colombo, M.I. *et al.*, *J. Cell. Physiol.* **156**, 303–310 (1993).
1105. Cycling of an 85-kDa lysosomal membrane glycoprotein between the cell surface and lysosomes in cultured rat hepatocytes. Akasaki, K., Michihara, A., Fukuzawa, M. *et al.*, *J. Biochem.* **116**, 670–676 (1994).
1106. Preparation of membrane vesicles from kidney cortex lysosomes using amino acid methyl ester. Harikumar, P. *Biochem. Molec. Biol. International* **30**, 1005–1011 (1993).
1107. Distribution and structure of the vacuolar H⁺ ATPase in endosomes and lysosomes from LLC-PK1 cells. Somsel Rodman, J., Stahl, P.D. and Gluck, S. *Exp. Cell Res.* **192**, 445–452 (1991).
1108. Rapid preparation of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial subpopulation from cardiac muscle. Chemnitius, J.-M., Manglitz, T., Kloeppel, M. *et al.*, *Int. J. Biochem.* **4**, 589–596 (1993).
1109. Developmental changes in rat liver mitochondrial populations analyzed by flow cytometry. Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., San Miguel, J. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **203**, 134–140 (1992).
1110. *Plasmodium berghei*: partial purification and characterization of the mitochondrial cytochrome c oxidase. Krungkrai, J., Krungkrai, S.R. and Bhumiratana, A. *Exp. Parasitol.* **77**, 136–146 (1993).
1111. Isolation and characterization of mitochondria from turkey spermatozoa. McLean, D.J., Korn, N., Perez, B.S. *et al.*, *J. Androl.* **14**, 433–438 (1993).
1112. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. Kjeldsen, L., Sengelov, H., Lollike, K. *et al.*, *Blood* **83**, 1640–1649 (1994).
1113. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L. *et al.*, *Biochem. J.* **299**, 473–479 (1994).
1114. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (I[m]I[2]) in human neutrophils. Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, M.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* **92**, 1467–1476 (1993).
1115. Subcellular localization of heparanase in human neutrophils. Matzner, Y., Vlodaysky, L., Bar-Ner, M. *et al.*, *J. Leuk. Biol.* **51**, 519–524 (1992).
1116. Granules of human CD3⁺ large granular lymphocytes contain a macrophage regulation factor(s) that induces macrophage H₂O₂ production and tumoricidal activity but decreases cell surface Ia antigen expression. Roussel, E. and Greenberg, A.H. *Cell. Immunol.* **134**, 31–41 (1991).
1117. Properties of plasma membrane-induced amylase release from rat parotid secretory granules: effects of Ca²⁺ and Mg-ATP. Mizuno, M., Kameyama, Y., Yashiro, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1116**, 104–111 (1992).
1118. Isolation of cytolytic granules from sea urchin amoebocytes. Pagliara, P. and Canicatti, C. *Eur. J. Cell. Biol.* **60**, 179–184 (1993).
1119. Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm. Wang, X. and Moore, Jr, T.S. *J. Biol. Chem.* **266**, 19981–19987 (1991).
1120. Characterization of a mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in axes of germinating sunflower seeds. Attucci, S., Rivoal, J., Brouquisse, R. *et al.*, *Plant Science* **102**, 49–59 (1994).
1121. Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male sterility. Boutry, M., Faber, A.-M., Charbonnier, M. *et al.*, *Plant Molec. Biol.* **3**, 445–452 (1984).
1122. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. Reinero, A. and Beachy, R.N. *Plant Molec. Biol.* **6**, 291–301 (1986).
1123. The methods for isolation of cytoplasts in several crop plants. Watanabe, M. and Yamaguchi, H. *Japan. J. Breed.* **38**, 43–52 (1988).
1124. Barley aleurone layer cell protoplasts as a transient expression system. Gopalakrishnan, B., Sonthayanon, B., Rahmatullah, R. *et al.*, *Plant Molec. Biol.* **16**, 463–467 (1991).
1125. Rapid isolation of nuclei from carrot suspension culture cells using a BioNebulizer. Okpodu, C.M., Robertson, D., Boss, W.F. *et al.*, *BioTechniques* **16**, 154–158 (1994).

1126. Purification of highly intact plastids from various heterotrophic plant tissues: analysis of enzymatic equipment and precursor dependency for starch biosynthesis. Neuhaus, H.E., Batz, O., Thom, E. *et al.*, *Biochem. J.* **296**, 395–401 (1993).
1127. Nuclear buoyant density determination and the purification and characterization of wild-type *Neurospora* nuclei using Percoll density gradients. Talbot, K.J. and Russell, P.J. *Plant Physiol.* **70**, 704–708 (1982).
1130. Endocytosis and lysosomal delivery of tissue plasminogen activator-inhibitor 1 complexes in Hep G2 cells. Underhill, D.M., Owensby, D.A., Morton, P.A. *et al.*, *Blood* **80**, 2746–2754 (1992).
1131. Characterization of peptides bound to extracellular and intracellular HLA-DR1 molecules. Max, H., Halder, T., Kropshofer, H. *et al.*, *Human Immunol.* **38**, 193–200 (1993).
1132. Subcellular fractionation of cultured normal human melanocytes: new insights into the relationship of melanosomes with lysosomes and peroxisomes. Smit, N.P.M., van Roermund, C.W.T., Aerts, H.M.F.G. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1181**, 1–6 (1993).
1133. Changes in the localization of catalase during differentiation of neutrophilic granulocytes. Ballinger, C.A., Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L., Kalmar, J.R. *et al.*, *Blood* **83**, 2654–2668 (1994).
1134. Biosynthesis and processing of cathepsin G and neutrophil elastase in the leukemic myeloid cell line U-937. Lindmark, A., Persson, A.-M. and Olsson, I. *Blood* **76**, 2374–2380 (1990).
1135. Spheroplast formation and partial purification of microbodies from hydrocarbon-grown cells of *Cladosporium resinae*.J. Carson, D.B. and Cooney, J.J. *Ind. Microbiol.* **3**, 111–117 (1988).

订购信息

用于细胞分离和培养的产品

产品	规格	货号
Percoll	1 l	17-0891-01
	250 mL	17-0891-02
Percoll PLUS	1 l	17-5445-01
	250 mL	17-5445-02
Ficoll-Paque PLUS	6 × 100 mL	17-1440-02
	6 × 500 mL	17-1440-03
Ficoll-Paque PREMIUM	6 × 100 mL	17-5442-02
	6 × 500 mL	17-5442-03
Ficoll PM 70	100 g	17-0310-10
	500 g	17-0310-50
	5 kg	17-0310-05
Ficoll PM 400	100 g	17-0300-10
	500 g	17-0300-50
	5 kg	17-0300-05
	40 kg	17-0300-08
Cytodex 1	25 g	17-0448-01
Cytodex 3	10 g	17-0485-01

用于RNA 纯化的产品

产品	规格	货号
QuickPrep Micro mRNA 纯化试剂盒 （ 24 次纯化 ）	1 个试剂盒†	27-9255-01
QuickPrep mRNA 纯化试剂盒 （ 4 次纯化 ）	1 个试剂盒†	27-9254-01
mRNA 纯化试剂盒		
（ 2 次纯化 ）	1 个试剂盒†	27-9258-01
（ 4 次纯化 ）	1 个试剂盒†	27-9258-02
CsTFA （ 溶液 ）	100 mL	17-0847-02
Oligo(dT)-7 型纤维素	1 g	27-5543-02

用于cDNA 合成的试剂盒

产品	规格	货号
TimeSaver cDNA 合成试剂盒 (5 次反应)	1 个试剂盒†	27-9262-01
第一链cDNA 合成试剂盒(55 次反应)	1 个试剂盒†	27-9261-01
Ready-To-Go™T-Primed 第一链试剂盒 (50 次反应)	1 个试剂盒†	27-9263-01

† 产品必须冷运。绝热集装箱和制冷剂需额外收费。



P(A): 在Percoll梯度中分离人血细胞。底层包含红细胞，中间带是多形核细胞（如粒细胞），顶部带是单个核细胞。
(B): Percoll是一款卓越的密度梯度离心介质，以易于打开、可重复密封的瓶装形式提供。
(C): PercollPLUS试剂可分离各种细胞类型，可用于临床研究，提供易于打开、可重复密封的250mL和1l瓶装。

cytiva.com/cellprep

Cytiva 和 Drop 标志是 GlobalLifeSciencesIPHoldcoLLC 或其附属公司的商标。Percoll、Sephadex、Sephacyl、Sephacryl、Ficoll、Ficoll-Paque、Cytodex 和 Ready-To-Go 是 GlobalLifeSciencesSolutionsUSALLC 或作为 Cytiva 开展业务的附属公司的商标。

PercollPLUS 受以下专利和其他国家 / 地区的同等专利和专利申请的保护, 这些专利和申请由 DendreonCorporation 授予 Cytiva: 美国专利号 4,927,749、美国专利号 4,927,750、加拿大专利号 1,338,492、日本专利号 2,628,509、美国专利号 5,789,148、美国专利号 6,015,843 和欧洲专利号 1,047,635。从 Cytiva 公司及其授权经销商处购买本产品时, 应附带一份根据上述专利权将本产品用于密度梯度分离目的的免费、不可转让的许可证, 但任何使用 PercollPLUS 或任何其他有机硅烷化胶态二氧化硅颗粒为基础的离心介质来富集、净化或分离细胞以用于肿瘤应用的主动免疫治疗的行为, 都应排除在该许可证之外。

Beckman 是 BeckmanCoulter,Inc. 的商标。Coomassie 是 ThermoFisherScientific,Ltd. 的商标。LUDOX 是 W.R. 的商标。Grace&Co.-Conn.Merthiolate 是 EliLillyandCompany 的商标, Triton 是 UnionCarbideChemicalsandPlasticCompanyInc. 的商标。所有其他第三方商标均为其各自所有者的财产。

©2021Cytiva

所有商品和服务的销售均应遵守 Cytiva 业务范围内的供应公司的销售条款和条件。如有要求, 可提供这些条款和条件的副本。有关最新信息, 请联系您当地的 Cytiva 代表。

有关当地办事处的联系信息, 请访问 cytiva.com/contact

