



单核细胞的分离

方法与应用



通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 手册



GST Gene Fusion System
Handbook
18-1157-58

Affinity Chromatography
Principles and Methods
18-1022-29

Antibody Purification
Handbook
18-1037-46

Cell Separation Media
Methodology and applications
18-1115-69

Isolation of mononuclear cells
Methodology and applications
18-1152-69

**Ion Exchange Chromatography
& Chromatofocusing**
Principles and Methods
11-0004-21

**Purifying
Challenging Proteins**
Principles and Methods
28-9095-31

Gel Filtration
Principles and Methods
18-1022-18

**Recombinant Protein
Purification Handbook**
Principles and Methods
18-1142-75

Protein Purification
Handbook
18-1132-29

**Hydrophobic Interaction and
Reversed Phase Chromatography**
Principles and Methods
11-0012-69

**2-D Electrophoresis
using immobilized pH gradients**
Principles and Methods
80-6429-60

Microcarrier Cell Culture
Principles and Methods
18-1140-62

单核细胞的分离

方法与应用

目录

介绍	5
Ficoll-Plaque PLUS	6
分离原理	6
推荐标准方法	7
所需设备和溶液	8
样品制备	8
淋巴细胞分离操作	8
洗涤淋巴细胞以使其与血小板脱离	10
实验室典型结果	10
注意事项	11
问题解决不完全履行	12
采用 Ficoll-Plaque PLUS 方法分离的淋巴细胞的特性	13
Ficoll-Plaque PLUS 的进一步应用	13
可用性和储存	14
 符合 ISO 13485:2003 和 (GMP) 的	
Ficoll-Paque PREMIUM	15
应用	15
规格	16
可用性和储存	16
 参考文献	17
 订购信息	21
从通用电气医疗集团 (GE-Healthcare) 选购的用于细胞科学研究的产品	21

介绍

Ficoll-Paque™ PLUS (见第 6 页) 是一种无菌的、用于提纯少量或大量人外周血中高产和高纯度的淋巴细胞的即用型密度梯度介质, 基于Bøyum (1) 发展方法中的一简单快速的离心操作来完成纯化过程。Ficoll-Paque™ PLUS 也可以用来制备除人外周血的其它来源的淋巴细胞。

购自通用电气医疗集团的 Ficoll-Paque PLUS :

是 Ficoll™ PM400 和密度为 1.077 ± 0.001 g/ml 的泛影酸钠的无菌内毒素测试 (< 0.12 EU/ml) 溶液。

推荐用于全人外周血中高产的各种淋巴细胞的少量或大量分离。

属于严格质量控制的试验, 保证了不同批次细胞的增殖性能。

供应时, 采用瓶装, 橡胶隔片密封, 这样容易保证溶液抽取时处于无菌状态。

可用的便利的包装尺寸: 根据研究要求设计的 6×100 ml 和根据日常常规淋巴细胞分离需要所设计的 6×500 ml。每一包装中已含有使用的详细说明。

避光储存于 $4-30^\circ\text{C}$ 中, 其稳定性可保持最少 3 年。

采用本小册子里推荐的操作对正常人外周血进行分离可进行如下典型的淋巴细胞制备:

原血液样品中 $60 \pm 20\%$ 的淋巴细胞回收率

$95 \pm 5\%$ 单核细胞

分离细胞具有 $> 90\%$ 的活力

$3 \pm 2\%$ 粒细胞

$5 \pm 2\%$ 红细胞

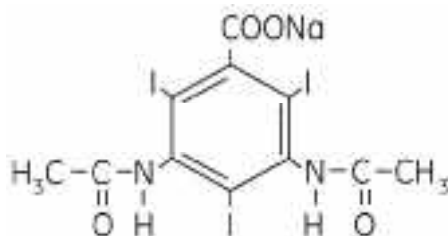
原血液样品中总血小板含量 $< 0.5\%$

2005 年 10 月, 通用电气医疗集团将 Ficoll-Paque PREMIUM 投入市场。该产品 (见第 15 页) 是在 Ficoll-Paque PLUS 基础上, 在符合 (GMP) 的环境 (37) 下生产的, 已通过 ISO 13485:2003 标准认证, 并将用于临床。Ficoll-Paque PREMIUM 可合并到使用 Ficoll-Paque PLUS 的现有操作中, 使人单个核细胞从骨髓、外周血及脐带血中分离成为可能。

Ficoll-Paque PLUS

Ficoll-Paque PLUS 是一密度为 1.077 ± 0.001 g/ml 的水溶液，每 100 ml 溶液中含 5.7g Ficoll PM400、9 g 泛影酸钠及 0.0231 g 依地酸钙钠。Ficoll PM400 是一由蔗糖和表氯醇合成的高分子量 (M_r 400 000) 聚合物，可溶于水。Ficoll PM400 的分子高度分支，近似球形，以 10 nm 的斯托克斯半径紧密的盘绕在一起。与分子量相同的线性多糖 (如葡聚糖， M_r 400000 : / / 49 ml/g) 相比，Ficoll PM400 具有低特性粘度 (17 ml/g)，具有低渗透压。

泛影酸钠是一方便与 Ficoll PM400 形成的低粘度高密度溶液的化合物。泛影酸钠 (M_r 635.92) 是 3,5-双(乙酰胺基)-2,4,6-三碘苯甲酸的钠盐。



由于泛影酸钠是一种光敏物质，因此 Ficoll-Paque PLUS 必须避光储存。Ficoll-Paque PLUS 中泛影酸钠的作用是提供了为有效去除淋巴细胞中其它细胞所必需的最佳的密度和渗透压。

Ficoll-Paque PLUS 以瓶装、橡胶隔片密封的无菌溶液的形式供应。为保持其无菌，抽取溶液时应采用无菌技术，其不应移开橡胶隔片。Ficoll-Paque PLUS 应避光储存于 4-30 °C 中。对未打开的瓶装 Ficoll-Paque PLUS 的储存可增加其储存期。Ficoll-Paque PLUS 变质表现为澄清溶液中出现黄色或微粒样物质。如发现 Ficoll-Paque PLUS 有此类变质，应将其丢弃。

分离原理

Ficoll-Paque PLUS 对淋巴细胞的分离是利用通过 Bøyum (1, 2, 3) 和我们实验室进行的广泛调查研究上建立起来的方法。自 1968 年 Bøyum 先驱工作成果发表以来，由 Ficoll PM400 和一碘化密度梯度介质 (如泛影酸钠) 的混合物构成的分离介质已被广泛用于纯化人淋巴细胞。

进行淋巴细胞分离时，采用等量的平衡盐溶液对去纤维蛋白或抗凝血剂处理后的血液进行稀释，并将其装入离心管中在 Ficoll-Paque PLUS (未混合) 之上进行小心的分层处理。在室温下进行短时离心 (一般是 400 g 离心处理 30-40 分钟) 后，可于 Ficoll-Paque PLUS 与样品层之间的界面处收获淋巴细胞、单核细胞及血小板。然后，将该物质置于平衡盐溶液中再离心两次，以洗涤淋巴细胞并去除血小板。

该分离成功与否受诸多因素的影响。离心处理时,血液样品中的细胞沉淀于血/Ficoll-Paque PLUS界面处,在该处,这些细胞与Ficoll-Paque PLUS中的Ficoll PM400接触。在室温下,该试剂可有效的凝集红细胞。这种凝集增加了红细胞的沉淀速度,这些红细胞在离心管底部形成一个沉淀,使其能够很好地从淋巴细胞中分离出来。粒细胞也沉淀到Ficoll-Paque PLUS层的底部。它们与轻微高渗的Ficoll-Paque PLUS的接触增加了其密度,而该密度的增加使该过程更容易实现。因此,离心结束时,在离心管底部可同时发现粒细胞和红细胞,它们都处于Ficoll-Paque PLUS的下方。

而淋巴细胞、单核细胞及血小板密度不够大,所以无法穿透Ficoll-Paque PLUS层。因此,这些细胞在原血液样品和Ficoll-Paque PLUS之间的界面上形成一集中带,便于收集。该区带的形成使采用少量此类细胞和Ficoll-Paque PLUS介质混合后高产回收淋巴细胞成为可能。然后,对收获的细胞进行洗涤和离心,以去除血小板、所有的Ficoll-Paque PLUS及血浆。由此得到的细胞悬浮液就只含高度纯化的各种淋巴细胞和单核细胞,适合进一步的研究。

推荐标准方法

可在大体积的血液样品量中采用Ficoll-Paque PLUS对淋巴细胞进行纯化。依靠其高产特性,该方法适用于对极少血液量的处理,比如,从小孩身体里获取的少量血液。为确保分离细胞的最大增殖性能,建议采用标准操作。我们实验室已对以下操作进行了评估,并建议将其用于Ficoll-Paque PLUS对正常血液样品的分离。对其进行简单的改变后可适用于特殊的离心系统。

为对技术进行标准化,应首先对离心管的血液量和直径进行选择。这些因素可确定血液样品在离心管中的高度,因此可确定其对应的离心时间。增加血液样品在离心管中的高度可增加红细胞的污染。然而,分离不会受到离心管直径改变的影响。因此,如果保证血液样品在离心管中的高度及其分离时间恒定,则更大体积的血液就可采用直径更大的离心管以相同的纯化度进行分离。

淋巴细胞纯度和产量在相当大程度上依赖于对红细胞去除的有效性。

当全血中的红细胞发生凝集时,一些淋巴细胞陷入红细胞凝块中,并和红细胞一起沉淀。可通过稀释血液减少淋巴细胞的这种自陷趋向。稀释提供了更高的淋巴细胞产量,且减小了红细胞凝块的大小。在较高温度(37℃)下,红细胞凝集效应会被加强,这将降低淋巴细胞的产量。然而,在相对较低的温度(4℃)下,凝集速度减慢,分离时间增加,这也会降低淋巴细胞的产量。在温度为18-20℃时才能获取淋巴细胞最佳产量。

所需设备和溶液

- 1. 为每一待处理血液样品准备两支 10 ml 玻璃试管。应对试管进行硅化处理 (见第 11 页的“ 注意事项 ”)。
- 2. 平衡盐溶液。至少为每一待处理样品准备 20 ml。可采用两种原液 A 和 B 来制备平衡盐溶液。

溶液 A

		浓度 (g/l)
Anhydrous D-glucose	5.5×10^{-3} M (0.1%)	1.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5.0×10^{-5} M	0.0074
MgCl ₂ · 6H ₂ O	9.8×10^{-4} M	0.1992
KCl	5.4×10^{-3} M	0.4026
TRIS	0.145 M	17.565

溶于约 950 ml 蒸馏水中，加入浓盐酸 (HCl)，使其 pH 值为 7.6，然后调整其体积，到 1 L。

溶液 B

		浓度 (g/l)
NaCl	0.14 M	8.19

制备平衡盐溶液，将1份量的溶液 A 与 9 份量的溶液 B 混合。应每周对该溶液重新制备。也可使用其它无菌标准盐溶液。

- 3. 巴斯德吸管 (3 ml)。为每一待处理血液样品准备一支。应对这些吸管进行硅化处理 (见第 11 页的“ 注意事项 ”)。
- 4. 低速离心机。
- 5. 玻璃离心管。为每一待处理血液样品准备两支离心管。内径约 1.3 cm，容量为 15 ml。应对离心管进行硅化处理 (见第 11 页的“ 注意事项 ”)。对于更大或更小的样品，见第 11 页的“ 注意事项 ”中的说明。
- 6. Ficoll-Paque PLUS。为每一待处理样品准备 3 ml。对于更大或更小的样品，见第 11 页的“ 注意事项 ”中的说明。
- 7. 带注射针头的注射器。在无菌条件下从瓶里抽取 Ficoll-Paque PLUS 时需要。

样品制备

应使用新鲜血液，以确保分离淋巴细胞的高活力。在 18-20 °C 下制备样品。

- 1. 在一 10 ml 试管中加入 2 ml 去纤维蛋白或抗凝血剂治疗后的血液和等量的平衡盐溶液 (最后总体积为 4 ml)。
- 2. 用巴斯德吸管抽出和滴入血液和缓冲液进行混合。

淋巴细胞分离操作

- 1. 移去 Ficoll-Paque PLUS 瓶上的蓝色盖子 (图 1)。
- 2. 将 Ficoll-Paque PLUS 瓶来回倒置几次，以确保其混合均匀。使用带注射针头的注射器刺穿隔片，倒置 Ficoll-Paque PLUS 瓶并抽取需要量的 Ficoll-Paque PLUS (每

一离心管 3 ml) (图 2)。如果使用该方 法，则将从每一只瓶中抽取出至少 100 ml Ficoll-Paque PLUS。

3. 将 Ficoll-Paque PLUS (3 ml) 加入离心管中。
4. 轻轻加入稀释血液样品 (4 ml)，使其置于 Ficoll-Paque PREMIUM 层上 (图 3)。
重要提示：加入稀释血液时，尽量使样品与 Ficoll-Paque PREMIUM 分层，二者不得混合。
5. 在 18-20 °C 下，离心 400 × g 30-40 分钟。
6. 使用无菌的巴斯德吸管抽出上层液体，使淋巴细胞层在界面处保持原状 (图 4 和图 5)。应注意别将淋巴细胞层搅乱。包含血浆的上层液体可储存好以被稍后使用。

图 1.



图 2.



图 3.



图 4.

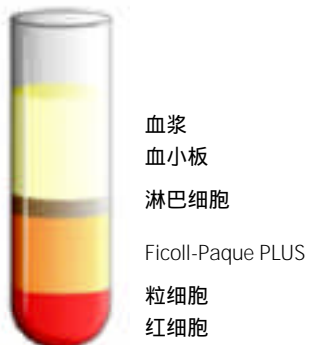


图 5.



洗涤淋巴细胞以使其与血小板脱离

1. 采用一无菌的巴斯德吸管将淋巴细胞层移入一清洁的离心管中。在最小量的情况下移出界面处所有的物质至关重要。移去多余的Ficoll-Paque PLUS会导致粒细胞污染；而移去多余的上清液则会引起血小板污染。
2. 向装有淋巴细胞的试管中加入至少 3 倍体积 (6 ml) 的平衡盐溶液。
3. 用巴斯德吸管轻轻地将细胞吹吸，使其悬浮。
4. 在 18-20 °C 下，以 60-100 × g 速度离心 10 分钟。
5. 丢弃上清液。
6. 用巴斯德吸管轻轻地将淋巴细胞吹吸，使其悬浮于 6-8 ml 的平衡盐溶液中。
7. 在 18-20 °C 下，离心 60-100 × g 10 分钟。
8. 丢弃上清液。至此，淋巴细胞应悬浮于适合应用的培养基上。

实验室典型结果

淋巴细胞：原血液样品中的淋巴细胞回收率为 $60 \pm 20\%$ 。
在淋巴细胞中的 $95 \pm 5\%$ 的细胞是单核白细胞。
活力 > 90% (使用台盼蓝排除法进行测量)。

其他细胞：粒细胞： $3 \pm 2\%$ 。
红细胞： $5 \pm 2\%$ 。
原血液样品中总血小板含量： $< 0.5\%$ 。

注意事项

玻璃器皿的准备：所有与样品接触的玻璃器皿在使用前都应进行硅化处理。玻璃器皿应浸泡于1%的硅酮溶液中保留10秒 (厂家不推荐在该溶液中进行任何特殊包衣操作)，用蒸馏水彻底冲洗，并置于恒温箱中烘干。最佳的硅化用液为那些可溶于有机溶剂的二甲基二氯硅烷溶液。

组织培养用塑料器具可作为代替品使用。

抗凝血剂：肝素、依地酸 (EDTA)、枸橼酸盐、枸橼酸葡萄糖 (ACD) 及枸橼酸磷酸盐葡萄糖 (CPD) 可被用作血液样品的抗凝血剂。去纤维蛋白血液不需要抗凝血剂。然而，去纤维蛋白会导致淋巴细胞的低产量，也可能增加红细胞污染 (3)。它也可引起单核细胞的选择性丢失。Bøyum发现，纯度稍高的淋巴细胞的制备可采用依地酸 (EDTA) 而非肝素作为抗凝血剂来实现 (3)。另外，也应注意，在来自外周血之外的其他来源的淋巴细胞的纯化中，加入肝素可能会导致细胞悬浊液发生胶凝现象。

大量血液样品：在保证Ficoll-Paque PLUS和血液样品的高度与上述标准方法中的高度大约相同 (分别为 2.4 cm 和 3.0 cm) 的情况下，可通过增加离心管的直径对大量血液进行处理，以获取相同的分离效果。增加离心管直径并不影响所需的分离时间。

少量血液样品：少量血液可采用Bøyum (5) 所描述方法的改进方法进行快速地处理。

样品储存：应在采集后尽可能快地对血液样品进行处理，以确保能够获取最佳结果。据报道，室温下储存 24 小时可降低淋巴细胞的产量，表面标志表达的改变，以及降低对促细胞分裂激素 (6) 的应答。

病态血液样品：为纯化从正常、健康人供体中获取的外周血中分离出来的淋巴细胞，发展了上述标准方法。从受感染或有其他病理改变 (如癌症) 的供体身上采集的样品中，可能会得到不同的结果 (见第 13 页的“Ficoll-Paque PLUS 的进一步应用”)。

血小板去除：该标准方法中所描述的洗涤操作在多数情况下可有效地将淋巴细胞中混合的血小板去除。如果这样做有困难，在可能会采用在Ficoll-Paque PLUS之上的 4-20% 蔗糖梯度分层进行离心的方法来去除血小板 (7)。作为备选方案，也可在分离淋巴细胞前，通过与二磷酸 - 5' - 腺苷 (ADP) 发生凝集反应来去除血小板 (8)。

问题解决不完全履行

如按照推荐标准操作使用 Ficoll-Paque PLUS ,则预期可在无任何问题的情况下实现人外周血中的淋巴细胞分离,获得第 10 页中“ 实验室典型结果 ”下显示的结果。然而 ,某些实验参数的偏差可能会导致出现糟糕的结果 ,这里问题解决图表旨在帮助对导致增殖性能降低的问题进行快速鉴定和纠正。

表现偏差	问题的可能来源	注释
增加红细胞和对淋巴细胞的污染。	A. 温度太低。	在低温下, Ficoll-Paque PLUS 的密度较大, 红细胞凝集较少, 因此粒细胞和红细胞被阻止进入 Ficoll-Paque PLUS 层。应将温度增加到 18-20 °C。
	B. 离心速度太慢和 / 或离心时间太短。	必须采用适当的时间和地心引力 (g-force), 以确保非淋巴细胞完全沉淀。
淋巴细胞低产量和低活力。	温度太高。	在高温下, Ficoll-Paque PLUS 的密度较小, 一些淋巴细胞可能穿透 Ficoll-Paque PLUS 层。因此, 细胞成活力也必然会受到影响。应将温度降低到 18-20 °C。
正常活力的淋巴细胞产量低。	未用平衡盐溶液将血液稀释到 1:1 ; 通常情况下, 红细胞比容较高。	高细胞密度导致大量的淋巴细胞陷入红细胞团块中。应进一步稀释血液样品。
淋巴细胞低产量和粒细胞污染增加。	离心机转子振动, 导致梯度搅拌。	离心机转子振动可能导致淋巴细胞带的增宽, 与下层细胞混合。应检查转子是否已适当平衡。选择合适的转速, 以避免自发共振频率。
淋巴细胞低产量和其他细胞类型低活力及污染	样品含有非正常密度的细胞; 这些细胞的密度不同于那些来自正常人血液中细胞的密度。	可能遇到病态血液样品、非人血液样品, 或来自外周血之外的来源的样品。Percoll™ 是一用于密度梯度离心的介质, 可能比 Ficoll-Paque PLUS 更加适合此类分离。

采用 Ficoll-Paque PLUS 方法分离的淋巴细胞的特性

自从 1968 年引进后，Bøyum 所描述的淋巴细胞分离方法 (1,2) 已在很多免疫学研究中被使用。这种普遍使用说明采用此技术可获取最佳结果，同时也可避免损伤淋巴细胞的功能。尽管如此，也发现了分离操作所产生的一些效应，这些将在下面具体陈述，对于具有重要意义的效应，就可能引发对相关研究环境的研究。

据报道，采用 Ficoll-Paque PLUS 进行分离会导致嗜细胞 IgG 被单核白细胞所吸收 (9)，从而导致不正确地高估含 Ig 的淋巴细胞数量，和低估含 F_c 受体的细胞数量。该干扰可通过在分离前使用平衡盐溶液冲洗血细胞来避免，从而去除血浆中引起这些伪影的 IgG。

据报道，采用标准操作时，会发生与自体红细胞形成簇团的一定数量的淋巴细胞的选择性丢失 (10,11)，已证实，这是特殊淋巴细胞与红细胞互相作用的结果，并非一种非特异性俘获 (11)。据我们所知，该数量占血液样品中初始淋巴细胞的 6% 左右，可通过对介质中的红细胞团块进行重新悬浮并以稍高于正常情况 (如 :1.083 g/ml) 的浓度梯度进行重新离心处理后，几乎能定量的回收 (11)。

据报道 (12)，与在“富含白细胞的血浆”中的淋巴细胞 (未暴露于 Ficoll-Paque PLUS 中) 相比，采用 Bøyum 的操作方法分离的淋巴细胞在混合淋巴细胞培养中表现出加强的刺激。可能该加强的反应部分依赖于 Ficoll-Paque PLUS 方法中对混合淋巴细胞反应有抑制作用的白细胞的去除 (12)。另外，据报道，Ficoll-Paque PLUS 分离的淋巴细胞表现出一升高的“自发”母细胞化水平，通过将³H- 胸苷与未经促细胞分裂剂刺激的培养物混合来对其进行测量，但是未发现导致这种加强的原因 (13)。在一例报道 (14) 中，与采用离心冲洗方法制备的淋巴细胞相比，Ficoll-Paque PLUS 分离的淋巴细胞对植物血细胞凝集素 (PHA) 的促细胞分裂刺激的反应降低。

Ficoll-Paque PLUS 的进一步应用

自 1968 年 Bøyum 所描述的技术被引进以及其后续的广泛使用后，对该方法的大量修改和延伸也得到应用。举例来说，如有需要，单核细胞 (采用该小册子里的标准操作从淋巴细胞中回收而得) 可在 Ficoll-Paque PLUS 上进行分离前通过用铁 (或羟基铁) 培养血液样品被去除。单核细胞吞噬铁颗粒后，密度增高，结果它们通过 Ficoll-Paque PLUS 层在离心管底部的红细胞团块中离心和聚集 (3)。

原始技术一项重要且广泛应用的延伸就是通过与选择性簇团形成 (集聚) 联合后，它在淋巴细胞亚类分离中的应用。在最常用的情况中，使用标准操作 (有或无单核细胞去除) 所获得的纯化的淋巴细胞利用一过量的绵羊红细胞 (红细胞与淋巴细胞的比例至少为 50:1) 进行培养，此处，T 淋巴细胞与绵羊红细胞自发形成簇团。在 Ficoll-Paque PLUS 上进行再一次离心处理时，T 淋巴细胞簇团会和过量的红细胞一起沉淀到离心管底部，留下其他 (非簇团) 淋巴细胞在界面处 (3)。

用于淋巴细胞亚类分离的此类技术以及用于分离整个淋巴细胞数的标准方法已经广泛应用于与正常对照组对比时疾病状态下的淋巴细胞功能和表面标志的研究。对于此类对比研究来说，淋巴细胞的纯化方法不引起任何特殊淋巴细胞亚类的择优富集或丢失，这一点是相当重要的。虽然在早期工作中并未认识到存在 Hokland 和 Heron (10) 所描述的可自体形成团块的淋巴细胞小亚型，但 Häyry *et al.* (15) 已经对关于标准 Ficoll-Paque PLUS 操作可以避免此类变形的证据作了陈述。然而，在将 Ficoll-Paque PLUS 技术应用于病态血液样品时，谨慎对待是必要的，因为，据发现，所获取的淋巴细胞层可受到有某种感染病人 (16) 尤其是癌症病人 (17, 18) 的未成熟粒细胞的污染。在后一情况下，也可能出现单核细胞数量的增多 (19)。然而，在一有关再生障碍性贫血或急性白血病免疫受损患者的研究中，淋巴细胞的分离在正常情况下采用 Ficoll-Paque PLUS 并得到结果，且在联合通过葡聚糖沉淀来纯化红细胞团块中的粒细胞的情况下，可引起血液样品中的病毒回收率的大幅度增加 (20)。

Ficoll-Paque PLUS 已被用于成功地分离非外周血之外的各种来源的细胞，并对血淋巴细胞分离作了专门的优化。因此，使异常体液或胸水中的癌细胞的检测和鉴定更易实现的基于 Ficoll-Paque PLUS 上的分离可通过使用不同密度的 Ficoll-Paque PLUS 的混合物，而非单一密度 (1.077 g/ml) (22, 23) 的 Ficoll-Paque PLUS，来进行实施。据报道，基于 Ficoll-Paque PLUS 上的分离也可辅助建立对羊水细胞的培养，并使其随后的细胞形成分析更加容易 (24)。

Ficoll-Paque PLUS 也被用于分离除人类之外的其他种属的淋巴细胞。在一些情况下 (如：牛、羊、兔)，改变标准操作以取得好的结果可能是必要的 (3)，应记住，虽然已针对人淋巴细胞的分离对 Ficoll-Paque PLUS 浓度进行了优化，但 Ficoll-Paque PLUS 浓度在用于其他种属的淋巴细胞分离时可能无法获得淋巴细胞的最佳产量和纯度。然而，采用标准浓度的 Ficoll-Paque PLUS 的分离方法在鼠 (25)、狗 (26)、猴 (27)、牛 (28, 29)、兔 (30)、马 (31)、猪 (31, 32)，甚至鱼 (33) 淋巴细胞分离上的应用已有相关描述。在任何需要使用到不同浓度而非 1.077 g/ml 浓度的溶液的地方，使用作为替代品的离心介质 Percoll (如有需要，描述了 Percoll 密度梯度介质的方法和应用的手册都是可得的) 可能都是非常便利的，因为不同密度的等渗溶液在该介质中非常容易制备，从而使对特殊分离的优化更易实现。据报道，采用 Percoll 的分离在一些情况 (34-36) 下可获取已经改善的淋巴细胞产量和纯度。

可用性和储存

Ficoll-Paque PLUS 可得的包装尺寸有两种：6 × 100 ml (代码编号：17-1440-02) 和 6 × 500 ml (代码编号：17-1440-03)。Ficoll-Paque PLUS 为一无菌的可用液体，采用玻璃瓶和橡胶隔片外盖封装。使用的完整说明已包含于每一包装中。Ficoll-Paque PLUS 应避光储存于 4-30 °C 之间，在该条件下，它可保持 3 年的无菌状态和稳定性。储存于阴冷的地方可延长其储存期。不建议对该产品冷冻储存，但如果只是偶尔冷冻储存，则解冻后，应反复几次来回倒置玻璃瓶，以确保瓶中液体为均一溶液。

符合 ISO 13485:2003 和(GMP) 的 Ficoll-Paque PREMIUM

Ficoll-Paque PREMIUM 是一密度梯度介质*，用于人单核细胞的制备。它是从Ficoll-Paque PLUS 的基础上发展而来，在同时使用 Bøyum (1) 发展的一简单快速的离心技术的情况下，可实现人外周血中大量和小量单核细胞的纯化。

Ficoll-Paque PREMIUM 与 Ficoll-Paque PLUS 的不同之处在于，它是在符合 ISO 13485:2003 和 (GMP) (37) 的受严格控制的环境下且按照美国药典 (USP) (38) 关于细胞治疗产品生产的建议进行生产的。ISO 13485:2003 和(GMP) 的依从性要求严格执行对生产规程的验证和资料文档化。



Ficoll-Paque PREMIUM 可提供如下益处：

按照 GMP 和 ISO 标准进行生产。

按照美国药典 (USP) <1043> 中关于辅助材料的建议进行生产。

无菌，即用型的试剂。

内毒素水平较低 (< 0.12 EU/ml)。

检测渗透压。

* 仅体外使用。

应用

针对人外周血中的单核细胞分离，已对 Ficoll-Paque PREMIUM 进行了优化。另外，该介质适用于来自其他来源包括脐带血和骨髓的人单个核细胞的分离。推荐实验设计中对正常人外周血的分离主要会制备得到如下的单个核细胞：

分离组分中 $95 \pm 5\%$ 的细胞为单个核细胞。

分离细胞的活力为：90%。

原血液样品中单个核细胞回收率为： $60 \pm 20\%$ 。

$3 \pm 2\%$ 粒细胞。

$5 \pm 2\%$ 红细胞。

原血液样品中总血小板含量 < 0.5%。

规格

Ficoll-Paque PREMIUM 由 Ficoll PM400 和密度为 1.077 g/ml 的泛影酸钠混合物组成，针对人外周血中的单个核细胞分离，已对其进行了优化。Ficoll-Paque PREMIUM 为无菌产品，在建议储存条件下，其稳定性可保持 3 年。

密度： 1.077 + 0.001 g/ml

稳定性： 避光储存于 4-30 °C，其稳定性可保持 3 年

内毒素： 含量 < 0.12 EU/ml

渗透压： 288-310 mOsm/kg

完整的使用说明已经包含于每一包装中。

可用性和储存

Ficoll-Paque PREMIUM 可得的包装尺寸有两种：6 × 100 ml 和 6 × 500 ml，Ficoll-Paque PREMIUM 为一无菌的即用液体，采用玻璃瓶和橡胶隔片外盖封装。

Ficoll-Paque PREMIUM 应避光储存于 4-30 °C 之间，在该条件下，它可保持 3 年的无菌状态和稳定性。储存于阴冷的地方可延长其储存期。不建议对该产品冷冻储存，但如果只是偶尔冷冻储存，则解冻后，应反复几次来回倒置玻璃瓶，以确保瓶中液体为均一溶液。

参考

1. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). Bøyum, A. *Scand J Clin Lab Invest 21 Suppl*, **97**, 77-89 (1968).
2. Isolation of leucocytes from human blood - further observations. (Paper II). Bøyum, A. *Scand J Clin Lab Invest 21 Suppl*, **97**, 31-50 (1968).
3. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Bøyum, A. *Scand J Immunol 5 Suppl*, **5**, 9-15 (1976).
4. Gel formation with leucocytes and heparin. Almeida, A.P., Beaven, M.A. *Life Sci*, **26**, 549-555 (1980).
5. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. Harris, R., Ukaejiofo, E.O. *Brit J Haematol*, **18**, 229-235 (1970).
6. Altered lymphocyte markers and blastogenic responses associated with 24 hour delay in processing of blood samples. Kaplan, J., Nolan, D., Ree, A. *J Immunol Methods*, **50**, 187-191 (1982).
7. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. Perper, R.J., Zee, T.W., Mickelson, M.M. *J Lab Clin Med*, **72**, 842-848 (1968).
8. Platelet aggregation technique used in the preparation of lymphocyte suspensions. Vives, J., Parra, M., Castillo, R. *Tissue Antigens*, **1**, 276-278 (1971).
9. Quantitation of F_c receptors and surface immunoglobulin is affected by cell isolation procedures using Plasmagel and Ficoll-Hypaque. Alexander, E.L., Titus, J.A., Sega, D.M. *J Immunol Methods*, **22**, 263-272 (1978).
10. Analysis of the lymphocyte distribution during Isopaque-Ficoll isolation of mononuclear cells from human peripheral blood. Hokland, P., Heron, I. *J Immunol Methods*, **32**, 31-39 (1980).
11. The Isopaque-Ficoll method re-evaluated: Selective loss of autologous rosette-forming lymphocytes during isolation of mononuclear cells from human peripheral blood. Hokland, P., Heron, I. *Scand J Immunol*, **11**, 353-356 (1980).
12. Reactivity in mixed cultures of mononuclear leucocytes separated on Ficoll-Hypaque. Bain, B., Pshyk, K. *Proceedings 7th Leucocyte Culture Conference* (Ed. Daguillard, F.) *Academic Press*, New York, 29-37 (1973).
13. Effect of Ficoll-Hypaque separation on activation and DNA synthesis of human blood lymphocytes. Farnes, P., Barker, B.E. In: *Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation*, (Ed. Lucas, D.O.) *Academic Press*, New York, 368-370 (1977).
14. Comparison of lymphocyte function after isolation by Ficoll-Hypaque flotation or elutriation. Berger, C.L., Edelson, R.L. *J Invest Dermatol*, **73**, 231-235 (1979).
15. Lack of subclass selection during density purification of human lymphocytes. Häyry, P., Tötterman, T.H., Ranki, A. *Clin Exp Immunol*, **28**, 341-346 (1977).
16. Special requirements for isolation of purified lymphocyte populations in infected patients. Dougherty, P.A., Balch, C.M. *Fed Proc*, **40**, 1120 (1981).
17. Changes in Ficoll-Hypaque gradients with advancing stage of lung cancer. Check, I.J., Hunter, R.L. *Fed Proc*, **38**, 1224 (1979).

18. Contamination of mononuclear cell suspensions obtained from cancer patients by the Bøyum method. Currie, G.A., Hedley, D.W., Nyholm, R.E., *et al. Brit J Cancer*, **38**, 555-556 (1978).
19. Non-lymphoid cells obtained by the Bøyum technique and their significance in cancer patients. Kluin-Nelemans, J.C., van Helden, H.P.T. *J Clin Lab Immunol*, **4**, 99-102 (1980).
20. Comparison of rates of virus isolation from leukocyte populations separated from blood by conventional and Ficoll-Paque/Macrodex methods. Howell, C.L., Miller, M.J., Martin, W.J. *J Clin Microbiol*, **10**, 533-537 (1979).
21. Gradient separation of normal and malignant cells. II. Application to *in vivo* tumour diagnosis. Minami, R., Yokota, S., Teplitz, R.L. *Acta Cytol*, **22**, 584-588 (1978).
22. A quick method for concentration and processing cancer cells from serous fluids and fine-needle nodule aspirates. Elequin, F.T., Muggia, F.M., Ghossein, N.A., *et al. Acta Cytol*, **21**, 596-599 (1977).
23. The comparative diagnostic accuracy of cancer-cell detection obtained with Ficoll-Hypaque gradient separation and standard centrifugation technics on body-cavity fluids. Katz, R.L., Lukeman, J.M. *Amer J Clin Pathol*, **74**, 18-24 (1980).
24. Enhancement of human amniotic cell growth by Ficoll-Paque gradient fractionation. Chang, H.-C., Jones, O.W., Bradshaw, C., *et al. In Vitro*. **17**, 81-90 (1981).
25. A simple method for the isolation of murine peripheral blood lymphocytes. Chi, D.S., Harris, N.S. *J Immunol Methods*, **19**, 169-172 (1978).
26. Isolation of various canine leucocytes and their characterization by surface marker analysis. Ho, C.K., Babiuk, L.A. *Immunol*, **35**, 733-740 (1978).
27. Lymphocyte isolation, rosette formation, and mitogen stimulation in rhesus monkeys. Taylor, D.W., Marchette, N.J., Siddiqui, W.A. *Develop Comp Immunol*, **2**, 539-546 (1978).
28. The bovine lymphoid system: Binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. Pearson, T.W., Roelants, G.E., Lundin, L.B., *et al. J Immunol Methods*, **26**, 271-282 (1979).
29. Acid -naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. Yang, T.J., Jantzen, P.A., Williams, L.F. *Immunol*, **38**, 85-93 (1979).
30. Humoral and formed elements of blood modulate the response of peripheral blood monocytes. I. Plasma and serum inhibit and platelets enhance monocyte adherence. Musson, R.A., Henson, P.M. *J Immunol*, **122**, 2026-2031 (1979).
31. Comparative study of six methods for lymphocyte isolation from several mammalian sources and determination of their carbohydrate composition. Hueso, P., Rocha, M. (Article in Spanish) *Rev Esp Fisiol*, **34**, 339-344 (1978).
32. Separation of porcine blood cells by means of Ficoll-Paque. Wittman, G. (Article in German) *Zbl Vet Med B*, **27**, 253-256 (1980).
33. A comparison of the methods used for the separation of fish lymphocytes. Blaxhall, P.C. *J Fish Biol*, **18**, 177-181 (1981).
34. Separation of human peripheral blood monocytes on continuous density gradients of Polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). Brandslund, I., Møller-Rasmussen, J., Fisker, D., *et al. J Immunol Methods*, **48**, 199-211 (1982).

35. Efficient separation of human T lymphocytes from venous blood using PVP-coated colloidal silica particles (Percoll). Feucht, H.E., Hadam, M.R., Frank, F., *et al.* *J Immunol Methods*, **38**, 43-51 (1980).
36. An improved technique for the isolation of lymphocytes from small volumes of peripheral mouse blood. Mizobe, F., Martial, E., Colby-Germinario, S., *et al.* *J Immunol Methods*, **48**, 269-279 (1982).
37. EC Guide to GMP (Good Manufacturing Practice), annex 1 "Manufacture of Sterile Medicinal Products.
38. United States Pharmacopeia. *Recommendations for ancillary materials*, chapter <1043>.

订购信息

从通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 选购的用于细胞科学研究的产品

Product		Quantity	Code no.
Ficoll-Paque PREMIUM	A density gradient medium manufactured in a GMP-compliant environment and certified to ISO 13485 standard; intended for the preparation of stem cells from blood and bone marrow for clinical applications.	6 × 100 ml	17-5442-02
		6 × 500 ml	17-5442-03
Ficoll-Paque PLUS	A density gradient medium for <i>in vitro</i> isolation of lymphocytes from whole human peripheral blood.	6 × 100 ml	17-1440-02
		6 × 500 ml	17-1440-03
Ficoll PM400	A hydrophilic polymer of high molecular weight for density gradient centrifugation.	100 g	17-0300-10
		500 g	17-0300-50
Percoll	A density gradient centrifugation medium for the isolation of cells, subcellular particles, and viruses.	250 ml	17-0891-02
		1 l	17-0891-01
Percoll PLUS	A silane-coated, silica-based medium for the isolation of various cell types for clinical research applications.	250 ml	17-5445-02
		1 l	17-5445-01
Density Marker Beads	Small colored beads of accurately known densities, for calibration of density gradients of Percoll and Percoll PLUS.	10 vials	17-0459-01
Protein A Sepharose 6MB	For separation of cells by affinity chromatography.	10 ml	17-0469-01
CNBr Activated Sepharose 6MB	For separation of cells by affinity.	15 g	17-0820-01
Cytodex™ 1	Microcarriers for cell culture.	25 g	17-0448-01
Cytodex 3	Microcarriers for cell culture.	10 g	17-0485-01

以上这些产品和其他产品可见于通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 的生命科学类产品和个别技术手册中，如有需要免费提供。

白页

白页

通用电气 (中国) 医疗集团

网址 : www.gelifesciences.com.cn

邮箱 : lifesciences@ge.com

免费咨询热线 : 800-810-9118

详情请与通用电气 (中国) 医疗集团各办事处联系 :

香港办事处

香港九龙旺角亚皆老街 8 号

朗豪坊办公大楼 12 楼

电话 : (852) 2100 6314

传真 : (852) 2100 6338

北京办事处

北京市经济技术开发区

永昌北路 1 号

电话 : (010) 5806 9403

传真 : (010) 6787 1162

邮编 : 100176

上海办事处

上海市浦东新区张江高科技园区

华佗路 1 号

电话 : (021) 3877-7888

传真 : (021) 3877-7449

邮编 : 201203

成都办事处

成都市新华大道文武路 42 号

新时代广场 12 层 A-C 单元

电话 : (028) 8678 2581

传真 : (028) 8678 2582

邮编 : 610017

广州办事处

广州市建设六马路 33 号

宜安广场 1212 室

电话 : (020) 8363 3828-67961, 67956

传真 : (020) 8363 4302

邮编 : 510060

通用电气(中国)医疗集团有权在任何时候,在不另行通知的情况下,不负有任何义务地改变上述规格和性能,并有权终止该产品的供应。如需要最新信息请与通用电气(中国)医疗集团在国内的销售代表联系。



GE imagination at work