

AO/PI 双荧光分析测定 PBMC 的浓度和活率

简介

通常使用密度梯度离心法从全血中分离出外周血单个核细胞（PBMC）。PBMCs 由淋巴细胞（T 细胞，B 细胞，NK 细胞）和单核细胞组成，常用于免疫学、细胞治疗、传染病和疫苗开发领域。监测和分析 PBMC 的活率和浓度对临床实验室、基础医学科学研究和免疫细胞制备至关重要。

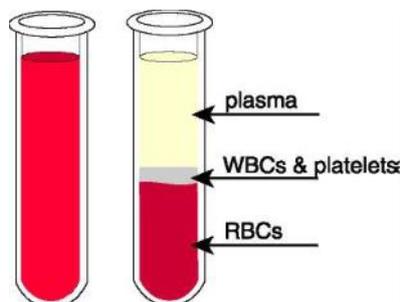


图 1 密度梯度离心法从新鲜血液分离出 PBMC

AO/PI 双荧光计数法用来检测细胞浓度和活率。细胞染色液由吖啶橙（绿色荧光核酸染料）和碘化丙啶（红色荧光核酸染料）混合而成。碘化丙啶（PI）不具有膜透过性，只能进入细胞膜受损的细胞，而吖啶橙能够穿过所有的细胞群体。当两种染料同时存在于细胞核中，碘化丙啶能够通过荧光共振能量转移（FRET）引起吖啶橙荧光的减少。因此，在 Countstar® FL 系统中，具有完整细胞膜的有核细胞染绿色荧光并被计为活细胞，而有受损细胞膜的有核细胞仅染红色荧光并被计为死细胞。红细胞、血小板和碎片等无核物质不发荧光并被 Countstar® Rigel 系统忽略。

实验步骤

1. 用 PBS 将 PBMC 样品稀释成 5 种不同浓度；
2. 将 12 μ L AO/PI 染色液加入到 12 μ L 样品中，用移液器轻轻混合；
3. 将 20 μ L 混合物吸入细胞计数板；
4. 让细胞在计数板上静置约 1 分钟；
5. 将计数板放入 Countstar® FL 仪器；
6. 选择“AO/PI 活率”测定，然后由 Countstar® FL 进行测试。

警告：AO 和 PI 是潜在的致癌物。建议操作人员佩戴个人防护装备（PPE），以避免直接接触皮肤和眼睛。

结果

1、PBMC 的明场和荧光图像

AO 和 PI 染料都能对细胞核中的 DNA 染色。因此，血小板、红细胞或细胞碎片的存在不会影响 PBMCs 的浓度和活率结果。活细胞、死细胞和细胞碎片很容易在 Countstar® FL 拍摄的图像中被区别出（图 2）。

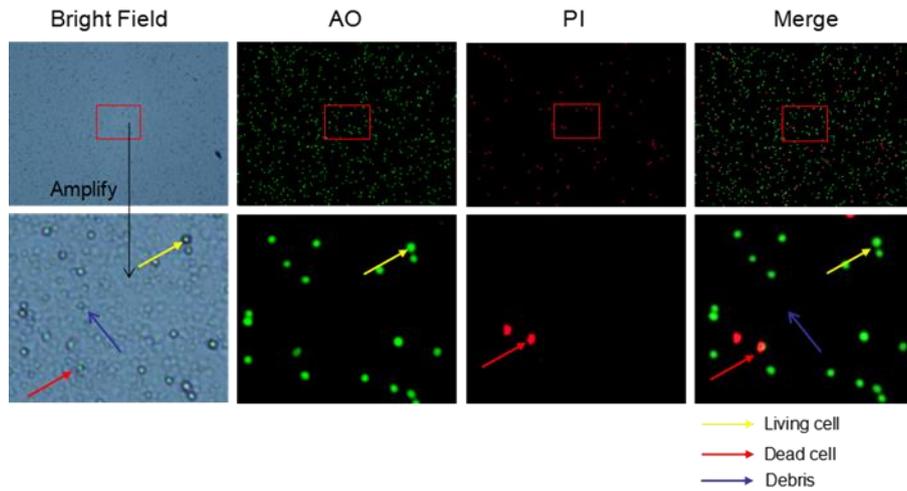


图 2 PBMC 的明场和荧光图像

2、PBMC 的浓度和活率

PBMC 样品分别用 PBS 进行 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍稀释，然后将这些样品与 AO/PI 染色液混合孵育并通过 Countstar® FL 进行分析。PBMC 的浓度和活率结果如下图所示：

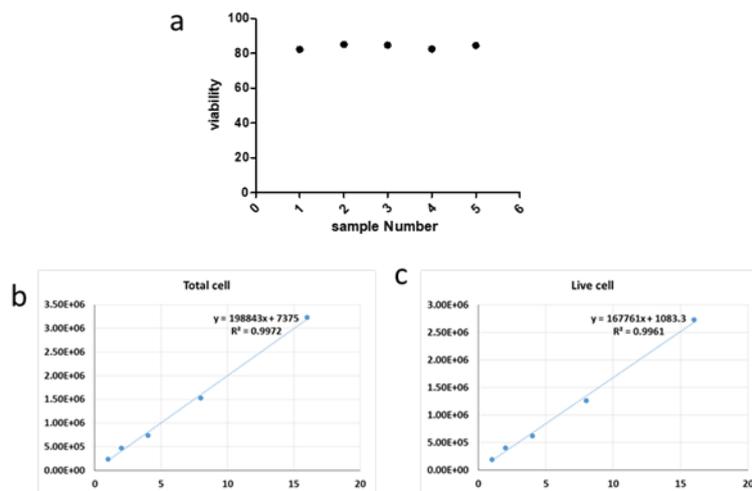


图 3 5 个不同 PBMC 样品的浓度和活率。(a) 不同样本的活率分布图。(b) 不同样本之间总细胞浓度的线性关系。(c) 不同样本之间活细胞浓度的线性关系。