

双荧光法细胞活率计数与台盼蓝方法细胞计数的区别

01 传统台盼蓝计数原理

台盼蓝是组织和细胞培养中最常用的死细胞鉴定染色方法之一。活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色。

机理：正常的活细胞，胞膜结构完整，能够排斥台盼蓝，使之不能够进入胞内；而丧失活性或细胞膜不完整的细胞，胞膜的通透性增加，可被台盼蓝染成蓝色。通常认为细胞膜完整性丧失，即可认为细胞已经死亡。因此，借助台盼蓝染色可以非常简便、快速地区分活细胞和死细胞。

Example:

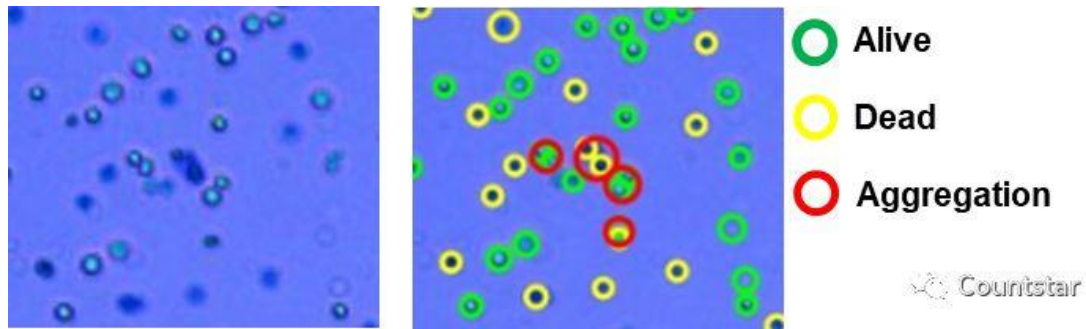
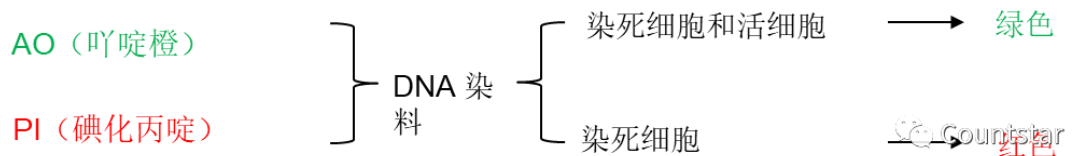


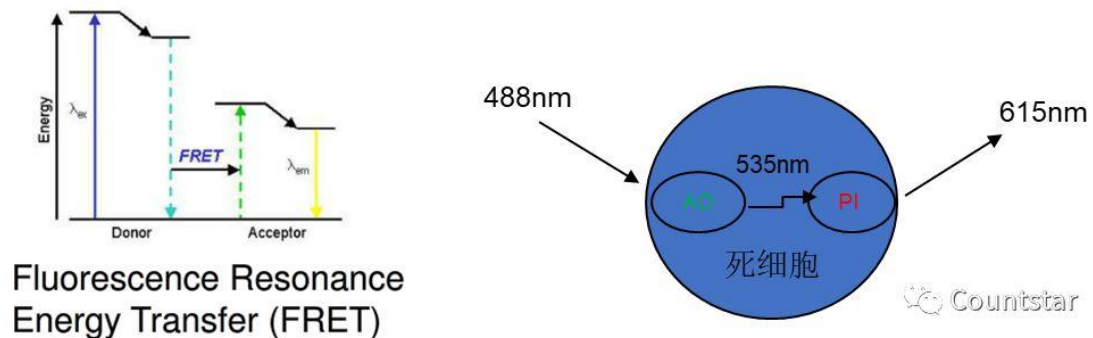
Figure1 Countstar Altair 细胞计数仪区分死活细胞图片

02 双荧光 AO/PI 细胞活率计数法

AO/PI 试剂由可以发出绿色荧光的 DNA 结合染料吖啶橙 (Acridine Orange, 简称 AO) 和可以发出红色荧光的 DNA 结合染料碘化丙啶 (Propidium iodide, 简称 PI) 组成。其中 AO 可以通过完整的细胞膜，嵌入所有细胞 (活细胞和死细胞) 的细胞核，呈现绿色荧光；PI 只能通过不完整的细胞膜，即死细胞的细胞膜，嵌入所有死细胞的细胞核，呈现红色荧光。



当两种染料均存在于细胞核内，在合适的 AO、PI 配比下，两种染料发生能量共振转移，死细胞在绿色通道下 (EX:525/30, EM:600LP) 激发出红色荧光。由于 AO 和 PI 为 DNA 结合染料，因此可有效排除杂质以及红细胞的干扰，确保对样品进行准确计数。



Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Example:

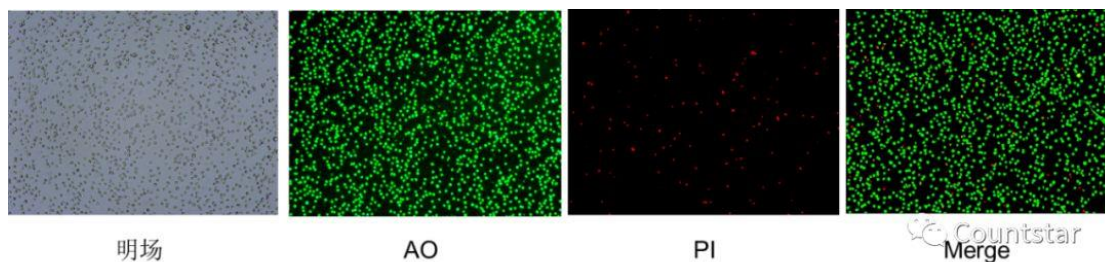


Figure2 Countstar Rigel AO/PI 细胞计数图片

03 不同行业中台盼蓝细胞计数存在的问题

1) 原代细胞样本计数

台盼蓝计数：PBMC 分离后，需要进行分离效果的测试，指标有浓度，活率，这些指标用于指导下一步的实验操作。但目前梯度离心分离过程中，会有红细胞的残留，而红细胞的大小与 PBMC 接近，且台盼蓝拒染，也就是传统的台盼蓝方法不能分辨红细胞与活的 PBMC，造成浓度与活率的差异（见 Figure3 中的图片）

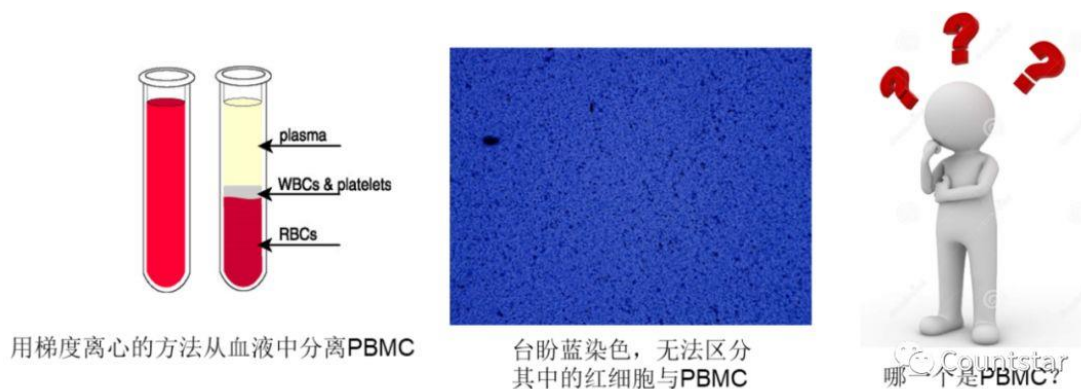


Figure3

2) 培养后期的细胞活率计数

CHO 细胞在发酵后期，会有很多细胞碎片和杂质产生，台盼蓝染色无法进行准确的活率，浓度计数（见 Figure4 中的图片）。浓度，活率指标对于发酵终点的确定是重要的参考依据。

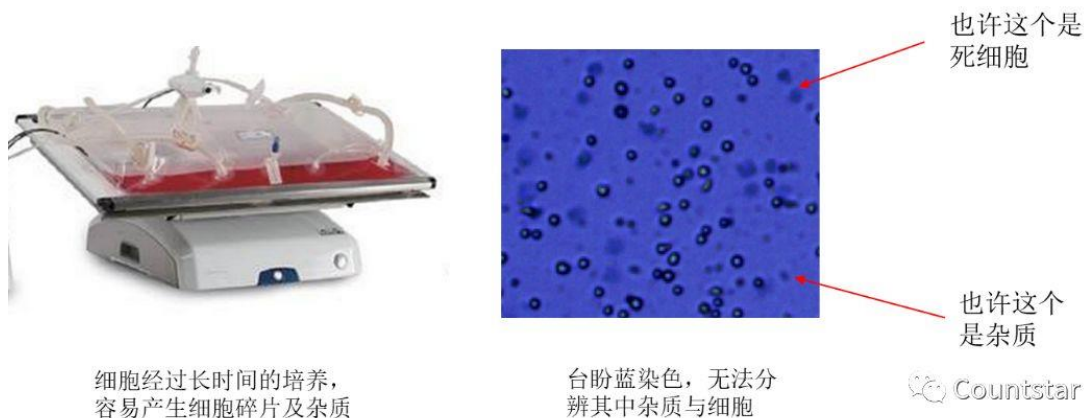


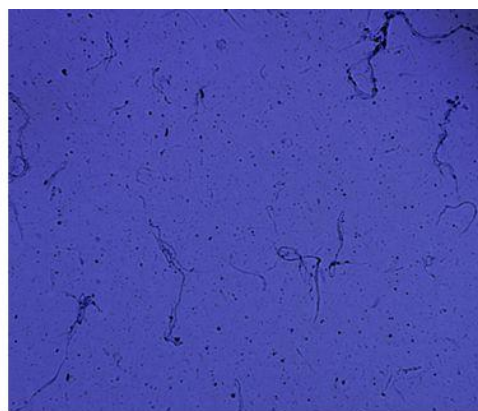
Figure4

3) 干细胞领域

原代间充质干细胞在分离的时候，会有大量的杂质产生，造成对目标细胞分析的干扰（见 Figure5 中的图片）。但原代细胞分离效果的确对于后面实验至关重要，有些分离效果很差或者未分离到间充质干细胞的样本，需要做不同的处理策略。



间充质干细胞分离，含有大量的杂质干扰



台盼蓝染色，无法分辨其中杂质与细胞

Figure5

04 AO/PI 计数解决台盼蓝计数的痛点

1) AO/PI 双荧光方法对 PBMC 细胞计数

Countstar 优化的双荧光染色方法，可以简单，准确地测定 PBMC 浓度和活力。用 AO/PI 染色的样品可用 Countstar Rigel 分析，Countstar Rigel 使用预先优化设置对 PBMC 进行浓度活率分析。AO/PI 方法可以精准区分死细胞和活细胞，并且能排除无核细胞的干扰。

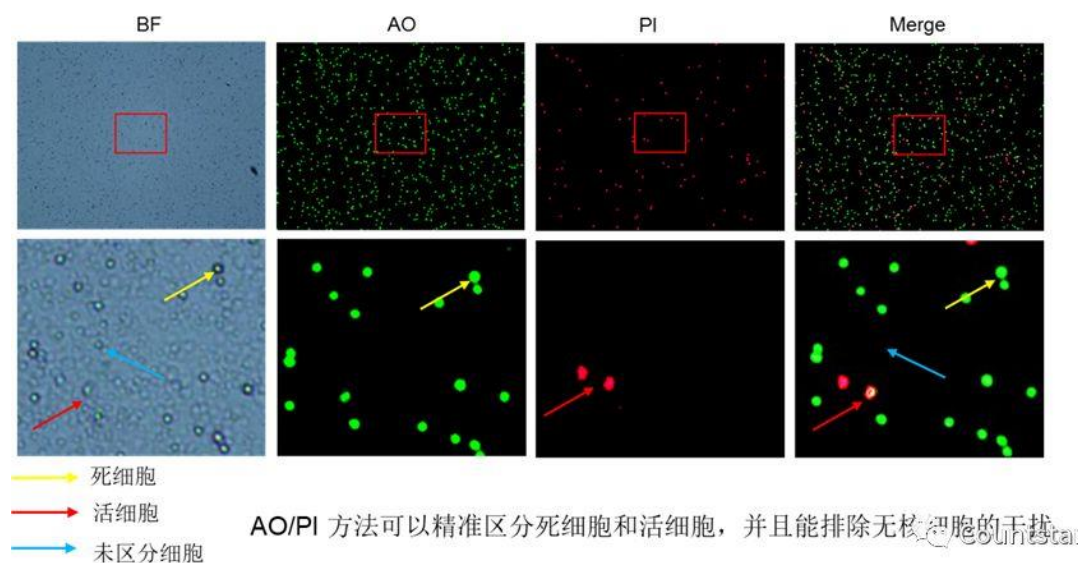


Figure6 Countstar Rigel 对 PBMC 进行细胞活率计数分析

2) 分析新鲜临床样品中的 TNC 活率

由于新鲜的临床样品含有非常高百分比的血小板和红血细胞，在明场下 TNC 很难被区分出来。在一些实验室中，样品被裂解用于 TNC 分析，但不能确定细胞活力。AO/PI 双荧光方法在无需裂解红细胞的情况下可轻松测量新鲜临床样品如骨髓，脐带血和外周血中的 TNC 浓度和活力。

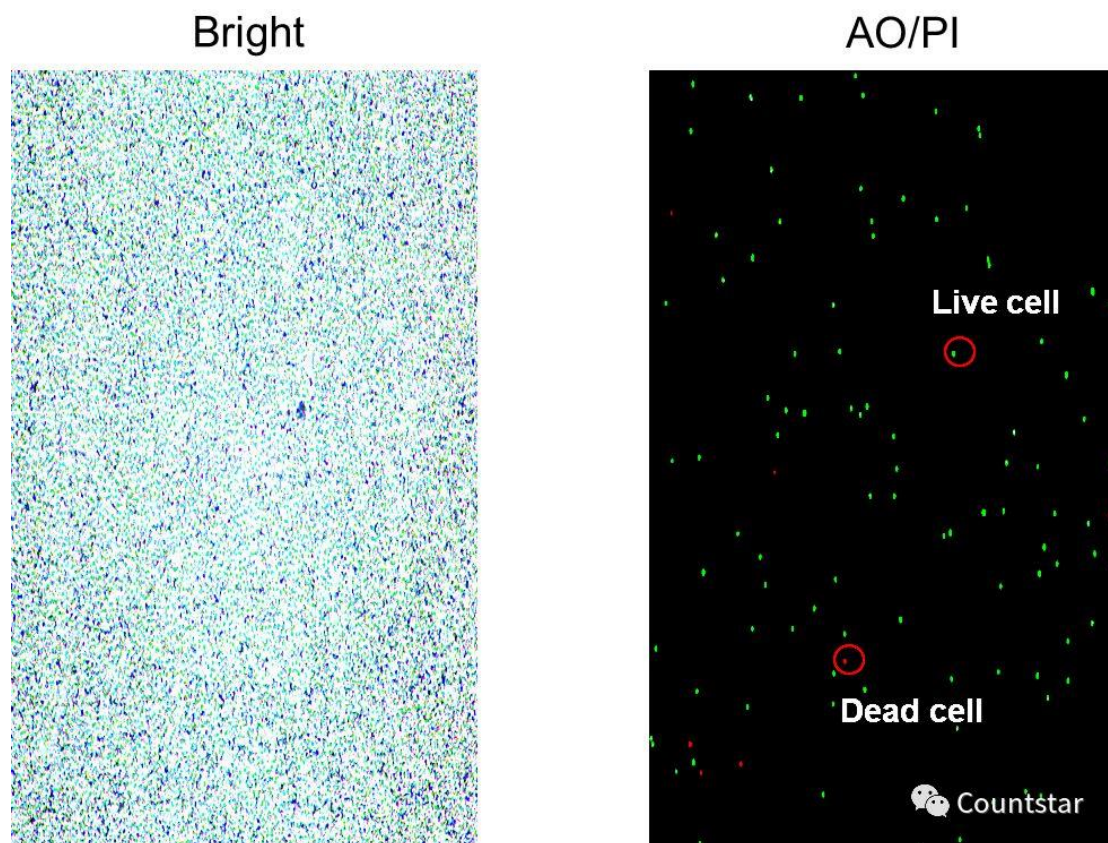
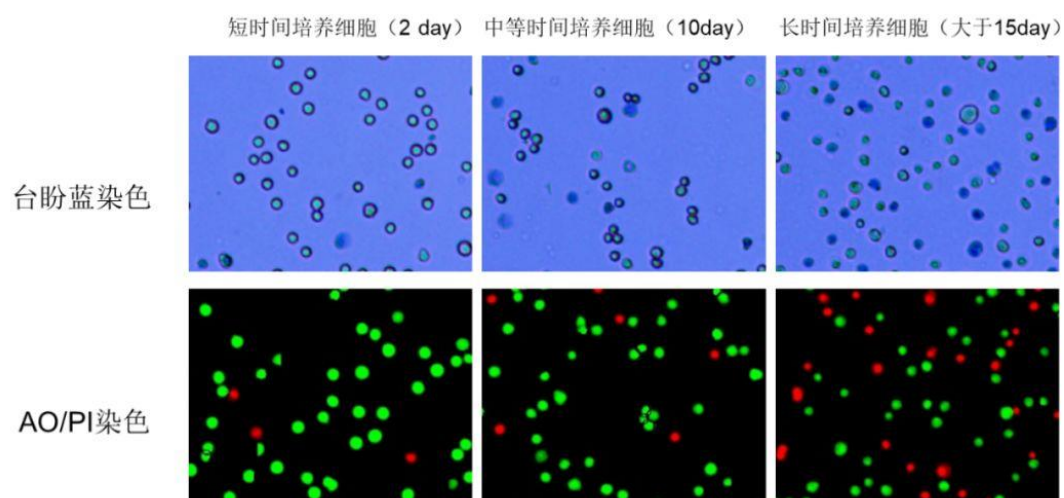


Figure7 Countstar Rigel 对未裂红的样机进行计数

3) AO/PI 方法对不同发酵时期的 CHO 细胞进行计数

AO/PI 染色可对不同状态下的细胞进行清晰准确的死活计数。AO/PI 特异性染色，同时具有极好的信噪比，可实现对细胞死活的准确区分，不再存在模棱两可的细胞。



AO/PI染色可对不同状态下的细胞进行清晰准确的死活计数

小结

目前台盼蓝计数还是市场上主流的细胞计数方法。但在细胞治疗行业，需要测量原代细胞已经冻存复苏的细胞，台盼蓝的技术原理已经不能满足其需求，双荧光 AO/PI 计数的方法变得越来越普及。

2018年9月，美国药典（USP-NF）出台了关于细胞冷冻保存的政策，文中明确提出，对于冻存复苏的样本，类似于台盼蓝的染料来检测细胞完整性的方法用的越来越少，因为其不能很好的辨别冻存和复苏的细胞，这种检测方法经常需要特定细胞种类并且指定合适的浓度和时间。当下荧光染料越来越多的应用于复苏细胞的浓度活率检测。USP-NF 建议至少选用两种方法对复苏后的细胞进行活率检测。详情请参考《USP General Chapter <1044> Cryopreservation of Cells》

（PS：仅限于研究用途，不可用于诊断操作）