

## 红细胞残留的 PBMC 精确计数和活性分析

### 一、 PBMC 精确计数和活性分析的重要性

外周血单个核细胞 (PBMC) 在免疫学、传染病、肿瘤学、干细胞移植、恶性血液肿瘤以及疫苗开发等领域被广泛的研究, 尤其是在免疫学领域, PBMC 细胞被用来监测在不同患者之间的免疫功能, 其监测浓度、活力、增值、细胞因子的功能, 对于临床试验和细胞医学研究都是至关重要的。

PBMC 通常从分离于全血或者采集于病人的脐带血, 这个过程就需要使用淋巴细胞分离液从血浆, 血小板, 和红细胞 (RBC) 中分离 PBMC。分离之后, 冷冻保存之前或者各种免疫分析都需要进行常规的活性和浓度测验来验证样品的质量。

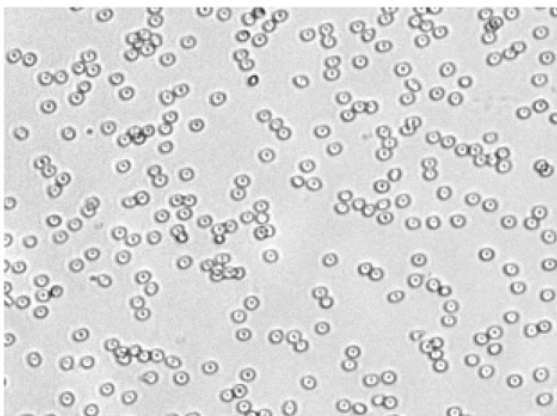
其中一个重要的问题就是 PBMC 细胞分离中红细胞的污染, PBMC 样品中红细胞的污染会导致测量浓度和活性的误差, 这就需要通过进一步的实验来分析这些细胞, 要解决这个问题, 可以用 RBC 溶解来消除潜在的 RBC 污染导致的问题。

### 二、 消除红细胞导致的计数误差的方法

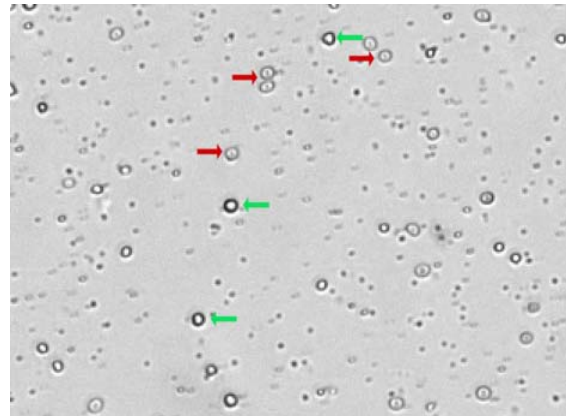
#### 1、新鲜的人类 PBMC 样品残留 RBC 的鉴定

用 Cellometer Vision 细胞计数仪明场图像计数 15 个分离的新鲜白细胞样品, 独特的光学系统使得红细胞的双凹面可视化, 因此 PBMC 和 RBC 被视觉化然后图像计数。因此 PBMC 和 RBC 可以被视觉识别, 然后根据图像计数。

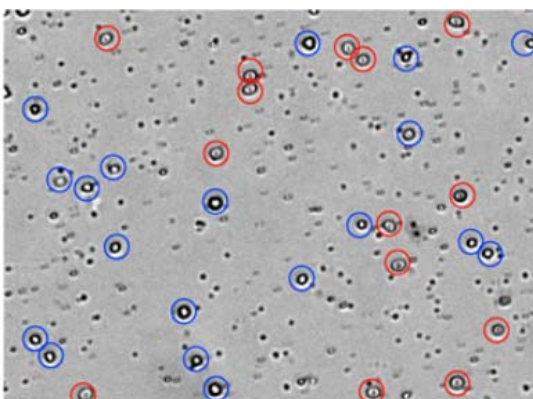
下图显示的是明场计数的 PBMC 样品, 红色圈圈出双凹面的红细胞, 蓝色圈圈出 PBMC



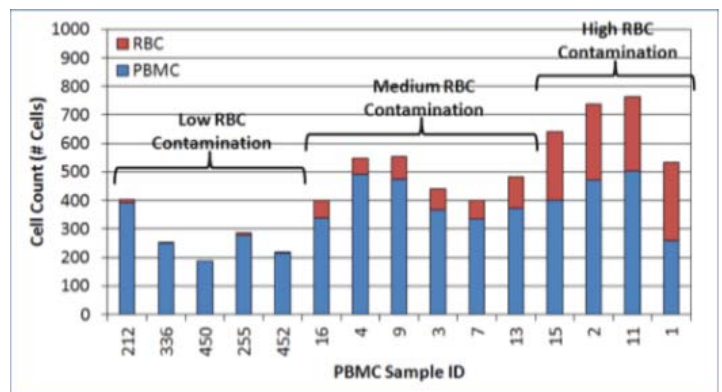
VISION CBA 调焦, 红细胞双凹面结构明场图像



荧光染料染 PBMC 确认, 红箭头为双凹的红细胞, 绿箭头为 PBMC



红色圈圈出红细胞, 蓝色圈圈出 PBMC



RBC 的污染程度用公式计算: 污染率%=RBC 计数/总计数×100%

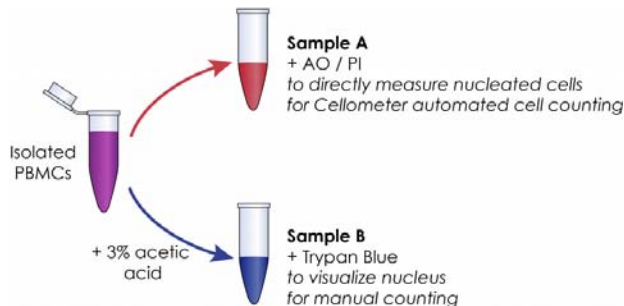
结果显示 4 个样品高度污染 (超过 30%), 6 个样品中度污染 (介于 10%-30%), 4 个样品低轻度污染 (低于 10%)。

## 2、AO/PI 双染活/死细胞进行自动计数

AO 和 PI 是荧光核酸染料，检测细胞的活性。AO 是一种细胞膜透过性染料，染总细胞，发绿色荧光；PI 不具有细胞膜通透性，染死细胞，发橙/红色荧光。当死细胞同时包含了 AO 和 PI，发生荧光共振能量转移，AO 发散的荧光被 PI 吸收，因此，只有活细胞才发绿色荧光。此外，成熟的血小板和红细胞是无核的，不能被荧光染料着色，完全排除。AO/PI 混合液 20ul 和白细胞样品 20ul，按照 1: 1 的比例混合，通过 Cellometer 细胞计数仪计数 PBMC 浓度。

## 3、通过 AO/PI 检测 PBMC 细胞活力

为了验证 AO/PI 双染法精确计数总 PBMC，从全血中分离了 5 个新鲜的白细胞样品，3%的醋酸溶解，然后台盼蓝染色人工计数对比 AO/PI 双染法



样品 A: 加 AO/PI，然后直接通过 Cellometer 双荧光细胞计数仪进行自动计数

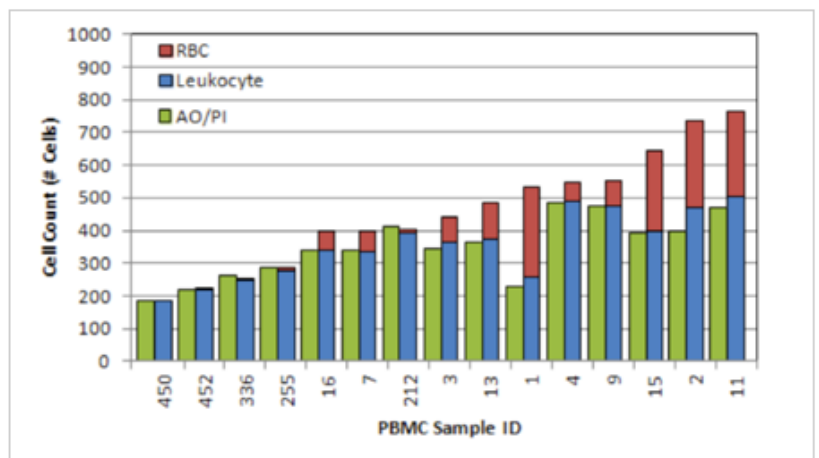
样品 B: 3%的醋酸裂解红细胞，然后台盼蓝染色，计数。

两种方法对比，结果显示，AO/PI 双染法能够不用裂解 RBC 进行总 PBMC 计数和活力分析。

## 4、AO/PI 双染色法排除 RBC 污染导致的计数误差

使用血球计数板手工计数和 AO/PI 双染自动计数两种方法，进行 15 个 PBMC 样品的计数。其中手工计数的操作者为经验丰富的计数方面专家，可以凭丰富的经验及不断微调显微镜焦距区分出红细胞和 PBMC。

如右图所示，手工计数法为蓝色柱条，AO/PI 双染自动计数法为绿色柱条。AO/PI 双染法没有受到高度 RBC 污染的影响，可以精确计数 PBMC。而手工计数需要靠经验丰富的操作者一个一个的判断红细胞和 PBMC。此结果显示 AO/PI 双染自动计数和经验丰富的操作者进行的手工计数计数 PBMC 的结果一致。同时，15 个样本中分离的结果差异很大，不同人尤其不同病人分离后红细胞 RBC 污染的差异大。



## 三、 结语

RBC 污染极大的影响 PBMC 样品的浓度和活性的精确性，RBC 污染的程度在不同病人之间有差异，标准的 PBMC 处理 protocol 无法区分，只有 AOPI 双荧光自动细胞计数仪能够快速、高效、精确进行 PBMC 计数和活力分析，有助于免疫学的研究。

供稿人：达科为生物技术有限公司

网址：[www.dakewe.com](http://www.dakewe.com)