

团 体 标 准

T/CSCB 0016—2024

细胞活率测定 吖啶橙/碘化丙啶染色法

Determination of cell viability—Acridine Orange/Propidium Iodide
staining method

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中国标准出版社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义、缩略语..... 1

4 原理 1

5 试剂或材料 1

6 仪器设备 2

7 样本 2

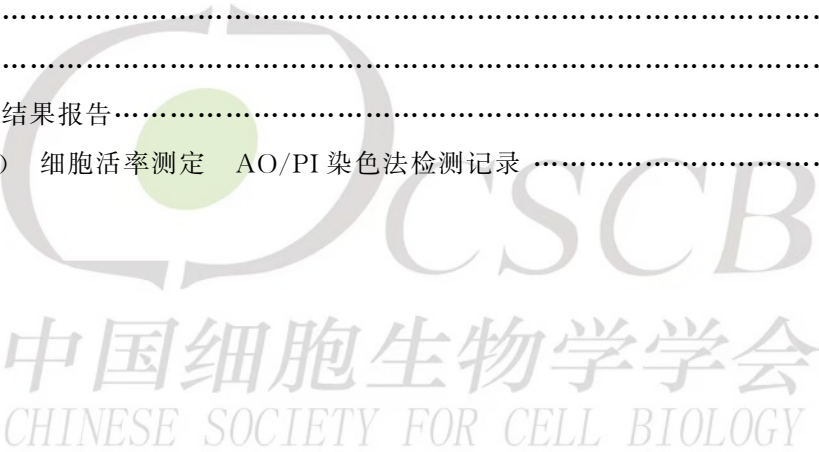
8 试验步骤 2

9 结果计算 3

10 精密度..... 3

11 试验记录和结果报告..... 3

附录 A（资料性） 细胞活率测定 AO/PI 染色法检测记录 4



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会提出并归口。

本文件主要起草单位：中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、中国计量科学研究院、北京工商大学、深圳华汉基因生命科技有限公司、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国医学科学院血液病医院（中国医学科学院血液学研究所）、安徽中盛溯源生物科技有限公司、深圳华大生命科学研究院（国家基因库）、中国科学技术信息研究所、中国食品药品检定研究院、广东省中医院（广州中医药大学第二附属医院）、中国合格评定国家认可中心、苏州大学、中山大学、复旦大学附属肿瘤医院。

本文件主要起草人：郝捷、王磊、赵同标、胡宝洋、傅博强、马爱进、牛帅帅、张勇、徐然然、马士卉、曹佳妮、赵红玲、王婉莹、王海滢、马娟、魏军、俞君英、李启沅、朱礼军、纳涛、蔡佳乐、范笑、彭耀进、于晓游、陈曲波、翟培军、胡士军、项鹏、华国强、周家喜。



细胞活率测定 吖啶橙/碘化丙啶染色法

1 范围

本文件描述了吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色法测定细胞活率的方法,包括原理、试剂或材料、仪器设备、样本制备、试验步骤、结果计算、方法确认和结果报告等。

本文件适用于有核哺乳动物细胞的活率检测,其他有核动物细胞的活率测定参照执行。

本文件不适用于植物细胞和无核细胞的活率检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

细胞活率 cell viability

总细胞群体中活细胞所占的百分比。

3.1.2

单分散细胞悬液 single cell suspension

由分散的单个细胞组成、无细胞团块的均匀液体混合物。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AO:吖啶橙(Acridine Orange)

PI:碘化丙啶(Propidium Iodide)

4 原理

AO/PI染色液由能发出绿色荧光的双链DNA结合染料AO和能发出红色荧光的双链DNA结合染料PI组成。其中,AO可通过完整的细胞膜,进入所有细胞(活细胞和死细胞)的细胞核,在480/30 nm光的激发下呈现绿色荧光;PI只能通过破损的细胞膜,进入所有死细胞的细胞核,在525/30 nm光的激发下呈现红色荧光。在死细胞中,AO/PI共存时,在合适的AO、PI配比下,会发生荧光共振能量转移,导致AO的绿色荧光被淬灭,而PI的红色荧光增强,因此死细胞呈现红色荧光。通过荧光细胞计数仪,基于其统计出的活细胞数及死细胞数,得出活细胞的比率,即细胞活率。

5 试剂或材料

5.1 细胞计数板:荧光细胞计数仪配套专用。

5.2 细胞过滤器:孔径 $40\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ 。

5.3 细胞稀释液:渗透压和 pH 值应符合待测细胞的生理状态。

5.4 AO/PI 染色液:AO 和 PI 需具有合适的比例,以满足细胞染色和检测需求。

6 仪器设备

6.1 荧光细胞计数仪:经校准的具有能够激发 AO 的 $480/30\ \text{nm}$ 和 PI 的 $525/30\ \text{nm}$ 激发光的激发光源和相应的荧光检测通道。

6.2 微量移液器:经检定校准,满足试验需求。

6.3 离心机:需满足细胞悬液离心所需离心力的要求,离心力上限 $\geq 1\ 000g$ 。

7 样本

7.1 应为单分散细胞悬液。

7.2 样本体积应符合荧光细胞计数仪的上样量要求。

7.3 细胞浓度应在 $1\times 10^5\ \text{mL}\sim 1\times 10^7\ \text{mL}$ 之间。

8 试验步骤

警示——AO 和 PI 对人体有刺激,操作时请小心,并注意适当防护以免直接接触人体或吸入体内。

8.1 细胞悬液制备

8.1.1 已标定细胞浓度的细胞悬液

如细胞浓度在要求的范围内,则直接取适量的细胞悬液(悬液 A)。

如细胞浓度超过规定的最高浓度,则取适量细胞悬液,加入适量的细胞稀释液将细胞沉淀重悬,制成浓度约为 1×10^6 个/mL 的单细胞悬液(悬液 A)。

如细胞浓度低于规定的最低浓度,则将细胞悬液转移至 $15\ \text{mL}$ 离心管中, $150g\sim 400g$ 离心 $5\ \text{min}$,弃上清,根据标注的细胞浓度,加入适量的细胞稀释液将细胞沉淀重悬,制成浓度约为 1×10^6 个/mL 的单细胞悬液(悬液 A)。

注:对于特殊细胞类型,如需调整离心力参数,应根据实际情况优化,并基于验证结果确认其适用性。

8.1.2 未标定细胞浓度的细胞悬液

取少量细胞悬液,加入细胞计数板中,然后用荧光细胞计数仪进行总细胞计数。

如细胞浓度在要求的范围内,则直接取适量的细胞悬液(悬液 A)。

如细胞浓度超过规定的最高浓度或低于规定的最低浓度,按照 8.1.1 进行操作。

8.2 制样

每组样品需制备 3 个平行样品(悬液 A)。向悬液 A 中按照适当的配比加入 AO/PI 染料并混匀,制成悬液 B。

8.3 加样

按照荧光细胞计数仪的体积要求,取适当体积的悬液 B,加入细胞计数板,覆盖计数板孔槽,室温避

光静置,然后在 10 min 内进行检测。

8.4 检测

将仪器专用的细胞计数板放入荧光细胞计数仪中,选择合适的荧光模式,通过仪器设备自动对焦测量,自动输出数据。

9 结果计算

细胞活率按式(1)计算:

$$x = \frac{N_h}{N_s + N_h} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

x ——细胞活率;

N_h ——呈现绿色荧光的活细胞数量,单位为个;

N_s ——呈现红色荧光的死细胞数量,单位为个。

最终计算结果以重复性条件下获得的 3 次独立测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。平均值按式(2)计数,单位以 % 表示。

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$\bar{x}$ ——细胞活率平均值, %;

x_i ——每个平行样本的细胞活率, %;

n ——平行样品数量,单位为个。

10 精密度

在重复性条件下获得的 3 次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10 %。

11 试验记录和结果报告

将试验条件、测量结果和计算结果进行记录。记录模板可参考附录 A。

报告内容应包括试验对象、采用标准、方法、结果、观察到的异常现象、日期。

附 录 A

(资料性)

细胞活率测定 AO/PI 染色法检测记录

检验日期：_____年_____月_____日 检验依据：_____

样品信息					
名称	批号	规格	用量		
材料					
名称	批号	有效期至	厂家		
AO/PI					
样品稀释液					
检测仪器设备					
名称	型号	编号	厂家		
荧光细胞计数仪					
测定方法					
1. 供试品溶液制备:取供试品细胞,轻轻混匀,吸取细胞悬液 _____ μL,加至含有 _____ μL 样品稀释液中,稀释 _____ 倍,轻轻吹打混匀。按此法平行制备 3 管。 2. 染色:分别取混匀后的供试品溶液 _____ μL,分别与等体积的 AO/PI 混合均匀后,各吸取 _____ μL 加至细胞计数板孔中,共 3 孔。 3. 检测及计算:将细胞计数板插入荧光细胞计数仪中,用“AO/PI 细胞活率”模块检测,设定稀释比例 1:1,读取并记录活细胞密度和细胞活率,计算 3 孔测定结果的平均值、RSD 值。					
结果					
细胞活率/%	1	2	3	平均值	RSD 值<10%
					☐ 是 ☐ 否
结论: _____ 备注: _____					
检验人/日期 _____			复核人/日期 _____		