

人间充质干细胞质量测定技术规范 第 2 部分 人间充质干细胞细胞周期 PI 染色法测定

Technical specification for quality measurement of human mesenchymal stem cells
Part 2 Determination of human mesenchymal stem cell cycle by PI staining

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	1
5 通用要求	1
5.1 试剂或材料	2
5.2 仪器设备	2
5.3 样本准备	2
5.4 试验步骤	2
5.5 数据分析	2
参考文献	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。

本文件由湖北省卫生健康委员会提出并归口。

本文件起草单位：武汉珈创生物技术股份有限公司，华中科技大学同济医学院附属协和医院，武汉光谷中源药业有限公司，武汉汉密顿生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：郑从义、徐国东、袁冰、刘愈杰、胡豫、梅恒、姚惟琦、武栋成。

引 言

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程，分为间期与分裂期两个阶段。细胞周期测定是评价细胞增殖功能的重要实验。通过测定细胞群体中处于不同时期细胞的细胞比率，可以直观的反映细胞合成DNA的能力。通过PI对细胞的DNA进行染色，用流式细胞术对细胞群体中的细胞DNA含量进行统计，是一种常用的测定细胞周期的方法。

人间充质干细胞质量测定技术规范

第2部分 人间充质干细胞细胞周期PI染色法测定

1 范围

本文件描述了PI染色法检测人间充质干细胞细胞周期的方法原理、试剂或材料、仪器设备、样本准备、试验步骤以及数据分析的方法。

本文件适用于PI染色法检测人间充质干细胞细胞周期。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人间充质干细胞 human mesenchymal stem cell

一类贴壁培养后呈成纤维细胞样形态（纺锤形和梭形）、可在体外自我更新并具有成骨、成脂、成软骨等分化能力的干细胞。

注：人间充质干细胞可由多种人体组织（如骨髓、脐带、胎盘、脂肪、脐带血等）分离得到，也可以通过分化或转分化等方式获得；不同来源的人间充质干细胞再基因表达和分化能力方面存在差异。

4 方法原理

流式细胞术PI染色法：细胞周期是从细胞分裂产生的新细胞生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止所经历的过程，主要分为G₀期，G₁期，S期，G₂期和M期。G₀/G₁期，细胞处于相对静止期及DNA合成前期，细胞为二倍体，含有二倍体量的DNA；S期即DNA合成期，此期细胞中DNA的含量经过复制增加一倍，所以细胞内的DNA处于从二倍体量到四倍体量的连续增加过程；G₂期即DNA合成后期，此时DNA合成已经完成，细胞为四倍体；M期即细胞分裂期，在分裂完成前细胞仍为四倍体。因此，依据不同时期DNA含量上的不同，整个细胞周期可以描述为G₀/G₁，S，G₂/M期。PI，即碘化丙啶（Propidium Iodide），可以与细胞内DNA和RNA结合，采用RNA酶将RNA消化后，通过流式细胞术检测到的与DNA结合的PI的荧光强度直接反映了细胞内DNA含量的多少，用特殊软件对获得的流式直方图进行分析，可以得到各个时期的细胞百分比。

5 通用要求

5.1 试剂或材料

本方法使用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

5.1.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4

5.1.2 干细胞温和消化酶

5.1.3 人间充质干细胞完全培养基

5.1.4 70%无水乙醇

5.1.5 RNase-A

5.1.6 Propidium Iodide Solution

5.1.7 Cell staining buffer

5.1.8 300 目的尼龙筛网

5.2 仪器设备

5.2.1 流式细胞仪

5.2.2 水平离心机

5.2.3 冷冻离心机

5.3 样本准备

5.3.1 细胞制备

选择处于对数生长期的待检样品细胞约 1×10^6 个，通过干细胞温和消化酶消化之后，使用水平离心机300 g离心10 min，弃上清。然后用预冷的磷酸盐缓冲液重悬制成单细胞悬液。

用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞，充分去除残留的培养基及消化酶，用一定体积的预冷磷酸盐缓冲液重悬细胞，缓慢加入预冷的70%无水乙醇，避免细胞聚团，于4℃固定30 min。

5.4 试验步骤

5.4.1 PI 染色

使用冷冻离心机4℃、300 g离心10 min，用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤两次，按照PI染料的使用说明用Cell staining buffer重悬细胞，并加入Propidium Iodide Solution对细胞进行染色，染色条件为4℃下避光孵育30 min，同时加入终浓度为10-100 $\mu\text{g/mL}$ 的RNase-A消化RNA。

5.4.2 过滤上机

将孵育完成的细胞悬液通过300目的尼龙筛网（可选操作）过滤，按流式细胞仪应用手册上机检测。每个样品采集细胞数目不小于10000个。

圈门原则：首先根据细胞大小和颗粒度圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，然后在分群1的基础上选择发射波长为617nm的荧光通道收集荧光信号并进行后续分析。

5.5 数据分析

采集的细胞周期结果用Modfit 5.0软件进行分析，记录G0/G1期，S期，G2/M期细胞比率。拟合模型的RCS值在1.0-3.0为比较好的一个范围，3.0-5.0为可以接受，大于5.0，都被视为不可接受。

参 考 文 献

- [1] GB/T 39729 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法
 - [2] GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法
 - [3] YY/T 0588 流式细胞仪
 - [4] T/CSCB 0003-2021 人间充质干细胞
-