

細胞生存率解析

トリパンブルー法？ それとも蛍光法？

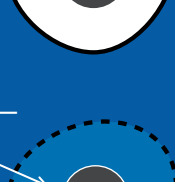
セルカウントによる細胞生存率解析には、トリパンブルー法と蛍光法がございます。トリパンブルー法は、長らく標準的な方法として使われてきた方法で、死細胞を青色に染めます。しかし細胞あるいはサンプルの種類によっては、トリパンブルー法がうまくワークしないことがあります。このような細胞やサンプルには、Acridine Orange (AO) と Propidium Iodide (PI) などを用いた蛍光染色法を用いると正確に測定が可能です。

トリパンブルー法

トリパンブルー法は、デブリスの少ない細胞懸濁液の細胞生存率解析にお勧めの方法です。

トリパンブルー色素は、細胞膜がダメージを受けていない細胞には入ることができず、死細胞だけが染色されます。

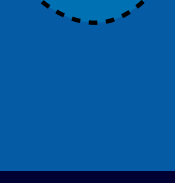
トリパンブルー



生細胞

トリパンブルーは細胞膜を通過することができず、細胞は染色されません。

トリパンブルー



死細胞

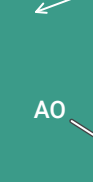
細胞膜が壊れているのでトリパンブルーが膜を通過して染色されます。

AO/PI 蛍光法

AOは細胞膜透過性の核酸染色蛍光試薬です。サンプル中の細胞の核を染色します。

PIは同じく核酸に結合する蛍光試薬ですが、ダメージを受けていない細胞膜は透過することができません。そのため、死細胞の核だけが染色されます。

AO



生細胞

細胞はAOでは染色されます、PIでは染色されず、細胞の核が緑色に光ります。

AO



死細胞

AOとPIのどちらの蛍光色素でも染色され、FRETによって細胞の核が赤色に光ります。

細胞タイプ別の推奨方法

■ トリパンブルー法あるいは AO/PI 蛍光法を推奨

■ AO/PI 蛍光法を推奨

デブリスの少ないサンプル

初代培養細胞

抽出された核のカウント

組織培養サンプル

全血サンプル中の白血球

小さい細胞あるいは酵母

デブリスの多いサンプル

Sample Prep

- オプション：トリパンブルー溶液を 0.2 μm のフィルターで濾過して、凝集した色素や結晶化した色素を取り除きます。
- トリパンブルー溶液を細胞懸濁液と1:1の割合で混和します。
- 直前によく混ぜてからセルカウンターにロードします。

- 蛍光試薬を室温に戻します。
- AO/PI溶液を細胞懸濁液と1:1の割合で混和します。
- 直前によく混ぜてからセルカウンターにロードします。

推奨のセルカウンターとアプリケーション

CellDrop™は、ディスポーサブルスライドを使わずに、サンプルを装置に直接ロードすることで細胞生存率を解析できる自動セルカウンターです。CellDrop BFは明視野によるトリパンブルー法を用いた細胞カウントと生存率解析が可能です。CellDrop FLは、明視野に加えて蛍光検出が可能で、トリパンブルー法だけでなくAO/PI法を用いた細胞生存率解析を行うことができます。

CellDrop BF

明視野



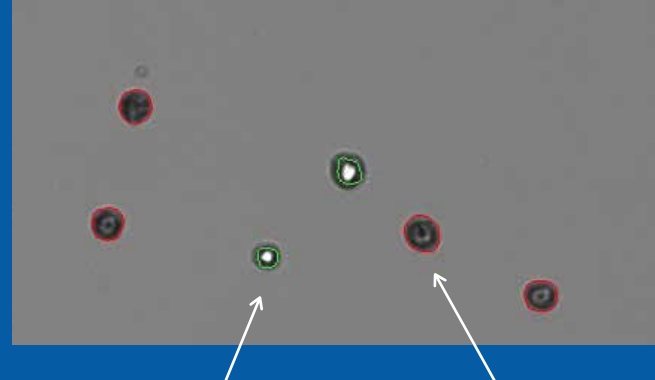
CellDrop FL

明視野 + 蛍光



トリパンブルー法による CellDrop カウント

暗い縁（ふち）で囲まれた中心が明るいオブジェクトが生細胞として認識され、全体が暗いオブジェクトが死細胞として認識されます。デブリスは、細胞認識アルゴリズムを調整して細胞と区別させる必要があります。

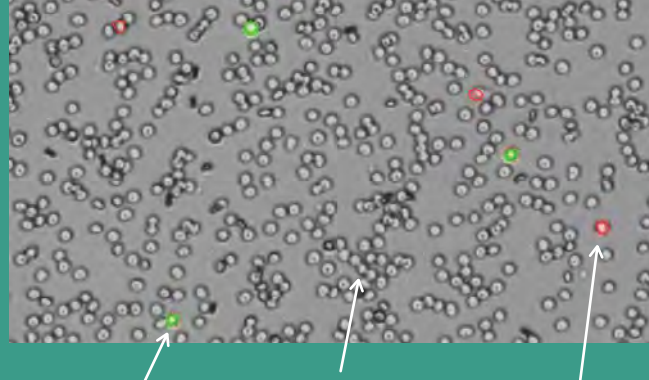


生細胞

死細胞

AO/PI 蛍光法による CellDrop カウント

緑色蛍光（AO）を生細胞、赤色蛍光（PI）を死細胞として認識してカウントします。デブリス（細胞の残骸）や無核細胞は蛍光を発しないので、画像解析において主観を除いて客観的に区別できます。



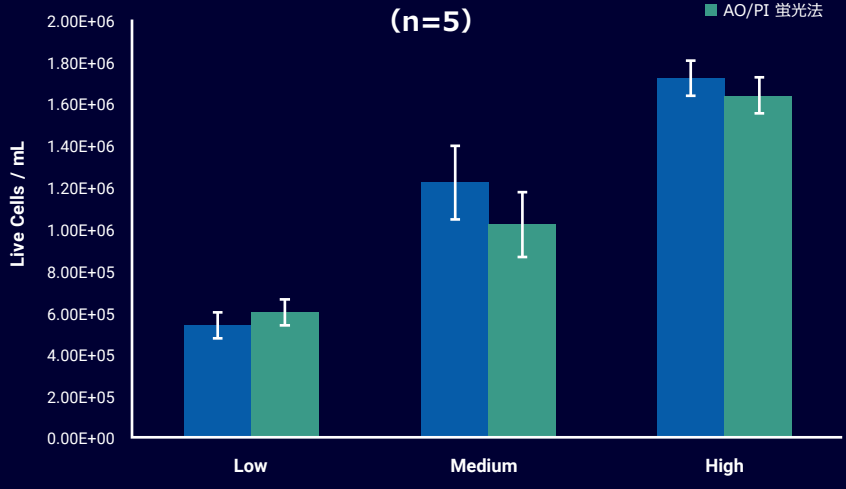
生細胞

赤血球 (無核)

死細胞

比較データ

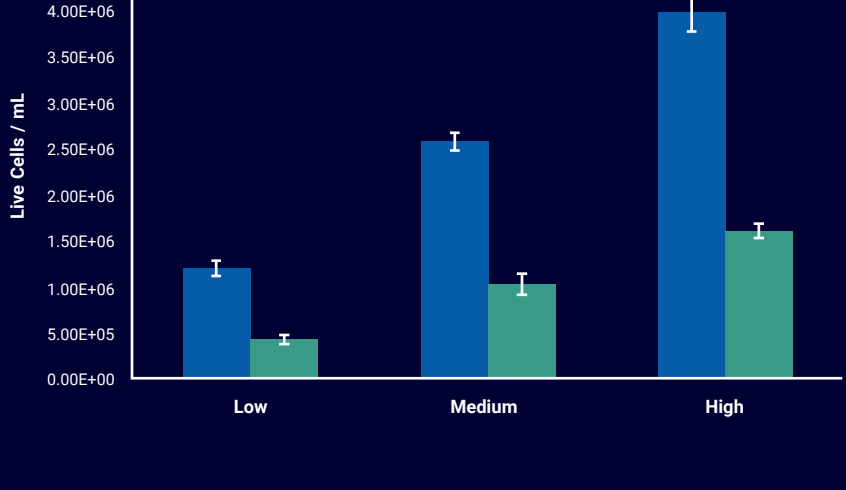
段階希釈したCHO細胞懸濁液のセルカウント (n=5)



CHO細胞株をトリパンブルー法とAO/PI法でカウントして比較した。

CHO細胞はトリパンブルー法でもAO/PI法でも正確にカウントされ、どの細胞密度でも手法による違いはあまり見られなかった。

段階希釈したマウスPBMC分画のセルカウント (n=5)



マウス全血をFicollで分画してPBSに再懸濁し、PBMCs（末梢血単核細胞）をトリパンブルー法とAO/PI法でカウントして比較した。

トリパンブルー法では、サンプル中にバックグラウンドとして混入するデブリスや無核赤血球を誤ってカウントしてしまい、生細胞密度が過大評価されてしまう。

まとめ

トリパンブルー染色による明視野法は、デブリスの少ない細胞株サンプルの細胞計数あるいは細胞生存率解析に優れた方法である。しかし、細胞とデブリスを正確に見分けるには限界が存在します。

AO/PI 二重染色による蛍光法は、デブリスあるいは無核細胞が多い中で、生細胞と死細胞を特異的に見分けて正確にカウントすることを可能にします。蛍光セルカウント法は、トリパンブルー法では排除することが難しい画像解析の主観性の問題も解決することができます。

CellDrop

独自のDirectPipette™ テクノロジーにより、ほとんどの自動セルカウンターで必要とされるディスポーサブルスライドを使わずにセルカウントと細胞生存率測定が可能、消耗品コストを削減し、プラスチック廃棄物も減らすことができます。

CellDrop FLは、明視野セルカウント（トリパンブルー法）と蛍光セルカウント（AO/PI法）をどちらも行うことができ、幅広い種類の細胞、幅広い細胞密度に使用できるユーザーフレンドリーな装置です。



テクニカルノート197
トリパンブルー法と
AO/PI蛍光法の比較

DeNovix®

スクラム株式会社