

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*

ひとこと

受領時の保管条件

- -20°C 以下
- 遮光

Ex/Em

- カルセイン=494/517 nm
- DNA 存在下でのエチジウムホモダイマー1=528/617 nm

注：カルセイン AM は水分に触れると加水分解することがあります。

はじめに

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit は、2 種類のプローブによる生細胞と死細胞の同時判定に基づく 2 色蛍光の細胞生存アッセイです。これらのプローブは、よく知られた細胞生存のパラメータである細胞内エステラーゼ活性と原形質膜の完全性を測定します。Molecular Probes により、カルセイン AM とエチジウムホモダイマー1 (EthD-1) が、このアプリケーションに最適の色素であることが明らかにされています¹³。本キットは蛍光顕微鏡または蛍光マルチウェルプレートスキャナーでの使用に適しており、フローサイトメトリーなどの蛍光検出システムでの使用に容易に適合させることが可能です。アッセイの原理は普遍的なものであり、接着細胞⁴および特定の組織^{5,6}などほとんどの種類の真核細胞に適用可能ですが、細菌や酵母には使用できません³。このような蛍光をベースにした細胞生存評価法は、トリパンブルー色素排除試験、⁵¹クロム (Cr) 放出試験など、生細胞および細胞傷害性を判定する手法の代わりに用いることができます。一般に、本キットは、細胞毒性イベントの検出法として、代替法よりも迅速、安価、安全、高感度です。動物細胞アプリケーションに対する LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity アッセイの妥当性が複数の研究室で立証されています。発表済みのアプリケーションとしては、腫瘍壊死因子 (TNF) の細胞毒性作用⁷、 β -アミロイドタンパク質⁸、アデノウイルス E1A タンパク質⁹、Na⁺チャンネルに結合するテトロドトキシン (TTX)¹⁰、メタアンフェタミン¹¹、有糸分裂促進性スフィンゴ脂質¹²の測定が挙げられます。また、本アッセイ法は、アポトーシス細胞死^{13,14}および細胞介在性細胞毒性^{15,16}の定量にも用いられています。

本法の原理

生細胞の識別は、遍在する細胞内エステラーゼ活性の有無に基づきます。定量は、ほぼ非蛍光である細胞膜透過性カルセイン AM を、強い蛍光を発するカルセインに変換する酵素活性を測定します。多価イオン性色素であるカルセインは生細胞内に良好に保持されるため、生細胞で強く均一な緑色蛍光を発します (ex/em : 約 495 nm/515 nm)。一方 EthD-1 は膜が損傷した細胞に入り、核酸に結合することにより蛍光が約 40 倍に増強されるため、死細胞で明るい赤色蛍光を発します (ex/em 約 495 nm/635 nm)。EthD-1 は生細胞の無傷な原形質膜では排除されます。細胞生存の判定は、このような細胞の物理的および生化学的特性に基づいています。そのため、これらの細胞特性に影響を及ぼさない細胞毒性イベントは、この手法では正確に評価できない可能性があります。これらの色素は細胞と相互作用する前はほぼ非蛍光であるため、このアッセイ技術ではバックグラウンド蛍光強度がかなり低く抑えられています。

キットの内容

- カルセイン AM (Component A)、バイアル 2 本にそれぞれ 40 μ L、4 mM の無水 DMSO 溶液
- エチジウムホモダイマー1 (Component B)、バイアル 2 本にそれぞれ 200 μ L、2 mM の 1:4 (v/v) DMSO/H₂O 溶液

本キットは、推奨試薬濃度および用量で、蛍光顕微鏡または蛍光マイクロプレートリーダーを用いて約 1,000 回のアッセイ、またはフローサイトメトリーを用いて約 100 回のアッセイを実施するのに十分な量の成分を含有しています。

試薬の保管および取り扱い

本キットの試薬は、密閉、乾燥、遮光条件下で、-20°C 以下で凍結保存します。開封前に試薬を室温になるまで静置して、軽く遠心分離します。再凍結前に、ストック溶液はすべてしっかりと密封します。カルセイン AM は水分に触れると加水分解しやすくなります。カルセイン AM を含有するワーキング溶液は使用直前に調製し、その日のうちに使用してください。EthD-1 は安定であり、水分に対する感受性はありません。DMSO/H₂O またはその他の水性溶媒中の EthD-1 ストック溶液は、-20°C 以下で 1 年以上保存可能です。

蛍光顕微鏡のプロトコール

光学フィルターを選択

カルセインおよび EthD-1 は、汎用のフルオレセインロングパスフィルターにより同時に観察できます。これらの色素由来の蛍光を別々に観察することも可能です。カルセインは、標準的蛍光色素バンドパスフィルターで可視化され、EthD-1 は Propidium iodide または Texas Red® 色素で可視化されます。適切なフィルターの一般的特性を表 1 に要約しています。

細胞の調製

1.1 接着細胞は、コンフルエントまたはサブコンフルエントな単層として滅菌カバーガラス上で培養します（例、線維芽細胞は通常、2~3 日間カバーガラス上で増殖すると、許容可能な細胞密度が得られます）。その細胞を 35 mm の使い捨てペトリ皿など、適切な容器中で培養します。また非接着細胞も使用可能です。

1.2 アッセイ前に細胞を洗浄し、血清含有培地中に存在する血清由来のエステラーゼ活性を除去または希釈します（血清エステラーゼによりカルセイン AM が加水分解されることにより細胞外蛍光を増強させることがあります）。接着細胞を、500~1,000 倍量のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) により穏やかに洗浄します（注 A）。

1.3 試験管内の非接着細胞を 500~1,000 倍量の組織培養等級 D-PBS で洗浄し、遠心分離により沈降させます。細胞上清のアリコートのカバーガラスに移します。蓋をした 35 mm のペトリ皿内で、37°C でカバーガラスの表面に細胞を定着させます。

1.4 この細胞を、LIVE/DEAD® 試薬浸漬前の任意の時点または浸漬と同時に、必要に応じて細胞毒性剤により処理します。

色素の最適濃度の決定

最良の結果を得るためには、カルセイン AM により生細胞が、EthD-1 により死細胞が明確に標識されるように各色素の濃度を調整する必要があります。最適濃度は細胞型により異なると考えられます。一般に、十分なシグナルが得られる最低濃度の色素を用いるのが理想的です。以下の手法を用いて、色素の最適濃度を決定することができます。

2.1 LIVE/DEAD® アッセイ用試薬を冷凍庫から取り出し、室温になるまで静置します。

表 1. LIVE/DEAD® Viability Kit の使用に適した一般的フィルターの特性

オメガフィルター*	クロマフィルター*	注
XF25, XF26, XF115	11001, 41012, 71010	カルセインおよび EthD-1 染色の同時観察に有用なロングパスおよびデュアル発光フィルター
XF22, XF23	31001, 41001	カルセインのみを観察できるバンドパスフィルター
XF32, XF43, XF102, XF108	31002, 31004, 41002, 41004	EthD-1 のみを観察できるバンドパスフィルター

*蛍光顕微鏡用に推奨されるバンドパスフィルターセットのカタログ番号。オメガフィルターは Omega Optical Inc. (www.omegafilters.com) が販売しています。クロマフィルターは Chroma Technology Corp. (www.chroma.com) が販売しています。

2.2 生細胞と死細胞のサンプルをカバーガラス上に調製します。細胞は以下のいずれかの方法で殺処理します（例、0.1% サポニンで 10 分間処理、0.1~0.5% ジギトニンで 10 分間処理、70% メタノールで 30 分間、補体および適切な IgG で 30 分間）。

2.3 死細胞サンプルを用いて、細胞質を大きく染色することなく死細胞核を明るい赤に染色する EthD-1 濃度を選択します（0.1~10 μM の濃度をお試しください）。

2.4 死細胞サンプルを用いて、死細胞の細胞質に顕著な蛍光を生じないカルセイン AM 濃度を選択します（0.1~10 μM の濃度をお試しください）。

2.5 生細胞サンプルを用いて、ステップ 2.4 で選択したカルセイン AM 濃度が生細胞で十分な蛍光シグナルを発することを確認します（十分でなかった場合、高い濃度をお試しください）。

2.6 ステップ 2.3 および 2.5 で決定した試薬濃度が生存実験に最適な濃度となります。

希釈プロトコールの例

このプロトコール例では、約 2 μM のカルセイン AM 溶液および約 4 μM の EthD-1 溶液を 10 mL 調製します。これらの色素の濃度は、室温で 20~40 分間インキュベートする場合に、NIH 3T3 細胞、PtK2 細胞、MDCK 細胞に適していることが明らかになっています。培養マウス白血球 (J774A.1) はエステラーゼ活性が高いため、カルセイン AM の必要量は他の細胞型の 1/5~1/10 で済みます。ただし、EthD-1 の必要量に変更はありません。これはあくまでも一例であり、実際の実験では最適な色素濃度は異なります。

3.1 LIVE/DEAD® アッセイ用試薬を冷凍庫から取り出し、室温になるまで静置します。

3.2 2 mM EthD-1 ストック溶液 (Component B) 20 μL を、滅菌済みの組織培養グレードの D-PBS 10 mL に添加し、ボルテックスにかけて完全に混合します。これにより、約 4 μM の EthD-1 溶液が得られます。

3.3 4 mM カルセイン AM ストック溶液 (Component A) 5 μL を EthD-1 溶液 10 mL に移すことにより、試薬を合わせます。得られた溶液をボルテックスにかけて、完全に混合します。

3.4 カルセイン AM を約 2 μM および EthD-1 を約 4 μM を含有するワーキング溶液を細胞に直接添加します。DMSO の最終濃度は 0.1% 以下であり、大部分の細胞にとって通常は無害なレベルとなります。

3.5 カルセイン AM 水溶液は加水分解しやすいことにご注意ください（「試薬の保管および取り扱い」参照）。したがって、使用水溶液はその日のうちに使用してください。

生存アッセイの実施

4.1 混合した LIVE/DEAD® アッセイ用試薬 100~150 μL を、最適濃度で、22 mm の角形カバーガラス表面に添加し、細胞が溶液で覆われるようにします。蓋をした容器（例、35 mm の使い捨てペトリ皿）の中でインキュベートし、サンプルのコンタミネーションや乾燥を防止します。

4.2 この細胞を室温で 30~45 分間インキュベートします。色素濃度やインキュベーション温度を上昇させると、インキュベーション時間を短くできます。

4.3 インキュベーション後、約 10 μ L の新鮮な LIVE/DEAD[®] 試薬または約 10 μ L の D-PBS を、清浄な顕微鏡用スライドに添加します。

4.4 濡らしたカバーガラスを、先端が細い鉗子を用いて慎重（かつ迅速）にひっくり返し、顕微鏡用スライドの上に乗せます。蒸発を防ぐため、カバーガラスをガラススライドに密閉します（例、透明なマニキュアを使用）。スライド調製中に細胞を傷つけたり、破碎したりしないように注意します。

4.5 標識した細胞を蛍光顕微鏡下で観察します。

蛍光マイクロプレートプロトコール

マイクロプレートリーダー用の光学フィルターの設定

プレートリーダーを用いて最大の感度を得るために、それぞれの吸光度に最適な光学フィルターを用いてフルオロフォアを励起させることを推奨します。カルセインを十分に励起するには蛍光色素光学フィルター（485 \pm 10 nm）を使用しますが、EthD-1 は一般的なローダミン光学フィルター（530 \pm 12.5 nm）と互換性があります。また、蛍光発光も、カルセインについては 530 \pm 12.5 nm、EthD-1 については 645 \pm 20 nm で別々に取得します。

マイクロプレートリーダー用に細胞を調製する

5.1 マルチウェルプレートで接着細胞を培養します。線維芽細胞は一般に、ウェル内で 2~3 日増殖させると、良好な細胞密度が得られます。アッセイ前に、細胞を、500~1,000 倍量のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）で穏やかに洗浄します（注 A）。最後の洗浄の後、D-PBS をウェルの底を覆うのに十分な量添加します。細胞サンプルを洗浄し、エステラーゼ活性を除去または希釈します。エステラーゼ活性は、血清含有培地に通常存在するものであり、カルセイン AM の加水分解により細胞外蛍光が増強される場合があります。

5.2 比較的接着性の低い細胞（例、白血球またはその他の浮遊細胞）を、試験管内で、500~1,000 倍量の組織培養グレードの D-PBS で洗浄し、遠心分離により沈降させて血清由来エステラーゼ活性を除去します。

5.3 この細胞を十分な量の緩衝液中に懸濁し、ウェルの底を十分に覆う量を添加します。一般に、総容量が 250~300 μ L の平底のウェルについては、約 100 μ L を添加します。総容量が 150~200 μ L の丸底のウェルについては、約 70 μ L を添加します。総容量が 100~150 μ L のコニカルウェルについては、約 50 μ L を添加します。細胞毒性剤などの試薬の希釈を最小限にするためには、少量の緩衝液が好まれる場合があります。

5.4 その細胞を、LIVE/DEAD[®] 試薬染色前の任意の時点で、または同時に、必要に応じて細胞毒性剤により処理します。

5.5 1 ウェルあたりの検出可能な最少の細胞数は通常、200~500 個です。1 ウェルあたりの使用可能な最大の細胞数は、10⁶ 単位です。

最適な色素濃度の決定

最良の結果を得るためには、カルセイン AM により生細胞が、EthD-1 により死細胞が明確に染色されるように各色

素の濃度を調整する必要があります。光学フィルター、装置の感度設定、細胞の数または種類を変更した場合、色素濃度も変更する必要がある場合があります。一般に、十分なシグナルが得られる最低濃度の色素を用いるのが理想的です。以下の手法を用いて、色素の最適濃度を決定することができます。

6.1 LIVE/DEAD[®] 試薬を冷凍庫から取り出し、室温になるまで静置します。プレートリーダーに適切なフィルターを選択し、適切に設定します。

6.2 生細胞と死細胞のサンプルを調製します。細胞はいずれかの方法で殺処理します（例、0.1%サポニンで 10 分間処理、0.1~0.5%ジギトニンで 10 分間処理、70%メタノールで 30 分間、補体および適切な IgG で 30 分間）。

6.3 死細胞サンプルを用いて、EthD-1 の飽和濃度（最大の蛍光を発する最低濃度）を決定します。細胞濃度を高く維持しながら（1 mL あたり約 10⁶ 個）、EthD-1 の濃度 0.1~10 μ M をお試しください。最適なインキュベーション時間を決定するために染色を経時的に観察します（例えば、10~15 分おきに測定値を取ります）。当社では、4 μ M EthD-1 で 45 分間インキュベートすることにより、120,000 個のマウス死白血球サンプルの結合部位が飽和されることが明らかになっています。

6.4 死細胞サンプルを用いて、死細胞がごくわずかにしか染色されないカルセイン AM 濃度を決定します（濃度 0.1~5 μ M をお試しください）。

6.5 生細胞サンプルを用いて、生細胞にはっきりと検出できる蛍光が認められるカルセイン AM 濃度を決定します。シグナルが低すぎる場合、細胞数を増やすか、色素の濃度を若干高くします。

6.6 ステップ 6.3 および 6.5 で決定した試薬濃度が生存アッセイに最適な濃度となります。

マイクロプレートリーダー測定用のサンプル調製例

このプロトコール例では、マルチウェルプレートスキヤナーで用いる、カルセイン AM 1 μ M および EthD-1 2 μ M の LIVE/DEAD[®] 試薬を 10 mL 調製します（当社テストでは、これらの試薬濃度がマウス白血球に最適であることが明らかになっています）。本プロトコールでは、2 倍濃縮試薬ストック液を調製し、これをウェルに添加することで、最終濃度が 2 倍希釈となるようにします。1 ウェルに用いる容量を 100 μ L とすると、ストック液が 10 mL あれば、96 ウェルマイクロプレート 1 枚に十分足りる染色液が得られます。これはあくまでもプロトコールの一例に過ぎません。実験で用いられる実際の容量および濃度は、用いられる細胞とマイクロプレートの種類によって異なります。

7.1 LIVE/DEAD[®] 試薬のストック液を冷凍庫から取り出し、室温になるまで温めます。

7.2 2 mM EthD-1 ストック溶液（Component B）20 μ L を、滅菌済みの組織培養グレードの D-PBS 10 mL に添加し、ボルテックスにかけて完全に混合します。これにより、約 4 μ M の EthD-1 溶液が得られます。

7.3 4 mM カルセイン AM の DMSO 溶液（Component A）5 μ L を 4 μ M EthD-1 溶液 10 mL に移します。得られた溶液をボルテックスまたは超音波にかけて、完全に混合します。これにより、カルセイン AM が約 2 μ M、EthD-1 が約 4 μ M のワーキング溶液が得られます。

7.4 各ウェルに細胞含有緩衝液を 100 μ L ずつ分注します。さらに、LIVE/DEAD[®]ワーキング溶液 100 μ L を添加すると、1 ウェルあたり 200 μ L となり、カルセイン AM を 1 μ M および EthD-1 を 2 μ M 含有する溶液が得られます。DMSO の最終濃度は 0.1% 以下であり、大部分の細胞にとって通常は無害なレベルとなります。

マイクロプレートリーダーを用いた蛍光測定

8.1 実験用細胞のサンプル（以下の A および B）および生細胞と死細胞の対照（以下の C~F）を調製します。

8.2 バックグラウンド蛍光の発生源に配慮して、一連の対照についても測定します。バックグラウンド蛍光は、のちほど計算により除外できます。被験細胞サンプルと対照細胞サンプルを同じ要領で処理します（すなわち、細胞数、試薬濃度、インキュベーション時間および温度を一定に維持します）。被験細胞をカルセイン AM および EthD-1 で標識します。対照サンプルをカルセイン AM または EthD-1 のいずれかで、指示どおりに標識します。試験を行う細胞毒性物質または培地中の他の添加物質由来のバックグラウンド蛍光を確認する場合は、細胞を含有しない対照（以下の G および H）を測定しても構いません。

8.3 LIVE/DEAD[®]試薬を最適な最終濃度になるようにウェルに添加します（「最適な色素濃度の決定」の項に記載）。

8.4 このサンプルを最適な時間インキュベートします（「最適な色素濃度の決定」の項に記載）。例、室温で 30 ~ 45 分間。

8.5 適切な励起フィルターと発光学フィルターを用いて被験細胞サンプルと対照細胞サンプルの蛍光を測定します。

- A. カルセイン AM と EthD-1 で標識した被験細胞サンプルにおける 645 nm での蛍光 = $F(645)_{\text{sam}}$
- B. カルセイン AM と EthD-1 で標識した被験細胞サンプルにおける 530 nm での蛍光 = $F(530)_{\text{sam}}$
- C. EthD-1 のみで標識した死細胞のみのサンプルにおける 645 nm での蛍光 = $F(645)_{\text{max}}$
- D. カルセイン AM のみで標識した死細胞のみのサンプルにおける 645 nm での蛍光 = $F(645)_{\text{min}}$
- E. EthD-1 のみで標識した（ほぼ）生細胞のみのサンプルにおける 530 nm での蛍光 = $F(530)_{\text{min}}$
- F. カルセイン AM のみで標識した（ほぼ）生細胞のみのサンプルにおける 530 nm での蛍光 = $F(530)_{\text{max}}$
- G. 色素添加の有無にかかわらず、細胞を含有していないサンプルにおける 530 nm での蛍光 = $F(530)_0$
- H. 色素添加の有無にかかわらず、細胞を含有していないサンプルにおける 645 nm での蛍光 = $F(645)_0$

結果の解釈

生細胞と死細胞の相対数は、約 530 nm とそれより長波長の特定の蛍光シグナル（「生細胞と死細胞の絶対数の決定」の項に記載）における細胞の割合または絶対数から表すことが可能です。死細胞は、波長 600 nm 超で強い蛍光を示し、530 nm 付近でほとんど蛍光を示さないという特徴があります。結果の算出前に、バックグラウンド蛍光値（ $F(530)_0$ と $F(645)_0$ ）を $F(530)$ および $F(645)$ の全値からそれぞれ差し引くことができます。

生細胞の割合は、上に定義する蛍光値から算出できます。

$$\% \text{生細胞} = \frac{F(530)_{\text{sam}} - F(530)_{\text{min}}}{F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}}} \times 100\%$$

死細胞の割合は、上に定義する蛍光値から算出できます。

$$\% \text{死細胞} = \frac{F(645)_{\text{sam}} - F(645)_{\text{min}}}{F(645)_{\text{max}} - F(645)_{\text{min}}} \times 100\%$$

マイクロプレートリーダーを用いた生細胞と死細胞の絶対数の決定

サンプル中の総細胞数は、細胞をすべて殺処理し（ステップ 6.2）、飽和濃度の EthD-1 で標識し、600 nm 超で蛍光を測定することにより計数できます。これにより、蛍光強度は、サンプル中に存在する総細胞数に対して直線性を示します。この操作を一連の生存実験の最後に行い、生細胞と死細胞の絶対数により細胞生存度を表すことができます。

9.1 細胞生存測定を実施します（「マイクロプレートリーダーを用いた蛍光測定」の項に記載）。

9.2 サンプル中の細胞をすべて殺処理します（例、0.1% サボニン各ウェルに添加。5% サボニン蒸留水ストック溶液から 1 ウェルあたり 2~5 μ L を添加する）。

9.3 プレートを振とうして混合します。10 分間（またはシグナルが平衡に達するまで）待ちます。

9.4 645 nm 付近の EthD-1 蛍光を読み取ります。蛍光強度は、サンプル中の細胞数と線形相関を示します。この値は、死細胞数対蛍光強度の標準曲線と比較可能です。この標準曲線は、マイクロプレート中の既知数の死細胞に対する飽和 EthD-1 濃度を用いて別途作成します。

フローサイトメトリーのプロトコール：生存アッセイ

10.1 各試薬を室温になるまで静置します。

10.2 カルセイン AM（Component A）DMSO 溶液の 80 倍希釈液を作成し、50 μ M のワーキング溶液を作成します（すなわち、158 μ L の DMSO に Component A を 2 μ L 添加）。このワーキング溶液はその日のうちに使用してください。

10.3 アッセイ 1 回につき $0.1 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL の浮遊細胞を 1 mL 調製します。培養液と緩衝液のいずれを使用しても構いません。

10.4 細胞 1 mL あたり、50 μ M カルセイン AM ワーキング溶液を 2 μ L および 2 mM エチジウムホモダイマー 1 ストック液 4 μ L を添加し、これを混合します。

10.5 この細胞を室温で遮光し、15~20 分間インキュベートします。

10.6 インキュベーション (1~2 時間以内) 後できるだけ早く、488 nm の励起光を用いたフローサイトメトリーにより染色細胞を解析し、カルセインについては緑色の蛍光発光 (すなわち、530/30 バンドパス) を、エチジウムホモダイマー1については赤色の蛍光発光 (すなわち、610/20 バンドパス) を測定します。細胞をゲーティングすることにより、デブリを除去します。単染色細胞を用いて、標準的な補正を実施します。細胞集団は2つに分離し、生細胞は緑色蛍光を示し、死細胞は赤色蛍光を示します (図 1)。

フローサイトメトリーのプロトコール： CountBright™細胞絶対数計数用ビーズによる生存アッセイ

注：CountBright™細胞絶対数計数用ビーズによる細胞計数の精度は、サンプルの取り扱いおよび正確なビーズ量の送出に左右されます。CountBright™細胞絶対数計数用ビーズは、十分に混合して、マイクロスフィアが均一な懸濁液とします。アリコートを取る直前にボルテックスに 30 秒間かけます。細胞懸濁液は希釈しても構いませんが、アッセイは洗浄ステップを行わずに実施してください。

11.1 各試薬を完全に溶けるまで静置します。

11.2 カルセイン AM (Component A) DMSO 溶液の 80 倍希釈液を作成し、50 μM の使用液を作成します (すなわち、158 μL の DMSO に Component A を 2 μL 添加)。この使用液はその日のうちに使用してください。

11.3 アッセイ 1 回につき 0.1~5×10⁶ 個/mL の浮遊細胞を 1 mL 調製します。培養液と緩衝液のいずれを使用しても構いません。

11.4 細胞 1 mL あたり、50 μM カルセイン AM ワーキング溶液を 2 μL および 2 mM エチジウムホモダイマー1 ストック液 4 μL を添加し、これを混合します。

11.5 この細胞を室温で遮光し、15~20 分間インキュベートします。

11.6 CountBright™細胞絶対数計数用ビーズを室温になるまで静置します。このマイクロスフィア懸濁液を 30 秒間穏やかにボルテックスにかけ、完全に再懸濁します。

11.7 この計数用ビーズ懸濁液のボルテックス直後に、サンプル 1 mL につき計数用ビーズ 50 μL を添加し、ボルテックスにかけます。

注：この希釈濃度で、CountBright™細胞絶対数計数用ビーズに添加された少量の Tween20 とアジ化ナトリウムが細胞の染色または生存に影響を及ぼすという報告はありません。

11.8 インキュベーション (1~2 時間以内) 後できるだけ早く、488 nm の励起光を用いたフローサイトメトリーにより染色細胞を解析し、カルセインについては緑色の蛍光発光 (すなわち、530/30 バンドパス) を、エチジウムホモダイマー1については赤色の蛍光発光 (すなわち、610/20 バンドパス) を測定します。細胞 (デブリ除去のため) および計数用ビーズの両者をゲーティングします。前方散乱閾値は低い値に設定し、前方散乱対側方散乱のプロットにこのマイクロスフィアが含まれるようにします (図 2)。単染色細胞を用いて、標準的な補正を実施します。細胞集団は2つに分離し、生細胞は緑色蛍光を示し、死細胞は赤色蛍光を示します。CountBright™細胞絶対数計数用ビーズは細胞と区別できます (図 3)。

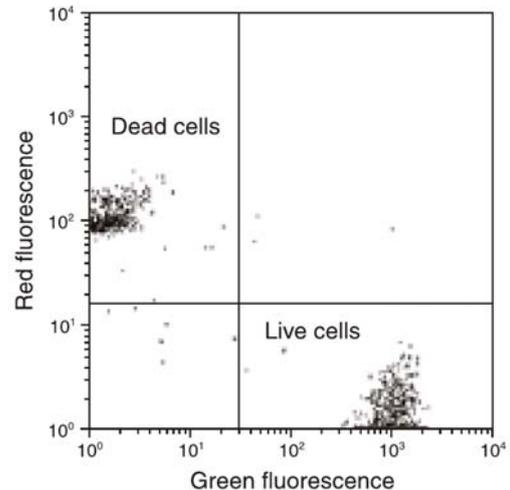


図 1. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit を用いたフローサイトメトリーによる生存アッセイ。ヒト B 細胞の生細胞および死細胞 (エタノールで固定) を 1:1 の割合で混合し、本プロトコールに従って、カルセイン AM およびエチジウムホモダイマー1 で染色します。フローサイトメトリー解析を 488 nm の励起光により実施します。その結果、二変量数分布が得られ、緑色蛍光 (530 nm) の生細胞集団と赤色蛍光 (585 nm) の死細胞集団の明確な分離が示されています。

注：サンプル量を統計学的に有意に定量できるように、1,000 以上のビーズイベントを採取します。

11.9 計数用ビーズは全蛍光プロットの右上隅に示されているため (図 3)、ゲーティングが可能です。

注：発光パラメータの特定の組み合わせでは CountBright™細胞絶対数計数用ビーズと細胞とを区別できない場合、計数用ビーズをゲーティングできるように発光パラメータの組み合わせの変更を試みてください。

細胞濃度の算出：

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} = \text{サンプル濃度、細胞数/}\mu\text{L}$$

ここで、

A = 細胞イベント数

B = ビーズイベント数

C = ロットに割り付けられたビーズ数 (ビーズ数/50 μL)

D = サンプル量 (μL)

計算例：細胞 1,000 μL を染色しました。その後、CountBright™細胞絶対数計数用ビーズ 50 μL を添加しました。

$$\frac{1,700 \text{ 個の細胞}}{1,030 \text{ ビーズ}} \times \frac{49,500 \text{ ビーズ}/50 \mu\text{L}}{1,000 \mu\text{L}} = 81.7 \text{ 個の細胞}/\mu\text{L}$$

注：この計算は、サンプルを希釈している場合、または異なる容量の CountBright™細胞絶対数計数用ビーズを用いている場合には補正する必要があります。

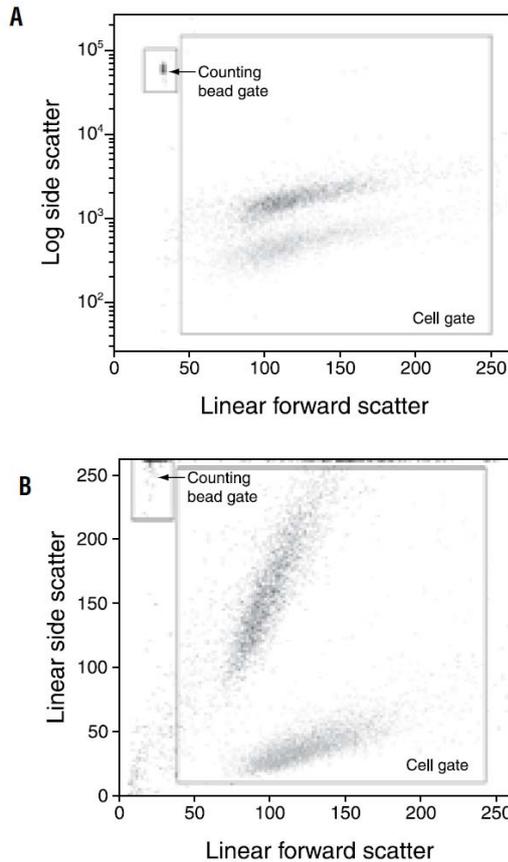


図 2. 前方散乱対側方散乱で、ゲーティングしたビーズの計数。ジャーカット細胞（ヒト T 細胞白血病）の生細胞と死細胞（加熱により殺処理）の混合物を、本プロトコールに従って、カルセイン AM とエチジウムホモダイマー1 で染色しました。フローサイトメトリーでのデータ取得前に CountBright™細胞絶対数計数用ビーズを添加しました。A) 前方散乱対対数側方散乱で、デブリ除去のための細胞のゲーティングと計数用ビーズのゲーティングが示されています。B) 前方散乱対線形側方散乱で、細胞のゲーティングによるデブリの除去と計数用ビーズのゲーティングが示されています。計数用ビーズのゲーティングは側方散乱に最終チャンネルが含まれるように調整します。

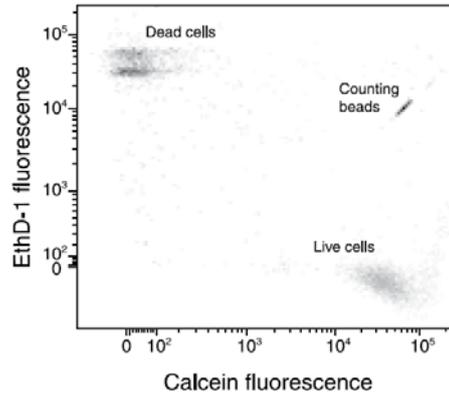


図 3. 530/30 バンドパスフィルターを通して収集されたカルセイン蛍光のプロットと、610/20 バンドパスフィルターを通して収集されたエチジウムホモダイマー1 蛍光のプロット。生細胞と死細胞、および計数用ビーズが明確に分離しています。ジャーカット細胞の生細胞と死細胞（加熱により殺処理）の混合物を、本プロトコールに従って、カルセイン AM とエチジウムホモダイマー1 で染色しました。488 nm の励起光を用いたフローサイトメトリーでのデータ取得の前に CountBright™細胞絶対数計数用ビーズを添加しました。

注

[A] 本プロトコールでは標準的な生理食塩緩衝液を用いることができます。ただし、フェノールレッドのような着色添加物は、蛍光に影響を及ぼすかどうかを確認する必要があります（ステップ 8.2 を参照）。推奨される緩衝液は滅菌済み組織培養等級 D-PBS です。組成は、KCl (200 mg/L)、KH₂PO₄ (200 mg/L)、NaCl (8,000 mg/L)、Na₂HPO₄ (1,150 mg/L) です。

参考文献

- Principles and Methods of Toxicology, Third Edition, A.W. Hayes, Ed., Raven Press (1994) pp. 1231–1258;
- J Immunol Methods 177, 101 (1994);
- J Microbiol Methods 17, 1 (1993);
- J Neurosci 15, 5389 (1995);
- J Cell Sci 106, 685 (1993);
- Pflügers Arch 427, 24 (1994);
- Cytometry 20, 181 (1995);
- J Biol Chem 270, 23895 (1995);
- J Biol Chem 270, 7791 (1995);
- J Neurosci 14, 2464 (1994);
- J Neurosci 14, 2260 (1994);
- J Biol Chem 269, 6803 (1994);
- J Cell Biol 133, 1041 (1996);
- J Cell Biol 133, 1053 (1996);
- J Immunol Methods 177, 101 (1994);
- Hum Immunol 37, 264 (1993)

製品リスト 現在の価格は、当社のウェブサイトまたはカスタマーサービス部から入手いただけます。

カタログ番号	製品名	サイズ
C1430	calcein, AM	1 mg
C3099	calcein, AM *1 mg/mL solution in dry DMSO* *special packaging*	1 mL
C3100	calcein, AM *special packaging*	20 x 50 µg
E1169	ethidium homodimer-1 (EthD-1).....	1 mg
L3224	LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*	1 kit
C36950	CountBright™ absolute counting beads	5 mL

Contact Information

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Service Department in Eugene, Oregon.

Please visit our website—probes.invitrogen.com—for the most up-to-date information.

Molecular Probes, Inc.

29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402
Phone: (541) 465-8300 • Fax: (541) 335-0504

Customer Service: 6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0338 • Fax: (541) 335-0305 • probesorder@invitrogen.com

Toll-Free Ordering for USA:
Order Phone: (800) 438-2209 • Order Fax: (800) 438-0228

Technical Service: 8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0353 • Toll-Free (800) 438-2209
Fax: (541) 335-0238 • probetech@invitrogen.com

Invitrogen European Headquarters

Invitrogen, Ltd.
3 Fountain Drive
Inchinnan Business Park
Paisley PA4 9RF, UK
Phone: +44 (0) 141 814 6100 • Fax: +44 (0) 141 814 6260
Email: euroinfo@invitrogen.com
Technical Services: eurotech@invitrogen.com

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Limited Use Label License

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402. Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2005, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.