

# 生細胞・死細胞を染め分けたい

## 使用製品

-Cellstain®- Double Staining Kit [CS01]

## 解析装置



## I はじめに

-Cellstain®- Double Staining Kit [セルステイン細胞二重染色キット (Code: CS01)] は、生細胞染色用蛍光色素 Calcein-AM と、死細胞染色用蛍光色素 PI(Propidium Iodide)で構成され、生細胞及び死細胞の染め分けに使用される。ここではこのキットの使用法を中心に説明する。

Calcein-AM は、蛍光色素 Calcein の四つのカルボキシル基をアセトキシメチル (AM) 化して脂溶性を高め細胞膜透過性としたものである。それ自体蛍光はないが、生細胞の細胞膜を浸透して細胞内に入ると、細胞内のエステラーゼにより加水分解され、黄緑色の強い蛍光を発する。一方、PIは核酸染色色素の一つで、死細胞内に入り込み、細胞内の DNA の二重らせん構造にインターカレートすることにより、特有の強い赤色蛍光を発する。

この作用の異なる二つの色素を同時に使用することにより、生細胞は黄緑色に、死細胞は赤色に染め分けることができる。蛍光顕微鏡下の細胞観察はもちろん、更にはフローサイトメトリへの応用が可能である。

蛍光色素を利用した細胞染色は、Trypan blue を用いた分染法に代わる高感度な方法として期待される。

## II 試薬類

### 1. キット内容

- Cellstain®- Double Staining Kit
- A液…Calcein-AM stock solution (1 mmol/l)
  - Calcein-AM, 1 mg/ml in DMSO, 50 µl..... 4 vials
- B液…PI stock solution (1.5 mmol/l)
  - PI, 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O, 300 µl ..... 1 vial

### 2. キットの保存及び取り扱い

このキットは密封して -20°C以下で冷凍保存すること。Calcein-AM は水分により加水分解する恐れがあるので、吸湿しないよう注意する。緩衝液や培養液などに希釈した染色溶液は、必要に応じて用時調製し、その日の内に使い切ること。PI溶液は冷凍保存すれば1年以上安定である。PIは発癌性の恐れがあるので、注意事項2)を熟読の上、取り扱いには充分注意すること。

## III 蛍光顕微鏡を使用した細胞形態観察

以下に、HeLa 細胞を使用した場合の細胞染色の例を示すが、染色条件は細胞の種類、濃度などの観察条件によって変わるので注意すること。条件に応じて細胞の固定や、試薬濃度の調整など最適条件を検討する必要がある。

### 1. 染色溶液の調製

- 1) A液およびB液を室温に戻す。
- 2) 5 ml の PBS(-) に A液 10 µl、B液 15 µl を入れる。これを染色溶液とする。この時、Calcein-AM は 2 µmol/l、PI は 4 µmol/l の濃度となる。

### 2. 細胞染色

- 1) HeLa 細胞等の付着細胞はトリプシン - EDTA などで剥がし細胞の懸濁液を用意する。
- 2) 細胞懸濁液を遠心分離する (1,000 rpm、3 min)。
- 3) 上清を除き PBS(-) を添加する。(この時、細胞数が 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cells/ml となるよう調整する) ペレットングなどで十分分散させる。
- 4) 培養液中の血清などに含まれるエステラーゼにより Calcein-

AM が加水分解し、バックグラウンドが上昇するので PBS(-) による洗浄、遠心分離を数回繰り返す。

- 5) マイクロチューブに細胞懸濁液を 200 µl 入れ、更に色素溶液を 100 µl 入れる。37°Cで 15 分間 インキュベートする。
- 6) カバーガラス上に染色した細胞溶液を適宜サンプリングし、上からもう一枚のカバーガラスを重ね染色溶液を挟みこむ。
- 7) 蛍光顕微鏡にセットし、まず 490 ± 10 nm のフィルターで励起すると黄緑色に染色された生細胞が観察される。また、同時に赤色に染色した死細胞も観察することが出来る。さらに 545 nm のフィルターで励起することにより赤色に染色した死細胞のみを蛍光観察することができる (図 1)。

### 3. 色素の最適濃度

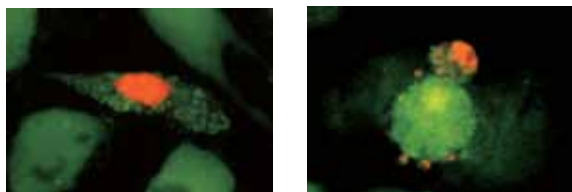


図 1 -Cellstain®- Double Staining Kit を使用した二重染色例  
Cell line: MHD-1, Detection: 488 nm (excitation)  
—広島大学医学部 山本正夫先生提供—

使用する Calcein-AM 及び PI の最適濃度は、細胞の種類に依存するので、使用する細胞毎に最適色素濃度を求める必要がある。以下の操作により、それぞれの細胞毎の最適濃度を求めることを薦める。

- 1) 目的とする細胞を、0.1% サポニン、あるいは 0.1~0.5% のジギトニンで 10 分間処理するか、70% エタノールで 30 分間処理することにより死滅させる。0.1~10 µmol/l の PI 溶液にて染色し、細胞質を染めることなく核のみを赤色に染色する濃度域を探し出す。
- 2) 1) の死細胞を使用し、0.1~10 µmol/l の Calcein-AM 溶液にて染色し、死細胞の細胞質を染色しない濃度域を探し出す。更にその濃度域で生細胞が十分染色することを、生細胞を使用して確認する。染色が十分でない場合は、Calcein-AM 濃度を上げることで染色条件を決定する。

## IV 注意事項

- 1) Calcein-AM は湿気によりエステル部位が加水分解する恐れがあるので、使用後はキャップをしっかり閉じ、水分の混入を避けて下さい。
- 2) PI は発癌性の疑いがあるので下記の点を参考にし、取り扱いには十分に注意して下さい。
  - ・ 取り扱い時には手袋・保護眼鏡・マスク等を着用し、接触および吸引しないよう注意して下さい。
  - ・ 万一、皮膚に接触した場合は、直ちに大量の水で洗い流して下さい。
  - ・ 処理方法  
使用した器具の洗浄液などの廃液は、各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理して下さい。

## 参考文献

- 1) L. S. De Clerck, C. H. Bridts, A. M. Mertens, M. M. Moens, W. J. Stevens, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 172, 115 .
- 2) E. S. Kaneshiro, M. A. Wyder, Y. -P. Wu, M. T. Cushion, *J. Microbiol. Methods*, **1993**, 17, 1 .
- 3) N. G. Papadopoulos, G. V. Z. Dedoussis, G. Spanakos, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, M. Papamichail, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 177, 101.

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料