

# 生細胞数を測りたい(蛍光測定)

## 使用製品

Cell Counting Kit-F [CK06]

## 解析装置



### I はじめに

Cell Counting Kit-F(Code:CK06)は、蛍光法により細胞の viability を定量するキットである。キット構成成分の Calcein-AM は、生細胞に容易に取り込まれ、細胞内のエステラーゼによりエステル部位が加水分解される。加水分解生成物(Calcein)は蛍光を発し、その蛍光を定量することにより、生細胞数を測定することができる。蛍光測定であることから、高感度に測定することが可能であり、HL60 細胞では 50 cells/well まで検出することができる。また細胞増殖アッセイとしてよく用いられる、<sup>3</sup>H]チミジン取り込み試験との相関も良好である。

Cell Counting Kit および Cell Counting Kit-8 では検出困難である還元物質が存在する場合や、低細胞濃度領域での測定に有用である。

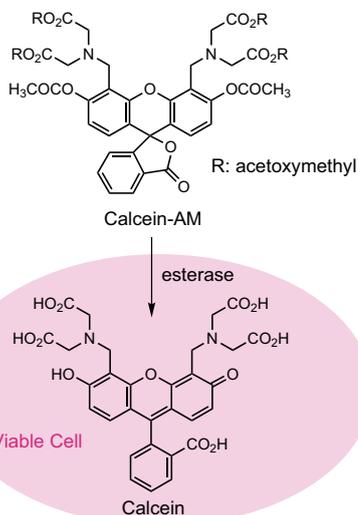


図1 Calcein-AMの発蛍光機構

### II 試薬、器具類

- (1) 器具・培養器具(培養フラスコ、ピペット)
  - ・マルチピペット(4、8 または 12 チャンネル)
  - ・血球計算盤
  - ・96 穴マイクロプレート
- (2) 機器
  - ・遠心機
  - ・炭酸ガスインキュベーター
  - ・マイクロプレートリーダー(蛍光)
- (3) 試薬
  - ・Cell Counting Kit-F 溶液  
Cell Counting Kit-F を PBS(-) で 50 倍に希釈する。希釈は使用前に行い、希釈後は早めに使用する(注意事項参照)。
  - ・PBS(-)                      ・ D-MEM
  - ・RPMI1640                  ・ ウシ胎児血清
  - ・Trypsin 溶液

### III 細胞数測定法

1. 付着性細胞 (HeLa など) の場合
  - 1) 対数増殖期にある細胞を Trypsin 溶液処理などで回収する。
  - 2) 血球計算盤などで細胞を計数し、細胞懸濁液を調製する。
  - 3) マルチピペットなどを用いて、細胞を 96 穴マイクロプレートに 100 μl ずつ播種する。
  - 4) 炭酸ガスインキュベーター内で前培養する。
  - 5) 培地を捨て、PBS または血清、フェノールレッド不含の培地 (100 μl) に置換する。
  - 6) Cell Counting Kit-F 溶液を各ウェルに 10 μl ずつ添加する。
  - 7) 室温で 15 ~ 30 分反応させる。
  - 8) 蛍光プレートリーダーで測定する (励起波長 480 ~ 500 nm、蛍光波長 500 ~ 535 nm)。

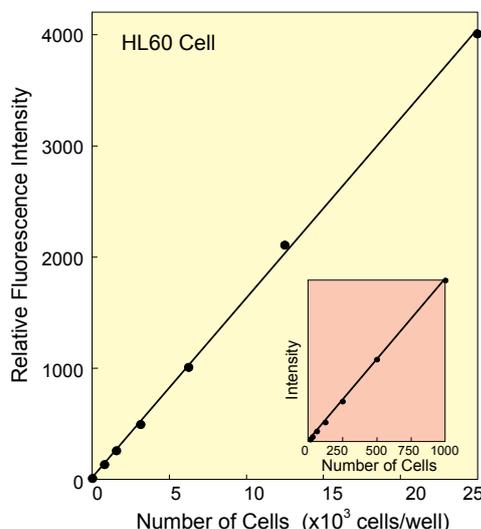
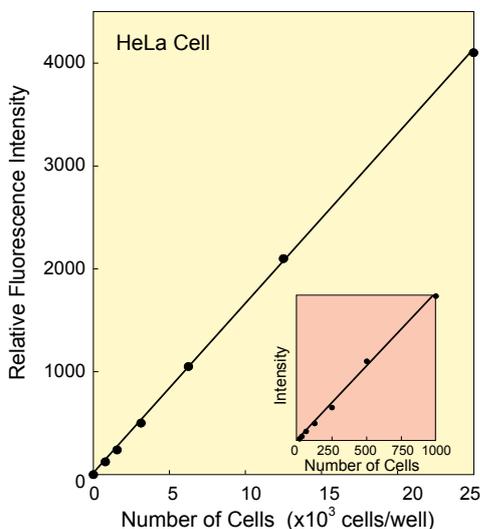


図2 細胞数測定例

Reaction buffer : PBS(-)  
Incubation : 30 min, room temperature  
Detection : 485 nm (励起), 535 nm (蛍光)

## 2. 浮遊性細胞 (HL60 など) の場合

- 1) 対数増殖期にある細胞を Trypsin 溶液処理などで細胞を回収する。
- 2) 血球計算盤などで細胞を計数し、細胞懸濁液を PBS(-) または血清、フェノールレッド不含の培地で調製する。
- 3) マルチピペットなどを用いて、細胞を 96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$ l ずつ播種する。
- 4) Cell Counting Kit-F 溶液を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加する。
- 5) 室温で 15~30 分反応させる。
- 6) 蛍光プレートリーダーで測定する (励起波長 480~500 nm、蛍光波長 500~535 nm)。

## IV 毒性試験法

- 1) 80% コンフルエントの細胞を血球計算盤で計数して細胞懸濁液を調製する。
- 2) マルチピペットを用いて 100  $\mu$ l ずつ、96 穴マイクロプレートの各ウェルに細胞懸濁液を分注する。ブランク (バックグラウンド値) 用のウェルには培地のみを 100  $\mu$ l 加える。
- 3) 炭酸ガスインキュベーター内で 48~72 時間培養したのち、培地を吸引により除く。浮遊細胞の場合には、吸引する前に遠心操作により、細胞を沈殿させておく。新たに培地 100  $\mu$ l を各ウェルに加える (培地交換)。ブランク用のウェルには培地のみ 100  $\mu$ l 加える。
- 4) 培地で種々濃度に調製した被験物質液を 10  $\mu$ l ずつ添加する。ブランクおよび陰性対照のウェルには、培地を 10  $\mu$ l ずつ加える。
- 5) 37°C の炭酸ガスインキュベーター内で 24 ~ 72 時間、培養する。
- 6) 培地を吸引により除く。浮遊細胞の場合には、吸引する前に遠心操作により、細胞を沈殿させておく。
- 7) PBS または血清、フェノールレッド不含の培地を 100  $\mu$ l 添加する。ブランク用のウェルにも同様に 100  $\mu$ l 加える。
- 8) Cell Counting Kit-F 溶液を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加する。
- 9) 室温で 15~30 分放置する。
- 10) 蛍光プレートリーダーで測定する (励起波長 480~500 nm、蛍光波長 500~535 nm)。

### 細胞傷害率の算定法

下記の式により細胞生存率を算出する。これを種々の被検物質濃度に対してグラフに表し、生存率が 50% になる値を IC<sub>50</sub> (50% 細胞傷害率) とする。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

A<sub>s</sub>: 検体の蛍光強度 (細胞、被検物質および Cell Counting Kit-F 溶液の入ったウェル)

A<sub>c</sub>: 陰性対照の蛍光強度 (細胞および Cell Counting Kit-F 溶液の入ったウェル 被検物質無し)

A<sub>b</sub>: ブランク蛍光強度 (培地および Cell Counting Kit-F 溶液の入ったウェル 細胞無し)

## V 注意事項

- 1) Cell Counting Kit-F は冷凍で 6 ヶ月安定です。
- 2) Cell Counting Kit-F を PBS(-) で希釈した溶液は、徐々に加水分解が進むので、使用前に希釈して下さい。希釈して長時間放置したものを使用すると、蛍光強度は弱くなります。一日経過すると加水分解してしまい使用できません。必要量以上に調製を行わないで下さい。例えば、100 回分しか使用しないときは Cell Counting Kit-F 20  $\mu$ l を分取し、PBS(-) 1 ml に希釈して下さい。
- 3) Cell Counting Kit-F は血清成分およびフェノールレッドの影響を受けるので、Cell Counting Kit-F 溶液を添加する前に血清、フェノールレッド不含の培地、または PBS(-) などの緩衝液に置換して下さい。
- 4) Cell Counting Kit-F 溶液の添加量が少ないため、ウェルの側壁に付着しよく混和されていない場合があります。プレートの底を軽く叩き、確実に試薬溶液と緩衝液 (培地) を混合して下さい。96 ウェル以外のプレート (6, 12, 24 ウェル) をご使用の場合は、1/10 量の Cell Counting Kit-F 溶液をウェルに添加して下さい。
- 5) 励起フィルターは 480 nm~500 nm、蛍光フィルターは 500 nm~535 nm をご使用下さい。

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