

昆蟲細胞(SF9)的 自動細胞計數與存活率 測定：染劑比較

背景介紹

哺乳動物細胞和昆蟲細胞等蛋白質生產系統廣泛應用於生命科學、生物技術和生物醫學產業。值得注意的是，像 SF9 細胞株這樣的昆蟲細胞由於具有以下優點而廣泛應用於蛋白質表達：易於培養、放大過程中具有成本效益，與哺乳動物細胞相比對滲透壓的耐受性更高。然而，確保高品質的蛋白質生產需要監測細胞濃度(Cell concentration)和存活率(Viability)，以維持健康的細胞培養和穩健的蛋白質生產。當與適當的染色方法配合使用時，LUNA-FX7™ 自動細胞計數器可以為此目的提供一種便捷的技術。本研究旨在比較不同的染劑(Dye)種類，並推薦用於評估 SF9 細胞存活率的最佳染劑。

染色步驟

- SF9 細胞以Logos Biosystems原廠染劑進行染色：
- Trypan Blue (TB) Stain, 0.4% (T13001)
- Acridine Orange (AO) / Propidium Iodide (PI) Stain (F23001)
- Fluorescein Diacetate (FDA) / Propidium Iodide (PI) Stain (F23214)

Trypan blue staining

1. Mix:

- 10 μ L TB, 0.4%
- 10 μ L cell sample

2. Load 10 μ L of stained cells.

3. Perform analysis using the LUNA-FX7™.

*Default protocol

Fluorescence staining

1. Mix:

- 2 μL pre-mixed dyes or 1 μL per individual dye
- 18 μL cell sample

2. Load 10 μL of stained cells.

3. Perform analysis using the LUNA-FX7™.

*注意：SF9細胞可能根據使用的染劑不同，表現出不同的螢光強度。請依據需求進行參數調整。

用於存活率測定的染劑

Dye	Properties	Colors
Trypan Blue (TB)	Membrane-impermeable dye	Blue (BF)
Fluorescein Diacetate (FDA)	Membrane-permeable esterase-activated dye	Green (FL)
Acridine Orange (AO)	Membrane-permeable nuclear dye	
Propidium Iodide (PI)	Membrane-impermeable nuclear dye	Red (FL)

*BF: Bright Field, FL: fluorescence.

用於 SF9 細胞評估的最佳染劑

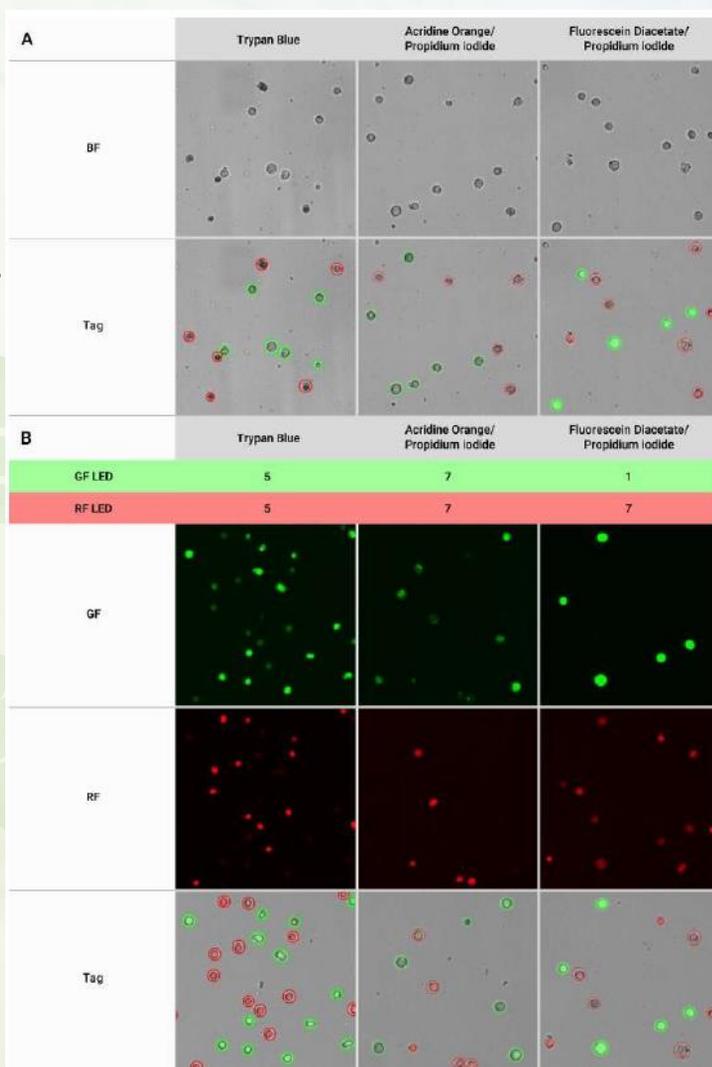
TB 和 FDA/PI 均可用於 SF9 細胞染色以進行存活率測量(圖 1A)，但 FDA/PI 是首選。

TB 通常用於評估 SF9 細胞的細胞濃度和存活率。然而，建議避免在貼壁培養時使用 TB，因為這需要在繼代培養 (Subculturing) 過程中進行物理操作。SF9 細胞容易受到機械力 (Mechanical force) 和攪動 (Agitation) 的影響，導致在貼壁培養時產生細胞碎片 (Cellular debris)。細胞碎片可能導致 TB 與樣品中的各種顆粒產生非特異性結合，而這個問題在懸浮培養中可能不太明顯。

在評估螢光染劑組合時，將 U937 細胞以 AO/PI 染劑組合進行染色，作為驗證染劑性能的參考。雖然 AO/PI 染劑通常對大多數哺乳動物細胞有效，但其功效可能因不同細胞類型而異。事實上，用 AO/PI 染劑組合染色的 SF9 細胞表達出的是低訊號強度。本研究中推測，這種差異可能是因為與哺乳動物細胞相比，昆蟲細胞的基因組大小相對較小所致。為了克服這個問題，與哺乳動物細胞典型的 Exposure level 參數 5 相比，建議將 GF 和 RF 的 Exposure level 參數皆調整為 7。雖然 PI 表達了足夠強的訊號，但調整 Exposure level 參數後 AO 的訊號強度仍然較低。儘管所有細胞都被成功標記，但微弱的 AO 訊號可能使得整體計數結果表現較差(圖 1B)。

考慮到上述問題，在測試的染劑種類中，FDA/PI 是 SF9 細胞計數和存活率評估最有效的染劑。FDA 依賴細胞酯酶 (Cellular esterase) 活性，該活性對酵母菌和昆蟲細胞等各種細胞類型都有效，無論基因組大小如何。FDA 可以在細胞質 (Cytosol) 中表達高訊號，此時需要將 GF Exposure level 參數降低至 1。

圖 1. (A) 使用 TB、AO/PI 和 FDA/PI 對 SF9 進行染色的結果。SF9 細胞可被 TB 和 FDA/PI 有效染色，而 AO/PI 染色則表達較低綠螢光訊號。(B) AO/PI 和 FDA/PI 染色的 SF9 細胞與 AO/PI 染色的 U937 細胞之染色結果比較。每個樣品都應用了不同的 LED 等級。



Tag：所有通道(螢光和明視野)的疊圖影像，並使用紅色和綠色圓圈標記已識別的物體(Objects)。紅色圓圈表示死細胞，綠色圓圈表示活細胞。

結論

SF9 細胞存活率評估最建議的染劑選擇是 FDA/PI，因為它具有一致的表現(Performance)和相容性(Compatibility)。當 FDA/PI 與 SF9 細胞一起使用時，LED 等級參數需要調整為 GF 1 / RF 7，因為 FDA 可以產生高訊號，而 PI 訊號與應用於哺乳動物細胞時相比可能較低。不建議對貼附培養的 SF9 繼代培養進行 TB 染色，儘管在懸浮培養時這個問題可能會得到緩解。此外，增加 LED 曝光等級可能會解決一部份 AO/PI 染色 SF9 細胞後，AO 產生低訊號的問題。然而，這種方法可能會影響 LUNA-FX7™ 自動細胞計數器的整體表現。綜合以上，選擇合適的染劑和調整 LUNA-FX7™ 自動細胞計數器的最佳 Exposure level 參數，可以為監測 SF9 細胞品質提供一種很好的方法。

原廠文章：[Automated cell counting and viability measurement of Insect cells \(SF9\): Comparison of staining method](#)