

【今更聞けない、、、死細胞染色用試薬を使った時の Compensation control ってどうしたらよいの？】

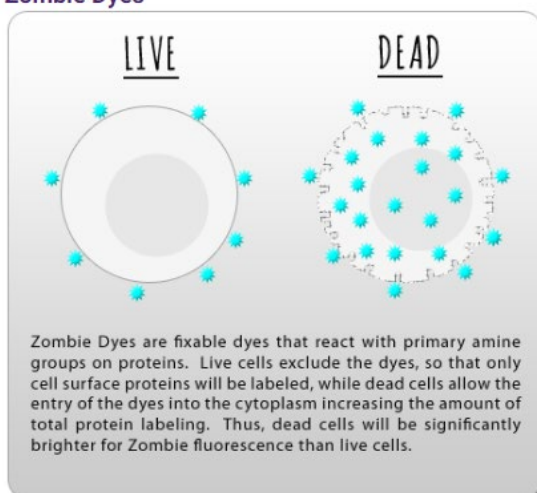
フローサイトメリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、、」ですが、今回は死細胞染色用試薬を使った際に Compensation control はどのように作成したらよいかについてお話ししたいと思います。

フローサイトメーターのスペック向上に伴い、同時に使用する抗体量も増加する傾向にあります。必然的に少ない細胞分画を見ることが多くなりますが、そうなるとデータ解釈の邪魔をするのが死細胞の存在です。死細胞は抗体を非特異的に吸着させてしまうことがあるため、擬陽性が出やすくなります。それを防ぐために死細胞をゲートアウトしてから細胞サブセットを同定する必要があります。

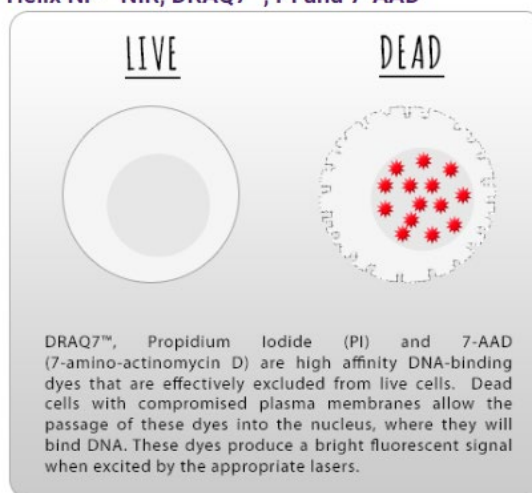
死細胞をゲートアウトするために使用するのが死細胞染色試薬です。

死細胞染色試薬には、核酸染色系の試薬（PI や 7-AAD）とアミン反応系試薬に大別されますが、どちらも細胞が死ぬと細胞膜構造が崩れることを利用して、死細胞を染色する試薬です。

Zombie Dyes



Helix NP™ NIR, DRAQ7™, PI and 7-AAD



PLAN

 I plan to run my cells live through the flow cytometer without any fixation. (Sorting live cells)



Propidium Iodide, 7-AAD, or Zombie Dyes

 I plan to fix my cells before I do any staining with antibodies.



Zombie Dyes prior to fixation.

 I plan to stain my cells with antibodies and then fix my cells.



Zombie Dyes prior to antibody staining and fixation.

 I plan to fix and permeabilize my cells for intracellular antibody staining.



Zombie Dyes prior to fixation.

 My cells are already fixed.



No Live/Dead options available.

OPTIONS

多重染色の際の Compensation control 作成は以前お話したように非常に重要です（参照：[第 38 回：今更聞けない、、、Compensation Beads を使ったコンペンセーションって正しいの？](#)）。死細胞染色試薬を使用した際には、当然 Compensation control として、死細胞染色試薬で単染色したサンプルを用意する必要があります（ダンブチャンネルなので、Compensation control がいないという考え方もありますが、基本はコンペンセーションが必要です）。

この死細胞染色試薬の単色コントロールを作った際によくあるトラブルの一つは、細胞の viability が良いために死細胞が染まらないということです。

そのような場合が想定される場合、取るべき方法は 2 つあります。

① 細胞を殺して使う

熱処理（例えば、56℃45 分間）や、エタノール処理（90%エタノール処理 1 分間など）などの方法があります

② アミン反応系 Comp beads を使う

アミン反応系の死細胞染色試薬で染色することのできる Compensation control 用のビーズがあります。

Spherotech 社製品 #CARCP-70-2K SPHERO™ COMPtrol Amine-Reactive Dye Compensation Kit

①の方法は、核酸染色系の試薬（PI や 7-AAD）とアミン反応系試薬と両方に適応可能です。汎用性が高いですが、手間がかかるのも事実です。②の方法は、アミン反応系試薬でのみ使用可能ですが、手間がかからないことや普段ビーズで Compensation を行っている場合に死細胞染色試薬を使えるといったメリットがあります。

試薬等を賢く使って、正確なデータ採取を心がけていただければと思います。

アミン反応系死細胞染色試薬：[BioLegend 社製品 Zombie Dyes](#)

PI 試薬：[BioLegend 社製品 #421301 Propidium Iodide Solution](#)

7AAD 試薬：[BioLegend 社製品 #420403/420404 7-AAD Viability Staining Solution](#)

アミン反応系 Comp beads：[Spherotech 社製品 #CARCP-70-2K COMPtrol Amine-Reactive Dye Compensation Kit, 2 populations \(Negative & High Binding\)](#)

※Spherotech 製品は、TDB web サイト Top 画面右上：[検索](#) から
製品番号（CARCP-70-2K）検索がおすすめ

「今更聞けない、、、」シリーズ 記事まとめページは[こちら](#)