

## Cell Counting – Trypanblau oder AO/PI?



# DID YOU KNOW?

### Was ist Viability?

Viability, auch Zellviabilität genannt, bezeichnet den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation. Dabei wird die Viability als Prozent der lebenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtheit aller (toten und lebendigen) Zellen in der Probe angegeben.

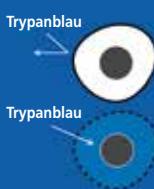
### Welche Methode ist geeignet für die Bestimmung des Lebendanteils, also der Viability?

Trypanblau (TB) ist seit langem der Standard für eine selektive Färbung toter Zellen und Gewebe. Bei einigen Zelltypen können jedoch Fluoreszenzanalysen, zum Beispiel mit Acridinorange (AO) und Propidiumiodid (PI), genauere Ergebnisse liefern.

#### Trypanblau

Trypanblau eignet sich gut zur Bestimmung der Viability von Proben mit minimalem Anteil an Zelltrümmern.

Sofern die Membran nicht beschädigt ist, kann der Farbstoff nicht in die Zellen eindringen, so dass er nur tote Zellen blau färbt.



#### Lebende Zellen

Trypanblau kann nicht durch intakte Zellmembranen dringen, daher bleiben lebende Zellen ungefärbt.

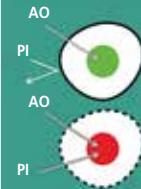
#### Tote Zellen

Trypanblau färbt Zellen mit geschädigten Membranen blau.

#### AO/PI Fluoreszenz

AO ist eine Zellmembran-durchlässige, Nukleinsäure-bindende Fluorophore, die die Kerne aller Zellen in einer Probe färbt.

PI ist ein Nukleinsäure-bindender Farbstoff, der nicht in lebende Zellen eindringen kann, sich jedoch zum Färben toter, kernhaltiger Zellen eignet.



#### Lebende Zellen

AO durchdringt die Zellmembran und färbt lebende Zellen, so dass sie grün fluoreszieren

#### Tote Zellen

AO und PI färben tote kernhaltige Zellen, die aufgrund von FRET rot fluoreszieren.

### Welche Methode für welche Zelltypen?

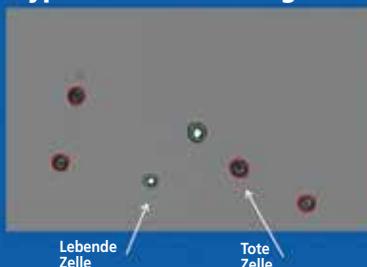
#### Trypanblau oder AO/PI:

- Proben mit minimalen Zelltrümmern
- Zellkultur-Proben

#### AO/PI empfohlen:

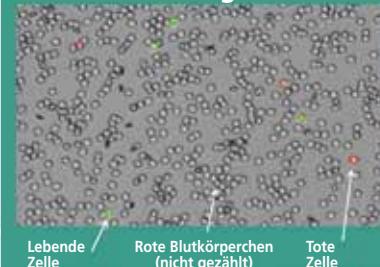
- Primäre Zellen
- Isolierte Kerne
- Vollblutproben
- Hefen und kleine Zellen
- Proben mit deutlichen Verunreinigungen/Zelltrümmern
- Hepatozyten
- Zellen mit im Hellfeld sichtbarer innerer Struktur

### Trypanblau-Zellzählung



Lebende Zellen im Hellfeld zeigen ein helles Zentrum mit einer schwarzen Membran. Trypanblau färbt tote Zellen dunkel. Lebende Zellen müssen entweder manuell oder durch Zählalgorithmen von Zelltrümmern unterschieden werden.

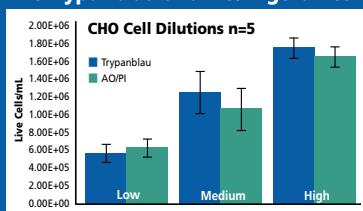
### AO/PI-Zellzählung



Mit AO/PI gefärbte Zellen fluoreszieren entweder grün (lebend) oder rot (tot). Zelltrümmer und kernlose Zellen werden nicht gefärbt, so dass die Analyse nicht subjektiv ist.

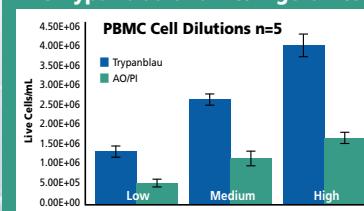
### Datenvergleich für Trypanblau und AO/PI

#### Mit Trypanblau und AO/PI gezählte CHO-Zellen.



CHO-Zellen können sowohl mit Trypanblau als auch mit AO/PI genau gezählt werden. Die Zellzahlen für jede Verdünnung sind bei beiden Zählmethoden ähnlich.

#### Mit Trypanblau und AO/PI gezählte PBMCs.



Mit AO/PI werden PBMCs genau gezählt. Die Zellzahlen werden beim Zählen mit Trypanblau überschätzt, da Zelltrümmer und kernlose rote Blutkörperchen falsch gezählt werden.

### Zusammenfassung – Trypanblau oder AO/PI?

Hellfeldmessungen mit Trypanblau eignen sich hervorragend für die schnelle Ermittlung der Zellzahl und Lebensfähigkeit von Zellproben mit minimalen Zelltrümmern. Der Farbstoff ist jedoch nur begrenzt in der Lage, Zellen vom Hintergrund oder von Zelltrümmern zu unterscheiden. Duale Fluoreszenzmessungen mit AO/PI ermöglichen die spezifische Identifizierung lebender und toter Zellen in Gegenwart einer großen Anzahl kernloser Zellen und Zelltrümmern und beseitigen die mit kolorimetrischen Farbstoffen verbundene Subjektivität.

#### Good to know:

Der Einsatz automatischer Cell Counter, wie z.B. dem CellDrop, zur Bestimmung der Viability entfernt nicht nur die Subjektivität aus dem Prozess, sondern beschleunigt den Arbeitsablauf und ermöglicht anpassbare Berichte und Datenarchivierung.

**Übrigens:** Trypanblau ist zwar ein bewährter Farbstoff zur Zellzählung, gilt aber als gesundheitsschädlich und zytotoxisch. Erythrosin B ist ein biologisch sicherer und ungiftiger kolorimetrischer Farbstoff, der mit ähnlichem Funktionsprinzip als Alternative zu Trypanblau für Zellzählung und Beurteilung der Viability verwendet werden kann.