

## Flow Cytometry -Cell Lab Quanta™-

4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール(DAPI)または  
ヨウ化プロピジウム(PI)による核染色を用いた DNA 細胞周期解析

## はじめに

真核細胞の増殖には、細胞周期として知られるいくつかの段階があります。

細胞周期の一連の過程は、以下のように同定することができます: 静止もしくは休止期の状態( $G_0$  期)に始まり、細胞増殖と染色体複製のための準備が行われます( $G_1$  期)。続いて DNA の合成期(S 期)を経て、細胞が分裂するための準備が行われます( $G_2$  期)。有糸分裂により細胞周期が完結し(M 期)、分裂した娘細胞へと引き継がれます。

フローサイトメトリーは、細胞の DNA 含量を迅速に測定でき、細胞周期の状態やその調節を観察するのに便利な研究手段です。指数関数的に増殖する細胞集団の DNA 含量分布では、 $G_0/G_1$  期細胞が最初のピーク、S 期細胞が谷間、 $G_2/M$  期細胞が 2 番目のピークを形成します。 $G_2/M$  期の細胞は、DNA 含量が  $G_0/G_1$  期の 2 倍となります(図 4 参照)。

DAPI やヨウ化プロピジウムなどの核染色蛍光色素は、適切な染色条件下で DNA に選択的に結合するので、Cell Lab Quanta™ で DNA 含量を測定することができます。これらの蛍光色素によって染色された細胞は、DNA 含量に直接的に比例した蛍光を発します。

Cell Lab Quanta は、細胞容積、核容積(EV)と蛍光とを同時に測定するフローサイトメトリーシステムです。細胞処理方法により、細胞核の容量を測定することができます。このアプリケーションノートでは、水銀アークランプと DAPI、または、488 nm レーザとヨウ化プロピジウムを用い、DNA を蛍光染色した細胞の細胞周期解析についてご紹介します。

## 材料

- FLOW-CHECK Fluorospheres 製品番号 6605359
- DNA Prep 試薬キット 製品番号 6607055
- NIM-DAPI 製品番号 731085
- フィルタチップ 製品番号 731087
- 細胞浮遊液または新鮮もしくは凍結組織
- リン酸緩衝生理食塩水(PBS)
- ニジマス赤血球(TRBC) 製品番号 629972  
(DNA Reference Calibrator)

## 測定手順

## &lt;NIM-DAPI 法&gt; 裸核染色法

## 浮遊細胞

1. NIM-DAPI 1 mL に TRBC を 1 滴、添加します。
2. NIM-DAPI 1 mL に細胞浮遊液を添加し、細胞最終濃度を  $1 \sim 2 \times 10^6$  個/mL になるようにします。

すべてのサンプルを  $\sim 25 \mu\text{m}$  のフィルタチップで濾過し、測定します。

## 固形組織検体

1. 新鮮組織または凍結組織を NIM-DAPI 2 mL を入れた組織破砕用のディッシュに取ります。
2. 組織が溶液と完全に混和するよう細かく切り刻みます。細胞の最終濃度が  $1 \sim 2 \times 10^6$  個/mL になるように調整します。
3.  $\sim 25 \mu\text{m}$  のフィルタチップで濾過し、測定します。

## &lt;DNA Prep 試薬キット法&gt;

## 浮遊細胞

1. 細胞の最終濃度が  $3 \sim 5 \times 10^6$  個/mL になるよう調整した単細胞浮遊液または TRBC  $100 \mu\text{L}$  に LPR 試薬を  $100 \mu\text{L}$  添加します。
2. Vortex ミキサーで良く攪拌し、DNA PrepStain 試薬を 2 mL 添加します。
3. Vortex ミキサーで良く攪拌し、 $25 \mu\text{m}$  のフィルタチップで濾過して、測定します。

## 固形組織検体

1. 新鮮組織または凍結組織を 2 mL の PBS を入れた組織破砕用のディッシュに取り、細かく切り刻みます。
2. 細胞の最終濃度が  $3 \sim 5 \times 10^6$  個/mL となるように調整したサンプル  $100 \mu\text{L}$  に LPR 試薬を  $100 \mu\text{L}$  添加し、Vortex ミキサーで良く攪拌します。
3. DNA PrepStain 試薬を 2 mL 添加し、Vortex ミキサーで良く攪拌します。
4.  $\sim 25 \mu\text{m}$  のフィルタチップで濾過し、測定します。  
488nm レーザについては、FLOW-CHECK Fluorospheres を用いて測定機器の調整を行ってください。  
水銀アークランプについては、DNA Reference Calibrator (TRBC) を用いて調整してください。

## <細胞周期プロトコル>

蛍光チャンネルのディスクリミネータ下限を調整して、蛍光にトリガーをかけます。TRBCの蛍光チャンネルが125となるように設定します。ディスクリミネータ下限を調整し、TRBCの蛍光より低い位置にでるサンプルのデブリを除去します。EVは、チャンネル200に核の集団がくるように調整します。測定するサンプルのDiploid G0/G1ピークがチャンネル200になるように調整します。

TRBCなどのDNA Reference Calibratorを内部標準として用いると、測定するサンプルのdiploidピーク位置を一定にすることができます。TRBCピークとの比率により、DNAヒストグラムの各ピーク位置を同定することができます。

## 測定機器の構成

### DAPI(図1参照)

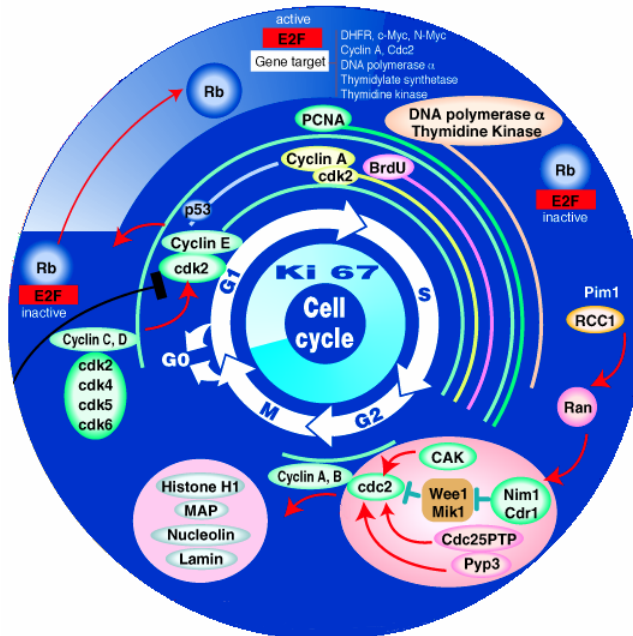
- ・水銀アークランプ-365 nm
- ・UG1 励起フィルタ
- ・560 ダイクロイックショートパスフィルタ
- ・450/55 バンドパスフィルタ(FL1)
- ・570 ロングパスフィルタ(FL2)

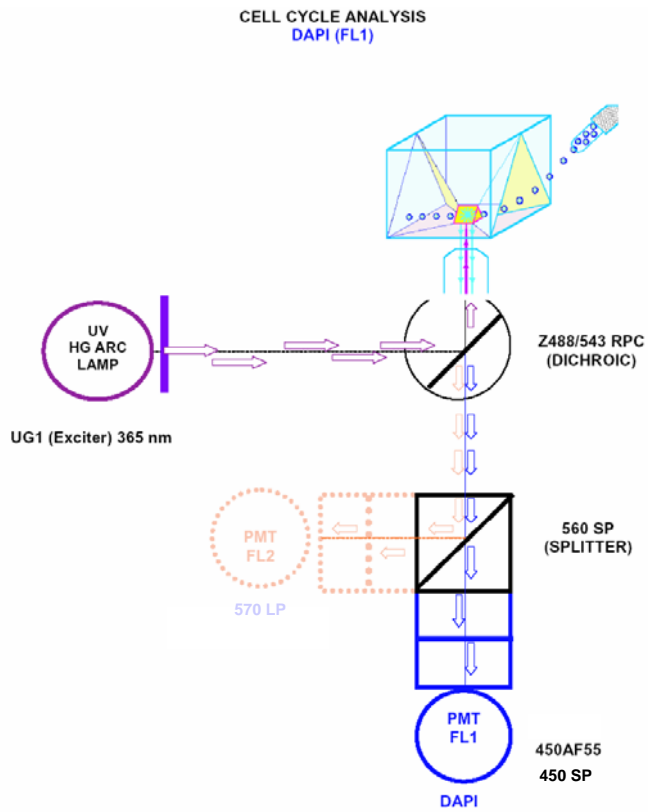
### ヨウ化プロピジウム(図2参照)

- ・488 nm レーザ 20 mW
- ・560 ダイクロイックショートパスフィルタ
- ・525/40 バンドパスフィルタ(FL1)
- ・570 ロングパスフィルタ(FL2)

## 参考文献

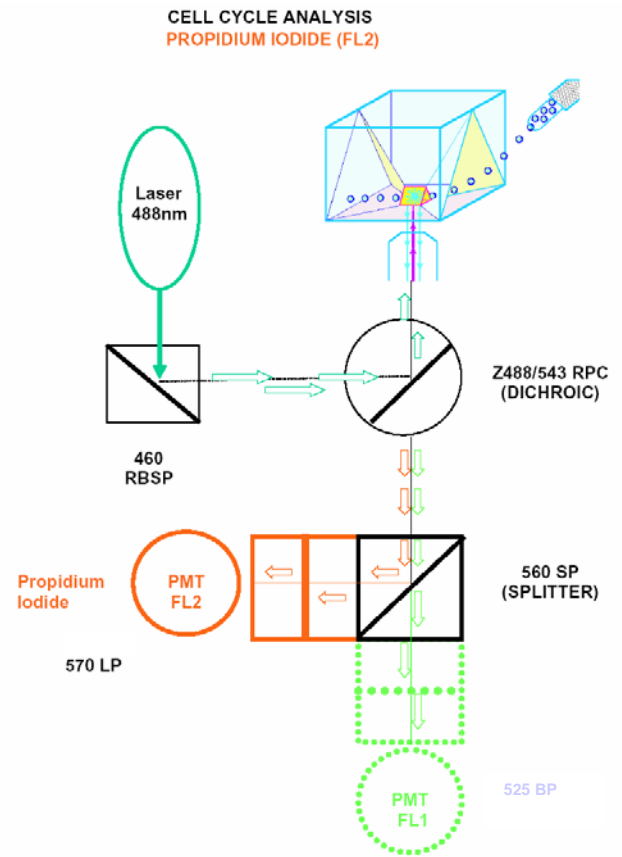
1. Raber M.N. and Barlogie R.: 1990. DNA Flow Cytometry of Human Solid Tumors. In: Flow Cytometry and Sorting. 2nd ed., New York, NY: Wiley-Liss, Inc, p. 745-754.
2. Krishan A., Ganapathi R.N. and Israel M.: 1978. Effect of adriamycin and analogs on the nuclear fluorescence of Propidium iodidestained cells. Cancer Res. 38: 3656-3662.
3. Shapiro H.M.: 1995. Practical Flow Cytometry, 3rd ed. New York, NY. Wiley-Liss, p. 198-199, 266-267, 372-373.
4. Vindelov L.L., Christensen I.J. and Nissen N.I.: 1983. Standardization of high-resolution flow Cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as interna reference standards. Cytometry 3: 328-331.
5. Ormerod M.G.: 1994. Analysis of DNA general ethods in Flow Cytometry: A Practical Approach (second edition, Ormerod MG ed.) Oxford University Press, New York, NY
6. Krishan A., Cabana R.: 2004. Flow Cytometric Analysis of Electronic Nuclear Volume and DNA Content in Normal Mouse Tissue. Cell Cycle 3:3, 380 - 38





**図1.**

水銀アークランプ使用時のCell Lab Quantaの光学系配置



**図2.**

488 nmダイオードレーザー使用時のCell Lab Quantaの光学系配置

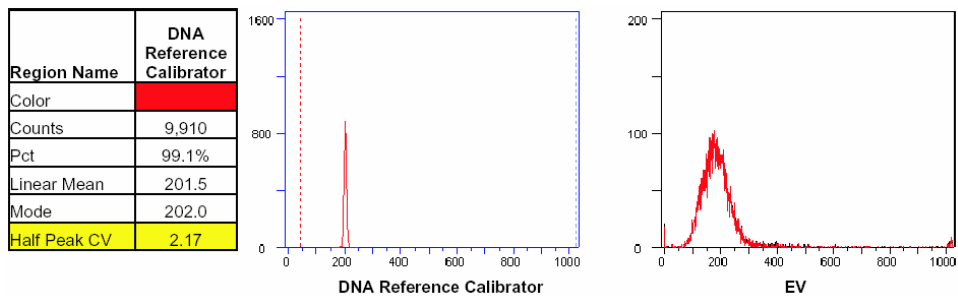


図3.

NIM DAPIで染色したDNA Reference Calibrator (TRBC)

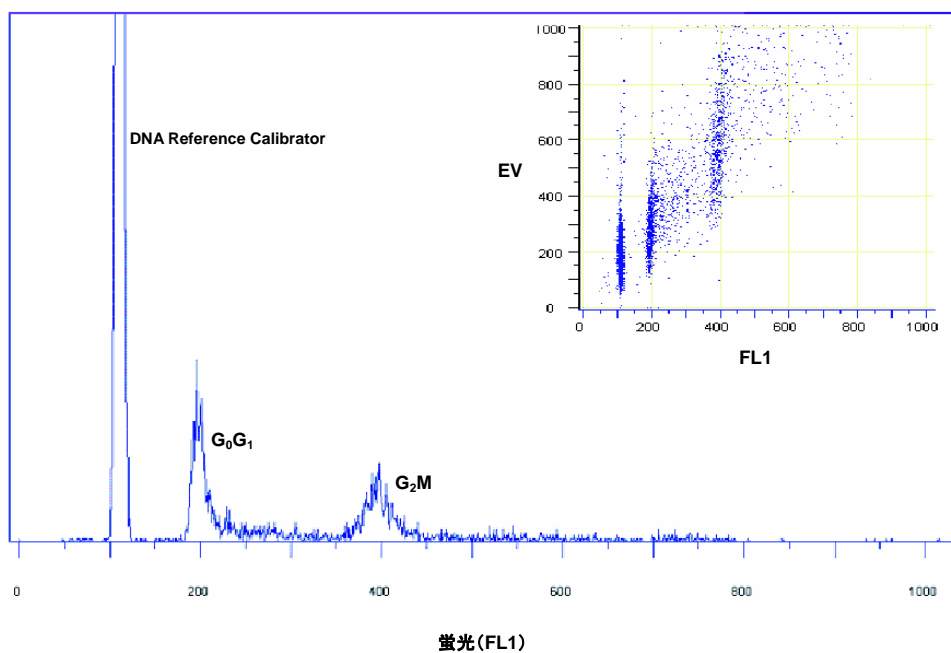


図4.

NIM DAPIで染色したCEM細胞株とDNA Reference Calibrator

ベックマン・コールター株式会社

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460  
 e-mail bckkcas@beckmancoulter.co.jp URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

本 社：〒135-0063 東京都江東区有明2-5-7 TOC有明ウエストタワー 大阪支店：〒560-0083 大阪府豊中市新千里1-1-8 第一火災ビル8F  
 全国サポートセンター：札幌・仙台・名古屋・広島・福岡