Application Note

1

染色体解析

はじめに

フローサイトメーターの染色体解析への応用により、高い精度での核型分析（Flow Karyotyping）が可能となりました。現在、Flow Karyotyping による染色体異常解析や植物染色体の解析なども試みられています。フローサイトメーターを用いることにより、染色体の解析／分取（Sorting）をより速く、人為的誤差を少なく行うことができます。分取した細胞を用いてヒトやマウスの染色体特異的ライブラリーの作製、マッピング、あるは染色体導入実験等に用いられています。

原理

分裂阻害剤（コルセミド、TN16 等）により、M 期で停止させた細胞から染色体を調製し、DNA に特異的に結合する蛍光色素で染色します。
代表的な、DNA 染色蛍光色素としては次の 3 種類があります。

1. PI（プロピジウムイオダイド）、EB（エチジウムブロマイド）
   DNA 鎖の隣り合った塩基対の間に挿入されるため、染色体中の DNA 含量に良く相関します。
2. Hoechist33342（33258）
   A−T（アデニン−チミン）塩基対により結合しやすい蛍光色素です。
3. ChromomycinA3
   G−C（グアニン−シトシン）塩基対により結合しやすい蛍光色素です。

蛍光色素で標識された染色体の解析には 1.の PI や EB で標識し、488nm の波長を持つレーザーで測定するシングルレーザー方式と 2.の Hoechist33342（33258）と 3.の ChromomycinA3 で標識し、UV 波長を持つレーザーと 458nm の波長を持つレーザーで測定するデュアルレーザー方式とがあります。
表 1 に各蛍光色素と励起するレーザーの組合わせを示します。

	PI	EB	Hoechist33342（33258）	ChromomycinA3
結合様式	塩基対	塩基対	A-T 塩基対	G−C 塩基対
使用レーザー（励起波長）	（空冷･水冷）Ar レーザー（488nm）	（空冷･水冷）Ar レーザー（488nm）	水冷 Ar レーザー（330～360nm）	水冷 Ar レーザー（458nm）

表1：染色体を標識する蛍光色素

デュアルレーザー方式は、シングルレーザー方式に比べ、DNA 含量に対する情報に加え、塩基対組成に関する情報をも同時に解析することにより、高い分解能で各染色体を解析できます。シングルレーザー方式よりさらに詳細な解析結果を得ることができます。
デュアルレーザー方式データ（図 1）とシングルレーザー方式データ（図 2）を示します。

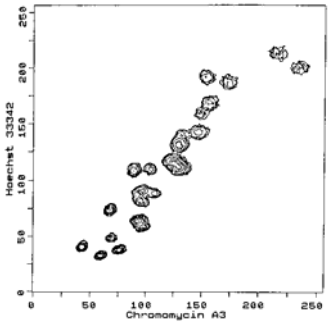


図 1：デュアルレーザー方式データ

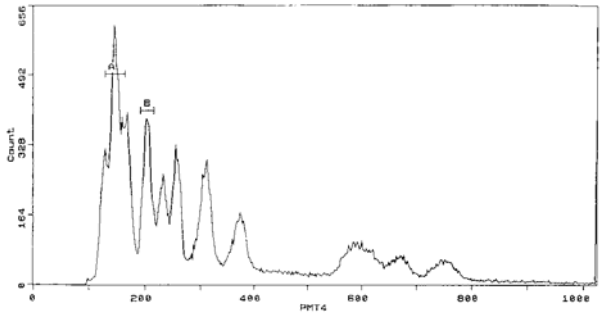


図 2：シングルレーザー方式データ

サンプル調製 ①　－低張処理を用いる方法－

Ⅰ．サンプル

細胞：CHO（チャイニーズ･ハムスターオバリー細胞）

Ⅱ．試薬

PI	SIGMA 社 Cat# P-4170
RNase	SIGMA 社 Cat# R-4875
Dithiothreitol	関東化学　Cat# 10752
Triton-X	半井化学　Cat# 335-01
NP-40	半井化学　Cat# 253-23

Ⅲ．溶液

- 低張処理溶液：　50mM KCl
  10mM $MgSO_4$
  5mM HEPES
  0.25mg／mL RNase
  3mM Dithiothreitol　（用時加える）
  上記を蒸留水に溶解し pH8.0 に調製します。
- 2.5% Triton-X 溶液：　2.5%Triton-X になるよう蒸留水に溶解します。
- 50μg／mL PI 溶液：50μg／mL になるよう PI を 75mM KCl に溶解します。

全ての試薬･溶液は、使用前に 0.22μミリポアフィルタを通します。

Ⅳ．その他

- 23～26 ゲージ注射針
- 注射筒
- 0.22μミリポアフィルタ
- 40μナイロンメッシュ（FCM で M 期を確認する場合）

Ⅴ．サンプル処理

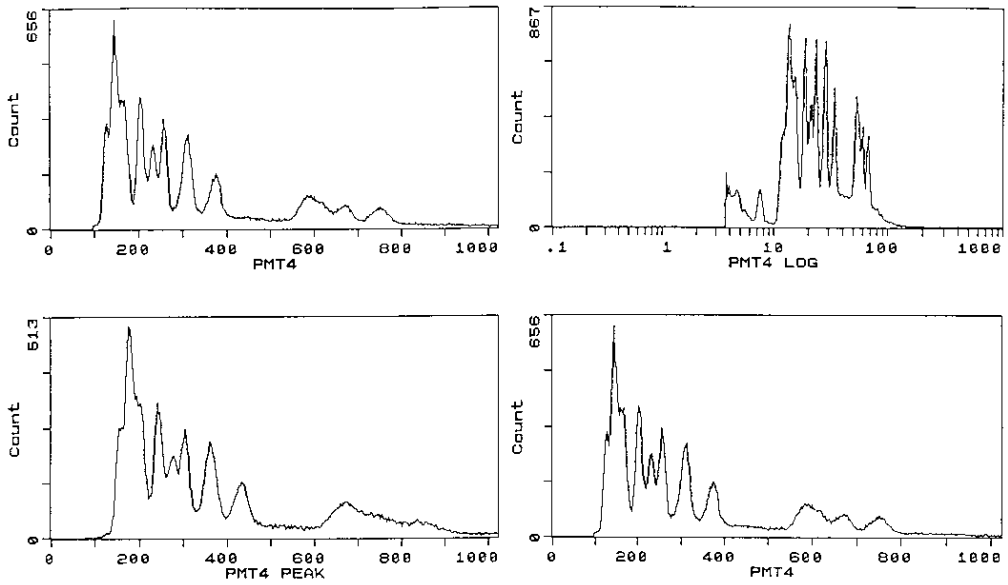
1. セルサイクルを M 期で止める為、メディウムにコルセミドを加え CO_2 インキュベータで培養します。
   コルセミドの濃度と投与のタイミングは細胞により異なります。
   ここでは、100μg／mL、インキュベートの時間は 3～4 時間培養しました。

2. M 期の細胞が良好に集まっているか確認し、良ければ培養を止め M 期の細胞を分離します（Mitotic Index 10%以上。
   M 期の細胞の確認：　M 期の細胞が形態的に他の期と異なる場合は顕微鏡で確認します。
   または、PI 染色を行い M 期の細胞を確認します。
   （1）PI 染色（蛍光顕微鏡）：　メディウム浮遊液中の細胞を一部取り、最終濃度 50μg／mL になるよう低張 PI 溶液を加え 30 分程度放置し、蛍光顕微鏡で確認します。
   （2）PI 染色（FCM）：　メディウム浮遊液中の細胞を一部取り、最終濃度 50μg／mL になるよう低張 PI 溶液を加え 30 分程度放置し、FCM で確認します。
   低張 PI 溶液：　50μg／mLPI
   0.1%クエン酸ナトリウム
   0.2%NP-40
   0.25%RNase
   上記を蒸留水に溶解します。
3. メディウムに細胞を浮遊させ、遠心洗浄します（1,500rpm×5 分）。
4. PBS を加えて遠心洗浄します（1,500rpm×5 分）。
5. 細胞数 1～10×10^6 に対して低張処理溶液 1mL を加えます。室温で 10 分放置します。
6. 2.5%Triton-X を 0.1mL（最終濃度 0.25%）加え、室温で 10 分放置します。
7. 23～26 ゲージの針を 2～3 回静かに通します（細胞により針のゲージをかえてください）。
8. 50μg／mL PI 溶液を等量加え、4℃で 30 分放置します。
9. 単一の染色体に分離したかを蛍光顕微鏡で確認します。
10. FCM で測定します。

Ⅵ. 参考文献

Gen van den Engh, et al：Preparation of Chromosome Susupension for Flow Cytometry.Cytometry 5：108-117,1984

Ⅶ. データ例



サンプル調製 ②　ーポリアミン･ジギトニンバッファを用いる方法ー

Ⅰ. サンプル

細胞：

GM130B（ヒトリンパ芽球培養細胞）

Ⅱ. 試薬

TN 16	和光純薬	Cat# 045-09711
コルセミド	Boechringer	Cat# 295892
Digitonin	SIGMA 社	Cat# D-5628
Nutridoma HU	Boehringer	Cat# 11011391
ChromomycinA3	和光純薬	Cat# 038-09781
Hoechist33342	和光純薬	Cat# 539-17191
Sprermine	半井テスク	Cat# 321-13
Spermidine	SIGMA 社	Cat# 5-2501

Ⅲ. 溶液

- PBS（−）
- 75mMKCl
- ポリアミンバッファ：　15mM Tris−HCl（pH7.4）
  2mM EDTA
  0.5mM EGTA
  80mM KCl
  20mM NaCl
  0.2mM Spermine
  0.5mM Spermidine
  14mM 2SHEtOH（用時加える）
- 0.1%ジギトニン／ポリアミンバッファ：　0.1%ジギトニンになるようポリアミンバッファで 37℃にて溶解します。
- ChromomycinA3 染色液：　1.25mM になるよう 0.1M クエン酸、0.2M $NaPO_4$,5mM $MgCl_2$（pH7）含有の溶液で溶解します。
- Hoechist33342（33258）染色液：　0.5mg/mL になるよう蒸留水で溶解します。

すべての試薬･溶液は、使用前に 0.22μミリポアフィルタを通します。

Ⅳ. その他

- 23～26 ゲージ注射針
- 注射筒
- 0.22μミリポアフィルタ
- 20μナイロンメッシュ

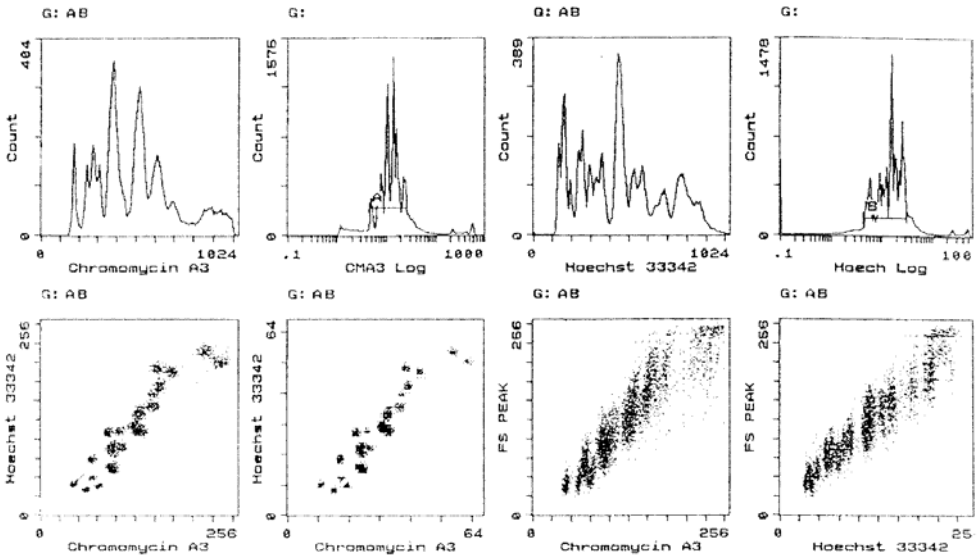
Ⅴ. サンプル処理

1. 2～3×10^5cell／mL の細胞を 0.25%Nutridoma HU 加 RPMI1640（15%FCS 加）で培養します。
2. 6～8×10^5cell／mL の細胞にコルセミド（最終濃度：0.2μg／mL）または TN16（最終濃度：1.5μg／mL）加え、16～18 時間培養します。
   細胞により、コルセミド、TN16 の濃度や培養時間、投与のタイミングは変わります。
3. PBS（−）に懸濁し、遠心洗浄します（900rpm×10 分、4℃）。
4. ペレットに 75mMKCl を加えます（10^7 の細胞に対し 10mL）
5. PBS（−）に懸濁し、遠心洗浄します（900rpm×10 分、4℃）。
6. ジギトニン／ポリアミンバッファをボルッテクスをかけながら、10^7 の細胞に対し 1mL 加えます。
7. 22G のシリンジを 5 回通します。
   この状態で、4℃で 2～3 ヶ月保存可能
8. クロモソームサンプル 20μL にポリアミンバッファ 1.5mL、1M $MgCl_2$ 溶液 15μL を加え、20μm ナイロンメッシュを通します。ChromomycinA3 染色液を、最終濃度が 0.1mM になるよう加えます。
9. 4℃で Over Night で遮光保存します。
10. サンプル 1.5mL に、Hoechist33342 染色液を 6μL 加えます。
11. 30 分、4℃で遮光保存します。
12. FCM で測定します。

Ⅵ. 参考文献

藤本秋佐夫：デュアルレーザー染色体ソーティングとその応用.蛋白・核酸・酵素 Vol.38, No.3, 586-590,1993

Ⅶ. データ例



（ヒトリンパ芽球培養細胞分析例）

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

CE1001 0610