

ハイスピードフローサイトメーター MoFloを用いた染色体分取

はじめに

フローサイトメトリーによる染色体分類^{1,2}(フローカリオタイプング)は、染色体異常^{3,4}を分析するだけでなく、哺乳類の核型分析にも用いられています。有糸分裂細胞から染色体を調製する様々な染色体分離方法^{5~7}が、フローカリオタイプングやフローソーティングのために開発されてきました。高精度なフローカリオタイプングを行うためには、デブリが少なく、単離した染色体を多く得られる良好な染色体サンプルを作る必要があります。このため、二価陽イオン⁷(マグネシウムイオン)やカチオン性ポリアミン⁵(スペルミン、スペルミジン)などの安定化剤をIsolation bufferに使用するプロトコルが用いられてきました。分離した染色体は、1種類(ヨウ化プロピジウム、エチジウムブロマイド)または2種類のDNA特異的蛍光色素(ヘキスト33258、クロモマイシンA3)で標識することにより、1パラメータ解析^{8~10}または2パラメータ解析^{11,12}のフローカリオタイプングを行うことができます。高度に純化された染色体画分は、MoFlo High-Performance Cell Sorterを用いて、迅速に単離することが可能です。

材料と方法

染色体の調製と染色

0.1 μ g/mLのデメコルシンを用い、有糸分裂細胞の割合が最大となる至適時間(例えば、リンパ芽球様細胞株の場合は約6時間)にて、細胞をM期で停止させます。遠心(289 \times g、5分間)し上清を除去したペレットに、低張性KClバッファを添加して、室温で10分間再懸濁します。遠心(289 \times g、5分間)し上清を除去したペレットを、氷冷したポリアミン分離バッファ⁵に再懸濁し、20秒間攪拌します。染色体懸濁液を200 \times gで2分間遠心し、上澄みを20 μ mのメッシュフィルタにてろ過し、5 μ g/mLのヘキスト33258、40 μ g/mLのクロモマイシンA3および10mMのMgSO₄を添加し、オーバーナイトで染色します。フロー解析の1時間前に、染色した染色体懸濁液に、10mMのクエン酸ナトリウムと25mM亜硫酸ナトリウムを加えます。

機器のセットアップ

染色した染色体懸濁液を、2つの水冷アルゴンイオンレーザを搭載したMoFloにて解析します。第1レーザは、ヘキスト33258を励起させるために、マルチラインUV(330~360nm)を出力するように調整し、第2レーザは、クロモマイシンA3を励起させるために、波長457nmを出力するように調整します。両レーザの出力を300mWに設定します。トリガースIGNALは、ヘキスト33258蛍光にします。前方散乱光(FSC)には351/10nmバンドパスフィルタ、ヘキスト33258蛍光は400nmロングパスフィルタと480nmショートパスフィルタ、クロモマイシンA3蛍光は、490nmロングパスフィルタを用いて検出します。MoFloは、各蛍光パラメータと前方散乱光が最小のCVになるよう、3 μ m蛍光ビーズを用いて、あらかじめ調整しておきます。70 μ mのCytonozzleチップを使用し、シース圧を約60 psi、drop drive frequencyを約95 KHzに設定し、高速ソーティングに設定します。さらに、4Way™ Sort上で、1ドロップエンベロープ当たり1モードの高純度ソートオプションを選択します。

解析とソーティング

1,000イベント/秒の速度で、合計100,000イベントのデータを取得し、Summitソフトウェアで解析します。デブリと凝集を除くため、前方散乱が小さく、かつヘキスト33258蛍光の高い領域にゲートしたヘキスト33258とクロモマイシンA3蛍光(図1)の2パラメータフローカリオグラムのデータを示します。

染色体の分取を行うため、2パラメータフローカリオグラム(図2)上で染色体クラスターにソートゲートを作成し、Sort Logic Editorを用いてソートディンジョンを設定し、必要な数の染色体をコレクションバイアルに分取します。

考察

MoFlo High-Performance Cell Sorterにより、哺乳類の細胞株由来の染色体のフローカリオタイプと特定の染色体の精製が可能となります。MoFloのソーティング設定は、高純度で迅速な染色体分離が行えるようカスタマイズすることが可能です。MoFloを用いることにより、染色体ピークの良い分離を保ったまま、染色体サンプルを1秒間に約8,000~12,000イベントで、ソーティングできます。ソーティングされた染色体からDNAや蛋白を抽出でき、ゲノミクス研究^{13~15}やプロテオミクス研究¹⁶に使用できます。

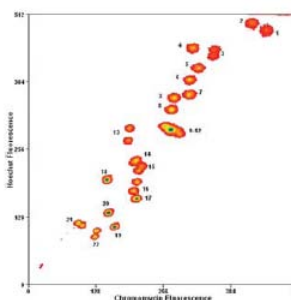


図1
正常ヒト細胞株の2パラメータフローカリオタイプ。染色体をヘキスト33258とクロモマイシンA3で染色した。各染色体型の位置が示されています。Summitソフトウェアにて解析、スムージングをかけて表示。スムージング法: ガウス分布、パス数=2。

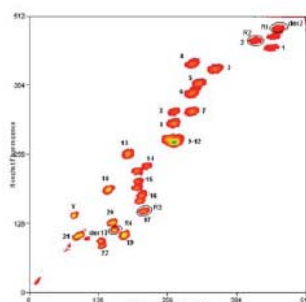


図2
第2染色体と第17染色体の間で転座があったヒト細胞株の、ヘキスト33258蛍光とクロモマイシンA3蛍光の2パラメータプロット。ソートゲートは、転座染色体である派生染色体2(R1)と17(R4)、そしてその正常染色体である第2染色体(R2)と第17染色体(R3)上に設定されています。Summitソフトウェアにて解析、スムージングをかけて表示。スムージング法: ガウス分布、パス数=2。

参考文献

1. Gray JW et al. High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. Clin Chem (21) 1975; 1258-62.
2. Stubblefield E, Cram, S. & Deaven, L. Flow micro-fluorometric analysis of isolated Chinese hamster chromosomes. Exp Cell Res (94) 1975; 464-8.
3. Gray JW et al. Application of flow karyotyping in prenatal detection of chromosome aberrations. Am J Hum Genet (42) 1988; 49-59 (1988).
4. Gray JW and Langlois RG. Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting. Annu Rev Biophys Chem (15) 1986; 195-235.
5. Sillar R and Young BD. A new method for the preparation of metaphase chromosomes for flow analysis. J Histochem Cytochem (29) 1981; 74-8.
6. Bijman JT. Optimization of mammalian chromosome suspension preparations employed in a flow cytometric analysis. Cytometry (3) 1983; 354-8.
7. Van den Engh G, Trask B, Cram S and Bartholdi M. Preparation of chromosome suspensions for flow cytometry. Cytometry (5) 1984; 108-17.
8. Cram LS, Bartholdi MF, Ray FA, Travis GL and Kraemer PM. Spontaneous neoplastic evolution of Chinese hamster cells in culture: multistep progression of karyotype. Cancer Res (43) 1983; 4828-37.
9. Green DK et al. Karyotyping and identification of human chromosome polymorphisms by single fluorochrome flow cytometry. Hum Genet (66) 1984; 143-6.
10. Young BD, Ferguson-Smith MA, Sillar R and Boyd E. High-resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow cytometry. Proc Natl Acad Sci USA (78) 1981; 7727-31.
11. Van den Engh, GJ, Trask BJ, Gray JW, Langlois RG and Yu LC. Preparation and bivariate analysis of suspensions of human chromosomes. Cytometry (6) 1985; 92-100.
12. Langlois RG, Yu LC, Gray JW and Carrano AV. Quantitative karyotyping of human chromosomes by dual beam flow cytometry. Proc Natl Acad Sci USA (79) 1982; 7876-80.
13. Fiegler H et al. Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. J Med Genet (40) 2003; 664-70.
14. Gribble SM et al. Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. Chromosome Res (12) 2004; 35-43.
15. Gribble S, Ng BL, Prigmore E, Burford, DC and Carter NP. Chromosome paints from single copies of chromosomes. Chromosome Res (12) 2004; 143-51.
16. Wray W and Wray VP. Proteins from metaphase chromosomes treated with fluorochromes. Cytometry (1) 1980; 18-20..