

データ解析による核集団のゲーティング

倍数性解析における核の蛍光と側方散乱光をもとにしたゲーティング

植物の倍数性およびゲノムサイズの解析ではさまざまな夾雑物の蛍光ノイズにより、ヒストグラム上で核のピークが識別できない場合があります。このような場合、フローサイトメトリーでは粒子の形態的情報を含む散乱光を同時に測定することにより、測定データから核集団のデータを抽出することが可能です。ここでは、CyFlow Ploidy Analyser (側方散乱光の測定が可能なモデル) で測定したデータから核のPI蛍光と側方散乱光 (SSC, Side Scatter) をもとにしたゲーティングによる核集団データの抽出についてご紹介します。

ゲーティング

フローサイトメトリーにおけるゲーティングとは、さまざまな粒子を含むサンプル全体の測定データから2種類以上の測定パラメーターにもとづいて目的の粒子集団のデータを抽出することを示します。

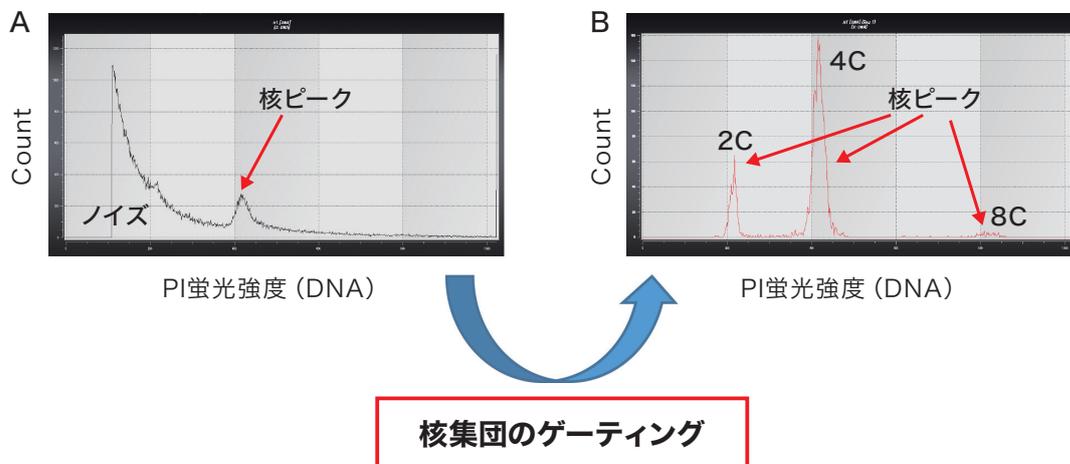


図1 カイワレ大根の子葉からCyStain PI Absolute T (弱酸性) を用いてサンプルを調製し、CyFlow Ploidy Analyserで測定。

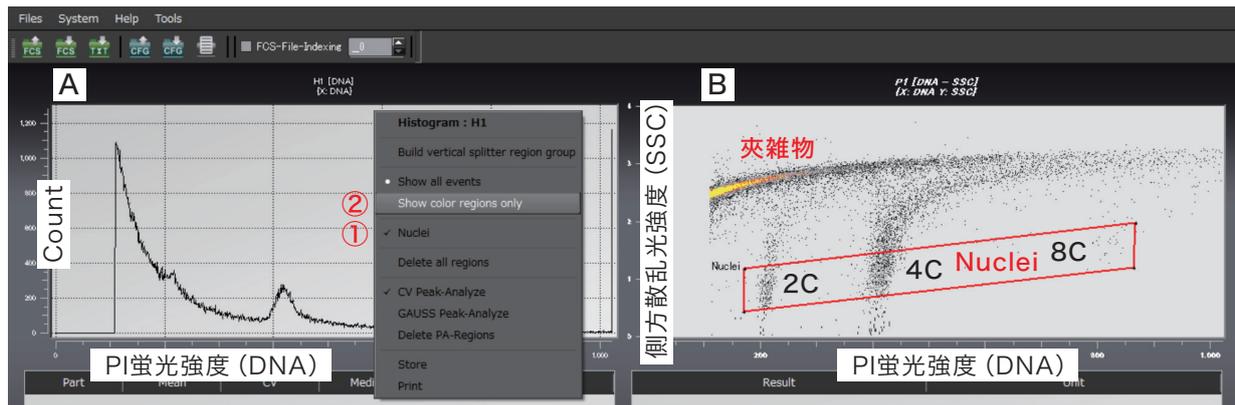
カイワレ大根の子葉からCyStain PI Absolute T (弱酸性) を用いてサンプルを調製した場合、夾雑物がうまく除去されずヒストグラム上で核のピークが識別できません (図1A)。このような場合、核のPI蛍光と側方散乱光の2つの測定パラメーターを用いてドットプロットを作成し、核集団をゲーティングすることにより核のピークを検出することができます (図1B)。

装置

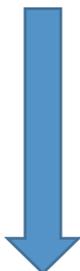
- ・ 核染色色素の蛍光および散乱光が同時に測定できる装置。
 - CY-S-3039_V2 CyFlow Ploidy Analyser “PI” (品番：AN834999)
 - CY-S-3039_V3 CyFlow Ploidy Analyser “DAPI + PI” (品番：BG111836) など

図2Aのヒストグラムでは夾雑物のために核のピークが識別できません。一方、図2BのPI蛍光と側方散乱光のドットプロットでは、夾雑物の集団ならびに異なる倍数性（核内倍加）を示す核の集団が観察されます。

図2 CyFlow Ploidy Analyser [PI測定] のメイン画面



核集団のゲーティング



1. 図2BのPI蛍光と側方散乱光のドットプロットにおいて、核の集団を含むリージョン (赤枠、Nuclei) を設定します。
2. 図2AのPI蛍光のヒストグラム上で右クリックし、メニュー画面を表示します。
3. メニュー画面より表示させたいリージョン (Nuclei) にチェックを入れ (①)、Show color regions onlyを選択し (②) ヒストグラムにゲートをかけます (図2A)。
4. ゲートリージョン内の粒子についてのデータのみがヒストグラムに反映されます (図2C)。

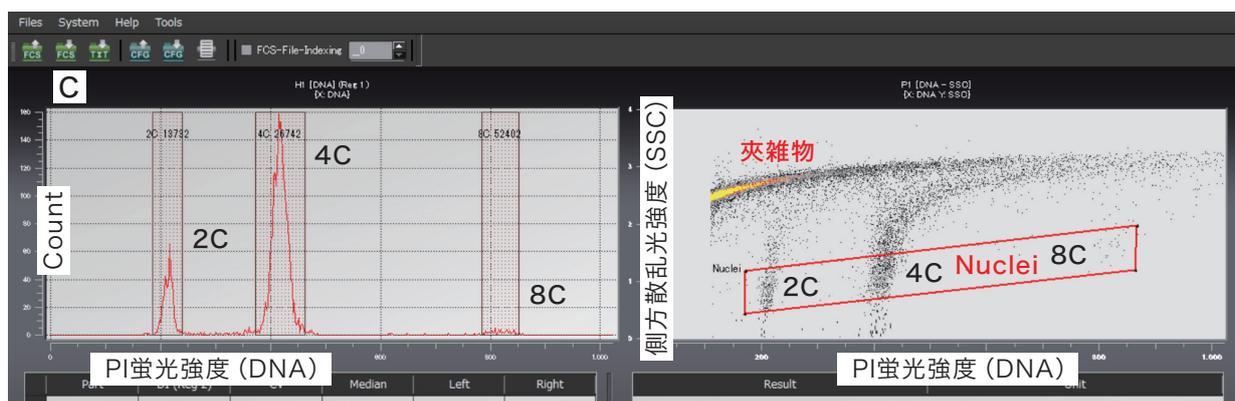


図2Aのヒストグラムでは核のピークが識別できませんでしたが、核集団でゲートをかけることにより、図2Cのヒストグラムでは個別の核ピークが観察されるようになりました。

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557