

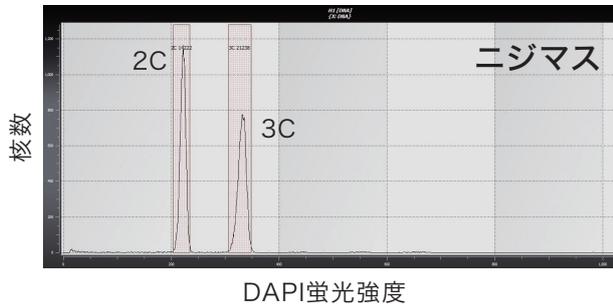
# 水産物の倍数性およびゲノムサイズの解析法

## CyStain DNA染色キットを用いたフローサイトメトリー

水産養殖において、染色体操作技術による性の統御や不妊個体の作出など、いわゆる倍数性育種が注目されています。このような育種技術の開発にあたって、作出された個体の倍数性およびゲノムサイズを判定することは非常に重要です。CyFlowシリーズのフローサイトメーターとCyStain DNA染色キットを用いた解析では、それらを迅速かつ正確に判定することが可能です。ここでは、フローサイトメトリーによる魚類・貝類の倍数性およびゲノムサイズの解析におけるサンプル調製方法についてご紹介します。

### フローサイトメトリーによる倍数性およびゲノムサイズの解析

細胞あるいは核をDNA特異的に結合する蛍光色素（DAPI、PIなど）で染色し、その蛍光強度をフローサイトメーターで測定します。内部標準試料の蛍光強度との相対値から倍数性およびゲノムサイズを算出します。



	核数	DNA指数	変動係数	中央値
	Part	DI (2C)	CV	Median
2C	14323	1.00	2.26	14222
3C	14085	1.49	2.17	21238

図1 二倍体、三倍体のニジマス血液を混合し、CyStain DNA 2 stepを用いてサンプル調製後、CyFlow Ploidy Analyserで測定。

※二倍体、三倍体のニジマス血液は近畿大学農学部水産学科水産生物学研究室 小林徹教授よりご提供いただきました。

ピーク蛍光強度の中央値 (Median) は二倍体ニジマス (2C) が14,222、三倍体ニジマス (3C) が21,238であり、これらの相対値から算出したDNA指数 (DI) は二倍体を1.00とした時、三倍体が1.49でした。これは、三倍体ニジマスが二倍体ニジマスのおよそ1.5倍の倍数性およびゲノムサイズであることを示しています。

## 試薬・装置

- CyStain DNA染色キット
  - DAPI染色：CyStain DNA 2 step (品番：AT803834)
  - PI染色：CyStain PI Absolute T (品番：AN695184)
- CellTrics 50  $\mu\text{m}$  (前処理用ろ過フィルター) (品番：BM786910)
- その他, 各キットのプロトコールに準ずる
- フローサイトメーター：(対応可能機種) CyFlow Ploidy Analyserなど
  - DAPI検出 (最大励起波長：345 nm, 最大蛍光波長：455 nm)  
：365 nm UV-LEDまたは355 nm, 375 nmレーザーを搭載した装置
  - PI検出 (最大励起波長：530 nm, 最大蛍光波長：630 nm)  
：532 nmレーザーまたは488 nmレーザーを搭載した装置

## 血液サンプルの調製

1. 腹側尻ビレ後部から針を刺し、背骨にあたる所まで差し込み、背骨下部にある血管から採血します (図2)。
2. 血液1滴を1 mlのPBS (1.5 mg/ml EDTA-2K) に加え、良く混合します。
3. 50  $\mu\text{l}$ を各キットのNuclei Extraction Bufferに加え、軽くボルテックスミキサーで攪拌し、5分間静置します。
4. 再度、軽くボルテックスミキサーで攪拌した後に、CellTrics 50  $\mu\text{m}$ でろ過します。
5. る液に各キットのStaining Bufferを加え染色後、フローサイトメーターで解析します。



図2 ニジマスからの採血

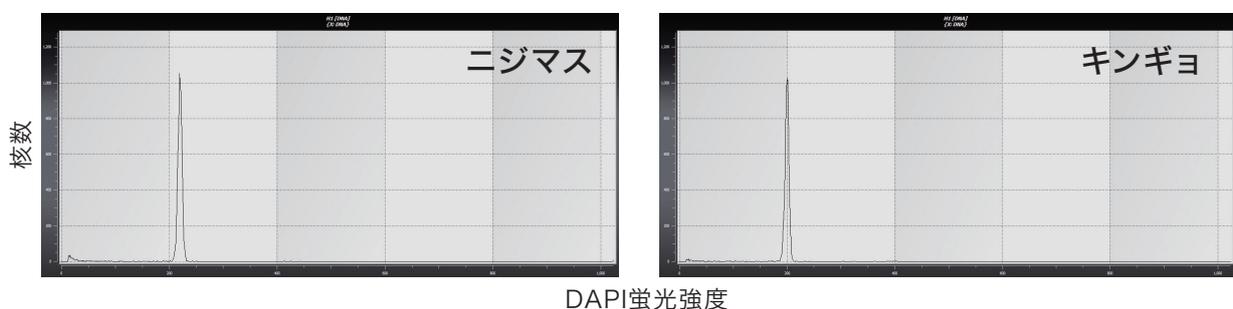


図3 ニジマス、キンギョの血液からCyStain DNA 2 stepを用いてサンプルを調製し、CyFlow Ploidy Analyserで測定。全てのサンプルを同じGain値で測定しています。

### 固形組織サンプルの調製

1. 魚類では尾ビレ（図4A）、貝類では外套膜（図4B）などから約5 mm角の組織を採取します。
2. 各キットのNuclei Extraction Bufferに入れ、軽くボルテックスミキサーで攪拌し、5分間静置します。
3. 再度、軽くボルテックスミキサーで攪拌した後に、CellTrics 50  $\mu\text{m}$ でろ過します。
4. ろ液に各キットのStaining Bufferを加え染色後、フローサイトメーターで解析します。

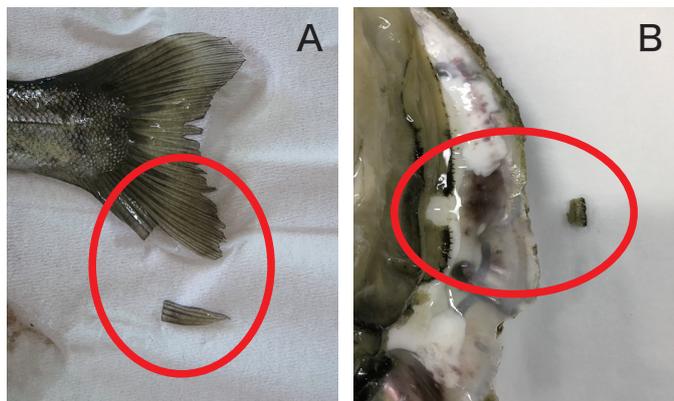


図4 魚類・貝類の固形組織片の採取  
A: ニジマス尾ビレ B: カキ外套膜

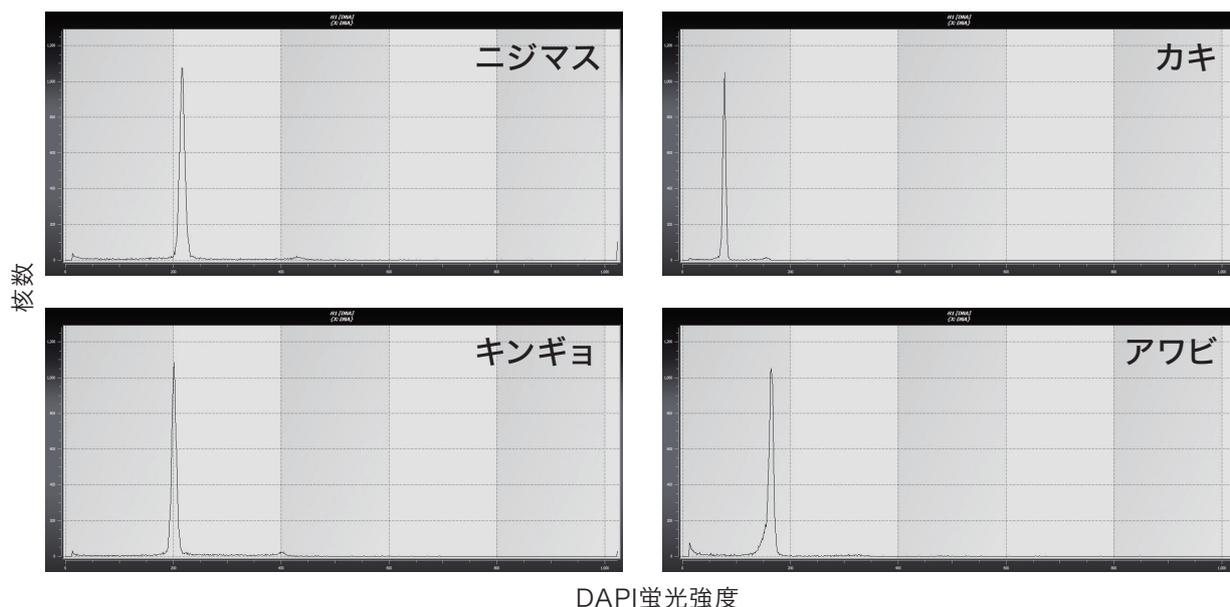


図5 魚類・貝類の固形組織からCyStain DNA 2 stepを用いてサンプルを調製し、CyFlow Ploidy Analyserで測定、全てのサンプルを同じGain値で測定しています。

### ゲノムサイズの解析における内部標準試料と蛍光色素の選択

定量性を高めるために、解析する試料と同程度のゲノムサイズを持つ生物種を内部標準試料とします。蛍光色素は塩基対非選択的に結合する蛍光色素 (PIなど) を使用します。内部標準試料は解析する試料と同時に調製します。

CyFlow Ploidy Analyser				
品番	製品名	製品説明		希望小売価格
CC994237	CY-S-3039_V1 CYFLOW PLOIDY	UV-LED - 365nm, 1パラメーター		3,000,000
AN834999	CY-S-3039_V2 CYFLOW PLOIDY	532nm, 30mW green laser, 2パラメーター		3,900,000
BG111836	CY-S-3039_V3 CYFLOW PLOIDY	UV-LED - 365nm, 532nm 30mW green laser, 2パラメーター		4,500,000
CC270652	CY-S-3080-6 CUBE 6 AUTOLOADER	Cube 6用オートローダー		2,430,000
別売品				
CJ100861	06-500-1040 KEYBOARD	PC用キーボード		7,000
BV637599	06-500-1041 MOUSE	PC用マウス		5,000
BY622643	07-1434 FCS Express RUO	解析ソフトバンドルパック (CyFlow CubeとCyFlow PA購入時)		160,000
AU070850	09-701-0001 Accessories box	アクセサリボックス (PA)		85,000
設置時消耗品				
品番	製品名	包装単位	製品説明	希望小売価格
CU521416	04-4007_R Sheath Fluid	5 L	シース液	5,000
AE454494	04-4009_R Cleaning Solution	250 ml	クレンジング液	4,500
BK728861	04-4010_R Decontamination Solution	250 ml	除染液	7,900
CB632918	04-2000 Sample Tubes 3.5 ml	500 packs	サンプルチューブ 3.5 ml	8,500
ビーズ・コントロール試薬 (レーザーにあわせて)				
BY978539	05-4022 Calibration Beads UV	1.5 ml	キャリブレーションビーズ 2.5 $\mu$ m, UV	56,000
AE733976	05-4006_R Green Calibration Beads	200 tests, 2 ml	キャリブレーションビーズ Green laser	56,000

倍数性やゲノム解析用試薬で定評ある CyStain				
品番	製品名	包装単位	製品説明	希望小売価格
CU246612	05-5001 CyStain UV Ploidy	250 tests	DAPI染色による植物細胞核染色用1ステップ試薬 (中性) 500 ml Staining Solution	15,000
AF009546	05-5002 CyStain UV Precise P	250 tests	DAPI染色による植物細胞核染色用2ステップ試薬 (強酸性) 125 ml Nuclei Extraction Buffer 500 ml Staining Buffer	35,000
CK250398	05-5003 CyStain UV Precise T	250 tests	DAPI染色による植物細胞核染色用2ステップ試薬 (弱酸性) 125 ml Nuclei Extraction Buffer 5 x 0.525 g Buffer Reagent 500 ml Staining Buffer	35,000
CY696051	05-5004 CyStain DNA 1 Step	250 tests	DAPI染色による動物細胞核染色用1ステップ試薬 (中性) 500 ml Staining Solution	15,000
AT803834	05-5005 CyStain DNA 2 Step	250 tests	DAPI染色による動物細胞核染色用2ステップ試薬 (弱酸性) 125 ml Nuclei Extraction Buffer 5 x 0.525 g Buffer Reagent 500 ml Staining Buffer	35,000
BH251553	05-5022 CyStain PI Absolute P	250 tests	PI染色による植物細胞核染色用2ステップ試薬 (強酸性) 125 ml Nuclei Extraction buffer, 500 ml Staining buffer, 2x1.5 ml Propidium iodide, 1x5 mg RNaseA	85,000
AN695184	05-5023 CyStain PI Absolute T	250 tests	PI染色による植物、動物、ヒト細胞核染色用2ステップ試薬 (弱酸性) 125 ml Nuclei Extraction buffer, 500 ml Staining buffer, 5 x 0.525 g Buffer Reagent, 2x1.5 ml Propidium iodide, 1x5 mg RNaseA	85,000

CellTrics (前処理用フィルター)				
フローサイトメーターの詰りの原因となる細胞塊などを除去できる前処理用フィルター。 3-15mlのチューブに対応し、傾斜したフィルターガーゼと減圧孔でスムーズにフィルトレーションが行えます。				
品番	製品名	包装単位	製品説明	希望小売価格
BN285567	04-0042-2313 CellTrics 5 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, black&white, 5 $\mu$ m	45,000
AP275603	04-0042-2314 CellTrics 10 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, black, 10 $\mu$ m	45,000
AN777717	04-0042-2315 CellTrics 20 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, red, 20 $\mu$ m	45,000
BP486257	04-0042-2316 CellTrics 30 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, green, 30 $\mu$ m	45,000
BM786910	04-0042-2317 CellTrics 50 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, yellow, 50 $\mu$ m	45,000
CB364744	04-0042-2318 CellTrics 100 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, blue, 100 $\mu$ m	45,000
BE337612	04-0042-2319 CellTrics 150 $\mu$ m	250 packs	未滅菌セルストレイナー, white, 150 $\mu$ m	45,000

※希望小売価格は消費税別です。

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

ツェンセンセンター 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