

# 植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FCM解析法

CyStain DNA 染色キットは植物や哺乳類細胞のゲノムサイズおよび倍数性を評価するための試薬です。ゲノムサイズおよび倍数性を測定して細胞周期や染色体異常を調べることができます。

### フローサイトメーターによる解析

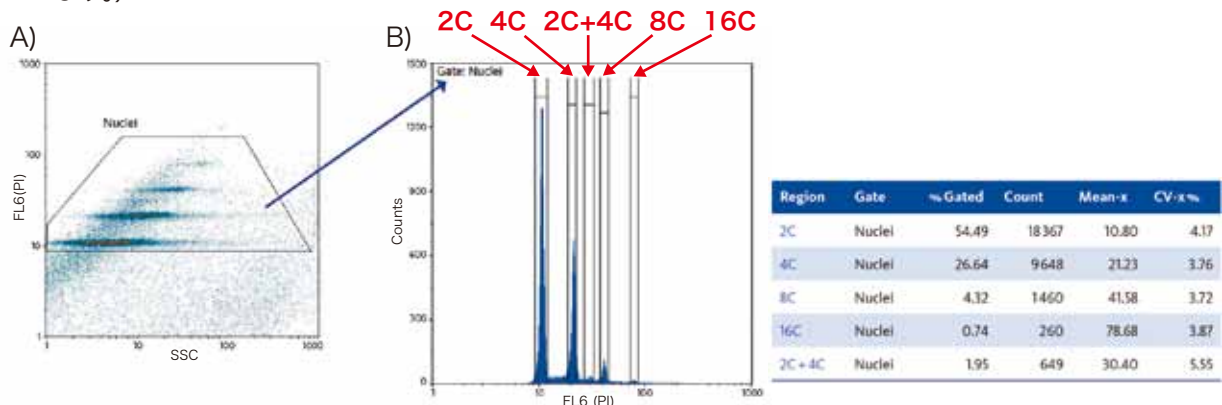
#### 倍数性解析

トマト (*Lycopersicon esculentum*) の倍数性の解析例;

A) DNA以外のバックグラウンドを排除するため横軸 (SSC) と縦軸 (DAPI またはPI の蛍光) でゲーティングします。

B) A) でゲーティングした“Nuclei” をヒストグラム (FL6) で解析した結果

この核内倍加のピークは通常の細胞周期のピーク (2C→4C→8C→16C) に相当します。(核および細胞の分裂がみられない状態での有糸分裂時のDNA複製である核内倍加 (endoreduplication) の現象を示しています。)



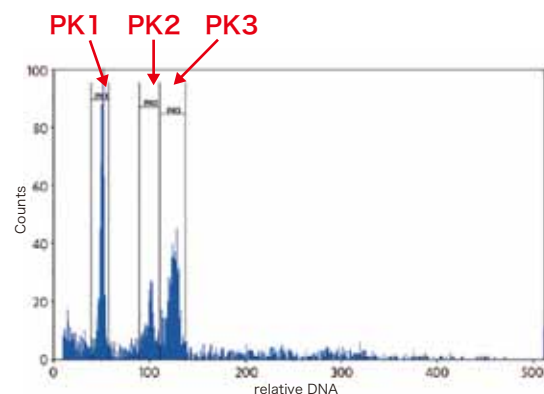
#### ゲノムサイズの測定

内部レファレンスを用いフローサイトメーターにてDNA定量する場合は、定量性の精度を上げるためにPIなど塩基非特異的に結合する二本鎖核酸結合性色素(インターカレーター)を使用します。下記のHorsetail (*Equisetum sp.*) の解析にはPIを使用しています。

| Region | Count | % Gated | GMn-x  | Mean-x | CV-x% |
|--------|-------|---------|--------|--------|-------|
| PK1    | 500   | 25.00   | 49.50  | 49.59  | 6.03  |
| PK2    | 251   | 12.55   | 99.60  | 99.73  | 5.11  |
| PK3    | 534   | 26.70   | 123.97 | 124.11 | 4.74  |

#### Horsetail (*Equisetum sp.*) ゲノムサイズの算出

PK1 とPK2 はレファレンスとして使用したgarlic 2C と4C (2C=34.80 pg)のピークで、PK3 がHorsetail で、PK1 と比較したときのDNA index=2.5(123.97/49.50)から、Horsetail の2Cの値は87.15 pg (2.50×34.80) と計算されます。



## 試薬・装置

- ・ CyStain DNA 染色キット (Sysmex: DAPI またはPI から選択)
- ・ CellTrics セルストレイナー (Sysmex)
- ・ フローサイトメーター

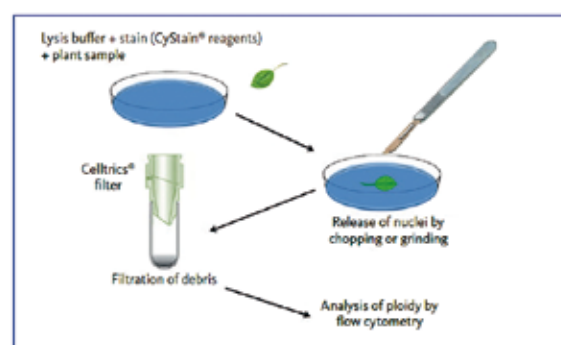
対応可能機種：CyFlow Ploidy Analyser, Cube 8, Space

|      | 検出フィルター構成  |
|------|--|
| DAPI | <ul style="list-style-type: none"> <li>・最大励起：345 nm、最大蛍光：455 nm</li> <li>・フィルター (455/50 nm etc.)</li> </ul>                                  |
| PI   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・最大励起：530 nm、最大蛍光：630 nm</li> <li>・PI 検出用フィルター (590 nm ロングパスフィルター、590/50 nm、675/20nm etc.)</li> </ul> |

## サンプル調製

組織断片にExtraction buffer を加えた後、カミソリでサンプルを刻み、一定時間静置します。

50  $\mu$ m CellTrics セルストレイナーにてフィルトレーションしたのち、CyStain buffer を加え核染色を行います。



目的サンプル種とほぼ同じゲノムサイズを持つ生物種の核からレファレンスを用意します。種間でのばらつきを低減するためにサンプルと同時に調製することが必要です。次の関係式により、レファレンスDNA(重量pgもしくは塩基対bp)との比較からサンプルの正確な測定が可能となります。

DNA content (bp) = 0.978 x 10<sup>9</sup> x DNA content (pg)

## 関連製品 (CyStain シリーズ)

| 製品番号     | 製品名                           | 内容                            | 容量・サイズ |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|--------|
| CU246612 | CyStain UV Ploidy             | 核抽出と染色 (DAPI) を1ステップで行う       | 250テスト |
| AF009546 | CyStain UV Precise P          | 強酸による核抽出、染色 (DAPI) を2ステップで行う  | 250テスト |
| BA327320 | CyStain UV Precise P automate | 同上で96ウェルプレート用に容量を調整           | 250テスト |
| CK250398 | CyStain UV Precise T          | 弱酸による核抽出、染色 (DAPI) を2ステップで行う  | 250テスト |
| BN763072 | CyStain UV Precise T automate | 同上で96ウェルプレート用に容量を調整           | 250テスト |
| BH251553 | CyStain PI Absolute P         | 強酸による核抽出、染色 (PI) を2ステップで行う    | 250テスト |
| AN695184 | CyStain PI Absolute T         | 弱酸による核抽出、染色 (PI) を2ステップで行う    | 250テスト |
| CY696051 | CyStain DNA 1 step            | 動物細胞用の核抽出と染色 (DAPI) を1ステップで行う | 250テスト |
| AT803834 | CyStain DNA 2 step            | 動物細胞用の核抽出と染色 (DAPI) を2ステップで行う | 250テスト |

発行：シスメックス株式会社 R&I事業本部 事業企画部 細胞計測事業推進課

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-991-2091 Fax 078-997-9976  
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

<http://www.sysmex-fcm.jp>

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。

G15100021