

細胞周期解析 – PI染色法 –

アプリケーションレポート Vol.24

細胞周期解析は、細胞増殖機構の解明のために欠かせない解析の一つです。フローサイトメトリーでは、DNA検出試薬で染色した個々の細胞の蛍光強度を測定することにより、DNA含量に応じた細胞周期の各期(G0/G1期：静止・細胞成長期[核相は2n]。S期：DNA合成期[核相が2nから4nへと増加]。G2/M期：分裂準備・分裂期[核相は4n])の細胞割合を算出することが可能です。本アプリケーションレポートでは、フローサイトメーターCyFlow Cube 6を用いたPI染色法での細胞周期解析例をご紹介します。

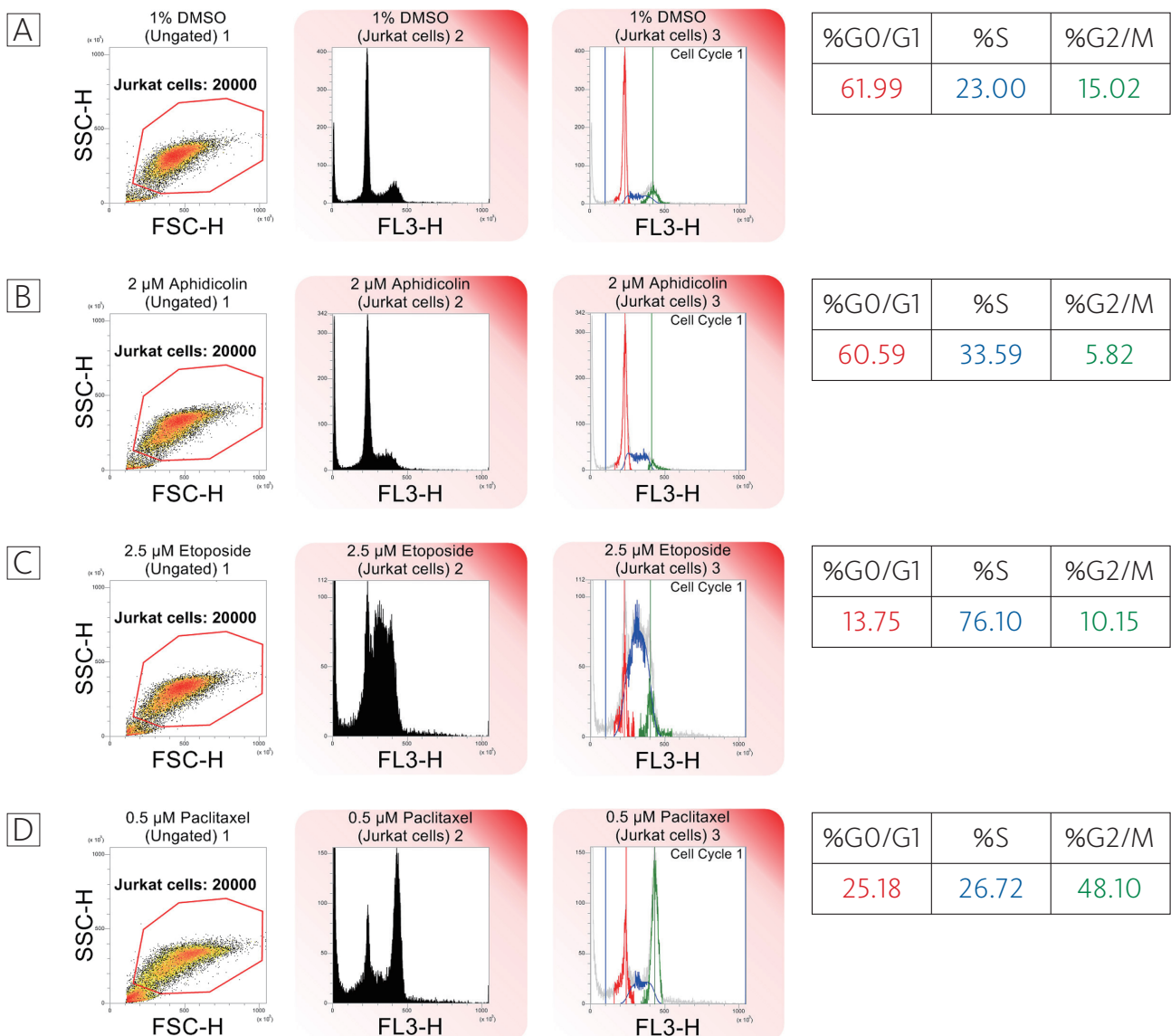


図1. CyFlow Cube 6を用いたJurkat細胞の細胞周期解析(PI染色法)

Jurkat細胞を1% DMSO(A)、2 μM Aphidicolin(B)、2.5 μM Etoposide(C)、0.5 μM Paclitaxel(D)で14時間処理しました。細胞を回収後、PI染色しCyFlow Cube 6で測定しました。測定結果をソフトウェアの細胞周期アルゴリズムで解析し、各期の細胞割合を算出しました。

サンプル調製・測定

1. Jurkat細胞を 5×10^5 cells/ml に濃度調整し、一晩培養します。
2. 細胞を回収後、 5×10^5 cells/ml に濃度調整し、12 wellプレートに1 ml ずつ播種します。
3. DMSOで目的の処理濃度の100倍に濃度調整した細胞周期阻害剤を1%添加後、14時間培養します。
4. PBS (-)で2回洗浄後、300 μ l のPBS (-)に懸濁します。
5. 細胞懸濁液をシェーカーで攪拌しながら、 -20°C で冷却した100%エタノールを1滴ずつ700 μ l 添加します。
6. -20°C で一晩静置します。
7. PBS (-)で2回洗浄後、1 ml の100 $\mu\text{g/ml}$ RNase溶液に懸濁し、 37°C で30分間静置します。
8. 10 μ lの5 mg/ml PI溶液を添加し混和後、直ちにCellTrics 30 μm でろ過してフローサイトメーターで測定します。

試薬・機器

- Aphidicolin (Wako、cat# 017-09813)
- Etoposide (Wako、cat# 055-08431)
- Paclitaxel (Wako、cat# 163-28163)
- Ribonuclease (DNase free) solution (ニッポンジーン、cat# 313-01461)
- Propidium iodide (Thermo Fisher SCIENTIFIC、cat# P1304MP)
- フローサイトメーター: CyFlow Cube 6 (CY-S-3060R_N1) (Sysmex、cat#BH04710)
- CellTrics 30 μm (Sysmex、cat# BP486257)

(すべて医療機器ではありませんので、診断には使用できません。)

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事業推進部

リサーチセンター 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