

ヒト人工多能性幹細胞の未分化マーカ発現解析

人工多能性幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cell, iPS細胞)は様々な細胞への分化能を有し、再生医療の細胞ソースとして広範な応用が期待されています。iPS細胞の特性評価ではフローサイトメーターを用いた未分化マーカ発現解析が広く実施されており、一般的に細胞表面マーカと細胞内マーカを組み合わせ、細胞の内外から評価することが好ましいとされています。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RF-500を用いたヒトiPS細胞の未分化マーカ発現解析の例をご紹介します。

結果

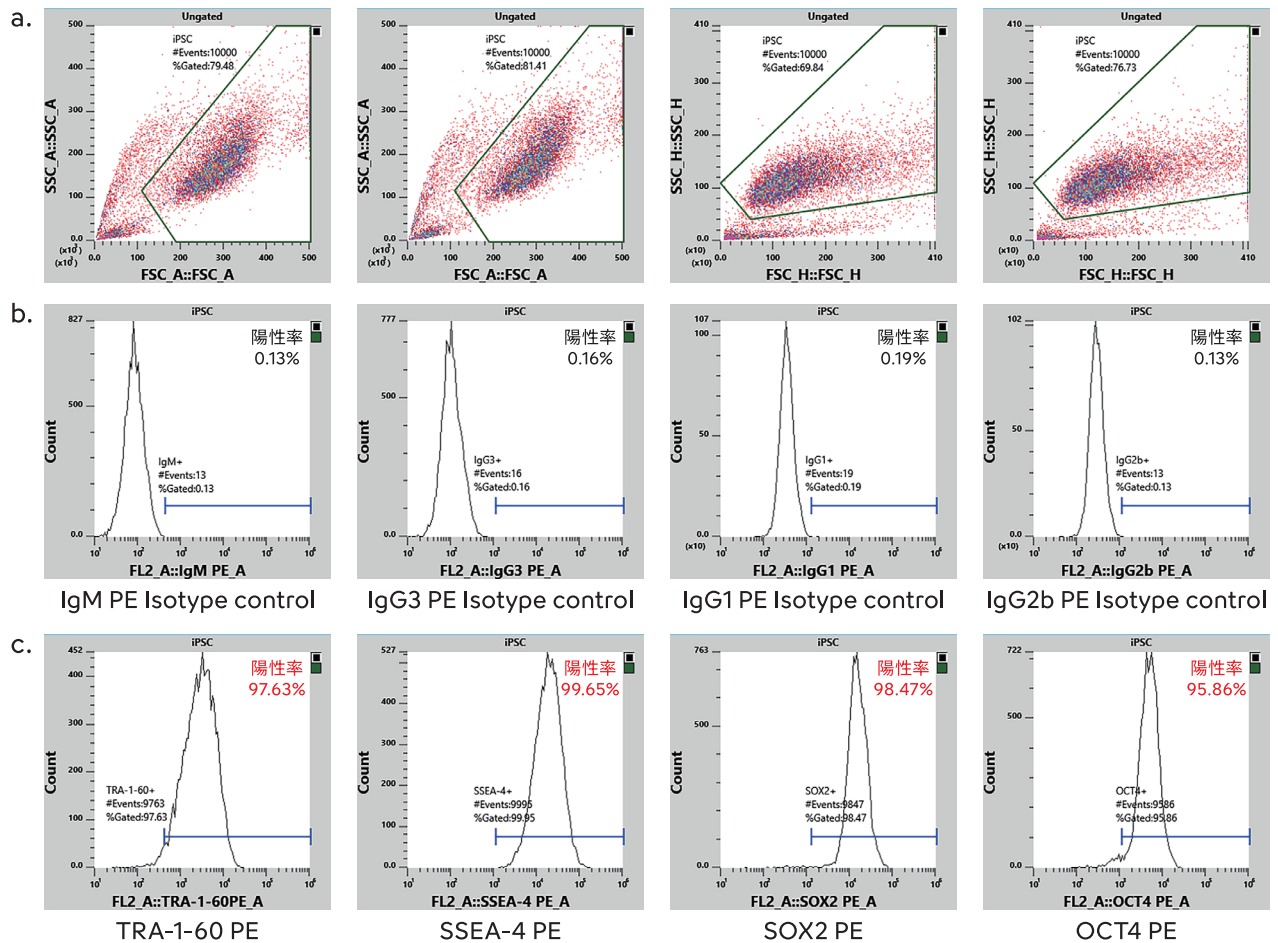


図1. RF-500を用いたヒトiPS細胞^{*1}の未分化マーカ(細胞表面マーカ: TRA-1-60, SSEA-4、細胞内マーカ: SOX2, OCT4)発現解析

a. 前方散乱光(Forward scatter, FSC)と側方散乱光(Side scatter, SSC)で展開しiPS細胞を含む領域にゲートを設定

b. 各マーカ抗体のIsotype control(陰性コントロール)の結果を基準に陽性ゲートを設定

c. 各マーカ抗体に対する陽性率を算出

*1: ヒトiPS細胞(CFIS-E06)は公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団(CIRA-F)よりご提供いただきました。

サンプル調製・測定

＜細胞表面マーカー＞

1. iPS細胞を0.5 × TrypLE Select処理により剥離・回収し、 1×10^6 cellsずつ4本の5 mLチューブに分注する。
2. 遠心回収後、100 μ LのFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁する。
3. 細胞表面マーカーTRA-1-60、SSEA-4に対する標識抗体、各アイソタイプコントロール抗体をそれぞれ推奨量加え、遮光条件下、4°Cで15分間静置する。
4. Flow Cytometry Staining Bufferで洗浄・再懸濁し、CellTrics 30 μ mでろ過後、フローサイトメーターRF-500で測定する。

＜細胞内マーカー＞

1. iPS細胞を0.5 × TrypLE Select処理により剥離・回収し、 1×10^6 cellsずつ4本の5 mLチューブに分注する。
2. Foxp3 / Transcription Factor Staining Bufferで固定・膜透過処理を行った後、細胞内マーカーSOX2、OCT4に対する標識抗体、各アイソタイプコントロール抗体をそれぞれ推奨量加え、遮光条件下、室温で30分間静置する。
3. Flow Cytometry Staining Bufferで洗浄・再懸濁し、CellTrics 30 μ mでろ過後、フローサイトメーターRF-500で測定する。

試薬・機器

- CTS TrypLE Select Enzyme (Thermo Fisher Scientific, cat# 1285901)
- eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific, cat# 00-4222-57)
- eBioscience Toxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, cat# 00-5523-00)
- PE anti-human TRA-1-60-R Antibody (BioLegend, cat# 330609)
- PE anti-human SSEA-4 Antibody (BioLegend, cat# 330405)
- PE anti-SOX2 Antibody (BioLegend, cat# 656103)
- PE anti-Oct4 (Oct3) Antibody (BioLegend, cat# 653703)
- PE Mouse IgM, κ Isotype Ctrl Antibody (BioLegend, cat# 401611)
- PE Mouse IgG3, κ Isotype Ctrl Antibody (BioLegend, cat# 401319)
- PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (BioLegend, cat# 400111)
- PE Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody (BioLegend, cat# 400313)
- CellTrics 30 μ m (Sysmex, cat# BP486257)
- フローサイトメーター RF-500 (Sysmex, cat# BF209548)

※ 本製品は研究用であり、診断には使用できません。

お問い合わせ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業推進部

神戸 神戸市西区室谷 1-3-2 〒651-2241

東京 東京都品川区大崎 1-2-2 〒141-0032

sysmex-fcm.jp