

増殖中の細胞各々が細胞周期内のどこに位置しているか、ということを知ることが非常に重要である。フローサイトメトリー (Flow Cytometry) を用いて細胞の DNA 含量を測定することによって、細胞周期内の位置 (phase) を推測することができる。

細胞の DNA 量は G1 期でもっとも少なく、G2 期と M 期ではその2倍になる。S 期では DNA 複製の程度により G1 と G2 の中間の値の DNA 量をもつ。フローサイトメトリーでは、DNA 結合蛍光色素を用いて DNA を染色したあと、レーザー光源を用いて色素を励起させ、各々の細胞の蛍光強度 (全蛍光量) を測定する。コントロールの G1 細胞と G2 細胞の蛍光強度 (全蛍光量) と比較することによって、サンプル細胞の DNA 含量を相対的に決定し、細胞周期内での位置を求めることができる。

当研究室では、BECKMAN COULTER 社の EPICS XL を使っておりソフトは System2 および EXPO32 を使用している。EPICS では、細胞あたりの蛍光強度 (FL として表される) の比較に加えて、更に蛍光強度のピーク値 (AUX として表される) を比較することができる。G2 細胞は、G1 細胞に比べて、2倍の蛍光強度 (全蛍光量) と2倍の蛍光強度のピーク値を示す。染色体分離前の M 期細胞は、G2 期と同じ蛍光強度 (全蛍光量) と蛍光強度のピーク値を示すが、染色体分離後には、蛍光強度 (全蛍光量) は変わらないが、蛍光強度のピーク値は 1/2 になる。分裂酵母細胞では、通常は DNA 複製が細胞分裂前に起こるため、単核細胞 (DNA content: 2C)、核分裂した二核細胞 (2C)、DNA 複製中の二核細胞 (2-4C)、DNA 複製後の二核細胞 (4C) が全細胞集団を構成しているが、それらを理論上分離して解析することができる。核分裂した二核細胞 (2C) は蛍光強度のピーク値が単核細胞 (2C) の 1/2 になるため、異なる細胞集団として扱うことができる。

以下、方法を簡単に紹介する。

Reagents

Cold absolute ethanol (store at -30°C)

50mM Na citrate stock (pH 7.0) (room temperature)

10 mg/ml RNase A (4°C)

SYTOX Green (Molecular Probes catalog S-7020; 5mM stock in DMSO) (-30°C)

Protocol**Fixation**

Spin down 10^7 cells from an exponentially growing culture.¹⁾

Pour off supernatant.

Vortex tubes while adding 1 ml cold 70% EtOH.²⁾

Store at 4°C (cells kept ~indefinitely).

RNase treatment

Take 0.3 ml of cells in 70% ethanol³⁾ and add to 3 ml of 50 mM Na citrate.

Mix and spin at 2,000 rpm for 5 min.

Discard supernatant.

Resuspend pellet in 0.5 ml of 50mM Na citrate containing 0.1 mg/ml RNase A.

Incubate at 37°C for 2 hr.

Sytox Green staining

Add 0.5 ml of 50 mM Na citrate containing 2 μ M Sytox Green.⁴⁾

Sonicate for 45 sec.⁵⁾

Flow Cytometry⁶⁾**データ採取**

シース液、洗浄液の残量確認、補充を行う。

ワークステーションを起動させ、サイトメーターを起動する。

精度管理。⁷⁾

実験用のプロトコルがない場合は作成する。

パラメーターは FS SS FL1 AUX (FL1) の4つを使う。⁸⁾

control を流し、調整する。⁹⁾

データ採取。

終了後、サンプルライン及びバキュームラインを洗浄する。

cleanse 実行。
アイドリングモードになったら蒸留水をセットしソフトウェアを終了。
ワークステーションのシャットダウン。

解析

データに必要なゲーティングをかけ、その分布及びヒストグラムを検討する。

<注意点>

- 1) 2,000 rpm for 5 min くらいで、集菌する。
- 2) 必ず冷えたものを使う。
- 3) $2-3 \times 10^6$ cells が必要量であるが wash で失われると考えて少し多めにとる。
- 4) 最終的な sample の SytoxGreen の濃度は $1 \mu\text{M}$ になる。
- 5) 凝集した細胞をばらばらにするために行う。
- 6) それぞれの機械やソフトによって扱い方など、細々と異なるため、所属の機械のプロトコルを参考にするのが好ましい。ここでは流れを簡単に紹介するのみにとどめた。
- 7) システム起動時は光学系ならびに液送系の安定性(データの分解能)をチェックする必要がある。FlowCheck 標準粒子(大きさと蛍光量が均一なビーズ)を使って変動係数(HP X-CV)を測定する。細胞周期の場合リニアで測定するので、変動係数が 2%以下であれば光学系、液送系ともに安定していると考えられる。これより、実際のサンプル測定が可能である。
- 8) レーザー光がサンプルにあたったときに生ずる光散乱や屈折で得られる直進方向を FS と呼び、細胞の大きさ(表面積)を反映する変数 直角方向の散乱を SS と呼び、細胞内部構造の複雑さを反映する。FL1 は蛍光量を、AUX(FL1)はそのピークを反映する。
- 9) 微妙な染まり具合や光軸が微妙にずれることもあるので、control をあわせて流すのが好ましい。System II は視覚的に調整ができるのでこの点において EXPO32 よりも優れているとおもう。

参考

<http://pingu.salk.edu/flow/protocols/ycc.html>

神野茂樹 第三章 細胞周期の解析 ①細胞内微量注入法およびシングルサイトメトリーを利用した細胞周期解析法

BECMAN COULTER EXPO32TM ソフトウェアトレーニングガイド -入門編/データ解析編-

BECMAN COULTER XL System II (入門コース)トレーニングガイド

BECMAN COULTER XL System II (データ解析コース)トレーニングガイド