

Cell Cycle Assay Solution Deep Red Cell Cycle Assay Solution Blue

Technical Manual

はじめに

細胞周期の制御機構は、細胞増殖と密接に関与しています。ひとつの細胞が二つの娘細胞を生み出す細胞分裂は細胞周期を介して起こります。細胞周期の解析には、フローサイトメーターが汎用されています。DNAを蛍光色素で染色しフローサイトメーターで測定することで、間期やM期の割合を算出することが可能です。細胞周期を解析する色素として、Propidium Iodide (PI) が広く使われます。しかし、PIを使って細胞周期を測定する場合は下記の前処理が必要となります。

- 1) 細胞の固定化 (PIには細胞膜透過性がありません)
- 2) RNase 処理 (PIはDNA選択性がなく、RNAも染色されます)
- 3) コンペンセーション (PEとFITCフィルターで共染色する場合は補正の必要があります)

Cell Cycle Assay Solutionは、細胞の固定化やRNase処理を必要とせず、簡便な操作で細胞周期の解析を可能にする製品です。また、試薬の調製なしに使用できる水溶液形態で、検出蛍光波長としてDeep RedとBlueの2色があり、実験系や使用される装置に合わせてお選びいただけます。固定化した細胞への適用も可能です。

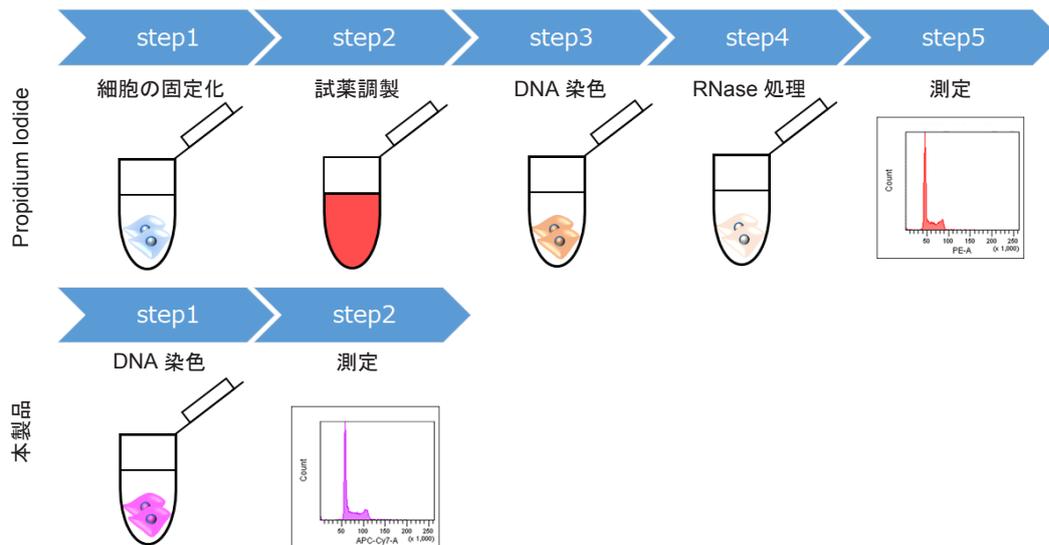


図1 細胞周期解析プロセスの比較

内容

C548 Cell Cycle Assay Solution Deep Red
C549 Cell Cycle Assay Solution Blue

品コード	50 tests
C548	250 μ l \times 1
C549	250 μ l \times 1

* いずれの製品も水溶液として提供しております。

保存条件

C548 遮光、-20 $^{\circ}$ Cにて保存して下さい。
C549 -20 $^{\circ}$ Cにて保存して下さい。

必要なもの (キット以外)

- フローサイトメーター
- フローサイトメーター測定用のセルストレーナー
- インキュベーター (37 $^{\circ}$ C)
- マイクロピペット (100-1000 μ l, 1-20 μ l)
- コニカルチューブ
- 遠心チューブ
- Phosphate buffered saline (PBS)

溶液調製

調製操作は不要です。使用前に室温に戻して融解してからご使用下さい。

操作

未固定の細胞をサンプルとする場合

1. 細胞密度 $1-5 \times 10^5$ cells/ml の細胞懸濁液を準備する。
2. 細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml 入れ、300 \times g で 5 分間遠心する。
3. 上澄みを除去し、PBS を 1 ml 加え細胞を再懸濁後、300 \times g で 5 分間遠心する。
4. 上澄みを除去し、PBS を 0.5 ml 加える。
5. Cell Cycle Assay Solution を 5 μ l 加える。
6. ボルテックスミキサーで攪拌混合し、遮光下、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベーションする。
7. サンプルをフローサイトメーター測定用のセルストレーナーに通す。
8. フローサイトメーターで測定する (表 1 参照)。

固定化した細胞をサンプルとする場合

1. 細胞密度 $1-5 \times 10^5$ cells/ml の細胞懸濁液を準備する。
2. 細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml 入れ、 $300 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を除去する。
3. 実験系に合った方法で細胞を固定化する。

例) 4% パラホルムアルデヒドで固定化する場合

1. 細胞ペレットに 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS を 1 ml 加え、室温で 20 分間静置する。
2. $300 \times g$ で 5 分間 遠心し、上清を除去する。
3. PBS を 1 ml 加え細胞を再懸濁後、 $300 \times g$ で 5 分間遠心する。
4. 上清を除去し、PBS を 0.5 ml 加える。

例) 冷 70% エタノールで固定化する場合

1. 細胞ペレットに冷 70% エタノールを 1 ml 加え、 $4^\circ C$ で 2 時間静置する。
2. $300 \times g$ で 5 分間 遠心し、上清を除去する。
3. PBS を 1 ml 加え細胞を再懸濁後、 $300 \times g$ で 5 分間遠心する。
4. 上清を除去し、PBS を 0.5 ml 加える。

4. Cell Cycle Assay Solution を 5 μ l 加える。
5. ボルテックスミキサーで攪拌混合し、遮光下、 $37^\circ C$ で 15 分間インキュベーションする。
6. サンプルをフローサイトメーター測定用のセルストレーナーに通す。
7. フローサイトメーターで測定する (表 1 参照)。

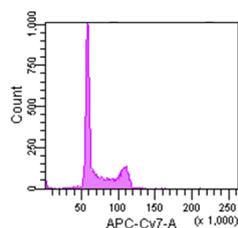
品コード	励起波長	蛍光波長
C548	633-647 nm	695LP もしくは 780/60 BP * 例) APC-Cy7 (BD 社)
C549	405-407 nm	450/50 BP * 例) Pacific Blue (BD 社)

* LP: Long pass filter
* BP: Band pass filter

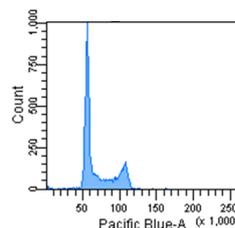
表 1 Cell Cycle Assay Solution を用い細胞周期を解析する際のフィルターセッティング

HeLa 細胞の細胞周期解析

1. 細胞密度 $4-5 \times 10^5$ cells/ml の細胞懸濁液を準備した。
2. 細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml 入れ、 $300 \times g$ で 5 分間遠心した。
3. 上澄みを除去し、PBS を 1 ml 加え細胞を再懸濁後、 $300 \times g$ で 5 分間遠心した。
4. 上澄みを除去し、PBS を 0.5 ml 加えた。
5. Cell Cycle Assay Solution Deep Red もしくは、Cell Cycle Assay Solution Blue を 5 μ l 加えた。
6. ボルテックスミキサーで攪拌混合し、遮光下、 $37^\circ C$ で 15 分間インキュベーションした。
7. サンプルをフローサイトメーター測定用のセルストレーナーに通した。
8. フローサイトメーターにて測定した。



Cell Cycle Assay Solution Deep Red
Excitation: 640 nm
Emission: 780/60 nm

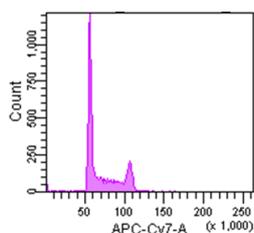


Cell Cycle Assay Solution Blue
Excitation: 405 nm
Emission: 450/50 nm

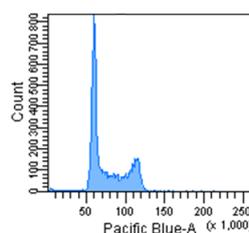
図 3 Cell Cycle Assay Solution を用い解析した HeLa 細胞の細胞周期

Jurkat 細胞の細胞周期解析

1. 細胞密度 $4-5 \times 10^5$ cells/ml の細胞懸濁液を準備した。
2. 細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに 1 ml 入れ、 $300 \times g$ で 5 分間遠心した。
3. 上澄みを除去し、PBS を 1 ml 加え細胞を再懸濁後、 $300 \times g$ で 5 分間遠心した。
4. 上澄みを除去し、PBS を 0.5 ml 加えた。
5. Cell Cycle Assay Solution Deep Red もしくは、Cell Cycle Assay Solution Blue を 5 μ l 加えた。
6. ボルテックスミキサーで攪拌混合し、遮光下、 $37^\circ C$ で 15 分間インキュベーションした。
7. サンプルをフローサイトメーター測定用のセルストレーナーに通した。
8. フローサイトメーターにて測定した。



Cell Cycle Assay Solution Deep Red
Excitation: 640 nm
Emission: 780/60 nm



Cell Cycle Assay Solution Blue
Excitation: 405 nm
Emission: 450/50 nm

図 4 Cell Cycle Assay Solution を用い解析した Jurkat 細胞の細胞周期

ご本製品は試験・研究用です。臨床診断用途には使用できません。
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO 株式会社同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
 熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 (代表) Fax:096-286-1525
 E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)
 東京都港区芝大門2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
 Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650
 フリーダイヤル : 0120-489548
 フリーファックス : 0120-021557

C548 : Cell Cycle Assay Solution Deep Red
 C549 : Cell Cycle Assay Solution Blue