

フローサイトメトリーのためのPIおよび7-AADによる死細胞除去方法

はじめに

細胞はその死より細胞膜の状態が保たれなくなり、PI (Propidium Iodide) または、7-AAD (7-amino-actinomycin D) などの核染色剤により容易に染色されるようになります。これらの染色色素を加えることにより、死細胞を見分け、サンプル中の生細胞のみのデータを得ることが可能です。このTechnical Protocolでは、マウス脾臓細胞をFITC、PE、APC標識抗体で染色したサンプルの死細胞除去の例を紹介します。

試薬

Propidium Iodide Staining Solution (PI): Sigmaカタログ番号 P-4170

Stock溶液: 1 mg/mL PBS, pH7.4

PIは水に溶解しにくいいため、まず、エタノールに溶解してください。小分けして凍結保存します。使用時にPBSで10倍に希釈します。

7-amino-actinomycin (7-AAD): BDカタログ番号 559925

100 µg/2mL溶液

PharmLyse: BDカタログ番号 555899

NH₄ Clベースの溶血剤

BD Pharmingen Stain Buffer (with FBS): BDカタログ番号 554656

Anti-mouse CD4 FITC: BDカタログ番号 553650

Anti-CD8a PE: BDカタログ番号 553032

Anti-mouse CD45R/B220 APC: BDカタログ番号 553092

留意: 上記の抗体試薬はこの例で使用したものです。実験のデザインに合わせて、必要な試薬を選択してください。

サンプル

マウス脾臓細胞: マウス脾臓細胞は洗浄後、 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/mLの細胞濃度になるようにBD Pharmingen Stain Bufferで調製します。

留意: 目的細胞の細胞浮遊液に混入した赤血球を予め溶血させたい場合や全血から染色し途中で溶血処理する場合には、PharmLyseなどの塩化アンモニアベースの溶血剤を使用してください。BD FACS Lysing Solution (BDカタログ番号: 349202) を使用すると、ホルムアルデヒドが含まれるため、細胞膜の浸透化が更新し、PIまたは7-AADのような核染色剤に染色されやすくなり、死細胞のみを染色することになります。

染色

コンペーンセーションの調整や結果の解釈のために表1のような染色細胞を用意します。サンプル1-4は機器調整用に使用します。すべての抗体で染色したサンプルが5です。すべてのサンプルにPIまたは7-AADを加えます。

	FITC	PE	APC	PI または 7-AAD
1	-	-	-	
2	CD4	-	-	
3	-	CD8a	-	
4	-	-	CD45R/B220	
5	CD4	CD8a	CD45R/B220	

表1 染色サンプル

- 5 mLのBD FALCON チューブに、細胞浮遊液(2×10^7 cells/mL)を50 μ L(10^6 cells)加えます。
- 表1に従い、各試験管に適切な濃度のFITC標識試薬、PE標識試薬、APC標識試薬を加えます。
- 試験管を緩やかに混和し、室温、4°Cで20~40分間インキュベーションします。
- 各試験管にBD Pharmingen Stain Bufferを1 mL加え、300 xg、5分間遠心し、上清を除去します。
- 4の洗浄操作を繰り返します。
- BD Pharmingen Stain Buffer 500 μ Lを加えます。
- PI(10 μ L: 最終濃度2 μ g/mL)または7-AAD(5 μ L: 最終濃度0.25 μ g/mL)を加え、室温、暗所で10分間インキュベーションします。

留意: PI、7-AADは時間が経過すると生細胞も染色されてきます。できるだけ速やかに測定してください。

測定

- 4カラーのBD FACSCCompを実施します。
- BD CellQuestでFSC vs SSCドットプロット、FL3ヒストグラムを作成します。必要に応じて、FL1 vs FL2、FL1 vs FL4ドットプロットなどを作成します。
- サンプル1を流します。FSC、SSC VoltageとThresholdを調整し、目的細胞にリージョン(R1)を設定します(図1)。

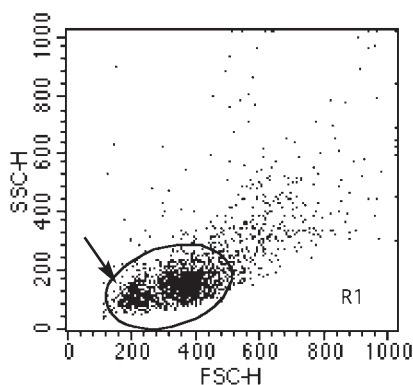


図1 FSC vs SSCドットプロットによるリージョン設定
左側の細胞集団(矢印)は、その後の解析により、死細胞であろうと思われた。

4. FL3 ヒストグラムでPI、または7-AAD陰性領域にリージョン(R2)を設定します(図2)

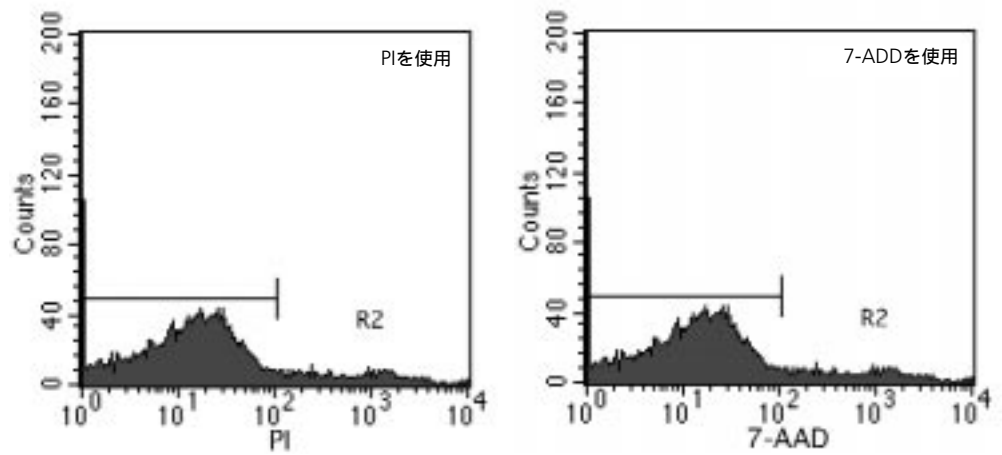


図2 FL3 ヒストグラム

PI、7-AAD弱陽性の細胞もあるが、明らかな陰性領域にリージョン設定した。

5. ロジカルゲートR1 and R2を作成します。

GatesメニューのGate Listを選択し、使われていないGateのDefinitionの欄にR1 and R2を設定します(図3)

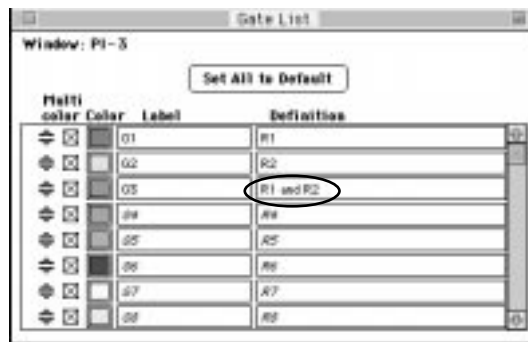


図3 Gate Listウィンドウ

6. FL1 vs FL2、FL1 vs FL4ドットプロットにG3 = R1 and R2を設定します(図4)

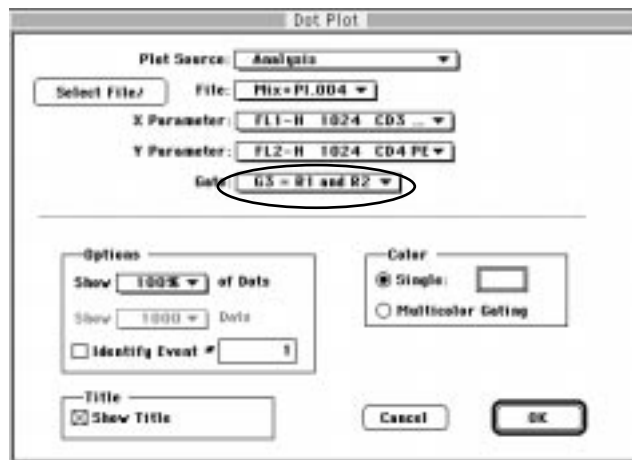


図4 ドットプロット ダイアログボックス

7. 蛍光コンペーンションを確認します。

サンプル2および3を流し、FL1-%FL2、FL2-%FL1コンペーンションを調整します(図5)。

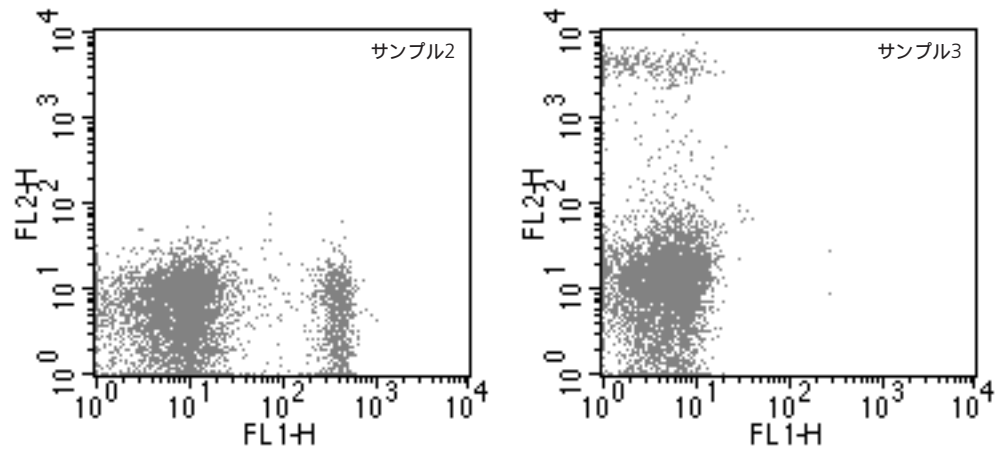


図5 FL1-%FL2、FL2-%FL1コンペーンション調整

FL3パラメータはPIまたは7-AAD陽性細胞を取り除くために使用されます。FL3が、このようにGate Outに使われる場合は、PEおよびAPCのFL3へのもれ込みの補正(FL3-%FL2、FL3-%FL4コンペーンション)をFACSCmp設定から更に調整する必要はありません(図6)。

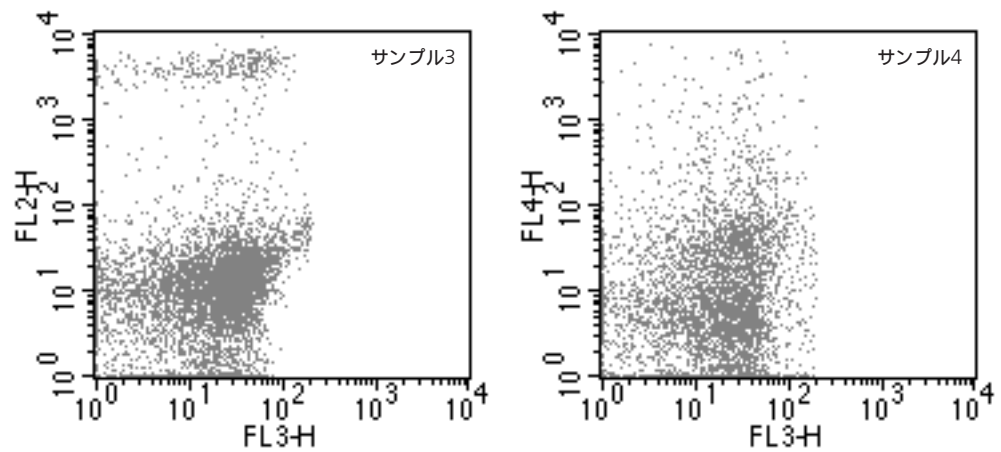


図6 FL3-%FL2、FL3-%FL4コンペーンション調整
実際にはコンペーンション調整は全くしていない。

G3 = R1 and R2のゲート設定で表示される細胞集団は生細胞であり、PIまたは7-AADではほとんど染色されていないはずですが、これらFL3で検出される色素のFL2またはFL4へのもれ込み(FL2-%FL3、FL4-%FL3コンペーンション)は、調整の必要がありません。

時間の経過とともに生細胞でもPIまたは7-AADに染まりやすくなります。特にPIを使用した場合、FL2の蛍光バックグラウンドが高くなっています。PIは7-AADより蛍光波長が短いため、PIの蛍光はFL2とFL3の両方の検出器で検出されることによるものです。

このような場合、死細胞の Gate Out に使用するFL3ヒストグラムも蛍光強度が強くなりがちです。生細胞と死細胞の境となる位置を見極め、ヒストグラム・マーカーを設定することが必要です。しかし、本来の目的を考え、PIまたは7-AAD添加後、時間を長く経ないで測定するようにしてください。

8. コンペンセーション終了後テストサンプル(5)を測定します。

解析

測定時と同様なゲート設定で解析します。図7は散乱光ゲートのみを使用したFL1 vs FL2、FL1 vs FL4ドットプロット解析(下)と散乱光ゲートとFL3ヒストグラムゲートを組み合わせたロジカルゲートを使用した同様の解析(上)を示しました。

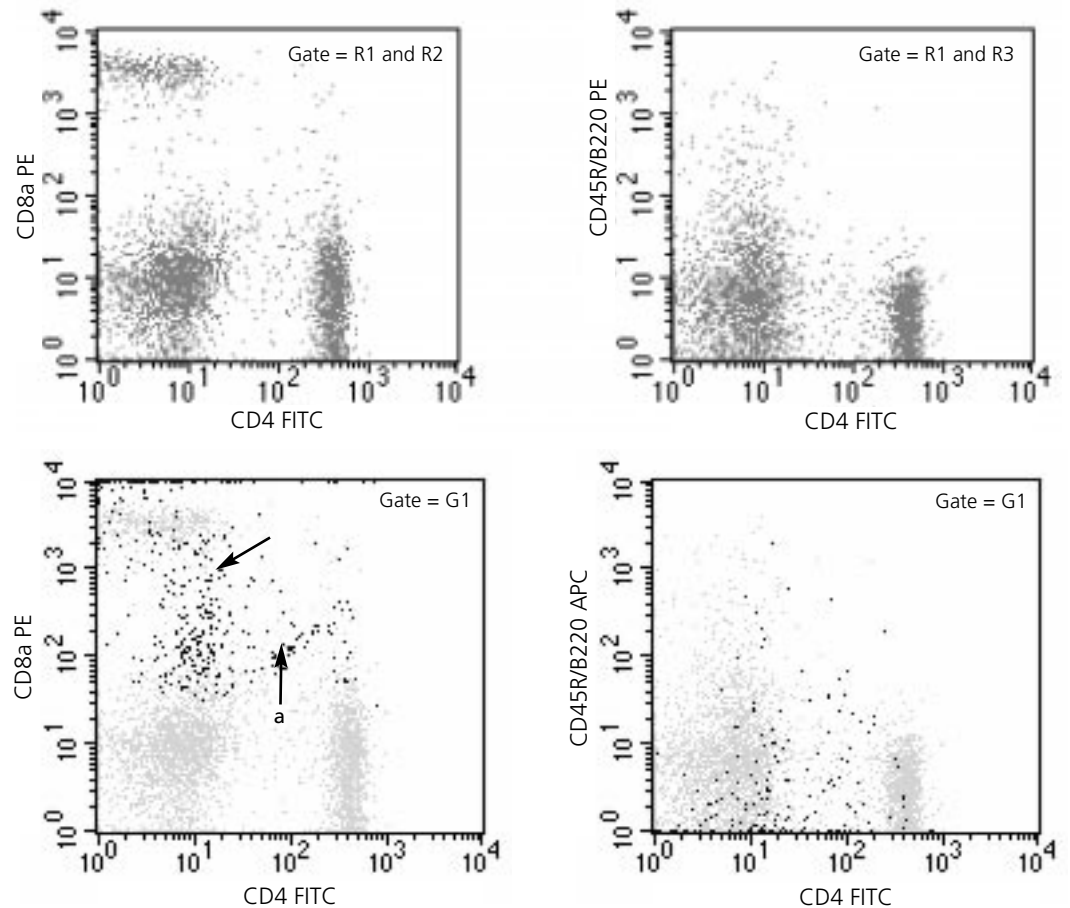


図7 R1 and R2を設定したドットプロット(上)と、散乱光ゲートのみを使用したドットプロット解析(下)。矢印で示した細胞集団は上の図では見られず、死細胞の影響と考えられる。矢印aのように、斜45度の細胞集団が見られることがある。

EMAによる死細胞除去

PIや7-AADにより死細胞除去をする場合は、パラホルムアルデヒドやホルムアルデヒドによる固定をしないで染色します。固定が必要な場合または細胞膜透過処理が必要な場合には、EMAにより死細胞除去ができます。固定および膜透過処理が必要な細胞内サイトカイン測定を例にとり、死細胞除去の例を紹介します。

試薬

EMA: Ethidium monoazide bromide(Molecular Probeカタログ番号: E-1374)
 Stock solution 5 mg/mL(エタノール)
 使用時にPBSで50倍に希釈します。
 蛍光は、FL3で検出します。

サンプル

活性化ヒトPBMC細胞: $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/mLの細胞濃度

染色

- 5 mLのBD FALCON チューブに、PBMCを100 μ L ($1 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL)ずつ分注します。
 - 表面抗原(CD4 APC、CD8 APCなど)とEMA(5 μ L: 最終濃度 5 μ g/mL)を試験管に加え、氷上、暗所で15~30分間インキュベーションします。
 - 2 mLのBD Pharmingen Stain Bufferで細胞を2回洗浄します。
 - 100 μ LのBD Pharmingen Stain Bufferに再浮遊します。
 - 氷上で近距離(蛍光灯下10~20 cm)から蛍光灯の光を10分間あてます。
 - 細胞を固定後、細胞膜浸透化し、細胞内をサイトカイン抗体で染色します。
- (以下省略、弊社アプリケーションノートを参照してください)

測定

- EMAによる蛍光はFL3で検出します。FSC vs SSC プロットにR1を設定し、FL4(CD4 APC、CD8 APCなど) vs SSC プロットにR2を設定します。

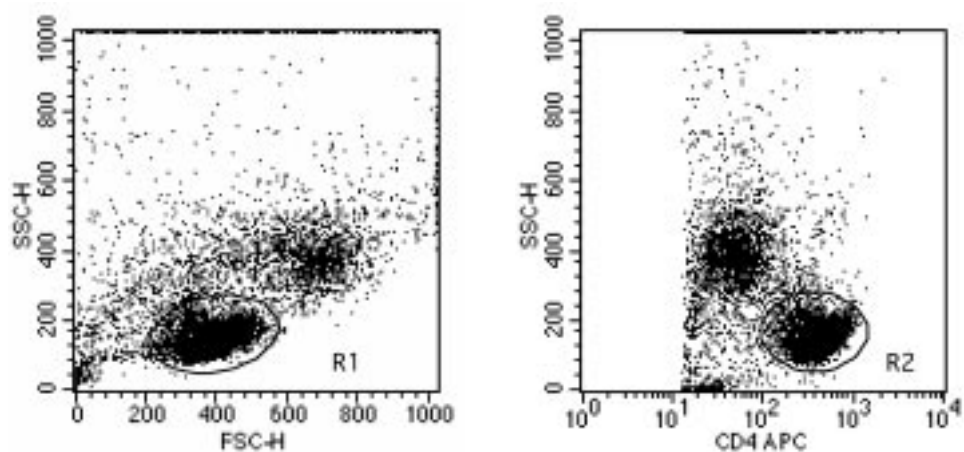


図8 CD4⁺細胞のゲーティング

2. PI、7-AADによる死細胞除去と同じようにFL3のヒストグラムにR3を設定します(図9)

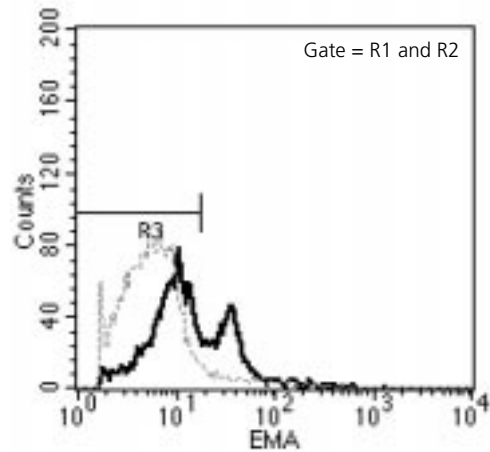


図9 EMAによる死細胞除去のためのヒストグラムゲート

太線はEMAを加えたサンプルのFL3ヒストグラムである。点線は参考として、EMAを加えないサンプルのFL3ヒストグラムをオーバーレイしたものである。

3. PMT Voltage調整、コンペーンセーション調整を行ない、サンプルを測定してください。

解析

測定時と同様なゲート設定で解析します。図10にはヒストグラムゲートによる死細胞のGate Outも使用したFL1 vs FL2ドットプロット解析(左)と散乱光ゲートのみを使用した同様の解析(右)を示しました。このサンプルはアイソタイプコントロールで染色しているサンプルです。右図の矢印の位置に死細胞の細胞集団が存在することがわかります。

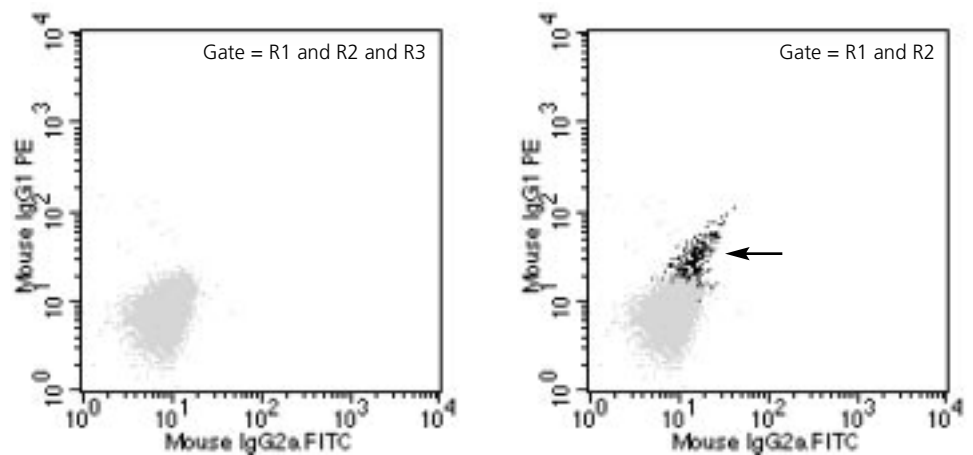


図10 EMAによる死細胞除去

留意: ここで使用したサンプルは、あえて採取から時間の経過したPBMCを使用しています。

参考文献

渡辺信和: クローズアップ実験法 細胞内サイトカイン染色法 4カラーフローサイトメトリーを用いた特異的メモリーCD4⁺T細胞の検出(実験医学 Vol.17 1661-1665, 1999)

Darzynkiewicz, Z.: Methods in Cell Biology, Vol. 41, Flow Cytometry, 2nd Ed., Par+ A



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

お客様情報センター
製品関連・資料請求 / 納期・在庫

☎ 0120-8555-90
Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
アプリケーションホットライン **Tel: 03-5805-9960**
技術研修室 **E-Mail: tech_cell@bd.com**

機器修理・メンテナンス ☎ 0120-7099-12

試薬カスタマーサポート ☎ 0120-4890-77
E-Mail: tech_cell@bd.com