

# フローサイトメトリープロトコール

岐阜大学生命科学総合研究支援センター・ゲノム研究分野

2014トレーニングコース

## 1 試薬・器具等

---

### 使用機器および器具

- ・セルソーター (SONY、SH800)
- ・セルアナライザー (SONY、EC800)
- ・遠心機 (クボタ、5500)
- ・25 平方cmフラスコ (Trueline、Cat. No. TR6000)
- ・15mL 遠心管 (ポリプロピレン製がよい) (greiner bio-one、Cat. No.188271)
- ・1.5mL マイクロチューブ (WATSON、Cat. No.131-715 c)
- ・5mL セルストレナーキャップ付き (BDFalcon、Cat. No.352235)
- ・マイクロピペッター、ピペッター用チップ
- ・血球計算盤 改良ノイバウエルタイプ (アズワン、Cat. No. 2-5390-02)
- ・トリパンプルー溶液 (Life Technologies, Cat. No.15250-061)

### 細胞および培養用試薬

- ・HD-Mar2 ヒトホジキンリンパ腫由来細胞株 (RIKEN RCB1981)
- ・RPMI1640 (Wako、189-0205)
- ・ウシ胎児血清 (DS ファーマ、M7466)
- ・Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X), Liquid (ライフテクノロジーズ、10378-016)
- ・10 x D-PBS (-) (Wako、048-29805)

### 抗体試薬

- ・FITC ラベル anti-human CD4 (SONY、62509)

## 2 細胞培養

---

### 概要

培地：RPMI1640 + 10%FBS + 0.5%ペニシリン

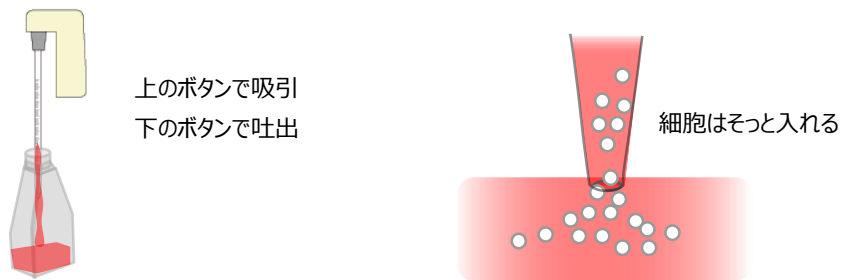
培養温度：37℃

CO<sub>2</sub> 濃度：5%

継代：dilution 1:4 once/week

### 培養操作

1. フラスコにピペットで 5mL の培地を入れ、そこに細胞を  $1 \times 10^6$  程度個入れます。



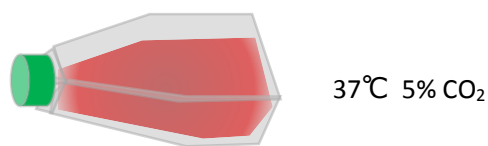
2. 軽くゆすって細胞を分散させたのち、フラスコを横向きにインキュベーター中に静置します。
3. そのまま 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養します。



### 継代操作（1週間毎）

4. 新しいフラスコに新しい培養液を 4mL 入れておきます。
5. 培養中のフラスコ内の細胞の濃度を測定します。（下記 16. 細胞濃度の測定 を参照してください。）
6.  $1 \sim 2 \times 10^6$  cell 個程度の細胞を含むようにフラスコから培養液をピペットで抜き取り、新しいフラスコの培養液に移します。

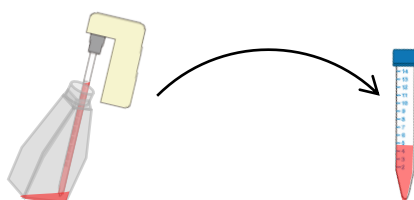
7. 軽くフラスコを振って細胞を分散させた後、37℃のインキュベーター内に横向きに静置し培養します。



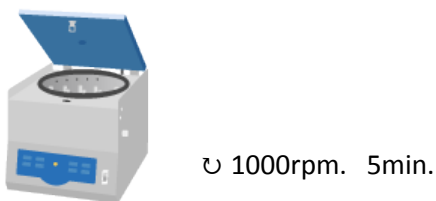
### 3 細胞の蛍光抗体染色

#### 細胞の回収

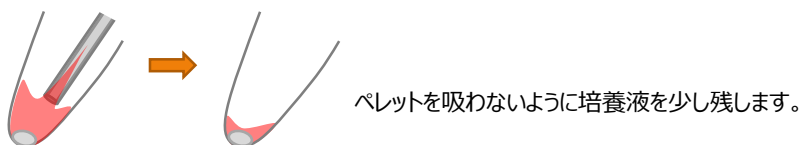
8. 予め 15mL チューブに自分のイニシャル等でラベルしておきます。  
9. フラスコで培養中の細胞をピペットを使って上記の 15mL チューブに全て（約 5mL）回収します。



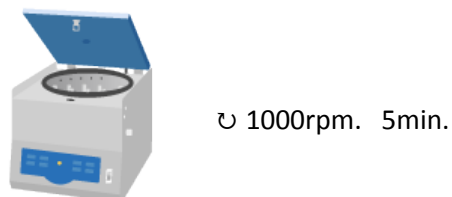
10. 1000rpm (x190g)、室温で 5 分間遠心分離を行い細胞を沈殿させます。



11. 培養上清をアスピレーターで吸引除去します。



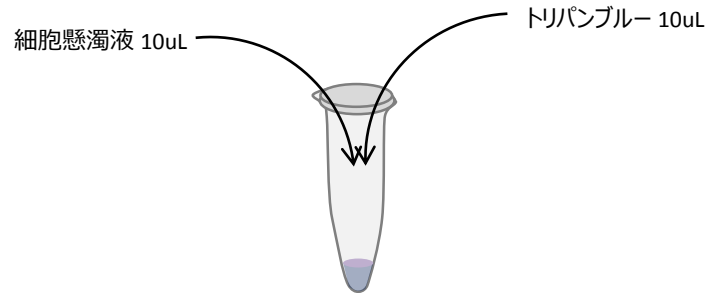
12. ペレットを PBS 5mL で懸濁します。  
13. 再び 1000rpm で 5 分間 遠心分離を行い、上清を吸引除去します。  
14.



15. ペレットを PBS 4mL で懸濁します。細胞がよく分散するようにピペッティングします。

## 細胞濃度の測定

16. 1.5mL チューブに細胞懸濁液 10uL を分取し、トリパンプルー液と混合、細胞濃度を測定します。



### 測定方法

細胞色素混合液を 10uL をマイクロピペットで吸い取り血球計算盤とカバーガラスの隙間に薄く広がるように流し入れます（四角いエリアからはみ出ない程度に残します）。

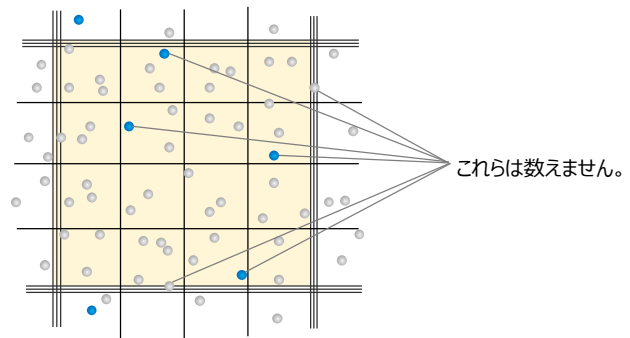
1 0 倍の対物レンズで覗きながら 4 x 4 のエリア内の細胞を数えます。

薄黄色で示した 4 x 4 エリア内の細胞を数えます。

青く色のついた細胞は死細胞なので数えません。

周囲の 3 本線にかかった細胞については上側と左側の辺にかかった細胞のみ数えます。

別の場所にある 4 x 4 エリアをさらに数えて細胞数を合計します。



2 箇所 の 4 x 4 エリアの細胞数を合計します。

以下のように濃度を算出します。

$$15\text{mL チューブ内の細胞濃度} = (\text{数えた細胞数}) \times 10^4 \text{ cells / mL}$$

17. 適正な細胞濃度 ( $1.0 \times 10^6$  cells / mL) になるように 15mL チューブに PBS を加え、濃度を薄めます。

## 蛍光抗体染色

18. 15mL チューブ 4 本を以下のようにラベルします。

- ① negative control
- ② FITC-CD4
- ③ PE/Cy7-CD3

④ CD4+CD3

(他の人のサンプルと区別するために自分のイニシャル等も記入しておいてください。)

19. 1mL ずつ (1x10<sup>6</sup> 個の細胞を含む) 15mL 遠心チューブ × 4 本に分注します。

20. 1000rpm で 5 分間 遠心分離、上清を吸引除去します。



▽ 1000rpm. 5min.

21. ペレットを 2% FBS/PBS 100uL で懸濁します。細胞がよく分散するようにピペティングします。

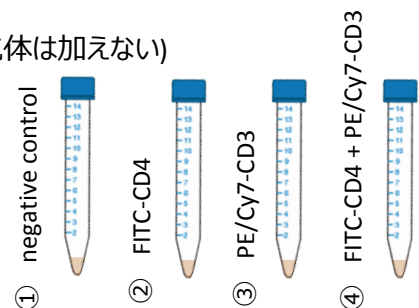
22. 抗体を以下のようにチューブに 5uL ずつ加えます。

① negative control (2% FBS/PBS に懸濁した状態にしておく。抗体は加えない)

② FITC- CD4 (5uL)

③ PE/Cy7-CD3 (5uL)

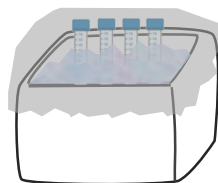
④ FITC-CD4 (5uL) + PE/Cy7-CD3 (5uL)



23. 指で軽く弾いて細胞と抗体を混ぜます。



24. 氷中におき、遮光状態で 15-30 分間反応させます。



25. 25mL のピペットを使って PBS を 5mL ずつ加え細胞を洗います。

26. 1000rpm で 5 分間 遠心分離、上清を吸引除去します



○ 1000rpm. 5min.

27. ペレットを 2% FBS/PBS 500uL で懸濁します。
28. 測定まで氷中で保存します。
29. フローサイトメーターで測定を行います。

以下の説明はフローサイトメーター付属の説明書を見ながら行います。