

# ヒト幹細胞の染色体解析 標準操作手順書

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 目次 .....  | 2  |
| 1. ヒト幹細胞のカルノア固定法 .....  | 3  |
| 1.1. ヒト IPS 細胞 (FEEDER FREE) ・ ES 細胞 (FEEDER FREE) のカルノア固定プロ<br>トコル (6CM DISH スケール) ..... | 3  |
| 1.2. ヒト MSC 細胞のカルノア固定プロトコル .....  | 5  |
| 2. ヒト幹細胞の染色体標本作製 .....  | 6  |
| 3. ヒト幹細胞の染色体標本の染色 .....   | 8  |
| 3.1. QH 染色 .....  | 8  |
| 3.2. トリプシン-ギムザ染色 .....  | 10 |

## 1. ヒト幹細胞のカルノア固定法

### 👉ポイント

- ✓ 細胞の増殖が最も早い時期に固定すること、分裂停止液の濃度と時間、低張処理の前に細胞をシングルにする事が重要です。
- ✓ 小さめのコロニーで多めに播種し、継代 3~4 日目頃(7~8 割コンフルエント)に固定で良好な結果が得られています。
- ✓ 固定する前日にメディアウムチェンジをしておくこと。
- ✓ iPS 細胞はアグリゲーションしやすいので、カルノア固定するまで(KCl やカルノアを加える前)は、こまめにピペティングし、細胞をしっかりシングルにして下さい。
- ✓ 同時に固定するのは 4 検体までにすること。
- ✓ パスツールピペットを用いる際は、1ml のゴム球をお勧めします。
- ✓ カルノア固定された細胞は、乾いたチューブやガラス管内に付きやすいため、ロスを防ぐために、ピペットなどはカルノア液で内壁を濡らして使用して下さい。また、ペレットをほぐす際も、タッピングは避けて下さい。

### 用意するもの

- 分裂停止液 ; 0.1mg/mL Metaphase Arresting Solution (iPS・ES 細胞の場合に使用)  
; 0.1mg/mL colcemid (MSC 細胞の場合に使用)
- パスツールピペット
- 1ml ゴム球
- PBS
- 細胞剥離液 ; 0.25% Trypsin, 0.75mM EDTA (iPS・ES 細胞の場合に使用)  
; 0.1% Trypsin, 0.04% EDTA (MSC 細胞の場合に使用)
- 血清
- 0.075M KCl
- メタノール
- 酢酸

### 1.1. ヒト iPS 細胞 (feeder free) ・ES 細胞 (feeder free) のカルノア固定

## プロトコル(6cm dish スケール)

- 0.1 mg/mL Metaphase Arresting Solution を 0.25  $\mu$ g/mL になるように加える。  
\* colcemid でも濃度は同じだが、iPS・ES 細胞の場合は MAS の方が死細胞が少なくなり、colcemid より良好な染色体標本が得られる。  
\* 細胞株によって至適条件が異なる場合があるので、その場合は濃度と時間を振って条件検討する。
- 37° C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1.5 時間(90 分) インキュベート。
- 上清を 15mL コニカルチューブ(★)に回収。
- 0.25% Trypsin, 0.75mM EDTA を 2 mL を dish に加えて洗浄したのち、★に回収(しっかりとシングルにするため、洗浄も 0.25% Trypsin, 0.75mM EDTA を使用する)。
- 0.25% Trypsin, 0.75mM EDTA を 2 mL 加える。
- 37°Cで数分間静置(5 分以内)。時々顕微鏡で様子を確認する。
- ★に血清を 1mL 加えておく(最終濃度 10%)。  
(トリプシンの働きを止める目的とチューブ内壁に細胞が付着するのを防ぐために血清を加えている)。
- パストツールピペットでよくピペッティングして、細胞をきちんとシングルにする。
- シングルになったら、★の回収培地で懸濁し、★に回収。
- 1200 rpm 3 分間 遠心(室温)。
- パストツールで上清を除去。
- 0.075 M KCl を 1mL 加え、パストツールピペットで速やかにピペッティングし、しっかりシングルにする(ピペット先端を使用し、あまり吸い込まないようにする)。
- 0.075 M KCl を 4 mL 加え、パストツールピペットでピペッティング。
- 15 分間静置。この間に、カルノア溶液を調製(酢酸:メタノール=1:3、検体数  $\times$  15mL+ $\alpha$ 、用事調整)。
- 再度、細胞をピペッティングする。
- カルノア液 1mL を 1 滴ずつ滴下しながらチューブを軽く振って混合する。
- カルノア液 4mL をさらに加えてパストツールピペットでピペッティング。
- 1300 rpm、5 分間 遠心。
- パストツールピペットで上清を除去(廃液は所定のタンクに回収)。
- カルノア溶液を 5 mL 加えパストツールピペットでピペッティング。
- 1300 rpm、5 分間 遠心。
- パストツールピペットで上清を除去(廃液は所定のタンクに回収)。

23. 20～22 を繰り返す(上清除去はデカントでも良い。
24. カルノア溶液を適量加えてスライド標本作製へ。(メタフェーズの数にもよるが、濃さの目安はスポーツ飲料より薄いぐらい。)  
\* すぐに標本作製しない場合はカルノア液を加え-30°Cで保存可能。

## 1.2. ヒト MSC 細胞のカルノア固定プロトコル

1. 0.1mg/mL Colcemid を(0.05～0.15 $\mu$ g/mL)になるように加える。
2. 37° C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3～4 時間インキュベート。  
\* 細胞株によって至適条件が異なる場合があるので、その場合は Colcemid の濃度と処理時間を振って条件検討する。
3. 上清を 15mL コニカルチューブ(★)に回収。
4. PBS 2 mL を dish に加えて洗浄したのち、★に回収。
5. 0.1% Trypsin, 0.04% EDTA を 2 mL 加える。

以降、操作手順 6. ～24. は、1-1.ヒト iPS 細胞 (feeder free) ・ES 細胞(feeder free)のカルノア固定プロトコルと同様。

- カルノア液は時間が経つとエステル化する。-30°Cで保存するのは、エステル化の反応を遅らせるためである。

## 2. ヒト幹細胞の染色体標本作製

### 📌ポイント

- ✓ -30℃保存したカルノア固定サンプルで標本作製する時は、フレッシュなカルノア液に置換すること。
- ✓ パスツールピペットを用いる際は、1mlのゴム球をお勧めします。
- ✓ カルノア固定された細胞は、乾いたチューブやガラス管内に付きやすいため、ロスを防ぐために、ピペットなどはカルノア液で内壁を濡らして使用して下さい。また、ペレットをほぐす際も、タッピングは避けて下さい。
- ✓ 細胞密度が高すぎないように、顕微鏡で観察した際に間期細胞核と染色体群に適度な隙間があるように調整する。

### 用意するもの

- wather bath
- 15mL チューブ立て
- プレパラート
- パスツールピペット
- 1ml ゴム球
- メタノール
- 酢酸
- 50% エタノール(4℃に冷やしておく)

### 操作手順

1. 50% エタノールの中にスライドガラスを入れ、4℃ に冷やしておく。
2. wather bath を 65～75℃にセット、15mL チューブ立てを横向きに入れ、液面から2～3cm 上にスライドガラスが置けるようにセットする。
3. カルノア固定サンプルをフレッシュなカルノア液で適度に希釈する。
  - \* パスツールの管内になるべく付かないように、空気を入れながら混ぜる。
4. 4℃ で冷やした 50% エタノールの中のスライドガラスを取り出し、エタノールを軽くふき取った後、カルノアサンプルを上方 20～30cm から一滴落とす。
5. 滴下液がある程度広がったところで、1.でセットしたチューブ立ての上に置く。
6. 滴下液が乾燥してから取り上げる。
7. 裏面の余分な水分を拭き取り、顕微鏡にて細胞の濃度や染色体の展開具合を確認する。

- \* 顕微鏡観察で間期細胞核や染色体群が白っぽくなっているときはwater bathに長く置きすぎなので短くしていく。
- 8. 染色体標本を埃のかからないところで数日間、室温にて乾燥させる。
- 9. 染色体標本を霜が直接かからないように標本箱などに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保管する。
  - \* 半永久的に保管可能である。(?)

### 3. ヒト幹細胞の染色体標本の染色

#### 3.1. QH 染色

##### 👉ポイント

- ✓ Quinacrine、Hoechst それぞれ単独でも染色できるが、二重染色の方が濃淡がはっきりと見える。

##### 用意するもの

- Quinacrine : sigma Q2876-25MG
- Hoechst 33258 : sigma B-2883-25MG
- 0.1M クエン酸
- 0.2M リン酸水素二ナトリウム
- カバーガラス
- コプリンジャー
- ピンセット

##### 試薬調整方法及び保管法

###### マキルベン溶液

###### ・組成

|             |          |
|-------------|----------|
| クエン酸一水和物    | 11.18 g  |
| リン酸水素二ナトリウム | 13.29 g  |
| 超純水         | up to 1L |

↓ pH4.5 に調整

オートクレーブで滅菌

###### ・保存: 室温保存

※カビ等でコンタミした場合は白濁するので注意。

###### キナクリンストック溶液

###### ・組成: 以下の試薬を混合する。

|             |          |
|-------------|----------|
| キナクリン       | 25mg     |
| 超純水         | 10ml     |
| final conc. | 2.5mg/ml |

- ・ 保存: クライオチューブに 1.2ml ずつ分注し、-30°Cで遮光保存。



### ヘキストストック溶液

・組成: 以下の試薬を混合する。

|             |        |
|-------------|--------|
| ヘキスト        | 5mg    |
| 超純水         | 5ml    |
| <hr/>       |        |
| final conc. | 1mg/ml |

・保存: クライオチューブに 2ml ずつ分注し-30°Cで遮光保存。

### キナクリン染色溶液

・組成: 以下の試薬を使用前日までに混合する。

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| キナクリンストック溶液(2.5mg/ml) | 1.2ml     |
| マキルベン溶液               | 50ml      |
| <hr/>                 |           |
| final conc.           | 0.06mg/ml |

・保存: 4°C、遮光保存

・使用期限: 作製より1週間

### ヘキスト染色溶液

・組成: 以下の試薬を混合する。

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| ヘキストストック溶液(1mg/ml) | 25 $\mu$ l     |
| マキルベン溶液            | 50ml           |
| <hr/>              |                |
| final conc.        | 0.5 $\mu$ g/ml |

・保存: 4°C、遮光保存

・使用期限: 作製から 2~3 週間

## 操作手順

1. 染色前日までにキナクリン染色溶液を作製する。
2. マキルベン溶液を染色瓶 3 本用意する( I ~ III)。
3. マキルベン溶液 I にスライドガラスを浸す。
4. 遮光下でキナクリン溶液にスライドガラスを 20 min. 浸す。
5. スライドガラスの背面から水流の弱い水道水を伝わらせて表面を洗浄する。
6. マキルベン溶液 II にスライドガラスを浸す。
7. ヘキスト溶液にスライドガラスを 15 min. 浸す。
8. スライドガラスの背面から水流の弱い水道水を伝わらせて表面を洗浄する。
9. マキルベン溶液 III にスライドガラスを浸す。

10. マキルベン溶液Ⅲにスライドガラスを浸す。
11. マキルベン溶液Ⅲのコップリンジャー内でカバーガラスをかける。
12. コップリンジャーから取り出し、余分な水分を除去する。
13. マニキュア等で封入する。
14. o/nで蛍光灯に当てる。

## 3.2. トリプシン-ギムザ染色

### 👉 ポイント

- ✓ 細胞種や染色体の進展具合などにより、条件が変わってくるので、その都度条件検討が必要。
- ✓ 条件検討を視野に入れ、標本は多めに準備しておく必要がある。

### 用意するもの

- Giemsa :MERCK, 1.09204.0100
- Trypsin :BD,215240(培養に使う0.25%のもので良い)
- PBS pH6.8 :MERCK,1113740100
- FBS
- HBSS(-)
- コプリンジャー5個
- 水洗用ビーカー(500~1000mL)
- ピンセット
- タイマー
- カバーガラス
- マリノール
- 温風乾燥機(100℃まで設定できるもの)
- 顕微鏡

### 試薬調整方法及び保管法

#### PBS pH6.8

- 組成: 以下の試薬を混合する。

|                |    |
|----------------|----|
| メルク バッファータブレット | 1錠 |
| MQ             | 1L |

↓ 30~60分放置し、攪拌溶解する

- ・ 保存: 4°C保存

#### 0.025% トリプシン溶液

- ・ 組成: 以下の試薬を混合する。

|           |        |
|-----------|--------|
| トリプシン     | 1.25mg |
| PBS pH6.8 | 50ml   |

- ・ 用時調整

#### ギムザ溶液

- ・ 組成: 以下の試薬を混合する。

|             |        |
|-------------|--------|
| ギムザ         | 1.5ml  |
| PBS pH6.8   | 48.5ml |
| final conc. | 3 %    |

- ・ 用時調整
- ・ コプリンジャー2つ分用意

#### 10%FBS/PBS

- ・ 組成: 以下の試薬を混合する。

|             |       |
|-------------|-------|
| FBS         | 5ml   |
| PBS pH6.8   | 45 ml |
| final conc. | 10 %  |

- ・ 用時調整

#### 5%FBS/PBS

- ・ 組成: 以下の試薬を混合する。

|             |         |
|-------------|---------|
| FBS         | 2.5 ml  |
| PBS pH6.8   | 47.5 ml |
| final conc. | 5 %     |

- ・ 用時調整

## 操作手順

1. 標本スライドを作成後、70°Cオーバーナイト(15hr 前後) or 80°C1  
~2 時間でハードニングを行う。
  - ◇ 時間が短いと処理後に染色体が膨張してしまい、長すぎるとトリ  
プシンの効きが悪くなるので、適宜調整する。
2. コプリンジャーに0.025%トリプシン溶液、10% FBS/PBS、5%  
FBS/PBS、ギムザ溶液(2個)を入れて準備する。
3. 条件設定として3枚のスライドガラスを用い、トリプシン溶液に20  
~35秒浸す。
  - ◇ トリプシン処理の2~3秒が大きく完成度に影響する。
4. 10% FBS/PBSに浸漬して洗う。
5. 5% FBS/PBSに浸漬して洗う。
6. ギムザ液に浸漬して洗う。
  - ◇ 思い切りスライドを前後し、良く洗う。
7. ギムザ液に7分浸す。
8. ビーカーに入れたDWでスライドを洗浄する。
  - ◇ DWは色が変わってきたらこまめに交換する。
9. 水気を切って、(ドライヤーで一気に)風乾させる。
10. どの条件で一番バンドがしっかり出ているかを顕微鏡で確認する。
  - ◇ 染色体が白くなっている場合はトリプシンの時間が長すぎる。染  
色体が黒すぎてバンドが出ていない場合はトリプシンの時間が短  
い。
11. はっきりとバンドが出ている条件を中心に残りのスライドガラスを  
染色する。
  - ◇ 写真に撮ってみると感じが変わることがあるので少し広い条件で  
染色を行った方が2度手間にならない。