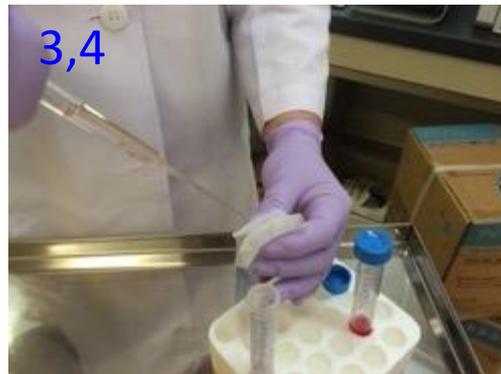


細胞分散およびPI染色法

1. PBSで組織を少し湿らせ、眼科用鉏で細切
(すり潰さないようにして鉏の先端で切ります)
2. 0.2% TritonX-100 inPBS1ml添加
(組織の大きさによって加減する、3mm角程度だと0.5~1ml)
3. パスツールピペットを用いて数回ピペッティングして細胞分散する
(泡を作らないように、水流で細胞をほぐします)
4. ナイロンメッシュを用いて細胞集塊を取り除く
5. 1mg/ml RNase 100 μ l添加し、軽く攪拌
6. 100 μ g/ml Propidium Iodide 50 μ l添加し、軽く攪拌



1,2
Mincing by scissors



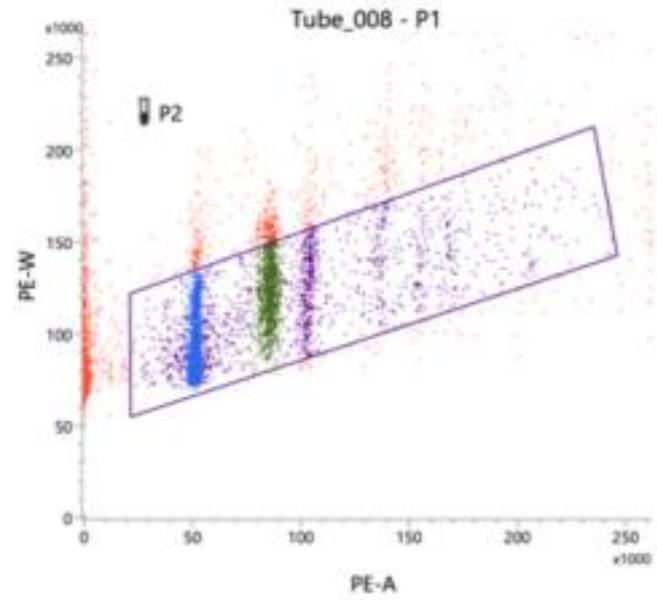
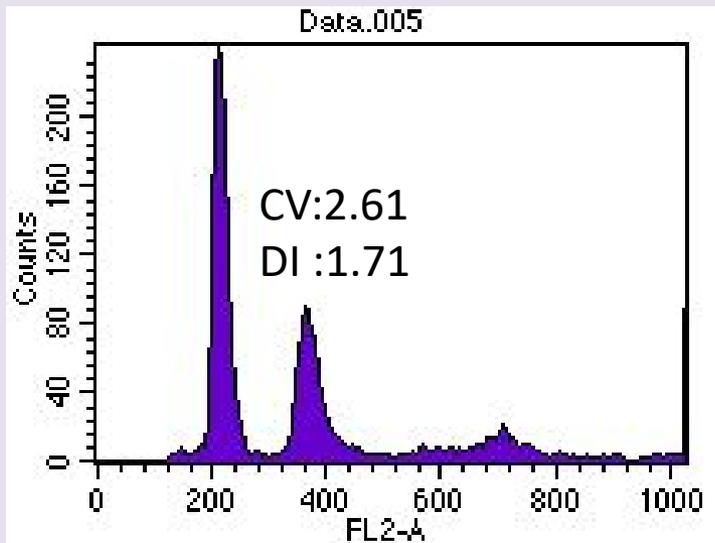
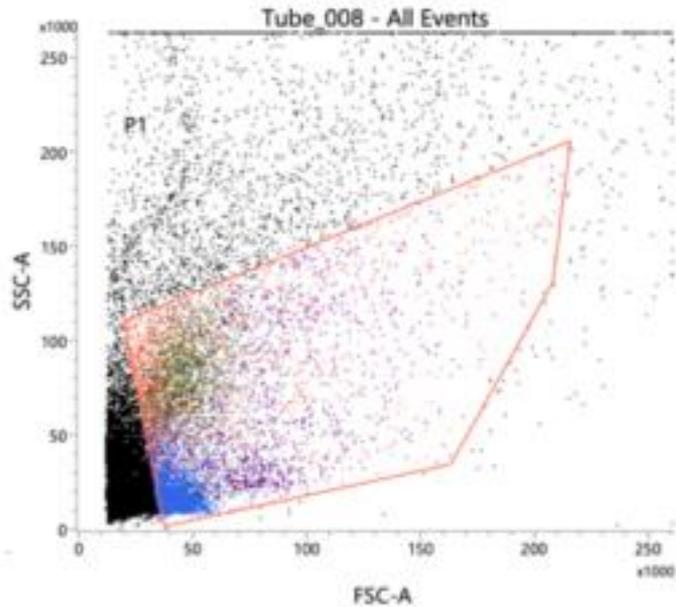
3,4
Cell dispersion & filtering



5,6
RNA digestion & DNA staining

肺癌症例：2016年に-80℃保存（2021年6月にFACSLyricで測定）

2016年Fresh SampleをFACSCalibur で測定

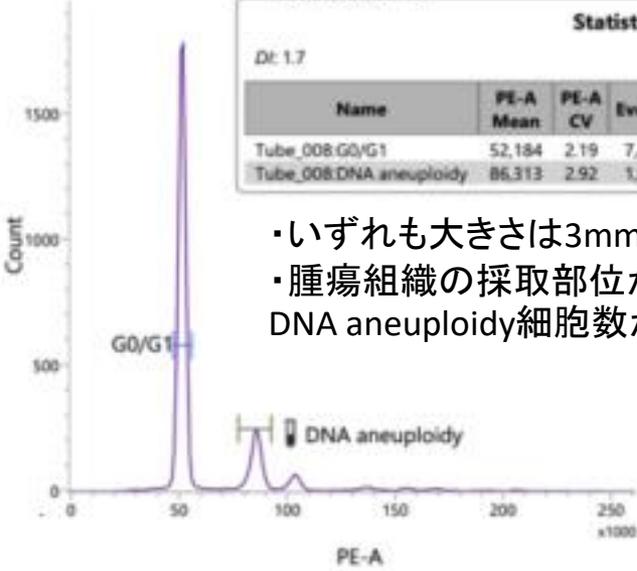


Tube 008 - P2

Statistics

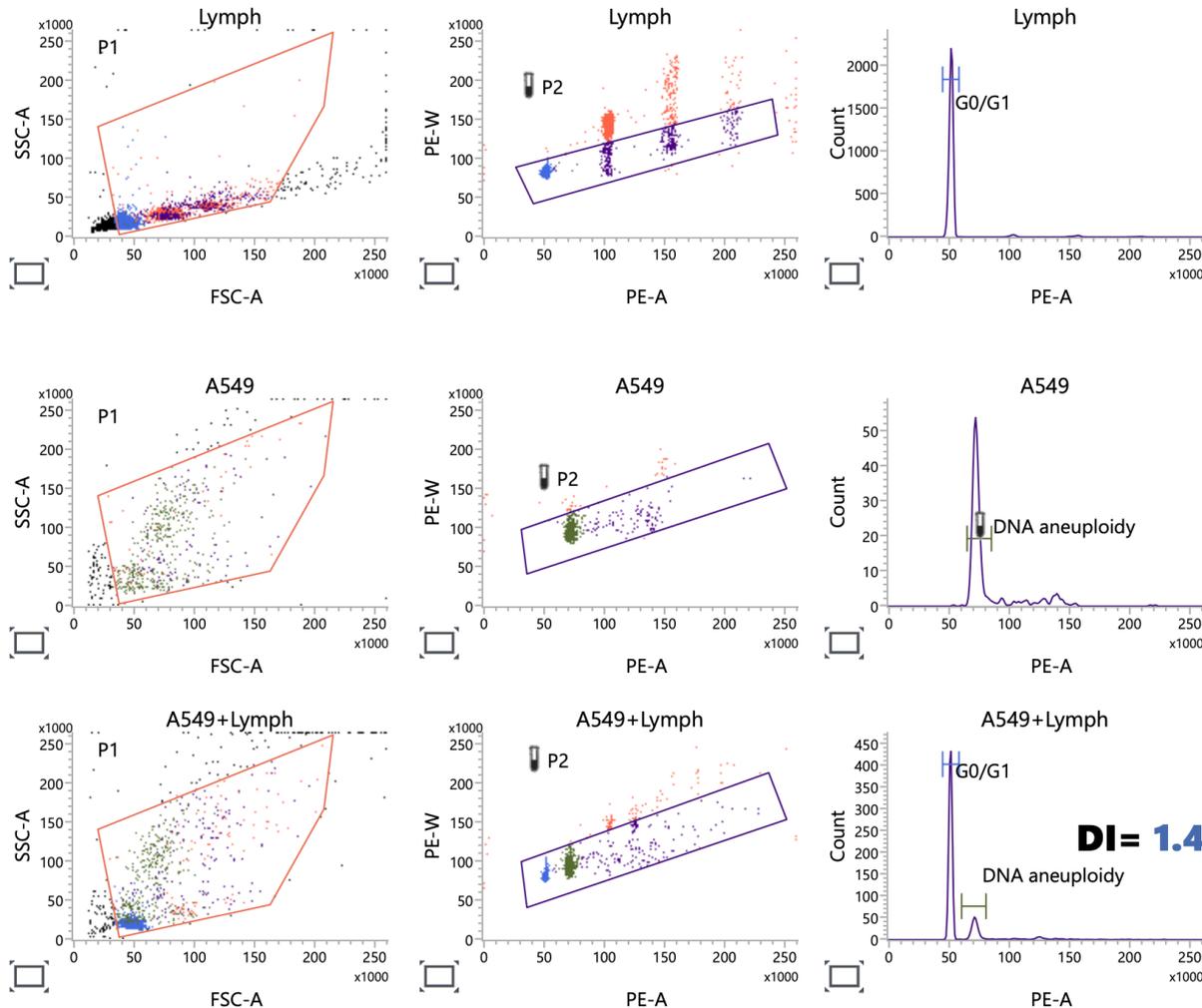
DI: 1.7

| Name | PE-A Mean | PE-A CV | Events | % Total | % Parent | % Grandparent |
|-------------------------|-----------|---------|--------|---------|----------|---------------|
| Tube_008.G0/G1 | 52,184 | 2.19 | 7,490 | 27.77 | 72.33 | 58.29 |
| Tube_008.DNA aneuploidy | 86,313 | 2.92 | 1,509 | 5.60 | 14.57 | 11.74 |



- ・いずれも大きさは3mm角程度
- ・腫瘍組織の採取部位が僅かに異なることから、DNA aneuploidy細胞数が違うが、CVやDIはほぼ同じ

フィコール分離リンパ球とA549(肺がん細胞株)のDNA測定



リンパ球サブセットなどの測定では全血から染色→溶血させて測定しますが、DNA測定では全血だと測定精度が落ちる(CV↑)ので、面倒ですがフィコール分離をお勧めします。

| Statistics | | |
|-------------------------|-----------|---------|
| Name | PE-A Mean | PE-A CV |
| Tube_003:G0/G1 | 52,355 | 1.36 |
| Tube_004:DNA aneuploidy | 68,235 | 10.08 |
| Tube_005:G0/G1 | 53,246 | 1.74 |
| Tube_005:DNA aneuploidy | 73,017 | 3.48 |

1. EDTA採血管を用いて採血→フィコール遠心法でリンパ球を分離し、PBSに浮遊させる
2. 培養細胞をTrypsin EDTAで処理、回収、PBSに浮遊させる
3. 細胞数を計測し、遠心、上清を取り除く
4. 0.2%TritonX-100/PBSで裸核化(細胞数によって量を加減)、ナイロンメッシュで凝集を取り除く。
5. サンプルチューブを3本用意し、リンパ球、培養細胞、混合したサンプルを作る(5~10x10⁵/ml)
6. RNase処理、Propidium Iodide 染色→FACS測定