

FACS-mQ FAQ

Q1 FACS-mQ って何ですか？

A1 細胞集団の中の少数のある特定の遺伝子を発現する細胞を分離し、その性質を解析する技術です。従来法の **FACS** は表面抗原に特異的な抗体で分離し、その後培養等で細胞を増やして解析していました。このような方法だと解析まで細胞を生かしておくことが必要なため、適当な表面抗原が無い細胞の分離はできませんし、臓器から酵素で分散した細胞では表面抗原が消失しているので分離が困難です。また、採取後の解析も手間暇がかかって大変です。**FACS-mQ** では採取した細胞を **RNA** を保持した状態で固定します。その後、**RNA** を分解させない条件で蛍光標識し、分離した後、**RNA** を抽出して遺伝子発現プロフィールを作成することでその性質を解析します。従って、細胞内・核内抗原を指標とした分離も可能で、解析も短時間で終了します。

Q2 **FACS-mQ** で細胞分離の指標とできるターゲットは何ですか？

A2 表面抗原だけでなく、細胞内抗原・核内抗原も使用可能です。従って、固形臓器を酵素処理で分散した細胞も使用可能です。また発現量の多いものであれば **mRNA** の標識も可能です。

Q3 多重染色は可能ですか。

A3 通常の **FACS** と同様に多重蛍光染色が可能です。

Q4 本当に染色過程で **RNA** は分解しないのですか？

A4 蛍光免疫染色では全過程が **4C** で行われますが、定量的 **RT-PCR** で判定する限り、**RNA** の減少はほとんど起こりません。また **mRNA** 同士の相対発現比も変化しませんので、遺伝子発現プロフィールは保持されているものと思われます。**RNA** が減少するとすれば洗浄過程等での細胞の消失によるものと考えられます。これに対して **mRNA** の染色の場合はハイブリダイゼーションの過程でかなり **RNA** が減少します。

Q5 使用できるターゲットを詳しく。

A5 免疫染色に関しては、通常の組織の免疫染色に使用可能な抗体であればほとんど使用できると思います。ただし、発現量の少ない蛋白に関しては後述の増感法が必要になるかもしれません。**mRNA** の染色に関しては、現状では残念ながらかなり高発現しているものしか使用できません。今後、**RNA** を感度が高く、熱に安定な蛍光色素で直接標識する技術が出れば、もう少し使用範囲が広

がるかと思えます。我々は、LNA を使用した標識も試みましたが、なぜか mRNA, miRNA に対してはうまくいきません、唯一使用可能だったのが rRNA でした。

Q6 免疫染色の感度を上げるにはどうしたらよいですか？

A6 免疫染色で感度を上げるために下記の検討をお勧めします。

1) 抗体の選択

ポリクローナル抗体よりモノクローナル抗体が一般的に感度が良いです。またモノクローナル抗体の種類によってもかなり感度に差がでます。

2) 抗体の濃度・反応時間の変更

一般的に、反応時間が長いほど、抗体濃度が濃いほどシグナルが上がりますが、バックグラウンドも上がります。最適な条件を検討してください。我々の経験ではモノクローナル抗体では濃度 0.5-1 μ g/ml, 反応時間 2-4 時間が最適でした。

3) 抗体希釈液の検討

通常の Blocking 液以外に TOYOBO の Can Get Signal Immunostain を使用すると S/N 比が向上することがあります。

4) 蛍光色素の変更

最も S/N 比が向上するのは APC 系統の蛍光色素です。（我々は Dylight 650 を使用しています）多重染色の場合、これを最も検出困難なターゲットの標識に使用すると良いでしょう。

5) 2次抗体の使用

1次抗体を非標識、2次抗体を蛍光標識抗体 F(ab')₂ とすることで劇的に感度が向上します。ただし、洗浄のステップが増えるのでやや煩雑です。

Q7 数はどれくらいのを回収したら遺伝子発現プロファイルは解析できますか？

A7 我々は、今までに最小で数千個レベルの細胞で解析を行っています。このレベルでは全く問題なく解析できます。今後、次世代シーケンサー等を使用すれば原理的には 1 個の細胞からでも遺伝子発現プロファイルの作成は可能であると考えられます。

Q8 細胞採取のコントロールとしては何を使用していますか？

A8 分離の指標となる遺伝子を発現している細胞株、発現していない細胞株を検体と同様に固定してコントロールにしています。

Q9 細胞の固定液は何ですか？

A9 免疫染色の場合、メタノールと PEG を混合したものを使用しています。

Q10 固定した細胞は保存できますか？

Q10 DMSO を加えて-80C で保存します。我々の経験では数カ月を経ても問題なく使用できます。

Q11 実験実施の上で何かコツがあれば教えてください。

A11 とにかく全過程で検体チューブをきっちり冷やすことです。バッファーの入れ替えはアスピレーターを使用していますが、下まで吸ってしまうと細胞が減るので 100-200 μ l 程度残してください。交換の時に先の細いピペット等で細胞を乱暴に懸濁すると細胞が壊れます。遠心条件は細胞ごとに違いますので、回転数と時間を細胞数が減らない最低のラインに合わせてください。チューブは現在アシストの 10ml チューブを使用していますが、清潔なものであれば特に RNase を気にする必要はありません。

参考文献

1. 高野 徹
幹細胞・癌幹細胞時代の新規臨床検査としての FACS-mQ (mRNA quantification after FACS) 臨床病理 60 (8) : 748-752, 2012.
2. Yamada, H., Maruo, R., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. mRNA quantification after FACS using *in situ* hybridization. Cytometry A 77A: 1032-1037, 2010.
3. Yamada, H., Maruo, R., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. Messenger RNA quantification after fluorescence activated cell sorting using intracellular antigens. Biochem Biophys Res Commun 397: 425-428, 2010.
4. Maruo, R., Yamada, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting using locked nucleic Acid probes. Mol Biotechnol 49: 42-47, 2011.
5. Yamada, H, Yamakawa, N., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T. Prolonged hybridization with a cRNA probe improves the signal to noise ratio for in-tube *in situ* hybridization for quantification of mRNA after fluorescence-activated cell sorting. Biotech Histochem 87: 366-371, 2012.