



アポトーシスを包括的に研究する手法： 遺伝子発現から細胞イベントまで

Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay, ImProm-II™ Reverse Transcription System, SV Total RNA Isolation System

By Katharine Miller, B.S., Rich Moravec, B.S., and Terry Riss, Ph.D., Promega Corporation

Jurkat細胞の培養においてアポトーシスを誘導し、Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay (カタログ番号G7790, G7791) を用いて DEVDase (Caspase-3/7) 活性を測定しました。Total RNA は、SV Total RNA Isolation System (カタログ番号Z3100) を用いてアポトーシスを起こしている細胞とコントロール細胞から精製しました。このRNAをImProm-II™ Reverse Transcription System (カタログ番号A3800) を用いる cDNA合成と遺伝子特異的増幅のテンプレートとしました。これらの試薬は、遺伝子発現から細胞イベントまでのアポトーシス研究を“キットを用いて一貫して研究する”ことを可能にしました。

アポトーシス誘導と関連する分子生物学的イベントを示すためのモデルとしてJurkat細胞を選びました。本稿では、アポトーシスの鳥瞰図を得るために、遺伝子発現解析、カスパーゼアッセイ、Total RNA 精製、cDNA合成、およびDNA増幅についてのプロメガ製品のアプリケーションを説明します。

カスパーゼ-3/7 アッセイ

アポトーシスの誘導を確認するために、処理済み対未処理コントロール細胞におけるDEVDase 活性の測定に、プロメガの新しい Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay を用いました (プロトコール TB295) (図1)。

RNAの単離

培養Jurkat 細胞からプロメガのSV Total RNA Isolation System を用いてプロトコール (TM048) にしたがってTotal RNA を精製しました。培養を1.4 × 10⁶ 細胞ずつの9つのプレップに分け、コントロールおよびアポトーシス細胞から転写レベル解析におよそ180μgのTotal RNA を得ました。

ImProm-II™ Reverse Transcription System を用いた Jurkat 細胞からの RT-PCR

コントロールおよびアポトーシス誘導 Jurkat 細胞のTotal RNA をテンプレートとして第一鎖 cDNA 合成を プロトコール TM236 にしたがって行いました。目的の RNA と 0.5μg の oligo(dT) プライマーを変性した後、cDNA 合成反応液を調製しました。

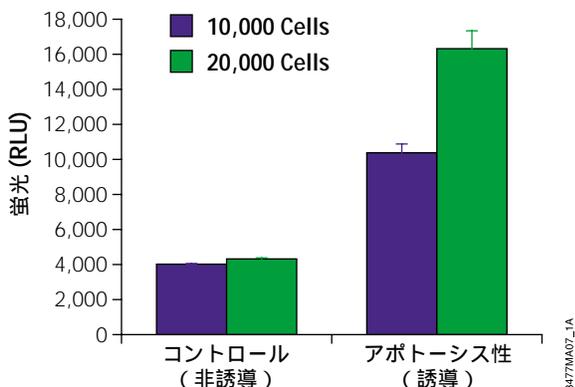


図1. コントロールおよび抗 Fas 誘導 Jurkat 細胞のカスパーゼ-3/7 活性

コントロールとアポトーシス Jurkat RNA 集団の類似性を示すために、PCR 増幅により cDNA ライブラリーをスクリーニングしました。増幅は 3 つのハウスキーピング遺伝子に特異的なプライマーを用いて行いました。β-アクチン (Total RNA 中でも発現頻度大)、α-アクチン (中程度の発現頻度)、ADP Ribosylation Factor-1 (低レベルの発現頻度) の遺伝子を選びました。また、カスパーゼ-3 のメッセージ (発現頻度はかなり低い) がアポトーシス細胞と非アポトーシス細胞の両方に存在する) を増幅しました。プライマー配列はCell Notes No.2をご覧ください。

すべてのハウスキーピング遺伝子はわずか 1pg の Total RNA (図 2) からでも検出でき、ImProm-II™ Reverse Transcription System の感度の良さが示されました。カスパーゼ-3 の増幅サイトは、わずか10pg の RNA で検出できました (図3C, Cell Notes No. 2 を参照)。

予想されたように、図 1 のデータは DEVDase 活性がアポトーシス誘導細胞で増加していることを示します。図 2 のデータは非誘導細胞とアポトーシス細胞で大きな違いを示しておらず、アポトーシスによりカスパーゼ-3 の発現の増加は起こっていないことを示唆しています。これらのデータは、アポトーシスの間に非活性化型前駆体カスパーゼ-3 の迅速なプロセッシングが起こっているという学説と一致しています。

結論

プロメガの試薬を用いると細胞活性の多数のレベルにおける生物学的プロセスの系統的な研究を行うことができます。Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay の“添加、混合、測定”形式により、アポトーシスイベントの迅速な評価ができました。SV Total RNA Isolation System は、高品質のRNAを単離するための信頼できる手法を提供し、ImProm-II™ Reverse Transcription System は遺伝子発現を研究するための強力なツールであることが示されました。

(この記事の全文はCell Notes No.2でご覧いただけます。)

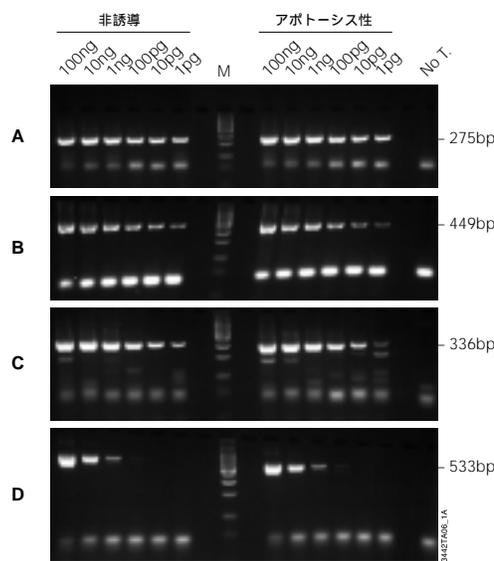


図2. 3つのハウスキーピング遺伝子およびカスパーゼ-3 の mRNA の高効率 RT-PCR パネルA、β-アクチン。パネルB、α-アクチン。パネルC、ADP Ribosylation Factor-1。パネルD、カスパーゼ-3。詳細はCell Notes No. 2 を参照。