

マルチプレックス解析： 同一細胞サンプルを用いた細胞生存性試験と遺伝子発現解析

培養細胞を用いた実験が日常化している現在、より生体に近い高次元細胞モデルである3次元培養細胞あるいは初代培養細胞、ES/iPS分化細胞など特殊かつ貴重な細胞が多く利用されてきています。プロメガでは、これらに対応すべく高次元細胞プロジェクトとして、3次元培養対応、カイネティクス測定、多重測定(マルチプレックスアッセイ)あるいは、細胞内エネルギー代謝測定システムなど、より高度なツールを提供しています。今回は、マルチプレックスアッセイの中でも、特にユニークな例をご紹介します。

細胞生存性測定とRNA精製あるいはレポーターアッセイとのマルチプレックス解析



細胞の継続的な生存性を測定するために、細胞非侵襲的な方法として RealTime-Glo™ が開発されました。この非侵襲的な特徴を生かして、細胞生存性測定後に細胞を他の目的に利用することが可能です。薬剤による細胞刺激、siRNA などによるノックダウンの影響の指標として、細胞生存性試験あるいは発現量(転写量)の変化を測定します。RealTime-Glo™ は両試験を同一細胞で測定することを可能にしました。

これを確認するために RealTime-Glo™ の RNA 精製に対する影響を調べたところ、その収量に影響が認められず(図1)、また、ホタルルシフェラーゼによるレポーターアッセイに対する影響も認められませんでした(図2)。

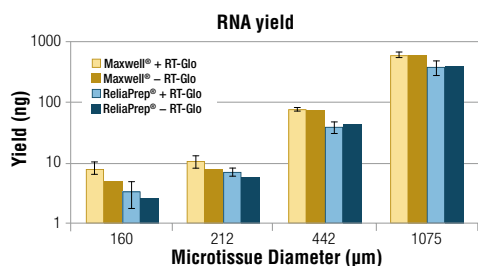


図1. Maxwell® (自動精製) あるいは Reliaprep™ (マニュアル精製) による RNA 精製に対する RealTime-Glo™ の影響

さまざまなサイズの HEK293 スフェロイドを RealTime-Glo™ を用いて細胞生存性を測定した後、Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit あるいは Reliaprep™ RNA Tissue Miniprep System を用いて RNA 精製を行った。RealTime-Glo™ は、RNA の収量に影響を与えなかった。

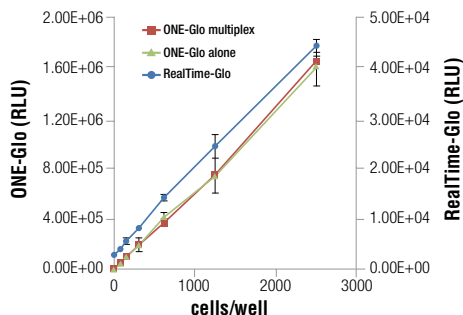


図2. ホタルルシフェラーゼアッセイに対する RealTime-Glo™ の影響

RealTime-Glo™ 試薬添加2時間後に細胞生存性を測定し、次にルシフェラーゼアッセイ試薬である ONE Glo™ を添加して、ルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの結果、RealTime-Glo™ 非処理(▲)と比較し RealTime-Glo™ 処理(■) による影響は認められなかった。

次に細胞周期をコントロールする CDK2 に対する siRNA をトランスフェクションし、同一細胞を用いて細胞生存性および転写産物を定量しました。CDK2 siRNA をトランスフェクションすると、継続的な細胞生存性の低下が認められ、併せて細胞内の転写量が低下していることも確認することができました(図3)。この結果は CDK2 のノックダウンにより細胞周期が停止し、細胞数が減少したことを示唆していました。

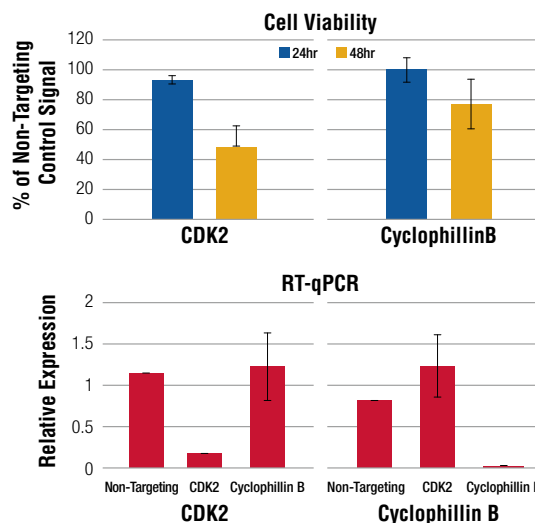


図3. siRNA 処理による細胞生存性試験と遺伝子発現解析のマルチアッセイ

CDK2 およびハウスキープ遺伝子 Cyclophilin B に対する siRNA 処理後 24 時間および 48 時間に RealTime-Glo™ による細胞生存性試験を行った。さらに、同一の細胞サンプルより抽出した RNA と GoTaq® 1-Step RT-qPCR System を用いて RT-qPCR を行い各遺伝子の転写物を定量した(コントロール: GAPDH)。CDK2 のノックダウンは細胞生存性を低下させたが、Cyclophilin B では顕著な影響は認められなかった。

RealTime-Glo™ については、このほかに ATP 測定による細胞生存性試験 CellTiter-Glo®、アポトーシス試験 Caspase-Glo® 3/7 などを組み合わせたマルチプレックスアッセイが可能で、その他 Promega の多くのアッセイシステムでもマルチプレックスアッセイが構築されています。詳細については弊社 Web サイトを参照いただくか直接お問い合わせください。

今すぐ始めたいけど装置が無い? そんな時は...
www.promega.co.jp/rentamax/

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
セルベースアッセイ			
細胞生存性試験 (リアルタイム)			
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	100 回分	G9711	20,000
	10 × 100 回分	G9712	97,000
	1000 回分	G9713	88,000
ホタルルシフェラーゼアッセイ			
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E6110	22,000
	100 ml	E6120	139,000
核酸精製			
RNA 自動精製			
Maxwell® RSC System	1 台	AS4500	2,800,000
Maxwell® RSC simplyRNA Tissue	48 回分	AS1340	39,000
RNA マニュアル精製			
Reliaprep™ RNA Tissue Miniprep System	50 回分	Z6111	34,000
	250 回分	Z6112	152,000
RT-qPCR			
GoTaq® 1-Step RT-qPCR System	200 回分	A6020	75,000

◎ キャンペーン対象製品: 詳細については 8 ページをご覧ください。

PC プロメガクラブ対象製品です。会員価格については www.promega.co.jp/promegaclub.html でご確認ください。