

## SuperPrep<sup>®</sup> Cell Lysis & RT Kit for qPCRを用いた 浮遊細胞の96ウェルプレートアッセイおよび遺伝子発現解析の事例

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 山崎 友実

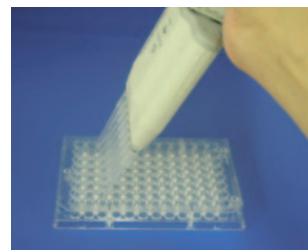
### はじめに

96ウェルプレートを用いるハイスループット遺伝子発現解析には多くは接着細胞が使用されますが、アッセイによっては浮遊細胞を対象としなければいけないケースもあります。しかし、浮遊細胞を96ウェルプレートでアッセイする場合、細胞のロスにより、精度が低くなるおそれがあります。そこで、今回、SuperPrep<sup>®</sup> Cell Lysis & RT Kit for qPCRによるヒト単球由来浮遊系細胞株U937の細胞ライセート調製手技について検討を行いましたのでご紹介いたします。

### 方 法

#### (1) プレートアッセイにおける細胞洗浄方法の検討

- U937細胞を10%FBSを添加したRPMI 1640培地で希釈し、96ウェルプレートに、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  cells/ウェルとなるよう、100 $\mu$ lずつ各3ウェルに播種したプレートを3枚用意しました。
- プレート遠心機で2,000rpm、5分間遠心し、それぞれ以下の3通りの方法で上清を除去しました。
  - マルチチャンネルピペットの先を内側の壁底にあてて上清を除去(ピペット除去)
  - プレートを下向きに傾けて上清を除去(デカンテーション)
  - デカンテーションで上清を除去し、ペーパータオル上でプレートを下向きにたたき、完全に上清を除去(デカンテーション&タッピング)
- PBS (-) を100 $\mu$ l各ウェルに加え、プレート遠心機で2,000rpm、5分間遠心し、再び前記3種類の方法<①②③>で上清を除去しました。(PBS (-) を添加後、細胞をほぐす操作は省略しました)。
- SuperPrep<sup>®</sup> Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code No.SCQ-101) の標準プロトコルでcDNA合成を行いました。
- 上記で合成したcDNAを使って、THUNDERBIRD<sup>®</sup> Probe qPCR Mix (Code No.QPS-101) を用いて $\beta$ -actin遺伝子のTaqMan<sup>®</sup>アッセイによる測定を実施しました。



#### (2) 浮遊細胞の96ウェルプレートアッセイ

- U937細胞を $5 \times 10^5$  cells/mlになるように10% FBSを添加したRPMI 1640培地に懸濁し、96ウェルプレートに2mlずつ播種したのち、最終濃度0、0.01、0.1、1、10 $\mu$ MになるようにPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を加え、37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>インキュベーターで6時間インキュベートしました。
- この細胞を96ウェルプレートに100 $\mu$ lずつ各3ウェルに分注しました ( $5 \times 10^4$  cells/ウェル)。
- このプレートをプレート遠心機で2,000 rpm、5分間遠心し、マルチチャンネルピペットで上清を除去しました。
- PBS (-) を100 $\mu$ l各ウェルに加え、プレート遠心機で2,000rpm、5分間遠心し、同様に上清を除去しました (PBS (-) を添加後、細胞をほぐすような操作は省略しました)。
- SuperPrep<sup>®</sup> Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code No.SCQ-101) の標準プロトコルでcDNA合成を行いました。
- 上記で合成したcDNAを使って、THUNDERBIRD<sup>®</sup> Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101) を用いて $\beta$ -actin、IL-8、TNF遺伝子のTaqMan<sup>®</sup>アッセイによる測定を実施しました。

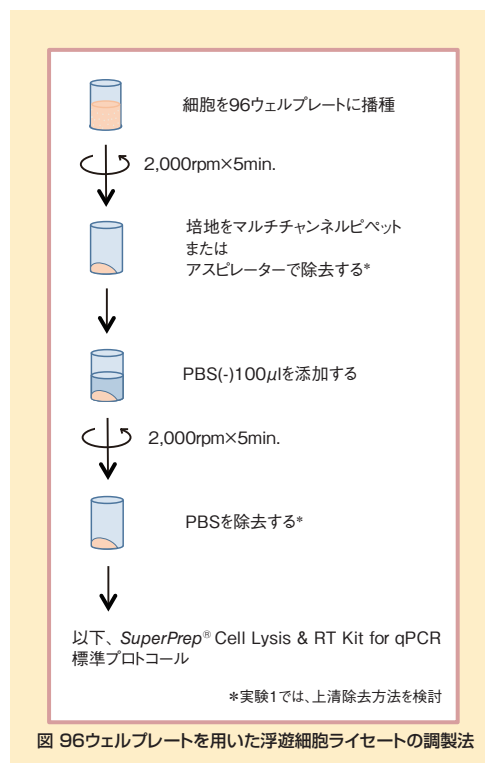


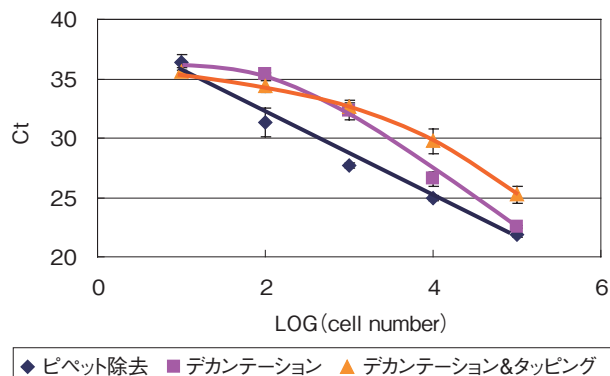
図 96ウェルプレートを用いた浮遊細胞ライセートの調製法

結果および考察

(1) プレートアッセイにおける細胞洗浄方法の検討

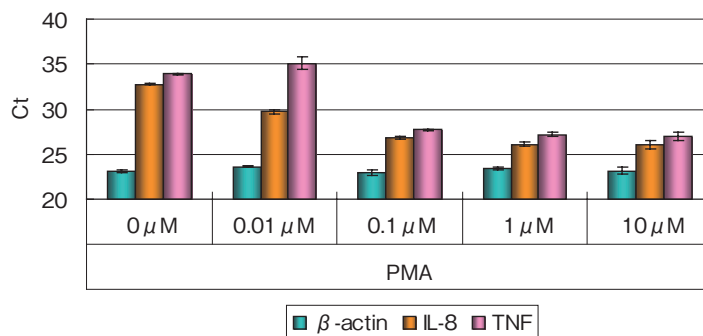
細胞洗浄のための上清除去の方法として、8連チャンネルピペットの先を内側の壁底につけるような形で静かに上清を除去した場合、細胞量とβ-actin遺伝子のCt値に高い直線性が認められました。一方、デカンテーションではピペットで除去した場合に比べ、Ct値の後退が認められ、細胞をロスしていると考えられます。

少し手間はかかりますが、ピペットで上清を除いていただくことで、精度の高いアッセイを行っていただけます。また、この作業はアスピレーターを用いる除去法も同様使用可能であることを確かめています。



(2) 浮遊細胞の96ウェルプレートアッセイ

PMAで刺激したU937細胞を処理して、リアルタイムPCRを実施しました。この結果、インターナルコントロールとしたβ-actin遺伝子については、同一条件内、条件間でCt値の変動やバラツキはほとんどなく、一定に維持されていました。一方、ターゲット遺伝子としたIL-8、TNFについては、PMA濃度依存的な発現量の亢進を確認することができました。



		β-actin		IL-8		TNF	
		Ct	STDEV	Ct	STDEV	Ct	STDEV
PMA	0 μM	23.07	0.18	32.76	0.03	33.91	0.06
	0.01 μM	23.63	0.13	29.70	0.21	35.11	0.63
	0.1 μM	22.94	0.31	26.83	0.11	27.69	0.04
	1 μM	23.39	0.17	26.12	0.22	27.19	0.28
	10 μM	23.15	0.41	26.02	0.42	27.02	0.45

(N=3)

まとめ

今回の検討から、浮遊細胞を用いた場合においても、プレート遠心機を用いることによりプレートフォーマットでの発現解析が可能であることが分かりました。ここで用いたU937細胞はRNase活性が強く、ライセートを用いる解析に向かないとされてきました。今回、そのU937細胞を用いてハイスループット解析を行い、正確にPMAに対する遺伝子の薬剤応答を解析できたことは本試薬システムの有用性を示すものであると考えられます。

本試薬は接着、浮遊に関わらず広範な細胞で解析可能であることを確認しています。是非一度、SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code No.SCQ-101) をお試しください。

➡ 製品の詳細に関してはp1・2に、また、p13にQ&Aを掲載しておりますので、併せてご覧ください。

\*TaqMan は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。