

FCMによるmRNA発現解析

癌抑制タンパク質p53によるDNAダメージ応答解析

転写因子である癌抑制タンパク質p53はDNAダメージにより活性化し、mRNAの転写を介して細胞周期停止やアポトーシスにかかわるタンパク質の発現を促進し、細胞の癌化を防いでいます。

PrimeFlow™ RNA Assay kitを用いることで、フローサイトメーター (FCM) により多様なmRNAの発現を細胞レベルで評価することが可能です。本アプリケーションレポートでは、p53活性化 (15位セリンのリン酸化) およびそれにより誘導されたmRNA発現の測定によるDNAダメージ応答の解析についてご紹介します。

結果

p53によって誘導されることが知られているDNAダメージ応答にかかわるタンパク質 (p21:細胞周期停止、Bax:アポトーシス) のmRNA発現をPrimeFlow™ RNA Assay kitを用いて解析しました。その結果、CamptothecinまたはEtoposide処理により、p21およびBax mRNAの増加が見られ、DNAダメージ応答の誘導が示されました。

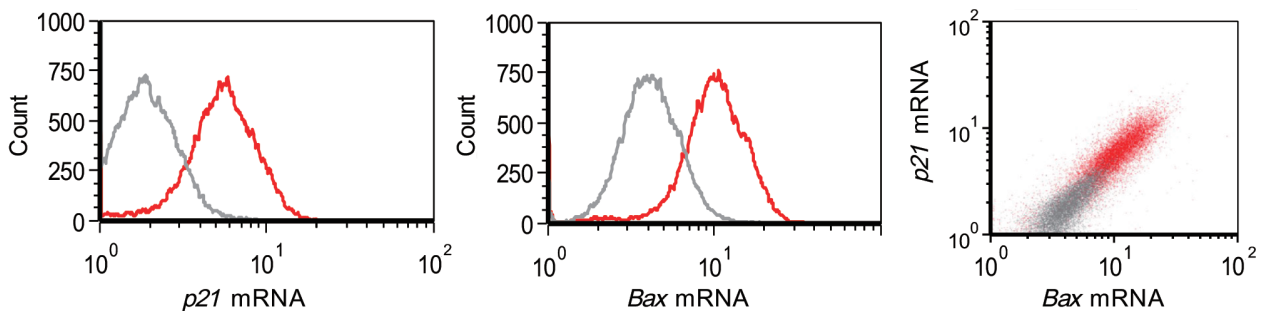


図1 Camptothecin処理 (赤色) によるp21およびBax mRNAの増加を示したヒストグラムおよびスキャターグラム (灰色はControl)

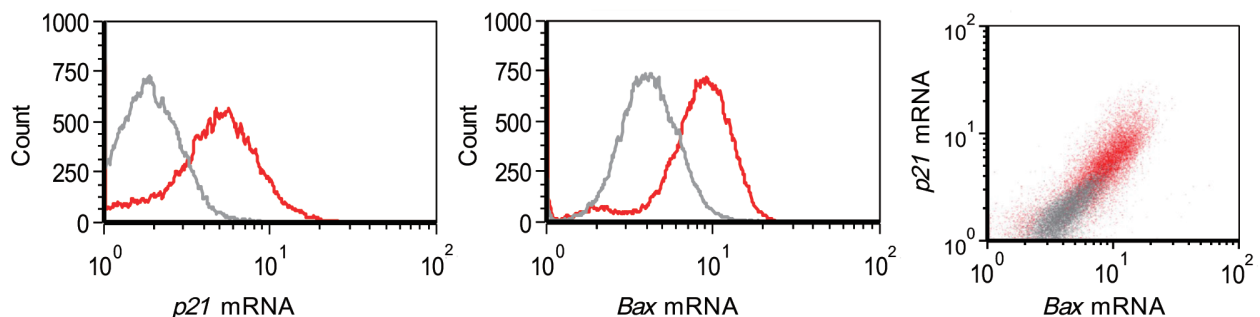


図2 Etoposide処理 (赤色) によるp21およびBax mRNAの増加を示したヒストグラムおよびスキャターグラム (灰色はControl)

*p21*および*Bax* mRNA発現の増加が著しい細胞群 (Positive,赤線) では、p53の活性化がみられました。このことから、p53により*p21*および*Bax* mRNAの転写が促進されていることが示唆されました。

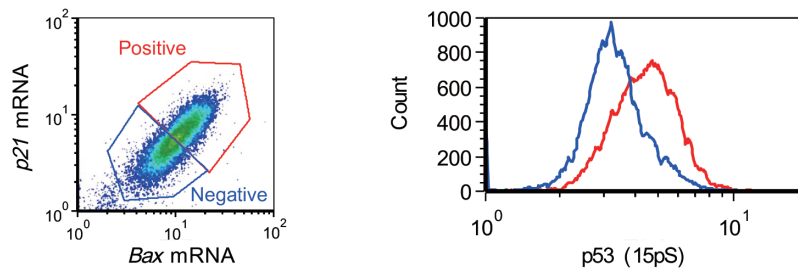


図3 Camptothecin処理後の*p21*および*Bax* mRNAの増加が見られた細胞群 (Positive,赤線)と大きな変化が見られなかった細胞群 (Negative,青線) のp53リン酸化 (15pS) の比較

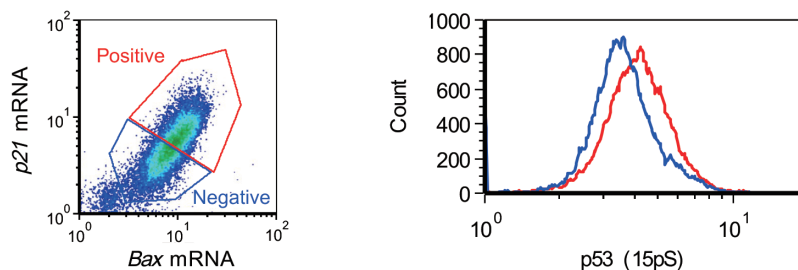


図4 Etoposide処理後の*p21*および*Bax* mRNAの増加が見られた細胞群 (Positive,赤線)と大きな変化が見られなかった細胞群 (Negative,青線) のp53リン酸化 (15pS) の比較

サンプル調製

A549細胞 (ヒト肺癌基底上皮腺癌細胞株) を10% FBS含有RPMI1640に播種し、アポトーシス誘導薬 (Camptothecin (トポイソメラーゼI阻害剤) またはEtoposide (トポイソメラーゼII阻害剤)) で刺激し、18時間培養しました。

刺激後の細胞をトリプシン処理により回収し、抗リン酸化p53 (15pS) 抗体によりリン酸化p53 (15pS) を染色しました。さらに、PrimeFlow™ RNA Assay kitを用いて*p21*および*Bax* mRNAを特異的プローブで染色しました。その後、フローサイトメーターCyFlow Spaceで測定し、p53によるDNAダメージ応答を解析しました。

試薬・装置

Human PrimeFlow™ RNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific, cat# 88-18009-204)

Anti-human p53(15pS) PE (Cell Signaling Technology, clone 16G8, cat# 8514)

Camptothecin - Apoptosis Inducer Set (TaKaRa, cat# PK-CA577-K121-5)

Etoposide (和光純薬工業, cat# 055-08431)

フローサイトメーター (対応可能機種) : CyFlow Space, Cube 6/8, RF-500

(すべて研究用機器のため診断には使用できません。)

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

リョーショセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557