

shRNA Expression Lentiviral Vector の作製方法

1. shRNA sequence を pENTR4-H1 へ挿入

・ターゲットサイトに対する shRNA のセンス鎖・リンカー・アンチセンス鎖のオリゴ DNA (両端に BglIII と XbaI サイト) を合成する。ターゲットの長さは 19 塩基で、A または G で始まるものを選ぶ。センス鎖に 3ヶ所程度 mismatches を入れる。Mutation は C→T あるいは A→G で 3つ散らして入れる。この際、TTTT および、TTATT ができないようにする。

例) Target sequence: AGATCACTTCCTATCCTGA

5' -GATCCCC AGGTCACTTTCTATCTTGA ACGTGTGCTGTCCGT TCAGGATAGGAAGTGATCT TTTTT GGAAAT -3'

3' -GGG TCCAGTGAAAGATAGAACT TGCACACGACAGGCA AGTCCTATCCTTCACTAGA AAAAA CCTTTAGATC -5'

(ligated to BglIII) (sense) (linker) (antisense) (termination) (ligated to XbaI)

ターゲット 19 塩基の 3'端が G または C の場合には、A に置換する。この際、アンチセンス鎖は T に置換する。AAAA ができる場合には、T に置換し、アンチセンス鎖は A に置換する。

例) Target sequence: AGATCACTTCCTATCCAAC

5' -GATCCCC AGGTCACTTTCTATCTAAT ACGTGTGCTGTCCGT ATTGGATAGGAAGTGATCT TTTTT GGAAAT -3'

3' -GGG TCCAGTGAAAGATAGATTA TGCACACGACAGGCA TAACCTATCCTTCACTAGA AAAAA CCTTTAGATC -5'

・オリゴ DNA をアニール後、pENTR4-H1 の BglIII, XbaI site にクローニングする (上記の例のデザインでは BglIII では切れなくなる)。DH10B 等に transformation し、Kanamycin で選択。

・挿入した shRNA の Sequence を確認する。H1 promoter 内から読むプライマー (pH1up2:CAGGAAGATGGCTGTGAGG) を使用。ほとんどの場合、Denature 98°C、DMSO 2% の条件で読めます。

2. Gateway により H1-shRNA を lentiviral vector へ挿入

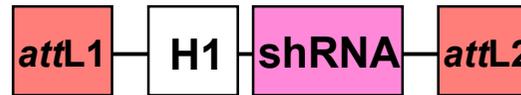
・shRNA を挿入した pENTR4-H1 と lentiviral vector (CS-RfA-CG 等) を Gateway LR Clonase (Invitrogen) と mix し、DH10B 等に transformation することにより Amp^r recombinant を得る。Mini prep. で recombinant を確認。

注) pENTR4-H1 は Kanamycin^r。

RfA (*ccdB* gene) の入ったプラスミド (CS-RfA-CG 等) を prep. する場合は、DB3.1 に transformation する!

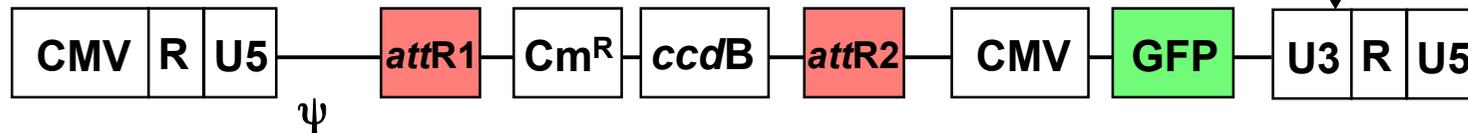
shRNA Expression by Lentiviral Vectors

Entry Vector for RNAi



Gateway LR Clonase

Lentiviral Vector for RNAi



shRNA Expression Lentiviral Vector

