

Inducible shRNA Expression Lentiviral Vector の作製方法

1. shRNA sequence を pENTR4-H1tet0x1 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-H1tet0x1 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 度、DMSO 2% の条件で読めます。

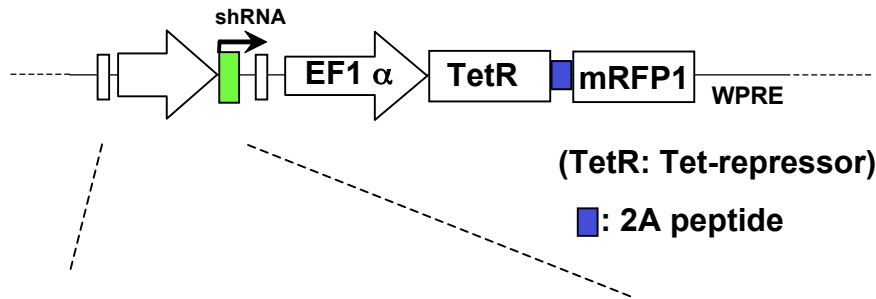
2. Gateway により H1tet0x1-shRNA を lentiviral vector へ挿入

・shRNA を挿入した pENTR4-H1tet02F と lentiviral vector (CS-CDF-RfA-ETVP 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。

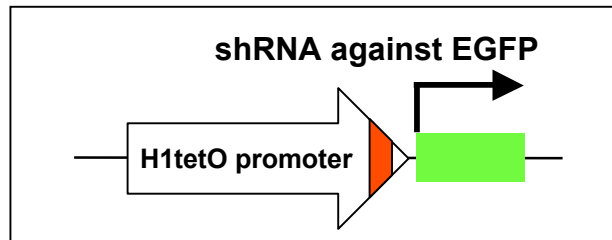
注) pENTR4-H1tet0x1 は Kanamycin^r。

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!

Inducible shRNA Expression Lentiviral Vector



LV-H1tetO-EGFP-ETRP



Tet-inducible H1 promoter

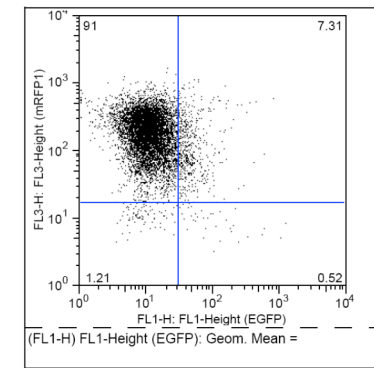
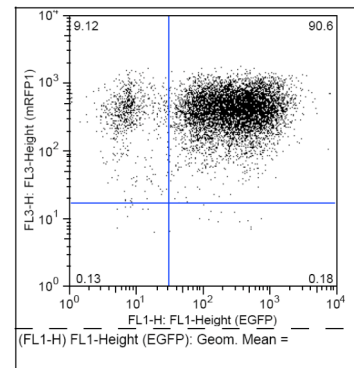
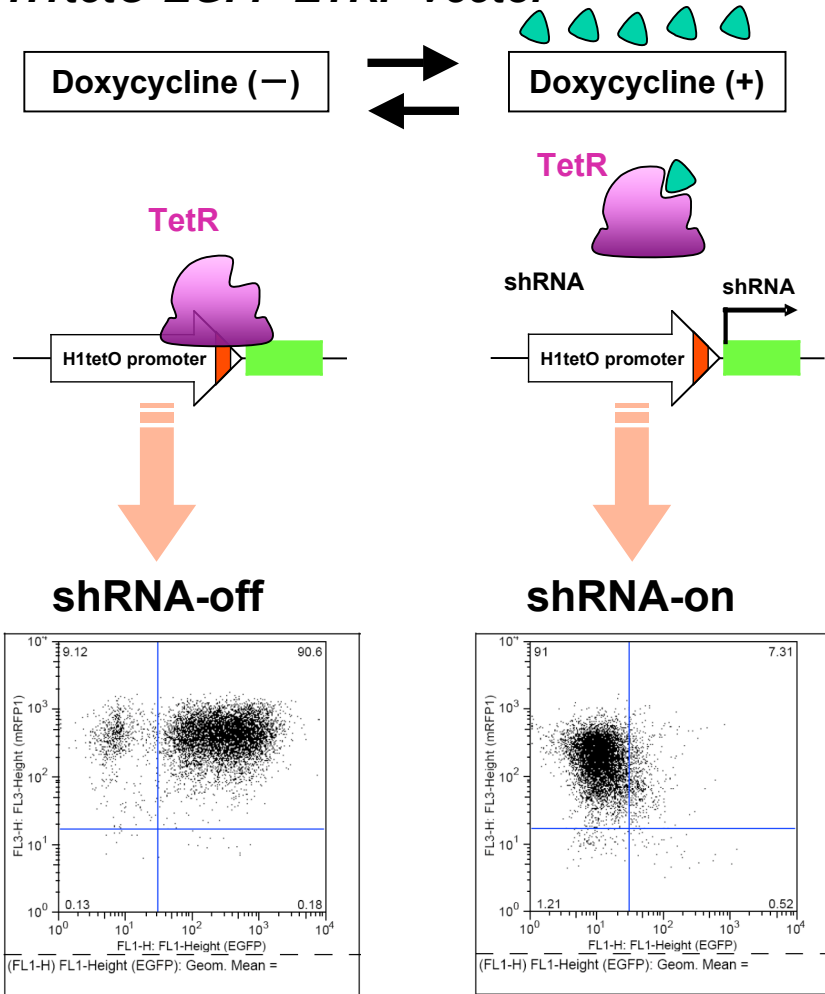
Insert the tet operator sequences between the TATA box in H1 promoter and transcription start site.



tet Operon (forward direction)

TCCCTATCAGTGATAGAGA (19 mer)

HeLa(EGFP) cells transduced with LV-H1tetO-EGFP-ETRP vector



→ GFP