

製品コード 3663
3664

研究用

Takara

pSINsi-DK I DNA Set (製品コード 3663)

pSINsi-DK II DNA Set (製品コード 3664)

説明書

目次

- I. 製品説明
- II. 製品内容
- III. 保存
- IV. 原理
- V. 準備
 - V-1. 標的配列の選択
 - V-2. ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成
- VI. pSINsi-DK ベクターへのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入
 - VI-1. 必要な器具・装置
 - VI-2. 用意するもの
 - VI-3. 二本鎖オリゴ DNA の調製
 - VI-4. ベクターの調製
 - VI-5. プラスミド DNA の大量調製
- VII. レトロウイルスベクターの産生 (Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho を用いる場合)
 - VII-1. 用意するもの
 - VII-2. ウイルス産生
 - VII-3. ウイルス力価測定
- VIII. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験
 - VIII-1. 必要な器具・装置 (VIII-2、VIII-3 共通)
 - VIII-2. RetroNectin® を用いる場合
 - VIII-2-1. 用意するもの
 - VIII-2-2. 準備
 - VIII-2-3. 感染
 - VIII-3. ポリブレンを用いる場合
 - VIII-3-1. 用意するもの
 - VIII-3-2. 準備
 - VIII-3-3. 感染
 - VIII-4. 遺伝子導入細胞の選択
- IX. 関連製品
- X. 参考文献
- XI. 注意

I. 製品説明

遺伝子発現を抑制するひとつの手法として RNA 干渉作用 (RNA interference ; RNAi) があります。RNAi は二本鎖 RNA を導入することにより、標的遺伝子の mRNA を分解し、発現を抑制する手法で、哺乳類細胞では 21 ~ 23 塩基の短い二本鎖 RNA (short interfering RNA ; siRNA) によって RNAi 効果が得られることが明らかとなっています。RNAi 実験の主な手法としては、合成 siRNA を導入する方法と、発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を形成させる方法が挙げられます。合成 siRNA ではその RNAi 効果は一過性ですが、発現ベクターを用いることで RNAi 効果の持続が期待でき、特に発現ベクターを用いて安定導入細胞を獲得すると、長期間にわたり遺伝子の発現抑制が可能となります。

レトロウイルスベクターは目的遺伝子を感染細胞染色体に安定に組み込むことができるため、目的遺伝子の長期安定発現ベクターとして非常に有効です。pSINsi-DK ベクターシリーズは、自己不活型レトロウイルスベクタープラスミドを基本骨格とし、2つの RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターにより 2つのヘアピン型 RNA を同時に発現させるベクターです。pSINsi-DK I は 2つの shRNA (short hairpin RNA) をそれぞれ hU6 プロモーターと hH1 プロモーターから発現させます。pSINsi-DK II は 2つの shRNA をそれぞれ hU6 プロモーターと mU6 プロモーターから発現させます。何れのベクターも同等に shRNA を発現し、2つの遺伝子の同時ノックダウンや一つの遺伝子に対するノックダウン効果の増強に利用できます。目的に応じて pSINsi-DK I と pSINsi-DK II を使い分けていただけます。マーカー遺伝子としてはネオマイシン耐性遺伝子を搭載しています。本製品はすでにカット済みであり、ベクター本体とプロモーターカセットで構成されています。

II. 製品内容

pSINsi-DK I DNA Set

pSINsi-DK (linearized)	3 μ g (0.1 μ g/ μ l)	5,361 bp
DK I Promoter Cassette*1	2.1 μ g (35 ng/ μ l)	380 bp

pSINsi-DK II DNA Set

pSINsi-DK (linearized)	3 μ g (0.1 μ g/ μ l)	5,361 bp
DK II Promoter Cassette*2	3.3 μ g (55 ng/ μ l)	599 bp

* 1 : human U6 promoter (Accession ; X07425) と human H1 promoter (Accession ; S68670) を搭載。

* 2 : human U6 promoter (Accession ; X07425) と mouse U6 promoter (Accession ; X06980) を搭載。

【調製】イオン交換カラムにより精製した後、制限酵素切断処理し、アガロースゲル電気泳動により各 DNA 断片を精製。

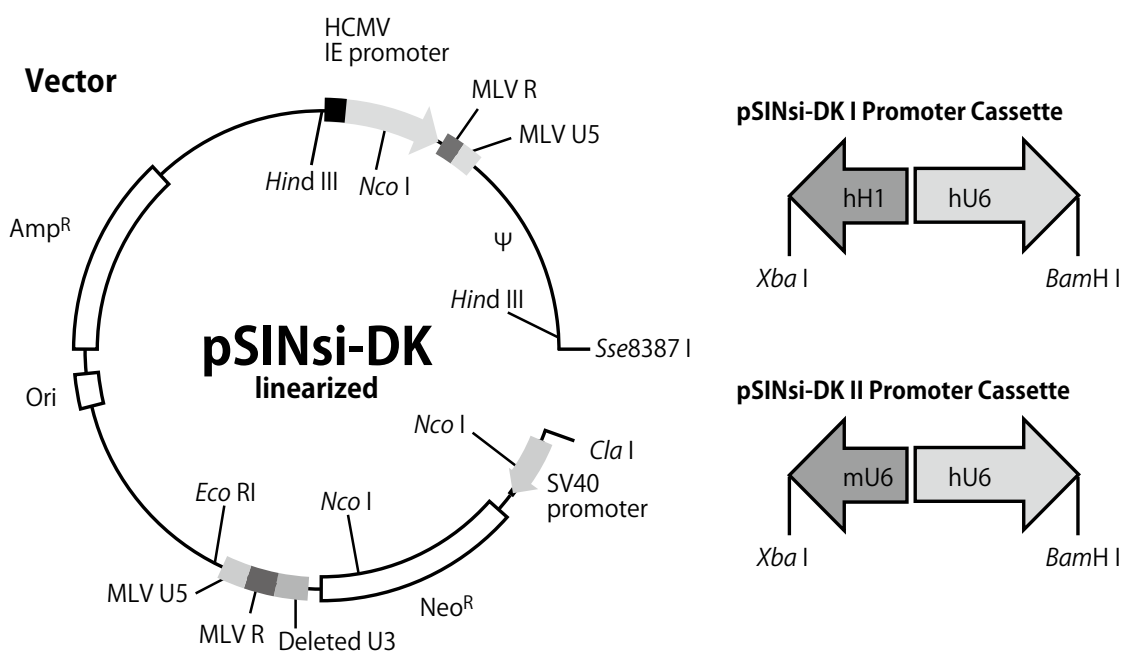


図 1. Linearized vector および Promoter Cassette の概要

III. 保存

− 20°C
(適切に保存し、受け取り後 2 年を目途にご使用ください。)

IV. 原理

shRNA を発現させるための 2 種類の二本鎖合成オリゴ DNA とベクター本体、プロモーターカセットの合計 4 つのフラグメントを同時にライゲーションすることによって一気にベクターを構築することが可能です。この 4 - フラグメントライゲーションには、DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023) が有効です (図 2)。

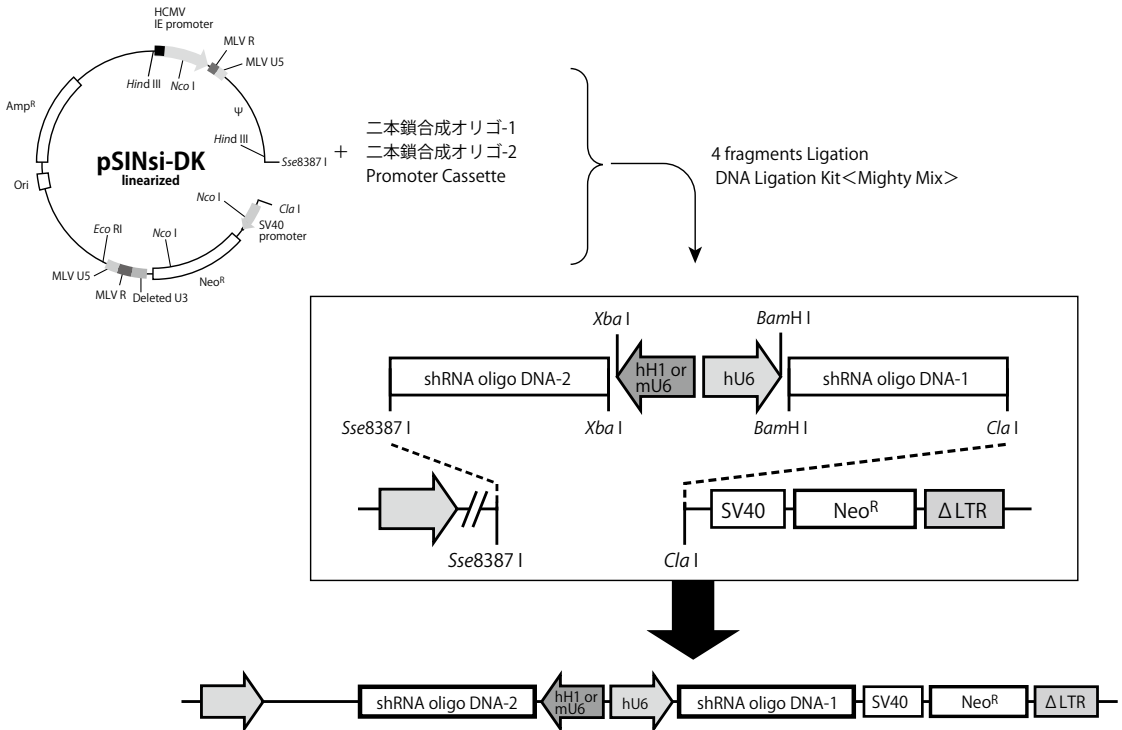
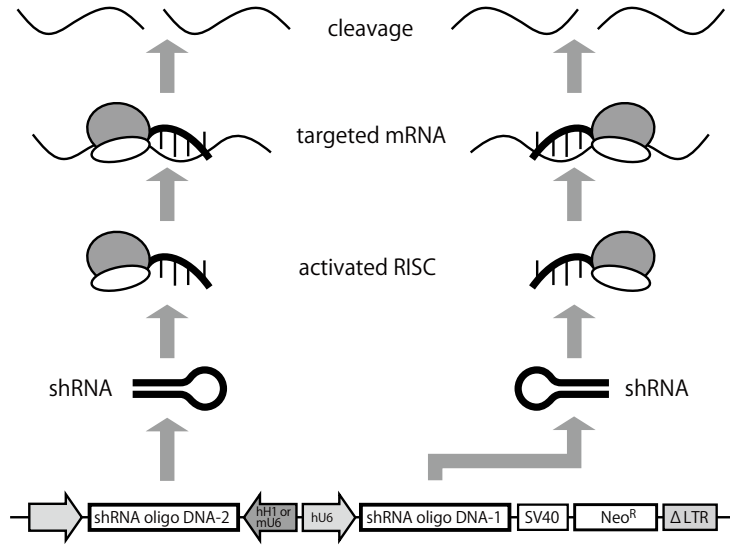


図 2. 4 - フラグメントライゲーション

得られたプラスミドを用いて、一過性トランスフェクションで簡単にダブルノックダウンレトロウイルスベクターを獲得することができます。この一過性ウイルス産生は、Retrovirus Packaging Kit Eco または Amphi (製品コード 6160/6161) と G3T-hi 細胞 (製品コード 6163) や 293T 細胞、293 細胞を用いることで効率よく行えます。一過性に得た組換えレトロウイルスを標的細胞に感染させ、G418 含有培地で選択培養することによって遺伝子導入細胞を獲得することができます。pSINsiベクターシリーズのレトロウイルスベクタープラスミドは 3' LTR U3 領域のプロモーター活性を欠損させているため、逆転写後、染色体に組み込まれたプロウイルスの状態では 5' LTR のプロモーター活性が消失し、プロウイルス由来の mRNA は転写されなくなっており、pol III 系のプロモーターからのヘアピン型 RNA と SV40 プロモーターからのネオマイシン耐性遺伝子のみが転写されます。発現したヘアピン型 RNA は細胞内の Dicer による分解を受けて siRNA となります。2 つの遺伝子を同時にノックダウンした細胞や、1 つの遺伝子に対して RNAi 効果が増強した細胞を獲得することが可能です。

2つの遺伝子の同時ノックダウン



1つの遺伝子のノックダウン効果の増強

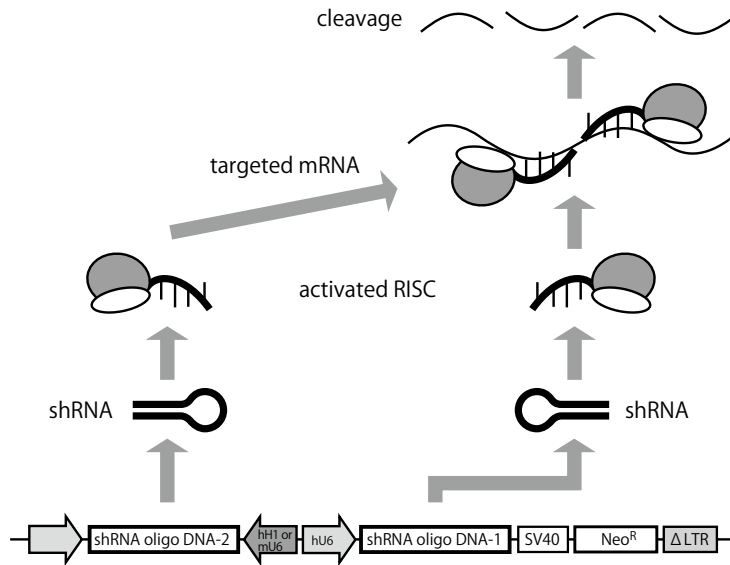


図3. ダブルノックダウンの利用方法

V. 準備

V-1. 標的配列の選択

RNAi の効果は標的配列によって大きく異なります。まずは合成 siRNA を用いて一過性トランスフェクションで RNAi 効果を検証し、効果のある配列を用いてベクターに応用することを推奨します。

なお、T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まるため、そのような配列は発現ベクターには適しません。

V-2. ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成

ヘアピン型 RNA を発現させるためには、「標的配列 (センス)」「ループ配列」「標的配列 (アンチセンス)」「ターミネーター配列」をプロモーターの下流に挿入します。下図に示す様な合成オリゴ DNA を作製してください (Top strand と Bottom strand、各 2 本)。転写開始点はプリン塩基 (G または A) が好ましいため、ターゲット配列が G または A で始まらない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入してください。本ベクターのクローニングサイトは 2 箇所あり、1 つは上流側が *Bam*H I、下流側は *Cla* I であり、もう一つは上流側が *Xba* I、下流側は *Sse*8387 I です。

ループ配列としては CTGTGAAGCCACAGATGGG (Boden *et al.*²⁾ や GTGTGCTGTCC (Miyagishi *et al.*³⁾ が利用できます。1 つのベクターに 2 つの shRNA 発現ユニットを搭載する場合には、ベクター内での組換えのリスクを軽減する目的で 2 つの shRNA に別々のループを用意することを推奨します。

shRNA oligo DNA-1

	<i>Bam</i> H I	転写開始点	target (sense)	loop	target (antisense)	Terminator	<i>Cla</i> I	
Top strand 1	5' - GATCC	(G/A)	[N19]	CTGTGAAGCCACAGATGGG	[N19] (C/T)	TTTTTT	AT	- 3'
Bottom strand 1	3' - G	(C/T)	[N19]	GACACTTCGGTGTCTACCC	[N19] (G/A)	AAAAAA	TAGC	- 5'

shRNA oligo DNA-2

	<i>Xba</i> I	転写開始点	target (sense)	loop	target (antisense)	Terminator	<i>Sse</i> 8387 I	
Top strand 2	5' - CTAGA	(G/A)	[N19]	GTGTGCTGTCC	[N19] (C/T)	TTTTTT	CCTGCA	- 3'
Bottom strand 2	3' - T	(C/T)	[N19]	CACACGACAGG	[N19] (G/A)	AAAAAA	GG	- 5'

VI. pSINsi-DK vector へのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入

VI-1. 必要な器具・装置

ウォーターバス (サーマルサイクラーも可)、インキュベーター、アガロースゲル電気泳動装置

VI-2. 用意するもの (主なもの)

- 10 × アニールリングバッファー：100 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM NaCl
- 制限酵素 *Cla*I (製品コード 1034A)、*Sse*8387I (製品コード 1183A)
- DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)
- コンピテントセル：*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)、*E. coli* DH5 *a* Competent Cells (製品コード 9057)、*E. coli* HB101 Competent Cells (製品コード 9051)、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) など。(注意：dam⁻株は使用しないこと)
- LB Amp プレート (アンピシリン 100 μg/ml 含有)、LB Amp 液体培地 (アンピシリン 100 μg/ml 含有)
- NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10)

VI-3. 二本鎖オリゴ DNA の調製

- (1) 合成した相補オリゴ DNA (Top strand および Bottom strand) を終濃度がそれぞれ 20 pmol/μl になるように 1 × アニールリングバッファー中に添加する。
- (2) サーマルサイクラーなどを用いて 95℃、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25℃ まで徐冷した後、滅菌水で 0.1 pmol/μl になるように希釈して以下の反応に用いる。

VI-4. ベクターの調製

pSINsi-DK (linearized)	1 μl	
Promoter Cassette	2 μl	
合成オリゴ <i>Bam</i> HI - <i>Cla</i> I*	1 μl	* : アニール済み合成オリゴを滅菌水で 0.1 pmol/μl になるように希釈して用いる。
合成オリゴ <i>Xba</i> I - <i>Sse</i> 8387I*	1 μl	
Total	5 μl	

↓
Ligation Kit < Mighty Mix > 5 μl を加え、16℃、30 分間ライゲーション。
↓
コンピテントセルの 1/10 容量のライゲーション反応液を加え、トランスフォームする。
↓
コロニー 10 個からそれぞれプラスミドを調製する。
↓
プラスミド DNA 約 1 μg を、*Cla*I 2 U、*Sse*8387I 2 U、1×M + BSA buffer、DNA 濃度 100 ng/μl で反応液を調製し 37℃ で 2 時間酵素消化を行う。
↓
2% のアガロースゲルで電気泳動
↓
DK I の場合約 500 bp のバンド、DK II の場合約 710 bp のバンドを確認する。通常、50% 以上の確率で、合成オリゴ DNA 挿入クローンが得られる。

必要に応じて、シーケンスプライマー pSINsi Primer R2 および pSINsi Primer F7 を用いて塩基配列を確認する。

CGAAGCCGCG CCGCGCGTCT TGTCTGCTGC AGCATCGTTC TGTGTTGCT CTGTCTGACT GTGTTTCTGT ATTTGTCTGA **AAATACGCGT CGGCTTCTTT**
 GCTTCGGGCGC GCGCGCAGAC ACAGACGACG TCGTAGCAAG ACACAACAGA GACAGACTGA CACAAGACA TAAACAGACT TTTATGCGCA GCCGAAGGAA

TGTCCCAAT CTGGGCGCGC GCCGCGGCC CCTGGCGGCC TAAGGACTCG GCGCGCCGGA AGTGCCAGG GCGGGGCGA CTTCCGGTCA CAGCGCGCCC
 ACAGGGGTTA GACCCGCGCG CGGCCGCGGG GAACCGCCGG ATTCTGAGC CCGCGGCCCT TCACCGGTCC CGCCCCCGT GAAGCCGAGT GTCGCGCGGG

GGCTATTCTC GCAGCTACC GCTAGCGTTT AAACCTAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCG ATCCGTCGAC GTTTCGAGCG GCCGCATTTA TCAAGCTTGC
 CCGATAAGAG CGTCGAGTGG CGATCGCAAA TTTGAATTCC AACCATGGCT CGAGCCTAGC TAGGCAGCTG CAAAGCTCGC CGGCGTAAAT AGTTGCAAGC

ATG**CCTGCAG** G **TCTAGA** ← **プロモーター** → **GGATCC** **クローニング部位** **ATCGATTCC** GGAACGATCT CGAAACGCAT
 TACGGACGTC C **AGATCT** **CCTAGG** **TAGCTAAGG** CCTTGCTAGA GCTTTGCGTA

GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCAGGTGTGG AAAGTCCCA GGCTCCCGC CAGGCAGAAG TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCATAGTC
 CGTAGAGTTA ATCAGTCGTT GGTCACACCC TTTCAGGGGT CCGAGGGGTC GTCCGCTTTC ATAC**GTTTCG TACGTAGAGT TAAT**AGTCG TGTGATCAC

← **GTTTCG TACGTAGAGT TAAT** pSINsi Primer R2

VI-5. プラスミド DNA の大量調製

プラスミド DNA はパッケージング細胞などへのトランスフェクションに用いるので、高純度に精製されたものが必要である。pSINsi-DK ベクターは high-copy プラスミドであり、25 ~ 40 ml の大腸菌培養液から約 100 μ g のプラスミドが得られる。プラスミドは塩化セシウム密度勾配による超遠心やイオン交換カラム [NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10) など] によって精製し、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水で無菌的に 1 mg/ml の濃度に溶解したものを用意しておく。

VII. レトロウイルスベクターの産生

VII-1. 用意するもの (主なもの)

- Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161)
- レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)、293 細胞、293T 細胞など
- ゼラチンまたはコラーゲンコートプレート
- 5 ml ポリスチレン丸底チューブ
- 培地 (DMEM 4.5 g/L Glucose, with L-Glutamine)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- 滅菌蒸留水
- Penicillin-Streptomycin Mixture
- ポリブレン (Hexadimethrine bromide, 8 mg/ml 水溶液, Aldrich)
- カ価測定用細胞 (NIH/3T3 など)
- 細胞培養用シャーレ・プレート
- 電動ピペッター
- フィルター付滅菌済みチップ
- 0.45 μ m 滅菌済みフィルター (低吸着タイプ)

VII-2. ウイルス産生

前日

G3T-hi 細胞、293 細胞または 293T 細胞を 6 cm シャーレに 3×10^6 cells/シャーレで播種する。

1 日目 (トランスフェクション)

- (1) Retrovirus Packaging Kit の中からベクター (pGP、pE-eco/ampho)、クロロキン、必要量のトランスフェクションバッファーを溶解する。
- (2) トランスフェクションバッファー、滅菌蒸留水を室温に戻す。
- (3) キットに添付のクロロキンを培地 (10%FBS/DMEM) に 1,000 分の 1 量添加し、培地を 37°C で温めておく。
- (4) 細胞が 70 ~ 80% コンフルエントであることを確認し、クロロキン入り培地 3 ml と交換する。
- (5) DNA 混合液の調製 (以下の溶液を 5 ml 容ポリスチレン丸底チューブで混合する。)

pSINsi retrovirus vector (1 μ g/ μ l 水溶液)	10 μ l
pGP Vector	5 μ l
pE-eco / ampho Vector	5 μ l
2 M CaCl ₂	62 μ l
滅菌蒸留水	418 μ l

- (6) リン酸カルシウム沈殿の作製およびトランスフェクション
 - ・トランスフェクションバッファー 500 μ l をはかりとる (電動ピペッターを使用)。
 - ・(5) の液に緩やかに加える (チューブを振りながら混ぜる)。添加後、直ちにピペッターの排出を利用してバブリングする (10 ~ 20 秒)。
 - ・1 ~ 2 分以内にシャーレに均一に滴下し、培地と混合する (長時間の放置は大きな結晶形成の原因となるためできるだけ避けること)。
 - ・37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養する (7 ~ 11 時間)。
(顕微鏡観察で細胞に粉雪が降りかかったような状態が見えればリン酸カルシウム沈殿の形成は成功している。)
 - ・(トランスフェクションから 7 ~ 11 時間後) シャーレから培地 3 ml を除き、新たに 10% FBS/DMEM を 4 ml 加える。

2 日目 (トランスフェクションから 24 時間後)

培地を交換する (10% FBS/DMEM、4 ml)。

3 日目 (トランスフェクションから 48 時間後)

上清を 0.45 μ m フィルターでろ過し、ウイルス液とする。調製したウイルス液は直ちに使用しない場合、小分けして -80°C 保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。G3T-hi 細胞や 293T 細胞を用いてウイルス生産した場合、 10^5 cfu/ml 程度のウイルス力価が得られる。

注) shRNA 発現レトロウイルスベクターは従来の組換えレトロウイルスベクターと比較して力価が低下する傾向があります。すでに販売している pSINsi シリーズ (製品コード 3660 ~ 3662) は $0.5 \sim 2 \times 10^6$ cfu/ml の力価ですが、shRNA 発現カセットを 2 つ搭載することによって力価はさらに低下します。高効率での遺伝子導入は困難ですが、薬剤選択を行うことにより、確実に遺伝子導入細胞を獲得することができ、目的遺伝子の長期安定ノックダウンによる発現解析に用いることができます。

VII-3. ウイルスカ価測定

【実施例】

前日

NIH/3T3 細胞を 6 ウェルプレートに 5×10^4 cells/well の密度で播種する。

1 日目 (感染)

ウイルスストックの溶解、希釈および感染

- (1) -80°C で保存したウイルス液を 37°C 水浴中で速やかに溶かし、溶解後は氷上で保持する。
- (2) 希釈系列の作製
ウイルス液はマイクロチューブ中で 10% ウシ血清入り DMEM を用いて 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍に希釈する。希釈液は各段階 200 μl 以上用意する。
- (3) NIH/3T3 細胞の培地を 8.9 $\mu\text{g/ml}$ のポリブレン含有 10% 血清培地 900 μl と交換する。
- (4) 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍に希釈したウイルス液 100 μl を各ウェルに添加し、感染させる。 37°C 、5% CO_2 インキュベーターで培養する。
(ここでウイルス液の最終希釈段階は 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍になり、ポリブレン濃度は 8 $\mu\text{g/ml}$ となる。)
- (5) 感染から 4～6 時間後、各ウェルに 10% 血清培地 1 ml を添加する。

2 日目以降

- (6) 感染から 24 時間後、G418 を 500 $\mu\text{g/ml}$ 含有する 10% 血清培地 2 ml と交換する。
(培地交換するときに細胞が乾かないように注意すること。)
- (7) 以後、3～4 日ごとに G418 含有培地を交換し、9～12 日間培養する。

10～14 日目 (コロニー染色)

コロニーが生育してきたところでコロニーをギムザ液やメチレンブルーなどで染色する。

[染色方法例：メチレンブルー染色]

用意するもの

- ・ PBS
- ・ 0.2% メチレンブルー／メタノール溶液

工程

- (1) プレートから培地を吸引除去し、1 ウェルあたり 1 ml の PBS を添加し、PBS を吸引除去する。
- (2) プレートの蓋を安全キャビネット内で開け、キャビネットのファンで風乾させる。
- (3) プレートが完全に乾いたら、1 ウェルあたり 0.5 ml の 0.2% メチレンブルー／メタノール溶液を添加して 10 分間染色する。
- (4) メチレンブルー染色液を除き、ウェルを水洗し、乾燥させる。
- (5) 青く染まったコロニーの数を計数し、10～100 個の範囲で得られた値に希釈倍率を乗じた値を力価 (cfu/ml) とする。

※ Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (製品コード 6166) を用いると、リアルタイム RT-PCR により迅速に力価 (RNA タイター) を測定することが可能である。

VIII. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験

VIII-1. 必要な器具・装置 (VIII-2、VIII-3 共通)

- ・CO₂ インキュベーター
- ・細胞観察用顕微鏡
- ・細胞培養用シャーレ
- ・安全キャビネット
- ・電動ピペッター
- ・フィルター付滅菌済みチップ

VIII-2. RetroNectin を用いる場合

VIII-2-1. 用意するもの

- ・RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B) およびノントリート培養容器
 - ・2% BSA/PBS 溶液
 - ・PBS
- ※ RetroNectin Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mmφ) (製品コード T110A) を用意する場合にはノントリート培養容器、2% BSA/PBS 溶液、PBS は不要。

VIII-2-2. 準備 (RetroNectin Dish を用いる場合には不要)

ノントリート培養容器に RetroNectin をコーティングし、2% BSA/PBS 溶液でブロッキング後、PBS または Hank's 緩衝液で洗浄する (詳細は RetroNectin の取扱説明書参照)。

VIII-2-3. 感染

- (1) RetroNectin をコートしたプレートにウイルス液を 125 ~ 250 μ l/cm² 加え、32°C または 37°C の 5% CO₂ インキュベーターで 3 ~ 5 時間インキュベートして、ウイルスベクターを RetroNectin に結合させる。結合を促進させる目的でプレートを 32°C、1,000 \times g、2 時間遠心しても良い。
- (2) 増殖期にある細胞を回収し、新しい増殖培地で 0.2 ~ 1 \times 10⁵ cells/ml になるように懸濁する。
- (3) 感染の直前に RetroNectin プレートからウイルス液を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄する。プレートが乾かないように注意すること。
- (4) 洗浄後直ちに細胞をプレートに添加する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は 0.5 ~ 2.5 \times 10⁴ cells/cm² である。

VIII-3. ポリブレンを用いる場合

VIII-3-1. 用意するもの
ポリブレン (8 mg/ml 水溶液)

VIII-3-2. 準備
感染の前日に細胞を組織培養用シャーレに播種する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は $0.5 \sim 2.5 \times 10^4$ cells/cm² である。血球系の浮遊細胞は一般的にポリブレン法での遺伝子導入効率が悪いいため RetroNectin 法が推奨される。

VIII-3-3. 感染

- (1) ウイルス希釈液に 1,000 分の 1 量のポリブレンを添加し、8 μ g/ml のポリブレンを含有するウイルス液を用意する。ウイルス液は原液を使用すると感染阻害がおこる可能性があるため、増殖培地で 3 ~ 4 倍以上に希釈したものをを用いる。
- (2) プレートから培地を吸引除去し、速やかにポリブレンを含有するウイルス液 125 ~ 250 μ l/cm² 加え CO₂ インキュベーターで培養する。
- (3) 4 ~ 6 時間後、ポリブレンを希釈するため必要に応じて増殖培地を添加する。ポリブレンへの感受性が高い細胞株の場合には新しい増殖培地と交換する。

VIII-4. 遺伝子導入細胞の選択

pSINsi ベクターはマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を搭載しているため、遺伝子導入細胞を G418 で選択することができる。G418 選択は感染後 24 時間以上経過してから開始し、3 ~ 4 日ごとに G418 培地を交換する。RetroNectin 法で感染した接着系の細胞の場合には、組織培養用培養器に細胞をまきなおしてから G418 選択を行う。G418 選択開始後約 2 週間で遺伝子導入細胞が得られる。細胞によって G418 に対する感受性は異なるので、あらかじめ使用する細胞に適した G418 濃度を決定しておく。

IX. 関連製品

pSINsi-hH1 DNA / pSINsi-hU6 DNA / pSINsi-mU6 DNA (製品コード 3660/3661/3662)
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)

コンピテントセル：

- E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
- E. coli* DH5 α Competent Cells (製品コード 9057)
- E. coli* HB101 Competent Cells (製品コード 9051)
- E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)

制限酵素：

- Cla*I (製品コード 1034A)
- Sse*8387I (製品コード 1183A)

NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100)

Retrovirus Packaging Kit Eco / Ampho (製品コード 6160/6161)

レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)

Retrovirus Constructive System Eco / Ampho (製品コード 6164/6165)

RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)

RetroNectin® Dish (RetroNectin® Precoated Dish, 35 mm ϕ) (製品コード T110A)

X. 参考文献

- 1) Yu *et al.* (1986) *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**: 3194-3198.
- 2) Boden *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res*. **32**: 1154-1158.
- 3) Miyagishi *et al.* (2004) *J Gene Med*. **6**: 715-723.
- 4) Lee *et al.* (2002) *Nat Biotech*. **20**: 500-505.
- 5) Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev*. **16**: 948-958.
- 6) Paul *et al.* (2002) *Nat Biotech*. **20**: 505-508.
- 7) Sui *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 5515-5520.

XI. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・レトロウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清液は挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えレトロウイルスの産生と取扱には、適切な処置が必要です。ご利用の際は、管轄省庁および組織内の安全委員会の組換え DNA 実験指針に従って実施してください。
- ・本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますのでご了承の上本製品をご使用ください。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社