

タイトル: MicroRNAと蛍光タンパク質の同時誘導発現(2)

カテゴリ: 発現誘導・発現制御

キーワード: 遺伝子発現、Tet System、Tet-On、miRNA

データソース: [Clontechiques 2007年早春号、クロンテック社 分子生物学グループ](#)

方法:

Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System (製品コード [630930](#))

miR-30 miRNAをベースにしたanti-luciferase (L1) miRNA配列をDsRed2 cDNA配列の5'側に連結し、pTRE-Tight Vectorのマルチクローニングサイトに挿入してpTRE-Tight-L1-DsRed2 Vectorを構築した。pTRE-Tight-L1-DsRed2とルシフェラーゼ発現プラスミド (pCMV-Luc) をHEK 293 Tet-On® Advanced Cell Line (製品コード [631149](#)) に一過性にコトランスフェクションし、Dox (1 µg/mL) の存在下または非存在下で72時間培養を行った。その後、ルシフェラーゼアッセイと蛍光顕微鏡による蛍光タンパク質の発現確認を行った。

結果:

ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Doxで処理した細胞ではDox未処理の細胞に比べてルシフェラーゼ活性が85%減少していた(図1)。また、Doxで処理した細胞でのみ強いDsRed2の蛍光が検出された(図2)。このように、L1 miRNAの誘導発現によるルシフェラーゼ遺伝子のノックダウンと蛍光タンパク質の誘導発現が同時に起こっていることが確認できた。

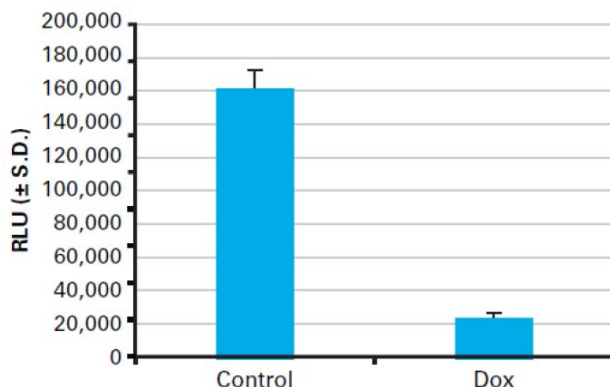


図1 ルシフェラーゼアッセイ (n=3)、S.D. =標準偏差

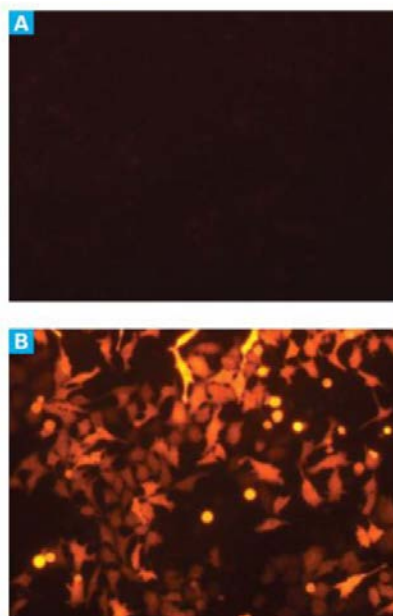


図2 DsRed2の蛍光顕微鏡観察
パネルA: Dox非存在、パネルB: Dox存在 (1 µg/mL)

備考: