

製品コード 3220 ~ 3228

研究用

TAKARA

pBAsi DNA シリーズ

説明書

v202106Da

目次

I. 製品説明と原理.....	3
II. 準備：ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成.....	6
III. pBAsi ベクターへのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入	7
III-1. 必要な器具・装置	7
III-2. 用意するもの	7
III-3. ベクターおよびインサート（二本鎖オリゴ DNA）の調製.....	7
III-3-1. 二本鎖オリゴ DNA の調製	
III-3-2. ベクターの調製	
III-4. ライゲーションおよびトランスフォーメーション	8
III-4-1. DNA 溶液の調製	
III-4-2. ライゲーション	
III-4-3. トランスフォーメーション	
III-5. インサートの確認.....	8
III-6. プラスミド DNA の大量調製.....	8
IV. 細胞へのトランスフェクション.....	8
V. siRNA 安定発現細胞の樹立.....	9
VI. アデノウイルスベクターへの挿入	9
VII. 実験例	9
VIII. 参考文献.....	11
IX. 関連製品.....	11
X. 注意.....	12

I. 製品説明と原理

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。しかし、合成などで作製した siRNA を直接細胞に導入する手法では、発現抑制効果が短く、RNAi 効果の持続が期待できません。また、細胞への導入効率が問題となる場合もあります。そこで、これらの問題を解決するため、発現ベクターを用いる方法が開発されました。pBA si ベクターシリーズは、RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターを利用した siRNA 発現用プラスミドベクターです (図 1-1、図 1-2 参照)。ネオマイシン耐性遺伝子またはピューロマイシン耐性遺伝子を搭載したプラスミドベクターも取り揃えています。導入細胞の選択などにご利用ください (siRNA 安定発現細胞の樹立および実験例参照)。

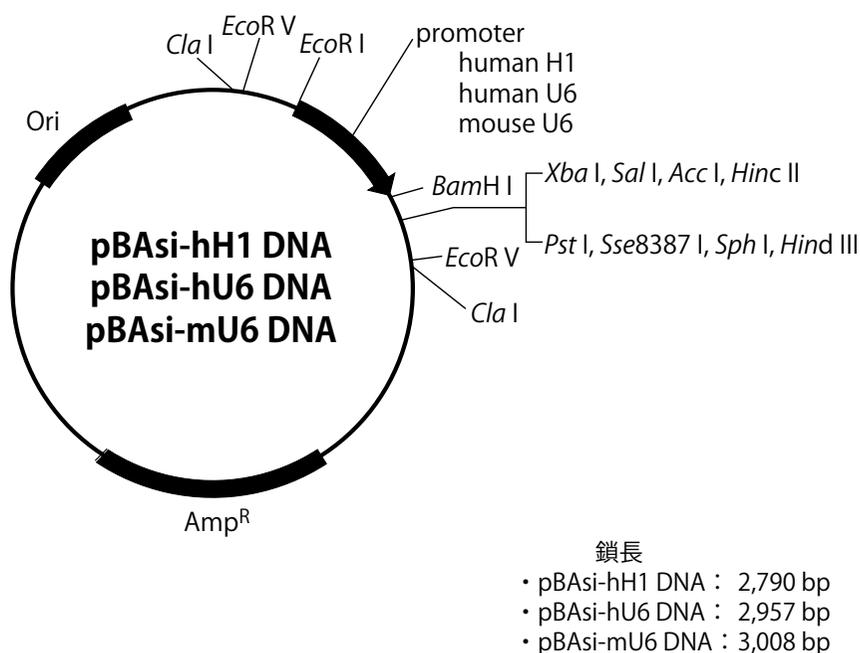
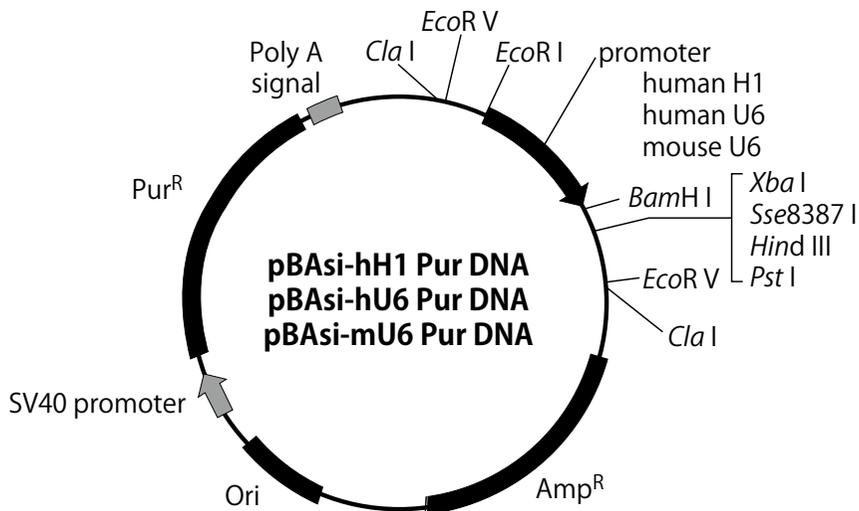
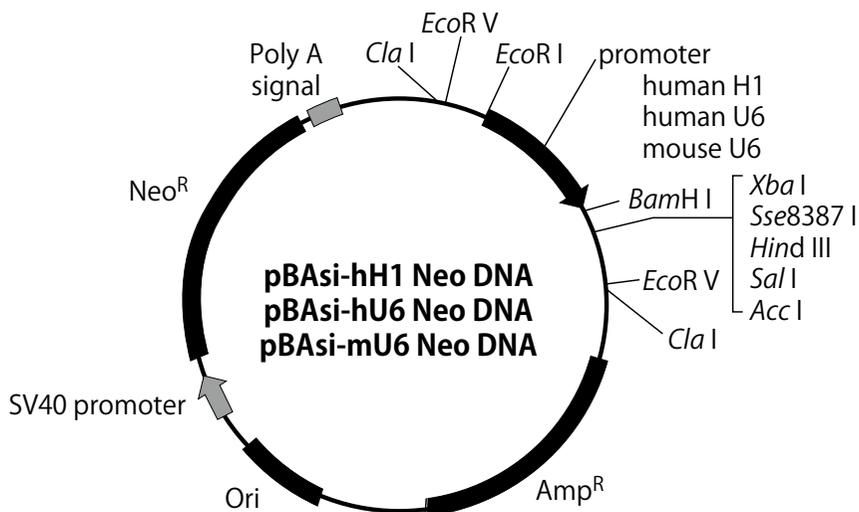


図 1-1. pBA si ベクターシリーズの制限酵素地図



鎖長

- pBAsi-hH1 Pur DNA : 3,701 bp
- pBAsi-hU6 Pur DNA : 3,868 bp
- pBAsi-mU6 Pur DNA : 3,919 bp



鎖長

- pBAsi-hH1 Neo DNA : 3,896 bp
- pBAsi-hU6 Neo DNA : 3,996 bp
- pBAsi-mU6 Neo DNA : 4,114 bp

図 1-2. pBAsi ベクターシリーズ (ピュロマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子搭載) の制限酵素地図

pol III 系のプロモーターの下流にヘアピン型 RNA を発現させるための合成 DNA 配列を挿入することによって、siRNA 発現プラスミドが作製できます。得られたプラスミドは細胞に導入して、RNAi 実験に使用することができます (図 2 参照)。

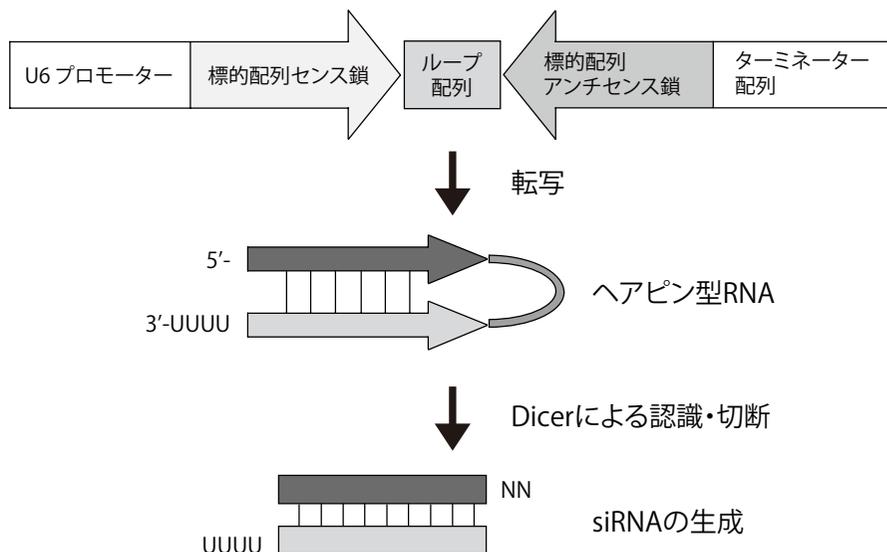


図 2. ヘアピン型 RNA 発現ベクターによる siRNA の生成

さらに「プロモーター+ヘアピン型 RNA 配列」を切り出して、容易にアデノウイルスベクターに寄せ換えることが可能です。アデノウイルスベクターは高い感染効率と広い感染域を持っているため、*in vitro* あるいは *in vivo* での遺伝子導入に適しています。組換えアデノウイルスの作製に関しては Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170) をご利用ください。

pBAsi ベクターシリーズではプロモーターおよび薬剤耐性遺伝子の異なる 9 種のプラスミドベクターを取り揃えています。標的細胞、実験目的に応じたベクターを選択してください。

- human H1 promoter (Accession No. S68670) を使用；
 pBAsi-hH1 DNA (製品コード 3220)
 pBAsi-hH1 Pur DNA (製品コード 3223)：ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載
 pBAsi-hH1 Neo DNA (製品コード 3226)：ネオマイシン耐性遺伝子を搭載
- human U6 promoter (Accession No. X07425) を使用；
 pBAsi-hU6 DNA (製品コード 3221)
 pBAsi-hU6 Pur DNA (製品コード 3224)：ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載
 pBAsi-hU6 Neo DNA (製品コード 3227)：ネオマイシン耐性遺伝子を搭載
- mouse U6 promoter (Accession No. X06980) を使用；
 pBAsi-mU6 DNA (製品コード 3222)
 pBAsi-mU6 Pur DNA (製品コード 3225)：ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載
 pBAsi-mU6 Neo DNA (製品コード 3228)：ネオマイシン耐性遺伝子を搭載

【各製品の包装】 20 μ g (500 ng/ μ l)

【各ベクターの形状】 10 mM Tris-HCl, pH8.0
 1 mM EDTA

II. 準備：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、[Ligation 用の制限酵素サイトー標的配列 (センス)ーループ配列ー標的配列 (アンチセンス)ーターミネーター配列ー Ligation 用の制限酵素サイト] の順でデザインした合成 DNA をプロモーターの下流に挿入します。

pBAsi ベクターのクローニングサイトは、上流側は *Bam*H I、下流側は薬剤耐性遺伝子を含まない場合は *Xba* I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Sal* I、*Acc* I、*Hinc* II、*Pst* I、*Sph* I のいずれか、ピューロマイシン耐性の場合には *Xba* I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Pst* I のいずれか、ネオマイシン耐性の場合には *Xba* I、*Sse*8387 I、*Hind* III、*Sal* I、*Acc* I のいずれかを使用できます。

例えば、*Bam*H I、*Hind* III に挿入する場合には、下図に示すような合成オリゴ DNA を作製してください (Top strand と Bottom strand の 2 本; N 部分が標的配列)。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基 (G または A) が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入してください。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG (Boden *et al.*¹⁾) を挙げていますが、GTGTGCTGTCC (Miyagishi *et al.*²⁾) も有用であることが確認されています。これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al.*³⁾、Paddison *et al.*⁴⁾、Paul *et al.*⁵⁾、Sui *et al.*⁶⁾ らによってそれぞれ異なる配列が報告されています。

ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用います (T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まります)。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていることを確認する必要があります。

		転写開始点*			
		<i>Bam</i> H I ↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator <i>Hind</i> III
Top strand	5'	-GATCC (G/A) NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T) TTTTTT A-3'
Bottom strand	3'	-G (C/T) NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A) AAAAAA TTCGA-5'

* : ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入すること。

RNAi の効果は標的配列によって大きく異なります。選択した配列が他の遺伝子に作用しないことを BLAST 検索により確認してください。

ネガティブコントロールの例としては、標的配列をランダムシャッフル法などによってスクランブルしたものが挙げられます。スクランブル配列についても BLAST 検索し、他の遺伝子に作用しないことを確認してください。

III. pBAsi ベクターへのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入

III-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 : Mupid-2plus (製品コード M-2P) など

III-2. 用意するもの

- ・ 10 × アニーリングバッファー (100 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM NaCl)
- ・ 制限酵素 *Bam*HI (製品コード 1010A)、*Hind* III (製品コード 1060A)
- ・ DNA Ligation Kit <Mighty Mix>、Ver. 1 または Ver. 2.1 (製品コード 6023/6021/6022)
- ・ 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 HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) など
- ・ LB Amp プレート (アンピシリン 100 μ g/ml 含有)
- ・ LB Amp 液体培地 (アンピシリン 100 μ g/ml 含有)

III-3. ベクターおよびインサート (二本鎖オリゴ DNA) の調製

III-3-1. 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 20 pmol/ μ l になるように 10 × アニーリングバッファーに溶解する。
- (2) サーマルサイクラーなどを用いて、95°C で 5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25°C まで徐冷する。

III-3-2. ベクターの調製

pBAsi ベクター	2 μ g (4 μ l)
<i>Bam</i> HI	10 units
<i>Hind</i> III	10 units
10 × K buffer	2 μ l
滅菌精製水	up to 20 μ l

37°C で 1 時間反応後、エタノール沈殿を行い、10 ~ 20 μ l の TE バッファーに溶解する。

通常、ライゲーションには 1 反応あたり 1 μ l を用いる。インサートとして用いる二本鎖オリゴ DNA の mole 濃度が高いため、ベクターから切り出された小断片をゲル抜きで除く操作をしなくても、通常、目的のクローンを取得できる。

III-4. ライゲーションおよびトランスフォーメーション

III-4-1. DNA 溶液の調製

ベクター 1 μ l にアニールした二本鎖オリゴ DNA 3 pmol 以上を加え、TE バッファーで液量を 5 μ l にする。

III-4-2. ライゲーション

[DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いる場合]

- (1) DNA 溶液 5 μ l に Ligation Mix 5 μ l を添加し、よく混合する。
- (2) 16°C、30 分間インキュベートする。

[DNA Ligation Kit Ver.1 を用いる場合]

- (1) DNA 溶液 5 μ l に A 液 20 μ l を加えてよく混合し、さらに B 液 5 μ l を加えてよく混合する。
- (2) 16°C、30 分間インキュベートする。

[DNA Ligation Kit Ver.2.1 を用いる場合]

- (1) DNA 溶液 5 μ l に I 液 5 μ l を添加し、よく混合する。
- (2) 16°C、30 分間インキュベートする。

III-4-3. トランスフォーメーション

- (1) ライゲーション液 10 μ l を 100 μ l のコンピテントセルに加え、トランスフォーメーションする。
- (2) LB Amp プレートにまき、37°C で 16 時間培養する。

III-5. インサートの確認

- (1) III-4-3. でトランスフォーメーションにより得られたコロニーを 2 ~ 5 ml の LB Amp 液体培地で 37°C、16 時間培養した後、菌体からプラスミドを調製する。
- (2) プラスミド約 500 ng を *Bam*H I、*Hind* III で消化し、2% アガロースゲル電気泳動にて約 60 bp のバンドを確認する。通常、約 90% 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、M13 Primer M4 または RV で塩基配列を確認する。(ただし、ピューロマイシンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むベクター (製品コード 3223 ~ 3228) では、M13 Primer RV は使用できない。)

III-6. プラスミド DNA の大量調製

プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションする場合は、高純度に精製されたものが必要である。pBAsi 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 NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100) などによって精製し、エタノール沈殿後、滅菌精製水で無菌的に 1 mg/ml の濃度に溶解したものを用意しておく。

IV. 細胞へのトランスフェクション

TransIT シリーズ (*TransIT*-X2、*TransIT*-2020、*TransIT*-LT1、*TransIT*-293 など) や *Xfect*TM Transfection Reagent (製品コード 631317/631318) など動物細胞への遺伝子導入試薬を用いて、III-6. で調製した siRNA 発現用 pBAsi ベクターを細胞に導入します。

※ 操作手順は各試薬の取扱説明書に従ってください。

V. siRNA 安定発現細胞の樹立

一過性にトランスフェクションした細胞を、ピューロマイシン耐性遺伝子またはネオマイシン耐性遺伝子を指標に選択し、長期安定発現株をクローン化することにより、stableにノックダウンされた細胞を取得することも可能です。

- (1) IV.と同様に目的細胞に siRNA 発現用 pBAsi ベクターを導入し、24～48 時間、選択薬剤を含まない培地で培養する。
- (2) 薬剤含有培地を準備する。ピューロマイシン耐性遺伝子を指標にする場合には 1～10 $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンを含む培地を、ネオマイシン耐性遺伝子を指標にする場合には 400～1,000 $\mu\text{g/ml}$ の G418 を含む培地を用いる。最適な薬剤濃度は細胞や培養条件によって異なるので、あらかじめ予備実験を行っておくことが望ましい。
- (3) 一過性にトランスフェクトした細胞をはがし、細胞数が 1/10、1/30、1/90、1/270、1/810 となるように各 2、3 枚ずつ継代し、薬剤含有培地で培養する。
- (4) 必要に応じて 3～4 日毎に薬剤含有培地を交換しながら 2 週間培養し、薬剤耐性コロニーを生育させる。
- (5) コロニーが隣接しないプレートを選択し、クローニングリングを用いて薬剤耐性コロニーを 24 ウェルプレートに移す (20 クローン程度)。
- (6) コンフルエントになった細胞から拡大培養を行い、細胞凍結ストックを作成すると同時に、RNAi 効果確認用のサンプルを調製する。
- (7) 各クローンについて RNAi 効果を確認し、クローンを選択して以後の実験を進める。

※ 薬剤耐性細胞が必ずしも siRNA 発現細胞とならない場合もあるため、RNAi 効果確認によるクローンの選択が必要である。

VI. アデノウイルスベクターへの挿入

アデノウイルスベクターは高力価 ($10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml) ウイルスを容易に得ることができ、感染する細胞域が広く、*in vitro* でも *in vivo* でも使用できるため、siRNA の delivery system としても有用です。pBAsi で構築した siRNA 発現プラスミドからは「Pol III プロモーター+ヘアピン型 RNA 配列」を *EcoR* V (平滑末端) または *Cla* I で切り出し、容易にアデノウイルスベクターに乗せ換えることが可能です。組換えアデノウイルスの作製には、Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170) をご利用ください。

VII. 実験例

プラスミドを細胞に導入する方法はいくつかありますが、いずれの方法でも 100% の効率で導入することは不可能です。例えば、標的細胞の mRNA を定量してノックダウンの効果を検出しようとした場合、導入効率が低いと未導入細胞の影響により、ノックダウンの効果を検出することが困難になります。

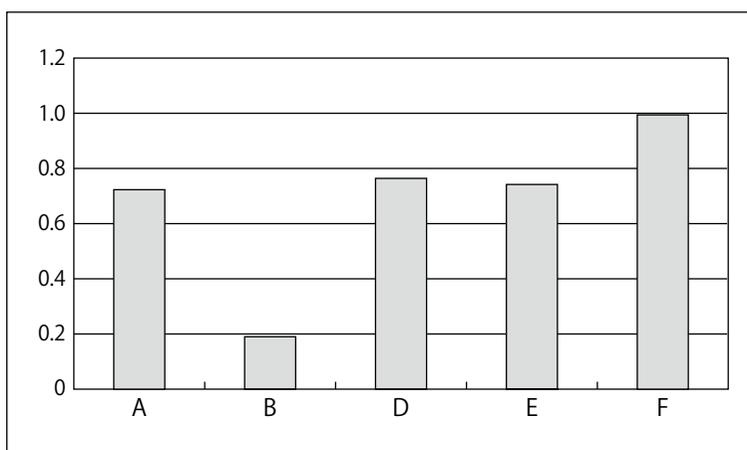
下記に示す実験例では、トランスフェクション後に薬剤で導入細胞のみを選択することにより、ノックダウンの効果を明瞭に検出することが可能となることを示しています。

【方法】

- (1) pBAsi-hU6-Neo DNA に合成オリゴを挿入し、ヒト GAPDH を標的とする siRNA を発現するプラスミド (pBAsiGAPDH-Neo) を構築した。
- (2) 前日に A549 細胞をプレートに準備し、遺伝子導入時に 40 ~ 70%コンフルエントになるようにした。
- (3) 遺伝子導入試薬 *TransIT-LT1* を用いて標準的な方法でプラスミドを導入した。コントロールとして、合成オリゴを挿入していない空ベクターを用いた。このときの導入効率 は約 40% だった。
- (4) 翌日に細胞を 10 倍希釈して播きなおし、1,000 $\mu\text{g/ml}$ の G418 を含む培地および G418 を含まない培地で培養した。
- (5) 4 日後にそれぞれ total RNA を調製し、リアルタイム RT-PCR で GAPDH mRNA を定量した。

【結果】

GAPDH mRNA の値を β -actin mRNA の値を用いて normalize した相対値を示す。



サンプル#	導入プラスミド	Neo 添加
A	pBAsi-hU6-Neo	あり
B	pBAsiGAPDH-Neo	あり
C *	No Plasmid	あり
D	pBAsi-hU6-Neo	なし
E	pBAsiGAPDH-Neo	なし
F	No Plasmid	なし

* : 細胞が死滅していた。

【考察】

薬剤で選択しない場合 (E)、未導入細胞の影響によりほとんどノックダウンの効果を検出することができなかった。一方、薬剤で選択した場合 (B)、ノックダウンを明瞭に検出することができた。

注意： 薬剤濃度、未導入の細胞が死滅するまでの日数は細胞によって異なります。予備検討をして適切な条件を決定してください。

VIII. 参考文献

- 1) Boden *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**: 1154-1158.
- 2) Miyagishi *et al.* (2004) *J Gene Med.* **6**: 715-723.
- 3) Lee *et al.* (2002) *Nat Biotech.* **20**: 500-505.
- 4) Paddison *et al.* (2002) *Genes and Dev.* **16**: 948-958.
- 5) Paul *et al.* (2002) *Nat Biotech.* **20**: 505-508.
- 6) Sui *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5515-5520.
- 7) Kawasaki H. *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**: 700-707.
- 8) Tuschl T. *et al.* (2003) *Nat Biotech.* **20**: 446-44.
- 9) Shen C. *et al.* (2003) *FEBS Lett.* **537**: 111-114.

IX. 関連製品

Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170)
DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022)
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 HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)

制限酵素：

*Bam*H I (製品コード 1010A/B)
Xba I (製品コード 1093A/B)
Sal I (製品コード 1080A/B)
Acc I (製品コード 1001A/B)
Hinc II (*Hind* II) (製品コード 1059A/B)
Pst I (製品コード 1073A/B)
*Sse*8387 I (製品コード 1183A/B)
Sph I (製品コード 1246A/B)
Hind III (製品コード 1060A/B)
*Eco*R V (製品コード 1042A/B)
Cla I (製品コード 1034A/B)

Mupid-2plus (製品コード M-2P)

TransIT シリーズ：

TransIT-X2 Dynamic Delivery System (製品コード MIR6000/MIR6003 ~ MIR6006)
TransIT-2020 Transfection Reagent (製品コード MIR5400/MIR5404 ~ MIR5406)
TransIT-LT1 Transfection Reagent (製品コード MIR2300/MIR2304 ~ MIR2306)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700/MIR2704 ~ MIR2706) など

Xfect™ Transfection Reagent (製品コード 631317/631318)
M13 Primer M4 (製品コード 3832A)
M13 Primer RV (製品コード 3830A)
NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100)

X. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
- ・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。
- ・Xfect は Takara Bio USA, Inc. の商標です。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。

なお、アデノ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、組み換えアデノウイルスの産生と取扱いには、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。

また、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。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社