

miRNA & shRNA 研究用ツール

商品ラインナップ

miRNA	ベクター	miRNA 発現用レンチウイルスベクター (デザイン済)	shRNA	システム	shRNA 発現用ベクターシステム
	ウイルス粒子	miRNA 発現用 レンチウイルス粒子 (デザイン済)		セット	shRNA 発現ベクターセット (デザイン済)
	インヒビター	miR-Locker miRNA 阻害用レンチウイルスベクター (デザイン済)			

miRNA 研究 miRNA 過剰発現 (ベクター)

miRNA 発現用 レンチウイルスベクター (デザイン済)

- メチル化による発現抑制なし！
- 非分裂細胞にも効果的に導入！

ヒト miRNA (hsa-mir) 前駆体と隣接するゲノム配列 (約 100 bp) を PCR により増幅し、pLV-miRNA ベクター (図 1) に挿入しています。

特長

● miRNA 発現用に最適化

miRNA 前駆体がヒトハウスキープ遺伝子の EF1 α プロモーター領域に挿入されているため、イントロン内での miRNA のプロセッシングが選択マーカーの発現に与える影響を最小限に抑えます。miRNA 前駆体と選択マーカーが同じ転写ユニットで発現しますので、miRNA の転写活性を簡単にモニタリングできます。

● 非分裂細胞にも効果的に導入、安定的に発現

レトロウイルスシステムとは異なり、レンチウイルスの導入は細胞周期に依存しません。また、lenti-miRNA が宿主の染色体に組み込まれますので、miRNA は導入細胞株で安定して発現します。

● メチル化による発現抑制を受けません

CMV や SV40 等のウイルスプロモーター活性は、しばらくすると DNA のメチル化により発現が抑制されることが報告されています。miRNA 前駆体やピューロマイシン選択マーカーの発現に使われるヒト EF1 α プロモーターは、ハウスキープ遺伝子のプロモーターです。したがって、*in vitro* や *in vivo* でメチル化により発現が抑制されることはありません。

● 赤色蛍光により可視化

rPuro が発現すると、ピューロマイシン-N-アセチル-トランスフェラーゼ (587/610 nm (励起/発光)) により赤色蛍光を發します (図 2)。

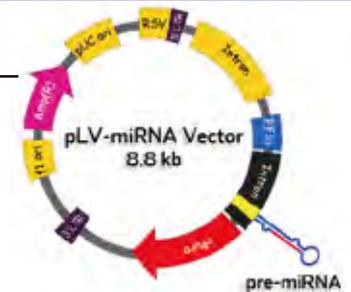


図 1. pLV-miRNA ベクターマップ

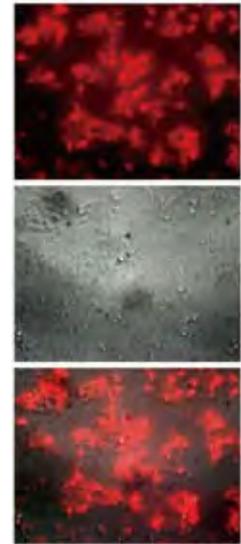


図 2. hsa-mir-24-1 レンチウイルスを形質導入した 293T 細胞の顕微鏡画像

miRNA 発現	バイオセティア社	A 社	B 社	C 社
フォーマット	レンチウイルス/ベクター (pLV-miRNA)	合成 RNA	レンチベクター	レンチベクター
恒常的発現	○	×	○	○
隣接配列	~ 100 bp	-	~ 200 bp	~ 250 bp
発現方法	EF1 α - [miRNA] - rPuro (1 プロモーター)	-	CMV-RFP-miRNA-IRES-Puro (1 プロモーター)	CMV-RFP-miRNA-EF1 α -GFP (2 プロモーター)
miRNA の発現	イントロン内	-	エクソン内	エクソン内
選択マーカー	RFP-Puro 融合	×	RFP/Puro	GFP
転写/発現	イントロン内の miRNA の加工は RFP-Ruro 発現への影響を最低限に抑える	-	miRNA のプロセッシングが mRNA の分解を引き起こす可能性有	miRNA と GFP は 2 種類のプロモーターにより発現
デリバリー効果	レンチウイルス-ready	トランスフェクションによる	パッケージングによる	パッケージングによる

表. miRNA レンチウイルス発現ベクター 他社との比較



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

実験例

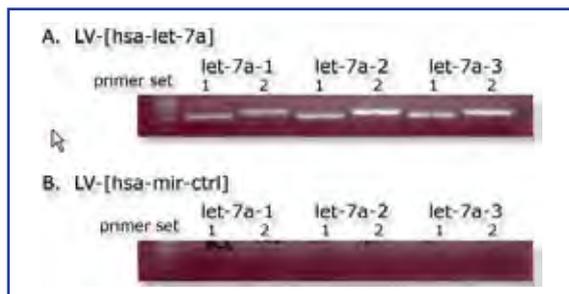


図3. バイオセティア社のLV-[sa-let-7a] レンチウイルストランスダクションの発現を RT-PCR により検出 let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3 を発現する Lenti-miRNA ウイルス (品番: mir-LV001-003、図 3A) または、EF1a イントロンに DNA 配列を挿入していないコントロール LV-[has-mir-ctrl] (品番: mir-LV000、図 3B) を HEK293 細胞にトランスダクション。72 時間後にトータル RNA を抽出し、RT-PCR で let-7a プリカーサーを検出。

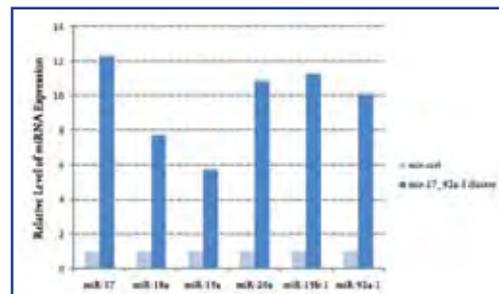


図4. 各種 lenti-miRNA の発現を RT-PCR により検出

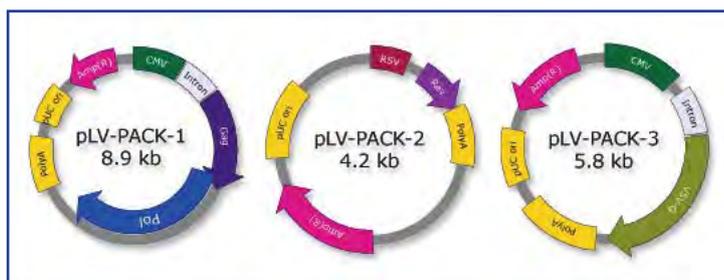
LV-[has-mir-ctrl] (品番: mir-LV000) または、LV-[hsa-mir-17_18a_19a_20a_19b-1_92a-1] (品番: mir-LVc02) をヒト foreskin (BJ) 細胞にトランスダクション。72 時間後、抽出したトータル RNA を TaqMan miRNA アッセイ (Applied Biosystems)。個々の miRNA の関連レベルは、ネガティブコントロール (LV-[hsa-mir-ctrl]) と比較して定量した。

商品検索の手順

バイオセティア社では、620 種類以上のヒト miRNA レンチウイルスベクターを取り揃えています。コスモ・バイオホームページ上 " サイト内検索 (キーワード: Biosettia miRNA) " にて、商品リストをご覧いただけます。

各 pLV-miRNA プラスミド DNA は、バクテリアのグリセロールストック (1 ml) としてご提供いたします。希望販売価格: ¥97,000。

関連商品: レンチウイルスパッケージングミックス



Biosettia Inc. メーカー略号: BOT

品名	種類	内容	品番	サイズ	希望販売価格
Lentiviral Packaging Mix	chimeric 5' LTR	5x10 cm プレートまたは 300 ウェル (6 ウェルプレート)	pLV-PACK-500	500 µg	¥113,000
		100x10 cm プレートまたは 600 ウェル (6 ウェルプレート)	pLV-PACK-1000	1000 µg	¥191,000
Lenti-LTR Packaging Mix	wild-Type 5' LTR	5x10 cm プレートまたは 300 ウェル (6 ウェルプレート)	LTR-PACK-450	450 µg	¥97,000
		100x10 cm プレートまたは 600 ウェル (6 ウェルプレート)	LTR-PACK-900	900 µg	¥165,000

miRNA 研究

miRNA 過剰発現 (ウイルス粒子)

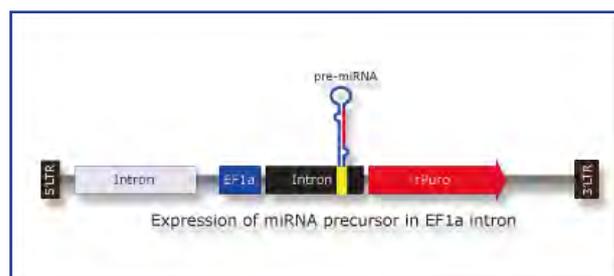
miRNA 発現用 レンチウイルスウイルス粒子 (デザイン済)

- Ready-to-use のレンチウイルスストック
- お手頃価格です!

miRNA レンチウイルスストックは、HEK293T 細胞に lenti miRNA ベクターと Gag-Pol 遺伝子産物及び水疱性口内炎ウイルスエンベロープ G (VSV-G) を発現するプラスミドを co-transfection して作製しています。レンチウイルスの上清は、トランスフェクション後 48 時間で回収し、70°C で保存しています。ウイルスの力価は、通常 1×10^7 IU/ml です。

商品検索の手順

バイオセティア社では、620 種類以上のヒト miRNA レンチウイルス粒子を取り揃えています。コスモ・バイオホームページ上 " サイト内検索 (キーワード: Biosettia miRNA) " にて、商品リストをご覧いただけます。希望販売価格: ¥59,000。



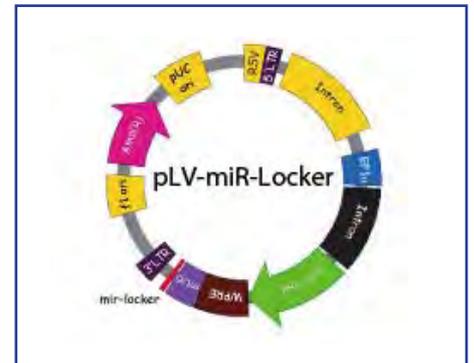
miR-Locker miRNA 阻害用レンチウイルスベクター (デザイン済)

■ レンチウイルス発現システムにより効果的かつ安定的に miRNA を抑制します！

バイオセティア社の miRNA 阻害用レンチウイルスベクター、miR-Locker は、ターゲット miRNA のバルジを挟んだ 5' および 3' 末端と完全に相補的な一本鎖ヌクレオチド計 2 コピーをレンチウイルス発現システムにより発現することで、効果的かつ安定的に相補鎖を過剰発現し、長時間の miRNA 抑制を達成します。

特長

- レンチウイルス発現システムにより、長時間 miRNA を抑制します。
- ヒトおよびマウス miRNA に対するインヒビター製品をご用意しています。
- 各 pLV-miRNA Locker プラスミド DNA は、1 mL 大腸菌グリセロールストックの状態でお届けします。



使用例

1, レポーターアッセイによる評価

pLacZ-miR-Locker プラスミドと、相当する pLV-miRNA 発現クローン (品番 mir-p###) を 293T 細胞に共導入し、続いて β -ガラクトシダーゼレポーターアッセイを行った。左側の図：B は、has-mir-1, 7, 9, 17, 30a, 30c, 125b, 146a, let-7a に対して miR-Locker を用いた際のレポーターアッセイの結果。miR-Locker を共導入したことにより β -ガラクトシダーゼ活性の低下がみられるのは、pLV-miRNA 発現ベクターが発現した成熟 miRNA が、LacZ 遺伝子の 3' 非翻訳領域にある miR-Locker 配列に結合し、 β -ガラクトシダーゼの翻訳を阻害した結果による。lacZ レポーターアッセイの結果は、Biosettia miR-Locker が miRNA の偽標的として作用することで、miRNA による内因性遺伝子の翻訳阻害を抑制していることを示す。

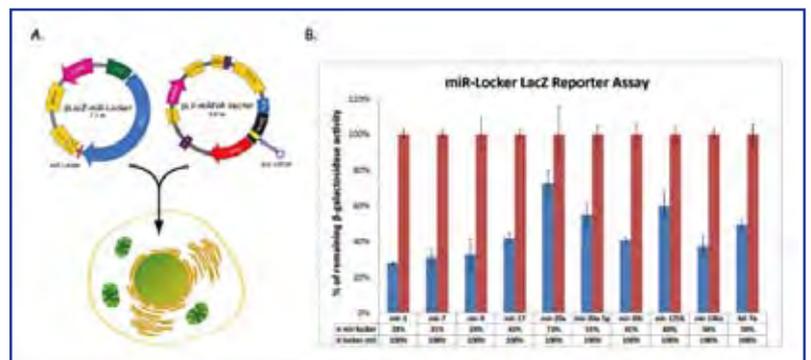


図 1. レポーターアッセイによる miR-Locker の有効性の実証。(A) pLacZ-miR-Locker プラスミドと相当する pLV-miRNA 発現ベクターを 293T 細胞に物質質量比 1 ~ 10 で共導入。(B) 遺伝子導入 24 時間後の β -ガラクトシダーゼ活性。共導入した miR-Locker による β -ガラクトシダーゼ活性の低下は、LacZ 遺伝子の 3' 非翻訳領域にクローニングした miR-Locker 配列が、pLV-miRNA ベクターが発現した成熟 miRNA と結合したことを示す。

2, TaqMan 法による評価

miR-Locker レンチウイルスを作製し、内因性 mir-17, 20a, 30a-5p, 30b, 30c 成熟 miRNA を標的として BJ ヒト包線線維芽細胞に形質導入した。miRNA 阻害の効果は、Taqman 法を用いて評価した (図 2)。その結果、先にレポーターアッセイによって示された結果と同様、miRNA の翻訳阻害作用を抑制することが確認できた。

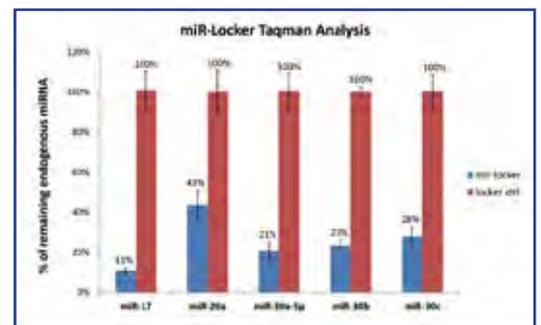


図 2. レンチウイルスにより BJ 細胞に形質導入した miR-Locker の Taqman 法による効果測定

Biosettia Inc. メーカー略号: BOT

品名	品番	包装	希望販売価格
ヒト用 miRNA 阻害用レンチウイルスベクター	hsa-xxx-locker	1mL	¥ 97,000
マウス用 miRNA 阻害用レンチウイルスベクター	mmu-xxx-locker	1mL	¥ 97,000

xxx には、ターゲットとする miRNA を区別する英数字が入ります。
コスモ・バイオホームページ上、「サイト内検索 (キーワード: Biosettia miRNA inhibitor)」にて、商品リストをご覧いただけます。

shRNA 発現用 ベクターシステム

- 1本のオリゴ DNA を用意するだけ！
ご自身で shRNA 発現クローンを作製できます！

特長

- 簡単なクローニング

shRNA をコードした一本鎖オリゴ DNA は完全な回文 (パルンドローム) 配列で、同じ回文配列のオリゴとアニールして二本鎖となります (図 1A)。

- 高効率、低バックグラウンド

二本鎖オリゴの 5' -AAAA は、ベクターの 5' -TTTT にライゲーションします。この 5' -TTTT は、一般的な shRNA 発現ベクターで制限酵素処理によって生じる突出塩基と違って、セルフライゲーションしないため、ライゲーション効率が增加し、クローニングバックグラウンドが低下します (図 1B)。

- 3種類の shRNA 発現プロモーターの選択

ヒト H1 (H1)、ヒト U6 (hU6)、マウス U6 (mU6) プロモーターからお選びいただけます。

- Ready-to-use

制限酵素処理やベクター精製は必要ありません。

- 経済的

1本のオリゴ DNA を用意するだけで shRNA 発現クローンの作製が可能です (通常 2本のオリゴ DNA が必要)。また、使用するオリゴ DNA の長さは、ほかの一般的な shRNA ベクターよりも短いものとなっています。

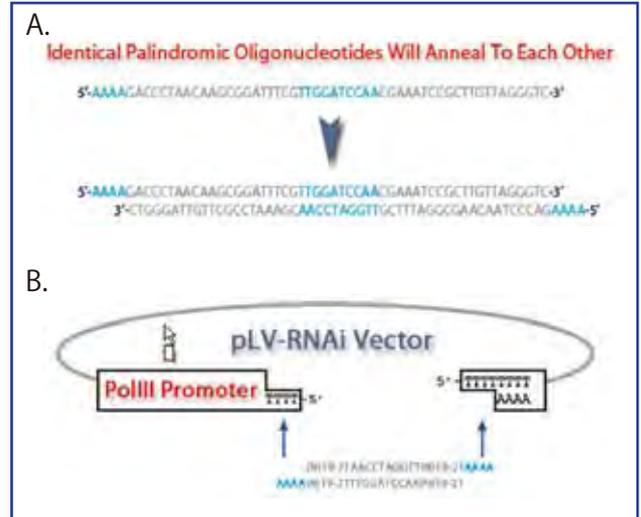


図 1. pRNAi/pLV-RNAi クローニングシステム

A: 2つの全く同じ一本鎖オリゴ DNA をお互いにアニールして 5' -AAAA 突出の二本鎖オリゴを作製する。一本鎖オリゴは 21 nt のターゲット配列、10 nt ループ配列 (TTGGATCCAA)、ターゲット配列の 21 nt アンチセンスをコードしている。

B: アニールした二本鎖オリゴの 5' -AAAA はベクターの 5' -AAAA とだけライゲーションする

構成内容

- 各ベクター (20 μ L)
- 10 \times アニールバッファー (100 μ L)
- ネガティブコントロール (20 μ L)
- シークエンシング・プライマー (10 μ M) (30 μ L)

shRNA 発現用ベクターシステムは、以下の 2つのラインナップをご用意しています。

pRNAi ベクターシステム

pRNAi ベクターシステムは、ステムループ配列をコードする二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドのクローニングを簡単で高効率、経済的に行えるシステムです。

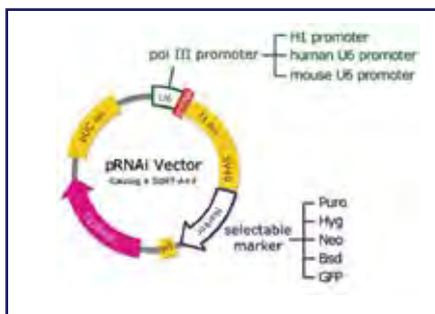


図 1. pRNAi ベクターマップ

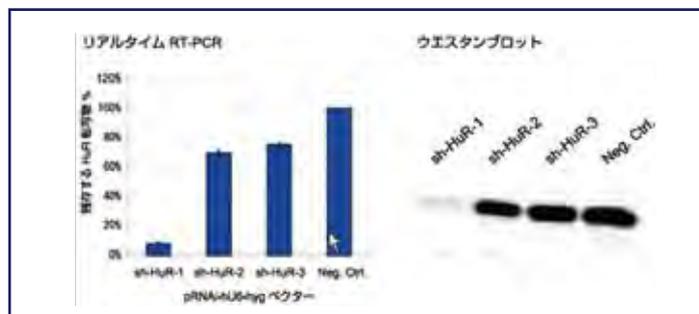


図 2. リアルタイム PCR とウェスタンブロットによるノックダウン効率の測定

pRNAi ベクター商品リスト

希望販売価格: ¥ 59,000

包装: 1kit (20 回分)

Biosettia Inc. メーカー略号: BOT

プロモーター		セレクションマーカー				
Pol III プロモーター		ビューロマイシン	ハイグロマイシン	ネオマイシン	プラスチジン	GFP
H1	品名	pRNAi-H1-puro	pRNAi-H1-hyg	pRNAi-H1-neo	pRNAi-H1-bsd	pRNAi-H1-green
	品番	SORT-A01	SORT-A04	SORT-A07	SORT-A10	SORT-A13
Human U6	品名	pRNAi-hU6-puro	pRNAi-hU6-hyg	pRNAi-hU6-neo	pRNAi-hU6-bsd	pRNAi-hU6-green
	品番	SORT-A02	SORT-A05	SORT-A08	SORT-A11	SORT-A14
Mouse U6	品名	pRNAi-mU6-puro	pRNAi-mU6-hyg	pRNAi-mU6-neo	pRNAi-mU6-bsd	pRNAi-mU6-green
	品番	SORT-A03	SORT-A06	SORT-A09	SORT-A12	SORT-A15

pLV-RNAi ベクターシステム

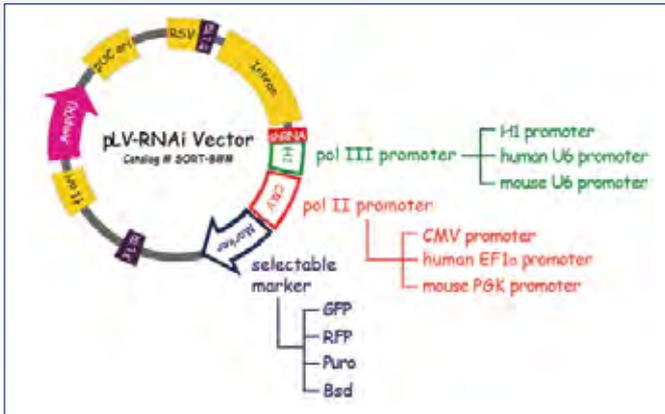


図 1. pLV-RNAi ベクターマップ



図 2. pLV-RNAi ベクターマップを使用した遺伝子抑制のウェスタンブロットング結果。ターゲット遺伝子の shRNA を pLV-RNAi ベクターにクローニングして、lenti-shRNA ウイルスストックを作製した。形質導入 2 日後の細胞溶解物を集め、SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットングで解析した。ネガティブコントロール (neg. ctrl.) は、LacZ 遺伝子の発現を抑制する shRNA である。

pLV-RNAi ベクター商品リスト

包装：1kit (20 回分)

Biosettia Inc. メーカー略号：BOT

プロモーター			セレクションマーカー						
Pol III	Pol II		GFP	RFP	ピューロマイシン	プラスチジン	GFP- プラスチジン	RFP- プラスチジン	RFP- ピューロマイシン
		希望販売価格	¥ 74,000	¥ 74,000	¥ 74,000	¥ 74,000	¥ 93,000	¥ 93,000	¥ 93,000
H1	CMV	品名	pLV-H1-CMV-green	pLV-H1-CMV-red					
		品番	SORT-B01	SORT-B10					
	EF1a	品名	pLV-H1-EF1a-green	pLV-H1-EF1a-red	pLV-H1-EF1a-puro	pLV-H1-EF1a-bsd	pLV-H1-EF1a-GFP-Bsd	pLV-H1-EF1a-RFP-Bsd	
		品番	SORT-B02	SORT-B11	SORT-B19	SORT-B22	SORT-B25	SORT-B27	
	mPGK	品名	pLV-H1-mPGK-green	pLV-H1-mPGK-red					
		品番	SORT-B03	SORT-B12					
human U6	CMV	品名	pLV-hU6-CMV-green	pLV-hU6-CMV-red					
		品番	SORT-B04	SORT-B13					
	EF1a	品名	pLV-hU6-EF1a-green	pLV-hU6-EF1a-red	pLV-hU6-EF1a-puro	pLV-hU6-EF1a-bsd			
		品番	SORT-B05	SORT-B14	SORT-B20	SORT-B23			
	mPGK	品名	pLV-hU6-mPGK-green	pLV-hU6-mPGK-red					
		品番	SORT-B06	SORT-B15					
mouse U6	CMV	品名	pLV-mU6-CMV-green	pLV-mU6-CMV-red					
		品番	SORT-B07	SORT-B16					
	EF1a	品名	pLV-mU6-EF1a-green	pLV-mU6-EF1a-red	pLV-mU6-EF1a-puro	pLV-mU6-EF1a-bsd	pLV-mU6-EF1a-GFP-Bsd	pLV-mU6-EF1a-RFP-Bsd	pLV-mU6-EF1a-RFP-Puro
		品番	SORT-B08	SORT-B17	SORT-B21	SORT-B24	SORT-B26	SORT-B28	SORT-B32
	mPGK	品名	pLV-mU6-mPGK-green	pLV-mU6-mPGK-red					
		品番	SORT-B09	SORT-B18					

