

# Product Information

## MISSION® Control Vectors

製品番号 SHC001, SHC002, SHC003, SHC004,

SHC005, SHC007

保存温度 -20 °C

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

### 製品概要

低分子ヘアピンRNA (shRNA) から形成される低分子干渉RNA (siRNA) は、哺乳類細胞における遺伝子特異的なRNA干渉 (RNAi) の強力な媒介手段です。MISSION製品ラインは、アノテートされたマウスおよびヒト遺伝子に対するウイルス性ベクター上のRNAiライブラリに基づいたものです。細胞内でsiRNAを生成するshRNAは、アンホトロピックなレンチウイルス粒子から形成され、多岐にわたる哺乳類細胞株においてスクリーニングが可能です。これらの細胞株において、MISSION shRNAクローンは迅速かつコストパフォーマンスの高い機能喪失および遺伝子相互作用のスクリーニングを可能とします。

このライブラリはマウスおよびヒト用の配列決定済みのshRNAレンチウイルスプラスミドベクターから構成されます。各遺伝子は、遺伝子配列上の様々な領域を標的とする3~5個の独立なコンストラクトまたはクローンからなるクローンセットからなります。標的となる細胞株に、一過性または安定的にジーンサイレンシングするための精製プラスミドでトランスフェクションすることもできます。さらに、適合するパッケージングプラスミドとコトランスフェクトすることにより、パッケージング細胞 (HEK293T) 中において自己不活性化した複製能力のないウイルス粒子を生成することができます<sup>1-2</sup>。マウスのMMLVやMSCVのレトロウイルスシステムとは異なり、レンチウイルスベクターは神経細胞および樹状細胞などの分化細胞および非分裂細胞へのshRNAコンストラクトの効率的な感染と組み込みを可能にし、これらの細胞株を使用する際にトランスフェクション率と組み込み率が低下するという問題を克服します。

MISSION shRNA クローンを用いて実験を行う際には、ノックダウンの結果の正確な解釈および観察される反応の特異性を保証するために、適切なコントロールを設けることが重要な要素となります。MISSION Control Vectors は、MISSION shRNA ライブラリを用いた実験におけるポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして有用なレンチウイルスプラスミドベクターです。それぞれのコントロール用ベクターは pLKO.1-puro ベクターからなり<sup>3</sup>、これには汎用されるレポーター遺伝子、標的を持たないshRNA、またはshRNA以外の挿入配列が含まれます。

汎用されるレポーター遺伝子に対するshRNAベクター (TurboGFP™-SHC004, eGFP-SHC005、および Luciferase-SHC007) はノックダウン用のポジティブコントロールとして有用であり、発現の安定なレポーター細胞株を扱う際には特に有用な場合があります。これらのベクターはマウスおよびヒトの遺伝子のいずれをも標的としないため、shRNA実験では標的のないネガティブコントロールとして利用することができます。The pLKO.1-puroベクター (SHC001) にはヘアピン型挿入配列は含まれず、RNAi経路を活性化しない有用なネガティブコントロールとなります。TurboGFP Control Vector (SHC003) には、TurboGFPをコードする遺伝子が含まれており、トランスフェクション効率の測定およびshRNA送達の最適化についての有用なポジティブコントロールとなり得ます。

あらゆるshRNA実験に対してSigma社が推奨するコントロールを、このコントロール選択表に示します。これは *Nature Cell Biology*誌の論説で提唱されたコントロールと厳密に一致したものです<sup>4</sup>。行われるshRNA実験に最も相応しいコントロールを選択するにはコントロール選択表をご参照ください。クリックリファレンスガイドには各製品に固有の関連挿入配列および標的遺伝子情報が示されています。

### コンポーネント/試薬

MISSION Control Vectorは、1 mMのEDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH 8.0)中に、約500 ng/μLの濃度で10 μgの精製プラスミドDNAとして提供されます。

### ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的としており、医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS)をご覧ください。

## 保存/安定性

これらの製品は-20 °C で保存した場合、受領後 1 年以上の安定性が保証されています。

## 手順

### トランスフェクション

プラスミドDNAの送達性能の優れたトランスフェクション試薬が推奨されます。Sigma社はESCORT™ II トランスフェクション試薬(製品番号 L6037)を提供しております。

細胞の接種およびトランスクレクトはトランスフェクション試薬メーカーの使用説明書に従ってください。細胞は健康で混入物がなく、よく増殖しかつプレート上で適切な濃度である必要があります。安定なトランスフェクションをお望みの場合は、ピューロマイシン含有培地で細胞を選択することができます。

### トランスフェクション後のインキュベーション時間

インキュベーション時間は細胞株、発現タンパク質、ならびにベクターコンストラクトにより異なります。ピューロマイシンで選択したトランスクレクトされていないコントロール細胞を、非耐性細胞を除去した完全な選択に要するトランスク

レクション後のインキュベーション時間を決定するために用いることができます。ピューロマイシンの最適濃度は、ご使用の細胞株における滴定あるいはPuromycin Kill Curveにより決定する必要があります。

### Puromycin Kill Curve

実験開始に先立ち、Puromycin Kill Curve 作成により標的細胞に対するピューロマイシンの濃度を決定します。次の手順を 5~7 日で行います。

1.  $1.6 \times 10^4$  個の細胞を  $120 \mu\text{L}$  の新鮮な培地と共に 96 ウェルプレートのウェルに播きます。
2. 翌日、ウェル内の培地を種々の濃度のピューロマイシン ( $0, 2, 4, 6, 8, 10 \mu\text{g/mL}$ ) を含む培地で置換します。
3. 細胞の生存性を 2 日おきに評価します。
4. 5~7 日間細胞を培養します。培地を 3 日ごとにピューロマイシン含有の新鮮な培地で置換します。
5. 3~5 日後に完全に細胞が死滅したピューロマイシンの最小濃度をその細胞タイプに対して使用してください。

## 製品クリクリアランスガイド

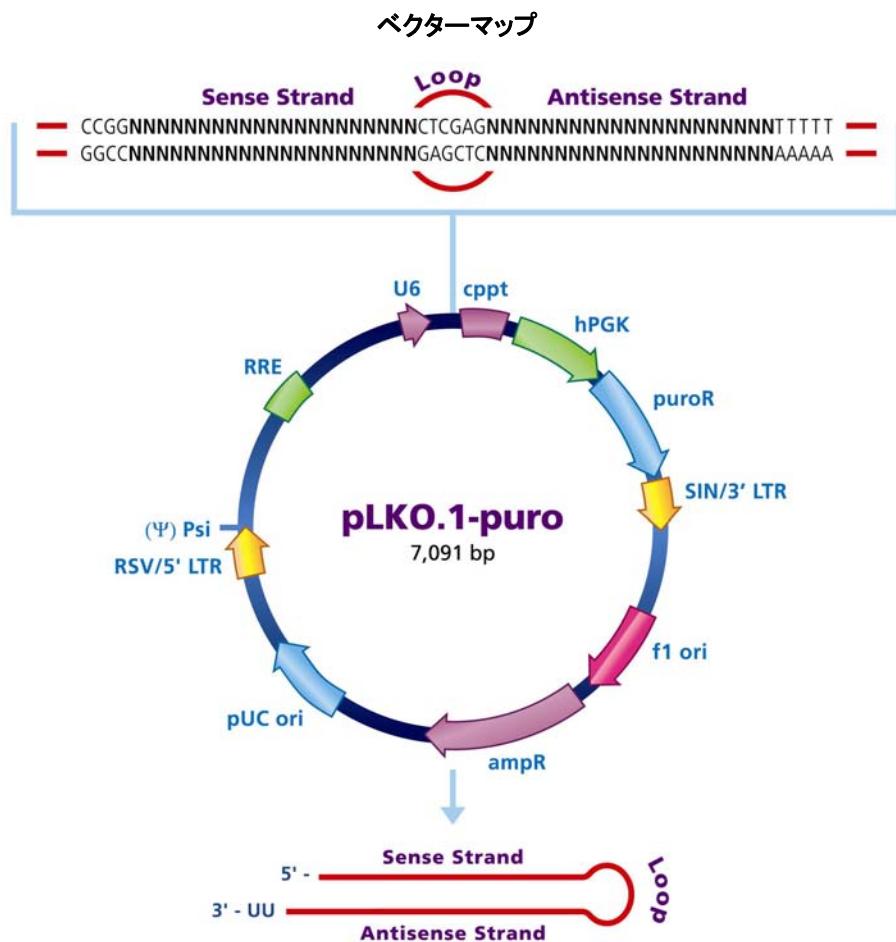
製品番号 製品情報	挿入配列	標的配列
<b>SHC001</b> MISSIONpLKO.1 -puro Control Vector	非ヘアピン	CCGG TCCGCAGGTATGCACGCGT GAATTC
<b>SHC002</b> MISSION Non- Target shRNA Control Vector	ヒトまたはマウ ス以外の shRNA	CCGG <b>CAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTCATCTTGTGTTTTT</b>
<b>SHC003</b> MISSION TurboGFP Control Vector	TurboGFP タン パク発現	CMV 制御下の TurboGFP コード遺伝子を含みます。TurboGFP は緑色蛍光タンパク copGFP の改良型です (焼脚類 <i>Pontellina plumata</i> からのクローニング)。
<b>SHC004</b> MISSION TurboGFP shRNA Control Vector	TurboGFP を 標的とする shRNA です。	CCGG <b>CGTGATCTCACCGACAAGATCTCGAGATCTTGTCGGTGAAGATCACGTTTTT</b>
<b>SHC005</b> MISSION eGFP shRNA Control Vector	eGFP を標的と する shRNA で す。	CCGG <b>TACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGGCTGTTGTATTTTT</b>
<b>SHC007</b> MISSION Luciferase shRNA Control Vector	ルシフェラーゼ を標的とする shRNA です。	CCGG <b>CGCTGAGTACTTCGAAATGTCCTCGAGGACATTCGAAGTACTCAGCGTTTTT</b>

## コントロール選択表

推奨されるコントロール	対象
ネガティブコントロール： 未処理細胞	未処理細胞は他の全サンプルの比較コントロールポイントとなります。
ネガティブコントロール： shRNA が挿入されていない空のベクターによるトランسفекション	MISSION pLKO.1-puro Control Vector、製品番号 SHC001 空のベクターである pLKO.1-puro には shRNA 挿入配列は含まれないため、RNAi 経路を活性化しない有用なネガティブコントロールとなります。これによりトランسفエクション過程の細胞への影響を観察することができ、レンチウイルスベクターを送達することができます。空のベクターによりトランسفエクトされた細胞は、特定のノックダウンを比較するための有用な参考点となります。
ネガティブコントロール： 標的を持たない shRNA によるトランسفエクション	MISSION Non-Target shRNA Control Vector、製品番号 SHC002 標的を持たない shRNA は RISC および RNAi 経路を活性化する有用なネガティブコントロールであり、ヒトおよびマウスのいずれの遺伝子をも標的としません。低分子ヘアピン配列はヒトおよびマウスのいずれの既知の遺伝子に対しても 5 塩基対のミスマッチを有します。これにより shRNA トランسفエクションの遺伝子発現に及ぼす影響を評価することができます。標的を持たない shRNA ベクターでトランسفエクトされた細胞は、ノックダウンの解釈のための有用なコントロールともなります。
トランسفエクションのポジティブコントロール： ポジティブレポーターベクターによるトランسفエクション	MISSION TurboGFP Control Vector、製品番号 SHC003 このベクターはトランسفエクション効率および shRNA 送達の評価のための有用なポジティブコントロールとなります。TurboGFP Control vector は、CMV プロモーターの制御を受ける TurboGFP をコードする遺伝子を含むレンチウイルスバックボーンベクターである pLKO.1-puro からなります。このベクターをトランسفエクションすることにより、トランسفエクションおよび送達の成功をビジュアル的に迅速に確認することができます。
ノックダウンのポジティブコントロール： shRNA 標的レポーター遺伝子によるトランسفエクション	MISSION TurboGFP shRNA Control Vector、製品番号 SHC004 TurboGFP shRNA vector は、TurboGFP を標的とする shRNA を含む pLKO.1-puro ベクターからなり、ノックダウンをビジュアル的に迅速に確認するためのポジティブコントロールとして利用できます。この TurboGFP shRNA Control Vector は HEK 293T 細胞において 24 時間後に GFP 発現を 99.6% 低下させることが実験的に示されています。このベクターは TurboGFP を標的とし、かつヒトおよびマウスのいずれの遺伝子をも標的としないことから、shRNA 実験における標的を持たないネガティブコントロールとしても利用できます。 MISSION eGFP shRNA Control Vector、製品番号 SHC005 eGFP shRNA ベクターは pLKO.1-puro ベクターからなり、これには eGFP (GenBank アクセッション番号 pEGFP U55761) を標的とする shRNA が含まれ、ノックダウンを迅速にビジュアル化するためのポジティブコントロールとして利用できます。このベクターはヒトおよびマウスにいずれの遺伝子をも標的としないことから標的を持たないネガティブコントロールとしても有用です。 MISSION Luciferase shRNA Control Vector、製品番号 SHC007 MISSION Luciferase shRNA vector は pLKO.1-puro からなり、これには北アメリカホタル <i>Photinus pyralis</i> 由来ルシフェラーゼを標的とする shRNA 挿入配列が含まれています (GenBank アクセッション番号 M15077)。このベクターはノックダウンを迅速に確認するためのポジティブコントロールとして利用できます。このベクターはホタルルシフェラーゼを標的とし、かつヒトおよびマウスのいずれの遺伝子をも標的としないことから、shRNA 実験における標的を持たないネガティブコントロールとしても利用できます。

## トラブルシューティングガイド

問題	可能性のある原因	提案
トランスフェクション効率が低い	トランスフェクション用混合液の体積	最適化するには、ウェルに様々な体積のトランスフェクション用混合液を加えた際のトランスフェクション性能を比較してください (例えば、75、100、120、150 $\mu\text{L}$ /ウェルなど)。
	DNAへの混入物	高品質のプラスミド調製法を用いOD <sub>260/280</sub> = 1.8-1.85となるようにしてください。
		エンドトキシンを含まないDNAを用いてください。エンドトキシンの除去にはEndotoxin Removal solution、製品番号 E4274を用いてください。
	最適でないDNA/トランスフェクション試薬比	トランスフェクション効率は $\mu\text{g}$ DNA/ $\mu\text{L}$ トランスフェクション試薬の比を変えることにより向上する場合があります。
	用いているベクター	トランスフェクトされた遺伝子の発現率を最適化するためにプロモーターは細胞株と適合する必要があります。
		トランスフェクション効率が低いと発現率が低下します。一方、外部タンパク質の発現レベルが非常に高いと、細胞毒性を示すことがあります。
		コントロールトランスフェクションを行ってください。
細胞毒性の微候	細胞の生育条件	細胞の継代数が多い場合、継代数の小さいストックから新たに培養を開始してください。
		プレーティングまたは培養中に細胞が強いストレス下にないことを確認してください。培地および血清が細胞生育に最適なことを確認してください。
		細胞内のマイコプラズマの存在を確認してください。
		細胞のプレーティング密度が最適なことを確認してください。
	アッセイ	アッセイが適切に機能することを保証するためポジティブコントロールを用いてください。
トランスフェクション効率は同一実験の繰返しでも変化します。	発現タンパク質が使用している発現レベルで毒性を示している	特定の細胞株を用いることが必須の場合は、違うプロモーターで発現を試みください。
	トランスフェクション用混合液の体積	最適化するには、ウェルに様々な体積のトランスフェクション用混合液を加えた際のトランスフェクション性能を比較してください (例えば、75、100、120、150 $\mu\text{L}$ /ウェルなど)。トランスフェクション用混合液を含む培地を新鮮な培地に交換してください。(トランスフェクションの 6-24 時間後)
	DNA への混入物	高品質のプラスミドベクターを用いてください。
		エンドトキシンを含まないDNAに対しては、Endotoxin Removal Solution (製品番号 E4274) を用いてください。
	細胞にストレスがかかっている。	プレーティングまたは培養中に細胞が強いストレス下にないことを確認してください。
	マイコプラズマの混入	細胞内のマイコプラズマの存在を確認してください。
	細胞密度および培養条件	異なるウェルの細胞密度は塊形成または接種時に混合していないことにより変化する可能性があります。繰返し細胞をピペッティングすることによりトリプシン分解後の塊形成を避けてください。インキュベーターにおいていたプレートが完全に水平でありインキュベーターのウェルに隣接していることを確認してください。
	マイコプラズマの混入	新しい細胞を調製してください。
	継代数が多すぎる	新しい細胞を調製してください。



## pLKO.1-puroの特徴

製品名	内容
U6 +1G	U6 プロモーター
cPPTCTE	セントラルポリプリン配列/構成的輸送エレメント
HPGK	ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ真核細胞プロモーター
PuroR	哺乳類選択のためのピューロマイシン体制遺伝子
SIN/LTR	3' 自己不活化 LTR
f1 ori	複製の f1 オリジン
AmpR	細菌選択のためのアンピシリン耐性遺伝子
pUC ori	複製の pUC オリジン
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	RNA パッケージング配列

## 参考文献

1. Zufferey R, et al., Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*., *Nat. Biotechnol.* **15**, 871-85 (1997).
2. Zufferey R, et al., Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery., *J Virol.* **72**, 9873-80 (1998).
3. Stewart, S.A., et al., Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells., *RNA*, **9**, 493-501 (2003).
4. Whither RNAi? *Nature Cell Biology*, **5**, 489-490 (2003).

本製品は米国特許番号 5,817,491、5,591,624、5,716,832、6,312,682、6,669,936、6,235,522、6,924,123 および Oxford BioMedica 社 (英国)、(英國オックスフォード) の外国特許を取得している、研究用および商業用の *in vitro* および *in vivo* 研究用であり、遺伝子機能解明、ならびに遺伝子産物候補および医薬品探索・開発の経路の検証に用いるためのものです。LentiVector®技術を用いてトランスジェニックトリを作製し有用あるいは価値あるタンパク質を卵から生産したり、遺伝子療法のデリバリーに用いたり、製品にレンチウイルスベクターが含まれていないかあるいは組み入れられていない場合には治療・診断その他の研究目的以外の製品の商業生産に用いてはなりません。このライセンスに含まれていない商用使用のライセンス情報は、Oxford BioMedica (UK), Ltd., Medawar Centre, Oxford Science Park, Oxford OX4 4GA UK [enquiries@oxfordbiomedica.co.uk](mailto:enquiries@oxfordbiomedica.co.uk)、または BioMedica Inc., 11622 El Camino Real #100, San Diego CA 92130-2049 USA から入手可能です。

本製品のライセンスは Benitec Australia 社と米国特許番号 6,573,099 および相当する外国特許の所有者である CSIRO 社の合意に基づいており、ヒト疾患の理解、診断、モニター、治療および予防のための研究に供するものであり、このような研究目的のための動物の使用は含まれますが、例外として ddRNAi を治療薬、または疾患治療、予防、診断もしくは疾患モニタリングにもちいることは除かれます。ddRNAi を治療薬またはその他の本ライセンスから除外された目的に用いるためのこれらの特許のライセンス情報は Benitec 社の [licensing@benitec.com](mailto:licensing@benitec.com) にて入手できます。ddRNAi を他の用途に使用するためのライセンス情報は CSIRO 社の [www.pi.csiro.au/RNAi](http://www.pi.csiro.au/RNAi) <<http://www.pi.csiro.au/RNAi>> にて入手できます。

本製品は Alnylam Pharmaceuticals 社 (米国ケンブリッジ) の欧州特許 1144623、1214945 およびそれに相当する外国特許のライセンスを受けており、医薬品探索および開発のための潜在的遺伝子産物および経路を確認するため、および siRNA 以外に基づく化合物 (siRNA に基づく医薬品の潜在的基盤としての本製品の評価または特性評価を除きます) のスクリーニングのための研究を含む遺伝子機能の解明を目的とする学問的ならびに商業的研究にその使用目的は限られます。商業目的のライセンス情報 (siRNA に基づく医薬品の探索および開発を含みます) は Alnylam Pharmaceuticals 社 (300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA) から入手できます。

本製品は独自の蛍光タンパク質をコードする独自の配列を含んでおり、研究目的にのみ使用されます。研究目的以外にこの独自の核酸または独自の蛍光タンパク質をコードする配列を使用することは厳しく禁止されています。その他のあらゆるアプリケーションへの使用には EVROGEN 社のライセンスが必要です。このライセンスを取得するためには、Evrogen 社 ([license@evrogen.com](mailto:license@evrogen.com)) へご連絡ください。

Carnegie Institution の米国特許 6,506,559 および Massachusetts Institute of Technology のライセンス取得 (研究および商業的研究目的に限ります)。

ESCORT は Sigma-Aldrich™ Biotechnology LP の登録商標です。LentiVector は Oxford BioMedica plc. 社の米国および欧州共同体の登録商標です。

MISSION は Sigma-Aldrich Biotechnology LP の登録商標です。TurboGFP は Evrogen Co. 社の商標です。

JR,KB,PHC 07/07-1