

SiRNA expression용 siXpress™ PCR Vector Systems

siXpress™ Human U6 PCR Vector System

TaKaRa V7300

siXpress™ Human H1 PCR Vector System

TaKaRa V7301

siXpress™ Mouse U6 PCR Vector System

TaKaRa V7302

Mirus사 제품입니다.

System의 내용

siXpress Expression Vector (0.1 mg/ml)	
(Human U6, Human 또는 Mouse U6 promoter)	50 µl
Upstream Promoter Primer (50 µM)	50 µl
Downstream Sequencing Primer (10 uM)	50 µl
Control anti-luciferase hairpin siRNA vector (0.1 mg/ml)	
(Human U6, Human 또는 Mouse U6 promoter)	50 µl
Downstream Control Primer (50 µM)	50 µl
TransIT-LT1 Transfection Reagent	400 µl

※각 component는 별도로 판매하고 있습니다.

제품 설명

본 제품은 PCR을 이용한 siRNA expression cassette의 조제하여 transfection 하기 위한 벡터 및 시약 시스템으로 포유동물 세포내에서 siRNA를 효율적으로 발현시켜 target 유전자를 knockdown 시키는데 유용하다. 각 제품에는 siRNA 발현 벡터, Upstream Promoter Primer, 유전자 도입시약 (TransIT-LT1 TaKaRa Code V2300) 등이 세트 구성되어 있다. siRNA 발현 promoter로는 3종류의 Polymerase III promoter (Human U6, Human H1, Mouse U6)가 각각 포함되어 있다. Pol III계 promoter는 short strand RNA의 발현 효율이 높으며 특히 U6, H1 등의 Type III에 속하는 Pol III계 promoter는 임의의 서열을 전사하는데 적합하다.

본 제품에는 siRNA expression Vector를 주형으로 하여 Upstream Promoter Primer와 Downstream Promoter Primer (별도 제조)를 이용해 PCR을 수행함에 따라 siRNA 발현 세트 (Pol III promoter, target 서열, transcription terminator, cloning site 포함)를 조제할 수 있다. Downstream Promoter Primer 설계에 따라 promoter downstream에 sense strand와 antisense strand를 각각 제조할 수 있는 set 및 hairpin 모양으로 연결할 수 있는 set를 구성할 수 있다. 예를 들면 hairpin 모양의 발현 cassette를 제작할 경우는 Downstream Promoter Primer를 5'-XhoI cloning site terminator-sense strand-loop antisense strand-promoter

downstream 서열-3' 과 같이 설계한다. PCR에서 조제된 siRNA 발현 cassette는 siXpress expression Vector에 cloning 되어, plasmid로서 대량으로 조제할 수 있다.

siRNA 발현 cassette 또는 벡터는 TransIT-LT1을 이용해 포유동물 세포에 transfection 되며 세포 안으로 들어간 siRNA 발현 cassette는 핵으로 이동해 transcription된 후, 세포질로 이동한다. 전사된 sense 및 antisense RNA는 세포질 안에서 double strand RNA를 형성하여 siRNA로서 그 가능하다. 전사된 hairpin 형태의 RNA는 세포질 안에서 Dicer 등에 의해 processing 받아 siRNA를 생성한다. 생성된 siRNA는 target 유전자에 유래하는 mRNA를 서열 특이적으로 분해하여 그 발현을 억제한다 (RNAi). 따라서 RNAi는 유전자의 발현 억제에 의한 유전자 기능의 해명 (knockdown mouse나 knockdown cell 제작) 및 유전자 치료에 대한 응용이 기대된다.

이 밖에 각 제품에는 firefly · luciferase 유전자의 발현을 억제하는 siRNA를 생성하는 Control anti-luciferase hairpin siRNA vector가 포함되어 있으며, 도입실험 또는 발현억제 실험 (luciferase를 발현하는 세포를 이용할 경우) 대조구로 사용할 수 있다.

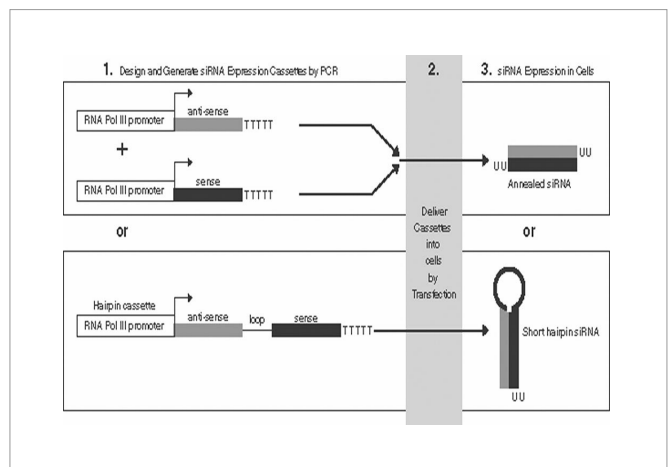


그림 1 PCR 증폭에 의한 siRNA expression cassette의 작성

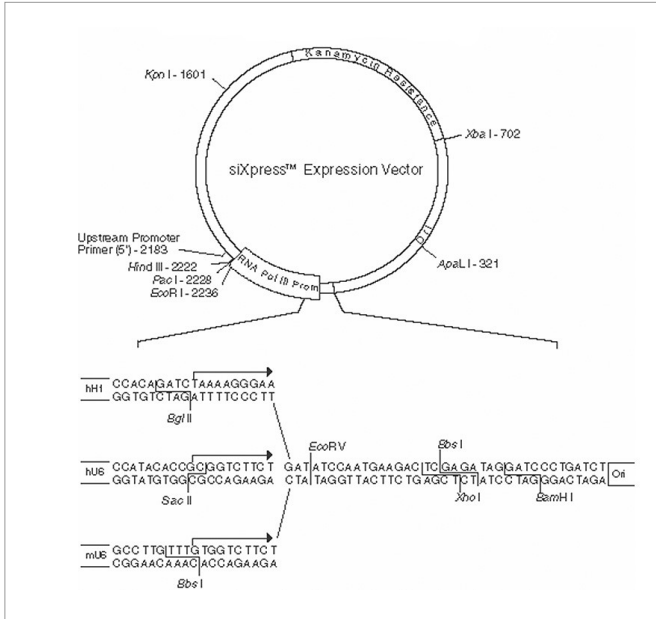


그림 2 siXpress™ Expression Vector Systems Map

특징

1. 포유동물 세포 내에서 고효율 siRNA 발현과 유전자 knockdown
2. siRNA 발현 cassette를 PCR을 이용한 단시간 제작 가능
3. siRNA 발현 cassette 제작은 hairpin형 또는 separate형 선택 가능
4. PCR에서 생성된 siRNA 발현 caessette를 siXpress expression Vector로 cloning
5. siRNA 발현 cassette를 제작하는 시약 (primer, template), 대조구 siRNA 발현용 벡터부터 유전자 도입 시약 (TransIT-LT1 TaKaRa Code V2300)까지를 포함한 시스템 완비

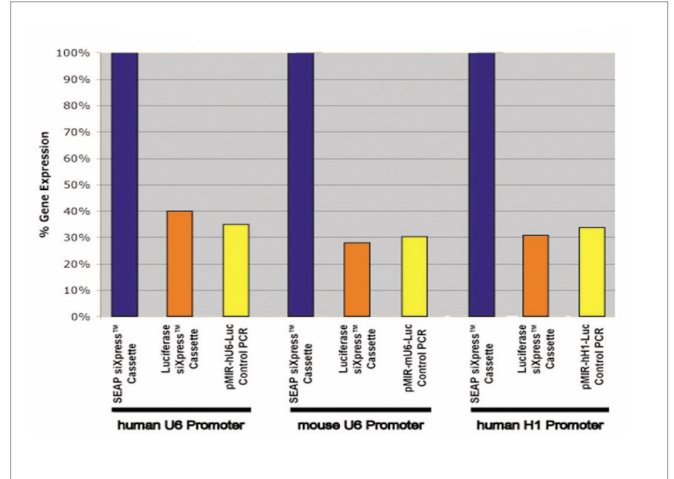


그림 siXpress™ PCR cassettes와 TransIT-LT1 reagent를 이용한 transfection (CHO-Luc cells)에 따른 Luciferase expression의 knock-out

실험 예

본 제품과 TransIT-LT1 transfection reagent를 사용하여 CHO-K1 cells에 firefly luciferase를 transfection 하였다 (CHO-luc cells). 그리고 3개의 siXpress™ promoter 벡터 (human U6, mouse U6, human H1)를 이용하여 테스트 하였다. Untargeted SEAP (alkaline phosphatase를 분비) hairpin siRNA expression cassette는 청색, luciferase specific hairpin siRNA expression cassette는 오렌지색, luciferase specific hairpin siRNA control cassette는 노란색으로 각각의 promoter에 의해 발현된 것을 볼 수 있었다. Luciferase hairpin siRNA control cassette는 luciferase hairpin siRNA expression plasmid를 이용하여 증폭하였다. 각각의 cassette는 50 ng이며, transfection 하고 48시간 후에 assay를 하였다.

변치않는 TaKaRa 제한효소 · 수식효소 · 유전공학용Kit 생명과학의 길에 언제나 함께 하겠습니다!

제한효소

제품명	TaKaRa Code	Size
<i>Bam</i> H I	1010A	10,000 U
<i>Eco</i> R I	1040A	10,000 U
<i>Hind</i> III	1060A	10,000 U
<i>Kpn</i> I	1068A	5,000 U
<i>Nco</i> I	1160A	500 U
<i>Nde</i> I	1161A	400 U
<i>Pst</i> I	1073A	10,000 U
<i>Sac</i> I	1078A	2,000 U
<i>Sal</i> I	1080A	3,000 U
<i>Sma</i> I	1085A	2,000 U
<i>Spe</i> I	1086A	300 U
<i>Sph</i> I	1180A	400 U
<i>Xba</i> I	1093A	3,000 U
<i>Xho</i> I	1094A	5,000 U

수식효소

제품명	TaKaRa Code	Size
T4 DNA Ligase	2011A	25,000 U
T4 Polynucleotide Kinase	2021A	1,000 U
T4 DNA Polymerase	2040A	100 U
T4 RNA Ligase	2050A	1,000 U
Alkaline Phosphatase (<i>E. coli</i> C75)	2120A	50 U
Klenow Fragment (<i>E. coli</i> DNA Pol I)	2140A	200 U
Ribonuclease H (RNase H)	2150A	1,000 U
Exonuclease III	2170A	5,000 U
Alkaline Phosphatase (Calf intestine)	2250A	1,000 U
Ribonuclease Inhibitor (Human Placenta)	2310A	5,000 U
S1 Nuclease	2410A	20,000 U
Mung Bean Nuclease	2420A	2,000 U
SP6 RNA Polymerase	2520A	3,000 U
Reverse Transcriptase XL (AMV)	2620A	500 U
Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH)	2640A	10,000 U

유전자 Kit

제품명	TaKaRa Code	Size
DNA Ligation Kit Ver.2	6022	50회
DNA Blunting Kit	6025	20회
Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2	6045	30회
BcaBEST Labeling Kit	6046	40회
Mutan-K Enzyme Set	6060	20회
3' -Full RACE Core Set	6121	20회
5' -Full RACE Core Set	6122	10회
Competitive RNA Transcription Kit	6125	10회
Adenovirus Expression Vector Kit	6150	1 Kit
Adenovirus Cre/loxP Kit	6151	1 Kit
Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10회
Retrovirus Packaging Kit Ampho	6161	10회
TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set	6601	50회
TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1	RR013A	50회
TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit	RR015	10회
LabelIT® non-RI Labeling Kits		
STAR★FISH Chromosome Painting		

T-vector와 expression vector가 하나로...

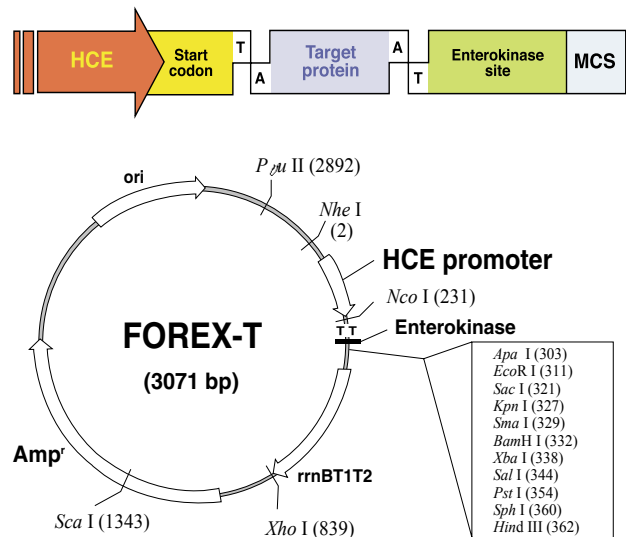
FOREX-T vector

[Full ORF Expression T-vector]

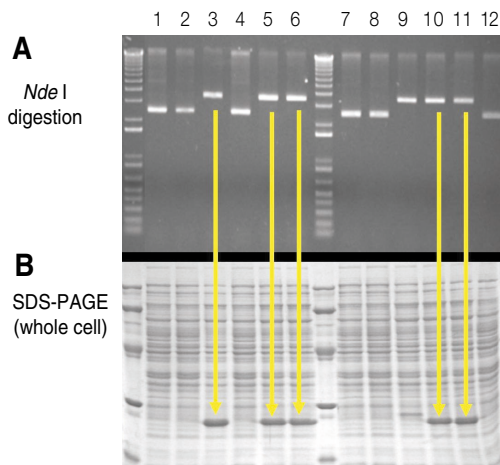
TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™, TaKaRa Z-Taq™ 사용가능

▲ FOREX-T vector는..

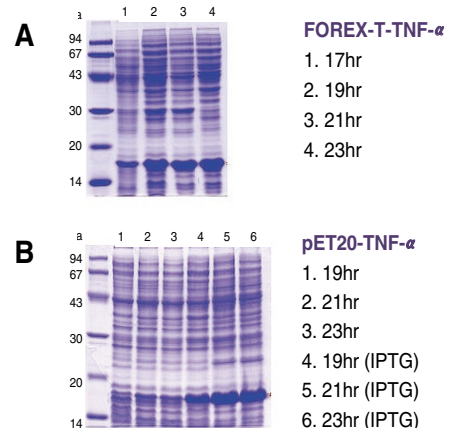
- PCR 산물을 단 한번의 T-vector cloning 으로 발현 용 plasmid 구축
- 높은 T-vector cloning 효율
- 항시적 고발현 promoter 사용
 - 유도물질 없이 대장균에서 고발현
- 5' -primer가 ATG로 시작되었을 경우 정방향 cloning시 *Nde* I 제한효소 site 생성
- Enterokinase cleavage site 함유
- Genome 정보 이용 초고속 ORF 유전자 발현에 최적



▲ FOREX-T vector의 Cloning 효율과 발현 비교



FOREX-T vector를 이용한 T-vector cloning 효율과 발현



FOREX-T vector 발현 시스템과 pET 발현 시스템의 TNF- α 발현 비교