

siRNA 발현 piGENE™ 벡터 (Ready to use)

piGENE™ hU6 <i>Bsp</i> M I (Human용)	TaKaRa Code SV307	5 μ g
piGENE™ mU6 <i>Bsp</i> M I (Mouse용)	TaKaRa Code SV308	5 μ g
piGENE™ tRNA <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	TaKaRa Code SV309	5 μ g
piGENE™ tRNA <i>Hyg</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	TaKaRa Code SV310	5 μ g
piGENE™ tRNA <i>Neo</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	TaKaRa Code SV311	5 μ g
piGENE™ tRNA <i>Pur</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	TaKaRa Code SV312	5 μ g

piGENE™ 벡터는 RNAi 연구에 있어 선두적인 역할을 하고 있는 동경대학 대학원 공학계 연구과에서 개발된 siRNA 발현용 벡터이다. 본 벡터를 사용할 경우 일시적인 유전자 억제 효과를 나타내는 합성 siRNA 도입과는 달리 지속적인 유전자 억제가 기대되며, knock-down mouse나 knock-down 세포주도 만들 수 있다.

piGENE™ 벡터의 특징은 각기 다른 U6 promoter계와 tRNA promoter계의 2종류로 되어 있으며 (표 1), 모두 제한효소를 처리한 linear 벡터로 바로 cloning에 사용할 수 있다.

장점

U6 promoter계 벡터

- Pol III 전사계이므로 전사량이 많음.
- 짧은 RNA를 효율적으로 전사.
- Tandem/stem-loop의 두 가지 type의 발현 벡터 구축 가능.

tRNA promoter계 벡터

- 독자적인 tRNA^{VAL} promoter 채택
- 전사 산물이 효과적으로 세포질에 존재
- Human, mouse 모두 사용 가능
- 약제 marker가 다양하며, 포유세포에서 약제 선택 가능

실험 예 1: siRNA 발현 벡터를 이용한 HygGFP 유전자 및 DsRed 유전자의 발현억제

【방법】

HygGFP 또는 DsRed2 (모두 형광 단백질)에 대한 siRNA 발현 벡터 (hU6, stem-loop type)를 각각 HygGFP, DsRed2 발현 벡터와 함께 HeLaS3 세포에 co-transfection하고, 2일 후에 형광현미경으로 관찰하였다 (target site는 GFP: GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC; DsRed2: GTG GGA GCG CGT GAT GAA CTT).

【결과】

어느 경우에서나 siRNA 벡터에 의해 약 90%의 특이적인 발현억제가 관찰되었다 (그림 1).

표1 각종 piGENE™ 벡터

제품명	promoter	siRNA 발현 type	대장균내에서의 내성약제	동물세포내에서의 내성약제	cloning 부위
piGENE™ hU6 <i>Bsp</i> M I	human U6	tandem/ stem loop	Ampicillin	없음	<i>Bsp</i> M I
piGENE™ mU6 <i>Bsp</i> M I	mouse U6	tandem/ stem loop	Ampicillin	없음	<i>Bsp</i> M I
piGENE™ tRNA <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	tRNA ^{VAL}	stem loop	Ampicillin	없음	<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I
piGENE™ tRNA <i>Hyg</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	tRNA ^{VAL}	stem loop	Ampicillin	Hygromycin	<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I
piGENE™ tRNA <i>Neo</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	tRNA ^{VAL}	stem loop	Ampicillin	Neomycin	<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I
piGENE™ tRNA <i>Pur</i> / <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I	tRNA ^{VAL}	stem loop	Ampicillin	Puromycin	<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I

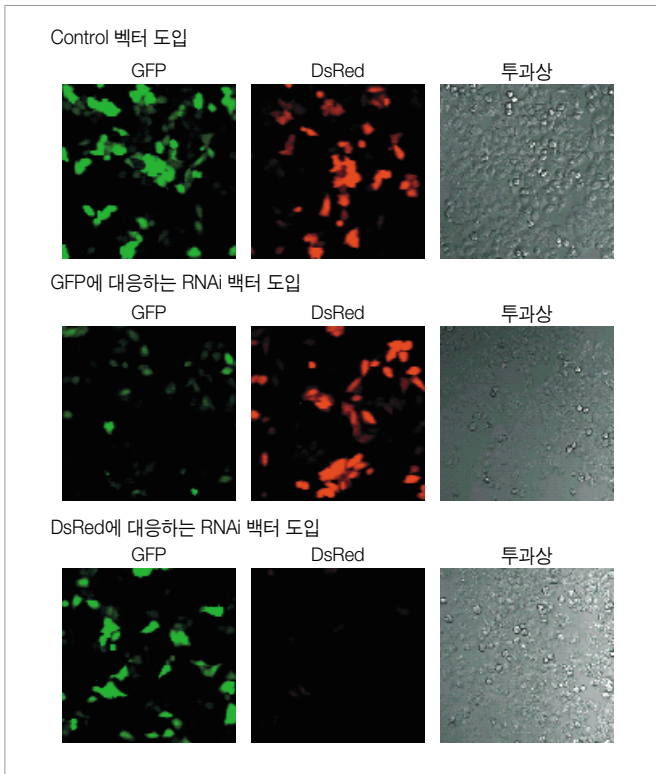


그림 1 siRNA 발현 벡터에 의한 유전자 발현억제를 형광현미경으로 관찰한 결과

실험 예 2: 변이형 k-ras mRNA를 target으로 한 piGENE™ tRNA 벡터의 발현억제 효과

【방법】

변이형 k-ras에 대한 piGENE™ tRNA-k-ras 벡터를 구축하고, 그 벡터를 대장암 유래의 SW480 세포에 도입해 k-ras 발현량을 western blot법으로 검토했다.

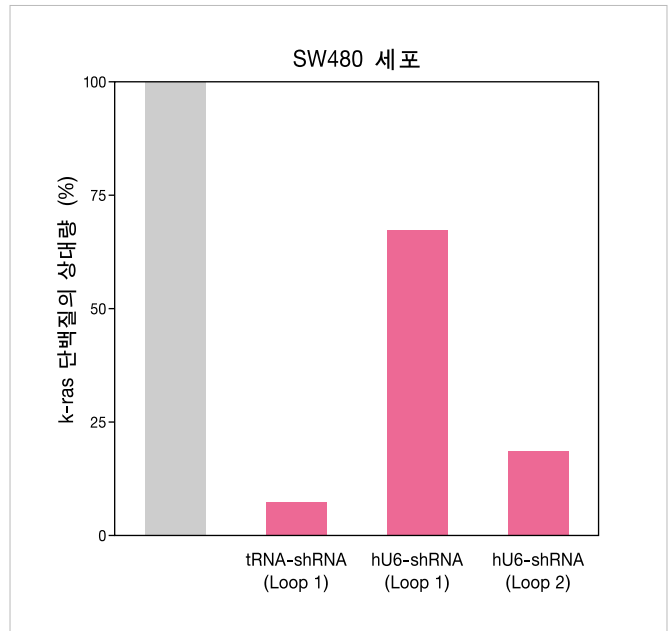


그림 2 piGENE™ tRNA 벡터의 유전자 발현억제 효과

【결과】

piGENE™ tRNA-k-ras를 도입한 세포에서는 현저한 k-ras 단백질 감소가 확인되었다 (그림 2). 한편 U6 type 벡터에서는 loop 1 (서열: -GAAAA-)의 경우, 전사 산물이 핵에 존재하며 억제효과도 그다지 얻지 못했지만, loop 2 (서열: -CITCCTGTCA-)의 경우에는 전사 산물이 세포질에 존재하여 높은 억제효과를 얻었다.

실험 예 1, 2: 주식회사 iGENE에서 제공.