

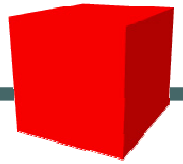
# MISSION TRC shRNA

Jiří Moos

Sigma-Aldrich spol. s r.o.

# Mission impossible?

## Jak umlčet gen když

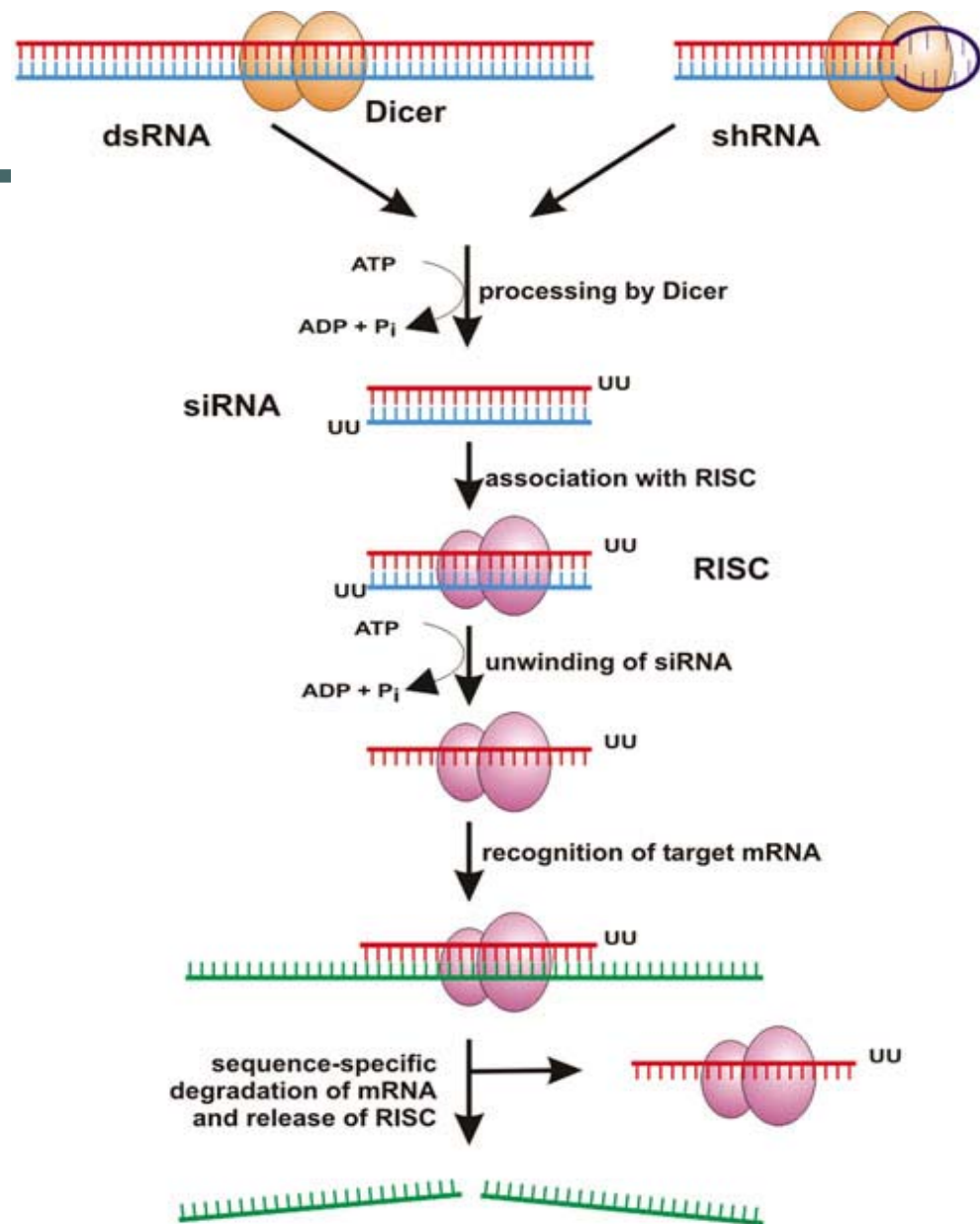


- Pracujete s primárními buňkami, které mají omezenou životnost a minimálně se dělí
- Potřebujete stabilní a ne jen přechodné utlumení genu
- Pracujete s buněčnými kulturami a nemáte zdroje, čas ani potřebu zavádět techniky práce s plasmidy, virovými vektory ....

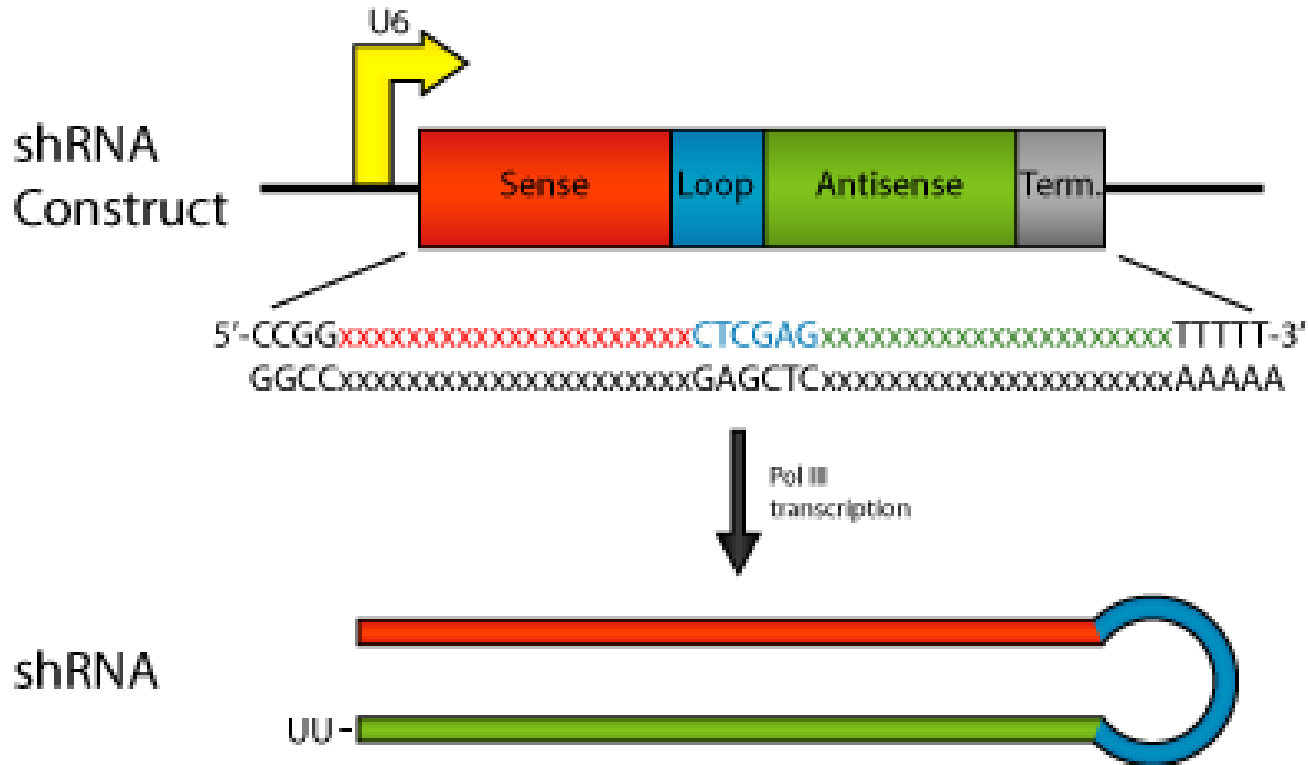
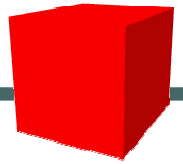


# Jak umlčet gen na úrovni RNA?

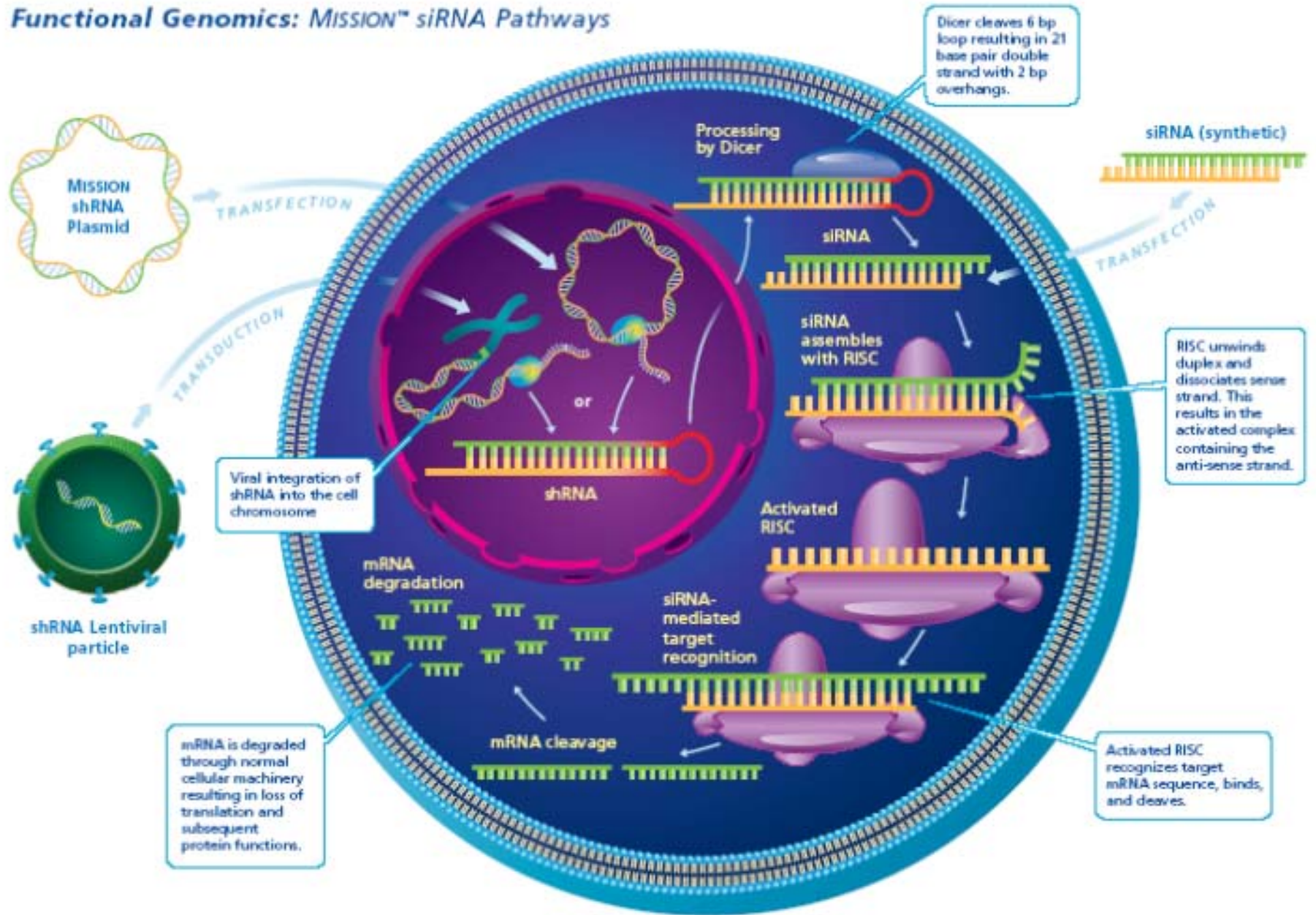
- Antisense RNA = malá účinnost
- Dvouvláknová RNA virového původu je účinně odstraňována pomocí RISC komplexu
- siRNA = dvouvláknová RNA se sekvencí utlumovaného genu
- siRNA = nutnost dopravit do buňky dostatečné množství kopií
- Řešením je **shRNA**



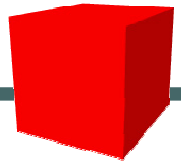
# shRNA = short hairpin RNA



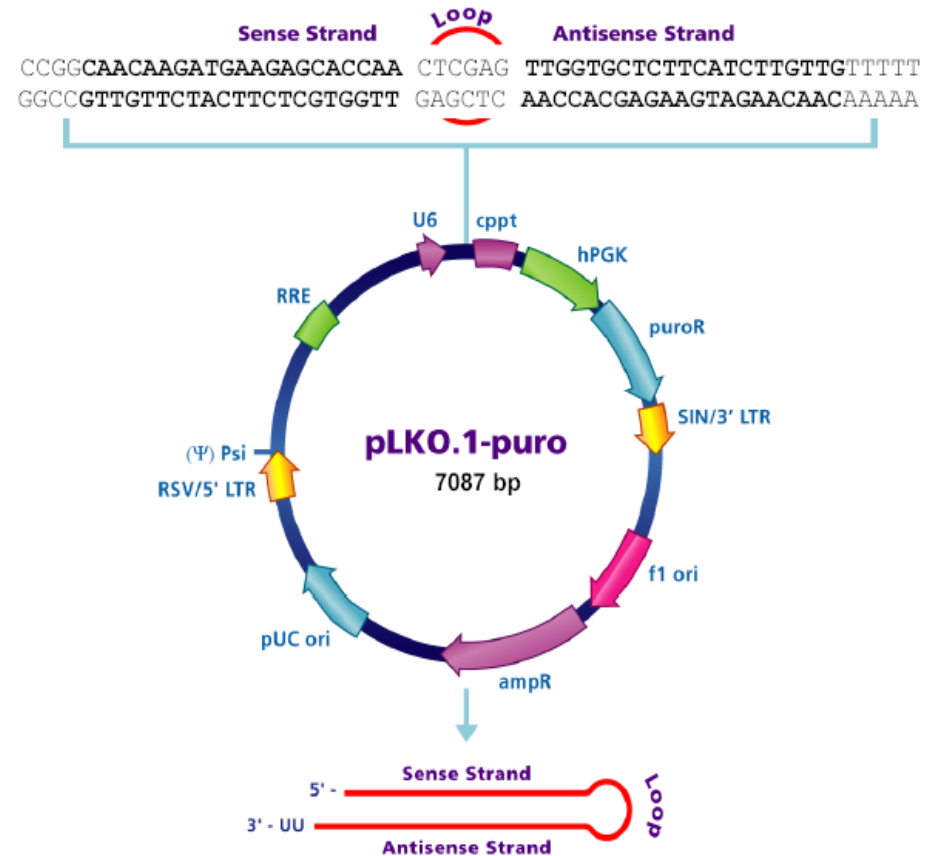
# Functional Genomics: MISSION™ siRNA Pathways



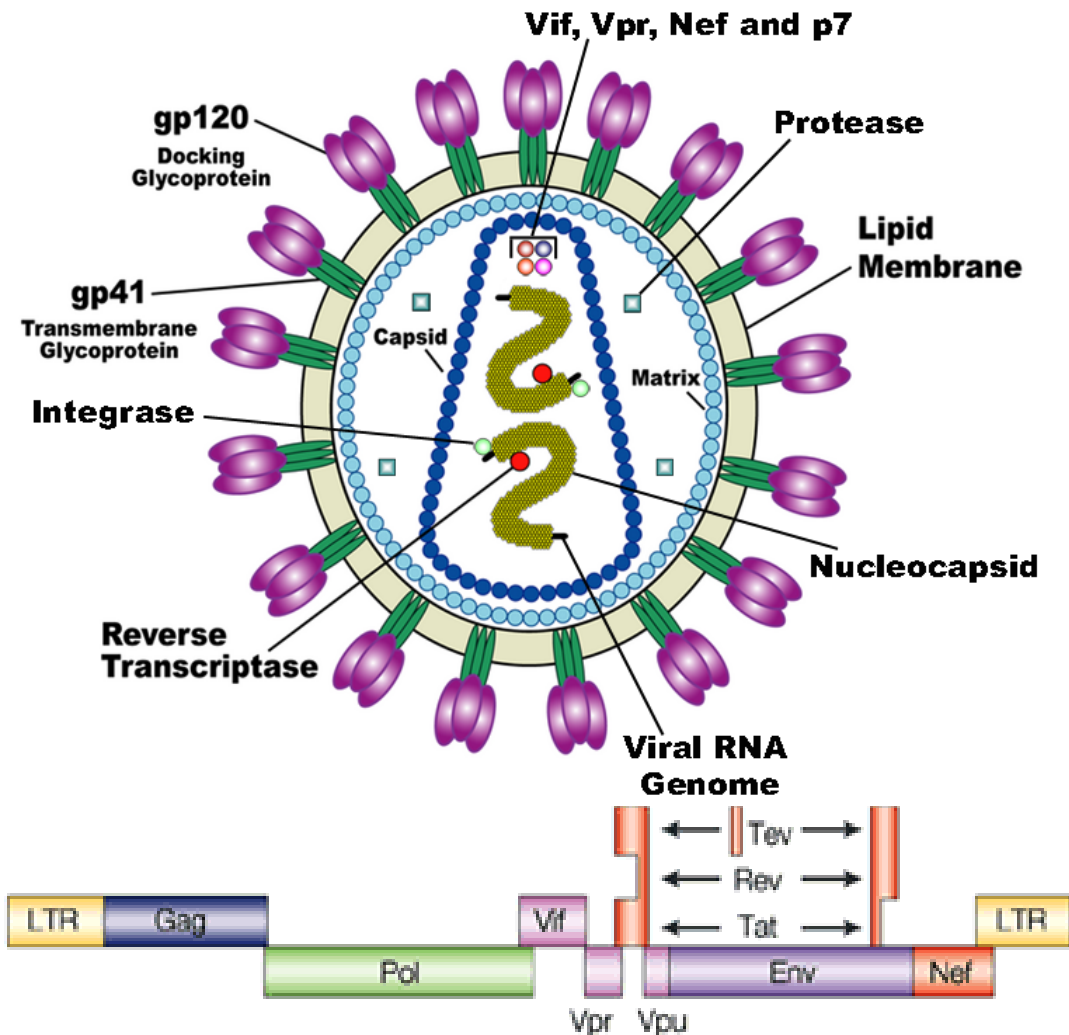
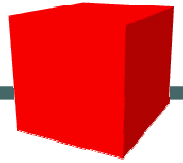
# pLKO.1-puro Vector



- Každá shRNA sekvenční je klonována do vektoru pLKO.1 v *E. coli* GC5
- Všechny sekvenční jsou ověřovány
- Vector obsahuje:
  - Sekvenční nutné pro integraci lentiviru.
  - U6 promotor pro iniciaci/terminaci transkripce shRNA
  - Selekční gen puromycinové resistance (puroR)
  - Signál pro množení v *E. coli* (ampR)



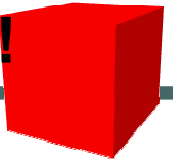
# Wild-Type Lentivirus



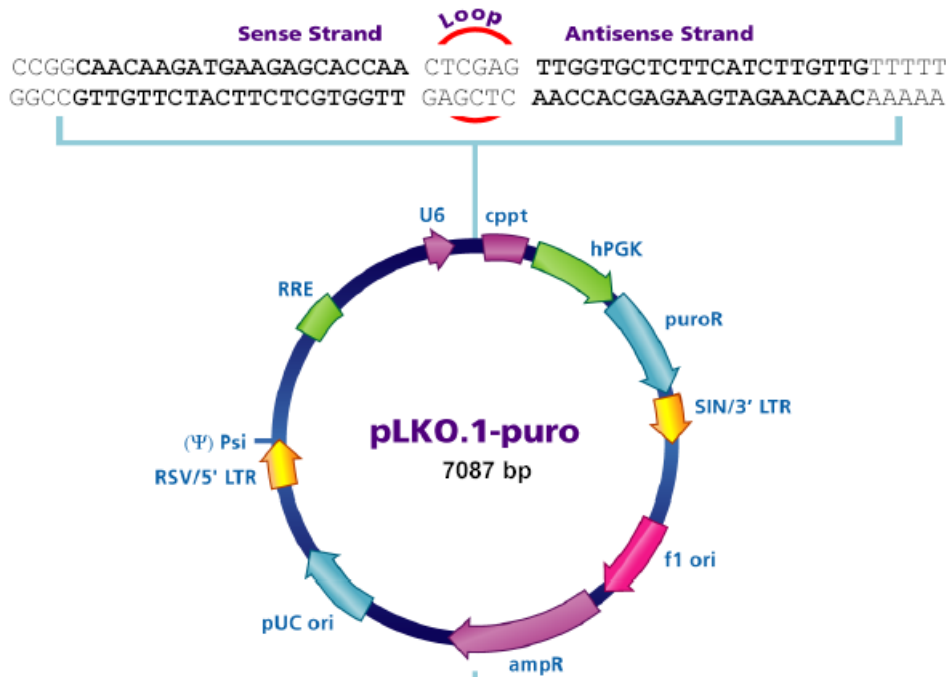
## Life Cycle

1. Target Cell Binding, fusion, and entry
2. Uncoating and Reverse Transcription
3. Nuclear Transport
4. Integration
5. Transcription and RNA transport into cytoplasm
6. Viral Protein Synthesis
7. Assembly
8. Budding
9. Maturation

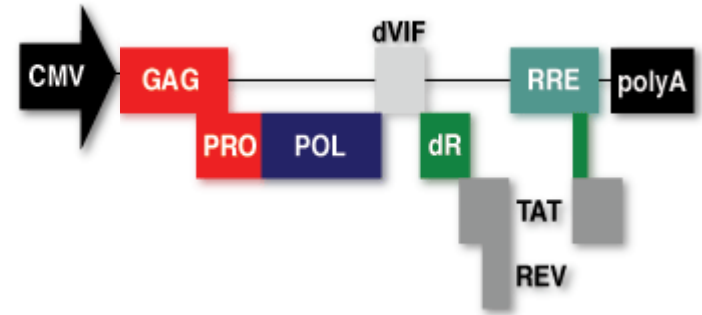
# K produkci lentivirorových částic potřeba 3 plasmidy. Lentivirové částice nejsou schopny reprodukce!



## 1. Transfer Vector (shRNA clones)



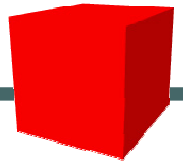
## 2. Packaging Vector (example)



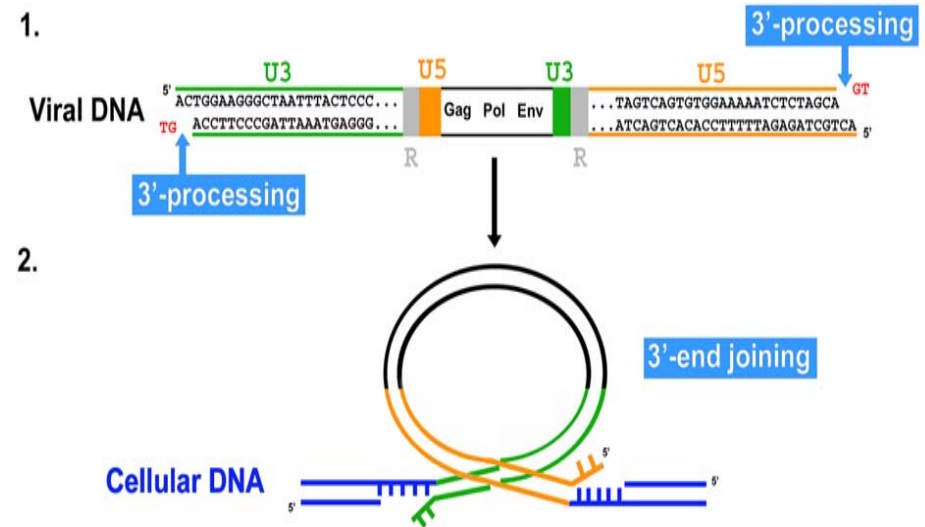
## 3. Envelope Vector (example)



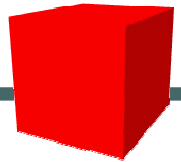
# Jak dosáhnout trvalého umlčení genu?



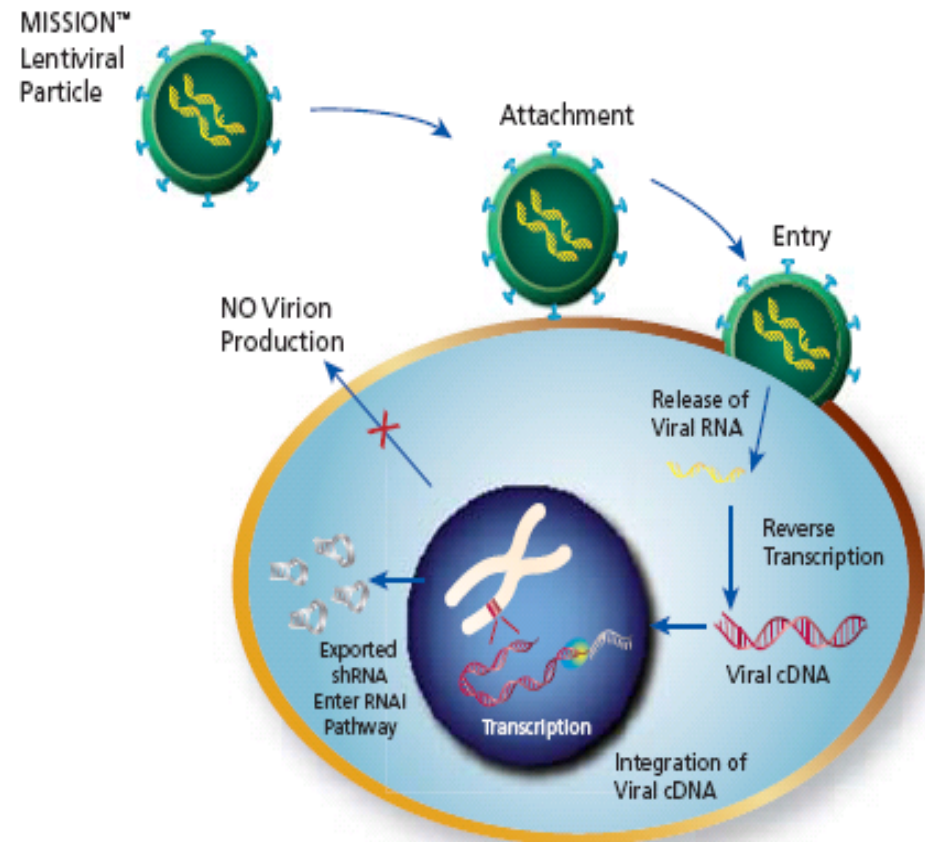
- Virová DNA se pomocí virové integrázy zabuduje do genomové DNA
- Zabuduje se sekvence mezi LTR sekvencemi
- Buňky s úspěšnou transdukcí selektujeme pomocí puromycinu



# Mission shRNA - lentivirová transdukce



- Vysoce efektivní přenos
  - Povrchové glykoproteiny VSV-G (glycoproteins of vesicular stomatitis virus). Selekcce pomocí genu puromycinové rezistence (připravuje se selekcce pomocí GFP)
- Stabilní exprese shRNA
  - Konstrukt se integruje do genomové DNA. Transkripce shRNA je konstitutivní.
- Transdukce nenaruší buněčné funkce
  - Negativní kontroly
- Bezpečnost
  - Virus neschopen replikace



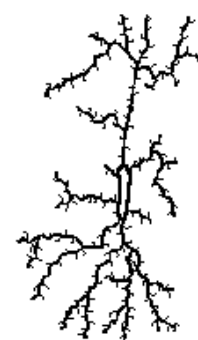
# Transdukce Astrocytů



astrocyt

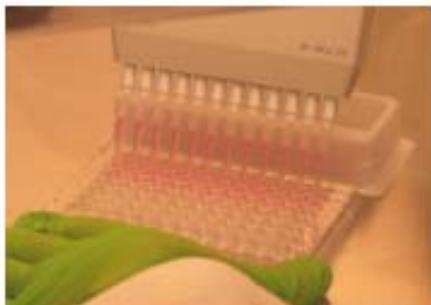


oligodendrocyt



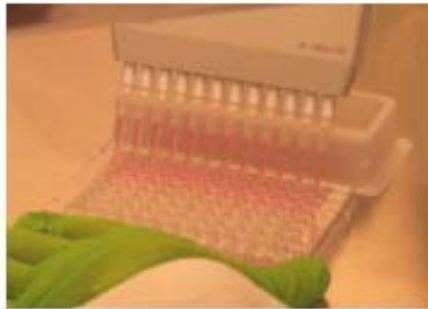
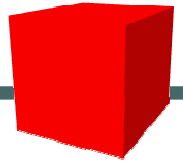
mikroglie

## GLIOVÉ BUŇKY V CNS



- $1.6 \times 10^4$  buněk/ jamku v 96 j.
- Medium
- 24 hodin po násadě
- Hexadimethrin Bromide
- Lentivirové částice
- Medium

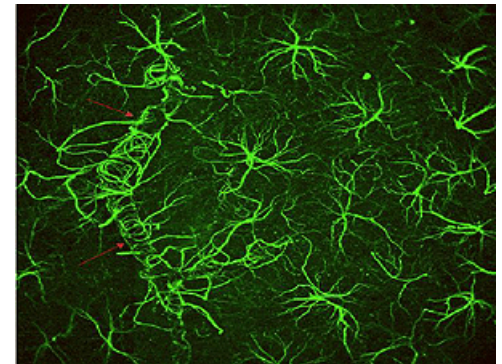
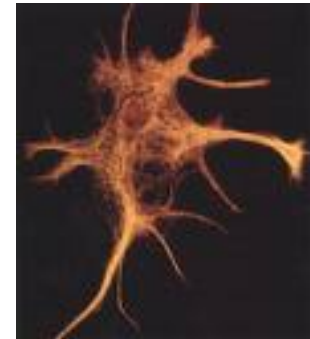
# Selekce transdukovaných buněk



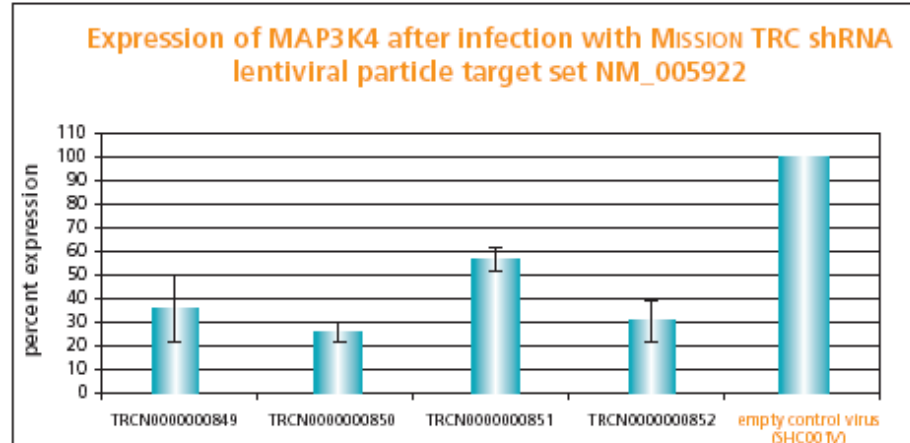
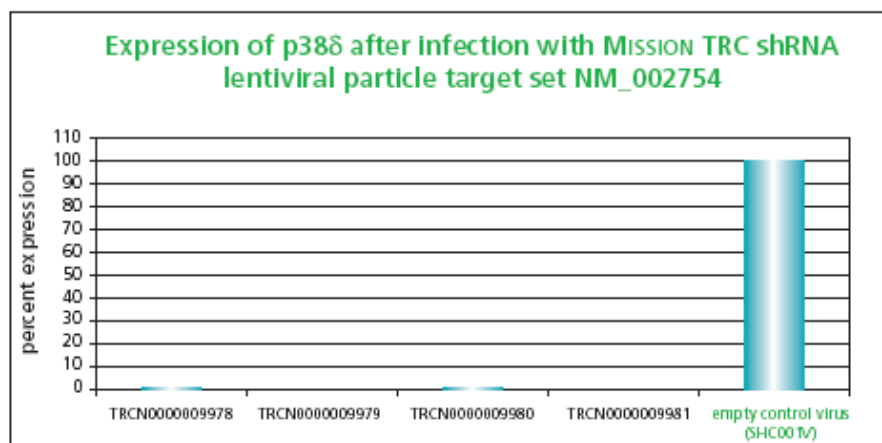
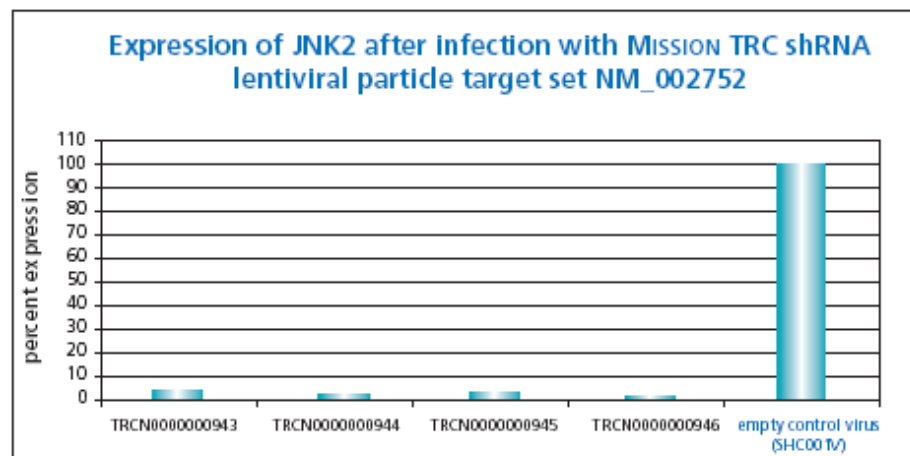
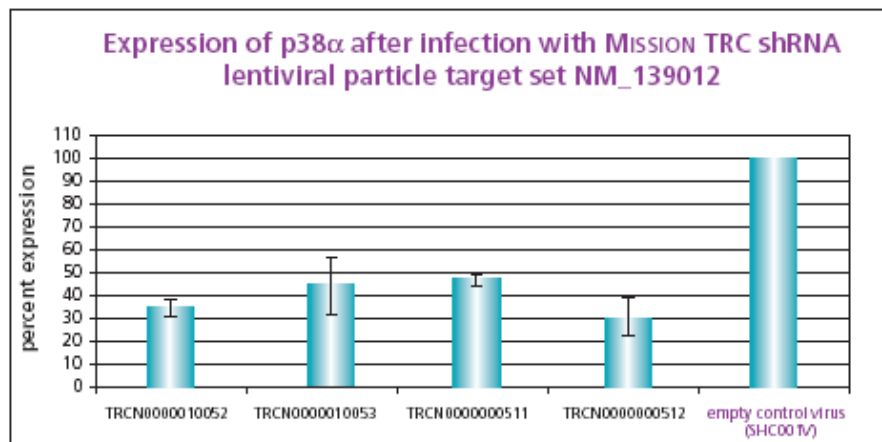
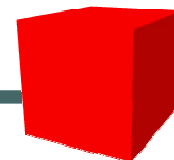
- 24 hodin po infekci
- Puromycin a nové medium



- 114 hodin po puromycinu
- Lýza buněk
- Extrakce a purifikace RNA
- qRT-PCR

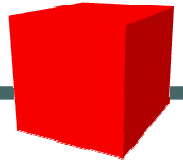


# Dosaženo minimálně 70% utlumení u každého genu

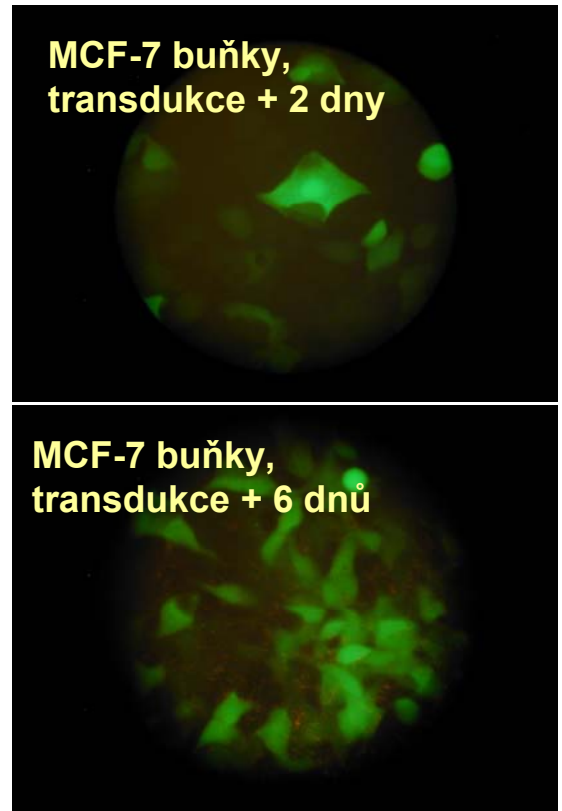


# První zkušenosti z ČR – FN Brno, CMBGT

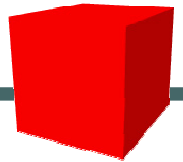
(Mgr. Šárka Pavlová, PhD.)



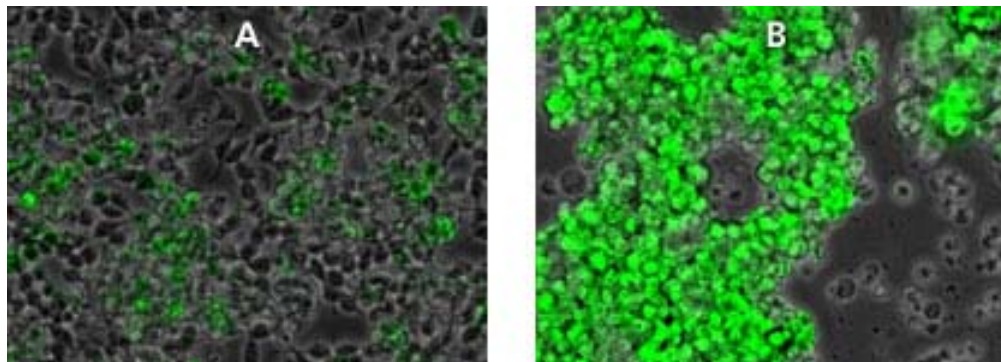
- **Porovnání transdukce a nukleofekce (Amaza) – exprese GFP**
- **Buněčná linie MCF-7**
  - $1,6 \times 10^4$  buněk na jamku = transdukce
  - $2 \times 10^6$  buněk = nukleofekce
  - Obě metody účinnost cca 50%
  - Nukleofekce = vysoká mortalita
  - Transdukce = bez efektu na životnost
- **CLL buňky** – transdukce zatím nefunguje
- **Embryonální kmenové buňky** – testování se připravuje



# ExpressMag™ Lentiviral Delivery Reagent

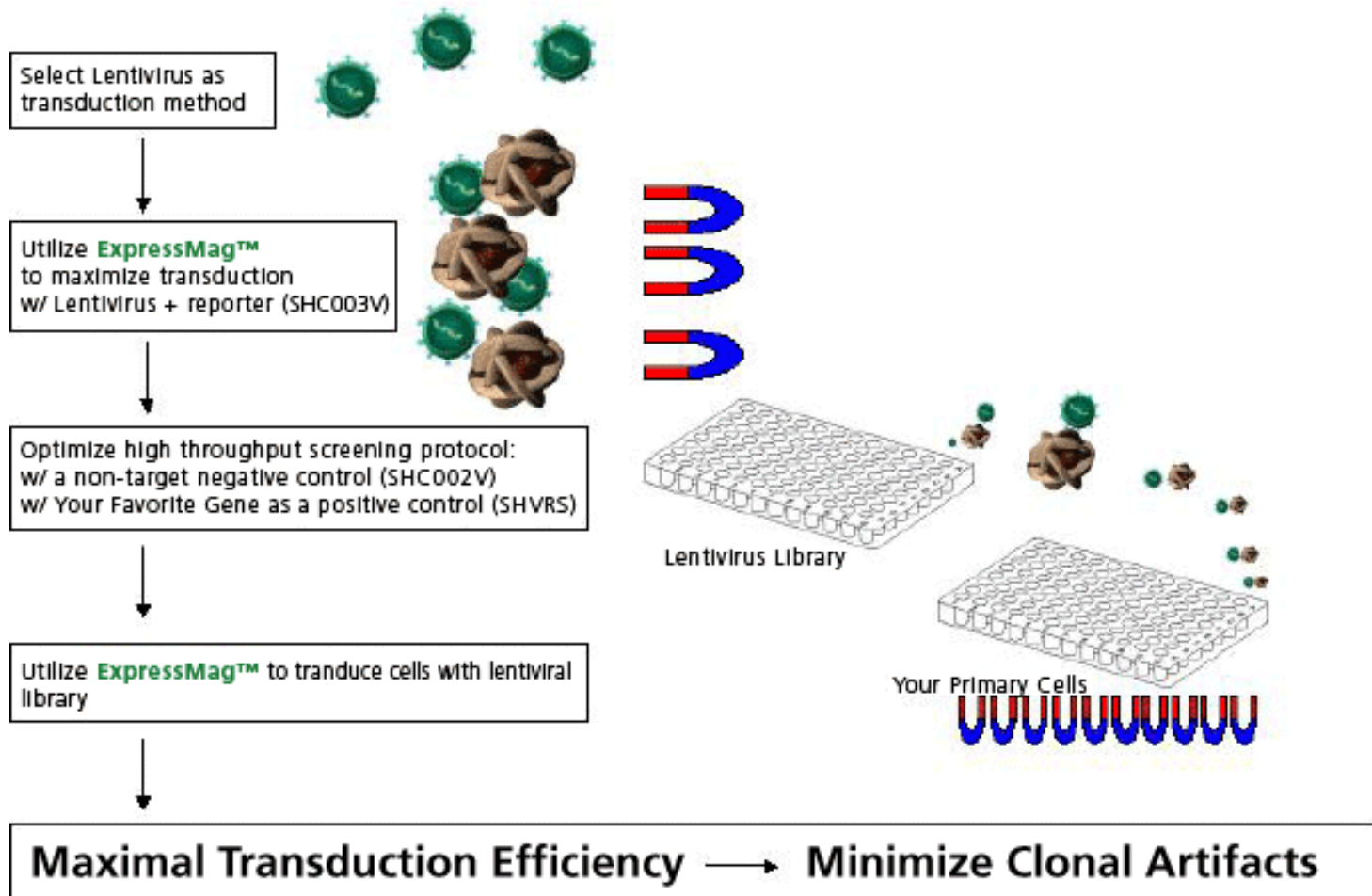
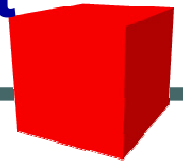


- Až 10x vyšší efektivita transdukce
- Zrychlí celý proces o jeden den
- Univerzální řešení pro všechny buněčné kultury včetně primárních buněk a suspensních kultur

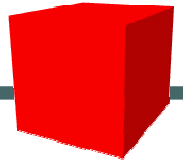


**Figure 1.** Suspension HEK 293T cells were transduced with MISSION® TurboGFP™ control lentiviral particles (Product No. [SHC003V](#)). Cells were transduced with a MOI of 1 and incubated for 49 hours. **A)** Traditional transduction with Polybrene. **B)** Cells transduced using ExpressMag system.

# ExpressMag™ Lentiviral Delivery Reagent



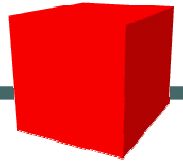
# The RNAi Consortium (TRC)



## • Partneri

- Broad Institute, MIT/Harvard
- Massachusetts General Hospital, Harvard
- Dana Farber Cancer Institute, Harvard
- Whitehead Institute, MIT
- Washington University
- Brent Stockwell-Columbia University
- Sigma-Aldrich
- Novartis
- Eli Lilly
- Bristol-Myers Squibb
- Academia Sinica, Taiwan





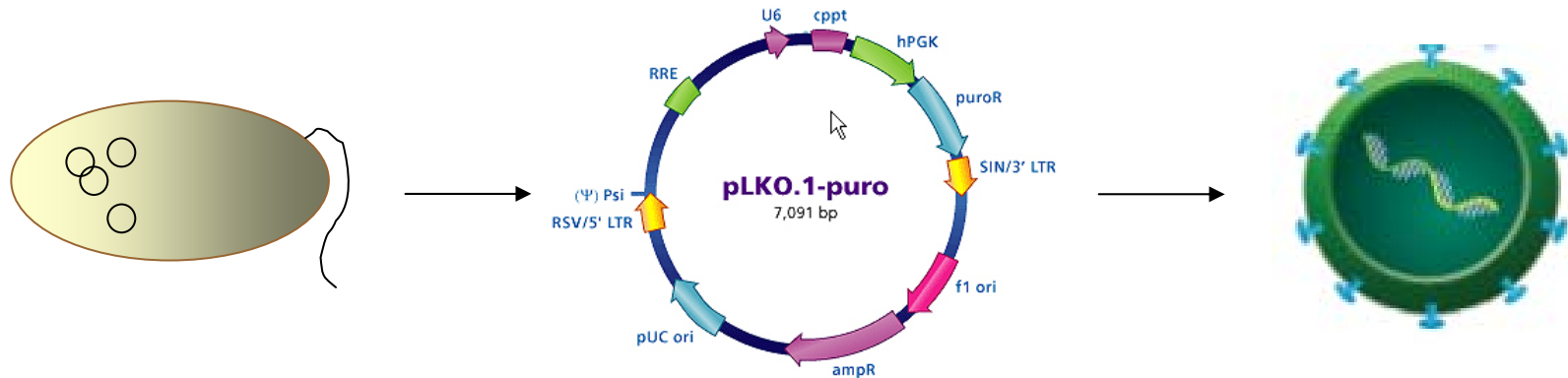
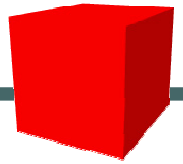
- Vytvořit shRNA knihovnu pokrývající všechny lidské/myší geny
- Umožnit používání klonů celosvětové vědecké komunitě
- Validace klonů
- Členové konsorcia budou sdílet know how v oblasti RNAi s cílem urychlit biomedicínský výzkum

## • Cíle Sigma-Aldrich

- Distribuce klonů ve 3 formátech
  - shRNA v bakteriích
  - Purifikované plasmidy
  - Lentivirové partikule
- Spolupráce s ostatními členy TRC konsorcia



# Formáty



- **Suspenze bakterií**

- GC5 *E. coli* obsahuje shRNA plasmid
- Plasmid je možno množit a purifikovat

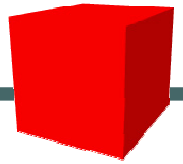
- **Čištěný plasmid**

- Pro přímé použití k tranfekci
- Může být použit k produkci lentivirových částic

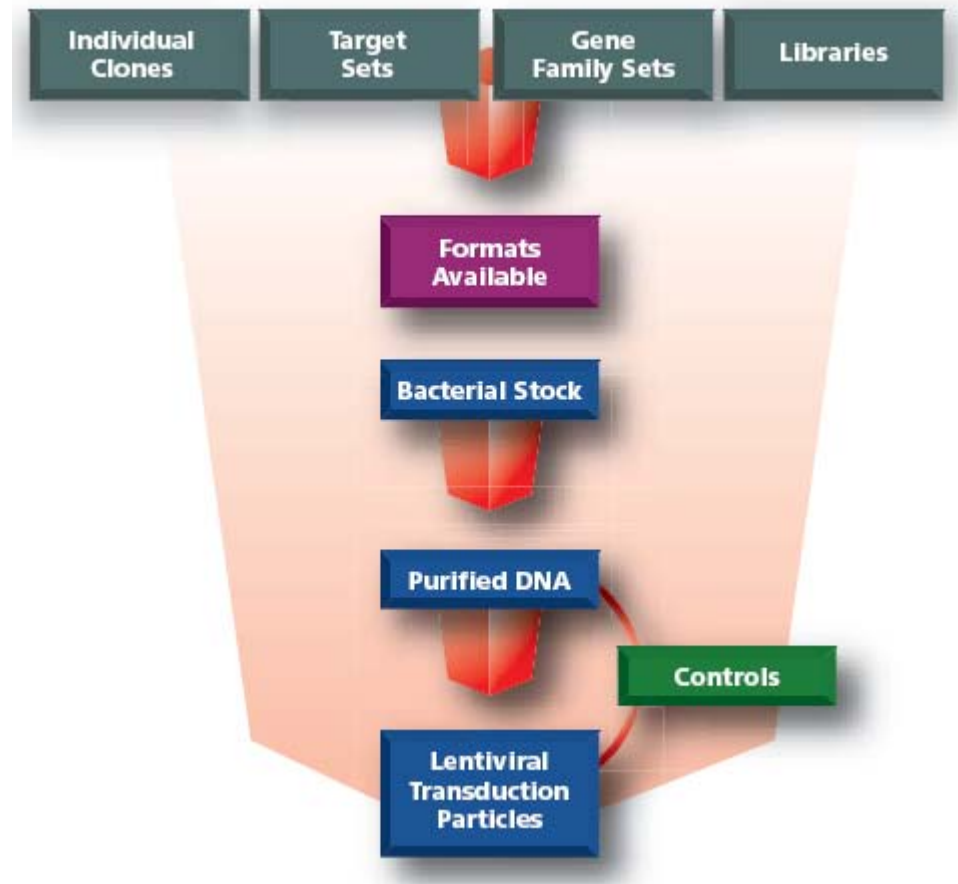
- **Lentivirové částice**

- Obsahuje shRNA sekvenci jednoho klonu
- Pro snadný přenos/transdukci do buněk

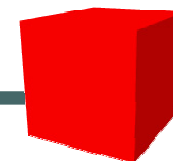
# The MISSION<sup>®</sup> shRNA knihovna



- 159 713 klonů celkem
- Cca 5 klonů / gen
  - **Lidský genom**
    - 81 895 klonů
    - 16 018 genů
  - **Myší genom**
    - 77 713 klonů
    - 15 959 genů



# Objednává se vše jako SHVRS NM\_003684 a jméno je jen poznámce



**NM\_003684** **MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1**  
Sigma **MISSION™ shRNA Lentiviral Transduction Particles**

[Expand/Collapse All](#)

## Target Set Price and Availability

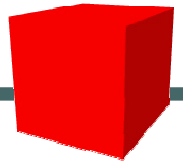
Product Number	Your Price USD	Available to Ship	Quantity	Actions
SHVRS-NM_003684	1,092.00	Custom <a href="#">details...</a>	<input type="text"/>	

## Individual Clone Price and Availability

Product Number	Your Price USD	Available to Ship	Quantity	Actions
SHVRS-TRCN0000006231	497.00	Custom <a href="#">details...</a>	<input type="text"/>	
SHVRS-TRCN0000006232	497.00	Custom <a href="#">details...</a>	<input type="text"/>	
SHVRS-TRCN0000006233	497.00	Custom <a href="#">details...</a>	<input type="text"/>	
SHVRS-TRCN0000006234	497.00	Custom <a href="#">details...</a>	<input type="text"/>	

# Mission accomplished ?

## shRNA v lentivirových lentivirových částicích



- Částice připraveny k okamžitému použití bez nutnosti zvládat záludnosti transfekce
- Metoda bez negativních efektů na buňky, vhodná i pro primární linie
- Stabilní utlumení genu
- K dispozici 160 000 klonů pro 16 000 lidských i myších genů



# Děkuji za pozornost

