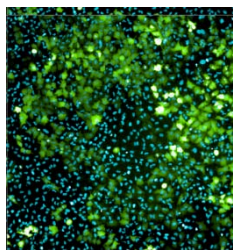


請有興趣執行 miRNA library 篩選計畫的老師，盡早建立適合的 Cell-based assay 篩選平台。我們強烈建議您們參考下列方法建立 Cell-based assay 篩選平台：

一、緣起

miRNA 表達庫並非利用 all-in-one 載體製備；因此，篩選平台必須先建立 advanced On (aOn) 表達細胞株。我們首先以 two-vector 系統建立 aOn 表達細胞株，A549 細胞株利用 pAS3w.aOn.Pbsd 病毒 (C6-4-5) 轉導得到了 aOn 表達細胞株，經 pAS4.1w.eGFP.Ppuro 病毒轉導後，如下圖所示：

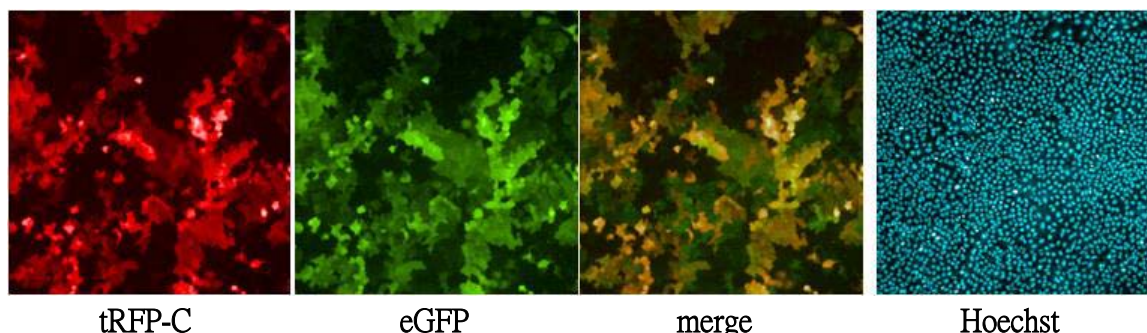


(Hoechst 與 綠螢光 merge 圖)

我們的研究發現，許多細胞並沒有表達綠螢光蛋白，或是有綠螢光強度表達不均一的現象，推測可能是 blasticidin (bsd) 抗藥細胞不表達或只表達微量的 aOn 所造成。若是勉強使用此一細胞株進行篩選實驗，將會大大降低實驗的準確性，造成後續分析實驗結果的困難。

二、改進方法

接下來，我們修正了實驗步驟如下，我們首先將 A549 細胞株轉導 pAS4.1w.RFP-C.Pbsd-aOn (C6-8-32 隨貨贈送品) 病毒並建立 bsd 抗藥株，此 A549 抗藥株再轉導 pAS4.1w.eGFP.Ppuro 病毒，並分析其螢光表現情形，如下圖所示：



tRFP-C

eGFP

merge

Hoechst

我們發現每個表達紅螢光蛋白的細胞也同時可以表達綠螢光蛋白，且紅綠兩螢光強度呈現正相關；反之，不表達紅螢光蛋白的細胞也不表達綠螢光蛋白。此結果顯示每個表達紅螢光蛋白的細胞都會表達 aOn transactivator。

利用 pAS4.1w.RFP-C.Pbsd-aOn 建立 aOn 表達細胞株有兩項優點：

- (1)紅螢光蛋白的表現可以用來推測 aOn 蛋白的表達情形，並確認此 tet-inducible 系統的可行性；
- (2)可以利用紅螢光篩選強度較均一的細胞株進行實驗，以增加實驗的準確性。

三、結論與建議

1. 因為 miRNA 表達庫是利用 pAS4.1w.Ppuro 建構 (如上圖的 pAS4.1w.eGFP.Ppuro)；基於上述實驗結果，我們強烈建議有興趣執行 miRNA library 篩選的老師們，先以 pAS4.1w.RFP-C.Pbsd-aOn 建立 aOn 表達細胞株，並進一步以 cell sorter 篩選出紅螢光強度適中且均一的細胞作為您的細胞株，以利後續 Cell-based assay 篩選實驗的進行。
2. 另外，因為第一代的 tet-on transactivator 表達系統有 leakage 的疑慮，請勿利用第一代的 tet-inducible 系統建立您的 tet-on transactivator 表達細胞株。核心所提供的 tet-inducible 系統是改良版的 aOn and tight TRE 系統，比較沒有 leakage 的問題。