

ターゲットプローブの設計方法(2 ページ目に図を記載)

ターゲットプローブは、36 塩基の DNA Probe1 (25 塩基 mRNA 結合部位、2 塩基の spacer 配列、および 9 塩基の Initiator 後半配列)および 39 塩基の DNA Probe2 (25 塩基の mRNA 結合部位、2 塩基の spacer 配列、および 12 塩基の Initiator 前半配列) 1 対で構成されています。

- ・ mRNA 結合部位は 40~60% (45-55% 推奨) の GC 含有量を持つように 52 塩基となる 1 領域を選び、1 領域あたり 5'側と 3'側に 25 塩基ずつ 2 種類設計します。リピート配列などは避ける。

- ・ NCBI Blast による相同性検索を使用してオフターゲットの相補性を最小限に抑えるようにします。50% 以下の相同性であれば交差は起こりません。

- ・ 36 塩基および 39 塩基の DNA プローブを 5 セット~30 セット(発現量等に応じて変更)、各ターゲット mRNA に対して設計します。1 コピーレベルの検出を行う場合には 10 セット以上を推奨します。

- ・ mRNA 結合部位は UTR 配列をなるべく避け、CDS 配列から選択してください。

※弊社ではターゲットプローブの受託設計も行っています。(ご提供した配列情報を元にオリゴ合成メーカーにご自身で発注していただく必要があります。)

ターゲットプローブの調製方法

各ターゲット mRNA のすべてのプローブセットを調製し、混合し、TE(10 mM Tris-HCl pH 8.0 および 1mM EDTA)に保存してください。

混合または精製後、使用する時はターゲットプローブを 1 μ M 以上になるように希釈してください。

例 1) DNA プローブを 10 セット、各ターゲット mRNA に対して設計した場合

納品時の濃度が 100 μ M の場合には、Probe1 合計 10 本を等量ずつ混ぜる \Rightarrow 10 μ M ストックとする。Probe2 合計 10 本も同様に調整してください。使用時は 1 μ M になるように Probe1 と Probe2 を等量混ぜて TE で希釈したもの(10 μ M ストック Probe1 1 μ l+10 μ M ストック Probe2 1 μ l+TE 8 μ l=Total 10 μ l)を Hybridization バッファー 100 μ l に対し 2 μ l 入れてください(Final 20nM)。

例 2) DNA プローブを 20 セット、各ターゲット mRNA に対して設計した場合

納品時の濃度が 100 μ M の場合には、Probe1 合計 20 本を等量ずつ混ぜる \Rightarrow 5 μ M ストックとする。Probe2 合計 20 本も同様に調整してください。使用時は 1 μ M になるように Probe1 と Probe2 を等量混ぜて TE で希釈したもの (5 μ M ストック Probe1 2 μ l+5 μ M ストック Probe2 2 μ l+TE 6 μ l=Total 10 μ l) を Hybridization バッファー 100 μ l に対し 2 μ l 入れてください(Final 20nM)。

※ターゲットプローブ 1 対のうち片側だけのハイブリダイゼーションでは検出することができませんので、ターゲットプローブを片方のみ入れたものをネガティブコントロールとして使用して頂けます。

引用元)Tsuneoka and Funato 2020 Front. Mol. Neurosci.

ISHpalette® Short hairpin amplifier(S41) で Gapdh mRNA を検出する場合の Target probe1 セットの例

