

### 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 領域当たり 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てください。
- ・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 20 セット前後、各ターゲット mRNA に対して設計します。相同性や GC 含量の都合でプローブを適切に設計できない場合にはプローブ数を減らして試すこともあります。
- ・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で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 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) を加えて冷凍保存してください。

ターゲットプローブを混合または精製後、使用する際に 1μM 以上になるように調製してください。

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

納品時の濃度が 100μM の場合には、Probe1 合計 10 本を等量ずつ混合⇒10μM ストックとし冷凍保存してください。Probe2 も同様に調製してください。使用時は 1μM になるように Probe1 と Probe2 を等量混合し TE を加えたもの (10μM Probe1 mix **1μL** + 10μM Probe2 mix **1μL** + TE **8μL** = Total **10μL**) を Hybridization バッファー100μL に対し 2μL 加えてください (Final 20nM)。

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

納品時の濃度が 100μM の場合には、Probe1 合計 20 本を等量ずつ混合⇒5μM ストックとし冷凍保存してください。Probe2 も同様に調製してください。使用時は 1μM になるように Probe1 と Probe2 を等量混合し TE を加えたもの (5μM Probe1 mix **2μL** + 5μM Probe2 mix **2μL** + TE **6μL** = Total **10μL**) を Hybridization バッファー100μL に対し 2μL 加えてください (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ご使用いただけます。

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

