

ISHpalette® Short hairpin amplifier ターゲットプローブ設計方法

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 100μ M の場合には、Probe1 合計 10 本を等量ずつ混合 $\Rightarrow 10\mu$ M 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 1μ M になるように Probe1 と Probe2 を等量混合し TE を加えたもの(10μ M Probe1 mix 1μ L + 10μ M Probe2 mix 1μ L + TE 8μ L = Total 10μ L)を Hybridization バッファー 100μ L に対し 2μ L 加えてください(Final 20nM)。

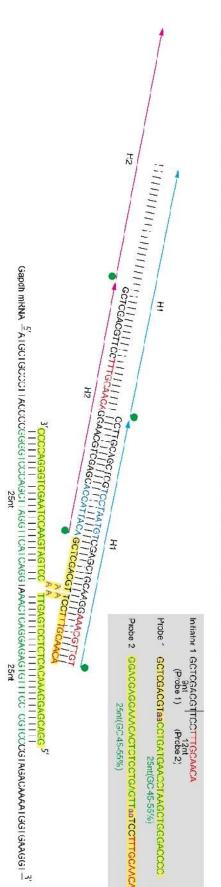
例 2) DNA プローブを 20 セット、ターゲット mRNA に対して設計した場合

納品時の濃度が 100μ M の場合には、Probe1 合計 20 本を等量ずつ混合 $\Rightarrow 5\mu$ M 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 1μ M になるように Probe1 と Probe2 を等量混合し TE を加えたもの(5μ M Probe1 mix 2μ L + 5μ M Probe2 mix 2μ L + TE 6μ L = Total 10μ L)をHybridization バッファー 100μ L に対し 2μ L 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