

Dharmacon™

# RNAi 研究用試薬カタログ

化学合成siRNA

shRNA発現用レンチウイルスベクター

microRNA研究用試薬

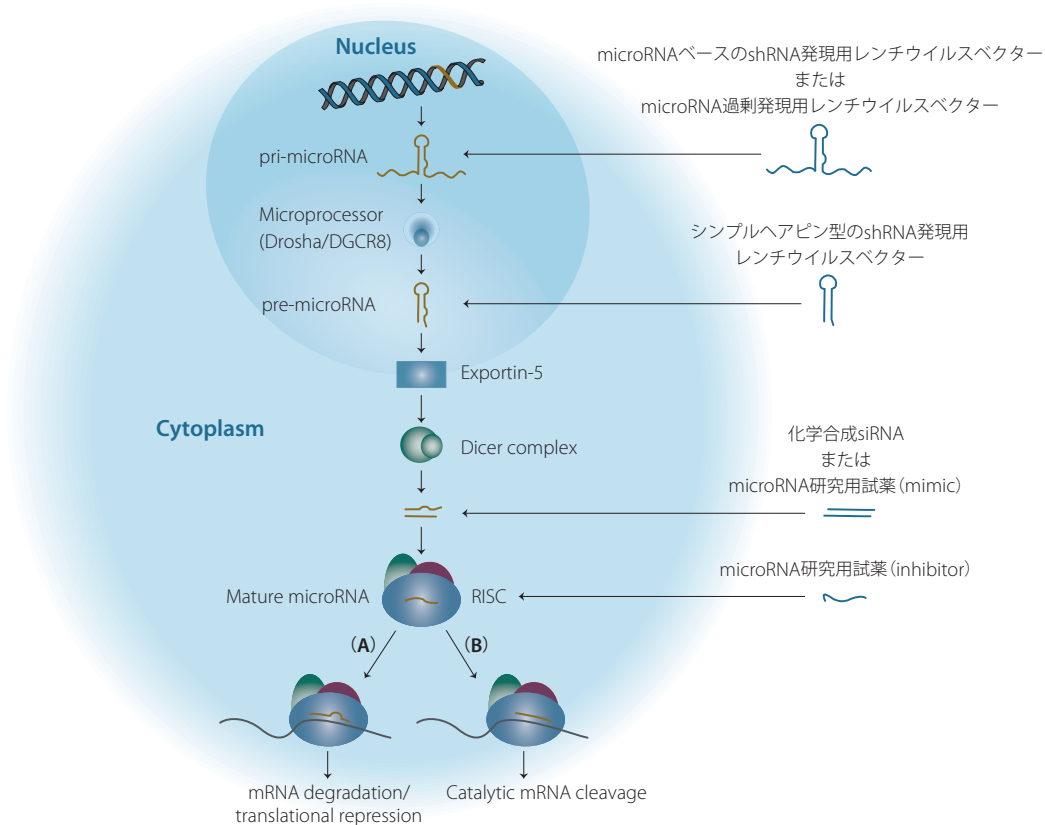
プール化レンチウイルスライブラリー

RNAi 実験関連試薬

# Dharmacon RNAi 研究用試薬

Dharmacon社は、RNA化学合成のリーダーとして、RNAi (RNA interference、RNA干渉) が発見された早期よりいくつかの重要な科学的発見に貢献し、またRNAi を応用した遺伝子発現調節技術の製品化に貢献してまいりました。このリーダーシップは、性能を向上させるためのバイオインフォマティクスおよび化学的修飾の技術的進歩を通じて実現されました。2018年、Dharmacon社は、ゲノム編集技術を用いた研究/生産用製品およびサービスを全世界に提供しているリーディングカンパニーであるHorizon Discovery社の一員となりました。現在も遺伝子編集技術および遺伝子発現調節を用いた研究手法の発展に貢献し続けています。

Dharmacon RNAi研究用試薬では、一過的あるいは短期的な遺伝子発現抑制用の**化学合成siRNA**、長期安定的あるいは誘導的な遺伝子発現抑制用の**shRNA発現用レンチウイルスベクター**、および**microRNA研究用試薬**をラインアップしています。また、網羅的で簡便なRNAiスクリーニングを実現するライブラリー製品もご用意しています。



## 内在性microRNAの生合成&制御機構

哺乳動物の内在性microRNA (図中ゴールド色の分子) 経路は、核内でpri-microRNAがゲノムから転写されることから始まります。pri-microRNAはDrosha-DGCR8複合体によって切断され、ヘアピン型pre-microRNAが形成されます。pre-microRNAはExportin-5により核外に輸送され、細胞質にてDicerにより切断され、短い二本鎖のmicroRNAが形成されます。そして、二本鎖microRNAがRISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、センス鎖が切断され、成熟型microRNA-RISC複合体が形成されます。成熟型microRNA-RISC複合体は、(A) シード配列を介したターゲットmRNAの分解/翻訳阻害、あるいは (B) ターゲットmRNAとの完全配列相補性を介したターゲットmRNAの切断、のいずれかの方法で遺伝子の発現を抑制します。図の右側に記載の青い分子は、Horizon Discovery社で開発したRNAi研究用試薬です。各試薬が入り込む内在性microRNA経路の位置を矢印で示しました。

## 化学合成siRNA

siRNA (small interfering RNA) とは、21~23塩基対からなる低分子二本鎖RNAです。siRNAはRNAiと呼ばれる現象に関与しており、mRNAの切断によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制します →P.2。細胞内に導入されたsiRNAは、二本鎖のうち一本鎖（アンチセンス鎖）がRISC (RNA induced silencing complex)とよばれる複合体に取り込まれます。RISCは取り込んだRNAと相補的な配列をもつmRNAを特異的に捕捉切断し、ターゲット遺伝子の発現抑制を引き起こします。siRNAによる遺伝子発現抑制技術は、その高い特異性と簡便性から、遺伝子機能解析の一般的な手法として広く使われています。

▶ **Horizon Discovery** 社は、高度なRNA合成技術、独自開発のsiRNAデザインテクノロジー →P.14~P.16、および化学修飾技術を採用し、ノックダウン効率と特異性の高いsiRNA 製品を提供しています。

## shRNA発現用レンチウイルスベクター

shRNA (small hairpin RNA、またはshort hairpin RNA) とは、RNAiによる遺伝子発現抑制のために用いられるヘアピン型のRNA配列です →P.2。shRNAはベクターによって細胞に導入され、恒常的あるいは誘導的に発現します。通常このベクターは娘細胞に受け継がれ、遺伝子発現抑制の効果も受け継がれます。shRNAのヘアピン構造は細胞内でsiRNAへと切断され、RISCと結合します。この複合体はsiRNAと相補的な配列を持つmRNAに結合し切断します。

▶ **Horizon Discovery** 社は、shRNA専用の配列設計アルゴリズムとscaffoldを採用した独自のshRNAデザインテクノロジーにより、ノックダウン効率と特異性の高いshRNA発現用レンチウイルスベクターを提供しています。

## microRNA研究用試薬

microRNAは、細胞内に存在する短鎖のnon-coding RNA (~22 mer) で、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与しています →P.2。microRNAは細胞内ネットワークの微調整において中心的な役割をもつため、細胞生理学の基礎研究のみならず、疾患診断や治療予後のバイオマーカーとしても重要であると考えられています。

▶ **Horizon Discovery**社は、独自の化学修飾と新規な二次構造モチーフを採用し、microRNA関連の研究において有用な独自の製品を提供しています。

# Contents

■ <b>Dharmacon RNAi 研究用試薬</b> .....	2
■ <b>化学合成siRNA</b> .....	4
化学合成siRNA選択ガイド .....	4
デザイン済み化学合成siRNA / siRNAライブラリー / コントロールsiRNA / カスタムsiRNA .....	
siRNAのテクノロジー .....	14
siRNA実験ガイド .....	17
■ <b>shRNA発現用レンチウイルスベクター</b> .....	18
shRNA発現用レンチウイルスベクター 選択ガイド .....	18
■ <b>microRNA研究用試薬</b> .....	26
microRNA研究用試薬選択ガイド .....	26
■ <b>プール化レンチウイルスライブラリー</b> .....	31
■ <b>RNAi 実験関連試薬</b> .....	33
cDNA/ORFクローン選択ガイド .....	33
その他の試薬 .....	36
■ <b>製品検索・注文のご案内</b> .....	39

# 化学合成siRNA

## 化学合成siRNA選択ガイド

### siRNA実験に必要な試薬

siRNA実験では、下記の試薬が必要となります

siRNAの細胞へのトランスフェクションでは、ターゲットsiRNAの他に、ポジティブコントロールsiRNA、ネガティブコントロールsiRNA、トランスフェクション試薬のみ、培地のみ、を実験コントロールとして用います。

- siRNA (ターゲット遺伝子に対するsiRNA)
- ポジティブコントロールsiRNA
- ネガティブコントロールsiRNA
- トランスフェクション試薬 (DharmaFECT [→P.37~P.38](#) 等。  
ただし、Accell siRNAを用いる場合は不要)
- Accell siRNA delivery media (Accell siRNAを用いる場合のみ必要)

### siRNA製品の選択

配列デザイン済みのsiRNAをご希望の場合

あらかじめ配列がデザインされたsiRNAは、下記のsiGENOME、ON-TARGET*plus*、Accell、Lincodeの4種類の製品タイプがあります。単品 (チューブフォーマット) は [→P.6~P.7](#) を、スクリーニング用アレイ化ライブラリー (プレートフォーマット) は [→P.8~P.9](#) をご覧ください。コントロール製品は、各製品タイプに対応した製品をご用意しています [→P.10~P.12](#)。

#### siGENOME<sup>TM</sup> siRNA

ノックダウン効果と特異性に優れたスタンダードタイプのsiRNAです。

#### ON-TARGET*plus*<sup>TM</sup> siRNA

siGENOME siRNAのアップグレード版として、ON-TARGET*plus*修飾 [→P.16](#) を導入することでオフターゲット効果をより抑え、ターゲット遺伝子に対する特異性を向上させています。

#### Accell<sup>TM</sup> siRNA

独自の化学修飾 (Accell テクノロジー [→P.15](#)) により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できるsiRNAです。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地 (Accell siRNA delivery media) と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でもRNAi実験を可能としました。

#### Lincode<sup>TM</sup> siRNA

長鎖non-coding RNAをターゲットとするsiRNAです。

各デザイン済みsiRNAに採用されているテクノロジーを右図にまとめました。テクノロジーの詳細については [→P.14~P.16](#) をご覧ください。

必要な試薬の準備や実験手順の詳細については、“siRNA実験ガイド [→P.17](#)”を参考にしてください。

生物種	タンパク質をコードする遺伝子をターゲット			長鎖non-coding RNAをターゲット
	siGENOME	ON-TARGET <sup>plus</sup>	Accell	Lincode
	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse
SMARTselection siRNA デザイン →P.14	●	●	●	●
Seed region フィルター →P.14	●	●	●	●
SMARTpool テクノロジー →P.15	●	●	●	●
Accell テクノロジー →P.15	—	—	●	—
ON-TARGET 修飾 →P.16	●*1	—	—	—
ON-TARGET <sup>plus</sup> 修飾 →P.16	—	●	●*2	●
siSTABLE 修飾 →P.16	—	—	●*3	—
掲載ページ	→P.6	→P.6	→P.7	→P.7

\*1 約20%のsiGENOME siRNAについて、センス鎖をON-TARGET修飾しています(デザインの段階でセンス鎖由来のオフターゲットの可能性が示唆された場合のみ)。

\*2 Accell siRNAでは、ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾に類似した化学修飾により特異性を高めています。

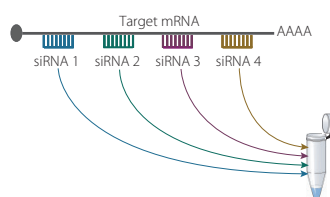
\*3 Accell siRNAでは、siSTABLE修飾に類似した化学修飾によりヌクレアーゼに対する安定性を高めています。

各デザイン済みsiRNAは、遺伝子1種類に対して、ノックダウン効果と特異性の高い4種類のsiRNAをデザインしています。これらのsiRNAは、4種類のプール、4種類のセット、1種類ごとの製品フォーマットにより提供しています。siRNAを使う実験の全体的な実験計画を考慮して選択します。各種フォーマットの製品を組み合わせる例を下記に示します。



### SMARTpool™

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAを、Pool (混合物) として1本のチューブに入れた製品です。ノックダウン効率の向上と、オフターゲット効果の低減に効果があります。(SMARTpoolテクノロジー →P.15)



#### ステップ 1

実験のはじめの段階ではSMARTpoolを用いて表現型を確認します。SMARTpoolは4種類のsiRNAからなるため、高確率で高効率にノックダウンでき、siRNAを用いる実験操作・時間を抑えられる製品です。



### Set of 4

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAをそれぞれ個別のチューブに入れ、チューブ4本で1セットとした製品です。

### Set of 4 Upgrade

Set of 4と同じ内容の製品です。同一のターゲット遺伝子に対するSMARTpoolを購入した方のための、価格を抑えたアップグレード用製品です。

※ SMARTpoolを購入せずに4種類のsiRNAの効果を個別に検討する場合はSet of 4をお使いください。

#### ステップ 2

Step 1で観察された表現型について、SMARTpoolに含まれる個々のsiRNAで確認します。配列の異なる複数のsiRNAを用いて確認することにより、実験結果の信頼性が向上します(研究内容によりオプション)。



### Individual

Set of 4フォーマットの4種類のsiRNAを、1種類(チューブ1本)ごとの個別包装とした製品です。

#### ステップ 3

特定のsiRNAを用いて、スケールアップまたは継続的な実験を行う場合は、Step 2で確認された個別のsiRNAを用いて実験を進めます(研究内容によりオプション)。

## ご自身でsiRNAの配列デザインをご希望の場合

お客様ご自身でsiRNAの配列をデザインいただく際は、弊社のWebツールであるsiDESIGN Center ([dharmacon.horizondiscovery.com/design-center/](http://dharmacon.horizondiscovery.com/design-center/)) をご活用ください。ヒト・マウス・ラット以外の生物種の遺伝子や、特定の遺伝子バリエーションをターゲットとするsiRNAの配列デザインに有用なツールです。お客様ご自身で配列デザインしたsiRNAや、各種修飾(蛍光標識やON-TARGET<sup>plus</sup>修飾、Accell修飾、*in vivo* 導入用のsiSTABLE修飾 →P.16) を導入したsiRNAの合成を承っています →P.13。詳しくはWebサイト ([dharmacon.horizondiscovery.com](http://dharmacon.horizondiscovery.com)) の「カスタムRNA合成」にアクセスしてください。

## デザイン済み化学合成siRNA

### ■ siGENOME siRNA

siGENOME siRNAは、ヒト・マウス・ラットのNCBI RefSeqデータベースに登録されている遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みsiRNAです。遺伝子ごとに、ノックダウン効果と特異性の高いsiRNAがデザインされています。4種類のsiRNAを混合したSMARTpool試薬は、高いノックダウン効率を維持しながら、オフターゲット効果を最小に抑え、ターゲット遺伝子をより確実にノックダウンします(右図)。製品形態は凍結乾燥品です。

### 特長

- ノックダウン効果と特異性に優れたスタンダードタイプのsiRNA

#### 製品ラインアップ

製品	生物種	フォーマット	容量
siGENOME	Human Mouse Rat	SMARTpool	5、10、20、50 nmol
		Set of 4 / Set of 4 Upgrade	2 × 4、5 × 4、10 × 4、 20 × 4 nmol
		Individual	2、5、10、20、50 nmol

### ■ ON-TARGET<sup>plus</sup> siRNA

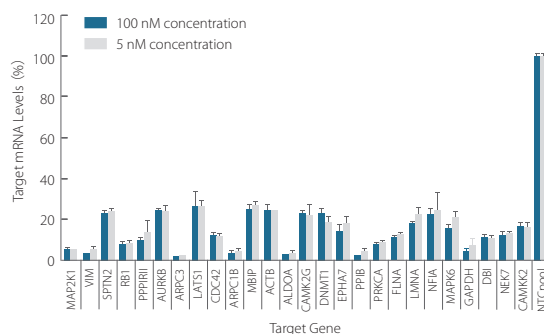
ON-TARGET<sup>plus</sup> siRNAは、ヒト・マウス・ラットのNCBI RefSeqデータベースに登録されている遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みsiRNAです。遺伝子ごとにノックダウン効果と特異性の高いsiRNAがデザインされています。siGENOME siRNAのアップグレード版として、ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾 **→P.16** を導入することでオフターゲット効果をより抑え、ターゲット遺伝子に対する特異性を向上させています。4種類のsiRNAを混合したSMARTpool試薬は、高いノックダウン効率を維持しながら、オフターゲット効果を最小に抑え、ターゲット遺伝子をより確実にノックダウンします(右図)。製品形態は凍結乾燥品です。

### 特長

- ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾によりオフターゲット効果を低減するとともにsiRNAのターゲット特異性を向上

#### 製品ラインアップ

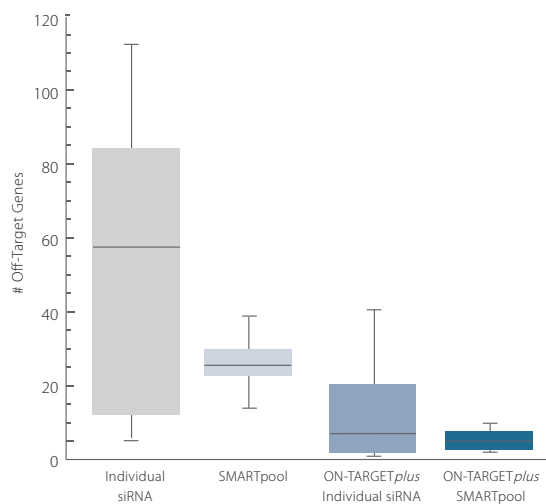
製品	生物種	フォーマット	容量
ON-TARGET <sup>plus</sup>	Human Mouse Rat	SMARTpool	5、10、20、50 nmol
		Set of 4 / Set of 4 Upgrade	2 × 4、5 × 4、10 × 4、 20 × 4 nmol
		Individual	2、5、10、20、50 nmol



#### siGENOME SMARTpool siRNAによる遺伝子ノックダウン

さまざまな遺伝子に対するsiGENOME SMARTpool siRNAの高いノックダウン効率を示しています。siRNA (5 nMおよび100 nM)は、DharmaFECT 1 **→P.37~P.38** を用いてHeLa細胞にトランスフェクションしました\*。NTCpoolはネガティブコントロール (siGENOME Non-targeting Pool#2 **→P.10**) を示します。

\* siRNA濃度5 nMにおいても高いノックダウン効果を示していますが、はじめのトランスフェクション条件検討およびノックダウン効率の確認では濃度100 nMとしてお使いください。条件が最適化された後に、ノックダウン効果が十分な範囲でsiRNAの濃度を下げる検討をおすすめします。なお、上図は5 nMにおけるノックダウン効率を保証するものではありません。



#### ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾とSMARTpoolテクノロジーによるオフターゲット効果の抑制

各種siRNA (ヒト遺伝子20種類) を用いたときのオフターゲット効果をマイクロアレイにより解析しました。発現抑制 (2倍以上) の確認されたオフターゲット遺伝子数のボックスプロットです。ボックス中の横線は中央値を示しています。ON-TARGET<sup>plus</sup> SMARTpoolでは、オフターゲット効果が最小となりました。

## ■ Accell siRNA

Accell siRNAは、ヒト・マウス・ラットのNCBI RefSeqデータベースに登録されている遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みsiRNAです。遺伝子ごとにノックダウン効果と特異性の高いsiRNAがデザインされています。Accell siRNAは独自の化学修飾により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できるsiRNAです **▶P.15**。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地であるAccell siRNA delivery media **▶P.38** と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でもRNAi実験を可能としました（右表）。トランスフェクション試薬による細胞毒性を回避でき、配列デザインと化学修飾によりオフターゲット効果を最大限抑えているため、目的の遺伝子をより特異的にノックダウンします。ヌクレアーゼ耐性修飾が導入されているため、*in vivo*実験にも有効です。製品形態は凍結乾燥品です。

### 特長

- トランスフェクション試薬不要
- 初代培養細胞、神経細胞、免疫細胞など様々な細胞へsiRNAを導入可能\*
- 容易な条件設定～トランスフェクション試薬が不要のため幅広い条件で使用可能（通常は細胞密度のみ検討）
- 低い毒性～リピッド系トランスフェクション試薬に由来する細胞毒性無し

### 製品ラインアップ

製品	生物種	フォーマット	容量
Accell	Human Mouse Rat	SMARTpool	5、10、20、50 nmol
		Set of 4 /	2 × 4、5 × 4、10 × 4、
		Set of 4 Upgrade	20 × 4 nmol
		Individual	5、10、20、50 nmol

\* すべての細胞へのAccell siRNA導入を保証するものではありません。

## ■ Lincode siRNA

Lincode siRNAは、RefSeqデータベースに登録されており、かつ、以下の基準に該当するヒト・マウス遺伝子をターゲットとするデザイン済みsiRNAです。製品形態は凍結乾燥品です。

### Lincode siRNAがターゲットとするヒト・マウス遺伝子の基準：

- 1) 200 ヌクレオチド以上の長さを持つこと
- 2) NR\_あるいはXR\_で始まるRefSeqアクセッション番号を少なくとも1つ持つこと
- 3) Long non-coding RNA (lncRNA) あるいはmiscellaneous RNAに指定されていること（ただし、tRNA、rRNA、snoRNAなどは除く）

### 特長

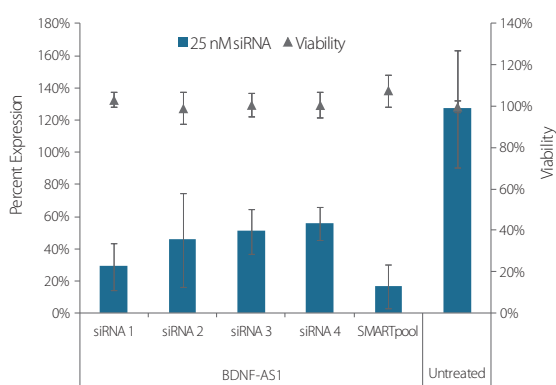
- ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾によりオフターゲット効果を低減するとともにsiRNAのターゲット特異性を向上

### 製品ラインアップ

製品	生物種	フォーマット	容量
Lincode	Human Mouse	SMARTpool	5、10、20、50 nmol
		Set of 4	2 × 4、5 × 4、10 × 4、20 × 4 nmol
		Individual	2、5、10、20、50 nmol

### Accell siRNAで発現抑制が確認されている細胞

ARPE-19 (human retinal epithelial cells)	Bone marrow cells
BxPC3 (pancreatic tumor cell lines)	Bronchial smooth muscle cells (BSMC)
C1 tumor derived cells	Cardiomyocytes
Caco-2 (colon colorectal adenocarcinoma)	CD4+ primary human T cells
E18 (Rat cortical neurons)	CD14+ primary monocytes
GH3 (rat somatolactotrophs pituitary cell line)	Cerebellar granule neurons (CGN)
H9 stem cell lines	Cortical neurons
HCT-116 (colorectal carcinoma)	Endometrial cells
HUVEC	Endothelial cells
JJN3 (plasma cell leukemia)	Extravillous trophoblasts (EVT)
MEC1 (human chronic B cell leukemia)	Hepatocytes
MN-1 (mouse motor neuron)	Immortalized B cells
MS1 (mouse pancreatic islet endothelia cells)	Keratinocytes
NOD CD4+CD25- splenic cells	Lymphocytes
OVCA 420 (ovarian carcinoma)	Macrophages
PGA-1 (lymphocytic leukemia B cell line)	Mantle cell lymphoma cells (MCL)
RAW264.7 macrophages	Monocytes
SHSY5Y (neuroblastoma)	Mouse embryonic fibroblasts (MEF)
SNB19 (glioma)	Natural killer (NK) cell line
T47D (ductal breast epithelial tumor cell line)	Neurons (primary rat)
T98 (glioma)	Oligodendrocyte precursors
THP-1 monocytes	Pancreatic tumor cell lines
U266 (peripheral blood B lymphocyt myeloma)	Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)
U937 (leukemic monocyte lymphoma)	Vascular smooth muscle cells (VSMC)
β-islet cells	



### Lincode siRNAは長鎖non-coding RNAの効率的なノックダウンを実現

hNDF1細胞において、長鎖Non-coding RNAの一種であるBDNFAS1 RNAをLincode siRNA（最終濃度25 nM）を用いてノックダウンしました。定量PCRにより測定したBDNFAS1 RNA発現量は、Non-targeting Control siRNAに対して標準化しました。Viabilityはresazurinアッセイを用いて評価しました。SMARTpoolフォーマットの製品の使用により、最も高いノックダウン効果が得られました。

## siRNAライブラリー

siRNAライブラリーは、デザイン済みsiRNAをプレートに分注した製品です。各siRNAをそれぞれ細胞に導入し、表現型の変化を検出することで、生命現象のプロセスに關与する遺伝子を迅速に同定することができます。siRNAライブラリーを使ったsiRNAスクリーニングは、細胞内パスウェイの解析・遺伝子の機能解析・創薬ターゲット分子の探索などで活用されています。

### siRNAライブラリーを用いたスクリーニングの流れ

スクリーニング実験に先立ちアッセイ系の至適化を行います。1次スクリーニングでは、ターゲット遺伝子を確実にノックダウンできるSMARTpoolフォーマット製品が有用です。2次スクリーニングでは、SMARTpoolを使うと同時にSet of 4フォーマット製品を用いてヒットの検証を行います。



### コレクションライブラリー

siRNAコレクションライブラリーは、デザイン済みsiRNAを遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類した製品です。siGENOME siRNA [▶P.6](#)、ON-TARGETplus siRNA [▶P.6](#)、Accell siRNA [▶P.7](#)、Lincode siRNA [▶P.7](#) の4種類の製品ラインアップがあり、それぞれSMARTpool [▶P.5](#) と Set of 4 [▶P.5](#) の2種類の製品フォーマットがあります。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 特長

- デザイン済みsiRNAをプレートに分注したライブラリー
- 遺伝子ファミリーおよびパスウェイごとに分類したコレクションライブラリー
- siGENOME、ON-TARGETplus、Accell、Lincode siRNA の4種類の製品ラインアップ
- SMARTpoolあるいはSet of 4フォーマット

### 製品ラインアップ (siGENOME、ON-TARGETplus、Accell)

コレクション	Human			Mouse		
	siGENOME	ON-TARGETplus	Accell	siGENOME	ON-TARGETplus	Accell
Apoptosis	446	558	—	289	535	—
Cell cycle regulation	169	131	—	105	128	—
Cytokine receptors	116	116	—	158	—	—
Deubiquitinating enzymes	98	98	—	260	126	—
DNA damage response	240	240	—	—	—	—
Drug targets*1	~4,700	~4,700	~4,700	~7,100	~5,100	—
Druggable genome*2	~7,500	~7,500	~7,500	~10,000	~6,400	—
Epigenetics	463	463	—	—	—	—
G Protein-Coupled Receptors (GPCR)	390	390	390	515	571	—
Ion channels	349	349	347	340	335	—
Membrane trafficking	140	140	—	113	—	—
Nuclear receptors	52	52	—	46	—	—
Phosphatases	256	254	257	273	220	—
Proteases	480	478	480	540	—	—
Protein kinases	712	709	714	715	742	652
Serine Proteases	143	—	—	123	—	—
Transcription Factors	1,529	—	—	1,440	—	—
Tyrosine kinases	85	88	—	85	—	—
Ubiquitin conjugation subset #1	89	88	89	80	82	—
Ubiquitin conjugation subset #2	115	115	115	104	109	—
Ubiquitin conjugation subset #3	396	386	396	339	351	—
Whole genome	~18,000	~18,000	—	~19,000	—	—

\* 表中の数字は、各コレクションライブラリーに含まれるsiRNAターゲット遺伝子数を表します。参照データベースの変更等により、遺伝子数や製品構成は変更になる場合があります。

\*1 アポトーシス、老化、DNA修復、オートファジー、核酸結合に關連する遺伝子や核内レセプター遺伝子などをターゲットとするsiRNAをまとめたコレクションです。

\*2 Drug targetコレクションライブラリーに、GPCR、Ion channel、Phosphatase、Protease、Protein kinase、Ubiquitin conjugation subset #1~#3の8つのコレクションライブラリーをプラスした製品です (ただし、Mouse ON-TARGETplus Druggable genomeコレクションライブラリーは、Drug targetコレクションライブラリーに、GPCRおよびProtein Kinaseの2つのコレクションライブラリーをプラスした製品です)。



## 製品ラインアップ (Lincode)

製品	生物種	ターゲット遺伝子数	フォーマット	容量
Human Lincode siRNA Library - NR IncRNA RefSeq v65	Human	3,430	SMARTpool Set of 4	0.1、0.25、0.5 nmol
Mouse Lincode siRNA Library - NR IncRNA RefSeq v65	Mouse	1,997	SMARTpool Set of 4	0.1、0.25、0.5 nmol

※ NCBI RefSeqのバージョンおよびターゲット遺伝子数は変更になる場合があります。

## ■ Cherry-pick RNAi ライブラリー

お客様のユニークな実験に対応するカスタムのRNAiライブラリーを作成するサービスです。Cherry-pick Library Loader<sup>※</sup>を使用して、ヒト・マウス遺伝子をターゲットとするデザイン済みsiRNAおよびmicroRNA研究用試薬を、最少20ウェルから96ウェルプレートにレイアウトできます(384ウェルプレートの場合、最少40ウェルから)。小容量包装のため、コストを抑えたRNAi実験が可能です。製品形態は凍結乾燥品です。

## 特長

- 目的の遺伝子を自由に選択可能
- ニーズに合ったRNAi製品とコントロール製品を選択可能
- 遺伝子当たりのコストを抑えたRNAi 実験を実現

## 製品ラインアップ

製品	製品タイプ	生物種	フォーマット	容量
Cherry-pick RNAi ライブラリー	siGENOME ON-TARGET <sup>plus</sup> Accell Lincode	Human Mouse	SMARTpool 1~4個のIndividual	0.1、0.25、0.5、1、2 nmol
	miRIDIAN microRNA Mimic miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor	Human Mouse	Mimic Hairpin Inhibitor	0.1、0.25、0.5、1、2 nmol



## Cherry-Pick RNAi ライブラリー作成の手順

1. ご希望のsiRNAまたはmicroRNAの遺伝子検索キーワードの読み込み
  - NCBI Gene IDまたはGene Symbol
  - Accession numberまたはmiRBase mature name
  - Dharmacon製品カタログ番号
2. 正しい製品と遺伝子が選択されているかを確認
3. 製品タイプとフォーマットを選択
4. 容量、コントロール、レプリケートの数、プレートレイアウトを設定

### ※ Cherry-pick Library Loader

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みsiRNAおよびmicroRNA研究用試薬を注文いただくWebツールです。詳しくはWebサイト ([dharmacon.horizondiscovery.com](http://dharmacon.horizondiscovery.com)) の [dharmacon.horizondiscovery.com/libraryimport/](http://dharmacon.horizondiscovery.com/libraryimport/) にアクセスしてください。

## コントロールsiRNA

### ■ siGENOME ポジティブコントロールsiRNA

siGENOME siRNAを用いた実験において、トランスフェクション条件の検討やsiRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインナップ

製品	製品説明	生物種	容量
siGENOME Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human、 Mouse、Rat	5、20、 50 nmol
siGENOME GAPD Control siRNA	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human	
siGENOME Lamin A/C Control siRNA	Lamin A/Cをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human、 Mouse、Rat	

### ■ siGENOME ネガティブコントロールsiRNA

siGENOME siRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインナップ

製品	製品説明	生物種	容量
siGENOME Non-targeting siRNA #1～#5 <sup>*1</sup>	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列のsiRNA	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
siGENOME Non-targeting siRNA Pool #1～#2 <sup>*2</sup>	siGENOME Non-targeting siRNA #1～#5のうち4種類の混合物 (Pool)		
siGENOME RISC-Free Control siRNA	化学修飾によりRISCに取り込まれないようにしたsiRNAです。RNAiのメカニズムとは別に、リピッドトランスフェクション試薬-siRNA複合体の細胞への影響について解析を行うときに有用です。		

\*1 siGENOME Non-targeting siRNA #1ではアッセイ方法や細胞種によりEGFR mRNA (NM\_005228) が50%程度ノックダウンされることがあります。siGENOME Non-targeting siRNA #2および#4はホタルルシフェラーゼ (U47296) をターゲットとしており、ヒト・マウス・ラットの細胞ではネガティブコントロールとして、またホタルルシフェラーゼに対するポジティブコントロールとして使用できます。

\*2 siGENOME Non-targeting siRNA Pool #1はNon-targeting siRNA #1～#4の混合物です。siGENOME Non-targeting siRNA Pool #2はNon-targeting siRNA #2～#5の混合物です。

### ■ ON-TARGET<sup>plus</sup> ポジティブコントロールsiRNA

ON-TARGET<sup>plus</sup> siRNAを用いた実験において、トランスフェクション条件の検討やsiRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインナップ

製品	製品説明	生物種	容量
ON-TARGET <sup>plus</sup> Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
ON-TARGET <sup>plus</sup> Cyclophilin B Control Pool	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		
ON-TARGET <sup>plus</sup> GAPD Control siRNA	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA		
ON-TARGET <sup>plus</sup> GAPD Control Pool	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		

### ■ ON-TARGET<sup>plus</sup> ネガティブコントロールsiRNA

ON-TARGET<sup>plus</sup> siRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインナップ

製品	製品説明	生物種	容量
ON-TARGET <sup>plus</sup> Non-targeting siRNA #1～#4	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列のsiRNA	Human、 Mouse、Rat	5、20、 50 nmol
ON-TARGET <sup>plus</sup> Non-targeting Pool	ON-TARGET <sup>plus</sup> Non-targeting siRNA #1～#4の混合物 (Pool)		

## ■ Accell ポジティブコントロールsiRNA

Accell siRNAのトランスフェクション条件の検討やsiRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
Accell Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
Accell Cyclophilin B Control Pool	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		
Accell GAPD Control siRNA	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA		
Accell GAPD Control Pool	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		
Accell Green Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin B をターゲットとし、ノックダウン確認済みの6-FAM 蛍光標識siRNA (Abs 494 nm、Em 520 nm)		
Accell Red Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin B をターゲットとし、ノックダウン確認済みのDY-547 蛍光標識siRNA (Abs 557 nm、Em 570 nm)		
Accell eGFP Control siRNA	eGFPをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA		
Accell eGFP Control Pool	eGFPをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		

## ■ Accell ネガティブコントロールsiRNA

Accell siRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は凍結乾燥品です。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
Accell Non-targeting siRNA #1~#4	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列のsiRNA	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
Accell Non-targeting Pool	Accell Non-targeting siRNA #1~#4の混合物 (Pool)		
Accell Green Non-targeting siRNA	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列の6-FAM 蛍光標識siRNA (Abs 494 nm、Em 520 nm)		
Accell Red Non-targeting siRNA	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列のDY-547 蛍光標識siRNA (Abs 557 nm、Em 570 nm)		

## ■ Accell コントロールsiRNAキット

Accell siRNAの評価に便利なポジティブコントロール、ネガティブコントロール、専用培地、バッファー試薬をセットにしたキットです。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
Accell Control siRNA Kits (Green)	ポジティブコントロール (2種: Cyclophilin B Control siRNA、GAPD Control siRNA)、ネガティブコントロール (2種: Non-targeting siRNA #1、Green Non-targeting siRNA)、Accell siRNA delivery media、5x siRNA Bufferのセット	Human Mouse Rat	ポジティブコントロール: 5 nmol、ネガティブコントロール: 5 nmol、Accell siRNA delivery media: 100 mL、5x siRNA Buffer: 1.5 mL
Accell Control siRNA Kits (Red)	ポジティブコントロール (2種: Cyclophilin B Control siRNA、GAPD Control siRNA)、ネガティブコントロール (2種: Non-targeting siRNA #1、Red Non-targeting siRNA)、Accell siRNA delivery media、5x siRNA Bufferのセット		

## ■ Lincode ポジティブコントロールsiRNA

Lincode siRNAを用いた実験において、トランスフェクション条件の検討やsiRNA実験の結果の評価に使用します。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
Lincode GAS5 Control siRNA	GAS5をターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human	5、20、50 nmol
Lincode GAS5 Control Pool	GAS5をターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA混合物 (Pool)		

## ■ Lincode ネガティブコントロールsiRNA

Lincode siRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
Lincode Non-targeting siRNA #1~#4	ヒト・マウス・ラットの長鎖non-coding RNAおよびタンパク質をコードする転写産物に対して、3か所以上のミスマッチを持つようにデザインされているsiRNA	Human Mouse Rat	5、20、50 nmol
Lincode Non-targeting siRNA Pool	Lincode Non-targeting siRNA #1~#4の混合物 (Pool)		

## ■ siGLO™ 蛍光標識ポジティブコントロールsiRNA

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
siGLO Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin B をターゲットとし、ノックダウン確認済みのDY-547蛍光標識siRNA (Abs 557 nm, Em 570 nm)	Human Mouse Rat	5、20、50 nmol
siGLO Lamin A/C siRNA	Lamin A/Cをターゲットとし、ノックダウン確認済みのDY-547蛍光標識siRNA (Abs 557 nm, Em 570 nm)		
siGLO RISC-Free Control siRNA	化学修飾によりRISCに取り込まれないようにしたDY-547蛍光標識siRNAです (Abs 557 nm, Em 570 nm)。RNAiのメカニズムとは別に、リビッドトランスフェクション試薬：siRNA複合体の細胞への影響について解析を行うときに有用です。		
siGLO Green Transfection Indicator*	細胞導入後に核に移行する性質をもつため、細胞導入の確認が容易な6-FAM蛍光標識siRNAです (Abs 494 nm, Em 520 nm)。ターゲットsiRNAと共にトランスフェクションして使用可能です。		
siGLO Red Transfection Indicator*	細胞導入後に核に移行する性質をもつため、細胞導入の確認が容易なDY-547蛍光標識siRNAです (Abs 557 nm, Em 570 nm)。ターゲットsiRNAと共にトランスフェクションして使用可能です。		

\* 細胞株やトランスフェクション条件によっては核に移行しない場合があります (核に移行することを保証するものではありません)。

## ■ siSTABLE™ コントロールsiRNA

siSTABLE修飾siRNAを用いた実験において、トランスフェクション条件の検討やターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
siSTABLE Cyclophilin B Control siRNA	Cyclophilin Bをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Human Mouse	5、20、50 nmol
siSTABLE GAPD siRNA	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのsiRNA	Mouse	
siSTABLE Non-targeting siRNA #1	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子配列と類似しない配列のsiRNA	Human、 Mouse、Rat	

## カスタムsiRNA

お客様自身で配列デザインしたsiRNAや、各種修飾（蛍光標識やON-TARGET $plus$ 修飾、Accell修飾、*in vivo*導入用のsiSTABLE修飾 **▶P.16**）を導入したsiRNAの合成を承っています。詳しくはWebサイト ([dharmacon.horizondiscovery.com](http://dharmacon.horizondiscovery.com)) の「カスタムRNA合成」にアクセスしてください。

siRNAの配列を設計いただく際は、弊社のWebツールであるsiDESIGN Center ([dharmacon.horizondiscovery.com/design-center/](http://dharmacon.horizondiscovery.com/design-center/)) をご活用ください。ヒト・マウス・ラット以外の生物種の遺伝子や、特定の遺伝子バリエーションをターゲットとするsiRNAの配列デザインに有用なツールです。

### 特長

- 各種化学修飾 (ON-TARGET、ON-TARGET $plus$ 、Accell、siSTABLE) を選択可能
- 5'末端、3'末端にさまざまな修飾 (下表) を導入可能
- 合成後の処理は5種類のオプションから選択
- 小容量 (15 nmolスケール) から大容量までのカスタム合成に対応

### 修飾\*1

5'修飾		3'修飾	
5'-Amino modifier C12	5'-dU	3'-Biotin	3'-Amino modifier C3
5'-Amino modifier C3	5'-Dabcyl	3'-Cholesterol	3'-Puromycin
5'-Amino modifier C5	5'-Disulfide Thiol-Modifier	3'-dG	3'-Disulfide-thiol modifier
5'-Amino modifier C6	5'-DY547 (Cy3 alternate)	3'-Fluorescein	
5'-Biotin	5'-DY647 (Cy5 alternate)	3'-TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine)	
5'-Cholesterol	5'-DY677 (Cy5.5 alternate)	3'-Cy3	
5'-Cy3	5'-Fluorescein	3'-Cy5	
5'-Cy5	5'-inverted deoxy-thymidine	3'-Cy5.5	
5'-Cy5.5	5'-Phosphate	3'-DY547 (Cy3 alternate)	
5'-dA	5'-Pyrene	3' Inverted deoxy-thymidine	
5'-dC	5'-TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine)	3'-Amino modifier C12	
5'-dG	5'-TET (Tetrachloro-fluorescein)	3'-Amino modifier C6	

### 合成後の処理オプション

	Single Strands (A1)	Standard (A4)	HPLC	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i> HPLC
エタノール沈殿あるいは逆相カラムによる脱塩処理	—	●	●	●	●
RNAは2'-ACE保護基を除去した状態	—	●	●	●	●
アニーリング (2本のRNAがアニーリングされ2本鎖になっています)	—	●	●	●	●
精製	—	—	●*2	—	●*2
エンドキシンテスト	—	—	—	●	●
カウンターイオン交換 (Na <sup>+</sup> )	—	—	—	●	●
RNAは2'-ACE保護基の付いた状態	●	—	—	—	—
RNAはセンス鎖とアンチセンス鎖を別々のチューブで提供	●	—	—	—	—

### 製品ラインアップ

製品	合成スケール
カスタムsiRNA	15 nmol ~

\*1 その他の修飾基についてはDharmacon専用Webサイト ([dharmacon.horizondiscovery.com](http://dharmacon.horizondiscovery.com)) をご覧ください。

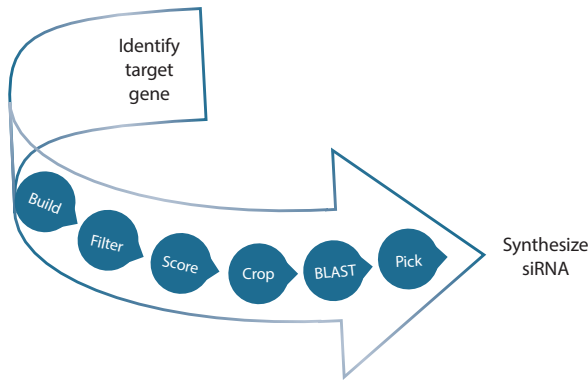
\*2 イオン交換HPLCにより精製しています。

# siRNAのテクノロジー

## SMARTselection™ siRNAデザイン

### 先進の配列デザインテクノロジー

効果的な遺伝子サイレンシングを実現するためには、siRNAの機能性と特異性に関する総合的な理解に基づいた配列デザインが重要です\*1。SMARTselectionは独自に開発した数多くのステップからなる配列デザインアルゴリズムで、機能性・特異性の高い製品配列デザインを実現します。



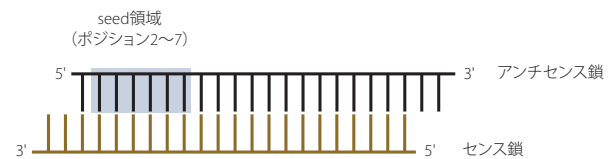
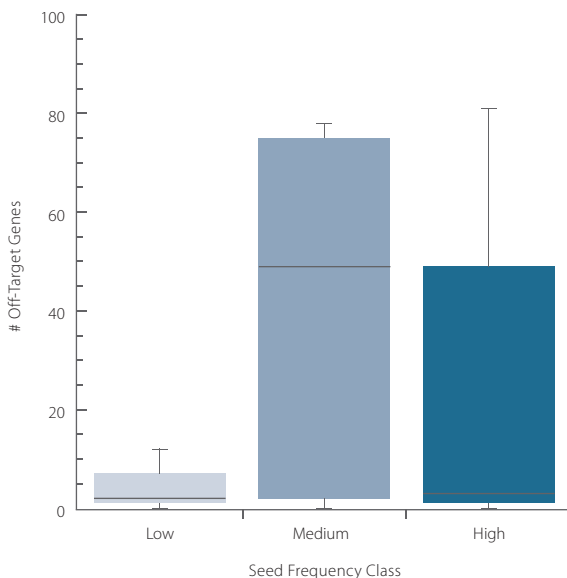
#### SMARTselectionテクノロジーによるsiRNAデザインワークフロー

- **Build** ターゲット遺伝子に対する19 merの配列領域の候補リストを作成
- **Filter** 機能・特異性に問題のある候補 (SNP、毒性、microRNA類似 seedモチーフなど) をフィルターで除去
- **Score** 独自のアルゴリズムによるスコアリング (高いスコア; ノックダウン効果が高い可能性)
- **Crop** スコアの低い候補をリストから削除
- **Blast** センス・アンチセンス両鎖の配列相同性を確認 (必要に応じてセンス鎖をON-TARGET修飾)
- **Pick** 独自の判定基準により候補リストから4つの配列を選択

## Seed regionフィルター

### 先進の配列デザインテクノロジー

Seed regionフィルターは、Dharmacon研究開発スタッフらによる、オフターゲット効果に関する最新の研究成果に基づくデザインアルゴリズムです\*2, 3。siRNAのseed領域 (アンチセンス鎖のポジション2~7) が、mRNAの3'-UTRに対してmicroRNAと類似した相互作用をすることに起因するオフターゲット効果を可能な限り排除します。



#### Seed領域配列の出現頻度とオフターゲット効果の関係

Seed領域配列の3'-UTRにおける出現頻度が低 (Low)、中 (Medium)、高 (High) の各5つのsiRNAをそれぞれHeLa細胞に導入し、オフターゲット効果についてマイクロアレイを用いて解析しました。Seed領域の頻度が低いsiRNAは、頻度が中または高いsiRNAと比べて、オフターゲット効果のみられる遺伝子の数が著しく低い傾向にありました。siRNAの配列は、ポジション1および8~19は一定とし、seed領域 (ポジション2 - 7) のみ変えました。

《HeLa細胞における出現頻度》

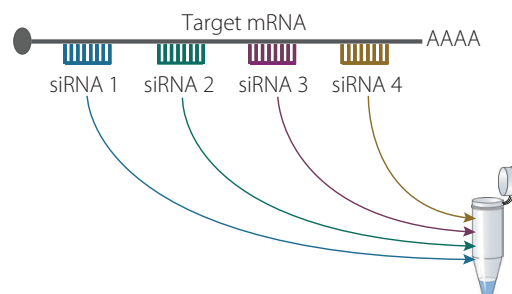
- Low : <350
- Medium : 2500 -2800
- High : >3800

\*1 Birmingham A, et al. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. Nat Protoc. 2007;2:2068-78.  
 \*2 Birmingham A, et al. 3'-UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off targets. Nat Method. 2006;3:199-204.  
 \*3 Anderson EM, et al. Experimental validation of the importance of seed frequency to siRNA specificity. RNA. 2008;14:853-61.

## SMARTpool™ テクノロジー

### ノックダウンをより確実にし、オフターゲット効果をより低減

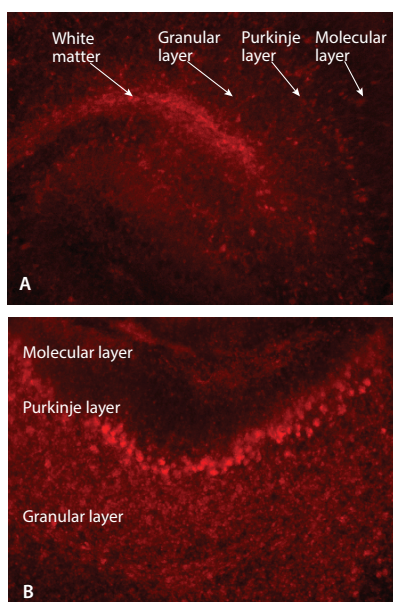
ターゲットmRNA上の異なる4か所の配列部位に対してそれぞれデザインした、4種類のsiRNAをpool (混合) する技術です。個々のsiRNAが変異遺伝子や未知SNP部分をターゲットとした場合には、他のsiRNAがそれを補います。1度の実験でより確実なノックダウンを実現でき、実験に要する手間を低減します。また、PoolすることによりsiRNA1種類あたりの実濃度を低くできるため、オフターゲット効果の低減にも効果的です。



## Accell テクノロジー

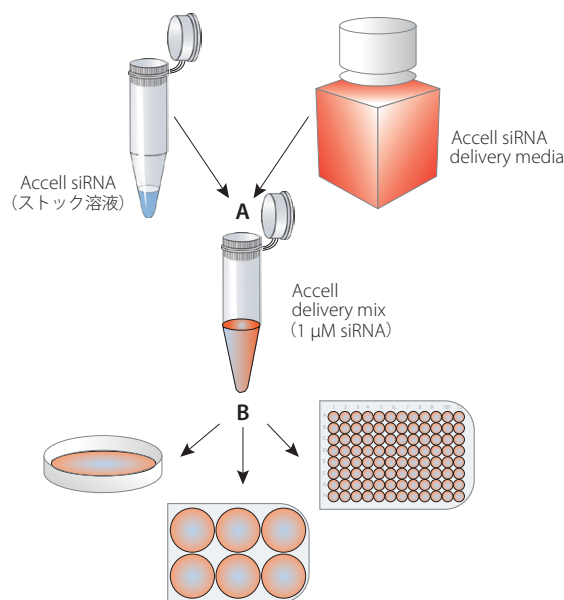
### トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入

Accell siRNAは独自の化学修飾により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できる新しいタイプのsiRNAです。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地 (Accell siRNA delivery media →P.38) と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でもRNAi実験を可能としました。また、トランスフェクション試薬に起因する細胞毒性を回避することができます。Accell siRNAは、トランスフェクション試薬によるsiRNA導入の困難な細胞においても導入が確認されています。詳しくは →P.7 をご覧ください。



### 小脳切片におけるAccell siRNAの導入確認

マウス小脳切片へAccell Red Non-targeting siRNA導入3時間 (A) および72時間後 (B) に蛍光顕微鏡により観察しました (シャッター時間は150 ms)。Accell siRNAの取り込みは、投与から3時間後に確認されました。最も強い蛍光シグナルは、プルキンエ細胞および顆粒細胞層において観察されました。72時間の培養により小脳切片における蛍光シグナルはより強くなったことから、培養時間の延長はAccell siRNA導入効率を上げることが分かりました。



### Accell siRNAの使用方法

- A Accell siRNAとAccell siRNA delivery mediaを混合
- B 培地をAccell delivery mixと置き換え72時間培養

## ON-TARGET 修飾

### センス鎖由来のオフターゲット効果を低減

ON-TARGET修飾はセンス鎖に対する独自の化学修飾です。センス鎖とRISCの相互作用を妨げる修飾を行うことにより、RISCはセンス鎖を取り込むことなく、アンチセンス鎖とのみ複合体を形成するようになります。センス鎖がRISCに取り込まれることに起因するオフターゲット効果が抑制されます。

## ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾

### センス鎖、アンチセンス鎖由来のオフターゲット効果を低減

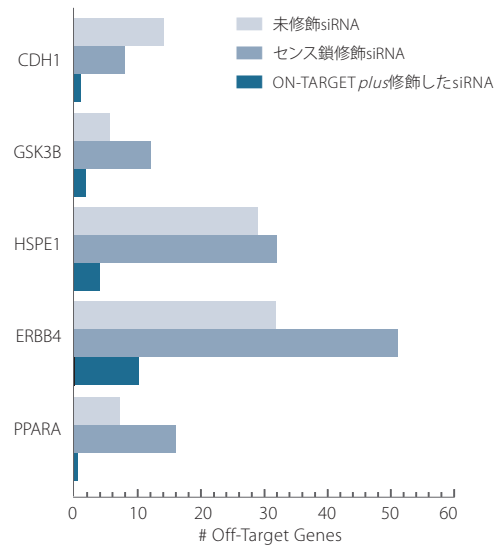
ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾は、センス鎖とアンチセンス鎖の両鎖に対する独自の化学修飾です。オフターゲット効果を抑えるとともに、ターゲット遺伝子に対する特異性を高めます。

#### センス鎖

RISCとの相互作用を妨げる修飾により、センス鎖がRISCに取り込まれることに起因するオフターゲット効果が抑えられます。

#### アンチセンス鎖

RISCに取り込まれたアンチセンス鎖がターゲットmRNAを認識する際に、より厳密な相補性が必要となる化学修飾により、ターゲット遺伝子に対する特異性が高められます。



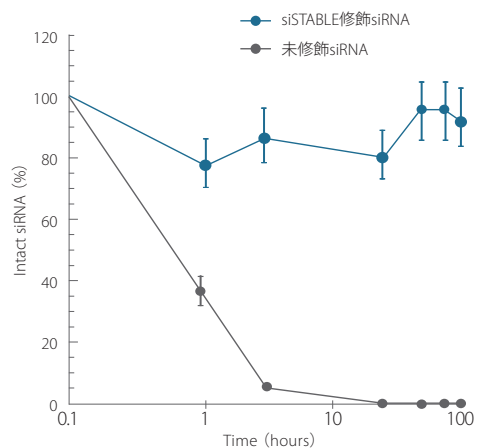
### ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾によるオフターゲット効果の低減

各ターゲット遺伝子について、未修飾、センス鎖修飾、ON-TARGET<sup>plus</sup>修飾したsiRNAを用い、発現抑制（2倍以上）が確認されたオフターゲット遺伝子の数を示しています。

## siSTABLE 修飾

### in vivo実験用に安定性を向上

siSTABLE修飾は、ヌクレアーゼに対する安定性を高める化学修飾です。通常のsiRNAは血清中での安定性が不十分のためin vivo実験には不向きですが、siSTABLE修飾されたsiRNAは血清中での安定性が大幅に向上するため、in vivo実験に適しています。同時にセンス鎖に対する修飾が施されるため、センス鎖由来のオフターゲット効果が低減されます。



### siSTABLE修飾による安定性の向上

ヒト血清（100%）中におけるsiSTABLE修飾siRNAと未修飾siRNAの安定性の比較を示しています。



# siRNA実験ガイド

## 準備

siRNA実験では、下記の試薬が必要となります。

- siRNA (ターゲット遺伝子に対するsiRNA) ● ポジティブコントロールsiRNA ● ネガティブコントロールsiRNA
- トランスフェクション試薬 (DharmaFECT [⇒P.37~P.38](#) 等。ただし、Accell siRNA を用いる場合は不要)
- Accell siRNA delivery media (Accell siRNAを用いる場合のみ必要)

siRNAの細胞へのトランスフェクションでは、ターゲットsiRNAの他に、ポジティブコントロールsiRNA、ネガティブコントロールsiRNA、トランスフェクション試薬のみ、培地のみ、を実験コントロールとして用います。下記の表を参考にして、実施する実験回数に十分なsiRNA包装容量を選択してください。

siGENOME/ON-TARGET <sup>plus</sup> siRNA濃度100 nMの場合の導入回数 (ピペティングロスがない場合)			
nmol	96-well plate (100 $\mu$ L/well)	24-well plate (500 $\mu$ L/well)	12-well plate (1,000 $\mu$ L/well)
2	200	40	20
5	500	100	50
10	1,000	200	100
20	2,000	400	200

Accell siRNA濃度1 $\mu$ Mの場合の導入回数 (ピペティングロスがない場合)			
nmol	96-well plate (100 $\mu$ L/well)	24-well plate (500 $\mu$ L/well)	12-well plate (1,000 $\mu$ L/well)
2	20	4	2
5	50	10	5
10	100	20	10
20	200	40	20

## 方法

製品プロトコルは、Webサイト ([www.horizondiscoverykk.com/](http://www.horizondiscoverykk.com/)) の「製品マニュアル」よりご覧ください。

- siRNAの再溶解：siRNA/microRNA試薬再溶解プロトコル
- DharmaFECTによるトランスフェクション：DharmaFECTを用いた一般的なトランスフェクション法
- Accell siRNAの細胞導入：Accell siRNA 導入プロトコル

## 実験

siRNA実験ではトランスフェクション条件が最も重要です。詳しくは製品プロトコル、文献等をご参照ください。

### 1 siRNAの再溶解

各種siRNAは乾燥状態で出荷されます。使用に際してはsiRNA再溶解プロトコルに従い、siRNA Bufferなどで溶解します。分光光度計により吸光度を測定し、ストック溶液の濃度を求めます。

### 2 トランスフェクション条件の至適化

トランスフェクション試薬を使う場合 (siGENOME、ON-TARGET<sup>plus</sup> siRNA)

- はじめにお使いの細胞へのトランスフェクション効率を最大となるように、トランスフェクション条件の至適化を行います。トランスフェクション効率は、ポジティブコントロールsiRNAを用い、その対象遺伝子のノックダウン効率から見積もります。
- ノックダウン効率は定量PCRなどによりmRNAレベルで評価します (PCR用プライマーはsiRNAがターゲットとする配列を挟む配列とすることが推奨されます)。
- 条件検討ではノックダウン効率と細胞生存率を評価して、トランスフェクション試薬の種類と量、細胞密度、トランスフェクション時間を検討します。
- トランスフェクション試薬の種類と量と細胞密度は、「DharmaFECTを用いた一般的なトランスフェクション法」を初期条件の目安として周辺条件を検討します。
- トランスフェクション時間・・・24時間および48時間  
おおよその条件が決まったら、研究対象の遺伝子に対する

siRNAを同時に用いて確認します。この段階の検討では100 nM siRNAを用います。

### Accell siRNAを使う場合

Accell siRNAの場合は、1  $\mu$ M siRNAを用いてトランスフェクション条件を至適化します。ノックダウン効率と細胞生存率を評価して、細胞密度とトランスフェクション時間を検討します。トランスフェクション時間は48時間、72時間、96時間を検討します。事前にAccell siRNA delivery mediaを用いてお使いの細胞を培養し、mediaの影響を確認することをおすすめします。培地には必要に応じて低濃度の血清、添加剤等を加えることができます。

### 3 siRNA濃度の至適化

次に、研究対象の遺伝子に対するsiRNAの濃度を、ノックダウン効率が十分な範囲で下げる検討をします。ノックダウン効率、細胞生存率、アッセイへの影響等を考慮してsiRNA濃度を決めます。

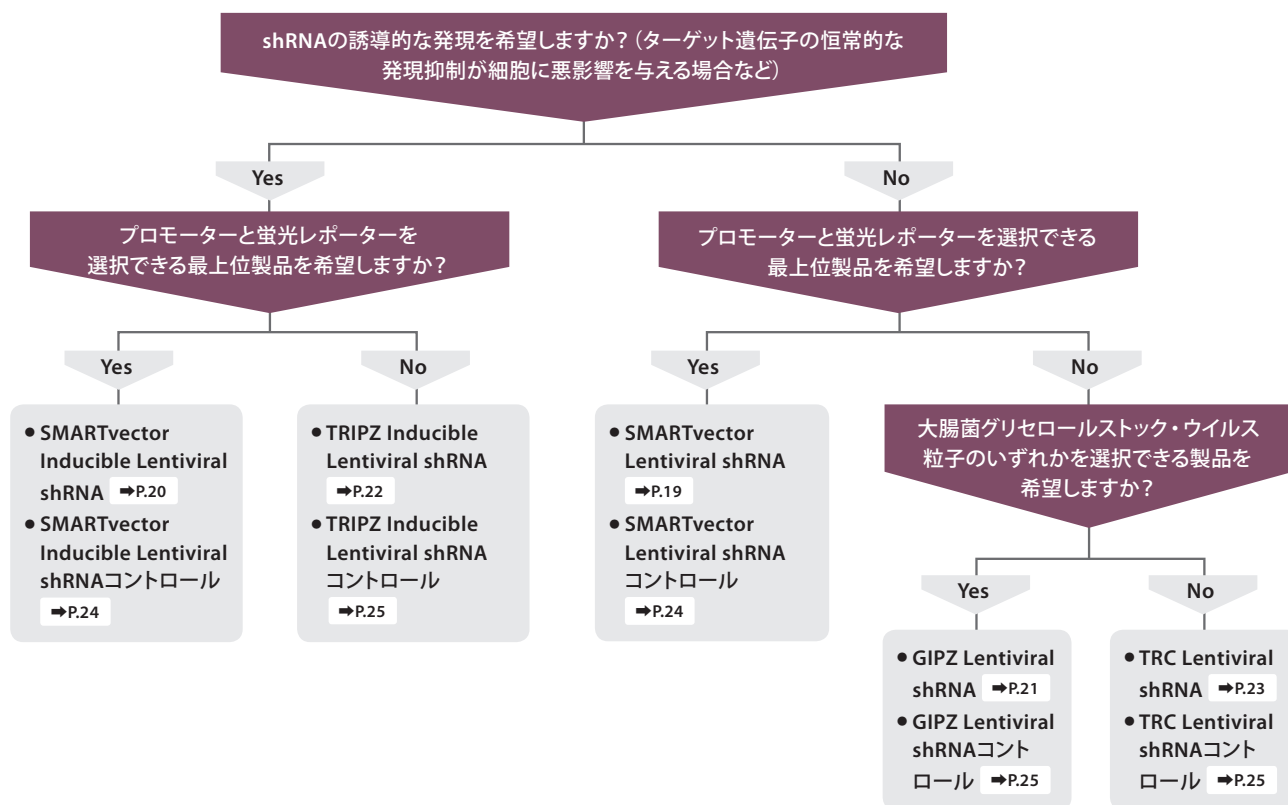
### 4 アッセイ

目的の実験 (アッセイ) を行います。ウェスタンブロットング等によりタンパク質レベルで検出する場合、mRNAレベルで検出される発現抑制よりも、抑制の程度が低く検出されることがあります (siRNAの発現抑制はmRNAレベルのため)。このときはトランスフェクション時間を72時間、96時間と延ばすことにより抑制効果を高められる場合があります。

# shRNA発現用レンチウイルスベクター

## shRNA発現用レンチウイルスベクター 選択ガイド

shRNA 発現用レンチウイルスベクター



### shRNA発現用レンチウイルスベクターの比較

	SMARTvector Lentiviral shRNA	SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA	GIPZ Lentiviral shRNA	TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA	TRC Lentiviral shRNA
生物種	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse	Human	Human/Mouse
shRNAの種類	microRNAベース <sup>*1</sup>				シンプルヘアピン型
プロモーター	7種類から選択	4種類から選択	Human CMV Pol II	TRE min-CMV	U6 Pol III
蛍光レポーター	TurboGFP/TurboRFP/無し	TurboGFP/TurboRFP	TurboGFP	TurboRFP	—
shRNA発現の誘導性	—	●	—	●	—
製品形態	● 高力価ウイルス粒子 <sup>*2</sup> ● 大腸菌グリセロールストック <sup>*3</sup>	● 高力価ウイルス粒子 <sup>*2</sup> ● 大腸菌グリセロールストック <sup>*3</sup>	● 高力価ウイルス粒子 <sup>*2</sup> ● 大腸菌グリセロールストック <sup>*3</sup> ● Starter Kit <sup>*4</sup>	● 大腸菌グリセロールストック <sup>*3</sup> ● Starter Kit <sup>*4</sup>	● 大腸菌グリセロールストック <sup>*3</sup>
掲載ページ	→P.19	→P.20	→P.21	→P.22	→P.23

\*1 microRNAベースのshRNAは、Drosha/Dicerによるプロセッシングを正確に受けるため特異的な遺伝子発現抑制が可能で、また、シンプルヘアピン型のshRNAに比べて細胞毒性が低いことが示唆されています (McBride et al., Beer et al.)。

\*2 高力価 レンチウイルス粒子として提供されます。

\*3 レンチウイルスベクターを形質転換した大腸菌の培養液にグリセロールを加えたもので、チューブあるいは96ウェルマイクロタイタープレートで提供されます。

\*4 shRNA発現用レンチウイルスベクターを用いた遺伝子発現抑制実験に必要な試薬をパッケージにしたキットです。

#### 参考文献

- McBride JL, et al. Artificial microRNAs mitigate shRNA mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. PNAS. 2008;105:5868-73.
- Beer S, et al. Low-level shRNA cytotoxicity can contribute to MYC induced hepatocellular carcinoma in adult mice. Molecular Therapy. 2010;18:161-70.

## デザイン済みshRNA発現用レンチウイルスベクター

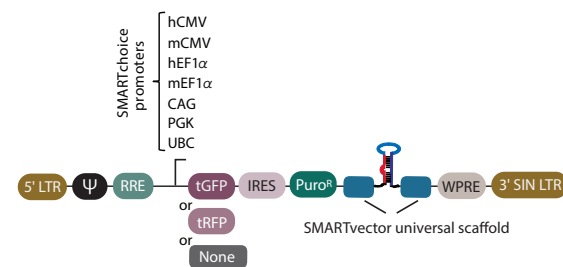
### SMARTvector™ Lentiviral shRNA \*1

ターゲット遺伝子を効率的にノックダウンするようにデザインされたshRNA配列を含む核酸配列をパッケージ化したレンチウイルス粒子です。本製品は、shRNA専用のアルゴリズムによりデザインしたターゲット配列を、microRNAパスウェイにおいて効率よくプロセッシングされるSMARTvector universal scaffoldに組み込んでいます。このscaffoldは、内在性のmicroRNA転写産物を模倣するようにデザインされており、Drosha/Dicerにより正確にプロセッシングされるとともに、shRNAアンチセンス鎖のRISCへの優先的な取り込みを実現するため、より特異的な遺伝子ノックダウンが可能です。また、使用する細胞に最適なプロモーター（shRNAの発現を駆動）を7種類から選択可能です。さらに、2種類の蛍光レポーターにより、導入効率を簡単にチェックできます（蛍光マーカー非搭載タイプもあります）。本製品を用いることによって、より確実なshRNAの恒常的発現実験が可能です。

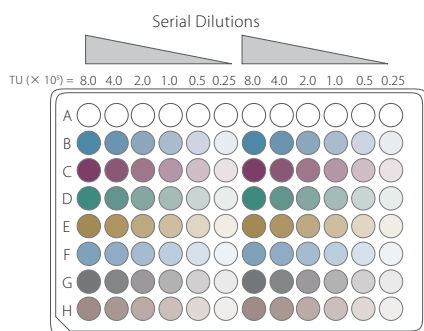
注) 製品の購入に際しては、SMARTchoice Promoter Selection Plate (下図、製品コード: SP-001000-01) を用いて、使用する細胞に最適なプロモーターを必ず事前に検討・選択してください。

### 特長

- ヒト・マウス・ラットの遺伝子に対応 ● 初代培養細胞や非分裂細胞を含む様々な細胞でshRNAの恒常的な発現を実現
- 使用する細胞に最適なプロモーターを7種類から選択可能
- TurboGFPあるいはTurboRFPの同時発現によってshRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能
- 大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子\*2



SMARTvector Lentiviral shRNAデザイン

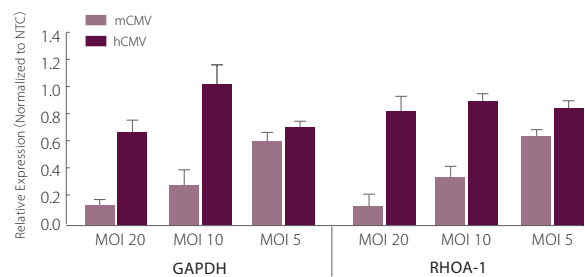


Promoter  
 ○ Empty ● hCMV: human cytomegalovirus ● mCMV: mouse cytomegalovirus  
 ● hEF1α: human elongation factor 1 alpha ● mEF1α: mouse elongation factor 1 alpha  
 ● CAG: chicken β actin hybrid promoter ● PGK: mouse phosphoglycerate kinase  
 ● UBC: human ubiquitin C

### SMARTchoice™ Promoter Selection Plate製品概要

7種類のプロモーターの制御下でTurboGFP遺伝子、Puromycin耐性遺伝子、Non-targeting shRNAを共発現するSMARTvector Lentiviral shRNAウイルス粒子を、力価を変えて96ウェルプレートにアレイ化しています（各ウェル25 μL）。各細胞におけるプロモーター活性をTurboGFPの蛍光強度から簡単に評価することができます。

ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
SMARTchoice promoters	7種類のプロモーターから選択可能
tGFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboGFP遺伝子)
tRFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboRFP遺伝子)
IRES	Internal ribosome entry site (リボソームが結合するサイト。TurboGFP/TurboRFPおよびPuromycin耐性遺伝子をコードする転写産物の翻訳を実現)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
SMARTvector universal scaffold	内在性のmicroRNA 転写産物を模倣するようにデザイン
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat



### マウスCMVプロモーターは、マウスNIH/3T3細胞において、ヒトCMVプロモーターより効率的な遺伝子発現抑制を実現

マウスNIH/3T3細胞をプレートにまき、マウスGAPDH遺伝子あるいはRHOA-1遺伝子をターゲットとするSMARTvector Lentiviral shRNAウイルス粒子（マウスあるいは、ヒトのCMVプロモーターを搭載）をMOI=20、10、5にて形質導入しました。形質導入から72時間後に各遺伝子の発現抑制レベルを評価しました。

\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging kit [▶P.36](#) の使用をおすすめします。  
 \*2 高力価 (1 x 10<sup>8</sup> ± 20% TU/mL) および超高力価 (2 x 10<sup>9</sup> ± 20% TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

## SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA \*1

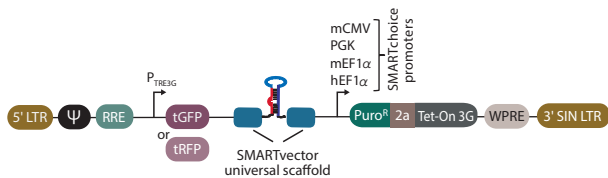
ターゲット遺伝子を効率的にノックダウンするようにデザインされたshRNA配列を含む核酸配列をパッケージ化したレンチウイルス粒子です。本製品は、shRNA専用のアルゴリズムによりデザインしたターゲット配列を、microRNAパスウェイにおいて効率よくプロセッシングされるSMARTvector universal scaffoldに組み込んでいます。このscaffoldは、内在性のmicroRNA転写産物を模倣するようにデザインされており、Drosha/Dicerにより正確にプロセッシングされるとともに、shRNAアンチセンス鎖のRISCへの優先的な取り込みを実現するため、より特異的な遺伝子ノックダウンが可能です。また、使用する細胞に最適なプロモーター (Tet-On 3Gアクチベータータンパク質の発現を駆動) を4種類から選択可能です。さらに、2種類の蛍光レポーターにより、導入効率を簡便にチェックできます。最新のテトラサイクリン誘導系であるTet-on 3Gシステムを採用した本製品を用いることによって、より厳密に制御されたshRNAの誘導的発現実験が可能です。

注) 製品の購入に際しては、SMARTchoice Inducible Non-targeting Control 4-Pack \*2を用いて、使用する細胞に最適なプロモーターを必ず事前に検討・選択してください。

### 特長

- ヒト・マウス・ラットの遺伝子に対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む様々な細胞でshRNAの誘導的発現を実現
- 使用する細胞に最適なプロモーターを4種類から選択可能
- TurboGFPあるいはTurboRFPの同時発現によってshRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能
- 大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子 \*3

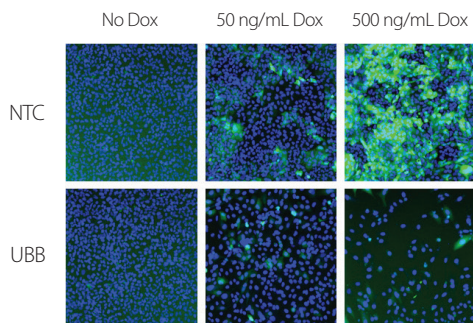
shRNA 発現用 レンチウイルスベクター



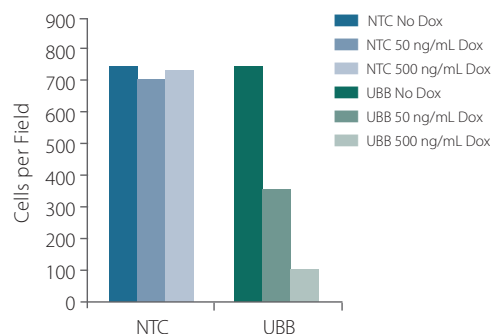
SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA デザイン

ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
P <sub>TRE3G</sub>	Tetracycline応答エレメントを持つ誘導性のプロモーター (doxycyclineの存在下でTet-On 3Gアクチベータータンパク質によって活性化)
tGFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboGFP遺伝子)
tRFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboRFP遺伝子)
SMARTvector universal scaffold	内在性のmicroRNA 転写産物を模倣するようにデザイン
SMARTchoice promoters	4種類のプロモーターから選択可能
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
2a	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。Puromycin耐性遺伝子産物およびTet-On 3Gアクチベータータンパク質の同時発現を実現)
Tet-On 3G	Doxycyclineによって制御されるアクチベータータンパク質 (Doxycycline存在下でPTRE3Gに結合)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

### A U2OS cells, SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA with mCMV



### B Terminal Cell Density (U2OS, mCMV promoter)



### SMARTvector Inducible Lentiviral shRNAは、doxycycline濃度依存的に必須遺伝子のノックダウンを実現

U2OS細胞に、non-targeting control shRNA (NTC) あるいはubiquitin B (UBB) 遺伝子をターゲットとするshRNAを発現するSMARTvector Inducible Lentiviral shRNAウイルス粒子 (マウスのCMVプロモーターを搭載) をMOI=0.1にて形質導入しました。形質導入された細胞を1.5 μg/mL puromycinにて3日間選択後、96ウェルプレートにウェルあたり2,000個の細胞を播きました。1日後、doxycyclineにてshRNAの発現を5日間誘導しました。細胞をHoescht 33342にて染色し、核(青)およびTurboGFP (緑)の発現をイメージアナライザーで解析しました (A)。また、Cell Titer-Glo assay (Promega) を用いて細胞の数をカウントし、フィールド当たりの細胞密度を定量しました (18フィールドの平均) (B)。

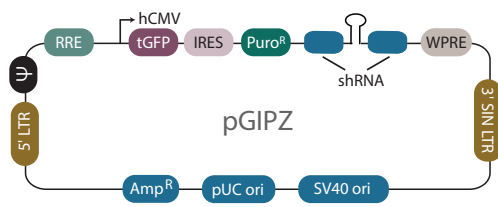
\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging Kit **▶P.36** の使用をおすすめします。  
 \*2 4種類の異なるプロモーター (mCMV、PGK、mEF1α、hEF1α) を搭載した SMARTvector Inducible Non-targeting Control (TurboGFP遺伝子発現タイプ) の各々をチューブに分注し4本セットとした製品です。各チューブに含まれるウイルス粒子の最小力価は  $1 \times 10^7$  TU/mL、容量は25 μLです。  
 \*3 高力価 ( $1 \times 10^7 \pm 20\%$  TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

## ■ GIPZ™ Lentiviral shRNA \*1

ヒトおよびマウス全ゲノムを網羅するshRNAコンストラクトをpGIPZレンチウイルスベクターに組み込むことによって構築されました。GIPZ Lentiviral shRNA を用いることにより、特異的、安定的、効率的なRNAi実験が可能です。GIPZ Lentiviral shRNAのお好みのクローン（最大3種類）にコントロールベクターなどをセットにしたGIPZ shRNA Starter Kitもラインアップしています（下表参照）。

### 特長

- ヒト・マウスの遺伝子に対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む様々な細胞でshRNAの恒常的な発現を実現
- ヒトのCMVプロモーターを採用
- TurboGFPの同時発現によってshRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能
- 大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子\*2

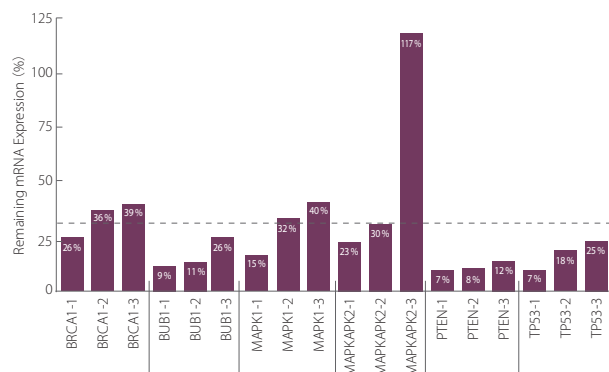


pGIPZ ベクターの構造

ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
hCMV	ヒトcytomegalovirusプロモーター
tGFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboGFP遺伝子)
IRES	Internal ribosome entry site (リボソームが結合するサイト。TurboGFPおよびPuromycin耐性遺伝子をコードする転写産物の翻訳を実現)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
shRNA	内在性のmicroRNA 転写産物を模倣するようにデザイン
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

### GIPZ shRNA Starter Kit

用途	製品名	キット内容
トランスフェクションの容易な細胞を用いる場合	Transfection Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GIPZ Lentiviral shRNAクローン (1~3種類) - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● GIPZ GAPDH Lentiviral shRNA Positive Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● DharmaFECT kb DNA transfection reagent</li> </ul>
トランスフェクションの困難な細胞用にレンチウイルス粒子を自作したい場合	Transduction Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GIPZ Lentiviral shRNAクローン (1~3種類) - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● GIPZ GAPDH Lentiviral shRNA Positive Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● GIPZ EG5 Lentiviral shRNA Positive Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control I - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>● CaCl<sub>2</sub> Reagent</li> <li>● 2 x HBSS Reagent</li> <li>● Trans-Lentiviral packaging mix (10回分)</li> </ul>
Ready-to-useの高力価レンチウイルス粒子をお求めの場合	Viral particle Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GIPZ Lentiviral shRNAクローン (1 - 3種類) - 高力価レンチウイルス粒子 (2 X 25 μL)</li> <li>● GIPZ GAPDH Lentiviral shRNA Positive Control - 高力価レンチウイルス粒子 (1 X 25 μL)</li> <li>● GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control - 高力価レンチウイルス粒子 (1 X 25 μL)</li> </ul>



### GIPZ Lentiviral shRNAによる効率的な遺伝子ノックダウン

GIPZ Lentiviral shRNAをOVCAR-8細胞にMOI=0.4~2にて導入しました（導入実験を2~4回行いました）。導入から48時間後にpuromycin (30 μg/mL) で細胞の選択を開始しました。導入から84時間後の細胞から抽出したRNAを用いて定量PCRを3連で行いました（18S rRNAを内部標準として使用）。Non-silencing ネガティブコントロールによるノックダウンとの比較で、3つのGIPZ Lentiviral shRNAのうち平均2つが70%以上のノックダウンを実現しました。

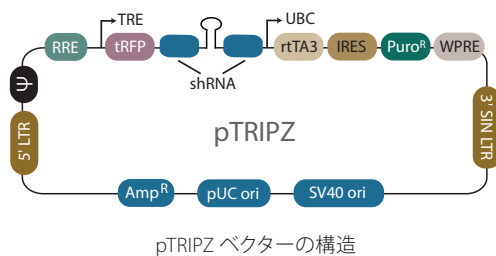
\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging Kit **▶P.36** の使用をおすすめします。  
\*2 高力価 (1 x 10<sup>8</sup> ± 20% TU/mL) の製品をラインアップしています。

## TRIPZ™ Inducible Lentiviral shRNA\*

ヒト全ゲノムを網羅するshRNAコンストラクトをpTRIPZレンチウイルスベクターに組み込むことによって構築されました。TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAを用いることにより、誘導的なRNAi実験が可能です。pTRIPZベクターにはテトラサイクリン誘導系であるTet-Onシステムが採用されています。大腸菌グリセロールストックの製品をラインアップしています。TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAのお好みのクローン(最大3種類)にコントロールベクターなどをセットにしたTRIPZ shRNA Starter Kit もラインアップしています(下表参照)。

### 特長

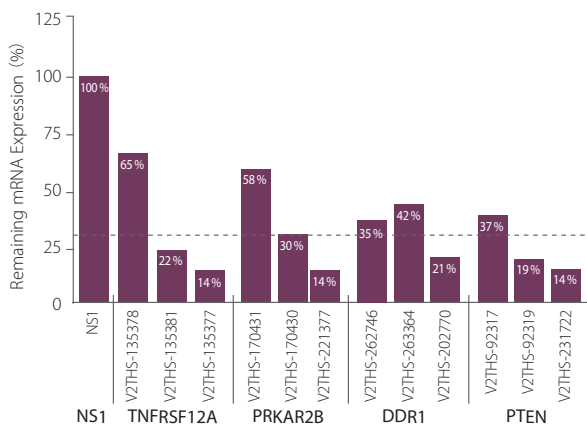
- ヒトの遺伝子に対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む様々な細胞でshRNAの誘導的な発現を実現
- TurboRFPの同時発現によってshRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
TRE	Tetracycline誘導性プロモーター
tRFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboRFP遺伝子)
shRNA	内在性のmicroRNA 転写産物を模倣するようにデザイン
UBC	ヒトubiquitin C プロモーター (rtTA3およびPuromycin耐性遺伝子の発現を駆動)
rtTA3	Reverse tetracycline-transactivator 3 (doxycycline存在下でTREに結合し、TREからのTurboRFPおよびshRNAの発現を活性化)
IRES	Internal ribosome entry site (リボソームが結合するサイト。rtTA3およびPuromycin耐性遺伝子をコードする転写産物の翻訳を実現)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3'末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

### TRIPZ shRNA Starter Kit

用途	製品名	キット内容
トランスフェクションの容易な細胞を用いる場合	Transfection Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAクローン (1~3種類) - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• TRIPZ Human GAPDH Inducible Lentiviral shRNA Positive Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• DharmaFECT kb DNA transfection reagent*</li> </ul>
トランスフェクションの困難な細胞用にレンチウイルス粒子を自作したい場合	Packaging Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAクローン (1~3種類) - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• TRIPZ Human GAPDH Inducible Lentiviral shRNA Positive Control- 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control- 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• CaCl<sub>2</sub> Reagent</li> <li>• 2 x HBSS Reagent</li> <li>• Trans-Lentiviral packaging mix (10回分)</li> </ul>



### TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAを用いた低MOIでの誘導的な遺伝子ノックダウン

4種類の遺伝子をターゲットとするTRIPZ Inducible Lentiviral shRNAレンチウイルス粒子(遺伝子あたり3種類)をHEK293T細胞にMOI=0.3にて導入し、48時間後にpuromycin (5 µg/mL)で細胞の選択を開始しました。導入から5日後にdoxycycline (1 µg/mL)でshRNAの発現を誘導しました。導入から2週間後の細胞から抽出したRNAを用いて定量PCRを3連で行い(18S rRNAを内部標準として使用)、各ターゲット遺伝子のノックダウンを評価しました。TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control (NS1)によるノックダウンと比較した結果をしました。ノックダウン実験は2回行いました。

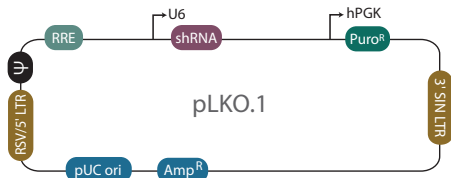
\* 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging Kit **▶P.36** の使用をおすすめします。

## ■ TRC Lentiviral shRNA

The RNAi Consortium (TRC) により、ヒトおよびマウス全ゲノムを網羅するshRNAコンストラクトをpLKO.1レンチウイルスベクターに組み込むことによって構築されました。大腸菌グリセロールストックの製品をラインアップしています。

### 特長

- ヒト・マウスの遺伝子に対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む様々な細胞でshRNAの恒常的な発現を実現
- *in vitro*および *in vivo*における安定期な遺伝子ノックダウンを実現
- ヒトのU6プロモーターを採用
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能



pLKO.1 ベクターの構造

ベクター中の要素	説明
RSV/5' LTR	RSV プロモーター/5' long terminal repeat (パッケージング細胞においてTat非依存的にレンチウイルスを強力に転写)
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
U6	ヒトU6プロモーター (RNA polymerase III、shRNAの発現を駆動)
shRNA	シンプルヘアピン型のshRNA
hPGK	ヒトphosphoglycerate kinaseプロモーター (Puromycin耐性遺伝子の発現を駆動)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat



### TRC Lentiviral shRNAを用いた遺伝子ノックダウン

A549細胞で発現する6つのチロシンキナーゼ遺伝子を、30種類のshRNAを用いてノックダウンする実験を2回行い (実験1および2)、各遺伝子の発現量を定量PCRで解析しました。6つのどの遺伝子についても、少なくとも1種類のshRNAがmRNAレベルを70%以上低減させました。Moffat et al. (2006)の一部改変データ\*。

\* Moffat J. et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high content screen. Cell. 2006;124:1283-98.

## コントロールshRNA発現用レンチウイルスベクター

### ■ SMARTvector Lentiviral shRNAポジティブコントロール

SMARTvector Lentiviral shRNAの導入条件の検討やshRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子<sup>\*1</sup>です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	プロモーター	蛍光レポーター
SMARTvector GAPD Positive Control	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのSMARTvector Lentiviral shRNA	Human Mouse Rat	hCMV hEF1α mCMV mEF1α	TurboGFP TurboRFP 無し
SMARTvector PPIB Positive Control	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) をターゲットとし、ノックダウン確認済みのSMARTvector Lentiviral shRNA			

### ■ SMARTvector Lentiviral shRNAネガティブコントロール

SMARTvector Lentiviral shRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子<sup>\*1</sup>です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	プロモーター	蛍光レポーター
SMARTvector Non-targeting Control # 1~12	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子と類似しない配列のSMARTvector Lentiviral shRNA	Human Mouse Rat	hCMV hEF1α mCMV mEF1α	TurboGFP TurboRFP 無し

### ■ SMARTvector Inducible Lentiviral shRNAポジティブコントロール

SMARTvector Inducible Lentiviral shRNAの導入条件の検討やshRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子<sup>\*2</sup>です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	プロモーター	蛍光レポーター
SMARTvector Inducible GAPDH Positive Control	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのSMARTvector Lentiviral shRNA	Human Mouse Rat	hCMV hEF1α mCMV mEF1α	TurboGFP TurboRFP
SMARTvector Inducible PPIB Positive Control	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) をターゲットとし、ノックダウン確認済みのSMARTvector Lentiviral shRNA			

### ■ SMARTvector Inducible Lentiviral shRNAネガティブコントロール

SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA を用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子<sup>\*2</sup>です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	プロモーター	蛍光レポーター
SMARTvector Inducible Non-targeting Control SMARTvector Inducible Non-targeting Control # 2~12	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子と類似しない配列のSMARTvector Lentiviral shRNA	Human Mouse Rat	hEF1α mCMV mEF1α PGK	TurboGFP TurboRFP
SMARTchoice Inducible Non-targeting Control 4-Pack	4種類の異なるプロモーターを搭載したSMARTvector Inducible Non-targeting Control (TurboGFP搭載タイプ) の各々をチューブに分注し4本セットとした製品	Human Mouse Rat	hEF1α mCMV mEF1α PGK	TurboGFP

\*1 高力価 ( $1 \times 10^8 \pm 20\%$  TU/mL) および超高力価 ( $2 \times 10^9 \pm 20\%$  TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

\*2 高力価 ( $1 \times 10^7 \pm 20\%$  TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。



## ■ GIPZ Lentiviral shRNA ポジティブコントロール

GIPZ Lentiviral shRNAの導入条件の検討やshRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子です。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
GIPZ GAPDH Lentiviral shRNA Positive Control	GAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのGIPZ Lentiviral shRNA	Human Mouse
GIPZ EG5 Lentiviral shRNA Positive Control	EG5をターゲットとし、ノックダウン確認済みのGIPZ Lentiviral shRNA	Rat

## ■ GIPZ Lentiviral shRNA ネガティブコントロール

GIPZ Lentiviral shRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはレンチウイルス粒子\*です。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control	ヒト・マウス・ラットの既知遺伝子と類似しない配列のGIPZ Lentiviral shRNA	Human、Mouse、Rat

\* 力価は $1 \times 10^7 \sim 10^8$  TU/mLです。

## ■ TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA ポジティブコントロール

TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAの導入条件の検討やshRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
TRIPZ Human GAPDH Inducible Lentiviral shRNA Positive Control	ヒトGAPDをターゲットとし、ノックダウン確認済みのTRIPZ Inducible Lentiviral shRNA	Human

## ■ TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA ネガティブコントロール

TRIPZ Inducible Lentiviral shRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control	ヒトの既知遺伝子と類似しない配列のTRIPZ Inducible Lentiviral shRNA	Human

## ■ TRC Lentiviral shRNA ポジティブコントロール

TRC Lentiviral shRNAの導入条件の検討やshRNA実験の結果の評価に使用します。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
TRC Lentiviral eGFP shRNA positive control	eGFPをターゲットとし、ノックダウン確認済みのTRC Lentiviral shRNA	—

## ■ TRC Lentiviral shRNA ネガティブコントロール

TRC Lentiviral shRNAを用いた実験において、ターゲット遺伝子に対するsiRNA特異的なノックダウンの評価に使用します。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種
TRC Lentiviral Non-targeting shRNA Control	ヒト・マウスの既知遺伝子と類似しない配列のTRC Lentiviral shRNA	Human、Mouse

# microRNA研究用試薬

## microRNA研究用試薬選択ガイド

microRNAの機能獲得 (gain-of-function) による  
特定のmicroRNAの機能解析をしたい

### 単品

- miRIDIAN microRNA Mimic →P.26
- miRIDIAN microRNA Mimicポジティブコントロール →P.30
- miRIDIAN microRNA Mimicネガティブコントロール →P.30
- miRIDIAN microRNA Mimicトランスフェクションコントロール →P.30
- shMIMIC Lentiviral microRNA →P.28
- shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA →P.29

### アレイ化ライブラリー

- miRIDIAN microRNA Mimic ライブラリー →P.27
- Cherry-pick miRIDIAN microRNA Mimic ライブラリー →P.9

### プール化レンチウイルスライブラリー

- shMIMIC Lentiviral microRNA Pooled Libraries →P.32
- shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA Pooled Libraries →P.32

microRNAの機能抑制 (loss-of-function) による  
特定のmicroRNAの機能解析をしたい

### 単品

- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor →P.27
- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorポジティブコントロール →P.30
- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorトランスフェクションコントロール →P.30
- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorネガティブコントロール →P.30

### アレイ化ライブラリー

- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor ライブラリー →P.27
- Cherry-pick miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor ライブラリー →P.9

## デザイン済みmicroRNA研究用試薬

### miRIDIAN™ microRNA Mimic

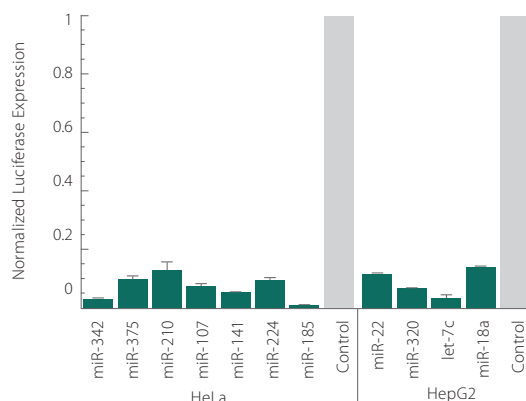
内在性microRNAの機能を効果的に模倣し機能増加するようにデザインされた、独自の化学修飾をもつ二本鎖のRNAです。miRBase Sequence Database (www.mirbase.org/) に登録されているヒト・マウス・ラットのmicroRNAに対応しています。製品形態は凍結乾燥品です。

### 特長

- 内在性成熟microRNAの機能を効果的に模倣
- microRNAの機能獲得 (gain-of-function) による特定のmicroRNAの機能解析に有用
- センス鎖がRISCに取り込まれるのを防ぎ、アンチセンス鎖がRISCに取り込まれやすくする独自の化学修飾
- 低濃度で長時間効果が持続

### 製品ラインアップ

製品	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic	Human Mouse Rat	2、5、20、50 nmol



### miRIDIAN microRNA MimicはmicroRNAの機能を効果的に模倣

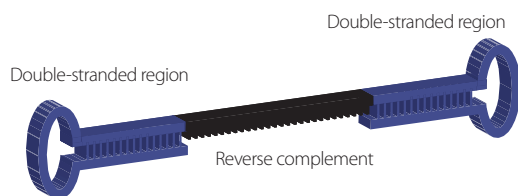
ヒトのmicroRNA (11種類) に対応するmiRIDIAN microRNA Mimicを、10 nM濃度でHeLa細胞およびHepG2細胞にトランスフェクションし、48時間後にデュアルルシフェラーゼレポーターシステムを用いてmicroRNA Mimicの機能を評価しました。値はコントロール (Mimic不使用) に対して標準化しました。1 nMのmiRIDIAN microRNA Mimicを用いた場合でも同様の結果が得られました (データは示していません)。

## ■ miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor

miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorは、内在性microRNAの機能を阻害するようにデザインされた、化学修飾とヘアピン構造をもつ一本鎖のRNAです\*。miRBase Sequence Database (www.mirbase.org/) に登録されているヒト・マウス・ラットのmicroRNAに対応しています。製品形態は凍結乾燥品です。

### 特長

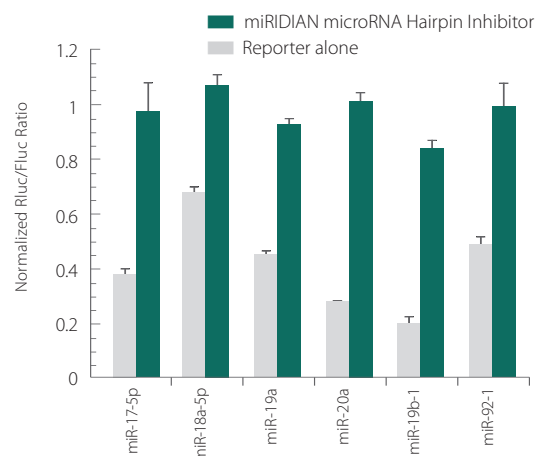
- 先進のデザインにより内在性成熟microRNAの機能を効果的に抑制
- microRNAの機能抑制 (loss-of-function) による特定のmicroRNAの機能解析に有用
- 独自の化学修飾と新規な二次構造 (ヘアピン構造) モチーフを採用
- 低濃度で長時間効果があるため複数のmicroRNAを低毒性で同時に阻害可能



miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorの構造

### 製品ラインアップ

製品	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic	Human Mouse Rat	2, 5, 20, 50 nmol



### microRNA Hairpin Inhibitorは複数のmicroRNAの機能を同時に抑制可能

6種類の共発現microRNA (cancer cluster由来: miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) を、miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorにより機能抑制しました。6種類のmiRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorを混合し (合計0.8 nM)、6種類のうちの1種類の各microRNAに特異的なレポータープラスミドとともに、DharmaFECT Duo (P.37) を用いてHeLa細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼにより検出しました。値はネガティブなレポータープラスミドに対して標準化しました。

## ■ miRIDIAN microRNA Mimic / Hairpin Inhibitorライブラリー

miRIDIAN microRNA MimicあるいはmiRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorを生物種ごとにプレートに分注したライブラリー製品です。microRNA全コレクションを対象としたハイスループットスクリーニングが可能です。本ライブラリーを利用した網羅的なスクリーニングは、疾病に関わるバイオマーカーの探索や、薬剤とともに投与すると治療効果をさらに発揮するmicroRNAの同定、薬効物質の発見や開発などの研究に有用です。製品形態は凍結乾燥品です。

### 製品ラインアップ

製品	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic Library (v21.0)	Human Mouse Rat	0.1, 0.25, 0.5 nmol
miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Library (v21.0)	Human Mouse Rat	0.1, 0.25, 0.5 nmol

※ 参照するmiRBase Sequence Databaseのバージョンは変更になる場合があります。

\* この新規microRNA インヒビターのデザインは、Dharmacon R&Dグループにより報告された知見をベースとしています: Vermeulen A, et al. Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function. RNA. 2007;13:723-30.

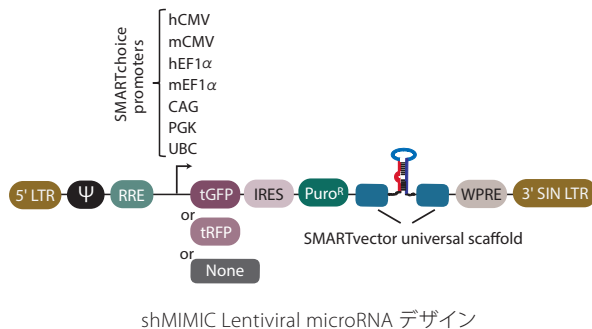
## ■ shMIMIC™ Lentiviral microRNA \*1

microRNAを発現するようにデザインされた核酸配列をパッケージしたレンチウイルス粒子です。本製品では、ヒト・マウス・ラットのmicroRNA配列を、microRNAパスウェイにおいて効率よくプロセッシングされるSMARTvector universal scaffoldに組み込んでいます。このscaffoldは、内在性のmicroRNA転写産物を模倣するようにデザインされており、Drosha/Dicerによるプロセッシングを正確かつ効率よく受け、目的のmicroRNA成熟鎖のRISCへの優先的な取り込みを実現します。microRNAの発現を駆動する恒常的なプロモーターを7種類から選択可能です。

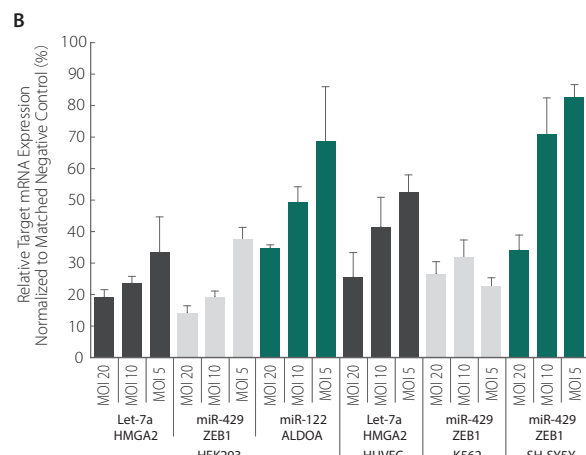
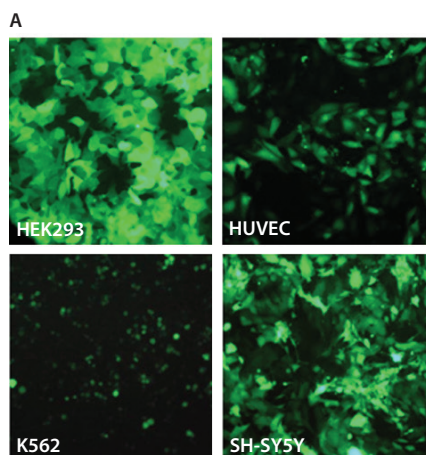
注) 製品の購入に際しては、SMARTchoice Promoter Selection Plate **▶P.19** を用いて、使用する細胞に最適なプロモーターを必ず事前に検討・選択してください。  
注) 本製品のコントロールには、SMARTvector Lentiviral shRNAポジティブコントロール **▶P.24** およびSMARTvector Lentiviral shRNAネガティブコントロール **▶P.24** をご使用ください。

### 特長

- ヒト・マウス・ラットのmicroRNAに対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む、さまざまな細胞でmicroRNAの恒常的な発現を実現
- 使用する細胞に最適なプロモーターを7種類から選択可能
- TurboGFPあるいはTurboRFPの同時発現によってmicroRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能
- 大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子\*2



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
SMARTchoice promoters	7種類のプロモーターから選択可能
tGFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboGFP遺伝子)
tRFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboRFP遺伝子)
IRES	Internal ribosome entry site (リボソームが結合するサイト。TurboGFP/RFPおよびPuromycin耐性遺伝子をコードする転写産物の翻訳を実現)
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
SMARTvector universal scaffold	内在性のmicroRNA転写産物を模倣するようにデザイン
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat



shMIMIC Lentiviral microRNAは、トランスフェクションの困難な細胞においてmicroRNAのターゲット遺伝子の発現抑制を実現

- A:** 4種類の異なる細胞株へのshMIMIC Lentiviral microRNA導入から120時間後のTurboGFP発現 (ピューロマイシン選択未実施)
- B:** ヒトのmicroRNAに対応するshMIMIC Lentiviral microRNAまたはネガティブコントロールを、HEK293やHUVEC、K562、SH-SY5Y細胞に導入しました (ピューロマイシン選択未実施)。導入120時間後に細胞を採取しRNAを抽出しました。定量RT-PCR法により各microRNAのターゲット遺伝子の発現抑制を評価しました。ハウスキーピング遺伝子 (*PPIB*) に対してデータを標準化し、さらにネガティブコントロールに対する標準化を行いました。

\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging kit **▶P.36** の使用をおすすめします。  
\*2 高力価 ( $1 \times 10^9 \pm 20\%$  TU/mL) および超高力価 ( $2 \times 10^9 \pm 20\%$  TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

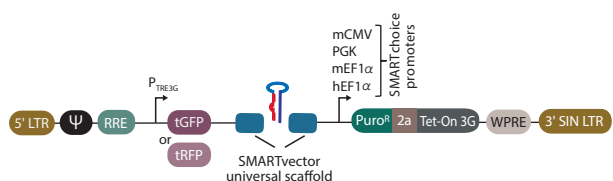
## ■ shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA \*1

microRNAを発現するようにデザインされた核酸配列をパッケージしたレンチウイルス粒子です。本製品では、ヒト・マウス・ラットのmicroRNA配列を、microRNAパスウェイにおいて効率よくプロセッシングされるSMARTvector universal scaffoldに組み込んでいます。このscaffoldは、内在性のmicroRNA転写産物を模倣するようにデザインされており、Drosha/Dicerによるプロセッシングを正確かつ効率よく受け、目的のmicroRNA成熟鎖のRISCへの優先的な取り込みを実現します。Tet-On 3Gテトラサイクリン誘導発現系のtransactivator proteinの発現を駆動するプロモーターを4種類から選択可能で、microRNAの誘導的な発現を実現します。

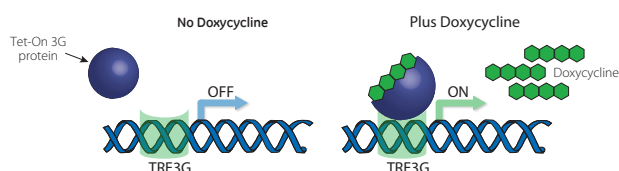
注) 製品の購入に際しては、SMARTchoice Inducible Non-targeting Control 4-Pack ➡P.20 を用いて、使用する細胞に最適なプロモーターを必ず事前に検討・選択してください。  
注) 本製品のコントロールには、SMARTvector Inducible Lentiviral shRNAポジティブコントロール ➡P.24 およびSMARTvector Inducible Lentiviral shRNAネガティブコントロール ➡P.24 をご使用ください。

### 特長

- ヒト・マウス・ラットのmicroRNAに対応
- 初代培養細胞や非分裂細胞を含む、さまざまな細胞でmicroRNAの誘導的な発現を実現
- 使用する細胞に最適なプロモーターを4種類から選択可能
- TurboGFPあるいはTurboRFPの同時発現によってmicroRNAの発現を確認可能
- ピューロマイシン耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能
- 大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子 \*2



shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA デザイン



### microRNAの誘導的な過剰発現を実現するシステム

shMIMIC Lentiviral Inducible microRNAは、第3世代のテトラサイクリン誘導系であるTet-On 3Gテクノロジーを採用しています。Tet-On 3Gテトラサイクリン誘導発現系は、非誘導時の基底レベルの発現が抑制され、ドキシサイクリンによる誘導を受けて発現が活性化されます\*3。Tet-On 3Gテトラサイクリン誘導発現系のtransactivator proteinは、ドキシサイクリンの存在下でTRE3Gプロモーター配列に結合し、microRNAの転写を活性化します。

ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
P <sub>Tet-On 3G</sub>	Tetracycline応答エレメントを持つ誘導性のプロモーター (doxycyclineの存在下でTet-On 3Gアクチベータータンパク質によって活性化)
tGFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboGFP遺伝子)
tRFP	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (TurboRFP遺伝子)
SMARTvector universal scaffold	内在性のmicroRNA 転写産物を模倣するようにデザイン
SMARTchoice promoters	4種類のプロモーターから選択可能
Puro <sup>R</sup>	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
2a	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド)。Puromycin耐性遺伝子産物およびTet-On 3Gアクチベータータンパク質の同時発現を実現
Tet-On 3G	Doxycyclineによって制御されるアクチベータータンパク質 (Doxycycline存在下でP <sub>Tet-On 3G</sub> に結合)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral shRNA Packaging kit ➡P.36 の使用をおすすめします。

\*2 高力価 (1 x 10<sup>7</sup> ± 20% TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

\*3 Zhou X, et al. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. Gene Ther. 2006;13:1382-90.

Loew R, et al. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. BMC Biotechnol. 2010;10:81.

## コントロールmicroRNA研究用試薬

### ■ miRIDIAN microRNA Mimic/Hairpin Inhibitor ポジティブコントロール

miRIDIAN microRNA Mimic/Hairpin Inhibitorを用いた実験の確認や、条件至適化に最適なポジティブコントロール試薬です。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #1 (PPIB)	ハウスキーピング遺伝子 (PPIB) の3' UTRをターゲットとするmicroRNA Mimic		
miRIDIAN microRNA Mimic Housekeeping Positive Control #2 (GAPDH)	ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) の3' UTRをターゲットとするmicroRNA Mimic	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
miRIDIAN microRNA Mimic Endogenous Positive Control	miR-122の機能に基づきAldolase A遺伝子をターゲットとするmicroRNA Mimic		
miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Positive Control	miR-16をターゲットとし、機能を抑制するmicroRNA Hairpin Inhibitor		

### ■ miRIDIAN microRNA Mimic/Hairpin トランスフェクションコントロール

蛍光色素 (Dy547; absorbance/emission max: 557/570 nm) でラベルされたネガティブコントロールです。蛍光により細胞導入が確認でき、miRIDIAN microRNAのトランスフェクション条件検討に便利です。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインアップ

製品	製品説明	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control with Dy547	蛍光ラベルされたmiRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Transfection Control with Dy547	蛍光ラベルされたmiRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1		

### ■ miRIDIAN microRNA Mimic/Hairpin Inhibitor ネガティブコントロール

miRIDIAN microRNA MimicおよびHairpin Inhibitorに対するネガティブコントロールです。製品形態は凍結乾燥品です。

#### 製品ラインアップ

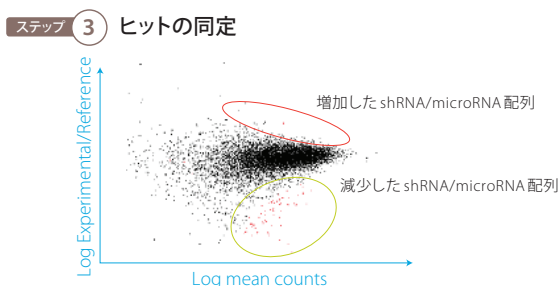
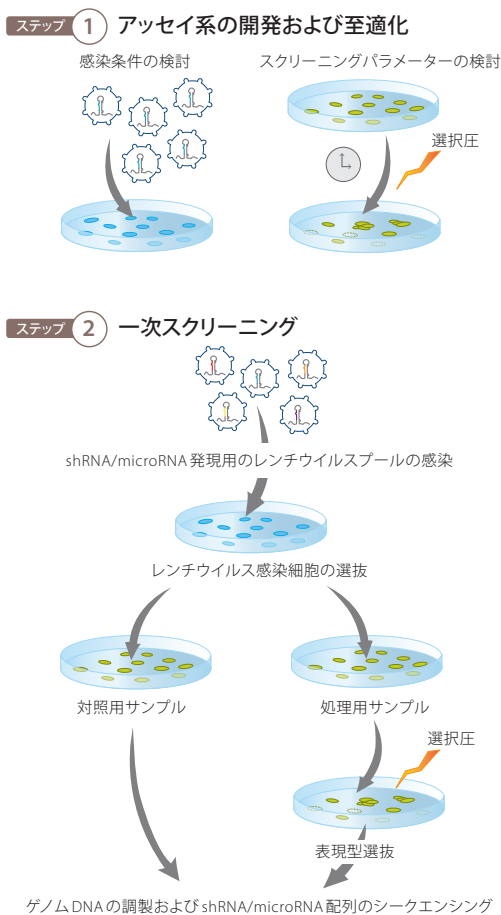
製品	製品説明	生物種	容量
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1	ヒト・マウス・ラットの既知microRNA配列と相同でない、miRIDIAN microRNA Mimicに対するネガティブコントロールです。線虫のmicroRNA (cel-miR-67; 成熟配列: UCACAAC-CUCCUAGAAAGAGUAGA, Accession Number: MIMAT0000039) の配列に基づいてデザインされています。		
miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #2	ヒト・マウス・ラットの既知microRNA配列と相同でない、miRIDIAN microRNA Mimicに対するネガティブコントロールです。線虫のmicroRNA (cel-miR-239b; 成熟配列: UUGUACUACACAAAAGUACUG, Accession Number: MIMAT0000295) の配列に基づいてデザインされています。	Human Mouse Rat	5、20、 50 nmol
miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1	ヒト・マウス・ラットの既知microRNA配列と相同でない、miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorに対するネガティブコントロールです。線虫のmicroRNA (cel-miR-67; 成熟配列: UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA, Accession Number: MIMAT0000039) の配列に基づいてデザインされています。		
miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #2	ヒト・マウス・ラットの既知microRNA配列と相同でない、miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorに対するネガティブコントロールです。線虫のmicroRNA (cel-miR-239b; 成熟配列: UUGUACUACACAAAAGUACUG, Accession Number: MIMAT0000295) の配列に基づいてデザインされています。		

# プール化レンチウイルスライブラリー

本ライブラリーは、shRNA/microRNA発現用のレンチウイルス粒子を全ゲノムレベルあるいは遺伝子ファミリーごとに混合してプールとした製品です。本製品を細胞に感染させて、ヒト・マウス遺伝子を網羅的に発現抑制（shRNAの場合）あるいはヒト・マウスのmicroRNAを過剰発現させることにより、目的の表現型（特定の選択条件下で生存可能あるいは増殖速度が変化するなどを指標に用いる）を細胞に与えるshRNA/microRNA配列をスクリーニングします。Illumina社シーケンサーにのみ対応した製品です。

## 特長

- ヒト・マウスの遺伝子に対応 ● 濃縮した高力価レンチウイルス粒子として提供
- 小規模の遺伝子ファミリーからゲノムワイドな解析が可能な製品をラインアップ **▶P.32**
- Illumina社シーケンサーに対応



## プール化レンチウイルスライブラリーを用いたスクリーニングワークフロー

**ステップ 1**

**アッセイ系の開発および至適化**

レンチウイルスの感染条件（感染に用いる培地、感染時間、細胞密度等）やスクリーニングパラメーター（アッセイの時間、選択圧等）を決定します。

**ステップ 2**

**一次スクリーニング**

細胞あたり1種類のshRNA/microRNA配列を発現させるために、レンチウイルスを低いMOIで細胞に感染させます。レンチウイルスの感染した細胞を、対照用サンプルと選択圧をかける処理用サンプルに分けます。実験用サンプルに選択圧をかけた後、対照用サンプルおよび処理用サンプルのそれぞれからゲノムDNAを抽出します。Illumina-adaptedプライマーおよびPhusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymeraseを用いて、ゲノム中に挿入されたshRNA/microRNA配列をPCR増幅し、アダプター付加したPCR増幅断片をIllumina flow cellに固定化します。結果的に生じるアンプリコンをIlluminaシーケンサーによりシーケンシングします。

**ステップ 3**

**ヒットの同定**

スクリーニング中に増減したshRNA/microRNA配列をヒットと見なし、それらヒットshRNAがターゲットとする遺伝子あるいは該当するmicroRNAを同定します。

## ■ SMARTvector Lentiviral shRNA Pooled Libraries

## ■ SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA Pooled Libraries

SMARTvector Lentiviral shRNA [→P.19](#) / SMARTvector Inducible Lentiviral shRNA [→P.20](#) のレンチウイルス粒子を全ゲノムレベルあるいは遺伝子ファミリーごとに混合してプールとした製品です。

ライブラリー*1	Human		Mouse	
	ターゲット遺伝子数	プール数 x プール当たりのコンストラクト数	ターゲット遺伝子数	プール数 x プール当たりのコンストラクト数*2
Whole Genome	19,241	16プール x 9,870 コンストラクト	21,745	18プール x 9,860 コンストラクト
Druggable Genome	7,341	6プール x 10,080 コンストラクト	9,723	8プール x 10,020 コンストラクト
GPCR	377	1プール x 3,384 コンストラクト	494	1プール x 4,281 コンストラクト
Ion Channel	340	1プール x 3,081 コンストラクト	332	1プール x 3,018 コンストラクト
Protein Kinase	702	1プール x 5,942 コンストラクト	697	1プール x 5,898 コンストラクト
Phosphatase	245	1プール x 2,312 コンストラクト	268	1プール x 2,505 コンストラクト
Protease	466	1プール x 4,074 コンストラクト	529	1プール x 4,570 コンストラクト
Ubiquitin Conjugate	557	1プール x 4,795 コンストラクト	511	1プール x 4,433 コンストラクト

注) 表中の数字は、参照データベースの変更等により変更になる場合があります。

## ■ Decode Pooled Lentiviral Libraries

GIPZ Lentiviral shRNA [→P.21](#) のレンチウイルス粒子を全ゲノムレベルあるいは遺伝子ファミリーごとに混合してプールとした製品です。

ライブラリー*1	Human	
	ターゲット遺伝子数	プール数 x プール当たりのコンストラクト数
Human genome	18,205	10プール x 9,570 コンストラクト
Druggable genome	7,494	5プール x 8,490 コンストラクト
GPCR	382	1プール x 2,591 コンストラクト
Ion Channel	374	1プール x 1,884 コンストラクト
Protein Kinase	709	1プール x 4,675 コンストラクト
Phosphatase	254	1プール x 1,561 コンストラクト
Protease	478	1プール x 2,559 コンストラクト
Ubiquitin Conjugation	571	1プール x 3,830 コンストラクト

注) 表中の数字は、参照データベースの変更等により変更になる場合があります。

## ■ shMIMIC Lentiviral microRNA Pooled Libraries

## ■ shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA Pooled Libraries

shMIMIC Lentiviral microRNA [→P.28](#) / shMIMIC Inducible Lentiviral microRNA [→P.29](#) レンチウイルス粒子を生物種ごとに混合してプールとした製品です。

ライブラリー*1	成熟型microRNAの数	ユニークなデザインの数	プール数 x プール当たりのコンストラクト数*2
Human	2,580	2,555	1プール x 2,665 コンストラクト
Mouse	1913	1,896	1プール x 2,006 コンストラクト
Human-Mouse conserved*3	355 human + 341 mouse	386	1プール x 496 コンストラクト

注) 表中の数字は、参照データベースの変更等により変更になる場合があります。

\*1 恒常的発現ライブラリーの力価は  $\geq 5 \times 10^8 \pm 20\%$  TU/mL、誘導的発現ライブラリーの力価は  $\geq 5 \times 10^7 \pm 20\%$  TU/mLです。

\*2 プール当たりのコンストラクト数は、遺伝子特異的なコントロールおよびネガティブコントロールのコンストラクトを含みます。

\*3 大部分の脊椎動物で保存されているヒトおよびマウスの成熟型microRNAに加えて、ヒトとマウスで同一の成熟型microRNAを含むライブラリーです。



# RNAi 実験関連試薬

## cDNA/ORF クローン選択ガイド

ヒト・マウス・ラット・ウシの全ゲノムをほぼ網羅するcDNAクローン、ご希望の発現ベクターにORFを容易に移し変えることのできるGateway対応のORFクローン、すぐに遺伝子過剰発現実験に使用できるレンチウイルスベースのORF発現ベクター (RNAi 研究におけるレスキュー実験に使用可能) などをご用意しています。

下表を参考にして研究目的に合ったcDNA/ORFクローンをご選択ください。

	cDNA	ORF				
	Mammalian Gene Collection (MGC)	CCSB Human ORFeome Collection	Human ORFeome V8.1 Collection	ORFeome Collaboration Collection	CCSB-Broad Lentiviral Expression Collection	Precision LentiORF Collection
生物種	Human/Mouse/Rat/Bovine	Human	Human	Human/Mouse	Human	Human
全塩基配列確認済*1	●*2	—	●	●	●	●
Expression-ready (すぐに遺伝子発現実験に使用可能)	一部の製品	—	—	—	●	●
Gateway対応のエントリークローン	—	●	●	●	—	—
蛍光レポーター	—	—	—	—	—	TurboGFP
製品形態	大腸菌グリセロールストック*3	大腸菌グリセロールストック*3	大腸菌グリセロールストック*3	大腸菌グリセロールストック*3	大腸菌グリセロールストック*3	大腸菌グリセロールストック*3 高力価ウイルス粒子*4 Precision LentiORF Starter Kit*5
掲載ページ	⇒P.33	⇒P.34	⇒P.34	⇒P.34	⇒P.35	⇒P.35

### ■ Mammalian Gene Collection (MGC)

米国国立衛生研究所を初めとする多くの研究機関の共同プロジェクトにより作成された、ヒト・マウス・ラット・ウシの完全長cDNAクローンコレクションです\*6, 7, 8。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

	Human	Mouse	Rat	Bovine
MGCのcDNAクローン数	29,818	27,285	6,763	9,104
MGCのNon-redundant遺伝子数	17,592	17,701	6,486	8,724

※ 表中の数字は、参照データベースの変更等により変更になる場合があります。

### 特長

- ヒト・マウス・ラット・ウシの全ゲノムをほぼ網羅
- 各クローンのcDNA塩基配列を確認済み\*1, 2
- 一部のクローンは、すぐに遺伝子発現実験に使用可能

\*1 公的研究機関で検証したものです。弊社では塩基配列を確認していません。

\*2 一部のヒトのMGC cDNAクローン (製品コード MHS6278) については弊社で末端塩基配列を確認しています。

\*3 プラスミドベクターを形質転換した大腸菌の培養液にグリセロールを加えたもので、チューブあるいは96ウェルマイクロタイタープレートで提供されます。

\*4 高力価レンチウイルス粒子として提供されます。

\*5 遺伝子過剰発現実験に必要な試薬をパッケージにしたキットです。

\*6 MGC Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 Full-length Human and Mouse cDNA Sequences. PNAS. 2002;99:16899-903.

\*7 MGC Project Team. The status, quality, and expansion of the NIH Full-length cDNA Project: The Mammalian Gene Collection (MGC). Genome Res. 2004;14:2121-7.

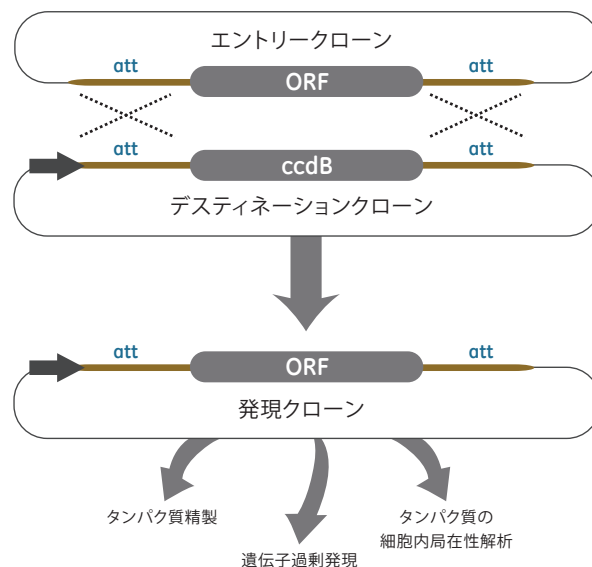
\*8 MGC Project Team. The completion of the Mammalian Gene Collection (MGC). Genome Res. 2009;19:2324-33.

## ■ CCSB Human ORFeome Collection

本クローンコレクションは、Dana - Farber Cancer InstituteのCenter for Cancer System Biology (CCSB) において作成されました。これらのクローンは、MGCの完全長cDNAを鋳型としたPCRにより得られたORFを、Gateway対応のエントリーベクターにクローニングすることによって作成されました\*1。Fidelityの高いDNA Polymeraseを用い、少ないサイクル数（25サイクル）で各ORFを増幅しているため、PCRに起因する塩基配列の変異の発生が最小限に抑えられています。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 特長

- ヒトの全ゲノムをほぼ網羅
- Gateway対応のエントリークローン
- ORFの終止コドンが除かれているため、C末端へのタグ等の付加が可能



### Gatewayシステムによる、発現ベクターへのORF配列の移動

Gatewayシステムによって、Gateway対応のエントリークローンから、さまざまな種類のデスティネーションクローンに容易にORFを移し変えることができます。そのため、発現クローンの構築に要する手間と時間を低減することができ、さまざまな実験系の構築が容易になります。

## ■ Human ORFeome V8.1 Collection

本クローンコレクションは、Dana - Farber Cancer InstituteのCenter for Cancer System Biology (CCSB) において作成された、最新バージョンのHuman ORFeome Collectionです。以前のバージョンのコレクションより各クローンのORF塩基配列の確度が向上しています。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 特長

- ヒトの全ゲノムをほぼ網羅
- 各クローンのORF塩基配列を確認済み\*2
- Gateway対応のエントリークローン
- ORFの終止コドンが除かれているため、C末端へのタグ等の付加が可能

## ■ ORFeome Collaboration Collection

ヒト・マウスの塩基配列確認済みORFをGateway対応のエントリーベクターに挿入したクローンコレクションです。Dana - Farber Cancer InstituteのCenter for Cancer System Biology (CCSB) をはじめとする世界中のゲノム研究組織の共同プロジェクトによりコレクションが整備されました。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 特長

- ヒト・マウスの全ゲノムをほぼ網羅
- 各クローンのORF塩基配列を確認済み\*2
- Gateway対応のエントリークローン
- ORFの終止コドンのあるクローンと除かれているクローンの両方をラインアップ

\*1 Lamesch P, et al. hORFeome v3.1: A resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. Genomics. 2007;89:307-15.

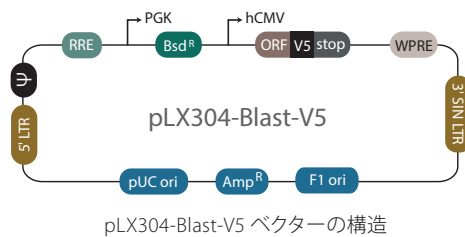
\*2 公的研究機関で検証したものです。弊社では塩基配列を確認していません。

## ■ CCSB-Broad Lentiviral Expression Collection\*1

本製品は、Dana-Farber Cancer InstituteおよびBroad Instituteにおいて作成されました。各クローンは、Gatewayシステムにより、Human ORFeome V8.1のORFをレンチウイルススペースの発現ベクターpLX304-Blast-V5に移し変えることにより作成されました。レンチウイルススペースの発現ベクターを採用しているため、様々な細胞において遺伝子発現実験に使用可能です。製品形態は大腸菌グリセロールストックです。

### 特長

- ヒトの全ゲノムをほぼ網羅
- 各クローンのORF塩基配列を確認済み\*2
- ヒトのCMVプロモーターを採用
- V5タグとの融合タンパク質としてORFを発現
- Blasticidin耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能



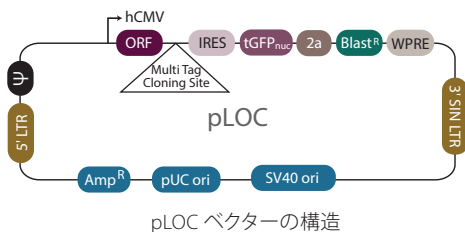
ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
PGK	ヒトのphosphoglycerate kinase (PGK) 遺伝子プロモーター (BsdRの発現を駆動)
Bsd <sup>R</sup>	Blasticidin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
hCMV	ヒトcytomegalovirusプロモーター (ORFの発現を駆動)
ORF	Open reading frame (タンパク質コード領域)
V5	V5エピトープタグ
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

## ■ Precision LentiORF Collection\*1

本クローンコレクションは、ORFeome Collaboration CollectionのORFをレンチウイルススペースの発現ベクターpLOCに挿入することにより作成されました。レンチウイルススペースの発現ベクターを採用しているため、様々な細胞において遺伝子発現実験に使用可能です。製品形態は、大腸菌グリセロールストックあるいはReady-to-useの高力価レンチウイルス粒子\*3です。Precision LentiORF Collectionのお好みのORFクローン (最大2種類) にコントロールベクターなどをセットにしたPrecision LentiORF Starter Kit もラインアップしています (下表参照)。

### 特長

- ヒトの全ゲノムをほぼ網羅
- 各クローンのORF塩基配列を確認済み\*2
- ヒトのCMVプロモーターを採用
- カスタムタグとの融合タンパク質としてORFを発現可能
- TurboGFPの同時発現によってORFの発現を確認可能
- Blasticidin耐性遺伝子を持つため、安定発現細胞を薬剤選択可能



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
hCMV	ヒトcytomegalovirusプロモーター (ORFの発現を駆動)
ORF	Open reading frame (タンパク質コード領域)
Multi Tag Cloning Site	タンパク質精製用または発現確認用タグ配列の追加に便利なクローニングサイト
IRES	Internal ribosome entry site (リボソームが結合するサイト。TurboGFPおよびBlasticidin耐性遺伝子をコードする転写産物の翻訳を実現する)
tGFPnuc	遺伝子形質導入と発現の確認マーカー (核移行シグナルを付加したTurboGFP遺伝子)
2a	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。TurboGFPおよびBlasticidin耐性タンパク質の同時発現を実現)
Blast <sup>R</sup>	Blasticidin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

### Precision LentiORF Starter Kit

用途	製品名	キット内容
トランスフェクションの困難な細胞用にレンチウイルス粒子を自作したい場合	Transduction Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precision LentiORFクローン (1~2種類) - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• Precision LentiORF RFP Positive Control - 大腸菌グリセロールストック</li> <li>• Calcium Phosphate Transfection Reagent Kit</li> <li>• Trans-Lentiviral packaging mix (10回分)</li> </ul>
Ready-to-useの高力価レンチウイルス粒子をお求めの場合	Viral particle Starter Kit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precision LentiORFクローン (1~2種類) - 高力価レンチウイルス粒子 (2 X 25 μL)</li> <li>• Precision LentiORF RFP Positive Control - 高力価レンチウイルス粒子 (1 X 25 μL)</li> </ul>

\*1 第3世代のレンチウイルスパッケージングシステムに適合しません。レンチウイルス粒子へのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit [▶P.36](#) の使用をおすすめします。  
\*2 公的研究機関で検証したものです。弊社では塩基配列を確認していません。 \*3 高力価 (≧ 1 x 10<sup>8</sup> TU/mL) フォーマットの製品をラインアップしています。

## その他の試薬

### ■ Trans-Lentiviral shRNA/ORF Packaging Kit

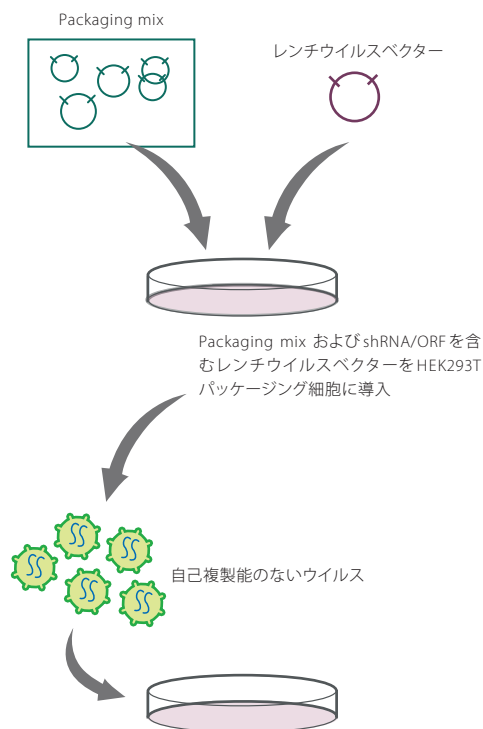
レンチウイルスベクター用の安全・高効率パッケージングシステムです。Packaging mixとレンチウイルスベクターをHEK293Tパッケージング細胞にコトランスフェクションすることによってパッケージングを行います。

#### 特長

- 多用途性：第2または第3世代のレンチウイルスベクターの効率的なパッケージングが可能です。
- 卓越したバイオセーフティー：ウイルスゲノムのパッケージングに必要なタンパク質をコードしている遺伝子を5つのプラスミドに分け、自己複製能を持つ組み換えウイルスの生じるリスクを低減しています。
- 幅広い細胞指向性：非分裂細胞を含む哺乳動物細胞に *in vitro* および *in vivo* において効率的に形質導入するレンチウイルス粒子を作成します。
- 高力価：1 ~ 5 x 10<sup>6</sup> TU/mLの力価が得られます。

#### キット内容

- Trans-Lentiviral Packaging Mix
- HEK293T Packaging Cell
- CaCl<sub>2</sub> Reagent
- 2 X HBSS reagent
- pGIPZ Non-silencing Control Vector DNA (shRNA Packaging Kitの場合) あるいは Precision LentiORF RFP control DNA (ORF Packaging Kitの場合)



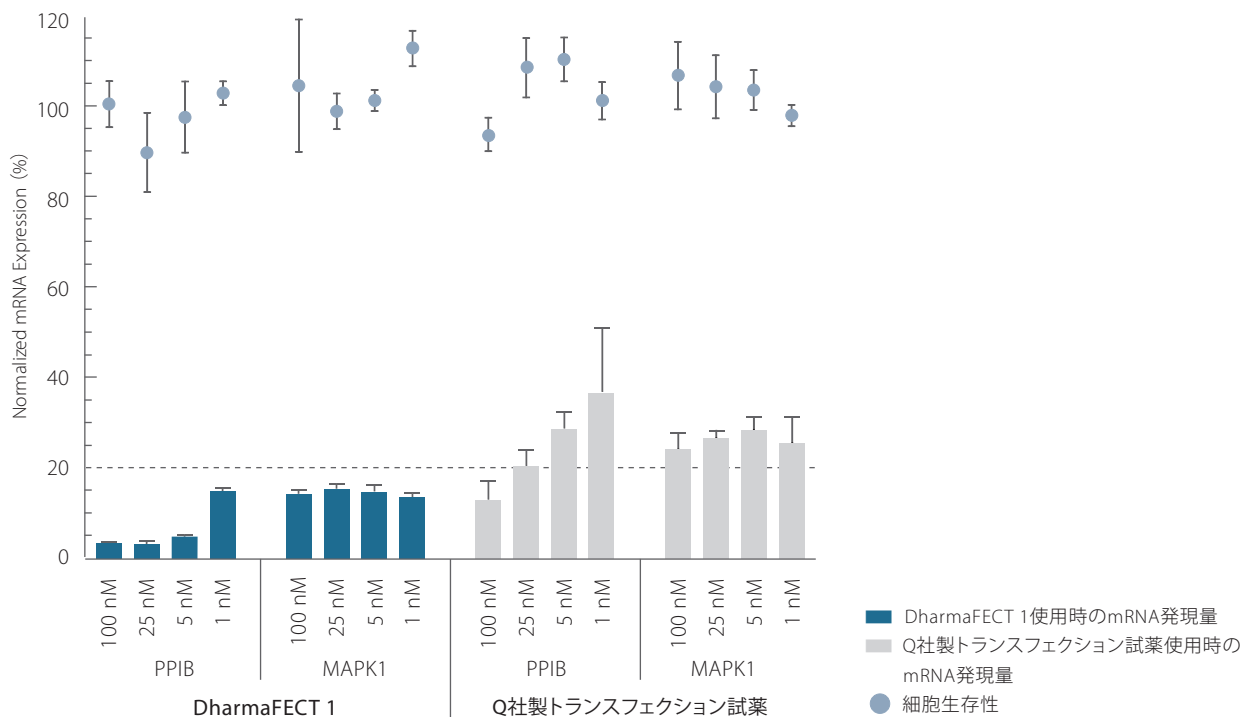
Trans-Lentiviral shRNA/ORF packaging Kit による  
ウイルスパッケージング

## ■ DharmaFECTトランスフェクション試薬

DharmaFECT 1~4は、細胞にあわせて最適条件で使い分ける4種類の低分子RNA用トランスフェクション試薬です。siRNA、miRIDIAN microRNA MimicおよびHairpin Inhibitorの導入にお使いいただけます。高い導入効率、低い細胞毒性、再現性のある結果を実現します。DharmaFECT 1が最も汎用性のある処方トランスフェクション試薬ですが、DharmaFECT 2~4の使用により、細胞株によっては最も高い導入効率を得ることができます（→P.38のDharmaFECT トランスフェクション試薬による導入確認済み細胞リストを参照ください）。DharmaFECT Duoは、siRNAとプラスミドDNAを同時に効率よく細胞へ導入するためのトランスフェクション試薬です。

### 特長

- 少数の遺伝子を対象としたsiRNA実験やsiRNAスクリーニングに最適
- 低濃度のsiRNAおよびmicroRNAを効率よく細胞へ導入 ● 幅広い条件で使えるため条件検討が容易
- 低い細胞毒性 ● DharmaFECT 1~4をセットにしたDharmaFECT Set of 4もラインアップ



### DharmaFECTによる効率的なトランスフェクション

DharmaFECT 1あるいはQ社製トランスフェクション試薬を用いて、Cyclophilin B (PPIB) あるいはMAPK1遺伝子をターゲットとするSMARTpool siRNAをHeLa細胞にトランスフェクションしました。mRNA発現量はbranched DNA assay (Panomics Quantigene Reagent System) によって、細胞生存性はAlamarBlue Reagent (Biosource International) を用いて評価しました。

### 製品ラインアップ

製品	容量
DharmaFECT 1	
DharmaFECT 2	
DharmaFECT 3	0.2, 0.75, 1.5, 5 × 1.5 mL
DharmaFECT 4	
DharmaFECT Set of 4	4 × 0.2, 4 × 0.75, 4 × 1.5 mL
DharmaFECT Duo	0.2, 0.75, 1.5, 5 × 1.5 mL

細胞株	細胞名	推奨Dharma FECT種類	GAPDHあるいは PPIB遺伝子発現抑制 (%)	96ウェルプレートのウェルあたり必要なDharmaFECT量 (μL)	96ウェルプレートのウェルあたりの細胞数	その他の適用可能なDharmaFECT種類
<b>ヒト</b>						
786-0	Kidney adenocarcinoma	1	94	0.4	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2
A549	Lung carcinoma	1	92	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2、3、4
BxPC3	Pancreas adenocarcinoma	2	85	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、3、4
DLD-1	Colorectal adenocarcinoma	2	85	0.4	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、3
DU 145	Prostate carcinoma	1	94	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2、3、4
NCI-H1299	Lung carcinoma	2	93	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	4
HCT-116	Colorectal carcinoma	2	83	0.1	5.0 x 10 <sup>3</sup>	4
HEK293	Kidney transformed embryonic cells	1	92	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2、4
HeLa	Cervical epithelial adenocarcinoma	1	95	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
HeLa S3	Cervical epithelial adenocarcinoma	4	97	0.4	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、2、3
Hep G2	Hepatocellular carcinoma	4	91	0.4	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、2
hMSC	Mesenchymal stem cells	1	94	0.4	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
HT-1080	Fibrosarcoma	4	96	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、2、3
HT-29	Colorectal carcinoma	1	99	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
Huh-7	Hepatocarcinoma	4	76	0.05	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、2
HUVEC	Umbilical vein endothelial cells	4	85	0.2	2.0 x 10 <sup>4</sup>	1、2
LNCaP	Prostate carcinoma	3	80	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1
MCF-10a	Breast adenocarcinoma	1	93	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2
MDA-MB-231	Breast adenocarcinoma	4	87	0.1	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1
MDA-MB-453	Breast adenocarcinoma	2	91	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、3、4
MCF7	Breast adenocarcinoma	1	90	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2、4
OVCAR-3	Ovarian adenocarcinoma	1	90	0.1	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
PC-3	Prostate carcinoma	2	88	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	3
SK-BR3	Breast adenocarcinoma	2	90	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、3、4
SK-OV-3	Ovarian adenocarcinoma	3	90	0.4	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、2、4
u87MG	Brain glioblastoma	1	87	0.1	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
<b>げっ歯類</b>						
A7R5	Rat aortic smooth muscle	2	95	0.1	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1
C2C12	Mouse myoblasts	1	87	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2、3、4
CHO K1	Chinese hamster ovary	4	92	0.8	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、2
ES-D3	Mouse embryonic stem cells	1	94	0.2	2.0 x 10 <sup>3</sup>	2
ES-E14TG2a	Mouse embryonic stem cells	1	93	0.2	2.0 x 10 <sup>3</sup>	2
H9C2	Rat heart myoblasts	1	96	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	2、3、4
J774A.1	Mouse macrophages	4	90	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	—
NIH/3T3	Mouse embryonic fibroblasts	1	91	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	3
NRK-49F	Rat kidney fibroblast	2	92	0.2	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1、4
RAT2	Rat fibroblast	1	75	0.2	2.0 x 10 <sup>4</sup>	2
3T3-L1	Mouse embryonic fibroblast	1	80	0.2	5.0 x 10 <sup>3</sup>	3
<b>その他</b>						
COS-7	African green monkey kidney	2	94	0.4	5.0 x 10 <sup>3</sup>	1、3、4

### DharmaFECT トランスフェクション試薬による導入確認済み細胞

ハウスキーピング遺伝子GAPDHあるいはPPIBのノックダウン効果をトランスフェクション効率の指標として、siRNAの効率的な導入条件を検討しました。GAPDHあるいはPPIBをターゲットとするコントロールsiRNA（これらのsiRNAは、最適化されたトランスフェクション条件ではmRNA発現レベルで90%以上のノックダウン効果が確認されています）を終濃度25~100 nMで用い、各々の細胞株について、プレーティング細胞密度（ウェルあたり2 x 10<sup>3</sup>、5 x 10<sup>3</sup>、1 x 10<sup>4</sup>、2.5 x 10<sup>4</sup>個の細胞）、DharmaFECTの種類（4種類）、DharmaFECTの量（0.05~0.8 μL/ウェル）を試しました（トランスフェクション時間は24時間）。これら3つのパラメーターについて、最もsiRNAトランスフェクション効率の高かった組合せ（いずれもmRNA発現レベルで80%以上のノックダウン効果を確認）を示しています。多くの細胞株において、「推奨DharmaFECT種類」に示したDharmaFECT以外の種類のDharmaFECTを用いてもトランスフェクションが可能です。これらのデータは、細胞株ごとのトランスフェクション条件を最適化する際の、初期目安としてご使用ください。

## RNAi実験用バッファー、水、培地

### 製品ラインナップ

製品	生物種	容量
5x siRNA Buffer	siRNAおよびmiRIDIAN microRNA研究用試薬溶解用の推奨バッファー 組成：300 mM KCl、30 mM HEPES-pH 7.5、1.0 mM MgCl <sub>2</sub>	100 mL
Molecular Grade RNase-free water	siRNAおよびmiRIDIAN microRNA研究用試薬を用いた実験用のRNase-free water	100 mL
Accell siRNA delivery media	Accell siRNA専用培地	100、500 mL

## 製品検索・注文のご案内

製品検索・注文はDharmacon専用Webサイト

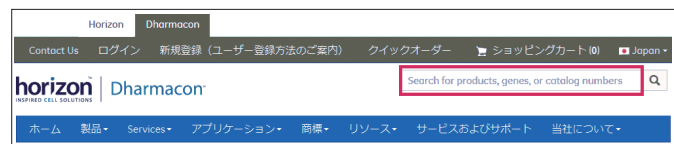
**dharmacon.horizondiscovery.com** にアクセスしてください。

※ ご注文には事前のユーザー登録が必要です。

### Step 1

ターゲット遺伝子情報を入力してください。

ターゲット遺伝子のGenBank accession number、gene symbol、gene IDのいずれかを、Webページの上にある検索窓（赤枠）に入力して検索ボタンをクリックしてください。



### Step 2

製品群ごとに検索結果をまとめてお知らせします。

画面は「BRCA1」と入力して検索した結果が表示された状態です。製品ならびに関連する技術情報が「遺伝子」のフィールドに表示されます。siRNAあるいはshRNAのリンク（赤枠）から各製品リストのページに移動してください。移動先ページで、各種デザイン済みsiRNAあるいはshRNAの+をクリックすると、さらに詳細な製品リストが表示されます。**製品のコード番号および価格は製品検索時に各Webページで表示されます。**ご希望の製品をカートに入れて注文してください。

製品名	Description	Species
<a href="#">siRNA</a> <a href="#">shRNA</a> crRNA / sgRNA cDNA / ORF EST	<b>BRCA1</b> BRCA1, DNA repair associated ID: 672 Alias: BRCA1, BRCC1, BROVCA1, FANCS, IRIS, PNCA4, PPP1R53, PSCP, RNF53	Human 

[dharmacon.horizondiscovery.com](http://dharmacon.horizondiscovery.com)

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0036 東京都渋谷区南平台町16-28 グラスシテイ渋谷6F

Tel : 03-4360-5160

[rnai.jp@horizondiscovery.com](mailto:rnai.jp@horizondiscovery.com)

[www.horizondiscoverykk.com](http://www.horizondiscoverykk.com)

B005-1812.20-v1

© Horizon Discovery Group Company

本書の全部または一部を無断で複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客様よりいただいた情報は、お客様への回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

**horizon**<sup>TM</sup>  
INSPIRED CELL SOLUTIONS