

信頼できる柔軟性の高い RNAi テクノロジー



Sample & Assay Technologies

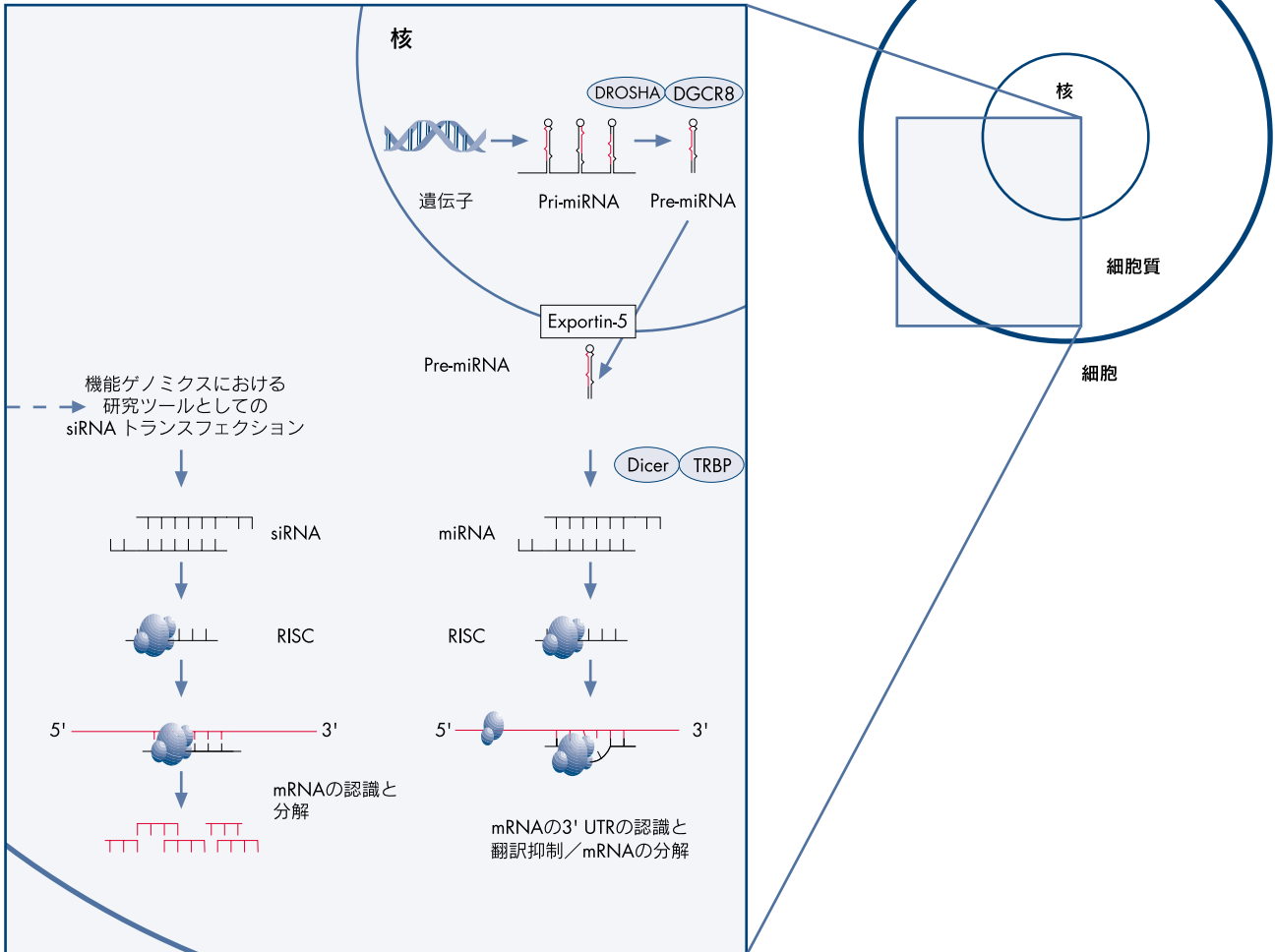
RNAi は機能ゲノミクスや創薬開発研究にとって非常に重要なツールです。本誌には QIAGEN の RNAi 関連製品だけでなく、コントロール実験に対するアドバイスや RNAi 実験を成功させるための重要なパラメーターに関する情報も掲載しています。QIAGEN は、お客様の研究促進を支援するため様々な実験スケールに対応できるフレキシブルで高度なテクノロジーを提供しています。

RNAi 実験を成功させるための重要なパラメーター	4
siRNA デザイン	6
siRNA の導入	7
RNAi コントロール	8
QIAGEN の GeneGlobe® ウェブサイト	9
RNAi 選択ガイド	11
RNAi に関する製品概要	12
オーダーインフォメーション	19

各種情報

- GeneGlobe ウェブツール：遺伝子およびパスウェイに特異的な製品に関する情報
www.qiagen.com/GeneGlobe
- RNAi 製品およびサービス
www.qiagen.com/siRNA
- TransFect Protocol Database：細胞株に特化したトランスフェクションプロトコールの検索
www.qiagen.com/TransFect
- Transfection Cell Database：トランスフェクション条件（核酸、試薬、細胞株など）で検索可能な実験情報データベース
www.qiagen.com/TransfectionCellDatabase
- QIAGEN AllStars RNAi Control 製品ページ：適切な RNAi control に関する情報
www.qiagen.com/AllStars
- 印刷物、引用文献、アドバイスやその他の有用なツール
www.qiagen.com/Support
- QIAGEN ProductFinder：アプリケーションに最適な QIAGEN 製品の検索
www.qiagen.com/ProductFinder

siRNA および miRNA のパスウェイ



機能ゲノミクス研究では、化学合成した siRNA (short interfering RNA) を細胞に導入します。RISC (RNA-induced silencing complex) が形成され、二本鎖 RNA が一本鎖にほどかれ、一方の一本鎖 RNA のみ RISC に留まります。RISC は結合した siRNA と相補的な配列を持つ mRNA を標的とし、その相同性を有する mRNA を切断し、その結果翻訳が妨害されます。

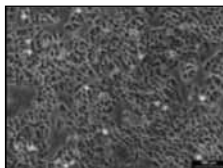
一方、miRNA は核内でまず長い primary miRNA (pri-miRNA) として転写され、その後 Drosha および DGCR8 (nuclear microprocessor complex) によりプロセッシングされ precursor miRNA (pre-miRNA) になります。pre-miRNA は Exportin-5 により核内から細胞質へ輸送されます。Dicer および TRBP により pre-miRNA はプロセッシングされ mature miRNA となり、mature miRNA は RISC に取り込まれます。相補的あるいは部分的に相補的な標的 mRNA を RISC が認識すると、mRNA の分解あるいは翻訳抑制により遺伝子発現が阻害されます。

siRNA	miRNA
研究ツールとして使用される外因性 siRNA	内因性の RNA
標的 mRNA に対し完全に相補的	標的 mRNA に対して部分的に相補的
配列特異的な標的 mRNA を分解	翻訳抑制/標的 mRNA の分解

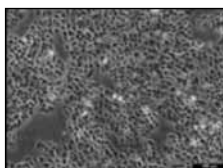
RNAi 実験を成功させるための重要なパラメーター

生物学的な疑問を解明したり仮説を証明するための RNAi 実験を開始する際に、実験系で考慮すべきいくつかの重要なパラメーターの決定に本章をお役立てください。これらのパラメーターとしては、標的遺伝子のタイプや数、siRNA を導入するための最適な細胞株や導入法、アッセイ法、適切なコントロール実験（8 ページ参照）、解析するタイムポイント、さらにデータ解析のための統計手法があります。

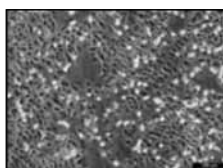
未処理の細胞



Nonsilencing siRNA



QIAGEN siRNA 1



QIAGEN siRNA 2

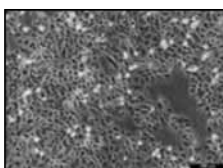


図 1. 2 種類の siRNA で表現型を検証

PLK1 siRNA あるいは nonsilencing siRNA をトランスフェクトした A549 細胞を 24 時間後に顕微鏡で観察した。PLK1 ノックダウンは明らかに有糸分裂細胞（球状の細胞）の蓄積という特徴的な現象を引き起こす。QIAGEN がデザインした 2 種類の siRNA のトランスフェクション後、両方の siRNA でこの表現型が明確に観察できる。

データ提供 ; Ralph Graeser, Sarah Umber, Michaela Brosig, and Michael H.G. Kubbutat, ProQinase GmbH, Freiburg, Germany.

遺伝子および siRNA の選択

RNAi 実験の規模は、1 種類の目的遺伝子から少数の関連遺伝子あるいはパスウェイに参与する遺伝子グループのノックダウン、さらにゲノムワイドなハイスループットスクリーニングにまで広範にわたります。QIAGEN ではチューブ包装の siRNA だけでなく、プレートフォーマットの FlexiPlate siRNA をお届けしています。プレートフォーマットでは、ミドルおよびハイスループット実験用に標的遺伝子を選択でき、ご希望に応じた siRNA のプレートレイアウトが可能です（13 ページ）。実験結果を正確に解釈するために、QIAGEN は各 RNAi 実験で並行して行なうべきコントロール siRNA を開発、検証しました（15 ページ）。

至適化されたトランスフェクション

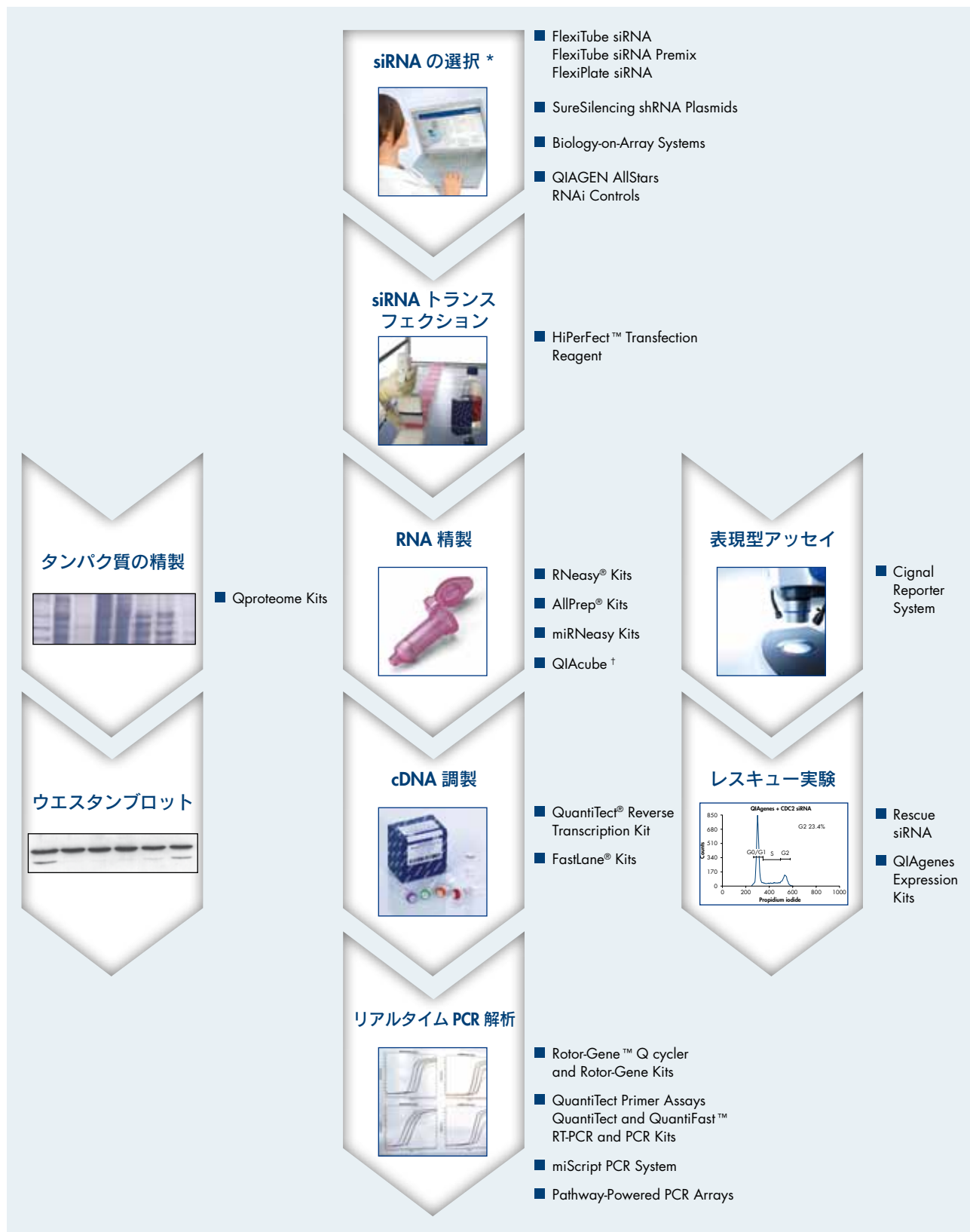
RNAi 実験に使用する細胞株は siRNA を効果的に導入できなければなりません。ノックダウン効果を最大限にし、かつオフターゲット効果を最小限にするために、トランスフェクションは最適化されていなければなりません。選択したトランスフェクション法は効率が高く、細胞毒性が低く、さらに、例えば自動化フォーマットにも適したセットアップしやすいリバーストランスフェクションにも対応する系が最適です。

適応性の高い表現型解析

表現型解析の多くは、細胞に関する様々なパラメーターを測定するアッセイ（生存率、検出可能な物質の生産、およびタンパク質局在性 / イオン濃度 / 細胞運動性 / 形態の変化など）を用いて行なわれます。タンパク質の局在化や修飾における変化を調べることにより遺伝子機能に関する重要な手がかりが得られます（18 ページの Qproteome® Kit 参照）。また、パスウェイ毎に活性を測定するセルベースアッセイにより遺伝子機能や制御に関する情報を解明できます（www.SABiosciences.com の Signal Reporter System 参照）。

ノックダウンの評価

QIAGEN は 1 種類の転写物に対して、異なる部位を標的にした 2 種類以上の siRNA を使用して実験を行なうことを推奨しています。同一標的遺伝子に対する異なる配列の siRNA がオフターゲット効果により同じ表現型を示す確率は非常に低くなります。従って、異なる siRNA を用いて表現型を確認することは、標的遺伝子のノックダウンに特異的なものかを検討するのに容易で説得力のある方法です（図 1）。論文審査のある多くの学術雑誌では、複数の siRNA による確証が RNAi 実験結果発表の必要条件になってきています。標的遺伝子のノックダウン効果はリアルタイム RT-PCR により mRNA レベルで、あるいはウエスタンブロットによりタンパク質レベルで検証できます（18 ページ）。また、複数の siRNA を用いて表現型を確認するだけでなく、レスキュー実験を行なうことでも、観察された表現型がオフターゲット効果ではなく標的遺伝子のノックダウンによるものであることを証明できます（8 ページ）。



QIAGEN のサンプル調製およびアッセイテクノロジーは、RNAi 実験の各工程に最適な製品をお届けしています。

* GeneGlobe で検索、注文 (9 ページ参照)。 † QIAGEN スピンカラムキットの完全自動化装置。

siRNA デザイン

QIAGENのsiRNAは、最新のHP OnGuard siRNA Designでデザインされており、抑制効果および特異性が高いsiRNAです。EntrezGene データバンクのヒト、マウス、ラット各遺伝子に対応する様々なsiRNAをGeneGlobe ウェブサイトで検索・オーダーできます（9 ページ）。HP OnGuard siRNA Design は以下の特長を取り揃えています（表 1）。

表 1. HP OnGuard siRNA Design の特長

特長	内容	利点	参考文献
ニューラル・ネットワークテクノロジー	大規模な RNAi データセットをベースにした BioPredsi neural network を siRNA デザインに利用。	抑制効果の高い siRNA	1 ~ 3
世界最大規模の siRNA 検証プロジェクト	QIAGEN 研究者が数千の siRNA のノックダウン効果を実証したプロジェクトからのデータをデザインプロセスの強化および改善に利用。	ゲノム創薬に繋がる多数の siRNA は本プロジェクトの実験で少なくとも 70% のノックダウン効果があることが実証された；このプロジェクトでの見識による、より効果的な siRNA をデザイン	4
ホモロジー解析	独自の解析ツールと重複のない最新配列データベースを使用。	オフターゲット効果を抑制	
Affymetrix® GeneChip® 解析	ゲノムワイド解析によりオフターゲット効果を最小限に抑える siRNA デザイン改良の開発を実現。	解析によりデザインアルゴリズムの特異性の向上	
最新の siRNA 標的配列	NCBI データベースからの最新データにより正確なデザインを実現。	正確な siRNA デザイン	
非相称	siRNA は、アンチセンス鎖とセンス鎖で 5' 末端の塩基対の安定性が同等でないようにデザインされている。5' 末端の結合が弱いアンチセンス鎖が RISC に取り込まれ、一方センス鎖は分解される。	機能性の高い siRNA をデザインし、センス鎖が RISC に組み込まれて起こるオフターゲット効果のリスクを抑制	5、6
3' UTR/Seed 領域	siRNA アンチセンス鎖の Seed 領域と目的としない mRNA 標的の 3' 非翻訳領域との一致を複数のパラメーター検索で情報処理を行なう。	siRNA が miRNA のように作用することで起こるオフターゲット効果のリスクを抑制	7 ~ 12
SNP 回避	SNPs (single nucleotide polymorphisms) にかかる siRNA を排除するために RefSNP データベースを使用。	SNP にかかる siRNA はその効果が変動するため、このような siRNA を排除することにより siRNA の有効性を増大	
インターフェロンモチーフの回避	インターフェロン応答を起こすことが判明している複数の配列モチーフに対して siRNA を検索し、そのようなモチーフを持つ siRNA を排除。	インターフェロン応答によるオフターゲット効果のリスクを抑制	13、14

参考文献

- Huesken, D. et al. (2005) Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23**, 995.
- Mukherji, M. et al. (2006) Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14819.
- Matveeva, O. et al. (2007) Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res.* **35**, e63.
- Krueger, U. et al. (2007) Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* **17**, 237.
- Aza-Blanc, P. et al. (2003) Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol. Cell* **12**, 627.
- Schwarz, D.S. et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199.
- Farh, K.K. et al. (2005) The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**, 1817.
- Grimson, A. et al. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* **27**, 91.
- Jackson, A.L. et al. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15.
- Lim, L.P. et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769.
- Saxena, S., Jónsson, Z.O., and Dutta, A. (2003) Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 44312.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* **23**, 457.
- Hornung, V. et al. (2005) Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263.

siRNA の細胞導入 — 重要な質問と答え

siRNA トランスフェクションの至適化をどのように行なうか？

研究室で RNAi 実験系を立ち上げる場合や新しい細胞株を用いる場合には siRNA トランスフェクションの至適化が必要です。HiPerFect Transfection Reagent Handbook に至適化に関する有用な情報が記載されています (www.qiagen.com/HB/HiPerFect)。至適化実験では、AllStars Cell Death Control siRNA (15 ページ) のようなポジティブコントロールを用いてトランスフェクション効率をモニタリングできます。

トランスフェクション実験で至適化するべきパラメーター：

- 試薬および siRNA 量
- トランスフェクション時の細胞密度
- 解析までの細胞とコンプレックスのインキュベーション時間

少量の siRNA をトランスフェクトすることがなぜ重要か？

高濃度の siRNA トランスフェクションでは、部分的に相同性を有する遺伝子や相同性のない遺伝子の発現に siRNA が影響を与え、オフターゲット効果が生じることがあります。また、低濃度の siRNA により、オフターゲット効果を大幅に回避できることが示唆されています (1, 2)。HiPerFect Transfection Reagent は siRNA を高い効率で取り込めるため、低濃度の siRNA を用いてノックダウン効果に影響することなく遺伝子サイレンシング実験を行なえます。

なぜ siRNA トランスフェクションで細胞毒性を回避するべきか？

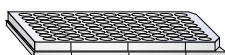
siRNA 導入によって起こる細胞毒性により表現型の解析が信頼できなくなるため、RNAi 実験でのデータ解析に悪影響を及ぼします。データ解析に影響する要素としては、トランスフェクション試薬による表現型の変化、ストレスによる遺伝子発現変化、解析に使用するべきではない死細胞の存在があります。HiPerFect Reagent は細胞毒性がなく、細胞内に空胞形成（これは細胞プロセスの破壊を示唆している）がおこりません。細胞周期や細胞形態の詳細な解析では、HiPerFect Transfection Reagent のみをトランスフェクトした Mock 細胞と未処理細胞との間に差異が認められません。

従来のトランスフェクションとリバーストランスフェクションの違いは？

リバーストランスフェクション・プロトコールでは、プレートにまず siRNA を添加し、続いてトランスフェクション試薬を添加します。そしてコンプレックス形成後に細胞を添加します。この点が、細胞をまずプレートに播種し、その後でコンプレックスを添加する従来のトランスフェクションと大きく異なります。リバーストランスフェクションは特にハイスループット実験に広く利用されています。理由は、自動化が簡単でトランスフェクション前に siRNA をプレートウェル内で保存でき、また別のプレートで siRNA とトランスフェクション試薬のコンプレックス形成が不要なため実験材料が少量で済むためです。

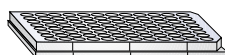
従来のプロトコール

ステップ 2. トランスフェクション・コンプレックス
ステップ 1. 細胞



リバーストランスフェクション

ステップ 3. 細胞
ステップ 2. HiPerFect Reagent
ステップ 1. 核酸



引用文献

1. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., and Fesik, S.W. (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6347.
2. Persengiev, S.P., Zhu, X., and Green, M.R. (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* **10**, 12.

RNAi コントロール

正確なデータ解析を行なうためには、適切なコントロール実験が不可欠です（15 ページ参照）。

ポジティブおよびトランスフェクションコントロール siRNA

ポジティブコントロール siRNA は、標的 mRNA を強くノックダウンすることが実証済みの siRNA です。ポジティブコントロールは、トランスフェクション実験のセットアップおよびノックダウン解析が最適に行なわれたかどうかを確認するために用います。標的遺伝子をノックダウンすることで研究中の表現型に影響を与える siRNA がポジティブコントロールとして使用できます。QIAGEN はヒト遺伝子に対応する数千の検証済み siRNA を提供しており、これらの siRNA をポジティブコントロールとして使用できます。あるいは AllStars Cell Death Control siRNA (15 ページ) のように検出しやすい表現型を誘導する siRNA も使用できます。ポジティブコントロール siRNA のトランスフェクション実験を毎回並行して行なうべきです。

ネガティブコントロール siRNA

ネガティブコントロール siRNA は、既知の哺乳動物遺伝子と相同性を持たない siRNA です。この siRNA は細胞表現型に影響しないことがテスト済みでなければなりません（15 ページの AllStars Negative Control siRNA 参照）。ネガティブコントロール siRNA のトランスフェクションは、表現型や遺伝子発現の変化が特異的ではないかどうかを決定するための基準となります。ネガティブコントロール siRNA のトランスフェクション実験を毎回並行して行なうべきです。

Mock トランスフェクションコントロール

Mock トランスフェクションコントロールとは siRNA なしに細胞にトランスフェクション操作だけを行なうことです（例；トランスフェクション試薬だけで細胞を処理する）。このコントロール実験は、トランスフェクション試薬あるいはトランスフェクションの工程に起因する非特異的な影響を判定するために使用します。

未処理の細胞コントロール

正常な遺伝子発現量を測定するために、未処理細胞での遺伝子発現解析も行ないます。この結果は他の実験サンプルで得た結果との比較に使用できます。未処理細胞は全ての実験で必ず解析します。

複数の siRNA を用いた表現型の確認

遺伝子のノックダウンに起因する表現型への影響は、同一 mRNA 上の異なる配列を標的にした 2 種類以上の siRNA を用いて確認しなければなりません。

レスキュー実験

観察された表現型の変化がオフターゲット効果ではなく標的遺伝子のノックダウンに起因することを検証するためにレスキュー実験を行なえます。典型的なレスキュー実験として、siRNA による標的遺伝子のノックダウンにより表現型が変化した細胞に、その siRNA により抑制されない標的遺伝子の変異体（サイレント変異など）を発現するコンストラクトと siRNA をコトランスフェクションし、表現型がネイティブと変わらないことを確認します。コンストラクトからの遺伝子発現は内因性遺伝子のノックダウンを相殺します。GeneGlobe ウェブツールからヒト遺伝子に対応する siRNA と QIAGEN Expression Construct を容易に入手できます。QIAGEN Expression Construct は即使用可能な発現ベクターであり、発現に対して塩基配列が最適化されたヒト遺伝子配列が挿入されています。また、rescue siRNA は標的遺伝子の 3' 末端非翻訳領域を標的にしていますが、これらの非翻訳領域は QIAGEN Expression Construct には存在していません。これらをコトランスフェクトすると rescue siRNA は内因性の標的遺伝子をノックダウンし、siRNA 耐性コンストラクト由来の同一タンパク質が発現されます。

QIAGEN の GeneGlobe ウェブサイト

QIAGEN の GeneGlobe ウェブサイトは、複数の生物種の遺伝子およびパスウェイに特異的な製品に関する情報、検索、注文が可能な使いやすいウェブ情報サイトです。GeneGlobe では RNAi、遺伝子発現解析、タンパク質発現、miRNA 研究を促進する 150 万以上の製品にアクセスできます。GeneGlobe で入手可能な製品には FlexiTube siRNA および FlexiTube GeneSolution (12 ページ)、FlexiTube siRNA Premixes (16 ページ)、QIAGEN AllStars RNAi Controls (15 ページ)、QuantiTect Primer Assays (18 ページ)、FlexiPlate siRNA (13 ページ)、miScript Primer Assays、miScript miRNA Inhibitors および Mimics (www.qiagen.com/miRNA)、QIAGENes Expression Constructs (www.qiagen.com/goto/QIAGENes) があります。これらの製品は頻りにアップデートされており、最新の配列情報に対応しています。詳細は GeneGlobe ウェブサイト www.qiagen.com/GeneGlobe をご覧ください (図 2)。

GeneGlobe の特長：

- RNAi 関連製品を簡単に検索でき直ぐに注文可能
- 標的遺伝子に対する siRNA やリアルタイム RT-PCR アッセイなどを同時に検索可能
- 相互にリンクしたパスウェイマップ情報



図 2. GeneGlobe ウェブサイトの検索ページ

GeneGlobe 検索ページ (www.qiagen.com/GeneGlobe) の検索項目に遺伝子名や Entrez Gene IDs などを入力するだけで、遺伝子、miRNA、パスウェイに特異的な製品を容易に検索できる。

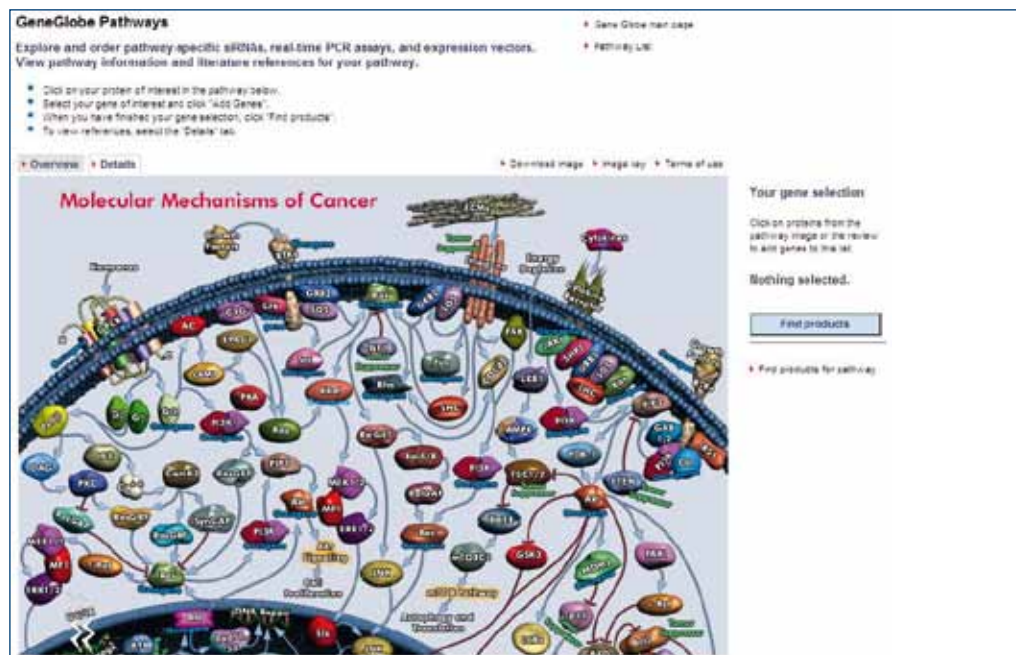


図 3. GeneGlobe パスウェイ パスウェイ情報が見やすいマップで表示されている。

GeneGlobe パスウェイ

GeneGlobe パスウェイは遺伝子ファミリーやパスウェイに関する有用な情報を見やすいマップで表示しており、標的遺伝子の新規の機能解明や次の実験計画の有用なツールとなります(図3)。各パスウェイ毎に詳細な解説およびリファレンスを提供しています。パスウェイの各タンパク質に対応する製品はタンパク質の画像をクリックするだけでご覧いただけます。

情報リソース

GeneGlobe は遺伝子およびパスウェイに関する有用な情報を提供します。Transcript map は siRNA、 QuantiTect Primer Assay、 QIAgenes Expression Construct の cDNA 上の部位を示しています(図4)。また NCBI ウェブページへのリンクがあり、目的遺伝子に関する豊富な情報が簡単に得られます。miRNA 製品には stem-loop のイメージ図も提供しています。

siRNA 情報にはデザイン時における 3' UTR/seed 領域の解析結果が含まれています(6 ページも参照)。実験的に検証された siRNA に関しては、検証に使用した細胞株やトランスフェクション条件、ノックダウン効率などの有用な実験情報をご提供しています。レスキュー実験は、QIAgenes Expression Constructs と併用するために特別にデザインされた、各ヒト遺伝子に対応した rescue siRNAs を用いて簡単に実施できます。(8 ページ)。推奨するコントロールや関連製品にも容易に検索できます。

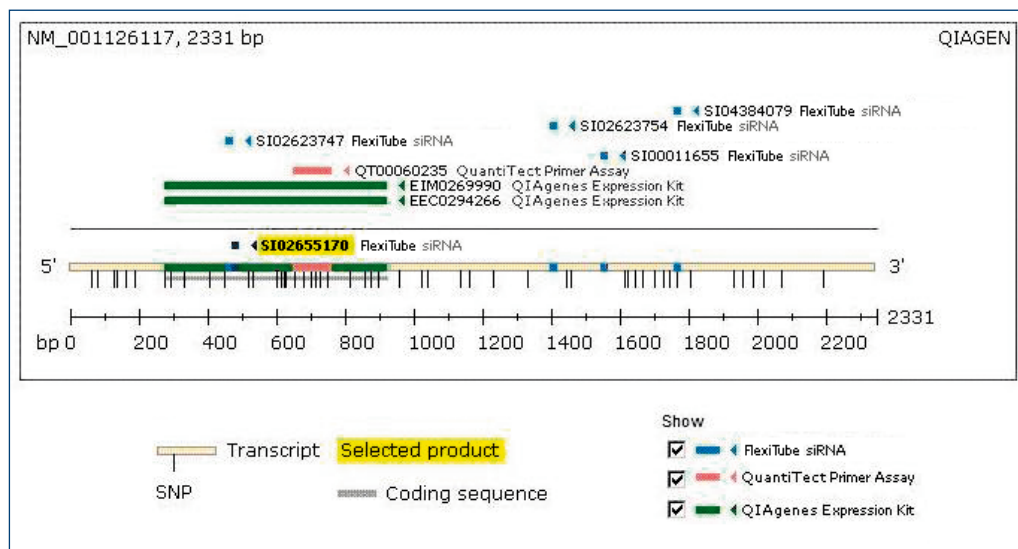
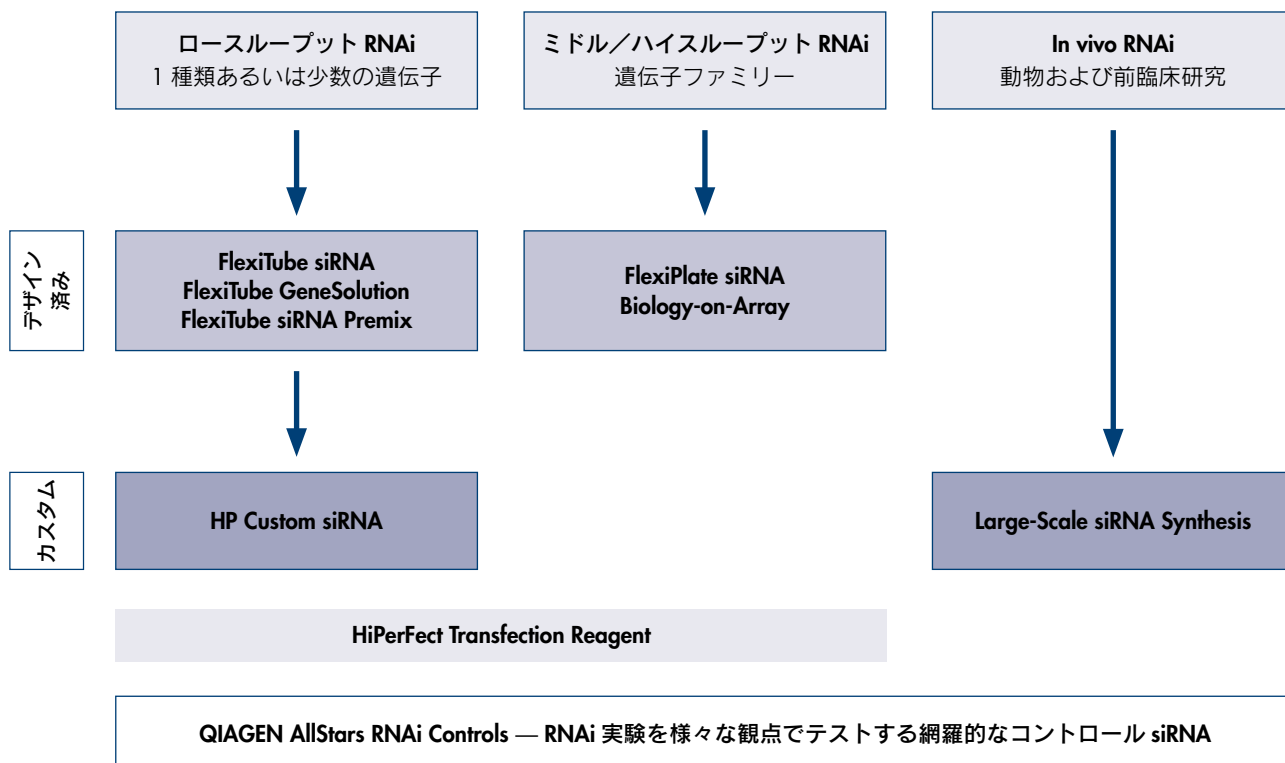


図 4. GeneGlobe ウェブサイトの Transcript map

RNAi 選択ガイド



RNAi 実験は初めてですか？

ヒト、マウスの系で RNAi 実験を始める方は、実験系の確立や最適化に必要なものが全て入った RNAi Human/Mouse Starter Kit をご利用ください。

QIAGEN がお届けする主要 siRNA 製品の特長

製品名	特長	スケール	フォーマット	デザイン	修飾の可否	最小限の注文数	種	配列添付
FlexiTube siRNA [†]	経済的な 1 nmol 収量	1 nmol	チューブ	HP OnGuard siRNA Design	無	4 siRNA	ヒト*	有
	全てのヒト、マウス、ラット遺伝子を網羅	5 nmol/20 nmol	チューブ	HP OnGuard siRNA Design	20 nmol 収量で可能	1 siRNA	ヒト*、マウス、ラット	有
FlexiTube GeneSolution	1 標的遺伝子につき選択済み siRNA4 種類	1 nmol	チューブ	HP OnGuard siRNA Design	無	4 siRNA/セット	ヒト、マウス	有
FlexiPlate siRNA	siRNA、スケールを選択でき、独自のプレートレイアウトが可能	0.1 nmol/ 0.25 nmol/1 nmol	プレート 96/384 ウェル	HP OnGuard siRNA Design	無	36 siRNA	ヒト、マウス	有
HP Custom siRNA	高純度な siRNA のカスタム合成	20 nmol	チューブ	カスタム	有	1 siRNA	-	-
Large-Scale siRNA Synthesis	In vivo 動物実験および前臨床アプリケーション用	20 nmol ~	チューブ/ プレート	カスタム	有	1 siRNA	-	-
AllStars RNAi Controls	Negative、Positive、Transfection 各種コントロール	Varies	チューブ/ プレート	-	有	Varies	-	無

* 数千の siRNA は、リアルタイム RT-PCR で 70%以上のノックダウンを検証済み。

[†] ノックダウン保証については弊社ウェブサイト (www.qiagen.co.jp) で “製品保証内容説明書” を検索・ダウンロードの上、ご確認ください。

表 2. 1 nmol 収量の siRNA でトランスフェクションできる回数

フォーマット	トランスフェクション数 *
6 ウェルプレート	41
12 ウェルプレート	83
24 ウェルプレート	166
48 ウェルプレート	332
96 ウェルプレート	504

* トランスフェクションの回数は培養液の容量および最終 siRNA 濃度に依存するが、この表では siRNA 最終濃度を 10 nM として計算されている。

FlexiTube siRNA/FlexiTube GeneSolution

経済的で使いやすい 1 nmol、5 nmol、20 nmol 収量の siRNA

- 経済的な siRNA でより多くの遺伝子解析が可能
- ゲノムワイドに用意された siRNA
- 最新の siRNA デザインで最小限のオフターゲット効果
- GeneGlobe ウェブサイトで siRNA を簡単に検索/注文
- 数千個のヒト siRNA は実験的に検証済み

FlexiTube siRNA により少数のヒト、マウス、ラット遺伝子を対象とした RNAi 解析を行なえます。ヒト、マウス、ラットに対応した siRNA では 5 nmol/20 nmol で、ヒト、マウスに対応した siRNA では 1 nmol の経済的な合成スケールが入手可能です (1 nmol は、最小注文数が 4 本です)。1 nmol は、複数のトランスフェクションに十分な siRNA 量です (表 2)。凍結乾燥の siRNA をチューブでお届けします。20 nmol の合成スケールでは、Alexa Fluor®、フルオレセイン、ローダミン、Cy®3、Cy5 による標識、アミノ、チオ・リンカーなどの修飾オプションやリン酸修飾が可能です。納品時に siRNA の配列情報が添付されます。

4 種類の siRNA セットが遺伝子特異的なソリューションを提供

FlexiTube GeneSolution はヒトあるいはマウスの各標的遺伝子に対して配列の異なる 4 種類の siRNA をセットにした製品です (図 5)。FlexiTube GeneSolution を用いれば、確実な RNAi 実験のために複数の実験を推奨する雑誌のガイドラインにも対応できます (1~3)。重複実験では、オフターゲット効果に起因した結果ではないことを実証するために同一 mRNA 上の異なる領域を標的にした数種類の siRNA を用います。

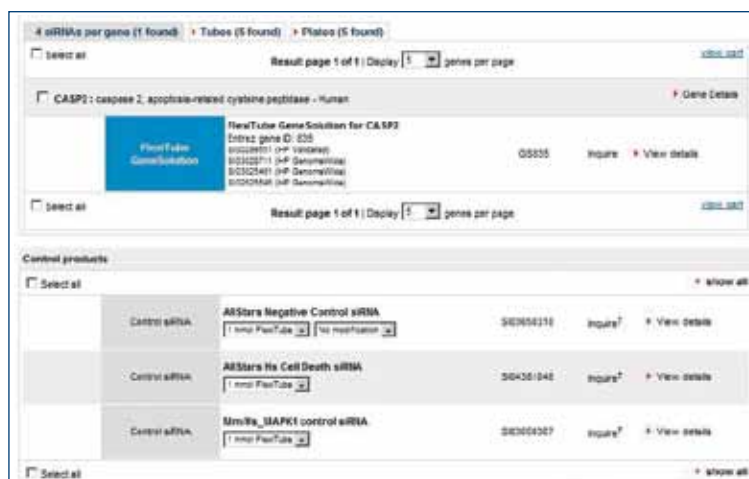


図 5. 簡単に最適な siRNA を選択できる FlexiTube GeneSolution

GeneGlobe ウェブサイトにヒトあるいはマウスの遺伝子の詳細を入力するだけで FlexiTube GeneSolution が提示される。

引用文献

1. Sharma, S. and Rao, A. (2009) RNAi screening: tips and techniques. *Nat. Immunology* **10**, 799.
2. Echeverri, C.J. et al. (2006) Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods*. **3**, 777.
3. Echeverri, C.J. and Perrimon, N. (2006) High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 373.

FlexiPlate siRNA

適応性が高く経済的な RNAi スクリーニングあるいはスクリーニング検証用のセット

- siRNA、コントロール、合成スケールが選択でき任意のプレートレイアウトも可能
- 経済的なスケール (0.1 nmol、0.25 nmol、1 nmol) でスクリーニングに最適
- 検索・注文を GeneGlobe ウェブサイトで迅速かつ簡単に実現
- 最新の siRNA デザインでオフターゲット効果のリスクが最小限
- 数千種のヒト siRNA は実験的に検証済み

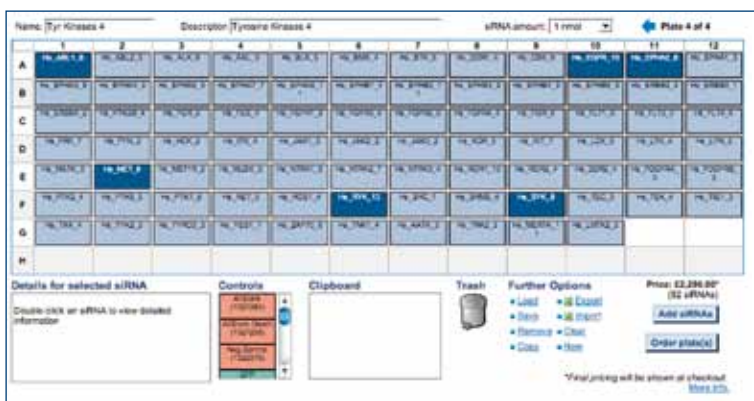
FlexiPlate siRNA は柔軟性の高い RNAi スクリーニングを実現します。ヒトあるいはマウスの標的遺伝子に対応する siRNA は、96 ウェルプレートでは 0.1 nmol、0.25 nmol、1 nmol から、384 ウェルプレートで 0.1 nmol、0.25 nmol から選択できます。ポジティブあるいはネガティブコントロールも各種取り揃えています。GeneGlobe ウェブサイトで siRNA を選択し、ご希望通りにプレートレイアウトができます (図 6)。

GeneGlobe パスウェイ (10 ページ、www.qiagen.com/GeneGlobe/Pathways) は、特定のパスウェイに関連する siRNA リストを作成するために使用できます。これらのリストをベースにして、siRNA を追加、削除、変更し、実験に必要な FlexiPlate siRNA を簡単に作成後は合成スケールを選択してすぐにご注文が可能です。

遺伝子リストのアップロード



ドラッグアンドドロップでプレートレイアウトを選択



注文あるいは保存

図 6. FlexiPlate siRNA の作製および注文プロセス

HP Custom siRNA

高純度な siRNA のカスタム合成

- 特許を持つ TOM アミダイド化学合成と精製プロセスで 90%以上の純度を実現
- 光安定性が高く蛍光強度の強い Alexa Fluor 修飾が可能
- 様々な修飾オプションを提供

お客様が指定した配列で合成した siRNA は、チューブあるいは 96 ウェルプレートでお届けします。Alexa Fluor、フルオレセイン、ローダミン、Cy3、Cy5、アミノおよびチオ・リンカー、リン酸修飾などの修飾オプションも提供しています。

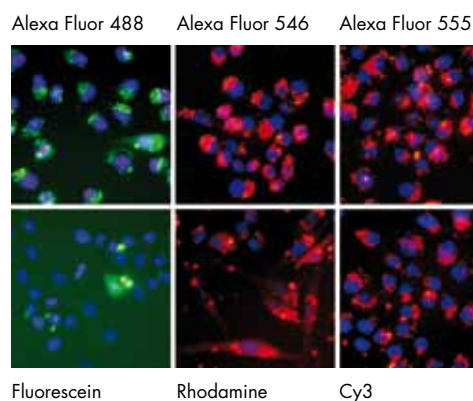


図 7. 最も強い蛍光強度の Alexa Fluor 標識 siRNA
センス鎖の 3' 末端をそれぞれ異なる蛍光色素で標識した siRNA (100 nM) をトランスフェクトし、24 時間後に HeLa S3 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

Large-Scale siRNA Synthesis

in vivo 動物実験および前臨床アプリケーション用 siRNA

- 様々なスケールや修飾が選択できる高い柔軟性
- エンドトキシン量の低い高純度 siRNA
- 大量合成のノウハウを持つメーカーの信頼できる品質

QIAGEN の Large-Scale siRNA Synthesis は、研究および前臨床試験用に 20 nmol からご希望の量までの様々なスケールで高純度な siRNA 合成します。修飾オプションとしては、コレステロール、リン酸、アミノヘキシル、FITC、3' OMe、2' OMe、ホスホロチオエート、フルオロピリミジン、リボT、リボイノシン、ピオチン、様々な色素標識を提供しています。お届けする siRNA は HPLC で精製し、純度は 90%以上です。RNAi 治療の研究や in vivo での動物実験では、高品質な siRNA を大量に入手できることが不可欠です。

QIAGEN AllStars RNAi Control および RNAi Human/Mouse Starter Kit

RNAi コントロール実験用の siRNA、アッセイおよびキット

- 様々な観点でテストされた網羅的な RNAi コントロール
- 検証済みのネガティブコントロール siRNA を入手可能
- RNAi 実験の至適化および確立に必要なものが全て入ったキット
- 細胞死の誘導により簡単にトランスフェクションを至適化

QIAGEN AllStars RNAi Control は、ヒト、マウス、ラットでの RNAi 実験に使用可能なテスト済みの網羅的なコントロール siRNA です (表 3)。AllStars Negative Control siRNA は、ゲノムワイドな発現解析および細胞を用いたアッセイにより検証され、非特異的な効果が最小限であることが示されました。また、RISC 形成も観察され、現在入手可能なネガティブコントロールとしては最も広く検証された siRNA です。詳細情報は www.qiagen.com/AllStars でご覧ください。

RNAi Human/Mouse Starter Kit を用いて siRNA による RNAi 実験系の簡単な確立、トランスフェクション条件の最適化、ルーチンでのコントロール実験ができます。本キットには AllStars Negative Control siRNA、MAPK1 positive control siRNA、AllStars Hs Cell Death Control siRNA、HiPerFect Transfection Reagent が入っています。QIAGEN は、リアルタイム定量 RT-PCR (18 ページ) によるノックダウン検証用製品も販売しています。

細胞死コントロールはトランスフェクションのモニタリングとポジティブコントロール実験を簡単に実現

AllStars Hs Cell Death Control siRNA (ヒト) および AllStars Mm/Rn Cell Death Control siRNA (マウスおよびラット) は、細胞生存に必要な不可欠な遺伝子で、普遍的に発現している遺伝子を標的とした非常に効果的な siRNA ミックスです。これらの遺伝子がノックダウンされると、細胞死が誘導され、光学顕微鏡で観察できます (図 8)。トランスフェクション効率は、AllStars Cell Death Control siRNA のトランスフェクション 48 ~ 96 時間後に光学顕微鏡で細胞を観察して簡単に確認でき、手間のかかる複雑なアッセイ実験を行なう必要はありません。

表 3. 各種 RNAi コントロール

AllStars RNAi Controls	製品説明
AllStars Negative Control siRNA	厳密にテストされた nonsilencing siRNA
AllStars Cell Death Control siRNAs	細胞死によるトランスフェクション用コントロール
AllStars Transfection Controls	トランスフェクション効率をモニタリングするための蛍光標識 siRNA と細胞死を誘導するコントロール
AllStars Positive Controls	機能検証済みポジティブコントロール
AllStars Reporter Controls	レポーターアッセイ遺伝子を標的にした siRNA
AllStars Interferon Controls	インターフェロン誘導性遺伝子検出用リアルタイム RT-PCR アッセイ
AllStars Downstream Controls	遺伝子発現定量用リアルタイム RT-PCR アッセイ
RNAi Human/Mouse Starter Kit	ポジティブ/ネガティブコントロールと HiPerFect Transfection Reagent

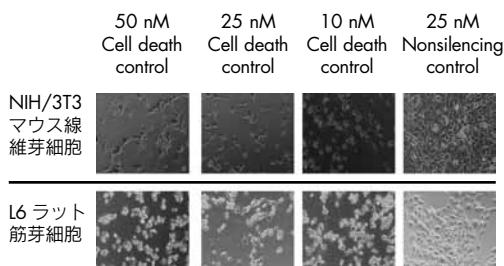


図 8. マウス、ラット細胞での迅速で簡便なトランスフェクション解析

24 ウェルプレート中の NIH/3T3、L6 細胞 (2×10^4 /ウェル) に表記量の AllStars Mm/Rn Cell Death Control siRNA または 25 nM Nonsilencing siRNA (AllStars Negative Controls siRNA) を、HiPerFect Transfection Reagent を用いてトランスフェクトした。72 時間後、細胞死を光学顕微鏡で観察した。使用した全ての条件で誘導された細胞死を nonsilencing control をトランスフェクトした細胞と簡単に見分けられた。

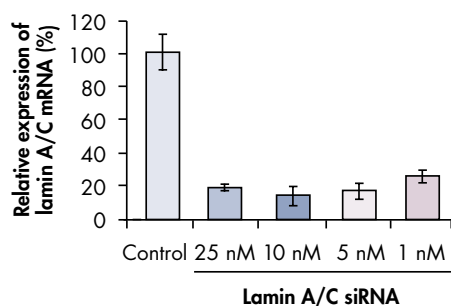


図 9. 初代細胞への効果的なトランスフェクション
HiPerFect Transfection Reagent を用いて正常なヒト肺由来繊維芽細胞に lamin A/C をターゲットにした siRNA をトランスフェクトした。Nonsilencing siRNA も Control としてトランスフェクトした。48 時間後にリアルタイム定量 RT-PCR によりノックダウン効果を解析した。

HiPerFect Transfection Reagent

低濃度 siRNA での効果的なノックダウンを実現するトランスフェクション試薬

- 低濃度 siRNA で効果的なトランスフェクション
- 細胞生存率が高く初代細胞でも効果的なトランスフェクション
- 浮遊細胞やマクロファージへの効果的なトランスフェクション
- miRNA mimic/inhibitor を効率的にトランスフェクト

陽イオン性脂質と中性脂質を最適に配合した HiPerFect Transfection Reagent は、低濃度の siRNA を用いた場合でも効率的な siRNA 取り込みと細胞内での siRNA 遊離により、高い遺伝子ノックダウン効果を実現します (図 9)。HiPerFect Transfection Reagent はハイスループトな Reverse Transfection 法や miRNA 研究に最適です。HiPerFect Transfection Reagent を用いて成功した細胞株のリストと詳細な実験条件を弊社ウェブサイトのオンラインデータベースでご覧いただけます (www.qiagen.com/TransfectionCellDatabase)。細胞株、核酸、プレートフォーマットを入力すれば最適なトランスフェクション用プロトコールが www.qiagen.com/TransFect で入手できます (図 10)。

図 10. トランスフェクション・プロトコールへ容易にアクセス
トランスフェクション情報の入力簡単な TransFect Protocol Database。

FlexiTube siRNA Premix

トランスフェクションが即開始可能な至適化済み siRNA トランスフェクション用試薬ミックス

- 直ぐに使用できる簡便な siRNA トランスフェクションミックス
- トランスフェクションの至適化が最小限
- 細胞生存率の高い効率的なトランスフェクション

全てのヒトおよびマウス遺伝子に対応した FlexiTube siRNA Premix により遺伝子サイレンシング実験を最大限に簡便化できます。siRNA とトランスフェクション試薬が混和済みなので、混和やコンプレックス形成ステップや siRNA、さらに試薬の比率を至適化する面倒な実験も不要なため実験時間を短縮できます。FlexiTube siRNA Premix はすぐにトランスフェクトでき、遺伝子ノックダウン結果が迅速に得られ、節約した時間を実験解析にあてることができます。

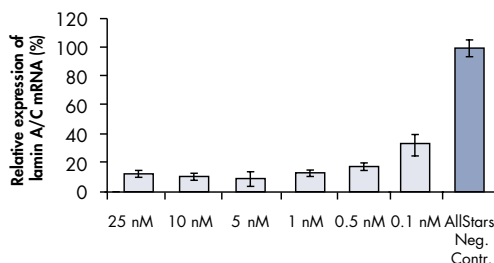


図 11. 至適化済みの FlexiTube siRNA Premix を用いて迅速で効率的なノックダウン
Lamin A/C をターゲットにした FlexiTube siRNA Premix を様々な量で HepG2 細胞にトランスフェクトした。48 時間後にリアルタイム定量 RT-PCR によりノックダウン効果を解析した。至適化なしに全ての量において lamin A/C の高いノックダウン効果が得られた。

Biology-on-Array Systems

遺伝子発現での変動を制御するメカニズムを解明

- 一回の実験で制御メカニズムを解析
- siRNA とリアルタイム RT-PCR を組み合わせた簡単な手法
- 遺伝子発現に関与する制御タンパク質を簡単にスクリーニング

Biology-on-Array System により、遺伝子の発現を制御するタンパク質の同定が可能です。このシステムは、遺伝子発現を抑制するアプローチを実現するため、即トランスフェクト可能な FlexPlate siRNA と定量リアルタイム RT-PCR を利用しています。各 Biology-on-Array siRNA プレートは、84 種類の関連する制御遺伝子機能を同時に抑制し、その後、各制御タンパク質のノックダウンに関連する遺伝子発現変化をリアルタイム PCR で検出します。Biology-on-Array 解析ソフトウェアにより、解析は簡便化でき、目的の遺伝子発現の制御メカニズムを同定できます。Biology-on-Array に関する詳細は www.SABiosciences.com をご覧ください。

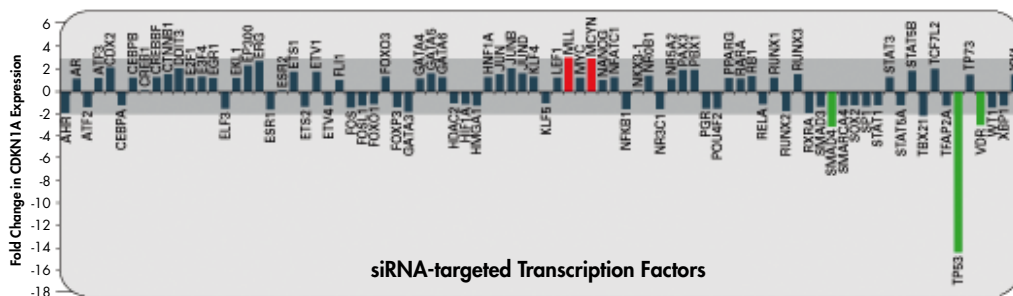


図 12. TP53 が 5-フルオロウラシル作用機序で主要メデイエータであることを Biology-on-Array 解析により同定
88 サンプル (84 種類のがん関連転写因子をノックダウンした後の 84 サンプルと 4 種類のネガティブコントロール) で CDKN1A に特異的な定量リアルタイム RT-PCR を行った結果、5-フルオロウラシル (抗がん剤) の影響下では TP53 のノックダウンが CDKN1A 発現を有意に抑制した。このことは、TP53 が CDKN1A のアップレギュレーション転写因子であることを示唆している。VDR や SMAD4 も 5-フルオロウラシルによる CDKN1A のアップレギュレーションに関与していることを示している。

SureSilencing shRNA Plasmids

発現プラスミドを利用したゲノムワイドな RNAi

- 抗生物質を用いて安定した導入細胞の選択が可能
- 実験的に検証済みのアルゴリズムで高い特異性と効率性を実現
- 完全な shRNA 配列情報を提供
- 大腸菌に導入したプラスミドのストックが可能

SureSilencing shRNA Plasmid は、ヒト、マウス、ラット遺伝子に対応しており、short-hairpin RNA を用いた特異的かつ効率的な遺伝子抑制を実現します。それぞれの遺伝子において、4 種類の目的遺伝子に特異的な shRNA プラスミドと 1 種類のネガティブコントロールプラスミドの 5 種類のプラスミドで構成されています。GFP マーカー、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシンの 4 種類のプラスミドオプションから選択できます。siRNA とは異なり、SureSilencing shRNA Plasmid は安定なプラスミド導入細胞を用いたプロジェクトや長期間のノックダウン効果の解析に利用できます。SureSilencing shRNA Plasmid に関する詳細は www.SABiosciences.com をご覧ください。

リアルタイム RT-PCR 用のキットおよびアッセイ

SYBR® Green を用いたリアルタイム RT-PCR 用プライマーセットおよびマスターミックス

- siRNA に対応し標準化されたゲノムワイドなプライマーセット
- 最大 60% まで時間を短縮できる高速サイクリング用 PCR 試薬
- 高い感度と特異性で正確な定量を実現

QuantiTect Primer Assay は SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR において非常に高い特異性と感度が得られるゲノムワイドなプライマーセットです。これらのアッセイは、最適な性能と機能性を QIAGEN siRNA と組み合わせてバイオインフォマティクスで検証済みです。siRNA も QuantiTect Primer Assay も GeneGlobe ウェブサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) で注文できます。QuantiTect Primer Assay はチューブまたは 96/384 ウェルプレートで入手可能です。SYBR Green 検出を用いたリアルタイム定量 RT-PCR には、QuantiTect Primer Assay と QuantiFast/QuantiTect SYBR Green Kit を組み合わせて使用します (図 13)。QuantiFast SYBR Green Kit にはリアルタイム RT-PCR で高速かつ特異的な定量を実現する最適化済みのマスターミックスが入っています。高速な加熱・冷却機能を持つサーマルサイクラーだけでなく、標準的なサーマルサイクラーでも PCR 時間を顕著に短縮することができます (www.qiagen.com/FastPCR)。SYBR Green I を用いた Rotor-Gene SYBR Green Kit はリアルタイム PCR 装置 Rotor-Gene での高精度でより高速のリアルタイム RT-PCR に最適化されています。

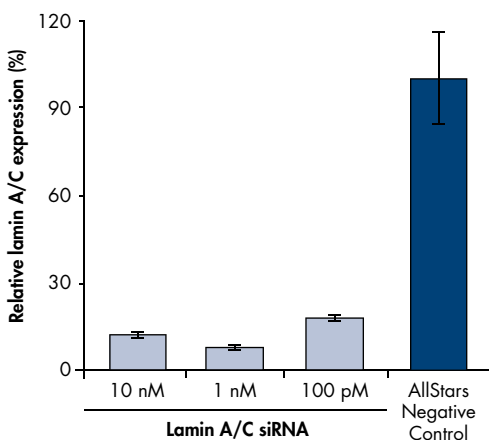


図 13. QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit を用いた遺伝子ノックダウン検証
Lamin A/C を標的にした siRNA (3 種類の濃度) を正常なヒト肺由来繊維芽細胞に HiPerFect Transfection Reagent を用いてトランスフェクトした。AllStars Negative Control siRNA もトランスフェクトした。48 時間後に、QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit と Lamin A/C QuantiTect Primer Assay を組み合わせた 1 ステップリアルタイム定量 RT-PCR によりノックダウンを解析した。

Qproteome Kit

遺伝子サイレンシング実験の効果をタンパク質レベルで解析するための使いやすいキット

- タンパク質レベルで効果的なノックダウンを確認
- タンパク質の局在性変化を検出
- タンパク質修飾の変化を検出
- 特別な装置が不要な簡単なタンパク質調製法

様々なサンプル種からの全タンパク質分離、細胞内局在に基づいたタンパク質分離や修飾タンパク質の分離に特化された各種 Qproteome Kit を取り揃えています。タンパク質調製用製品に関しては www.qiagen.com/Protein をご覧ください。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
FlexiTube siRNA	20 nmol, 5 nmol, or 1 nmol siRNA; delivered in tubes	Varies*	Inquire
FlexiTube GeneSolution	4 siRNAs (1 nmol) recommended for a gene; delivered in tubes	Varies*	70,000
FlexiTube siRNA Premix	Optimized siRNA-reagent mix; 0.75 nmol siRNA	Varies*	36,500
FlexiPlate siRNA	siRNA in 96-well and 384-well plates; minimum order 36 siRNAs	Varies*	Inquire
HP Custom siRNA	siRNA purified to >90% (20 nmol) [§]	Varies	44,500
Large-Scale siRNA Synthesis	siRNA from 10 mg to 10 g with labeling and modification options	Varies	Inquire
QIAGEN AllStars RNAi Controls	Positive, negative, transfection, downstream, reporter, and interferon controls	Varies*	Inquire
RNAi Human/Mouse Starter Kit	For >160 transfections in 24-well plates: HiPerFect Reagent, Positive and Negative Control siRNA	301799	59,500
HiPerFect Transfection Reagent (0.5 ml) [†]	Reagent for up to 166 transfections in 24-well plates	301704	33,500
QuantiTect Primer Assay (200)	Forward and reverse primer mix for SYBR Green-based real-time PCR	Varies*	18,000
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (400) [‡]	Fast real-time PCR kit for 400 x 25 µl reactions	204054	49,000
Biology-on-Array Systems [¶]	siRNA plates, kit for first-strand synthesis, data analysis software	Varies	Inquire
SureSilencing shRNA Plasmids [¶]	Gene-specific shRNA cloned into a plasmid containing a choice of markers	Varies	Inquire

* これらの製品の検索および注文は www.qiagen.com/GeneGlobe をご覧ください。 † 大きなサイズのキット、あるいは異なるフォーマットも入手可能です。お問い合わせください。 ‡ 大きいサイズのキットおよび RT-PCR Kit も入手可能です。お問い合わせください。 § 蛍光や修飾の各種オプションも可能です。お問い合わせください。 ¶ パスウェイサイエンティスト (Tel : 03-6890-7312) にお問い合わせください。

QuantiTect、QuantiFast、FastLane 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては、各 QIAGEN 製品の英語版 Handbook あるいは User Manual をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

RNAi サンプル調製およびアッセイテクノロジーは www.qiagen.com/siRNA をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, AllPrep®, FastLane®, GeneGlobe®, HiPerFect™, Qproteome®, QuantiFast™, QuantiTect®, RNeasy®, Rotor-Gene™ (QIAGEN Group); Affymetrix®, GeneChip® (Affymetrix, Inc.); Alexa Fluor®, SYBR® (Molecular Probes, Inc.); Cy® (GE Healthcare).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

Purchase of QuantiTect SYBR Green Kits is accompanied by a limited license under U.S. Patent Numbers 5,035,996; 5,945,313; 6,518,026 and 6,287,823 and corresponding foreign patents.

LIMITED USE LABEL LICENSE

SureSilencing shRNA Plasmids contain proprietary technology owned and/or licensed exclusively for certain fields of use by Promega Corporation (US Patents 7,413,874 & 7,291,711 &/or US Patent Applications 10/564,020, 09/645,706 & 10/314,827). Except as provided herein below, use of this product is restricted to the use by the purchaser of this product in the purchaser's own research. Such researchers may transfer modified derivatives and modified progeny of this product to their research colleagues who agree in writing to be bound by the terms and conditions of this label license. No transfer of unmodified product is authorized. No other use or transfer of this product or its derivatives is authorized without the express, written consent of each of Promega Corporation and SABiosciences Corporation. Such prohibition includes, without limitation, any and all nonresearch uses of this product in any procedure, application, product manufacture, or product transfer for which monetary or other consideration is received from another party. With respect to such commercial use, or any therapeutic or diagnostic uses, please contact Promega Corporation for supply and licensing information.

© 2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

