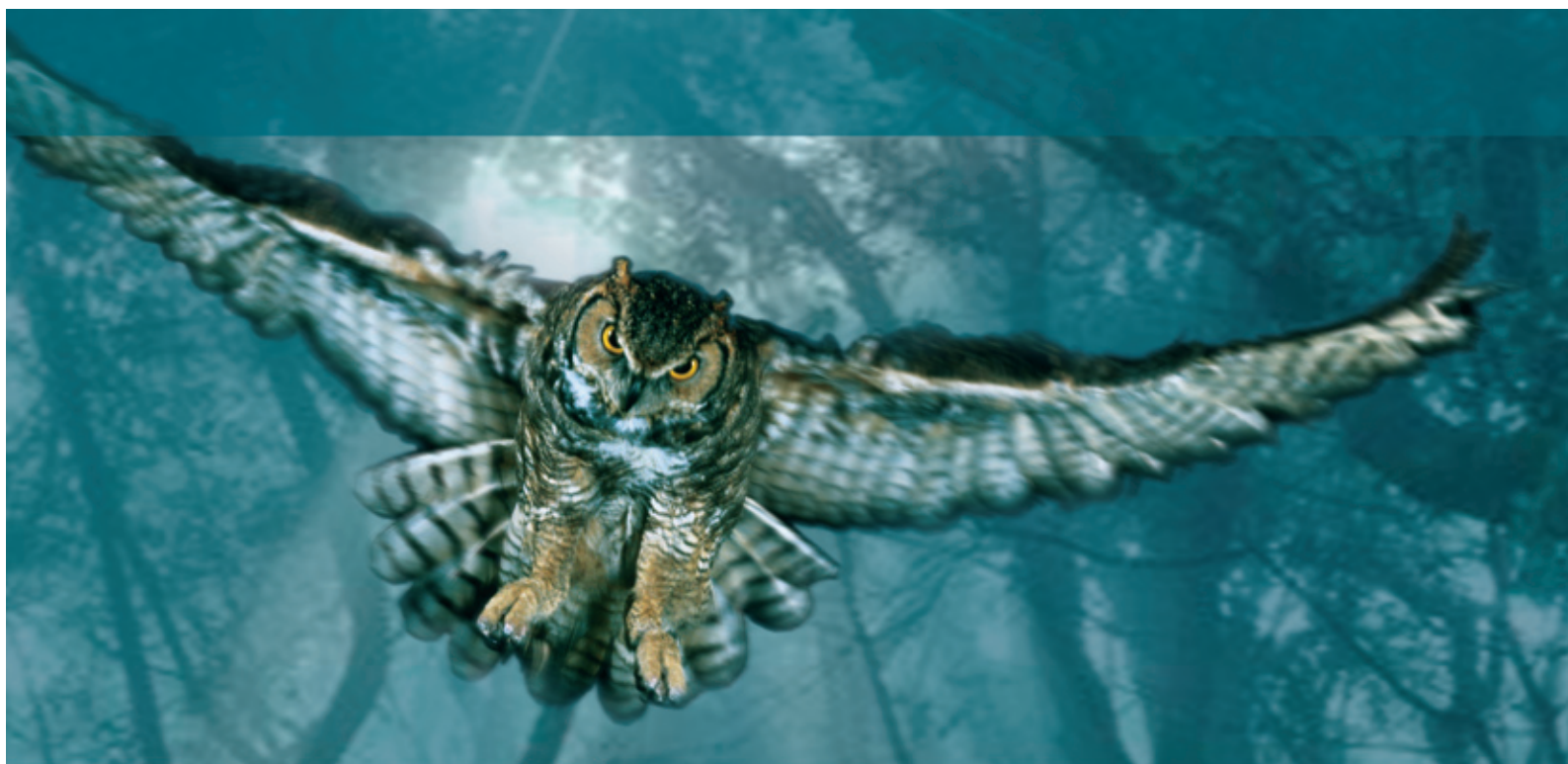




Roche Applied Science
Gene Knockdown

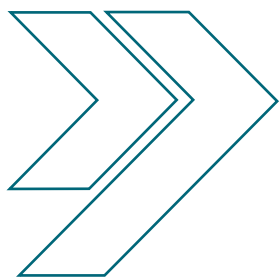
日本語版



Integrated Solutions



Focus on Your Target –
Effective and Specific Gene Knockdown



ジーンノックダウンにおける 統合されたソリューション

RNA干渉(RNAi)パスウェイは、ターゲット遺伝子に相同な二重鎖RNA(dsRNA)をインジェクションした時に、その遺伝子の発現が抑制されるという結果により、初めて線虫*Caenorhabditis elegans*において発見されました。ジーンサイレンシングにおけるその優れた特異性と効率により、遺伝子機能の特定やパスウェイ解析、ターゲットの同定や確認において、広く使用される強力な重要なファンクショナルゲノミクスのツールとなっています。

ジーンノックダウンにおける統合されたソリューション	2
RNA干渉とは?	4
ジーンノックダウンワークフロー	6
概要	6
siRNAの作成	8
トランスフェクション	12
ノックダウンの検証	14
mRNAの定量	14
タンパク質の検出	19
機能アッセイ	20
オーダー情報	25
免責条項とトレードマーク	29
リファレンスと略語	31



siRNAの作成	トランスフェクション	ノックダウンの検証	機能アッセイ
RZPDから提供のesiRNA* X-tremeGENE siRNA Dicerキット	X-tremeGENE siRNAトランスフェク ション試薬	ライトサイクラー® 2.0 システム	細胞増殖試薬WST-1

利点

信頼できる高品質の製品とテクノロジーの最適な組み合わせによる
ジーンノックダウン実験の成功と確実な結果の提供。

siRNA作成の加速

esiRNAリソース製品*をテンプレートとし、X-tremeGENE siRNA Dicerキットを使用することにより高効率のsiRNAミクスチャーが合成されるため、時間が節約できます。

効率的なジーンノックダウンの達成

さまざまな細胞株へのsiRNAのデリバリーには、X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬がもたらす高い効率と低細胞毒性から利益を得ることが出来ます。

正確なリアルタイムPCRテクノロジーの採用

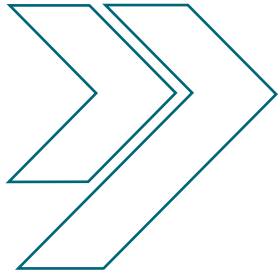
ターゲットmRNAのサイレンシングの成功は、ライトサイクラー® 2.0システムとトランスクリプター ファーストスタートcDNA合成キットの組み合わせによる融解曲線分析で検証してください。タンパク質レベルでのノックダウンの検証には、Lumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットティングキット(マウス/ラビット)が高感度の結果を提供します。

細胞生存活性の高感度測定

ターゲット遺伝子ノックダウン後の細胞生存活性は、細胞増殖試薬WST-1で測定してください。

* esiRNAはRZPDゲノム研究ドイツリソースセンターから提供されています。詳しくは、www.rzpd.de/products/esiRNAを訪問してください。

Integrated
Solutions for
Gene
Knockdown



RNA干渉とは？

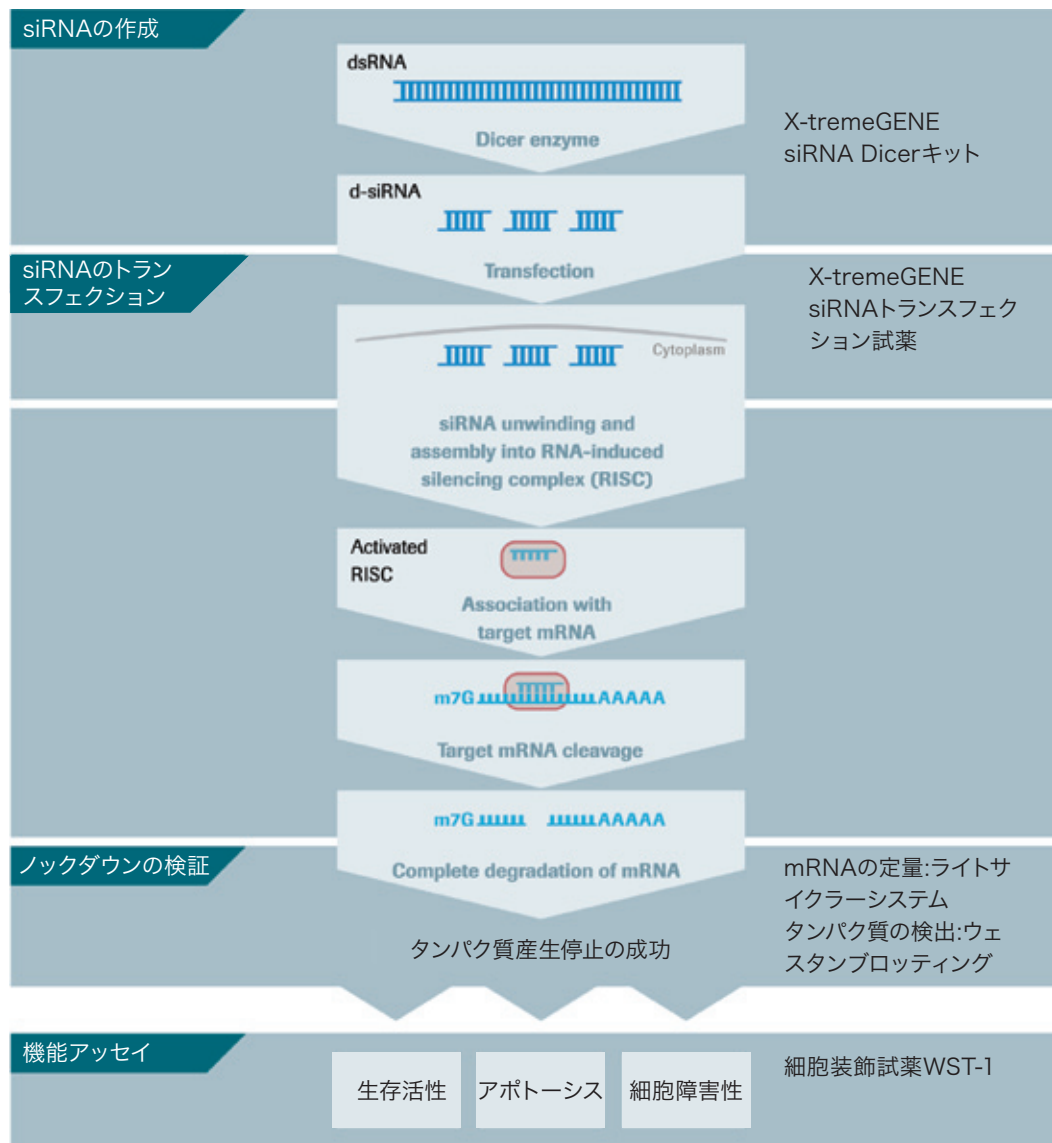
転写後ジーンサイレンシングとしても知られるRNA干渉(RNAi)は、遺伝子機能の研究において重要なツールとなってきました。遺伝子配列に相同な長い二重鎖RNA分子(dsRNA)が細胞内に導入された場合、対応するmRNAの分解とその後のタンパク質レベルの減少を引き起こすカスケードの引き金となります(1、2、3、4、5、6)。

1. 長鎖のdsRNAがDicerと呼ばれる細胞質酵素により、21-23bpの短い干渉(siRNA)に切断されます。
2. そのsiRNAsが、多くの分子で構成されるヌクレアーゼ・RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に取り込まれます。
3. 二重鎖siRNAの巻き戻しの後、活性化したRISCが相補的なmRNAターゲットを分解します。

それゆえ、遺伝子の配列が既知の場合、多くの生物や細胞株において、その機能を抑制するためにRNAiが使用できます。しかしながら、ほとんどの哺乳細胞株では、30bp以上のdsRNAによるアポトーシスの原因となる非特異的なインターフェロン応答の誘導が見られるため、長鎖dsRNAをRNAi解析に直接用いることは出来ません(7)。それゆえ、これらの細胞株でのRNAi解析に使用するには、最初に長鎖dsRNAをDicer酵素により、21-23bpのsiRNAに *in vitro* で切断しなければなりません。これが細胞内RNAiパスウェイの出発点です(8)。

これらの切り刻まれたsiRNA(d-siRNA*)の細胞への導入が、ターゲット遺伝子を阻害する内在性のRNAiパスウェイの引き金となります(図1)。その効果は、リアルタイムPCRや通常のプロット分析によるmRNAレベルのモニタリングや、ウェスタンブロットによるタンパク質レベルの実験、機能アッセイの実施などで分析されます。

*エンドヌクレアーゼにより調製されたsiRNAとしてesiRNAとも呼ばれます。



▲ 図1: d-siRNAのトランスフェクションにより誘導されたRNAiパスウェイの概要。

What is RNA Interference?

ジーンノックダウンワークフロー

概要

siRNAの作成

diced siRNAの作成

diced siRNAの高純度プール作成の加速

- ◆ esiWayサイレンシングリソース*
- ◆ X-tremeGENE siRNA Dicerキット

プラスミドの精製

ショートヘアピンRNA(shRNA)を発現するトランスフェクショングレードプラスミドの精製

- ◆ GenoPureプラスミドキット

トランスフェクション

siRNAのトランスフェクション

siRNAとコトランスフェクションに基づくジーンノックダウン実験用に使用する単一試薬

- ◆ X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬

プラスミドのトランスフェクション

shRNAを発現するプラスミドによる多種類の真核細胞の効率的なトランスフェクション

- ◆ FuGENE 6トランスフェクション試薬

選択用抗生物質

ステーブルなトランスフェクション細胞の選択

- ◆ ジェネティシン(G418)
- ◆ ハイグロマイシンB

ノックダウンの検証

mRNAの定量

マニュアルでのRNA分離

High Pure RNAキットでの高品質RNAの分離

- ◆ High Pure RNAアイソレーションキット

様々な量の培養細胞からのmRNAの直接分離

- ◆ mRNAアイソレーションキット

単一試薬によるトータルRNA、DNA、タンパク質の同時分離

- ◆ TriPureアイソレーションリエージェント

全自動のRNA分離

MagNA Pure LCシステムによる32サンプルまでのRNAの全自動分離

- ◆ MagNA Pure LCインスツルメント

- ◆ MagNA Pure LC RNAアイソレーションキット-高性能

- ◆ MagNA Pure LC mRNAアイソレーションキットI



タンパク質の検出

タンパク質の安定化

様々なプロテアーゼインヒビターの至適なミックスによるタンパク質の保護

- ◆ コンプリート錠

* esiRNAはRZPDゲノム研究ドイツリソースセンターから提供されています。詳しくは、www.rzpd.de/products/esiRNAを訪問してください。

ノーザンブロットング

高感度なNon-R1標識法による mRNAの定量

- ◆ DIGノーザンスターターキット

cDNA合成と定量リアルタイム PCR

迅速で正確なリアルタイム PCRによるmRNAの定量

- ◆ トランスクリプター ファーストストランドcDNA合成キット
- ◆ ライトサイクラー®システム
 - ・ライトサイクラー® 2.0と1.5インストルメント
 - ・ライトサイクラー®プローブデザインソフトウェア
 - ・ライトサイクラー®相対定量ソフトウェア
 - ・ライトサイクラー®ファストスタート^{PLUS}キット

**細胞増殖アッセイ**

トランスフェクション後の細胞の生存活性の測定

- ◆ 細胞増殖試薬WST-1

アポトーシスアッセイ

アポトーシス関連ターゲットの研究のための様々な高感度アッセイ法より選択

- ◆ 細胞死検出ELISA^{PLUS}

細胞障害性アッセイ

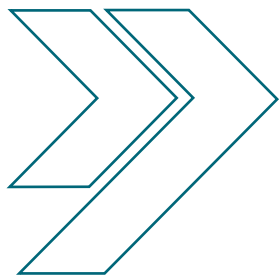
迅速で精密なアッセイによる細胞障害性/細胞溶解の定量

- ◆ 細胞障害性検出キット (LDH)

ウェスタンブロットング

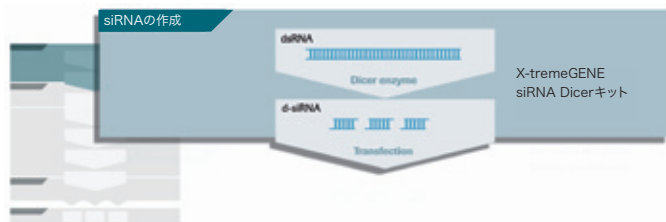
高感度な化学発光法によるタンパク質の検出

- ◆ Lumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットングキット



siRNAの作成

長鎖dsRNAからのDicerを用いた効果的なsiRNAプールの作成



In vitro でsiRNAを作成するには、いろいろな方法があります:

- 化学合成
- 短鎖RNAの*in vitro*トランスクリプション
- 長鎖RNAの*in vitro*トランスクリプションと、その後のDicer酵素による消化

今日、使用可能なテクノロジーでは、siRNAの化学合成がもっとも簡便な方法です。その他には、テンプレートとしてT7プロモーター部位を含む短鎖合成DNAオリゴヌクレオチドから、siRNA二重鎖となる短鎖RNA分子をT7 RNAポリメラーゼによる*in vitro*トランスクリプションで作成することが出来ます。しかし、ターゲットmRNAに相補的でないシーケンスはジーンノックダウンに適さないため、至適なsiRNAのためには注意と時間がかかるデザインが必要なことが、二つの方法の欠点です。

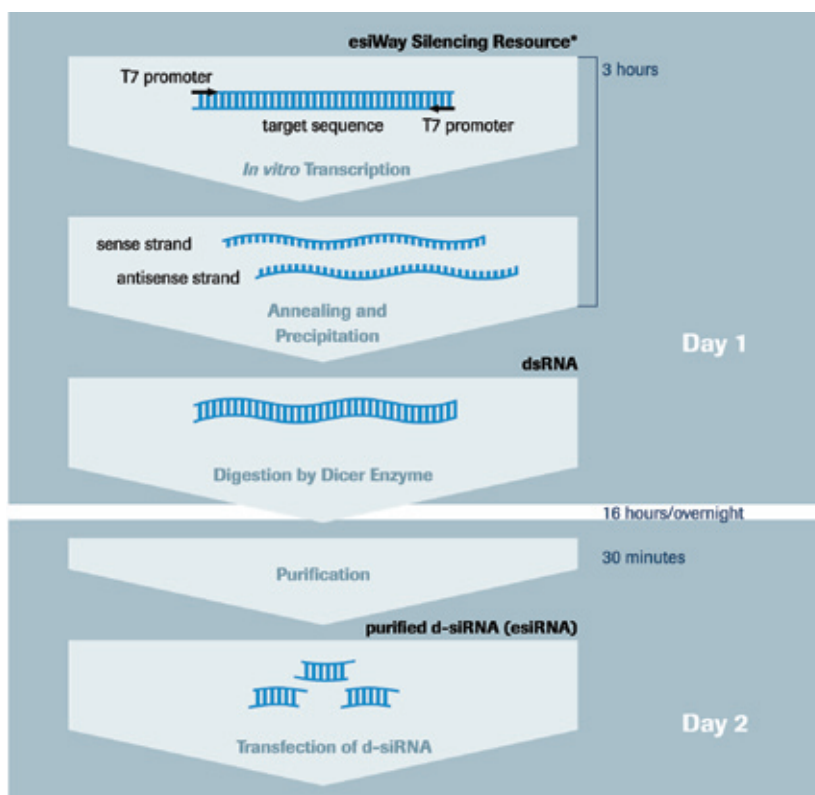
ノックダウンが達成される可能性を増やす方法は、効果的な配列をより多く含むさまざまなターゲット遺伝子特異的siRNAのミクスチャーを使用することです。これらは、両端にT7プロモーター配列を持つより長いDNAテンプレートからの*in vitro*トランスクリプションと、その後のDicer酵素による、アニールした長鎖RNAから21-23bpのsiRNAへの切断により作成することが出来ます(図2)。ロシュ・ダイアグノスティックスが提供する新製品のX-tremeGENE siRNA Dicerキットは、効率的な遺伝子ノックダウンのための、高純度なd-siRNAを作成するために特に開発されました。

また、別のアプローチとしては、培養細胞中でsiRNAを*in vivo*で発現させます。そのためには、siRNA発現カセットをプラスミドやウイルスベクターに導入します。このカセットから、Dicer酵素の天然基質となる内在性のマイクロRNA(miRNA)に類似のショートヘアピンRNA(shRNA)が発現されます。それゆえ、このコンストラクトのトランスフェクション後、発現したshRNAは細胞内機構により、効率的なsiRNAに変換されます。

1 d-siRNAの作成

X-tremeGENE siRNA Dicer キットは、細胞のsiRNAパスウェイの最初の過程を模擬的に行い、直ちにトランスフェクション可能なターゲット遺伝子特異的d-siRNAミックスを効率的に作成します(図2)。至適化されたT7 *in vitro*トランスクリプションシステムが、両端にT7プロモーター配列を持つDNAテンプレートから、長鎖のdsRNAを高い収量で合成するために使用されています。PCR増幅によりDNAテンプレートを作成するために、自分のcDNAと遺伝子特異的3'-部位とT7プロモーターで構成された各プライマーを使用します。あるいは、RZPDゲノム研究ドイツリソースセンターから提供されている即時使用可能な遺伝子特異的esiWayサイレンシングリソースを利用します。

次に、リコンビナントのDicer酵素が、dsRNAを21-23bpのsiRNAのミックスに切断するために適用されます。最後に、高純度のd-siRNAを得るために、残余の未切断dsRNAが除去されます。残余の長鎖dsRNAは、哺乳類細胞において非特異的なインターフェロン応答の原因となるため、d-siRNAの純度が特に重要です。



◀ 図2: X-tremeGENE siRNA Dicerキットとテンプレートとして esiWayサイレンシングリソースを使用したd-siRNA作成の概要。

* esiRNAはRZPDゲノム研究ドイツリソースセンターから提供されています。詳しくは、www.rzpd.de/products/esiRNA を訪問してください。

X-tremeGENE siRNA Dicerキットを使用したd-siRNA作成を採用することで:

- 単一のsiRNAよりも、ターゲット遺伝子の発現をより抑えるsiRNAミックスを適用することにより、効率的なジーンノックダウンを保証します。
- 高純度のsiRNAミックスがそれぞれ低濃度で存在していますので、オフターゲット効果が最小限に抑えられます。
- 効果的な配列を持つsiRNAをスクリーニングする代わりに、“天然の”さまざまなsiRNAを使用することで、時間と資源が節約できます。
- 陽性コントロールd-siRNAを合成するために、キットのコントロールDNA(ヒポキサンチンホスフォリボシルトランスフェラーゼ[HPRT])テンプレートを使用します。HPRT遺伝子はこのd-siRNAによりノックダウンされ、ライトサイクラー® h-HPRTハウスキーピングジーンセットとライトサイクラー®インストゥルメントにより簡便に測定できます。

詳細な情報は、www.roche-applied-science.com/geneknockdownを訪問してください。



siRNAの作成

長鎖dsRNAからのDicerを用いた効果的な siRNAプールの作成

ヒトやマウスの遺伝子をターゲットとするd-siRNA作成の能率を上げるために、最初のテンプレートとしてRZPDのesiWayサイレンシングリソースを選択してください。esiWayサイレンシングリソースは、反復や保存配列を含まないことを保証した平均300bpの遺伝子特異的PCRフラグメントです。これらは、X-tremeGENE siRNA DicerキットによるdsRNAの迅速な *in vitro* トランスクリプションと、その後のd-siRNAを作成するためのdicingのために、両端にT7プロモーターを持っています。

RZPDゲノム研究ドイツリソースセンターからの esiWayサイレンシングリソース



- 両端にT7プロモーター配列を含む遺伝子特異的PCRフラグメント
- ヒト遺伝子は約5,000種類、マウスは約14,000種類が入手可能
- 平均長は300bp
- 反復および保存配列を含まない
- X-tremeGENE siRNA Dicerキットによるd-siRNA作成用のテンプレートとして供給

詳しくは、www.rzpd.de/products/esiRNAを訪問してください。

RNAiを使用した抗アポトーシス遺伝子 AKT2のノックダウン

典型的なジーンノックダウン実験を示すために、AKT2特異的siRNAによる抗アポトーシス遺伝子AKT2のサイレンシングに関して記述します。この実験の方法と結果を以下に述べます：

- AKT2特異的esiWAYサイレンシングリソースをX-tremeGENE siRNA Dicerキットによるd-siRNA作成用のテンプレートとして使用する方法；
- AKT2特異的siRNAがX-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬によりどのようにPC-3細胞にデリバリーされるか；
- AKT2発現の減少を、ライトサイクラー®システムの相対定量とウェスタンブロッティングにより分析する方法；
- 細胞の増殖とアポトーシスにおけるAKT2ノックダウンの効果を測定する方法。

AKT2は、成長因子やプロテインホスファターゼ阻害剤、ストレスなどのさまざまな刺激因子により活性化されるセリン/スレオニンプロテインキナーゼであるAktサブファミリーの一員です(9)。Akt プロテインキナーゼは、Actリン酸化コンセンサス配列であるR-X-R-X-X-S/T-F/Lを持つさまざまな細胞内タンパク質をリン酸化し、アポトーシスパスウェイをブロックすることでストレス下にある細胞の生存に貢献しています。

これは、Aktアイソフォームのひとつに対するアンチセンスRNAの投与がアポトーシスを引き起こすという観察より支持されています。Aktリン酸化の既知の、あるいは推測されるターゲットにはGSK3、BAD、カスパーゼ9、転写因子FKHRL1が含まれます。そのアポトーシスに抵抗する活性のため、AKT2はヒトの腫瘍形成に関与しています。AKT2の増幅や過剰発現は、卵巣癌腫やすい臓がんの10-20%で検出されています。さらに、Aktの発現は、前立腺がんの実験モデルでの疾患進行と相関しています(10)。ここに記述された実験では、AKT2タンパク質の発現が見られる前立腺がん細胞株PC-3でのAKT2活性のブロック効果が分析されています。

AKT2特異的siRNAの合成

PC-3細胞におけるAKT2遺伝子のノックダウンに必要とされるsiRNAを作成するために、ACT2特異的esiWayサイレンシングリソースであるRZPDp3000A01530 (398bp)とX-tremeGENE siRNA Dicerキットを組み合わせ使用しました。長鎖のdsRNAは、テンプレートとしてACT2特異的esiWayサイレンシングリソースを使用して、*in vitro*トランスクリプションで合成しました。次に、この長鎖dsRNAをDicer酵素によりd-siRNAに切断しました(図3、レーン2)。最後に、残余の未切断dsRNAをHigh Pureフィルターチューブで除去し、トランスフェクションに適する高純度のd-siRNAの明瞭なバンドを得ました(図3、レーン3)。



◀ 図3: High Pure フィルターチューブでの精製前と後のAKT2特異的d-siRNA。dicing反応液の一部を4%アガロースゲル上で分析しました。
レーン1: 100bpラダー;
レーン2: 300ngの未精製dicer反応産物;
レーン3: 300ngの精製d-siRNA。



トランスフェクション

高いノックダウン効率と低毒性での細胞への siRNAのデリバリー



トランスフェクションによる培養細胞へのsiRNAのデリバリーは、RNAiワークフローの重要なステップです。ジーンノックダウンの結果を研究するためには、トランスフェクションされなかった細胞の数を最少に保つことが必須となります。その上、残余の遺伝子活性はこの特定の遺伝子の抑制による効果に大きな影響を与えることとなります。

RNAi実験に適したトランスフェクション試薬は、次の条件を満たさなければなりません:

- 1) 高い効率で核酸を細胞内にデリバリーできること、
- 2) トランスフェクション試薬が引き起こす細胞障害性効果が実験結果に干渉しないように、可能な限り少ない細胞毒性であること。

トランスフェクションに特異的なオフターゲット効果を排除するために、X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬やFuGENE 6トランスフェクション試薬のような高品質のトランスフェクション試薬を使用します。

X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬は、特に短いsiRNA分子の効率的なトランスフェクションのために開発されています。FuGENE 6トランスフェクション試薬は、プラスミドのトランスフェクションに至適化されており、shRNAを発現するプラスミドの導入に使用してください。

siRNAのトランスフェクション
siRNAとプラスミドのコトランス
フェクション

X-tremeGENE siRNAトランス
フェクション試薬

shRNA発現プラスミドの
トランスフェクション

FuGENE 6 トランスフェク
ション試薬

siRNAのトランスフェクション

ロシュ・ダイアグノスティックスの新規の**X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬**により、一般的に使用される多くの細胞株や、HT-29 (ヒトのアデノカルシノーマ細胞株) などの数種類のトランスフェクションが困難な細胞において、ジーンノックダウンの細胞および機能的な結果の研究を効率的に行えます。このトランスフェクション試薬はsiRNA単独と同様に、siRNAとプラスミドDNAのミクスチャーとも複合体を形成するマルチコンポーネント試薬です。このトランスフェクション複合体は、siRNAを哺乳細胞に効率的にデリバリーし、ジーンサイレンシングを誘導します。X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬は血清の存在/不在にかかわらず、大変良好に機能し、低毒性を示しますので、培地を交換する必要がありません。コトランスフェクションに基づくジーンノックダウンに使用した場合、X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬の高いトランスフェクション効率は、十分なタンパク質発現と効率的なノックダウンレベルを可能とします。

- 多くの細胞タイプで90%以上のジーンノックダウンを達成
- 単一の試薬でsiRNAとコトランスフェクションの両方を行える最高の柔軟性
- 高効率と低毒性からの利点
- 培地交換の必要の無いため時間を節約

詳細な情報は、www.roche-applied-science.com/geneknockdownを訪問してください。

PC-3細胞へのAKT2特異的siRNAのトランスフェクション

24ウェル内で、指数的に増殖しているPC-3前立腺がん細胞 (4×10^4 cells/well) を10%(v/v) のFCSと2mMのL-グルタミンを含むRPMI 1640培地(Sigma)中に播種しました。細胞をオーバーナイトで増殖した後、2.5μLのX-treme GENE siRNAトランスフェクション試薬と

各0.5μgのsiRNAを用いて、説明書に従いsiRNAのトランスフェクションを行いました。AKT2特異的siRNAおよびルシフェラーゼに対するコントロールsiRNAを使用しました。AKT2のノックダウンとRNAi誘導効果の分析はトランスフェクションの2日後に行いました。

shRNAsを発現するプラスミドのトランスフェクション(プラスミドトランスフェクション)

FuGENE6トランスフェクション試薬は、培養細胞でのジーンノックダウンを研究するための、スモールヘアピンRNA(shRNA)を発現するプラスミドの効率的なデリバリーに特に適しています。これは、初代細胞やトランスフェクションが困難な細胞を含む広範囲の真核細胞へのトランスフェクションが、高い効率と最小の細胞毒性で可能にする先進のノンリポソーム試薬です。FuGENE 6トランスフェクション試薬は、トランジェントなトランスフェクション実験と共に、長期の遺伝子サイレンシングのための永久的なトランスフェクション細胞の作成にも使用できます。これらの細胞株の選択には、ロシュ・ダイアグノスティクスではジェネティシン(G 418)とハイグロマイシンBを提供しています。

- 700種以上の細胞株で成功を保証する、確立されたトランスフェクション試薬
- トランジェントおよびステータブルなトランスフェクションでの高いトランスフェクション効率を達成
- 桁外れの低細胞毒性により、信頼できる結果の獲得

トランスフェクション複合体の至適化された形成と、したがって高品質なプラスミドDNAを使用することが、デリバリーの成功のための要件です。イオン交換クロマトグラフィーに基づくGenopureプラスミドキットは、特にトランスフェクショングレードのDNAの精製用にデザインされています。

詳細は、www.roche-applied-science.com/napureを訪問してください。

Transfection



ノックダウンの検証

mRNAの定量とタンパク質の検出による ジーンノックダウンの確認



ジーンノックダウンはmRNAレベルとタンパク質レベルで分析できます。通常、RT-PCRやノーザンブロットングのためのプライマー/プローブは容易にデザインされます。しかしながら、タンパク質の定量には、a) 遺伝子産物が既知で特異抗体が入手可能なこと、b) タンパク質の生物活性が検出可能なこと、c) タンパク質にタグが付加されていることの、いずれかが要求されます。

mRNAの定量とタンパク質の検出により、siRNAが誘導するジーンサイレンシングにタンパク質発現の抑制を一義的に相関させるために、ジーンノックダウンの検証を行うことが推奨されます。

ロシュ・ダイアグノスティックスのライトサイクラー®システムは、相対定量により迅速で正確なmRNAレベルの測定に対する傑出した技術を提供します。

mRNAの定量

mRNAレベルでのノックダウンの検証には、トランスフェクション細胞からの純粋で完全なmRNAの精製が要求されます。ロシュ・ダイアグノスティックスでは多くのキットや試薬、全自動機器であるMagNA Pure LCシステムを提供し、最小限の努力と時間で高品質のRNAの分離を可能にしています。

MagNA Pure LCインスツルメント

MagNA Pure LC インスツルメントは、磁性体粒子テクノロジーに基づく迅速でクロスコンタミネーションの無い、核酸分離用のロボットワークステーションです。RNA精製後、MagNAPureLCインスツルメントは、ライトサイクラー®システムとの組み合わせによるRT-PCRのセットアップを精密に実行します。

MagNA Pure LC RNAアイソレーションキット、高性能やMagNA Pure LC mRNAアイソレーションキットなどの、細胞から高純度なトータルRNAやmRNAを精製するためのシステム試薬が供給されます。

- 32サンプルまでのRNA分離を全自動で実行
- 高純度RNA分離のために磁性体粒子テクノロジーを採用
- トータルRNAやmRNAの効率的な分離のために至適化されたレディー・ユーザーシステム試薬を選択



▲ 図4: MagNA Pure LCインスツルメント

詳細は、www.magnapure.comを訪問してください。

高純度RNAのマニュアルでの分離には、**High Pure RNAアイソレーションキット**が推奨されます。

RNA、DNA、タンパク質を同時に分離する**TriPure アイソレーションリジェント**を使用することで、同一サンプルからmRNAとタンパク質の分析が行えます。

詳細は、www.roche-applied-science.com/napureを訪問してください。



1 ライトサイクラー® 2.0システム

リアルタイムPCRは、mRNAレベルでの遺伝子発現のノックダウンの確認における第一の選択肢です。

ライトサイクラー® 2.0インストゥルメントを使用することで、PCR産物の増幅を、リアルタイムのオンラインで、6つの検出チャンネルで同時にモニターすることが出来ます。増幅は、迅速な熱の移動を可能にする優れた表面/容量比を持つ特別なガラスキャピラリー内で行われます。この特性は、迅速なPCRを可能にする機器の空気制御温度コントロールと組み合わせられて、35サイクルがわずか30分以内に完了します。更なる利点は、高い再現性とプライマーダイマーのリスクを最小限にすることです。

高感度で特異的なPCR産物の検出には、Hyb-probeプローブや加水分解プローブフォーマットの使用が推奨されます。また、SYBRGreenIなどの他のフォーマットもサポートしています。

ジーンノックダウンの結果の分析は、ライトサイクラー®相対定量ソフトウェア/ライトサイクラー®ソフトウェア4.0により十分に改善されます。このソフトウェアは、リファレンス遺伝子との関連によりターゲット遺伝子発現を計算し、実験における変動を補正します。遺伝子発現レベルでの最小限の変化でも、使用するサンプル量にかかわらず最高の正確性で検出します。結果として、このソフトウェアは価値のある定量データの作成を手助けします。

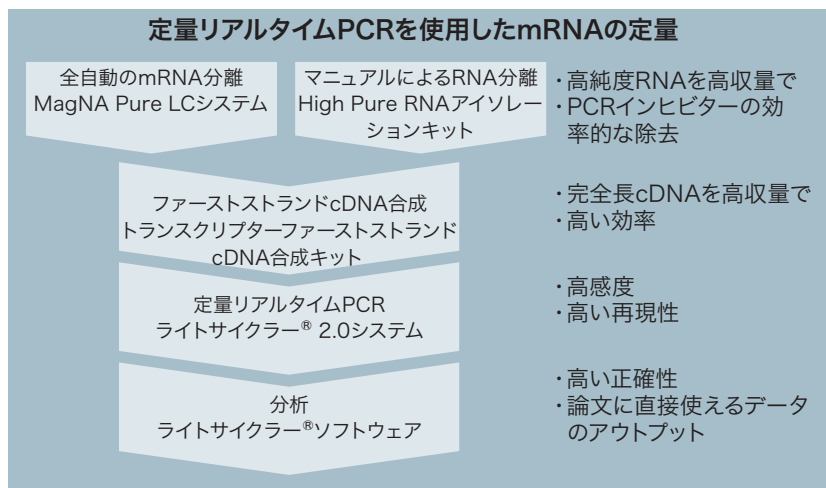
- ジーンサイレンシングの定量に信頼の融解曲線テクノロジーを採用
- 低レベルの遺伝子発現を高感度に検出できる利点
- 正確で再現性の高いリアルタイムPCRの結果による信頼性

ライトサイクラー® 2.0システムでの2ステップRT-PCRには、高収量で完全長のcDNAを作成するためのトランスクリプターファストスタートcDNA合成キットが推奨されます。増幅ステップの成功のために選択された検出フォーマットに応じて、ライトサイクラー® ファストスタートDNAマスターPLUSハイブプローブや、ライトサイクラー® ファストスタートDNAマスターPLUS SYBR Green I、ライトサイクラー® TaqManマスターは、高い特異性と高感度なホットスタートPCRを保証します。特別にデザインされたマスターミックスは、タイトレーションの必要のない、至適化されたMgCl₂濃度となっています。



◀ 図5: ライトサイクラー® 2.0インストゥルメント

Knockdown
Verification





ノックダウンの検証 mRNAの定量とタンパク質の検出による ジーンノックダウンの確認

1 ライトサイクラー® 2.0システム

ライトサイクラー® 2.0インストゥルメント
ライトサイクラー® 1.5インストゥルメント
ライトサイクラー® ファーストスタートDNAマスター^{PLUS}キット
ライトサイクラー® TaqManマスター
ライトサイクラー® h-ハウスキーピングジーン セレクションセット
ライトサイクラー® プローブデザインソフトウェア2.0
ライトサイクラー® 相対定量ソフトウェア

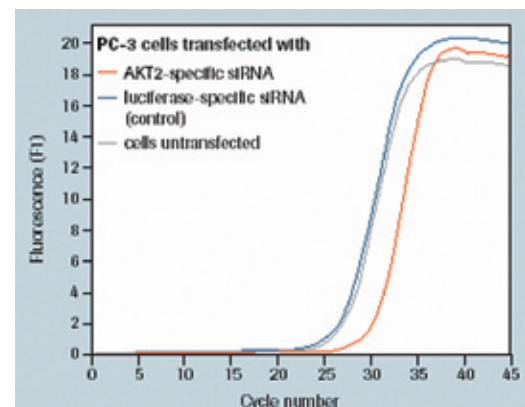
詳細は、www.lightcycler-online.comを訪問してください。

定量リアルタイムPCRによるPC-3細胞中のAKT2ノックダウンの確認

リアルタイムPCRにより、様々なsiRNAをトランスフェクションされたPC-3細胞でのmRNA発現を定量化するために、RNAはHigh Pure RNA アイソレーションキットを使用して、トランスフェクションの2日後に分離されました。50 μ LのトータルRNAがカラムから溶出されました。各サンプルにおいて、5 μ gのトータルRNAが、トランスクリプターファーストストランドcDNA合成キットとランダムプライマーを用いて逆転写されました。ライトサイクラー® 2.0システムによる定量の前に、cDNAはPCRグレード水により10倍に希釈されました。定量リアルタイムPCRは、ライトサイクラー® 2.0インストゥルメントとライトサイクラー®ファーストスタートDNAマスター^{PLUS} SYBR Green Iを用いて、キットの説明書に従い、0.5 μ Mの各プライマーと4mM MgCl₂で実行しました。AKT2特異的プライマーは、ライトサイクラー®プローブデザインソフトウェア2.0でデザインしました。結果の補正には、ライトサイクラー® h-ハウスキーピングジーン選択セット中の5-アミノレバリン酸シターゼ(h-Alas)のプライマー/プローブを使用しました。

PC-3細胞がAKT2 siRNAでトランスフェクションされたとき、相当するmRNAの特異的な

減少が検出できました。トランスフェクションされていない細胞と、ルシフェラーゼ特異的siRNAをトランスフェクションした細胞でのAKT2発現がほとんど同じであることを示しました(図6)。一方、AKT2特異的siRNAをトランスフェクションされた細胞では、約85%のノックダウン効率に相当する、クロッシングポイント(CP)値の2.7のシフトが観察されました。



▲ 図6: 定量リアルタイムPCR。

ファーストストランドcDNAは、様々なsiRNAをトランスフェクションされたPC-3細胞から分離されたRNAから合成されました。定量リアルタイムPCRはライトサイクラー® 2.0システムを用いて行い、蛍光シグナルを観察しています。



ユニバーサルプローブライブラリーセット

ライトサイクラー® 2.0システムのリアルタイムPCRによるターゲット遺伝子の発現レベルの特異的で簡便な定量のために、ユニバーサルプローブライブラリーセットかシングルプローブを選択してください。

ユニバーサルプローブライブラリーは、現実的にひとつの生物種(ヒト、霊長類、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ)のすべての転写産物をリアルタイムPCRでアッセイするために提供される165種類のプローブと独特のアッセイデザインソフトウェアの組み合わせです。このプローブは特定の生物に対して、すべてのトランスクリプトームのカバーを保証するようにデザインされ、検証されています。それぞれのプローブは別個に、あるいは生物種に特異的な90種類のセットがオーダーできます。プローブはレポーター蛍光色素とダーククエンチャーで二重標識されています。ユニバーサルプローブライブラリーはLNA(Locked Nucleic Acid)と呼ばれる独自のヌクレオチドケミストリーを使用しています。これは、プローブを8-9塩基まで短縮できます。短縮されたLNA PCRプローブは一塩基のミスマッチを判別するリアルタイムPCRに必要なとされる高い溶解温度を保持しています。

それゆえ、ユニバーサルプローブライブラリーは一般的に使用されるPCR条件と加水分解プローブフォーマットに適用可能です。ターゲットシーケンスの特異的増幅は、アッセイデザインソフトウェアにより慎重に選択されたプライマーにより保証されます。

次に、選択されたユニバーサルプローブライブラリーによるアッセイが、ライトサイクラー® TaqManマスターとライトサイクラー® 2.0システムでの、確立されたリアルタイムPCRプロトコールにより実行

されます。遺伝子特異的発現の定量アッセイは、プローブファインダーソフトウェアを使用して、簡単にデザインされます(www.universalprobelibrary.comでアクセス可能)。

ユニバーサルプローブライブラリー ワークフロー



- 顕著にアッセイデザインにかかる時間が減少し、柔軟性が高まります。
- シーケンス特異的プローブと慎重に選択されたプライマーペアを使用することでアッセイの高い特異性を達成します。
- 特別な機器や反応条件を必要とせずにアッセイをワークフローに統合することができます。

ユニバーサルプローブライブラリーと次回のPCRアッセイをデザインするための詳細は、www.universalprobelibrary.comを訪問してください。

Knockdown
Verification



ノックダウンの検証

mRNAの定量とタンパク質の検出による ジーンノックダウンの確認

1 ノーザンプロットティング

ターゲット遺伝子のサイレンシングは、ノーザンプロットティングでも測定できます。現在、プラスチャージのナイロンメンブレンとNon-RIのDIG標識プローブ、化学発光検出の組み合わせは、RI法と同感度の技術として広く知られています。ロシュ・ダイアグノスティクスにより開発されたDIGシステムは、高感度で低バックグラウンドのシグナル検出だけでなく、安全で簡便な取り扱いを提供します。それに加え、DIG標識プローブは性能を損なうことなく一年以上の保存が可

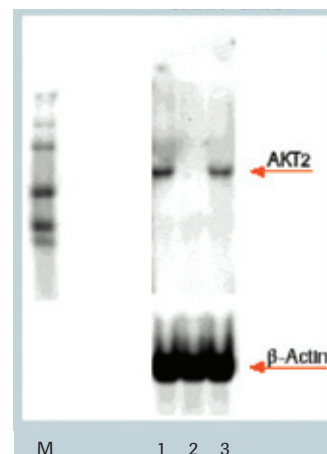
能です。DIGノーザンスターキットには、DIG標識RNAの調製やCDP-Starによる転写産物の化学発光検出に必要なすべての試薬が含まれます。

詳細は、www.roche-applied-science.com/digを訪問してください。

ノーザンプロットティングによるPC-3細胞中のAKT2ノックダウンの確認

AKT2 mRNA発現の抑制を検出するために、トータルRNAを様々なsiRNAをトランスフェクションされたPC-3細胞からHigh Pure RNAアイソレーションキットを使用して、トランスフェクションの2日後に分離しました。ノーザンプロットは5μgのトータルRNAを使用して、DIGノーザンスターキットの能書に従い行いました。ハイブリダイゼーションには、PCR DIGプローブ合成キットで合成したジゴキシゲニン標識AKT2 DNAプローブを使用しました。コントロールとしては、DIG標識アクチンRNAプローブをロードしました。

トランスフェクションされていない細胞と、ルシフェラーゼ特異的siRNAをトランスフェクションした細胞でのAKT2発現がほとんど同じであることを示しました。一方、AKT2特異的siRNAをトランスフェクションされた細胞では、AKT2 mRNAの発現は検出限界以下で、効率的なノックダウンが示されました(図7)。



M: ジゴキシゲニン標識RNA分子量マーカーII
レーン1: トランスフェクションしていないPC-3細胞
レーン2: AKT2 siRNAでトランスフェクションしたPC-3細胞
レーン3: ルシフェラーゼsiRNAでトランスフェクションしたPC-3細胞

▲ 図7: さまざまなsiRNAをトランスフェクションされた細胞から分離されたRNAをノーザンプロットティングに使用し、ジゴキシゲニン標識プローブとハイブリダイズしました。β-アクチンに対するハイブリダイゼーションをローディングコントロールとして使用しました。

タンパク質の検出

1 ウェスタンブロットニング

通常、タンパク質のレベルでsiRNAトランスフェクションの効果をモニターするためには、細胞を溶解し、クルードな細胞抽出液をそのまま使用するか、免疫沈降などで濃縮した後、対象のタンパク質をウェスタンブロットニングで検出します。ウェスタンブロットニングは、少量のタンパク質の検出のために十分に確立された技術です。これは、変性あるいは部分的に変性された検出したいタンパク質に結合する特異的な抗体を必要とします。あるいは、コトランスフェクション実験でタグタンパク質が発現される場合、タグ特異的な抗体が使用できます。化学発光は高感度のタンパク質検出を提供する第一の選択肢となってきました。

Lumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットニングキット (マウス/ラビット)

本キットに含まれる基質は、高感度レベルを維持するだけでなく、より長時間の発光を行わせます。

- 1–5pgの抗原を検出する高感度よりの利点。
- シグナルが9時間以上安定なため多数回の露光が可能。
- 必要な抗原が少なくすむため貴重なサンプル材料が少量でOK

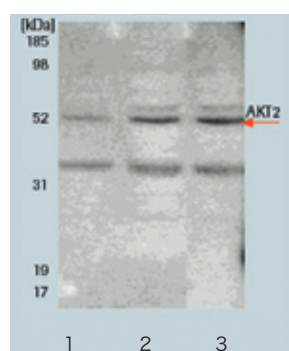
内在性のプロテアーゼ量や、対象のタンパク質のプロテアーゼ消化に対する感受性に依りて、プロテアーゼインヒビターを加えることが必須になります。ロシュ・ダイアグノスティクスでは、非特異的なタンパク質分解によりジーンノックダウン効果を曖昧にする事を防ぐために、プロテアーゼインヒビターのミクスチャーを含むコンプリート錠の使用を推奨します。

ウェスタンブロットニング用のキットと基質の詳細は、www.proteomic-science.comを訪問してください。コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテル錠の詳細は、www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitorを訪問してください。

ウェスタンブロットニングによるPC-3細胞中のAKT2ノックダウンの確認

タンパク質レベルでのAKT2ノックダウンを確認するために、細胞をコンプリートプロテアーゼインヒビターの存在下で溶解しました。PVDFメンブレンを使用する標準的なプロトコールに従ってウェスタンブロット分析を行うために、溶解液を使用しました。ヤギAnti-AKT2抗体のインキュベーションの後、HPR標識anti-Goat IgG、Lumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットニングキット(マウス/ラビット)中のブロッッキング試薬と基質を組み合わせ検出を行いました。

AKT2タンパク質の発現は、AKT2特異的なsiRNAのトランスフェクション(図8、レーン1)後、85%減少し、ルシフェラーゼ特異的なsiRNAのトランスフェクション(図8、レーン2)では効果はありませんでした。



レーン1: AKT2 siRNAでトランスフェクションしたPC-3細胞
レーン2: ルシフェラーゼsiRNAでトランスフェクションしたPC-3細胞
レーン3: トランスフェクションしていないPC-3細胞

▲ 図8: ウェスタンブロットニングによるAKT2タンパク質発現の分析。さまざまなsiRNAをトランスフェクションされた細胞から分離された等量のタンパク質をSDS-PAGEにアプライし、AKT2特異的な抗体によりウェスタンブロットニング分析を行いました。40 kDのバンドは、一次抗体の非特異的な反応でコントロールとして使用されました。

Knockdown
Verification



機能アッセイ

siRNAによるジーンノックダウンに対する細胞応答の分析



ターゲット遺伝子のノックダウンの成功がmRNAやタンパク質レベルで確認された後、細胞増殖におけるダウストリーム効果が特に興味の対象です。ロシュ・ダイアグノスティクスでは、細胞増殖やアポトーシスなどの遺伝子の抑制効果を研究するための高感度で高い信頼性のアッセイ法を広範囲に提供しています

細胞増殖アッセイ

比色法によるマイクロプレートフォーマット(96ウェルプレート)のアッセイが、細胞の増殖や生存活性をELISAプレートリーダーにより測定するために開発されてきました。細胞のダメージは必然的に、代謝細胞の機能や成長にエネルギーを供給し維持する能力の損失をもたらします。代謝活性アッセイは、この効果を測定します:

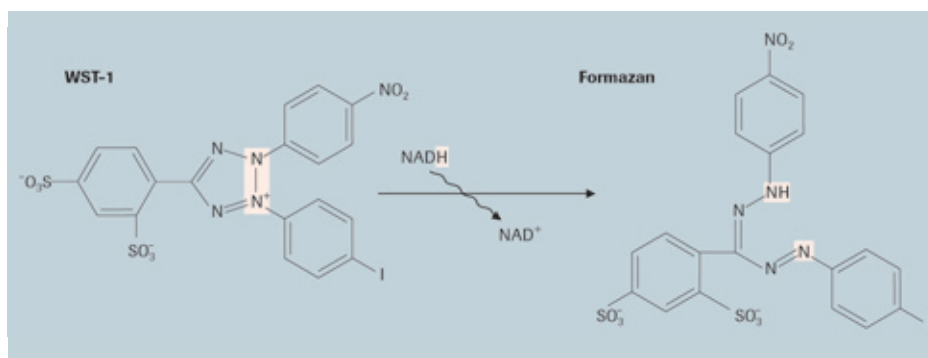
細胞増殖試薬WST-1

細胞増殖試薬WST-1は、生細胞の代謝活性を測定するための高感度なアッセイです。WST-1は修飾テトラゾリウム塩の一種で、生細胞により還元されると発色する水溶性のフォルマザンとなります。このフォルマザンは簡便、迅速に定量できます。

- 高感度のWST-1により少数の細胞でも検出できるという利点
- 測定された吸光度が細胞数に強く相関することによる正確な結果の獲得
- 簡便な1ステップアッセイとレディー・ツー・ユース溶液による時間の節約

細胞増殖アッセイの詳細は、www.roche-applied-science.com/apoptosisを訪問してください。

▼ 図9: WST-1とその反応産物の分子構造図

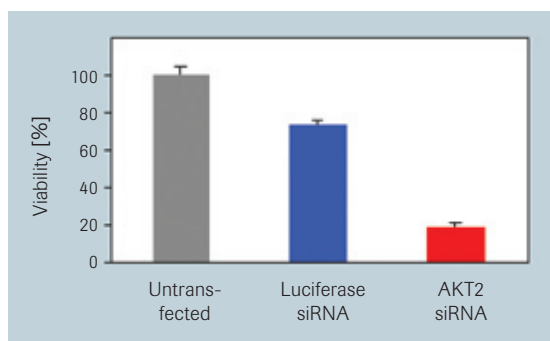




AKT2ノックダウン後のPC-3細胞の生存活性の測定

PC-3細胞の生存活性におけるAKT2ノックダウンの効果を研究するために、トランスフェクションした2日後に、トランスフェクションを実施/未実施したPC-3細胞で細胞増殖試薬WST-1を使用して、細胞増殖アッセイを行いました。反応中に形成されるフォルマザンの発色強度は直接に代謝活性と相関します。サンプルの吸光度を培地に対して、437nmで測定しました。

AKT2特異的siRNAのトランスフェクションは、顕著にPC-3細胞の増殖率と生存活性を減少させましたが、ルシフェラーゼ特異的siRNAは小さな効果しか持ちませんでした(図10)。AKT2遺伝子発現のブロッキングは結果的にアポトーシスを引き起こすため、これは予想されることです。



▲ 図10: 細胞増殖アッセイ

細胞増殖試薬WST-1を使用して、さまざまなsiRNAでトランスフェクションされたPC-3細胞の生存活性を分析しました。

I アポトーシスアッセイ

アポトーシスあるいは“プログラムされた”細胞死は、決定された順列のイベントを示す高度に制御されたプロセスです。ロシュ・ダイアグノスティクスでは、標識アネキシンVを使用しての、アポトーシス細胞における膜の外側に暴露されたホスファチジルセリンの検出による細胞膜の転座など、さまざまなステージでアポトーシスの進行をモニターできるアッセイ法を開発しています。アポトーシスの証明はゲノムDNAの断片化で、細胞死に関与した引き返せないイベントであり、モノあるいはオリゴヌクレオソームの検出により確認できます。アポトーシスパスウェイの基本的な役割を考慮する上で、アポトーシスを測定するテストシステムはRNAiによる遺伝子機能を研究するための重要なツールです。

- アポトーシス過程の特定のステージを検出するためにそれぞれ至適化された多くの種類のキットと試薬から選択
- アポトーシス中の細胞を高感度に検出するために確立されたアッセイを採用
- 多数の検出フォーマットを選択 – 光学および蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、発色および化学発光基質でのELISA

アポトーシスアッセイの詳細は、www.roche-applied-science.com/apoptosisを訪問してください。



機能アッセイ

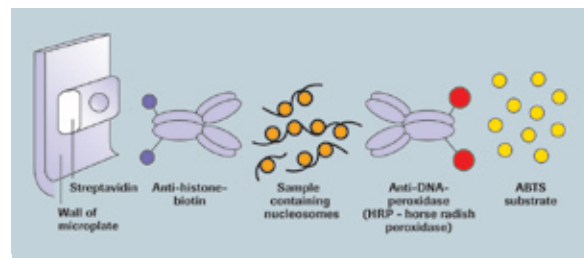
siRNAによるジーンノックダウンに対する細胞応答の分析

細胞死検出ELISA^{PLUS}

細胞死検出ELISA^{PLUS}により、DNAとヒストンに対するマウスモノクローナル抗体を使用した定量的“サンドイッチ酵素免疫アッセイ”で、アポトーシスで活性化したエンドヌクレアーゼにより産生されるモノおよびオリゴヌクレオソームのDNA断片が測定されます。サンプルはstreptavidinコート済みマイクロタイタープレート内で、ビオチン標識抗ヒストンとPOD標識抗DNAのミクスチャーとインキュベーションされます。ヌクレオソームはビオチン標識抗ヒストンにより、そのヒストン成分を介してstreptavidinコート済みマイクロタイタープレートに結合することで、捕捉されます。同時に、POD標識抗DNAがヌクレオソームのDNA部分に結合します。洗浄およびPOD基質であるABTSとのインキュベーションの後、免疫複合体のPOD量が、ELISAプレートリーダーで吸光度的に測定されます。

- 細胞ライセート(アポトーシス細胞)あるいは細胞培養上澄(ネクローシス細胞)からヒストン関連DNAを測定することによるアポトーシスが進行中の細胞を特異的に検出
- 僅か600個の細胞での高感度なアポトーシスの検出を達成
- DNAラダー法のデータと良好に相関するヌクレオソーム粒子の数量的測定による再現性の高い相対定量を実施

アポトーシスアッセイの詳細は、www.roche-applied-science.com/apoptosisを訪問してください。

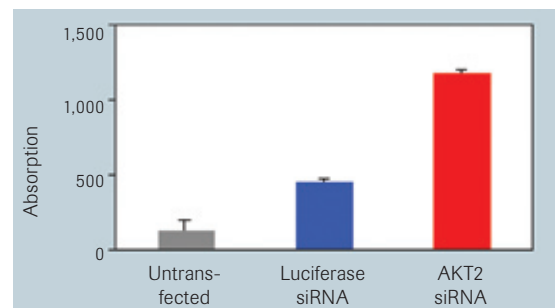


▶ 図11: 細胞死検出ELISA^{PLUS}の原理

AKT2ノックダウンのPC-3細胞へのアポトーシス効果の測定

AKT2ノックダウンのアポトーシス効果をより分析するために、トランスフェクションを実施/未実施したPC-3細胞で、細胞死検出ELISA^{PLUS}を使用してアポトーシスアッセイを行いました。細胞を培養プレート中でスピンドウンし、上澄を完全に除去します。次に、残っている細胞をキット内の溶解バッファーで溶解します。溶解細胞および培養上澄から等量の溶液を採取しプロトコールに従ってテストします。トランスフェクションされていない細胞やルシフェラーゼ特異的siRNAをトランスフェクションされた細胞に比べて、AKT2特異的siRNAをトランスフェクションされたPC-3細胞中に高レベルの細胞質内DNAフラグメントが検出されました(図12)。上澄に放出されたDNAフラグメント量が非常に低いため、この効果はネクロー

シスではなく、主にアポトーシスが原因でした(データ未掲載)。



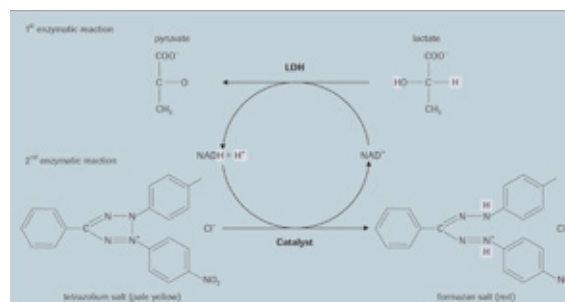
▲ 図12: アポトーシスにより誘導されたDNA断片化の分析。DNA断片化は細胞死検出ELISA^{PLUS}を使用して、様々なsiRNAをトランスフェクションされたPC-3細胞のライセート中で分析されました。

1 細胞障害性アッセイ

ネクロシスやアポトーシスに比較して、細胞障害性は特異的な細胞死の機構とは定義されていません。その結果、細胞障害性を測定するアッセイは、その時点での死細胞の数に関する情報を与えるだけです。RNAi実験において、このようなアッセイは遺伝子の抑制(ダウンレギュレーション)が細胞障害効果を持つかどうかを試験するために使用されます。

細胞障害性検出キット(LDH)

細胞障害性検出キット(LDH)は、乳酸脱水素酵素(LDH)活性を検出することにより細胞障害性と細胞溶解を測定します。LDHはすべての細胞に存在する安定な細胞質酵素で、細胞膜が損傷を受けた場合、直ちに細胞培養上澄に放出されます。上澄中のLDH活性は、テトラゾリウム塩であるINTをフォルマザンに還元する、共役酵素反応により測定されます。水溶性のフォルマザンはELISAプレートリーダーで簡単に定量できます。



▲ 図13:最初の酵素反応で、乳酸からピルビン酸へのLDHによる変換により、NAD⁺がNADH/H⁺に還元されます。次のステップで、触媒(ジアフォラーゼ)が、H/H⁺をNADH/H⁺からテトラゾリウム塩INTに転移します。

- 溶解された細胞の数に強く相関する正確な結果を獲得
- 危険な³H-チミジンアップテイク/放出技術や⁵¹クロム放出アッセイの使用を回避
- 前標識や洗浄操作が必要でないため、非常に簡便なアッセイである利点

細胞障害性アッセイの詳細は、www.roche-applied-science.com/apoptosisを訪問してください。

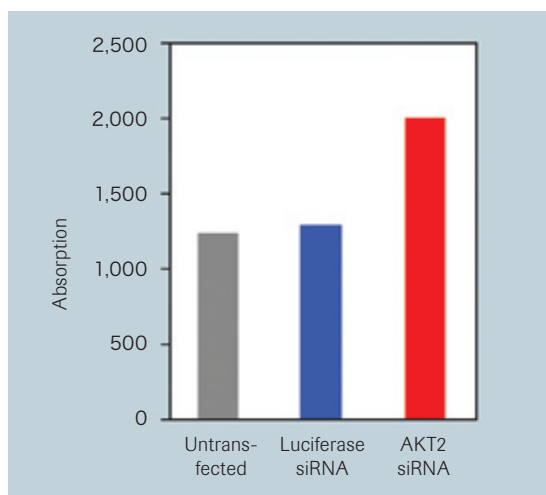


機能アッセイ

siRNAによるジーンノックダウンに対する細胞応答の分析

AKT2ノックダウンのPC-3細胞への細胞障害効果の分析

アポトーシスの非常に後期のステージにおいて、アポトーシス細胞は最終的に溶解し、培地中に放出された細胞内酵素であるLDHがモニター可能となります。トランスフェクションの2日後に、トランスフェクションを実施/未実施されたPC-3細胞のLDH放出を分析しました。100 μ Lの培養上澄とキットよりの同量の反応ミックスを混合し、30分間インキュベートしました。サンプルの吸光度を培地に対して、490nmで測定しました。このキットで、培地中に放出された乳酸脱水素酵素の測定により細胞溶解の割合がモニターできます。ルシフェラーゼ特異的siRNAによるトランスフェクションでは、未トランスフェクション細胞に比較して、細胞溶解の率に変化はありませんが、AKT2特異的siRNAはアポトーシス過程の導入によりPC-3細胞の溶解が顕著に増加しました(図14)。

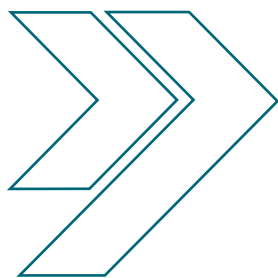


▲ 図14: 細胞障害性アッセイ。様々なsiRNAをトランスフェクションしたPC-3細胞でのLDHの放出を、細胞障害性検出キット(LDH)を用いて測定しました。

サマリー

AKT2遺伝子の特異的で効率的なノックダウンが、新規のX-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬を用いたAKT2特異的siRNAの導入により達成されました。ノックダウンはライトサイクラー®システムやノーザンブロットティング、DIG標識プローブによる検出によりmRNAレベルで検証されました。これらの結果は、Lumi-Light^{PLUS}基質によるウェスタンブロットティングを行い、タンパク質レベルでも確認されました。

アポトーシス抵抗タンパク質であるAKT2のノックダウンは、PC-3細胞に劇的な効果を持つことを示しました。細胞の増殖は、WST-1アッセイで示されたとおりに、アポトーシスの開始により深刻な影響を受けました。細胞はさらに、細胞死検出ELISA^{PLUS}分析されました。DNA断片化と膜の再構成(データ未掲載)が検出されました。これらの変化は最終的に、細胞膜の崩壊を引き起こし、細胞障害性検出キット(LDH)により、細胞培地中の細胞質LDHの放出が測定されました。



オーダー情報



siRNAの作成

製品名	製品番号	包装単位
d-siRNAの作成		
X-tremeGENE siRNA Dicerキット*	4 579 020	1キット(10回反応)
プラスミドの精製		
GenoPureプラスミド ミディキット	3 143 414	1キット(20回調製)
GenoPureプラスミド マキシキット	3 143 422	1キット(10回調製)

トランスフェクション

製品名	製品番号	包装単位
siRNAのトランスフェクション		
X-tremeGENE siRNAトランスフェクション試薬	4 476 093	1 mL(24ウェルプレートで400回)
	4 476 115	5 x 1 mL(24ウェルプレートで2000回)
プラスミドのトランスフェクション		
FuGENE 6トランスフェクション試薬	1 815 091	0.4 mL
	1 814 443	1 mL
	1 988 387	5 x 1 mL
ジェネティシン(G 418)	1 464 981	1 g 非滅菌
	1 464 990	5 g 非滅菌
ハイグロマイシン B	843 555	1 g (20 mL) 滅菌



オーダー情報

1 ノックダウンの検証

製品名	製品番号	包装単位
RNAの安定化		
プロテクター RNaseインヒビター	3 335 399	2,000 U
	3 335 402	10,000 U (5 x 2,000 U)
RNAの全自動分離		
MagNA Pure LCインストゥルメント	2 236 931	ご照会
MagNA Pure LC RNAアイソレーションキットI-高性能*	3 542 394	1キット(192回分離)
MagNA Pure LC mRNAアイソレーションキットI*	3 004 015	1キット(192回分離)
RNAのマニュアルによる分離		
High Pure RNAアイソレーションキット*	1 828 665	1キット(50回精製)
mRNAアイソレーションキット	1 741 985	1キット
TriPureアイソレーションリジェント	1 667 157	50 mL
	1 667 165	200 mL
リアルタイムPCR		
トランスクリプターファーストストランドcDNA合成キット	4 379 012	1キット(50 回反応)
ライトサイクラー® 2.0インストゥルメント #	3 531 414	-
ライトサイクラー® 1.5インストゥルメント	4 484 495	-
ライトサイクラー®	3 515 575	1キット(96 回反応)
ファストスタートDNAマスター ^{PLUS} HybProbe ●	3 515 567	1キット(480 回反応)
ライトサイクラー®	3 515 869	1キット(96 回反応)
ファストスタートDNAマスター ^{PLUS} SYBR Green I ▼	3 515 885	1キット(480 回反応)
ライトサイクラー® TaqManマスター†	4 535 286	1キット(96 回反応)
ライトサイクラー® h-ハウスキーピングジーンセ レクションセット *	3 310 159	5 x 16 回反応
ユニバーサルプロープライブラリー		
ユニバーサルプロープライブラリー セット、ヒト◆	4 683 633	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、マウス◆	4 683 641	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、ラット◆	4 683 650	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、霊長類◆	4 683 617	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、ショウ ジョウバエ ◆	4 683 625	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、線虫 ◆	4 683 609	1セット
ユニバーサルプロープライブラリー セット、シロイヌナズナ◆	4 683 595	1セット
ユニバーサルプロープライブラリーコントロール セット	4 696 417	1セット



1 ノックダウンの検証

製品名	製品番号	包装単位
ノーザンブロットニング		
DIG RNAラベリングキット(SP6/T7)	1 175 025	1キット(2 x 10回標識反応)
DIGルミネッセントデテクションキット	1 363 514	1キット(50プロット)
DIGノーザンスターターキット	2 039 672	1キット(10回標識反応と 10 x 10 cmの10プロット検出)
DIGイージーハイブ	1 603 558	500 mL
ナイロンメンブレン、プラスチャージ	1 209 272	10枚(20 x 30 cm)
	1 209 299	20枚(10 x 15 cm)
	1 417 240	1ロール(0.3 x 3 m)
タンパク質の安定化		
コンプリート プロテアーゼインヒビターカクテル錠	1 697 498	20錠
	1 836 145	3 x 20錠
コンプリート、EDTAフリー プロテアーゼイン ヒビターカクテル錠	1 873 580	20錠
ウェスタンブロットニング		
Lumi-Light ^{PLUS} ウェスタンブロットニングキット	2 015 218	1キット
Lumi-Light ^{PLUS} ウェスタンブロットニング基質	2 015 196	100 mL
ウェスタンブロットニング試薬	1 921 673	100 mL
PVDFウェスタンブロットニングメンブレン	3 010 040	1 Roll
タグ抗体		
Anti-HA高親和性(ラットモノクローナル抗 体、クローン3F 10)	1 867 423	50 µg
	1 867 431	500 µg
Anti-c-myc(マウスモノクローナル抗体、クローン9E 10)	1 667 149	200 µg(lyoph.)
	1 667 203	5 mg(1 mL)
Anti-His ₆ (マウスモノクローナル抗体、クローンBMG-His-1)	1 922 416	100 µg
レポータージーンアッセイ		
β-Galレポータージーンアッセイ、化学発光	1 758 241	1キット(マイクロプレートで500ア ッセイ、チューブで250アッセイ)
ルシフェラーゼ レポータージーンアッセイ、高感度	1 669 893	200アッセイ
	1 814 036	1000アッセイ
hGH ELISA	1 585 878	1キット(192テスト)
SEAPレポータージーンアッセイ	1 779 842	1キット(マイクロプレートで500ア ッセイ、チューブで250アッセイ)
CAT ELISA	1 363 727	1キット(192 テスト)

Ordering
Information



オーダー情報

機能アッセイ

製品名	製品番号	包装単位
細胞増殖アッセイ		
細胞増殖試薬WST-1	1 644 807	2500 テスト
細胞増殖ELISA、BrdU(化学発光)	1 669 915	1キット(1000テスト)
細胞増殖キットI(MTT)	1 465 007	1キット(2500テスト)
細胞増殖キットII(XTT)	1 465 015	1キット(2500テスト)
アポトーシスアッセイ		
細胞死検出ELISA ^{PLUS}	1 774 425	1キット (96テスト)
細胞死検出ELISA ^{PLUS} 、10×	1 920 685	1キット(10 x 96テスト)
アネキシンV-FLUOS染色キット	1 858 777 1 988 549	50テスト 250テスト
細胞障害性アッセイ		
細胞障害性検出キット(LDH)	1 644 793	1キット(2000テスト)



免責条項と登録商標

‡ The purchase of this product does not convey any licenses or other rights for the performance of PCR.

* This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process covered by patents owned by F. Hoffmann-La Roche Ltd. No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

‡ This LightCycler® Instrument is licensed under U.S. Patent No. 6,814,934 and non-U.S. counterpart patent claims for use in life science research. It is also an Authorized Thermal Cycler. Purchase and use of this LightCycler® Instrument, in conjunction with Authorized Reagents, provides a limited license for use of the PCR process in life science research. No rights are conveyed expressly, by implication or by estoppel under any other patent claims or for any other application.

This LightCycler® 2.0 Instrument is licensed under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in its non-U.S. counterparts for use in research, *in vitro* diagnostics and other applied fields. It is also an Authorized Thermal Cycler. Purchase and use of the LightCycler Instrument, in conjunction with Authorized Reagents, provide a limited license for use of the PCR process in life science research. No rights are conveyed expressly, by implication or by estoppel under any other patent claims or for any other application.

• Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for the purchaser's life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, *i.e.*, an authorized thermal cycler. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights owned by Applied Biosystems, and no rights for any other application, including any *in vitro* diagnostic application under patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd claiming homogeneous or real-time amplification and detection methods are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

▼ Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process, including homogeneous PCR methods described in U.S. Patents Nos. 5,994,056, 6,171,785, 6,569,627 and corresponding patents outside the United States, for life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, *i.e.*, an authorized thermal cycler.

No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights owned by Applied Biosystems are conveyed expressly, by implication or by estoppel. No rights for any other application, including any *in vitro* diagnostic application, are conveyed expressly, by implication or by estoppel under U.S. Patents Nos. 6,174,670 and 6,245,514 and corresponding patent claims outside the United States, or any other patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd, claiming real-time amplification and detection methods.

✦ Purchase of this product is accompanied by a limited, non-transferable license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for the purchaser's life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Applied Biosystems or as purchased, *i.e.*, an authorized thermal cycler.

† Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process with 5' nuclease detection for the purchaser's life science research in conjunction with Licensed Probe and a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, *i.e.*, an authorized thermal cycler. This product is an Authorized Core Kit without Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under certain patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd, for using only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's life science research in conjunction with Licensed Probe. No rights are conveyed expressly, by implication or by estoppel under any other patent claims or for any other application.



◆ NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the 5' nuclease process for research requires the use of a Licensed 5' Nuclease Kit (containing Licensed Probe), or the combination of an Authorized Core Kit plus Licensed Probe, or license rights that may be purchased from Applied Biosystems. This product contains Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 6,214,979 and 5,804,375 (claims 1-12 only) and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), for using only this amount of probe in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's own internal research and development activities. This product is also a Licensed Probe for use with service sublicenses available from Applied Biosystems. This product conveys no rights under U.S. Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972, which claim 5' nuclease processes, or U.S. Patents Nos. 5,476,774 and 5,219,727, which claim quantification methodology, and corresponding patent claims outside the United States of any of the foregoing patents and no right under any other patent claims (such as apparatus or system claims in U.S. Patent No. 6,814,934) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research purposes only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information regarding the 5' nuclease licensing program may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

NOTICE TO PURCHASER: DISCLAIMER OF LICENSE

This product is compatible for use in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process claimed in patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. No license under these patents is conveyed expressly, by implication, by estoppel or otherwise to the purchaser by the purchase of this product. A license to use these patented processes for certain research and development activities accompanies the purchase of certain reagents of Applied Biosystems and other licensed suppliers when used in conjunction with an authorized thermal cycler, or is available from Applied Biosystems.

ProbeLibrary™ is covered by US and other patent applications owned by Exiqon A/S. Locked Nucleic Acids (LNA™) are covered by U.S. patents No. US 6,794,499, US 6,670,461, US 6,268,490 and US 6,770,748 and other patents and patent applications owned by Exiqon A/S and Prof. Takeshi Imanishi. The quencher used in the probes is covered by patent applications owned by Exiqon A/S.

COMPLETE, FASTSTART, GENOPURE, HIGH PURE, HYBPROBE, LIGHTCYCLER, MAGNA PURE, TAQMAN, and X-TREMEGENE are trademarks of Roche.

esiWay is a trademark of RZPD.

FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C., USA.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

PROBELIBRARY and LNA are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.



リファレンスと略語

1. Hannon, G.J. (2002) *Nature* 418: 244-251.
2. McManus, M. T., Sharp, P. A. (2002) *Nat Rev Genet.* 3: 737-747.
3. Shi, Y. (2003) *Trends Genet.* 19: 9-12.
4. Hannon, G.J., Rossi, J.J. (2004) *Nature* 431: 371-378.
5. Meister, G., Tuschl. T. (2004) *Nature* 431: 343-349.
6. Mello, C.C., Conte, D.Jr. (2004) *Nature* 431: 338-342.
7. Kaufman, R. J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11693-11695.
8. Bernstein, E. *et al.* (2001) *Nature* 409: 363-366.
9. *Biochemica* 1: 4-6 (2004).
10. *Biochemica* 1: 7-8 (2004).
11. Liu, A. X. *et al.* (1998) *Cancer Res* 58: 2973-2977.
12. Graff, J. R. *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275:24500-24505.

RNAi = RNA Interference

dsRNA = double-stranded RNA

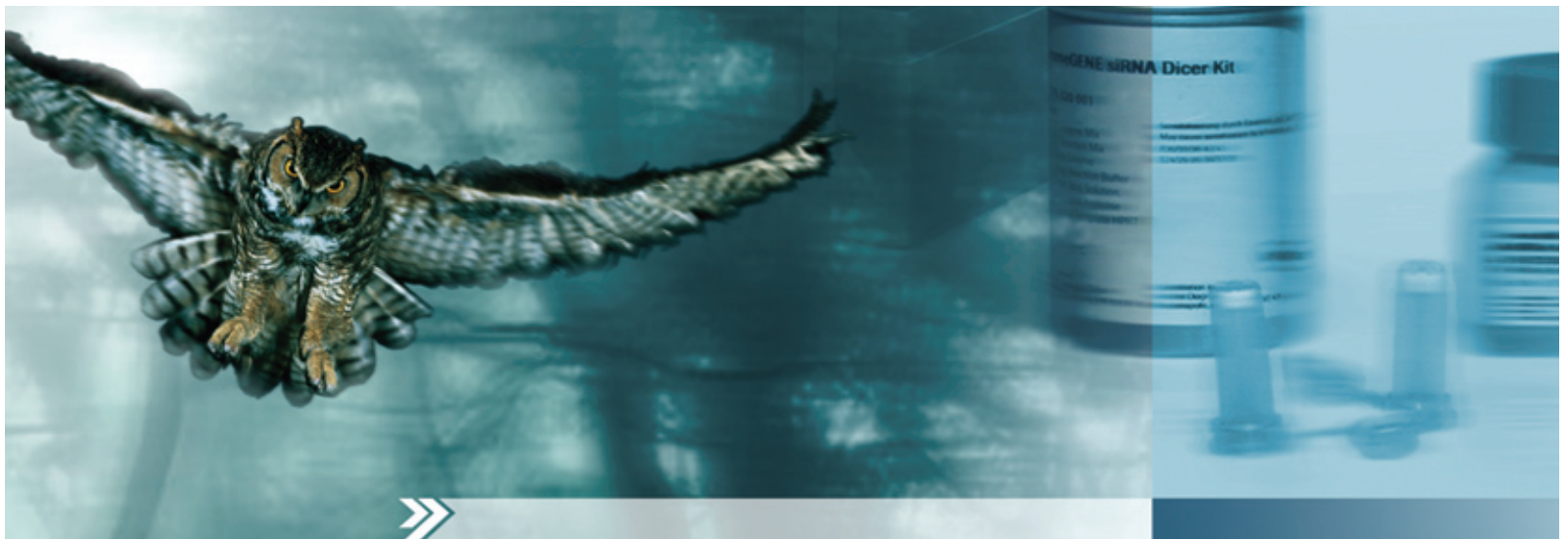
siRNA = small interfering RNA

d-siRNA = diced small interfering RNA

esiRNA = endoribonuclease-prepared small interfering RNA

shRNA = short hairpin RNA

RISC = RNA-induced silencing complex



For additional information, visit
www.roche-applied-science.com/geneknockdown
or contact your local sales representative.

お問い合わせは・・・

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

本社: 〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
AS事業部(研究用試薬・機器) TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098
E-Mail: Tokyo.biochemicals@roche.com
URL: www.roche-biochem.jp

札幌支店	TEL. 001-251-1331	FAX. 011-231-1603
仙台支店	TEL. 022-224-6491	FAX. 022-267-3877
関東支店	TEL. 03-5730-9431	FAX. 03-5730-9446
東京支店	TEL. 03-5765-8081	FAX. 03-5765-8082
名古屋支店	TEL. 052-220-5741	FAX. 052-220-5742
大阪支店	TEL. 06-4863-7621	FAX. 06-4863-7625
広島支店	TEL. 082-545-5120	FAX. 082-545-5123
福岡支店	TEL. 092-461-1021	FAX. 092-461-1025



Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
68298 Mannheim
Germany