

B_{RNAi}

- 01. siRNA Synthesis Service
- 02. miRNA Synthesis Service
- 03. *In vivo* siRNA Custom Service: SAMiRNA™

○ siRNA & miRNA

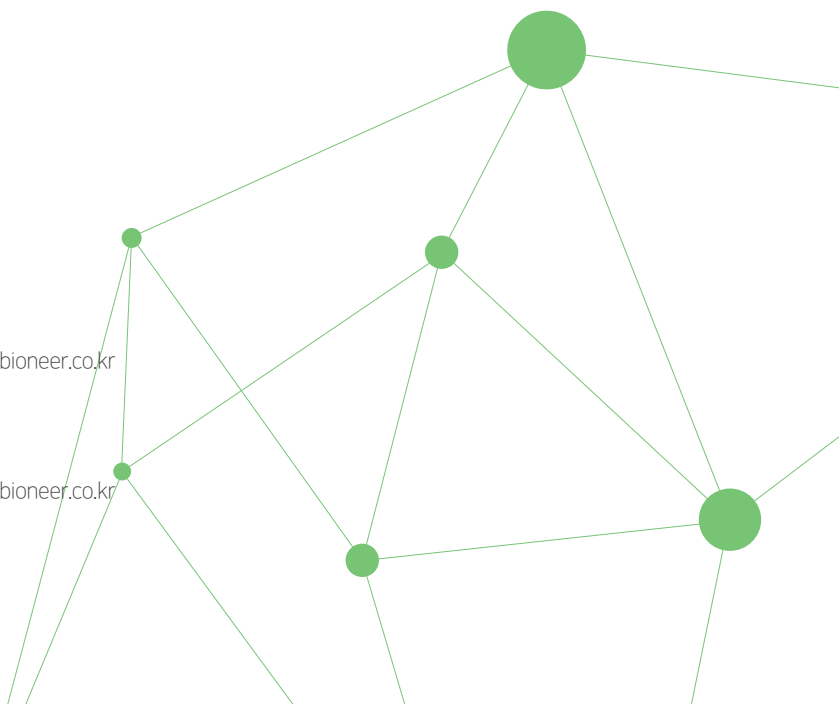
☎ Phone: 합성 관련 - 042-930-8593
실험 관련 - 042-930-8673

✉ E-mail: siRNA@bioneer.co.kr

○ SAMiRNA™

☎ Phone: 042-930-8773

✉ E-mail: siRNA@bioneer.co.kr



01. siRNA Synthesis Service

<i>AccuTarget™</i> siRNAs	39
Genome-wide Predesigned siRNA & Primer	
<i>AccuTarget™</i> Genome-wide Predesigned siRNA Library	40
<i>AccuTarget™</i> Real-Time PCR Primers Library	41
Premade siRNA & Primer	
<i>AccuTarget™</i> Premade Human siRNA Sets	42
<i>AccuTarget™</i> Real-Time PCR Primers for Premade siRNA Sets	44
Custom siRNA	
<i>AccuTarget™</i> Custom Designed siRNA Synthesis	45
Control siRNA	
<i>AccuTarget™</i> Control siRNAs (Positive/Negative)	47
siRNA Oligonucleotide FAQs	51
Users Protocol	54

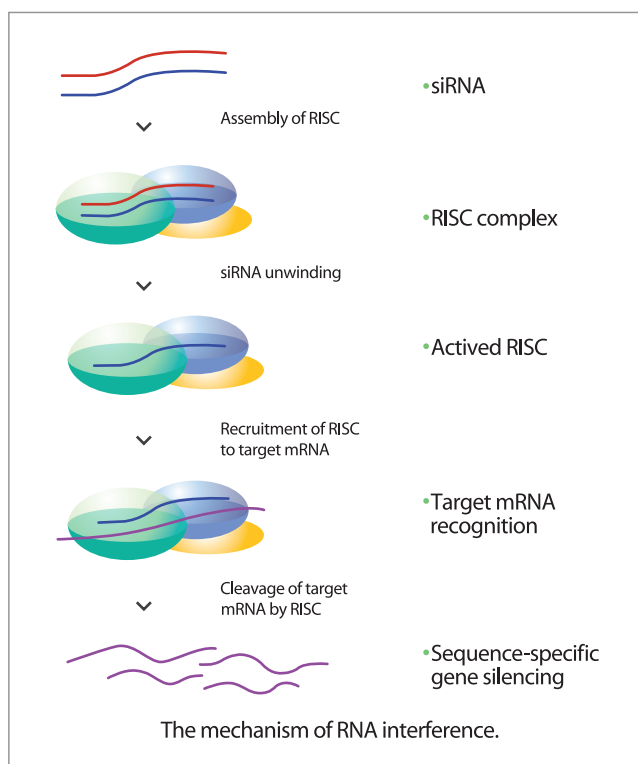
개요

siRNA (Small interfering RNA)는 target specific gene silencing을 위한 가장 강력한 수단으로 유전자 기능의 확인, drug target의 validation, 각종 질병의 gene therapy 등에 사용되고 있습니다. siRNA는 기존 antisense technology에 비해 다음과 같은 장점을 가지고 있습니다.

- 적은 수의 screening으로도 높은 효율의 siRNA를 찾을 수 있어 시간과 경비를 절감할 수 있습니다.
- 낮은 농도로 효율적인 gene silencing이 가능합니다.
- Natural biological mechanism으로 target specificity가 매우 높습니다.

siRNA Mechanism

siRNA는 약 21-nucleotide sense/anti-sense RNA로 구성된 double-strand RNA입니다. siRNA는 세포 내에서 RNA-induced silencing complex (RISC)라고 불리는 protein complex와 결합합니다. Single strand RNA가 RISC에 의해 선택 및 장착되어 ribonucleoprotein complex를 형성하고, 이러한 과정을 통하여 활성화된 RISC의 single strand RNA는 상보적인 서열의 target mRNA에 결합하여 이를 분해합니다.



Turbo si-Designer - Bioneer's proprietary siRNA design algorithm

siRNA는 최근 새로운 functional genomics의 tool로서 각광을 받고 있고, 그 중요성을 인정받아 2002년도 Science 저널에서 small RNA (siRNA와 miRNA)가 Breakthrough of the year 1번으로 선정되었습니다. RNAi 연구에 있어서 가장 중요한 요소 가운데 하나는 “효율이 높은 target site를 찾는 것”입니다. Target site마다 이에 상응하는 siRNA의 효율이 다르기 때문에, 고효율의 siRNA target site를 찾는 것이 정확한 실험 결과를 얻는데 매우 중요합니다.

바이오니아에서는 2003년 10월부터 산업자원부 지원하에 “siRNA design algorithm” 개발 프로젝트를 시작하였고 주관 기관인 바이오니아와 위탁기관인 국가유전체정보센터(NGIC, 책임자: 김영주 박사)가 공동으로 3년에 걸쳐 총 9억 원을 투입하여 효능이 뛰어난 siRNA design algorithm을 개발하였습니다. 본 과제의 주 목적은 기존의 연구를 통해 이미 알려져 있는 nonfunctional한 siRNA site를 배제시키고 다른 여러 변수들을 고려하여 효율적인 siRNA target site를 찾는 algorithm을 개발하는 것이었습니다. 이렇게 일차적으로 개발된 algorithm을 이용하여 예측한 siRNA target site의 효율 확인을 위한 실험을 진행하고, 각 변수가 실험 결과에 미치는 영향을 분석하여 보다 효율적인 siRNA target site를 높은 확률로 예측할 수 있는 design program인 Turbo si-Designer를 완성했습니다.

Turbo si-Designer의 성능을 확인하기 위하여 항세포사멸 및 세포분열 관련 유전자인 survivin을 target으로 82개의 siRNA를 design하여 A549 lung carcinoma 세포에 transfection한 후, northern blot과 QuantiGene kit로 mRNA의 발현량을 측정하였습니다. 점수가 낮은 siRNA (Figure 1B)는 점수가 높은 siRNA (Figure 1A)에 비해 효율이 좋지 않음을 확인하였고, 이를 통해 Turbo si-Designer가 비효율적인 siRNA site들을 매우 효과적으로 배제하여 고효율의 siRNA를 찾을 확률을 높여 주는 것을 알 수 있습니다(Figure 1).

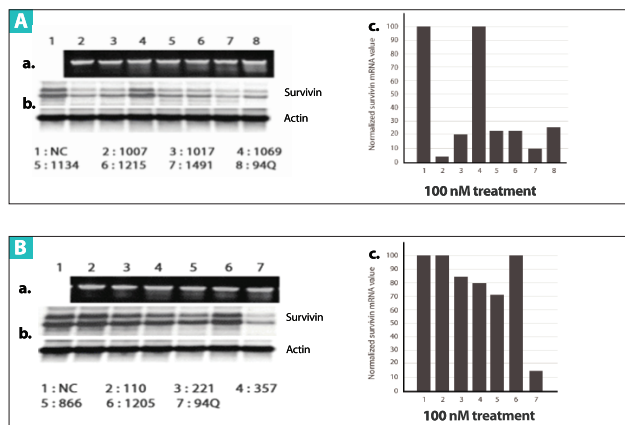


Figure 1. siRNA knockdown efficiency of siRNAs designed by Turbo si-Designer was analyzed by Northern blot and Real-Time PCR analysis.

A) siRNA knockdown efficiency of high NGIC score siRNAs.

B) siRNA knockdown efficiency of low NGIC score siRNAs.

AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNA Library

○ 제품 개요

AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNA Library는 한국생명공학연구원 국가유전체정보센터와 바이오니아가 공동 개발한 siRNA design algorithm인 Turbo si-Designer를 이용하여 predesign된 siRNA입니다. 이를 사용하여 knockdown 효율이 우수한 AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNA Database를 구축하였습니다. Human, mouse 및 rat에서 44,000개 이상의 target 유전자에 대한 132,000개의 predesigned siRNA가 design되어 있어 주문 접수 후 바로 합성하여 배송 가능합니다.

The Bioneer Guarantee

같은 유전자에 대한 3개의 siRNA를 구입하시면, 바이오니아는 3개 중에서 2개가 target mRNA expression level의 80% 이상 knockdown 효율을 보장합니다. Target 유전자의 mRNA 수준에서 80% 이상 감소가 없을 경우, 무료로 2개의 siRNA를 제공합니다.

*단, 본사에서 요하는 다음과 같은 supporting data를 별도로 제출하셔야 합니다.

1. siRNA knockdown efficiency data: NC (AccuTarget™ Negative Control) and siRNA concentration at 100 nM
2. Transfection efficiency data: PC (AccuTarget™ GAPDH/GFP/Luciferase siRNA) and NC (AccuTarget™ Fluorescein-labeled Negative Control)

○ 특징점

■ High siRNA knockdown rates

동일 유전자 3개의 siRNA 중 2개는 target mRNA expression level을 80% 이상 억제합니다(Figure 2).

■ Unique design algorithm

Off target effect를 최소화하면서 siRNA knockdown 효율을 최대화하였습니다.

■ 합리적인 가격

연구 비용 대비 극대화된 효율을 확인할 수 있습니다.

○ 응용 분야

AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNA Library는 다양한 RNAi 실험에 활용될 수 있습니다.

- Functional genomics and proteomics research
- Gene expression studies
- Array analysis

○ 주문 정보

정제 방법	보장량 (nmole)
Bio-RP	10
	20
HPLC	50
	100

* 하나의 Target gene에 대한 다른 3개의 siRNA를 한 튜브에 Mixture로 제공하는 Pooling Service 추가 가능 (별도 비용)

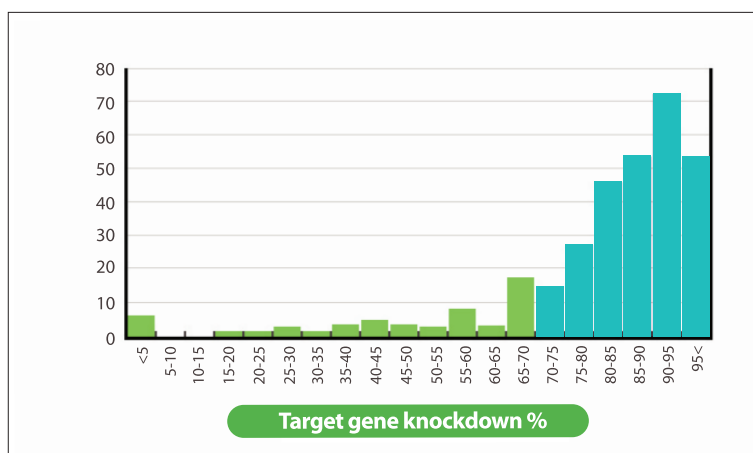


Figure 2. siRNA knockdown efficiency of AccuTarget™ Genome-wide Predesigned siRNA.

AccuTarget™ Predesigned siRNAs are highly effective. To determine siRNA knockdown efficiency of predesigned siRNAs, HeLa cells were transfected with siRNAs at 100 nM concentration. By 24 hrs post-transfection, total RNA was isolated and the level of target mRNA was measured by qPCR. This data demonstrates the effectiveness of the Turbo si-Designer algorithm: 83.8% of tested siRNAs induced >70% siRNA knockdown and 38.1% of tested siRNAs elicited >90% knockdown.

AccuTarget™ Real-Time PCR Primer Library

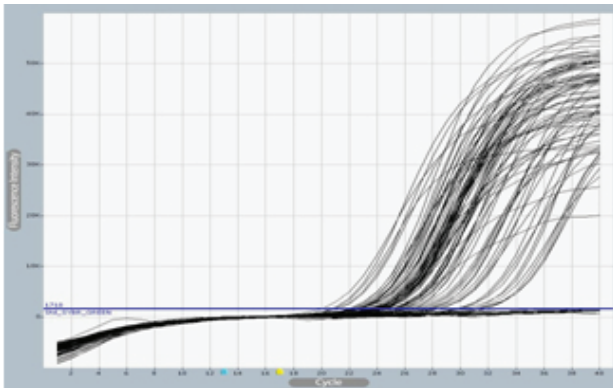
○ 제품 개요

바이오니아는 siRNA knockdown validation에 필요한 Real-Time PCR primer library를 제공합니다. Human predesigned siRNA에 대해 실험적으로 검증된 11,154개의 Real-time PCR primer set을 구비하고 있습니다. 바이오니아 홈페이지에서 predesigned siRNA를 검색하시면 해당 Real-Time PCR primer가 함께 검색되어 primer를 design 하고 검증하는 시간을 절약할 수 있습니다. 모든 primer의 증폭 효율은 자사 Real-Time PCR 기기인 Exicycler™ 96과 AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix를 이용하여 검증하였습니다(Figure 3).

○ 특징점

- In ready-to-ship format
11,154개 human 유전자 특이적 primer 입니다.
- 철저한 QC 검증
MALDI-TOF Mass Spectrometer를 통해 철저한 QC 검증을 거친 제품입니다.
- 합리적인 가격
연구 비용 대비 극대화된 효율을 확인할 수 있습니다.

A Fluorescence Analysis Data



B Melting Analysis Data

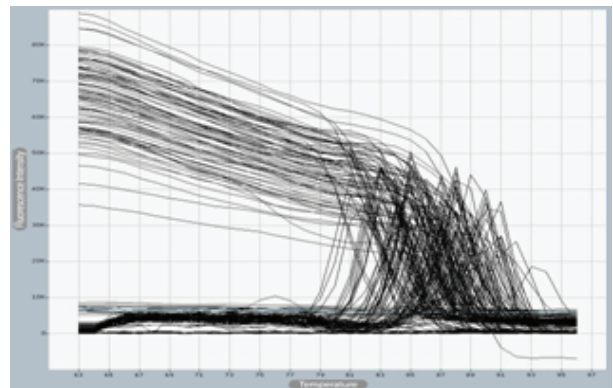


Figure 3. Real-Time PCR validation test of human oxidoreductase using AccuTarget™ Human Oxidoreductase Real-Time PCR Primer set.

○ 주문 정보

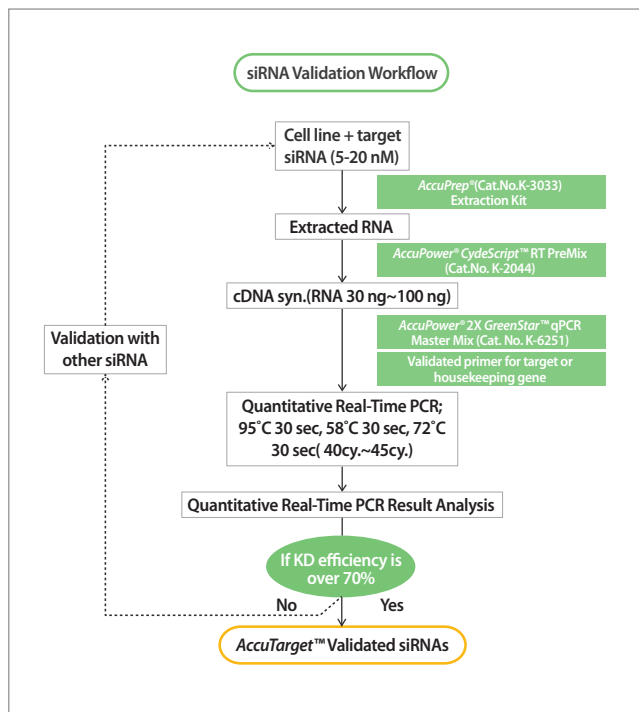
AccuTarget™ Real-Time PCR Primer for Individual Gene

제품명	Reactions
AccuTarget™ Human Real-Time PCR Primer for Individual Gene	100
AccuTarget™ Human Real-Time PCR Primer for Individual Gene	200

○ 제품 개요

AccuTarget™ Premade Human siRNA Sets은 즉시 transfection 실험에 사용할 수 있도록 제작된 54,144종의 siRNA로 이루어진 제품입니다.

특정 cellular process, 암, 질병 등의 연구 목적에 특화된 25개의 biological pathway (혹은 gene family)별로 제작된 siRNA library set을 0.1, 0.25, 0.5, 1 nmole로 제공하며, 각 set에 포함되어 있는 siRNA는 개별로도 10, 20, 50, 100 nmole의 다양한 용량으로 주문 가능합니다. Premade siRNA의 validation 과정은 다음과 같습니다.



○ 특징점

- **Categorized by pathway / family**
연구수행에 편리하게 특화되어 있습니다.
- **Available Pre-validated siRNA libraries**
즉시 사용 가능한 검증된 효능의 siRNA library입니다.
- **합리적인 가격**
연구 비용 대비 극대화된 효율을 확인할 수 있습니다.

○ 응용 분야

AccuTarget™ Premade siRNA Sets은 다양한 RNAi 실험에 활용할 수 있습니다

- Pathway analysis and target identification and validation
- Drug target HTS (High Throughput siRNA Screening)

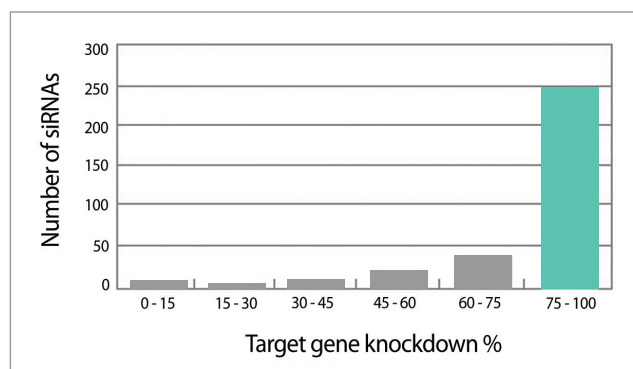


Figure 4. Knockdown efficiency of AccuTarget™ siRNA Library.

To determine knockdown efficiency, HeLa cells were transfected with individual siRNAs at 100 nM concentration. By 24 hrs post-transfection, total RNA was isolated and the level of target mRNA was measured by qPCR. This data demonstrates the effectiveness of the Turbo si-Designer algorithm: 83.8% of tested siRNAs induced >70% knockdown and 38.1% of tested siRNAs elicited >90% knockdown.

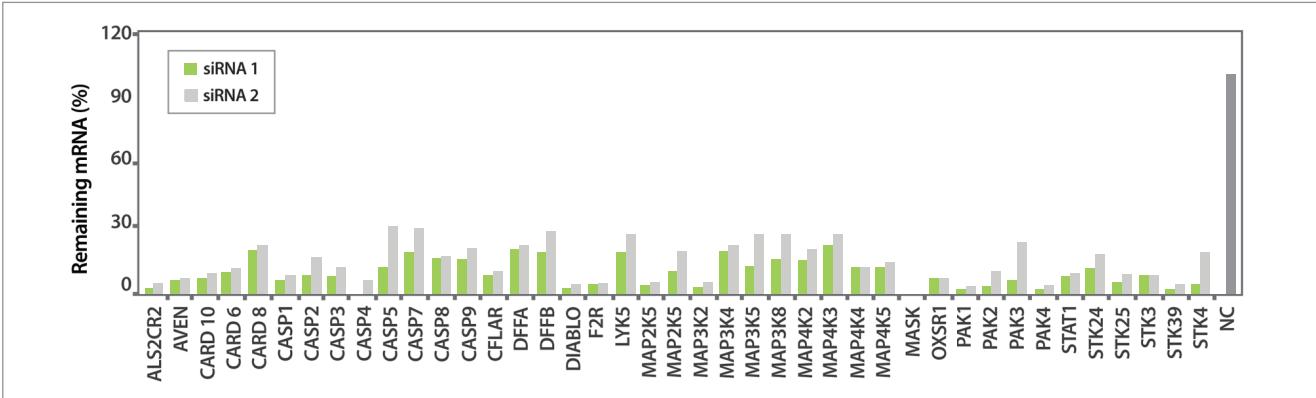


Figure 5. siRNA knockdown efficiency of AccuTarget™ Human Validated Cell cycle siRNA Set. HeLa cells were transfected with siRNAs targeting 33 different genes at a concentration of 20 nM. Total RNA was isolated and the level of target mRNA was measured by qPCR. This data demonstrates the effectiveness of the Turbo si-Designer algorithm.

주문 정보

AccuTarget™ Premade Human siRNA Sets			
카탈로그 번호	제품명	No. of Genes	No. of siRNAs
SHS-0010	AccuTarget™ Human Antioxidant siRNA set	38	114
SHS-0020	AccuTarget™ Human Apoptosis siRNA set	290	870
SHS-0250	AccuTarget™ Human Cancer siRNA set	1,157	3,471
SHS-0030	AccuTarget™ Human Caspase siRNA set	37	111
SHS-0040	AccuTarget™ Human Cell cycle siRNA set	112	336
SHS-0050	AccuTarget™ Human Cyclase siRNA set	21	63
SHS-0060	AccuTarget™ Human Cytochrome P450 siRNA set	52	156
SHS-0070	AccuTarget™ Human Deaminase siRNA set	22	66
SHS-0080	AccuTarget™ Human GPCR signaling pathway siRNA set	727	2,181
SHS-0090	AccuTarget™ Human Helicase siRNA set	114	342
SHS-0100	AccuTarget™ Human Isomerase siRNA set	104	312
SHS-0110	AccuTarget™ Human Kinase siRNA set	699	2,097
SHS-0120	AccuTarget™ Human Ligase siRNA set	272	816
SHS-0130	AccuTarget™ Human Lyase siRNA set	123	369
SHS-0140	AccuTarget™ Human Motor siRNA set	122	366
SHS-0150	AccuTarget™ Human NF-kB pathway siRNA set	37	111
SHS-0160	AccuTarget™ Human Nucleic acid binding siRNA set	2,573	7,719
SHS-0170	AccuTarget™ Human Oxidoreductase siRNA set	551	1,653
SHS-0180	AccuTarget™ Human Peptidase siRNA set	491	1,473
SHS-0190	AccuTarget™ Human Phosphatase siRNA set	188	564
SHS-0200	AccuTarget™ Human Receptor siRNA set	1,516	4,548
SHS-0210	AccuTarget™ Human Transferase siRNA set	1,428	4,284
SHS-0220	AccuTarget™ Human Transporter siRNA set	1,021	3,063
SHS-0230	AccuTarget™ Human Tubulin siRNA set	20	60
SHS-0240	AccuTarget™ Human Ubiquitin siRNA set	77	231

AccuTarget™ Real-Time PCR Primers for Premade siRNA Sets

○ 제품 개요

Premade siRNA set에 대한 Real-Time PCR Primer Library는 유전자 기능별 pathway 분류에 따른 11,154개의 primer set로 제공됩니다. dsDNA binding dye 방식의 Real-time PCR (AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix, Cat. No. K-6210)에 본 제품을 이용할 경우 더욱 specific하고 sensitive한 결과를 얻을 수 있습니다.

○ 주문 정보

제품명	No. of Genes	Reactions / gene
AccuTarget™ Human Antioxidant Real-Time PCR primer Set	38	50
AccuTarget™ Human Apoptosis Real-Time PCR primer Set	277	50
AccuTarget™ Human Cancer Real-Time PCR primer Set	1,082	50
AccuTarget™ Human Caspase Real-Time PCR primer Set	35	50
AccuTarget™ Human Cell cycle Real-Time PCR primer Set	111	50
AccuTarget™ Human Cyclase Real-Time PCR primer Set	20	50
AccuTarget™ Human Cytochrome P450 Real-Time PCR primer Set	37	50
AccuTarget™ Human Deaminase Real-Time PCR primer Set	19	50
AccuTarget™ Human GPCR signaling pathway Real-Time PCR primer Set	566	50
AccuTarget™ Human Helicase Real-Time PCR primer Set	112	50
AccuTarget™ Human Isomerase Real-Time PCR primer Set	91	50
AccuTarget™ Human Kinase Real-Time PCR primer Set	673	50
AccuTarget™ Human Ligase Real-Time PCR primer Set	261	50
AccuTarget™ Human Lyase Real-Time PCR primer Set	118	50
AccuTarget™ Human Motor Real-Time PCR primer Set	111	50
AccuTarget™ Human NF-kB pathway Real-Time PCR primer Set	37	50
AccuTarget™ Human Nucleic acid binding Real-Time PCR primer Set	2,235	50
AccuTarget™ Human Oxidoreductase Real-Time PCR primer Set	502	50
AccuTarget™ Human Peptidase Real-Time PCR primer Set	461	50
AccuTarget™ Human Phosphatase Real-Time PCR primer Set	179	50
AccuTarget™ Human Receptor Real-Time PCR primer Set	1,288	50
AccuTarget™ Human Transferase Real-Time PCR primer Set	1,355	50
AccuTarget™ Human Transporter Real-Time PCR primer Set	946	50
AccuTarget™ Human Tubulin Real-Time PCR primer Set	11	50
AccuTarget™ Human Ubiquitin Real-Time PCR primer Set	70	50

AccuTarget™ Custom Designed siRNA Synthesis

○ 개요

Custom siRNA는 고객이 요구하는 siRNA sequence를 합성해 드리는 서비스입니다. 바이오니아에서 siRNA를 합성하는 경우에는 free-design 서비스를 제공받을 수 있습니다.

Pre-designed siRNA 이외의 유전자는 Turbo si-Designer에 의해 제작 및 합성이 가능하며, 하나의 유전자에 대하여 세 개 이상의 siRNA를 design 및 합성할 수 있습니다. 정제방법으로 Bio-RP, HPLC 정제를 선택하실 수 있습니다. 또한 원하시는 siRNA sequence에 다양한 modification도 가능합니다. 다양한 옵션을 선택함으로써 다양한 형태의 siRNA를 주문할 수 있습니다. siRNA는 정제방법, annealing 유/무, 동결건조 또는 ready-to-use 등의 선택 옵션에 따라 제작되어 제공됩니다.

Modification 문의는 siRNA@bioneer.co.kr로 메일을 보내 주시거나 042) 930-8593으로 연락주시기 바랍니다.

Custom siRNA는 본사의 최첨단 clean room 시설에서 합성된 후 바이오니아의 Bio-RP purification system을 통해 정제됩니다. 정제된 siRNA는 MALDI-TOF Mass Spectrometry를 이용한 품질 검사를 시행하여 합격된 siRNA만을 발송합니다. 보다 높은 순도의 siRNA를 원하신다면, HPLC purification 선택을 추천합니다(Figure 6).

Annealed siRNA를 요청하신 경우에는 동량의 sense와 antisense RNA를 annealing하여 double strand form으로 제작한 다음, PAGE로 double strand siRNA가 제대로 만들어졌는지 확인한 후 제공해드립니다(Figure 7).

○ 특징점

■ Guaranteed performance

자사 siRNA design program을 이용하여 custom siRNA를 design 하실 경우, 동일 유전자 3개 중 2개가 적어도 80%의 knockdown 효율을 나타냅니다. 그렇지 않을 경우 무료로 2개의 siRNA를 추가로 제공합니다.

■ 철저한 QC 검증

모든 siRNA는 clean room에서 제조되며 MALDI-TOF 및 PAGE로 검증됩니다.

■ siRNA design service

Turbo si-Designer software를 사용하여 무료로 design 해 드립니다.



Figure 6. MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis of a custom siRNA.
All siRNAs are subjected to MALDI-TOF Mass Spectrometry to ensure its quality.

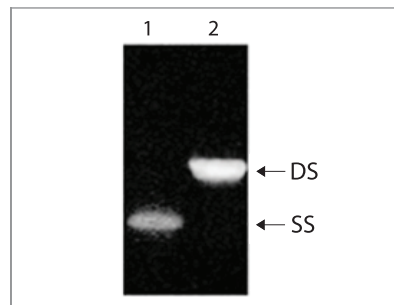


Figure 7. PAGE data of annealed double-stranded custom siRNA.
Complementary single-strand RNA strands were hybridized to form siRNA duplex and analyzed by 15% non-denaturing PAGE.
SS: single-strand RNA, DS: double-strand siRNA.

○ 주문 정보

카탈로그 번호	정제 방법	보장량 (nmole)
S-1017-1	Bio-RP	10
S-1017-2		20
S-1017-3		50
S-1017-4		100
S-1018-1	HPLC	10
S-1018-2		20
S-1018-3		50
S-1018-4		100

- ✓ Single strand 형태의 sense 및 antisense RNA 각각을 동일한 농도로 건조하여 제공해 드립니다.
- ✓ Annealing buffer와 DEPC D.W.를 기본으로 제공해 드립니다.
- ✓ Annealing된 상태의 siRNA를 원하실 경우는 2만원의 비용이 추가됩니다.
- ✓ 모든 합성 RNA에 대해 MALDI-TOF QC data를 첨부해 드립니다.

AccuTarget™ Custom Designed siRNA Synthesis

○ Modification available for custom siRNA

5'- Modification	3'- Modification	Internal Modification	정제 방법	보장량 (nmole)
5' Fluorescein	3' Fluorescein	Phosphorothioate	HPLC	10
5' Phosphorylation	3' Phosphorylation	2'-OMe-rA, rC, rG, rU		
5' Biotin	3' Biotin	2'-F(A)		
5' Amine	3' Amine	2'-F(U)		20
5' TAMRA	3' TAMRA	2'-F(G)		
5' Thiol	3' Thiol	2'-F(C)		
5' Cyanine3	3' DABCYL	Inosine		50
5' Cyanine5	3' Cholesterol	Deoxy-abase		
5' PEG 2000	3' PEG 2000	Chimeric DNA		
5' Cyanine5.5	3' Cyanine5.5	Phosphorothioate		

✓ 그 외 Modification 합성 여부 및 가격은 별도 문의 바랍니다.

■ 신속하고 전문적인 고객센터 서비스

siRNA 실험이 익숙하지 않은 고객들도 본사의 제품을 구입하시면 언제든지 실험 관련 상담을 받으실 수 있습니다.

siRNA를 이용한 다양한 실험들에 대해 수년간의 경험이 축적된 바이오니아의 연구원들이 고객들의 질문에 대해 신속하고 친절하게 답변드립니다. 제품 및 실험 관련 문의 사항은 다음의 이메일 또는 전화번호로 연락을 주시면 성실히 답변해 드립니다.

■ siRNA 제품 및 실험관련 상담

E-mail: siRNA@bioneer.co.kr

Tel: 042-930-8593 (올리고팀)

AccuTarget™ Control siRNAs (Positive / Negative)

○ 제품 개요

AccuTarget™ Positive Control siRNA는 target gene에 대하여 높은 효율의 knockdown 효과를 나타냅니다(Figure 8, 9 & 10). House-keeping gene으로 널리 사용되는 GAPDH 및 reporter system으로 잘 알려진 GFP와 luciferase에 대한 positive control siRNA를 제공합니다. 또한 mouse positive control로는 Lamin A/C or PPIB (cyclophilin B)에 대해 효율적인 siRNA를 제공합니다.

Human과 mouse, rat에서 공통으로 사용 가능한 AccuTarget™ Negative Control siRNA는 non-targeting siRNA로써, human과 mouse, rat의 알려진 모든 유전자들에 대해 homology가 낮은 sequence입니다. 따라서 모든 유전자의 knockdown 실험에 negative control로 사용할 수 있어서 편리합니다. Transfection 효율을 쉽게 관찰하기 위하여 siRNA uptake를 확인할 수 있는 fluorescein-labeled negative control siRNA도 함께 제공합니다(Figure 11). 또한, 간편하고 저렴한 positive와 negative control siRNA로 구성된 control set도 제공합니다. AccuTarget™ Positive Control siRNA와 Negative Control siRNA는 바이오니아 홈페이지에서 원하는 scale과 purification을 선택하여 주문이 가능합니다.

○ 특징점

■ 높은 효율

90% 이상의 knockdown 효율을 갖는 positive control siRNA를 제공합니다.

■ Monitoring of transfection rate

형광물질로 labeling되어 편리하게 효능 검증이 가능한 negative control sets를 제공합니다.

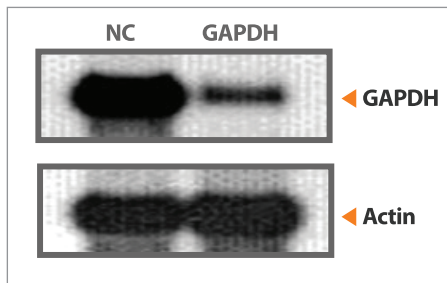
■ 합리적인 가격

연구 비용 대비 극대화된 효율을 경험할 수 있습니다.

Positive Control siRNA

1. GAPDH-siRNA

A) Northern blotting



B) qPCR

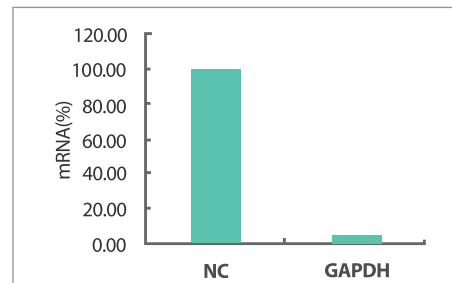


Figure 8. Effects of Human GAPDH Positive Control siRNA.

HeLa cells were transfected separated with AccuTarget™ Human GAPDH Positive Control and Negative Control siRNA using lipofectamine 2000 (Invitrogen) at a final concentration of 100 nM. Total cellular RNA was isolated from transfected cells 24 hrs after transfection and subjected to northern blot and qPCR analysis. As can be seen from Figure 8-B, about 3% GAPDH mRNA remained.

2. GFP-siRNA

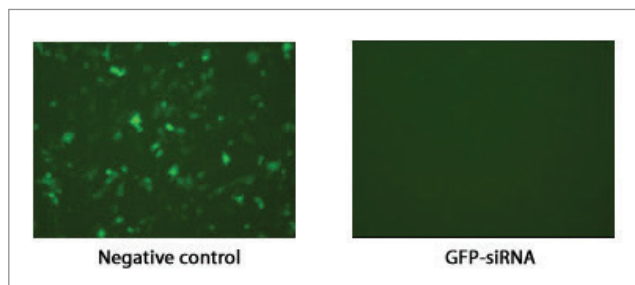


Figure 9. HeLa cells in a 24-well plate were co-transfected with 200 ng of CMV-GFP plasmid and 10 nM of GFP siRNA using lipofectamine 2000 transfection reagent.

Next day, the expression of GFP was observed by using a Nikon Eclipse TS100 epifluorescence microscope. In contrast to bright green fluorescence of GFP protein in NC-siRNA-transfected cells, no fluorescence was detected from GFP-siRNA-transfected cells, indicating efficient knockdown of GFP by using our positive control GFP-siRNA.

AccuTarget™ Control siRNAs (Positive / Negative)

3. Luciferase-siRNA

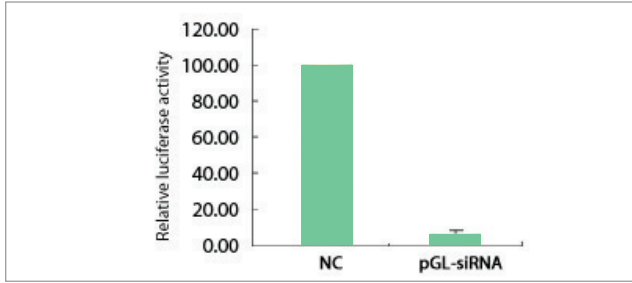


Figure 10. HeLa cells in a 6-well plate were co-transfected with 400 ng of CMV-luc plasmid and 10 nM of luciferase siRNA using lipofectamine 2000 transfection reagent.

Next day, cells were harvested and assayed for luciferase activity. As shown in Figure. 6, co-transfection with our positive control luciferase siRNA led to efficient knockdown of luciferase activity (85%-95% knockdown compared to luciferase activity of NC-siRNA-transfected cells).

4. Mouse Positive Control siRNA

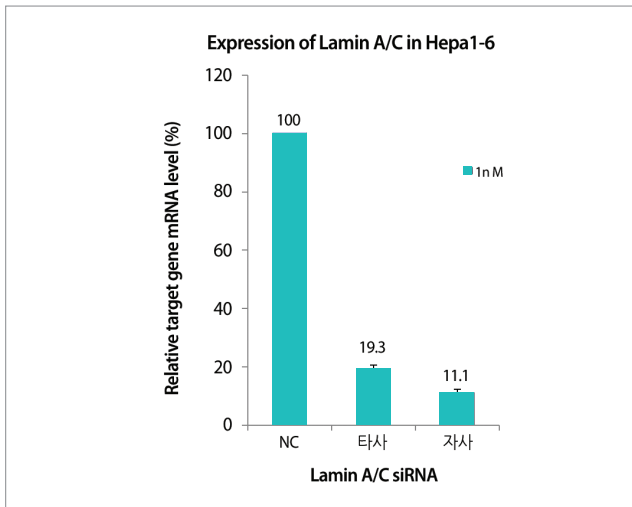


Figure 11. Effects of Mouse Lamin A/C Positive Control siRNA.

Hepa1-6 cells were transfected separately with *AccuTarget™* Mouse Lamin A/C Positive Control and Negative Control siRNA using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) at a final concentration of 1 nM. Total cellular RNA was isolated from transfected cells 24 hrs after transfection and subjected to real-time PCR analysis.

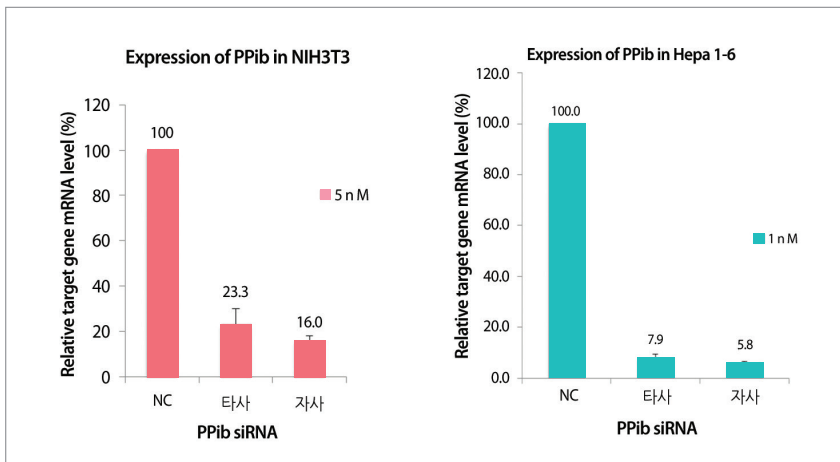


Figure 12. Effects of Mouse PPib (Cyclophilin B) Positive Control siRNA.

Hepa 1-6 & NIH3T3 cells were transfected separately with *AccuTarget™* Mouse PPib (Cyclophilin B) Positive Control and Negative Control siRNA using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) at a final concentration of 5 & 1 nM. Total cellular RNA was isolated from transfected cells 24 hr after transfection and subjected to real-time PCR analysis.

AccuTarget™ Control siRNAs (Positive / Negative)

Negative control siRNA

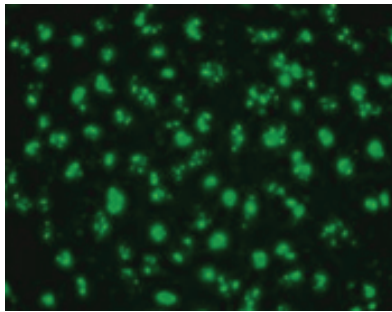


Figure 13. HeLa cells transfected with FITC-labeled siRNA (Cat. No. SN-1021, Bioneer) was observed by confocal microscopy.

The fluorescent cells indicate that the target cells were successfully transfected with the siRNA.

주문 정보

AccuTarget™ Positive Control siRNAs

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SP-1001	AccuTarget™ GAPDH Positive Control siRNA	Bio-RP	5
SP-1002			10
SP-1003			20
SP-1011		HPLC	5
SP-1012			10
SP-1013			20
SP-2001	AccuTarget™ GFP Positive Control siRNA	Bio-RP	5
SP-2002			10
SP-2003			20
SP-2011		HPLC	5
SP-2012			10
SP-2013			20
SP-3001	AccuTarget™ Luciferase Positive Control siRNA	Bio-RP	5
SP-3002			10
SP-3003			20
SP-3011		HPLC	5
SP-3012			10
SP-3013			20
SP-4001	AccuTarget™ Mouse Lamin A/C Positive Control	Bio-RP	5
SP-4002			10
SP-4003			20
SP-4011		HPLC	5
SP-4012			10
SP-4013			20
SP-5001	AccuTarget™ Mouse cyclophilin B Positive Control	Bio-RP	5
SP-5002			10
SP-5003			20
SP-5011		HPLC	5
SP-5012			10
SP-5013			20

AccuTarget™ Control siRNAs (Positive / Negative)

AccuTarget™ Negative Control siRNAs

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SN-1001	AccuTarget™ Negative Control siRNA	Bio-RP	5
SN-1002			10
SN-1003			20
SN-1011		HPLC	5
SN-1012			10
SN-1013			20
SN-1021	AccuTarget™ Fluorescein-labeled Negative Control siRNA	HPLC	5
SN-1022			10
SN-1023			20

AccuTarget™ Control siRNA Sets

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SS-1001	AccuTarget™ GAPDH Control siRNA Set	Bio-RP	5 nmole positive control + 2 nmole negative control
SS-1002	AccuTarget™ GFP Control siRNA Set		
SS-1003	AccuTarget™ Luciferase Control siRNA Set		
SS-1011	AccuTarget™ GAPDH Control siRNA Set	HPLC	
SS-1012	AccuTarget™ GFP Control siRNA Set		
SS-1013	AccuTarget™ Luciferase Control siRNA Set		

합성 및 주문

1. Pre-designed siRNA 주문을 어떻게 하나요?

바이오니아에서 판매하는 AccuTarget™ Genome-wide predesigned siRNA는 Human, Mouse, Rat에 대해서 모두 design 되어있습니다. 바이오니아 홈페이지(www.bioneer.co.kr)를 통해 직접 주문할 수 있습니다. Symbol, Gene No, Refseq accession No, Description을 통해 검색할 수 있습니다. 그리고 정제 종류 및, 보장량(nmole)을 선택한 후 주문할 수 있습니다.

2. 주문 후 배송 기간은 얼마나 걸리나요?

모든 siRNA 제품은 주문 확정 후 2~4일 후 제품을 받으실 수 있습니다. 추가적인 modification이 있을 경우 합성 일정에 따라 변동됩니다.

3. 바이오니아에서는 최대 몇 base까지 합성 가능한가요?

Single strand RNA는 최대 85 mer까지 서비스 가능하며 siRNA는 30 mer까지 동일한 가격으로 제공해 드립니다.

30 mer 이상의 siRNA가 필요하신 경우 별도 문의(sirna@bioneer.co.kr) 바랍니다.

4. 주문해서 받게 되는 siRNA의 상태는 어떤가요?

Genome-wide predesigned siRNA, Validation siRNA, siRNA Library, Control siRNA는 Sense와 Antisense 각각을 동일 농도로 정제(MALDI-TOF mass 확인)한 다음 "Annealing" 과정을 거쳐 Duplex 형태로 건조 후 제공합니다. 이를 함께 동봉해 드리는 DEPC D.W에 원하시는 농도(100 µM로 권장함)로 녹여서 바로 실험에 사용하시면 됩니다. Custom siRNA 주문 시 Annealing service를 신청하신 경우 Sense와 Antisense 각각을 동일 농도로 정제(MALDI-TOF mass 확인)한 다음 "Annealing"과정을 거쳐 Duplex로 건조 후 제공합니다. 이를 함께 동봉해 드리는 DEPC D.W에 원하시는 농도(100 µM로 권장함)로 녹여서 사용하시면 됩니다. Annealing service를 신청하지 않으신 경우 annealing buffer (1X)를 이용하여 동봉되는 annealing protocol 대로 annealing하시면 됩니다.

5. In vitro에서 실험을 하려고 하는데 어떤 scale의 siRNA를 주문하는 것이 좋을까요? 그리고 purification은 어떤 방법을 선택해야 할까요?

10 nmole scale의 siRNA를 100 nM로 transfection 한다면 6 well plate 기준으로 100개의 well에 transfection 할 수 있는 양입니다. 일반적인 세포 실험에서는 Bio-RP Purification을 선택하셔도 좋은 결과를 얻으실 수 있습니다.

6. Chimeric RNA 합성도 가능한가요?

네, 가능합니다. dA, dC, dG, dT를 원하시는 sequence로 DNA와 RNA가 섞여있는 chimeric RNA의 합성하실 수 있습니다. 또한 2'-O-Methyl 형태의 RNA와 2'-F(rA, rC, rG, rUrU, rC) RNA 합성도 가능합니다. 단 주문 시에는 웹상의 주문 안내 manual을 따라 홈페이지에서 바로 주문 가능합니다.

7. 하나의 gene에서 4개 이상의 candidate를 주문하고 싶습니다. 어떻게 해야 하나요?

바이오니아의 Genome-wide predesigned siRNA의 경우 3개의 candidate까지만 제공합니다. 4개 이상의 candidate를 주문하고자 하시면 Custom siRNA으로 주문하시면 됩니다. siRNA의 sequence는 주문을 하셔야만 확인하실 수 있습니다. 논문에 나온 sequence와 비교하거나 Design 조건을 변경하고자 하실 경우 이메일(sirna@bioneer.co.kr)로 연락주시면 신속하게 답변해드립니다.

8. AccuTarget™ Genome-wide predesigned siRNA를 주문하였는데 효능이 좋지 않았습니다. 어떻게 해야 할까요?

먼저 siRNA를 PAGE로 확인해 보시고 siRNA가 분해되지 않았다면 transfection 효율을 확인해보셔야 합니다. 바이오니아에서 한 유전자당 3개의 Pre-designed siRNA를 구매하신 후 그 중 2개가 80%의 knock-down 효율을 보이지 않을 경우 2개의 siRNA를 무상으로 제공해드립니다. 다만 아래의 supported data 제출이 필요합니다.

1. siRNA 효율 측정 data

NC: AccuTarget™ negative control, siRNA농도: 100 nM

2. Transfection 효율 측정 data

PC: AccuTarget™ GAPDH/GFP/Luciferase siRNA

실제로 실험실에서 사용하셔서 knockdown efficiency 가 나타났던 siRNA data 도 positive control 로 인정합니다. 단, 이 경우 cell line 및 transfection method 가 동일하게 진행하여 주셔야 합니다.

9. 합성된 siRNA에는 5' 또는 3' 위치에 phosphate가 붙어있나요?

주문하실 때 별도로 지시하지 않으면 5' 과 3' 위치에는 -OH 기가 붙어 있습니다. 따라서 5 phosphate가 부착된 siRNA를 원하시면 5' phosphorylation modification된 siRNA를 주문하셔야 합니다.

Modified siRNA

1. Modified siRNA의 종류를 알고 싶습니다.

siRNA의 다양한 응용을 위해서는 modified된 siRNA의 사용이 필요하며 siRNA를 modification 하기 위해서는 여러 가지 방법이 응용될 수 있으나 가장 간편한 것은 phosphoramidite 방법을 이용하여 siRNA 합성기를 통해 siRNA 상에 label을 부착하는 것입니다.

siRNA의 5'위치에 modification이 필요한 경우는 정해진 염기배열의 siRNA 합성이 완료된 후 label phosphoramidite를 사용하여 5'위치에 결합시킴으로써 결과적으로 siRNA의 5' 위치에 label을 부착하게 됩니다.

3'-Modification의 경우는 5'-modification 보다 복잡한데 일반적으로 label이 미리 부착된 고형 지지체로부터 siRNA 합성을 수행함으로써 3' 위치에 label이 부착된 siRNA를 합성할 수 있게 됩니다.

Deoxyuridine의 base의 5' 위치에 label을 도입한 phosphoramidite를 이용하면 siRNA 합성 시 원하는 sequence에 label을 도입할 수 있어 결과적으로 internal modified siRNA의 합성이 가능하게 됩니다.

다음은 바이오니아에서 합성 제공하는 modified siRNA입니다.

- 5' Amine - 3' Amine Modification
- 5' Phosphorylation & 3' Phosphorylation
- 5' Thiol - 3' Thiol Modification
- 5' Biotin - Internal Biotin-dT Modification
- 5' Fluorescein - 3' Fluorescein Modification
- 3' TAMRA Modification

이상의 modification을 포함하여 100여 종의 modification을 제공하고 있으니 홈페이지에서 원하는 modification을 확인하시어 주문하실 수 있습니다.

취급 및 보관

1. siRNA는 어떻게 보관하며 얼마나 오래가나요?

일반적으로 바이오니아에서 제공한 모든 siRNA 제품은 clean room에서 제작되어 -20℃에서 1년 이상 안정합니다. 특히 최초 제공해드린 건조 상태의 제품은 보다 안정적으로 보관하실 수 있습니다. 동봉한 DEPC-DW로 녹인 용액 상태의 siRNA는 공기 중의 RNase를 포함하고 있는 에어로졸 입자가 들어가면 분해될 수 있어서 효능 저하를 보일 수 있으므로 합성 siRNA는 받으신 후에 clean bench에서 여러 개의 RNase-free tube로 분주하여 각각을 보관하신 뒤 필요량만큼 따로 사용하시는 것이 바람직합니다. RNA의 경우는 pH 11 이상에서는 hydrolysis에 의해 phosphodiester bond가 깨질 수 있으니 주의를 요합니다.

2. siRNA는 어떻게 용해시키나요?

용액 상태로 보관할 때에는 제품 발송 시 동봉하여 드리는 DEPC D.W.에 녹여두시면 더 오래 보관할 수 있습니다.

3. Fluorescent dye modified siRNA는 어떻게 보관해야 하나요?

빛에 노출되면 형광이 약해질 수 있으므로 빛이 차단된 용기에 보관하시고 또 저장하는 장소도 빛이 들어오지 않는 장소에서 보관하시는 것이 좋습니다. Cyanine 3, Cyanine 5는 pH 9 이상에서는 분해될 수 있으므로 Cyanine 3, Cyanine 5 modified siRNA는 보관 시 basic 한 환경을 피하도록 하셔야 합니다.

정량 및 농도

1. siRNA의 O.D. 값은 무엇을 의미하나요?

합성 siRNA는 매우 미량이라 어느 정도의 양이 있는지 무게를 재서 알아 내기는 매우 힘듭니다. 따라서 siRNA의 빛의 흡광도를 측정하여 간접적으로 합성 siRNA의 정량을 하게 되는데 이때 빛의 흡수량을 O.D. (Optical density) 값으로 표시합니다.

2. 합성된 siRNA가 몇 ng 인지 알 수 있나요?

일반적으로 siRNA 합성은 Guarantee nmole 단위로 신청되며 합성된 결과도 보통 nmole 단위로 report 됩니다. 하지만, 사용하고자 하실 때 ng 또는 µg 단위로 하신다면 mole을 g으로 환산하시면 됩니다. Report에 siRNA의 분자량이 표시되기 때문에 쉽게 바꿀 수 있습니다.

$$\text{분자량(g/mol)} \times \text{mole 수(nmole)} = \text{siRNA의 양(ng)}$$

3. 합성 siRNA의 농도 맞추는 방법에 대한 설명

우선 siRNA 합성 시트에 쓰여있는 'volume for 100 pmole/µl' 라는 말은 100 pmole/µl의 농도로 만들기 위해 첨가해야 할 DEPC D.W.의 양을 이야기합니다. 받으신 리포트 용지에 각각 100과 200라고 적었다면, 각 oligomer tube에 적힌 대로 각각 DEPC D.W. 등을 100 µl와 200 µl를 각각 첨가했을 때 농도가 100 pmole/µl가 됩니다.

즉, 각 tube에는 siRNA가

$$100 \mu\text{l} \times 100 \text{ pmole}/\mu\text{l} = 10,000 \text{ pmole} = 10 \text{ nmole},$$

$$200 \mu\text{l} \times 100 \text{ pmole}/\mu\text{l} = 20,000 \text{ pmole} = 20 \text{ nmole}$$

씩 들어 있습니다.

사용하시는 목적에 따라 siRNA의 농도를 알맞게 설정하여야 하지만, 일반적으로 실험의 경우 100 pmole/µl 농도로 녹였을 때 사용하기 편리하기 때문에, 본사에서 제공하는 sheet에는 농도를 100 pmole/µl로 만들기 위한 volume을 제공하는 것입니다.

실험

1. siRNA 실험을 하기 전에 유념해야 할 점은 무엇입니까?

첫째, 고효율의 siRNA 디자인은 sequence에 따른 여러 물리, 생화학적 요인들을 종합적으로 최적화한 프로그램에 의해 예측되기 때문에 실제 가장 효과 좋은 siRNA를 선별하기 위해서는 3개의 siRNA 후보들을 각각 실험을 통해 가장 효율이 높은 siRNA서열을 발굴해야 합니다.

둘째, 단백질 수준에서 siRNA 작용에 의한 억제효과를 정확히 확인하기 위해서는, 먼저 siRNA 처리에 의해 타겟 유전자 mRNA가 분해되는지 Real-time PCR을 통해 확인한 후 ELISA나 Western blot을 통해 단백질 발현 억제를 확인하시면 됩니다.

셋째, RNase 오염을 최소화해야 합니다. RNase는 피부, 실험 용기뿐만 아니라 공기 중 바이오 에어로졸에 존재하고 있으므로 이러한 RNase에 의해 분해된 siRNA를 사용할 경우 원하는 결과를 얻을 수 없습니다.

넷째, 실험에 사용할 세포의 상태를 건강하게 유지해야 합니다. 적절한 세포 수를 유지하여 Transfection reagent를 이용한 실험을 하셔야 합니다. 세포수가 너무 많으면 transfection 효율이 떨어질 수 있습니다.

다섯째, 대조군을 설정하는 것은 결과의 해석에 큰 도움이 됩니다. 양성 대조군, 음성대조군, 그리고 형광 표지 siRNA는 실험과정에서 있을 수 있는 실수 혹은 실험 설계의 오류를 확인하는데 필수적입니다.

2. siRNA 실험을 처음 시작하려고 합니다. 어떻게 실험 조건을 잡을까요?

첫 테스트를 진행하시면서 siRNA의 처리 농도, 배양된 세포의 수, antibiotics의 제외 등의 추가 조건을 조정하는 방향으로 진행하시면 됩니다. 추가로 양성대조군, 음성대조군, 그리고 형광 표지 siRNA는 실험의 조건을 잡는 과정에서 결과 해석에 큰 도움을 줍니다. siRNA 실험에서 중요한 것은 siRNA가 Cell 내에 제대로 delivery 되는 것이므로, 기존에 transfection 효율이 불확실한 세포주를 사용하는 경우, 반드시 형광 라벨링된 scrambled siRNA인 NC-FITC를 양성대조군으로 하여 세포 내 전달을 확인하는 것이 중요합니다.

현재 바이오니아에서 판매되고 있는 Positive control이나 NC-FITC를 이용하여 간단하게 siRNA delivery를 모니터링하실 수 있습니다.

siRNA Oligonucleotide FAQs

* Positive control: *AccuTarget*™ Positive Control siRNAs (Human GAPDH, GFP, Luciferase)

* Negative control: *AccuTarget*™ Negative Control siRNAs (Human, Mouse, Rat)

* NC-FITC: *AccuTarget*™ Fluorescein-labeled Negative Control siRNA

3. siRNA를 transfection 하기 위한 세포배양 조건은 %가 적당할까요?

siRNA를 transfection 하기 위한 cell density는 약 60-70% 정도가 적당합니다(HeLa cell, 6-well plate 기준: 1.5×10^5 cells/well, 단 사용자의 조건에 따라 조절이 필요합니다).

4. siRNA의 세포 처리 시 얼마의 농도를 사용해야 하나요?

Starting concentration은 100 nM이며, 농도를 낮추어 가면서 실험하려는 세포 조건에 맞게 optimization 과정이 필요합니다(100 pmol/well).

5. 10 nmole의 siRNA로 어떻게 100 nM로 transfection 할 수 있을까요?

가장 많이 혼동하시는 부분입니다. siRNA를 100 nM로 6 well plate의 하나의 well에서 transfection 하실 때, Transfection 용액(배양 용액)의 volume이 1 ml이므로 100 nM(100 pmole/ml)의 농도로 siRNA를 처리하려면 100 pmole 수의 siRNA가 필요합니다. 50 μ M(50 pmole/ μ l) stock의 siRNA를 2 μ l 넣으면 100 pmole의 siRNA를 transfection 한 것이 됩니다. 만약, 10 nmole 주문하시면 100 nM(100 pmole/ml) transfection시 100개 well에 사용하실 수 있습니다.

6. siRNA를 transfection하기 위한 transfection reagent는 무엇을 사용해야 하나요?

실험하려는 세포 조건에 따라 적합한 transfection reagent 사용을 권장합니다. Cell line마다 사용되는 reagent에 따라 siRNA 효율에 차이가 생길 수 있으니 각 제조사들의 기술 자료들을 참고하여 사용하시면 됩니다.

7. siRNA의 transfection efficiency를 확인하는 방법은 무엇인가요?

NC-FITC를 transfection 후 형광현미경 관찰을 통해 transfection efficiency 확인이 가능합니다. 또한 NC-FITC는 siRNA와 transfection reagent의 사용농도 및 세포 조건의 확립 등 본 실험에 앞서 transfection 조건을 셋팅하기 위한 테스트 시약으로 사용될 수 있습니다.

8. siRNA 실험에 사용하는 control에는 어떤 것이 있나요?

Human과 Mouse, Rat에서 공통으로 사용 가능한 *AccuTarget*™ Negative control siRNA는 non-targeting siRNA로써, Human과 Mouse, Rat의 알려진 모든 유전자들에 대해 homology가 낮은 sequence입니다. 따라서 모든 유전자의 knockdown 실험에 negative control로 사용할 수 있어서 편리합니다.

AccuTarget™ Positive control siRNA (human)는 target gene에 대하여 높은 효율의 knockdown 효과가 확인된 siRNA 들입니다. 모든 세포에서 발현되는 house-keeping gene인 GAPDH에 대한 효율적인 siRNA를 제공하며 이를 통해 transfection 효율을 간접적으로 확인해 볼 수 있습니다. 이외에도 reporter gene으로 많이 사용되는 GFP와 Luciferase에 대해 고효율의 knock-down 효과를 보이는 siRNA들을

Positive Control siRNA로 판매하고 있습니다

9. siRNA의 knockdown 효율을 확인하기 위한 실험 방법은 무엇입니까?

qRT-PCR, Northern blot을 통해 mRNA degradation을 확인할 수 있고, Western blot 등의 실험을 통해 해당 단백질의 감소를 확인하실 수 있으며, 일반적으로 간편하고 정확하여 가장 널리 사용되는 분석법은 qRT-PCR을 통해 Negative control siRNA 대비 발현 저해 효율을 측정하는 방법입니다.

10. *AccuTarget*™ Genome-wide predesigned siRNAs는 무엇입니까?

한국생명공학연구원과 바이오니아가 공동으로 개발한 효율적인 siRNA 설계 algorithm인 Turbo si-Designer를 이용하여 predesigned된 siRNA입니다. 혁신적인 Turbo si-Designer를 사용하여 높은 knockdown 효율이 검증된 *AccuTarget*™ Genome-wide predesigned siRNA database를 제공하고 있습니다.

현재, 바이오니아의 웹사이트에는 Human (18,048 genes), Mouse (17,117 genes), Rat (9,392 genes)에 대한 predesigned siRNA를 주문 확정 후 2-3일 내로 제품을 받으실 수 있습니다.

11. 특정 유전자에 대한 siRNA를 주문할 수 있나요?

바이오니아의 주문 사이트에서 원하는 유전자의 이름 또는 Gene accession No.를 입력한 후 검색된 siRNA candidate를 선택하여 주문하실 수 있습니다. 원하는 유전자에 대하여 Predesigned siRNA 가 아닌 Custom siRNA으로 주문 시 Turbo si-Designer algorithm을 통한 siRNA 디자인 서비스가 가능하며 이메일(sirna@bioneer.co.kr)을 통해 주문하실 수 있습니다. 단, 동일 유전자에 대하여 3개 이상의 candidate 주문 시에만 적용됩니다.

Dilution Protocol

1. Briefly centrifuge tubes (or multi-well plates) containing siRNA to ensure that the siRNA pellet is located at the bottom of the tube.
2. Dissolve siRNAs to a convenient stock concentration using the recommended volume of DEPC-D.W. (or RNase-free water) shown in Table 1.
3. Pipette the solution up and down 3-5 times (or vortex briefly).
4. Briefly centrifuge tubes (or multi-well plates) containing siRNA to ensure that the solution is collected at the bottom of the tube.
5. Aliquot the siRNAs into small volumes and store at -20°C. siRNA is stable for 1 year under the specified storage condition. For best results, limit freeze-thaw events for each tube no more than five.

Table 1. Recommended siRNA resuspension volumes and concentrations.

siRNA Amount (nmol)	DEPC-D.W. volume(μl) for desired final concentration	
	100 μM stock	20 μM stock
10	100	500
20	200	1000
50	500	Exceeds tube volume
100	1000	

Transfection Protocol

- * We use the Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen; Cat. no. 13778) and HeLa cell for transfection procedure.
- * This protocol is fixed at 6-well plate *in vitro* culture condition (if you want to change this condition, you have to consider the relative surface area (Table 2) and Invitrogen protocol, when you are seeding the cells into the culture dish).

1. One day (24 hrs) before transfection, plate 3.0×10^5 HeLa cells in each well with 2.5 ml of growth medium without antibiotics such that they will be 50~60% confluent at the time of transfection.
2. Remove the growth medium from the 6-well plate before transfection. And add the 500 μl fresh growth medium without serum in each well.
3. For each well to be transfected, prepare siRNA duplex-Lipofectamine™ RNAiMAX complexes as follows.
 - 3-1. Dilute siRNA duplex (making final concentration as 5 nM~100 nM) in 250 μl growth medium (or Opti-MEM I Reduced Serum medium) without serum. Mix gently by vortex.
 - 3-2. Mix Lipofectamine™ RNAiMAX gently before use, then dilute 3.5 μl in 250 μl medium (or Opti-MEM I Reduced Serum medium) without serum. Incubate this solution 5 min at room temperature.
 - 3-3. Combine the diluted siRNA duplex with the diluted Lipofectamine™ RNAiMAX. Mix and incubate for 20 min at room temperature.
4. Add the mixture to each well containing HeLa cells, which result 1 ml as total volume. Mix gently by hand rocking the plate back and forth.
5. Incubate the cells for 5~6 hr at 37°C in CO₂ incubator.
6. Change the medium with fresh one containing serum and incubate the cells 24~48 hr until you are ready to assay for gene knockdown.

Table 2. The relative surface area of *in vitro* cell culture dish and culture media volume.

Culture Vessel	Relative surface area	Volume of plating medium
96-well	0.2	100 μl
48-well	0.4	200 μl
24-well	1	500 μl
6-well	5	2.5 ml
60 mm	10	5 ml
100 mm	30	10 ml

02. miRNA Synthesis Service

<i>AccuTarget™</i> miRNAs	56
miRNA Mimics & Inhibitors	
<i>AccuTarget™</i> miRNA mimics & inhibitors	57
Control miRNA	
<i>AccuTarget™</i> Control miRNAs (Positive / Negative)	59
miRNA mimic FAQs	61

개요

MicroRNA (miRNA)는 21~25 nucleotide (nt)의 small non-coding RNA 분자로서 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질입니다. 사람에는 약 1,700 여종의 miRNA가 알려져 있으며(miRBase version 22), 이러한 miRNA는 특정 세포에서 특정 시점에 발현되어 mRNA의 발현을 정교하게 조절합니다. 주로 mRNA의 3'-UTR에 결합하여 발생, 분화, 증식, apoptosis, stress response 등을 포함한 대부분의 세포 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 있습니다.

miRNA의 생성은 두 단계의 과정으로 이루어집니다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA/pri-miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII type 효소에 의해 70~90 nt 정도의 stem-loop 구조의 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 Dicer라는 효소에 의해 절단되어 21~25 nt의 mature miRNA가 됩니다(Figure 1).

miRNA는 생명 공학 연구에 새로운 통찰력을 제공하며, 비교적 최근에 발견된 물질임에도 불구하고, post-transcriptional level에서 가장 중요한 유전자 regulator로 인정되고 있습니다. 여러 연구에서 miRNA가 protein coding 유전자 30% 이상의 발현을 조절하는 것으로 밝혀지고 있습니다. miRNA의 biogenesis, gene expression regulation mechanism과 기능에 대한 연구가 축적되면서 복잡한 유전자 조절 네트워크를 이해할 수 있는 새로운 지평을 열었다고 인정되고 있습니다. 최근 연구를 통해 miRNA는 암 발생단계나 다양한 암 유형에 따라 고유한 발현 양상을 보이고 있으며 많은 질병 및 바이러스 감염에 중요한 역할을 할 것으로 알려지고 있습니다. 이러한 결과는 miRNA가 질병 진단을 위한 새로운 biomarker로서 기능할 뿐 아니라 miRNA를 이용한 유전자 치료에 대한 새로운 전략을 수행할 수 있다는 것을 보여줍니다.

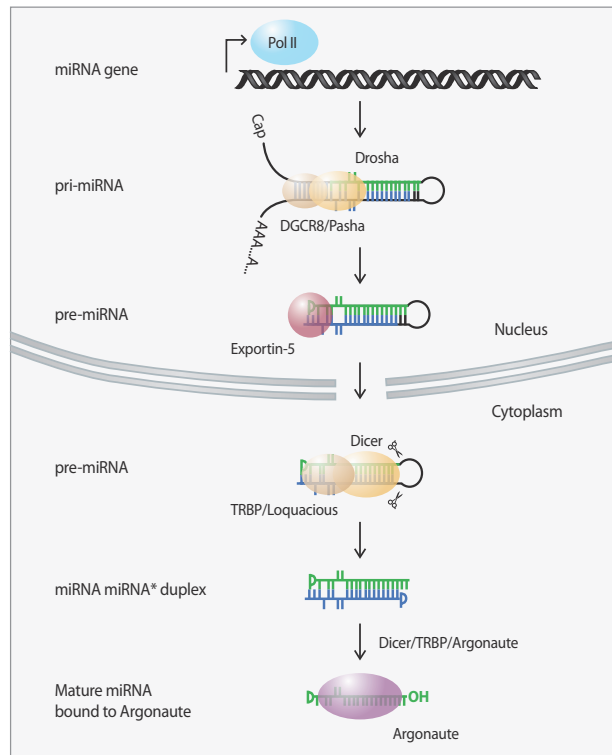


Figure 1. MicroRNA biogenesis (Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2007. 23:175-205).

○ 개요

miRNA의 안정성을 극대화하기 위해 바이오니아의 모든 miRNA는 clean room에서 제조되며, MALDI-TOF Mass Spectrometer를 통한 엄격한 QC 과정을 거치고 있습니다. 이렇게 제조된 고효율, 고품질의 miRNA는 고객의 편의를 위해 주문 다음날 바로 발송해 드립니다. 바이오니아의 AccuTarget™ miRNA mimic는 화학적으로 합성되는 double-stranded RNA oligonucleotide로서 miRBase Sequence Database (version 22)에 존재하는 2,000 여 개의 human mature miRNA와 동일한 sequence로 제조됩니다. 또한 AccuTarget™ miRNA inhibitor는 각각의 human miRNA를 targeting하여 그 기능을 억제하도록 제작되는 single-stranded synthetic RNA입니다. 바이오니아는 고객들의 요구를 충족시키기 위해 96-well plate에 분주된 다양한 농도(0.25, 0.5, 1, 2 nmole)의 predesigned mimic 및 inhibitor로 구성된 miRNA mimic, inhibitor library set를 제공합니다. 이러한 miRNA mimic, inhibitor는 5, 10 및 20 nmole 보장량으로 주문 가능합니다.

또한, 고객이 지정한 염기서열을 가지는 mimic 및 inhibitor도 제조 가능하며 이들로 이루어진 flexible miRNA library set는 최소 48개 이상의 miRNA로 구매 가능합니다. Ready-to-transfect miRNA mimic은 transfection 후 세포에 실제 존재하는 endogenous miRNA와 같은 활성을 나타내며, miRNA inhibitor는 target miRNA의 활성을 억제하여 miRNA의 loss-of-function 연구에 사용될 수 있습니다.

○ 특징점

■ 고순도 및 고품질

Clean room에서 전자동 high-throughput 시스템에 의해 생산되고, HPLC 및 Bio-RP purification을 거친 고순도, 고품질의 miRNA입니다.

■ 합리적인 가격

고품질의 다양한 miRNA 제품을 경제적 가격으로 제공합니다.

■ 합성 및 검수

miRNA inhibitor는 target miRNA의 complementary strand로 제공되며 miRNA mimic은 double-stranded RNA로 제공됩니다.

MALDI-TOF Mass Spectrometry 질량 분석 데이터가 모든 miRNA mimic 및 inhibitor와 함께 제공되며, PAGE 분석을 통해 miRNA mimic의 RNA 두 가닥이 제대로 annealing 되었는지 확인합니다.

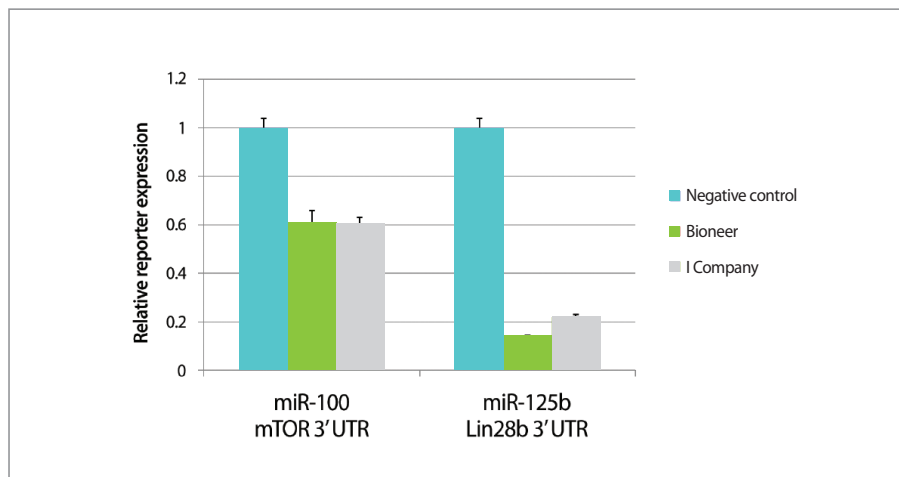


Figure 2. 바이오니아의 AccuTarget™ miRNA mimics과 타사 제품의 reporter gene expression 제어 비교 평가. HEK cells을 96 well-plate에 100 µl culture media로 배양 후, transfection 실시. 50-70% confluence한 상태에서 10 ng의 luciferase vectors (3' UTR reporter와 control luciferase)와 final concentration 100 nM의 miRNA mimic을 co-transfection 함. 24시간 후, luciferase 활성을 측정하여 translational repression을 비교함. mTOR와 Lin28b는 각각 miR-100과 miR-125b의 validated target mRNA.

AccuTarget™ miRNA mimics & inhibitors

주문 정보

AccuTarget™ Custom miRNAs

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SMM-001	AccuTarget™ Human miRNA mimic	Bio-RP	5
SMM-002			10
SMM-003			20
SMI-001	AccuTarget™ Human miRNA inhibitor		5
SMI-002			10
SMI-003			20

AccuTarget™ Library miRNAs

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SML-1001	AccuTarget™ Human miRNA mimic	Bio-RP	0.25
SML-1002			0.5
SML-1003			1
SML-1004			2
SML-2001	AccuTarget™ Human miRNA inhibitor		0.25
SML-2002			0.5
SML-2003			1
SML-2004			2

✓ 단, Flexible library 주문의 경우는 최소 48개 이상 주문 시 가능합니다

AccuTarget™ Control miRNAs (Positive / Negative)

○ 개요

miRNA positive 및 negative control은 바이오니아의 AccuTarget™ miRNA를 사용한 miRNA 기능연구실험에서 대조군으로 사용 가능합니다. AccuTarget™ miRNA Housekeeping Positive Control은 housekeeping gene인 GAPDH의 3' UTR (untranslated region)을 target으로 하며, transfection control로 사용할 수 있습니다. miRNA negative control sequence는 일반적인 miRNA의 구조를 가지며 human, mouse, rat 세포주를 이용한 실험에서 negative control로 사용될 수 있도록 각 genomic sequence 및 현재 miRBase database에 있는 miRNA sequence에 대해서 서열 유사성이 최소화되어 있음을 BLAST를 통해 확인하였습니다. 바이오니아는 두 종류의 miRNA negative control을 제공합니다.

○ 특징점

■ 우수한 성능의 제품

GAPDH를 targeting하여 90% 이상 knockdown efficiency를 나타내는 miRNA Housekeeping Positive Control 및 human, mouse, rat에 존재하는 모든 miRNA에 대해 minimum sequence identity를 갖는 miRNA Negative Control입니다.

■ 고순도 및 고품질

Clean room에서 전자동 high-throughput 시스템에 의해 생산되고, HPLC 및 Bio-RP purification을 거친 고순도, 고품질의 miRNA를 제공합니다.

■ 합리적인 가격

고품질의 다양한 miRNA 제품을 경제적 가격으로 제공합니다.

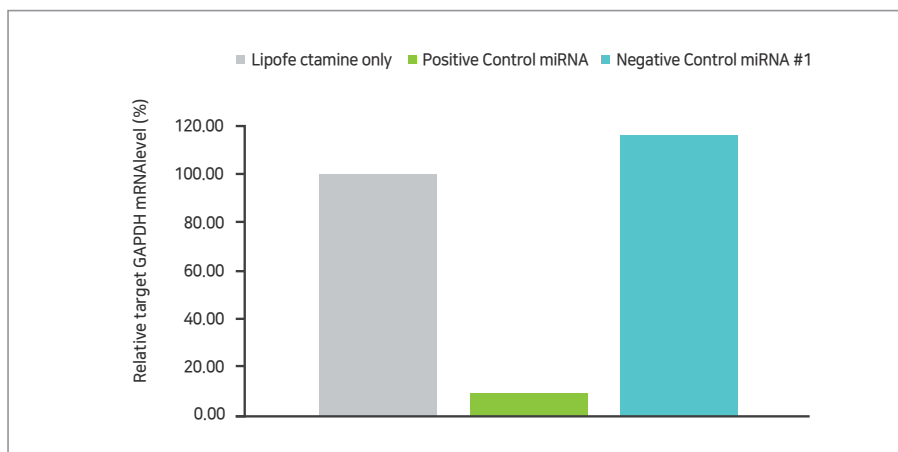


Figure 3. Performance of miRNA mimics positive and negative controls.

AccuTarget™ miRNA mimic Positive & Negative Controls were transfected at 20 nM using Lipofectamine™ RNAiMAX into HeLa cell lines and assessed for their ability to decrease target mRNA levels. Down-regulation of GAPDH was determined using the Real-Time quantitative RT-PCR at 48 hr post-transfection using Bioneer's Exicycler™ 96 qPCR instrument.

AccuTarget™ Control miRNAs (Positive / Negative)

○ 주문 정보

카탈로그 번호	제품명	정제 방법	보장량 (nmole)
SMC-1001	AccuTarget™ miRNA Housekeeping Positive Control (GAPDH)	Bio-RP	5
SMC-1002			10
SMC-1003			20
SMC-2001	AccuTarget™ miRNA mimic Negative Control #1		5
SMC-2002			10
SMC-2003			20
SMC-3001	AccuTarget™ miRNA mimic Negative Control #2		5
SMC-3002			10
SMC-3003			20
SMC-4001	AccuTarget™ Fluorescein-labeled miRNA mimic Negative Control siRNA #1	HPLC	5
SMC-4002			10
SMC-4003			20
SMC-5001	AccuTarget™ Fluorescein-labeled miRNA mimic Negative Control siRNA #2		5
SMC-5002			10
SMC-5003			20
SMC-2101	AccuTarget™ miRNA inhibitor Negative Control #1	Bio-RP	5
SMC-2102			10
SMC-2103			20
SMC-3101	AccuTarget™ miRNA inhibitor Negative Control #2		5
SMC-3102			10
SMC-3103			20
SMC-4101	AccuTarget™ Fluorescein-labeled miRNA inhibitor Negative Control siRNA #1	HPLC	5
SMC-4102			10
SMC-4103			20
SMC-5101	AccuTarget™ Fluorescein-labeled miRNA inhibitor Negative Control siRNA #2		5
SMC-5102			10
SMC-5103			20

1. miRNA와 siRNA 실험 시 주의해야 할 사항이 있나요?

기본적으로 siRNA와 miRNA는 20-23 mer의 RNA duplex로 구성되어 있습니다. 따라서, 대부분의 miRNA 실험은 siRNA 실험과 동일한 방식으로 진행이 됩니다. 그 외 miRNA에만 적용할 수 있는 사안에 대해서는 아래를 참조하시기 바랍니다.

2. miRNA 서열 정보는 어디서 확인하나요?

miRBase (www.mirbase.org) 22 Version에서 확인 가능합니다. 다만, 새로운 miRNA들이 계속 update되고 있기 때문에, 새로 발굴되는 miRNA의 경우 custom siRNA를 통해 주문하시기 바랍니다.

3. 동일한 miRNA를 사용하는데, 실험에 사용하는 세포가 달라지면 결과도 달라지나요?

문헌에 따라 다소 상이한 내용이 보고되어 있습니다. miRNA의 기능이 cell context에 따라 다르다는 보고와, 반대로 세포의 종류와 상관없이 동일하다는 보고가 있습니다. 보다 자세한 내용은 관련 문헌 내용을 참조하시기 바랍니다(Reference: 1-4).

4. miRNA가 제대로 작동하는지는 어떻게 확인하나요?

miRNA는 타겟이 되는 mRNA의 단백질 발현을 저해합니다. 따라서, miRNA의 알려진 타겟 mRNA에 대하여 Western으로 확인하거나, 타겟 mRNA의 3'UTR의 miRNA binding site가 포함된 luciferase vector를 이용하여 luciferase assay를 진행합니다. Western 또는 luciferase assay protocol은 적절한 문헌을 참조하시기 바랍니다(Reference: 5). miRNA는 몇몇 mRNA의 분해를 유발하는 것으로도 알려져 있기 때문에, mRNA에 따라서는 qPCR로 효과를 측정하기도 합니다.

5. miRNA에 형광 label을 달아 transfection 효율을 알아볼 수 있나요?

miRNA도 siRNA와 마찬가지로 형광 라벨링을 통해 transfection 효율을 체크해 볼 수 있습니다. 형광 label된 miRNA를 원하실 경우 custom siRNA로 주문하실 수 있습니다. 주문 시에 miRNA의 활성을 가지는 strand에 형광을 라벨링 할 경우 miRNA의 기능이 상실될 수 있으므로 가능하면 반대 strand에 형광을 라벨링 하는 것이 좋습니다.

6. AccuTarget™ Human miRNA는 합성하는 miRNA와 무슨 차이가 있나요?

AccuTarget™ Human miRNA는 miRBase 서열 정보를 기반으로 화학적으로 합성된 mature miRNA로서 고순도로 정제되어 상시 재고를 가지고 판매되고 있습니다. 개별적으로 miRNA를 주문 제작하시길 바라는 경우에는 custom RNA 합성 서비스를 통하여 가능합니다.

7. Negative control은 무엇으로 사용해야 하나요?

miRNA negative control (Cat.No. SN-1001-CFG, Bioneer)을 사용하면 됩니다.

8. miRNA mimic와 inhibitor의 차이점은 무엇인가요?

miRNA mimic는 mature miRNA를 화학적으로 합성한 것으로 생체 내의 miRNA와 같은 역할을 하도록 제조된 RNA double strand oligonucleotide입니다. miRNA inhibitor는 miRNA의 활성을 저해하는 역할을 하기 위해 miRNA에 강하게 hybrid를 형성하는 상보적인 합성 올리고입니다.

Reference

1. Erhard F, et al. (2014) Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation. *Genome research* 24(6):906-919.
2. Carroll AP, Tooney PA, & Cairns MJ (2013) Context-specific microRNA function in developmental complexity. *Journal of Molecular Cell Biology* 5(2):73-84.
3. Gao F-B (2010) Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Development* 5(1):25.
4. Huang Y, et al. (2011) Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry* 67(1):129-139.
5. Jin Y, Chen Z, Liu X, & Zhou X (2013) Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 936:117-127.

03. *In vivo* siRNA Custom Service: SAMiRNA™

<i>In vivo</i> siRNA Custom Service Using SAMiRNA™ Technology	63
SAMiRNA™ Technical Spec	65

In vivo siRNA Custom Service Using SAMiRNA™ Technology

개요

바이오니아의 *in vivo* siRNA Custom Service는 동물모델에서 RNAi 기작을 활용한 신규 target 발굴, 유전자의 기능 연구 및 *in vivo* 효능 확인에 필요한 해결책을 제공합니다.

○ 제품 개요

바이오니아의 풍부한 전임상 연구 경험과 20여 년간 전 세계에 최고 품질의 올리고와 siRNA를 공급해 온 핵심 제조 및 연구개발 노하우가 결합된 SAMiRNA™ Custom Services는 독창적인 구조의 나노입자 기반 전자전달기술을 바탕으로 siRNA 연구 전반에 걸친 실험 서비스를 제공합니다.

SAMiRNA™는 특허 출원된 독창적인 구조의 자가조립 siRNA 나노입자로, 외부의 polymer 층에 의해 내부 siRNA가 보호되는 형태입니다. SAMiRNA™는 EPR (Enhanced Permeability and Retention) 효과에 최적화된 나노입자 크기로, 표면에 부착된 targeting 물질에 의해 종양조직이나 목표 장기로 선택적으로 전달됩니다.

바이오니아는 세계적인 제약회사들과 신약개발을 위한 SAMiRNA™ 자체 개발 연구를 지속적으로 수행해 왔습니다. 차세대 RNAi 신약 기술인 SAMiRNA™는 전세계 RNAi 연구 개발자들에게 축적된 기술과 정보를 제공하고, 합리적인 가격으로 *in vivo* siRNA 연구를 수행할 수 있는 새로운 기회를 제공합니다.

SAMiRNA™ (Self-Assembled-Micelle-inhibitory-RNA)

SAMiRNA™는 바이오니아가 개발한 혁신적인 신기술로 기존의 siRNA 치료제 기술의 문제점들을 극복하여 siRNA를 생체 내 질병 표적장기 세포까지 효율적이고 안정적으로 전달할 수 있는 나노입자형 RNAi 신약물질입니다. SAMiRNA™는 세계 유일의 siRNA prodrug으로, 단일 분자구조로서 스스로 나노입자를 형성하여 주사제로 사용되었을 때 혈액 내에서 안정적인 나노입자 구조를 유지합니다. 또한, 암 및 질병조직에만 선택적으로 전달된 후, 세포 내에서 활성화된 siRNA로 전환되어 암 유발 RNA를 분해시키는 획기적인 RNAi 물질입니다.

현재 임상테스트에 사용 중인 대부분의 siRNA 치료제 기술은 siRNA 제조 후, 제조된 siRNA를 생체 조직 내로 전달해 주는 전달체(delivery vehicle)인 리포좀(liposome)과 섞어 주는(formulation 혹은 encapsulation) 과정이 있습니다. 이 때 siRNA가 리포좀 안으로 들어가는 효율/loading efficiency)이 떨어지고, 낮은 loading efficiency로 인해 대량 생산 시 이를 분리, 정제하는 복잡한 QC 과정이 진행됩니다. 또한 리포좀의 구성성분으로 사용되는 지질(lipid) 자체의 독성이 보고되고 있습니다. SAMiRNA™는 전자동합성라인에서 단일분자(single chemical entity)로 만들어지며 formulation을 거치지 않고 수용액 안에서 자가 조립되어 안정적인 나노입자의 형태로 만들어지기 때문에, formulation을 기반으로 하는 리포좀 siRNA 신약기술의 문제점을 해결할 수 있습니다. 비임상 동물테스트를 통해 항암효과가 입증되었으며 일반 siRNA에 비해 혈액 내 안정성이 뛰어나고, 기존에 알려진 siRNA 전달체와 비교하여 독성이 매우 적어 신약후보물질로서 뛰어난 장점을 가지고 있습니다.

* NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

These products are for research purpose only. They are not for diagnostic or therapeutic purpose and are not to be administered to humans.

Use of SAMiRNA™ is covered by U.S. patents Nos. 8,779,114, 8,771,976, and their foreign counterparts or pending patents. The purchase of these products includes a limited, non-transferable immunity from suit under the forgoing patents for using only this amount of product solely for the purchaser's own internal research. No other patent rights to use this product for any other purpose or for commercial purpose, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, are conveyed expressly, by implication, or by estoppels. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting Bioneer at licensing@bioneer.com

SAMiRNA™ is a trademark of Bioneer Corporation.

○ 상세 설명

■ Custom designed siRNA synthesis

Custom siRNA는 고객이 제공하는 siRNA sequence를 합성해 드리는 서비스입니다. Free-design 서비스는 바이오니아에서 siRNA를 합성 시에만 제공되는 서비스입니다. 원하시는 siRNA sequence에 다양한 modification도 가능합니다. 30 mer 이하의 siRNA에 최대 32 개의 서로 다른 3' overhang 및 다양한 옵션을 선택하여 수많은 형태의 siRNA/SAMiRNA™를 이용하실 수 있습니다.

■ Genome-wide predesigned mouse, rat and human siRNA

바이오니아의 siRNA는 고효율이 검증된 Turbo si-Designer를 이용하여 설계됩니다. 또한 siRNA의 안정성을 극대화하기 위해 모든 siRNA는 clean room에서 제조됩니다.

Human, mouse 및 rat에서 44,000개 이상의 target 유전자에 대한 132,000개의 predesigned siRNA가 항상 준비되기 때문에 Search and Order 페이지를 이용하여 빠르고 쉽게 siRNA를 주문하실 수 있습니다. 또한 siRNA knockdown 실험에 꼭 필요한 검증된 real-time PCR primer가 모든 유전자 별로 준비되어 있습니다. 연구자 분들의 RNAi 실험에 필요한 모든 제품들을 바이오니아에서 one-stop shopping으로 주문할 수 있습니다.

■ SAMiRNA™ nanoparticle synthesis for *in vivo* siRNA delivery and efficacy/biodistribution tests using animal models

바이오니아에서 제공하는 SAMiRNA™를 이용하여 다양한 고품질 동물 모델에 주사제로 투여하여 target 유전자에 대한 최적화된 효능 연구를 수행할 수 있습니다.

■ *In vitro* screen/validation of siRNAs of choice lead optimization service

최적의 target 유전자 저해 효과를 검증하기 위해 *in vitro* siRNA/SAMiRNA screening 및 validation 서비스를 제공해 드립니다. 세포주 대상 100개의 siRNA에 대하여, 각각 MIQE 가이드라인에 준한 저해 효능 검증을 수행하여 신속하게 결과를 제공해 드리며, 최적의 siRNA 효능을 갖는 SAMiRNA™로 합성하여 *in vitro*에서 재확인한 후 배송해 드립니다.

In vivo siRNA Custom Service Using SAMiRNA™ Technology

■ Quantitation of functional knockdown of target gene by Real-Time qPCR (AccuPower® qPCR Array Service)

바이오니아는 20년간의 분자진단연구 경험을 바탕으로 새로운 qPCR Array System을 출시하였습니다. qPCR Array System은 유전자 발현 분석에 있어 가장 민감하고 신뢰성 있는 방법인 real-time PCR과 여러 유전자의 발현 양상을 한번에 profiling 할 수 있는 microarray 분석 기법을 조합한 것으로, 적은 비용으로 정확한 결과를 얻을 수 있는 획기적인 분석 방법입니다.

qPCR Array System은 다양한 pathway와 질병에 관련된 유전자들을 한 번에 screening 가능하도록 panel 형태로 제작되어 여러 유전자들의 발현 양상을 한 눈에 볼 수 있습니다.

또한 qPCR 실험 수행 시 관련된 모든 과정은 논문 게재를 위한 qPCR 실험 지침서인 MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) 가이드라인을 따르고 있으며, 숙련된 전문가들에 의해 이루어지기 때문에 정확하고 신뢰성 있는 결과를 신속하게 얻을 수 있습니다.

○ 주문 정보

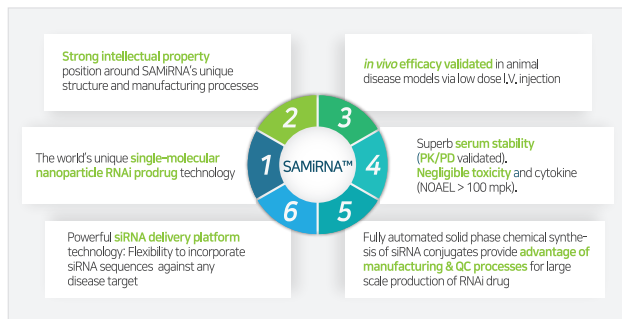
바이오니아의 SAMiRNA™ Custom Service는 다양한 서비스 패키지를 매우 경제적인 가격으로 제공합니다. 수행하고자 하는 프로젝트의 세부사항을 이메일(siRNA@bioneer.co.kr)을 통해 보내주시면 정확한 견적 및 예상 소요기간을 알려드립니다.

*SAMiRNA™는 주사액에 다시 녹여 즉시 동물에 투여 가능한 동결건조 형태로 제공해 드립니다. 입자크기 및 물질 정보에 대한 QC 데이터를 함께 제공해 드립니다.

SAMiRNA™	Order scale of SAMiRNA™ (nmole)	Number of mice (intravenous injections)
Custom Designed SAMiRNA™	100	5 mg/kg → 5 mice 1 mg/kg → 25 mice
	500	5 mg/kg → 25 mice 1 mg/kg → 125 mice
	1,000	5 mg/kg → 50 mice 1 mg/kg → 250 mice
Control SAMiRNA™	100	5 mg/kg → 5 mice 1 mg/kg → 25 mice
	500	5 mg/kg → 25 mice 1 mg/kg → 125 mice
	1,000	5 mg/kg → 50 mice 1 mg/kg → 250 mice
Fluorescence conjugated SAMiRNA™ (FITC, Cyanine 5.5 etc)	100	5 mg/kg → 5 mice 1 mg/kg → 25 mice
	500	5 mg/kg → 25 mice 1 mg/kg → 125 mice
	1,000	5 mg/kg → 50 mice 1 mg/kg → 250 mice

○ 개요

SAMiRNA™는 효율은 극대화하고 부작용은 최소화한 차세대 RNAi 플랫폼 기술입니다. 이를 이용하여 기존에 약이 존재하지 않았던 난치성 질병에 대한 siRNA 치료제 개발이 가능합니다.



■ RNAi 기반 신약 개발의 모든 핵심 과제들을 해결

기존 siRNA 기술의 주요 문제점	SAMiRNA™ 전구약물 기술
생체 내 불안정	탁월한 생체 내 안정성
독성 유발	독성이나 부작용 없음
표적 세포 내 전달 효율 낮음	생체 내 질병 표적장기/암 세포로 효율적인 전달
낮은 유전자 저해 효율	동물모델에서 낮은 투여량으로도 지속적 약효

■ 신개념 고효율 RNAi 신약기술

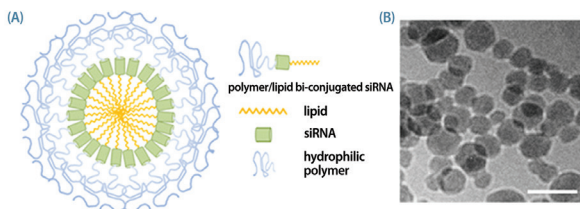


Figure 1. SAMiRNA™ 나노입자 구조 및 형상

(A) SAMiRNA™의 도식화.

(B) SAMiRNA™의 동결전자현미경(Cryo-TEM) 사진 (scale bar = 100 nm).

○ Pre-clinical Data for SAMiRNA™

1. 동물 모델에서의 SAMiRNA™ 항암 효과

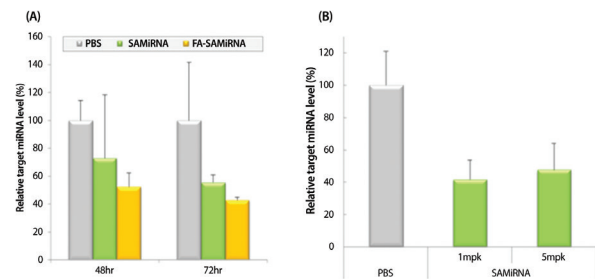


Figure 2. SAMiRNA™ 나노입자의 타겟 mRNA *in vivo* 발현 저해 효과.

(A) 종양이 이식된 mouse 모델에 미정맥으로 PBS와 SAMiRNA™, 종양표적물질인 엽산(FA, folic acid)이 결합된 SAMiRNA™ 나노입자를 5 mg/kg으로 단회 투여한 뒤, 표시된 시간이 경과하였을 때 종양조직을 채취하여 조직 안의 목표 유전자인 survivin의 mRNA 양을 Real-Time qPCR로 측정함.

(B) 종양이 이식된 mouse 모델에 미정맥으로 PBS와 SAMiRNA™를 1 또는 5 mg/kg으로 단회 투여한 뒤, 70시간이 경과하였을 때 종양조직을 채취하여 조직 안의 목표 유전자인 survivin의 mRNA의 양을 Real-Time PCR로 측정함.

2. 암세포 특이적 전달 특성

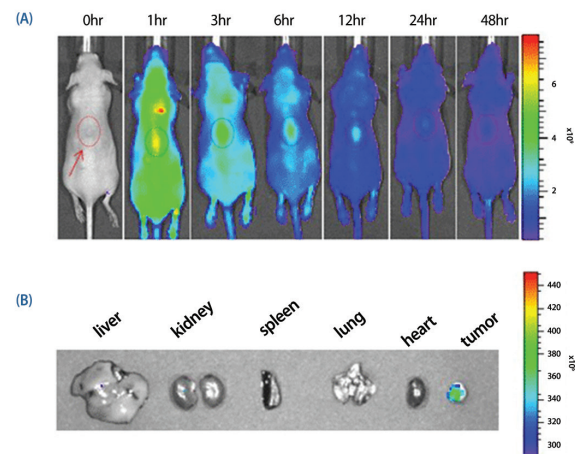


Figure 3. *In vivo* targeting of SAMiRNA™ Nanoparticles to s.c. grafted tumor.

(A) 형광(Cyanine 5.5) 표지된 SAMiRNA™ 나노입자의 *in vivo* 종양 전달 특이성 확인. 종양이 이식된 마우스 모델에 미정맥으로 투여함.

(B) 48시간 경과시점에서 채취된 장기에서 측정된 SAMiRNA™의 형광이미지. 종양조직을 제외한 타 장기에서는 형광이 측정되지 않음.

3. 탁월한 생체 내 안정성

SAMiRNA™의 미정맥 투여(Intravenous injection)후, 혈청안정성 및 약동력학 (PK) 확인.

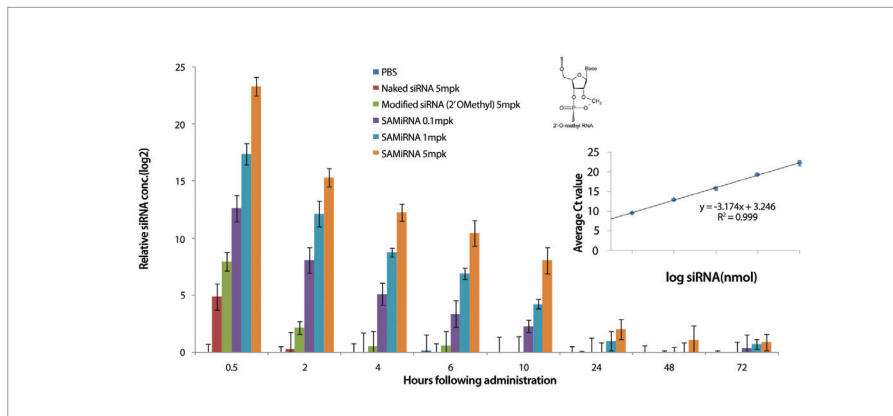


Figure 4. SAMiRNA™ i.v injection 후 mouse에서 혈청을 채취하여 HIT qRT-PCR 방법을 이용하여 siRNA 검출. siRNA PK/PD 확인을 위하여 SAM-siRNA를 ICR mouse에 미정맥 투여 후, 0.5, 2, 4, 6, 10, 24, 48, 72 시간에 혈액을 추출하여 plasma에서 SAMiRNA™와 siRNA detection을 진행. 투여량과 투여 후 경과시간에 의존적으로 SAMiRNA™와 siRNA 양이 감소하고, SAMiRNA™의 경우 72 시간까지 detection됨을 확인.

4. 부작용이 없는 뛰어난 안전성

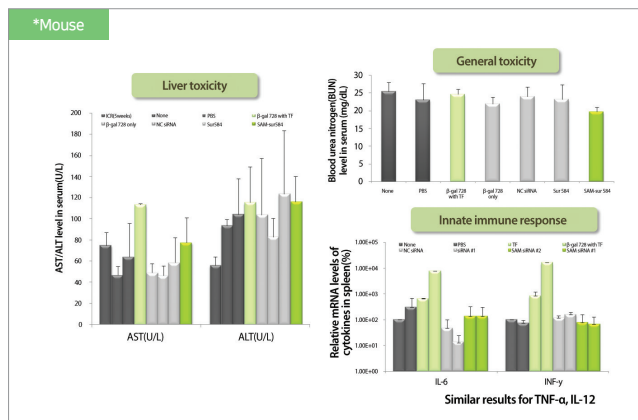


Figure 5. SAMiRNA™ 투여에 따른 간독성, 일반독성, cytokine 측정 결과.

생후 5주 된 ICR 생쥐에 None (not-injected), PBS, TF (QBiogene 사의 *in vivo* MegaFectine), β -gal 728 with TF, NC siRNA (negative control siRNA), Sur584 (survivin siRNA), SAM-siCON (negative control siRNA-containing SAMiRNA™), SAM-sur584 (survivin siRNA-containing SAMiRNA™)의 각 물질을 5 mg/kg의 농도로 투여한 뒤 6시간 후에 비장을 채취하여 균질화 한 후, mRNA를 추출하여 cytokine mRNA level을 qPCR분석함.

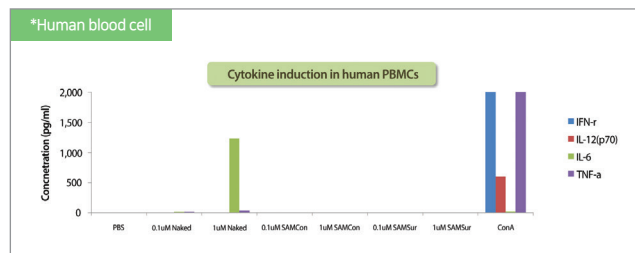


Figure 6. Human 혈액세포에서 SAMiRNA™ 투여에 의한 innate immune response 유발 확인.

Human blood sample을 채혈하여 PBMC세포를 분획한 뒤 culture dish에 분주함. 각 군의 SAMiRNA™ sample을 각 well 에 분주하고 나서 37℃에서 24시간 반응시킨 뒤 상층액을 모아서 공인인증기관에서 cytokine induction 유무를 ELISA를 통해 측정.

*28일간 반복투여 후, SAMiRNA-Survivin의 독성 확인

1) 일반독성시험

(a) 단회 정맥투여 독성시험

- SAMiRNA™를 암수 마우스(ICR)에 단회 정맥투여 후 발현되는 급성독성을 조사하기 위해 실시.

군당 암수 각각 5마리씩을 이용하여 시험물질을 0 (부형제대조군) 및 100 mg/kg의 용량으로 1 회 정맥투여 한 후 15 일간 사망률, 일반증상, 체중측정 및 부검소견관찰을 실시.

- (1) 시험기간 중 사망동물은 발생하지 않았음.
- (2) 일반증상관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 증상은 관찰되지 않았음.
- (3) 체중측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (4) 부검 결과, 시험 물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았음.

(b) 4주 반복 정맥투여 독성시험

- SAMiRNA™를 암수 마우스(ICR)에 4주간 매일 1회 반복하여 정맥으로 투여하였을 때 발현되는 독성을 조사하기 위해 실시.

군당 암수 각각 10 마리씩을 이용하여 시험물질을 0 (부형제대조군), 25, 50 및 100 mg/kg의 용량으로 4주간 투여한 후 사망률 및 일반증상을 관찰하였고, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사, 부검소견관찰, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시.

- (1) 시험기간 중 시험물질 투여와 관련된 사망동물은 발생하지 않았음.
- (2) 일반증상 관찰결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 증상은 관찰되지 않았음.
- (3) 체중측정 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (4) 사료섭취량 측정 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (5) 안검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (6) 혈액학적 검사 결과, 암컷 100 mg/kg/day 투여군에서 혈소판 수치가 감소하였음.
- (7) 혈액생화학적 검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (8) 뇨검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (9) 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았음.

- SAMiRNA™를 4주간 정맥 투여하였을 때 무해용량(NOEL: No Observed Adverse Effect Level)은 암수 모두 100 mg/kg/day 로 확인.

2) 유전독성시험

(a) 복귀돌연변이 시험(Ames test)

- SAMiRNA™는 5,000 µg/plate 농도에 이르기까지 *Salmonella typhimurium* 4종 및 *Escherichia coli* 1종 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않았음.

(b) 체외 염색체이상시험(Chromosome aberration assay)

- SAMiRNA™는 대사활성계 적용 여부에 관계없이 CHL 세포 (Chinese Hamster Lung cell)에 염색체 이상을 유발하지 않았음.

5. 안정성 평가

SAMiRNA™는 일반독성시험(단회, 4주반복 정맥투여 독성시험) 및 유전독성시험(복귀돌연변이, 체외 염색체이상시험)을 통해서 신약후보 물질로서 우수한 안전성이 입증됨.

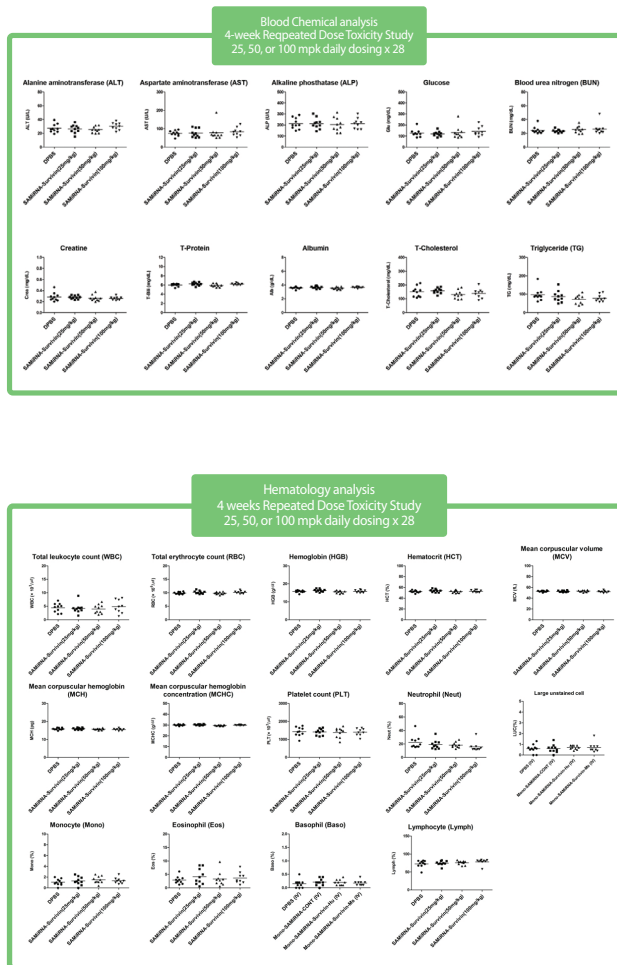


Figure 7. 공인인증기관 분석을 통한 SAMiRNA™ 독성 Profile.

SAMiRNA™를 생후 6주된 마우스 (ICR)에 3일간 매일 1회 반복하여 정맥으로 투여하였을 때 발현되는 독성을 조사하기 위해 실시.

SAMiRNA™는 10 mg/kg의 농도로 투여하였으며 마지막 투여 24시간 후에 채혈을 통해 전혈(whole blood) 및 혈청(serum)을 얻어 혈액생화학적 검사(Blood chemical analysis) 및 혈액학적 검사(Hematological analysis)를 수행하였음.

- (1) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (2) 혈액학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.