

血清、血漿などの体液中の microRNA プロファイリングガイド

～ miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR System 使用に関するガイドライン ～



TaKaRa

EXIQON
Seek Find Verify

Table of Contents

はじめに	3
血清、血漿などの体液を用いた miRNA プロファイリングでの問題	3
血清か血漿のどちらを選択するか?	3
サンプルの適切な採取と調製	4
最適な RNA 抽出	4
RNA の品質管理の実施	6
QC チェック1: プロファイリングに対する RNA の適格性確認	7
QC チェック2: 細胞由来の miRNA 混入に対するプロファイリング後の解析	8
cDNA 合成	8
リアルタイム PCR 増幅	8
ノーマライゼーション	10



はじめに

血清、血漿などの体液中の microRNA (miRNA) は、様々な疾患や生物学的プロセスの低侵襲な診断に使用できるバイオマーカーとして大きく期待されています。これらの短鎖 RNA は生体内で様々な役割を有し、血清、血漿、尿などの体液サンプル中で比較的安定に存在します。しかし、体液サンプル中の miRNA プロファイリングには課題もあり、頑健なバイオマーカーの開発には高感度で正確な miRNA 検出法だけでなく、最適かつ標準化されたサンプルの取扱いおよび調製の手順ならびに信頼性の高いサンプルおよびデータの品質管理 (QC) 法が必要とされます。

Exiqon 社は、体液中の miRNA の検出について感度、特異性に優れた各種製品を提供しています。Exiqon 社で厳しくバリデートされた LNA™ qPCR アッセイを用いることで、感度、特異性ともに最高レベルの miRNA プロファイリングを行うことができます。体液サンプルは、RNA 含量が低い一方で阻害物質の濃度が高く、多くの分析前の要素の影響を受けやすいため、扱いが困難です。この問題に対処するため、Exiqon 社は広範な QC 手法を組み合わせた信頼性の高いアッセイを開発しました。Exiqon 社がここで推奨する事項は、長年にわたる体液サンプルを用いた miRNA プロファイリングならびにバイオマーカー開発およびバリデーション業務で得た経験に基づいています。本紙は、血清や血漿を試料とした miRNA プロファイリング実験の準備に焦点を当てていますが、他の体液サンプルを用いた miRNA 実験にも有用な情報を含んでいます。また、miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR システムを用いた miRNA の定量を成功に導く重要な情報やアドバイスを提供しています。

血清、血漿などの体液を用いた miRNA プロファイリングでの問題

体液サンプルを用いた miRNA プロファイリングは大きく期待されていますが、このような実験を成功させるために克服すべき問題がいくつかあります。本ガイドラインは血清と血漿についてのみ記載していますが、多くは他の体液サンプルに対しても有効です。

第 1 に、血清、血漿などの体液の RNA 含量は極めて低く、このようなタイプのサンプルに対しては、Bioanalyzer や吸光度 (OD) 測定を用いた通常の RNA 品質管理は適していません。第 2 に、体液サンプル中に検出される miRNA は細胞外由来または細胞由来の可能性がありますが、バイオマーカーの開発という観点では細胞外由来の miRNA が興味深い対象となります。そのため血清および血漿サンプルへの細胞の混入および溶血 (赤血球の溶解) を回避することが克服すべき重要な課題となります。

第 3 に、体液には qPCR 反応に用いられる逆転写酵素やポリメラーゼの阻害物質が含まれています。qPCR に対する阻害物質を RNA サンプルに極力持ちこまないようにすること、およびサンプルの品質を確認することが、考慮すべき重要な課題となります。

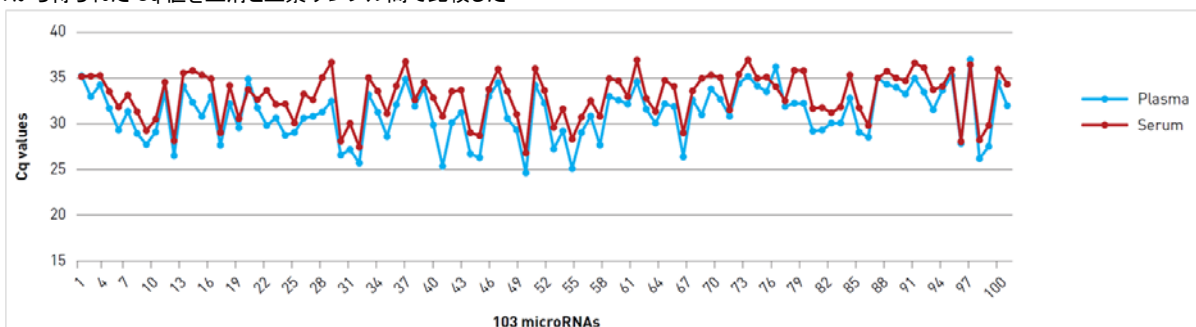
最後に、体液サンプルから得た qPCR データを標準化することも課題となり得ます。コントロール RNA として頻繁に用いられる比較的大きい small RNA (U6 RNA など) のいくつかは血清、血漿などの体液

中に極めて低濃度でしか存在していないため、標準化に用いるコントロールを選択する際には注意が必要です。尿や脳脊髄液 (CSF) といった体液を取り扱う際には、miRNA 含量がサンプル間で大きくばらつくという別の問題が生じます。患者または薬剤や毒素の曝露を受けた個人から得たサンプルでは臓器特異的な miRNA 含量が顕著に上昇している可能性があり、それに比べて健常人の尿や CSF 中の miRNA 量は極めて少ないという問題があります。本紙では、このような問題を克服するための方法についてご紹介します。

血清か血漿のどちらを選択するか？

miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR システムを使用すると、血清および血漿のいずれから調製した RNA も正確にプロファイリングすることができます。どちらのサンプルもバイオマーカー開発に用いられた実績があります。一般に、血漿サンプルの Cq 値の方がわずかに低いことが認められており、これはサンプル中の血小板の混入が原因であると考えられています。一方、血清サンプルでは凝固時間や温度が結果に影響する場合があります。正常な血清と血漿を比較すると、適切に採取された血清から得たデータと対応する血漿から得たデータの差異は小さいことが示されています。図 1 に血清と血漿サンプルの比較を示します。

図 1. 血清と血漿から得た miRNA プロファイルは極めて類似している 血清と血漿サンプルで最も一般的に発現している miRNA のうち 103 の miRNA から得られた Cq 値を血清と血漿サンプル間で比較した



サンプルの適切な採取と調製

血清および血漿調製の第1ステップは、全血採取です。血清および血漿中に存在する miRNA を正確に分析するには、全血の採取時および採取後に RNA 発現プロファイルを損なわないようにすることが重要です。この段階で手技的な誤差を持ち込まないように、十分に記載された標準化済みの手順を用いて採取してください。またサンプルは同じ条件下で、可能な限り同時に採取するようにします。新たにサンプルを採取する際には、全血を速やかに処理して血清または血漿にすることを推奨します。サンプル採取ならびに血清および血漿の調製については、国立がん研究所 (NCI) 早期発見研究ネットワーク (Early Detection Research Network, EDRN) の標準操作手順書を参照されることを推奨します。保管済みのサンプルから最適な結果を得るためには、同じプロトコールに従って採取し処理したサンプルのみを選択するように注意を払ってください。

サンプル採取および取扱いを統一し標準化することが不可欠です

全血から血清および血漿への処理ステップでは、いずれも、細胞溶解を防ぐ対策を取る必要があります。これは、他の体液サンプルの場合でも重要です。これに失敗すると、細胞由来の RNA がサンプルに混入する可能性が生じます。細胞からの RNA が混入した場合、miRNA 発現プロファイルでのわずかな変化が打ち消されること、またはその検出が妨げられることが予想されます。血漿の調製の際には、通常は EDTA やクエン酸などの抗凝固剤が用いられます。これらの抗凝固剤はいずれも使用可能ですが、ヘパリンは cDNA 合成および PCR などの下流の酵素反応を阻害することが知られています (図 2)。現在のところ、RNA サンプルまたは元の血漿サンプルからヘパリンを確実に除去できる方法は確立されていないため、全血の処理時にはヘパリンを使用しないでください。

RNA の取扱いおよび保管に関する一般的なガイドライン

RNase の混入および RNA の分解を防止するために次のことに注意してください。

- ・ 常に使い捨て手袋を着用し、ヌクレアーゼフリーの環境で作業すること
- ・ ヌクレアーゼフリーで核酸が結合しにくいプラスチック製容器およびフィルター付きピペットチップを用いること
- ・ 出来るだけチューブのキャップを閉めておき、チューブのキャップを開ける前には必ずスピンドウン (短時間の遠心) をすること
- ・ 長期間保管の際は、RNA を -80°C で保管すること
- ・ 凍結融解の繰返しを避けること

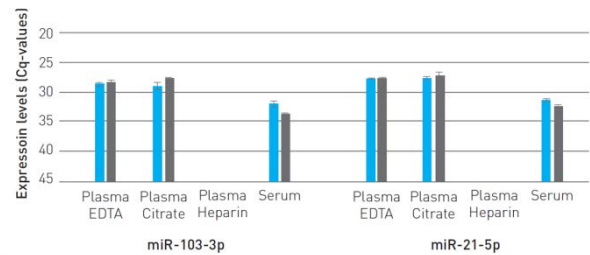


図 2. miRNA PCR 解析のための各種血液サンプル調製法の適合性 EDTA 血漿、クエン酸血漿、ヘパリン血漿および血清からそれぞれ total RNA を調製し、triplicate で RT 反応を行った。リアルタイム PCR で miR-103-3p および miR-21-5p の定量解析を行い、各サンプルの平均 Cq 値を示した。ヘパリン添加を除く全てのサンプルで良好な増幅が確認された。

血清、血漿などの体液サンプルは、調製後は RNase-free のチューブ (cryo-tube など) に入れて -80°C で保管します。また、ただちに RNA 抽出を行う選択肢もあります。

最適な RNA 抽出

RNA 取扱いの際には、RNase が試薬に混入しないよう、かつ RNA サンプルが分解しないよう、特別な注意が必要です。以下に、最適な PCR 実験を行うための一般的なガイドラインを示します。

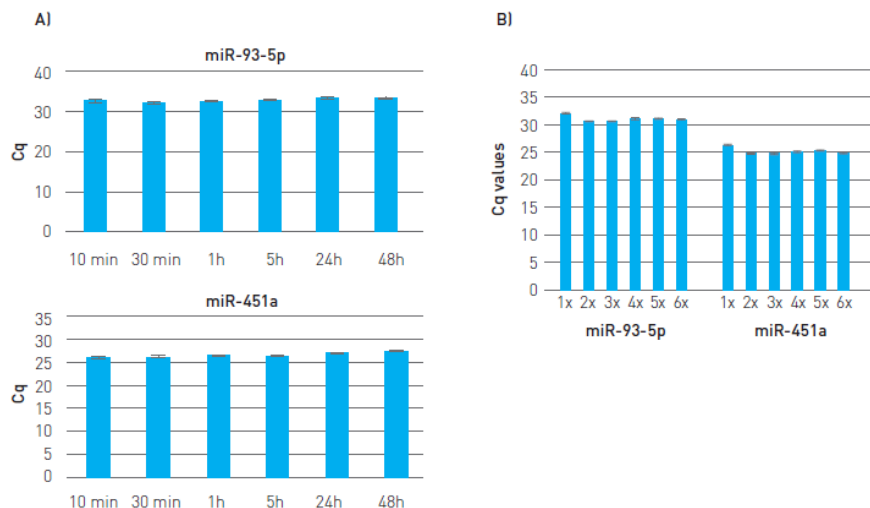


図 3. EDTA 血漿サンプル中での miRNA の高い安定性 A) EDTA 血漿から精製した total RNA を用いて triplicate で RT 反応を行い、リアルタイム PCR で miRNA の定量解析を行った。血漿は RNA 抽出前に図に表示の時間だけ室温で保存した。血漿を室温で最長 48 時間にわたって保存しても、miRNA 分解は認められなかった。B) EDTA 血漿から精製した total RNA を用いて triplicate で RT 反応を行い、リアルタイム PCR で miRNA の定量解析を行った。血漿を表示のように凍結融解サイクルを 1~6 回繰り返したが、miRNA 増幅に影響は認められなかったことから、血漿中の miRNA は複数回の凍結融解に対して安定であることが確認された。

前述のように、体液サンプルの RNA 含量は非常に微量であり、抽出中に RNA がかなりの割合で失われる可能性があります。このため、抽出操作の際にはキャリア RNA を添加し、その後の操作では、OD 測定結果に基づく RNA 濃度ではなく、初発の RNA 容量に基づく RNA 量を用いて操作することを推奨します。キャリア RNA を使用すると、血清および血漿サンプルから RNA を安定的に高い収率で確

実に得られるようになります(図 4)。キャリア RNA は、miRNA を含んでいないことが保証されているものを選択することが重要です。Exiqon 社では、バクテリオファージ MS2 からの RNA (Roche Applied Science から入手可能、カタログ番号 10165948001) を使用しています。

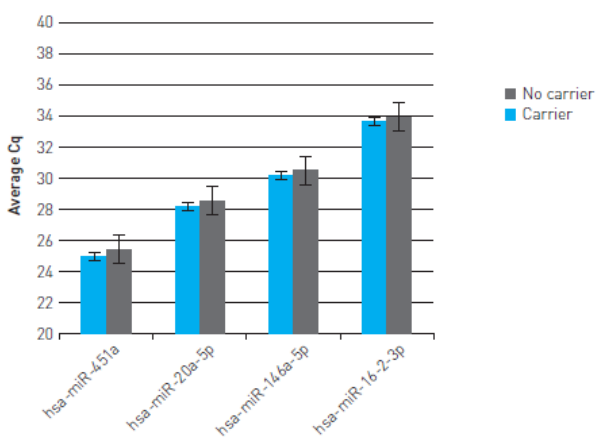


図 4. キャリア RNA は血清や血漿からの RNA の収率を向上させる RNA 抽出作業時にキャリア RNA を加えることで、抽出操作の再現性が向上し、より安定した収率で RNA が得られるようになる。

体液サンプルは RNA 量が少ないことに加えて、逆転写や PCR 反応の効率に影響を及ぼす可能性のある酵素阻害物質を高濃度で含む傾向があります。したがって、RNA 収率を最大限とする一方で、このような阻害物質の持ち込みを最小限にする精製法を選択することが重要です。

体液サンプルには最適化された RNA 抽出方法が必要です

Exiqon 社は、血清、血漿などの体液からの small RNA (<1000 bp) 抽出に最適なキットを提供しています: miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids (製品コード 300112, 300113)。推奨するサンプル量はサンプルのタイプおよび由来により異なります(詳細については表 1 を参照)。

表1. 各生物種、サンプルでの推奨サンプル量

	血清 / 血漿	尿	CSF	その他の生体液*
ヒトサンプル	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
マウス、ラットサンプル	50 μ L**	200 μ L	Not tested	50 μ L**
RT反応へのRNA溶出液添加量***	4 μ L	4 μ L	8 μ L	4 μ L

*) qPCR 解析を行うためには、PCR 阻害物質を少なくするためにサンプル量を調整する必要があります

***) 全量が 200 μ L となるように RNase-free water を添加

***) Universal cDNA Synthesis Kitの20 μ L RT反応液への添加量

RNA の品質管理の実施

RNA 収量および品質を測定する一般的な方法は、体液サンプルには適していません。これらのサンプルではキャリア RNA が存在しているため、低濃度の内在性 RNA を OD260 で測定することができません。抽出の際にキャリアを添加しなかった場合でも、溶出液中の RNA 濃度が極めて低いため NanoDrop や他の分光光度計で信頼性の高い OD260 測定値を得ることは困難です。そのため、別の方法で収量をモニタリングし、使用する RNA 量を標準化する必要があります。Exiqon 社では、RNA 濃度ではなく、初発のサンプル容量に基づく標準化を推奨します (cDNA 合成についての章を参照)。

セルフリー血清および血漿から抽出した RNA の品質を評価するためには次のパラメーターを考慮する必要があります。

1. 抽出の収率と収量
2. cDNA 合成および PCR 酵素に対する阻害物質が混入していないこと

3. 細胞の混入または溶血による RNA の有無
4. 血清や血漿に典型的な miRNA が存在すること

これらのパラメーターは、RNA Spike-in (コントロール RNA) の添加と特定の内在性 miRNA の解析を組み合わせることで調べることができます。他の体液サンプルを取り扱う際には、文献調査または miRNome panel を用いた予備試験のいずれかにより、そのサンプルタイプに適した miRNA を設定する必要があります。

Exiqon 社は、qPCR による RNA サンプルの品質管理に使用できる合成 RNA Spike-in を用意しています。RNA Spike-in は RNA 抽出、cDNA 合成および PCR 増幅の効率の確認に使用できます (詳細は表 2 を参照)。RNA Spike-in を用いることで、ヌクレアーゼの有無を確認できる場合があります。

表2. microRNA QC PCR Panelを用いた品質検定とRNA抽出の収率と収量、cDNA合成とPCR反応の性能および一般的なサンプルの品質確認方法についての概要 詳細については、microRNA QC PCR PanelおよびRNA Spike-in Kitのマニュアルを参照してください

アッセイ	血清 / 血漿サンプルに対する適用
UniSp2, UniSp4, UniSp5 (RNA Spike-in)	<ul style="list-style-type: none"> • 3種類の濃度で混合 • RNA抽出時にlysis bufferに添加 • RNA抽出の品質確認に
UniSp6, cel-miR-39-3p (RNA Spike-in)	<ul style="list-style-type: none"> • 異なる濃度で混合 • cDNA合成反応時に添加 • RTおよびPCRの阻害物質の確認に
UniSp3 (RNA Spike-in)	<ul style="list-style-type: none"> • PCR panelにテンプレートとプライマーを搭載 • マルチプレートでのPCR解析に • プレート間補正用キャリブレーター (Inter plate calibrator :IPC) として使用
miR-451a, miR-23a-3p	<ul style="list-style-type: none"> • 溶血マーカー • ΔCq (miR-23a-3p - miR-451a) を確認
miR-30c-5p, miR-103a-3p, miR-124-3p, miR-191-5p	<ul style="list-style-type: none"> • 生物学的に重要な内在性miRNA • 血清、血漿などの体液から得たRNAに存在 • 一般的なサンプルの品質確認に使用

UniSp2, UniSp4, UniSp5およびcel-miR-39-3pはRNA Spike-in Kitに含まれています。UniSp6はUniversal cDNA Synthesis Kit IIIに含まれており、対応するプライマーセットはExiLent SYBR® Green master mixに添付されています。

各RNA Spike-inは全てRNA Spike-in Kitに含まれており、いずれもExiqon社のmicroRNA Ready-to-Use PCR Panelに含まれているプライマーを用いて検出することができます。また、RNA Spike-in検出用の6種類のプライマーと内在性miRNA検出用の6種類のプライマーを含むmicroRNA QC PCR Panelを用いても検出できます。大規模な

試験では、サンプルセットに問題はないかを確認するために、少なくとも一部のサンプルについて品質管理を行ったうえでmiRNAプロファイリングを実施することをお勧めします。詳細については、miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR、RNA Spike-in KitおよびmicroRNA QC PCR Panelのマニュアルをご参照ください。

RNA 抽出とテンプレート調製を成功させるために

miRNA 発現プロファイリングを成功させるための最初の重要なステップは、生体サンプルからの small RNA (<200 nt) を含む total RNA の抽出および調製です。そのため RNA サンプル調製に用いる方法が、実験を成功させるカギとなります。実験を開始するにあたって、次の点を考慮してください。

- ・ 必ず MS2 RNA のようなキャリア RNA を添加して、サンプルからの収率を高くかつ安定的に得られるようにする
- ・ 異なる RNA 抽出方法を用いて調製したサンプルを比較することは推奨しません
- ・ cDNA を PCR アンプリコンで汚染しないように、RNA 抽出とリアルタイム PCR 前の反応ステップはリアルタイム PCR 反応を行う実験室とは別の実験室で行ってください
- ・ 血漿を取り扱う際には、必ず EDTA またはクエン酸を抗凝固剤として使用してください。ヘパリンは qPCR プロファイリングに適していません
- ・ 血清および血漿以外の体液サンプルから RNA を抽出する前には、細胞画分を含むかどうか考慮してください。例えば尿のようなサンプルタイプは、細胞ペレットとセルフリー画分それぞれに対して別個に分析する方がよい場合があります

QC チェック1:

プロファイリングに対する RNA の適格性確認

抽出可能な RNA 量と抽出後に残存する阻害物質の量はサンプル間で異なる可能性があります。RNA サンプルを miRNA qPCR Panel によるプロファイリングに用いる前に、RNA サンプルの量を変えて cDNA 合成反応(例: 10 μ L の RT 反応に 0.5 μ L、1.0 μ L、2.0 μ L、4.0 μ L のサンプルを使用)を行って RNA Spike-in アッセイおよび少数の miRNA アッセイをし、抽出収率と PCR 阻害物質の有無を確認することを推奨します。これは、miRNA QC PCR Panel を用いれば容易に行うことができます。この予備試験に基づいて RNA 収率の低いサンプルを除外した上で追加試験を実施することが可能であり、その際 PCR 阻害物質を含むサンプルは、サンプル使用量とシグナルとの関係が予想された直線ではない希釈曲線を示します(図 5)。このような予備試験で適格とされる miRNA の例として、次の miRNA があげられます。これらは、一般に中～高レベルで検出されます。

- ・ hsa-miR-103a-3p
 - ・ hsa-miR-191-5p
 - ・ hsa-miR-423-3p/5p
 - ・ hsa-miR-451a
 - ・ hsa-miR-30c-5p
 - ・ hsa-miR-124-3p
- 血清/血漿
- 尿
- CSF

多くの場合、これらの miRNA は発現データの標準化に用いることができますが、発現の安定性を確認する必要があります(後述参照)。希釈曲線の解析結果は、得られた RNA の品質評価にのみ使用するようにします。この結果に基づいて qPCR Panel 解析前の RT 反応でのサンプル使用量を調整することは推奨しません。前述のように、RT 反応に用いる精製 RNA の容量は全ての血清/血漿サンプルで同じにすることを推奨します。

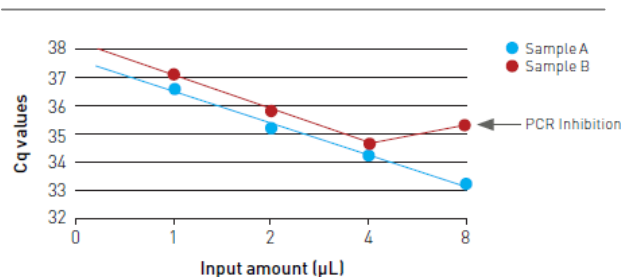


図 5. RNA 使用量の最適化 RNA 希釈系列を用いることで、使用量が測定系の直線範囲に入るかが判断でき、阻害の影響を受けない適切なシグナルが確実に得られるようになります(例、8 μ L でのサンプル A)。シグナルレベルを高くするために RNA 容量を増やすと、RT-PCR 反応への阻害物質の持ち込みが多くなりシグナルが低くなる場合があります(例、8 μ L でのサンプル B)。

QC チェック 2: 細胞由来の miRNA 混入に対するプロファイリング後の解析

血清および血漿を対象とした miRNA プロファイリングで最も注目されるターゲットは、循環または細胞外の miRNA です。プロファイルに白血球または赤血球由来の RNA 種が過剰に現われている場合は、RNA 抽出前のどこかの時点で細胞が溶解したことを示しています。この原因は、白血球および血小板のサンプルからの不十分な除去や溶血であると考えられます。細胞由来の RNA 種が存在すると、血清/血漿 miRNA プロファイリング実験が妨げられ、偏った再現性のないプロファイルになってしまう可能性があります。血清および血漿サンプル中の溶血は、遊離ヘモグロビンレベルを測定する各種分光光度測定法でモニタリングすることができます。しかし、RNA が抽出済みで元のサンプルが入手できない場合、別の方法として赤血球で多く発現している miRNA (hsa-miR-451a) のレベルを溶血の影響を受けない miRNA (hsa-miR-23a-3p)² のレベルと比較します。Exiqon 社は、 $\Delta Cq(miR-23a-3p - miR-451a)$ が溶血の程度を良好に示す尺度となることを見出しました。この値が 5 を超えると、赤血球由来の miRNA が混入している可能性があり、7~8 以上だと、ヒトサンプルの場合はデータに影響を及ぼす溶血が生じている恐れがあります(マウス、ラットのサンプルに対する値は異なります)。しかしここで、血清および血漿中の多くの miRNA は溶血の影響を受けないため、溶血が生じたサンプルからでも疾患関連 miRNA バイオマ

ーカーは検出できる可能性があることに留意します。ただし、標準化やデータ解析の際には miRNA プロファイルに対する影響に注意することが重要で、これにより系統的なバイアスを除くことができます。

cDNA 合成

前述の RNA 品質管理では、RNA サンプル中に一般的な阻害物質が存在しているかどうかに基づいています。阻害物質含量のサンプル間での小さなばらつきの影響を最小限または軽減するために、通常のサンプルよりも反応容積を大きくして cDNA 合成を行うことを推奨します(図 6 と www.exiqon.com/mirna-pcr の Instruction Manual for miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR for serum/plasma samples を参照)。

リアルタイム PCR 増幅

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR システムを用いる場合は、cDNA 合成後の反応液を希釈して PCR 反応に使用します。体液サンプルの場合は、RT 反応の容量が大きいため、通常のサンプルと比べて cDNA の希釈率は小さくなります(図 6 を参照)。

2. Blondal et al. (2012), Methods, 59(1):164-9

図6. 実験準備ガイド この図は、初期のスクリーニングからバリデーションまで、あらゆるプロジェクトの規模に合わせて調製可能な実験準備の概要を示しています

サンプルタイプ	血清、血漿などの体液				
	miRNome panel	miRNome panel	Pick-&-Mix/Focus panel		individual assays
パネルまたはプライマーセット	I	I+II	1-96 assays	97-192 assays	(<96)
キットあたりの Universal cDNA 反応	16	8	64	32	64
Universal cDNA 反応容量 (μL)	40	80	10	20	10
ExiLent Master Mix 中の cDNA 希釈率	50x				40x
ExiLent Master Mix 使用量 (μL)	2000	4000	5/assay		

図 7 では、上記の反応容量を用いて達成が可能な、血清から得た RNA に対する異なる逆転写反応間の高い再現性が示されています。これ以降の取扱いおよび PCR サイクル条件は、すべて Instruction Manual for miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR に記載の体液サンプルについての手順に従っています。

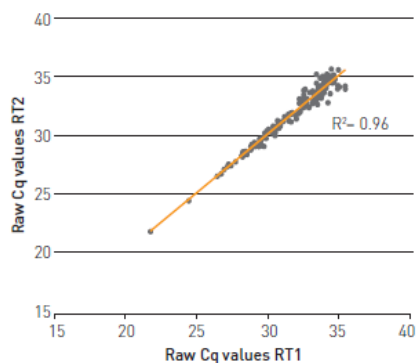


図 7. 血清 total RNA を用いた RT 反応間での優れた再現性 血清 65 μ L から抽出した total RNA を用いて 2 回繰り返して RT 反応 (RT1、RT2) を行い Cq 値を求めた。全 730 種類の miRNA について発現プロファイリングを行い、Cq 値が 35 未満の miRNA のみを示した (133 データポイント)。

Exiqon 社が提供する体液サンプルを用いた miRNA プロファイリングに適した製品および RNA Spike-in の添加のタイミングの概要については、図 8(P11)を参照してください。

ROX:

ExiLENT SYBR® Green master mix には、ROX passive reference dye は含まれていません。ご使用される装置によっては必要な場合があります。

ABI 社装置:

ベースラインおよび閾値はマニュアルで設定してください。これに対する SDS テンプレートファイル (設定済みのプレートレイアウトを含む) は www.exiqon.com/sds からダウンロードできます。

ノーマライゼーション

ノーマライゼーションの目的は、研究対象の生物学的変化に関連しない手法などによるデータのばらつきを除くことです。適切なノーマライゼーションは、リアルタイム PCR 実験から得た結果の解析および解釈を正しく行うために重要です。ノーマライゼーションに最もよく用いられる方法として次の方法があります。

1. 安定に発現しているリファレンス遺伝子を特定し、用いる
2. 使用するサンプルで発現している全 miRNA の発現値の平均をノーマライゼーションファクターとして用いる³

Exiqon 社の GenEx Software では、これらのアプローチの両方をサポートします。対象データのノーマライゼーションにはどちらの方法が適当か確認する必要があります。

通常、体液サンプルは、他のサンプルのノーマライゼーションに用いられることがある比較的大きい small RNA 種 (5S、U6 および snoRNA など) を含んでいません。また他の相違点として、体液サンプルで検出される miRNA の数は少ない傾向があります。発現値の平均をノーマライゼーションに用いる場合は、多数の miRNA が発現している必要があります。そのため一般的なガイドラインとして、検出された miRNA 数が 80~100 未満の場合には、安定的に発現しているリファレンス遺伝子を特定し、ノーマライゼーションに用いることを考慮してください。

安定的に発現しているリファレンス遺伝子をノーマライゼーションに使用する場合は、miRNA 発現の本解析を行う前に、いくつかのリファレンス遺伝子候補を用いた確認試験を行うことを推奨します。候補とするリファレンス遺伝子には、対象とするサンプル全てにおいて安定的に発現しているものを選択します。

血清や血漿をサンプルとする場合には、通常、文献または既存のデータ(例、qPCR panel を用いたスクリーニング)に基づきリファレンス遺伝子候補を選択します。Exiqon 社の Serum/Plasma Focus microRNA PCR Panel には、リファレンス遺伝子の候補として hsa-miR-93-5p、hsa-miR-103a-3p、hsamiR-191-5p、hsa-miR-423-3p および hsa-miR-425a が搭載されています。これらの遺伝子は、一般に中程度から高度に安定的に発現することが知られていますが、これらがリファレンス遺伝子として適当であるかどうかは、試験ごとに評価する必要があります。

その他の体液サンプルについては、初期的なパイロット試験を実施してその実験結果からリファレンスとして最も適当な miRNA を特定することを推奨します。miRNA qPCR の実験準備およびデータ解析に関する詳細については、Exiqon 社の miRNA qPCR ガイドライン <http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/miRNA-qPCR-guidelines.pdf> を参照してください。

GenEx Software

迅速かつ簡便なデータ解析用ソフト

www.exiqon.com/qpcr-software

3. Mestdagh et al. (2009), Genome Biol, 10, R64

図8. 体液サンプル処理ガイド

サンプルタイプ	血清、血漿	尿	CSF	その他の体液
サンプル調製	miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids and RNA Spike-in kit, UniRT (サンプル抽出効率のモニタリングにUniSp2、4、5を添加)			
cDNA合成	Universal cDNA Synthesis Kit および RNA Spike-in kit, UniRT (cDNAおよびqPCR効率のモニタリングにUniSp6およびcel-miR-39-3pを添加)			
RNA QC (推奨)	miRCURY™ microRNA QC PCR Panel	miRCURY™ microRNA QC PCR Panel	LNA Control primer set	miRCURY™ microRNA QC PCR PanelまたはLNA Control primer set
初期スクリーニング	Serum/Plasma Focus microRNA PCRパネル	Toxicology Focusまたは 少数のサンプルに対して miRNome microRNA PCR パネル	少数のサンプルに対して miRNome microRNA PCRパネル	少数のサンプルに対してmiRNome microRNA PCRパネル
プロファイリング	Serum/Plasma Focus microRNA PCRパネル	Toxicology Focusまたは 選択した関連アッセイで Pick-&-Mix microRNA PCRパネル	選択した関連アッセイで Pick-&-Mix microRNA PCRパネル	選択した関連アッセイで Pick-&-Mix microRNA PCRパネル

その他の記事およびリソース

体液サンプルに関する情報は、www.exiqon.com/biofluids を参照してください

下記の参考文献は www.exiqon.com/mirna-pcr からダウンロードできます

- Instruction Manual for microRNA LNA™ Universal RT microRNA PCR serum and plasma
- Instruction Manual for miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids
- Instruction manual for miRCURY™ microRNA QC PCR Panel
- Pitfalls and recommendations for microRNA expression analysis using qPCR – guidelines to setting up microRNA qPCR
- ABI 社装置用の SDS テンプレートファイル
- Exiqon GenEx Software

データ解析用ソフトウェアとツールの詳細については、www.exiqon.com/qPCR-resources を参照してください

EDRN の標準操作手順書は、<http://edrn.nci.nih.gov/resources/standard-operating-procedures> で確認できます

www.exiqon.com/e-talk では、miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Systemと LNA™技術の利点についてご紹介しています

・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。

・本チラシに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

TaKaRaテクニカルサポートライン、受託窓口

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店