

miRNA解析受託サービス

タカラバイオ(株)バイオメディカルセンターでは、研究目的に応じたmiRNA解析サービスをご提供しています。長年培ってきたアレイ解析や遺伝子工学の技術を活用し、経験豊富なスタッフの作業により、高品質のサービスをお届けいたします。



miRNA解析受託プラットフォーム

	miRNA マイクロアレイ発現解析	miRNA シーケンス解析	miRNA リアルタイムPCR解析
用途	・網羅的解析 ・低コスト解析	・高感度な解析 ・網羅的解析 ・新規miRNAの発見	・高精度、高感度な解析 ・アレイやシーケンスの検証
対象	・細胞、組織、培養上清など	・血清／血漿	・血清／血漿、脳脊髄液、尿 ・細胞、組織、培養上清など

miRNAマイクロアレイ発現解析サービス

- ・ アジレント社認定サービスプロバイダーによるmiRNAマイクロアレイを用いた網羅的発現解析
- ・ 最新のmiRBaseより設計されたヘアピンキャップ構造プローブにより、成熟型miRNAのみを検出



主要なアレイ

生物種	アレイの種類	コンテンツ
ヒト	SurePrint G3 Human miRNA Microarray, Release 21.0	2,588 mature miRNA
マウス	SurePrint G3 Mouse miRNA Microarray, Release 21.0	1,915 mature miRNA
ラット	Rat miRNA Microarray, Release 21.0	765 mature miRNA

基本サービス

RNA抽出、RNA品質検定、ダイレクトエンドラベリング、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションおよびスキャニングを行います。データの数値化を行い、指定の組み合わせ(1対1比較)で発現比を算出したファイルをお返しします。

- ヒト、マウス、ラットのほか、miRBaseに登録されている生物のカスタムmiRNAアレイもご利用いただけます。
- miRNA、small RNAの分離・濃縮は不要です。短鎖を含むtotal RNAを500 ng以上ご提供ください。

納品データ

- ・作業報告書
- ・Rawデータ (txtファイル)
- ・RNA QCデータ、ハイブリダイゼーションQCレポート
- ・解析データ (シグナルデータ、発現比率データ、変動遺伝子データ)

miRNAシーケンス解析サービス

- ・ RNA抽出からライブラリー作製、シーケンス、データ解析までの全作業をエキシコン社で実施
- ・ ヒトの血清または血漿検体からmiRNAシーケンスを実施
- ・ 様々な図表を含む解析レポートを納品

基本サービス

ヒトの血清または血漿500 µl以上をご提供いただき実施する受託解析メニューです。血清および血漿の採取方法につきましてはお問い合わせください。

RNA抽出、qPCRによるRNAの品質検定、miRNAライブラリーの調製、ライブラリーの品質検定、イルミナ社シーケンサーによる配列解析を行います。

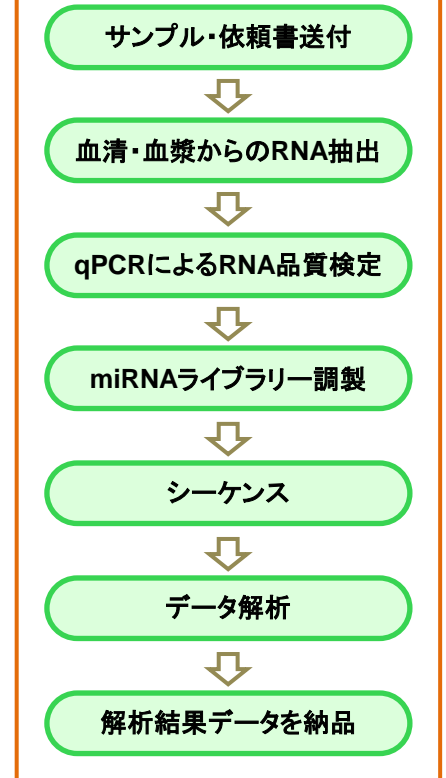
データ解析ではmiRBaseに全データをマッピングし、新規miRNA予測を含めた既知および未知のmiRNAの発現解析、t-testやANOVAによる統計解析などを行います。

さらに有意な発現変動を示したmiRNAの標的遺伝子に対するGO (Gene Ontology) enrichment解析を行います。

納品データ

- ・ 作業報告書
- ・ 解析データ
(miRBaseにマップされたカウント数、新規のmiRNA配列候補、発現比較データなど)

解析の流れ



microRNAの発現比較解析データ

microRNA	logFC	logCPM	PValue	FDR	Group 1 Counts	Group 2 Counts
hsa-mir31-5p	3,06551	6,609658	6,86E-47	3,77E-44	27	258
hsa-mir424-3p	2,393819	5,593967	5,98E-19	1,64E-16	20	119
hsa-mir493-5p	1,874253	6,309347	1,99E-15	3,65E-13	44	181
hsa-mir222-3p	1,344097	10,662955	8,50E-15	1,17E-12	1214	3409
hsa-mir493-3p	2,006251	5,403651	1,57E-10	1,73E-08	21	96
hsa-mir221-5p	1,216798	8,378246	8,42E-07	7,70E-05	263	676
hsa-mir196b-5p	3,941207	3,071203	1,33E-05	1,04E-03	1	19
hsa-mir221-3p	0,816838	11,072732	5,96E-03	4,09E-01	2069	4197
hsa-mir4521	2,113294	3,855361	7,56E-03	4,61E-01	6	32
hsa-mir503-5p	1,22824	5,482292	1,69E-01	9,26E+00	34	93
hsa-mir10b-5p	0,854688	10,129677	1,15E+00	5,73E+01	1049	2137
hsa-mir494-3p	0,944758	5,701749	3,12E+00	1,43E+02	46	100

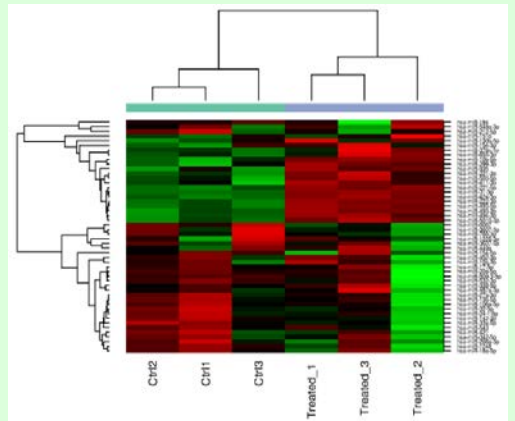
サンプル間で有意に変動したmiRNAを、log Fold change値やP-value、Benjamini and Hochberg FDR、カウント数などの値とともにリストアップします。

GO enrichment解析データ

Rank	GO_ID	Term	Annotated	Significant	classic KS	elim KS
1	GO:0070011	catalytic activity		155	16 5.98e-07	4.2e-07
2	GO:0008233	peptidase activity		103	16 2.2e-07	5.2e-07
3	GO:0016787	hydrolase activity		188	27 1.6e-10	0.00018
4	GO:0055114	oxidation-reduction process		190	27 4.0e-04	0.00128
5	GO:0070022	peptidase activity		267	46 3.9e-04	0.00216
6	GO:0033077	T cell differentiation in thymus		10	6 0.0023	0.00227
7	GO:0007051	spindle organization		27	2 0.0024	0.00240
8	GO:0006508	proteolysis		11	7 0.0019	0.00186
9	GO:0010564	regulation of cell cycle process		98	11 0.0010	0.00288
10	GO:0043434	response to peptide hormone stimulus		23	8 0.0010	0.00101

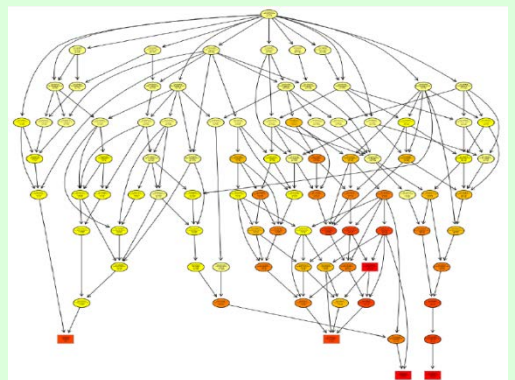
サンプル間で有意に発現変動が見られたmiRNAに対して、miRSearchを用いてmiRNAの標的遺伝子を探索し、その標的遺伝子のGO (Gene Ontology) enrichment解析を行います。解析されたGO termのネットワーク図も報告いたします。

クラスタリング結果



検体間と各miRNA間のtwo-way hierarchicalクラスタリング結果をヒートマップで表示します。

GO ネットワーク



miRNAリアルタイムPCR解析サービス

- ・ miRCURY LNA™ microRNA PCRシステムの高い特異性と検出感度により微量のmiRNAを正確に定量
- ・ 網羅的なプロファイリング用パネルのほか、フォーカスパネルやカスタムパネルでの解析が可能
- ・ 血清や血漿中のmiRNA、エクソソーム中のmiRNAのプロファイリングにも利用可能

日本国内唯一のエキシコン社サービスプロバイダーとして、miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Systemを用いてmicroRNAの定量PCR解析サービスを行います。本システムは、2014年にNature Methodsから発表された各社miRNA発現解析プラットフォームの性能比較を行った論文においてその性能の高さが示されています。 *Nature Methods*. 2014 Aug; 11 (8):809-815. PMID: 24973947

主要なパネル

目的	パネルの種類	コンテンツ
網羅的	miRNome Human panel (microRNA Ready-to-Use PCR, Human panel)	752種類のヒトmiRNA検出プライマーを搭載。 Panel I (高発現のmiRNA)のみかPanel I+IIで解析
網羅的	miRNome Mouse & Rat panel (microRNA Ready-to-Use PCR, Mouse&Rat panel)	752種類のマウス・ラットmiRNA検出プライマーを搭載。 Panel I (高発現のmiRNA)のみかPanel I+IIで解析
フォーカス	Cancer Focus panel	ヒトがん遺伝子や腫瘍抑制因子に関連する84種類のmiRNA検出プライマーを搭載
フォーカス	Serum / Plasma Focus panel	ヒト血清や血漿に存在する179種類のmiRNA検出プライマーを搭載
カスタム	Pick-&-Mix microRNA panel	搭載するmicroRNA検出プライマーの種類とプレートレイアウトをカスタマイズして解析可能

基本サービス

組織、血清／血漿、尿などから抽出した短鎖を含むtotal RNA(200 ng以上)を品質検定後、エキシコン社の推奨する方法に従い、cDNA合成、定量PCR反応を行います。血清／血漿由来の検体の場合は、溶血の有無や阻害物質の存在をチェックできるQC PCRパネルを使用した品質検定を行います。得られたデータから数値化を行い、解析データを納品いたします。

納品データ

- ・ 作業報告書
- ・ Rawデータ(txtファイル)
- ・ QCレポート(PDFファイル)
- ・ amp_chart, melt_chart(PDFファイル)
- ・ 解析データ(エクセルファイル)
- ・ 比較解析データ(エクセルファイル)

■ 解析データ(エクセルファイル)

解析結果はエクセル形式で納品します。各プローブのCq値、Tm値、増幅曲線、融解曲線を確認することができます。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
pid	miRNA	Assay type	EQ9999_01 delta cq	EQ9999_02 delta cq	EQ9999_03 delta cq	EQ9999_04 delta cq	EQ9999_01 Tm	EQ9999_02 Tm	EQ9999_03 Tm	EQ9999_04 Tm	EQ9999_01 Melting curve plot	EQ9999_02 Melting curve plot	EQ9999_03 Melting curve plot	EQ9999_04 Melting curve plot	EQ9999_01 Amplification curve plot	
1	hsa-miR-379	GOI					69.29	69.09	69.17	69.28	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
2	hsa-miR-217	GOI				7.0522	70.18			70.18	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
3	hsa-miR-337-5p	GOI		9.6022			68.9	68.69	68.67	68.79	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
4	hsa-miR-328	GOI	3.9009	4.1722	4.2247	4.6222	70.83/77.05	70.63/77.87	70.95/73.81	73.97	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
5	hsa-miR-374b*	GOI		7.5522			70.48	70.61			Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
6	hsa-miR-143	GOI	2.9909	3.7822	3.7947	3.2122	70.84/77.19	70.73/77.05		72.96	70.72/77.10	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve
7	hsa-miR-623	GOI						72.05	71.91		Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
8	hsa-miR-520c-3p	GOI									Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
9	hsa-miR-557	GOI									Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
10	hsa-miR-218	GOI		8.4622				70.62/77.21		69.60/77.50	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
11	hsa-miR-136	GOI					69.74	70.88		70.68/77.78	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
12	hsa-miR-127-5p	GOI				7.8322	71	70.23		70.02	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
13	hsa-miR-140-5p	GOI	2.5209	3.3622	3.8247	3.3422	70.49	70.41	70.3	70.44	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	
14	hsa-miR-31*	GOI					72.15				Melt curve	Melt curve	Melt curve	Melt curve	Amp curve	

■ 比較解析データ(エクセルファイル)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
pid	miRNA	Assay type	Target EQ9999_04 delta cq	Control EQ9999_01 delta cq	Target mean	Control mean	Ratio	target sequence	prod. no.	Target EQ9999_04 raw cq	Control EQ9999_01 raw cq			
17	144 hsa-miR-432	GOI	6.7222	8.4709	6.7222	8.4709	1.7488	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	204776	36.79	38.03			
18	674 hsa-miR-450b-3p	GOI	5.3630	7.0918	5.3630	7.0918	1.7288	UUGGGAUCAUUUUGCAUCCAU	204369	35.82	37.04			
19	401 hsa-miR-502-3p	GOI	4.0930	5.6518	4.0930	5.6518	1.5888	AAUUCACUUGGCAAGGAUUA	204043	34.55	35.6			
20	689 hsa-miR-223*	GOI	3.5830	5.1318	3.5830	5.1318	1.5488	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	204529	34.04	35.08			
21	273 hsa-miR-766	GOI	4.7922	3.8809	4.7922	3.8809	-0.9113	ACUCCAGCCACAGCCUCCAGC	204499	34.86	33.44			
22	467 hsa-let-7f-1*	GOI	6.6130	5.6718	6.6130	5.6718	-0.9413	CUAUAACAUAUUGCCUUC	204323	37.07	35.62			
23	163 hsa-miR-662	GOI	8.4622	7.5209	8.4622	7.5209	-0.9413	UCCACGUUGGCGCCAGCAGC	204180	38.53	37.08			
24	120 hsa-miR-151-3p	GOI	2.8622	1.8709	2.8622	1.8709	-0.9913	CUAGACUGAAGCUUUGAGG	204576	32.93	31.43			
25	163 hsa-miR-662	GOI	8.4622	7.5209	8.4622	7.5209	-0.9413	UCCACGUUGGCGCCAGCAGC	204180	38.53	37.08			
26	120 hsa-miR-151-3p	GOI	2.8622	1.8709	2.8622	1.8709	-0.9913	CUAGACUGAAGCUUUGAGG	204576	32.93	31.43			
27	254 hsa-miR-148b	GOI	1.5422	0.5109	1.5422	0.5109	-1.03125	UCAGUGCAUCACAGAUAUUUGU	204047	31.61	30.07			
28	387 hsa-miR-543	GOI	5.7730	4.7018	5.7730	4.7018	-1.07125	AAACAUCGCGGUGCAUUCUU	204447	36.23	34.65			
29	518 hsa-miR-518*	GOI	7.4230	6.3218	7.4230	6.3218	-1.10125	CUCUAGAGGGAAGCACUUCUC	204671	37.88	36.27			
30	166 hsa-miR-484	GOI	1.8222	0.6709	1.8222	0.6709	-1.15125	UCAGGCUCAGUCCUCCUCCGAU	204448	31.89	30.23			

指定の検体の組み合わせ(1対1比較)で発現比率を算出します。変動(2倍以上、1/2倍以下)が確認された遺伝子については色分けして表示します。

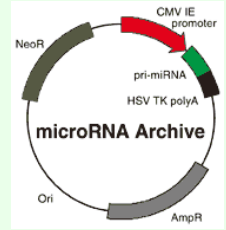
その他のsmall RNA解析ツール

total RNA精製・Exosome単離

- miRNAマイクロアレイやリアルタイムPCR解析に使用する高品質なsmall RNAを含むtotal RNAを精製
- 血漿、全血、FFPE組織切片などの臨床検体や各種組織、培養細胞など様々な検体からの核酸精製が可能
- 血清、血漿、尿、培養上清などからのExosomeの単離と、単離したExosomeからのtotal RNAの精製が可能

miRNA発現プラスミド作製

- ヒトおよびマウスの約800種のmiRNA発現プラスミドライブラリー「microRNA Archive」を用意
- 配列情報をもとに新規miRNA候補の発現プラスミドの作製も可能



miRNA Target Site Blocker

- miRCURY LNA microRNA Target Site Blocker(TSB)は、mRNA中のmiRNA結合部位をブロックすることでmiRNAの結合を競合的に阻害
- LNAの高い結合親和性により、低濃度でも効果的にmiRNAと競合してmiRNA結合配列をブロック。細胞内での安定性に優れるため長期間に渡るアンチセンス活性が期待できる。

miRNA PCR Primer Set

- miRBaseに登録されたほぼ全てのmiRNAをカバーする約20,000のデザイン済みmiRNA定量PCR用プライマーセット
- わずか1 pgのtotal RNAからmiRNAを検出できる感度を持ち、1塩基の違いも識別可能な高い特異性を持つ。
- タカラバイオウェブサイトのLNA PCR Primer Set検索サイトで検索と発注が可能

ご依頼方法、解析の流れ

■ サンプル送付方法

- ① ウェブサイトから「解析依頼書」をダウンロードして必要事項をご記入の上、FAXまたはメールにて送付してください。サンプル送付の際にも「解析依頼書」を同梱してください。
- ② サンプルは破損・漏れのないように梱包いただき、十分量のドライアイスと同梱の上、平日午前着指定、冷凍便にて送付してください。

【送付先】 タカラバイオ株式会社 バイオメディカルセンター 受託受付担当 宛て
〒525-0058 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号 TEL:077-565-6981

■ 組織、血清／血漿、細胞送付時の注意点

- 組織、血清／血漿、細胞の必要量を事前に確認いただき、規定量のサンプルを送付してください。血液検体の場合、ヘパリンは酵素反応を阻害しますので、絶対に使用しないでください。抗凝固剤は、EDTAまたはクエン酸ナトリウムをお勧めします。
- ヒト組織等の臨床検体の場合には、受託サービス実施の前に感染性の確認をさせていただきます。なお、以下に該当する検体は受けできません（お客様ご自身で感染性微生物を不活化されている検体は除きます）。
 - (1)「国立感染症研究所病原体等安全管理規程 <http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/>」に準じて、ヒトに対する病原性レベルがバイオセーフティーレベル3以上の微生物等に感染している、あるいは感染している疑いのある患者由来の検体
 - (2) HIV、HCV、HBV ウイルスに感染していることが確認されている患者由来の検体
 - (3) その他、弊社作業者の安全性確保が難しいと判断される検体

■ total RNAサンプルの送付時の注意点

- RNAサンプルはRNase free水に溶解してください。
- サンプル調製時にエタノール沈殿を行う場合、共沈剤としてグリコーゲンを追加しないでください。
- microRNA、small RNAの分離、濃縮は不要です。
- small RNAを含むtotal RNAは使用する試薬・キットのプロトコールに従って調製してください。

※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。 2015年10月作成G

タカラバイオ株式会社

■ 受託サービスに関するお問い合わせ先
〒525-0058 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号
TEL 077-565-6999

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店