

microRNA Sample and Assay Technologies



miRNA 精製、定量および機能解析

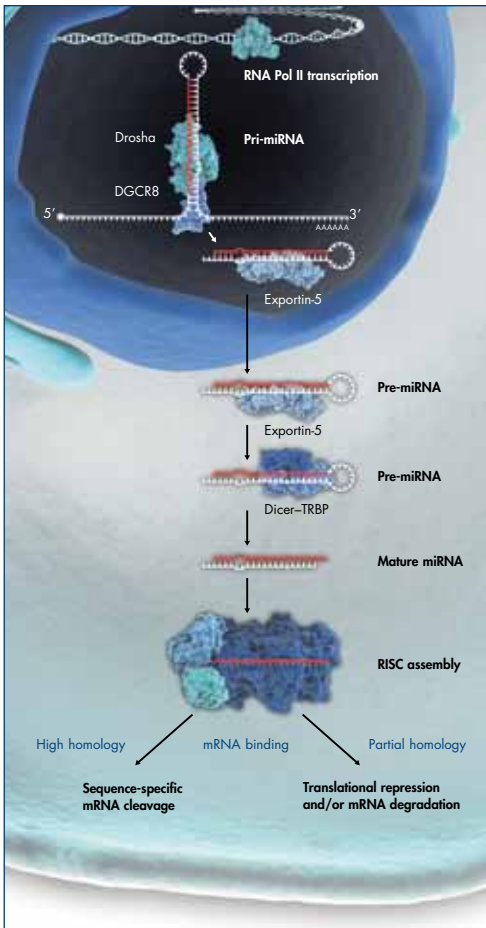


Sample & Assay Technologies

miRNA の生合成から miRNome のプロファイリングまでをカバーする miRNA 研究

microRNAs (miRNAs) は様々な生物に存在する noncoding RNA (約 22 ヌクレオチド) で、転写後遺伝子制御に関与しています (図 1)。miRNA は発生や分化、細胞シグナリング、感染応答を含む多くの生物学的なプロセスにおいて重要な役割を果たしています。miRNA 発現の調節異常が、がんを含むいくつかの疾病プロセスの原因あるいは指標であることを膨大な証拠は示唆しています。血清や血漿中を循環している miRNA が検出可能で、疾病の結果としてそれらの発現が変動するという発見は、循環 miRNA の発現レベルが疾病診断や予防のバイオマーカーとして使用できる大きな可能性を提示しています。

性能の高いテクノロジーおよび製品を確保することは miRNA 研究成功の鍵になります。QIAGEN は miRNA の精製、定量および機能研究に必要なツールを全てお届けします。また、遺伝子、パスウェイに関する多数の貴重な情報およびバイオインフォマティクス・ツールを QIAGEN の GeneGlobe® のポータルサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) で検索・収集でき、同時に miRNA に特化した製品のご注文も可能です。



QIAGEN がお届けするソリューション :

- **miRNA 精製**
miRNeasy Kits および PAXgene® Kits を用いて高品質トータル RNA (miRNA を含有) の精製
- **miRNA 発現プロファイリング**
miScript™ miRNA PCR Arrays を用いて全 miRNome やパスウェイに特化した miRNA パネルの迅速な網羅的発現解析
- **miRNA の生合成および制御研究**
miScript PCR System を用いて mature miRNAs (miScript Primer Assays 使用)、precursor miRNAs (miScript Precursor Assays 使用)、mRNA ターゲット (QuantiTect® Primer Assays 使用) の同時定量
- **miRNA 機能解析**
miScript miRNA Mimics、Inhibitors や Target Protectors を用いて miRNA 機能を効果的に研究

図 1. miRNA 生合成パスウェイ

まず核内で転写された長い primary miRNAs (pri-miRNAs) は、Drosha-DGCR8 により処理され precursor miRNA stem loops (pre-miRNAs) に変換される。pre-miRNA は Exportin-5-Ran-GTP により核内から細胞質へ輸送され、さらに Dicer-TRBP によるプロセッシングを受け、約 22 nt の mature miRNA となる。これらの mature miRNA は RISC (RNA-induced silencing complexes) の構成成分である Ago2 と結合し取り込まれる。RISC に組み込まれた miRNA は標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、その結果、転写後遺伝子発現が制御される。mRNA の分解 (標的 mRNA と完璧あるいはほぼ完璧な相補性がある場合)、あるいは翻訳制御 / mRNA の不安定化 (標的 mRNA との相補性が低い場合) による制御かは、標的 mRNA と miRNA の相補性の程度により決定される。

miScript PCR System — アップグレードされた miRNA 定量法

次世代の miScript PCR System は SYBR® Green によるリアルタイム PCR を用いて高感度で特異的な miRNA 発現の定量およびプロファイリングを実現します。miScript miRNA PCR Arrays は全 miRNome あるいは様々な生物種に対応するパスウェイに特化した mature miRNA パネルで迅速な網羅的遺伝子発現の解析を行なえます。また、各種 miRNA (mature miRNAs、precursor miRNAs、その他の small noncoding RNAs [ncRNA]) に対応する個別アッセイは GeneGlobe ポータルサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) でご注文いただけます。

miScript PCR System の特長：

- miRNome やパスウェイに特化した PCR アレイを用いて mature miRNA 発現を高感度にプロファイリング
- 同一 cDNA サンプルから mature miRNA、precursor miRNA、ncRNA、mRNA の定量を実現
- miScript miRNA PCR Array 用の使いやすいオンライン無料データ解析ツール

miRNA 定量に必要な全てを一つのシステムでカバー

適応性の高い miScript PCR System は RNA の cDNA への変換から miRNA のリアルタイム PCR 検出、そして効率的なデータ解析までの miRNA 定量に必要な全てのツールを提供します。miScript PCR System の構成品の詳細：

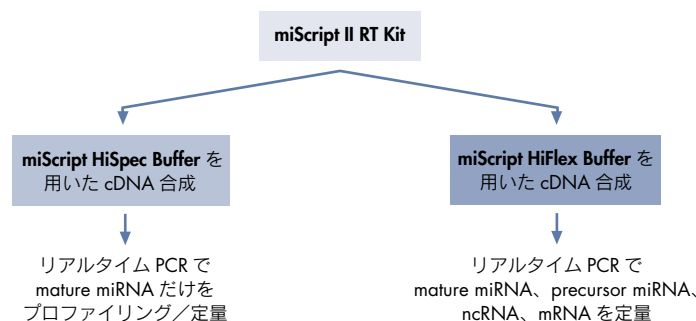


図 2. miScript II RT Kit デュアルバッファシステム

miScript miRNA PCR Array あるいは miScript Primer Assay を用いた mature miRNA 定量を行なう際は、miScript HiSpec Buffer を cDNA 合成に使用する。同一 cDNA から mature miRNA、precursor miRNA、noncoding RNA (ncRNA)、および/あるいは mRNA を定量 (適切な Primer Assay を使用) する際は、cDNA 合成に miScript HiFlex Buffer を使用する。

miScript II RT Kit

miScript II RT Kit を用いて 1 本のチューブで逆転写反応を 1 ステップで行なえます。デュアルバッファシステムは、リアルタイム PCR を用いて mature miRNA 発現の迅速なプロファイリングと全ての RNA 種の定量の両方を容易に実現するために開発されました (図 2)。

miScript HiSpec Buffer は選択的に mature miRNAs を cDNA に変換するため、バックグラウンドシグナルのない mature miRNA のプロファイリングを迅速に行なえます。miScript HiFlex Buffer は全ての RNA 種 (mature miRNA、precursor miRNA、noncoding RNA、mRNA) の cDNA 合成を促進します。従って、一本のチューブで miRNA の生合成、ゲノムワイドな miRNA、mRNA 制御の研究ができるという高いフレキシビリティを提供します。

miScript II RT Kit に関する詳細は www.qiagen.com/miScriptRT を参照ください。

miScript SYBR Green PCR Kit

miScript SYBR Green PCR Kitには QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix と miScript Primer Assays (mature miRNA に特異的な forward プライマー) との組み合わせで mature miRNA を検出できる miScript Universal Primer (reverse PCR プライマー) が入っています。本キットはリアルタイム PCR を用いて精度の高い miRNA 検出を実現するために至適化済みです。

miScript SYBR Green PCR Kit に関する詳細は www.qiagen.com/miScriptPCR を参照ください。

miScript Primer Assays および miScript Precursor Assays

miScript Primer Assay は mature miRNA に特異的な forward プライマーです。miScript Universal Primer (reverse プライマー) と組み合わせて使用することで miScript Primer Assays は mature miRNA を特異的に検出できます。miScript Precursor Assay は precursor miRNA に特異的な forward プライマーと reverse プライマーのセットで、precursor miRNA のステムループを特異的に定量します。miRBase から最新の配列情報を用いて設計された全てのアッセイは、GeneGlobe ポータルサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) から入手できます。

miScript Assays に関する詳細は www.qiagen.com/miScriptAssays および www.qiagen.com/miScriptPrecursor を参照ください。

miScript miRNA PCR Arrays

mature miRNA に特異的な forward プライマー (miScript Primer Assays) をアレイした miScript miRNA PCR Arrays は、miRNome および生物学的パスウェイに特化したパネルです。miScript SYBR Green PCR Kit と共に使用することにより、miScript miRNA PCR Arrays は、迅速かつ特異的で再現性の高い mature miRNA 発現のプロファイリングを実現します。miScript miRNA PCR Array の各アッセイは、高感度で特異的な mature miRNA 検出を確保するためウェット実験検証済みで、信頼できる結果が得られます。

miScript miRNA PCR Arrays に関する詳細は www.qiagen.com/miScriptArrays を参照ください。

miScript PCR Controls

miScript PCR Controls は miScript PCR System を用いたリアルタイム miRNA 定量実験におけるリアルタイム PCR を標準化するためのプライマーです。miScript PCR Controls として 5 種類の snoRNAs と 1 種類の snRNA が入手できます。これらのコントロールはヒト、マウス、イヌ、ラット、アカゲザルに関する実験における標準化に使用できます。

生物種に関する最新情報および詳細情報は www.qiagen.com/miScriptControls を参照ください。

miScript miRNA PCR Array Data Analysis Tool

miScript miRNA PCR Arrays 用の使いやすい無料データ解析ソフトがオンラインで利用できます。それぞれの miScript miRNA PCR Array のコンテンツに特化したデータ解析ツールが用意されています。生の C_T 値データが一度アップロードされると、解析ツールは PCR アレイのコントロールを自動的に取り込み、 $\Delta\Delta C_T$ 法を用いて相対的な定量を実施、結果を様々なグラフで表記できるため、実験者はデータを迅速に判定できます。

データ解析の詳細情報は www.qiagen.com/miScriptAnalysis を参照ください。



miScript miRNA PCR Arrays

最新の miRNA 発現プロファイリング用ツール

miScript miRNA PCR Arrays を用いた miRNA 発現プロファイリング

miScript miRNA PCR Arrays は mature miRNA に特異的な forward プライマー (miScript Primer Assays) をアレイした miRNome や生物学的パスウェイに特化したパネルです (表 1)。これらの PCR アレイは即使用可能な各種フォーマット (384 ウェルプレート、96 ウェルプレート、100-well Rotor-Disc™) で入手可能です (表 2、図 3)。miScript miRNA PCR Arrays は様々な生物種に対応しており、信頼できる結果を提供し、カスタマイズも可能です。各アレイにはサンプル調製からデータ解析までの全実験をモニタリングできるコントロールがセットされています。これらのコントロールには、データの標準化用コントロール、逆転写反応コントロール、PCR コントロールが含まれています。miScript miRNA PCR Array の各アッセイは、リアルタイム PCR による高感度で特異的な mature miRNA 検出を確保するためウェット実験検証済みです。

表 1. 入手可能な miScript miRNA PCR Arrays

アレイ	生物種
Complete miRNome	ヒト、マウス、ラット、イヌ、アカゲザル
miFinder	ヒト、マウス、ラット、イヌ、アカゲザル
Brain Cancer	ヒト、マウス、ラット
Breast Cancer	ヒト、マウス、ラット
Cancer PathwayFinder	ヒト、マウス、ラット
Cell Differentiation & Development	ヒト、マウス、ラット
Immunopathology	ヒト、マウス、ラット
Inflammatory Response & Autoimmunity	ヒト、マウス、ラット
Neurological Development & Disease	ヒト、マウス、ラット
Ovarian Cancer	ヒト、マウス、ラット
Serum & Plasma	ヒト、マウス、ラット
Custom Array	ヒト、マウス、ラット、イヌ、アカゲザル、その他の生物種

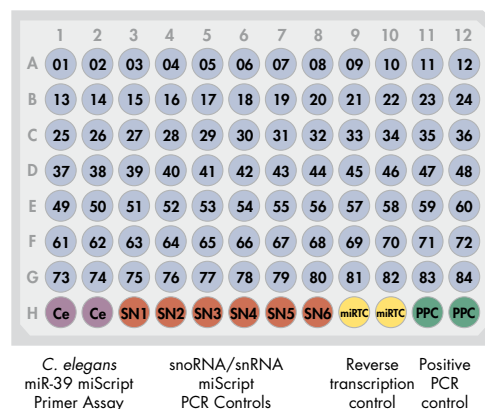
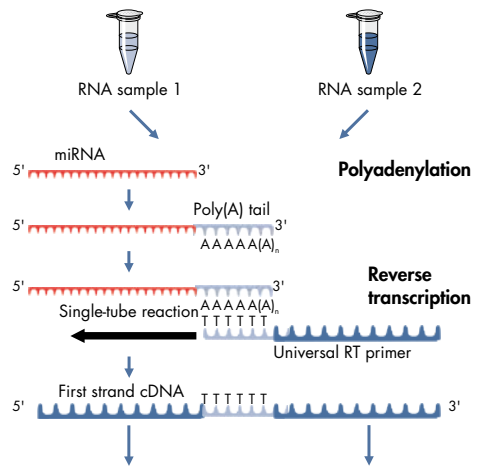


図 3. miScript miRNA PCR Array レイアウト
miScript miRNA PCR Arrays には 84 種類の miRNA 用 miScript Primer Assays およびデータ標準化用、逆転写、PCR 用のそれぞれのコントロールがセットされている。データ標準化コントロールは 6 種類の miScript PCR Control (10 ページ参照) と *C. elegans* miR-39 用 Primer Assay を含む。cel-miR-39 アッセイは spike-in control として使用できる Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic を検出する。Rotor-Disc および 384 ウェルフォーマットも入手可能である。

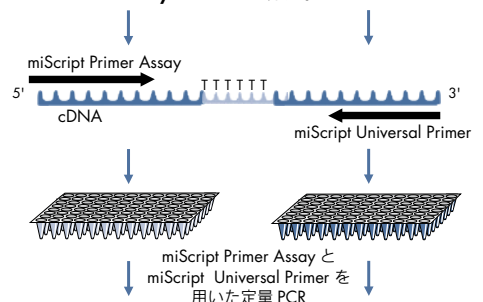
表 2. miScript miRNA PCR Arrays を使用できるリアルタイム PCR 装置

Manufacturer	Cycler	Format
QIAGEN	Rotor-Gene™ Q、Rotor-Gene 6000	R
Applied Biosystems®	ABI™ 5700、7000、7300、7500 Standard、7900HT Standard (96-well block)、7700、ViiA™ 7 (96-well block)	A
	ABI 7500 Fast、7900HT Fast (96-well block)、ViiA 7 Fast (96-well block)、StepOnePlus™	C
	ABI 7900HT、ViiA 7 (384-well block)	E
Bio-Rad®	iCycler®、iQ™ 5、MyiQ™、MyiQ2、Chromo4™	A
	CFX96™、DNA Engine Opticon®、DNA Engine Opticon 2	D
	CFX384™	E
Agilent (Stratagene®)	Mx3000P、Mx3000SP	A
	Mx4000	D
Roche®	LightCycler® 480 (96-well block)	F
	LightCycler 480 (384-well block)	G
Eppendorf®	Mastercycler® ep realplex 2、2S、4、4S	A
TaKaRa	TP-800	A

1.1本のチューブ内の1ステップ逆転写反応でmiRNAをcDNAに変換



2.cDNAをmiScript Universal Primer、 QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix、水と混和し、その溶液をmiScript miRNA PCR Arrayのウェルに分注。



3.リアルタイムPCR装置で反応実施

4.データを解析

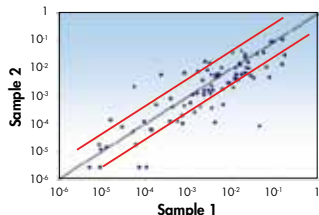


図4. miScript miRNA PCR Array の操作手順

効率的で迅速な操作手順

miScript miRNA PCR Arrays を用いた miRNA 発現プロファイリングは簡単で適応性の高い方法です (図4)。まず、miScript HiSpec Buffer を用いて miScript II RT Kit で cDNA を調製します。次に cDNA、miScript Universal Primer、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix、RNase フリー水を混和した溶液を miScript miRNA PCR Array に分注し、リアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始します。最後に miScript miRNA PCR Array Data Analysis Tool を用いてデータを解析します。

血清／血漿サンプル内の miRNA バイオマーカー探索

生物学的なプロセスにおける miRNA の役割に関する新しい発見を促進するため、パスウェイに特化した miScript miRNA PCR Arrays の種類は常に増え続けています。miScript miRNA PCR Arrays の各アッセイが最新データに基づき、生物学的に最適であるように、miScript miRNA PCR Arrays のコンテンツは独自の方法を用いて選択しています。現在 miRNA 研究で現在最も関心の高い分野の一つとして、血清や血漿サンプルに存在する miRNAs プロファイルの評価があります。血清や血漿中に比較的安定に存在する細胞外 miRNAs は、これら miRNA レベルの変動が、様々な疾病の非観血的バイオマーカーとして利用できる可能性があり、感心が高まっています。これらの動向を反映した結果、血清および血漿中に存在する疾病に関連する最も重要な miRNA、84 種類をプロファイリングできるよう、Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array を開発しました (図5)。

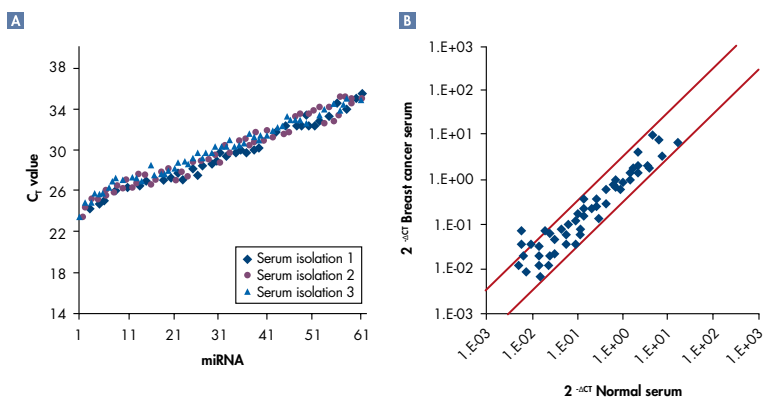


図5. 血清サンプル中 miRNA バイオマーカー探索

健常者 (n=10) および乳がん患者 (n=3) の血清からトータル RNA を分離した。miScript II RT Kit および添付の miScript HiSpec Buffer を用いて cDNA を調製した。リアルタイム PCR による mature miRNA のプロファイリングのために miScript SYBR Green PCR Kit と共に Human Serum & Plasma miScript miRNA を用いた。A 健常者血清 3 サンプルでの C_t 値は非常に高い再現性を示している。B 2^{-ΔC_t} 値のスクアッタープロットは健常者血清と乳がん患者の血清プールにおける mature miRNA 発現レベルで有意な差異があることを示している (赤線で示されている部分は ±3 倍)。

FFPE サンプル中に保存された miRNA 発現情報を解明

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルは過去の miRNA 発現プロファイルを知るための非常に重要なサンプルの一つです。QIAGEN は FFPE サンプルを有効に利用するための完璧なソリューションを提供しています。トータル RNA 精製用の miRNeasy FFPE Kit は、フェノール・クロロホルム抽出法のような他の miRNA 精製法に比べ、その収量および性能において卓越した結果を提供します。また、miScript miRNA PCR Arrays により FFPE サンプル内に存在する価値ある miRNA の発現プロファイルを解析できます (図 6)。

お客様のモデルシステムにおける最大の miRNA 発現プロファイルを保存

パスウェイに特化したアレイに加え最新の miRNome miScript miRNA PCR Arrays がヒト、マウス、ラット、イヌ、アカゲザルを含む様々な生物種で入手可能です。1 µg 以下のトータル RNA を用いてヒトの全 miRNA、miRNome を迅速にプロファイリングできます (図 7)。

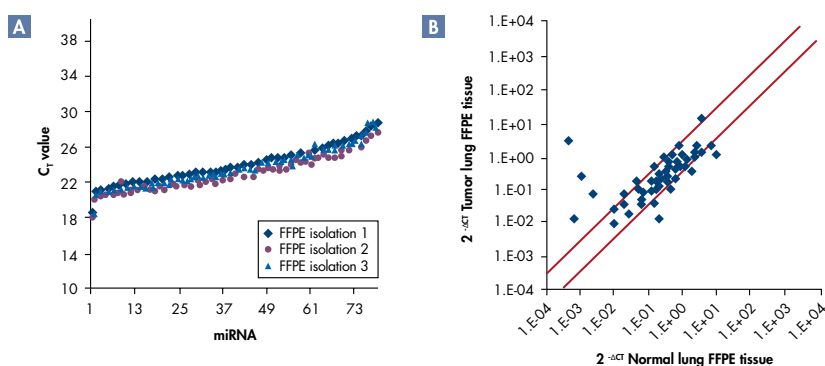


図 6. FFPE サンプル中の miRNA 発現プロファイリング

健康者および肺がん患者由来の FFPE 肺組織切片 (5 µm) から miRNeasy FFPE Kit を用いてトータル RNA を分離した。miScript II RT Kit と添付の miScript HiSpec Buffer を用いて cDNA を調製した。リアルタイム PCR による mature miRNA 発現のプロファイリングに Human miFinder miScript miRNA PCR Array と miScript SYBR Green PCR Kit を組み合わせて使用した。A 3 つの肺がん患者 FFPE サンプルにおける C_T 値は非常に高い再現性を示している。B 健康者サンプルとがんサンプルを比較した $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 値のスクアッタープロットは、2 種類の組織タイプにおける mature miRNA 発現レベルで有意な差異があることを証明している (赤線で示されている部分は ± 3 倍)。

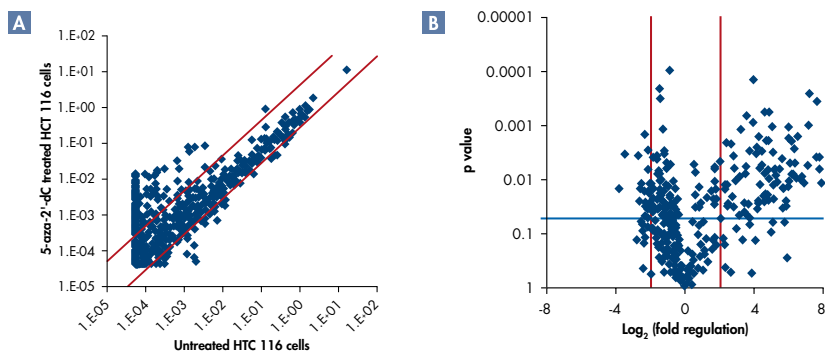


図 7. モデルシステムにおける miRNA 発現プロファイリング

5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-2'-dC) demethylation 試薬で処理、未処理の HCT 116 大腸がん細胞から miRNeasy Mini Kit を用いてトータル RNA を分離した。この試薬は DNA に取り込まれ、メチル化反応を起こす DNA methyltransferase の活性部位に共有結合された結果、DNA methyltransferase を不可逆的に阻害する。miScript II RT Kit と miScript HiSpec Buffer を用いて cDNA を調製した。リアルタイム PCR による mature miRNA 発現のプロファイリングに Human miRNome miScript miRNA PCR Array と miScript SYBR Green PCR Kit を使用した。A $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 値のスクアッタープロットは、2 種類のサンプルの mature miRNA 発現レベルで有意な差異を証明している。B ボルケーノプロットは制御された miRNA を示している (赤線で示されている部分は ± 4 倍)。5-aza-2'-dC で処理した HCT 116 細胞では、104 種類の miRNAs は顕著にアップレギュレートされ、30 種類はダウンレギュレートの程度が高かった。p 値で 0.05 を用いると (青線で記載)、104 種類の miRNA のうち 89 種類のアップレギュレーションが、また 30 種類の miRNA のうち 21 種類のダウンレギュレーションで有意差があった。

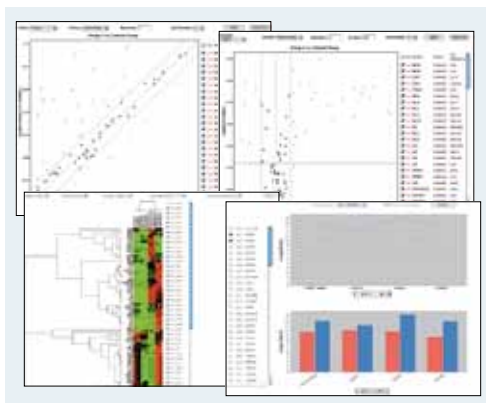


図 8. ウェブベースのソフトウェアで簡単にデータ解析

リアルタイム PCR データの解析を簡便化

それぞれの miScript miRNA PCR Array 用のデータ解析ツールをオンラインから無料で利用できます。このデータ解析ツールはウェブベースか Excel[®] フォーマットで、相対的な定量に $\Delta\Delta C_T$ 法を用いて自動的に定量します (図 8)。

miScript miRNA PCR Array Data Analysis Tools が自動的に実施できる事項：

- コントロールウェルを含んだ解釈
- $\Delta\Delta C_T$ 法を用いて fold-change を計算
- 様々な図表フォーマットで結果を表示

miRNA 生合成メカニズムを解明

precursor miRNA の mature miRNA への関係を調べる実験では、同一 cDNA サンプルから両タイプの miRNA を検出する必要があります。その場合には、miScript II RT Kit と添付の miScript HiFlex Buffer を用いて調製した cDNA を用います。そして、miScript Primer Assays を用いて mature miRNA を、miScript Precursor Assays を用いて precursor miRNAs をリアルタイム PCR で検出します (図 9)。miScript Primer Assays および miScript Precursor Assays はそれぞれ GeneGlobe ポータルサイトで入手できます。mature miRNA と precursor miRNA の相対的な割合は miRNA ごとで変動します。さらに、mature miRNAs は異なる条件や異なる組織では違った precursor miRNAs から発現することもあります (図 9)。

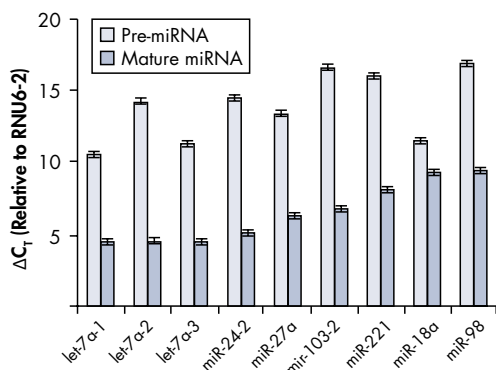


図 9. mature miRNA と precursor miRNA の検出

miRNeasy Mini Kit を用いて HeLa S3 細胞からトータル RNA を精製した。miScript II RT Kit と添付の miScript HiFlex Buffer を用いて cDNA を調製した。miScript Primer Assays を用いて mature miRNA を、miScript Precursor Assays を用いて precursor miRNAs をリアルタイム PCR で検出し、RNU6-2 用の miScript PCR Control を標準化に使用した。mature miRNA と precursor miRNA の相対的なレベルは異なる miRNA で変動し、異なるゲノム遺伝子座から発現した異なる precursor miRNA でも同じ mature miRNA が生成される。

miScript PCR Starter Kit を用いて miScript PCR System を簡便にセットアップ

miRNA 研究を初めて実施する研究者には、miRNA 定量実験に必要な全ての製品が入った miScript PCR Starter Kit を販売しています。本キットは逆転写反応やリアルタイム PCR 用の試薬だけではなく、ヒト miR-15a 用の miScript Primer Assay および RNU6-2 用の miScript PCR Control も入っています。本キットを用いて実験のセットアップを至適化しモニタリングできます。miRNA 研究の興味ある分野での実験開始に最適なツールです。

再現性の良い高感度な miRNA 定量

適応性の高い miRNA 検出システムは、感度が高く、幅広い定量ダイナミックレンジが必要です。さらに、プライマーはほぼ 100% の増幅効率で、miRNA アイソフォーム間の差異を判別できなければなりません。再現性の高い実験を実現できる定量のための操作手順も簡単であるべきです。miScript PCR System は、miRNA 発現プロファイリングあるいは miRNA 生合成研究においても、本システムの利点を発揮できることが証明されています。miScript HiSpec Buffer あるいは miScript HiFlex Buffer のどちらを用いて cDNA を調製した場合でもわずか 10 コピーの miRNA を検出できます (図 10)。ほぼ 100% の増幅効率を持つプライマーを用いたデータ作成にはわずか 10 pg のトータル RNA しか必要ありません。感度が高いだけでなく、プライマー特異性の高さも保証されています。miScript PCR System は、わずか 1 塩基しか変わらない場合でも miRNA ファミリーの類似性の高いアイソフォーム間の差異を区別できます (表 3)。miScript PCR System を初めて使用するお客様でも技術的、生物学的に再現性の高い結果が得られます (図 11)。

表 3. miScript Primer Assays の特異性

cDNA used	% Activity relative to perfect match primer assay as 100%								
	miScript Primer Assay used								
	Let-7b	Let-7c	miR-98	Let-7d	Let-7e	Let-7a	Let-7f	Let-7g	Let-7i
Let-7b	100.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Let-7c	0.5	100.0	0.0	0.0	2.4	0.1	0.0	0.0	0.0
miR-98	0.0	0.2	100.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1
Let-7d	0.1	0.0	0.0	100.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Let-7e	0.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.2	0.0	0.0	0.0
Let-7a	0.1	0.6	0.0	0.5	3.1	100.0	0.1	0.0	0.0
Let-7f	0.6	0.1	0.0	0.1	0.0	1.0	100.0	0.1	0.1
Let-7g	0.6	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.2
Let-7i	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	100.0

Let-7 ファミリーはわずか 1 塩基単位で異なるアイソフォームが存在する。各 Let-7 アイソフォーム (Let-7a ~ Let-7i, miR-98) に対応する合成 miRNA を miScript II RT Kit と添付の miScript HiFlex Buffer を用いた cDNA 合成に使用した。miScript HiSpec Buffer を用いて同じ実験を実施したが、類似した結果が得られた (データ未掲載)。各 cDNA をテンプレートとして、それぞれのアイソフォームに対応する miScript Primer Assay を用いてリアルタイム PCR 反応を行なった。完全にマッチしている miScript Primer Assay とミスマッチな miScript Primer Assays で得られた C_T 値の差異を用いて相対的な検出率 (%) を計算した (% relative detection = $2^{-\Delta CT} \times 100$)。miScript PCR System は非常に類似したアイソフォームメンバーを効率良く判別した。

図 11. 技術的および生物学的に再現性の高い繰り返し実験

トータル RNA を次のようなサンプルから miRNeasy Mini Kit を用いて精製した。A 継代数が同じで同一の HeLa S3 細胞ベレット 2 つ、および B 異なる時期に異なる株ストックから採取した 2 種類の HeLa S3 細胞ベレット。miScript II RT Kit と添付の miScript HiSpec Buffer を用いて cDNA を調製した。miFinder miScript miRNA PCR Array を miRNA プロファイリングに使用した。繰り返し実験のプロット C_T 値は、技術的にも生物学的にも再現性の高いことを示した。これらの実験は miScript PCR System を初めて使用したユーザーにより行なわれた。

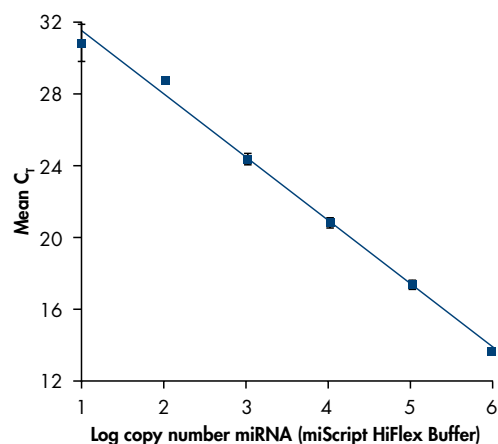
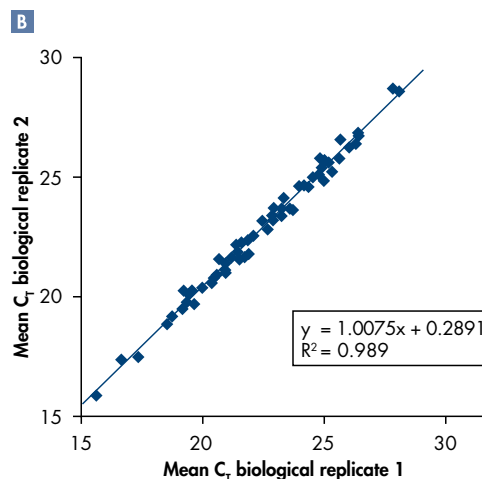
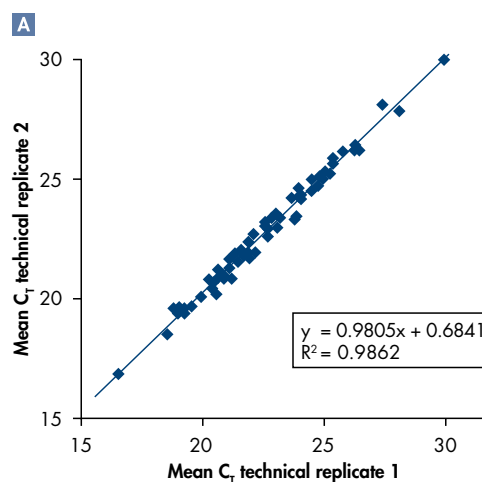


図 10. わずか 10 コピーの miRNA を高精度に検出
miScript II RT Kit と添付の miScript HiFlex Buffer を用いて合成 miR-21 から cDNA を合成した。10 コピーから 10^6 コピーの cDNA と miScript PCR System を用いてリアルタイム PCR を行なった。miRNA のコピー数が増加すると C_T 値は直線的に減少することから、広範囲のテンプレート量にわたり高感度な検出を示唆している。miScript HiSpec Buffer を用いた場合も同様の結果が得られた (データ未掲載)。



QIAGEN の miRNA プロファイリング受託サービス

RNA Isolation Service および miScript miRNA PCR Array Service では、専門知識を持つ QIAGEN サイエントリストチームがお客様の精製された核酸をお預かりし、miRNA プロファイリングを行ないます。

サンプルから結果までを提供する QIAGEN miRNA Services 内容：

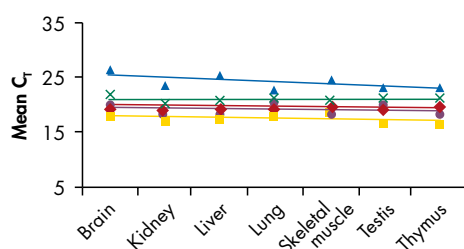
- QIAGEN キット (miRNeasy あるいは PAXgene Kits) を用いたトータル RNA 精製
- miScript II RT Kit を用いた逆転写反応
- miScript miRNA PCR Arrays を用いた miRNome あるいはパスウェイに特化した発現プロファイリング
- miScript miRNA PCR Array Data Analysis Tool* を用いたデータ解析

* 販売開始準備中です (2012 年 6 月現在)。詳細はパスウェイサイエンティスト (Tel : 03-6890-7312) までお問い合わせください。

miRNA 定量のための標準化コントロール

リアルタイム PCR において正確で再現性の高い miRNA 定量結果を得るためには、適切な内源性リファレンス RNA を用いてターゲット miRNA の発現量を標準化することが必要です。これは相対定量法として知られています。標準化は、不正確な結果を引き起こす可能性がある因子を補正するだけでなく、異なる実験やサンプルの直接比較を可能にします。miScript PCR Controls により、miScript PCR System で得たヒト、マウス、ラット、イヌ、アカゲザルのリアルタイム PCR による miRNA 発現データを標準化できます。生物種の最新リストは www.qiagen.com/miScriptControls を参照ください。

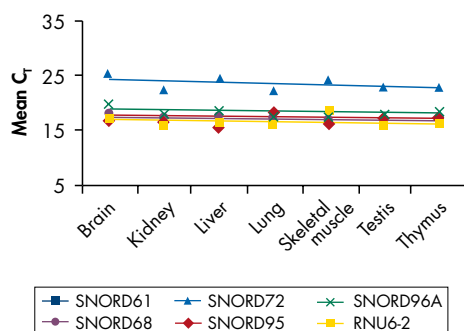
A



miScript PCR Controls の利点：

- 全コントロールはヒト、マウス、ラット、アカゲザルで効果的に使用可能
- ほぼ 100% の非常に高い増幅効率
- 様々な細胞や組織で一定した発現レベル

B



信頼性の高い結果を実現

miScript PCR Controls は 5 種類の snoRNAs と 1 種類の snRNA のパネルを定量するようにデザインされたプライマーです。これらの RNA は様々な組織や細胞タイプにおいて比較的安定して発現しています (図 12)。miScript PCR Controls はほぼ 100% の増幅効率を実現します。miScript HiSpec Buffer あるいは miScript HiFlex Buffer で調製した cDNA は miScript PCR Controls と共に使用できます。miScript PCR Controls はすべての miScript miRNA PCR Arrays にセットされています (図 3) が、GeneGlobe ポータルサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) での個別注文も可能です。

図 12. 標的 RNA の一定した発現レベル

様々なヒト組織から精製したトータル RNA (200 ng) を miScript II RT Kit と添付の A miScript HiSpec Buffer あるいは B miScript HiFlex Buffer を用いて cDNA に変換した。miScript PCR System と各 miScript PCR Control を用いて 1 ng の cDNA でリアルタイム PCR を行なった。C_T 値は各 RNA 発現レベルが異なる組織間でも非常に類似していることを示している。マウス、ラット、イヌ、アカゲザルの組織を用いた場合でも同様の結果が得られた (データ未掲載)。

より正確で詳細な miRNA 機能研究を実現

miRNA 機能研究により、特定 miRNA の標的および役割の同定、個別 miRNA のミスレギュレーションによる生物学的な影響の解析、特定の miRNA と標的遺伝子の確認が可能です。miScript miRNA Mimics、miScript miRNA Inhibitors、miScript Target Protectors を用いて様々な機能性研究を実施できます (図 13)。これらの製品はチューブ、96 ウェルプレートや 384 ウェルプレートなど、様々なスケールやフォーマットでお届けしています。

miRNA 機能解明のための方法：

- miScript miRNA Mimics を用いて内在性 miRNA 制御のシミュレーション
- miScript miRNA Inhibitors を用いて内在性 miRNA を抑制
- miScript Target Protectors を用いて miRNA が標的とする 1 遺伝子のみをプロテクト

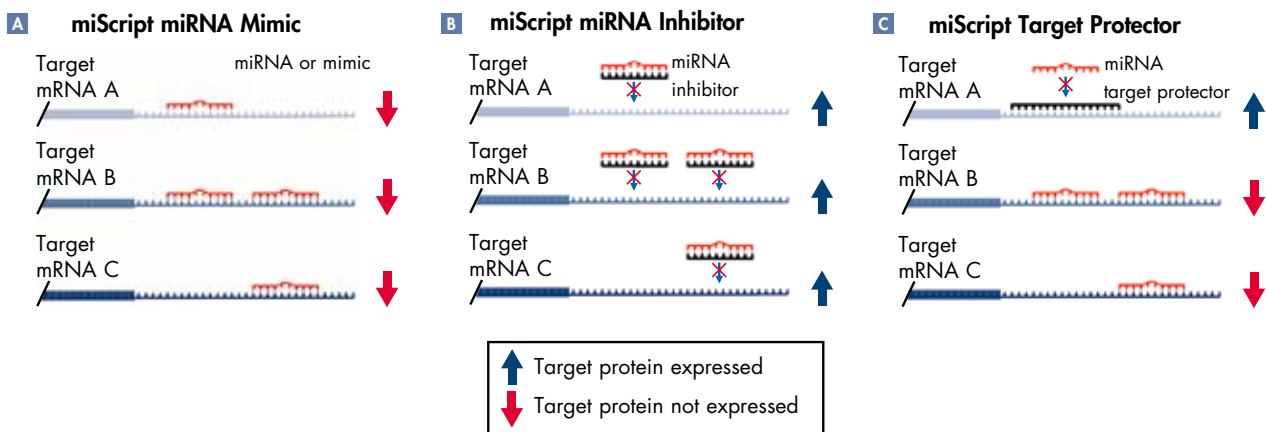


図 13. miScript miRNA Mimics、miScript miRNA Inhibitors、miScript Target Protectors の作用機序

A miRNAs あるいは miScript miRNA Mimics は標的 mRNA に結合し、全ての標的遺伝子発現のダウンレギュレーションを引き起こす。**B** miScript miRNA Inhibitors は対応する miRNA に結合するため、その miRNA が標的とする全ての遺伝子で発現がおこる。**C** miScript Target Protector は特定の miRNA 結合部位に結合するためその標的遺伝子だけは発現するが、他の標的遺伝子発現は抑制された状態を保持する。

miScript miRNA Mimics を用いて内在性 miRNA 機能を再現

miScript miRNA Mimics は細胞へのトランスフェクション後に内在性 miRNA と同様の機能を持つ合成二本鎖 RNA です (図 13)。miScript miRNA Mimics は内在性 miRNA で観察されるように遺伝子発現の抑制を引き起こします (図 14)。遺伝子発現はトランスフェクション後 72 時間まで効果的に阻害されています (データ未掲載)。

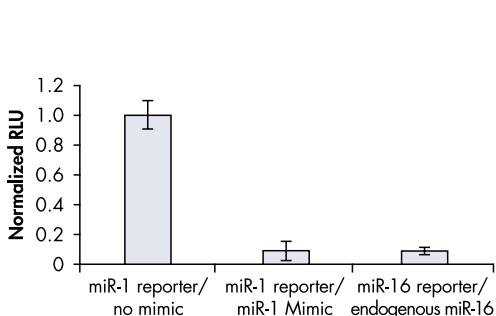


図 14. 内在性 miRNA と miScript miRNA Mimic による同様の発現抑制

HeLa S3 細胞内では miR-1 は発現していないが、miR-16 は大量に発現している。HiPerFect Transfection Reagent を用いて HeLa S3 細胞 (6 x 10⁴ 細胞/ウェル) に次のようにトランスフェクトした。3' UTR に miR-1 結合部位を持つルシフェラーゼレポーターコンストラクトのみ；3' UTR に miR-1 結合部位を持つルシフェラーゼレポーターコンストラクトと miR-1 Mimic をコトランスフェクト；3' UTR に miR-16 結合部位を持つルシフェラーゼレポーターコンストラクトのみ。24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。miR-1 Mimic は内在性 miR-16 と同様にルシフェラーゼ活性低下を引き起こした。

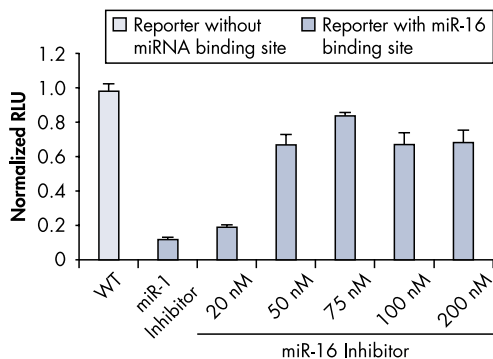


図 15. miRNA 由来のサイレンシング効果を阻害する miScript miRNA Inhibitor

HeLa S3 細胞内では miR-1 は発現していないが、miR-16 は大量に発現している。3' UTR に miR-16 結合部位を持つルシフェラーゼレポーター・コンストラクトを miR-16 Inhibitor と共に HeLa S3 細胞 (6×10^4 細胞/ウェル) に HiPerFect Transfection Reagent を用いてコトランスフェクトした。様々な濃度の miR-16 Inhibitor を用いて阻害効果に最適な濃度を調べた。ネガティブコントロールとして miR-1 Inhibitor のみを細胞にトランスフェクトした。また、ポジティブコントロールとして、miRNA 結合部位のないルシフェラーゼコンストラクト (WT) を細胞にトランスフェクトした。miR-16 Inhibitor のトランスフェクション後にルシフェラーゼ発現が増大し、内源性 miR-16 によるレポーター遺伝子発現抑制を miR-16 Inhibitor が阻害したことを示唆した。

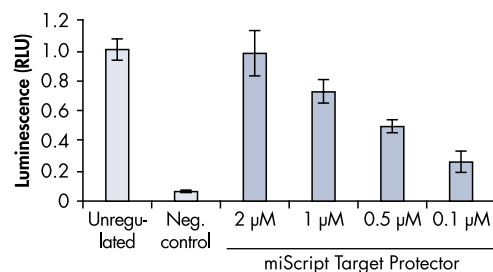


図 16. 信頼できる miRNA 阻害効果

miR-16 は MCF-7 細胞内で発現している。miR-16 との結合部位をもつルシフェラーゼレポーター・コンストラクトおよび同じ結合部位をプロテクトする miScript Target Protector を様々な量で一緒にトランスフェクトした。全ての量において、miRNA による抑制が阻害されルシフェラーゼの発現が顕著に増加した。Neg. control: ルシフェラーゼ・コンストラクトと Negative Control miScript Target Protector のコトランスフェクション。Unregulated: miR-16 結合部位をもたないルシフェラーゼ・コンストラクト。Attractene Transfection Reagent をコトランスフェクションに使用した。

miScript miRNA Inhibitors を用いて内源性 miRNA をブロック

miScript miRNA Inhibitors は化学修飾された合成一本鎖 RNA で、細胞への導入後に miRNA 機能を特異的に阻害します (11 ページ、図 13)。miScript miRNA Inhibitors は内源性 miRNA 機能の効果的な阻害を実現するようにデザインし、修飾されています (図 15)。経時実験はトランスフェクション後少なくとも 96 時間は miScript miRNA Inhibitors の効果があることを示唆しています (データ未掲載)。

miScript Target Protector を用いて一つの miRNA 標的を選択的にプロテクト

miScript Target Protectors は修飾された合成一本鎖 RNA で、miRNA と 1 種類の標的遺伝子の相互作用を特異的に阻害する一方、同じ miRNA が標的とする他の標的遺伝子の発現制御には影響を与えません (11 ページ、図 13)。miScript Target Protector のトランスフェクション後、miScript Target Protector は mRNA 上の miRNA 結合部位に結合し、この部位へ miRNA のアクセスをブロックし、特定 miRNA による遺伝子のダウンレギュレーションを阻害します (図 16、17)。miScript Target Protector のトランスフェクション後に表現型あるいは遺伝子発現解析を行ないます。標的遺伝子の発現増大、シグナル伝達パターンの変化、表現型の変化は、miRNA とその標的遺伝子が研究対象のパスウェイあるいは表現型に関与している証明になります。

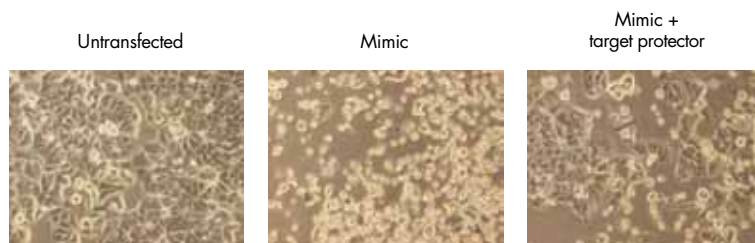


図 17. miScript Target Protector トランスフェクション後の表現型の変化

miR-9 は細胞の生存能力に非常に重要な遺伝子のダウンレギュレーションを引き起こす。MCF-7 細胞に miR-9 miScript miRNA Mimic (10 nM) をトランスフェクト、あるいは miR-9 miScript miRNA Mimic (10 nM) と miScript Target Protector (細胞生存関連遺伝子の miR-9 結合部位をプロテクト、1 μM) をコトランスフェクトした。72 時間後に、細胞生存を光学顕微鏡で観察した。トランスフェクションには HiPerFect Transfection Reagent を使用した。miR-9 miScript miRNA Mimic のトランスフェクションにより高レベルで細胞死が起こったが、遺伝子の miR-9 結合部位に対応するようにデザインされた miScript Target Protector と miR-9 miScript miRNA Mimic のコトランスフェクションにより細胞死は起こらなかった。miScript Target Protector が miR-9 のダウンレギュレーションを阻害したため、細胞生存に関する遺伝子が発現できた。

高品質な miRNA 精製

品質の低い RNA は酵素反応を阻害したり、非効率的な small RNA 精製は不正確な結果につながることもあるため、miRNA を含有する高品質なトータル RNA 精製は miRNA 定量実験を成功させるための必須条件の一つです。miRNA 精製用製品の miRNeasy および PAXgene miRNA Kits は、実験に最適な最高品質を持つ RNA をお届けします (表 4)。フェノールを利用した抽出・沈殿法のような miRNA 精製法に比べて、卓越した収量で miRNA を精製できます (図 18、19)。必要に応じて、miRNA は QIAcube™ や QIAasymphony™ 装置を用いて精製の自動化も可能です (詳細は弊社ウェブサイト www.qiagen.com/automation をご覧ください)。

miRNA 精製用 miRNeasy、PAXgene Kits の特長：

- 高純度 RNA の精製
- 全てのアプリケーションに最適な RNA
- 様々なサンプルタイプからの精製を実現

表 4. miRNA 精製用キット一覧リスト

キット	サンプルタイプ
miRNeasy Mini Kit	動物/ヒトの組織および細胞
miRNeasy 96 Kit	動物/ヒトの組織および細胞
miRNeasy Micro Kit	少量の動物/ヒトの組織および細胞
miRNeasy Serum/Plasma Kit	血清、血漿、その他の体液
miRNeasy FFPE Kit	ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプル
PAXgene Blood miRNA Kit*	PAXgene Blood RNA Tube 内で安定化済みのヒト全血
PAXgene Tissue miRNA Kit	PAXgene Tissue Container 内で固定、安定化した動物/ヒトの組織

* QIAasymphony 装置を用いたヒト全血からの miRNA 精製の自動化には QIAasymphony PAXgene Blood RNA Kit をご利用ください。

トータル RNA 精製あるいは miRNA の濃縮

miRNeasy および PAXgene miRNA Kits は約 18 ヌクレオチド以上の RNA を含むトータル RNA を精製できます。また、殆どのサンプルタイプ (FFPE のような分解の激しい RNA サンプルや大きな RNA を少量しか含まない血清/血漿サンプルなど以外) では、miRNeasy Kits を用いて miRNA 濃縮画分 (<~200 nt) とトータル RNA 画分 (>~200 nt) を別々に精製できます。miRNeasy および PAXgene miRNA Kits を用いて精製した RNA はノーザンブロット解析、マイクロアレイ解析、リアルタイム定量 RT-PCR のようなアプリケーションに最適です。RNAs の濃縮により、特定のアプリケーション (例; いくつかのマイクロアレイシステム) においてバックグラウンドが低減することもあります。miScript miRNA PCR Arrays および miScript Primer Assays を用いた解析では不要です。

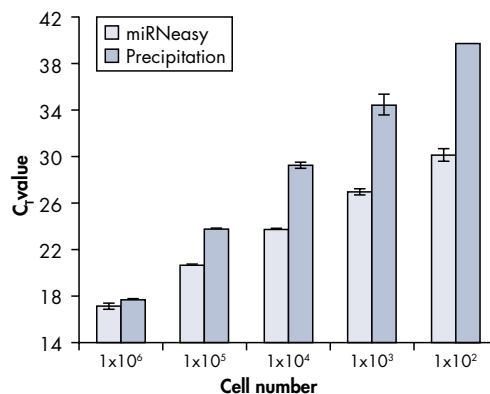


図 18. フェノール抽出・沈殿調製法と比較して卓越した性能を実現する miRNeasy Kit

幅広い細胞数の Jurkat 細胞から miRNeasy Mini Kit あるいはフェノール抽出と沈殿による RNA 調製法を用いて miRNA を含むトータル RNA を精製した。精製した RNA を miRNA miR-16 のリアルタイム定量 RT-PCR アッセイのテンプレートとして使用した。結果は miRNeasy Kit による精製 RNA がより低い C_t 値であったことを示しており、miRNeasy Kit がフェノール抽出・沈殿調製法に比べてより高い収量で miRNA を精製できたことを示唆している。miRNeasy Kit を用いてわずか 1 x 10² 個の細胞から miRNA を効率的に精製できた。しかしフェノール抽出・沈殿調製法では 1 x 10² 個の細胞から 40 サイクルの PCR 増幅後にも miRNA は検出されなかった。

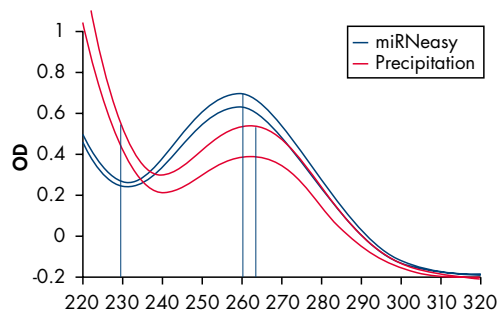


図 19. フェノールが混入していない高純度 RNA

miRNA を含むトータル RNA を Jurkat 細胞 (1 x 10⁶ 個) から miRNeasy Mini Kit あるいはフェノール抽出・沈殿調製法を用いて RNA を精製した。吸光度スペクトルは miRNeasy Kit で精製した RNA の最大 OD が 260 nm であることを示した。しかし、フェノールを用いた精製では 260 nm 以上に最大 OD 値があり、フェノールの混入を示唆している。さらに、230 nm での OD 値が沈殿を利用して調製した RNA でより高いことから、塩類のキャリーオーバーがあることを示唆している。

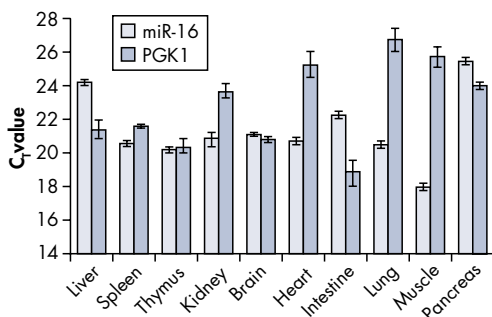


図 20. miRNA を含むトータル RNA を様々な組織から効果的に同時精製
 RNAlater® で安定化した様々なラット組織 (25 mg) から miRNeasy 96 Kit を用いて miRNA を含むトータル RNA を精製した。miR-16 および PGK1 遺伝子のリアルタイム定量 RT-PCR アッセイのテンプレートとして精製した RNA を用いた。これらの結果は同じ溶出液から PGK1 mRNA (高分子 RNA) と miRNA miR-16 の両方の検出に成功したことを示している。

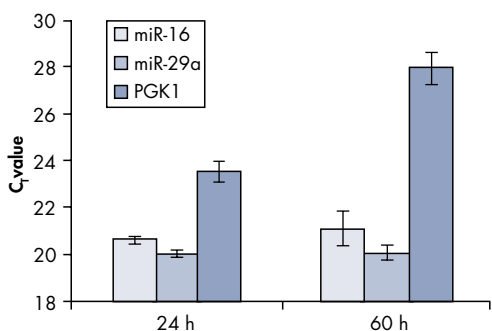


図 21. FFPE 組織由来 miRNA の効率的なリアルタイム定量 RT-PCR
 ラット肝臓組織をホルマリンで 24 時間あるいは 60 時間固定し、miRNeasy FFPE Kit を用いて miRNA を含むトータル RNA の精製を行なった。miRNA miR-16 および miR-29a、PGK1 遺伝子の mRNA を検出するために、miScript PCR System を用いたリアルタイム定量 RT-PCR のテンプレートとして精製した RNA を用いた。固定の時間が長いと RNA の分解度が高くなり、特に長いアンプリコンへの影響が大きいことが明確であった。これらの結果は、同じ溶出液から 2 種類の miRNA と mRNA の検出に成功したことを示している。

細胞および組織からの効果的な精製

miRNeasy Mini、Micro、96 Kits は、使用できるサンプル量が少量の組織および細胞からさえ効率的な RNA 精製を実現し、また溶解困難な組織を含む様々な組織や細胞からの RNA 精製も可能です。miRNA を含むトータル RNA を精製できるため、標的 mRNA、リファレンスとしてのハウスキーピング遺伝子、あるいは関心のある他の mRNA の発現レベルと miRNA の発現レベルを直接比較できます (図 20)。

血清／血漿からの遊離 miRNA 精製

遊離 miRNAs は異なるがんや糖尿病のような疾病を判定するバイオマーカーとして利用できる可能性を秘めています。いくつかのがんでは、血清や血漿から精製した RNA を用いて数種類の miRNA の発現変異が観察されました。miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いて微量の血漿や血清からトータル RNA を精製できます。miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control は血清や血漿サンプルからサンプル調製を行なう際の標準化のための合成 spike-in control です。精製した RNA は miScript PCR System と共にバイオマーカーの検索に使用できます。

FFPE 切片からの高品質な RNA 精製

クロスリンクや断片化は FFPE 切片から核酸を精製する際に大きな問題となります。miRNeasy FFPE Kit は RNA のホルマリンクロスリンクを遊離し効率的に RNA を精製する一方、RNA が更に分解しないように、特別の溶解条件およびインキュベーション条件を用いています。DNase と DNase 反応を最適化する DNase Booster Buffer を用いて RNA を処理することで、リアルタイム RT-PCR のようなアッセイを阻害する可能性がある微量の小さな DNA フラグメントも除去できます。miRNeasy FFPE Kit と miScript PCR System を用いることで FFPE サンプルに保存されているトータル RNA の有用な発現データを利用することが可能です (図 21 および 7 ページ、図 6)。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.
miRNeasy Mini Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	217004
miRNeasy Micro Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	217084
miRNeasy Serum/Plasma Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	217184
miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control	10 pmol <i>C. elegans</i> miR-39 miRNA mimic spike-in control for serum/plasma samples	219610
miRNeasy 96 Kit (4)	Columns, plasticware, and reagents for 4 x 96 preps	217061
miRNeasy FFPE Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	217504
PAXgene Tissue miRNA Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	766134
PAXgene Blood miRNA Kit (50)	Columns, plasticware, and reagents for 50 preps	763134
QIAsymphony PAXgene Blood RNA Kit (96)	Reagent cartridges, accessories, and buffers for 96 preps	762635
miScript II RT Kit (12)	Reagents for 12 x 20 µl cDNA synthesis reactions	218160
miScript II RT Kit (50)	Reagents for 50 x 20 µl cDNA synthesis reactions	218161
miScript SYBR Green PCR Kit (200)	Reagents for 200 x 50 µl PCRs	218073
miScript SYBR Green PCR Kit (1000)	Reagents for 1000 x 50 µl PCRs	218075
miScript PCR Starter Kit (80)	Reagents for 12 x 20 µl cDNA synthesis reactions and 80 x 25 µl PCRs	218193
miScript Primer Assay (100)	miRNA-specific primer for 100 x 50 µl PCRs	Varies*
miScript Precursor Assay (100)	Precursor-specific primer pair for 100 x 50 µl PCRs	Varies*
miRNome miScript miRNA PCR Array	miRNome panels of miRNA assays	331222
miScript miRNA PCR Array	Pathway or disease panels of miRNA assays	331221
Custom miScript miRNA PCR Array	Custom panels of miRNA assays	331231
miScript miRNA Mimic	1 nmol, 5 nmol, or 20 nmol mimic	Varies*
miScript miRNA Inhibitor	1 nmol, 5 nmol, or 20 nmol inhibitor (option of phosphorothioate modification)	Varies*
miScript Target Protector	5 nmol target protector	Varies*

* これらの製品の検索・ご注文は www.qiagen.com/GeneGlobe からお願いします。

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

miRNA に関するイノベティブなサンプル調製およびアッセイテクノロジーは www.qiagen.com/miRNA をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, QIAcube™, QIAsymphony™, GeneGlobe®, miScript™, QuantiTect®, Rotor-Gene™, Rotor-Disc™ (QIAGEN Group); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Roche®, LightCycler® (Roche Group); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Agilent®, Stratagene® (Agilent Technologies); Bio-Rad®, iCycler®, Chromo4™, CFX96™, DNA Engine Opticon®, CFX384™, iQ™, MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); ABI™, Applied Biosystems®, StepOnePlus™, ViiA™, SYBR® (Life Technologies Corporation); Excel® (Microsoft, Inc.).

"RNAlater®" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。2301993 05/2012 © 2012 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

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

