

TaqMan Advanced miRNA Assays— 優れた性能で miRNA を検出・定量

このホワイトペーパーでは、Applied Biosystems™ TaqMan® Advanced miRNA Assaysが提供する以下の利点を記載しています：

- 簡単なワークフローでmiRNAを解析
- 相同性の高いmiRNA間の1塩基の違いを識別
- 低量のmiRNAを優れた感度で検出
- 血清内におけるわずかな発現量の差を高精度で測定

細胞は多様なメカニズムを用いて、自身のゲノム機能を調節しています。マイクロRNA (miRNA) は比較的近年の発見にもかかわらず、今や遺伝子発現を調節する因子として認識されています。miRNAは、幅広い細胞機能における転写後の遺伝子制御に関わり、多量に偏在している内在性の短いノンコーディングRNAに分類されています [1,2]。miRNAの発現パターンは、細胞代謝や細胞内シグナル伝達、細胞分裂や細胞死など、多くの重要な生物学的プロセスと関連しています [1]。そのため、miRNA発現量の変化は、がん [3]、アルツハイマー病 [4]、免疫関連疾患およびその他多くの疾病の発症や進展と関連付けられています [1]。

miRNAはヒトの健康問題と関連付けられていることから、ここ10年ほどでmiRNA関連研究への関心が高まると同時に、増大する発見された配列を検出し、機能特徴づけるための優れた感度と特異性を持つツールの要求も高まっています。リアルタイムPCRは、その感度と特異性から、miRNAの発現定量を行う際の選択肢となります [5,6]。しかしながらmiRNAは、配列が22塩基と短く、非常に高い配列相同性を有していることから、近縁のmiRNAを正確に検出・識別することが難しく、リアルタイムPCR法で、miRNAをターゲットとするのは困難な場合があります [5,6]。また、循環型miRNAを血漿、血清、脳脊髄液 (CSF)

などの体液におけるバイオマーカーとして用いることへの関心が高まっていますが、これには感度や検出限界に関連する、また別の課題があります [7]。

miRNAを確実に定量するリアルタイムPCRとして、もっともよく知られている方法の一つがApplied Biosystems™ TaqMan® MicroRNA Assaysで、cDNA合成用のターゲット特異的なステムループプライマーと、一般的に合成されたcDNAを用いたTaqMan Probeベースのケミストリーに基づいています。現在さまざまなqPCRに基づく解析手法が利用可能ですが、感度や特異性が十分でない、ワークフローが複雑、対応する機器・ソフトウェアが限られているなどの課題があります。こうした課題に対処するため、当社はユニバーサルな逆転写 (RT) ステップと、優れた感度・特異性を備えたTaqMan®プローブベースのケミストリーを含むワークフローを開発しました (図1)。このワークフローでは、Applied Biosystems™ TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kitを用いて、3'末端へのポリ (A) 鎖の付加および5'末端へのアダプター配列のライゲーションを行い、ターゲット特異的ではなく、サンプル内に存在するすべての成熟miRNAを全般的に逆転写させます。特異的なTaqMan Advanced miRNA Assaysを用いた検出の前に、cDNAは全体的なmiRNAの相対的発現比率を維持しながら、低発現のターゲットmiRNAを最大限に検出するために、ユニバーサルなmiR-Ampプライマーを用いて増幅されます。この重要なステップにより、配列の特異性に影響されることなく、アッセイの感度が大幅に向上します。さらに、TaqMan Advanced miRNA Assaysは、さまざまなqPCR機器における標準的なプロトコルで使用可能で、幅広い解析ソフトウェアの既存のパラメータを用いてデータ解析が可能です [8]。

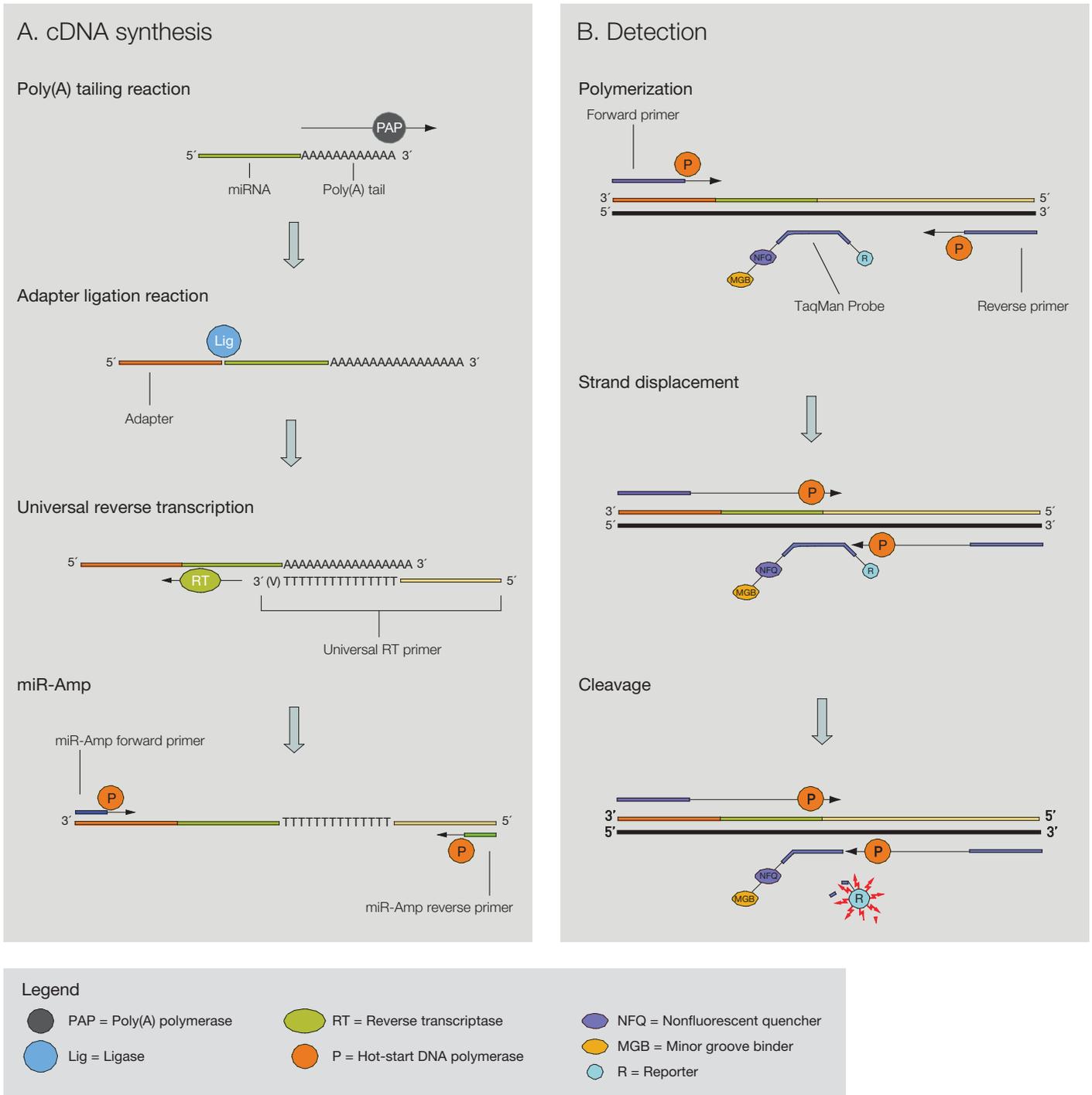


図1. TaqMan Advanced miRNA Assay ワークフロー。 (A) cDNA合成ワークフローでは、3'末端へのポリ(A)鎖付加および5'末端へアダプター配列のライゲーションのステップの後、ユニバーサルなRTプライマーによる逆転写を行います。その後、qPCRによる検出前にオプションでmiR-Amp反応を行い、miRNA cDNAを均一に増幅させます。(B) 各TaqMan Advanced miRNA Assayは、フォワードプライマーとリバースプライマーの結合部位の間の相補的な配列に特異的に結合するminor groove binder (MGB)プローブを採用しています。このMGB修飾は、プローブの長さを増加させることなく、融解温度を上昇させるため、より短いプローブの設計が可能です。反応前のプローブは、非蛍光クエンチャー (NFQ) がレポーター色素に近接しているためレポーター蛍光が抑制されます。プライマー伸長中にDNAポリメラーゼによりプローブが分解され、NFQとレポーター色素が離れることで、レポーターからの蛍光が増加します。注：プライマーおよびプローブの結合部位は、特異性を最大化するようにデザインされておりアッセイごとに異なります。

TaqMan Advanced miRNA Assaysの性能は、Mestdagh et al.と同様、一連の標準実験により、評価しました [9]。具体的には、保存性の高いlet-7 miRNAファミリー間の交差反応の測定により特異性を、段階希釈実験により検出限界を、血清中のmiRNA濃度のわずかな差を測定することで精度を評価しました。

TaqMan Advanced miRNA Assaysは相同性の高いmiRNA間の1塩基の違いを識別

miRNAは非常に配列相同性が高く、ほぼ同一の配列を有する高度に保存されたファミリーに分類されます。miRNAは、通常3' UTRに位置する7塩基長の相補的な領域に結合することにより、標的のmRNAを制御します。miRNAの5'末端の2-7塩基（シード領域）における相補性が、標的mRNAを認識するうえでの主要な決定要因となります。miRNAのこの領域における1塩基の違いにより、標的mRNAの範囲が50%以上変化する可能性が明らかになっています [10]。そのため、相同性の高いmiRNAの研究においては、使用するツールが、誤った結果につながりかねないため、交差反応を回避する識別力を確実に備えていることが重要です。

Mestdagh et al. [8] に記載されたプロトコルに基づき、合成した標的配列をバクテリオファージMS2 RNA (5×10⁶ copies/μg RNA) に添加して、4種類のhsa-let-7 miRNAファミリー間（表1）におけるTaqMan Advanced miRNA Assaysの交差性を試験しました。リアルタイムPCRの測定にはApplied Biosystems™ ViiA™ 7 Real-Time PCR Systemを使用しました。検出下限をC_t値35に設定しました。アッセイとターゲットの各組み合わせについての反復試験の結果から、完全一致の

表1. TaqMan Advanced miRNA Assaysの特異性検証に使用した相同性の高いhsa-let-7標的配列と対応するアッセイ

hsa-let7 family member	miRNA sequence	製品番号
hsa-let-7a-5p	UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U	478575_mir
hsa-let-7b-5p	UGA GGU AGU AGG UUG UGU GGU U	478576_mir
hsa-let-7c-5p	UGA GGU AGU AGG UUG UAU GGU U	478577_mir
hsa-let-7d-5p	AGA GGU AGU AGG UUG CAU AGU U	478439_mir

表2. 完全一致の結果をもとに算出したTaqMan Advanced miRNA Assaysによる各hsa-let-7ファミリーにおける交差反応率

Assay	Target			
	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7d-5p
hsa-let-7a-5p	100	0	0	0
hsa-let-7b-5p	0	100	0	0
hsa-let-7c-5p	1.5	0.1	100	0
hsa-let-7d-5p	0	0	0	100

表3. ヒト肝臓由来のtotalRNAの段階希釈による検出限界の評価に使用したTaqMan Advanced miRNA Assays

miRNA name	Relative expression in liver	miRNA sequence	製品番号
hsa-miR-16-5p	High	UAGCAGCAGCUAAAUUUGGCG	477860_mir
hsa-miR-21-5p	High	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	477975_mir
hsa-miR-141-3p	Medium	UAAACACUGUCUGGUAAGAUGG	478501_mir
hsa-miR-130b-5p	Low	ACUCUUUCCUGUUGCACUAC	477899_mir

miRNAに対して交差性を計算し、比較しました。すべてのTaqMan Advanced miRNA Assayのデザインは、一定の性能と、相同性の高い配列間において高い特異性を備えるApplied Biosystems™ TaqMan® Assayデザイン基準を活用しました。

TaqMan Advanced miRNA Assaysでは、ほとんどの組み合わせにおいて交差反応がまったく見られませんでした（表2）。hsa-let-7cは1塩基（G/A）異なるhsa-let-7aと2%未満の交差性となりました。それに対し、別のqPCRに基づく検出系では、17%までの交差性が見られました [11]。このことから、TaqMan Advanced miRNA Assaysは、1つのヌクレオチドの違いしかない近縁のmiRNA配列の識別が可能であることが示されます。

TaqMan Advanced miRNA Assaysは高感度で低量のmiRNAを検出

RT-qPCRは、miRNA定量の感度においてゴールドスタンダードと言えますが、miRNAの配列の長さ、配列の高い相同性から、低量のmiRNAの信頼性高い検出は困難な場合があります [5,6]。TaqMan Advanced miRNA Assay ワークフローは、独自のmiR-Ampによるユニバーサルな増幅行程と、実績のあるTaqMan Assayデザインとケミストリーを組み合わせしており、わずか1 pgのRNAから一貫性のある信頼性の高い検出・定量を可能にしています。このレベルの精度は、循環型miRNA量が限られている非侵襲のバイオマーカー探索などのような困難な研究において求められます [7]。

検出限界を、10 ng、1 ng、100 pg、10 pgおよび1 pgと段階希釈したInvitrogen™ Human Liver Total RNAと、肝臓での発現量をもとに選択した4種類のアッセイ（表3）を用いて評価しました。TaqMan Advanced miRNA Assaysと他社microRNAアッセイをプロトコルに従い、並行して比較しました [12]。

各アッセイとすべての希釈段階の結果を通じて、TaqMan Advanced miRNA Assaysは、同等の他社microRNAアッセイと比較して低いC_t値を示し、全般的により優れた感度が得られました（図2）。さらに、hsa-miR-141-3pアッセイにおいて一部の希釈段階サンプル（100 pg、10 pg、1 pg）で他社microRNAアッセイは増幅せず、hsa-miR-16アッセイに

おいて1 pgのサンプルで、他社microRNAアッセイはhas増幅を示しませんでした。また、TaqMan Advanced miRNA Assaysはテクニカルレプリケート（n=3）でも優れた再現性を示し、特に低発現のhsa-miR-130b-5pの最低濃度において、一貫して小さい標準偏差を示しました（表4）。TaqMan Advanced miRNA Assaysのより優れた感度と変動性の低さは、さまざまな希釈段階とターゲットを、低発現のmiRNAをより確実に同定できることを示すものです。一方、他社microRNAアッセイは感度が低く、偽陰性のデータが生じる可能性や生物学的プロセスに誤解につながる可能性があります。

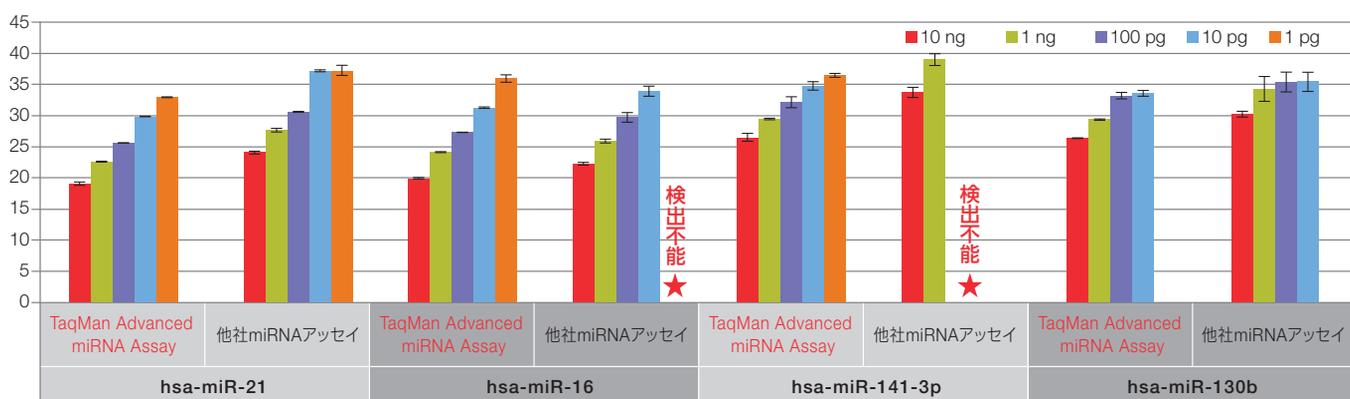


図2. 段階希釈したヒト肝臓由来のtotalRNAの増幅。ターゲットの相対的発現量（高、中、低）をもとに選択した4種類のアッセイすべてで、TaqMan Advanced miRNA Assaysは他社microRNAアッセイと比較してより優れた感度を示しました。また、増幅のばらつきもすべてのTaqMan Advanced miRNA Assaysにおいてわずかでした。エラーバーは3反復から算出された標準偏差を示します。

表4. 段階希釈したヒト肝臓由来のtotalRNAのC_t値と標準偏差

RNA input	hsa-miR-21				hsa-miR-16				hsa-miR-141-3p				hsa-miR-130b-5p			
	TaqMan Advanced miRNA Assay		他社miRNAアッセイ		TaqMan Advanced miRNA Assay		他社miRNAアッセイ		TaqMan Advanced miRNA Assay		他社miRNAアッセイ		TaqMan Advanced miRNA Assay		他社miRNAアッセイ	
	Ct	SD	Ct	SD												
10 ng	19.06	0.28	24.09	0.23	19.91	0.11	22.27	0.25	26.50	0.58	33.71	0.78	26.36	0.08	30.19	0.47
1 ng	22.60	0.04	27.65	0.29	24.11	0.07	25.95	0.30	29.46	0.06	39.00	NA	29.37	0.11	34.26	1.97
100 pg	25.63	0.01	30.59	0.07	27.34	0.00	29.70	0.77	32.12	0.87	ND	NA	33.18	0.51	35.40	1.55
10 pg	29.79	0.08	37.24	0.15	31.27	0.09	33.88	NA	34.78	0.64	ND	NA	33.58	0.45	35.45	NA
1 pg	32.91	0.05	37.24	0.79	35.95	0.64	ND	NA	36.40	0.28	ND	NA	ND	NA	ND	NA

ND 検出せず、増幅なし
 増幅 C_t >35
 : 増幅せず、検出不可
 : Ct値 35以上
 : Ct値 1レプリケートのみのため、計算不能

*C_t値が得られたのが1レプリケートのみのため、SDは計算できず。

miRNA 定量において新たなスタンダードを確立

ここ20年ほどでmiRNAの研究は急速に広がり、数多くの重要な生物学的プロセスにおいて、遺伝子を包括的に制御する非翻訳性のmiRNAの大きな重要性がより理解されるようになりました [11]。さらには、体液内の循環型miRNAの存在と、その発現が病態と関係することが明らかになり、バイオマーカーや将来の診断ツールとして活用される可能性を生み出しています [7]。高感度で安定した効率的なmiRNAのリアルタイムPCR反応を可能にするTaqMan Advanced miRNA Assaysは、現在および将来の研究アプリケーションを支える可能性があることを実証しました。TaqMan Advanced miRNA Assay ワークフローは、1塩基の違いまでを識別する優れた特異性と、増幅バイアスがない高い感度を提供し、miRNAに対するリアルタイムPCR検出の新たなスタンダードを確立するために特別にデザインされました。

参考文献

1. Li Y, Kowdley KV (2012) MicroRNAs in common human diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10:246–253.
2. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297.
3. Lu J, Getz G, Miska EA et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838.
4. Nunez-Iglesias J, Liu CC, Morgan TE et al. (2010) Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 5:e8898.
5. Redshaw N, Wilkes T, Whale A et al. (2013) A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. *Biotechniques* 54:155–164.
6. Chen C, Tan R, Wong L et al. (2011) Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. *Methods Mol Biol* 687:113–134.
7. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J et al. (2014) Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 18:371–390.
8. TaqMan Advanced miRNA Assays user guide. Pub. No. 100027897, Rev. B.
9. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L et al. (2014) Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 11:809–815.
10. Hill CG, Jabbari N, Matyunina LV et al. (2014) Functional and evolutionary significance of human microRNA seed region mutations. *PLoS One* 9:e115241.
11. Data available at: <http://www.exiqon.com/ls/PublishingImages/Figures/let-7-discrimination.htm>
12. Qavi AJ, Kindt JT, Bailey RC (2010) Sizing up the future of microRNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 398:2535–2549.

Ordering information

製品名	サイズ	製品番号
TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	50 reactions	A28007
TaqMan Advanced miRNA Assays	250 qPCR reactions (20 µL)	A25576

詳細はこちらをご覧ください。 www.thermofisher.com/advancedmirna

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. ©2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますので予めご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.thermofisher.com/jp-tc

販売店

SDR115-A1803E

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584

営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)

[@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC