

miScript miRNA PCR Array プロトコールとトラブルシューティング

miScript II RT Kit

miScript SYBR® Green PCR Kit

miScript miRNA PCR Arrays

miScript miRNA QC PCR Array

Pathway-Focused miRNA PCR Array あるいは
miRNome miScript miRNA PCR Array を用いた
リアルタイム PCR (SYBR Green ベース) による
microRNA のプロファイリング



目次

プロトコール

リアルタイム定量 PCR のための逆転写反応	3
Mature miRNA 発現プロファイルのためのリアルタイム PCR	7
miScript miRNA PCR Array のデータ解析 — 相対定量の $\Delta\Delta C_T$ 法を使用	12
Mature miRNA のプロファイリングを実施する前の cDNA 品質管理	15
miScript miRNA QC PCR Array を用いた品質管理のための解析	18
トラブルシューティング	22

プロトコール：リアルタイム定量 PCR のための逆転写反応

実験を始める前の重要事項

- miScript II RT Kit には 2 種類の 5 倍濃縮バッファー (5x miScript HiSpec Buffer と 5x miScript HiFlex Buffer) が入っています。Pathway-Focused miRNA PCR Array あるいは miRNome miScript miRNA PCR Array を用いて **mature miRNA** プロファイリング用の **cDNA** を調製するためには、**5x miScript HiSpec Buffer** のみを使用してください (mature miRNA、small noncoding RNA、precursor miRNA、mRNA の同時定量のために miScript HiFlex Buffer を用いた逆転写反応プロトコールは、miScript PCR System Handbook を参照)。
- miRNA を含むトータル RNA をスタートサンプルとして使用してください。RNA 精製に関しては英語版 Handbook 24 ページをご覧ください。本プロトコールは 2 µg までの RNA に適しています。RNA 量が多い場合は、反応溶液の量をスケールアップしてください。推奨するスタートサンプル量は表 3 をご覧ください。RNA を初めて調製する場合には Appendix B (英語版 Handbook 51 ページ) をお読みください。
- RNA 分解のリスクを最小限に抑えるために全ての反応溶液は氷上でセットアップします。
- テンプレート RNA または miScript II RT Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。

表 3. 逆転写反応に推奨する RNA 量ならびにバッファー

PCR アプリケーション	Assay	Buffer	RNA 推奨量 *†
mature miRNA の パスウェイ・プロ ファイリング	Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays	5x miScript HiSpec Buffer	125 ~ 250 ng / RNA サンプル
mature miRNA の 全 miRNome プロ ファイリング	miRNome miScript miRNA PCR Arrays	5x miScript HiSpec Buffer	384 ウェルプレート あるいは 4 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc™ あたり 250 ~ 500 ng (miRNome miScript miRNA PCR Array に 付属のプレート数は 生物種により異なる) ‡

* RNA サンプル量に制限がない場合は、推奨範囲の上限量を使用する。

† これらの推奨 RNA スタート量を用いて得られる cDNA は、アレイウェルあたり 0.5 ~ 1 ng になる。

‡ RNA スタート量により異なるが、1 回の逆転写反応で、8 x 384 ウェルプレートあるいは 32 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc に十分な cDNA が得られる。

操作手順

1. **テンプレート RNA を氷上で解凍する。RNase フリー水、10x miScript Nucleics Mix、5x miScript HiSpec Buffer を室温 (15 ~ 25°C) で解凍する。**

チューブを指で弾いて各溶液を混和します。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンし、氷上で保冷します。

2. **表 4 に従い、氷上で逆転写反応液を調製する。**

穏やかに混和し、氷上で保冷します。逆転写反応マスターミックスには、一本鎖 cDNA 合成に必要な全ての成分がテンプレート RNA を除いて含まれています。

注：miScript Reverse Transcriptase Mix は、マスターミックスの調製直前にフリーザー (-20°C) から取り出し、穏やかに混和して氷上で保冷します。使用後は即座にフリーザーに戻してください。

注：2 反応液以上をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の 10% 増しでマスターミックスを調製します。

表 4. 逆転写反応成分

成分	容量／反応
5x miScript HiSpec Buffer	4 μ l
10x miScript Nucleics Mix	2 μ l
RNase フリー水	適量
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μ l
テンプレート RNA (ステップ 3 で添加)	適量 (表 3 の推奨量を参照)*
トータル容量	20 μl

* "QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit"を用いて調製した血清あるいは血漿サンプル由来の RNA を使用する場合は、スタートサンプル量として 5 μ l の RNA 調製液を Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array と使用することを推奨。

3. 逆転写反応マスターミックスが入った各チューブにテンプレート RNA を添加する。穏やかに混和後スピンドウンして、氷上で保冷する。
4. 37°C で 60 分間インキュベートする。
5. 95°C で 5 分間インキュベートして miScript Reverse Transcriptase Mix を不活化し、氷上に置く。
6. 表 5 に従って RNase フリー水で cDNA を希釈し、すぐにリアルタイム PCR を開始する。

リアルタイム PCR 実施前に逆転写反応液を保存する場合には、未希釈の cDNA を -20°C のフリーザーに入れるか、希釈した cDNA を扱いやすい量に分注して -20°C のフリーザーで保存してください。

表 5. PCR 実施前に行なう cDNA 希釈

PCR アプリケーション	Assay	反応液の希釈
パスウェイ・ プロファイリング	Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays	200 μ l の RNase フリー水を 20 μ l の逆転写反応液に添加する。
全 miRNome プロファイリング	miRNome miScript miRNA PCR Arrays	<p>希釈は、miRNome miScript miRNA PCR Array のプレート / Rotor-Disc の数により異なる：</p> <p>1 x 384 ウェルプレートあるいは 4 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc : 90 μl の RNase フリー 水を 20 μl の逆転写反応液に添加 する。</p> <p>2 x 384 ウェルプレートあるいは 8 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc : 200 μl の RNase フリー 水を 20 μl の逆転写反応液に添加 する。</p> <p>3 x 384 ウェルプレートあるいは 12 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc : 310 μl の RNase フリー 水を 20 μl の逆転写反応液に添加 する。</p> <p>4 x 384 ウェルプレートあるいは 16 x 96 ウェルプレート / Rotor-Disc : 420 μl の RNase フリー 水を 20 μl の逆転写反応液に添加 する。</p>

プロトコール: mature miRNA 発現プロファイルのためのリアルタイム PCR

miScript II RT Kit と miScript HiSpec Buffer で調製した cDNA は、本プロトコールの最適なスタートサンプルです。このプロトコールは、miScript miRNA PCR Array と、miScript Universal Primer (reverse primer) および QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix の入った miScript SYBR Green PCR Kit を組み合わせて、mature miRNA のリアルタイム PCR プロファイリングを実現します。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップは、**まず 95°C で 15 分のインキュベーションにより HotStarTaq DNA Polymerase (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に含まれる) を活性化します。**
- miScript HiSpec Buffer を用いて調製したテンプレート cDNA のみをこのプロトコールで使用してください。
- 20 µl の cDNA 合成反応液を適切に希釈したことを確認してください。6 ページの表 5 の推奨量を参照してください。
- テンプレート cDNA あるいは miScript SYBR Green PCR Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。
- 標準の miScript miRNA PCR Array 反応容量は、384 ウェルプレートでウェルあたり 10 µl、96 ウェルプレートでウェルあたり 25 µl、100-well Rotor-Disc でウェルあたり 20 µl です。
- miScript SYBR Green PCR Kit (200) には少なくとも 2 x 384 ウェルアレイ、3 x 96 ウェルアレイ、4 x Rotor-Disc 100 アレイに十分な量の試薬が入っています。miScript SYBR Green PCR Kit (1000) には少なくとも 11 x 384 ウェルアレイ、18 x 96 ウェルアレイ、22 x Rotor-Disc 100 アレイに十分な量の試薬が入っています。
- iCycler iQ®、iQ5 または MyiQ™ を使用する際は、各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアル、あるいは www.qiagen.co.jp で “Technical Information : Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad® cyclers” をご覧ください。
- miScript miRNA PCR Array を実施する前に、miScript miRNA QC PCR Array により cDNA サンプルの品質を評価することができます(15 ページのプロトコール参照)。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix**、**10x miScript Universal Primer**、テンプレート cDNA、RNase フリー水を室温（15 ~ 25°C）で解凍する。各溶液を混和する。
2. 表 6（**Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array**）あるいは表 7（**miRNome miScript miRNA PCR Array**）に従って反応ミックスを調製する。完全に、かつ穏やかに混和する。

ホットスタート PCR 法のため、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

表 6. Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array 用反応ミックス *

アレイフォーマット：	384 ウェル (4 x 96)	96 ウェル	Rotor-Disc 100
成分	Formats E、G [†]	Formats A、C、D、F	Format R
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [‡]	550 µl	1,375 µl	1,100 µl
10x miScript Universal Primer	110 µl	275 µl	220 µl
RNase フリー水	340 µl	1,000 µl	780 µl
テンプレート cDNA [§]	100 µl	100 µl	100 µl
トータル容量	1,100 µl	2,750 µl	2,200 µl

* これらの容量は、384 ウェルプレートでウェルあたり 10 µl の反応容量、96 ウェルプレートでウェルあたり 25 µl、100-well Rotor-Disc でウェルあたり 20 µl の反応容量になる。

[†] 表示した容量は 1 種類のテンプレート cDNA に十分。アッセイは quadruplicate で配列されているので、トータルで 4 種類の cDNA テンプレートを 1 枚の 384-well Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array で解析可能（英語版 Handbook 16 ページ、Figure 4 参照）。

[‡] Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

[§] ウェルあたり 0.5 ~ 1 ng の cDNA。

表 7. miRNome miScript miRNA PCR Array 用反応ミックス * †

アレイフォーマット： 成分	384 ウェル Formats E、G [†]	96 ウェル Formats A、C、D、F	Rotor-Disc 100 Format R
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [‡]	2,050 µl	1,375 µl	1,100 µl
10x miScript Universal Primer	410 µl	275 µl	220 µl
RNase フリー水	1,540 µl	1,075 µl	855 µl
テンプレート cDNA [§]	100 µl	25 µl	25 µl
トータル容量	4,100 µl	2,750 µl	2,200 µl

* miRNome セットのプレートあるいは Rotor-Disc 1 枚あたりの容量を示す。miRNome セットのプレート数は生物種により異なる。プレート / Rotor-Disc の数により容量をスケールアップする。miRNome セットがプレート / Rotor-Disc の半分未満の場合は、適宜スケールダウンする。

† これらの容量は、384 ウェルプレートでウェルあたり 10 µl の反応容量、96 ウェルプレートでウェルあたり 25 µl、100-well Rotor-Disc でウェルあたり 20 µl の反応容量になる。

‡ Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

§ ウェルあたり 0.5 ~ 1 ng の cDNA。

3. 密封バッグから miScript miRNA PCR Array を慎重に取り出す。

96 ウェルおよび 384 ウェルアレイフォーマットでのオプション：反応ミックスをチューブ中で調製した場合は、RT² PCR Array Loading Reservoir (cat. no. 338162) などの loading reservoir に移し変えます。

4. 以下のように反応ミックスを miScript miRNA QC PCR Array の各ウェルに添加する。

注：384 ウェルおよび 96 ウェルアレイフォーマットに関しては、マルチチャンネルピペッターを使用して反応ミックスをアレイに添加することができます。Rotor-Disc 100 フォーマットに関しては、連続分注ピペットあるいは QIAgility™ を使ってアレイにアプラインすることが可能です。

384 ウェル miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 10 µl 添加。

96 ウェル miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 25 µl 添加。

Rotor-Disc miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 20 µl 添加。

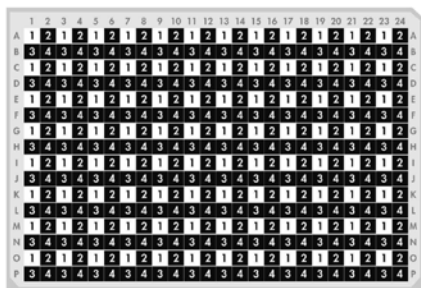
384 ウェル (4 x 96) Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays へのアプライン：

注：各 Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array には 96 アッセイが 4 回繰り返しアレイされているので、4 サンプルの解析に使用できます。スタンダードのマルチチャンネルピペッターに一つ置きにチップをセットすることで、各サンプルを添加する際に行または列をスキップできます。マルチチャンネルピ

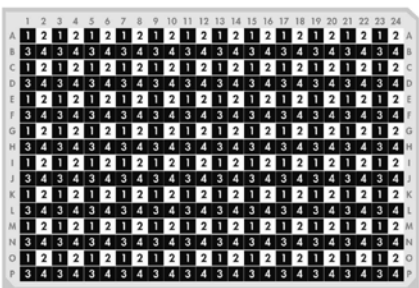
ベッターおよび 384EZLoad Covers (付属) を用いて、正しいウェルセットに各サンプルをロードしたことを確認してください。図 10 を参照してください。384EZLoad Cover を再使用しないでください。

- 384EZLoad Cover 1 (白色) をプレートにセットする。サンプル 1 用の 10 μ l の反応ミックスをオープンウェル (A、C、E、G、I、K、M、O 列の奇数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 1 を取り除き廃棄する。
- 384EZLoad Cover 2 (黄色) をプレートにセットする。サンプル 2 用の 10 μ l の反応ミックスをオープンウェル (A、C、E、G、I、K、M、O 列の偶数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 2 を取り除き廃棄する。
- 384EZLoad Cover 3 (黒色) をプレートにセットする。サンプル 3 用に 10 μ l の反応ミックスをオープンウェル (B、D、F、H、J、L、N、P 列の奇数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 3 を取り除き廃棄する。
- 384EZLoad Cover 4 (赤色) をプレートにセットする。サンプル 4 用に 10 μ l の反応ミックスをオープンウェル (B、D、F、H、J、L、N、P 列の偶数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 4 を取り除き廃棄する。

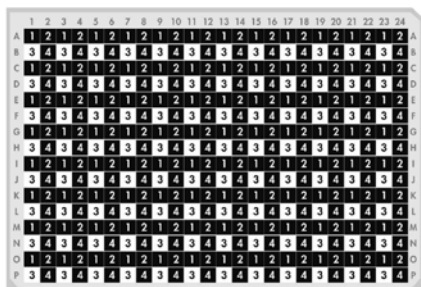
サンプル 1 用の Cover 1 (白色)



サンプル 2 用の Cover 2 (黄色)



サンプル 3 用の Cover 3 (黒色)



サンプル 4 用の Cover 4 (赤色)

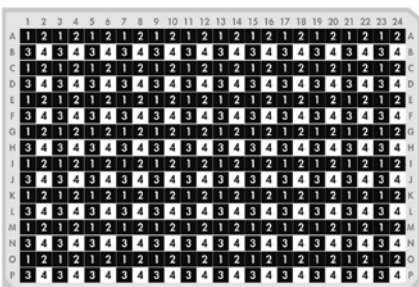


図 10. プレートフォーマット E および G (384 ウェル) の Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array へのアプライ

各 4 種類のサンプル用反応ミックス 10 μ l を、図に表記されているように同じ番号をもつ千鳥配置のウェルに添加する。

5. **Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (Formats A および D)、Optical Adhesive Film (Formats C、E、F、G)、あるいは Rotor-Disc Heat-Sealing Film (Format R) で miScript miRNA PCR Array を慎重にしっかりと密封する。**
6. **PCR プレート**を室温 (15 ~ 25°C) で **1,000 g**、1 分間遠心操作して、気泡を除去する。
注：本ステップは Rotor-Disc での反応セットアップには不要です。
7. **表 8 に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムする。**
注:PCR 産物の特異性と同一性を確認するために、解離曲線解析を行いません。解離曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。

表 8. リアルタイム PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期の活性化 ステップ	15 分	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase はこの加熱ステップにより活性化
3 ステップ サイクリング：*†‡			
変性	15 秒	94°C	
アニーリング	30 秒	55°C	
エクステンション§	30 秒	70°C	蛍光データの収集を行なう
サイクル数	40 cycles¶		サイクルの数はテンプレート cDNA の量とターゲットの量に依存する。

* Bio-Rad models CFX96™および CFX384™に関しては ramp rate を 1°C /s にする。

† Eppendorf® Mastercycler® ep realplex models 2、2S、4、4S の Silver Thermoblock は ramp rate を 26%、Aluminum Thermoblock は ramp rate を 35%にする。

‡ Roche® LightCycler® 480 を使用する場合は、ramp rate を 1°C /s にする。

§ 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM® 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems® 7300 および 7500 では 34 秒間で行なう。

¶ Roche LightCycler 480 を用いる場合は、45 サイクルを使用する。

8. **プレート / Rotor-Disc をサーマルサイクラーにセットし、サイクリングプログラムをスタートする。**
9. **データ解析を行なう。**

プロトコール：miScript miRNA PCR Array のデータ解析 — 相対定量の $\Delta\Delta C_T$ 法を使用

本プロトコールでは、miScript miRNA PCR Array で得られたデータ解析のステップを記述しています。最初のステップはユーザーが実施します。後のステップは無料のデータ解析ソフトウェアにより行なわれます。miScript miRNA PCR Array 用のデータ解析ソフトウェアは <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna> で入手いただけます。miScript miRNA PCR Array のウェブベースのソフトウェアまたは miScript miRNA PCR Array Data Analysis Excel Template (データ解析の Excel® テンプレート) のいずれかにアクセスすることができます。両ツールともに、相対定量の $\Delta\Delta C_T$ 法による定量およびコントロールウェルの解釈を自動的に行ないます。結果は表、スカッタープロット、三次元プロファイル、およびボルケーノプロット (リブリケートを行なった場合) で表示されます。

実験を始める前の重要事項

- ■でマークしたテキストは、96 ウェルおよび 384 ウェルプレート (フォーマット A、C、D、E、F、および G) での操作を示します。▲でマークしたテキストは、100 ウェル Rotor-Disc (フォーマット R) での操作を示します。

操作手順

ユーザーが実施するステップ

1. ベースラインを定義する。

ベースラインは初期のサイクルにおけるノイズレベルを排除するため、通常、PCR 産物による蛍光の増加が検出されないサイクル数で設定されます。

■増幅が開始するサイクルを調べるために増幅プロットの “Linear View” をご利用ください。2 サイクルと、最初の増幅を目視可能なサイクルより 2 つ少ないサイクル数の間にベースラインをセットします。15 サイクルを超えないようにします。ベースラインを計算するために使用するサイクル数は変更でき、テンプレート量を多く使用した場合にはサイクル数を減らさなければなりません。リアルタイム PCR データの出力に関する詳細は英語版 Handbook 48 ページの Appendix A をご覧ください。

▲Rotor-Gen[™] Q に関しては、“Dynamic Tube” 設定と、“Slope Correct” および／あるいは “Ignore First” 設定を使用することを推奨します。詳細は Rotor-Gen[™] Q User Manual をご覧ください。

注：結果の比較を可能にするために、同じ実験に関連するすべての PCR ランでベースラインの設定が同じであることを確認してください。

2. Threshold 値を決定する。

Threshold 値の設定は対数表示の増幅プロットを使用するので、曲線の対数直線領域は容易に同定できます。増幅プロットの “Log View” を使用して、バックグラウンドシグナルよりも上にあり、増幅プロットの対数直線領域の半分よ

り下に Threshold 値を設定します。プラトー領域には Threshold 値を設定しないでください。Threshold 値の絶対位置よりも、PCR ランでの交差する位置が一定であることの方が重要です。

■様々な PCR 装置 (例えば Applied Biosystems 社のモデル 7500 および ViiA 7、Stratagene® 社のモデル Mx3005P と Mx3000P など) では、データを適切に解析するために、デフォルトの “Manual C_T” Threshold 値の 0.2 を低い値に調節することが必要になる場合があります。スタートポイントとして 0.02 を使用します。

▲Rotor-Gene Q に関しては、データを適切に解析するために、C_T 値を約 0.02 にすることを推奨します。

注：結果の比較を可能にするために、Threshold 値の設定は、同じ分析では、すべての PCR ランで同一であることを確認してください。

- リアルタイム PCR 装置に付属のマニュアルに従って C_T 値をエクスポートする。
- フリーのデータ解析ツールにアクセスする：
<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>

ウェブベースのソフトウェアか Excel テンプレートのどちらかを選んで、指示に従ってください。

データ解析ソフトウェアによって実行されるステップ

- ：35 より大きい、または N/A (検出されない) として報告されたすべての C_T 値は 35 に変更される。▲：33 より大きい、または N/A (検出されない) として報告されたすべての C_T 値は 33 に変更される。

この時点で、35 (■) あるいは 33 (▲) と記載されている C_T 値は、negative call としてみなされます。

- ポジティブ PCR コントロールウェル (PPC) の C_T 値を調べる。

RNA サンプルが高品質で、サイクリングプログラムは適切に実行され、Thresholds 値が正しく定義された場合は、C_T^{PPC} の値はすべてのアレイまたはサンプル間で 19 ± 2 (■) または 15 ± 2 (▲) になります。

- 逆転写反応コントロール (miRTC) の C_T 値を、ポジティブ PCR コントロール (PPC) の値を用いて、次の計算値により求める：

$$\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$$

この値が 7 未満の場合は、逆転写反応の阻害物質は存在しないことは明確なので、何もする必要はありません。この値が 7 より大きい場合、逆転写反応を阻害する不純物が存在する可能性があります。22 ページの “トラブルシューティング” を参照してください。

注： $\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$ の計算は Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array でのみ有効です。miRNome miScript miRNA PCR Array に関しては、cDNA が非常に多数のウェルに配分されているので、使用されているプレート / Rotor-Disc の枚数に応じて補正係数を計算に導入する必要があります。これは miRTC の希釈を補正します。次ページ、表 9 に示したように計算します。

表 9. miRNome miScript miRNA PCR Array の $\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ の計算

プレート / Rotor-Disc の数				
384 ウェル	96 ウェル	Rotor-Disc 100	補正係数	$\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ の計算
1	4	4	1.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.1) - (AVG C_T^{PPC})$
2	8	8	2.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.1) - (AVG C_T^{PPC})$
3	12	12	2.7	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.7) - (AVG C_T^{PPC})$
4	16	16	3.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 3.1) - (AVG C_T^{PPC})$

8. プレートでプロファイルされた各 mature miRNA の ΔC_T 値は、次の式により計算する： $\Delta C_T = C_T^{miRNA} - AVG C_T^{SN1/2/3/4/5/6}$

注：正規化のために適切な snoRNA/snRNA コントロールを選択してください。各アレイに 6 個の snoRNA/snRNA controls (SN1-6) が含まれています。選んだコントロールが実験条件により影響を受けないことを確認してください。一つ以上の snoRNA/snRNA が既に個別に同定済みの場合、また miScript miRNA PCR Array がそれらの結果を再現する場合は、上記の式でその C_T 値の平均を使用してください。適切な snoRNA/snRNA がまだ同定されていない場合は、すべての snoRNA/snRNA の平均 C_T 値を使用してください。生物学のおよび/または技術的な replicate 実験を実施する際に、各処理群の replicates のアレイを介してそれぞれの snoRNA/snRNA の (各ウェル) の平均 ΔC_T の値を計算する。

9. 2 種類の miScript miRNA PCR Array あるいは 2 サンプルの各 miRNA の $\Delta\Delta C_T$ 値を以下の計算で求める：

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (サンプル 2) - ΔC_T (サンプル 1)、ここでサンプル 1 はコントロールサンプル、サンプル 2 は実験サンプル。

10. サンプル 1 からサンプル 2 への各遺伝子の Fold-change を $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ として求める。

オプション：fold-change が 1 を超える場合は、結果が fold upregulation としてレポートされることがあります。fold-change が 1 未満の場合、結果の負の逆数が fold downregulation としてレポートされることがあります。

11. Fold-changes はデータ解析ツールにより表、スカッタープロット、三次元プロファイル、およびボルケーノプロット (リプリケートを行なった場合) などの様々なフォーマットで表示される。

プロトコール：Mature miRNA のプロファイリングを実施する前の cDNA 品質管理

miScript miRNA QC PCR Array を使用すると、miScript HiSpec Buffer を用いて調製した cDNA の品質をテストでき、時間と試薬を節約します。miScript miRNA QC PCR Array を用いた品質管理にはわずか 5 μ l の希釈 cDNA 溶液が必要です。miScript II RT Kit と miScript HiSpec Buffer で調製した cDNA は本プロトコールの最適なスタートサンプルです。本プロトコールでは、miScript miRNA PCR Array による miRNA プロファイリング実施前に、miScript SYBR Green PCR Kit と miScript miRNA QC PCR Array を用いた複数の cDNA サンプルの品質管理法について記述しています。トータルで 32 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の 384 ウェル miScript miRNA QC PCR Array で、8 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の 96 ウェル miScript miRNA QC PCR Array で、8 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の Rotor-Disc 100 miScript miRNA QC PCR Array で行なえます。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップは、**まず 95°C で 15 分のインキュベーション**により HotStarTaq DNA Polymerase (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に含まれる) を活性化します。
- miScript HiSpec Buffer を用いて調製したテンプレート cDNA のみをこのプロトコールで使用してください。
- 3 ページに従って cDNA サンプルを調製したこと、また 20 μ l の cDNA 合成反応液を適切に希釈したことを確認してください (6 ページの表 5)。
- テンプレート cDNA あるいは miScript SYBR Green PCR Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。
- 標準の miScript miRNA PCR Array 反応容量は、384 ウェルプレートで 10 μ l、96 ウェルプレートで 25 μ l、100-well Rotor-Disc で 20 μ l です。
- iCycler iQ、iQ5 または MyiQ を使用する際は、各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアルあるいは www.qiagen.co.jp で “Technical Information: Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad cyclers” をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix**、**10x miScript Universal Primer**、**テンプレート cDNA**、**RNase フリー水**を室温（15 ~ 25℃）で解凍する。各溶液を混和する。
2. 表 10 に従って反応ミックスを調製する。穏やかにかつ完全に混和する。
ホットスタート PCR 法のため、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

表 10. miScript miRNA QC PCR Array 用反応ミックス *

アレイフォーマット： 成分	384 ウェル Formats E、G [†]	96 ウェル Formats A、C、D、F [†]	Rotor-Disc 100 Format R [†]
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [‡]	75 µl	175 µl	150 µl
10x miScript Universal Primer	15 µl	35 µl	30 µl
RNase フリー水	55 µl	135 µl	115 µl
テンプレート cDNA	5 µl	5 µl	5 µl
トータル容量	150 µl	350 µl	300 µl

* これらの容量は、384 ウェルプレートでウェルあたり 10 µl の反応容量、96 ウェルプレートでウェルあたり 25 µl、100 ウェル Rotor-Disc でウェルあたり 20 µl の反応容量になる。

[†] 表示した容量は 1 種類のテンプレート cDNA に十分な量。トータルで 8 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の 96 ウェル miScript miRNA QC PCR Array で、8 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の Rotor-Disc 100 miScript miRNA QC PCR Array で、また、32 種類の cDNA サンプルの解析が 1 枚の 384 ウェル miScript miRNA QC PCR Array で行なえる。

[‡] Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

3. 密封バッグから **miScript miRNA QC PCR Array** を慎重に取り出す。
4. 以下のように反応ミックスを **miScript miRNA QC PCR Array** のウェルに添加する。
384 ウェルの miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 10 µl 添加。
96 ウェルの miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 25 µl 添加。
Rotor-Disc 100 miScript miRNA PCR Array：ウェルあたり 20 µl 添加。
5. **Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (Formats A、D)**、**Optical Adhesive Film (Formats C、E、F、G)**、あるいは **Rotor-Disc Heat-Sealing Film (Format R)** で **miScript miRNA PCR Array** を慎重にしっかりと密封する。

6. PCR プレート室温 (15 ~ 25°C) で 1,000 g、1 分間遠心操作して、気泡を除去する。

注：本ステップは Rotor-Disc での反応セットアップには不要です。

7. 表 11 に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムする。

注：PCR 産物の特異性と同一性を確認するために、解離曲線解析を行いません。解離曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。

表 11. リアルタイム PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期の活性化ステップ	15 分	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase はこの加熱ステップにより活性化
3 ステップ			
サイクリング：*†‡			
変性	15 秒	94°C	
アニーリング	30 秒	55°C	
エクステンション§	30 秒	70°C	蛍光データの収集を行なう
サイクル数	40 cycles¶		サイクルの数はテンプレート cDNA の量とターゲットの量に依存する。

* Bio-Rad models CFX96 および CFX384 に関しては ramp rate を 1°C /s にする。

† Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2、2S、4、4S の Silver Thermoblock は ramp rate を 26 %、Aluminum Thermoblock は ramp rate を 35% にする。

‡ Roche LightCycler 480 を使用する場合は、ramp rate を 1°C /s にする。

§ 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems 7300 および 7500 では 34 秒間で行なう。

¶ Roche LightCycler 480 を用いる場合は、45 サイクルを使用する。

8. プレート / Rotor-Disc をサーマルサイクラーにセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

9. データ解析を行なう。

プロトコール：miScript miRNA QC PCR Array を用いた品質管理のための解析

本プロトコールでは、miScript miRNA QC PCR Array で得られたデータ解析のステップを記述しています。最初のステップはユーザーが実施します。後のステップはデータ解析ソフトウェアにより行なわれます。miScript miRNA QC PCR Array 用のデータ解析ソフトウェアは <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna> で入手いただけます。miScript miRNA PCR Array のウェブベースのソフトウェアまたは miScript miRNA PCR Array Data Analysis Excel Template（データ解析 Excel のテンプレート）のいずれかにアクセスすることができます。両ツールともに、相対定量の $\Delta\Delta C_T$ 法による定量およびコントロールウェルの解釈を自動的に行ないます。

実験を始める前の重要事項

- ■でマークしたテキストは、96 ウェルおよび 384 ウェルプレート（フォーマット A、C、D、E、F、および G）での操作を示します。▲でマークされたテキストは、100 ウェル Rotor-Disc（フォーマット R）での操作を示します。

操作手順

ユーザーが実施するステップ

1. ベースラインを定義する。

ベースラインは初期のサイクルにおけるノイズレベルを排除するため、通常、PCR 産物による蛍光の増加が検出されないサイクル数で設定されます。

■増幅が始まるサイクルを調べるために増幅プロットの“Linear View”をご利用ください。2 サイクルと、最初の増幅を目視可能なサイクルより 2 つ少ないサイクル数の間にベースラインをセットします。15 サイクルを超えないようにします。ベースラインを計算するために使用するサイクル数は変更でき、テンプレート量を多く使用した場合にはサイクル数を減らさなければなりません。リアルタイム PCR データの出力に関する詳細は英語版 Handbook 48 ページの Appendix A をご覧ください。

▲Rotor-Gene Q に関しては、“Dynamic Tube”設定と、“Slope Correct”および／あるいは“Ignore First”設定を使用することを推奨します。詳細は Rotor-Gene Q User Manual をご覧ください。

注：結果の比較を可能にするために、ベースラインの設定は、同じ分析では、すべての PCR ランで同一であることを確認してください。

2. Threshold 値を決定する。

Threshold 値の設定は対数表示の増幅プロットを使用するので、曲線の対数直線領域は容易に同定可能です。増幅プロットの“Log View”を使用して、バックグラウンドシグナルよりも上にあり、増幅プロットの対数直線領域の半分より下に Threshold 値を設定します。プラトー領域には Threshold 値を設定しないでください。Threshold 値の絶対位置よりも、PCR ランでの交差する位置が一定であることの方が重要です。

■様々な PCR 装置 (例えば Applied Biosystems 社のモデル 7500 および ViiA 7、Stratagene 社のモデル Mx3005P と Mx3000P など) では、データを適切に解析するために、デフォルトの “Manual C_T” Threshold 値の 0.2 を低い値に調節することが必要になる場合があります。スタートポイントとして 0.02 を使用します。

▲ Rotor-Gene Q に関しては、データを適切に解析するために、C_T 値を約 0.02 にすることを推奨します。

注：結果の比較を可能にするために、Threshold 値の設定は、同じ分析では、すべての PCR ランで同一であることを確認してください。

3. リアルタイム PCR 装置に付属のマニュアルに従って C_T 値をエクスポートする。

4. フリーのデータ解析ツールにアクセスする：

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>

ウェブベースのソフトウェアか Excel テンプレートのどちらかを選んで、インストールに従ってください。

データ解析ソフトウェアによって実行されるステップ

5. ■：35 より大きい、または N/A (検出されない) として報告されたすべての C_T 値は 35 に変更する。▲：33 より大きい、または N/A (検出されない) として報告されたすべての C_T 値は 33 に変更する。

この時点で、35 (■) あるいは 33 (▲) と記載されている C_T 値は、negative call としてみなされます。

6. ポジティブ PCR コントロールウェル (PPC) の C_T 値を調べる。

RNA サンプルが高品質である場合、サイクリングプログラムは適切に実行され、Thresholds 値が正しく定義された場合は、C_T^{PPC} の値はすべてのアレイまたはサンプル間で 19 ± 2 (■) または 15 ± 2 (▲) になります。

7. 逆転写反応コントロール (miRTC) の C_T 値を、ポジティブ PCR コントロール (PPC) の値を用いて、次の計算値により求める：

$$\Delta C_T = \text{AVG } C_{T, \text{miRTC}} - \text{AVG } C_{T, \text{PPC}} - \text{補正係数}$$

この値が 7 未満の場合は、逆転写反応の阻害物質は存在しないことは明確なので、何もする必要はありません。この値が 7 より大きい場合、逆転写反応を阻害する不純物が存在する可能性があります。22 ページの “トラブルシューティング” を参照してください。

注：cDNA がダウンストリーム実験で様々な数のウェルに配分されているので、使用されているプレート / Rotor-Disc の枚数に応じて補正係数を計算に導入する必要があります。これは miRTC の希釈を補正します。次ページの表 12 に示したように計算します。

表 12. miScript miRNA QC PCR Array の $\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ の計算

cDNA の利用 アレイ種と数	補正係数	$\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ の計算
Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays	1.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全 miRNome : 1 x 384 ウェルプレート あるいは 4 x 96 ウェル プレート / Rotor-Disc	0.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 0.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全 miRNome : 2 x 384 ウェルプレート あるいは 8 x 96 ウェル プレート / Rotor-Disc	1.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全 miRNome : 3 x 384 ウェルプレート あるいは 12 x 96 ウェル プレート / Rotor-Disc	2.0	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.0) - (AVG C_T^{PPC})$
全 miRNome : 4 x 384 ウェルプレート あるいは 16 x 96 ウェル プレート / Rotor-Disc	2.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.5) - (AVG C_T^{PPC})$

8. snoRNA/snRNA controls (SN1-6) の C_T 値を調べる。

注：これらの small RNA は組織や細胞で比較的安定した発現レベルを有することが確認されています。しかし、snoRNA/snRNA コントロール C_T 値はサンプルにより変動することもあり、それらの発現が解析するサンプル全体で一定しているかを判断するためにチェックする必要があります。特定のコントロールの発現が実験サンプル全体で一定していない場合は、そのコントロールは、データの正規化には使用しないでください。種々の組織タイプに関連付けられた C_T 値の例については、www.qiagen.com/miRNAControls で miScript PCR Control のアプリケーションのデータを参照してください。

9. *C. elegans* miR-39 miScript Primer Assay C_T 値 (Ce) を調べる。

RNA 精製を実施する前にサンプルに Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic をスパイクした場合、*C. elegans* miR-39 miScript Primer Assay の C_T 値は Threshold 値を上回ります。詳細は “QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit” を参照してください (www.qiagen.com/miRNeasyMiniResources で入手可能)。

10. 上記のすべての条件が満たされている場合は、cDNA サンプルは分析のために十分な品質を有している。miScript miRNA PCR Array 実験を開始する。

トラブルシューティング

コメント

逆転写効率が低い ($AVG C_T^{miRTC} - AVG C_T^{PPC} > 7$)

- a) RNA が低品質 RNA の $A_{260} : A_{280}$ および $A_{260} : A_{230}$ の比率をチェックする。分光光度計で測定する際に必ず RNase フリーの 10 mM Tris-Cl、pH 7.5 で希釈する。必要ならばスピンカラムを利用したクリーンアップ法 (例; miRNeasy Mini Kit [cat. no. 217004]) を用いて RNA を再精製する。
- b) 計算に補正係数が含まれていない miRNome miScript miRNA PCR Array または miScript miRNA QC PCR Array を使用する場合は、14 ページの表 9、あるいは 20 ページの表 12 に記載されているように補正係数を含める。

全体的に PCR 増幅効率が低い ($AVG C_T^{PPC}$ 値の変動がアレイ間で 2 を超える、および/あるいは 96 ウェル、384 ウェルプレートで 21 を超える、または 100-well Rotor-Disc で 17 を超える)

- a) 装置の感度がばらついている 装置が異なると、感度のレベルが異なる。使用した装置で C_T^{PPC} の平均値が 96 ウェルおよび 384 ウェルで 19 ± 2 、100 ウェル Rotor-Disc で 15 ± 2 を得ることが困難な場合、比較したアレイ間でのばらつきが 2 サイクルを超えない限りは、観察された C_T^{PPC} の平均値を許容できる。
- b) HotStarTaq DNA Polymerase がホットスタートで活性化されていない 初期の熱活性化ステップを 95°C で 15 分間行なったこと、他のすべてのサイクルのパラメータをプロトコールに従って実施したことを確認する。
- c) RNA の品質が低く PCR 阻害物質を含む可能性 RNA の $A_{260} : A_{280}$ および $A_{260} : A_{230}$ の比率をチェックする。分光光度計で測定する際に必ず RNase フリーの 10 mM Tris-Cl、pH 7.5 で希釈する。必要ならばスピンカラムを利用したクリーンアップ法 (例; miRNeasy Mini Kit [cat. no. 217004]) を用いて RNA を再精製する。

コメント

リアルタイム PCR で産物がない、あるいは遅れて検出される (逆転写反応中に問題が生じていることを示唆)

- a) 逆転写反応のセットアップの際に、ピペティングエラーまたは試薬の入れ忘れ
実験のセットアップに用いたピペットをチェックする。解凍後、全ての試薬をよく混和し、逆転写反応をもう一度行なう。
- b) 逆転写反応のセットアップが不適切
反応液を氷上でセットアップしたことを確認する。
- c) 逆転写反応に用いたテンプレート RNA の品質が悪い、あるいは量が間違っている
プロトコールを開始する前にテンプレート RNA の濃度、分解度、純度をチェックする。テンプレート RNA を解凍後、よく混和する。特に少量の RNA を用いた際に、微量の RNase でも cDNA 合成や RT-PCR の感度に影響することがある。
- d) RNA 濃度が高すぎる、あるいは低すぎる
4 ページ、表 3 の RNA 量を参照する。
- e) RNA が変性されている
テンプレート RNA の変性は不要。RNA の変性を行なった場合には、RNA が分解することがある。
- f) インキュベーション温度が高すぎる
逆転写反応は必ず 37°C で行なう。これより高い温度では cDNA 産物の長さが短くなり、miScript Reverse Transcriptase Mix の活性が低下することがある。ヒートブロックまたは水浴の温度をチェックする。

コメント

リアルタイム PCR で産物がない、あるいは遅れて検出される、またはプライマーダイマーのみを検出（リアルタイム PCR 中に問題が生じていることを示唆）

- | | | |
|----|--|---|
| a) | PCR アニーリング時間が短すぎる | プロトコールに特化したアニーリング時間を使用する。 |
| b) | PCR エクステンション時間が短すぎる | プロトコールで設定したエクステンション時間を使用する。 |
| c) | PCR のセットアップの際にピペッティングエラーあるいは試薬の入れ忘れ | プライマーや cDNA を含む試薬の濃度および保存条件をチェックする。 |
| d) | HotStarTaq DNA Polymerase がホットスタートで活性化されていない | HotStarTaq DNA Polymerase のホットスタート活性化ステップを含むサイクリングプログラムであることを確認；詳細はプロトコールを参照。 |
| e) | 蛍光取り込みの設定がない | サイクリングプログラムで蛍光検出が設定されていることをチェックする。 |
| f) | 間違った検出ステップ | 蛍光検出が PCR サイクリングプログラムのエクステンションステップで行なわれたか確認する。 |
| g) | 間違った色素 layer/filter を設定 | 適切な layer/filter を設定したことを確認する。 |
| h) | スタートテンプレート量が不十分 | テンプレート cDNA 量を増やす。 |

テンプレート量の対数値と C_T 値 / **Crossing point** 間の相関関係に直線性がない

- | | | |
|----|---------------|--|
| a) | テンプレート量が多すぎる | 推奨されたテンプレート cDNA 量の最大量を超えないようにする。詳細はプロトコールを参照。 |
| b) | テンプレート量が少なすぎる | テンプレート RNA 量を増やす。 |

蛍光強度がばらつく

- | | | |
|----|---------------------------|--|
| a) | リアルタイム用サーマルサイクラーが汚染されている | 使用説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの汚染を除去する。 |
| b) | リアルタイム用サーマルサイクラーが較正されていない | 使用説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのキャリブレーションを再度行なう。 |

Trademarks: QIAGEN®, QIAgility™, HotStarTaq®, QuantiTect®, RNeasy®, Rotor-Gene™, Rotor-Disc™ (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); Bio-Rad®, CFX96™, CFX384™, iCycler®, iQ®, MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Roche®, LightCycler® (Roche Group); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Stratagene® (Stratagene); Excel® (Microsoft, Inc.).

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。

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。

© 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

