

# 仕 様 書

件 名 TaqMan リアルタイム PCR 法を用いた肝障害および関連疾患の血清中 miRNA 発現解析

## 1. 目的

本委託解析は、発注者より提供するヒト血清検体に含まれるmicroRNA を定量PCR 法 (TaqMan 法) を用いて測定する業務である。

## 2. 内容

### 2-1 作業内容

#### 1) RNA 抽出精製

供与サンプル (血清) - 200  $\mu$  LからmirVana™ PARIS™ RNA and Native Protein Purification Kit (Thermo Fisher Scientific 社)を用いてmiRNAを含む total RNA を抽出精製する。RNA抽出時に Lysis Bufferにノーマライズ用および品質確認用の外因性コントロールRNA (ath-miR159a、cel-lin-4-5p)を添加し、品質検定の指標の一つとする。

#### 2) cDNA 合成

TaqMan Advanced MicroRNA Assays cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて、RNA抽出液 2  $\mu$  L からPoly(A) 付加反応、Adaptor ligation 反応を行い、定量PCR の鋳型となる1 本鎖cDNA 合成を行う (cDNA合成液量 30  $\mu$  L)。続いて、miRNA増幅反応を行う (50  $\mu$  L)。各濃度(1000pM, 100pM, 10pM, 1pM, 0.1pM) の合成 miRNAに関するcDNA合成、増幅を行う。

#### 3) 品質確認

以下の内容で品質確認を行う。

確認事項	方法	
溶血	目視	色見本を参照の上、溶血あり/なしを記録する
RNA抽出効率 RTおよびPCRの 阻害物質の確認	外因性コントロール	ath-miR159a、cel-lin-4-5p (異なる濃度) をLysis Bufferに添加する。 <ul style="list-style-type: none"><li>• ath-miR159a のサンプル間 Ct値の誤差が <math>\pm 2</math> 以内</li><li>• cel-lin-4-5pのサンプル間Ct値の誤差が <math>\pm 2</math> 以内</li><li>• <math>\Delta Ct</math> (ath-miR159a - cel-lin-4-5p)のサンプル間の誤差が<math>\pm 2</math> 以内</li></ul>

\* 上記基準はあくまでも参考値とする。上記基準を大きく外れる場合にはデータ提示の上、今後の作業内容を相談、方針決定する。

#### 4) 定量 PCR

2)で調製されたcDNAを鋳型に、Thermo Fisher Scientific 社及びIntegrated DNA Technologies社推奨のプロトコルに従ってTaqMan Advanced MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific社) による定量PCR (N=1) をApplied Biosystems QuantStudio 7 Flex 4484643 (Thermo Fisher Scientific 社) または同等以上の機能を有する機種を用いて行う。

測定するmiRNA

Candidates	ASSAY_ID	TARGET_NAME	TARGET_SEQUENCE	ACCESSION
1 miR-122-5p	477855_mir	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	MIMAT0000421
2 miR-483-5p	478432_mir	hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG	MIMAT0004761
3 miR-192-5p	478262_mir	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	MIMAT0000222
4 miR-194-5p	477956_mir	hsa-miR-194-5p	UGUACAGCAACUCCAUGUGGA	MIMAT0000460
5 miR-218-5p	477977_mir	hsa-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	MIMAT0000275
6 miR-27b-3p	478270_mir	hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	MIMAT0000419

Normalizers	ASSAY_ID	TARGET_NAME	TARGET_SEQUENCE	ACCESSION
7 let-7d-5p	478439_mir	hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	MIMAT0000065
8 miR-148b-3p	477855_mir	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	MIMAT0000421
9 miR-24-3p	477992_mir	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	MIMAT0000080
10 miR-484	478308_mir	hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	MIMAT0002174

Spike in Control	ASSAY_ID	TARGET_NAME	TARGET_SEQUENCE	ACCESSION
11 ath-miR159a	478411_mir	ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	MIMAT0000177
12 cel-lin-4-5p	478289_mir	cel-lin-4-5p	UCCUGAGACCUCAAGUGUGA	MIMAT0000002

#### 5) データ解析

各 miRNA について、検量線を作成し定量値を求める。ノーマライザーによりノーマライズ処理を行う。

## 2-2 作業仕様

定量PCR関連製品は以下の試薬及び使用機器を利用する。



## 6 納品

2019年3月29日までに、木原記念横浜生命科学振興財団に提出すること。

## 7 その他

当該事業について疑義が生じた場合、木原記念横浜生命科学振興財団またはその指定する者と協議するものとする。

本契約の相手方が、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（以下、AMED）から委託されている『官民共同による重篤副作用バイオマーカー開発』事業における再委託先機関や、研究開発参加者が所属する機関及び共同研究参加企業となる場合は、AMEDが定める『委託研究開発契約事務処理説明書』に定められている利益排除等の取り扱いに従う。