

仕 様 書

件 名 リアルタイム PCR 法を用いた miRNA 発現解析 (血清・尿)

1. 目的

本委託解析は、発注者より提供するヒト血清/尿検体に含まれるmicroRNA を定量PCR 法を用いて網羅的に測定する業務である。

2. 内容

2-1 作業内容

1) RNA 抽出精製

1)-1 血清サンプル

供与サンプル (血清) 250 μ LからmiRNeasy mini kit (Qiagen 社)を用いてtotal RNA を抽出精製する。このとき供与サンプルに品質確認用のコントロールRNA(キャリアRNA 及びスパイクコントロール)を添加し、品質検定の指標の一つとする。

1)-2 尿サンプル

供与サンプル (尿)5.5 mL からmiRCURY™ Exosome Isolation Kit - Cells, urine and CSF (Exiqon 社)を用いてExosome 画分を単離し、その後miRCURY™ RNA Isolation Kit- Cell & Plant (Exiqon 社)を用いてtotal RNA を抽出精製する。このとき供与サンプルに品質確認用のコントロールRNA(キャリアRNA及びスパイクコントロール)を添加し、品質検定の指標の一つとする。

2) RNA 品質確認

2)-1 血清サンプル

NanoDrop2000 およびAgilent 2100 Bio Analyzer または同等以上の機能を有する機種を用いた吸光度測定 (OD260) 及び、エレクトロフェログラム (電気泳動像) の結果から品質および収量を確認する。

検定基準は以下とする。

キャリアRNA の回収率が40%以上 (吸光定量により375 ng 以上) であること、及びキャリアRNA の分解が見られないこと。

2)-2 尿サンプル

NanoDrop2000 およびAgilent 2100 Bio Analyzer または同等以上の機能を有する機種を用いた吸光度測定 (OD260) 及び、エレクトロフェログラム (電気泳動像) の結果から品質お

よび収量を確認する。

検定基準は以下とする。

キャリア RNA の回収率が 40%以上（400ng 以上）であること、及びキャリア RNA の分解が見られないこと。

* 検定基準を満たさない場合には、データ提示の上、サンプルの再送を含む今後の作業内容を相談、方針決定する。

3) cDNA 合成

Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon 社) を用いて、total RNA 20 μ L から定量PCR の鋳型となる1 本鎖cDNA 合成を行う。

* 合成に使用するtotal RNA 量は、QC PCR panel による品質検定結果次第で変更する可能性がある。

4) cDNA 品質確認

3) で調製されたcDNA の一部を鋳型にExiqon 社推奨のプロトコルに従って、microRNA QC PCR Panel (Exiqon 社) を用いて定量PCR を行い、RNA 抽出とcDNA 合成、及びPCR反応についての品質検定を行う。

品質検定基準は以下とする。

UniSp6 とCel-miR-39-3p はcDNA 合成時の逆転写反応を、UniSp3 はPCR 反応を評価し、UniSp2~5はRNA抽出効率を、miR23a及びmiR451はサンプルの溶血性を評価する。

- ・UniSp3 のサンプル間 Δ Cq 2 以内
 - ・UniSp6 のサンプル間 Δ Cq 2 以内
 - ・Cel-miR-39-3p のサンプル間 Δ Cq 2 以内
 - ・UniSp2 のサンプル間 Δ Cq 3 以内
 - ・UniSp4 のサンプル間 Δ Cq 3 以内
 - ・UniSp5 のサンプル間 Δ Cq 3 以内
 - ・UniSp5 がN/D（不検出）でない
 - ・各サンプルで Δ Cq (UniSp4 - UniSp2) が5-8.2の間
 - ・各サンプルで Δ Cq (UniSp5 - UniSp4) が5-8.2の間
- 血清由来サンプルの場合、以下を検定基準に加える。
- ・各サンプルで Δ Cq (miR23a-miR451) が 7 以内

* 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。

5) 定量 PCR

3)で調製されたcDNAを鋳型に、Exiqon社推奨のプロトコルに従ってmicroRNA Ready-to-Use PCR, Human panel I+II (Exiqon社) による定量PCR (N=1) をLightCycler® 480 Instrument II (Roche社) または同等以上の機能を有する機種を用いて行う。定量PCR 反応終了後、機器付属のソフトウェアにてCq 値の算出および融解曲線分析を行う。

6) 定量 PCR データ品質確認

得られたスパイクコントロールのデータをもとに、定量PCR データの品質確認を行う。UniSp6 とUniSp3 のCq 値が同一コンディションのサンプル群において一定の再現性を示すこと、及びCq 値37 以下を示すmiRNA 数が同一コンディションのサンプル群においておおよそ等しい数であることを確認する。

* 上記基準を満たさない場合には、データ提示の上、今後の作業内容を相談、方針決定する。

7) データ解析

ノーマライズ処理を行い Excel ファイルとしてまとめる。ノーマライズ手法には Global mean と Best Normalizers を用いる。

2-2 作業仕様

定量PCR関連製品はExiqon社のmiRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR systemを利用する。

2-3 納品仕様

- ・ 解析報告書
- ・ 解析データ (記録メディア)
 - Raw データ
 - 定量 PCR QC データ
 - 解析結果をまとめたエクセルファイル

3 供与物

- ・ 血清 79 検体 (各 250 μ L以上×2本)
- ・ 尿 79 検体 (各 5.5mL以上)

4 実施機関

- ・ 解析機関は、上記作業内容を同一施設内で実施できること。
- ・ 輸送時の供与物の品質劣化を抑えるために、解析機関は日本国内にあること。

5 試験の進捗状況の報告等

- ・ 解析データについて説明を求めることがあるため、問い合わせ後3営業日以内に解析機関担当者が技術説明訪問可能であること。

6 納品

2017年11月24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こと。