

血清Exosome由来のmicroRNA発現解析 -miRNAarrayとRT-qPCRでの再現性の検証実験-

通常miRNAarray(Agilent)実験ではTotalRNA100ngを使用します。しかしながら、今話題のExosome由来microRNAは微量なサンプルであり、その基準を満たすことは困難です。

そこで、健康人血清より単離したExosome由来のmicroRNAを用いた解析例をご紹介します。

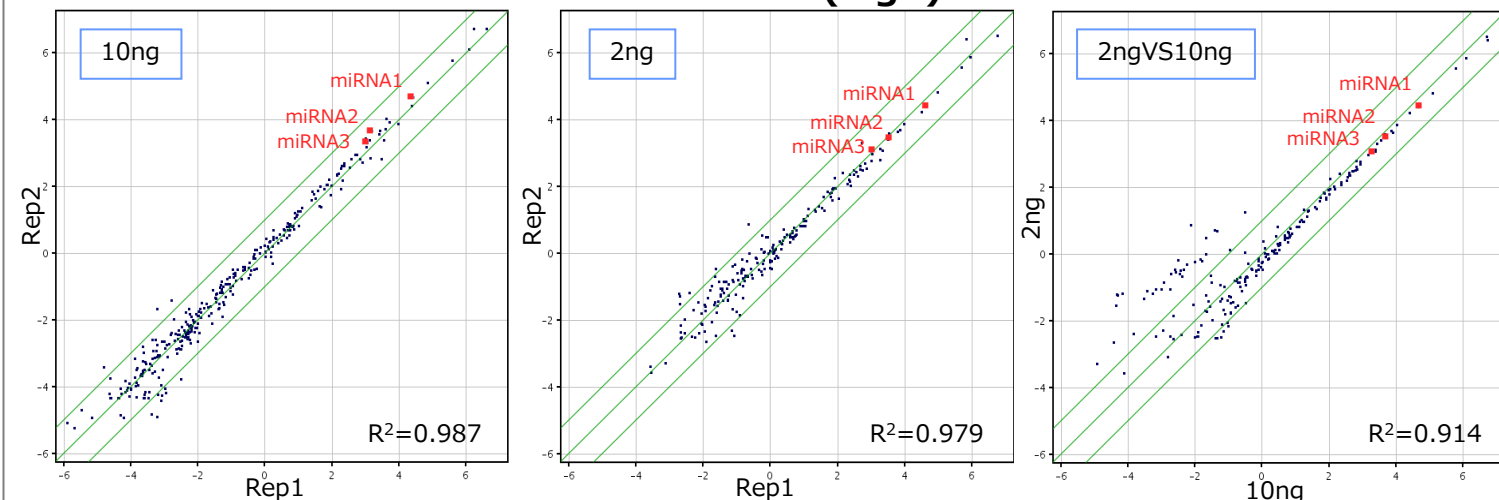
【目的】 血清Exosome由来の微量microRNAを用いたArray実験およびqPCRによる再現性

【実験解析方法】

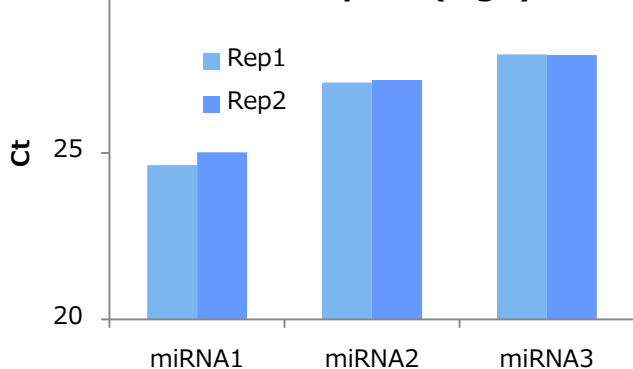
- **サンプル抽出**：健康人血清よりTotal Exosome Isolation from serumおよびTotal Exosome RNA & Protein Isolation Kit(Life Technologies)を用いてExosome単離およびmicroRNA抽出を行った。血清量は1mlとし、N=2で実験を行った。
- **サンプルQC**：Bioanalyzer pico kit(Agilent)により測定し、Array実験投入量を決定した。
- **Array実験解析**：Bioanalyzerの濃度で2ngと10ngを投入量とし、Human miRNA Microarray, Release 19.0, 8x60K(Agilent)を用いてProtocolに従い実験を行った。解析にはGeneSpring ver12.6.1を使用し、アレイ間補正(95percentile Shift)を行った。ScatterPlotにはシグナルの得られたデータのみを使用した。
- **RT-qPCR**：TaqMan Micro RNA Reverse Transcription KitおよびTaqMan Universal Master Mix II(Life Technologies)を用い、ABI7500(Life Technologies)にて検証実験を行った。

【結果・考察】 Array実験の結果、投入量を揃えた場合再現性の高い結果が得られた(Fig1)。投入量が減るとシグナルが検出出来るmicroRNAが減ったが、同等の相関となった。しかし、2ngと10ngの比較では相関が下がることから、Array実験の投入量は出来るだけ揃える必要がある。また、Arrayの発現量はRT-qPCRと一致することが確認出来た(Fig2)。血清Exosome由来の微量microRNAでも発現解析が可能であった。

Scatter Plot (Fig1)



RT-qPCR (Fig2)



ScatterPlot (Fig1)

Replicate Array実験の投入量揃えた図および同じサンプルで投入量の異なる図

RT-qPCR (Fig2)

Array実験で得られた3種のmicroRNAについてRT-qPCRで得られたReplicate実験のCt値

DNAチップ研究所はAgilent社のマイクロアレイおよびNGS Target Enrichmentにおいて、Certified Service Providerの認定資格を取得しております。受託解析をご利用になるお客様に高品質なサービスを提供してまいります。

