



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107075578 A

(43)申请公布日 2017. 08. 18

(21)申请号 201580049304.X

(22)申请日 2015.09.15

(30)优先权数据

2014-187685 2014.09.16 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/076085 2015.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/043170 JA 2016.03.24

(71)申请人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 小园聪子 近藤哲司

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 曾祯 段承恩

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 37/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书25页

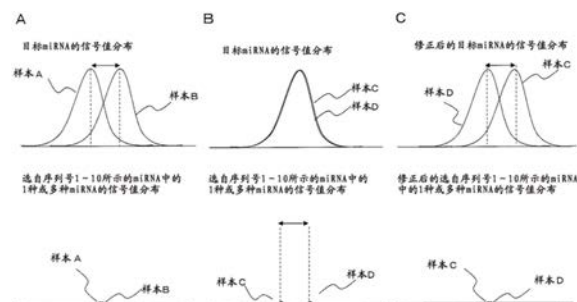
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

miRNA表达量的比较分析方法和装置

(57)摘要

公开了在多个体液样本之间对miRNA的表达量进行比较分析的方法。在本发明的比较分析方法中,使用与体液样本中的目标miRNA的表达量同时测定的修正用内源性miRNA的表达量,来修正该样本中的目标miRNA的表达量。作为修正用内源性miRNA,使用选自特定的10种修正用内源性miRNA的1种或多种miRNA。根据本发明,能够比以往更正确地实施体液样本之间的目标miRNA的比较分析。



1. 一种方法,是在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析的方法,所述方法包括:

测定工序,对于多个体液样本,同时进行目标miRNA的表达量的测定和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定;

代表值获得工序,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值;

修正系数获得工序,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过代表值获得工序获得的各体液样本的代表值的差或比;和

修正工序,分别使用对各体液样本获得的修正系数,来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量。

2. 根据权利要求1所述的方法,在所述修正工序中,如下进行所述修正,

(a) 在所述修正系数获得工序中将所述代表值减去所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值减去修正系数来进行所述修正,

(b) 在所述修正系数获得工序中将所述基准值减去所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值加上修正系数来进行所述修正,

(c) 在所述修正系数获得工序中将所述代表值除以所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值除以修正系数来进行所述修正,或

(d) 在所述修正系数获得工序中将所述基准值除以所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值乘以修正系数来进行所述修正。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,所述基准值是,对于修正用内源性miRNA表达量任意规定的固定数值,或者对于从所述多个体液样本任意选择的第1体液样本获得的修正用内源性miRNA表达量的代表值。

4. 根据权利要求1~3的任一项所述的方法,所述测定工序包括:使用于捕捉固定化在支持体上的多个目标miRNA的核酸探针和用于捕捉选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的探针,与被标记物质标记的来自体液样本的核酸试样接触而进行杂交,分别作为信号强度测定值获得目标miRNA和所述1种或多种修正用内源性miRNA的表达量。

5. 根据权利要求1~4的任一项所述的方法,所述体液样本是血液、血清或血浆。

6. 根据权利要求1~5的任一项所述的方法,所述代表值是由选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA表达量的测定值计算出的、用对数值表示的平均值或中央值。

7. 一种装置,是对多个体液样本中的目标miRNA的表达量进行比较分析的miRNA表达分析装置,所述装置包含:

记忆单元,记忆对于多个体液样本测定的、目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

代表值获得单元,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值;

修正系数获得单元,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对

于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过所述代表值获得单元获得的各体液样本的代表值的差或比；

修正单元，分别使用对各体液样本获得的修正系数，来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量；和

输出单元，根据修正后的目标miRNA表达量，输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

8. 根据权利要求7所述的装置，所述修正单元如下进行所述修正，

(a) 在所述修正系数获得单元中将所述代表值减去所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下，通过目标miRNA的表达量的测定值减去修正系数来进行所述修正，

(b) 在所述修正系数获得单元中将所述基准值减去所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下，通过目标miRNA的表达量的测定值加上修正系数来进行所述修正，

(c) 在所述修正系数获得单元中将所述代表值除以所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下，通过目标miRNA的表达量的测定值除以修正系数来进行所述修正，或

(d) 在所述修正系数获得单元中将所述基准值除以所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下，通过目标miRNA的表达量的测定值乘以修正系数来进行所述修正。

9. 根据权利要求7或8所述的装置，所述记忆单元中记忆的、多个各体液样本所含的目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值，是用于捕捉固定化在支持体上的多个目标miRNA的探针和用于捕捉所述1种或多种修正用内源性miRNA的探针、与被标记物质标记的来自体液样本的核酸试样接触而进行杂交，分别作为信号强度测定值测定目标miRNA和所述1种或多种修正用内源性miRNA的表达量而得的值。

10. 一种程序，用于为了在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析，而使1台或多台计算机执行以下工序：

测定工序，对于多个体液样本，同时进行目标miRNA的表达量的测定和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定；

代表值获得工序，对于各体液样本，从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的各测定值获得代表值；

修正系数获得工序，作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数，分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过代表值获得工序获得的各体液样本的代表值的差或比；和

修正工序，分别使用对各体液样本获得的修正系数，来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量。

11. 一种程序，用于为了在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析，而使1台或多台计算机作为以下单元发挥功能：

记忆单元，记忆多个体液所含的目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值；

代表值获得单元，对于各体液样本，从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值；

修正系数获得单元，作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数，分别获得对

于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过所述代表值获得单元获得的各体液样本的代表值的差或比；

修正单元，分别使用对各体液样本获得的修正系数，来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量；和

输出单元，通过修正后的目标miRNA表达量，输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

12. 一种计算机可读的记录介质，记录了权利要求10或11所述的程序。

13. miRNA表达分析用芯片，包含固定化了用于捕捉多个目标miRNA的探针和用于捕捉选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的探针的支持体。

miRNA表达量的比较分析方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于对多个体液样本所含的miRNA的表达量进行比较分析的方法和装置。

背景技术

[0002] miRNA(微RNA)从基因组DNA作为发夹样结构的RNA(前体)而被转录出来。该前体被具有特定的酶RNase III切割活性的dsRNA切割酶(Drosha、Dicer)切割后,变成双链形态,然后变成单链。并且,一般认为一条反义链被叫做RISC的蛋白质复合体摄入,参与mRNA的翻译抑制。这样,因为miRNA在转录后各阶段其形态不同,所以通常在以miRNA为靶标(检测对象)的情况下,需要考虑发夹结构体、双链结构体、单链结构体等各种形态。miRNA由15~25个碱基的RNA组成,在各种生物中确认了其存在。

[0003] 近年来发现,miRNA不仅在细胞内存在,在不含细胞的样本血清、血浆、尿、脊髓液等体液中也较多存在,启示其表达量可能成为以癌为代表的各种疾病的生物标志物。miRNA在2014年6月的现在,在人中存在2500种以上(miRBase release 20),在利用高灵敏度的DNA微阵列等测定体系的情况下,其中超过1000种的miRNA能够在血清·血浆中同时检测到表达。于是,进行了使用DNA微阵列法以血清·血浆、尿、脊髓液等体液为对象的生物标志物探索研究。

[0004] 另一方面,已知在使用DNA微阵列进行基因表达分析时,根据样本、实验者、实验条件不同,所得的数据可能产生误差。因此,考察了用于修正误差的数据修正方法。

[0005] 修正中使用以如下原理为前提的方法:在取多个基因的表达数据一起作为基因表达数据群的情况下,基因表达数据群全体的表达量对于任何样本都没有差异。该方法包括整体归一化(global normalization)法、分位数(quantile)法、局部加权回归散点平滑法(lowess)法、75%分位数(75percentile)法等。

[0006] 另外,还进行了着眼于样本之间表达量相同的特定的基因(β -肌动蛋白、GAPDH等),对样本逐个修正数据使得其基因的检测值一定的方法

[0007] 作为修正使得特定的miRNA的表达量一定的方法,提出了使用样本所表达的非编码RNA中被认为在各种样本中表达量一定的管家RNA(U1snoRNA、U2snoRNA、U3snoRNA、U4snoRNA、U5snoRNA、U6snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNA)进行修正的方法(专利文献1、专利文献2)。即,在专利文献1、专利文献2中,进行使在检测miRNA时同时检测的5S rRNA的检测值在全部样本中为一定这样的操作,来修正miRNA的检测结果。

[0008] 另一方面,由于在DNA微阵列中同时测定多种miRNA,因而认为仅使用限定种类的管家RNA进行修正的方法缺乏正确性,提出了与miRNA同时测定多种mRNA的表达量,使用这些多种mRNA的表达量进行miRNA的修正这样的方法(专利文献3)。在专利文献3中,进行使在检测miRNA时同时检测的多种mRNA的检测值在全部样本中为一定这样的操作,来修正miRNA的检测结果。

[0009] 在非专利文献1中,在小鼠血清中的miRNA表达量的测定中,利用内源性miRNA进行

表达量的修正,评价其有效性。其中,内源性miRNA是指作为对象的样本中(非专利文献1的情况为小鼠血清)自然存在的、来源于提供该样本的生物的miRNA。即,在非专利文献1中,作为修正用内源性miRNA的例子,使用miR-16、miR-31、miR-223,尝试小鼠血清中的miRNA表达量的修正,但由于这些miRNA的表达量在个体之间并不一定,因而提出了不能采用通过内源性的miRNA的表达量来进行全体数据修正的方法,而将从外部添加的RNA作为基准物质用于数据修正。总之,得出了使用这些内源性miRNA进行miRNA表达量的修正不妥的结论。

[0010] 在非专利文献2中,提出在用定量RT-PCR、测序法检测人血清中的miRNA时,组合使用let-7d、let-7g、let-7i作为修正用内源性miRNA。即,通过进行使let-7d、let-7g、let-7i的表达量在样本之间为一定的操作,来修正作为测定对象的miRNA的表达量。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:日本特开2007-75095号公报

[0014] 专利文献2:日本特开2007-97429号公报

[0015] 专利文献3:日本特开2014-7995号公报

[0016] 非专利文献

[0017] 非专利文献1:Roberts,T.C.等,2014年,PLoS ONE,第9(2)卷,e89237

[0018] 非专利文献2:Chen,X.等,2013年,PLoS ONE,第8(11)卷,e79652

发明内容

[0019] 发明所要解决的课题

[0020] 如上所述,在检测基因表达时一般使用利用在样本之间表达量的变化少的“管家基因”的表达量来修正作为检测对象的基因的表达量的方法。作为特别被熟知的管家基因,可列举ACTB、GAPDH等。但是,这些基因与miRNA相比核酸长、表达量的绝对值差异较大,不优选用于修正miRNA的表达量。

[0021] 因此,一直以来,在检测miRNA的表达量时,修正中主要使用U1snoRNA、U2snoRNA、U3snoRNA、U4snoRNA、U5snoRNA、U6snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNA这样的管家RNA。然而,在测定体液中的miRNA的表达量要修正其数据的情况下,由于U1snoRNA、U2snoRNA、U3snoRNA、U4snoRNA、U5snoRNA、U6snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNA是存在于核内、细胞质内的RNA,在不含细胞的样本血清、血浆、尿、脊髓液等体液中几乎检测不到表达量,因此认为不能将它们作为用于体液中的miRNA的表达量的检测修正的指标。

[0022] 在通过定量RT-PCR法进行的miRNA的表达量检测中,进行了个别分析在血清、血浆中存在的miRNA,发现在样本之间没有表达量差异的“体液中管家miRNA”的尝试。如上所述,在非专利文献2中,提出用定量RT-PCR、测序法检测人血清中的miRNA时,组合使用let-7d、let-7g、let-7i。然而,这些miRNA在DNA微阵列法中是否能作为修正用内源性miRNA发挥功能也是不明的。即,在使用DNA微阵列的体液中的miRNA分析中,没有使用特定的修正用内源性miRNA的有效修正方法。

[0023] 另一方面,在DNA微阵列中进行测定值的修正时,一般使用能用DNA微阵列测定的多(数百~数万)种基因的全表达量(信号值)进行修正。作为其方法,可列举例如,整体归一化(global normalization)法、分位数标准化(quantile)法等。

[0024] 此外,在以由miRNA的表达量获得的基准值为指标的情况下,如果有几个成为用于构成基准值的元数据的miRNA,则存在能否形成普遍的修正用基准值这样的课题。特别是在所测定的miRNA的数限于几种~几十种的面向特定用途的DNA微阵列中,如果应用整体归一化法等,则带来不充分的修正结果的可能性大。另外,测定样本中的多种mRNA的表达量作为用于修正miRNA的表达量的基准值的专利文献3的方法对于来源于组织、细胞的RNA有效,但体液中的mRNA的表达量极低,难以将它们作为用于miRNA的表达量修正的指标。

[0025] 如上,在要测定多个体液样本所含的miRNA的表达量进行比较分析的情况下,尚未发现修正其测定值的有效方法。特别是不存在能够通过DNA微阵列使用少数的修正用内源性miRNA进行有效的修正的方法。本发明要解决如上的课题,特别要解决对于检查・诊断用途等比较少数的miRNA测定用DNA微阵列的实用化极为重要的课题。

[0026] 用于解决课题的方法

[0027] 本申请发明者们为了解决上述课题反复进行了深入研究,结果完成了以下的发明。

[0028] (1) 一种方法,是在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析的方法,所述方法包括:

[0029] 测定工序,对于多个体液样本,同时进行目标miRNA的表达量的测定和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定;

[0030] 代表值获得工序,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值;

[0031] 修正系数获得工序,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过代表值获得工序获得的各体液样本的代表值的差或比;和

[0032] 修正工序,分别使用对各体液样本获得的修正系数,来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量。

[0033] (2) 根据(1)所述的方法,在所述修正工序中,如下进行所述修正,

[0034] (a) 在所述修正系数获得工序中将所述代表值减去所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值减去修正系数来进行所述修正,

[0035] (b) 在所述修正系数获得工序中将所述基准值减去所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值加上修正系数来进行所述修正,

[0036] (c) 在所述修正系数获得工序中将所述代表值除以所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值除以修正系数来进行所述修正,或

[0037] (d) 在所述修正系数获得工序中将所述基准值除以所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值乘以修正系数来进行所述修正。

[0038] (3) 根据(1)或(2)所述的方法,所述基准值是,对于修正用内源性miRNA表达量任意规定的固定数值,或者对于从所述多个体液样本任意选择的第1体液样本获得的修正用内源性miRNA表达量的代表值。

[0039] (4) 根据(1)~(3)的任一项所述的方法,所述测定工序包括:使用于捕捉固定化在支持体上的多个目标miRNA的核酸探针和用于捕捉选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的探针,与被标记物质标记的来自体液样本的核

酸试样接触而进行杂交,分别作为信号强度测定值获得目标miRNA和所述1种或多种修正用内源性miRNA的表达量。

[0040] (5) 根据(1)~(4)的任一项所述的方法,所述体液样本是血液、血清或血浆。

[0041] (6) 根据(1)~(5)的任一项所述的方法,所述代表值是由选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA表达量的测定值计算出的、用对数值表示的平均值或中央值。

[0042] (7) 一种装置,是对多个体液样本中的目标miRNA的表达量进行比较分析的miRNA表达分析装置,所述装置包含:

[0043] 记忆单元,记忆对于多个体液样本测定的、目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

[0044] 代表值获得单元,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值;

[0045] 修正系数获得单元,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过所述代表值获得单元获得的各体液样本的代表值的差或比;

[0046] 修正单元,分别使用对各体液样本获得的修正系数,来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量;和

[0047] 输出单元,根据修正后的目标miRNA表达量,输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

[0048] (8) 根据(7)所述的装置,所述修正单元如下进行所述修正,

[0049] (a) 在所述修正系数获得单元中将所述代表值减去所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值减去修正系数来进行所述修正,

[0050] (b) 在所述修正系数获得单元中将所述基准值减去所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值加上修正系数来进行所述修正,

[0051] (c) 在所述修正系数获得单元中将所述代表值除以所述基准值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值除以修正系数来进行所述修正,或

[0052] (d) 在所述修正系数获得单元中将所述基准值除以所述代表值而得的值作为修正系数获得的情况下,通过目标miRNA的表达量的测定值乘以修正系数来进行所述修正。

[0053] (9) 根据(7)或(8)所述的装置,所述记忆单元中记忆的、多个各体液样本所含的目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值,是用于捕捉固定化在支持体上的多个目标miRNA的探针和用于捕捉所述1种或多种修正用内源性miRNA的探针、与被标记物质标记的来自体液样本的核酸试样接触而进行杂交,分别作为信号强度测定值测定目标miRNA和所述1种或多种修正用内源性miRNA的表达量而得的值。

[0054] (10) 一种程序,用于为了在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析,而使1台或多台计算机执行以下工序:

[0055] 测定工序,对于多个体液样本,同时进行目标miRNA的表达量的测定和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定;

[0056] 代表值获得工序,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的各测定值获得代表值;

[0057] 修正系数获得工序,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过代表值获得工序获得的各体液样本的代表值的差或比;和

[0058] 修正工序,分别使用对各体液样本获得的修正系数,来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量。

[0059] (11)一种程序,用于为了在多个体液样本之间对目标miRNA的表达量进行比较分析,而使1台或多台计算机作为以下单元发挥功能:

[0060] 记忆单元,记忆多个体液所含的目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

[0061] 代表值获得单元,对于各体液样本,从选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值;

[0062] 修正系数获得单元,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过所述代表值获得单元获得的各体液样本的代表值的差或比;

[0063] 修正单元,分别使用对各体液样本获得的修正系数,来修正在各体液样本中测定的目标miRNA的表达量;和

[0064] 输出单元,通过修正后的目标miRNA表达量,输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

[0065] (12)一种计算机可读取的记录介质,记录了(10)或(11)所述的程序。

[0066] (13)miRNA表达分析用芯片,包含固定化了用于捕捉多个目标miRNA的探针和用于捕捉选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的探针的支持体。

[0067] 发明的效果

[0068] 根据本发明,在对多个体液样本所含的目标miRNA的表达量进行比较分析的情况下,特别是使用微阵列等测定多种miRNA的表达量,在样本之间比较miRNA表达量的情况下,能够比以往更正确地修正miRNA表达量。通过本发明,能够更正确地进行样本之间的目标miRNA的比较分析。

附图说明

[0069] 图1是本发明的方法的概念图。

[0070] 图2是显示本发明的分析装置的构成的概略的方框图。

[0071] 图3是利用本发明的目标miRNA的表达量的修正处理的流程图的一例。

[0072] 图4-1显示用实施例2所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。A:修正前、B:用hsa-miR-6085修正、C:用hsa-miR-1227-5p修正、D:用hsa-miR-2861修正、E:用hsa-miR-149-3p修正、F:用hsa-miR-4463修正、G:用hsa-miR-4508修正

[0073] 图4-2显示用实施例2所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。A:修正前、H:用hsa-miR-6090修正、I:用hsa-miR-6775-5p修正、J:用hsa-

miR-6803-5p修正、K:用hsa-miR-5787修正

[0074] 图5显示用实施例2所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。

[0075] 图6显示用比较例1所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。

[0076] 图7显示用比较例2所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。

[0077] 图8-1显示用实施例4所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。A:修正前、B:通过hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861的组合修正、C:通过hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4508的组合修正、D:通过hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4463的组合修正、E:通过hsa-miR-149-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4508的组合修正

[0078] 图8-2显示用实施例4所示的方法测定、修正的通过DNA微阵列检测得到的miRNA信号值的直方图。A:修正前、F:通过hsa-miR-149-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4463的组合修正、G:通过hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4508的组合修正、H:通过hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4463的组合修正、I:通过hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4508、hsa-miR-4463的组合修正

具体实施方式

[0079] 首先,关于本发明中进行的目標miRNA的修正方法的概念,基于图1进行说明。在图1中,标记体液样本中的RNA,用固定了用于捕捉多种目标miRNA的探针(以下也称为“目标miRNA捕捉探针”)和用于捕捉选自序列号1~10所示的miRNA中的1种或多种miRNA(以下也称为“修正用内源性miRNA”)的探针(以下也称为“修正用内源性miRNA捕捉探针”)的微阵列进行检测,将检测结果结果通过作为各miRNA的表达量的测定值的信号值的直方图示意性地显示。以下,将用于捕捉目标miRNA的探针或用于捕捉修正用内源性miRNA的探针总称为“miRNA捕捉探针”或仅称为“探针”。

[0080] 在图1A中,分别使用DNA微阵列来分析从体液样本A和体液样本B提取的样本的目标miRNA,将分析结果用直方图显示。分别显示从装载于微阵列的多个目标miRNA捕捉探针获得的信号值、和从本发明的修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值的直方图。体液样本A与体液样本B之间miRNA的直方图较大地偏离。这可以解释为在样本之间miRNA的表达量有较大差异。另一方面,也可以解释为由于实验误差而产生差异。哪一种解释正确,仅从miRNA的直方图无法判断。

[0081] 但是,在其中存在体液中的存在量经常为一定的修正用内源性miRNA的情况下,该修正用内源性miRNA的信号值的值应该在样本之间一致。

[0082] 图1A所示的、从修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值的直方图,在体液样本A与体液样本B之间显示几乎相同的分布。即,可以判断体液样本A和体液样本B正确地供给实验,无实验误差。此时,体液样本AB之间miRNA的表达量有较大差异,在进行体液样本之间的比较时不需要进行miRNA的信号值的修正。

[0083] 在图1B中,示意性地显示使用DNA微阵列分析体液样本C和体液样本D的结果。分别

显示从目标miRNA捕捉探针获得的信号值、和从修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值。

[0084] 在体液样本C与体液样本D之间,miRNA的直方图显示相同的分布。另一方面,从修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值的直方图在体液样本C与体液样本D之间较大地偏离。由此可知体液样本C和体液样本D的检测结果中由于某些原因而产生了实验误差。在这样的情况下,在进行体液样本CD之间的比较时,需要适当地修正miRNA的信号值。

[0085] 将按照本发明修正目标miRNA的信号值之后的直方图示于图1C。修正的具体方法如后所述。修正体液样本C的数据,使得从体液样本C和体液样本D的修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值的直方图一致。通过该修正,从修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值的直方图在体液样本C与体液样本D之间变得一致,使用相同的修正系数修正后的目标miRNA捕捉探针的信号值的直方图较大地偏离。即,样本CD之间目标miRNA的表达量也有较大差异。

[0086] 这里显示在2个体液样本之间修正miRNA的信号值的方法,但比较的体液样本不限于2个,可以无限地比较。在比较3个以上体液样本时,例如,预先将从修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值假定为一定的数值(常数),计算从各体液样本的修正用内源性miRNA捕捉探针获得的信号值相对于该常数的差或比,对体液样本中的目标miRNA的信号值加上或减去该差,或者对体液样本中的目标miRNA的信号值乘以或除以比的倒数,可以容易地进行多个样本之间的修正。

[0087] 在本发明中,在多个样本之间对miRNA的表达量进行比较分析。样本数可以为2个,也可以为3个以上。

[0088] “miRNA”是表示生物体内产生的链长15~25个碱基左右的短链RNA的非编码RNA(ncRNA)的一种,认为具有调节mRNA的表达的功能。miRNA由基因组DNA作为发夹样结构的RNA(前体)转录出来。该前体被具有特定的酶RNase III切割活性的dsRNA切割酶(Drosha、Dicer)切割后,变成双链的形态,然后变成单链。并且,认为一条反义链被称为RISC的蛋白质复合体摄入,认为参与mRNA的翻译抑制。这样,因为miRNA在转录后各阶段其形态不同,所以通常在以miRNA为靶标(检测对象)的情况下,需要考虑发夹结构体、双链结构体、单链结构体等各种形态。miRNA在各种生物中确认了其存在。

[0089] 能够应用本发明的样本是从生物体分离的体液样本,可列举例如,血液、血清、血浆、尿、髓液、唾液、粘液、各种组织液等体液,但不限于这些。比较分析的多个样本可以是来源于不同体液的多个样本,也可以是来源于从不同生物体分离的同一种类的体液的多个体液样本。

[0090] 从这些样本提取RNA,使用该RNA测定miRNA的表达量。这样的RNA的提取方法是公知的(例如,Favaloro等的方法(Favaloro et.al.,Methods Enzymol.65:718-749(1980))等),用于该方法的试剂盒也有各种市售(例如,キアゲン社のmiRNeasy、东丽株式会社的“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample等)。

[0091] 本发明中提到“内源性”的情况下,是指不是人工添加到样本中的,而是在样本中自然存在。例如提到“内源性miRNA”的情况下,表示样本中自然存在的、来源于提供该样本的生物的miRNA。

[0092] <测定工序>

[0093] 在本发明的比较分析方法中,在测定样本中的多种目标miRNA的表达量的同时也测定1种或多种修正用内源性miRNA的表达量。修正用内源性miRNA的表达量如后所述,在计算用于修正目标miRNA的表达量的修正系数的计算中使用。多个miRNA的表达量的同时测定例如,使用将与对象miRNA特异性地结合的探针固定化在支持体上而成的微阵列等阵列芯片通过杂交测定来进行。在本发明中,使用包含固定化了多个目标miRNA捕捉探针和1种或多种修正用内源性miRNA捕捉探针的支持体的阵列芯片即可。

[0094] “捕捉探针”或“用于捕捉的探针”是指能与捕捉对象miRNA直接或间接地、优选直接地、且选择地结合的物质,作为代表例,可以列举核酸、蛋白质、糖类和其他抗原性化合物。在本发明中,可以优选使用核酸探针。核酸除了DNA、RNA之外,还可以使用PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸,Locked Nucleic Acid)等核酸衍生物。其中衍生物在核酸的情况下,是指包含利用荧光基团等的标记化衍生物、修饰核苷酸(例如,包含卤素、甲基等烷基、甲氧基等烷氧基、硫代、羧甲基等基团的核苷酸、和受到碱基的再构成、双键的饱和、脱氨基化、氧分子向硫分子的置换等的核苷酸等)的衍生物等化学修饰衍生物。

[0095] 核酸探针的链长从确保杂交的稳定性和特异性的观点出发,优选为检测对象miRNA的长度以上。通常,如果为17~25个碱基左右的链长,则探针能够充分发挥与对象miRNA的选择结合性。这样的链长短的寡核酸探针可以通过周知的化学合成法等容易地调制。

[0096] 核酸探针优选为与对象miRNA完全互补的碱基序列,但即使一部分不同,只要是能与对象miRNA在严格条件下杂交的程度的同源性高的碱基序列,就能够作为捕捉探针使用。

[0097] 已知杂交时的严格度是温度、盐浓度、探针的链长、探针的核苷酸序列的GC含量和杂交缓冲液中的离液剂的浓度的函数。作为严格条件,例如,可以使用Sambrook, J. et al. (1998) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York所记载的条件等。严格的温度条件为约30℃以上。作为其他条件,为杂交时间、清洗剂(例如, SDS)的浓度、和载体DNA(carrier DNA)的存在与否等,通过将条件进行组合,能够设定各种严格度。本领域技术人员能够适宜决定用于获得作为为了检测所期望的样本RNA而准备的捕捉探针的功能的条件。

[0098] miRNA的序列信息可以从GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)等数据库获得。另外,miRNA的序列信息可以从例如miRBase的网站(<http://www.mirbase.org/>)获得。修正用内源性miRNA捕捉探针、和目标miRNA捕捉探针可以基于能够从这些站点获得的序列信息来设计。

[0099] 对固定化于支持体上的miRNA捕捉探针的数量不特别限定。例如,可以使用将包括鉴定了序列的公知的全部miRNA的数量的miRNA捕捉探针固定化于支持体上而得的阵列芯片来测定miRNA的表达量,也可以使用将所期望的数量的miRNA捕捉探针固定化于支持体上而得的阵列芯片。

[0100] 作为排列固定化了捕捉探针的支持体,可以使用与在公知的微阵列、宏阵列等中使用的支持体同样的支持体,例如可以使用载玻片、膜、珠等。还可以使用日本特许第4244788号等中记载的、表面具有多个凸部的形状的支持体。对支持体的材质不特别限定,可列举玻璃、陶瓷、硅等无机材料;聚对苯二甲酸乙二醇酯、醋酸纤维素、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、硅胶等聚合物等。

[0101] 作为在支持体上固定化捕捉探针的方法,已知在支持体表面上合成寡DNA的方法、和将预先合成的寡DNA滴加到支持体表面而固定的方法。

[0102] 作为前者的方法,可列举Ronald等的方法(美国专利第5705610号说明书)、Michel等的方法(美国专利第6142266号说明书)、Francesco等的方法(美国专利第7037659号说明书)。这些方法中在DNA合成反应时使用有机溶剂,因而优选支持体是对有机溶剂有耐性的材质。另外,在Francesco等的方法中,从支持体的背面照射光来控制DNA合成,因而优选支持体是具有透光性的材质。

[0103] 作为后者的方法,可列举广田等(日本特许第3922454号)的方法、使用点样机的方法。作为点样的方式,可列举利用针尖与固相的机械接触的针方式、利用了喷墨打印机的原理的喷墨方式、利用毛细管的毛细管方式等。点样处理后,根据需要进行利用UV照射的交联、表面的封闭等后处理。为了在经表面处理的支持体表面通过共价键固定化寡DNA,在寡DNA的末端导入氨基、SH基等官能基。支持体的表面修饰通常通过具有氨基等的硅烷偶联剂处理来进行。

[0104] 与固定化在支持体上的各miRNA捕捉探针的杂交如下进行:由从体液样本提取的RNA调制被标记物质标记的核酸试样(来源于体液样本的核酸试样),使该标记核酸试样与探针接触。“来源于体液样本的核酸试样”中除了从体液样本提取的RNA之外,还包含由该RNA通过逆转录反应调制的cDNA和cRNA。经标记的来源于体液样本的核酸试样可以是将样本RNA直接或间接地用标记物质标记而得的,还可以是将由样本RNA调制的cDNA、cRNA直接或间接地用标记物质标记而得的。

[0105] 作为使来源于体液样本的核酸试样结合标记物质的方法,可列举使核酸试样的3'末端结合标记物质的方法、使5'末端结合标记物质的方法、使结合了标记物质的核苷酸掺入核酸的方法。在使3'末端结合标记物质的方法、使5'末端结合标记物质的方法中,可以使用酶反应。酶反应中可以使用T4RNA连接酶、末端脱氧核苷酸转移酶、多聚腺苷酸聚合酶等。任一标记方法均可参考“Shao-Yao Ying编、miRNA実験プロトコル(miRNA实验规程)、羊土社、2008年”中记载的方法。另外,用于使RNA的末端直接或间接地结合标记物质的试剂盒有各种市售。例如,作为使3'末端直接或间接地结合标记物质的试剂盒,可以例示“3D-Gene” miRNA labeling kit(东丽株式会社)、miRCURY miRNA HyPower labeling kit(エキシコン社)、NCode miRNA Labeling system(ライフテクノロジーズ社)、FlashTag Biotin RNA Labeling Kit(ジェニスフィア社)等。

[0106] 此外,与现有方法同样地,也可以采用如下方法:通过在标记的脱氧多核苷酸或标记的多核苷酸存在下从样本RNA合成cDNA或cRNA,调制掺入了标记物质的cDNA或cRNA,使其与阵列上的探针杂交。

[0107] 在本发明中,使用多个样本,但可均可使用同一标记物质。

[0108] 在本发明中,作为能够使用的标记物质,可列举在公知的微阵列分析中也使用的各种标记物质。具体可列举荧光色素、磷光色素、酶、放射性同位素等,但不限于这些。优选测定简便、信号容易检测的荧光色素。具体可列举菁(菁2)、氨甲基香豆素、荧光素、吖啶碳菁(菁3)、菁3.5、四甲基若丹明、若丹明红、德克萨斯红、吖啶碳菁(菁5)、菁5.5、菁7、牡蛎(oyster)等公知的荧光色素,但不限于这些。

[0109] 另外,作为标记物质,也可以使用具有发光性的半导体微粒。作为这样的半导体微

粒,可列举例如硒化镉(CdSe)、碲化镉(CdTe)、磷化铟镓(InGaP)、银铟硫化锌(AgInZnS)等。

[0110] 使如上所述标记后的来源于体液样本的核酸试样与支持体上的miRNA捕捉探针接触,使探针与核酸试样杂交。该杂交工序可以与以往完全同样地进行。反应温度和时间可根据杂交的核酸的链长适宜选择,在核酸的杂交的情况下,通常在30℃~70℃左右1分钟~十几小时。进行杂交,清洗后,检测支持体上的各个探针固定化区域中的来自标记物质的信号强度。信号强度的检测根据标记物质的种类使用适当的信号读取装置来进行。在使用荧光色素作为标记物质的情况下,可以使用荧光显微镜、荧光扫描仪等。

[0111] 将检测到的信号值与周围噪声进行比较。具体地,将从探针固定化区域获得的信号值与从除了探针固定化区域以外的位置获得的信号值进行比较,将前者的数值较高的情况作为检测到(有效判定阳性)。

[0112] 在检测到的信号值包含背景噪声的情况下,也可以减去背景噪声。也可以将周围噪声作为背景噪声,从检测到的信号值中减去。此外,还可以使用“藤渊航、堀本胜久编,マイクロアレイデータ統計解析プロトコール(微阵列数据统计分析规程)、羊土社、2008年”所记载的方法。

[0113] 通过上述方法,作为信号强度的测定值获得修正用内源性miRNA和目标miRNA的表达量的测定值。

[0114] <代表值获得工序>

[0115] 在本发明的分析方法中,接下来对于各样本,由修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值、优选对数值表示的代表值(代表值获得工序)。本发明中的“对数值”是指转换成以2为底的对数而得的值。

[0116] 在使用多个修正用内源性miRNA的情况下,代表值采用由这些多个修正用内源性miRNA的表达量的各测定值计算出的平均值或中央值、优选对数值表示的平均值或中央值。在仅使用1种修正用内源性miRNA的情况下,可以直接采用该修正用内源性miRNA的表达量的测定值、优选该测定值的对数值作为代表值。或者,如后所述,在使用对1种修正用内源性miRNA点样了多个捕捉探针的阵列芯片的情况下,由来自这些多个点样(探针固定化区域)的信号测定值,求出平均值或中央值、优选为用对数值表示的平均值或中央值,作为代表值。

[0117] “用对数值表示的平均值”,是指用将多个修正用内源性miRNA的表达量的测定值(例如,使用微阵列获得的信号强度的测定值)转换为以2为底的对数而得的对数值求得的平均值。在代表值为中央值的情况下,“用对数值表示的中央值”,是指将多个修正用内源性miRNA的表达量的测定值(例如,使用微阵列获得的信号强度的测定值)转换为以2为底的对数而得的对数值的中央值、或将修正用内源性miRNA表达量测定值的中央值转换为以2为底的对数而得的对数值。在中央值的情况下,将测定值的对数转换先进行或后进行都得到相同的值。

[0118] 平均值和中央值可以是使用实际作为测定对象的多个修正用内源性miRNA的全部测定值求得的,也可以是使用从该多个修正用内源性miRNA中提取的一部分测定值求得的。例如,可以使用通过搭载于微阵列的修正用内源性miRNA捕捉探针获得的全部修正用内源性miRNA的测定值来求,也可以提取全部修正用内源性miRNA捕捉探针中的一部分(例如,当搭载于微阵列的修正用内源性miRNA捕捉探针为10种时,提取其中3种)来求。另外,也可以

是从对1种修正用内源性miRNA进行多种点样的修正用内源性miRNA捕捉探针获得的测定值。例如,可以仅提取在应比较分析的全部样本中都为有效判定阳性的修正用内源性miRNA捕捉探针固定化区域,获得修正用内源性miRNA的代表值。

[0119] 接下来,使用代表值获得工序中获得的各样本的修正用内源性miRNA的代表值、和对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值,获得在目标miRNA的表达量的修正中使用的修正系数(修正系数获得工序)。该修正系数获得工序中,可以应用下述修正系数获得工序-1或修正系数获得工序-2的工序。

[0120] <修正系数获得工序-1>

[0121] 修正系数获得工序-1是利用修正用内源性miRNA的代表值与基准值之差的方法。本工序中,可以应用下述1-1.基准样本获得法、或1-2.固定数值修正法。

[0122] 1-1.基准样本获得法

[0123] 从作为miRNA的检测对象的多个体液样本中任意选择1个样本(第1样本),将其作为“基准样本”。其余的1或1个以上样本(第2以后的样本)成为“被修正的样本”。

[0124] 此外,在本说明书中,“第2以后的样本”这样的术语也包含第2样本。例如,如果应比较的多个样本是2个,则被修正的样本仅为第2样本,如果应比较的多个样本是3个,则被修正的样本是第2样本和第3样本2个。

[0125] 在该方法中,以基准样本的修正用内源性miRNA的代表值作为“基准值”。使用该基准值与第2以后的各样本(被修正的样本)的修正用内源性miRNA的代表值之差作为用于该第2以后的各样本的修正系数。修正系数的数量与被修正的样本的数量相同。

[0126] 具体地,修正系数通过式1或式1' 来求。

[0127] $c_{1-1} = (\text{基准样本的修正用内源性miRNA的代表值(基准值)})$

[0128] $-(\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值}) \cdots \text{式1}$

[0129] $c_{1-1}' = (\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值})$

[0130] $-(\text{基准样本的修正用内源性miRNA的代表值(基准值)}) \cdots \text{式1'}$

[0131] 例如,在使用微阵列进行表达量的测定,作为修正用内源性miRNA的代表值使用平均值的情况下,用于被修正的样本的修正系数可以通过式2或式2' 来求。

[0132]
$$c_{1-1} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \quad \cdots \text{式2}$$

[0133]
$$c_{1-1}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \quad \cdots \text{式2'}$$

[0134] 其中,式2、式2' 中,

[0135] n为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数,

[0136] A_j 是来自用于捕捉基准样本中的第j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值,

[0137] X_j 是来自用于捕捉第2样本中的第j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0138] 在探针与修正用内源性miRNA一一对应的情况下,n与作为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针的靶标的修正用内源性miRNA的数量相等。

[0139] 在式2和式2'中,还可以使用用于捕捉在应比较的全部样本中都为有效判定阳性的修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数 n' 来代替 n 。

[0140] 1-2.固定数值修正法

[0141] 是预先假定修正用内源性miRNA的代表值在全部样本中取一定的数值的方法。即,获得固定的数值与来源于各样本的修正用内源性miRNA的代表值之差,利用该差作为修正系数。在该方法中,使用该固定的数值作为“基准值”。修正系数的数量与被修正的样本的数量相同。此外,此时,因为不存在1-1.所示的“基准样本”,所以作为miRNA的检测对象的多个样本全部成为“被修正的样本”。

[0142] 具体地,修正系数通过式3或式3'来求。

[0143] $r_{1-2} = (\text{固定数值(基准值)})$

[0144] $-(\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值}) \cdots \text{式3}$

[0145] $r_{1-2}' = (\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值})$

[0146] $-(\text{固定数值(基准值)}) \cdots \text{式3'}$

[0147] 例如,在作为修正用内源性miRNA的代表值使用平均值的情况下,用于被修正的样本的修正系数可以通过式4或式4'来求。

$$[0148] \quad r_{1-2} = \alpha - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \quad \cdots \text{式4}$$

$$[0149] \quad r_{1-2}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j - \alpha \quad \cdots \text{式4'}$$

[0150] 其中,式4、式4'中,

[0151] α 为基准值,

[0152] n 为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数,

[0153] Y_j 为来自用于捕捉样本中的第 j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0154] 在探针与修正用内源性miRNA一一对应的情况下, n 与作为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针的靶标的修正用内源性miRNA的数量相等。

[0155] 在式2和式2'中,还可以使用用于捕捉在应比较的全部样本中都为有效判定阳性的修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数 n' 来代替 n 。

[0156] 在固定数值修正法中作为基准值使用的固定数值只要在至少1次比较分析中对全部样本统一使用同一数值,就可以使用任何数值(但除了0以外)。只要使用同一表达测定系统,且经常使用同一数值作为固定数值,则在不同天进行表达量的测定的体液样本之间也能够进行比较分析。虽然不特别限定,但固定数值可以采用用于获得修正系数的1种或多种修正用内源性miRNA一般取得的表达量的数值。根据在表达量的测定中使用的系统这样一般取得的数值可以变化,因此根据使用的系统,固定数值可以自由选择。

[0157] 例如,在使用1种修正用内源性miRNA的情况下,可以求作为比较分析对象的多个体液样本中的该修正用内源性miRNA的表达量的平均值,利用该平均值作为固定数值。在使用3种修正用内源性miRNA的情况下,可以求多个体液样本中全部这3种miRNA表达量的平均值,利用该平均值作为固定数值。另外,还可以使用多个体液样本预先确定固定数值,将该

固定数值在之后的分析中反复使用。

[0158] <修正系数获得工序-2>

[0159] 修正系数获得工序-2是利用修正用内源性miRNA的代表值与基准值之比的方法。本工序中,可以应用下述2-1.基准样本获得法、或2-2.固定数值修正法。

[0160] 2-1.基准样本获得法

[0161] 从作为miRNA的检测对象的多个样本中任意选择1个样本(第1样本),将其作为“基准样本”。其余的第2以后的样本成为“被修正的样本”。

[0162] 在该方法中,以基准样本的修正用内源性miRNA的代表值作为“基准值”,使用该基准值与第2以后的各样本(被修正的样本)的修正用内源性miRNA的各代表值之比作为用于该第2以后的各样本的修正系数。修正系数的数量与被修正的样本的数量相同。

[0163] 具体地,修正系数通过式5或式5'来求。

[0164] $c_{2-1} = (\text{基准样本的修正用内源性miRNA的代表值(基准值)})$

[0165] $/ (\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值}) \cdots \text{式5}$

[0166] $c_{2-1}' = (\text{被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值})$

[0167] $/ (\text{基准样本的修正用内源性miRNA的代表值(基准值)}) \cdots \text{式5'}$

[0168] 例如,在使用微阵列进行表达量的测定,使用平均值作为修正用内源性miRNA的代表值的情况下,用于第2样本的修正系数可以通过式6或式6'来求。

[0169]
$$c_{2-1} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \cdots \text{式6}$$

[0170]
$$c_{2-1}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \cdots \text{式6'}$$

[0171] 其中,式6、式6'中,

[0172] n为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数,

[0173] A_j 为来自用于捕捉基准样本中的第j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值、

[0174] X_j 为来自用于捕捉第2样本中的第j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0175] 在探针与修正用内源性miRNA一一对应的情况下,n与作为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针的靶标的修正用内源性miRNA的数量相等。

[0176] 在式6和式6'中,还可以使用用于捕捉在应比较的全部样本中都为有效判定阳性的修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数 n' 来代替n。

[0177] 2-2.固定数值修正法

[0178] 是预先假定修正用内源性miRNA的代表值在全部样本中取一定的数值的方法。即,获得来源于各样本的修正用内源性miRNA的代表值相对于固定的数值的比,利用该比作为修正系数。在该方法中,使用该固定的数值作为“基准值”。修正系数的数量与被修正的样本的数量相同。此外,这种情况下,因为不存在2-1所示的“基准样本”,所以作为miRNA的检测对象的多个样本全部成为“被修正的样本”。

[0179] 具体地,修正系数通过式7或式7'来求。

[0180] $r_{2-2} =$ (固定数值(基准值))

[0181] $/$ (被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值) $\cdots$ 式7

[0182] $r_{2-2}' =$ (被修正的样本的修正用内源性miRNA的代表值)

[0183] $/$ (固定数值(基准值)) $\cdots$ 式7'

[0184] 例如,在作为修正用内源性miRNA的代表值使用平均值的情况下,用于被修正的样本的修正系数可以通过式8或式8' 来求。

$$[0185] \quad r_{2-2} = \alpha \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \quad \cdots \text{式8}$$

$$[0186] \quad r_{2-2}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \div \alpha \quad \cdots \text{式8'}$$

[0187] 其中,式8、式8' 中,

[0188] α 为固定数值,

[0189] n 为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数,

[0190] Y_j 为来自用于捕捉样本中的第 j ($1 \leq j \leq n$) 修正用内源性miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0191] 在探针与修正用内源性miRNA一一对应的情况下, n 与作为支持体上的用于捕捉修正用内源性miRNA的探针的靶标的修正用内源性miRNA的数量相等。

[0192] 在式8和式8' 中,还可以使用用于捕捉在应比较的全部样本中都为有效判定阳性的修正用内源性miRNA的探针固定化区域的总数 n' 来代替 n 。

[0193] 其中,关于作为基准值的“固定数值”,详细与“1-2.固定数值修正法”中的固定数值是同样的。

[0194] 接着,使用通过修正系数获得工序-1或修正系数获得工序-2获得的修正系数,利用修正工序-1或修正工序-2的方法,进行被修正的样本中的目标miRNA的表达量的修正。

[0195] <修正工序-1>

[0196] 修正工序-1是使用通过修正系数获得工序-1获得的修正系数开进行目标miRNA的表达量的修正的方法,通过对目标miRNA的表达量加上修正系数或从该表达量减去修正系数来进行修正。本工序有与修正系数获得工序-1的基准样本获得法和固定数值修正法分别对应的2种修正方法。

[0197] 1-1.基准样本获得法

[0198] 第2以后的样本中的目标miRNA的表达量的修正分别使用用于第2以后的样本的修正系数来进行。即,在对于第2样本修正目标miRNA的表达量时,使用用于第2样本的修正系数(c_{21-1} 或 c_{21-1}'),在对于第3样本修正目标miRNA表达量时,使用用于第3样本的修正系数(c_{31-1} 或 c_{31-1}')。

[0199] 在作为修正系数,使用从基准样本的修正用内源性miRNA的代表值减去第2以后的样本的修正用内源性miRNA的代表值而得的差的情况下,即上述式1的情况下,通过对第2以后的样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值加上修正系数,来对于第2以后的各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示,则某一“被修正的样本”中的第 i miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式9来求。

[0200] $E_i = \log_2 W_i + c_{1-1} \cdots$ 式9

[0201] 其中, W_i 是来自用于捕捉第 i miRNA 的探针固定化区域的信号测定值。

[0202] 与此相反, 在作为修正系数使用从第2以后的样本的修正用内源性miRNA的代表值减去基准样本的修正用内源性miRNA的代表值而得的差的情况下, 即上述式1' 的情况下, 通过从第2以后的样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值减去修正系数, 来对于第2以后的各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示, 则某一“被修正的样本”中的第 i 目标miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式9' 来求。

[0203] $E_i = \log_2 W_i - c_{1-1}' \cdots$ 式9'

[0204] 其中, W_i 的定义与上述式9相同。

[0205] 如果修正在第2样本中测定的目标miRNA表达量, 则对该第2样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值加上 c_2 , 或减去 c_2' 即可。对于第3以后的样本也是同样的。此外, 作为基准样本的第1样本的代表值与基准值之差当然为0, 但在程序的构成上也可以进行对第1样本的目标miRNA表达量加上或减去0这样的计算。

[0206] 1-2. 固定数值修正法

[0207] 目标miRNA表达量的修正分别使用通过代表值与固定数值(基准值)之差而获得的修正系数来进行。即, 对于某一样本修正目标miRNA表达量时, 使用用于该样本的修正系数(r_{1-2} 或 r_{1-2}')。

[0208] 在作为修正系数, 使用从基准值减去样本的修正用内源性miRNA的代表值而得的差的情况下, 即上述式3的情况下, 通过对样本中的各目标miRNA的表达量的测定值的对数值加上修正系数, 来对于各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示, 则某一“被修正的样本”中的第 i 目标miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式10来求。

[0209] $E_i = \log_2 W_i + r_{1-2} \cdots$ 式10

[0210] 其中, W_i 是来自用于捕捉第 i miRNA 的探针固定化区域的信号测定值。

[0211] 与此相反, 在作为修正系数使用从样本的修正用内源性miRNA的代表值减去固定数值而得的差的情况下, 即上述式3' 的情况下, 通过从样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值减去修正系数, 来对于各样本进行目标miRNA表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示, 则某一“被修正的样本”中的第 i 目标miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式10' 来求。

[0212] $E_i = \log_2 W_i - r_{1-2}' \cdots$ 式10'

[0213] W_i 的定义与上述式10相同。

[0214] <修正工序-2>

[0215] 修正工序-2是使用通过修正系数获得工序-2获得的修正系数来进行目标miRNA的表达量的修正的方法, 通过目标miRNA的表达量除以修正系数、或该表达量乘以修正系数来进行修正。本工序中也有与修正系数获得工序-2的基准样本获得法和固定数值修正法分别对应的2种修正方法。

[0216] 2-1. 基准样本获得法

[0217] 第2以后的样本中的目标miRNA的表达量的修正分别使用用于第2以后的样本的修正系数来进行。即, 对于第2样本修正目标miRNA的表达量时, 使用用于第2样本的修正系数

(c_{2-1} 或 c_{2-1}'),对于第3样本修正目标miRNA表达量时,使用用于第3样本的修正系数(c_{3-1} 或 c_{3-1}')。

[0218] 在作为修正系数,使用以被修正的第2以后的样本的修正用内源性miRNA的代表值为分母、以基准样本的修正用内源性miRNA的代表值为分子而得的比的情况下,即上述式5的情况下,通过对第2以后的样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值乘以修正系数,来对于第2以后的各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示,则某一“被修正的样本”中的第i目标miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式11来求。

$$[0219] \quad E_i = \log_2 W_i \times c_{2-1} \cdots \text{式11}$$

[0220] 其中, W_i 是来自用于捕捉第i miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0221] 与此相反,在作为修正系数,使用以基准样本的修正用内源性miRNA的代表值为分母、以第2以后的样本的修正用内源性miRNA的代表值为分子而得的比的情况下,即上述式5'的情况下,通过第2以后的样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值除以修正系数,来对于第2以后的各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示,则某一“被修正的样本”中的第i miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式11'来求。

$$[0222] \quad E_i = \log_2 W_i \div c_{2-1}' \cdots \text{式11'}$$

[0223] 其中, W_i 的定义与上述式11相同。

[0224] 如果修正在第2样本中测定的目标miRNA表达量,则对该第2样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值除以 c_{2-1} 、或乘以 c_{2-1}' 即可。对于第3以后的样本也是同样的。无论按照式5和式11的步骤,还是按照式5'和式11'的步骤,最终获得的修正后目标miRNA的表达量 E_i 的值是相同的。此外,作为基准样本的第1样本的代表值与本方法中的固定数值(基准值)之比当然为1,但在程序的构成上也可以进行对第1样本的目标miRNA表达量乘以1或该目标miRNA表达量除以1这样的计算。

[0225] 2-2.固定数值修正法

[0226] 目标miRNA表达量的修正分别使用通过与固定数值(基准值)的比获得的修正系数来进行。即,对于某一样本修正目标miRNA表达量时,使用用于该样本的修正系数(r_{2-2} 或 r_{2-2}')。

[0227] 在作为修正系数,使用以样本的修正用内源性miRNA的代表值为分母、以基准值为分子而得的比的情况下,即上述式7的情况下,通过对样本中的各目标miRNA的表达量的测定值的对数值乘以修正系数,来对于各样本进行目标miRNA的表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示,则某一“被修正的样本”中的第i目标miRNA的修正后表达量 E_i 可以通过下述式12来求。

$$[0228] \quad E_i = \log_2 W_i \times r_{2-2} \cdots \text{式12}$$

[0229] 其中, W_i 是来自用于捕捉第i miRNA的探针固定化区域的信号测定值。

[0230] 与此相反,在作为修正系数,使用以样本的修正用内源性miRNA的代表值为分母、以基准值为分子而得的比的情况下,即上述式7'的情况下,通过样本中的各目标miRNA表达量的测定值的对数值除以修正系数,从而对于各样本进行目标miRNA表达量的修正。如果将这种情况下的修正用方程式表示,则某一“被修正的样本”中的第i目标miRNA的修正后表达

量 E_i 可以通过下述式12'来求。

[0231] $E_i = \log_2 W_i \div r_{2-2}' \cdots$ 式12'

[0232] 其中, W_i 的定义与上述式12相同。

[0233] <比较分析工序>

[0234] 根据修正后的目标miRNA表达量,在多个体液样本之间对比目标miRNA表达量。在通过基准样本获得法进行修正的情况下,由于作为基准样本的第1样本的目标miRNA表达量不受到修正,因此例如第1样本与第2样本之间的对比成为未修正的第1样本的目标miRNA表达量与修正后的第2样本的目标miRNA表达量之间的对比,但所对比的样本中至少1个是必须经修正的样本。因此,“根据修正后的目标miRNA表达量,在多个体液样本之间对比目标miRNA表达量”这样的术语,也包含在未修正的基准样本与经修正的其他样本之间进行对比的方式。

[0235] 比较分析工序本身可以与现有方法同样地进行。例如,可以作为被称为散布图(Scatter plot)的表达量数据的散布图显示比较分析结果。在应比较的样本是3个的情况下,例如,可以制成2幅将3个中的任1样本与其余的各样本进行比较分析而得的散布图(例如,第1样本-第2样本之间的散布图和第1样本-第3样本之间的散布图),根据需要,也可以进一步制成在其余的2个样本之间(在前述的例子情况下,进一步在第2样本-第3样本之间)进行比较分析而得的散布图。4个以上的样本的比较分析也可以同样地进行。此外,如果是3个样本的比较分析,则也可以3维地制成散布图。即使在基准样本获得法的情况下,也不是必须将基准样本与其他2个样本分别进行比较,也可以进行例如第2样本-基准样本之间的比较和第2样本-第3样本之间的比较。

[0236] 另外,根据修正后的目标miRNA表达量,在任1样本与其余的其他样本之间计算目标miRNA的表达量的差,作为将该差进行对数化而得的变化倍率(fold-change)显示比较分析结果。例如,可以计算基准样本中的目标miRNA的表达量(基准样本获得法的情况)或第1样本中的修正后的目标miRNA的表达量(固定数值修正法的情况)、与第2以后的样本中的修正后的目标miRNA的表达量之差。这种情况下也与上述情况同样地,不限于计算第1样本与其他样本之差,也可以计算第2以后的样本的任一个与其他样本之差。

[0237] 本发明的miRNA表达分析装置是进行上述本发明的比较分析法的装置,包含:

[0238] 记忆单元,记忆对于多个体液样本测定的、目标miRNA的表达量的测定值和选自序列号1~10所示的修正用内源性miRNA中的1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

[0239] 代表值获得单元,对于各体液样本,从1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值、优选为用对数值表示的代表值;

[0240] 修正系数获得单元,作为用于各体液样本的目标miRNA表达量的修正系数,分别获得对于修正用内源性miRNA的表达量任意设定的基准值、与通过所述代表值获得单元获得的各体液样本的代表值的差或比;

[0241] 修正单元,分别使用通过所述修正系数获得单元获得的各修正系数,来修正在该各体液样本中测定的目标miRNA的表达量;和

[0242] 输出单元,根据修正后的目标miRNA表达量,输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

[0243] 在某一方式中,基准值是任意选择的第1样本(基准样本)的修正用内源性miRNA的代表值,在第2以后的体液样本中测定的目标miRNA的表达量被修正。即,在该方式中,本发明的miRNA表达分析装置包含:

[0244] 记忆单元,记忆对于多个样本各自同时测定的多个目标miRNA的表达量和1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

[0245] 代表值获得单元,对于各体液样本,从修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值、优选为用对数值表示的代表值;

[0246] 修正系数获得单元,以任意选择的第1样本作为基准样本,以基准样本的修正用内源性miRNA的代表值作为基准值,分别获得该基准值与其余的第2以后的样本的修正用内源性miRNA代表值的差或比作为用于该第2以后的样本的修正系数;

[0247] 修正单元,分别使用通过修正系数获得单元获得的用于第2以后的样本的修正系数,来修正在第2以后的样本中测定的目标miRNA的表达量;

[0248] 输出单元,根据修正后的目标miRNA表达量,输出在至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

[0249] 在其他方式中,基准值是对于修正用内源性miRNA表达量任意设定的固定数值,对于包含第1样本的全部样本进行目标miRNA表达量的修正。即,在该方式中,本发明的miRNA表达分析装置包含:

[0250] 记忆单元,记忆对于多个样本各自同时测定的多个目标miRNA的表达量和1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值;

[0251] 代表值获得单元,对于各体液样本,从修正用内源性miRNA的表达量的测定值获得代表值、优选为用对数值表示的代表值;

[0252] 修正系数获得单元,以固定数值为基准值,分别获得该基准值与各样本的修正用内源性miRNA的代表值的差或比作为用于该样本的修正系数;

[0253] 修正单元,分别使用通过修正系数获得单元获得的用于各样本的修正系数,来修正在各样本中测定的目标miRNA的表达量;

[0254] 输出单元,根据修正后的目标miRNA表达量,在输出至少2个体液样本之间对比目标miRNA表达量而得的结果。

[0255] 将显示本发明的分析装置的一例的构成的概略的方框图示于图2。本发明的分析装置10具备输入部110、显示部120、输出部130、记忆部140、控制部150、转换部160、分析部170。另外,图3显示本发明的目标miRNA的表达量的修正处理的流程图的一例。

[0256] 输入部110是输入与分析装置10的运作相关的信息的单元。可以优选使用键盘等现有公知的输入单元。通过使用了微阵列的杂交测定获得的表达量数据通过例如与本发明的装置分别设置的扫描仪等读取单元读取,转换成数值数据之后,从输入部110将该数值数据输入分析装置10。或者,扫描仪等读取单元也可以包含在本发明的分析装置10中(未图示)。

[0257] 从输入部110输入的表达量数据、或通过组装在分析装置10中的读取单元读取并数值化的表达量数据,被记忆部140记忆。此时,记忆部140作为记忆对于多个样本分别同时测定的多个目标miRNA的表达量和1种或多种修正用内源性miRNA的表达量的测定值的记忆单元发挥功能。

[0258] 存储在记忆部140的各样本的目标miRNA和修正用内源性miRNA的表达量的测定值数据通过转换部160被转换成以2为底的对数。接着,通过分析部170对于各样本获得对数转换后的修正用内源性miRNA的表达量的测定值的代表值。代表值如关于比较分析法的说明中所述的那样,例如可以是1个或多个修正用内源性miRNA表达量的平均值或中央值(在修正中仅使用1种修正用内源性miRNA的情况下,如果在阵列上存在多个用于测定该修正用内源性miRNA的探针固定化区域,则代表值可以成为平均值或中央值)、或特定的1种修正用内源性miRNA的测定值。

[0259] 获得代表值之后,通过分析部170计算出基准样本的修正用内源性miRNA的代表值与第2以后的样本的修正用内源性miRNA的代表值的差或比,分别获得用于该第2以后的样本的修正系数。修正系数的获得的详细描述如比较分析法的<修正系数获得工序>中所述。此外,程序的构成上,也可以是对于作为基准样本的第1样本也获得修正系数0(计算差的情况)或修正系数1(计算比的情况)的构成。

[0260] 在装置10中,基准样本的选择可以通过由装置10的操作者从输入部110指定任意的1个样本来进行。或者,也可以由装置10自动地选择成为基准样本的1个样本。例如,可以从输入部110输入数据,通过装置10选择记忆部140最初记忆了数据的样本作为基准样本。该基准样本的选择或输入的步骤在图3中方便地位于代表值获得工序(S-3)之后,但不限于此,也可以在更早的步骤、例如数据存储时执行。

[0261] 接下来,分析部170分别使用用于第2以后的样本的修正系数,修正在第2以后的样本中测定的目标miRNA的表达量数据。修正操作的详细如比较分析法的<修正工序>所述。此外,在程序的构成上,也可以对于作为基准样本的第1样本的目标miRNA表达量数据也执行使用修正系数0(计算差的情况)或修正系数1(计算比的情况)的修正操作。

[0262] 接着,通过分析部170进行基准样本的目标miRNA表达量与第2以后的样本的修正后目标miRNA表达量的对比。对比的结果通过输出部130而被输出到显示部120显示。进而,可以将对比结果输出到打印机等输出装置、记录介质等。此外,输出部130也可以介由网络向存在于装置外部的数据库等外部记忆装置输出对比分析结果那样地构成。

[0263] 记忆部140除了记忆多个目标miRNA的表达量和多个修正用内源性miRNA的表达量的测定值之外,还适当记忆上述各工序产生的中间分析结果。

[0264] 装置10的上述各种运作通过控制部150来控制。具体地,如图2的虚线箭头所示,对输入部110、显示部120、输出部130、记忆部140、控制部150、转换部160、分析部170的各单元,从控制部150输出控制信息,基于该控制信息各单元联合运作,从而装置10全体运作。

[0265] 另外,在该分析装置中,可以在装置10中将预先指定的固定数值登记在转换部160等,作为代替基准样本中的修正用内源性miRNA的表达量的代表值的基准值利用,从而取代利用基准样本的修正用内源性miRNA代表值作为基准值。这种情况下的方法的详细如比较分析法的<修正系数获得工序>、<修正工序>所述。

[0266] 另外,本发明提供用于使计算机作为上述分析装置发挥功能的程序。该程序具体地是使计算机作为上述的各单元(即,记忆单元、代表值获得单元、修正系数获得单元、修正单元、和输出单元)发挥功能的程序。或者另外,本发明提供用于使计算机执行上述本发明的比较分析方法的各工序的程序。比较分析方法中包含上述的测定工序、代表值获得工序、修正系数获得工序、和修正工序,进而根据修正后的目标miRNA表达量,可以包含在多个体

液样本之间对比目标miRNA表达量的比较分析工序。这些程序是使用通过微阵列等与目标miRNA的表达量同时测定的修正用内源性miRNA的表达量的数据,使计算机执行目标miRNA的表达量的修正的程序。

[0267] 此外,本发明提供记录了上述任一程序的计算机可读的记录介质。

[0268] “记录介质”可以是软盘、磁光盘、ROM、EPROM、EEPROM、CD-ROM、MO、DVD等任意的“便携的物理介质”(非瞬时性的记录介质)。或者,也可以是像在介由以LAN、WAN、互联网为代表的网络传送程序时的通信回路、载波那样,短期保持程序的“通信介质”。

[0269] “程序”是用任意的语言、记述方法记述的数据处理方法,源代码、二进制代码等形式均可。此外,“程序”未必限于单一地构成的程序,也包含作为多个模块、库分散构成的程序、以OS(操作系统、Operating System)为代表的与一个个程序协作实现其功能的程序。此外,关于实施方式中所示的各装置中用于读取记录介质的具体构成、读取步骤、或者读取后的安装步骤等,可以使用公知的构成、步骤。

[0270] 本发明包含固定化了用于捕捉多个目标miRNA的探针和用于捕捉多个修正用内源性miRNA的探针的支持体的miRNA表达分析用芯片。关于该芯片的优选条件,如本发明的比较分析方法中所说明的那样。

[0271] 在本发明中,使用以下所说明的序列号1~10所示的miRNA的至少1一者作为修正用内源性miRNA。

[0272] 序列号1是在miRBase中以Accession No.(登记号)MIMAT0023710登记的hsa-miR-6085的碱基序列。在本说明书中,“miR-6085基因”或“miR-6085”这样的术语包含序列号1所记载的hsa-miR-6085、其他生物种同源物(homologue)或直系同源物(orthologue)等。hsa-miR-6085基因可以通过Voellenkle C等、2012年、RNA、18卷、p.472-484所记载的方法获得。

[0273] 序列号2是在miRBase中以Accession No.MIMAT0022941登记的hsa-miR-1227-5p的碱基序列。在本说明书中,“miR-1227-5p基因”或“miR-1227-5p”这样的术语包含序列号2所记载的hsa-miR-1227-5p、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-1227-5p基因可以通过Berezikov E等、2007年、Molecular Cell、28卷、p.328-336所记载的方法来获得。

[0274] 序列号3是在miRBase中以Accession No.MIMAT0013802登记的hsa-miR-2861的碱基序列。在本说明书中,“miR-2861基因”或“miR-2861”这样的术语包含序列号3所记载的hsa-miR-2861、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-2861基因可以通过Li H等、2009年、Journal of Clinical Investigation、119卷、p.3666-3677所记载的方法来获得。

[0275] 序列号4是在miRBase中以Accession No.MIMAT0004609登记的hsa-miR-149-3p的碱基序列。在本说明书中,“miR-149-3p基因”或“miR-149-3p”这样的术语包含序列号4所记载的hsa-miR-149-3p、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-149-3p基因可以通过Lagos-Quintana M等、2002年、Current Biology、12卷、p.735-739所记载的方法来获得。

[0276] 序列号5是在miRBase中以Accession No.MIMAT0018987登记的hsa-miR-4463的碱基序列。在本说明书中,“miR-4463基因”或“miR-4463”这样的术语包含序列号5所记载的hsa-miR-4463、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-4463基因可以通过Jima DD等、2010年、Blood、116卷、p.e118-e127所记载的方法来获得。

[0277] 序列号6是在miRBase中以Accession No.MIMAT0019045登记的hsa-miR-4508的碱基序列。在本说明书中,“miR-4508基因”或“miR-4508”这样的术语包含序列号6所记载的

hsa-miR-4508、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-4508基因可以通过Jima DD等、2010年、Blood、116卷、p.e118-e127所记载的方法来获得。

[0278] 序列号7是在miRBase中以Accession No.MIMAT0023715登记的hsa-miR-6090的碱基序列。在本说明书中，“miR-6090基因”或“miR-6090”这样的术语包含序列号7所记载的hsa-miR-6090、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-6090基因可以通过Yoo JK等、2012年、Stem Cells and Development、21卷、p.2049-2057所记载的方法来获得。

[0279] 序列号8是在miRBase中以Accession No.MIMAT0027450登记的hsa-miR-6775-5p的碱基序列。在本说明书中，“miR-6775-5p基因”或“miR-6775-5p”这样的术语包含序列号8所记载的hsa-miR-6775-5p、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-6775-5p基因可以通过Ladewig E等、2012年、Genome Research、22卷、p.1634-1645所记载的方法来获得。

[0280] 序列号9是在miRBase中以Accession No.MIMAT0027506登记的hsa-miR-6803-5p的碱基序列。在本说明书中，“miR-6803-5p基因”或“miR-6803-5p”这样的术语包含序列号9所记载的hsa-miR-6803-5p、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-6803-5p基因可以通过Ladewig E等、2012年、Genome Research、22卷、p.1634-1645所记载的方法来获得。

[0281] 序列号10是在miRBase中以Accession No.MIMAT0023252登记的hsa-miR-5787的碱基序列。在本说明书中，“miR-5787基因”或“miR-5787”这样的术语包含序列号10所记载的hsa-miR-5787、其他生物种同源物或直系同源物等。hsa-miR-5787基因可以通过Yoo H等、2011年、Biochem Biophys Res Commun、415卷、p.567-572所记载的方法来获得。

[0282] 实施例

[0283] 以下，基于实施例更具体地说明本发明。当然，本发明不限于下述实施例。

[0284] <实施例1>

[0285] 通过以下的过程，选择本发明中使用的修正用内源性miRNA。

[0286] (DNA微阵列)

[0287] 使用东丽株式会社制的“3D-Gene”human miRNA oligo chip(对应于miRBase release 20)进行以下的实验。

[0288] (样本RNA的调制)

[0289] 作为样本RNA，使用从健康人血清157个样本使用“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample kit提取的RNA。将所得的样本RNA使用“3D-Gene”miRNA labeling kit(东丽株式会社)进行标记。标记的样本RNA按照“3D-Gene”miRNA chip(东丽株式会社)的标准规程进行杂交和清洗。反应后的DNA微阵列使用微阵列扫描仪(东丽株式会社)检测荧光信号。扫描仪的设定为激光输出100%、光电倍增管的电压设定为AUTO设定。

[0290] (miRNA信号值的获得)

[0291] 将从DNA微阵列获得的miRNA的信号值转换成以2为底的对数，利用在RNA提取和标记时添加的外标核酸进行实验误差修正。

[0292] (修正用内源性miRNA的获得)

[0293] 对于所得的实验误差修正后的全部157个样本的miRNA信号值，通过geNorm法进行样本之间最少变化miRNA的提取。GeNorm法是由Vandesompele等提出的定量RT-PCR法中的内源性管家基因(参考基因)的探索法(Genome Biology 2002,3:research0034-research0034.11)。作为挑选对象样本所特有的内源性管家基因的mRNA的方法使用。具体

地,对于同一样本中的全部检测对象的基因的信号值,循环计算2种基因的信号值的比。接着,对于全部的基因的组合所得的比的值(A)计算样本之间的标准误差。接着,对于特定的基因,计算在与其他基因的关系中得到的标准误差(V)的总和(M)。该M值较小的基因是优异的内源性管家基因。

[0294] 另一方面,信号值越小,则通过上述算法获得的A和V成为越小的值,表现上越是优异的内源性管家基因。本次使用的DNA微阵列完整地检测miRBase release 20所登记的全部miRNA,因而如果使用该数据实施geNorm法,则优选选择信号值小的miRNA。由于这样的现象,到目前为止通过geNorm法选择DNA微阵列检测中的内源性管家基因一直被避免。

[0295] 在本实施例中,通过DNA微阵列检测的miRNA中,仅选择信号值在全部样本的半数以上中超过64的稳定检测的miRNA作为geNorm法的应用对象。进而鉴于作为geNorm法的特性,基于同一样本内的基因表达量比来选择内源性管家基因,因而在表达图谱差异较大的样本之间显示稳定的表达量的基因选择困难,因此预先对于实验误差修正后的全部157个样本的各miRNA信号值获得CV(标准误差/平均值),仅选择CV为0.1以下的miRNA作为geNorm法的对象。其结果认为,在从2555种miRNA检测用探针获得的信号值中,以检测281种miRNA的探针的信号值作为geNorm法的对象是适当的。

[0296] 从实际应用geNorm法的281种miRNA中选择M值较小的内源性管家基因、即能作为修正用内源性miRNA利用的10种。将这10种修正用内源性miRNA的序列号、miRNA的名、在miRBase中登记的MIMAT号、通过geNorm计算的M值、碱基序列、和序列中的鸟嘌呤·胞嘧啶的比例(GC%)示于表1。

[0297] 表1

[0298]

序列号	miRNA 名	MIMAT ID	geNorm M 值	碱基序列	GC%
1	hsa-miR-6085	MIMAT0023710	0.058	AAGGGGCUGGGGAGCACA	68
2	hsa-miR-1227-5p	MIMAT0022941	0.058	GUGGGGCCAGGCGGUGG	82
3	hsa-miR-2861	MIMAT0013802	0.059	GGGGCCUGGCGGUGGGCGG	89
4	hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	0.059	AGGGAGGGACGGGGGCGUGUC	76
5	hsa-miR-4463	MIMAT0018987	0.060	GAGACUGGGGUGGGGCC	76
6	hsa-miR-4508	MIMAT0019045	0.060	GCGGGGCUGGGCGCGCG	94
7	hsa-miR-6090	MIMAT0023715	0.061	GGGGAGCGAGGGGCGGGGC	89
8	hsa-miR-6775-5p	MIMAT0027450	0.061	UCGGGGCAUGGGGGAGGGAGGCUGG	76
9	hsa-miR-6803-5p	MIMAT0027506	0.062	CUGGGGGUGGGGGGCGGGCGU	82
10	hsa-miR-5787	MIMAT0023252	0.063	GGGCUGGGGCGCGGGGAGGU	85

[0299] 利用DNA微阵列的miRNA的检测通过目标miRNA与用于捕捉该目标miRNA的探针形成核酸双链的杂交法来进行,因而预想使核酸双链稳定化的鸟嘌呤和胞嘧啶的含量高的序列可以特别稳定地通过DNA微阵列检测。即,一般设想优选选择鸟嘌呤和胞嘧啶的含量高的序列作为内源性管家基因。然而,如表1所示,未必通过geNorm法选择的内源性管家基因(修正用内源性miRNA)鸟嘌呤和胞嘧啶的含有率就高。相反完全没有发现鸟嘌呤和胞嘧啶的含有率高的miRNA优先成为内源性管家基因(修正用内源性miRNA)这种现象。

[0300] <实施例2>

[0301] 分别单独使用所选择的修正用内源性miRNA,进行多个体液样本的目标RNA的表达量修正。

[0302] 由于RNA的物质不稳定性,在测定RNA表达量时,经常要求在其品质不同、即RNA的分解度不同的样本之间进行绝对的表达量比较。在样本是体液的情况下,特别设想需要通过测定长时间放置在室温的样本中的目标miRNA表达量来获得某些结果的情况。

[0303] 此时,认为通过以血清中所含的特定的修正用内源性miRNA的量作为基准根据RNA的分解度进行修正,无论RNA品质如何,都能够对于miRNA的表达谱(相对的miRNA的表达量比)进行绝对的样本间比较。

[0304] 在本实施例中,通过将人采取的血清在各种条件保存,制成血清中所含的miRNA的品质处于各种水平的血清,对来自这些血清的提取RNA样本的测定值应用本发明的修正方法。

[0305] (DNA微阵列)

[0306] 使用东丽株式会社制的“3D-Gene”human miRNA oligo chip(miRBase release 20对应、东丽株式会社)进行以下的实验。

[0307] (样本RNA的调制)

[0308] 对人血清进行采血,血清分离后静置在下述2种条件,使血清所含的RNA的品质变化。以下显示2种条件。1:血清分离后在室温静置6小时,进行RNA提取。2:血清分离后在25℃静置24小时,进行RNA提取。使用“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample kit RNA从各种条件下制成的血清提取总RNA,作为样本RNA。

[0309] 将所得的样本RNA分别使用“3D-Gene”miRNA labeling kit(东丽株式会社)进行标记。经标记的样本RNA按照“3D-Gene”human miRNA oligo chip(东丽株式会社)的标准规程进行杂交和清洗。反应后的DNA微阵列使用微阵列扫描仪(东丽株式会社)检测荧光信号。扫描仪的设定为激光输出100%,光电倍增管的电压设定为AUTO设定。

[0310] (miRNA信号值的修正)

[0311] 图4A显示将从DNA微阵列获得的miRNA的信号值转换成以2为底的对数而得的信号值的分布(即未修正的表达量信号值)。与此相对,图4B~K显示经序列号1~10所示的修正用内源性miRNA的信号值和作为预先分别设定的固定数值的基准值修正的、修正后信号值的分布。图中、Day-0(虚线)是条件1的样本RNA,Day-1_25℃(实线)是条件2的样本RNA。

[0312] 其中,利用序列号1~10所示的修正用内源性miRNA的信号值的修正通过以下所示的方法进行。

[0313] 对于序列号1~10所示的修正用内源性miRNA,分别设定作为基准值使用的固定数值。进而,对于各样本,将序列号1~10所示的修正用内源性miRNA的信号值转换为以2为底的对数,将该转换后的信号值作为代表值,取与基准值的比(基准值/代表值),作为修正系数。修正系数是对于序列号1~10的修正用内源性miRNA分别设定的。对于每个修正用内源性miRNA,通过各样本的全部miRNA信号值乘以这些修正系数来进行修正。

[0314] 其结果如图4B~K所示,即使单独使用序列号1~10所示的修正用内源性miRNA的任一者,也能够使改变了条件的2种样本的表达谱同一化。

[0315] <实施例3>

[0316] 如实施例2所示,序列号1~10的修正用内源性miRNA即使分别单独使用也具有充

分的目标miRNA的表达量的修正效果,但设想通过进一步将它们进行组合,即使在由于实验不完备等而发生一部分修正用内源性miRNA数据损失的情况下,也能够将其补充。因此,组合使用多个修正用内源性miRNA进行目标miRNA的表达量的修正,确认了修正的效果。样本使用与实施例2同样的样本。

[0317] 将序列号2、4和5的修正用内源性miRNA的信号值转换为以2为底的对数,获得该转换后的信号值的平均值或中央值,作为代表值。作为基准值使用固定数值。求出包含实施例2中调制的2种样本的多个血清RNA样本中的3种修正用内源性miRNA的全部表达量(对数转换后信号值)的平均值,使用该平均值作为固定数值(基准值)。对于各样本,取修正用内源性miRNA的代表值与基准值的比(基准值/代表值)作为用于该样本的修正系数。通过使对应的各样本的全部目标miRNA信号值乘以该修正系数,来进行目标miRNA信号值的修正。

[0318] 图5是作为修正用内源性miRNA的表达量的代表值使用对数转换后信号值的平均值的情况下的目标miRNA的修正后信号值的分布。与分别单独使用序列号1~10的修正用内源性miRNA进行修正的实施例2同样地,即使在组合使用多个修正用内源性miRNA进行修正的情况下,也能够使各样本的目标miRNA的表达谱同一化。

[0319] <实施例4>

[0320] 如实施例3所示,序列号1~10的修正用内源性miRNA,通过将它们进行组合也对修正有用。关于该修正效果,确认了组合序列号1~10的任一者都显示同样的效果。样本使用与实施例2同样的样本。

[0321] 将序列号2、3、4、5和6的修正用内源性miRNA的信号值转换为以2为底的对数,对于各样本,获得任意3种修正用内源性miRNA转换后的信号值的平均值,作为该样本中的代表值。基准值为固定数值,使用用于代表值获得的3种修正用内源性miRNA的对数转换后信号值在包含实施例2中调制的2种样本的多个血清RNA样本中的平均值作为固定数值(基准值)。对于各样本,取代表值与基准值的比(基准值/代表值)作为用于该样本的修正系数。通过使对应的各样本的全部目标miRNA信号值乘以该修正系数,来进行各样本的miRNA表达量的修正。

[0322] 图8显示修正后信号值的分布。图8A是未修正的表达量信号值的分布,图8B~I是修正后表达量信号值的分布。与分别单独使用序列号1~10的修正用内源性miRNA进行修正的实施例2同样地,能够使各样本的目标miRNA的表达谱同一化。

[0323] <比较例1>

[0324] 进行实施例1的研究时,在将从血清RNA获得的样本RNA分别使用“3D-Gene”miRNA labeling kit(东丽株式会社)进行标记的步骤中,作为从外部添加的基准物质,添加2种合成RNA序列(分别为20mer(20聚体)、称为添加对照1和添加对照2)。这些合成RNA序列与来自血清的miRNA同样地被荧光标记,通过“3D-Gene”human miRNA oligo chip(东丽株式会社)来检测信号量。于是,将从添加对照1和添加对照2个各8点、计16点的点样获得的信号值转换成以2为底的对数,获得其中央值,作为代表值。取该代表值与预先设定的固定数值(基准值)的比(基准值/各样本的代表值),获得各样本用的修正系数。通过各样本的全部miRNA信号值乘以该修正系数来进行修正。图6A显示修正前的信号值的分布,图6B显示修正后的信号值的分布。显示在通过标记时从外部添加的添加对照来进行修正的情况下,样本中的目标miRNA的信号值未被充分修正。

[0325] <比较例2>

[0326] 表2显示到目前为止通过现有例作为miRNA的表达量修正用显示的let-7d-5p、let-7g-5p、let-7i-5p、miR-16、miR-31、miR-223在实施例2中的表达量。除了has-miR-16-5p以外,在将所得的信号值转换成以2为底的对数的情况下,仅显示0~5的范围的信号,由于表达量不充分这样的理由,不适合作为用于修正全部miRNA的表达量的基准。另外,图7显示用hsa-miR-16-5p进行修正时的修正信号值的分布。显示在利用hsa-miR-16-5p的表达量的修正中,样本中的目标miRNA的信号值未被充分修正。

[0327] 表2

[0328]

miRNA 名	ID	表达量 Day0-1	表达量 Day-1_25℃
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	0.0	0.0
hsa-let-7e-3p	MIMAT0004485	4.7	4.1
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	4.0	0.0
hsa-let-7g-3p	MIMAT0004584	4.0	0.0
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	4.4	0.0
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	3.9	0.0
hsa-miR-16-1-3p	MIMAT0004489	3.6	0.0
hsa-miR-16-2-3p	MIMAT0004518	3.8	4.5
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	7.1	7.5
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	0.0	0.0
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	3.7	4.8
hsa-miR-223-5p	MIMAT0004570	3.7	4.4
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	6.0	0.0

[0329] 符号说明

[0330] 10 装置

[0331] 110 输入部

[0332] 120 显示部

[0333] 130 输出部

[0334] 140 记忆部

[0335] 150 控制部

[0336] 160 转换部

[0337] 170 分析部

序列表

	<110>	东丽株式会社	
	<120>	miRNA 表达量的比较分析方法和装置	
	<130>	PF543-PCT	
	<160>	10	
	<170>	PatentIn 版本 3.5	
	<210>	1	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人(Homo sapiens)	
	<400>	1	
		aaggggcugg gggagcaca	19
[0001]	<210>	2	
	<211>	17	
	<212>	RNA	
	<213>	人(Homo sapiens)	
	<400>	2	
		guggggccag gcggugg	17
	<210>	3	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人(Homo sapiens)	
	<400>	3	
		ggggccuggc ggugggcgg	19
	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人(Homo sapiens)	

	<400> 4 agggagggac gggggcugug c	21
	<210> 5 <211> 17 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 5 gagacugggg uggggcc	17
	<210> 6 <211> 17 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 6 gcggggcugg gcgcgcg	17
[0002]	<210> 7 <211> 19 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 7 ggggagcgag gggcggggc	19
	<210> 8 <211> 25 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 8 ucggggcaug ggggagggag gcugg	25
	<210> 9 <211> 22 <212> RNA <213> 人(Homo sapiens)	

	<400> 9	
	cugggggugg ggggcugggc gu	22
	<210> 10	
[0003]	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 10	
	gggcuggggc gcggggaggu	20

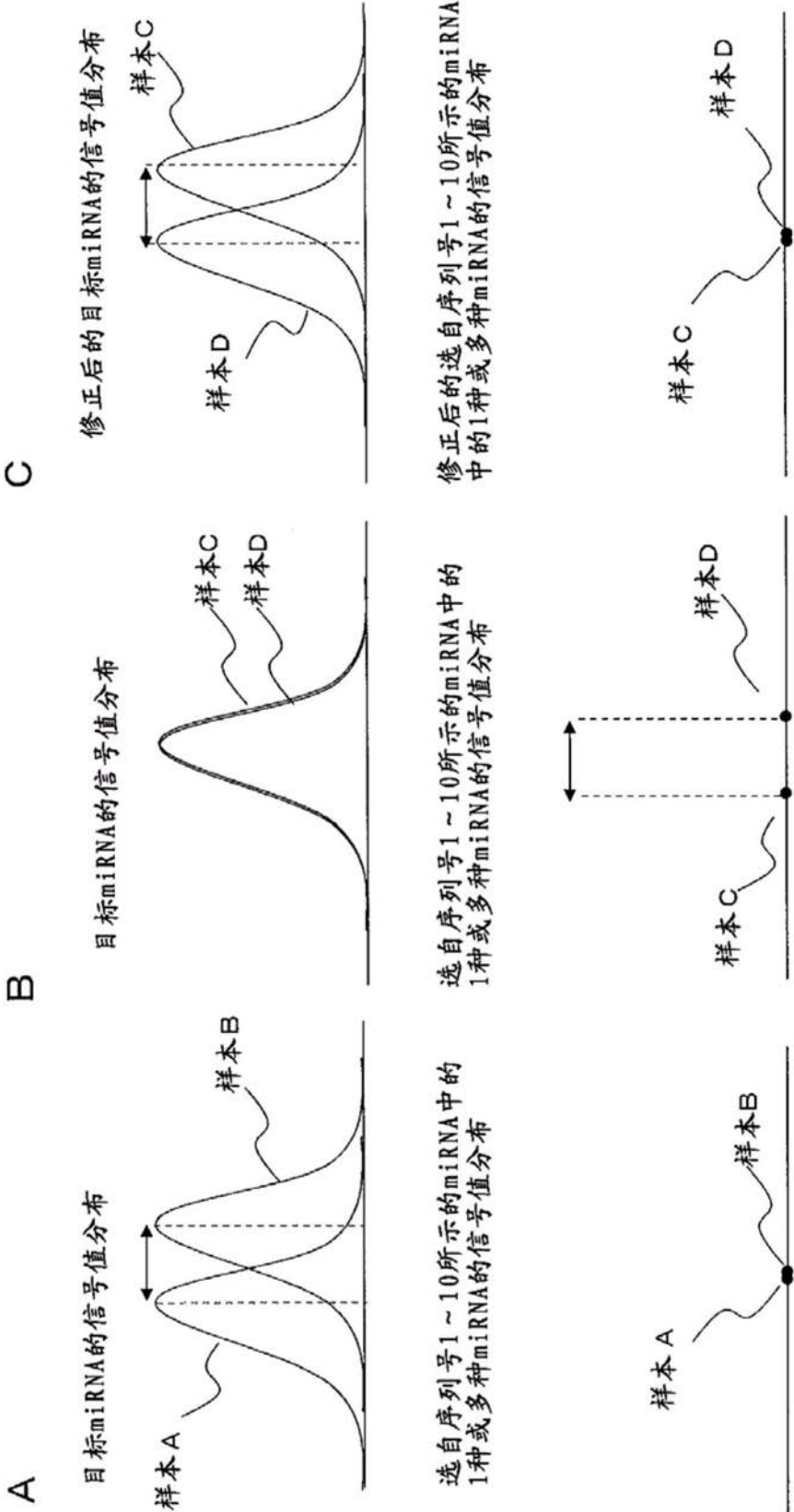


图1

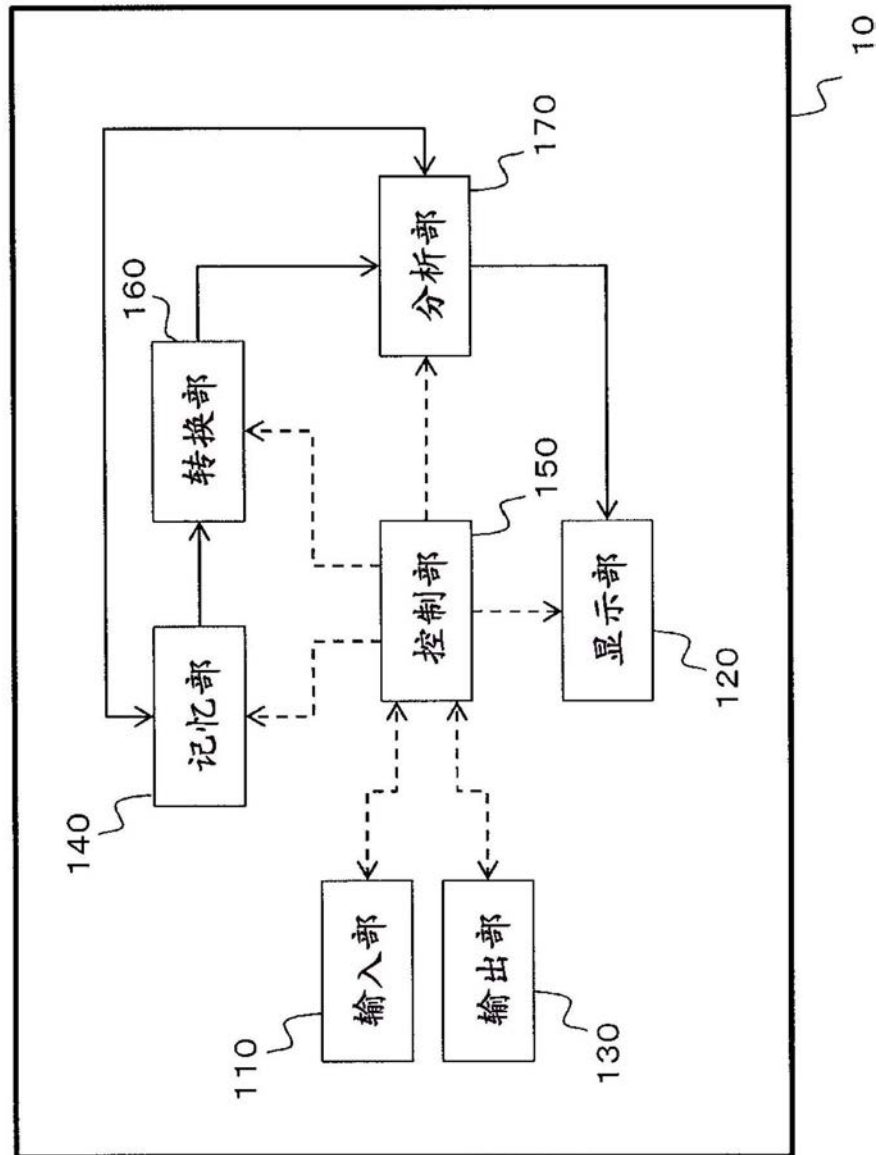


图2

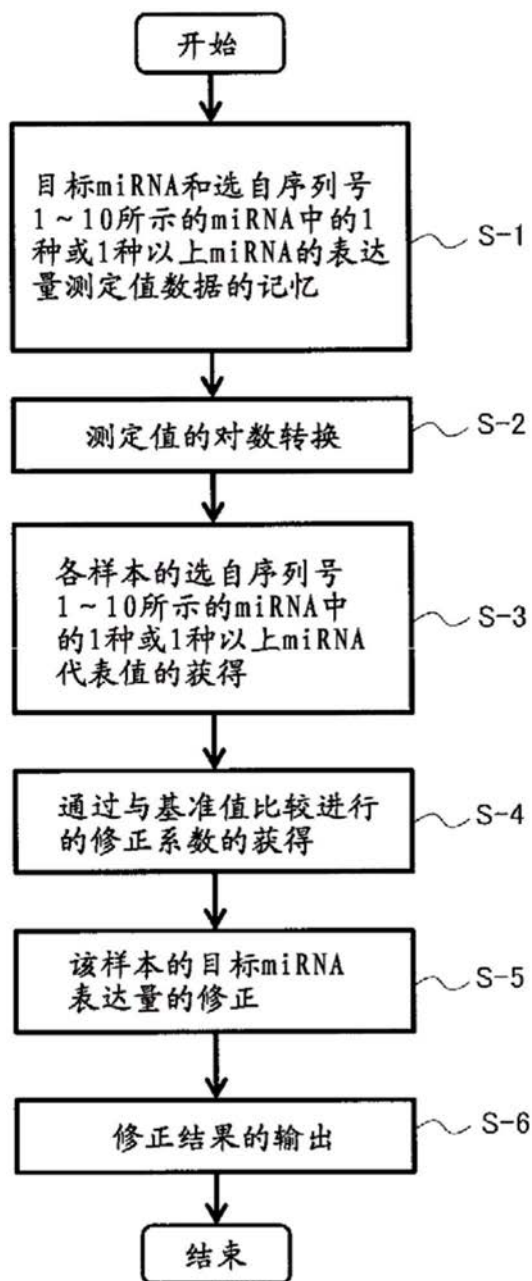


图3

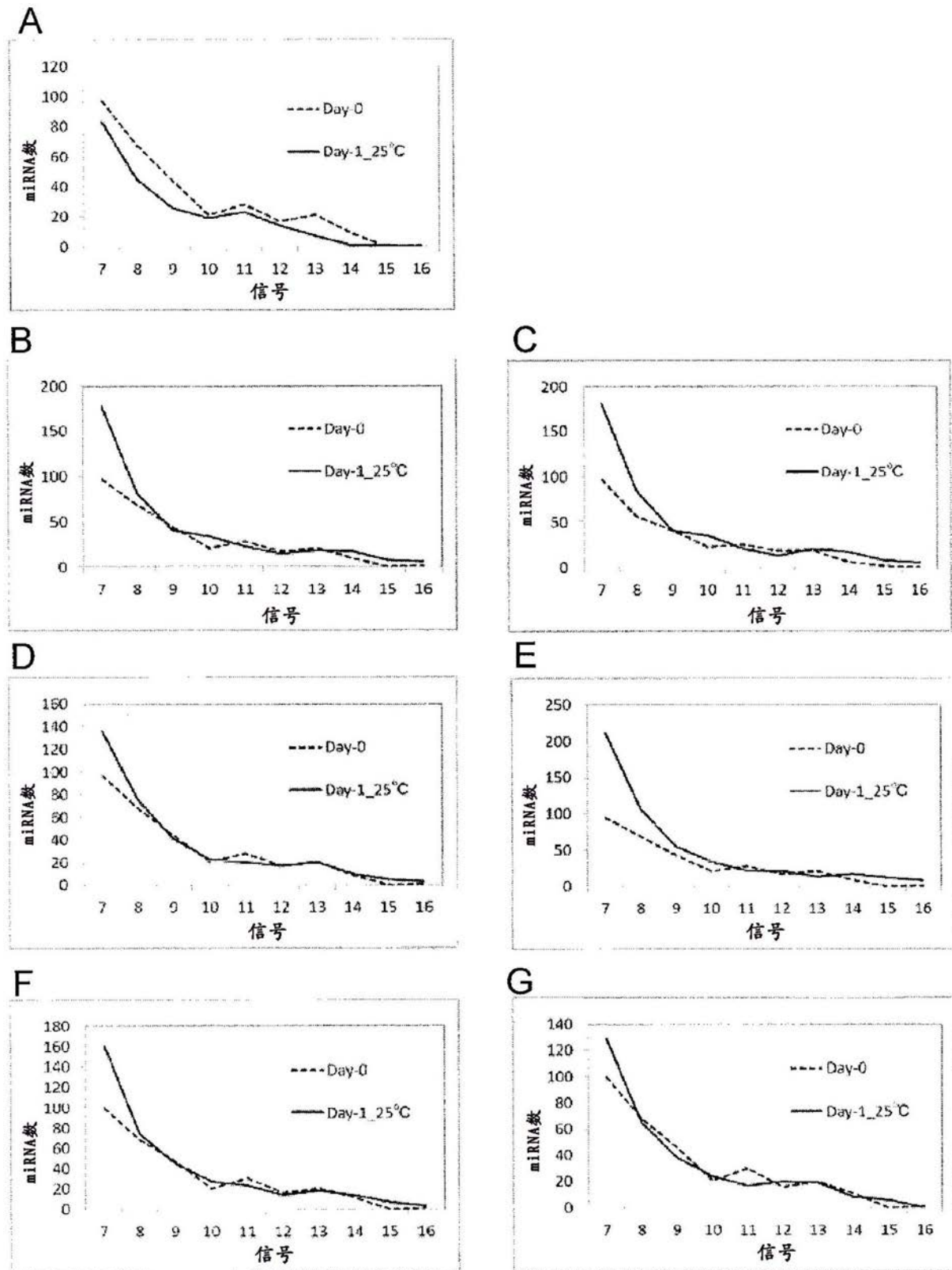


图4-1

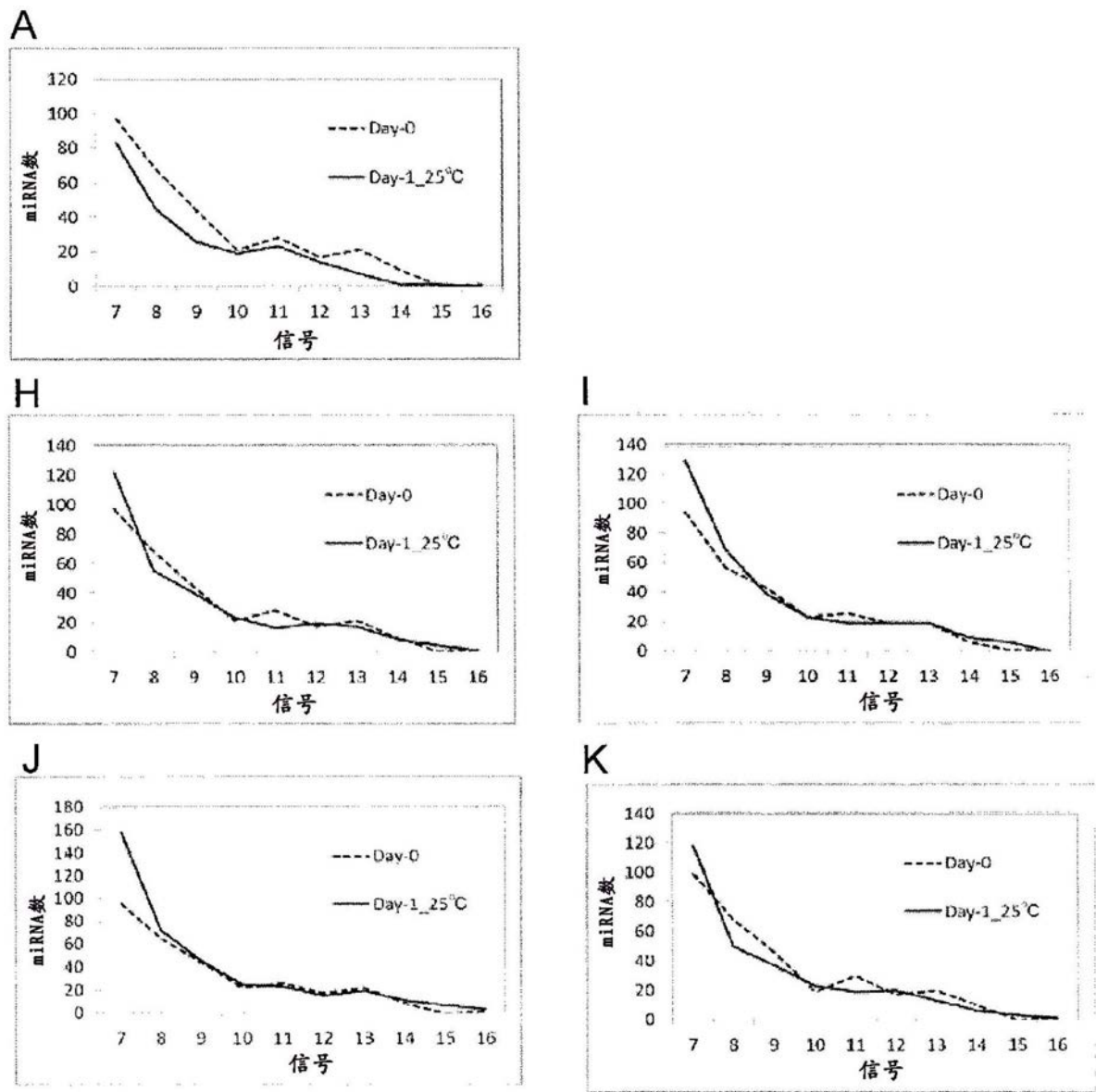


图4-2

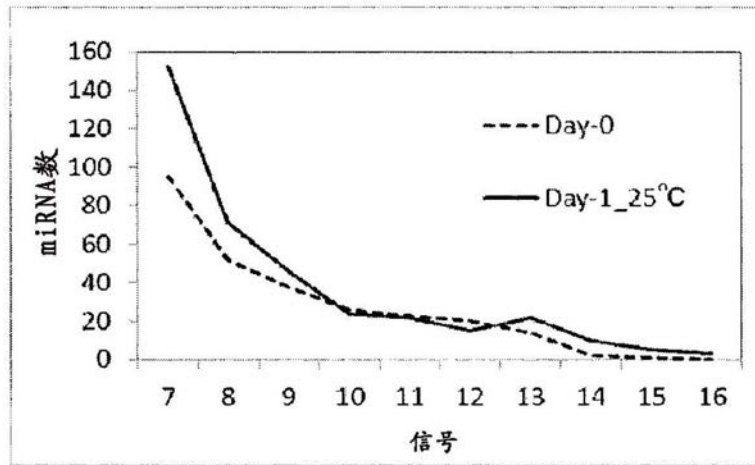


图5

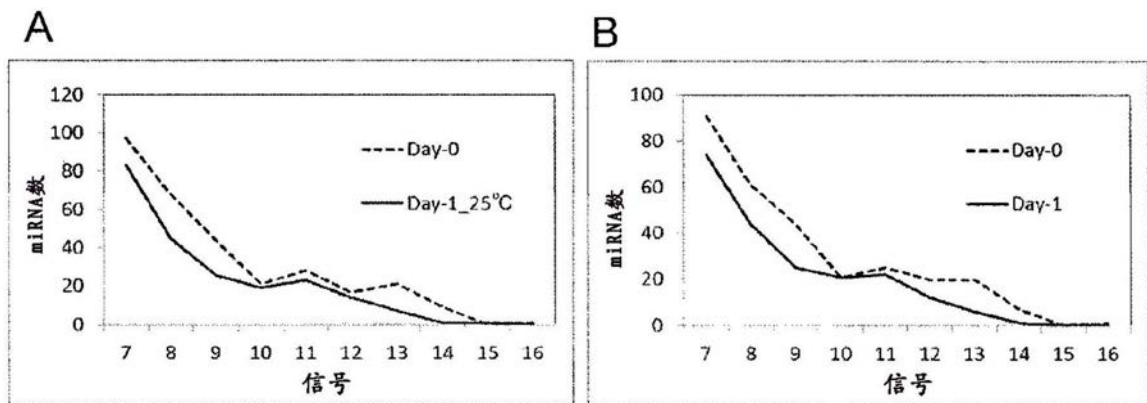


图6

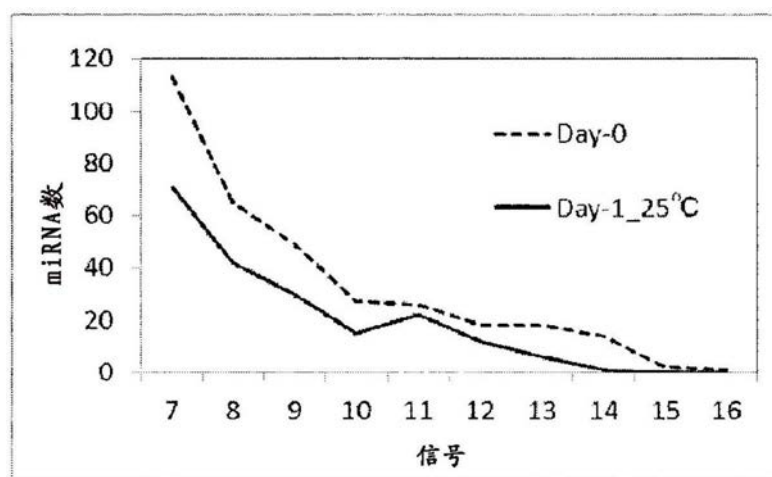


图7

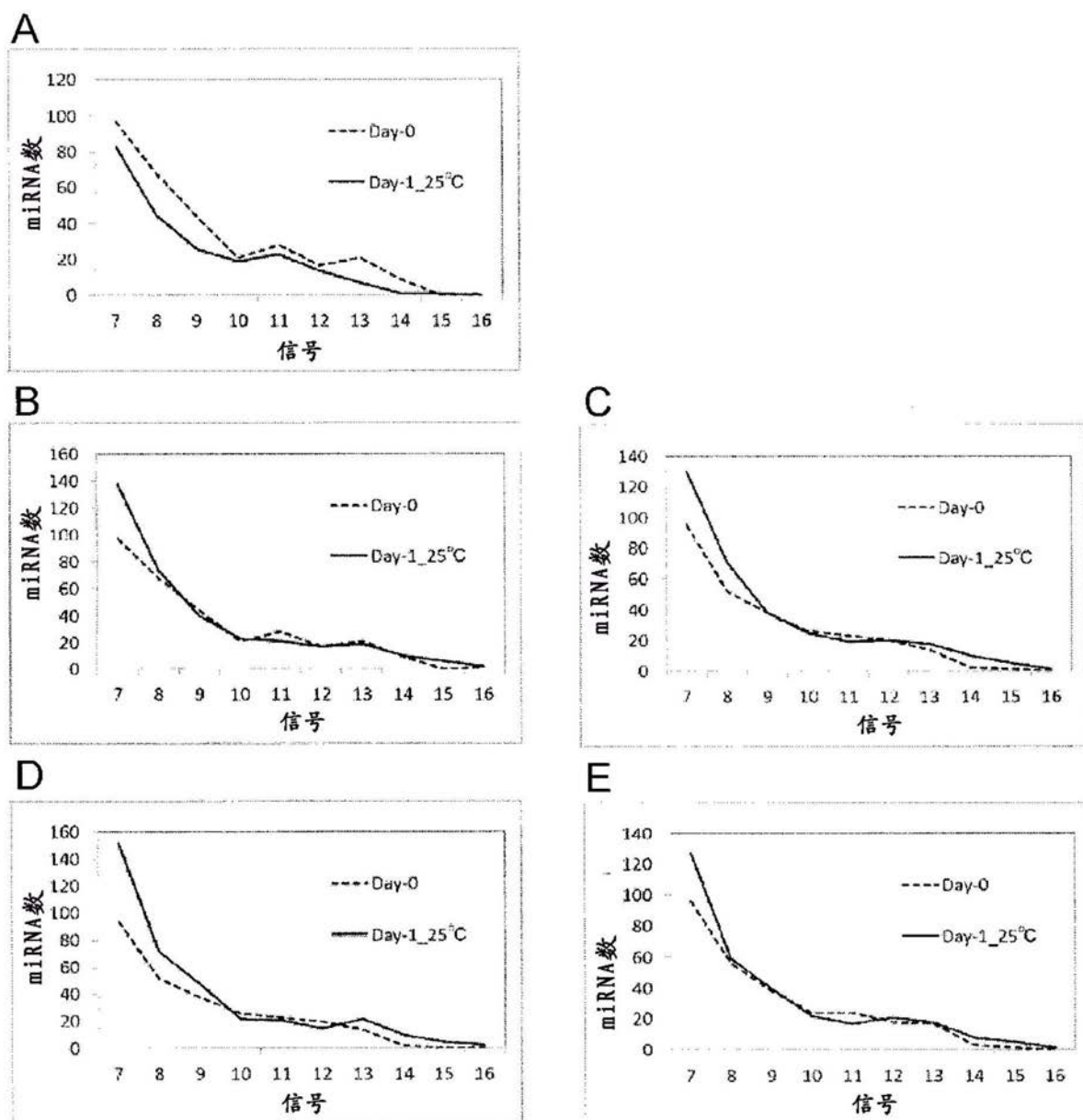


图8-1

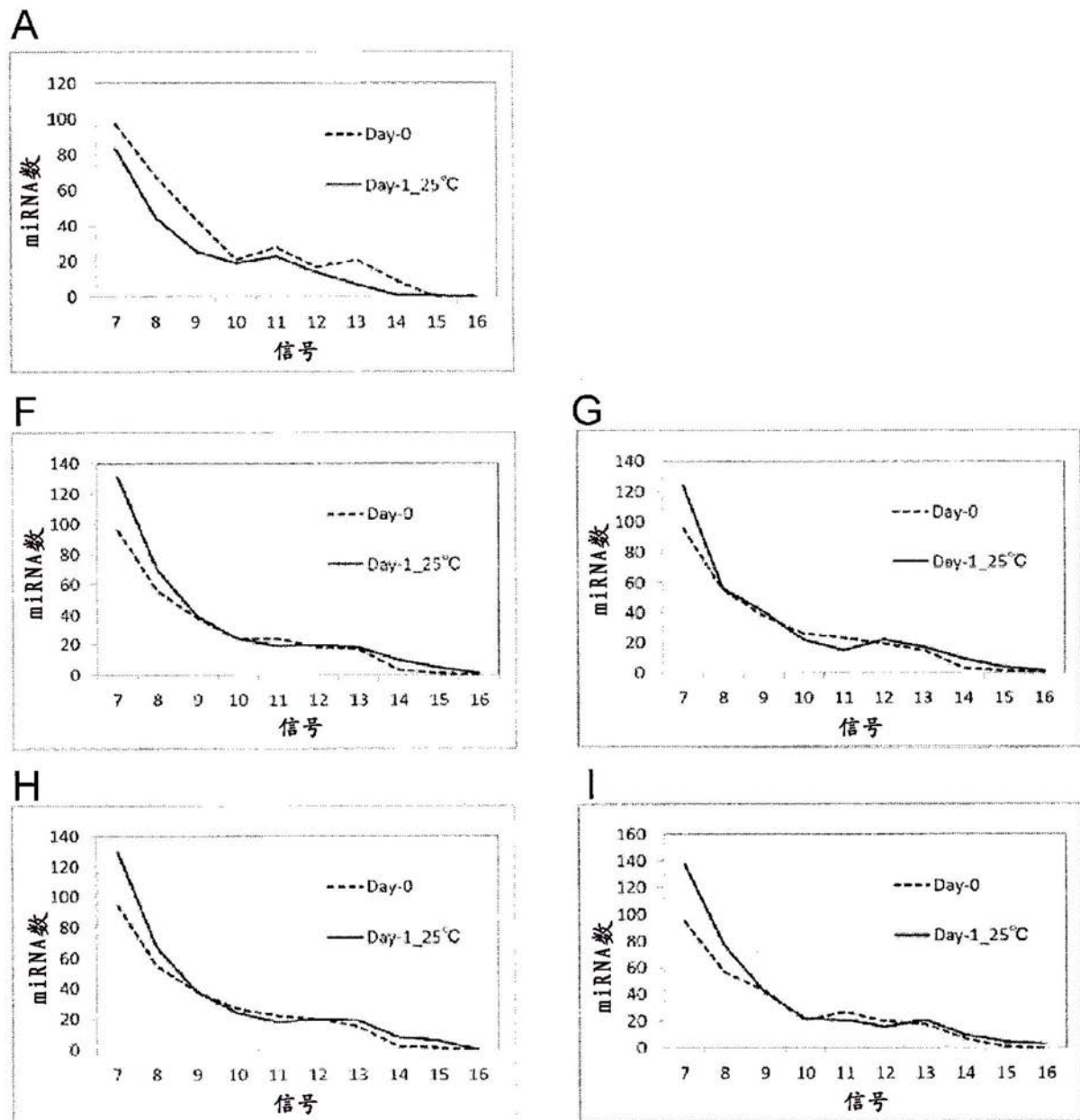


图8-2

专利名称(译)	miRNA表达量的比较分析方法和装置		
公开(公告)号	CN107075578A	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN201580049304.X	申请日	2015-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	小园聪子 近藤哲司		
发明人	小园聪子 近藤哲司		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	G16B40/00 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6816 C12Q1/6876 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/53 G01N37/00 G16B25/00 C12Q2525/207 C12Q2537/165 C12Q2545/101		
代理人(译)	段承恩		
优先权	2014187685 2014-09-16 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了在多个体液样本之间对miRNA的表达量进行比较分析的方法。在本发明的比较分析方法中，使用与体液样本中的目标miRNA的表达量同时测定的修正用内源性miRNA的表达量，来修正该样本中的目标miRNA的表达量。作为修正用内源性miRNA，使用选自特定的10种修正用内源性miRNA的1种或多种miRNA。根据本发明，能够比以往更正确地实施体液样本之间的目标miRNA的比较分析。

