



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108474033 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201780005057.2

(22)申请日 2017.02.21

(30)优先权数据

2016-030904 2016.02.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/006324 2017.02.21

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/146033 JA 2017.08.31

(71)申请人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 名取一惠 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 1/6869*(2018.01)

*G01N 37/00*(2006.01)

*G06F 19/20*(2011.01)

*C12M 1/00*(2006.01)

*C12N 15/09*(2006.01)

*C12N 15/113*(2010.01)

*G01N 33/50*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页  
序列表7页

(54)发明名称

来源于体液的miRNA的品质的评价方法

(57)摘要

本发明公开了评价来源于体液样本的miRNA的品质的新方法。在本发明的方法中,以序列号1~12所示miRNA的至少任一种作为基准miRNA,将体液样本中的该基准miRNA的存在量、与处于核酸试样未分解状态的标准体液样本中的miRNA的存在量进行比较,从而评价miRNA的品质。包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA是作为依赖于体液样本中的核酸试样的分解而存在量减少的miRNA,由本申请发明者们选择的miRNA。

1. 一种来源于体液样本的miRNA的品质评价方法,所述方法包括:

测定工序,使用由体液样本和标准体液样本制备的包含miRNA的RNA样品,分别测定1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择;

比较工序,将体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得体液样本和标准体液样本之间的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比;和

判定工序,基于所述比较工序中得到的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质好坏。

2. 根据权利要求1所述的方法,所述比较工序是获得1种基准miRNA的存在量测定值的差或比、多种基准miRNA各自的存在量测定值的差或比、或者多种基准miRNA的存在量测定值的代表值的差或比的工序。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,所述判定工序包括将所述1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,与作为基准预先设定的阈值进行对比的操作。

4. 根据权利要求1~3的任一项所述的方法,所述比较工序包括从体液样本中的存在量测定值或其代表值减去标准体液样本中的存在量测定值或其代表值而求差的操作,或者将体液样本中的存在量测定值或其代表值除以标准体液样本中的存在量测定值或其代表值而求比的操作。

5. 根据权利要求4所述的方法,所述判定工序包括将所述1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,与作为基准预先设定的阈值进行对比的操作,在该差或比超过该阈值的情况下,将来源于体液样本的miRNA的品质判定为良好。

6. 根据权利要求1~5的任一项所述的方法,体液样本和标准体液样本中的多种基准miRNA的存在量测定值的代表值,分别为多种基准miRNA的存在量测定值的平均值或中央值。

7. 根据权利要求1~6的任一项所述的方法,所述测定工序包括对体液样本和标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值进行修正的操作,使用修正后的测定值实施以后的工序。

8. 根据权利要求1~7的任一项所述的方法,所述测定工序包括使固定化于支持体上的用于捕捉所述1种或多种基准miRNA的探针、与从体液样本和标准体液样本提取且经标记物质标记的核酸试样分别接触而进行杂交,从而测定体液样本和标准体液样本中的该1种或多种基准miRNA的存在量的操作。

9. 根据权利要求1~8的任一项所述的方法,所述测定工序包括在测定体液样本中的所述1种或多种基准miRNA的存在量的同时,测定该体液样本中的目标miRNA的存在量的操作。

10. 根据权利要求9所述的方法,所述测定工序包括对体液样本中的目标miRNA的存在量测定值进行修正的操作。

11. 根据权利要求9或10所述的方法,所述测定工序包括使固定化于支持体上的用于捕捉目标miRNA的探针和用于捕捉所述1种或多种基准miRNA的探针、与从体液样本提取且经标记物质标记的核酸试样接触而进行杂交,从而分别测定体液样本中的目标miRNA和该1种或多种基准miRNA的存在量的操作。

12. 根据权利要求1~11的任一项所述的方法,所述体液样本是血液、血清或血浆。

13. 一种程序,用于为了评价来源于体液样本的miRNA的品质,而使1台或多台计算机执行以下工序:

测定值获得工序,获得使用由体液样本和标准体液样本制备的包含miRNA的RNA样品分别测定的、1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量测定值,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择;

比较工序,将体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得体液样本和标准体液样本之间的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比;和

判定工序,基于所述比较工序中得到的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质好坏。

14. 一种计算机可读的记录介质,记录了权利要求13所述的程序。

15. 一种miRNA品质评价用芯片,包含固定化了用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。

16. 一种miRNA表达分析用芯片,包含固定化了用于捕捉目标miRNA的探针和用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。

## 来源于体液的miRNA的品质的评价方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及来源于体液样本的miRNA的品质的评价方法。

### 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,提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2016年2月的现在,在人中存在2500种以上,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,并期待向能够早期发现疾病的生物标志物检查展开。

[0004] 另一方面,已知RNA是容易由于热、分解酶、冻融等各种物理和化学因素而分解的物质,在使用DNA微阵列进行基因表达分析的情况下,RNA的分解影响表达量的测定。在作为疾病的生物标志物测定体液所含的miRNA的表达量的检查中,如果基于具有不确实性的表达量的测定值进行检查、诊断,则有时会由于丧失适当的治疗机会、应用了错误的医疗而带给患者患者不必要的经济、体力负担。因此,为了正确测定表达量,将作为检查目标的miRNA不分解的样本用于检查是极为重要的。

[0005] 一直以来,作为测定RNA的分解度的方法,一般使用电泳,例如,可以根据来源于28S核糖体RNA的带与来源于18S核糖体RNA的带的浓度比(28S/18S)来测定。另外,作为别的方法,专利文献1中提出了根据RNA片段的长度不同来定量评价RNA的分解度的方法,其中,利用了如果核苷酸分解则片段长度变短这样的长链RNA的特征。

[0006] 然而,在测定miRNA的表达量时,多利用短链级分的RNA,此时不含长链RNA,因此如上所述的现有方法不是用于测定RNA的分解度的有效方法。也可以根据基因表达分析结果的全基因的相关系数测定所使用的RNA的分解度,但需要全基因的数据,花费时间和工夫。因此,着眼于来源于长链RNA的分解片段,开发了以混入短链级分的分解片段作为指标评价短链级分中的miRNA的分解度的方法(专利文献2)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特表2015-519045号公报

[0010] 专利文献2:日本特开2008-35779号公报

## 发明内容

[0011] 发明所要解决的课题

[0012] 如上所述,为了正确测定目标RNA的表达量,测定样本中的RNA的分解度并评价品质是重要的。但是,前述的现有方法是利用核糖体RNA、长链RNA的方法,核糖体RNA、长链RNA是存在于核内、细胞质内的RNA,在例如血清、血浆、尿、脊髓液等体液样本中几乎不存在。因此,通过该现有方法,不能正确测定体液样本所含的miRNA的分解度并评价品质。

[0013] 本发明的课题是发现在作为样本使用不适于现有方法的体液样本时,测定该体液样本所含的miRNA的分解度并评价品质的方法。

[0014] 用于解决课题的方案

[0015] 为了解决上述课题,本发明者们发现,通过以依赖于体液样本所含的核酸试样的分解而存在量变化的miRNA(以下称为“基准miRNA”)作为基准测定其存在量,能够评价目标miRNA的品质,从而完成了本发明。即,本发明是以序列号1~12所示的miRNA的至少任一种作为基准miRNA,将体液样本中的该基准miRNA的存在量、与处于未进行核酸试样的分解的状态下的标准体液样本中的miRNA的存在量进行比较,从而评价miRNA的品质的方法,包含以下方式。

[0016] (1)一种来源于体液样本的miRNA的品质评价方法,所述方法包括:

[0017] 测定工序,使用由体液样本和标准体液样本制备的包含miRNA的RNA样品,分别测定1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择;

[0018] 比较工序,将体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得体液样本和标准体液样本之间的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比;和

[0019] 判定工序,基于所述比较工序中得到的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质好坏。

[0020] (2)根据(1)所述的方法,所述比较工序是获得1种基准miRNA的存在量测定值的差或比、多种基准miRNA各自的存在量测定值的差或比、或者多种基准miRNA的存在量测定值的代表值的差或比的工序。

[0021] (3)根据(1)或(2)所述的方法,所述判定工序包括将所述1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,与作为基准预先设定的阈值进行对比的操作。

[0022] (4)根据(1)~(3)的任一项所述的方法,所述比较工序包括从体液样本中的存在量测定值或其代表值减去标准体液样本中的存在量测定值或其代表值而求差的操作,或者将体液样本中的存在量测定值或其代表值除以标准体液样本中的存在量测定值或其代表值而求比的操作。

[0023] (5)根据(4)所述的方法,所述判定工序包括将所述1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,与作为基准预先设定的阈值进行对比的操作,在该差或比超过该阈值的情况下,将来源于体液样本的miRNA的品质判定为良好。

[0024] (6)根据(1)~(5)的任一项所述的方法,体液样本和标准体液样本中的多种基准miRNA的存在量测定值的代表值,分别为多种基准miRNA的存在量测定值的平均值或中央

值。

[0025] (7) 根据(1)~(6)的任一项所述的方法,所述测定工序包括对体液样本和标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值进行修正的操作,使用修正后的测定值实施以后的工序。

[0026] (8) 根据(1)~(7)的任一项所述的方法,所述测定工序包括使固定化于支持体上的用于捕捉所述1种或多种基准miRNA的探针、与从体液样本和标准体液样本提取且经标记物质标记的核酸试样分别接触而进行杂交,从而测定体液样本和标准体液样本中的该1种或多种基准miRNA的存在量的操作。

[0027] (9) 根据(1)~(8)的任一项所述的方法,所述测定工序包括在测定体液样本中的所述1种或多种基准miRNA的存在量的同时,测定该体液样本中的目标miRNA的存在量的操作。

[0028] (10) 根据(9)所述的方法,所述测定工序包括对体液样本中的目标miRNA的存在量测定值进行修正的操作。

[0029] (11) 根据(9)或(10)所述的方法,所述测定工序包括使固定化于支持体上的用于捕捉目标miRNA的探针和用于捕捉所述1种或多种基准miRNA的探针、与从体液样本提取且经标记物质标记的核酸试样接触而进行杂交,从而分别测定体液样本中的目标miRNA和该1种或多种基准miRNA的存在量的操作。

[0030] (12) 根据(1)~(11)的任一项所述的方法,所述体液样本是血液、血清或血浆。

[0031] (13) 一种程序,用于为了评价来源于体液样本的miRNA的品质,而使1台或多台计算机执行以下工序:

[0032] 测定值获得工序,获得使用由体液样本和标准体液样本制备的包含miRNA的RNA样品分别测定的、1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量测定值,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择;

[0033] 比较工序,将体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得体液样本和标准体液样本之间的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比;和

[0034] 判定工序,基于所述比较工序中得到的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质好坏。

[0035] (14) 一种计算机可读的记录介质,记录了(13)所述的程序。

[0036] (15) 一种miRNA品质评价用芯片,包含固定化了用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。

[0037] (16) 一种miRNA品质评价用芯片,包含固定化了用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。

[0038] 发明的效果

[0039] 通过本发明,能够进行通过现有方法难以进行的、体液样本所含的miRNA的品质评价。另外,根据本发明,能够高精度且简便地评价体液样本是否具有适用于使用例如miRNA的基因表达分析的品质,因此能够以体液样本中的生物标志物的表达量作为指标进行更正

确的疾病检查。

### 具体实施方式

[0040] 本发明是来源于体液样本的miRNA的品质(分解程度)的评价方法,所述方法包括:以从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择的1种或多种miRNA作为基准miRNA,测定该体液样本中的基准miRNA的存在量、和标准体液样本中的基准miRNA的存在量的测定工序;获得由该测定工序得到的体液样本中的基准miRNA的测定值或其代表值、与标准体液样本所含的基准miRNA的测定值或其代表值的差或比的比较工序;基于由该比较工序得到的各存在量测定值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质(分解程度)的判定工序。

[0041] 体液样本中的基准miRNA的存在量可以通过测定由体液样本提取的RNA样品中的基准miRNA量来调查。“体液样本所含的miRNA的品质”、“体液样本中的miRNA的品质”、“来源于体液样本的miRNA的品质”这样的表述,与由体液样本提取的RNA样品中的miRNA的品质这样的表述含义相同。

[0042] 本发明的方法用于通过在基因表达分析、例如利用微阵列等阵列芯片的分析、聚合酶链反应(PCR)法、利用测序法的分析中,预先评价体液样本所含的miRNA的品质,从而判断是否适合进行这些分析。基因表达分析包含例如,将体液中的miRNA标记,使用固定有用于捕捉1种或多种目标miRNA的探针、和用于捕捉基准miRNA的探针的支持体测定各miRNA的表达量;使用用于扩增1种或多种目标miRNA的引物、和用于扩增基准miRNA的引物进行扩增反应,测定目标miRNA的表达量等。还包含利用这些结果进行基因表达的分析、检查,例如,为了掌握病情而进行测定临床样本的检查。

[0043] “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,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为目标(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。

[0044] 能够应用本发明的体液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、拭子液、各种组织液等体液,但不限于这些。对体液样本所来自的生物体的种类不特别限定,包含各种生物种,典型地为哺乳动物、特别是人。

[0045] 作为这些体液中的miRNA的品质降低、即miRNA分解的原因,考虑有温度、热等、以及包含对体液的振动、超声波等外部力、电场、磁场等的各种直接、间接的物理力等,但品质降低的原因不限于这些。

[0046] 本发明中,可以从这些样本提取RNA,使用该RNA测定miRNA的表达量。RNA的提取可以应用公知的方法(例如,Favaloro等的方法(Favaloro et.al.,Methods Enzymol.65:718(1980))等)、用于RNA提取的各种市售的试剂盒(例如,キアゲン社のmiRNeasy、東レ社の“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample等)。

[0047] <测定工序>

[0048] 本发明中,进行从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择的1种或多种

基准miRNA在体液样本中的存在量、和从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择的1种或多种基准miRNA在标准体液样本中的存在量的测定。另外,在体液样本中的基准miRNA的存在量的测定的同时,还进行后述的目标miRNA的存在量、修正用标准核酸的存在量的测定。

[0049] 本发明中作为基准miRNA使用的包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA,是作为依赖于体液样本中的核酸试样的分解而存在量减少的miRNA而选择的miRNA。一般地,如果RNA分解,则一部分片段化,因而基因RNA的存在量减少。此时,在基因表达分析中检测出的全基因中,分解了的RNA与未分解的RNA的相关降低,例如相关系数变为0.95以下。本发明中使用的基准miRNA是与这样的RNA的分解相关地存在量变化(减少)的miRNA。例如,优选在通过后面所示的修正处理获得的表达量中, RNA分解前与RNA分解后的表达量比优选为0.8以下、更优选为0.7以下的miRNA。

[0050] 在作为体液样本使用血清(血液)的情况下,作为本发明中使用的基准miRNA,可以优选选择依赖于血清状态下的保存时间而存在量更大地减少的miRNA。依赖于保存时间而存在量减少的miRNA可以如下选择:例如,将采血后制备的血清样本在冷藏室(例如,4℃)中保存,在保存开始0小时后、6小时后、12小时后、24小时后、以及以后每隔1天直至7天后的miRNA的存在量,通过比较其减少的程度来选择。在将血清样本在冷藏室中保存的期间为更长期的情况下,根据其期间,例如将保存时间延长到2周后、1个月后进行测定miRNA的存在量来进行比较即可。将这样从保存时间不同的血清获得的miRNA的存在量,应用统计学方法在基因表达分析的组之间比较,从而能够筛选出随着时间经过的存在量减少在统计学上显著的miRNA。例如,可以利用基于一般应用的t检验等的统计分析法。例如,也可以直接应用统计语言“R”的“SAM”包(Tusher VG et.al., Proc Natl Acad Sic USA.2001 98(9) 5116-5121)。

[0051] 在本发明的测定工序中,测定由本申请发明者们选定的特定12种miRNA、优选为从包含序列号1~12所示的碱基序列的12种miRNA中选择的1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量。标准体液样本是核酸试样未进行分解的样本,是与体液样本相比,作为判定体液样本所含的miRNA的品质好坏的基准的样本。作为标准体液样本,例如,也可以使用刚刚获得或制备对象的体液样本之后、处于其所含的核酸试样尚未进行分解的状态的同一样本。或者,在不能获得刚刚制备之后的对象体液样本的同一样本的情况下,也可以使用从同一生物种的别的个体的同种体液制备的样本。或者,也可以获得作为标准品市售的同一生物种的体液样本使用。在体液样本是血清(血液)的情况下,可以使用刚刚制备血清样本之后的样本(经过保存时间0小时后的样本)作为标准体液样本。在不能获得刚刚制备之后的血清样本的情况下,既可以使用从相同生物种的别的个体刚刚制备之后(经过保存时间0小时后)的血清样本,也可以使用市售的血清。

[0052] 以下将用于捕捉基准miRNA、后述的目标miRNA、修正用标准核酸等核酸的探针总称为“捕捉探针”或也仅称为“探针”。

[0053] miRNA的存在量的测定可以通过例如,使用在支持体上固定化了与对象miRNA特异性地结合的探针的微阵列等阵列芯片进行杂交测定来进行。本发明中,可以使用包含固定化了用于捕捉1种或多种基准miRNA的“基准miRNA捕捉探针”的支持体的阵列芯片。另外,也可以使用包含进一步固定化了后述的用于捕捉目标miRNA的“目标miRNA捕捉探针”、用于捕

捉修正用标准核酸的“修正用标准核酸捕捉探针”的支持体的阵列芯片。

[0054] “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。其中作为衍生物,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。

[0055] 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。这样的链长较短的寡核酸探针可以通过周知的化学合成法等容易地制备。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] miRNA的序列信息可以从GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 等数据库、miRBase的网站 (<http://www.mirbase.org/>) 获得。基准miRNA捕捉探针、目标miRNA捕捉探针和修正用标准核酸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。

[0059] 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的存在量,也可以使用根据检查目的等将所期望的数量的miRNA捕捉探针固定化于支持体上而得的阵列芯片。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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制备经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通过逆转录反应制备的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制备的cDNA、cRNA直接或间接地用标记物质标记而得的。

[0065] 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实验プロトコール(miRNA实验方案)、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(東レ株式会社)、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。

[0066] 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,制备掺入了标记物质的cDNA或cRNA,使其与阵列上的探针杂交。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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测定值与从除了探针固定化区域以外的位置获得的测定值进行比较,将前者的数值较高的情况作为检测到(有效判定阳性)。

[0071] 在检测到的测定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。

[0072] <修正处理>

[0073] 本发明中,通过测定工序得到的目标miRNA和基准miRNA的存在量的测定值也可以直接在后述的比较工序、判定工序中使用,但例如在进行体液样本中的目标miRNA的表达分析的情况下,可以进行目标miRNA的测定值和基准miRNA的测定值的修正,以修正后的测定值作为表达量,使用该表达量实施比较工序和判定工序。即,测定工序包含修正目标miRNA和基准miRNA的测定值的处理。

[0074] 作为修正方法,可以使用现有方法,可列举例如,使用检测到的总miRNA的测定值进行修正的整体归一化法、分位数归一化法等。另外,既可以使用U1snoRNA、U2snoRNA、U3snoRNA、U4snoRNA、U5snoRNA、U6snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNA这样的管家RNA(参照日本特开2007-75095号公报、日本特开2007-97429号公报等)、特定的修正用内源性miRNA(参照Roberts, T.C.等、2014年、PLoS ONE、第9(2)卷、e89237;Chen, X.等、2013年、PLoS ONE、第8(11)卷、e79652;W02016/043170等)进行修正,也可以使用在RNA的提取时、标记时添加的外标核酸进行修正。“内源性”是指不是人工添加到样本中的,而是样本中自然存在的。例如提到“内源性miRNA”时,表示样本中自然存在的、来源于提供该样本的生物的miRNA。在体液样本中的目标miRNA的表达分析中应用本发明的方法进行miRNA的品质评价时,优选使用利用了不依赖于样本的外标对照(spike-in control)等外标核酸的修正方法。

[0075] <比较工序>

[0076] 本发明的比较工序,是将通过所述测定工序得到的体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得两样本中的各基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比的工序。其中,基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比典型地是指通过下式求出的差或比。

[0077] 基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差

[0078] = (体液样本中的存在量测定值或代表值) - (标准体液样本中的存在量测定值或代表值) ··· (式I)

[0079] 基准miRNA的存在量测定值或其代表值的比

[0080] = (体液样本中的存在量测定值或代表值) / (标准体液样本中的存在量测定值或代表值) ··· (式II)

[0081] 此外,也可以代替式I、式II,将计算的顺序反过来用以下的式I'、式II'来计算差或比。

[0082] 基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差

[0083] = (标准体液样本中的存在量测定值或代表值) - (体液样本中的存在量测定值或

代表值) ··· (式I')

[0084] 基准miRNA的存在量测定值或其代表值的比

[0085] = (标准体液样本中的存在量测定值或代表值) / (体液样本中的存在量测定值或代表值) ··· (式II')

[0086] 基准miRNA的存在量测定值或代表值的差或比,既可以在计算出差或比之后转换为对数值,也可以先将样本中存在量进行对数转换然后计算出差或比。本发明中,对数值是指转换成底为2的对数而得的值。

[0087] 判定工序的说明如后所述,在使用包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中的一种miRNA作为基准miRNA时,求出体液样本所含的该基准miRNA的存在量测定值与标准体液样本所含的该基准miRNA的存在量测定值的差或比用于判定即可。另外,在使用多种miRNA作为基准miRNA时,可以求出体液样本所含的该多种基准miRNA的存在量测定值的代表值和标准体液样本所含的该多种基准miRNA的存在量测定值的代表值,求出该两代表值的差或比用于判定。作为代表值,如后所述,可以使用平均值或中央值。或者,可以对于每种基准miRNA求出体液样本中的存在量测定值与标准体液样本中的存在量测定值的差或比,在以后的判定工序中对于每种基准miRNA按照规定基准进行判定,判定体液样本所含的miRNA的品质好坏。

[0088] <判定工序>

[0089] 本发明的判定工序,是基于通过比较工序得到的体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值、与所述标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,来判定体液样本所含的miRNA的品质好坏的工序。miRNA的品质好坏的判定,可以对于体液样本与标准体液样本所含的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,预先设定作为用于判定品质好坏的基准的阈值,通过是否超过该阈值来判定品质好坏(良好或不良)。即,在通过上述式I或式II得到的基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比超过预先任意设定的阈值的情况下,将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好,在该基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比为阈值以下的情况下,将体液样本所含的miRNA的品质判定为不良。或者,在使用通过上述式I'或式II'得到的差或比时,可以在该差或比低于作为预先任意设定基准的阈值的情况下,判定体液样本所含的miRNA的品质良好,在该差或比为该阈值以上的情况下,将体液样本所含的miRNA的品质判定为不良。

[0090] 判定工序中,如上所述,也可以将通过比较工序得到的各基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比转换为对数,使用其对数值进行判定。

[0091] 在使用包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中的一种miRNA作为基准miRNA时,在比较工序中,可以求出体液样本所含的该基准miRNA的存在量测定值与标准体液样本所含的该基准miRNA的存在量测定值的差或比,根据该差或比的值是否超过作为基准的阈值(式I, II的情况),或是否低于作为基准的阈值(式I', II'的情况),来判定品质好坏。

[0092] 在作为基准miRNA,使用包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中的多种基准miRNA时,可以求出体液样本所含的该多种基准miRNA的存在量测定值的代表值和标准体液样本所含的该多种基准miRNA的存在量测定值的代表值,根据这些代表值的差或比是否超过作为基准的阈值(式I, II的情况),或是否低于作为基准的阈值(式I', II'的情况),来判

定品质好坏。其中,作为代表值,可以使用多种基准miRNA的存在量的平均值或中央值。

[0093] 另外,在作为基准miRNA使用包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中的多种基准miRNA时,也可以对于每种基准miRNA求出体液样本所含的存在量测定值与标准体液样本所含的存在量测定值的差或比,对于每种基准miRNA判定是否超过/是否低于作为基准的阈值。此时,优选通过对利用多种基准miRNA的各个判定赋予优先顺位、权重等而设定进一步的判断基准。在使用1种基准miRNA时,从序列号1~12所示的miRNA中任意选择1种miRNA即可,但优选选择依赖于保存时间而存在量显著减少的,例如,优选选择hsa-miR-125a-3p(序列号1)、hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)的任一者。另外,在进行更严格或高精度的评价时,优选使用多种基准miRNA。例如,更优选使用2~5种基准miRNA,特别优选选择hsa-miR-125a-3p和hsa-miR-125b-1-3p 2种。本来,如下述实施例所记载,仅采用hsa-miR-125a-3p和hsa-miR-125b-1-3p的任一者作为多种基准miRNA中的一种的情况下,也能够以充分良好的精度判定品质好坏。另外,例如在以基因表达分析为目的时,且作为表达分析对象的目标miRNA对应于序列号1~12所示的miRNA的任一者的情况下,从除了该目标miRNA以外的miRNA中选择基准miRNA即可。

[0094] 作为判定基准的阈值可以根据评价的目的、要求的精度等任意设定。例如,可以将标准体液样本所含的基准miRNA的存在量测定值设定为阈值。

[0095] 以下对于按照式I或式II计算基准miRNA的存在量测定值或代表值的差或比时的判定工序,更具体地进行说明。在按照式I'或式II'进行时,根据下述采用适当的阈值,在低于该阈值的情况下可以判定miRNA的品质良好。

[0096] 在使用1种基准miRNA的情况下,例如,按照以下式1A~9A或式1B~9B所示的判断基准将体液样本中的基准miRNA的存在量测定值与标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值进行比较,能够判定品质好坏。

[0097] 如式1A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 的比( $e/E$ ),在该值超过阈值 $t_1$ 的情况下,可以将该体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。阈值 $t_1$ 优选为0.7以上,更优选为0.8以上。

[0098]  $e/E > t_1$  (式1A)

[0099] 另外,如式2A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 的差( $e-E$ ),在该值超过阈值 $t_2$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。因为根据miRNA的种类不同有时其存在量不同,所以阈值 $t_2$ 可以根据用于判定的基准miRNA而任意设定。例如,阈值 $t_2$ 可以在-50~0的范围设定,在以更严格的基准判定的情况下,可以在-20~0的范围设定。例如,取阈值 $t_2$ 为0,在存在量测定值的差( $e-E$ )大于0(+)的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0100]  $e-E > t_2$  (式2A)

[0101] 另外,作为阈值 $t_3$ 也可以采用标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ ,此时,如式3A所示,在体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 超过阈值 $t_3$ 、即标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。这相当于式2A中阈值 $t_2$ 为0的情况。因此,式3A相当于式2A的一种方式。即,式3A相当于基于存在量测定值的差的判定。

[0102]  $e > E (=t_3)$  (式3A)

[0103] 除了体液样本中的miRNA的分解之外,在考虑实验操作上影响测定结果的要素的情况下,也可以利用作为不依赖于RNA的分解的稳定存在的miRNA的内源性miRNA(以下也称为“非分解内源性miRNA”)进行判定。非分解内源性miRNA是在体液样本中不依赖于其种类而包含一定量的miRNA,优选选定在RNA分解前(刚刚获得或制备样本之后等,其所含的核酸试样未进行分解那样的时刻)与RNA分解后(获得或制备样本后经过一定时间,预想其所含的核酸试样进行了分解的时刻)的存在量测定值的比为0.90以上、更优选为0.95以上那样的miRNA。例如,可以使用包含序列号25所示的碱基序列的hsa-miR-149-3p、包含序列号26所示的碱基序列的hsa-miR-4463等作为非分解内源性miRNA。在进行体液样本中的目标miRNA的表达分析的情况下,可以将所述修正处理中使用的“修正用内源性miRNA”作为“非分解内源性miRNA”通用。

[0104] 在利用非分解内源性miRNA判定体液样本所含的miRNA的品质好坏时,例如,如式4A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $c$ 的比(存在量比 $e/c$ )、和标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $C$ 的比(存在量比 $E/C$ ),在这2个各存在量比的比超过阈值 $t_4$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0105] 或者,如式5A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $c$ 的差(存在量差 $e-c$ )、和标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $C$ 的差(存在量差 $E-C$ ),在这2个各存在量差的比超过阈值 $t_5$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。此时的阈值 $t_4$ 和 $t_5$ 优选为0.7,更优选为0.8。

[0106] 式4A、式5A相当于基于存在量测定值的比的判定。

[0107]  $(e/c) / (E/C) > t_4$  (式4A)

[0108]  $(e-c) / (E-C) > t_5$  (式5A)

[0109] 另外,如式6A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $c$ 的比(存在量比 $e/c$ )、和标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $C$ 的比(存在量比 $E/C$ ),在这2个各存在量比的差超过阈值 $t_6$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0110] 或者,如式7A所示,求出体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $c$ 的差(存在量差 $e-c$ )、和标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $C$ 的差(存在量差 $E-C$ ),在这2个各存在量差的差超过阈值 $t_7$ 的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。阈值 $t_6$ 和 $t_7$ 可以在例如-50~0的范围设定,例如可以为0。

[0111] 式6A、式7A相当于基于存在量测定值的差的判定。

[0112]  $(e/c) - (E/C) > t_6$  (式6A)

[0113]  $(e-c) - (E-C) > t_7$  (式7A)

[0114] 另外,作为阈值 $t_8$ ,也可以采用标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $C$ 的比(存在量比 $E/C$ ),此时,如式8A所示,在体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $e$ 与非分解内源性miRNA的存在量测定值 $c$ 的比(存在量比 $e/c$ )超过阈值 $t_8$ 、即标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值 $E$ 与非分解内源性miRNA的

存在量测定值C的比(存在量比E/C)的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。这相当于在采用式6A时阈值 $t_6$ 为0的情况。因此,式8A是式6A的一种方式,相当于基于存在量测定值的差的判定。

[0115] 或者,作为阈值 $t_9$ ,也可以采用标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值E与非分解内源性miRNA的存在量测定值C的差(存在量差E-C),此时,如式9A所示,在体液样本中的基准miRNA的存在量测定值e与非分解内源性miRNA的存在量测定值c的差(存在量差e-c)超过阈值 $t_9$ 、即标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值E与非分解内源性miRNA的存在量测定值C的差(存在量差E-C)的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。这相当于在采用式7A时阈值 $t_7$ 为0的情况。因此,式9A是式7A的一种方式,相当于基于存在量测定值的差的判定。

[0116]  $e/c > E/C (=t_8)$  (式8A)

[0117]  $e-c > E-C (=t_9)$  (式9A)

[0118] 在使用多种miRNA作为基准miRNA的情况下,可以求出体液样本中的多种基准miRNA的存在量测定值的代表值、和标准体液样本中的该多种基准miRNA的存在量测定值的代表值,再求出这两代表值的差或比用于判定。具体地,在上述式1A~式9A所示的判断基准中,使用体液样本中的多种基准miRNA的存在量测定值的代表值r代替体液样本中的基准miRNA的存在量测定值e,使用标准体液样本中的多种基准miRNA的存在量测定值的代表值R代替标准体液样本中的基准miRNA的存在量测定值E即可。即,使用下述式1B~式9B的任一个进行判定即可。作为代表值,可以使用各测定值的平均值或中央值。

[0119]  $r/R > t_1$  (式1B)

[0120]  $r-R > t_2$  (式2B)

[0121]  $r > R (=t_3)$  (式3B)

[0122]  $(r/c) / (R/C) > t_4$  (式4B)

[0123]  $(r-c) / (R-C) > t_5$  (式5B)

[0124]  $(r/c) - (R/C) > t_6$  (式6B)

[0125]  $(r-c) - (R-C) > t_7$  (式7B)

[0126]  $r/c > R/C (=t_8)$  (式8B)

[0127]  $r-c > R-C (=t_9)$  (式9B)。

[0128] 这里,在上述式1A~式9A、式1B~式9B中,考虑实验误差等,也可以使阈值 $t_1 \sim t_9$ 具有一定的误差 $\alpha$ 的宽度,分别为“ $t_1 \pm \alpha$ ”~“ $t_9 \pm \alpha$ ”。此时的误差 $\alpha$ 可以任意设定,例如,在式2A中,可以将E的10%左右设定为 $\alpha$ ,从而使阈值 $t_2$ 具有宽度。

[0129] 另外,作为各阈值,也可以使用将存在量的测定值转换为对数而得的值。此时,可以根据该转换而设定适当的阈值。例如,在应用式1A的情况下,将基准miRNA的存在量比(e/E)转换为对数值,根据该转换设定阈值 $t_1$ 即可。此时,结果变成求存在量测定值e、E的各对数值的差。

[0130] 另外,也可以对于各种基准miRNA逐一求出体液样本中的存在量测定值与标准体液样本中的存在量测定值的差或比,对于每种基准miRNA按照判定基准进行判定,将其结果综合而判定体液样本所含的miRNA的品质好坏。

[0131] 具体地,例如,在每种基准miRNA的判定中判定为良好的基准miRNA数超过判定为

不良的基准miRNA数或任意规定数的情况下,可以将体液样本所含的miRNA的品质判定为良好。相反地,在判定为不良的基准miRNA数超过判定为良好的基准miRNA数或规定数的情况下,可以将样本所含的miRNA的品质判定为不良。另外,在进行更严格或高精度的评价时,也可以使基于特定1种基准miRNA的不良判定优先于给出良好判定的基准miRNA数。即,可以在该特定1种基准miRNA的判定结果为不良的情况下,无论良好判定种基准miRNA数如何,都将体液样本所含的miRNA的品质判定为不良。作为这样的特定1种基准miRNA,优选采用hsa-miR-125a-3p(序列号1)和hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)的任一者。

[0132] 另外,本发明提供用于按照上述本发明的miRNA品质评价方法,为了评价来源于体液样本的miRNA的品质,而使1台或多台计算机执行下述各工序(即,包含使1台或多台计算机执行下述各工序的命令)的程序、和记录了该程序的计算机可读的记录介质,

[0133] 测定值获得工序,获得使用由体液样本和标准体液样本制备的包含miRNA的RNA样品分别测定的、1种或多种基准miRNA在体液样本和标准体液样本中的存在量测定值,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择;

[0134] 比较工序,将体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值,与标准体液样本中的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值进行比较,获得体液样本和标准体液样本之间的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比;和

[0135] 判定工序,基于所述比较工序中得到的1种或多种基准miRNA的存在量测定值或其代表值的差或比,判定来源于体液样本的miRNA的品质好坏。

[0136] 例如,在分析miRNA的表达量的装置中装入该程序,在测定值获得工序获得由该装置的表达测定部或与该装置分别设置的另外的表达测定装置测定的基准miRNA表达量(即样本中的基准miRNA存在量)的测定值,使用该测定值进行各工序即可。获得的测定值也可以是修正后的测定值。另外,该程序也可以包含使计算机执行对所获得的测定值进行修正的处理的命令。各工序的详细如关于本发明的miRNA品质评价方法在上述所说明的那样。

[0137] “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。

[0138] “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”。

[0139] 本发明还提供miRNA品质评价用芯片,包含固定化了用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。另外,本发明提供miRNA表达分析用芯片,包含固定化了用于捕捉目标miRNA的探针和用于捕捉1种或多种基准miRNA的探针的支持体,所述1种或多种基准miRNA从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择。其中,目标miRNA、从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择的1种或多种基准miRNA、用于捕捉它们的探针、以及用于固定化这些捕捉探针的支持体如上所述。

[0140] 本发明的miRNA表达分析用芯片也可以进一步在支持体上固定化用于捕捉所述修

正处理中使用的管家RNA、特定的修正用内源性miRNA、添加的外标核酸等修正用核酸、特别是修正用内源性miRNA的探针。

[0141] 本发明中,将从miR-125a-3p、miR-125b-1-3p、miR-3184-5p、miR-4443、miR-4638-5p、miR-4746-3p、miR-5572、miR-575、miR-6798-5p、miR-7110-5p、miR-887-3p、和miR-939-5p中选择1种或多种miRNA、优选为从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择1种或多种miRNA作为用于测定来源于体液样本RNA的分解度的基准miRNA使用。在体液样本为人的体液样本的情况下,也可以使用从包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA中选择1种或多种miRNA作为基准miRNA。

[0142] “miR-125a-3p基因”或“miR-125a-3p”这样的术语,包含人的miR-125a-3p(即hsa-miR-125a-3p、miRBase Accession No.MIMAT0004602)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号1所示的RNA序列是hsa-miR-125a-3p的序列。hsa-miR-125a-3p基因可以通过Lagos-Quintana M等、2002年、Curr Biol、12卷、p735-739所记载的方法获得。另外,“miR-125a-3p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-125a”,例如“hsa-miR-125a-3p”这样的表述也包含hsa-mir-125a(miRBase Accession No.MI0000469、序列号13)。

[0143] “miR-125b-1-3p基因”或“miR-125b-1-3p”这样的术语,包含人的miR-125b-1-3p(即hsa-miR-125b-1-3p、miRBase Accession No.MIMAT0004592)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号2所示的RNA序列是hsa-miR-125b-1-3p的序列。hsa-miR-125b-1-3p基因可以通过Lagos-Quintana M等、2002年、Curr Biol、12卷、p735-739所记载的方法获得。另外,“miR-125b-1-3p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-125b-1”,例如“hsa-miR-125b-1-3p”这样的表述也包含hsa-mir-125b-1(miRBase Accession No.MI0000446、序列号14)。

[0144] “miR-3184-5p基因”或“miR-3184-5p”这样的术语,包含人的miR-3184-5p(即hsa-miR-3184-5p、miRBase Accession No.MIMAT0015064)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号3所示的RNA序列是hsa-miR-3184-5p的序列。hsa-miR-3184-5p基因可以通过Stark MS等、2010年、PLoS One、5卷、e9685所记载的方法获得。另外,“miR-3184-5p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-3184”,例如“hsa-miR-3184-5p”这样的表述也包含hsa-mir-3184(miRBase Accession No.MI0014226、序列号15)。

[0145] “miR-4443基因”或“miR-4443”这样的术语,包含人的miR-4443(即hsa-miR-4443、miRBase Accession No.MIMAT0018961)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号4所示的RNA序列是hsa-miR-4443的序列。hsa-miR-4443基因可以通过Jima DD等、2010年、Blood、116卷、p118-127所记载的方法获得。另外,“miR-4443”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-4443”,例如“hsa-miR-4443”这样的表述也包含hsa-mir-4443(miRBase Accession No.MI0016786、序列号16)。

[0146] “miR-4638-5p基因”或“miR-4638-5p”这样的术语,包含人的miR-4638-5p(即hsa-miR-4638-5p、miRBase Accession No.MIMAT0019695)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号5所示的RNA序列是hsa-miR-4638-5p的序列。hsa-miR-4638-5p基因可以通过Persson H等、2011年、Cancer Res、71卷、p78-86所记载的方法获得。另外,“miR-4638-5p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-4638”,例如“hsa-miR-4638-5p”这样的表述也包含hsa-miR-4638(miRBase Accession No.MI0017265、序列号17)。

[0147] “miR-4746-3p基因”或“miR-4746-3p”这样的术语,包含人的miR-4746-3p(即hsa-miR-4746-3p、miRBase Accession No.MIMAT0019881)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号6所示的RNA序列是hsa-miR-4746-3p的序列。hsa-miR-4746-3p基因可以通过Persson H等、2011年、Cancer Res、71卷、p78-86所记载的方法获得。另外,“miR-4746-3p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-4746”,例如“hsa-miR-4746-3p”这样的表述也包含hsa-mir-4746(miRBase Accession No.MI0017385、序列号18)。

[0148] “miR-5572基因”或“miR-5572”这样的术语,包含人的miR-5572(即hsa-miR-5572、miRBase Accession No.MIMAT0022260)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号7所示的RNA序列是hsa-miR-5572的序列。hsa-miR-5572基因可以通过Tandon M等、2012年、Oral Dis、18卷、p127-131所记载的方法获得。另外,“miR-5572”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-5572”,例如“hsa-miR-5572”这样的表述也包含hsa-mir-5572(miRBase Accession No.MI0019117、序列号19)。

[0149] “miR-575基因”或“miR-575”这样的术语,包含人的miR-575(即hsa-miR-575、miRBase Accession No.MIMAT0003240)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号8所示的RNA序列是hsa-miR-575的序列。hsa-miR-575基因可以通过Cummins JM等、2006年、Proc Natl Acad Sci USA、103卷、p3687-3692所记载的方法获得。另外,“miR-575”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-575”,例如“hsa-miR-575”这样的表述也包含hsa-mir-575(miRBase Accession No.MI0003582、序列号20)。

[0150] “miR-6798-5p基因”或“miR-6798-5p”这样的术语,包含人的miR-6798-5p(即hsa-miR-6798-5p、miRBase Accession No.MIMAT0027496)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号9所示的RNA序列是hsa-miR-6798-5p的序列。hsa-miR-6798-5p基因可以通过Ladewig E等、2012年、Genome Res、22卷、p1634-1645所记载的方法获得。另外,“miR-6798-5p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-6798”,例如“hsa-miR-6798-5p”这样的表述也包含hsa-mir-6798(miRBase Accession No.MI0022643、序列号21)。

[0151] “miR-7110-5p基因”或“miR-7110-5p”这样的术语,包含人的miR-7110-5p(即hsa-miR-7110-5p、miRBase Accession No.MIMAT0028117)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号10所示的RNA序列是hsa-miR-7110-5p的序列。hsa-miR-7110-5p基因可以通过Ladewig E等、2012年、Genome Res、22卷、p1634-1645所记载的方法获得。另外,“miR-7110-5p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-7110”,例如“hsa-miR-7110-5p”这样的表述也包含hsa-mir-7110(miRBase Accession No.MI0022961、序列号22)。

[0152] “miR-887-3p基因”或“miR-887-3p”这样的术语,包含人的miR-887-3(即hsa-miR-887-3p、miRBase Accession No.MIMAT0004951)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号11所示的RNA序列是hsa-miR-887-3p的序列。hsa-miR-887-3p基因可以通过Berezikov E等、2006年、Genome Res、16卷、p1289-1298所记载的方法获得。另外,“miR-887-3p”这样的表述也包含采取发夹样结构的其前体“mir-887”,例如“hsa-miR-887-3p”这样的表述也包含hsa-mir-887(miRBase Accession No.MI0005562、序列号23)。

[0153] “miR-939-5p基因”或“miR-939-5p”这样的术语,包含人的miR-939-5p(即hsa-miR-939-5p、miRBase Accession No.MIMAT0004982)、其他生物种的同源物或直系同源物等。序列号12所示的RNA序列是hsa-miR-939-5p的序列。hsa-miR-939-5p基因可以通过Lui

WO等、2007年、Cancer Res、67卷、p6031-6043所记载的方法获得。另外，“miR-939-5p”这样的表述也包含作为其前体而采取发夹样结构的“mir-939”，例如“hsa-miR-939-5p”这样的表述也包含hsa-mir-939(miRBase Accession No.MI0005761、序列号24)。

[0154] 实施例

[0155] 以下，基于实施例对于包含选择依赖于RNA的分解的基准miRNA的过程在内的本发明进行更具体的说明。当然，本发明不受下述实施例限定。

[0156] <实施例1>基准miRNA的选择

[0157] (DNA微阵列)

[0158] 使用東レ株式会社制的“3D-Gene”human miRNA oligo chip(对应于miRBase release 21)进行以下实验。

[0159] (血清样本的制备)

[0160] 从3名健康人分别采血，制备血清。将对于每一人所得的血清分装成6支，每支各300 $\mu$ L，将其中5支静置在设定于4 $^{\circ}$ C的冷藏室中。可将每一人1支立即收到设定于-80 $^{\circ}$ C的冷冻室中(0小时)。对于静置于冷藏室的血清样本在6小时、24小时、48小时、72小时和168小时后分别回收，收到设定于-80 $^{\circ}$ C的冷冻室中。收到-80 $^{\circ}$ C的冷冻室中的样本就那样一直静置到下边所述的RNA提取操作。

[0161] (样本RNA的制备和miRNA表达量的测定)

[0162] 将如上所述制备并静置在冷冻室中的血清同时溶解，提取血清样本所含的RNA(以下称为样本RNA)。提取使用“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample kit(東レ社)。

[0163] 将所得的样本RNA使用“3D-Gene”miRNA labeling kit(東レ社)进行标记。标记时为了将miRNA的测定值修正成表达量而添加外标核酸。对于标记的样本RNA，使用“3D-Gene”miRNA chip(東レ社)，按照其标准方案进行杂交。将杂交后的DNA微阵列用微阵列扫描仪(東レ社)测定荧光强度。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。

[0164] 将通过DNA微阵列检测到的各miRNA的测定值转换成底为2的对数，通过标记时添加的外标核酸进行修正，获得各miRNA的表达量。

[0165] 如上，在通过DNA微阵列检测后0、6、24、48、72、168小时，对于在4 $^{\circ}$ C静置的血清测定各静置时间经过时各miRNA的表达量，测定3次获得其平均值。

[0166] (基准miRNA的选择)

[0167] 对如上所述获得的各血清样本的miRNA表达量进行比较，抽取依赖于静置时间而表达量(样本中存在量)变化的程度较大的miRNA，从而进行基准miRNA的选择。

[0168] 首先，以静置0小时经过时的各miRNA的表达量作为基准，计算静置6、24、48、72、168小时经过时的各miRNA的表达量与之的比((6、24、48、72或168小时经过时的表达量)/0小时的表达量)。

[0169] 接着，在检测的miRNA中将范围缩小到高表达区域能稳定检测的miRNA。

[0170] 为了从缩小范围后的miRNA中选择依赖于静置时间经过而表达量变化程度大的miRNA，使用统计语言“R”的包“SAM”(Tusher VG et.al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2001, 98(9), 5116-5121)，抽取SAM的统计量为-1以下的miRNA。将抽取的上位12种的miRNA及其表

达量比示于表1。

[0171] 表1所示的miRNA(序列号1~12)在4℃这样的血清中的miRNA比较不稳定的状态下保存的条件下,表达量随时间降低,其程度较大。另外,冷藏室中的静置时间为0小时时的血清样本和168小时经过时的血清样本中检测到的总miRNA的表达量,在这两血清样本之间的相关系数为0.95以下,由此确认在168小时经过时刻血清样本中的RNA进行了分解。由此确认,表1所示的miRNA能够作为依赖于血清样本所含的RNA的分解而其表达量(样本中存在量)随时间变化的miRNA指标利用。即,可知表1所示的miRNA能够通过测定其表达量来获知血清样本的miRNA的品质(分解程度)。特别是hsa-miR-125a-3p(序列号1)和hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)从早期(48小时经过时)开始显示敏锐的变化,适合更高精度的品质评价。

[0172] 表1在4℃保存的血清样本中的miRNA表达量随时间的变化

miRNA名	SAM的统计量	静置时间				
		6小时	24小时	48小时	72小时	168小时
hsa-miR-125a-3p (序列号1)	-2.4	0.99	0.93	0.81	0.75	0.33
hsa-miR-125b-1-3p (序列号2)	-1.5	1.00	0.91	0.79	0.71	0.43
hsa-miR-3184-5p (序列号3)	-1.4	1.09	1.04	0.97	0.87	0.60
hsa-miR-4443 (序列号4)	-1.1	1.03	1.00	0.94	0.90	0.67
hsa-miR-4638-5p (序列号5)	-1.1	1.02	1.04	0.96	0.92	0.49
hsa-miR-4746-3p (序列号6)	-1.1	1.03	1.02	0.95	0.89	0.68
hsa-miR-5572 (序列号7)	-1.2	1.04	1.04	0.91	0.88	0.58
hsa-miR-575 (序列号8)	-1.1	1.13	1.13	1.05	0.97	0.63
hsa-miR-6798-5p (序列号9)	-1.0	1.05	1.06	1.01	0.96	0.78
hsa-miR-7110-5p (序列号10)	-1.3	1.06	1.05	0.97	0.86	0.60
hsa-miR-887-3p (序列号11)	-1.1	1.10	1.10	1.03	0.97	0.65
hsa-miR-939-5p (序列号12)	-1.2	1.05	1.05	0.95	0.92	0.63

[0173] [0174] 根据实施例1的结果,在以下实施例2~6中,将基准miRNA的表达量比的阈值设定为0.8,在超过该值的情况下,将该样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0175] <实施例2>

[0176] 从1名健康人采血,制备血清样本。将所得的血清分装成300μL,立即收入设定于-80℃的冷冻室中。RNA的提取使用“3D-Gene”RNA extraction reagent from liquid sample kit(東レ社)。

[0177] 将所得的样本RNA使用“3D-Gene”miRNA labeling kit(東レ社)进行标记,标记时为了将miRNA的测定值修正为表达量而添加外标核酸。来源于标记后的样本的RNA使用“3D-Gene”miRNA chip(東レ社)按照其标准方案进行杂交。将杂交后的DNA微阵列用微阵列扫描

仪(東レ社)测定荧光强度。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。将检测到的miRNA的信号值通过外标核酸的信号值进行修正,获得表达量。

[0178] 作为品质判定中使用的基准miRNA,选择hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)。另外,使用市售的血清样本作为核酸试样未进行分解的状态的标准体液样本,与上述同样地获得其标准体液样本所含的hsa-miR-125b-1-3p的表达量。

[0179] 来源于血清样本的hsa-miR-125b-1-3p的表达量除以来源于标准体液样本的hsa-miR-125b-1-3p的表达量,从而求出两者的表达量比。表达量比为0.99,超过阈值0.8,因而将血清样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0180] 另一方面,来源于所检测的血清样本的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.99,显示了miRNA的品质良好、未进行分解。这与上述通过本发明进行的品质判定结果一致。

[0181] <实施例3>

[0182] 作为在品质判定中使用的基准miRNA,代替hsa-miR-125b-1-3p(序列号2),变更为使用hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)和hsa-miR-6798-5p(序列号9)2种,除此以外与实施例2同样地测定来源于血清样本和来源于标准体液样本的这2种miRNA的表达量。

[0183] 两样本的表达量的比较,以2种miRNA的表达量的平均值作为代表值进行。血清样本的代表值除以标准体液样本的代表值,从而求出表达量比。其结果表达量比为0.98,超过阈值0.8,因而将该血清样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0184] 另一方面,来源于检测的血清样本的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.99,显示了miRNA的品质良好、未进行分解。这与上述通过本发明进行的品质判定结果一致。

[0185] <实施例4>

[0186] 将血清样本变更为制备血清后在4℃静置168小时经过后的,除此以外与实施例3同样地测定来源于血清样本和来源于标准体液样本的2种miRNA(hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)和hsa-miR-6798-5p(序列号9))的表达量。以2种miRNA的表达量的平均值作为代表值,从代表值求出表达量比。

[0187] 其结果表达量比为0.34,低于阈值0.8,因而将该血清样本所含的miRNA的品质判定为不良。

[0188] 另一方面,来源于检测的血清样本的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.93的低值,显示miRNA发生了分解,品质恶化了。这与上述通过本发明进行的品质判定结果一致。

[0189] <实施例5>

[0190] 将血清样本变更为制备血清后在4℃静置72小时经过后的,除此以外与实施例3同样地测定来源于血清样本和来源于标准体液样本的2种miRNA(hsa-miR-125b-1-3p(序列号2)和hsa-miR-6798-5p(序列号9))的表达量。分别求出hsa-miR-125b-1-3p的表达量比和hsa-miR-6798-5p的表达量比,进行表达量的比较。

[0191] 其结果是,hsa-miR-6798-5p的表达量比为0.95,超过阈值0.8,但hsa-miR-125b-1-3p的表达量比为0.73,低于阈值0.8。由于2种基准miRNA种的1种低于阈值,因而将样本所含的miRNA的品质判定为不良。

[0192] 另一方面,检测的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.94的稍低的值,显示miRNA发生了分解,品质恶化了。这与上述通过本发明进行的品质判定结果一致。

[0193] <比较例1>

[0194] 为了将本发明的miRNA的品质评价方法与作为现有的品质评价方法的利用电泳的方法进行比较,使用上述实施例4、5中使用的血清样本进行利用电泳的品质评价。

[0195] 其结果是,从上述静置72小时经过时、静置168小时经过时的血清样本提取的RNA,与从作为核酸试样未进行分解的标准体液样本的市售的血清样本提取的RNA相比,通过电泳的结果不能确认品质(分解程度)的差异。

[0196] <比较例2>

[0197] 作为在品质判定中使用的基准miRNA,代替hsa-miR-125b-1-3p(序列号2),变更为使用hsa-miR-149-3p(序列号25),另外,将血清样本变更为制备血清后在4℃静置168小时经过后的,除此以外与实施例2同样地测定来源于血清样本和来源于标准体液样本的这2种miRNA的表达量。其中,作为基准miRNA使用的hsa-miR-149-3p是在上述实施例1中即使静置时间经过表达量也不变化(降低)的最稳定的miRNA的之一。

[0198] 其结果表达量比为0.98,超过阈值0.8。在以与本发明的方法同样的基准进行评价时,将样本所含的miRNA的品质判定为良好。然而,来源于检测的血清样本的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.94,因而显示实际上miRNA发生了分解,品质恶化了。即,在使用不是本发明中能够使用的基准miRNA的hsa-miR-149-3p时,不能正确地进行品质判定。

[0199] <实施例6>

[0200] 与实施例2同样地作为品质判定中使用的基准miRNA使用hsa-miR-125b-1-3p(序列号2),此外还利用作为不依赖于RNA的分解的非分解内源性miRNA的hsa-miR-4463(序列号26),测定来源于血清样本和来源于标准体液样本的这2种miRNA的表达量。对于血清样本和标准体液样本,分别求出hsa-miR-125b-1-3p的表达量除以hsa-miR-4463的表达量而得的表达量比后,通过来源于血清样本的表达量比除以来源于标准体液样本的表达量比而求出表达量比的比,与阈值进行比较。

[0201] 其结果是,hsa-miR-125b-1-3p的表达量除以hsa-miR-4463的表达量而得的表达量比,来源于血清样本为0.97,来源于标准体液样本为0.98。这些表达量比的比为0.99,超过阈值0.8,因而将样本所含的miRNA的品质判定为良好。

[0202] 另一方面,来源于检测的血清样本的总miRNA的表达量、与来源于标准体液样本的总miRNA的表达量的相关系数为0.99,显示了miRNA的品质良好、未进行分解。这与上述通过本发明进行的品质判定结果一致。

	<110> 东丽株式会社	
	<120> 来源于体液的 miRNA 的品质的评价方法	
	<130> PF584-PCT	
	<160> 26	
	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 1	
	acaggugagg uucuugggag cc	22
[0001]	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 2	
	acggguuagg cucuugggag cu	22
	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 3	
	ugaggggccu cagaccgagc uuuu	24
	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	

	<400> 4		
	uuggaggcgu ggguuuu		17
	<210> 5		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 5		
	acucggcugc gguggacaag u		21
	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 6		
	agcggugcuc cugcgggccg a		21
[0002]	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 7		
	guuggggugc aggggucugc u		21
	<210> 8		
	<211> 19		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		
	<400> 8		
	gagccaguug gacaggagc		19
	<210> 9		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> 人(Homo sapiens)		

<400> 9		
ccagggggau gggcgagcuu ggg		23
<210> 10		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 10		
ugggggugug gggagagaga g		21
<210> 11		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 11		
gugaacgggc gccaucccga gg		22
[0003]		
<210> 12		
<211> 24		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 12		
uggggagcug aggcucuggg ggug		24
<210> 13		
<211> 86		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 13		
ugccagucuc uagguccug agaccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga		60
gguucuuggg agccuggcgu cuggcc		86
<210> 14		

	<211> 75	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 14	
	aagcaagacu gaggggccuc agaccgagcu uuuggaaaau agaaaagucu cgcucucugc	60
	cccucagccu aacuu	75
	<210> 15	
	<211> 75	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 15	
	aagcaagacu gaggggccuc agaccgagcu uuuggaaaau agaaaagucu cgcucucugc	60
	cccucagccu aacuu	75
[0004]	<210> 16	
	<211> 68	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 16	
	gacucggcug cgguggacaa guccggcucc agaaccugga caccgcucag cggcccggc	60
	cagggguc	68
	<210> 17	
	<211> 68	
	<212> RNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
	<400> 17	
	gacucggcug cgguggacaa guccggcucc agaaccugga caccgcucag cggcccggc	60
	cagggguc	68
	<210> 18	

<211> 71		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 18		
gugucugugc cggucccagg agaaccugca gaggcaucgg gucagcggug cuccugcggg		60
ccgacacuca c		71
<210> 19		
<211> 137		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 19		
agccagacaa gagggucaug gggagucacu gucaaccag agcaggcacu gccccugcga		60
ccagccuggg gcaucgguug gggugcaggg gucugcuggu gaugcuuucc aucucuuugc		120
uuuguccuga uuguagc		137
[0005]		
<210> 20		
<211> 94		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 20		
aaucagecc ugccacuggc uuaugucaug accuugggcu acucaggcug ucugcacaau		60
gagccaguug gacaggagca gugccacuca acuc		94
<210> 21		
<211> 67		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 21		
ggcagccagg gggauaggcg agcuugggcc cauuccuuuc cuuacccuac cccccauccc		60
ccuguag		67

<210> 22		
<211> 86		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 22		
ggggcugggg guguggggag agagagugca cagccagcuc agggauuaaa gcucuuucuc		60
ucucucucuc ucccacuucc cugcag		86
<210> 23		
<211> 79		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 23		
gucagauc uugggagccc uguuagacuc uggauuuuac acuuggagug aacgggcgcc		60
aucggaggc uuugcacag		79
[0006]		
<210> 24		
<211> 82		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 24		
ugugggcagg gccucgggga gcugaggcuc uguggguggc cggggcugac ccugggcuc		60
ugcucuccag ugucugaccg cg		82
<210> 25		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 25		
agggagggac gggggcugug c		21
<210> 26		

[0007] <211> 17  
<212> RNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
  
<400> 26  
gagacugggg uggggcc

17

专利名称(译)	来源于体液的miRNA的品质的评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108474033A</a>	公开(公告)日	2018-08-31
申请号	CN201780005057.2	申请日	2017-02-21
[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	名取一惠 小园聪子 近藤哲司		
发明人	名取一惠 小园聪子 近藤哲司		
IPC分类号	C12Q1/6869 G01N37/00 G06F19/20 C12M1/00 C12N15/09 C12N15/113 G01N33/50 G01N33/53		
代理人(译)	段承恩		
优先权	2016030904 2016-02-22 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了评价来源于体液样本的miRNA的品质的新方法。在本发明的方法中，以序列号1~12所示miRNA的至少任一种作为基准miRNA，将体液样本中的该基准miRNA的存在量、与处于核酸试样未分解状态的标准体液样本中的miRNA的存在量进行比较，从而评价miRNA的品质。包含序列号1~12所示的碱基序列的miRNA是作为依赖于体液样本中的核酸试样的分解而存在量减少的miRNA，由本申请发明者们选择的miRNA。

miRNA名	SAM的 统计量	静置时间				
		6小时	24小时	48小时	72小时	168小时
hsa-miR-125a-3p (序列号1)	-2.4	0.99	0.93	0.81	0.75	0.33
hsa-miR-125b-1-3p (序列号2)	-1.5	1.00	0.91	0.79	0.71	0.43
hsa-miR-3184-5p (序列号3)	-1.4	1.09	1.04	0.97	0.87	0.60
hsa-miR-4443 (序列号4)	-1.1	1.03	1.00	0.94	0.90	0.67
hsa-miR-4638-5p (序列号5)	-1.1	1.02	1.04	0.96	0.92	0.49
hsa-miR-4746-3p (序列号6)	-1.1	1.03	1.02	0.95	0.89	0.68
hsa-miR-5572 (序列号7)	-1.2	1.04	1.04	0.91	0.88	0.58
hsa-miR-575 (序列号8)	-1.1	1.13	1.13	1.05	0.97	0.63
hsa-miR-6798-5p (序列号9)	-1.0	1.05	1.06	1.01	0.96	0.78
hsa-miR-7110-5p (序列号10)	-1.3	1.06	1.05	0.97	0.86	0.60
hsa-miR-887-3p (序列号11)	-1.1	1.10	1.10	1.03	0.97	0.65
hsa-miR-939-5p (序列号12)	-1.2	1.05	1.05	0.95	0.92	0.63