

MicroRNA 연구의 A to Z

1. MicroRNA Isolation
2. Expression Analysis Array
3. Expression Analysis qPCR
4. Localization
5. Functional Analysis

1. MicroRNA Isolation (page 7)

miRCURY RNA Isolation Kits

- Get total RNA from a wide range of sources
- Ideal for microRNA research

2. Expression Analysis Array (page 8)

miRCURY LNA microRNA Array, 7th gen – hsa, mmu & mo

- Our sensitive and specific human, mouse and rat microRNA microarray

miRCURY LNA microRNA Hi-Power Labeling Kits

- Fast and simple labeling of total RNA
- Ideal for use with Exiqon's microRNA arrays

Spike-in microRNA Kits

- Improve the quality of your array data with these synthetic microRNAs

3. Expression Analysis qPCR (page 10)

Universal cDNA Synthesis & ExiLENT SYBR Green Master Mix kits

- Optimized reagents for use with the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Primer Sets

- Individual microRNA PCR primer sets for quantification of microRNAs
- Design custom LNA primers for any small RNA online

Ready-to-Use PCR panels

- miRNome PCR panels
- microRNA Pick-&-Mix PCR panels
- Focus microRNA PCR panels

4. Localization (page 12)

miRCURY LNA microRNA Detection Probes

- Sensitive and specific probes for all microRNAs. Available with a wide variety of modifications

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kits (FFPE)

- Kits for optimizing microRNA ISH from many sample sources
- First optimize your experiment, then use an LNA probe for your microRNA of interest

5. Functional Analysis (page 14)

miRCURY LNA microRNA Inhibitors

- Pre-designed and custom inhibitors for specific suppression of all microRNAs in miRBase and more

miRCURY LNA microRNA Power Inhibitors

- Our most potent inhibitors. Synthesized with PS backbones

miRCURY LNA microRNA Family Inhibitors

- Inhibitors of all microRNAs within a family

miRCURY LNA microRNA Target Site Blockers

- Unmatched high efficacy *in vitro* and *in vivo*
- Unrivalled performance - LNA TSBs do not catalyze RNase H-dependent mRNA degradation

1. MicroRNA Isolation

빠르고 간편하게 microRNA 연구에 적합한 total RNA 추출

miRCURY RNA Isolation Kit 시리즈

- 다양한 sample로부터 고품질의 total RNA 추출
- Exiqon의 microarray, PCR 등 다양한 downstream 실험에 적합
- 20분 만에 빠르고 간편하게 total RNA 추출
- Phenol-free 과정

Exiqon에서는 샘플 형태에 따라 아래와 같이 세 가지 제품이 있다. 샘플 타입에 적합한 kit의 선택은 그림 1에서 확인 가능하다.

- **miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids** : serum, plasma, urine, CSF 와 같은 Biofluids 샘플로부터 풍부한 small RNA (<1000 bp) 분리
- **miRCURY RNA Isolation Kit - Cell & Plant** : animal cell, small tissue samples, blood, yeast, fungi, bacteria 및 식물로부터 total RNA의 추출을 위한 빠른 프로토콜을 제공
- **miRCURY RNA Isolation Kit - Tissue** : animal tissue sample로부터 total RNA 추출에 최적화

Sample Type	Recommended kit	RNA fraction	Recommended detection method
Serum Plasma Urine CSF Other biofluids	miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids	Small RNA (<1000 bp)	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR
Cultured cells Plant Tissues Brain and Adipose Tissue* Full Blood (non-coagulating)	miRCURY™ RNA Isolation Kit - Cell & Plant	Total RNA	miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR or miRCURY LNA™ microRNA Arrays
Tissue	miRCURY™ RNA Isolation Kit - Tissue		

* For brain and adipose tissue extra Lysis Additive is required.

그림 1. Isolation kit selection guide. Select the right sample isolation kit and detection method for your samples.

miRCURY RNA Isolation Kit는 separation matrix와 같이 특유의 resin을 이용한 spin column chromatography 방법을 이용한다. Total RNA는 phenol 이나 chloroform 같은 유기용매를 사용하지 않고도 20 ~ 50 분 정도면 쉽게 추출할 수 있다. miRCURY RNA Isolation Kit는 기본적으로 아래와 같은 네 가지의 단계를 가진 샘플타입에 최적화된 프로토콜을 포함한다.

- 1) 세포 용해 및 단백질 침전
- 2) Ethanol/isopropanol 첨가와 column에 loading
- 3) Column 세척
- 4) Column으로부터 RNA elution

Biofluids Kit

miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids는 serum, plasma와 같은 생체액으로부터 RNA를 추출하기 위해 최적화한 제품이다. 시료가 생체액인 경우 제한된 양의 RNA가 포함되어 있고 PCR 저해 물질이 존재하기 때문에 microRNA 정제에 어려움이 있다. miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids는 정제 수율이 낮은 샘플을 조작하는데 최적화되었고 각종 inhibitor의 carryover 현상을 최소화하여 생체액으로부터 microRNA를 정제하는데 최적화되어 있으며, 고순도 small RNA를 높은 수율로 얻을 수 있다(그림 2).

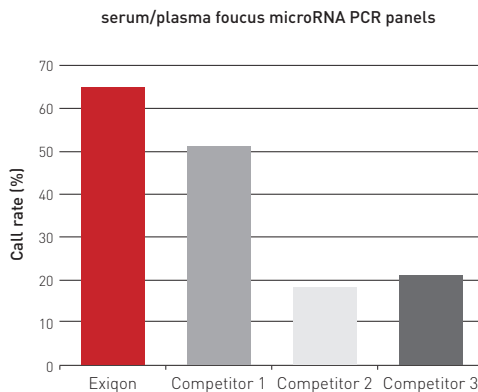


그림 2. The miRCURY RNA Isolation Kit -Biofluids allows detection of more microRNAs compared to three other column based RNA isolation kits. RNA isolations were performed from the same plasma sample, using 4 different sample preparation kits. microRNA profiling was performed using the Serum/Plasma Focus microRNA PCR panel (168 microRNA assays in total). Call rate (percent of microRNAs detected) for each kit is shown. Only assays detected as present in all 5 replicates were calculated as a call.

표 1. Recommended starting material for different organisms /sample types

	Serum/plasma	Urine	CSF	Other biofluids*
Human samples	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Rodent samples	50 µl**	200 µl	Not tested	50 µl**
RNA eluate for PCR***	4 µl	4 µl	8 µl	4 µl

*) For subsequent qPCR analysis, start volume may need to be adjusted to keep PCR inhibitors at a minimum.

**) Add RNase-free water to keep final volume at 200 µL

***) Volume used as input in a 20 µL RT reaction using Exiqon's Universal cDNA Synthesis Kit.

Cell & Plant Kit

miRCURY RNA Isolation Kit - Cell & Plant는 Real time PCR, Microarray, Northern blotting 등의 실험에 적용 가능한 고품질의 total RNA 추출에 최적이다.

Tissue Kit

miRCURY RNA Isolation Kit- Tissue는 대부분의 동물세포로부터 RNA를 추출하는데 최적화되어 있다. 본 제품에는 Proteinase K가 포함되어 있어 섬유질을 많이 포함하는 근육조직이나 지방을 많이 포함된 뇌 조직으로부터 단백질의 제거가 용이하다. miRCURY RNA Isolation Kit - Tissue는 이러한 조직 샘플로부터 고품질의 total RNA 추출이 가능하다(그림 3).

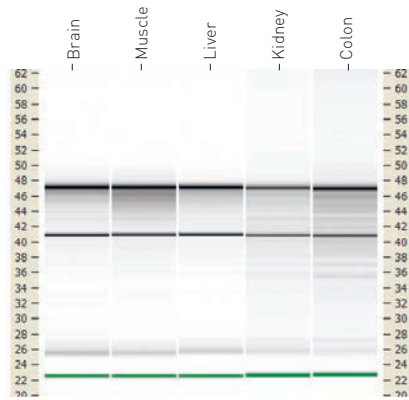


그림 3. High quality total RNA from difficult tissues. Total RNA was isolated from five mouse tissues using the miRCURY RNA Isolation Kit - Tissue. Brain and muscle tissues are usually considered difficult sources of RNA as they are very rich in lipids and fiber, respectively. However, great results were produced as seen from the average OD ratios (260/280: 1.85, 260/230: 1.7) and RIN values (8.8) of the five tissues.

2. Expression Analysis Array

LNA 기반의 정확하고 민감한 microRNA microarray miRCURY LNA microRNA Arrays

- miRBase 19.0에 등재된 3100개의 human, mouse, rat의 microRNA capture probe
- 검증을 거친 LNA-enhanced capture probe로 검출, 특이성과 민감도 향상
- GC 함량에 관계없이 모든 microRNA를 검출 가능
- 고감도: 30ng 수준의 total RNA로부터 microRNA Profiling
- 상동성이 매우 높은 microRNA family member도 특징적으로 구별 가능
- Single color, Dual color microarray 가능

miRCURY LNA microRNA Array, 7th gene - has, mmu & rno

Exiqon의 7세대 miRCURY LNA microRNA array는 miRBase 19.0에 등재되어 있는 총 3100개의 human, mouse, rat microRNA 뿐만 아니라 이들 중에 연관된 viral microRNA까지 검출하는 Probe를 포함하고 있다. 또한 추가적으로 miRPlus human microRNA에 대한 capture probe도 포함한다.

Organism name	Organism code	Common name	In miRBase 19	Array 7th gen
Homo sapiens	hsa	Human	2042	94%
Mus musculus	mmu	Mouse	1281	90%
Rattus norvegicus	mo	Rat	723	95%

LNA capture probes의 장점

Exiqon의 microRNA array 제품은 모두 LNA-enhanced capture probe를 이용한다. LNA probe는 일반 DNA probes에 비하여 두 가지 중요한 장점이 있다(그림 4, 5).

1) High affinity - Capture probe에 LNA를 삽입하면 probe-target duplex에서 높은 값의 melting temperature (T_m)를 얻을 수 있어 array의 특이성과 민감성을 높일 수 있다.

2) Uniform affinity - DNA capture probe와는 달리 T_m -normalized LNA probe는 microRNA의 GC 함량에 관계없이 동등한 효율로 목적 서열에 결합할 수 있다. 이는 각 probe에 삽입된 LNA의 양이나 위치에 따라 T_m 값이 달라질 수 있기 때문이다.

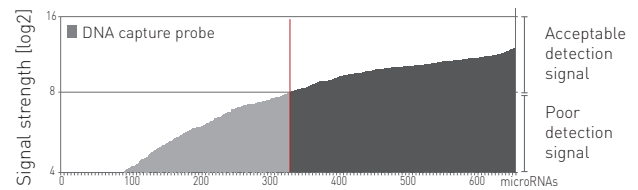
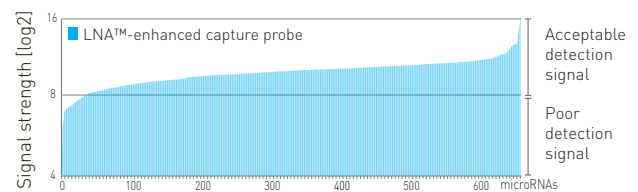


그림 4. LNA-enhanced capture probes ensure robust detection of microRNAs. With DNA-based capture probes, half of microRNAs were either undetected or poorly detected. Signal strength (\log_2 signal/100amol target) from 660 synthetic microRNAs hybridized to Exiqon's microarray and Supplier A's DNA-based array are compared.

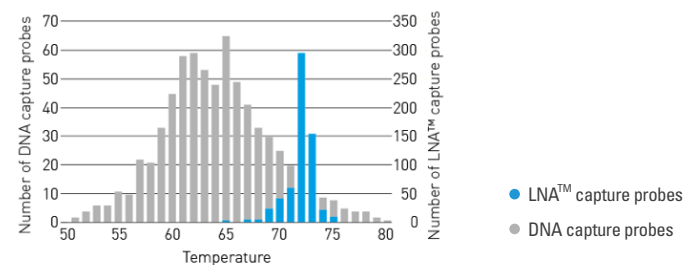


그림 5. T_m -normalized LNA capture probes. DNA capture probes (gray bars) for human microRNAs, have a T_m range of more than 30 °C and an average T_m of 64 °C (StDev 5 °C). The LNA capture probes (yellow bars) have a T_m range of only 10 °C and an average T_m of 71.5 °C (StDev=1.62 °C).

매우 높은 민감성

miRCURY LNA microRNA Hi-Power Labeling Kit와 함께 이용하면 더욱 증가된 민감성을 확인할 수 있다(그림 6). Microarray에 사용되는 LNA capture probe의 절반 이상이 ≤ 0.5 amol의 검출한계를 지니고 있다.

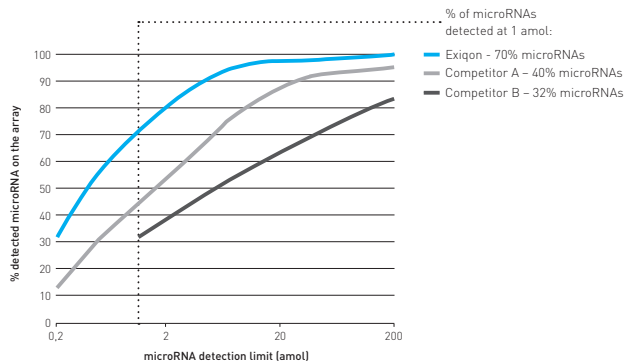


그림 6. The most sensitive array available. Due to optimally designed T_m normalized capture probes and extremely efficient labeling, the Exiqon array detects a significantly higher percentage of microRNAs than competitor arrays.

Exiqon microRNA array는 30ng 수준의 소량의 total RNA로부터 재현성 높은 결과를 얻을 수 있다(그림 7). Array의 높은 특이성 때문에 데이터 품질의 손상 없이 샘플의 양을 늘릴 수 있다. 이러한 특징은 낮은 수준으로 발현되는 microRNA를 연구하는 데 있어 중요하다.

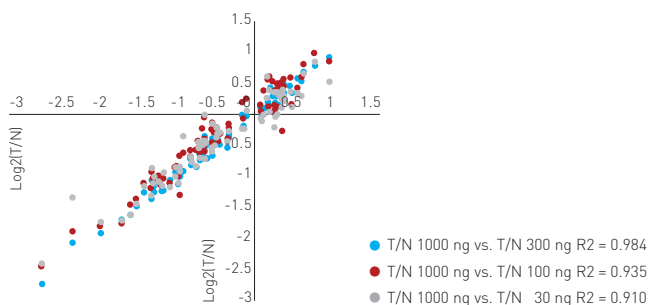


그림 7. Reliable microRNA expression profiles with as little as 30ng total RNA. Four different microarray experiments with varying amount of input RNA from oesophagus cancer (T) and normal adjacent (N) tissue were compared. A very high correlation is obtained when plotting the results from the experiment using 1000ng input RNA against those using 300, 100, and 30ng.

높은 특이성

miRCURY LNA microRNA Array는 microRNA 타겟에 대해 높은 특이성을 보유한다. T_m -normalized LNA capture probe와 최적화된 hybridization 반응 조건은 capture probe의 특이성을 상당히 증가시킨다. 그 결과 Exiqon array는 상동성이 매우 높은 microRNA family member도 구별 가능하다(표 2).

	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i
let-7a	100%	2%	17%	4%	4%	2%	1%	2%
let-7b	1%	100%	4%	1%	1%	1%	1%	1%
let-7c	0%	8%	100%	0%	1%	0%	0%	0%
let-7d	2%	2%	5%	100%	1%	0%	0%	0%
let-7e	1%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
let-7f	6%	3%	5%	3%	3%	100%	2%	3%
let-7g	0%	0%	1%	0%	0%	1%	100%	4%
let-7i	0%	3%	0%	0%	0%	0%	2%	100%

표 2. Superior discrimination between microRNA family members. There is very little cross-hybridization between let-7 family members. The experiments were performed with synthetic let-7 spike-in microRNA (300 amol) in a background of tRNA.

데이터 품질 향상을 위한 Spike-in miRNA Kit의 적용

7th gen microRNA array는 52개의 synthetic spike-in microRNA를 포함한다. Spike-in microRNA는 array hybridization 전 labeling 단계에서 첨가되며 spike-in capture probe를 이용한 signal은 labeling과 hybridization, scanner setting, data normalization, array replicate 등의 control로 사용된다.

또한, array는 10개의 추가적인 spike-in microRNA에 대한 probe를 포함하고 있는데 이는 profiling 연구의 calibration과 control로써 사용된다.

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR로 검증

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR를 이용하여 microarray 결과를 검증할 수 있다. Ready-to-use microRNA PCR panels을 이용하면 microRNA 발현 profiling을 빠르고 쉽게 수행할 수 있다.

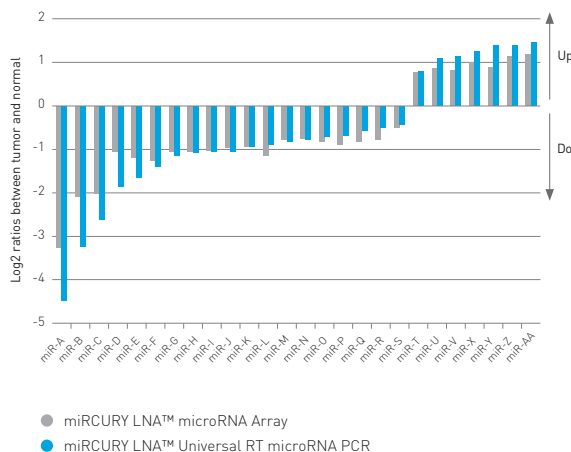


그림 8. Great correlation between microarray and qPCR results. The array data was normalized (quantile normalization) and microRNAs with \log_2 ratios > 0.5 were included in the study. The qPCR data was normalized to reference genes. Only microRNAs that were detected (Cp < 36 for all replicates) were included. A total of 26 microRNAs were included in the study.

3. Expression Analysis qPCR

LNA-enhanced PCR primer를 이용한 최상의 microRNA real time PCR profiling

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR

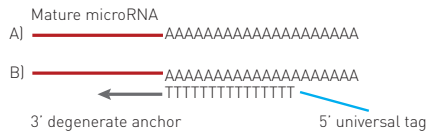
- 우수한 감도: 1 pg의 소량 total RNA부터도 각 microRNA의 재현성 높은 정량
- 96 well, 384 well PCR panel을 이용한 수백개의 microRNA profiling
- 최상의 특이성: LNA-enhanced primer를 이용한 특이성 높은 microRNA 검출
- 3시간의 빠르고 용이한 프로토콜

MicroRNA profiling을 위한 Exiqon의 독자적인 시스템

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR System(그림 9)은 아래의 두 가지 중요한 특징과 우수한 성능 및 사용의 편리성을 제공한다.

- Universal RT: 합성된 first-strand cDNA는 multiple microRNA PCR assay의 주형이 된다. 이 반응은 sample의 소모량과 조작에 의한 오차 값을 줄일 뿐만 아니라 시간과 노력을 절약할 수 있다.
- LNA PCR amplification: PCR 증폭 primer(forward와 reverse)는 각 microRNA에 특이적이고, LNA로 최적화되어 있다. LNA의 높은 민감성은 낮은 백그라운드로 microRNA family member를 검출할 수 있다.

Step 1: First-strand synthesis (RT)



Step 2: Real-time PCR amplification

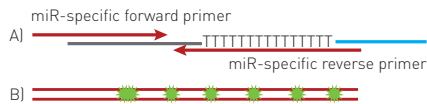


그림 9. Schematic outline of the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR System. A polyA tail is added to the mature microRNA template (step 1A). cDNA is synthesized using a PolyT primer with a 3' degenerate anchor and a 5' universal tag (step 1B). The cDNA template is then amplified using microRNA-specific and LNA-enhanced forward and reverse primers (step 2A). SYBR Green is used for detection (step 2B).

Exiqon의 개별 microRNA 정량과 expression profiling을 위한 방법은 그림 10과 같다. Exiqon의 제품은 유연하고 쉬운 방법으로 microRNA profiling이 가능하도록 최적화되어 있다. 일단 cDNA synthesis kit로 first strand cDNA를 합성 후 Ready-to-Use PCR panel(miRNome

panels, Focus panels, custom designed Pick-&-Mix plate)(그림 11), 또는 미리 디자인된 각각의 PCR primer set, custom primer set를 이용하여 PCR을 수행할 수 있다.

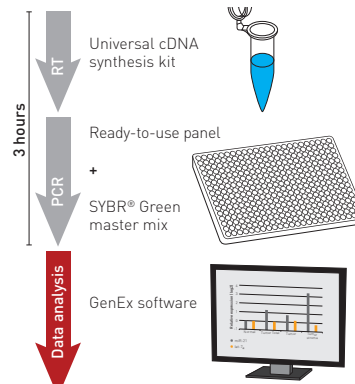


그림 11. Overview of the miRCURY LNA Universal RT PCR workflow. The PCR primer sets have been designed for optimal performance when used with Exiqon's ExiLent SYBR Green master mix. Use of other master mixes may affect the quality of the results. Ready-to-use (miRNome, Focus and Pick-&-Mix) panels can be replaced by individual PCR primers in this workflow.

1 pg total RNA로부터 정확한 microRNA 정량 가능

LNA-enhanced Tm-normalized primer는 상당히 높은 민감성을 가지고 있으므로 1 pg 수준의 소량 total RNA로부터 재현성 높은 microRNA 정량이 가능하다(그림 12). 또한 단 20 ng total RNA를 이용하여 384well plate에서 다수의 microRNA profiling 실험을 수행할 수 있다. 이러한 Exiqon 제품의 특징은 FFPE section, LCM, serum/plasma나 그 외 biofluids와 같은 미량의 total RNA를 포함한 sample로부터 microRNA의 발현양상을 파악하는 데 중요하다(그림 13, 14).

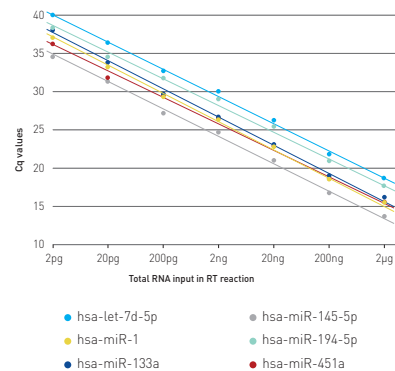


그림 12. Accurate quantitation from 1pg total RNA starting material. Data from the amplification of 6 microRNAs in serial dilutions of human AM6000 total reference RNA are shown. All microRNA assays exhibit linear read-out with correlation coefficients $R(2) > 0.99$.

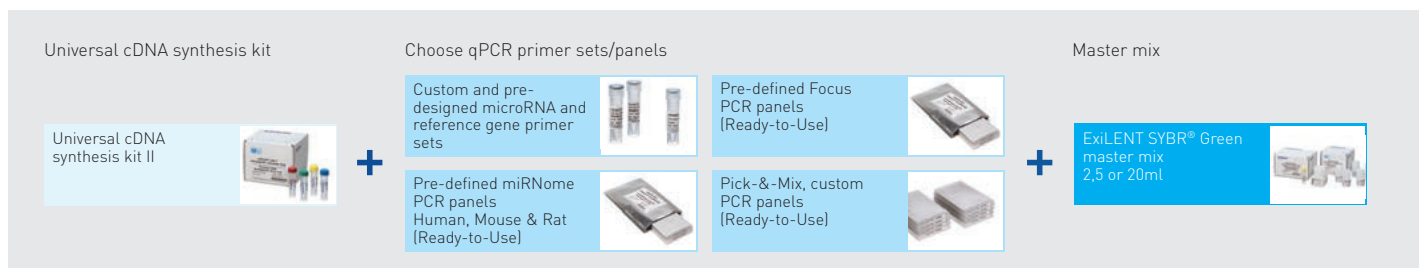


그림 10. Overview of the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system.

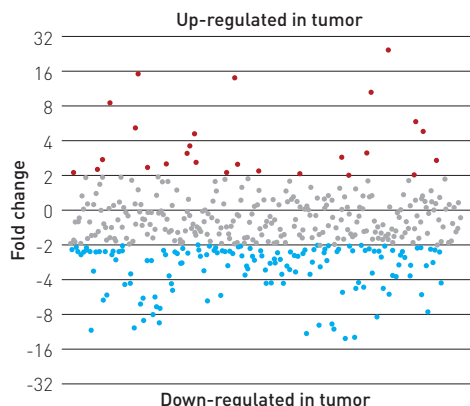


그림 13. Expression profiling of 742 microRNAs using 40 ng total RNA from tumor and normal FFPE sections. Real-time PCR was performed using triplicate RT reactions per sample on human miRNome microRNA panels I and II. Data from 424 microRNAs with Cp values <37 is included. Normalized expression is shown as fold changes in tumor compared to normal. Out of 424 microRNAs expressed, 144 were > 2-fold down-regulated in the tumor (blue dots) and 26 were > 2-fold up-regulated in the tumor (red dots).

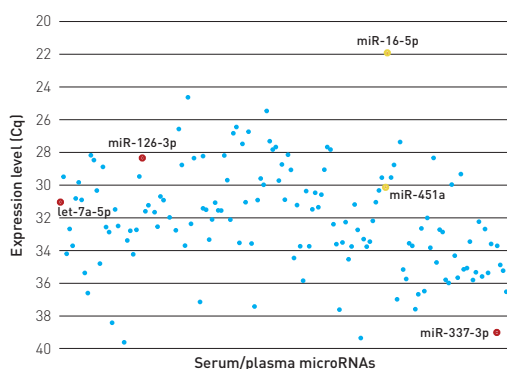


그림 14. microRNA profiling in blood serum and plasma. Serum/Plasma Focus microRNA PCR Panels were used to profile 175 microRNAs commonly found in serum/plasma. MicroRNAs for sample quality control in orange and interesting microRNAs in red.

Universal RT 반응을 이용한 소량의 샘플 사용

Exiqon의 qPCR system은 microRNA PCR 증폭 분석을 위해 first-strand cDNA pool을 형성하는 single universal RT 반응을 이용한다. 이 때문에 시료 사용을 절감할 수 있으며 실험 간의 오차를 줄이는데 용이하다. 합성된 cDNA는 보관하여 추가적인 PCR 반응에 사용 가능하므로 microRNA specific RT 반응보다 유연하게 실험을 진행할 수 있다.

높은 특이성

PCR amplification primer(forward, reverse)에 포함된 LNA는 microRNA family member간의 1염기 수준의 차이도 구별할 수 있도록 설계되었다(표 3). 또한 mature microRNA와 precursor microRNA도 구별 가능하다. 모든 miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR primer set는 ExiLENT SYBR Green master mix에 최적화되어 있다.

며 최소의 background signal로 정확한 target amplification이 가능하도록 validation되어 있다.

Assay	Sequence	Template			
		miR-181a	miR-181c	miR-181b	miR-181d
miR-181a-5p	AACAUUCAACGUGUCGGUGAGU	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%
miR-181c-5p	AACAUUCAAC-CUGUCGGUGAGU	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGUGU	0.1%	100.0%	0.0%	0.0%
miR-181d	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGUGU	0.0%	0.2%	0.0%	100.0%

표 3. Excellent discrimination between closely related microRNA family members. Examples of single nucleotide discrimination in the miR-181 family.

Real Time PCR을 이용한 biomarker 발굴

Exiqon의 real time PCR system은 biomarker 발굴에 이상적인 실험 방법이다. miRNome panel은 목적 시료에서 어떤 microRNA가 발현되는지를 확인 가능하며, Focus panel, Pick-&-Mix panel은 특정한 목적으로 시료에 특정 microRNA의 스크리닝하는 방법으로 비용을 절감할 수 있다(그림 15).

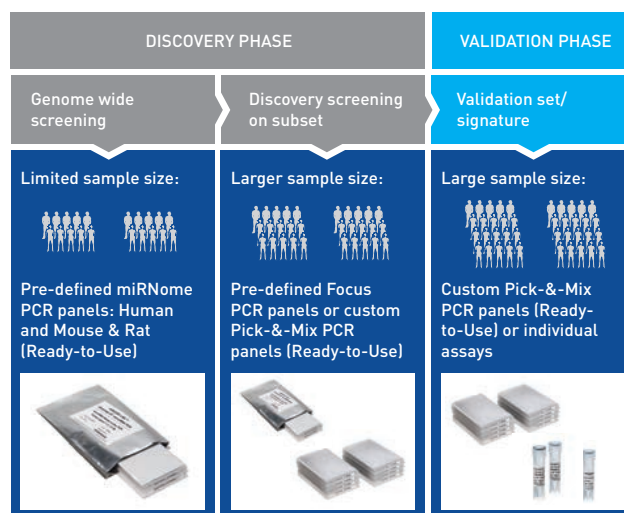


그림 15. Biomarker discovery workflow. Exiqon's qPCR system is designed for biomarker discovery, from screening in miRNome panels to final validation in a subset of samples by either Pick-&-Mix panels or individual assays.

Ready-to-Use PCR panels

모든 panel은 well당 10 ul reaction volume의 ready-to-use 형태로 되어 있어 cDNA와 ExiLENT SYBR Green master mix만 넣고 PCR 반응을 시작하여 약 3시간 만에 반응을 완료할 수 있다. Exiqon의 panel은 대부분의 Real time PCR 기기에 적용할 수 있는 reference gene과 control을 포함한다.

1) miRNome panels

miRNome panel에는 384well plate에 human, mouse, rat microRNA에 관한 primer가 분주되어 있다. Pre-amplification 과정 없이, 40 ng의 total RNA로부터 microRNA profiling이 가능하다.

- 752개의 human, 752개의 rodent microRNA assay 가능
- 많은 종류의 microRNA를 포함하는 assay에 적합
- Reference gene, inter-plate calibrator와 control primer set가 포함

2) Focus panels

Focus panel은 특정한 연구 분야에 대해 적용 가능한 real time PCR panel이며 Exiqon의 수천 개의 임상 샘플로부터 수집된 데이터를 이용하여 제작되었다.

- Serum/Plasma Focus panel: 단 20 ul의 serum/plasma 샘플로부터 정확하고 민감한 microRNA profiling이 가능하다.
- Cancer Focus panel: oncogene, tumor suppressor 관련 microRNA profiling
- Stem cell Focus panel: 배아줄기세포와 만능줄기세포에 관련된 microRNA profiling
- Toxicology Focus panel: toxicology에 관련된 human, rat, dog, monkey microRNA profiling
- RNA QC panel: RNA sample의 quality control을 위한 PCR 분석법

3) Pick-&-Mix panels

Exiqon 홈페이지에서 연구자의 실험에 맞는 primer set의 선택과 plate layout을 디자인할 수 있다. 이 panel은 다수의 샘플로부터 microRNA를 검출하는데 적절하다.

- Fully customizable: plate 형태, layout, PCR 장치, 크기 등을 연구자가 원하는 대로 디자인할 수 있다.
- miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR assay에 최적화된 pre-designed primer set의 선택
- 연구자의 needs에 따라 pre-designed panel을 제작 가능
- 96 well 및 384 well 형태 모두 선택 가능

4) Individual pre-designed assay

Human, rat, mouse microRNA 뿐만 아니라 viral microRNA까지 포함한 방대한 qPCR primer set와 endogenous reference gene을 보유하고 있다. LNA가 포함된 1400개의 validated primer set를 선택 가능하며 단 1 pg의 total RNA로부터 microRNA의 정량이 가능하다.

5) Individual custom assays

Exiqon의 easy-to-use design tool을 이용하여 실험자의 목적에 맞는 microRNA 또는 small RNA primer set를 제작 가능하다.

- 모든 microRNA에 대한 LNA-enhanced qPCR primer set 제작 가능
- In-house 알고리즘에 의한 최적의 PCR primer set 제작

6) RNA quality control

RNA spike-in Kit 또는 ready-to-use 형태의 RNA QC panel을 이용하면 RNA sample의 quality control을 수행할 수 있다. RNA spike-in에 대한 control primer set 또한 PCR panel 또는 individual assay로 사용 가능하며, 이는 RNA 회수 수율, cDNA 합성 및 PCR 효율의 quality control에 사용된다.

4. Localization

microRNA와 small RNA 검출을 위한 LNA-enhanced Detection system

miRCURY LNA microRNA Detection Probes for *in situ* hybridization & Northern Blotting

- 다양한 label 형태의 LNA-enhanced probe를 선택 가능
- 최상의 특이성과 민감성
- 짧은 시간 내에 실험 완료
- 2.5 ug의 total RNA로부터 microRNA detection 가능
- Unlabeled 또는 custom label이 가능
- 방사성, 비방사성 방법 모두 가능

In situ hybridization과 Northern blotting을 위한 Exiqon 제품은 아래와 같다.

- Pre-designed miRCURY LNA microRNA Detection Probes: miRBase에 등록된 대부분의 microRNA에 이용 가능하다.
- Custom miRCURY LNA microRNA Detection Probes: microRNA, small RNA 뿐만 아니라 precursor microRNA도 이용 가능하다. 또한, positive control과 negative control probe도 구비되어 있다.

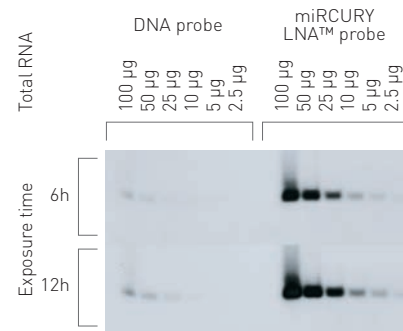


그림 16. LNA probes are superior to DNA probes. *A. thaliana* total RNA was hybridized with 32P-labeled DNA and LNA probes for miR-171. From Valoczi et al. 2004, Nucleic Acids Res. e175; reprinted with permission from Oxford University Press.

민감한 microRNA 검출

In situ hybridization을 위한 miRCURY LNA microRNA Detection Probe는 whole mounts, single cell 또는 FFPE(Frozen or Formalin-fixed paraffin-embedded) 조직에서 타겟과 높은 결합력으로 결합한다. FFPE sample에 대해서는 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit과 함께 사용하는 것을 권장한다. miRCURY LNA microRNA Detection probe for *in situ* hybridization은 그림 17, 18과 같이 다양한 샘플에서 최상의 특이성을 보였다. Exiqon의 detection probe는 microRNA가 '어디에' 또는 '언제' 발현되는지 분석할 수 있는 최적의 툴이다.



그림 17. MicroRNA detection in zebrafish. Detection of miR-122a (top), miR-206 (middle) and miR-124a (bottom) using LNA probes in whole mount zebrafish embryos. Image kindly provided by Dr. Ronald Plasterk, Hubrecht Laboratory, The Netherlands.



그림 18. MicroRNA detection in chick. Specific detection of miR-206 in a Gallus gallus embryo using an LNA probe. miR-206 is detected in myotomal muscle cells (Ason et al. 2006).

높은 감도를 위한 double DIG labels

Double [5' and 3'] DIG-labeled probe는 single labeled probe에 비해 높은 감도로 microRNA 검출이 가능하다. 두 개의 DIG label의 협력효과는 noise를 낮추고 signal 강도를 높이는 결과를 나타낸다(그림 19).

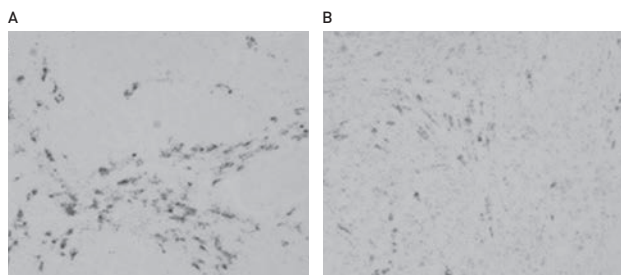


그림 19. Double DIG labeling is more sensitive than single DIG labeling. hsa-miR-21 detection in tissue sections using an LNA probe with a double DIG (5' and 3') label at 40nM (A) or a single 3' DIG label at 80nM (B).

FFPE 샘플의 *in situ* hybridization 반응조건 최적화를 위한 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit(FFPE)

- 성공적인 microRNA ISH를 위한 지름길-적은 실험 단계와 최소화된 최적화 과정
- 빠르고 쉬운 one-day microRNA ISH protocol
- 최상의 특이성과 민감성: ISH 실험의 반응조건 최적화를 위한 필수 시약과 Double-DIG labeled LNA Probe 포함
- 다양한 조직에 사용가능: 실험용, 임상 FFPE 샘플에도 적용 가능

MicroRNA ISH 실험 시작을 위한 가장 쉬운 방법

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit(FFPE)는 FFPE 조직 샘플에서 microRNA *in situ* hybridization(ISH) 실험의 조건을 최

적화 및 셋팅하는데 효과적이다. 최상의 민감성을 가진 double [5' and 3'] DIG-labeled miRCURY LNA microRNA detection probe를 기반으로 한 본 제품은 성공적인 microRNA ISH 실험을 수행하는데 최적이다. 모든 kit에는 FFPE 조직 절편에 대한 LNA probe와 무독성의 formamide-free ISH buffer가 포함되어 있다.

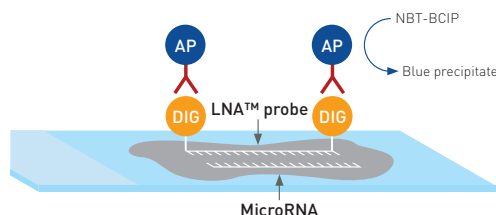


그림 20. Overview of the procedure. First, the tissue is "opened" using Proteinase K. In the hybridization step, the double DIG-labeled LNA probe binds specifically to its target microRNA. Alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-DIG antibodies are then added. This step is followed by NBT-BCIP development and optional counter-staining with Nuclear Red.

본 제품은 세포나 세포내 microRNA의 위치 연구와 microRNA의 발현 공간을 확인하는 실험 등에 적용할 수 있으며, 일반적인 ISH 프로토콜의 일부 과정(pre-hybridization, post-fixation, acetylation)을 제거한 빠르고 쉬운 프로토콜을 포함한다. 또한 formamide-free이고 방사성물질을 사용하지 않기 때문에 해로운 화학물질에 대한 노출을 최소화할 수 있다.

모든 샘플에 대한 솔루션

9종류의 miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit가 판매되고 있으며, 각 kit는 positive, negative control과 hybridization buffer, Proteinase K를 포함하고 있고 각 kit는 조직 특이적인 miRCURY LNA microRNA Detection probe를 포함한다(표 3). 이 probe는 다양한 조직과 세포 종류에 검증되어 있으며 실험의 초기 셋업과 최적화 과정에서 positive control probe로 사용된다.

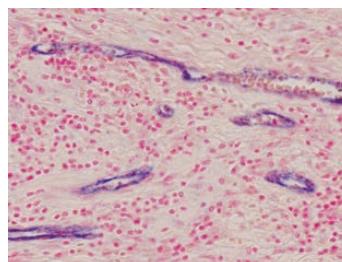


그림 21. miR-126 detection in colon wall. Kit 5 can be used to detect microRNAs in inflamed colon FFPE tissue. Here, it was used to detect miR-126. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

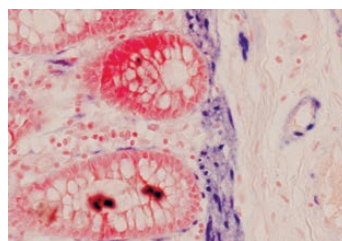


그림 22. miR-145 detection in human colon. Kit 7 can be used to detect microRNAs in colon FFPE tissue. Here, miR-145 is detected in a human colon wall with underlying muscle layers. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

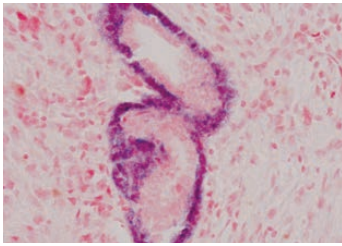


그림 23. miR-205 detection in human breast carcinoma. Kit 8 can be used for detection of microRNAs in breast cancer FFPE tissue. Here, it was used to detect miR-205. Staining was performed with NBT-BCIP (blue). Sections were counterstained with nuclear red.

miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit의 선택

아래 표 4는 각 kit에 적용 가능한 조직과 세포 종류를 나타낸다.

	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4	Kit 5	Kit 7	Kit 8	Kit 9
Brain				yes				
Eye				yes	yes			
Muscle	yes				yes			
Lung				yes	yes	yes		
Kidney					yes			
Liver			yes		yes			
Colon					yes	yes		yes
Cervix							yes	
Heart	yes				yes	yes		
Mammary Gland					yes		yes	
Lung cancer		yes			yes	yes	yes	
Colorectal cancer		yes			yes	yes		
Breast cancer		yes			yes	yes	yes	
Kidney cancer		yes			yes	yes		
Cervix cancer		yes			yes	yes	yes	
Testis cancer					yes	yes		
Esophagus cancer								yes
Cell entity	myocyte	varies	hepatocyte	neuron	endothelial	smooth muscle	basal cells	granulocyte

표 4. Choosing the appropriate miRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit. The table indicates the tissue(s) in which each of the kits has been validated.

5. Functional Analysis

MicroRNA의 기능 연구를 위한 강력한 방법

miRCURY LNA microRNA Inhibitors & Power Inhibitors

- AU-rich microRNA target에도 높은 효율
- miRBase 등재 microRNA 뿐만 아니라 Exiqon의 miRPlus microRNA에 대한 inhibitor도 가능
- Off-target effect의 최소화로 낮은 농도에서도 최상의 억제효율
- 높은 특이성과 안정성으로 지속적인 antisense 활성
- 폭넓은 적용성- *in vivo*와 family inhibitor

강력한 microRNA inhibitors

Exiqon의 miRCURY LNA inhibitor는 microRNA 활성을 억제하는 저해제로써 microRNA의 확인과 검증을 위해 사용하거나, 세포의 프로세스나 질병의 경로에서 microRNA의 역할을 연구하기 위해 사용된다. 최적의 길이와 LNA의 위치를 조절하는 디자인 알고리즘을 이용하여 모든 microRNA inhibitor가 제작된다. 이 inhibitor는 자가결합self-complementarity이 최소화되며 생물학적 안정성을 유지하는 한편 타겟에 대해 높은 억제율을 나타낸다. 또한 LNA 염기는 전체 inhibitor에 분산되

어 삽입되는데, 이는 LNA inhibitor/RNA duplex가 RNaseH의 기질로써 인식되지 못하게 함으로써 off-target effect를 최소화하도록 한다.

1) miRCURY LNA microRNA Inhibitors는 디자인 알고리즘을 이용해 미리 디자인된 inhibitor로 Tm-normalized되어있으며 최상의 억제율과 안정성을 가질 수 있도록 최적화되어 있다(그림 24). Exiqon은 inhibitor libraries도 제공하며, miRCURY LNA Inhibitor Libraries는 세 가지로 분류된다.

- Human library: 980 microRNA
- Mouse library: 739 microRNA
- Combined human and mouse library: 980 Human + 739 mouse microRNA

모든 library는 0.2 nmol의 건조 된 형태로 96-well plate에 제공된다.

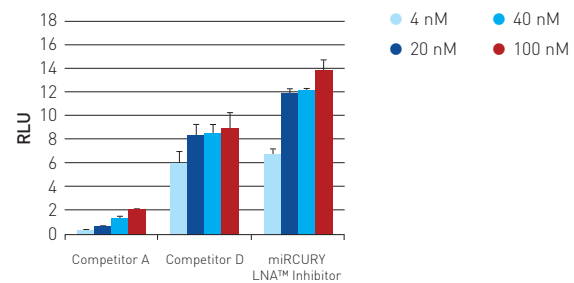


그림 24. Exiqon's microRNA inhibitors offer higher efficacy than leading competitors. MCF7 cells were cotransfected with a Firefly Luciferase-Reporter plasmid with a miR-21 target sequence, a transfection efficiency control and different concentrations of miR-21 inhibitors. Reporter gene expression was measured 48h after transfection with a Dual Luciferase assay.

2) miRCURY LNA microRNA Power Inhibitors는 타겟에 대해 최고의 억제율을 자랑한다. 이 inhibitor는 phosphorothioate(PS) backbone을 갖추고 있어 효소 분해에 대해 강한 내성을 지녀, 최상의 억제율과 장시간 안정성을 보인다(그림 25).

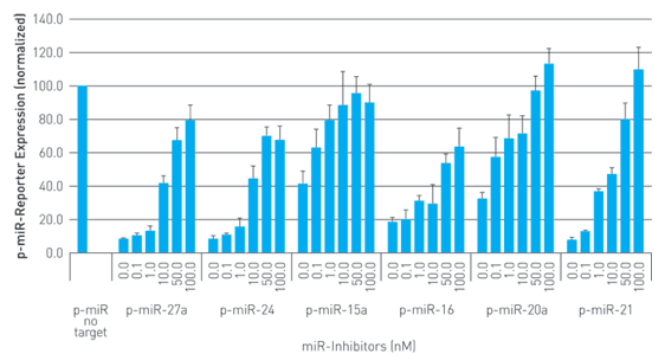


그림 25. Silencing of common microRNAs. HeLa cells were transfected with a Firefly Luciferase-Reporter plasmid with a miR target sequence, a plasmid expressing Renilla luciferase (transfection efficiency control) and the corresponding miRCURY LNA microRNA Inhibitor in different concentrations. Reporter gene expression was measured 48 h after transfection with a Dual Luciferase assay. Ratios of Firefly and Renilla luciferase activity were calculated and normalized to values obtained with a Firefly Luciferase reporter with no miR target sequence (p-miR no target).

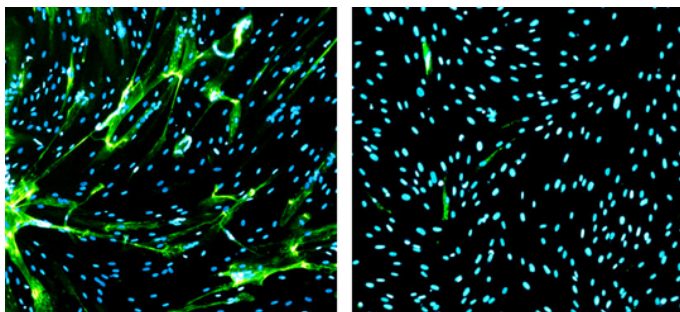


그림 26. Efficacy of microRNA Power Inhibitors. Cells transfected with miRCURY LNA microRNA Power Inhibitor against miR-181a (right panel) fail to differentiate normally (left panel). LHCN-M2 cells were plated and transfected with 50 nM of microRNA inhibitor or control. After 24 hours differentiation was induced by shifting to low serum medium. Seven days later the cells were fixed in formalin and permeabilized with Triton. Cells were stained with late differentiation marker (Myosin Heavy Chain (MHC)-Alexa488) and nuclei with Hoechst 33258. No MHC (green) is observed in miR-181a transfected cells. In addition, pictures without stains show that they also fail to form myotubes. Mir-181a is required to down-regulate HoxA11 which in turn is a repressor of MyoD. The absence of mir-181 causes a repression of MyoD, resulting in a failure of the cells to differentiate.

3) miRCURY LNA microRNA Family Inhibitors는 microRNA family 내 모든 microRNA를 일시적으로 억제할 수 있다. Family inhibitor는 human과 mouse에 보존된 40개 종의 microRNA family에 이용 가능하며 PS backbone을 보유한 Power Family inhibitor도 보유하고 있다.

4) *In vivo* miRCURY LNA microRNA inhibitors는 살아있는 동물 실험에 적용 가능한 microRNA inhibitor로 custom 제작이 가능하다.

모든 microRNA inhibitor는 fluorescein[6-FAM]과 Ready-to-label (unlabeled) 형태의 라벨링이 가능하며 HPLC 정제가 완료된 5 nmol의 dried-down oligonucleotide이다. *In vivo* inhibitor의 경우 실험 동물에 적합하도록 정제가 되며 대용량 제품도 가능하다.

5) miRCURY LNA microRNA Target Site Blockers는 microRNA와 특정 타겟 간의 상호작용을 억제할 수 있는 antisense oligonucleotides이다. MicroRNA는 일반적으로 다수 타겟의 발현을 조절하기 때문에 microRNA inhibitor는 다수의 타겟에 대해 작용하게 된다. 그러므로 microRNA 억제에 따른 표현형은 여러 타겟을 억제한 결과이다. 이러한 다수의 타겟을 동정하는 것은 microRNA의 기능을 이해하는데 중요하다. Target Site Blocker(TSB)는 단일 타겟에 대해 특이적으로 저해함으로써 표현형의 해석이 가능하다. 그림 27과 그림 28에서 Target Site Blocker의 기작을 확인할 수 있다.

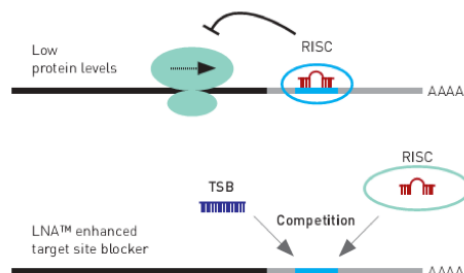


그림 27. LNA enhanced Target Site Blockers compete effectively with RISC for microRNA binding site. Target Site Blockers are antisense oligonucleotides designed to compete with microRNA/RISC by hybridizing to the microRNA target site of a particular mRNA.

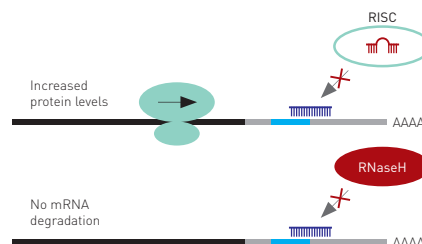


그림 28. Target Site Blockers stimulate translation of specific mRNAs by masking the microRNA target sites. LNA enhanced high affinity target site blockers compete effectively with microRNA/RISC for the microRNA target site. In addition LNA distribution throughout the LNA/DNA mixmer ensures that the antisense oligonucleotide does not catalyze RNaseH dependent degradation of the mRNA. As a result the TSB will cause increased expression of the protein encoded by the targeted mRNA.

[License Notice www.Exiqon.com 참조]