

# microRNA 연구를 위한 모든 솔루션



miRNA 정제, 정량, 그리고 기능 분석

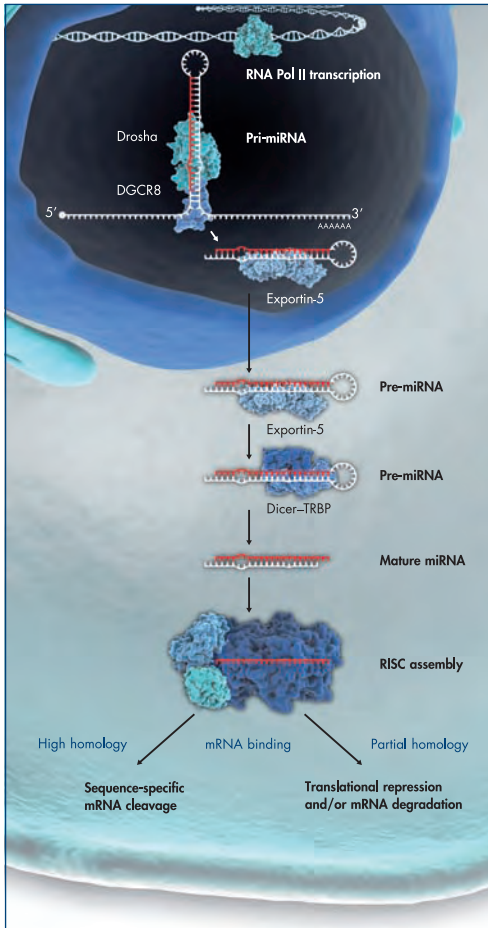


Sample & Assay Technologies

## miRNA 연구 — 발생에서 miRNome 프로파일 분석까지

microRNA (miRNA)는 자연적으로 생기는 핵산 ~22개의 noncoding RNA로 전사 후 유전자 조절 과정을 중재하며 (그림 1), miRNA는 분화와 발달, 세포 신호전달과 감염에 대한 반응을 비롯한 수많은 생물학적 과정에서 중요한 역할을 하고 있습니다. miRNA 발현 조절 상 문제가 암을 포함한 여러 질병의 원인이 되거나 질병의 지표라는 점에 대해서는 이미 강력한 증거가 나와 있는 상태입니다. miRNA가 혈청과 혈장을 타고 순환하고 있으며 질병의 결과에 따라 발현에 차이가 있다는 사실을 찾아내면서 혈중 miRNA 발현 표지를 질병 진단과 예방의 바이오마커로 이용할 수 있는 거대한 가능성이 열렸습니다.

miRNA 연구는 고성능 장비와 기술에 그 성패가 크게 좌우됩니다. QIAGEN은 miRNA 정제, 정량, 그리고 기능 분석까지 모든 요구를 수용할 수 있는 제품을 공급하고 있습니다. QIAGEN GeneGlobe® 웹 포털 ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe))에서 miRNA 전용 제품 주문은 물론 중요한 유전자 정보, pathway 정보, 생물정보학 툴을 찾아보십시오.



### QIAGEN 솔루션:

- **miRNA 정제**  
miRNeasy Kits와 PAXgene® Kit: miRNA를 포함하는 고순도 total RNA 정제
- **miRNA 발현 프로파일 분석**  
miScript® miRNA PCR Arrays: 전체 miRNome나 pathway 관련 miRNA 패널의 프로파일을 빠르게 분석
- **miRNA 발생과 조절 연구**  
miScript PCR System: Mature miRNA (miScript Primer Assays), Precursor miRNA (miScript Precursor Assays), mRNA targets (QuantiTect® Primer Assays) 동시 정량
- **miRNA 기능 분석**  
miScript miRNA Mimics, Inhibitors, Target Protectors: miRNA 기능 조사

**그림 1. miRNA의 표준 발생 경로.** miRNA는 길이가 긴 primary miRNA (pri-miRNA)로 전사된 후에 핵에 있는 Drosha-DGCR8에 의해 precursor miRNA stem loop (pre-miRNA)로 만들어진다. 이렇게 만들어진 pre-miRNA를 Exportin-5-Ran-GTP가 세포핵으로 내보내면 Dicer-TRBP를 통하여 ~22개의 핵산으로 이루어진 mature miRNA로 만든다. 이런 mature miRNA는 Ago2-RNA가 되어 silencing 복합체 (RISC)로 조립된다. RISC-miRNA 복합체는 표적 mRNA의 3'-비번역 부위에 결합하여 전사후 유전자 조절에 관여한다. miRNA가 표적 mRNA의 염기와 어느 정도로 염기 쌍을 이루느냐에 따라 그 조절 방식이 결정되는데, 이는 mRNA cleavage(표적과의 염기쌍 결합길이) 또는 번역억제/mRNA 불안정화 (표적과의 결합 정도 결정)에 의한 방식으로 조절된다.

## miScript PCR System — miRNA 정량 재정립

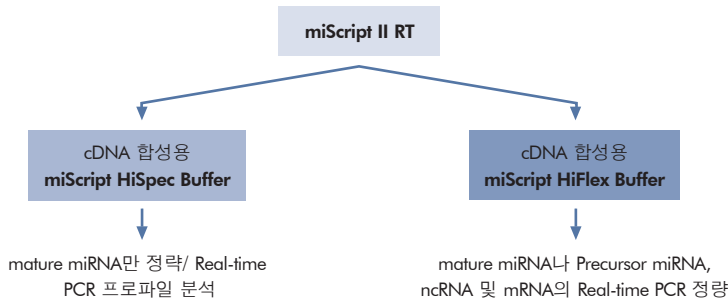
SYBR® Green-based real-time PCR 방법인 차세대 miScript PCR System으로 miRNA 발현을 높은 감도와 특이성으로 정량하고 프로파일까지 분석할 수 있습니다. miScript miRNA PCR Array가 있으면 다양한 종의 mature miRNA 전체 miRNome이나 pathway-focused panels의 프로파일을 빠르게 분석할 수 있습니다. 뿐만 아니라 GeneGlobe 웹 포탈에 오시면 miRNA나 Precursor miRNA 및 그 외 짧은 noncoding RNA (ncRNA)를 개별 분석할 수 있습니다 ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe)).

### miScript PCR System:

- miRNome와 pathway-focused PCR arrays으로 mature miRNA 발현 프로파일 고감도 분석
- cDNA 샘플 하나로 mature miRNA와 Precursor miRNA, ncRNA와 mRNA까지 정량
- miScript miRNA PCR Arrays를 위한 편리한 무료 분석 도구

### 하나의 시스템에 miRNA 정량에 필요한 모든 것 구현

강력한 miScript PCR System에는 RNA를 cDNA로 변환하는 과정부터 miRNA real-time PCR 검출과 데이터 직접 분석과 같이 miRNA 정량에 필요한 모든 단계가 포함되어 있습니다. miScript PCR System 구성은 아래에 자세히 설명하였습니다.



**그림 2. miScript II RT Kit dual-buffer system.** miScript HiSpec Buffer로 cDNA를 합성한 후 miScript miRNA PCR Arrays나 miScript Primer Assays로 mature miRNA 정량. miScript HiFlex Buffer로 cDNA를 합성한 후 동일한 cDNA (적절한 primer assays 사용)로 mature miRNA나 Precursor miRNA, 그 외 noncoding RNA (ncRNA) 및 mRNA 정량.

### miScript II RT Kit

miScript II RT Kit는 1-step 1-tube reverse transcription kit입니다. Dual-buffer system은 real-time PCR 로 mature miRNA 발현 프로파일을 신속히 분석하고 모든 종류의 RNA를 정량하기 위해 개발 되었습니다 (그림 2).

miScript HiSpec Buffer로 mature miRNA 를 cDNA로 선택적으로 변환할 수 있어 사실상 background signal 없이 mature miRNA 프로파일을 빠르게 분석할 수 있습니다. miScript HiFlex Buffer는 모든 종류의 RNA (mature miRNA, Precursor miRNA, noncoding RNA, mRNA)를 cDNA로 변환하는 과정을 유도함으로써 하나의 cDNA 샘플로 정량 miRNA 발생 연구와 유전체 규모의 miRNA 및 mRNA 조절 연구에 두루 사용할 수 있습니다.

[www.qiagen.com/miScriptRT](http://www.qiagen.com/miScriptRT)을 방문하시면 miScript II RT Kit에 대한 좀 더 자세한 정보를 구할 수 있습니다.

### miScript SYBR Green PCR Kit

miScript SYBR Green PCR Kit는 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 와 miScript Universal Primer 그리고 miScript Primer Assay (mature miRNA-specific forward primer)와 reverse PCR primer를 조합하여 mature miRNA를 검출할 수 있도록 구성되어 있습니다. 이 키트는 real-time PCR로 고순도 mature miRNA를 검출하는 실험에 최적화 되어 있습니다.

[www.qiagen.com/miScriptPCR](http://www.qiagen.com/miScriptPCR)로 오시면 miScript SYBR Green PCR Kit에 대한 자세한 정보를 볼 수 있습니다.

### miScript Primer Assays와 miScript Precursor Assays

miScript Primer Assays는 mature-miRNA-specific forward primers입니다. miScript Primer Assays에 miScript Universal Primer (reverse primer)를 함께 사용하면 mature miRNA 특이 검출도 가능합니다. miScript Precursor Assays는 Precursor-miRNA-specific forward/reverse primer 쌍으로 Precursor miRNA stem loop만을 특이적으로 정량합니다. 분석 제품은 모두 miRBase에 올라온 최신 서열 정보를 토대로 설계하였으며 GeneGlobe 웹 포털 ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe))에서 검색할 수 있습니다.

[www.qiagen.com/miScriptAssays](http://www.qiagen.com/miScriptAssays)와 [www.qiagen.com/miScriptPrecursor](http://www.qiagen.com/miScriptPrecursor)에서 miScript Assays에 대한 자세한 정보를 볼 수 있습니다.



miScript miRNA PCR Arrays.

### miScript miRNA PCR Arrays

최신 기술인 miScript miRNA PCR Arrays는 mature miRNA-specific forward primers (miScript Primer Assays)를 붙인 miRNome 패널과 생물학적 연관성을 알아보는 pathway-focused 패널로 되어 있습니다. miScript miRNA PCR Arrays를 miScript SYBR Green PCR Kit와 함께 사용하면 mature miRNA 특이 발현 프로파일을 빠르게 분석할 수 있을 뿐 아니라 실험 재현도 가능합니다. miScript miRNA PCR Array은 여러 실험 환경에서 테스트 하여 검출 감도와 특이성에 대한 확인을 거친 제품으로 실험 결과의 신뢰성을 확신할 수 있습니다.

[www.qiagen.com/miScriptArrays](http://www.qiagen.com/miScriptArrays)에서 miScript miRNA PCR Arrays에 대한 자세한 정보를 볼 수 있습니다.

### miScript PCR Controls

miScript PCR Controls은 miScript PCR System로 miRNA를 정량분석 할 때 real-time PCR 결과를 normalization할 수 있도록 해주는 primer입니다. snoRNA 5종과 snRNA은 1종이 miScript PCR Controls용으로 나와 있습니다. 이 제품은 human, mouse, rat, dog, 그리고 히말라야 원숭이(rhesus macaque) 연구에 사용할 수 있습니다.

최신 종 정보나 그 외 자세한 사항은 [www.qiagen.com/miScriptControls](http://www.qiagen.com/miScriptControls)에서 확인하십시오.

### miScript miRNA PCR Array 데이터 분석 툴

miScript miRNA PCR Arrays 결과를 쉽게 분석할 수 있는 무료 소프트웨어를 웹에서 제공하고 있습니다. 각각의 miScript miRNA PCR Array 별로 데이터를 분석할 수 있습니다. Raw C<sub>T</sub> 값을 업로드 하면 분석 툴이 PCR array Control을 자동으로 분석하고  $\Delta\Delta C_T$  법으로 상대 정량을 한 후 다양한 양식으로 결과를 보여주므로 여러분의 데이터를 빠르게 분석해 볼 수 있습니다.

[www.qiagen.com/miScriptAnalysis](http://www.qiagen.com/miScriptAnalysis)에서 서비스를 제공합니다.

# 최첨단 miRNA 발현 프로파일 분석 툴

## miScript miRNA PCR Arrays로 miRNA 발현 프로파일 분석

miScript miRNA PCR Arrays는 mature-miRNA-specific forward primers (miScript Primer Assays)가 miRNome 및 생물학적 연관성 조사용 pathway-focused 패널에 분주되어 있습니다 (표 1). 이 PCR arrays는 384-well plate, 96-well plate, 100-well Rotor-Disc® 형이 있으며 바로 사용할 수 있게 되어 있습니다(표 2와 그림 3). 높은 성능을 보장하는 miScript miRNA PCR Arrays 제품이 몇 가지 종을 대상으로 출시되어 있으며 사용자의 실험 조건에 맞춰 완벽히 조정할 수 있습니다. Array마다 control이 있어 샘플 준비부터 데이터 분석까지 전 실험 단계를 모니터링할 수 있으며 데이터 normalization control, reverse transcription control, PCR control을 갖추고 있습니다. miScript miRNA PCR Array의 전 분석 과정은 실험으로 직접 확인하여 real-time PCR mature miRNA 검출 감도와 특이성을 보장합니다.

표 1. 시판 중인 miScript miRNA PCR Arrays

| Array           | 대상 종   |
|-----------------|--|
| 전체 miRNome      | Human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이(rhesus macaque) |
| miFinder        | Human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이                 |
| 뇌종양             | Human, mouse, rat                                |
| 유방암             | Human, mouse, rat                                |
| 암 PathwayFinder | Human, mouse, rat                                |
| 세포 분화와 발달       | Human, mouse, rat                                |
| 면역병리학           | Human, mouse, rat                                |
| 염증반응 & 자가면역     | Human, mouse, rat                                |
| 신경발달 & 질병       | Human, mouse, rat                                |
| 난소암             | Human, mouse, rat                                |
| 혈청 & 혈장         | Human, mouse, rat                                |
| 사용자 맞춤형 Array   | Human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이, 그 외 종          |

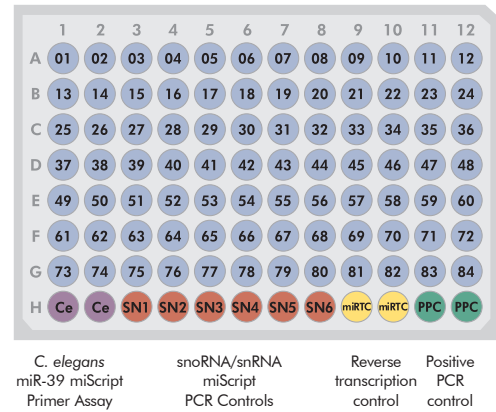
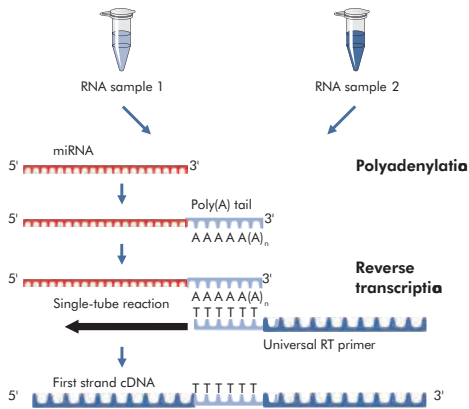


그림 3. miScript miRNA PCR Array 배치. miScript miRNA PCR Arrays에는 84 miRNA용 miScript Primer Assays는 물론 데이터 normalization와 reverse transcription 그리고 PCR을 위한 control이 포함되어 있다. 데이터 normalization control에는 6개의 miScript PCR Controls (10쪽 참조)과 C. elegans miR-39용 primer assay가 함께 들어있다. cel-miR-39 assay는 Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic을 검출하므로 spike-in control로 사용할 수 있다. Rotor-Gene Q용 Rotor-Disc와 384-well 형식으로도 공급된다.

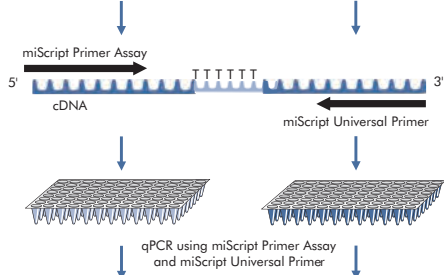
표 2. miScript miRNA PCR Arrays와 호환해 쓸 수 있는 real-time cycler

| 제조사                  | Cycler   | 명식 |
|----------------------|--|----|
| QIAGEN               | Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene 6000   | R  |
| Applied Biosystems   | ABI™ 5700, 7000, 7300, 7500 Standard, 7900HT Standard (96-well block), 7700, ViiA™ 7 (96-well block) | A  |
|                      | ABI 7500 Fast, 7900HT Fast (96-well block), ViiA 7 Fast (96-well block), StepOnePlus™                | C  |
|                      | ABI 7900HT, ViiA 7 (384-well block)  | E  |
| Bio-Rad              | iCycler®, iQ™ 5, MyiQ™, MyiQ2, Chromo4™  | A  |
|                      | CFX96™, DNA Engine Opticon®, DNA Engine Opticon 2  | D  |
|                      | CFX384™  | E  |
| Agilent (Stratagene) | Mx3000P®, Mx30005P®  | A  |
|                      | Mx4000®  | D  |
| Agilent (Stratagene) | Mx4000®  | F  |
|                      | LightCycler 480 (384-well block)   | G  |
| Eppendorf            | Mastercycler® ep realplex 2, 2S, 4, 4S   | A  |
| TaKaRa               | TP-800   | A  |

1. 1-step 1-tube reverse transcription 반응으로 miRNA를 cDNA로 변환



2. cDNA에 QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix와 miScript Universal Primer와 water를 넣음  
miScript miRNA PCR Array의 각 well에 혼합액 분주



3. Real-time PCR cyclers 반응

4. 데이터 분석

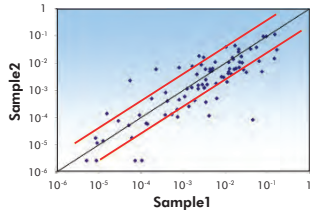


그림 4. miScript miRNA PCR Array workflow

## 직관적이고 빠른 실험

miScript miRNA PCR Arrays의 miRNA 발현 프로파일 분석 작업은 간단하면서도 강력합니다 (그림 4). 먼저 miScript II RT Kit에 miScript HiSpec Buffer를 넣어 cDNA를 준비합니다. 그런 후 혼합액 (cDNA + miScript Universal Primer + QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix + RNase free water)을 miScript miRNA PCR Array에 넣습니다. 세 번째로 real-time PCR cycler에서 반응시킵니다. 마지막으로 miScript miRNA PCR Array Data Analysis Tool로 데이터를 분석합니다. 실험자 입장을 적극 고려하여 설계된 miScript miRNA PCR Arrays는 기존의 real-time PCR 기술을 활용하는 mature miRNA 프로파일 분석 도구입니다.

## 혈청/혈장 샘플에서 miRNA 바이오마커 찾기

Pathway-focused miScript miRNA PCR Arrays는 miRNA가 생물학적 과정에서 수행하는 역할을 이해하기 위한 더욱 광범위한 연구를 가능하게 합니다. miScript miRNA PCR Arrays 구성은 QIAGEN의 독자적인 방법을 이용하여 array의 최신성과 생물학적 연관성 보장합니다. 현재 miRNA 연구에서 가장 각광받는 분야 중 하나가 혈청이나 혈장 중의 miRNA를 분석하는 분야입니다. 혈청/혈장 중에 비교적 안정된 형태로 세포외 miRNA가 있다는 사실은, miRNA 농도 변화를 수많은 질병의 손쉬운 바이오마커로 사용할 수 있다는 가능성을 보여주었고 그 결과로 개발된, Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array로 혈청/혈장에 존재할 가능성이 있는 84 가지 질병 연관 miRNA의 프로파일을 빠르게 분석할 수 있게 되었습니다 (그림 5).

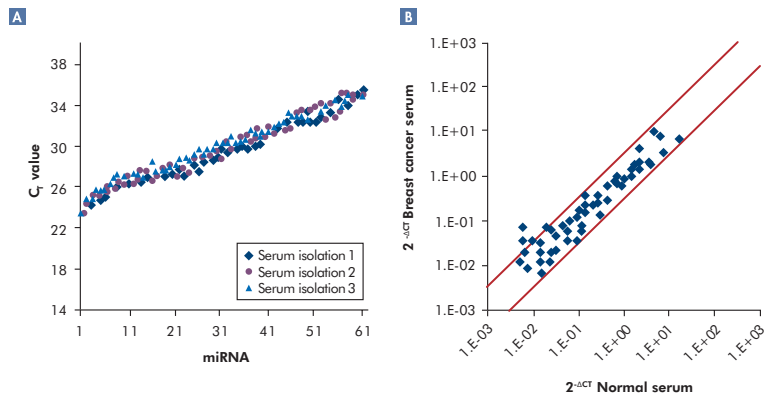


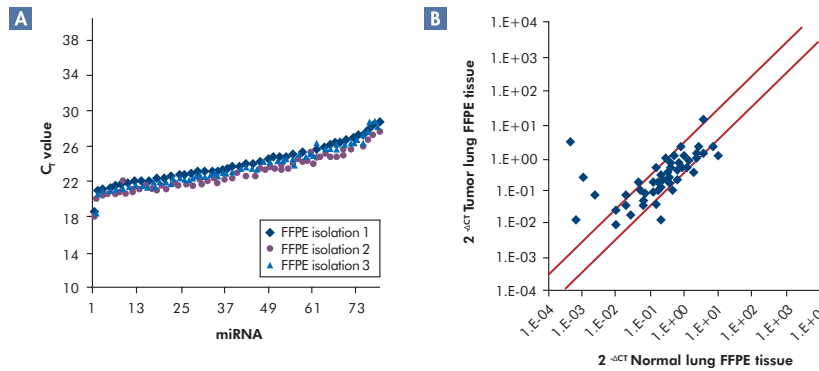
그림 5. 혈청 샘플에서 miRNA 바이오마커 탐색. 정상인의 혈청 샘플과 (n=10) 유방암 환자의 혈청 샘플 (n=3)에서 total RNA를 분리하였다. miScript II RT Kit에 miScript HiSpec Buffer를 사용하여 cDNA를 준비하였다. Human Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array와 miScript SYBR Green PCR Kit를 함께 사용하여 real-time PCR로 mature miRNA 발현을 분석을 하였다. A) 3 개의 정상 혈청 샘플의 Ct 값으로 높은 재현성을 확인할 수 있다. B) 2<sup>-delta CT</sup> 값에 대한 분산형 그래프를 보면 정상 혈청과 유방암 혈청 집단의 mature miRNA 발현 농도가 현저히 차이가 나는 것을 볼 수 있다 (±3-배 발현 차이, 붉은 선).

## FFPE 샘플로 miRNA 발현 데이터 분석

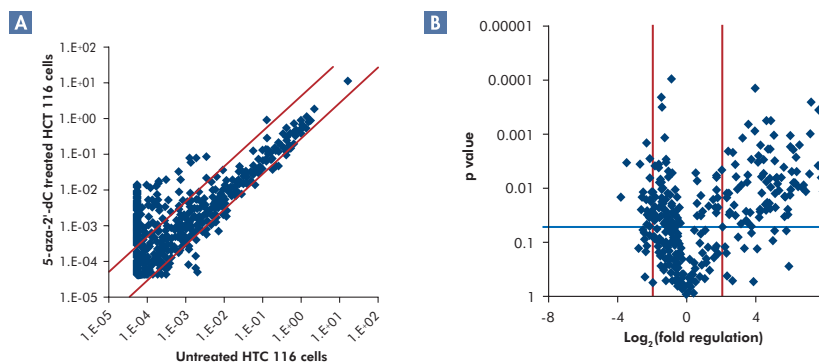
Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) 조직 샘플은 retrospective(과거의 샘플로부터 분석) miRNA 발현 프로파일 분석 시 매우 중요한 샘플입니다. QIAGEN은 FFPE 샘플 분석을 위한 모든 솔루션을 제공하고 있습니다. miRNeasy FFPE Kit는 miRNA를 포함한 total RNA를 정제하는 kit로 페놀-클로로포름 추출과 같은 여타 miRNA 정제는 따라오지 못할 회수율과 성능을 보여줍니다. miScript miRNA PCR Arrays로 FFPE 샘플의 소중한 miRNA 데이터를 찾아낼 수 있습니다 (그림 6).

## 모델 시스템으로 최상의 miRNA 발현 프로파일 분석

Pathway-focused arrays 외에도 human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이를 포함한 다양한 종에 사용할 수 있는 최신 miRNome miScript miRNA PCR Arrays 제품이 출시되어 있습니다. 1 µg 미만의 total RNA로도 human의 모든 miRNome이 프로파일을 빠르게 분석할 수 있습니다 (그림 7).



**그림 6. FFPE 샘플의 miRNA 발현 프로파일 분석.** miRNeasy FFPE Kit로 얇은 (5 µm) 정상/중양 lung FFPE 조직 절편에서 total RNA를 분리하였다. cDNA는 miScript II RT Kit에 miScript HiSpec Buffer를 넣어 준비하였다. Human miFinder miScript miRNA PCR Array를 miScript SYBR Green PCR Kit와 조합하여 real-time PCR로 mature miRNA 발현 프로파일을 분석하였다. **A** 3개의 중양 lung FFPE 샘플의  $C_t$  값에서 높은 재현성을 볼 수 있다. **B** 정상/중양 샘플을 비교한  $2^{-\Delta CT}$  값의 분산형 그래프에서는 두 조직의 mature miRNA 발현 농도 차가 큰 것을 확인할 수 있다 ( $\pm 3$ -배 발현 차이, 붉은 선).



**그림 7. 모델 시스템의 miRNA 발현 프로파일 분석.** miRNeasy Mini Kit로  $\pm$  5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-2'-dC) demethylation 시약을 처리한 HCT 116 대장암 세포에서 total RNA를 분리하였다. 이 시약은 DNA에 끼어 들어 DNA methyltransferase 활성 부위와 공유결합 하여 DNA methyltransferase의 반응을 비가역적으로 저해한다. cDNA는 miScript II RT Kit와 miScript HiSpec Buffer로 준비하였다. real-time PCR을 이용해 Human miRNome miScript miRNA PCR Array와 miScript SYBR Green PCR Kit로 mature miRNA 발현 프로파일을 조사하였다. **A**  $2^{-\Delta CT}$  값의 분산형 그래프로 두 샘플의 mature miRNA 발현 농도 차가 크다는 것을 알 수 있다. **B** volcano plot에는 miRNA 조절 ( $\pm 4$ -배, 붉은 선)을 볼 수 있다. 5-aza-2'-dC 처리 HCT 116 세포에서는 104 miRNA 가 강하게 발현촉진 되었고 30은 발현억제 되는 것을 볼 수 있었다. p값 0.05를 적용하면 (파란선) 104 miRNA 89은 발현촉진 이 30 miRNA 21은 발현억제가 유효한 것으로 나타났다.

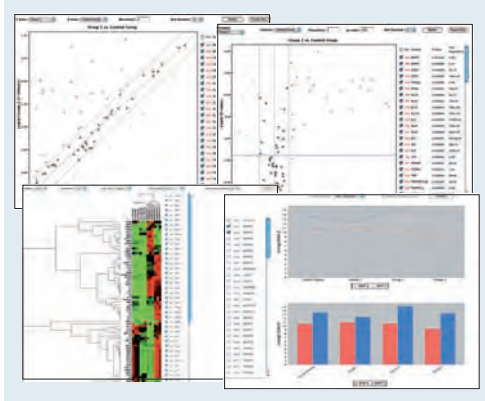


그림 8. 웹 기반 소프트웨어를 통한 편리한 데이터 분석

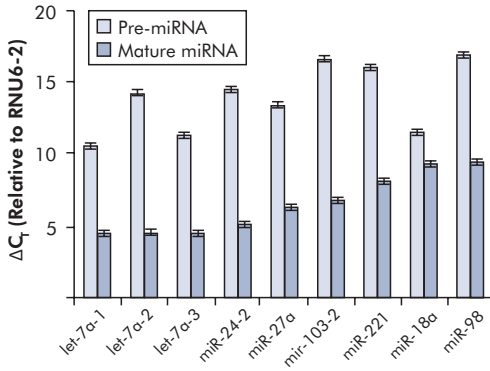


그림 9. Mature miRNA와 precursor miRNA 검출. miRNeasy Mini Kit로 HeLa S3 세포에서 total RNA를 분리하였다. cDNA는 miScript II RT Kit + miScript HiFlex Buffer로 준비하였다. Real-time PCR에 miScript Primer Assays를 사용하여 mature miRNA를 정량하였고 miScript Precursor Assays는 precursor miRNA 정량에, RNU6-2용 miScript PCR Control은 normalization에 사용하였다. Mature miRNA와 precursor miRNA의 상대적 농도는 miRNA 별로 차이가 있고, 다른 유전자 부위에서 발현된 precursors가 동일한 mature miRNA를 만들어 낼 수 있다.

## Real-time PCR 데이터 분석을 간단히

온라인에서 miScript miRNA PCR Array 개별 분석이 가능한 무료 데이터 분석 툴 서비스를 하고 있습니다. 웹 기반 Excel® 포맷의 데이터 분석 툴이  $\Delta\Delta C_t$  상대 정량법으로 자동 정량해 줍니다 (그림 8).

### miScript miRNA PCR Array 데이터 분석 툴의 자동 처리 기능:

- Control well 해석
- $\Delta\Delta C_t$  법으로 배수 변화 계산
- 다양한 시각 포맷으로 결과 제시

## miRNA 발생 메커니즘 탐구

Precursor miRNA와 mature miRNA 간 관계 연구 실험에서는 이 두 가지 miRNA 타입을 동일한 cDNA 샘플에서 검출해 내는 유연성이 매우 중요한 요소입니다. miScript HiFlex Buffer와 miScript II RT Kit로 cDNA를 준비하면 이런 유연성을 발휘할 수 있습니다. Real-time PCR에서는 miScript Primer Assays로 mature miRNA를 검출하고 miScript Precursor Assays로 precursor miRNA를 검출합니다 (그림 9). GeneGlobe 웹 포털 온라인에서 miScript Primer Assays와 miScript Precursor Assays를 따로 구입할 수도 있습니다. Mature miRNA와 precursor miRNA의 상대 농도는 miRNA에 따라 달라지며, mature miRNA가 환경과 조직이 다른 다른 종류의 precursor miRNA에서 발현되기도 합니다 (그림 9).

## miScript PCR Starter Kit를 이용하여 쉽게 시작할 수 있습니다.

miRNA 연구를 시작하려는 연구자라면 miRNA 정량 실험에 필요한 모든 요소를 갖춘 miScript PCR Starter Kit로 실험을 시작할 수 있습니다. 이 키트에는 reverse transcription PCR과 real-time PCR용 시약에 human miR-15a용 miScript Primer Assay와 RNU6-2용 miScript PCR Control가 함께 들어있습니다. 본 키트 제품으로 실험 세팅에서 모니터링까지 가능하여 흥미로운 miRNA 연구를 위한 이상적인 툴입니다.

## 재현성 높은 고감도 miRNA 정량

강력한 miRNA 검출 시스템이라면 감도가 높고 검출 범위가 넓어야 합니다. 그 밖에 primer는 100%에 가까운 효율을 지니고 있는 동시에 miRNA isoform을 구분할 수도 있어야 합니다. 정량 작업은 쉽고 재현성이 있어야 합니다. miScript PCR System은 miRNA 발현 프로파일 분석이나 발생 연구에 관계없이 이 모든 특징을 갖고 있습니다. miScript HiSpec Buffer 나 miScript HiFlex Buffer 중 어떤 것으로 cDNA를 준비해도 10 miRNA copies 정도의 소량을 검출해 낼 수 있습니다 (그림 10). 100%에 가까운 primer 증폭 효율로 10 pg 정도의 total RNA만 있으면 확실한 데이터를 만들 수 있습니다. 감도뿐만 아니라 특이성도 높습니다. miScript PCR System은 서로 연관성이 높은 miRNA군 isoform을 효과적으로 구분할 수 있으며 염기 하나 차이까지도 잡아냅니다 (표 3). miScript PCR System 을 처음 사용하는 경우라도 거의 동일한 technical/biological replicates를 만들 수 있습니다 (그림 11).

표 3. miScript Primer Assays의 높은 특이성

| cDNA used | % Activity relative to perfect match primer assay as 100% |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|           | miScript Primer Assay used                                |        |        |        |        |        |        |        |        |
|           | Let-7b  | Let-7c | miR-98 | Let-7d | Let-7e | Let-7a | Let-7f | Let-7g | Let-7i |
| Let-7b    | 100.0   | 1.8    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    |
| Let-7c    | 0.5   | 100.0  | 0.0    | 0.0    | 2.4    | 0.1    | 0.0    | 0.0    | 0.0    |
| miR-98    | 0.0   | 0.2    | 100.0  | 0.1    | 0.0    | 0.1    | 0.0    | 0.0    | 0.1    |
| Let-7d    | 0.1   | 0.0    | 0.0    | 100.0  | 0.0    | 0.4    | 0.0    | 0.0    | 0.0    |
| Let-7e    | 0.1   | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 100.0  | 0.2    | 0.0    | 0.0    | 0.0    |
| Let-7a    | 0.1   | 0.6    | 0.0    | 0.5    | 3.1    | 100.0  | 0.1    | 0.0    | 0.0    |
| Let-7f    | 0.6   | 0.1    | 0.0    | 0.1    | 0.0    | 1      | 100.0  | 0.1    | 0.1    |
| Let-7g    | 0.6   | 0.2    | 0.0    | 0.1    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 100.0  | 0.2    |
| Let-7i    | 0.1   | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.1    | 100.0  |

Let-7군에는 염기 하나 정도가 차이 나는 isoform이 있다. miScript II RT Kit와 miScript HiFlex Buffer로 각 Let-7 isoform의 합성 miRNA (Let-7a-Let-7i, miR-98)를 사용하여 cDNA를 만들었다. miScript HiSpec Buffer로 같은 실험을 해도 유사한 결과 (데이터 표시 안됨)가 나왔다. cDNA 각각은 각 isoform별 miScript Primer Assay에서 real-time PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 불일치 miScript Primer Assays와 완벽 일치 miScript Primer Assays의 C<sub>t</sub> 값 차이로 % 상대 검출율을 계산하였다 (% 상대 검출율 =  $2^{-\Delta C_t} \times 100$ ). miScript PCR System은 연관성이 높은 isoform군을 효율적으로 구분할 수 있다.

그림 11. 인공 복제본과 생물학적 복제본의 결과 재현. A Passage number가 동일한 2개의 HeLa S3 cell pellet과 B 다른 모세포 stock에서 각기 다른 시기에 수집한 HeLa S3 cell pellet 2개에서 miRNeasy Mini Kit로 total RNA를 정제하였다. cDNA는 miScript II RT Kit + miScript HiSpec Buffer로 준비하였다. 그런 다음 miFinder miScript miRNA PCR Array를 miRNA 프로파일 분석에 사용하였다. Replicates의 C<sub>t</sub> 값 그래프를 비교해 본 결과 technical replicates와 biological replicates 결과에 재현성이 있었다. 본 실험은 miScript PCR System을 처음 사용해 본 연구원에 의하여 수행되었다.

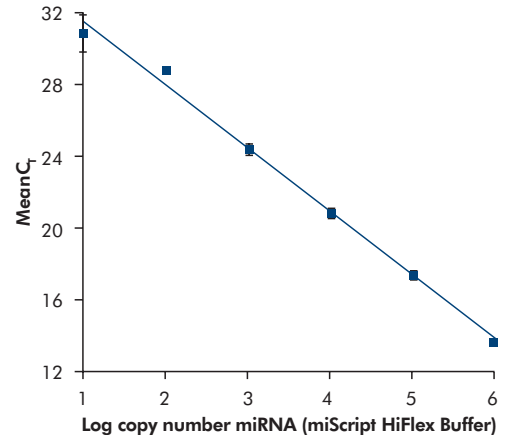
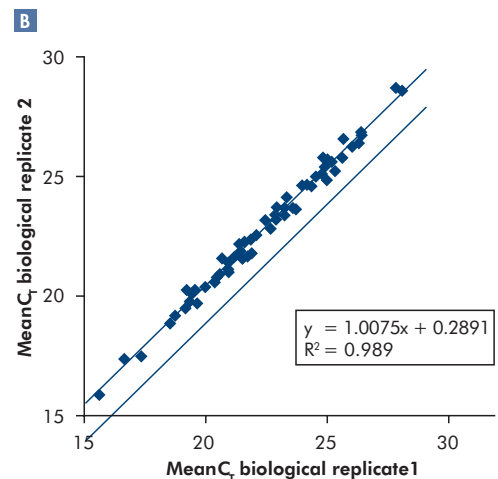
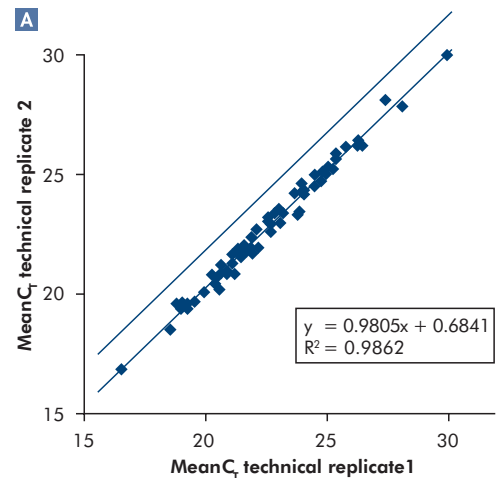
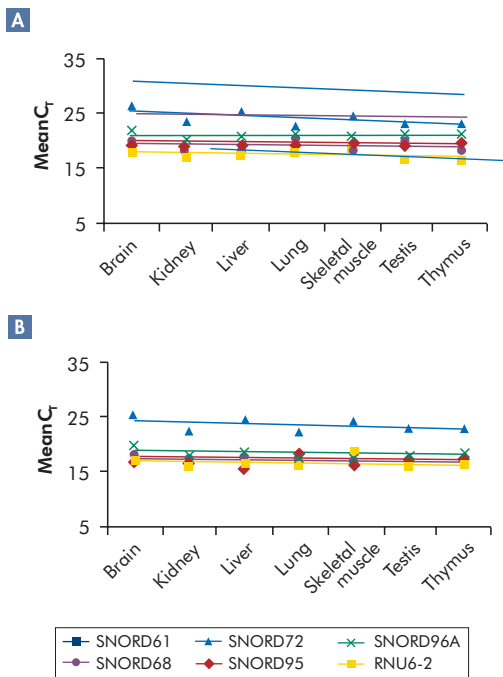


그림 10. 10dog 정도의 miRNA copy도 정확히 검출. 합성 miR-21와 miScript II RT Kit + miScript HiFlex Buffer (키트에 포함)를 사용하여 cDNA를 만들었다. 10 개 ~ 10<sup>6</sup> 개의 cDNA를 miScript PCR System을 이용하여 real-time PCR 하였다. miRNA 복제수가 늘어나면 이에 비례하여 C<sub>t</sub> 결과값이 감소하여 주형의 양에 크게 좌우되지 않고 높은 감도를 보여주었다. miScript HiSpec Buffer로도 유사한 결과를 얻었다 (데이터 표시 안됨).



## miRNA 정량용 normalization controls

Real-time PCR 방법으로 miRNA 정량 시, 정확하고 재현성 있는 결과를 얻으려면 적합한 endogenous reference RNA로 표적 miRNA의 양을 normalization해 놓아야 합니다. 이 방법을 상대 정량이라 하며, normalization으로 부정확한 정량 결과로 이어질 수 있는 인자를 보정하여 실험이나 샘플 차이에 관계없이 결과를 직접 비교할 수 있습니다. miScript PCR Controls은 the miScript PCR System을 사용하는 human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이 real-time PCR miRNA 발현 데이터를 normalization한 것입니다. 최신 종 목록은 [www.qiagen.com/miScriptControls](http://www.qiagen.com/miScriptControls)에 올라와 있습니다.



### miScript PCR Controls의 장점:

- Human, mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이에 사용할 수 있는 control
- 100%에 가까운 높은 증폭 효율
- 세포나 조직이 달라도 일정한 발현 농도

### 결과의 신뢰성

miScript PCR Controls은 5 snoRNA와 1 snRNA 패널로 되어 있는 정량용 primer입니다. 이 RNA는 조직과 세포 종류와 관계없이 발현 농도가 상대적으로 안정적이고 (그림 12), miScript PCR Controls의 증폭 효율은 100%에 가깝습니다. miScript HiSpec Buffer나 miScript HiFlex Buffer로 준비한 cDNA 는 miScript PCR Controls과 함께 사용할 수 있습니다. miScript miRNA PCR Arrays에는 miScript PCR Controls이 모두 들어있고 (그림 3) GeneGlobe 웹 포털 ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe))에서 별도 주문할 수도 있습니다.

**그림 12. 발현 농도가 일정한 표적 RNA.** Human의 여러 조직에서 정제한 total RNA (200 ng)을 miScript II RT Kit + **A** miScript HiSpec Buffer 또는 **B** miScript HiFlex Buffer (키트에 포함)를 사용하여 cDNA로 변환하였다. 1 ng cDNA와 miScript PCR Controls 각각으로 miScript PCR System에서 Real-time PCR을 실시 하였다. Ct 값을 보면 조직 별 RNA의 발현 농도가 거의 유사한 것을 볼 수 있다. Mouse, rat, dog, 히말라야 원숭이 조직에서도 비슷한 결과가 나왔다 (데이터 표시 안됨).

## 기능 연구에 중요한 pinpoint miRNA

miRNA 기능 연구는, miRNA의 표적과 역할을 파악하고 개별 miRNA 조절 실패가 생물학적으로 어떤 영향을 주는지 분석하는 동시에 특정 유전자가 특정 miRNA의 표적인지 확인해 볼 수 있습니다. miScript miRNA Mimics, miScript miRNA Inhibitors, miScript Target Protectors로 이런 기능 연구를 수행 할 있습니다 (그림 13). 실험규모나 형식이 다양해도 거기에 맞게 튜브, 96-well plates, 384-well plates 등을 주문할 수 있습니다.

### miRNA 기능을 밝혀내기 위한 전략:

- miScript miRNA Mimics으로 endogenous miRNA 조절 자극
- miScript miRNA Inhibitors로 endogenous miRNA 억제
- miRNA Target Protectors로 단일 miRNA target 억제

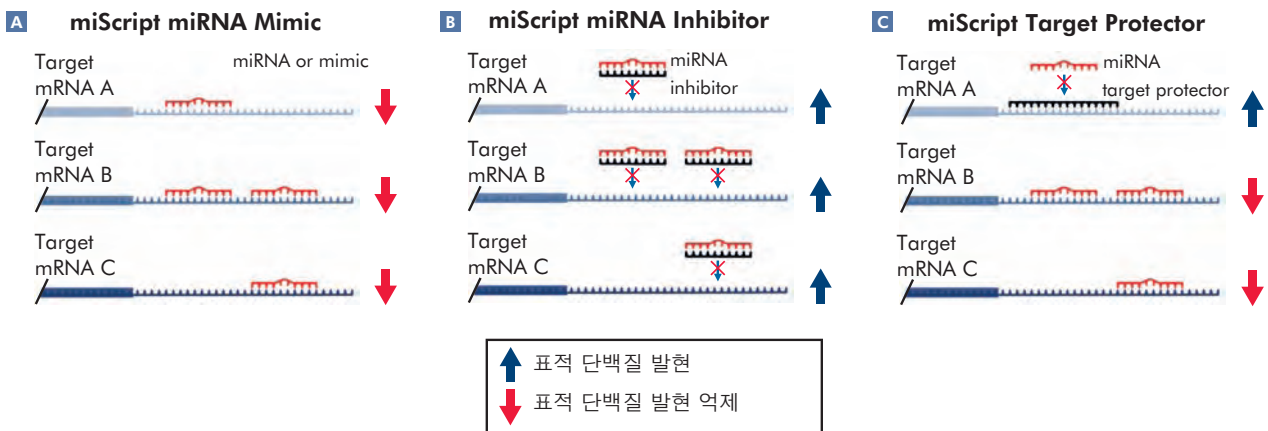


그림 13. miScript miRNA Mimics, miScript miRNA Inhibitors, miScript Target Protectors의 작용 메커니즘. **A** miRNA 또는 miScript miRNA Mimics이 표적 mRNA에 결합하여 전 표적의 발현을 저하. **B** miScript miRNA Inhibitors가 대상 miRNA에 결합하여 miRNA의 전체 유전자 표적이 발현. **C** miScript Target Protectors는 특정 miRNA 결합 부위에만 특이적으로 결합하여 그 miRNA 표적만 발현되고 다른 연관 표적은 발현을 저하한다.

## miScript miRNA Mimics으로 endogenous miRNA 기능 복제

miScript miRNA Mimics은 합성 이중나선 RNA로 세포에 주입한 후에는 자연 발생 miRNA와 같은 행동을 합니다 (그림 13). miScript miRNA Mimics은 endogenous miRNA와 마찬가지로 유전자 발현을 저해합니다 (그림 14). 세포 내 주입 후 최고 72시간까지 유전자 발현을 효과적으로 저해합니다 (데이터 표시 안됨).

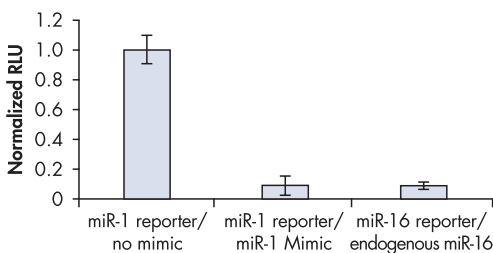
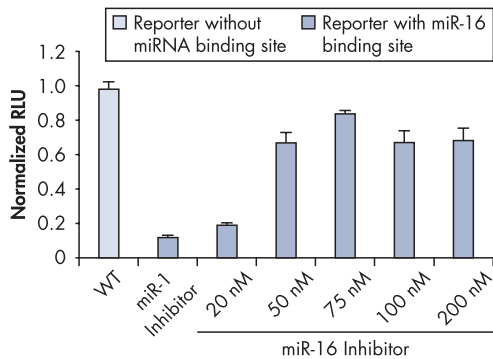
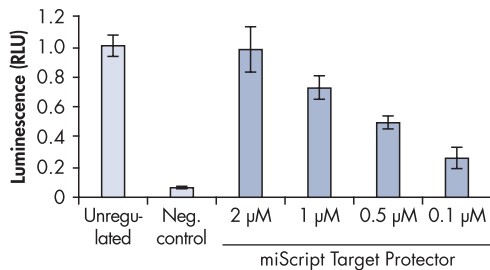


그림 14. Endogenous miRNA와 miScript miRNA Mimic 저해 수준 비교. miR-1은 HeLa S3 세포 내부에서는 발현되지 않는다. miR-16은 HeLa S3 세포 내부에서 높은 농도로 발현된다. HeLa S3 세포 ( $6 \times 10^4$  cells/well)에 HiPerFect Transfection Reagent를 이용하여 3' UTR에 miR-1 결합 부위가 있는 luciferase reporter construct와 3' UTR에 miR-1 결합 부위가 있는 luciferase reporter construct + miR-1 Mimic을 transfection하였다. 또한 3' UTR에 miR-16 결합 부위가 있는 luciferase reporter construct transfection하였다. 24시간 후에 luciferase 활성을 측정하였다. luciferase 농도로 보아 miR-1 Mimic은 endogenous miR-16과 비슷한 수준으로 감소한 것을 알 수 있었다.



**그림 15. miRNA - 유도성 silencing을 방해하는 miScript miRNA Inhibitor.** HeLa S3 세포는 miR-16를 고농도로 발현하고 miR-1은 발현하지 않는다. HiPerFect Transfection Reagent를 사용한 cotransfection 실험에서 HeLa S3 세포 ( $6 \times 10^4$  cells/well)에 3' UTR에 miR-16 결합 부위가 있는 luciferase reporter construct와 miR-16 Inhibitor를 함께 주입하였다. miR-16 Inhibitor는 여러 농도로 실험해 보아 저해 효과를 관찰하기 위한 최적 저해 농도를 조사하였다. 또 miR-1 Inhibitor만을 세포에 주입하여 대조군으로 사용하였다. 양성 대조군으로 miRNA 결합 부위(WT)가 없는 luciferase construct를 주입하였다. miR-16 Inhibitor를 주입한 후에 luciferase 발현이 증가한 것으로 endogenous miR-16가 reporter 유전자 발현 저해를 막는 것을 볼 수 있다.



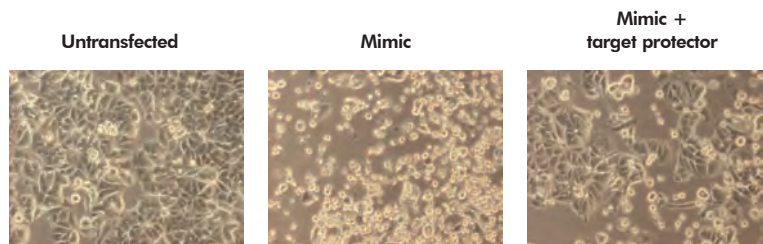
**그림 16. 신뢰할 수 있는 miRNA 저해 작용.** miR-16은 MCF-7 세포 내에서 발현된다. 동일한 결합 부위에 대한 miScript Target Protector의 양을 달리하여 miR-16 결합 부위가 있는 luciferase reporter construct와 함께 주입하였다. 주입량에 관계없이 miRNA 발현이 저해되면 luciferase 발현이 현저히 증가하는 것을 볼 수 있었다. **음성 대조군:** Luciferase construct를 Negative Control miScript Target Protector와 함께 주입. **비조절:** miR-16 결합 부위가 없는 Luciferase construct. Cotransfection은 Atractene Transfection Reagent를 사용하였다.

## miScript miRNA Inhibitors로 endogenous miRNA 억제

miScript miRNA Inhibitors는 단일-가닥의 화학적으로 변형한 합성 RNA로 세포에 주입된 후에 miRNA 기능을 특이적으로 저해합니다 (11쪽 그림 13). miScript miRNA Inhibitors는 endogenous miRNA 기능을 효과적으로 저해하도록 설계하였으며 (그림 15), 시간대 실험을 수행해 보면 miScript miRNA Inhibitors는 주입 후 최소한 96시간 동안 효과가 있는 것으로 나타났습니다 (데이터 표시 안됨).

## miScript Target Protector의 miRNA 표적 선택적 보호

miScript Target Protectors는 단일-가닥 변형 RNA로 miRNA와 단일 표적의 상호작용을 선택적으로 간섭하지만 같은 miRNA의 다른 표적 조절 부분은 그대로 남겨둡니다 (11쪽 그림 13). 주입 후에 miScript Target Protector는 특정 miRNA-결합 부위에 결합하여 miRNA 접근을 막고 특정 miRNA의 유전자 발현 저해 작용을 막는 역할을 합니다 (그림 16과 17). miScript Target Protector를 주입하면 표현형이나 유전자 발현에 변화가 옵니다. 표적-유전자 발현 증가나 신호 전달 패턴 변화나 표현형 변화로 miRNA와 표적의 pathway나 형질과 연관성을 알아볼 수 있습니다.



**그림 17. miScript Target Protector 주입 후의 표현형 변화.** miR-9는 세포 활성화에 중요한 유전자의 발현을 저해한다. MCF-7 세포에 10 nM miR-9 miScript miRNA Mimic 또는 10 nM miR-9 miScript miRNA Mimic + 세포 활성화에 중요한 miR-9와 결합하는 1 pM miScript Target Protector를 주입하였다. 72 시간 후에 광학현미경으로 세포 활성을 조사하였다. 주입에는 HiPerFect Transfection 시약을 사용하였다. miR-9 miScript miRNA Mimic을 주입한 경우는 세포가 상당량 사멸하였지만 miR-9 miScript miRNA Mimic + miR-9 결합 miScript Target Protector를 공동 주입한 경우에는 유전자 발현이 세포 사멸을 극복하였다. miScript Target Protector가 miR-9 발현 저해를 억제하여 세포 활성 유전자가 발현되었다.

## 고순도 miRNA 정제

RNA 순도가 떨어지면 효소 반응을 저해하고 소량의 RNA를 제대로 정제하지 못하면 부정확한 결과가 나올 수 있으므로 miRNA 정량 실험에서 제대로 된 결과를 얻으려면 miRNA가 포함된 고순도 total RNA 정제는 매우 중요한 과정입니다. miRNA 정제용 miRNeasy와 PAXgene miRNA Kit를 사용하면 실험에 사용할 수 있는 초고순도 RNA를 얻을 수 있습니다 (표 4). 페놀을 사용하는 추출법이나 침전법 등 다른 miRNA 정제법에 비해 탁월한 miRNA 회수율을 보장합니다 (그림 18, 19). 필요 시 QIAcube®나 QIAAsymphony® 기기를 사용하면 자동으로 miRNA를 정제할 수도 있습니다 (자세한 정보는 웹사이트를 참고하십시오 [www.qiagen.com/automation](http://www.qiagen.com/automation)).

### miRNA 정제용 miRNeasy와 PAXgene Kit의 특징:

- 고순도 RNA 획득
- 모든 종류의 downstream 실험에 적합한 RNA
- 다양한 샘플로부터 정제

표 4. miRNA 정제 키트

| 키트                            | 샘플 유형  |
|-------------------------------|--|
| miRNeasy Mini Kit             | 동물/Human 조직과 세포                              |
| miRNeasy 96 Kit               | 동물/Human 조직과 세포                              |
| miRNeasy Micro Kit            | 소량의 동물/Human 조직과 세포                          |
| miRNeasy Serum/<br>Plasma Kit | 혈청, 혈장, 그 외 체액                               |
| miRNeasy FFPE Kit             | 포르말린 고정 파라핀 (FFPE) 조직 샘플                     |
| PAXgene Blood<br>miRNA Kit*   | Human의 전혈 (PAXgene Blood RNA 튜브에서 안정화 과정 포함) |
| PAXgene Tissue<br>miRNA Kit   | 동물/Human 조직 (PAXgene Tissue 용기에서 고정 및 안정화)   |

\* QIAAsymphony에서 human의 전혈을 자동 정제 할 때에는 QIAAsymphony PAXgene Blood RNA 키트를 사용하십시오.

### RNA 또는 miRNA 농축물 정제

miRNeasy와 PAXgene miRNA Kit로 최소 길이 18 핵산 (nt) 정도의 RNA가 포함된 total RNA를 정제할 수 있습니다. miRNeasy Kit를 사용하면 심하게 분해된 RNA 샘플과 (예, FFPE 샘플) 거대 RNA가 소량 들어있는 샘플(혈청/혈장 샘플)을 제외한 모든 종류 샘플에서 miRNA-농축 fraction (<~200 nt) 과 total RNA fraction (>~200 nt)을 따로 정제할 수 있습니다. miRNeasy와 PAXgene miRNA Kit로 정제한 RNA는 northern blot 분석, microarray 분석, 정량 real-time RT-PCR과 같은 이후 분석에 사용하기에 적합한 순도입니다. Small RNA의 농축 과정은 일부 실험에서 background를 낮출 수 있지만 (예: microarray systems) miScript miRNA PCR Arrays와 miScript Primer Assays 분석에서 필수 조건은 아닙니다.

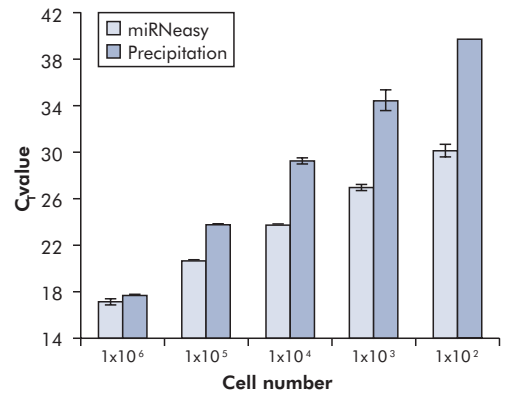


그림 18. 페놀 추출법을 증가하는 miRNeasy Kit. miRNeasy Mini Kit와 페놀 추출-침강법으로 Jurkat 세포량을 달리하여 miRNA가 들어있는 total RNA를 정제하였다. 정제한 RNA는 정량을 위한 miRNA miR-16을 real-time RT-PCR 분석의 주형으로 사용하였다. 실험 결과에서 miRNeasy Kit로 정제한 후 Ct 값이 내려가는 것을 보아 페놀추출-침강법보다 miRNA 양이 더 많다는 것을 알 수 있다. 1 x 10<sup>2</sup> cells using the miRNeasy Kit를 사용하면 1 x 10<sup>2</sup> 정도의 세포로도 miRNA를 정제할 수 있다. 이와는 달리 1 x 10<sup>2</sup> 세포를 페놀추출-침강법으로 정제하고 40 PCR cycle을 돌렸을 때에는 miRNA는 검출되지 않았다.

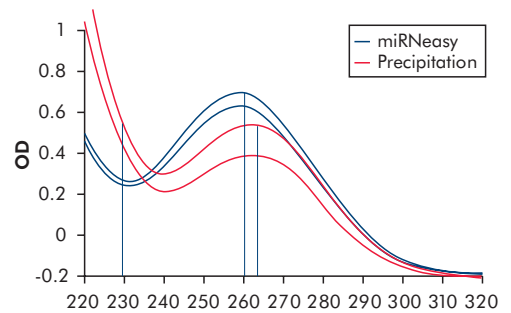
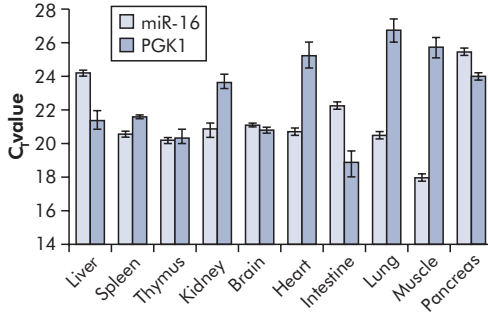
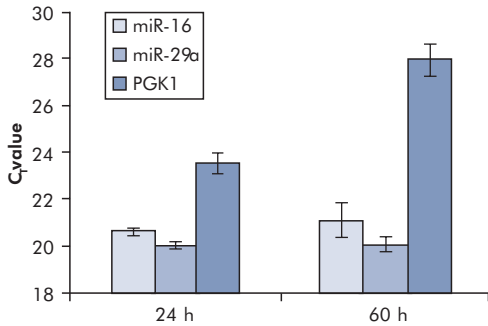


그림 19. 페놀이 없는 고순도 RNA. miRNeasy Mini Kit와 페놀 추출-침강법으로 1 x 10<sup>6</sup> Jurkat 세포에서 miRNA가 들어 있는 total RNA를 정제하였다. 분광스펙트럼 결과를 보면 miRNeasy Kit의 RNA 정제 OD 최대값은 260 nm였다. 반대로 침강법으로 정제했을 때 OD 최대값은 230 nm보다 더 큰 것으로 페놀이 남아있는 것을 알 수 있었다. 또한 OD230에서, 페놀 법으로 정제한 RNA가 더 높은 수치를 보여 다량의 salt가 남아있는 것을 알 수 있다.



**그림 20. 다양한 조직의 정제결과.** miRNeasy 96 Kit를 이용하여 RNAlater<sup>®</sup>로 안정화된 rat 조직 25 mg에서 miRNA가 들어있는 total RNA를 정제하였다. 정제한 RNA는 miRNA miR-16와 PGK1 유전자의 mRNA real-time RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 같은 정제 샘플에서 PGK1 mRNA와 miR-16를 검출할 수 있었다.



**그림 21. Real-time RT-PCR를 이용하여 FFPE 조직에서 효과적으로 miRNA 정량.** Rat의 간 조직을 24시간, 60시간 동안 포르말린으로 고정된 후 miRNeasy FFPE Kit로 miRNA가 포함된 total RNA를 정제하였다. 정제한 RNA를 miScript PCR System을 사용하여 real-time RT-PCR 수행 결과, PGK1 유전자의 miRNA miR-16와 miR-29a를 검출하였다. 너무 오래 고정하면 오히려 RNA의 순도에 악영향을 주며 특히 길이가 긴 PCR 증폭에 영향을 준다. 실험 결과를 보면 동일한 용출액에서 miRNA는 물론 mRNA까지 검출해 내는 것을 알 수 있다.

## 세포와 조직에서의 효과적인 RNA 정제

miRNeasy Mini/Micro/96 Kit는 시작 샘플이 소량인 경우에도 조직과 세포에서 RNA를 효과적으로 정제할 수 있으며 용해가 어려운 조직을 포함해 다양한 조직과 세포에서 RNA를 분리할 수 있습니다. miRNA가 포함된 total RNA에서 miRNA 발현 농도를 표적 mRNA, housekeeping reference gene, 그리고 다른 대상 mRNA의 발현 농도와 비교해 볼 수 있습니다 (그림 20).

## 혈청이나 혈장에서 혈중 miRNA 정제

혈중 miRNA는 여러 암이나 당뇨와 같은 질환의 바이오마커 역할을 할 수 있습니다. 혈청이나 혈장에서 정제한 RNA를 이용하면 암종 별로 고유한 miRNA 발현 양상을 볼 수 있습니다. miRNeasy Serum/Plasma Kit가 있으면 소량의 혈청이나 혈청에서 total RNA가 가능합니다. 혈청이나 혈장 샘플과 함께 사용하도록 miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control에는 normalization용 합성 spike-in control이 함께 들어있습니다. miScript PCR System과 함께 정제한 RNA를 바이오마커 연구에 사용합니다.

## FFPE 절편에서 고순도 RNA 정제

Crosslinking과 fragmentation은 FFPE 절편에서 핵산 정제를 어렵게 만드는 부분입니다. miRNeasy FFPE Kit는 RNA와 포르말린의 교차결합 역반응을 일으켜 RNA를 효과적으로 정제하는 동시에 정제 후 RNA의 분해를 막아주는 특수 lysis-incubation 환경을 조성합니다. RT-PCR 등의 다음 단계 실험 결과에 악영향을 주는 미량의 작은 DNA 단편을 제거하기 위해 RNA를 DNase와 DNase Booster Buffer로 처리하여 DNase 반응 조건을 최적화 합니다. 그런 후 miRNeasy FFPE Kit를 사용하여 준비한 total RNA로 miScript PCR System을 이용하여 발현데이터를 얻습니다 (그림 21과 7쪽 그림 6).

주문 정보

| Product                                 | Contents   | Cat. no. |
|---|--|----------|
| miRNeasy Mini Kit (50)                  | Columns, plasticware, and reagents for 50 preps  | 217004   |
| miRNeasy Micro Kit (50)                 | Columns, plasticware, and reagents for 50 preps  | 217084   |
| miRNeasy Serum/Plasma Kit (50)          | Columns, plasticware, and reagents for 50 preps  | 217184   |
| miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control  | 10 pmol <i>C. elegans</i> miR-39 miRNA mimic spike-in control for serum/plasma samples | 219610   |
| miRNeasy 96 Kit (4)                     | Columns, plasticware, and reagents for 4 x 96 preps                                    | 217061   |
| miRNeasy FFPE Kit (50)                  | Columns, plasticware, and reagents for 50 preps  | 217504   |
| PAXgene Blood miRNA Kit (50)            | Columns, plasticware, and reagents for 50 preps  | 763134   |
| QIAasymphony PAXgene Blood RNA Kit (96) | Reagent cartridges, accessories, and buffers for 96 preps                              | 762635   |
| miScript II RT Kit (12)                 | Reagents for 12 x 20 µl cDNA synthesis reactions                                       | 218160   |
| miScript II RT Kit (50)                 | Reagents for 50 x 20 µl cDNA synthesis reactions                                       | 218161   |
| miScript SYBR Green PCR Kit (200)       | Reagents for 200 x 50 µl PCRs  | 218073   |
| miScript SYBR Green PCR Kit (1000)      | Reagents for 1000 x 50 µl PCRs   | 218075   |
| miScript PCR Starter Kit (80)           | Reagents for 12 x 20 µl cDNA synthesis reactions and 80 x 25 µl PCRs                   | 218193   |
| miScript Primer Assay (100)             | miRNA-specific primer for 100 x 50 µl PCRs   | Varies*  |
| miScript Precursor Assay (100)          | Precursor-specific primer pair for 100 x 50 µl PCRs                                    | Varies*  |
| miRNome miScript miRNA PCR Array        | miRNome panels of miRNA assays   | 331222   |
| miScript miRNA PCR Array                | Pathway or disease panels of miRNA assays  | 331221   |
| Custom miScript miRNA PCR Array         | Custom panels of miRNA assays  | 331231   |
| miScript miRNA Mimic                    | 1 nmol, 5 nmol, or 20 nmol mimic   | Varies*  |
| miScript miRNA Inhibitor                | 1 nmol, 5 nmol, or 20 nmol inhibitor (option of phosphorothioate modification)         | Varies*  |
| miScript Target Protector               | 5 nmol target protector  | Varies*  |

\*상기 제품을 주문하거나 찾으려면 GeneGlobe를 방문해 주십시오 ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe)).

최신 라이선스 정보와 제품별 법적 책임에 대한 정보는 QIAGEN kit 개별 핸드북이나 사용자 설명서를 참고해 주십시오. QIAGEN kit 핸드북과 사용자 설명서는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)에서 구하거나 QIAGEN Technical Services 또는 지역 대리점에 문의하여 구할 수 있습니다.

**[www.qiagen.com/miRNA](http://www.qiagen.com/miRNA)에서 혁신적인 샘플과 분석 기술을 만나십시오!**

Trademarks: QIAGEN®, QIAcube®, QIAasymphony®, GeneGlobe®, miScript®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, Rotor-Disc® (QIAGEN Group); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Roche®, LightCycler® (Roche Group); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Agilent®, Stratagene®, Mx3005P®, Mx3000P®, Mx4000® (Agilent Technologies); Bio-Rad®, iCycler®, Chromo4™, CFX96™, DNA Engine Opticon®, CFX384™, iQ™, MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); ABI™, Applied Biosystems®, StepOnePlus™, ViiA™, SYBR® (Life Technologies Corporation); Excel® (Microsoft, Inc.).

"RNAlater®"은 AMBION, Inc. (Austin, Texas)의 상표이며 미국과 그 외 여러 국가의 특허로 보호받고 있습니다.

본 문서에서 사용한 등록명과 상표 등은 특별히 명시하지 않았더라도 해당 법률의 보호를 받습니다.

**퀴아젠코리아 유한회사** ■ 서울시 금천구 가산동 우림라이온스밸리 C동 1012호 153-786

주문문의 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ [orders-KR@qiagen.com](mailto:orders-KR@qiagen.com)

학술문의 080-000-7145 ■ [techservice-KR@qiagen.com](mailto:techservice-KR@qiagen.com) ■ [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

#### Life Science 대리점

■ 서울(동부) 다원바이오 1588-9741

■ 경기 씨엔지 031-294-7380

■ 대전/충청/메가바이오 042-824-2088

■ 광주/전남 제노필 062-383-5816

■ 부산/경남 팔이합성 051-505-4604

■ 제주 금성하이텍 064-721-7749

■ 서울(서부) 바이오세상 031-707-2300

■ 강원 프라임텍 033-244-6969

■ 대구/경북 벵텍사이언스 053-383-2989

■ 전북 바이오서브 063-251-1256

■ 진주/경남 선일과학 055-745-8622

