

製品コード 3790/3791/3792

研究用

Takara

Human Housekeeping Gene Primer Set

(製品コード 3790)

Mouse Housekeeping Gene Primer Set

(製品コード 3791)

Rat Housekeeping Gene Primer Set

(製品コード 3792)

説明書

通常、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析は相対定量により行われ、多くの場合、ハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして mRNA 量の補正を行います。従って、正確な定量結果を得るためには、実験系ごとに発現量が安定したハウスキーピング遺伝子を選定することが重要です。

本製品は、インターカレーター法によるリアルタイム RT-PCR 解析実験で、リファレンス候補となるハウスキーピング遺伝子の検出に用いるプライマーのセットであり、それぞれの実験系に適したリファレンスを選定するために使用します。

なお、リファレンスとして選定したハウスキーピング遺伝子を実際の遺伝子発現解析に使用するには、本製品と同じプライマーを「Perfect Real Time サポートシステム*」で個別にご購入いただけます。

* : Perfect Real Time サポートシステム (<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/>)
インターカレーター法によるリアルタイム RT-PCR 用プライマーをオンラインで簡単に検索・注文できるシステムです。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対して、網羅的に対応しています。

I. 内容

Human Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3790)

以下の 15 種類のプライマー対 (各 10 μ M) が含まれます。(容量 : 各 100 μ l)

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1. Human_ATP5F1_primer | 9. Human_B2M_primer |
| 2. Human_TFRC_primer | 10. Human_RPS18_primer |
| 3. Human_YWHAZ_primer | 11. Human_TBP_primer |
| 4. Human_RPLP0_primer | 12. Human_PGK1_primer |
| 5. Human_RPLP1_primer | 13. Human_PPIA_primer |
| 6. Human_ACTB_primer | 14. Human_GAPDH_primer |
| 7. Human_RPLP2_primer | 15. Human_GUSB_primer |
| 8. Human_HPRT1_primer | |

Mouse Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3791)

以下の 13 種類のプライマー対 (各 10 μ M) が含まれます。(容量 : 各 100 μ l)

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 1. Mouse_Atp5f1_prime | 8. Mouse_Gusb_primer |
| 2. Mouse_B2m_primer | 9. Mouse_Tbp_primer |
| 3. Mouse_Hprt1_primer | 10. Mouse_Actb_primer |
| 4. Mouse_Rplp1_primer | 11. Mouse_Tfrc_primer |
| 5. Mouse_Ppia_primer | 12. Mouse_Ywhaz_primer |
| 6. Mouse_Rps18_primer | 13. Mouse_Gapdh_primer |
| 7. Mouse_Pgk1_primer | |

Rat Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3792)

以下の 12 種類のプライマー対 (各 10 μ M) が含まれます。(容量 : 各 100 μ l)

- | | |
|---------------------|----------------------|
| 1. Rat_B2m_primer | 7. Rat_Actb_primer |
| 2. Rat_Tbp_primer | 8. Rat_Atp5f1_primer |
| 3. Rat_Gusb_primer | 9. Rat_Rplp2_primer |
| 4. Rat_Ppia_primer | 10. Rat_Pgk1_primer |
| 5. Rat_Ywhaz_primer | 11. Rat_Hprt_primer |
| 6. Rat_Rps18_primer | 12. Rat_Gapdh_primer |

※ 各遺伝子の情報 (GenBank Accession、Entrez Gene、Symbol)、Perfect Real Time サポートシステムの Primer Set ID および PCR 増幅サイズは、「VI. 遺伝子情報リスト」にてご確認ください。

-
- II. 保存 – 20℃
※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

- リアルタイム RT-PCR 試薬
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
(製品コード RR096A/B) など
- 0.1 ml または 0.2 ml および 1.5 ml マイクロチューブ
- マイクロピペットおよびチップ
- サーマルサイクラー（逆転写反応に使用）
- リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980)
Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960：終売)
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760：終売) など

IV. 使用方法

本製品の使用方法は、実際に使用されるリアルタイム RT-PCR 試薬および装置（キット以外に必要な試薬、機器に記載）の取扱説明書に従って操作してください。

<反応例>

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A)、TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820A) を用いた 2 ステップリアルタイム RT-PCR の場合 (Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) を使用)

逆転写反応

- (1) 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。

[1 反応分]

試薬	使用量	最終濃度 (または添加量)
5 × PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μl	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
total RNA (250 ng/μl)	2 μl	500 ng
RNase Free dH ₂ O	4.5 μl	
Total	10 μl	

※ 反応液量は必要に応じてスケールアップ（またはスケールダウン）することも可能です。

- (2) 逆転写反応を行う。

37℃ 15 分（逆転写反応）
85℃ 5 秒（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

リアルタイム PCR 反応

- (3) 「逆転写反応」で調製した cDNA と TB Green *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820A) を混合してマスターミックスを調製する。

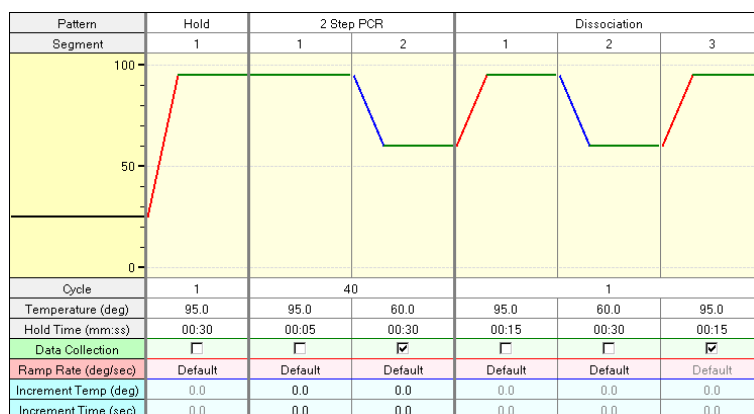
試薬	1 反応分	15 反応分*2
TB Green <i>Premix Ex Taq II</i> (2 ×)	12.5 μl	187.5 μl
cDNA 溶液 (50 ng/μl) *1	0.5 μl	7.5 μl
滅菌精製水	11 μl	165 μl
Total	24 μl	360 μl

* 1 : total RNA 相当量

* 2 : 使用するプライマーの数にあわせて、反応数を変更してください。

- (4) リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 24 μl ずつ分注する。
- (5) プライマーを分注する。
Housekeeping Gene Primer Set の各プライマーをリアルタイム PCR プレートの対応するウェルに 1 μl ずつ分注する。
- (6) 反応を開始する。
調製済みのリアルタイム PCR 反応プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、リアルタイム PCR を実施する。

初期変性
95°C 30 秒
2 Step PCR
95°C 5 秒
60°C 30 秒
(40 サイクル)
融解曲線分析



- (7) データ解析
リアルタイム PCR 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認する。その後、相対定量解析を行う。

V. 使用例

ラット脂肪細胞の遺伝子発現解析

ラット白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞の分化に伴う遺伝子発現変動の解析を行った。まず、Rat Housekeeping Gene Primer Set を用いてサンプル間で発現量が安定したハウスキーピング遺伝子の選定を行い、次に、それらをリファレンスとした相対定量により目的遺伝子の発現プロファイルを解析した。

1. リファレンスの選定

【方法】

4種類のラット脂肪細胞から調製した total RNA を鋳型として逆転写反応を行い、引き続き、リアルタイム PCR により 12 種類のハウスキーピング遺伝子の測定を行った。

<測定遺伝子>

ラットハウスキーピング遺伝子 12 種類 (Rat Housekeeping Gene Primer Set 使用)

<サンプル>

A001: 白色脂肪細胞 (分化前) A002: 褐色脂肪細胞 (分化前)
A003: 白色脂肪細胞 (分化後) A004: 褐色脂肪細胞 (分化後)

<逆転写反応>

試薬: PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)

鋳型: total RNA 各 2 μ g

反応液量: 40 μ l

<リアルタイム PCR 反応>

試薬: TB Green Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)

鋳型: cDNA 各 50 ng (total RNA 相当量)

反応液量: 25 μ l

<リアルタイム PCR 装置>

Thermal Cycler Dice Real Time System

※ 逆転写反応、PCR 反応の条件は取扱説明書の記載に従った。

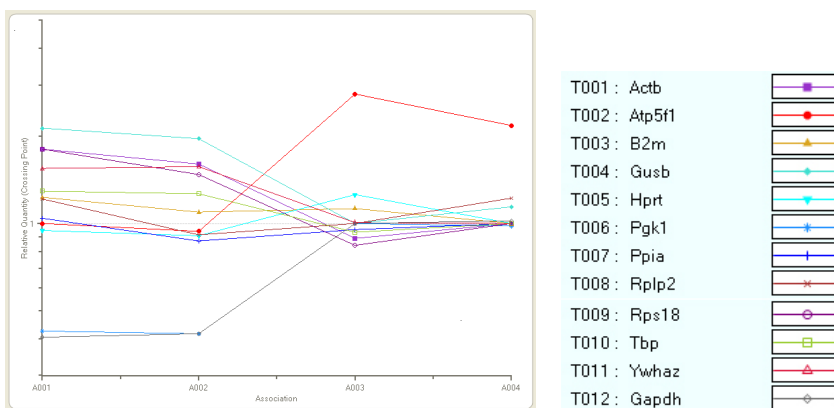
【結果】

リアルタイム PCR の結果から $\Delta\Delta$ Ct 法により相対定量値を算出し、その値を geNorm * で解析しハウスキーピング遺伝子のランキングを行った。その結果、発現量をもっとも安定している考えられた 3 種類の遺伝子 (Actb, Gusb, Rps18) をリファレンスとして選定した。

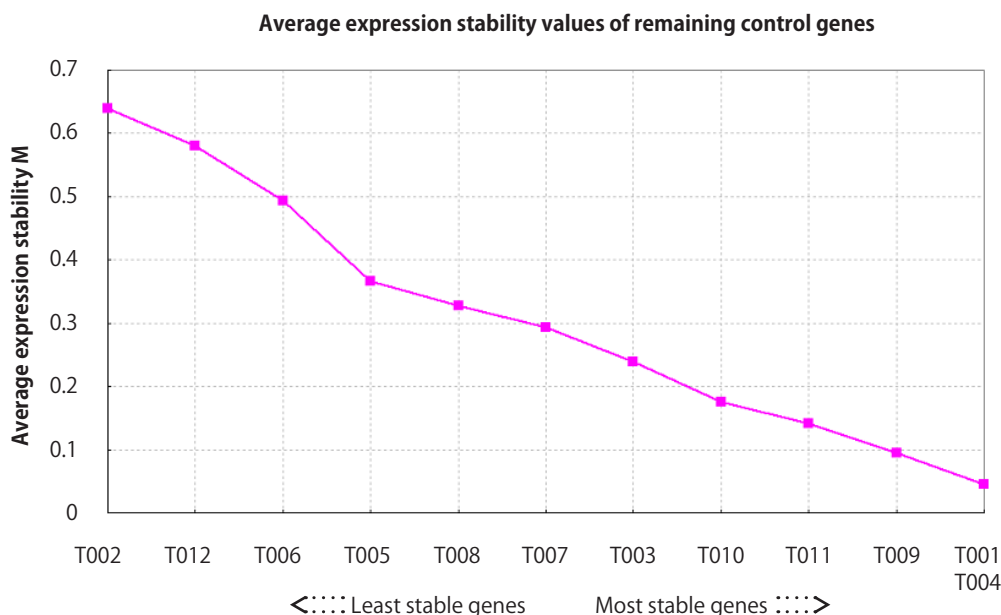
* : リアルタイム PCR 定量結果から発現量の安定したハウスキーピング遺伝子を選定するためのソフト。

(参照 URL : <https://genorm.cmgg.be/>)

< 12 種類のハウスキーピング遺伝子のプロファイル >



< geNorm によるランキング結果 >



2. 遺伝子発現解析

【方法】

4種類のラット脂肪細胞から調製したtotal RNAを鋳型として逆転写反応を行い、引き続き、リアルタイムPCRにより3種類のハウスキーピング遺伝子および5種類の定量目的遺伝子の測定を行った。

<測定遺伝子>

ラットハウスキーピング遺伝子：Actb、Gusb、Rps18

定量目的遺伝子：Ucp1、Ucp2、Ucp3、Lep、Adrb3

※ いずれも Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用。

<サンプル>

「1. リファレンスの選定」と同様

<逆転写反応>

「1. リファレンスの選定」と同様

<リアルタイム PCR 反応>

試薬：TB Green *Premix Ex Taq* II (Perfect Real Time)

スタンダード：NTC および褐色脂肪細胞 (分化後) の cDNA 6.4 pg ~ 100 ng (total RNA 相当量)

未知サンプル：cDNA 各 50 ng (total RNA 相当量)

反応液量：25 μ l

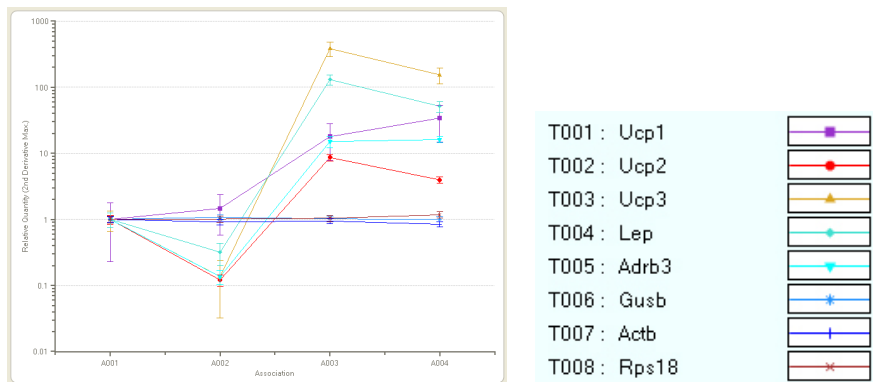
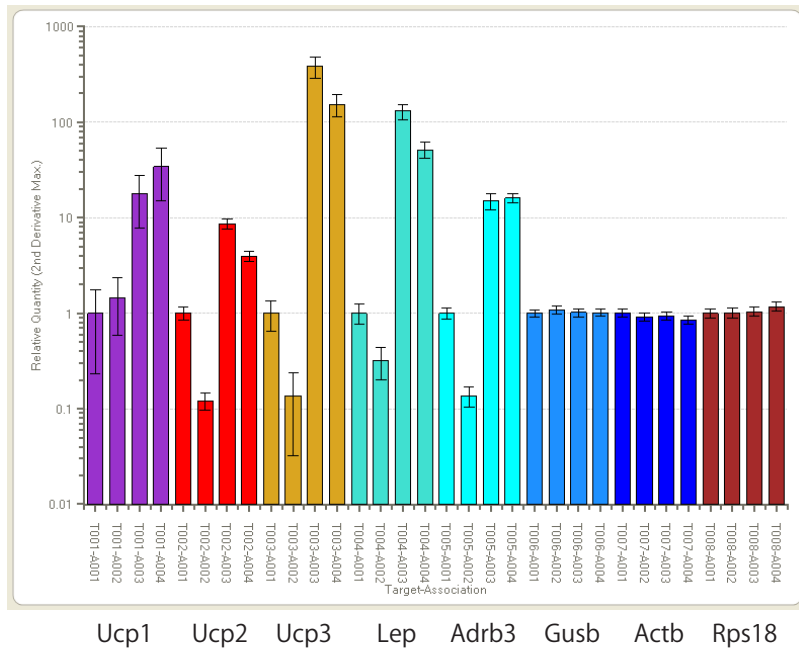
<リアルタイム PCR 装置>

Thermal Cycler Dice Real Time System

※ 逆転写反応、PCR 反応の条件は取扱説明書の記載に従った。

【結果】

リアルタイム PCR の結果から検量線法により相対定量解析を行った。白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞のいずれも分化後の細胞では、定量目的遺伝子の発現が上昇していることが確認された。



VI. 遺伝子情報リスト

Human Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3790)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	増幅サイズ
1. Human_ATP5F1_primer	HA035517	NM_001688	515	ATP5F1	142 bp
2. Human_TFRC_primer	HA037799	NM_003234	7037	TFRC	194 bp
3. Human_YWHAZ_primer	HA067800	NM_145690	7534	YWHAZ	194 bp
4. Human_RPLP0_primer	HA067801	NM_053275	6175	RPLP0	108 bp
5. Human_RPLP1_primer	HA067802	NM_213725	6176	RPLP1	166 bp
6. Human_ACTB_primer	HA067803	NM_001101	60	ACTB	186 bp
7. Human_RPLP2_primer	HA067804	NM_001004	6181	RPLP2	92 bp
8. Human_HPRT1_primer	HA067805	NM_000194	3251	HPRT1	131 bp
9. Human_B2M_primer	HA067806	NM_004048	567	B2M	194 bp
10. Human_RPS18_primer	HA067807	NM_022551	6222	RPS18	89 bp
11. Human_TBP_primer	HA067808	NM_003194	6908	TBP	170 bp
12. Human_PGK1_primer	HA067809	NM_000291	5230	PGK1	94 bp
13. Human_PPIA_primer	HA067810	NM_021130	5478	PPIA	200 bp
14. Human_GAPDH_primer	HA067812	NM_002046	2597	GAPDH	138 bp
15. Human_GUSB_primer	HA067813	NM_000181	2990	GUSB	75 bp

Mouse Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3791)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	増幅サイズ
1. Mouse_Atp5f1_primer	MA027956	NM_009725	11950	Atp5f1	109 bp
2. Mouse_B2m_primer	MA027969	NM_009735	12010	B2m	200 bp
3. Mouse_Hprt1_primer	MA031262	NM_013556	15452	Hprt1	189 bp
4. Mouse_Rplp1_primer	MA032574	NM_018853	56040	Rplp1	170 bp
5. Mouse_Ppia_primer	MA050363	NM_008907	268373	Ppia	146 bp
6. Mouse_Rps18_primer	MA050364	NM_011296	20084	Rps18	127 bp
7. Mouse_Pgk1_primer	MA050365	NM_008828	18655	Pgk1	105 bp
8. Mouse_Gusb_primer	MA050366	NM_010368	110006	Gusb	102 bp
9. Mouse_Tbp_primer	MA050367	NM_013684	21374	Tbp	161 bp
10. Mouse_Actb_primer	MA050368	NM_007393	11461	Actb	171 bp
11. Mouse_Tfrc_primer	MA050369	NM_011638	22042	Tfrc	154 bp
12. Mouse_Ywhaz_primer	MA050370	NM_011740	22631	Ywhaz	115 bp
13. Mouse_Gapdh_primer	MA050371	NM_001001303	407972	Gapdh	150 bp

Rat Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3792)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	増幅サイズ
1. Rat_B2m_primer	RA008157	NM_012512	24223	B2m	163 bp
2. Rat_Tbp_primer	RA015369	NM_001004198	117526	Tbp	186 bp
3. Rat_Gusb_primer	RA015370	NM_017015	24434	Gusb	144 bp
4. Rat_Ppia_primer	RA015371	NM_017101	25518	Ppia	135 bp
5. Rat_Ywhaz_primer	RA015373	NM_013011	25578	Ywhaz	187 bp
6. Rat_Rps18_primer	RA015374	NM_213557	294282	Rps18	140 bp
7. Rat_Actb_primer	RA015375	NM_031144	81822	Actb	150 bp
8. Rat_Atp5f1_primer	RA027140	NM_134365	171375	Atp5f1	87 bp
9. Rat_Rplp2_primer	RA015377	NM_001030021	140662	Rplp2	115 bp
10. Rat_Pgk1_primer	RA015378	NM_053291	24644	Pgk1	147 bp
11. Rat_Hprt_primer	RA015379	NM_012583	24465	Hprt	132 bp
12. Rat_Gapdh_primer	RA015380	NM_017008	24383	Gapdh	143 bp

VII. 参考文献

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F. *Genome Biol.* 2002 Jun 18; **3** (7) : RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

VIII. 関連製品

[リアルタイム RT-PCR 試薬]

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
TB Green® Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B)
TB Green® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (製品コード RR091A)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、*Premix Ex Taq*、DimerEraser はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社