

製品コード 3789

研究用

TAKARA

**External Standard Kit
(λ polyA) for qPCR**

説明書

v202204Da

遺伝子発現解析では、通常リファレンスにより核酸量を補正して目的遺伝子の発現量を比較します（相対定量法）。リファレンスにはハウスキーピング遺伝子を用いるのが一般的ですが、実験系によっては発現量が安定した遺伝子を選定することが困難な場合があります。その際には次善の策として、外部標準 RNA (External RNA) を系に添加しリファレンスとして用いることも可能です。

本製品は、外部標準を用いたリアルタイム RT-PCR 実験を行うための External RNA とその希釈溶液、および検出用プライマーのセットです。

External RNA は、 λ DNA を鋳型に *in vitro* transcription にて合成した polyA をもつ約 1.0 kb の RNA であり、真核生物を対象とする実験の外部標準として使用します。3' 末端に polyA 配列を含んでいるため、polyA 配列構造を 3' 末端にもつ RNA に External RNA を添加した場合、Oligo dT プライマーで逆転写反応を行うことも可能です。

I. 内容

Real Time Primer for λ polyA	10 μ M each	200 μ l
EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml
λ polyA ⁺ RNA-A	10 ng/ μ l	15 μ l

※ EASY Dilution (for Real Time PCR) は単品でも購入できます（製品コード 9160）。

キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

- ・ 逆転写試薬、リアルタイム PCR 試薬
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B) など
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) など
One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
(製品コード RR096A/B) など
- ・ 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
- ・ リアルタイム PCR 装置

II. 保存

Real Time Primer for λ polyA、EASY Dilution (for Real Time PCR) : - 20°C
 λ polyA⁺ RNA-A : - 80°C

III. 操作

1. λ polyA⁺ RNA-A の希釈

10 ng/ μ l の λ polyA⁺ RNA-A (約 1.8×10^{10} コピー/ μ l) を EASY Dilution (for Real Time PCR) でリアルタイム RT-PCR 実験に適した濃度に段階希釈し、凍結融解を繰り返さないように適量ずつ分注して -80°C で保存する。

2. リアルタイム RT-PCR 反応への添加

λ polyA⁺ RNA-A の使用量は、添加するステップにより異なるため、それに応じて段階希釈する。リアルタイム PCR 反応への λ polyA⁺ RNA-A の添加量は final $10^2 \sim 10^7$ コピー程度となるように調整する。

(例)

total RNA 抽出前に細胞溶液などに添加する場合

350 μ l の細胞溶液に λ polyA⁺ RNA-A を 1.8×10^8 コピー添加し、total RNA 抽出時に最終液量を 50 μ l とする。この場合、計算上 total RNA 中の λ polyA⁺ RNA-A の濃度は、 3.6×10^6 コピー/ μ l となる。

逆転写反応前に total RNA 溶液に添加する場合

total RNA 溶液に λ polyA⁺ RNA-A を 1.8×10^7 コピー添加し、全量を 10 μ l とする。その内、2 μ l を逆転写反応 (反応液量 20 μ l) の鋳型として用いる。この場合、計算上、逆転写反応液中の λ polyA⁺ RNA-A の濃度は、 1.8×10^5 コピー/ μ l となる。

IV. 使用例

λpolyA⁺ RNA-A をリファレンスとして用いた遺伝子発現解析 (相対定量)

【方法】

4種類のマウス組織由来の total RNA 各 500 ng に外部標準として λpolyA⁺ RNA-A を 1.8×10^8 コピー添加した。PrimeScript RTase による逆転写反応後、リアルタイム PCR により λpolyA⁺ RNA-A と解析目的遺伝子である Pah および Sord の定量を行った。なお、検量線作成用の標準サンプルには (a) 肝臓サンプルを使用した。

測定遺伝子：(A) λpolyA⁺ RNA-A、(B) Pah、(C) Sord

サンプル：マウス組織由来の total RNA

(a) 肝臓、(b) 脳、(c) 心臓、(d) 腎臓

未知サンプル；各 cDNA 1 ng

標準サンプル；肝臓由来 cDNA 5 pg ~ 50 ng (1:9 dilution, 6STD) および NTC

※ cDNA 量は total RNA 相当量で示した。

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)

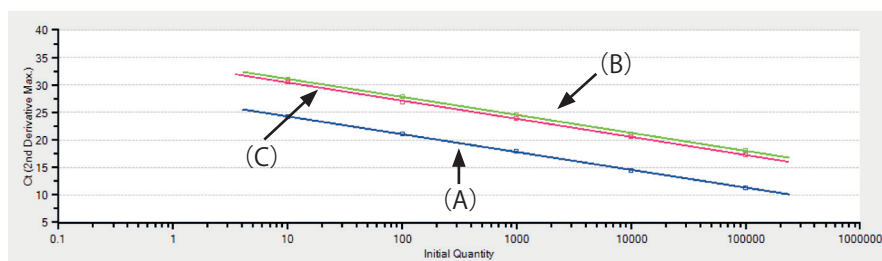
※ 逆転写反応、PCR 反応の条件は説明書の記載に従った。

装置：Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900：終売)

【結果】

標準サンプルを用いて作成した検量線は、目的遺伝子および外部標準のいずれにおいても良好な精度を示した。検量線から得られた各未知サンプルの測定値を、λpolyA⁺ RNA-A をリファレンスとして補正することで、Pah 遺伝子および Sord 遺伝子の相対定量解析結果が得られた。

各遺伝子に対する検量線

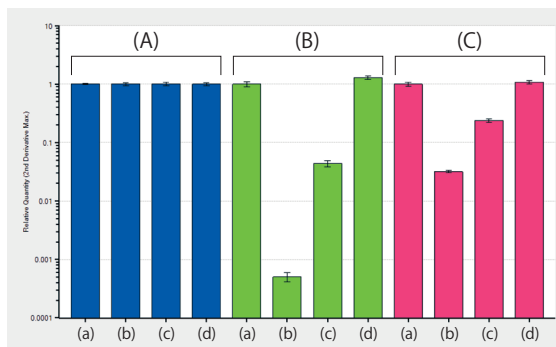


(A) λpolyA⁺ RNA-A (青)； R2：1.000 Eff：103.6% Y=-3.238 × LOG(X) + 27.52

(B) Pah (緑)； R2：1.000 Eff：102.2% Y=-3.271 × LOG(X) + 34.37

(C) Sord (ピンク)； R2：0.999 Eff：101.2% Y=-3.294 × LOG(X) + 33.73

相対定量結果



測定遺伝子：(A) λpolyA⁺ RNA-A、(B) Pah、(C) Sord

サンプル：マウス組織由来の total RNA (a) 肝臓、(b) 脳、(c) 心臓、(d) 腎臓

V. 参考文献

Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. Gilsbach R, Kouta M, Bonisch H, Bruss M. *Biotechniques*. (2006) **40**(2): 173-177.

VI. 関連製品

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)
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 RR820A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)

VII. 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* 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