

研究用

---

# TaKaRa

## PrimerArray<sup>®</sup> Analysis Tool

### Ver.2.2

---

説明書

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 は、PrimerArray（製品コード PH001～PH007、PH009～PH015、PN001～PN015）で得られたデータを解析するためのツールで、コントロールサンプルと1種類の未知サンプル間の比較が可能です。リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで算出された Ct 値を用いて  $\Delta\Delta Ct$  法による相対定量解析を行い、結果をグラフで表示します。

※ PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 は、Microsoft Office Excel で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム (OS) および Microsoft Office Excel で正常に動作することを確認しています。

Windows XP operating system  
Microsoft Office Excel 2003  
Microsoft Office Excel 2007

※ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。  
[https://www.takara-bio.co.jp/research/r/primerarray\\_tool1/](https://www.takara-bio.co.jp/research/r/primerarray_tool1/)

## I. Ct 値の算出と出力

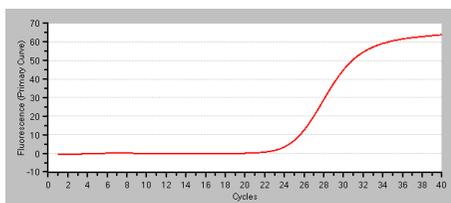
リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し、Ct 値を算出します。（操作方法の詳細は、各リアルタイム PCR 解析ソフトウェアの取扱説明書をご参照ください。）

### (1) 解析パラメーターの設定

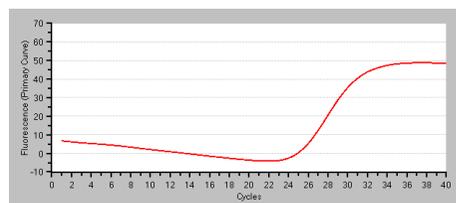
ほとんどのリアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは解析パラメーターが自動で設定されますが、まず、その設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定し直してください。

#### ベースライン領域

増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。



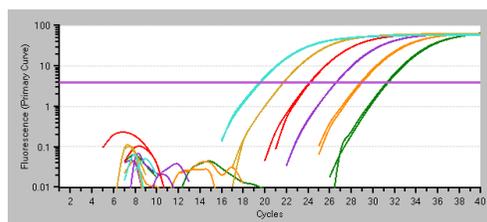
正しくベースラインが設定された例



ベースライン領域が広すぎる例

#### Threshold (閾値)

PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数 (Log scale) で表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。



正しく Threshold (閾値) が設定された例

---

(2) Ct 値の算出

Ct 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

(3) データの出力

Ct 値を Microsoft Office Excel または CSV などの形式で出力します（出力形式はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアによって異なります）。

※ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外 (Omit) したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

## II. 相対定量解析

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 を用いて  $\Delta \Delta Ct$  法による相対定量解析を行います。

### (1) PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 の起動

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 のファイル (PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2.xls) を開きます。

### (2) Plate の選択

実験に用いた PrimerArray の種類を選択し、Plate Select ボタンをクリックします。

Human	Product Code	Product Name
PH001	PrimerArray® Cytokine-cytokine receptor interaction(Human)	
PH002	PrimerArray® Cell cycle(Human)	
PH003	PrimerArray® Cell adhesion molecules(Human)	
PH004	PrimerArray® Jak-STAT signaling pathway(Human)	
PH005	PrimerArray® Natural killer cell mediated cytotoxicity(Human)	
PH006	PrimerArray® Axon guidance(Human)	
PH007	PrimerArray® Focal adhesion(Human)	
PH008	PrimerArray® T cell receptor signaling pathway(Human)	
PH009	PrimerArray® TGF-beta signaling pathway(Human)	
PH010	PrimerArray® Wnt signaling pathway(Human)	
PH011	PrimerArray® Colorectal Cancer & Pancreatic Cancer (Human)	
PH012	PrimerArray® Prostate Cancer & Melanoma (Human)	
PH013	PrimerArray® Small Cell Lung Cancer & Non-small Cell Lung Cancer (Human)	
PH014	PrimerArray® Asthma & Rheumatoid arthritis (Human)	
PH015	PrimerArray® Diabetes mellitus, TypeI & TypeII (Human)	
Mouse	Product Code	Product Name
PN001	PrimerArray® Cytokine-cytokine receptor interaction(Mouse)	
PN002	PrimerArray® Cell cycle(Mouse)	
PN003	PrimerArray® Cell adhesion molecules(Mouse)	
PN004	PrimerArray® Jak-STAT signaling pathway(Mouse)	
PN005	PrimerArray® Natural killer cell mediated cytotoxicity(Mouse)	
PN006	PrimerArray® Axon guidance(Mouse)	
PN007	PrimerArray® Focal adhesion(Mouse)	
PN008	PrimerArray® T cell receptor signaling pathway(Mouse)	
PN009	PrimerArray® TGF-beta signaling pathway(Mouse)	
PN010	PrimerArray® Wnt signaling pathway(Mouse)	
PN011	PrimerArray® Colorectal Cancer & Pancreatic Cancer (Mouse)	
PN012	PrimerArray® Prostate Cancer & Melanoma (Mouse)	
PN013	PrimerArray® Small Cell Lung Cancer & Non-small Cell Lung Cancer (Mouse)	
PN014	PrimerArray® Asthma & Rheumatoid arthritis ( Mouse)	
PN015	PrimerArray® Diabetes mellitus, TypeI & TypeII ( Mouse)	

Plate Select

### (3) Control Sample データの入力

Plate Select ボタンをクリックすると、Control Sample のデータを入力するシート (ControlSampleData) に変わります。exp1 (C 列)、exp2 (D 列)、exp3 (E 列)・・・の順に Ct 値を入力します (リアルタイム PCR 解析ソフトウェアから出力した Ct 値をコピー & ペーストすると簡単に入力できます)。反復実験の結果は、最大 10 個まで入力することができます。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Symbol	Well	Control Samp								
2			exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9
3	AKT3	A01	26.16	26.45	26.57						
4	CDK4	A02	26.5	26.56	26.55						
5	CDK6	A03	28.39	28.43	28.49						
6	TNFRSF10B	A04	20.51	20.58	20.56						
7	APC2	A05	31.11	30.95	31.04						
8	RALBP1	A06	22.56	22.41	22.52						
9	CHUK	A07	34.61	34.28	34.81						
10	CTNNB1	A08	33.89	33.92	34.36						
11	DCC	A09	22.36	22.35	22.59						
12	E2F1	A10	33.48	33.95	33.83						
13	E2F2	A11	23.63	23.62	23.72						
14	GUSB	A12	23.87	23.76	24.04						
15	E2F3	B01	31.59	31.54	31.3						
16	EGF	B02	24.69	25.09	25.39						
17	EGFR	B03	30.78	31.45	31.1						
18	ERBB2	B04	26.11	26.18	26.18						
19	AKT1	B05	28.44	28.48	28.66						
20	AKT2	B06	25.84	25.89	25.98						
21	FIGF	B07	28.11	28.11	28.15						

---

(4) Test Sample データの入力

次に、Test Sample 入力用のシート (TestSampleData) を選択します。Control Sample と同じ要領で Ct 値を入力します。入力が完了したら set sample data ボタンをクリックします。

データのクリア

データ入力をやり直す場合には clear ボタンをクリックします。すると、入力したすべてのデータが消去されます。

Ct 値の cutoff 値の設定

Ct 値の cutoff 値を設定すると、一定以上の Ct 値のデータを解析から除外することができます。デフォルトでは 35 サイクルに設定されており、Ct 値が 35 以上のデータは解析から除外されます。cutoff 値を変更する場合には、この Ct cutoff value の値を変更します。

### (5) Normalization Factor の算出

set sample data ボタンをクリックすると、Normalization Factor 算出のシート (normalization\_factors) に変わります。補正に用いるハウスキーピング遺伝子 (HKG) \*1 をチェックボックスで選択し、NF value ボタンをクリックします。すると、Normalization Factor が算出され、自動的に相対定量解析が行われます。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		HKG	Control Sample		Test Sample		Quantity ratio		
2			Quantity	SD_Q	Quantity	SD_Q	(Test / Control)		
3	<input checked="" type="checkbox"/>	GUSB	6.43E-08	6.29E-09	4.55E-08	2.68E-09	0.71		
4	<input checked="" type="checkbox"/>	HPRT1	1.28E-07	8.23E-09	9.16E-08	8.76E-09	0.72		
5	<input checked="" type="checkbox"/>	PGK1	8.71E-07	5.61E-08	4.87E-07	2.11E-08	0.56		
6	<input checked="" type="checkbox"/>	ACTB	3.29E-05	4.82E-06	2.50E-05	3.66E-06	0.76		
7	<input checked="" type="checkbox"/>	GAPDH	5.90E-06	2.49E-07	3.51E-06	1.75E-07	0.59		
8	<input checked="" type="checkbox"/>	TBP	2.92E-08	1.88E-09	1.56E-08	1.14E-09	0.55		
9	<input checked="" type="checkbox"/>	B2M	2.70E-06	2.47E-07	4.17E-06	2.46E-07	1.55		
10	<input checked="" type="checkbox"/>	PPIA	3.84E-06	0.00E+00	3.06E-06	0.00E+00	0.80		
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18		normalization factors	Quantity	SD_Q					
19		NF Test							
20		NF Control							
21									

#### \* 1 : ハウスキーピング遺伝子の選択について

Normalization Factor は反応に用いた鋳型量を補正するための係数で、サンプル間で発現量が安定しているハウスキーピング遺伝子 (HKG) を指標として算出します。サンプル間で発現量が異なるハウスキーピング遺伝子を補正に用いると結果が不正確になりますので、その選択には注意が必要です。適切なハウスキーピング遺伝子を選択するには、実験的に確かめるか\* 2、既知の情報 (生物学的知見、文献情報、マイクロアレイの解析結果等) を利用します。そのような情報も得られない場合には、全種類のハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして用いるか、RNA 量の補正を行わずに (全種類を非選択とする) 解析を行います。

#### \* 2 : 参考

- Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3790/3791/3792) 説明書
- Vandesompele J, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* (2002) Jun 18; **3**(7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

(6) 解析結果の確認

解析後、Fold Difference の 3D profile が表示されます。その他の結果を見るには、各シートを選択します。

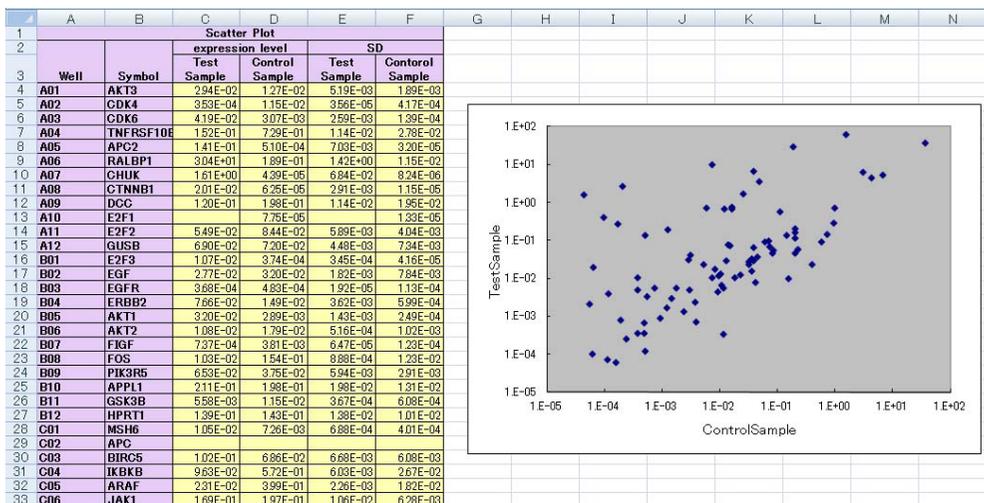
Fold Difference

Control Sample を 1 とした場合の Test Sample の相対定量値および標準偏差の一覧です。

	A	B	C	D	E	F
1	Fold Difference					
2			expression level		SD	
3	Well	Symbol	Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample
4	A01	AKT3	2.31E+00	1.00E+00	4.08E-01	1.49E-01
5	A02	CDK4	3.08E-02	1.00E+00	3.11E-03	3.64E-02
6	A03	CDK6	1.36E+01	1.00E+00	8.42E-01	4.52E-02
7	A04	TNFRSF10B	2.09E-01	1.00E+00	1.56E-02	3.81E-02
8	A05	APC2	2.76E+02	1.00E+00	1.38E+01	6.26E-02
9	A06	RALBP1	1.61E+02	1.00E+00	7.54E+00	6.11E-02
10	A07	CHUK	3.66E+04	1.00E+00	1.56E+03	1.88E-01
11	A08	CTNNB1	3.22E+02	1.00E+00	4.66E+01	1.85E-01
12	A09	DCC	6.07E-01	1.00E+00	5.73E-02	9.84E-02
13	A10	E2F1		1.00E+00		1.72E-01
14	A11	E2F2	6.51E-01	1.00E+00	6.98E-02	4.78E-02
15	A12	GUSB	9.59E-01	1.00E+00	6.23E-02	1.02E-01
16	B01	E2F3	2.86E+01	1.00E+00	9.25E-01	1.11E-01
17	B02	EGF	8.65E-01	1.00E+00	5.70E-02	2.45E-01
18	B03	EGFR	7.63E-01	1.00E+00	3.98E-02	2.34E-01

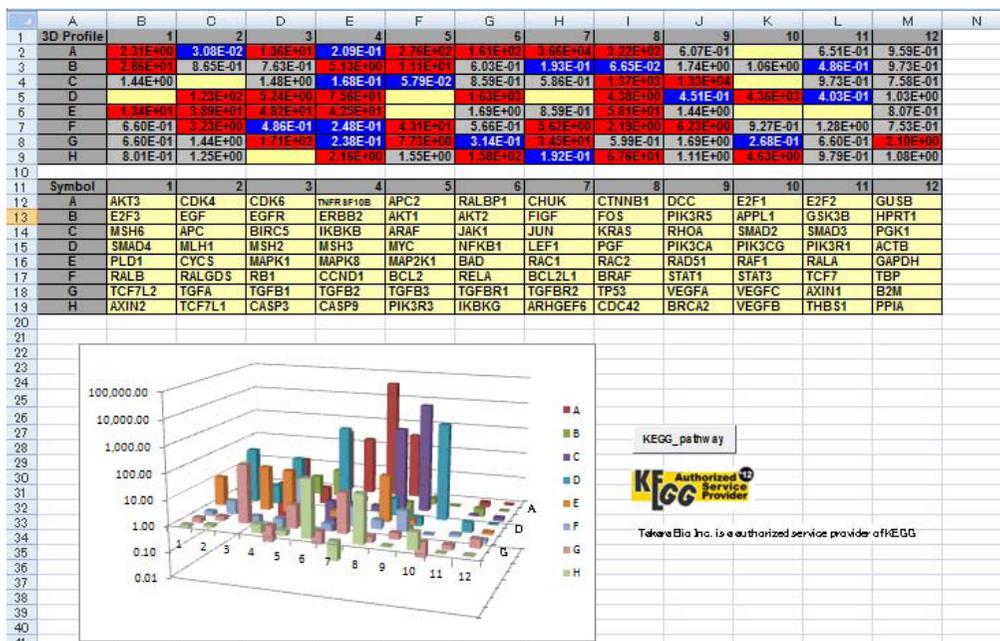
Scatter plot

左の表は、Control Sample に対して相対化する前の定量値と標準偏差の一覧です。その右には、それらの値が Scatter plot で表示されます。



### 3D Profile

Fold Difference を棒グラフで表示します。グラフの上には Plate と同じ配置で Test Sample の Fold Difference および遺伝子の Symbol の表が表示されます。Fold Difference の表は発現減少(0.5 以下)を青、変化なし(0.5 より大きく 2 未満)を灰色、発現増大(2 以上)を赤としています。





### III. トラブルシューティング

- セキュリティの警告が表示される

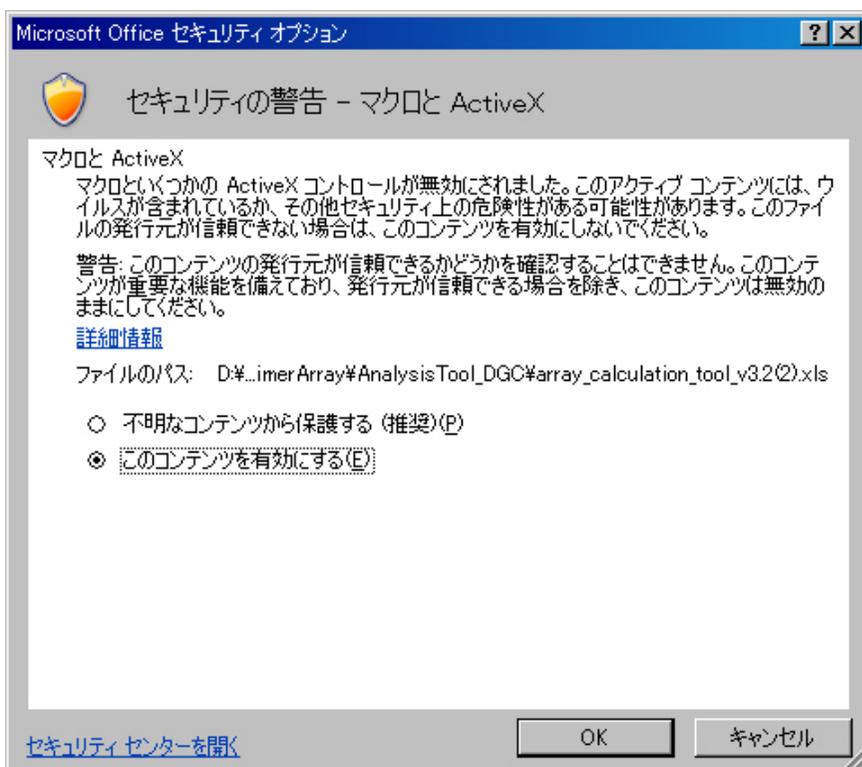
PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示されることがあります。その場合には、マクロを有効にする操作を行ってください。

Microsoft Office Excel 2007 の場合

(1) セキュリティの警告のオプションをクリックする。



(2) 「このコンテンツを有効にする」を選択して、OK ボタンをクリックする。



PrimerArray はタカラバイオ株式会社の登録商標です。

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**