

RT² Profiler PCR Arrays : パスウェイ解析

Focus on Your Pathway

PCR アレイ総合ガイド

Pathway and disease research profiling

QIAGEN

- Apoptosis
- Biomarkers
- Cancer research
- Cell Cycle
- Cytokines
- ECM/adhesion
- Neuroscience
- Signal transduction
- Stem cell/development
- Toxicology/drug ADME



Sample & Assay Technologies

目次

| | |
|--|----|
| RT ² Profiler PCR Arrays | 3 |
| RT ² Profiler PCR Array システム | 5 |
| RT ² Profiler PCR Array パフォーマンス | 8 |
| FFPE 組織サンプル用 RT ² PreAMP システム | 9 |
| RT ² Profiler PCR Array データ解析 | 10 |
| QIAGEN [®] RNeasy [®] Kits | 11 |
| サンプル破砕用 QIAGEN 製品 | 12 |
| RNA 安定化用 QIAGEN 製品 | 13 |
| RT ² Profiler PCR Array クイックガイド | 14 |

| リアルタイム PCR 装置 | | プレート フォーマット |
|---|---|----------------|
| QIAGEN | Rotor-Gene™ Q、Rotor-Gene 6000 | R |
| Applied Biosystems[®] (ABI) | ABI™ 5700、7000、7300 | A |
| | ABI 7500 Standard、ViiA [®] 7 (96-well block) | A |
| | ABI 7500 FAST、ViiA 7 FAST (96-well Block) | C |
| | ABI 7900HT Standard (96-well Block)、7700 | A |
| | ABI 7900HT FAST (96-well Block) | C |
| | ABI 7900HT、ViiA 7 (384-well Block) | E |
| Bio-Rad[®] | iCycler、iQ5、MyiQ、MyiQ2、Chromo4 | A |
| | CFX96、Opticon 2 | D |
| | CFX384 | E |
| Stratagene[®] | Mx3000P、Mx3005P | A |
| | Mx4000 | D |
| Roche[®] | LightCycler [®] 480 (96-well Block) | F |
| | LightCycler 480 (384-well Block) | G |
| Eppendorf[®] | Mastercycler [®] ep realplex 2/2S、4/4S | A |
| TaKaRa | TP-800 | A |
| Fluidigm™ | BioMark | H |

| RT ² Profiler PCR Array 付属品 | | Cat. no. |
|--|------------|----------|
| RT² First Strand Kit | 12 samples | 330401 |

| RT ² Profiler PCR Arrays 用マスターミックス | | Cat. no. |
|--|---------------------|----------|
| RT² SYBR[®] Green ROX™ qPCR Mastermix | 2 arrays (96-well) | 330520 |
| | 12 arrays (96-well) | 330522 |
| | 24 arrays (96-well) | 330523 |
| | 4 arrays (384-well) | 330521 |
| RT² SYBR Green Fluor qPCR Mastermix | 2 arrays (96-well) | 330510 |
| | 12 arrays (96-well) | 330512 |
| | 24 arrays (96-well) | 330513 |
| | 4 arrays (384-well) | 330511 |
| RT² SYBR Green qPCR Mastermix | 2 arrays (96-well) | 330500 |
| | 12 arrays (96-well) | 330502 |
| | 24 arrays (96-well) | 330503 |
| | 4 arrays (384-well) | 330501 |

| RT ² Profiler PCR Arrays : 一般研究用 | PCR Array Cat. no.* |
|--|------------------------|
| Angiogenesis | PAXX-024Y |
| Apoptosis | PAXX-012Y |
| Autophagy | PAXX-084Y |
| Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling | PAXX-005Y |
| Cancer PathwayFinder | PAXX-033Y |
| Cell Cycle | PAXX-020Y |
| Chemokines and Receptors | PAXX-022Y |
| Diabetes | PAXX-023Y |
| DNA Damage Signaling Pathway | PAXX-029Y |
| Drug Metabolism | PAXX-002Y |
| EGF/PDGF Signaling Pathway | PAXX-040Y |
| Embryonic Stem Cells | PAXX-081Y |
| Endothelial Cell Biology | PAXX-015Y |
| Epigenetic Chromatin Modification Enzymes | PAXX-085Y |
| Epithelial to Mesenchymal Transition | PAXX-090Y |
| Extracellular Matrix and Adhesion Molecules | PAXX-013Y |
| GPCR Signaling Pathway | PAXX-071Y |
| Growth Factors | PAXX-041Y |
| Heat Shock Proteins | PAXX-076Y |
| Hedgehog Signaling Pathway | PAXX-078Y |
| Hematopoietic Stem Cells & Hematopoiesis | PAXX-054Y |
| Hepatotoxicity | PAXX-093Y |
| Hypoxia Signaling Pathway | PAXX-032Y |
| Inflammatory Cytokines and Receptors | PAXX-011Y |
| Innate and Adaptive Immune Response | PAXX-052Y |
| Interferon α,β Response | PAXX-016Y |
| JAK/STAT Signaling Pathway | PAXX-039Y |
| MAP Kinase Signaling Pathway | PAXX-061Y |
| Mitochondrial Energy Metabolism | PAXX-008Y |
| Nephrotoxicity | PAXX-094Y |
| NFκB Signaling Pathway | PAXX-025Y |
| Oxidative Stress and Antioxidant Defense | PAXX-065Y |
| p53 Signaling Pathway | PAXX-027Y |
| WNT Signaling Pathway | PAXX-043Y |

* XX = 動物種 ; Y = プレートフォーマット

RT² Profiler PCR Array とは？

RT² (RT スクウェア) Profiler PCR Array は、シグナル伝達、生物学的プロセス、疾病研究パスウェイに關する遺伝子パネルに焦点をおいた解析をリアルタイム PCR により実現する、信頼性と感度の高い遺伝子発現プロファイリング・テクノロジーです。

RT² Profiler PCR Array 各製品はパスウェイ特異的な遺伝子リストと 5 種類のハウスキーピング (リファレンス) 遺伝子から構成されています。さらに各アレイに入っている独自のコントロールウェルはゲノム DNA の混入 (GDC)、一本鎖 cDNA 合成 (RTC)、リアルタイム PCR 効率 (PPC) をモニターします。

RT² Profiler PCR Array の優位性

- **簡便性**：簡便な RT² Profiler PCR Array により、リアルタイム装置を所有するどのようなラボでもルーチンで発現プロファイリングを実施できます。
- **性能**：RT² Profiler PCR Array は、96/384 ウェルプレート、100-well disc、96 x 96 chip フォーマットでお届けし、複数の遺伝子の感度・再現性・特異性・信頼性の高いプロファイリングを同時に行ないます。
- **相関性**：RT² Profiler PCR Array はパスウェイあるいは疾病に關する遺伝子のプロファイリングに焦点をあてています。

RT² とは？

Real Time PCR と Reverse Transcription を組み合わせたシステムで、RT の二乗 ($RT \times RT = RT^2$ [RT square : RT スクウェア]) を意味します。

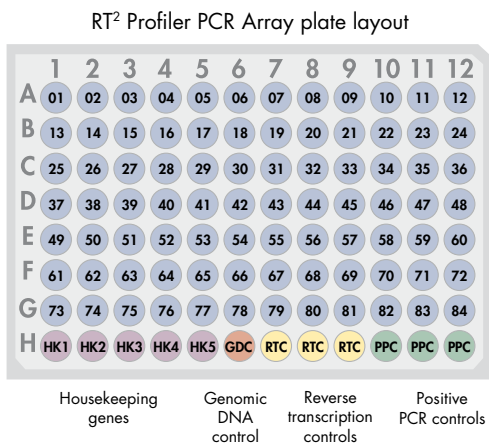
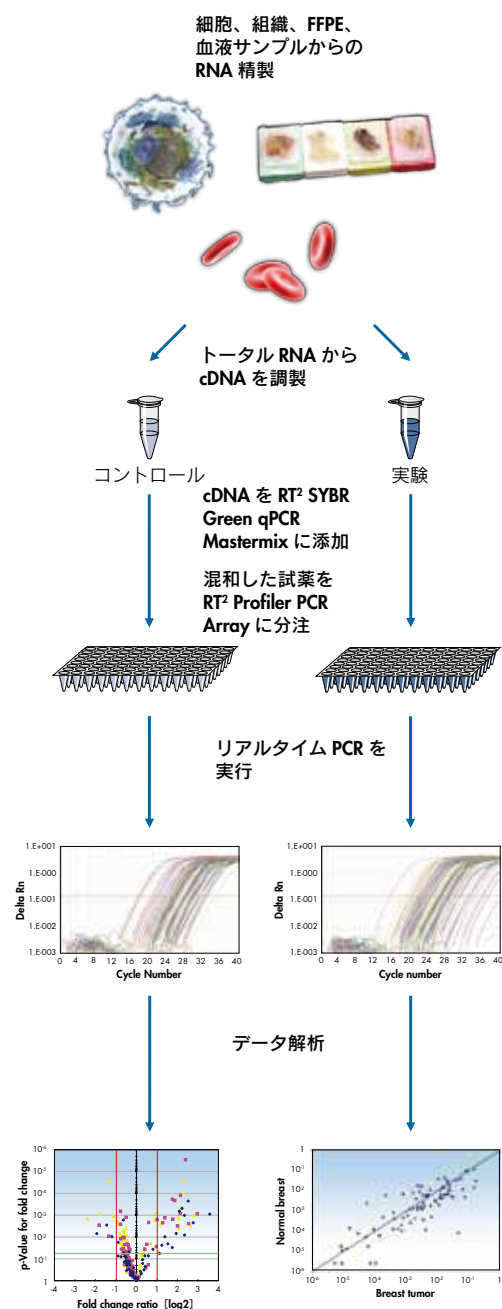


図 1. RT² Profiler PCR Array の各ウェルでパスウェイあるいは疾病に關する遺伝子発現を測定
一般的な 96 ウェルフォーマットを示す。384 ウェルプレート、100-well disc、96 x 96 chip フォーマットでも入手可能。



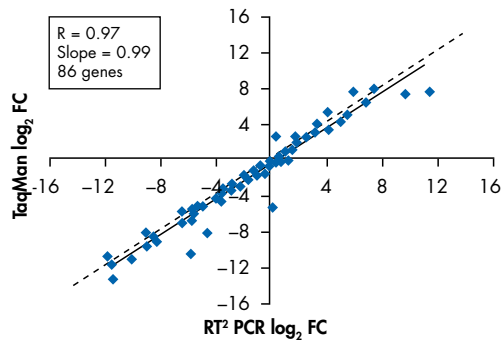


図 2. 他の解析法と高い相関性*
RT² Profiler PCR Arrays (SYBR Green を利用) と TaqMan[®] プラットフォームアッセイの遺伝子発現解析を比較した。POLR2A に対して標準化したデータの fold difference の対数分析は、2 種類の解析方法が高い相関性をもつことを示した。

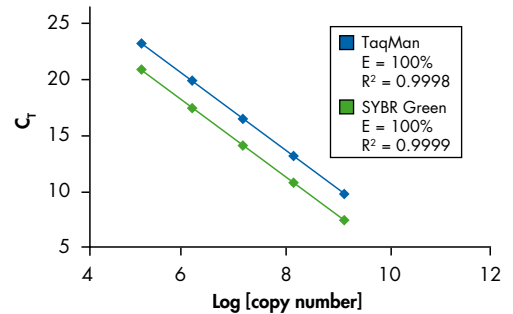


図 3. RT² SYBR Green と TaqMan の感度の比較*
SYBR Green 法あるいは TaqMan 法を用いて TaqMan プローブ存在下あるいは非存在下で同じプライマーペアを用いて PCR 産物を検出した。SYBR Green 法では各希釈液で低い C_t 値が得られ、TaqMan 法よりも感度が高いことが示された。

図 4. Stress and Toxicity PathwayFinder RT² Profiler PCR Array は 3 種類の PPAR γ アゴニストにより引き起こされる肝臓毒性に関連する遺伝子発現プロファイルを明確に解明 II 型糖尿病治療薬である 3 種類のグリタゾン PPAR γ アゴニストで処理済みの HepG2 細胞から RNA を解析し、結果をコントロール (DMSO) と比較した。特有の肝臓毒性のために販売中止になった薬剤 (Rezulin) では、市場で販売されている 2 種類の安全な薬剤 (Avandia と Actos) よりも、ストレス関連遺伝子の発現に大きな変化が観察された。

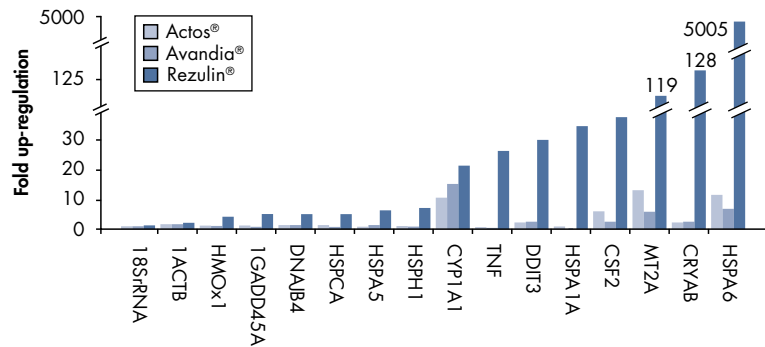


図 5. Common Cytokine RT² Profiler PCR Array は PBMC 処理後、23 種類のアップレギュレーションされた遺伝子と 6 種類のダウンレギュレーションされた遺伝子を検出した 50 ng/ml の PMA と 1 mg/ml のイオノマイシンにより 6 時間処理あるいは処理していないヒト末梢血管単核細胞からトータル RNA を抽出した。これを、ヒト Common Cytokine RT² Profiler PCR Array を用いて triplicate で検出した。6 時間処理した細胞では、インターロイキン、コロン刺激因子、TNF リガンドをはじめとする 23 種類のサイトカイン遺伝子がアップレギュレーション (5 倍以上、 $p < 0.0005$) された。同じ条件下で 6 種類のインターロイキンと TNF リガンド遺伝子がダウンレギュレーションされた。

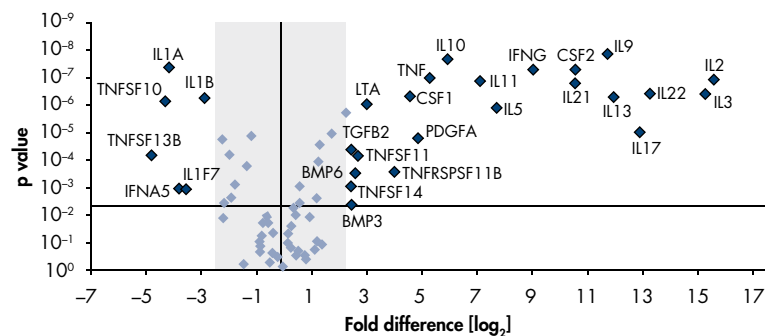
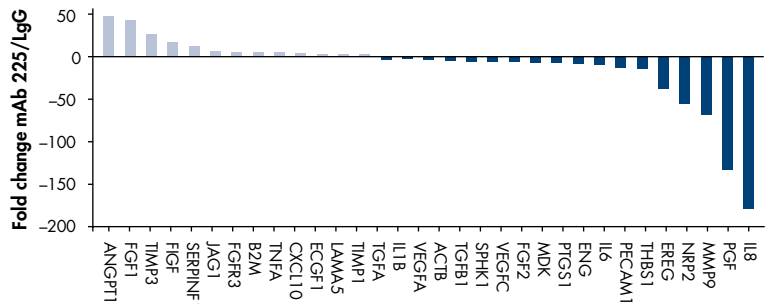


図 6. Angiogenesis RT² Profiler PCR Array を用いてコロニーまたはコロニー非形成細胞間の相対的な fold change を測定†
コントロールの抗体 (IgG)、あるいは EGFR シグナルをブロックする mAb225 で処理した T4-2 細胞から RNA を分離し、逆転写した。相対遺伝子発現量をヒト Angiogenesis RT² Profiler PCR Array により得た。血管新生に関連する 84 遺伝子と 5 種類のハウスキープینگ遺伝子の発現プロファイル調べた。Fold change の計算は、処理あるいは未処理の群の遺伝子発現の fold change を自動的に計算する SABiosciences のデータ解析ソフトウェアを用いて行なった。



* Arikawa, E., et al. (2008) Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. BMC Genomics 9, 378.

† Chen, A., et al. (2009) Endothelial cell migration and vascular endothelial growth factor expression are the result of loss of breast tissue polarity. Cancer Research 69, 6721.

RT² Profiler PCR Array システムの活用

RT² Profiler PCR Array はパスウェイに特異的な遺伝子発現解析のためのトータルシステムです。サンプル調製からデータ解析まで、RT² Profiler PCR Array システムは、品質・再現性・信頼性の高い遺伝子発現データを保証するために4種類の製品で構成されています。

RT² Profiler PCR Array システムの性能発揮に必須である独自のコントロールセットは、データの信頼性を高め、性能を保証します。これらのコントロール群により、研究者はサンプルへのゲノム DNA (gDNA) 混入がないか、逆転写反応の質、リアルタイム PCR 効率を調べ、これらのデータの品質を迅速に評価することが可能です。RT² Profiler PCR Array システムの各製品は、プロセスの各ステップを包括的にモニタリングするための連結したシステムの採用で、これらの品質管理に寄与しています。

■ RT² Profiler PCR Arrays

各パスウェイに特化した RT² Profiler PCR Array には、ウェットベンチで検証済みの 89 種類の RT² qPCR Primer Assays (5 種類のハウスキーピング遺伝子を含む) と独自のコントロールパネルが入っています。

■ RT² SYBR Green qPCR Mastermixes

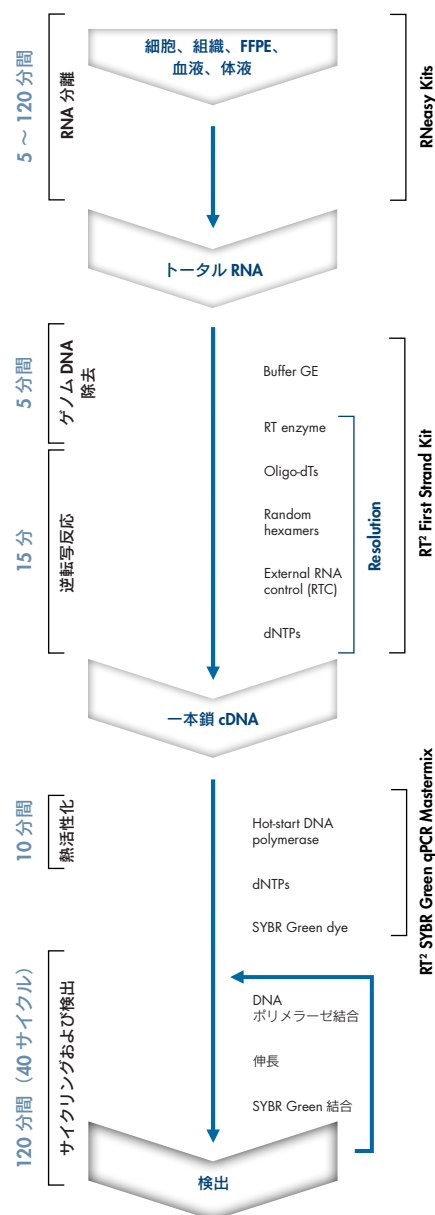
ユニークなバッファー成分とプライマーデザイン・アルゴリズムにより高い増幅効率を実現します。リファレンスダイの利用も可能です (ROX、Fluorescein または無し)。

■ RT² First Strand Kit

RT² Profiler PCR Array により検出される外因性 RNA コントロールの採用により、用いた RNA の品質を確認できます。独自のゲノム DNA 除去バッファーにより、混入した gDNA が除去され、mRNA を高い特異性で検出します。

■ 無料データ解析用ソフト

パスウェイに特異的な遺伝子セットの発現を広範な解析範囲で評価するために、RT² Profiler PCR Array から豊富なデータが得られます。ウェブ上から無料 RT² Profiler PCR Array データ解析ツール (スキャッタープロット、ボルケーノプロット、クラスターグラム) を用いて、C_T 値から fold change の結果表示までが様々なフォーマットで迅速に提供されます。



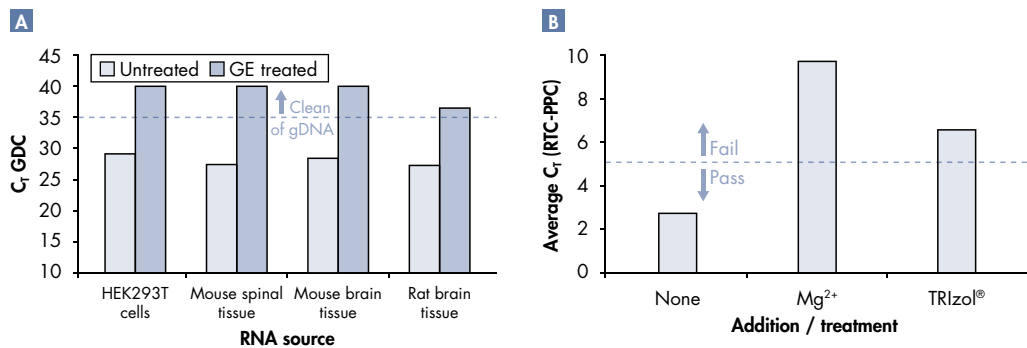


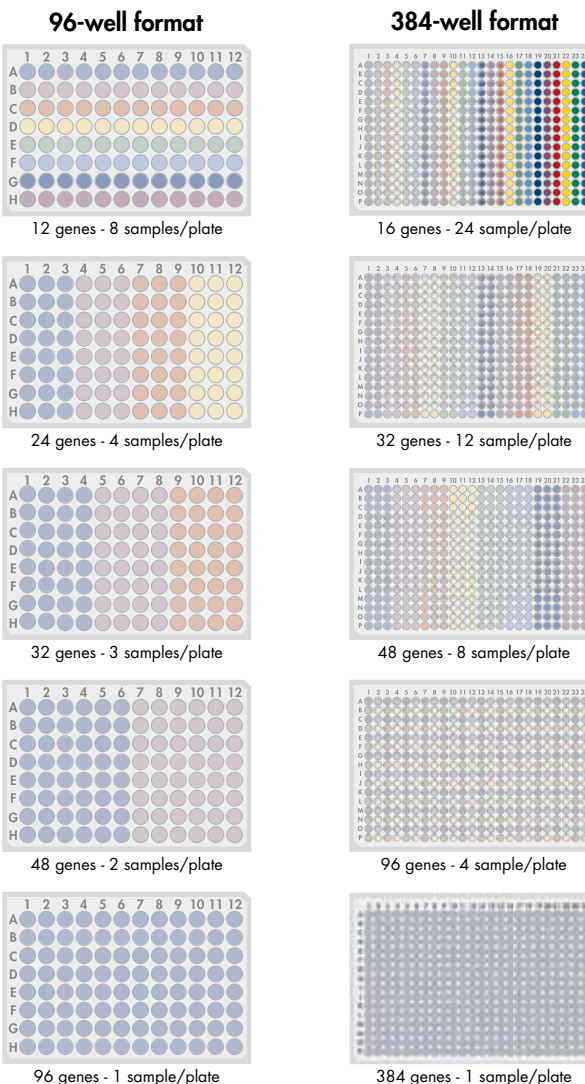
図 7. **A** 混入したゲノム DNA の除去

HEK 293T 細胞、マウス脊髄組織、マウス脳組織、ラット脳組織から RNA を抽出した。RT² First Strand Kit の gDNA Elimination Buffer による処理無し（薄青）または処理有り（濃青）において RT² Profiler PCR Arrays にて比較した。

B 逆転写反応における阻害物質のモニタリング

Human universal RNA にマグネシウム塩を添加して RNA 分解をシミュレート、あるいは TRIZOL 試薬を添加して酵素活性を阻害する混入物としてシミュレートした。RT² First Strand Kit を cDNA 合成に使用した。

Custom RT² Profiler PCR Array : プレートフォーマット



Custom RT² Profiler PCR Arrays とは？

Custom RT² Profiler PCR Array はお客様の研究内容に即した遺伝子のプロファイリングをハイスループット実験で実現します。ヒト、マウス、ラット、アカゲザル、ショウジョウバエ、イヌゲノム中の遺伝子からお選びいただけます（最高 384 種類の遺伝子に対応）。お客様の研究内容がバイオマーカーの発見、マイクロアレイ・フォローアップ、創薬、疾病の特性解明、シグナル伝達メカニズムのどれに関わっていても、Custom RT² Profiler PCR Array は目的遺伝子の発現解析を可能にします。

Custom RT² Profiler PCR Arrays の優位性

- **性能** : Custom RT² Profiler PCR Array の各アッセイは一連の厳密なパラメーターを用いてデザインされ、ウェットベンチで確認実験が行なわれています。その結果、サンプル中の遺伝子は広い定量範囲で再現性よく認識され、定量化されます。
- **適応性** : Custom RT² Profiler PCR Array は、迅速なサンプルロードやデータ解析のために様々な使いやすいフォーマットで提供しています。
- **所要時間** : お客様の遺伝子リストをご提出いただいてから約 4 週間後に custom RT² Profiler PCR Array をお届けいたします。

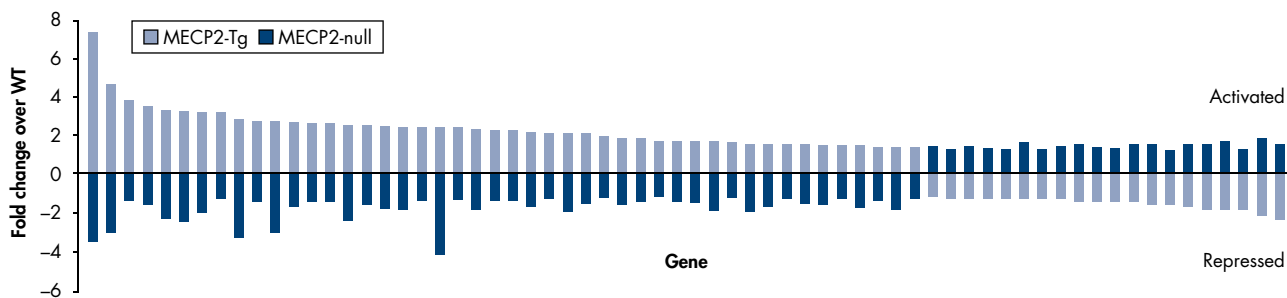


図 8. MECP2 マウスモデルの視床下部における遺伝子発現の変化

qPCR 解析により 66 遺伝子の発現変化を検証した。マイクロアレイ解析による遺伝子発現レベルを 4 匹の MECP2-Tg (MECP2 遺伝子強制発現マウス、オス) と 4 匹の MECP2-null (MECP2 遺伝子欠損マウス、オス) について評価した。野生型に対して相対的にアップレギュレーションしたかダウンレギュレーションしたかでデータをプロットした ($P < 0.05$, t 検定)。各カラムは 1 つの遺伝子を示し、それぞれの棒グラフは各遺伝子型のマウス 4 匹より得られたデータに由来する*。

96-well plate[†] または 100-well disc custom RT² Profiler PCR Arrays

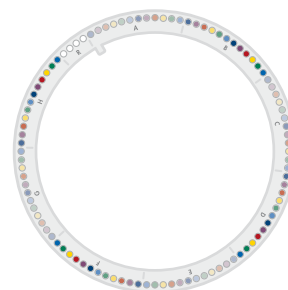
| フォーマット | アレイ数 (最小) |
|--------------------|-------------|
| 8 遺伝子、12 サンプル/プレート | 12 |
| 12 遺伝子、8 サンプル/プレート | |
| 16 遺伝子、6 サンプル/プレート | |
| 24 遺伝子、4 サンプル/プレート | 24 |
| 32 遺伝子、3 サンプル/プレート | |
| 48 遺伝子、2 サンプル/プレート | |
| 96 遺伝子、1 サンプル/プレート | |
| 全プレート | 追加単位 12 アレイ |

Custom RT² Profiler PCR Array : Rotor-Gene Q format

100-well disc format



12 genes - 8 sample/plate



96 genes - 1 sample/plate

384-well custom RT² Profiler PCR Arrays

| フォーマット | アレイ数 (最小) |
|---------------------|------------|
| 8 遺伝子、48 サンプル/プレート | 6 |
| 12 遺伝子、32 サンプル/プレート | |
| 16 遺伝子、24 サンプル/プレート | |
| 24 遺伝子、16 サンプル/プレート | 6 |
| 32 遺伝子、12 サンプル/プレート | |
| 48 遺伝子、8 サンプル/プレート | |
| 64 遺伝子、6 サンプル/プレート | |
| 96 遺伝子、4 サンプル/プレート | 24 |
| 128 遺伝子、3 サンプル/プレート | |
| 192 遺伝子、2 サンプル/プレート | |
| 384 遺伝子、1 サンプル/プレート | 追加単位 6 アレイ |

| Modified RT ² Profiler PCR Arrays | アレイ数 (最小) |
|---|-----------|
| カタログ商品 RT ² Profiler PCR Arrays に 4 遺伝子まで追加 (96-well、100-well disc) | 24 |
| カタログ商品 RT ² Profiler PCR Arrays に 4 遺伝子まで追加 (384-well) | 4 |

| RT ² Profiler PCR Array 付属品 | 包装 | Cat. no. |
|---|---------|----------|
| RT ² PreAMP cDNA Synthesis Kit | 12 サンプル | 330451 |
| RT ² PreAMP Pathway Primer Mixes (pathway focused) | 12 サンプル | 330241 |

* Chahrour, M., et al. (2008) MeCP2, A key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. Science **320**, 1224.

[†] 96 x 96 Fluidigm BioMark フォーマットでも入手可能。

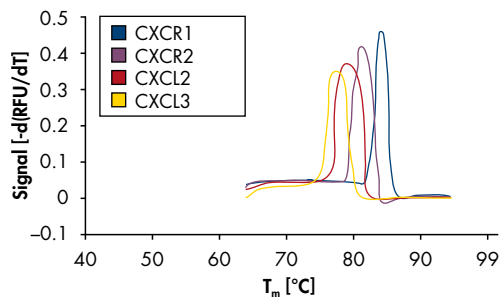


図 9. RT² Profiler PCR Array は全ての反応においてシングル遺伝子特異的産物を増幅

Universal total RNA を 4 種類のケモカインとケモカインレセプターについて RT² qPCR Primer Assay で増幅後、解離（融解）曲線解析を用いて解析した。同一の RNA サンプル中で関連した遺伝子ファミリーメンバーが発現しているにもかかわらず、RT² Profiler PCR Arrays は個々の遺伝子を特異的に検出した。

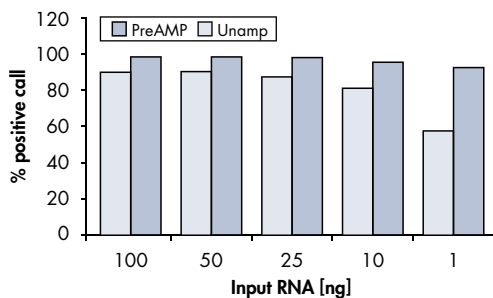


図 10. RT² Profiler PCR Array はわずか 1 ng の RNA を検出

Universal total RNA の量を変えて、Human Inflammatory Cytokines and Receptors RT² Profiler PCR Array (PAHS-011) を用いて、RT² PreAMP システム (9 ページ参照) で事前増幅あり、または無しで解析した。各 RNA 量に対して検出可能な遺伝子のパーセンテージを計算した。パスウェイ特異的な PreAMP テクノロジーにより 1 ng RNA でも十分解析できた。

多くの研究者が RT² Profiler PCR Arrays に信頼を寄せ、パスウェイ特異的遺伝子の発現解析に使用しています。RT² qPCR Primer Assay デザインアルゴリズム、独自のコントロールパネル、厳格な生産プロセスおよび品質コントロールプロセスなどのいくつかのファクターにより、弊社 RT² Profiler PCR Array の卓越した性能と信頼性が発揮されています。各 RT² Profiler PCR Array および全ての RT² qPCR Primer Assay は性能を保証するために試薬を用いて検証され、ここに記載するいくつかの性能が証明されました。

明確な特異性

RT² Profiler PCR Array トータルシステムで高品質 RNA サンプルを使用することにより、プライマーダイマーや副産物のないシングルバンドが得られます。独自のプライマーデザイン用アルゴリズムは、10 種類を超える熱力学および配列アライメントに関するクライテリアを組み込んでいます。また、ウェットベンチによる検証は全てのリアルタイム qPCR アッセイが目的遺伝子の発現を正確に反映しているという確証をお届けします。弊社は 20,000 を超える遺伝子特異的な RT² qPCR Primer Assays を設計し、お客様に満足してご利用いただいています。

高い感度と幅広いダイナミックレンジ

パスウェイに特異的な RT² Profiler PCR Array を用いた解析では、過剰発現した遺伝子も発現抑制された遺伝子と同様の信頼性で測定されるという利点があります。RT² Profiler PCR Array トータルシステムでは 25 ng ~ 5 µg の RNA では 85% を超える positive call が、また、RT² PreAMP システム (9 ページ参照) を用いて事前増幅したわずか 1 ng の RNA では >90% を超える positive call が得られました。発現レベルに影響するパスウェイ特異的遺伝子パネルを様々なサンプル間で比較する際に、リアルタイム PCR による 8-log の広い測定範囲を実現します。

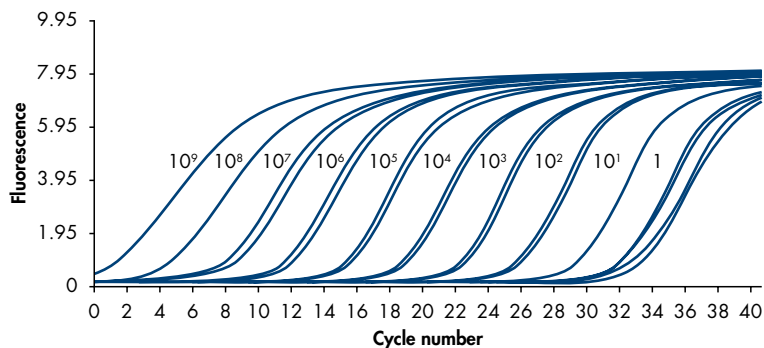


図 11. RT² Profiler PCR Arrays は広い測定範囲で RNA を検出

ヒト CHRNA5 の 10 倍連続希釈液に対応する RT² qPCR Primer Assay で解析した。

FFPE サンプルからの遺伝子発現解析

FFPE サンプルの qRT-PCR 解析を正確に実現する画期的な製品です。RT² PreAMP テクノロジーは multiplex tandem PCR を利用し、遺伝子特異的な cDNA を最小限のバイアスで前もって増幅します。本キットは、FFPE サンプル中の断片化されたトータル RNA から的一本鎖 cDNA を前もって増幅してから RT² Profiler PCR Arrays を用いた遺伝子発現解析に使用します。

簡便な RNA 抽出とハイフィデリティ増幅の組み合わせにより、大量の RNA が回収されます。RT² Profiler PCR Arrays は FFPE サンプルから生物学的なパスウェイあるいは疾病に関連する遺伝子の発現解析を簡単かつ高い信頼性で容易に行ないます。

FFPE サンプル用 RT² PreAMP システムの利点

- 迅速かつ効率的：RNeasy FFPE Mini Kit による FFPE サンプルからの高品質で高収量のトータル RNA
- 超高感度：RT² PreAMP プロトコールによる FFPE サンプルの高感度 qRT-PCR 検出
- 容易なワークフロー：簡単な操作と適応性の高いパフォーマンス

RT² PreAMP の性能

- FFPE サンプルからの positive call rate が増加
- 以前発現なしと判断された遺伝子の検出
- 事前増幅した cDNA のバイアスのない増幅
- 生物学的な変化を忠実に保存

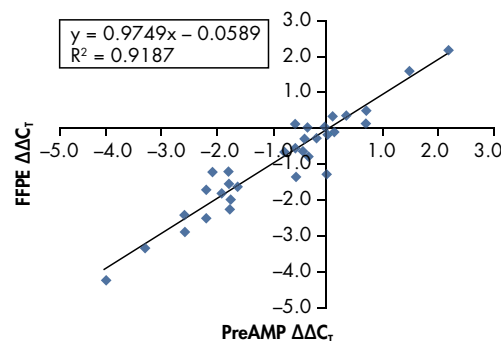
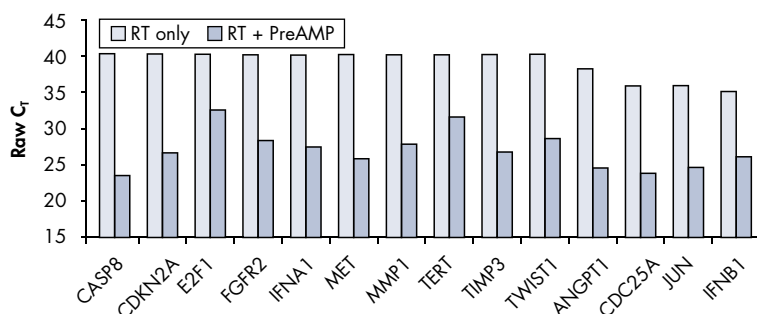


図 12. RT² PreAMP システムで事前増幅した FFPE サンプルと事前増幅していないサンプルで、遺伝子発現の fold change に高い相関性

FFPE 脾臓組織および腸組織から RNA を抽出し、事前増幅条件の有無にて cDNA に変換した。全ての 4 種類の cDNA を用いて Human Cancer PathwayFinder RT² Profiler PCR Array で解析した。増幅していない脾臓および腸組織サンプル共に元の C_T 値が 33 未満の遺伝子について ΔΔC_T 値の比較を示した。

図 13. FFPE 組織サンプルから抽出した RNA で、以前発現無しと判断された遺伝子も RT² PreAMP で事前増幅後にその遺伝子発現の検出が可能

RNA を FFPE 脾臓組織サンプル (ヒト) から抽出後、cDNA への逆転写反応を RT² PreAMP システムを用いて (事前増幅あり; 濃青の棒グラフ)、あるいは PreAMP システムを用いずに (事前増幅なし; 薄青の棒グラフ) 行なった。Human Cancer PathwayFinder RT² Profiler PCR Array の結果、事前増幅していない遺伝子の 55% が 10 ~ 30 の C_T 値の範囲では検出できなかった。C_T 値が 30 を超える遺伝子を RT² PreAMP システムを用いて事前増幅した結果、検出可能な範囲 (C_T = 10 ~ 30) にシフトした。

オーダーインフォメーション

| 製品名 | Cat. no. |
|---|----------|
| RT ² PreAMP cDNA Synthesis Kit | 330451 |
| RT ² PreAMP Pathway Primer Mixes for all RT ² Profiler PCR Arrays | 330241 |
| RT ² PreAMP Primer Mixes for custom RT ² Profiler PCR Arrays | 330141 |
| RT ² Profiler PCR Arrays | Varies |
| RT ² SYBR Green qPCR Mastermixes | Varies |
| RNeasy FFPE Kit (50) | 73504 |

ウェブ上の無料 RT² Profiler PCR Array データ解析ソフトウェア

ウェブ上のソフトウェアを用いて、RT² Profiler PCR Array によって得られた C_T 値の生データから $\Delta\Delta C_T$ ベースの fold-change が自動計算されます。アレイのカタログ番号を入力すると、結果が遺伝子リストに追加されます。また表タイプの解析データだけでなく、スキャッタープロット、ボルケーノプロット、クラスターグラムプロット、マルチグループプロットが得られます。自分で fold-change や統計学的に有意な閾値を定め、replicate の実験群間での比較やグループの全てを並べて比較することもできます。ウェブ上のポータルサイトのソフトウェアを用いてゲノム DNA、逆転写反応効率、positive PCR コントロールウェルについても解析することができます。RT² Profiler PCR Array システムと RT² Profiler PCR Array Data Analysis Suite を用いて、パスウェイに特異的な遺伝子の発現解析を迅速かつ容易に行なえます。

- 簡単：データをアップロードしてパラメーターを設定するだけ *
- 便利：ソフトウェアのダウンロードあるいはインストールが不要
- 論文形式での出力：Excel[®] ファイルあるいは png 画像ファイルとしてエクスポートが可能

* Excel 形式のデータ解析用テンプレートが弊社ウェブサイトから入手可能。

方法

1. Excel ファイルにデータを入力
 2. ハウスキーピング遺伝子と実験群を決定
 3. 自動的に作製されたデータ解析結果を選ぶ
- プリロードのサンプルデータセットでご確認いただけます：
www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php
 - ウェビナー “PCR Array Data Analysis Tutorial” が以下のサイトで予定されてます：
www.SABiosciences.com/seminarlist.php

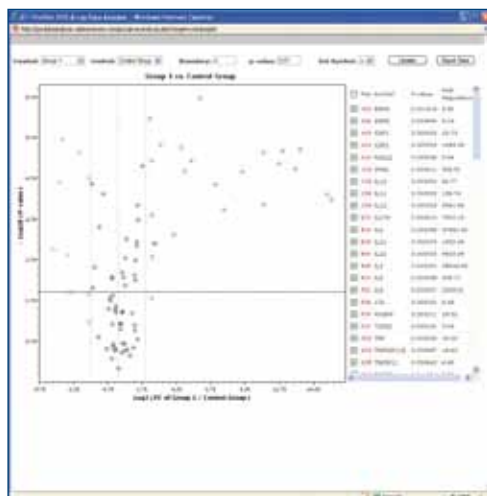


図 14. 遺伝子発現変化の統計的有意性を示すボルケーノプロット

X 軸には log₂ の fold-difference をプロットし、Y 軸は replicate で得られた C_T 値の t 検定に基づいた p 値をプロットした。グレーの領域の外にある青と赤のシンボルはスキャッタープロットと同じ意味を持つ（赤はアップレギュレートされた遺伝子で緑はダウンレギュレートされた遺伝子）。ボルケーノプロットで点線より上にあるシンボルは、fold-differences が、少なくとも設定した閾値と比べ統計的に有意であることを容易に示している。

RNeasy Kits とは何か？

RNeasy Kits は実証済みのテクノロジーを利用して、迅速かつ簡便に高品質 RNA を精製します。高い Agilent® RIN (RNA integrity number) 値を持つインタクトな RNA が再現性のある収量で得られ、リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで信頼性の高い結果が得られます。細胞用、溶解が容易な組織用キットだけではなく、繊維性組織や脂肪組織、穿刺吸引、凍結切片などの調製が困難なサンプルに関する専用キットをお届けしています。

なぜ RNeasy Kits を使用するのか？

RNA 精製の際に重要なことは RNA の品質を維持し、夾雑物を除去できる方法を用いることです。RNA が分解すると遺伝子発現解析の信頼性が低下し、また精製した RNA 中にコンタミが存在するとリアルタイム RT-PCR やマイクロアレイ解析などのダウンストリーム・アプリケーションで酵素反応を阻害します。RNeasy Kits は特殊な溶解バッファーとシリカゲル・メンブレンテクノロジーによりこれらの問題を克服しています。

RNeasy Kit はどのように作用するか？

生体サンプルをまずグアニジン塩を含む溶解バッファーで溶解します。グアニジン塩は RNase を変性して RNA の分解を抑えます。その後 RNA は RNeasy スピンカラムあるいは RNeasy 96 plate のウェル中のシリカゲルメンブレンに特異的に結合します。その他の細胞成分を一連の洗浄用バッファーで効率的に洗い流した後、純度の高いインタクトな RNA を RNase フリー水で溶出します。

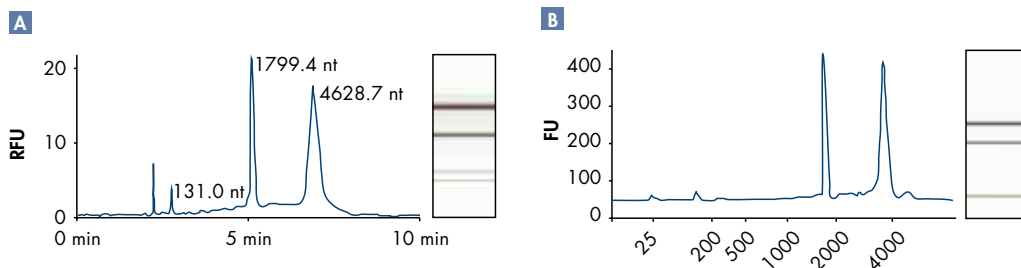
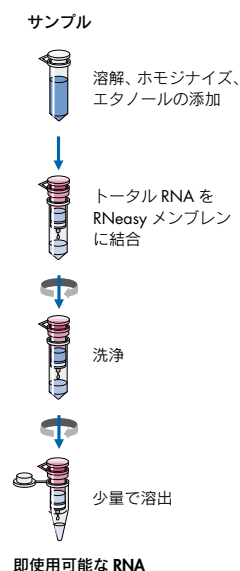


図 15. インタクトな RNA

RNeasy Mini Kit を用いて Jurkat 細胞から RNA を精製した。精製した RNA を、**A** QIAxcel™ system (28S と 18S rRNA の比率: 1.55) および **B** Agilent 2100 Bioanalyzer (28S と 18S rRNA の比率: 1.7) で解析した。9.6 という高い RIN 値が得られ、RNA が非常にインタクトであることを示した。

オーダーインフォメーション

| 製品名 | 内容 | Cat. no. |
|--------------------------------------|--|----------|
| RNeasy Mini Kit (50)* | For purification of RNA from cells & easy-to-lyse tissues | 74104 |
| RNase-Free DNase Set (50) | For DNase digestion RNA purification | 79254 |
| RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)* | For purification of RNA from fiber-rich tissues | 74704 |
| RNeasy Plus Universal Mini Kit (50)* | For purification of RNA from all tissue types | 73404 |
| RNeasy 96 Kit (12) | For purification of RNA from cells in 96-well format | 74182 |
| QIAzol® Lysis Reagent (200 ml) | For lysis of fatty and standard tissues before RNA isolation | 79306 |

* QIAcube で自動化可能。詳細は www.qiagen.com/goto/QIAcube を参照。

サンプル破碎とは？

生体サンプルを効率的に破碎しホモジナイズすることは、どのような RNA 精製法にとっても必須条件です。破碎によりサンプル中の RNA が遊離し、ホモジナイゼーションによりサンプル粘性が低下して次の RNA 精製が容易に行なえます。

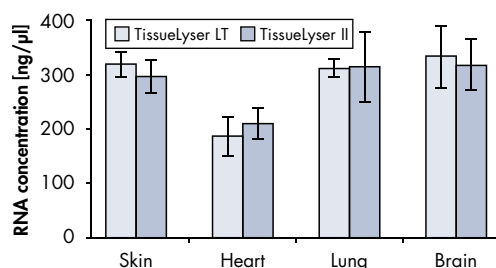


図 16. 効果的な組織破碎

TissueLyser LT あるいは TissueLyser II を用いて様々なラット組織を破碎した。RNeasy Fibrous Tissue MiniKit (皮膚、心臓、肺) あるいは RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (脳) を用いて QIAcube™ 上でサンプル 20 mg から RNA を自動精製した。RNA は 50 µl の水で溶出し、分光光度計で濃度を測定した。

QIAGEN のサンプル破碎システムをなぜ使用するのか？

QIAGEN がお届けする破碎およびホモジナイゼーション用のテクノロジーには、細胞ライセートを迅速かつ簡便にホモジナイズする QIAshredder スピンカラムから、堅固な組織サンプルの機械的な破碎とホモジナイゼーションを様々なスループット数で行なう TissueRuptor™ および TissueLyser システムなど様々なものがあります。TissueRuptor および TissueLyser システムは迅速で効率的な破碎を実現し、乳鉢と乳棒を用いた時間のかかる破碎方法に代わります。

QIAGEN のサンプル破碎用製品の作用メカニズムは？

QIAshredder は、スピンカラム・フォーマットで生体高分子を切断するユニークなシステムです。細胞ライセートを QIAshredder スピンカラムにアプライ後、遠心操作を行なってライセートをホモジナイズします。

TissueRuptor は、TissueRuptor Disposable Probe の刃が高速回転することにより破碎とホモジナイゼーションを同時に行なうハンドヘルド装置です。プローブはディスポーザブルで透明なので、クロスコンタミのリスクが最小限に抑えられ、サンプルの破碎プロセスを目視できます。ディスポーザブルプローブを使用することにより、各サンプルの破碎後にプローブを洗浄する必要がないため、時間も節約できます。

TissueLyser は、プラスチックチューブ内での粉碎用ビーズとの高速攪拌により、サンプルの破碎とホモジナイズを同時に行なうビーズミルです。数個のチューブを保持できるアダプターを用いると、複数のサンプルを同時に破碎できます。TissueLyser LT では最高 12 サンプル、TissueLyser II では 48 あるいは 192 サンプルの処理が可能です。

オーダーインフォメーション

| 製品名 | 内容 | Cat. no. |
|-------------------------------------|---|----------|
| QIAshredder (50) | For homogenization of cell lysates | 79654 |
| TissueRuptor | For disruption of individual samples | 9001271 |
| TissueRuptor Disposable Probes (25) | Disposable probes for use with the TissueRuptor | 990890 |
| TissueLyser LT | For disruption of up to 12 samples | 85600 |
| TissueLyser LT Adapter, 12-tube | For purification of RNA from cells in 96-well format | 69980 |
| TissueLyser II | For disruption of up to 48 or 192 samples | 85300 |
| TissueLyser Adapter Set 2 x 24 | Adaptor set for use with the TissueLyser II; holds 48 tubes | 69982 |

RNA の安定化とは？

生体サンプルの採取後 RNA は急激に不安定になります。RNA は RNase により分解され、サンプルの取り扱いにより生じる遺伝子発現誘導やダウンレギュレーションも引き起こされます。mRNA レベルを保護するために細胞 RNA を迅速に安定化することは、遺伝子発現解析を正確に行なうために非常に重要です。

サンプル破碎や RNA 精製を行なう前にサンプルが解凍しないように気をつけなければなりません。RNA の安定化は、液体窒素あるいはドライアイスでサンプルを急速冷凍することにより通常行ないます。しかし、このような物質の取り扱いには危険が伴います。

QIAGEN の RNA 安定化製品をなぜ使用するのか？

QIAGEN は細胞、組織、血液、唾液中の RNA を室温で安定化するための様々な試薬を提供しています。サンプルを凍結するために使用する取り扱いが危険な液体窒素あるいはドライアスを回避することができます。サンプルを試薬中に沈めるだけで遺伝子発現プロファイルは急速に保護され、その後 RNA 精製に先立って常温でサンプルを処理・輸送することが可能です。さらに安定化試薬は RNA 精製用 QIAGEN キットにも同梱されており非常に便利です。

オーダーインフォメーション

| 製品名 | 内容 | Cat. no. |
|--|---|----------|
| Allprotect Tissue Reagent (100 ml) | For stabilization of RNA, DNA, & protein in tissues | 76405 |
| AllPrep [®] DNA/RNA Mini Kit (50) | For simultaneous purification of DNA and RNA | 80204 |
| RNAlater [®] RNA Stabilization Reagent (250 ml) | For stabilization of RNA in tissues | 76106 |
| RNeasy Protect Mini Kit (50) | For stabilization of RNA in tissues and RNA purification | 74124 |
| RNAprotect [®] Cell Reagent (250 ml) | For stabilization of RNA in cells | 76526 |
| RNAprotect Animal Blood Tubes (50 x 100 µl) | For collection of 100 µl animal blood with RNA stabilization | 76544 |
| RNeasy Protect Animal Blood Kit (50) | For purification of RNA from blood collected in RNAprotect Animal Blood Tubes | 73224 |
| miRNeasy Protect Animal Blood Kit (50) | For purification of RNA, including miRNA, from blood collected in RNAprotect Animal Blood Tubes | 217304 |

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては、各 QIAGEN 製品の英語版 Handbook あるいは User Manual をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

"RNAlater[®]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

Trademarks: QIAGEN[®], QIAcube[™], QIAxcel[™], QIAzol[™], AllPrep[®], RNAprotect[®], RNeasy[®], Rotor-Gene[™], TissueRuptor[™] (QIAGEN Group); SYBR[®] (Molecular Probes, Inc.); Roche[®], LightCycler[®], TaqMan[®] (Roche Group); ABI[™], Applied Biosystems[™], ROX[™], ViiA[®], StepOnePlus[™] (Applied Biosystems); Eppendorf[®], Mastercycler[®] (Eppendorf AG); Stratagene[®] (Stratagene); Bio-Rad[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Fluidigm[™] (Fluidigm Corp.); Agilent[®] (Agilent Technologies, Inc.); Excel[®] (Microsoft Corporation); Actos[®] (Takeda Pharmaceutical Company Limited); Avandia[®] (GlaxoSmithKline); Rezulin[®] (Parke-Davis Pharmaceuticals, Ltd.).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。© 2011 QIAGEN, all rights reserved.

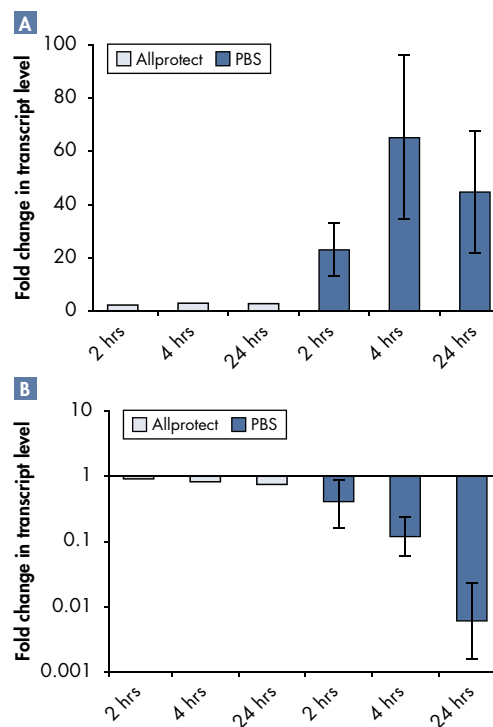






図 17. 効率的な RNA 安定化
ラット組織を Allprotect Reagent あるいは PBS 中に 25°C、2～24 時間保存した後、リアルタイム RT-PCR 解析を行なった。A ラット肺組織の c-fos 発現を解析した。B ラット腸組織の Madh7 発現を解析した。液体窒素中で安定化した組織の転写レベルに対して相対的な転写レベルを計算した。転写レベルの変化は Allprotect Reagent により回避された。

| 研究分野 | アポトーシス  | バイオマーカー  | がん  | 細胞周期  |
|--|---|---|---|---|
| RT² Profiler PCR Array 製品リスト カタログ番号に関しては 2 ページまたは ウェブサイトをご覧ください： www.SABiosciences.com/ArrayList.php | Apoptosis | Alzheimer's Disease | Angiogenesis | Apoptosis |
| | Autophagy | Angiogenesis | Apoptosis | Autophagy |
| | Cancer PathwayFinder | Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling | Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling | Cancer PathwayFinder |
| | Cell Cycle | Cancer PathwayFinder | Cancer Drug Resistance and Metabolism | Cell Cycle |
| | DNA Damage Signaling Pathway | Cell Surface Markers | Cancer PathwayFinder | DNA Damage Signaling Pathway |
| | DNA Repair | Dendritic and Antigen Presenting Cell | Cell Cycle | DNA Repair |
| | Endothelial Cell Biology | Epigenetic Chromatin Modification Enzymes | DNA Damage Signaling Pathway | Epithelial to senchymal Transition (EMT) |
| | Heat Shock Proteins | Epigenetic Chromatin Remodeling Factors | EGF/PDGF Signaling Pathway | MAP Kinase Signaling Pathway |
| | NFκB Signaling Pathway | Epithelial to esenchymal Transition (EMT) | Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) | mTOR Signaling |
| | Oxidative Stress and Antioxidant Defense | Extracellular Matrix and Adhesion Molecules | MAP Kinase Signaling Pathway | Neurogenesis and Neural Stem Cell |
| | p53 Signaling Pathway | Glucose Metabolism | p53 Signaling Pathway | NFκB Signaling Pathway |
| | PI3K-AKT Signaling Pathway | Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis | PI3K-AKT Signaling Pathway | p53 Signaling Pathway |
| | Stress and Toxicity PathwayFinder | Homeobox (HOX) Genes | Protein Phosphatases | PI3K-AKT Signaling Pathway |
| | TNF Ligand and Receptor | Mesenchymal Stem Cell | TGFβ BMP Signaling Pathway | Protein Phosphatases |
| | Tumor Suppressor Genes | Stem Cell | Tumor Metastasis | Signal Transduction PathwayFinder |
| | Ubiquitination Pathway | T-cell and B-cell Activation | Tumor Suppressor Genes | Transcription Factors |
| Unfolded Protein Response | Th1-Th2-Th3 | WNT Signaling Pathway | Ubiquitination Pathway | |

無料 RT² Profiler PCR Array データ解析ツールに関しては 10 ページ、またはウェブサイトをご覧ください：
<http://sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>

| 炎症  | 細胞外マトリクス ／ 接着  | 神経科学  | シグナル伝達  | 幹細胞  | 毒物学／ 薬物体内動態  |
|--|--|---|---|--|---|
| Chemokines & Receptors | Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors | Alzheimer's Disease | cAMP/Ca ²⁺ Signaling PathwayFinder | Adipogenesis | Cancer Drug Resistance and Metabolism |
| Common Cytokine | Atherosclerosis | Apoptosis | EGF/PDGF Signaling Pathway | Dendritic and Antigen Presenting Cell | Cancer PathwayFinder |
| Inflammasomes | Chemokines and Receptors | Autophagy | G Protein Coupled Receptors | Embryonic Stem Cells | Cardiotoxicity |
| Inflammatory Cytokines and Receptors | Common Cytokine | Drug Transporters | GPCR Signaling PathwayFinder | Hedgehog Signaling Pathway | Cell Cycle |
| Inflammatory Response and Autoimmunity | Embryonic Stem Cells | Embryonic Stem Cells | Heat Shock Proteins | Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis | DNA Damage Signaling Pathway |
| Interferon α , β Response | Endothelial Cell Biology | GPCR Signaling PathwayFinder | Hedgehog Signaling Pathway | Homeobox (HOX) Genes | Drug Metabolism |
| Interferon and Receptor | Extracellular Matrix and Adhesion Molecules | Heat Shock Proteins | Insulin Signaling Pathway | Lipoprotein Signaling and Cholesterol Metabolism | Drug Metabolism: Phase I Enzymes |
| JAK/STAT Signaling Pathway | Glycosylation | Hedgehog Signaling Pathway | JAK/STAT Signaling Pathway | Mesenchymal Stem Cell | Drug Metabolism: Phase II Enzymes |
| NF κ B Signaling Pathway | MAP Kinase Signaling Pathway | Huntington's Disease | MAP Kinase Signaling Pathway | Neurogenesis and Neural Stem Cell | Drug Transporters |
| T Cell Anergy & Immune Tolerance | Mesenchymal Stem Cell | Hypoxia Signaling Pathway | mTOR Signaling | Neurotrophin & Receptors | GPCR Signaling PathwayFinder |
| T-cell and B-cell Activation | NF κ B Signaling Pathway | Mesenchymal Stem Cell | NF κ B Signaling Pathway | Notch Signaling Pathway | Hepatotoxicology |
| TGF β BMP Signaling Pathway | Osteogenesis | Neurogenesis and Neural Stem Cell | Nuclear Receptors and Coregulators | Osteogenesis | Lipoprotein Signaling & Cholesterol Metabolism |
| Th17 for Autoimmunity and Inflammation | TGF β BMP Signaling Pathway | Neuroscience Ion Channels and Transporters | PI3K-AKT Signaling Pathway | Stem Cell Signaling | Mitochondria |
| Th1-Th2-Th3 | TNF Ligand and Receptor | Neurotransmitter Receptors and Regulators | Signal Transduction PathwayFinder | T-cell and B-cell Activation | Molecular Toxicology 384HT |
| TNF Ligand and Receptor | Tumor Metastasis | Neurotrophin and Receptors | TGF β BMP Signaling Pathway | Terminal Differentiation Marker | Nephrotoxicity |
| Toll-Like Receptor Signaling Pathway | VEGF Signaling | Nitric Oxide Signaling Pathway | Transcription Factors | TGF β BMP Signaling Pathway | Oxidative Stress and Antioxidant Defense |
| Tumor Necrosis Factor (TNF) Ligand and Receptor | Wound Healing | Notch Signaling Pathway | WNT Signaling Pathway | WNT Signaling Pathway | Stress and Toxicity PathwayFinder |

www.SABiosciences.com

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

