

1. Comparative C_T法 (C_T法) による相対発現定量

ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systemでは、Comparative C_T法 (C_T法)を用いた相対発現定量の解析が行えます。Comparative C_T法は、ターゲット遺伝子とコントロール遺伝子の増幅効率がほぼ等しいことを前提に、キャリブレーターサンプルに対する相対量として

$$2^{-C_T}$$

が成り立つことを利用する定量手法です。Comparative C_T法に関する詳細はABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification of Gene Expression (P/N 4303859)をご参照下さい。

・内在性コントロール (Endogenous Control)

相対発現定量では、テンプレート量及びRT効率の補正のために、ターゲット遺伝子の他に、内在性コントロール遺伝子の定量を行います。コントロール遺伝子は18s rRNA、 β -actin、GAPDHなどが用いられますが、対象の実験系で発現が変動しない遺伝子を用いることが必要です。

・キャリブレーターサンプル

Comparative C_T法による解析では、基準になるサンプルをキャリブレーターとして設定することで、そのサンプルに対する相対値の定量を行います。タイムコースの実験では0時間サンプルもしくは刺激前サンプルなど、また組織特異性の実験では比較対照にしたい組織由来のサンプルをキャリブレーターサンプルに設定します。

・レプリケート

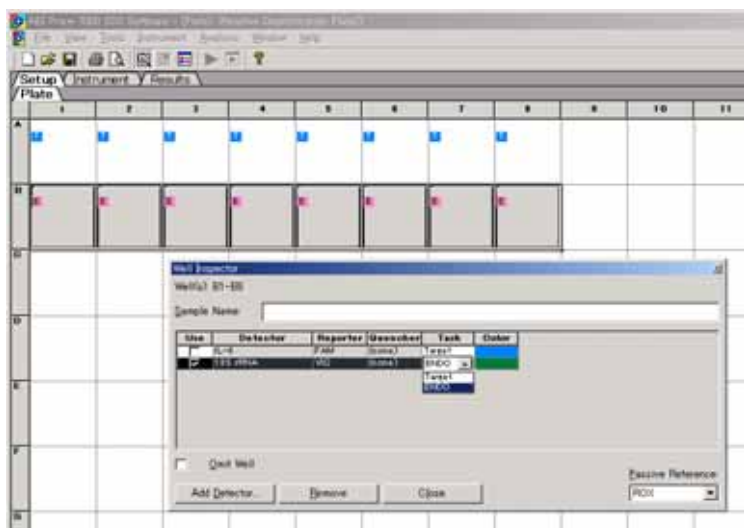
統計学上精度の高い定量結果を得るために、複数のレプリケートを設定することを推奨します。

・棄却検定による解析対象ウェルからの自動除去

SDSソフトウェアの機能で、レプリケート数を3以上回収した場合に、スミルノフ-グラブスの棄却検定アルゴリズムに基づき、シングルウェルではC_T値、マルチプレックスランでは C_T値が外れている場合に、自動的に解析対象から外します。解析の設定で棄却検定を用いるかどうかを設定します。

1-1. プレートドキュメントの新規作成 ~ ラン

1. File-New を選択するか、ツールバーの New のマークをクリックします。
2. Assay, container, template の各ドロップダウンメニューから適切なものを選択します。
Assay: Relative Quantification (ddCt) Plate
Container: 96-well Clear
Template: 新たに作成するときには Blank Template、ひな型ファイルを使用するときは Browse ボタンをクリックしてフォルダ中のひな型ファイルを選択
3. OKを選択すると新規のプレートドキュメントが開きます。
4. DetectorのTask設定として、Target(ターゲット遺伝子)及びENDO(内在性コントロール遺伝子)の2種類のいずれかに設定します。その他の設定 ~ ランについてはABI PRISM 7000 Sequence Detection System 簡易操作ガイドの2章をご参照下さい。

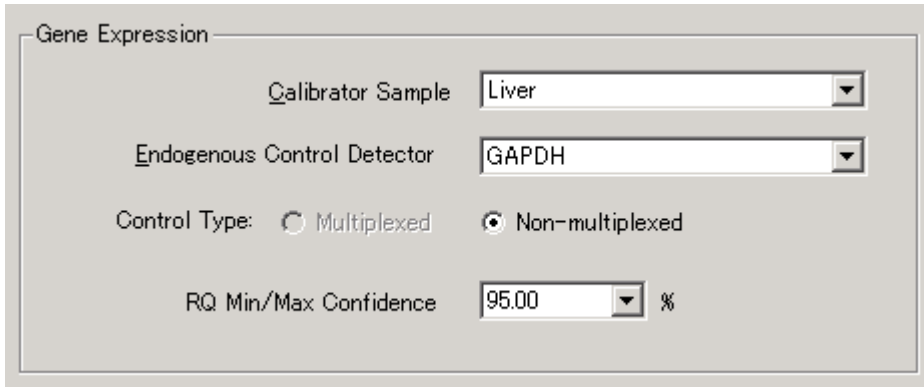



1-2. SDS ファイルの複数プレート解析 (10 プレート以下の小規模での解析)

SDS1.1RQ では複数の SDS ファイルをマルチブルドキュメント(.sdm)として統合し、解析を設定して相対発現解析を行うことが可能です

1. File-new を選択します。
2. New documentのAssayからRelative Quantification (ddC_T) Studyを選択します。
3. OK をクリックします。
4. Add Plateをクリックし、フォルダからRelative Quantificationラン済みのプレートを選択します。そしてOpenをクリックするとRelative Quantification (ddC_T) Studyのドキュメントに選択したプレートが登録されます。
5. Analysis-Analysis Settingsを選択し、解析の設定を行います(ベースラインサイクル及びC_T値の設定に関しては、簡易操作ガイド 2-41 ページデータ解析をご参照下さい)。

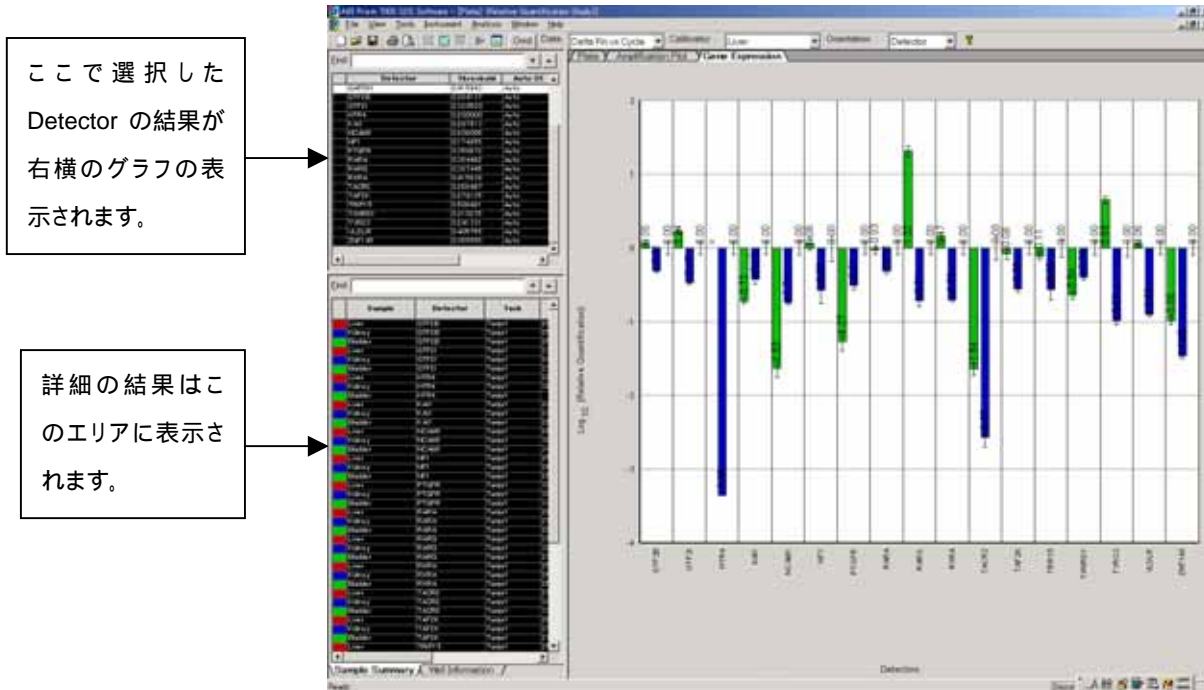
6. キャリブレーターサンプルの指定、コントロール遺伝子の Detector 選択及び相対定量における信頼水準の設定を行います。



7. OK をクリックし設定を終了後、Analysis-Analyze もしくは  ショートカットキーをクリックして解析を行います。

8. 解析結果の表示

C_T 法による解析結果が以下のように表示されます。横軸にDetectorごと、縦軸にキャリブレーターに対する全サンプルの相対量のLogで表示されます。



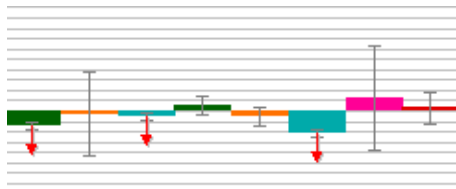
結果の表示は以下のとおりです。

相対発現量 + エラーバーによる表示



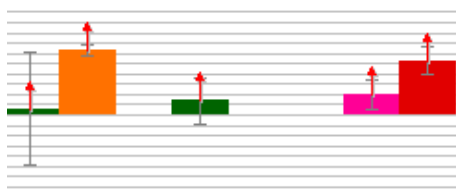
キャリブレーターサンプル及びテストサンプルのターゲット遺伝子及びコントロール遺伝子の全ての有効な C_T 値が算出されている(設定した C_T 値の最大値より小さい)場合、相対発現量 + エラーバー(信頼水準より算出した相対量のとりうる最大/最小値の範囲)で表示されます。

相対発現量の最大値 + による表示



キャリブレーターサンプルのターゲット遺伝子及びコントロール遺伝子は有効な C_T 値が算出され、かつテストサンプルのターゲット遺伝子の C_T が算出されていない場合、とりうる最大レベルの相対発現量 + で表示されます。このことは、テストサンプル中に正確な相対定量を行うために必要なターゲットcDNAが含まれていないことを示しており、テストサンプルのテンプレート量を増やして再実験する等が必要になります。

相対発現量の最小値 + による表示



テストサンプルのターゲット遺伝子及びコントロール遺伝子は有効な C_T 値が算出され、かつキャリブレーターサンプルのターゲット遺伝子の C_T が算出されていない場合、とりうる最小レベルの相対発現量 + で表示されます。このことは、キャリブレーターサンプル中に正確な相対定量を行うために必要なターゲットcDNAが含まれていないことを示しており、キャリブレーターサンプルを変更して再解析を行うか、キャリブレーターサンプルのテンプレート量を増やして再実験する等が必要になります。

その他の結果の場合には、相対量の表示は行われません。

10. 結果表示とエクスポート

下図のような表で結果一覧が表示されますので、File-Export で出力し解析に使用します。また解析終了後は、File-Save As でまとめて保存(.sdm)することができます。

| Position | Sample | Detector | Task | Ct | ΔCt | Avg ΔCt | ΔCt SD | ΔΔCt | RQ | RQ min | RQ max |
|----------|----------|----------|--------|--------------|-----|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Demo3... | Sample 9 | X | Target | 25.677488 | | 3.6904735565 | 3.7496639E-1 | -2.7475357E-2 | 3.0192270279 | 4.9478814E-1 | 2.0995321274 |
| Demo3... | Sample 9 | F | Target | 22.59096 | | -8.361454E-1 | 2.753458E-1 | -2.732769E0 | 6.6473026276 | 2.1317436695 | 2.07279301E1 |
| Demo3... | Sample 9 | F | Target | 23.590313 | | -8.361454E-1 | 2.753458E-1 | -2.732769E0 | 6.6473026276 | 2.1317436695 | 2.07279301E1 |
| Demo3... | Sample 9 | U | Target | 23.962523 | | -3.0075073E-1 | 6.8807222E-2 | -2.0133781E0 | 4.0372648239 | 3.0385193825 | 5.3642921448 |
| Demo3... | Sample 9 | U | Target | 23.963526 | | -3.0075073E-1 | 6.8807222E-2 | -2.0133781E0 | 4.0372648239 | 3.0385193825 | 5.3642921448 |
| Demo3... | Sample 9 | A | Target | 32.50284 | | 9.0029773712 | 4.9606094E-1 | -2.9452448E0 | 7.70206213 | 9.9261683E-1 | 5.97630043E1 |
| Demo3... | Sample 9 | A | Target | 34.318867 | | 9.0029773712 | 4.9606094E-1 | -2.9452448E0 | 7.70206213 | 9.9261683E-1 | 5.97630043E1 |
| Demo3... | Sample 9 | B | Target | Undetermined | | 3.08115492E1 | 4.1421052E-2 | 8.8904667E-1 | 5.3997082E-1 | 4.5506132E-1 | 6.4072347E-1 |
| Demo3... | Sample 9 | B | Target | Undetermined | | 3.08115492E1 | 4.1421052E-2 | 8.8904667E-1 | 5.3997082E-1 | 4.5506132E-1 | 6.4072347E-1 |
| Demo3... | Sample 9 | H | Target | 29.128298 | | 4.6121369408 | 3.217765E-1 | -1.916153E0 | 3.7741532326 | 2.2823328972 | 6.241083622 |
| Demo3... | Sample 9 | H | Target | 28.756552 | | 4.6121369408 | 3.217765E-1 | -1.916153E0 | 3.7741532326 | 2.2823328972 | 6.241083622 |
| Demo3... | Sample 9 | V | Target | 26.1715 | | 2.0112476349 | 7.5636007E-2 | -8.9634705E-1 | 3.8613469601 | 3.3619238138 | 2.5439107418 |
| Demo3... | Sample 9 | V | Target | 26.04332 | | 2.0112476349 | 7.5636007E-2 | -8.9634705E-1 | 3.8613469601 | 3.3619238138 | 2.5439107418 |