

Code No. 3790/3791/3792

研究用

TaKaRa

Human Housekeeping Gene Primer Set
(Code No. 3790)

Mouse Housekeeping Gene Primer Set
(Code No. 3791)

Rat Housekeeping Gene Primer Set
(Code No. 3792)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 管家基因相关信息表	6
● 参考文献	7
● 关联产品	8

使用 Real Time RT-PCR 方法进行基因相对表达量分析时，经常使用管家基因进行 mRNA 的校正。为了得到正确的定量结果，选择实验体系中稳定表达的管家基因非常重要。

本制品是为使用嵌合法进行 Real Time RT-PCR 解析实验时，提供一系列管家基因检出用的 Primer Set。可以根据需要，选择适合各实验体系的参照基因。

另外，使用管家基因为参照进行实验体系中遗传基因表达分析时，**本公司提供用于基因表达定量分析的引物探针设计合成服务和引物探针设计合成验证一条龙服务。**

本公司以美国 NCBI Data Base 上登录的 Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken、Arabidopsis、Oryza 的 RefSeq 为对象，已经设计完成了各基因用于定量表达分析的 Real Time RT-PCR 用高特异性 Primer Set，可省略 PCR 反应条件优化实验。

注) 本公司只对在本公司合成的引物/探针提供免费设计服务，恕不受理不在本公司合成的引物/探针的设计委托!

● 制品内容

Human Housekeeping Gene Primer Set (Code No. 3790)

以下 15 种 primer 中含有一对 (各 10 μ M)。(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 (Code No. 3791)

以下 13 种 primer 中含有一对 (各 10 μ M)。(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 (Code No. 3792)

以下 12 种 primer 中含有一对 (各 10 μ M)。(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 |

注: 各基因的信息 (GenBank Accession、Entrez Gene、Symbol)、Perfect Real Time Support System 的 Primer Set ID 及扩增片段大小信息, 详见“管家基因相关信息表”。

【制品以外所需试剂和仪器】

· Real Time RT-PCR 反应试剂:

PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)

One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B) 等。

· 0.1ml, 0.2 ml 及 1.5 ml 的 microtube

· 微量移液枪及枪头

· 热循环仪 (反转录用)

· Real Time PCR 仪:

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980)

Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖) 等

● 保存: -20°C。

*: 自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

● 操作方法

本制品的使用, 请参照使用的 Real Time RT-PCR 试剂和定量仪器的说明书要求进行操作。

<反应例>

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A)、TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A) 进行两步法 Real Time RT-PCR (使用 Thermal Cycler Dice Real Time System II: 终卖)。

反转录反应

① 按下列组份配制 RT 反应液 (反应液请在冰上配制)。

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript Buffer (Real Time 用)	2 μl	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl	25 pmol
Total RNA (250 ng/μl)	2 μl	500 ng
RNase Free dH ₂ O	4.5 μl	
Total	10 μl	

*: 如有需要, 反应液用量也可按比例扩大 (或缩小)。

② 反转录反应条件如下:

37°C 15 min (反转录反应)

85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

4°C

Real Time PCR 反应。

- ③ 反转录中的 cDNA 溶液与 TB Green *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A) 预混后配制反应液。

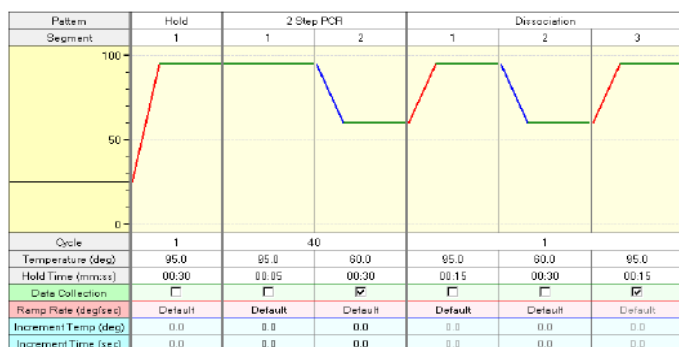
试剂	1 个反应量	15 个反应量*2
TB Green <i>Premix Ex Taq II</i> (2×)	12.5 μl	187.5 μl
cDNA 溶液 (50 ng/μl) *1	0.5 μl	7.5 μl
灭菌水	11 μl	165 μl
Total	24 μl	360 μl

*1: Total RNA 量的相当浓度是 (50 ng/μl)。

*2: 根据使用的引物量调整反应量。

- ④ 在 Real Time PCR 反应用 Plate 各孔内分注 24 μl 的上述混合液。
 ⑤ 加入 Primer: 向上述 Real Time PCR 反应用 Plate 各孔内加入 1 μl Housekeeping Gene Primer Set。
 ⑥ 进行 Real Time PCR 反应。

将配制好的 Real Time PCR 反应 Plate 放置于定量 PCR 仪中进行 Real Time PCR 反应。



Stage 1: 预变性

Repeat: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Stage 3: 融解曲线分析

- ⑦ 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，然后进行相对定量解析。

● 实验例

Rat 脂肪细胞基因表达量的解析实验。

随着 Rat 白色脂肪细胞以及褐色脂肪细胞的分化，基因表达量会随之变化，进行表达量的解析。利用 Rat Housekeeping Gene Primer Set 进行各样品间稳定表达的管家基因筛选，然后使用筛选的管家基因作为参照，通过相对定量对目的基因进行表达量分析。

1. 管家基因的选定

【方法】

使用 4 种 Rat 脂肪细胞提取的 Total RNA 作为模板进行反转录反应，通过 Real Time PCR 方法对 12 种管家基因进行测定。

<测定基因>

大鼠 12 种管家基因 (使用 Rat Housekeeping Gene Primer Set)。

<样品>

A001: 白色脂肪细胞 (分化前) A002: 褐色脂肪细胞 (分化前)

A003: 白色脂肪细胞 (分化后) A004: 褐色脂肪细胞 (分化后)

<反转录反应>

试剂: PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time)

模板: Total RNA 各 2 μg

反应体系: 40 μ l

<Real Time PCR 反应>

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

模板: cDNA 各 50 ng (Total RNA 相当量)

反应体系: 25 μ l

<Real Time PCR 装置>

Thermal Cycler Dice Real Time System

* 反转录反应、PCR 反应条件按照各制品说明书进行设定。

【结果】

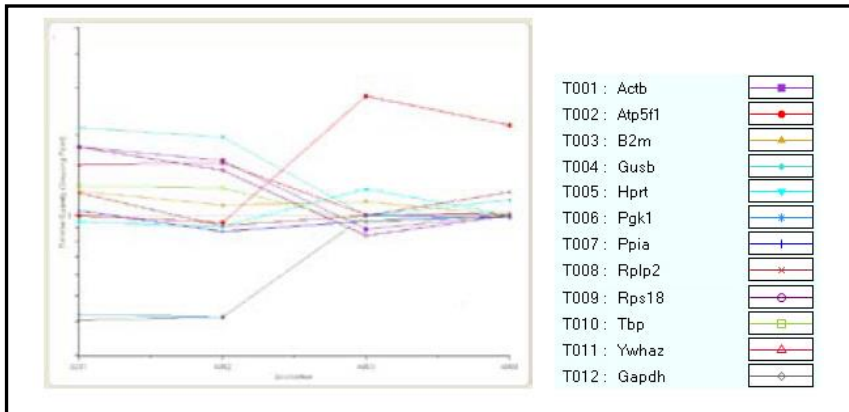
Real Time PCR 的结果使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算出相对值, 其值使用 geNorm*对基因相对量进行分析。

从结果中选择 3 种 (Actb、Gusb、Rps18) 表达量更稳定的基因作为参照基因。

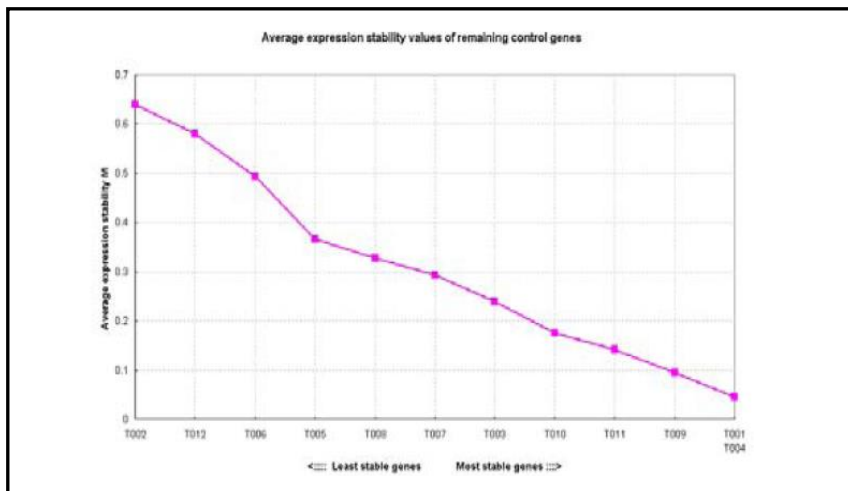
* 根据 Real Time PCR 定量结果选择表达量稳定的管家基因的软件。

(参照 URL: <https://genorm.cmgg.be/>)

12 种管家基因的概况。



geNorm 分析结果。



2. 基因表达分析

【方法】

使用 4 种 Rat 脂肪细胞提取的 Total RNA 作为模板进行反转录反应, 通过 Real Time PCR 方法对 3 种管家基因及 5 种目的基因进行定量检测。

<测定基因>

大鼠的管家基因: Actb、Gusb、Rps18

定量的目的基因: Ucp1、Ucp2、Ucp3、Lep、Adrb3

*: 均使用 Perfect Real Time Support System 的引物。

<样品>

与“1.管家基因的选定”样品一样。

<反转录反应>

与“1.管家基因的选定”中的方法一样。

<Real Time PCR 反应>

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

标准品: NTC 及褐色细胞 (分化后) 的 cDNA 6.4 pg~100 ng (Total RNA 相当量)

未知样品: cDNA 各 50 ng (Total RNA 相当量)

反应液量: 25 μ l

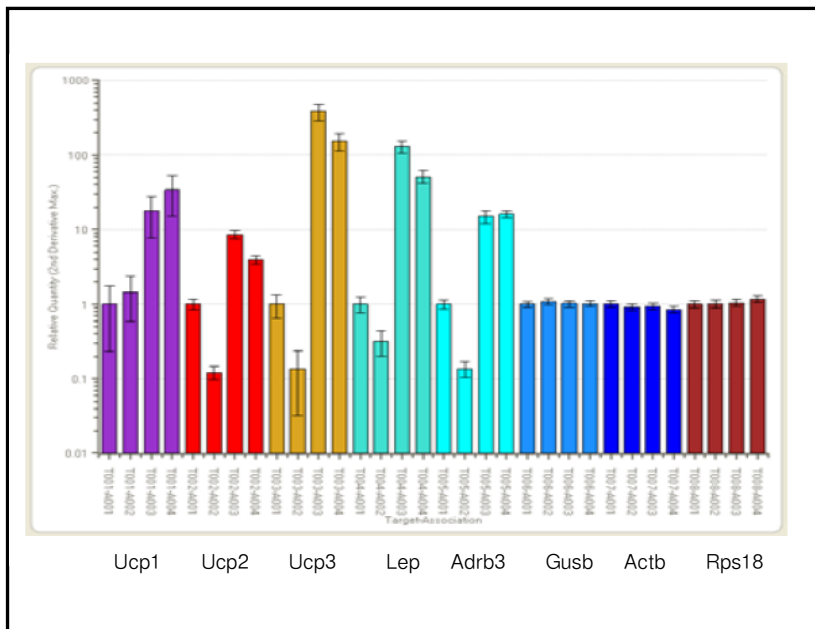
<Real Time PCR 装置>

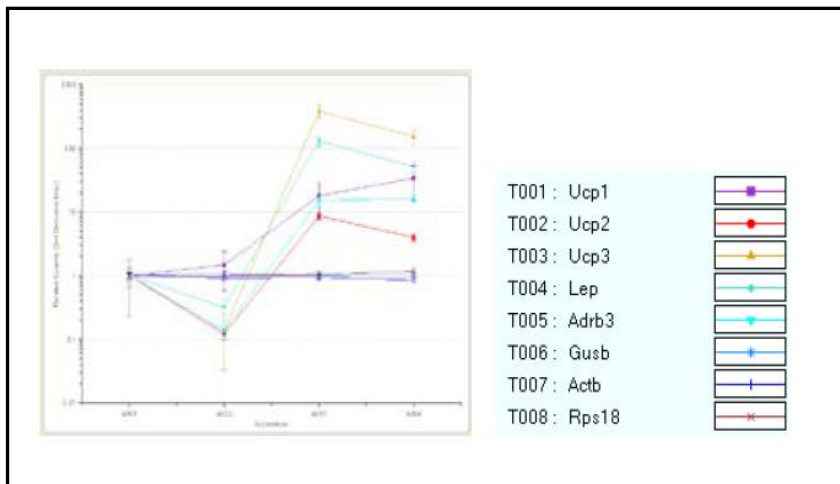
Thermal Cycler Dice Real Time System

* 反转录反应、PCR 反应的条件按照各制品说明书进行设定。

【结果】

Real Time PCR 的结果使用标准曲线方法进行相对表达量解析, 白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞分化后目的基因表达量都提高。





● 管家基因相关信息表

Human Housekeeping Gene Primer Set (Code No. 3790)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	扩增片段大小
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 (Code No. 3791)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	扩增片段大小
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 (Code No. 3792)

	Primer_set_ID	Genbank Acc.	Entrez Gene	Symbol	扩增片段大小
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

● 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, Speleman F. *Genome Biol* . 2002 Jun 18; **3** (7) : RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

● 关联产品

· Real Time RT-PCR 试剂:

- PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)
- PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B)
- PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A/B)
- TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
- TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
- TB Green® Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)
- TB Green® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (Code No. RR091A)
- One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)
- One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/B)
- One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/B)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Premix Ex Taq, Thermal Cycler Dice, DimerEraser, and PrimeScript are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202212Da