ΔΔCt法によるqPCRの評価

ne26
2021年11月22日 09:36

ΔΔCt法でqPCR結果を評価する方法についてです。
流れとしては、

①測りたい遺伝子(Target gene)と内在性コントロール遺伝子(Endogeneous control gene)のCt値を用意する。

② (Target geneのCt値)-(Endogeneous control geneのCt値)をして、ΔCt値を出す。

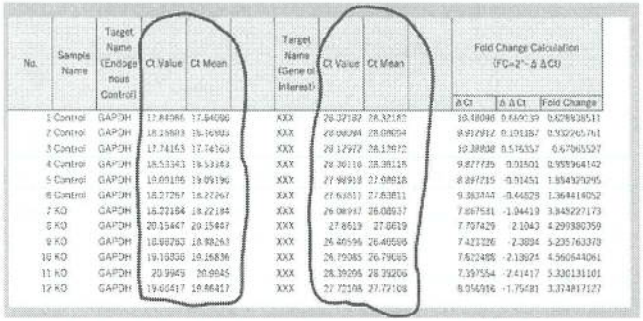
③Controlグループの ΔCt値の平均(Average ΔCt of control)を出す。

④(Controlグループおよび Targetグループ)-(Average ΔCt of control)をして、ΔΔCt値を出す。

⑤(2^-ΔΔCt値)をしてFold changeを出す。

という感じです。

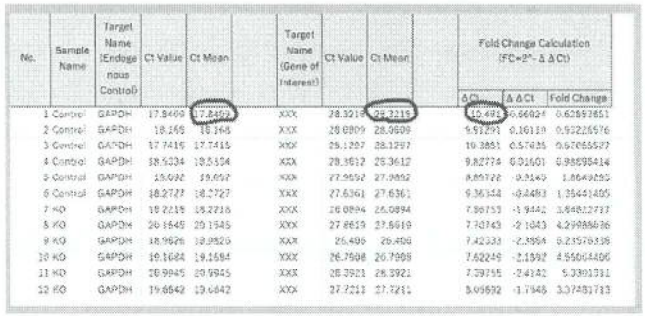
①測りたい遺伝子(Target gene)と内在性コントロール遺伝子(Endogeneous control gene)のCt値を用意する。



No.	Sample Name	Target Name (Endogenous Control)	Ct Value	Ct Mean	Target Name (Gene of Interest)	Ct Value	Ct Mean	Fold Change Calculation (FC=2^- Δ ΔCt)		
								ΔCt	Δ ΔCt	Fold Change
1	Control	GAPDH	17.84086	17.84086	XXX	28.32182	28.32182	10.48096	0.669039	0.628938511
2	Control	GAPDH	18.15803	18.15803	XXX	28.08094	28.08094	9.922932	0.101187	0.932765761
3	Control	GAPDH	17.74163	17.74163	XXX	28.12972	28.12972	10.38808	0.566357	0.67065527
4	Control	GAPDH	18.53343	18.53343	XXX	28.38118	28.38118	9.847735	0.01501	0.989964142
5	Control	GAPDH	19.09196	19.09196	XXX	27.98918	27.98918	8.897735	-0.91451	1.884920295
6	Control	GAPDH	18.27267	18.27267	XXX	27.63811	27.63811	9.363744	-0.44829	1.364414052
7	KO	GAPDH	18.27184	18.27184	XXX	26.08937	26.08937	7.867581	-1.94419	3.845227173
8	KO	GAPDH	20.15447	20.15447	XXX	27.8619	27.8619	7.707429	-2.1043	4.299380359
9	KO	GAPDH	18.98263	18.98263	XXX	26.40596	26.40596	7.423226	-2.3894	5.235763378
10	KO	GAPDH	19.16836	19.16836	XXX	26.79085	26.79085	7.622486	-2.13914	4.560644061
11	KO	GAPDH	20.9945	20.9945	XXX	28.39206	28.39206	7.397554	-2.41417	5.330131101
12	KO	GAPDH	19.66417	19.66417	XXX	27.77108	27.77108	8.014916	-1.75681	3.374817127

こんな感じでTarget gene(今回はXXX)と内在性コントロール(今回はGAPDH)のCt Meanを用意します。
(今回はduplicateとかしていないのでCt value=Ct meanです)

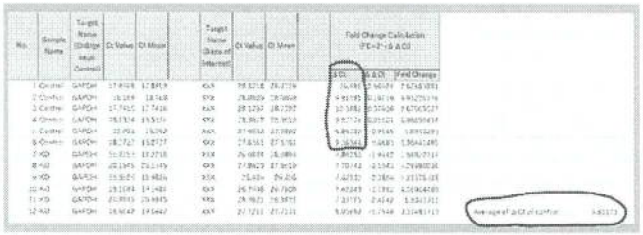
②(Target geneのCt値)-(Endogeneous control geneのCt値)をして、ΔCt値を出す。



No.	Sample Name	Target Name (Endogenous Control)	Ct Value	Ct Mean	Target Name (Gene of Interest)	Ct Value	Ct Mean	Fold Change Calculation (FC=2^- Δ ΔCt)		
								ΔCt	Δ ΔCt	Fold Change
1	Control	GAPDH	17.8409	17.8409	XXX	28.3218	28.3218	10.481	0.66024	0.628938511
2	Control	GAPDH	18.158	18.158	XXX	28.0809	28.0809	9.91291	0.10119	0.932765761
3	Control	GAPDH	17.7416	17.7416	XXX	28.1297	28.1297	10.3881	0.57435	0.67065527
4	Control	GAPDH	18.5334	18.5334	XXX	28.3812	28.3812	9.82774	0.01601	0.989694414
5	Control	GAPDH	19.092	19.092	XXX	27.9892	27.9892	8.89172	-0.9149	1.884920295
6	Control	GAPDH	18.2727	18.2727	XXX	27.6361	27.6361	9.36354	-0.4483	1.364414052
7	KO	GAPDH	18.2218	18.2218	XXX	26.0894	26.0894	7.86753	-1.9442	3.845227173
8	KO	GAPDH	20.1545	20.1545	XXX	27.8619	27.8619	7.70743	-2.1043	4.299380359
9	KO	GAPDH	18.9626	18.9626	XXX	26.406	26.406	7.42333	-2.3894	5.235763378
10	KO	GAPDH	19.1684	19.1684	XXX	26.7908	26.7908	7.62249	-2.1392	4.560644061
11	KO	GAPDH	20.9945	20.9945	XXX	28.3921	28.3921	7.39755	-2.4142	5.3301331
12	KO	GAPDH	19.6642	19.6642	XXX	27.7211	27.7211	8.09592	-1.7948	3.374817127

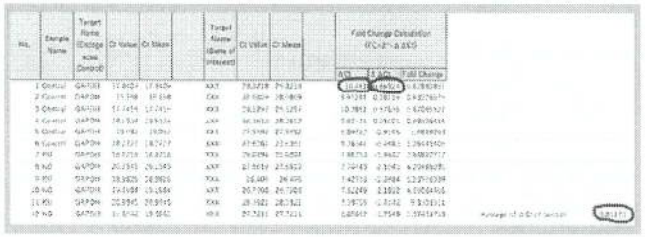
上の図でいうと、ΔCt(10.481)=XXXのCt mean(28.3218)-GAPDHのCt mean(17.8409)です。これを全サンプル分出します。

③Controlグループ のΔCt値の平均(Average ΔCt of control)を出す。



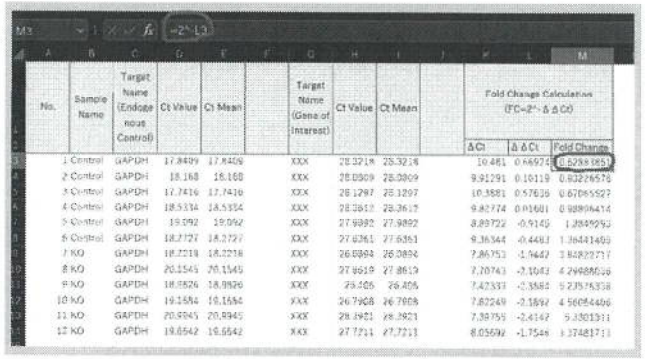
Average ΔCt of controlは上でいう、ControlのΔCtの平均です。

④(ControlグループおよびTargetグループ)-(Average ΔCt of control)をして、ΔΔCt値を出す。



ΔΔCt値は上でいう、ΔCt値(10.481)-Average ΔCt of control(9.81173)です。これを全サンプル分出します。

⑤(2^-ΔΔCt値)をしてFold changeを出す。

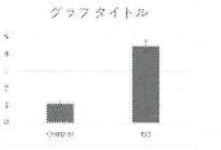


Fold changeはエクセルで=2^-(ΔΔCtのセル)したら出ます。

Fold Change Calculation (FC=2^-ΔΔCt)		
ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
10.481	0.66924	0.62883851
9.91291	0.10119	0.93226576
10.3881	0.57636	0.67065527
9.82774	0.01601	0.98896414
8.89722	-0.9145	1.8849293
9.36344	-0.4483	1.36441405
7.86753	-1.9442	3.84822717
7.70743	-2.1043	4.29988036
7.42333	-2.3884	5.23576338
7.62249	-2.1892	4.56064406
7.39755	-2.4142	5.3301311
8.05692	-1.7548	3.37481713

	Control	KO
Average	1.078344505	4.44158
SD	0.475399476	0.76741
SE	0.194079778	0.31329
ttest	3.85164E-06	

Average of ΔCt of control 9.81173



これで比較できるようになりました。