

QuantStudio 3 / QuantStudio 5

リアルタイムPCR システム

簡易操作ガイド

QuantStudio Design & Analysis Software v1.2

マニュアル番号 A29331JP Rev.B

For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Information in this document is subject to change without notice.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. TO THE FULLEST EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF, WHETHER OR NOT FORESEEABLE AND WHETHER OR NOT APPLIED BIOSYSTEMS IS ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES.

Limited Use Label License No. 358: Research Use Only

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial applications of any kind, including, without limitation, quality control and commercial services such as reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This Instrument is licensed for use under U.S. Patent No. 7,670,832, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc. No right is conveyed expressly by implication or by estoppel under any other patent claim.

TRADEMARKS

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan, Amperase, and AmpliTaq Gold are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

RealTime StatMiner is a trademark of Integromics SL.

Microsoft, Microsoft Vista, and Internet Explorer are trademarks of Microsoft Corporation.

Adobe, Acrobat, and Reader are trademarks of Adobe Systems, Incorporated.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All.

本ガイドはApplied Biosystems™ QuantStudio™ 3とQuantStudio™ 5リアルタイムPCRシステムの操作を行う際に必要となる部分のみを記載している簡易操作ガイドです。

詳細は装置付属の英文ユーザーガイドをご確認ください。また本ガイドには知的財産に関するいかなる情報も含んでおりません。知的財産に関する情報は英文ユーザーガイドに記載されておりますのでご参照ください。

目次

QuantStudio Design & Analysisソフトウェア簡易操作ガイド(I)	
Standard Curve ~検量線を用いた定量~ -----	5
Standard Curve使用フロー-----	6
新規ドキュメントの作成-----	7
ランの開始-----	18
反応プレートの準備-----	19
ランの終了-----	23
データ解析-----	24
データ出力-----	37
補足情報 VeriFlexの設定方法-----	39
QuantStudio Design & Analysisソフトウェア簡易操作ガイド(II)	
Relative Standard Curve ~検量線を用いた相対定量~ -----	40
ドキュメントの設定-----	40
Relative Standard Curve データ解析-----	43
QuantStudio Design & Analysisソフトウェア簡易操作ガイド(III)	
Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) ~検量線を用いない相対定量~ -----	46
ドキュメントの設定-----	46
Comparative C _T ($\Delta\Delta C_T$)データ解析-----	49
QuantStudio Design & Analysisソフトウェア簡易操作ガイド(IV)	
Genotyping ~対立遺伝子識別アッセイ~ -----	52
新規ドキュメントの作成-----	53
ランの開始-----	62
反応プレートの準備-----	63
ランの終了-----	67
タイピング結果の検証-----	68
データ出力-----	75

QuantStudio Design & Analysisソフトウェア 簡易操作ガイド(I)

Standard Curve ～検量線を用いた定量～

概要

QuantStudio 3 / QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムでは、検量線を用いた絶対定量を行うことができます。

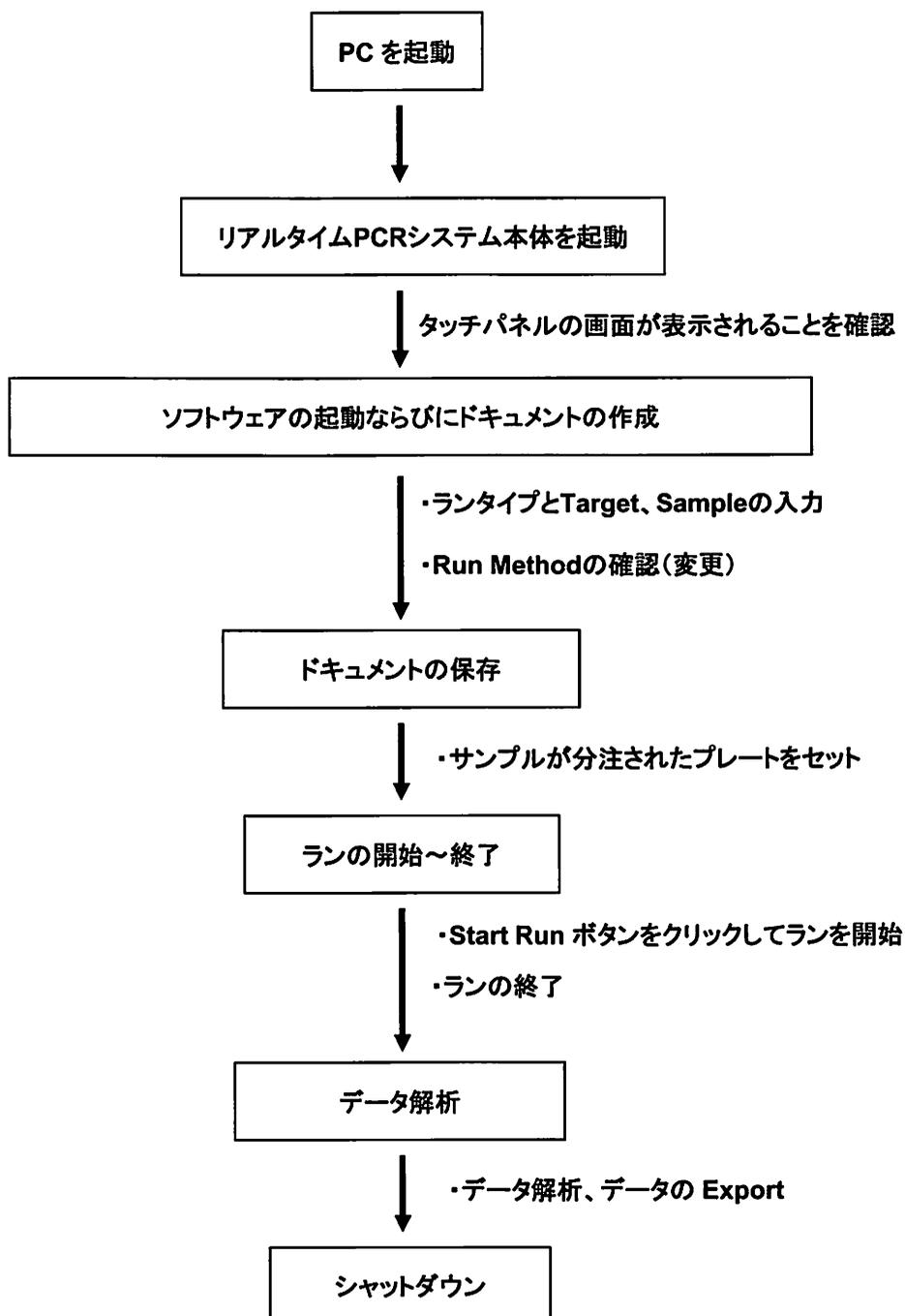
分子数が明確なサンプル(例:プラスミドや精製したPCR産物等)を用いて検量線を作成すると絶対定量を行うことができます。主に以下のアプリケーションに利用されています。

- ウィルスや微生物の定量
- 遺伝子組み換え食品の検出・定量

また、同一のサンプル内で複数遺伝子のmRNAの量比を定量する場合にも、絶対定量を行うことが必要です。

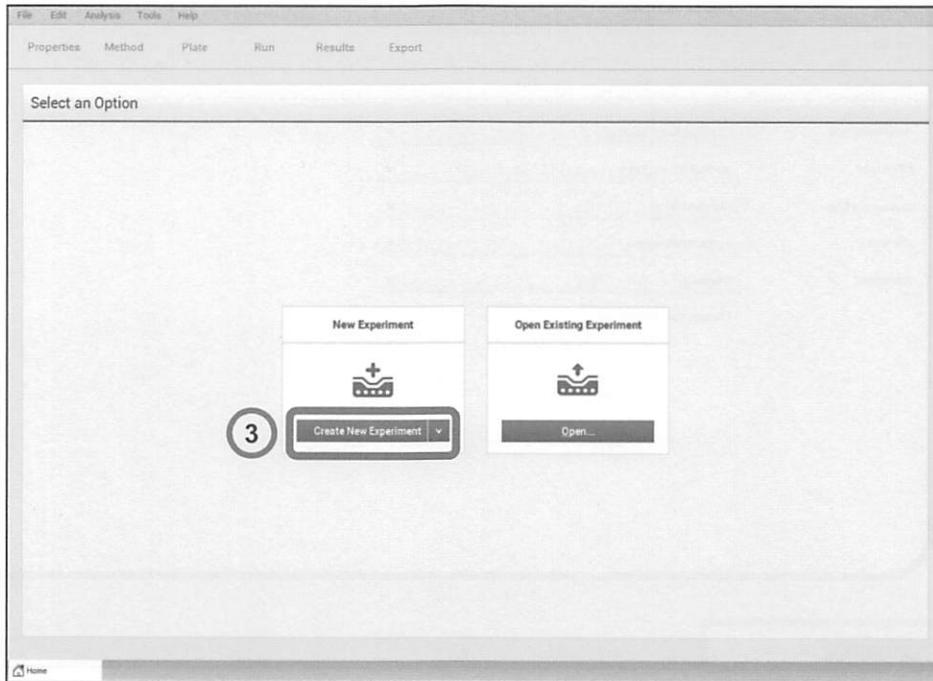
なお、分子数が不明確なサンプルからでも、増幅することが確実なサンプルを希釈することにより、相対定量のための検量線を作成することができます。各反応系毎に、相対的な定量値を算出することも可能です。

Standard Curve 使用フロー

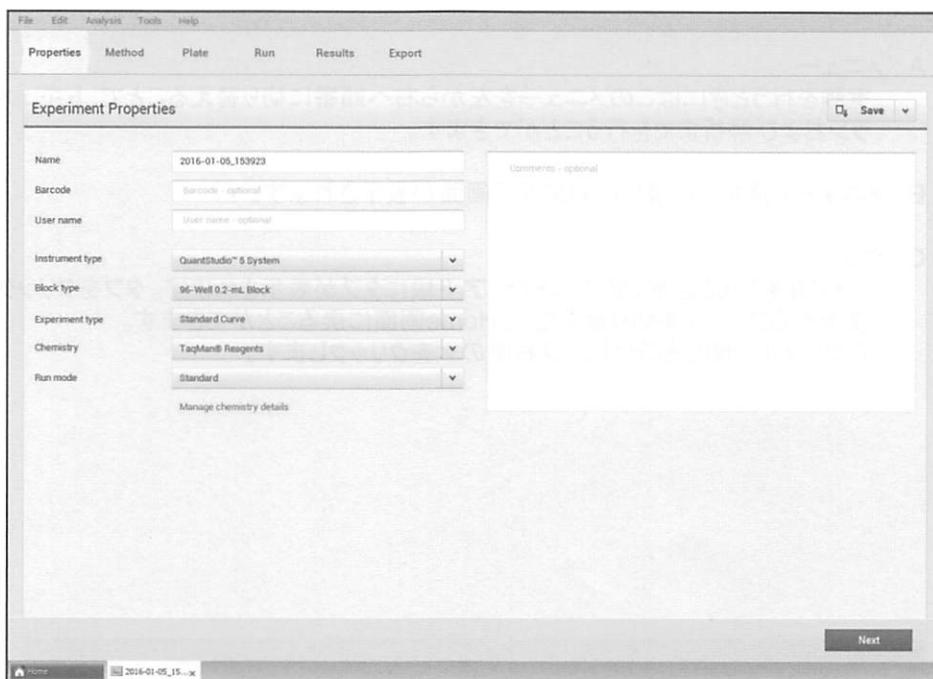


新規ドキュメントの作成

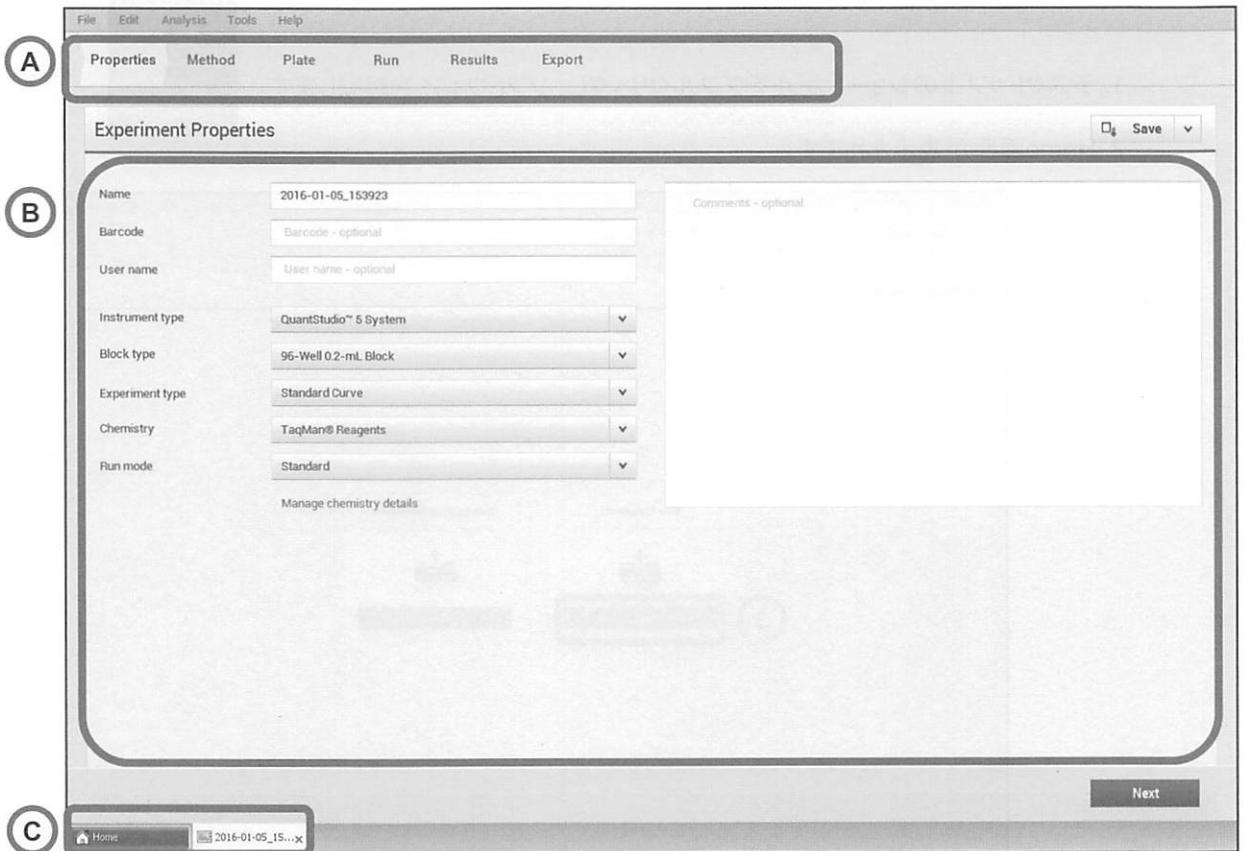
1. デスクトップ上のショートカットをダブルクリックし、ソフトウェア を起動します。
2. Home画面が表示されます。



3. Select an option内の**Create New Experiment**をクリックすると、新規ドキュメントが開きます。



ドキュメントについて



A: メニュー

実験を行うときにはこのメニューを左から右へ順番に切り替えることで、ドキュメントの設定、ランおよび解析までを行うことができます。

B: メニューで選択した項目に対応する画面が表示されます。

C: タブ

ファイルを開くと自動的にソフトウェア下段にタブが表示されます。タブをクリックすることで表示するファイルを切り替えたり、Home画面に戻ることができます。各ファイルを閉じる時にはタブ右側の×をクリックします。

ドキュメントの設定 : Properties

新規ドキュメントを作成するとProperties画面が表示されます。
この画面でファイル名や実験系の基本情報を入力します。

1. Name

自動的にドキュメント作成日時が入力されます。必要に応じて変更・追加します。
BarcodeとUser Nameは全て任意で入力してください。

2. Instrument type

ご利用の機器をプルダウンメニューから選択します。

3. Block type

ご利用の機器のブロックタイプをプルダウンメニューから選択します。

4. Experiment type

検量線を用いた定量実験を行うときには**Standard Curve**をプルダウンメニューから選択します。

注記: Standard Curve / Relative Standard Curve / Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)の各ドキュメントタイプはラン終了後に変更し、再解析することができます。

5. Chemistry

検出に用いる蛍光ケミストリを選択します。

TaqMan プローブを用いるときには**TaqMan Reagents**を、SYBR Greenを用いるときには**SYBR Green Reagents**を、両者が混在しているケースかその他の蛍光色素を用いるときには**Other**を選択します。

6. Run mode

ご利用いただく試薬にあわせて選択します。

Standard用試薬をご利用の場合は**Standard**を、Fast用試薬をご利用の際は**Fast**を選択します。

7. 入力が完了したら、Nextをクリックします。

Properties Method Plate Run Results Export

Experiment Properties Save

Name 1

Barcode

User name

Instrument type 2

Block type 3

Experiment type 4

Chemistry 5

Run mode 6

[Manage chemistry details](#)

7 Next

ドキュメントの設定 : Method

次に **Method**画面が表示されます。

Experiment Propertiesで選択した項目に合わせたサーマルサイクラー条件が自動的に表示されます。必要に応じて適宜変更します。

1. 反応ボリュームを入力します。ブロック毎の推奨ボリューム及び最大ボリュームは以下の通りです。

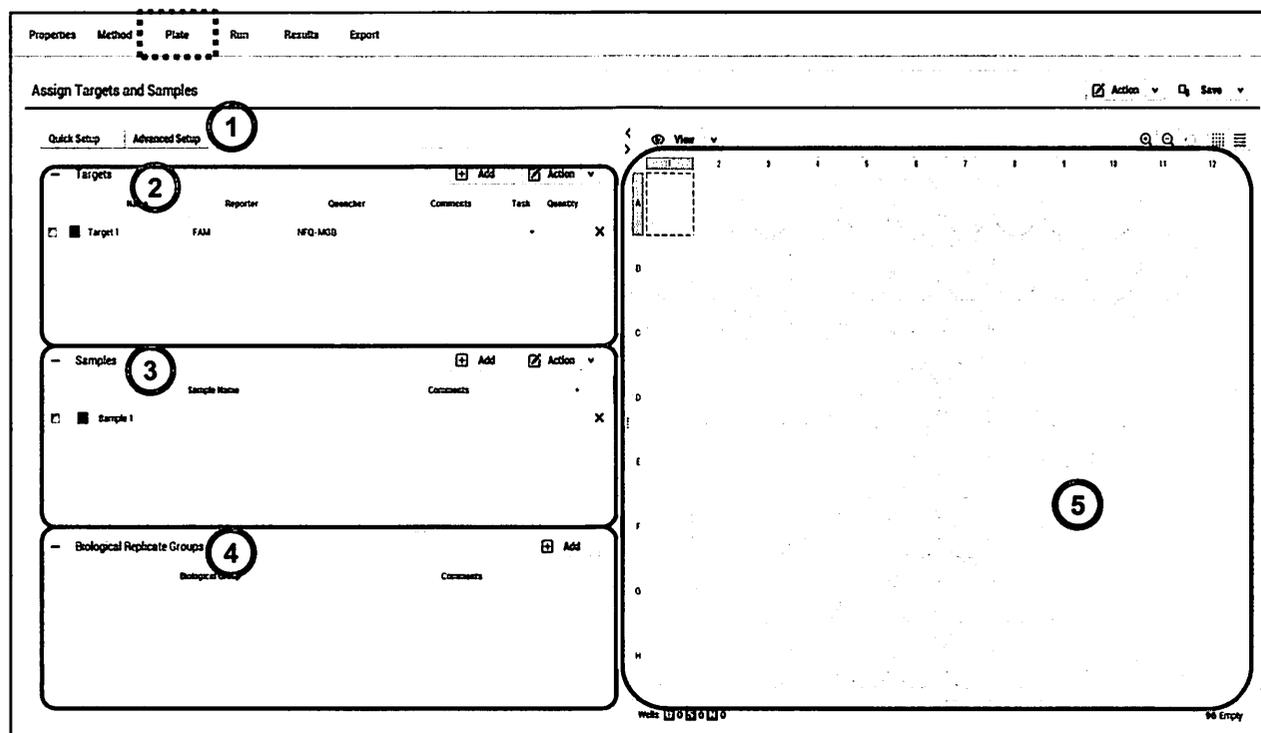
ブロックタイプ	推奨ボリューム	最大ボリューム
384ウェル	5-20 μ L	30 μ L
Standard 96ウェル	10-100 μ L	200 μ L
Fast 96ウェル	10-30 μ L	100 μ L

注記: 推奨ボリューム以上の値に設定すると、Fastモードの時のランプスピードが遅くなります。

2. 温度条件を確認します。各ステップにポインターを重ねた時に表示される+ボタンをクリックすることで、任意のプログラムを追加・削除することができます。
3.  のマークがアクティブになっているポイントで蛍光データを回収します。マークの上をクリックすることで、データ回収ポイントを設定することができます。
注記: データを取り込むために必要な時間は10秒以上です。
4. (オプション) Veriflex機能により、ブロック間で異なる温度を設定することができます。詳細は39ページを参照してください。
5. 入力が完了したら、Nextをクリックします。

The screenshot displays the 'Method' configuration interface. At the top, there are tabs for 'Properties', 'Method', 'Plate', 'Run', 'Results', and 'Export'. The 'Method' tab is active. Below the tabs, the 'Experiment Method' section shows 'Volume' set to 50 μ L and 'Cover' set to 105.0 $^{\circ}$ C. The main area is a thermal profile graph with 'Hold Stage' and 'PCR Stage' sections. The graph shows temperature ramps and holds for Step 1 and Step 2. A '1' is circled next to the volume input, a '2' is circled on the first PCR hold stage, and a '3' is circled on the second PCR hold stage. At the bottom, there are 'Previous' and 'Next' buttons, with a '5' circled next to the 'Next' button. A legend at the bottom indicates data collection and pause options.

ドキュメントの設定 : Plate



次に **Plate**画面が表示されます。

この画面では検出する遺伝子 (Target) 及び未知サンプル (Sample) の情報を入力します。

注記: Plate画面の設定はラン終了後にも入力・変更できます。

1. **Advanced Setup**タブを選択します。

2. Targetの設定をします (詳細はp12.参照)。

3. Sampleの設定をします (詳細はp13.参照)。

4. (オプション) Biological Replicate groupの設定 (詳細はp42参照)。

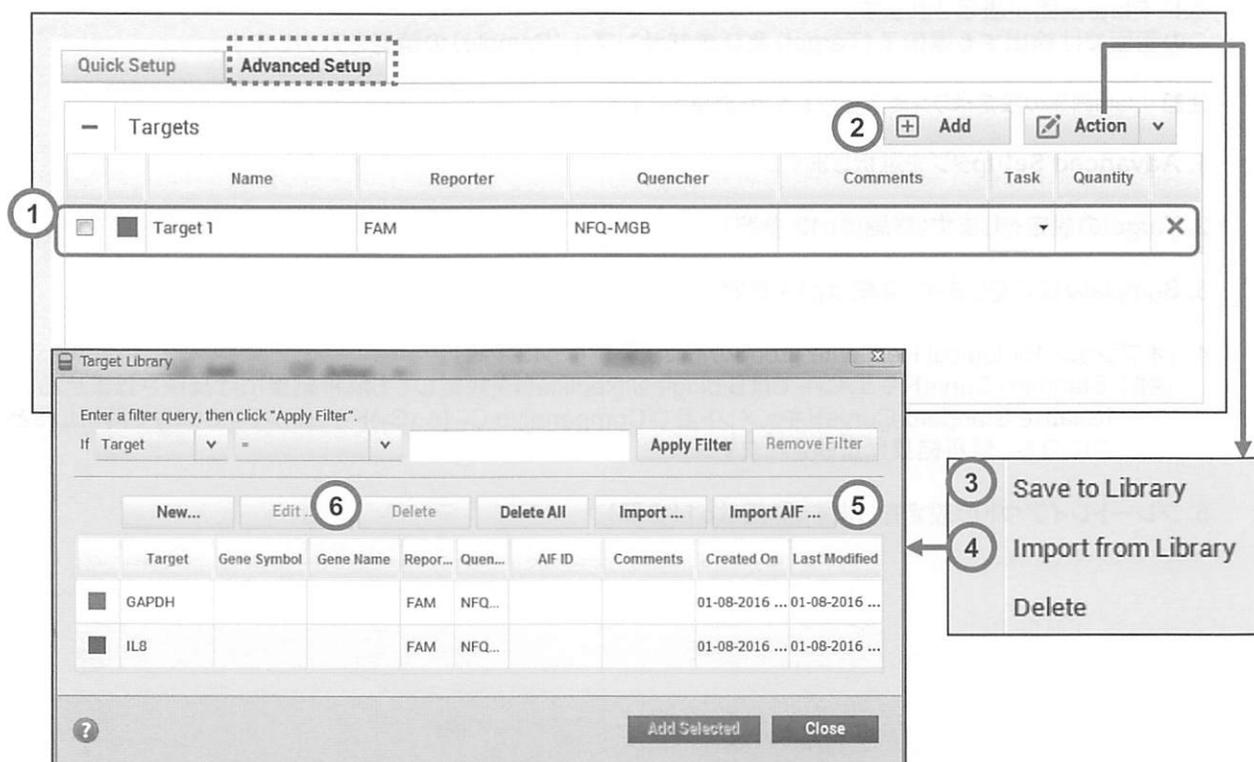
注記: Standard CurveドキュメントではBiological Replicateを設定しても解析結果には反映されません。
Relative Standard Curveドキュメント及びComparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)ドキュメントをStudyで解析したときにのみ、解析結果に反映されます。

5. プレートレイアウトの設定をします (詳細はp14参照)。

ドキュメントの設定 : Plate(1) Targetsの設定

注記: Plate画面の設定はラン終了後にも入力・変更できます。

1. Targetsには検出する遺伝子の情報を入力します。
 - Nameには遺伝子名等を入力します。
 - Reporterの蛍光色素をプルダウンメニューから選択します。
 - Quencherの設定を確認します。
2. 複数の遺伝子を検出するときにはAddをクリックしてリストに追加し、1の作業を繰り返します。
3. 繰り返し使用するTargetはその情報をLibraryに保存することができます。保存するTargetをクリックしてハイライトで選択したら、ActionメニューからSave to Libraryをクリックします。
4. 以前Libraryに保存したTargetを呼び出して使用したいときには、ActionメニューからImport from LibraryをクリックしてTarget Libraryを表示させ、使用するTargetを選択してからAdd Selected Target(s)をクリックします。
5. (オプション) TaqMan Gene Expression Assayをご利用の場合、ActionメニューからImport from LibraryをクリックしてTarget Libraryを表示させ、ライブラリー内のImport AIFをクリックし、添付のCD内のAssay Information File (AIF)を選択すると、各Assay IDがTarget Nameに入ったTarget Listが自動的にLibraryに登録されます。
6. (オプション) 以前Libraryに保存したTargetを削除したいときにはActionメニューからImport from LibraryをクリックしてTarget Libraryを表示させ、Targetを選択してからDeleteをクリックします。



ドキュメントの設定 : Plate (3) プレートレイアウトの設定

1. 画面右側で、設定するウェルを選択します。
 - マウスをドラッグさせると選択枠が広がります。
 - 列番号または行のアルファベットをクリックすると、列または行全体を一度に選択できます。
 - ウェルの左上の小さな正方形のブロックをクリックすると、全ウェルを一度に選択できます。
 - Controlキーを押しながらかlickすると、任意のウェルの選択及び選択解除ができます。
2. Targetsフィールド内のターゲットリストのチェックボックスにチェックを入れると、選択したウェルにTargetが設定されます。
3. Taskを選択します。初期設定では全て"U"です。アルファベットをクリックして設定を適宜変更します。
 - U : Unknown 未知サンプル
 - S : Standard 検量線作成用標準サンプル
注記: Standardの設定はDefine and Set Up Standardsの機能(15ページ参照)を使用することができます。
 - N : No Template Control テンプレート無しのネガティブコントロール
4. QuantityにStandard(検量線作成用標準サンプル)の初期量を入力します。
 - 注記: Quantityの入力はDefine and Set Up Standardsの機能を使用することで自動化できます。(詳細はp16. 参照)
 - 注記: 希釈倍率が等間隔ではないときには、Define and Set Up Standardsの機能を使用できないため、この項目で直接入力します。
5. Unknown(未知サンプル)にSampleを設定します。設定するUnknownウェルを選択し、Samplesフィールド内のサンプルリストのチェックボックスにチェックを入れると、選択したウェルにSampleが設定されず。
6. (オプション)Biological Replicateを適宜設定します。設定するUnknownウェルを選択し、Biological Groupsフィールド内のサンプルリストのチェックボックスにチェックを入れると、選択したウェルにBiological Replicateが設定されます。
 - 注記: Standard CurveドキュメントではBiological Replicateを設定しても解析結果には反映されません。Relative Standard Curveドキュメント及びComparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)ドキュメントで解析したときのみ、解析結果に反映されます。
7. **View**をクリックしてウェルの表示設定を変更することができます。
8. (オプション) Passive referenceをROXから変更する必要がある場合、Quick Setupタブ内の**Passive reference**プルダウンメニューから変更します。

ドキュメントの設定 : Plate (3) プレートレイアウトの設定

The screenshot shows the 'Assign Targets and Samples' interface with the following numbered callouts:

- 1**: Points to a well in the plate layout grid.
- 2**: Points to the 'Quick Setup' button.
- 3**: Points to the 'Add' button in the 'Targets' table.
- 4**: Points to the 'Assign' button in the 'Targets' table.
- 5**: Points to the 'Sample Name' column in the 'Samples' table.
- 6**: Points to the 'Biological Group' column in the 'Biological Replicate Groups' table.
- 7**: Points to the 'View' button.
- 8**: Points to the 'Advanced Setup' button.
- 9**: Points to the 'Action' button in the top right corner.

Targets	Name	Reporter	Quantifier	Comments	Task	Quantity
<input type="checkbox"/>	IL8	FAM	RFQ-MDD		-	X
<input type="checkbox"/>	ACTB	FAM	RFQ-M33		-	X

Samples	Sample Name	Comments
<input type="checkbox"/>	Sample 1	
<input type="checkbox"/>	Sample 2	
<input type="checkbox"/>	Sample 3	

Biological Replicate Groups	Biological Group	Comments

Plate Layout (Grid):

- Row A: 12 wells (M, M, M, S, S, S, S, S, S, S, S, S)
- Row B: 6 wells (S, S, S, S, S, S)
- Row C: 12 wells (T, T, T)
- Row D: 12 wells (M, M, M, S, S, S, S, S, S, S, S, S)
- Row E: 6 wells (S, S, S, S, S, S)
- Row F: 12 wells (T, T, T)
- Row G: 12 empty wells

Footer: 43 Empty

Define and Set Up Standardsを用いたStandardの設定方法

前項⑨のActionメニューからDefine and Set Up Standardを選択します。

1. 1wellあたり1色の反応 (Singleplex) か、複数色の反応 (Multiplex) かを選択します。
2. Standardを設定するTargetをプルダウンメニューから選択します。
3. Standardに設定する濃度の数値を入力します。
 - 希釈系列は5点以上設定することを推奨します。最低でも3点をご用意ください。
4. 各Standardの反復数を入力します。
5. Standardの濃度の、基点となる数値を入力します。
6. 希釈倍率をプルダウンメニューから選択します。
 - 1:5を選択すると、基点の濃度に対して1/5の値が繰り返し自動的に算出されます。
 - 10Xを選択すると、基点の濃度に対して10倍の値が繰り返し自動的に算出されます。
7. 希釈系列の並び順の設定です。Columnsを選択すると縦方向に、Rowsを選択すると横方向に、希釈系列がそれぞれ並びます。
8. ウェルの自動配置の設定を行います。
 - Automatically Select Wells for Meを選択するとソフトウェアが自動的にウェルを決定します。
 - Let Me Select Wellsを選択すると、任意の位置を使用者が選択して設定することができます。
9. Standardが設定されるウェルの範囲がハイライトで表示されます。7でLet Me Select Wellsを選択した時には、この場所で設定するウェルを選択します。
10. Applyをクリックすると、上記設定に従ってウェルへのStandard Sampleの設定が適用されます。
11. 複数のTargetがあるときには、1から9までの作業を繰り返します。
12. 設定が終了したらCloseをクリックし、画面を閉じます。

Select a target

① * Model: **Singleplex** * Select the target for this standard curve: **IL8** ②

Define the standard curve

③ * # of Points: **5** (5 Recommended)

④ * # of Replicates: **3** (3 Recommended)

⑤ * Starting Quantity: **1.0** (Enter the highest or lowest standard quantity for the standard curve)

⑥ * Serial Factor: **1.5** (Select a value from 1:10 to 10x)

5 Points X 3 Replicates = 15 Required Wells

Standard Curve Preview

1E0
2E-1
4E-2
6E-3
16E-3

Select and arrange wells for the standards

⑦ Arrange standards in: Columns Rows

⑧ Use Wells: Automatically Select Wells for Me Let Me Select Wells

⑨

15 Required Wells / 15 Selected Wells

A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8,A9,A10,
11,A12,B1,B2,B3

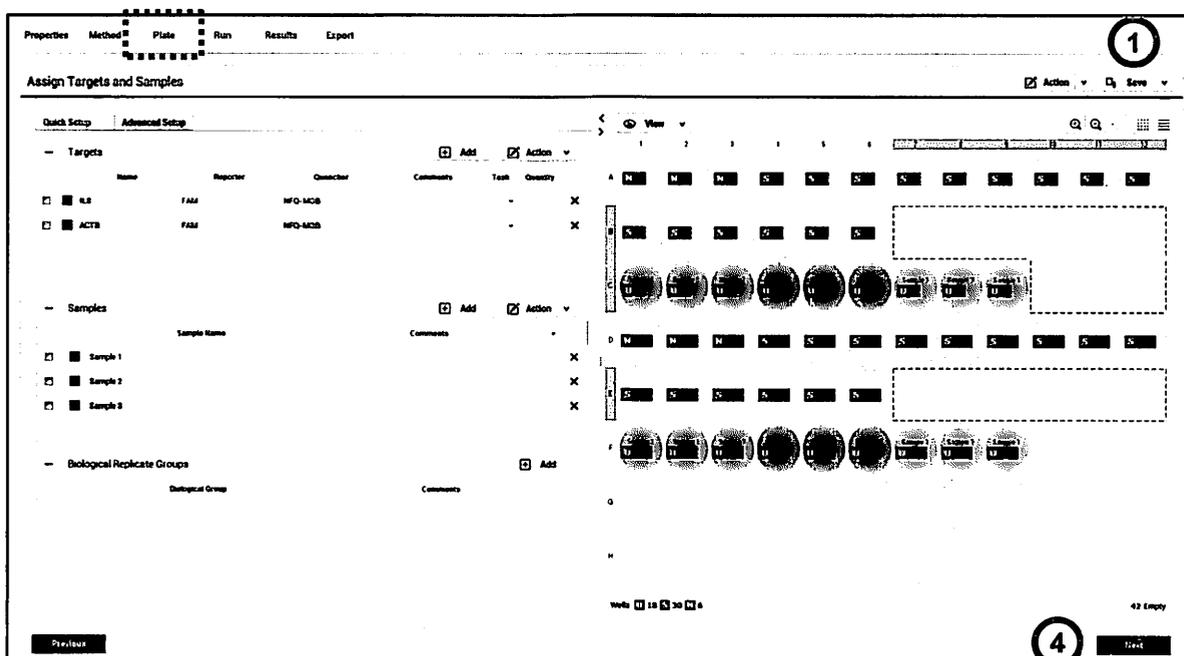
⑩ Apply Reset ⑫ Close

ドキュメントの設定 : Plate (3) プレートレイアウトの設定

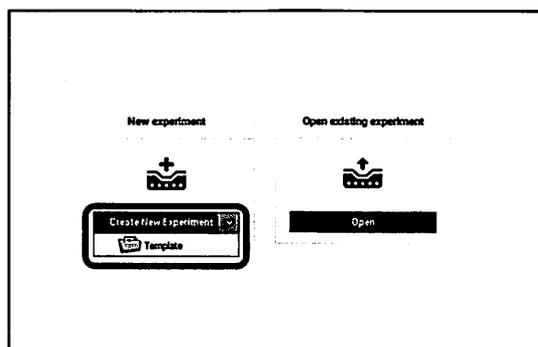
(オプション) 雑型ファイルの保存

同じ条件で何回も繰り返し実験を行う場合、雑型ファイルを作成しておくことができます。

1. SaveよりSave Asを選択します。
2. 保存先の指定の画面が表示されます。
3. 保存先を指定し、File Nameを入力してSaveをクリックすると保存されます。
注記: PCの動作安定の為、C:ドライブへの保存は避けD:ドライブに保存を行ってください。
4. 入力が完了したら、Nextをクリックします。



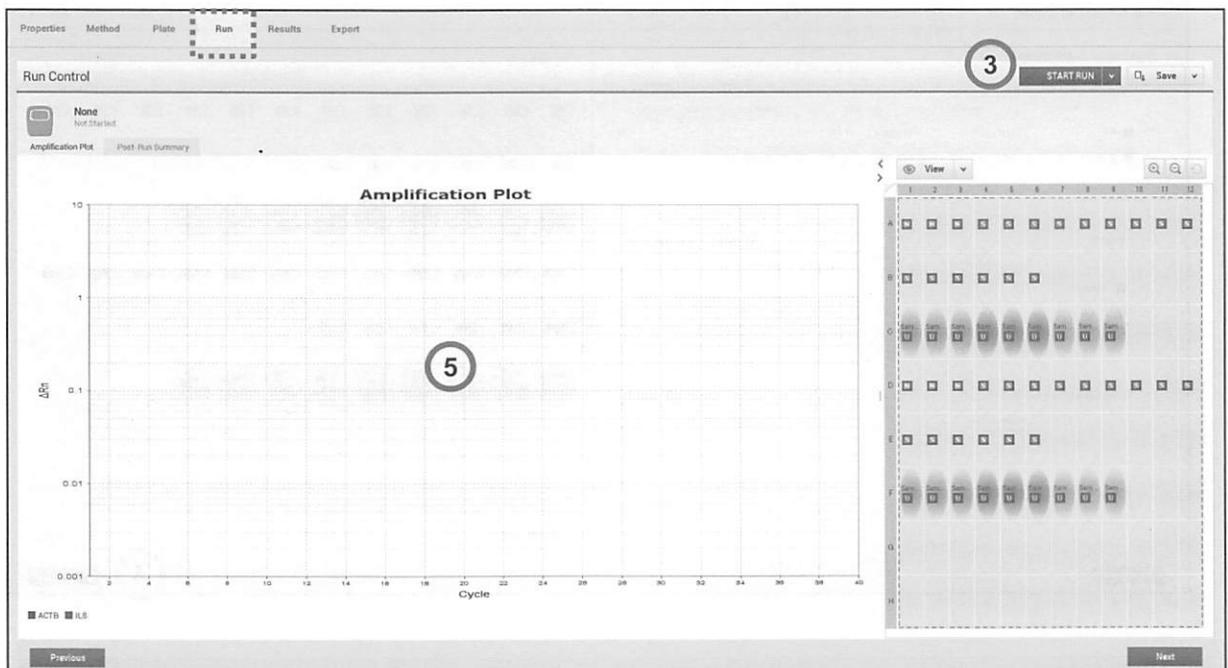
注記: 雑型ファイルから新規実験系ファイルを作成するときは、HomeページCreate New ExperimentのプルダウンメニューからTemplateを選択し、雑型ファイルを選択してOpenをクリックします。



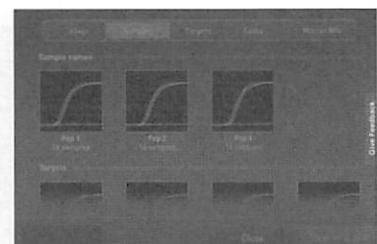
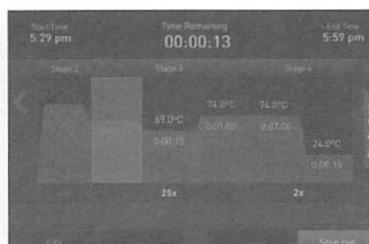
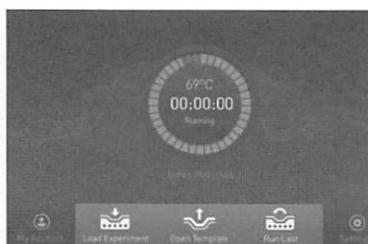
ランの開始: Run

次に Plate画面が表示されます。

1. 本体タッチパネル右上の を押してサンプルブロックを出します。
2. プレートブロックを載せ、 を押してサンプルブロックを収納します。
3. ソフトウェア画面の右上STRT RUNをクリックし、プルダウンメニューでシリアルナンバーを選択するとSave画面が表示されます。
4. 任意のファイル名を入力し、Saveをクリックするとランが開始します。
5. ラン中に増幅曲線を確認することができます。



注意: ランニング中に本体タッチパネルより残り時間、PCRサイクル詳細、増幅曲線を確認することができます。



反応プレートの準備

推奨の消耗品とその組み合わせは下記の通りです。

ブロックタイプ	プレート・チューブ	シール・キャップ	トレー・リテーナー	ベース(サンプル調整時のみ使用)
384ウェル	MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate 商品番号: 4309849	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		
Standard 96 ウェル	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate 商品番号: N8010560	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		MicroAmp 96-Well Support Base 商品番号: 4379590
	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate 商品番号: N8010560			
	MicroAmp Optical 8-Tube Strip (0.2mL) 商品番号: 4316567	MicroAmp Optical 8-Cap Strip 商品番号: 4323032 (Flatタイプ)	MicroAmp 96-Well Tray/Retainer set (Blue) 商品番号: 4381850	
	MicroAmp Optical Tube without Cap (0.2mL) 商品番号: N8010933			
Fast 96ウェル	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		
	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical 8-Cap Strip 商品番号: 4323032 (Flatタイプ)		
	MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0.1mL) 商品番号: 4358293		MicroAmp 96-Well Tray (Black) 商品番号: 4379983	
	MicroAmp Fast Reaction Tube with Cap (0.1mL) 商品番号: 4358297			

重要: 反応系調製用の消耗品を取り扱う際には必ずパウダーフリーの手袋を装着してください。



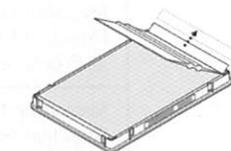
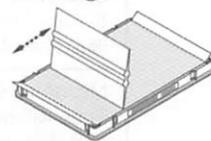
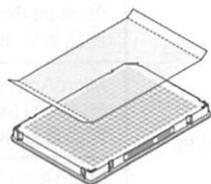
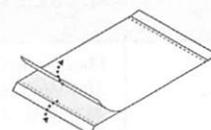
警告! チューブにセットするキャップは必ずフラットタイプのものをご利用ください。ドーム型のキャップを用いるとヒートカバーが損傷します。

重要: 反応するプレートやチューブ等にマジックでラベルをしないでください。マジックの中には蛍光物質が含まれているため、データに悪影響を及ぼします。

重要: プレートの底を汚さないように注意してください。プレートの底に液体や他の汚染物がつくと、サンプルブロックを汚染し、異常に高いバックグランド信号が検出されてしまう可能性があります。

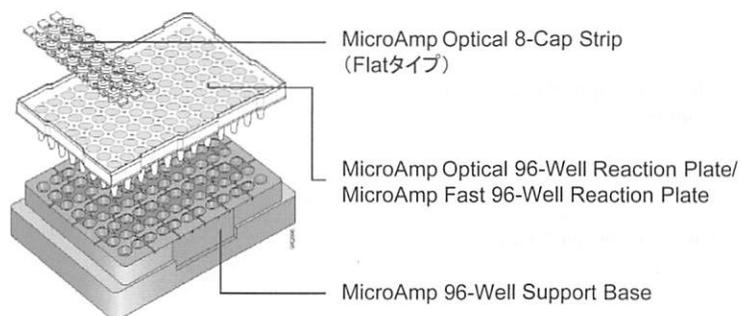
プレートのシール方法

1. プレートに反応試薬を適宜分注します。
注記: 96ウェルプレート・Fast 96ウェルプレートをご利用の場合、ベースの上にプレートに乗せて作業を行ってください。
 2. Optical Adhesive Film を1枚取り出し、両端を上向きに折り曲げます。フィルムの保護面を上側に向けます。
 3. 白色の保護フィルムをすばやくシール面から剥がします。シール面には触れないでください。
 4. フィルムの両端を持ち、フィルムを反応プレートの方に向けて降ろします(接着面が反応プレートに面するように)。フィルムが反応プレート中の全ウェルを完全に覆っていることを確認します。
 5. 上から圧力をかけながらアプリケータを縦横にゆっくり動かして、反応プレート全体にフィルムとプレートが密着するようにします。
 6. アプリケータを使ってフィルムの端を押さえながら、他方の端を持ってすばやく引っ張り、フィルムのタブを取り外します。反対側についても同じようにします。
フィルムのタブは綺麗に取り除いてください。タブが残っているとプレートがヒートカバーにくっついてしまう原因になります。
 7. 蒸発が生じないように完全に密着させるために、ステップ5を繰り返します。
 8. アプリケータの端をフィルムの外側の縁に沿ってしっかり圧力をかけながら、フィルムを密着させます。
注記: Optical Adhesive Film は、接触しただけで密着するものではありません。蒸発が生じないように完全に密着させるためには、圧力をかけることが必要です。
 9. 反応プレートを点検し、全てのウェルがシールされていることを確認します。フィルム表面上に全ウェルの縁がはっきりと映っていなければなりません。ラン後に装置にプレートが付着しないよう、フィルムのタブが完全に取り除かれていることを確認します。
- 重要:** フィルムを適用する際、光学接着カバーの接着剤が、プレートの縁に付着することがあります。Optical Adhesive Film の外周から、余剰の接着剤をすべて拭き取ります。余剰な接着剤を拭き取らないと機器本体のサンプルブロックに付着することがあります。
10. プレートの底からみて、反応液がプレートの各ウェルの底に集まっていることを確認してください。ウェルの底に集まっていないものが1つでもあれば、プレートを遠心してください。



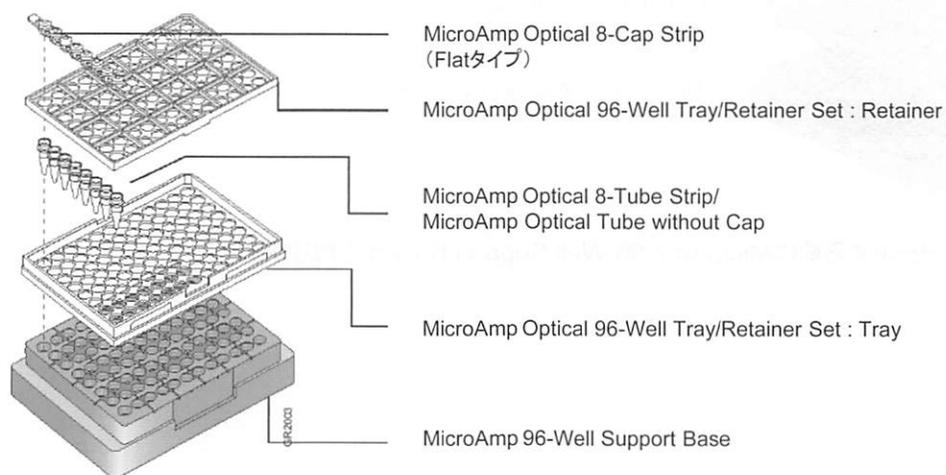
キャップを使用する方法

96ウェルプレートにキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。



重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

Standard 96ウェルブロックでチューブ及びキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。

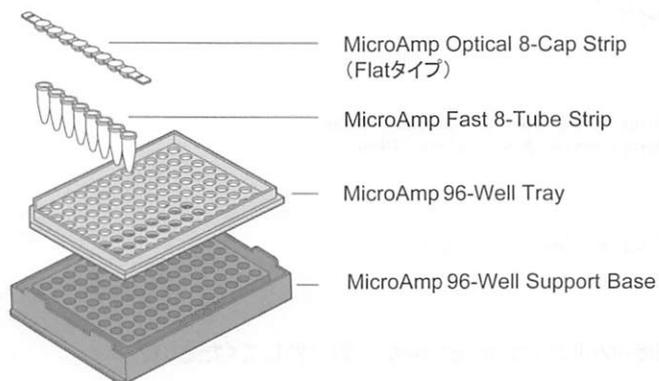


重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

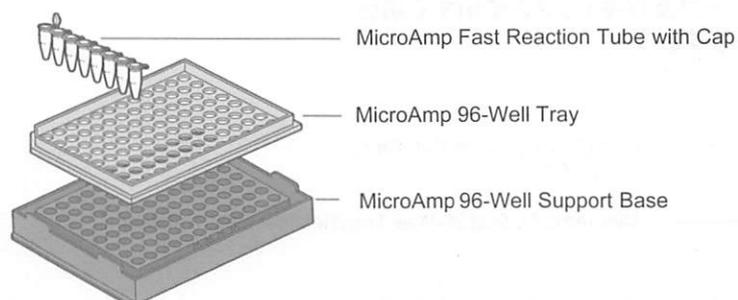
キャップを使用する方法

Fast 96ウェルブロックでチューブ及びキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。

8連チューブとキャップ



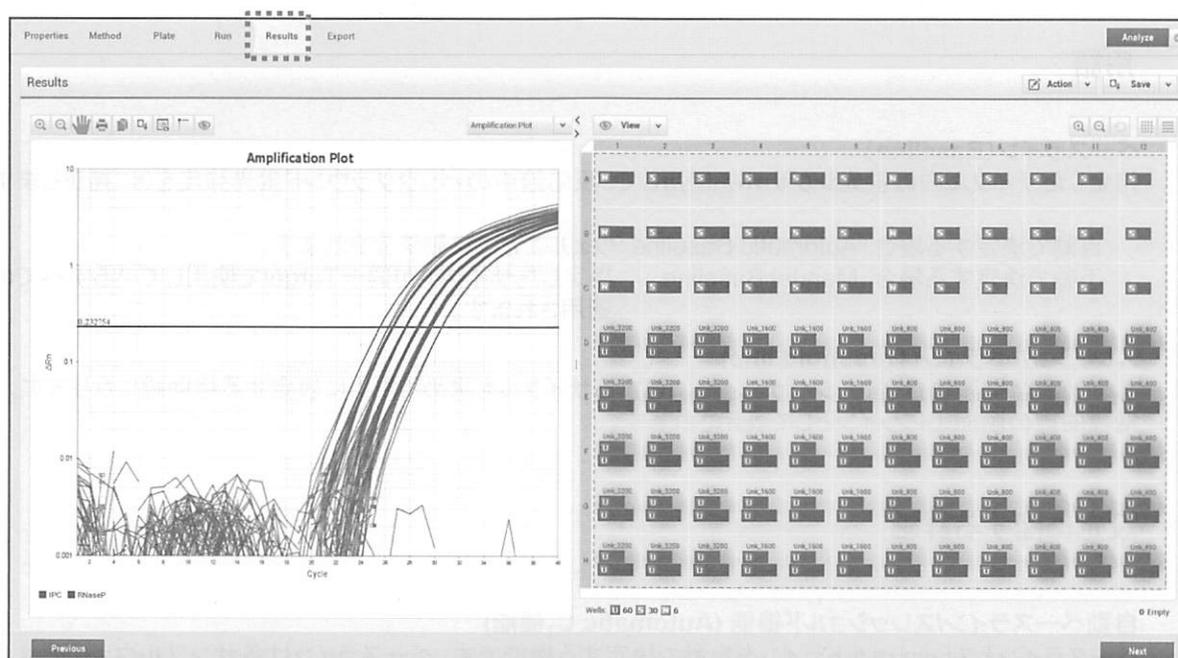
キャップ付きチューブ



重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

ランの終了: Results

ランが終了すると、自動的にResults画面のAmplification Plotに切り替わり、自動解析が行われた結果が表示されます。



プレートの取り出し

1. 本体タッチパネル右上の  をタッチしてサンプルブロックを出します。
2. プレート取り出します。

警告！ 怪我の危険: 装置のラン中、プレートは105°Cに加熱されています。プレートは室温になるまで待ってから取り出してください。

3. 再度本体タッチパネル右上の  をタッチしてサンプルブロックを収納します。

(オプション) 機器本体のシャットダウン

連続して実験を行わない場合は、ラン終了時に機器本体の電源(本体背面)を切っていただくことができます。データ解析はソフトウェア単独で行うことができます。

データ解析

ランの終了後、データ解析を行います。解析する前に、遺伝子ごとに解析パラメータ値を指定します。ソフトウェアにはすべての解析パラメータを自動で決定するAuto C_T機能と、パラメーターをマニュアルで設定するManual C_T機能が搭載されています。

用語

ベースライン(Baseline)

指定したサイクル内の蛍光シグナルを使用して、反応液中のバックグラウンド蛍光強度を0に補正します。

自動で決定する場合: Automatic Baseline ウェルごとに自動決定されます。

手動で決定する場合: Manual Baseline 指定したサイクルが同一Targetで使用しているすべてのウェルに適用されます。

スレッシュホールドライン(Threshold line)

あるPCR増幅産物量(蛍光シグナル量)に達するサイクルを求めるために設定する補助線になります。増幅曲線の画面上にラインとして表示されます。

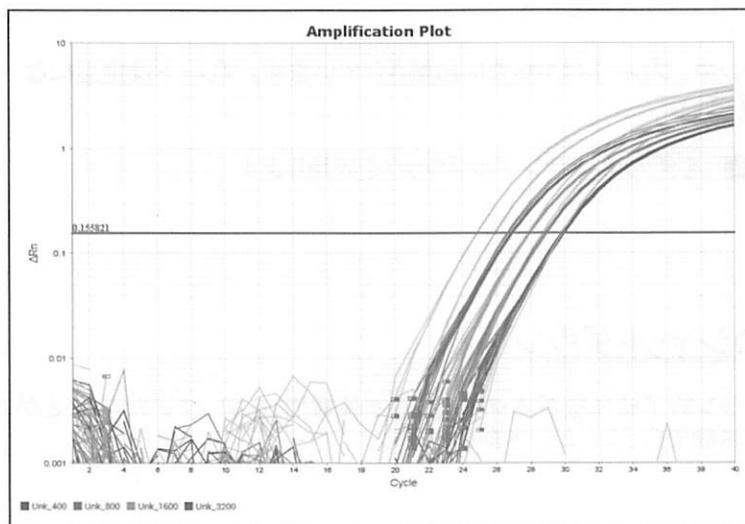
設定に関する詳細

自動ベースライン/スレッシュホールド機能 (Automatic C_T機能)

ベースラインとスレッシュホールドラインを自動で決定する機能です。ベースラインは各サンプルウェルそれぞれの増幅曲線立ち上がりサイクルから自動的に決定されます。スレッシュホールドラインは指数関数的増幅領域内に自動設定されます。

手動ベースライン/スレッシュホールド機能 (Manual C_T機能)

ベースラインとスレッシュホールドラインを手動で決定する機能です。指定したサイクルのシグナルをベースラインとしてすべてのウェルに適用する Manual Baseline と、ウェルごとに自動で決定する Automatic Baseline を選択できます。スレッシュホールドラインは手動設定になります。



※左図のような増幅曲線の形で、適切な位置にスレッシュホールドラインを設定するように機能を使い分けてください。

Amplification Plotの確認

ランが終了すると、自動的にResults画面のAmplification Plotに切り替わり、自動解析が行われ、結果が表示されます。

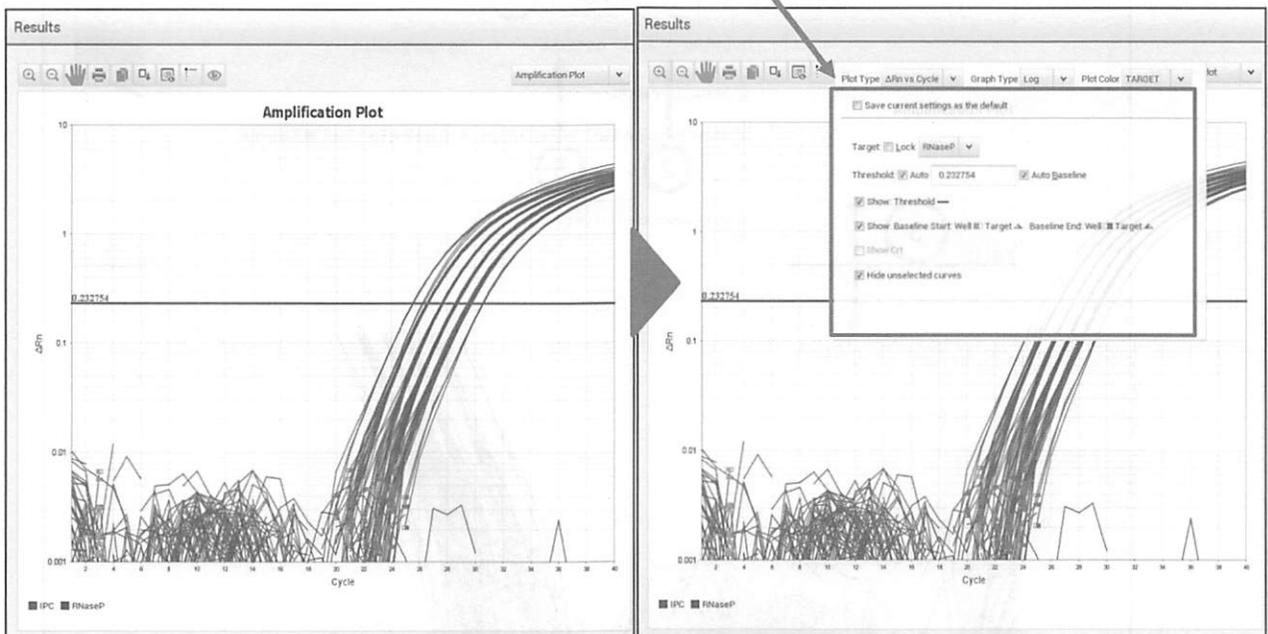
ソフトウェアは典型的なAmplification Plotのデータが得られていると想定し、自動的にBaselineとThreshold Lineを設定・解析します。

重要: ブロックの汚染やコンタミ・ピペッティングエラーなどにより、Amplification Plotの波形が変わると、QuantStudio ソフトウェアは正確なBaselineとThreshold Lineを設定することができなくなる場合があります。

解析後Amplification Plot画面でBaselineとThreshold Lineを確認することを推奨します。

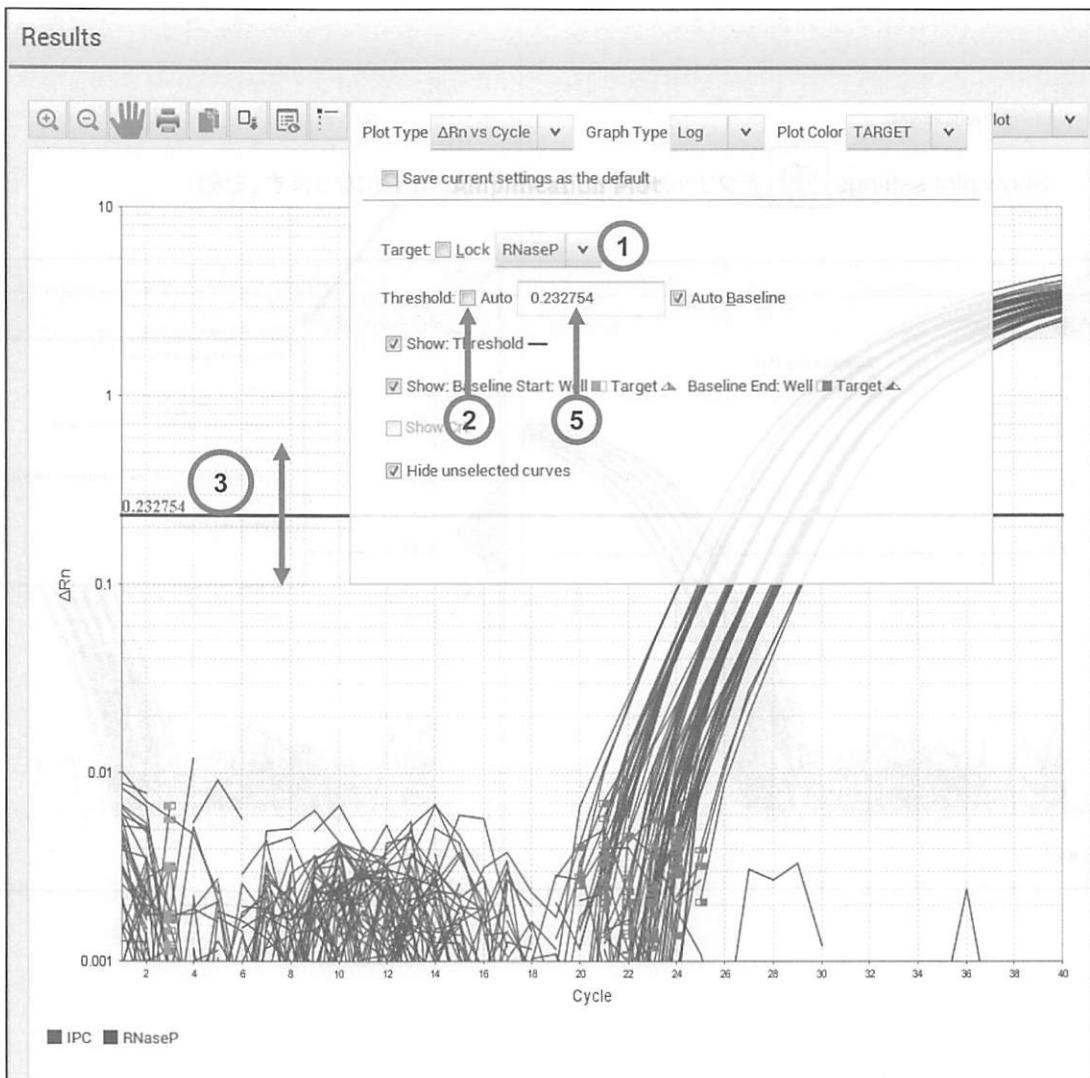
もしイレギュラーな波形及びThreshold Lineが表示された場合には、手動解析による解決を試みてください。

Show plot settings  をクリックすると、詳細設定が可能になります(右図)。



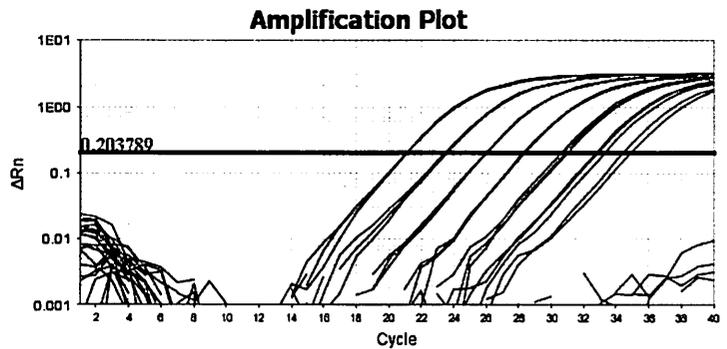
Threshold LineのManual設定

1. TargetのプルダウンメニューをThreshold設定するTargetにあわせませす。
2. Autoチェックボックスをクリックしてチェックをはずします。
3. グラフ上のThreshold Lineにマウスのポインタを合わせると上下に移動することができるので、ドラッグして任意の位置にあわせませす。
4. 画面右上の **Analyze** をクリックすると新しく設定したThresholdを用いた解析が行われます。
5. テキストボックスにThreshold Lineの数値を直接入力することもできます。値を入力して画面右上の **Analyze** をクリックすると、新しく設定したThresholdを用いた解析が行われます。

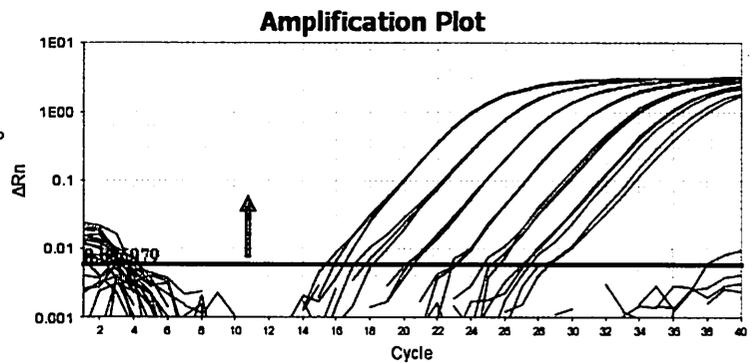


—スレッシュヨルドラインの設定—

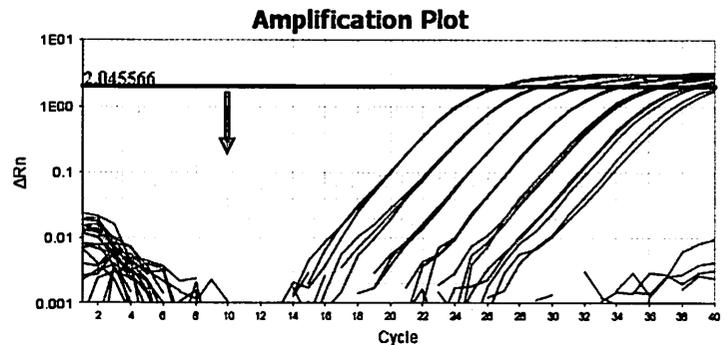
[正しく設定されたスレッシュヨルド]
設定されたスレッシュヨルドは、増幅曲線の指数関数増幅領域内にあります。スレッシュヨルドが最適値を上回ったり下回って設定されると、複製グループの標準偏差が増加します。



[低すぎるスレッシュヨルド]
設定されたスレッシュヨルドは、増幅曲線の指数関数増幅領域より低い領域にあります。この場合、スレッシュヨルドが正しく設定された場合のプロットよりも、はるかに多くの標準偏差が発生します。スレッシュヨルドバーを指数関数増幅領域内に引き上げてください。

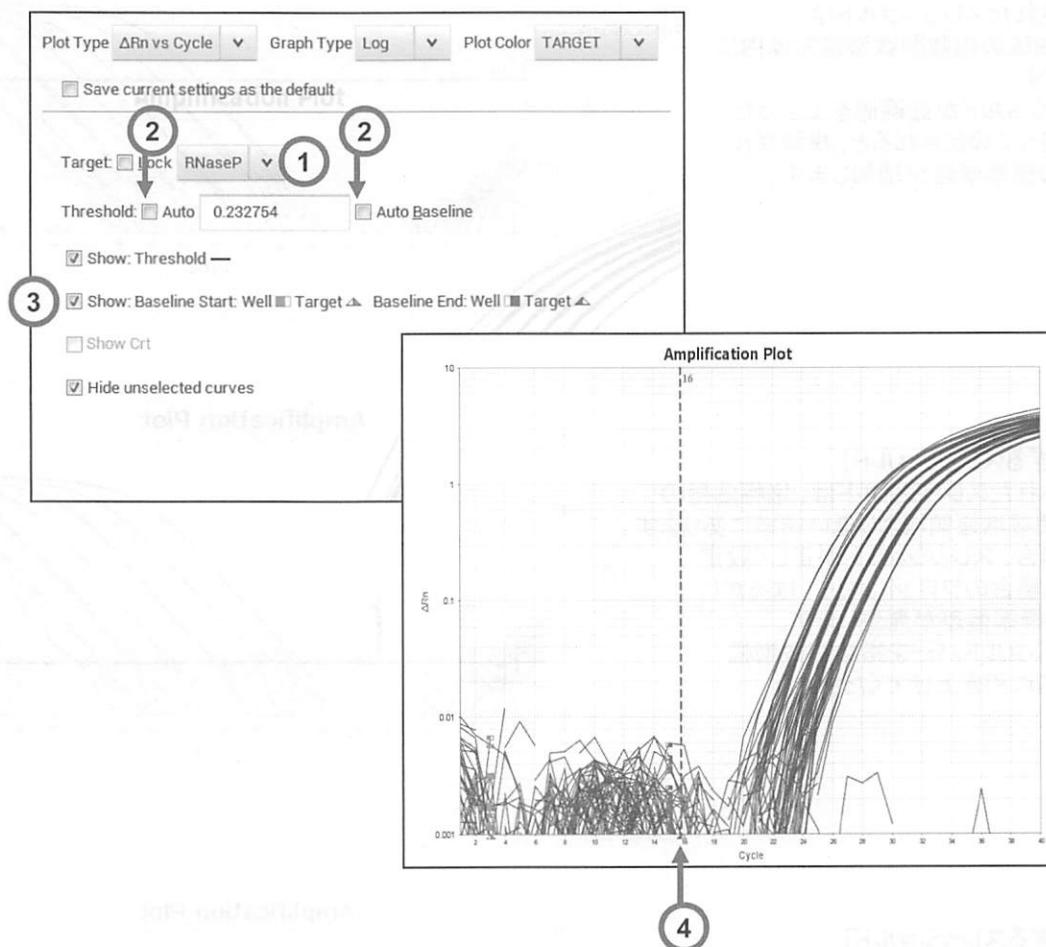


[高すぎるスレッシュヨルド]
設定されたスレッシュヨルドは、増幅曲線の幾何学的相より高い領域にあります。この場合、スレッシュヨルドが正しく設定された場合のプロットよりも、はるかに多くの標準偏差が発生します。スレッシュヨルドバーを指数関数増幅領域内に下げてください。



BaselineのManual設定:Target単位

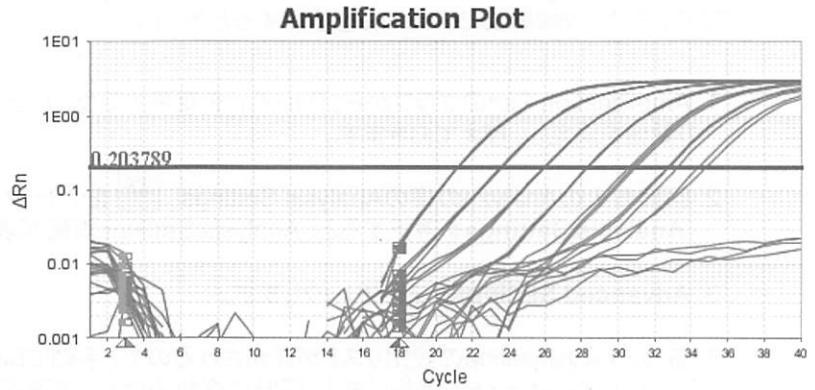
Amplification PlotのOptionsの項目でBaselineをManualで設定することができます。
この方法は、Target毎にまとめて同一のBaselineを設定するときに用います。



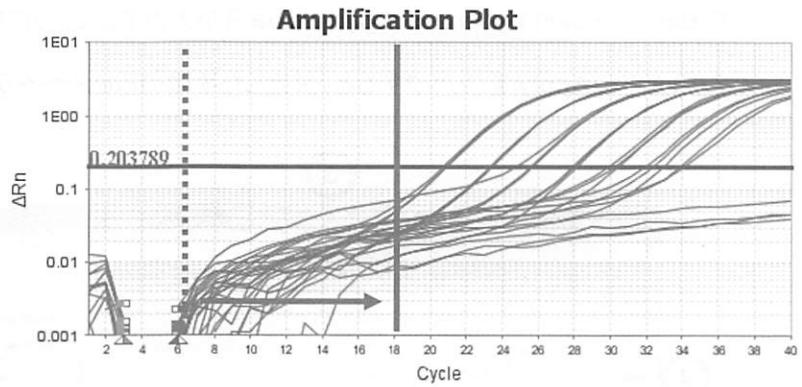
1. TargetのプルダウンメニューをBaseline設定するTargetにあわせませす。
2. Autoチェックボックスをクリックしてチェックをはずします。
続けてAuto Baselineチェックボックスをクリックしてチェックをはずします。
3. ShowのBaselineのチェックを入れると、BaselineのStart(緑)とEnd(赤)が表示されます。
初期設定ではStartが3サイクル、Endが15サイクルになっています。
4. サイクル数軸に表示されているStartとEndの三角ボタンは、マウスのポインタを合わせると横方向にドラッグして移動することができます。最も早く増幅開始しているプロットの増幅開始直前のポイントにBaselineのEndの位置を合わせませす。
5. 移動したのち画面右上の **Analyze** をクリックすると、新たに設定したBaselineでの解析が行われます。

—ベースラインの設定—

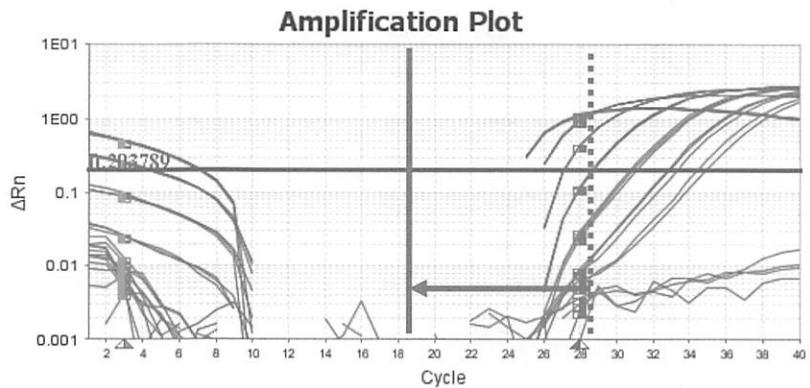
[正しく設定されたベースライン]
増幅曲線がベースラインのEnd cycleを越えてから始まっており、調整の必要はありません。



[短すぎるベースライン]
ベースラインのEnd cycle を大幅に越えてから増幅曲線が始まっているので、End Cycle 値を増やす必要があります。



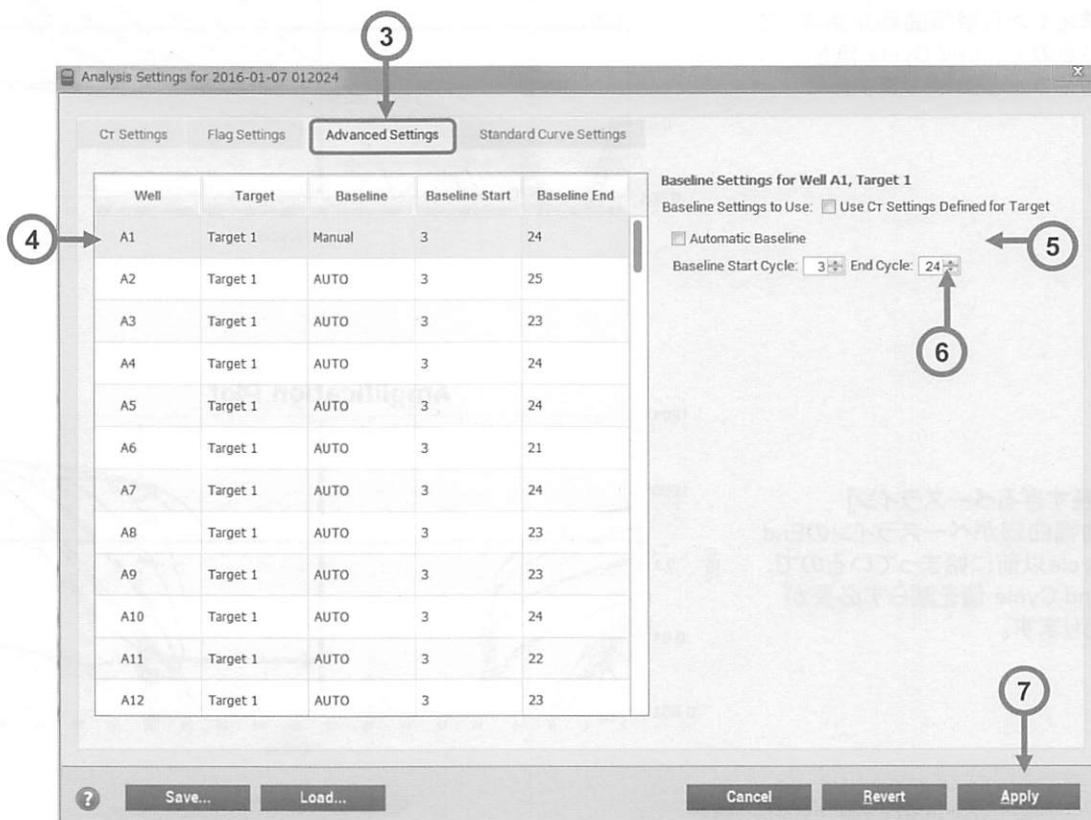
[長すぎるベースライン]
増幅曲線がベースラインのEnd cycle以前に始まっているので、End Cycle 値を減らす必要があります。



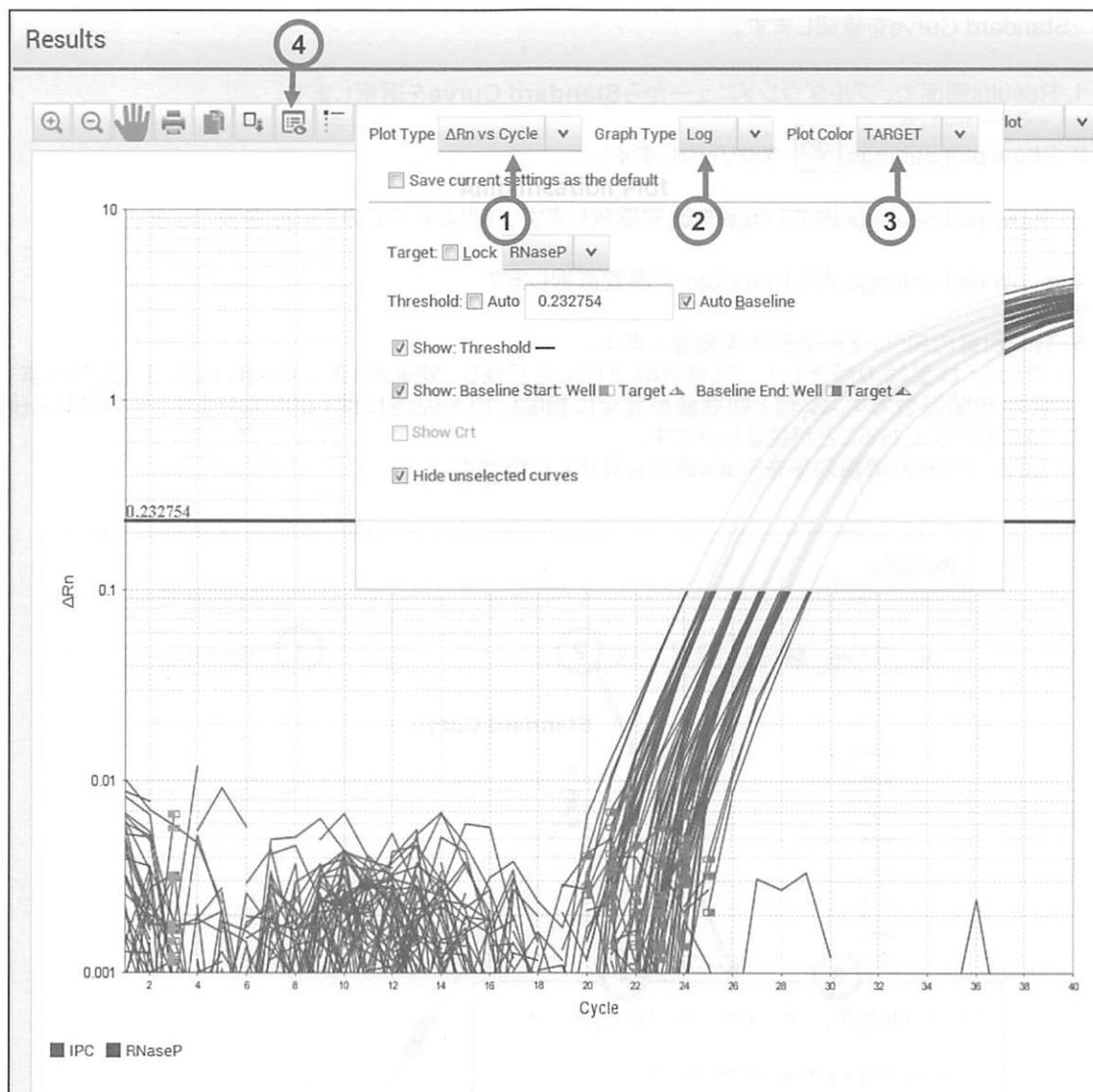
Baselineの手動設定:Well単位

Analysis SettingsのAdvanced SettingsタブでBaselineを手動で設定することができます。この方法は、Well単位でBaselineを設定するときに用います。

1. Amplification Plotのグラフから、Baselineを変更するウェルと、Baselineを設定するサイクルの数値を決定し、控えておきます。
2. 画面右上のAnalyzeの横のAnalysis Settings  をクリック、またはAnalysisメニューから **Analysis Settings**を選択すると、Analysis Settings画面が表示されます。
3. **Advanced Settings**タブをクリックします。
4. 各ウェルのBaselineの設定リストが表示されるので、手動でBaselineを設定する任意のウェルをクリックしてハイライトで選択します(同時に複数のウェルを選択することも可能です)。
5. 画面右側の[Automatic Baseline]および[Use C_T Settings Defined for Target] のチェックを外します。
6. Baseline Start Cycle:とEnd Cycle:の項目が入力できるようになるので、適宜任意の値を入力します。
7. 画面下の**Apply** をクリックすると、設定した手動のBaselineを反映した再解析が行われます。



Amplification Plot画面でのその他の設定



1. **Plot Type** : Amplification Plotのグラフ表示を切り替えることができます。通常は ΔRn vs. Cycleを選択してください。

2. **Graph Type** : グラフの縦軸をLog / Linearに切り替えることができます。

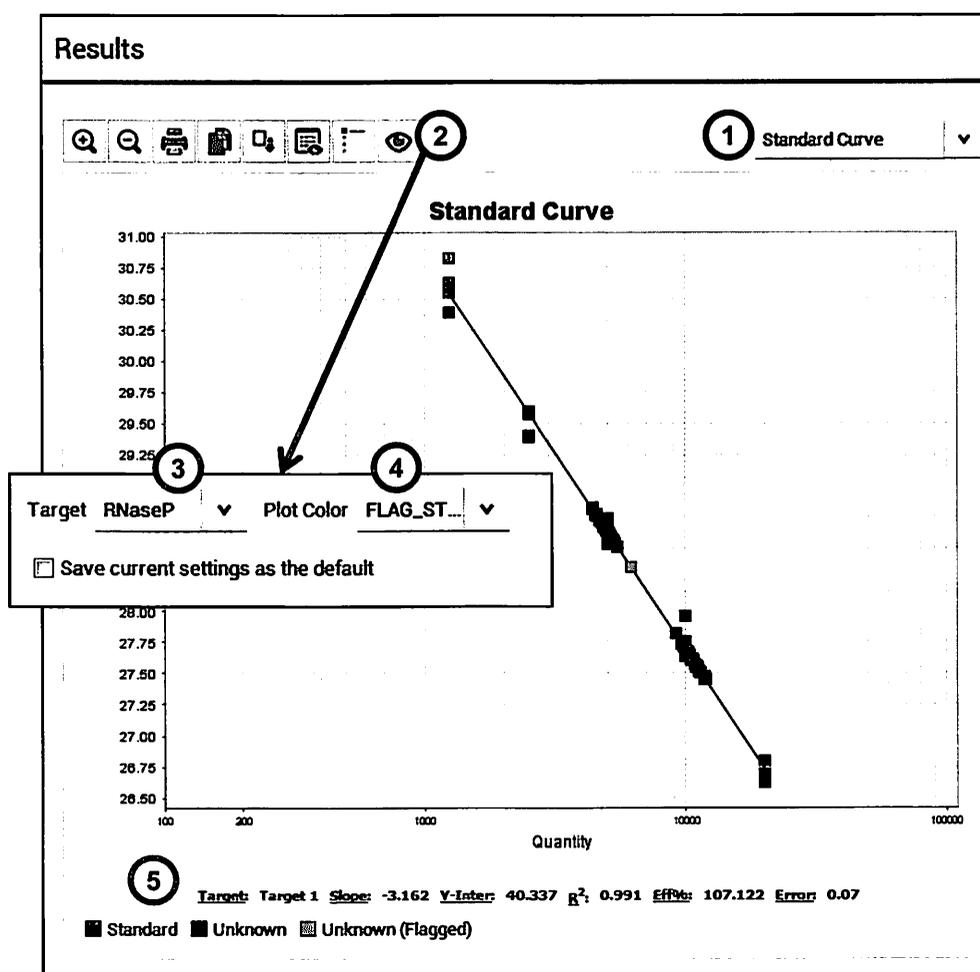
3. **Plot Color** : Amplification Plotの表示色を、WELL / SAMPLE / TARGET / FLAG_STATUS のいずれかから選択することができます。

4. グラフ左上のPlot Properties ボタンをクリックすると、グラフの縦軸・横軸のスケールを変更することができます。

Standard Curveの確認

Standard Curveを確認します。

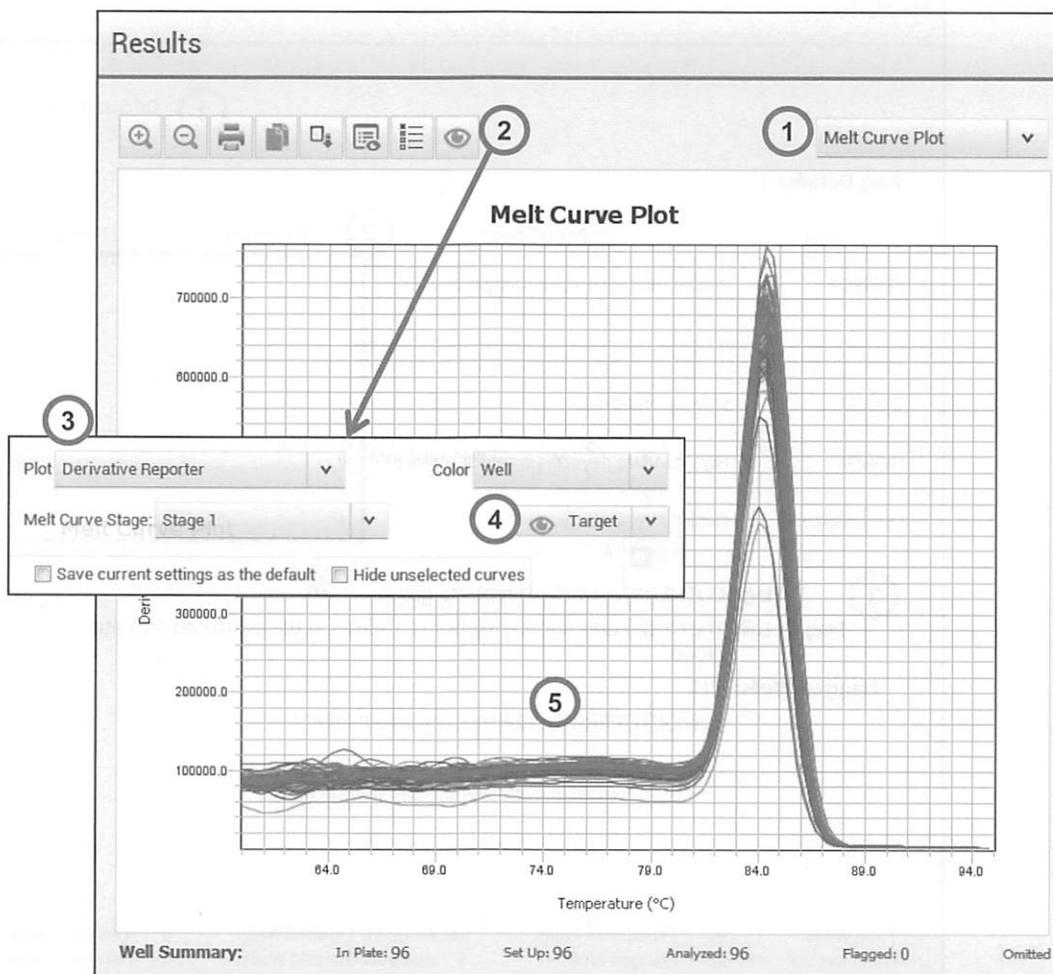
1. Results画面で、プルダウンメニューから**Standard Curve**を選択します。
2. Show plot settings  をクリックします。
3. Show plot settings 内でTargetを適宜選択します。AllはすべてのTargetを表示します。
4. Show plot settings 内でPlot Colorを適宜選択します。
5. Target毎のSlopeとR²とEff%を確認します。
 - Slope：検量線の傾きです。PCR効率(Eff%)を反映し、効率が100%の時には約-3.32になります。
 - R²：相関係数です。C_T値と初期量が完全に相関しているときには1.00になります。一般的にR²値は0.990以上あることが望ましいです。
 - Eff%：PCRの増幅効率をSlope値から算出した値です。



Melt Curveの確認

(SYBR Greenアッセイの場合のみ) Melt Curve画面で二次産物の有無を確認します。

1. Results画面で、プルダウンメニューから**Melt Curve**を選択します。
2. Show plot settings  をクリックします。
3. **Plot**がDerivative Reporter であることを確認します。
4. Targetを適宜選択します。
5. ピークが単独か複数か確認します。下図の通り単独であれば問題ありません。もし異なる温度を示す複数のピークがあった場合は、実験系の最適化を行っていただく必要があります。
6. Targetが複数あるときには1つずつ切り替えて確認します。



フラグの確認: QC Summary画面

Analyzeを行った後に、プレートレイアウト画面のウェル上にフラグ(黄色の三角マーク)が表示される場合があります。フラグは表示されたウェルに何かしらの問題がある可能性を示しています。フラグ内の数字は確認された問題の数を示します。

QC Summary画面ではフラグの具体的な内容、及びその対策方法を確認することができます。

1. Results画面で、プルダウンメニューから**QC Summary** を選択します。
2. テーブル内の「Frequency」および「Wells」カラムを調べ、問題の内容とウェル数、およびウェルの位置を確認します。
3. 各フラグの行をクリックすると、下段にそのフラグの詳細が表示されます。

Results

1 **QC Summary** ▼

Flag Details

Flag:	Description	Frequency	Wells
PRFDROP	Passive reference signal changes near Cr	0	
DR1/MI11	Define acceptable delta Rn based on Cr range		
CQCONF	Low Cq confidence	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	1	C11

3

Flag: OUTLIERRG—Outlier in replicate group
Flag Detail: The Cr deviates significantly from Cr values in the associated replicate group.
Flagged Wells: C11
[View OUTLIERRG Troubleshooting Information](#)

Total Wells:	96	Processed Wells:	96	Manually Omitted Wells:	0	Targets Used:	1
Wells Set Up:	96	Flagged Wells:	5	Analysis Omitted Wells:	0	Samples Used:	2

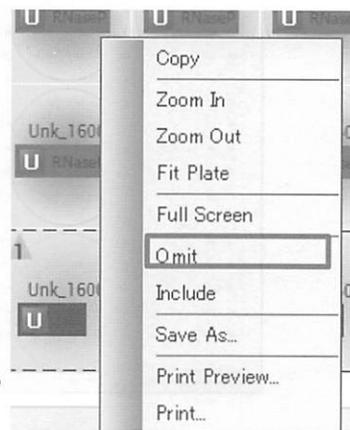
Standard Curve Method実験では、実験データの状況により下記のフラグが表示されます。

フラグ	内容
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	パッシブリファレンス値に異常あり
OFFSCALE	蛍光値がオフスケール
HIGHSD	リプリケートグループ内の標準偏差が高い
NOAMP	増幅なし
NOISE	他のウェルと比較してノイズが高い
SPIKE	スパイクノイズ有り
NOSIGNAL	蛍光値が検出されない
OUTLIERRG	リプリケートグループ内に異常値がある
EXPFAIL	指数関数的増幅領域が確認されない
BLFAIL	ベースライン自動設定時に問題確認
THOLDFAIL	Threshold自動設定時に問題確認
CTFAIL	C_T 値自動算出時に問題確認
PRFLOW	Passive reference の値が低い
PRFDROP	Passive referenceが C_T 値近傍で変動している

サンプルの削除

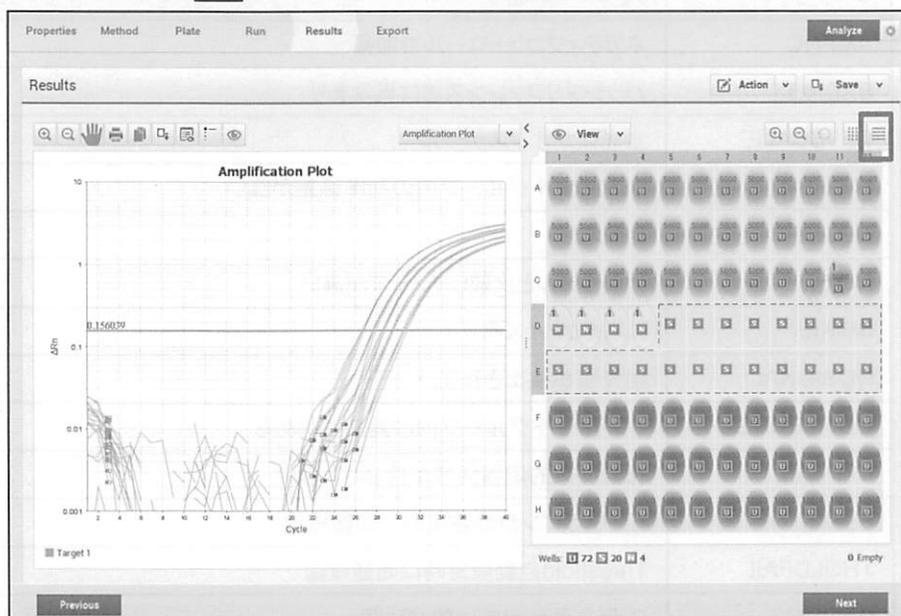
任意のウェルを解析対象外に指定することができます。

1. プレートレイアウト面上で、解析対象から外すウェルを選択します。
2. そのまま右クリックするとメニューが表示されるので、**Omit**を選択します。
3. 解析対象外に指定されたウェルの左上に赤い×マークが表示されます。
4. **Analyze**をクリックすると、削除指定したウェルのデータを除外した解析が行われます。
注記: Omit作業を行った後は、必ず**Analyze**をクリックして再解析してください。
5. 解析対象に戻すときは、ウェルを選択して右クリックメニューから**Include**を選択します。



View Well Tableタブ画面

1. 全ての解析が終了したら、 を押してResults tableを表示します。



#	Well	Cont	Flag	Sample No.	Target No.	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Inhibition...	Reproduc...	Efficiency	Slope	RQ	RQ Min	RQ Max	Amp Status	PSFEROP	Comments
79	G7			Urk_300	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	28.860	28.845	0.054	385.244	1.093	102.001	-3.278	1.000	0.825	1.212	REVIEW				
80	G8			Urk_300	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	28.878	28.845	0.054	380.163	1.093	102.001	-3.278	1.000	0.825	1.212	REVIEW				
81	G9			Urk_300	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	28.806	28.845	0.054	375.055	1.093	102.001	-3.278	1.000	0.825	1.212	REVIEW				
82	G10			Urk_400	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	29.355	29.828	0.063	189.995	1.042	102.001	-3.278	0.707	0.646	0.773	REVIEW				
83	G11			Urk_400	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	29.970	29.828	0.063	176.437	1.042	102.001	-3.278	0.707	0.646	0.773	REVIEW				
84	G12			Urk_400	RNameP	UNKNOWN FAM-NF	29.765	29.828	0.063	203.824	1.042	102.001	-3.278	0.707	0.646	0.773	REVIEW				
85	H1			Urk_3200	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	27.637	27.879	0.068	2,191.907	1.042	110.089	-3.102								
86	H2			Urk_3200	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	27.809	27.879	0.065	2,409.889	1.042	110.089	-3.102								
87	H3			Urk_3200	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	27.899	27.879	0.065	2,564.997	1.042	110.089	-3.102								
88	H4			Urk_1600	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.253	28.333	0.059	1,387.485	1.042	110.089	-3.102								
89	H5			Urk_1600	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.374	28.333	0.059	1,367.951	1.042	110.089	-3.102								
90	H6			Urk_1600	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.371	28.333	0.059	1,370.469	1.042	110.089	-3.102								
91	H7			Urk_300	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.724	28.762	0.206	970.617	1.042	110.089	-3.102								
92	H8			Urk_300	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.981	28.762	0.206	808.136	1.042	110.089	-3.102								
93	H9			Urk_300	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	28.571	28.762	0.206	3,098.057	1.042	110.089	-3.102								
94	H10			Urk_400	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	29.327	29.226	0.092	624.726	1.042	110.089	-3.102								
95	H11			Urk_400	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	29.147	29.226	0.092	714.485	1.042	110.089	-3.102								
96	H12			Urk_400	IPC	UNKNOWN VIC-TAM	29.205	29.226	0.092	664.369	1.042	110.089	-3.102								

各ウェルの詳細情報が横一列に表示されます。

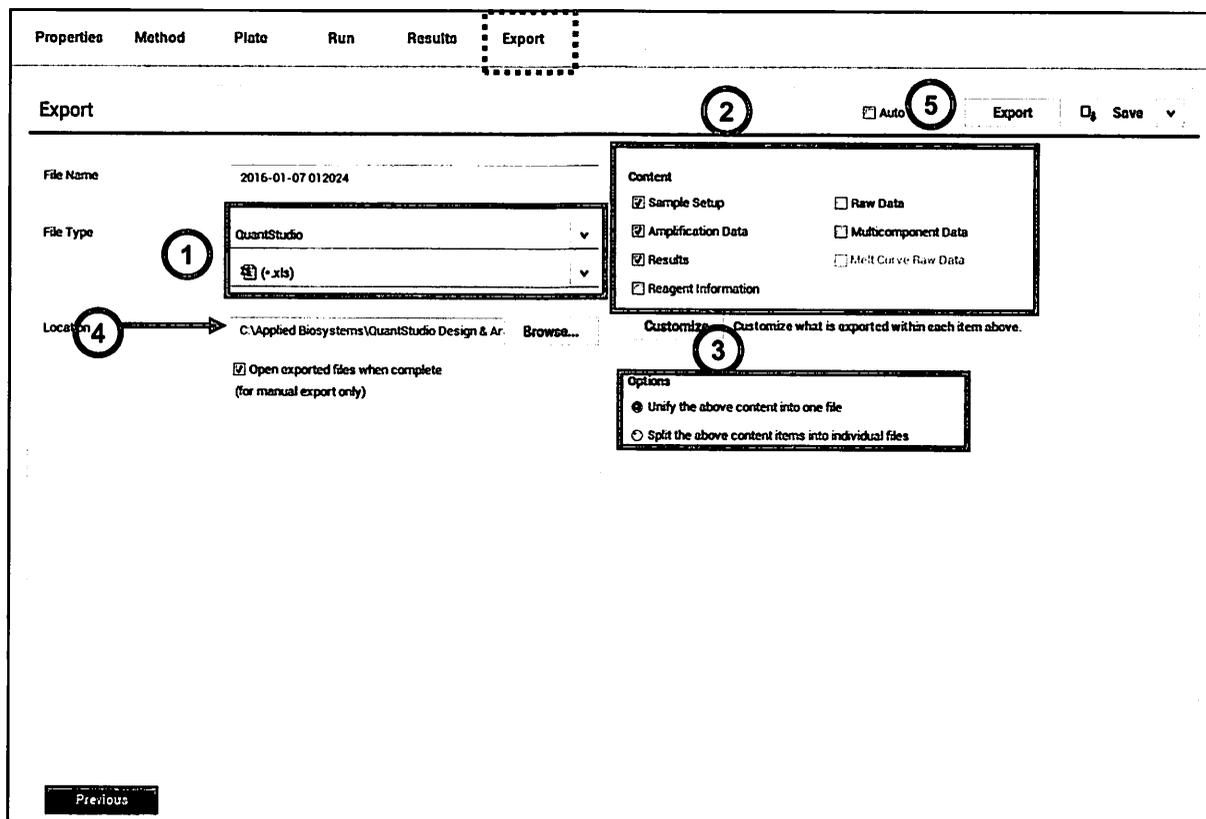
- a. Viewプルダウンメニューから、Results Tableに表示する項目を設定することができます。
- b. Group byプルダウンメニューから、ターゲット毎、サンプル毎等にグループ表示することができます。
- c. 表の各タイトルカラムをクリックするとソートすることができます。

2. データを確認したら、Nextをクリックします

データ出力: 数値データ

次にExport 画面が表示されます。

1. File Typeプルダウンメニューから、QuantStudio形式およびファイル形式、もしくはRDML形式を選択します。
2. 出力するデータの種類の種類を、Contentから選択します。
最終的な定量結果のみを出力したい場合は、Resultsにチェックが入った状態にしてください。
3. 出力するデータを個別のファイルで出力するか、1つのファイルで出力するか選択できます。
4. Browseをクリックし、データの出力先を指定します。
5. Exportをクリックするとデータが出力されます。



データ出力:画像データ

Amplification Plotなどのグラフを画像ファイルとして出力することができます。

JPEG等の画像ファイルへの出力

1. 出力したいグラフ上で右クリック>**Save As**を選択、もしくは  アイコンをクリックします。
2. 出力したファイルの保存先の指定画面が表示されるので、画像ファイルの保存形式を選択し、任意の場所を指定して保存します。

データ出力:印刷

定量結果やグラフを印刷することができます。

グラフの印刷

1. 出力したいグラフ上で右クリック>**Print**を選択、もしくは  アイコンをクリックします。
2. プリンター選択の画面が表示されますので、任意のプリンターを選択し、印刷します。

定量結果の印刷

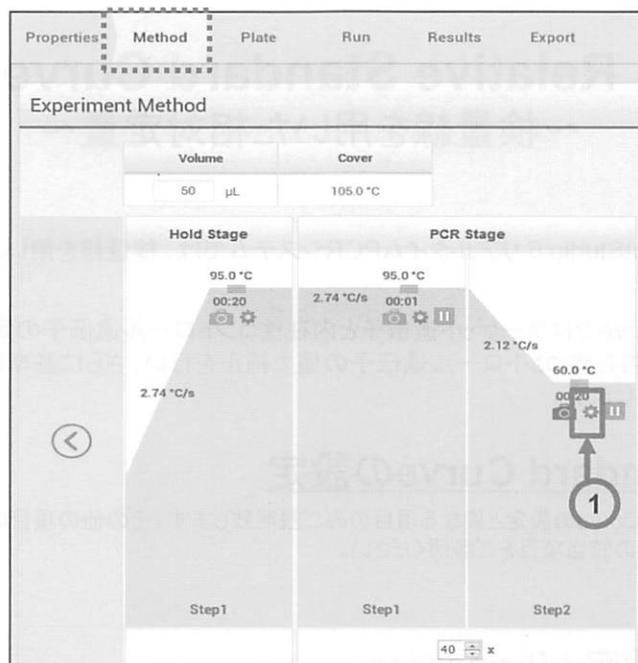
1. FileメニューからPrint Reportを選択します。
2. 出力するデータ及びグラフにチェックを入れます。
3. **Print Report**をクリックすると、プリンター選択の画面が表示されますので、任意のプリンターを選択し、印刷します。

注記: プリンター選択画面でCute PDF Writerを選択すると、PDFファイルを作成することができます。この場合はPrintをクリックした後ファイルの保存先指定画面が表示されるので、任意の場所を選択して保存します。

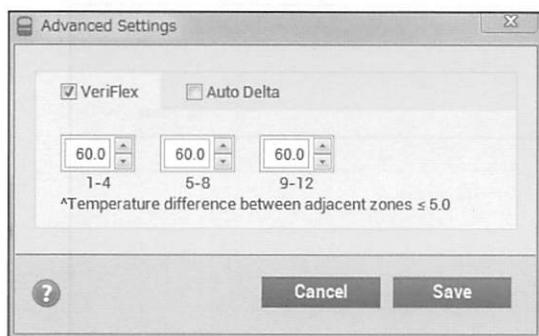
補足情報 VeriFlexの設定方法

QuantStudio 3 / QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムは、独立したブロックゾーンで異なる温度を設定・運転することができる「VeriFlex」ブロックを搭載しています。

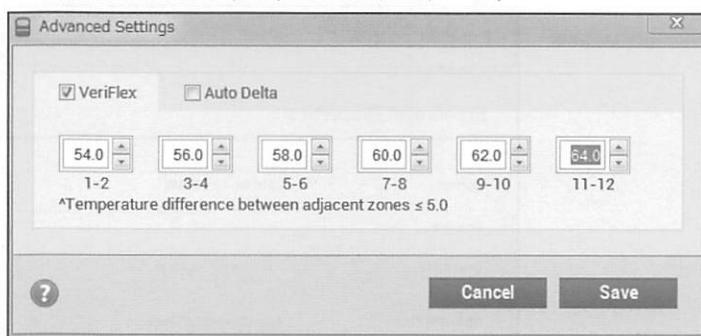
1. Methodの画面で、異なる温度を設定するステップのAdvanced Settings  をクリックします。



QuantStudio 3 (3ゾーン)



QuantStudio 5 (96ウェルのみ 6ゾーン)



2. VeriFlex チェックボックスにチェックを入れ、各ゾーンに任意の温度を入力します。
隣接するブロック間の温度差は、5°C以内まで入力可能です。
3. 入力後、Saveをクリックして設定を保存します。

QuantStudio Design & Analysisソフトウェア 簡易操作ガイド (II)

Relative Standard Curve ～検量線を用いた相対定量～

概要

QuantStudio 3 / QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムでは、検量線を用いた相対定量を行うことができます。

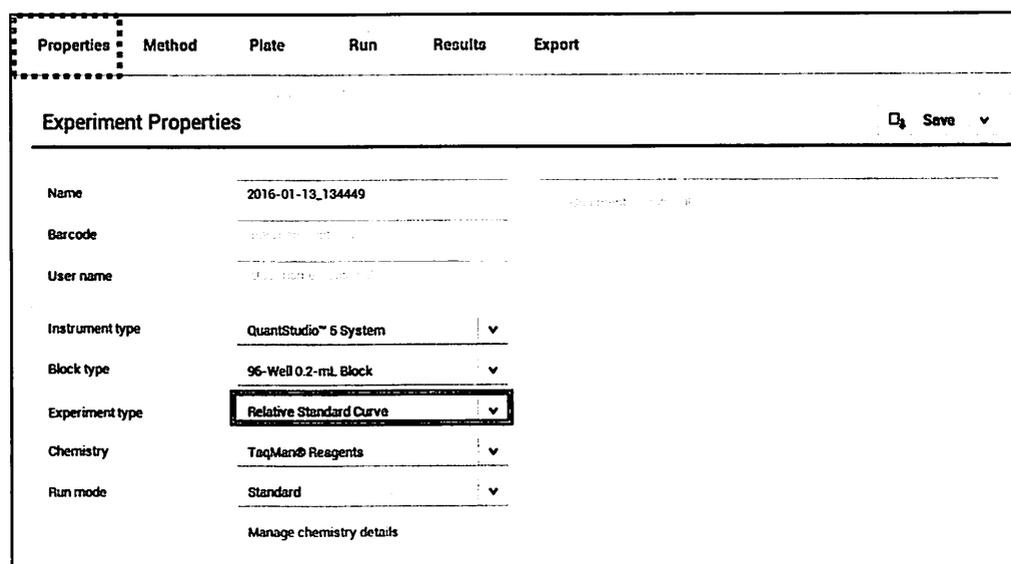
Relative Standard Curveではターゲット遺伝子と内在性コントロール遺伝子の定量値をそれぞれの検量線から求めたあと、内在性コントロール遺伝子の値で補正を行い、さらに基準にしたリファレンスサンプルとの相対値を算出します。

Relative Standard Curveの設定

注記:ここではStandard Curveの設定と異なる項目のみご説明致します。その他の項目の設定方法につきましては、Standard Curveでの該当項目をご参照ください。

ドキュメントの設定 : Properties

Experiment typeからRelative Standard Curveを選択します。



The screenshot shows the 'Experiment Properties' dialog box in the software. The 'Experiment type' dropdown menu is highlighted with a red box, and 'Relative Standard Curve' is selected. Other visible settings include: Name (2016-01-13_134449), Instrument type (QuantStudio™ 5 System), Block type (96-Well 0.2-mL Block), Chemistry (TaqMan® Reagents), and Run mode (Standard).

注記: Standard Curve / Relative Standard Curve / Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)の各ドキュメントタイプはラン終了後に変更し、再解析することができます。

ドキュメントの設定 : Plate 基準サンプルと内在性コントロールの設定

1. Plate画面内Quick Setup のPlate Attributesで、基準とするReference Sampleと、内在性コントロール (Endogenous Control)とする遺伝子をそれぞれプルダウンメニューから選択します。

注記: Reference Sample及びEndogenous Controlはラン終了後に変更することができます。

注記: Endogenous ControlとしてMultiple Controlを選択すると、複数のTargetの平均値を内在性コントロール用補正值として用いることができます。

Properties	Method	Plate	Run	Results	Export
Assign Targets and Samples					
Quick Setup Advanced Setup					
Well Attributes					
Sample	New Sample ▼				
Target	New Target ▼				
Well Comments	Well Comments				
Plate Attributes					
1 Passive Reference	ROX ▼				
Reference Sample:	Sample 1 ▼				
Endogenous Control:	GAPDH ▼				

ドキュメントの設定 : Plate Biological Replicate Groupsの設定

(オプション) 集団間での比較定量を行いたい場合は、集団ごとの名前(Biological Replicate Groups)の入力も行います。Biological Replicate Groupとは、同一の生物学的な集団の指定に相当します。

Biological Replicate Groupの指定を行うと、Sample間の相対値の算出とは別に、Biological Replicate Group間の相対値も求めることができます。

2. Plate画面内Advanced SetupのBiological Replicate Groupsに任意のBiological Replicateを登録します。

- Addをクリックするとリストに新規のBiological Replicate Groupが追加されます。
- 該当ウェルを選択し、各Biological Replicate Groupsのチェックボックスにチェックを入れます。

注記: Biological Replicate Groupはラン終了後に変更することができます。

The screenshot shows the 'Plate' configuration screen. At the top, there are tabs for 'Properties', 'Method', 'Plate', 'Run', 'Results', and 'Export'. The 'Plate' tab is selected. Below the tabs is the 'Assign Targets and Samples' section, which is divided into 'Quick Setup' and 'Advanced Setup' (the latter is active). Under 'Advanced Setup', there are three main sections: 'Targets', 'Samples', and 'Biological Replicate Groups'. The 'Biological Replicate Groups' section is highlighted with a red box and a circled '2'. It contains a table with columns for 'Biological Group' and 'Comments', and a list of two groups: 'Biological Group 1' and 'Biological Group 2'. Each group has a checkbox and an 'X' icon next to it.

Assign Targets and Samples					
Quick Setup					
Advanced Setup					
Targets					
	Name	Reporter	Quencher	Comments	Task
<input type="checkbox"/>	IL8	FAM	NFQ-MGB		-
<input checked="" type="checkbox"/>	GAPDH	FAM	NFQ-MGB		-
Samples					
	Sample Name	Comments			
<input type="checkbox"/>	Sample 1				X
<input type="checkbox"/>	Sample 2				X
<input type="checkbox"/>	Sample 3				X
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 4				X
Biological Replicate Groups					
	Biological Group	Comments			
<input type="checkbox"/>	Biological Group 1				X
<input checked="" type="checkbox"/>	Biological Group 2				X

Relative Standard Curve データ解析

注記:ここではStandard Curveの設定と異なる項目のみご説明致します。その他の項目の解析方法につきましては、Standard Curveでの該当項目をご参照ください。

Relative Standard Curveを選択した場合、Analysis画面にGene Expression画面及びQC Plot画面が追加されます。

Gene Expressionの確認

Gene Expressionには、内在性コントロールで補正後の、リファレンスサンプルとの相対値が表示されます。

1.Results画面内でプルダウンメニューからGene Expressionを選択します。

2.Show plot settings  をクリックします。

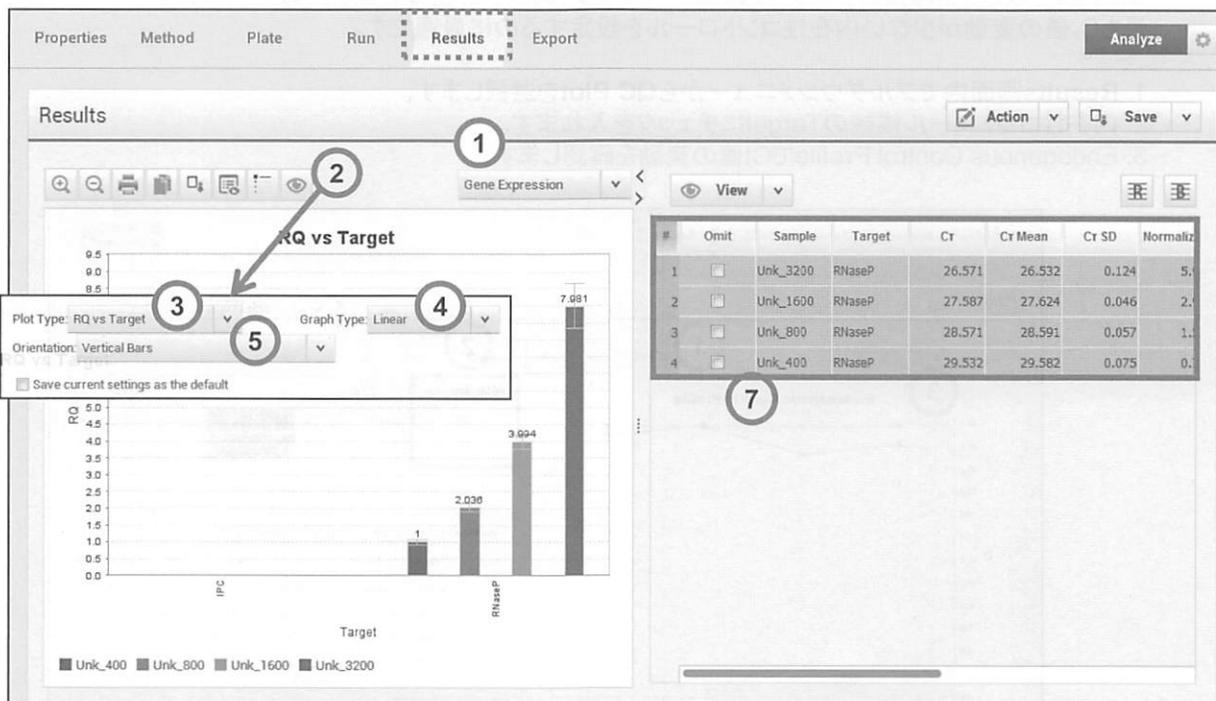
3.Plot Typeでグラフ表示単位を変更できます。

4.Graph Typeで縦軸のスケールを変更できます。

5.Orientationでグラフの向きを変更できます。

6. (オプション)棒グラフの順番、はポインターでドラッグすることで入れ替えることができます。

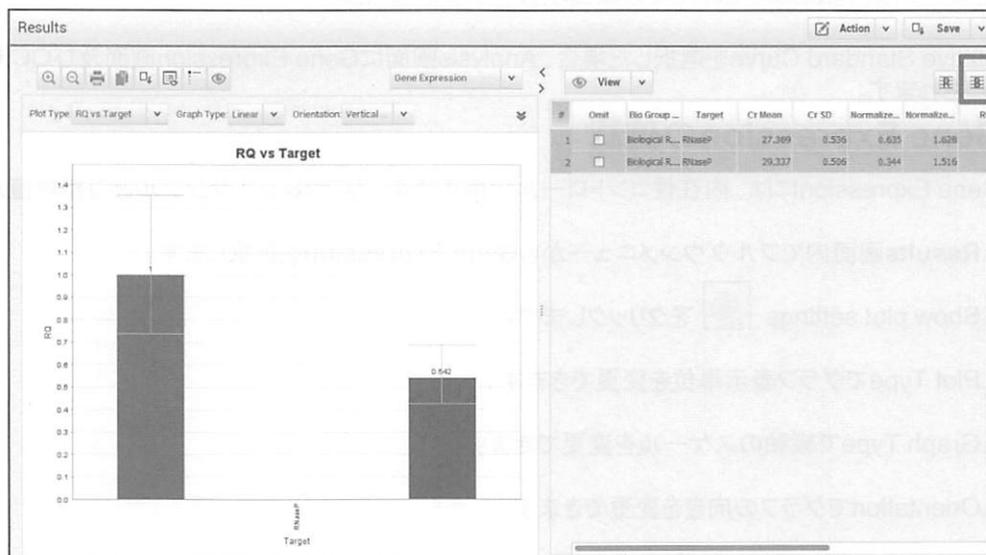
7. 画面右側にサンプル毎の相対値等詳細データが表示されます。



Gene Expressionの確認 (続き)

8. (オプション: Biological Replicate Groupを設定した場合のみ)

 をクリックするとBiological Replicate Group毎の相対値等詳細データが表示されます。



8

QC Plotの確認

QC Plotでは最大4種類のターゲット遺伝子のサンプル毎の C_T 値の変動を比較できます。最も C_T 値の変動が少ない内在性コントロールを設定するのに最適です。

1. Results画面内でプルダウンメニューからQC Plotを選択します。
2. 内在性コントロール候補のTargetにチェックを入れます。
3. Endogenous Control Profileで C_t 値の変動を確認します。



内在性コントロールやリファレンスサンプルを変更する場合はAnalysis SettingsのRelative Quantification Settingsで行うことができます。

AnalysisメニューからAnalysis settingを選択、もしくはAnalyzeボタン横の  アイコンをクリックするとAnalysis Settingが表示されます。

Cr Settings Flag Settings **1** Relative Quantification Settings Advanced Settings Standard Curve Settings

Analysis Type
Select the type of analysis to perform.
 Multiplex Singleplex

2 **Select Reference(s)**
Select the biological replicate group and/or sample to use as the reference(s) for this experiment.
Biological Replicate Group Reference: Biological Replicate Group 1 Reference Sample: Unk_800

Select Endogenous Control(s)
Select the target to use as the endogenous control for this experiment. To use multiple endogenous controls, select Multiple Controls from the drop-down list, then select the controls as necessary.
Endogenous Control(s): IPC

Outlier Rejection
Select to reject replicates with ΔCt values less than or equal to the value entered below. These analysis settings apply only to multiplex reactions.
 Reject Replicates with specified ΔCt
 $\Delta Ct \leq$ 1.0

RQ Min/Max Calculations
Select the algorithm to use to determine RQ Min and Max values (error bars).
 Confidence Level: 95.0 % Standard Deviations: 1

Save... Load... Cancel Revert **3** Apply

1. Relative Quantitation Settingsを選択します。
2. Select Reference およびSelect Endogenous Controlを適宜変更します。
3. 設定を変更したらApplyをクリックしてウインドウを閉じ、Analyzeをクリックして再解析を行ってください。

QuantStudio Design & Analysisソフトウェア 簡易操作ガイド (III)

Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) ～検量線を用いない相対定量～

概要

QuantStudio 3 / QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムでは、検量線を用いない比較 C_T 法 (Comparative C_T 法)による相対定量を行うことができます。

比較 C_T 法 ($\Delta\Delta C_T$ 法)では、基準としたリファレンスサンプルとの C_T 値 (Threshold Cycle値)の差から相対値を求める相対定量法です。

Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)の設定

注記:ここではStandard Curveの設定と異なる項目のみご説明致します。その他の項目の設定方法につきましては、Standard Curveでの該当項目をご参照ください。

ドキュメントの設定 : Experiment Properties

Experiment typeからComparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)を選択します。

Properties	Method	Plate	Run	Results	Export
Experiment Properties Save					
Name	2016-01-13_150903				
Barcode	Barcode (optional)				
User name	User name (optional)				
Instrument type	QuantStudio™ 5 System				
Block type	96-Well 0.2-ml Block				
Experiment type	Comparative Ct ($\Delta\Delta C_T$)				
Chemistry	TaqMan® Reagents				
Run mode	Standard				
Manage chemistry details					

注記: Standard Curve / Relative Standard Curve / Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)の各ドキュメントタイプはラン終了後に変更し、再解析することができます。

ドキュメントの設定 : Plate 基準サンプルと内在性コントロールの設定

1. Plate画面内Quick Setup のPlate Attributesで、基準とするReference Sampleと、内在性コントロール (Endogenous Control)とする遺伝子をそれぞれプルダウンメニューから選択します。

注記: Reference Sample及びEndogenous Controlはラン終了後に変更することができます。

注記: Endogenous ControlとしてMultiple Controlを選択すると、複数のTargetの平均値を内在性コントロール用補正值として用いることができます。

Properties	Method	Plate	Run	Results	Export
Assign Targets and Samples					
Quick Setup Advanced Setup					
Well Attributes					
Sample	New Sample ▼				
Target	New Target ▼				
Well Comments	Well Comments				
Plate Attributes					
1 Passive Reference	ROX ▼				
Reference Sample:	Sample 1 ▼				
Endogenous Control:	GAPDH ▼				

ドキュメントの設定 : Plate Biological Replicate Groupsの設定

(オプション) 集団間での比較定量を行いたい場合は、集団ごとの名前(Biological Replicate Groups)の入力も行います。Biological Replicate Groupとは、同一の生物学的な集団の指定に相当します。

Biological Replicate Groupの指定を行うと、Sample間の相対値の算出とは別に、Biological Replicate Group間の相対値も求めることができます。

2. Plate画面内Advanced SetupのBiological Replicate Groupsに任意のBiological Replicateを登録します。

- Addをクリックするとリストに新規のBiological Replicate Groupが追加されます。
- 該当ウェルを選択し、各Biological Replicate Groupsのチェックボックスにチェックを入れます。

注記: Biological Replicate Groupはラン終了後に変更することができます。

The screenshot shows the 'Plate' tab in a software interface. The 'Assign Targets and Samples' section is active, with 'Advanced Setup' selected. It contains two main sections: 'Targets' and 'Samples'. The 'Targets' section has a table with columns: Name, Reporter, Quenchor, Comments, Task, and Quantity. The 'Samples' section has a table with columns: Sample Name and Comments. Below these is the 'Biological Replicate Groups' section, which is circled in red and has a '2' in a circle next to it. It contains a table with columns: Biological Group and Comments. The 'Add' button is visible in the top right of the 'Biological Replicate Groups' section.

Assign Targets and Samples						
Quick Setup		Advanced Setup				
- Targets						
<input type="checkbox"/>	IL8	FAM	NFQ-MGB		-	X
<input type="checkbox"/>	GAPDH	FAM	NFQ-MGB		-	X
- Samples						
<input type="checkbox"/>	Sample 1					X
<input type="checkbox"/>	Sample 2					X
<input type="checkbox"/>	Sample 3					X
<input type="checkbox"/>	Sample 4					X
- Biological Replicate Groups						
<input type="checkbox"/>	Biological Group 1					X
<input type="checkbox"/>	Biological Group 2					X

Relative Standard Curve データ解析

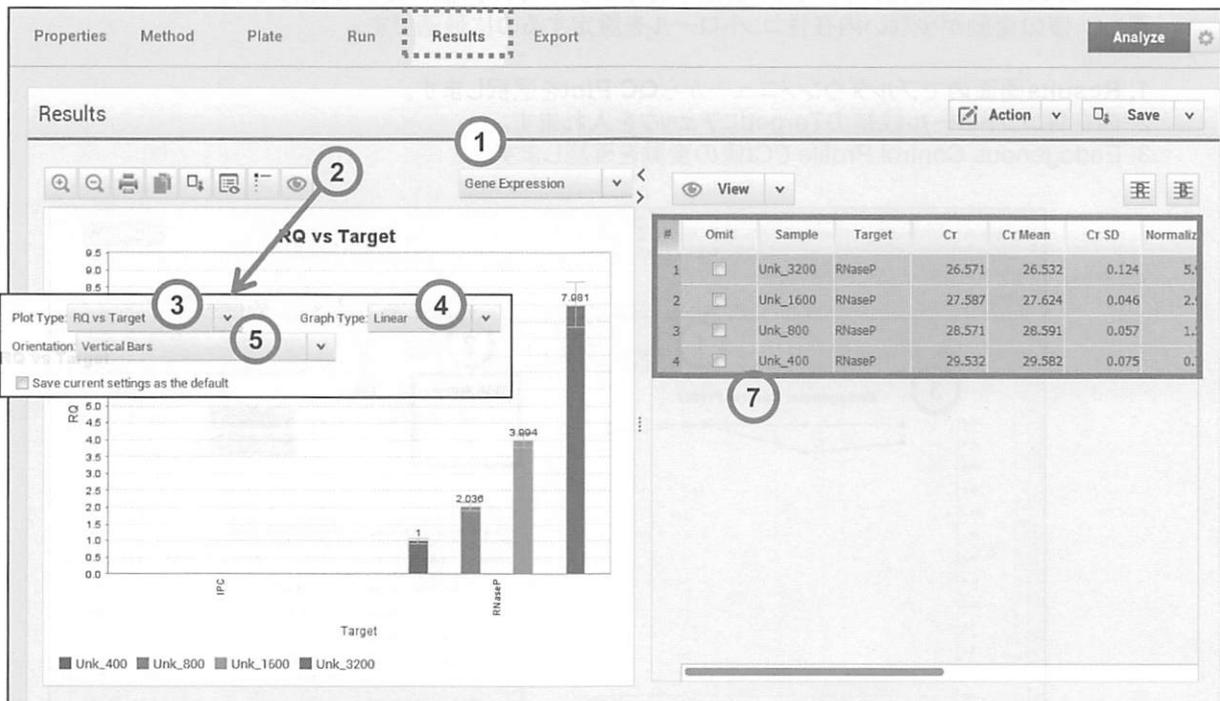
注記:ここではStandard Curveの設定と異なる項目のみご説明致します。その他の項目の解析方法につきましては、Standard Curveでの該当項目をご参照ください。

Relative Standard Curveを選択した場合、Analysis画面にGene Expression画面及びQC Plot画面が追加されます。

Gene Expressionの確認

Gene Expressionには、内在性コントロールで補正後の、リファレンスサンプルとの相対値が表示されます。

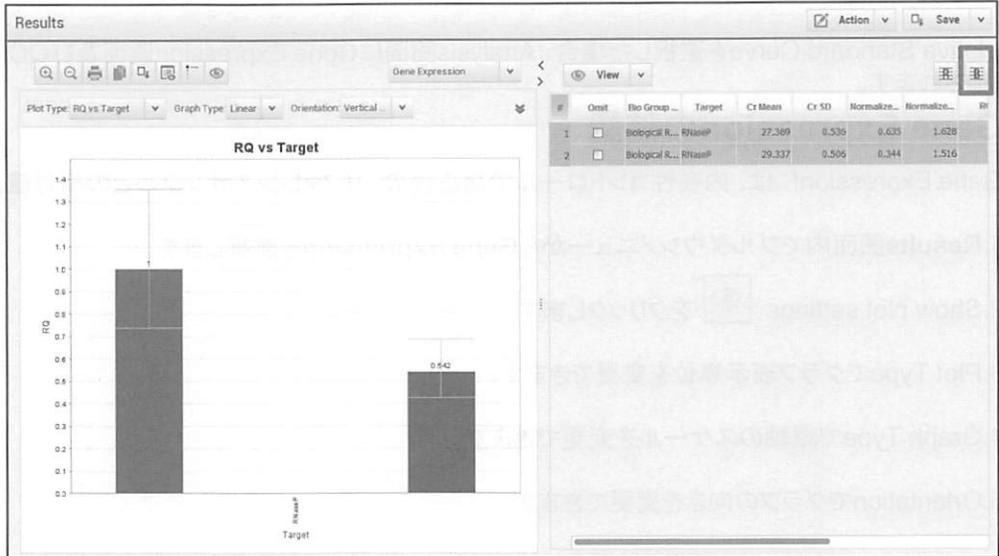
- 1.Results画面内でプルダウンメニューから**Gene Expression**を選択します。
- 2.Show plot settings  をクリックします。
- 3.Plot Typeでグラフ表示単位を変更できます。
- 4.Graph Typeで縦軸のスケールを変更できます。
- 5.Orientationでグラフの向きを変更できます。
6. (オプション)棒グラフの順番、はポインターでドラッグすることで入れ替えることができます。
7. 画面右側にサンプル毎の相対値等詳細データが表示されます。



Gene Expressionの確認 (続き)

8. (オプション: Biological Replicate Groupを設定した場合のみ)

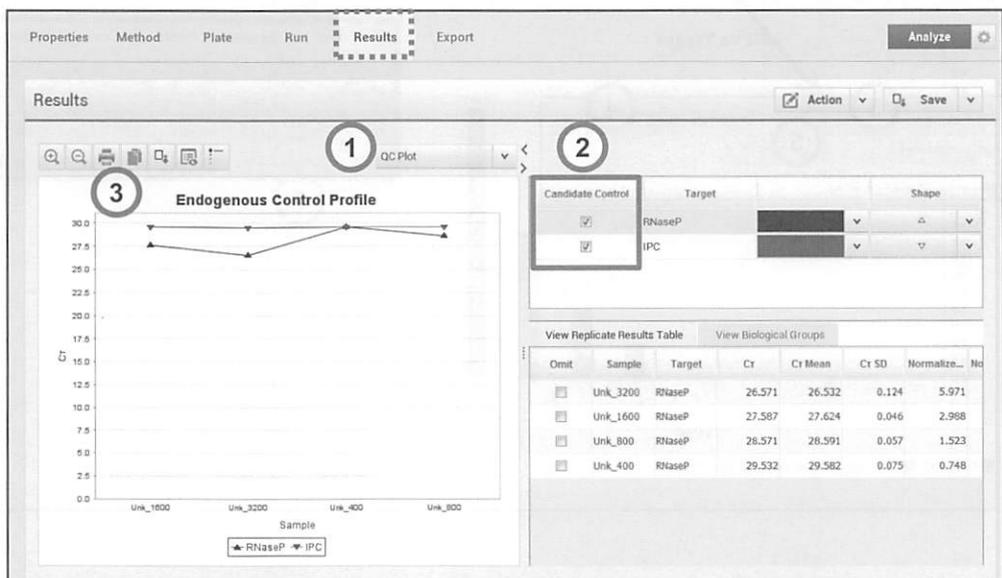
 をクリックするとBiological Replicate Group毎の相対値等詳細データが表示されます。



QC Plotの確認

QC Plotでは最大4種類のターゲット遺伝子のサンプル毎の C_T 値の変動を比較できます。最も C_T 値の変動が少ない内在性コントロールを設定するのに最適です。

1. Results画面内でプルダウンメニューからQC Plotを選択します。
2. 内在性コントロール候補のTargetにチェックを入れます。
3. Endogenous Control Profileで C_t 値の変動を確認します。



内在性コントロールやリファレンスサンプルを変更する場合はAnalysis SettingsのRelative Quantification Settingsで行うことができます。また、PCR効率の補正も行うことができます。

AnalysisメニューからAnalysis settingを選択、もしくはAnalyzeボタン横の  アイコンをクリックするとAnalysis Setting が表示されます。

Cr Settings Flag Settings **1** Relative Quantification Settings Advanced Settings

Analysis Type
Select the type of analysis to perform.
Multiplex Singleplex

2 **Select Reference(s)**
Select the biological replicate group and/or sample to use as the reference(s) for this experiment.
Biological Replicate Group Reference: Reference Sample:

Select Endogenous Control(s)
Select the target to use as the endogenous control for this experiment. To use multiple endogenous controls, select Multiple Controls from the drop-down list, then select the controls as necessary.
Endogenous Control(s):

3 **Efficiency**
Enter percentage values between 1 and 150%

	Target	Efficiency (%)
IPC		100.0
RNaseP		100.0

Outlier Rejection
Select to reject replicates with ΔCr values less than or equal to the value entered below. These analysis settings apply only to multiplex reactions.
 Reject Replicates with specified ΔCr
ΔCr ≤

RQ Min/Max Calculations
Select the algorithm to use to determine RQ Min and Max values (error bars).
 Confidence Level: % Standard Deviations:

4 Save... Load... Cancel Revert Apply

a. Efficiencyでは、Target毎のPCR効率を入力することで、PCR効率を考慮した解析が可能です。過去に検量線を作成し明確なPCR効率がわかっている場合、入力して解析を行うことで、より正確な相対値を算出することができます。

1. Relative Quantitation Settingsを選択します。
2. Select Reference およびSelect Endogenous Controlを適宜変更します。
3. Efficiencyでは、Target毎のPCR効率を入力することで、PCR効率を考慮した解析が可能です。過去に検量線を作成し、PCR効率がわかっている場合、Efficiencyに入力します。
4. 設定を変更したらApplyをクリックしてウインドウを閉じ、Analyzeをクリックして再解析を行ってください。

QuantStudio Design & Analysisソフトウェア 簡易操作ガイド (IV)

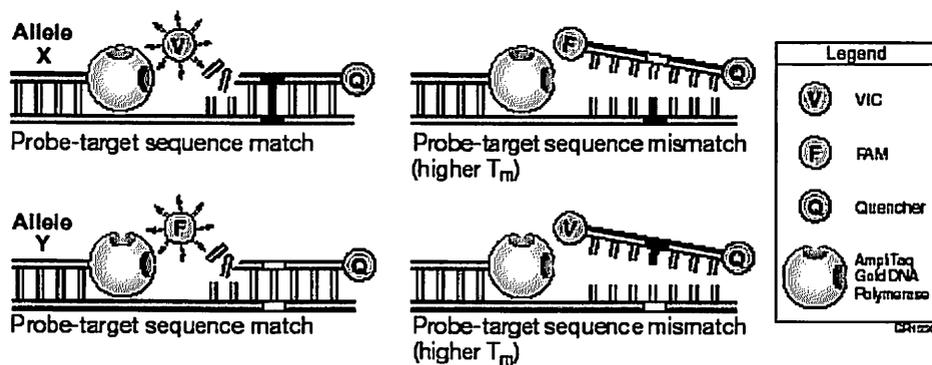
Genotyping ～対立遺伝子識別アッセイ～

概要

QuantStudio 3 / QuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムでは、5'-nuclease アッセイによる Allelic Discrimination アッセイ(対立遺伝子識別アッセイ)を行うことができます。

原理

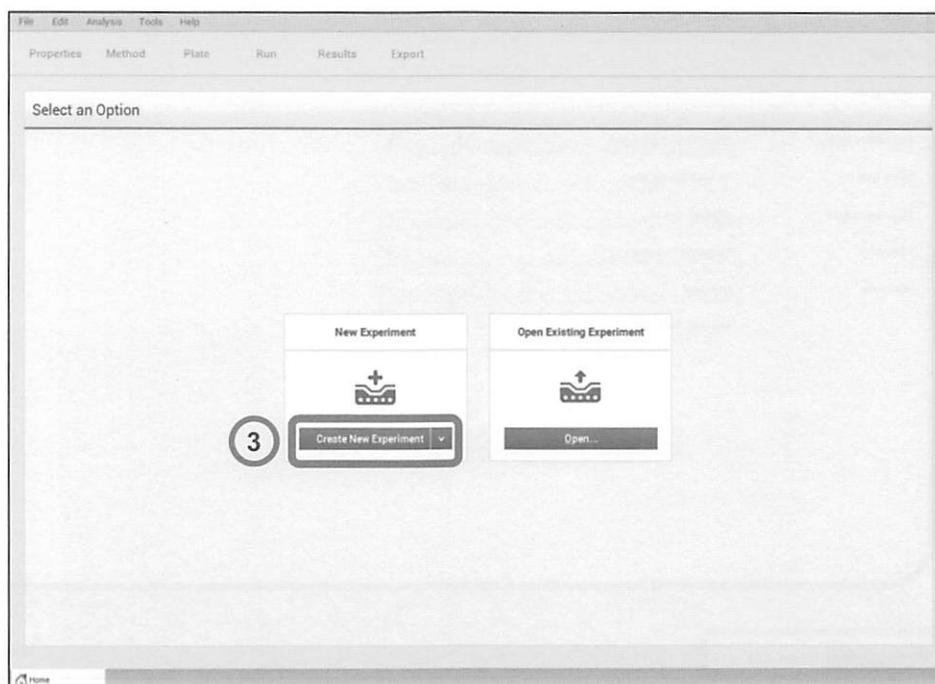
既知の SNPs に対応する2つの異なる蛍光色素でラベルした2プローブを加えてPCR 反応を行います。プローブと標的配列の間にミスマッチがあるとプローブの T_m 値が下がり、競合反応により100%マッチのプローブが優先的にハイブリダイズしてプローブの分解によるリポーター蛍光色素を検出します。一方ミスマッチのプローブの分解及び蛍光強度の上昇が最小限に抑えられるので、PCR 終了後のエンドポイントで蛍光量をプロットすることで両ホモ及びヘテロのタイピングを行うことができます。



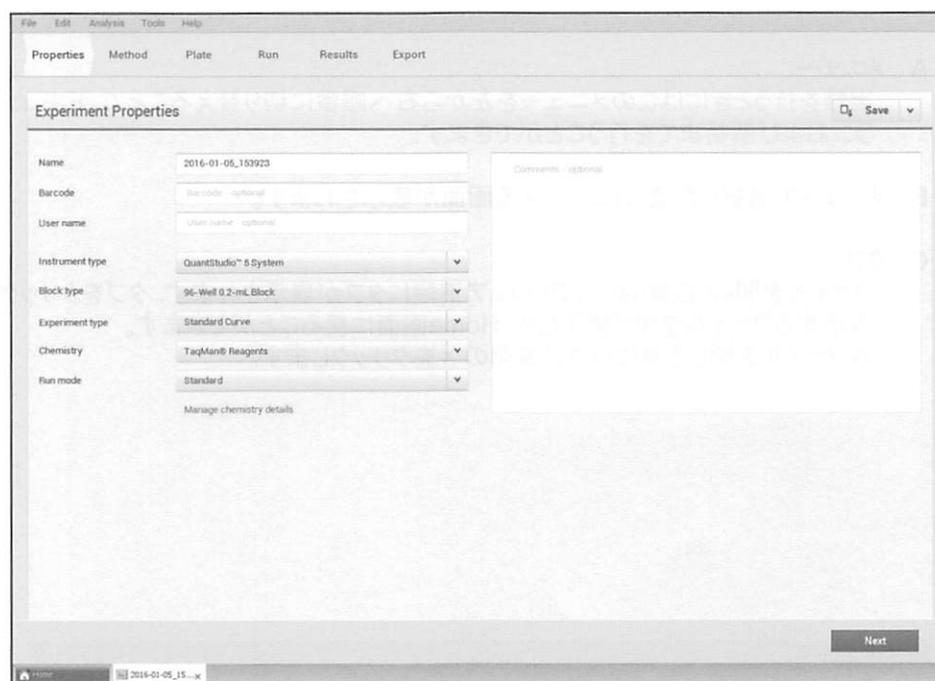
新規ドキュメントの作成



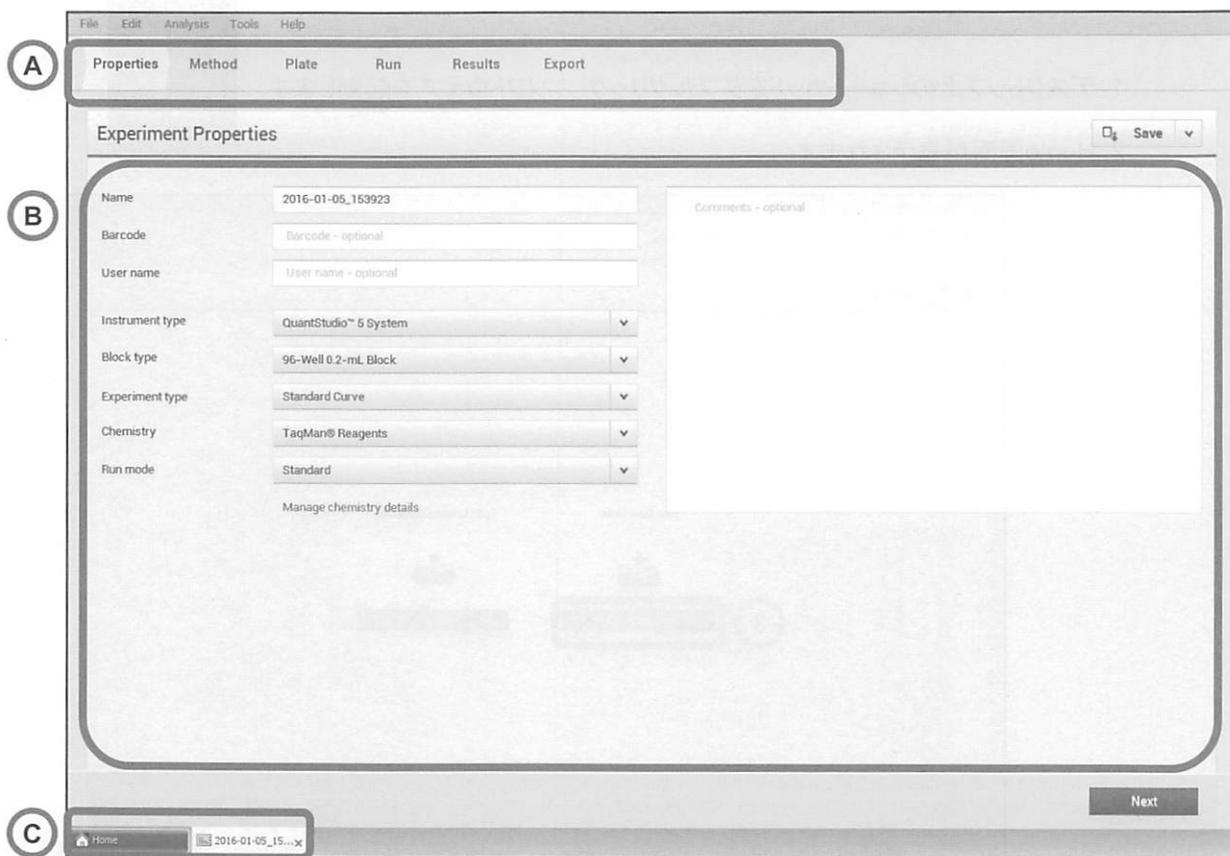
1. デスクトップ上のショートカットをダブルクリックし、ソフトウェア を起動します。
2. Home画面が表示されます。



3. Select an option内の**Create New Experiment**をクリックすると、新規ドキュメントが開きます。



ドキュメントについて



A: メニュー

実験を行うときにはこのメニューを左から右へ順番に切り替えることで、ドキュメントの設定、ランおよび解析までを行うことができます。

B: メニューで選択した項目に対応する画面が表示されます。

C: タブ

ファイルを開くと自動的にソフトウェア下段にタブが表示されます。タブをクリックすることで表示するファイルを切り替えたり、Home画面に戻ることができます。各ファイルを閉じる時にはタブ右側の×をクリックします。

ドキュメントの設定 : Properties

新規ドキュメントを作成するとProperties画面が表示されます。
この画面でファイル名や実験系の基本情報を入力します。

1. Name
自動的にドキュメント作成日時が入力されます。必要に応じて変更・追加します。
BarcodeとUser Nameは全て任意で入力してください。
2. Instrument type
ご利用の機器をプルダウンメニューから選択します。
3. Block type
ご利用の機器のブロックタイプをプルダウンメニューから選択します。
4. Experiment type
対立遺伝子識別アッセイを行うときには**Genotyping**をプルダウンメニューから選択します。
5. Chemistry
検出に用いる蛍光ケミストリを選択します。
TaqMan Reagentsが選択されていることを確認してください。
6. Run mode
ご利用いただく試薬にあわせて選択します。
Standard用試薬をご利用の場合は**Standard**を、Fast用試薬をご利用の際は**Fast**を選択します。
7. 入力が完了したら、Nextをクリックします。

The screenshot shows the 'Experiment Properties' dialog box. At the top, there are tabs for 'Properties', 'Method', 'Plate', 'Run', 'Results', and 'Export'. The 'Properties' tab is active. The form contains the following fields:

- Name:** 2016-01-13_153505 (circled 1)
- Barcode:** Barcode - optional
- User name:** User name - optional
- Instrument type:** QuantStudio™ 5 System (dropdown, circled 2)
- Block type:** 96-Well 0.2-mL Block (dropdown, circled 3)
- Experiment type:** Genotyping (dropdown, circled 4)
- Chemistry:** TaqMan® Reagents (dropdown, circled 5)
- Run mode:** Standard (dropdown, circled 6)

At the bottom right, there is a 'Next' button (circled 7) and a 'Save' button.

ドキュメントの設定 : Method

次に **Method**画面が表示されます。

Experiment Propertiesで選択した項目に合わせたサーマルサイクラー条件が自動的に表示されます。必要に応じて適宜変更します。

1. 反応ボリュームを入力します。ブロック毎の推奨ボリューム及び最大ボリュームは以下の通りです。

ブロックタイプ	推奨ボリューム	最大ボリューム
384ウェル	5 μ L	20 μ L
Standard 96ウェル	25 μ L	50 μ L
Fast 96ウェル	10 μ L	30 μ L

注記: 推奨ボリューム以上の値に設定すると、Fastモードの時のランプスピードが遅くなります。

2. 温度条件を確認します。各ステップにポインターを重ねた時に表示される+ボタンをクリックすることで、任意のプログラムを追加・削除することができます。

重要: Pre-ReadとPost Readをそれぞれ25°Cに設定していただくことをお勧めします。

3.  のマークがアクティブになっているポイントで蛍光データを回収します。マークの上をクリックすることで、データ回収ポイントを設定することができます。

4. (オプション) 別のサーマルサイクラーで増幅させたプレートのリードだけ行いたい場合には、Pre-PCR Read と Amplificationチェックボックスを外します。

重要: 必ずQuantStudioのそれぞれの機器に対応したプレートを使用してください。プレートの種類を間違えますと故障の原因となります。

5. 入力が完了したら、Nextをクリックします。



The screenshot shows the 'Method' configuration screen in the QuantStudio software. The interface is divided into several sections:

- Properties:** Method (selected), Plate, Run, Results, Export.
- Experiment Method:** Includes 'Action' and 'Save' buttons.
- Volume and Cover:** Volume is set to 25 μ L, and Cover is set to 105.0 °C.
- Thermal Cycle Graph:** Shows a graph with four stages:
 - Pre-Read Stage:** Step 1, 1.6 °C/s, 25.0 °C, 00:30.
 - Hold Stage:** Step 1, 95.0 °C, 10:00, 1.6 °C/s.
 - PCR Stage:** Step 1, 95.0 °C, 00:15, 1.6 °C/s; Step 2, 60.0 °C, 01:00, 1.6 °C/s.
 - Post-Read Stage:** Step 1, 25.0 °C, 00:30, 1.6 °C/s.
- Include Checkboxes:** Pre-PCR Read, Amplification, Post-PCR Read.
- Legends:** Data Collection On, Data Collection Off, Pause On, Pause Off, Advanced Settings, V VeriFlex.
- Navigation:** Previous and Next buttons, with the Next button highlighted by a circled '5'.

ドキュメントの設定 : Plate (1) SNPsの設定

次に **Plate**画面が表示されます。

この画面では検出するSNP (SNP Assay) 及び未知サンプル (Sample) の情報を入力します。

注記: Define画面の設定はラン終了後でも入力・変更できます。

SNPsに検出する遺伝子の情報を入力します。

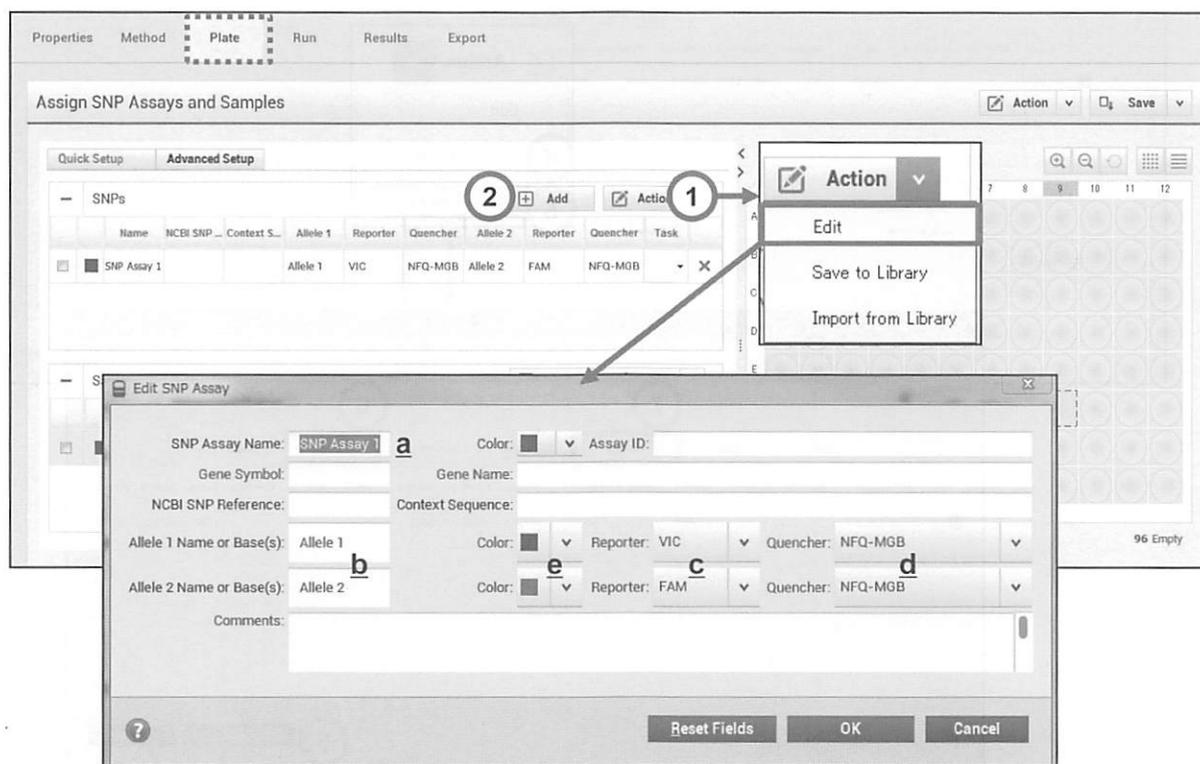
1. 初期設定では"SNP Assay 1"が表示されます。

詳細情報を入力する場合は1度クリックしてハイライト表示してから**Action**から**Edit**を選択します。

- SNP Assay NameにSNP名を入力します。
- 各アレルの名称または塩基を入力します。
- Reporterの蛍光色素をプルダウンメニューから選択します。
- Quencherの設定を確認します。
- Colorはソフトウェアが自動的に振り分けますが、もしカスタマイズしたいときにはプルダウンメニューから選択します。

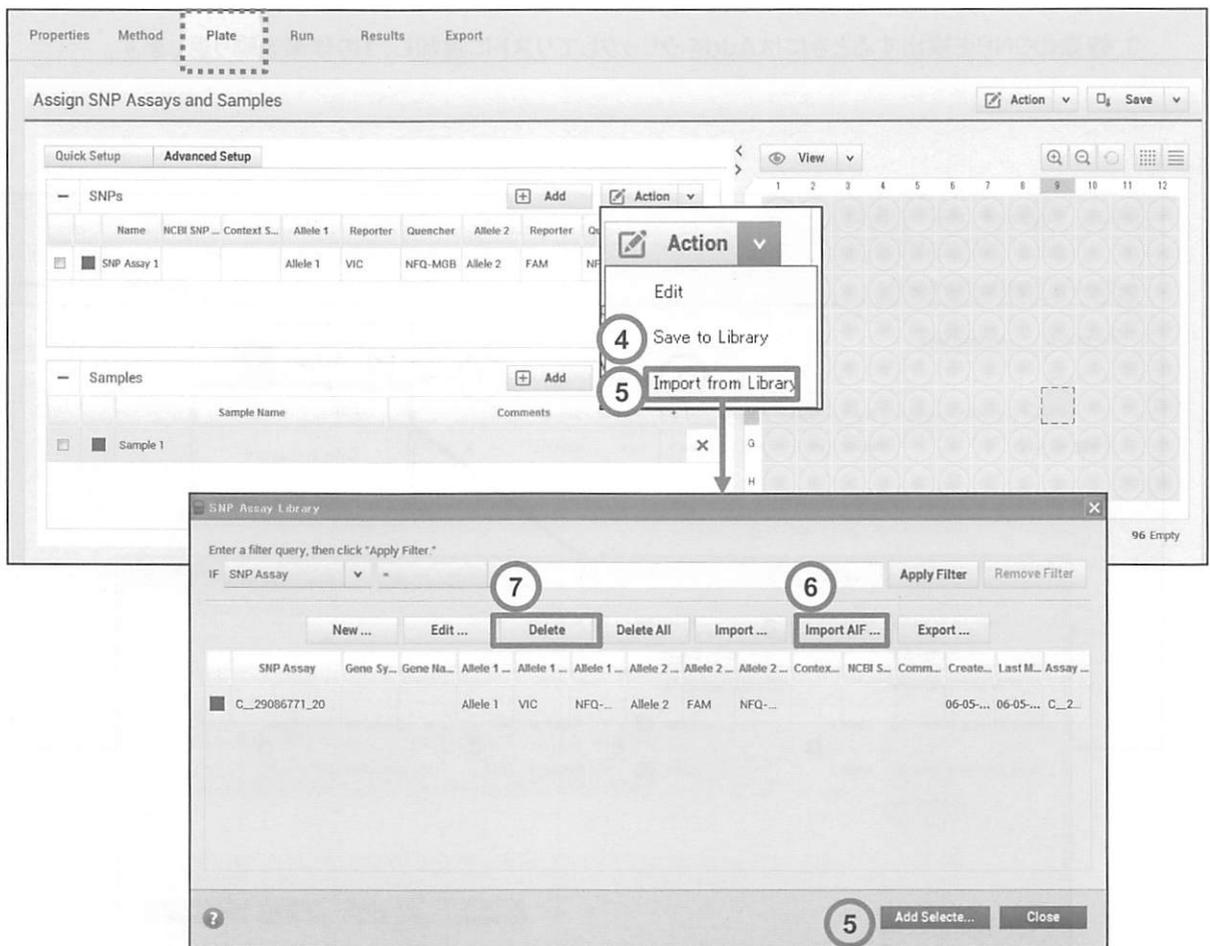
2. 設定が完了したら、OKをクリックします。

3. 複数のSNPを検出するときには**Add**をクリックしてリストに追加し、1の作業を繰り返します。



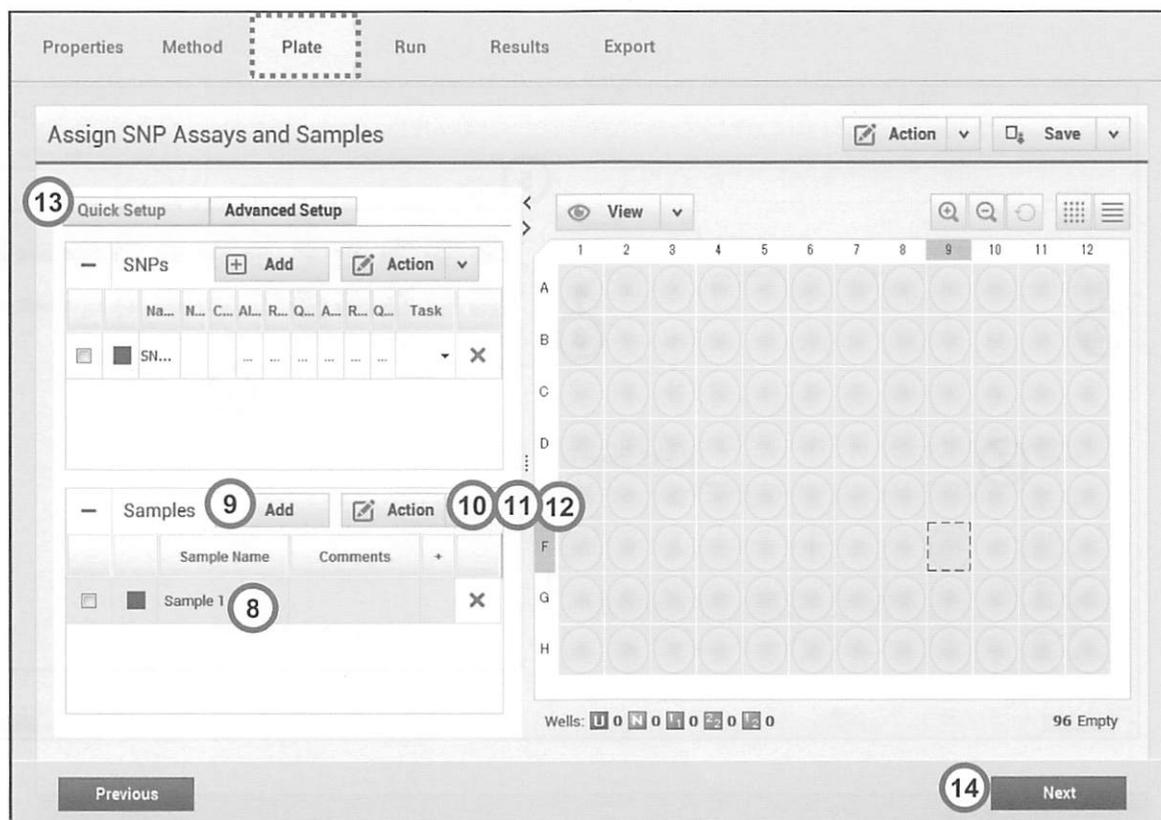
ドキュメントの設定 : Plate (2) SNPsの設定

- 繰り返し使用するSNPはその情報をLibraryに保存することができます。保存するSNP Assayをクリックしてハイライトで選択したら、**Action**から**Save to Library**で保存されます。
- 以前Libraryに保存したSNPを呼び出して使用したいときには、**Action**から**Import from Library**をクリックしてSNP Libraryを表示します。使用するSNP Assayをクリックし、**Add Selected SNP(s)**をクリックします。
- 弊社で設計・合成のAssayで納品時にCDが添付されている製品の場合、SNP Libraryの**Import AIF**をクリックし、添付のCD内のAssay Information File (AIF)を選択すると、SNP Assay Listが自動的に保存されます。
- 以前Libraryに保存したSNPを削除したいときには、**Action**から**Import from Library**をクリックしてSNP Libraryを表示します。削除するSNP Assayをクリックして選択したら、**Delete**をクリックします。



ドキュメントの設定 : Plate (3) Samplesの設定

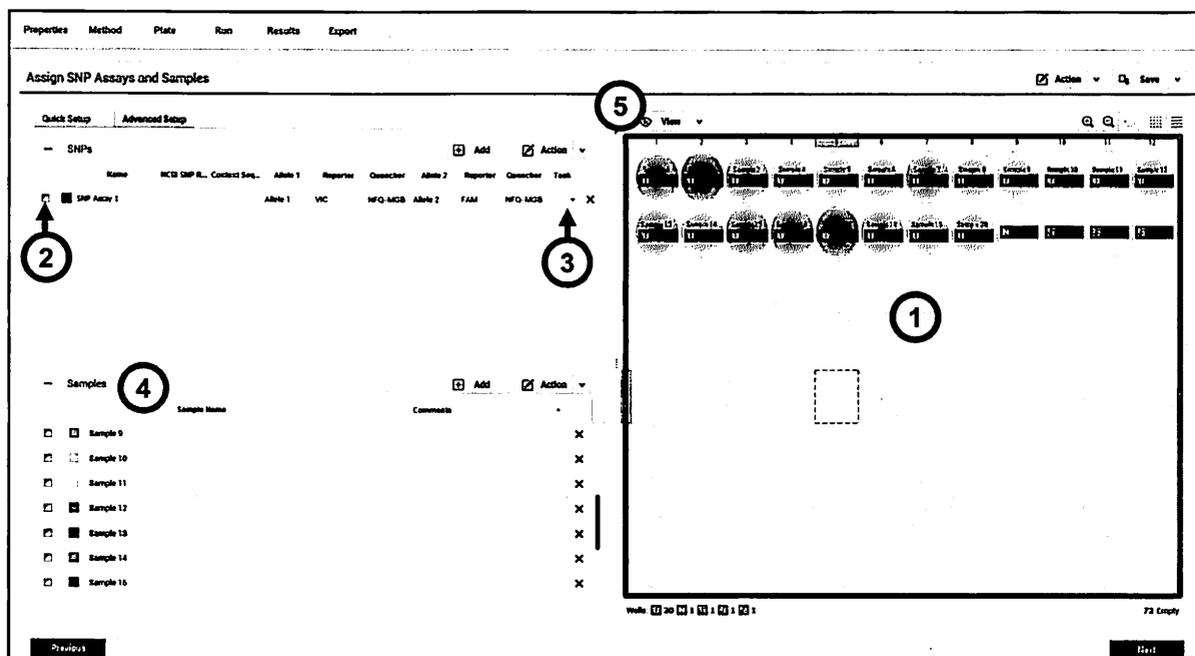
8. SamplesにSNPのタイピングをする未知サンプルを登録します。
 - Sample Nameにはサンプル名を入力します。
 - Colorはソフトウェアが自動で振り分けますが、カスタマイズしたいときにはプルダウンメニューから選択します。
9. 複数の未知サンプルがある時には、**Add**をクリックしてリストに追加し、8の作業を繰り返します。
10. 繰り返し使用するSampleをLibraryに保存することができます。保存するSampleをクリックしてハイライトで選択し、**Action**から**Save to Library**ボタンをクリックすると、確認画面が表示されて保存されます。
11. 以前Libraryに保存したSampleを呼び出して使用したいときには、**Action**から**Import from Library**をクリックしてSample Libraryを表示します。使用するSampleをクリックし、**Add Selected Sample (s)**をクリックすると、選択したSampleがリストに追加されます。
12. 以前Libraryに保存したSampleを削除したいときには、**Action**から**Import from Library**をクリックしてSample Libraryを表示します。削除するSampleをクリックし、Deleteをクリックすると、選択したSampleがリストから削除されます。
13. (オプション) Passive referenceをROXから変更する必要がある場合、Quick Setupタブ内の**Passive reference** プルダウンメニューから変更します。
14. 入力が完了したら、Nextをクリックします。



ドキュメントの設定 : Plate (4) プレートレイアウトの設定

1. プレートレイアウト内で、設定するウェルを選択します。
 - マウスをドラッグさせると選択枠が広がります。
 - 列番号または行のアルファベットをクリックすると、列または行全体を一度に選択できます。
 - ウェルの左上の小さな正方形のブロックをクリックすると、全ウェルを一度に選択できます。
 - Controlキーを押しながらクリックすると、任意のウェルの選択及び選択解除ができます。
2. SNPsフィールド内のSNPリストのチェックボックスにチェックを入れると、選択したウェルにSNPが設定されます。
3. Taskを選択します。初期設定では全て"U"です。アルファベットをクリックして設定を適宜変更します。
 - **U**: Unknown 未知サンプル
 - **N**: No Template Control テンプレート無しのネガティブコントロール
 - **1**: Allele 1 ホモコントロール
 - **2**: Allele 2 ホモコントロール
 - **12**: ヘテロコントロール

注記: Nは1SNPあたり必ず1ウェル以上設定してください。3ウェル以上設定していただくことを推奨しています。
注記: 各アレルコントロールの設定は必須ではありません。全て未知サンプルでもクラスタが分離すればタイピングすることができます。
4. Unknown (未知サンプル)にSampleを設定します。設定するUnknownウェルを選択し、Samplesフィールド内のサンプルリストのチェックボックスにチェックを入れると、選択したウェルにSampleが設定されます。
5. Viewをクリックしてウェルの表示設定を変更することができます。



ドキュメントの設定 : Plate (5) プレートレイアウトの設定

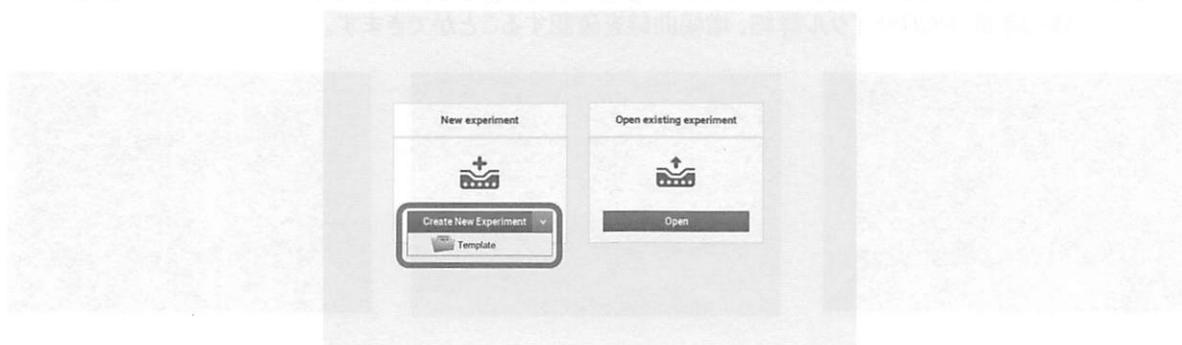
(オプション) 雛型ファイルの保存

同じ条件で何回も繰り返し実験を行う場合、雛型ファイルを作成しておくことができます。

1. **Save**より**Save As**を選択します。
2. 保存先の指定の画面が表示されます。
3. 保存先を指定し、File Nameを入力して、**Save**をクリックすると保存されます。
注記:C:ドライブへの保存は避け、D:ドライブに保存を行ってください。
4. 入力が完了したら、**Next**をクリックします。



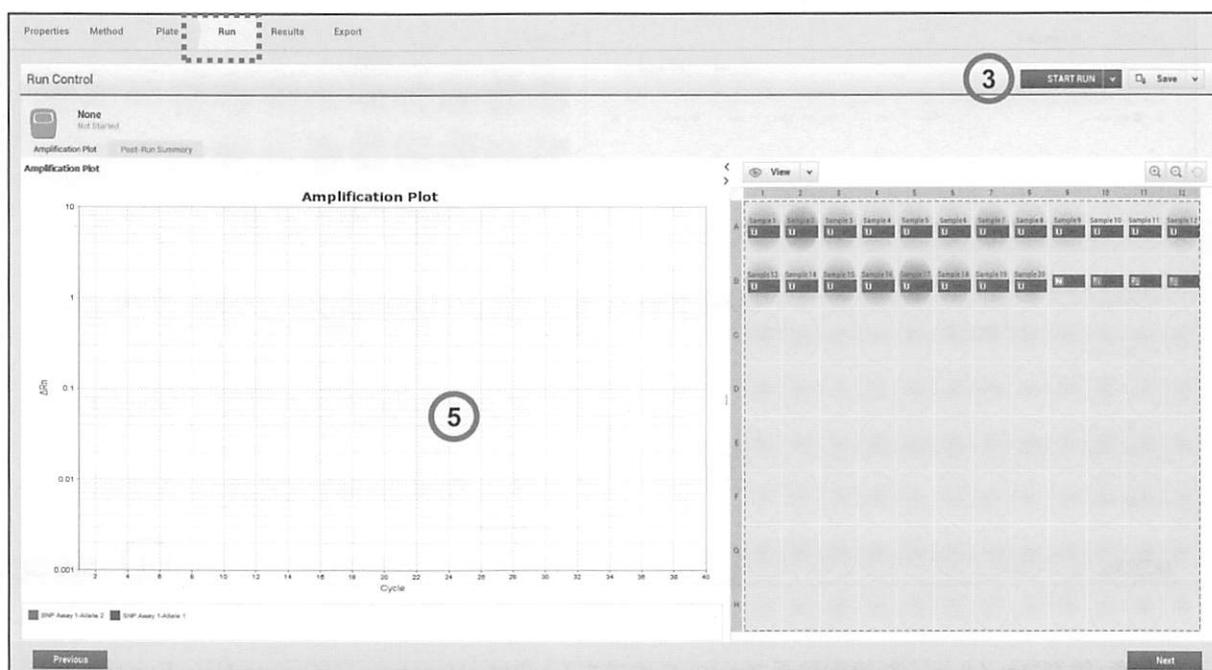
注意: 雛型ファイルから新規実験系ファイルを作成するときは、HomeページCreate New ExperimentのプルダウンメニューからTemplateを選択し、雛型ファイルを選択して**Open**をクリックします。



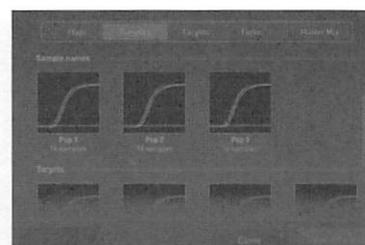
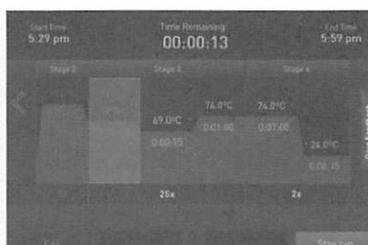
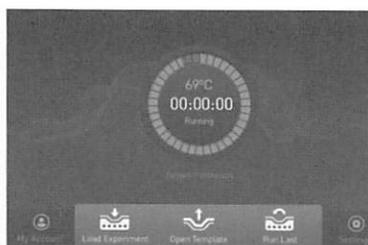
ランの開始:Run

次に **Plate**画面が表示されます。

1. 本体タッチパネル右上の  を押してサンプルブロックを出します。
2. プレートをブロックに載せ  を押してサンプルブロックを収納します。
3. ソフトウェア画面の右上 **STRT RUN**をクリックし、プルダウンメニューでシリアルナンバーを選択すると **Save**画面が表示されます。
4. 任意のファイル名を入力し、**Save**をクリックするとランが開始します。
5. ラン中に増幅曲線を確認することができます。



重要: ランニング中のデータをソフトウェアから確認することはできませんが、本体タッチパネル上で残り時間、PCRサイクル詳細、増幅曲線を確認することができます。



反応プレートの準備

推奨の消耗品とその組み合わせは下記の通りです。

ブロックタイプ	プレート・チューブ	シール・キャップ	トレー・リテーナー	ベース (サンプル調整時のみ使用)
384ウェル	MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate 商品番号: 4309849	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		
Standard 96 ウェル	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate 商品番号: N8010560	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		MicroAmp 96-Well Support Base 商品番号: 4379590
	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate 商品番号: N8010560			
	MicroAmp Optical 8-Tube Strip (0.2mL) 商品番号: 4316567	MicroAmp Optical 8-Cap Strip 商品番号: 4323032 (Flatタイプ)	MicroAmp 96-Well Tray/Retainer set (Blue) 商品番号: 4381850	
	MicroAmp Optical Tube without Cap (0.2mL) 商品番号: N8010933			
Fast 96ウェル	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		MicroAmp 96-Well Support Base 商品番号: 4379590
	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical 8-Cap Strip 商品番号: 4323032 (Flatタイプ)		
	MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0.1mL) 商品番号: 4358293		MicroAmp 96-Well Tray (Black) 商品番号: 4379983	
	MicroAmp Fast Reaction Tube with Cap (0.1mL) 商品番号: 4358297			

重要: 反応系調製用の消耗品を取り扱う際には必ずパウダーフリーの手袋を装着してください。



警告! チューブにセットするキャップは必ずフラットタイプのものをご利用ください。ドーム型のキャップを用いるとヒートカバーが損傷します。

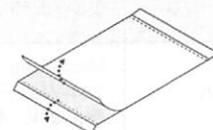
重要: 反応するプレートやチューブ等にマジックでラベルをしないでください。マジックの中には蛍光物質が含まれているため、データに悪影響を及ぼします。

重要: プレートの底を汚さないように注意してください。プレートの底に液体や他の汚染物がつくと、サンプルブロックを汚染し、異常に高いバックグランド信号が検出されてしまう可能性があります。

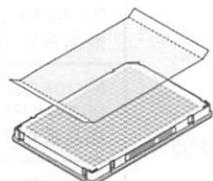
プレートのシール方法

1. プレートに反応試薬を適宜分注します。
注記: 96ウェルプレート・Fast 96ウェルプレートをご利用の場合、ベースの上にプレートを乗せて作業を行ってください。

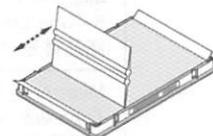
2. Optical Adhesive Film を1枚取り出し、両端を上向きに折り曲げます。フィルムの保護面を上側に向けます。



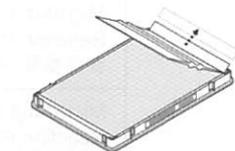
3. 白色の保護フィルムをすばやくシール面から剥がします。シール面には触れないでください。



4. フィルムの両端を持ち、フィルムを反応プレートの方に向けて降ろします(接着面が反応プレートに面するように)。フィルムが反応プレート中の全ウェルを完全に覆っていることを確認します。



5. 上から圧力をかけながらアプリケータを縦横にゆっくり動かして、反応プレート全体にフィルムとプレートが密着するようにします。



6. アプリケータを使ってフィルムの端を押さえながら、他方の端を持ってすばやく引っ張り、フィルムのタブを取り外します。反対側についても同じようにします。

フィルムのタブは綺麗に取り除いてください。タブが残っているとプレートがヒートカバーにくっついてしまう原因になります。



7. 蒸発が生じないように完全に密着させるために、ステップ5を繰り返します。

8. アプリケータの端をフィルムの外側の縁に沿ってしっかり圧力をかけながらなぞってフィルムを密着させます。
注記: Optical Adhesive Film は、接触しただけで密着するものではありません。蒸発が生じないように完全に密着させるためには、圧力をかけることが必要です。

9. 反応プレートを点検し、全てのウェルがシールされていることを確認します。フィルム表面上に全ウェルの縁がはっきりと映っていなければなりません。ラン後に装置にプレートが付着しないよう、フィルムのタブが完全に取り除かれていることを確認します。



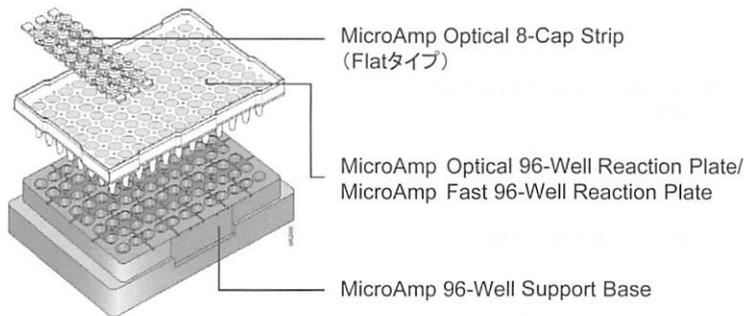
重要: フィルムを適用する際、光学接着カバーの接着剤が、プレートの縁に付着することがあります。Optical Adhesive Film の外周から、余剰の接着剤をすべて拭き取ります。余剰な接着剤を拭き取らないと機器本体のサンプルブロックに付着することがあります。

10. プレートの底からみて、反応液がプレートの各ウェルの底に集まっていることを確認してください。ウェルの底に集まっていないものが1つでもあれば、プレートを遠心してください。



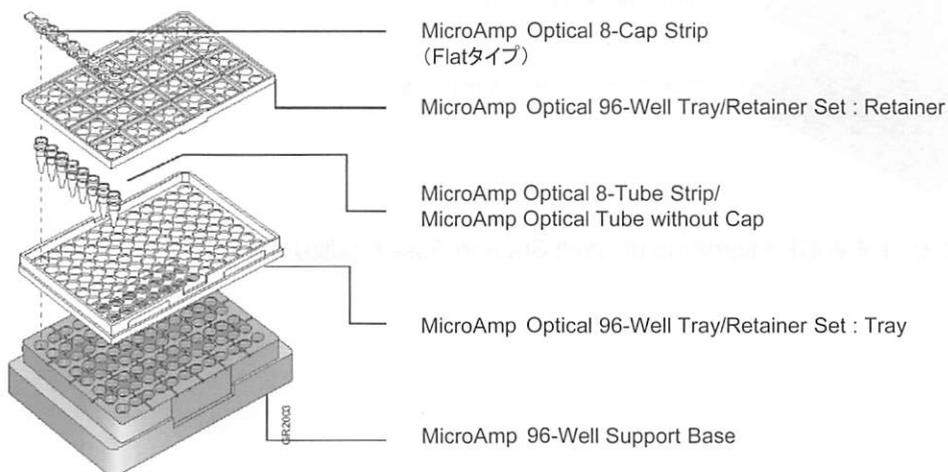
キャップを使用する方法

96ウェルプレートにキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。



重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

Standard 96ウェルブロックでチューブ及びキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。

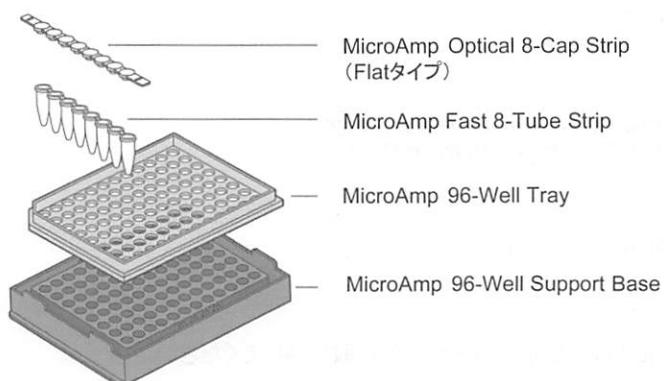


重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

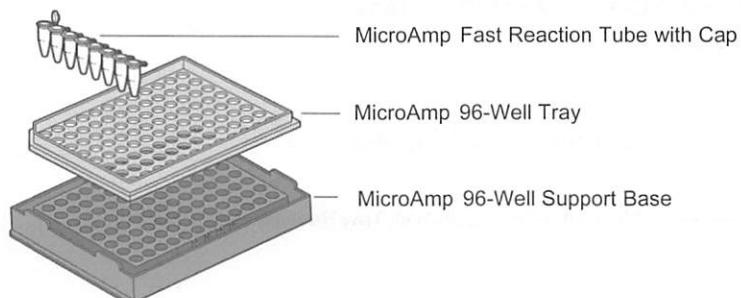
キャップを使用する方法

Fast 96ウェルブロックでチューブ及びキャップを使用する場合
以下のように組み合わせて使用します。

8連チューブとキャップ



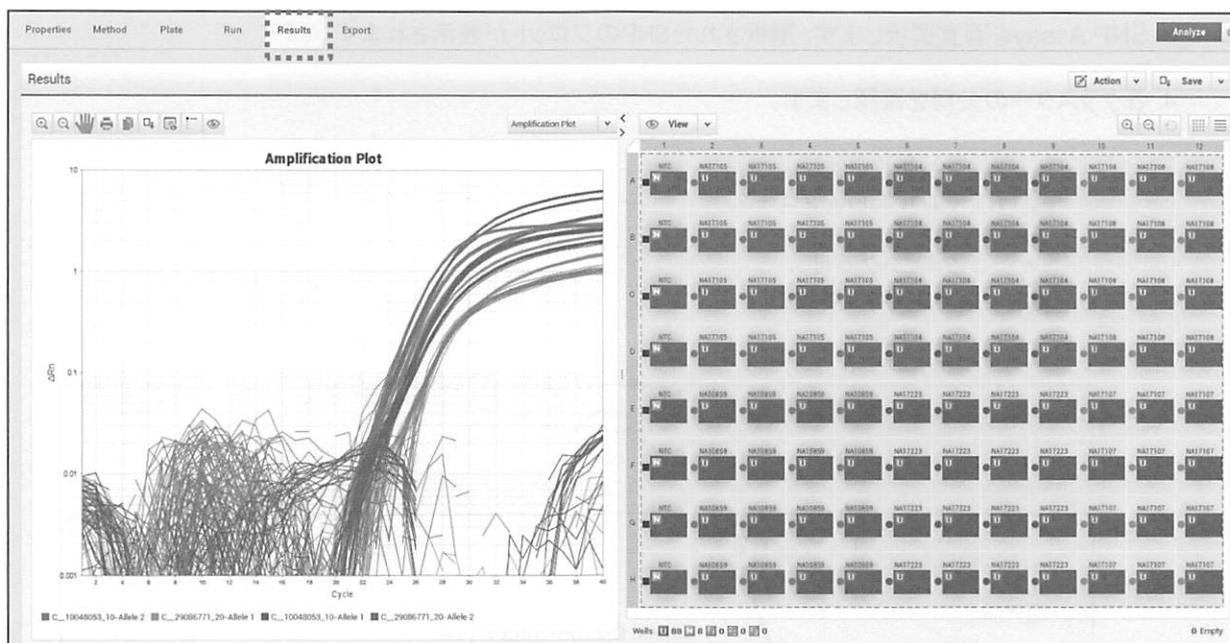
キャップ付きチューブ



重要: 機器にセットする前にMicroAmp 96-Well Support Baseから取り外してください。

ランの終了

ランが終了すると、自動解析が行われ、Results画面のAmplification Plotsが表示されます。



プレートの取り出し

1. 本体タッチパネル右上の  をタッチしてサンプルブロックを出します。
2. プレートを取り出します。

警告！ 怪我の危険:装置のラン中、プレートは105℃まで加熱されています。プレートは室温になるまで待ってから取り出してください。

3. 再度本体タッチパネル右上の  をタッチしてサンプルブロックを収納します。

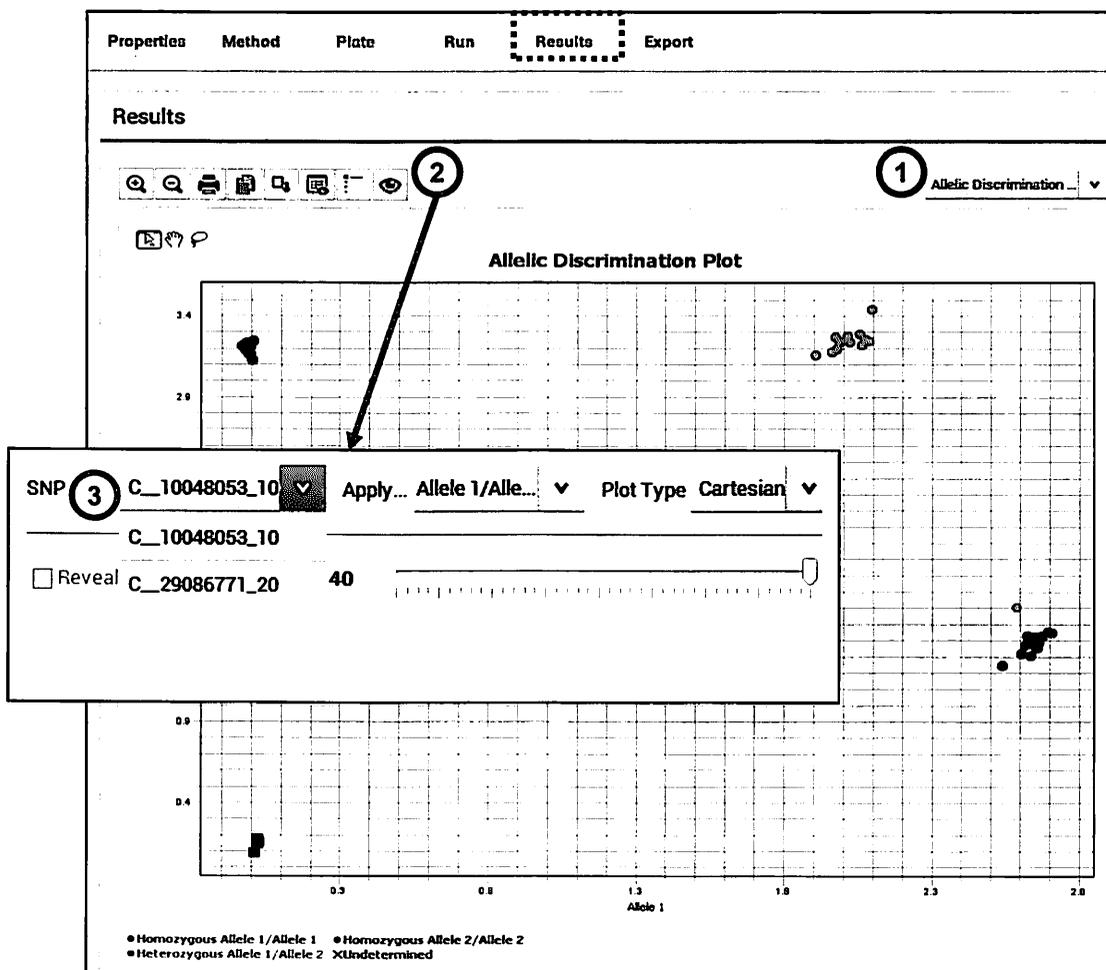
(オプション)機器本体のシャットダウン

連続して実験を行わない場合は、ラン終了時に機器本体の電源を切っていただくことができます。データ解析はソフトウェア単独で行うことができます。

タイピング結果の検証:

1. Results画面のプルダウンメニューからAllelic Discrimination Plotsを選択します。
2. Show Plot settings  をクリックします。
3. SNP Assayを適宜選択します。選択されたSNPのプロットが表示されます。
4. 各クラスターの分離を確認します。

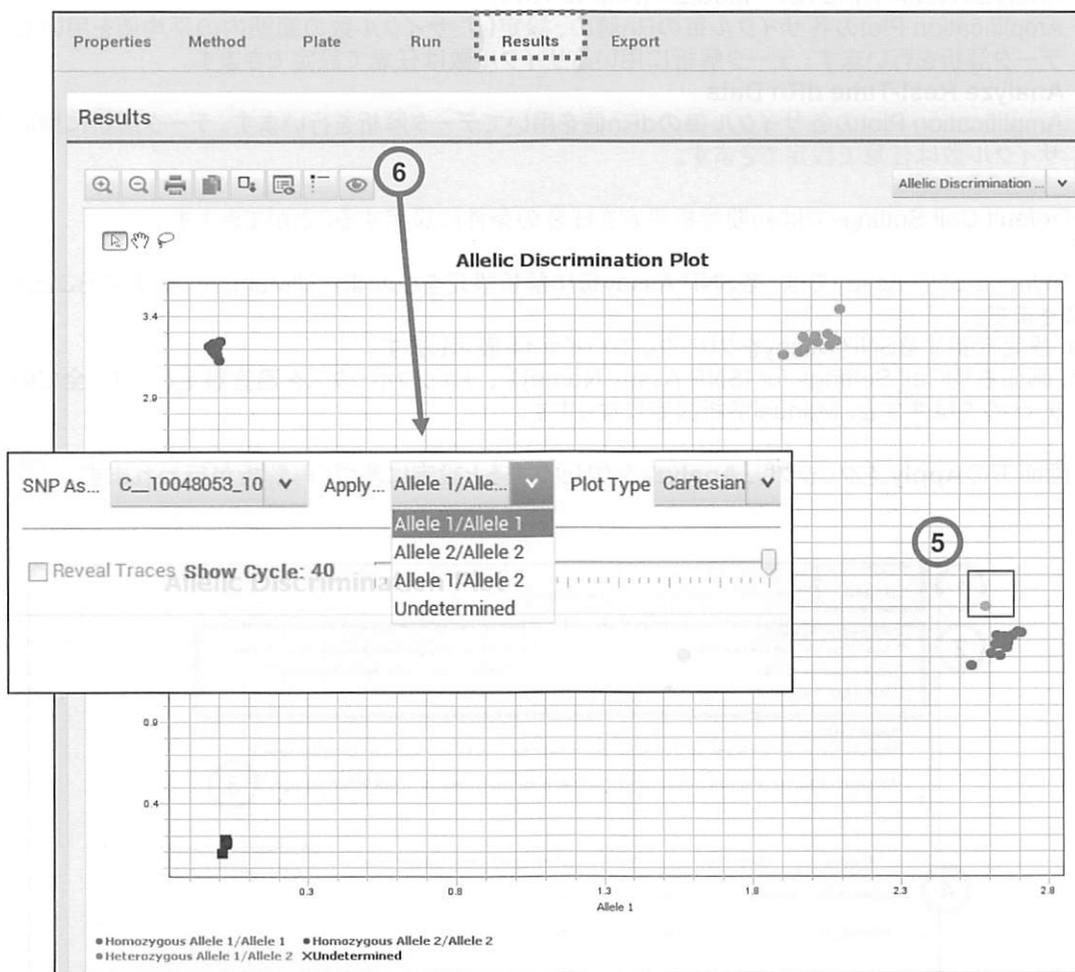
- (赤): アレル1 (VICプローブ)
- (青): アレル2 (FAMプローブ)
- (緑): ヘテロ
- × : タイピング不可
- : Negative Control



タイピング結果の検証:

任意のウェルのコール結果を手動で変更することができます。

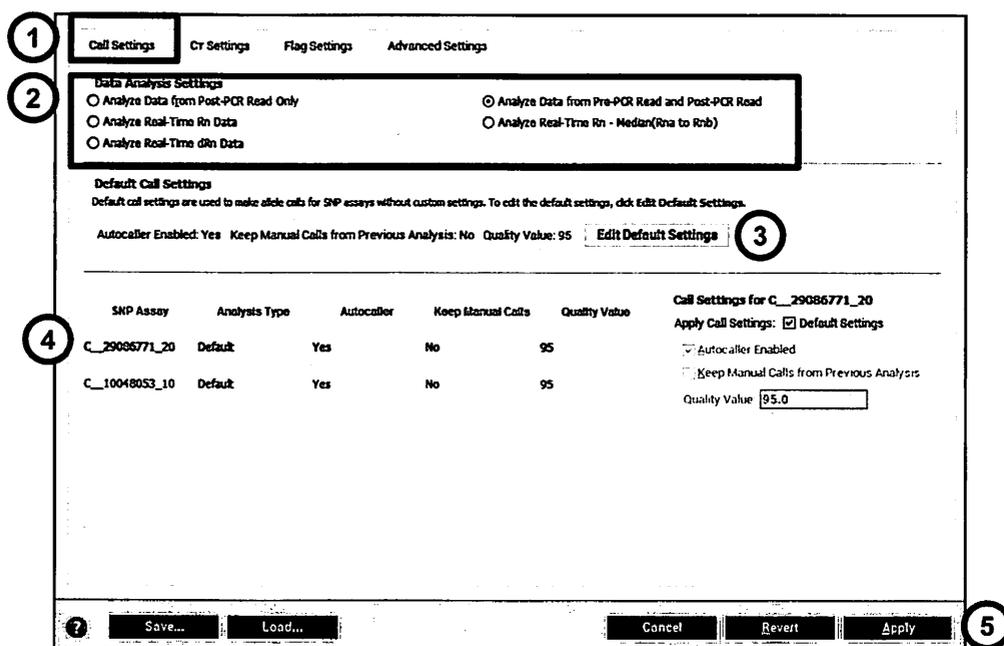
- Allelic Discrimination Plot画面上で、変更したいプロットをマウスのポインタで囲うようにドラッグして選択します。選択されるとプロットがハイライト表示されます。
- Show Plot Settings  をクリックします。
- Apply Callのプルダウンメニューから、該当する遺伝子型を選択します。選択したコールタイプの色に切り替わります。



解析設定変更: Analysis Settings画面

Analysisメニューから**Analysis setting**を選択、もしくはAnalyzeボタン横の  アイコンをクリックするとAnalysis Setting が表示されます。

1. Analysis Settings画面で**Call Settings**タブを選択します。
2. Data Analysis Settingsでは、コールに用いるデータを設定することができます。
 - **Analyze Data from Post-PCR Read Only**
PCR増幅反応後に回収した蛍光データのみを用いてデータ解析を行います。
 - **Analyze Data from Pre-PCR Read and Post-PCR Read (初期設定)**
PCR増幅反応前のデータを差し引いたデータを用いてデータ解析を行います。
 - **Analyze Real-Time Rn Data**
Amplification Plotの各サイクル毎のRn値を用いてデータ解析を行います。データ解析に用いるサイクル数は任意で設定できます。
 - **Analyze Real-Time Rn - Median (Rna to Rnb)**
Amplification Plotの各サイクル毎のRn値の、設定したサイクル数の範囲内の平均値を用いてデータ解析を行います。データ解析に用いるサイクル数は任意で設定できます。
 - **Analyze Real-Time dRn Data**
Amplification Plotの各サイクル毎のdRn値を用いてデータ解析を行います。データ解析に用いるサイクル数は任意で設定できます。
3. Default Call Settingsでは初期解析設定を任意の条件に設定することができます。
4. Select a SNP Assayでは、各SNP Assay毎に解析設定をAutoまたはManualに変更することができます。
 - a. 設定変更するSNP Assayをクリックしてハイライト表示します。
 - b. 画面右側Call Settings for [SNP Assay Name]で、チェックボックスを適宜設定します。全てのチェックをはずすと、Manual解析設定になります。
5. 画面下の**Apply** をクリックし、**Analyze**をクリックすると設定に基づく再解析が行われます。



1 Call Settings Ct Settings Flag Settings Advanced Settings

2 Data Analysis Settings

Analyze Data from Post-PCR Read Only Analyze Data from Pre-PCR Read and Post-PCR Read

Analyze Real-Time Rn Data Analyze Real-Time Rn - Median (Rna to Rnb)

Analyze Real-Time dRn Data

Default Call Settings
Default cal settings are used to make allele calls for SNP assays without custom settings. To edit the default settings, click Edit Default Settings.

Autocaller Enabled: Yes Keep Manual Calls from Previous Analysis: No Quality Value: 95 **3** Edit Default Settings

SNP Assay	Analysis Type	Autocaller	Keep Manual Calls	Quality Value	Call Settings for C__29086771_20
C__29086771_20	Default	Yes	No	95	Apply Call Settings: <input checked="" type="checkbox"/> Default Settings
C__10048053_10	Default	Yes	No	95	<input checked="" type="checkbox"/> Autocaller Enabled <input type="checkbox"/> Keep Manual Calls from Previous Analysis Quality Value <input type="text" value="95.0"/>

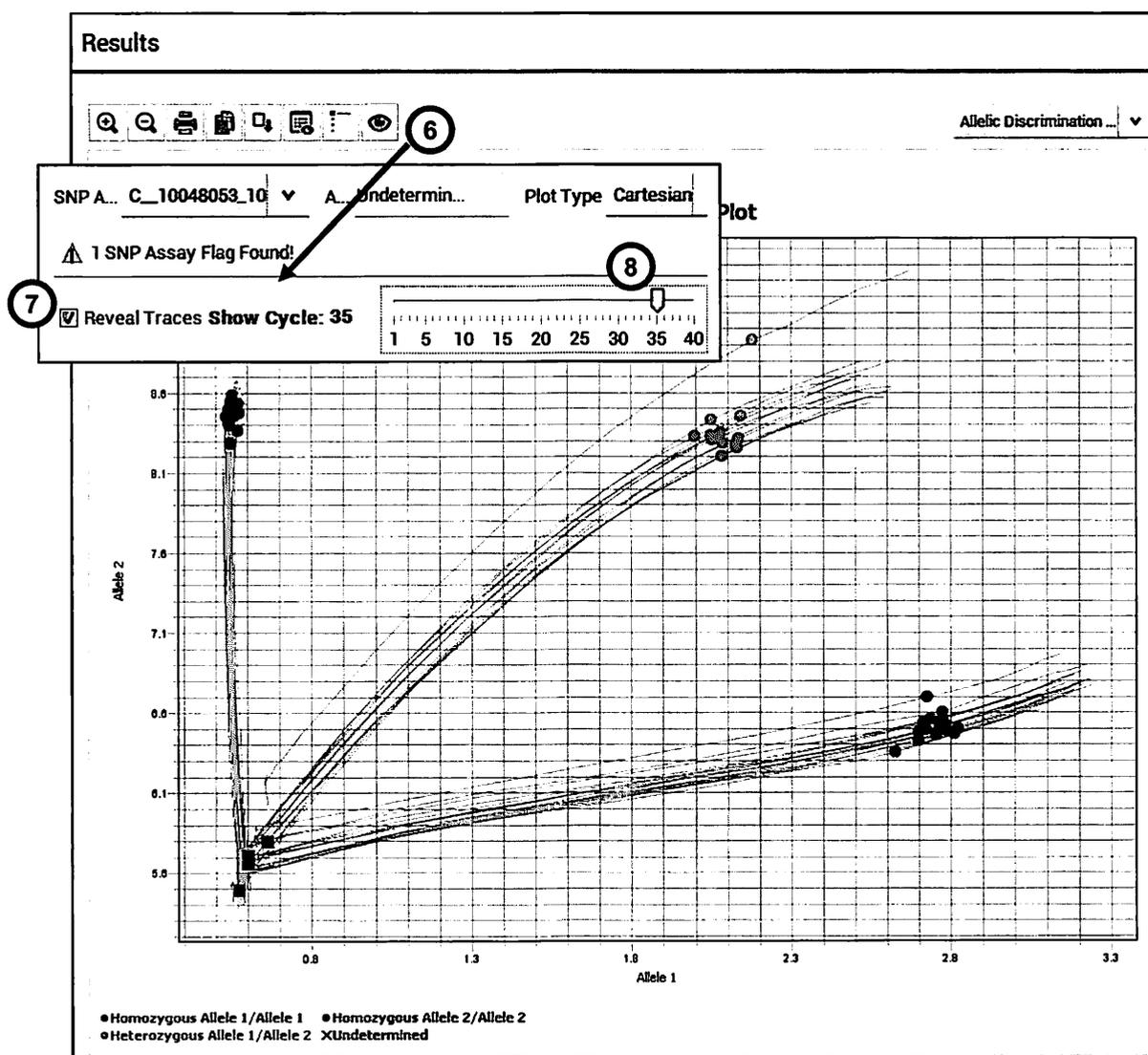
4 **5**

Save... Load... Cancel Revert Apply

解析設定変更: Analysis Real-Time Rn

Analysis SettingsでAnalyze Real-Time RnもしくはdRnを選択すると、各サンプルのサイクル毎の軌跡を表示することが可能になります。

- Allelic Discrimination Plot画面で、show plot settings  をクリックします。
- Reveal Traces にチェックを入れると、軌跡が表示されます。
- Show Cycleのバーをマウスで横方向にドラッグすることで、各サイクル毎のプロットが表示されるので、各クラスターが最も分離しているポイントを選択することができます。



フラグの確認: QC Summary画面

Analyzeを行った後に、プレートレイアウト画面のウェル上にフラグ(黄色の三角マーク)が表示されることがあります。フラグは表示されたウェルに何かしらの問題がある可能性を示しています。フラグ内の数字は確認された問題の数を示します。

QC Summary画面ではフラグの具体的な内容、及びその対策方法を確認することができます。

1. Results画面で、プルダウンメニューからQC Summary を選択します。
2. テーブル内の「Frequency」および「Wells」カラムを調べ、問題の内容とウェル数、およびウェルの位置を確認します。
3. 各フラグの行をクリックすると、下段にそのフラグの詳細が表示されます。

Results

1 QC Summary ▾

Flag Details

Flag:	Description	Frequency	Wells
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
NOSIGNAL	No signal in well		
PCFAIL	Positive control failed	0	
SMCLUSTER	Small number of samples in cluster	2	C__10048053_10, C__29086771_20
AMPNC	Amplification in negative control	0	
DRUMIN	Define acceptable data Rn based on Ct range		

2

3

Flag: SMCLUSTER—Small number of samples in cluster
Flag Detail: The number of data points in the cluster is less than the threshold.
Flag Criteria: Number of data points in the cluster <= 2.0
Wells Containing SNP Assays: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12
Flagged SNP Assays: C__10048053_10, C__29086771_20
[View SMCLUSTER Troubleshooting Information](#)

Total Wells:	96	Processed Wells:	96	Manually Omitted Wells:	0	SNP Assays Used:	2
Wells Set Up:	96	Flagged Wells:	0	Analysis Omitted Wells:	0	Samples Used:	7

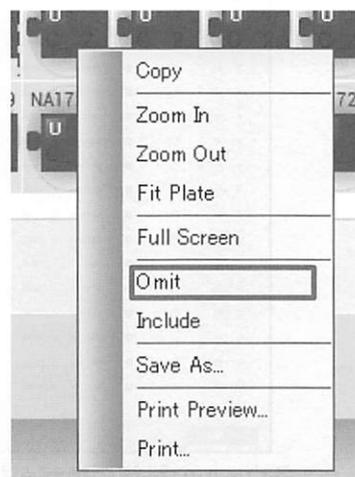
Genotyping実験では、実験データの状況により下記のフラグが表示されます。

フラグ	内容
BADROX	パッシブリファレンス値に異常あり
OFFSCALE	蛍光値がオフスケール
NOSIGNAL	蛍光値が検出されない
PCFAIL	ポジティブコントロール不良
SMCLUSTER	クラスターにタイピングされたサンプル数が少ない
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
DRNMIN	ΔRn 値が低い（増幅が弱い）
NOAMP	増幅なし
NOISE	他のウェルと比較してノイズが高い
SPIKE	スパイクノイズ有り
EXPFAIL	指数関数的増幅領域が確認されない
BLFAIL	ベースライン自動設定時に問題確認
THOLDFAIL	Threshold自動設定時に問題確認
CTFAIL	C_T 値自動算出時に問題確認

サンプルの削除

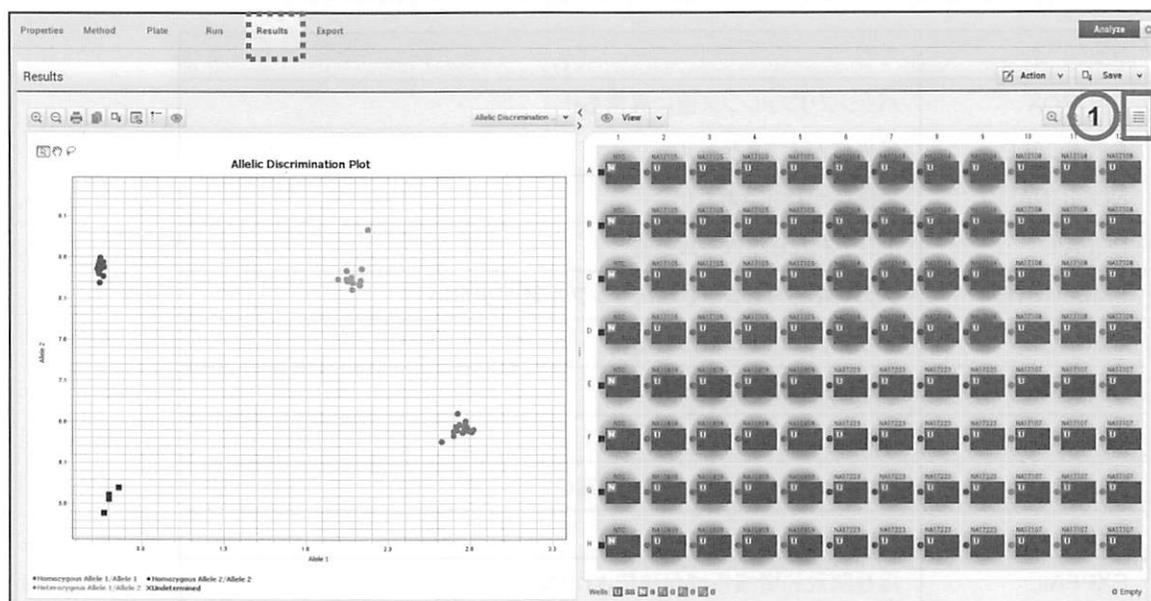
任意のウェルを解析対象外に指定することができます。

1. プレートレイアウト面上で、解析対象から外すウェルを選択します。
2. そのまま右クリックするとメニューが表示されるので、**Omit**を選択します。
3. 解析対象外に指定されたウェルの左上に赤い×マークが表示されます。
4. **Analyze**をクリックすると、削除指定したウェルのデータを除外した解析が行われます。
注記: Omit作業を行った後は、必ず**Analyze**をクリックして再解析してください。
5. 解析対象に戻すときは、ウェルを選択して右クリックメニューから**Include**を選択します。



View Well Tableタブ画面

1.全ての解析が終了したら、 を押してResults Tableを表示します。



#	Well	Out	Flag	Sample No.	SMP Assay	Assay ID	Task	Allele 1	Allele 2	Allele 1 Dy.	Allele 2 Dy.	Allele 1 ΔFt	Allele 2 ΔFt	Passive R.	Call	Quality%	Method	NCBI SMP	Context Se.	Comments	Allele 1 Ct	Allele 2 Ct
1	A1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NTC	C_10048	C_10048	No Templ.	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.645	8.203	173,261.5	Negative C.	100.000	Auto				Undeter.	Undeter.
2	A2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.029	6.787	167,129.3	Homozyg.	98.492	Auto				26.746	26.160
3	A3	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.973	6.563	163,870.0	Homozyg.	98.492	Auto				25.770	26.017
4	A4	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.932	6.605	150,287.0	Homozyg.	98.492	Auto				28.855	26.470
5	A5	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.859	6.501	141,533.8	Homozyg.	98.492	Auto				25.873	26.014
6	A6	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17104	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.552	8.878	161,396.6	Homozyg.	98.492	Auto				23.327	
7	A7	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17104	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.560	8.563	147,738.2	Homozyg.	98.492	Auto				Undeter.	23.407
8	A8	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17104	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.557	8.998	150,577.6	Homozyg.	98.492	Auto				Undeter.	23.502
9	A9	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17104	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.559	8.590	140,485.7	Homozyg.	98.492	Auto				23.365	
10	A10	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17108	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.268	8.614	145,690.7	Heterozyg.	98.492	Auto				26.136	24.533
11	A11	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17108	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.217	8.545	142,093.4	Heterozyg.	98.492	Auto				26.233	24.404
12	A12	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17108	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.408	9.140	137,011.2	Heterozyg.	98.492	Auto				26.072	24.305
13	B1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NTC	C_10048	C_10048	No Templ.	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.594	5.725	163,092.4	Negative C.	100.000	Auto				Undeter.	Undeter.
14	B2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.995	6.097	153,995.9	Homozyg.	98.492	Auto				25.750	26.174
15	B3	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.990	6.595	144,140.6	Homozyg.	98.492	Auto				25.737	26.175
16	B4	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.922	6.544	144,571.8	Homozyg.	98.492	Auto				26.862	26.241
17	B5	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17106	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	2.949	6.572	130,843.1	Homozyg.	98.492	Auto				25.954	26.298
18	B6	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	NA17104	C_10048	C_10048	Unknown	Allele 1	Allele 2	VIC-NFL	FAM-NF	0.548	8.595	139,546.2	Homozyg.	98.492	Auto				Undeter.	22.658

各ウェルの詳細の情報が横一列に表示されます。

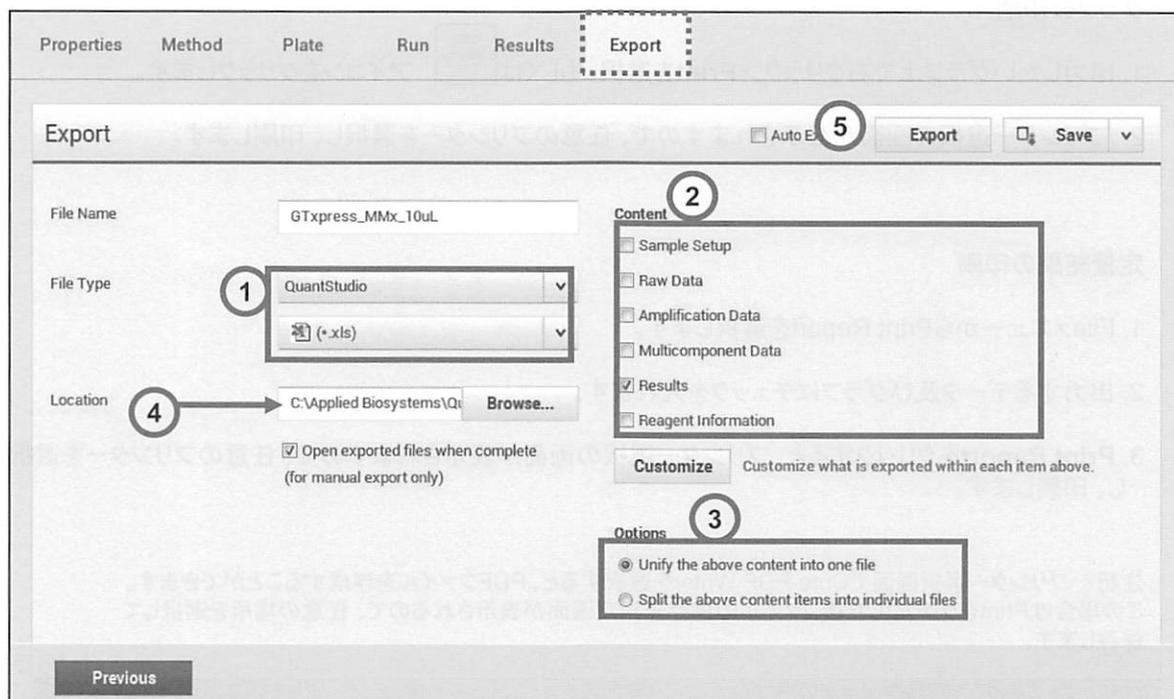
- a. Viewプルダウンメニューから、Results Tableに表示する項目を設定することができます。
- b. Group byプルダウンメニューから、ターゲット毎、サンプル毎等にグループ表示することができます。
- c. 表の各タイトルカラムをクリックするとソートすることができます。

2. データを確認したらNextをクリックします

データ出力: 数値データ

次にExport 画面が表示されます。

1. File Typeプルダウンメニューから、QuantStudio形式およびファイル形式、もしくはRDML形式を選択します。
2. 出力するデータの種類を、Contentから選択します。
最終的な定量結果のみを出力したい場合は、Resultsタブにチェックが入った状態にしてください。
3. 出力するデータを個別のファイルで出力するか、1つのファイルで出力するか選択できます。
4. Browseをクリックし、データの出力先を指定します。
5. Exportをクリックするとデータが出力されます。



データ出力:画像データ

Amplification Plotなどのグラフを画像ファイルとして出力することができます。

JPEG等の画像ファイルへの出力

1. 出力したいグラフ上で右クリック>**Save As**を選択、もしくは  アイコンをクリックします。
2. 出力したファイルの保存先の指定画面が表示されるので、画像ファイルの保存形式を選択し、任意の場所を指定して保存します。

データ出力:印刷

定量結果やグラフを印刷することができます。

グラフの印刷

1. 出力したいグラフ上で右クリック>**Print**を選択、もしくは  アイコンをクリックします。
2. プリンター選択の画面が表示されますので、任意のプリンターを選択し、印刷します。

定量結果の印刷

1. FileメニューからPrint Reportを選択します。
2. 出力するデータ及びグラフにチェックを入れます。
3. **Print Report**をクリックすると、プリンター選択の画面が表示されますので、任意のプリンターを選択し、印刷します。

注記: プリンター選択画面でCute PDF Writerを選択すると、PDFファイルを作成することができます。この場合はPrintをクリックした後ファイルの保存先指定画面が表示されるので、任意の場所を選択して保存します。

■アプリケーションサポートについて

テクニカルサポート

TEL : 0120-477-392

(受付時間：月曜日～金曜日 9:00～18:00 祝日除く)

✉ jpotech@thermofisher.com

■修理・メンテナンスなどのアフターサービスについて

修理、点検整備、キャリブレーションサービス、バリデーション、移設などについてはこちらまでお問い合わせください。

TEL : 0120-203-885 FAX : 03-6832-9587

(受付時間：月曜日～金曜日 9:00～18:00 祝日除く)

■保守契約について

TEL : 0120-203-885 FAX : 03-6832-9588

(受付時間：月曜日～金曜日 9:00～12:00、13:00～17:30 祝日除く)

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.thermofisher.com/TC

For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

Printed in Japan, 01/2016, Part Number A29331JP Rev.B

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jpotech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9584

営業部 TEL : 03-6832-9300 FAX : 03-6832-9580

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC