



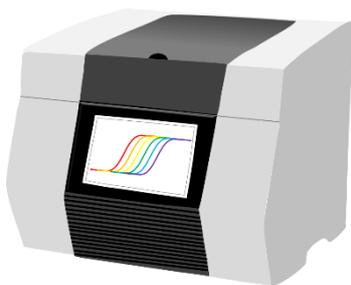
AriaMx Real-Time PCR Software

日本語版

AriaMx ソフトウェア version **1.7**

簡易ユーザーマニュアル

Version 2021.04



はじめに

本書では、AriaMx ソフトウェアでのプレートセットアップ、サーマルプロファイルの設定方法とデータ解析方法を簡単にご紹介します。

本書は日本語版簡易マニュアルですので、詳細については AriaMx ソフトウェア内の AriaMx ソフトウェアユーザーマニュアル（英語版）をご覧ください。

AriaMx ソフトウェアのインストール方法については、別紙セットアップガイドをご参照ください。

AriaMx ソフトウェアをインストールすると、サンプルデータとテンプレート、ユーザーマニュアル（英語版）も同時にインストールされます。

サンプルデータとテンプレートは、C:\Users\Public\Public Documents\Agilent Aria フォルダに、ユーザーマニュアル（英語版）は C:\Program Files(x86)\Agilent\Agilent Aria フォルダに保存されています。

ご不明な点は下記お問い合わせ窓口までお問い合わせください。

【リアルタイム PCR 装置・関連消耗品のお問い合わせ先】

アズワン株式会社 ヘルスサイエンスグループ

〒550-8527 大阪市西区江戸堀 2-1-27

Tel: (06)6447-8930

Fax: (06)6447-8939

Web: <https://axel.as-1.co.jp/contents/bio>

Email: l7001-37@so.as-1.co.jp

目次

AriaMx ソフトウェアをご利用いただける PC 環境	5
1. AriaMx ソフトウェアの起動	6
2. Getting Started パネル	7
3. AriaMx で選択できる実験タイプ	8
プレートセットアップ クイックガイド (遺伝子定量解析)	9
4. サンプルの調製方法	10
5. クイックセットアップで RUN NOW!	11
6. プレートセットアップ方法、変更方法	12
最初の画面 (概要)	12
プレートセットアップ方法	13
ウェルタイプの設定	13
ウェルネームの設定 (オプション)	14
検出したい蛍光色素 (Dye) の設定	15
ターゲット (遺伝子名、プライマー名など) の設定	15
レプリケートの設定	16
スタンダードの設定	17
AriaMx ソフトウェアで相対定量解析を行う時に必要な設定	18
ノーマライザーの設定	19
キャリブレターの設定	20
サンプルネームの設定	20
バイオロジカルレプリケート ID の設定	20
蛍光プローブによる SNP/変異検出 (Allele Discrimination/Fluorescence Probe)	21
実験デザイン	21
プレートセットアップ (Allele Discrimination/Fluorescence probe)	22
7. サーマルプロファイルの設定方法 RUN (実験開始) と Raw Data Plot	23
サーマルプロファイル概要	24
Raw Data Plot: リアルタイム蛍光モニタリング	25
8. データ解析方法	26
Analysis 画面の概要	26
Amplification plot (増幅曲線解析)	28
Standard curve (スタンダード曲線解析)	29
Melting curve, Dissociation curve (融解曲線解析)	30
相対定量解析	31
相対定量解析の計算方法 (Pfaffl の計算式)	31
9. HRM (高解像度融解曲線解析)	34
Allele Discrimination – DNA Binding Dye Experiment Type 概要	34
HRM Calibration Plate (HCP)	34

HRM Calibration Plate (HCP)のラン	35
HCP の準備	35
HCP のラン	35
HRM Calibration Plate (HCP)の指定	36
HCP の指定方法	36
HRM 解析のプレートセットアップ 温度条件 (Thermal Profile) の設定	37
HRM 解析方法 - Graphical Display	38
Melting Curve - Raw/Derivative Curve の設定	39
Difference Plot の設定	39
各データのチェックのジェノタイプのコールの決定	39
10. Multiple Experiment Analysis (複数実験解析)	40
Multiple Experiment Analysis (MEA) 複数実験のプロジェクト解析 概要	40
Multiple Experiment Analysis のアプリケーション	40
Multiple Experiment Analysis (MEA) 実施に際しての注意点	40
実験タイプのコンバート方法	41
Multiple Experiment Analysis の開始	41
Multiple Experiment Analysis での相対定量解析	42
MEA 解析に使用する増幅曲線を整える	43
Threshold line の設定とロック	43
増幅効率のインプット	43
MEA の開始	44
Compare の設定	44
多サンプル/ターゲットの場合の Multiple Experiment Analysis	45
Inter-experiment Control による Threshold line のマニュアル設定	45
Threshold line のマニュアル設定	46
Graphical Display - 結果の確認	47
11. レポートの作成とデータのエクスポート	48
Results	48
Generate Report	48
Export Data	49
AriaMx リアルタイム PCR 純正試薬及び消耗品のご案内	51
参考文献	53
Miscellaneous	54

AriaMx ソフトウェアをご利用いただける PC 環境

オペレーティングシステム	Windows 7 Pro (32 and 64 bit) Windows10 (64bit)
プロセッサ	2 GHz Dual Core プロセッサ以上
メモリ	2 GB 以上
ハードディスク容量	40 GB 以上
ディスプレイ解像度	1024 x 768 (1280 x 1024 を推奨)

*AriaMx との接続には LAN ポートが必要です。



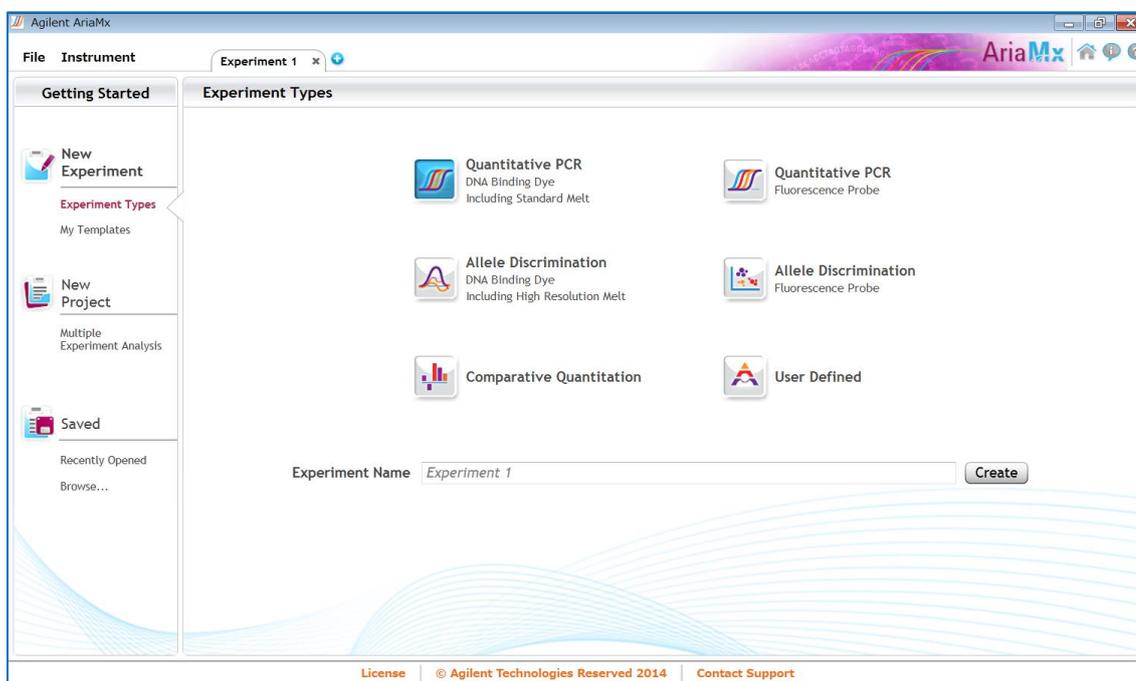
1. AriaMx ソフトウェアの起動



AriaMx ソフトウェアがインストールされた PC を起動させます。デスクトップ上の「Agilent AriaMx – ショートカット」のアイコンをダブルクリックすると AriaMx ソフトウェアが起動します。

AriaMx ソフトウェアは C:\ProgramFiles(x86)\Agilent に保存されています。

最初の画面



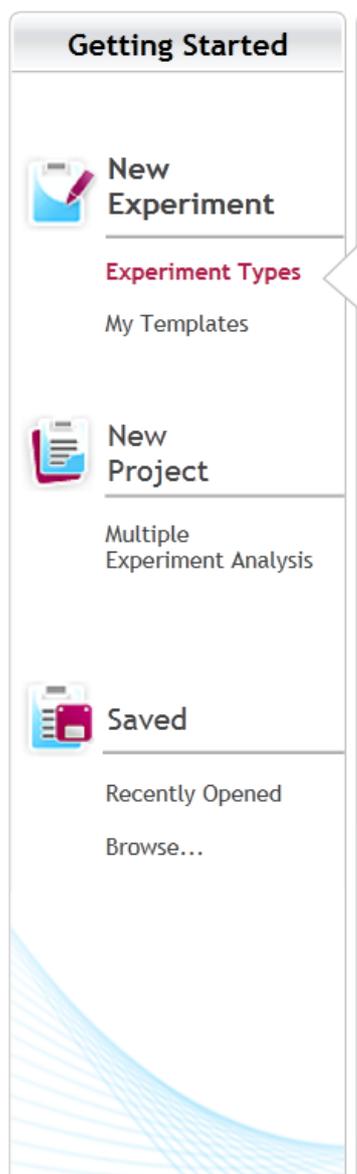
オープニング画面は、2つのメニューと2つのパネルに分かれています。

File メニューでは、新しいファイルの作成、保存されたファイルを開く、ファイルやテンプレートの保存、実験タイプのコンバート、印刷、品質管理テスト、ファイル名や解析テンプレートのデフォルト設定の変更ができます。

Instrument メニューでは、AriaMx と PC との接続、検出系のコンフィグレーション、品質管理テストの実施の際に使用します。



2. Getting Started パネル



新しい実験を開始する場合

Experiment Type: 実験タイプの選択画面が開きます。

My Templates: テンプレートから選択できます。

複数実験解析

8 回分の実験を合わせて解析することが可能です。

保存された実験を解析する場合

Recently Opened: 最近使われた実験ファイルのリストからデータを選択し、解析することができます。

Browse...: 指定のフォルダから実験ファイルを開くことができます。



3. AriaMx で選択できる実験タイプ



Quantitative PCR
DNA Binding Dye
Including Standard Melt

SYBR GreenI などの DNA 結合蛍光色素を利用した絶対定量法を行う時にこの実験タイプを選びます。スタンダード曲線解析と融解曲線解析を行うことができます。



Quantitative PCR
Fluorescence Probe

TaqMan プローブなどの蛍光ラベルプローブを用いた絶対定量法を行う時にこの実験タイプを選びます。

融解曲線解析のプログラムがありません。



Allele Discrimination
DNA Binding Dye
Including High Resolution Melt

SYBR Green や EvaGreen などの DNA 結合色素を用いた融解曲線解析による遺伝子変異の解析を行う時にこの実験タイプを選びます。

HRM 解析の時もこのプログラムを選びます。



Allele Discrimination
Fluorescence Probe

TaqMan プローブなどの蛍光ラベルプローブを用いた遺伝子配列の単変異検出解析を行う時にこの実験タイプを選びます。

増幅曲線解析を行い、適当なサイクル数での Dual color plot により解析することができます。



Comparative Quantitation

相対定量解析を行う時にこの実験タイプを選びます。増幅効率の補正が可能な $\Delta\Delta C_t$ 法による解析をすることができます。

プローブ法と DNA 結合色素法 (SYBR Green 法など) の共用プログラムです。

融解曲線解析のプログラムがないのでご注意ください。



User Defined

ユーザーオリジナルのプログラムを作成することができます。

プレートセットアップ クイックガイド (遺伝子定量解析)

絶対定量法

相対定量法

AriaMx 本体のタッチスクリーンで実験開始

- ・ 実験タイプの選択
- ・ RUN

- ・ 実験タイプの選択
- ・ RUN

PC の AriaMx ソフトウェアで設定

- ・ ウェルタイプの設定
- ・ 検出蛍光色素 (Dye) の設定
- ・ リファレンス色素の設定
- ・ ターゲットの設定
- ・ レプリケートの設定
- ・ スタンダードの設定

- ・ ウェルタイプの設定
- ・ 検出蛍光色素 (Dye) の設定
- ・ リファレンス色素の設定
- ・ ターゲットの設定
- ・ レプリケートの設定
- ・ スタンダードの設定
- ・ キャリブレーションの設定
- ・ ノーマライザーの設定
- ・ サンプルネームの設定



4. サンプルの調製方法

反応液の調製は、基本的にはご利用の試薬のマニュアルに従って行います。ここでは一例として、アジレント推奨の Brilliant III Master mix 試薬を用いた場合の調製方法をご紹介します。

Brilliant III QPCR Master mix 試薬

キットには2本のボトルに2 mL ずつマスターミックスが入っています。このマスターミックスには、バッファー、dNTPs、酵素が含まれており、2倍濃度に調製されています。1反応のトータルボリュームの半量を加えることで調製できます。

リファレンス色素 (ROX Reference Dye) の添加

キット内に Reference Dye が添付されています。AriaMx の蛍光検出には原理的に Reference Dye の検出は不要ですが、レプリケートサンプル間の誤差を補正するために利用されます。添付の **Reference Dye (1 mM) を 2 mL のマスターミックスのボトルに 0.5 µL 加え**、よく混和します。

1 チューブ当たりトータル 20 µL でアッセイを行う場合

	SYBR Green アッセイ	プローブアッセイ
2x Master Mix	10 µL	10 µL
Primer (200-600 nM)	X µL	X µL
Probe (150-600 nM)	None	X µL
Template	X µL	X µL
DW	Up to 20 µL	Up to 20 µL

AriaMx リアルタイム PCR システムの反応液量は 10 µL から 30 µL が最適です。

試薬の調製ができたら、各ウェルに分注し、キャップをして遠心操作により反応液をチューブの底に落とします。反応液の底に泡がないことを確認して AriaMx のサーマルブロックにセットします。



5. クイックセットアップで RUN NOW!



上の図では、AriaMx の蛍光検出部を示しています。1つのオプティカルモジュールには8つの検出器が備わっています。このオプティカルモジュールをAriaMx本体に6つまで装着することが可能です。1回のスキャンで96ウェルすべてについて6カラーでの検出が行われます。1列目から12列目までのスキャン時間は約1秒です。

プレートセットアップの状態にかかわらずスキャンを行いますので、実験際にはすべてのウェルについて、すべての蛍光検出をしておくことをお勧めします。Unknown、Standard、NTCなどの設定は検出中あるいは検出後に設定することができます。

AriaMx本体のタッチパネルで、Plate Setup画面を開くと、すべてのウェルが選択されているので、右側のパネルから測定したい蛍光色を選んで、Thermal profileの設定に進みます（23ページ参照）。





6. プレートセットアップ方法、変更方法

ウェルタイプ、レプリケート、スタンダードなどの設定は、RUN の後、データを PC に移し、PC の AriaMx ソフトウェアでプレートセットアップを行うのが便利です。

AriaMx ソフトウェアで、AriaMx 本体で保存されたデータを開き、プレートのセットアップを行います。

AriaMx ソフトウェアの左側のパネル内の「Saved」、「Browse...」よりデータが保存されているフォルダを指定し、ファイルを開きます。

最初の画面（概要）

プレートセットアップ、温度条件の設定、データの解析、エクスポートなどを行うエリアです。

実験ファイルは5つまで同時に開くことができます。

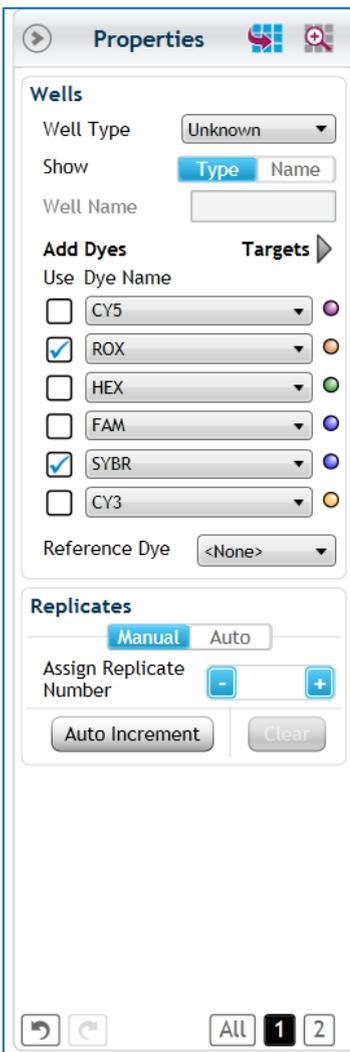
The screenshot displays the AriaMx software interface. At the top, there are five tabs for 'Experiment 1' through 'Experiment 5', with a red box highlighting them and an arrow pointing to the text above. The main workspace is a 12x8 grid of wells, with the first well (A1) highlighted in blue. On the left, a vertical 'Experiment Area' panel contains sections for 'Setup', 'Run', 'Analysis', and 'Results', all enclosed in a red box. On the right, a 'Properties' panel is also enclosed in a red box, showing settings for 'Wells', 'Add Dyes', and 'Replicates'. An arrow points from the text 'インポートとミニマップのアイコン' to the top-right corner of the Properties panel. Another arrow points from the text 'スタンダードの設定に移動できます。' to the 'All 1 2' buttons at the bottom right of the well grid.

インポートとミニマップのアイコン

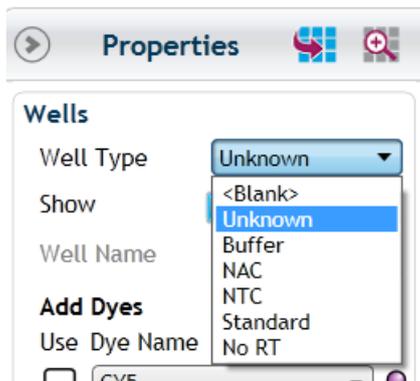
各種プレート設定などを行うエリア

スタンダードの設定に移動できます。

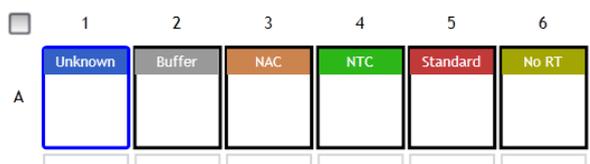
プレートセットアップ方法 ウェルタイプの設定



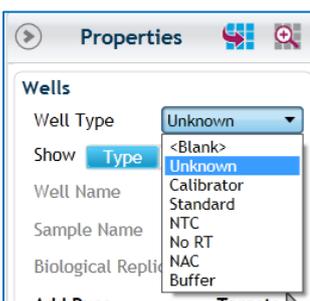
「Wells」では、Unknown や Standard などのウェルタイプを設定します。



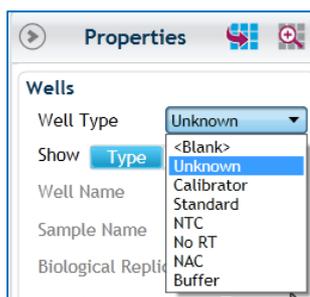
設定したいウェルを選択後、ウェルタイプをクリックすると、Unknown、Standard などの設定ができます。



下のように、各ウェルにウェルタイプが表示されます。

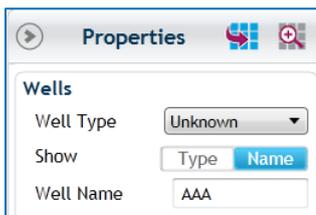


相対定量解析（Comparative quantitation）のときは、左のように Calibrator の設定が加わります。



変異解析（Allele discrimination）のときは、Homo Allele A、Homo Allele B、Hetero というウェルタイプが加わります。

ウェルネームの設定 (オプション)



Properties

Wells

Well Type: Unknown

Show: Type Name

Well Name: AAA

ウェルを選択して、ウェルネームのボックスにサンプル名を入力することができます。

ウェルネームをエクセルファイルまたはテキストファイルからまとめてインポートすることができます。下に示すような形式でファイルを作成しインポートすることができます。

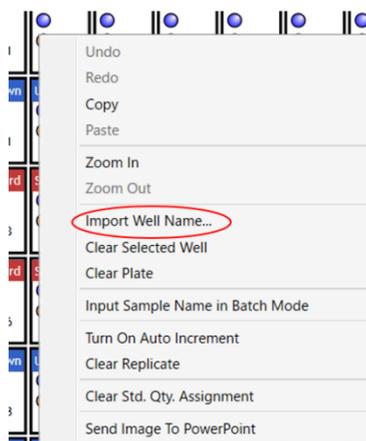
Excel spreadsheet

	A	B
1	Well ID	Well Name
2	A1	Reference RNA (1)
3	B1	Reference RNA (10)
4	C1	Reference RNA (100)

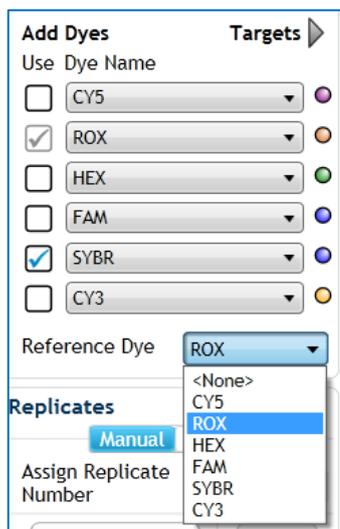
Text file

```
A1,Reference RNA (1)
B1,Reference RNA (10)
C1,Reference RNA (100)
```

インポートするときは、ウェル画面上で右クリックをして「Import Well Name」を選択します。



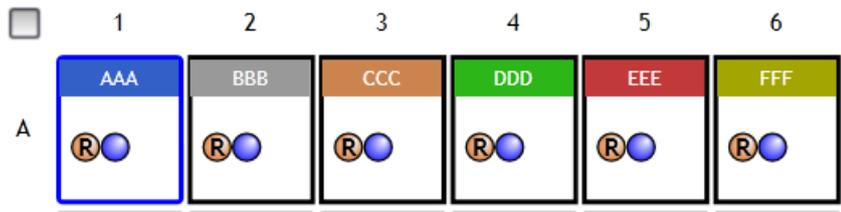
検出したい蛍光色素（Dye）の設定



ウェルを選択し、Add Dyes の Use のチェックボックスをクリックします。

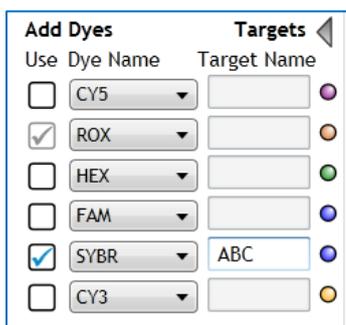
リファレンス色素を ROX に設定するときには「Reference Dye」で ROX（あるいは任意の色素）を設定します。

ウェルに選択された色素、指定されたリファレンス色素に「R」と表示されます。

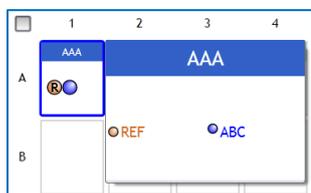


ターゲット（遺伝子名、プライマー名など）の設定

増幅に使われたプライマーや遺伝子に合わせて名前と表示の色を指定することができます。



指定したいウェルを選択後、「Target」の表示横の▶マークをクリックすると名前や色を設定できるようになります。



指定したウェルにカーソルをホバリングさせると、ウェルの情報が拡大表示されます。

レプリケートの設定

レプリケートとは、同じサンプルに設定される番号です。

2通りの入力方法があります。

The 'Manual' mode control panel shows the 'Manual' button selected. It includes a numeric input field for 'Assign Replicate Number' with a value of 1, and buttons for 'Auto Increment' and 'Clear'.

Manual: 選択したウェルにひとつずつ「Assign Replicate Number」から番号をインプットします。「Auto Increment」機能を利用すると、カーソルでウェルを選択しながら連続でレプリケート番号をインプットできます。

A 3x3 well plate grid with columns 1, 2, 3 and rows A, B, C. The first well (A1) is selected and contains 'R 1'. The second well (B1) is selected and contains 'R 2', indicated by a blue circle around the number 2. Other wells are labeled 'Unknown'.

ウェル内にインプットされた最初の番号が表示されます。「Auto Increment」ボタンをアクティブにすると、次に設定したいウェルにカーソルを合わせると次の番号が表示され、連続してレプリケート番号をインプットできます。

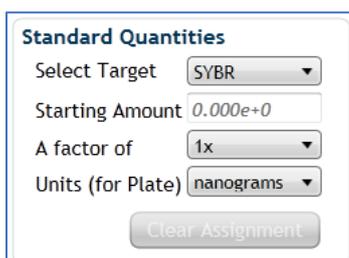
The 'Auto' mode control panel shows the 'Auto' button selected. It includes a dropdown menu for 'Direction of Assignment' set to 'Horizontal', a numeric input field for 'Wells per replicate set' with a value of 3, and a 'Clear' button.

Auto: 自動的にレプリケート番号をインプットできます。番号をつけたいウェルすべてを選択し、横方向にそろえたい場合は「Horizontal」、縦方向にそろえたい場合は「Vertical」に設定し、レプリケートの数を設定します。

A 3x3 well plate grid with columns 1, 2, 3 and rows A, B, C. The first well (A1) is selected and contains 'R 1'. The second well (B1) is selected and contains 'R 2'. The third well (C1) is selected and contains 'R 3'. All other wells are labeled 'Unknown'.

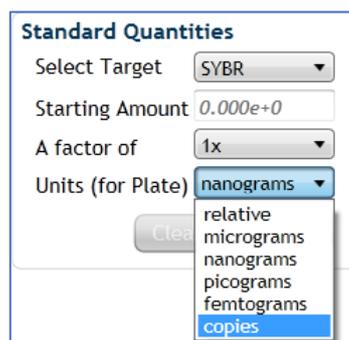
例えば「Direction of Assignment」を「Horizontal」に、「Well per replicate set」を「3」にすると、横方向に3つずつ、上から順にレプリケート番号が設定されます。

スタンダードの設定

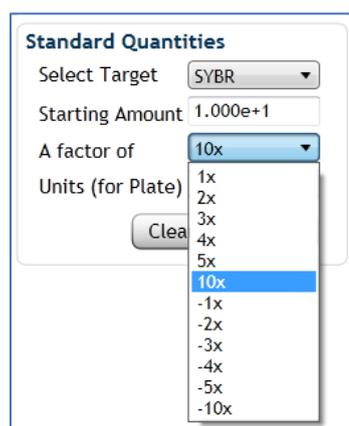


スタンダードテンプレートの濃度を設定します。

ウェルタイプを Standard と設定したウェルを選択すると、Standard Quantities の項目がアクティブになります。「Select Target」から濃度をインプットしたターゲットあるいはフィルターを選択します。個々に設定することもできますし、まとめて (All) 設定することもできます。

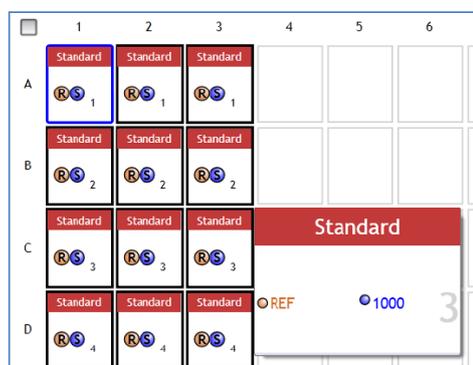


「Units (for Plate)」で単位を設定します。



希釈系列の倍率を「A factor of」から選択します。

最初の濃度を「Starting Amount」にインプットします。



濃度が各ウェルに設定されます。カーソルをウェル上に合わせるとそのウェルに設定されている濃度が表示されます。

AriaMx ソフトウェアで相対定量解析を行う時に必要な設定

相対定量解析 (Comparative quantification) では、ここまでの設定に加えて、ノーマライザー、キャリブレーター、サンプルネーム、バイオロジカル ID の設定が可能です。この設定を行うと AriaMx ソフトウェアが自動的に相対定量解析を行います。

ノーマライザー: ハウスキーピング遺伝子やゲノムコピー数などが使用されます。

キャリブレーター: 相対定量解析で「1」とするサンプルに設定します。

サンプルネーム: ウェルネームとは異なり、同じサンプルを関連付けするために設定します。

例えばターゲットの遺伝子量をハウスキーピング遺伝子で補正する際に同じサンプルに同じサンプルネームを設定します。

バイオロジカル ID: 遺伝学的に同系の個体や細胞に、また群としてまとめる場合に設定します。

【相対定量解析の例】

方法: SYBR Green 法での発現量解析

サンプル: 培養細胞 刺激後 0 時間 (無刺激)、1 時間、3 時間

ターゲット: 遺伝子 A (Gene A)

ノーマライザー (ハウスキーピング遺伝子) : β -2-マイクログロブリン (B2M)

スタンダード解析 (増幅効率の計算) : テンプレートの 10 倍希釈系列、4 段階 (x1, x0.1, x0.01, x0.001)

ネガティブコントロール: NTC

レプリケート: n=3

サンプル情報	Well Type	Target				Sample Name
		GeneA (Target)		B2M (Normalizer)		
		Replicate#	Well	Replicate#	Well	
無刺激	Calibrator	#1	A1-A3	#9	A4-A6	0h
1時間	Unknown	#2	B1-B3	#10	B4-B6	1h
3時間	Unknown	#3	C1-C3	#11	C4-C6	3h
スタンダード x1	Standard	#4	D1-D3	#12	D4-D6	
スタンダード x0.1	Standard	#5	E1-E3	#13	E4-E6	
スタンダード x0.01	Standard	#6	F1-F4	#14	F4-F6	
スタンダード x0.001	Standard	#7	G1-G3	#15	G4-G6	
ネガティブ コントロール	NTC	#8	H1-H3	#16	H4-H6	

	1	2	3	4	5	6
A	Unknown R1	Unknown R1	Unknown R1	Unknown R9	Unknown R9	Unknown R9
B	Unknown R2	Unknown R2	Unknown R2	Unknown R10	Unknown R10	Unknown R10
C	Unknown R3	Unknown R3	Unknown R3	Unknown R11	Unknown R11	Unknown R11
D	Standard R4	Standard R4	Standard R4	Standard R12	Standard R12	Standard R12
E	Standard R5	Standard R5	Standard R5	Standard R13	Standard R13	Standard R13
F	Standard R6	Standard R6	Standard R6	Standard R14	Standard R14	Standard R14
G	Standard R7	Standard R7	Standard R7	Standard R15	Standard R15	Standard R15
H	NTC R8	NTC R8	NTC R8	NTC R16	NTC R16	NTC R16

左に示すプレートセットアップでは以下の点が既に設定された状態です。

設定方法は p13 からご参照ください。

- ・ ウェルタイプ
- ・ Reference Dye として Rox を指定
- ・ レプリケート番号
- ・ ターゲット (GeneA と B2M)
- ・ Standard の濃度

ノーマライザーの設定

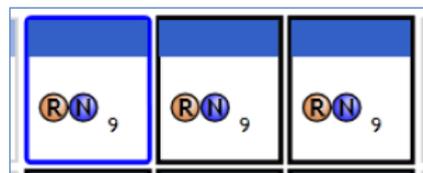
Unknown サンプル中のノーマライザーに設定するウェル（このケースではハウスキーピング遺伝子の B2M のウェル）を選択します。

	1	2	3	4	5	6
A	R1	R1	R1	R9	R9	R9
B	R2	R2	R2	R10	R10	R10
C	R3	R3	R3	R11	R11	R11

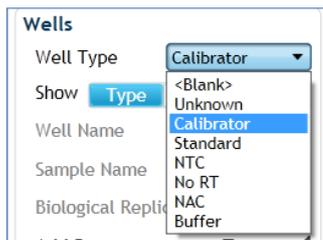
Add Dyes	Targets	
Use	Dye Name	Target Name
<input type="checkbox"/>	CY5	
<input checked="" type="checkbox"/>	ROX	
<input type="checkbox"/>	HEX	
<input type="checkbox"/>	FAM	
<input checked="" type="checkbox"/>	SYBR	B2M
<input type="checkbox"/>	CY3	
Reference Dye		ROX
Normalizer Dye		<input checked="" type="checkbox"/> SYBR
Replicates		
Manual		
Assign Replicate Number		
Auto Increment		<input checked="" type="checkbox"/> SYBR
		<input type="checkbox"/> CY3

「Normalizer Dye」で SYBR にチェックを入れます。

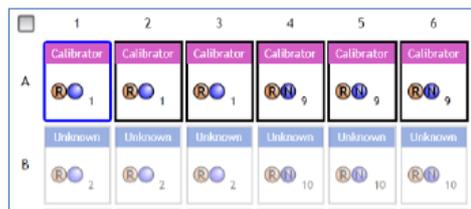
ウェル内の SYBR のマークに「N」と表示されます。



キャリブレーターの設定



Unknown サンプルの中の「1」とするサンプルのウェルタイプを「Calibrator」に設定します。



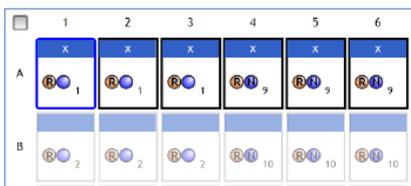
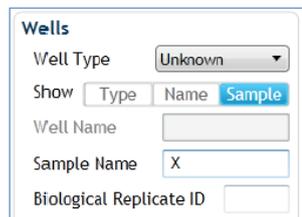
1とするサンプル（このケースでは「無刺激 (0h)」のサンプル#1と#9)のウェルを選択し、ウェルタイプを「Calibrator」に変更します。

サンプルネームの設定

同じサンプル、例えば#1と#9のウェルを選択し、右側のパネル内で「Sample」ボタンをクリックします。

「Sample Name」がアクティブになるので、ここにサンプル名をインプットします。サンプル名によって、UnknownとNormalizerが関連付けされます。

「Sample」ボタンをクリックすると「Sample Name」と「Biological Replicate ID」をインプットすることができます。



このケースでは#1と#9は同じサンプルなので、これらのウェルを選択して「0h」とサンプル名を付けます。

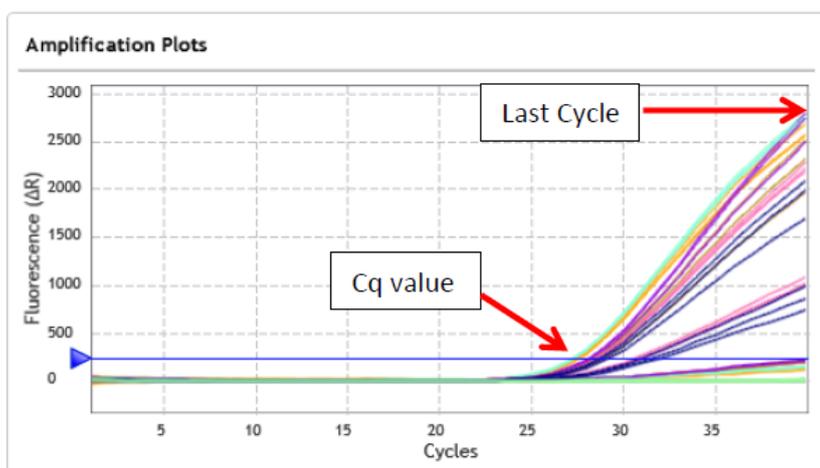
バイオロジカルレプリケートIDの設定

Biological Replicate IDは、リソースは生物学的に同じもの（遺伝的に同一、同系の細胞である等、実験内では同一条件であるような場合）だが、個別に準備されたサンプルである、といった場合に設定します。例えば、同じ実験条件下で処理された同じ遺伝型を持つ2匹のマウスの同じ組織から得られた2つのcDNAサンプル、というようなケースがBiological Replicateとして設定されます。Biological Replicateを設定しておく、サンプル間の生物学的なばらつきによる遺伝子発現実験の変動レベルを決定する際に便利です。この設定は計算には特に利用されません。

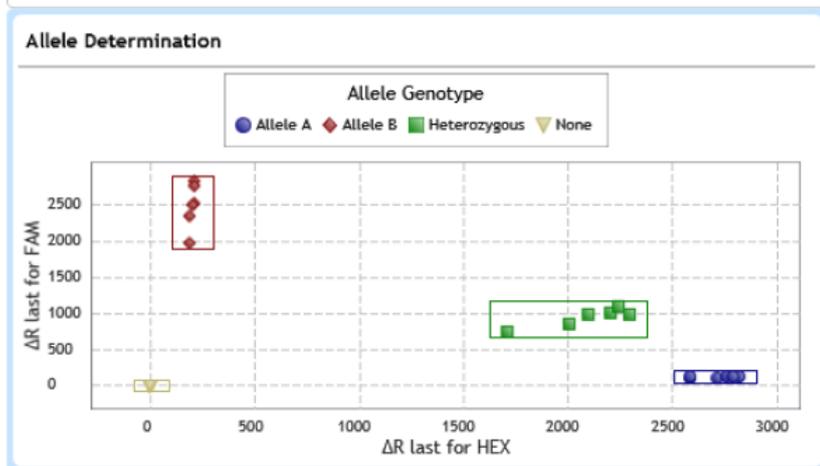
蛍光プローブによる SNP/変異検出 (Allele Discrimination/Fluorescence Probe)

実験デザイン

蛍光ラベルプローブ (TaqMan probe 等) を用いた変異解析を行うことができます。例えば、A/G の SNP 検出にあたって、A に対応する FAM ラベルプローブと G に対応する VIC (HEX) ラベルプローブを用いて解析を行います。このような実験において、Unknown サンプルのジェノタイプを NTC (No template control) の Dual color port 内の位置から判定するので、NTC の解析は必須です。また、できるだけそれぞれのアリルの陽性コントロールを使用することをお勧めします。結果の解釈の際に有用です。



NTC、陽性コントロール、そして Unknown サンプルについて増幅曲線解析を行います。この増幅曲線の Last Cycle (デフォルトでは最終サイクル、マニュアルで変更も可能) の蛍光値、あるいは Cq 値から Dual color plot (左下図) が作成されます。



プレートセットアップ (Allele Discrimination/Fluorescence probe)

Properties

Wells

Well Type: Unknown

Show: Type Name Sample

Well Name:

Sample Name:

Add Dyes **Targets**

Use Dye Name Target Name

CY5

ROX

HEX

FAM

CY3

Reference Dye: <None>

Allele

Dye/Target Name

Allele A: HEX

Allele B: FAM

Replicates

Manual Auto

Assign Replicate Number: 1

Auto Increment Clear

ウェルタイプの設定

Wells

Well Type: Unknown

Show: Type

Well Name:

Sample Name:

実サンプルには Unknown と設定する他に、必ず NTC サンプルを用意し NTC と設定します。陽性コントロールがあれば、それぞれの設定を行います。

Well Name と Sample Name

必要に応じて入力することが可能です。

Add dyes

各ウェルに FAM と HEX のチェックを入れます。もし FAM と VIC (HEX) 以外の蛍光色素の場合には、それに対応した Dye にもチェックを入れます。

Targets

プローブ名、遺伝子名、SNP 名などを入力できます。

Reference Dye

ROX 等のリファレンス色素をご利用の場合に設定してください。

Dye/Target Name

それぞれのアリルに色素、あるいはターゲット名を設定できます。

右図はウェルタイプが Unknown、NTC、Homo Allele A、Homo Allele B、および Hetero と設定され、各ウェルで FAM と HEX の検出が設定されています。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Unknown 1							Unknown 7
B	Unknown 1							Unknown 7
C	Unknown 1	Homo A 3	Hetero 4	Homo B 5	NTC 6			Unknown 7
D		Homo A 3	Hetero 4	Homo B 5	NTC 6			
E		Homo A 3	Hetero 4	Homo B 5	NTC 6			
F	Unknown 2							Unknown 8
G	Unknown 2							Unknown 8
H	Unknown 2							Unknown 8



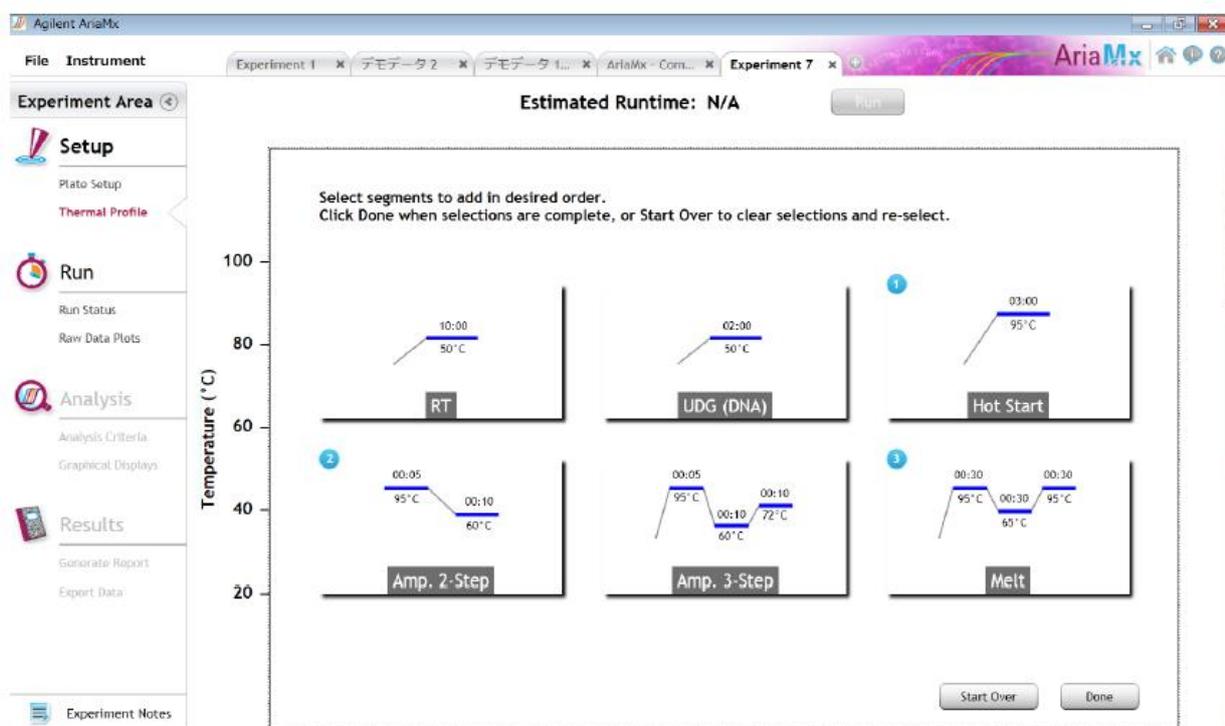
7. サーマルプロファイルの設定方法 RUN（実験開始）と Raw Data Plot

デフォルトのサーマルプロファイルは、実験タイプによって異なります。



User Defined

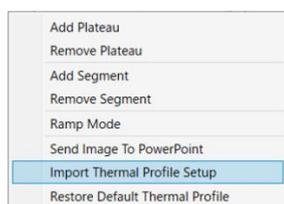
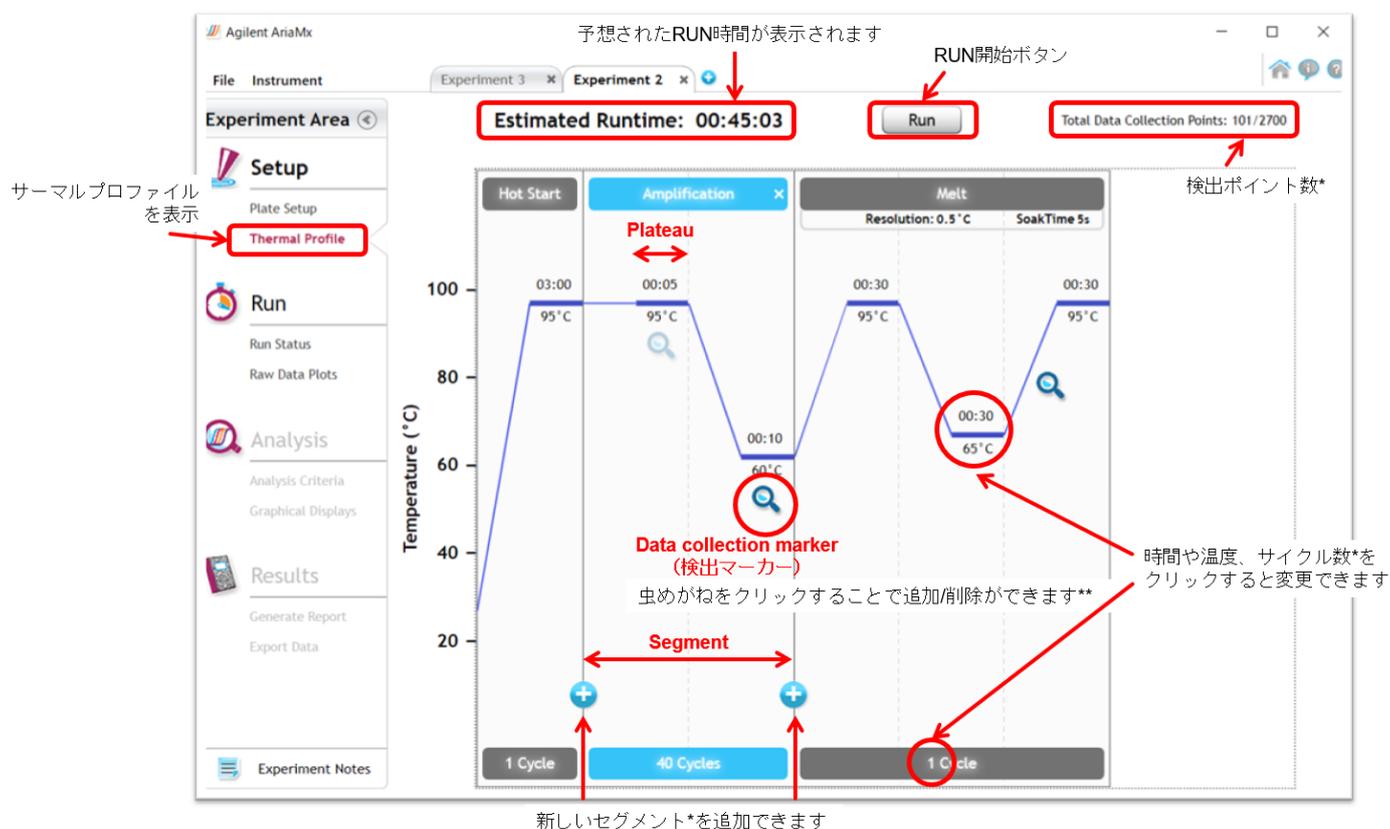
User Defined の実験タイプを選択すると、最初に任意のサーマルプロファイルを選択し、セットアップを行うことができます。



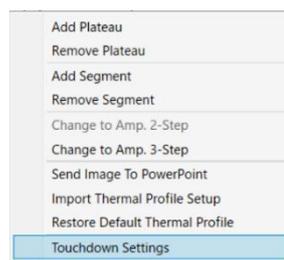
サーマルプロファイル概要

各実験タイプを開くと、デフォルトのサーマルプロファイルが既に設定されています。

下に示すのは、PCのAriaMxソフトウェアで“Quantitative PCR_DNA Binding Dye including Standard Melt”を選択した際に、デフォルトで表示されるサーマルプロファイルです。



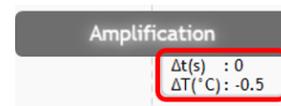
右クリック>“Import Thermal Profile Setup”よりプロファイルをインポートできます。



“Amplification”のセグメントでは、右クリック>“Touchdown Setting”よりタッチダウンPCRの設定が可能です。*



タッチダウンPCRを設定するとセグメントタイトルの下に設定したパラメータが表示されます。



* 設定可能な最大数

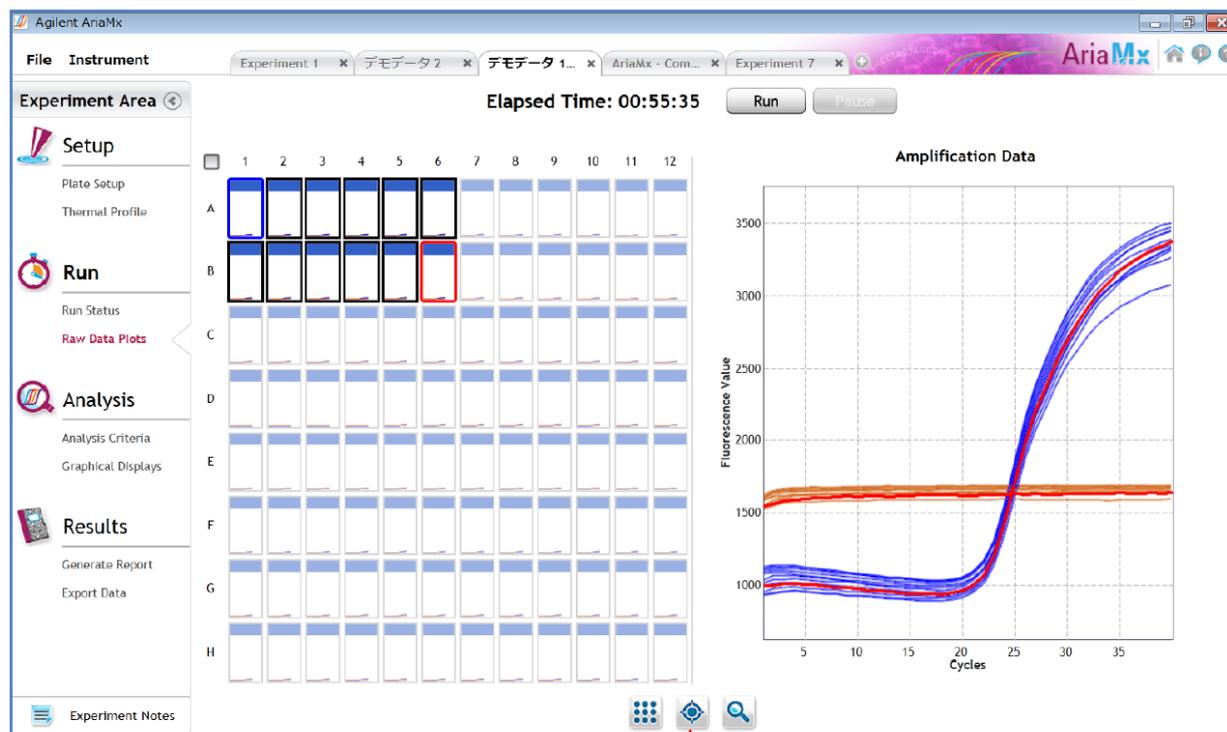
セグメント: 20, サイクル数: 255 (Amplificationのみ), Plateau/検出マーカー**: 20 (セグメント内)
検出ポイント: 2700 (プロファイル内)

** version 1.7からの機能です。それ以前のバージョンでは、セグメント内での複数の検出マーカー設定、及びタッチダウンPCRの設定はできません。

Raw Data Plot: リアルタイム蛍光モニタリング

選択されたウェルでの生データが右側のグラフに表示されます。ウェルの上にカーソルを合わせると右側のグラフの増幅曲線が赤色で表示されます。グラフ上をダブルクリックするとプロパティの変更も可能です。

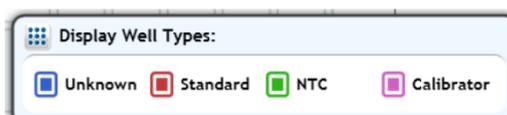
この画面を PC でリアルタイム表示するには、RUN 中に PC が AriaMx 本体に接続されている必要があります。



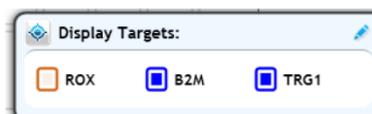
アイコンをクリックすると表示が変更できます。



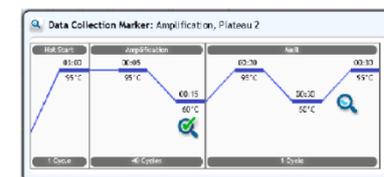
ウェルタイプ別に表示



ターゲット別に表示



表示したい検出マーカーの選択





8. データ解析方法

Analysis 画面の概要

得られたデータの解析は PC にインストールした AriaMx ソフトウェアで行います。

「Analysis Criteria」は解析したいサンプルを選択する画面です。

「Graphical Displays」で解析を行います。

解析のアルゴリズムを変更するパネル

データの表示
選択されているデータが表示されます。

表示されるグラフの選択

前頁参照

Replicateの個別/平均表示の選択

グラフ表示の数、並び方が変更できます。

Well	Well Type	Target	Rep
A1	Unknown	SYBR	1
A2	Unknown	SYBR	1
A3	Unknown	SYBR	1
A4	Unknown	SYBR	1
A5	Unknown	SYBR	1
A6	Unknown	SYBR	1
A7	Unknown	SYBR	1
A8	Unknown	SYBR	1
A9	Unknown	SYBR	1
A10	Unknown	SYBR	1
A11	Unknown	SYBR	1
A12	Unknown	SYBR	1
B1	Unknown	SYBR	1
B2	Unknown	SYBR	1
B3	Unknown	SYBR	1
B4	Unknown	SYBR	1
B5	Unknown	SYBR	1
B6	Unknown	SYBR	1

Agilent AriaMx

File Instrument

modified_Exp... Experiment 2 AriaMx - Com... AriaMx - Qua... modified_Ma...

Experiment Area

Setup
Plate Setup
Thermal Profile

Run
Run Status
Raw Data Plots

Analysis
Analysis Criteria
Graphical Displays

Results
Generate Report
Export Data

Experiment Notes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown 19.17	Unknown 19.06	Unknown 18.92	Unknown 18.59	Unknown 18.94	Unknown 18.89	Unknown 18.76	Unknown 19.23	Unknown 19.00	Unknown 18.92	Unknown 19.77	Unknown 19.27
B	Unknown 19.05	Unknown 19.05	Unknown 19.02	Unknown 18.95	Unknown 18.47	Unknown 18.91	Unknown 18.87	Unknown 18.91	Unknown 18.80	Unknown 19.04	Unknown 19.33	Unknown 19.35
C	Unknown 19.13	Unknown 18.85	Unknown 18.64	Unknown 18.96	Unknown 18.58	Unknown 18.83	Unknown 18.82	Unknown 18.94	Unknown 18.86	Unknown 18.43	Unknown 18.91	Unknown 19.38
D	NTC No Cq	NTC No Cq	NTC No Cq	NTC No Cq	Standard 22.39	Standard 22.43	Standard 22.40	Standard 22.35	Standard 21.36	Standard 21.53	Standard 21.38	Standard 21.68
E	Standard 20.23	Standard 20.19	Standard 20.00	Standard 20.07	Standard 18.79	Standard 19.13	Standard 18.96	Standard 18.79	Standard 18.19	Standard 18.01	Standard 18.23	Standard 18.22
F	Unknown 20.25	Unknown 20.00	Unknown 20.12	Unknown 20.02	Unknown 19.94		Unknown 19.94	Unknown 19.99	Unknown 19.93	Unknown 19.96	Unknown 19.93	Unknown 19.93
G	Unknown 20.22	Unknown 20.13	Unknown 20.15	Unknown 20.00	Unknown 19.99		Unknown 20.07	Unknown 20.11	Unknown 20.18	Unknown 19.97	Unknown 20.20	
H	Unknown 20.22	Unknown 20.01	Unknown 20.27	Unknown 20.33	Unknown 20.08	Unknown 20.28	Unknown 20.00	Unknown 20.10	Unknown 20.16	Unknown 20.14	Unknown 20.19	Unknown 20.31

Analysis Criteria icon highlighted with a red box and arrow.

Analysis Criteria 画面でウェルに Cq 値を表示できます。



Amplification plot (増幅曲線解析)

Amplification plot を選択すると、画面右側に下記が表示されます。

Fluorescence Term

R: Raw data (生データ)

Rn: ROX で補正したデータ

ΔR: ベースラインを合わせたデータ (ROX 補正なし)

ΔRn: ROX で補正後、ベースラインを合わせたデータ

ROX を使用していなければ、Rn と ΔRn は表示されません。
ROX を使用しているのに表示されない場合は、Plate Setup 画面で Reference Dye の設定を行ってください (15 ページ)。

Baseline Correction

自動的に Adaptive baseline 補正で表示されています。

「Adjust」をクリックするとベースラインを変更できます。

Graph Type

増幅曲線の Y 軸を Log 表示に変更できます。

Threshold Fluorescence

増幅曲線の Threshold line (閾値線) をマニュアルで変更、ロックすることができます。

Threshold line は Background-based アルゴリズムにより自動設定されます。

Background Based Threshold

増幅曲線のバックグラウンド領域 (サイクル数) が指定できます。



Standard curve (スタンダード曲線解析)

Standard curve のグラフを選択すると、画面右側に下記が表示されます。

Standard Curve

Fluorescence Term:

Threshold Fluorescence:
 SYBR: 0.015

Level (%): 99

Show confidence interval

Target Information Table

Target	Efficiency	R ²	Slope	Intercept
■ SYBR	99.04	0.992	-3.345	31.4

Fluorescence Term

ROX 補正の有無を選択できます。

Threshold Fluorescence

Threshold line の変更ができます。

Level (%)

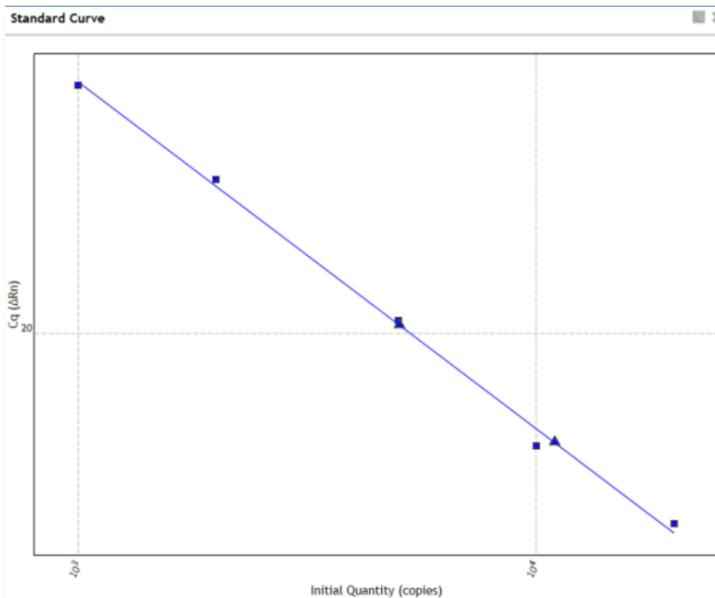
Confidence interval (信頼領域) の%を決定します。

Show confidence interval にチェックを入れるとグラフ上に表示されます。

Target Information Table

増幅効率、R 二乗値、スロープなどが表示されます。

Standard curve に示される ■ のプロットは Standard、▲のプロットは Unknown のサンプルです。





Melting curve, Dissociation curve (融解曲線解析)

Melting curve のグラフを選択すると、画面右側に表示されます。

Melt Curve - Raw/Derivative Curve

Fluorescence Term: R Rn -R'(T) -Rn'(T)

Savitzky-Golay: On Off

Points: 5 7 9 11

Normalization: On Off

Temperature Range:
Lower: 65 Upper: 95

Product Melting Temperature:
Max Number: 4
Min Peak Height: On Off
 6.000 ↻

Fluorescence Term

R: Raw data (生データ)

Rn: ROX で補正したデータ

-R'(T): 生データを微分解析して-1 を掛けたデータ
(ROX 補正なし)

-Rn'(T): ROX で補正後、微分解析して-1 を掛けたデータ

Savitzky-Golay

Savitzky-Golay の平滑化アルゴリズムが適応されています。

Points を大きくするとより滑らかなカーブになります。

Normalization

Raw Data の Y 軸について、最低蛍光値を 0 に、最大蛍光値を 1 となるように補正します。

Temperature Range

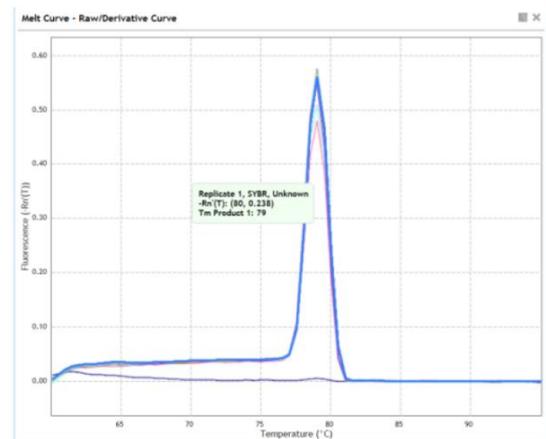
グラフに表示する温度幅を設定できます。

Product Melting Temperature

融解曲線解析でフラグ表示される Tm の数を設定します。

Min Peak Height

On にすると Tm を決定するピークの高さの最低値を設定できます。





相対定量解析

Relative Quantity

Fluorescence Term:

Chart Type:

Error Bar:

Amplification Efficiencies:

Target	Slope	Efficiency(%)
Norm	-3.295	101.15
Target	-3.714	85.89

Apply Std Curve Efficiencies to CQ Results

Mode:

Fluorescence Term

ROX 補正の有無を選択できます。

Chart Type

棒グラフのデータの表示形式を選択できます。

Error Bar

エラーバーの表示の有無を選択できます。

Amplification Efficiencies

「Apply Std Curve Efficiencies to CQ Results」にチェックを入れると、Standard curve 解析が同一実験内で行われている場合、Standard curve のスロープ、増幅効率が自動的にインプットされます。チェックを外すとマニュアルで増幅効率をインプットすることができます。

Mode

ΔCq: ノーマライザーでの補正を伴わない場合

ΔΔCq (Livak): ノーマライザーで補正をし、増幅効率を 100%で計算する場合

Pfaffl (Efficiency Corrected Method): ノーマライザーで補正をし、増幅効率を計算に加味する場合

相対定量解析の計算方法 (Pfaffl の計算式)

$$Rel. Q \text{ to Norm.} = \frac{(1+Eff)^{Cq_{GOI}}}{(1+Eff)^{Cq_{Norm}}}$$

$$Rel. Q \text{ to Cal.} = \frac{(1+Eff)^{(Cq_{calibrator} - Cq_{sample})_{GOI}}}{(1+Eff)^{(Cq_{calibrator} - Cq_{sample})_{Norm}}}$$

増幅効率の計算方法

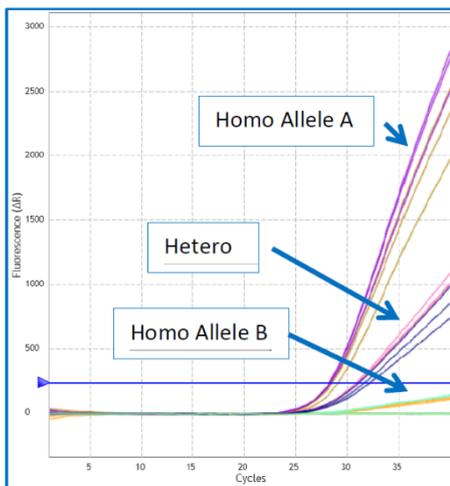
$$Efficiency = [10^{(-1/Slope)}] - 1$$



Allele Discrimination (Fluorescence Probe) 解析 (SNP 解析)

Allele Discrimination を解析する場合は、増幅曲線で Threshold line を設定し、Dual color plot のジェノタイプを確認しながら Last Cycle を設定する必要があります。Cq 値での Dual color plot の場合には増幅曲線での Threshold line の設定のみ行います。

解析方法の一例を示します。この解析では Allele A の認識に FAM ラベル TaqMan プローブを、Allele B の認識に VIC (HEX) ラベル TaqMan プローブを利用しています。NTC 及び陽性コントロールとして同濃度の Allele A Home, Allele B Homo, Hetero を用いています。



左図はこの実験の増幅曲線解析で、Homo Allele A の陽性コントロール、Hetero 陽性コントロール、Homo Allele B の陽性コントロールについて、FAM の検出のみを表示しています。

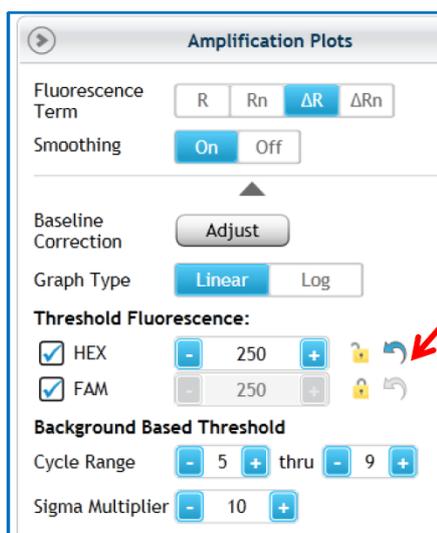
チェックポイント 1: NTC にシグナルがないことを確認します。NTC にシグナルがあった場合は、プローブの分解などの問題が考えられます。

チェックポイント 2: Homo Allele A, Hetero, Homo Allele B の増幅曲線を確認します。Allele A の FAM ラベルプローブは Allele B に対して、1 塩基の違いしかないので多少の結合が起こる場合があります。

Allele A を認識する FAM ラベル TaqMan プローブでの増幅曲線では、Homo Allele B と Hetero のシグナルの間で、Homo Allele B の直上に Threshold line を設定します。

同様に Allele B を認識する VIC ラベル TaqMan プローブについても Threshold line の設定を行います。

Threshold line をマニュアルで設定したら、その設定をロックします。



Threshold line の高さ設定のロック
下段がロックされた状態です。

次に Dual color plot をチェックします。

Allele Determination

Display by: Fluorescence Cq

R last ΔR last

Rn last ΔRn last

R last / R first

Genotype Calls: None Manual Auto

Last Cycle: 40

Rename Genotypes:

Allele A: Allele A

Allele B: Allele B

Hetero: Heterozygous

Display by

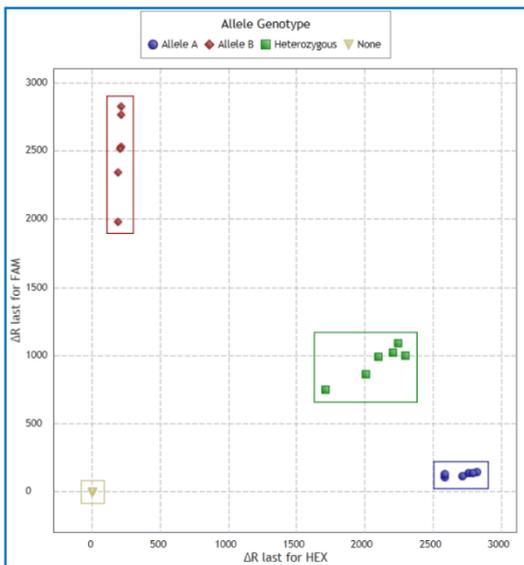
解析を蛍光値 (Fluorescence) か Cq 値で行うかを選択します。Reference Dye での補正がない場合は ΔR Last、補正をする場合には ΔRn Last を選択します。

Genotype Calls

Auto に設定すると (デフォルト) 自動的にソフトウェアがジェノタイプをコールします。マニュアルで設定したい場合は Manual を選択します。

Rename Genotypes

ジェノタイプ名を設定できます。テキストレポートにも反映されます。



左図は蛍光値 (Fluorescence) で解析した Dual color plot です。ジェノタイプのコールは自動で表示されています。

Last Cycle

このジェノタイプのコールを確認しながら Last Cycle の数値を変更することができます。Last Cycle は増幅曲線の何サイクル目の蛍光値で Dual color plot を表示させるかを決定するものです。

グラフ上で右クリックするとグラフのプロパティが表示されます。

Reset Zoom

Allele A

Allele B

Hetero

None

Axis Options ▶

Legend Options ▶

Grid Options ▶

Edit Background Color...

Edit Graph Title...

Print Image...

Save Image As...

Send Image To PowerPoint

Send To Excel

Restore Default Settings



9. HRM（高解像度融解曲線解析）

Allele Discrimination – DNA Binding Dye Experiment Type 概要

この実験タイプは、ゲノム DNA あるいは cDNA サンプルの特定の遺伝子について Allele 識別を行う時に利用されるプログラムで、方法としては SYBR Green I や EveGreen などの DNA 結合型蛍光色素を用い、高解像度融解曲線（HRM）解析を行います。

HRM 解析は、DNA 配列中の SNP（Single Nucleotide Polymorphism）の検出など、ジェノタイピングで利用されるテクニックです。また、HRM 解析は種の判別や遺伝子変異のスクリーニング、ハプロタイプの決定等に利用されています。HRM 解析にこの実験タイプを利用する場合には、1つの反応系内で同じプライマーセットで全ての Allele を増幅させ、これらを DNA 結合型色素（SYBR Green I や EvaGreen）を利用して検出します。この実験タイプの融解曲線解析では、ターゲット配列中に 1塩基の違いがあれば融解曲線のパターンはわずかにずれて表示されます。この解析は変異をパターン認識する方法なので、それぞれの Allele の陽性コントロールが必要になります（Homo と Hetero）。

HRM Calibration Plate (HCP)

この実験タイプの Thermal profile 内の HRM セグメントでは、0.2°C ずつ温度を上昇させながらサンプルの蛍光を測定します。非常にわずかな温度差をサーマルブロック全てのウェル間で検出するためには正確な温度制御が必要です。HCP の目的は各ウェルのオフセット温度（各ウェルの T_m と平均 T_m の差）を計算することで、サーマルブロック内の温度変動の正規化に利用されます。この実験タイプでは、AriaMx ソフトウェアは HCP の結果と実験結果を関連付けすることで、各ウェルで得られた T_m 値からオフセット温度を減算します。この補正によって Difference plot や Raw/Derivative melt curve の精度が高くなり、配列の差を明瞭に識別することができるようになります。HCP ではオフセット温度を計算するために、全てのウェルに同じアンプリコンが入っているものを使用します。HCP をランすることで、各ウェルの T_m が得られ、ソフトウェアはこのプレートの結果からオフセット温度を計算します。

HCP は各システムにおいて HRM 解析の前に実施する必要があります。この HCP の結果を HRM 解析に利用できますが、正確な結果をキープするために年に 1 回程度は HCP を実施することをお勧めします。

HRM Calibration Plate (HCP)のラン

HRM 解析で Difference Plot 解析を行う前に、ご利用の AriaMx システムで HCP のランを実施し、その解析結果を関連付ける必要があります。

HCP の準備

- ・ アジレント製純正 HCP をご利用の場合

アジレント社純正の HRM Calibration Plate (HCP)をご購入いただけます (part# 5190-7702)。96 ウェルプレートにアンプリコン、マスターミックス試薬、EvaGreen 色素等がプレミックスされた製品です。詳細は弊社ウェブページでご確認ください (<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>)。

- ・ ホームメイドの HCP プレートを利用する場合

作製方法は AriaMx ユーザーマニュアル (英語版) を参考にしてください。

HCP のラン

HCP の実施は PC からではなく、必ず AriaMx 本体 (タッチスクリーン) から実施してください。

HCP の手順

1. AriaMx 本体タッチスクリーンのホーム画面で「HRM Calibration」アイコンをクリックします。
2. 次の画面で「Open Default Experiment」をクリックします。
デフォルトの HCP experiment が開きます。96 ウェル全てが Unknown、SYBR の検出で設定されています。EvaGreen 色素は SYBR とほぼ同じ波長なので FAM/SYBR の検出設定となります。
3. Thermal Profile 画面に進み、「Run Experiment」をクリックします。
ファイルを保存する指示のメッセージボックスが開きますので、OK をクリックします。
この結果 HCP フォルダーに保存されます。
4. ファイル名を入力し「Save」をクリックします。ファイルが保存するとランが開始します。
5. ラン終了後、メッセージボックスが開き、HCP の Pass あるいは Failed が表示されます。

Pass の場合には、HCP ファイルを解析用 PC に移し HRM 解析に利用します。

もし Failed の場合はこのファイルを HCP として利用することはできません。テクニカルサービスへご連絡ください。

HRM Calibration Plate (HCP)の指定

Melt curve – Difference plot 解析をする際には、HCP ファイルの指定が必要です。

HCP ファイルは前頁で実施した HCP ファイルを用います。

HCP ファイルは以下の条件が必要です。

1. システムの品質チェックを Pass したファイルであること
2. HRM 実験と同じシステムであること
3. HRM 実験と同一のサーマルプロファイル（温度条件）であること

HCP の指定方法

HRM 実験を行い、最初にその実験ファイルを開いたときに、下のメッセージボックスが表示されます。



1. メッセージボックス内の「Import」をクリックします。ダイアログボックスが開きます。
2. ブラウザに表示された指定する HCP ファイルを選択し「Open」をクリックします。

HCP の指定は、HRM 解析プログラムの Graphical Display 画面内のアイコン  から設定・変更・指定の解除が可能です。

HRM 解析のプレートセットアップ 温度条件 (Thermal Profile) の設定

HRM 解析のプレートセットアップ方法は、定量 PCR のプレートセットアップ方法と大きな違いはありません。定量 PCR のプレートセットアップ方法を参考にしてください。

ウェルタイプでコントロールサンプルの設定が必要になります。

The image shows two panels from a software interface. The top panel is titled 'Wells' and contains the following controls: 'Well Type' dropdown set to 'Homo Allele A'; 'Show' tabs for 'Type', 'Name', and 'Sample'; 'Well Name' and 'Sample Name' text input fields; 'Add Dyes' section with 'Targets' arrow and 'Use Dye Name' section with checkboxes and dropdowns for FAM, ROX, HEX, CY5, and CY3; and 'Reference Dye' dropdown set to 'ROX'. The bottom panel is titled 'Replicates' and contains: 'Manual' and 'Auto' radio buttons; 'Assign Replicate Number' section with minus, '1', and plus buttons; and 'Auto Increment' and 'Clear' buttons.

ウェルタイプの設定



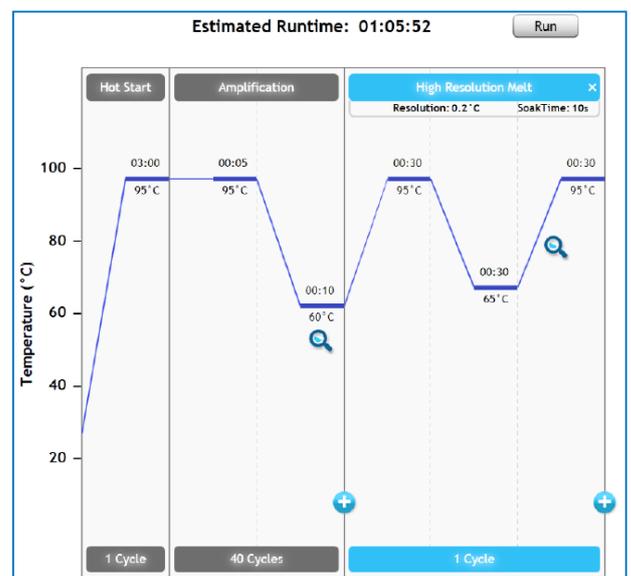
「Wells」では、Unknown や Standard 等のウェルタイプを設定します。

設定したいウェルを選択し、プルダウンメニューから適したタイプを選択してください。

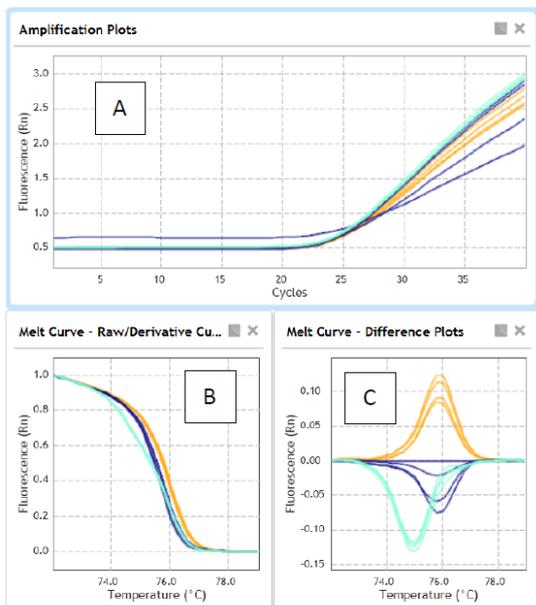
HRM 解析では複数の Allele A, Allele B, Hetero のコントロールサンプルの設定が必須です。

Thermal Profile の設定

Thermal Profile 内のセグメント「High Resolution Melt」は HCP と一致している必要があるので留意してください。



HRM 解析方法 – Graphical Display



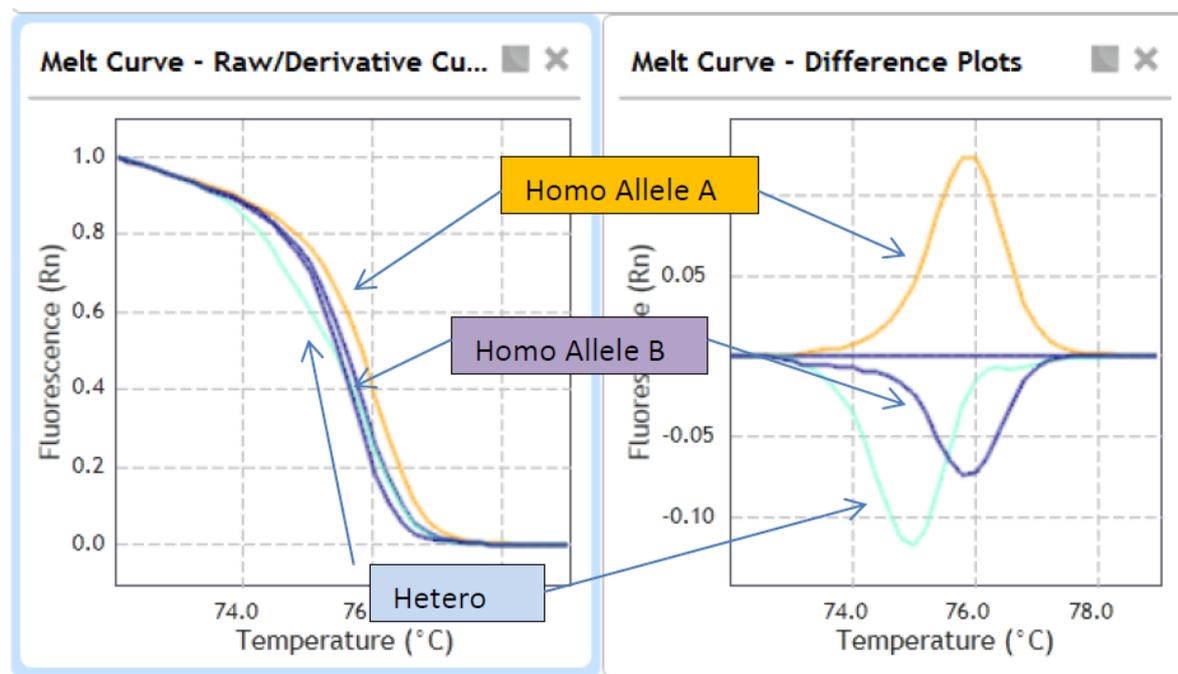
HRM 解析を実施すると増幅曲線解析、融解曲線解析 (Raw/Derivative Curve)、差分解析 (Difference Plot) の3つの結果が得られます。Difference Plot の解析に HCP の結果が必要となります。

増幅曲線と融解曲線解析の際の各種設定方法は、他のアッセイと同様です。設定方法は前項目を参考にしてください。

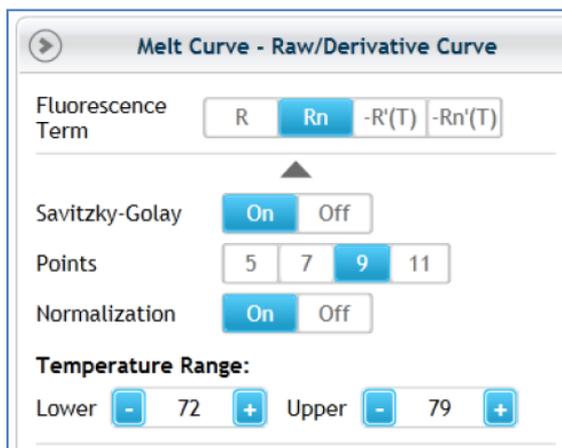
Difference Plot は HRM 解析で利用される解析アルゴリズムです。図 B は Raw/Derivative Curve で X 軸は温度を示しています。各温度で測定した蛍光値を Y 軸に表示しています。各サンプルの最も高い蛍光値を 1 とし、最も低い蛍光値は 0 としてノーマライズした結果です。

図 C は図 B の蛍光強度について、どれか 1 つのサンプルを基準と設定し、この差異をプロットしたものです。

以下に例として、Homo Allele A、Homo Allele B (2 本)、Hetero の 3 パターンを示します。Homo Allele B の 1 本を基準として設定し、Homo Allele A、Homo Allele B、Hetero の 3 つのコントロールのパターンを決定し、実際のサンプルのジェノタイプを解析していきます。



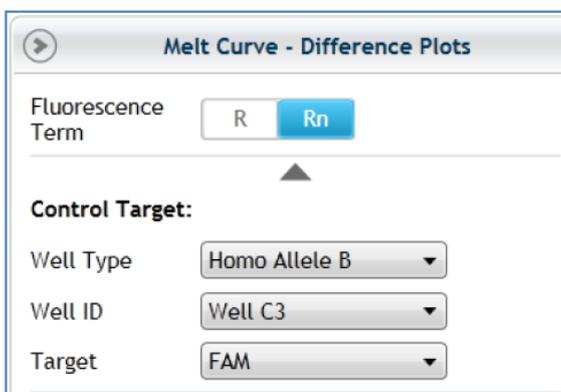
Melting Curve – Raw/Derivative Curve の設定



他のアッセイでの融解曲線解析と同様の設定です。

HRM 解析の場合、Temperature Range を蛍光シグナル強度に差がある範囲に設定すると、Difference Plot の表示が見やすくなります。

Difference Plot の設定



Control Target の指定

基準とすべきサンプルを決定します。各コントロールサンプル内の典型的なサンプルを基準としますが、既知の Allele が基準とすべきサンプルで上下に分かれるサンプルを設定するとジェノタイプを識別しやすくなります。

各データのチェックのジェノタイプのコールの決定

解析画面に右側にある Result Table で、解析したいサンプルのカラム上にカーソルをあてると Difference Plot 内の該当サンプルが青色で表示されます。この波形を見てジェノタイプを決定します。決定したジェノタイプのコールは、右クリック>「Apply Call to Current Item」から入力します。コールは Tabular Results (テキストレポート)にも反映されます

Well	Well Type	Replicate
B3	Homo Allele A	1
B4	Homo Allele A	1
B5	Homo Allele A	1
B6	Homo Allele A	1
B7	Unknown	6
B8	Unknown	6
B9	Unknown	6
B10	Unknown	6
C3	Homo Allele B	2
C4	Homo Allele B	2
C5	Homo Allele B	2
C6	Homo Allele B	2
C7	Unknown	7
C8	Unknown	7
C9	Unknown	7



10. Multiple Experiment Analysis (複数実験解析)

Multiple Experiment Analysis (MEA) 複数実験のプロジェクト解析 概要

AriaMx ソフトウェアでは、各実験ファイルを合わせて解析することができる機能 (Multiple Experiment Analysis (MEA)) を備えています。この解析はプロジェクト解析ともいい、解析ファイルには拡張性 amxp が付されます。プロジェクト内にアップロードされた実験ファイルについて、ターゲット名やサンプル名などによる様々なグループ化をしての解析が可能です。

Multiple Experiment Analysis のアプリケーション

- ・ 相対定量解析の場合
ノーマライザー (ハウスキーピング遺伝子等) と測定したいターゲット遺伝子を別の実験で行ったものを合わせて解析した場合や、定量解析を行った多くのターゲット遺伝子において、一度測定したノーマライザーの実験結果を利用する場合に有用です。
- ・ サンプル数が大量の場合
1 回の実験で 96 ウェルを超える場合、Standard curve 解析を各実験で行わず、別実験で取得した Standard curve を共有し定量解析を行うことができます。
- ・ プロジェクトタイプでの解析では、複数のデータを合わせて解析しつつ、同じソフトウェア上で個別に解析することも可能です。

Multiple Experiment Analysis (MEA) 実施に際しての注意点

- ・ 必ず同一の実験タイプである必要があります。実験タイプは実験後、コンバートすることが可能です。また、Thermal Profile も同一である必要がありますが、これは実験後には変更できませんので、あらかじめ留意してください。
- ・ Melt Curve – Difference Plots については、MEA では解析できません。

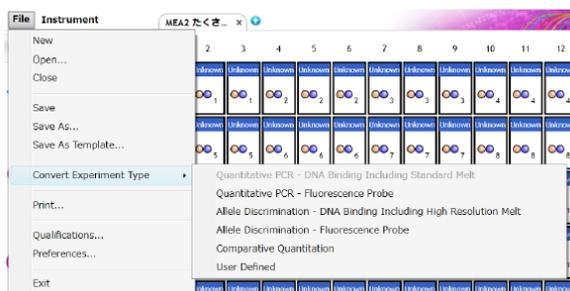
実験タイプのコンバート方法

実験を開始する際、実験タイプを選択しますが、間違ったタイプを選択すると解析ができない場合があります。

Multiple Experiment Analysis の場合、異なる実験タイプをアップロードすることはできません。

また、「Quantitative PCR -Fluorescence Probe」の実験タイプを選択すると、SYBR Green アッセイ等で必要な融解曲線解析ができない、「Quantitative PCR」を選択すると、相対定量解析を行いたい場合にノーマライザーやキャリブレーター等の設定ができません。

このような場合に、データを取得した後、実験タイプを変更（コンバート）することができます。

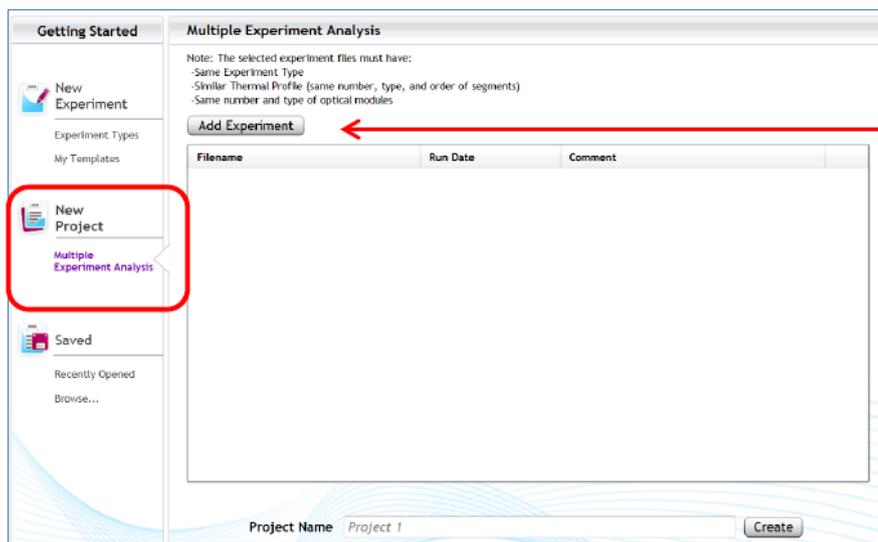


コンバートしたいファイルを開き、

「File」>「Convert Experiment Type」から変更したい実験タイプを選択することができます。

Multiple Experiment Analysis の開始

Multiple Experiment Analysis (MEA) は「Getting Started」内の Multiple Experiment Analysis から開始します。

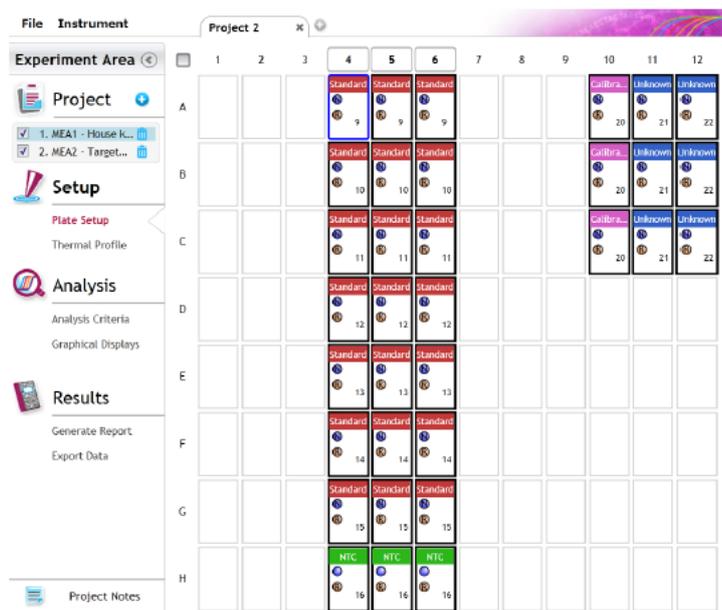


Add Experiment から解析したいファイルを選択し、アップロードします。

Multiple Experiment Analysis での相対定量解析

実験 1 でハウスキーピング遺伝子だけを、実験 2 でターゲット遺伝子のみを解析した場合、2 つの実験を合わせて解析する方法を示します。

1. 「New Project」から「Multiple Experiment Analysis」をクリックし、解析した実験ファイルをアップロードします。
2. Project Name を入力します。
3. Project が表示されます。

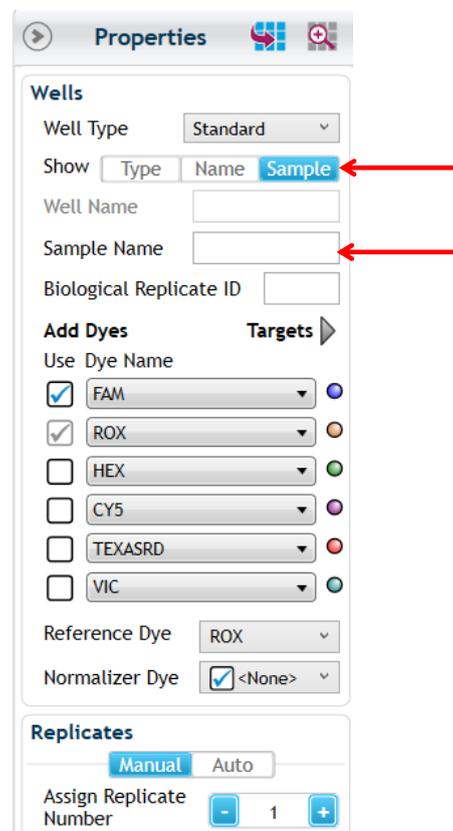


Project に表示されているファイルを選択するとそれぞれのプレートセットアップが開き、解析に必要なパラメータを設定できます。また、ファイルの削除・追加ができます。

4. Sample Name の設定

相対定量解析では、Sample Name の設定が必須です。Sample Name によって複数のファイル内にある同一のサンプルを一致させて解析することができます。

Biological Replicate ID も設定することができます。



MEA 解析に使用する増幅曲線を整える

それぞれに実験ファイルを開き、増幅曲線の Background と Threshold line を整えます。

以下に示す相対定量解析では、1つの遺伝子（例えばハウスキーピング遺伝子）については1つの実験内で実施されています。このようなケースでは、Threshold line は各増幅曲線で設定します。

Graphical Displays を開き、設定を行いたい実験を選択します。

Threshold line の設定とロック

Background をマニュアルで設定し、Threshold line の高さを決定します。その後、🔒 アイコンをクリックして Threshold line の高さをロックします。解析する各遺伝子について行います。

グラフ上をクリックすると右側に各種設定パネルが表示されます。

は MEA 解析、
 はそれぞれの実験の解析ができます。

増幅効率のインプット

実験に使用した各プライマーの増幅効率をインプットする場合、それぞれの実験で行います。設定方法は通常の相対定量法のセットアップと同様です。ここで設定された増幅効率が MEA 解析で反映されます。

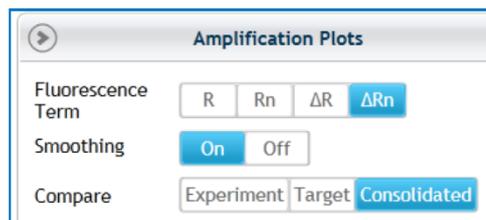
MEA の開始

ソフトウェア画面下側にある  アイコンをクリックし、 となれば MEA 解析です。



Compare の設定

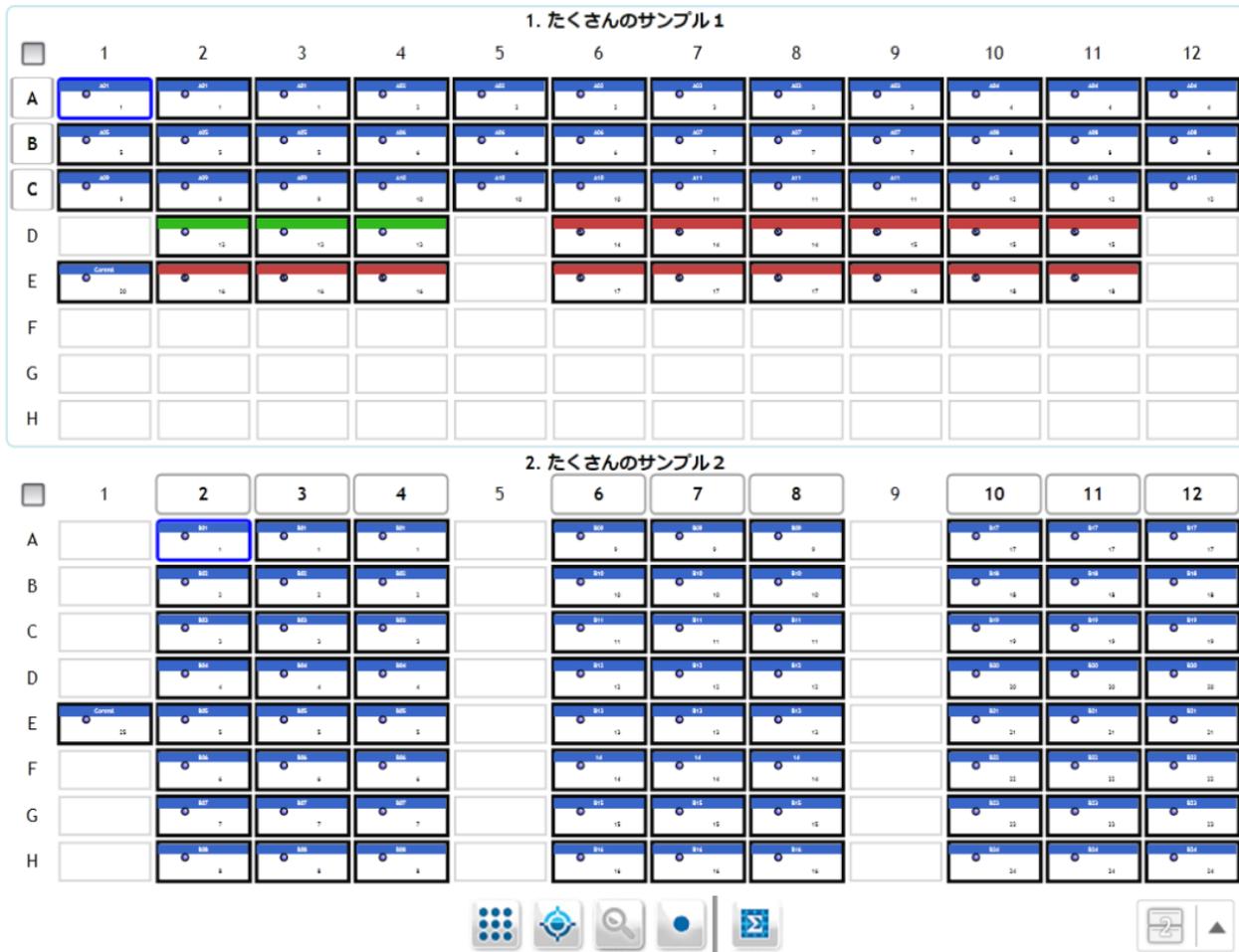
解析画面右側のパネル内で表示するデータを選択できます。



- Experiment: 実験ごとに表示します。
- Target: Target ごとに表示します。
- Consolidated: 実験を合わせて表示します。

多サンプル/ターゲットの場合の Multiple Experiment Analysis

サンプル数が多く、1回の実験で定量を行えない場合、MEAが便利です。以下に例を示します。



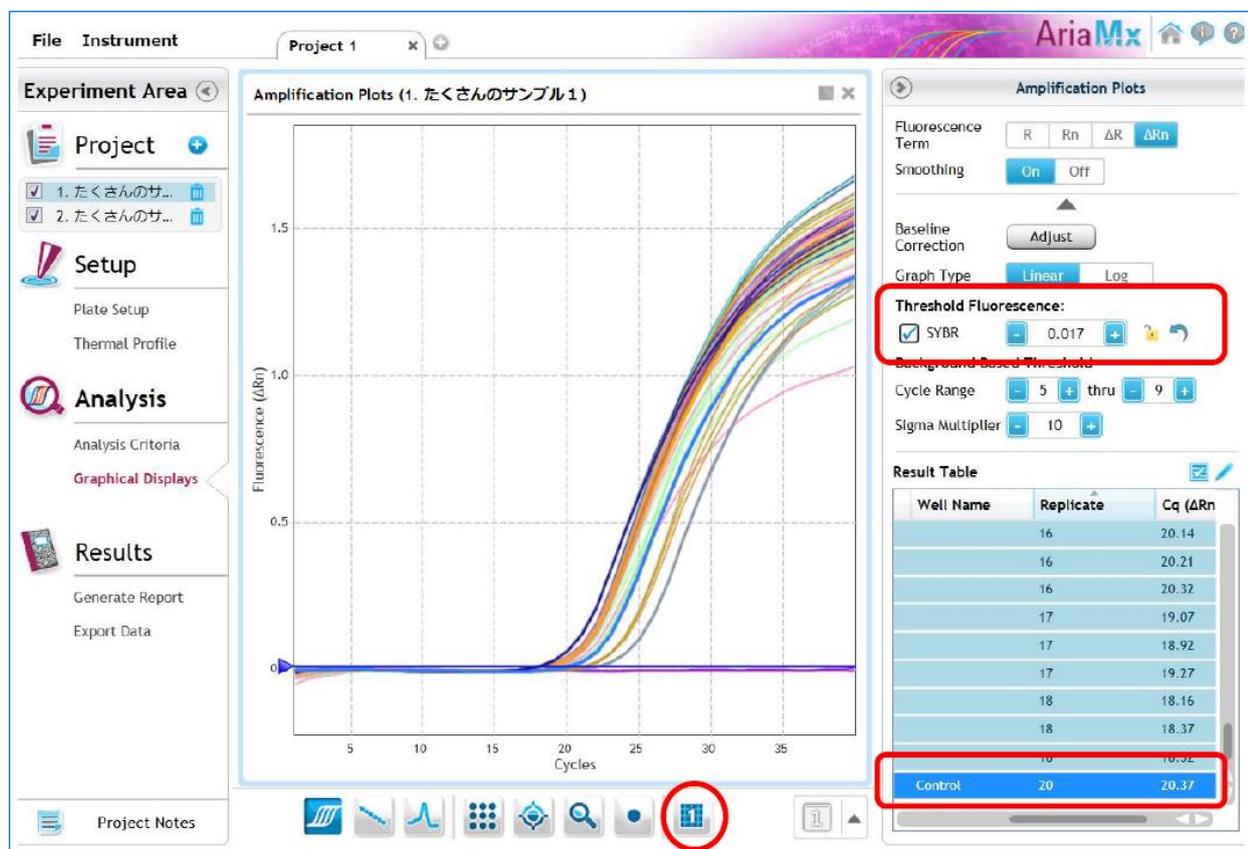
2回の実験を MEA で合わせ、Analysis Criteria で表示しています。サンプル数が多く、1回の実験ではウェル数が足りないケースです。上段の実験では Standard curve アッセイも行っています。

Inter-experiment Control による Threshold line のマニュアル設定

上記のように実験を合わせる場合には、Threshold line の互換性を持たせる必要があります。Threshold line はそれぞれの実験で Background based アルゴリズムにより設定されていますが、このケースでは Inter-experiment Control によって互換性を持たせます。いずれの実験でも上記では Well E1 に同一のサンプルをアッセイし、これを Inter-experiment Control として利用します。Well E1 で得られる Cq 値が各実験で一致する高さに Threshold line を設定しロックすることで実験間に Cq 値の互換性を得ることができます。

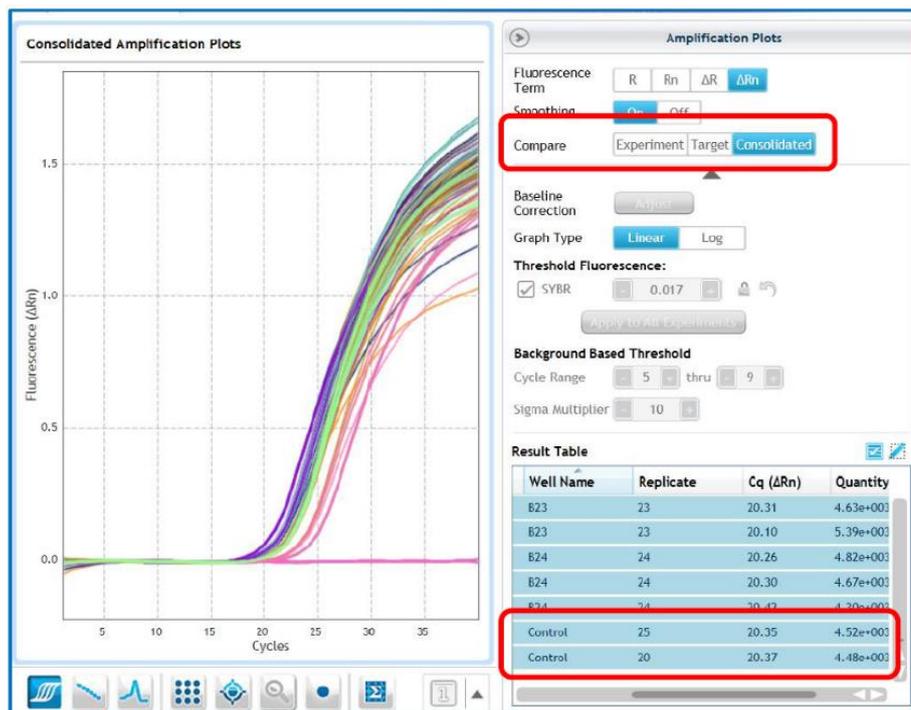
この設定によって、1回目の実験の Standard curve を2回目の実験で利用することができます。ただし、実験間で時間が経過することによる使用する蛍光色素の劣化等がなく、複数の実験が同様に行われていることが基本的な条件です。蛍光色素や試薬の劣化は MEA に影響しますのでご注意ください。

Threshold line のマニュアル設定



- ・ ソフトウェア画面下側にある **1** アイコンをクリックし、**Σ** として個別に Threshold line を設定します。
- ・ Inter-experiment Control と設定したサンプル Cq 値を確認します。Results Table 内で該当サンプルをクリックすると増幅曲線が青色で表示されます。
- ・ 「Threshold Fluorescence」の **🔒** アイコンをクリックし Threshold line の高さをロックします。
- ・ 続いて別の実験でも同様に Control の Cq 値を確認し、「Threshold Fluorescence」の数値を変更して同一の Inter-experiment Control サンプルの Cq 値が同じとなる高さに設定します。

Graphical Display - 結果の確認



・ Compare を「Consolidated」にすることで、複数実験を合わせて解析できます。

Inter-experiment Control (Control) の Cq 値がほぼ同じ値となります。この Cq 値より Standard curve 解析を用いた結果 (Quantities)として表示されます。Cq 値を合わせているのでほぼ同等の結果となります。この Threshold line で他のサンプルの Cq 値も得られるので、複数の実験を合わせて解析することができます。



11. レポートの作成とデータのエクスポート

Results



AriaMx で行った定量 PCR の結果について、レポート作成およびエクスポートを行います。

Generate Report

必要な項目・データの選択をし、レポートを作成します。

The screenshot shows the 'Report Configuration' dialog box with the following settings:

- Definition: Default
- Report Type: PDF (selected), PowerPoint
- Items (all checked):
 - Cover Page
 - Plate Setup
 - Thermal Profile
 - Raw Data Plots
 - Analysis Criteria
 - Amplification Plots
 - Standard Curve Plots
 - Relative Quantity Plots
 - Consolidated Plots
 - Tabular Results
 - Experiment Notes
- Show Analysis Settings: Yes (selected), No
- Header & Footer (all checked):
 - Instrument Name
 - Instrument Type
 - Experiment Name
 - Experiment Type
 - Run Date
 - Page Number

A 'Generate Report' button is located at the bottom of the dialog.

Definition

利用する項目、レポートタイプなどの設定を変更し、デフォルトに設定することができます。

Report Type

レポートの形式は PDF、パワーポイントが選択できます。

Items

チェック入れた項目がレポートに記載されます。
編集アイコン  をクリックするとさらに詳細な設定が可能です。

Show Analysis Settings

解析の際に設定したパラメーターの表示/非表示が選択できます。

Header & Footer

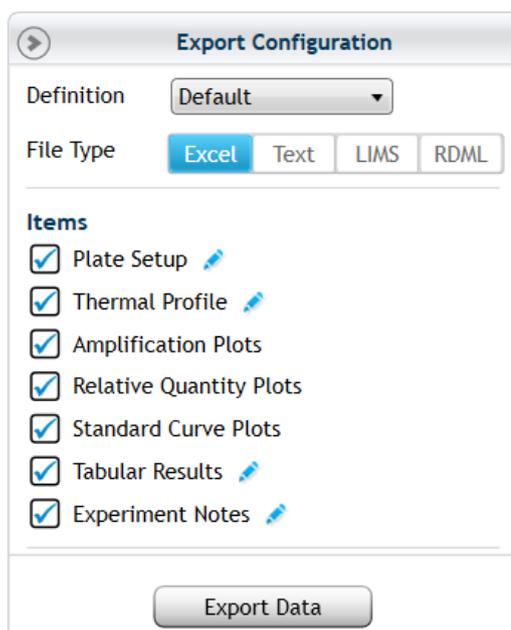
レポートのヘッダーとフッターの表示を選択できます。

Generate Report

このボタンをクリックするとレポートが作成されます。

Export Data

各解析結果の詳細データをエクセル、テキスト、LIMS、RDML*形式で出力できます。



Definition

利用する項目、ファイルタイプなどの設定を変更し、デフォルトに設定することができます。

File Type

エクセル、テキスト、LIMS、RDML 形式から選択できます。

Items

出職した項目にチェックを入れます。

編集アイコン  をクリックするとさらに詳細な設定が可能です。

Export Data

このボタンをクリックするとデータが出力されます。

*RDML ファイル

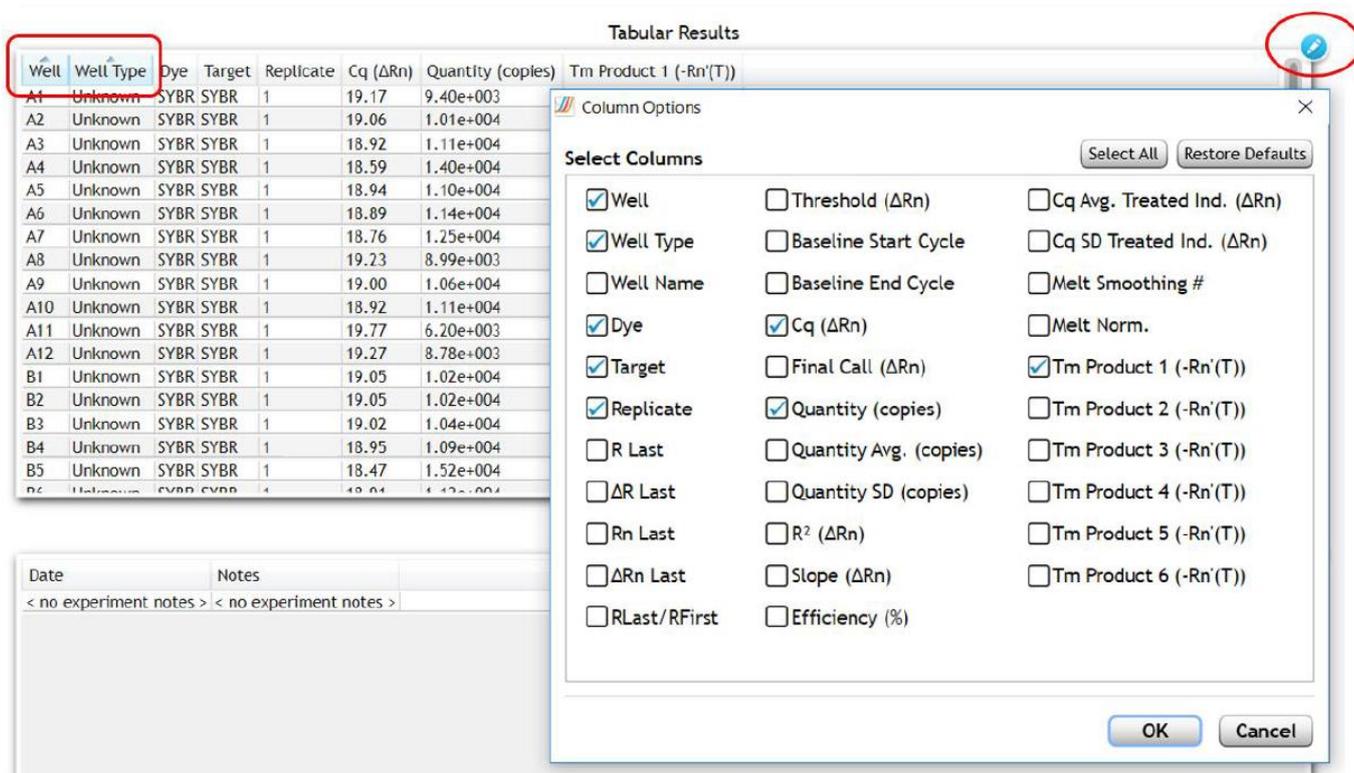
MIQE ガイドラインでは QPCR のデータを論文に投稿する際、RDML (Real-time PCR Data Markup Language)ファイル形式を推奨しています。

RDML についての詳細は、www.rdml.org をご参照ください。

Tabular Results

エクセル形式などでデータを出力する際に利用します。

表右上にある編集アイコン  をクリックすると Column Options が開きます。必要なカラムを選択します。また、各カラムをソートすることができます。複数のカラムでソートする場合は、Shift キーを押しながら選択してください。



The screenshot shows the 'Tabular Results' window with a table of data. The 'Well' and 'Well Type' columns are highlighted with a red box. The 'Column Options' dialog box is open, showing a list of columns with checkboxes. The 'Well' and 'Well Type' checkboxes are checked. The 'Tm Product 1 (-Rn'(T))' checkbox is also checked. The 'OK' button is highlighted with a red circle.

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (ΔRn)	Quantity (copies)	Tm Product 1 (-Rn'(T))
A1	Unknown	SYBR SYBR	1	19.17	9.40e+003		
A2	Unknown	SYBR SYBR	1	19.06	1.01e+004		
A3	Unknown	SYBR SYBR	1	18.92	1.11e+004		
A4	Unknown	SYBR SYBR	1	18.59	1.40e+004		
A5	Unknown	SYBR SYBR	1	18.94	1.10e+004		
A6	Unknown	SYBR SYBR	1	18.89	1.14e+004		
A7	Unknown	SYBR SYBR	1	18.76	1.25e+004		
A8	Unknown	SYBR SYBR	1	19.23	8.99e+003		
A9	Unknown	SYBR SYBR	1	19.00	1.06e+004		
A10	Unknown	SYBR SYBR	1	18.92	1.11e+004		
A11	Unknown	SYBR SYBR	1	19.77	6.20e+003		
A12	Unknown	SYBR SYBR	1	19.27	8.78e+003		
B1	Unknown	SYBR SYBR	1	19.05	1.02e+004		
B2	Unknown	SYBR SYBR	1	19.05	1.02e+004		
B3	Unknown	SYBR SYBR	1	19.02	1.04e+004		
B4	Unknown	SYBR SYBR	1	18.95	1.09e+004		
B5	Unknown	SYBR SYBR	1	18.47	1.52e+004		
B6	Unknown	SYBR SYBR	1	18.84	1.42e+004		

The 'Column Options' dialog box shows the following columns and their selection status:

Column	Selected
Well	Yes
Well Type	Yes
Well Name	No
Dye	Yes
Target	Yes
Replicate	Yes
R Last	No
ΔRn Last	No
Rn Last	No
ΔRn Last	No
RLast/RFirst	No
Threshold (ΔRn)	No
Baseline Start Cycle	No
Baseline End Cycle	No
Cq (ΔRn)	Yes
Final Call (ΔRn)	No
Quantity (copies)	Yes
Quantity Avg. (copies)	No
Quantity SD (copies)	No
R ² (ΔRn)	No
Slope (ΔRn)	No
Efficiency (%)	No
Cq Avg. Treated Ind. (ΔRn)	No
Cq SD Treated Ind. (ΔRn)	No
Melt Smoothing #	No
Melt Norm.	No
Tm Product 1 (-Rn'(T))	Yes
Tm Product 2 (-Rn'(T))	No
Tm Product 3 (-Rn'(T))	No
Tm Product 4 (-Rn'(T))	No
Tm Product 5 (-Rn'(T))	No
Tm Product 6 (-Rn'(T))	No

AriaMx リアルタイム PCR 純正試薬及び消耗品のご案内

リアルタイムPCR用 マスターミックスキット

SYBR Green Assay用

600882	Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix	400 Rxn
600892	Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix, Plus ROX	400 Rxn
600886	Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix, 1-Step	400 Rxn

Probe Assay用

600880	Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix	400 Rxn
600890	Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, Plus ROX	400 Rxn
600884	Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, 1-Step	400 Rxn

HRM Assay用

5190-7862	Brilliant III HRM Ultra-Fast Loci Master Mix	200 Rxn
-----------	--	---------

cDNA合成キット

600559	AffinityScript QPCR cDNA synthesis Kit	50 Rxn
--------	--	--------

リファレンスRNA

750550	QPCR Reference Total RNA, Human	25 µg
750600	QPCR Reference Total RNA, Mouse	25 µg

QPCR用スタンダードテンプレート作製補助キット

240205	StrataClone PCR Cloning Kit	20 Rxn
400766	StrataPrep DNA Gel Extraction Kit	50 Rxn
400771	StrataPrep PCR Purification Kit	50 Rxn
400761	StrataPrep Plasmid Miniprep Kit	50 Rxn

QPCRを抑制する原因を調べるための外部コントロール

300600	Alien QRT-PCR Inhibitor Alert	400 Rxn
300602	Alien Reference RNA QRT-PCR Detection Kit (FAM detection)	100 Rxn
300604	Alien Reference RNA QRT-PCR Detection Kit (VIC detection)	100 Rxn

細胞からのダイレクトQPCR

400917	SideStep II QRT-PCR Master Mix, 1-Step	400 Rxn
400900	SideStep Lysis and Stabilization Buffer	10 ml
400916	SideStep II Cell Lysate Analysis Kit	100 Rxn

NGSライブラリ定量用キット

G4880A	QPCR NGS Library Quant Kit, Illumina GA	1 Kit
--------	---	-------

リファレンスプレート

5190-7702	HRM AriaMx Calibration Kit	1 Plate
5190-7708	SYBR reference plate	1 Plate

AriaMx リアルタイムPCR用 プラスチック消耗品

401490	AriaMx 96 well plates, Skirted and Low Profile	25 Plates
401491	AriaMx 96 well plates, Skirted and Rigid	25 Plates
401494	AriaMx 96 well plates, Non Skirted Low Profile	25 Plates
401492	AriaMx Adhesive Plate Seals	50 Sheets
401493	AriaMx Tube Strips	120 Strips
401425	Mx3000P Optical Strip Caps	120 Strips

参考文献

- ・ 融解曲線のスムージング・アルゴリズム
Savitzky and Golay, Analytical Chemistry, 1964; 36(8): 1627-1639.
- ・ 相対定量 (CQ) 解析に利用されるアルゴリズム
Pfaffle M. W., Nucleic Acids Res. 2001; 29(9): e45.
- ・ Multiple Experiment Analysis での Threshold line の設定について
Hellemans *et. al.*, Genome Biology, 2007; 8(2): R19.
- ・ RDML ファイル形式に関する論文
www.rdml.org Nucleic Acids Res., 2009 April; 37(7): 2065-2069.
- ・ MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment
www.rdml.org/miqe.php

QPCR 実験用ツール集

- ・ Primer3Plus
<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
- ・ Primer3 の使い方 (統合 TV)
<https://togotv.dbcls.jp/20110111.html>
- ・ 文部科学省委託研究開発事業 統合データベースプロジェクト
<http://lifesciencedb.jp/>
- ・ RefSeq (Reference sequence database)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
- ・ Splign (cDNA to genomic alignment tool)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>
- ・ Nucleic Acids Research Group study on Primer and Probe Design
<https://abrf.org/sites/default/files/temp/RGs/NARG/assaydesign-primer3.pdf>

Miscellaneous

Introduction to Quantitative PCR - Methods and Applications Guide

https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf

・ 定量 PCR 法 理論

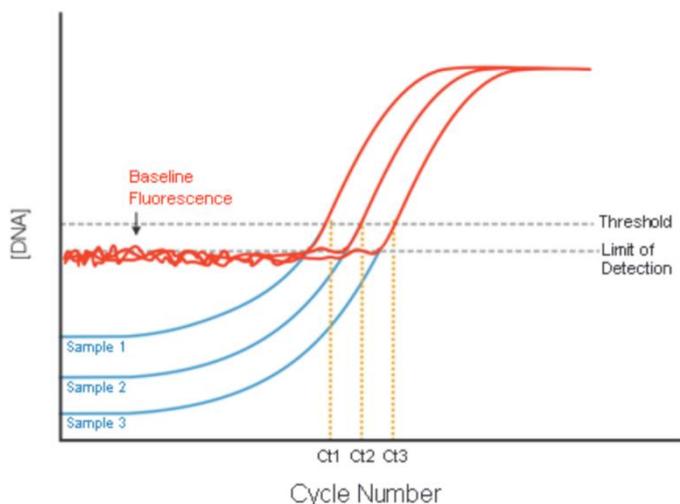


Figure 2
Principles of real-time fluorescence detection and QPCR target concentration measurements using threshold cycle (Ct). The Ct is inversely proportional to the initial copy number. Only when the DNA concentration has reached the fluorescence detection threshold can the concentration be reliably inferred from the fluorescence intensity. A higher initial copy number will correlate to a lower threshold cycle.

SYBR® Green I アッセイ

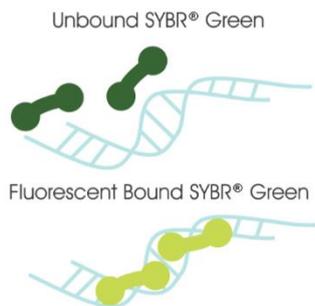


Figure 6
SYBR® Green I detection mechanism; double-stranded DNA in the reaction is bound by the dye. In the bound state, SYBR® Green I is 1000-fold more fluorescent than in the unbound state. As PCR amplification increases the amount of dsDNA present, the fluorescence signal increases proportionately.

蛍光ラベルプローブアッセイ

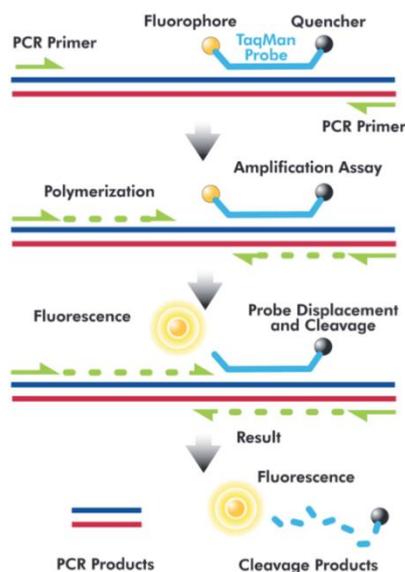


Figure 7
TaqMan® probe chemistry mechanism. These probes rely on the 5'-3' nuclease activity of Taq DNA polymerase to cleave a dual-labeled probe during hybridization to the complementary target sequence.

【リアルタイムPCR装置・関連消耗品のお問い合わせ先】

アズワン株式会社 ヘルスサイエンスグループ

〒550-8527 大阪市西区江戸堀 2-1-27

Tel: (06)6447-8930

Fax: (06)6447-8939

Web: <https://axel.as-1.co.jp/contents/bio>

Email: I7001-37@so.as-1.co.jp

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2019