

Mx3000P & Mx3005P Real-Time QPCR System

MxPro Software version 4.10



取扱説明書

Revision# 090530



STRATAGENE

An Agilent Technologies Division

Change is part of
life, science.

Stratagene has changed
to Agilent Technologies

A transition question?
[Click here to learn more.](#)



Agilent Technologies

STRATAGENE

An Agilent Technologies Division

リアルタイムPCR 関連のアジレント・Stratagene製品群

SYBR® Green Iアッセイ用リアルタイム定量PCR試薬キット

• Brilliant II FAST SYBR® QPCR Master Mix	Cat# 600843	400回
• Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix	Cat# 600828	400回
• Brilliant II SYBR® Green QPCR Low ROX Master Mix	Cat# 600830	400回
• Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, 1-step	Cat# 600825	400回
• Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Low ROX Master Mix, 1-step	Cat# 600835	400回
• Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR AffinityScript Master Mix, 2-step	Cat# 600834	400回
• Brilliant SYBR® Green Core Reagent Kit	Cat# 600546	400回

プローブ法リアルタイム定量PCR試薬キット

• Brilliant II FAST QPCR Master Mix	Cat# 600845	400回
• Brilliant II QPCR Master Mix	Cat# 600804	400回
• Brilliant II QPCR low ROX Master Mix	Cat# 600806	400回
• Brilliant II QRT-PCR Master Mix, 1-step	Cat# 600809	400回
• Brilliant II QRT-PCR low ROX Master Mix, 1-step	Cat# 600837	400回
• Brilliant II QRT-PCR AffinityScript Master Mix, 2-step	Cat# 600827	400回
• Brilliant II QRT-PCR Core Reagent Kit, 1-step	Cat# 600810	400回
• Brilliant Multiplex QPCR Master Mix	Cat# 600553	200回

SideStep キットシリーズ

• SideStep SYBR® Green QPCR Master Mix	Cat# 400904	400回
• SideStep II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, 2 Step	Cat# 400909	400回
• SideStep II QRT-PCR Master Mix, 1-step	Cat# 400917	400回
• SideStep II QRT-PCR Master Mix, 2-step	Cat# 400918	400回
• SideStep Lysis and Stabilization Buffer	Cat# 400900	10 ml
• SideStep Cell Lysate Analysis Kit	Cat# 400916	100回
• SideStep II QPCR cDNA Synthesis Kit	Cat# 400908	50回

cDNA合成キット & 逆転写酵素

• AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Cat# 600559	50回
• AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase	Cat# 600107	50回

リファレンスRNA

• Stratagene QPCR Reference Total RNA, Human	Cat# 750500	25µg
• Stratagene QPCR Reference Total RNA, Mouse	Cat# 750600	25µg
• Universal Human miRNA Reference RNA	Cat# 750700	10µg

miRNA検出試薬キット

• High-Specificity miRNA QRT-PCR Detection Kit	Cat# 600580	200回
• miRNA QPCR Master Mix	Cat# 600583	200回
• miRNA QRT-PCR First strand cDNA Synthesis Kit	Cat# 600036	50回
• High-Specificity miRNA QPCR Core Kit	Cat# 600545	200回

QPCR を抑制する原因を調べるための外部コントロール

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

RNA 精製キット

• Absolutely RNA Miniprep Kit	Cat# 400800	50 回
• Absolutely RNA Microprep Kit	Cat# 400805	50 回
• Absolutely RNA Nanoprep Kit	Cat# 400753	50 回
• Absolutely RNA 96 Microprep Kit	Cat# 400793	2 plates
• Absolutely mRNA Purification Kit	Cat# 400806	10 回
• Absolutely RNA FFPE Kit	Cat# 400809	50 回
• Absolutely RNA miRNA Kit	Cat# 400814	50 回

Mx3000P および Mx3005P で用いられる消耗品

• Mx3000P / Mx3005P Replacement Bulb Assembly	Cat# 401411	1 bulb
• 96-Well QPCR Plate, Semi-Skirted	Cat# 401334	25 plates
• 96-Well QPCR Plate, Non-Skirted (おすすめ製品)	Cat# 401333	25 plates
• Mx3000P / Mx3005P Strip tubes	Cat# 401428	120 strips
• Mx3000P / Mx3005P Optical Strip Caps	Cat# 401425	120 strips
• Single PCR Reaction Tubes (Without Caps)	Cat# 410023	1 bag
• MxP Perfect Frame	Cat# 401421	1 frame

新登場！グラジエントサイクラー



反応液の調整方法

基本的には用いる試薬に添付の説明書に従って調製を行います。ここでは、アジレント（旧ストラタジーン）社 Brilliant master mix キットを用いた場合について説明します。

準備

- ・ マスターミックス試薬

Brilliant キットのマスターミックスは、2本のボトルに 2.5 ml ずつ分注されています。1本を室温で溶解し、これに添付の **Reference dye (ROX 1mM)を 0.5μl** を加えよく混和します。（チューブごとに ROX を調製したい場合は、Reference dye 原液を DW で 200 倍希釈し、この ROX 希釈液を 20μl の反応液中 0.3μl となるよう加えます。）

また白色プレートの場合には高感度となるため、ROX の量をさらに希釈する必要があります。

- ・ プライマー・プローブの調製
- ・ テンプレートの調製

トータル 20μl でアッセイを行う場合のコンテンツ

	SYBR Green アッセイ	プローブアッセイ
2x Master Mix	10μL	10μL
Primer	xμL	xμL
Probe	none	xμL
Template	xμL	xμL
DW	Up to 20μL	Up to 20μL

Mx3000P/Mx3005P で定量 PCR を行う場合の反応液量は 10μl ~ 60μl が最適です。

注意 1) サンプルをレプリケートで調製する場合は、上のミックスをレプリケートの数分調製してからウェルに分注します。

注意 2) テンプレート量、プライマーやプローブの量は実験に合わせて至適化が必要です。至適化実験は standard curve 解析で行います（日本語 QPCR ガイドブックを参照）。

試薬を調製したら、各ウェルに分注します。分注後、**キャップ（もしくはシール）をして**、遠心操作により反応液をチューブのボトムに落とします。

Mx3000P/Mx3005P にセットします。

**Mx3000P/Mx3005P のサーマルブロックへのサンプルチューブ/プレートの
セットアップ方法**

1) Mx3000P/Mx3005P の背面にある電源を ON にします。 Mx3000P/Mx3005P に接続された PC の電源も ON にします。

2) Mx3000P/Mx3005P のフロントのドアを開けます。



上に表示するサーマルブロックが見えます。

2) ホットトップの**ハンドルを手前に引いて**
ホットトップを上を上げます。



3) ホットトップを開けると右のようになります。サーマルブロックに 96 well プレート、8 連チューブ、シングルチューブなどをセットします (キャップは Optical cap やシールが利用できます。シールは辺縁部分がはがれやすいので、しっかり貼るよう to してください)。

4) ホットトップを開くと、右に示すパーフェクト・フィット・フレームが入っています。これは8連チューブやシングルチューブ、上面がフラットな96 well プレートの場合に周囲からエアが入ることを防ぐために利用するものです。用いるチューブやプレートに応じて適宜ご利用ください。

パーフェクト・フィット・フレーム



5) サーマルブロックにサンプルチューブ/プレートをセットしたら、ホットトップを閉めます(ハンドルを引いたままホットトップを閉め、ハンドルを奥方向へ押します)。

6) Mx3000P/Mx3005P のフロント・ドアを閉め、実験開始です。

***ホットトップを開けたままや、ホットトップの上にサンプルチューブやプレートを置いたまま Mx3000P を始動するとスキャンアームがチューブ/プレートに衝突し、故障の原因となります。ご注意ください。**

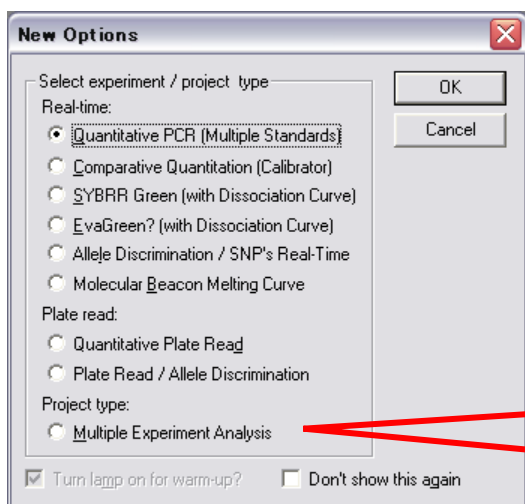
MxPro Ver.4.10 ソフトウェアで解析できること

デスクトップ上の MxPro ソフトウェアのショートカットアイコン
してソフトウェアを立ち上げます。



をダブルクリック

ソフトが立ち上がると、最初に下のようなダイアログが開きますので、実験タイプを選択してください。



Mx Pro ソフトウェアでは、次の解析モードがあります。

「Multiple Experiment Analysis」は、Mx3000P/
Mx3005P 接続の PC ではアクティブになりません。
スタンドアローンか、解析用 PC でのみアクティブ
になります。

1) Quantitative PCR (Multiple Standards)

基本的には**蛍光ラベルプローブ**（加水分解型リニアプローブ TaqMan probe や Molecular Beacon など）を利用するとき用いる絶対定量解析用のプログラムです（絶対定量解析とは、Standard curve から絶対量を得る解析方法）。Mx3000P なら 4 カラー、Mx3005P なら 5 カラーのマルチプレックス QPCR 解析が実施できます。このプログラムには **Dissociation curve**（融解曲線）解析がありません。

2) Comparative Quantification (Calibrator)

遺伝子発現解析等でのハウスキーピング遺伝子で補正された相対定量（Ct）解析を行うプログラムです。このプログラムでは、キャリブレーターと規定したサンプルに対する相対的な定量を行うことができます。ハウスキーピング遺伝子に対する相対定量値や Standard テンプレートに対する相対定量値をテキストレポートさせることもできます。TaqMan probe 法や SYBR Green アッセイで解析することができます。Dissociation curve 解析を行うこともできますし、Standard curve 解析やマルチプレックス QPCR 解析で相対定量解析を行うこともできます。

3) SYBR Green (with Dissociation Curve)

基本的には SYBR Green アッセイによる絶対定量解析用のプログラムです。このプログラムではデフォルトで **Dissociation curve** 解析を行うことができます。

4) EvaGreen (with Dissociation Curve)

SYBR Green アッセイと同様ですが、蛍光色素として EvaGreen を選択できます。アジレント (Stratagene) 社製品の High Specificity miRNA Detection kit の利用に便利なプログラムです。

5) Allele Discrimination / SNP's Real-Time

Molecular Beacon を利用し、amplification plot ベースの SNP 解析プログラムです。

6) Molecular Beacon Melting Curve

Molecular Beacon の融解曲線を解析するプログラムです。

7) Quantitative Plate Read

蛍光プレートリード機能です。 サンプルの蛍光強度を測定し、Standard curve を作成することができます。SYBR Green、PicoGreen、RiboGreen、EvaGreen などによる核酸定量や、蛍光フィルターに合った蛍光測定に便利なモードです。

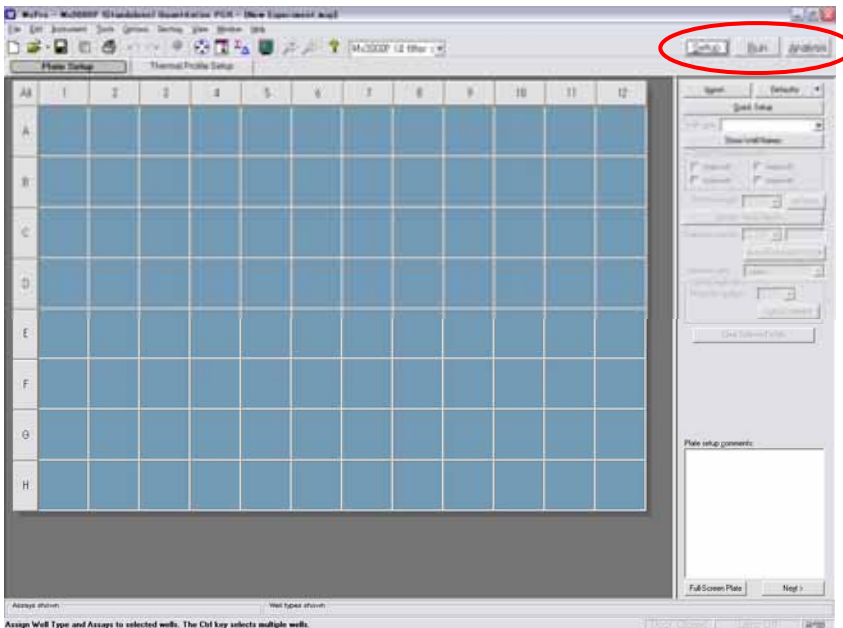
8) Plate Read / Allele Discrimination

一般的な TaqMan probe による SNP 解析プログラムです。

9) Multiple Experiment Analysis

複数のプレートの結果を合わせて解析できるプログラムです。他のプレートで行った Standard curve 解析の結果を利用して絶対量を得たり、複数のプレートでの相対定量解析を合わせることができます。

ソフトウェアの構成



Mx Pro ソフトウェアの基本構成は、「Setup」、「Run」、「Analysis」です。「Multiple Experiment Analysis」のときだけ「Project」タブが表示されます。

1) Setup 画面

Setup 画面は、「Plate Setup」と「Thermal Profile」より構成されます。サンプルの配置、各ウェルの設定、フィルターの設定、Thermal Profile の設定などを行います。

2) Run 画面

Run 画面は、「Thermal Profile Status」と「Raw data plots」より構成されます。またこの画面では Mx3000P/Mx3005P 本体の制御も行います。

3) Analysis 画面

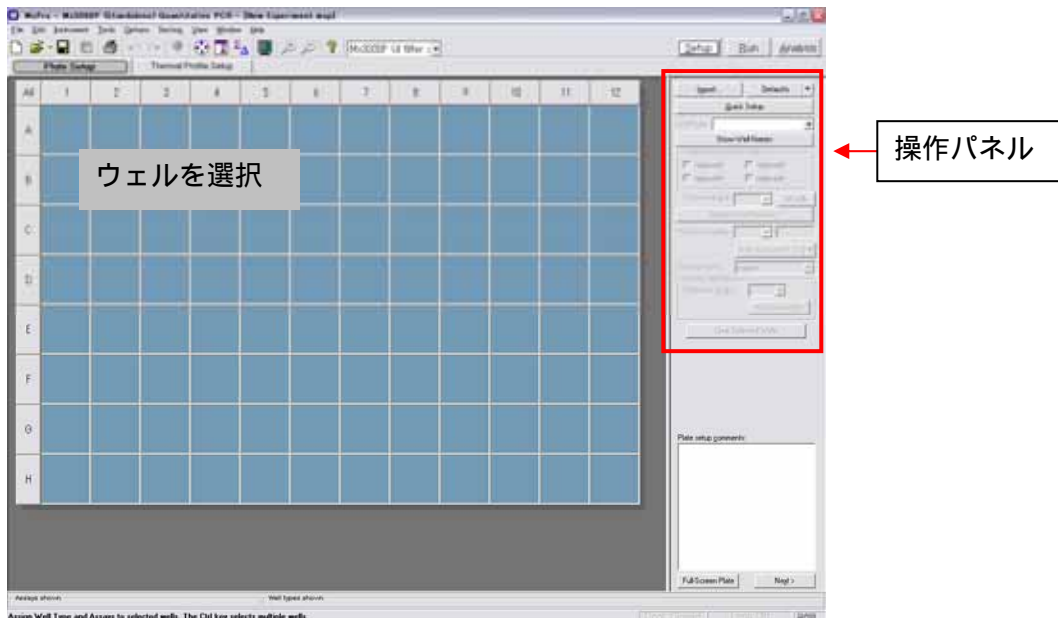
Analysis 画面は、「Analysis Selection / Setup」と「Results」より構成されます。解析したいウェルの選択や、解析の結果を表示します。

4) Project 画面

Project 画面は、「Project Setup」と「Project Results」より構成されます。複数のプレートのセットアップや複数のプレートでの解析結果を表示します。

Plate Setup の概要

プレートセットアップは、ウェルをマウスで選択後、画面右側の操作パネルで設定します。操作パネルは Experimental type によって異なります。

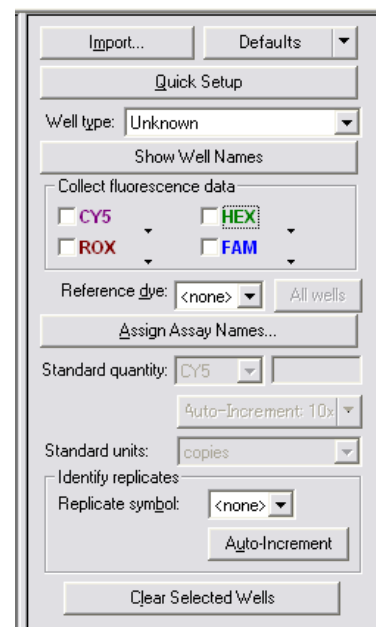


1) Quantitative PCR (Multiple Standards)および SYBR Green (with Dissociation curve)の操作パネル

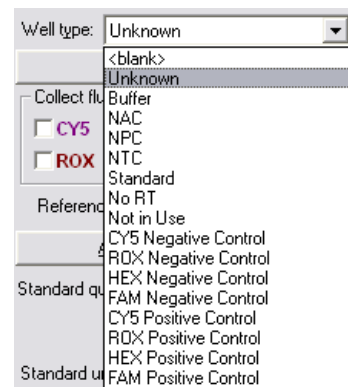
【Import】 このボタンは、他の mxp ファイルからプレートセットアップのみをインポートする際に利用します。

【Defaults】 このボタンは、ユーザー自身のデフォルト設定を行う際に利用します。

【Quick Setup】 このボタンを押すと、全てのウェルで全ての蛍光を検出する設定が瞬時にできます。詳細な設定は後から行うことができます。すぐに実験を開始したい場合に便利なボタンです。



【Well type】 このボックスに各ウェルの種別をインプットします。このボックスをクリックすると右に示すプルダウンメニューが表示されますので、Well type を設定できます。



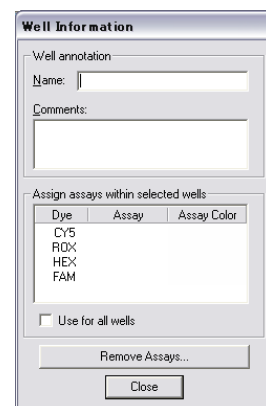
【Show Well Names】 このボタンを押すことにより、各ウェルに Well Information で設定された Well Name を表示させることができます。

【Collect fluorescence data】 ここに表示されたフィルターにチェックを入れることにより検出すべきフィルターの設定ができます。機器に接続されている場合には、Mx3000P/Mx3005P に設置されているフィルターのみが表示されますが、解析用 MxPro ソフトウェアでは全てのフィルター種類が表示されます（注：Mx3000P/Mx3005P に設置されているフィルター以外での検出はできません）。

フィルター名の右横の▼ボタンをクリックするとフィルター名を変更することができます。

【Reference dye】 このボックスで、補正用の Reference dye を設定することができます。

【Assign Assay Names】 このボタンを押すと、右に示す Well Information ダイアログが表示され、Well name、Comments、各蛍光色素で検出されたデータの Assign を行うことができます。解析時のグループ化に便利です。



【Standard Quantity】 Standard template の濃度を入力するところです。各蛍光色素別に入力することもできますし、まとめて入力することもできます。この【Auto Increment】ボタンを利用すると、希釈系列などの入力に便利です。

【Standard Units】 Standard template の単位を選択することができます。

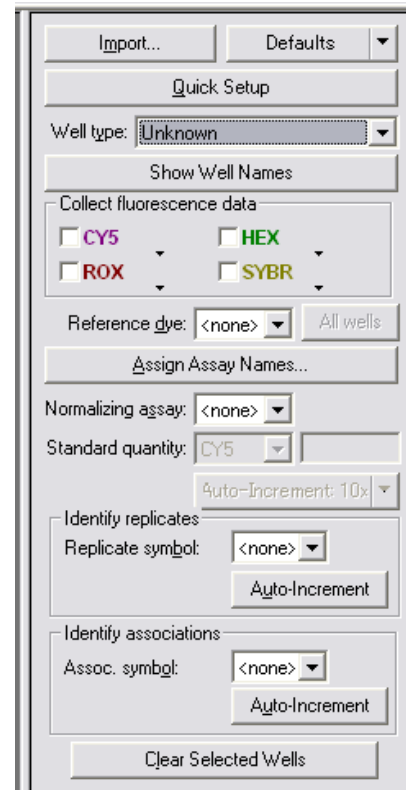
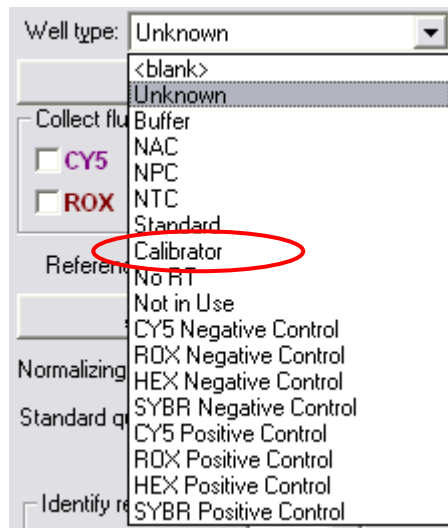
【Identify replicates】 この【Replicate symbol】のボックスに番号を設定することで、replicate well の設定ができます。Threshold line の「Minimum Ct spread algorithm」に重要な設定なので、同一サンプルには replicate symbol を設定することを推奨します。

【Clear Selected Wells】 ここでは、選択されたウェルの設定をまとめてクリアすることができます。

2) Comparative quantification (Calibrator) の操作パネル

この実験タイプに特有なものだけを以下に説明します。

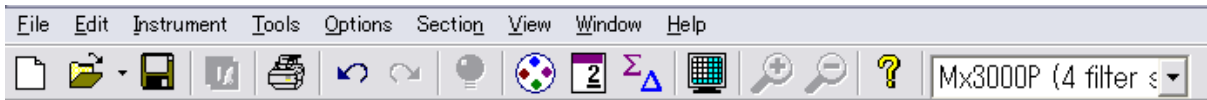
【Well type】 この設定では、Comparative quantification (相対定量解析) のときだけ、特有な「Calibrator」の設定をすることができます。











【Normalizing assay】 ハウスキーピング遺伝子など、目的遺伝子の Ct 値を除算によって補正するウェルを設定することができます。

【Association symbol】 SYBR Green アッセイなどの単色で Normalizer による補正を必要とする相対定量を行うようなケース、すなわち目的遺伝子のウェル (Unknown) と Normalizer が別々のウェルで実験されており、これらに関連付けさせたい場合に、同じ Association symbol を設定します。

アイコンメニューの説明



- 1)  新しいファイルを作成するときに使います。
- 2)  保存されているファイルを開くときに使います。
- 3)  ファイルをセーブするときに使います。
- 4)  画面をプリントアウトするときに使います。
- 5)  Undo と Redo のときに使います。
- 6)  ランプの On / Off ボタンです。

MxPro ver.4.1 をインストールすると、本体の電源を ON にした時  が点灯し、20 分経過後  に変わります。



ランプが点灯中。



ウォーミングアップ中。



ランプが消灯中。



接続されていません。

これらは、機器に接続された PC で MxPro ソフトウェアを立ち上げた場合に表示されます。








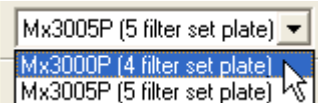
- 7)  フィルターの設定を行います。
- 8)  Replicate Wells treatment setting。平均データの表示または個々のデータの表示を行います。
- 9)  Analysis Term Setting。 Threshold line、Baseline のアルゴリズムの変更や増幅効率のインプットを行います。
- 10)  フルスクリーン・プレートビューができます。
- 11)   Amplification plot や Chart 画面で、選択した領域のズームができます。
- 12)  ヘルプが開きます。
- 13)  ご利用の機器について、Mx3005P か Mx3000P かを選択できます。

Plate Setup Quick Protocol

プレートセットアップの方法

Plate Setup Quick Protocol (SYBR Green 法)

2本鎖 DNA のインターカレーターである SYBR Green I 色素を用いたリアルタイム定量 PCR を行う場合のプレートセットアップ方法をご説明します。

例として、次のようなサンプルを定量したい場合の設定方法を示しながら説明します。

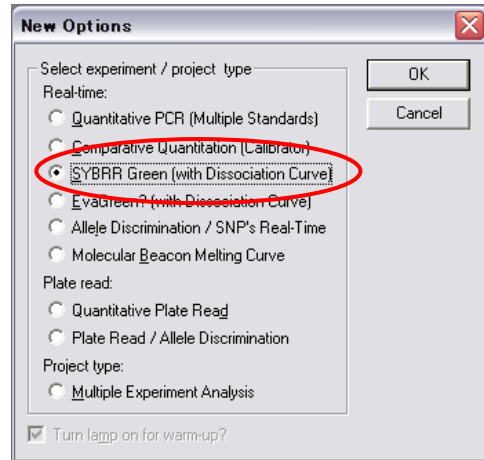
【サマリー】

SYBR Green 用リアルタイム定量 PCR 試薬を用いてリアルタイム定量 PCR 法を行います。サンプル数は 3 サンプルで、定量したい遺伝子は 2 種類です。スタンダードはそれぞれの遺伝子について、コピー数が分かっている standard template を用意し、 10^6 コピーから 10 倍希釈を行い 10^3 コピーまで (4 段階希釈) とします。ネガティブコントロール (NTC) も必ず設定します。サンプルとスタンダードは、各々トリプリケートで行うこととします。各々を 3 本分ずつまとめて調製し、以下の通りに分注します。

Sample #	Gene	Well type	Filter	Conc.	Well
1	A	unknown	SYBR		A1-A3
2	A	unknown	SYBR		B1-B3
3	A	unknown	SYBR		C1-C3
4	B	unknown	SYBR		A4-A6
5	B	unknown	SYBR		B4-B6
6	B	unknown	SYBR		C4-C6
7	A	standard	SYBR	10^6	A7-A9
8	A	standard	SYBR	10^5	B7-B9
9	A	standard	SYBR	10^4	C7-C9
10	A	standard	SYBR	10^3	D7-D9
11	A	NTC	SYBR		E7-E9
12	B	standard	SYBR	10^6	A10-A12
13	B	standard	SYBR	10^5	B10-B12
14	B	standard	SYBR	10^4	C10-C12
15	B	standard	SYBR	10^3	D10-D12
16	B	NTC	SYBR		E10-E12

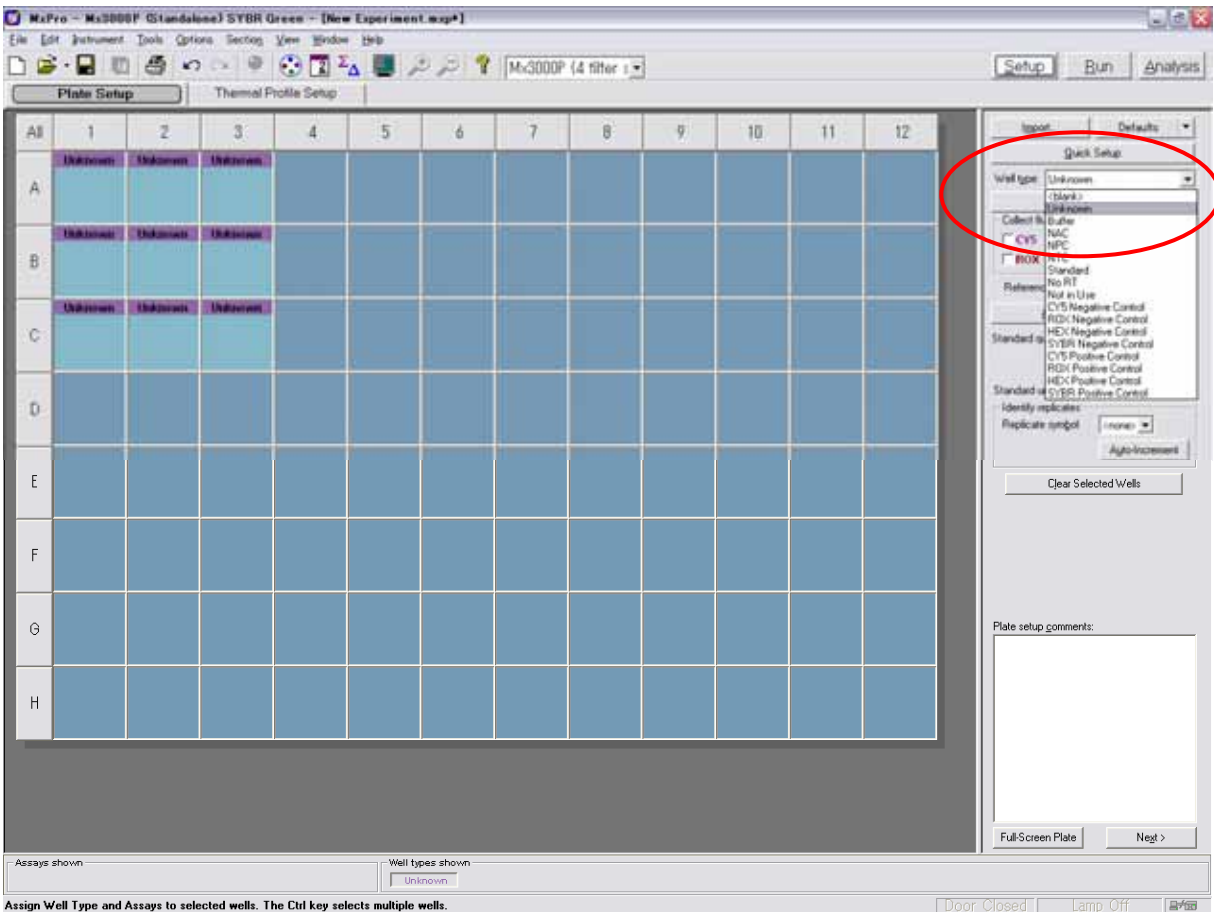
プレートセットアップの方法

MxPro ソフトウェアを立ち上げると、右のダイアログが開きます。SYBR Green アッセイの場合は、赤丸の「SYBR Green (with Dissociation Curve)」を選択します。



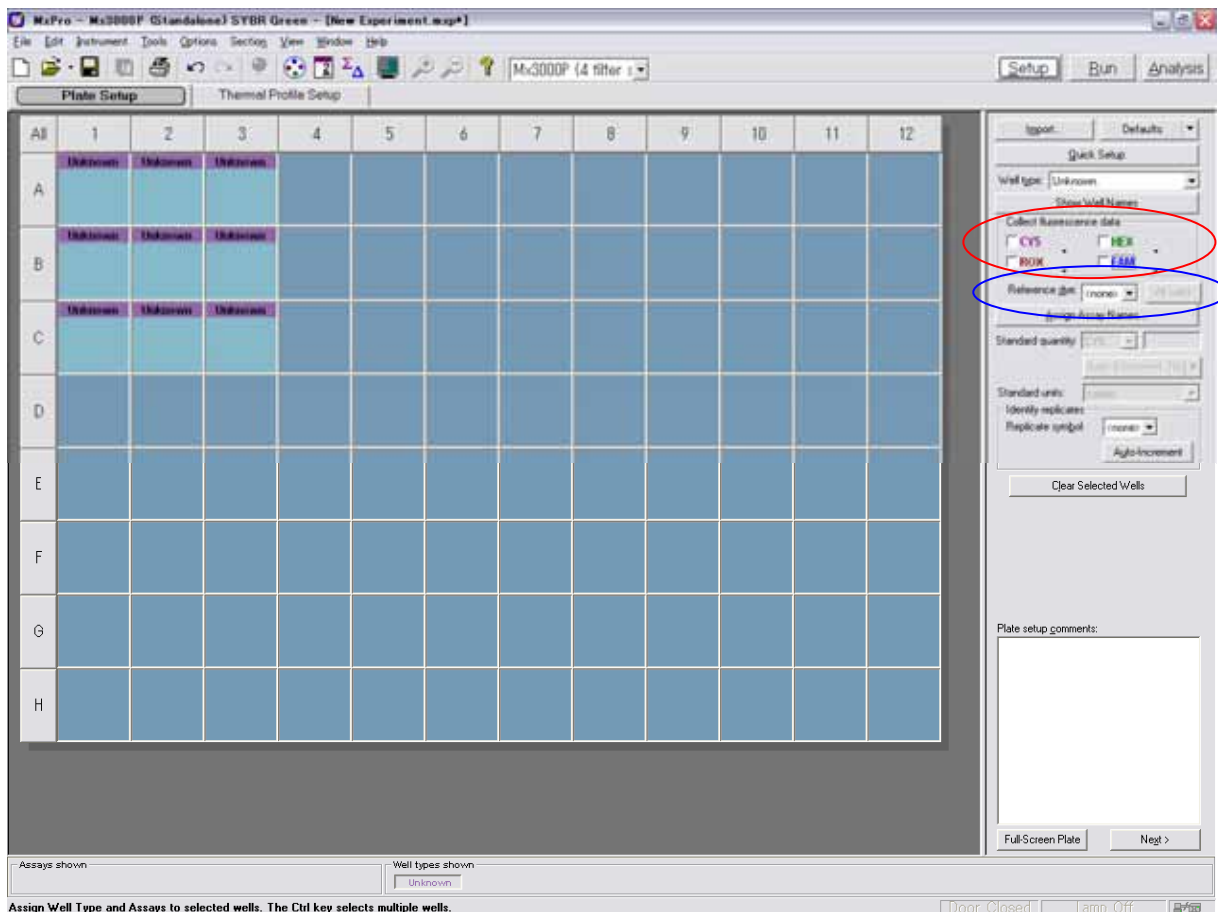
a) サンプル#1 ~ 3 までの設定を行います。

サンプルはトリPLICATEですので、9つのウェルをマウスで選択します。赤丸の Well type の選択で、「unknown」を選択します。



b) 9つのウェルに「unknown」と表示されるはずですが。

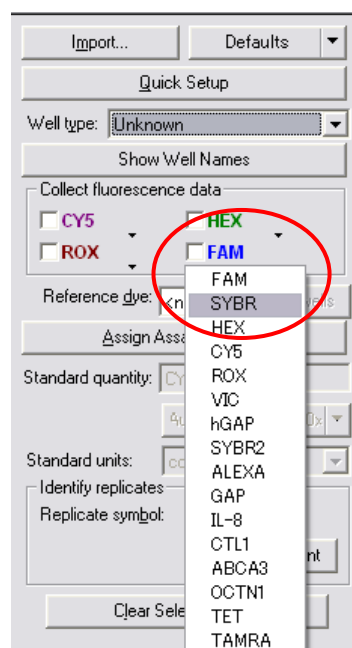
このサンプル1～3はSYBR用フィルターでアッセイするので、下図赤丸で囲った「Collect fluorescence data」でフィルターをSYBR（あるいはFAM）およびROXを選択します（ROXで補正を行うため）。そのまま下図青丸で表示した「Reference dye」の設定で「ROX」を選択します。



FilterにSYBRがなかった場合、次のようにセッティングします。

「Collect fluorescence data」に表示されているフィルター名を変更したい場合、フィルター名（例えば「FAM」という表示の右側にある▼マークをマウスでクリックすると右図のようにプルダウンメニューが開き、フィルターを変更することができます。SYBRとFAMのフィルターは共用です。

ただし、Mx3000P/Mx3005Pに接続されたPCでは、すでに機器に設置されているフィルターが認識されているので、利用できるフィルターのみが表示されます。解析専用PC（Mx3000P/Mx3005Pに接続されていないPC）の場合、右のように全てのフィルター名が表示されます。

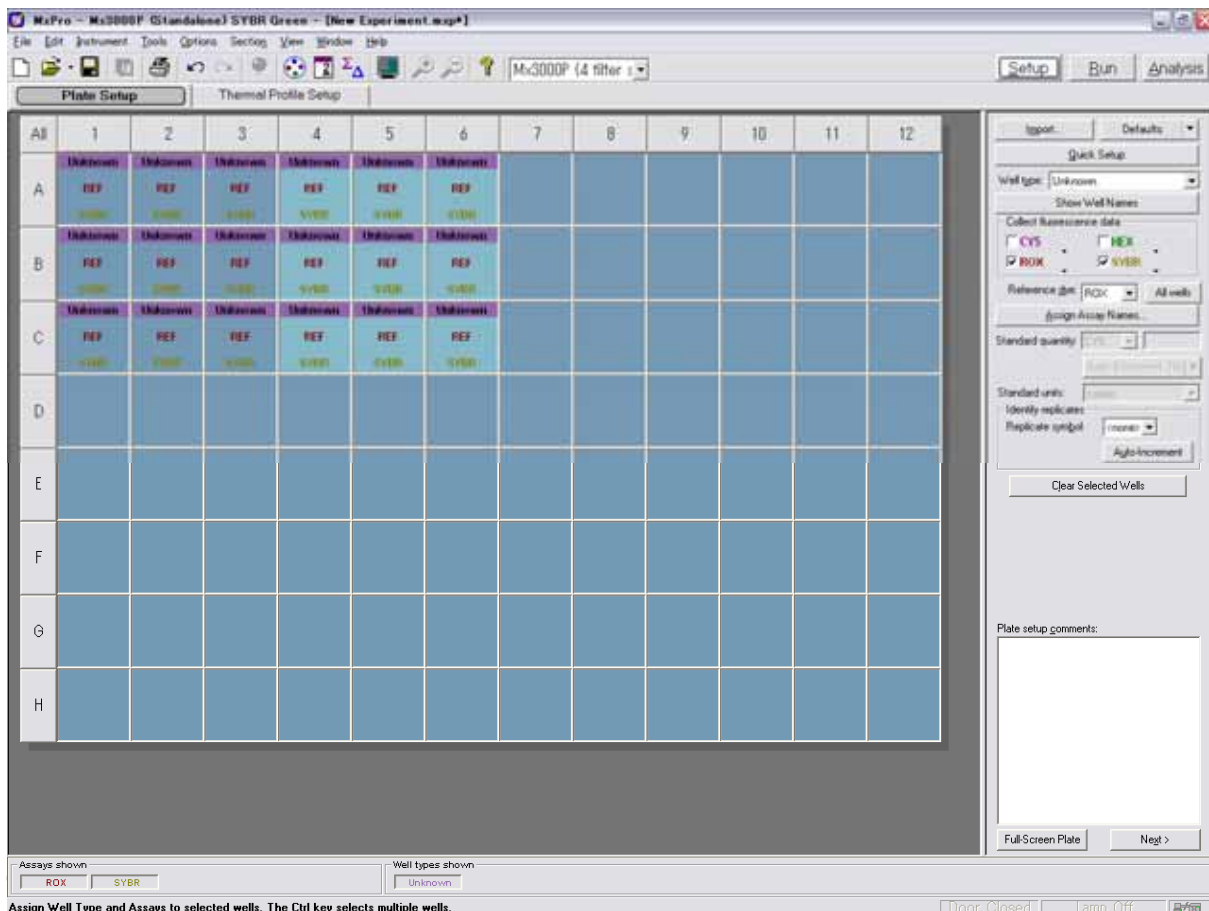


SYBR Green アッセイを行いたい場合には、FAM フィルターの右のプルダウンメニューを開き、SYBR を選択し、表示を SYBR に変更させます。SYBR Green の波長は FAM とほぼ同じなので、蛍光色素に FAM を利用した場合も SYBR Green の場合もこのフィルターで測定することが可能です。表示が変更されているだけのことになります。

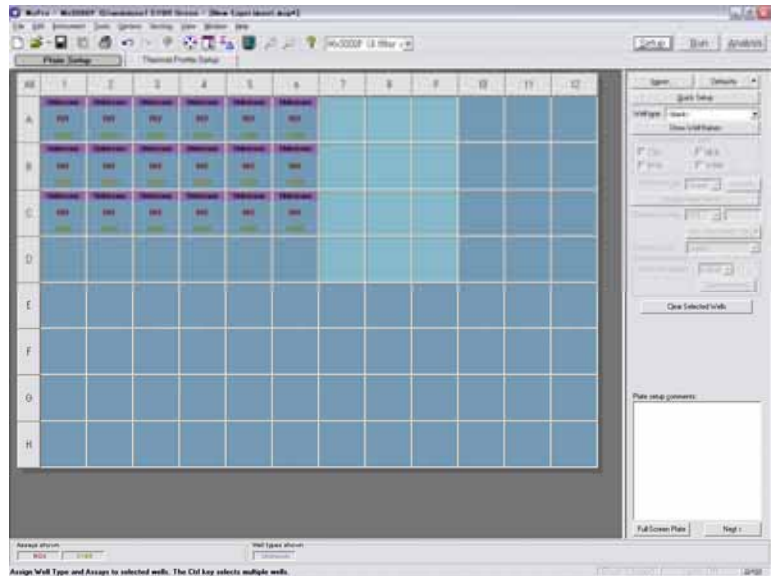
右に示すように、9つのウェルに「SYBR」と表示され、「ROX」は「REF」と表示されます。

All	1	2	3
A	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR
B	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR
C	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR	Unknown REF SYBR

c) サンプル 4 ~ 6 の設定を行います。 サンプル 1 ~ 3 の設定と同様に行います。 サンプル 4 ~ 6 の設定を Well A4 ~ C6 に設定すると下のようになるはずですが。



まず、standard の#7～#10 をトリプレケートで設定するため、well A7～D9 をマウスで選択します。



e) 赤丸の「Well type」の設定で「Standard」を選択します。各ウェルに「Standard」と表示されます。

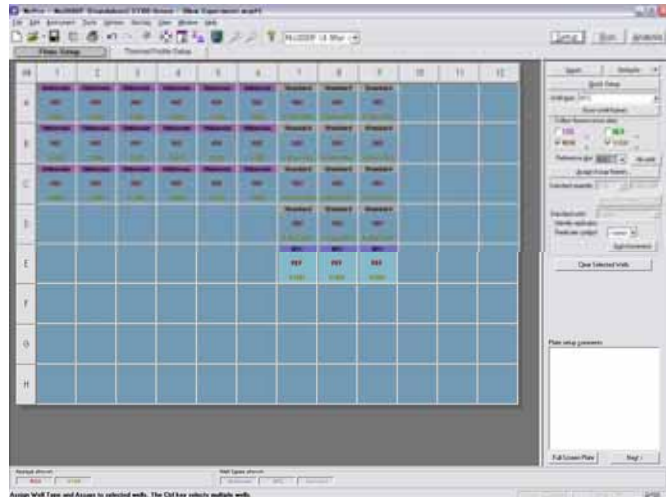


f) 赤丸のパネルで、SYBR と ROX のフィルターを選択し、ROX を Reference dye に設定します。

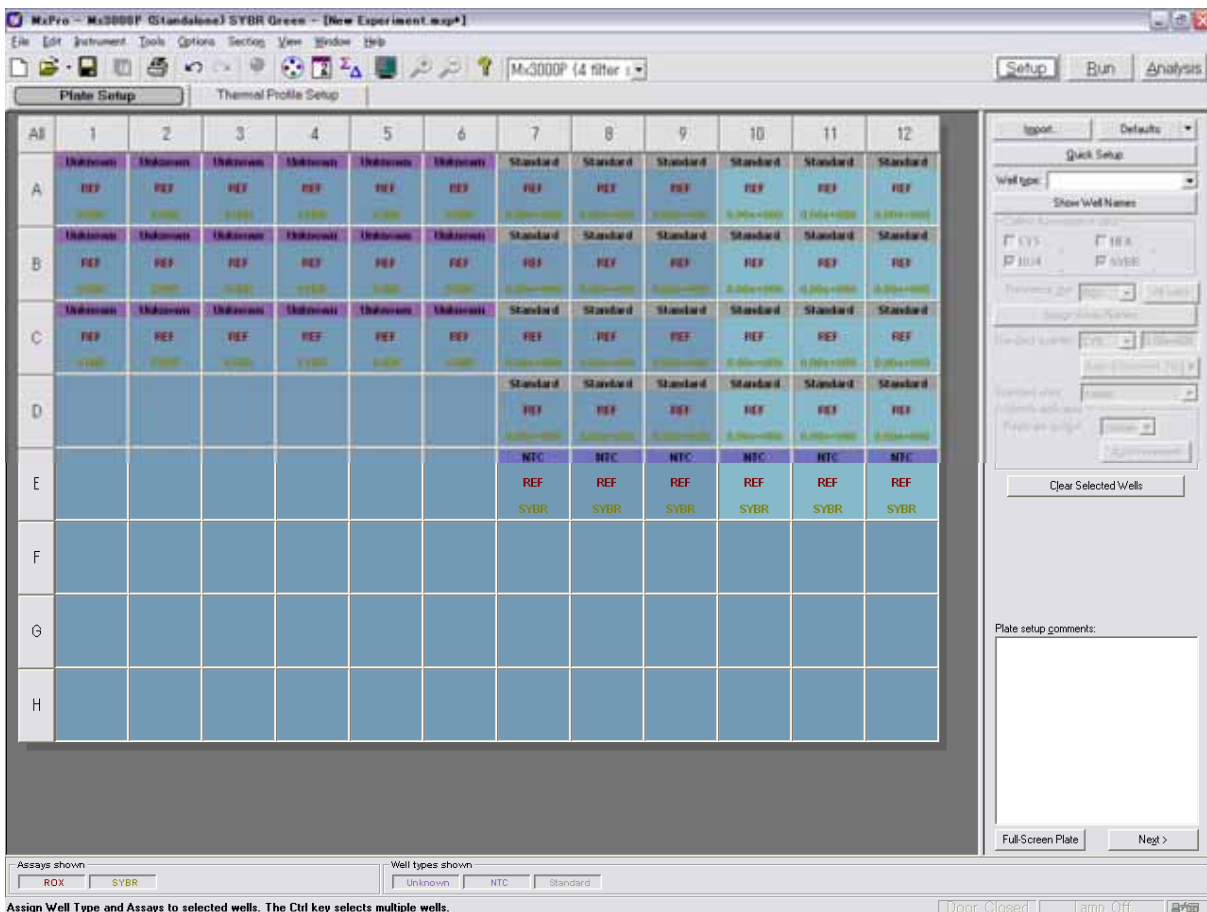


g) 同様にサンプル#11の「NTC」を well E7 ~ E9 に設定します。

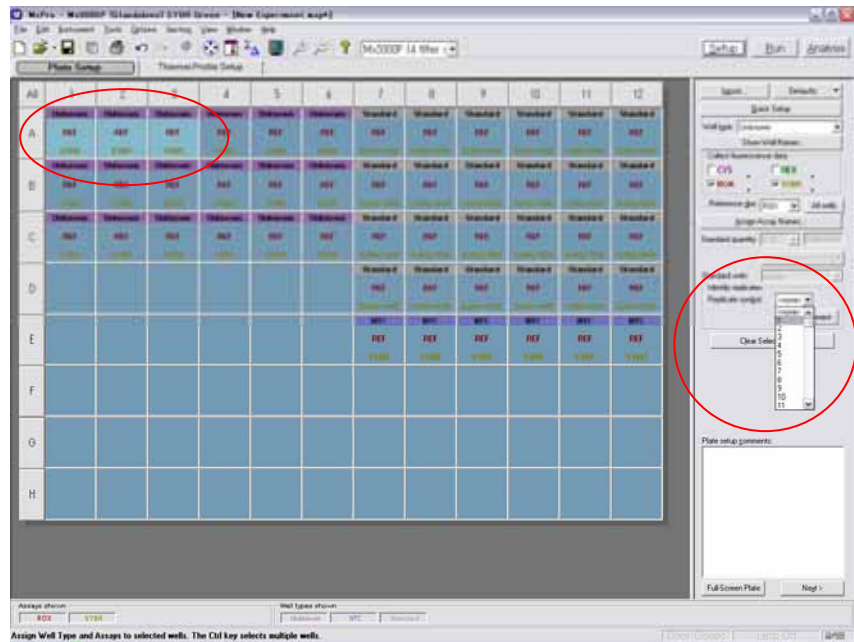
「Well type」で「NTC」選択し、フィルターは SYBR と ROX にチェックを入れ、ROX を Reference dye に設定すると右図のようになります。



h) 同様にサンプル 12 ~ 16 についても設定します。(e) ~ (g) の設定と同様です。下図のようになるはずですが。

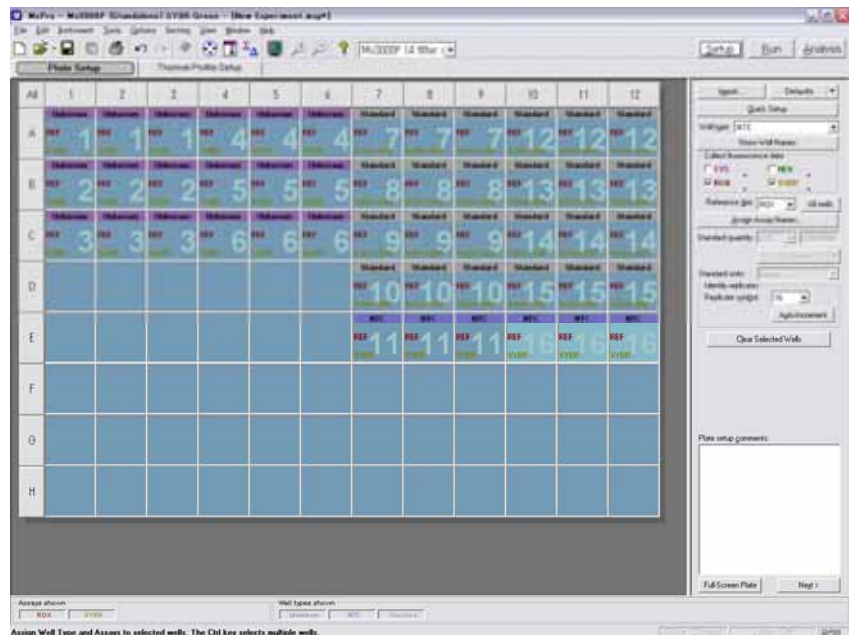


i) Replicate symbol を設定します。サンプルはトリPLICATEで設定するので、サンプル 1 は well A1 ~ A3、サンプル 2 は well B1 ~ B3・・・というように、サマリーに示してある通りに Replicate symbol を設定します。

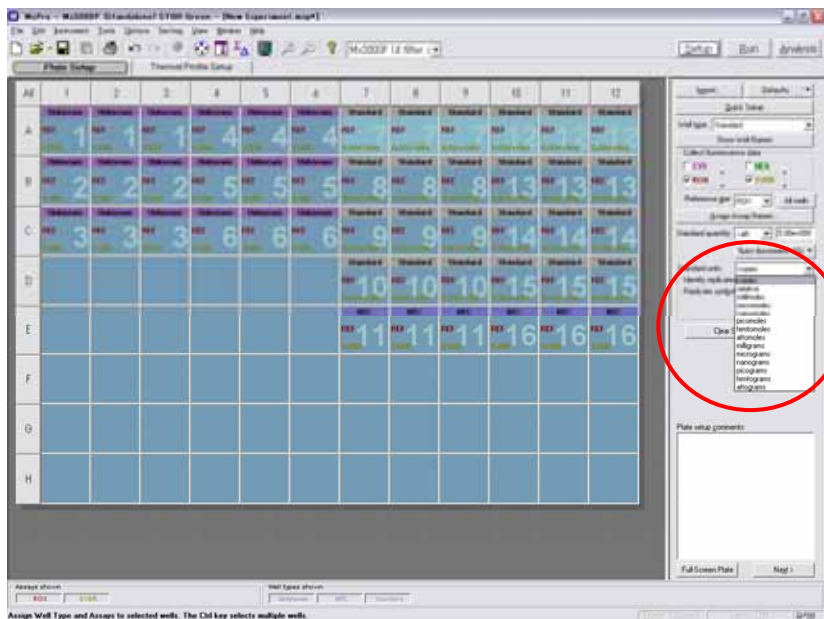


上に表示するように、サンプル 1 (Replicate #1) を設定するためには well A1 ~ A3 をマウスで選択し、上図右側のパネル内 (赤丸) 「Replicate Symbol」という表示の右側のボックスより数値を選択して設定していきます。「Auto-increment」機能を利用すると便利です。

全てのウェルに Replicate symbol が設定できると、下のようになるはずですが。

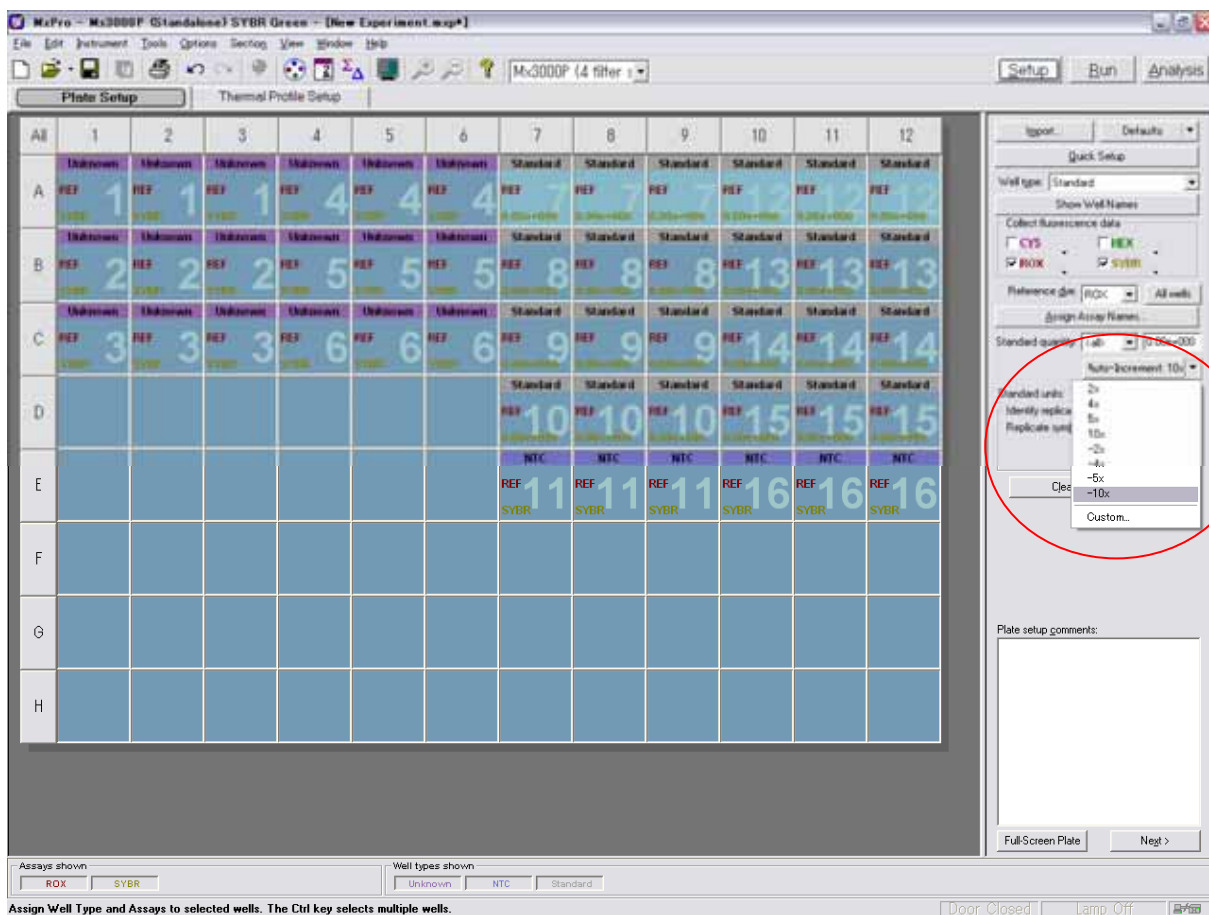


j) スタンダードのウェルに濃度を設定していきます。この例でのサンプルの濃度はコピー数で計算されているので、先ずユニットを「copies」と設定します。



上図の赤丸のところの「Standard Units」のボックスに単位を設定します。実験に合わせて設定してください。この例では「Copies」を選択します。

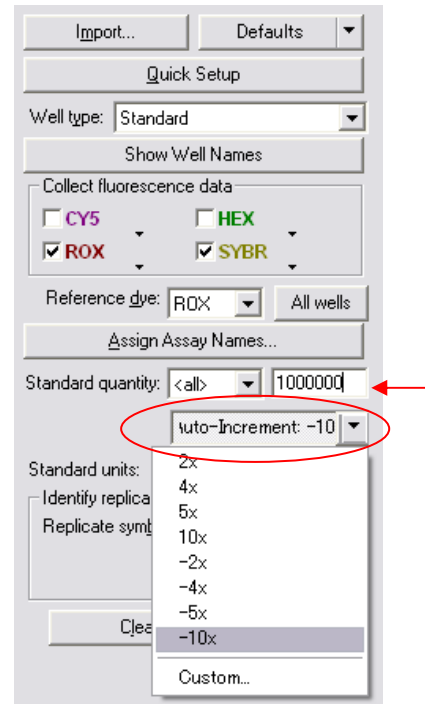
サンプル#7 とサンプル#12 の濃度はいずれも 10^6 copies なので、一緒にまとめて設定していきます。別々の濃度の場合には個別に設定します。



A7～A12までを選択すると、右図に示すように、矢印のボックスに濃度を入力し、赤丸の「Auto-Increment」で「-10x」を選択します。Auto-Increment 機能を設定しておくこと、マウスで次のウェルを選択すると設定された濃度を順次入力することができます。

赤矢印の Standard quantity という表示の横のボックスでフィルター（設定した遺伝子名）を選択します。SYBR（あるいは遺伝子名）だけの場合は SYBR、あるいは個別に設定する場合にはそれぞれのフィルター（遺伝子名）を選択します。マルチプレックス解析の際に利用しますが、個別に設定する場合は「all」のままで結構です。

となりのボックスに濃度（数値）を入力します。数値を入力した直下の「Auto-Increment」ボタンを押して Auto-Increment 機能を利用する際の規定の希釈倍率を設定することができます。便利です。

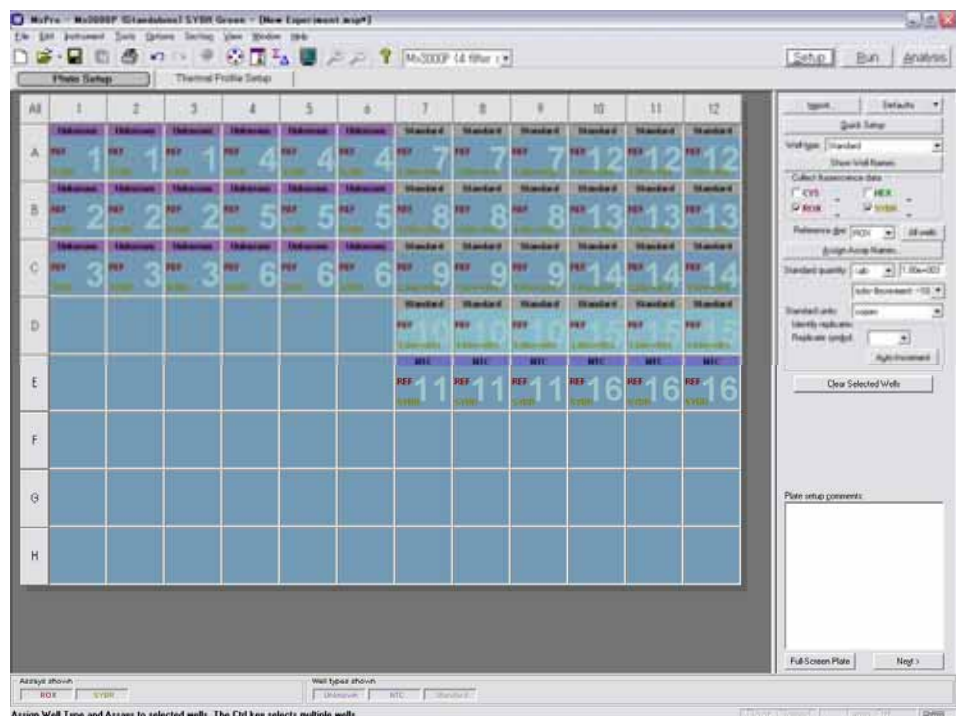


この例では、 10^6 copies から 1/10 倍希釈なので、「-10」を選択します。

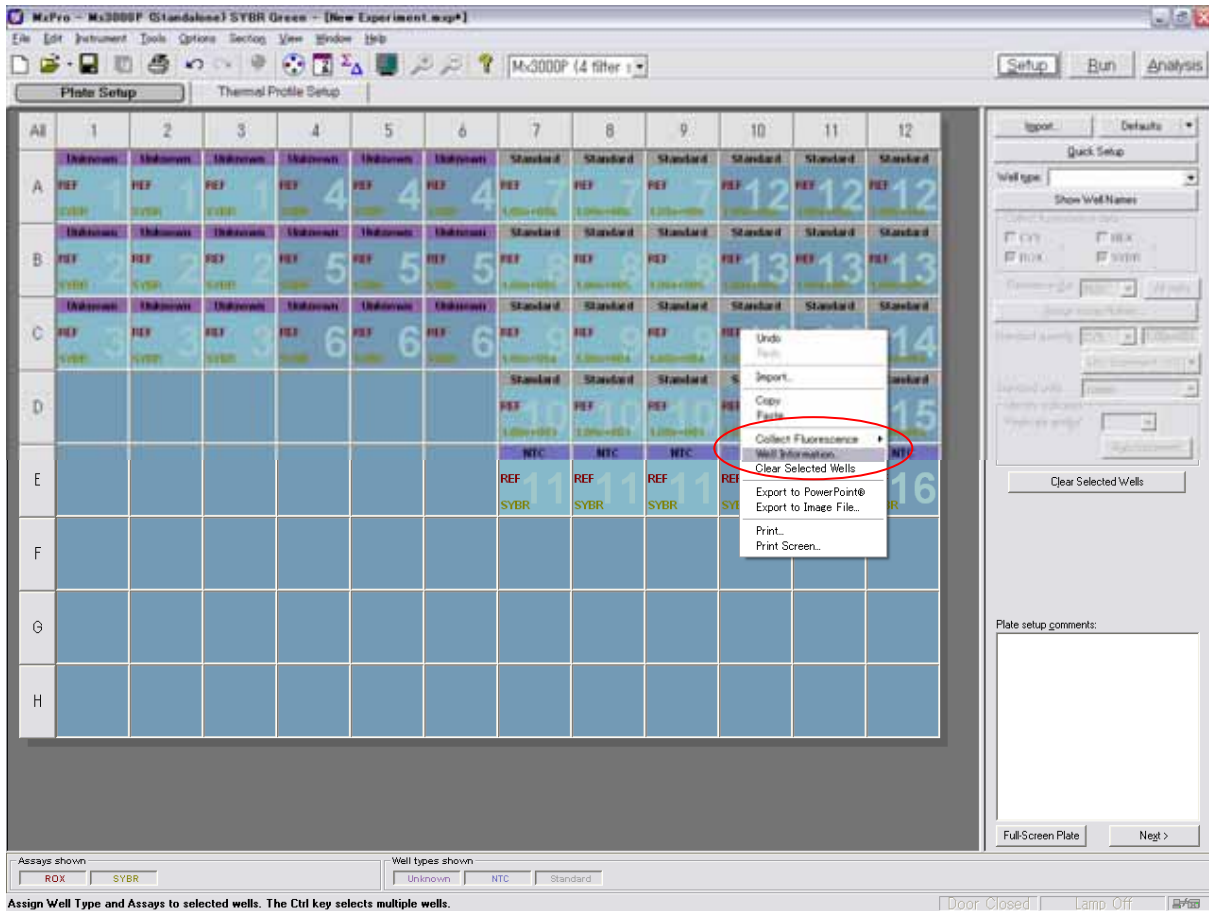
次に#8 と#13 のウェルをマウスで選択すると、自動的に 10^5 copies が各ウェルに入力されます。同様に続けて濃度を入力します。

濃度の入力完了すると、右図のようになります。

Auto-Increment 機能で濃度を入力し終わったら、Auto-Increment ボタンを再度押して、機能を解除してください。

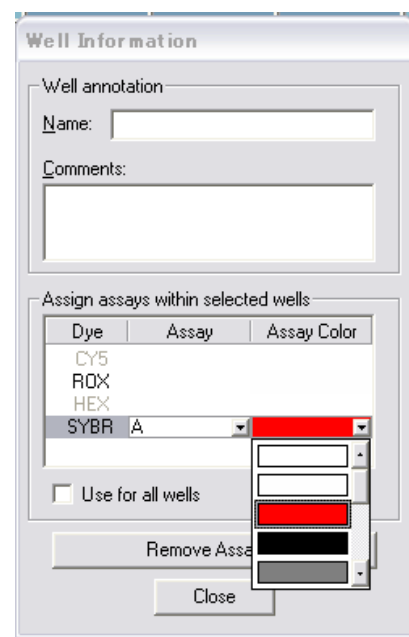


k) ここまでの設定では、実際には2つのターゲット遺伝子の測定を想定していますが、あたかも1つの遺伝子について6サンプル (triplicate) および standard の測定をするかのような設定です。そこで、この2つの測定をグループ化してみます。

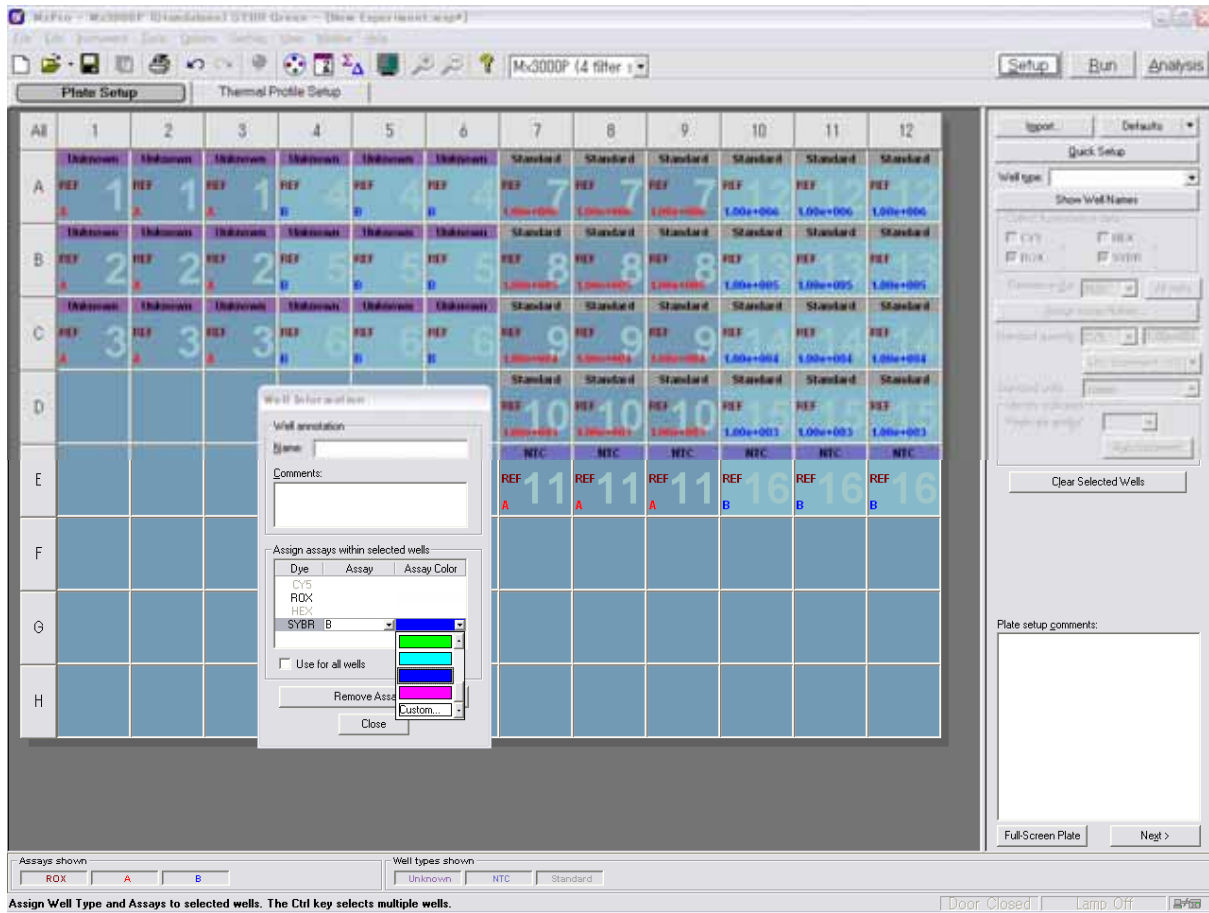


上のようにマウスで選択されたサンプル (Replicate #1 ~ #3、#7 ~ #11) は、サマリーでは遺伝子 A を測定するグループです。上のようにマウスでウェルを選択し、マウスの右クリックをすると上図赤丸で示したダイアログが開きます。この中の「Well Information...」を選択すると右のダイアログが開きます。

SYBR の段の Assay のボックスに遺伝子名などを入力します。そのとなりの Assay Color で色を選択します。この例では、Assay 名を「A」、Assay Color を「赤」に設定しています。



このように設定できると、下図のようになるはずです。下図ではサンプル#4~#6、#12~#16を「B」で青に設定しています。



このように遺伝子ごとにグループ化することで、より正確な定量を行うことができ、またデータの解析に際しても便利になります。以上です。

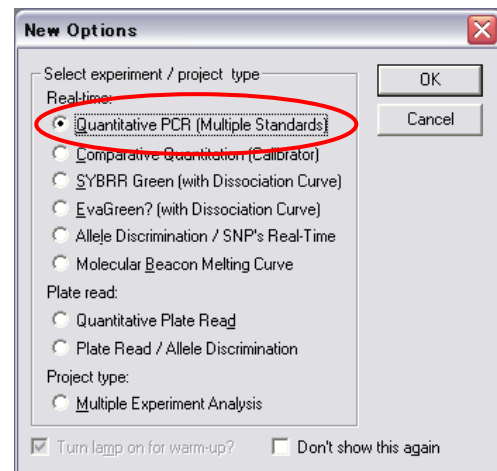
Plate Setup Quick Protocol (Probe 法)

TaqMan probe や Molecular Beacon などの蛍光ラベルプローブでのリアルタイム定量 PCR を行う場合のプレートセットアップ方法をご説明します。

プレートセットアップの方法

MxPro ソフトウェアを立ち上げると、右のダイアログが開きます。プローブアッセイの場合は、赤丸の「Quantitative PCR (Multiplex Standards)」を選択します。

TaqMan probe、Molecular beacon など、蛍光ラベルプローブのアッセイができます。



(1) 2つの遺伝子を別々に測定する方法 (Simple assay)

例として、次のようなサンプルを定量したい場合の設定方法を示しながら説明します。

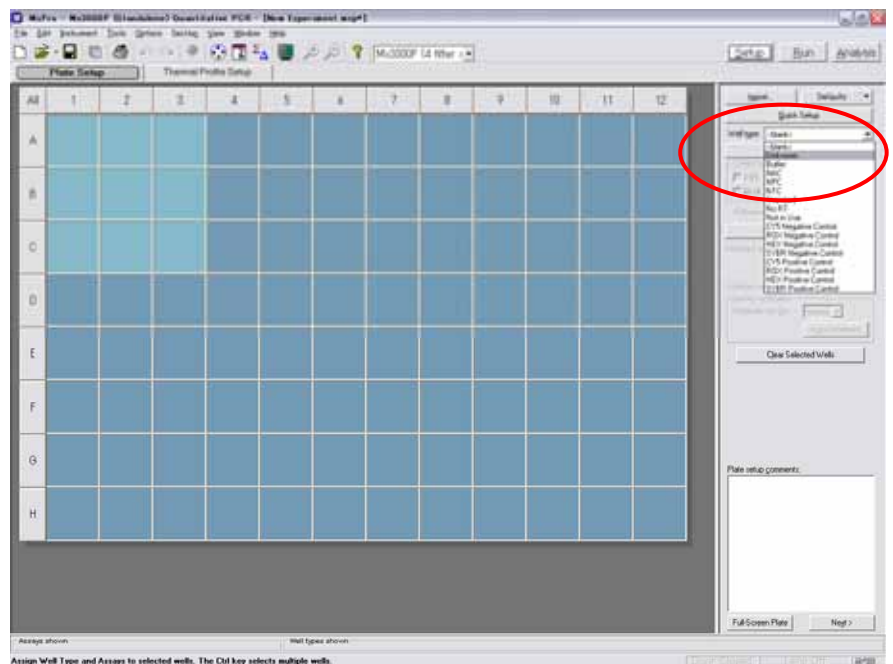
【サマリー】

TaqMan probe を用いてリアルタイム定量 PCR 法を行います。サンプル数は3サンプルで、定量したい遺伝子は2種類です。2種類の遺伝子は FAM で蛍光ラベルされた TaqMan probe (A 遺伝子) と VIC で蛍光ラベルされた TaqMan probe (B 遺伝子) で測定します。スタンダードはそれぞれの遺伝子について、コピー数が分かっている standard template を用意し、 10^6 コピーから 10 倍希釈を行い 10^3 コピーまで (4 段階希釈) とします。ネガティブコントロールとして NTC を設定します。サンプルとスタンダードはトリプリケートで行うこととします。

各々を3本分ずつまとめて調製し、以下の通りに分注します。

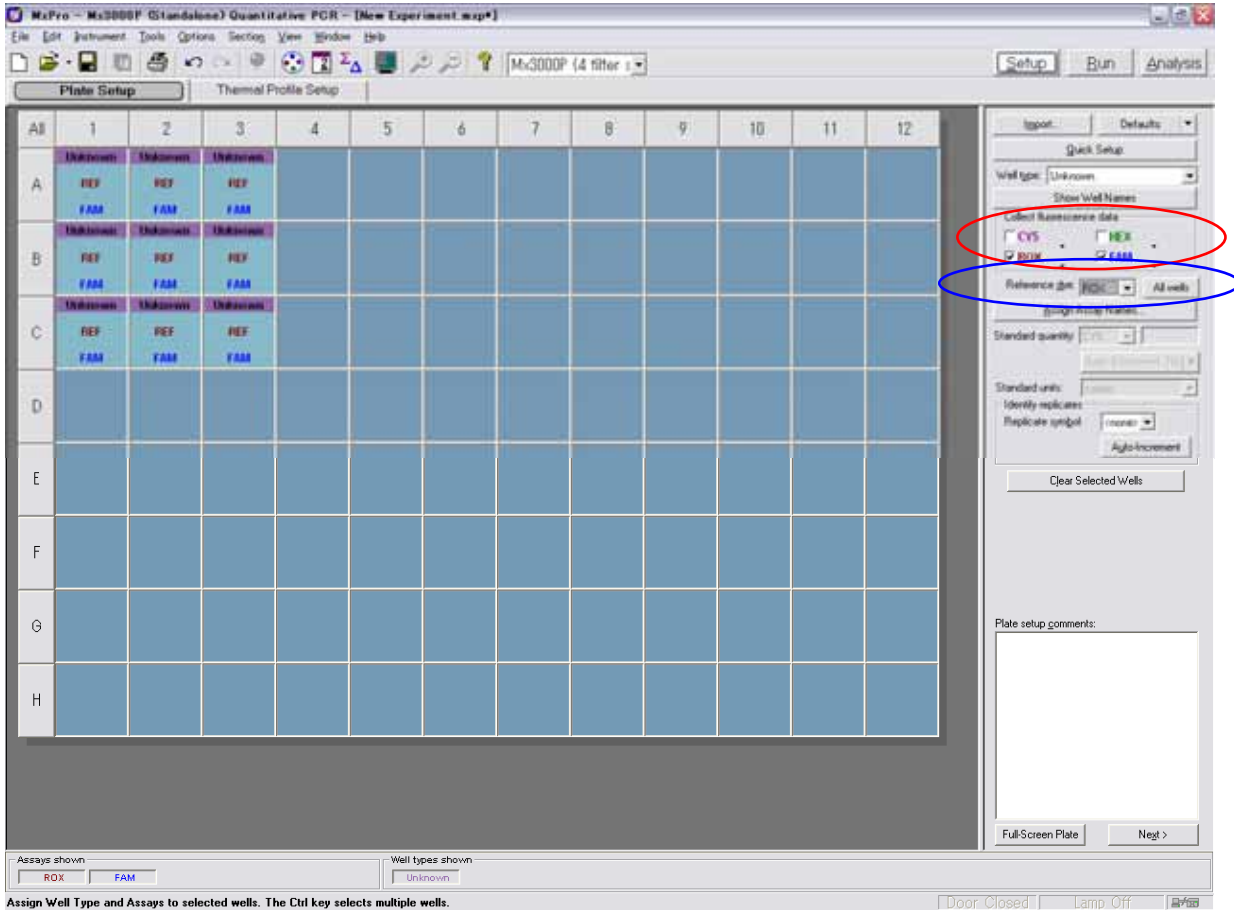
Sample #	Gene	Well type	Fileter	Conc.	Well
1	A	unknown	FAM		A1-A3
2	A	unknown	FAM		B1-B3
3	A	unknown	FAM		C1-C3
4	B	unknown	HEX		A4-A6
5	B	unknown	HEX		B4-B6
6	B	unknown	HEX		C4-C6
7	A	standard	FAM	10 ⁶	A7-A9
8	A	standard	FAM	10 ⁵	B7-B9
9	A	standard	FAM	10 ⁴	C7-C9
10	A	standard	FAM	10 ³	D7-D9
11	A	NTC	FAM		E7-E9
12	B	standard	HEX	10 ⁶	A10-A12
13	B	standard	HEX	10 ⁵	B10-B12
14	B	standard	HEX	10 ⁴	C10-C12
15	B	standard	HEX	10 ³	D10-D12
16	B	NTC	HEX		E10-E12

a) サンプル# 1 ~ 3までの設定を行います。サンプルはトリPLICATEですので、まず下ののように遺伝子 A の unknown のサンプルを triplicate で設定するために、9つのウェルをマウスで選択します。
赤丸の Well type の選択で、「unknown」選択します。



b) 9つのウェルに「unknown」と表示されるはずですが、

このサンプル1～3は FAM ラベル TaqMan probe でアッセイするので、下図赤丸で囲った「Collect fluorescence data」でフィルターをFAM、そしてROXを選択します（ROXで補正を行うため）。そのまま下図青丸で表示した「Reference dye」の設定で「ROX」を選択します。

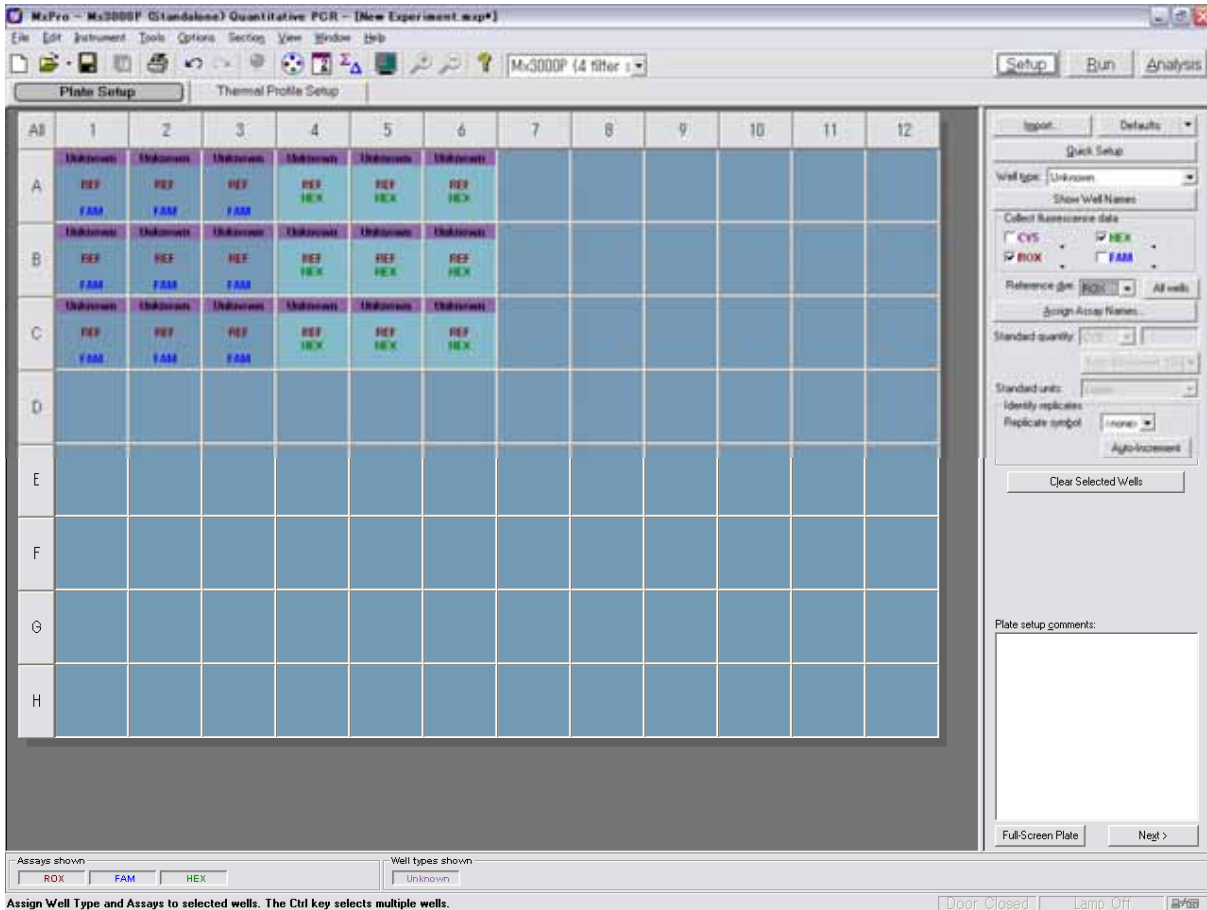


右に示すように、9つのウェルに「FAM」と表示され、「ROX」は「REF」と表示されます。

All	1	2	3
	Unknown	Unknown	Unknown
A	REF FAM	REF FAM	REF FAM
B	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM
C	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM	Unknown REF FAM

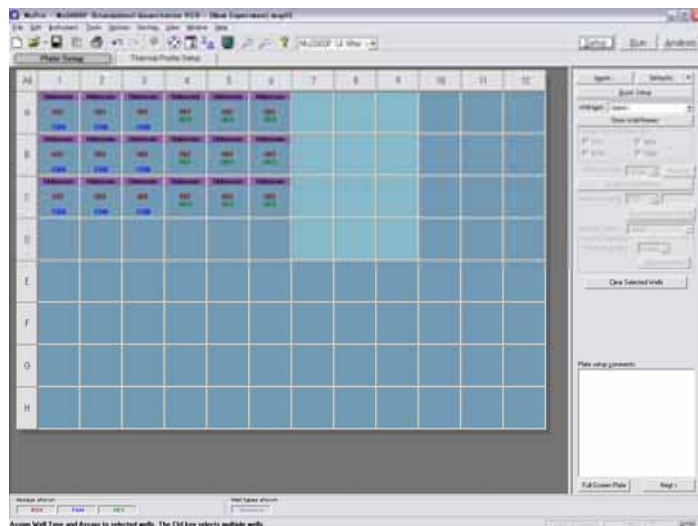
c) サンプル 4 ~ 6 の設定を行います。 サンプル 1 ~ 3 の設定と同様に行いますが、FAM ラベル TaqMan probe ではなく、VIC ラベル TaqMan probe を用いるので、FAM のフィルターの代わりに HEX フィルターを選択します (VIC は HEX フィルターで検出できます)。

サンプル 4 ~ 6 の設定を Well A4 ~ C6 に設定すると下のようになるはずですが。



d) 次にサンプル#7 ~ #11 の「standard」と「NTC」をセットします。

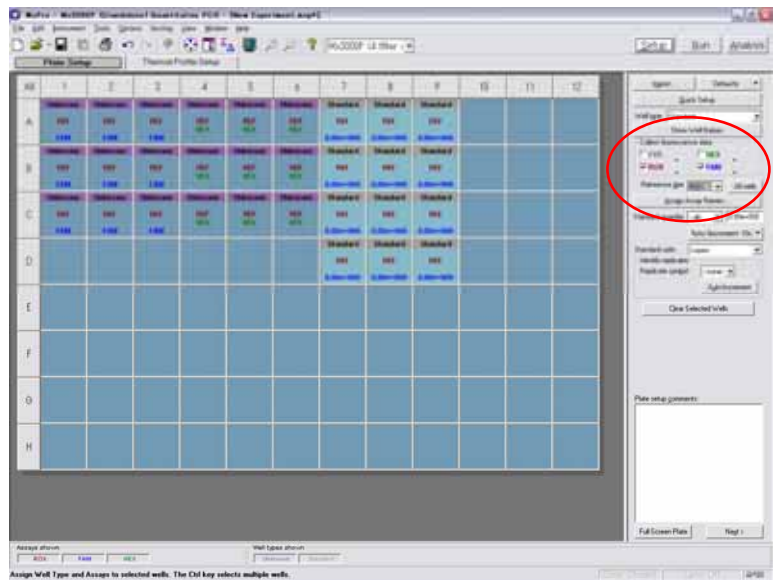
まず、standard の#7 ~ #10 をトリプリケートでセットするため、well A7 ~ D9 をマウスで選択します。



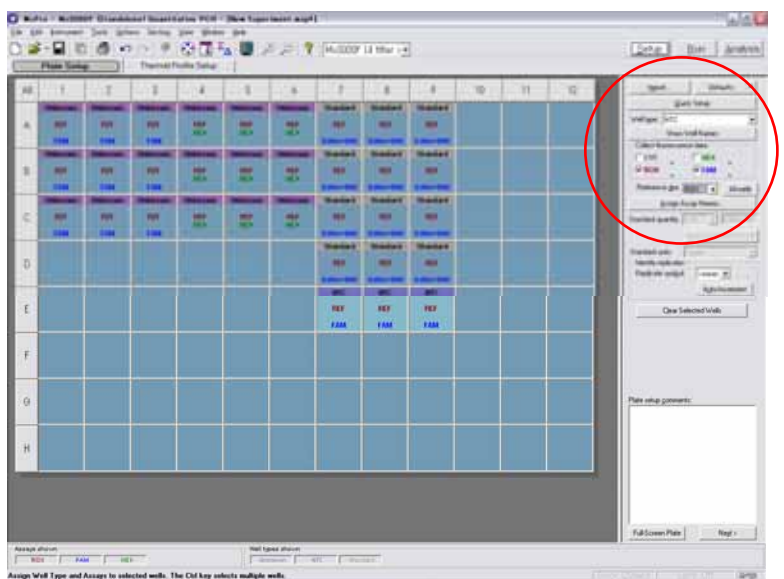
e) 赤丸の「Well type」の設定で「Standard」を選択します。各ウェルに「Standard」と表示されます。



f) 赤丸のパネルで、FAMとROXのフィルターを選択し、ROXをReference dyeに設定します。

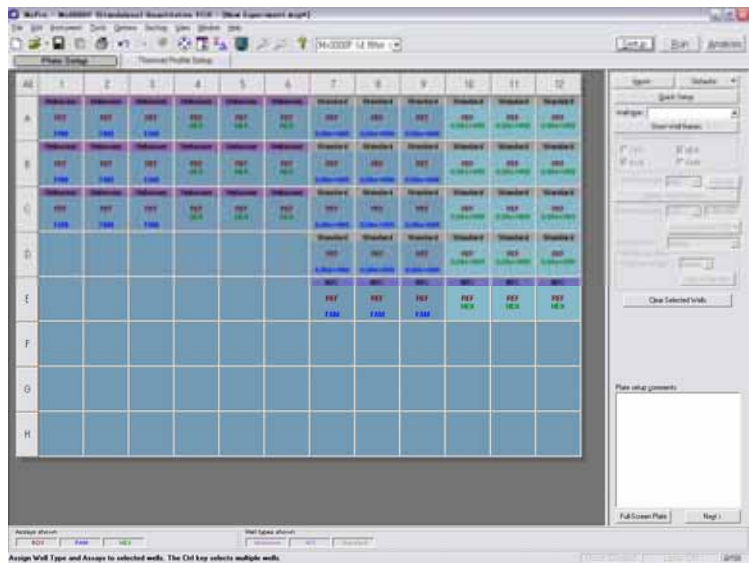


g) 同様にサンプル#11の「NTC」をwell E7~E9に設定します。
「Well type」で「NTC」選択し、フィルターはFAMとROXにチェックを入れ、ROXをReference dyeに設定すると右図のようになります。

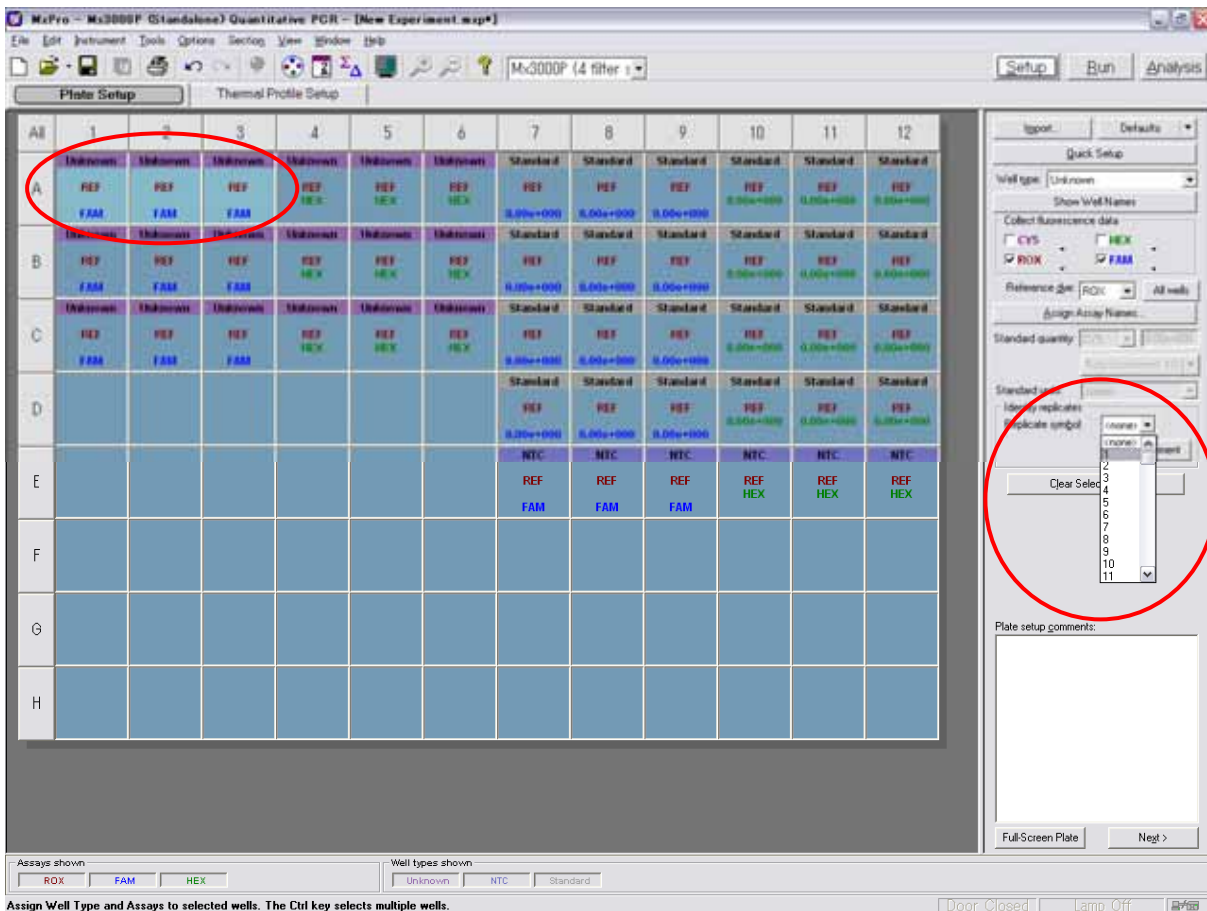


h) 同様にサンプル 12~16 についても設定します。(e)~(g)の設定と同様ですが、フィルターを FAM の代わりに HEX を設定します。

右図のようになるはずです。

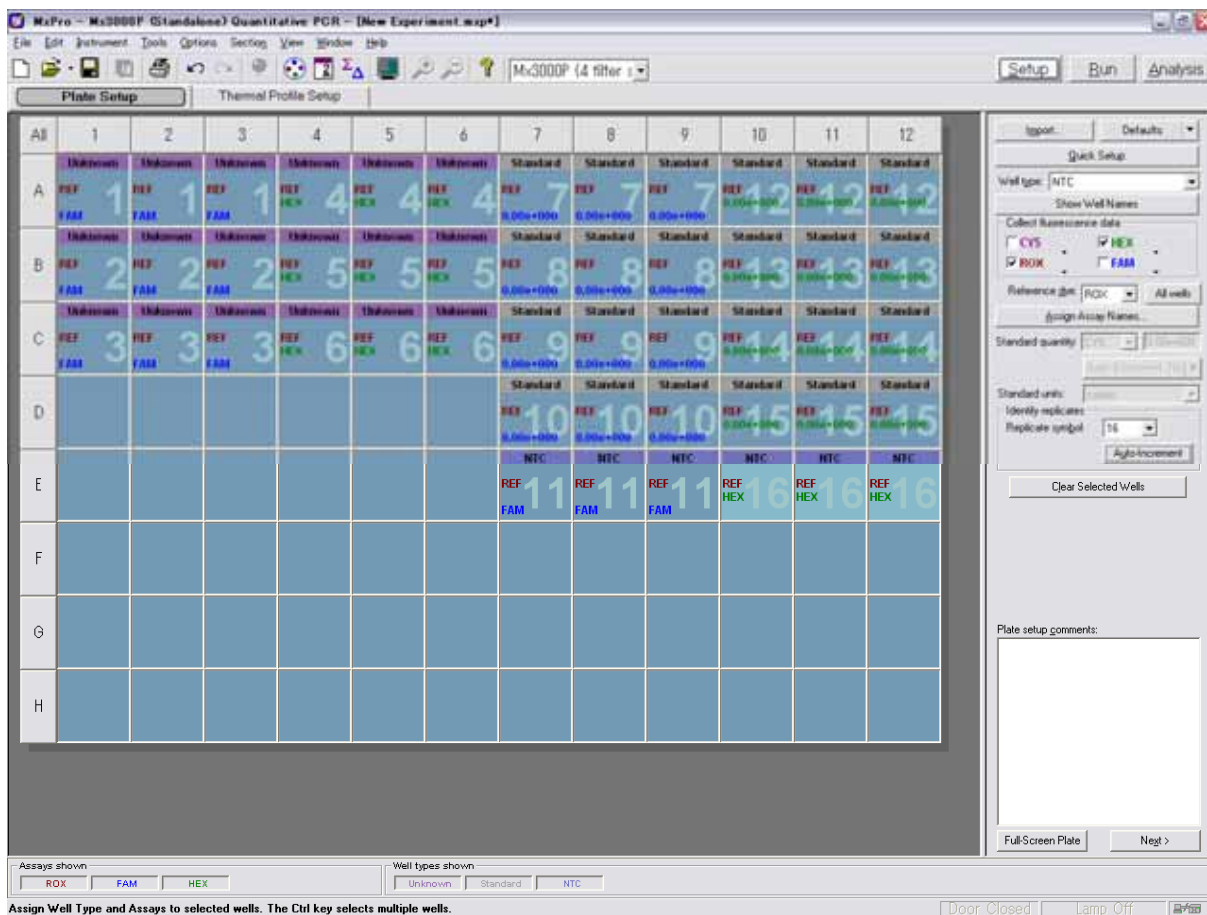


i) Replicate symbol を設定します。サンプルはトリPLICATEで設定するので、サンプル 1 は well A1~A3、サンプル 2 は well B1~B3・・・というように、サマリーに示してある通りに Replicate symbol を設定します。



前ページに示すように、サンプル 1 (Replicate #1) を設定するためには well A1 ~ A3 をマウスで選択し、画面右側のパネル内 (赤丸) 「Replicate Symbol」という表示の右側のボックスより数値を選択して設定していきます。「Auto-increment」機能を利用すると便利です。

全てのウェルに Replicate symbol が設定できると、下のようになるはずです。

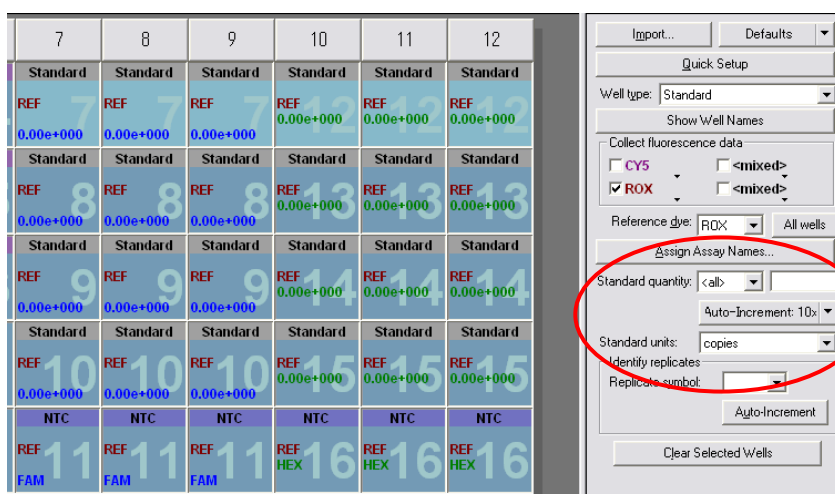


j) スタンダードサンプルに濃度を設定します。FAM フィルターで測定するスタンダードと HEX フィルターで測定するサンプルの濃度が別々であれば別々に濃度を設定し、同じであれば同時に設定することもできます。

サンプル 7 とサンプル 12 の濃度が同じであれば、まとめて濃度設定ができます。

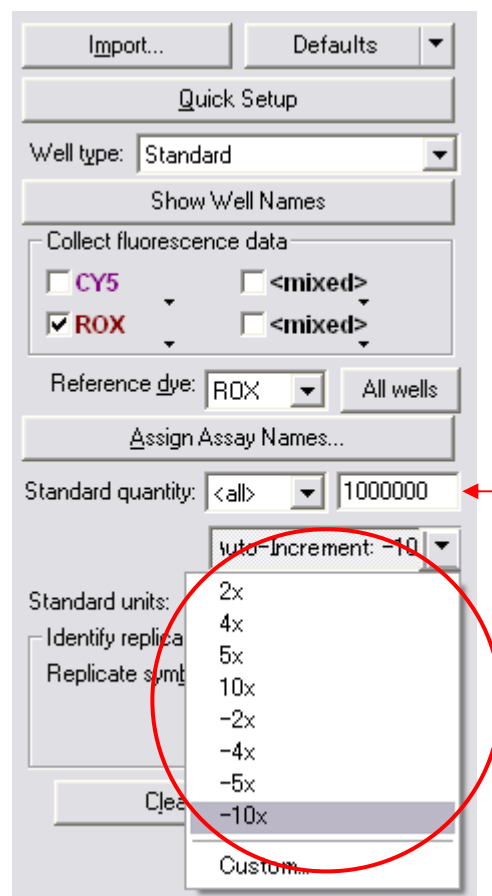
[all] を使えます。

このような場合はサンプル 7 とサンプル 12 のウェルを選択します。



濃度設定は、画面右側のパネル（赤丸内）の「Standard quantity」と「Standard units」で行います。まず、「Standard units」で「copies」や「relative」、「milimole」など、最適な単位を選択します。次に「Standard quantity」で濃度の数値を入力します。FAM 測定と HEX 測定のスタンダードの濃度が一緒の場合には Standard quantity という表示の右側は「all」にします。別々で濃度を設定したい場合にはそれぞれのフィルター名（あるいは設定された遺伝子名）を設定します。Replicate #7(well A7 – A9) と Replicate #13 (well A10 – A12)のウェルを選択します。この2つの standard サンプルの濃度は同じなので、「all」選択し、まとめて濃度を入力していきます。

右図に示すように、矢印のボックスに濃度を入力し、赤丸の「Auto-Increment」で「-10x」を選択します。Auto-Increment 機能を設定しておくと、マウスで次のウェルを選択すると設定された濃度を順次入力することができます。



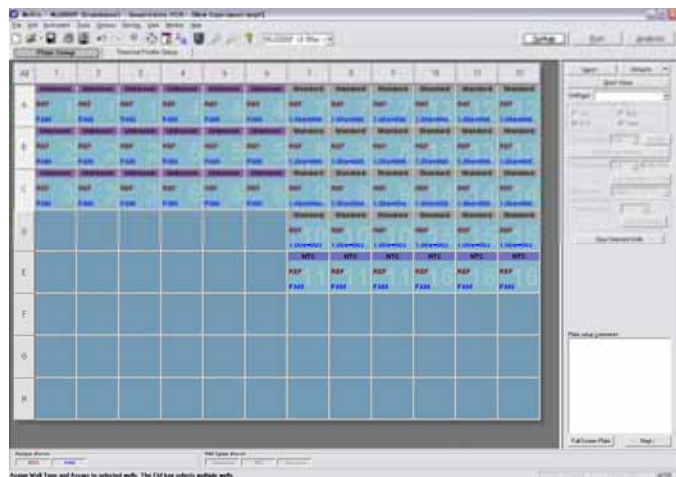
全ての Standard と設定されたウェルに濃度が入力できると右図のように、各ウェルに濃度が入力されているはずです。

Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
REF 7 1.00e+006	REF 7 1.00e+006	REF 7 1.00e+006	REF 12 1.00e+006	REF 12 1.00e+006	REF 12 1.00e+006
Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
REF 8 1.00e+005	REF 8 1.00e+005	REF 8 1.00e+005	REF 13 1.00e+005	REF 13 1.00e+005	REF 13 1.00e+005
Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
REF 9 1.00e+004	REF 9 1.00e+004	REF 9 1.00e+004	REF 14 1.00e+004	REF 14 1.00e+004	REF 14 1.00e+004
Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
REF 10 1.00e+003	REF 10 1.00e+003	REF 10 1.00e+003	REF 15 1.00e+003	REF 15 1.00e+003	REF 15 1.00e+003
NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
REF FAM 11 1.00e+003	REF FAM 11 1.00e+003	REF FAM 11 1.00e+003	REF HEX 16 1.00e+003	REF HEX 16 1.00e+003	REF HEX 16 1.00e+003

このように測定したいサンプル(プライマーあるいは目的遺伝子)が蛍光ラベルごと、すなわち FAM ではA遺伝子、HEX (VIC)ではB遺伝子というように異なっている場合には、わざわざ前項 (SYBR Green アッセイの項)のように Well information でグループ化設定をしなくても FAM で測定されたウェルのデータはFAMの standard で定量結果が示され、standard curve はFAMと HEX (VIC)の2本が示されます。したがって Well information を設定しなくても、FAM と HEX (VIC)でグループ化されています。もちろん、遺伝子名を付して分かりやすくするために Well information を設定することも可能です。

Well information での遺伝子名を付し、グループ化することの有用性は、例えば、2つの遺伝子を同じ FAM ラベルプローブで測定した場合や、単色の SYBR Green や Eva Green 等で別々のウェルで異なる遺伝子を測定した場合です。

例えばプローブ法でも、右図のように FAM でラベルされた異なる2つのプローブで、2種類の遺伝子を別々のウェルで測定した場合などが、上述のケースに該当します。このようなケースでは、SYBR Green アッセイの時と同じように、unknown サンプルと standard サンプルを関連付けるためのグループ化 (Well information) の設定をしておく便利です。



グループ化 (Well information の入力) は、前項 (SYBR Green アッセイの実施例の項) をご参照ください。

(2) 2つ(以上)の遺伝子を同一のウェル内で測定する方法 (Multiplex assay)

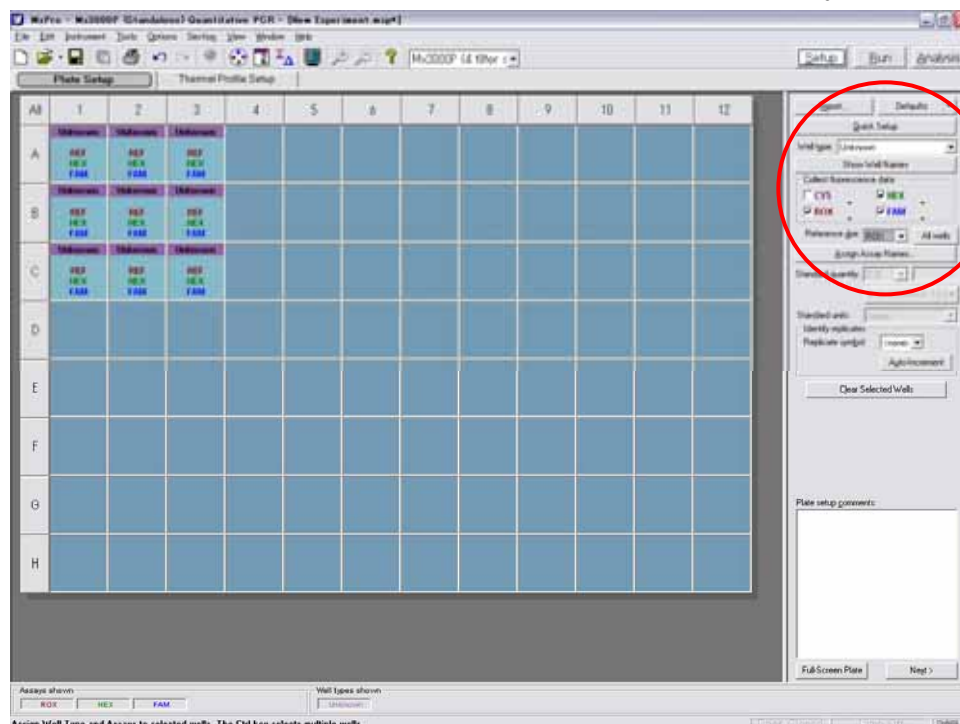
ここまででは、2つの遺伝子を FAM プローブと HEX (VIC) プローブで測定する際の設定を示しましたが、別々のウェルで測定する際のセットアップ方法を示しました。ここからは同様のアッセイを同じウェルで測定 (Multiplex アッセイ) する際の設定方法を示します。

Sample #	Gene	Well type	Filter	Conc.	Well
1	A/B	unknown	FAM & HEX		A1-A3
2	A/B	unknown	FMA & HEX		B1-B3
3	A/B	unknown	FAM & HEX		C1-C3
4	A/B	standard	FAM & HEX	10 ⁶	A4-A6
5	A/B	standard	FAM & HEX	10 ⁵	B4-B6
6	A/B	standard	FAM & HEX	10 ⁴	C4-C6
7	A/B	standard	FAM & HEX	10 ³	D4-D6
8	A/B	NTC	FAM & HEX		E4-E6

上の表に示すような Multiplex 定量アッセイのプレートセットアップの方法を示します。

a) 最初に「unknown」のサンプルを設定します。

下図のように、A1~C3のウェルを選択します。赤丸のパネルで、Well type を「unknown」に設定し、フィルターはFAM、HEX、ROXを選択し、Reference dyeとしてROXを設定します。



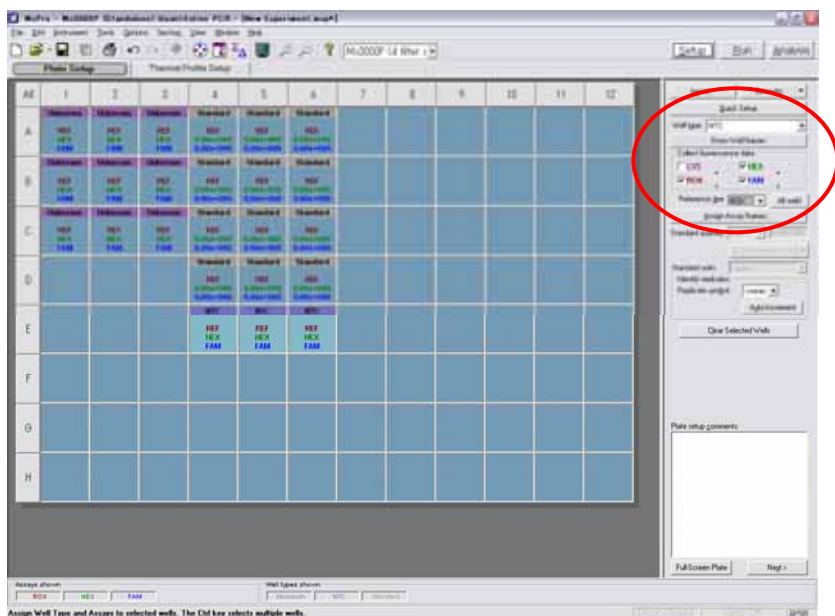
b) Standard サンプルを well A4 - D6 に設定します。Well A4 - D6 を選択し、右側のパネルで設定を行います。

Well type を「standard」に設定し、フィルターは FAM、HEX、ROX を選択します。Reference Dye に ROX を設定します。

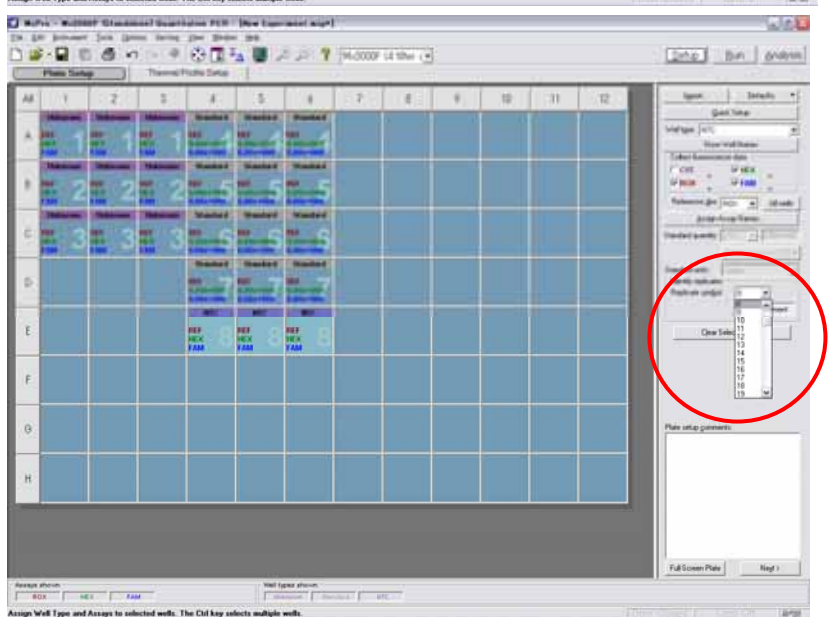


c) NTC サンプルを Well E4 - E6 に設定します。Well E4 - E6 をマウスで選択し、右側のパネルで設定を行います。

Well type を「NTC」に設定し、フィルターは FAM、HEX、ROX を選択します。Reference Dye に ROX を設定します。

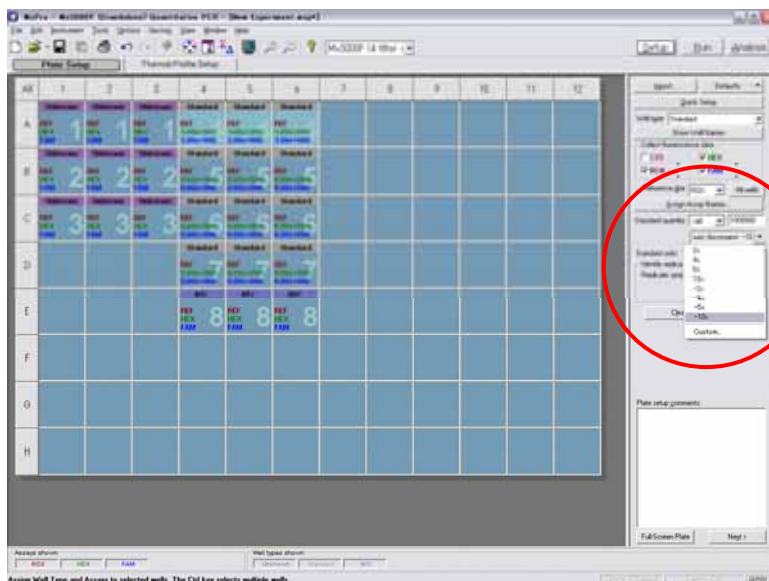


d) Replicate symbol をサマリー通りに設定します。右図の赤丸のところで設定していきます。



e) Standard サンプルに濃度を
入力していきます。

右図、パネル内赤丸のところで
Standard Units を設定し、Standard
Quantities (濃度) を設定してい
きます。Auto-Increment 機能を利用
すると便利です。



設定が完了すると、右図のよう
になるはずです。

Simple アッセイの半分のウェル
で定量アッセイを行うことが可能
です。

All	1	2	3	4	5	6
A	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Standard REF 1.00e+006 1.00e+006	Standard REF 1.00e+006 1.00e+006	Standard REF 1.00e+006 1.00e+006
B	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000
C	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Unknown REF HEX FAM	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000
D				Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000	Standard REF 0.00e+000 0.00e+000
E				NTC REF HEX FAM	NTC REF HEX FAM	NTC REF HEX FAM

Multiplex assay の場合にも Well information を設定しておく、解析の際
に便利です。Well information の設定方法は、前述の方法と同様です。
上のように全てのウェルを選択し、マウスの右クリックでダイアログを
開きます。Multiplex assay の際には各ウェルに 2 つの遺伝子名などを設定し
ます。

以上です。

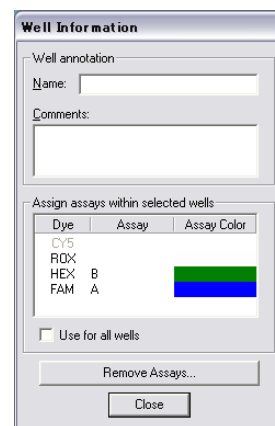


Plate Setup Quick Protocol (相対定量法)

ここでは、SYBR Green アッセイで2つのターゲット遺伝子および1つのハウスキーピング遺伝子を測定し(計3種類の遺伝子のアッセイ)、2つのターゲット遺伝子についてハウスキーピング遺伝子で補正を行い、相対定量を行うためのプレートセットアップ方法をご紹介します。

例として、次のようなサンプルを定量したい場合の設定方法を示しながら説明します。

【サマリー】

SYBR Green 法により、細胞に刺激を加える前(無刺激)、刺激を加えてから1時間後、3時間後の目的遺伝子「A」と「B」について相対定量を行います。この時、同じサンプルでハウスキーピング遺伝子(b-actin)を測定し、目的遺伝子「A」と「B」の結果を補正します。

同時に、同一プレート内で増幅効率を得るため(その他、定量可能範囲(RSq、再現性)の確認、NTCの確認のため)希釈系列を測定します。サンプルとスタンダードはトリPLICATEで行うこととします。

20µlの反応系で3本分ずつまとめて調整し、3つのウェルに分注します。

Sample #	Gene	Well type	Filter	Description	Well
#1	A	calibrator	SYBR	無刺激	A1-A3
#2	A	unknown	SYBR	刺激 1 時間	B1-B3
#3	A	unknown	SYBR	刺激 3 時間	C1-C3
#4	B	calibrator	SYBR	無刺激	A4-A6
#5	B	unknown	SYBR	刺激 1 時間	B4-B6
#6	B	unknown	SYBR	刺激 3 時間	C4-C6
#7	b-act	calibrator	SYBR	無刺激	A7-A9
#8	b-act	unknown	SYBR	刺激 1 時間	B7-B9
#9	b-act	unknown	SYBR	刺激 3 時間	C7-C9

Sample #	Gene	Well type	Filter	Conc.	Well
#10	A	standard	SYBR	1 x	D1-D3
#11	A	standard	SYBR	1/10 x	E1-E3
#12	A	standard	SYBR	1/100 x	F1-F3
#13	A	standard	SYBR	1/1000 x	G1-G3
#14	A	NTC	SYBR		H1-H3

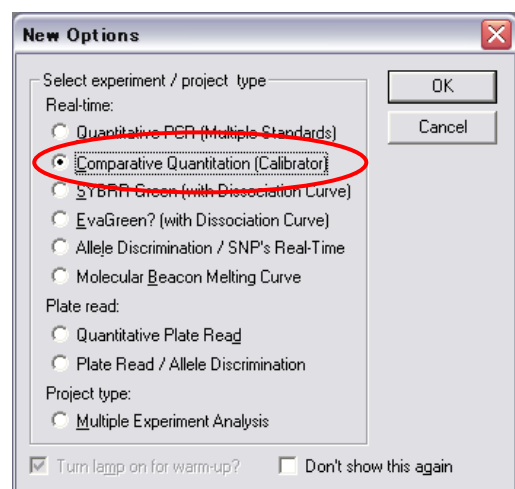
#15	B	standard	SYBR	1 x	D4-D6
#16	B	standard	SYBR	1/10 x	E4-E6
#17	B	standard	SYBR	1/100 x	F4-F6
#18	B	standard	SYBR	1/1000 x	G4-G6
#19	B	NTC	SYBR		H4-H6

#20	b-act	standard	SYBR	1 x	D7-D9
#21	b-act	standard	SYBR	1/10 x	E7-E9
#22	b-act	standard	SYBR	1/100 x	F7-F9
#23	b-act	standard	SYBR	1/1000 x	G7-G9
#24	b-act	NTC	SYBR		H7-H9

プレートセットアップの方法

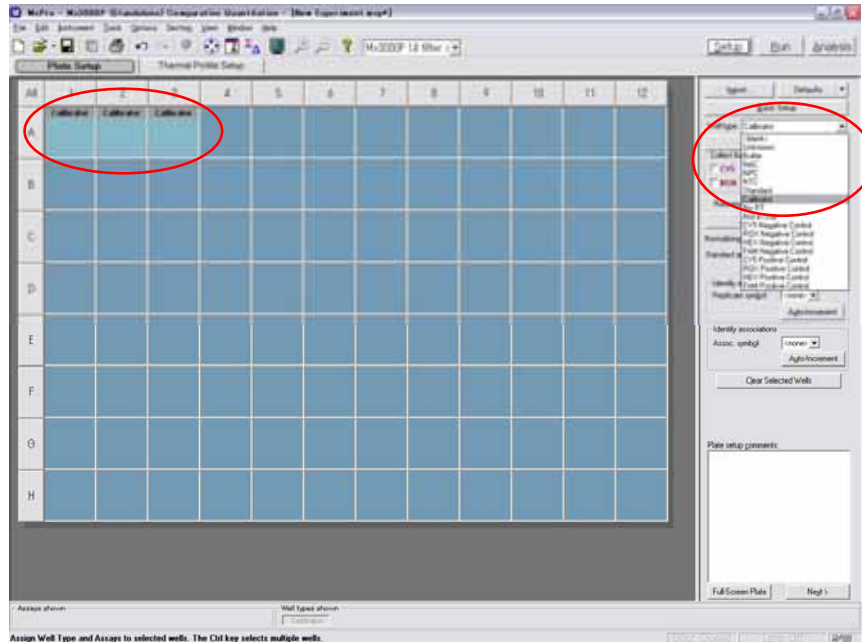
MxPro ソフトウェアを立ち上げると、右のダイアログが開きます。相対定量解析の場合は、赤丸の「Comparative Quantification (Calibrator)」を選択します。

「Quantitative PCR」や「SYBR Green」を選択して行った実験ファイルを、後に相対定量解析したい場合にはそのファイルを、後に「Comparative Quantification」にコンバートすることもできます。



a) サンプル#1 の設定を行います。 サンプル #1 は、well A1 ~ A3 に、ターゲット遺伝子「A」の「Calibrator」と設定されます。

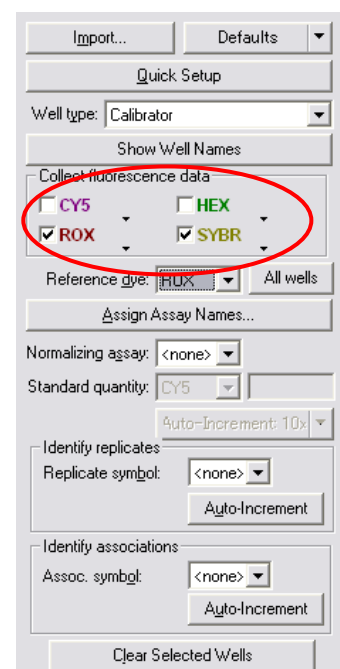
Well A1 ~ A3 をマウスで選択し、well type を「Calibrator」に設定します（赤丸部分）。



相対定量(Comparative quantification)でも、プローブ法や Multiplex アッセイ法での設定ができます。設定方法は前項を参考にしてください（ 50 ページ参照 ）。

その後、右図赤丸のところでは SYBR と ROX のフィルターを選択し、Reference dye を「ROX」に設定します。Well A1 ~ A3 は下図のように表示されます。

All	1	2	3
	Calibrator	Calibrator	Calibrator
A	REF	REF	REF
	SYBR	SYBR	SYBR



詳しいフィルター設定方法は SYBR Green アッセイの項（ p17 ~ p18 ）をご参照ください。

b) サンプル#2、#3 の設定を行います。 サンプル #2、#3 は、well B1 ~ C3 に、ターゲット遺伝子「A」の「Unknown」と設定されます。(a)と同様に、Well B1 ~ C3 をマウスで選択し、Well type は「Unknown」と設定し、SYBR と ROX のフィルターを選択して、Reference dye を「ROX」と設定します。右図のようになります。

All	1	2	3
	Calibrator	Calibrator	Calibrator
A	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
B	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
C	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR

c) 次にサンプル#4 をターゲット遺伝子「B」の「Calibrator」、そして#5、#6 をターゲット遺伝子「B」の「Unknown」と設定します。フィルターと Reference dye の設定はターゲット遺伝子「A」の場合と同様です。下図のようになります。

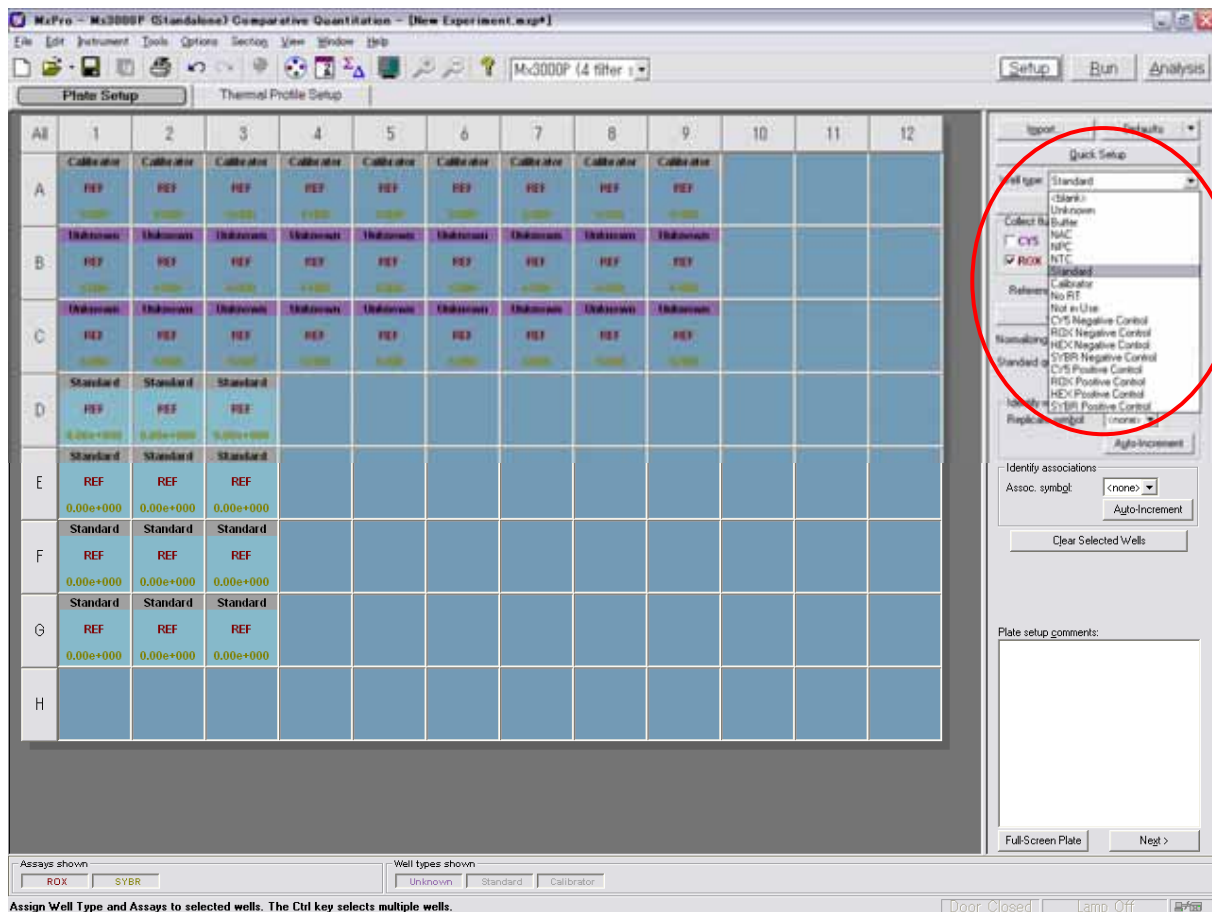
All	1	2	3	4	5	6
	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
A	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR

d) 次に「normalizer」であるサンプル#7 ~ #9 の設定を行います。最初の設定は(a) ~ (c)と同様です。サンプル#7 はハウスキーピング遺伝子「b-actin」の「Calibrator」、そして#8 ~ #9 は「b-actin」の「Unknown」と設定します。下図のようになります。

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
A	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR

e) 次にサンプル#10～#13の「Standard」およびサンプル#14の「NTC」を設定します。

サンプル#10～#13はWell D1～G3に設定されるので、そのウェルをマウスで選択し、画面右のパネル(赤丸)でWell typeを「Standard」、フィルターをSYBRとROX、Reference dyeにROXを設定します。下図のようになるはずです。

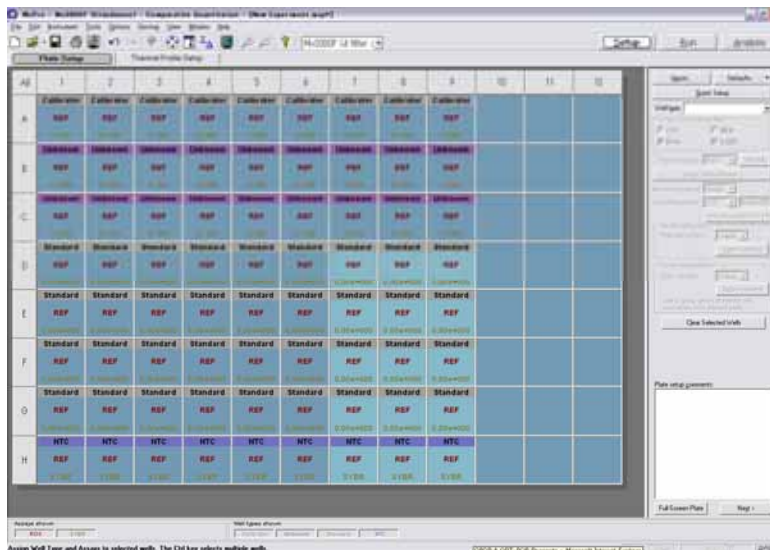


Well H1～H3にサンプル#14の「NTC」を設定します。マウスでWell H1～H3を選択し、Well typeは「NTC (No Template Control)」に設定、SYBRとROXのフィルターを選択し、ROXをReference dyeに設定します。

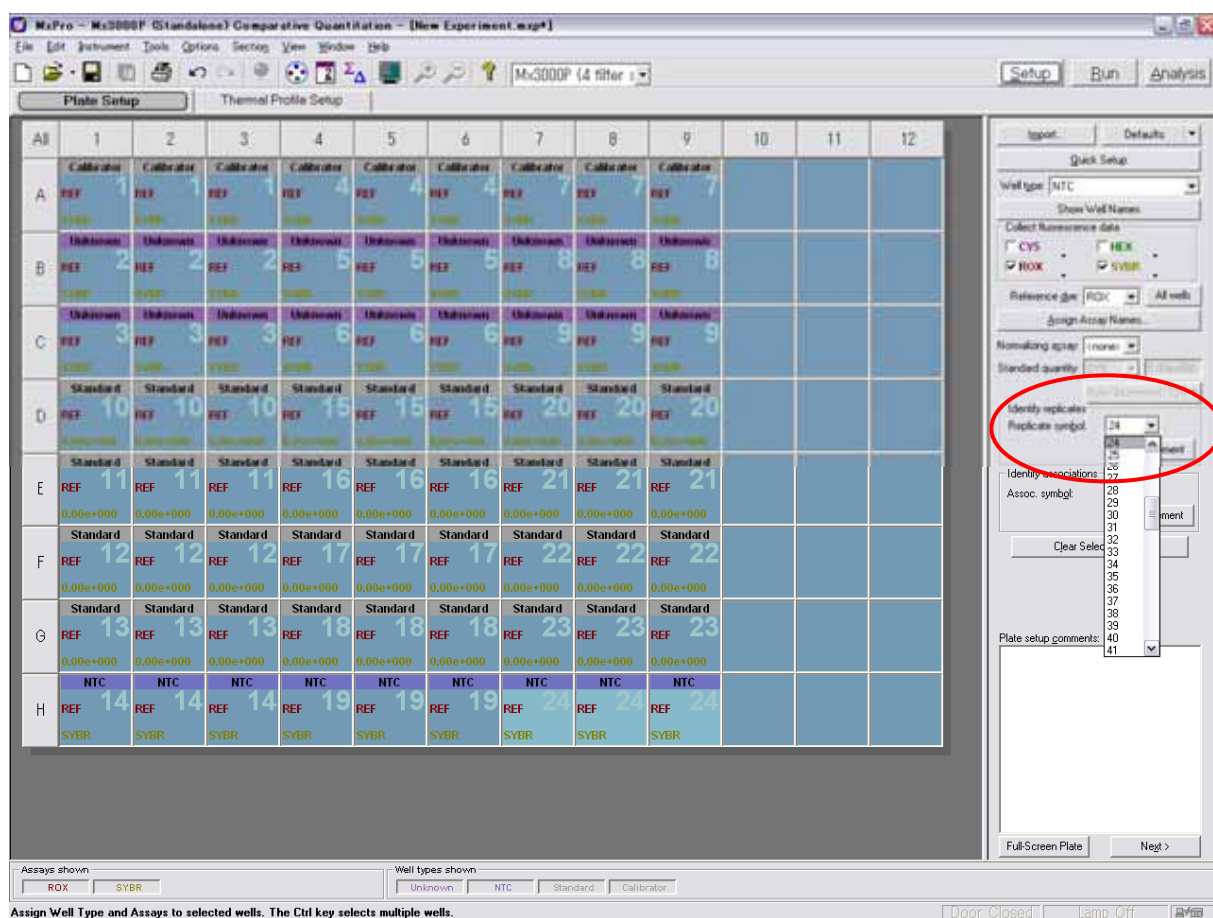
右図のようになるはずです。

	Standard	Standard	Standard
D	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000
	Standard	Standard	Standard
E	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000
	Standard	Standard	Standard
F	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000
	Standard	Standard	Standard
G	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000	REF 0.00e+000
	NTC	NTC	NTC
H	REF SYBR	REF SYBR	REF SYBR

f) サンプル#15~#19 はターゲット遺伝子「B」の「Standard」と「NTC」、サンプル#20~#24 はハウスキーピング遺伝子「b-actin」の「Standard」と「NTC」です。(e)と同様に、サンプル#15~#19 は Well D4~H6 に、サンプル#20~#24 は Well D7~H9 に設定します。右のようになるはずですが。

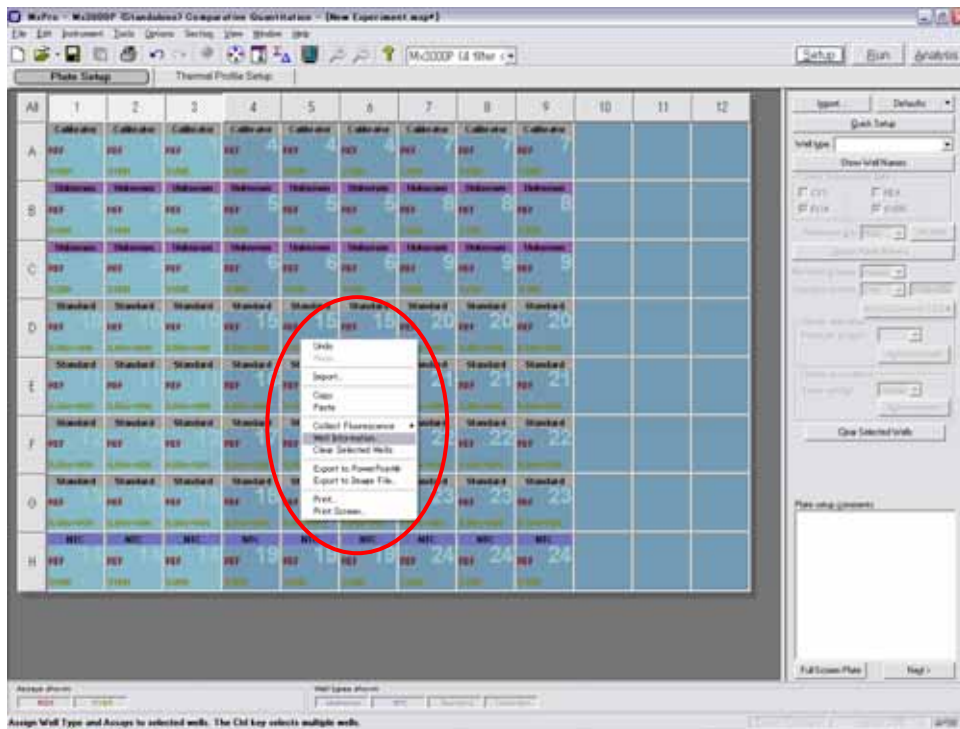


g) 各サンプルはトリPLICATEでのアッセイなので、Replicate symbol を付けます。下図の画面右側(赤丸)のパネルで Association symbol から設定を行います。

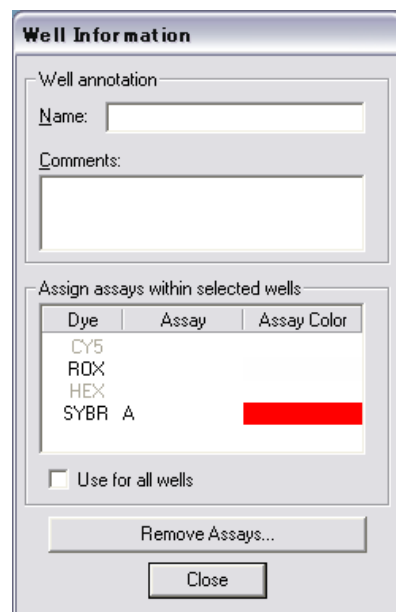


h) 遺伝子ごとにグループ化を行います。 サンプル#1~#3 とサンプル#10~#14 は、いずれもターゲット遺伝子「A」のアッセイなので、Well information の設定で遺伝子名「A」を設定し、カラーを赤に設定してみます。

マウスでサンプル#1~#3 とサンプル#10~#14 に該当するウェル (Well A1~Well H3) をマウスで選択し、マウスの右クリックをすると、赤丸のメニューが開きます。ここから「Well information」を選択します。



右図のダイアログが開きます。 アッセイは SYBR フィルターで行われたものなので、SYBR の項目の「Assay」のボックスに遺伝子名「A」を入力します。 Assay Color は赤を選択します。



選択した各ウェルに遺伝子名「A」が赤色で表示されます。

同様にサンプル#4～#6 およびサンプル#15～#19 をターゲット遺伝子「B」で青色、サンプル#7～#9 およびサンプル#20～#24 をハウスキーピング遺伝子「b-actin」で黄色に設定します。

全ての Well information の入力完了すると、下図のようになります。

The screenshot displays the Stratagene software interface for a 96-well plate. The plate layout is as follows:

Row	Col 1	Col 2	Col 3	Col 4	Col 5	Col 6	Col 7	Col 8	Col 9	Col 10	Col 11	Col 12
A	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator			
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown			
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown			
D	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
E	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
F	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
G	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC			

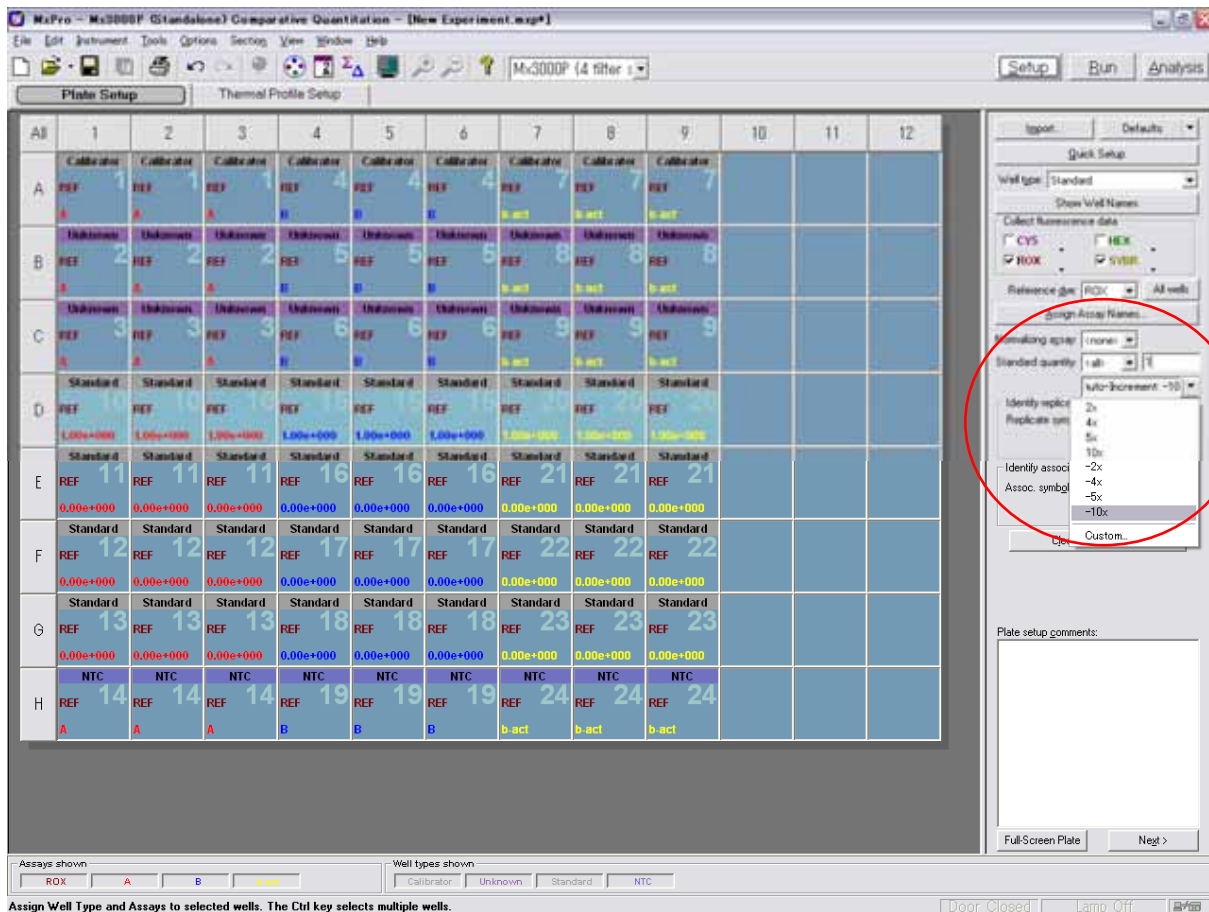
The 'Well Information' dialog box is open, showing the following details:

- Well annotation: Name: [Empty], Comments: [Empty]
- Assign assays within selected wells:

Dye	Assay	Assay Color
CY5		
ROX		
HEX		
SYBR	b-act	Yellow
- Use for all wells:
- Buttons: Remove Assays..., Close

At the bottom of the interface, the 'Assays shown' section lists: ROX, A, B, b-act. The 'Well types shown' section lists: Calibrator, Unknown, Standard, NTC.

i) 次に Standard サンプルの濃度（相対値や希釈倍率など）を入力します。サンプル#10、#15、#20 は 1 × 濃度のサンプルですので、Well D1 ~ Well D9 をマウスで選択して、下図画面右側のパネル（赤丸）内の「Standard quantity」に「1」と入力します。



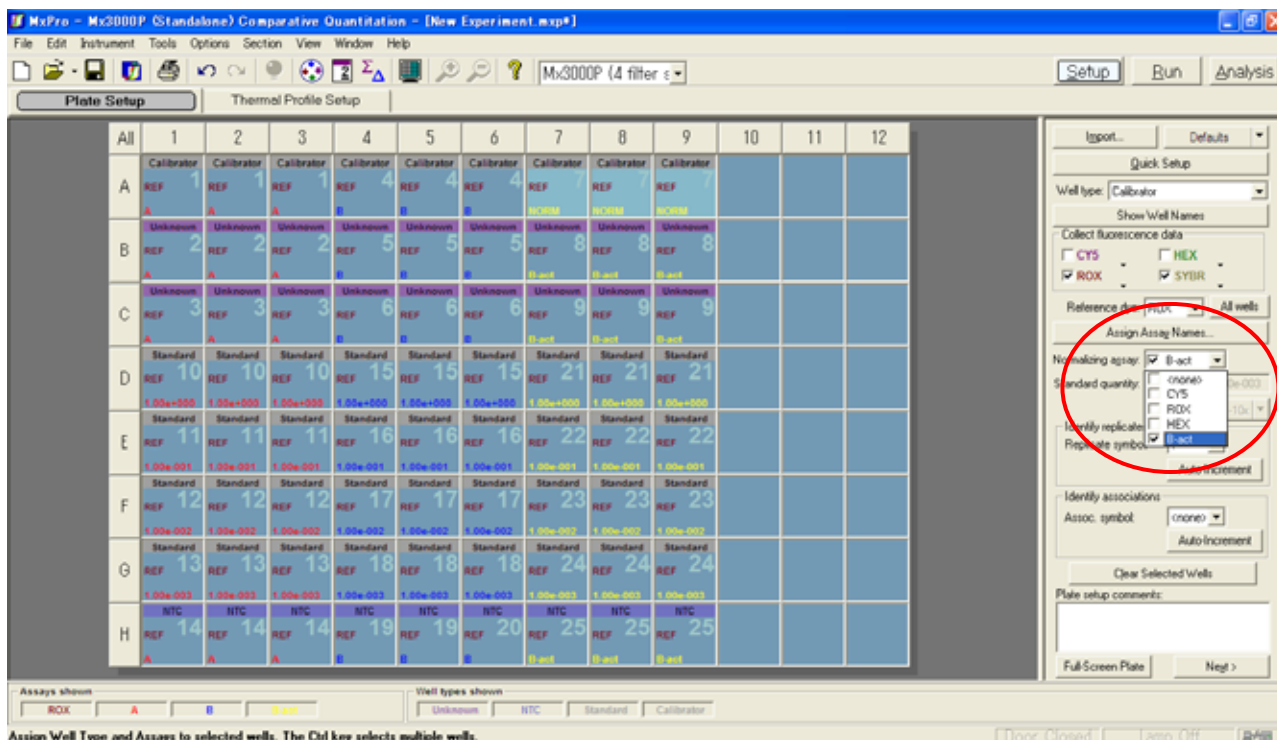
サンプル#11、#15、#21 は 1/10 倍希釈、サンプル#12、#17、#22 は 1/100 倍希釈、サンプル#13、#18、#23 は 1/1000 倍希釈の設定なので、上と同様に濃度をインプットします。赤丸内の「Auto Increment」機能を利用すると便利です。

Standard サンプルの濃度設定が完了すると、下図のようになります。

	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
D	REF 10 1.00e+000	REF 10 1.00e+000	REF 10 1.00e+000	REF 15 1.00e+000	REF 15 1.00e+000	REF 15 1.00e+000	REF 20 1.00e+000	REF 20 1.00e+000	REF 20 1.00e+000
E	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
	REF 11 1.00e-001	REF 11 1.00e-001	REF 11 1.00e-001	REF 16 1.00e-001	REF 16 1.00e-001	REF 16 1.00e-001	REF 21 1.00e-001	REF 21 1.00e-001	REF 21 1.00e-001
F	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
	REF 12 1.00e-002	REF 12 1.00e-002	REF 12 1.00e-002	REF 17 1.00e-002	REF 17 1.00e-002	REF 17 1.00e-002	REF 22 1.00e-002	REF 22 1.00e-002	REF 22 1.00e-002
G	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
	REF 13 1.00e-003	REF 13 1.00e-003	REF 13 1.00e-003	REF 18 1.00e-003	REF 18 1.00e-003	REF 18 1.00e-003	REF 23 1.00e-003	REF 23 1.00e-003	REF 23 1.00e-003

j) ハウスキーピング遺伝子 (b-actin) を「Normalizer」に設定します。Normalizer の設定は、Well type ごとに行います。

b-actin はサンプル#7~#9 で、その中の「Calibrator」はサンプル#7 です。まずサンプル#7 に該当する Well A7~A9 を選択し、下図画面右側のパネル (赤丸) 内の「Normalizing assay」で「b-act」を選択します。



Well A7~A9 の表示が「b-act」から「NORM」に変更されます。同様に、「Unknown」のサンプル #8 と#9 についても Normalizer の設定を行います。

右図のように設定されるはずですが。

Normalizer の設定は Well type ごとに設定可能ですので、Calibrator と Unknown を別々に設定する必要があります。

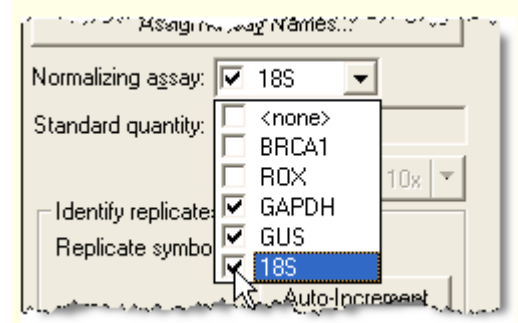
7	8	9
Calibrator	Calibrator	Calibrator
REF 7	REF 7	REF 7
NORM	NORM	NORM
Unknown	Unknown	Unknown
REF 8	REF 8	REF 8
NORM	NORM	NORM
Unknown	Unknown	Unknown
REF 9	REF 9	REF 9
NORM	NORM	NORM

【新機能：複数の normalizer の設定】

MxPro version 4.10 では、複数の Normalizer を設定することが可能です。

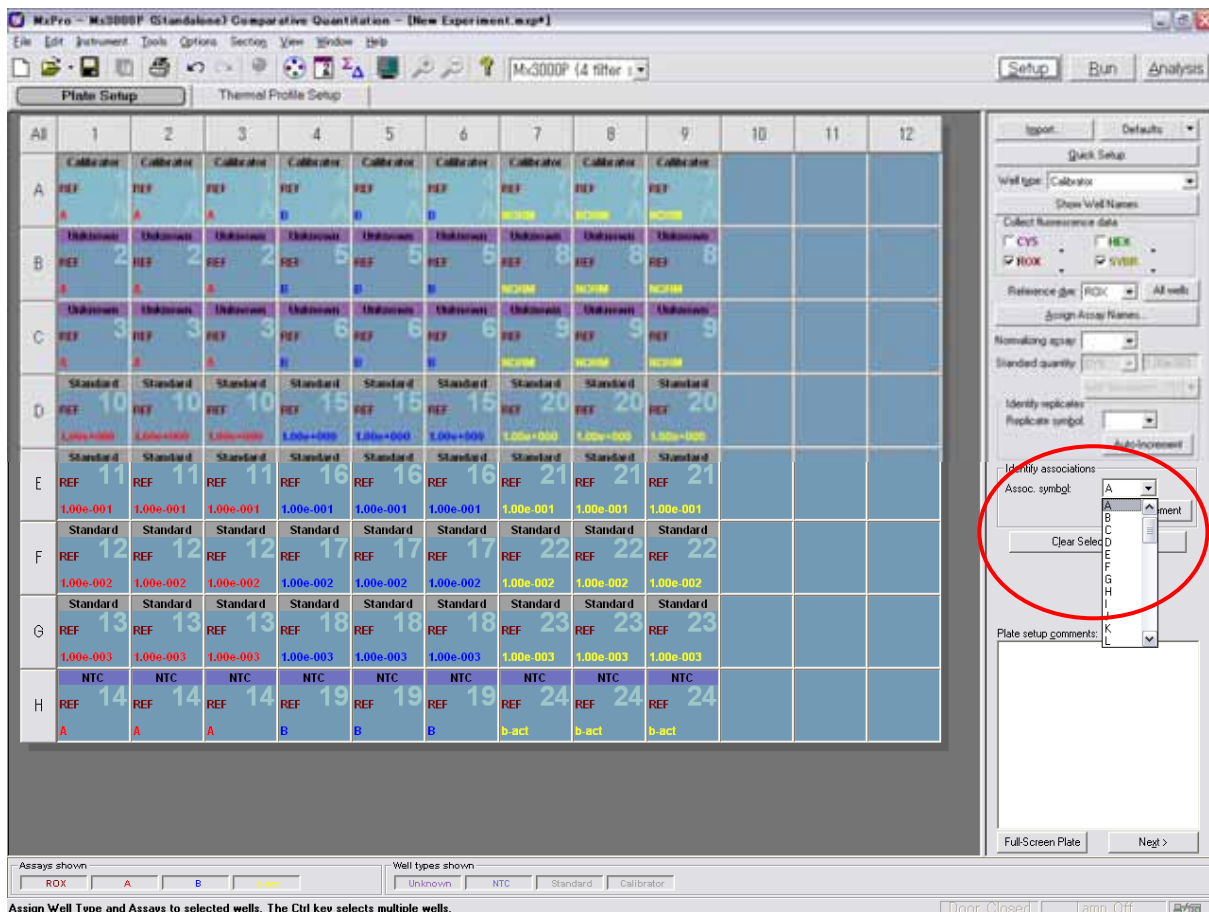
All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
	BRCA	BRCA	BRCA	GAPDH	GAPDH	GAPDH	18S	18S	18S	GUS	GUS	GUS
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	BRCA	BRCA	BRCA	GAPDH	GAPDH	GAPDH	18S	18S	18S	GUS	GUS	GUS
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	BRCA	BRCA	BRCA	GAPDH	GAPDH	GAPDH	18S	18S	18S	GUS	GUS	GUS
D	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	BRCA	BRCA	BRCA	GAPDH	GAPDH	GAPDH	18S	18S	18S	GUS	GUS	GUS

例えば、上に示すようにターゲット遺伝子である BRCA 遺伝子 (Replicate #1 ~ 4) を、GAPDH (Replicate #5 ~ 8)、18S (Replicate #9 ~ 12) および GUS (Replicate #13 ~ 16) の3つを Normalizer として設定して補正させたい場合、右に示すように Normalizing assay で GAPDH、18S、GUS のチェックボックスにチェックを入れ、それらを Normalizer に設定することによって、それらの Ct 値の平均によって Ct 法にて相対定量を実施させることができます。



Normalizer の設定は最大5つまで設定することが可能です。

k) ターゲット遺伝子とそれを補正するハウスキーピング遺伝子の関連付け (Association) を行います。
 サンプル#1 のターゲット遺伝子「A」、サンプル#4 のターゲット遺伝子「B」はサンプル#7 のハウスキーピング遺伝子「b-act」で補正されます。それらのサンプルは Well A1 ~ A9 に該当するので、Well A1 ~ A9 をマウスで選択し、下図画面右側のパネル (赤丸) の「Assoc. Symbol」で「A」と設定します。

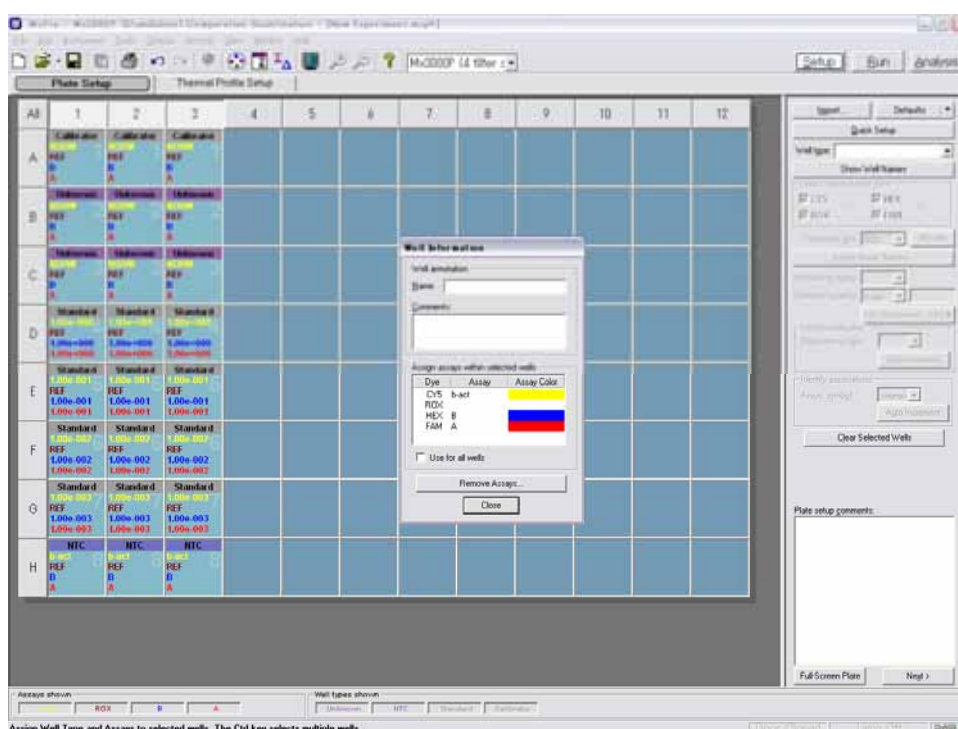


上図のように、設定されたウェルに「A」と表示されます。同様に Well B1 ~ B9、Well C1 ~ C9 についてもそれぞれ「B」および「C」と設定します。下図のようになるはずです。

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
A	REF A	REF A	REF A	REF B	REF B	REF B	REF A	REF A	REF A
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF A	REF A	REF A	REF B	REF B	REF B	REF B	REF B	REF B
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
	REF A	REF A	REF A	REF B	REF B	REF B	REF C	REF C	REF C

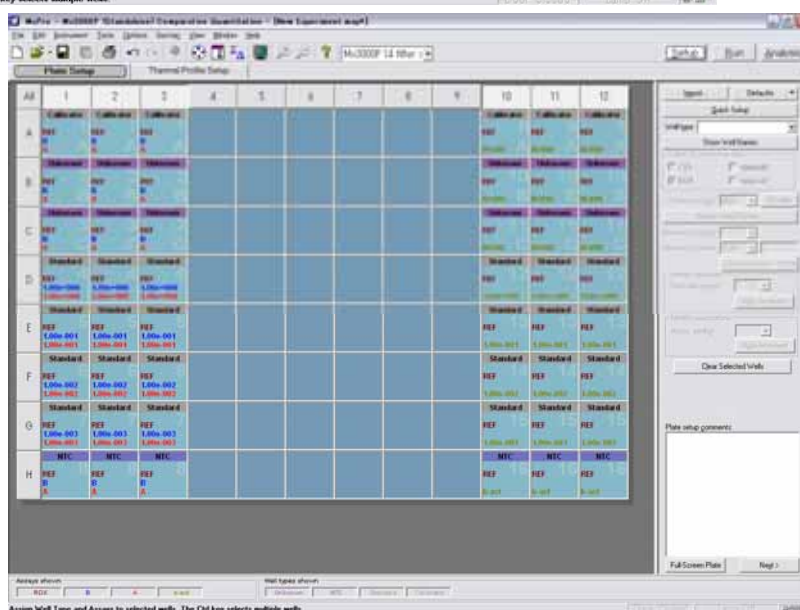
Standard と設定されたウェルについては Association symbol を設定する必要はありません。Standard サンプルでは、各プライマーセットでの増幅効率を得ることができ、この増幅効率を相対定量計算に反映させることができます。また、この Standard curve より Relative quantity to Standard を得て、そのデータで相対定量を行うことも可能です（エクセル上でマニュアル計算になります）。

Multiplex アッセイ法を相対定量解析に応用することもできます。例えば、Cy5 ラベルプローブで b-actin を、FAM ラベルプローブで A 遺伝子を、VIC ラベルプローブで B 遺伝子を検出できるよう実験系を構築し、1つのウェルで3つの遺伝子を同時に定量するような場合は、下に示すように設定することができます。1つのウェルの定量に normalizer に設定された b-actin が含まれるので association 設定をしなくても補正されます。



また、A 遺伝子（FAM）と B 遺伝子（VIC）は Multiplex アッセイで解析し、b-actin だけ別のウェルで SYBR Green アッセイで解析し、補正させる、という設定などもできます。

このような解析の場合には Association を設定する必要がありません。右の例を参考にしてください。



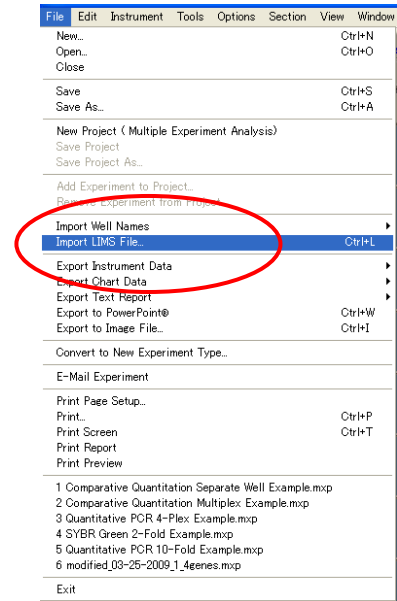
【新機能：複数の normalizer の設定】

Multiplex アッセイの場合でも複数の normalizer を設定することが可能です。

プレートセットアップへの LIMS データのインポート

MxPro version 4.10 から先端データ管理システムである LIMS (Laboratory Information Management System)からのデータインポート機能が標準装備されています。したがって、自動化ワークフローシステムにも対応が可能です。

LIMS をお使いの場合、プレートセットアップデータ (プレート、ウェルネームなどのウェルの属性データ) を LIMS ファイル (ASCII もしくはテキストフォーマット) からインポートすることができます。



Thermal Profile Setup Quick Protocol

Quantitative PCR (Multiple Standards)および Comparative Quantification (Calibrator)での Thermal Profile (デフォルト)

SYBR Green もしくは Eva Green の実験タイプの場合には、この位置に Dissociation curve のプログラムがデフォルトで入っています。SYBR Green 法での Comparative quantification の際に任意に加えたい場合には「Dissociation curve」のボタンを押すと自動的に Dissociation curve の profile が加わります。

「Quantitative PCR」および「Comparative Quantification」の Experimental type では、デフォルトで上に示す Thermal Profile が表示されます。

また Thermal Profile の上部に、予想される反応時間が表示されます。

上の画面の右側に表示される操作パネルで、Thermal profile の設定を変更することができます。

【Thermal Profile Design】 ここで **Standard** を選択した場合。その下に表示される「Pre-Melt / RT Segment(s)」、「Amplification Segment」、「Dissociation / Melt Segment」を用いて標準的なセグメントを組み合わせ設定することができます。

【Thermal Profile Design】 ここで **Custom** を選択した場合。

その下に表示される **【Add】** で「Segment」、「Plateau with Ramp」、「Data collection marker by dragging」、「All point」、「End point」によって自由な Thermal Profile のデザインができます。



All points:

このアイコンを設定すると、設定された Plateau あるいは Ramp で、できるだけ多くの検出を行います。Ramp に設定された場合、Ramp のスピードは自動的に遅くなり、およそ 0.2 度 / scan 程度の Ramp スピードになります。

Dissociation curve 解析で利用されます。



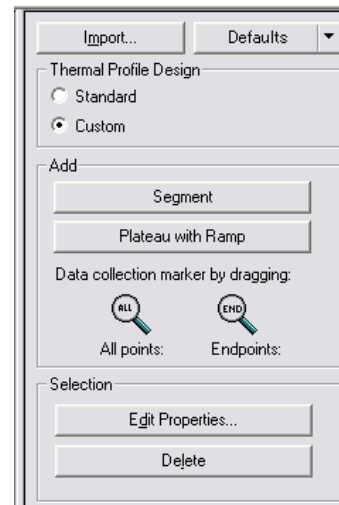
Endpoints:

このアイコンを設定すると、設定された Plateau あるいは Ramp の終点で蛍光検出を行います。設定された Plateau の時間には影響しません。

【Selection】 ここでは、一度設定した Plateau や Ramp、Segment の Property を設定したり、消去したりすることができます。

【Import】 他のファイルで設定された Thermal Profile をインポートすることができます。Import 機能が利用できるのは「Custom」の場合のみです。

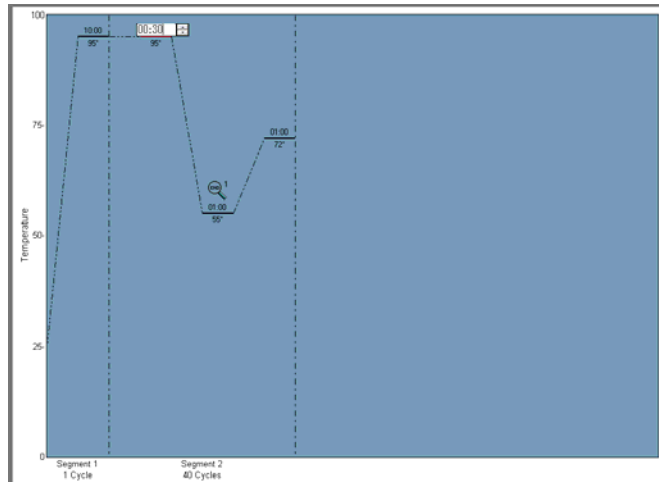
【Defaults】 ユーザー自身で作製した Thermal Profile をデフォルトとして設定することができます。



Thermal Profile の設定方法

【温度の変更】 Plateau をマウスでクリックし、ドラッグすることにより変更することができます。また、温度を直接入力することもできます。

【時間の変更】 Plateau をマウスでクリックし、時間を直接入力します。Ramp のスピードは変更することができません。



【サイクルの変更】 Segment の下にサイクル数が表示されているので、数値を入力して変更します。

【Segment および Plateau の追加と消去】 Thermal Profile 右に表示される操作パネルで行います。

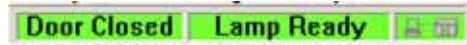
【Data collection marker の追加と消去】 Data collection marker (ムシメガネ) は、操作パネル内のムシメガネをドラッグすることで設定できます。消去はドラッグして Thermal Profile 画面の外に置くと消去されます。

Data collection marker (ムシメガネ) はどの Plateau および Ramp に、いくつでも設定することができます。ただし、Ramp に All point の Data collection marker を設定すると Ramp スピードが遅くなります (0.2 / scan 程度)。

Running the Experiment Quick Protocol

定量 PCR の実験開始

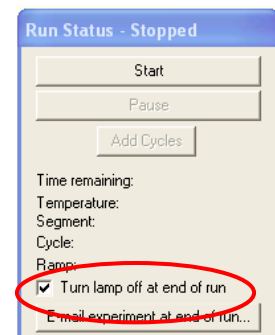
ランプの点灯を確認し、サンプルをロードした後は装置のドアが閉まっていることを画面右下のダイアログで確認してください。



* ランプ点灯後 20 分以内の場合、Lamp Ready の表示ではなく「Lamp Start-up」(黄色) の表示になっています。このまま Run することも可能です。



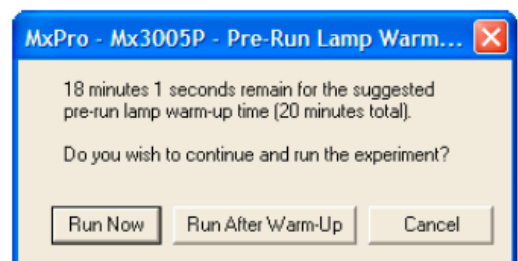
RUN 画面では、右図で示す「Run Status – Stopped」ダイアログが表示され、Mx3000P/Mx3005P の起動を制御します。赤丸で示した「Turn lamp off at end of run」にチェックを入れると実験終了後、自動的にランプが消灯します。Start Run ボタンをクリックすると実験が開始します。「Run Status – Stopped」ダイアログは、Mx3000P/Mx3005P が接続されている場合にのみ表示されます。



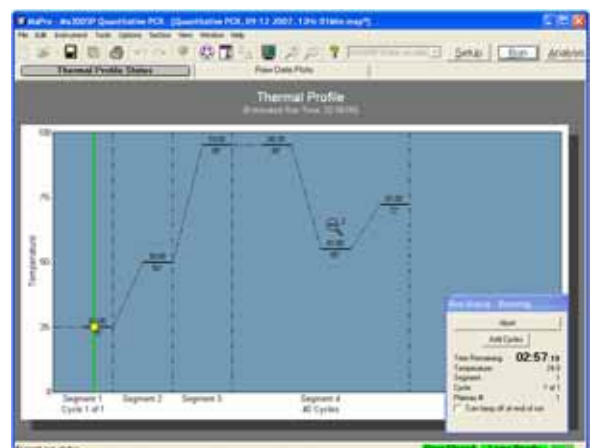
Warming Up の状態でスタートボタンを押し、ファイルを保存後、実験を開始しようとするのと右のようなダイアログが現れます。タングステンランプのウォーミングアップには 20 分を要し、ソフトウェアはその時間をカウントダウンしています。ウォームアップ後ランするのなら

「Run After Warm-Up」を、最初のデータコレクションまで

に 20 分を経過するのなら「Run Now」を、クリックしてください。ランプ点灯後、20 分を経過している場合にはこのダイアログは表示されません。

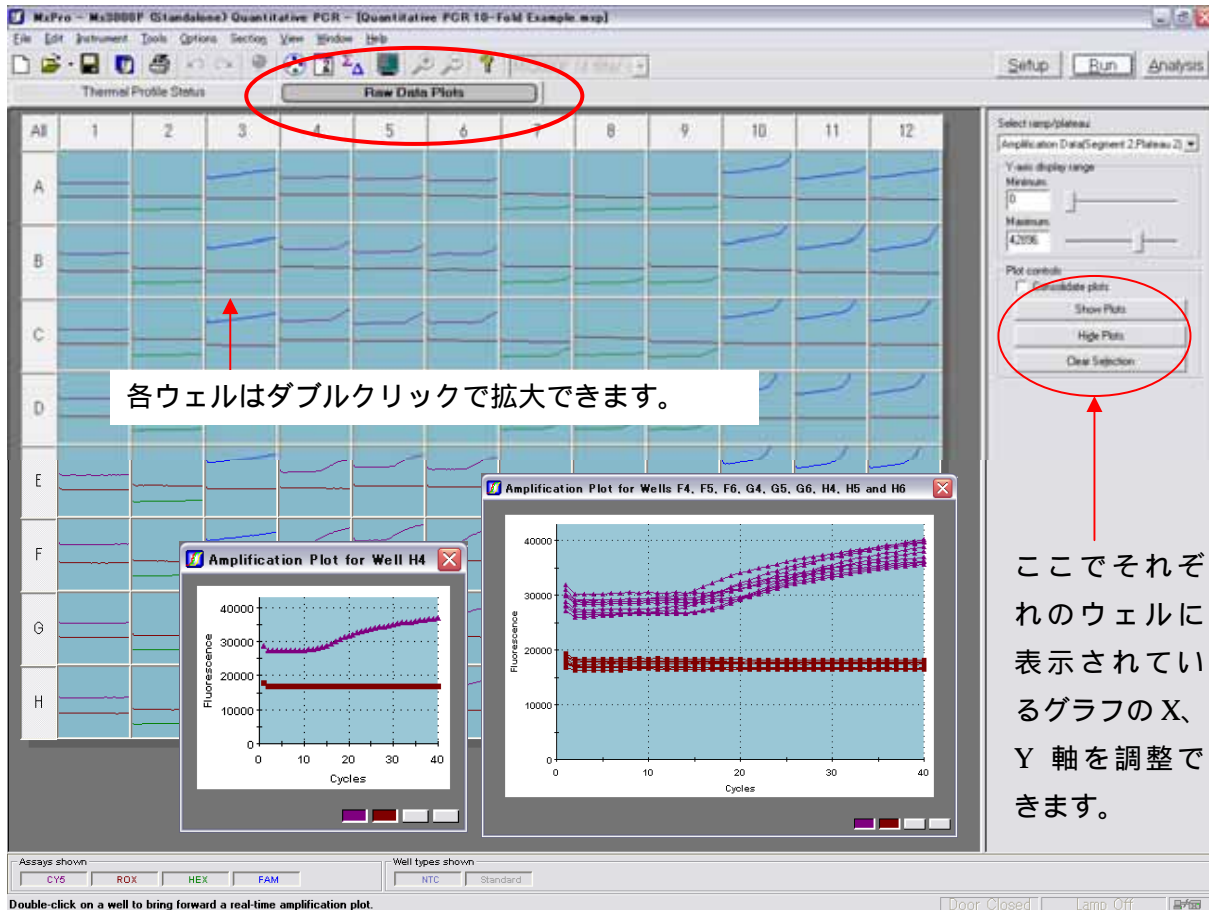


実験中には、右図の Thermal Profile 中に緑の縦方向のマーカーと黄色のボールがサーマルサイクリングプロファイルの進行をトラックしています。

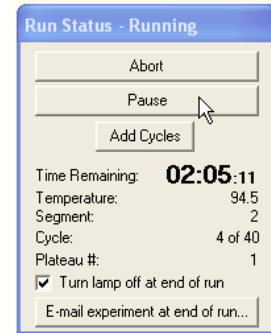


【Raw Data Plots】

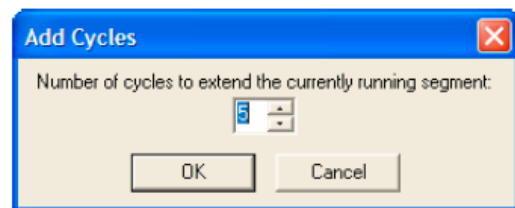
実験中に収集された蛍光データをリアルタイムに見るときは、Raw Data Plots タブをクリックしてください。Raw Data Plots スクリーンではそれぞれのウェルのそれぞれの色素での増幅プロットが表示されています。増幅プロットはウェルを選択し、Show Plots をクリックすることで拡大することもできます（最大9個の well の情報を1度に拡大できます）。サーマルプロファイルが終了するとソフトウェアは自動的にデータを解析するための Analysis セクションへと移ります。



Mx3000P/Mx3005P の実験が行われている間は、右の「Run Status – Running」ダイアログが表示されます。実験の中止やサイクルの追加（**Add Cycle**）を行うことができます。実験中には残り時間やサーマルブロックの温度、Thermal Profile の状態などが表示されます。



PCR のサイクルを追加することができます。その際には、前ページの「Run Status」ダイアログの「**Add cycle**」ボタンをクリックすると右に示すダイアログが開き、数値を入力することでサイクルを追加することができます。



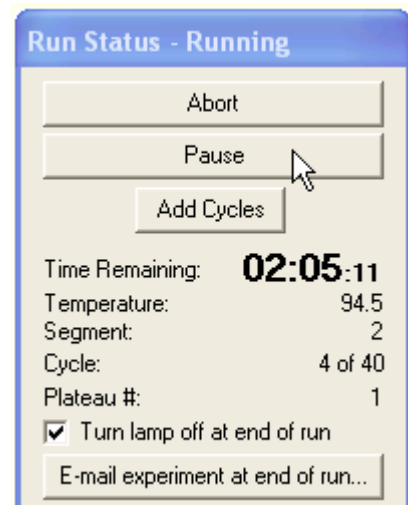
【便利な新機能】

【Pause】 Run 中に Pause ボタンをクリックすることで、Thermal profile のどの位置でも Run を一時中断することが可能です。途中でサンプルを取り出したり、試薬を添加したりすることも可能です。

サンプルチューブはとても熱くなっていることがあるので取扱いには注意してください。

Run を再開させるには「Continue」ボタンが表示されますので、サンプルを再度セットした後に、「Continue」ボタンで再開させてください。

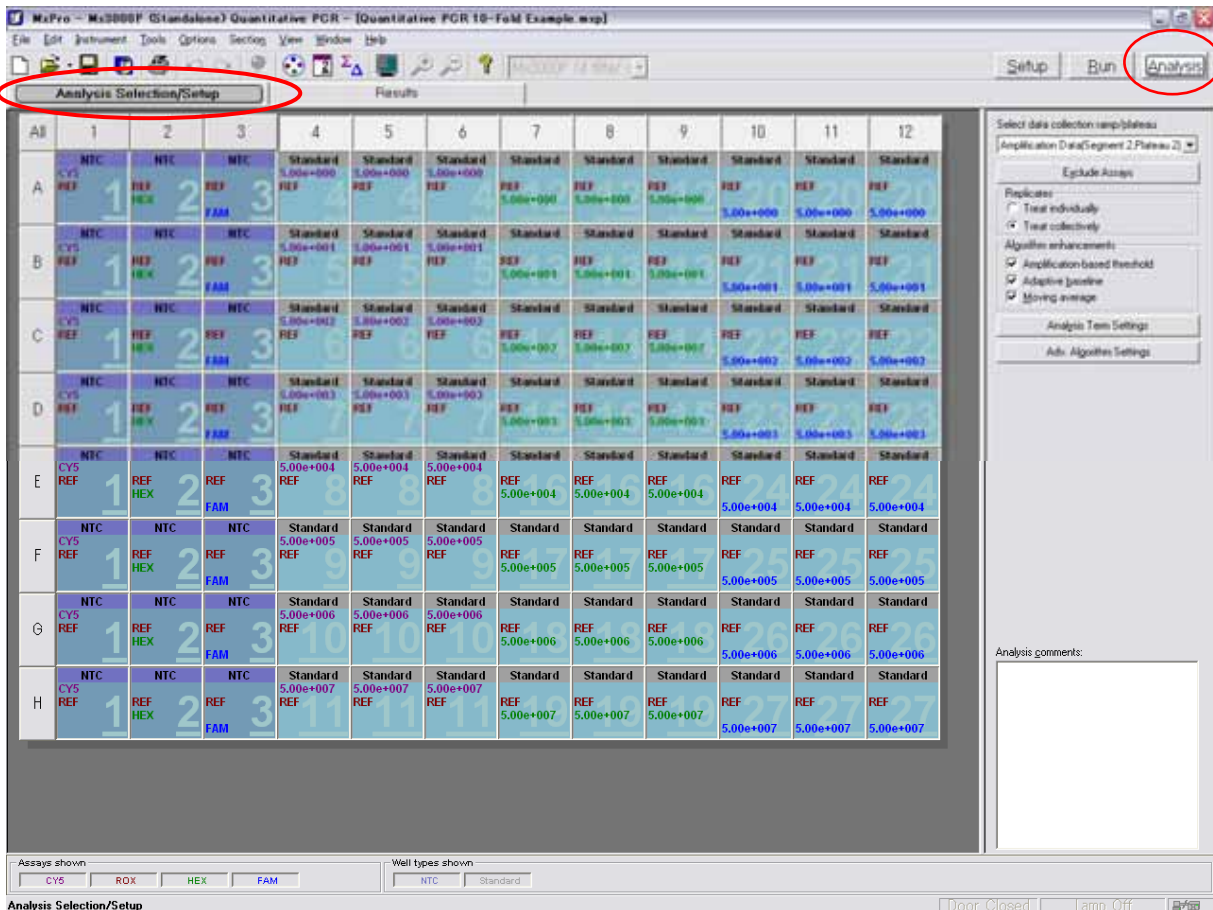
【E-mail experiment at end of run...】 Run 終了後、設定された実験ファイルを指定のメールアドレスに送信することが可能です。この機能を利用するためには、Mx3000P/ Mx3005P 接続の PC のメールソフトウェア、インターネット環境の設備が必要です。



Data Analysis Quick Protocol

【Analysis / Selection Setup 画面】

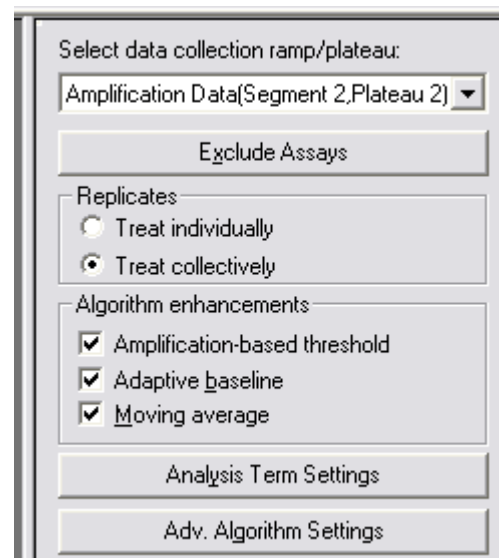
Quantitative PCR (Multiple standard)の解析が終わると、下に示すような「Analysis」画面の「Analysis Selection / Setup」画面になります。





最初に、解析したいウェルをマウスで選択します。

画面右側に表示される操作パネルで、【**Select data Collection ramp / plateau**】で解析すべきデータを選択します。

【**Exclude Assays**】では、選択されているウェルのデータを解析から取り除くことができます。

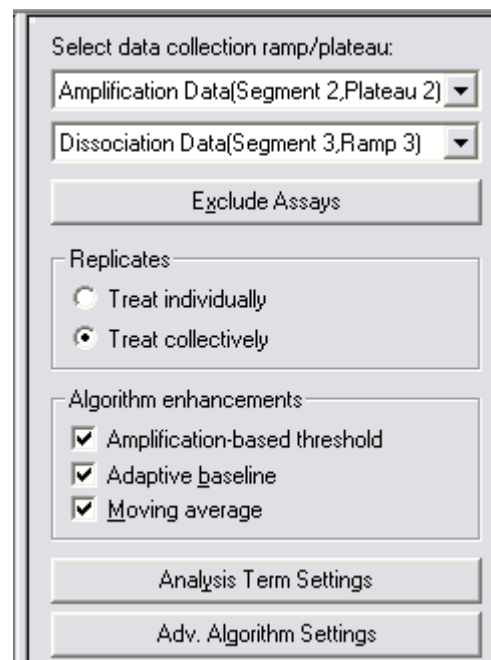


【Replicates】は、平均データで表示するか、個々のデータで表示するかを選択できます。アイコン  と同様の操作ですが、ここで選択することもできます。「Treat individually」は個々のデータ表示で、「Treat collectively」は平均化データの表示です。

【Algorithm enhancements】では、「Amplification-based threshold」、「Adaptive baseline」、「Moving average」を選択できます。アイコン 、あるいは【Analysis Term Setting】ボタンを利用すれば、Analysis Term Setting ダイアログが開き、さらに詳細な設定が可能です。

【Adv. Algorithm Settings】は、「Data Collection Marker」で複数の検出を設定した場合に使用するアルゴリズムです。デフォルトでは「Average（平均データでの表示）」になっています。

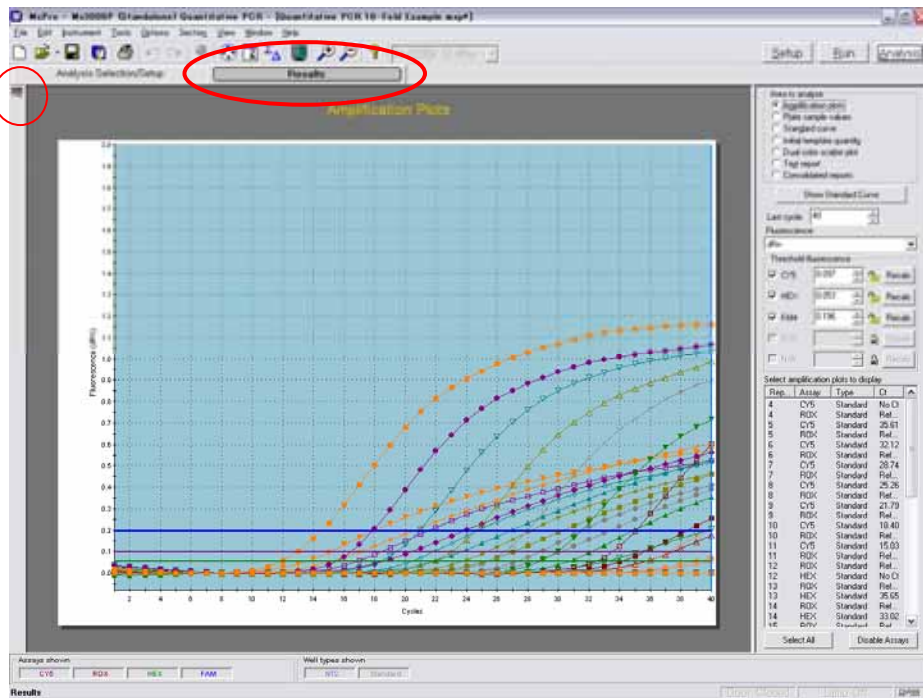
SYBR Green アッセイ時などの【Select data collection ramp/plateau:】 Dissociation curve 解析を行った場合には、ここに「Dissociation Data」が表示されますので、Dissociation curve 解析をすべきデータを選択します。



The screenshot shows a software dialog box with the following elements:

- Section: Select data collection ramp/plateau:
 - Dropdown 1: Amplification Data(Segment 2,Plateau 2)
 - Dropdown 2: Dissociation Data(Segment 3,Ramp 3)
 - Button: Exclude Assays
- Section: Replicates
 - Radio button: Treat individually
 - Radio button: Treat collectively (selected)
- Section: Algorithm enhancements
 - Checked checkbox: Amplification-based threshold
 - Checked checkbox: Adaptive baseline
 - Checked checkbox: Moving average
- Buttons: Analysis Term Settings, Adv. Algorithm Settings

【Results 画面】



「Results」(赤丸)画面を開くと、上のように、「Analysis / Selection Setup」画面で選択されたウェルについての解析結果が表示されます。画面右側の操作パネルでさまざまな解析結果を表示することができます。

ここは「Customized Tool bar」です。自分の好きなショートカットを作成することができます。

Amplification plots 表示の際のパネルの説明

【Area to analyze】 このラジオボタンで選択された解析が表示されます。

【Show Standard Curve】 このボタンをクリックすると 1 画面に Amplification plot と Standard curve を表示することができます。

【Last cycle】 Amplification plot の endpoint を決めることができます。

【Fluorescence】 R (Multicomponent view)、dR、Rn、dRn の表示切替ができます。

【Threshold fluorescence】 Threshold line の表示、マニュアル / オートでの高さの変更、Threshold line のロックなどができます。

Threshold line をロックすると、Analysis / Selection Setup 画面でデータを外しても Threshold line が再計算によって変更されなくなります。

【Select amplification plots to display】 表示されているデータの表示を切り替えます。マウスで選択されたものの表示のみを切り替えます。解析から取り除かれることはありません。表示のみの切り替えです。

Area to analyze

- Amplification plots
- Plate sample values
- Standard curve
- Initial template quantity
- Dual color scatter plot
- Text report
- Consolidated reports

Show Standard Curve

Last cycle: 40

Fluorescence: dRn

Threshold fluorescence

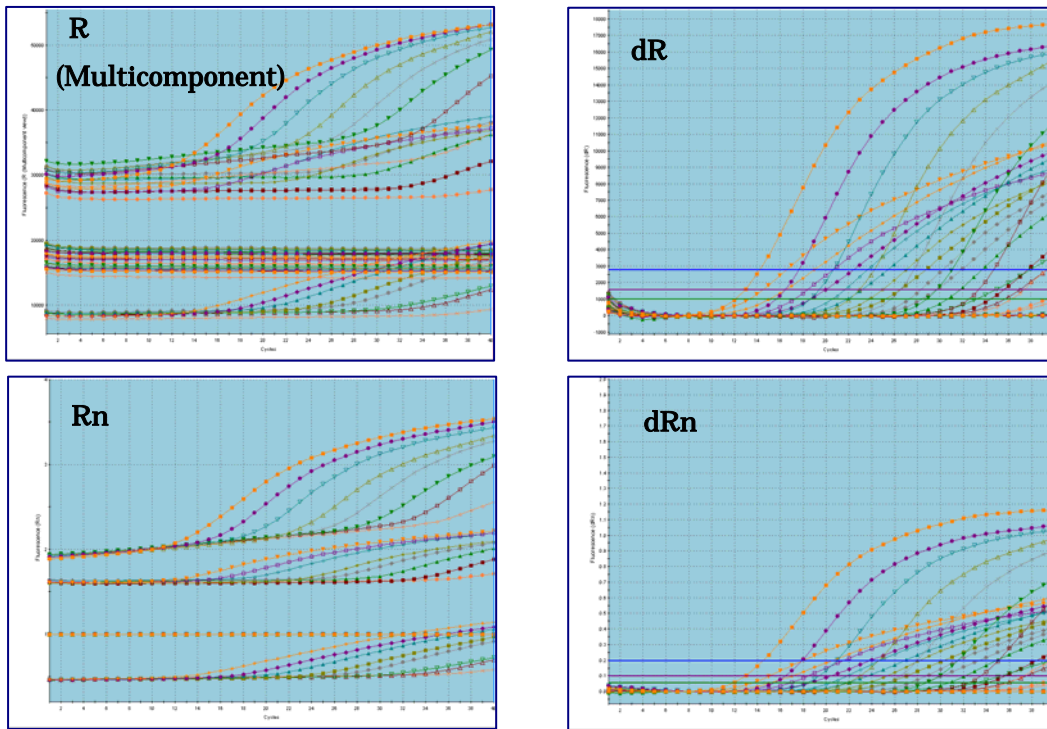
<input checked="" type="checkbox"/> CY5	0.097	Recalc
<input checked="" type="checkbox"/> HEX	0.053	Recalc
<input checked="" type="checkbox"/> FAM	0.196	Recalc
<input type="checkbox"/> N/A		Recalc
<input type="checkbox"/> N/A		Recalc

Select amplification plots to display

Rep...	Assay	Type	Ct
4	CY5	Standard	No Ct
4	ROX	Standard	Ref...
5	CY5	Standard	35.61
5	ROX	Standard	Ref...
6	CY5	Standard	32.12
6	ROX	Standard	Ref...
7	CY5	Standard	28.74
7	ROX	Standard	Ref...
8	CY5	Standard	25.26
8	ROX	Standard	Ref...
9	CY5	Standard	21.79
9	ROX	Standard	Ref...
10	CY5	Standard	18.40
10	ROX	Standard	Ref...
11	CY5	Standard	15.03
11	ROX	Standard	Ref...
12	ROX	Standard	Ref...
12	HEX	Standard	No Ct
13	ROX	Standard	Ref...
13	HEX	Standard	35.65
14	ROX	Standard	Ref...
14	HEX	Standard	33.02
15	ROX	Standard	Ref...

Select All Disable Assays

【Fluorescence】補足



【Show Standard Curve】を利用すると、Amplification plot と Standard curve が同一画面に表示されます。Standard curve には RSq や Eff も同時に表示され、amplification plot の threshold line をマニュアルで変更すると、連動して RSq、Eff も変更されます。

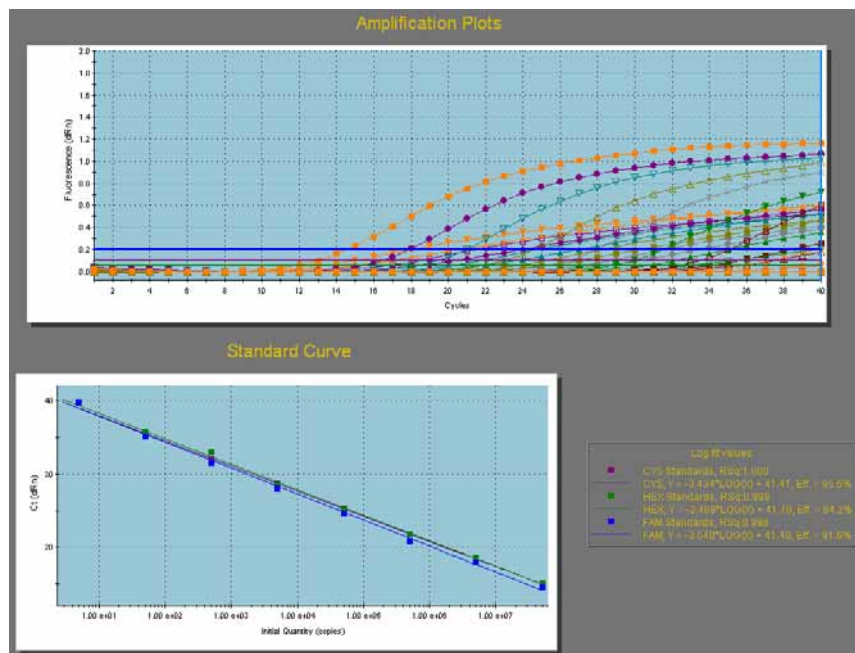


Plate sample values

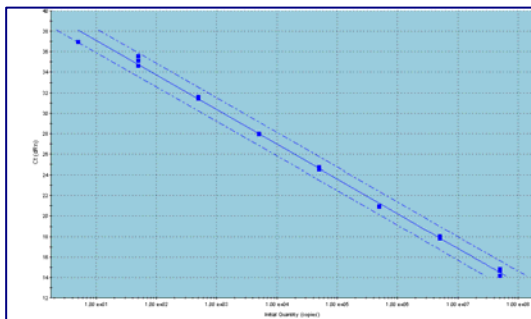
選択されているウェルに蛍光値あるいは Ct 値を表示させます。

AB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Standard 36.13 Ref	Standard 35.96 Ref	Standard 36.21 Ref	Standard 36.13 Ref	Standard 36.13 Ref	Standard 36.26 Ref	Standard 36.13 Ref	Standard 36.13 Ref	Standard 36.13
B				Standard 35.56 Ref	Standard 35.89 Ref	Standard 35.27 Ref	Standard 35.85 Ref	Standard 35.43 Ref	Standard 35.99 Ref	Standard 35.54 Ref	Standard 35.31 Ref	Standard 34.61
C				Standard 33.37 Ref	Standard 34.31 Ref	Standard 32.83 Ref	Standard 32.94 Ref	Standard 34.13 Ref	Standard 33.53 Ref	Standard 33.89 Ref	Standard 33.36 Ref	Standard 33.33
D				Standard 35.63 Ref	Standard 35.73 Ref	Standard 35.49 Ref	Standard 35.63 Ref	Standard 35.43 Ref	Standard 35.46 Ref	Standard 35.26 Ref	Standard 35.81 Ref	Standard 37.36
E				Standard 35.42 Ref	Standard 35.38 Ref	Standard 35.27 Ref	Standard 35.43 Ref	Standard 35.36 Ref	Standard 35.21 Ref	Standard 34.68 Ref	Standard 34.52 Ref	Standard 34.36
F				Standard 33.58 Ref	Standard 33.79 Ref	Standard 33.28 Ref	Standard 33.96 Ref	Standard 33.33 Ref	Standard 33.94 Ref	Standard 33.99 Ref	Standard 33.99 Ref	Standard 33.99
G				Standard 34.54 Ref	Standard 35.17 Ref	Standard 35.26 Ref	Standard 35.36 Ref	Standard 35.14 Ref	Standard 35.84 Ref	Standard 35.83 Ref	Standard 37.26 Ref	Standard 37.36
H				Standard 33.26 Ref	Standard 33.27 Ref	Standard 34.44 Ref	Standard 33.94 Ref	Standard 33.36 Ref	Standard 33.31 Ref	Standard 34.63 Ref	Standard 34.31 Ref	Standard 34.61

Standard Curve

【Show Amplification Plots】このボタンをクリックすると、1画面上に Standard curve と Amplification Plots を表示させることができます。

【Show confidence interval:】ここにチェックを入れると、設定されたレベルの confidence interval を表示させることができます。



【Threshold fluorescence】ここで Standard curve を見ながら threshold line を調整することができます。

【Initial template quantity calculator】Ct 値をインプットすることで初期テンプレート量を計算させることができます。

【Amplification efficiency calculator】Slope もしくは Eff をインプットすることで増幅効率を計算させることができます。

Area to analyze

Amplification plots
 Plate sample values
 Standard curve
 Initial template quantity
 Dual color scatter plot
 Text report
 Consolidated reports

Show Amplification Plots

Ct based on:
dRn

Show confidence interval
Level (%): 99.0

Threshold fluorescence

CY5: 0.097 Recalc
 HEX: 0.053 Recalc
 FAM: 0.196 Recalc
 N/A: Recalc
 N/A: Recalc

Initial template quantity calculator

Select assay: CY5 Ct: Interpolated qty:

Amplification efficiency calculator

Slope: Eff. (%):

Initial template quantity

プレート形式で各ウェルに standard curve 解析で得られた初期テンプレート量や Ct 値を表示させることができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct	Standard No Ct
B				Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001	Standard 5.00e+001
C				Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002	Standard 5.00e+002
D				Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003	Standard 5.00e+003
E				Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004	Standard 5.00e+004
F				Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005	Standard 5.00e+005
G				Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006	Standard 5.00e+006
H				Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007	Standard 5.00e+007

Text Report

テキストレポートでは、データを項目を選んでテキスト形式でレポートさせることができます。

項目を選択
できます。

エクスポートの形式
を選択できます。

フィルター別、遺伝子
別等で表示の切り替え
ができます。

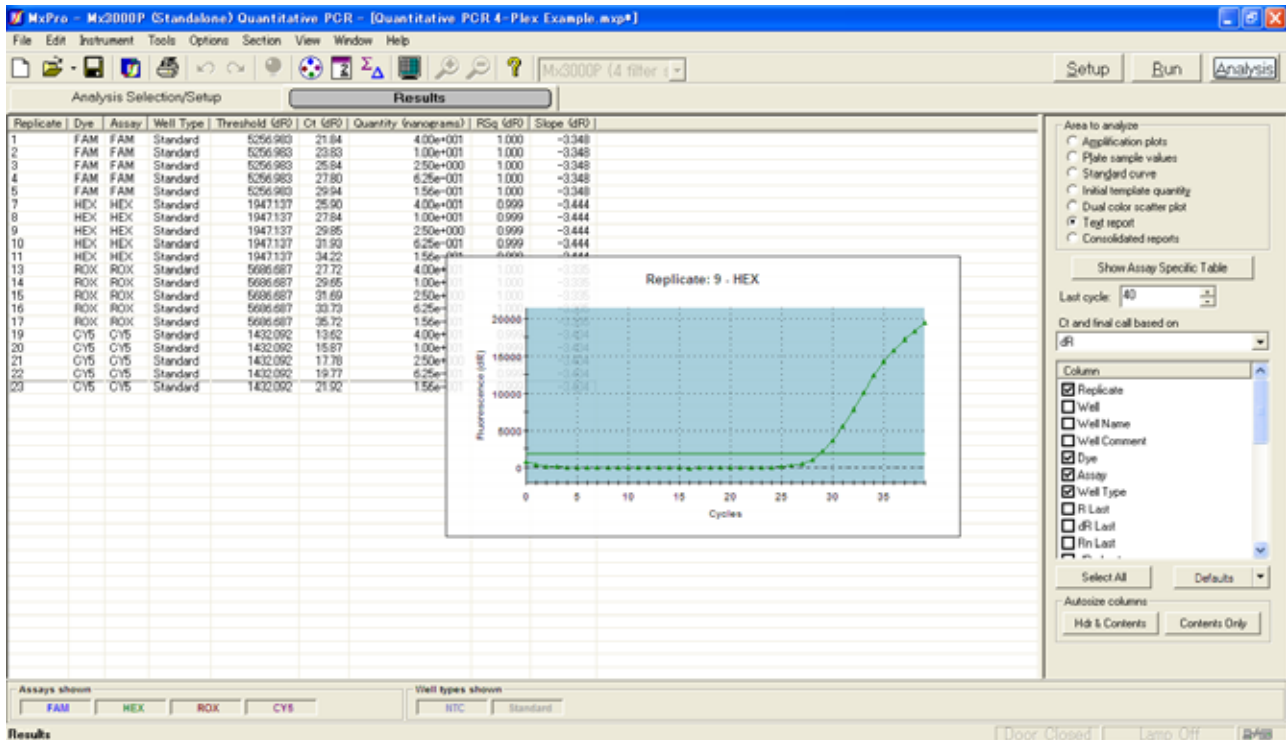
Assay	Quantity	Copyes?	Rn	RFn	RFn2	RFn3	RFn4	RFn5	RFn6	RFn7	RFn8	RFn9	RFn10	RFn11	RFn12
No Ct	Reference	No Ct	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+000	Reference	5.00e+000	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+001	Reference	5.00e+001	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+002	Reference	5.00e+002	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+003	Reference	5.00e+003	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+004	Reference	5.00e+004	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+005	Reference	5.00e+005	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+006	Reference	5.00e+006	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
5.00e+007	Reference	5.00e+007	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference

グラフやテキストレポートを含む、表示された全ての画面については「File」メニューより、Power Point 形式、エクセル形式（チャート形式）でエクスポートすることが可能です。

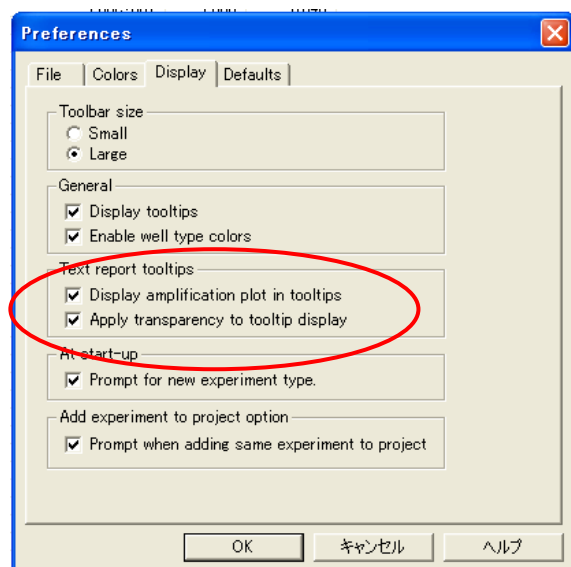
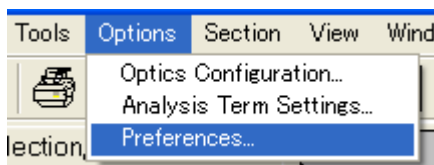
- Export Instrument Data
- Export Chart Data
- Export Text Report
- Export to PowerPoint®
- Export to Image File...

【新機能：テキストレポートでの amplification plot 表示】

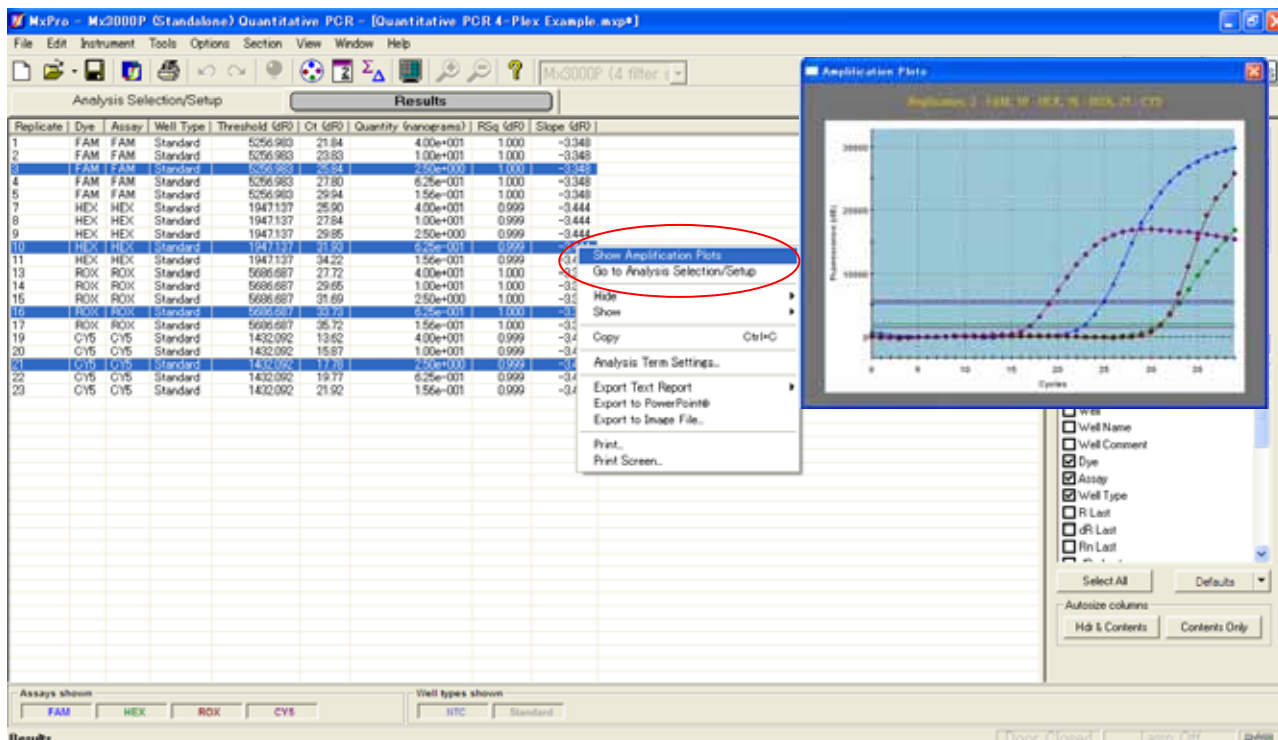
テキストレポートの表示の際、各カラムにマウスのポインターを載せることで amplification plot が表示されます。



この設定を行うためには、右に示す「Options」メニューから「Preferences...」を選択し、Preferences ダイアログ内の Text Report tooltips で設定をすることができます。

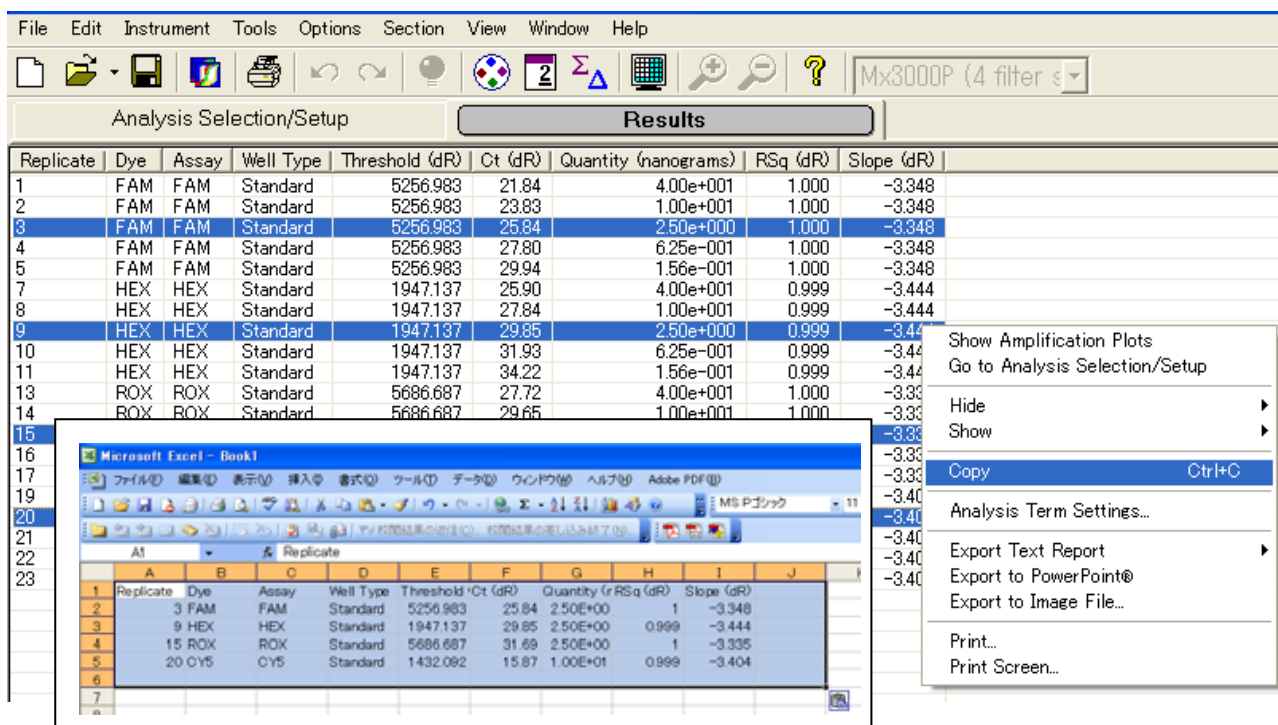


また、テキストレポートで選択されたカラムの amplification plot を表示させることも可能です。表示させたいカラムをマウスで選択し（離れたカラムは Ctrl キー、連続したカラムは Shift キー）マウスの右クリックで、メニュー内の「Show Amplification Plots」コマンドで表示させることができます。



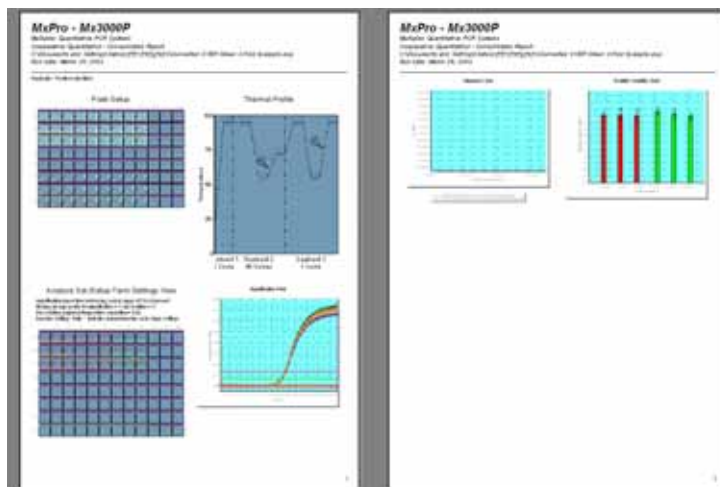
【新機能：選択したテキストレポートのエクセルへのコピー＆ペースト】

テキストレポート内のコピーしたカラムをマウスで選択し、コピーしてエクセルなどにペーストすることが可能です。



Consolidated Report

Consolidated report 形式を選択すると、データ項目を選んで右図のように表示、プリントアウトさせることができます。



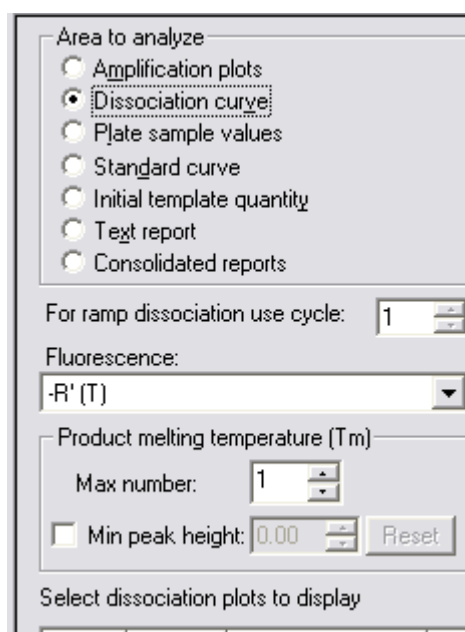
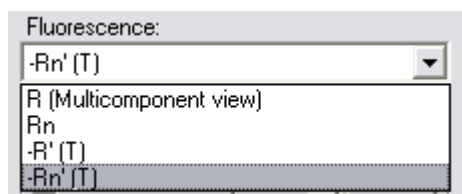
Dissociation Curve (for SYBR or Eva Green Assays)

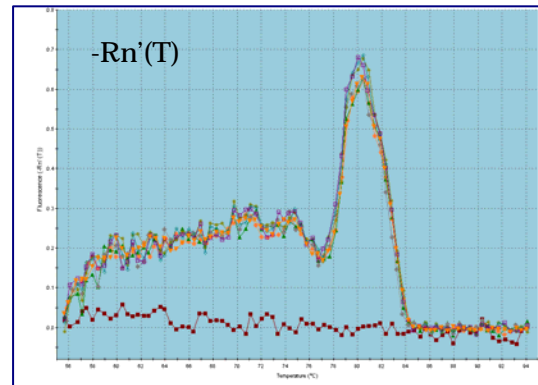
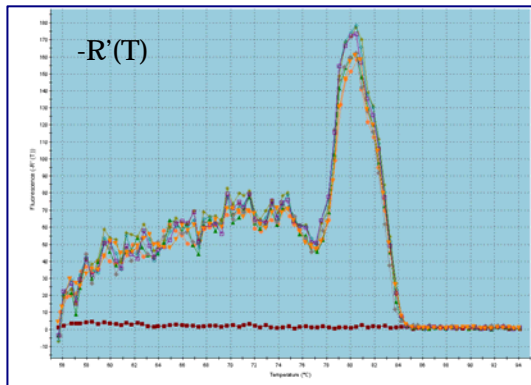
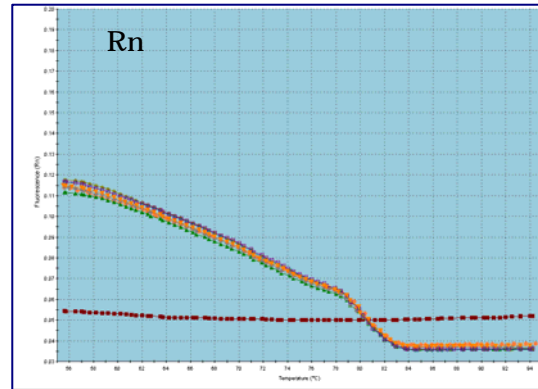
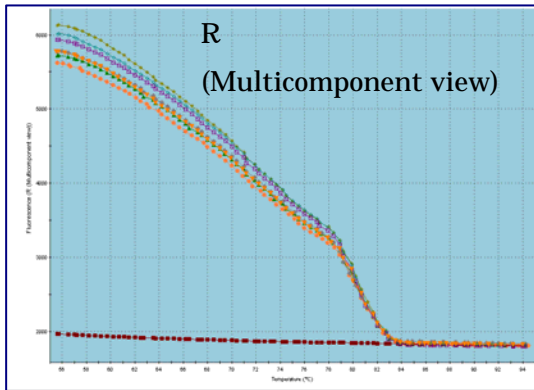
Dissociation curve 解析は SYBR Green あるいは Eva Green の Experimental type が選択されている場合のみ Results 画面で解析することができます。Quantitative PCR の Experimental type でも Thermal profile で Dissociation curve 設定し実行することはできますが、解析することができません (Results 画面に Dissociation curve 解析のモードがありません)。このような場合には、Experimental type のコンバートを行い、SYBR Green の Experimental type にコンバートすることによって Dissociation curve 解析ができるようになります。

【Dissociation curve】 このモードは、Experimental Type が SYBR Green あるいは Eva Green のときのみ、Results 画面で表示されます。ここを選択すると Dissociation curve 解析を行うことができます。

【For ramp dissociation use cycle:】 Cycle increment を利用した Dissociation curve 解析の際に利用します。デフォルトでの Ramp で All point 検出を行った際には利用しません。

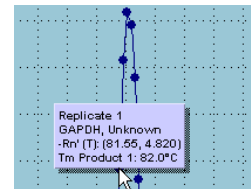
【Fluorescence】 ここをクリックすると下に示すような表示に変更することができます。





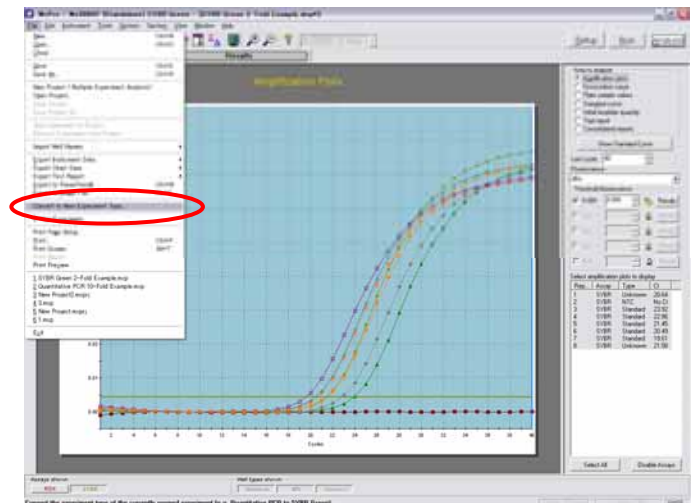
【Product melting temperature (Tm)】 Tm を表示するピークの数を変更することができます。また **【Min peak height】** では、ピークとすべき高さの設定ができます。

Dissociation curve のプロットにマウスを当てると、フラッグが表れ、Tm などを含む該当サンプルの情報が表示されます。



Experimental type のコンバートの方法

Experimental type のコンバートは、「File」メニュー内の「Convert Experimental Type」コマンドで行うことができます。

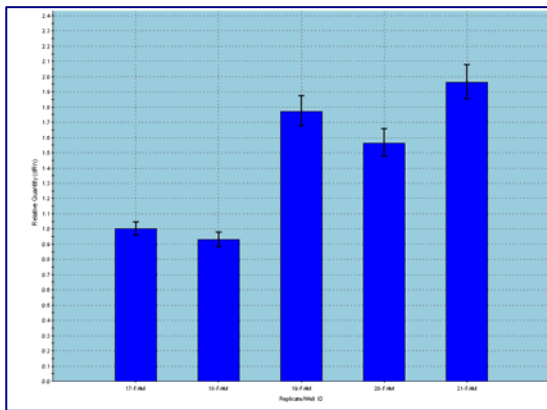


Relative quantity (Comparative quantification の際にのみ利用可能です)

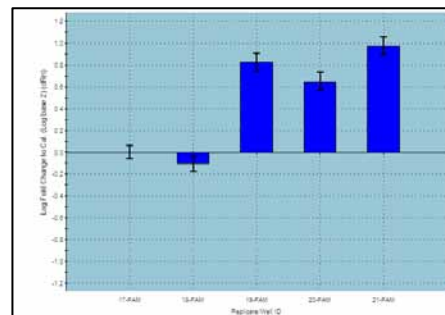
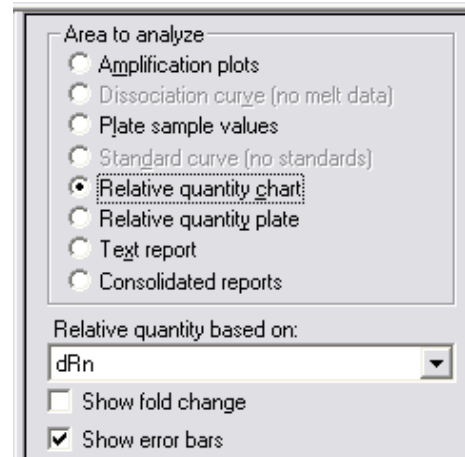
相対定量解析や遺伝子発現解析で用いられる Comparative quantification の Experimental type でのみ「Relative quantity_chart」および「Relative quantity_plate」の解析モードがあります。

相対定量解析の方法については別項を参考にして下さい。

【Relative quantity chart】では、Calibrator に設定されたウェルの Ct 値に対する相対定量値を下に示すようなグラフとして表示させることができます。

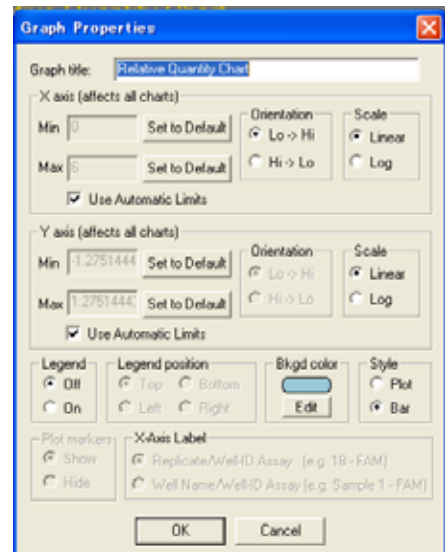


【Show fold change】にチェックを入れると log2 Fold change のグラフを、【Show error bar】にチェックを入れるとエラーバーが表示されます。



グラフ画面をダブルクリックすると、右の「Graph Properties」ダイアログが開き、X・Y 軸の調整、スケールの変更、色の調整、説明の調整など、さまざまなグラフ表示をさせることができます。

(p74 参照)



【Relative quantity plate】では、右に示すように Calibrator に対する相対定量値をプレート画面に表示させることができます。

Alt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
B							1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
C							6.536	6.536	6.536	6.536	6.536	6.536
D							1.77	1.77	1.77	1.77	1.77	1.77
E							1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
F							1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96
G												
H												

【Text report】では、Calibrator に対する相対定量値の他、Standard に対する相対定量値 (Rel. Quant. to Std)や Normalizer (house keeping gene など)に対する相対定量値 (Rel. Quant. to Norm.)を計算させレポートすることができます。

Area to analyze

- Amplification plots
- Dissociation curve (no melt data)
- Plate sample values
- Standard curve (no standards)
- Relative quantity chart
- Relative quantity plate
- Text report
- Consolidated reports

Show Assay Specific Table

Last cycle:

Ct and relative quantity based on:

Melting temperature (Tm) results based on:

Column

- Ct SD Treated Ind.
- Rel. Quant. to Norm. (dRn)
- Rel. Quant. to Norm. Avg. (dRn)
- Rel. Quant. to Norm. SD (dRn)
- Rel. Quant. to Norm. Cv (dRn)
- Rel. Quant. to Cal. (dRn)
- Log Fold Change to Cal. (dRn)

Select All Defaults

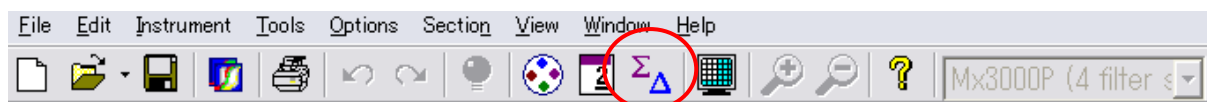
Autosize columns

Hdr & Contents Contents Only

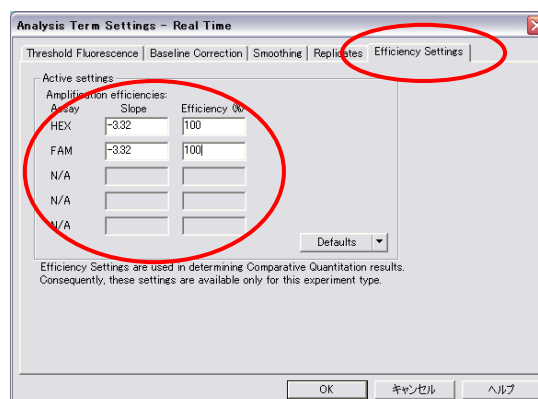
増幅効率のインプット

相対定量解析の際に、各測定サンプルの増幅効率を加味した Ct 法による計算をさせたい場合は、増幅効率をマニュアルでインプットし、MxPro ソフトウェアで計算させることができます。

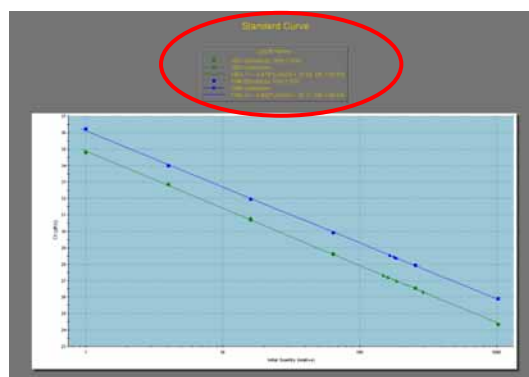
下に示した赤丸のアイコンをクリックすると「Analysis Term Setting」ダイアログが開きます。



右のダイアログが開いたら、「Efficiency Setting」タブをクリックし、各遺伝子の増幅効率をインプットします。このように設定することにより、相対定量計算に増幅効率が加味されます。増幅効率をインプットしない場合には 100% として計算されています。



右図のように Normalizer と Target 遺伝子それぞれの standard curve を行った場合、Standard curve のグラフ画面にそれぞれの増幅効率が表示されます（赤丸内）。この数値を Efficiency Setting にインプットします。



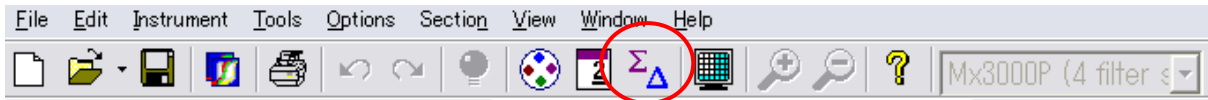
インプットされた増幅効率は、下に示す計算式の「Eff」(Eff = Efficiency) に代入され、計算されます。

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

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

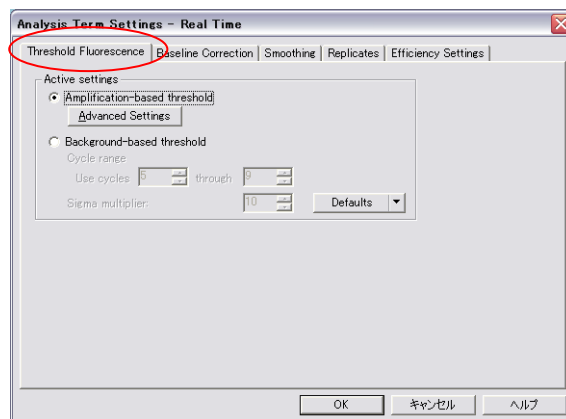
Threshold line、Baseline、Moving average の設定変更方法

下に示すアイコンをクリックすると Analysis Term Setting ダイアログが開きます。



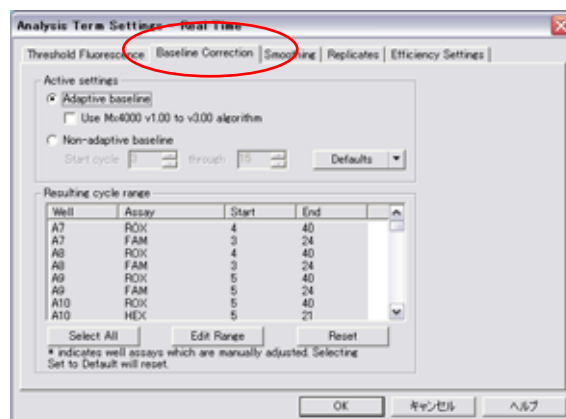
【Threshold line のアルゴリズム設定】

右のダイアログ (Threshold Fluorescence) でアルゴリズムを変更することができます。



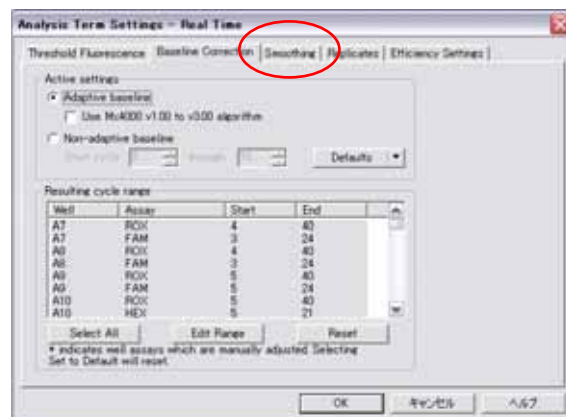
【Baseline のアルゴリズム設定】

右のダイアログ (Baseline Correction) で Baseline 設定のアルゴリズムの変更ができます。



【Moving average の設定】

右のダイアログ (Smoothing) で Moving average の設定変更ができます。



グラフなどの設定変更方法 (Graph Properties)

Amplification plot、Dissociation curve、Standard curve、Dual color plot、Relative quantity chart などのグラフの表示方法の変更は、グラフ上をマウスでダブルクリックし、右に示す Graph Properties を表示させて変更することができます。

【X axis】: 最大・最小値の設定。方向の変更、スケールの変更

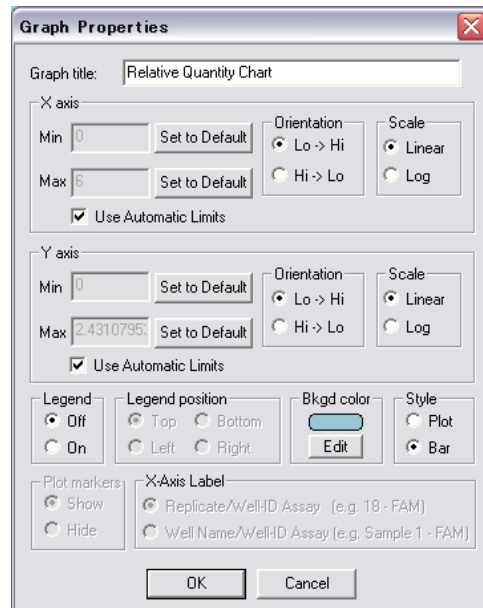
【Y axis】: 最大・最小値の設定。方向の変更、スケールの変更

【Legend】: On/Off。 添付位置。

【Bkgd colors】: グラフのバックグラウンドの色設定。

【Style】: プロット形式とバー形式の選択。

【X-Axis Label】: Plate Setup の際に Well ID がインプットされていれば、これをグラフ中に表示させることができます。



複数プレートでの定量解析 (Multiple experiments analysis)

MxPro Ver.4.10 ソフトウェアでは、複数のプレートで解析したデータを合わせて解析することができます。この解析方法では、複数の絶対定量解析の結果、あるいは相対定量解析の結果を合わせて解析することができます。いずれの解析でも、複数のプレートの結果を合わせる場合、**同じ機種 (Mx3000P あるいは Mx3005P)、同じフィルターセット、同じ実験タイプ、同じ Thermal profile であることが条件**となります。

(1) 複数のプレートで行った絶対定量解析の結果を合わせる場合

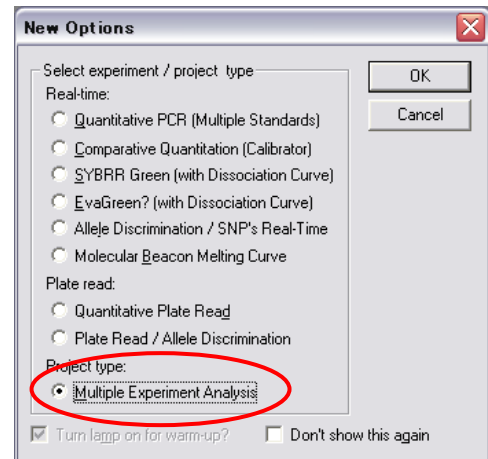
ここでは、Exp.1.mxp というファイルで unknown サンプルと Standard curve 解析を行い、同様の実験を Exp.2.mxp というファイルで unknown のみを行った場合、Exp.1.mxp の Standard curve 解析の結果を利用して Exp.2.mxp の絶対定量結果を出す方法を示します。

Exp.1.mxp							Exp.2.mxp			
All	1	2	3	4	5	6	All	1	2	3
A	Unknown	Unknown	Unknown	Standard	Standard	Standard	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 1	REF 1	REF 1	REF 8	REF 8	REF 8	REF 1	REF 1	REF 1	
	SYBR	SYBR	SYBR	1.25e-001	1.25e-001	1.25e-001	SYBR	SYBR	SYBR	
B	Unknown	Unknown	Unknown	Standard	Standard	Standard	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 2	REF 2	REF 2	REF 9	REF 9	REF 9	REF 2	REF 2	REF 2	
	SYBR	SYBR	SYBR	2.50e-001	2.50e-001	2.50e-001	SYBR	SYBR	SYBR	
C	Unknown	Unknown	Unknown	Standard	Standard	Standard	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 3	REF 3	REF 3	REF 10	REF 10	REF 10	REF 3	REF 3	REF 3	
	SYBR	SYBR	SYBR	5.00e-001	5.00e-001	5.00e-001	SYBR	SYBR	SYBR	
D	Unknown	Unknown	Unknown	Standard	Standard	Standard	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 4	REF 4	REF 4	REF 11	REF 11	REF 11	REF 4	REF 4	REF 4	
	SYBR	SYBR	SYBR	1.00e+000	1.00e+000	1.00e+000	SYBR	SYBR	SYBR	
E	Unknown	Unknown	Unknown	NTC	NTC	NTC	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 5	REF 5	REF 5	REF 12	REF 12	REF 12	REF 5	REF 5	REF 5	
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	
F	Unknown	Unknown	Unknown	No RT	No RT	No RT	Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 6	REF 6	REF 6	REF 13	REF 13	REF 13	REF 6	REF 6	REF 6	
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	
G	Unknown	Unknown	Unknown				Unknown	Unknown	Unknown	
	REF 7	REF 7	REF 7				REF 7	REF 7	REF 7	
	SYBR	SYBR	SYBR				SYBR	SYBR	SYBR	
H										

これまでは、2つのプレートで別々に実験が行われると、amplification plot をあわせることができなかったため、Ct 値を共通の threshold line で得ることができず、そのため複数のプレートの結果を合わせたり、他のプレートで行われた Standard curve 解析の結果を利用することが困難でした。

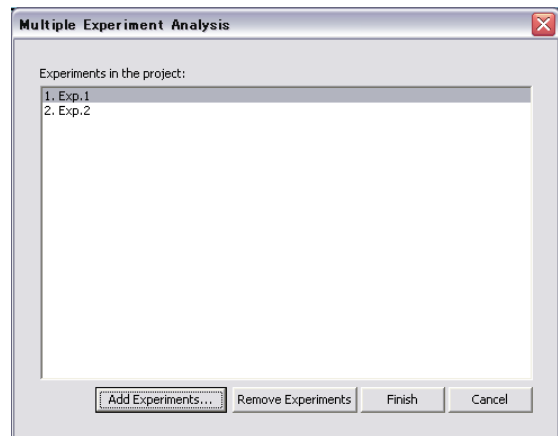
MxPro ソフトウェアで複数のプレートの結果を合わせる場合、ソフトウェアを立ち上げたときに表れる右の New Options ダイアログで赤丸で示した「Multiple Experiment Analysis」を選択します。

「Multiple Experiment Analysis」は Mx3000P/Mx3005P に接続されている PC では、Standalone でソフトウェアを立ち上げた場合にのみ利用可能となります。



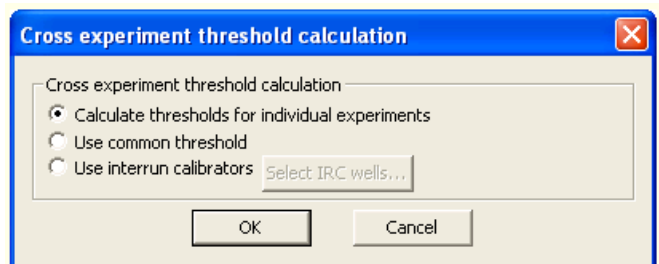
「Multiple Experiment Analysis」ダイアログが開きます。「Add Experiments」ボタンで、実験ファイルをアップロードします。終了したら、「Finish」ボタンを押します。

「Remove Experiments」ボタンでファイルを外すことも可能です。



【新機能：Multiple experiment analysis での threshold line 設定方法】

MxPro ver.4.10 では、Multiple experiment analysis の際に threshold line の設定方法を選択し、自動的に設定させることが可能です。

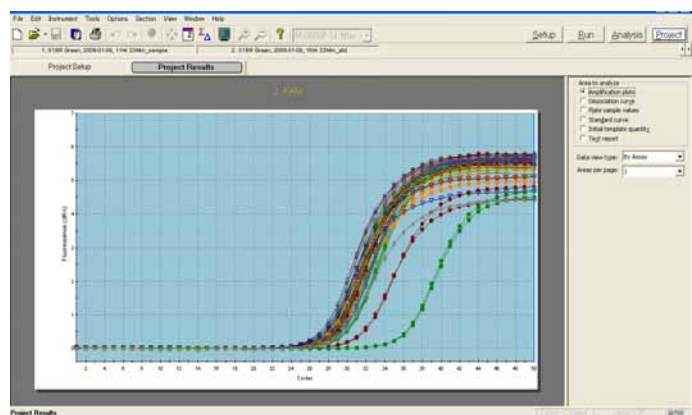


プレート（実験）間における threshold line の互換性

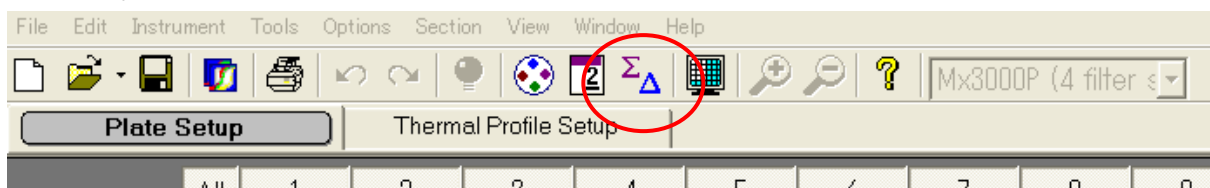
Method 1) Calculate thresholds for individual experiments

この method を選択した場合、それぞれの実験で threshold line が設定され、new project のデフォルトではそれぞれの実験で「Background-Based Threshold Algorithm」によって設定されます。通常の解析のデフォルトである「Amplification-Based Threshold Algorithm」に比べ「Background-Based Threshold Algorithm」での threshold line は、実験間の互換性は高くなります。

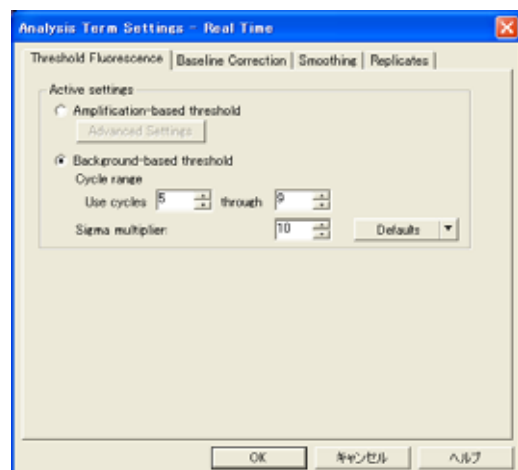
この method が選択されている場合、Data view type が「By Experiment」の時のみ threshold value が表示されることになります。この場合、ひとつのアッセイにつき複数の threshold line が存在することになるので、「By Assay」もしくは「Consolidated」という Data view type の場合には threshold line が表示されません。



マニュアルで threshold line を設定する場合、Background based で設定することが推奨されます。変更の方法は、下図の赤丸で示す「Analysis Term Setting」アイコンをクリックすると下のダイアログが開きます。

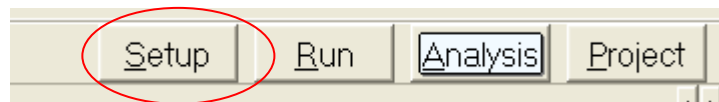


「Threshold Fluorescence」→
「Background-based threshold」を選択し、
「Cycle range」を設定して Background-based threshold に変更してください。

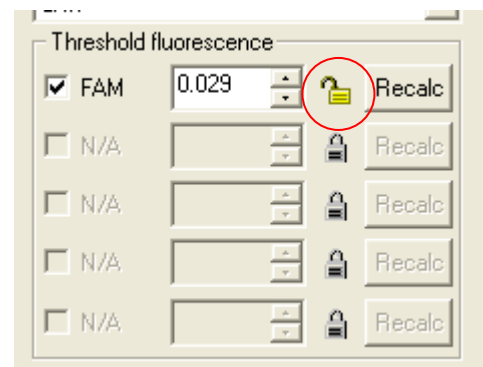


このように Background-based threshold アルゴリズムで threshold line をあわせることができますが、そのためには個々のプレートの amplification plot でバックグラウンドの蛍光シグナルが同様でなければなりません。実験の条件を合わせることもとても重要です。試薬、そのロット、ROX の量などの条件が合っていることがとても重要です。

バックグラウンドの条件がほぼ合っていたとしても、微妙に threshold line の高さがずれるケースが多いので、その場合は Setup 画面で各 amplification plot で調整します。



右に示す「Threshold fluorescence」で threshold line の高さを調節し、Lock のアイコンを利用して threshold line の高さを固定させると便利です。



このように threshold line を合わせることができ、別プレートの standard curve を利用することができますが、そのためには、amplification plot のバックグラウンド、シグナル強度、ROX 量などが一致していることが条件です。

試薬のメーカーやロット、時間的な誤差が気になる場合には各プレートに standard を設定するか、少なくとも IRC (Inter-run control)を設定することをお勧めします(Method 3)。最も互換性のある threshold line を決定することができます。

Method 2) Use common threshold

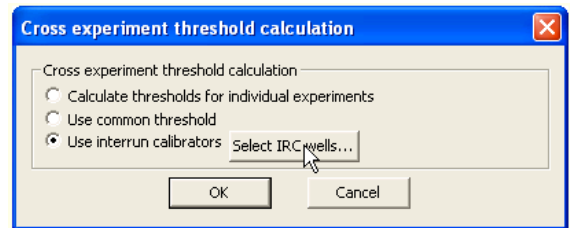
この method が選択されている場合、実験間で共通の threshold line を設定するために MxPro ソフトウェアはそれぞれの実験の蛍光データを再計算します。この時、Project で選択されている全ての assay、ウェルのデータから threshold line の再計算が行われるので、それぞれ独立した threshold line の設定による Ct 値の影響を考える必要がなくなります。

この設定の場合には、いずれの Data view type(By Experiment, By Assay, Consolidated)でも threshold line が表示されることとなります。

Method 3) Use interrun calibrators

この方法は、それぞれの実験で「Interrun calibrator (IRC)」を Run し、その Ct 値に基づいて共通の threshold line を設定する方法です。この方法が Multiple experiment analysis を行う際にも最も正確な方法とされています（参考文献：Hellems et al., Genome Biology, 2007; 8(2): R19）。この方法を選択した場合、IRC は共通のサンプルであり、プレート内の同じ位置（同じ Well Id）に設定されている必要があります。

IRC を設定する場合には、「Select IRC Wells...」ボタンをクリックし、IRC に設定されたウェルを選択してください。

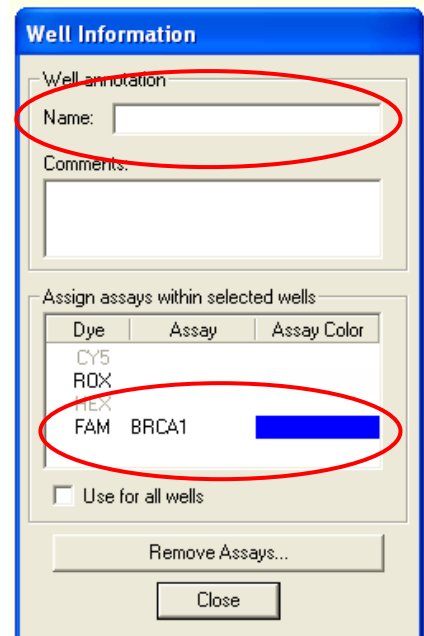


プレート（実験）間におけるアッセイ（ターゲット遺伝子）およびサンプルの互換性

Multi Experiment Analysis でのプレート間の互換性は、次のように行われます。

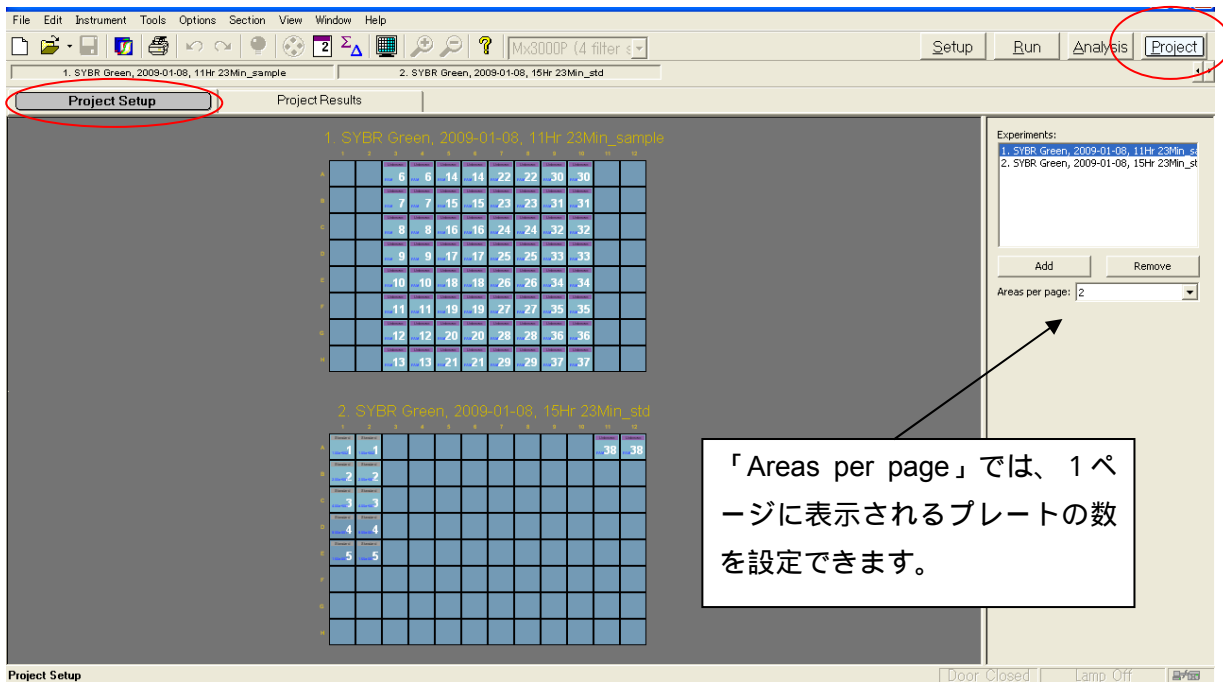
- (1) サンプルの互換性：Well name
- (2) ターゲット遺伝子互換性：Assay name

右に示す「Well information」の設定で、同じサンプルが実験間でまたがっている場合は Well name を合わせてください。また、ターゲット遺伝子が実験間でまたがっている場合には Assay name を合わせるようにしてください。



Multi Experiment Analysis の開始

「Project」画面の「Project Setup」画面にアップロードされたファイルのプレートが表示されます。おのこのファイルの設定を変更したい場合は、この画面から「Setup」、「Run」、「Analysis」画面に移動することもできます。

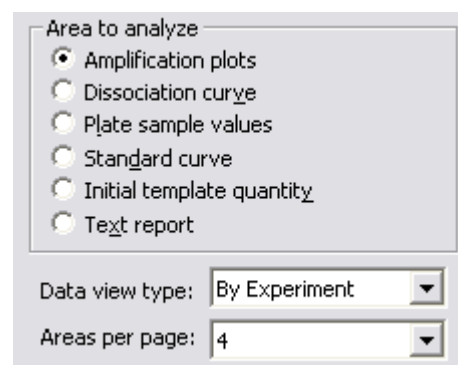


Project Results

Project Results 画面では、複数のプレートを合わせて右に示す解析を行うことができます。

Area to analyze で解析したい項目を選択します。結果が表示されます。

Data view type では、By Experiment、By Assay、Consolidated を選択できます。



Amplification plot 画面では、選択された実験、選択されたサンプルについての amplification plot が表示されます。「Fluorescence (dRn や dR などの設定)」は、Setup 画面で個々に設定されているものが反映されます。

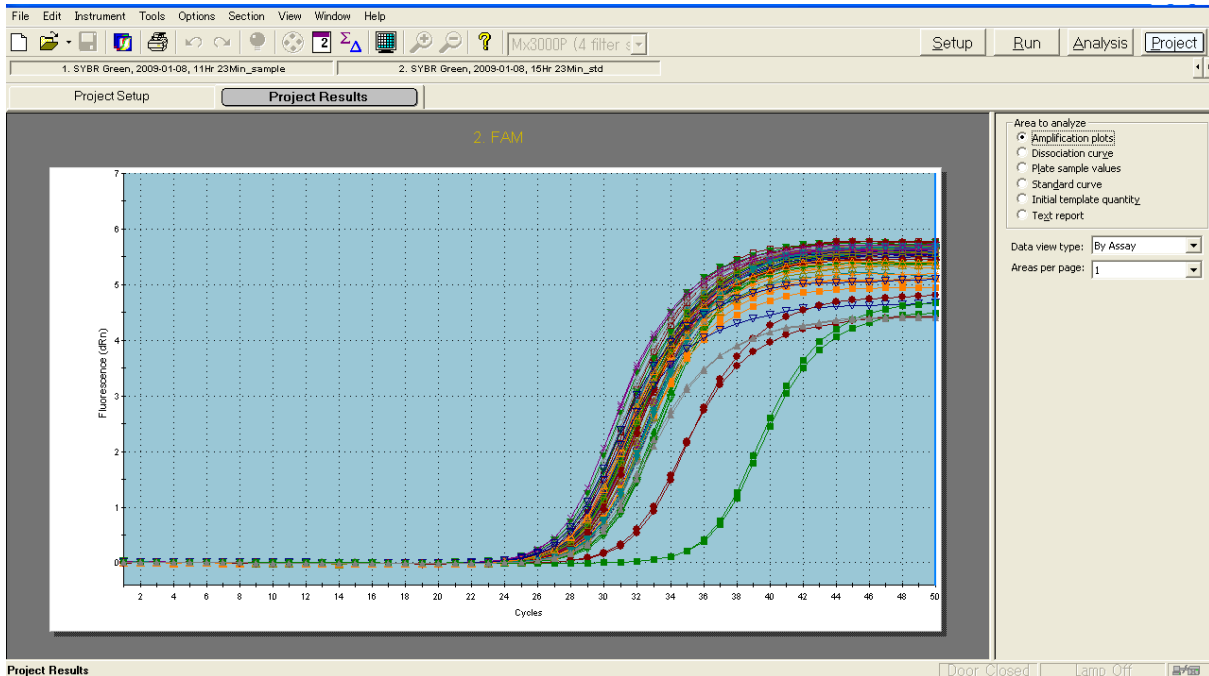
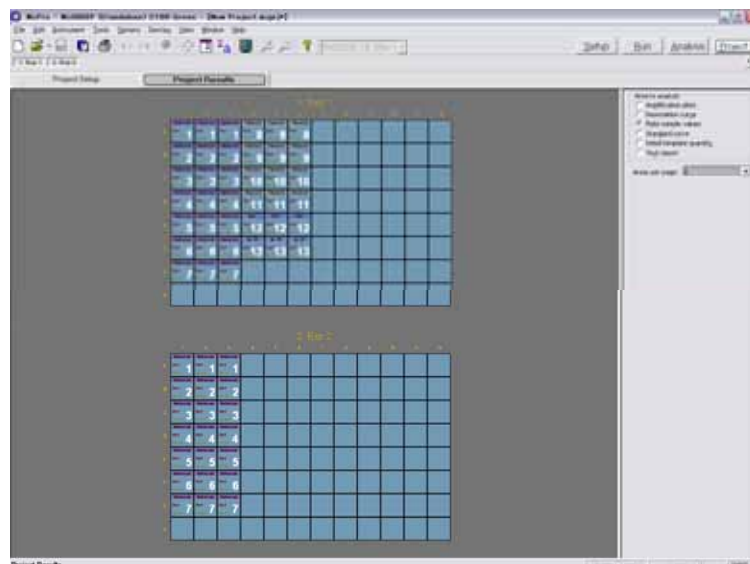
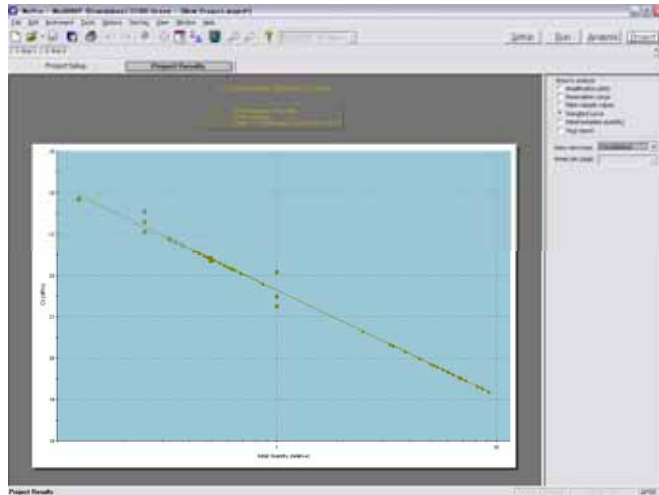


Plate sample value 画面では、プレート形式で各ウェルに Ct 値が表示されます。

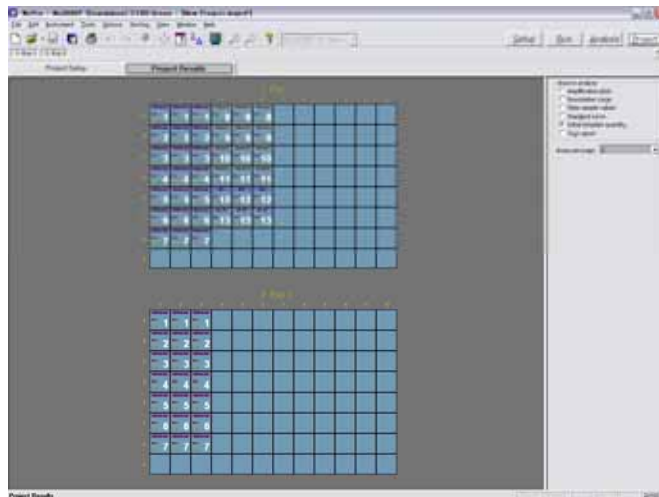


Standard curve では、Consolidated で表示された Amplification plot から得られた Ct 値に基づく Standard curve 解析が行われます (Consolidated)。

By Experiment、By Assay で表示させることも可能です。



Initial template quantity では、プレート形式で各ウェルに Standard curve 解析で得られた初期テンプレート量が表示されます。



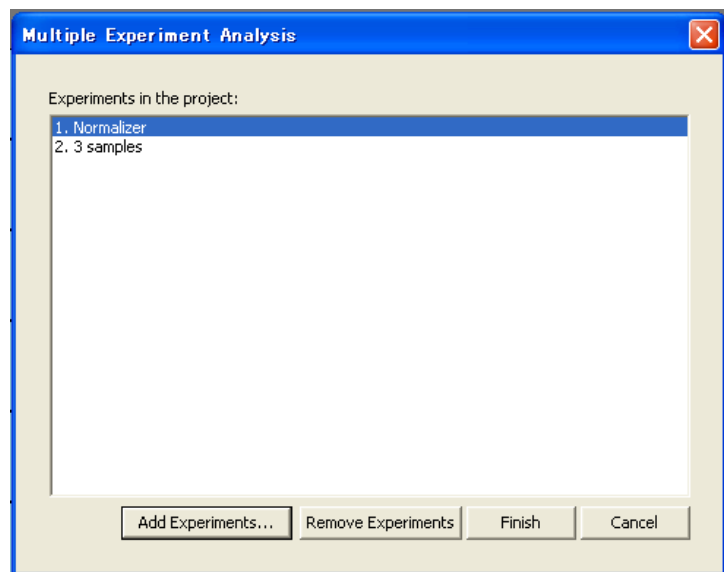
Text report では、操作パネルの Column で選択された項目についての結果をレポート形式で表示させることができます。

(2) 複数のプレートで行った相対定量解析の結果を合わせる場合

MxPro Ver.4.10 ソフトウェアでは、複数のプレートで行った相対定量解析の結果を合わせて解析・表示させることができます。

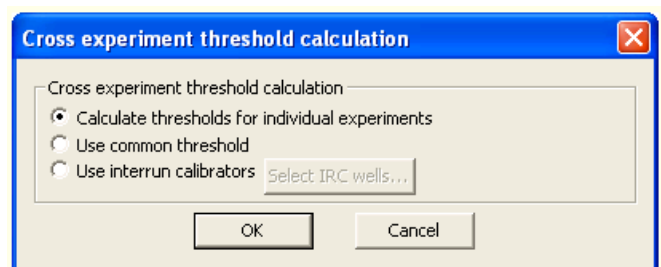
ここではいくつかのサンプルについて、1つの実験で Normalizer のみを、もう1つの実験で3つの遺伝子について別々にアッセイし、その結果をまとめて相対定量解析を行う例を示します。

最初に「Multiple Experiment Analysis」を開き、2つのファイルを選択します。ここでは、「Normalizer」というファイルと「3 samples」というファイルを開きます。



【新機能：Multiple experiment analysis での threshold line 設定方法】

相対定量解析 (Comparative quantification) での Multiple experiment analysis の際にも threshold line の設定方法を選択し、自動的に設定させることが可能です (p77 参照)。



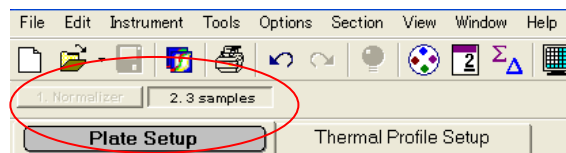
(1) プレートセットアップ

6サンプルについて、1枚目のプレートでは house keeping gene を、2枚目のプレートでは遺伝子 A、B、C についてアッセイします。 Inter-run control (Standard)としていくつかの希釈系列を同時にアッセイしています。

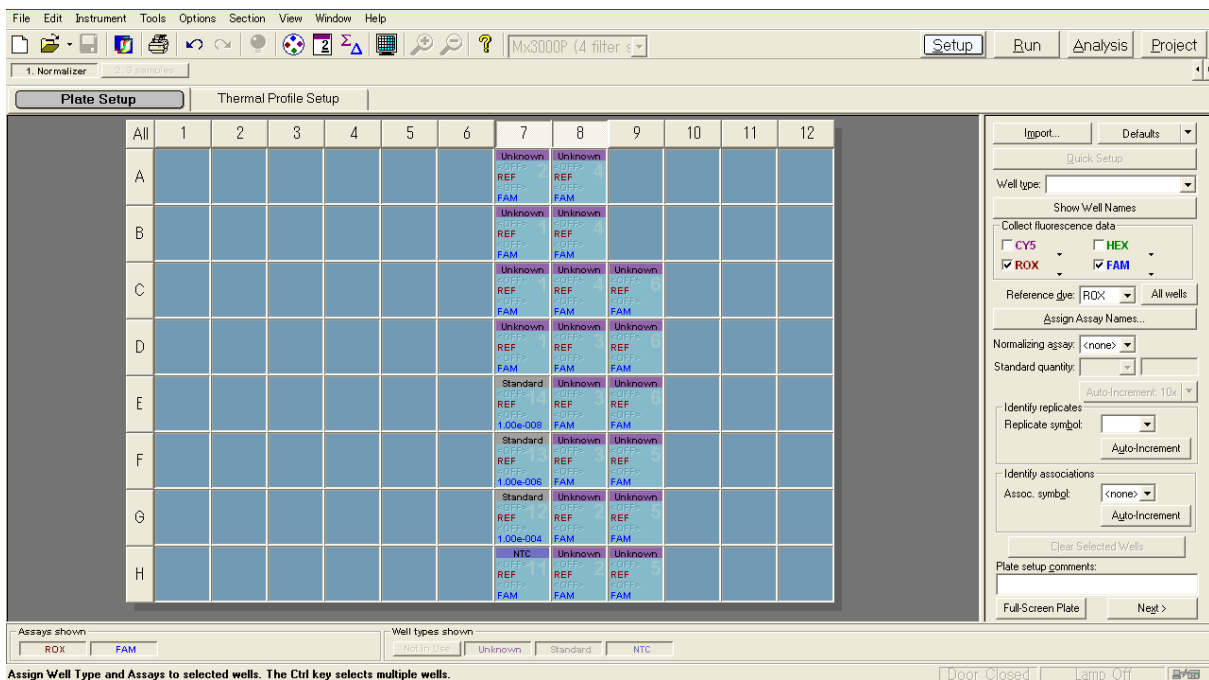
プレートのセットアップを示します。

プレートのセットアップは、各プレートで行います。

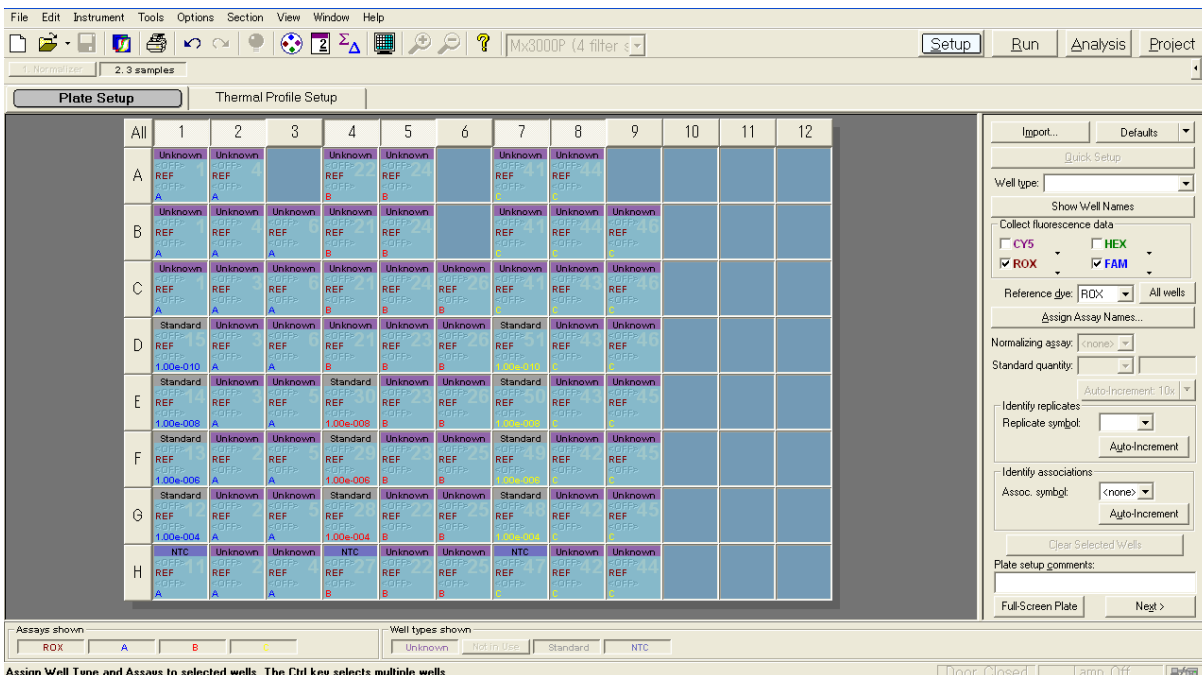
選択されたファイルが画面左上（赤丸）に表示されているので、各ファイルを開きプレートのセットアップを行います。



1枚目 (Normalizer)



2 枚目 (左より遺伝子 A、B、C)

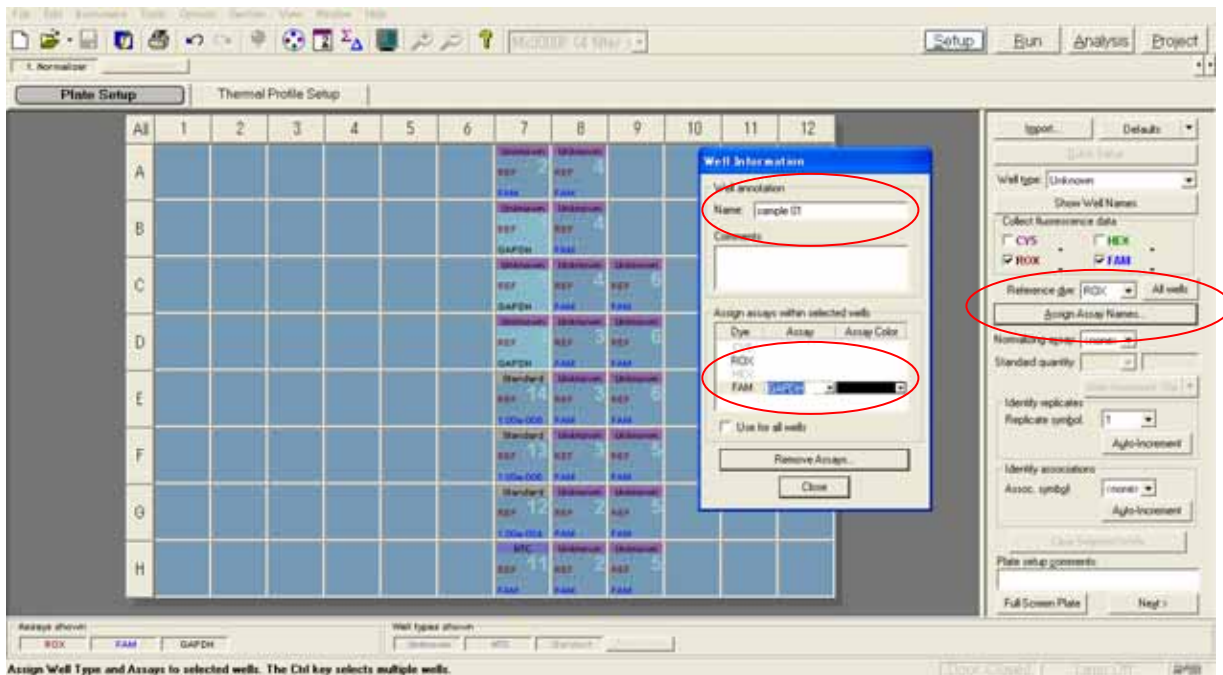


・ Normalizer のセットアップ

最初は右のようにセットアップされています。両アッセイは相対定量解析を行うため「Comparative quantification」で行われます (別の Experiment type で行った場合は Convert して下さい)。

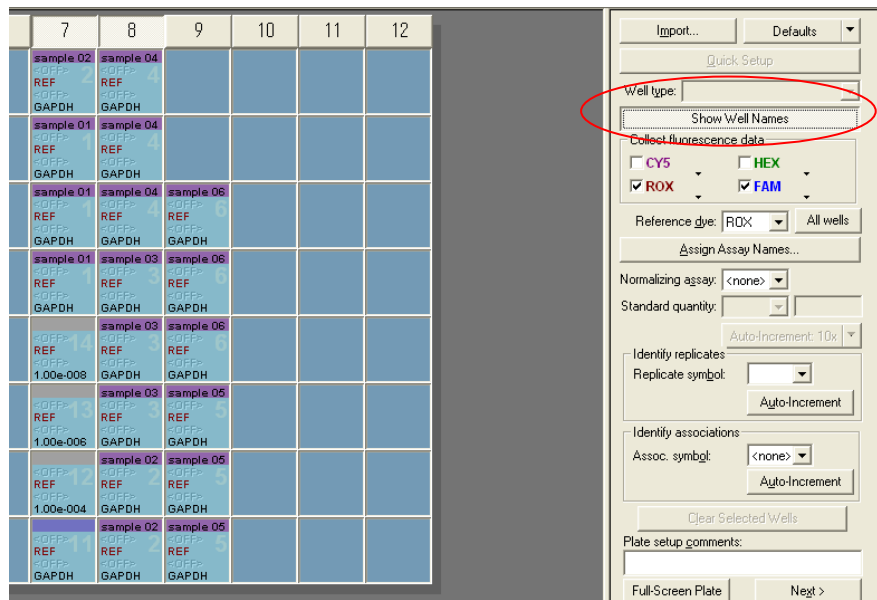
もう1枚のプレートでも同じサンプルがアッセイされているはずです。遺伝子 A、B、C、そして Normalizer について、同じサンプルであることをソフトウェアに認識させるためには、Well information の Well Name に互換性を持たせる (同じサンプルには同じ Well name が設定されている) 必要があります。

	7	8	9
Unknown	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
FAM	FAM	FAM	
Unknown	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
FAM	FAM	FAM	
Unknown	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
FAM	FAM	FAM	
Standard	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
1.00e-008	FAM	FAM	
Standard	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
1.00e-006	FAM	FAM	
Standard	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
1.00e-004	FAM	FAM	
NTC	Unknown	Unknown	
REF	REF	REF	
FAM	FAM	FAM	



Replicate #1 のサンプルを「Sample 01」と設定してみます。「Name」に「Sample 01」と入力します。遺伝子 A、B、C についても「Name」に同じ「Sample 01」と入力することで、サンプル間に互換性を持たせます。また「Assay」にアッセイ名を入力します。ここでは「GAPDH」と入力し、カラーを決定していきます。同様に sample 02～sample 06、Standard の設定も行います。

「Show Well Names」で各ウェルで Well Name を表示させ、確認すると便利です。



GAPDH のウェル全てを「Normalizer」に設定し「Calibrator」の設定を行います（ここでは Replicate #1 (sample 01) を「Calibrator」に設定しました）
また、Association symbol も設定します。

	7	8	9	10	11	12
Unknown	Unknown					
REF	REF					
<OFF>	<OFF>					
NORM	NORM					
Calibrator	Unknown					
<OFF>	<OFF>					
REF	REF					
<OFF>	<OFF>					
NORM	NORM					
Calibrator	Unknown	Unknown				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
REF	REF	REF				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
NORM	NORM	NORM				
Standard	Unknown	Unknown				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
REF	REF	REF				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
1.00e-008	NORM	NORM				
Standard	Unknown	Unknown				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
REF	REF	REF				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
1.00e-006	NORM	NORM				
Standard	Unknown	Unknown				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
REF	REF	REF				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
1.00e-004	NORM	NORM				
NTC	Unknown	Unknown				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
REF	REF	REF				
<OFF>	<OFF>	<OFF>				
NORM	NORM	NORM				

2枚目のプレートとの関連性を考えながら設定を行っていきます。

- Sample のプレートセットアップ

相対定量解析に際して、2つの実験でのサンプル間の互換性を持たせるために、同一のサンプルについて、Normalizer で設定された「Name」と同じ設定を合致するサンプルに行います。

「Show Well Names」ボタンを押しておくで各ウェルに「Name」が表示されるので便利です。「Assign Assay Name」ボタンで Well information のダイアログが開きますので、ここで「Name」、「Assay」などを設定していきます。

全てのサンプルについて「Name」をインプットします。

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sample 01 REF A	sample 04 REF A		sample 02 REF B	sample 04 REF B		sample 01 REF A	sample 04 REF A				
B	sample 01 REF A	sample 04 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF B	sample 04 REF B		sample 01 REF A	sample 04 REF A	sample 06 REF A			
C	sample 01 REF A	sample 03 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF B	sample 04 REF B	sample 06 REF B	sample 01 REF A	sample 03 REF A	sample 06 REF A			
D	sample 03 REF 1.00e-010 A	sample 06 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF B	sample 03 REF B	sample 06 REF B	sample 03 REF A	sample 06 REF A				
E	sample 03 REF 1.00e-008 A	sample 06 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF 1.00e-008 B	sample 03 REF B	sample 06 REF B	sample 03 REF A	sample 06 REF A				
F	sample 02 REF 1.00e-006 A	sample 06 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF 1.00e-006 B	sample 03 REF B	sample 05 REF B	sample 02 REF A	sample 06 REF A				
G	sample 02 REF 1.00e-004 A	sample 06 REF A	sample 06 REF A	sample 01 REF 1.00e-004 B	sample 03 REF B	sample 05 REF B	sample 02 REF A	sample 06 REF A				
H	sample 02 REF A	sample 04 REF A		sample 02 REF B	sample 05 REF B		sample 02 REF A	sample 06 REF A				

Association symbol が設定されていても、Multi Experiment Analysis の際には利用されません。別の目的で Association symbol が設定されていた場合、「Invalid(赤色表示)」になることがありますが、Multi Experiment Analysis の際にはこのまま無視して解析を進めてもかまいません。

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Calibrator REF A	Unknown REF A		Unknown REF B	Unknown REF B		Calibrator REF A	Unknown REF D				
B	Calibrator REF A	Unknown REF D	Unknown REF A	Calibrator REF F	Unknown REF A		Calibrator REF A	Unknown REF D	Unknown REF F			
C	Calibrator REF A	Unknown REF A	Unknown REF C	Calibrator REF F	Unknown REF A	Unknown REF D	Calibrator REF A	Unknown REF C	Unknown REF F			
D	Standard REF 1.00e-010 A	Unknown REF C	Unknown REF F	Calibrator REF A	Unknown REF C	Unknown REF F	Standard REF A	Unknown REF C	Unknown REF F			
E	Standard REF 1.00e-008 A	Unknown REF C	Unknown REF E	Standard REF 1.00e-008 B	Unknown REF C	Unknown REF F	Standard REF A	Unknown REF C	Unknown REF E			
F	Standard REF 1.00e-006 A	Unknown REF B	Unknown REF E	Standard REF 1.00e-006 B	Unknown REF C	Unknown REF E	Standard REF A	Unknown REF B	Unknown REF E			
G	Standard REF 1.00e-004 A	Unknown REF B	Unknown REF E	Standard REF 1.00e-004 B	Unknown REF B	Unknown REF E	Standard REF A	Unknown REF B	Unknown REF E			
H	NTC REF A	Unknown REF B	Unknown REF D	NTC REF B	Unknown REF B	Unknown REF E	NTC REF A	Unknown REF B	Unknown REF D			

Import... Defaults

Quick Setup

Well type: [v]

Show Well Names

Collect fluorescence data

CY5 HEX

ROX FAM

Reference dye: ROX All wells

Assign Assay Names...

Normalizing assay: <none>

Standard quantity: ROX

Auto-Increment: 10x

Identify replicates

Replicate symbol: [v]

Auto-Increment

Identify associations

Assoc. symbol: [v]

INVALID SETS Auto-Increment

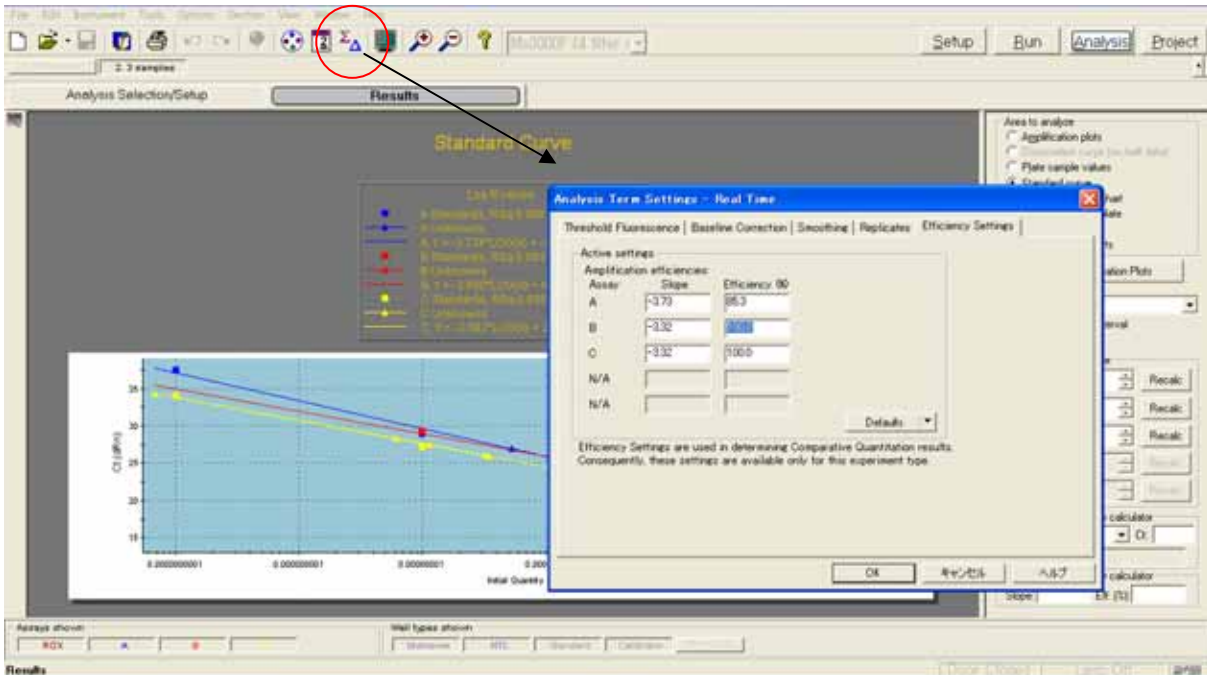
Clear Selected Wells

Plate setup comments:

Full-Screen Plate Next >

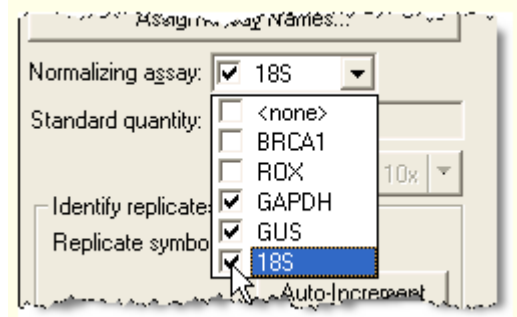
もし Multi Experiment Analysis の Relative quantity chart で不要な解析が含まれている場合（例えば「Standard」や「NTC」など）、不要なものはここで解析表示から外しておきます。Project 解析の時にこの操作ができません。「Standard curve」を評価する際には表示させておきます。

増幅効率をインプットするには、各アッセイの standard curve で増幅効率を確認しながら、この段階でインプットしておく便利です。ここでインプットされた増幅効率が相対定量計算に反映されます。



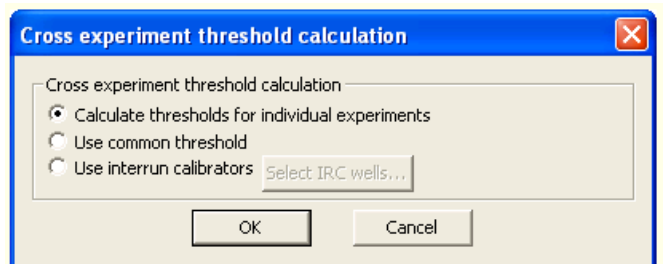
【新機能：複数の normalizer の設定】

Multiple experiment analysis でも複数の normalizer を最大5つまで設定することが可能です。



【Threshold line について】

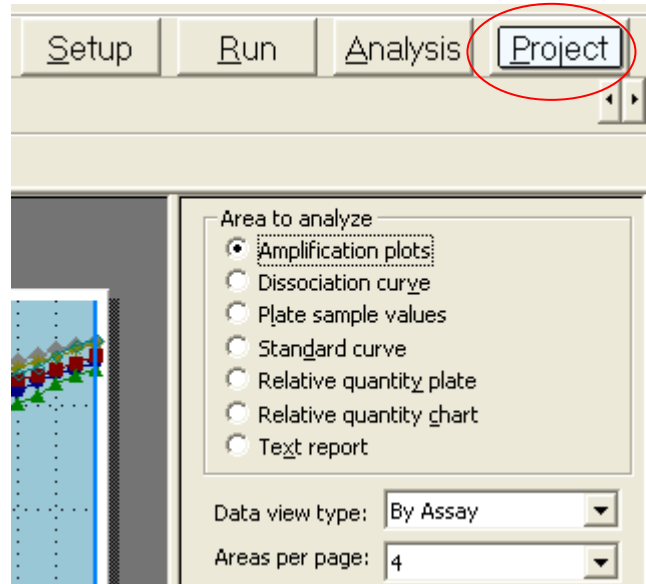
ここに示したアッセイの場合、各遺伝子については1つのプレート内でアッセイされ、2つのプレートにまたがることはありません。したがって、各遺伝子に1本ずつの threshold line が設定されます。1つの遺伝子について2つのアッセイになってしまう場合には、Project 解析の開始時の「Cross experiment threshold calculation」で「Use interrun calibrators」を利用することをお勧めします。そのために事前に Interrun Calibrators とするサンプルの設定を計画しておくようにしてください。



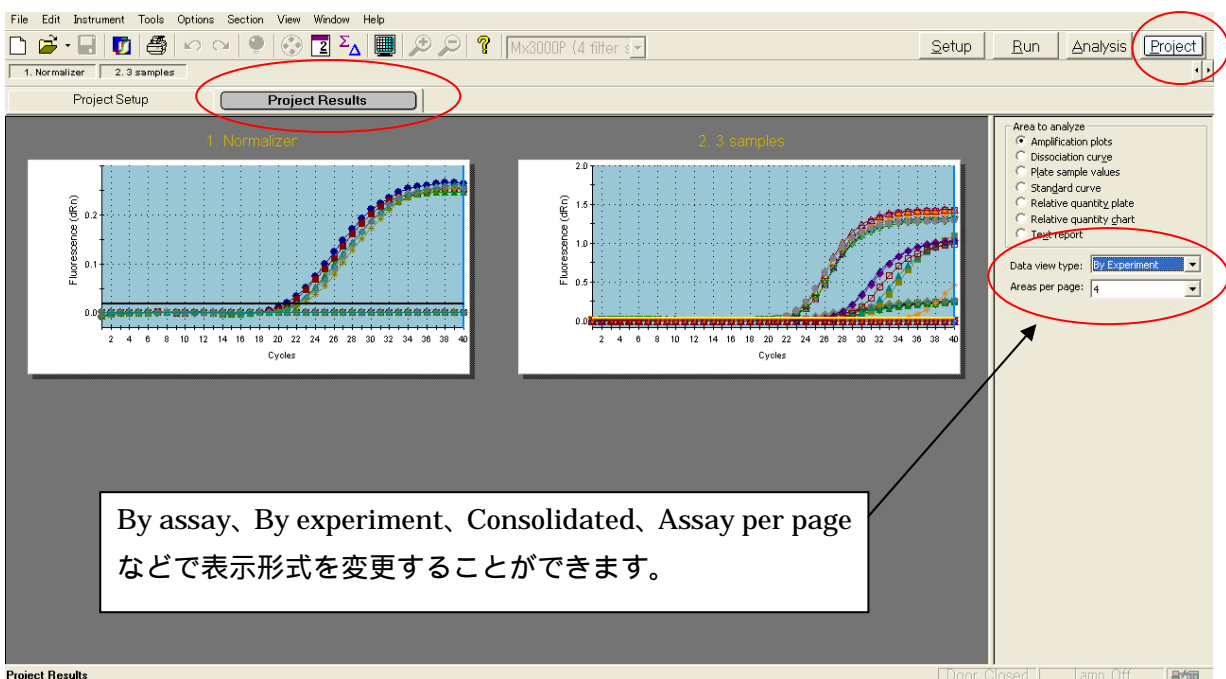
【解析結果の表示】

「Project」 → 「Project Results」で結果を表示させることができます。

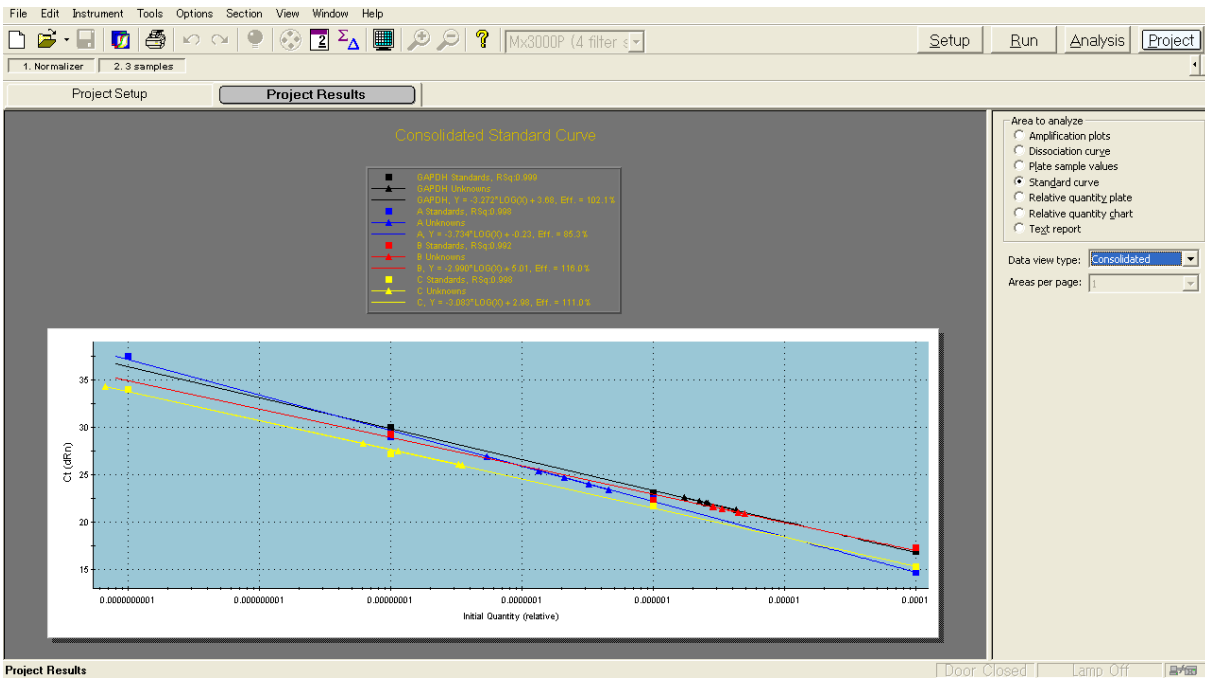
結果を表示させるためには、プレートのセットアップ後、「Project」で行います。



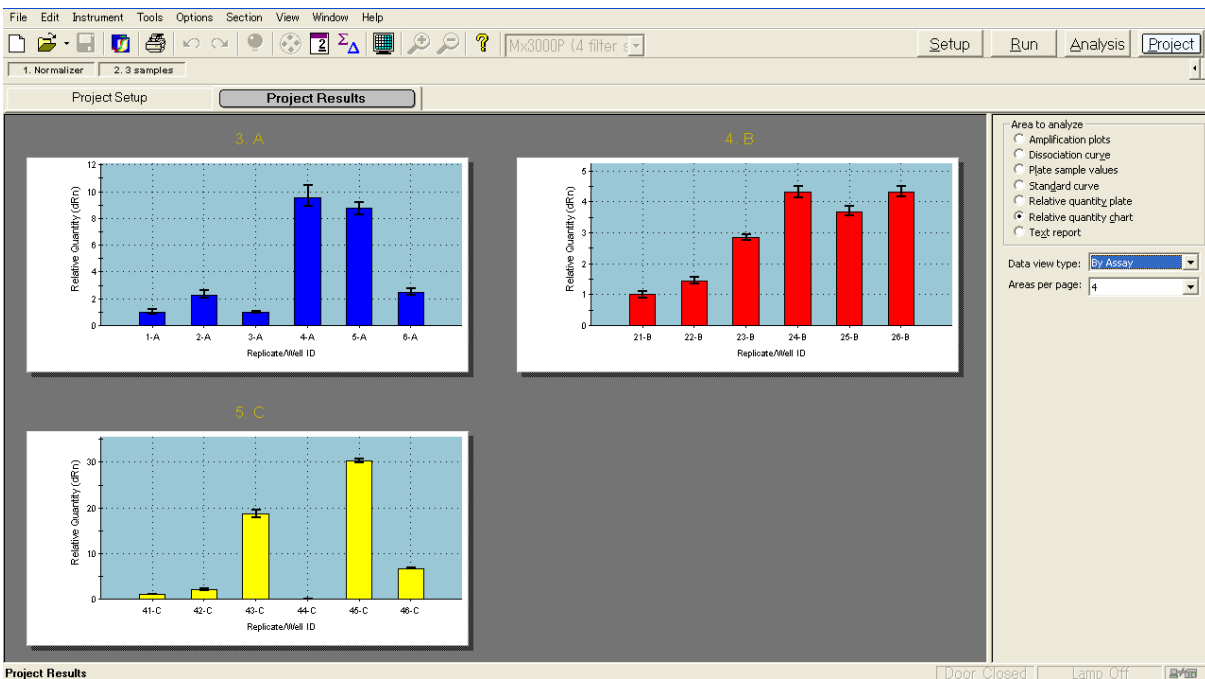
(1) Amplification plot



(2) Standard curve 解析



(3) Relative quantity chart



(4) テキストレポート

Experiment	Well Name	Well Type	Replicate	Threshold (dRn)	Ct (dR)	Rel. Quant. to Norm. Avg. (dRn)	Rel. Quant. to Cal. Avg. (dRn)
1. Normalizer	sample 01	Calibrator	1	0.0174	20.81	Normalizer	Normalizer
1. Normalizer	sample 02	Unknown	2	0.0174	21.26	Normalizer	Normalizer
1. Normalizer	sample 03	Unknown	3	0.0174	21.97	Normalizer	Normalizer
1. Normalizer	sample 04	Unknown	4	0.0174	22.17	Normalizer	Normalizer
1. Normalizer	sample 05	Unknown	5	0.0174	22.55	Normalizer	Normalizer
1. Normalizer	sample 06	Unknown	6	0.0174	22.01	Normalizer	Normalizer
2. 3 samples	sample 01	Calibrator	1	0.0259	25.55	Calibrator	Calibrator
2. 3 samples	sample 02	Unknown	2	0.0259	24.71	0.752	2.29
2. 3 samples	sample 03	Unknown	3	0.0259	26.92	0.316	0.964
2. 3 samples	sample 04	Unknown	4	0.0259	23.44	3.14	9.56
2. 3 samples	sample 05	Unknown	5	0.0259	24.02	2.87	8.74
2. 3 samples	sample 06	Unknown	6	0.0259	25.44	0.813	2.46
2. 3 samples	sample 01	Calibrator	21	0.0258	21.68	Calibrator	Calibrator
2. 3 samples	sample 02	Unknown	22	0.0258	21.62	1.84	1.44
2. 3 samples	sample 03	Unknown	23	0.0258	21.38	0.363	2.83
2. 3 samples	sample 04	Unknown	24	0.0258	21.03	0.532	4.30
2. 3 samples	sample 05	Unknown	25	0.0258	21.58	0.472	3.68
2. 3 samples	sample 06	Unknown	26	0.0258	20.87	0.554	4.32
2. 3 samples	sample 01	Calibrator	41	0.0301	28.89	Calibrator	Calibrator
2. 3 samples	sample 02	Unknown	42	0.0301	28.30	2.08e-003	2.12
2. 3 samples	sample 03	Unknown	43	0.0301	29.05	1.82e-002	18.7
2. 3 samples	sample 04	Unknown	44	0.0301	34.34	4.36e-005	4.45e-002
2. 3 samples	sample 05	Unknown	45	0.0301	26.96	2.96e-002	30.2
2. 3 samples	sample 06	Unknown	46	0.0301	27.47	6.57e-003	6.71

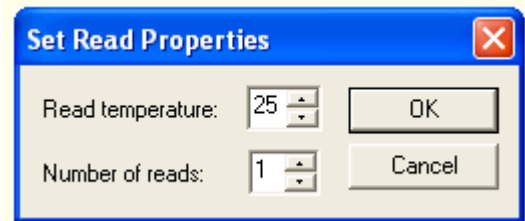
マニュアルで相対定量解析をしたい場合、Multiplate Comparative assay の計算シートをご用意していますので、ご要望の際はアジレントテクノロジー・ストラタジーン製品・テクニカルサービスまでご要望ください。

Quantitative Plate Read Analysis Quick Protocol

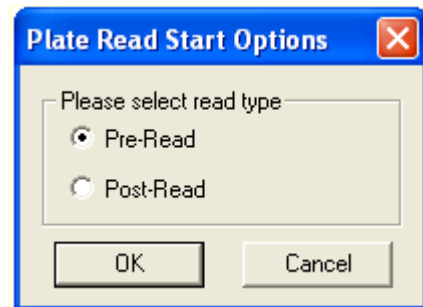
プレートリーダー機能

【Set Read properties】の設定

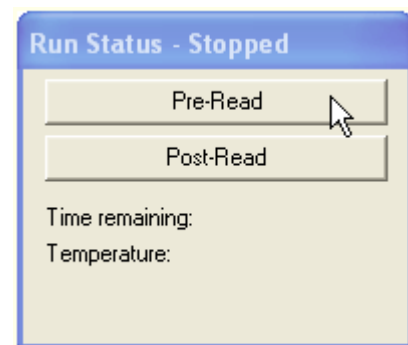
プレートリード、あるいは SNP 解析の場合、Thermal cycling での蛍光検出とは異なり、1 度だけの蛍光検出を行うことができます。操作パネルの【Set Read Properties】ボタンをクリックすると右のダイアログが開き、検出時の温度、検出回数（平均蛍光値が表示されます。Instrument data のエクスポートで全てのデータを得ることも可能です）を決定します。



【Plate Read Start Options】では、Pre-Read と Post-Read を選択できます。解析時、Pre-Read のみ、Post-Read のみ、Pre – Post などの表示が可能です。

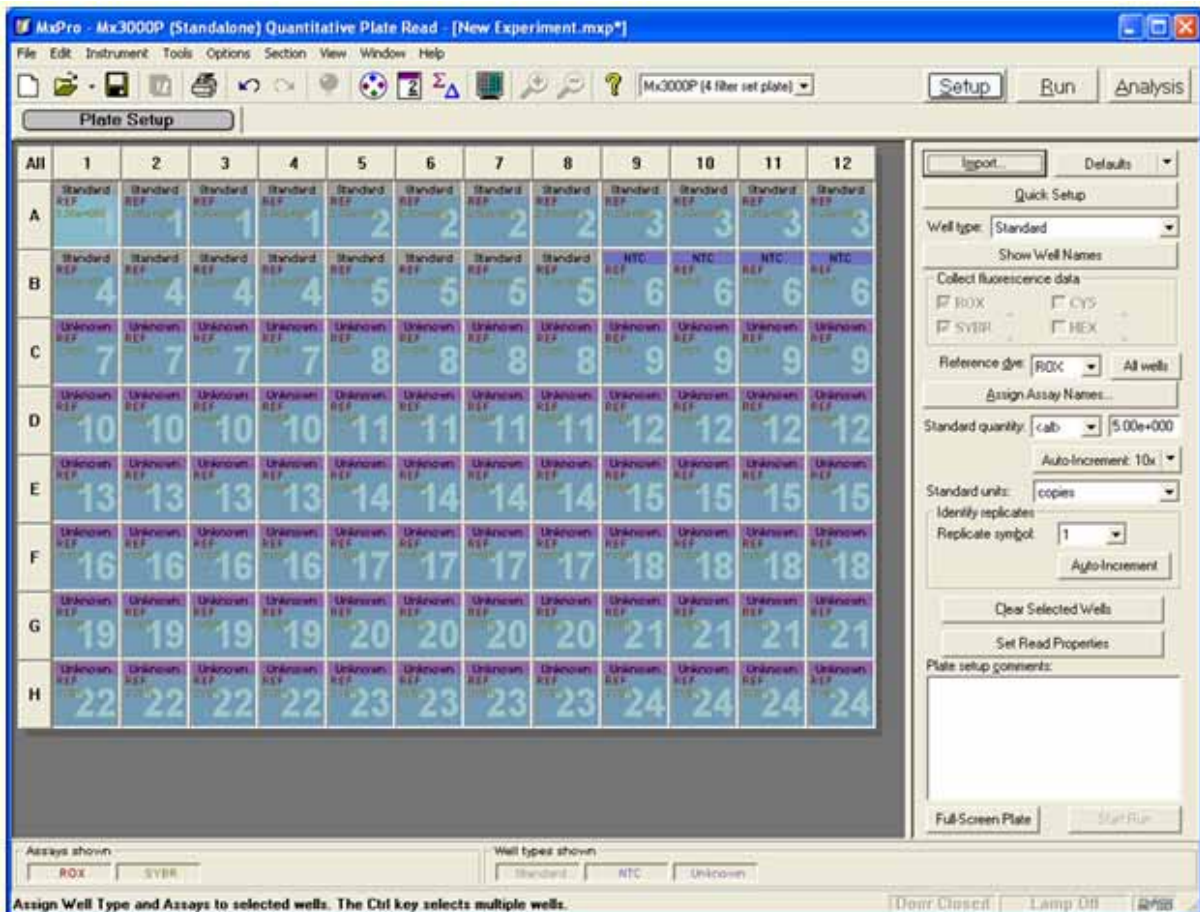


【Run Status - Stopped】ダイアログで蛍光検出を開始します。



(1) Plate Setup

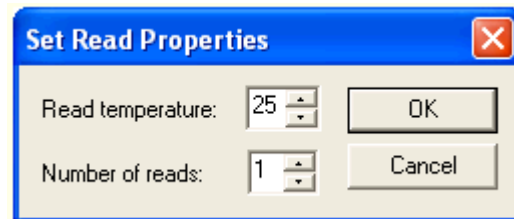
プレートリーダー機能で利用する場合も、リアルタイム定量 PCR の際とほぼ同様にセットアップを行うことができます。



- ・ 「Well type」では Unknown、Standard、NTC などの設定ができます。
- ・ 「Collect fluorescence data」では各ウェルの蛍光検出フィルターの設定ができます。
- ・ 「Reference dye」では ROX など Reference dye の設定ができます。
- ・ 「Assign Assay Name」では Well information の設定ができます。
- ・ 「Standard quantity」では Standard に設定されたウェルの各濃度のインプットができます。
- ・ 「Replicate symbol」では Replicate のウェルの設定ができます。
- ・ 「Import」や「Quick Setup」機能を利用することもできます。

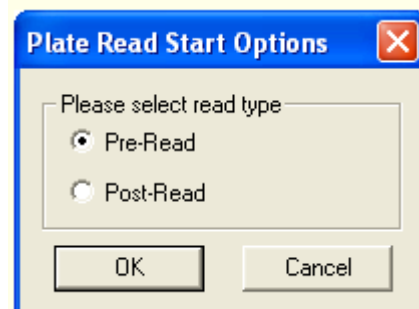
(2) Run の設定

Plate Setup 画面の右側「Read properties」ボタンをクリックすると、右のダイアログが開きます。



ここで蛍光検出時の温度設定 (25 ~ 99)、検出回数を設定することができます。

RUN 画面の「Start Run」ボタンで蛍光検出を開始させます。右のダイアログが表示されるので、Pre-Read、Post-Read を選択して蛍光検出させることができます。

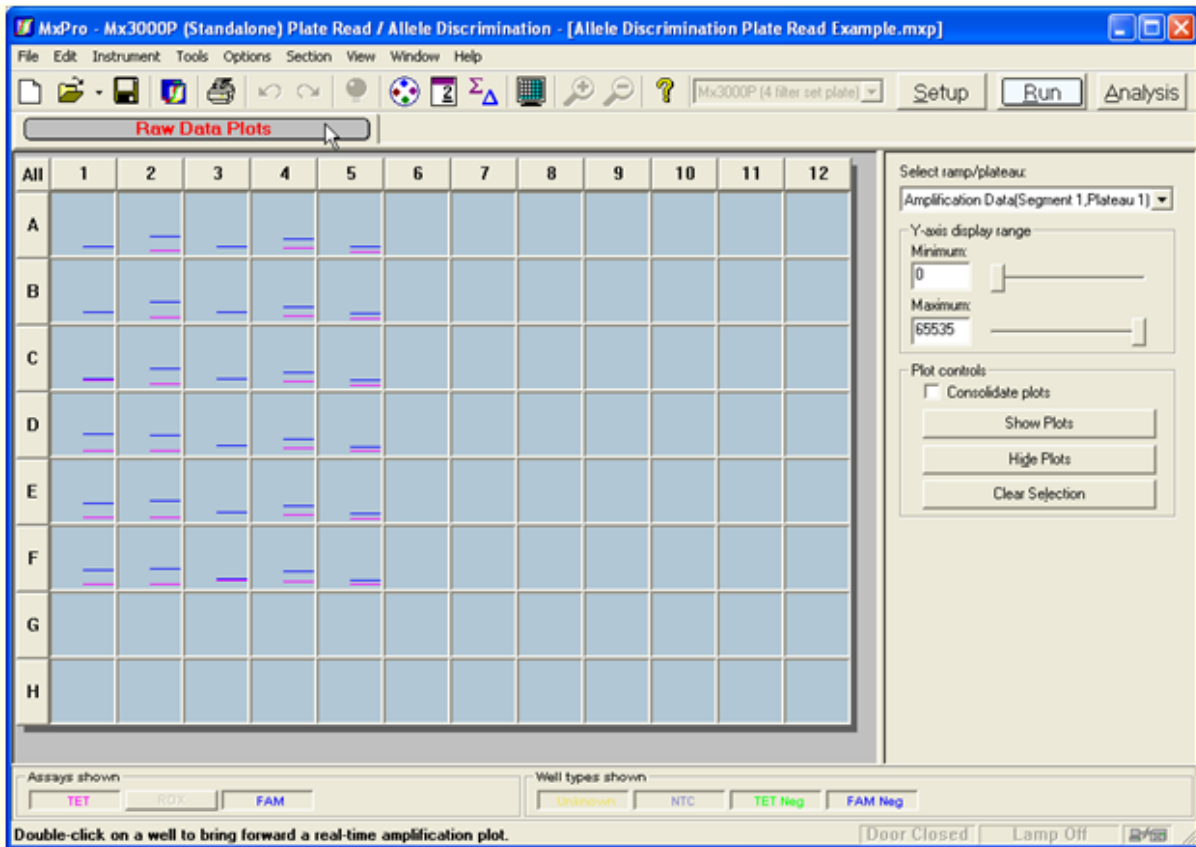


右に示すデータ解析を行うことが可能です。必要に応じて、Pre-Read、Post-Read を行うことができます。

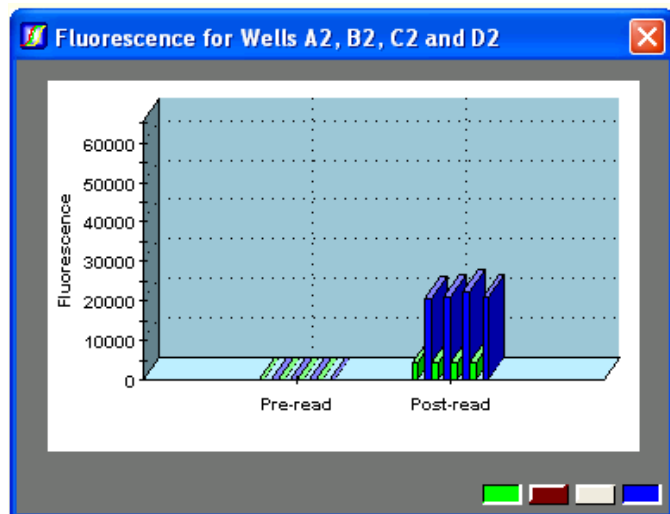
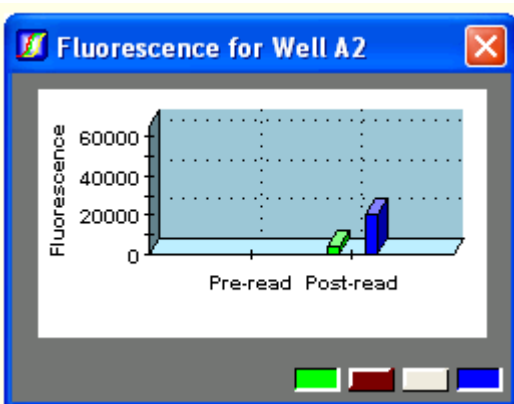
Data Type
Rpre
Rpost
Rn,pre
Rn,post
Rpost-Rpre
Rn,post-Rn,pre
Rpost/Rpre

(3) Raw data plot

Raw data plot では、下に示すように Raw data が表示されます。



Raw data を拡大して、下のように表示させることも可能です。選択されたウェルについて、「Show Plots」ボタンで表示されます。

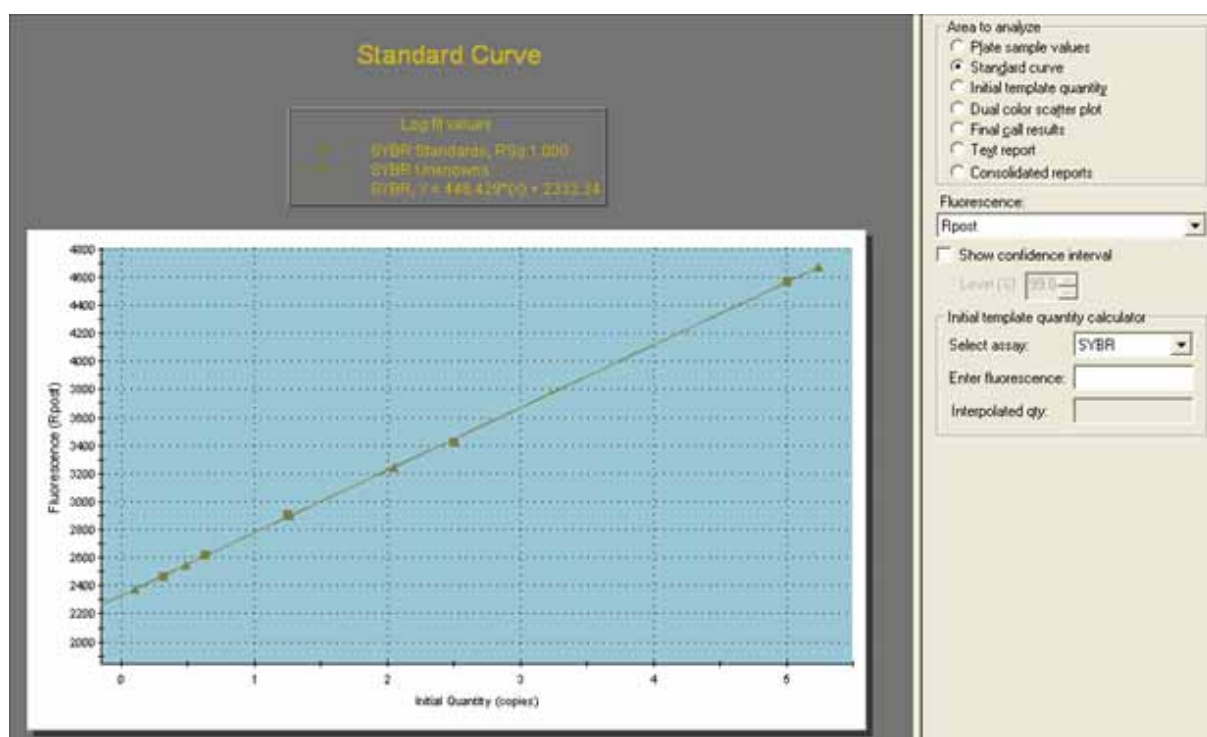


(4) データの解析

蛍光測定終了後、Analysis Selection/Setup スクリーンが現れます。

1. 解析するウェルをマウスと Shift キーおよび Ctrl キーで選択してください。
2. レプリケート (individually と collectively) の設定を必要に応じて選択することができます。Adv.Algorithm Settings をクリックすることによって他のセッティングを解析に利用することもできます。

Analysis 画面の「Results」では、「Analysis Selection/Setup」で選択されたウェルについてデータ解析を行うことが可能です。



「Plate sample values」, 「Standard curve」, 「Initial template quantity」, 「Dual color scatter plot」, 「Final call results」, 「Text report」, 「Consolidated reports」など、さまざまな解析・表示を行うことができます。

Plate sample values スクリーンでは、収集された各 well の蛍光値と Ct 値がプレートフォーマットで表示されます。

Standard curve スクリーンでは、Standard に設定された well の既知テンプレート量とそれに対する Ct 値が対数プロットされます。この解析スクリーンで得られた標準曲線を検量線とすることによって Unknown well の初期テンプレート量を決定します。

Dual color scatter plot スクリーンでは、マルチプレックス解析の場合の同一 well 内におけるふたつの蛍光色素強度あるいはその Ct 値を散布図として表示することができます。このスクリーンでは目的の遺伝子の増幅とコントロール遺伝子の増幅の間の相関関係を表示することができ、特定のコントロール遺伝子との適合性を評価する場合に有用です。

Final call results スクリーンでは、それぞれの well においてどちらの蛍光色素に対応する産物が増幅されたかをシンプルに表示させることができます。(+)表示はその産物が増幅されていることを、(-)表示はその産物が検出されなかったことを示しています。Final call は Ct 値に基づいています。すなわち解析に用いたデータの最終サイクルよりも Ct 値が低い場合は(+)表示となります。

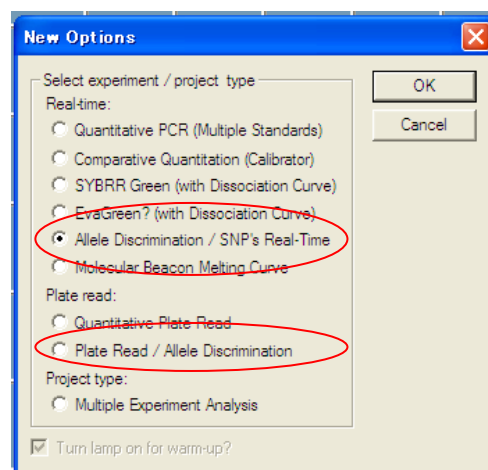
Text report スクリーンでは、ランデータをテキストフォーマットで表示します。レポート内容に関しては Column チェックボックスを用いて選択することができます。

Mx3000P/Mx3005P による Allele discrimination/SNP's 解析

Mx3000P/ Mx3005P リアルタイム QPCR システムで、TaqMan® probe を用いた Allele discrimination / SNP's 解析の方法を示します。MxPro ソフトウェアでは Real time PCR (Advanced) モードと End point アッセイの 2 つのアプリケーションを利用することが可能です。

Allele discrimination/SNP 解析を行う場合は、New Options で Allele Discrimination / SNP's Real-Time、あるいは Plate Read / Allele Discrimination のいずれかを選択することができます。

新しい実験系の場合、Allele Discrimination / SNP's Real-Time モードで基礎検討をすることが推奨されています。

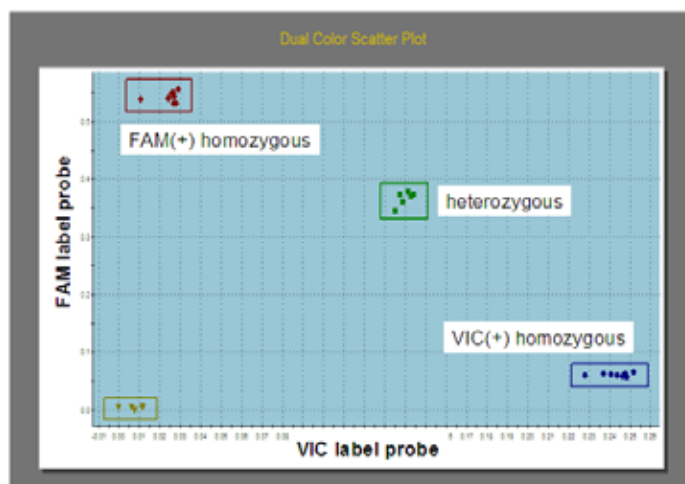


TaqMan® probe を用いた SNP/Mutation の検出原理

例えば A/G の SNP/Mutation を検出したい場合、それぞれの SNP/Mutation に対応した TaqMan® probe を作成します。A に対応した T の TaqMan® probe は FAM でラベル、G に対応した C の TaqMan® probe は VIC などラベルされています。ゲノム DNA を用いた PCR 反応で、SNP/Mutation を含む領域はプライマーによって特異的に増幅され、それぞれの SNP/Mutation に対応した TaqMan® probe が競合的にハイブリダイズし分解され目的の蛍光が検出されるようになります。

例えば、A-homozygote のサンプルは FAM の検出が高くなり、G-homozygote のサンプルは VIC の検出が高くなり、heterozygote では FAM と VIC、両方の検出が高くなります。これらのデータが Dual color plot に表示され、分類されます。

これらの蛍光は基本的に Negative control (NTC) のデータに基づいて表示されますので、必ず NTC が設定される必要があります。



Allele Discrimination/SNP's Real-Time による蛍光検出・実施例

ここでは、6つのサンプル (unknown: triplicate) で、FAM ラベルおよび VIC ラベル TaqMan probe を用いて SNP 解析を行う際の実施例を示します。MxPro での SNP/Mutation 解析の場合に最低必要なウェルの設定としては、**3つのウェルの NTC (No template control)**です。この NTC のデータが解析の基本になります。また、FAM probe および VIC probe に対応するポジティブコントロールがあれば、解析結果の信頼性は高まります。

【サマリー】

6つのサンプルについて SNP 解析を行うため、3つの NTC と3つの FAM ラベルプローブのポジティブコントロール、3つの VIC ラベルプローブのポジティブコントロールと共に解析します。

* Mx3000P/Mx3005P の標準フィルターでは、蛍光色素 VIC は HEX フィルターで最適に検出することができます。HEX フィルターの表示は VIC と変更することも可能です。

20µl の反応系で3本分ずつまとめて調整し、3つのウェルに分注します。

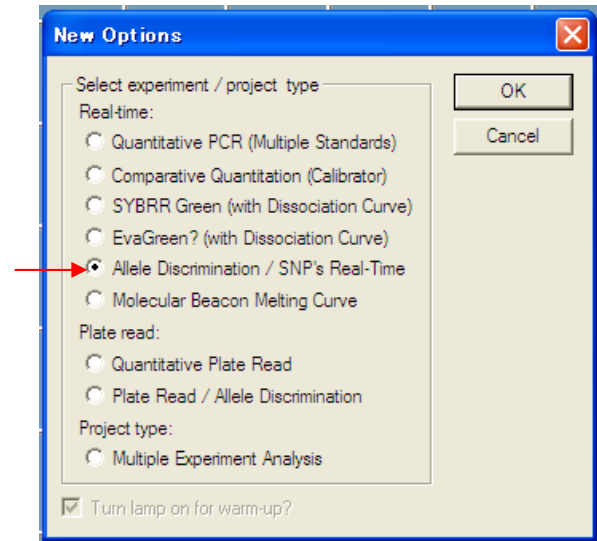
Sample #	Well type	Filter	Description	Well
#1	VIC positive	FAM/VIC	VIC positive cont.	A1-C1
#2	FAM positive	FAM/VIC	FAM positive cont	D1-F1
#3	unknown	FAM/VIC	Patient #1	A2-C2
#4	unknown	FAM/VIC	Patient #2	D2-F2
#5	unknown	FAM/VIC	Patient #3	A3-C3
#6	unknown	FAM/VIC	Patient #4	D3-F3
#7	unknown	FAM/VIC	Patient #5	A4-C4
#8	unknown	FAM/VIC	Patient #6	D4-F4
#9	NTC	FAM/VIC	No template	A5-C5

1) SNP 解析用のプライマーおよび加水分解型蛍光ラベルプローブを用いて、PCR で増幅を行った 96 well plate / tubes を Mx3000P / Mx3005P にセットしてください。

2) デスクトップ上の MxPro ソフトウェアのアイコンをダブルクリックしてソフトウェアを立ち上げます。



3) 右のダイアログが開きますので、赤矢印の「Allele Discrimination / SNP's Real-Time」を選択して「OK」をクリックします。



4) VIC positive (Allele 1)と FAM positive (Allele 2)、6つの Unknown サンプル、NTC サンプルを設定したときの例を示します。

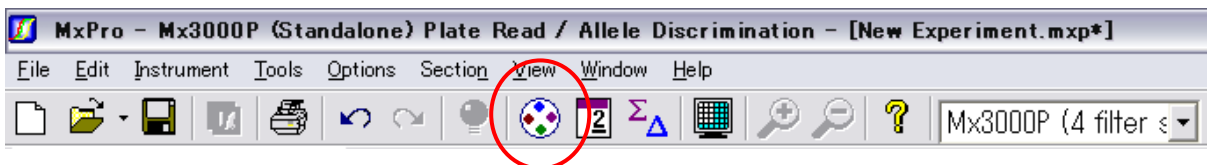
5) サマリーに示されたように、Plate setup を行います。

a) フィルター名の変更。

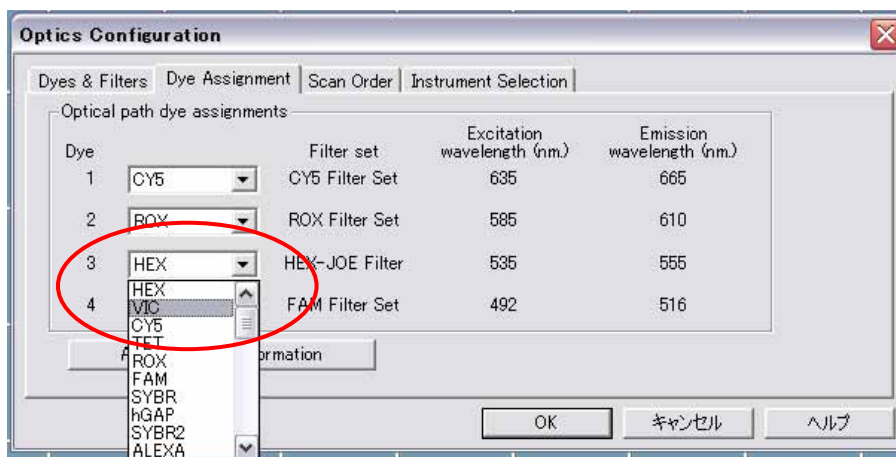
* VIC は HEX フィルターで検出可能です。HEX フィルターの名称を VIC に変更することもできます。

フィルター名の変更。

ソフトウェア画面上部のアイコンより、赤丸で示したフィルターホイールアイコンをクリックします。

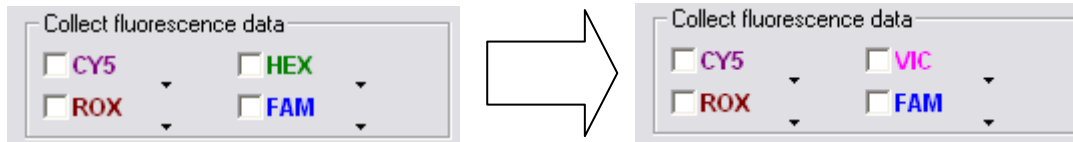


下に示す「Optics Configuration」ダイアログが開きます。

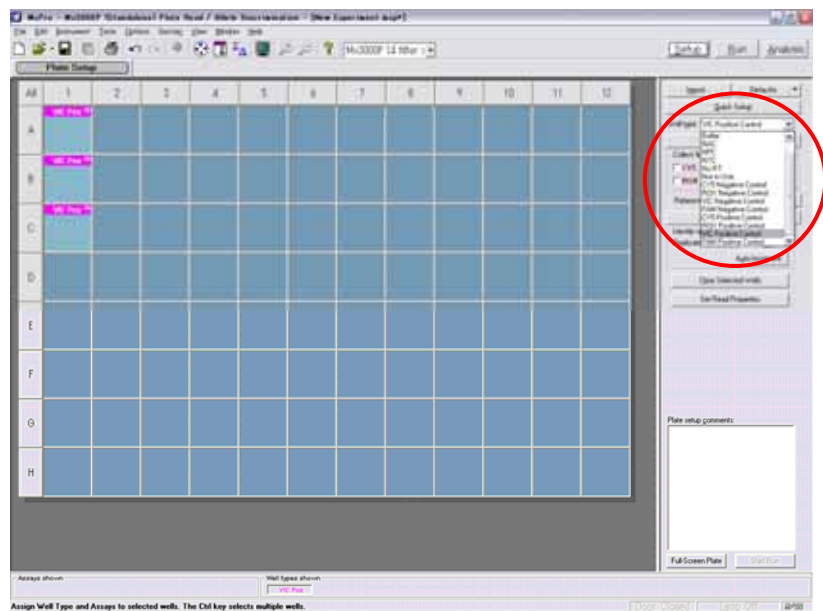


HEX-JOE Filter の名称が HEX となっていますので、ここを VIC に変更します。

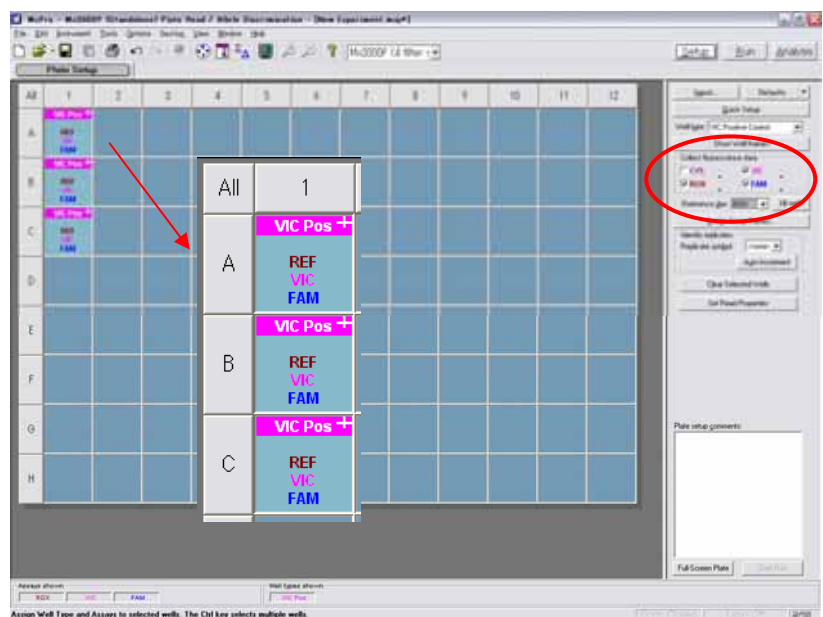
下に示すように、操作パネル内のフィルター表示が HEX から VIC に変更されます。



b) Well A1 ~ C1 に VIC positive を設定します。

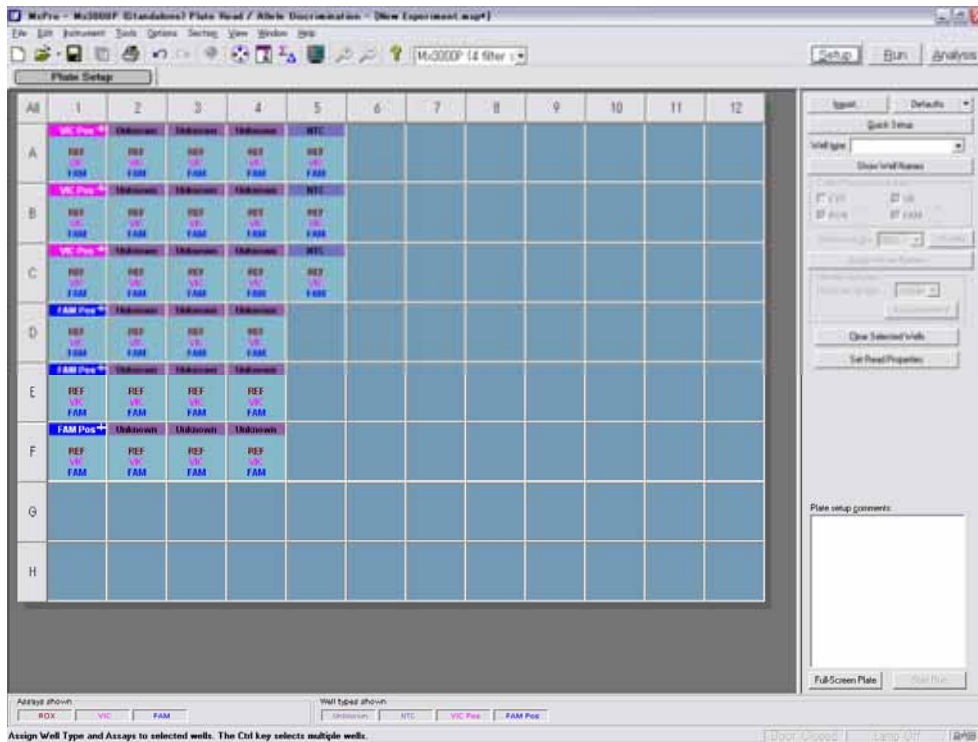


c) 上に示すように、Well A1、B1、C1 をマウスで選択し、操作パネル内の Well type の設定で VIC positive を選択します。

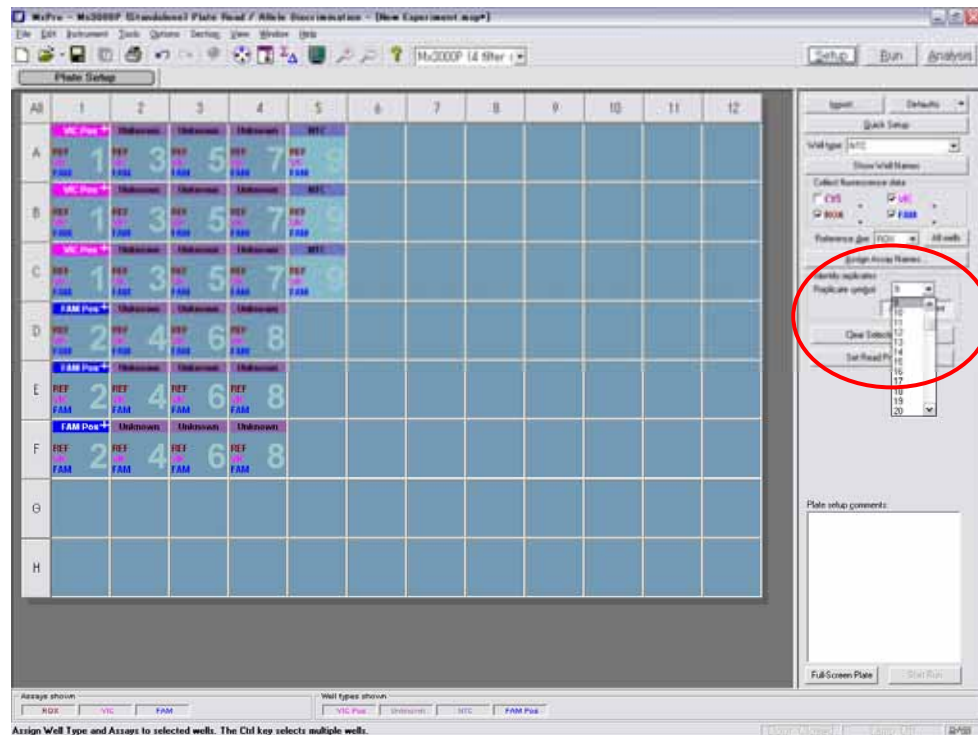


d) フィルターを設定します。
ここでは、VIC、FAM、ROX を
選択し、ROX を Reference dye
として設定しています。

e) 同様に、D1~F1にFAM positiveを設定し、フィルターも設定します。また、Well A2~F4にunknownを設定し、Well A5~C5にNTCを設定します。下の図のようになるはずですが。



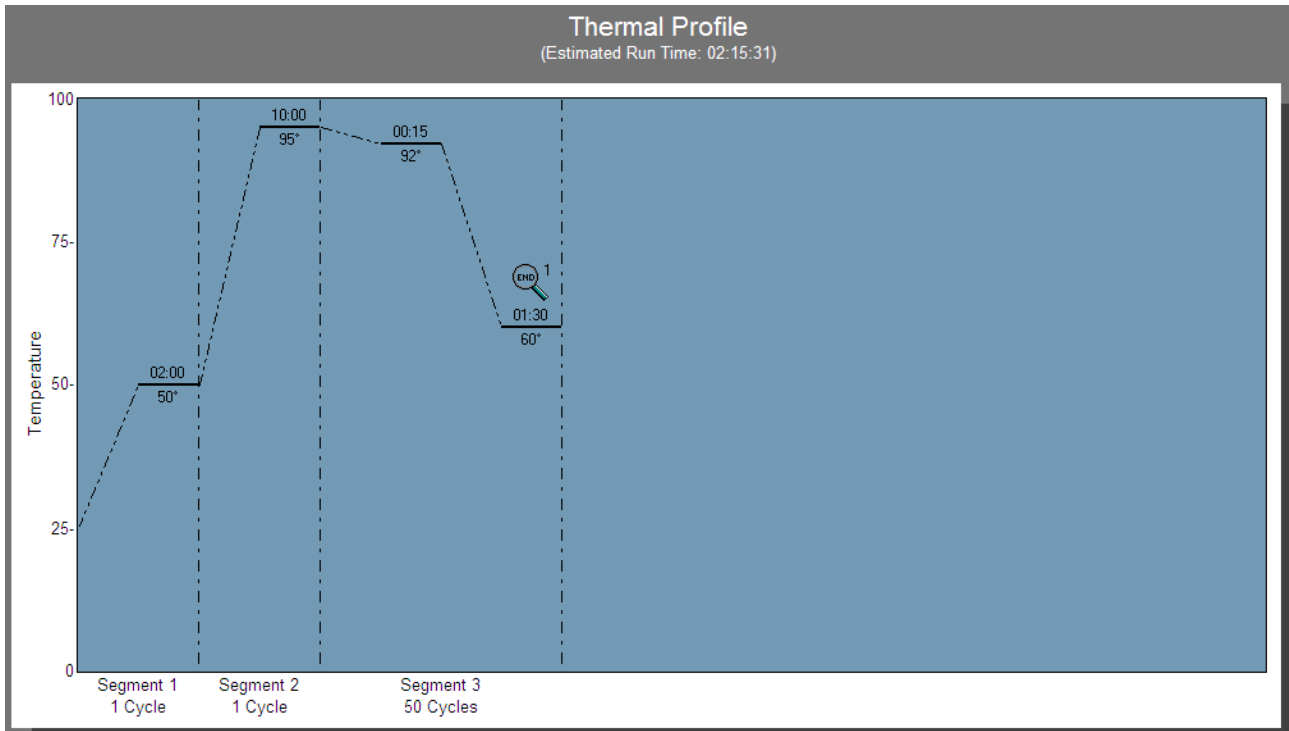
f) サマリーに合わせて Replicate symbol を設定します。



Replicate Symbol は操作パネル（赤丸）で設定します。 Auto-increment 機能が便利です。

g) Thermal profile の設定

Thermal profile は、用いる試薬、プライマー・プローブの T_m に合わせて設定してください。



Thermal profile の設定方法は通常の定量 PCR の際の設定と同様です。

h) Real-Time PCR モードでの Run の開始

Run の方法も通常の定量 PCR の際と同様です。

(p55 参照)

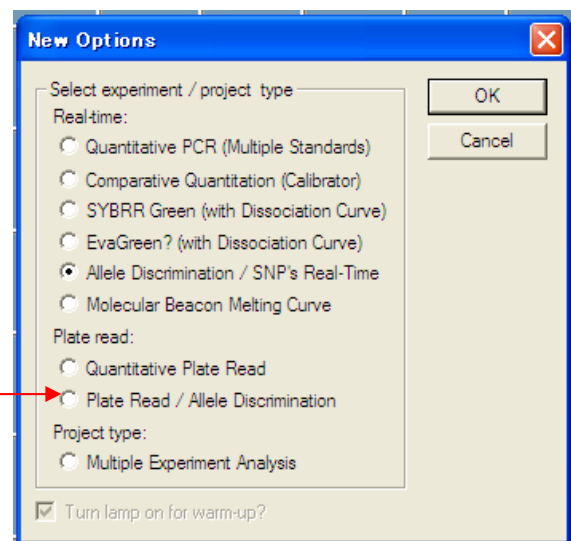
Plate Read / Allele Discrimination モードによる蛍光検出・実施例

1) SNP 解析用のプライマーおよび加水分解型蛍光ラベルプローブを用いて、PCR で増幅を行った 96 well plate / tubes を Mx3000P / Mx3005P にセットしてください。

2) デスクトップ上の MxPro ソフトウェアのアイコンをダブルクリックしてソフトウェアを立ち上げます。



3) 右のダイアログが開きますので、赤矢印の「Plate Read / Allele Discrimination」を選択して「OK」をクリックします。



4) VIC positive (Allele 1)と FAM positive (Allele 2)、6つの Unknown サンプル、NTC サンプルを設定したときの例を示します。

5) サマリーに示されたように、Plate setup を行います。

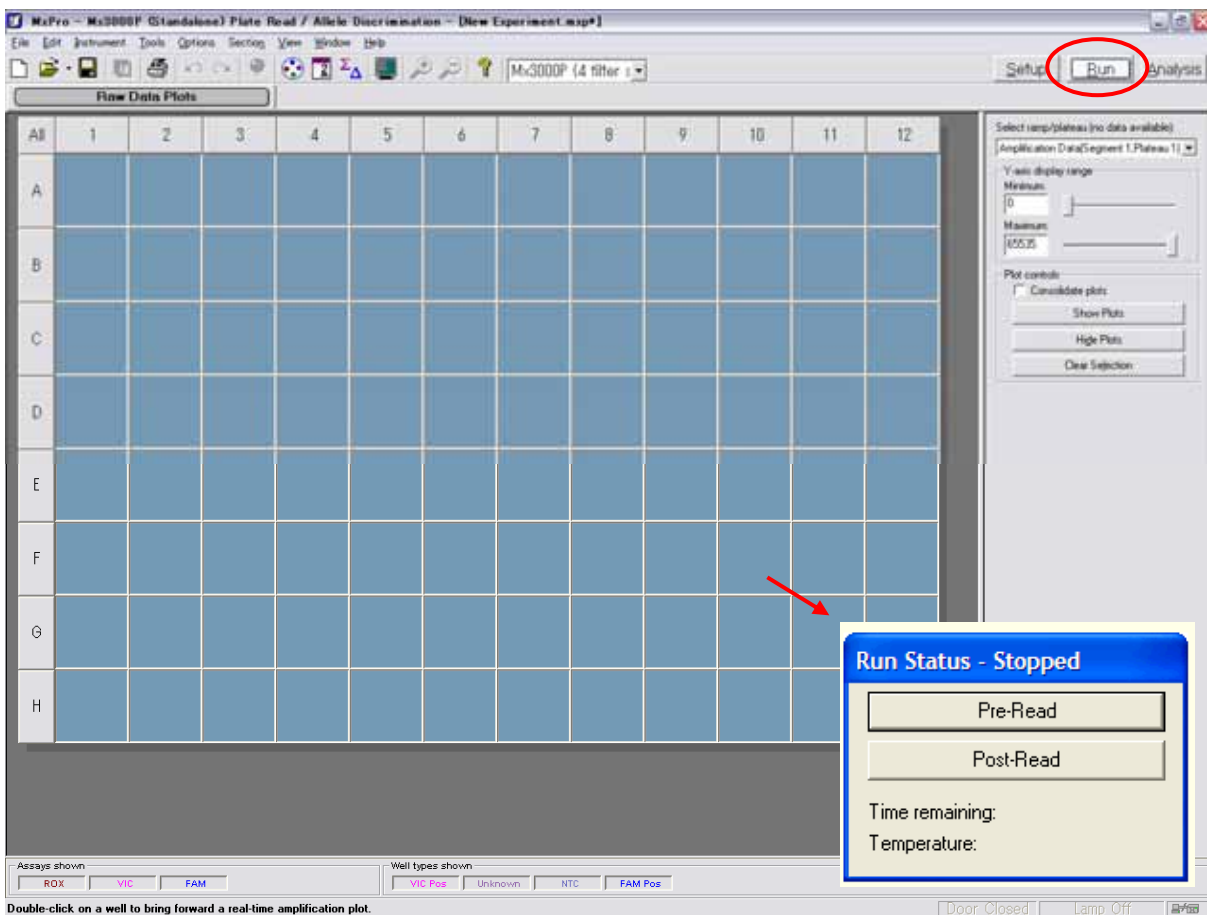
Plate Setup は「Allele Discrimination / SNP's Real-Time」と同様です。

Plate Read モードでは、Amplification plotの検出は行わず、End pointの蛍光だけを Mx3000P/Mx3005P の蛍光プレートリード機能で検出します。したがって、PCR は Mx3000P/Mx3005P で行われる必要はなく、他の Thermal cycler で実施することも可能です。

Plate Read モードでのサンプルの蛍光測定

プレートセットアップが完了したら、サンプルを Mx3000P/Mx3005P に設定します。

Run ボタン（赤丸）をクリックすると、矢印で示したダイアログがあらわれますので、Pre-Read あるいは Post-Read ボタンをクリックし、蛍光測定を開始します。

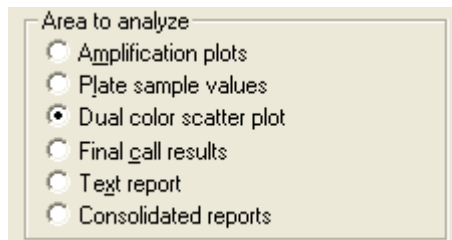


蛍光測定は数十秒で完了します。

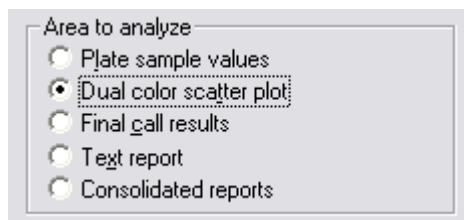
MxPro ソフトウェアによる SNP 解析

MxPro ソフトウェアでの Allele Discrimination / SNP's 解析では、次の項目について解析することができます。

「Allele Discrimination / SNP's Real-Time」



「Plate Read / Allele Discrimination」



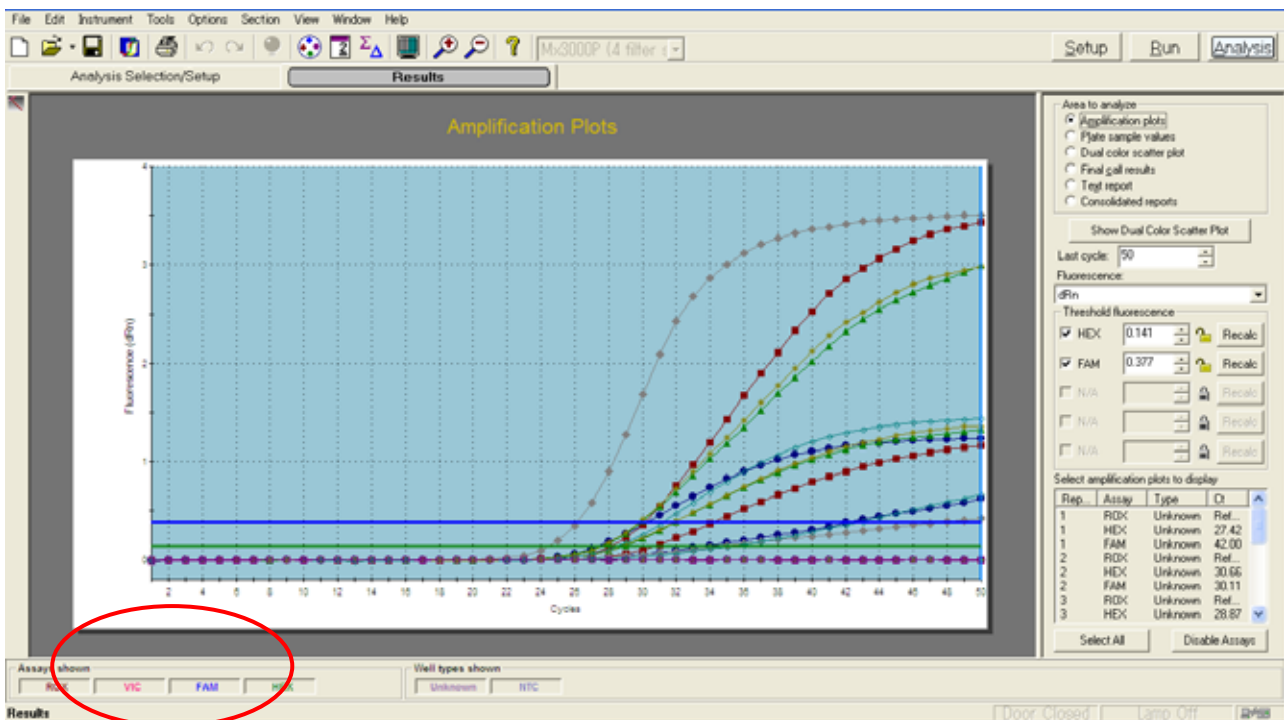
* Plate Read / Allele Discrimination モードでは、「Allele Discrimination / SNP's Real-Time」モードで解析できる Amplification plot が解析できません。

Area to analyze で解析したい項目を選択します。

Allele Discrimination / SNP's Real Time の解析方法

Amplification plot の解析は Real-Time PCR モードの際だけ利用することができます。

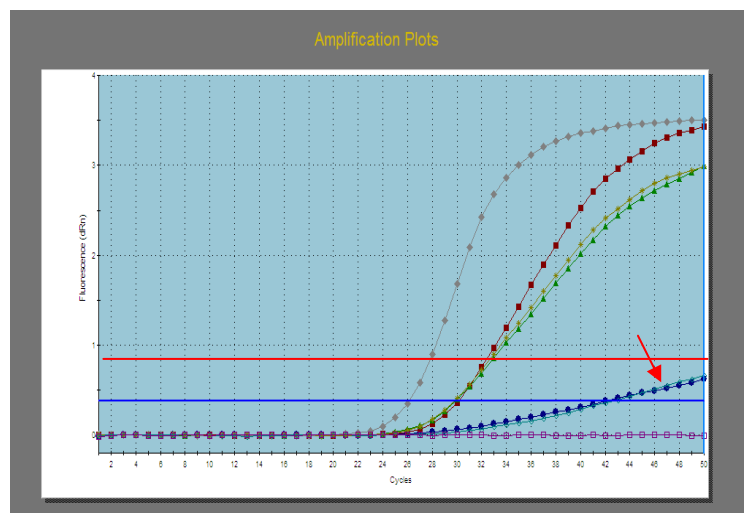
- 「Analysis Selection/Setup」画面で解析したいウェルを選択します。
- 「Results」画面に移ります。Amplification plot での threshold line の設定。



上は、「Results」画面で「Amplification plot」を表示しています。この Amplification plot では FAM と VIC、両方の amplification plot が表示されています。赤丸のボタンを利用して、それぞれを表示させることができます。

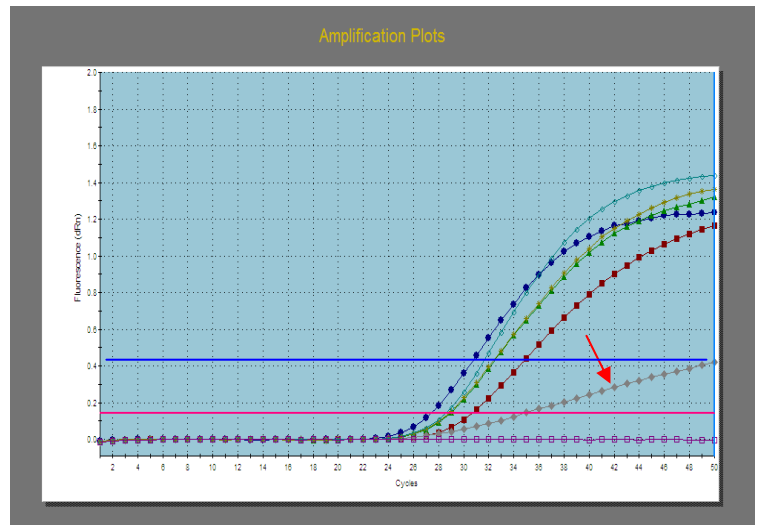
右は FAM の amplification plot だけを表示させています。全てのサンプルについて FAM の検出状態が表示されています。

赤矢印が設定されているサンプルは、VIC の homozygote とわかっているポジコンが含まれており、この蛍光は FAM-Negative とすべき蛍光強度なので、Threshold line を赤の位置まで上げます。

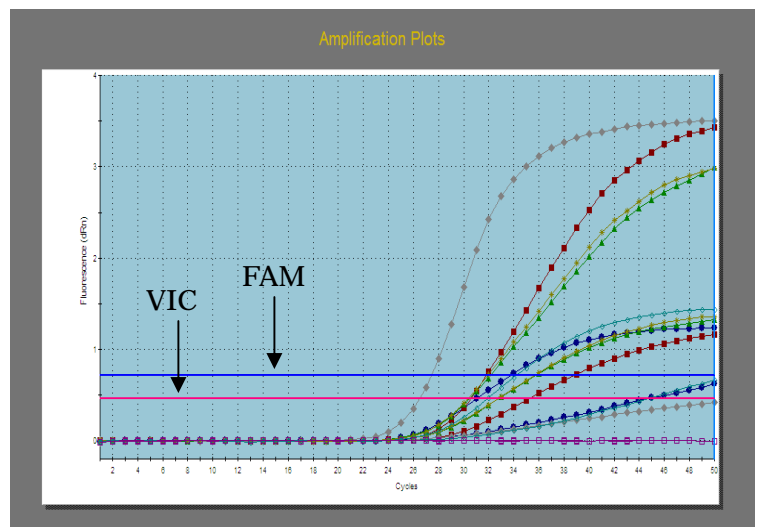


このように設定することで赤矢印の蛍光を negative と認識させることができます。

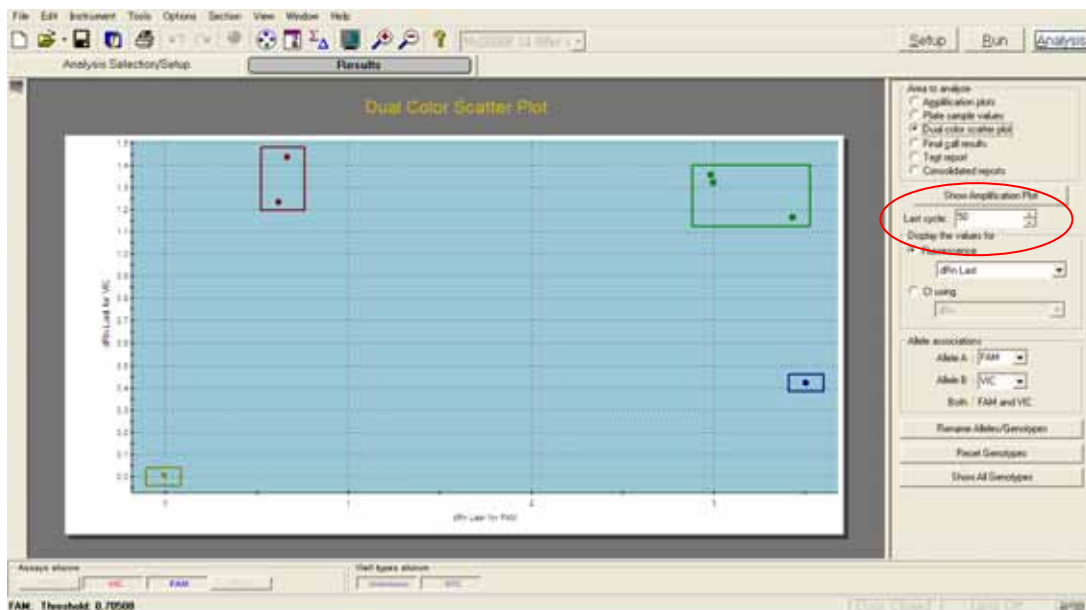
右は VIC について amplification plot を表示させています。赤矢印のサンプルは FAM について homozygous であるサンプルで、VIC は negative とわかっているサンプルの蛍光データ (negative) を利用して threshold line を青線の高さまで上げます。



Threshold line の高さを設定後、FAM と VIC の両方の amplification plot を表示させます。



c) Dual color plot



この Dual color plot で表示されている蛍光強度は、amplification plot の Last cycle です。赤丸の「Last cycle」の数値を変更することで、蛍光が検出されるサイクル数を変更することが可能です。何サイクル目の蛍光強度を利用すると allele discrimination が最適化を Dual color plot を観察しながら決定することが可能です。

下に示すように Amplification plot と Dual color plot を同時に表示させ (Amplification plot 内で「Show Dual color plot」ボタンを利用します) 赤矢印の縦軸の line をマウスで動かしながら、あるいは Last cycle の数値を変更させながら最適な検出ポイントを探ることができます。

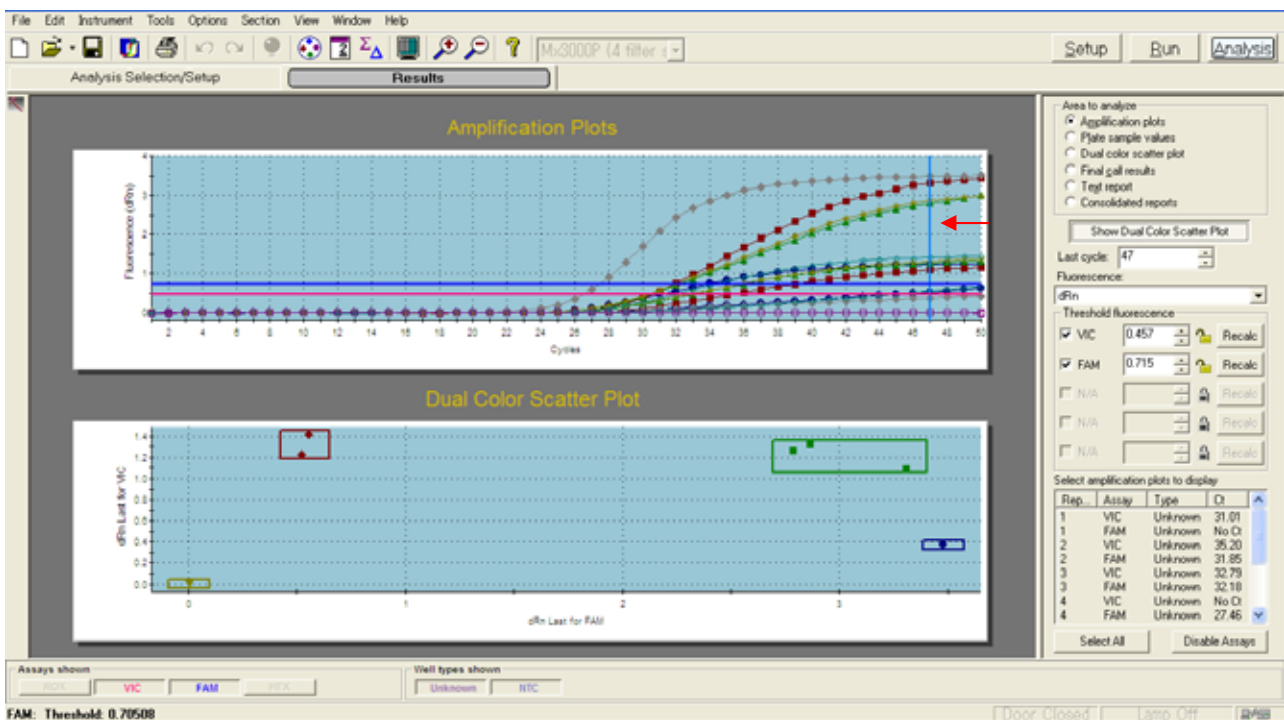


Plate Read / Allele Discrimination の解析

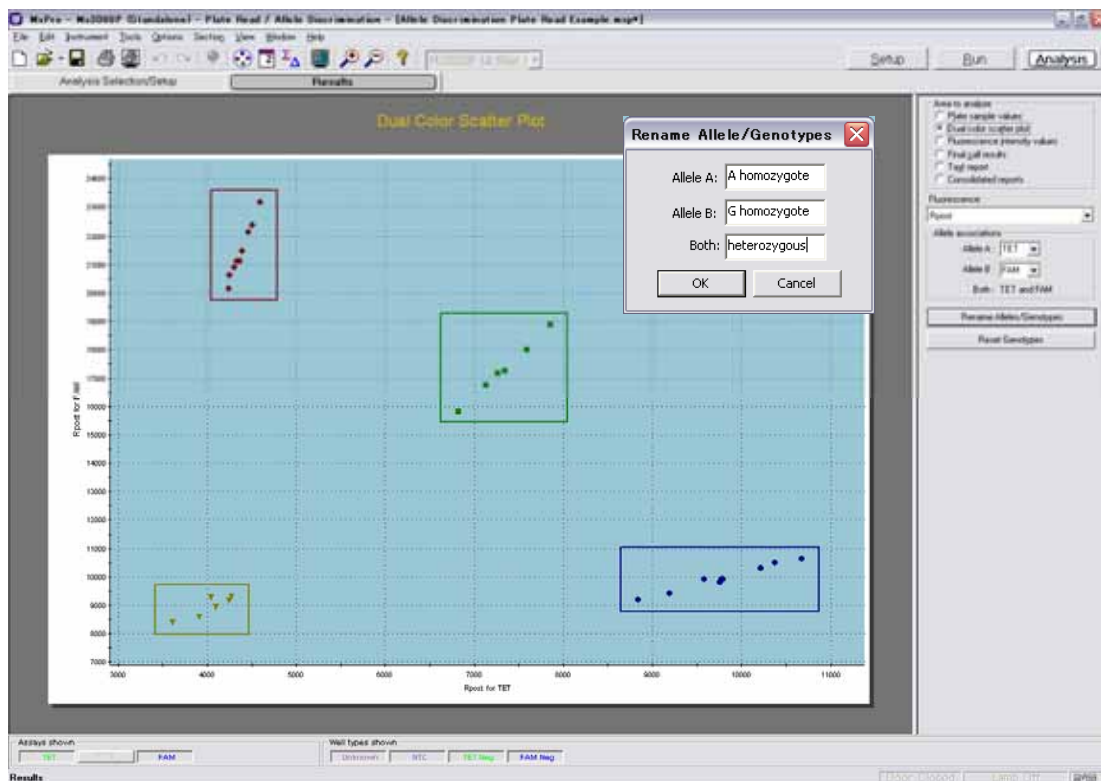
Plate Read / Allele Discrimination experiment type (SNP 解析) では、PCR 後のサンプル中の蛍光量 (エンドポイントの蛍光量) を蛍光プレートリード機能で測定することで行われる SNP 解析方法で、最もハイスループットで一般的な方法です。ただし、Real-time モードで行ったように、最適な検出サイクルを選んだり、Negative の蛍光を threshold line で規定したりすることはできません。あくまでも End point の蛍光値に基づいて Dual color plot が表示されます。

基礎検討を Real-time PCR モードで行い、実験条件を整えた上で End point アッセイを行うことでハイスループットな解析を行うことが可能となります。

Dual color plot 以降の機能は Real-Time PCR モード、Plate Read モード、共通の解析方法になります。

【Dual Color Scatter Plot】

Dual Color Scatter Plot スクリーンでは、2つの蛍光色素で示される2つのターゲット (allele) の蛍光量を同時に比較検討する際に便利なスクリーンです。



ここに示す Dual Color Scatter Plot では、縦軸に FAM の蛍光強度、横軸に TET の蛍光強度を表示しています。赤で囲まれたプロットは FAM のみの蛍光強度が強かったサンプル、青で囲まれたのが TET のみの蛍光強度が強かったサンプル、緑で囲まれたプロットが FAM と TET の蛍光が検出されたものを示しています。例えば A allele に対応するプローブが FAM で、G allele に対応するプローブが TET でそれぞれラベルされていた場合、赤色の枠で囲まれたサンプルは A homozygote を、青色で囲まれたサンプルが G homozygote を、そして緑で囲まれたプロットが heterozygote をあらわすこととなります。同様に、点突然変異の検出などでも wild-type と mutant-type を分けることが可能です。

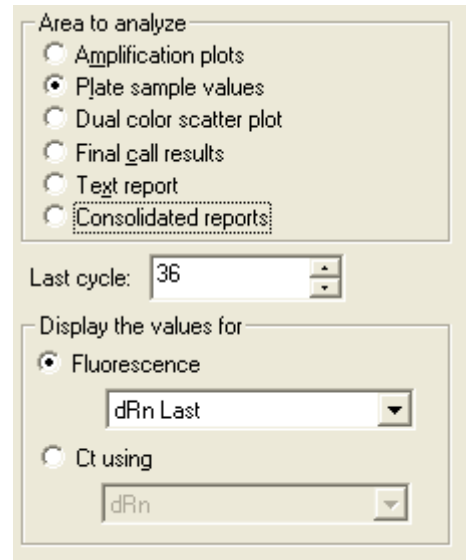
この分画は Dual color plot に示されている plot の位置によって自動的に規定され表示されます。最終的な Allele discrimination に際しては、それぞれの positive control、NTC の plot データによってマニュアルで修正することができます。

【Plate sample value】

・ Real-Time モードの操作パネル

【Last cycle】で Dual color plot で示される蛍光値を Amplification Plot のどのサイクルにするかを決定できます。

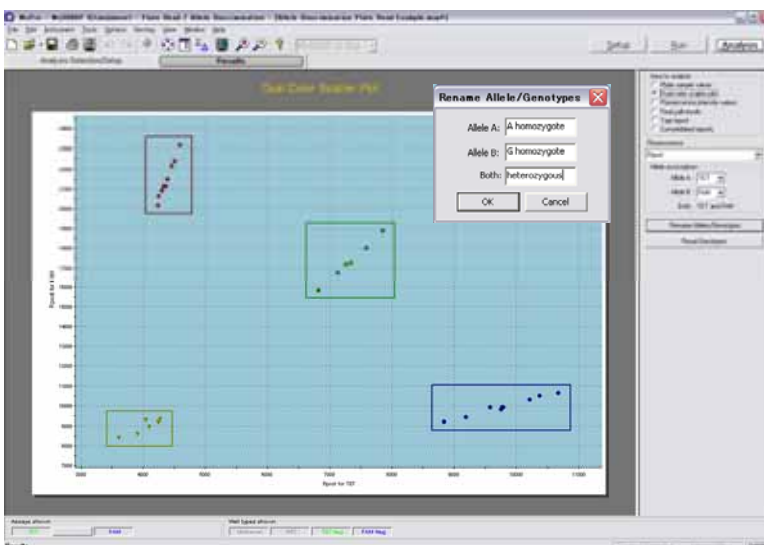
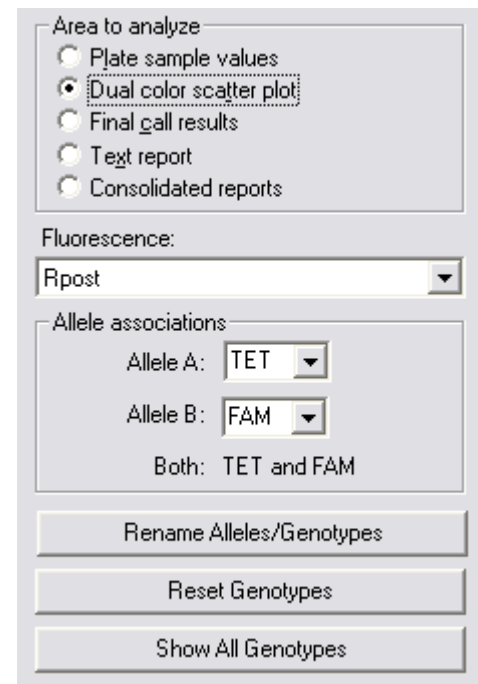
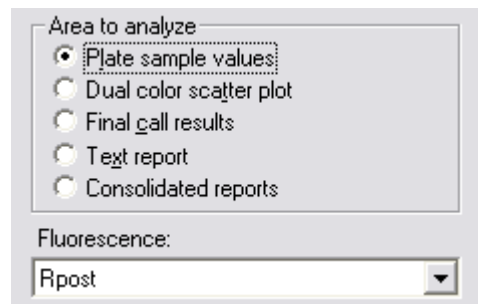
【Display the values for...】では、蛍光値を示すか、Ct 値を示すか、選択することが可能です。



・ Plate Read モードでの操作パネルは右に示すとおりで、各ウェルに蛍光値を表示させることができます。

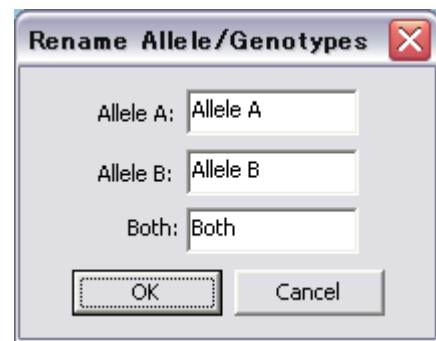
【Fluorescence】のボックスで、Rpost や Rpre など、解析したい蛍光データを選択できます。

Dual color scatter plot では、下に示すようなデータが表示されます。それぞれの Genotype を示すプロットが自動的に 4 つの四角形 (Rectangle) に囲まれて解析結果として表示されます。

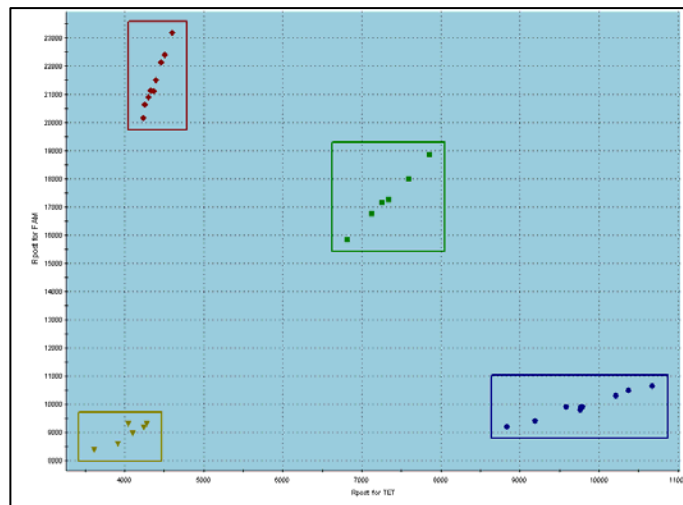


Allele associations では、**Rename Alleles/Genotypes** で設定された Allele に対する蛍光色を設定することができます。

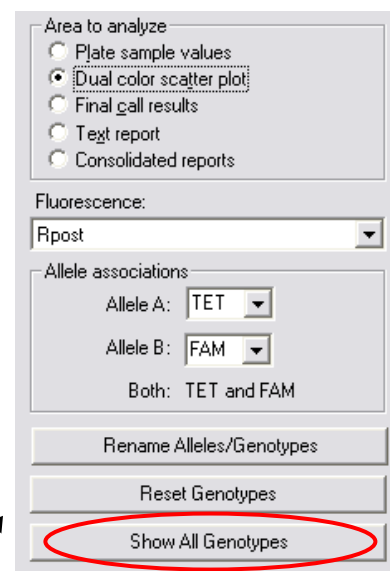
Rename Alleles/Genotypes ボタンをクリックすると下のダイアログが表示され、好きな名前に設定を変更できます。



右に Dual color scatter plot を示します。それぞれの Genotype を規定している rectangle はマニュアルで変更することができます。



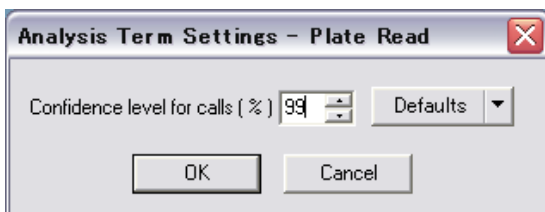
Rectangle の設定をデフォルト設定にする時には「**Reset genotype**」ボタンを、またデフォルトで Rectangle が表示されなかった場合には「**Show all genotype**」ボタンをクリックし、自在に Genotype を決定することができます。



下の赤丸のアイコンをクリックすると、confidence を設定することができます。



下のようなダイアログが開き、ユーザー自身で設定することができます。



【Final Call Result】では各ウェルに VIC あるいは FAM のいずれか、あるいは両方が NTC に比べて positive であったかどうか、という結果が表示されます。

【Text Report】では、各ウェルの Final Call をテキスト形式、エクセル形式で表示、エクスポートすることができます。 表示された全ての画面はパワーポイント形式でもエクスポートすることが可能です。

Allele Discrimination / SNP's Real-Time Experiment Type

Molecular Beacon probe を利用した場合

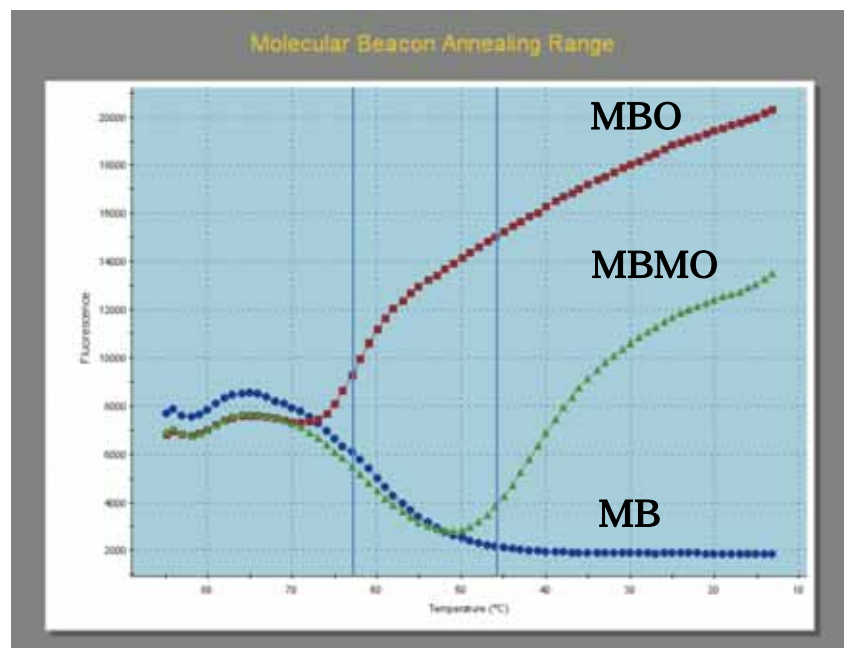
Molecular beacon プローブを利用した SNP 解析法は、日本ではあまり一般的な方法ではありませんが、簡単にご説明しておきます。

この実験方法では、allelic composition を決定するために、それぞれの allele に対応させた 2 つ蛍光色素でラベルした Molecular beacon を蛍光プローブとして利用します。各 allele に対応した molecular beacon を合成し、最初にこれらのプローブのアニーリング温度を調べることから実験は開始します。例えば A/G の SNP を検討する場合、A に一致したプローブと G に一致したプローブを、蛍光色素を変えてデザインし、それぞれの Allele のテンプレート（配列が既知のもの）を用意します。

例えば A allele に対応した molecular beacon のアニーリング温度をチェックする場合、次のセットを用意します。

- 1 : Molecular beacon のみ (MB)
- 2 : Molecular beacon + matched oligo (MBO)
- 3 : Molecular beacon + mismatched oligo (MBMO)

ひとつの Molecular beacon について、上の 3 つのサンプルで Molecular Beacon Melting Curve Experiment Type で解析を行います。その時の結果が右のように示されます。縦軸が蛍光強度で横軸が温度です。各温度での蛍光強度を知ることができます。

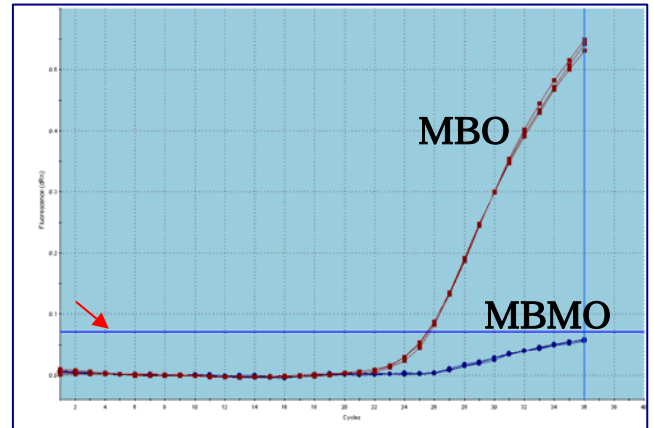


MBO サンプルでは、Molecular beacon の配列はテンプレートと一致していますので、低い温度からテンプレートに結合し、ループは開放した状態ですので強い蛍光を発しています。65 度付近で Molecular beacon はテンプレートと乖離しループを再構成するので蛍光はバックグラウンドレベルに消光します。一方 MBMO では、Molecular beacon は SNP の箇所ではテンプレートと 1 塩基のミスマッチがあり、低い温度では強い蛍光強度を示すものの、MBO に比べて低い温度（50 付近）でバックグラウンドレベル

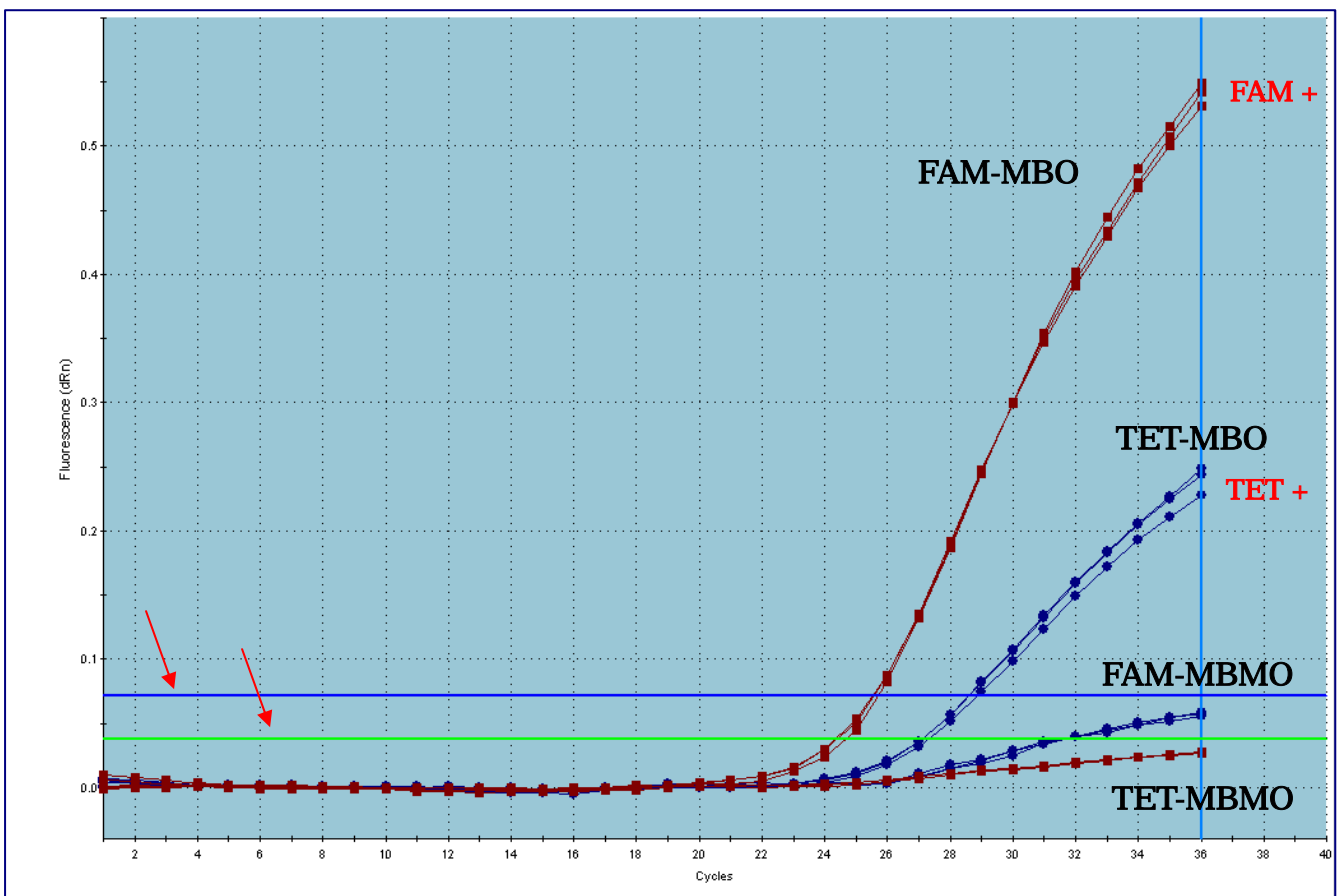
に消光してしまいます。この差を利用して SNP 解析を行います。このグラフでは 60 以下の温度帯では MBO と MBMO との間で十分な蛍光量の差が得られることが予測できます。

さて、上の実験をふまえて、MBO サンプルと MBMO サンプルでアニーリング温度を 55 度として PCR を行った場合、下のような結果が期待できます。

この際、赤矢印で示した threshold line は Minimum Ct Spread algorithm で設定されますが、マニュアルで MBMO の amplification plot の上に (MBMO の Ct 値が得られないように) マニュアルで設定します。

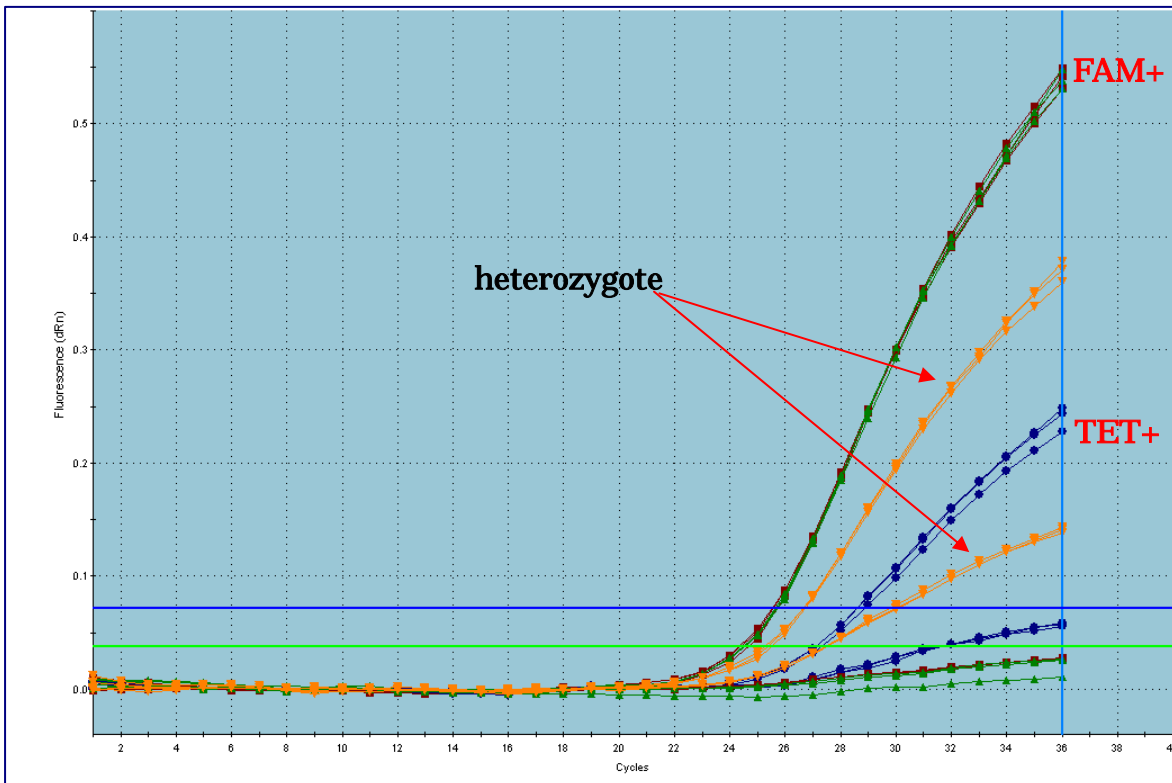


SNP 解析では 2 つの allele の解析を行うので、当然 2 つの Molecular beacon が用いられます。したがって、それぞれの Molecular beacon について上と同様の解析を行います。その結果を下に示します。



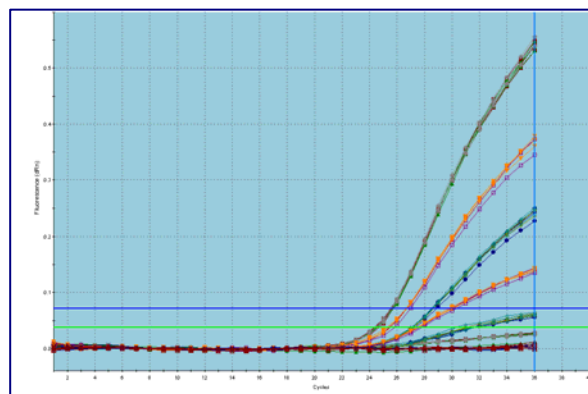
前ページの図でも、FAMとTETについて、それぞれFAM-MBMOおよびTET-MBMOの直上に threshold line を設定します。このようにすると、FAMあるいはTETでラベルされたそれぞれの Molecular beacon は完全に配列が一致したものと結合した場合のみ Ct 値が得られるようになり、区別することができます。

さて、前ページの図では、例えばFAMはA-alleleに、TETはG-alleleに対応するMolecular beacon だとして、サンプルが heterozygote であった場合、どのような蛍光シグナルになるか、次に示します。

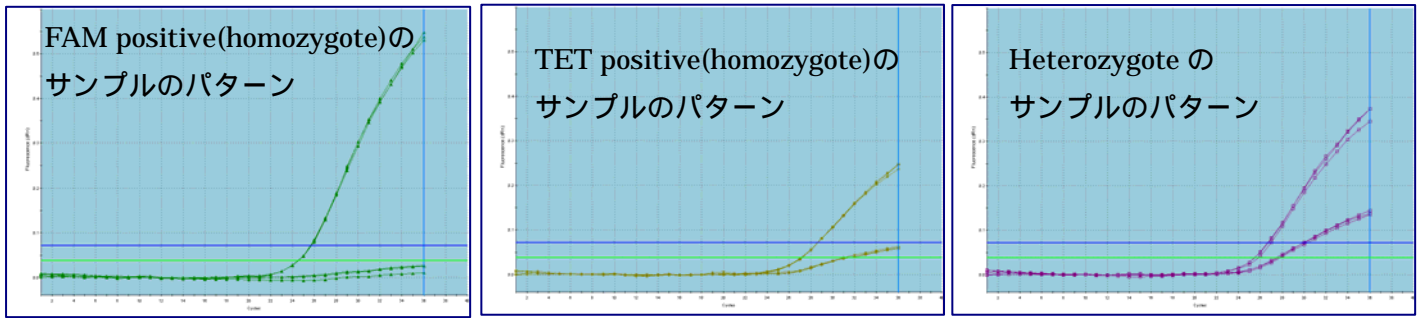


Heterozygote のサンプルは上のオレンジ色のラインのような蛍光強度を示します。

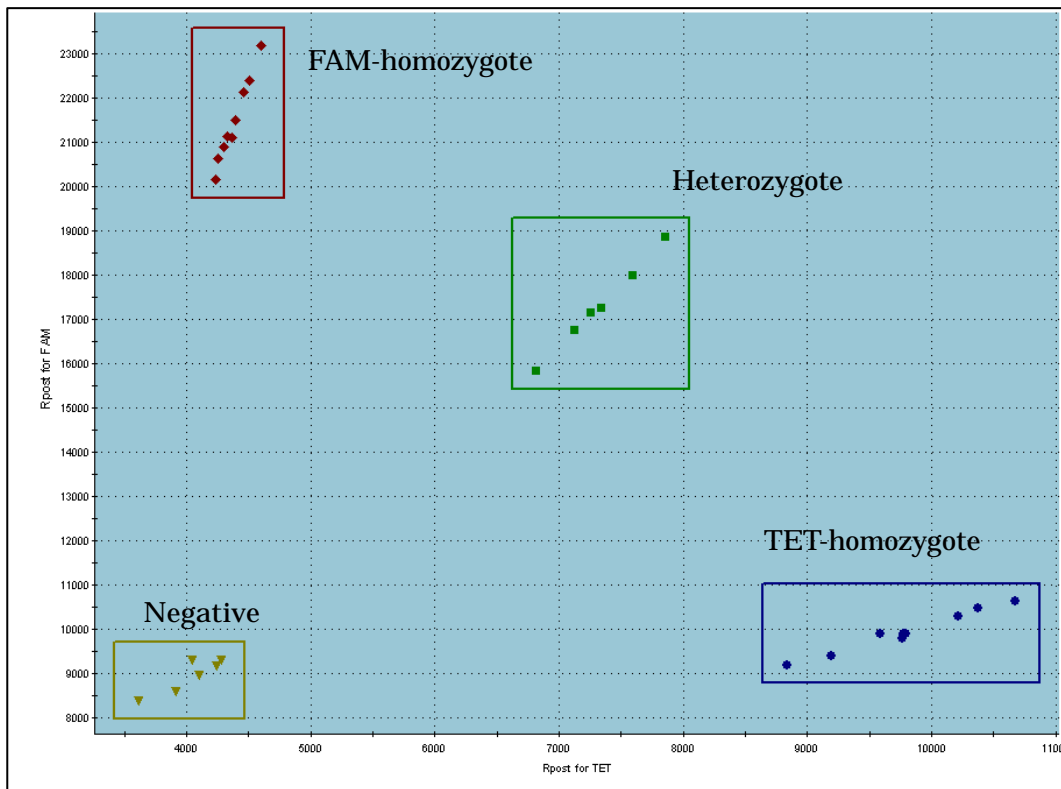
ここまで示したそれぞれの Molecular beacon についてのポジティブコントロール、ネガティブコントロールと合わせて、いくつかの unknown サンプルを測定した結果を右に示します。Threshold line を上述の要領で設定し、良好な結果を得られる位置を決定し測定していきます。



以下に、それぞれの典型的なパターンを示します。




これらのパターンを Dual Color Plot で表示すると下のように表示することができます。



Amplification plot で SNP 解析を行う方法論の利点は endpoint 法と異なり、amplification plot で得られた良好な蛍光値が得られるところを利用して解析が可能なことです。また Molecular beacon の Melting curve 解析が MxPro ソフトウェアのできるなので解析結果に自信を持てることも利点のひとつでしょう。

Molecular Beacon Melting Curve Analysis Quick Protocol

サーマルプロファイル終了後、Analysis Selection/Setup スクリーンが現れます。

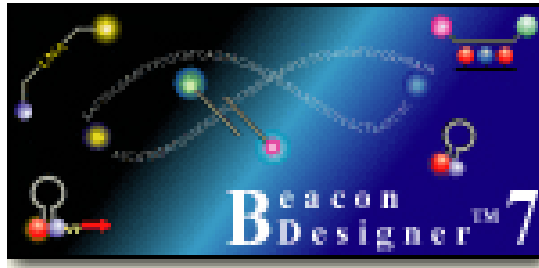
1. 解析するウェルをマウスと Shift キーおよび Ctrl キーで選択してください。
2. Select data collection ramp/plateau のボックスに表示されたリストより解析するデータのセットを選択してください。ランプあるいはプラトーに設定したコレクションマーカー の  タ解析を選択することができます。
3. レプリケート (individually と collectively) の設定を必要に応じて選択することができます。Adv.Algorithm Settings をクリックすることによって他のセッティングを解析に利用することもできます。
4. 次に Results タブを選択してください。
5. Area to analyze のボックスからデータ解析の方法を選択してください：

Annealing range スクリーンでは、テストしたモレキュラービーコンの最適なアニーリングレンジが表示されます。最適なレンジとは、モレキュラービーコンに完全に一致する合成オリゴ(MBO)が加えられたものとモレキュラービーコンに不一致なオリゴ(MBMO)が加えられたものとの蛍光強度の差が最も大きく、かつバックグラウンドの蛍光が低い温度です。

Melting curves/temperature スクリーンでは、テストしたモレキュラービーコンの溶解温度 (T_m) が算出・表示されます。

プライマー・プローブ・デザインソフトウェア

Beacon Designer



ウェブページは

http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html

or

<http://www.premierbiosoft.com/stratagene/stratagene.html>

Beacon Designer のスライドショーで使い方のご説明をご覧ください。

Windows 用、Mac 用のデモ版 CD もダウンロードしてご利用いただけます。

* Mac 用デモ版のダウンロードの際には MacOSX 添付のブラウザ「safari」ではなく、MS IE などを使ってダウンロードしてください。

グラジエントサイクラー

Introducing... the new **STRATAGENE GRADIENT CYCLER**
— state of the art in amplification technology.

Why settle for less when you can have it all?

- ▶ Flexibility – interchangeable blocks
- ▶ Speed – fast cycling capabilities
- ▶ Convenience – preloaded protocols and a USB port
- ▶ Reliability – 8 peltiers provide uniform results



Mx3000P および Mx3005P のタングステン・ランプ 交換方法

ランプの寿命は 1000 時間 ~ 2000 時間程度です。ランプの点灯・消灯などもランプの寿命に大きく影響してきます。

交換ランプのご用命は、

Cat# 401411 Mx3000P Real-Time PCR System Bulb ¥ 48,000 (2008 年 4 月現在)

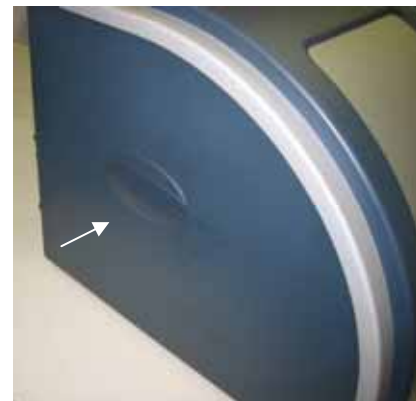
タングステン・ランプの交換

注意) 交換用ランプのガラス部分には手を触れないでください。
ランプを持つときは、右図のように持ちます。



最初に Mx3000P / Mx3005P の電源を OFF にします。

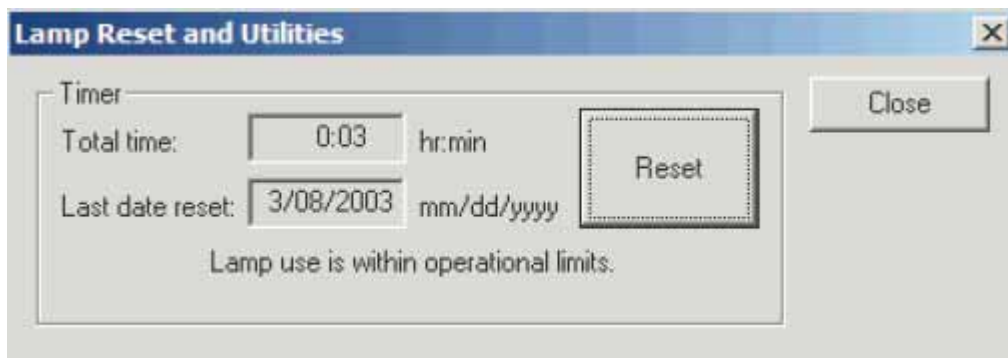
Mx3000P / 3005P のランプは、本体の左側面、
ランプハウス内にあります (右図矢印)。



- 1) ランプハウスのカバーパネルを取り外します。
カバーは2つのネジでとまっています。



- 2) のコネクタを手で外します。
- 3) のスクリューネジを手で回しながらゆるめます。
- 4) の古いランプを手で引いて取り外します。
ランプは熱い場合がありますので、ご注意ください。
- 5) 新しいランプをランプハウス内のソケット側の溝に合わせて装着します。
- 6) のスクリューネジを締めます。
- 7) のコネクタを手で接続します。
- 8) カバーパネルを元通りに戻します（ネジは2ヶ所）
- 9) ランプ交換後、Lamp Reset and Utilities のダイアログボックス内で、ランプタイマーをリセットしておいてください。



以上で、ランプ交換は完了です。古くなったランプは危険物として廃棄してください。

付録

1) Dye and Quencher choice

Filter Set	Ex Wavelength	Em Wavelength
Alexa 350	350	440
FAM/SYBR Green	492	516
TET	517	538
HEX/JOE/MC	535	555
CY3	545	568
TAMRA	556	580
ROX/Texas Red	585	610
CY5	635	665
FR 640	492	635
FR ROX	492	610
FR CY5	492	665

- **Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies):**
 - BHQ-1 480–580 nm
 - BHQ-2 550–650 nm
 - BHQ-3 620–730 nm
- **Iowa Black (Integrated DNA Technologies)**
 - Iowa Black-FQ 420–620 nm
 - Iowa Black-RQ 500–700 nm

2) 相対定量法で用いられている計算式

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

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

3) 増幅効率の計算式

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

その他、MxPro ソフトウェアの使用方法、リアルタイム定量 PCR に関するご相談などのご遠慮なくストラタジーン・テクニカルサービスまでお問い合わせください。

STRATAGENE

An Agilent Technologies Division

Stratagene's

Mx3000^P / Mx3005^P

Realtime QPCR system

STRATAGENE

An Agilent Technologies Division

Change
is part of
life, science.

Stratagene has changed
to Agilent Technologies

A transition question?
[Click here to learn more.](#)

アジレントテクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9 - 1

ストラタジーン製品 テクニカルサービス

電話 : 0 1 2 0 - 4 7 7 - 1 1 1

e-mail : jtech@agilent.com