



2023 年 4 月

# QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 用 Investigator® Quantiplex® Pro ハンドブック

法医学サンプルにおけるヒトおよび男性 DNA  
定量用

# 目次

キットの内容物 .....	4
出荷と保管 .....	5
用途 .....	5
安全情報 .....	5
品質管理 .....	6
はじめに .....	7
原理と手順 .....	8
ターゲット領域 .....	8
内部コントロール .....	9
Quantiplex Pro Reaction Mix .....	10
男性コントロール DNA M1 と標準曲線 .....	11
通常作業のためのテンプレートファイル .....	11
ユーザーが準備する装置と試薬 .....	12
重要な注意 .....	13
キットとプロトコールの選択 .....	13
汚染リスク .....	13
コントロール .....	13
プロトコール：Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit と QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用したサイクラーキャリブレーション .....	15
プロトコール：QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用した DNA の定量 .....	20
QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool を使用したデータの解釈 .....	41
結果の全般的解釈 .....	51

データ解析に関する全般的な考慮事項.....	51
標準曲線.....	51
内部コントロール.....	52
未知 DNA の定量.....	53
女性／男性 DNA の混合物の定量.....	54
分解状態の評価.....	54
トラブルシューティングガイド.....	56
付録：代わりとなる標準曲線.....	60
発注情報.....	62
文書改訂履歴.....	64

# キットの内容物

## Investigator® Quantiplex® Pro Kit (200)

カタログ番号

387216

20  $\mu$ L 反応液数

200

Quantiplex Pro Reaction Mix	1 x 1.9 mL
Quantiplex Pro Primer Mix	1 x 1.9 mL
Male Control DNA M1 (男性コントロール DNA M1) (50 ng/ $\mu$ L)	0.2 mL
QuantiTec® Nucleic Acid Dilution Buffer	1 バイタル
Quick-Start Protocol (クイックスタートプロトコール)	1

## 出荷と保管

キットの試薬は、受領後直ちに恒温冷凍庫に入れ、-30 から-15°Cの温度で保管してください。キットコンポーネントは、最初に使用した後は 2~8°Cで保管し、凍結させないようにしてください。QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer も、-30 から-15°Cの温度で保管してもかまいません。Quantiplex Pro Primer Mix は、遮光して保存する必要があります。DNA サンプルは、PCR 試薬と一緒に保管しないでください。これらの条件下であれば、コンポーネントはキットに記載された有効期限まで安定した状態を保ちます。

## 用途

Investigator Quantiplex Pro Kit は、法医学、ヒト個人識別、父子鑑定における分子生物学アプリケーション用です。本製品を疾病の診断、予防、治療に使用することはできません。

本製品の取り扱いには、しかるべき配慮と注意を払う必要があります。当社は QIAGEN®製品のすべてのユーザーに対し、組換え DNA 実験用に作成された NIH ガイドライン、またはその他の該当するガイドラインに従うことを推奨します。

## 安全情報

薬品を取り扱う際には、適切な白衣、使い捨て手袋、保護メガネを必ず着用してください。詳細は、該当する安全データシート (Safety Data Sheets, SDS) を参照してください。SDS は、[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) からオンラインで、便利でコンパクトな PDF 形式で入手できます。このサイトで、QIAGEN キットおよびキットコンポーネントの SDS を検索、表示、印刷することができます。

## 品質管理

QIAGEN の ISO 認定品質管理システムに従い、既定の仕様に照らし合わせて Investigator Quantiplex Pro Kit の各ロットの検査が行われ、製品の一貫した品質が保証されています。Investigator Quantiplex Pro Kit は ISO 18385 の要件を満たしています。

## はじめに

ヒト同定は一般的に、検査の要件やサンプルの質に応じて、ショートタンデムリピート (Short Tandem Repeats、STR)、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms、SNP)、または欠失／挿入多型 (Deletion Insertion Polymorphisms、DIP) の解析に基づいて行われます。これらのヒト同定に使用されるマルチプレックスアッセイは、定義した範囲のテンプレートインプットを必要とする複合システムです。

Investigator Quantiplex Pro Kit では、定量的リアルタイム PCR を使用して、サンプル内のヒトゲノム DNA、男性 DNA、および DNA の損傷の程度を定量的に解析することができます。このキットは、サンプルに DNA フィンガープリントによる分析 (STR、DIP、SNP 解析など) を可能にするために十分な DNA が含まれているかどうかを確認できるように設計されています。さらに、キットは、解析の妨げになるような反応阻害物質が含まれているかどうか、さらなる精製が必要かどうかの判断にも役立ちます。また、DNA 分解システムを使用すれば、DNA の分解状態をより精密に評価することが可能です。

Investigator Quantiplex Pro Kit はホットスタート DNA ポリメラーゼ酵素と QuantiNova Guard 添加剤を使用します。これらのユニークな構成要素の組み合わせにより、抗体型のホットスタートの厳密性はさらに向上します。

キットの特徴には、正しいピペッティングを視覚的に識別できるビルトインコントロールや、PCR の感度や効率を失うことなくサイクル段階を短縮できるバッファー添加剤である Q-Bond<sup>®</sup>も含まれています。

## 原理と手順

Investigator Quantiplex Pro Kit は、そのまま使用できるシステムで、ヒトおよび男性 DNA の検出と DNA 分解度の評価を定量リアルタイム PCR を使用して並行して行えます。キットは、法医学データベースやケースワークサンプルからヒト DNA を迅速かつ正確に定量します。

増幅の検出は TaqMan®プローブと高速 PCR ケミストリーを使用して行われます。二重標識プローブには、5'末端および 3'末端にそれぞれ蛍光レポーターとクエンチャーが含まれています。PCR の伸長フェーズ中に、DNA ポリメラーゼの 5'および 3'エキソヌクレアーゼ活性がクエンチャーから蛍光色素を切断します。その結果、蛍光が PCR 産物の蓄積量に比例した量で検出可能になります。

## ターゲット領域

ヒト DNA 定量 (4NS1C®) のターゲット領域はヒトゲノムのいくつかの常染色体に存在する 91 bp の独自の領域です。この領域が選択されたのは高い感度が実現できるためで、QuantStudio 5 Real-Time PCR System の FAM™色素チャンネルを使用して検出されます。

さらに、キットを使用することで、91 bp の 4NS1C 常染色体ターゲットと同じ遺伝子座を標的にしつつ、より長い常染色体増幅産物 (353 bp) が検出できます。常染色体ターゲットのサイズが異なるため、DNA 分解には長い常染色体ターゲットの方が感度が高く、DNA の分解状態により正確な評価が可能となります。このより大きい 353 bp の常染色体定量ターゲット領域は、QuantStudio 5 Real-Time PCR System の ATTO 550 色素チャンネルを使用して検出されます。

男性 DNA 定量のターゲット領域は、女性 DNA と男性 DNA が混在するサンプルについて高い感度を実現するために選択されました。これは QuantStudio 5 Real-Time PCR System の ATTO 647N 色素チャンネルを使用して、81 bp 断片として検出されます。



## 内部コントロール

さらに、Investigator Quantiplex Pro Kit には、増幅が問題なく行われるかをテストし、また PCR 阻害物質の特定を行うために使用する、増幅用内部コントロールがバランス良く含まれています。このヘテロ接合性増幅システムは、QuantStudio 5 Real-Time PCR System の JOE™ 色素チャンネルを使って、434 bp 内部コントロール (Internal Control、IC) として検出されます。IC はヒトや男性 DNA の定量ターゲットに比べて、阻害物質に対する感度が高くなるように設計されています。DNA 標準用 IC システムの  $C_T$  値と未知のサンプル用 IC システムの  $C_T$  値を比較すると、未知のサンプルで反応が阻害されているかどうかを判断する目安になります。したがって、IC システムでサンプルに阻害物質が存在することが報告されたとしても、DNA 定量の結果は通常、信頼性のあるものとなります。サンプル中の阻害物質の存在はダウンストリームアプリケーションに影響を与える可能性があるため、考慮する必要があります。

阻害の検出基準を決定するために、関連する阻害物質に対する実験室検証を実施する必要があります。

表 1. Investigator Quantiplex Pro Kit 用 QuantStudio 5 Real-Time PCR System のターゲット、アンプリコン長、チャンネル

ターゲット	アンプリコン長	チャンネル	倍数性	コピー数
ヒトターゲット、小型常染色体、(ヒト)	91 bp	FAM	二倍体	マルチコピー
ヒトターゲット、大型常染色体、(分解)	353 bp	ATTO 550	二倍体	マルチコピー
ヒト男性ターゲット (男性)	81 bp	ATTO 647N	二倍体	マルチコピー
内部 PCR コントロール	434 bp	JOE	該当なし	合成フラグメント

## Quantiplex Pro Reaction Mix

Quantiplex Pro Reaction Mix には、ホットスタート DNA ポリメラーゼおよび Quantiplex Pro 反応バッファーが含まれています。DNA ポリメラーゼは不活性状態で提供され、環境温度では酵素活性を示しません。抗体型ホットスタートのメカニズムによって、反応液のセットアップおよび初回の変性ステップ中における非特異的 PCR 産物やプライマーダイマーの形成、伸長が阻止されます。したがって、このメカニズムを使用することで、PCR の特異性の向上と正確な定量が可能になります。低温では DNA ポリメラーゼは抗体および QuantiNova Guard によって不活性状態を保ちますが、これにより複合体が安定するとともにホットスタートの厳密性が向上します。2 分間 95°C に温度を上げると、抗体および QuantiNova Guard は変性し、DNA ポリメラーゼが活性化して PCR 増幅が可能になります。ホットスタートで急速かつ簡単に室温の設定が行えます。

さらに、Quantiplex Reaction Mix には、添加剤である Q-Bond が含まれています。Q-Bond を使用すると標準サイクラーおよび高速ランプ速度の高速サイクラーでサイクリング時間が短縮されます。Q-Bond は DNA ポリメラーゼの短い 1 本鎖 DNA に対する親和性を高め、プライマー／プローブアニーリングに必要となる時間を数秒まで短縮します。さらに、独自のバッファー構成が DNA の融解挙動を助け、変性およびアニーリング／伸長時間が短縮されて、全体の PCR のランタイムが約 60 分になります。

Quantiplex Pro Reaction Mix もまた、独自の QIAGEN PCR バッファーシステムをベースにしています。バッファーには KCl および NH<sub>4</sub>Cl がバランス良く配合され、各 PCR サイクルのアニーリングステップ中に、特異的プライマー結合が非特異的に対して高い比率で行われるように促します。これによって厳密なプライマーのアニーリング環境が生成され、PCR の特異性を高めます。

## 男性コントロール DNA M1 と標準曲線

DNA 定量用標準は正確な解析にとって非常に重要です。各アッセイの標準曲線には、4 つの濃度点をもつ 27 倍の希釈液のシリーズを使うことを強く推奨します。コントロール DNA には、濃度 50 ng/μL の男性 DNA プールが含まれています。滴下の正確性を確保するために、希釈液に対する DNA の最小インプット量は 5 μL にする必要があります。標準曲線は手軽な 1 : 27 希釈液シリーズを使用して簡単にセットアップできるように設計されています。QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を使用して Control DNA を希釈すると、希釈液は 2~8°C の環境で 1 週間以上安定しています。

**重要：** Male Control DNA M1 は、Investigator Quantiplex Kits と併用する場合にのみ最適化されています。

## 通常作業のためのテンプレートファイル

装置のセットアップと QuantStudio 5 Real-Time PCR System での結果の解析を能率化するため、QIAGEN はテンプレートファイルのセットをご用意しました。テンプレートファイルは、[www.qiagen.com/QPpro-template-files](http://www.qiagen.com/QPpro-template-files) の製品群のページからダウンロードしてください。

# ユーザーが準備する装置と試薬

薬品を取り扱う際には、適切な白衣、使い捨て手袋、保護メガネを必ず着用してください。詳細は、製品の供給元が提供する適切な安全データシート（Safety Data Sheet, SDS）を参照してください。

## 器具

- 冷却装置または氷
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System

## 資材

- ピペットおよびピペットチップ
- PCR チューブまたはプレート（お使いのサーマルサイクラーのメーカーが推奨する PCR またはプレートを使用）

## 試薬

- ヌクレアーゼフリー（RNase/DNase-フリー）の消耗品：ヒト DNA に対して高い検出感度に PCR をセットアップするために使用する、あらゆる試薬や消耗品がヌクレアーゼで汚染されることを避けるため、細心の注意を払う必要があります。

## Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit (カタログ no. 387416)

- キャリブレーション標準 FAM、キャリブレーション標準 JOE、キャリブレーション標準 ATTO 550、キャリブレーション標準 ROX、キャリブレーション標準 ATTO 647N、Quantiplex Pro キャリブレーションバッファー

# 重要な注意

## キットとプロトコールの選択

本ハンドブックには、QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用した DNA 定量用のプロトコールや推奨事項が記載されています。ここにリストアップされたもの、または *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems* 用 HB-2335 Investigator® Quantiplex® Pro ハンドブックに記載されたもの以外のリアルタイムサイクラーは、QIAGEN による Investigator Quantiplex Pro Kit を使用した、DNA の定量に向けた検証を行っていません。

## 汚染リスク

増幅が完了したら、反応プレート上のシールを剥がさないでください。プレートのシールを剥がすと、その後増幅するサンプルを汚染するリスクが高まります。

クロスコンタミネーションを最小限に抑えるため、すべての反応混合物は DNA 分離や PCR 産物の分析 (post-PCR) に使用する場所から離れた場所でセットアップしてください。また、それらを最小限に抑えるため、フィルターの付いた使い捨てのチップを使用してください。

## コントロール

### テンプレートなしのコントロール (No-template control、NTC)

汚染を検出するために、複数の NTC 反応液を各定量ランに含める必要があります。NTC は、テンプレート以外の反応溶液成分がすべて含まれます。Investigator Quantiplex Pro Kit を使用した定量は高感度です。Quantiplex Kit に含まれる試薬は、ヒト DNA 汚染フリーであることを評価するため厳格な品質管理を行っていますが、高感度アッセイであるため、まれにバックグラウンド DNA が検出されることがあります。NTC をピペッティングする際は細心の注意を払ってください。

NTC 反応は、少なくとも複数測定することを推奨します。

## 内部陽性コントロール

内部陽性コントロール (TaqMan プローブを使用して検出) は、増幅が問題なく行われたことの検査および PCR 阻害物質の存在の検出に使用します。内部コントロール用のプライマー、TaqMan プローブ、テンプレートはすべて Quantiplex Pro Primer Mix に含まれています。

## QuantStudio 5 Real-Time PCR System のキャリブレーション

QuantStudio 5 Real-Time PCR System を Investigator Quantiplex Pro と併用する場合、FAM、JOE、ATTO 550、ROX、ATTO 647N 用のカスタム色素のキャリブレーションが必要です。最適なパフォーマンスを達成するため、Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit (カタログ番号 387416) でキャリブレーションを実施してください。正しいセットアップの詳細な情報については、装置のユーザーガイドを参照してください。

# プロトコール：Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit と QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用したサイクラーキャリブレーション

このプロトコールは、QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) を使用して、QuantStudio 5 Real-Time PCR System で Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit を使用するために最適化されています。

装置のキャリブレーションについての全般的な情報は、*QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument User Guide* を参照してください。

## 開始する前の重要な留意点

- キャリブレーション用プレートは、DNA 分離や PCR 産物の解析 (PCR 後) に使用する場所から隔離された場所でセットアップしてください。
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System 関連の消耗品 (光学用 96 ウェル反応プレートおよび光学用粘着フィルム) を使用してください。
- クロスコンタミネーションを最小限に抑えるため、疎水性のフィルター付の使い捨てのチップを使用してください。
- 連続分注用ピペットを使用すれば、1 つの色素に割り当てられたプレートの 96 ウェルすべてに迅速に 20  $\mu$ L を分注することができます。
- 連続分注用ピペットには、使い捨ての個別包装された無菌分注用リピートチップを使用してください。
- 必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを使用してください。プレートのウェル、光学用粘着フィルム、プレートの底には触れないでください。

- Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit でカスタム蛍光色素のキャリブレーションを行う前に、ターゲット (Regions of Interest, ROI) やバックグラウンドのキャリブレーションを実施することをおすすめします。ROI やバックグラウンドのキャリブレーションの実施方法の詳細については、*QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument User Guide* をご覧ください。

## 操作手順 A：キャリブレーション用プレートセットアップ

1. 必要に応じてキットの試薬を解凍、使用前にキットの試薬すべてを混合します。
2. 各キャリブレーション用標準液から溶液を分取する前に少なくとも 5 秒間ボルテックスします。
3. 表 2 に示すように、各 Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit 標準液は、個別のチューブ (5 mL 反応チューブなど) で希釈します。

表 2. Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit 標準液の希釈図

試薬	容量 (μl)				
キャリブレーション標準液 FAM	23	-	-	-	-
キャリブレーション用標準液 JOE	-	23	-	-	-
キャリブレーション用標準液 ATTO 550	-	-	23	-	-
キャリブレーション用標準液 ROX	-	-	-	23	-
キャリブレーション用標準液 ATTO 647N	-	-	-	-	23
Quantiplex Pro Calibration Buffer	2277	2277	2277	2277	2277
<b>合計容量</b>	<b>2300</b>	<b>2300</b>	<b>2300</b>	<b>2300</b>	<b>2300</b>

4. 各キャリブレーション標準液は、少なくとも 5 秒間ボルテックスして混合します。



5. 各 Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit 標準液ごとに Optical 96-well reaction plate を割り当て、ラベル表示します (合計 5 個)。
6. 希釈した Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit の FAM 標準液 20  $\mu$ L を、色素ごとに割り当てられた光学用 96 ウェル反応プレートに分注します。
7. プレートに光学用粘着フィルムで封じます。
8. 以上のステップを、他の残りの Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit 標準液 (JOE、ATTO 550、ROX、ATTO 647N) のそれぞれについて繰り返します。
9. プレートを軽く遠心分離機にかけます。必ずプレートは遮光保存してください。
10. キャリブレーション後は、キャリブレーション用プレートを、 $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-15^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内で、遮光保存します。キャリブレーション用プレートは、最大 3 か月まで保存や再利用が可能です。

## 操作手順 B : QuantStudio 5 Real-Time PCR System 用のキャリブレーションプロトコール

1. サイ클ラーをスタートして、ホーム画面の **Settings** (設定) メニューを入力します。  
**Maintenance and Service** (メンテナンスとサービス) を選択します。
2. **Calibrations** (キャリブレーション) をクリックし、次に **Custom** (カスタム)、**Custom Dye** (カスタム色素) をクリックします。
3. **Add Custom Dye** (カスタム色素を追加) を選択します。
4. 新しい染色色素名として **QPP\_FAM** と入力し、**Reporter** (レポーター) が選択されていることを確認したら、**Save** (保存) をクリックします。
5. 操作手順 A で調製した QPP\_FAM プレートを装置に装填します。
6. キャリブレーション温度に **60°C** と入力します。
7. **Start** (開始) を押します。

8. キャリブレーションが完了すると、画面に **Calibration Complete** (キャリブレーション完了) と表示されます。詳細を確認するには、**View Results** (結果を表示) を押します。QPP\_FAM キャリブレーションスペクトルは、フィルター-x1-m1 で高いシグナルを示すはずですが、他の QPP 染色色素については、表 3 を参照してください。

表 3. 蛍光色素フィルターでのキャリブレーション

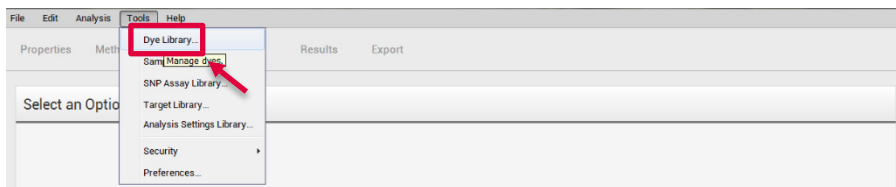
カスタム色素	フィルターでのシグナル
QPP_FAM	x1-m1
QPP_JOE	x2-m2
QPP_ATTO550	x3-m3
QPP_ROX	x4-m4
QPP_ATTO647N	X5-m5

9. 以下の染色色素にはステップ 1 からステップ 8 を繰り返します：

- QPP\_JOE
- QPP\_ROX
- QPP\_ATTO550
- QPP\_ATTO647N

### 操作手順 C：Quantiplex Pro 染色色素を QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) に追加

1. QuantStudio Design and Analysis Software を開き、**Tools** (ツール) > **Dye Library** (染色色素ライブラリー) を選択します。

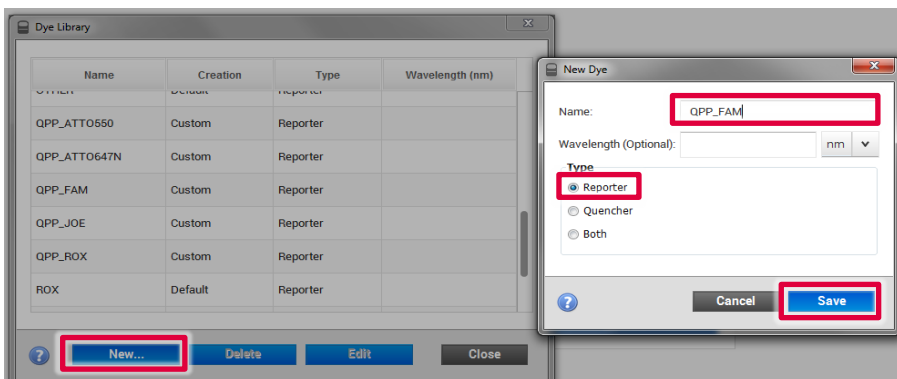


2. **New** (新規) をクリックしてすべての QPP 染色色素を追加します：

- QPP\_FAM
- QPP\_JOE
- QPP\_ROX
- QPP\_ATTO550
- QPP\_ATTO647N

**重要：**カスタム染色色素のキャリブレーション時には、Dye Library（染色色素ライブラリー）に入力した染色色素名が、QuantStudio 5 に入力した染色色素名と正確に一致している必要があります！

各染色色素に **Reporter**（レポーター）が選択されていることを確認して、**Save**（保存）をクリックします。



# プロトコール：QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用した DNA の定量

このプロトコールは、QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) を使用して、QuantStudio 5 Real-Time PCR System で Investigator Quantiplex Pro Kit を使用するために最適化されています。

装置のセットアップや他のソフトウェアのバージョンについての全般的な説明は、*QuantStudio 5 Real-Time PCR 装置ユーザーガイド*を参照してください。

## 開始する前の重要な留意点

- すべての反応混合液のセットアップは、DNA 分離や PCR 産物の解析 (PCR 後) に使用する場所から隔離された場所で行ってください。
- クロスコンタミネーションを最小限に抑えるため、疎水性のフィルター付の使い捨てのチップを使用してください。
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System を Investigator Quantiplex Pro と併用する場合、FAM、JOE、ATTO 550、ROX、ATTO 647N 用のカスタム色素のキャリブレーションが必要です。最適なパフォーマンスのため、Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit でキャリブレーションを実施してください。
- プロトコールで規定されているサイクル条件を使用してください。サイクルは、このアッセイ用に最適化されています。
- プロトコールで規定されているテンプレート容量を使用してください。反応液は、正確に 2  $\mu$ L のテンプレート DNA の使用に対して最適化されています。反応液 20  $\mu$ L につき 2  $\mu$ L を超える量または 2  $\mu$ L 未満の量を使用しないでください。
- DNA 定量用標準液の QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer (QuantiTect 核酸希釈用バッファー希釈液) は、2~8°C で少なくとも 1 週間保存できます。
- 正確な定量データを得るには、最適な解析設定が不可欠です。ランごとに、各レポーター染料チャンネルの解析用に解析設定 (ベースラインの設定や閾値) を再調整してください。

## 操作手順 A : PCR

1. 塩濃度むらを回避するため、使用前にすべての溶液を十分に混合してください。
2. 表 4 に従って、Male Control DNA M1 の新鮮な段階希釈液を調製します。各希釈液は少なくとも 5 秒間ボルテックスし、次の希釈用のアリコートを取り分ける前に軽く遠心分離機にかけます。各希釈には新しいピペットチップを使用してください。絶対にクロスコンタミネーションが生じないようにしてください。

**注釈：**代替にできる標準曲線は付録の 60 ページにリストアップされています。

表 4. Male Control DNA M1 の段階希釈

コントロール DNA の段階希釈 (ng/ $\mu$ L)	コントロール DNA ( $\mu$ L)	QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer ( $\mu$ L)
50	未希釈 DNA	-
1.8519	5	130
0.0686	5	130
0.0025	5	130

3. テンプレートの核酸を解凍します。  
塩濃度むらを回避するため、使用前にすべての溶液を十分に混合してください。
4. 表 5 に従って、マスターミックスを調製します。  
マスターミックスには、テンプレート（サンプル）DNA とヌクレアーゼフリー水以外の、PCR に必要なすべての構成要素が含まれています。  
実施する PCR アッセイの合計数に必要な容量より 10% 容量の多いマスターミックスを調製します。これには、ポジティブコントロールとネガティブコントロールのための反応液を含める必要があります。  
反応のセットアップは通常室温 (15~25°C) で行うことができます。ただし、試薬、サンプル、コントロールは氷上または冷却装置内で保管することを推奨します。

表 5. DNA 定量用のマスターミックス

試薬	反応液 20 $\mu$ l あたりの 容量	最終濃度
Quantiplex Pro Reaction Mix	9 $\mu$ l	1x
Quantiplex Pro Primer Mix	9 $\mu$ l	1x
<b>マスターミックスの合計容量</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	-

5. マスターミックスを十分に混合して、PCR プレーットのウェルに 18  $\mu$ l 分注します。
6. NTC のウェルに、2  $\mu$ l の QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を添加します。  
NTC のウェルがヒト DNA と接触しないようにしてください。
7. 2  $\mu$ l のコントロール DNA 希釈液または 2  $\mu$ l の未知のサンプル DNA を別個のウェルに添加し、十分に混合します。プレートを密閉します。  
塩濃度むらを回避するため、良く混合します。  
表 6 に、可能なプレートセットアップを示します。マスターミックスとテンプレート  
を十分に混合してください。  
コントロール DNA は、アッセイごと、また反応プレートごとに二重測定する必要があります。

表 6. QuantStudio 5 Real-Time PCR System での反応に対する可能なプレートセットアップ

ウェルの内容物

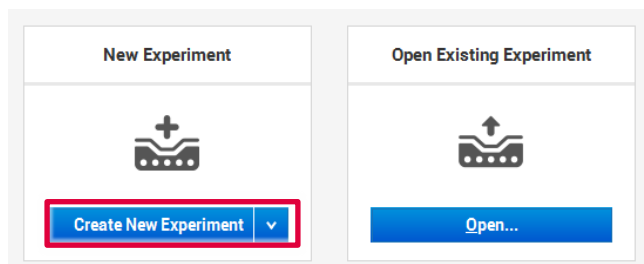
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	50	50	1.8519	1.8519	0.0686	0.0686	0.0025	0.0025	NTC	NTC	UNK	UNK
<b>B</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>C</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>D</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>E</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>F</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>G</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK
<b>H</b>	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK	UNK

内容物の単位はすべて ng/μL。NTC、no-template control（テンプレートなしのコントロール）；UNK、unknown sample（未知のサンプル）。

8. QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) を開きます。
9. ランをセットアップするためのいくつかのオプションを次に説明します：
  - テンプレートファイルを使用してマニュアルでプレートセットアップを行う場合、ステップ 20 に進んで DNA サンプル名を定義し、プレートのレイアウトに割り当ててください。その後ステップ 25 に進み、ランを開始します。
  - テンプレートファイルを使用しており、さらにプレートセットアップのために TXT セットアップファイルを使用している場合には、36 ページの「操作手順 B：テンプレートファイルとプレートセットアップのファイルを使用した実行のセットアップ」に進んでください。
  - テンプレートファイルを使用していない場合、以下のステップ10に進んでください。

テンプレートファイルは、標準曲線の設定やサイクルのプロファイル、ターゲットの蛍光シグナルなど、Investigator Quantiplex Pro のランを開始するために必要なすべての設定をします。テンプレートファイルは、[www.qiagen.com/QPpro-template-files](http://www.qiagen.com/QPpro-template-files) の製品群のページからダウンロードしてください。

10. テンプレートファイルを使用していない場合は、**Create New Experiment**（新規の実験を作成）を選択してください。



11. **Properties** (プロパティ) タブで、Experiment Properties (実験のプロパティ) の以下の設定を確認します：

Instrument type: **QuantStudio™ 5 System**

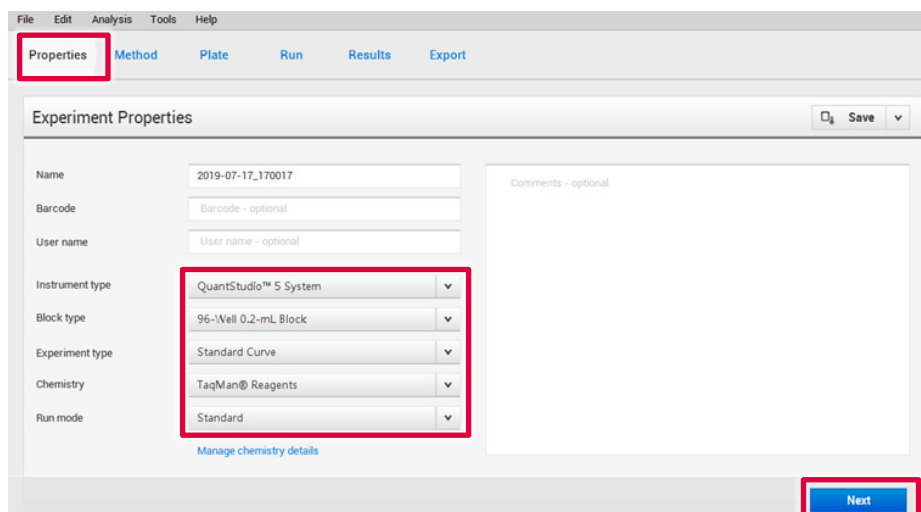
Block type: **96-Well 0.2 mL Block**

Experiment type: **Standard Curve**

Chemistry: **TaqMan® Reagents**

Run mode: **Standard**

次に、**Next** (次へ) をクリックします。





12. **Method**（方法）タブで、保持時間を表7にあるように変更して温度プロフィールを調整します。**Volume**（容量）を **20  $\mu$ L** に変更します。

データ取得は、アニーリング／伸長ステップで実行します。

**Next**（次へ）をクリックします。

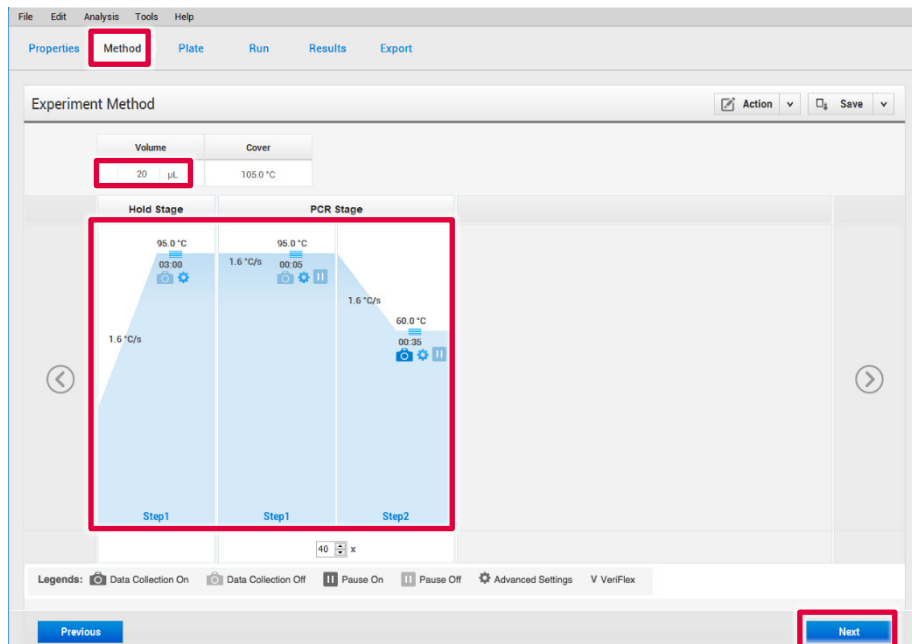
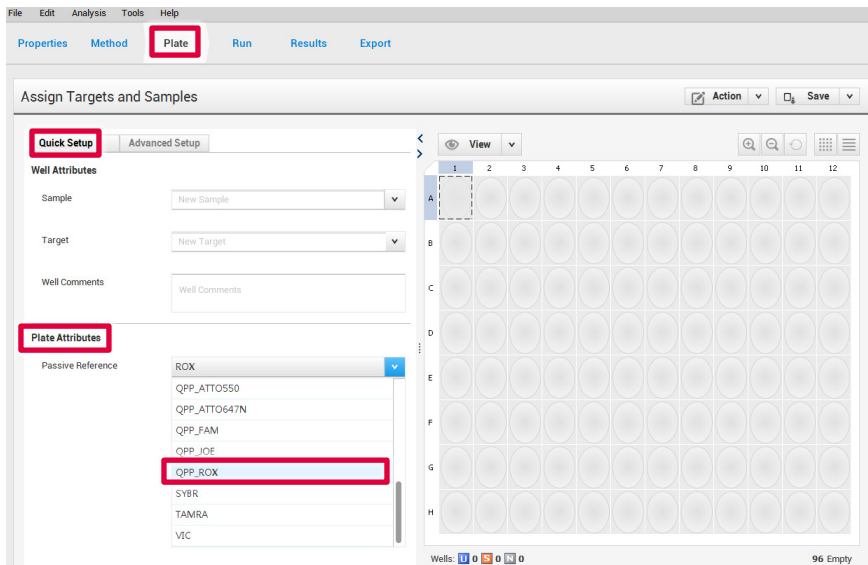


表 7. QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用したサイクルのプロトコル

段階	温度	時間	サイクル数	コメント
最初の PCR 活性化ステップ	95°C	3 分	-	PCR は、DNA ポリメラーゼを活性化させるために、まず 95°C でインキュベーションする必要があります。
変性	95°C	5 秒	40	
アニーリング／伸長	60°C	35 秒		蛍光データを取得

13. **Plate** (プレート) タブで、**Quick Setup** (クイックセットアップ) を選択します。次に **Plate Attributes** (プレートの特性) > **Passive Reference** (パッシブリファレンス) で **QPP\_ROX** を選択します。



14. 再度 **Plate** (プレート) タブで、**Advanced Setup** (詳細セットアップ) を選択します。**Add** (追加) を 3 回クリックしてから、表 8 に記載されているターゲットを追加します。

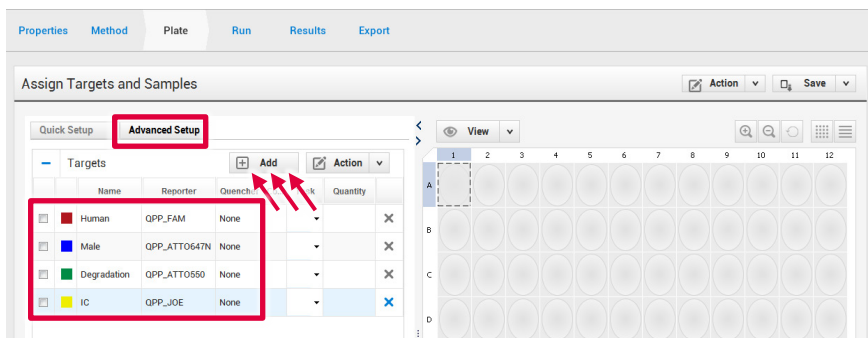
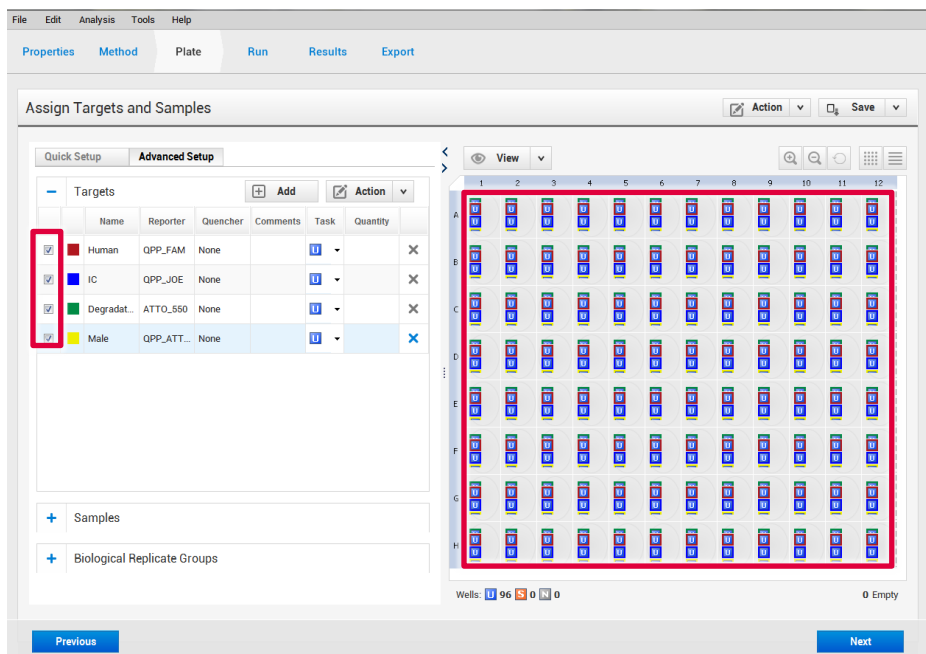


表 8. ターゲットとサンプルの割り当て

名前	Reporter (レポーター)	クエンチャー
Human	QPP_FAM	なし
Male	QPP_ATTO647N	なし
Degradation	QPP_ATTO550	なし
IC	QPP_JOE	なし

15. 使用中のウェルを選択し、4 種類のターゲットすべてに対して左側のボックスにチェックを入れます。

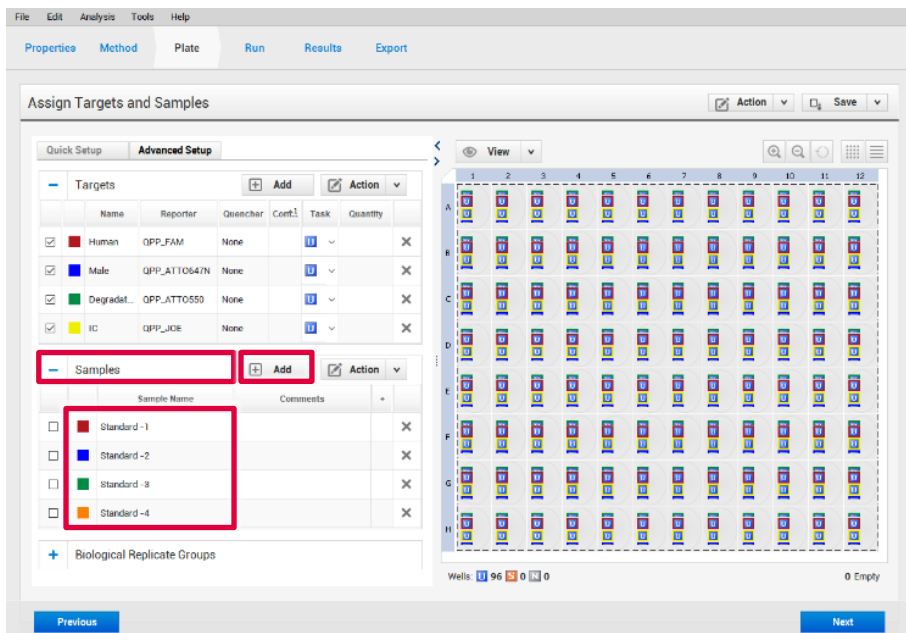
**重要：** 使用していないウェル（反応混合液のないウェル）は強調表示しないでください。未使用のウェルを含めると、データを表示する際に X 軸と Y 軸のスケールに大きく影響します。



16. 再度 **Advanced Setup** (詳細セットアップ) で **Samples** (サンプル) セクションを開き、**Add** (追加) をクリックして、標準液用のサンプル名 (**Standard -1**、**Standard -2** など、または **Std1**、**Std2** など) と NTC を入力します。

**注釈**：標準液の命名は、後に QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool で適切に解析するために必要です。

**重要**：重複ウェルが必要な場合、次のステップに進む前に割り当てる必要があります。2 個以上のウェルに同じサンプル名を使用するか、**Biological Replicate Groups** (生物学的複製グループ) パネル \* を使用して重複ウェルを定義します。



\* Biological Replicate Groups (生物学的複製グループ) パネルを使用するための説明は、本ハンドブックには記載していません

17. テンプレートなしのコントロール（No-Template Control、NTC）用のウェルを選択し、灰色の **N** ボタンを選択して、**Task**（タスク）で陰性コントロールとしてフラグ付けします。

注釈：IC（QPP\_JOE）タスクを **U**（「未知」）に設定した NTC 反応液用に残します。

**Samples** (サンプル) で、サンプル名 **NTC** を選択します。

The screenshot displays the 'Assign Targets and Samples' window in the software. It is divided into two main sections: 'Targets' and 'Samples', and a 96-well plate grid on the right.

**Targets Table:**

	Name	Reporter	Quencher	Comp	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	Human	QPP_FAM	None		N	
<input checked="" type="checkbox"/>	Male	QPP_ATT0647N	None		N	
<input checked="" type="checkbox"/>	Degradat...	QPP_ATT0550	None		N	
<input checked="" type="checkbox"/>	IC	QPP_JOE	None		U	

**Samples Table:**

	Sample Name	Comments
<input checked="" type="checkbox"/>	NTC	
<input type="checkbox"/>	Standard -1	
<input type="checkbox"/>	Standard -2	
<input type="checkbox"/>	Standard -3	

The 96-well plate grid shows columns 1-12 and rows A-H. In row A, wells 9 and 10 have a grey 'N' button highlighted with a red box. In row B, wells 9 and 10 also have a grey 'N' button highlighted with a red box. All other wells have a blue 'U' button.

18. 標準曲線用のウェルを選択し、オレンジ色の **S** ボタンを選択して、**Task** (タスク) カラムで標準液としてフラグ付けをします。

**注釈：** IC (QPP\_JOE) タスクを **U** (「未知」) に設定した標準反応液用に残します。

The screenshot shows the 'Assign Targets and Samples' window in the software. The 'Advanced Setup' tab is selected. On the left, there are two tables: 'Targets' and 'Samples'. The 'Targets' table has columns for Name, Reporter, Quencher, Cor, Task, and Quantity<sup>1</sup>. The 'Task' column is highlighted with a red box, and the 'S' button is selected for 'Degradat...', 'Human', and 'Male', while the 'U' button is selected for 'IC'. The 'Samples' table lists NTC and Standard -1, -2, -3. On the right, a well plate grid is shown with wells A1-A12. A red dashed box highlights wells A1-A8, which contain 'S' buttons, and wells A9-A12, which contain 'U' buttons. The status bar at the bottom indicates 'Wells: 96 8 2' and '0 Empty'.

19. 濃度を入力して、各標準液用にサンプル名を選択します。21 ページの表 4 に従ってウェル内の DNA の容量を入力します。

The screenshot shows the 'Assign Targets and Samples' window in the QuantStudio 5 software. The interface is divided into several sections:

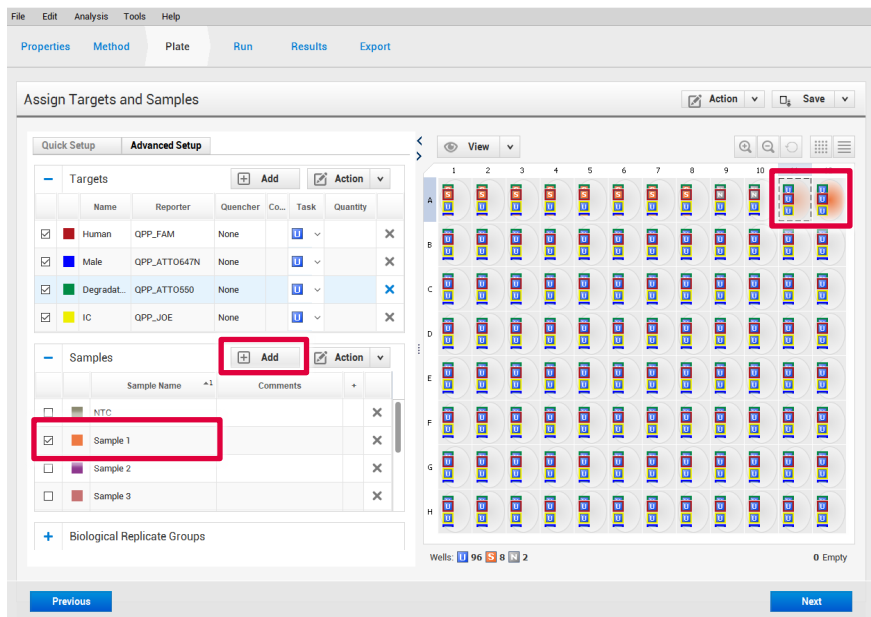
- Targets Table:** A table with columns: Name, Reporter, Quencher, Com..., Tas..., and Quantity. The 'Quantity' column is highlighted with a red box. The data is as follows:
 

Name	Reporter	Quencher	Com...	Tas...	Quantity
Human	QPP_FAM	None		S	50.0
Male	QPP_ATTO647N	None		S	50.0
Degradat...	QPP_ATTO550	None		S	50.0
IC	QPP_JOE	None		U	
- Samples Table:** A table with columns: Sample Name and Comments. The 'Standard -1' row is highlighted with a red box.
 

Sample Name	Comments
NTC	
Standard -1	
Standard -2	
Standard -3	
- Assay Plate Grid:** A 12x8 grid of wells. A tooltip is visible over well B3, showing target and sample information:
  - Target: Degradation
  - Task: Standard
  - Dye: QPP\_ATTO550-None
  - Quantity: 50.000
  - Target: Human
  - Task: Standard
  - Dye: QPP\_FAM-None
  - Quantity: 50.000
  - Target: IC
  - Task: Unknown
  - Dye: QPP\_JOE-None
  - Quantity: 50.000
  - Target: Male
  - Task: Standard
  - Dye: QPP\_ATTO647N-None
  - Quantity: 50.000
  - Sample: Standard -1

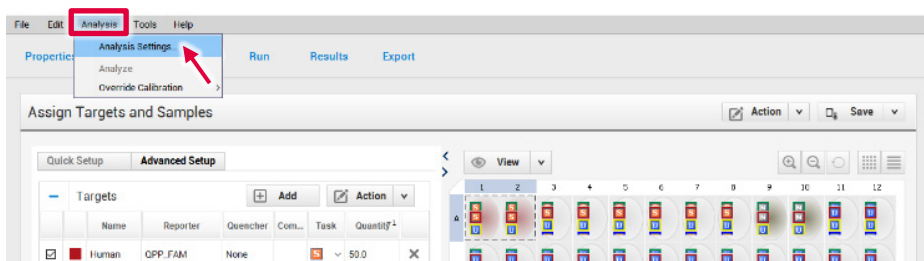
20. **Samples** (サンプル) セクションで **Add** (追加) をクリックして、DNA サンプルの名前を入力します。

DNA サンプルを、ウェル上をクリックして左側の **Sample** (サンプル) パネルの上の該当ボックスにチェックを入れて、プレートのレイアウトに割り当てます。

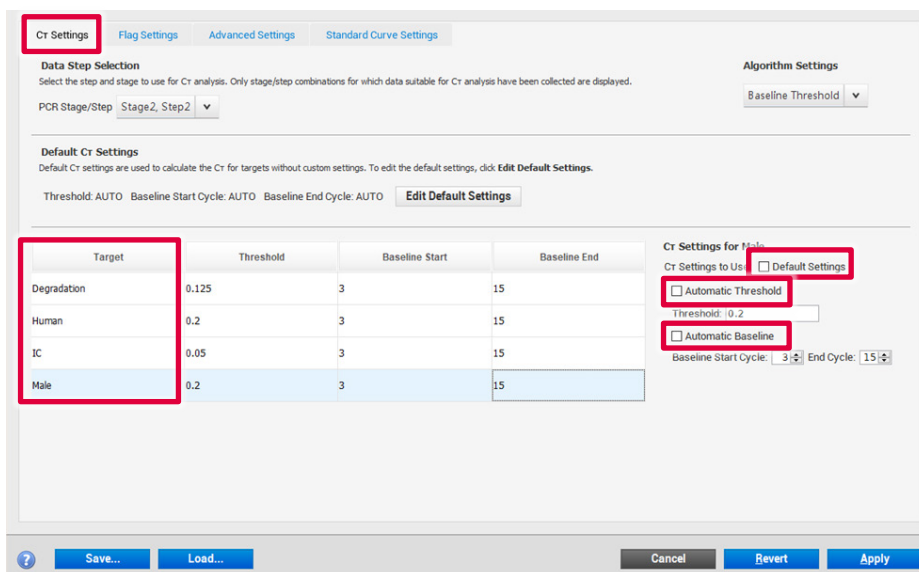




21. 上部のツールバーで、**Analysis** (分析) > **Analysis Settings** (分析設定) を選択します。



22. **CT Settings** (CT 設定) タブの **Default CT Settings** (デフォルト CT 設定) で、最初の Target (ターゲット) を選択します。ウィンドウの左端で、**Default Settings** (デフォルト設定)、**Automatic Threshold** (自動閾値)、**Automatic Baseline** (自動ベースライン) の隣のボックスのチェックを外します。残りのターゲットについても同様にします。



23. 各ターゲットに以下の設定を入力し（表 9）、**Apply**（適用）をクリックします：

表 9. CT 設定

ターゲット	閾値	ベースラインスタート	ベースラインエンド
Degradation	0.125	3	15
Human	0.2	3	15
IC	0.05	3	15
Male	0.2	3	15

**重要：Automatic Threshold**（自動閾値）と **Automatic Baseline**（自動ベースライン）のオプションがすべてのターゲットについて選択解除されていることを確認してください。最適なスレッシュホールドを設定するには、お使いの施設でのさらなる内部検証が必要となる場合があります。

**Default Ct Settings**  
 Default Ct settings are used to calculate the Ct for targets without custom settings. To edit the default settings, click **Edit Default Settings**.

Threshold: AUTO Baseline Start Cycle: AUTO Baseline End Cycle: AUTO **Edit Default Settings**

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Degradation	0.125	3	15
Human	0.2	3	15
IC	0.05	3	15
Male	0.2	3	15

**Ct Settings for Male**  
 Ct Settings to Use:  Default Settings  
 Automatic Threshold  
 Threshold: 0.2  
 Automatic Baseline  
 Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 15

? Save... Load... Cancel Revert **Apply**

24. **オプション**：反応プレートを実行する前に、EDT テンプレートファイルとしてセットアップを保存することができます：

24a. **File** (ファイル) > **Save as** (名前を付けて保存) をクリックします。

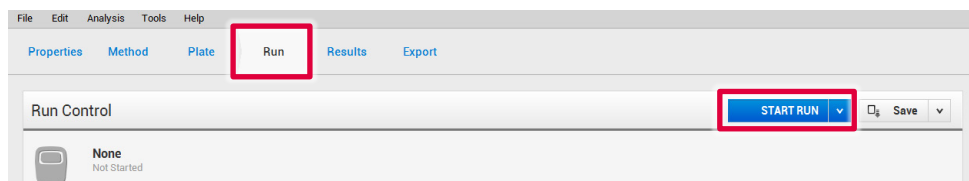
24b. テンプレートのドキュメントの名前を入力します。

24c. 再度 **Save** (保存) をクリックします。

セットアップをテンプレートとして保存したい場合、次のステップに進みます。

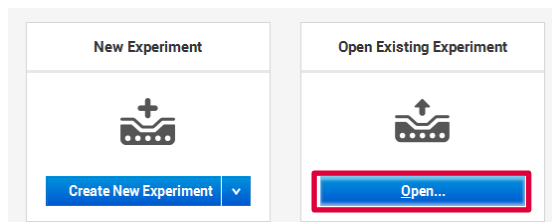
25. プレートを装置にセットします。プレート上の A1 の位置がトレイの左上にあることを確認します。

26. **Run** (実行) タブを選択し、**Start Run** (実行開始) をクリックします。

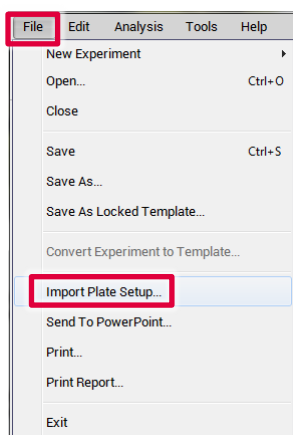


## 操作手順 B：テンプレートファイルとプレートセットアップのファイルを使用した実行のセットアップ

1. QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) を開きます。**Open** (開く) を選択します。



2. EDT テンプレートファイルを選択します。
3. **File** (ファイル) > **Import Plate Setup** (プレートセットアップをインポート) をクリックしてプレートセットアップの TXT ファイルを選択したら、**Apply** (適用) をクリックします。



4. プレートセットアップを問題なくインポートしたら、プレートを装置にセットします。プレート上の A1 の位置がトレイの左上にあることを確認します。
5. **Run** (実行) タブを選択し、**Start Run** (実行開始) をクリックします。

## 操作手順 C：データ分析

正確な定量データを得るには、最適な解析設定が不可欠です。ランごとに必要であれば、解析設定（ベースラインの設定やスレッシュホールドなど）の確認、再調整を行います。

1. QuantStudio Design and Analysis Software (v1.4.1 以上) を使用して実行ファイルを開きます。

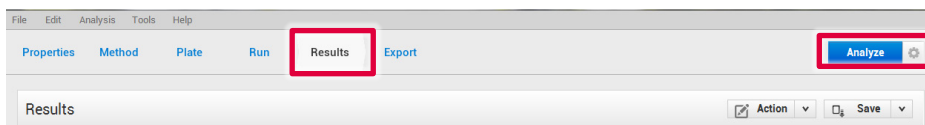
2. 標準曲線を作成する前に、まず標準溶液を定義する必要があります。

**注釈：**ランを開始する前に標準溶液が定義された場合、以下のステップ 4 に進みます。

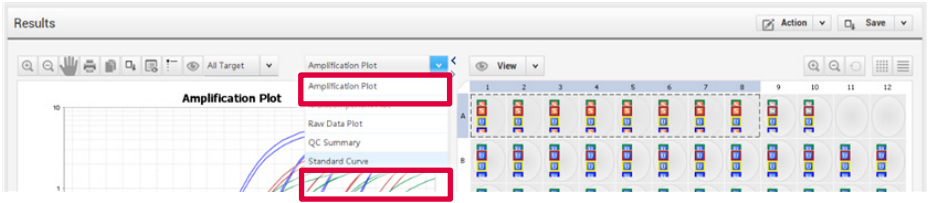
3. **Setup** (セットアップ) に進み、**Plate Setup** (プレートセットアップ) を選択します。「操作手順 A：PCR」(28 ページから開始) のステップ16~19 に説明するように DNA 標準溶液の入ったウェルを定義します。

4. 上部のツールバーから **Analysis** (解析) > **Analysis Settings** (解析設定) を選択して、設定が表 9 に記載されたように設定されていることを確認します。

5. **Results** (結果) タブをクリックして解析対象のウェルを選択し、**Analyze** (解析) をクリックします。

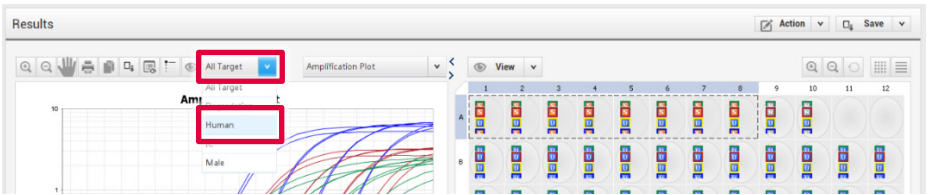


6. 標準曲線を表示するには、ドロップダウンメニューから **Amplification Plot** (増幅プロット) > **Standard Curve** (標準曲線) を選択します。



7. **All Target** (すべてのターゲット) を選択して、各ターゲットの標準曲線を確認します。

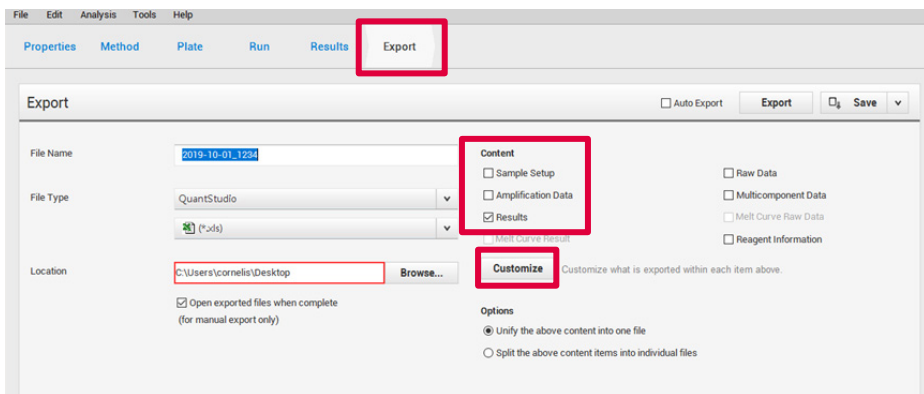
定量標準反応の  $C_T$  値、算出した回帰直線、傾き、 $y$  切片および  $R^2$  値を表示します。



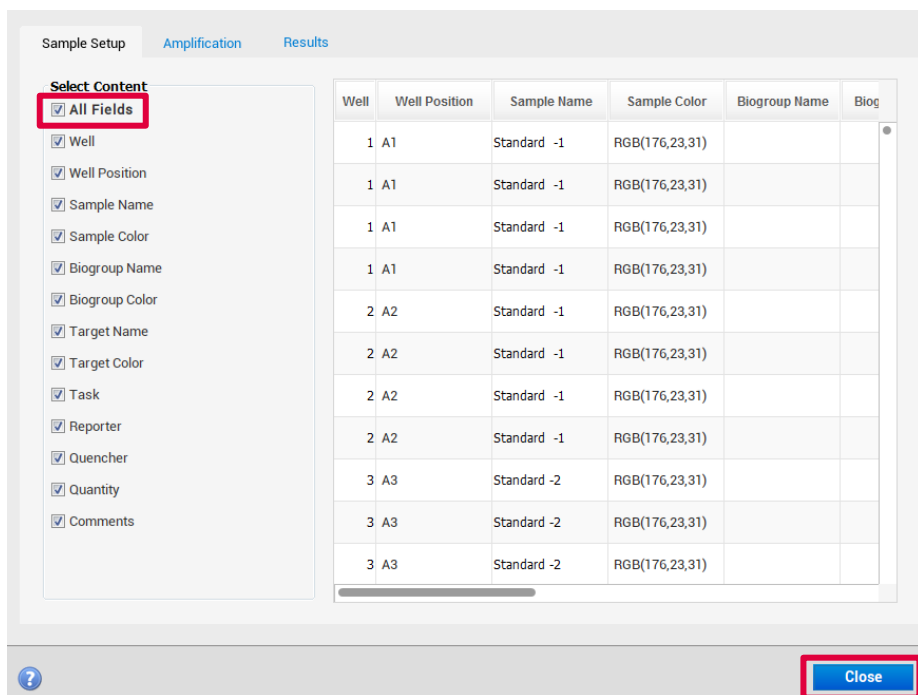
8. 結果のレポートをエクスポートして保存するには、上部のバーの **Export** (エクスポート) に進みます。

**Content** (内容) の **Results** (結果) ボックスだけにチェックが入っていることを確認します。

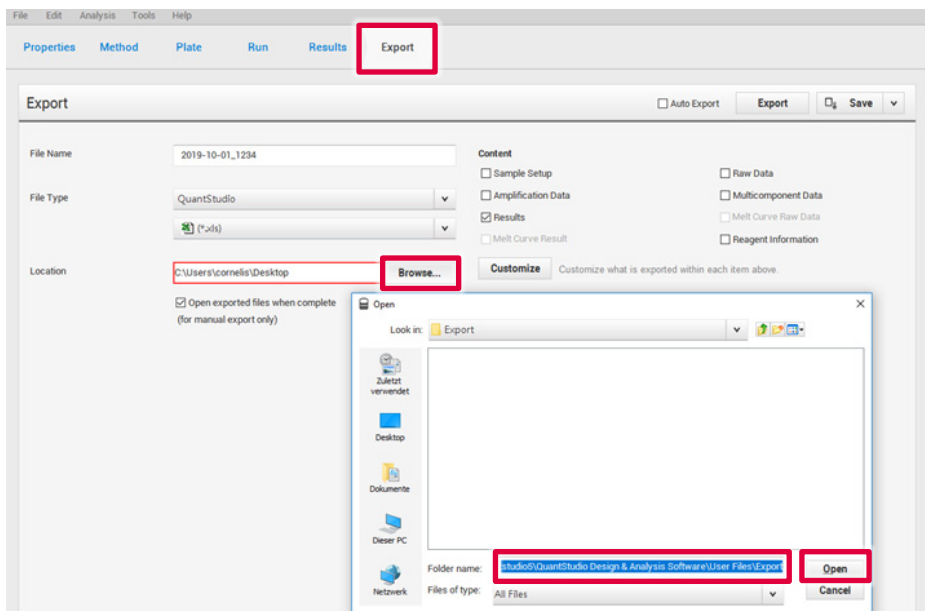
**Customize** (カスタマイズ) をクリックします。



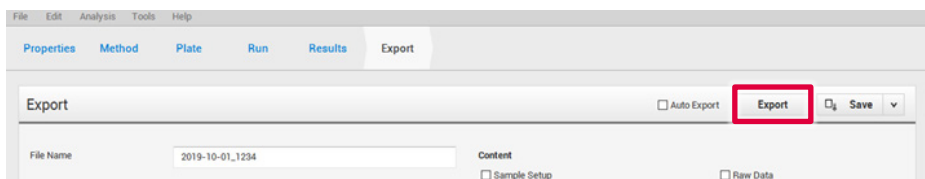
9. **All Fields** (すべてのフィールド) がエクスポート用に選択されていることを確認したら、**Close** (閉じる) をクリックします。



10. Export (エクスポート) で **Browse** (閲覧) をクリックしてファイルの保存先を選択したら、**Open** (開く) をクリックします。



11. **Export** (エクスポート) をクリックします。ファイルを XLS 形式で保存します。



12. 結果を判定するには、次の「QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool を使用したデータの解釈」セクションを参照してください。



# QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool を使用したデータの解釈

QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool は正確な定量、データ解析、そして解釈を目的としています。Opening Page ワークシートには、バージョン番号およびソフトウェア要件／互換性に関する情報が含まれています。Configuration (設定) ワークシートでは、データ処理用のルートディレクトリ、結果のインポートオプション、および解析基準のデフォルト値や閾値が設定できます。各ワークシートには、押すと特定のワークシートの機能を使用するための詳細な指示が表示される指示ボタンが含まれています。



Instructions

## Quantification Assay Data Handling Configuration

### Import QIASymphony Rack File Data for Quantification Setup

Define the root directory where the QIASymphony Rack File is stored

Root directory

Defined root directory

To import QIASymphony Rack files

Browse...

The screenshot shows the 'Instructions' section of the 'Configuring root directories, Quantiplex Pro specific settings, Diluent naming & Archive options' window. The window has a breadcrumb trail: Contents | Configuration | Quantification Setup | Quantification Reagent Volumes | Importing Quantification Data | Virtual Quantification Standards | Standard Assessment | PCR Setup | PCR Reagent Volumes | CE Setup on QIAGility. The 'Instructions' section contains the following text:

**Description**  
The Quant Assay Data Handling tool (QDHT) reads, reformats and exports data from defined locations, these locations are specified in the "Configuration" sheet and must be configured prior to using the associated function. The tool also performs analysis of exported data from the 7500, QuantStudio and RQ2 for Quantiplex Pro and supports CE set-up on the QIAGility. Archive options can be set for the reported Quantification data and the PCR Setup sheets.

**Instructions**  
The configuration sheet is presented in 5 main sections as described below. To specify the directory for the import and export functions click the browse button and navigate to the appropriate folder.

- Quantification Data Processing**  
The QDHT will produce plate record files for use with the RQ2 and Life Technologies 7500 (Q25/HD) and QuantStudio. These files contain data relating to standards, samples and locations on the plate. Specify here where these files should be saved.
- Quant Result Import**  
Specify here where in the directory the quantification result files are located.  
Following the import of quantification run results, for Investigator Quantiplex and Investigator Quantiplex HTm the QDHT will calculate PCR Setup volumes. For Investigator Quantiplex Pro the QDHT will perform a quality analysis assessment. Investigator Quantiplex Pro data may then be used for calculating PCR Setup volumes.
- Quantiplex Pro Plate Setup and Analysis Criteria**  
For Quantiplex Pro it is possible to specify the target name for each of the targets in the result file, this option is only required if the targets have been changed from the default values in the Quantiplex Pro handbook. The Quality Assessment thresholds may also be modified, see the Quantiplex Pro handbook for more details.  
Note: Default handbook values may be entered for the Target Names and Threshold Quality Criteria by pressing the "Enter Defaults" button located in each table as required.  
For Quantiplex Pro it is possible to define a Quantification control sample(s) in the run, entering the name of the control here will allow the control to be filtered, if required, from the imported sample data. If filtering is not required delete the entry from this field.  
To configure Virtual Standards, please refer to the "Virtual Quantification Standards" tab at the top of this window.
- Normalization Diluent Naming**  
The diluent used at PCR stage may be defined here, the PCR Setup sheet will then present the name entered into this field.
- Archive Settings**  
The archive format, archive location and a filename prefix (which will be appended with a timestamp) may be defined using the options presented in this section.
- Export Quantification Result to Instrument for PCR Setup**

Save the QDHT to retain configuration settings for future use, to do this, select "File/Save".

## 操作手順

1. QIAGEN Quantification Assay Data Handling Tool を開きます。
2. サイクラーが Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit を使用してキャリブレーションされている場合で、現コンピューター上で Data Handling Tool を初めて使用する場合、ワンタイムアップデートを実行する必要があります。Data Handling Tool を適切に機能させるには、サイクラーにおける QPP 染色色素が、本ハンドブックのキャリブレーションセクションに記載されたとおりに名付けられていることを確認してください。ワンタイムアップデートで Data Handling Tool に適切な染色色素の名前が設定されます。その後、Data Handling Tool をコンピューター上に保存してください。コンピューター上で Data Handling Tool を初めて使用する場合はステップ 3 に進んでください。ワンタイムアップデートが実行済みで変更が保存済みの場合はステップ 4 に進んでください。

3. 青い One Time update (ワンタイムアップデート) (ABI 7500 & QuantStudio サイクル) ボタンをクリックします。



## QIAGEN Quantification Assay Data Handling and STR Setup Tool

Release Date: 16.12.2022 Version: 4.0.1

**This tool will generate CSV (comma-separated value) text files for use on Real-Time PCR Instruments  
For compatibility the regional settings of the PC running this tool must be set to US or UK English**

This tool enables the creation of sample records for use with the following assays as follows:

Investigator Quantiplex® – 7500 SDS, 7500 HID, and RGQ  
Investigator Quantiplex HYres – 7500 SDS, 7500 HID, and RGQ  
Investigator Quantiplex Pro – 7500 SDS, 7500 HID, and QuantStudio™  
Investigator Quantiplex Pro RGQ – Rotor-Gene® Q Instruments

Result data may be exported from the Rotor-Gene Q, AB 7500, QuantStudio, and Bio-Rad® CFX instruments and imported using this tool.

The import process will format the data removing standards and NTC data.

In the case of AB 7500 Quantiplex HYres, the tool will prompt which result to import (human or male).

From the sample quantification data, information is provided for the setup of QIAGEN STR reactions including normalization if required.

Quantiplex Pro users on ABI 7500 & QuantStudio cyclers – Click to perform a One Time update

**Note: This document requires Excel macros to be enabled in order to function.**

**This tool has been tested with Excel 2010 and Excel 2016.**

**Excel 2007 has not been tested but may be compatible; versions prior to 2007 are not compatible.**

Instructions for each function can be found by pressing the "Instructions" button located on each page.

**QIAGEN shall not be held liable in connection with the use of this Excel tool by any user.**

... Opening Page Configuration Quantification Setup Quant Component Volumes Quant Result Import Quant Standard Plots PCR Setup

#### 4. Configuration (設定) ワークシートタブをクリックし以下を設定します：

4a. “定量”バッチファイルを保存するためのルート／ホームディレクトリ

4b. “定量”結果ファイルをインポートするためのルート／ホームディレクトリ



Instructions

### Quantification Assay Data Handling Configuration

#### Import QIASymphony Rack File Data for Quantification Setup

Define the root directory where the QIASymphony Rack File is stored  
Root directory  Defined root directory  
To import QIASymphony Rack files

#### Quantification Data Processing

Define the root directory where the quantification RT-PCR plate record will be saved  
Root directory  Defined root directory  
To save Quant batch files

#### Quant Result Import

Define the root directory where concentration data result file from the RGQ/AB7500/QuantStudio will be saved  
Root directory  Defined root directory  
To import Quant result files   
Use Virtual Standard for Data Analysis?   Yes  No

#### Quantiplex Pro Plate Setup and Analysis Criteria Options

Result File Target Name Specification (Quantiplex Pro only)

Target Description	Name in Results File	<input type="button" value="Enter Defaults"/>
Human Target	Human	
Male Target	Male	
Human Degradation Target	Degradation	
Internal Positive Control (IPC)	IC	
Male Degradation Target (RGQ Only)	Male Degradation	

#### Threshold Specification for Quality Assessment in Quantiplex Pro only

Quality Assessment	Threshold	<input type="button" value="Enter Defaults"/>
Mixture Index (Human/Male)	2	
Human Degradation Index (Human/Human Degradation)	10	
Inhibition Index (IC Shift)	1	
Male Degradation Index (Male/Male Degradation)	10	

#### Quantification NTC & QC Control Specification, to be removed during data import (Quantiplex Pro only)

Control Name in Result File

Opening Page **Configuration** Quantification Setup Quant Component Volumes Quant Result Import Quant Stand

5. QuantStudio 5 Real-Time PCR System 用にターゲット名を割り当てる必要があります。  
**Enter Defaults** (デフォルトを入力) ボタンをクリックし、**ABI 7500/QuantStudio** を選択します。ターゲットのデフォルト名は「Human」 (ヒトターゲット)、「Male」 (男性ターゲット)、「Degradation」 (分解ターゲット)、「IC」 (内部陽性コントロール) となります。デフォルト名は **Enter Defaults** (デフォルトの入力) ボタンをクリックすると保存できます。

**注釈：**男性分解 DNA マーカーは Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit でのみご利用いただけます。



**Instructions** Quantification Assay Data Handling Configuration

**Import QIASymphony Rack File Data for Quantification Setup**  
 Define the root directory where the QIASymphony Rack File is stored  
 Root directory Defined root directory  
 To import QIASymphony Rack files **Browse...**

**Quantification Data Processing**  
 Define the root directory where the quantification RT-PCR plate record will be saved  
 Root directory Defined root directory  
 To save Quant batch files **Browse...**

**Quant Result Import**  
 Define the root directory where concentration data result file from the RGQ/AB7500/QuantStudio will be saved  
 Root directory Defined root directory  
 To import Quant result files **Browse**  
 Use Virtual Standard for Data Analysis? [What's This?](#)  Yes  No **Edit Standard Data** **Delete Saved Standard**

**Quantiplex Pro Plate Setup and Analysis Criteria Options**  
 Result File Target Name Specification (Quantiplex Pro only)

Target Description	Name in Results File	<b>Enter Defaults</b>
Human Target	Human	
Male Target	Male	
Human Degradation Target	Degradation	
Internal Positive Control (IPC)	IC	
Male Degradation Target (RGQ Only)	Male Degradation	

**Threshold Specification for Quality Assessment in Quantiplex Pro only**

Quality Assessment	Threshold	<b>Enter Defaults</b>
Mixture Index (Human/Male)	2	
Human Degradation Index (Human/Human Degradation)	10	
Inhibition Index (IC/Strain)	1	
Male Degradation Index (Male/Male Degradation)	10	

**Quantification NTC & QC Control Specification, to be removed during data import (Quantiplex Pro only)**  
 Control Name in Result File 3948

Opening Page **Configuration** Quantification Setup Quant Component Volumes Quant Result Import Quant Stand

6. 品質評価のための閾値設定は必要に応じて変更／調整していただけます。デフォルトの閾値設定は下記のとおりです。

- Mixture Index（混在インデックス）（ヒト DNA／男性 DNA）：2
- Degradation Index（分解インデックス）（ヒト DNA／分解 DNA）：10
- Inhibition Index（阻害インデックス）（IC シフト）：1

注釈：最適な閾値を設定するには、お使いの施設でのさらなる内部検証が必要となる場合があります。定量 QC コントロール仕様セクションに含まれていることを前提に、9948 はインポートからフィルター処理されます。これを除外すると最終データセットに保持することが可能になります。

デフォルト名は **Enter Defaults**（デフォルトの入力）ボタンをクリックすると保存できます。



Instructions Quantification Assay Data Handling Configuration

Import QIASymphony Rack File Data for Quantification Setup

Define the root directory where the QIASymphony Rack File is stored

Root directory

To import QIASymphony Rack files

Quantification Data Processing

Define the root directory where the quantification RT-PCR plate record will be saved

Root directory

To save Quant batch files

Quant Result Import

Define the root directory where concentration data result file from the RIGQIAB7500QuantStudio will be saved

Root directory

To import Quant result files

Use Virtual Standard for Data Analysis? [What's This?](#)  Yes  No

Quantplex Pro Plate Setup and Analysis Criteria Options

Result File Target Name Specification (Quantplex Pro only)

Target Description	Name in Results File	<input type="button" value="Enter Defaults"/>
Human Target	Human	
Male Target	Male	
Human Degradation Target	Degradation	
Internal Positive Control (IPC)	IC	
Male Degradation Target (RIGQ Only)	Male Degradation	

Threshold Specification for Quality Assessment in Quantplex Pro only

Quality Assessment	Threshold	<input type="button" value="Enter Defaults"/>
Mixture Index (Human/Male)	2	
Human Degradation Index (Human/Human Degradation)	10	
Inhibition Index (IC Shift)	1	
Male Degradation Index (Male/Male Degradation)	10	

Quantification NTC & QC Control Specification, to be removed during data import (Quantplex Pro only)

Control Name in Result File

7. 定量結果をインポートするには、**Quant Result Import**（定量結果インポート）ワークシートタブをクリックします。



Instructions

## Quantification Assay Data Handling Configuration

### Import QIASymphony Rack File Data for Quantification Setup

Define the root directory where the QIASymphony Rack File is stored

Root directory

Defined root directory

To import QIASymphony Rack files

Browse...

### Quantification Data Processing

Define the root directory where the quantification RT-PCR plate record will be saved

Root directory

Defined root directory

To save Quant batch files

Browse...

### Quant Result Import

Define the root directory where concentration data result file from the PGQA87500/QuantStudio will be saved

Root directory

Defined root directory

To import Quant result files

Browse...

Use Virtual Standard for Data Analysis?

What's This?

Yes

No

Edit Standard Data

Delete Saved Standard

### Quantiplex Pro Plate Setup and Analysis Criteria Options

Result File Target Name Specification (Quantiplex Pro only)

#### Target Description

#### Name in Results File

Enter Defaults

Human Target

Human

Male Target

Male

Human Degradation Target

Degradation

Internal Positive Control (IPC)

IC

Male Degradation Target (PGQ Only)

Male Degradation

#### Threshold Specification for Quality Assessment in Quantiplex Pro only

#### Quality Assessment

#### Threshold

Enter Defaults

Mixture Index (Human/Male)

2

Human Degradation Index (Human/Human Degradation)

10

Inhibition Index (IC Shift)

1

Male Degradation Index (Male/Male Degradation)

10

#### Quantification NTC & QC Control Specification, to be removed during data import (Quantiplex Pro only)

Control Name in Result File

9948

←

...

Opening Page

Configuration

Quantification Setup

Quant Component Volumes

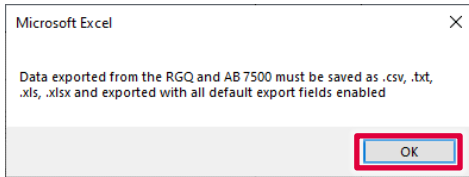
Quant Result Import

Quant Stand





9. データが必要なフォーマットになっていることを確認します。



定量データがインポートされ、これからデータが解析されます。Mixture Index (混在インデックス)、Degradation Index (分解インデックス)、Inhibition Index (阻害インデックス) は計算され、「Below Threshold」(閾値未満)、「Possible Mixture」(混在の可能性)「Possible Degradation」(分解の可能性)または「Possible Inhibition」(阻害の可能性)とタグ付けされます。

Result Summary	Human			Human Degradation			IPC			Male			Quality Assessment			
	WT	Quantity	Quantity Mean	CT	Quantity	Quantity Mean	CT	Quantity	Quantity Mean	Mixture Index	Mixture Threshold	Degradation Index	Degradation Threshold	Inhibition Index	Inhibition Threshold	
B1 HE 10xJ1	30.132	0.359	0.361	29.664	0.106	0.116	23.422	27.025	0.320	0.343	0.62	Below Threshold	0.96	Below Threshold	-1.68	Possible Inhibition
C1 HE 10xJ1	29.516	0.334	0.346	27.357	0.2970	0.2934	22.318	26.509	0.9953	0.940	1.76	Below Threshold	1.16	Below Threshold	-0.66	Below Threshold
D1 Mixture 3	21.197	51.182	51.267	20.247	51.6025	52.879	22.599	33.145	0.0014	0.0012	37666.79	Possible Mixture	0.99	Below Threshold	-0.66	Below Threshold
E2 HE 10xJ1	30.124	0.364	0.361	28.941	0.105	0.116	23.106	27.125	0.197	0.243	0.89	Below Threshold	0.96	Below Threshold	-1.17	Possible Inhibition
C2 HE 10xJ1	28.577	0.378	0.346	27.282	0.279	0.294	22.231	26.507	0.198	0.240	1.78	Below Threshold	1.14	Below Threshold	-0.29	Below Threshold
D2 Mixture 3	21.195	51.5732	51.267	20.772	54.2694	52.879	22.278	33.405	0.0011	0.0012	40256.34	Possible Mixture	0.96	Below Threshold	-0.34	Below Threshold
C3 HE 20xJ1	30.000	0.191	0.195	29.809	0.0480	0.058	24.634	28.804	0.920	0.930	0.76	Below Threshold	2.42	Below Threshold	-2.70	Possible Inhibition
D3 Male DNA 500bp	28.673	0.2971	0.309	28.731	0.1053	0.107	22.422	28.662	0.964	0.930	1.78	Below Threshold	2.42	Below Threshold	-0.49	Below Threshold
D3 Male 100ngJ1	19.362	109.246	109.279	18.789	149.099	150.949	21.940	17.751	120.242	120.275	1.09	Below Threshold	0.99	Below Threshold	0.93	Below Threshold
D4 HE 10xJ1	29.921	0.329	0.196	29.298	0.0971	0.096	23.914	28.662	0.900	0.910	0.82	Below Threshold	1.76	Below Threshold	-1.88	Possible Inhibition
C4 Male DNA 500bp	28.628	0.307	0.309	28.621	0.191	0.197	22.260	28.642	0.175	0.190	1.79	Below Threshold	2.69	Below Threshold	-0.32	Below Threshold
D4 Male 100ngJ1	18.986	138.8052	138.979	18.753	152.8842	150.949	21.547	17.709	132.389	130.275	1.05	Below Threshold	0.91	Below Threshold	0.39	Below Threshold
E5 HS 25ngJ1	29.378	0.303	0.321	28.720	0.1062	0.103	23.135	27.257	0.3095	0.132	1.66	Below Threshold	1.70	Below Threshold	-1.20	Possible Inhibition
E5 Male DNA 300bp	28.395	0.2902	0.290	28.930	0.1429	0.1486	21.989	28.748	0.896	0.974	1.57	Below Threshold	5.70	Below Threshold	-0.05	Below Threshold
D6 Female 100ngJ1	29.943	87.505	88.251	19.297	102.8036	104.7978	22.060	Undetermined	0.0000	0.0000	0.00	Below Threshold	0.66	Below Threshold	-0.12	Below Threshold
E6 HS 25ngJ1	29.350	0.339	0.321	29.619	0.1143	0.103	23.001	27.146	0.1978	0.132	1.58	Below Threshold	1.61	Below Threshold	-1.08	Possible Inhibition
C6 Male DNA 300bp	28.862	0.258	0.2550	29.769	0.0434	0.0466	22.003	28.778	0.953	0.974	1.67	Below Threshold	5.26	Below Threshold	-0.06	Below Threshold
D6 Female 100ngJ1	29.568	91.938	89.251	19.245	109.7120	104.7978	21.902	Undetermined	0.0000	0.0000	0.00	Below Threshold	0.86	Below Threshold	0.04	Below Threshold
D7 HS 10ngJ1	29.428	0.140	0.154	29.395	0.0663	0.0635	24.105	27.460	0.164	0.151	1.47	Below Threshold	2.82	Below Threshold	-2.17	Possible Inhibition
D7 Male DNA 100bp	29.401	0.175	0.172	28.154	0.0095	0.0095	21.951	27.385	0.940	0.925	1.71	Below Threshold	373.63	Below Threshold	-0.01	Below Threshold
D7 Mixture 1400.000	19.485	97.8239	200.0430	19.404	245.4578	245.3752	21.741	16.442	0.0002	0.0003	690289.60	Possible Mixture	0.81	Below Threshold	0.20	Below Threshold
D7 HS 33ngJ1	29.406	0.178	0.154	29.489	0.0606	0.0635	24.208	27.266	0.978	0.131	1.64	Below Threshold	2.82	Below Threshold	-2.35	Possible Inhibition

10. 表示オプションは **Display Settings** (表示設定) をクリックすると調節できます。

- Show Raw Data (生データを表示)
- 定量の平均値を表示
- C<sub>T</sub>値を表示

**注釈：**Degradation Index（分解インデックス）はデフォルトでは 10 に設定されています。平均の大きさが約 300 bp に断片化された DNA の STR の全プロファイルを取得できます。デフォルトの Degradation Index（分解インデックス）10 は、DNA 断片が 300 bp より大きい小さいかの差は許容するものとします。

**注釈：**Inhibition Index（阻害インデックス）はデフォルトでは 1 に設定されています。IC は品質センサーとして機能し、定量の信頼性を保持しながら  $C_T$  シフトにより阻害物質の有無を報告します。デフォルト値は阻害の程度に合わせて変更および調節できます。したがって、阻害の検出基準を決定するために、実験室検証を実施する必要があります。

# 結果の全般的解釈

## データ解析に関する全般的な考慮事項

リアルタイム PCR データは、蛍光がサイクル数に対してプロットされ、S 字状の増幅曲線（直線スケールを使用した場合）として作成されます。

閾値サイクル（ $C_T$  値）は各サンプルの開始テンプレートを算出するツールとして機能します。これは蛍光が初めて検出可能になる顕著な増加を示すサイクルのことです。

最適な閾値設定は、PCR に使用されている反応液の化学反応に依存します。したがって、他のキットで最適だとされる閾値設定が Investigator Quantiplex Pro Kit に適しているとは限らず、調整が必要な場合もあります。

Investigator Quantiplex Pro Kit を使用した DNA 定量では、解析設定を両方のレポーター染料について調整する必要があります。

## 標準曲線

標準曲線は、標準連続希釈データに関する線形回帰の最良適合です。方程式は次のようになります。

$$y = mx + b$$

ただし、 $x$  = 対数濃度、 $y$  =  $C_T$ 。

## 勾配

勾配 (m) は PCR 効率を表します。-3.3 の勾配は、PCR 効率が 100% であること (すなわち、増幅産物のコピー数がサイクルごとに倍増している) を示しています。通常、この勾配は -3.0 から -3.6 の範囲になります。値がこの範囲から外れた場合は、トラブルシューティングガイドの 56 ページで詳細を確認してください。

## Y 切片

Y 切片 (b) は、数量値が 1 であるサンプル (例えば 1 ng/μl) に想定される  $C_T$  値を示します。

## R<sup>2</sup> 値

R<sup>2</sup> 値は回帰直線に対するデータポイントの適合の度合いを示すものです。一般的に、標準曲線の R<sup>2</sup> 値は  $\geq 0.990$  になります。R<sup>2</sup> 値が低くなる ( $R^2 \leq 0.98$ ) 原因にはさまざまなものが考えられます。R<sup>2</sup> 値が低い場合は、トラブルシューティングガイドの 56 ページで詳細を確認してください。

## 内部コントロール

内部コントロール (Internal Control, IC) は化学反応の失敗や器具の故障、アッセイ設定のエラー、およびサンプル中の阻害の有無を報告することを目的としています。IC システムはヒト DNA について、特定のターゲットより阻害に対する感度が高くなるように設計されています。したがって、サンプル中で阻害があったとしても定量は有効になります。この場合、作業者はサンプル中の DNA の濃度について、および阻害物質の存在についての両方の情報を取得します。DNA 標準用 IC システムの  $C_T$  値と未知のサンプル用 IC システムの  $C_T$  値を比較すると、阻害の有無を判断する目安となります。阻害物質の濃度が高い場合、定量データにも影響がありますので、ダウンストリームアプリケーションについては、これを考慮する必要があります。一般的に、内部コントロールは以下のように解釈できます。

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | IC システムは正常な増幅を示している。<br>規定値より大きい IC シフトは観察されない。<br>Human、Degradation、Male ターゲットの増幅は検出できない。 | DNA が存在しないか、量が不十分だった。  |
| b) | IC シフトが規定値より大きい。<br>Degradation Index（分解インデックス）が閾値より小さい。                                   | サンプル中に阻害物質が存在する。<br>DNA は分解していない。  |
| c) | IC シフトが規定値より大きい。<br>Degradation Index（分解インデックス）が閾値より大きい。                                   | サンプル中に阻害物質が存在する。<br>DNA は分解した可能性がある。<br><b>注釈：</b> 阻害物質の濃度が極度に高いと分解ターゲットの増幅を阻害し、分解インデックスをトリガーする可能性があります。 |

**重要：** 阻害の検出基準を決定するための、関連する阻害物質に対する内部実験室検証を実施する必要があります。

## 未知 DNA の定量

Investigator Quantiplex Pro Kit は、200 ng/μL から約 0.5 pg/μL のヒトゲノム DNA まで、幅広い範囲のサンプル中の DNA 量を定量することが可能です。非常に濃度が低いサンプル 2 μL が反応液に装填された場合、ウェルに含まれるのは二倍体がヒトゲノム相当量のおそらく 1 個未満になります。DNA 濃度が低い範囲にある場合、統計的変動と言われる統計効果により、アッセイ結果は著しい影響を受けます。低い DNA 濃度のサンプルを使用する場合、結果を確実なものにするために、必ず可能な限り多くの複製を測定するようにしてください。

## 女性／男性 DNA の混合物の定量

Investigator Quantiplex Pro Kit は、女性 DNA が非常に高いバックグラウンド中に混在する少量の男性 DNA も検出できる高い感度を有しています。Mixture Index（混在インデックス）は、サンプルが女性／男性 DNA の混合物かどうかの情報も提供します。一般的に、Mixture Index（混在インデックス）は以下のように解釈できます。

- |  |   |
|--|---|
| a) サンプルの Mixture Index（混在インデックス）が規定されているインデックスより小さい。 | サンプルには男性 DNA しか含まれていないか、女性 DNA が非常に少ない。 |
| b) サンプルの混在インデックスが規定のインデックスより大きい。                     | サンプルに男性 DNA／女性 DNA が混合されている可能性がある。      |

## 分解状態の評価

法医学ケースワークのサンプルでは環境による分解が発生する可能性があり、常用されている遺伝子指紋法の典型的な課題となっています。Investigator Quantiplex Pro Kit には、新しく開発された、DNA 分解を検出するシステムが搭載されています。一般的に、Degradation Index（分解インデックス）は以下のように解釈できます。

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | <p>サンプルの Degradation Threshold (分解閾値) が規定されているインデックスより小さい。</p> <p>IC シフトが検出されていない。</p>       | <p>DNA が分解している可能性が非常に低い。</p> <p>サンプルに阻害物質が含まれている可能性が非常に低い。</p> |
| b) | <p>サンプルの Degradation Threshold (分解閾値) が規定されているインデックスより小さい。</p> <p>閾値を超えた IC シフトが検出されている。</p> | <p>DNA が分解している可能性が非常に低い。</p> <p>サンプルに阻害物質が含まれている可能性がある。</p>    |
| c) | <p>サンプルの Degradation Threshold (分解閾値) が規定されているインデックスより大きい。</p> <p>IC シフトが検出されていない。</p>       | <p>DNA が分解している可能性が非常に高い。</p> <p>サンプルに阻害物質が含まれている可能性が非常に低い。</p> |
| d) | <p>サンプルの Degradation Threshold (分解閾値) が規定されているインデックスより大きい。</p> <p>閾値を超えた IC シフトが検出されている。</p> | <p>DNA が分解している可能性もしていない可能性もある。</p> <p>サンプルに阻害物質が含まれている。</p>    |

**注釈：**非常に濃度が低いサンプル 2  $\mu\text{L}$  が反応液に装填された場合、ウェルに含まれるのは二倍体がヒトゲノム相当量のおそらく 1 個未満になります。DNA 濃度が低い範囲にある場合、統計的変動と言われる統計効果により、アッセイが影響を受けます。非常に低い濃度で DNA が分解している場合、分解ターゲットが影響を受けます。分解ターゲットに未確定値がある場合、サンプルは「Possible Degradation」(分解の可能性) とタグ付けされます。阻害物質の濃度が極度に高い場合にも、分解ターゲットが影響を受ける可能性があり、「Possible Degradation」(分解の可能性) のフラグが付くことがあります。

# トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは、何らかの問題が発生した際にお役立てください。詳細については、当社のテクニカルサポートセンターの「よくある質問 (Frequently Asked Questions、FAQ)」：[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) を参照してください。本ハンドブックの内容やプロトコール、またはサンプルやアッセイの技術についてご不明な点は、QIAGEN テクニカルサービスの専門チームにお問い合わせください（お問い合わせ先については、本書の裏表紙または弊社ウェブサイト ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) をご参照ください）。

## コメントと推奨事項

---

### PCR でシグナルが検出されない、または 1 つ以上のシグナルが遅れて検出される

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| a) サイクル条件が間違っている          | 必ずプロトコールで規定されている最適化されたサイクル条件を使用してください。QuantStudio 5 Real-Time PCR System のパッシブ色素として ROX が選択されていることを確認してください。   |
| b) ピペット滴下のミス、試薬がないか劣化している | 試薬の保管環境を確認してください。アッセイを繰り返します。  |
| c) 検出ステップがないか、間違っている      | アニーリング／伸長の結合ステップ中に、蛍光検出が実行されることを確認してください。  |
| d) 開始テンプレートの量が不十分         | 可能であれば、テンプレートの量を増やします。サンプル中にテンプレート DNA のコピーが十分な数あることを確認してください。   |
| e) 開始テンプレートに問題が生じた        | 開始テンプレート DNA の保管環境を確認してください。<br>最適な結果には PCR 阻害物質を十分に除去しておくことが重要です。サンプルから採取した核酸を適切な精製方法を使って精製してください。テンプレート核酸を分離および希釈するために使用する試薬、バッファー、溶液はすべてヌクレアーゼがないことを確認してください。 |



## コメントと推奨事項

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| f) 間違っただ検出チャンネル／フィルターが選択されている | 各レポーター染料について、正しい検出チャンネルが起動している、または正しいフィルターセットが選択されていることを確認してください。選択されたレポーター染料の組み合わせが、選択された検出チャンネルまたはフィルターセットと互換性があることを確認してください。 |
| g) コントロール DNA が分解している         | 保管している溶液から新しいコントロールで DNA の希釈液を調製する新しい希釈液でアッセイを繰り返します。   |

### ランの間で $C_T$ 値または PCR 効率が違っている

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| a) サイクル条件が間違っている               | 必ずプロトコールで規定されている最適化されたサイクル条件でランを開始してください。サイクル条件に、DNA ポリメラーゼの活性化の最初のステップと変性およびアニーリング／伸長の規定時間が含まれていることを確認してください。 |
| b) 解析設定（例えば、閾値やベースライン設定）が最適でない | 各レポーター染料について、解析設定（閾値およびベースライン設定）を確認してください。各レポーター染料について最適な設定を使用して解析を繰り返してください。                                  |

### テンプレート量のログに対する $C_T$ 値／交点の比率に線形性がない

未知のサンプル中のテンプレート量が多すぎる	線形性は標準曲線の範囲内について保証されているものです。もしごく初期の $C_T$ 値でシグナルがあらわれた場合は、サンプルを希釈し反応を繰り返してください。
-----------------------	---

### テンプレートなしのコントロールで蛍光または $C_T$ 値が増加した

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| a) 試薬の汚染                      | アッセイのすべてのコンポーネント（マスターミックスなど）を破棄します。新しいコンポーネントでアッセイを繰り返します。 |
| b) わずかなプローブの劣化が蛍光色素の連続した上昇を招く | 増幅プロットを確認し、閾値設定を調整してください。                                  |

## コメントと推奨事項

- c) クロストーク問題      マルチプレックスアッセイに複数の蛍光色素を使用するとき、スペクトルクロストークを回避するために装置によって、さまざまな技術が使用されています。しかしながら、分離できないスペクトルオーバーラップの結果として最小のクロストークが、特に装置がキャリブレーションを必要とする場合に、NTC ウェル内で観察されることがあります。

### 蛍光強度にばらつきがある

- a) リアルタイムサイクラーの汚染      反応液がターゲット DNA によって汚染されています。製造業者の指示に従って、リアルタイムワークステーションとサイクラーを除染してください。新しい試薬と溶液を使用してください。
- b) リアルタイムサイクラーのキャリブレーションが効いていない      製造業者の指示に従って、リアルタイムサイクラーのキャリブレーションを再度行ってください。
- c) ターゲットの濃度が高い場合に、プレート量が高く波状の曲線となっている      解析設定で、バックグラウンド計算に使用するサイクル数を減らす（リアルタイムサイクラーで許容されるのであれば）か、またはプレート量を減らします。

### 標準曲線の勾配が-3.33 から著しく異なっている、または R<sup>2</sup> 値が 0.98~0.99 から著しく小さい

- a) リアルタイムサイクラーの汚染      製造業者の指示に従って、リアルタイムサイクラーを除染してください。
- b) リアルタイムサイクラーおよび/またはピペットのキャリブレーションが効いていない      製造業者の指示に従って、リアルタイムサイクラーのキャリブレーションを再度行ってください。  
ピペットをキャリブレーションして、ピペットのばらつきを最小化してください。

## コメントと推奨事項

- |    |                                      |   |
|----|--------------------------------------|---|
| c) | ターゲットの濃度が高い場合に、テンプレート量が高く波状の曲線となっている | 解析設定でバックグラウンド計算に使用するサイクル数を減らすか、テンプレート量を減らします。   |
| d) | 標準液の希釈の問題                            | 使用する前に DNA 標準が完全に解凍し、十分に混合されていることを確認してください。<br><br>連続希釈用に各アリコートを取り分ける前に、DNA 標準の希釈液が十分に混合されていることを確認してください。<br><br>必ずサンプル量は 2 $\mu\text{L}$ を使用してください。<br><br>希釈ステップごとにピペットチップを交換します。 |
| e) | テンプレートが密閉されていない                      | 丁寧にプレートに密閉して蒸発を防ぎます。  |
| f) | DNA 標準を希釈中にエラーが発生した                  | すべての計算を検証し、DNA 標準の希釈を繰り返します。  |
| g) | ソフトウェアに間違った濃度値が入力されている               | 標準曲線を生成するのに使用されたすべてのサンプルについて、濃度を検証してください。   |
| h) | 蛍光の異常                                | プレートに記入しないでください。プレートは注意して扱ってください。手袋を着用してください。   |
| i) | 統計的変動                                | 特に DNA ターゲットが少ないコピー数で存在している場合、反応の変動が正常なものもあります。標準曲線について少なくとも 2 回以上繰り返して、この変動の影響を最小化します。   |

## 付録：代わりとなる標準曲線

表 10. 5 点標準曲線（10 倍希釈）

コントロール DNA の段階希釈 (ng/ $\mu$ L)	コントロール DNA の量 ( $\mu$ L)	QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer ( $\mu$ L)
50	未希釈 DNA	–
5	5	45
0.5	5	45
0.05	5	45
0.005	5	45

表 11. 6 点標準曲線（9 倍希釈）

コントロール DNA の段階希釈 (ng/ $\mu$ L)	コントロール DNA の量 ( $\mu$ L)	QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer ( $\mu$ L)
50	未希釈 DNA	–
7.1429	5	40
1.0204	5	40
0.0686	5	40
0.0076	5	40
0.0030	5	40

表 12.7 点標準曲線 (5 倍希釈)

コントロール DNA の段階希釈 (ng/μL)	コントロール DNA の量 (μL)	QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer (μL)
50	未希釈 DNA	–
10	10	40
2	10	40
0.4	10	40
0.08	10	40
0.016	10	40
0.0032	10	40

## 発注情報

製品	内容	カタログ番号
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Quantiplex Pro Reaction Mix、 Quantiplex Pro Primer Mix、 Male Control DNA M1、 QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387216
Investigator Quantiplex Pro Calibration Kit	キャリブレーション用標準液 FAM、 JOE、 ATTO 550、 ROX、 ATTO 647N、 Quantiplex Pro Calibration Buffer	387416
<b>関連製品</b>		
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix、 Quantiplex Pro RGQ Primer Mix、 Male Control DNA M1、 QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316
Investigator 24plex QS Kit (100)*	プライマーミックス、 Fast Reaction Mix 2.0、 Control DNA、 アレリック ラダー、 DNA 標準サイズ、 ヌクレ アーゼフリー水	382415
Investigator 26plex QS Kit (100)*	プライマーミックス、 Fast Reaction Mix 3.0、 Control DNA、 アレリック ラダー、 ヌクレアーゼフリー水	382615

製品	内容	カタログ番号
*大きいサイズのキットもご用意しております。お問い合わせください。		
Investigator ESSplex SE QS Kit (100)*	プライマーミックス、Fast Reaction Mix 2.0、Control DNA、アレリックラダー、DNA 標準サイズ、ヌクレアーゼフリー水	381575
Investigator Argus X-12 QS Kit (25)*	プライマーミックス、Fast Reaction Mix 2.0、Control DNA、アレリックラダー、DNA 標準サイズ、ヌクレアーゼフリー水	383223
Investigator Argus Y-28 QS Kit (100)*	プライマーミックス、Fast Reaction Mix 3.0、Control DNA、アレリックラダー、DNA 標準サイズ、ヌクレアーゼフリー水	383625

\* 大きいサイズのキットもご用意しております。お問い合わせください。

最新のライセンス情報と製品固有の免責事項については、該当する QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルを参照してください。QIAGEN キットのハンドブックとユーザーマニュアルは、弊社ウェブサイト ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) から入手できます。QIAGEN テクニカルサービスや最寄りの代理店からも入手可能です。

# 文書改訂履歴

日付

変更

---

04/2023

ハンドブック HB-3355 として初版公開、  
補足的プロトコール HB-2700 から展開。



このページは意図的に空白のままにしています

## Quantiplex Pro Kit に関する限定ライセンス契約

本製品を使用することで、本製品の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものとみなされます。

1. 本製品は、本製品および本ハンドブックと共に提供されるプロトコールのみに従い、パネルに含まれるコンポーネントのみを用いて使用することができます。QIAGEN は、本製品と共に提供されるプロトコール、本ハンドブック、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) に記載する追加プロトコールの中で説明されているものを除き、所有する知的財産に基づき、本パネルに含まれない一切のコンポーネントを、本パネルに同梱されるコンポーネントと共に使用したり、組み合わせたりするライセンスを一切許諾しません。追加プロトコールには、QIAGEN のユーザーが QIAGEN の他のユーザーに提供しているものもあります。このようなプロトコールは QIAGEN による十分なテストや最適化が施されていません。QIAGEN はこれらのプロトコールを保証せず、また、これらが第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
2. 明示されたライセンスを除き、QIAGEN は本パネル、その使用、またはそれら両方が第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
3. 本パネルとそのコンポーネントは 1 回のみ使用についてライセンスが許諾されるものであり、それらを再使用したり、再生したり、再販したりすることはできません。
4. QIAGEN は明確に表示されたものを除き、明示、黙示を問わず、他のライセンス許諾から明確に免責されます。
5. 本パネルの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為につながる、もしくは容易にする一切の手段をいづれのものにも許可しないことに同意します。QIAGEN は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本限定ライセンス契約、本パネルおよびそのコンポーネントに関する所有する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項については、[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) を参照してください。

商標：QIAGEN<sup>®</sup>、Sample to Insight<sup>®</sup>、Investigator<sup>®</sup>、Q-Bond<sup>®</sup>、Quantinova<sup>®</sup>、Quantiplex<sup>®</sup> (QIAGEN Group)：Applied Biosystems<sup>®</sup>、QuantStudio<sup>™</sup>、(Thermo Fisher Scientific またはその子会社)；Taqman<sup>®</sup> (Roche Group)。本文書で使用した登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合であっても法的保護の対象から外れることはありません。

04-2023 HB-3355-001 © 2023 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。

