

January 2009

Rotor-Gene™ Q クイックマニュアル

操作手順およびソフトウェア使用法



Sample & Assay Technologies

目次

1	ランニング前の準備事項	1-1
1.1	ランニング前の注意事項	1-1
1.2	Rotor-Gene Q 本体のセットアップ	1-1
1.3	Rotor-Gene Q ソフトウェアの起動	1-1
1.4	ランの準備	1-1
2	ソフトウェアの設定方法	2-1
2.1	新しい Run File の作成	2-1
2.2	ロータータイプの設定	2-2
2.3	ランニングメモの入力	2-2
2.4	PCR 反応プロファイルの設定	2-3
2.5	初期活性化	2-3
2.6	サイクリング条件の設定	2-4
2.7	蛍光取り込みの設定	2-4
2.8	融解曲線解析での反応温度	2-5
2.9	“ Auto-Gain Optimization ” の設定 (任意)	2-5
2.10	反応のスタート	2-6
3	サンプル情報の入力	3-1
4	解析方法	4-1
4.1	ツールバーアイコン	4-1
4.2	Analysis menu	4-1
4.2.1	Analysis	4-1
4.2.2	定量解析 (Quantitation)	4-2
4.2.3	定量解析 (Two Standard Curve)	4-5
4.2.4	C_T 比較解析 (Delta delta C_T relative Quantitation)	4-6
4.2.5	融解曲線解析 (Melt curve analysis)	4-8
4.2.6	比較定量解析 (Comparative Quantitation)	4-10
4.2.7	対立遺伝子の識別 (Allelic Discrimination)	4-11
4.2.8	分布解析 (Scatter Graph Analysis)	4-11
5	High Resolution Melt	5-1
5.1	ソフトウェアの設定方法	5-1
5.2	リアルタイム PCR データの解析	5-6
5.3	HRM データの解析	5-7

1 ランニング前の準備事項

1.1 ランニング前の注意事項

- Rotor-Gene Q は、装置下部より外気を吸入する冷却方式を採用しているため、ランニング中は装置下部には紙など、空気吸入部を塞ぐ恐れのあるものは置かないようにしてください。
- ランニング中は、チューブの蓋が熱膨張などにより開くのを防止するため、必ずローターにロッキングリングをセットしてください。
- ソフトウェアが“ Virtual Mode ” に設定されていないかを確認してください。Rotor-Gene Q ソフトウェアの“ File ”メニューの“ Set up ” から確認することができます。

1.2 Rotor-Gene Q 本体のセットアップ

1. Rotor-Gene Q 本体に電源ケーブルとシリアルケーブル（もしくはUSBケーブル）を接続する。
2. シリアルケーブル（もしくはUSBケーブル）をパソコンに接続する。

1.3 Rotor-Gene Q ソフトウェアの起動

1. パソコンの電源を入れ、Windows を起動する。
2. Rotor-Gene Q 本体の電源を入れる。
3. Rotor-Gene Q ソフトウェアを起動する。



1.4 ランの準備

ローターの選択

解析サンプル数と使用するチューブに応じて、ローターを選択することが可能です。



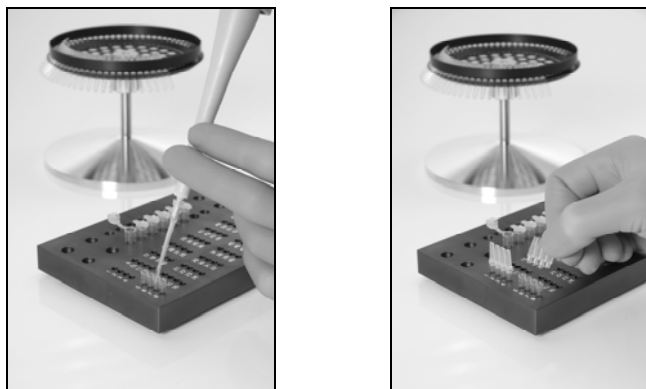
36-Well Rotor



72-Well Rotor

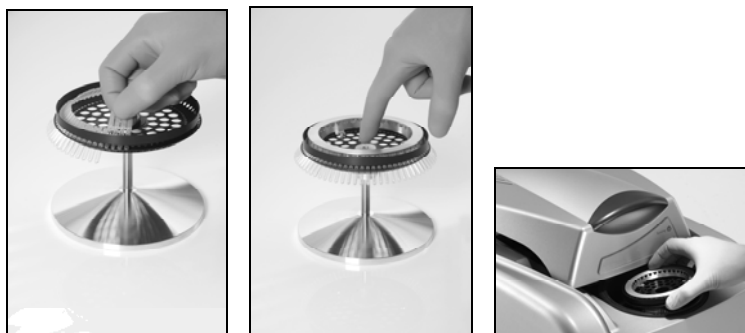
反応溶液の調製

72-Well Rotor を使用する際は、下図に示す専用のローディングブロックを使用します（オプションでマルチチャンネルピペット対応のローディングブロックもあります）。また調製終了後、反応チューブをスピンドウンする必要はありません。



ローターを装置にセットする

1. ローターの全てのウェルにチューブをセットする。解析サンプル数が足りない場合、空チューブを空いたウェルにセットする（左下図）。
2. ローターにロッキングリングをセットする（中下図）。
3. カチッと音がするまでローターを押し込む（右下図）。



ローターの取り外し方

1. ローターをセットするときと逆の手順で、ローターの真ん中の軸を押す。
2. ローターを取り外す。

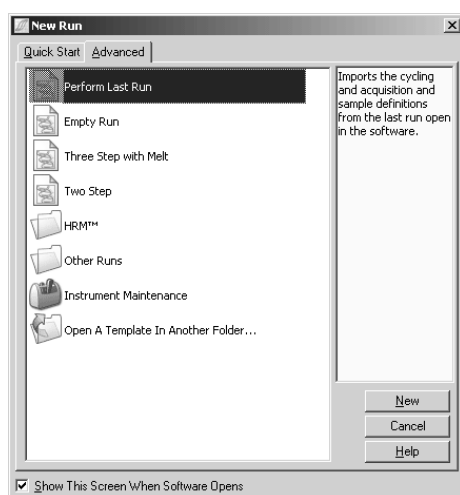
2 ソフトウェアの設定方法

ランニングを開始するため、新しいランニングファイルの作製を行ないます。Rotor-Gene Q のソフトウェアを起動すると、2.1 に示したようなランニングテンプレートファイルの選択画面が表示されます。表示されない場合は、画面上部ツールバーの “ New ” から開くことができます。ここでは SYBR® Green I などのインターカレーター法による 3 ステップの PCR 反応の作成例を示します。

2.1 新しい Run File の作成

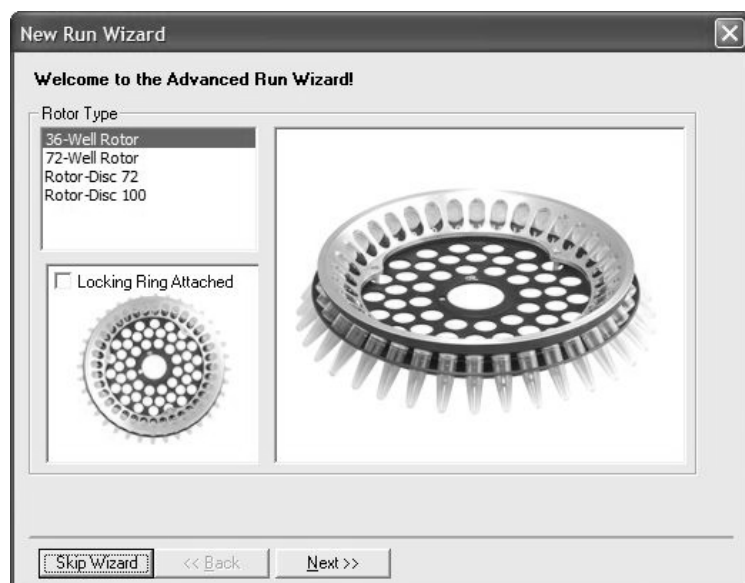
上部ツールバーの “ File ” より “ New ” を選択し、Advanced タブから解析を行なうファイルタイプを選択します。

Perform Last Run	前回ランニング時と同じランニングを行なう
Empty Run	はじめからプログラムを作製する
Three Step with Melt	3 ステップサイクリングの PCR 反応と融解曲線解析を行なう
Two Step	2 ステップサイクリングの PCR 反応を行なう
HRM	PCR 反応および HRM、もしくは HRM 反応のみを行なう
Other Runs	その他の解析ファイル
Instrument Maintenance	装置メンテナンスのための “ Optical Temperature Verification (OTV) ” のランニングファイル



2.2 ロータータイプの設定

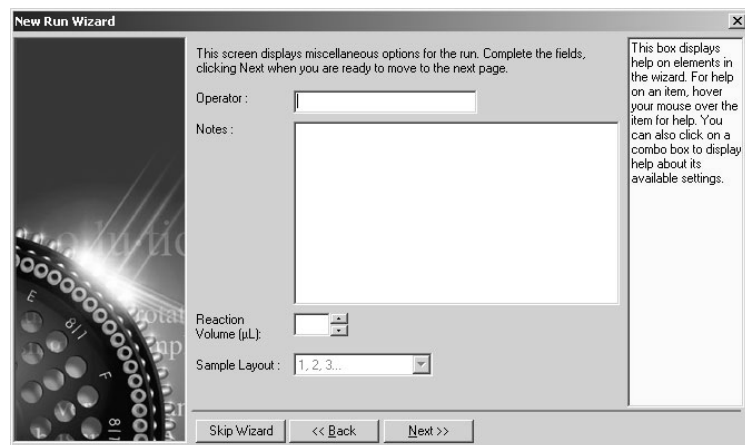
使用するローターを選択し “ Locking Ring Attached ” にチェックを入れる（下図は 36-Well Rotor 使用の場合）。



2.3 ランニングメモの入力

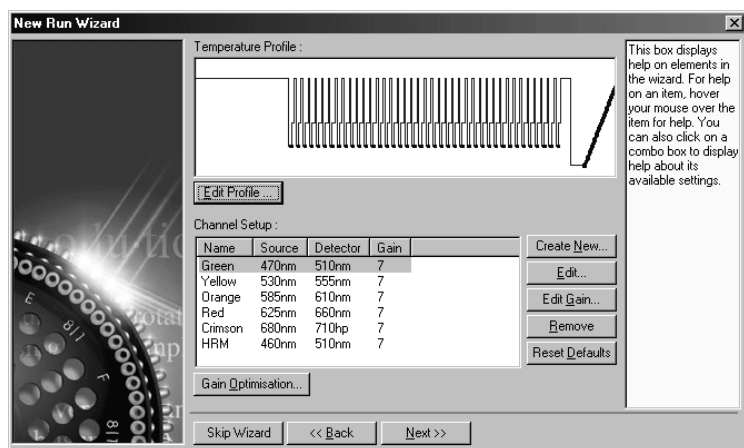
実験に関するメモなどの入力および反応ボリュームの入力を行なう。“ Operator ” 欄には実験者の名前を “ Notes ” 欄には実験内容などのメモを記入する。

注：これらの情報は、実験結果をまとめた “ Report ” 内に反映されます。



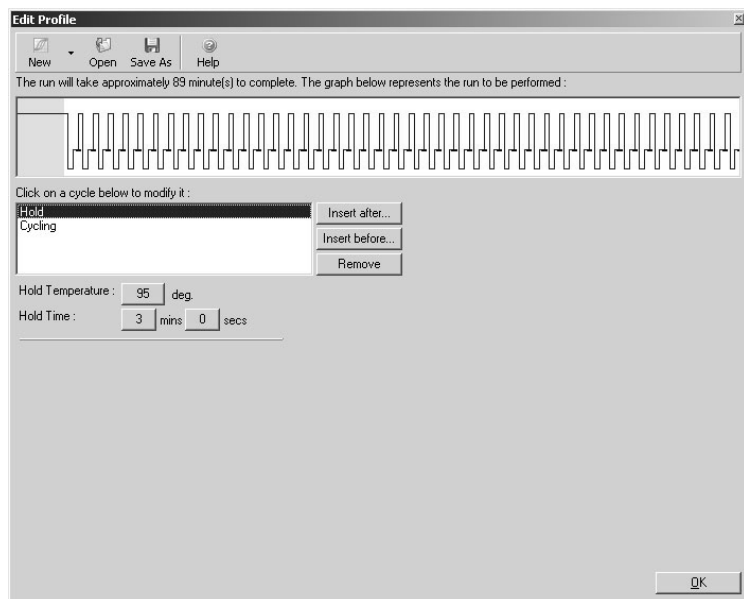
2.4 PCR 反応プロファイルの設定

反応温度条件などを変更する場合には、画面中央部の“ Edit Profile...”を選択する。



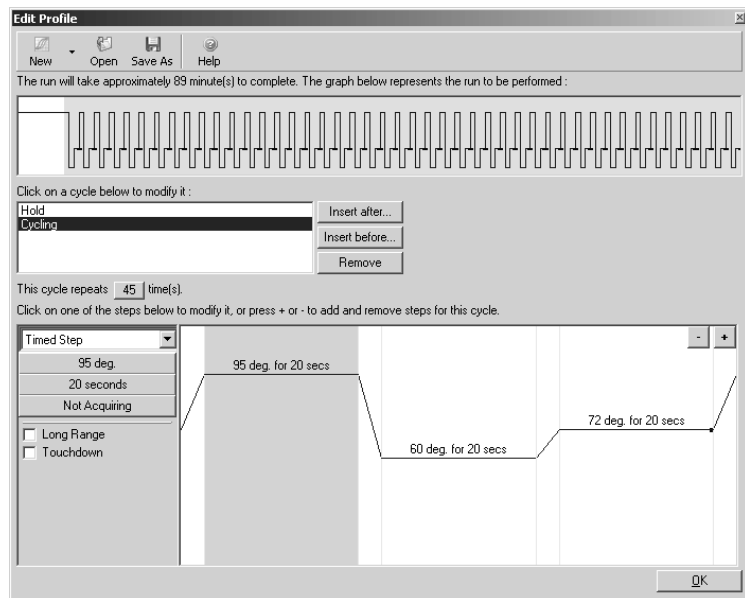
2.5 初期活性化

初期活性化時間は、デフォルトでは 10 分となっているので、使用する酵素に応じて変更する。



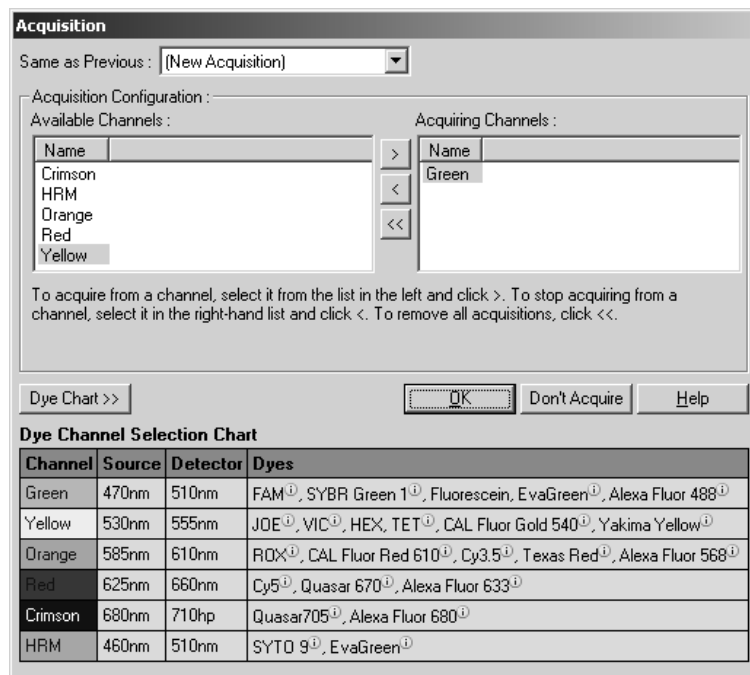
2.6 サイクリング条件の設定

PCR 反応の反応プロファイルを入力する。アニーリング温度の設定はアッセイに用いるプライマーにより設定を変更する。反応ステップ数を変更する場合は、画面右側の “ + ” もしくは “ - ” アイコンをクリックして増減させる。ステップを増やす場合は、最後のステップの後に挿入され、ステップを減らす場合は、最後のステップから削除される。また、画面上部の反応プロファイルに新たにサイクリング反応や温度ホールドステップを追加および削除する場合は、画面中央の “ Insert after... ”、“ Insert before... ” あるいは “ Remove ” を選択する。



2.7 蛍光取り込みの設定

ここではインターカレーター法による取り込み方法を示す。伸長ステップの最後に蛍光の取り込みを行なうために、該当のステップが選択されている（グレー）状態で、画面左の “ Not Acquiring ” をクリックする（例えば、既に設定されている場合は “ Acquiring to Cycling A ” などと表示）。SYBR Green I などのインターカレーター法では “ Green ” チャンネルを “ Acquired channels ”（右側）に設定し “ OK ” を選択する。マルチプレックス反応を行なう場合は、必要な波長を中央の “ > ” で右側の検出側に移動する。



2.8 融解曲線解析での反応温度

融解反応ステップでは、温度上昇の開始温度および終了温度の設定、温度上昇率の設定を行なう。温度上昇開始点は、通常 DNA 増幅反応の伸長反応温度と同じにし、終了温度は 95 付近とする。

注：増幅産物の T_m 値がそれより高い場合には、それに応じて 99 まで設定することができます。温度上昇率は、通常 1 /step で問題ありません。

Ramp from 50 degrees to 90 degrees,
 Rising by 1 degree(s) each step,
 Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step,
 Wait for 5 seconds for each step afterwards.
 Acquire to Melt A on Green

2.9 “ Auto-Gain Optimization ” の設定（任意）

2-3 ページの図の下部にある “ Auto-Gain Optimization ” を選択すると、図のようなウィンドウが表示される。ここでは、リアルタイム PCR における装置の “ Gain（感度） ” の自動設定を行なう。SYBR Green を使用する場合は “ Optimize Acquiring ” を選択し、Green チャンネルに関して、蛍光範囲が 1~3 となるように設定を行なう。また、自動設定をサイクリングの最初の蛍光取り込み前に行なうように設定するため、 “ Perform Optimization Before 1st Acquisition ” にチェックをする。Tube Position が “ 1 ” になっているため、1 番には NTC サンプルなどを入れないようにする。

Auto-Gain Optimisation Setup

Optimisation :
 Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.

Set temperature to 60 degrees.

Optimise All Optimize Acquiring

Perform Optimisation Before 1st Acquisition
 Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run

Channel Settings :

Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain
Green	1	5FI	10FI	-10	10

Buttons: Start, Manual..., Close, Help

Auto-Gain Optimisation Channel Settings

Channel Settings :

Channel : Green Tube Position : 1

Target Sample Range : 5 FI up to 10 FI.

Acceptable Gain Range: -10 to 10

Buttons: OK, Cancel, Help

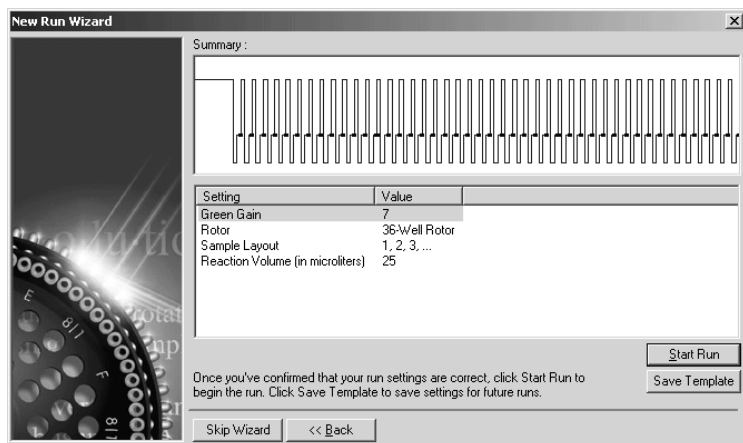
注：“ Auto-Gain Optimization ” では、Target Sample Range に入力した範囲に蛍光の初期値が収まるように、Gain（感度）を自動設定します。Target Sample Range は使用するケミストリーや反応系に応じて設定を行いません。設定は下記を参考にしてください。

SYBR Green I の場合： Target Sample Rang : 1 ~ 3

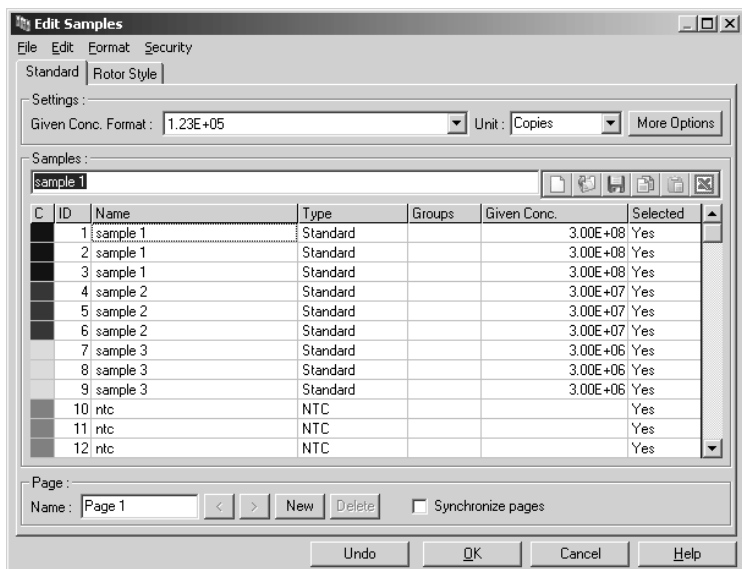
TaqMan[®] Probe の場合： Target Sample Rang : 5 ~ 10

2.10 反応のスタート

全ての設定が完了したら “ Start Run ” をクリックし、Run File の保存を行なう。ファイルの保存後、自動的にランニングが開始される。



3 サンプル情報の入力



ツールバーアイコンの Samples をクリックすると、上図のようなサンプル情報入力画面が表示される。ここでは、サンプルの名前や種類 (Standard, Unknown etc...) などの設定を行なう。入力した情報は、その後のランニング中およびランニング後にも変更することが可能。



- Edit 各サンプルの表示色を変更
- Reset Default 設定変更を行なったものをデフォルト状態に戻す
- Gradient 選択したウェル間の表示色にグラジエント表示設定を行なう



- New icon 入力したサンプル情報を全てクリア
- Open icon 他のランニングファイルから、サンプル情報をインポート
- Save icon 入力したサンプル情報を保存
- Copy icon 選択したセルのサンプル情報をコピー
- Paste icon サンプル情報を貼り付け
- Excel icon 入力したサンプル情報を Excel に転送
- Sample Types サンプルタイプを次の表より選択

サンプル	解説
None	サンプルが入っていないウェル
NTC	No template control
Negative Control	ネガティブコントロール
Positive Control	ポジティブコントロール
Unknown	未知サンプル
Standard	検量線作製のためのスタンダードサンプル

Page の設定

同時にランニングを行なうサンプル中に Standard が二系列以上ある場合など、解析を個別に行なう際にサンプルを集団化する機能です。

Page 初期設定の状態では通常サンプル情報を入力している画面が Page 1 となる。

まず、1 系列分の情報を入力した後、下の “Page 1” と表記のあるボックスの右側の “New” をクリックする。これで、ボックス内には “Page 2” と表示され、その時点で画面に表示されているサンプル設定画面は “Page 2” となり、続けて入力を行なう。この画面での Page 間の切り替えは、“<” もしくは “>” ボタンで行なう。

オプション： “Page 1” や “Page 2” などの表記は、遺伝子名などを入力することにより Page の名前を設定することも可能です。

注： Page の概念は、解析を行なうサンプルの集団分けを行なうことです。

具体的には、一度のランニングで二つの遺伝子についてそれぞれ検量線を作製し、個別に定量解析を行なう場合、Page 設定を行なわないと Standard が二系列分ある場合であっても、ソフトウェアがそれを認識せず、正確な結果が得られません。そこで、Page 機能を使うと一つの遺伝子に関しては、“Page 1” で、もう一つの遺伝子に関しては “Page 2” で解析を行なうというように、解析を行なう集団を予め “Page” として定義しておくことで、ソフトウェアが自動的に 1 ランニングで二系列の Standard があることを認識します。これ以外にも、解析の集団分けを行ないたい場合に “Page” 設定を使用することができます。

4 解析方法

4.1 ツールバーアイコン

画面上部に表示されているこれらのアイコンは、比較的使用頻度の高い機能を集約させたものです。

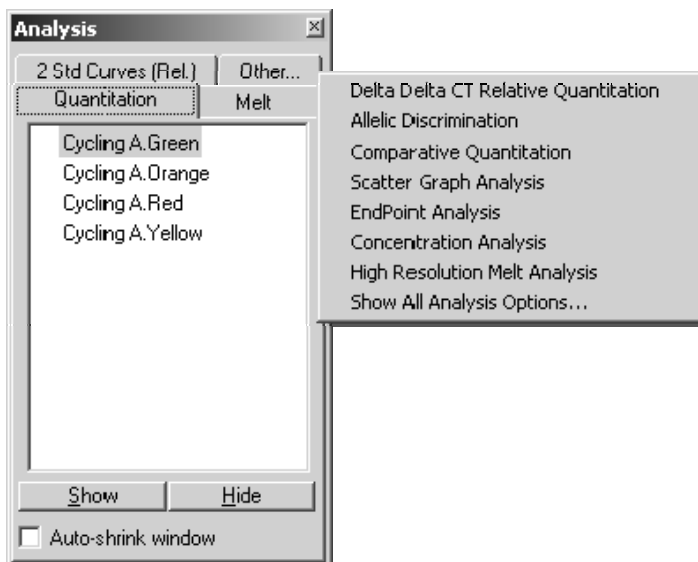


Settings	ランニングに関するセッティング情報（ローターの種類やメモなど）を表示
Progress	反応プロファイルの進行状況を表示
Profile	反応の温度や時間設定などを表示
Temp.	ランニングの温度履歴を表示
Samples	サンプル名およびサンプル情報を入力
Analysis	各種解析を行なう
Reports	ランニングのレポートを作成
Arrange	表示されているウィンドウの整理を行なう

4.2 Analysis menu

4.2.1 Analysis

ランニングが終了したら、上部ツールバーの“ Analysis ”アイコンから様々な解析を行なうことができる。各種解析方法の概要を以下に示す。解析を行なう内容を選択し“ Show ”をクリックすると各解析を実施することができる。



Show	解析結果を表示
Hide	解析結果を非表示
Remove Analysis	解析結果を削除後、再度 Show を選択すると再解析を行なうことが可能

4.2.2 定量解析 (Quantitation)

Quantitation 解析では、検量線法による定量解析を実施します。

Amplification Curve

定量結果の増幅曲線が表示されます。ウィンドウ上部と下部のいくつかのアイコンに関して、下記をご参照ください。

Dynamic Tube

Dynamic Tube Normalization 機能は、ランニング前に全てのサンプルのバックグラウンドの平均を算出し、それをもとにバックグラウンドの補正を行なう機能です。通常のバックグラウンド補正では、各サンプルの初めの 5 サイクルのデータをバックグラウンドとし、それ以後のデータをこのバックグラウンド値で除算することで補正を行ないます。しかし、6 サイクル目以降もバックグラウンドが安定しない場合など、この方法では正確に補正が行なわれない場合があります。

Dynamic Tube Normalization では、各サンプルに対し二次微分した値を算出し、増幅曲線の立ち上がりのポイント “Starting Point” を求め、1 サイクル目からこの “Starting Point” までのバックグラウンドを平均化したものを各サンプルのバックグラウンドとしています。この手法により、より精度の高いバックグラウンド補正を行なうことができ、全ての解析のデフォルト状態で ON になっています。

Slope Correct

バックグラウンドの蛍光値は、指数増幅期前の段階では一定であることが望ましいのですが、サンプルによっては緩やかな上昇もしくは下降を示す場合があります。Noise Slope Correction 機能は、このような増幅期前のバックグラウンドのノイズを一定にします。この機能を ON にすると、生データでスロープのノイズが見られた場合などに、解析結果の改善を行なうことができます。

Ignore First

ランニング開始後の数サイクルなど、指数増幅期前の段階は定量結果に直接的に大きな影響を与えないと考えられます。これにより、場合によっては初めの数サイクルを解析結果から除外し、それ以後のデータのみで解析を行なうことができます。データの除外は最大で最初の 10 サイクルまでです。

Outlier Removal...

Outlier Removal では、蛍光シグナルの強度について正常な反応により得られた蛍光値であるか、蛍光ノイズによるものかの判別を自動的に行ないます。

Save Defaults

ここで設定した環境をデフォルト設定として保存します。

Adjust Scale...

Adjust Scale では、増幅曲線の表示範囲を任意に設定することができます。Maximum と Minimum に表示させる最大蛍光値と最小蛍光値を入力します (マイナス表示も可能)。

Auto-Scale

Auto-Scale では、増幅曲線の縦軸について最大蛍光値を示すサンプルが軸の最上部に、また最小蛍光値を示すサンプルが軸の最下部に表示されるように自動で調整されます。

Default Scale

Default Scale では、上記の Adjust Scale や Auto-Scale により変更を行なった表示スケールを自動的にデフォルト状態に戻します。また、ズーム表示をさせた状態から全体表示に戻す場合にも使用します。

Log. Scale

このアイコンは、増幅曲線の縦軸の表示を Log 表示もしくは Linear 表示させるかの切り替えを行ないます。Log 表示されているときには “ Linear Scale ” のアイコンが、Linear 表示されているときには “ Log. Scale ” のアイコンが表示されます。

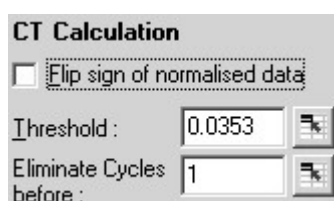
C_T Calculation

C_T 値を算出するための Threshold は、マニュアルもしくは自動で設定することができます。

Threshold のマニュアル設定

Threshold マニュアルで Threshold を設定する場合に使用します。設定の仕方は以下の通りです。

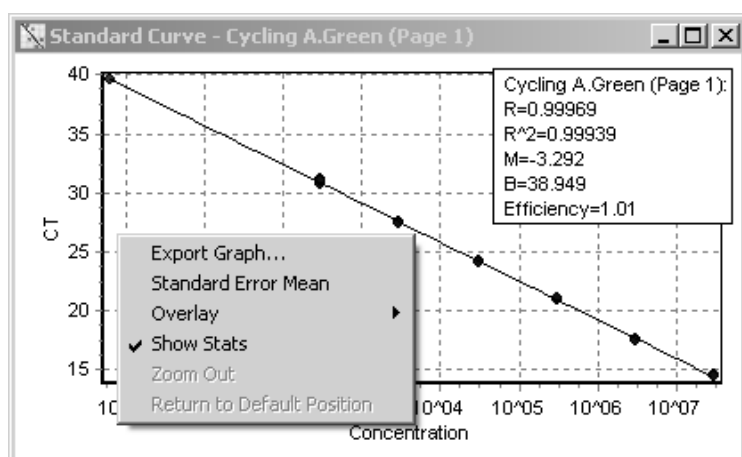
- 図のボックス中に、任意の数値を入力することで、設定する。
- 数値入力ボックス右側のアイコンをクリックし、増幅曲線グラフ上の任意の位置で再度クリックおよびドラッグすることで、Threshold を設定することができる。

**Threshold の自動設定**

Auto-Find Threshold 増幅曲線中で、上限 (Upper) と下限 (Lower) を設定し、その範囲内で自動的に Threshold を探索することができます。Threshold は、Standard サンプルをもとに作製される検量線の R 値が最も 1.0 に近似する位置に設定されます。Upper と Lower の設定は、ほとんどの場合でデフォルト設定のまま使用できます。

Auto-Find Threshold

検量線は、Threshold の設定を変更すると、それに応じて自動的に再計算されます。グラフ中の青ドットは Standard サンプルを、赤ドットは Unknown サンプルを表しています。



Efficiency PCR 反応の反応効率

R² value (correlation coefficient) Standard サンプルを元に作成した検量線とそのサンプルの実測値との相関係数。R² は、0.99 以上となる系が望ましく、低い値であると定量性の低下の恐れがある。

R value (square root of correlation coefficient) R^2 値の平方根値

M and B 検量線における傾き (M) と切片 (B)。 $Y = Mx + B$ の式で表される。

Results

解析結果の数値データが表示されます。表示されていないカラムは、表の最上段上で右クリックすることで、表示させる項目を選択することができます。また、表は Excel へエクスポートすることも可能です。

No.	Name	Type	Q1	Given Conc. [Exp.]	Calc. Conc. [Exp.]	%Var	Rep. C _T	Rep. C _T Std.	Rep. C _T 95% C.I.	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. 95% C.I.
1	3x10 ⁹	Standard	14.42	30000000	26255864	5.9%	14.42	0.10	[14.21, 14.73]	27329521	[19819879, 36036705]
2	3x10 ⁸	Standard	14.58	30000000	25142920	16.2%					
3	3x10 ⁸	Standard	14.40	30000000	28730050	4.2%					
4	3x10 ⁷	Standard	17.44	3000000	342624	14.1%	17.40	0.09	[17.26, 17.68]	3327013	[2517622, 4396613]
5	3x10 ⁷	Standard	17.58	3000000	3103291	3.4%					
6	3x10 ⁷	Standard	17.42	3000000	3467111	15.6%					
7	3x10 ⁶	Standard	20.99	300000	285393	4.9%	20.98	0.06	[20.84, 21.13]	288528	[231158, 395162]
8	3x10 ⁶	Standard	20.92	300000	288898	0.4%					
9	3x10 ⁶	Standard	21.04	300000	279802	8.1%					
10	3x10 ⁵	Standard	24.20	30000	30296	1.0%	24.12	0.07	[23.94, 24.29]	30005	[25827, 39661]
11	3x10 ⁵	Standard	24.06	30000	32276	10.9%					
12	3x10 ⁵	Standard	24.09	30000	32530	8.4%					
13	3x10 ⁴	Standard	27.51	3000	2987	0.4%	27.42	0.09	[27.20, 27.63]	3180	[2427, 4190]
14	3x10 ⁴	Standard	27.40	3000	3223	7.4%					
15	3x10 ⁴	Standard	27.34	3000	3367	12.2%					
16	3x10 ³	Standard	30.76	300	300	2.5%	30.92	0.16	[30.52, 31.32]	224	[109, 397]
17	3x10 ³	Standard	31.08	300	246	18.1%					
18	3x10 ³	Standard	30.93	300	273	9.0%					

%Var 実測値と設定した既知濃度との差異を%表示したもの

$$\%Var = \text{Abs}(\text{Calculated}/\text{Given} - 1)$$

Rep. C_T 同一の名前に設定されているサンプルの C_T 値の平均値

Rep. C_T Std. Dev. 同一の名前に設定されているサンプルの C_T 値の標準偏差値

Rep. C_T 95% C.I. 同一の名前に設定されているサンプルの C_T 値のバラつきのうち、平均値に対し 95%以内に位置する上限と下限サンプルの C_T 値

Rep. Calc. Conc 実測値の平均値

Rep. Calc. Conc. 95% C.I. 実測値の平均値に対し 95%以内に位置する上限と下限サンプルの C_T 値

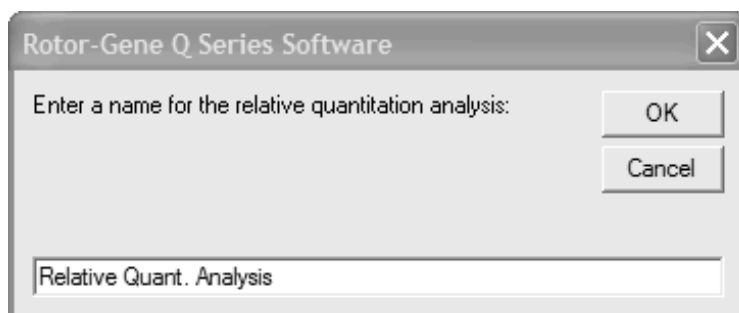
4.2.3 定量解析 (Two Standard Curve)

“Two Standard Curve”解析法では、二つの検量線からそれぞれ算出された定量データをもとに、一方をターゲット遺伝子として、またもう一方を補正用遺伝子（ハウスキーパー遺伝子）として、ターゲット遺伝子の定量値をハウスキーパー遺伝子の定量値で除算し、自動的に定量結果を求める解析方法です。なお、この解析法では、二系列の検量線法による解析結果が必要となります。その際、それぞれの系において解析対象となるサンプルに対して、同じサンプル名を入力しておく必要があります。ソフトウェアは、同一のサンプル名が入力されているサンプルに対して、除算による補正を行いません。一度のランニングにおいて、二系列を同時にランニングする場合は、サンプル情報入力画面において、“Page”設定を行なってください（“Page”設定に関しては、3-2 ページ参照）。

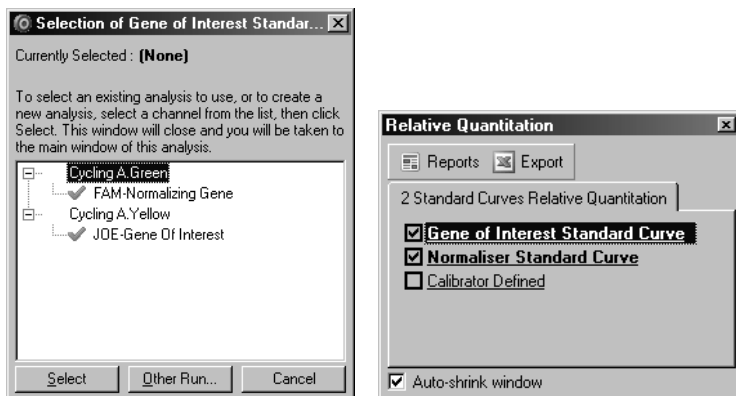
1. Analysis ウィンドウから“2 Std Curves (Rel.)”を選択して“New Analysis”を選択し、“Show”をクリックする。解析ファイルに名称を設定するウィンドウが表示されるので、ファイル名を入力する。



2. 解析のファイル名を入力する。



3. 解析を行なうターゲット遺伝子の定量ファイルとハウスキーピング遺伝子の定量ファイルを設定する。設定方法はそれぞれ “ Gene of Interest Standard Curve ” および “ Normaliser Standard Curve ” を選択することでランニングファイル選択画面が表示されるので、そこから解析ファイルを選択する。



4. 相対定量において基準となるサンプルを “ Calibrator ” として設定を行なう。

“ Calibrator ” とは、ハウスキーピング遺伝子で補正した後のターゲット遺伝子の比較定量を行なう際、あるサンプルの値を “ 1 ” としたときの他のサンプルの相対値の算出を自動的に行なう時に使用します。ここでは、“ Calibrator Defined ” をクリックし、基準とするサンプルを選択すると、自動的に計算結果が表示されます。

Colour	Replicate Name	GOI Conc.	GOI Count	Norm. Conc.	Norm. Count	Relative Conc.	Calibrator
	000086	1,288	3	1,311	3	1.00	Yes
	976356	634	3	637	3	1.01	
	381912	321	3	311	3	1.05	
	568152	158	3	158	3	1.02	
	784719	82	3	80	3	1.04	
	134414	40	3	41	3	0.99	

4.2.4 C_T比較解析 (Delta delta C_T relative Quantitation)

比較 C_T 定量法 (ΔC_T 法) では、検量線を使用せずにターゲット遺伝子の定量を行なうことができます。その基本原理は、異なるサンプル間において、それぞれターゲット遺伝子およびハウスキーピング遺伝子の定量を行ない、その際に算出される C_T 値から各サンプルにおいて、以下の式で ΔC_T を算出します。

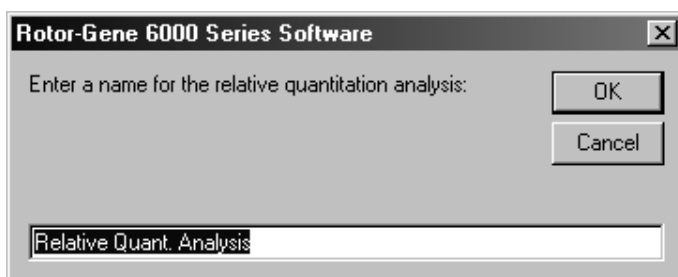
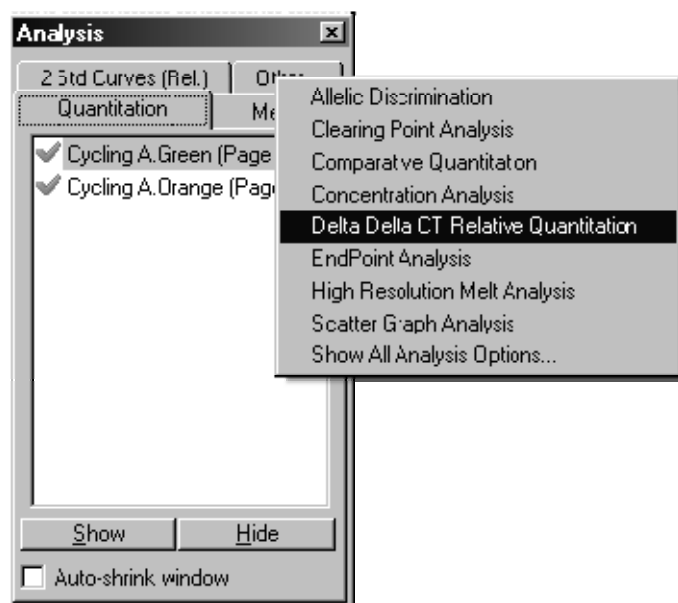
$$\text{“ターゲット遺伝子の } C_T \text{ 値”} - \text{“ハウスキーピング遺伝子の } C_T \text{ 値”} = \Delta C_T$$

また、サンプルの内、定量の基準となるサンプル (キャリブレーター) の C_T をその他の各サンプルの C_T から引いたものが ΔC_T となります。この解析法により、検量線を作成することなく各サンプルの C_T 値の比較のみで定量結果を導き出すことができます。この解析法では、ターゲット遺伝子とハウスキーピング遺伝子の増幅効率が一致していることが必要です。*

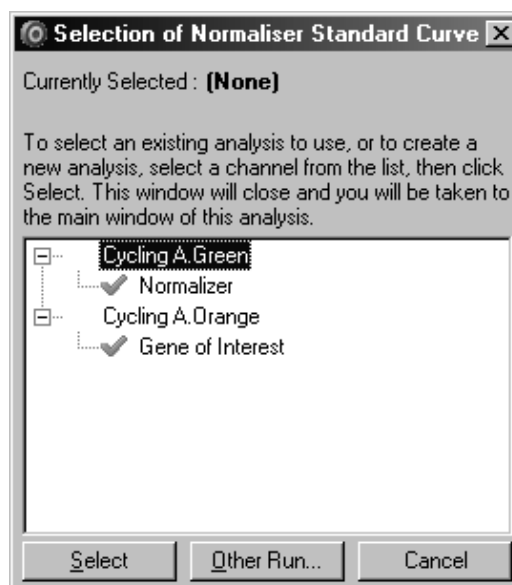
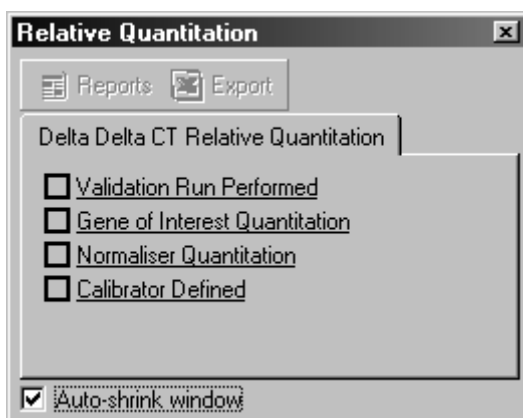
注：ソフトウェアでは、同一サンプルであるか否かの判別をサンプル名によって行ないますので、ターゲット遺伝子の定量とハウスキーピング遺伝子の定量とでサンプル名が一致するように設定を行なってください。

* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. Livak KJ & Schmittgen TD. Methods 2001 Dec;25(4): 402-408.

1. Analysis ウィンドウから “Delta Delta C_T Relative Quantitation” を選択して “New Analysis” を選択し、“Show” をクリックする。解析ファイルに名称を設定するウィンドウが表示されるので、ファイル名を入力する。



2. ターゲット遺伝子の増幅効率とハウスキーピング遺伝子の増幅効率が一貫していることを確認後 “Validation Run Performed” をチェックする。解析を行なうターゲット遺伝子の定量ファイルとハウスキーピング遺伝子の定量ファイルを設定する。設定方法はそれぞれ “Gene of Interest Quantitation” および “Normaliser Quantitation” を選択することで図のようなランニングファイル選択画面が表示されるので、そこから解析ファイルを選択する。



3. 相対定量において基準となるサンプルを “ Calibrator ” として設定を行なう。

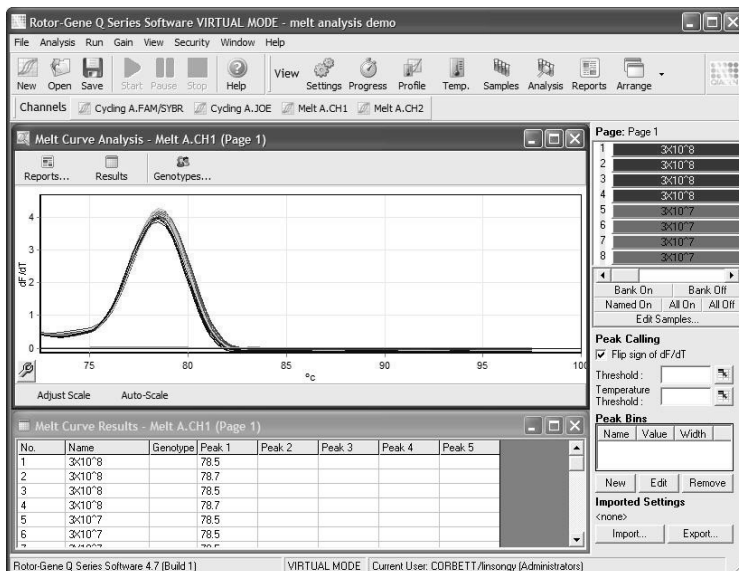
“ Calibrator ” とは、あるサンプルの値を “ 1 ” としたときの他のサンプルの相対値の算出を自動的に行なう際に基準の “ 1 ” となるサンプルです。 “ Calibrator Defined ” をクリックし、基準とするサンプルを選択すると、自動的に計算結果が表示されます。

Colour	Replicate Name	GOI CT	GOI Count	Norm. CT	Norm. Count	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Calibrator
	000086	22.19	3	19.51	3	2.68	0.00	1.00	Yes
	976356	23.28	3	20.55	3	2.72	0.04	0.97	
	381912	24.30	3	21.56	3	2.74	0.06	0.96	
	568152	25.25	3	22.61	3	2.64	-0.04	1.03	
	784719	26.27	3	23.58	3	2.69	0.01	0.99	
	134414	27.31	3	24.66	3	2.65	-0.03	1.02	

4.2.5 融解曲線解析 (Melt curve analysis)

融解曲線解析では、サンプルの融解反応の結果に基づき、その結果を微分し融解曲線における蛍光値の変化率を縦軸のピークとなるようにプロットしたグラフで解析を行ないます (下図参照)。融解曲線解析では、PCR 産物の T_m 値の算出をはじめとして、 T_m 値の違いなどによりジェノタイピングを行なうこともできます。ここでは、それらの解析方法に関して説明します。

1. Analysis ウィンドウから “ Melt ” を選択し、 “ Show ” をクリックする。
2. 初期状態では Threshold は設定されておらず、ノイズを含む全てのピークが結果として表示される。このバックグラウンドノイズなどを除くために、Threshold の設定を行なう。設定方法は画面右の “ Peak Calling ” より Threshold 欄に任意の数値を入力する、もしくは数値入力欄の右のアイコンをクリックし、その後グラフ上で Threshold を設定する高さで再度クリックする。Threshold 設定後は、Threshold line より上に位置するピークのみが表に表示される。また、横軸の温度に関しても Threshold line 設定を同様の方法により行なうことが可能。



Peak Calling

Flip sign of dF/dT

Threshold :

Temperature Threshold :

Peak Bins

Name	Value	Width
Bin A	93.36	4
Bin B	96.04	4

New Edit Remove

Imported Settings

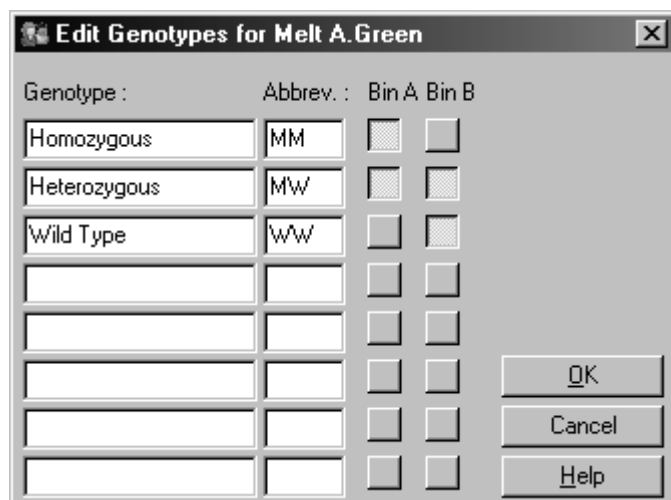
<none>

Import... Export...

ジェノタイプビン

ピークの位置を指定する印を“Bin”といいます。この“Bin”の位置を設定することにより、その Bin に最も近いピークを示すサンプルを自動的にタイプ分けすることができます。

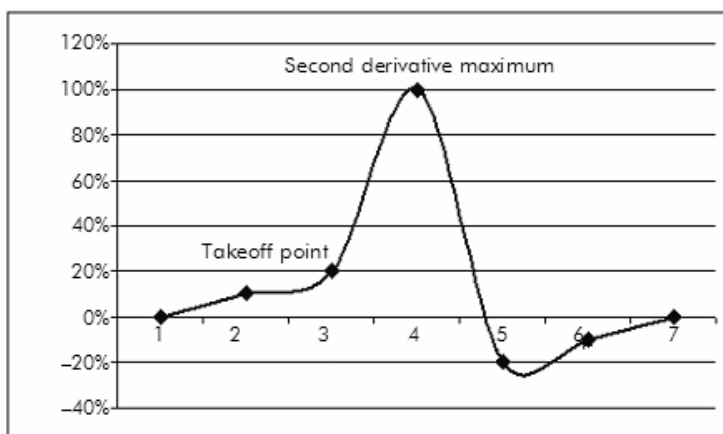
まず、画面右側の“Peak Bins”項目より“New”をクリックし、任意のサンプルのピークの位置でクリックすると、右図のような Bin 設定ウィンドウが表示されます。ここで、この Bin の温度および自動クラス分けがされる際の左右温度軸の幅を設定します。その後、融解曲線上部の“Genotype...”アイコンを選択し、各タイプの名称、レポート上で略称、および対応する Bin の設定を行ないます。Genotype 設定完了後、自動的にジェノタイプとピーク温度および属する Bin が表示されます。



4.2.6 比較定量解析 (Comparative Quantitation)

Comparative Quantitation では、検量線を用いずにコントロールサンプルに対してのその他のサンプルの相対発現量の比較定量を行なうことができ、マイクロアレイ解析の追試実験として有用です。

1. Analysis ウィンドウの “ Other... ” を選択し “ Comparative Quantitation ” をクリックする。
2. 画面上部のウィンドウには、DNA 増幅シグナルを二次微分した値をプロットしたグラフが表示される。このグラフでは、蛍光シグナルの増加率が最も高い点がピークとなる (Second Derivative Maximum : 下図参照)。また、このグラフ中で縦軸のピークの位置を 100%としたとき、20%の位置に達したサイクル数を “ Take off Point ” とする。このグラフを基にして “ Take off Point ”、“ Second Derivative Maximum ” および各サンプルの増幅効率や相対量などを算出した結果が下部ウィンドウの表に表示される。各サンプル間の相対量を算出する際には、基準とするサンプルを設定する必要があるので、画面右側の “ Calibrator Replicate ” から対象とするサンプルを選択する。



Second Derivative Maximum と Take Off Point について

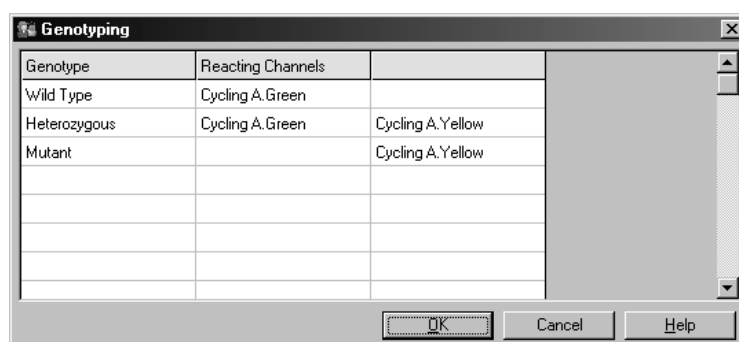
Comparative Quantitation では、PCR 反応における蛍光シグナルの増加率を縦軸にプロットするように、増幅曲線が二次微分されたグラフになっています。このグラフのピークは “ 2nd Derivative Maximum ” といわれ、反応中での最大蛍光増加率を示したポイントになっています。また、この最大値を 100%としたとき、グラフの値が 20%に達したサイクル数を “ Take Off Point ” といい、このポイントがバックグラウンドノイズの終点であり、DNA 増幅の指数関数増幅期 (exponential phase) の開始点を示しています。

サンプル間の相対量 (Comparative Concentration) は、この各サンプルの “ Take Off Point ” と増幅効率 (Amplification) をもとに算出されます。

4.2.7 対立遺伝子の識別 (Allelic Discrimination)

Allelic Discrimination では、2 色以上の波長を使用したリアルタイム PCR の解析により、サンプルのジェノタイピングを行ないます。

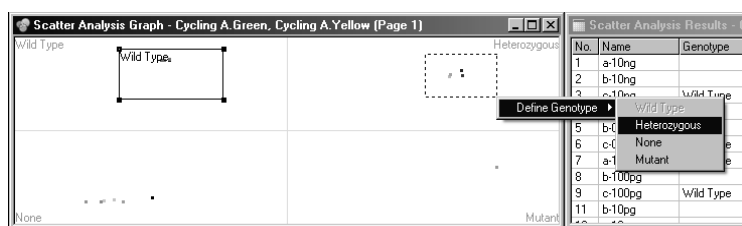
1. Analysis ウィンドウの “ Other...” を選択し、 “ Allelic Discrimination ” をクリックする。この解析法では、二色以上の波長を使用したマルチチャンネル解析となるため、解析を行なう波長を同時に複数選択する必要がある。右図の解析ファイル選択画面で Shift もしくは Ctrl キーを押しながら解析を行なう複数のファイルを選択し、 “ Show ” をクリックする。
2. 画面上部のウィンドウに選択した各波長の増幅曲線が表示される。 “ Allelic Discrimination ” 解析法では、特定の波長での増幅の有無を Threshold line を閾値として判別し、それをもとに遺伝子型の特定を行なう。そのため、まず画面右側にある “ Discrimination Threshold ” の設定を行なう。Threshold 値は、増幅曲線において増幅の有無を識別できる位置に任意で設定する。
3. 画面上部のウィンドウの “ Genotype ” アイコンをクリックすると下図のようなウィンドウが表示される。ここでは、遺伝子型の名前の設定及び各遺伝子型に対応する蛍光チャンネルの設定を行なう。



4.2.8 分布解析 (Scatter Graph Analysis)

Scatter Graph Analysis では、前項の Allelic Discrimination と同様に 2 色以上のマルチチャンネルでの解析を行ない、各波長での増幅の有無をプロットグラフとして表示する解析法です。

1. Analysis ウィンドウの “ Other...” を選択し、 “ Scatter Analysis ” をクリックする。この解析法では、二色以上の波長を使用したマルチチャンネル解析となるため、解析を行なう波長を同時に複数選択する必要がある。右図の解析ファイル選択画面で、Shift もしくは Ctrl キーを押しながら解析を行なう複数のファイルを選択し、 “ Show ” をクリックする。
2. 画面上部のウィンドウには、選択した各波長の増幅曲線が表示される。 “ Genotypes ” アイコンをクリックし、右下図のウィンドウで各遺伝子型に対応する波長を選択する。
この設定をもとにして、特定の波長での増幅の有無より遺伝子型を判別し、それを画面左下のプロットグラフに表示します。
3. プロットグラフ上でカーソルをドラッグすると下図のような選択肢が表示される。ここでは、ドラッグにより任意に選択したグループを遺伝子型の一覧として画面右下のウィンドウ (下図) に表示することができる。



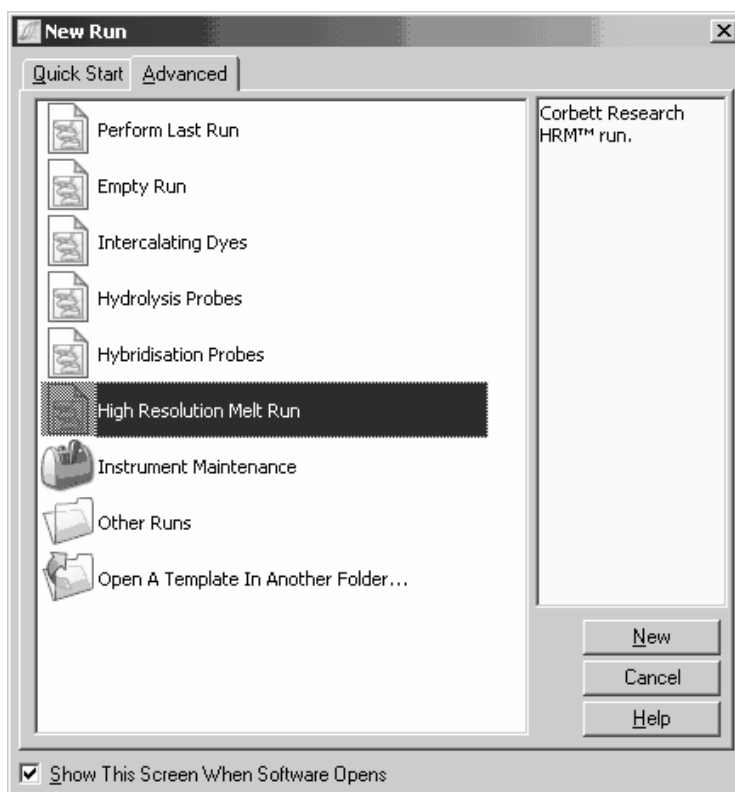
5 High Resolution Melt

5.1 ソフトウェアの設定方法

Software setup

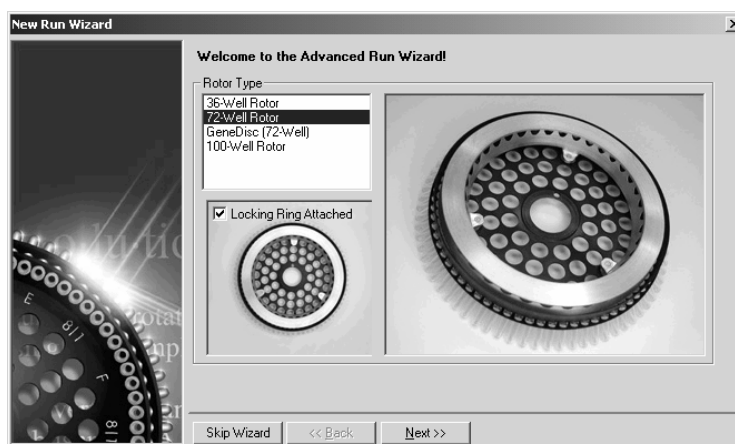
1. 上部ツールバーの “ File ” より “ New ” を選択し、Advanced タブより “ High Resolution Melt ” を選択する。

ソフトウェア起動時には、通常図のような画面が表示されますので、そこから “ High Resolution Melt ” を選択してください。



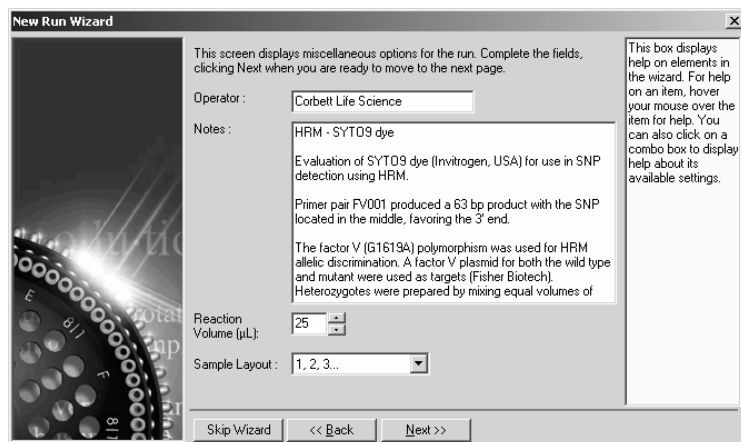
2. 使用するローターを選択し、“ Locking Ring Attached ” にチェックを入れる。

例は 72-Well Rotor 使用の場合です。

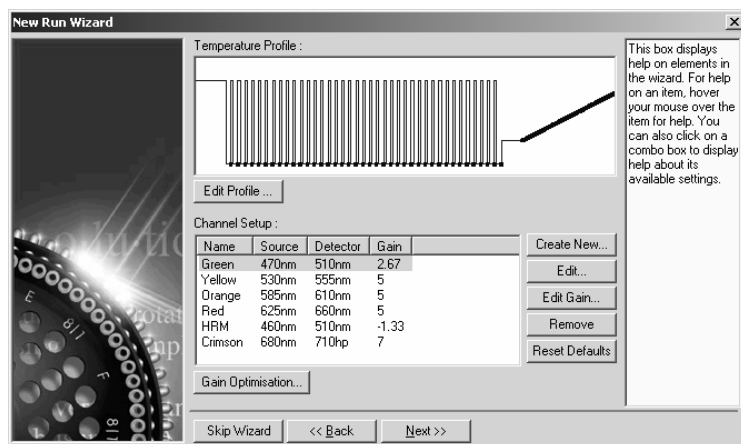


3. 実験に関するメモなどの入力および反応ボリュームの入力を行なう。“Operator”欄には実験者の名前を“Notes”欄には実験内容などのメモを記入する。

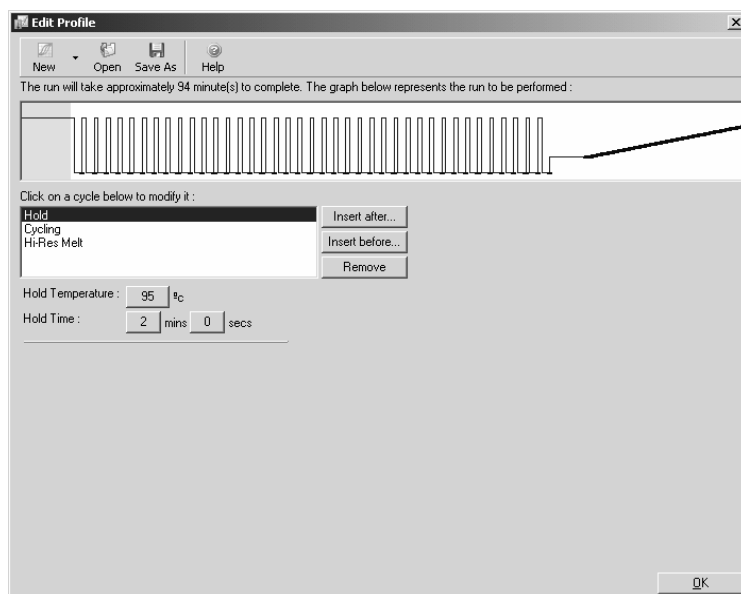
これらの情報は、実験結果をまとめた“Report”内に反映されます。



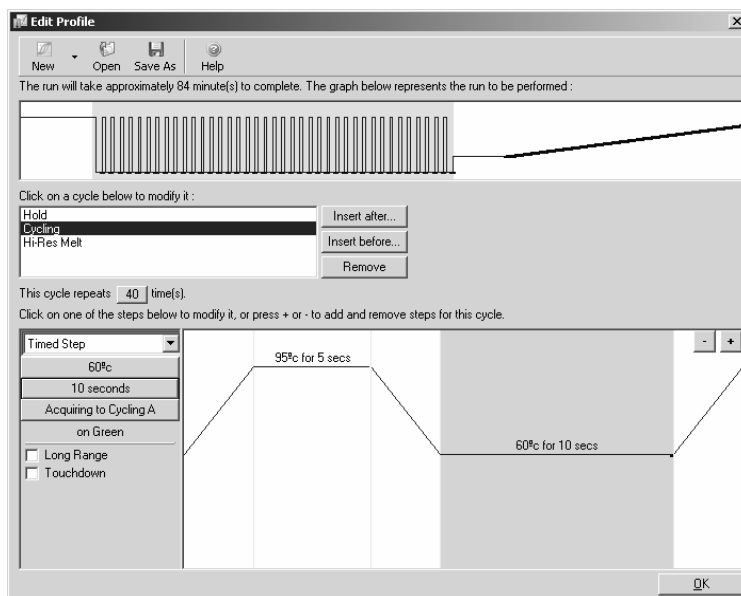
4. 反応温度条件などを変更する場合には、画面中央部の“Edit Profile...”を選択する。



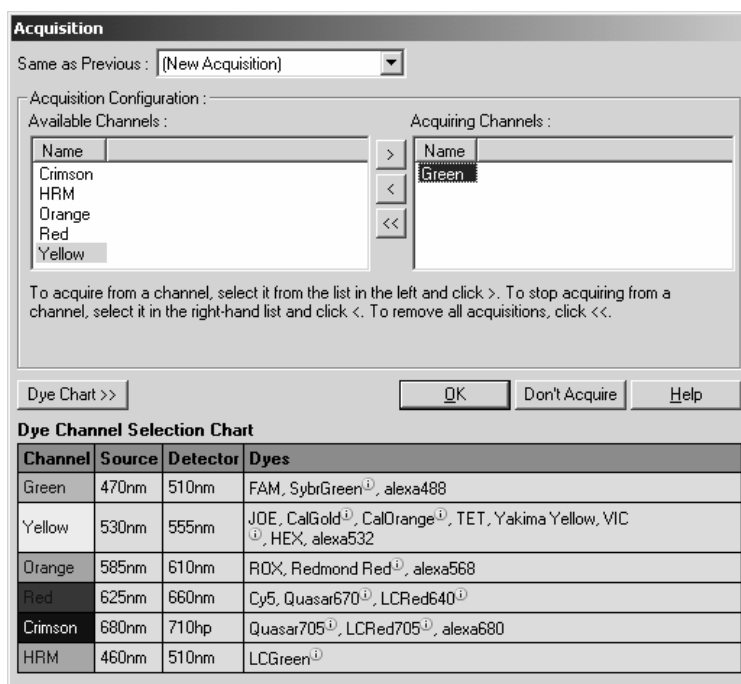
5. 初期活性化時間は、デフォルトで10分となっているので、使用される酵素に応じて変更する。



6. PCR 反応条件を使用する試薬のプロトコールに従い、設定を行なう。



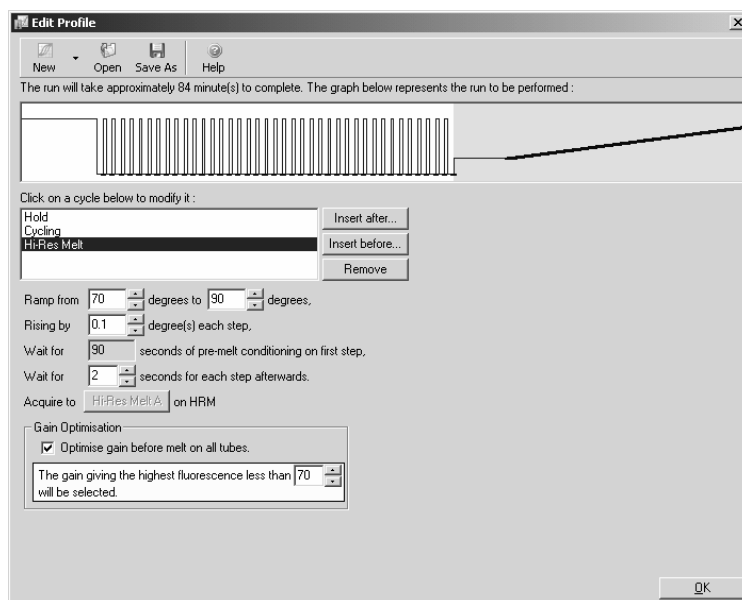
7. アニーリングステップの最後に蛍光の取り込みを行なうため、図のように “ Green ” チャンネルを “ Acquired channels ” （右側）に設定し “ OK ” を選択する。



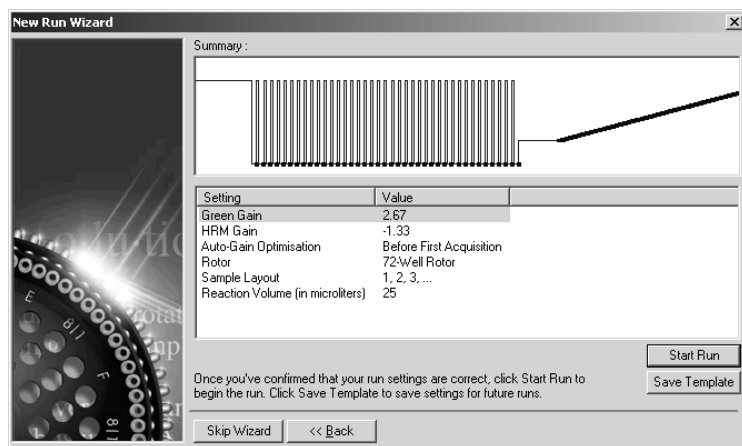
8. HRM の反応条件は、解析内容に応じて設定を行なう。初めて行なう解析では、温度の設定レンジを広めに取り一度融解温度が明らかになったら、次回からは融解温度を狭めて 10 程のレンジに設定する。

HRM 解析では、融解反応を行なう前に全てのサンプルの蛍光値を取得し、それを元に装置の Gain (感度) の自動設定を行ないます。“Gain Optimization”では、その設定を行なう際の最大蛍光値の入力をします (“70”と入力した場合、最大の蛍光値を示すサンプルの HRM スタート時の蛍光値が “70” 以下となるように自動設定する)。

通常は、デフォルトの “70” のままで問題ありません。



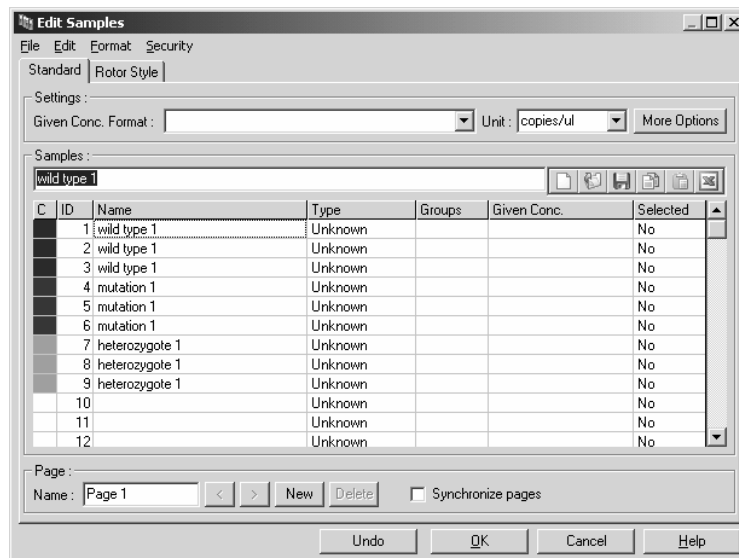
9. リアルタイム PCR における装置の “Gain (感度)” の自動設定を行なう。“Optimize Acquiring” を選択し、Green チャンネルに関して、1~3 の範囲となるように設定する。また、自動設定をサイクリングの最初の蛍光取り込み前に行なうように設定するため、“Perform Optimization Before 1st Acquisition” にチェックをいれる。



10. 全ての設定を完了後 “Start Run” をクリックし、Run File の保存を行なう。ファイルの保存後、自動的にランニングが始まる。

11. ランニングを開始すると、自動的にサンプル情報設定画面が表示される。ここでは、サンプル名やサンプルの種類 (Standard、Unknown など) および濃度設定などを行なう。

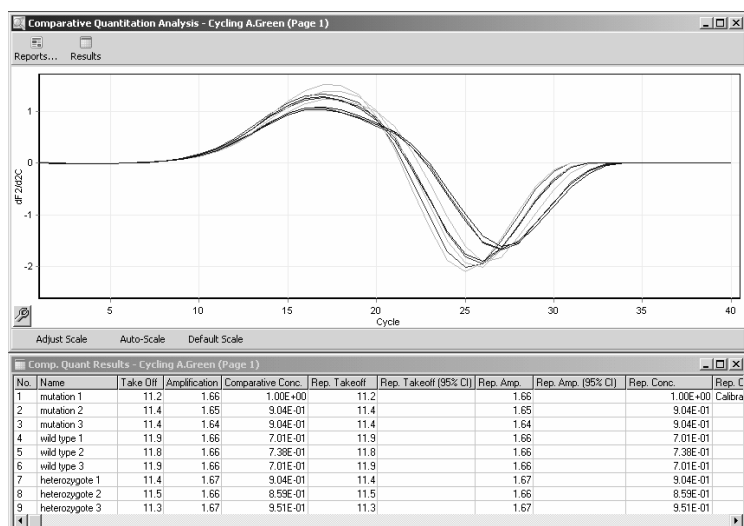
この設定はランニング中およびランニング後にも行なうことができるため、“OK” をクリックしスキップすることもできます。



5.2 リアルタイム PCR データの解析

HRM 解析は、PCR 産物を高分解能で融解曲線分析を行なう技術であり、その結果は増幅産物の質に左右されます。そのため、HRM 解析を行なう前にリアルタイム PCR のデータの解析を行ないます。リアルタイム PCR のデータの解析方法に関しては、下記をご参考ください。

- “Quantitation analysis” により定量解析を行ないます。C_T 値が 30 以上であるサンプルに関しては、増幅に用いたテンプレートの純度が低い、テンプレートの初期濃度が低い、テンプレートの分解が進んでいる、などの理由が考えられるため、解析の対象として不適切な場合があります。
- 増幅が終了した段階での各サンプルの蛍光値を比較し、他のサンプルと比較して低い蛍光レベルを示しているサンプルは、HRM 解析の対象から外します（C_T 値が 30 以下であっても、最終蛍光レベルが低い場合は、解析からは除外してください）。特定のサンプルのみ蛍光レベルが低くなる原因としては、蛍光色素の量の問題、その他の反応組成の量の問題、および増幅の阻害剤の影響などが考えられます。
- 個々の反応サンプルの増幅効率を算出するために、Analysis Mode の “Comparative Quantitation” を利用します。
- 他のサンプルから外れた増幅効率を示すサンプルや、増幅効率が 1.4 以下であるサンプルに関しては、解析の対象として不適切な場合があります。



“Comparative Quantitation” の例

Comparative Quantitation では、個々のサンプルの増幅効率が “Amplification” の欄に表示されます。増幅効率が 100% の場合、“Amplification” の欄に表示される値は 2 となります。

注：プライマーダイマーや非特異的副産物の増幅の有無を確認する場合には、通常通り Analysis Mode の “Melt” から解析を行なってください。解析結果において 2 つ以上のピークが見られる場合には、PCR 反応の最適化もしくはプライマーの再設計を行なってください。なお、メルト解析では、PCR 産物を温度でしか分けられないため、極まれにですが同一温度帯に複数の産物が重なる場合があります。増幅産物の長さで識別のできる電気泳動で念のため確認をしてください。

5.3 HRM データの解析

HRM 解析の結果は、“Normalized melt plot” もしくは “Difference plot” として表示されます。“Normalized melt plot” では、カーブのパターンにより遺伝子型の識別を行ない、Homozygotes の識別は温度軸（横軸）のカーブのシフト、Heterozygotes の識別はカーブの形状の変化として判別されます。

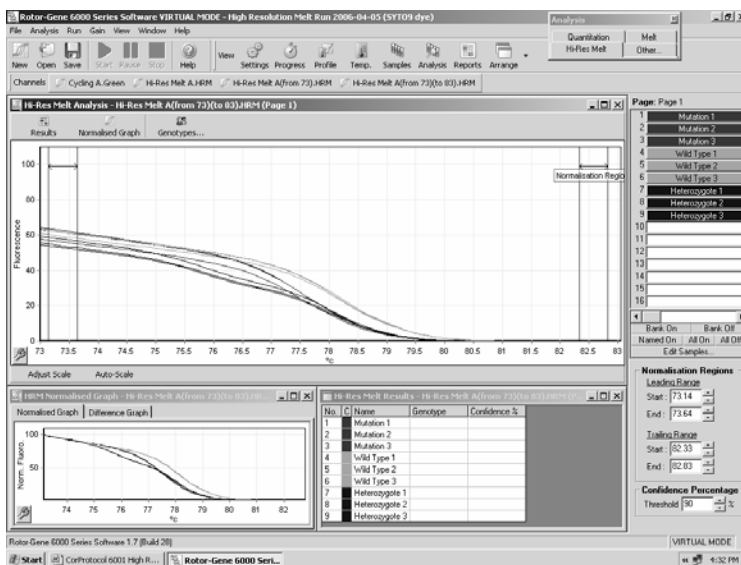
“Difference plot” では、任意に選択したサンプルの蛍光値に対する差（Difference）をプロットしたグラフを示します。このグラフでは、より視覚的に遺伝子型を認識しやすくなっています。

注：通常 “Melt” で使用される融解曲線分析（融解反応の生データを一次微分し、蛍光値の変化率をピークとして表示したものは、微分による人工的なノイズなどの影響のため、HRM 解析には適していません。HRM 解析をされる際には “Normalization” を行なった融解曲線を使用する必要があります。

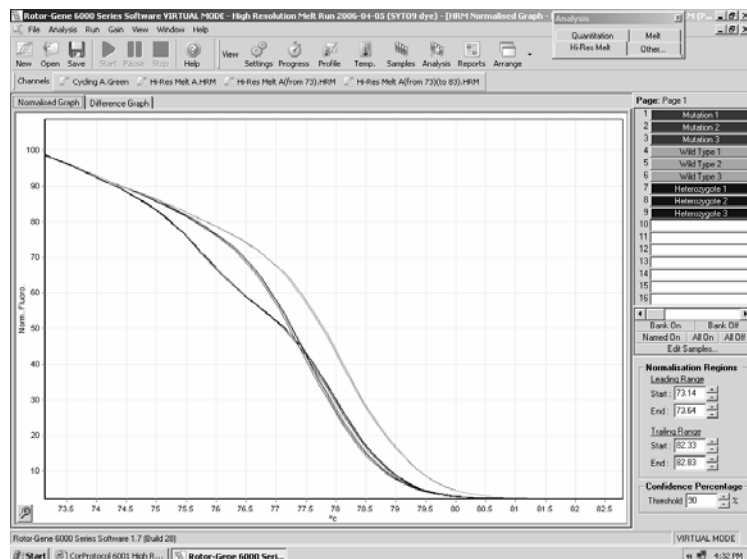
1. Analysis ウィンドウから “HRM” を選択し、解析を行なうファイルを選択後 “Show” をクリックする。Analysis ウィンドウに “HRM” のタブが表示されていない場合は “Other” タブより “High Resolution Melt” を選択する。



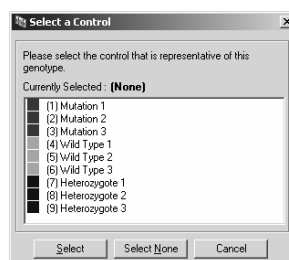
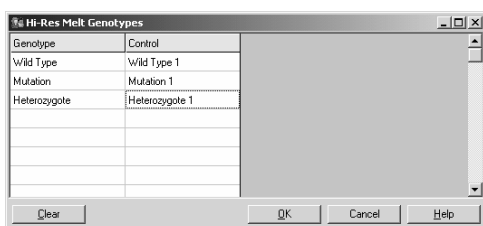
2. HRM 解析のメイン画面には、生データ（画面上）、“Normalized” データ（画面左下）、および判定結果（画面右下）の 3 種類のウィンドウが表示される。生データのウィンドウでは、HRM 開始時および終了時における蛍光レベルを均一化するために、“Normalization region”（ウィンドウ左右の黒線で囲われた領域）の設定を行なう。“Normalized” データのウィンドウでは、この補正領域の内側のグラフが表示される（外側のデータは除外される）。“Normalization region” の位置および幅は、任意に設定することができるが、特に左側のメルト開始前に関しては、全体のカーブが平行になっている領域に設定し、メルト領域上に設定をしないようにする。



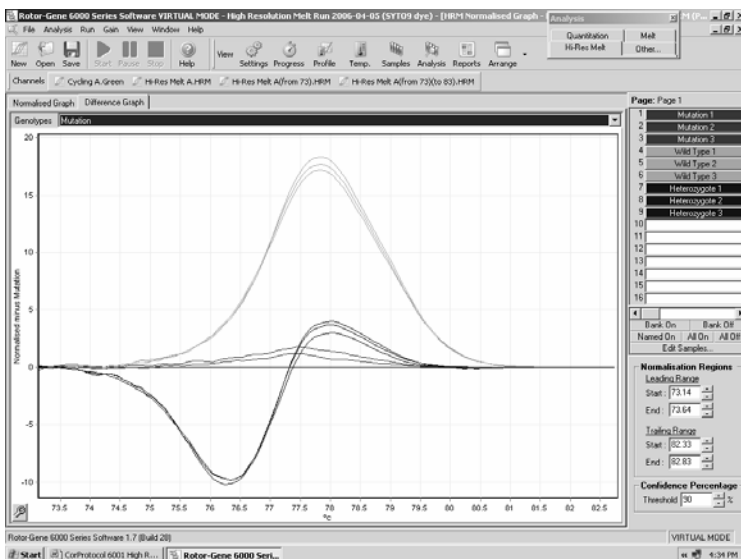
3. 画面左下の“Normalized”データからは、通常の融解曲線の形状の他に、特定のサンプルのカーブを基準とした“Difference plot”の表示を行なうことも可能（ステップ5参照）。



4. “Difference plot”の表示および判定結果を表示するために“Genotype”の設定を行なう。この設定は、生データウィンドウ上部の“Genotype...”アイコンをクリックし、“Genotype”欄に遺伝子型名あるいはサンプル名を入力し、“Control”欄にそれぞれに対応するコントロールサンプルをリストから選択する。

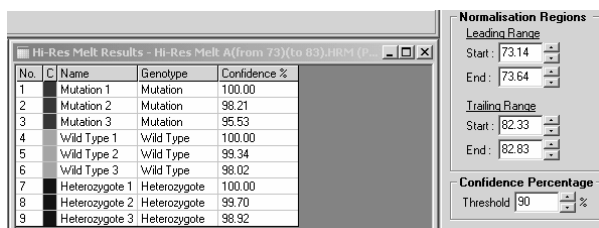


5. “Difference plot”の表示は、左下の“Normalized”データウィンドウ上部の“Normalized graph”タブと“Difference graph”タブを切り替える。次に、その下にある“Genotype”のプルダウンメニューから、基準とするタイプを選択する。



6. 右下の判定結果ウィンドウでは、“Genotype”で設定を行なったサンプルを基準としたときの他のサンプルのカーブパターンの近似率を表示する。画面右下の“Confidence Percentage”では、タイプ判別の閾値を設定することが可能。

例えば“Confidence Percentage”が90%に設定されている場合、90%以上のConfidenceを示すサンプルは、基準としたサンプルと同じタイプであり、90%以下のものは“variation”として、異なるタイプのものと判定されます。



No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1		Mutation 1	Mutation	100.00
2		Mutation 2	Mutation	98.21
3		Mutation 3	Mutation	95.53
4		Wild Type 1	Wild Type	100.00
5		Wild Type 2	Wild Type	99.34
6		Wild Type 3	Wild Type	98.02
7		Heterozygote 1	Heterozygote	100.00
8		Heterozygote 2	Heterozygote	99.70
9		Heterozygote 3	Heterozygote	98.92

Normalisation Regions

Leading Range
Start: 73.14
End: 73.64

Trailing Range
Start: 82.33
End: 82.83

Confidence Percentage
Threshold: 90 %

Memo

Memo

Memo

Trademarks: QIAGEN® (QIAGEN Group), Rotor-Gene™ (Corbett Research); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); TaqMan® (Roche Group).

本文に記載の会社名および商品名は各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的に使用することは出来ません。

© 2009 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社キアゲン 〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II
Tel: 03-6890-7300 FAX: 03-5547-0818 E-mail: techservice-jp@qiagen.com

