

QuantStudio3対応消耗品

作成中
2023.11.7

ブロックタイプ	プレート・チューブ	シール・キャップ	トレイ・リテーナー	ベース（サンプル調整時のみ使用）
Fast 96ウェル	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical Adhesive Film 商品番号: 4311971		MicroAmp 96-Well Support Base 商品番号: 4379590
	MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 商品番号: 4346907	MicroAmp Optical 8-Cap Strip 商品番号: 4323032 （Flatタイプ）		MicroAmp 96-Well Support Base 商品番号: 4379590
	MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0.1mL) 商品番号: 4358293		MicroAmp 96-Well Tray (Black) 商品番号: 4379983	
	MicroAmp Fast Reaction Tube with Cap (0.1mL) 商品番号: 4358297			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- チューブ類のセット方法注意点
- 測定時にはチューブの上部から加圧するため、バランスよいチューブ類設置が必要
 - 8連チューブやチューブをダミーとして用意（図の灰色位置参考）
 - 反対側や四隅などバランスよい位置に設置（図の赤色位置参考）
 - チューブやプレート使用時はマジック等での記入禁止

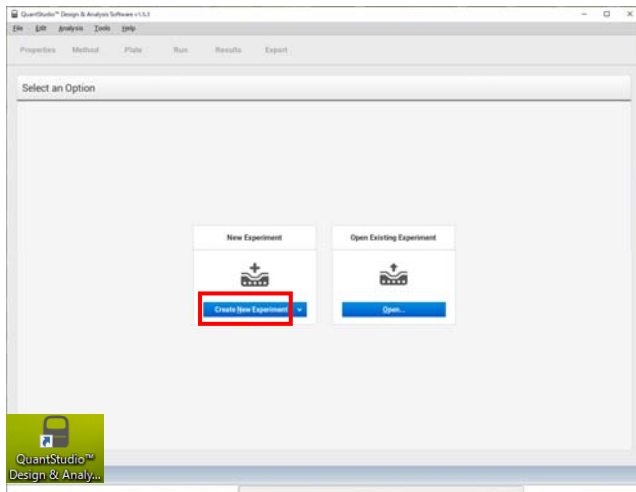
起動

- PCの起動
- 起動アナウンス画面の【OK】をクリック
- 【Ctrl】キー + 【Alt】キー + 【Delete】キー の3つを同時に押す
- ユーザー名【INSTR-ADMIN】
- パスワードは123456

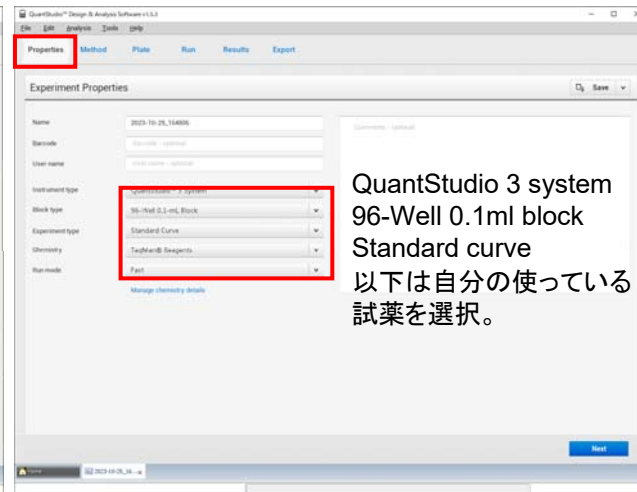


- RT-PCRの起動
- 画面タッチ
- 画面がつかない場合は本体裏側のスイッチON

QuantStudio3操作方法(絶対定量法)

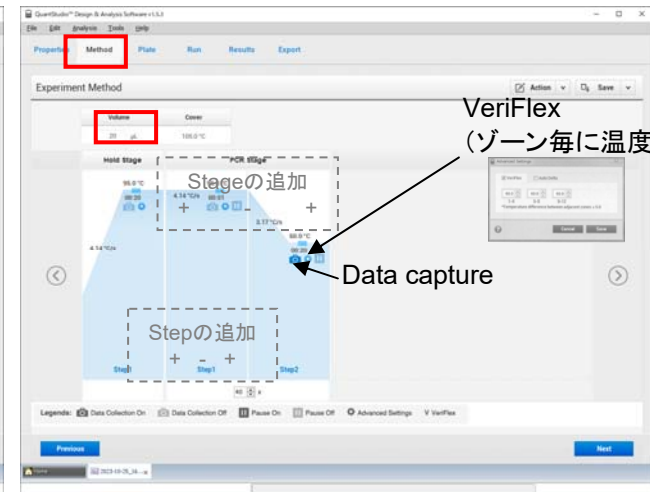


デスクトップのQuantStudio Design&Analysisを起動。
Create New Experimentをクリック。
(保存した雛形を使用する場合はプルダウンからTemplate選択)
Templateはダブルクリックで開かないこと

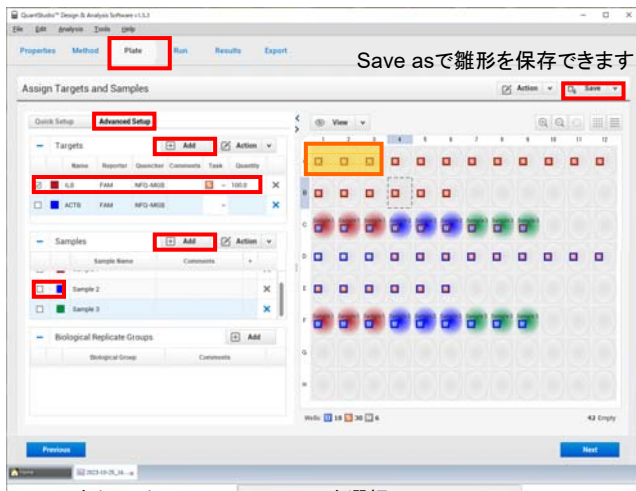


QuantStudio 3 system
96-Well 0.1ml block
Standard curve
以下は自分の使っている
試薬を選択。

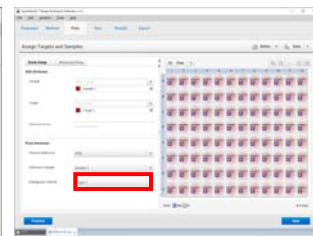
Propertiesをクリック。
赤枠を設定する。



Methodをクリック。
トータルボリュームを設定する。
必要に応じて温度プログラムを変更する。
(温度、時間部分クリックで変更。+, - をクリックするとStageの追加削除ができる)

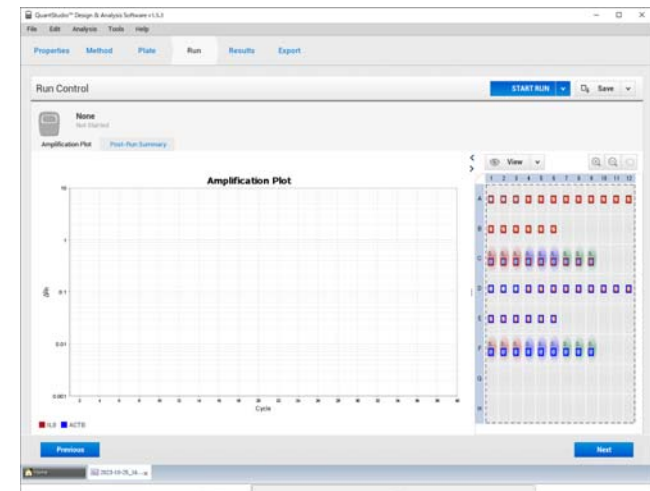


Save asで雛形を保存できます



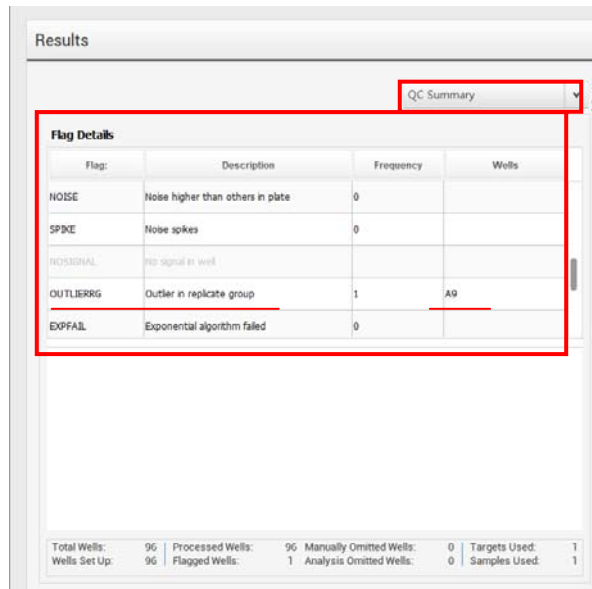
設定を後からする場合(Quick start)
Quick setupを選択。
Wellを全選択する。
Sampleのプルダウンでsample1を選択。
Targetsのプルダウンでtarget1を選択。

Plateをクリック。Advanced setupを選択。
Addをクリックし、Targetsに遺伝子名を登録。Reporter、Quencherの色素を選択。Samplesにサンプル名を登録。
(Standardサンプル)
Wellの場所を選択し、該当する遺伝子にチェックを入れTaskでSを選択。
Quantityに量を入力。ネガの場合はTaskでNを選択。
(Unknownサンプル)
Wellの場所を選択し、該当する遺伝子とサンプル名にチェックを入れTaskでUを選択。
Passive referenceを設定する場合はQuick setupタブで選択する。

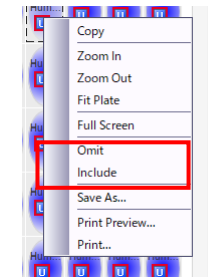


本体タッチパネルの△をタップしてプレートをセットする。
Runをクリック。
START RUNをクリックし、シリアルナンバーを選択。
ファイル名を入力し、Saveをクリックするとスタートします。
(フォルダを変えないこと)

QuantStudio3操作方法(データ解析1) 必ず確認



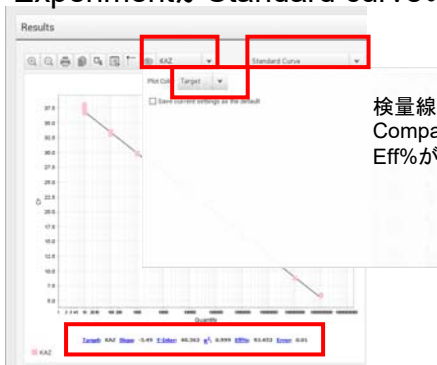
フラグ	内容
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	パッシブリファレンス値に異常あり
OFFSCALE	蛍光値がオフスケール
HIGHSD	リプリケートグループ内の標準偏差が高い
NOAMP	増幅なし
NOISE	他のウェルと比較してノイズが高い
SPIKE	スパイクノイズ有り
NOSIGNAL	蛍光値が検出されない
OUTLIERRG	リプリケートグループ内に異常値がある
EXPFAIL	指数関数的増幅領域が確認されない
BLFAIL	ベースライン自動設定時に問題確認
THOLDFAIL	Threshold自動設定時に問題確認
CTFAIL	C _T 値自動算出時に問題確認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



【重要】<問題点の確認>

Resultをクリック。PlotをQC Summaryに切り替え。
Wellsに問題のあるWell番号、Descriptionに内容が表示される。
フラグの行を選択すると下部に詳細が表示される。
一覧を参考にエラーを解決してください。
解析対象から外したいWellがある場合はWell上で右クリックし、Omitを選択。
解析対象に戻すときは右クリック、Includeを選択。

ExperimentがStandard curveの場合



検量線が引けていることを確認してください
Comparative Ctを検討している場合は
Eff%が100%に近いことを確認してください

<Standard curveの確認>

Resultをクリック。PlotをStandard curveに切り替え。

Targetを選択。Show plot settings をクリック。

Plot colorを選択。

下部のSlope,R2,Eff%を確認する。

Eff%がPCR増幅効率。

R2がCt値の相関係数で完全相関で1になる。(0.99以上が望ましい)

ChemistryがSYBR Greenの場合



<Melt curveの確認>

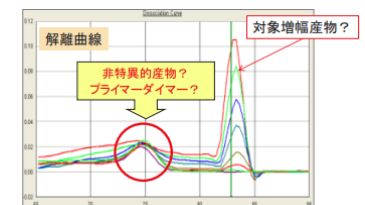
Resultをクリック。PlotをMelt curveに切り替え。

Show plot settings をクリック。

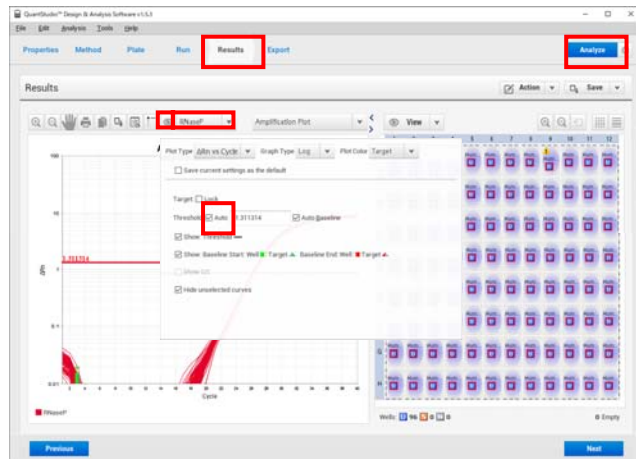
PlotがDerivativeであることを確認。

Targetを選択。

ピークが単独であることを確認。



QuantStudio3操作方法(データ解析2) 必要に応じて使用する



<Thresholdの変更>

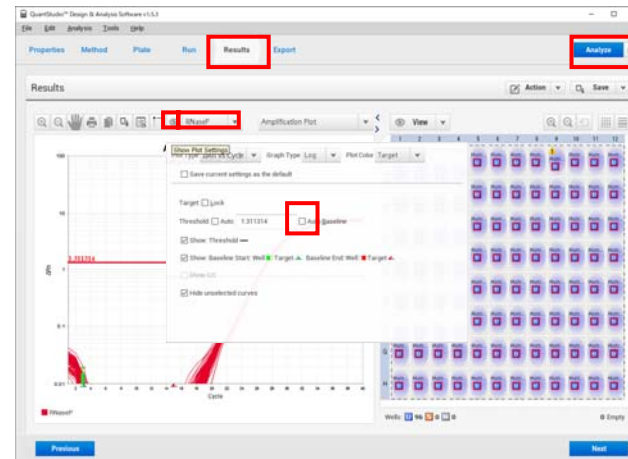
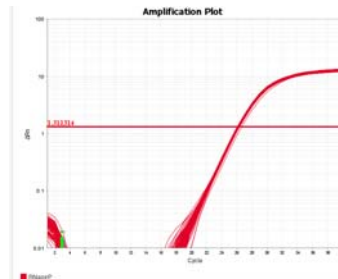
Resultをクリック。

Targetを選択。Show plot settings  をクリック。

ThresholdのAutoのチェックを外し、Threshold lineを移動させる。

Thresholdは指数関数増幅領域中央やや上に設定します。

新しく設定したThresholdで解析するためにAnalyzeをクリック。



<Baselineの変更>

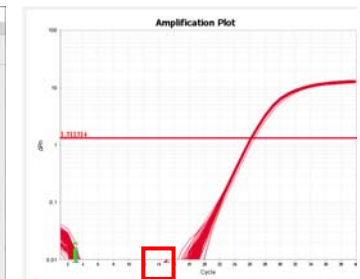
Resultをクリック。

Targetを選択。Show plot settings  をクリック。

Auto Baselineのチェックを外し、End位置(▲)を移動させる。

End位置は最も早く増幅開始しているプロットの増幅開始位置3サイクル前に設定します。

新しく設定したBaselineで解析するためにAnalyzeをクリック。

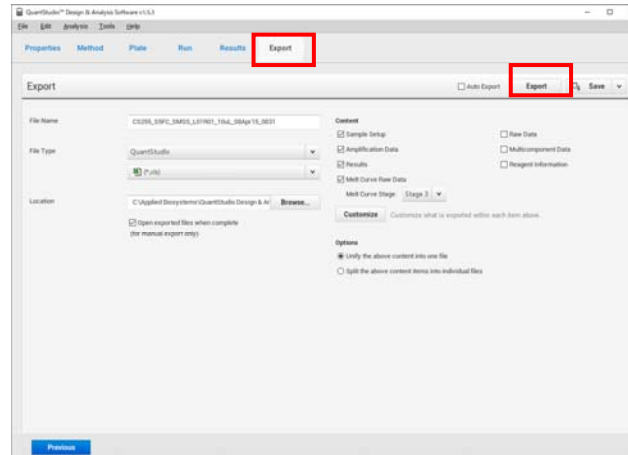


<結果の一覧>

Resultをクリック。Result tableをクリック。

Viewで表示項目を変更できます。

Group byでグループ毎に表示します。



<結果のエクスポート>

Exportタブをクリック。

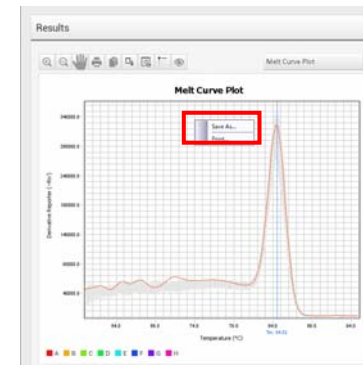
File typeを選択。

Contentで出力する項目を選択。

Optionsで個別ファイルか1つのファイルにするか選択。

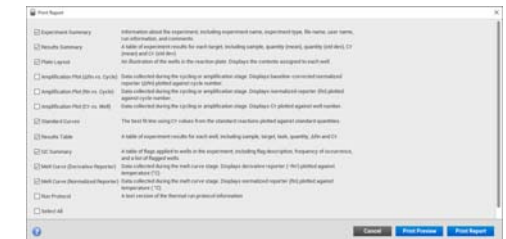
Locationで出力先を選択。

Exportボタンで実行。



<グラフの保存>

グラフ上で右クリック→Save as



<結果の印刷>

File→Print report

出力したいデータやグラフにチェック

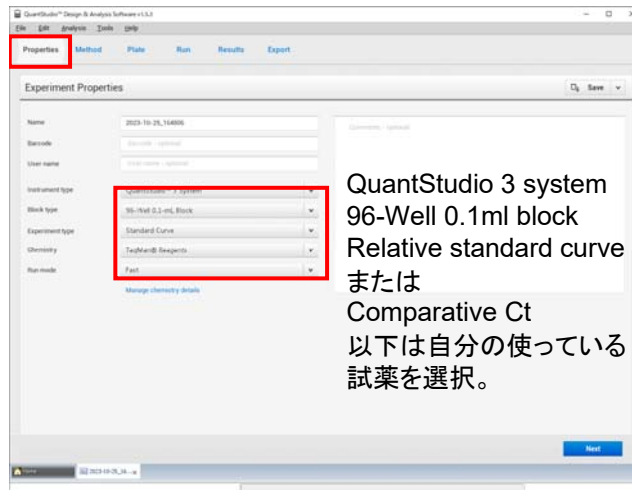
Print reportをクリック。

<グラフの印刷>

グラフ上で右クリック→Print

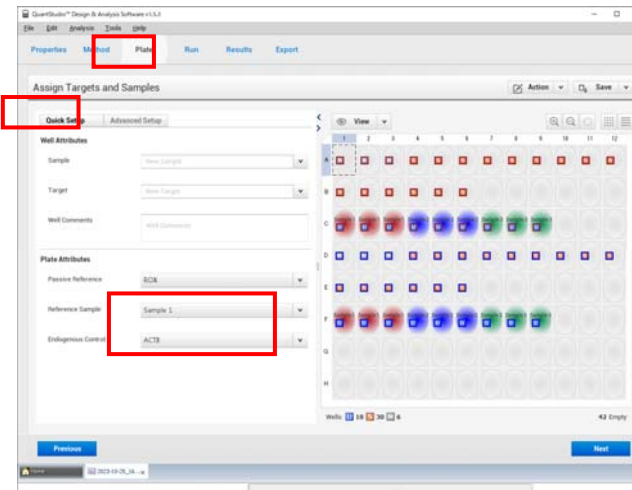
QuantStudio3操作方法(相対定量法、 $\Delta\Delta Ct$ 法)

絶対定量法と違う部分の説明です。
説明のない部分は絶対定量法マニュアルを参照



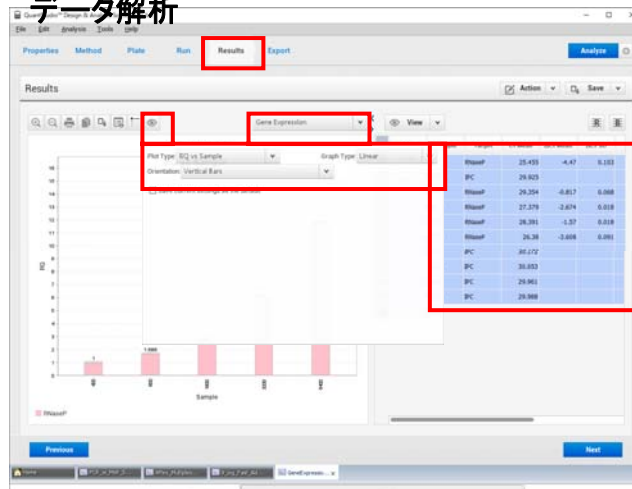
QuantStudio 3 system
96-Well 0.1ml block
Relative standard curve
または
Comparative Ct
以下は自分の使っている
試薬を選択。

Propertiesをクリック。
赤枠を設定する。



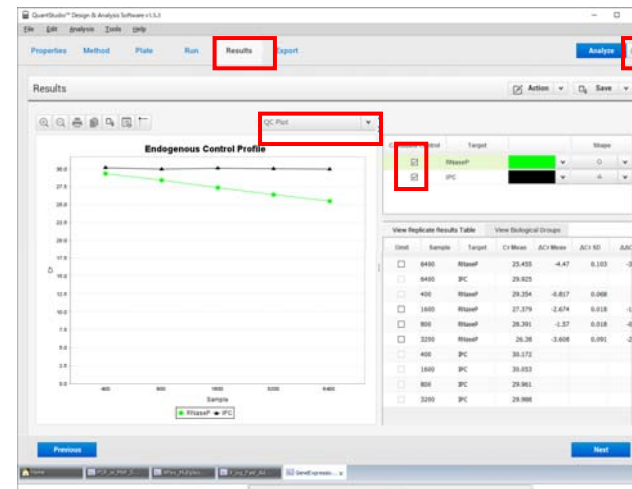
Plateをクリック。Advanced setupでPlate設定を作成。
Quick setupをクリック。
基準とするサンプルと内在性コントロールを選択する。

データ解析



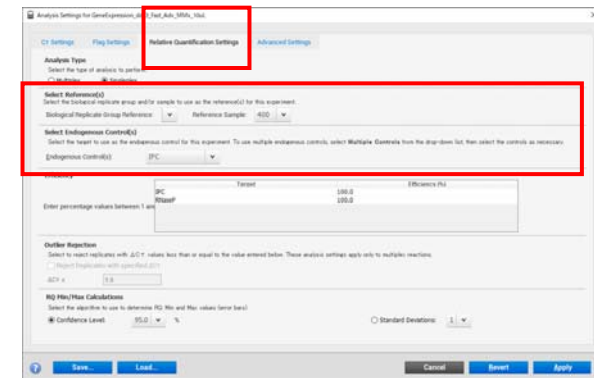
<Gene Expressionの確認>

Resultをクリック。プルダウンからGene Expressionを選択。
Show plot settings をクリック。
赤枠内を設定して任意のグラフ表示にする。
グラフ右側に詳細データが表示される。
Biological replicate groupを設定した場合、
をクリックするとグループ毎相対表示に変わる。



<QC Plotの確認>

Resultをクリック。プルダウンからQC Plotを選択。
Candidate controlにチェックを入れる。
グラフで変動を確認。

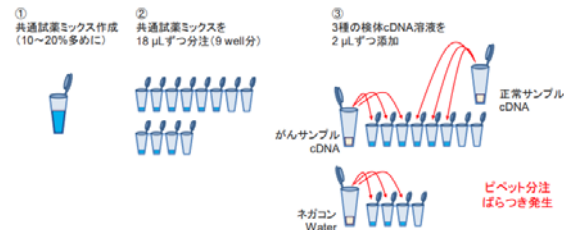


内在性コントロールやリファレンスサンプルを変更する場合は
Analysis settingのRelative quantification settingsで設定する。
Select ReferenceとSelect Endogenous controlで変更する。
EfficiencyでTarget毎のPCR効率を入力する。(ΔΔCt法)
Applyし、Analyzeで再解析する。

×ばらつきの出やすい分注例

【試薬分注】個別的分注方法:ピペット分注の誤差が生じやすい

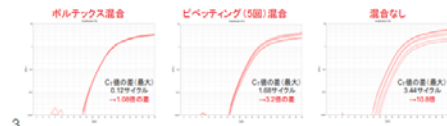
- 1つの検体を3反復(レプリケート:n=3)で測定する事例
- 3種類(がん、正常、ネガコン)の検体を合計9wellで測定(共通試薬18 μ L + cDNA 2 μ Lの事例)



混合の違いによるばらつき

試薬混合方法によるデータの差異

- 試薬混合や分注の際のポイント
 - 液量が多い/安価な試薬(Water)の順で添加する
 - 試薬種の混合、ボルテックス等で丁寧に混合
 - 強い振動や長時間の混合は酵素の劣化が生じる
 - 冷却の指示がある場合は遵守
 - テクニカルレプリケート分をまとめて混合して分注(溶液を均一に)
- 混合方法によるデータの違い
- リアルタイムPCRデータ テクニカルレプリケート(n=6)で測定



補正について

内在性コントロールの選択に関して

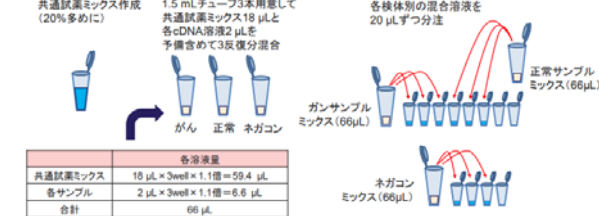
リアルタイムPCRでの検体間補正などで重要な機能

- サンプル間におけるインプット量を整える
- 複数サンプル間の補正因子として利用
- 反応系へのcDNA持込量、阻害や逆転写効率の差を補正
- サンプル間で差が小さく、恒常的かつ安定して転写される遺伝子を選択
- 内在性コントロール(Endogenous Control)の選択
 - β -ActinやGAPDH遺伝子でも変動やサンプル間でのばらつきあり
 - 薬剤処理や特殊な状況では注意が必要
 - HPRTやTBPなど低発現遺伝子も評価対象候補としてご検討ください
 - HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase
 - TBP: TATA-binding protein
- Ribosomal RNA(真核生物: 18S rRNA、バクテリア等: 16S rRNA)
 - 逆転写時の添加Total RNA量に注意(最大許容量あり: 使用する試薬説明書をご確認ください)
 - rRNAはpoly A配列を持たないのでOligo dTプライマーだけの逆転写では逆転写されない
 - 18S rRNA検出の場合にはランダムプライマーを含む逆転写が必要

◎ばらつきの出にくい分注例

【試薬分注】反復をまとめて混合:ピペット分注の誤差を低減

- 1つの検体を3反復(レプリケート:n=3)で測定する事例
- 3種類(がん、正常、ネガコン)の検体を合計9wellで測定(共通試薬18 μ L + cDNA 2 μ Lの事例)

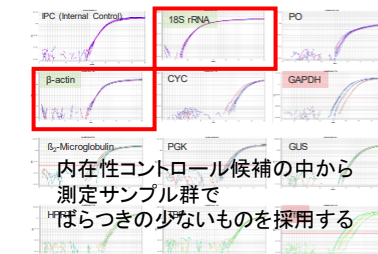


ロスを考慮して1.1倍作る

	各溶液量
共通試薬ミックス作成	18 μ L $\times$ 3well $\times$ 1.1倍 = 59.4 μ L
各サンプル	2 μ L $\times$ 3well $\times$ 1.1倍 = 6.6 μ L
合計	66 μ L

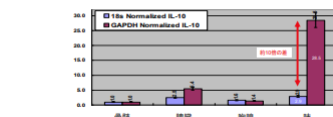
複数サンプルにおける内在性コントロール検証例

- 測定サンプル(4組織) 脾臓、胸腺、肺、骨髄
- Total RNA量をそろえて逆転写を実施
- IPC (Internal Positive Control) でサンプル由来での逆転写阻害がないことを確認
- 候補となる内在性コントロール遺伝子での評価を実施



■ 18S rRNAで補正・計算した場合(L-10/18S rRNA) 青色バー=2.9倍

■ GAPDHで補正・計算した場合(L-10/GAPDH) 赤色バー=28.5倍



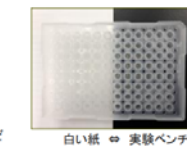
機器不良、データ不良を起こしやすい原因

リアルタイムPCR装置にかける前の注意点

- 消耗品に関して
 - プレートやチューブ、シールやキャップは純正品を使用
 - 他社消耗品は装置の故障やデータ不良が生じる可能性あり
 - プレートやチューブの下部に水や水滴が付かないように注意
 - 水道水由来の製氷機の氷の場合はカルシウムなど沈着の恐れあり
 - クラッシュアイス使用の際: アルミブロック使用や氷の上にアルミホイルを敷く
- チューブ内の泡に関して
 - 試薬が適切な位置に分注されているか確認
 - 出来るだけ泡を入れないように分注
 - 泡の底部の泡はデータ不良となる
 - 軽くスピンダウンして反応溶液をチューブ底部に落としておく
 - タッピングで泡を上方に移動させる
 - 浮いている泡はそのままOK(加熱により泡は破裂)
- 安心できる分注事例(初心者向け!)
- 油性ペンで線を引いたりマーカーキングで書きません
- 黒色実験ペンの上に白い紙やアルミホイルなど設置し境界で判別
- プレート側面にカッターナイフやニードルペン(針金)などで明記
- 8連チューブの側面には小さな番号あり
- リアルタイムPCRマスターミックスで色素入りの試薬を使用
- Applied Biosystems™ PowerTrack™ SYBR Green Master Mixなど
- リアルタイムPCR反応終了後の確認
 - 完全な蒸発が生じた場合はシールやキャップの取扱いに注意
 - 水蒸気の付着や若干の液面低下は問題なし
 - データ不良や増幅曲線の不良Wellの確認
 - 増幅曲線のみではなくMulticomponent画面も併せて確認
 - ゴミの混入確認(反応溶液にゴミが入ると蛍光データ減衰の原因)
 - シールやフタを開けずにそのまま実験廃棄物として処理(コンタミネーション防止)



混合例(動画紹介)
【視認のため着色】



今回の検証では...

- 同量添加したIPCでサンプル間で差がない
サンプル由来の逆転写阻害の否定
- 内在性コントロール遺伝子での各サンプル評価
ばらつきが大きい: GAPDH、TIRなど
ばらつきが小さい: 18S rRNA、 β -Actinなど

【IPC (Internal Positive Control)】
・VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA
製品番号: A29763 (人工合成RNA)
・VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control - VIC™ Assay
製品番号: A29765 (リアルタイムPCR検出用アッセイ)

ばらつきの多いもので補正すると
結果が大きく変わるので注意