QuantStudio3対応消耗品



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

				Sa	ve	as	C	淮井	12	1禾	仔	CE	559
ssign Targets and Samples									Ø	Action	٣	D4 1	iave v
Quick Setup Advanced Setup		5 0	View	*							9.0	d.a	
- Targets - Add - Action	ψ i		1		4		8	1				11	15
Name Reporter Georgenets Task Quantity							•	•			•	•	
2. 🖬 8.8 FAM MAG 📓 - 100.2	×												
ACTE FAM NFG-MGE -	×	1			-	1		-		-			
- Constant III And III Andrew	1021	° 🖬	0			Q.	Ø.						
		• •											
		1											
angin 2	×		•	•		•							
Eample 3	×	1.00	1	1	-			-	-	-			
- Biological Replicate Groups 🕀 Ad	d.		-	-	-			-	-	-			
Bological Group Commonte		0											
		webs [1 1 1	30 🛄 6									42 Empty

Passive referenceを設定する場合はQuick setupタブで選択する。

赤枠を設定する。

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。

exercererer

-

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。 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)



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

		40.5	ummary	· ·
Flag Details				_
Flag:	Description	Frequency	Wells	
NOISE	Noise higher than others in plate	0		
SPIKE	Noise spikes	0		
NOSIGNAL	tte signal in well			1
OUTLIERRG	Outler in replicate group	1	A9	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0		1

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	リブ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



<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>

[2] Action v

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。



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。

- 0

新しく設定したBaselineで解析するためにAnalyzeをクリック。

0	Eile Esit Analysia	Toop Tanta			Results
* * * * * * * * * * * * * * * * *	Proportion Motion Proportion Motion Export File Name Lacober	CORLASSCAMELARINE, March Expert CORLASSCAMELARINE, March 2009 (19,000) CORLASSCAMELARINE, March 2009 (19,000) CORRECTORS CORRECTORS CORRECTORS CORRECTORS CORRECTORS	Content Stangin Hong Contained to the Stand Content of the Stand Mark Court Hong Coupy of the Content of the Stand Stand Content of the Stand Stand Stand Content of the Stand Stand Stand Stand Content of the Stand Stand Stand Stand Content of the Stand Stand Stand Stand Stand Stand Stand Content of the Stand Stand Stand Stand Stand Stand Stand Content of the Stand	Anto Export 2, Save v	
					<グラフの保存> グラフトで右クリ

ōクリック→Save as

elt Curve Plo

<グラフの印刷> グラフ上で右クリック→Print



<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。

<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。

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



ssign Targets and !	Samples									ø	Action	٠	0, 1	Save
Quick Set p Arty	anced Setup		5 ®	View	÷								la	
Well Attributes				1	1		- 8		2			- 18	11	17
Sample		*	•			•	•	•	•	•	•	•	•	•
Target		*	• •	•		•								
Well Convents			•			o	8		a	•	a			
Plate Attributes			• •	•		•	•	•	•		•		•	•
Passive Reference	RCK	*						•						
Reference Sample	Sample 1			10					-					
Endagenius Control	ACTB	. v												
			н.											
			Wells [30 🛄 4									43 Empt

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

Propertiesをクリック。 赤枠を設定する。



<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。 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。

Results									Di A	etien v	D ₆ Save	Ŧ
0.0.4				OC Bet	10	1						
14 14 12	100.00	_		40.7.00	13			Target			line	
		Endogeno	us Control Pr	ofile				and the second				1.
36.0			•	•	•			(1997) (1997)				
27.8			-	-				-				
26.8												
25.8												
						Vev B	spicate flesu	ts Table	Vew Dulogo	al Drouge		
						- Dest	Sergis	. taget	Critivan	ACI Mean	ACT SD	ANC
0						1 0	0400	Attacel	25.455	-4,47	0.103	- 4
.944							6400	PC .	29.825			
12.8							+00	Risser	29.354	-8.817	0.068	
10.0							1600	Ritssef	27,379	2.6%	0.018	-4
1.8							800	Ritarel	28.391	4.37	0.018	1
							3290	Rissie	26.38	3.606	6.091	- 4
							400	PC	30.172			
							1649	PC	30.453			
	-40	900	1805	8206	8.401		804	PC	29.961			
			Sample				3209	NC .	28,998			



Contractory State Support	Relation Dissettly when Relations	And in case of the local division of the			
Contraction () () and () and ()	reserve consecutive security	Accession of the local division of the local			
Analysis Type					
Cation and a series of an and a series	5				
Salart Balancerals)					
Select the biobacial replicate array and?	to cample to use as the referenceful?	for this superiners.			
Biological Replicate Group Networks	r 💌 Reference Sample	400 ¥			
Select Endogenous Control(s)					
Select the heart to use at the endogen	ou consi fa tia equipert Taua	e nifei ritena co	cit, princt Maltiple Ge	entrals have the stop-down list, Nam or	iert fie controls as recessary
(pologenous Control(s)	PC ¥				
() delay	Ter Ter	uert .		Efficiency (%)	
	PC Riser		199.0		
Enter percentage values between 1 a					
22.2					
Select to reside togethome with ACT is	share her that or spail to the value	armost habe. These main	a settings and only to	miliples marting.	
Depart Projections with specified.					
AD 4 13					
Bith Miss (Mary Colordations)					
Select the algorithm to use to determine	RO No and National Secondary				
# Confidence Level 95.0	v 3		01	Standard Deviations 1 +	

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。

Xばらつきの出やすい分注例

【試薬分注】個別の分注方法: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18uL+cDNA2uL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)の順番で添加する
- 試薬類の混合、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ブリケート(n=6)で測定

ポルテックス混合 ビベッティング(5回)混合 混合なし C+佳の差(最大) 0.52サイウル Cr種の差(最大) 1.68サイウル Cr値の差(最大) 3.44サイクル

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 µL+cDNA 2 µLの事例)







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

- ブレートやチューブ、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氷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
- ・ 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
- タッビングで泡を上方に移動させる
- 浮いている泡はそのままでOK(加熱により泡は破裂)
- 安心できる分注事例(初心者向け!)
- 油性ベン等で線を引いたりマーキングできません。
- 黒色実験ベンチの上に白い紙やアルミホイルなど設置し境界で判別
- ブ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 Mixts
- 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】



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

複数サンプルにおける内在性コントロール検証例

・ 候補となる内在性コントロール遺伝子での評価を実施



PGK B-Microglobulin 内在性コントロール候補の中から







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

2、内在性コントロール遺伝子での各サンプル評価

今回の検証では・・・

ばらつきが大きい: GAPDH、TfR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)



1、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