

CFX Managerクイックガイド

version 3.1



注意

- ・製品をご使用になる前に、リアルタイムPCR解析システム取扱説明書をよくお読みください。
- ・本書の注意事項は必ずお守りください。
- ・本クイックガイドは、必要な時にすぐに取り出して読めるように大切に保管してください。

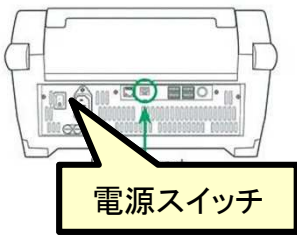
BIO-RAD

準備	4
Protocol設定	5
Plate設定	10
Start Run設定	22
Status	24
測定後解析	25
Gene Expression解析	29

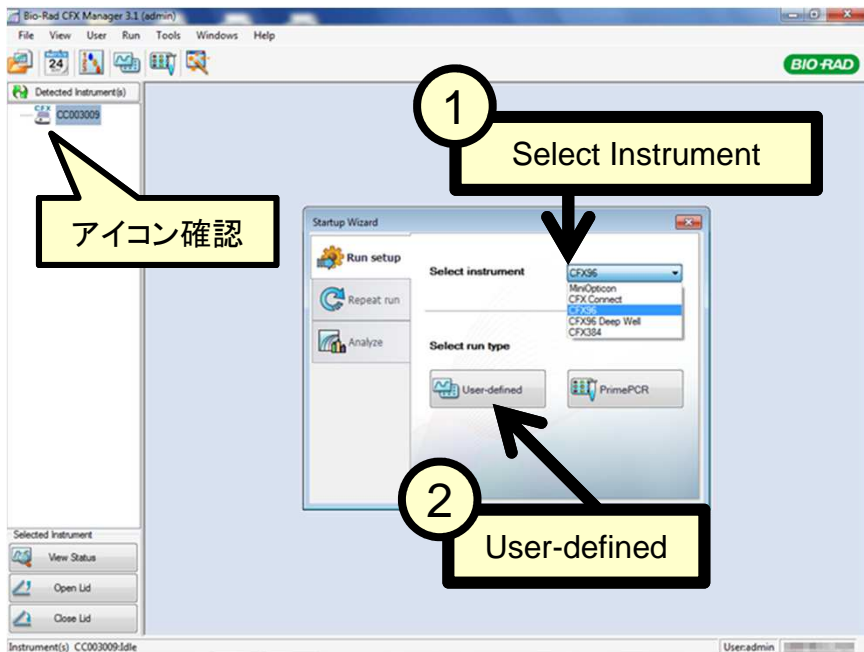
データを出力するには？	31
PCRランデータファイルを呼び出すには？	32
再度同じプロトコールでランを実行したい場合には？	32
温度グラジエント機能を使用するには？	33
データ(蛍光曲線)をTarget別に色分けするには？	34
検量線とThreshold lineの色を変更するには？	35
データポイントを一時的に除外するには？	36
Threshold lineをマニュアルで変更するには？	37
Gene ExpressionのBar Chart以外にはどのようなグラフがありますか？	38
Gene Expressionの複数のデータを統合して表示させるには？	39
Gene Expressionでサンプルグループ間の比較を行うには？(群比較)	40
ユーザー設定(User Preferences)を変更するには？	41
装置本体に保存されているデータを回収するには？	42

(当ガイドでは、SYBR Green検出系での発現解析を前提として、実際の操作の手順を示しています。その他のアプリケーションについては、当ガイドと日本語取扱説明書を合わせてご参照ください。)

準備



1. CFX装置本体とPCがUSBケーブルで接続されていることを確認します。
2. CFX装置本体の電源を投入します(電源スイッチは本体背面右下にあります)。
3. PCの電源を投入します。
4. PCのデスクトップ上にあるBio-Rad CFX Managerのショートカットアイコンをダブルクリックして起動します。
5. メインウィンドウ(下図)が開きます。
(複数ユーザーの設定がされている場合、ユーザーを選択した後にメインウィンドウが開きます)

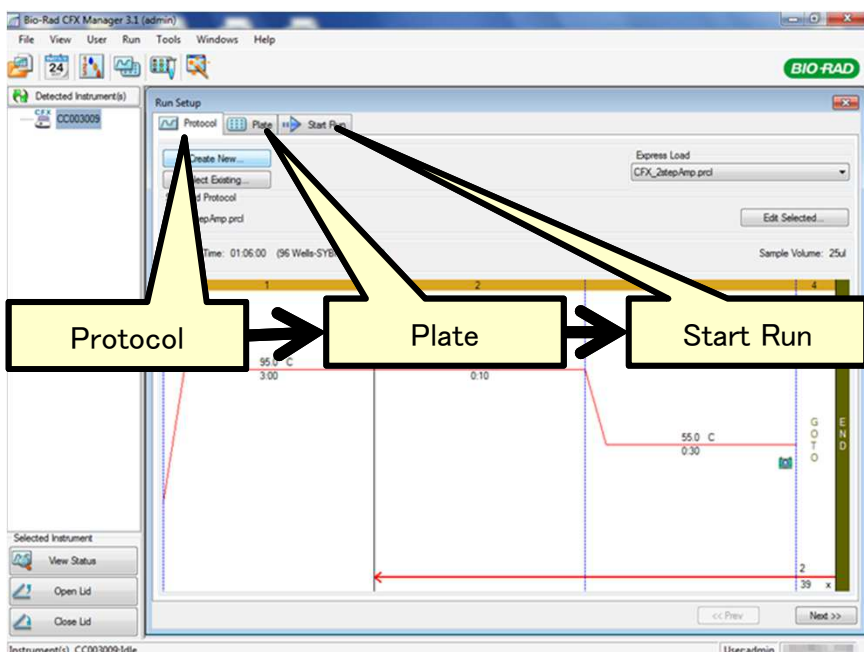


Detected Instrumentペインに接続された装置のアイコンが表示されることを確認します。アイコンが表示されていない場合、装置との通信ができていないので、電源等を確認してください。

1. Startup Wizardウィンドウ内の Selected Instrumentから使用する装置を選択します。
例: CFX96
2. Startup Wizardウィンドウ内の Select run typeではUser-defined ボタンをクリックします。

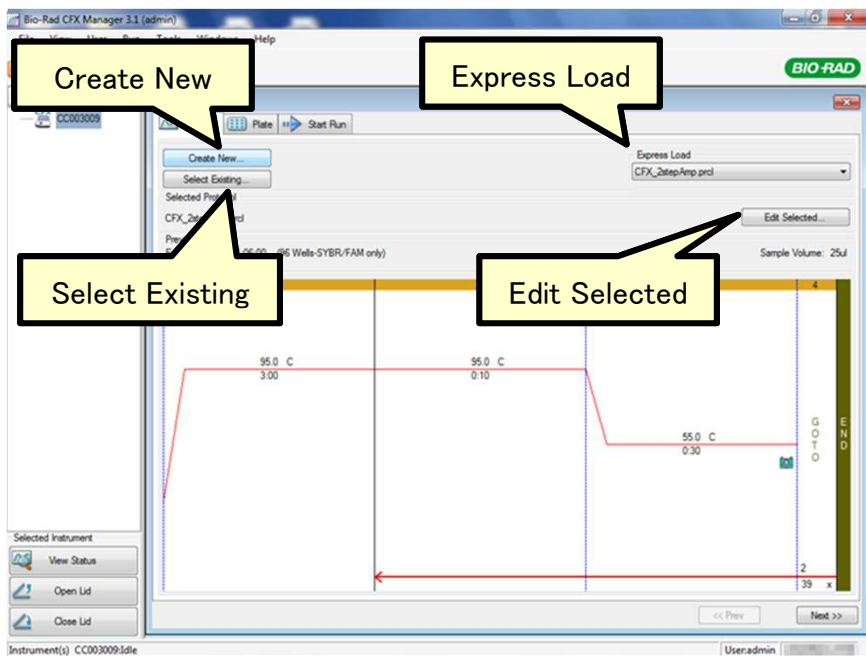
注: PrimePCRボタンは日本国内では使用いたしません)

Run Setupウィンドウが開きます。



Run Setupウィンドウは
 - Protocolタブ
 - Plateタブ
 - Start Runタブ
 の三つのタブにより構成されています。左のタブより順に進めていくことで、ランを実行できます。

Protocolでは温度条件を設定します。Plateではサンプル情報や蛍光色素を設定します。

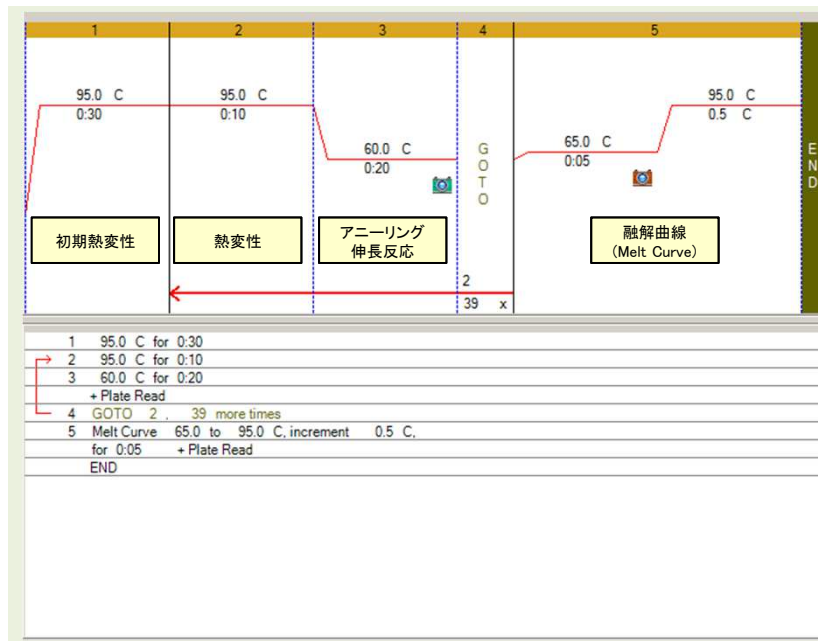


Protocolタブ

Protocolタブでは温度条件やデータ取得の設定を行います。

Protocolタブの説明

- Create New: 新規作成
- Select Existing: 過去に作成したプロトコルの呼出
- Express Load: プリセットプロトコルの呼出
- Edit Selected: 表示されているプロトコルの編集

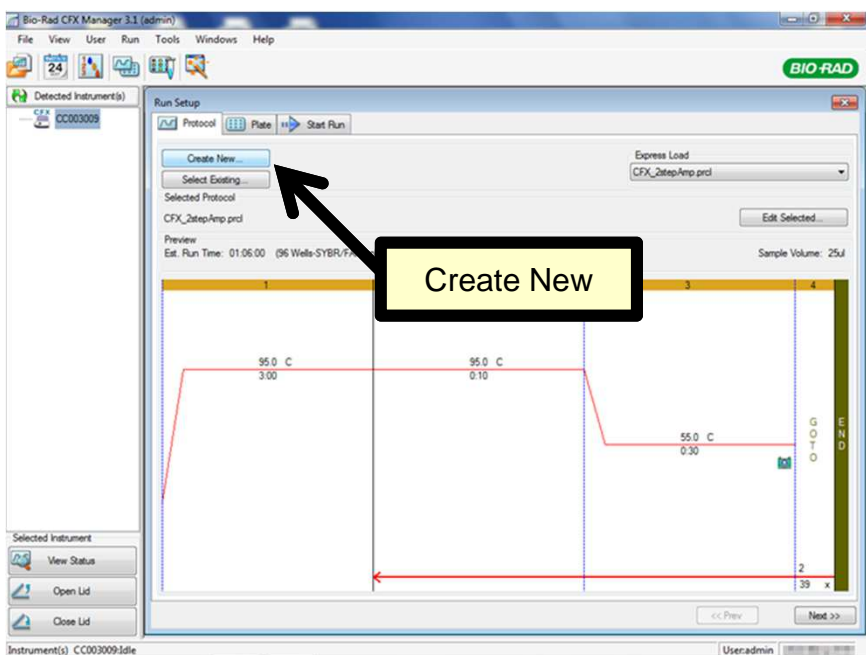


当ガイドでは、左図のプロトコルを例(下記参照)として作成していきます。

初期熱変性(酵素活性): 95.0 C, 0:30

熱変性: 95.0 C, 0:10
 アニール・伸長反応: 60.0 C, 0:20
 (データ取得) 40リピート

融解曲線: 65.0→95.0 C, 0.5 C刻み, 0:05



Protocolタブでプロトコルを設定します。

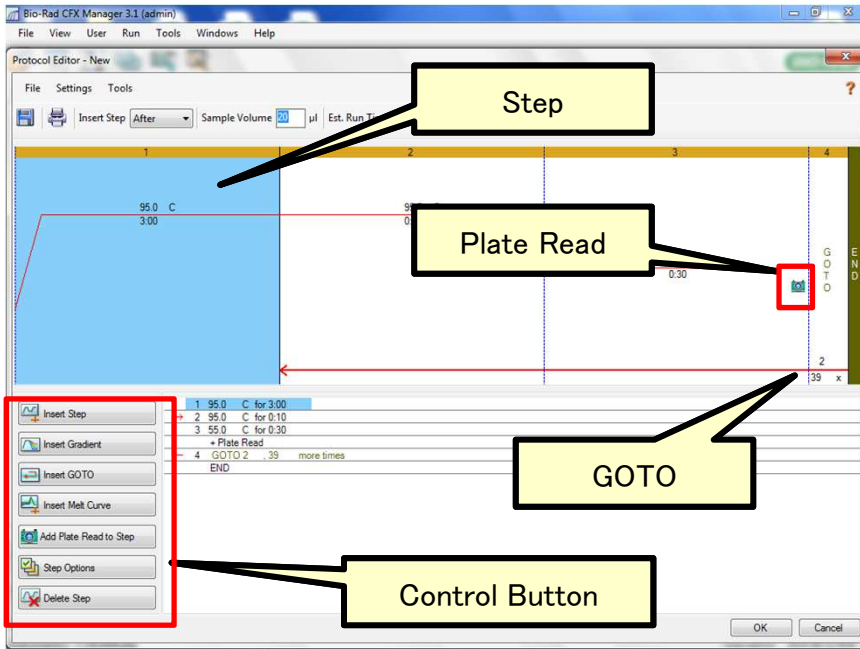
新しくプロトコルを作成するために、Protocolタブ内のCreate Newボタンをクリックします。

Protocol Editor

Protocol Editorが開きます。

Protocol Editorの説明

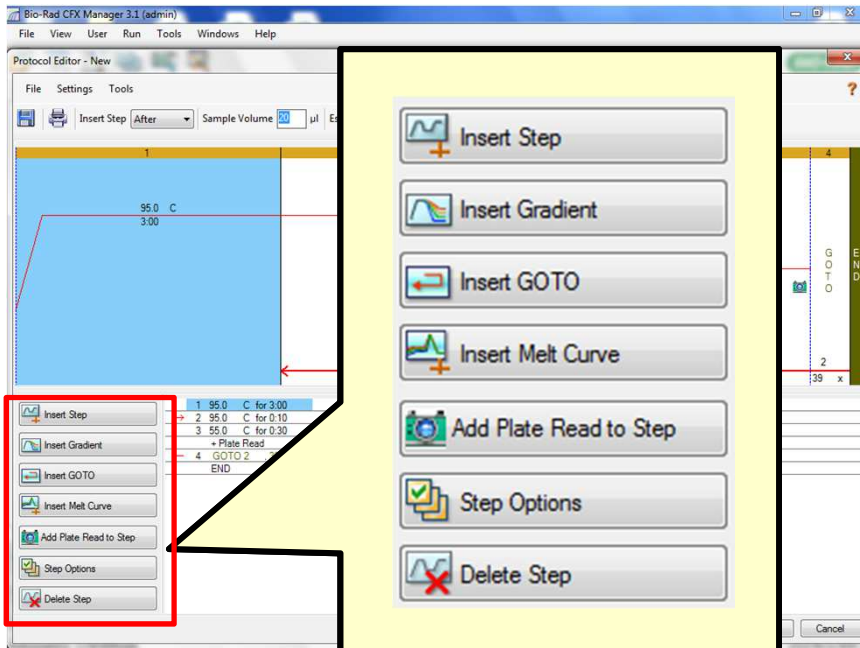
- Step: 青でハイライトされた部分がクリックして選択されたステップを示します。
- Plate Read: データ取得するステップを示しています。
- GOTO: 繰り返し(サイクル)を行う部分(赤矢印)を設定します。
- Control Button: ステップ追加/削除などの各種ボタン。



Control Buttonの説明

- Insert Step: ステップ追加。
- Insert Gradient: 温度グラジエントステップ追加。
- Insert GOTO: GOTOステップ追加。
- Insert Melt Curve: Melt Curveステップ追加。
- Add Plate Read to Step: Plate Read(データ取得)をステップに追加および削除が可能。
- Step Options: 温度制御の詳細設定。
- Delete Step: ステップ削除。

温度グラジエント機能については、33ページをご参照ください。

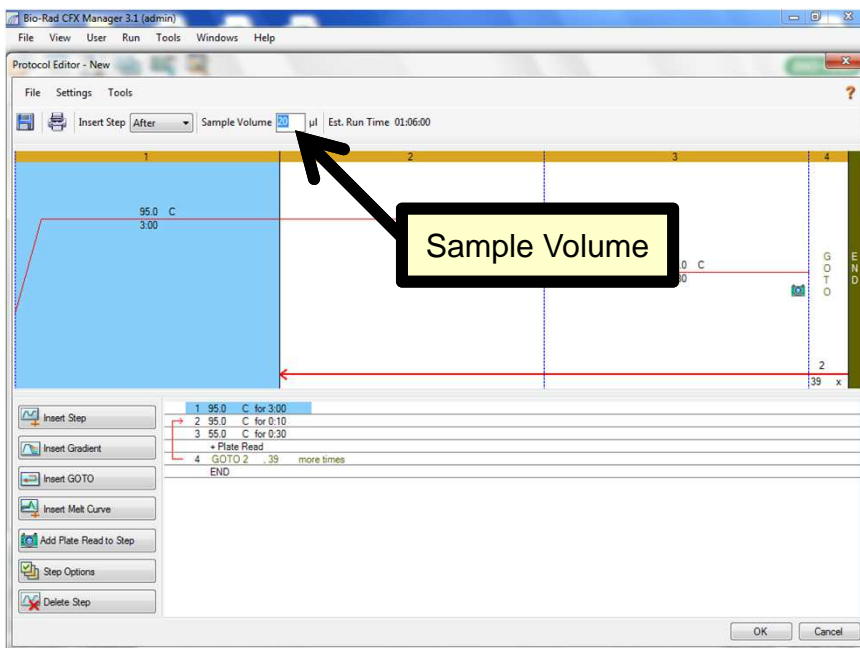


Sample Volumeの設定

Sample Volumeに1ウェルあたりの溶液量を入力します。

例: 20

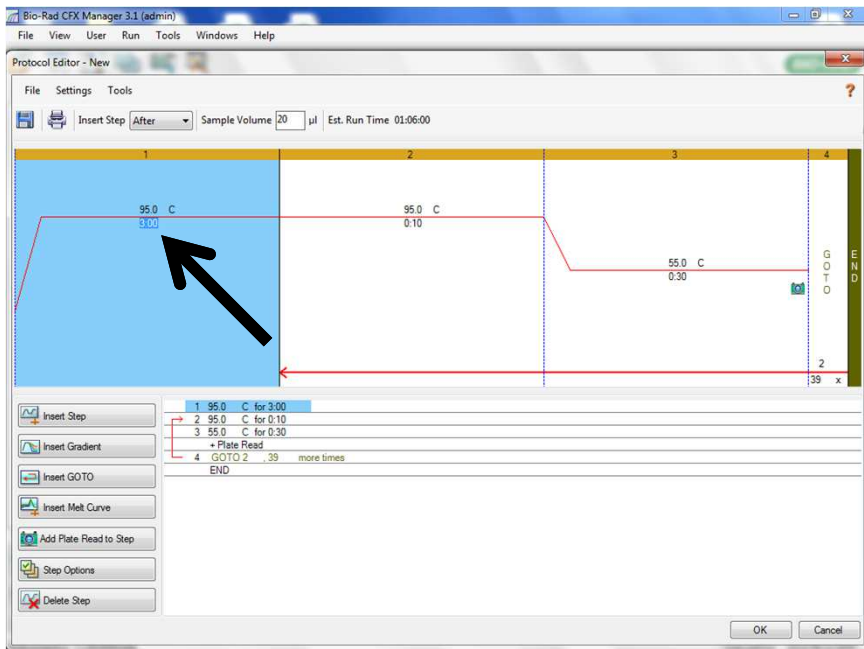
推奨ボリューム
 CFX96/Connect: 10uL-25uL
 CFX384: 5uL-20uL
 CFX96 Deep: 25uL-100uL



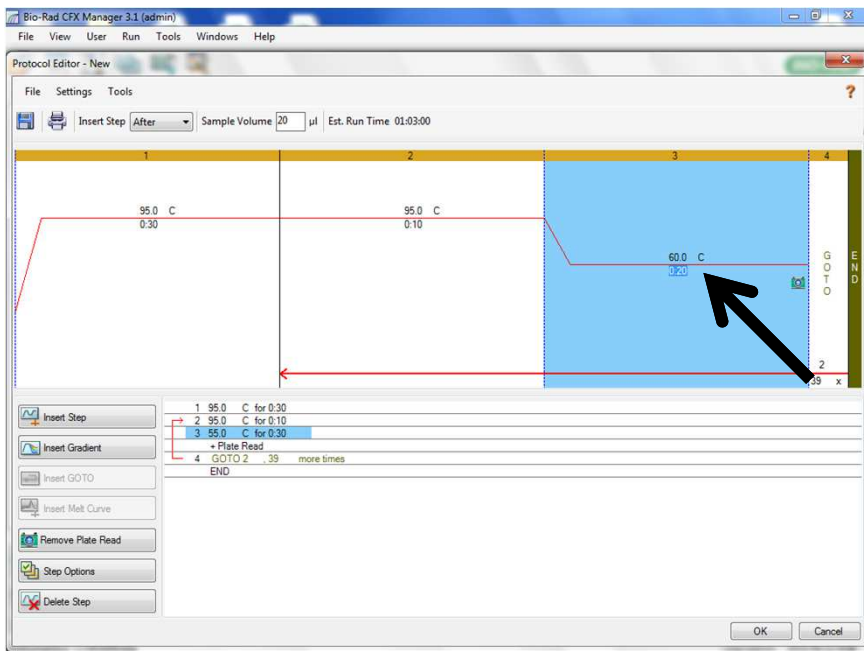
温度ステップの設定

グラフの上段に温度、下段に時間を入力します。

例: 最初の95°Cステップの時間を0:30に変更します。



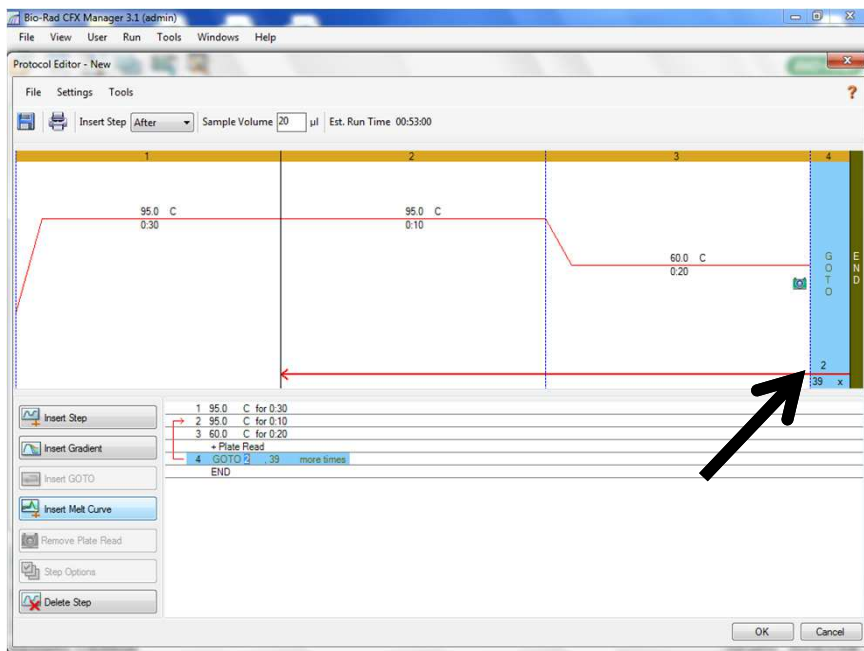
例: アニーリング/エクステンションステップの温度を60°Cに、時間を0:20に変更します。



GOTOステップの設定

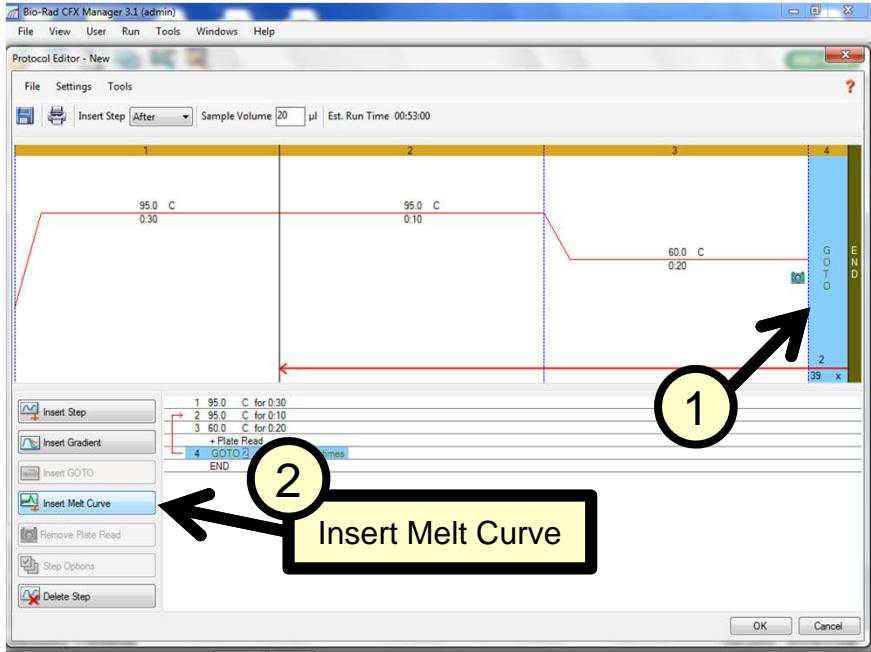
PCRの繰り返し(サイクル)を設定するためにGOTOステップをクリックします。何番目のステップに戻るか(赤矢印上段)、何回戻るか(赤矢印下段)を数値として入力します。戻る回数はサイクル数-1を入力します。赤矢印の範囲が繰り返し範囲を示します。

例: 2番目のステップに戻って、39回戻る設定になっていることを確認します。



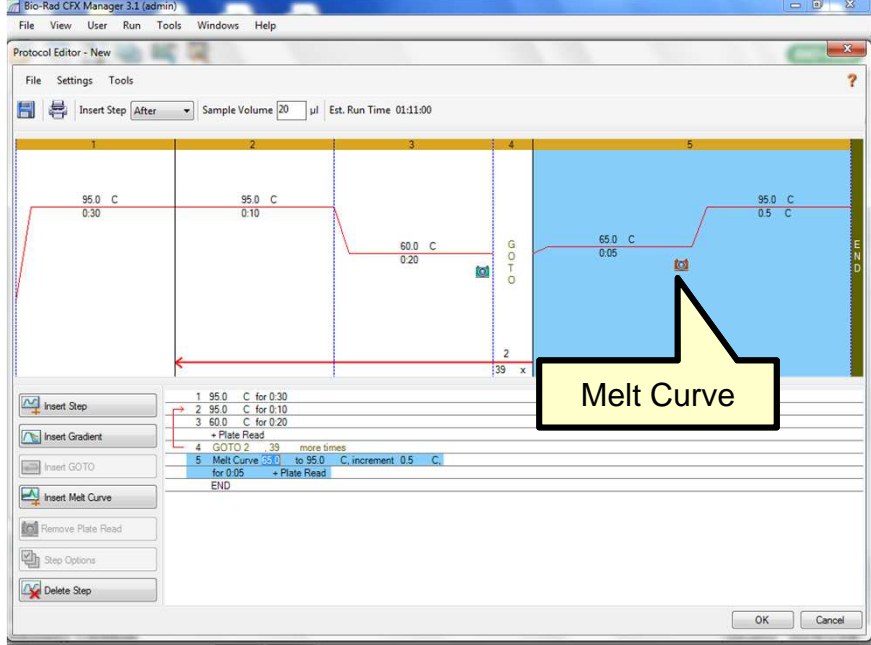
Melt Curveステップの設定

1. Melt Curveステップを追加するために、まず最終ステップ(この場合GOTOステップ)をクリックします。
2. Insert Melt Curveボタンをクリックします。



Melt Curveステップが追加されます。

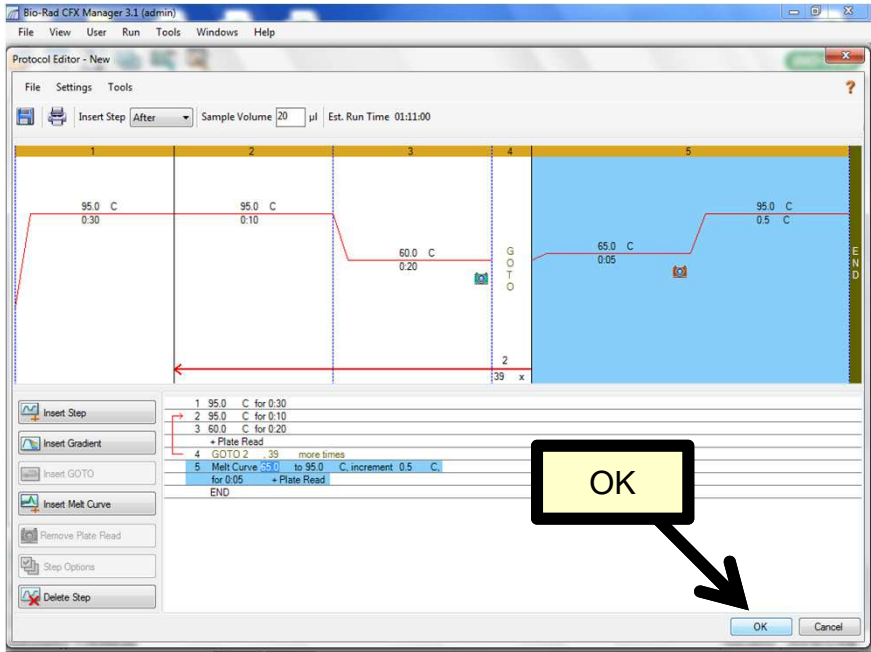
例: 65°Cから95°Cまで、0.5°C刻みで5秒保持した後データ取得を繰り返す設定になっていることを確認します。

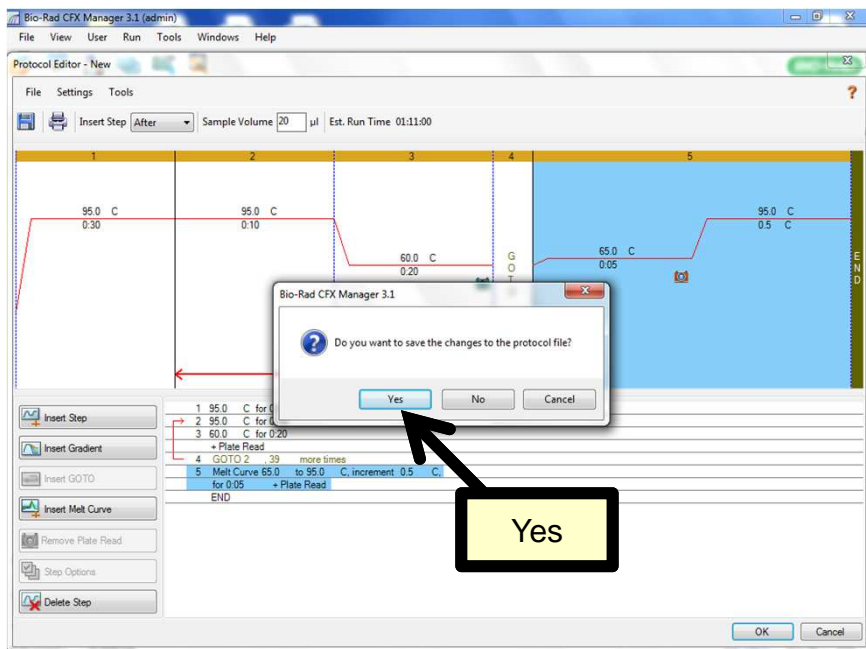


Melt CurveはSYBR Green等のインターカレーションダイ系の検証(副産物の有無確認など)に用います。
Melt Curveステップは最小0.1°C刻みの設定ができますが、副産物の有無確認には0.5°C刻みで行います。

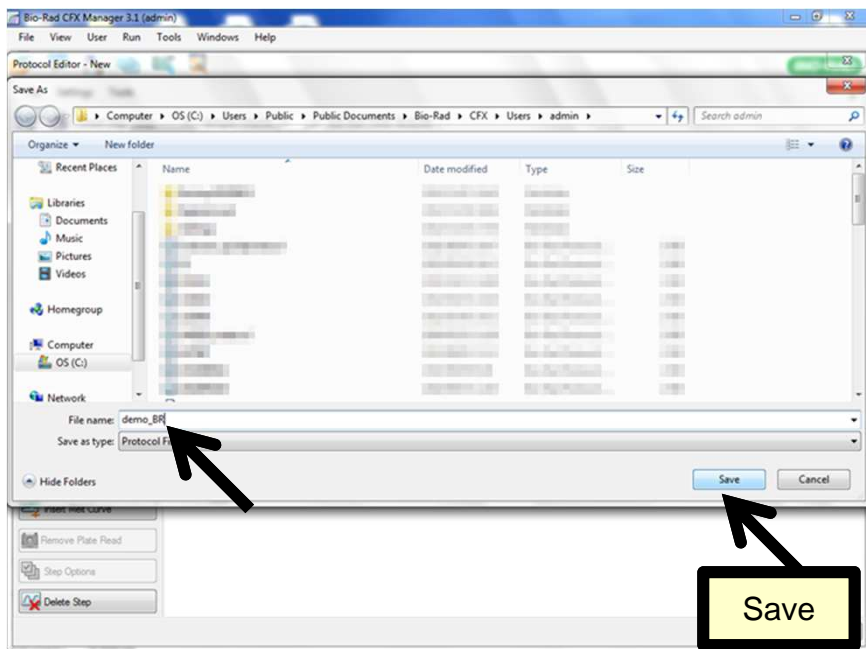
プロトコルの編集終了と保存

プロトコル編集が終了したら、OKボタンをクリックします。



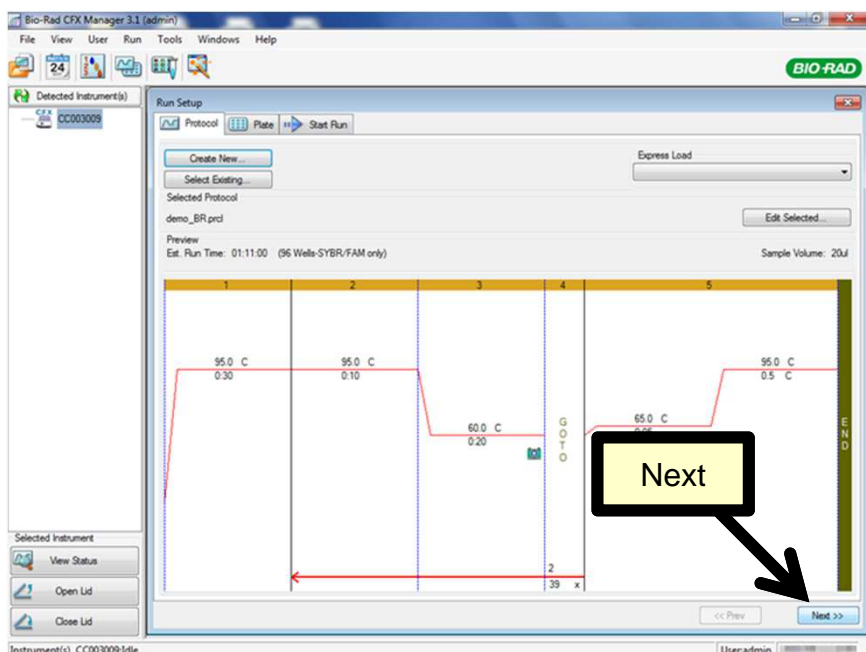


プロトコルファイルを保存するかどうかを聞いてきます。
Yesをクリックして、プロトコルファイルを保存します。



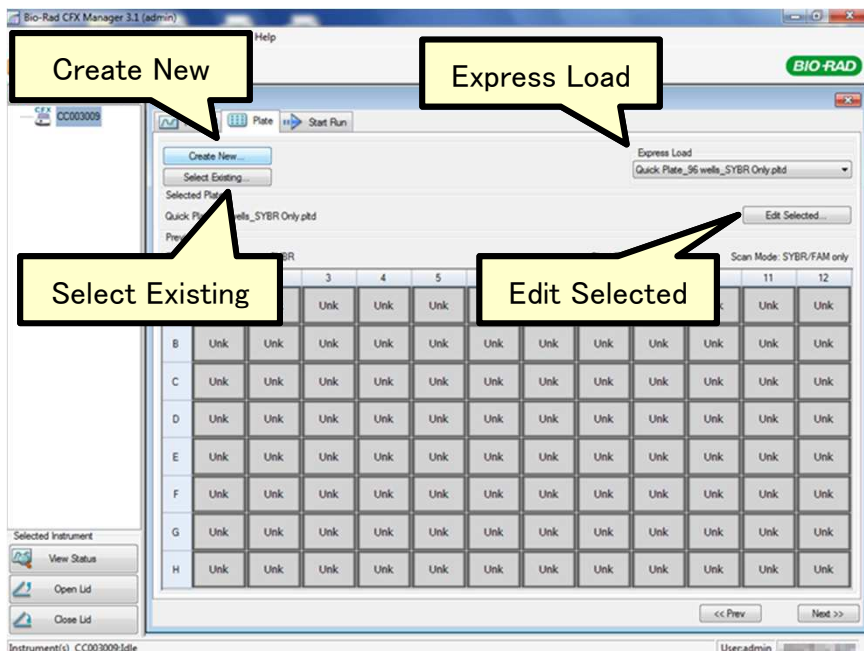
プロトコルファイル(.prcl)のファイル名を入力して、保存場所を指定して、Saveボタンをクリックします。

例: demo BRと入力して、そのままadminフォルダ内に保存します。



Run Setupウィンドウに戻ります。

Nextボタンをクリックして、Plateタブ(プレートの設定)へ移動します。

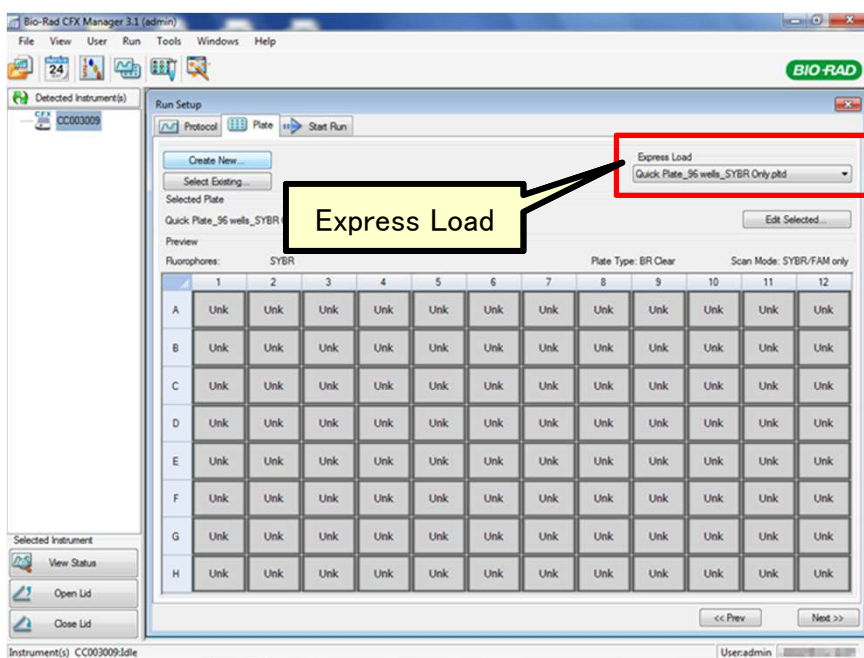


Plateタブ

Plateタブでは、プレートでのサンプル配置、サンプルタイプ、遺伝子名・サンプル名の入力、測定する蛍光色素の設定等を行います。

Plateタブの説明

- Create New: 新規作成
- Select Existing: 過去に作成したプレート設定の呼出
- Express Load: プリセットプレート設定の呼出
- Edit Selected: 表示されているプレート設定の編集



簡易プレート設定

CFXシステムは常に全ウェルのデータを取得しますので、簡易プレート設定を行なって、ラン終了後に詳細設定を行うことも可能です(注: Scan Modeは変更不可、12ページ参照)。

簡易プレート設定を行う方法は、左図のようにExpress LoadからQuick Plateで始まるプリセットの設定を選択して、Nextボタンをクリックして進めます。具体的には下記の表をご参照ください。

ラン終了後、11~21ページを参考に詳細プレート設定を行ってください。

CFX96 Touch/CFX96 Deep	SYBR Green系の測定	Quick Plate_96 wells_SYBR Only.pltd
	5波長すべての測定	Quick Plate_96 wells_All Channels.pltd
CFX384 Touch	SYBR Green系の測定	Quick_Plate_384 wells_SYBR Only.pltd
	4波長すべての測定	Quick_Plate_384 wells_All Channels.pltd
CFX Connect	SYBR Green系の測定	Quick Plate_96 wells_SYBR Only.pltd
	2波長すべての測定	注(下記参照)

注: CFX ConnectでQuick_Plate_96 wells_All Channels.pltdを選択して、ランを実行するとエラーが表示されます。CFX Connectでは2波長測定システムのため、チャンネル3、4、5番目の色素が選ばれているプレート設定をランすることができません。

CFX Connectで2波長測定を行う場合には、Express LoadからQuick_Pkate_96 wells_All_Channels.pltdを選択した後、Edit Selectedをクリックして、Plate Editoriに入って、Select Fluorophoresでチャンネル3、4、5番目の色素のチェックを外します(13ページ参照)。Plate Editorを閉じて、プレート設定を保存した後、ランを実行します。

	1	2	3	4	5	6
A	Std-1 1.00E+06	Std-1 1.00E+06	Std-1 1.00E+06	Std-6 1.00E+06	Std-6 1.00E+06	Std-6 1.00E+06
B	Std-2 1.00E+05	Std-2 1.00E+05	Std-2 1.00E+05	Std-7 1.00E+05	Std-7 1.00E+05	Std-7 1.00E+05
C	Std-3 1.00E+04	Std-3 1.00E+04	Std-3 1.00E+04	Std-8 1.00E+04	Std-8 1.00E+04	Std-8 1.00E+04
D	Std-4 1.00E+03	Std-4 1.00E+03	Std-4 1.00E+03	Std-9 1.00E+03	Std-9 1.00E+03	Std-9 1.00E+03
E	Std-5 1.00E+02	Std-5 1.00E+02	Std-5 1.00E+02	Std-10 1.00E+02	Std-10 1.00E+02	Std-10 1.00E+02
F	NTC-1 HK	NTC-1 HK	NTC-1 HK	NTC-2 TG	NTC-2 TG	NTC-2 TG
G	Unk-1 HK SampleA	Unk-1 HK SampleA	Unk-1 HK SampleA	Unk-3 TG SampleA	Unk-3 TG SampleA	Unk-3 TG SampleA
H	Unk-2 HK SampleB	Unk-2 HK SampleB	Unk-2 HK SampleB	Unk-4 TG SampleB	Unk-4 TG SampleB	Unk-4 TG SampleB
	HK			TG		

当ガイドでは、左図に示すプレート設定を例として作成していきます。

遺伝子(プライマーセット)について

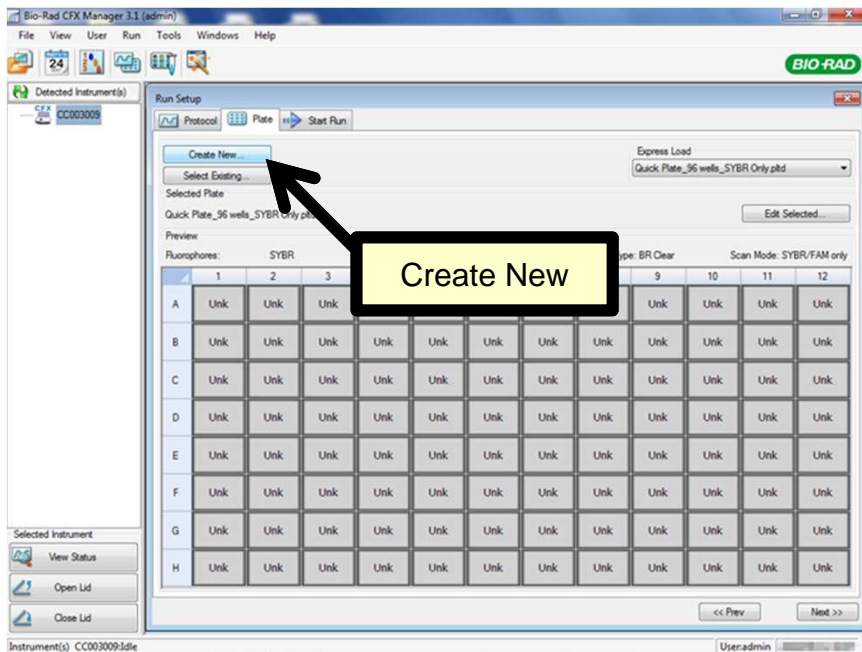
- リファレンス遺伝子(HK)x1
- ターゲット遺伝子(TG)x1

サンプルタイプについて

- スタンダード(10⁶~10² pg、10倍希釈、5段階)
- テンプレート無しコントロール
- 比較サンプルA, Bの二種類

リプリケートについて

- N=3(Triplicate)



詳細プレート設定

新しくプレートの作成を行うために、Plateタブ内のCreate Newボタンをクリックします。

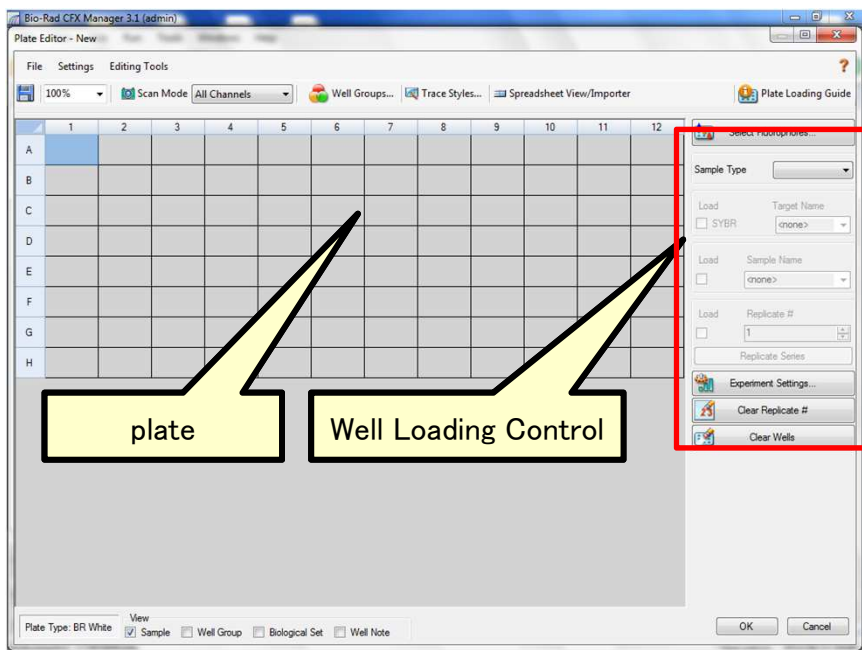
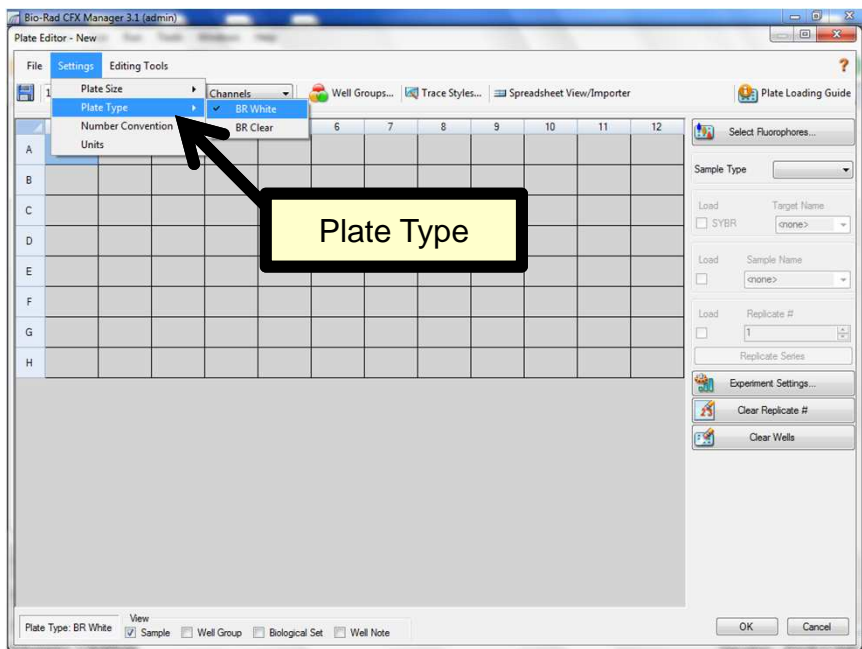


Plate Editor

Plate Editorウィンドウが開きます。

Plate Editorの説明

- plate: サンプルのプレート上での配置を示します。
- Well Loading Control: 各ウェルの蛍光色素(遺伝子名)、サンプル名などの設定を行います。



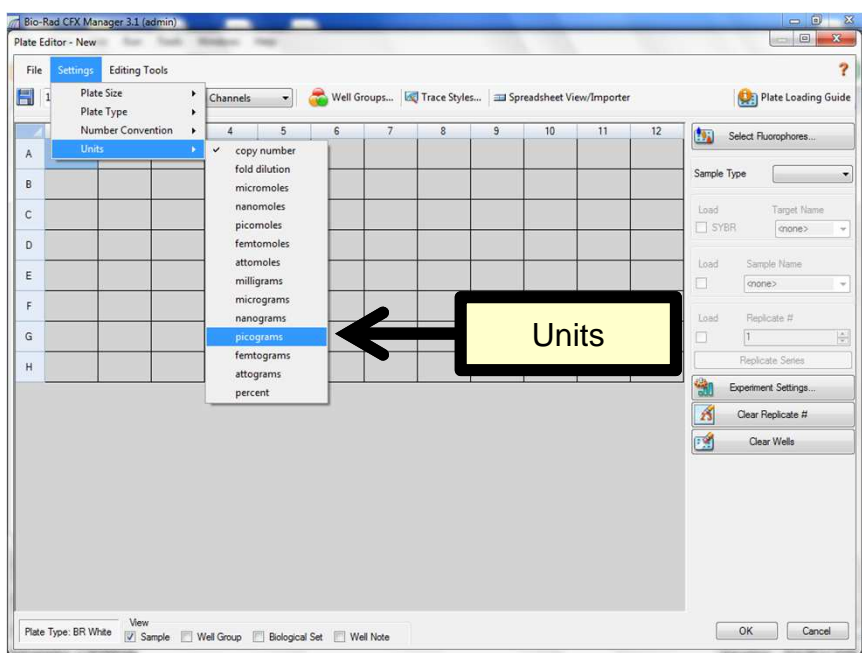
プレートタイプの設定

SettingsメニューからPlate Typeで使用するプレートを選択します。
 BR White: 白色プレート/チューブ
 BR Clear: 透明プレート/チューブ

例: BR White

白色プレートは透明プレートよりも蛍光の反射が大きいため、高い蛍光値が得られること、プレートの汚れなどの影響を受けない利点があります。

注: CFX384システムではBR Whiteのみです。



スタンダード単位の設定

スタンダードの濃度の単位をSettingsメニューのUnitsから選択します。

例: picograms

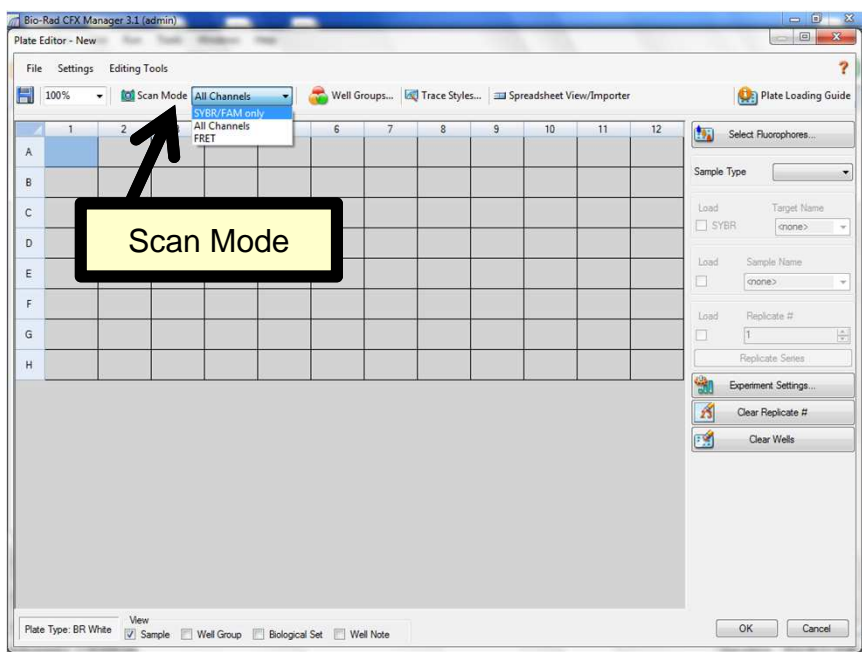
Scan Mode(測定方式)の設定

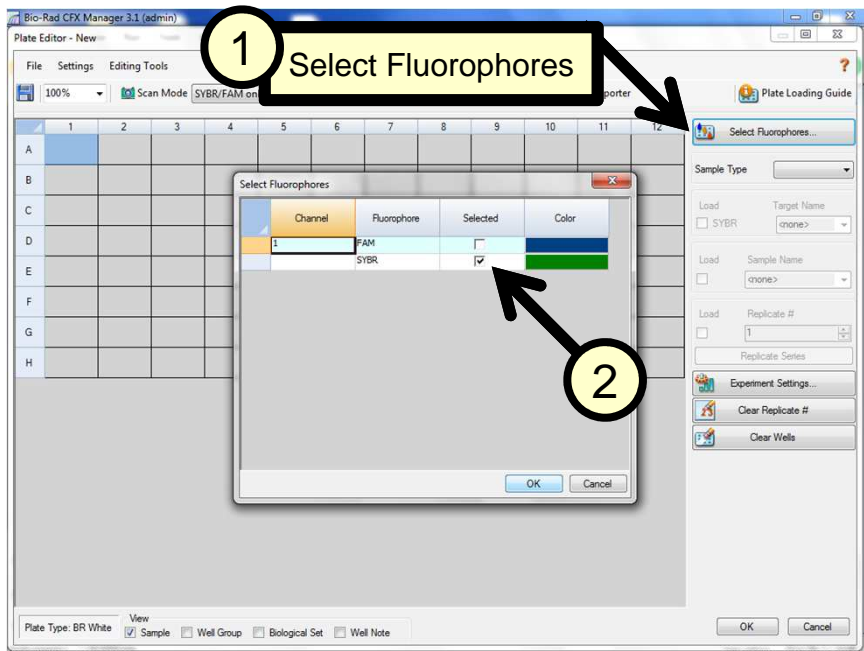
3種類のScan Modeから測定方式を設定します。

SYBR/FAM only: SYBR Green系またはFAM1色だけの測定 (Channel 1のみ使用)
 All Channels: 全波長測定
 FRET: FRETケミストリー用 (核酸検出には使用しません)

例: SYBR/FAM only

注: Scan Modeはラン開始後変更することはできません。SYBR/FAM onlyで測定すると、他のチャンネルのデータは取得されないの、ご注意ください。

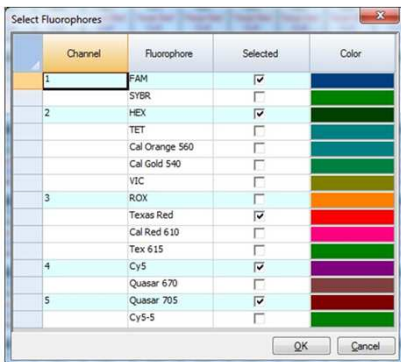




蛍光色素の設定

1. 使用する蛍光色素を選択するため、Select Fluorophoresボタンをクリックします。
2. 使用する蛍光色素にチェックを付けます。

例: SYBR



Scan ModeでSYBR/FAM only設定にしている場合、Channel1の蛍光色素情報しか表示されません。

Scan ModeでAll Channelに設定すると、左図のように全チャンネルの蛍光色素が表示されます。

下記の表は各チャンネルの励起波長(Ex)、測定波長(Em)、測定可能な蛍光色素名、CFXシステムでの測定チャンネルの有無を示します。

注: 出荷時期により、一部の蛍光色素が登録されておりませんので、ご注意ください。

Channel	Ex (nm)	Em (nm)	Fluorophore	CFX96 Touch CFX96 Deep	CFX384 Touch	CFX Connect
1	450-490	515-530	FAM,SYBR	○	○	○
2	515-535	560-580	HEX,TET,Cal Gold 540,VIC,Cal Orange 560	○	○	○
3	560-590	610-650	ROX,Texas Red,Cal Red 610,TEX 615	○	○	×
4	620-650	675-690	Cy5,Quasar670	○	○	×
5	672-684	705-730	Quasar705,Cy5.5	○	×	×

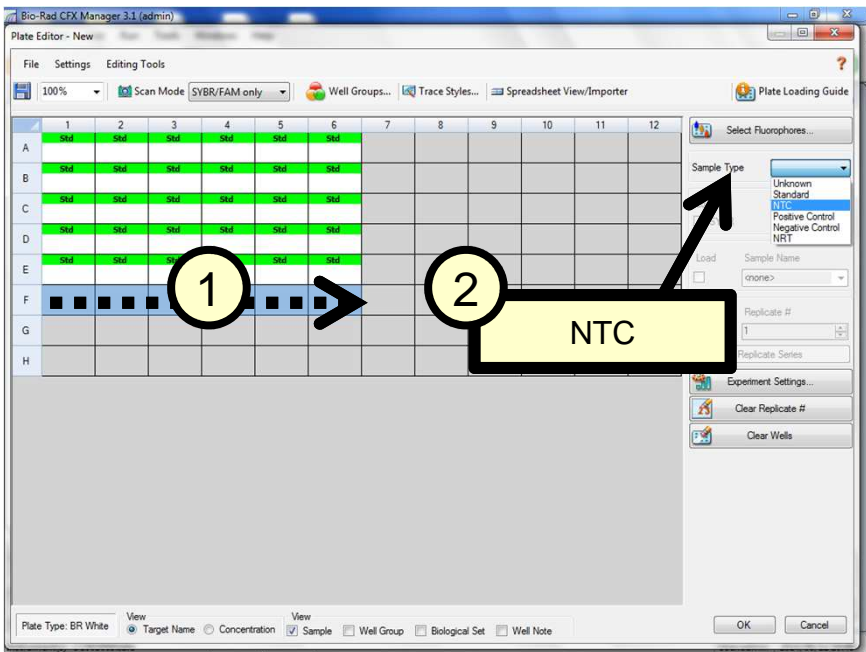
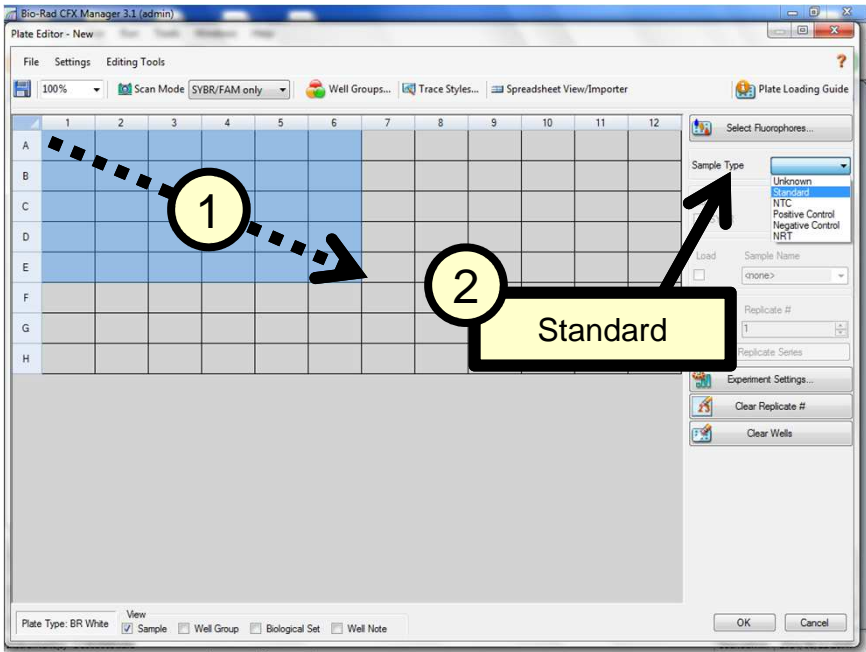
Sample Typeの設定

Sample Typeを設定します。Unknown、Standard、NTCから選択します。

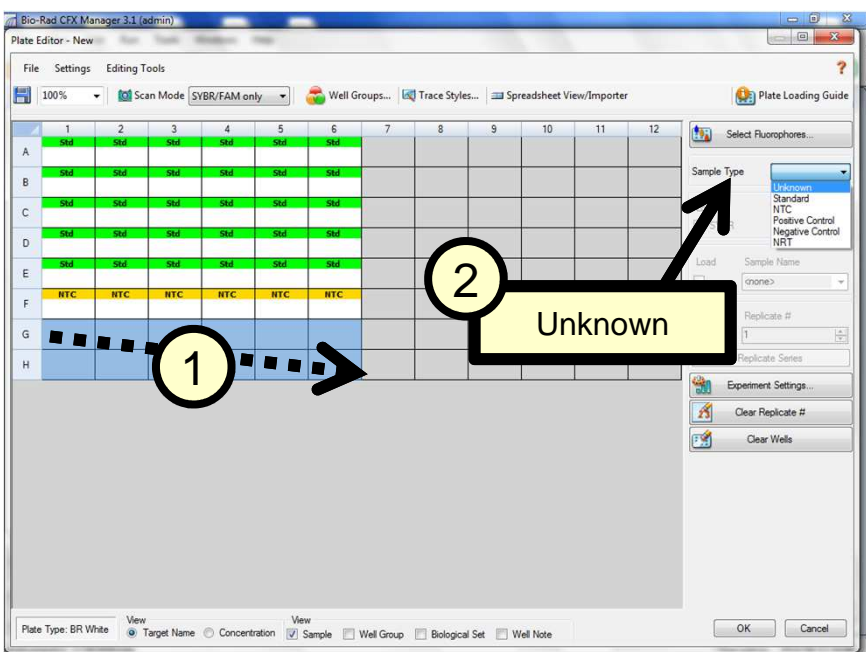
1. Standardに設定したいウェル領域をドラッグにて指定します。
例: A1からE6をドラッグ
2. Sample Typeから**Standard**を選択します。

Sample Typeは以下の選択肢があります。

- Unknown: 未知サンプル
- Standard: 検量線用の標準サンプル
- NTC: テンプレート無しコントロール
- Positive Control: 陽性コントロール
- Negative Control: 陰性コントロール
- NRT: 逆転写無しコントロール



1. NTCに設定したいウェル領域をドラッグにて指定します。
例: F1からF6をドラッグ
2. Sample Typeから**NTC**(No Template Control)を選択します。



1. Unknownに設定したいウェル領域をドラッグにて指定します。
例: G1からH6をドラッグ
2. Sample Typeから**Unknown**を選択します。

遺伝子名(プライマー名)の設定

遺伝子名(プライマー名)を割り当てるために、Target Nameの設定を行います。

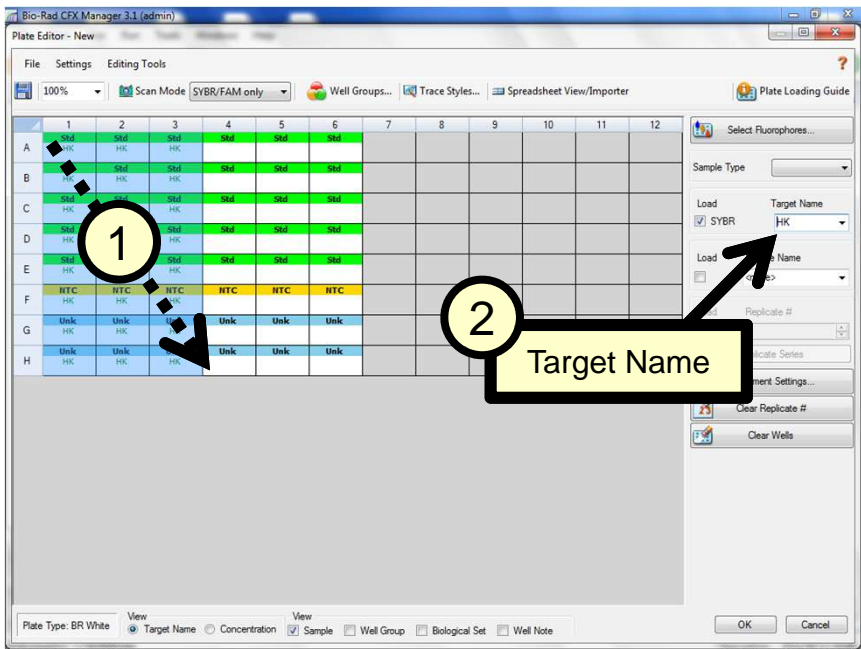
遺伝子名を設定すると遺伝子名毎にデータ解析できるようになります。

1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。

例: A1からH3をドラッグ

2. Target Name欄に遺伝子名を入力して、Enterキーで確定します。

例: HK



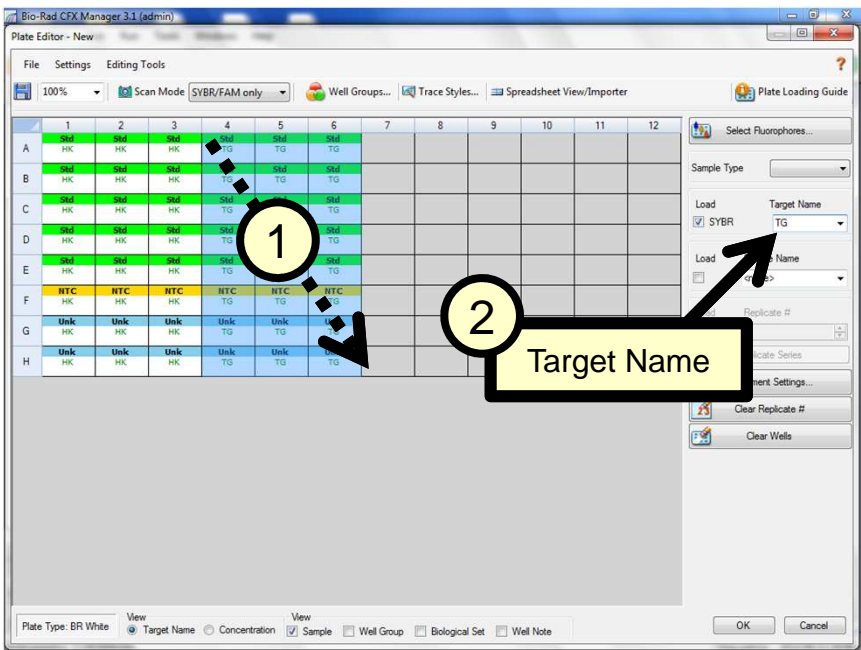
同様に他の遺伝子名も設定していきます。

1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。

例: A4からH6をドラッグ

2. Target Name欄に遺伝子名を入力して、Enterキーで確定します。

例: TG



リプリケートの設定(Standard)

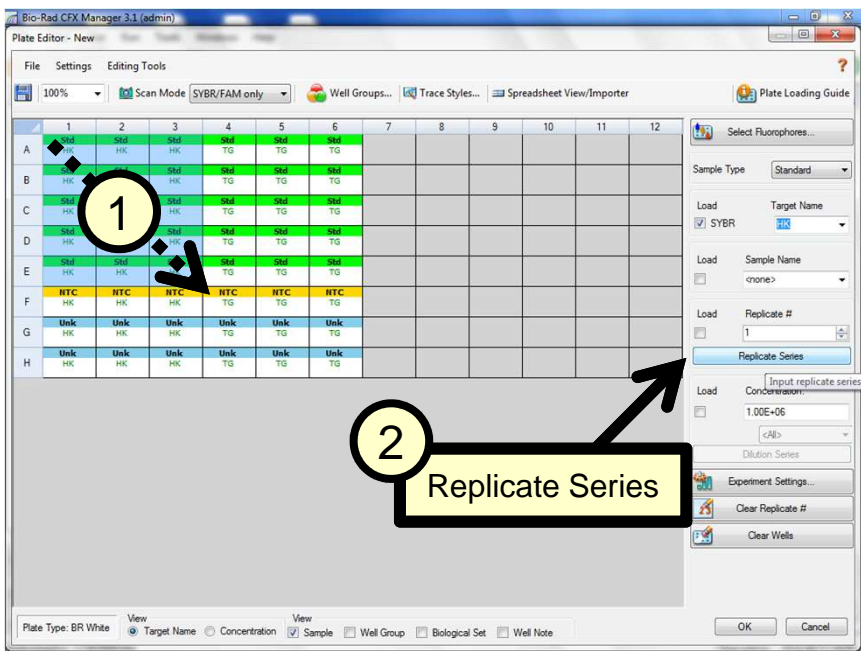
Standardのリプリケート(N数)設定を行います。

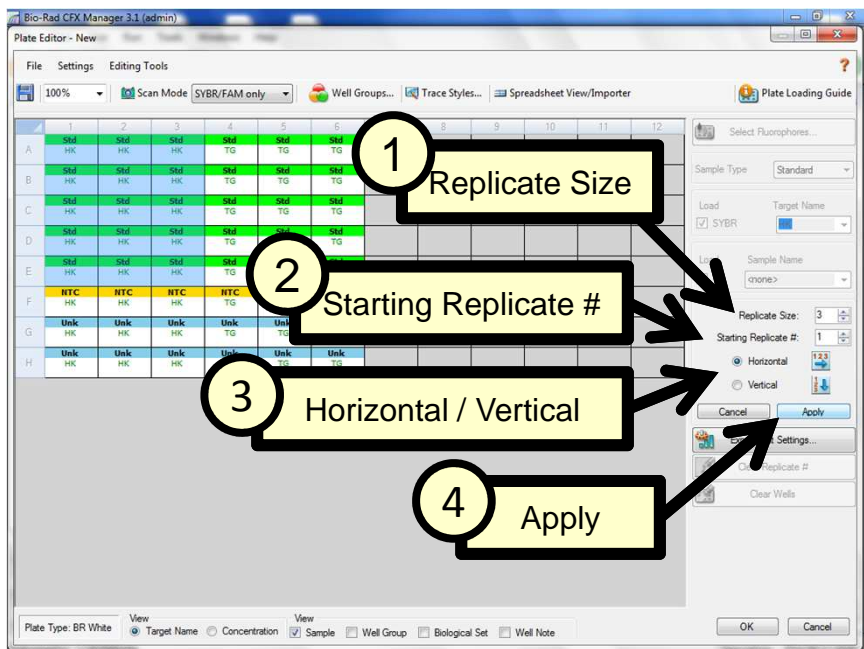
1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。

例: A1からE3をドラッグ

2. Replicate Seriesボタンをクリックします。

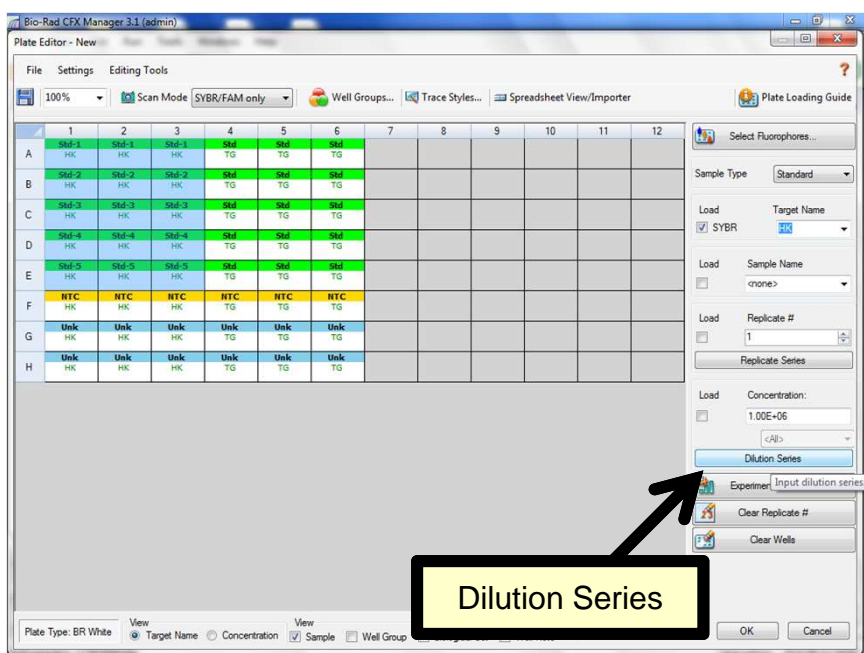
リプリケート設定を行うと数値データの平均値、SD値が自動計算されます。





リプリケートの設定を行います。

1. Replicate SizeにN数を入力します。
例: 3
2. Starting Replicate #に割り振る最初の番号を入力します。
例: 1
3. リプリケートの割り振り方向を選択します。
例: Horizontal
4. Applyボタンをクリックします。

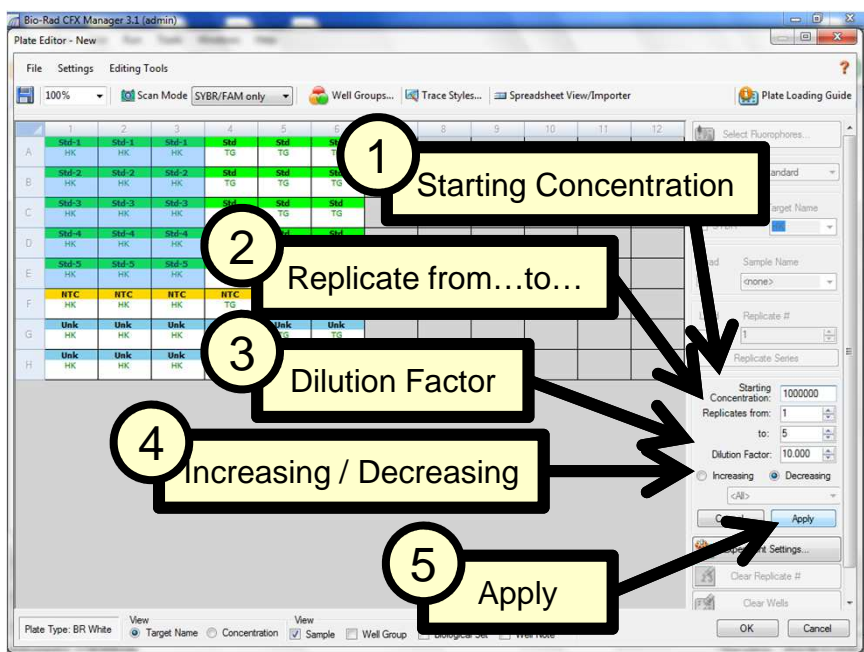


濃度の設定 (Standard)

標準の濃度の割り振りを設定します (希釈系列の場合、Dilution Seriesを使用するのが便利です)。

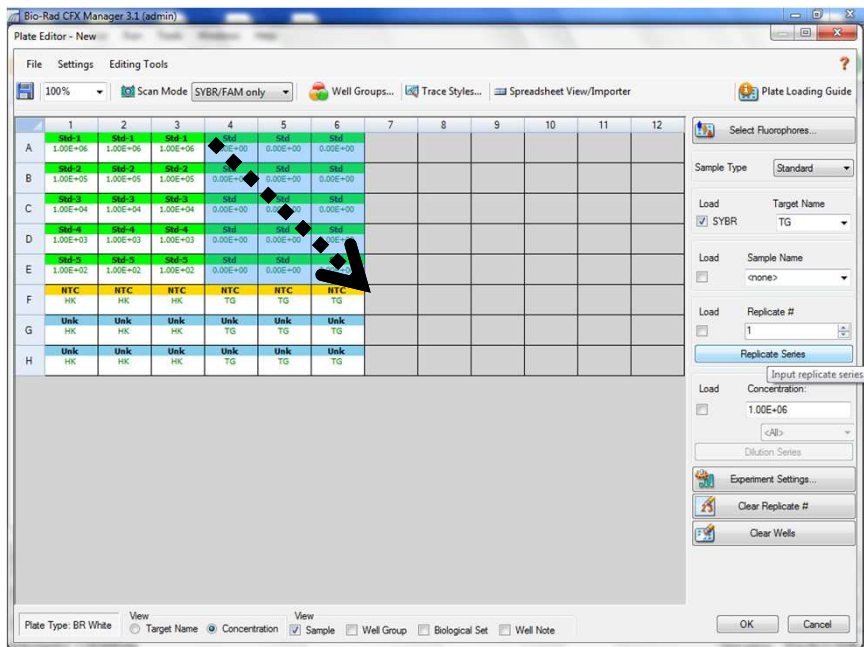
リプリケート設定に続いてDilution Seriesボタンをクリックします。

Concentrationで1.00E+06という指数表記は1,000,000と同じです。



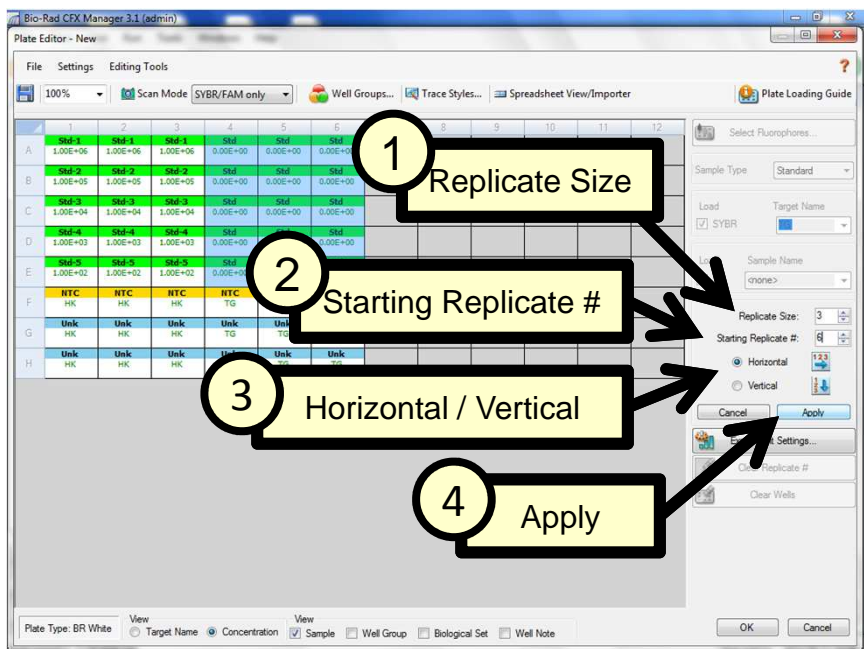
濃度の割り当てを行います。

1. Starting Concentrationに最初の濃度を入力します。
例: 1,000,000
2. Replicate fromとtoに設定したいReplicate番号を入力します。
例: (from) 1 (to) 5
3. 希釈率をDilution Factorに入力します。
例: 10
4. 増加させる場合はIncreasingを、減少させる場合はDecreasingを選択します。
例: Decreasing
5. Applyボタンをクリックします。



同様に他の遺伝子(Target)についてもリプリケート設定(Replicate Series)や濃度割り当て(Dilution Series)を行います。

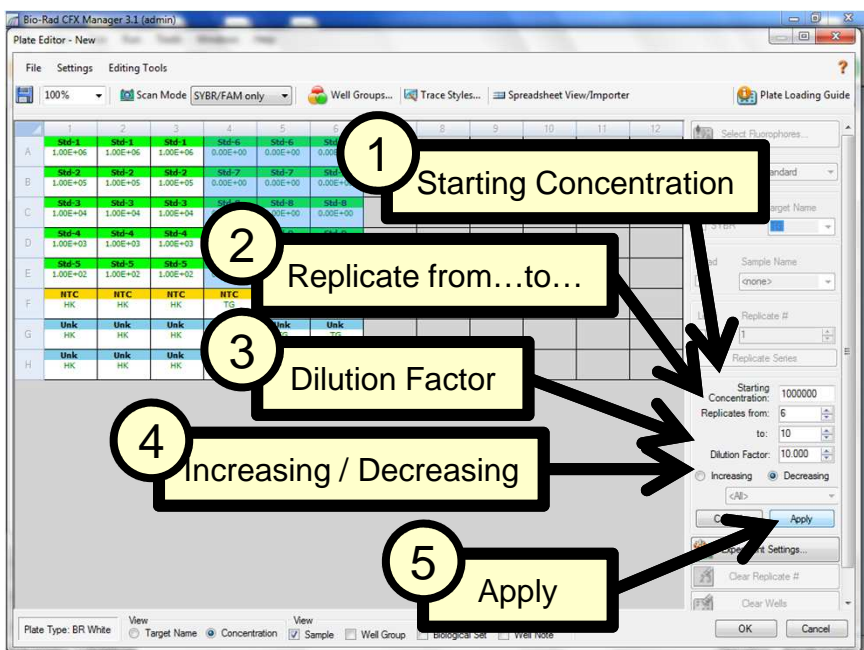
設定範囲をドラッグします。
例: A4からE6をドラッグします。



Replicate Series

1. Replicate SizeにN数を入力します。
例: 3
2. Starting Replicate #に割り振る最初の番号を入力します。
例: 6
3. リプリケートの割り振り方向を選択します。
例: Horizontal
4. Applyボタンをクリックします。

Starting Replicate #は遺伝子別で違う番号を割り振りしないとアラートが表示されます。



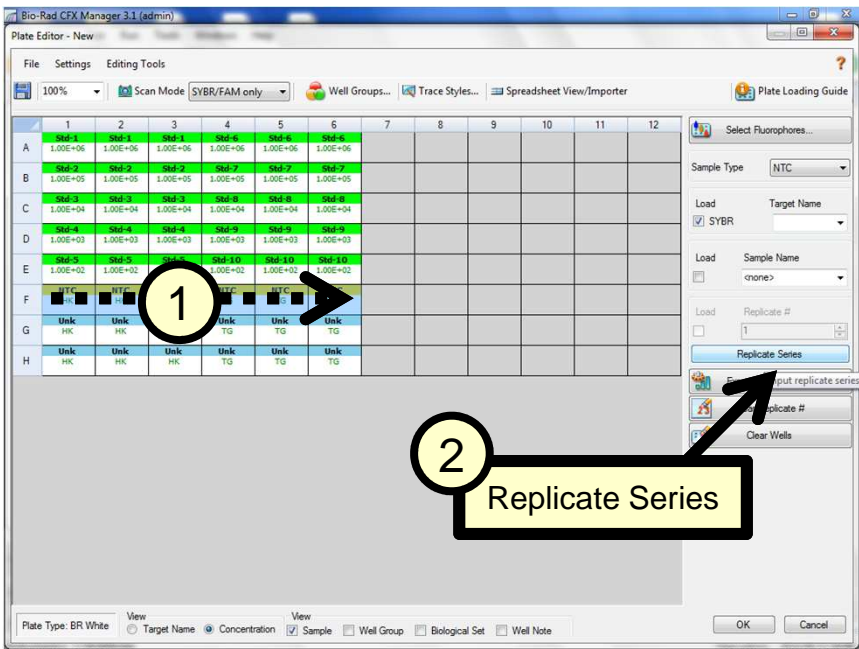
Dilution Series

1. Starting Concentrationに最初の濃度を入力します。
例: 1,000,000
2. Replicate fromとtoに設定したいReplicate番号を入力します。
例: (from) 6 (to) 10
3. 希釈率をDilution Factorに入力します。
例: 10
4. 増加させる場合はIncreasingを、減少させる場合はDecreasingを選択します。
例: Decreasing
5. Applyボタンをクリックします。

リプリケートの設定 (NTC)

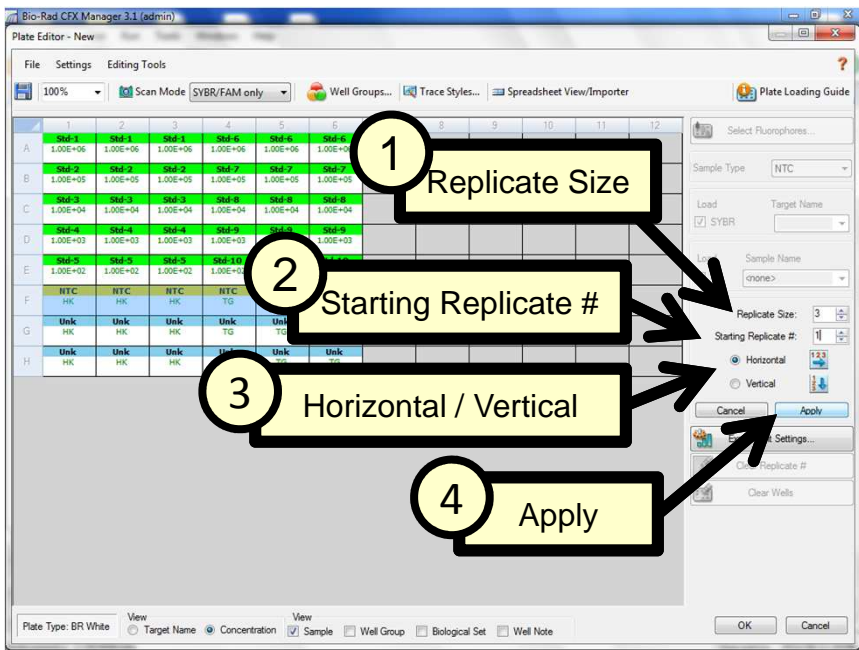
NTCのリプリケート設定を行います。
(NTCのリプリケート設定は省略しても問題はありません。)

1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。
例: F1からF6をドラッグ
2. Replicate Seriesボタンをクリックします。



Replicate Series

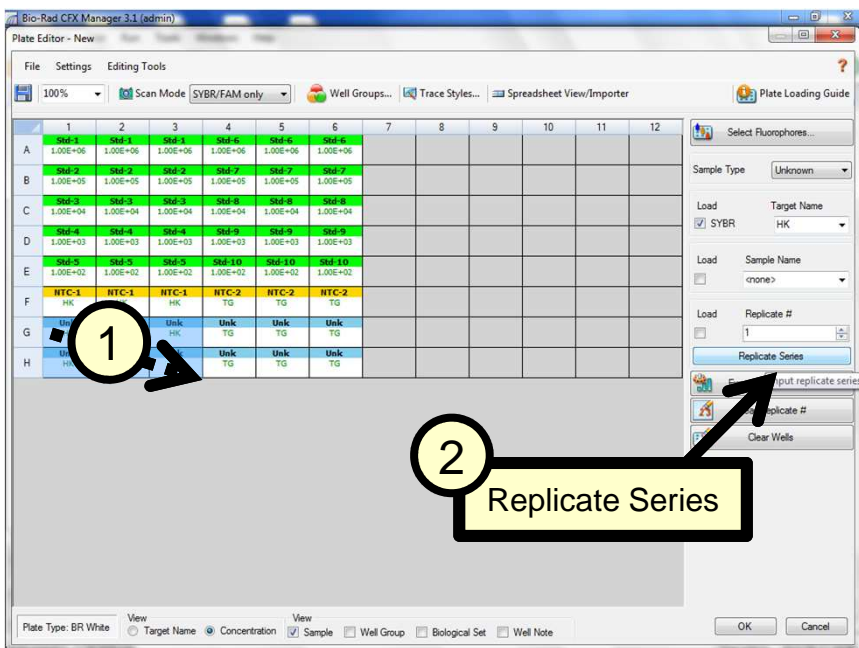
1. Replicate SizeにN数を入力します。
例: 3
2. Starting Replicate #に割り振る最初の番号を入力します。
例: 1
3. リプリケートの割り振り方向を選択します。
例: Horizontal
4. Applyボタンをクリックします。

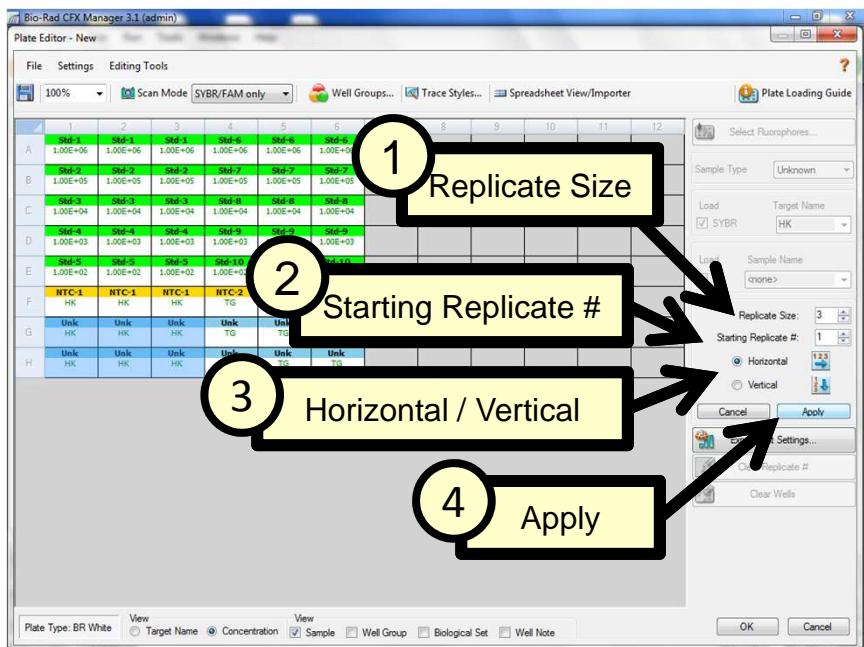


リプリケートの設定 (Unknown)

Unknown (HK側) のリプリケート設定を行います。

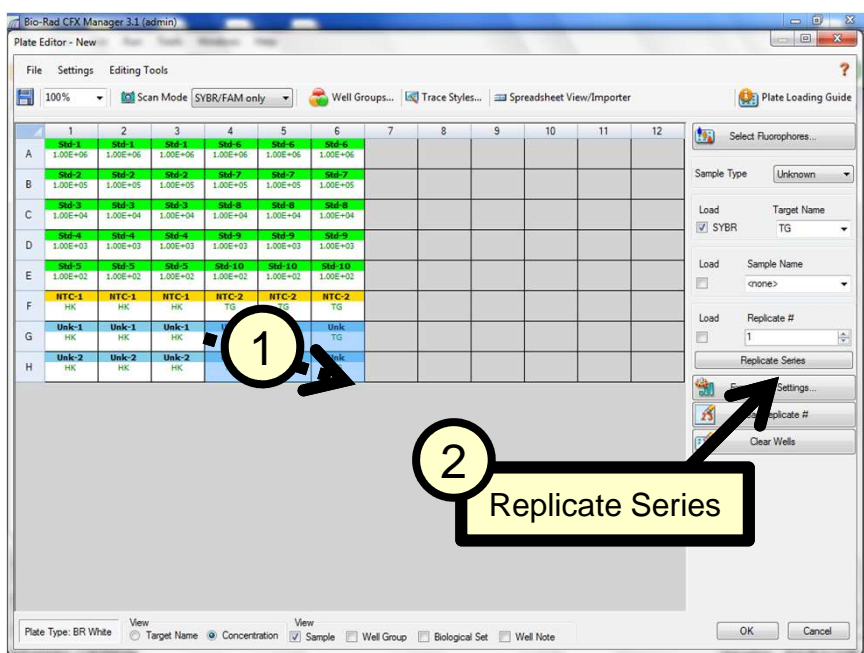
1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。
例: G1からH3をドラッグ
2. Replicate Seriesボタンをクリックします。





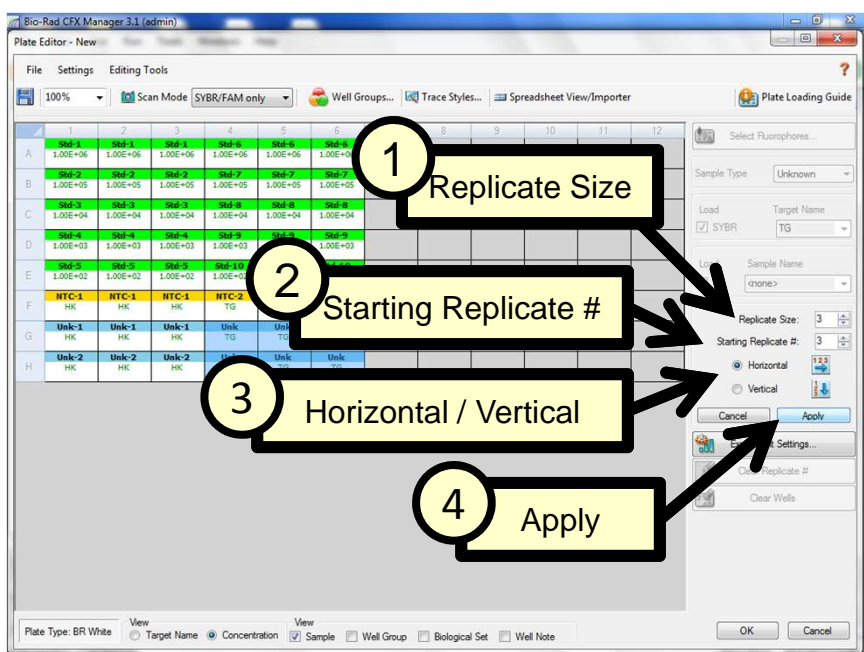
Replicate Series

1. Replicate SizeにN数を入力します。
例: 3
2. Starting Replicate #に割り振る最初の番号を入力します。
例: 1
3. リプリケートの割り振り方向を選択します。
例: Horizontal
4. Applyボタンをクリックします。



Unknown (TG側) のリプリケート設定を行います。

1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。
例: G4からH6をドラッグ
2. Replicate Seriesボタンをクリックします。



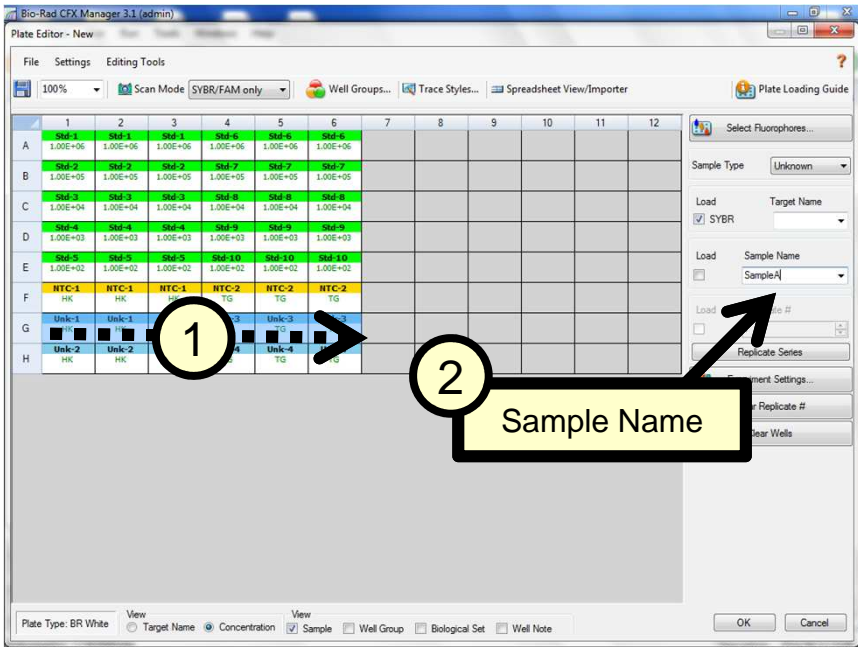
Replicate Series

1. Replicate SizeにN数を入力します。
例: 3
2. Starting Replicate #に割り振る最初の番号を入力します。
例: 3
3. リプリケートの割り振り方向を選択します。
例: Horizontal
4. Applyボタンをクリックします。

サンプル名の設定 (Unknown)

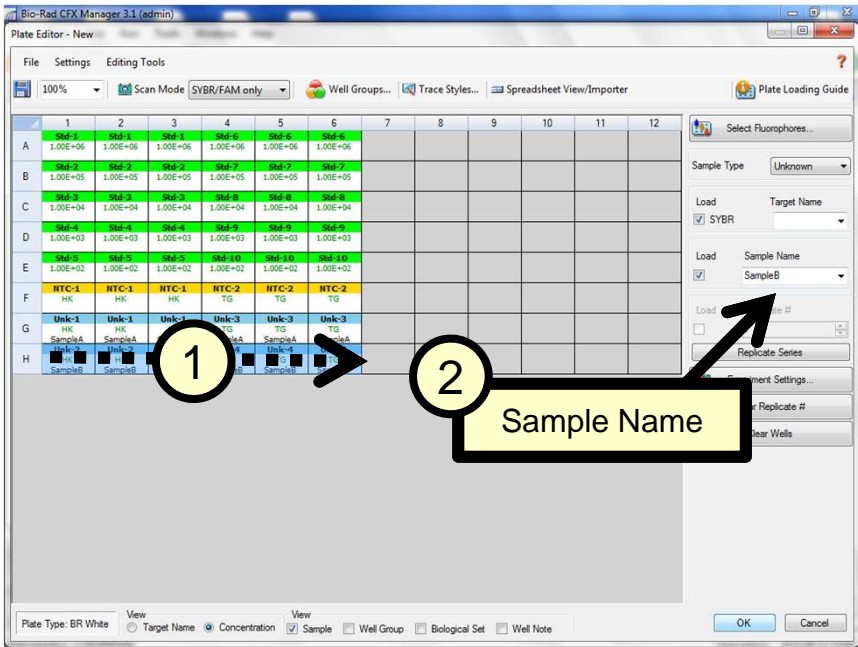
Unknownについてサンプル名 (Sample Name)を入力します。

1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。
例: G1からG6をドラッグ
2. Sample Nameに名称を入力して、Enterキーで確定します。
例: SampleA



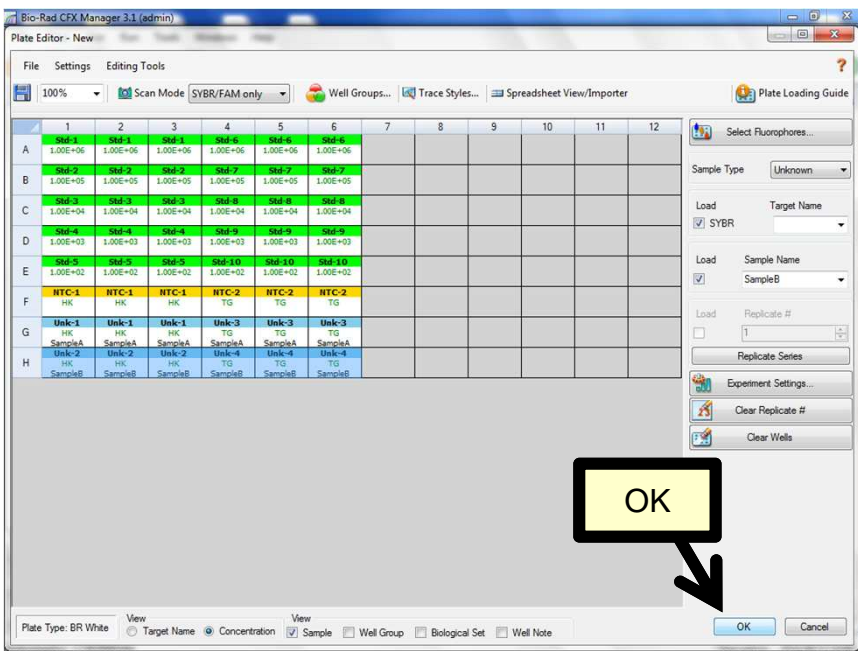
他のUnknownについてもサンプル名 (Sample Name)を入力します。

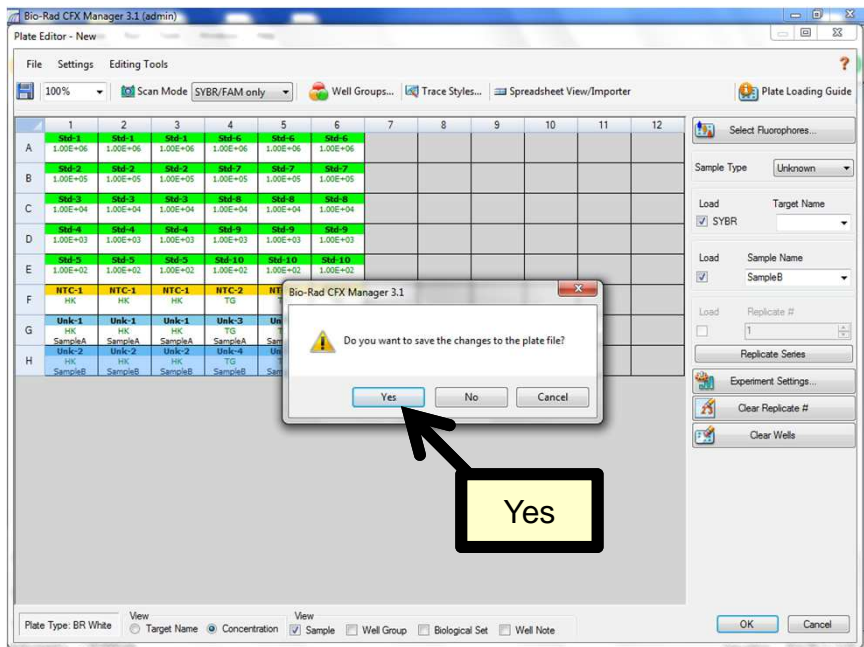
1. 設定したい領域をドラッグにて選択します。
例: H1からH6をドラッグ
2. Sample Nameに名称を入力して、Enterキーで確定します。
例: SampleB



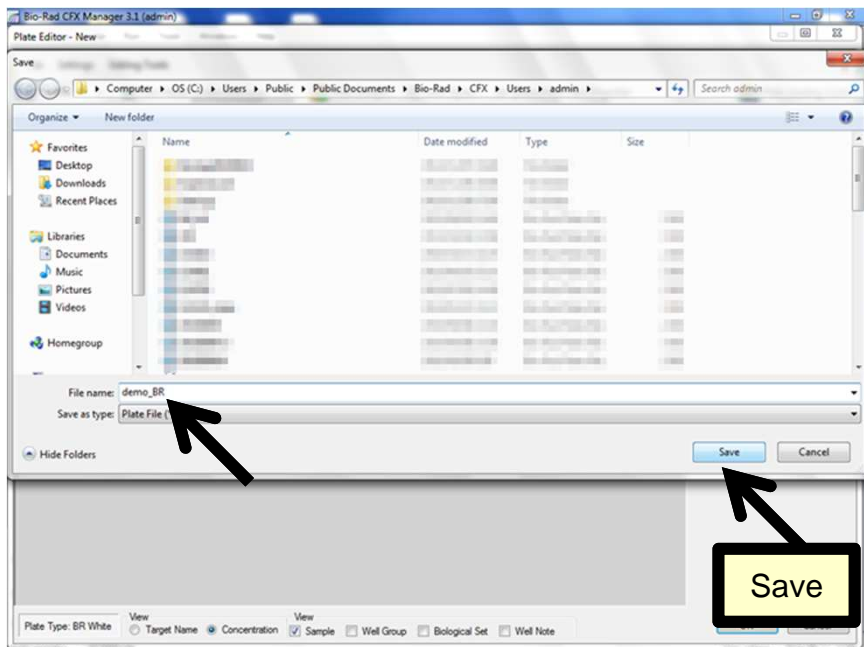
プレート設定の保存

プレート設定が完了したら、OKボタンをクリックします。



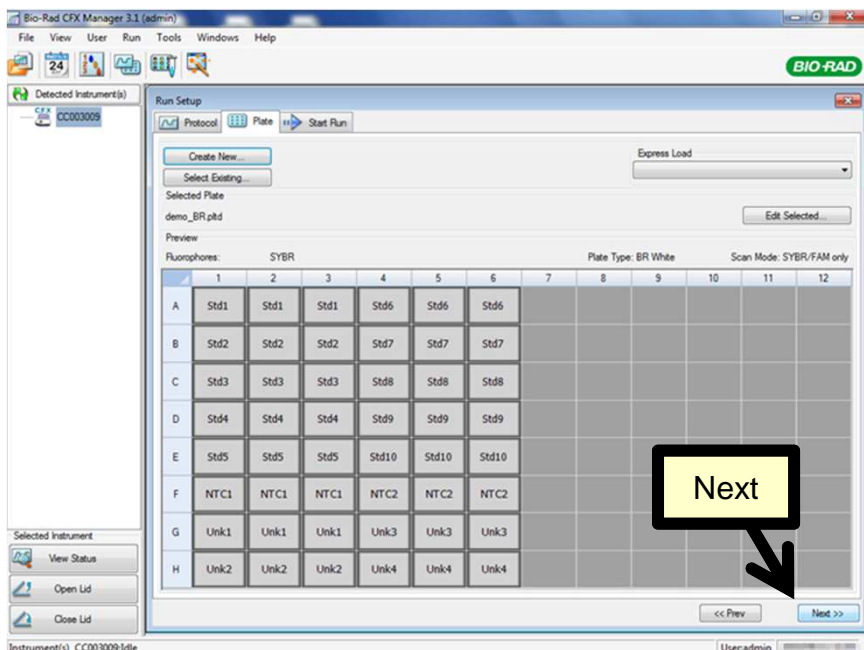


プレートファイルを保存するかどうかを聞いてきます。
Yesをクリックして、プレートファイルを保存します。



プレートファイル(.pltd)のファイル名を入力して、保存場所を指定して、Saveボタンをクリックします。

例: demo BRと入力して、そのままadminフォルダ内に保存します。

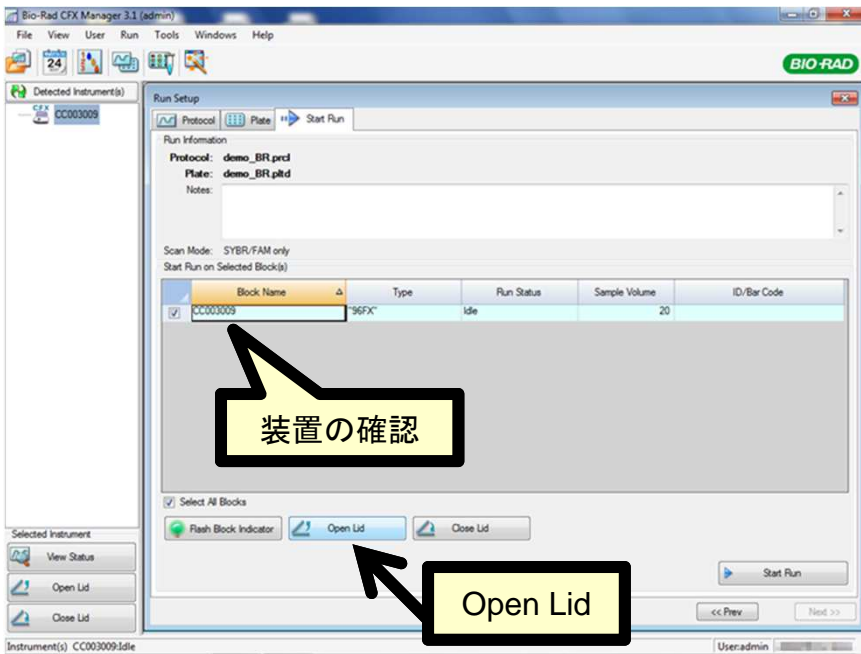


Run Setupウィンドウに戻ります。

Nextボタンをクリックして、Start Runタブ(ラン実行)へ移動します。

Start Run設定

Start Runタブで接続されている装置の確認をして、Open Lidボタンをクリックして、装置のリッドを開きます。

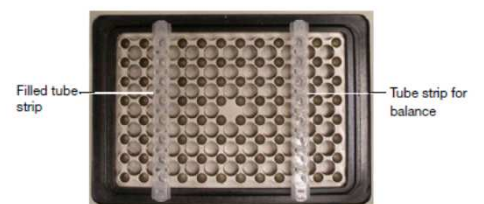
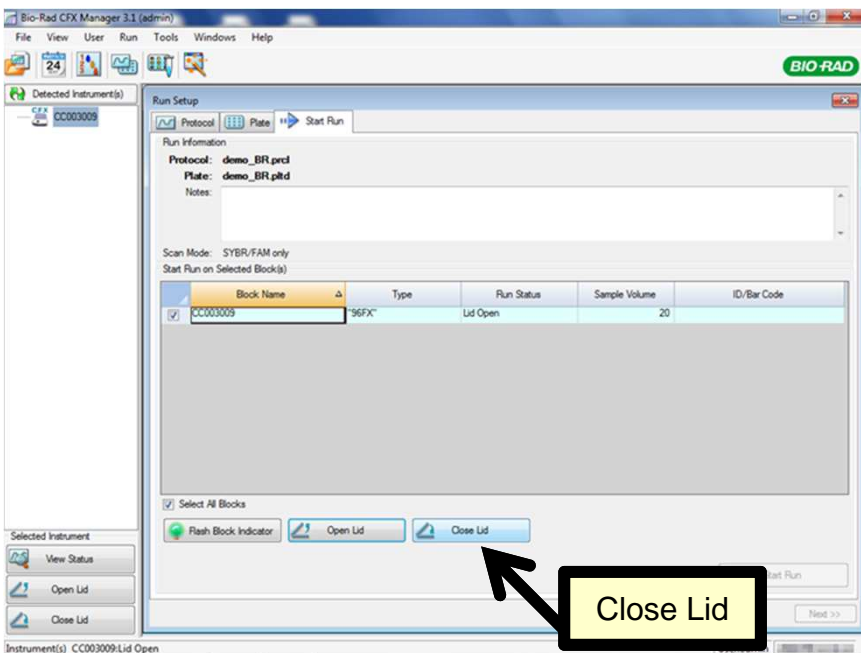


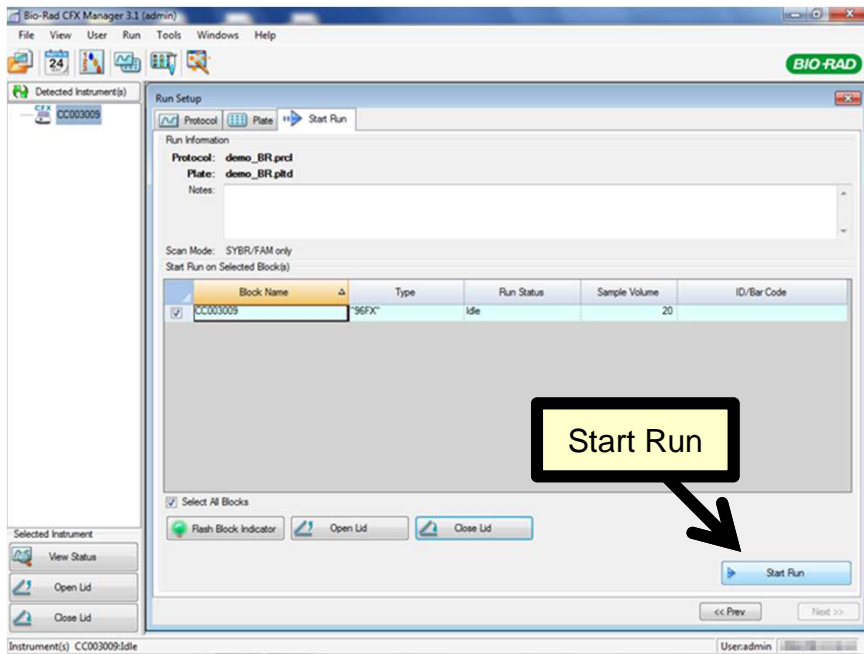
CFX装置本体の前面にあるボタン(左図参照)を押すことで、リッドの開閉を行うこともできます。



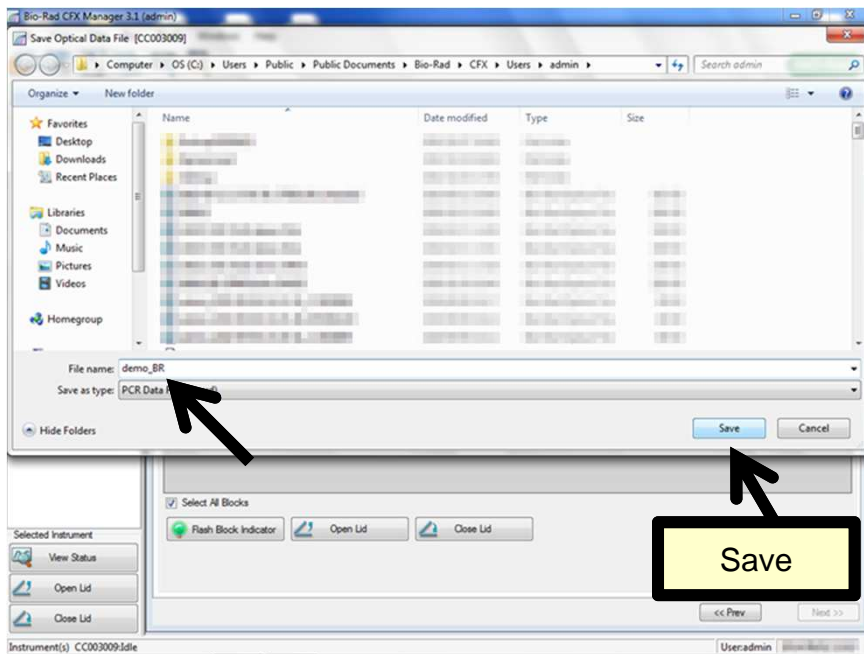
プレートもしくは8連チューブをブロックにセットして、Close Lidボタンをクリックして、装置のリッドを閉じます。

8連チューブをブロックにセットする場合、上下左右均等に配置します。下図のように、左端にサンプル8連チューブを置いた場合には、反対側の右端にダミー8連チューブをセットします。



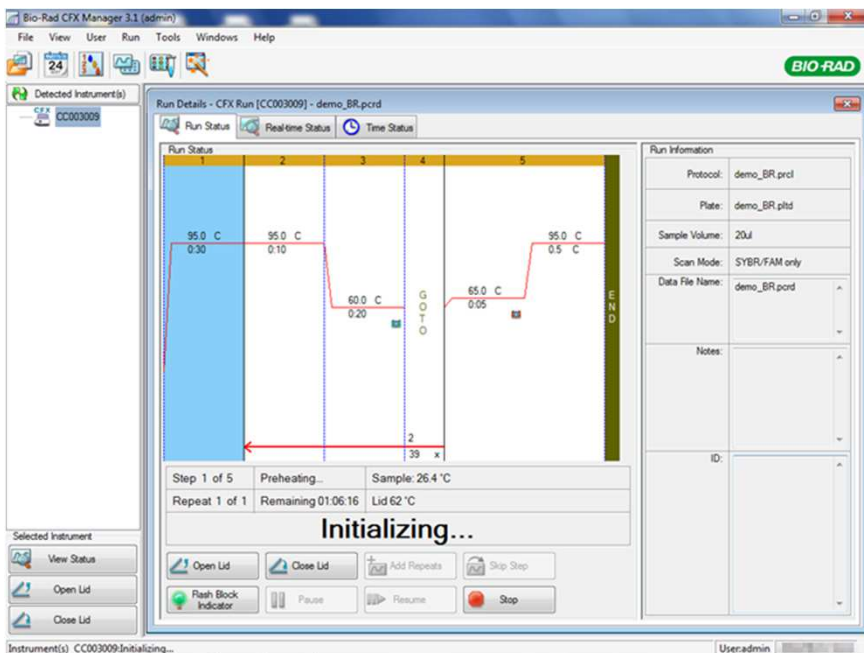


Start Runボタンをクリックして、ランを開始します。

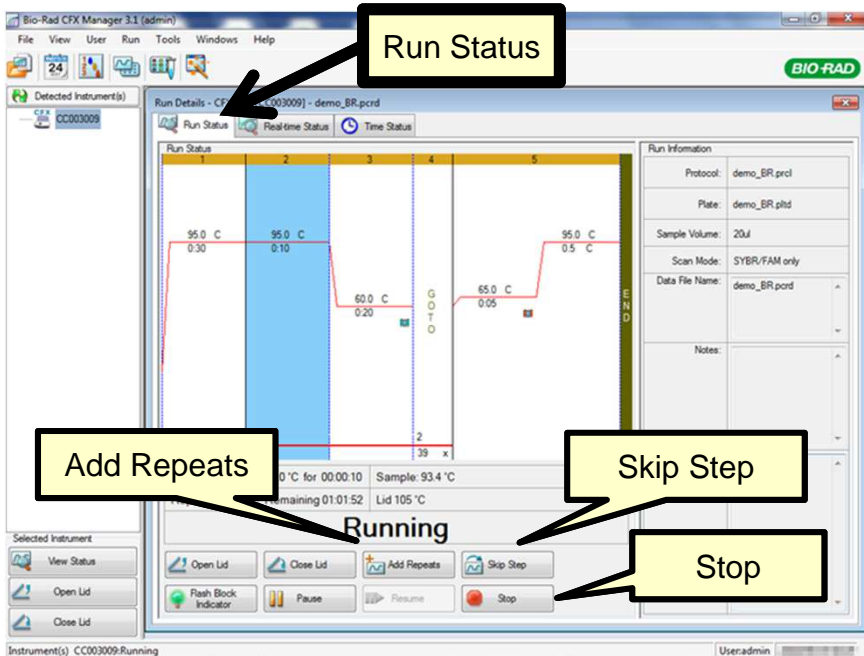


PCRランデータファイル(.pcrd)のファイル名を入力して、保存場所を指定して、Saveボタンをクリックします。

例: demo BRと入力して、そのまま adminフォルダ内に保存します。



ランが開始されます。



Status

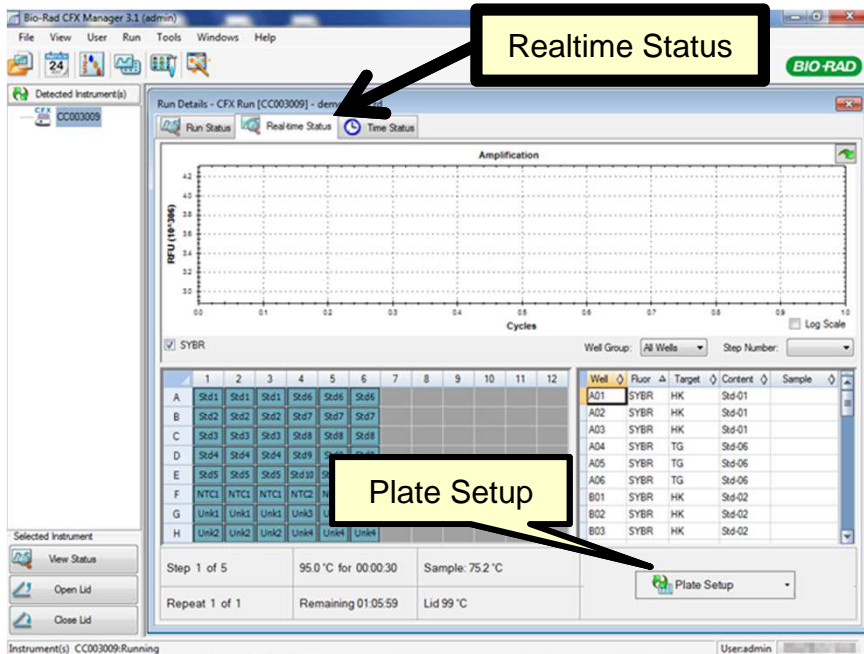
Run Status

ランのプロトコル状況はRun Statusタブにて確認できます。ラン状況によって、リピート数の調整や強制終了を行うことができます。

Add Repeats: リピート数を増やすことができます。

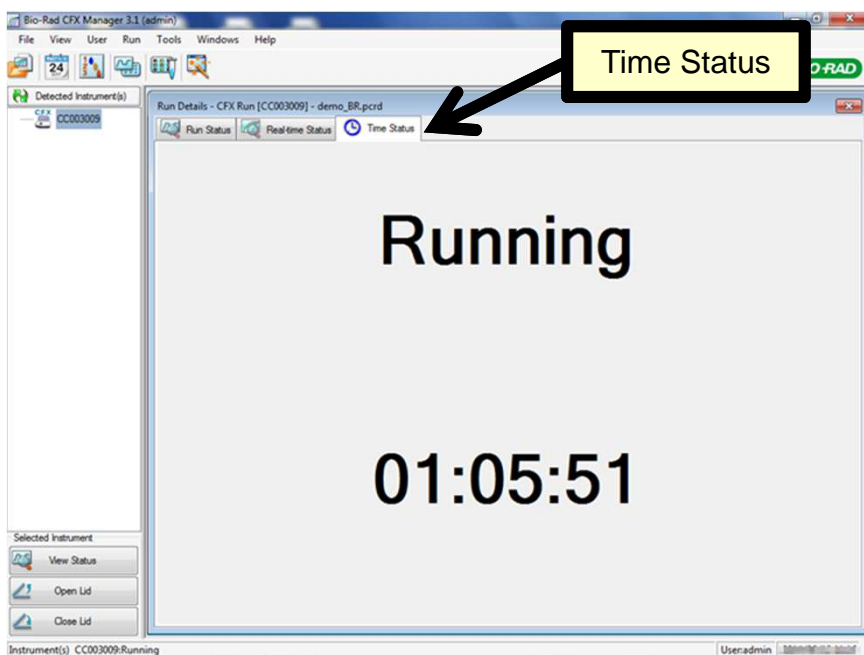
Skip Step: 次のステップへ進めることができ、GOTOループから抜け出すこともできます。

Stop: 強制的にランを終了させることができます。データは終了させた時点まで保存されます。



Realtime Status

ラン中の蛍光強度変化を確認できます。Plate SetupドロップダウンからView/Edit Plateを選択することでプレートの編集ができます。



Time Status

ランの残り時間はTime Statusタブでも確認できます。

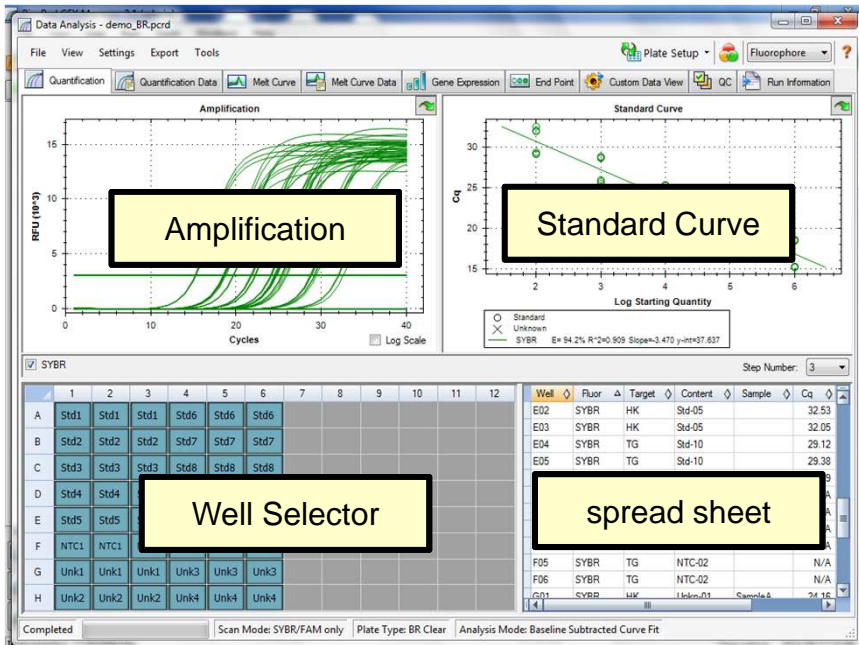
測定後解析

Quantificationタブ

ランが終了すると、自動的に解析画面(Data Analysisウインドウ)が開きます。通常Quantificationタブが表示されます。

Amplification: 蛍光増幅曲線グラフ
Standard Curve: 検量線グラフ
Well Selector: ウェル情報
spread sheet: 結果表(簡易)

いずれかのデータにカーソルを合わせると連動して他のデータもハイライトされます

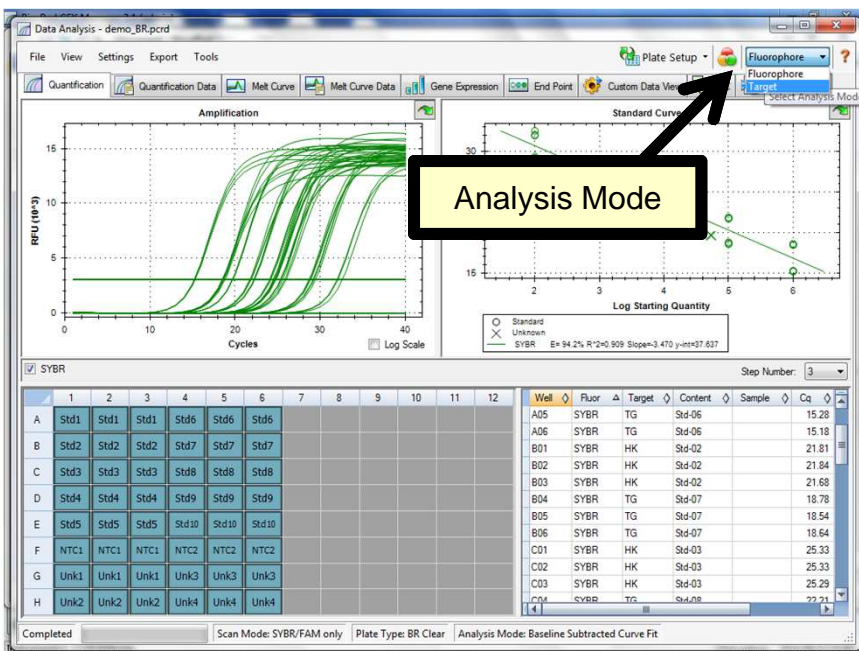


解析モードの変更

解析モード(Analysis Mode)をFluorophoreからTargetに変更します。

Targetに変更することにより、SYBR Greenなどの1色測定ではターゲット(遺伝子)別で解析が可能になります。

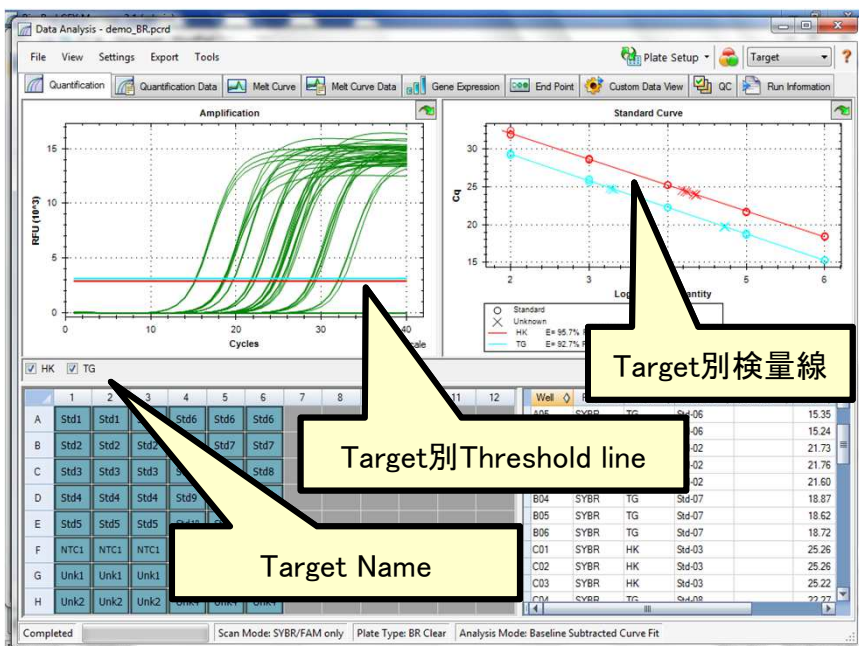
Fluorophoreは多波長測定時に使用します。

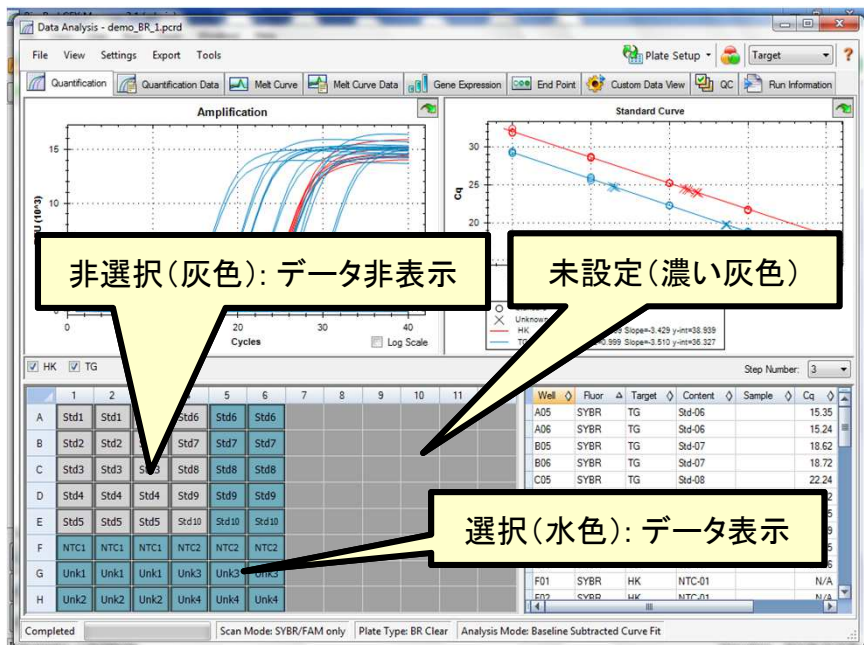


Targetモードに変更すると、AmplificationでTarget別にThreshold Lineが引かれ、Standard CurveでTarget別に検量線が表示されます。

Threshold lineは自動で設定されますが、手動での設定は31ページをご参照ください。

Amplification下部のチェックボックスにTarget Nameが表示されます。チェックボックスにチェックを入れると、目的のTarget遺伝子のデータのみを表示することができます。

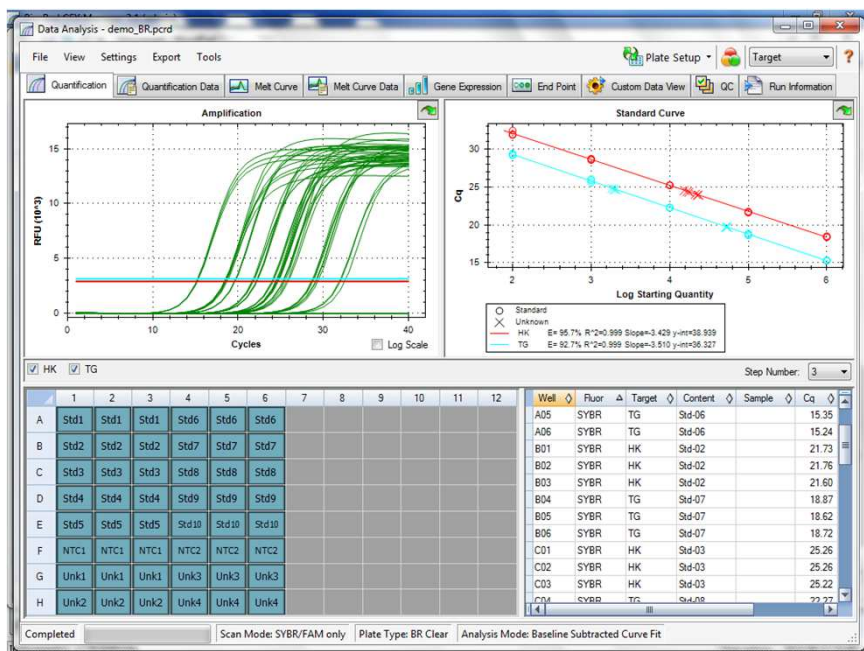




Well Selector (ウェル表示選択)

ウェルを選択 (水色) することで、Amplificationなどにデータ表示されます。選択状態のウェルをクリックすると、非選択状態 (灰色) になり、データが表示されません。

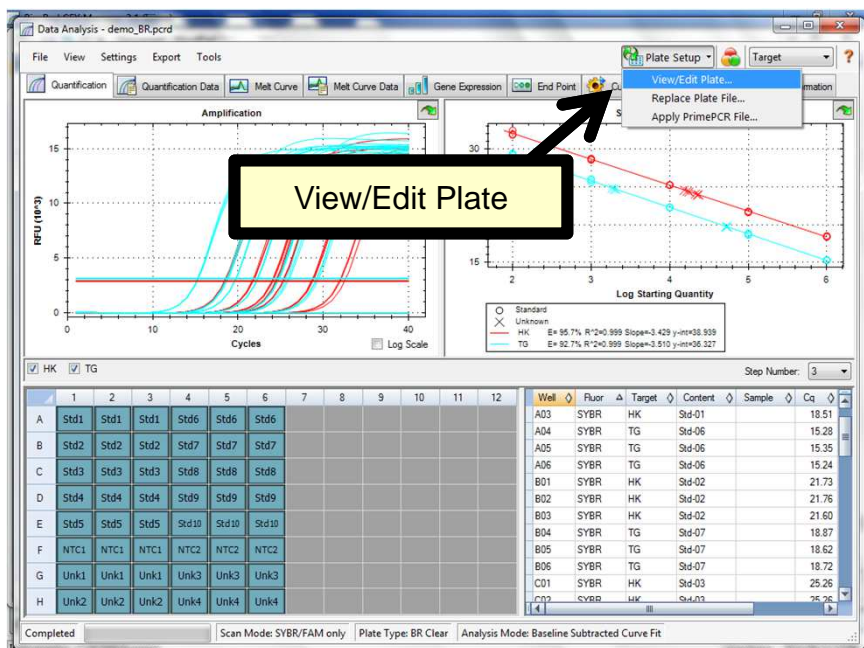
非選択ウェルは表示がされていないだけで、解析から除外はされていません。解析から除外する場合には、34ページをご参照ください。



Standard Curve (検量線)

Target毎またはFluorophore毎に検量線が作成されます。

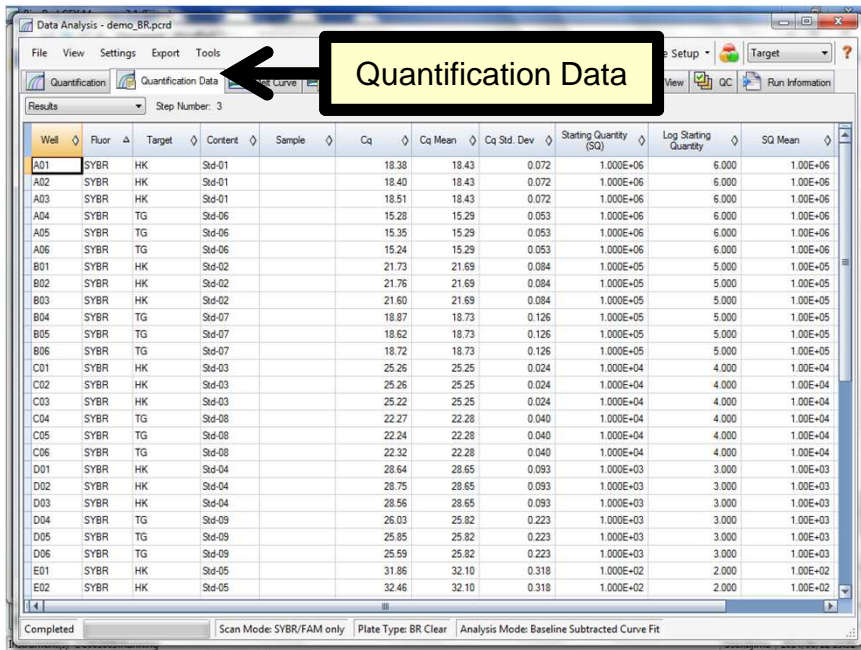
O: Standard
X: Unknown (UnknownはWell Selectorで選択されているウェルのみグラフに表示されます)



解析時のプレート編集

解析時にプレートの編集を行いたい場合には、Plate SetupからView/Edit Plateを選択して、Plate Editorウィンドウを呼び出します。

Plate設定法は11~21ページをご参照ください。Scan Mode以外すべての設定を変更できます。

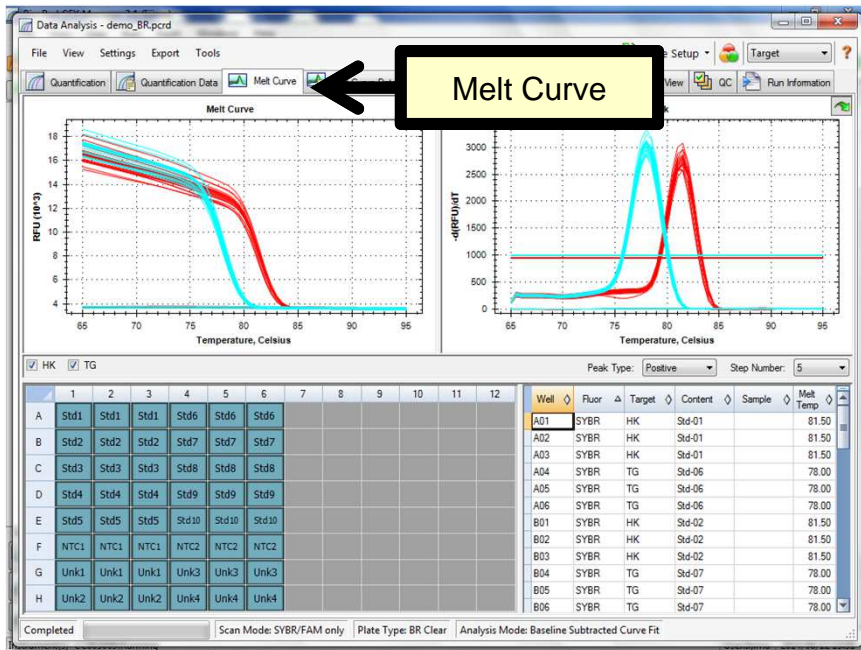


Quantification Dataタブ

詳細な数値データを確認したい場合には、Quantification Dataタブを開きます。

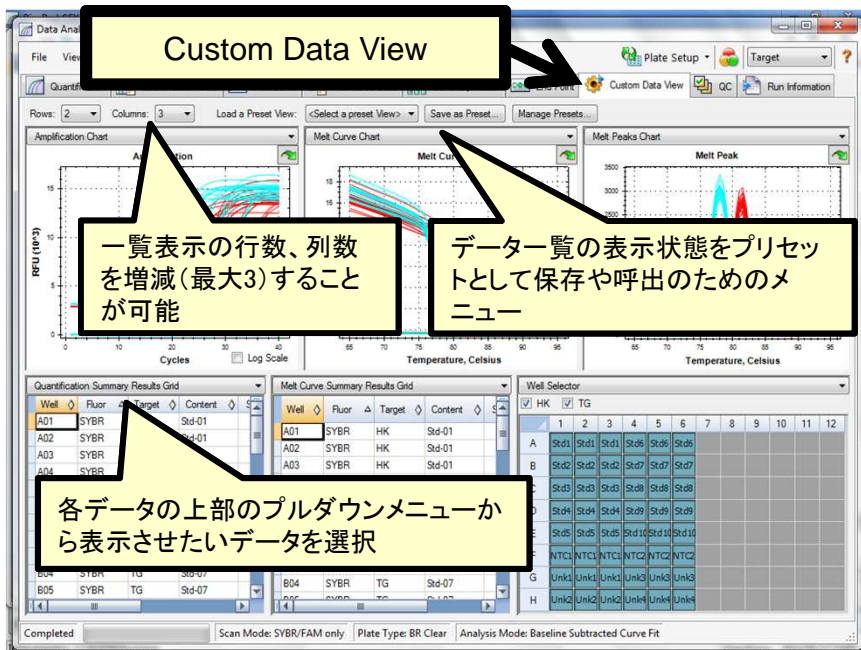
PlateでReplicatesの設定を行っていると各ウェルの数値情報に加え、平均値、SD値が自動算出されます。

データシート情報のエクスポートはシート上で右クリックして表示されるメニューで行います。詳細は31ページをご参照ください。



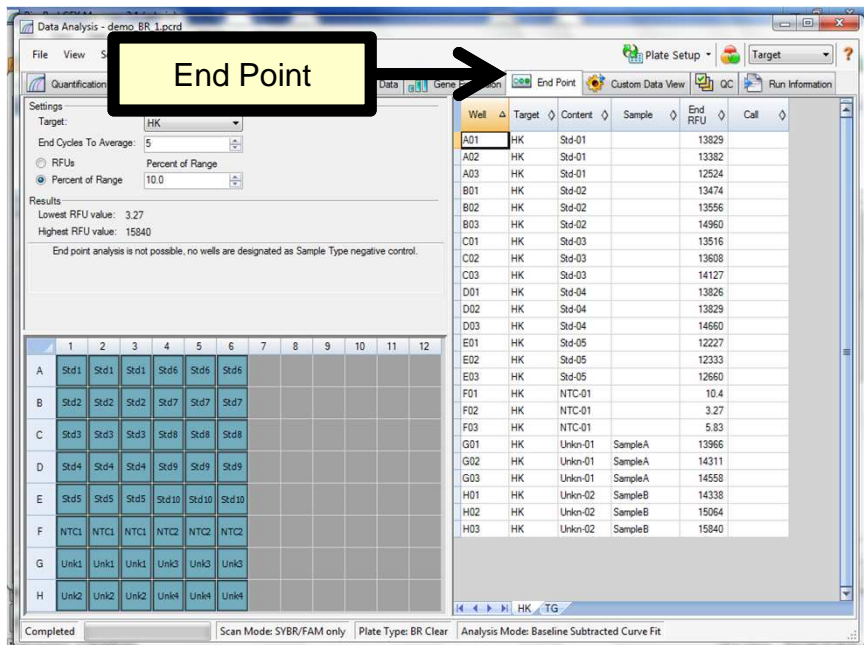
Melt Curveタブ

Melt Curveの結果を確認します。



Customer Data Viewタブ

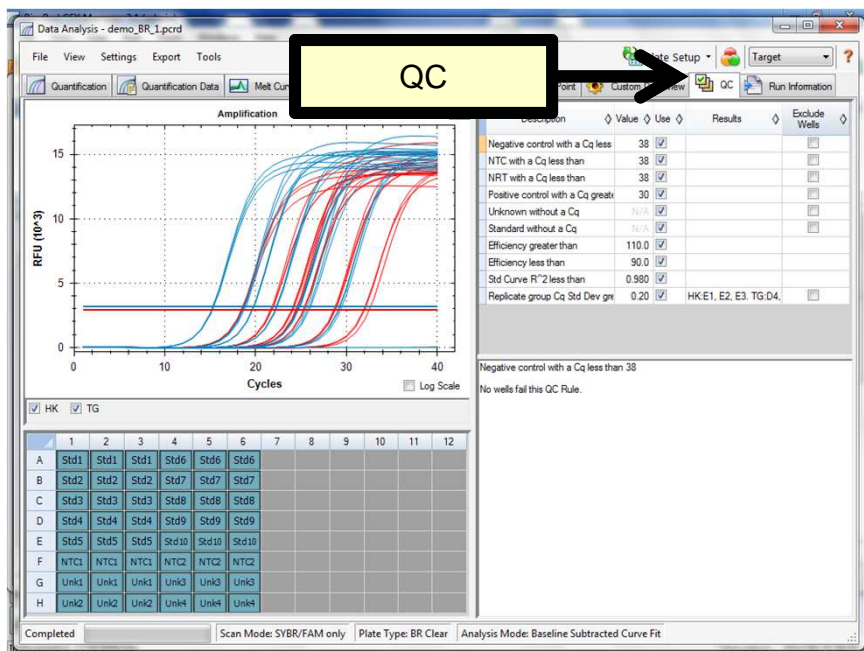
Custom Data Viewタブはいくつかのグラフや結果シートをまとめて1画面に表示させることができます。



End Pointタブ

最終サイクル付近での蛍光値についての解析を行うタブです。

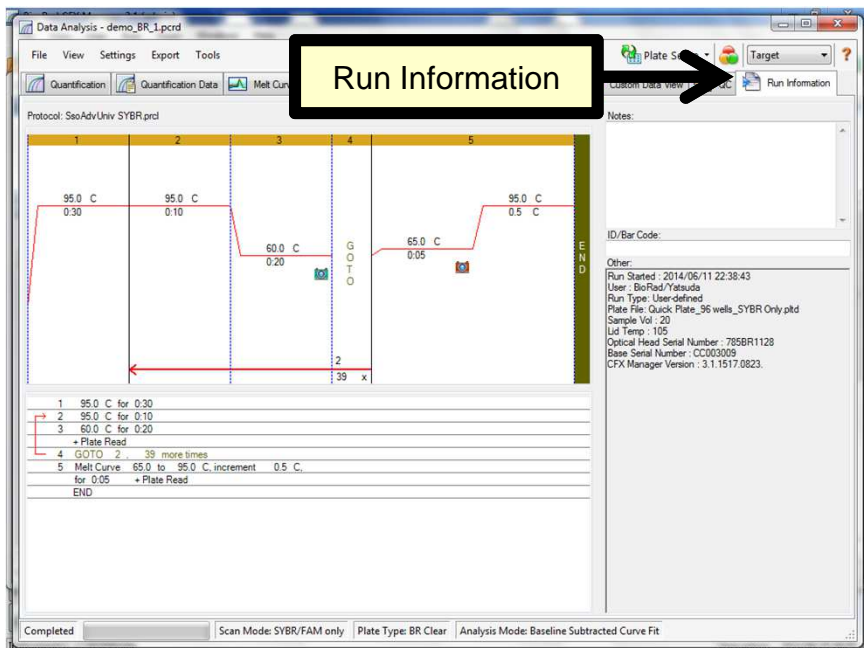
最終サイクルから特定設定のサイクル数での平均蛍光値でポジティブ、ネガティブの判定を行うことが可能です(定量判定ではないのでご注意ください)。



QCタブ

ランのデータが正常とする基準をクリアしているかどうかを確認することができます。

基準値は自由に変更することができるので、実験の目的に沿った基準を設けることができます。



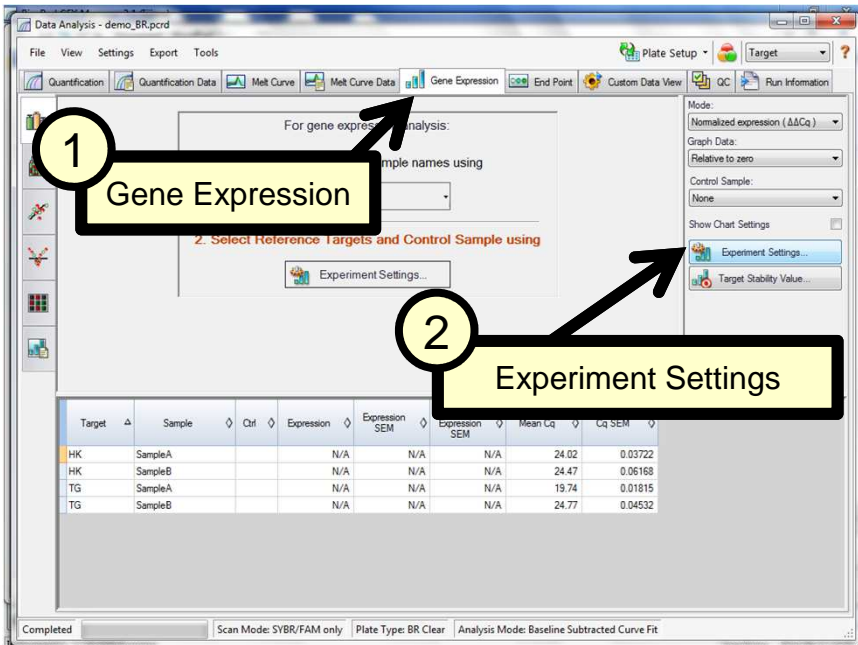
Run Informationタブ

実行したランのプロトコルを確認することができます。

Gene Expression解析

遺伝子発現解析を行うにはGene Expressionタブを使用します。

1. Gene Expressionタブをクリックします。
2. リファレンス(一般にハウスキーピング遺伝子が選択されます)やコントロール(基準となるサンプル)の指定をするために、Experimental Settingsボタンをクリックします。



Experimental Settingウインドウが開きます。

Targetタブの説明

Name: Target Nameと同じ表示

Full Name: 略称ではない遺伝子名を入力可能

Reference: 下記参照

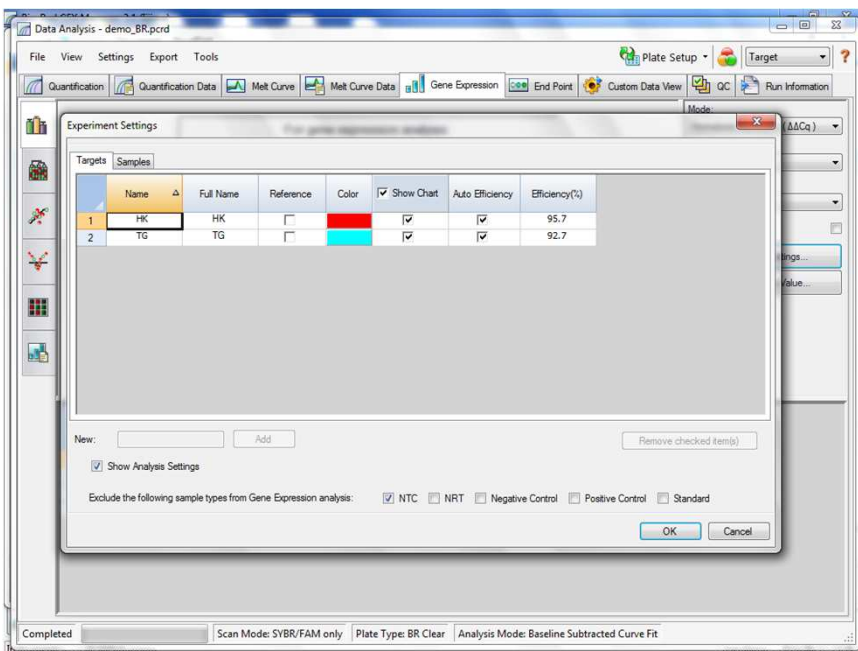
Color: グラフの色を変更可能

Show Chart: グラフ表示の有無

Auto Efficiency: チェックがついているとプレート

上にある検量線の増幅効率(E)が自動的に反映

Efficiency: 増幅効率(数値の変更も可能)

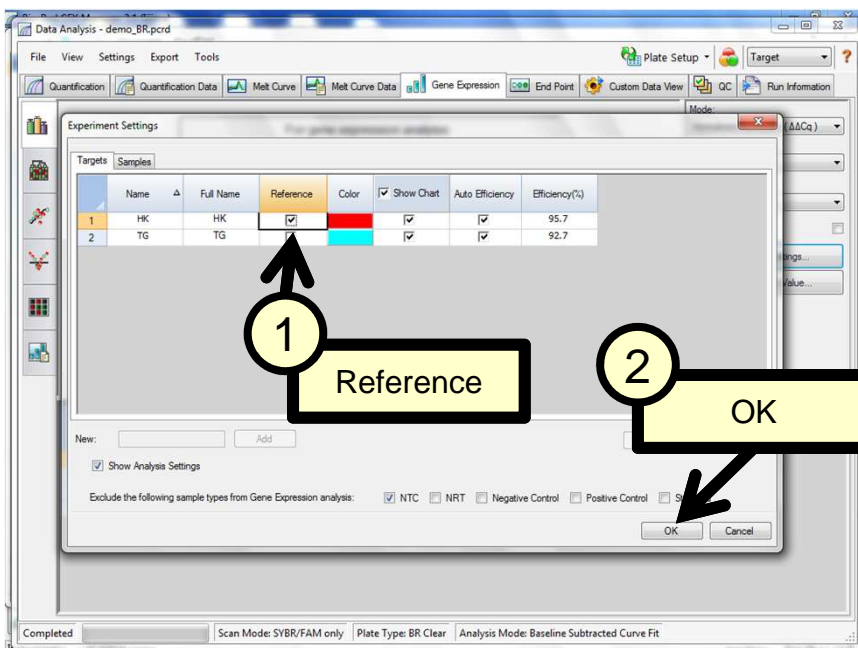


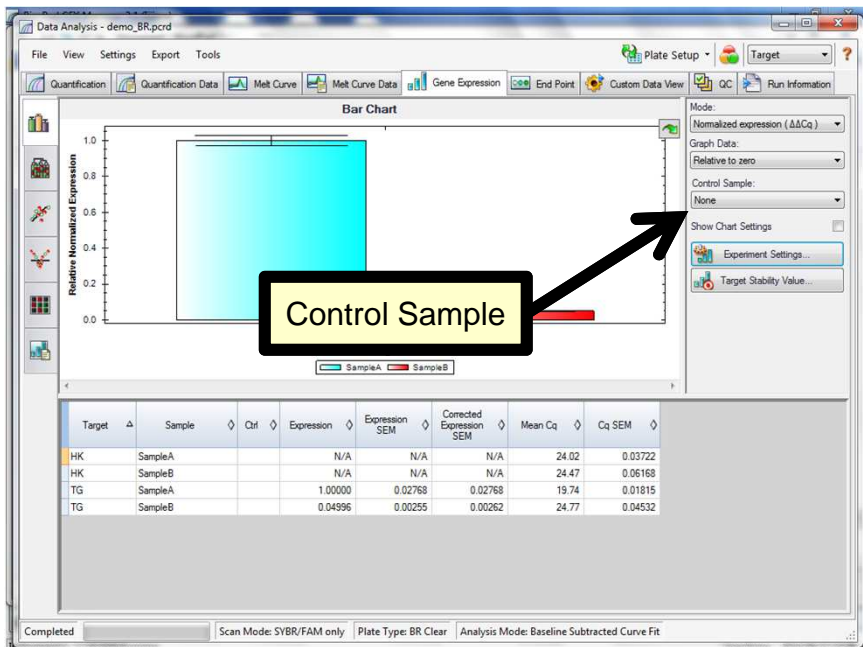
Targetsタブにプレートにて設定したTarget Nameのリストが表示されています。

1. リファレンスとして設定したいTarget NameのReference欄にチェックを付けます。

例: HKのReference欄にチェックを付けます。

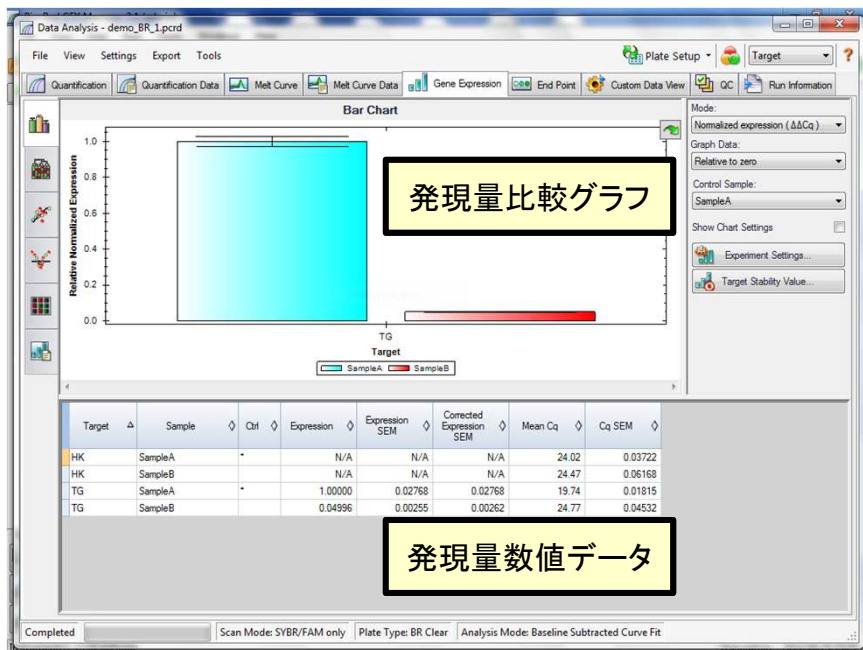
2. OKボタンをクリックし、設定を保存して、Experiment Settingsウインドウを閉じます。





Bar Chartにグラフが表示されますが、これはコントロールサンプルを基準としていない状態です。コントロールサンプルの設定はグラフの右側にあるControl Sampleから選択します。

例: Control SampleからSampleAを選択します。



Control Sampleで選択したサンプルを基準としてBar Chartに発現量比較グラフが表示されます。

グラフの並びはグラフ上で右クリックして表示されるメニューからSortを選んで変更ができます。

Mode: $\Delta\Delta Cq$ はリファレンス遺伝子で補正する設定、 ΔCq は補正しない設定
Graph Data: Relative to zeroは0からグラフが伸びる表示、Relative to controlは1からグラフが伸びる表示

Bar Chartの下には発現解析の発現量数値データが表示されます。

Expression: 発現量比
Expression SEM: 発現量比での標準誤差
Mean Cq: Cq値の平均値
Cq SEM: Cq値での標準誤差

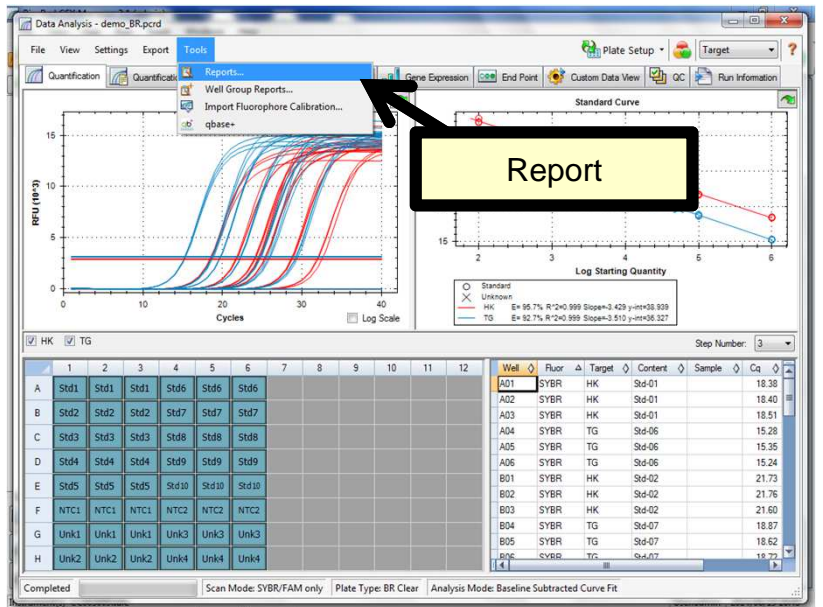
注: もしBar Chartにグラフが表示されない場合、UnknownのSample NameやTarget Nameの入力が間違っている場合があります。再度Plate Editorを呼び出して(Plate Setup > View/Edit Plate)、UnknownのSample NameやTarget Nameを確認してください。特にSample NameはTargetが違う場合でも同じサンプルであれば、全く同じSample Nameにする必要があります。

データを出力するには？

データの出力方法はいくつかあります。

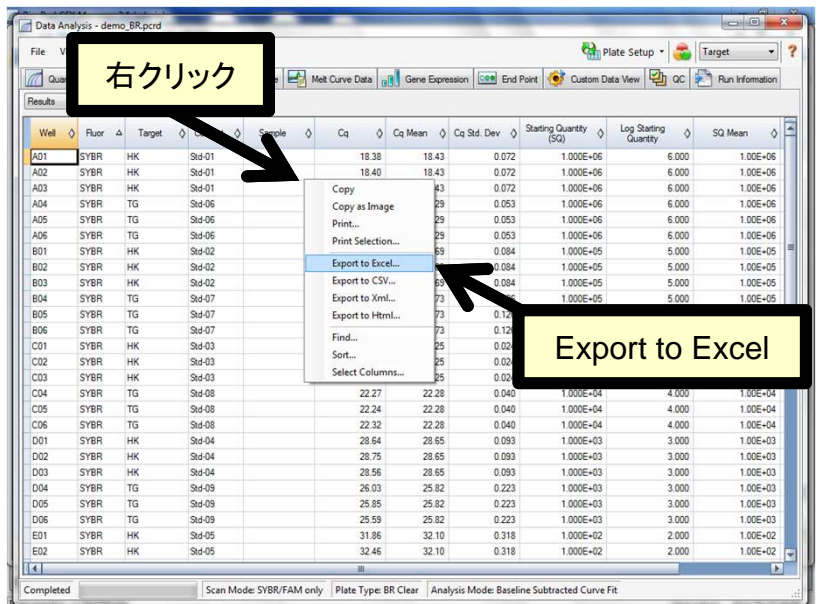
レポートの作成

Data AnalysisウィンドウのToolsメニューからReportを選択して、Reportウィンドウを呼び出します。レポート形式で直接印刷も可能ですが、PDFファイルとして保存も可能です。



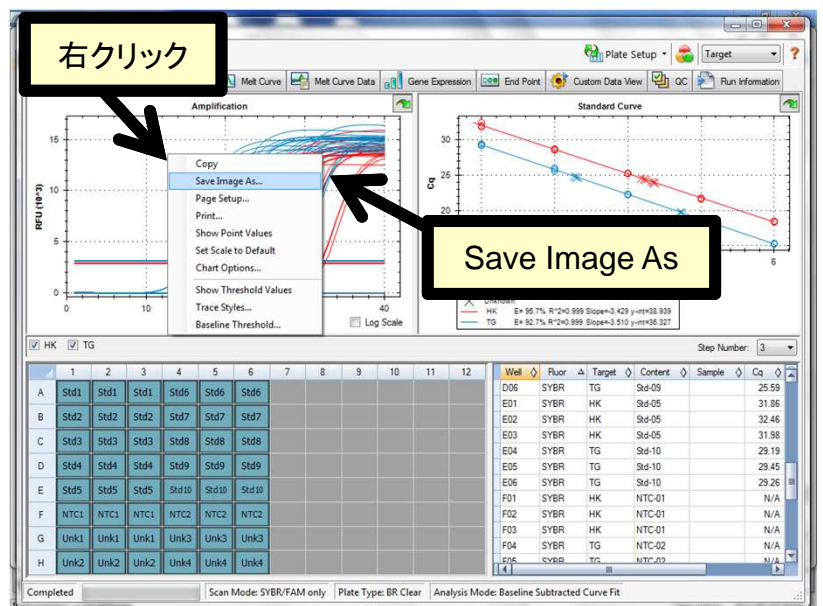
数値情報の出力

spread sheetになっているデータは全て右クリックして表示されるメニューから形式を選んで、Exportが可能です。



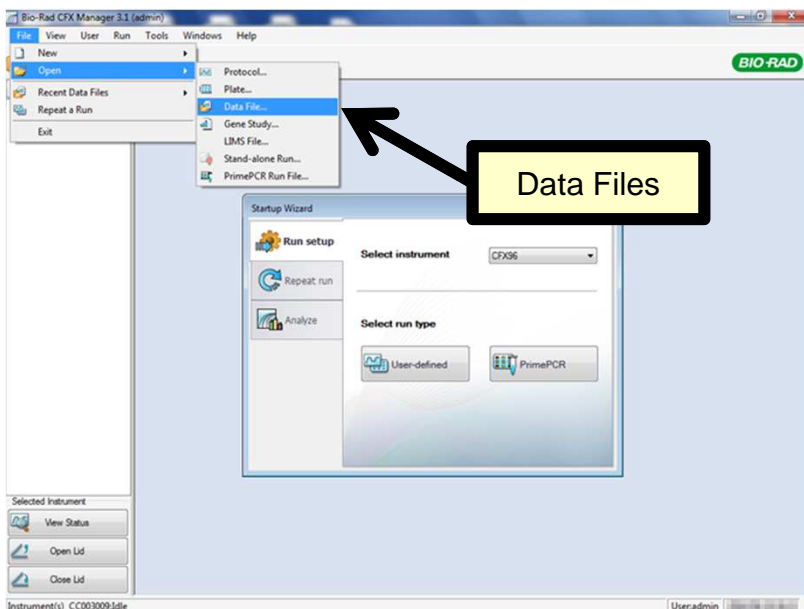
グラフの出力

グラフも右クリックして表示されるメニューからSave Image Asを選ぶと画像ファイルとして保存が可能です。



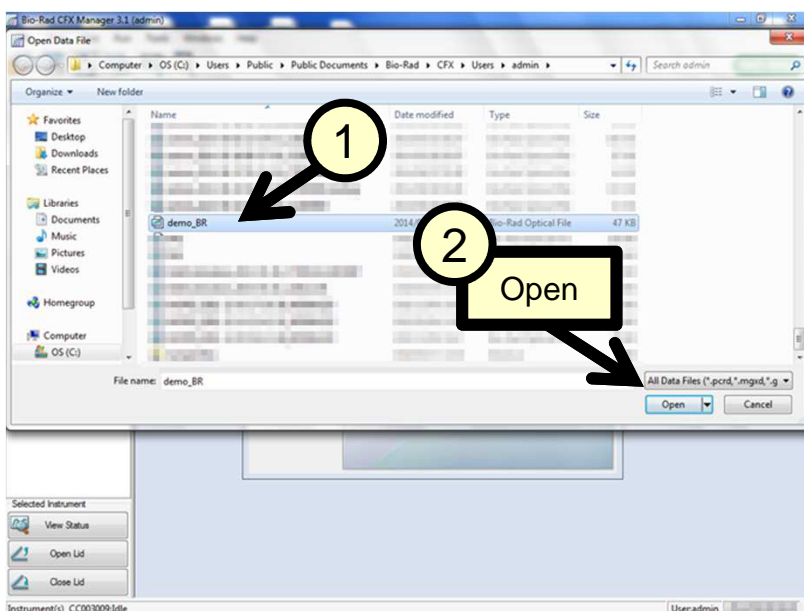
PCRランデータファイル 呼び出すには？

メインメニューのFile > Open > Data Filesを選択します。



1. 該当ファイルを選択します。
2. Openボタンをクリックします。

該当ファイルの解析画面が開きます。

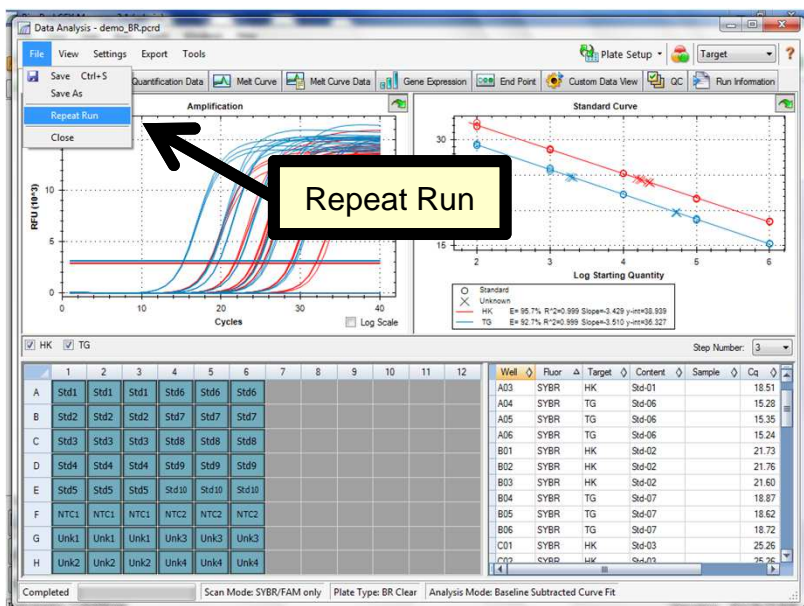


再度同じプロトコルでラ ンを実行したい場合には？

PCRランデータファイル(.pcrd)を開いた状態で、Data AnalysisウインドウのメニューからFile > Repeat Runを選択します。

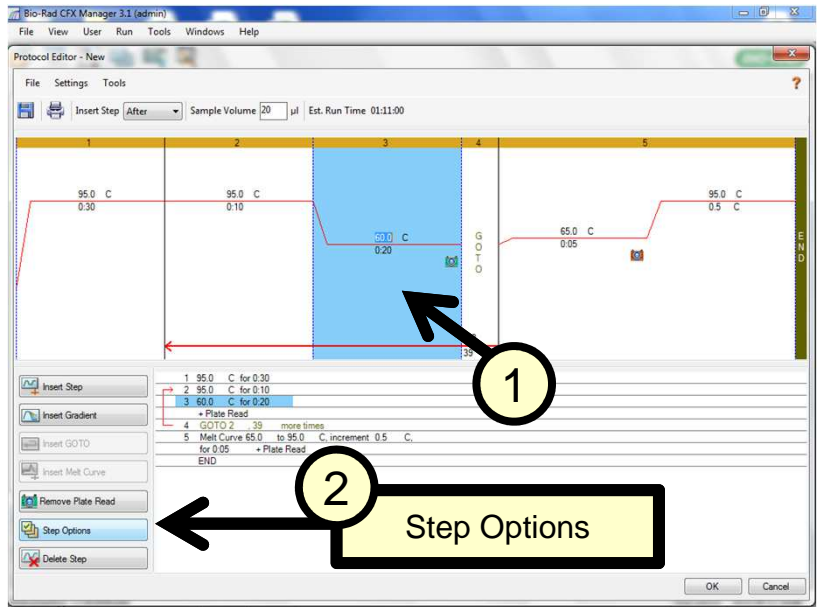
Run Setupが開き、全く同じProtocolとPlateでランが可能です。

またProtocolやPlateの各タブをクリックして編集を行うことも可能です。

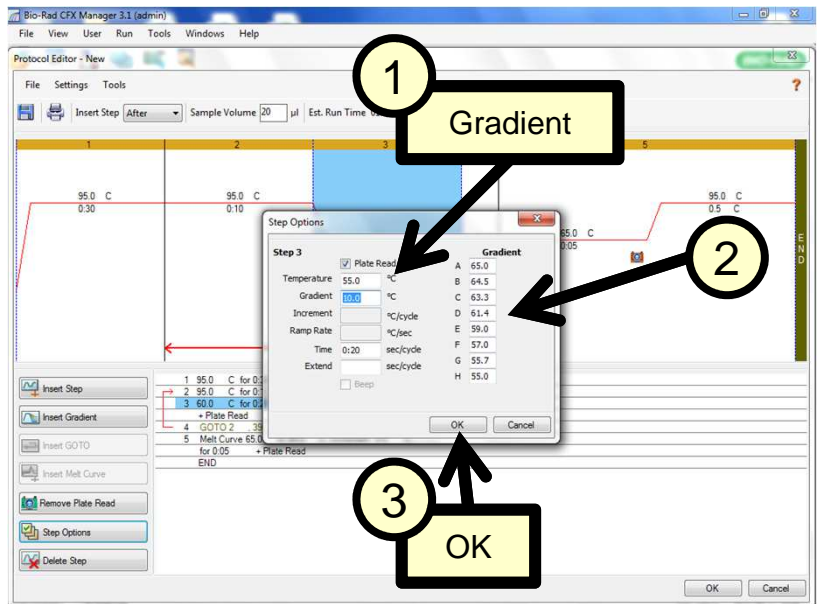


温度グラジエント機能を使用するには？

1. Protocol Editorウィンドウで設定したいステップをクリックして、選択します。
2. Step Optionsボタンをクリックします。

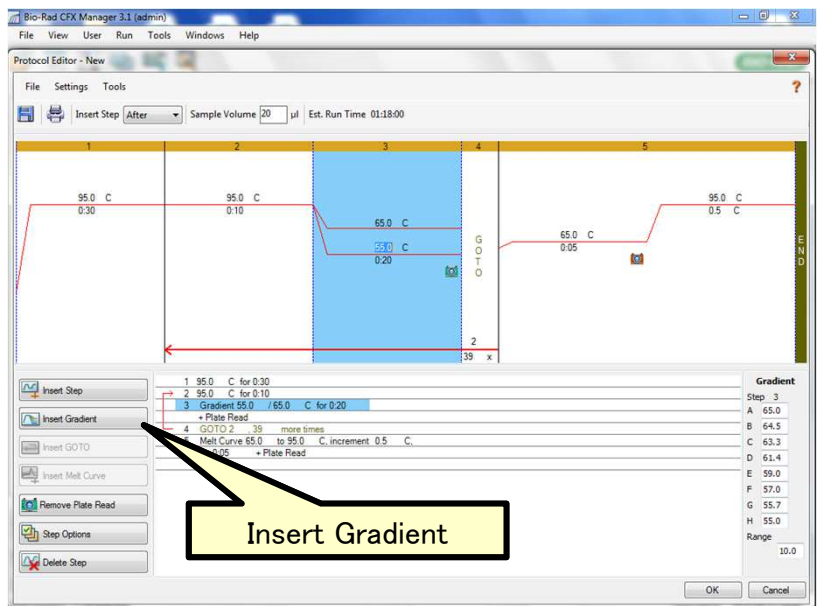


1. Step OptionsウインドのGradientフィールドに温度グラジエント幅を入力します。
2. AからH列の各列の予想温度が表示されます。列に直接温度を入力して、修正することもできます。
3. 設定が終了したら、OKボタンをクリックします。



設定したステップで、上限と下限の温度が表示されて、温度グラジエント機能が適用されていることを示しています。

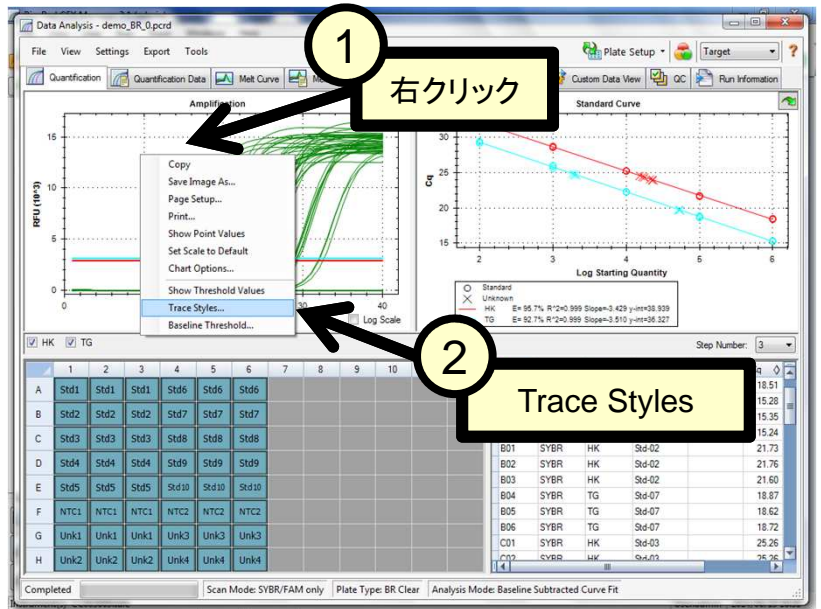
Insert Gradientボタンをクリックすることで、温度グラジエント設定のステップを追加することもできます。



データ(蛍光曲線)をTarget別に色分けするには？

Amplificationで蛍光曲線をターゲット別で色分けするために、Trace Stylesを呼び出します。

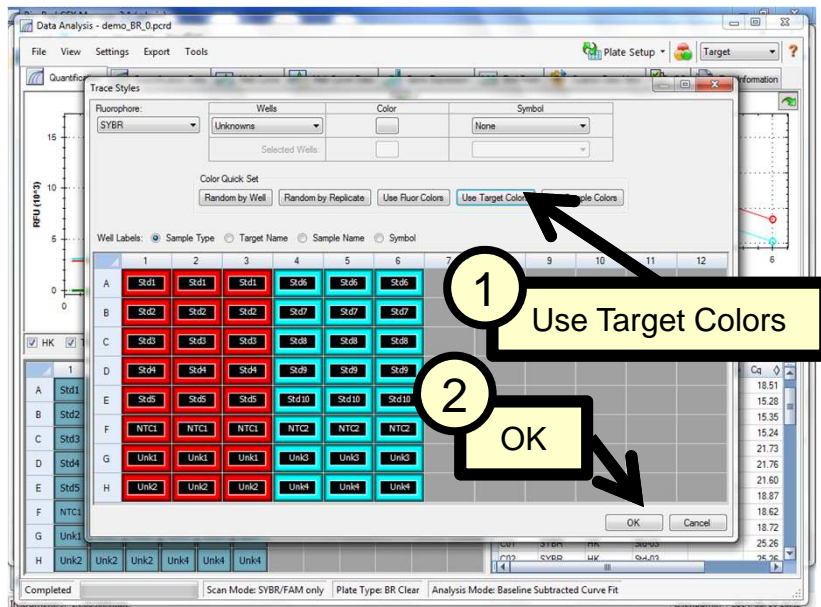
1. Amplificationのグラフ上で右クリックします。
2. 表示されるメニューからTrace Styles..を選択します。



Trace Stylesウィンドウが開きます。

1. Use Target Colorsボタンをクリックします。
2. OKボタンをクリックして閉じます。

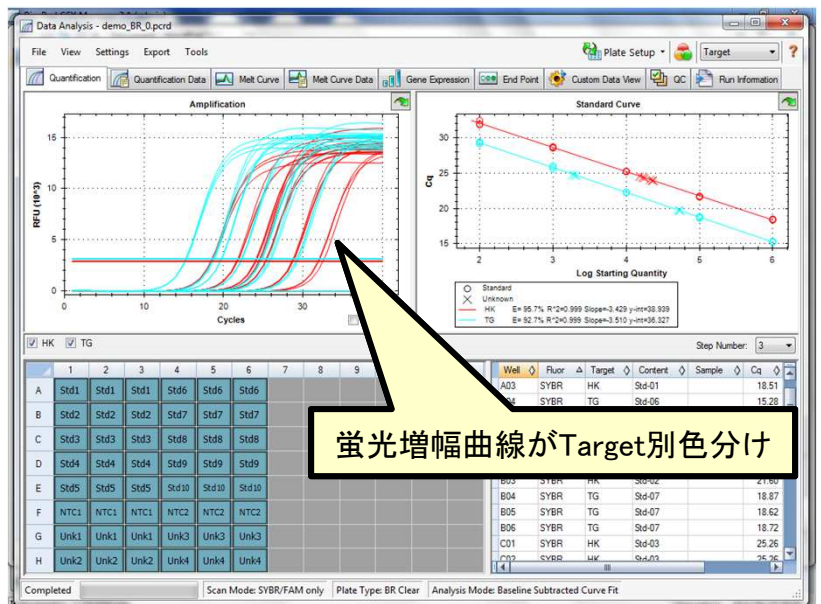
Trace Stylesでは個別のウェルの色を変更したり、ランダムに色を割り当てることもできます。



Amplificationの蛍光増幅曲線の色がThreshold lineと同じ色に変更されます。

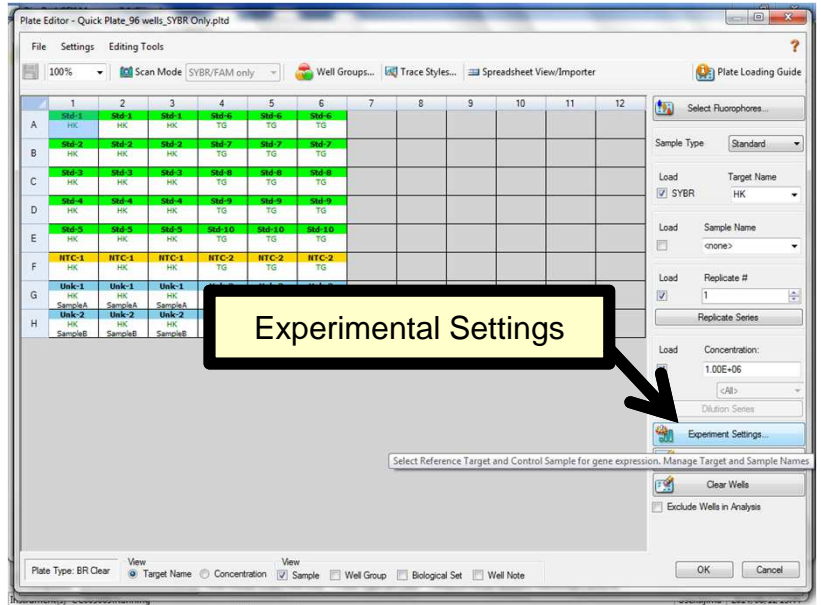
その他のデータ(Melt Curveなど)についても同時に曲線の色が変更されます。

Threshold lineの色の変更は35ページをご参照ください。

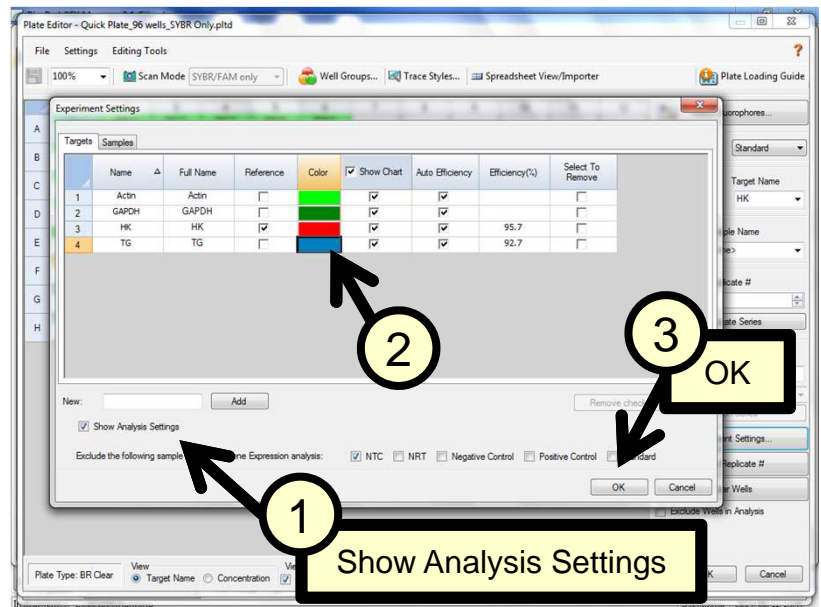


検量線とThreshold lineの色を変更するには？

Plate Editorを呼び出し(26ページ参照)、Plate Editorウィンドウ内のExperimental Settingsボタンをクリックします。

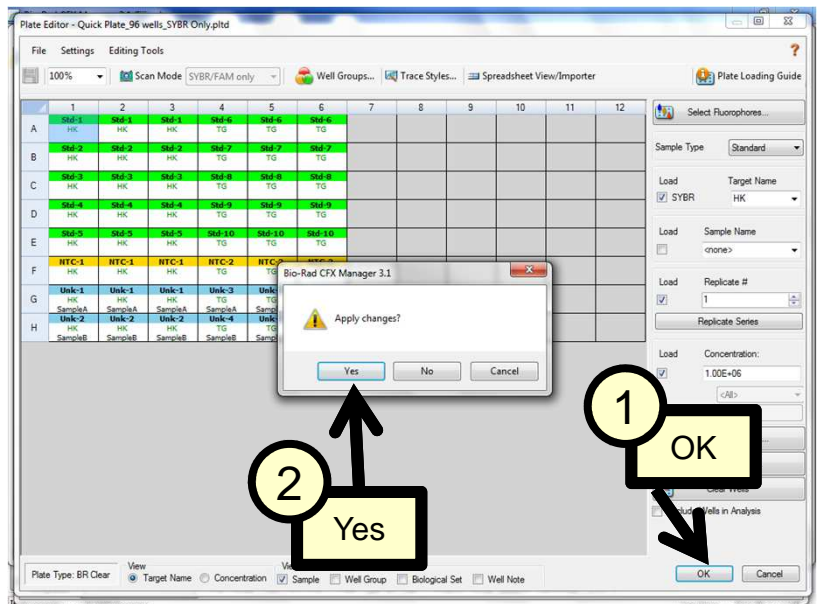


1. Experimental Settingsウィンドウ内のShow Analysis Settingsにチェックを付けます。
2. Color欄が表示されて、各Targetの色を変更できます。
3. 色を変更した後、OKボタンをクリックします。



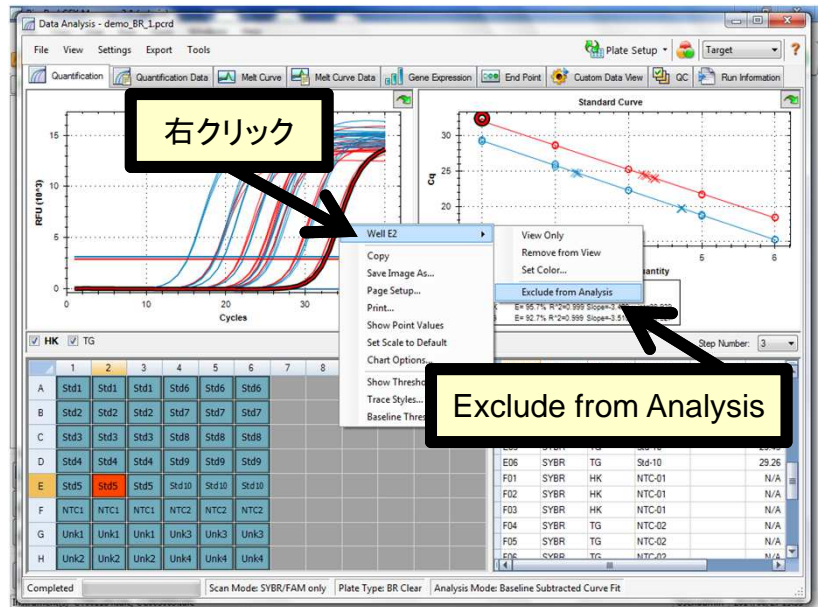
1. Plate Editorウィンドウを閉じる際にOKボタンをクリックします。
2. Apply Change?と聞いてくるので、Yesボタンをクリックして適用します。

色変更の適用がされると、検量線(Standard curve)とAmplificationのThreshold lineの色が変更されています。

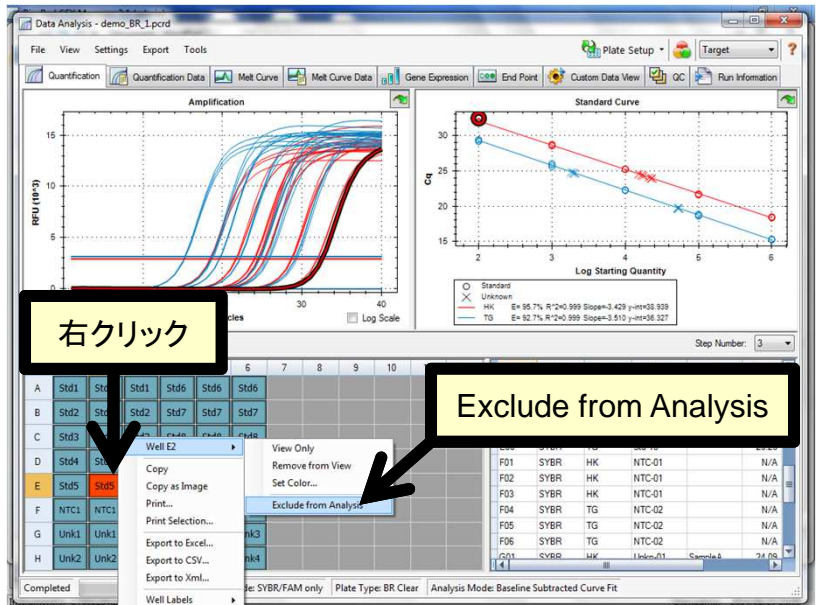


データポイントを一時的に除外するには？

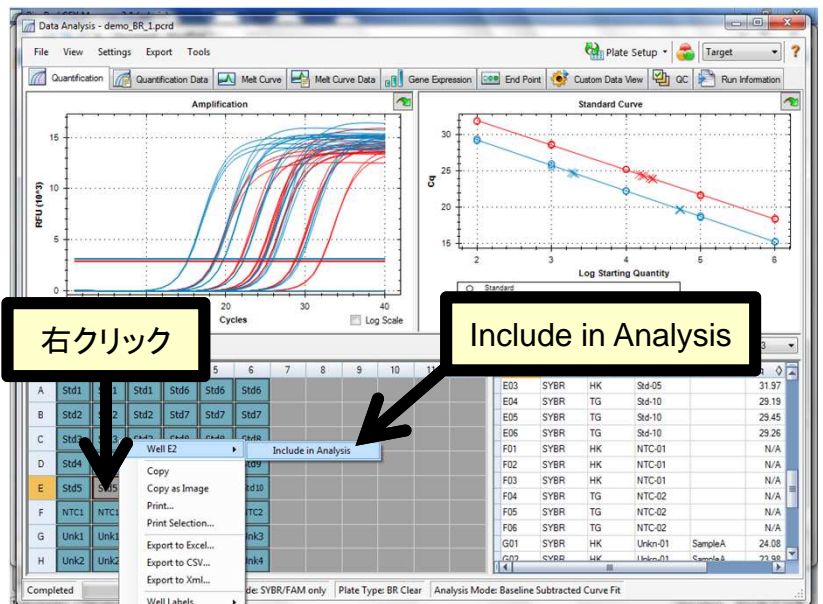
Quantificationタブで解析から除外したいデータポイントがある場合、Amplificationグラフの除外したい蛍光増幅曲線の上で右クリックすると、表示されるメニューにExclude from Analysisが表示されます。それを選択すると一時的に解析から除外されます。



Well Selectorでも除外したいウェルの上で右クリックすると、表示されるメニューにExclude from Analysisが表示されます。



除外したデータポイントを戻すには、Well Selectorの該当ウェル上で右クリックして表示されるメニューから、Include in Analysisを選択します。選択すると、解析に含まれるようになります。

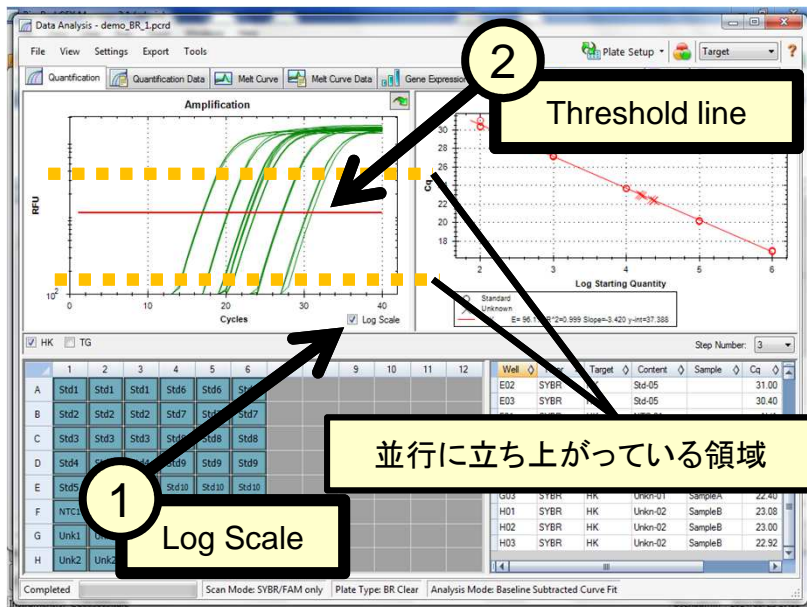


Threshold lineをマニュアルで変更するには？

Threshold lineはマニュアルで変更する場合には、2つの方法があります。

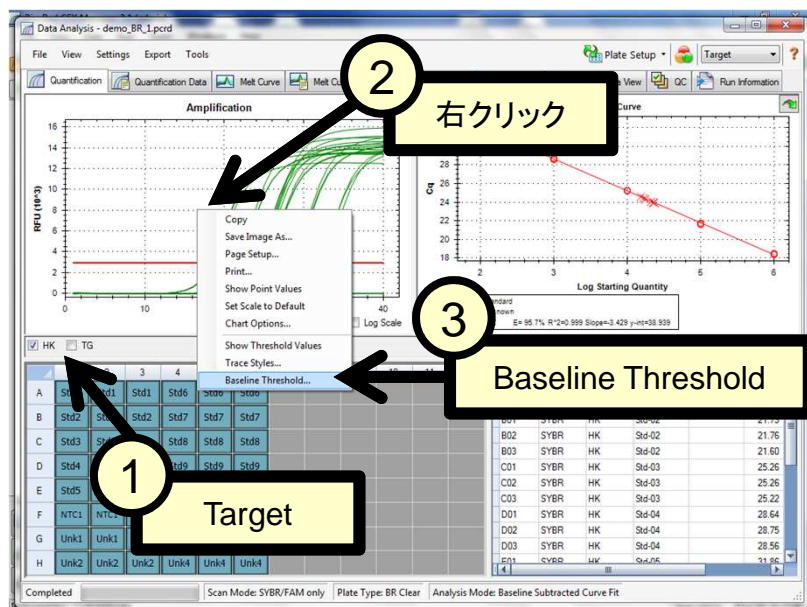
直接Threshold lineをドラッグ

1. Log Scaleにチェックをつけて、縦軸をLogに変更します。
2. 検量線がない場合、Threshold lineを増幅曲線が並行に立ち上がる領域の中心に設定します。検量線がある場合、検量線の相関係数(R^2)が最も高くなるように、Threshold lineをドラッグして決定します。



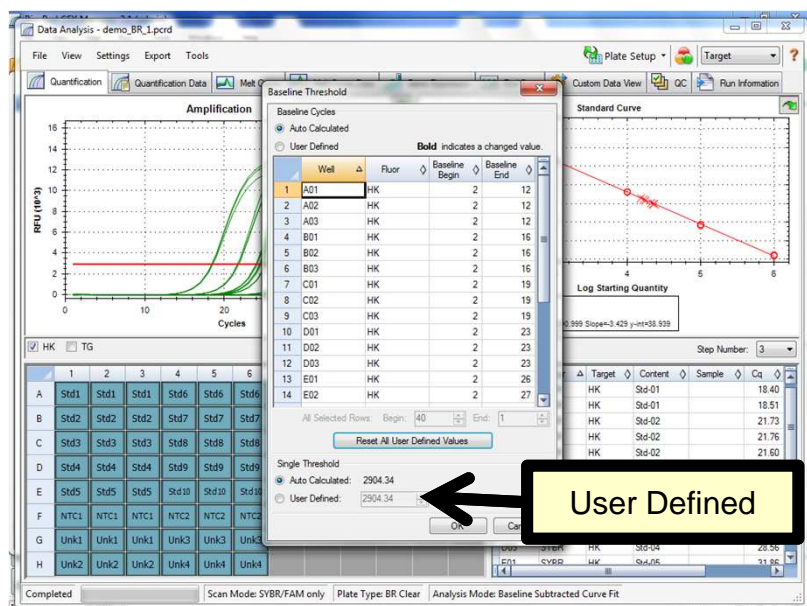
数値での指定 (Baseline Threshold)

1. Amplificationグラフの下にあるTargetで設定したい1つのTargetのみ残して他のチェックは外します。
2. Amplificationグラフ上で右クリックします。
3. 表示されるメニューからBaseline Thresholdを選択します。



Baseline Thresholdウインドウの下部にあるSingle ThresholdのUser Definedを選択して、数値を入力します。

元のAutoに戻すには、Auto Calculatedを選択します。



Gene ExpressionのBar Chart以外にはどういうグラフがありますか？

Gene ExpressionのグラフにはBar Chart(棒グラフ)以外に、4種類のグラフがあります。2つのサンプル間で多くの遺伝子を比較する場合などに適しています。

Clustergram

サンプル間で多数の遺伝子の発現(促進、抑制と単純化)を比較して、パターン別(階層化)に分けて系統樹解析を行います。同じようなパターンを示す遺伝子群などを発見できやすくなります。

Scatter Plot

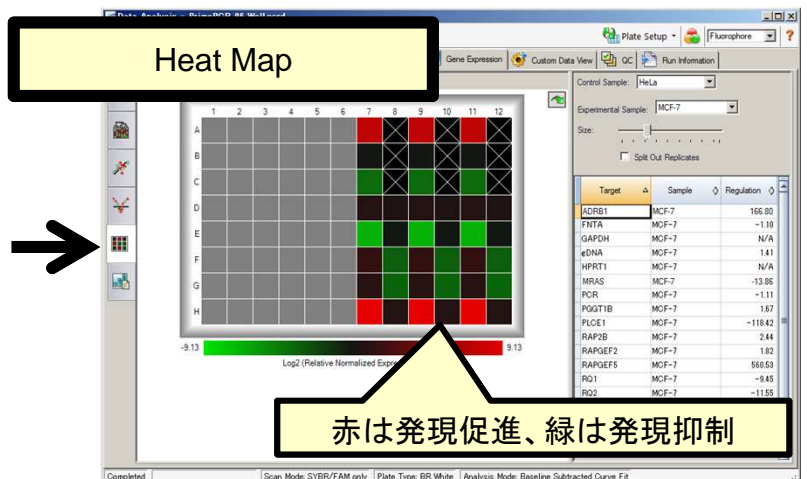
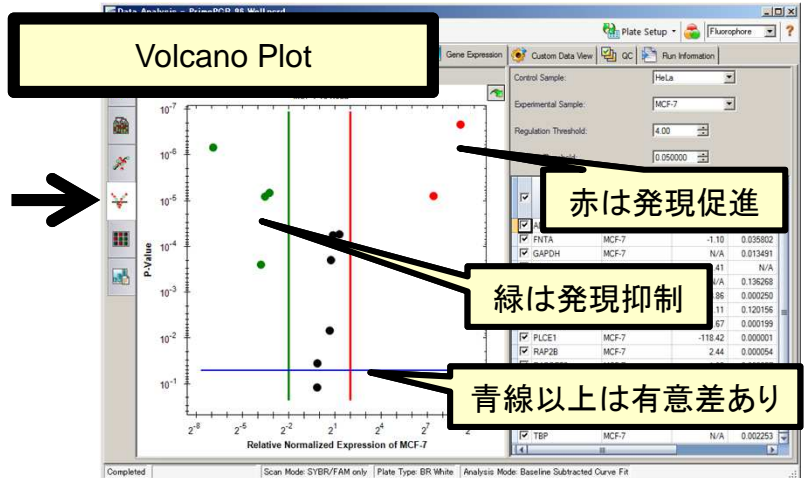
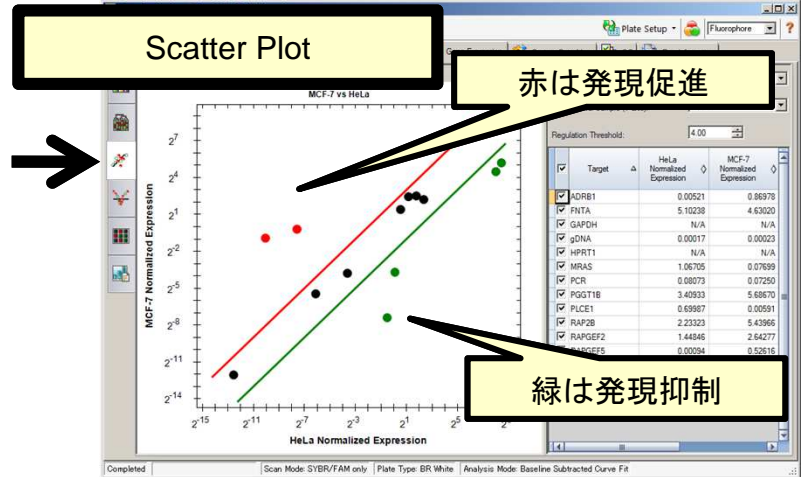
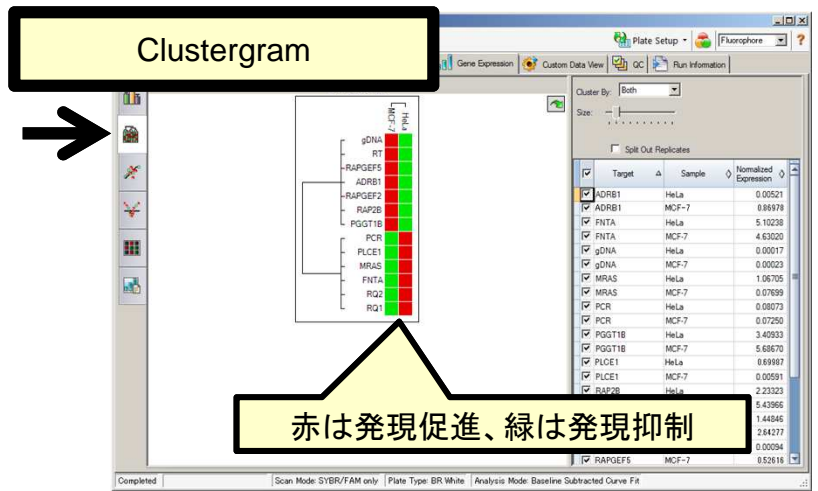
2つのサンプル間で各遺伝子の発現量をプロットして比較します。より発現が促進されている、もしくは発現が抑制されている遺伝子を見つけやすくなります。

Volcano Plot

2つのサンプル間で各遺伝子の発現量と同時に有意差(p値)があるかどうかを同時に表示します。発現量の違いが統計的に有意差があるかどうかを確認できます。

Heat Map

プレートマップ上で、どこのウェルの発現量が多いか、少ないかを示します。色の濃さで発現の促進と抑制程度をウェル(遺伝子)別に確認できます。

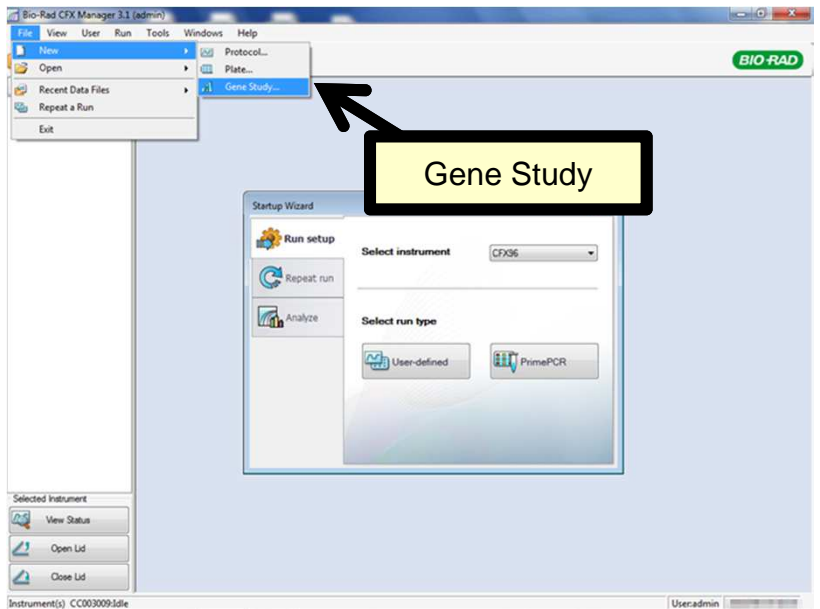


Gene Expressionの複数のデータを統合して表示させるには？

複数のデータファイルを統合して一つのグラフにまとめる機能をGene Studyと呼びます。

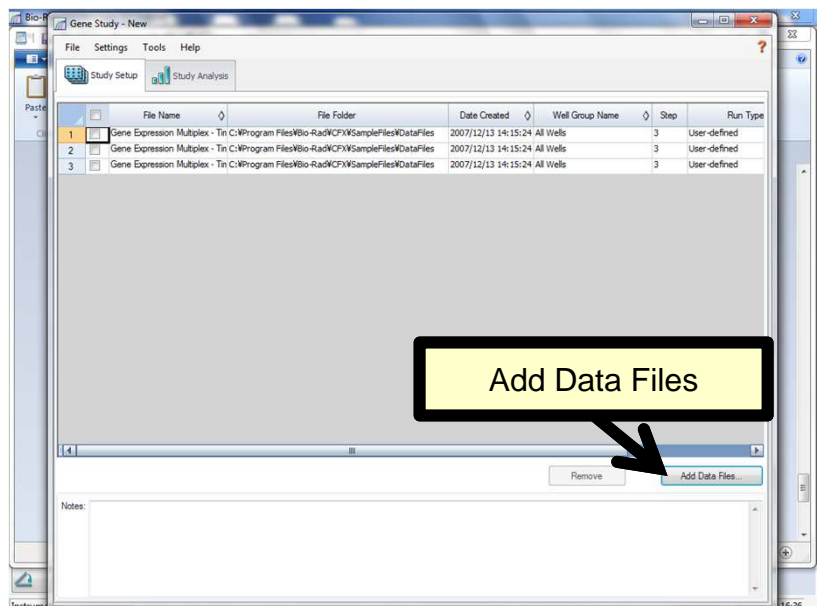
メインメニューからFile > New > Gene Studyを選択します。

注: Gene Studyを利用するには、各データファイルでGene Expression解析の設定を事前に行なっておく必要があります。



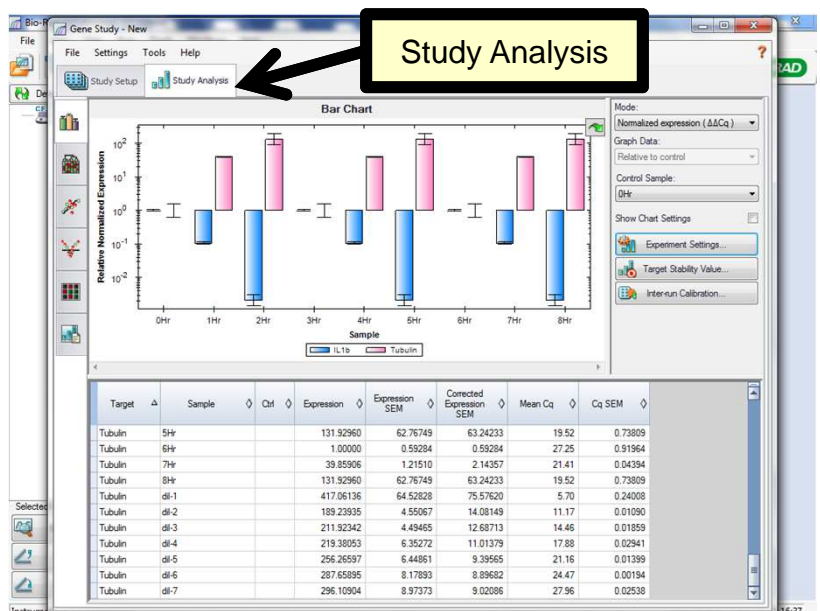
Add Data Filesボタンをクリックして、統合したいデータファイル(.pcrd)を複数選択します。

選択されたデータファイルはリスト表示されます。



Study Analysisタブをクリックすると、統合された結果が表示されます。

Control Sampleを改めて設定し直します。



Gene Expressionでサンプルグループ間の比較を行うには？(群比較)

Gene ExpressionではSample Nameとは別にBiological Set Nameを設定することで、サンプルグループ間での遺伝子発現解析を行うことができます。

Plate Editorを呼び出し(26ページ参照)、Plate Editorウィンドウの下部にあるBiological Setにチェックを入れます。

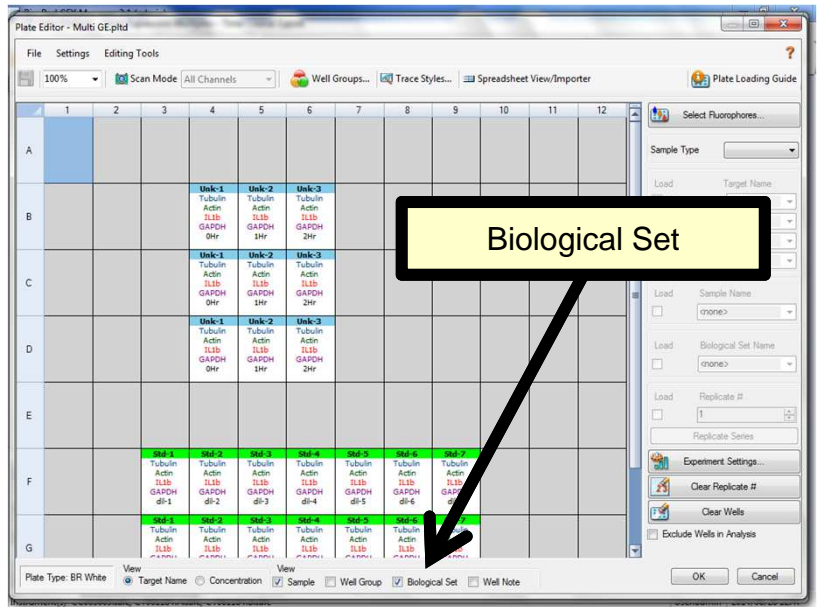
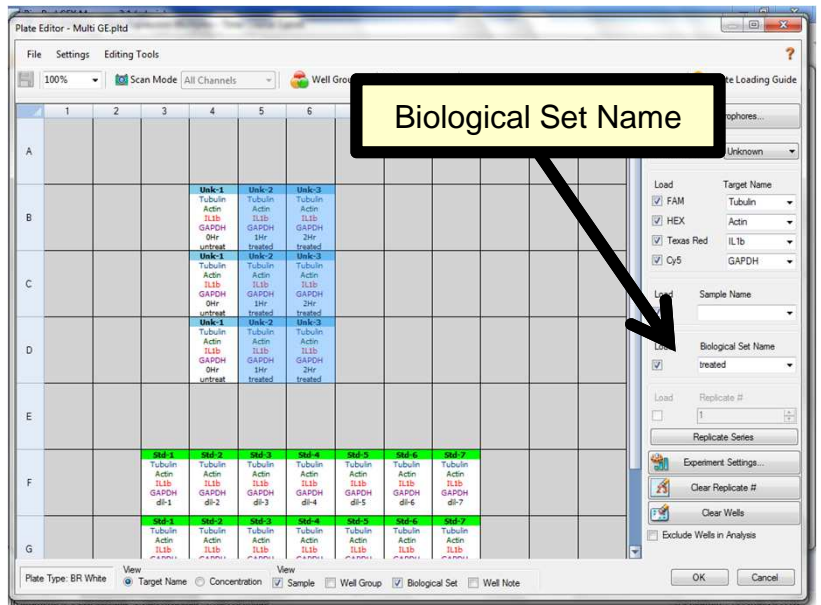


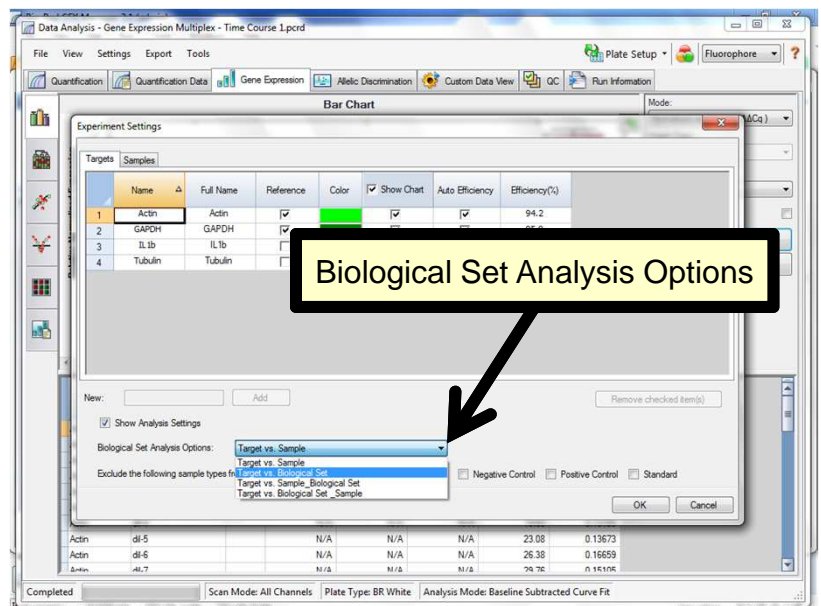
Plate Editorウィンドウのプレート上のウェルを選択して、Biological Set Nameにサンプルグループの名称を入力します。

解析を行いたいサンプルグループ全てに名称を入力した後、OKボタンをクリックして、設定を保存し、Plate Editorウィンドウを閉じます。



Gene ExpressionのExperiment Settingsを呼び出し(29ページ参照)、Experiment Settingsウィンドウの下部のBiological Set Analysis OptionsドロップダウンメニューからTarget vs Biological Setを選択することで、サンプルグループ間の発現量比較グラフが表示されます。

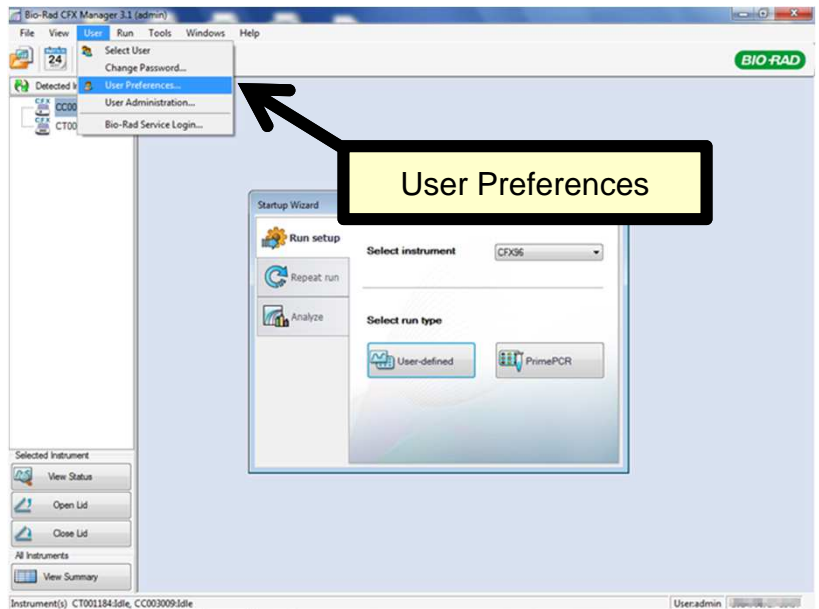
Biological SetはGene Studyでも利用できます。



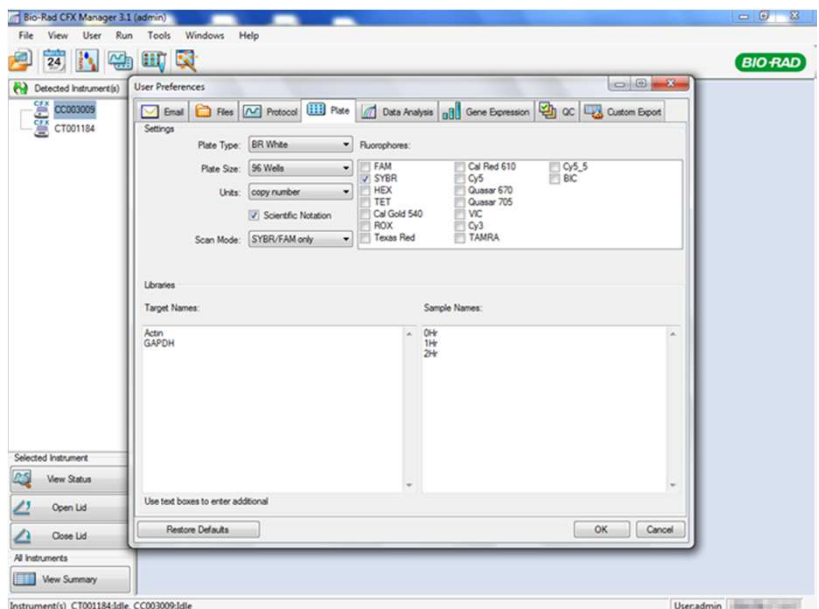
ユーザー設定 (User Preferences) を変更するには？

User Preferencesにてデフォルトのユーザー設定を変更することができます。

メインウインドウメニューのUserからUser Preferencesを選択することで、呼び出します。

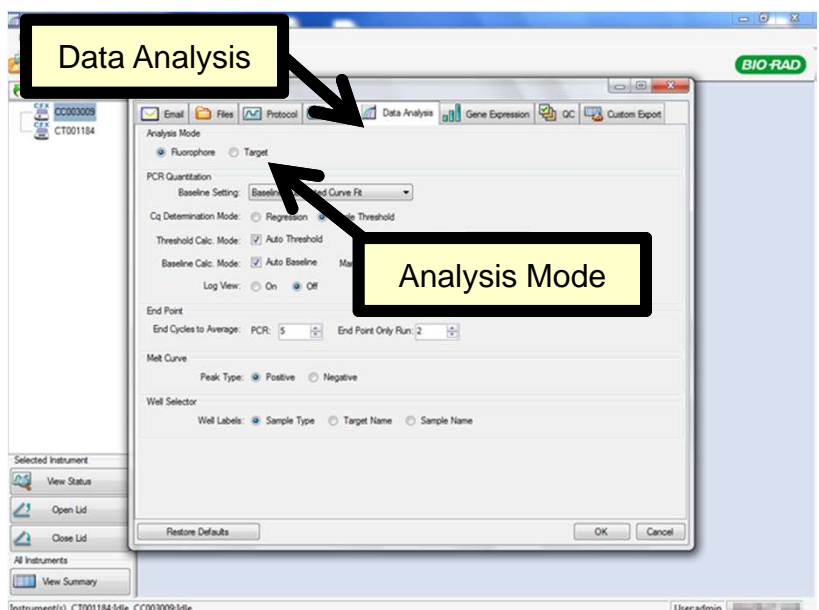


ProtocolタブやPlateタブで設定を変更することで、新規でのProtocolやPlate作成を行なった時のデフォルト設定を規定できます。



Data AnalysisタブではAnalysis Modeのデフォルト設定をTargetモードに変更することも可能です。

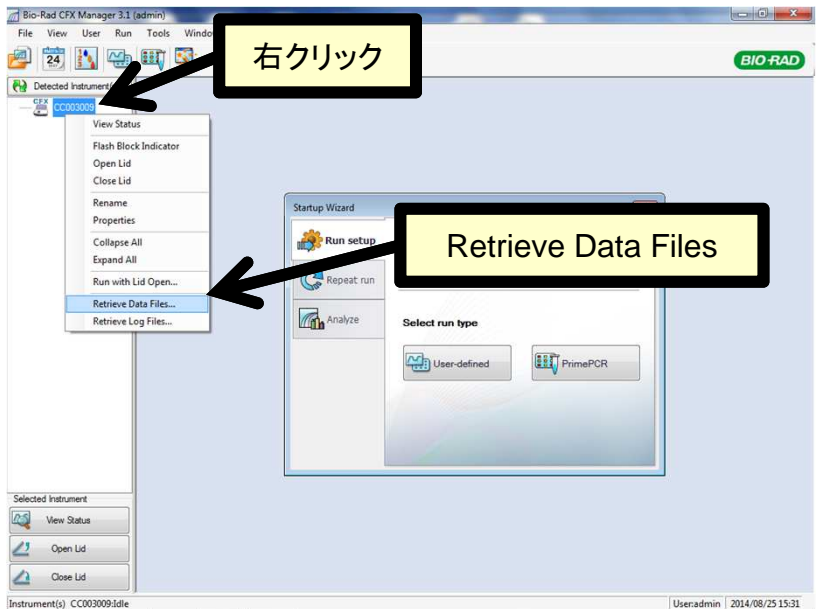
デフォルト設定を変更すると、ランが終了した時点で、Targetモードでの解析状態になりますので、Fluorophoreモードからの変更は必要無くなります。



装置本体に保存されているデータを回収するには？

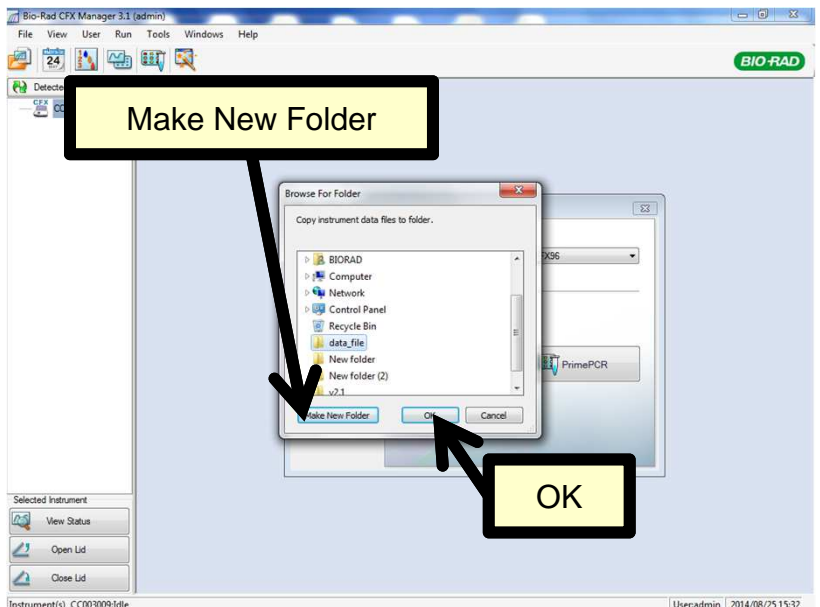
ラン開始時にデータファイル(拡張子.pcrd)はPC内に自動保存されますが、不測のトラブルでデータファイルがPCから紛失した場合、本体に保存されているデータを回収して解析することができます。

接続されている装置のアイコン上で右クリックして表示されるメニューから Retrieve Data Filesを選択します。



PC上にデータを保存する場所を指定するウィンドウが表示されます。新しくフォルダを作って(Make New Folder)、そのフォルダを指定して、OKボタンを押します。

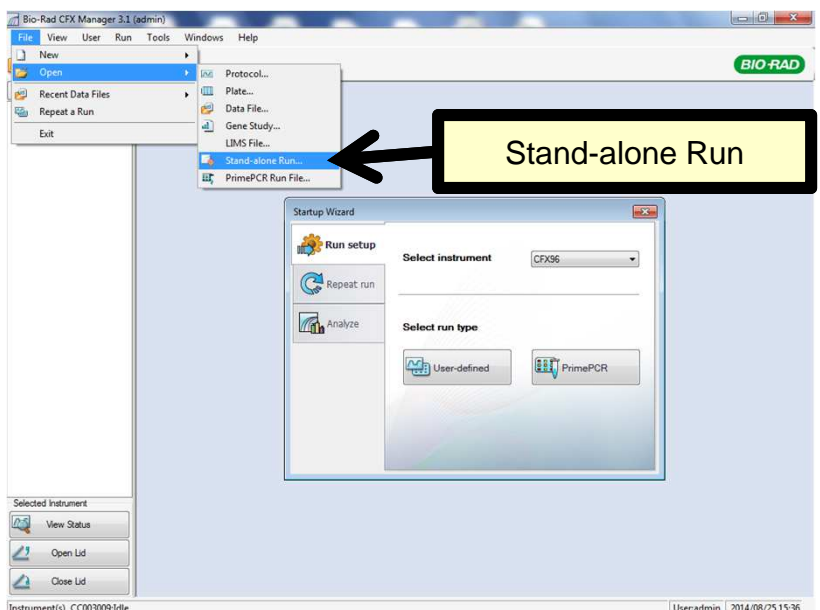
指定したフォルダに、本体に保存されているデータ(直近の最大20ファイル)が保存されます。



保存されたデータ(拡張子.zpcr)はまだ解析用のデータファイルではないため、変換作業が必要です。

メインメニューからFile > Open > Stand-alone Runを選択して、変換したいzpcrファイル(ランの日付と時間がファイル名になっている)を選択して開くと、変換後のpcrdファイルの保存場所を指定します。

保存された後、データの解析画面が表示されます。





バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本社 〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-24
天王洲セントラルタワー20F

Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

大阪 〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11

Tel : 06-6308-6568 Fax : 06-6308-3064

福岡 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-5-28

Tel : 092-475-4856 Fax : 092-474-5580

製品の学術的なお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com