



LightCycler® 480 簡易操作ガイド ver.1.5.1

---

# 定量解析について

Software Version 1.5.1



本マニュアルは、機器操作の概要を説明したものです。

本資料に記載の情報・説明・仕様等は予告なく変更されることがございます。

より詳しい操作やスペック、知的財産に関する情報は、製品に添付される公式マニュアルをご参照ください。

For life science research only.

Not for use in diagnostic procedures.

2021年6月 最終更新

## 目次

1 章 システム概要.....	5
2 章 LightCycler® 480 本体の起動と終了 .....	8
2-1. 本体の起動 .....	8
2-2. コンピュータとソフトウェアの起動 .....	9
2-3. コンピュータと機器本体のシャットダウン .....	11
3 章 プロトコールの設定 .....	12
3-1. プロトコールの作成 .....	12
3-2. テンプレートの保存 .....	18
3-3. ランファイルの保存 .....	19
4 章 リアルタイム PCR をスタートする .....	20
4-1. マルチウェルプレート /8 連ストリップの挿入と取り出し .....	20
4-2. ランのスタート .....	21
5 章 サブセットの設定 .....	22
6 章 サンプルエディターの設定 .....	23
6-1. 絶対定量の場合 .....	23
6-2. 相対定量の場合 .....	24
6-3. オートスタンダードによる設定 .....	30
7 章 解析を行う .....	31
7-1. 絶対定量解析 .....	31
7-2. 相対定量解析 .....	41
7-3. 融解曲線分析 .....	45
7-4. データのエクスポート .....	47
8 章 レポートを作成する .....	49
付録 .....	51
A. マルチカラーアッセイについて .....	52
B. ログファイルの回収方法 .....	61
C. バックアップとインポート .....	63
D. 機器の再接続 .....	67
E. 専用試薬・消耗品のご案内 .....	69

LightCycler®480 の機器トラブル、お問い合わせは、下記までお問い合わせください。

日本ジェネティクス株式会社  
03-3813-0961  
e-mail: [info@genetics-n.co.jp](mailto:info@genetics-n.co.jp)

## はじめに

リアルタイムPCRとは、PCRによる増幅をリアルタイムに測定することで、鋳型となるDNAの定量や検出を行う方法です。様々なアプリケーションがありますが、このマニュアルではLightCycler®480を使用して定量解析を行うための方法を記載します。リアルタイムPCRを用いた定量解析には、目的とするデータの種類により、大きく分けて絶対定量と相対定量の2種類があります。

### 絶対定量

サンプル中に含まれるターゲット遺伝子の絶対数（コピー数）を定量する解析です。必ず既知濃度のサンプルを用いて検量線を作成する必要があります。

#### 【例】

ウイルスや細菌数の定量  
遺伝子組換え食品の検出・定量

### 相対定量

サンプル間でのターゲット遺伝子の発現量の比較を行う解析です。必ずしも発現量の絶対量を知る必要はなく、基準とするサンプル（キャリブレーター）と比較して、何倍に増えたか、または減ったかという比較を行います。

相対定量には相対比の求め方がいくつかあります。

スタンダードカーブ法	未知サンプルと同時に検量線サンプルの反応を実施し、検量線より定量結果を算出する
$\Delta\Delta C_p$ 法	PCR増幅効率が100%という仮定のもとに算出する
E-メソッド法	あらかじめ検量線から得られたPCR効率を用いて算出する

#### 【例】薬物刺激試験時のターゲット mRNA 発現量の相対定量



	薬剤刺激なし (Calibrator)	薬物刺激あり (Unknown)
ターゲット遺伝子の数	6	18
リファレンス遺伝子の数	4	6
ターゲット遺伝子数 / リファレンス遺伝子数	1.5	3
相対比	1	2

## 必要な試薬とその調製

LightCycler®480の推奨反応容量は20 µLですが、実験系にあわせて96 Well Block Typeでは10~100 µL、384 Well Block Typeでは5~20 µLでもご利用いただけます。

なお、このガイドは典型的な組成を記載しています。詳細は試薬付属のプロトコールをご参照ください。

### ○反応プレートの作製（反応容量 20 µL の場合）

1. サンプルDNA溶液を目的濃度/5 µLに調製
2. 必要反応数+α（5~10%）のリアクションミックス（サンプルDNA以外の溶液ミックス）を作製
3. リアクションミックスをホワイトプレートあるいはホワイト8連ストリップに15 µLずつ分注
4. サンプルDNA溶液を5 µLずつ添加
5. プレートの場合はシールをし、付属のヘラで全体をよく押さえつける。8連ストリップの場合はキャップをする。
6. 約2,000 x gで2分間遠心する。
7. 機器にセットして反応を開始

#### 【注意】 プレートの使いまわし

一度測定に使用したプレートやチューブの使いまわしを行いますと、先に使用したウェルに入っている蛍光色素が、RUN開始時点に行われる「機器の蛍光取得時間の調整」に影響を与えます。

結果として、蛍光を測定するIntegration Timeが短くなり、正しい結果が得られなくなるため、使いまわしは原則行わないでください。

使いまわしの例)

- ① 1回目のRUNで、96ウェルプレートの半分を使用し、2回目のRUNでもう半分を使用する。
- ② 測定済みの8連チューブを、バランスとして使用する。

### ○マスターミックス組成表

SYBR Green 試薬 : LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Cat.No. 04707516001)			
試薬	1反応 (µL)	終濃度	XX reactions
LightCycler 480 SYBR Green I Master	10.0	1 x	
Forward Primer (20 µM=pmol/µL)	0.5	500 nM (200~1000 nM)	
Reverse Primer (20 µM=pmol/µL)	0.5	500 nM (200~1000 nM)	
Water, PCR-grade	4.0		
cDNA, DNA溶液	5.0	~100 ng	
Total Vol.	20.0		

※逆転写反応溶液の持ち込みは、反応ボリュームの10%までとなるようにしてください。

Probe試薬 : LightCycler® 480 Probes Master (Cat.No. 04707494001)			
試薬	1反応 (µL)	終濃度	XX reactions
LightCycler 480 Probes Master	10.0	1 x	
Forward Primer (20 µM=pmol/µL)	0.5	500 nM (300~1000 nM)	
Reverse Primer (20 µM=pmol/µL)	0.5	500 nM (300~1000 nM)	
Probe (10 µM=pmol/µL)	0.4	200 nM (50~200 nM)	
Water, PCR-grade	3.6		
cDNA, DNA溶液*	5.0	~500 ng	
Total Vol.	20.0		

※逆転写反応溶液の持ち込みは、反応ボリュームの10%までとなるようにしてください。

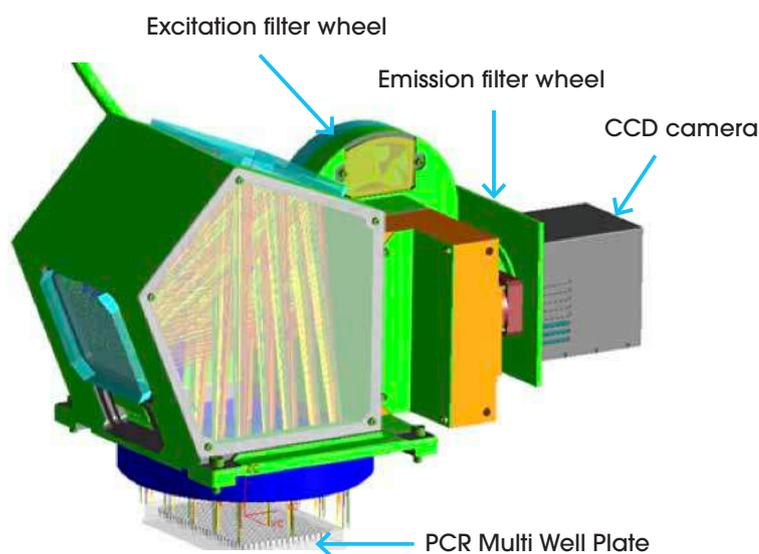
# 1章 システム概要

## 主な仕様について

ハードウェア		
温度制御方式	ペルチェ素子/Therma-Base方式	
ブロックタイプ	96あるいは384ウェルブロック	
蛍光励起光源	High-power broad spectrum LED	
検出器	冷却モノクロCCDカメラ	
光学システム	5励起波長/6検出波長	
フィルター	励起波長 (nm) ; 440, 465, 498, 533, 618 検出波長 (nm) ; 488, 510, 580, 610, 640, 660	
対応蛍光色素	LightCycler Cyan 500 SYBR Green I FAM Yellow555 HEX VIC LightCycler Red 610 LightCycler Red 640 Cy5 Cy5.5 など	
コンピュータ	Windows XP, 7, 8, 10	
データ解析	■ 絶対定量 ■ 相対定量 ■ 融解曲線解析 ■ エンドポイントジェノタイピング ■ メルトカーブジェノタイピング ■ HRM (オプション)	
検出フォーマット	インターカレーター色素	SYBR Green I, ResoLight
	加水分解プローブ	UPLプローブなど
	ハイブリダイゼーションプローブ	HybProbe
データエクスポート	Result table : テキストファイル Charts : テキスト,XML,HTMLファイル、各種イメージファイル	
データインポート	サンプルシート情報 : テキストファイルからインポート可能	
マルチプレックス	4色まで可能	

## Detection Unit :

- 励起光源は高輝度広域波長のLEDを採用しており、幅広い波長域の蛍光色素に対応可能です。
- 非常に長い焦点距離により、プレート全体にわたり、均一なデータ取得が可能です。
- ウェルの場所やエッジ効果によるデータのばらつきがなく、パッシブリファレンスダイの添加は不要です。
- 検出ユニットに可動部がなく、定期的なキャリブレーションは不要です。
- 幅広いレンジをカバーする光学フィルターは励起5波長、検出6波長を自由に組み合わせが可能です。

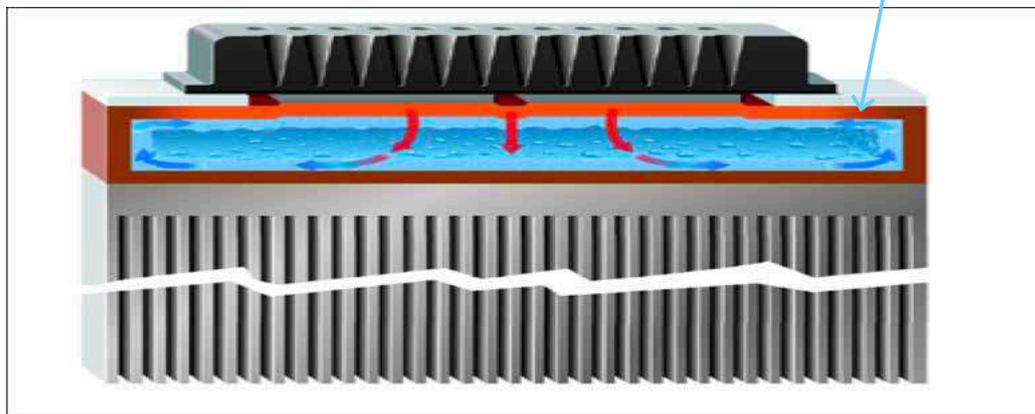
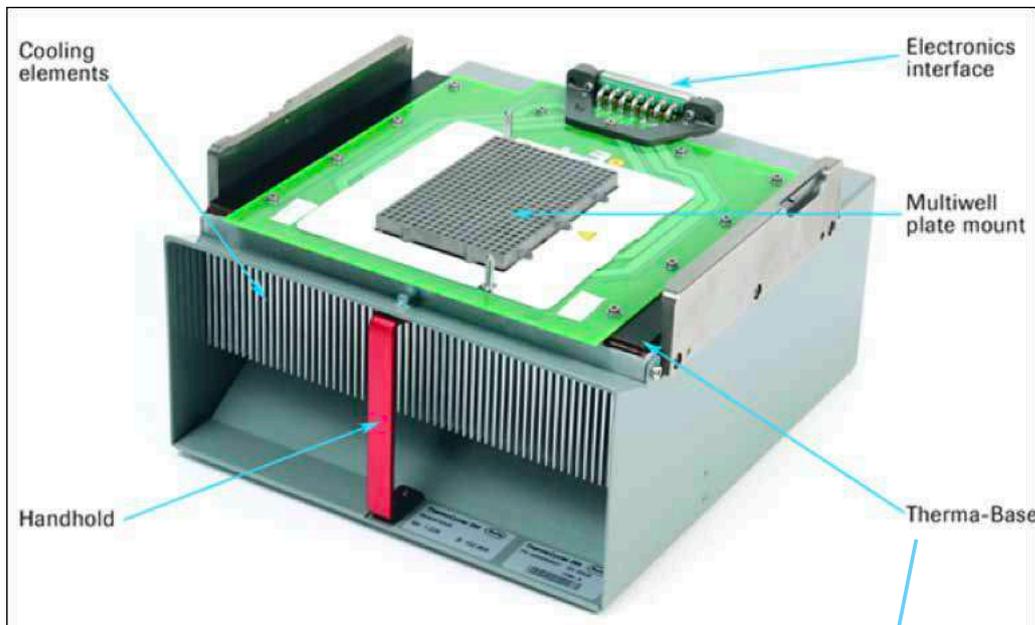


## Filter Set :

蛍光色素	Excitation Filter	Emission Filter	Detection Format
LightCycler® Cyan 500	440	488	4 Color Hydrolysis Probe
SYBR Green I Resolight	465	510	SYBR Green I / HRM
FAM/Fluos	465	510	Mono Color Hydrolysis Probe Dual Color Hydrolysis Probe 3 Color Hydrolysis Probe Multi Color HybProbe
	498	580	4 Color Hydrolysis Probe
VIC / HEX / Yellow555 / Joe	533	580	Dual Color Hydrolysis Probe 3 Color Hydrolysis Probe
LightCycler® Red 610	533	610	4 Color Hydrolysis Probe
	498	610	Multi Color HybProbe
LightCycler® Red 640	498	640	Mono Color HybProbe Multi Color HybProbe
Cy5 / Cy 5.5	618	660	3 Color Hydrolysis Probe 4 Color Hydrolysis Probe
	498	660	Multi Color HybProbe

## Block Cycler Unit :

- Therma-Baseテクノロジーにより、エッジ効果を排除した温度変化を実施可能です。(プレート全体に均一な温度分布)
- 迅速で正確なPCRサイクリングが両立可能です。
- 40cycleの PCR反応: 384 well < 40 分、96 well < 60分で実施
- **メルティングカーブは5分で実施** (SYBR Green Iの系)



PCR 反応ボリューム	5~20 $\mu\text{L}$ (384well) 10~100 $\mu\text{L}$ (96well)	温度制御レンジ	+37°C~+95°C
最大温度上昇速度	4.8°C/秒 (384 well) 4.4°C/秒 (96 well)	最大温度下降速度	2.5°C/秒 (384 well) 2.2°C/秒 (96 well)
温度正確性	±0.2°C (55°C~95°C、ターゲット温度到達後60秒以内において)		

## 2章 LightCycler® 480 本体の起動と終了

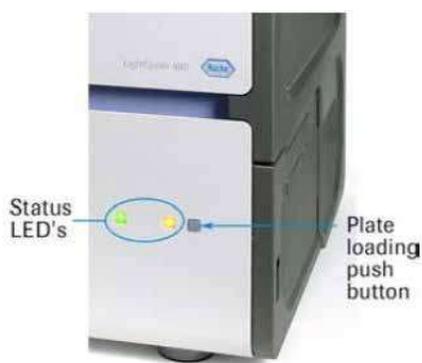
### 2-1. 本体の起動

1. 本体背面の電源ボックスのメインスイッチをONにします。  
(機器正面から見て右側・背面にあります)



2. 本体前面のステータスランプが点灯 (点滅) し、初期テスト (約5分) が自動的に開始します。  
左側のランプの状態を確認してください。

- オレンジ点滅：初期テスト中
- 緑：初期テスト正常終了→機器を御使用頂くことが可能です。
- 赤：初期テスト異常終了→当社までご連絡ください。



#### ⚠ 注意

- 電源を入れると一度プレートローダーが排出されます。まわりに当たるものがないことを確認してください。当たってしまった場合は、キャリブレーションエラーとなり赤ランプが点灯するので、再起動してください。
- プレートが装填されている場合、ローダーが途中で止まった状態になります。  
プレートを取出した後、プレートローディングボタンを押し、ローダーを閉じてください。

## 2-2. コンピュータとソフトウェアの起動

1. コンピュータの電源を入れます。

2. Windows にログインします。

ユーザー名；LC480

パスワード；なし

3. Exor4（データベース）が立ち上がったことを確認します。



4. デスクトップ上の「LightCycler® 480」アイコンをダブルクリックします。

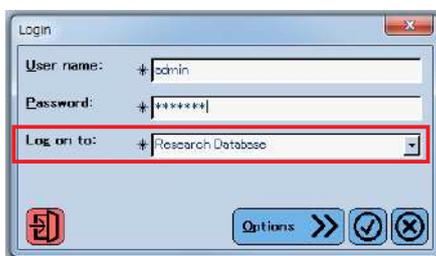


5. LC480 ソフトウェアにログインします。

User name；admin

Password；Master 1

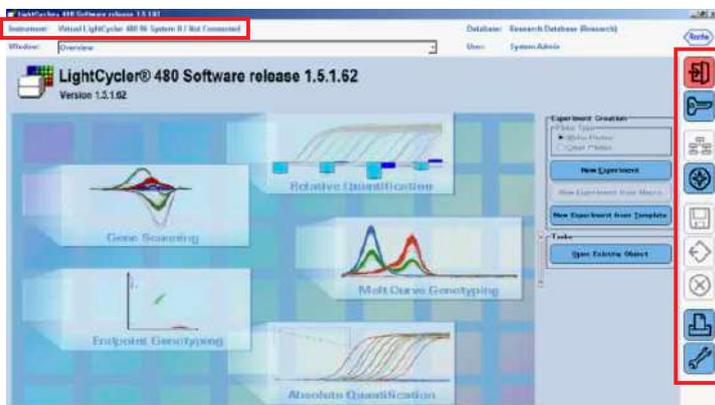
Log on to；Research Database



Traceable Database を選択するとデータの削除ができない等の制限があります。

6. オーバービューウィンドウが表示されます。

コンピュータとソフトウェアが正しく接続されていれば、左上Instrument; LC480/ Standby と表示されます。

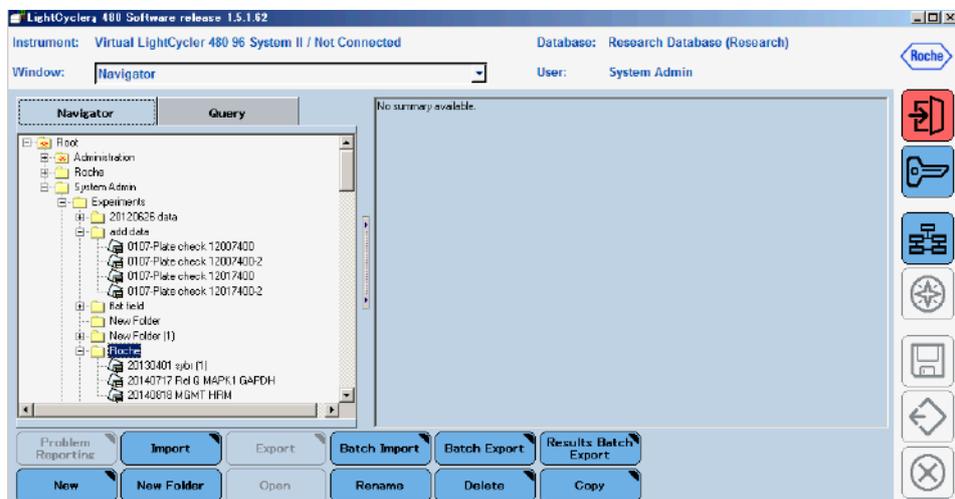


	ソフトウェアを終了します。
	別のデータベースへログインします。
	オーバービューウィンドウを表示し、初期画面に戻ります。
	ナビゲータを表示します。 データへアクセスするためのウィンドウが表示されます。
	開いている実験ファイル を保存、あるいは上書き保存します。
	開いている実験ファイル をデータベースからエクスポートしま す（バックアップ機能）。
	開いている実験ファイル を閉じます。
	プリントアウトします。 * 機器コンポーネントにプリンタは含 まれておりません。

※  (ナビゲータ) ボタンについて

過去データの閲覧、解析やデータの管理を行う際にクリックします。

- ▷ データ名をダブルクリックし、データを開きます。
- ▷ New Folder をクリックし、新しいサブフォルダを作成できます。
- ▷ Rename、Delete、Copy でデータ名を変更、消去、コピーできます。



## White /Clear Plateの使用・設定について

設定がWhite Platesになっている場合は、Roche社純正以外のWhite Plate、Clear Plate、8連チューブを使用することができません。

Roche社純正以外のWhite Plate、Clear Plate、8連チューブを使用する場合、以下の設定を行ってください。

1. オーバービュー画面の右側アイコン群から、「Tools」アイコンをクリックします。
2. 表示される「Tools」のダイアログの左側の選択枝から、「Instruments」を選択します。
3. Instrument Settingsの項にある、Plate Type から使用するPlate Typeを選択します。
  - ・ White Plates : 白色 プレート をデフォルトで使用する場合
  - ・ Clear Plates : 透明プレート をデフォルトで使用する場合
  - ・ Mixed Plates (user configurable) : 白色、透明プレートどちらも使用する場合

\* Barcode Enabledにチェックが入っていると、バーコードを読み込みます。

バーコードがないプレートや、8連チューブを使用する場合は、チェックを外してください。



4. 「Make default」をクリックします。
5. Mixed Plates を選択した場合は、オーバービュー画面の「Experiments Creation」にて白色、透明プレートを選択する事ができます。

## 2-3. コンピュータと機器本体のシャットダウン

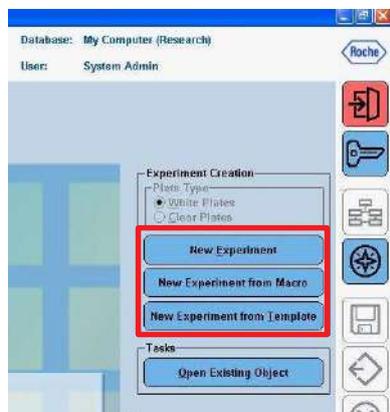
1.  ボタンをクリックし、ソフトウェアを終了します。
2. Windowsの「Start」ボタンをクリックし、「Shut down the Computer」を選択します。  
「Shut Down」をクリックし、終了します。
3. プレートを取り出したことを確認し、本体のメインスイッチをOFFにします。



# 3章 プロトコルの設定

## 3-1. プロトコルの作成

プロトコルの作成方法は以下の3種類から選択できます。



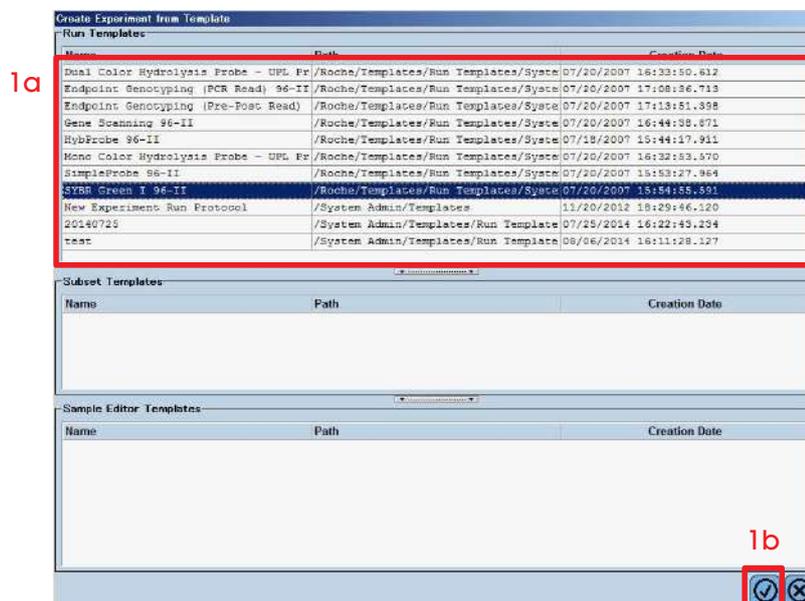
Experiment Creationリスト	
New Experiment	新規にプロトコルを作成します。
New Experiment from Macro	すでに作成済みのマクロファイルがある場合、これ呼び出すことができます。
New Experiment from Template	デフォルトで保存されているロシュのテンプレート（8種類）または過去に保存したテンプレートを呼び出して作成します。

### 3-1-1. テンプレートから新規ファイルを作成する場合（推奨）

1. New Experiment from Template をクリックします。

1a Run Templates よりテンプレートを選択します。

1b チェックボタンをクリックします。



デフォルトで保存されているテンプレートの例

テンプレート名	適用
Mono Color Hydrolysis Probe-UPL Probe	加水分解プローブ用（FAM用）
Dual Color Hydrolysis Probe-UPL Probe	加水分解プローブ用（FAM/ VICあるいはFAM/ Yellow555用）
SYBR Green I	SYBR Green I用テンプレート

2. 選択したプロトコルが表示されます。

▷ プロトコルの作成から解析までは、左側のボタン（※）を上から順に進めていきます。

2a Detection Format の確認をします。変更する場合は、プルダウンより適切なものを選択します。

▷ マルチカラーアッセイを行う場合は使用している蛍光色素に合わせたDetection Format に設定する必要があります。  
15 ページ『3-1-2. 1a』または52 ページ『付録A. マルチカラーアッセイについて』をご参照ください。

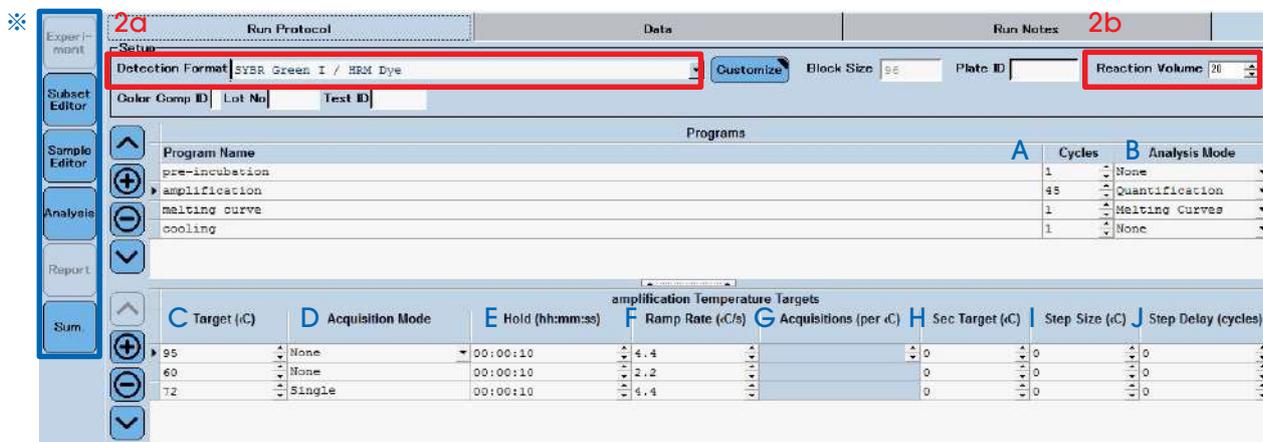
2b Reaction Volume を設定します。

- 96 Well Block の場合：10-100  $\mu$ L
- 384 Well Block の場合：5-20  $\mu$ L

▷ 必要に応じてプロトコルを書き換えます。

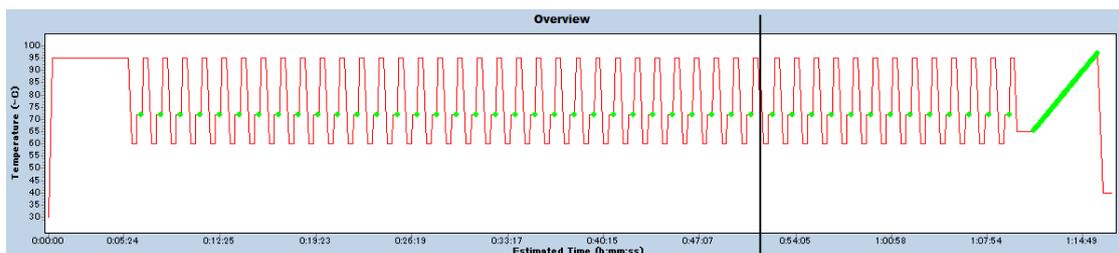
▷ ここで書き換えたプロトコルをテンプレートとして保存することも可能です。

詳細は18 ページ『3-2 テンプレートの作成』をご参照ください。



A	Cycle	サイクル数	1-99サイクル
B	Analysis Mode	解析の種類	None: なし
			Quantification: PCR増幅ステップ
			Melting Curves: 融解曲線分析
			Color Compensation: 色補正データ作成
C	Target	保持温度	37-99°C
D	Acquisition Mode	データ検出モード	None: なし
			Single: 温度保持の最後に1回シグナルを取得します。
			Continuous: 連続的にシグナルを取得します。
E	Hold (hh:mm:ss)	反応時間	00:00:01-12:00:00
F	Ramp Rate (°C/s)	温度の上昇・下降速度	特に指定がない限り変更する必要はありません。
G	Acquisition (per°C)	1°Cあたりに測定する回数	Melting Curveにおいて使用します。
H	Sec Target (°C/s)	タッチダウン後の最終的なターゲット温度	タッチダウンPCRは通常のリアルタイムでは特に指定がない限り使用しません。
I	Step Size (°C/s)	タッチダウンの際、1サイクル毎に変化させる温度	
J	Step Delay (cycles)	タッチダウンPCRを何サイクル目から開始するか	

3. プロトコル全体を確認し 20 ページ『4 章リアルタイムPCR をスタートする』へ進みます。  
 ▶ 必ず Overview に蛍光シグナル取得（緑色の丸印 ●）が含まれていることを確認してください。



**【注意】**

RUN Protocol 設定について

RUN Protocol において、Target の温度は、小数点以下の値を、入力することができません。

整数でご入力ください。

Target (C)	Acquisition Mode	Hold (h:mm:ss)	Ramp Rate (C/s)	Acquisitions (per C)	Sec Target (C)	Step Size (C)	Step Delay (cycles)
95	Some	00:00:10	4.4	0	0	0	0
57	Some	00:00:10	2.2	0	0	0	0
72	Single	00:00:10	4.4	0	0	0	0

### 3-1-2. 新規ファイルを作成する場合

1a Detection Format を選択します。

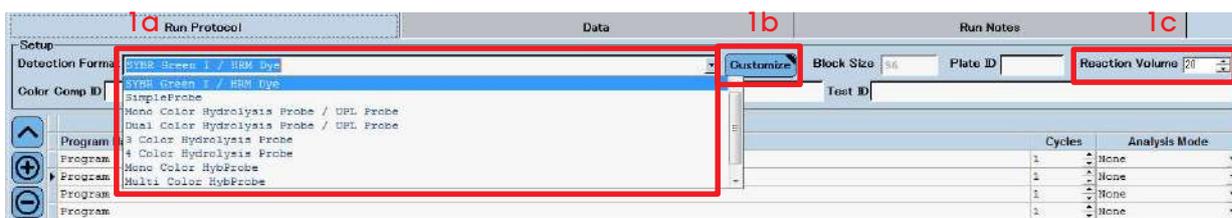
(例)

- SYBR Green I → “SYBR Green I /HRM Dye”
- FAM 標識 Probe / UPL Probe → “Mono color Hydrolysis Probe/ UPL Probe”
- FAM 及び Yellow 555 標識 Probe/ UPL Probe → “Dual color Hydrolysis Probe/ UPL Probe”

1b Customize から選択した Detection Format の励起、検出波長を確認できます。

1c Reaction Volume を設定します。

- 96 Well Block の場合：10-100  $\mu$ L · 384 Well Block の場合：5-20  $\mu$ L



1d Programs 欄左側のボタンを使用して必要に応じた数のセグメントを作成します。

- SYBR Green I の場合 4 つ
- Probe/UPL Probe の場合 3 つ

: プログラムを追加します。 : プログラムの順番を上げます。

: プログラムを削除します。 : プログラムの順番を下げます。

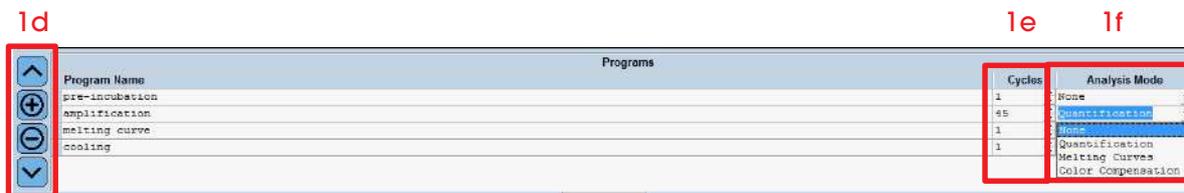
▷ 必要に応じて、Program Name を書き換えます。

▷ 17 ページ『標準的なプログラムの一例』もご参照ください。

1e サイクル数を設定します。

1f Analysis Mode を設定します。

▷ PCR 増幅ステップには Quantification を、融解曲線分析には Melting Curves を選択します。



1g 作成した各プログラムの詳細を Program Temperature Targets に入力します。必要に応じて Program Temperature Targets にもセグメントを追加します。

- SYBR Green I の場合 PCR 増幅プログラムに 3 つ、融解曲線分析に 3 つ
- Probe/UPL Probe の場合 2 つ

1h Target、Acquisition Mode、Hold の設定を行います。

- ▷ 必ず Acquisition Mode のどこかに Single が設定されていることを確認してください。  
詳細は 13 ページをご参照ください。

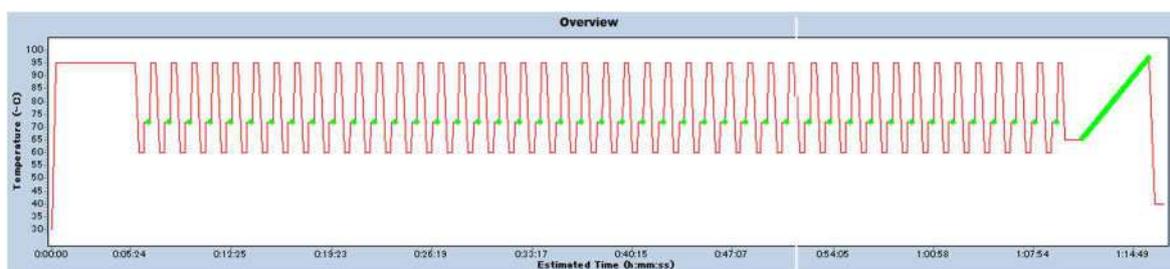
⚠ Single が設定されていないと、蛍光が取得されません。

The screenshot shows the 'Programs' section with a list of steps: pre-incubation (1 cycle, None), amplification (45 cycles, Quantification), melting curve (1 cycle, Melting Curves), and cooling (1 cycle, None). Below this is the 'amplification Temperature Targets' table, which is highlighted with a red box. The table has columns for Target (°C), Acquisition Mode, Hold (hh:mm:ss), Ramp Rate (°C/s), Acquisitions (per °C), Sec Target (°C), Step Size (°C), and Step Delay (cycles). The 'Acquisition Mode' column is highlighted with a red box, and the value 'Single' is visible in the third row. A red '1g' label is placed above the table, and a red '1h' label is placed below it.

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4		0	0	0
60	None	00:00:10	2.2		0	0	0
72	Single	00:00:10	4.4		0	0	0

2. プロトコール全体を確認します。

- ▷ 必ず Overview に蛍光シグナル取得（緑色の丸印 ●）が含まれていることを確認してください。



## 【標準的なプログラムの一例】

○SYBR Green I の場合

Program Name	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold	Ramp Rate	Cycles	Analysis Mode
Pre-incubation	95°C	None	10min	4.4	1	None
Amplification	95°C	None	10sec	4.4	45	Quantification
	60°C	None	10sec	2.2		
	72°C	Single	10sec	4.4		
Melting curve	95°C	None	5sec	4.4	1	Melting Curve
	65°C	None	1min	2.2		
	97°C	Continuous		0.11		
Cooling	40°C	None	30sec	2.2	1	None

○Probe/ UPL Probe の場合

Program Name	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold	Ramp Rate	Cycles	Analysis Mode
Pre-incubation	95°C	None	10min	4.4	1	None
Amplification	95°C	None	10sec	4.4	45	Quantification
	60°C	Single	10sec	2.2		
Cooling	40°C	None	30sec	2.2	1	None

※1 アニール温度はプライマーに依存します。

※2 伸長時間はアンプリコンの長さに依存します。目安としては アンプリコンサイズ (bp) /25=時間 (sec)

## 3-2. テンプレートの保存

プロトコルをテンプレートとして保存しておくことで、次回のランで呼び出すことが出来ます。テンプレートの作成は、ランニングが終了した後も可能です。作成したテンプレートはNew Experiment form Templateから呼び出すことが可能です。呼び出しに関しては12ページ『3-1-1. テンプレートから新規ファイルを作成する場合』をご参照ください。

1. 画面左下にある  ボタンをクリックし、Save as Templateをクリックします。

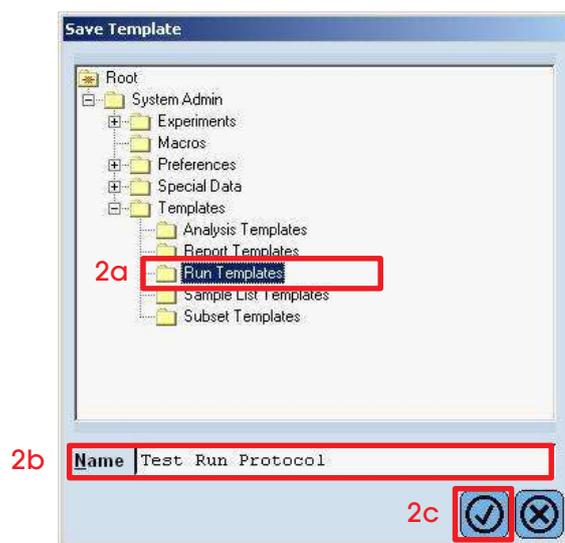


2. 保存先指定の画面が表示されます。

2a テンプレートの保存先を選択します。通常はRun Templateへ保存します。

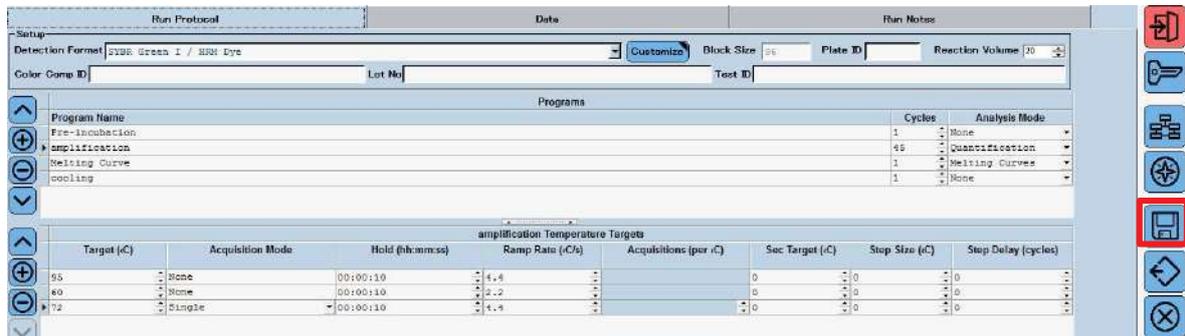
2b 保存するテンプレートに名前を付けます。

2c チェックボタンをクリックします。



### 3-3. ランファイルの保存

1. プロトコルを確認後、保存ボタンをクリックします。

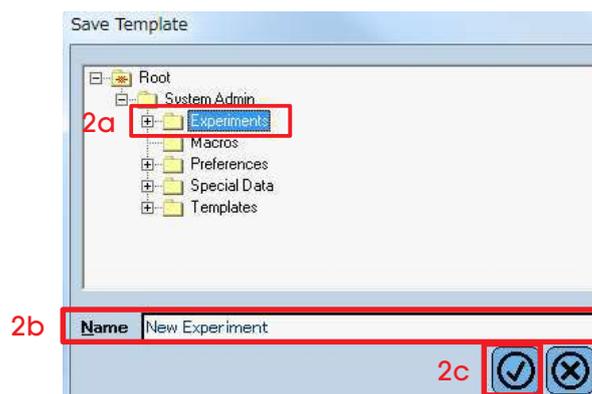


2. ランデータの保存場所設定の画面が表示されます。

2a ランデータの保存先を選択します。通常は Experiments へ保存します。

2b ランデータに名前を付けます。

2c チェックボタンをクリックします。



# 4章 リアルタイムPCR をスタートする

## 4-1. マルチウェルプレート/8 連ストリップの挿入と取り出し

機器正面の2つあるLEDランプのうち、左側がグリーンになった段階で可能となります。  
電源投入後、5分ほどかかります。

利用可能なプレート/8連ストリップ

- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (96ウェルタイプ)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white (384ウェルタイプ)
- LightCycler® 8-tube strips (white) + Adaptor Plate

 上記の白色プレート/ストリップの使用を推奨いたしますが、透明なクリアプレート/ストリップも使用可能です。

1. プレートローディングボタンを押します。



2. プレートローダーが本体右側から出てきます。

3. ブロックタイプに対応した96 または384 ウェルのプレートをセットします。

再度プレートローディングボタンを押し、本体へローディングします。プレートが入ると、右側のランプがグリーンに変わります。



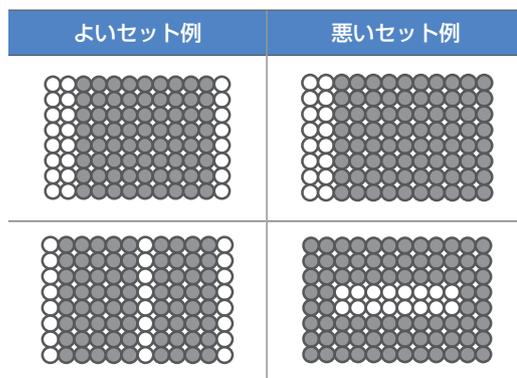
プレートの切り込みを確認し、向きを合わせて挿入します。

▷ 96 ウェルブロックタイプの場合は、アダプタープレートを使用することで、8 連ストリップでのランが可能になります。

LightCycler 8-Tube Strips Adapter Plate (06612598001)

▷ アダプタープレートに8 連ストリップを図のようにセットし、機械に搭載してください。

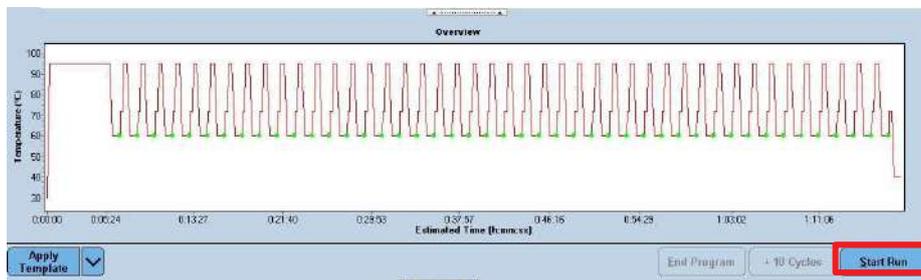
 ランの最後にはCooling のプログラムを入れ、取り出しの際は火傷に注意してください。



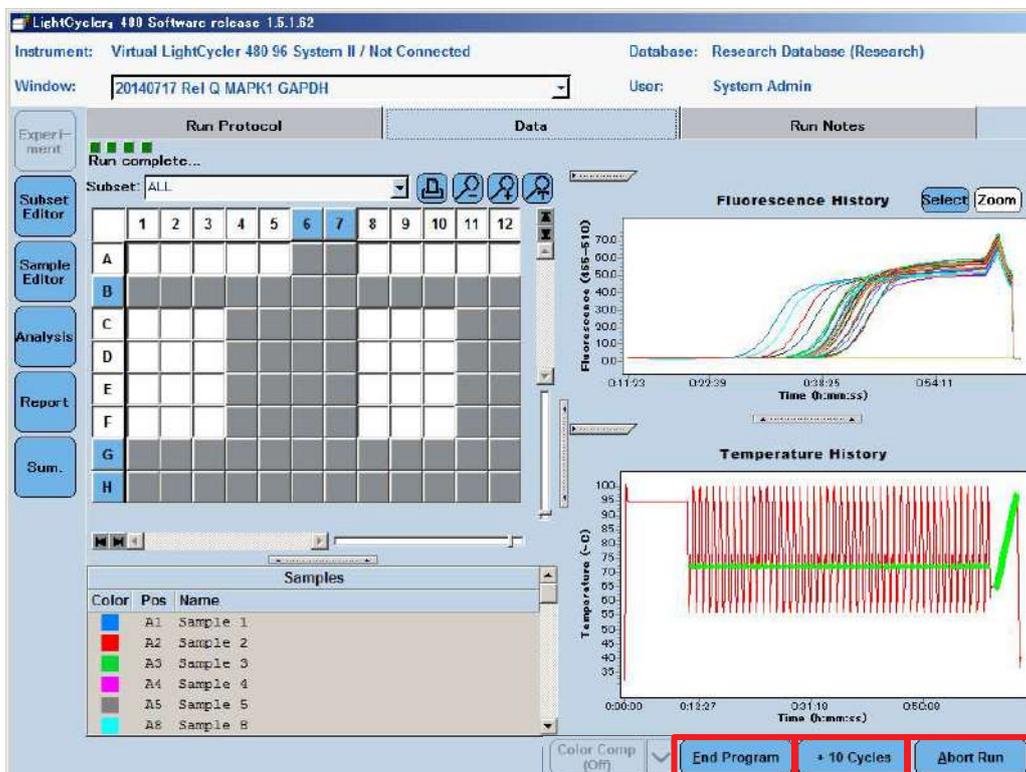
※図中白色部分がチューブセット位置となります

## 4-2. ランのスタート

1. Start Run をクリックし、ランをスタートします。電源投入後、5分ほどかかります。  
 ▷ プレートが挿入されていない場合、Start Run はアクティブになりません。



2. ランがスタートするとData タブに切り替わります。



ランニング中には画面右下の3種類のボタンがアクティブになります。

End Program	現在のプログラムを終了し、次のプログラムに移行します。増幅プログラム中の場合、残りのサイクルは行わず、Melting Curveなど次のプロセスに移行できます。
+10 Cycles	増幅プログラム実行中にサイクル数を追加することができます。
Abort Run	強制的にランを終了させます。このボタンでランを終了させた場合、データは保存されず、 <b>解析を行うことができません。</b>

## 5章 サブセットの設定

サブセットの設定とは、解析に用いるウェルを指定することです。測定に使用していないウェルを解析から除外します。ラン中やラン後でも操作できます。

- ▷ 絶対定量を行う場合 → 遺伝子毎（プライマーセット毎）にサブセットを作成し、グループ分けを行います。
- ▷ 相対定量を行う場合 → ターゲット遺伝子、リファレンス遺伝子の両者を含んだサブセットが必要です。  
ただし、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を別プレートでデータ取得する場合は、絶対定量と同様に、遺伝子毎のサブセットを作成します。

1. Subset Editorをクリックします。
2. サブセット設定画面が表示されます。

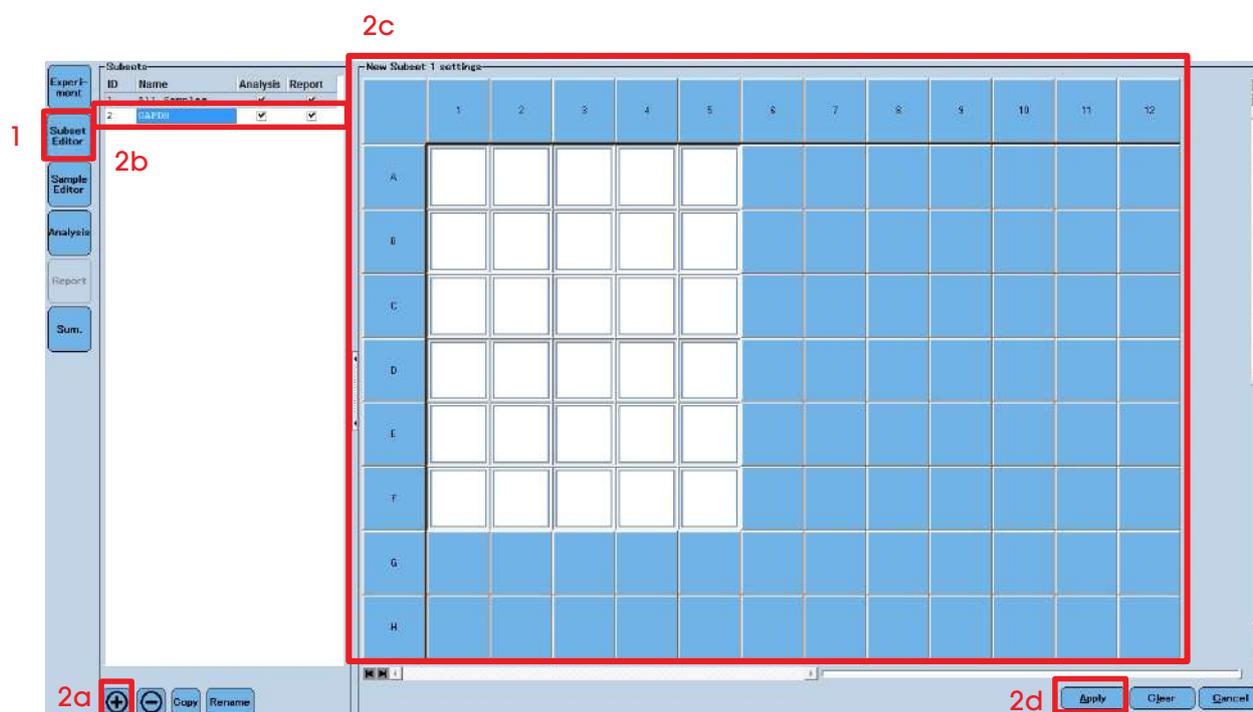
2a  ボタンをクリックし、新しいサブセットを作成します。

2b Nameにサブセット名（遺伝子名など）を入力します。

2c settings内で、設定するウェルを選択します。

- ▷ マウスをドラッグすると連続した領域を選択できます。
- ▷ 列番号または行のアルファベットをクリックすると、列または行を一度に選択できます。
- ▷ Ctrl keyを押しながら各ウェルをクリックし、任意のウェルを追加することができます。

2d Applyをクリックし、ウェルを確定します。



3. 複数のサブセットを作成する場合は、2を繰り返します。

# 6章 サンプルエディターの設定

サンプルエディターの設定とは、サンプル情報の入力です。  
ラン中やラン後でも操作できます。

- ▷ 絶対定量の場合：6-1へ進みます
- ▷ 相対定量の場合：6-2へ進みます

## 6-1. 絶対定量の場合

1. Sample Editor をクリックします。
2. サンプルエディター画面が表示されます。
  - ▷ Step 1, Step 2, Step 3 を順に設定していきます。
  - 2a Step 1 で Abs Quant を選択します。
  - 2b Step 2 で Subset のプルダウンより、情報を入力したいSubset に変更します。
  - 2c Step 2 のプレートレイアウト上でウェルを選択します。

**2a**

Step 1: Select Workflow

Abs Quant     Rel Quant     Scanning     Color Comp

Tm     Melt Geno     Endpt Geno

Select Filter Combinations

465-510

**1**

Subset Editor

Subset: GAPDH

**2b**

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

**2c**

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
A1	Blue	A1	SampleA	Unknown	
A2	Red	A1	SampleA	Unknown	
A3	Green	A3	Sample 3	Standard	1.00E6
A4	Magenta	A3	Sample 3	Standard	1.00E6
A5	Grey	A3	Sample 3	Standard	1.00E6
B1	Blue	B1	SampleB	Unknown	
B2	Red	B1	SampleB	Unknown	
B3	Green	B3	Sample 15	Standard	1.00E5
B4	Magenta	B3	Sample 15	Standard	1.00E5
B5	Grey	B3	Sample 15	Standard	1.00E5
C1	Blue	C1	SampleC	Unknown	
C2	Red	C1	SampleC	Unknown	
C3	Green	C3	Sample 27	Standard	1.00E4
C4	Magenta	C3	Sample 27	Standard	1.00E4
C5	Grey	C3	Sample 27	Standard	1.00E4

Quantification Sample Type

Unknown     Negative Control

Standard

2d Step3のSample Nameを入力します。

▷ 同じサンプル名のは、2cでまとめてウェルを選択し名前を入力することで一度に入力できます。

2e Sample Typeを選択します（下記Sample typeリスト参照）。

▷ Sample TypeでStandardを選択した場合、Concentrationにコピー数を入力します。

▷ 30ページ『6-3オートスタンダードによる設定』もご参照ください。

2f 使用したすべてのウェルにサンプル情報を入力したらレプリケートの設定を行います。

▷ 入力したすべてのウェルを選択します。

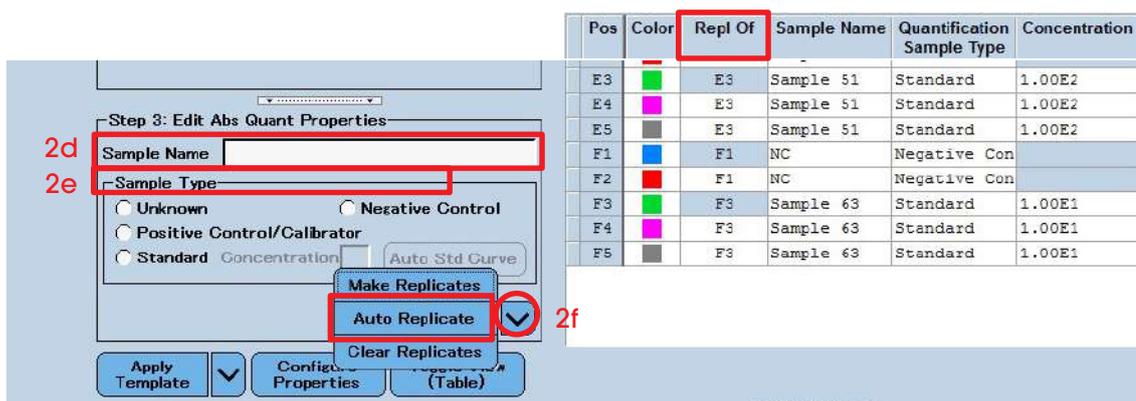
▷ Make ReplicateのプルダウンよりAuto Replicateを選択します。

▷ 右側の表でレプリケートの設定を確認できます。

 すべてを選択した状態で Make Replicates をクリックすると、すべての Sample Name と Sample Type がすべて A1 ウェルと同じになるので注意してください。



- 右側の表より、セル単位でのコピー＆ペーストも可能です。
- Pos をダブルクリックすることで、デフォルトでは A1、A2、A3、A4・・・となっている並びを A1、B1、C1、D1・・・の順番に変更することができます。



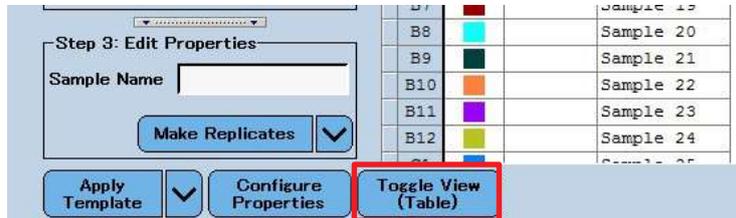
Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
E3	Green	E3	Sample 51	Standard	1.00E2
E4	Purple	E3	Sample 51	Standard	1.00E2
E5	Grey	E3	Sample 51	Standard	1.00E2
F1	Blue	F1	NC	Negative Con	
F2	Red	F1	NC	Negative Con	
F3	Green	F3	Sample 63	Standard	1.00E1
F4	Purple	F3	Sample 63	Standard	1.00E1
F5	Grey	F3	Sample 63	Standard	1.00E1

Sample type リスト	
Unknown	未知サンプル
Standard	検量線作成のためのサンプル（Concentration に数値を入力します）
Positive control	ポジティブコントロールサンプル
Negative control	ネガティブコントロールサンプル（水など）

## ※ビューレイアウトの変更

レイアウトをPlate Viewに切り替えて入力することも可能です。どちらの方法でも、Step2 Subsetの選択までは同じとなります。以下、Plate Viewにて入力する方法を記載します。

1. Toggle View ボタンをクリックし、画面を切り替えてPlate Viewを選択します。



2. プレートレイアウトが表示されます。

2a Step2からウェルを選択します。

2b Step3のSample NameおよびSample Typeを入力または選択します。

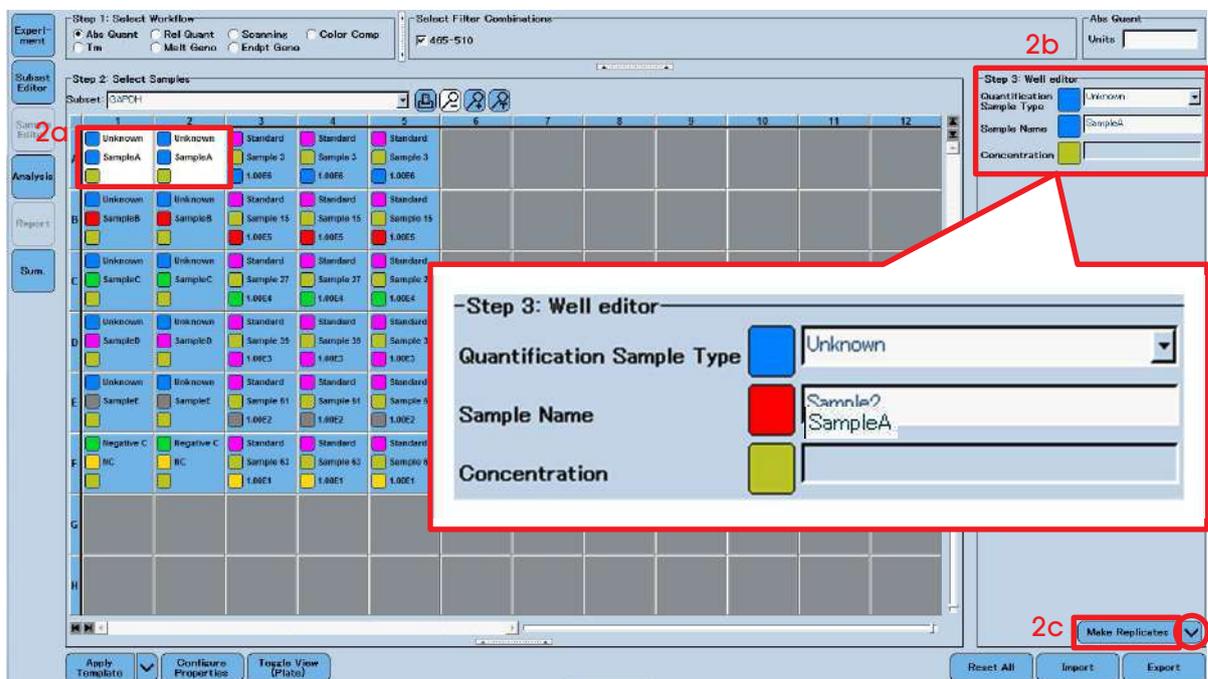
▷ 同じサンプル名のものは、2aでまとめてウェルを選択し名前を入力することで一度に入力できます。

2c 使用したすべてのウェルにサンプル情報を入力したらレプリケートの設定を行います。

▷ 入力したすべてのウェルを選択します。

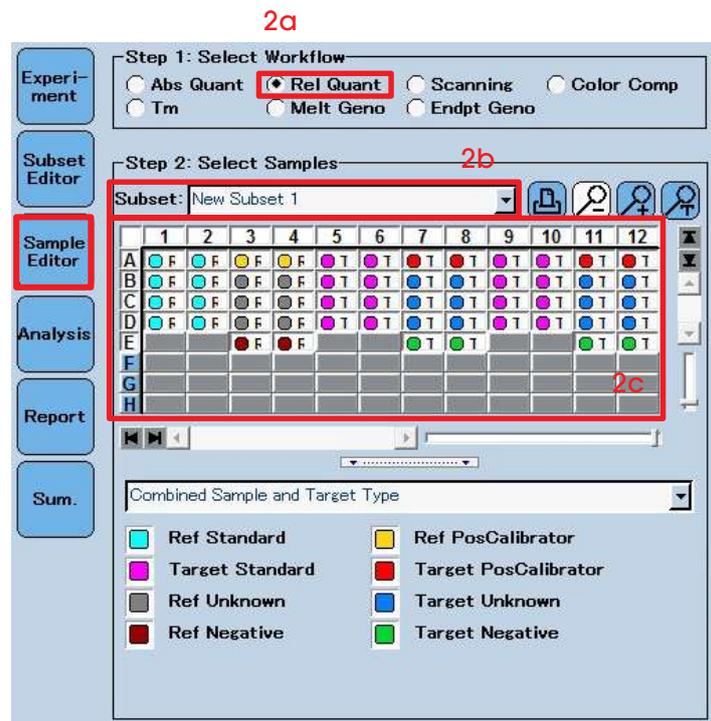
▷ Make ReplicateのプルダウンよりAuto Replicateを選択します。

⚠ レプリケートの確認はTable Viewで行います。



## 6-2. 相対定量の場合

1. Sample Editor をクリックします。
2. サンプルエディターが表示されます。  
▷ Step 1, Step 2, Step 3 を順に設定していきます。
  - 2a Step 1 で Rel Quant を選択します。
  - 2b Step 2 で Subset のプルダウンより、情報を入力したい Subset に変更します。
  - 2c Step 2 のプレートレイアウト上でウェルを選択します。



2d Step3 Sample Nameを入力します。

- ⚠ スペースや大文字、小文字も識別します。入力ミスをするると相対比が算出されません。誤入力を防ぐため、同一の検体名はプレートレイアウトにおいてまとめて選択し、一度に入力することをおすすめします。

2e Sample Type を選択します。(Sample type リスト参照)

- ▷ Sample Type で Standard を選択した場合、Concentration にコピー数や相対値などの数値を入力します。
- ▷ 30ページ『6-3 オートスタンダードによる設定』もご参照ください。

2f 同一の遺伝子を測定しているウェルをすべて選択し、Step2 Gene target の Target Name に遺伝子名を入力します。

2g その遺伝子がターゲット遺伝子か、リファレンス遺伝子か選択します。

2h Eff には PCR 効率を設定することができます。これは Sample Type で Standard を選択していない場合のみ設定することができます。PCR 効率は遺伝子ごとに入力することができます。

2i 2d から 2h の項目は、右側のテーブルで入力することもできます。その場合の Combined Sample and Target Type は 29 ページ『Combined Sample and Target Type リスト』をご参照ください。

2j 使用したすべてのウェルにサンプル情報を入力したらレプリケートの設定を行います。

- ▷ 入力したすべてのウェルを選択します。
- ▷ Make Replicate のプルダウンより Auto Replicate を選択します。
- ▷ 右側の表でレプリケート の設定を確認できます。



- 右側の表より、セル単位でのコピー&ペーストも可能です。
- Pos をダブルクリックすることで、デフォルトでは A1、A2、A3、A4 . . . . . となっている並びを A1、B1、C1、D1 . . . . . の順番に変更することができます。

Sample type リスト	
Unknown	未知サンプル
Standard	検量線作成のためのサンプル (Concentration に数値を入力します)
Positive control	ポジティブコントロールサンプル
Negative control	ネガティブコントロールサンプル (水など)

## ※ビューレイアウトの変更

レイアウトをPlate Viewに切り替えて入力することも可能です。どちらの方法でも、Step2 Subsetの選択までは同じとなります。以下、Plate Viewにて入力する方法を記載します。

1. Toggle View ボタンをクリックし、画面を切り替えてPlate Viewを選択します。

2. プレートレイアウトが表示されます。

2a Step2からウェルを選択します。

2b Step3 Combined Sample and Target Typeをプルダウンより選択します。

▷ 29ページ『Combined Sample and Target Typeリスト』をご参照ください。

2c Step3 Sample Nameを入力します。

 スペースや大文字、小文字も識別します。入力ミスをするると相対比が算出されません。誤入力を防ぐため、同一の検体名はプレートレイアウトにおいてまとめて選択し、一度に入力することをおすすめします。

2d 2bでTarget StandardまたはReference Standardを選択した場合は、Concentrationにコピー数や相対値などの数値を入力します。

 Plate Viewではオートスタンダード機能が使用できません。

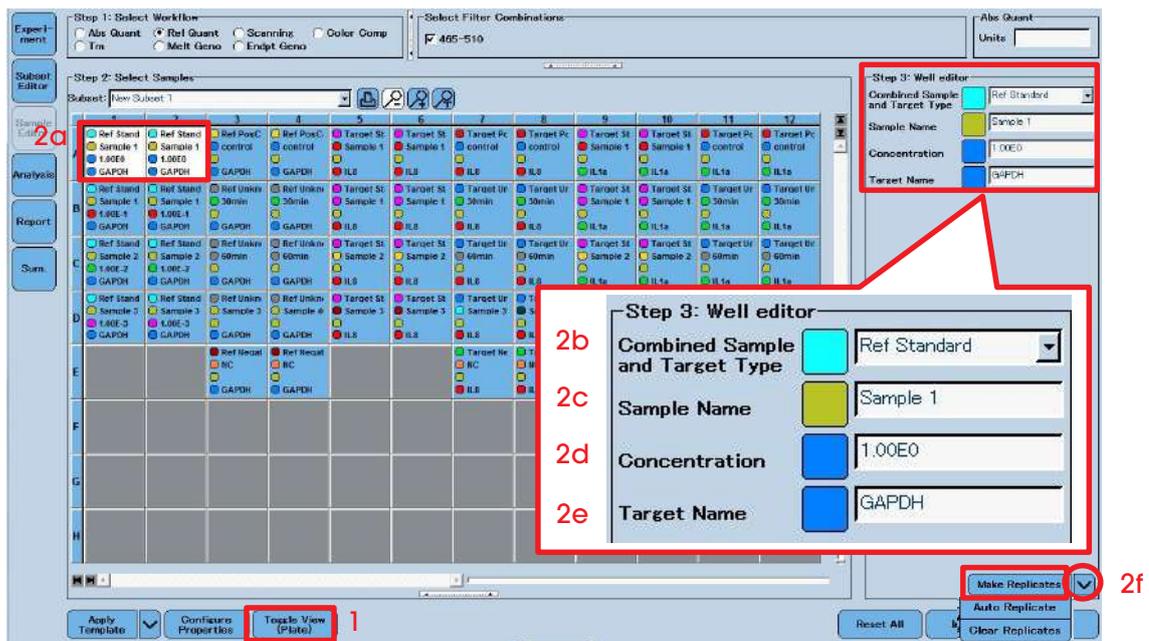
2e Step3 Target Nameを入力します。

2f 使用したすべてのウェルにサンプル情報を入力したらレプリケートの設定を行います。

▷ 入力したすべてのウェルを選択します。

▷ Make ReplicateのプルダウンよりAuto Replicateを選択します。

 レプリケートの設定方法は同じですが、確認はTable Viewで行います。



1

2a

2b

2c

2d

2e

2f

Combined Sample and Target type リスト	
Target Unknown	未知サンプル (ターゲット遺伝子測定)
Target Standard	検量線作成のためのサンプル (ターゲット遺伝子測定) Concentration に数値を入力します
Target PosCalibrator	Calibratorサンプル (ターゲット遺伝子測定)
Target Negative	ネガティブコントロールサンプル (ターゲット遺伝子測定)
Ref Unknown	未知サンプル (リファレンス遺伝子測定)
Ref Standard	検量線作成のためのサンプル (リファレンス遺伝子測定) Concentration に数値を入力します
Ref PosCalibrator	Calibratorサンプル (リファレンス遺伝子測定)
Ref Negative	ネガティブコントロールサンプル (リファレンス遺伝子測定)

## 6-3. オートスタンダードによる設定

本機能により、スタンダードサンプルの濃度入力を簡便に行うことができます。ただし、前提として下記の事項を満たしている必要があります。

- ▷ 各コピー数のスタンダードにおいてテクニカルレプリケートを取っている場合、レプリケートは横列にとっておくこと。  
(例：A1, A2, A3 などにレプリケートをとります。)
- ▷ 各コピー数のレプリケート数は一定であること。
- ▷ すべてのスタンダードは等倍希釈をして作成すること。

 Plate View ではオートスタンダード機能が使用できません。

1. Sample Editor を開き、Table View レイアウトを表示します。

1a Step2 でスタンダードサンプルのウェルをすべて選択します。

1b Step3 の Standard をチェックします。

1c Auto Std Curve をクリックするとダイアログが立ち上がります。

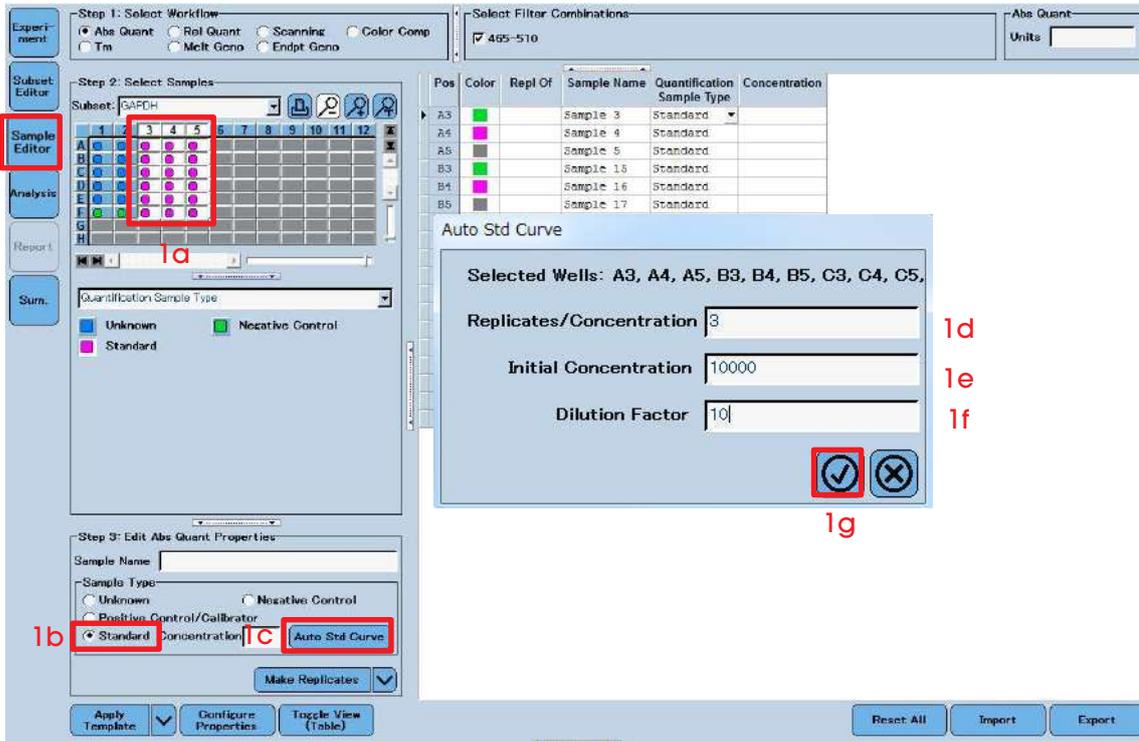
1d Replicates/Concentration にレプリケート数を入力します。

1e Initial Concentration に選択したウェルの中で、最も左上のウェルのコピー数を入力します。

1f Dilution Factor に希釈倍率を入力します。

- 10 倍ずつ薄くなる場合：10
- 10 倍ずつ濃くなる場合：0.1

1g チェックボタンをクリックします。



The screenshot shows the software interface with several components labeled with red numbers 1 through 1g:

- 1**: Points to the **Sample Editor** button in the left sidebar.
- 1a**: Points to a grid of wells (A1-A5, B3-B5, C3-C5) where standard samples are selected.
- 1b**: Points to the **Standard** radio button in the **Step 3: Edit Abs Quant Properties** section.
- 1c**: Points to the **Auto Std Curve** button in the **Step 3** section.
- 1d**, **1e**, and **1f**: Point to the input fields for **Replicates/Concentration** (value: 3), **Initial Concentration** (value: 10000), and **Dilution Factor** (value: 10) in the **Auto Std Curve** dialog.
- 1g**: Points to the checkmark button in the **Auto Std Curve** dialog.

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
A3	Green		Sample 3	Standard	
A4	Purple		Sample 4	Standard	
A5	Grey		Sample 5	Standard	
B3	Green		Sample 15	Standard	
B4	Purple		Sample 16	Standard	
B5	Grey		Sample 17	Standard	

# 7章 解析を行う

## 7-1. 絶対定量解析

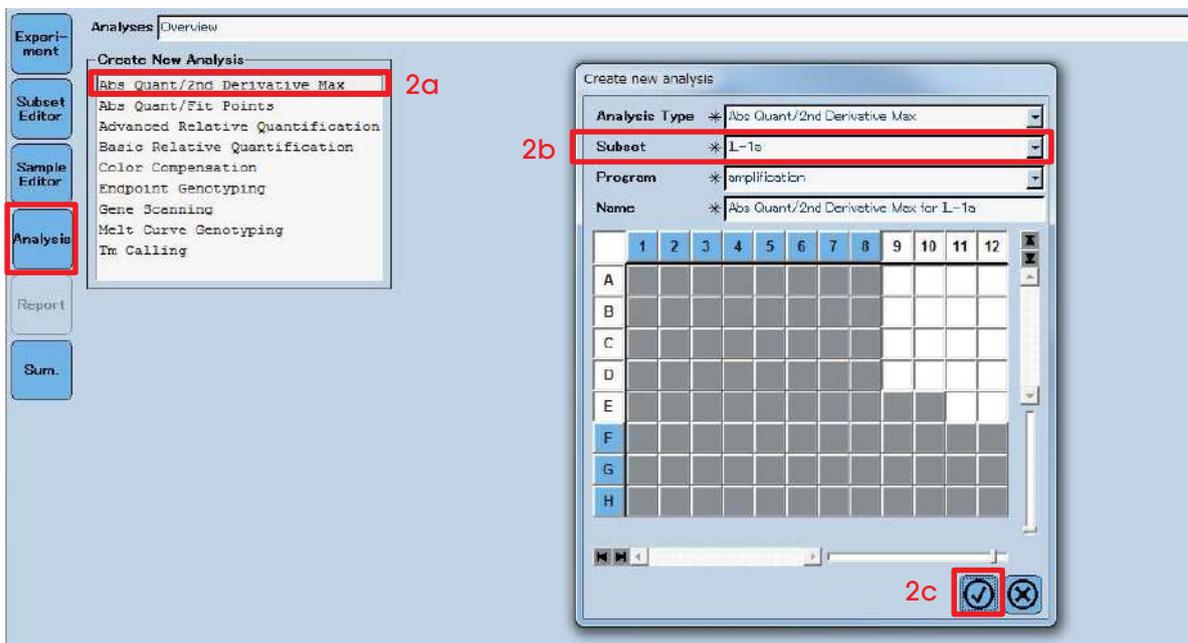
2<sup>nd</sup> Derivative max 法と Fit Points 法の2つの解析法がありますが2<sup>nd</sup> Derivative max 法を推奨します。

- ▷ 2<sup>nd</sup> Derivative max 法（推奨）の場合：7-1-1へ進みます
- ▷ Fit Points 法の場合：7-1-2へ進みます

### 7-1-1. AbsQuant/2nd Derivative max での解析（推奨）

2<sup>nd</sup> Derivative max では増幅シグナルを2回微分し、その極大値のサイクル数をCp値とします。  
Cp値は自動的に算出されるため、客観性、再現性に優れた解析法となります。

1. Analysis をクリックします。
2. 解析設定画面が表示されます。
  - 2a Create New Analysis で Abs Quant/2nd Derivative Max をクリックします。
  - 2b ダイアログが表示されるので、Subset のプルダウンより、解析したいサブセットを選択します。
  - 2c チェックボタンをクリックします。



3. データが呼び出されます。

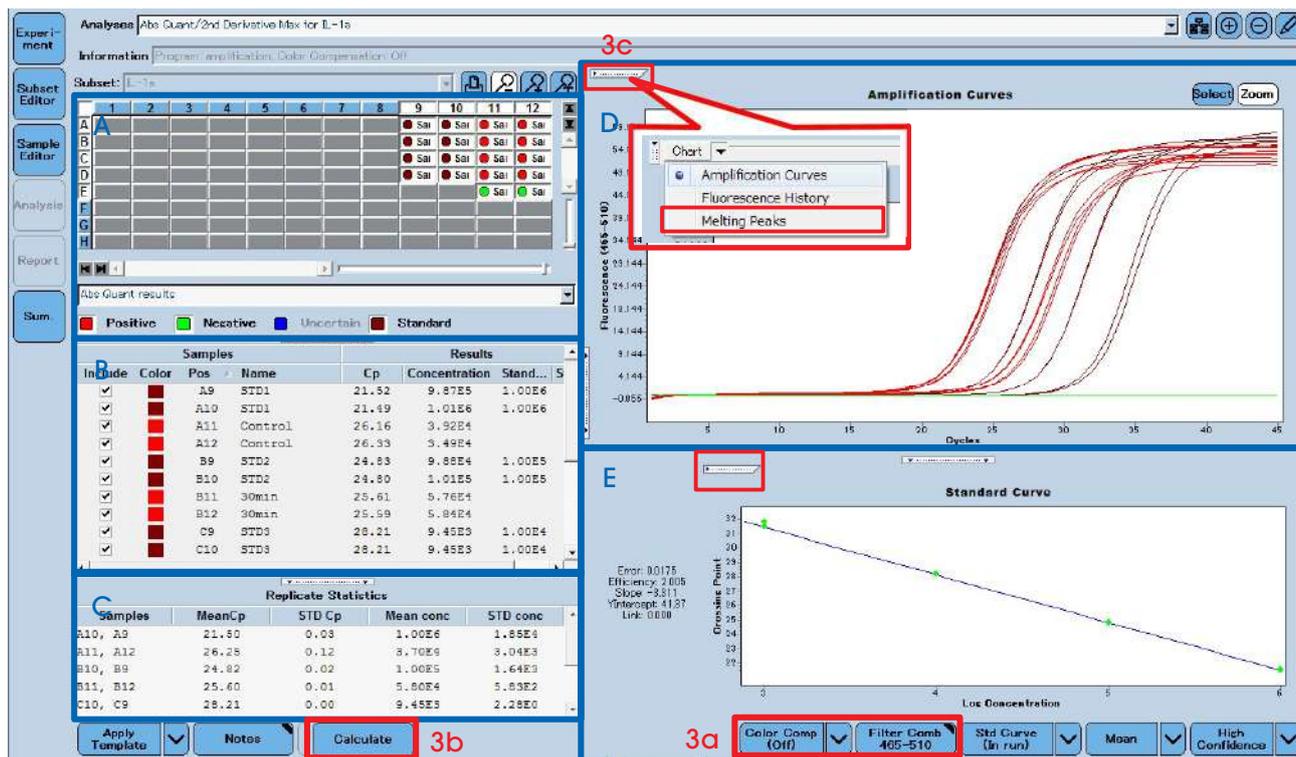
3a Color Comp. Filter Comb を確認します。詳しくは59 ページ『付録A マルチカラーアッセイ 2. CC Objectの適用』をご参照ください。

3b Calculate をクリックします。各画面に、解析結果の各種詳細が表示されます。

▷ サンプルエディターのSample Type でStandard を選択したサンプルを用いて検線を作成します。

3c SYBR Green I を使用した場合の融解曲線分析は※Melting Peakes で確認することができます。

▷ 詳細なTm 値を確認したい場合は、45 ページ『7-3 融解曲線分析』をご参照ください。



A : Plate Layout		Amplification Curves	
解析に使用したサブセットのプレートレイアウトが示されます。確認したいウェルを選択すると、そのサンプルの結果だけを表示させることができます。		x軸にサイクル数、y軸に蛍光強度を取ったベースライン補正済みの増幅曲線が示されます。	
B : Result Table		Standard Curve	
Include ;	チェックを入れた検体のみ計算に使用します。解析から除外したい場合、ダブルクリックでチェックをはずし、Calculateをクリックします。	Error ;	エラー値、0.2以下になることが推奨。
Cp ;	増幅サイクル。この数値を使用し、定量を行います。	Efficiency ;	検量線の傾きから計算したPCR効率
Concentration ;	検量線、Cp値から算出された定量結果。	Slope ;	検量線の傾き
Standard ;	サンプルエディターで入力したコピー数。	Y-intercept ;	検量線のy切片
C : Replicate Statistics		ボタン	
MeanCp ;	Cpの平均値	 ボタンを押し、Chartの▼プルダウンに表示される項目の選択で、表示するグラフの切り替えを行うことができます。	
STD Cp ;	Cpの標準偏差	Amplification Curve	
Mean conc ;	Concentrationの平均値	Fluorecence History	
STD conc ;	Concentrationの標準偏差	Melting Peaks	

4. 複数のサブセットがある場合、解析を追加します。

4a  ボタンをクリックします。

4b Create New Analysis ダイアログが立ち上がります。

4c Analysis Type のプルダウンより解析のタイプを選択します。

4d Subset のプルダウンより、解析したいサブセットを選択します。

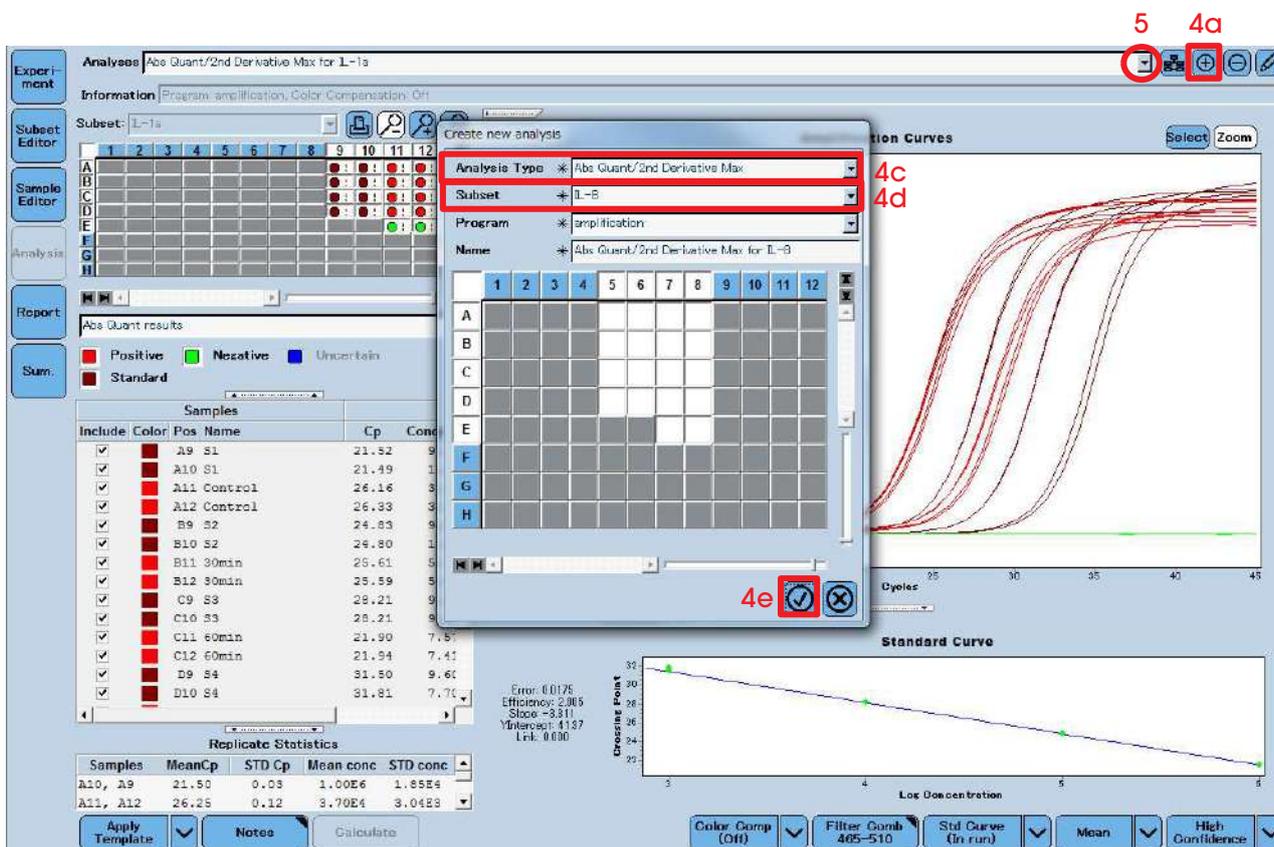
4e チェックボタンをクリックすると、3 と同様の画面が立ち上がります。

5. 複数の解析を行った場合は、Analysis のプルダウンより表示を切り替えることができます。



#### 結果の外部ファイルへのエクスポート

Result Table や各グラフ上で右クリックし、テキストファイルや画像ファイルとしてアウトプット可能です。  
47 ページ『7-4 データのエクスポート』をご参照ください。



5 4a

4c  
4d

4e

Include	Color	Pos	Name	Cp	Conc
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	1	A9 S1	21.52	9.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	1	A10 S1	21.49	1.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	1	A11 Control	26.16	3.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	1	A12 Control	26.33	3.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	2	B9 S2	24.83	9.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	2	B10 S2	24.80	1.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	2	B11 30min	25.61	5.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	2	B12 30min	25.59	5.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	C9 S3	28.21	9.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	C10 S3	28.21	9.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	C11 60min	21.90	7.5
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	3	C12 60min	21.94	7.4
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	4	D9 S4	31.50	9.6
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	4	D10 S4	31.81	7.7

Samples	MeanCp	STD Cp	Mean conc	STD conc
A10, A9	21.50	0.03	1.00E6	1.85E4
A11, A12	26.25	0.12	3.70E4	3.04E3

Error: 0.0178  
Efficiency: 2.865  
Slope: -3.311  
Intercept: 4137  
Lin: 0.630

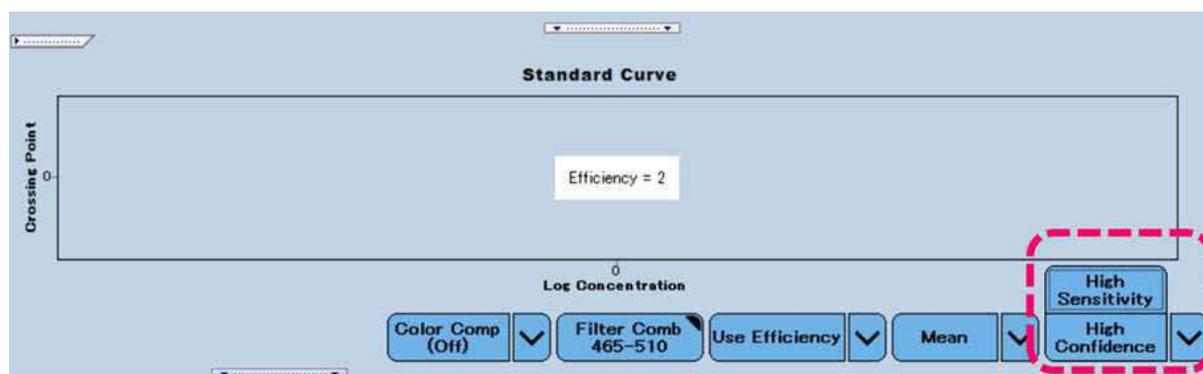
## Positive/Negative 判定について

Analysis の Abs Quant/2nd Delivative Max 法において、ウェルの増幅が正常に行われているか、Positive/Negative 判定が自動で行われますが、見た目上は Positive と見られるにも関わらず、Negative 判定となってしまうことがあります。

\* Negative 判定となると、Cp 値が算出されません。

この場合は、下記画像赤枠部分の下矢印をクリックすることで High Confidence から、High Sensitivity に変更することができます。

High Sensitivity に変更することで、Positive/Negative 判定の基準が変更されるため、Positive 判定に変更できる場合があります。



## スタンダード横の記載について

- Error : 各ポイントから回帰直線までの距離の2乗の平方根となります。  
マニュアルでは<0.2を推奨しております。
- Efficiency : PCR 効率となります。1 サイクルで何倍になるかの指標となります。
- Slope : グラフの傾きとなります。通常10倍のグラフ (Log)なので、10倍になるのにかかるサイクル数に相当します。
- YIntercept : Y 切片となります。  
検量線のY 切片の値は、コピー数0と仮定した場合 (Concentration=0 のとき)に返されるCq 値を意味いたします。
- Link : Link はスタンダードカーブの形状を示す値になります。  
Link 値が0.000の時、スタンダードカーブは直線であることを意味します。  
Link 値が0.000より大きい時、スタンダードカーブが、あるプレート濃度より直線から外れることを意味いたします。Link の値は、この時の濃度を示します。

## 7-1-2. Abs Quant/Fit Points での解析（オプション）

Fit Points ではオペレータが設定したThreshold ラインと、増幅カーブとの交点をCp 値として算出します。

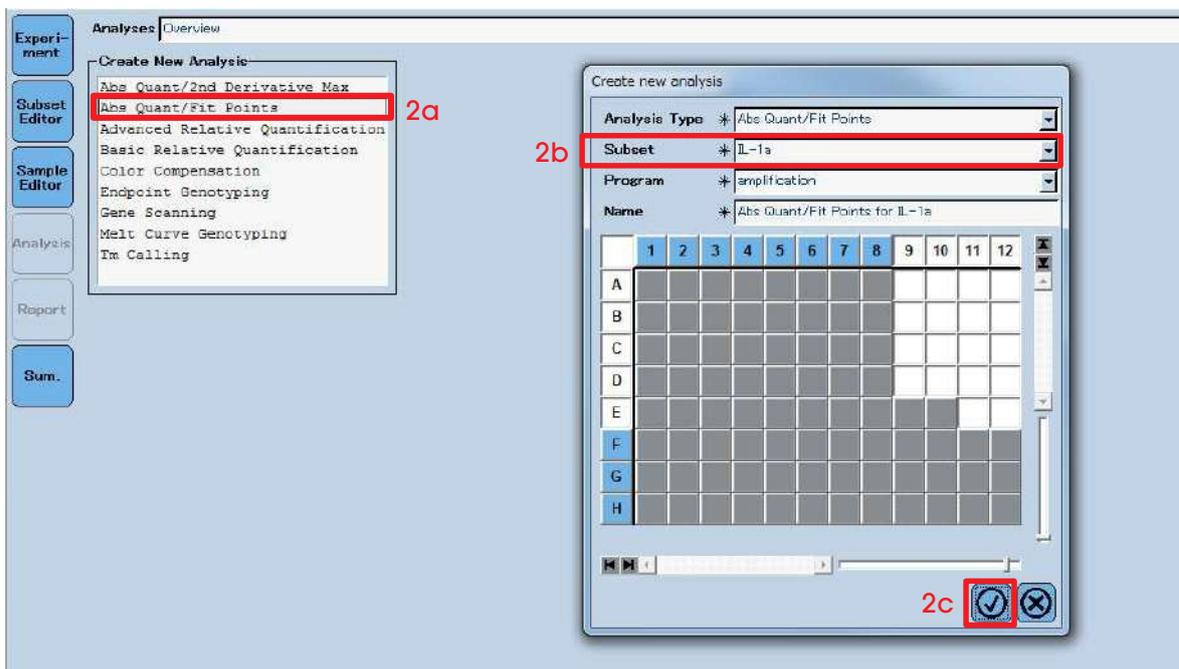
1. 7-2-1. Abs Quant/2nd derivative Max と同様Analysis から解析をスタートします。

2. 解析の設定画面が表示されます。

2a Create New Analysis で Abs Quant/Fit Points をクリックします。

2b 新たなダイアログが表示されるので、Subset のプルダウンより、解析したいサブセットを選択します。

2c チェックボタンをクリックします。



3. データが呼び出され、Cycle Range 画面が表示されます。

▷ バックグラウンド補正された増幅曲線が表示されます。

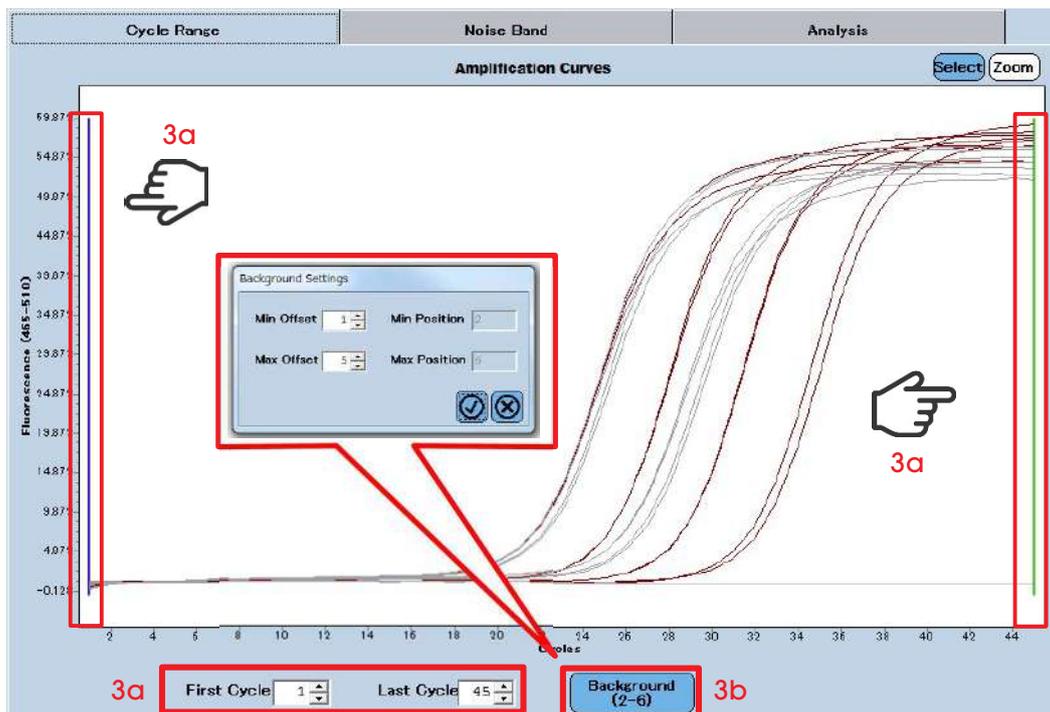
3a Cycle Range は、マウス操作で青および緑のスライダを移動させるか、直接数値を入力することで変更できます。

▷ 解析対象から外したいイレギュラーな部分があるときに変更します。

▷ デフォルトでは、その実験で設定したサイクルの始めから終わりまでとなっています。

3b Background ボタンをクリックすると、手動でバックグラウンド範囲の設定を行うことができます。

▷ バックグラウンド補正は Min Position と Max Position の間での蛍光の平均値で行われます。



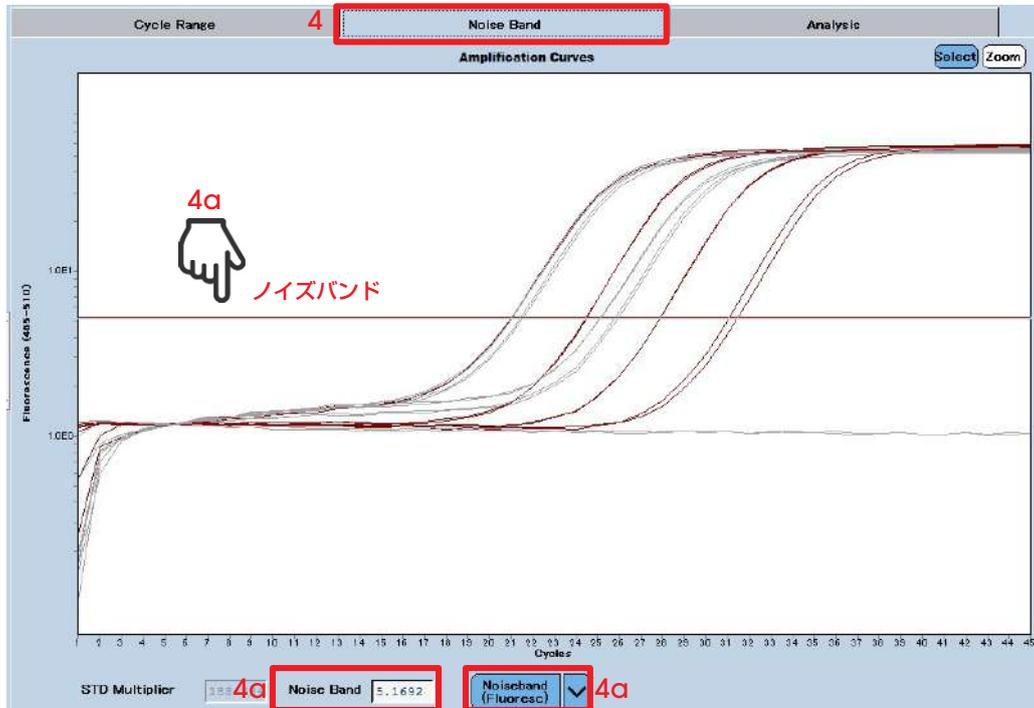
4. Noise Band タブをクリックし、ノイズバンドを表示します。

▷ ノイズバンドの設定でサンプルのノイズを除くことができます。

4a マウス操作でスライダーを移動させるか、直接数値を入力することで変更できます。

▷ ノイズバンドは各サンプルが指数関数的に増幅している領域（増幅曲線がまっすぐになっているところ）に設定します。

▷ 直接数値を入力する場合は、Noise band (Auto)のプルダウンでNoise band (Fluoresc)を選択します。



5. Analysis タブをクリックします。Fit Point と Threshold の設定画面が表示されます。

- ▷ Fit Point とは Noise Band を超えた実測値を何点取るかを示します。通常は 2 点で十分です。
- ▷ Fit point を結んだ線と Threshold ラインとの交点が Cp 値として計算されます。

5a Show Fit Point にチェックを入れ Fit Point を表示します。

5b マウス操作でスライダーを移動させるか直接数値を入力することで Threshold ラインを変更します。

- ▷ Threshold 入力欄に直接値を入力する場合は、Threshold (Auto) ボタン (5b) をクリックし Threshold (Manual) に変更することで、数値の入力が可能になります。
- ▷ Threshold ラインの設定位置は① Noise Band の値を 5b に入力② Fit Point 2 点の間等に設定します。

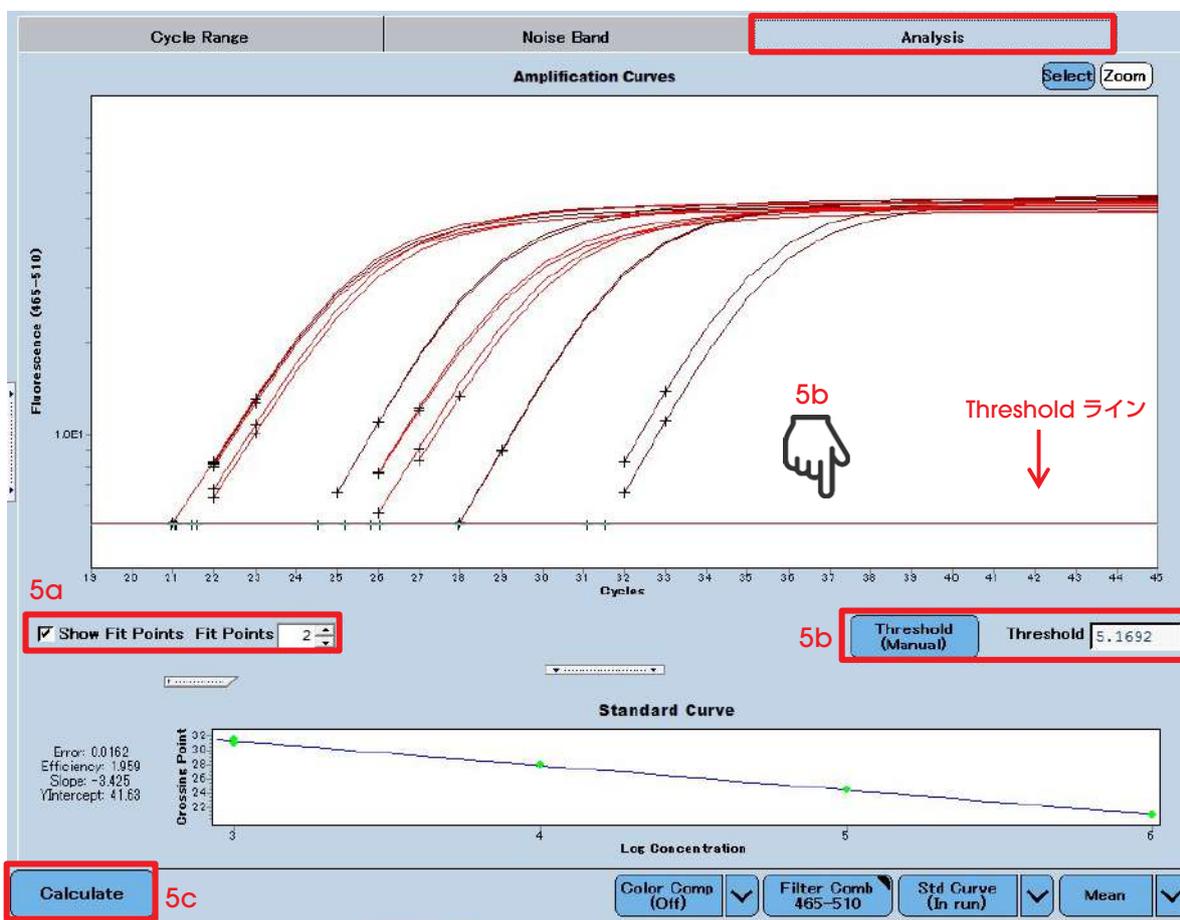
5c Calculate をクリックすると Cp 値が計算されます。

- ▷ 各画面に、解析結果の詳細が表示されます。詳細は 28 ページをご参照ください。



結果の外部ファイルへのエクスポート

Result Table や各グラフ上で右クリックし、テキストファイルや画像ファイルとしてアウトプット可能です。  
47 ページ『7-4 データのエクスポート』をご参照ください。



### 7-1-3. 検量線のエクスポート及びインポート

一度作成した検量線を保存しておき、別のランデータに適用にすることができます。  
この方法を実施するためには、下記を満たしている必要があります。

- ▷ エクスポートした検量線とインポートする実験では同一の解析方法を用いること。  
(Abs Quant/2<sup>nd</sup> Derivative あるいは Abs Quant/Fit Points を統一すること)
- ▷ インポートする実験では、検量線作成時と同じスタンダードサンプルのうち1点を設定、実施しておくこと。

 この1点が前回の結果と大きくずれていないことを確認して、インポートしてください。

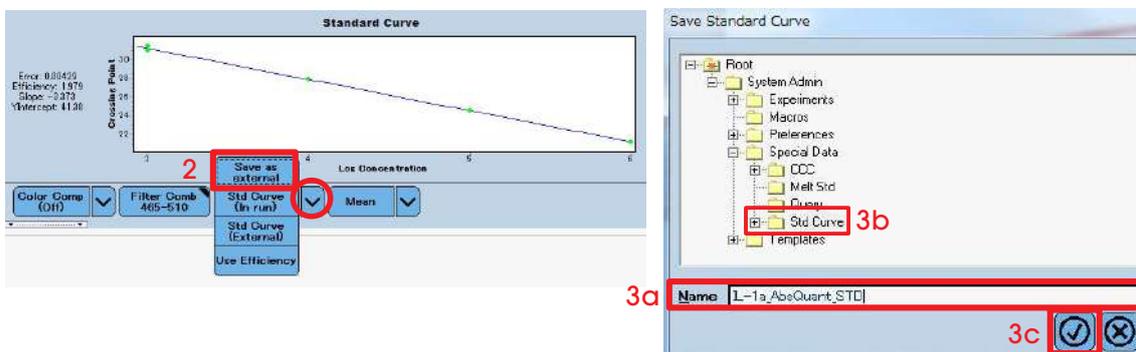
#### 検量線のエクスポート

1. エクスポートする検量線を表示します。
2. Std Curve のプルダウンより Save as external をクリックします。
3. Save Standard Curve ダイアログが表示されます。

3a 保存先に Std Curve を選択します。

3b Name に任意の名前を入力します。

3c チェックボタンをクリックします。



## 検量線のインポート

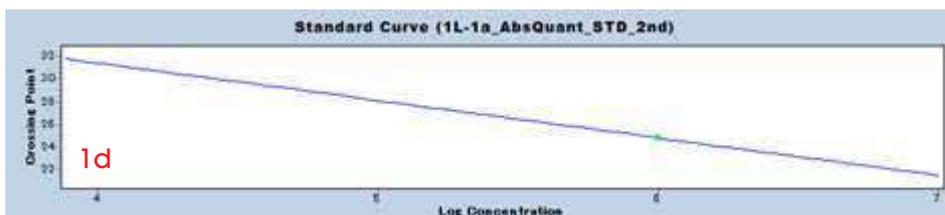
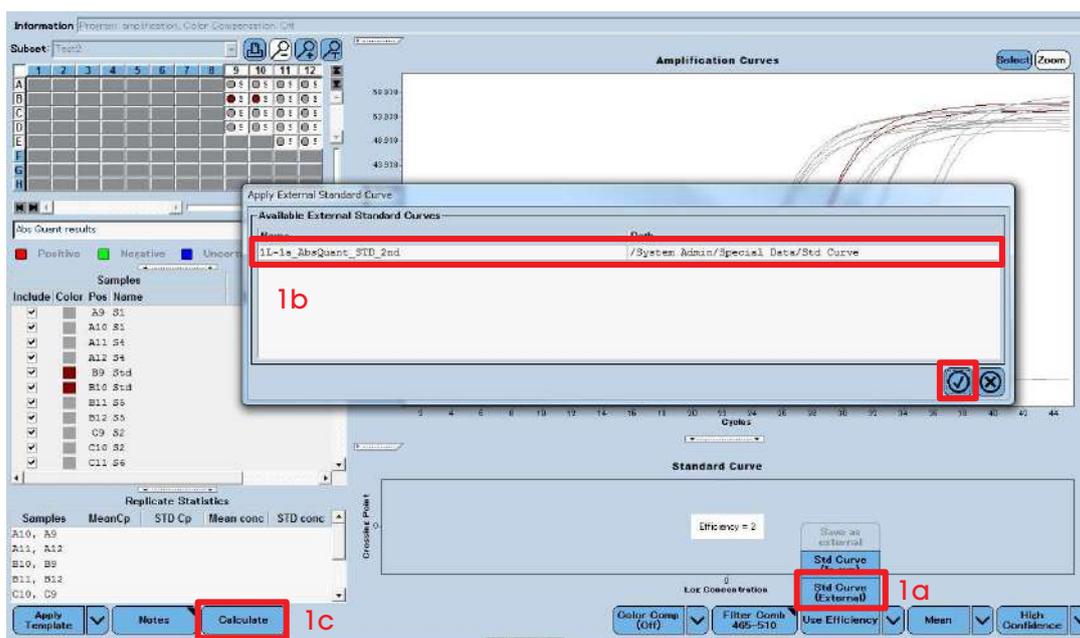
1. 検量線をインポートしたい実験を開きます。

1a Std Curve (External)をクリックします。

1b Apply External Standard Curve が表示されるので、この中からインポートしたい検量線を選択します。

1c Calculate をクリックします。

1d 検量線が呼び出され、解析結果が表示されます。1点のみ今回の実験のスタンダードのCp値がプロットされます。



## 7-2. 相対定量解析

相対定量解析を実施すると、以下の2つの値を算出できます。

事前にサンプルエディターでサンプル設定を行っておく必要があります（6章、23～30ページ）。

### Ratio

リファレンス遺伝子による標準化を行い、サンプル間の目的遺伝子の相対的な比を示します。

《用途》

- リファレンス遺伝子でターゲット遺伝子を補正する

### Normalized Ratio

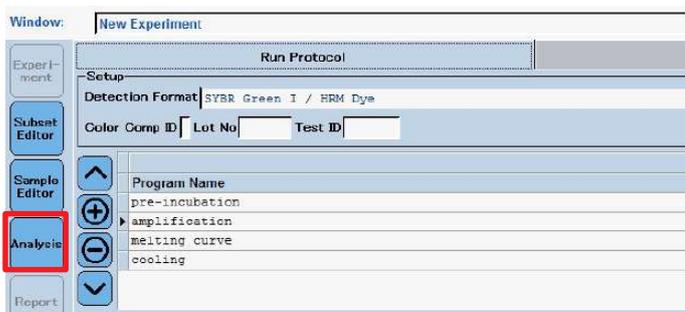
「Ratio」を用いて、Calibrator サンプルを基準（1）とした相対値を示します。

《用途》

- Calibrator サンプルに対する Unknown サンプルのターゲット遺伝子の発現量の相対比を求める

1. Analysis をクリックし、解析を開始します。

1a 既に解析を行っている場合は、33 ページ（7-1-1 の4）に従い解析の追加を行います。

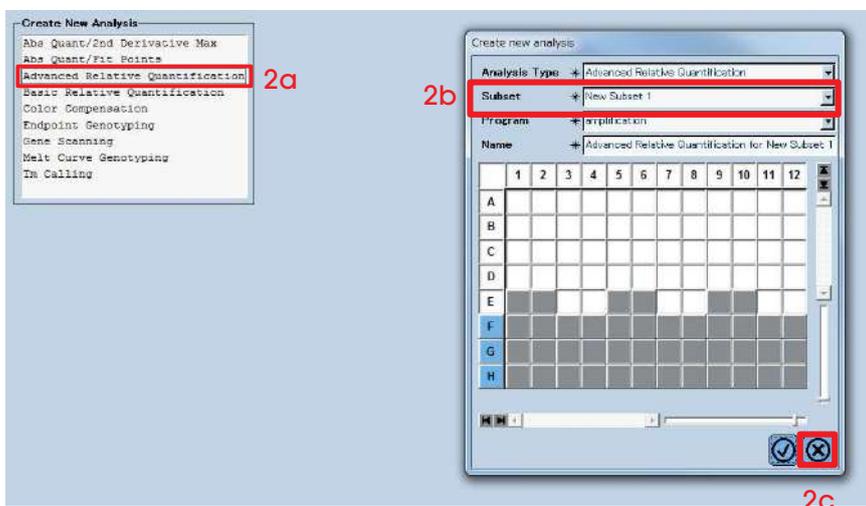


2. 解析の設定の画面が表示されます。

2a Create New Analysis で Advanced Relative Quantification をクリックします。

2b ダイアログが表示されるので、Subset のプルダウンより、解析したいサブセットを選択します。

2c チェックボタンをクリックします。



3. 解析オプションを選択し、チェックボタンをクリックします。

### Abs Quant Type

Cp 値の算出を2nd Derivative max、あるいはFit Points Method で行うかを選択します。2nd Derivative max を推奨します。

詳細は7-2 絶対定量解析をご参照ください。

2<sup>nd</sup> Derivative max の場合、High Confidence にチェックを入れます。

### Subordinate Abs Quant Analysis

データ詳細確認の際、遺伝子名毎に表示するか、フィルター毎に表示するかを選択します。通常は遺伝子名毎に表示します。

### Reference Analysis

リファレンス遺伝子のデータが選択したサブセットに存在する場合、Create In-Run を選択します。

別のプレート上にある場合、Select External から別データを選択します。

### Pairing Rule

複数のターゲット遺伝子、リファレンス遺伝子を測定した場合のターゲット/リファレンスペアリング方法を選択します。

(例) ターゲット遺伝子、リファレンス遺伝子がそれぞれ2 つずつあった場合

ターゲット遺伝子：T1,T2 リファレンス遺伝子：R1,R2

One to One	ソフトが任意の組み合わせで解析を行います。複数遺伝子測定時には使用できません。ターゲット遺伝子、リファレンス遺伝子が1種類の場合のみ選択できます。	T1/R1、T2/R2
All To All	すべてのターゲット遺伝子、リファレンス遺伝子の組み合わせで相対値を算出します。	T1/R1、T1/R2、T2/R1、T2/R2
All To Mean	すべてのリファレンス遺伝子の平均値を使用して各ターゲット遺伝子の相対値を算出します。	$T1 / (R1 \times R2)^{1/2}$ 、 $T2 / (R1 \times R2)^{1/2}$
Mean To All	すべてのターゲット遺伝子の平均値を使用して各リファレンス遺伝子による相対値を算出します。	$(T1 \times T2)^{1/2} / R1$ 、 $(T1 \times T2)^{1/2} / R2$

### Default Standard Curve Settings

スタンダードサンプルを設定しない場合のオプションです。

- サンプルエディターで定義したPCR 効率を使用する場合  
always use efficiency をチェックします。
- 以前に作成した検量線を呼び出す場合  
allow external standards with matching target name をチェックします。

4. 同じサンプル名の検体が相対比を算出するペアだと認識されます (Pairing)。

4a ペアリングが正しく認識されているか確認します。

4b Calculate をクリックします。解析結果が表示されます。

▷ Ratio (Target/Ref)欄にそれぞれのサンプルのCp 値を基に、リファレンス遺伝子量で補正したターゲット遺伝子の相対比が算出されます。

▷ Ratio (Normalized)欄に PosCalibrator に対するそれぞれの未知検体の相対値が表示されます。

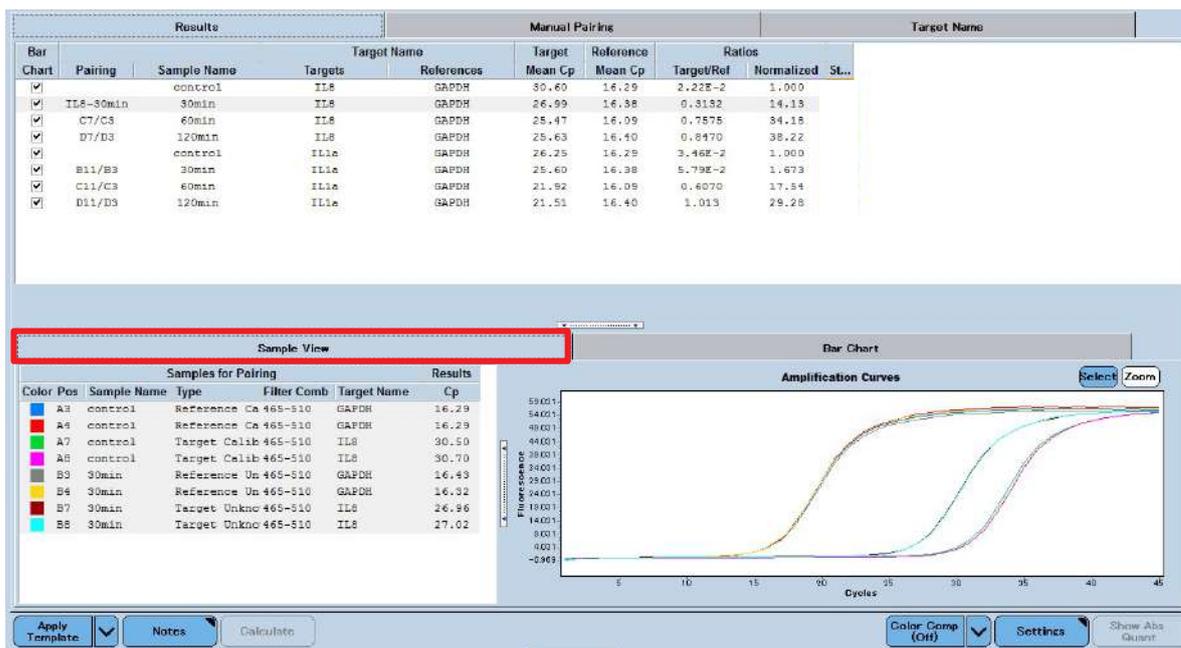
▷ Settings をクリックすると、表示項目の変更を行うことができます。

Manual Pairing タブ Pairs 欄の Name を変更することで、グラフに表示するサンプル名を変更することができます。

表示項目について (Settings ボタンから表示項目を追加できます。)

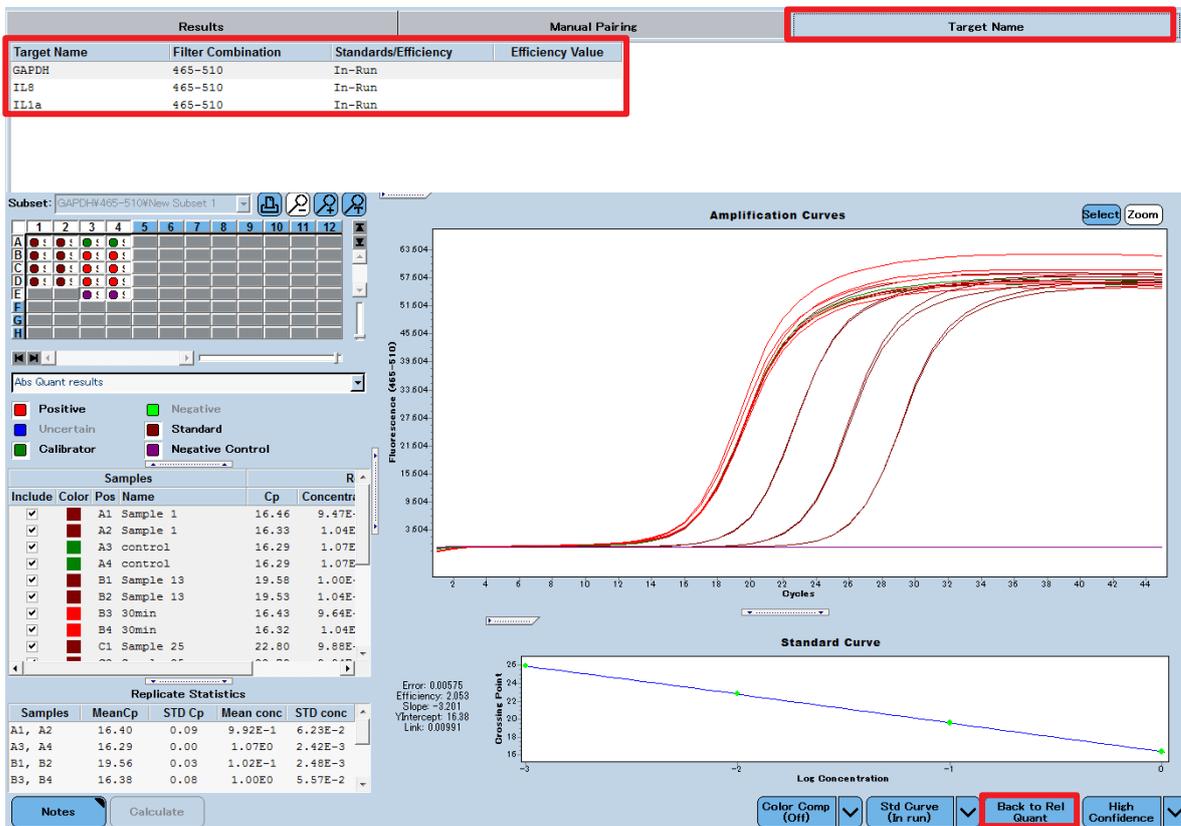
Resultタブ各項目		
デフォルト表示	Chart	チェックを入れたサンプルのみ Bar Chart を表示
	Pairing	相対比を算出するペアのウェルポジション (ターゲット遺伝子のウェル/リファレンス遺伝子のウェル) サンプルエディターで事前に登録が必要
	Sample Name	サンプルの名前
	Target Name	ターゲット遺伝子名、リファレンス遺伝子名
	Mean Cp	Cp 値 (増幅サイクル)の平均値。この数値を使用し、定量計算を実施。
	Ratio (Target/Ref)	リファレンス遺伝子量で補正したターゲット遺伝子の相対比
Settings タブ	Rati (Normalized)	Ratio (Target/Ref)を用いて求めたサンプル間の相対比 (サンプルエディターで PosCalibrator 設定したサンプルに対する Unknown サンプルの相対値)
	Ratio Error	Ratio の標準偏差
	Cp Error	Cp 値の標準偏差
	Use Median Cp for Calculate	計算に Median Cp 値を使用する
Logarithmic/Linear Bar Chart	Bar Chart のリニア / ログ表示切替	

▷ Sample View タブより、選択したサンプルの増幅曲線を確認することができます。



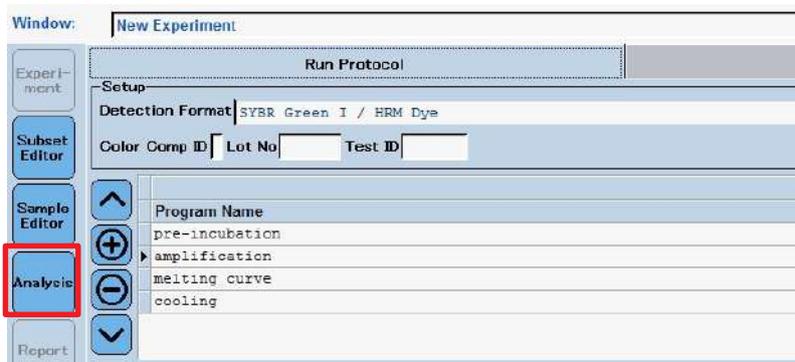
▷ Target Name タブより、確認したい遺伝子をダブルクリックすることで、絶対定量解析画面に切り替わります。

- 遺伝子毎に増幅シグナルやCp 値、Standard Curve を確認、編集することができます。
- Fit Points 法を選択した場合は、Fit Points の設定を変更することができます。
- Back to Rel Quant をクリックすることで、もとの画面に戻ります。



## 7-3. 融解曲線分析

1. Analysis をクリックします。

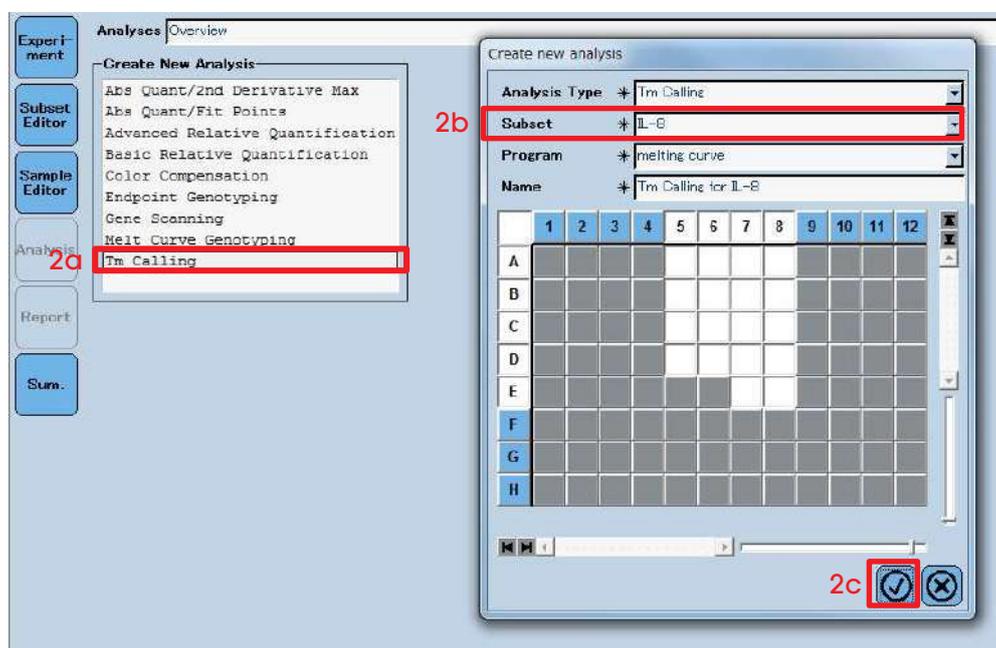


2. 解析画面が表示されます。

2a Create New Analysis で Tm Calling をクリックします。

2b ダイアログの Subset プルダウンより、解析に使用するサブセットを選択します。

2c チェックボタンをクリックします。



3. データが呼び出されます。

3a Calculate をクリックすると、Melting Peak が表示されます。

3b Result Table に各サンプルのTm 値が表示されます。

3c プレートレイアウト上で確認したいサンプルを選択すると、その結果のみを表示させることができます。

3d Result Table の各カラム名 (Pos, Name, Tm1 など) をクリックすると、昇順、降順にソートできます。



#### 特異性をチェックする際のポイント

- Melting Peak がシングルピークかどうか
- ネガティブコントロールサンプル（鋳型DNA を加えていない）が立ち上がっていないか。
  - サンプルと同じTm 値にピークがある場合：コンタミネーションの可能性
  - サンプルとは異なるTm 値にピークがある場合：非特異反応の可能性

The screenshot shows the LightCycler 480 software interface. On the left, there is a plate layout grid with columns 1-12 and rows A-H. A red box highlights the grid, labeled '3c'. Below the grid is a 'Result Table' with columns 'Include', 'Color', 'Pos', 'Name', 'Tm1', and 'St'. A red box highlights the table, labeled '3d'. The table contains the following data:

Include	Color	Pos	Name	Tm1	St
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	A5	Sample 5	82.07	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	A6	Sample 5	82.11	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	A7	Control	82.07	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	A8	Control	82.04	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	B5	Sample 17	81.93	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	B6	Sample 17	81.93	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	B7	30min	82.09	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	B8	30min	82.12	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	C5	Sample 29	81.93	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	C6	Sample 29	81.83	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	C7	60min	82.04	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	C8	60min	82.10	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	D5	Sample 41	81.93	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	D6	Sample 41	81.84	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	D7	90min	82.07	
<input checked="" type="checkbox"/>	Red	D8	90min	82.07	

At the bottom of the interface, a 'Calculate' button is highlighted with a red box and labeled '3a'. To the right, there are two graphs: 'Melting Curves' and 'Melting Peaks'. The 'Melting Peaks' graph shows a single sharp peak at approximately 82°C. At the bottom right, there are buttons for 'Color Comp (Off)', 'Filter Comp 465-510', 'Max Peaks (2 or less)', and 'HybProbe Format'.

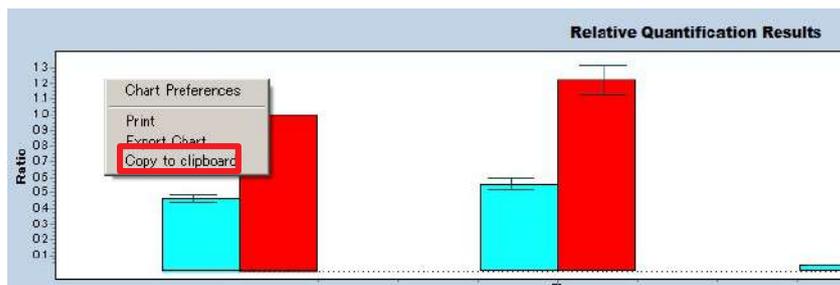
## 7-4. データのエクスポート

本ソフトウェアに表示される Result Table や各種チャートは、テキストファイル (.txt)、画像ファイル (.bmp, .emf, .gif, .jpg, .pcx, .png)としてエクスポートできます。

### 7-4-1. グラフデータのエクスポート

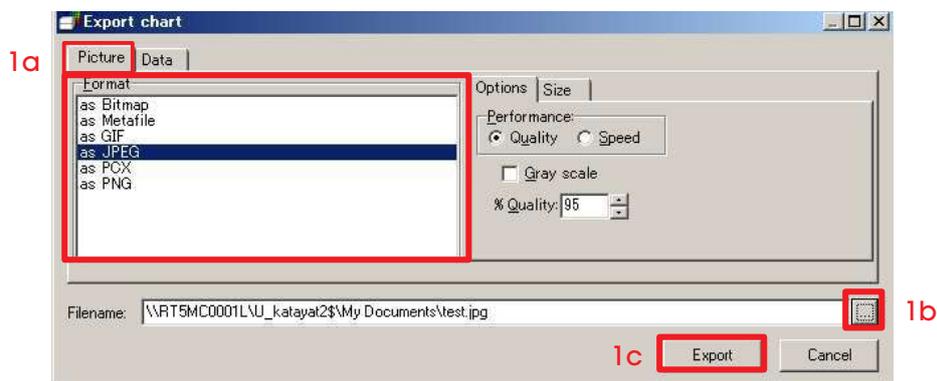
増幅曲線、検量線のデータ、相対定量の棒グラフは画像データまたは数値データとしてエクスポートできます。

1. エクスポートしたいデータ上で右クリックし、『Export Chart』をクリックします。



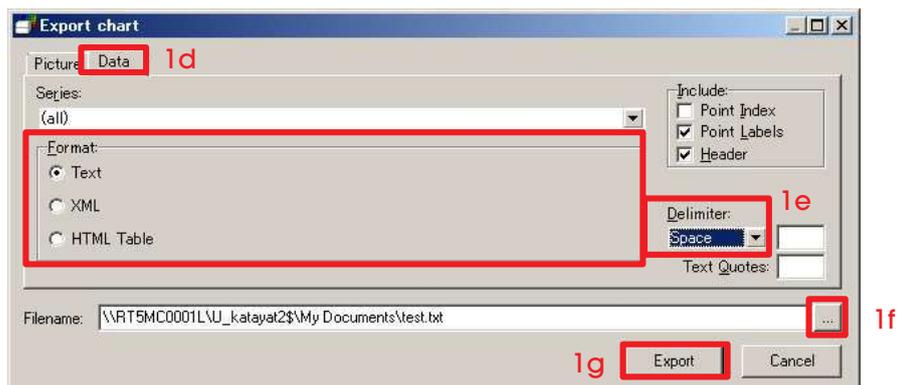
【画像として保存する場合】

- 1a Picture タブを選択します。
- 1b  ボタンで保存場所とファイル名を選択します。
- 1c Export をクリックします。



【数値データとして保存する場合】

- 1d 数値データの場合はDataタブでファイル形式を選択します。
- 1e Delimiterから適切なものを選択します。
- 1f  ボタンで保存場所とファイル名を選択します。
- 1g Exportをクリックします。



## 7-4-2. テーブルデータのエクスポート

【直接エクセルシートに貼り付ける場合】

1. テーブル全体をCtrl + A key で選択後、Ctrl+ C key でコピーします。
2. エクセルのシート上でCtrl + V key でペーストします。

【タブ区切りのテキストファイルとして保存する場合】

1. テーブル上で右クリックしてExport Table を選択します。
2. ファイル名を付け、保存します。

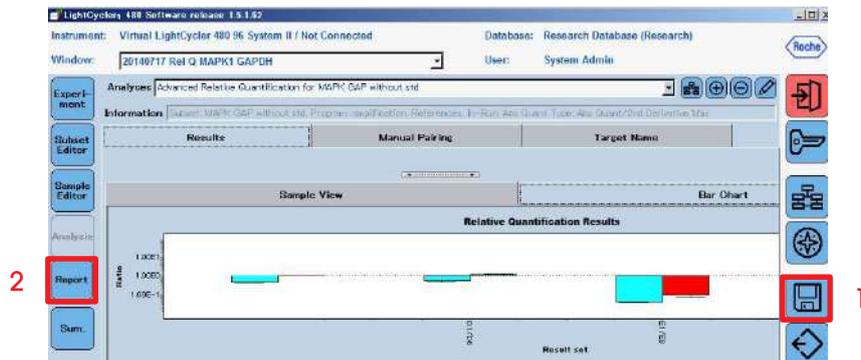
Samples				Results			
Include	Color	Pos	Name	Cp	Concentration	Stand...	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A3	Sample 3	22.75	1.53E4	1.00E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A4	Sample 4	25.90	1.70E3	1.00E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A5	Sample 5				
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A8	Sample 8	17.45	6.22E5	1.00E6	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A9	Sample 9	20.80	5.97E4	1.00E5	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A10	Sample 10	24.22	5.50E3	1.00E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A11	Sample 11	27.20	6.82E2	1.00E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A12	Sample 12				
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C1	Tissue A	24.01	6.24E2		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C2	Tissue A	24.01	6.24E2		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C3	Tissue A	24.00	6.37E3		

Export Table

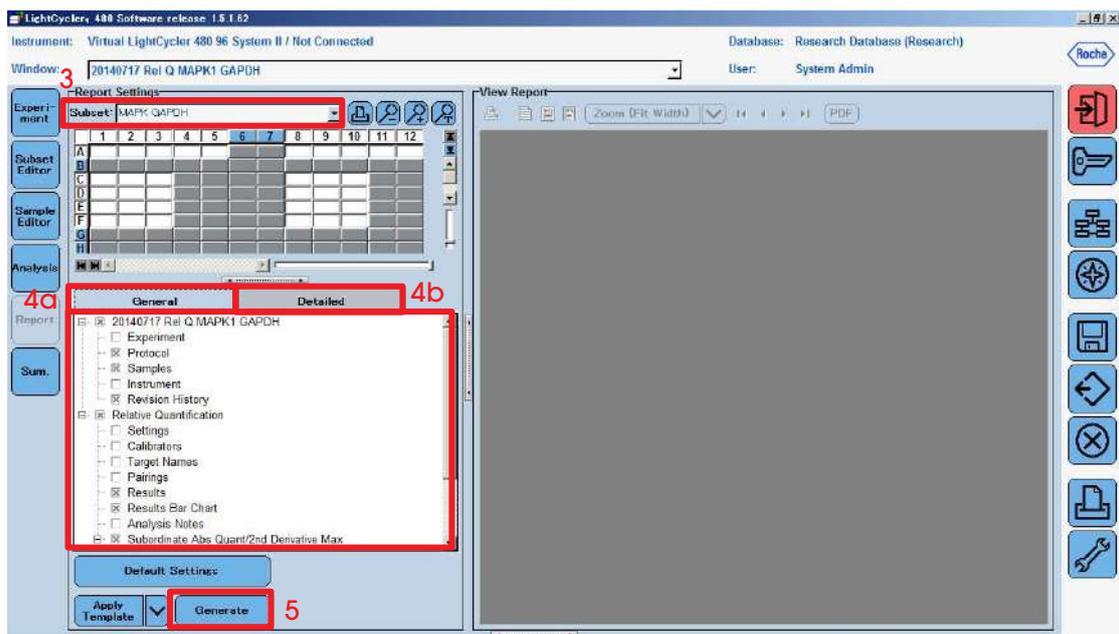
## 8章 レポートを作成する

解析を行った後、レポートを作成し、PDF ファイルで保存することが可能です。レポート内容はカスタマイズでき、必要な項目のみを表示させることが可能です。

1. 解析終了後、Save ボタンをクリックし、データを保存します。
2. Report をクリックし、レポート作成メニューを表示します。



3. Subset から解析に使用したサブセットを選択します。
4. General タブ、Detailed タブからレポートに表示する項目を選択します。
  - 4a General タブにおける入力は、すべての解析において適用されます。
  - 4b Detailed タブにおける入力は複数の解析を行った場合、それぞれの解析ごとに適用され、レポートの表示内容をカスタマイズできます。
5. Generate をクリックします。



6. レポートが表示されます。

6a PDF ボタンをクリックするとレポートを保存することができます。

▷ 不要な項目があった場合、手順2に戻り、General タブ、Detailed タブから必要項目を選択し、レポートを再作成することも可能です。

**View Report**

Zoom (Fit Width) Page 1 of 5 PDF 6a

**LightCycler® 480 Software**

Roche

**20140717 Rel Q MAPK1 GAPDH**

**Programs**

Program Name	Cycles	Analysis Mode
pre-incubation	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	Cycles	Analysis Mode
amplification	45	Quantification

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
60	None	00:00:10	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:10	4.40		0	0	0

Program Name	Cycles	Analysis Mode
melting curve	1	Melting Curves

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
65	None	00:01:00	2.20		0	0	0
97	Continuous		0.11	5	0	0	0

Program Name	Cycles	Analysis Mode
cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

# 付録

---

## A. マルチカラーアッセイについて

1. color compensation ファイルの作成
2. color compensation ファイルの適用
3. マルチカラーアッセイの結果の確認方法

## B. ログファイルの回収方法

## C. バックアップとインポート

## D. 専用試薬・消耗品のご案内

## A. マルチカラーアッセイについて

マルチカラーアッセイを行う際、ターゲットごとに複数の蛍光色素を検出しますが、この際にそれぞれの蛍光が他の蛍光色素の測定チャンネルでも検出され誤った結果を得るケースがあります（蛍光のクロストーク）。特に波長の近い蛍光色素を組み合わせで使用する場合、クロストークを軽減し誤った蛍光を検出しないようにするため、Color Compensation ファイル（CC ファイル）を作成する必要があります。

このCCファイルは一度作成すれば、同様の蛍光色素を使用した他のマルチカラーアッセイの反応系にも適用できます。

ただし、同一機器で作成したCCファイルのみが適用でき、異なる機器で作成したCCファイルは適用できません。

FAMラベルとVICラベル（またはLC Yellow 555ラベルまたはHEXラベル）のマルチカラーアッセイの場合は、デフォルトで搭載されているファイルを使用することも可能です。ただし、完全に補正しきれない場合や補正しすぎて負の増幅が見られる場合には、本マニュアルに沿ってCCファイルを作成する必要があります。

また、CCファイルの不要な蛍光の組み合わせもあります。

ここではFAMラベル、VICラベル、LC 610ラベルの加水分解プローブを使用した例を記載します。

### CCファイル不要な蛍光の組み合わせ

Cyan 500 (440-488)	—	Red610 (533-610)
Cyan 500 (440-488)	—	Red640 (618-660)
Cyan 500 (440-488)	—	Cy 5 (618-660)
FAM (456-510)	—	Red610 (533-610)
FAM (456-510)	—	Red640 (618-660)
FAM (456-510)	—	Cy 5 (618-660)
HEX/VIC (533-580)	—	Cy 5 (618-660)

## 1. color compensation ファイルの作成

### 1-1. 試薬の調製

反応は各蛍光色素を用いたシングルプレックスアッセイが必要となります。このときのプライマー、プローブの濃度は、実際にマルチプレックスアッセイを行う際の条件に従います。

これと同時に、ネガティブコントロール（試薬と水のみ）も必ず測定する必要があります。

反応は3～5重測定することを推奨します。

### 1-2. 試薬の分注

プレートへの分注例

	1	2	3
A	water		
B	FAM		
C	VIC		
D	LC610		
E			
F			
G			
H			

Water： テンプレートやプライマー、プローブは加えず、実際に使用する試薬と水のみ加えます（ROXなし）。

FAM： ポジコンとなるテンプレート、プライマー、FAM標識プローブ、実際に使用する試薬を加え、シングルプレックスPCRを行います。

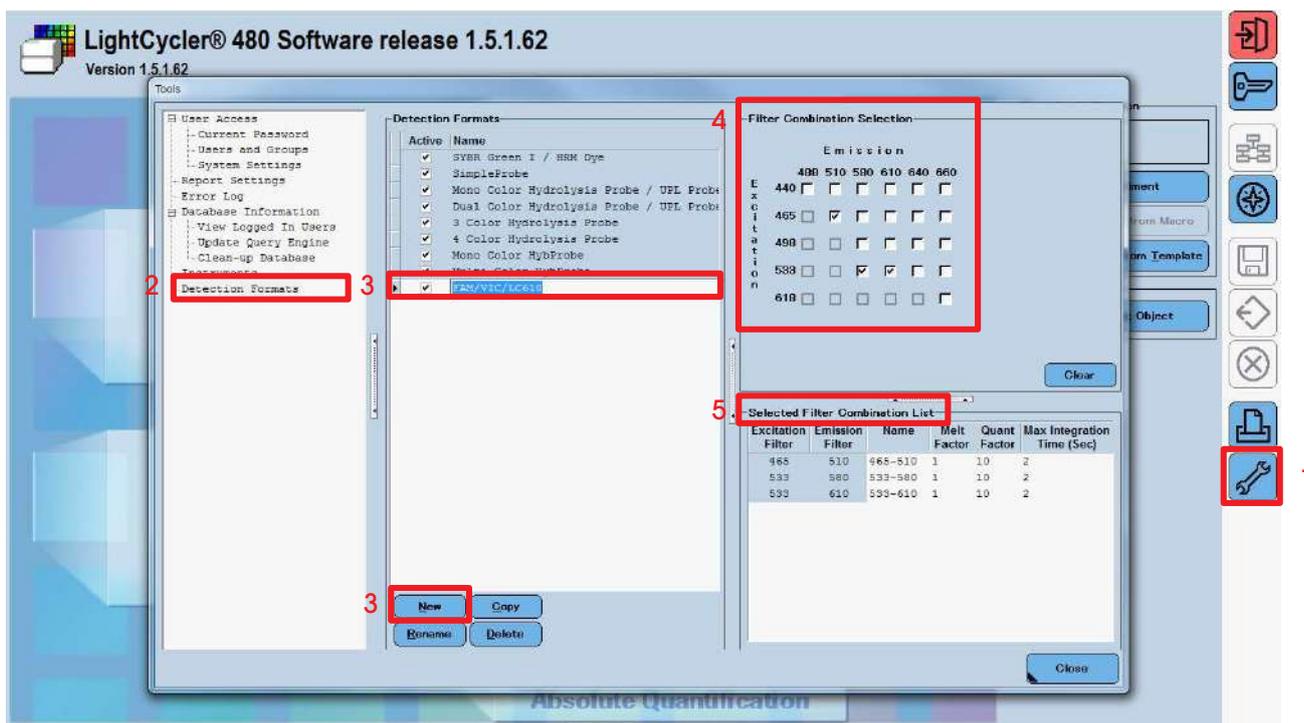
VIC： ポジコンとなるテンプレート、プライマー、VIC標識プローブ、実際に使用する試薬を加え、シングルプレックスPCRを行います。

LC610： ポジコンとなるテンプレート、プライマー、LC610標識プローブ、実際に使用する試薬を加え、シングルプレックスPCRを行います。

### 1-3. 新しいDetection Format の作成

Color Compensation のデータを取る前に、Detection Formatの新しいファイルを作成します。  
蛍光色素ごとの各パラメーターの設定例を下記に示します。

1. ソフトウェア画面の『Tools 』をクリックします。
2. 画面左側の一覧から『Detection Format』をクリックします。
3. 『New』をクリックして新しいファイルを作成します。ファイル名を入力します。
4. 検出したいフィルターセットにチェックを入れます。
5. Selected Filter Combination List で詳細の設定を行います。



#### ▷ Selected Filter Combination List の設定

- Melt Factor 1.2
- Quant Factor 20
- Max Integration Time 2sec 以下

添付マニュアル等に記載がある場合は、そちらに従ってください。

## 1-4. ランの設定

1. プロトコールは実際にマルチブックスPCRで行うPCRプロトコールを適用し、その後にColor Compensation objectを作成する工程を追加します。

1a ボタンでProgramを1つ追加します。

1b Analysis ModeでColor Compensationを選択します。

1c Temperature Targetを【Color Compensationの目安】を参考に設定します。

Program Name		Cycles	Analysis Mode
pre-incubation	1	None	
amplification	45	Quantification	
CC	1	Color Compensation	
cooling	1	None	

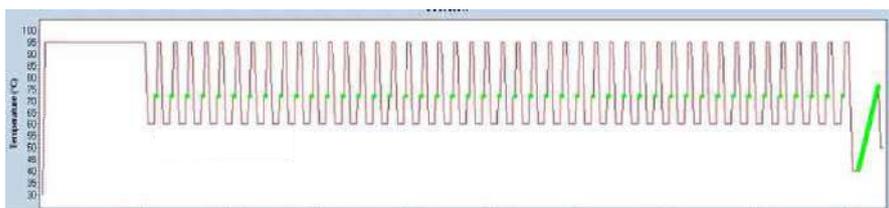
CC Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.4				
40	None	00:00:30	2.2				
77	Continuous		0.29	1			

【Color Compensation 条件の目安】

	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate	Acquisitions (per °C)	Analysis Mode
変性	95	None	10 sec	初期値		Color Compensation
データ取得開始温度	40	None	30 sec	初期値		
データ取得収量温度	X※	Continuous	-	-	1	

※マルチブックスPCR時のデータ取得温度プラス5°Cを目安とします

2. プロトコール全体の確認を行います。



3. ランをスタートさせます。

## 1-5. サブセットの設定

22 ページ『5章サブセットの設定』に従い、サブセットの作成を行います。

The screenshot displays the software interface for setting up a subset. On the left, a vertical sidebar contains buttons for 'Experiment', 'Subset Editor', 'Sample Editor', 'Analysis', 'Report', and 'Sum'. The main area is divided into two panels. The top-left panel, titled 'Subsets', contains a table with the following data:

ID	Name	Analysis	Report
1	All Samples	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2	CC FAM/VIC/LC610	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

The row for ID 2 is highlighted with a red border. The top-right panel, titled 'New Subset 1 settings', shows a grid with columns numbered 1 to 6 and rows labeled A, B, C, and D. The cells in the first three columns (1, 2, 3) for rows A, B, C, and D are shaded in a darker blue, while the cells in columns 4, 5, and 6 are a lighter blue.

## 1-6. サンプルエディターの設定

ここではTable View でのサンプルエディターの設定方法を記載します。

Plate View での入力方法や詳細は、23 ページ『6 章サンプルエディターの設定』をご参照ください。

1. Step1 でColor Comp をチェックします。
2. Step2 でSubset のプルダウンメニューから前項1-5 で作成したサブセットを選択します。
3. Step2 のプレートレイアウト上でウェルを選択します。
4. Step3 でSample Name およびDominant channel を入力/選択します。
5. 使用したすべてのウェルにサンプル情報を入力したら、レプリケートの設定を行います。

**Step 1: Select Workflow**

Abs Quant  Rel Quant  Scanning  Color Comp  
 Tm  Melt Geno  Endpt Geno

**Step 2: Select Samples**

Subset: CC FAM/VIC/LC610

2

3

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Dominant Channel
B1	Blue	B1	FAM	465-510
B2	Red	B1	FAM	465-510
B3	Green	B1	FAM	465-510

**Step 3: Edit Color Comp Properties**

4

Sample Name: FAM

Dominant channel: 465-510

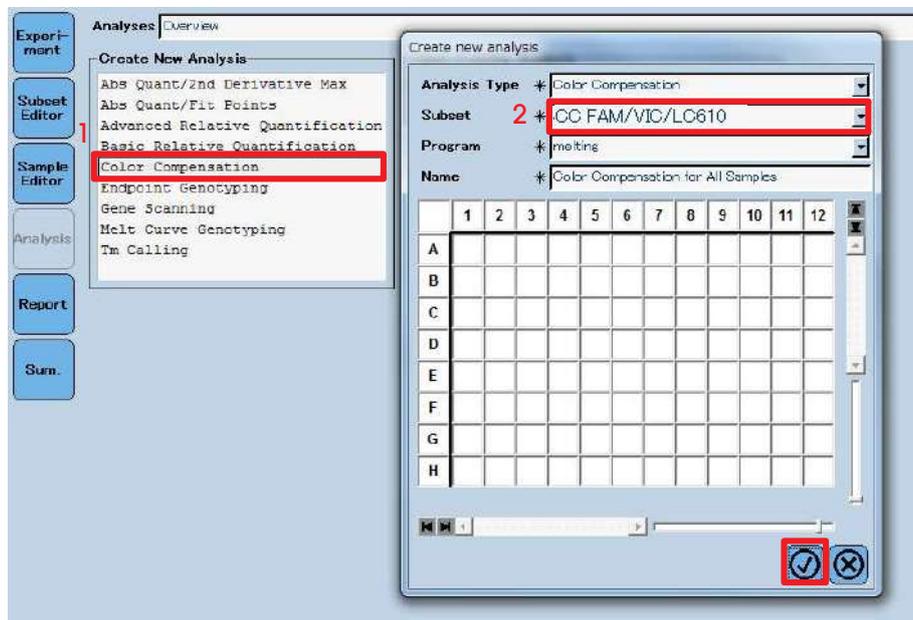
Water  
465-510  
533-580  
533-610

5 Auto Replicate

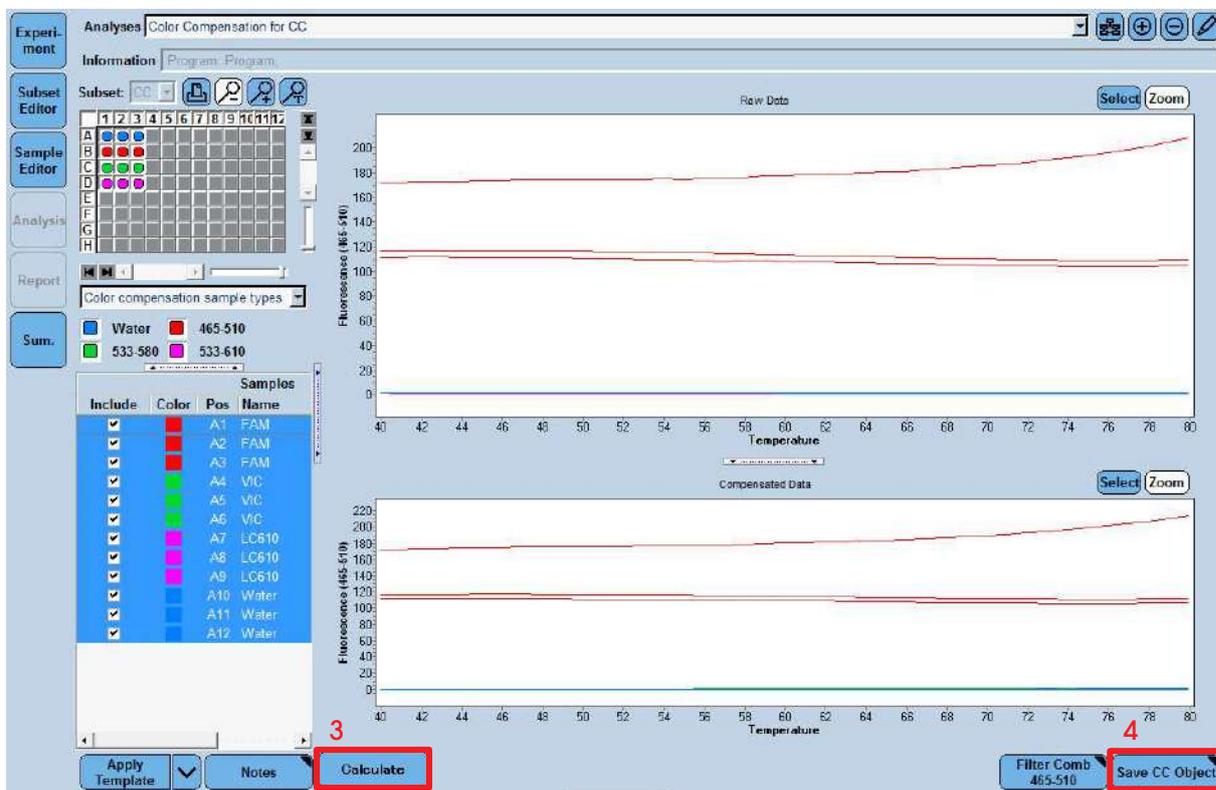
Apply Template | Configure Properties | Toggle View (Table)

## 1-7. 解析を行う

1. Create New Analysis で Color Compensation をクリックします。
2. Subset のプルダウンより、56 ページ 1-5 で作成したサブセットを選択し、チェックボタンを押して解析をスタートします。

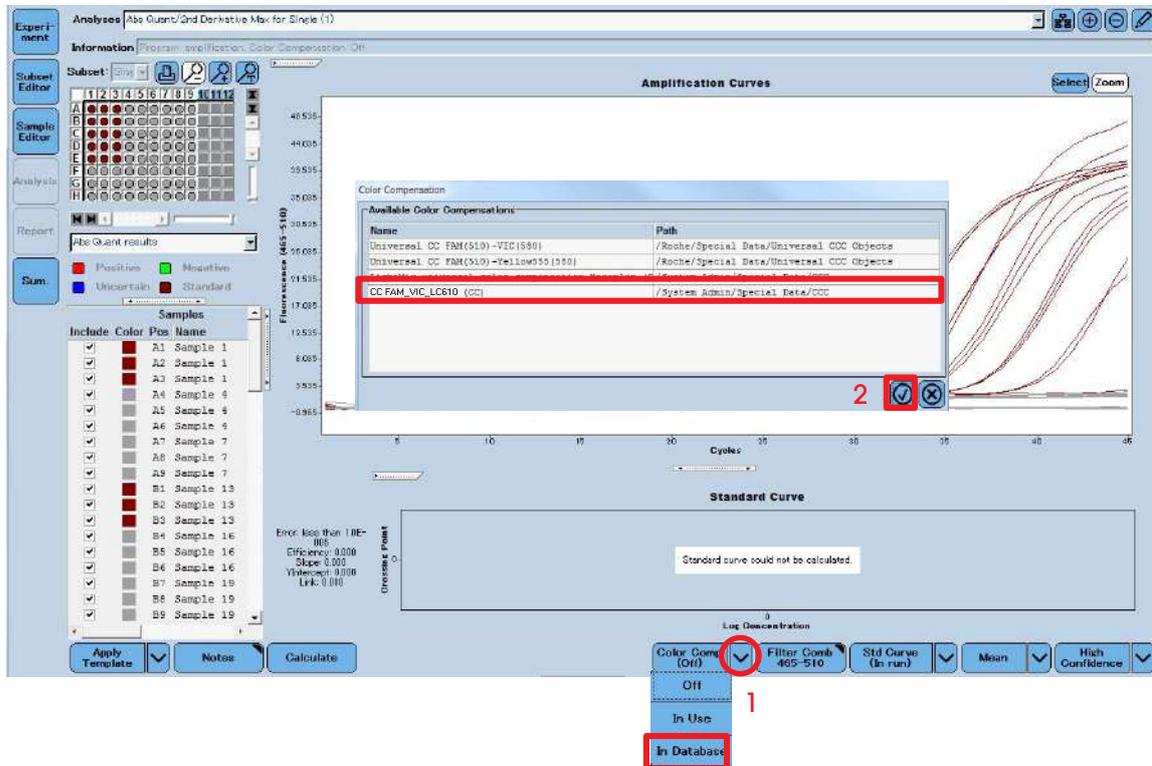


3. データが呼び出されたら Calculate をクリックします。
4. Save CC Object をクリックしてファイルを保存します。保存先はデフォルトで指定される CCC フォルダとします。

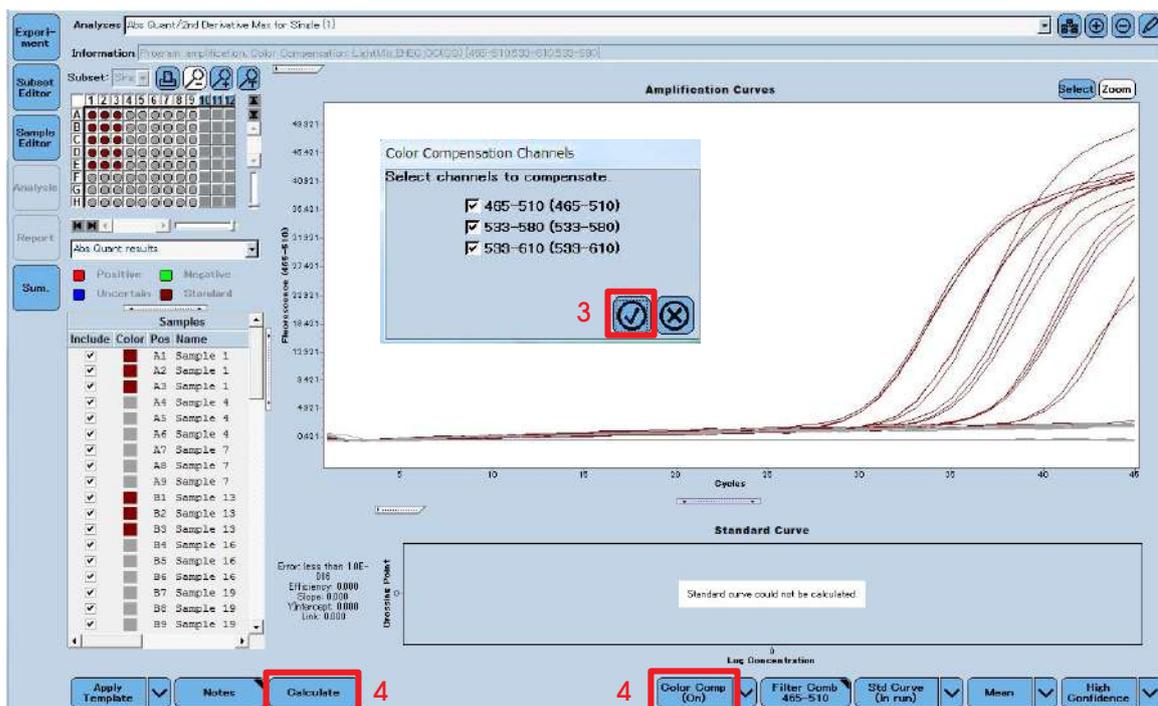


## 2. CC Object の適用

1. Color Comp (Off)の横の矢印をクリックして、In Database を選択します。
2. 適用可能なCC ファイルが表示されます。目的のCC ファイルを選択し、チェックボタンをクリックします。



3. 補正を行うチャンネルにチェックを入れ、チェックボタンをクリックします。
4. Color Comp (On)と表示されていることを確認し、calculate をクリックします。



### 3. マルチカラーアッセイの結果の確認方法

1. CC ファイル適用後、Filter Comb ボタンをクリックします。
2. Filter Combination より、表示させたい結果のフィルターを選択し、チェックボタンをクリックします。
3. Calculate ボタンをクリックします。



解析するフィルターごとに解析ファイルの追加を行っておくと便利です。

Amplification Curves

Filter Combination

- 465-510 (465-510)
- 533-580 (533-580)
- 533-610 (533-610)

Calculate 3

Filter Comb 465-510 1

1

## B. ログファイルの回収方法

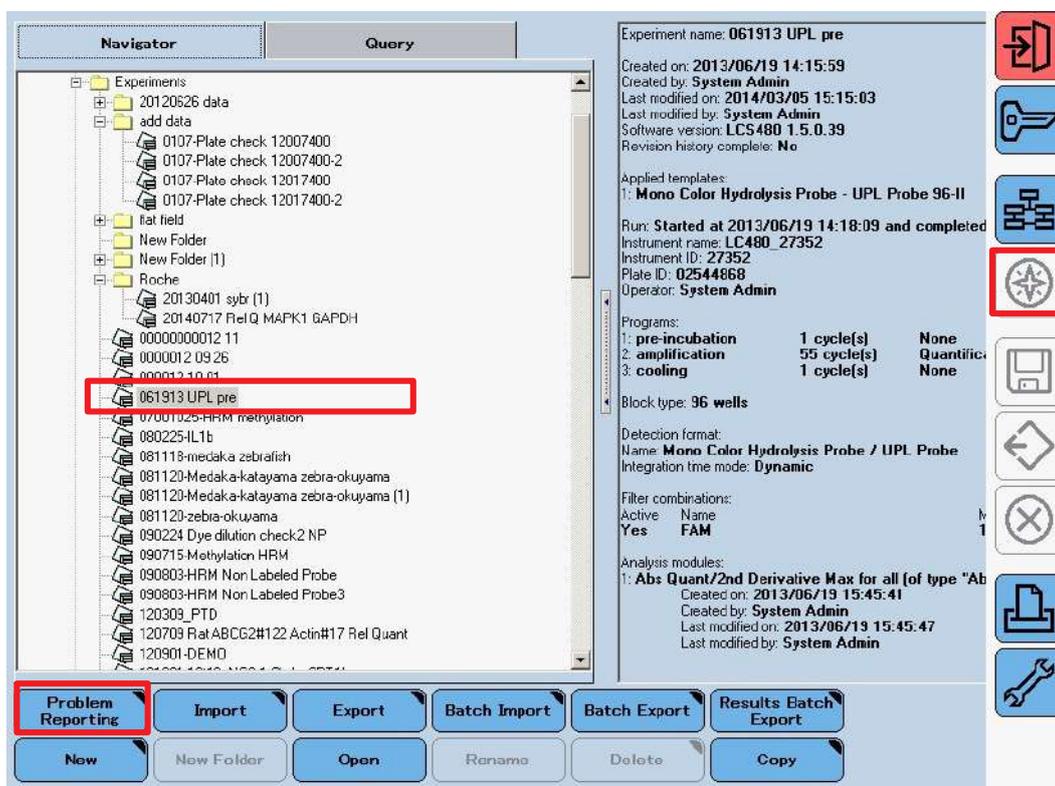
LightCycler® 480でトラブルが発生した場合、問題解決のため当社よりログファイルの回収をお願いする場合がございます。以下の方法でログファイルを回収いただき、下記までお問い合わせください。

お問合せ先：日本ジェネティクス株式会社（販売元）

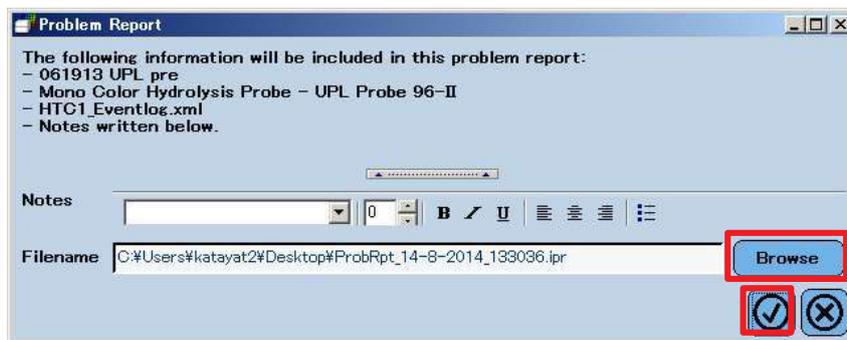
〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18F

メールアドレス：info@genetics-n.co.jp TEL：03-3813-0961 FAX：03-3813-0962

1.  をクリックし、ナビゲータを開きます。対象のデータを選択後、Problem Reporting をクリックします。



2. Browse ボタンで保存場所を選択し、チェックをクリックします。  
保存されたファイル (.ipr) をメールに添付して当社カスタマーサポートセンターまでご連絡ください。



前項記載のログファイルの取得と併せて、以下の方法でも、ログファイルを回収、ご送付ください。

**【ログファイルの取得方法】**

1. 下記の階層にあるフォルダ内のファイルごと回収します。

Cドライブ > Program Data > Roche > LightCycler 480 > Bin > Logs

XPの場合: Cドライブ > Program Files > Roche > LightCycler 480 > Bin > Logs フォルダに、

7, 8, 10の場合: Cドライブ > Program Data > Roche > LightCycler 480 > Bin > Logs フォルダに、

上記の「Logs」フォルダのコピーをデスクトップ作成します。

**【注意】** 必ずコピーをデスクトップに作成してから、以下の作業を進めてください。

フォルダ内で操作を続けると、ソフトウェアの破損につながります。

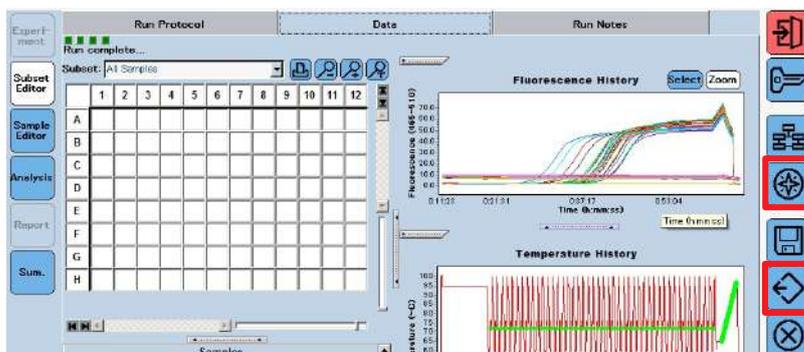
2. コピーしたフォルダ上で右クリック、メニューからSend to > Zippedを選択すると、「Logs.zip」ファイルが生成されます。
3. 作成した「Logs.zip」ファイルを下記の弊社メールアドレス宛にお送りください。

## C. バックアップとインポート

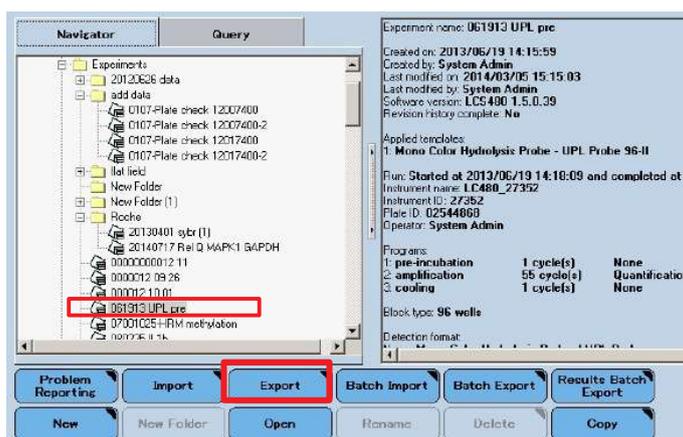
コンピュータの障害に備え、重要なデータは定期的にバックアップを取っておくことを推奨します。  
あるいは別のコンピュータでデータ解析する場合もこの作業が必要です。

### エクスペリメントファイルを1つずつエクスポートする

1. 対象のデータを開き、 をクリックします。



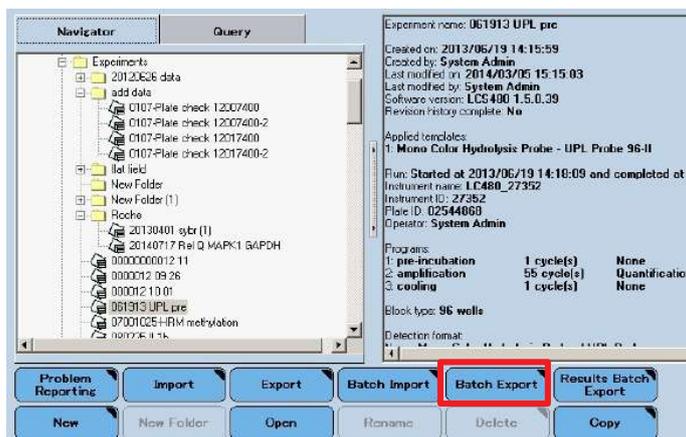
あるいは  をクリックし、対象のデータを選択後、Exportをクリックします。



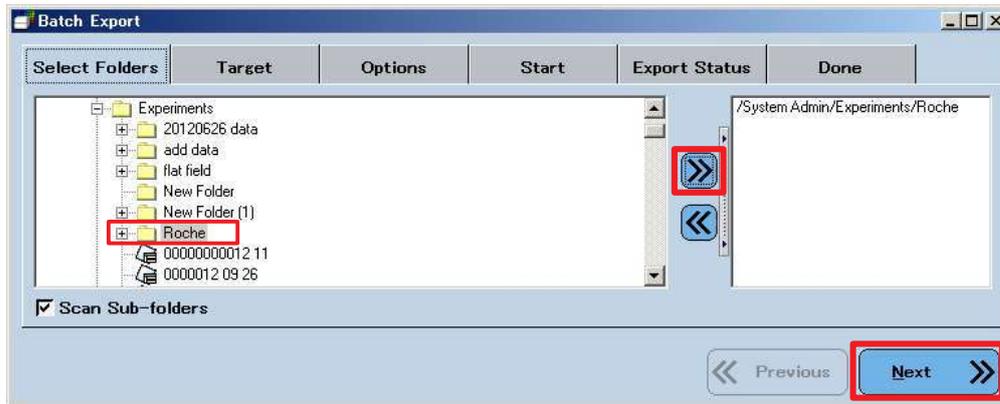
2. ファイルに名前を付けて、外部メディアなどに保存します。  
バックアップファイルは .ixo ファイルとして保存されます。

### エクスペリメントファイルをフォルダ単位でエクスポートする

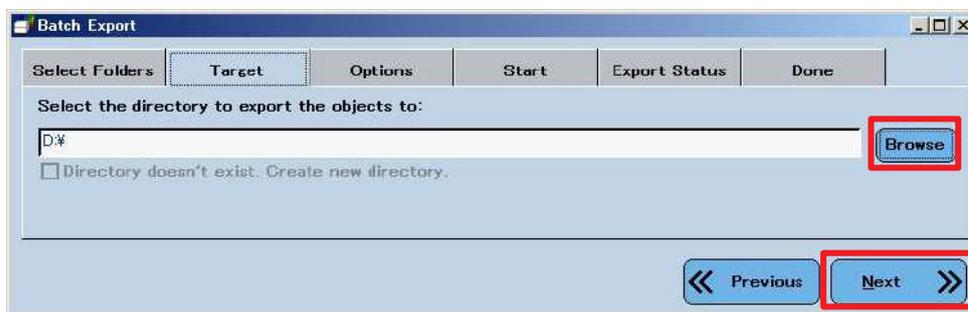
1.  をクリックし、Batch Export をクリックします。



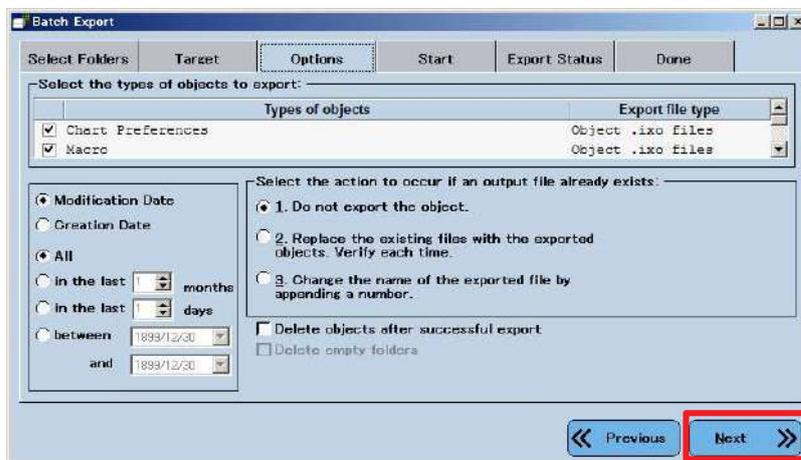
- 対象のフォルダを選択し、 ボタンをクリックします。他にもフォルダがある場合はこの作業を繰り返します。Next をクリックします。



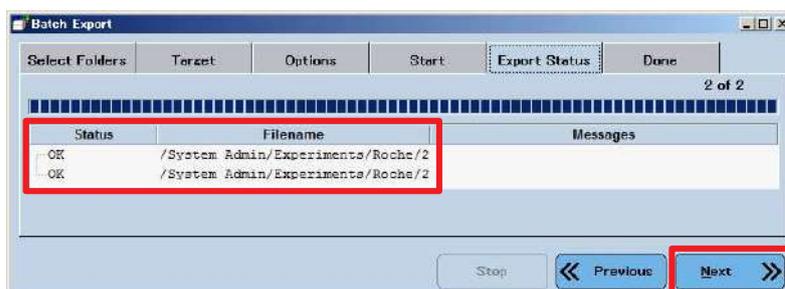
- Browse でアウトプット場所を決定し、Next をクリックします。



- ファイルの種類や作成日、重複ファイルがあった場合の対応を選択し、Next をクリックします。



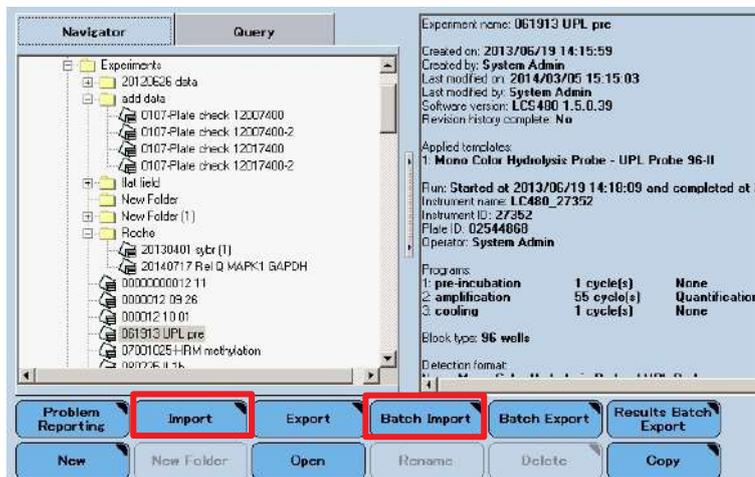
- 再度、Next をクリックし、エクスポートを開始します。完了すると、OK が表示されます。バックアップファイルは .ixo ファイルとして保存されます。



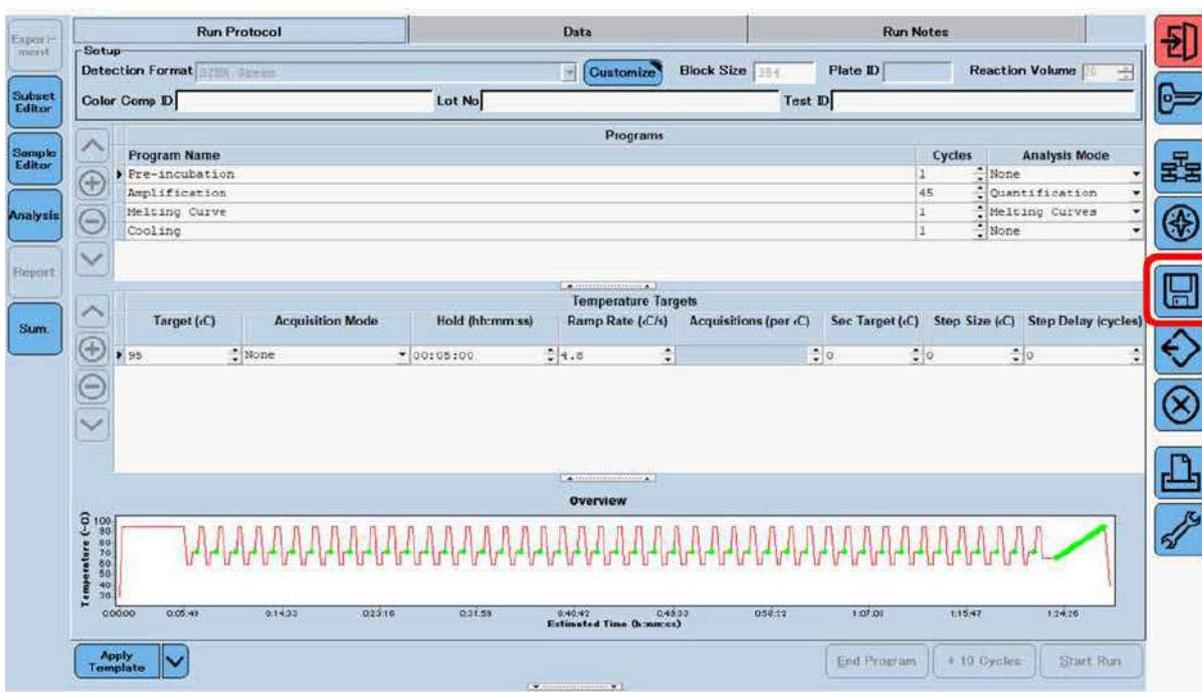
## バックアップファイル (.ixo)をインポートする

コンピュータに障害があった場合、あるいは別のコンピュータで解析したい場合は作成しておいた .ixo ファイルをインポートします。

1. .ixo ファイルを一つずつインポートするには Import をクリックします。  
あるいはフォルダ単位でまとめて .ixo ファイルをインポートする場合は Batch Import をクリックします。  
この処理は Batch Export 同様に処理することができます。



2. 読み込みを行った段階では、データは保存されていないので、保存が必要な場合は、セーブボタンを押してください。



#### 制御PCにてデータ解析を行う場合の注意点

制御PCにて、RUN中に、データの解析を複数行いますと、PCに負荷がかかり、RUNがストップしてしまうことがあります。このため、可能であれば、データの解析は制御PC以外の装置で行っていただく方が、安全です。

## D. 機器の再接続

### LightCycler480 本体と制御用PC の再接続について

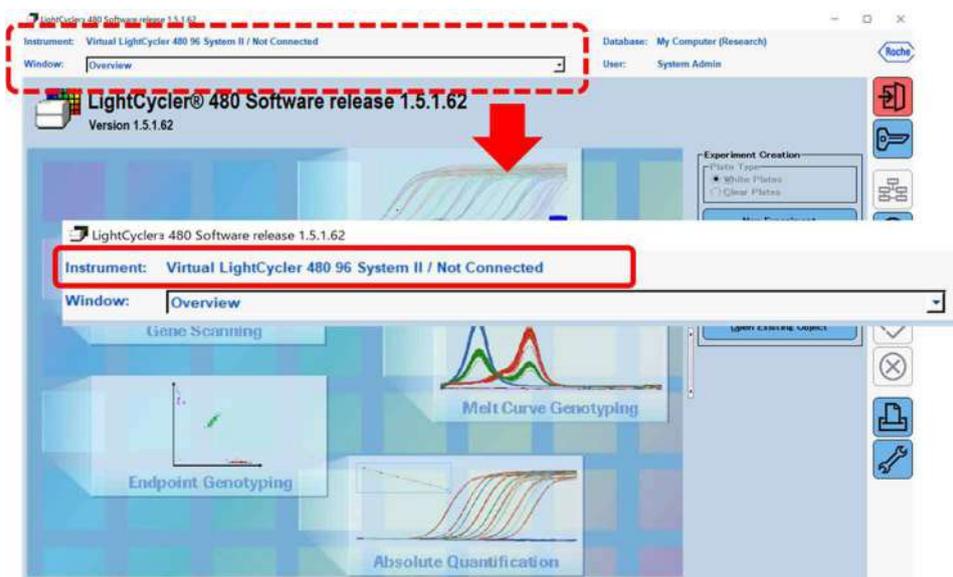
ソフトの2重立ち上げ等を行うと、LightCycler480本体と制御用PCとの接続が切れます。

もし、接続が切れた場合は、“no active instrument”等のエラーメッセージが発生し、次のステップに進めることができなくなります。

接続が切れた場合は、以下の手順で再接続を行ってください。

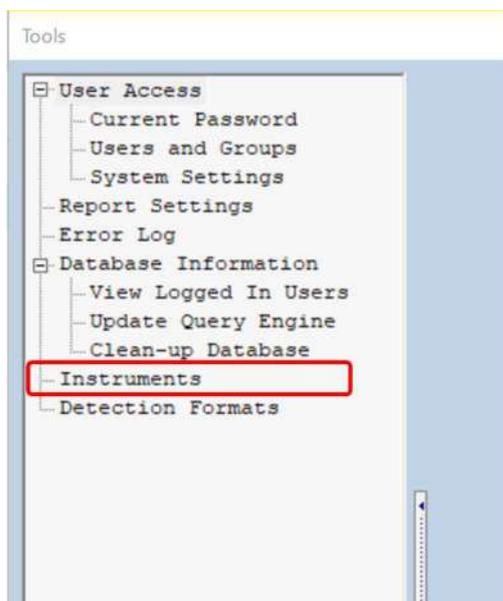
### 設定前の確認

- LightCycler 480および、制御用PCの電源を入れた状態でご確認ください。
- LightCycler480のソフトウェアを起動し、オーバービューの画面上的「Instrument : 」の表示をご確認ください。  
「Virtual LightCycler480 96 well」または、「Virtual LightCycler480 384 well」等のように、「Virtual XXXXX…」と「Virtual」の記載がある場合には、接続が切れています。

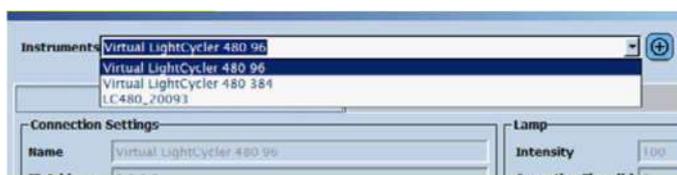


## LightCycler480 通信接続の再設定方法

1. オーバービュー画面の右側アイコン群から、「Tools」アイコンをクリックします
2. 表示される「Tools」のダイアログの左側の選択肢から、「Instruments」を選択します



3. 右側に表示される最上部の「Instruments」の項目が「Virtual XXXXX…」となっていることを確認し、右側にあるプルダウンボタン(▼)をクリックし表示されるサブメニューから、「LC480\_XXXXXX」(XXXXXXは機器本体シリアル番号)を選択します。



4. 先程3. にて、変更いただいた項目の下部にある、「Test Connection」アイコンをクリックし、「Success to Connection」の表示を確認いたします。  
※ 「Failed」が表示された場合には、機器制御用PCを再起動し、上記操作を繰り返し実施します。
5. 「Tools」ダイアログの右下にある、「Update Information」ボタンをクリックし、「Make Default」ボタンをクリックします。最後に、「Close」ボタンをクリックし、ダイアログを閉じます。

## 再設定後の確認

1. LightCycler480制御用ソフトウェアのオーバービューの画面左上の「Instrument :」の項目が、「LC 480\_ XXXXXX / Standby (no MWP)」(XXXXXXは機器本体シリアル番号)になっていることを確認します。



2. もし、「Instruments:」の項目が「Virtual XXXXX…」と、「Virtual」の記載が引き続きある場合にはLightCycler480 および、制御用PCの電源を入れなおした後に、最初から再設定操作を行ってください。

## E. 専用試薬・消耗品のご案内

### インターカレーター色素用試薬

	製品番号	梱包単位	希望販売価格
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	04707516001	500反応分/20 µL (5 mL)	¥50,000
	04887352001	5,000反応分/20 µL (10×5 mL)	¥369,000

### Probe/UPL用試薬

	製品番号	梱包単位	希望販売価格
LightCycler® 480 Probes Master	04707494001	5×1 mL (500 反応分/20 µL)	¥49,000
	04887301001	10×5 mL (5000 反応分/20 µL)	¥369,000
LightCycler® Multiplex DNA Master	04902343001	5000反応分/20 µL (1×50 mL)	¥369,000

### Probe/UPL用 1 Step RT-PCR 試薬

	製品番号	梱包単位	希望販売価格
LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes	04991885001	500反応分/20 µL (5 mL)	¥74,000

### プレート、および8連チューブ

	製品番号	梱包単位	希望販売価格
LightCycler® 480 Multiwell Plate96 white (プレート&シーリングホイル各50枚入)	4729692001	プレート&シーリングホイル各50枚入	¥48,000
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 clear	5102413001	プレート&シーリングホイル各50枚入	¥48,000
LightCycler® 480 Multiwell Plate384 white	4729749001	プレート&シーリングホイル各50枚入	¥48,000
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 clear	5102430001	プレート&シーリングホイル各50枚入	¥48,000
LightCycler® 8-Tube Strips (white)	6612601001	120 strips	¥14,000
LightCycler® 8-Tube Strip Adapter Plate *8連チューブにて計測する場合は、必要になります。	6612598001	1アダプター	¥24,000