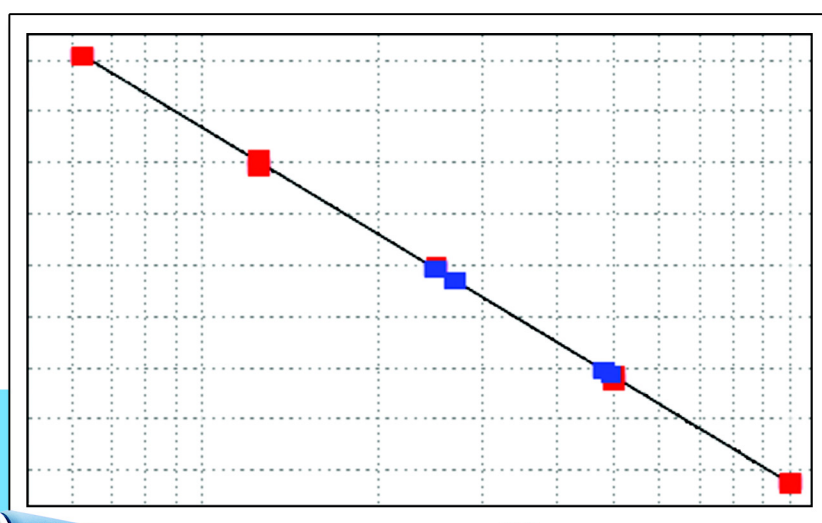


Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

標準曲線実験



はじめに

1

Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

標準曲線実験

実験の設計

2

反応の準備

3

実験の測定

4

実験の解析

5

© Copyright 2007, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems are covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods.

Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, ROX, StepOne, StepOnePlus, TAMRA, and VeriFlex are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

部品番号 4377734 Rev. C
06/2010

目次

	序章	vii
	このガイドの使用方法	vii
	詳細に関する参考資料	ix
	サポートの受け方	xii
	本書で使われている安全に関する表記法	xiii
	装置に付いているマーク	xiv
	装置に付いている安全上のラベル	xvi
	装置の安全性に関する一般的注意事項	xvii
	薬品に関する安全性	xviii
	化学廃棄物に関する安全性	xix
	電気に関する安全性	xx
	LED の安全性	xxi
	バイオハザードに関する安全性	xxi
	ワークステーションに関する安全性	xxii
	安全性および電磁環境適合性（EMC）規格	xxii
第 1 章	はじめに	1
	StepOne™ および StepOnePlus™ システムについて	2
	使用可能な消耗品	4
	標準曲線実験について	6
	本書の使用方法	9
	実験例について	10
	実験例ワークフロー	13
第 2 章	実験の設計	15
	本章の概要	16
	新しい実験の作成	17
	実験プロパティの定義	20
	方法と物品の定義	22
	ターゲットのセットアップ	25
	スタンダードのセットアップ	27
	サンプルのセットアップ	29
	測定方法のセットアップ	31
	反応セットアップの確認	33
	実験用物品の注文	38

[Design Wizard] (設計ウィザード) の終了	42
-------------------------------------	----

第 3 章 **反応の準備** **45**

本章の概要	46
サンプル希釈液の調製	47
スタンダード希釈シリーズの調製	49
反応ミックスの調製	51
反応プレートの調製	53

第 4 章 **実験の測定** **59**

本章の概要	60
測定の準備	61
(オプション) 通知設定の有効化	63
測定の開始	65
測定の監視	69
プレートの取り出しとデータの転送	76

第 5 章 **実験の解析** **81**

本章の概要	82
セクション 5.1：結果の確認	83
実験の解析	84
標準曲線の表示	90
増幅プロットの表示	92
ウェルテーブルの表示	99
データのパブリッシュ	102
セクション 5.2：トラブルシューティング (必要に応じて)	103
[Analysis Settings] (解析設定) の表示	104
[QC Summary] (QC サマリー) の表示	106
解析からウェルを選択削除	108
[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) の表示	109
[Raw Data Plot] (生データプロット) の表示	112

付録 A **代替実験ワークフロー** **115**

[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー	116
[QuickStart] (クイックスタート) ワークフロー	117
[Template] (テンプレート) ワークフロー	119
[Export/Import] (エクスポート/インポート) ワークフロー	121

参考文献	125
用語集	127
索引	143

このガイドの使用方法

システム文書について

Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (StepOne™ および StepOnePlus™ システム) には、以下に示したガイドが付属しています。

参考: 本ガイドで使用される Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems という表記は、Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System および Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System の 2 製品を示します。

ガイド	目的と対象	PN	日本語版 PN
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	StepOne および StepOnePlus システムで実験を行う方法を解説します。各『入門ガイド』には次の 2 つの機能があります。	4376786	4377731
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	- Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software (StepOne™ ソフトウェア) で提供されている実験データ例を使ったチュートリアル。 - 実際の実験のためのガイド。	4376787	4377722
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	StepOne または StepOnePlus システムを使って実験を実施する実験室スタッフや研究者を対象に書かれています。	4376785	4377740
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>		4376784	4377734
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation, Networking, and Maintenance Guide</i>	StepOne および StepOnePlus システムの設置とメンテナンスの方法を解説します。	4376782	4377796
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Quick Reference Card</i>	StepOne または StepOnePlus システムを設置、メンテナンスする実験室スタッフを対象に書かれています。	4376783	4377790
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide</i>	StepOne および StepOnePlus システムで使用する試薬に関する情報を提供し、以下のものが含まれます。 - TaqMan® および SYBR® Green 試薬に関する序論 - 以下の実験タイプに対する設計ガイドラインの説明 - 定量実験 - ジェノタイピング実験 - 有無実験 StepOne または StepOnePlus システムを使って実験を実施する実験室スタッフや研究者を対象に書かれています。	4379704	4377716

ガイド	目的と対象	PN	日本語版 PN
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus® Real-Time PCR Systems Site Preparation Guide</i>	StepOne および StepOnePlus システムの受け取りと設置に向けた設置場所の準備作業を解説します。 StepOne または StepOnePlus システムの設置前にしておくべき設置場所の準備作業をスケジュール設定、管理、実施する担当者向けに書かれています。	4376768	4378357
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software Help</i>	StepOne ソフトウェアを用いて以下の事項を行う方法を解説します。 • StepOneおよびStepOnePlusシステムで実験のセットアップ、測定、解析。 • ネットワーク上の StepOne および StepOnePlus 装置の監視。 • StepOneおよびStepOnePlus装置のキャリブレーション。 • RNase P 測定による StepOne および StepOnePlus 装置の性能確認。 対象： • StepOneまたはStepOnePlusシステムを使って実験を実施する実験室スタッフや研究者。 • StepOne または StepOnePlus システムを設置、メンテナンスする実験室スタッフ。	NA	NA

前提条件 本書は、次のことを前提に書かれています。

- Microsoft Windows® XP オペレーティングシステムに精通している。
- インターネットとインターネットブラウザに精通している。
- DNAまたはRNAサンプルの取扱いおよびPCRのための調製方法に関する知識がある。
- データ保存、ファイル転送、コピーと貼り付けを理解している。
- 既存の実験データフローへ StepOne または StepOnePlus システムを組み込む場合、ネットワーク構築の経験がある。

テキスト表記法 本書では、次の表記法を採用しています。

- 太字はユーザーが行う操作を示します。次に例を示します。
0を入力してから、残りの各フィールドで **Enter** を押します。
- 斜体文字は、新規または重要な用語を示すほか、強調する際にも使われます。次に例を示します。
解析前に、必ず新しいマトリックスを調製してください。
- 右矢印記号 (▶) は、ドロップダウンまたはショートカットメニューからユーザーが続けて選択すべきコマンドの区切りとして使われます。次に例を示します。
[File] (ファイル) ▶ [Open] (開く) を選びます。

ユーザーの注意を促す語句

Applied Biosystems ユーザー文書では、ユーザーの注意を促す 2 種類の用語が使われています。各語句は、次のような注意や対応が必要なことを示します。

参考： — 必ずしも製品の使用に不可欠というわけではありませんが、製品を使用する上で役に立つ情報です。

重要！ — 装置の適切な操作、試薬キットの正しい使用、化学薬品の安全な使用にとって必要な情報を提供します。

ユーザーの注意を促す用語の例を下記に示します。

参考： [Calibrate] (キャリブレーション) 機能は、コントロールコンソールでも利用できます。

重要！ クライアント接続を確認するには、有効なユーザー ID が必要です。

安全上の警告語句 本書では安全上の警告語句も使用されています。詳細については、「安全上の警告語句」(xiii ページ) をご参照ください。

詳細に関する参考資料

関連文書 StepOne および StepOnePlus システム文書

下表に示した文書は、StepOne または StepOnePlus 装置に付属していません。以下の文書は、2007 年 7 月以降に入手可能となります。

文書	PN
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Planned Maintenance Protocol</i>	4376788

ジェノタイピング実験関連文書

文書	PN
<i>Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card</i>	4312212
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card</i>	4374204
<i>Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4371394
<i>Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4367636
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856

有無実験関連文書

文書	PN
<i>DNA Isolation from Fresh and Frozen Blood, Tissue Culture Cells, and Buccal Swabs Protocol</i>	4343586
<i>NucPrep® Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol</i>	4333959
<i>PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol</i>	4318925

相対標準曲線および比較 C_T 実験関連文書

文書	PN
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

標準曲線実験関連文書

文書	PN
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

試薬ガイド関連文書

文書	PN
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol</i>	4367218
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4304965
<i>SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4310251
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol</i>	4308335
<i>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol</i>	4351891
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol</i>	4371135
<i>TaqMan® Genotyping Master Mix Protocol</i>	4371131
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol</i>	4304449
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859
<i>Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note</i>	127AP08

参考： その他の文書については、「[サポートの受け方](#)」(xii ページ) をご参照ください。

ソフトウェアヘルプ 情報の入手

StepOneソフトウェアヘルプは、ユーザーインターフェースの各機能の使い方を説明します。ソフトウェア内のヘルプにアクセスするには、下記のいずれかを行います。

- **F1** を押します。
- ツールバーの  をクリックします。
- **[Help]** (ヘルプ) ▶ **[StepOne Software Help]** (StepOne ソフトウェアヘルプ) を選択します。

ヘルプで関心トピックを見つけるには：

- 目次を確認します。
- トピックを指定して検索します。
- アルファベット順の索引を検索します。

コメントの送付

Applied Biosystems は、ユーザー文書を改善するために、お客様のコメントやご意見をお待ちしています。コメントは電子メールで以下のアドレスまでお寄せください。

techpubs@appliedbiosystems.com

重要！ 上記の電子メールアドレスは、文書に関するコメントおよびご意見専用です。文書のご注文や、PDF ファイルのダウンロード、技術上のご質問については、<http://www.appliedbiosystems.com> で **[Support]** (サポート) リンクをクリックしてください。(「サポートの受け方」(xii ページ) 参照)。

サポートの受け方

最新のサービスおよびサポート情報については、<http://www.appliedbiosystems.co.jp> で **[Support]** (サポート) リンクをクリックしてください。

カスタマーサポートページでは次のサービスをご利用いただけます。

- Q&A の検索
- テクニカルサポートへの質問提出
- Applied Biosystems ユーザー文書、MSDS、その他の関連文書の注文
- PDF 文書のダウンロード
- ユーザートレーニングに関する情報入手
- ソフトウェアのアップデートやパッチのダウンロード

尚、技術的な質問を行うには、Applied Biosystems メンバーシップ会員として入会し、ログインしていただく必要があります。

重要！ 本書に指示のある場合や StepOne™ または StepOnePlus™ 装置のメンテナンス (年次定期メンテナンスや温度確認／キャリブレーション) をスケジュールする際は、Applied Biosystems PCR アドミにご連絡ください。PCR アドミへは、お電話 0120-203-885 までお問い合わせください。

本書で使われている安全に関する表記法

安全上の警告語句 安全上の警告語句は 4 種類あり、Applied Biosystems の文書中、危険発生の可能性についてユーザーに警告を促すべき箇所に適宜使われています。警告を促す各語句（重要、注意、警告、危険）は、次のような注意や対応の必要を示します。

定義

重要！ – 装置の適切な操作、試薬キットの正しい使用、化学薬品の安全な使用にとって必要な情報を示します。



注意

– この情報を無視すると、軽度または中程度の怪我を負う可能性のある危険な状況であることを示します。安全でない行為を警告する際に使われる場合もあります。



警告

– この情報を無視すると、重傷を負ったり、死亡する可能性のある危険な状況であることを示します。



危険

– すぐに対応しないと、死亡や重症を引き起こす切迫した状況であることを示します。この語句は、もっとも危険な状況にのみ使われます。

Applied Biosystems 文書中で使われている「重要」以外の安全上の警告語句は、危険マークを含む三角形のグラフィックとともに記載されています。これらの危険マークは、Applied Biosystems の装置に貼付されている危険アイコンと同じマークです（「安全上のマーク」(xv ページ) 参照）。

例

重要！ 各 96 ウェルプレートについて、個別のサンプル入カスプレッドシートを作成する必要があります。

 **注意** 危険な薬品：TaqMan® Universal PCR Master Mix は、目と皮膚に炎症を引き起こす可能性があります。飲み込んだり、吸入すると、不快な症状が発生する可能性があります。MSDS をよく読み、取扱い上の指示に従ってください。使用時には、適切な保護めがね、保護服、保護手袋を着用してください。

 **警告** 怪我の危険：装置の操作中、カバーやサンプルブロックは 100 °C 超にまで加熱される可能性があります。

 **危険** 電気に関する危険：安全に操作するには、接地回路の連続性が不可欠です。接地回路が接続されていないシステムは絶対に操作しないでください。

装置に付いているマーク

電気関連のマーク 次表に、Applied Biosystems の装置に表示されている電気関連のマークを示します。

記号	説明	記号	説明
	主電源スイッチが オン の位置になっていることを示します。		別の装置の信号接地基準に接続されている可能性のある端子を示します。これは、保護接地端子ではありません。
	主電源スイッチが オフ の位置になっていることを示します。		保護接地端子を示し、装置に他の電氣的接続を行う前に、この端子をアース接地に接続する必要があります。
	装置を スタンバイ 状態にするスタンバイスイッチを示します。このスイッチがスタンバイ状態の場合は、危険な電圧が存在する恐れがあります。		交流の電流または電圧を入力または出力できる端子を示します。
	プッシュプッシュ主電源スイッチが オン／オフ の位置になっていることを示します。		交流または直流の電流または電圧を入力または出力できる端子を示します。

安全上のマーク

次表に、Applied Biosystems の装置に表示されている安全上のマークを示します。これらのマークは、マーク単独で示されることもあれば、関連する危険を説明するテキストと一緒に表示される場合もあります（「装置に付いている安全上のラベル」（xvi ページ）参照）。これらの安全上のマークは、本書やその他の製品マニュアル中で「危険」、「警告」、「注意」の語句の隣に表示される場合もあります。

記号	説明	記号	説明
	詳細情報についてマニュアルを参照し、適切な注意を払いながら操作を進める必要があることを示します。		可動性の部品が存在するため、適切な注意を払いながら操作を進める必要があることを示します。
	表面などの高温の危険があるため、適切な注意を払いながら操作を進める必要があることを示します。		感電の危険があるため、適切な注意を払いながら操作を進める必要があることを示します。
			装置内でレーザーが発生するため、適切な注意を払いながら操作を進める必要があることを示します。

環境に関するマーク

下記の記号は、2005 年 8 月 13 日以降に欧州市場で販売されるすべての Applied Biosystems 電気および電子機器製品に適用します。

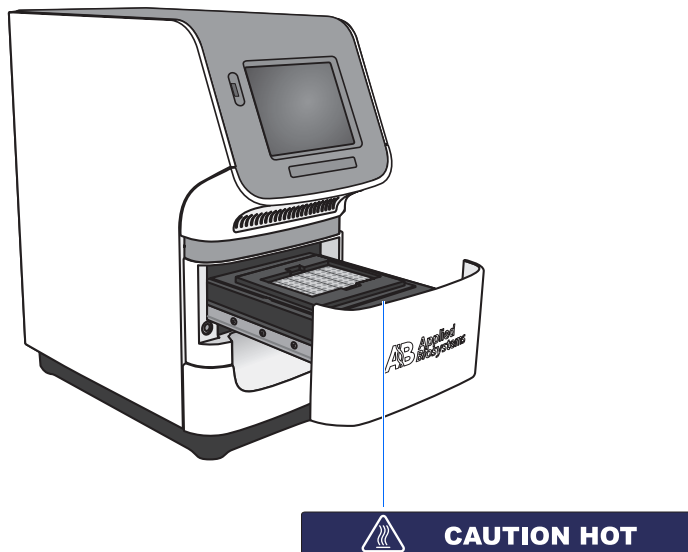
記号	説明
	本製品は、一般廃棄物として廃棄しないでください。 廃電気電子機器（WEEE）による環境への影響を低減するための、地域の廃棄物条例の適切な廃棄に関する規定に従ってください。 欧州連合のお客様： 最寄りの Applied Biosystems カスタマーサービスオフィスまで、装置の回収とリサイクルについてお問い合わせください。欧州連合カスタマーサービスオフィスのリストについては、http://www.appliedbiosystems.com を参照してください。

装置に付いている安全上のラベル

「注意」、「警告」、「危険」で始まる下記の注意事項は、前のセクションで説明した安全上のマークとともに Applied Biosystems の装置に表示されることがあります。

英語	フランス語
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	ATTENTION Produits chimiques dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	ATTENTION Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la réglementation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	ATTENTION Surface brûlante.
DANGER High voltage.	DANGER Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	AVERTISSEMENT Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	ATTENTION Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	DANGER Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

警告の表示位置 StepOne および StepOnePlus システムでは、警告は下図に示す位置にあります。



装置の安全性に関する一般的注意事項



警告 怪我の危険：本装置を Applied Biosystems の指示に従わないで使用すると、ユーザーが怪我を負ったり、装置が破損する可能性があります。

装置の移動と持ち上げ



注意 怪我の危険：本装置の移動や配置は、各装置の設置場所の準備に関するガイドに指定されている担当者または販売業者のみが行ってください。一旦設置した後に装置を持ち上げたり、移動する場合は、必ず、他の人にも助けを依頼し、適切な搬送器具や正しいリフト技術をお使いください。正しい方法で持ち上げないと、背中を痛め、痛みが長く続く恐れがあります。装置の重量によりませんが、装置の移動や持ち上げには、2 人以上の人員が必要になることがあります。

コンピュータとモニタの移動と持ち上げ



警告 一人でコンピュータやモニタを持ち上げたり、移動しようとししないでください。コンピュータやモニタの重量によりませんが、移動や持ち上げには 2 人以上の人員が必要になることがあります。

コンピュータやモニタを持ち上げる前に考慮すべき項目：

- 持ち上げる際に、コンピュータまたはモニタをしっかりと持ちやすいようにつかんでいることを確認してください。
- 装置の現在位置から設置予定場所までの経路に障害物がないことを確認してください。
- 装置を持ち上げるのと同時に胴体をひねらないように注意してください。
- 持ち上げる際には両脚の力を利用し、背骨は良好な中間位に保ってください。
- 装置を持ち上げて運ぶ前に、それら作業に携わる人員の間で、持ち上げと移動の呼吸やタイミングを確認しあってください。
- 装置を梱包されてきた箱から出すには、装置を箱から持ち上げるのではなく、箱を注意深く横に傾けて、一人がしっかりと押さえている間に、他の人が中身を箱からスライドさせて取り出してください。

装置の操作

装置の操作者に関して次のことを確認してください。

- 一般的な実験室の安全性基準と装置固有の安全性基準に関する指導を受けたこと。
- 該当するすべての化学物質等安全性データシート (MSDS) をよく読み理解していること。「MSDS について」(xviii ページ) をご参照ください。

装置のクリーニング／除染



注意 製造元が推奨する以外のクリーニング／除染方法を使用する際は、事前に製造元に、その方法で装置が損傷しないかご確認ください。

薬品に関する安全性

危険な薬品に関する警告



警告 危険な薬品：薬品を取り扱う前に、必ず、製造元の提供する化学物質等安全性データシート（MSDS）をよく読み、関連するすべての注意事項を確認してください。



警告 危険な薬品の保管：ガラス容器は壊れる恐れがあるため、廃棄物の収集や保管にガラス容器を使用しないでください。試薬ボトルおよび廃棄物ボトルは、ひびが入ったり、漏れる恐れがあります。各廃棄物ボトルは、低密度ポリエチレン安全容器内に保管し、カバーをしっかりと閉め、ハンドルをまっすぐ立てた状態でロックします。試薬ボトルや廃棄物ボトルを取り扱う際には、適切なめがね、保護服、手袋を着用してください。

薬品に関する安全性 ガイドライン

薬品の危険を最小限にするため：

- 薬品や危険物を貯蔵し、取扱い、使用する前に、必ず、製造元の提供する化学物質等安全性データシート（MSDS）をよく読み、理解してください。（「[MSDS について](#)」（[xviii ページ](#)）をご参照ください。）
- 薬品との接触を最小限に抑えてください。薬品の取扱い時には、適切な保護具（例、安全めがね、保護手袋、保護服）などを着用してください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品の吸入を最小限に抑えてください。薬品の容器を開けたままにしないでください。必ず適切な換気の下（例、ドラフト）でご使用ください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品が漏れたり、こぼれていないかを定期的にチェックしてください。漏れたり、こぼれた場合には、MSDS で製造元の推奨する清掃手順に従ってください。
- 薬品の貯蔵、取扱い、廃棄に関する国や地方自治体の法律および規制に従ってください。

MSDS について

薬品製造元は、新しい顧客に危険な薬品を納品する時に最新の化学物質等安全性データシート（MSDS）を提供します。また、MSDS を更新した後初めて危険な薬品を納品する際にも最新の MSDS を提供します。MSDS には、その薬品を安全に貯蔵し、取扱い、輸送、廃棄する際に必要な安全上の情報が記載されています。

危険な薬品とともに新しい MSDS を受け取ったときは必ず、古い MSDS と差し替えて保管してください。

MSDS の入手

Applied Biosystems が提供する薬品の MSDS は、無料で毎日 24 時間ご利用いただけます。MSDS の入手：

1. <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html> を開きます。
2. [MSDS Search]（MSDS 検索）ページの [Search]（検索）フィールドで：
 - a. 目的の MSDS に記載されていることが期待される、薬品名、部品番号、またはその他の情報をタイプ入力します。
 - b. 中央の [All languages]（全言語）をプルダウンして「Japan-Japanese」（日本 - 日本語）を選びます。
 - c. [Search]（検索）をクリックします。

3. 目的の文書を表示、ダウンロード、印刷するには：

- a. 文書のタイトルを右クリックします。
- b. 以下から選択します。
 - **Open**（開く）－ 文書を表示する場合
 - **Save Target As**（対象をファイルに保存）－ 文書の PDF ファイルを希望の保存先にダウンロードする場合
 - **Print Target**（対象を印刷）－ 文書を印刷する場合

4. [Search Results] (検索結果) ページの MSDS のコピーを FAX や電子メールで送信するには：

- a. 文書タイトル下の [Fax] または [Email]（電子メール）を選択します。
- b. 文書リストの最後にある [RETRIEVE DOCUMENTS]（文書取得）をクリックします。
- c. 必要な情報を入力します。
- d. [View/Deliver Selected Documents Now]（選択した文書を表示／送信）をクリックします。

参考：Applied Biosystems が提供する以外の化学薬品の MSDS を入手するには、各製造元にお問い合わせください。

化学廃棄物に関する安全性

危険な化学廃棄物



注意

危険な廃棄物：取扱いと廃棄については、化学物質等安全性データシートと地方自治体の規制に従ってください。



警告

危険な化学廃棄物：Applied Biosystems の装置から排出される廃棄物は危険物質で、怪我、病気、死亡を引き起こす可能性があります。



警告

危険な薬品の保管：ガラス容器は壊れる恐れがあるため、廃棄物の収集や保管にガラス容器を使用しないでください。試薬ボトルおよび廃棄物ボトルは、ひびが入ったり、漏れる恐れがあります。各廃棄物ボトルは、低密度ポリエチレン安全容器内に保管し、カバーをしっかり閉め、ハンドルをまっすぐ立てた状態でロックします。試薬ボトルや廃棄物ボトルを取り扱う際には、適切なめがね、保護服、手袋を着用してください。

化学廃棄物に関する 安全性ガイドライン

化学廃棄物の危険を最小限にするため：

- 化学廃棄物は、廃棄物容器に入っている薬品の製造元の提供する原材料安全性データシート（MSDS）をよく読んで理解してから貯蔵、処理、廃棄してください。
- 第一および第二廃棄物容器を用意してください。（第一廃棄物容器には廃棄物をそのまま入れます。第二廃棄物容器には、第一廃棄物容器から漏れたり、こぼれたものを入れておきます。両容器とも、廃棄物に適したもので、容器の保管に関する国や地方自治体の必要条件を満たす必要があります。）

- 薬品との接触を最小限に抑えてください。薬品の取扱い時には、適切な保護具（例、安全めがね、保護手袋、保護服）などを着用してください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品の吸入を最小限に抑えてください。薬品の容器を開けたままにしないでください。必ず適切な換気の下（例、ドラフト）でご使用ください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品廃棄物は、ドラフト内で取り扱ってください。
- 廃棄物容器の内容物を廃棄した後は、容器のふたをしっかりと閉めてください。
- 廃棄物トレイや廃棄物ボトルの内容物は、Good Laboratory Practices (GLP) および国や地方自治体の環境・健康に関する規制に従って廃棄してください。

廃棄物の廃棄

装置の操作時に危険な可能性のある廃棄物が出た場合は、次のことを実施してください。

- 実験室で使用した特定のアプリケーション、試薬、基質から発生する廃棄物を同定（必要に応じて分析）してください。
- 実験室のスタッフ全員の健康と安全を確保してください。
- 装置廃棄物が、国および地方自治体の規制に従って貯蔵、移動、輸送、廃棄されることを確認してください。

重要！ 放射性物質やバイオハザード物質は、特別な処理法が必要となり、廃棄が制限される場合があります。

電気に関する安全性



危険

感電の危険：装置パネルを所定の位置にセットしないで StepOne または StepOnePlus システムを操作すると、重度の感電が発生することがあります。装置のパネルは取り外さないでください。装置パネルを装置から取り外すと、高電圧接点が露出します。

ヒューズ



警告

火災の危険：ヒューズや高圧電源を誤って取り付けると、装置の配線システムを破損し、火災が発生する可能性があります。装置の電源を入れる前に、ヒューズが正しく取り付けられ、装置の電圧が実験室の電源に一致していることを確認してください。



警告

火災の危険：火災の危険を防止するため、ヒューズの交換には、必ず、装置に指定されたタイプと定格のヒューズをお使いください。

電源



危険

電気に関する危険：装置を安全に操作するには、接地回路の連続性が不可欠です。接地回路が接続されていない装置は絶対に操作しないでください。



危険

電気に関する危険：施設の電圧電源には、適切に構成された認可済みの電源コードをお使いください。



危険

電気に関する危険：本システムのプラグは、適切な電気容量を持つ正しく接地されたコンセントに接続してください。

過電圧定格

StepOne および StepOnePlus 装置は、設置カテゴリ（過電圧カテゴリ）II で、ポータブル機器に分類されています。

LED の安全性

安全な LED 動作のために：

- 本システムは、Applied Biosystems のテクニカルサポート担当者にメンテナンスを依頼してください。
- 装置使用時は、すべての装置パネルを装置の所定の位置にセットしてください。すべてのパネルを設置すると、検出可能な放射は起こりません。LED 作動中（安全インターロックを無効にして整備中）にパネルを取り外すと、クラス **3B** の定格を超える LED 照射被曝の恐れがあります。
- 安全性ラベルをはがしたり、安全インターロックを無効にしないでください。

バイオハザードに関する安全性

一般的な バイオハザード



警告

バイオハザード：ヒトやその他の動物の組織、体液、感染因子、血液などの生物学的サンプルは、感染症を媒介する可能性があります。適切な国や地方自治体の規制すべてに従ってください。適切な保護具（例、保護めがね、保護面、保護衣／白衣、保護手袋）などを着用してください。すべての作業は、適切な設備の施設で、適切な安全機器（物理的封じ込め装置など）を使用して行ってください。担当者は、適切な規制および社内／組織内の必要条件に従って訓練を受けてから、感染源となりうる物質を取り扱うようにしてください。下記の適切なガイドラインや規制上の必要条件をよく読み、従ってください。

- U.S. Department of Health and Human Services guidelines published in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (stock no. 017-040-00547-4; <http://bmbll.od.nih.gov>)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html)
- 感染源となりうる物質の取り扱いに関する、社内／組織内の生物学的安全性（バイオセーフティー）プログラムプロトコル。

バイオハザードのガイドラインに関する追加情報は、次のサイトからも入手できます。

<http://www.cdc.gov>

ワークステーションに関する安全性

適切な人間工学的環境が確保できるようワークステーションを構成すると、疲れ、痛み、緊張などの影響を軽減または防止できます。作業中に自然でリラックスした姿勢を取れるようにワークステーションを構成して、これらの影響を最小限または完全になくすようにしてください。



注意 筋肉や骨に与える繰り返し動作の危険：この危険は、繰り返し動作、不適切な姿勢、無理な力、不健康な姿勢を長時間維持、接触圧、その他のワークステーション環境因子などを含む危険要因によって生じます。

筋骨格および繰り返し動作の危険を最小限にするには：

- 自然な作業姿勢を維持し、キーボード、モニタ、マウスをより使いやすくするような備品を使用します。
- キーボード、マウス、モニタは、胴体や頭がリラックスできるような位置に配置してください。

安全性および電磁環境適合性（EMC）規格

米国とカナダにおける安全性規格



StepOne および StepOnePlus 装置は、以下の規格に準拠していることが試験で確認されています。

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, 「Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements.」

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, 「Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials.」

FDA 「Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 and 1040.11」 (該当する場合)

カナダの EMC 規格

本装置は、「ICES-001, Issue 3: Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators」に準拠していることが試験で確認されています。

ヨーロッパの安全性および EMC 規格



安全性

本装置は安全性に関するヨーロッパの必要条件 (Low Voltage Directive 73/23/EEC) を満たしています。本装置は、EN 61010-1:2001 規格、「Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control and Laboratory Use, Part 1: General Requirements.」に準拠していることが試験で確認されています。

EN 61010-2-010, 「Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials」

EN 61010-2-081, 「Particular Requirements for Automatic and Semi-Automatic Laboratory Equipment for Analysis and Other Purposes」

EN 60825-1, 「Radiation Safety of Laser Products, Equipment Classification, Requirements, and User's Guide」

EMC

本装置は、エミッションとイミュニティに関するヨーロッパの必要条件 (EMC Directive 89/336/EEC) を満たしています。本装置は、EN 61326 (Group 1, Class B) 規格、「Electrical Equipment for Measurement, Control and Laboratory Use – EMC Requirements」に準拠していることが試験で確認されています。

オーストラリアの EMC 規格



本装置は、AS/NZS 2064 規格、「Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment」に準拠していることが試験で確認されています。

本章の内容：

■ StepOne™ および StepOnePlus™ システムについて	2
■ 使用可能な消耗品	4
■ 標準曲線実験について	6
■ 本書の使用方法	9
■ 実験例について	10
■ 実験例ワークフロー	13

参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの  をクリックするか、**[Help]** (ヘルプ) ▶ **[StepOne Software Help]** (StepOne Software ヘルプ) を選択します。

StepOne™ および StepOnePlus™ システムについて

Real-Time PCR システムには、二つのモデルがあります。

システム	特徴
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (StepOne™ システム)	48 ウェルプラットフォーム 3 色システム
Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (StepOnePlus™ システム)	96 ウェルプラットフォーム 4 色システム - VeriFlex™ サンプルブロック

StepOne および StepOnePlus システムでは、蛍光ベースのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 試薬を使って、次の機能を提供します。

- リアルタイム解析を使ったターゲット核酸配列 (ターゲット) の定量検出
- PCR 後 (エンドポイント) 解析を使ったターゲットの定性検出
- PCR 生成物の定性解析 (PCR 後の融解曲線解析による)

データ収集について

StepOne および StepOnePlus システムは、実施する測定タイプに応じて、PCR 中に様々なポイントで生の蛍光データを収集します。

測定タイプ		データ収集ポイント
リアルタイム測定	標準曲線法	装置は、PCR の各伸長ステップ後にデータを収集します。
	相対標準曲線法	
	比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$)	
PCR 後 (エンドポイント) 測定	ジェノタイピング実験	装置は、次のポイントでデータ収集を行います。 - PCR 前 (有無実験の場合には、PCR 前のデータ収集はオプションですが、推奨されています。) (オプション) PCR 中。装置は、測定中 (リアルタイム) にデータを収集できます。測定中のデータ収集は、トラブルシューティングに役立ちます。 - PCR 後
	有無実験	

測定タイプに関わらず、StepOne™ または StepOnePlus™ 装置によるデータ収集ポイントまたは読取は、3 相で構成されています。

- 励起** — 装置内にある反応プレートのすべてのウェルを照射し、各反応でフルオロフォアを励起します。
- 放射** — 装置の光学系は、反応プレートのウェルから放射された残留蛍光を収集します。装置で収集されたイメージは、放射波長の範囲に対応する光だけで構成されています。
- 収集** — 装置は、一定時間内に収集された残留蛍光をデジタル表示します。StepOne™ ソフトウェアには、解析向けに生の蛍光イメージが保存されます。

ノート

測定後、StepOne ソフトウェアは、キャリブレーションデータ（空間、Dye、Background）を使って、各読取における蛍光信号の位置と強度、各蛍光信号に関連する色素、信号の重要性を特定します。

フィルタについて StepOne および StepOnePlus システムでは、以下のフィルタを使用します。

StepOne システム		StepOnePlus システム	
フィルタ	色素	フィルタ	色素
1	FAM™ 色素	1	FAM™ 色素
	SYBR® Green 色素		SYBR® Green 色素
2	JOE™ 色素	2	JOE™ 色素
	VIC® 色素		VIC® 色素
3	ROX™ 色素	3	TAMRA™ 色素
			NED™ 色素
		4	ROX™ 色素

VeriFlex™ 技術について StepOnePlus 装置には、個別に熱制御可能な VeriFlex™ ブロックが 6 個あり、サーマルサイクリング条件の最適化が容易です。VeriFlex ブロックは、それぞれ異なる温度設定をしてサンプルに応じて最高で 6 つのゾーンを作成することも、すべての VeriFlex ブロックを同じ温度にすることも可能です。

詳細について 詳細については：

- StepOneおよびStepOnePlusシステムについては、『Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Software Help』をご参照ください。

参考： [Help]（ヘルプ）にアクセスするには、StepOne ソフトウェアで [Help]（ヘルプ） ▶ [StepOne Software Help]（StepOne Software ヘルプ）を選択してください。

- ジェノタイピング実験については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems ジェノタイピング実験入門ガイド』をご参照ください。
- 有無実験については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 有無実験入門ガイド』をご参照ください。
- 相対標準曲線と比較 C_T (ΔΔC_T) 実験については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR System 相対標準曲線と比較 C_T 実験入門ガイド』をご参照ください。

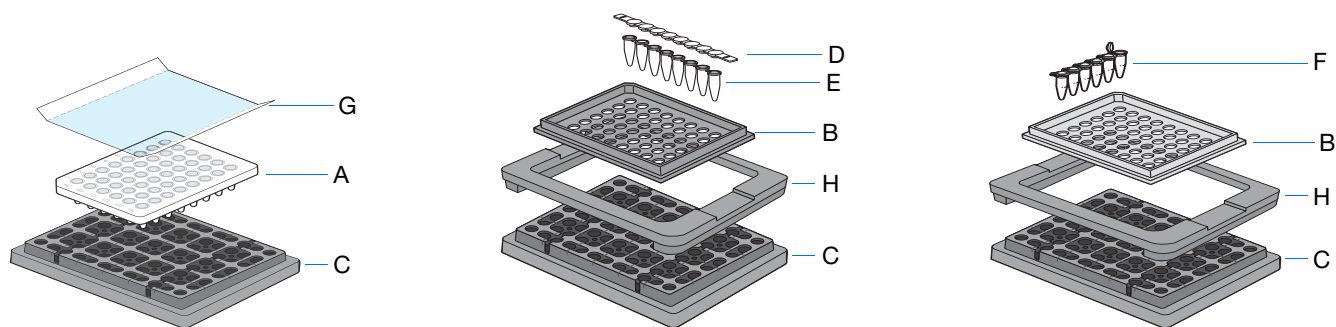
ノート _____

使用可能な消耗品

StepOne システム StepOne システムでは、以下に挙げる消耗品を使用できます。これらの消耗品は、標準および高速試薬／プロトコルの両方で使用可能です。

重要！ 標準試薬を用いた実験でも、StepOne および StepOnePlus システムでは Fast 用消耗品（反応プレート、チューブストリップ、チューブ）以外は使用しないでください。

消耗品	部品番号
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate - MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film	4375816 4375323 と 4375928
- MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip - MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	4358293 4323032
MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap	4358297
- MicroAmp™ Fast 48-Well Tray - MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor - MicroAmp™ 96-Well Support Base	4375282 4375284 4379590



#	消耗品
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ 96-Well Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap
G	MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
H	MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor

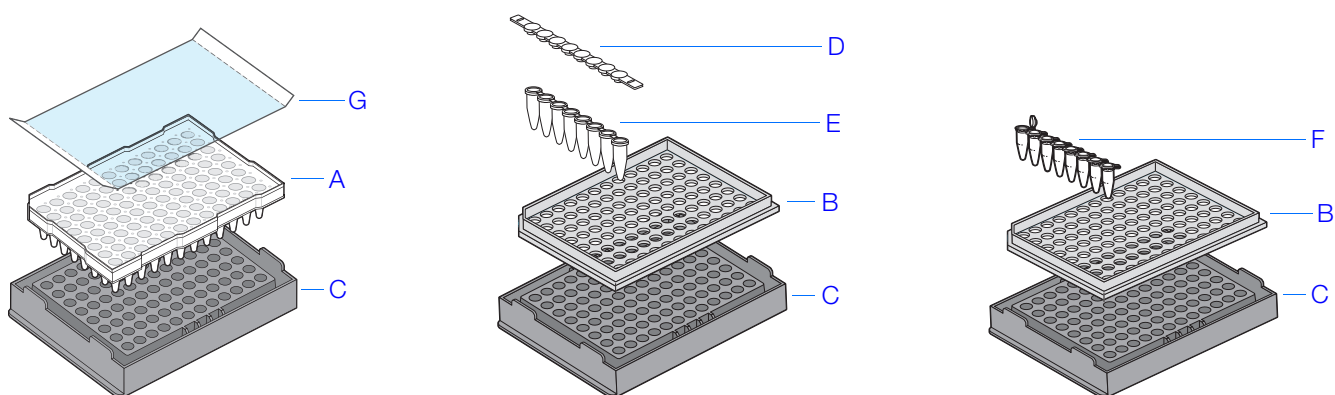
ノート

StepOnePlus
システム

StepOnePlus システムでは、以下に挙げる消耗品を使用できます。これらの消耗品は、標準および高速試薬／プロトコルの両方で使用可能です。

重要！ 標準試薬を用いた実験でも、StepOne および StepOnePlus システムでは Fast 用消耗品（反応プレート、チューブストリップ、チューブ）以外は使用しないでください。

消耗品	部品番号
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode - MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4346906 と 4366932 4360954 と 4311971
- MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip - MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	4358293 4323032
MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap	4358297
- MicroAmp™ 96-Well Tray for VeriFlex™ Blocks - MicroAmp™ 96-Well Support Base	4379983 4379590
- MicroAmp™ Adhesive Film Applicator - MicroAmp™ Cap Installing Tool (ハンドル)	4333183 4330015



#	消耗品
A	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ 96-Well Tray for VeriFlex™ Blocks
C	MicroAmp™ 96-Well Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tube with Cap
G	MicroAmp™ Optical Adhesive Film

ノート

標準曲線実験について

リアルタイム PCR 実験

標準曲線実験はリアルタイム PCR 実験です。リアルタイム PCR 実験では：

- 装置は、PCR の進捗状況をリアルタイムで監視します (Kwok and Higuchi, 1989)。
- データは、PCR プロセス全体を通して収集されます。
- サイクリング中にターゲットの増幅が最初に検出された時点で、反応の特徴づけが行われます (Saiki *et al.*, 1985)。

参考：本書では、*実験* という用語は、StepOne または StepOnePlus システムでの測定実施のプロセス全体を指し、セットアップ、測定、解析を含みます。

標準曲線実験に ついて

標準曲線法を用いて、サンプルに含まれるターゲットの絶対量を特定します。標準曲線法では、StepOne ソフトウェアにより、サンプルおよびスタンダード希釈シリーズ中に含まれるターゲットの増幅を測定します。標準希釈シリーズのデータを使用して標準曲線を作成します。ソフトウェアは、標準曲線を用いて、サンプル中ターゲットの絶対量を外挿します。

コンポーネント

標準曲線実験用に PCR 反応をセットアップするには、次のコンポーネントが必要です。

- **サンプル** — ターゲットの量が未知のサンプル。
- **スタンダード** — 既知量のスタンダードを含むサンプル。定量実験で使用して標準曲線を作成します。
- **スタンダード希釈シリーズ** — ある範囲の既知量のスタンダードからなるセット。スタンダード希釈シリーズは、スタンダードを連続的に希釈して調製されます。
- **反復** — 同一サンプル、同一コンポーネントを同一量含む同一反応の総数。
- **ネガティブコントロール** — サンプルテンプレートの代わりに蒸留水やバッファーを含むウェル。ターゲットの増幅は、ネガティブコントロールウェルでは起こりません。

PCR オプション

リアルタイム PCR を実施する際は、次のいずれかを選択してください。

- シングルプレックス PCR とマルチプレックス PCR (下記参照)
および
- 1 ステップと 2 ステップの RT-PCR (7 ページ参照)

シングルプレックス対マルチプレックス PCR

PCR 反応は、次のいずれかで実施できます。

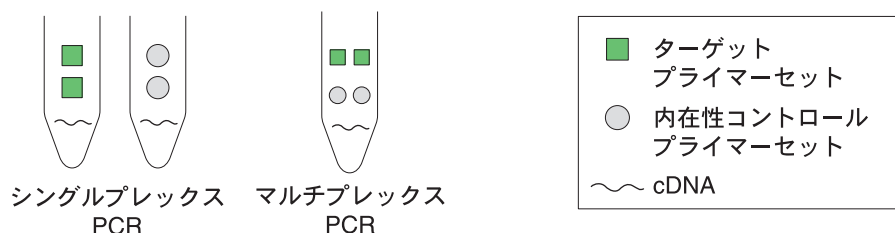
- **シングルプレックス PCR** — シングルプレックス PCR では、反応チューブまたはウェルにはプライマーセットが 1 つだけ存在します。反応ごとにターゲットまたは内在性コントロールを 1 つだけ増幅できます。

または

- **マルチプレックス PCR** – マルチプレックス PCR では、反応チューブまたはウェルにプライマーセットが複数存在します。各セットが、特定のターゲットまたは内在性コントロールを増幅します。通常は、FAM™ 色素でラベルしたプローブは、ターゲットを検出し、VIC® 色素でラベルしたプローブは、内在性コントロールを検出します。

重要！ SYBR® Green 試薬は、マルチプレックス PCR には使用できません。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA™ 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。



1 ステップ RT-PCR 対 2 ステップ RT-PCR

逆転写 (RT) と PCR を 1 回の反応 (1 ステップ) で実施するか、別の反応 (2 ステップ) で実施するかを選択できます。使用する試薬は、RT-PCR を 1 ステップまたは 2 ステップのどちらで実施するかによって異なります。

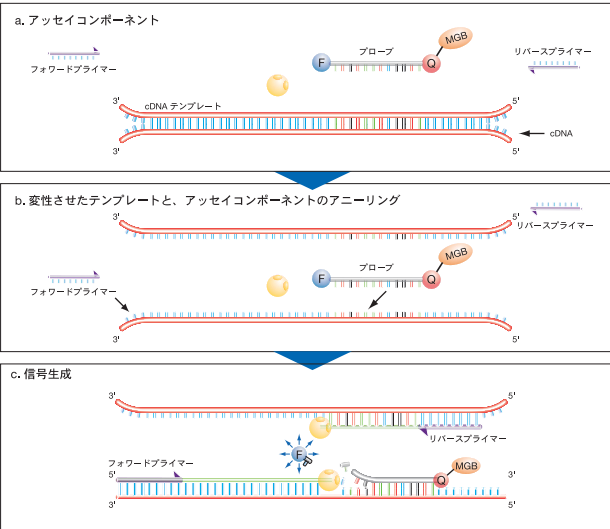
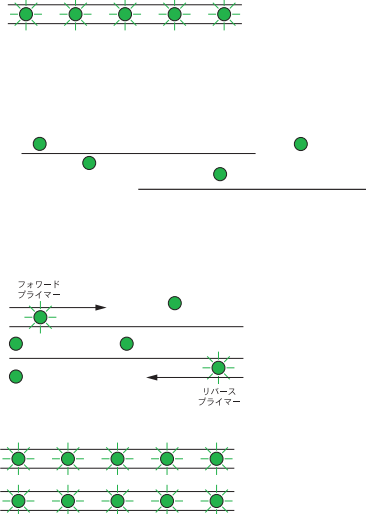
- 1 ステップ RT-PCR では、RT と PCR が同一のバッファー系で実施されるので、RT と PCR 増幅のための調製を 1 本のチューブで行えます。但し、1 ステップ RT-PCR では、Fast PCR Master Mix やキャリーオーバー防止の酵素である AmpErase® UNG (ウラシル-N-グリコシラーゼ) を使用できません。
- 2 ステップ RT-PCR は、2 回の反応に分けて実施されます。最初に全 RNA が cDNA に逆転写され、その後で cDNA が PCR によって増幅されます。この方法は、1 つの cDNA テンプレートから複数のトランスクリプトを検出したり、後日使用するために一部の cDNA を貯蔵しておくのに便利です。AmpErase® UNG 酵素を使ってキャリーオーバー汚染を防ぐことができます。

参考： AmpErase® UNG については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 試薬ガイド』をご参照ください。

ノート

使用できる試薬 TaqMan® 試薬と SYBR® Green 試薬

弊社では、StepOne および StepOnePlus システム用に、TaqMan® および SYBR® Green 試薬を提供しています。下表に、両試薬のタイプを概説します。

試薬タイプ	プロセス
TaqMan® 試薬またはキット 説明 TaqMan 試薬は、蛍光プローブを使って、PCR サイクル中に蓄積する特定のPCR生成物を検出します。 特長 ・ 蛍光プローブの追加による高い配列特異性。 ・ マルチプレックス法に対応。 ・ 広範なサーマルサイクリング条件に最適化した、調製済みアッセイを使用可能。 ・ 1ステップおよび2ステップ RT-PCR 両方に利用可能。 制限 特異的な蛍光プローブを合成する必要あり。	PCR および cDNA 検出  凡例 - F FAM™ 色素 - Q クエンチャー - MGB マイナグループバインダー - AmpliTaq Gold® DNA Polymerase — プローブ — プライマー — テンプレート — 伸長プライマー
SYBR® Green 試薬 説明 SYBR Green 試薬は、SYBR® Green I Dye (二本鎖 DNA 結合色素) を使い、PCR サイクル中に蓄積する PCR 生成物を検出します。 特長 ・ 経済的（プローブ不要） ・ 融解曲線で PCR 生成物の T_m を測定可能。 ・ 1ステップおよび2ステップ RT-PCR 両方に利用可能。 制限 すべての二本鎖DNAシーケンスに非特異的に結合します。偽陽性信号の発生を避けるため、融解曲線またはゲル解析を使って、非特異的生成物の形成を確認してください。	 ステップ 1：反応セットアップ SYBR® Green I 色素は、二本鎖 DNA に結合すると蛍光を発します。 ステップ 2：変性 DNA が一本鎖 DNA に変性すると、SYBR® Green I 色素は解離し、蛍光が大幅に減少します。 ステップ 3：重合 伸長ステップの間、プライマーがアニールし、PCR 産物が生成されます。 ステップ 4：重合完了 SYBR® Green I 色素は生成された二本鎖に結合し、その結果、装置で検出される蛍光の総量が増加します。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

その他の試薬

StepOne および StepOnePlus システムでは、他の蛍光ベース試薬も使用できますが、以下の事項にご注意ください。

- [Design Wizard] (設定ウィザード) ではなく、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) により、実験を設計する必要があります。(「[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー」(116 ページ) 参照)。
- Applied Biosystems TaqMan および SYBR Green 試薬を使用すると、StepOne ソフトウェアの [Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面で自動的に反応量が計算されます。

詳細について リアルタイム PCR 実験、PCR オプション、試薬については、『*Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 試薬ガイド*』をご参照ください。

本書の使用方法

本書は、チュートリアルおよび実際の実験を実施するためのガイドとして機能します。

本書を チュートリアルとして 使用

StepOne ソフトウェアで提供されている実験データの例を利用すると、StepOne または StepOnePlus システムで標準曲線実験を実施する際のチュートリアルとして本書を使用できます。第2章～第5章の手順に従ってください。

章	手順
2	StepOne ソフトウェアの [Design Wizard] (設計ウィザード) を使って実験を設計します。
3	第2章で [Design Wizard] (設計ウィザード) によって計算した試薬と容量を使って実験を準備します。
4	StepOne または StepOnePlus 装置 (スタンドアロンまたはコロケーションレイアウト) で実験を実施します。
5	結果を解析します。

詳細については、「[実験例について](#)」(10 ページ) をご参照ください。

本書を実際の実験に 使用

第2章～第5章のチュートリアル手順の完了後、本書に従って、実際の標準曲線実験を実施できます。第2章～第5章の各手順には、実際の実験を実施する際のガイドラインセットが含まれています。

ノート

さらに、StepOne ソフトウェアで提供されている他のワークフローを使って、実際の実験を実施することもできます。下表に、StepOne ソフトウェアで利用できるすべてのワークフローの概要を示します。

ワークフロー	説明	参照
Design Wizard (設計ウィザード)	ソフトウェアの指示に従い、新しい実験をセットアップします。[Design Wizard] (設計ウィザード) に従って、最適な実験が実施できます。[Design Wizard] (設計ウィザード) は、初めてのユーザーにお勧めします。 参考： [Design Wizard] (設計ウィザード) は、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) と比べて、設計上のオプションに制限があります。	第2章
Advanced Setup (高度なセットアップ)	[Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使って、新しい実験をセットアップします。[Advanced Setup] (高度なセットアップ) では、実際の実験を実施する際、設計に自由度が高くなります。[Advanced Setup] (高度なセットアップ) は、熟練したユーザーにお勧めです。	116 ページ
QuickStart (クイックスタート)	プレートセットアップ情報なしに新しい実験を実施します。必要な場合には、測定後に設計パラメータを追加できます。	117 ページ
Template (テンプレート)	テンプレートからのセットアップ情報を使って新しい実験をセットアップします。	119 ページ
Export/Import (エクスポート/インポート)	実験セットアップ情報を含む ASCII テキストファイルから、実験設計をインポートします。	121 ページ

実験例について

標準曲線実験の実施方法については、本書に従って実験例を設計、準備、測定、解析するプロセスを通して体験することができます。実験例は、StepOne または StepOnePlus システムに慣れるための典型的なセットアップとしてお使いください。

説明 標準曲線実験例の目的は、2つの集団に含まれる RNase P 遺伝子の量を特定することです。

標準曲線実験例では：

- サンプルは2つの集団から分離されたゲノム DNA です。
- ターゲットは RNase P 遺伝子です。
- 1つの標準曲線が、RNase P 遺伝子 (ターゲット) のためにセットアップされます。スタンダード希釈シリーズに使用するスタンダードには、既知量の RNase P 遺伝子が含まれています。対象となるターゲットが1つだけなので、標準曲線も1つしか必要ありません。

参考： 複数のターゲットを対象とする実験では、各ターゲットごとに標準曲線が必要となります。

- 統計的な有意性を確保するために、各サンプルと標準曲線の各希釈ポイントを3連で測定します。

ノート

- この実験はシングルプレックス PCR のために設計されており、各ウェルには単一ターゲット用のプライマー/プローブセットが含まれます。
- 反応は、2 ステップ RT-PCR 用にセットアップされます。
- プライマー/プローブセットは、Applied Biosystems RNase P アッセイのものです。

参考： Human RNase P FAM™ 色素ラベル MGB プローブは、TaqMan® Gene Expression Assay としては使用できません。Custom TaqMan® Gene Expression Assay (PN 4331348) としてご注文ください。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

反応プレートの レイアウト

標準曲線実験例は、StepOne 装置用です。StepOne 装置の場合、ソフトウェアは、48 ウェル反応プレートレイアウトを表示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

StepOnePlus 装置用に実験例を作成することもできます。ただしその場合には、反応プレートレイアウトは本書に示す 48 ウェル反応プレートレイアウトと異なります。StepOnePlus 装置の場合、ソフトウェアは、96 ウェル反応プレートレイアウトを表示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N RNase...	N RNase...	N RNase...	pop1 RNase...	pop1 RNase...	pop1 RNase...	pop2 RNase...	pop2 RNase...	pop2 RNase...	S RNase... 1E4	S RNase... 1E4	S RNase... 1E4
B	S RNase... 5E3	S RNase... 5E3	S RNase... 5E3	S RNase... 2.5E3	S RNase... 2.5E3	S RNase... 2.5E3	S RNase... 1.25E3	S RNase... 1.25E3	S RNase... 1.25E3	S RNase... 625	S RNase... 625	S RNase... 625
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ノート

実験例のデータについて

本書では、2つのファイルを使用します。

- 第2章では、標準曲線実験例ファイルを作成しますが、このファイルには、セットアップデータが含まれており、このファイルをご使用のコンピュータの実験フォルダに保存します。

<ドライブ>:\Applied Biosystems\<ソフトウェア名>\experiments\
Standard Curve Example.eds

- 第5章では、標準曲線実験例ファイルにある結果を確認します。このファイルには測定データが含まれています。実験例のデータファイルは、StepOne ソフトウェアとともにインストールされます。実験例のデータファイルは、コンピュータ内の次の場所に保存されているはずです。

<ドライブ>:\Applied Biosystems\<ソフトウェア名>\experiments\examples\
Standard Curve Example.eds

ここで、

- <ドライブ> は、StepOne ソフトウェアがインストールされているコンピュータのハードドライブです。本ソフトウェアのデフォルトのインストールドライブは、D ドライブです。
- <ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

実験例フォルダ中のデータファイル

実験例フォルダには、以下に示したいくつかのデータファイルが入っており、実際のデータを解析する際に参照できます。データファイルは、StepOne ソフトウェアとともにインストールされます。

参考：本書のチュートリアル手順を実施する場合には、「Standard Curve Example.eds」を使用していることをご確認ください。「96-Well Standard Curve Example.eds」は、標準曲線実験法のもう一つの例です。

StepOne 装置	StepOnePlus 装置
Comparative CT Example.eds	96-Well Comparative CT Example.eds
Multiplex Example.eds	96-Well Multiplex Example.eds
Genotyping Example.eds	96-Well Genotyping Example.eds
Presence Absence Example.eds	96-Well Presence Absence Example.eds
Relative Standard Curve Example.eds	96-Well Relative Standard Curve Example.eds
RNase P Experiment.eds	96-Well RNase P Experiment.eds
Standard Curve Example.eds	96-Well Standard Curve Example.eds
SYBR Example.edsSYBR Example.eds	96-Well SYBR Example.eds

ノート

実験例ワークフロー

13 ページの図に、標準曲線実験例のワークフローを示します。

実験開始

実験の設計（第2章）

1. 新しい実験を作成します。
2. 実験プロパティを定義します。
3. 方法と物品を定義します。
4. ターゲットをセットアップします。
5. スタンダードをセットアップします。
6. サンプルをセットアップします。
7. 測定方法をセットアップします。
8. 反応セットアップを確認します。
9. 実験に必要な物品を注文します。
10. [Design Wizard]（設計ウィザード）を終了します。

反応の準備（第3章）

1. サンプル希釈液を調製します。
2. スタンダード希釈シリーズを調製します。
3. 各ターゲットのアッセイ用に反応ミックスを調製します。
4. 反応プレート調製します。

実験の測定（第4章）

1. 測定の準備をします。
2. (オプション) 通知設定を有効にします。
3. 測定を開始します。
4. 測定を監視します。
5. プレートを取り出し、データを転送します。

実験の解析（第5章）

セクション 1、結果の確認：

1. 解析します。
2. 標準曲線を表示します。
3. 増幅プロットを表示します。
4. 結果のテーブルを表示します。
5. データを出力します。

セクション 2、トラブルシューティング（必要に応じて）：

1. 解析設定を表示し、ベースライン／閾値を調整します。
2. QC サマリーを表示します。
3. ウェルを選択削除します。
4. マルチコンポーネントプロットを表示します。
5. 生データプロットを表示します。

実験終了

ノート

2

実験の設計

本章の内容：

■ 本章の概要	16
■ 新しい実験の作成	17
■ 実験プロパティの定義	20
■ 方法と物品の定義	22
■ ターゲットのセットアップ	25
■ スタンドアードのセットアップ	27
■ サンプルのセットアップ	29
■ 測定方法のセットアップ	31
■ 反応セットアップの確認	33
■ 実験用物品の注文	38
■ [Design Wizard] (設計ウィザード) の終了	42

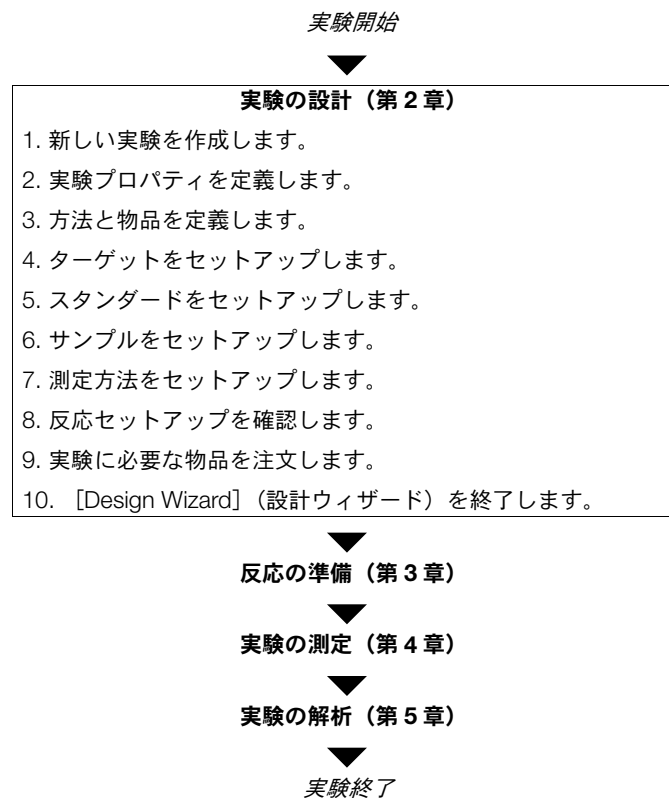
参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの ⓘ をクリックするか、[Help] (ヘルプ) ▶ [StepOne Software Help] (StepOne Software ヘルプ) を選択します。

本章の概要

本章では、StepOne™ ソフトウェアの [Design Wizard]（設計ウィザード）を使って、標準曲線実験例をセットアップする方法について説明します。[Design Wizard]（設計ウィザード）に従うと、Applied Biosystems が推奨する最良の方法で実験例の設計パラメータを入力できます。

実験例ワークフロー 本書に記載されている実験例を設計するワークフローを以下に示します。

参考： StepOne ソフトウェアの [Design Wizard]（設計ウィザード）を使って実験例を設計します。実際の実験を設計する際は、代替ワークフローを選択できます（「[本書の使用方法](#)」(9 ページ) 参照）。

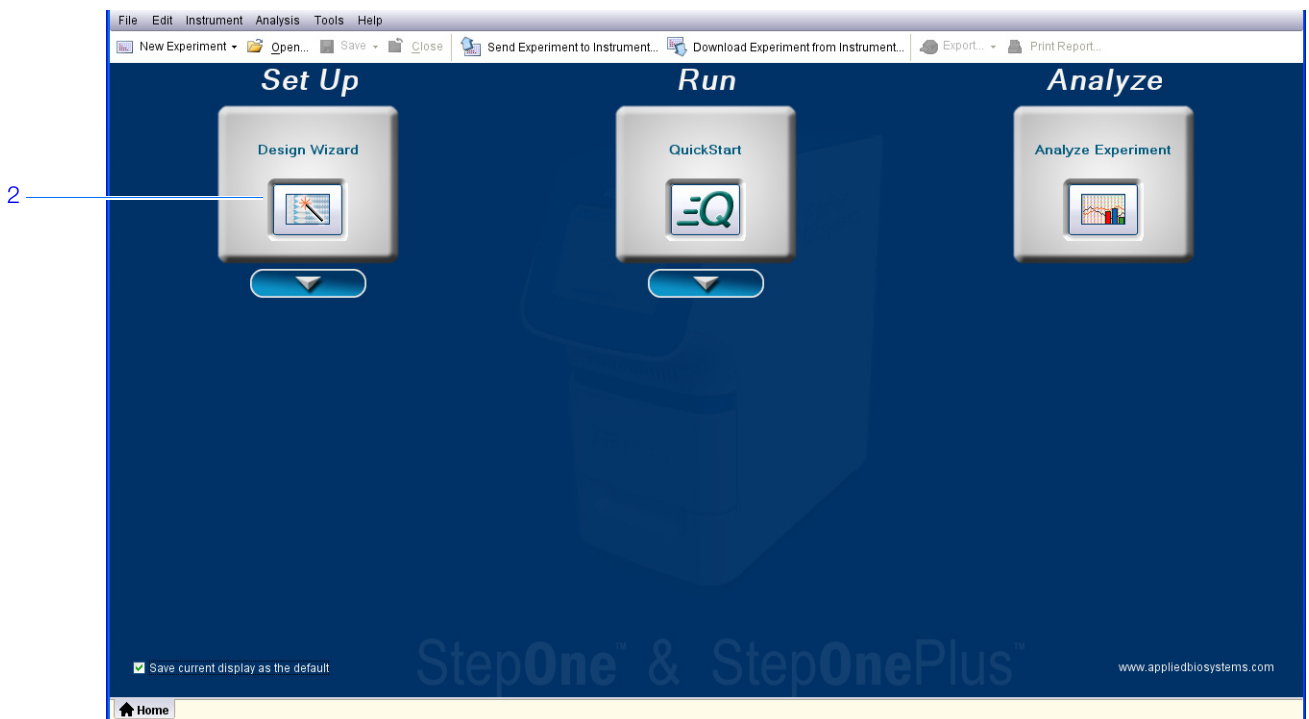


ノート

新しい実験の作成

StepOne ソフトウェアの [Design Wizard] (設計ウィザード) を使って、新しい実験を作成します。

- 実験の作成**
1.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。
ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。
 2. [Home] (ホーム) 画面で  [Design Wizard] (設計ウィザード) をクリックして、[Design Wizard] (設計ウィザード) を開きます。



3. [Design Wizard] (設計ウィザード) 内のナビゲーション方法については、「ソフトウェアの エレメント」(18 ページ) を参照してください。

ノート

ソフトウェアの
エレメント

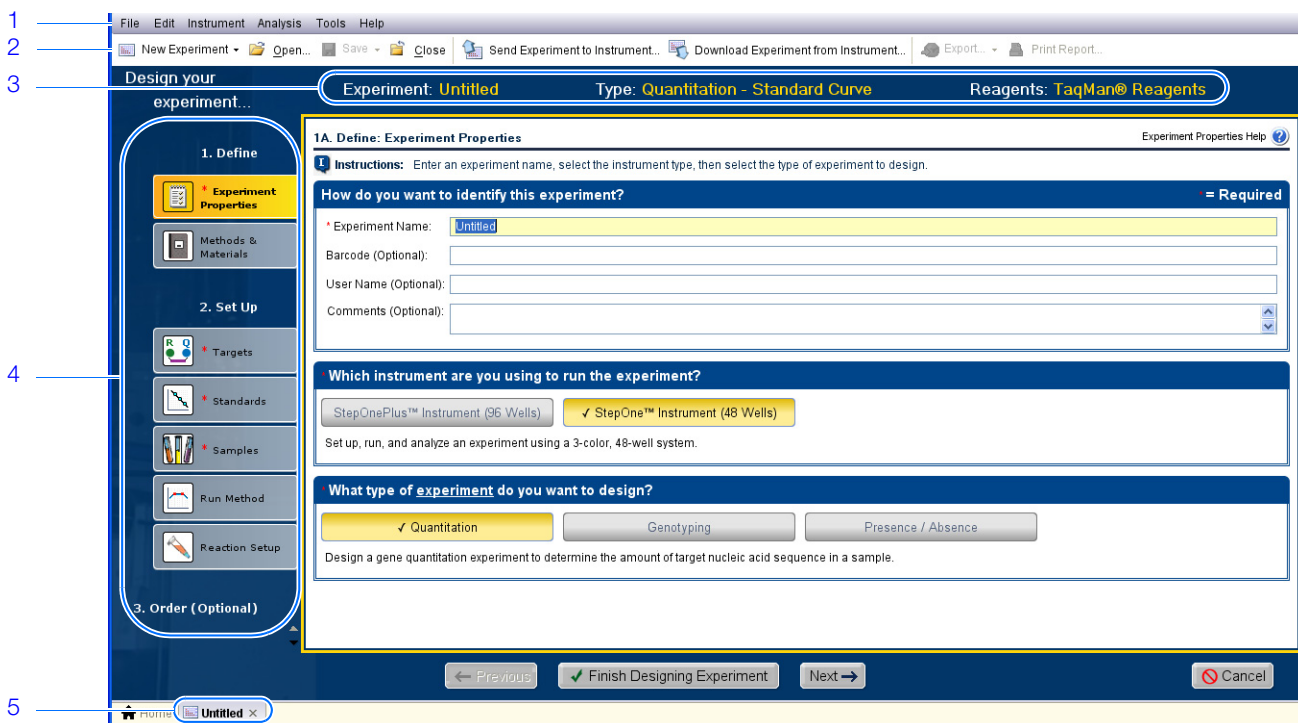
StepOneソフトウェアの[Design Wizard] (設計ウィザード)のエレメントを以下に示します。

1. メニューバー – ソフトウェアで利用できるメニューが表示されます。
 - File (ファイル)
 - Edit (編集)
 - Instrument (装置)
 - Analysis (解析)
 - Tools (ツール)
 - Help (ヘルプ)
2. ツールバー – ソフトウェアで利用できるツールが表示されます。
 - New Experiment (新しい実験)
 - Open (開く)
 - Close (閉じる)
 - Send Experiment to Instrument (実験を装置に送信)
 - Download Experiment from Instrument (実験を装置からダウンロード)
3. 実験ヘッダー – 開いている実験の実験名、実験タイプ、試薬が表示されます。
4. ナビゲーション欄 – [Design Wizard] (設計ウィザード)の全画面へのリンクがあります。
 - Experiment Properties (実験プロパティ)
 - Methods & Materials (方法と物品)
 - Targets (ターゲット)
 - Standards (スタンダード)
 - Samples (サンプル)
 - Run Method (測定方法)
 - Reaction Setup (反応セットアップ)
 - Materials List (物品リスト)

参考：[Design Wizard] (設計ウィザード) は、初期設定で [Quantitation - Standard Curve] (定量－標準曲線) 実験タイプを表示します。別の実験タイプを選択すると、[Design Wizard] (設計ウィザード) 画面が変わります。例えば、[Relative Quantitation Settings] (相対定量設定) 画面は、標準曲線または比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 実験タイプを選択すると表示されます。

5. 実験タブ – 開いている各実験のタブが表示されます。

ノート



ノート

実験プロパティの定義

「Experiment Properties」(実験プロパティ) 画面で、実験の識別情報を入力し、装置タイプを選択してから、設計する実験のタイプを選択します。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 実験は例として識別されます。
- 実験の測定用に選択した装置は、StepOne 装置です。
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate を使用します。
- 実験タイプは定量です。

「Experiment Properties」
(実験プロパティ)
画面の入力

1. 「Experiment Name」(実験名) フィールドをクリックしてから、「Standard Curve Example」(標準曲線例) と入力します。

参考： 入力した実験名が、実験ヘッダーに表示されます。

2. 「Barcode」(バーコード) フィールドは空欄のままにしておきます。

参考： MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate には、バーコードがありません。

3. 「User Name」(ユーザー名) フィールドをクリックしてから、「Example User」(ユーザー例) と入力します。

4. 「Comments」(コメント) フィールドをクリックしてから、「Standard Curve Getting Started Guide Example」(標準曲線入門ガイド例) と入力します。

5. 「StepOne™ Instrument (48 Wells)」(StepOne™ 装置 (48 ウェル)) を選択します。

参考： この実験例は、StepOne 装置用です。StepOnePlus 装置用の実験例を作成する場合には、反応プレートレイアウトは本書に示すレイアウトと異なります。ソフトウェアには、StepOne 装置用の 48 ウェル反応プレートレイアウトおよび StepOnePlus 装置用の 96 ウェル反応プレートレイアウトが表示されます。StepOnePlus 装置用の実験例を作成するためには、「StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)」(StepOnePlus™ 装置 (96 ウェル)) を選択します。

6. 実験タイプに「Quantitation」(定量) を選択します。

7. 「Next>」(次へ) をクリックします。

ノート

1A. Define: Experiment Properties

Instructions: Enter an experiment name, select the instrument type, then select the type of experiment to design.

How do you want to identify this experiment? (= Required)

Experiment Name: Standard Curve Example

Barcode (Optional):

User Name (Optional): Example User

Comments (Optional): Standard Curve Getting Started Guide Example

Which instrument are you using to run the experiment?

StepOnePlus™ Instrument (96 Wells) ☒ StepOne™ Instrument (48 Wells)

Set up, run, and analyze an experiment using a 3-color, 48-well system.

What type of experiment do you want to design?

☒ Quantitation ☐ Genotyping ☐ Presence / Absence

Design a gene quantitation experiment to determine the amount of target nucleic acid sequence in a sample.

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- 実験名を入力します。
 - 内容がわかるような覚えやすい名称を入力します。[Experiment Name] (実験名) フィールドには、100 文字まで入力できます。

参考： [Experiment Name] (実験名) フィールドには、次の文字は使用できません。スラッシュ (/)、バックスラッシュ (\)、大なり記号 (>)、小なり記号 (<)、アスタリスク (*)、クエスチョンマーク (?)、引用符 ("), バー (|)、コロン (:)、セミコロン (;)

- この実験名は、デフォルトの実験ファイル名として使用されます。
- (オプション) MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate をご使用の場合には、反応プレート上のバーコードを特定するため、バーコードを入力します。[Barcode] (バーコード) フィールドには、100 文字まで入力できます。

参考： MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate には、バーコードがありません。

- (オプション) 実験の所有者を特定するユーザー名を入力します。[User Name] (ユーザー名) フィールドには、100 文字まで入力できます。
- (オプション) 実験を説明するコメントを入力します。[Comments] (コメント) フィールドには、1000 文字まで入力できます。

ノート

- 実験を測定するために用いる装置を選択します。
 - StepOne™ 装置 (48 ウェル)
 - StepOnePlus™ 装置 (96 ウェル)

参考: StepOne ソフトウェア V2.0 以降を用いて、StepOne および StepOnePlus 装置両方での実験設計が可能です。[Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面で選択する装置によって、反応プレートレイアウトおよび物品リストが変わります。

参考: デフォルトの装置タイプを設定するには、[Tools] (ツール) ▶ [Preferences] (環境設定) を選択してから、[General] (全般) タブを選択します (デフォルト設定)。[Default Instrument Type] (デフォルト装置タイプ) ドロップダウンメニューで、適切な装置を選択します。

- 実験タイプとして [Quantitation] (定量) を選択します。

詳細について 詳細については：

- [Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面の入力については、 をクリックするか、F1 を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- 消耗品については、「使用可能な消耗品」(4 ページ) をご参照ください。
- 定量実験については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 試薬ガイド』をご参照ください。

方法と物品の定義

[Methods & Materials] (方法と物品) 画面で、実験に使用する定量方法、試薬、ランプ速度、PCR テンプレートを選択します。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 標準曲線定量法を使用します。
- TaqMan® 試薬を使用します。
- 装置測定には標準ランプ速度を使用します。
- テンプレートのタイプは、精製済み gDNA (2 つの集団から分離) です。gDNA テンプレートを使用する前に、まず組織やサンプルから gDNA を抽出する必要があります。

**[Methods & Materials]
(方法と物品)
画面の入力**

1. 定量方法として [Standard Curve] (標準曲線) を選択します。
2. 試薬に、[TaqMan® Reagents] (TaqMan® 試薬) を選択します。
3. ランプ速度に [Standard (~2 hours to complete a run)] (標準 (測定完了まで 2 時間以下)) を選択します。
4. テンプレートタイプに [gDNA (genomic DNA)] (gDNA (ゲノム DNA)) を選択します。
5. [Next>] (次へ) をクリックします。

ノート

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help

Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

Which quantitation method are you using?

1 ☒ Standard Curve ☐ Relative Standard Curve ☐ Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)

With the standard curve method, you use standards to determine the absolute quantity of target sequence in a sample.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

2 ☒ TaqMan® Reagents ☐ SYBR® Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

Which ramp speed do you want to include in the instrument run?

3 ☒ Standard (~ 2 hours to complete a run) ☐ Fast (~ 40 minutes to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your real-time PCR reactions.

What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?

4 ☐ cDNA (complementary DNA) ☐ RNA ☒ gDNA (genomic DNA)

You are adding purified gDNA to the real-time PCR reactions. You have already extracted the gDNA from tissue or sample.

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- 定量方法として [Standard Curve] (標準曲線) を選択します。標準曲線法を用いて、サンプルに含まれるターゲットの絶対量を特定します。反応プレートを設定アップする際、標準曲線法では、ターゲット、スタンダード、サンプルが必要です。
- 使用する試薬を選択します。
 - TaqMan 試薬を使ってサンプル中のターゲットの増幅を検出し、定量する場合は、[TaqMan® Reagents] (TaqMan® 試薬) を選択します。TaqMan 試薬は、2つのプライマーと1つの TaqMan® プローブで構成されています。プライマーは、ターゲットを増幅するよう設計されています。TaqMan プローブは、ターゲットにハイブリダイゼーションし、ターゲットが増幅されたときに蛍光信号を生成するよう設計されています。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA™ 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne™ システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus™ システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

ノート

- SYBR Green 試薬を使ってサンプル中のターゲットの増幅を検出し、定量する場合は、**[SYBR® Green Reagents]** (SYBR® Green 試薬) を選択します。SYBR Green 試薬は、2つのプライマーと1つの SYBR Green 色素で構成されています。プライマーは、ターゲットを増幅するよう設計されています。SYBR Green 色素は、二本鎖 DNA に結合すると蛍光信号を生成します。SYBR Green 色素は、反応に添加される SYBR Green Master Mix に含まれています。SYBR Green 色素を使用する場合：**[Include Melt Curve]** (融解曲線を含む) チェックボックスを選択して、増幅されたターゲットの融解曲線解析を実施するようにします。
ランプ速度として、**[Standard]** (標準) を選択します。弊社では、SYBR Green 試薬の Fast Master Mix は提供していません。

参考： StepOne および StepOnePlus システムで他の蛍光ベースの試薬を使うこともできますが、その場合は、**[Design Wizard]** (設計ウィザード) でなく、**[Advanced Setup]** (高度なセットアップ) を使って、実験を設計する必要があります。

- 装置での測定に適切なランプ速度を選択します。
 - PCR 反応に Fast 試薬を使っている場合は、**[Fast (~40 minutes to complete a run)]** (高速 (測定完了まで 40 分以下)) を選択します。
 - PCR 反応に標準試薬を使っている場合は、**[Standard (~2 hours to complete a run)]** (標準 (測定完了まで 2 時間以下)) を選択します。
- 適切な PCR 法テンプレートを選択します。
 - 2 ステップ RT-PCR を実施中で、すでに逆転写を実施して RNA を cDNA に転写した場合は、**[cDNA (complementary DNA)]** (cDNA (相補 DNA)) を選択します。PCR 反応に相補 DNA が追加されます。
 - 1 ステップ RT-PCR を実施中の場合は、**[RNA]** を選択します。PCR 反応に総 RNA または mRNA が追加されます。

参考： [Fast] (高速) ランプ速度で RNA テンプレートを使用する場合には、**[Design Wizard]** (設定ウィザード) ではなく、**[Advanced Setup]** (高度なセットアップ) ワークフローにより、実験を設計する必要があります。

- 組織またはサンプルからすでに gDNA を抽出した場合は、**[gDNA (genomic DNA)]** (gDNA (ゲノム DNA)) を選択します。PCR 反応に精製済みゲノム DNA が追加されます。

詳細について 詳細については：

- **[Methods & Materials]** (方法と物品) 画面の入力については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- **[Advanced Setup]** (高度なセットアップ) の使用については、「**[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー**」(116 ページ) をご参照ください。
- 他の定量方法の使用については、『*Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 相対標準曲線と比較 C_T 実験入門ガイド*』をご参照ください。
- TaqMan および SYBR Green 試薬については、『*Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 試薬ガイド*』をご参照ください。
- シングルプレックス PCR 対マルチプレックス PCR および 1 ステップ RT-PCR 対 2 ステップ RT-PCR を含めた PCR については、『*Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 試薬ガイド*』をご参照ください。

ノート

ターゲットのセットアップ

[Targets] (ターゲット) 画面で、PCR 反応プレートで定量したいターゲット数を入力してから、各ターゲットのアッセイをセットアップします。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 反応プレートごとに1つのターゲットを定量します。
- [Set Up Standards] (スタンダードのセットアップ) チェックボックスを選択します。このチェックボックスが選択されていると、ユーザーが [Targets] (ターゲット) 画面を入力し終わった後、ソフトウェアが自動的に [Standards] (スタンダード) 画面を表示します。[Standards] (スタンダード) 画面では、ターゲットアッセイ用の標準曲線をセットアップできます ([「スタンダードのセットアップ」\(27 ページ\)](#) 参照)。
- Target 1 アッセイは、試験中のターゲットのためにセットアップします。実験例では、これは RNase P 遺伝子です。

[Targets] (ターゲット) 画面の入力

1. [How many targets do you want to quantify in the reaction plate?] (この反応プレートで定量したいターゲット数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「1」を入力します。

参考：ターゲットアッセイ表の行数が、入力した数でアップデートされます。

2. [Set Up Standards] (スタンダードのセットアップ) チェックボックスを選択して、ターゲットアッセイのスタンダードをセットアップします。

参考：[Set Up Standards] (スタンダードのセットアップ) チェックボックスは、デフォルトで選択されています。

3. Target 1 アッセイをセットアップします。
 - a. [Enter Target Name] (ターゲット名の入力) セルをクリックしてから、「RNase P」を入力します。
 - b. [Reporter] (レポーター) ドロップダウンメニューで [FAM] を選択します (デフォルト設定)。
 - c. [Quencher] (クエンチャー) ドロップダウンメニューで [NFQ-MGB] を選択します (デフォルト設定)。
 - d. [Color] (カラー) フィールドは、デフォルト設定のままにします。
4. [Next>] (次へ) をクリックします。

参考：[(Optional) Enter Gene Name] ((オプション) 遺伝子名の入力) フィールドは空欄のままにします。物品を注文するときは、遺伝子/アッセイ ID で検索できます ([「実験用物品の注文」\(38 ページ\)](#) 参照)。

ノート

2A. Set Up: Targets

Instructions: Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.

Set Up Targets = Required

How many targets do you want to quantify in the reaction plate? 1

For each target [assay](#) in the reaction plate, select whether to set up [standards](#), enter a target name, select the [reporter](#) and [quencher](#) to use to detect the target, and select a [target color](#). (Optional) Enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the [Assay ID](#).

Set Up Standards	* Enter Target Name	Reporter	Quencher	Color	(Optional) Enter Gene Name and Click...	Assay ID
☒	RNase P	FAM	NFQ-MGB	[Red]		

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- [Set Up Standards] (スタンダードのセットアップ) チェックボックスを選択します。弊社では、反応プレートの各ターゲットアッセイに対して標準曲線をセットアップするようお勧めします。
- 各ターゲットアッセイに一意の名前とカラーを指定します。[Target Name] (ターゲット名) フィールドには、100 文字まで入力できます。
- ターゲットアッセイで使用するレポーター色素を選択します。以下の試薬を選択した場合には、22 ページにある [Methods & Materials] (方法と物品) 画面で、次の操作を行います。
 - TaqMan[®] 試薬を選択した場合には、TaqMan プローブの 5' 末端に結合する色素を選択します。
 - SYBR[®] Green 試薬を選択した場合には、「SYBR」を選択します。
- ターゲットアッセイで使用するクエンチャーを選択します。以下の試薬を選択した場合には、22 ページにある [Methods & Materials] (方法と物品) 画面で、次の操作を行います。
 - TaqMan[®] 試薬を選択した場合には、TaqMan プローブの 3' 末端に結合するクエンチャーを選択します。
 - SYBR[®] Green 試薬を選択した場合には、「None」(なし) を選択します。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

詳細について [Targets] (ターゲット) 画面の入力については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート

スタンダードのセットアップ

[Standards] (スタンダード) 画面で、反応プレートのすべての標準曲線についてポイントと反復の数を入力します。各標準曲線について、開始量を入力し、シリアル係数を選択します。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 1つの標準曲線が、ターゲット (RNase P) のためにセットアップされます。スタンダード希釈シリーズに使用するスタンダードには、既知量の RNase P 遺伝子が含まれています。対象となる遺伝子が1つだけなので、標準曲線も1つしか必要ありません。
- 5ポイントを使用します。
- 各ポイントに3つの反復を使用します。反復とは、同じ反応コンポーネントと容量を含む同一の反応です。
- 開始量は10,000 コピーで、シリアル係数は1:2 です。

[Standards] (スタンダード) 画面の入力

1. [How many points do you need for each standard curve?] (各標準曲線に必要なポイント数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「5」を入力します。
2. [How many replicates do you need for each point?] (各ポイントに必要な反復数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「3」を入力します。
3. RNase P アッセイのスタンダード量の範囲を指定します。
 - a. [Enter Starting Quantity] (開始量の入力) フィールドをクリックしてから、「10000」を入力します。
 - b. [Select Serial Factor] (シリアル係数の選択) ドロップダウンメニューで [1:2] を選択します。
4. [Standard Curve Preview] (標準曲線プレビュー) 欄を確認します。標準曲線には次のポイント、10000、5000、2500、1250、625が含まれています。
5. [Next>] (次へ) をクリックします。

2B. Set Up: Standards

Standards Help

Instructions: Enter the number of points and replicates for all standard curves in the reaction plate. For each standard curve, enter the starting quantity and select the serial factor.

Set Up Standards = Required

• How many **points** do you need for each standard curve?

• How many **replicates** do you need for each point?

For each standard curve, define the range of standard quantities by entering the **starting quantity** and **serial factor**.

Define one standard curve so that the range of standard quantities spans the expected range of quantities for the unknowns.

Target Name	Enter Starting Quantity	Select Serial Factor
● RNase P	10000.0	1:2

Standard Curve Preview

Standard Curve Preview for ● RNase P

1E4
5E3
2.5E3
1.25E3
6.25E2

Well Count

6 - Unknown 15 - Standard 3 - Negative Control 24 - Empty

View Plate Layout

Arrange Plate by: Rows Place Negative Controls in:

Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RN...	RN...	RN...	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2
B	Sample 2	RN... 1E4	RN... 1E4	RN... 1E4	RN... 5E3	RN... 5E3	RN... 5E3	RN... 2.5E3
C	RN... 2.5E3	RN... 2.5E3	RN... 1.25E3	RN... 1.25E3	RN... 1.25E3	RN... 625	RN... 625	RN... 625
D								
E								
F								

ノート

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- 反応プレートの各ターゲットに対して標準曲線をセットアップします。ターゲットは、[Targets] (ターゲット) 画面ですでに定義されています ([「ターゲットのセットアップ」\(25 ページ\)](#))。
- 反応プレートの各標準曲線について、ポイント数を入力します。弊社では、各標準曲線について少なくとも 5 つの希釈ポイントを取ることをお勧めします。
- 標準曲線の各ポイントについて、反復 (同一反応) の数を入力します。弊社では、各ポイントについて少なくとも 3 回の反復をお勧めします。
- スタンダード量の範囲は増幅効率の計算に影響するため、アッセイのスタンダード量は、適切な範囲を注意深く選択してください。
 - 増幅効率をより正確に測定するには、スタンダード量に 5 ~ 6 log の広範囲を使用してください。広範なスタンダード量を指定するには、cDNA クローンなど、PCR 産物または高濃縮テンプレートを使用する必要があります。
 - cDNA テンプレートの量が限られている場合、ターゲットがコピー数の小さい転写産物の場合、一定の範囲内に収まることが分かっている場合などは、スタンダード量を狭い範囲に設定することが必要となります。
- シリアル係数は、標準曲線のすべてのポイントの量を計算する際に使用されます。開始量が大きな値の場合は、1:2、1:3 などの希釈係数を選択します。開始量が小さな値の場合は、2X、3X などの濃縮係数を選択します。

詳細について 詳細については：

- [Standards] (スタンダード) 画面の入力については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- 増幅効率については、『*Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*』をご参照ください。

ノート

サンプルのセットアップ

[Samples] (サンプル) 画面で、反応プレートに含めるサンプル、反復、ネガティブコントロールの数を入力し、サンプル名を入力してから、サンプル/ターゲット反応を選択してセットアップします。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 2つのサンプル、すなわち2つの集団からのゲノムDNAを使用します。サンプルには、未知量のターゲット (RNase P) が含まれています。
- 3つの反復を使用します。反復とは、同じ反応コンポーネントと容量を含む同一の反応です。
- 3つのネガティブコントロールを使用します。ネガティブコントロール反応には、サンプルの代わりに蒸留水が含まれており、増幅しません。

[Samples] (サンプル) 画面の入力

1. [How many samples do you want to test in the reaction plate?] (この反応プレートで試験したいサンプル数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「2」を入力します。

参考：サンプル表の行数が、入力した数でアップデートされます。

2. [How many replicates do you need?] (必要な反復数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「3」を入力します。
3. [How many negative controls do you need for each target assay?] (各ターゲットアッセイに必要なネガティブコントロール数はいくつですか?) フィールドをクリックしてから、「3」を入力します。
4. サンプル1のセットアップ：
 - a. [Enter Sample Name] (サンプル名の入力) フィールドをクリックしてから、「pop1」 (population 1 の場合) を入力します。
 - b. [Color] (カラー) フィールドはデフォルト設定のままにします。
5. サンプル2のセットアップ：
 - a. [Enter Sample Name] (サンプル名の入力) フィールドをクリックしてから、「pop2」 (population 2 の場合) を入力します。
 - b. [Color] (カラー) フィールドはデフォルト設定のままにします。
6. [All Sample/Target Reactions] (すべてのサンプル/ターゲット反応) を選択して、すべてのサンプル中のすべてのターゲットを試験します。
7. [Well Count] (ウェル数) 欄で次のことを確認します。
 - 未知のウェルが6個であること。U
 - スタンダードウェルが15個であること。S
 - ネガティブコントロールウェルが3個であること。N
 - 空のウェルが24個であること。

ノート

8. [View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブで:

- [Arrange Plate by] (プレートの配置方法) ドロップダウンメニューで **[Rows]** (行) を選択します (デフォルト設定)。
- [Place Negative Controls in] (ネガティブコントロールの配置) ドロップダウンメニューで **[Upper Left]** (左上) を選択します (デフォルト設定)。

9. [Next >] (次へ) をクリックします。

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合:

- 各サンプルに一意の名前とカラーを指定します。[Sample Name] (サンプル名) フィールドには、100 文字まで入力できます。
- セットアップする反復 (同一反応) 数を入力します。弊社では、各反応について少なくとも3つの反復をお勧めします。
- セットアップするネガティブコントロール反応数を入力します。弊社では、各ターゲットアッセイについて少なくとも3つのネガティブコントロール反応をお勧めします。
- サンプル中のどのターゲットを試験するかを選択します。
 - [All Sample/Target Reactions] (すべてのサンプル/ターゲット反応) を選択すると、すべてのサンプル中のすべてのターゲットを試験できます。
 - [Specify Sample/Target Reactions] (サンプル/ターゲット反応を指定) を選択すると、各サンプル中で試験するターゲットを指定できます。

参考: [Design Wizard] (設計ウィザード) を用いて標準曲線実験をセットアップする場合には、シングルプレックス反応 (ウェル当たり 1 ターゲットの増幅と検出) のみセットアップできます。標準曲線実験でマルチプレックス反応 (ウェル当たり 2 以上のターゲットの増幅と検出) をセットアップするには、[Design Wizard] (設計ウィザード) ではなく [Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使って実験を設計してください。

ノート

- StepOnePlus 装置で実験を測定するときに、[Run Method] (測定方法) (31 ページ) を編集して各 VeriFlex ブロックを異なる温度に設定するには、次のことが必要です。
 - a. [Design Wizard] (設定ウィザード) ではなく、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) を用いて、実験を設計します。
 - b. [Plate Setup] (プレートのセットアップ) 画面で、[Assign Targets and Samples] (ターゲットとサンプルの割り当て) タブを選び、[View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブを選んだ後、[Enable VeriFlex™ Block] (VeriFlex™ ブロックの有効化) チェックボックスを選択します。

重要! [Plate Setup] (プレートのセットアップ) 画面の [Enable VeriFlex™ Block] (VeriFlex™ ブロックの有効化) チェックボックスを選択しておかないと、[Run Method] (測定方法) 画面 (31 ページ) で各 VeriFlex ブロックを異なる温度に設定できません。

詳細について 詳細については：

- [Samples] (サンプル) 画面の入力については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- [Advanced Setup] (高度なセットアップ) の使用については、「[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー」(116 ページ) をご参照ください。

測定方法のセットアップ

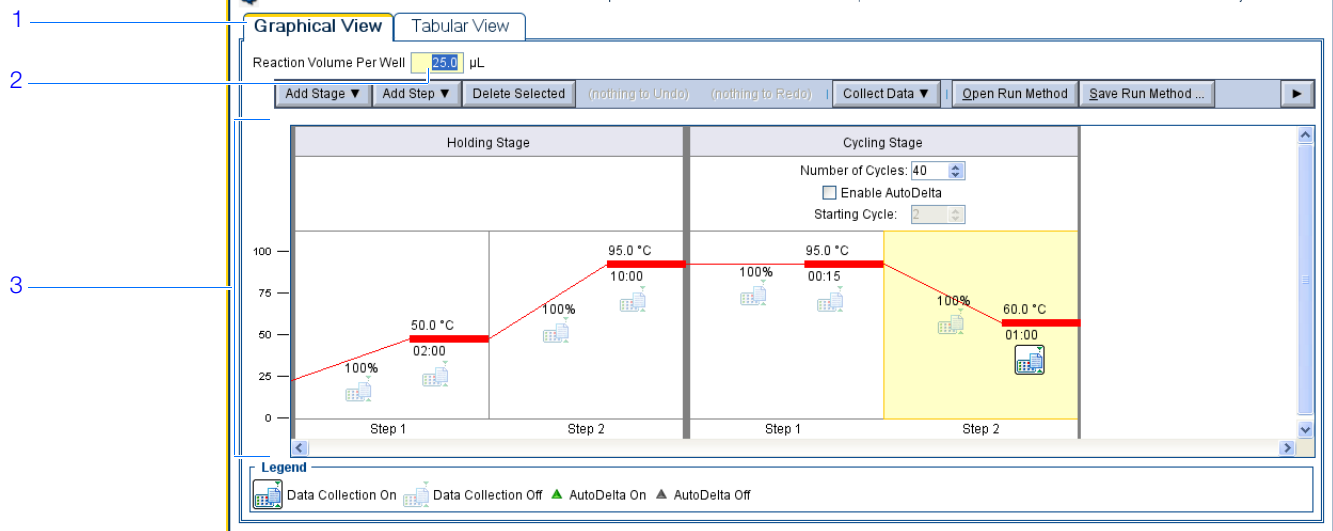
[Run Method] (測定方法) 画面で、デフォルトの測定方法の反応量とサーマルプロファイルを確認します。必要に応じて、デフォルトの測定方法を編集したり、Run Method ライブラリから選択することもできます。

実験例について 標準曲線実験例では、デフォルトの測定方法を 1 箇所だけ変更して使用します。ウェルあたりの反応量を 20 µL から 25 µL に変更します。

**[Run Method]
(測定方法)
画面の確認**

1. [Graphical View] (グラフィック表示) タブ (デフォルト設定) をクリックするか、[Tabular View] (テーブル表示) タブをクリックします。
2. [Reaction Volume Per Well] (ウェルあたりの反応量) フィールドをクリックしてから、**25 µL** を入力します。
3. サーマルプロファイルに、以下のように [Holding Stage] (ホールドイングステージ) と [Cycling Stage] (サイクリングステージ) が表示されていることを確認します。
4. [Next >] (次へ) をクリックします。

ノート



設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- 反応量／ウェルに 10 ～ 30 の値を入力します。StepOne および StepOnePlus システムでは、10 ～ 30 μL の反応量がサポートされています。
- サーマルプロファイルを確認します。
 - サーマルプロファイルが試薬に適していることを確認します。
 - 1 ステップ RT-PCR を実施中の場合は、逆転写ステップを含めます。

実験に別のサーマルプロファイルが必要な場合は、サーマルプロファイルを編集するか、Run Method ライブラリから測定方法を選択することもできます。Run Method ライブラリは、StepOne ソフトウェアに含まれています。

- StepOnePlus 装置で実験を測定するときに、各 VeriFlex ブロックを異なる温度に設定するには、次のことが必要です。
 - a. [Design Wizard] (設定ウィザード) ではなく、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) を用いて実験を設計します。
 - b. [Plate Setup] (プレートのセットアップ) 画面 (31 ページ) で、[Assign Targets and Samples] (ターゲットとサンプルの割り当て) タブを選び、[View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブを選んだ後、[Enable VeriFlex™ Block] (VeriFlex™ ブロックの有効化) チェックボックスを選択します。

重要！ [Plate Setup] (プレートのセットアップ) 画面の [Enable VeriFlex™ Block] (VeriFlex™ ブロックの有効化) チェックボックスを選択しておかないと、[Run Method] (測定方法) 画面で各 VeriFlex ブロックを異なる温度に設定できません。

- c. [Run Method] (測定方法) 画面で、[Graphical View] (グラフィック表示) タブを選択します。

ノート

- d. 変更したい各 VeriFlex™ ブロックについて、温度をクリックしてから希望の値を入力します。

参考：VeriFlex ブロックはそれぞれ異なる温度設定をすることも、すべての VeriFlex ブロックを同じ温度にすることも可能です。隣り合う VeriFlex ブロックを同じ温度に設定しない場合は、設定温度の差を 0.1 ~ 5.0 °C にする必要があります。最高温度は 99.9 °C です。

詳細について

詳細については：

- Run Method ライブラリや [Run Method] (測定方法) 画面入力の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- VeriFlex ブロックの温度設定の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスします。
- [Advanced Setup] (高度なセットアップ) の使用については、「[\[Advanced Setup\] \(高度なセットアップ\) ワークフロー](#)」(116 ページ) をご参照ください。

反応セットアップの確認

[Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面で、アッセイタイプを選択してから、PCR 反応、スタンダード希釈シリーズ、サンプル希釈液の調製のための容量計算値を確認します (TaqMan 試薬を使用する場合)。必要に応じて、反応容量、過剰反応容量、コンポーネント濃度、スタンダード濃度、希釈サンプル濃度は編集できます。

重要！ 反応プレートの各ターゲットアッセイに対して、これらのステップを実施します。

実験例について

標準曲線実験例では：

- Applied Biosystems RNase P アッセイを使用します。
- ウェルあたりの反応容量は、25 µL です。
- 過剰反応容量は 10% です。
- 反応コンポーネントは：
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) または TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - RNase P Assay Mix (20×)
 - サンプルまたはスタンダード
 - 蒸留水
- ストック中のスタンダード濃度は 20,000 コピー／µL です。
- 希釈サンプル濃度は、6.6 ng/µL です。
- サンプルストック濃度は、100 ng/µL です。

ノート

[Reaction Setup]
(反応セットアップ)
画面の入力

[Reaction Mix Calculations] (反応ミックス計算) タブの入力

1. [Reaction Mix Calculations] (反応ミックス計算) タブを選択します (デフォルト設定)。
2. [Select Target] (ターゲットの選択) 欄で [RNase P] を選択します (デフォルト)。
3. [Assay Type] (アッセイタイプ) ドロップダウンメニューで、[Inventoried/Made to Order] (在庫/注文生産) を選択します。
4. [Reaction Volume Per Well] (ウェルあたりの反応量) フィールドに「25 μ L」と表示されていることを確認します。
5. [Excess Reaction Volume] (過剰反応量) フィールドに「10%」と表示されていることを確認します。
6. [Reactions for RNase P] (RNase P の反応) 欄で：
 - a. [Master Mix Concentration] (Master Mix 濃度) フィールドに「2.0 $\times$ 」と表示されていることを確認します。
 - b. [Assay Mix Concentration] (Assay Mix 濃度) フィールドに「20.0 $\times$ 」と表示されていることを確認します。
 - c. PCR 反応のコンポーネントと容量計算値を確認します。

コンポーネント	1 反応あたりの容量 (μ L)
Master Mix (2.0 $\times$)	12.5
Assay Mix (20.0 $\times$)	1.3
サンプル (10 $\times$) またはスタンダード	2.5 [†]
H ₂ O	8.8
総容量	25.0

[†] サンプルまたはスタンダードの容量は、上限が反応総容量の 10% です。

2E. Set Up: Reaction Setup

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

1. Reaction Mix Calculations | 2. Sample | 3. Dilution Calculations

4. Select Target: RNase P | 5. Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 25 μ L | Excess Reaction Volume: 10 % | Print Reaction Setup

6a. Reactions for RNase P

6b. Master Mix Concentration: 2.0 X | Assay Mix Concentration: 20.0 X

Component	Volume (μ L) for 1 Reaction
Master Mix (2.0X)	12.5
Assay Mix (20.0X)	1.3
Sample (10X or Standard)	2.5
H ₂ O	8.8
Total Volume	25.0

6c. Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: 100.0 ng per μ L

Dilution Point	Source	Source Volume (μ L)	Diluent Volume (μ L)	Total Volume (μ L)	Standard Concentration
1 (10,000)					

ノート

7. [Standard Dilution Series for RNase P] (RNase P のスタンダード希釈シリーズ) 欄で:
- [Standard Concentration in Stock] (ストック中のスタンダード濃度) フィールドをクリックしてから、「20000」を入力します。
 - 単位フィールドをクリックしてから、「copies」(コピー) per μL を入力します。
 - スタンダード希釈シリーズの調製のための容量計算値を確認します。

希釈ポイント	原液	原液容量 (μL)	希釈液容量 (μL)	総容量 (μL)	スタンダード濃度 (コピー/ μL)
1 (10,000)	ストック	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	希釈液 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	希釈液 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	希釈液 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	希釈液 4	9.1	9.1	18.2	250.0

7a
7b
7c

2E. Set Up: Reaction Setup

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: RNase P

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 25 μL | Excess Reaction Volume: 10 % | Print Reaction Setup

Total Volume: 25.0

Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: 20000 copies per μL

Dilution Point	Source	Source Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume (μL)	Standard Concentration (copies/ μL)
1 (10,000)	Stock	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	Dilution 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	Dilution 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	Dilution 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	Dilution 4	9.1	9.1	18.2	250.0

[Sample Dilution Calculations] (サンプル希釈計算) タブの入力

- [Sample Dilution Calculations] (サンプル希釈計算) タブを選択します。
- [Diluted Sample Concentration (105 for Reaction Mix)] (希釈サンプル濃度 (反応ミックスの 10X)) フィールドをクリックしてから、「6.6」を入力します。
- 単位ドロップダウンメニューで [ng/ μL] を選択します (デフォルト設定)。

ノート

4. サンプル希釈のための容量計算値を確認します。

サンプル名	ストック濃度 (ng/μL)	サンプル容量 (μL)	希釈液容量 (μL)	希釈サンプルの 総容量 (μL)
pop1	100.0	1.0	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10x for Reaction Mix): 3.3 ng/μL

Print Reaction Setup

Sample Name	Stock Concentration (ng/μL)	Sample Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume of Diluted Sample (μL)
pop1	100.0	1.0	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

反応セットアップ手順の印刷

詳細な反応セットアップ手順を印刷してから、第3章「反応の準備」用に手順を保存します。

1. [Print Reaction Setup] (反応セットアップの印刷) をクリックします。

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10x for Reaction Mix): 3.3 ng/μL

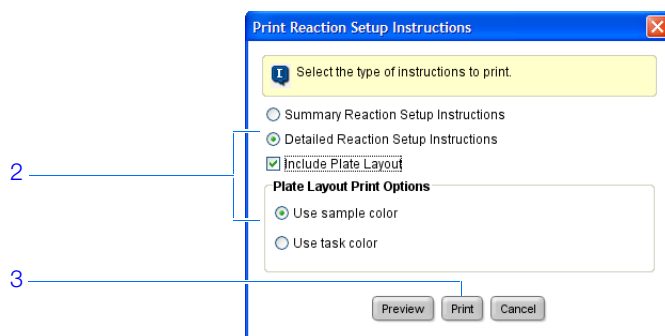
Print Reaction Setup

2. ダイアログボックスで以下を選択します。

- [Detailed Reaction Setup Instructions] (詳細な反応セットアップ手順)
- [Include Plate Layout] (プレートレイアウトを含める)
- [Use sample color] (サンプルカラーを使う)

3. [Print] (印刷) をクリックして、反応セットアップ手順をプリンタに送信します。

ノート



4. [Next >] (次へ) をクリックします。

設計ガイドライン

標準曲線実験を設計する場合：

- TaqMan 試薬を使っている場合は、使用しているアッセイタイプを選択します。
 - Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays (Inventoried または Made to Order) または Applied Biosystems Custom TaqMan® Gene Expression Assays を使っている場合は、[**Inventoried/Made to Order**] (在庫／注文生産) を選択します。
 - Primer Express® ソフトウェアでアッセイを設計している場合は、[**Custom**] (カスタム) を選択します。
- 反応量／ウェルに 10 ～ 30 の値を入力します。StepOne および StepOnePlus システムでは、10 ～ 30 μL の反応量がサポートされています。
- 試薬分注の際に発生するロスを検討して、反応容量を多めにしてください。弊社では、過剰反応容量を少なくとも 10% とすることを勧めます。
- 各ターゲットの反応ミックス濃度を確認します。必要に応じて：
 - TaqMan 試薬については、Master Mix と Assay Mix の濃度を編集します。
 - SYBR Green 試薬については、Master Mix、フォワードプライマー、リバープライマーの濃度を編集します。
 - 1 ステップ RT-PCR については、逆転写酵素の濃度を編集します。
- 各ターゲットの反応ミックスコンポーネントを確認します。
 - 高速 PCR 反応を実施している場合は、PCR 反応に Fast Master Mix を使用していることを確認します。
 - 標準 PCR 反応を実施している場合は、PCR 反応に標準 Master Mix を使用していることを確認します。
 - 1 ステップ RT-PCR については、PCR 反応に逆転写酵素を含むこと、特定のバッファーを使用していることを確認してください。
- 各ターゲットのスタンダード希釈シリーズの計算値を確認します。必要に応じて、ストック中のスタンダード濃度を編集します (単位を含む)。

参考： [Standard Concentration in Stock] (ストック中のスタンダード濃度) の単位フィールドには、ドロップダウンメニューから [ng] か [μg] を選択するか、あるいはフィールドに別の単位 ([copies]、[IU (International Units : 国際単位)]、[nmol]、[pg] など) を入力することもできます。入力した内容に応じてテーブルがアップデートされます。

ノート

- 各サンプルのサンプル希釈計算値を確認します。必要に応じて、希釈サンプル濃度（単位を含む）とストック濃度を編集します。

詳細について 詳細については：

- [Reaction Setup]（反応セットアップ）画面の入力については、をクリックするか、**F1**を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- Applied Biosystems アッセイについては、以下をご参照ください。
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

実験用物品の注文

[Materials List]（物品リスト）画面で、PCR 反応プレートの準備に推奨されている物品リストを確認します。オプションで、物品リストを印刷し、ショッピングリストを作成し、Applied Biosystems Store から推奨物品を注文することもできます。

参考：Applied Biosystems Store にアクセスするには、自由にインターネットに接続ができる環境が必要です。製品の在庫状況や価格は、お住まいの地域や国により変動します。全ての国から、Applied Biosystems Store にオンラインで注文可能とは限りません。不明な点は、弊社セールス担当者までお問い合わせください。

参考：StepOne ソフトウェアは、実験設計に基づいて注文する物品を推奨します。ソフトウェアは、ユーザーが、実験を設計し、物品を注文し、物品到着時に反応プレートを準備（第3章）、測定（第4章）するものと仮定します。

実験例について 標準曲線実験例では、次の物品が推奨されます。

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
- MicroAmp™ 96-Well Support Base
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) または TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG

ノート

- Applied Biosystems RNase P assay

参考：Human RNase P FAM™ 色素ラベル MGB プローブは、TaqMan® Gene Expression Assay としては使用できません。Custom TaqMan® Gene Expression Assay (PN 4331348) としてご注文ください。

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

参考：この実験例は、StepOne 装置用です。[Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面 (20 ページ) で StepOnePlus 装置を選択した場合、96 ウェル用消耗品 (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate など) が 48 ウェル用消耗品の代わりに表示されます。

[Ordering Materials] (物品の注文) 画面の入力

1. 実験例については、[Find Assay] (アッセイの検索) 欄を空欄のままにします。

Human RNase P FAM 色素ラベル MGB プローブは、TaqMan Gene Expression Assay としては使用できないので、[Order Materials List] (注文物品リスト) 画面から注文できません。必要な場合には、Custom TaqMan Gene Expression Assay (PN 4331348) としてご注文できます。『Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol』を参照してください。

参考：標準曲線実験を設計する場合、[Find Assay] (アッセイの検索) 欄の入力の仕方については、「設計ガイドライン」(41 ページ) をご覧ください。

2. [Display] (表示) ドロップダウンメニューで [All Items] (すべてのアイテム) を選択してから (デフォルト設定)、推奨物品を確認します。必要に応じて、右側のスクロールバーを使って、すべてのアイテムを確認します。

参考：特定のアイテムに関する詳細については、部品番号リンクをクリックしてください。Applied Biosystems Store の製品情報ページに接続します。Applied Biosystems Store にアクセスするには、自由にインターネットに接続ができる環境が必要です。

3. (オプション) [Print Materials List] (物品リストの印刷) をクリックして、物品リストをプリンタに送信します。
4. (オプション) ショッピングリストを作成します。
 - a. 以下の各アイテムの横にあるチェックボックスを選択します。
 - MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
 - MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
 - MicroAmp™ 96-Well Support Base
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×) または TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - b. [Add Selected Items to Shopping List] (選択したアイテムをショッピングリストに追加) をクリックします。

ノート

5. (オプション) Applied Biosystems Store にショッピングバスケットを作成します。

参考： Applied Biosystems Store にアクセスするには、自由にインターネットに接続ができる環境が必要です。製品の在庫状況や価格は、お住まいの地域や国により変動します。全ての国から、Applied Biosystems Store にオンラインで注文可能とは限りません。不明な点は、弊社セールス担当者までお問い合わせください。

- a. [Experiment Shopping List] (実験ショッピングリスト) に希望の物品が含まれていること、数量が正しいことを確認してから、[Order Materials in List] (リストの物品の注文) をクリックします。

3A. Order: Materials List (Optional)

Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.

Find Assay

Enter Gene Name Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

Experiment Materials List

Display:

☐ Check All	Item	Part Number	Description
☒	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate...	4375816	The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating. An optically clear adhesive film used to seal the samples into the...

Experiment Shopping List (2 items)

Shopping Basket Name:

☐ Check All	Item	Part Number	Quantity
☐	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction P...	4375816	1
☐	MicroAmp™ 96-Well Support Base (10 bases)	4379590	1

- b. [Order Materials - Log In] (物品の注文－ログイン) ダイアログボックスで、Applied Biosystems Store 用のユーザー名とパスワードを入力してから、[Login and Submit] (ログインと送信) をクリックします。

参考： Applied Biosystems Store のアカウントをお持ちでない場合は、[Register Now] (今すぐ登録) をクリックして、アカウントを作成してください。(直接アメリカのインターネットオーダーシステムにご登録いただいても、日本国内のお客様はご利用いただけません。詳細は、03 (5566) 6700 までお問い合わせください。)

Order Materials - Log In

Log into the Applied Biosystems Store to place the selected items in your shopping basket. If you do not have a user name and password, click "Register Now" to create a new account.

Store Log In

To log into the Applied Biosystems Store, enter your user name and password then click "Log In and Submit".

User Name:

Password:

OR

Register

If you do not have an Applied Biosystems account, click the link below to create a new account.

[Register Now](#)

☐ Remember my user name and password for future orders

ノート

- c. Applied Biosystems Store に接続した後は、注文を完了するまで指示に従ってください。

6. 「[Design Wizard] (設計ウィザード) の終了」(42 ページ) に進みます。

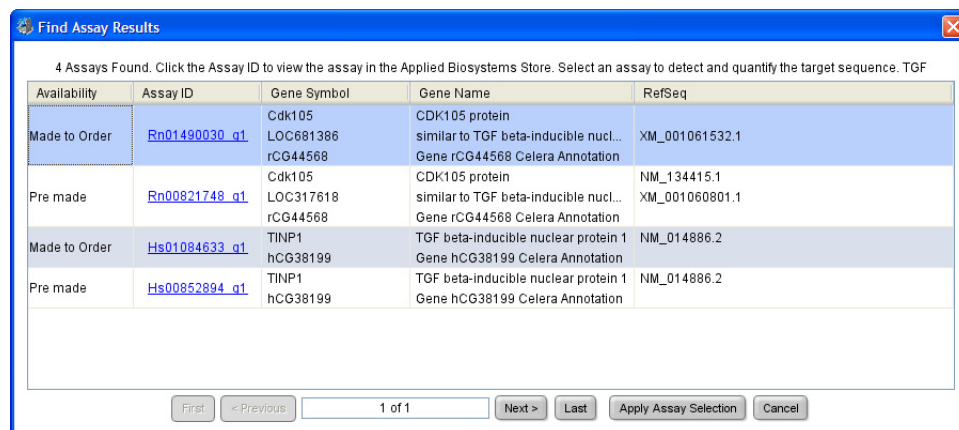
設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- 実験に必要な物品をすべて選択し、ショッピングリストに追加します。
- Applied Biosystems Store にアクセスするためには、
 - コンピュータが、インターネットに接続できることを確認します。
 - Applied Biosystems のウェブサイトをご利用になる際は、以下のバージョンのブラウザと Adobe® Acrobat® Reader を使うようお勧めします。

デスクトップ オペレーティング システム	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Macintosh® Safari	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 2000/NT/XP/Vista	v6.x 以降	v6.x 以降	該当なし	v4.0 以降
Macintosh® OS 9 以降	利用できません	利用できません	v2.0.4 以降	v4.0 以降

参考：ウェブサイトが正しく機能するため、cookie と Java Script がオンになっていることを確認してください。

- Applied Biosystems Store でアッセイを検索するには、[Find Assay] (アッセイの検索) 欄にもれなく入力します。
 - [Enter Gene Name] (遺伝子名の入力) フィールドをクリックし、遺伝子名を入力した後「Find Assay」(アッセイの検索) をクリックします。
 - [Find Assay Results] (アッセイの検索結果) ダイアログボックスでアッセイを選択します。
 - [Apply Assay Selection] (アッセイ選択の適用) をクリックします。



詳細について [Materials List] (物品リスト) 画面の入力に関する詳細については、 をクリックするか、F1 を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート

[Design Wizard] (設計ウィザード) の終了

[Design Wizard] (設計ウィザード) を終了するには、プレートレイアウトを確認してから、終了オプションを選択してください。

実験例について

StepOne ソフトウェアは、反応プレート中のウェルの位置を自動的に選択します。標準曲線実験例では：

- ウェルは、以下に示すように配置されます。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	pop1 U RNase P	pop1 U RNase P	pop1 U RNase P	pop2 U RNase P	pop2 U RNase P
B	pop2 U RNase P	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

参考： この実験例は、StepOne 装置用です。[Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面 (20 ページ) で StepOnePlus 装置を選択した場合には、反応プレートレイアウトは上記のレイアウトと異なります。ソフトウェアは、StepOnePlus 装置には、96 ウェル反応プレートレイアウトを表示します。96 ウェル反応プレートレイアウトの例については、11 ページをご参照ください。

- 実験をそのまま保存し、閉じます。

参考： 実験例では、この時点で測定を実施しないでください。

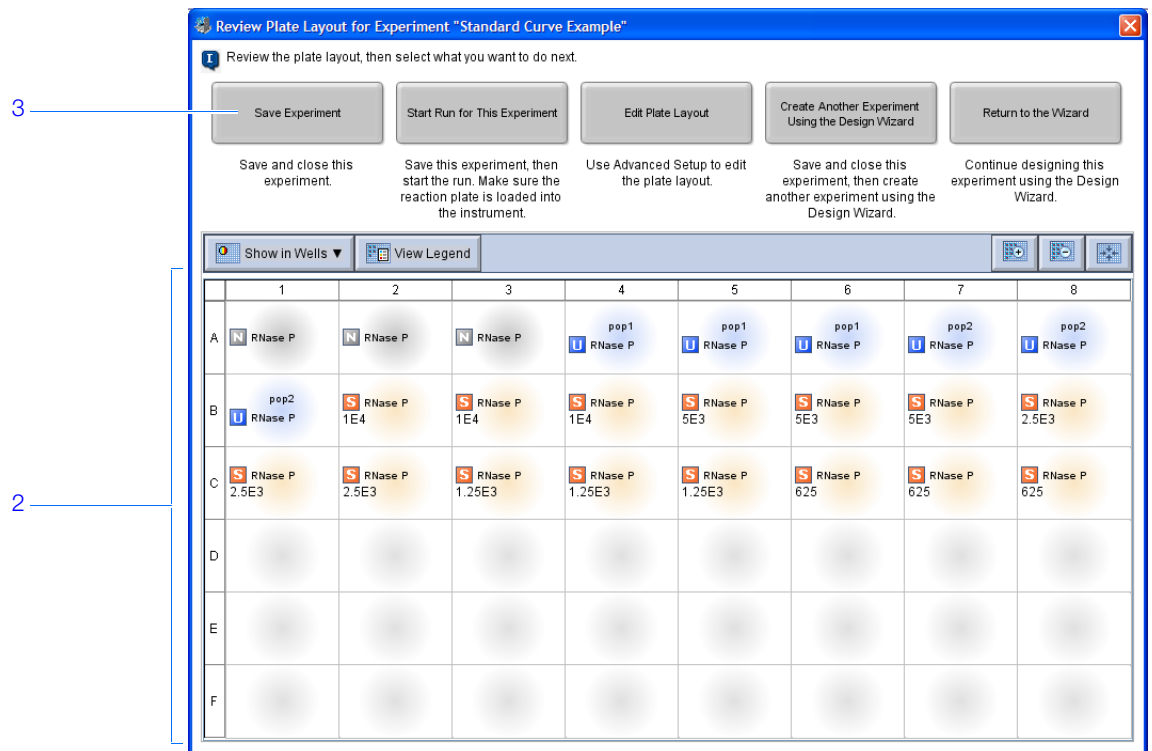
[Design Wizard] (設計ウィザード) の終了

- StepOne ソフトウェア画面の下にある **[Finish Designing Experiment]** (実験設計の完了) をクリックします。
- [Review Plate Layout for Experiment]** (実験のプレートレイアウトの確認) ウィンドウで、プレートレイアウトを確認します。以下の確認を行ってください。
 - 未知のウェルが 6 個であること。U
 - スタンダードウェルが 15 個であること。S
 - ネガティブコントロールウェルが 3 個であること。N
 - 空のウェルが 24 個であること。

参考： プレートレイアウトが誤っている場合は、**[Return to the Wizard]** (ウィザードに戻る) をクリックして、入力されている値を確認してください。

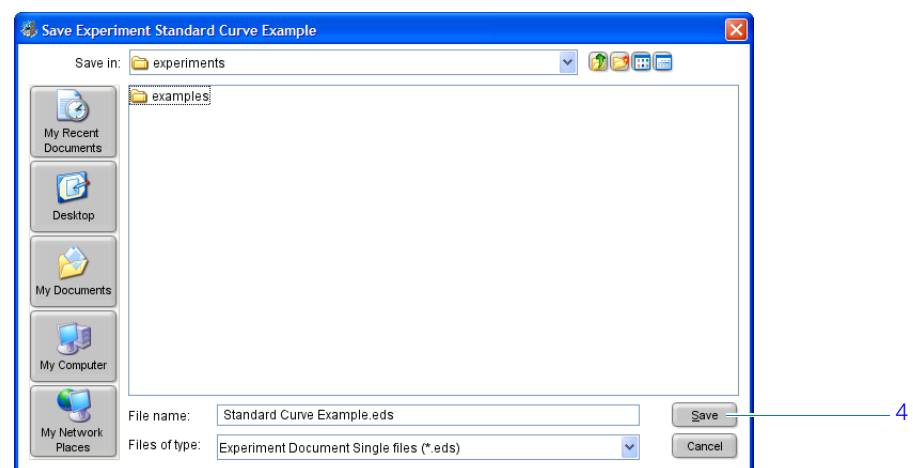
ノート

3. [Save Experiment] (実験の保存) をクリックします。



4. [Save Experiment] (実験の保存) ダイアログボックスで、[Save] (保存) をクリックして、デフォルトのファイル名と保存場所をそのまま使用します。実験例を保存してから閉じ、[Home] (ホーム) 画面に戻ります。

参考：デフォルト設定の場合、実験例は、< ドライブ>:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名>\experiments フォルダに保存されます。



ノート

設計ガイドライン 標準曲線実験を設計する場合：

- [Review Plate Layout for Experiment] (実験のプレートレイアウトの確認) ウィンドウで、適切な終了オプションを選択します。

クリック	行いたい操作
[Save Experiment] (実験の保存)	変更も測定開始もせずに実験を保存し、終了します。
[Start Run for This Experiment] (この実験の測定を開始)	実験を保存し、測定を開始します。反応プレートが装置にロードされていることを確認します。
[Edit Plate Layout] (プレートレイアウトの編集)	• [Advanced Setup] (高度なセットアップ) を用いてプレートレイアウトを変更します。 • (StepOnePlus 装置のみ) 各 VeriFlex ブロックに異なる温度を設定するには、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使います。
[Create Another Experiment Using the Design Wizard] (設計ウィザードを用いて他の実験を作成する)	現在の実験を保存終了した後、[Design Wizard] (設計ウィザード) を用いて他の実験を作成します。
[Return to the Wizard] (ウィザードに戻る)	実験に戻り、[Design Wizard] (設計ウィザード) を用いて変更を行います。

- デフォルト設定の場合、実験は、< ドライブ>:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名>\experiments フォルダに保存されます。変更する場合：
 - 特定の実験の保存場所を変更するには、[Save Experiment] (実験の保存) ダイアログボックスを使って希望の保存場所に進みます。
 - デフォルトの保存場所を変更するには、[Tools] (ツール) ▶ [Preferences] (環境設定) を選択してから、[General] (全般) タブ (デフォルト設定) を選択します。[Default Data Folder] (デフォルトデータフォルダ) フィールドで、希望の保存場所を参照します。

詳細について [Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフローの詳細については、「[\[Advanced Setup\] \(高度なセットアップ\) ワークフロー](#)」(116 ページ) をご参照ください。

ノート

3

反応の準備

本章の内容：

■ 本章の概要	46
■ サンプル希釈液の調製	47
■ スタンダード希釈シリーズの調製	49
■ 反応ミックスの調製	51
■ 反応プレートの調製	53

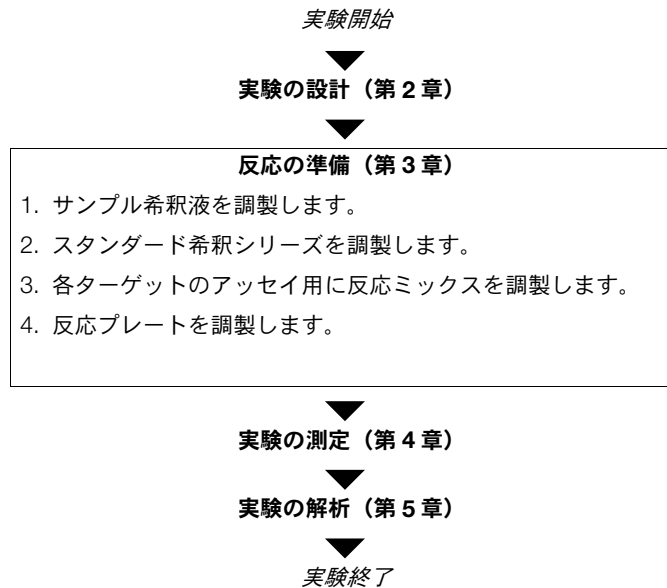
参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの  をクリックするか、**[Help]** (ヘルプ) ▶ **[StepOne Software Help]** (StepOne Software ヘルプ) を選択します。

ノート

本章の概要

本章では、標準曲線実験例の PCR 反応を準備する方法について説明し、実際の標準曲線実験の PCR 反応を準備する際のガイドラインを提供します。

実験例ワークフロー 本書に記載されている実験例用 PCR 反応を準備するワークフローを、以下に示します。



ノート

サンプル希釈液の調製

サンプルを最終反応ミックスに添加するまえに、サンプル希釈を行います。サンプルは、StepOne™ ソフトウェアで計算した容量で希釈します（「[Sample Dilution Calculations]（サンプル希釈計算）タブの入力」（35 ページ））。

実験例について 標準曲線実験例では：

- StepOne ソフトウェアでは、サンプルの容量は反応総容量の 10% に限られているため、サンプルの希釈が必要です。反応総容量は 25 μL / 反応なので、サンプル量は 2.5 μL / 反応となります。
- ストック濃度は 100 ng/ μL です。[Sample Dilutions Calculations]（サンプル希釈計算）表に従ってサンプルを希釈すると、サンプル濃度は、6.6 ng/ μL となります。これは、容量が 25 μL の最終反応ミックスに、2.5 μL の容量で加えた場合、10 $\times$ の濃度となります。最終反応液中の濃度は、1 $\times$ です。
- ソフトウェアで計算した容量は、以下のようになります。

サンプル名	ストック濃度 (ng/ μL)	サンプル容量 (μL)	希釈液容量 (μL)	希釈サンプルの総容量 (μL)
pop1	100.0	1.0	14.2	15.2
pop2	100.0	1.0	14.2	15.2

必要な物品

- サンプル希釈用蒸留水
- マイクロ遠心管
- ピペッター
- ピペットチップ
- サンプルストック
- ボルテックスミキサー
- 遠心機

サンプル希釈液の調製

1. 各希釈サンプル用遠心管にラベリングします。
 - 集団 1
 - 集団 2
2. 必要量の蒸留水（希釈液）を空の遠心管にそれぞれ加えます。

遠心管	サンプル名	希釈液容量 (μL)
1	集団 1	14.2
2	集団 2	14.2

ノート

3. 必要量のサンプルストックを各遠心管にそれぞれ加えます。

遠心管	サンプル名	サンプル容量 (μL)
1	集団 1	1.0
2	集団 2	1.0

4. 各希釈サンプルを 3 ～ 5 秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
5. 反応プレートの準備ができるまで、希釈サンプルを氷冷します。

準備ガイドライン 標準曲線実験を準備する場合：

- StepOne ソフトウェアではサンプル容量が反応総容量の 10% までと定められているため、サンプル希釈が必要です。サンプルを最終反応ミックスに添加するまえに、サンプル希釈を行います。
- TaqMan[®] Gene Expression Assay や Custom TaqMan[®] Gene Expression Assay の性能を最大限に活用するためには、20 μL 反応液当たり 10 から 100 ng の cDNA テンプレートを使用してください。高速試薬の場合には、10 ng とすることをお勧めします。
- TE 緩衝液または蒸留水でサンプルを希釈します。

詳細について Applied Biosystems アッセイの詳細については、以下をご参照ください。

- *TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*

ノート

スタンダード希釈シリーズの調製

スタンダード希釈シリーズを、StepOne ソフトウェアで計算した容量で調製します
(「[Reaction Mix Calculations] (反応ミックス計算) タブの入力」(34 ページ))。

実験例について 標準曲線実験例では：

- ストック中のスタンダード濃度は 20,000 コピー／ μL です。
- ソフトウェアで計算した容量は、以下のようになります。

希釈ポイント	原液	原液容量 (μL)	希釈液容量 (μL)	総容量 (μL)	スタンダード濃度 (コピー／ μL)
1 (10,000)	ストック	3.6	14.5	18.2	4000.0
2 (5,000)	希釈液 1	9.1	9.1	18.2	2000.0
3 (2,500)	希釈液 2	9.1	9.1	18.2	1000.0
4 (1,250)	希釈液 3	9.1	9.1	18.2	500.0
5 (625)	希釈液 4	9.1	9.1	18.2	250.0

必要な物品

- スタンダード希釈用蒸留水
- マイクロ遠心管
- ピペッター
- ピペットチップ
- サンプルストック
- ボルテックスミキサー
- 遠心機

**RNase P アッセイの
スタンダード希釈
シリーズの調製**

1. 各スタンダード用遠心管に、次のようにラベリングをします。
 - RNase P Std. 1
 - RNase P Std. 2
 - RNase P Std. 3
 - RNase P Std. 4
 - RNase P Std. 5
2. 必要量の蒸留水（希釈液）を空の遠心管にそれぞれ加えます。

遠心管	スタンダード名	添加する希釈液容量 (μL)
1	RNase P Std. 1	14.5
2	RNase P Std. 2	9.1
3	RNase P Std. 3	9.1
4	RNase P Std. 4	9.1
5	RNase P Std. 5	9.1

ノート

3. RNase P Std 1 遠心管に希釈液 1 を調製します。
 - a. ストックを3～5秒間ボルテックスにかけた後、遠心管を短時間遠心機にかけます。
 - b. 新しいピペットチップを使って、3.6 μ L のストックを RNase P Std 1 遠心管に添加します。
 - c. Std 1 遠心管を3～5秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
4. RNase P Std 2 遠心管に希釈液 2 を調製します。
 - a. 新しいピペットチップを使って、9.1 μ L の希釈液1をRNase P Std 2遠心管に添加します。
 - b. Std 2 遠心管を3～5秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
5. RNase P Std 3 遠心管に希釈液 3 を調製します。
 - a. 新しいピペットチップを使って、9.1 μ L の希釈液2をRNase P Std 3遠心管に添加します。
 - b. Std 3 遠心管を3～5秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
6. RNase P Std 4 遠心管に希釈液 4 を調製します。
 - a. 新しいピペットチップを使って、9.1 μ L の希釈液3をRNase P Std 4遠心管に添加します。
 - b. Std 4 遠心管を3～5秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
7. RNase P Std 5 遠心管に希釈液 5 を調製します。
 - a. 新しいピペットチップを使って、9.1 μ L の希釈液4をRNase P Std 5遠心管に添加します。
 - b. Std 5 遠心管を3～5秒間ボルテックスにかけた後、短時間遠心機にかけます。
8. 反応プレートの準備ができるまで、スタンダードを氷冷します。

準備ガイドライン 標準曲線実験を準備する場合：

- 測定データの正確な分析には、スタンダードが重要です。
- 希釈液を準備する際に誤ったり不正確であると、結果に直接影響が出ます。
- ピペッターやピペットチップの品質の他、希釈液の計量や混合の際に注意を怠ると、精度に影響が出ます。
- スタンダードの希釈には、TE 緩衝液または蒸留水を用います。

ノート

反応ミックスの調製

反応ミックスを、StepOne ソフトウェアで計算したコンポーネントと容量で調製します（「[Reaction Mix Calculations]（反応ミックス計算）タブの入力」（34 ページ））。

参考：ソフトウェアが PCR 反応の全コンポーネントの容量を計算します。しかし、本章に従って反応ミックスを調製する場合には、マスターミックス、アッセイミックスおよび蒸留水のみとしてください。反応プレートの準備をする際に、サンプルまたはスタンダードを加えてください（「反応プレートの調製」（53 ページ）参照）。

実験例について 標準曲線実験例では：

- 反応ミックスコンポーネントには、次のものが含まれます。
 - TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2×) または TaqMan[®] 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG
 - RNase P Assay Mix (20×)
 - 蒸留水
- ソフトウェアが計算した容量は：

コンポーネント	1 反応あたりの容量 (μL)
Master Mix (2.0×)	12.5
Assay Mix (20.0×)	1.3
H ₂ O	8.8
総容量	22.6

参考：この時点では、サンプルやスタンダードは加えません。

必要な物品

- マイクロ遠心管
- ピペッター
- ピペットチップ
- 反応ミックスコンポーネント（上掲）
- 遠心機

ノート

反応ミックスの調製

**注意**

危険な薬品：TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) は、目と皮膚に炎症を引き起こす可能性があります。飲み込んだり、吸入すると、不快な症状が発生する可能性があります。MSDS をよく読み、取扱い上の指示に従ってください。使用時には、適切な保護めがね、保護服、保護手袋を着用してください。

**注意**

危険な薬品：TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG は、目と皮膚に炎症を引き起こす可能性があります。飲み込んだり、吸入すると、不快な症状が発生する可能性があります。MSDS をよく読み、取扱い上の指示に従ってください。使用時には、適切な保護めがね、保護服、保護手袋を着用してください。

1. 反応ミックスに適したサイズの遠心管に下記のラベルを付けます。
RNase P Reaction Mix
2. RNase P アッセイでは、各コンポーネントの必要量を遠心管に添加します。

コンポーネント	1 反応あたりの容量 (μL)	24 反応あたりの容量 (μL) (過剰容量を 10% 含む)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) または TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12.5	330.0
RNase P Assay Mix (20X)	1.3	34.3
蒸留水	8.8	232.3
総反応ミックス容量	22.6	596.6

3. 上下にそっとピペットして反応ミックスを混合してから、遠心管にキャップをします。
4. 遠心管を遠心機にかけて、気泡を除きます。
5. 反応ミックスは、反応プレートを調製し終わるまで氷上に置きます。

準備ガイドライン

標準曲線実験を準備する場合：

- 実験にターゲットアッセイが複数含まれる場合には、各ターゲットアッセイ用の反応ミックスは、別々に調製してください。
- 試薬分注の際に発生するロスを検討して多めの容量を準備するため、容量計算の際には、過剰分を含めてください。弊社では、過剰容量を少なくとも 10% とすることを勧めします。
- 必要なコンポーネントをすべて添加します。
- 製造メーカーの指示に従って、試薬を調製してください。
- アッセイミックスは、使う準備が整うまで、遮光して冷凍庫で保存します。光に過度にさらすと、蛍光プローブに影響が生じる場合があります。
- 使用前には：
 - マスターミックス容器を十分に振って、よく攪拌してください。
 - ボルテックスミキサーでアッセイミックスを懸濁分散させた後に、遠心管を短時間遠心機にかけてください。

ノート

- 冷凍サンプルは、氷の上で解凍します。解凍後に、ボルテックスミキサーでサンプルを懸濁分散させた後に、遠心管を短時間遠心機にかけてください。

詳細について 反応ミックス調製方法の詳細については、PCR 反応に使用している試薬が該当する次のプロトコルをご参照ください。

- *TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*

反応プレートの調製

各反復グループ用の反応液を調製した後、反応プレートに移します。StepOne ソフトウェアで表示されるプレートレイアウトを使います。

実験例について 標準曲線実験例では：

- MicroAmp[™] Fast Optical 48-Well Reaction Plate を使用します。
- ウェルあたりの反応容量は、25 μ L です。
- 反応プレートには次の内容が含まれています。
 - 未知のウェルが 6 個。U
 - スタンダードウェルが 15 個。S
 - ネガティブコントロールウェルが 3 個。N
 - 空のウェルが 24 個。
- StepOne ソフトウェアで自動的に表示されるプレートレイアウトを使います。

ノート

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

参考：この実験例は、StepOne 装置用です。[Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面で StepOnePlus 装置を選択した場合には (20 ページ)、反応プレートレイアウトは上記のレイアウトと異なります。ソフトウェアは、StepOnePlus 装置には、96 ウェル反応プレートレイアウトを表示します。96 ウェル反応プレートレイアウトの例については、11 ページをご参照ください。

必要な物品

- マイクロ遠心管
- ピペッター
- ピペットチップ
- RNase P 反応ミックス (52 ページから)
- 蒸留水
- スタンダード (49 ページから)
- サンプル (47 ページより)
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film
- 遠心機

反応プレートの調製

1. ターゲットに対してネガティブコントロール反応を調製します。
 - a. 適当なサイズの遠心管に、以下に示す容量の反応ミックスおよび蒸留水を加えます。

遠心管	反応ミックス	反応ミックス容量 (μL)	蒸留水容量 (μL)
1	RNase P Reaction Mix	74.6	8.3

- b. 丁寧なピペット操作によって、各遠心管に反応液を加えた後、遠心管にキャップをします。

ノート

- c. 遠心管を遠心機にかけて、気泡を除きます。
- d. 反応プレートの適当なウェルに、ネガティブコントロール反応液を 25 μ L 加えます。

2. 各反復グループ用に、スタンダード反応液を調製します。

- a. 適当なサイズの遠心管に、以下に示す容量の反応ミックスおよびスタンダードを加えます。

遠心管	スタンダード 反応	反応ミックス	反応ミックス 容量 (μ L)	スタンダード	スタンダード 容量 (μ L)
1	RNase P Std 1	RNase P Reaction Mix	74.6	RNase P Std 1	8.3
2	RNase P Std 2	RNase P Reaction Mix	74.6	RNase P Std 2	8.3
3	RNase P Std 3	RNase P Reaction Mix	74.6	RNase P Std 3	8.3
4	RNase P Std 4	RNase P Reaction Mix	74.6	RNase P Std 4	8.3
5	RNase P Std 5	RNase P Reaction Mix	74.6	RNase P Std 5	8.3

- b. 丁寧なピペット操作によって反応液を加えた後、遠心管にキャップをします。
- c. 遠心管を短時間遠心機にかけて、気泡を除きます。
- d. 反応プレートの適当なウェルに、スタンダード反応液を 25 μ L 加えます。

3. 各反復グループについて、未知サンプルの反応を調製します。

- a. 適当なサイズの遠心管に、以下に示す容量の反応ミックスおよびサンプルを加えます。

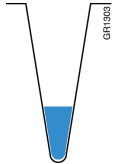
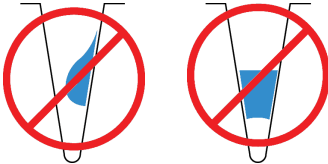
遠心管	未知の反応	反応ミックス	反応ミックス 容量 (μ L)	サンプル	サンプル 容量 (μ L)
1	RNase P pop1	RNase P Reaction Mix	74.6	pop1	8.3
2	RNase P pop2	RNase P Reaction Mix	74.6	pop2	8.3

- b. 丁寧なピペット操作によって反応液を加えた後、遠心管にキャップをします。
- c. 遠心管を短時間遠心機にかけて、気泡を除きます。
- d. 反応プレートの適当なウェルに、未知の（サンプル）反応液を 25 μ L 加えます。

ノート

4. 反応プレートを光学接着フィルムでシールします。
5. 遠心管を短時間遠心機にかけて、気泡を除きます。
6. 液が反応プレートの各ウェルの底にたまっていることを確認します。ウェルの底まで達していないものがあれば、反応プレートをより高速で長時間遠心機にかけます。

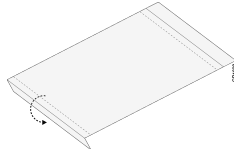
重要！ 反応プレートの底を汚さないように注意してください。反応プレートの底に液体や他の汚染物がつくと、サンプルブロックを汚染し、異常に高いバックグラウンド信号が検出されてしまう可能性があります。

正	誤
 液がウェルの底にたまっている。	 - 遠心力が不十分、または - 遠心時間が不十分

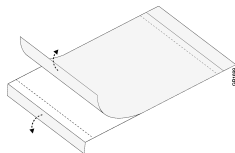
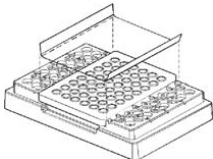
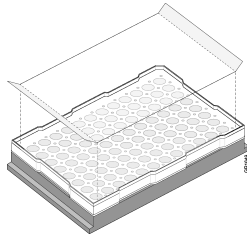
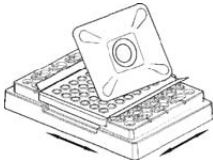
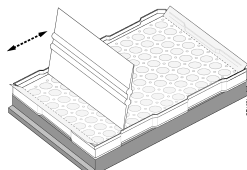
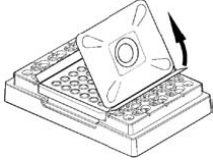
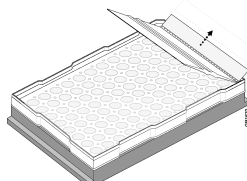
7. 測定の準備ができるまで、反応プレートを冷暗所で氷冷します。

準備ガイドライン 標準曲線実験を準備する場合：

- 使用する消耗品が適切であることを確認します。
- PCR 反応の配置が StepOne ソフトウェアで表示されるプレートレイアウトに合致していることを確認してください。次のいずれかが可能です。
 - ソフトウェアが自動的に作成するプレートレイアウトを使います。
 - または
 - 「Advanced Setup」(高度なセットアップ) を使って、ソフトウェアでプレートレイアウトを変更します。
- 光学接着フィルムを用いて反応プレートをシールする場合には、各反応プレートを以下のようにシールしてください。

操作	具体例	
	StepOne™ システム	StepOnePlus™ システム
1. 反応プレートを 96 ウェルベースの中央部に置きます。反応プレートが 96 ウェルベースの上部面とびったり重なることを確認します。		
2. 必要に応じて反応プレートを装填します。		
3. ボックスから光学接着フィルム(フィルム)を1枚取り出します。 - StepOne システム反応プレートの場合には、両端を上向きに折り曲げます。フィルムの保護面を上側に向けます。 - StepOnePlus システム反応プレートの場合には、片側の端を折り返します。フィルムの保護面を上側に向けます。		

ノート

操作	具体例	
	StepOne™ システム	StepOnePlus™ システム
4. 白色の保護フィルムをすばやくシール面から剥します。シール面には触れないでください。 重要！ 光学接着フィルムがきちんと密着していないと、ウェルがくっきりと見えませんが、結果に影響はありません。装置のヒートカバーがフィルムと接触すると、びったりくっつきます。		
5. フィルムの両端を持ち、フィルムを反応プレートの方に向けて降ろします（接着面が反応プレートに面するように）。フィルムが反応プレート中の全ウェルを完全に覆っていることを確認します。		
6. 上から圧力をかけながらアプリケータを縦横にゆっくり動かして、反応プレート全体とフィルムが密着するようにします。		
7. アプリケータを使ってフィルムの端を正しい位置で押さえている間に、他方の端を持って、すばやく引っ張ってください。反対側についても同じようにします。		
8. 蒸発が生じないように完全に密着させるためには： a. ステップ 6 を繰り返します。 b. アプリケータの端をフィルムの外側の縁に沿ってしっかり圧力をかけながら動かします。 参考： 光学接着フィルムは、接触しただけで密着するものではなく、蒸発が生じないように完全に密着させるためには、圧力をかけることが必要です。		
9. 反応プレートを点検し、ウェルがすべて密閉されているかどうか確認します。フィルム表面上に全ウェルの縁がはっきりと映っていないければなりません。		

詳細について 詳細については：

- 反応プレート調製方法の詳細については、PCR 反応に使用している試薬が該当する次のプロトコルをご参照ください。
 - TaqMan® Gene Expression Assays Protocol
 - Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol
- 消耗品については、「使用可能な消耗品」(4 ページ) をご参照ください。
- [Advanced Setup] (高度なセットアップ) を用いてプレートレイアウトを変更するには、「[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー」(116 ページ) をご参照ください。

ノート _____

4

実験の測定

本章の内容：

■ 本章の概要	60
■ 測定の準備	61
■ (オプション) 通知設定の有効化	63
■ 測定の開始	65
■ 測定の監視	69
■ プレートの取り出しとデータの転送	76

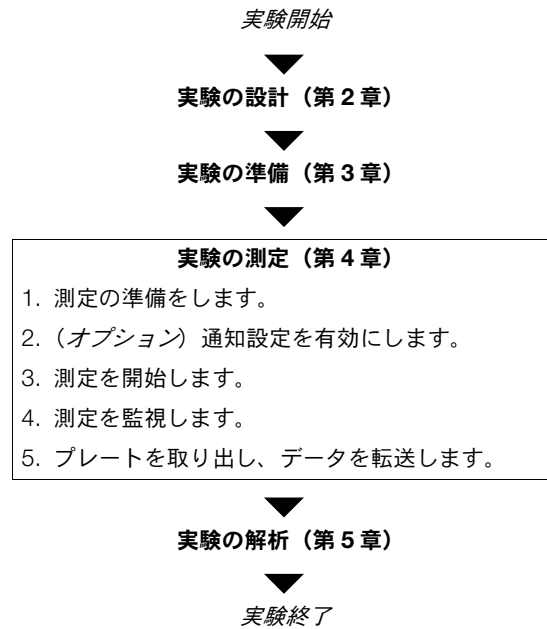
参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの  をクリックするか、**[Help]** (ヘルプ) ▶ **[StepOne Software Help]** (StepOne Software ヘルプ) を選択します。

ノート

本章の概要

本章では、Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems において測定を実施する方法について説明します。

実験例ワークフロー 本書に記載されている実験例の測定を実施するワークフローを以下に示します。



ノート

測定の準備

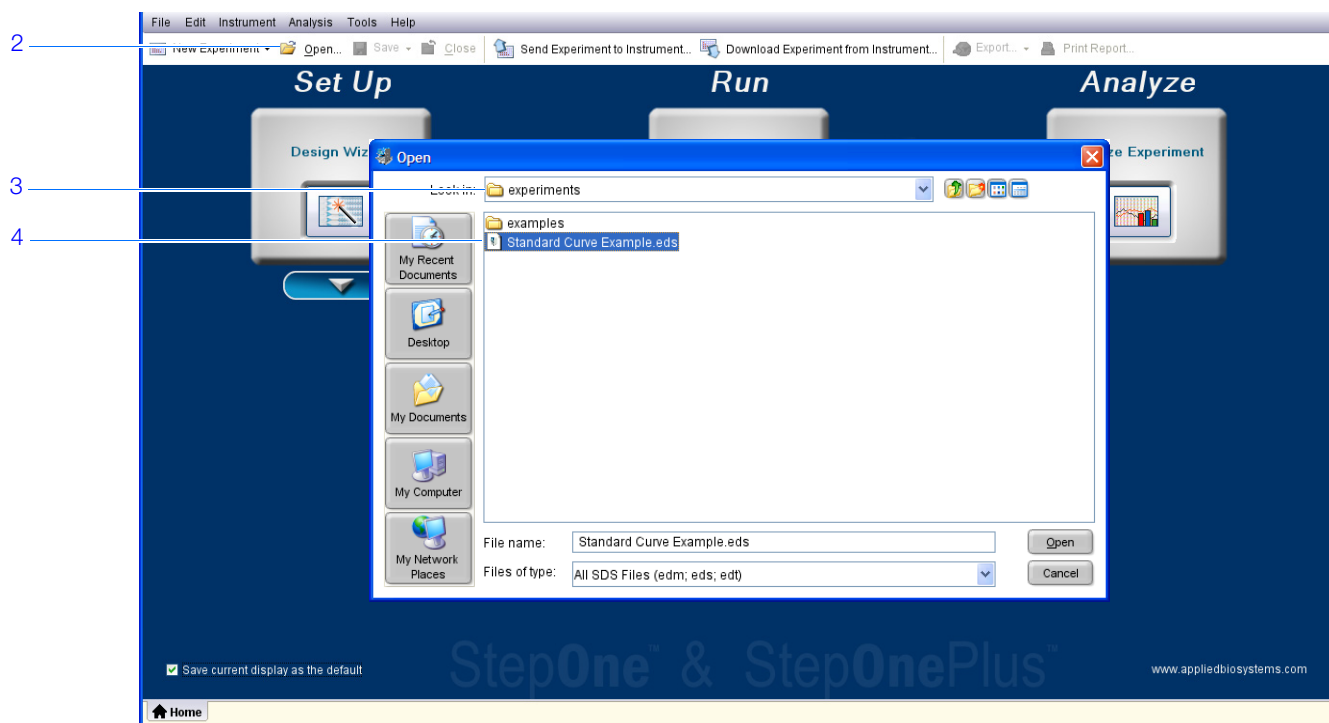
第2章で作成した実験例ファイルを開き、密閉した反応プレートを StepOne™ または StepOnePlus™ 装置にロードして、測定の準備をします。

実験例ファイルを開く

1.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。

ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

2. [Home] (ホーム) 画面で、[Open] (開く) をクリックします。
3. [Open] (開く) ダイアログボックスで、[experiments] (実験) フォルダを選択します (デフォルト設定)。
<ドライブ>:\Applied Biosystems\<ソフトウェア名>\experiments
4. [Standard Curve Example] (標準曲線例) をダブルクリックして、第2章で作成した実験例ファイルを開きます。



ノート

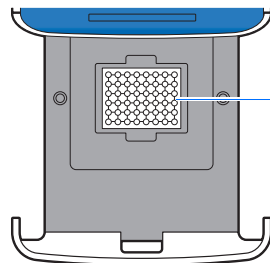
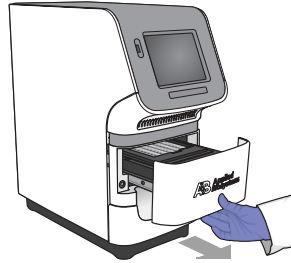
反応プレートを
装置にロード

注意 怪我の危険：装置の操作中、サンプルブロック温度は 100 °C を超える可能性があります。装置使用後は、サンプルブロックが室温に戻るまで手を触れないでください。

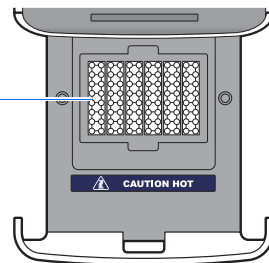


重要！ 反応プレートを取り扱う際は、パウダーフリーの手袋を着用してください。

1. 装置のドロアーを開きます。



StepOne 装置サンプル
ブロック



StepOnePlus 装置の
VeriFlex™ サンプル
ブロック

2. サンプルブロックに反応物を入れます。

- 反応プレートを使用する場合は、A1 ウェルが左奥になるようにサンプルブロックに反応プレートを入れます。
- 反応チューブストリップを使用する場合は、チューブストリップを入れたトレイをサンプルブロックに入れます。
- 反応チューブを使用する場合は、チューブを入れたトレイをサンプルブロックに入れます。



ノート

重要！ 一部分しかロードしない場合に性能を最大限に発揮するためには、

StepOnePlus 装置 – 少なくとも 16 本のチューブをロードし、次のように配列してください。

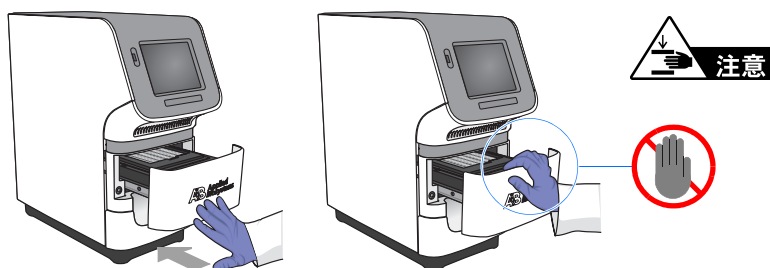
- 隣接する各列に 8 本のチューブを入れ、A から H までの行を使用します。例えば、第 1 列（A 行から H 行まで）と第 2 列（A 行から H 行まで）を使います。

または

- 隣接する各行に 8 本のチューブを入れ、3 から 10 までの列を使用します。例えば、A 行（第 3 列から第 10 列まで）と B 行（第 3 列から第 10 列まで）を使います。

StepOne 装置 – 少なくとも 4 本のチューブをサンプルブロックにロードします。

3. 装置ドロアを慎重に閉じます。



(オプション) 通知設定の有効化

通知設定を有効にすると、StepOne または StepOnePlus 装置が実験を開始、終了した際に、あるいは測定中にエラーが生じた場合に、StepOne ソフトウェアが電子メールにより通知します。通知設定は、オプションであり、StepOne™ および StepOnePlus™ システムの機能や測定時間には影響しません。

重要！ 通知設定は、使用するコンピュータが StepOne または StepOnePlus 装置を制御し、かつイーサネットネットワークに接続している場合にのみ有効にできます。

参考： 通知設定は、コンピュータによる StepOne または StepOnePlus 装置の遠隔監視を行っている場合も有効にできます。詳細については、「[遠隔監視](#)」(73 ページ) をご参照ください。

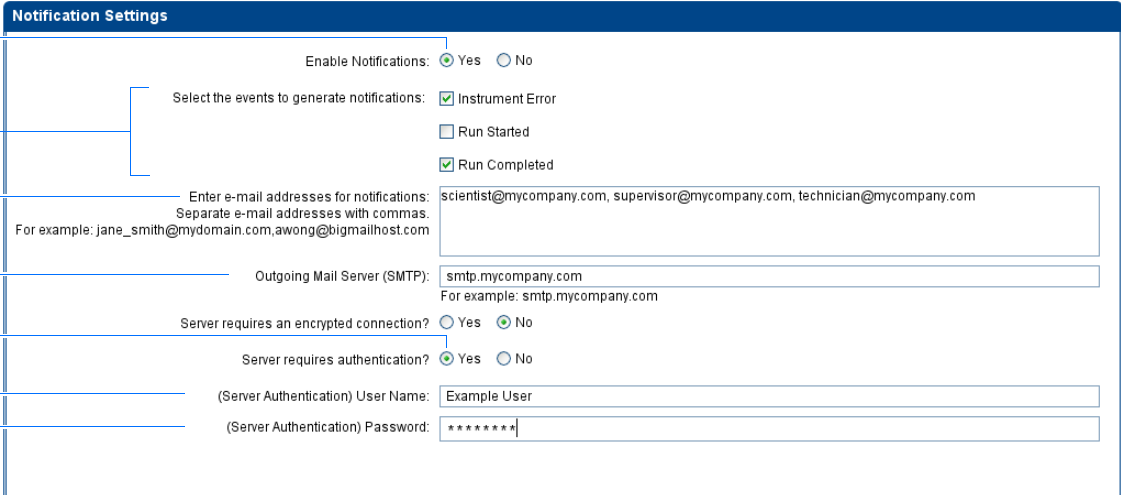
実験例について 実験例では、

- StepOne または StepOnePlus システムが測定を終了し、稼働中にエラーが生じた場合に、3 名のユーザー（ドメイン名が「mycompany.com」で、アドレスが「scientist」、「supervisor」および「technician」）に対して StepOne ソフトウェアにより通知が行われるように設定されます。
- 実験例の SMTP サーバー（www.mycompany.com）は、SSL 暗号化プロトコルを用いてセットアップされており、使用には認証が必要となります。

ノート

通知設定の
セットアップ

1. StepOne ソフトウェアのナビゲーション欄で  [Run] (測定) をクリックします。
2.  [Notification Settings] (通知設定) をクリックします。
3. [Enable Notifications] (通知の有効化) で [Yes] (はい) を選択します。
4. 通知するイベントを選択します。
 - a. [Instrument Error] (装置エラー) を選択します。
 - b. [Run Completed] (測定完了) を選択します。
5. [Enter e-mail addresses for notifications] (通知する電子メールアドレスの入力) フィールドに、次のアドレスを入力します。
scientist@mycompany.com、supervisor@mycompany.com、technician@mycompany.com
6. [Outgoing Mail Server (SMTP)] (送信メールサーバー (SMTP)) フィールドに「smtp.mycompany.com」と入力します。
7. 認証に関する設定を行います。
 - a. [Server requires authentication] (サーバーに認証が必要ですか) には、[Yes] (はい) を選択します。
 - b. [User Name] (ユーザー名) フィールドに「Example User」(ユーザー例) と入力します。
 - c. [Password] (パスワード) フィールドに「password」と入力します。



The screenshot shows the 'Notification Settings' window. Callout 3 points to the 'Enable Notifications' section where 'Yes' is selected. Callout 4 points to the 'Select the events to generate notifications' section where 'Instrument Error' and 'Run Completed' are checked. Callout 5 points to the 'Enter e-mail addresses for notifications' text box containing the example email addresses. Callout 6 points to the 'Outgoing Mail Server (SMTP)' text box containing 'smtp.mycompany.com'. Callout 7a points to the 'Server requires an encrypted connection?' section where 'No' is selected. Callout 7b points to the 'Server requires authentication?' section where 'Yes' is selected. Callout 7c points to the '(Server Authentication) Password' text box containing 'password'.

測定ガイドライン 自動通知を StepOne または StepOnePlus システムでセットアップする場合：

- システムがネットワークに接続されていることが必要です。『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 設置・ネットワーク・メンテナンスガイド』をご参照ください。

ノート

- 電子メールによる通知を希望するイベントを選びます。
 - Instrument Error** (装置エラー) – 装置のエラーが、各測定ごとに電子メールで受信者に通知されます。
 - Run Started** (測定開始) – 装置が測定を開始するごとに電子メールで受信者に通知されます。
 - Run Completed** (測定完了) – 装置が測定を完了するごとに電子メールで信者に通知されます。
- 通知を受ける電子メールアドレスを入手します。

重要！ アドレスは、コンマ (,) で区切ります。

- 必要に応じ、次の情報について、システム管理者か情報技術部門に問い合わせます。
 - 通知を受けるユーザーの電子メールアドレス
 - LAN 上の送信 (SMTP) サーバーのネットワークアドレス
 - ユーザー名とパスワード (サーバーのアクセスに必要な場合)
 - サーバーの SSL 暗号化プロトコルの設定 (有効か無効か)

測定の開始

StepOne または StepOnePlus システムのレイアウトに従って、測定を開始してください。

レイアウト	説明	参照
コロケーション	コンピュータと装置が黄色いケーブルで接続されている。	下記 「コロケーション スタートアップ」
スタンドアロン	- コンピュータと装置が接続されていない、または - コンピュータと装置が同じネットワークに接続されている。	「スタンドアロン スタートアップ」 (66 ページ)

コロケーション
スタートアップ

コンピュータが黄色いケーブルで StepOne または StepOnePlus 装置に直接接続されている場合には、この手順に従います。

- StepOne ソフトウェアのナビゲーション欄で  **[Run]** (測定) をクリックします。
- [START RUN]** (測定開始)  をクリックします。



ノート

**スタンドアロン
スタートアップ**

コンピュータと StepOne または StepOnePlus 装置が、黄色いケーブルで直接接続されていない場合には、この手順に従います。実験を開始します。

- コンピュータと装置が同じネットワークに接続されている場合には、「[ネットワーク経由で実験を装置に送信](#)」(66 ページ)に従います。

または

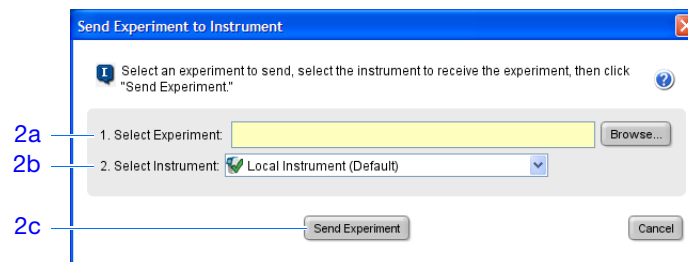
- コンピュータと装置が同じネットワークに接続されていない場合には、「[装置に USB ドライブを用いて実験を転送](#)」(66 ページ)に従います。

ネットワーク経由で実験を装置に送信

1. StepOne ソフトウェアで、 **[Send Experiment to Instrument]** (実験を装置に送信) をクリックします。
2. **[Send Experiment to Instrument]** (実験を装置に送信) ダイアログボックスで、
 - a. **[Browse]** (参照) をクリックして、実験例ファイルを開き、**[Open]** (開く) をクリックします。
 - b. 実験ファイルを受信する装置を選択します。

参考： リストに装置が表示されない場合には、『*Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 設置・ネットワーク構築・メンテナンスガイド*』の説明に従って、装置が監視されるようにセットアップしてください。

- c. **[Send Experiment]** (実験の送信) をクリックして、実験をネットワーク上の装置に送信します。



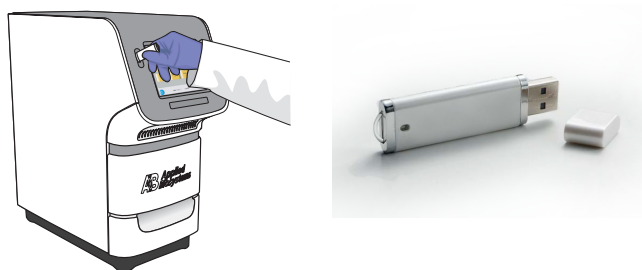
3. 確認の表示がでたら、**[OK]** をクリックしてウィンドウを閉じます。
4. 「[タッチスクリーンを使用した装置測定の開始](#)」(67 ページ)に進みます。

装置に USB ドライブを用いて実験を転送

1. USB ドライブをコンピュータの USB ポートの 1 つに接続します。
2. StepOne ソフトウェアで、 **[Save]** (保存) ▶ **[Save As]** (名前を付けて保存) を選択します。
3. **[Save]** (保存) ダイアログボックスで USB ドライブを選び、**[Save]** (保存) をクリックします。

ノート

4. USB ドライブをコンピュータから取り外し、StepOne または StepOnePlus 装置の USB ポートに接続します。



5. 下記の「タッチスクリーンを使用した装置測定の開始」に進みます。

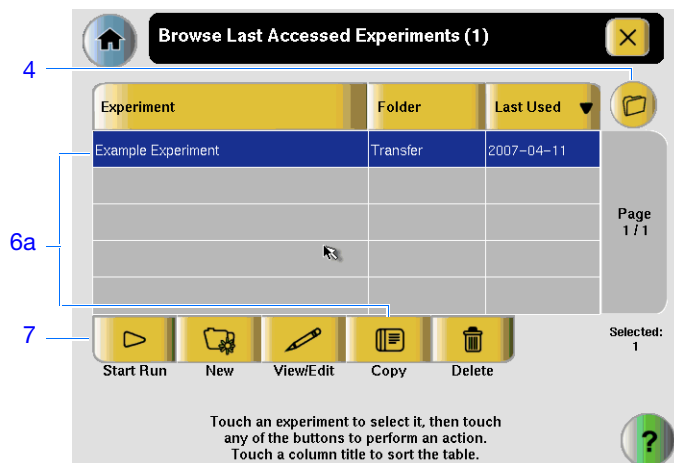
タッチスクリーンを使用した装置測定の開始

1. StepOne または StepOnePlus 装置のタッチスクリーンに触れて、休止を解除します。

参考：タッチスクリーンに [Main Menu]（メインメニュー）画面が表示されない場合には、①に触れます。

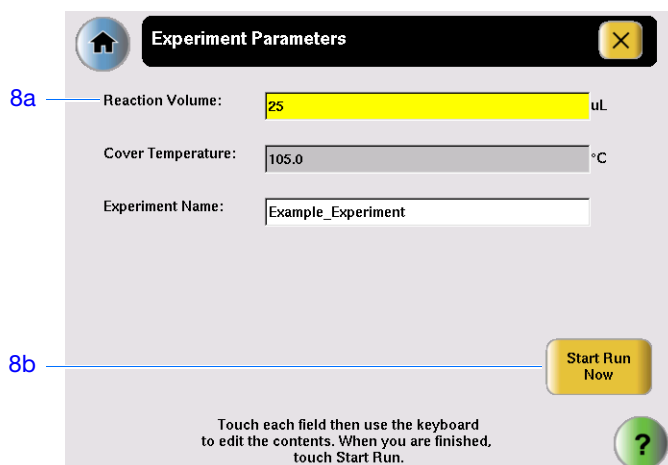
2. タッチスクリーンに USB のマークが表示されるまで待ちます。
3. [Main Menu]（メインメニュー）画面で、[Browse/New Experiments]（実験の参照／新しい実験）に触れます。
4. [Browse]（参照）画面で  [Folders]（フォルダ）に触れます。
5. [Choose an Experiment Folder]（実験フォルダの選択）画面で：
 - USB ドライブから実験を転送した場合には、[USB] に触れます。
 - ネットワーク経由で実験を転送した場合には、[Default]（デフォルト）に触れます。
6. 測定を開始する前に、実験例を装置に保存します。
 - a. [Browse]（参照）画面で実験例名に触れ、[Copy]（コピー）に触れます。
 - b. [Save Experiment]（実験の保存）画面で保存先フォルダを選択し、[Save & Exit]（保存して終了）をクリックします。
7. [Browse]（参照）画面で実験例名に触れ、 [Start Run]（測定の開始）に触れます。

ノート



8. [Run Parameters] (測定パラメータ) 画面で：

- a. [Reaction Volume] (反応容量) フィールドに触れ、キーパッドで実験例の反応容量を入力した後、[Done] (完了) に触れます。
- b. [Start Run Now] (すぐに測定開始) に触れます。



ノート

測定の監視

StepOne または StepOnePlus システムのレイアウトに従って、測定を監視します。

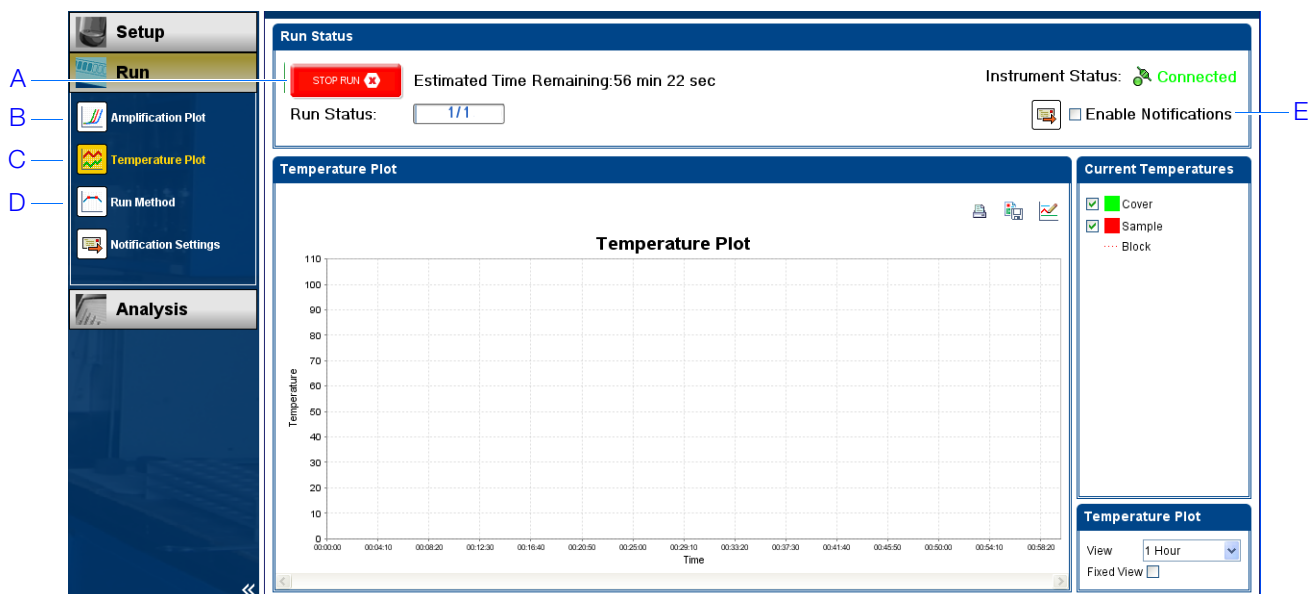
レイアウト	説明	参照
コロケーション	黄色いケーブルで、コンピュータと装置が接続されている。	下記 「コロケーション監視」
スタンドアロン (ネットワーク)	コンピュータと装置が同じネットワークに接続されている。	「遠隔監視」 (73 ページ)
スタンドアロン (ベーシック)	コンピュータと装置が接続されていない。	「スタンドアロン監視」 (75 ページ)

コロケーション監視

コンピュータが黄色いケーブルで StepOne または StepOnePlus 装置に直接接続されている場合には、次に示すように、測定の進行をリアルタイムで表示することができます。測定中、StepOne ソフトウェア上で示される 3 種類のプロットを定期的にチェックして、問題がないかどうか確認してください。

#	目的	操作
A	測定の停止	- StepOne ソフトウェアで、[STOP RUN] (測定停止) をクリックします。 [Stop Run] (測定停止) ダイアログで次のいずれかをクリックします。 - 測定を即座に停止する場合には、[Stop Immediately] (すぐに停止) をクリックします。 - 今のサイクル／ホールド終了後に測定を停止する場合には、[Stop after Current Cycle/Hold] (現在のサイクル／ホールド後に停止) をクリックします。 - 測定を継続する場合には、[Cancel] (キャンセル) をクリックします。
B	増幅データをリアルタイムで表示	 [Amplification Plot] (増幅プロット) を選択します。 「 [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面について」 (70 ページ) をご参照ください。
C	測定の温度データをリアルタイムで表示	 [Temperature Plot] (温度プロット) を選択します。 「 [Temperature Plot] (温度プロット) 画面について」 (71 ページ) をご参照ください。
D	[Run Method] (測定方法) 画面に測定の進行状況を表示	 [Run Method] (測定方法) を選択します。 「 [Run Method] (測定方法) 画面について」 (72 ページ) をご参照ください。
E	通知設定を有効化／無効化	[Enable Notifications] (通知の有効化) を選択または選択解除します。 「(オプション) 通知設定の有効化」 (63 ページ) をご参照ください。

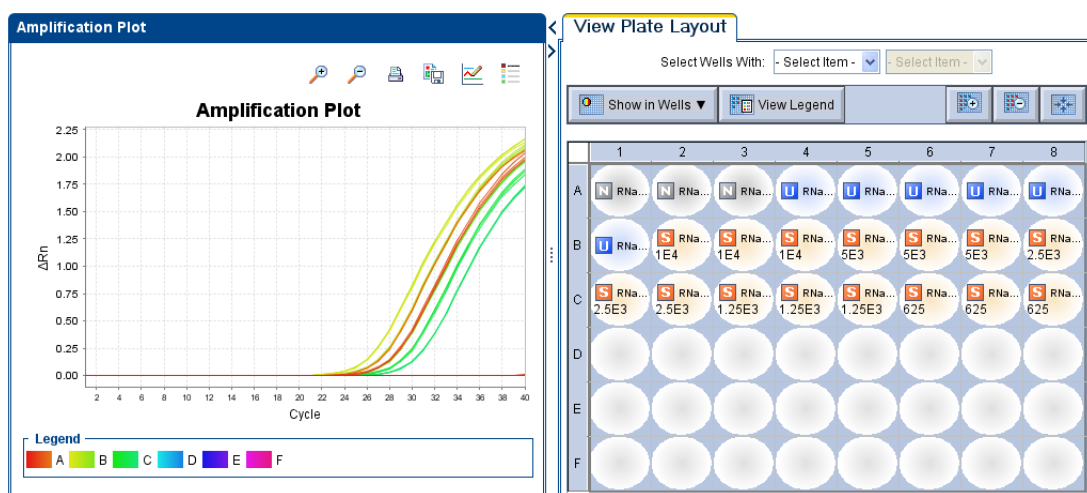
ノート



【Amplification Plot】（増幅プロット）画面について

【Amplification Plot】（増幅プロット）画面には、装置が測定中に収集する蛍光データをもとに、サンプルの増幅を表示できます。リアルタイムデータを収集するように測定方法が設定されている場合、【Amplification Plot】（増幅プロット）画面には、【View Plate Layout】（プレートレイアウトの表示）タブで選んだウェルのデータが表示されます。このプロットは、ノーマライズ色素蛍光（ ΔRn ）対サイクル数の関数として表示されます。下図は、実験例による【Amplification Plot】（増幅プロット）画面の様子を示します。

【Amplification Plot】（増幅プロット）画面のデータを表示するには、【View Plate Layout】（プレートレイアウトの表示）タブで、表示したいウェルを選択します。



【Amplification Plot】（増幅プロット）画面は、増幅異常を発見したり、調べるのに有益です。増幅異常には、次の場合があります。

- ネガティブコントロールウェルの蛍光が増加する。

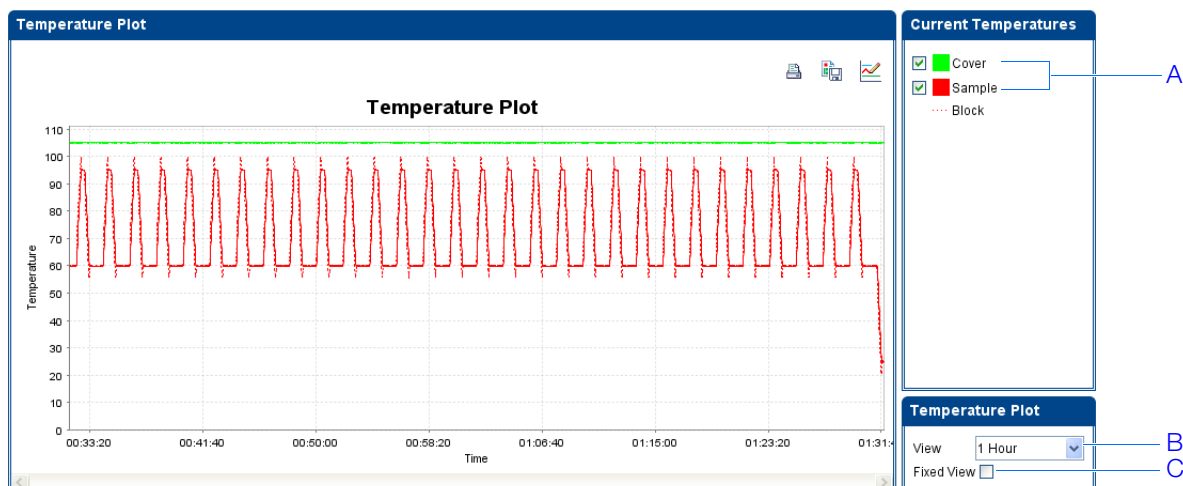
- サイクルで想定される蛍光（以前に同一条件下で同じ試薬を使用して行った実験の測定結果から判断）が検知されない。

増幅異常が発見されたり、信号が全く検知されない場合には、StepOne ソフトウェアのヘルプ（ツールバーの  をクリックするか、[F1] を押します）で、問題のトラブルシューティングを行ってください。

[Temperature Plot]（温度プロット）画面について

[Temperature Plot]（温度プロット）画面は、測定中、サンプルブロック、加熱カバーおよびサンプル（計算値）の温度をリアルタイムで表示します。下図は、実験例による [Temperature Plot]（温度プロット）画面の様子を示します。

	目的	操作
A	温度プロットを追加／削除	[Cover]（カバー）または [Sample Block]（サンプルブロック）を選択して、プロットに表示するデータを切り替えます。
B	プロットに表示される時間を変更	[View]（表示）ドロップダウンメニューから、プロットに表示する時間を選択します。
C	装置測定中、固定時間ウィンドウを表示 全プロットが画面に入りきらない場合、測定の進行に伴う画面の更新は行われません。例えば、[View]（表示）ドロップダウンメニューで 10 分を選択すると、プロットには 10 分間分のデータしか表示されません。測定が 10 分間以上継続する場合、 • [Fixed View]（固定表示）の選択を解除すると、測定の進行に伴うプロットが更新されます。 • [Fixed View]（固定表示）を選択されていると、測定の進行に伴うプロットの更新は行われません。	[Fixed View]（固定表示）を選択します。



[Temperature Plot]（温度プロット）画面は、装置の故障を発見するのに有益です。

[Temperature Plot]（温度プロット）画面を監視する際には、[Sample]（サンプル）および [Block]（ブロック）のプロットに異常な挙動がないかどうかを確認します。

ノート

- 通常、サンプルプロットとブロックプロットは、ほぼ同じように動きます。プロットが大きく食い違う場合には、問題が起こっている可能性があります。
- [Cover] (カバー) プロットは、方法で指定した温度を一定に保つはずですが、**一定の温度**を保持できない場合には、問題が起こっている可能性があります。

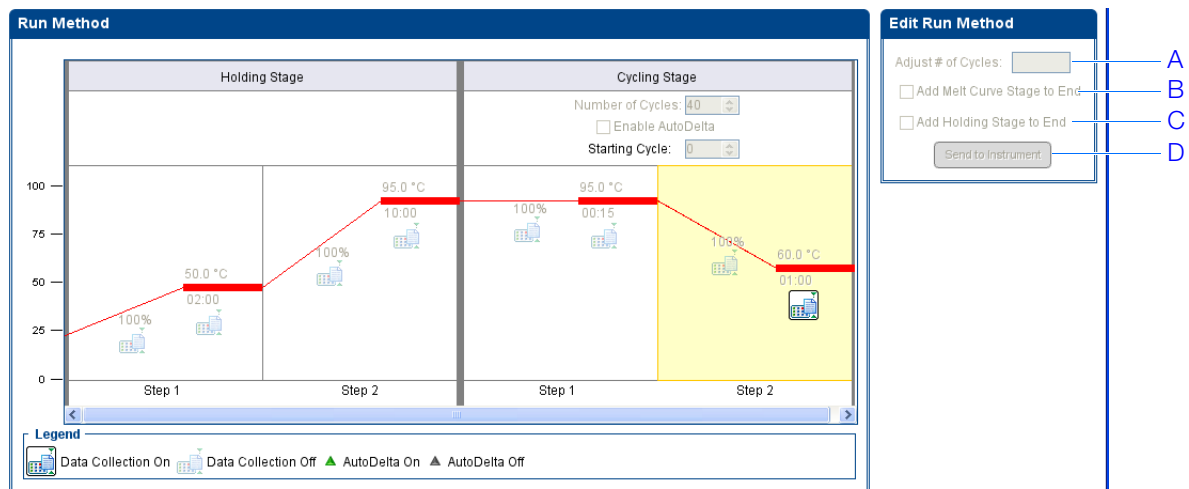
温度プロットに異常が発見された場合には、StepOne ソフトウェアのヘルプ (? をクリックするか、[F1] を押します) で、問題のトラブルシューティングを行ってください。

参考： [Current Temperatures] (現在の温度) グループに表示されるサンプル温度は推定値です。

【Run Method】(測定方法) 画面について

【Run Method】(測定方法) 画面には、進行中の測定に関して選択した測定方法が表示されます。測定中は、ソフトウェアにより、【Run Status】(測定ステータス) が更新されます。下図は、実験例による 【Run Method】(測定方法) 画面の様子を示します。

	目的	操作
A	サイクル数の変更	[Adjust # of Cycles] (サイクル数の調整) フィールドで、[Cycling Stage] (サイクリングステージ) に適用するサイクル数を入力します。
B	融解曲線を測定の最後に追加	[Add Melt Curve Stage to End] (最後に融解曲線を追加) を選択します。
C	[Hold] (ホールド) ステージを測定の最後に追加	[Add Holding Stage to End] (最後にホールディングステージを追加) を選択します。
D	変更の確定	[Send to Instrument] (装置に送信) をクリックします。



警告が表示された場合は、エラーをクリックして詳細を表示し、StepOne ソフトウェアのヘルプ (ツールバーの ? をクリックするか、[F1] を押します) に従って問題をトラブルシューティングしてください。

ノート

遠隔監視 StepOne または StepOnePlus 装置がネットワークに接続されている場合、StepOne ソフトウェアの [Remote Monitor] (遠隔監視) を用いて、ネットワーク上の任意のコンピュータ上に測定の進行状況をリアルタイムで表示することができます。

重要！ ネットワーク上のコンピュータでは、StepOne または StepOnePlus 装置の制御はできません。監視のみ可能です。

装置を遠隔監視するには：

1. StepOne ソフトウェアで、[Instrument] (装置) ▶ [Remote Monitor] (遠隔監視) を選択します。
2. ナビゲーション欄で、装置を選択します。

ナビゲーション欄に装置が表示されない場合には：

- a. [Add Instrument] (装置の追加) をクリックします。
- b. [Remote Monitor] (遠隔監視) 内にある装置プロファイル名を入力します。

参考： 装置を特定できるようなプロファイル名を入力してください。入力するプロファイル名は、実験を送信したり、実験をダウンロードしたり、装置を監視するときに、[Remote Monitor] (遠隔監視) および装置ドロップダウンメニューに表示されます。

- c. [Instrument Name] (装置名)、[Host Name] (ホスト名)、[IP Address] (IP アドレス) フィールドに：
 - ホスト名が分かっている場合は、ホスト名を入力します。
 - ホスト名が分からない場合は、装置名か IP アドレスを入力します。

参考： 装置名やIPアドレスは、装置のタッチスクリーンに表示されます。[Settings Menu] (設定メニュー) ▶ [Admin Menu] (管理メニュー) ▶ [Set Instrument Name] (装置名の設定) または [Set IP Address] (IP アドレスの設定) に進みます。ホスト名については、システム管理者または情報技術部門に問い合わせてください。

- d. [Save & Exit] (保存して終了) をクリックします。

2b — * Profile Name

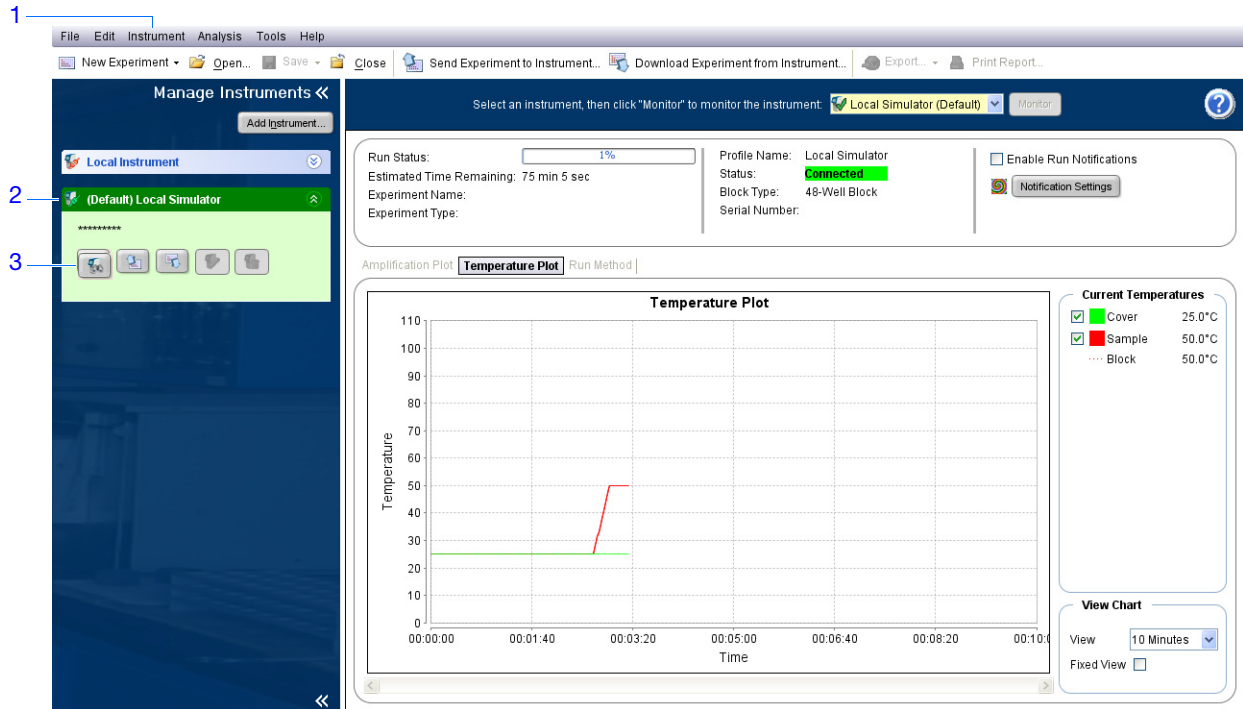
2c — * Instrument Name, Host Name, or IP Address

2d — Save & Exit Save & Add Another Cancel

参考： StepOne または StepOnePlus 装置のネットワーク使用や [Remote Monitor] (遠隔監視) 機能の設定の詳細については、『Applied Biosystems StepOne™ および StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 設置・ネットワーク構築・メンテナンスガイド』をご参照ください。

ノート

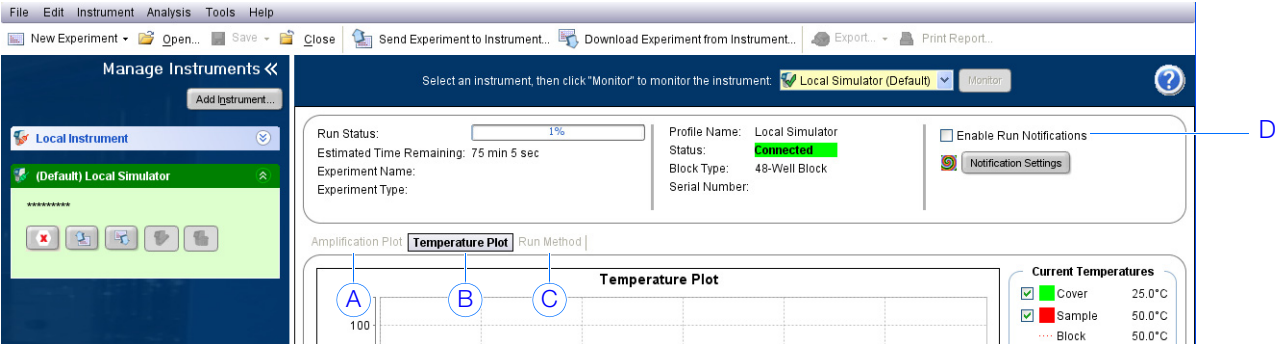
3. 該当する装置の  **[Start monitoring the instrument]** (装置の監視開始) をクリックします。装置が情報をコンピュータに送信するのに数分かかる場合があります。



4. 以下の手順に従ってデータを確認します。

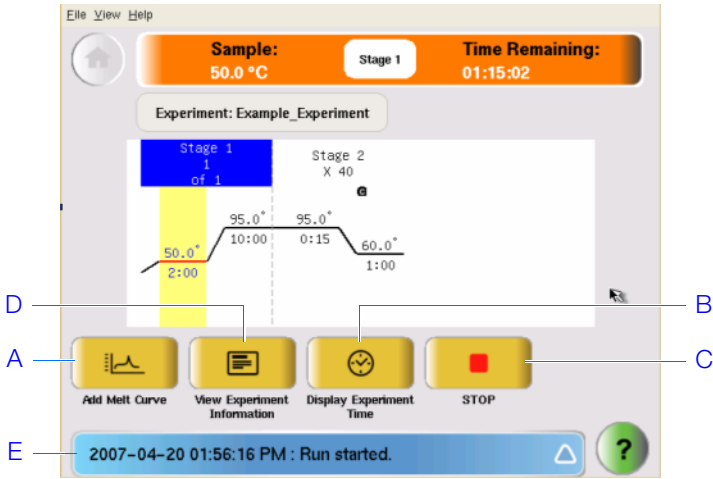
#	目的	操作
A	増幅データをリアルタイムで表示	[Amplification Plot] (増幅プロット) をクリックします。 「 [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面について 」(70 ページ) をご参照ください。
B	測定の温度データをリアルタイムで表示	[Temperature Plot] (温度プロット) をクリックします。 「 [Temperature Plot] (温度プロット) 画面について 」(71 ページ) をご参照ください。
C	[Run Method] (測定方法) 画面に測定の進行状況を表示	[Run Method] (測定方法) を選択します。 「 [Run Method] (測定方法) 画面について 」(72 ページ) をご参照ください。
D	通知設定を有効化/無効化	[Enable Notifications] (通知の有効化) を選択または選択解除します。 「 (オプション) 通知設定の有効化 」(63 ページ) をご参照ください。

ノート



スタンドアロン監視 StepOne または StepOnePlus 装置から測定を開始した場合には、タッチスクリーンで測定の進行状況を表示できます。[Run Method]（測定方法）画面には、実験の方法が表示され、装置が実行中のサーマルプロファイルのステップがハイライト表示されます。

#	目的	操作
A	融解曲線ステージを測定に追加	[Add Melt Curve]（融解曲線の追加）に触れた後、[OK] に触れます。
B	測定の残り時間を表示	[Display Experiment Time]（実験時間の表示）に触れてから、 に触れて [Run Method]（測定方法）画面に戻ります。
C	測定の停止	[STOP]（停止）に触れた後、次のいずれかに触れます。 - 今のサイクルまたはホールド完了後に、装置による測定を停止するには、[Stop]（停止）に触れます。 - 測定を即座に停止するには、[Abort]（中止）に触れます。 - 変更を加えずに測定を継続するには、 に触れます。
D	実験情報を表示	[View Experiment Information]（実験情報の表示）に触れてから、 に触れて [Run Method]（測定方法）画面に戻ります。
E	エラーログを表示	ステータスバーに触れて、エラーログを表示します。



ノート _____

プレートの取り出しとデータの転送

StepOne または StepOnePlus 装置に [Main Menu] (メインメニュー) 画面が表示されているときに、反応プレートを装置から取り出し、実験データをコンピュータに転送して、解析を行います。

反応プレートの 取り出し

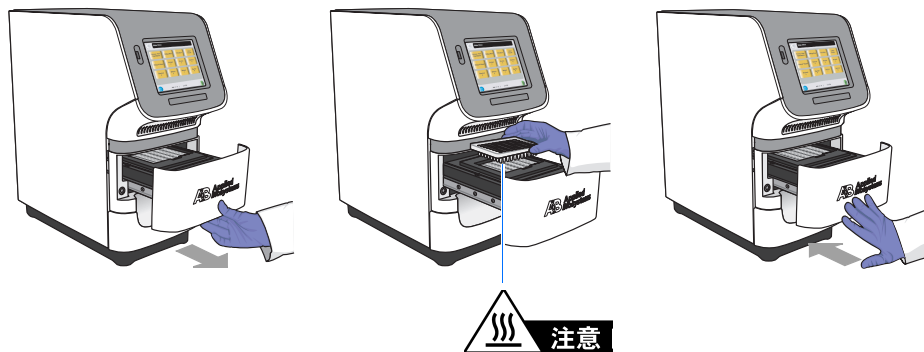


注意

怪我の危険：装置の操作中、サンプルブロック温度は 100 °C を超える可能性があります。サンプルブロックが室温に戻るまで触れないでください。

参考： StepOne または StepOnePlus 装置が測定を完了すると、システムは、測定の詳細を測定履歴に保存しますが、当該情報は、次の測定が完了するまでシステムに残ります。

1. [Run Report] (測定報告) 画面が StepOne または StepOnePlus 装置タッチスクリーンに表示されたら、 に触れます。
2. 装置のドロアーを開きます。
3. サンプルブロックから反応プレートを取り出します。
4. 装置ドロアーを静かに閉じます。



データ転送方法の 選択

StepOne または StepOnePlus システムのレイアウトに従って、実験をコンピュータに転送し、解析を行います。

レイアウト	説明	参照
コロケーション	黄色いケーブルで、コンピュータと装置が接続されている。	下記 「コロケーションでの データ転送」
スタンドアロン (ネットワーク)	コンピュータと装置が同じネットワークに接続されている。	「遠隔データ転送」 (77 ページ)
スタンドアロン (ベーシック)	コンピュータと装置が接続されていない。	「スタンドアロンでの データ転送」 (78 ページ)

ノート

コロケーションでの データ転送

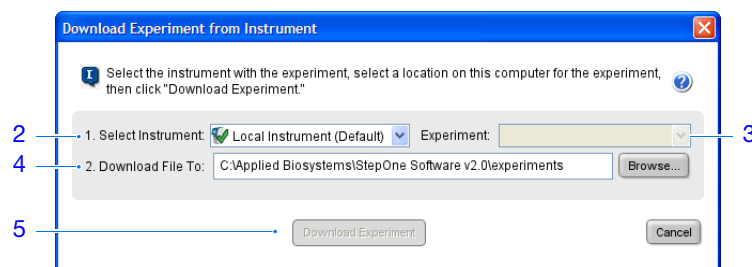
コンピュータが黄色いケーブルで StepOne または StepOnePlus 装置に直接接続されている場合には、操作は不要です。StepOne ソフトウェアは、測定後、自動的に装置からコンピュータに実験データを転送します。

参考：コロケーションレイアウトでは、コンピュータまたは装置のタッチスクリーンから測定が開始できます。しかし、StepOne ソフトウェアが自動的に実験データを転送するのは、測定をコンピュータから開始した場合のみです（「コロケーション スタートアップ」(65 ページ) 参照）。

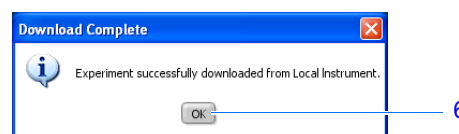
遠隔データ転送

コンピュータと StepOne または StepOnePlus 装置が同じイーサネットネットワークに接続されている場合には、ネットワーク経由で装置から実験をダウンロードします。

1. StepOne ソフトウェアで、 **[Download Experiment from Instrument]**（実験を装置からダウンロード）をクリックして、**[Download Experiment from Instrument]**（実験を装置からダウンロード）ダイアログボックスを開きます。
2. **[Select Instrument]**（装置の選択）ドロップダウンメニューで装置を選択します。
3. **[Experiment]**（実験）ドロップダウンメニューで実験例ファイルを選択します。
4. **[Download File To]**（ファイルのダウンロード先）フィールドで：
 - a. **[Browse]**（参照）をクリックします。
 - b. 以下の場所に進みます。
 < ドライブ>:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名>\experiments\
 ここで、
 < ドライブ> は、StepOne ソフトウェアがインストールされているコンピュータのハードドライブです。本ソフトウェアのデフォルトのインストールドライブは、D ドライブです。
 < ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。
 - c. **[Select]**（選択）をクリックします。
5. **[Download Experiment]**（実験のダウンロード）をクリックして、ネットワーク経由で装置から実験ファイルをコンピュータにダウンロードします。
6. 確認の表示がでたら、**[OK]** をクリックしてウィンドウを閉じます。



6. 確認の表示がでたら、**[OK]** をクリックしてウィンドウを閉じます。

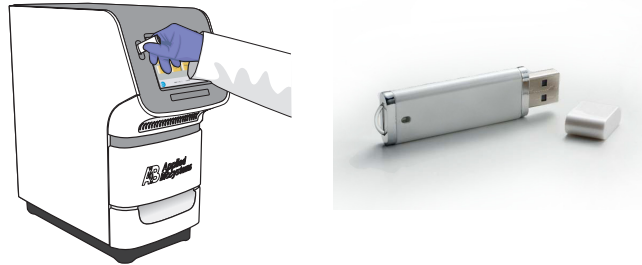


ノート

スタンドアロンでの
データ転送

コンピュータが StepOne または StepOnePlus 装置に接続されていない場合には、USB ドライブを用いて、実験を装置からコンピュータに転送します。

1. USB ドライブが装置に接続されていない場合には、USB ドライブを USB ポートに接続します。



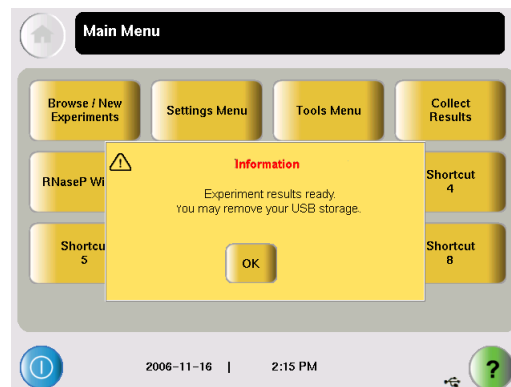
2. StepOne または StepOnePlus 装置のタッチスクリーンに触れて、休止を解除します。

参考： タッチスクリーンに [Main Menu] (メインメニュー) 画面が表示されない場合には、① に触れます。

3. タッチスクリーンに USB のマークが表示されるまで待ちます。
4. [Main Menu] (メインメニュー) で [Collect Results] (結果の収集) に触れ、データを USB ドライブに保存します。

参考： 装置が USB ドライブを検出できない場合には、一度 USB ドライブを取り外し、やり直します。それでも USB ドライブが検出されない場合には、USB ドライブを交換してください。

5. データ転送の成功が表示されたら、[OK] に触れます。



6. USB ドライブを装置から取り外し、コンピュータの USB ポートに接続します。
7. コンピュータ画面上で、Windows Explorer を用いて USB ドライブを開きます。

ノート

8. 実験例を次の場所にコピーします。

< ドライブ>:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名>\experiments\

ここで、

- < ドライブ> は、StepOne ソフトウェアがインストールされているコンピュータのハードドライブです。本ソフトウェアのデフォルトのインストールドライブは、D ドライブです。
- < ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

ノート

5

実験の解析

本章の内容：

- 本章の概要 82
- セクション 5.1 結果の確認 83
- セクション 5.2 トラブルシューティング（必要に応じて） 103

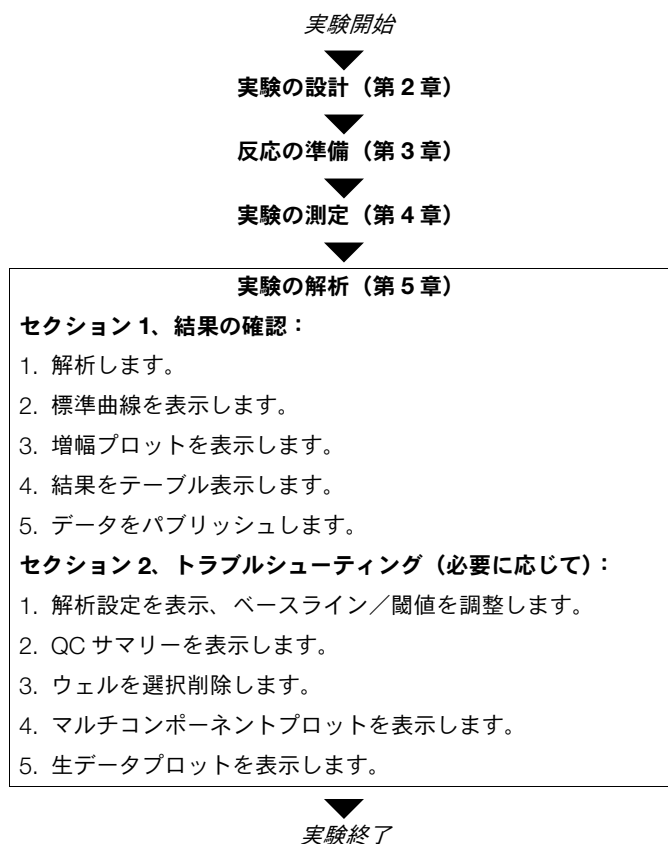
参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの  をクリックするか、**[Help]**（ヘルプ） ▶ **[StepOne Software Help]**（StepOne Software ヘルプ）を選択します。

ノート

本章の概要

StepOne™ ソフトウェアは、標準曲線定量法を用いてデータの解析を行います。本書のセクション1では、いくつかの解析画面を用いて解析データを確認する方法およびデータのパブリッシュ方法について、説明します。問題のある結果が得られた場合には、本章のセクション2で説明するトラブルシューティング手順の実行方法を参照してください。

実験例ワークフロー 本書に記載されている実験例を解析するワークフローについて、以下に示します。



ノート

セクション 5.1 結果の確認

本セクションの内容：

■ 実験の解析	84
■ 標準曲線の表示	90
■ 増幅プロットの表示	92
■ ウェルテーブルの表示	99
■ データのパブリッシュ	102

ノート

実験の解析

StepOne ソフトウェアでは、実験を解析し、解析画面に結果を表示します（[Amplification Plot]（増幅プロット）画面、[QC Summary]（QC サマリー）画面等）。

実験例について

標準曲線実験例では、StepOne ソフトウェアとともにインストールされるデータファイルを使用します。データファイルは、第2章で提示した設計パラメータを使って作成されており、StepOne™ 装置で測定され、解析されています。実験例のデータファイルは、コンピュータ内の次の場所に保存されています。

< ドライブ >:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名 >\experiments\examples\Standard Curve Example.eds

ここで、

- < ドライブ > は、StepOne ソフトウェアがインストールされているコンピュータのハードドライブです。本ソフトウェアのデフォルトのインストールドライブは、D ドライブです。
- < ソフトウェア名 > は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

実験例の解析

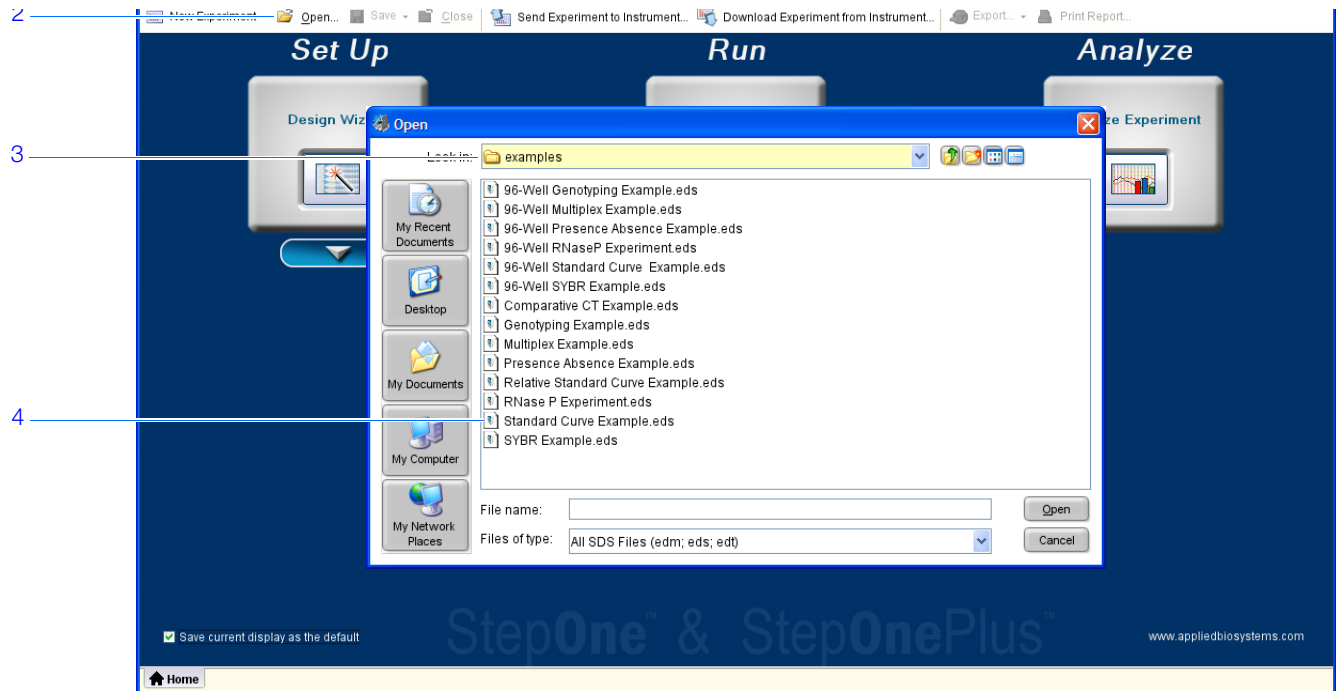
1.  StepOne ソフトウェア（ショートカット）をダブルクリックするか、[Start]（スタート）▶[All Programs]（すべてのプログラム）▶[Applied Biosystems] ▶[StepOne Software] ▶< ソフトウェア名 > を選択します。

ここで、< ソフトウェア名 > は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

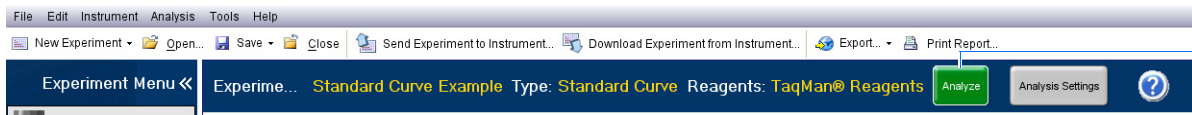
2. [Home]（ホーム）画面で、[Open]（開く）をクリックします。
3. [Open]（開く）ダイアログボックスで、[examples]（実験例）フォルダを選択します。
< ドライブ >:\Applied Biosystems\< ソフトウェア名 >\experiments\examples
4. **Standard Curve Example**（標準曲線例）をダブルクリックして、実験例データファイルを開きます。

参考： 実験例フォルダには、データファイルがいくつか入っているので、「**Standard Curve Example**」（標準曲線例）を選択したことを確認します。その他のデータファイルの詳細については、「[実験例フォルダ中のデータファイル](#)」（12 ページ）をご参照ください。

ノート



5. **[Analyze]** (解析) をクリックします。ソフトウェアは、デフォルトの解析設定を使ってデータを解析します。



6. 解析画面のナビゲーション方法については、下記の「**ソフトウェアのエレメント**」および「**ナビゲーションのヒント**」(88 ページ) を参照します。

ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合：

- 測定終了後すぐに、StepOne ソフトウェアは、デフォルト解析設定により自動的にデータ解析を行い、コンピュータ上に **[Amplification Plot]** (増幅プロット) 画面を表示します。
- データの再解析を行うには、プレートレイアウトですべてのウェルを選び、**[Analyze]** (解析) をクリックします。

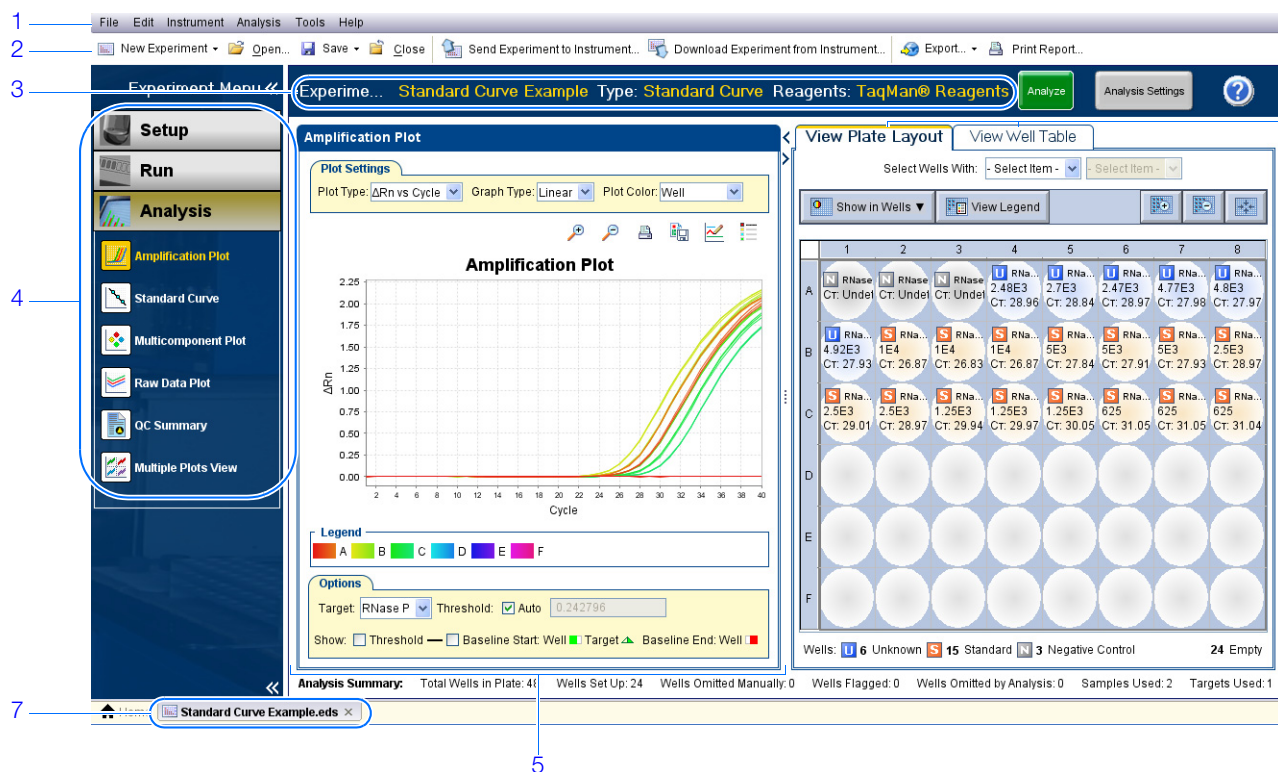
ソフトウェアのエレメント

StepOne ソフトウェアの解析画面のエレメントについて、以下に示します。

1. **メニューバー** — ソフトウェアで利用できるメニューが表示されます。
 - File (ファイル)
 - Edit (編集)
 - Instrument (装置)
 - Analysis (解析)
 - Tools (ツール)
 - Help (ヘルプ)

ノート

2. ツールバー – ソフトウェアで利用できるツールが表示されます。
 - New Experiment (新しい実験)
 - Open (開く)
 - Save (保存する)
 - Close (閉じる)
 - Send Experiment to Instrument (実験を装置に送信)
 - Download Experiment from Instrument (実験を装置からダウンロード)
 - Export (エクスポート)
 - Print Report (レポートの印刷)
3. 実験ヘッダー – 開いている実験の実験名、実験タイプ、試薬が表示されます。
4. 実験メニュー欄 – 以下のソフトウェア画面へのリンクがあります。
 - [Setup] (セットアップ) 画面
 - [Run] (測定) 画面
 - [Analysis] (解析) 画面
 - Amplification Plot (増幅プロット)
 - Standard Curve (標準曲線)
 - Multicomponent Plot (マルチコンポーネントプロット)
 - Raw Data Plot (生データプロット)
 - QC Summary (QC サマリー)
 - Multiple Plots View (複数プロット表示)
5. プロット欄 – 開いている実験に対して選択した解析画面を表示します。
6. 表示タブ – 開いている実験のプレートレイアウトや [Well Table] (ウェルテーブル) を表示します。
7. 実験タブ – 開いている各実験のタブが表示されます。

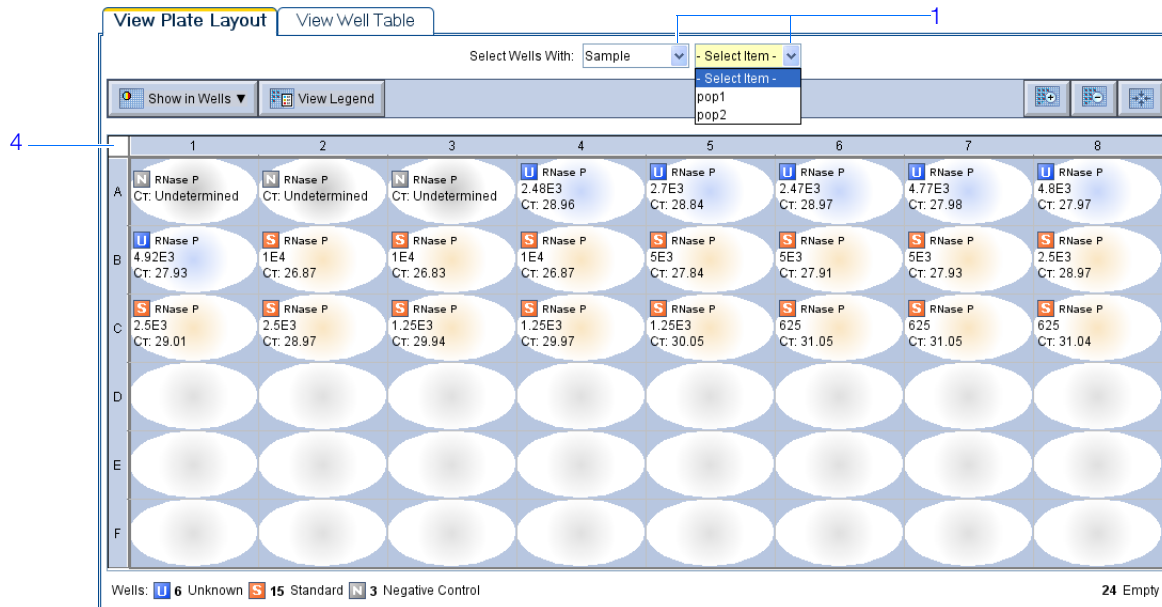


ノート

ナビゲーションの
ヒント ウェルの選択方法

解析画面で特定のウェルを表示するには、以下の方法に従って、[View Plate Layout]（プレートレイアウトの表示）タブで、表示したいウェルを選択します。

1. 特定のタイプのウェルを選択するには、[Select Wells With]（ウェルの選択条件）ドロップダウンメニューを使用します。[Sample]（サンプル）、[Target]（ターゲット）、[Task]（タスク）のいずれかを選択してから、サンプル、ターゲット、タスク名を選択します。
2. 単一のウェルを選択するには、プレートレイアウトで該当するウェルをクリックします。
3. 複数のウェルを選択するには、プレートレイアウトをクリックし、該当するウェル上でマウスをドラッグしてから、**Ctrl** を押しながらクリックするか、**Shift** を押しながらクリックします。
4. 48 ウェルをすべて選択するには、プレートレイアウトの左上隅をクリックします。



ノート

複数プロットの表示方法

複数プロット画面を使うと、最高4種類のプロットを同時に表示できます。[Multiple Plots] (複数プロット) 画面内を移動するには：

1. Experiment Menu (実験メニュー) 欄から、[Analysis] (解析) ▶  [Multiple Plots View] (複数プロット表示) を選択します。
2. プロットを4つ表示するには、 [Show plots in a 2 × 2 matrix] (2 × 2 マトリックスでプロット表示) をクリックします。
3. プロットを横に表示するには、 [Show plots in two rows] (2つを横に並べてプロット表示) をクリックします。
4. プロットを縦に表示するには、 [Show plots in two columns] (2つを縦に並べてプロット表示) をクリックします。
5. 特定のプロットを表示するには、各プロット表示の上にあるドロップダウンメニューから、プロットを選択します。



ノート

標準曲線の表示

[Standard Curve] (標準曲線) 画面には、スタンダードとして指定されたサンプルの標準曲線が表示されます。StepOne ソフトウェアは、この標準曲線から未知のターゲットの量を計算します。

- 実験例について** 標準曲線実験例で、次の回帰係数値について [Standard Curve] (標準曲線) 画面で確認します。
- 傾き／増幅効率
 - R^2 値 (相関係数)
 - C_T 値

- 標準曲線の表示** 1. Experiment Menu (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Standard Curve] (標準曲線) を選択します。

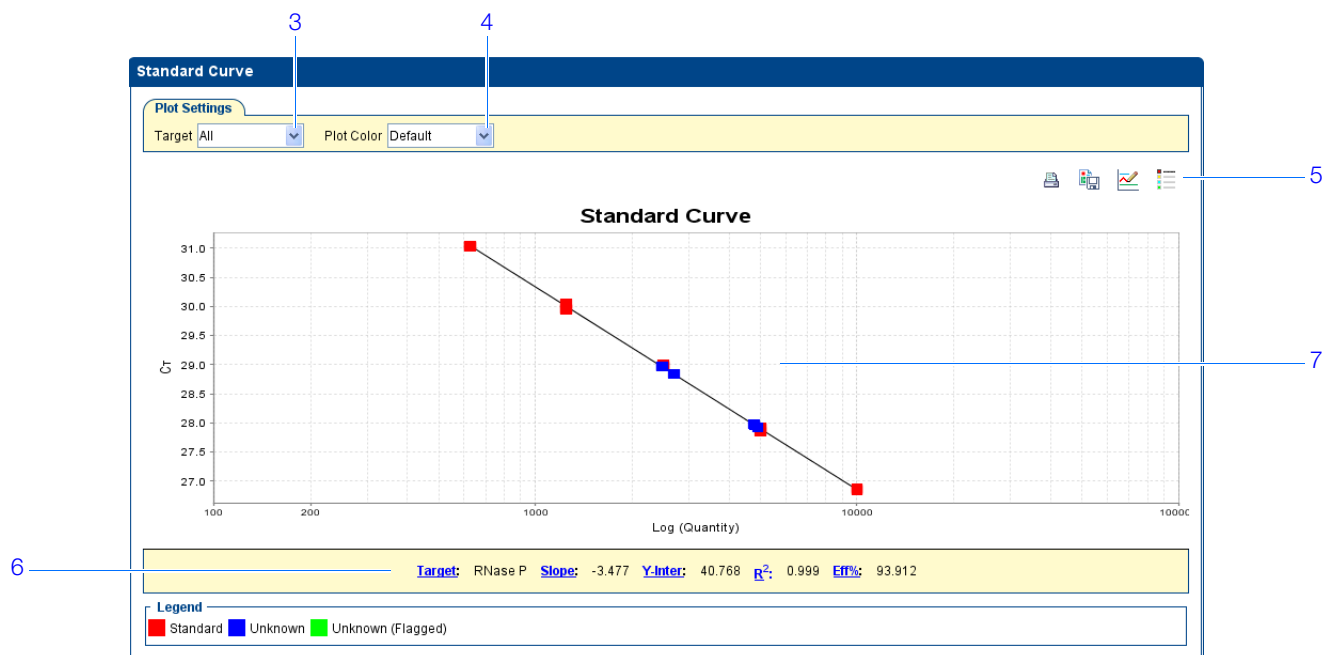
参考： データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブでプレートレイアウトの左上隅をクリックして、[Standard Curve] (標準曲線) 画面に 48 ウェルをすべて表示します。
3. [Target] (ターゲット) ドロップダウンメニューで、[All] (すべて) を選択します。
4. [Plot Color] (プロットカラー) ドロップダウンメニューで、[Default] (デフォルト) を選択します。
5.  [Show a legend for the plot] (プロットの凡例を表示) をクリックします (デフォルト)。

参考： これはトグルボタンになっていて、凡例が表示されているとき、ボタンは、[Hide the plot legend] (プロットの凡例を非表示) に変わります。

6. 標準曲線の下に表示される値を確認します。実験例では、ターゲット (RNase P) の値は、許容範囲内に収まっています。
 - 傾きは -3.477。
 - R^2 値は 0.999。
 - 増幅効率 (EFF%) は 93.912%。
7. すべてのサンプルが標準曲線内にあることを確認します。実験例では、すべてのサンプル (青い点) が、標準曲線 (赤い点) 内にあります。

ノート



8. C_T 値を確認します。

- [View Well Table] (ウェルテーブルの表示) タブをクリックします。
- [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューで、[Replicate] (反復) を選択します。
- C_T 欄の値を確認します。実験例では、 C_T 値は、期待範囲 (>8 かつ <35) 内にあります。

8a

8b

8c

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
RNase P - NTC													
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...					
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...					
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...					
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	31.05255	31.04659	0.01	625		

ノート

解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合は、次のことに注意してください。

- **傾き／増幅効率値** — 増幅効率は、標準曲線内の回帰直線の傾きを使って計算します。傾きが -3.3 に近いとき、最適な 100% PCR 増幅効率を示します。増幅効率に影響する要因には、次のものがあります。
 - スタンダード量の範囲 — より精密・正確な効率測定を行うには、広範囲のスタンダード量、すなわち、 $5 \sim 6 \log (10^5 \sim 10^6)$ 倍) をご使用ください。
 - スタンダードの反復数 — より正確な効率測定を行うには、反復を含めることで不正確な分注の影響を低減できます。
 - PCR 阻害剤 — 反応中の PCR 阻害剤により、増幅効率が低下する可能性があります。
- **R² 値 (相関係数)** — R² 値は、回帰直線と、スタンダード反応の各 C_T データポイントとの適合度を示します。値が 1.00 なら、回帰直線とデータポイントとの完全フィットを示します。R² 値は >0.99 が理想的です。
- **C_T 値** — threshold cycle (C_T) は、蛍光レベルが閾値と一致する PCR サイクル数です。C_T 値は、 >8 かつ <35 が理想的です。C_T 値 <8 は、反応中のテンプレートが多すぎることを示します。C_T 値 >35 は、反応中のターゲット量が低すぎることを意味します。C_T 値 >35 の場合には、標準偏差が大きくなることが想定されます。

実験が上記のガイドラインを満たさない場合は、以下に従ってトラブルシューティングを実施してください。

- ウェルの選択削除 (「[解析からウェルを選択削除](#)」(108 ページ) 参照)。
または、
- 実験の再測定。

詳細について 詳細については：

- [Standards Curve] (標準曲線) 画面については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。
- 増幅効率については、『*Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*』をご参照ください。

増幅プロットの表示

[Amplification Plot] (増幅プロット) 画面には、選択したウェル内のすべてのサンプルの増幅が表示されます。3 種類のプロットを表示できます。

- **ΔRn vs Cycle (ΔRn 対サイクル)** — ΔRn は、PCR 増幅の各サイクルでレポーターが生成したノーマライズ済み蛍光シグナルの強度。このプロットには、ΔRn がサイクル数の関数として表示されます。このプロットを使うと、不規則な増幅を特定、調査できるほか、測定の閾値とベースラインの値を表示できます。
- **Rn vs Cycle (Rn 対サイクル)** — Rn は、パッシブリファレンスの蛍光信号にノーマライズした、レポーター色素からの蛍光信号。このプロットには、Rn がサイクル数の関数として表示されます。このプロットを使うと、不規則な増幅を特定、調査できます。

ノート

- **C_T vs Well (C_T 対ウェル)** – C_T は、蛍光レベルが増幅プロットの閾値と一致する PCR サイクル数です。このプロットには、 C_T がウェル位置の関数として表示されます。このプロットを使うと、異常な増幅（域外値）を特定できます。

各プロットは、リニアまたは log10 のグラフタイプで表示できます。

実験例について

標準曲線実験例で、次の項目について [Amplification Plot]（増幅プロット）画面でターゲットを確認します。

- ベースラインと閾値が正しいこと
- 域外値

Amplification Plot (増幅プロット) の 表示

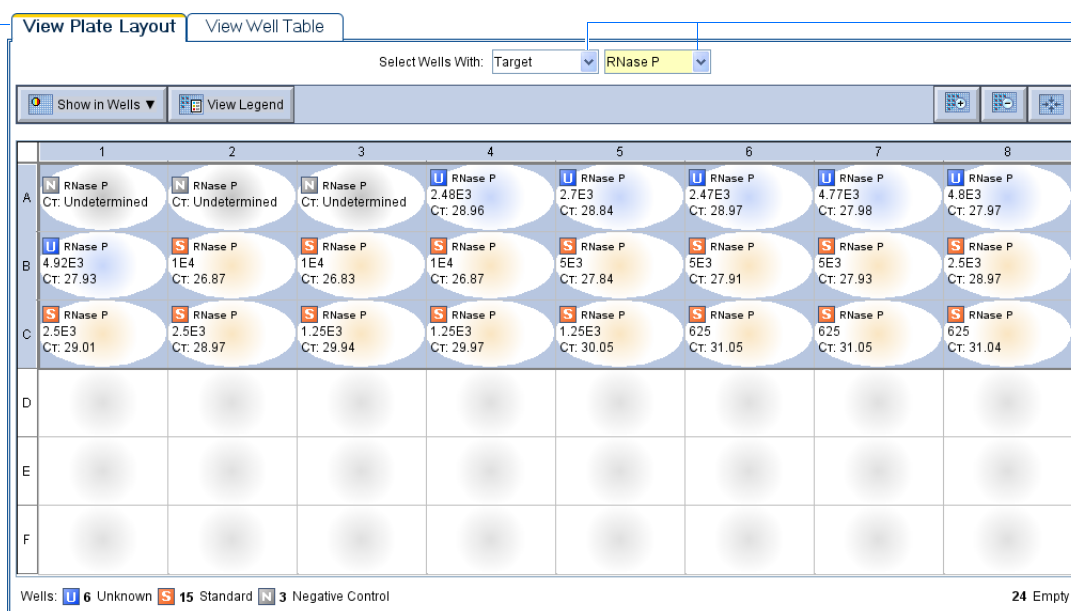
1. Experiment Menu (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Amplification Plot] (増幅プロット) を選択します。

参考：データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面に、RNase P ウェルを表示します。

- a. [View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブをクリックします。
- b. [Select Wells With] (ウェルの選択条件) ドロップダウンメニューで、[Target] (ターゲット)、[RNase P] を選択します。

2a



2b

3. [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面で：

- a. [Plot Type] (プロットタイプ) ドロップダウンメニューから、[ΔRn vs Cycle] (ΔRn 対サイクル) を選択します (デフォルト)。
- b. [Plot Color] (プロットカラー) ドロップダウンメニューで、[Well] (ウェル) を選択します (デフォルト)。

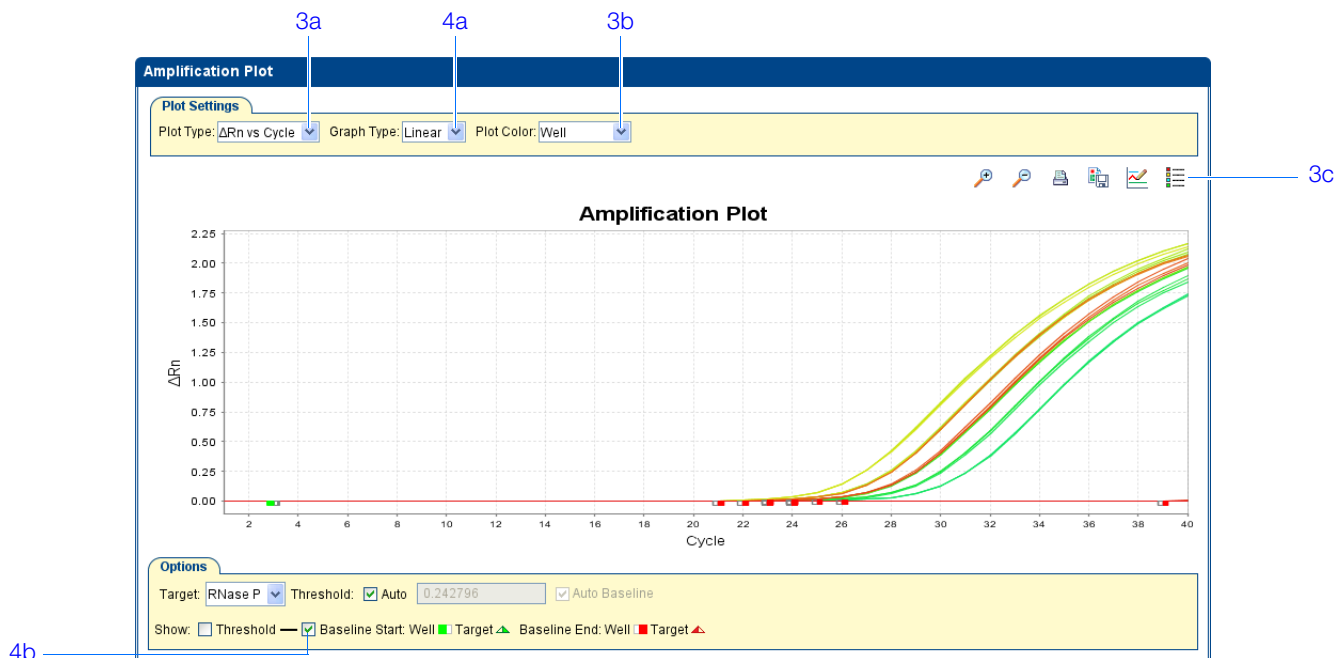
ノート

- c.  [Show a legend for the plot] (プロットの凡例を表示) をクリックします (デフォルト)。

参考： これはトグルボタンになっていて、凡例が表示されているとき、ボタンは、[Hide the plot legend] (プロットの凡例を非表示) に変わります。

4. ベースライン値を表示します。

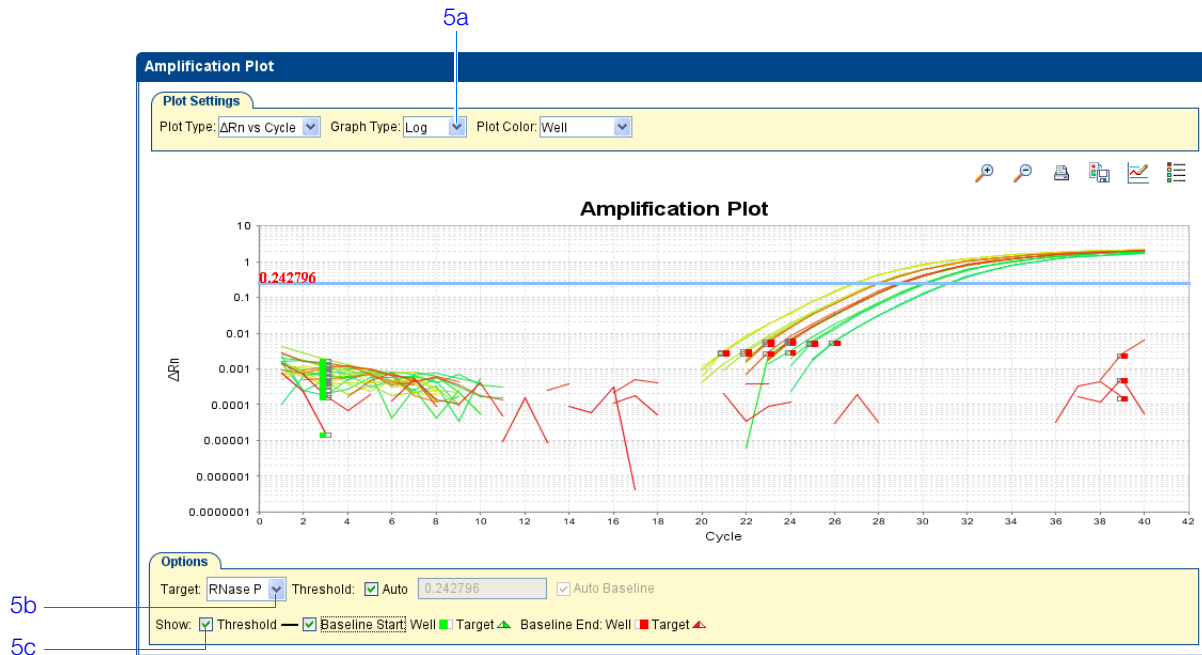
- [Graph Type] (グラフタイプ) ドロップダウンメニューで、[Linear] (リニア) を選択します。
- [Baseline] (ベースライン) チェックボックスを選択して、開始サイクルと終了サイクルを表示します。
- ベースラインが正しく設定されていることを確認します。すなわち、終了サイクルは、蛍光信号の検出されるサイクル数よりも数サイクル前に設定されていなければなりません。実験例では、ベースラインは、正しく設定されています。



5. 閾値を表示します。

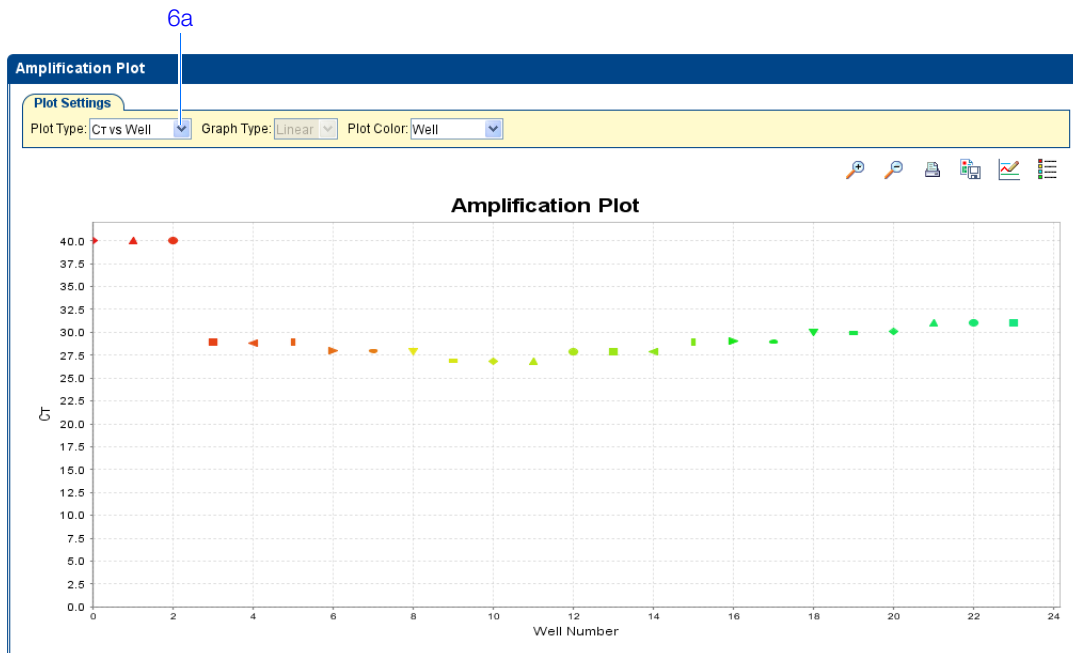
- [Graph Type] (グラフタイプ) ドロップダウンメニューで、[Log] (ログ) を選択します。
- [Target] (ターゲット) ドロップダウンメニューで、[RNase P] を選択します。
- [Threshold] (閾値) チェックボックスを選択して、閾値を表示します。
- 閾値が正しく設定されていることを確認します。実験例では、閾値は、指数増幅領域にあります。

ノート



6. 域外値を特定します。

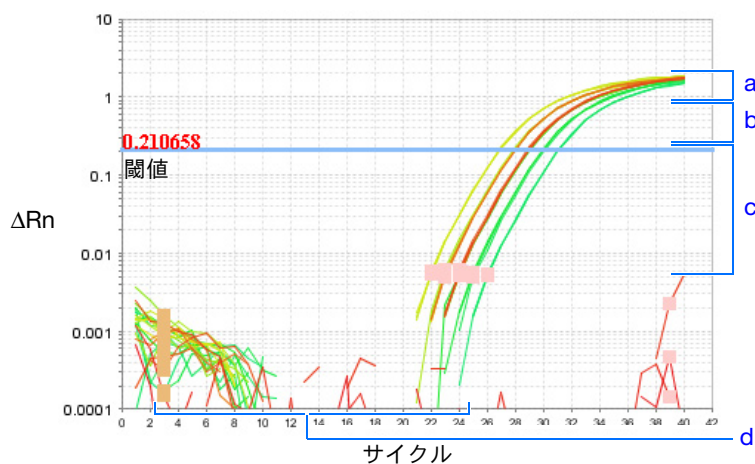
- [Plot Type] (プロットタイプ) ドロップダウンメニューで、[C_T vs Well] (C_T 対 ウェル) を選択します。
- 増幅プロットで域外値を探します。実験例では、RNase P の域外値はありません。



ノート

解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合は、次のことに注意してください。

- 域外値
- 典型的な増幅プロット – StepOne ソフトウェアは、データが典型的な増幅プロットを示していると仮定して、ベースラインと閾値を自動的に計算します。典型的な増幅プロットには、四つの特異的なセクションがあります。
 - a. プラトー領域
 - b. 直線領域
 - c. 指数関数的（幾何学的領域）
 - d. ベースライン



重要！ 実験エラー（汚染や分注エラーなど）により、非典型的な増幅曲線が作成され、StepOne ソフトウェアが計算するベースラインと閾値に誤りが発生する可能性があります。したがって、Applied Biosystems は、解析が完了したら、[Amplification Plot]（増幅プロット）画面を調べ、各ウェルに割り当てられたベースラインと閾値を確認するようお勧めします。

- 正しいベースラインおよび閾値 閾値の例については [97 ページ](#)を、ベースラインの例については [98 ページ](#)をご覧ください。

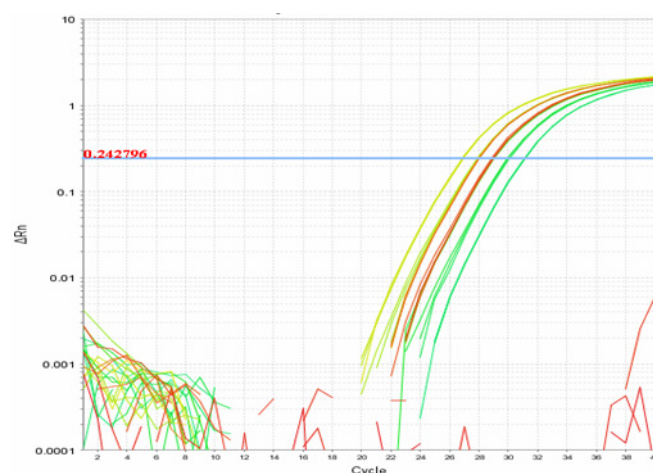
ノート

正しく設定された Threshold (閾値)

Threshold (閾値) は、増幅曲線の指数関数的増幅領域内に設定されています。

Threshold が最適値を上回ったり下回って設定されると、反復グループの標準偏差が増加します。

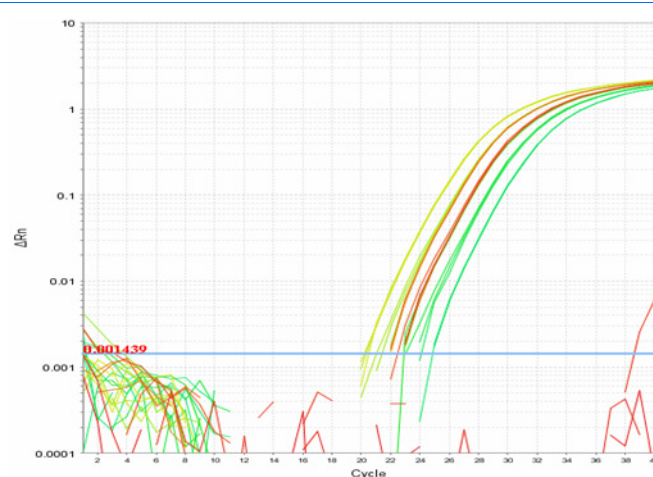
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Commi
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126.2	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	126.2	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2,473.064	2,551.476	126.2	



低すぎる Threshold

Threshold は、増幅曲線の指数関数的増幅領域より低い領域に設定されています。この場合、Threshold が正しく設定された場合のプロットよりも、はるかに大きい標準偏差が発生します。Threshold バーを曲線の指数関数的増幅領域内に引き上げてください。

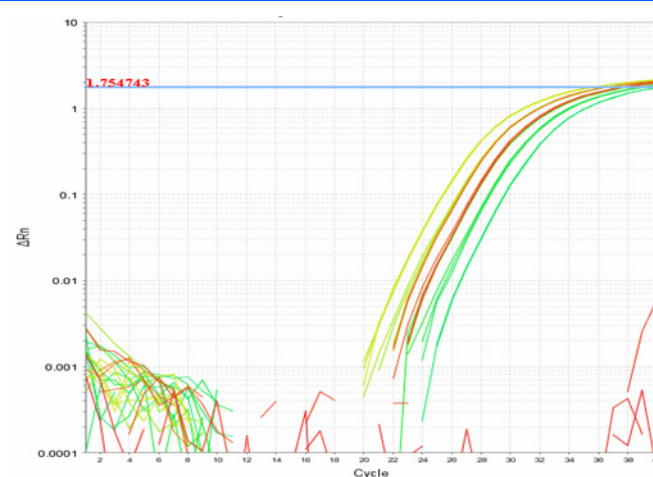
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Commi
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	38.453182						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.85404	22.761744	0.252	2,314.852	2,472.463	400.435	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.476973	22.761744	0.252	2,927.722	2,472.463	400.435	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	22.954218	22.761744	0.252	2,174.816	2,472.463	400.435	



高すぎる Threshold

Threshold は、増幅曲線の指数関数的増幅領域より高い領域に設定されています。この場合、Threshold が正しく設定された場合のプロットよりも、はるかに大きい標準偏差が発生します。Threshold バーを曲線の指数関数的増幅領域内に下げてください。

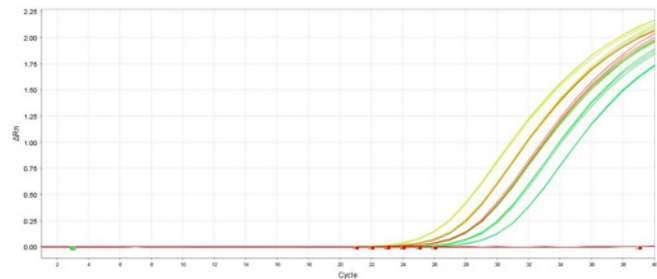
Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Commi
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...						
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.681107	37.49507	0.202	2,571.177	2,888.429	353.775	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.27971	37.49507	0.202	3,269.923	2,888.429	353.775	
UNKNOWN	FAM-NFQ...	37.524395	37.49507	0.202	2,824.187	2,888.429	353.775	



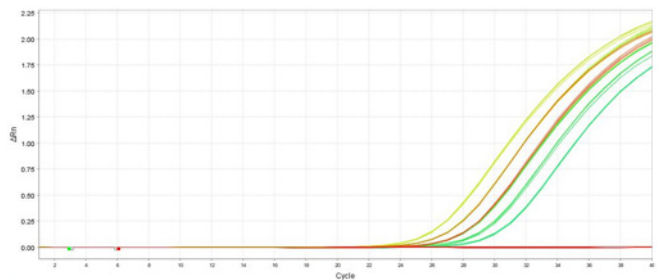
ノート

正しく設定されたベースライン

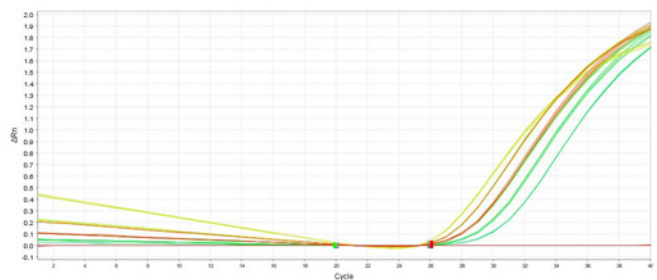
増幅曲線が最大のベースラインを越えてから始まっています。

**低すぎるベースライン**

最大のベースラインを右に大幅に越えてから増幅曲線が始まっているので、「End Cycle」（終了サイクル）値を増やす必要があります。

**高すぎるベースライン**

増幅曲線がベースラインの最大以前に始まっているので、「End Cycle」（終了サイクル）値を減らす必要があります。



実験が上記のガイドラインを満たさない場合は、以下に従ってトラブルシューティングを実施してください。

- ウェルの選択削除（「[解析からウェルを選択削除](#)」（108 ページ）参照）。
または
- ベースラインと閾値の手動調整（「[\[Analysis Settings\]（解析設定）の表示](#)」（104 ページ）参照）。

詳細について [Amplification Plot]（増幅プロット）画面の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート

ウェルテーブルの表示

ウェルテーブルには、反応プレート内の各ウェルに関して次のようなデータが表示されます。

- サンプル名、ターゲット名、タスク、色素
- Threshold cycle (C_T) 計算値、ノーマライズ済み蛍光 (Rn)、量
- コメント
- フラッグ

実験例について

標準曲線実験例では、[Well Table] (ウェルテーブル) で次の項目を確認します。

- 量
- フラッグ
- C_T 値 (C_T 標準偏差を含む)

ウェルテーブルの表示

1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) を選択してから、[View Well Table] (ウェルテーブルの表示) タブを選択します。

参考： データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューを使って、特定のカテゴリでウェルをグループ分けします。実験例では、Replicate (反復)、Flag (フラッグ)、 C_T 値でグループ分けします。

参考： カテゴリは、一度に1つしか選択できません。

- a. [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューで、[Replicate] (反復) を選択します。ソフトウェアが、反復ウェルをネガティブコントロール、スタンダード、サンプルにグループ分けします。実験例で、各反復グループ内の Quantity (量) が同じであることに注意してください。

参考： 実験例では、Quantity (量)、Quantity Mean (量平均)、Quantity SD (量標準偏差) 欄が、デフォルトの位置から [Well Table] (ウェルテーブル) の始めに移動されています。欄を移動するには、欄見出しをクリックし、ドラッグしてください。

ノート

2a

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Table ▼ Group By ▼ Expand All Collapse All

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.05255	31.04659	0.01	625		
17	C7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.052055	31.04659	0.01	625		
18	C8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.052100	31.04659	0.01	625		

- b. [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューで、[Flag] (フラッグ) を選択します。ソフトウェアが、フラッグの付いたウェルと付いていないウェルをグループ分けします。実験例では、フラッグの付いたウェルはありません。

2b

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Table ▼ Group By ▼ Expand All Collapse All

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
Flagged Wells													
Unflagged Wells													
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
4	A4	☐	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126.1
5	A5	☐	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	126.1
6	A6	☐	pop1		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2,473.064	2,551.476	126.1
7	A7	☐	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.976233	27.958857	0.024	4,774.927	4,830.585	76.1
8	A8	☐	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.968481	27.958857	0.024	4,799.501	4,830.585	76.1
9	B1	☐	pop2		RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.931858	27.958857	0.024	4,917.327	4,830.585	76.1
10	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
11	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
12	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
16	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
17	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
18	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
19	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
20	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
21	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		

ノート

- c. Group By (グループ別) ドロップダウンメニューで、[C_T] を選択します。ソフトウェアが、C_T 値の Low (低)、Medium (中)、High (高)、Undetermined (未決定) にウェルをグループ分けします。実験例では、C_T 値は、期待範囲 (>8 と <35) 内にあります。

2c

#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1				RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2				RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3				RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
4	A4			pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96287	28.923796	0.074	2,484.31	2,551.476	126
5	A5			pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.838797	28.923796	0.074	2,697.054	2,551.476	126
6	A6			pop1	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	28.96972	28.923796	0.074	2,473.064	2,551.476	126
7	A7			pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.976233	27.958857	0.024	4,774.927	4,830.585	76.1
8	A8			pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.968481	27.958857	0.024	4,799.501	4,830.585	76.1
9	B1			pop2	RNase P	UNKNOWN	FAM-NFQ...	27.931858	27.958857	0.024	4,917.327	4,830.585	76.1
10	B2				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
11	B3				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
12	B4				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
13	B5				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
16	B8				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
17	C1				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
18	C2				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
19	C3				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
20	C4				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
21	C5				RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		

解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合は、次の項目別にウェルをグループ分けします。

- **Replicate** (反復) — ソフトウェアが、反復によってウェルを、ネガティブコントロール、スタンダード、サンプルにグループ分けします。[Quantity] (量) 欄で、各反復グループ内の量が同じであることを確認してください。これは高い精度を意味します。
- **Flag** (フラッグ) — ソフトウェアが、フラッグの付いたウェルと付いていないウェルをグループ分けします。フラッグは、ソフトウェアが、フラッグの付いているウェルにエラーを検出したことを意味します。StepOne ソフトウェアのフラッグについては、「[QC Summary] (QC サマリー) の表示」(106 ページ) をご参照ください。
- **C_T** — threshold cycle (C_T) は、蛍光レベルが閾値と一致する PCR サイクル数です。C_T 値は、>8 かつ <35 が理想的です。C_T 値 <8 は、反応中のテンプレートが多すぎることを示します。C_T 値 >35 は、反応中のターゲット量が低すぎることを意味します。C_T 値 >35 の場合には、標準偏差が大きくなることが想定されます。

詳細について Well Table (ウェルテーブル) の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

データのパブリッシュ

実験データは、いくつかの方法でパブリッシュできます。

- プロットをイメージファイルとして保存する。
- プロットを印刷する。
- プレートレイアウトを印刷する。
- スライドを作成する。
- レポートを印刷する。
- データをエクスポートする。

これらの手順の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート

セクション 5.2 トラブルシューティング（必要に応じて）

本セクションの内容：

- [Analysis Settings]（解析設定）の表示..... 104
- [QC Summary]（QC サマリー）の表示..... 106
- 解析からウェルを選択削除..... 108
- [Multicomponent Plot]（マルチコンポーネントプロット）の表示..... 109
- [Raw Data Plot]（生データプロット）の表示..... 112

ノート

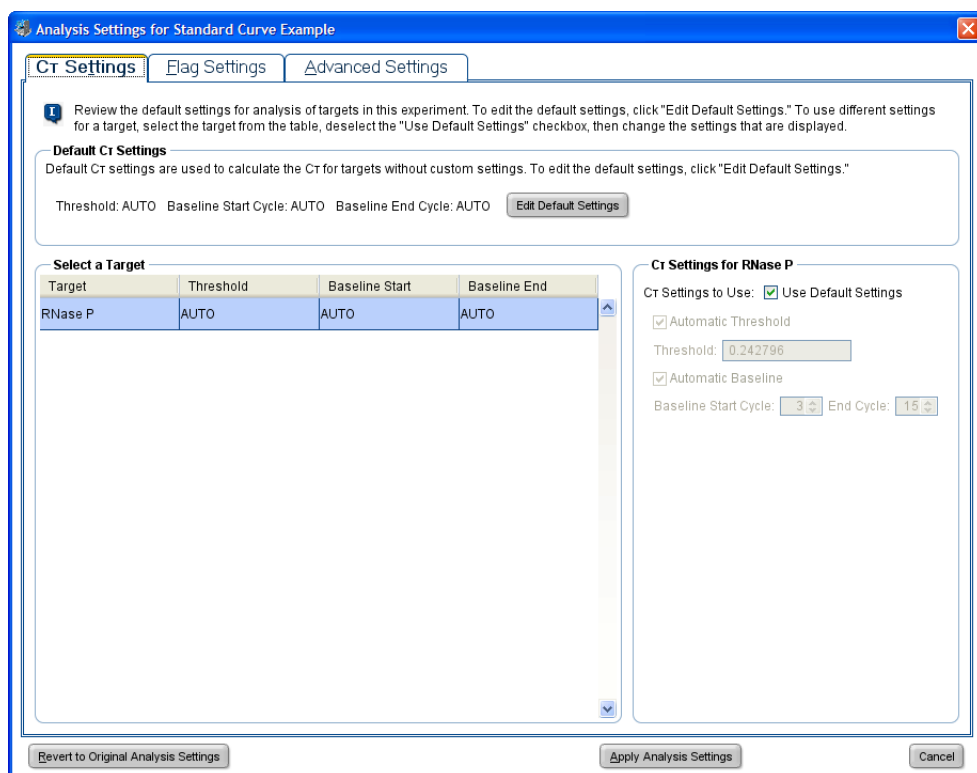
[Analysis Settings] (解析設定) の表示

[Analysis Settings] (解析設定) ダイアログボックスには、threshold cycle (C_T)、フラッグ、詳細オプションなどの解析設定が表示されます。StepOne ソフトウェアのデフォルトの解析設定が、実験に適さない場合は、[Analysis Settings] (解析設定) ダイアログボックスで設定を変更してから、実験を再解析できます。

実験例について 標準曲線実験例では、デフォルトの解析設定を変更せずに使用します。

[Analysis Settings] (解析設定) の表示

1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) を選択します。
2. [Analysis Settings] (解析設定) をクリックして、[Analysis Settings] (解析設定) ダイアログボックスを開きます。
3. 実験例では、各タブのデフォルトの解析設定を使用します。
 - C_T Settings (C_T 設定)
 - Flag Settings (フラッグ設定)
 - Advanced Settings (詳細設定)



ノート

解析ガイドライン 実験の最適設定を特定できていない場合は、StepOne ソフトウェアのデフォルトの解析設定を使用してください。デフォルト設定が実験に適していない場合は、次の設定を変更できます。

- **C_T Settings** (C_T 設定) – このタブを使うと、閾値とベースラインを手動で設定できます。閾値とベースラインを手動で設定する場合は、Applied Biosystems は次のことをお勧めします。

設定	推奨
閾値	閾値が次を満たすように値を入力してください。 • バックグラウンドより上。 • 増幅曲線のプラトー領域と直線領域より下。 • 増幅曲線の指数関数的増幅領域内。
ベースライン	[Start Cycle] (開始サイクル) と [End Cycle] (終了サイクル) は、蛍光信号が検知される前にベースラインが終了するよう選択してください。

- **Flag Settings** (フラッグ設定) – このタブを使うと、
 - 感度を調整して、フラッグを付けるウェルを増やしたり、減らしたりできます。
 - StepOne ソフトウェアが適用するフラッグを変更できます。
- **Advanced Settings** (詳細設定) – このタブを使うと、ベースライン設定をウェルごとに変更できます。

詳細について 解析設定の詳細については、[Analysis Settings] (解析設定) ダイアログボックスが開いているときに、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート _____

[QC Summary] (QC サマリー) の表示

[QC Summary] (QC サマリー) 画面には、開いている実験のフラッグの頻度や場所などを含む、StepOne ソフトウェアのフラッグのリストが表示されます。

実験例について

標準曲線実験例で、実験データによって付けられたすべてのフラッグについて、[QC Summary] (QC サマリー) 画面で確認します。実験例では、フラッグは付いていません。

[QC Summary] (QC サマリー) の 表示

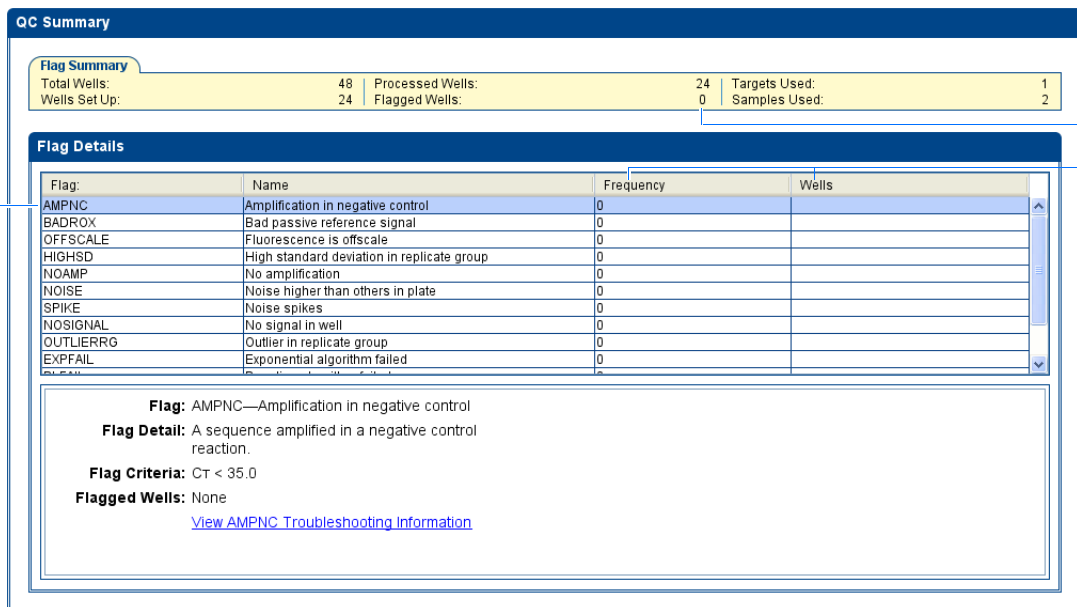
1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [QC Summary] (QC サマリー) を選択します。

参考：データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [Flags Summary] (フラッグサマリー) を確認します。実験例では、フラッグの付いたウェルはありません。
3. [Flag Details] (フラッグの詳細) テーブルで、[Frequency] (頻度) 欄と [Wells] (ウェル) 欄を確認して、実験に付けられたフラッグを特定します。実験例では、[Frequency] (頻度) 欄には、すべてのフラッグに 0 が表示されています。

参考：[Frequency] (頻度) 欄に表示された 0 は、この実験にはフラッグが付いていないことを示します。

4. (オプション) フラッグの各行をクリックすると、そのフラッグに関する詳細情報が表示されます。



QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	Targets Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	2

Flag Details

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

Flag: AMPNC—Amplification in negative control
Flag Detail: A sequence amplified in a negative control reaction.
Flag Criteria: CT < 35.0
Flagged Wells: None
[View AMPNC Troubleshooting Information](#)

ノート

考えられるフラッグ 標準曲線実験では、実験データに応じて次に挙げるフラッグが付けられる可能性があります。フラッグが実験で現れない場合、頻度は 0 です。頻度が >0 の場合、実験のどこかにフラッグが表示されています。ウェルの位置は、[Wells] (ウェル) 欄にあります。

フラッグ	説明
AMPNC	ネガティブコントロールで増幅
BADROX	異常なパッシブリファレンス信号
BLFAIL	ベースラインアルゴリズムに失敗
CTFAIL	C _T 値アルゴリズムに失敗
EXPFAIL	指数増幅アルゴリズムに失敗
HIGHSD	反復グループで高標準偏差
MTP	複数の T _m ピーク 参考：このフラッグは、実験に融解曲線が含まれる場合にのみ表示されます。
NOAMP	増幅なし
NOISE	プレート内の他よりノイズが高い
NOSIGNAL	ウェルに信号なし
OFFSCALE	蛍光がオフスケール
OUTLIERRG	反復グループに域外値
SPIKE	ノイズスパイク
THOLDFAIL	閾値アルゴリズムに失敗

解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合：

- [Flag Details] (フラッグの詳細) テーブルで、頻度が >0 の各フラッグをクリックすると、そのフラッグに関する詳細が表示されます。必要に応じて、トラブルシューティングリンクをクリックして、フラッグの修正に関する情報を表示します。
- フラッグの設定は変更できます。
 - 感度を調整して、フラッグを付けるウェルを増やしたり、減らしたりできます。
 - StepOne ソフトウェアが適用するフラッグを変更できます。

詳細について [QC Summary] (QC サマリー) 画面またはフラッグ設定の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート

解析からウェルを選択削除

実験中のエラーにより、充分に増幅されなかったり、または全く増幅されないウェルが発生する可能性があります。通常これらのウェルからは、対応する反復ウェルの平均値から大幅に逸脱する C_T 値が生成されます。これらの域外値を計算に含めると、測定結果に誤りが生じる可能性があるため、精度を高めるために解析からこれらの域外値を選択削除してください。

実験例について

標準曲線実験例では、域外値は存在しないため、解析からウェルを削除する必要はありません。

ウェルの選択削除

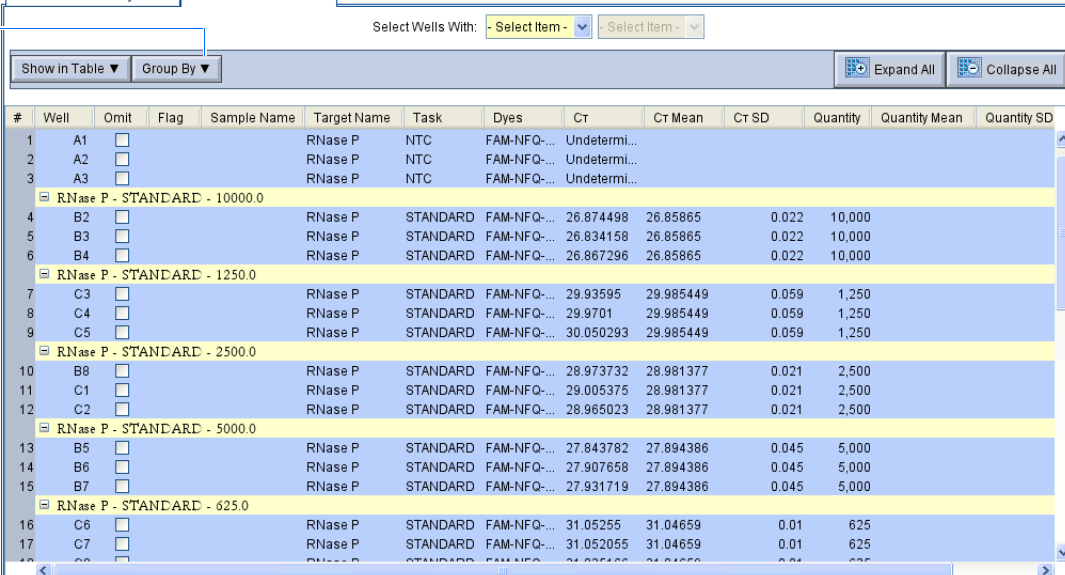
1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Amplification Plot] (増幅プロット) を選択します。

参考：データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面で、[Plot Type] (プロットタイプ) ドロップダウンメニューから [C_T vs Well] (C_T 対ウェル) を選択します。
3. [View Well Table] (ウェルテーブルの表示) タブを選択します。
4. [Well Table] (ウェルテーブル) で：
 - a. [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューで、[Replicate] (反復) を選択します。
 - b. 反復グループに域外値がないか確認します (フラッグが付いているはずです)。実験例では、域外値はありません。

3

4a



#	Well	Omit	Flag	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
1	A1	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
2	A2	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
3	A3	☐			RNase P	NTC	FAM-NFQ...	Undetermi...					
RNase P - STANDARD - 10000.0													
4	B2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.874498	26.85865	0.022	10,000		
5	B3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.834158	26.85865	0.022	10,000		
6	B4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	26.867296	26.85865	0.022	10,000		
RNase P - STANDARD - 1250.0													
7	C3	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.93595	29.985449	0.059	1,250		
8	C4	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.9701	29.985449	0.059	1,250		
9	C5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	30.050293	29.985449	0.059	1,250		
RNase P - STANDARD - 2500.0													
10	B8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.973732	28.981377	0.021	2,500		
11	C1	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	29.005375	28.981377	0.021	2,500		
12	C2	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	28.965023	28.981377	0.021	2,500		
RNase P - STANDARD - 5000.0													
13	B5	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.843782	27.894386	0.045	5,000		
14	B6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.907658	27.894386	0.045	5,000		
15	B7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	27.931719	27.894386	0.045	5,000		
RNase P - STANDARD - 625.0													
16	C6	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.05255	31.04659	0.01	625		
17	C7	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.052055	31.04659	0.01	625		
18	C8	☐			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ...	31.052055	31.04659	0.01	625		

ノート

解析ガイドライン

標準曲線実験を解析する場合は、域外値がないか反復グループを注意深く表示します。必要に応じて、ウェルテーブルを使って域外値を手動で削除します。

1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Amplification Plot] (増幅プロット) を選択します。

参考： データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面で、[Plot Type] (プロットタイプ) ドロップダウンメニューから [C_T vs Well] (C_T 対ウェル) を選択します。
3. [View Well Table] (ウェルテーブルの表示) タブを選択します。
4. [Well Table] (ウェルテーブル) で：
 - a. [Group By] (グループ別) ドロップダウンメニューで、[Replicate] (反復) を選択します。
 - b. 反復グループに域外値がないか確認します (フラグが付いているはずです)。
 - c. 異常なウェルの横にある [Omit] (選択削除) チェックボックスを選択します。
5. [Analyze] (解析) をクリックして、解析から異常なウェルを削除した状態で実験データを再解析します。

詳細について

解析からのウェルの選択削除の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。ヘルプ内で、ウェルの選択削除に関するトピックを検索してください。

1. [Search] (検索) タブをクリックします。
2. [omit well] (ウェルの選択削除) を入力します。
3. [List Topics] (トピックをリスト) をクリックします。
4. 確認したいトピックをダブルクリックします。

[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) の表示

[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面には、PCR 測定中を通して、選択したウェル内の各色素の全スペクトル構成が表示されます。

実験例について

標準曲線実験例では、[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面で次の項目を確認します。

- ROX™ 色素 (パッシブリファレンス)
- FAM™ 色素 (レポーター)
- スパイク、ディップ、突然の変化
- ネガティブコントロールウェルでの増幅

ノート

Multicomponent Plot
(マルチコンポーネント
プロット) の表示

1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) を選択します。

参考：データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

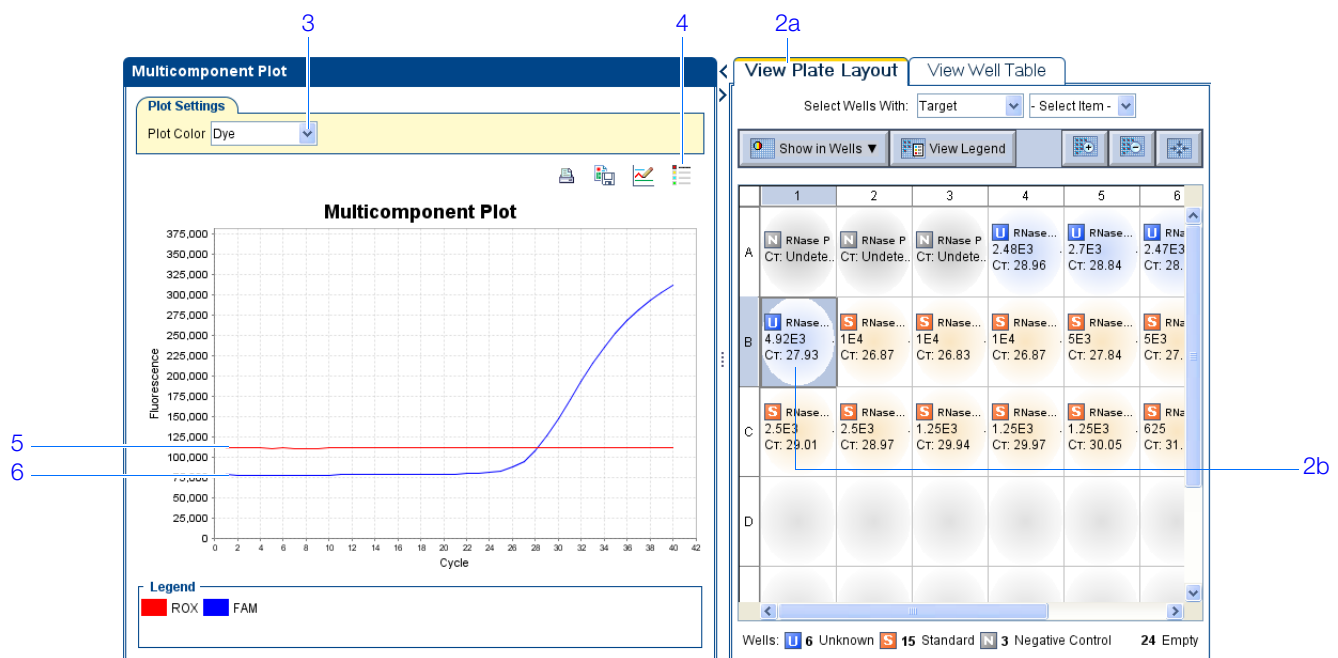
2. [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面で未知およびスタンダードウェルを一度に 1 つだけ表示します。
 - a. [View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブをクリックします。
 - b. プレートレイアウトでウェルを選択すると、そのウェルが [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面に表示されます。

参考：複数のウェルを選択すると、[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面に、選択したすべてのウェルのデータが同時に表示されます。

3. [Plot Color] (プロットカラー) ドロップダウンメニューで、[Dye] (色素) を選択します。
4.  [Show a legend for the plot] (プロットの凡例を表示) をクリックします (デフォルト)。

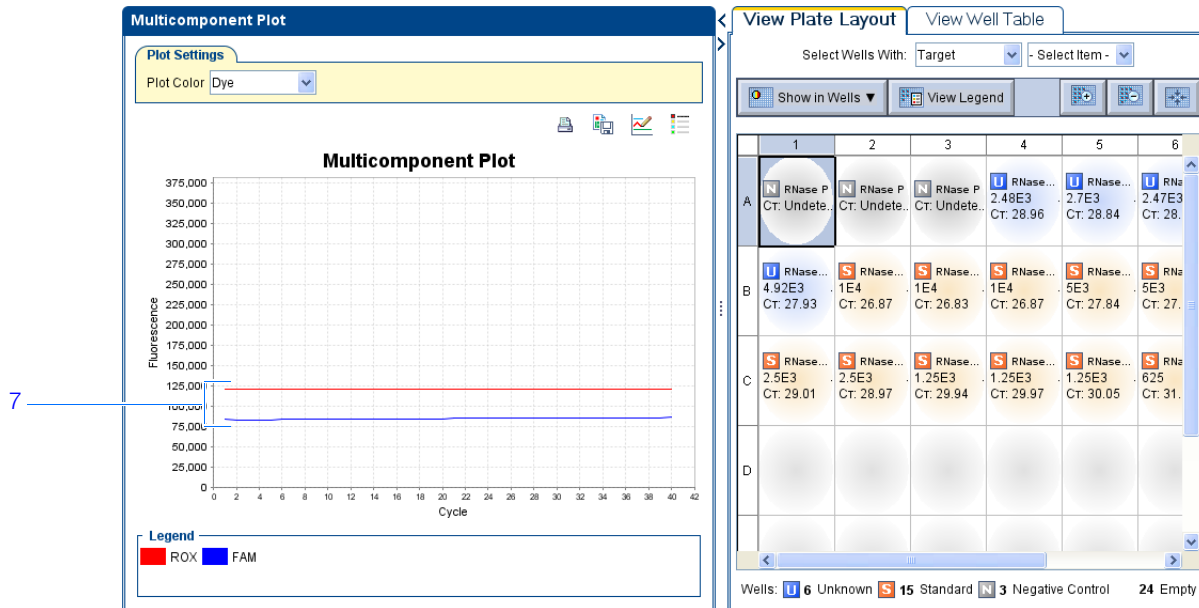
参考：これはトグルボタンになっていて、凡例が表示されているとき、ボタンは、[Hide the plot legend] (プロットの凡例を非表示) に変わります。

5. ROX 色素信号を確認します。実験例は、ROX 色素の信号が PCR プロセスの間中一定値を示すという典型的なデータです。
6. FAM 色素信号を確認します。実験例は、FAM 色素信号が PCR プロセスの間増加するという、正常な増幅を示しています。



ノート

7. ネガティブコントロールウェルを一度に1つずつ選択して、増幅を確認します。実験例では、ネガティブコントロールウェルに増幅はありません。



解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合は、次のことに注意してください。

- パッシブリファレンス – パッシブリファレンス色素の蛍光レベルは、PCR プロセス中比較的一定です。
- レポーター色素 – レポーター色素の蛍光レベルは、ベースラインに対応する平らな領域に続いて、増幅が進むにつれて蛍光レベルが急激に上昇します。
- 信号に異常がないこと – 蛍光信号に、スパイク、ディップ、突然の変化はないはずです。
- ネガティブコントロールウェル – ネガティブコントロールウェルに増幅はないはずです。

詳細について [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

[Raw Data Plot] (生データプロット) の表示

[Raw Data Plot] (生データプロット) 画面には、リアルタイム PCR の各サイクル中、選択したウェルの各光学フィルタの生蛍光信号（ノーマライズされていない）が表示されます。

実験例について

標準曲線実験例では、[Raw Data Plot] (生データプロット) 画面で、適切なフィルタからの信号の安定した増加（突然の変化やディップなし）を確認します。

[Raw Data Plot] (生データプロット) の 表示

1. [Experiment Menu] (実験メニュー) 欄で、[Analysis] (解析) ▶  [Raw Data Plot] (生データプロット) を選択します。

参考： データが表示されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。

2. [View Plate Layout] (プレートレイアウトの表示) タブでプレートレイアウトの左上隅をクリックして、[Raw Data Plot] (生データプロット) 画面に 48 ウェルをすべて表示します。

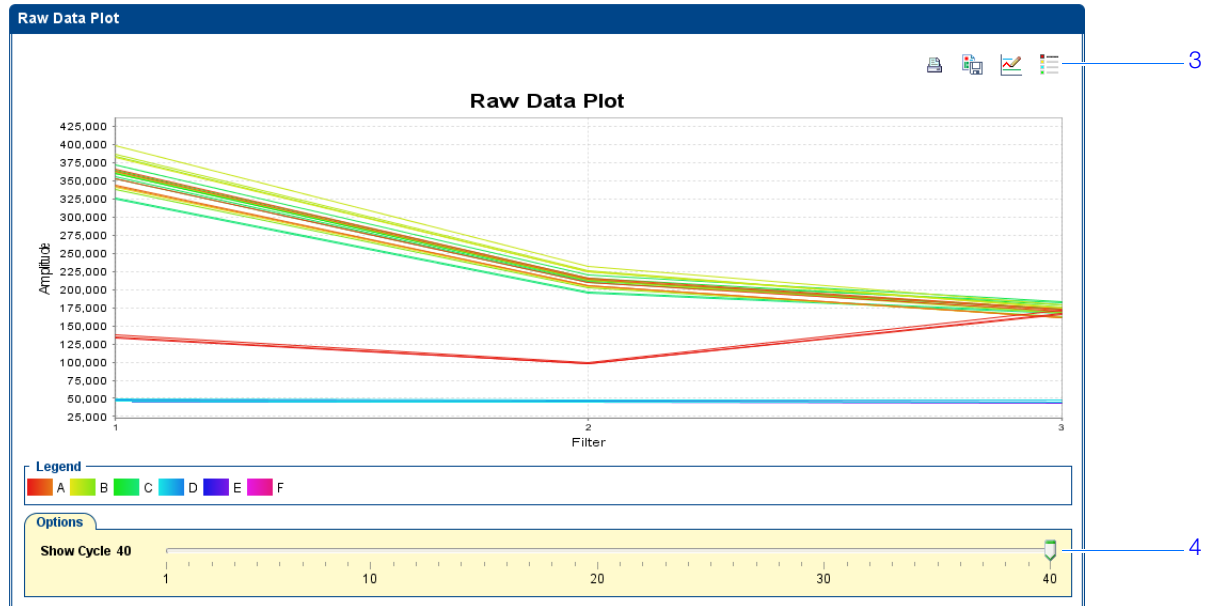
3.  [Show a legend for the plot] (プロットの凡例を表示) をクリックします（デフォルト）。

参考： これはトグルボタンになっていて、凡例が表示されているとき、ボタンは、[Hide the plot legend] (プロットの凡例を非表示) に変わります。

参考： 凡例には、反応プレートの各行のカラーコードが表示されます。下に示す例では、A 行が赤、B 行が黄緑、C 行が緑のようになっています。

4. [Show Cycle] (サイクル表示) ポインターをクリックし、サイクル 1 ~ サイクル 40 までドラッグします。実験例では、FAM™ 色素フィルタに対応するフィルタ 1 からの信号に安定した増加が認められます。

ノート



フィルタは：

StepOne システム		StepOnePlus システム	
フィルタ	色素	フィルタ	色素
1	FAM™ 色素	1	FAM™ 色素
	SYBR® Green 色素		SYBR® Green 色素
2	JOE™ 色素	2	JOE™ 色素
	VIC® 色素		VIC® 色素
3	ROX™ 色素	3	TAMRA™ 色素
			NED™ 色素
		4	ROX™ 色素

解析ガイドライン 標準曲線実験を解析する場合は、各フィルタについて次のことに注意してください。

- 特徴的な信号増加
- 突然の変化やディップがないこと

詳細について [Raw Data Plot] (生データプロット) 画面の詳細については、 をクリックするか、**F1** を押して、StepOne ソフトウェアのヘルプにアクセスしてください。

ノート



代替実験ワークフロー

A

本付録の内容：

- [Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー 116
- [QuickStart] (クイックスタート) ワークフロー 117
- [Template] (テンプレート) ワークフロー 119
- [Export/Import] (エクスポート/インポート) ワークフロー 121

参考：本書に記載されている各トピックに関する詳細について Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software v2.0 内のヘルプにアクセスするには、**F1** を押すか、ツールバーの ⓘ をクリックするか、**[Help]** (ヘルプ) ▶ **[StepOne Software Help]** (StepOne Software ヘルプ) を選択します。

ノート

[Advanced Setup] (高度なセットアップ) ワークフロー

StepOne™ ソフトウェアの [Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使って実験を作成すると、各自の設計に応じて実験をセットアップできます。

1.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。

ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

2. [Home] (ホーム) 画面で、 [Advanced Setup] (高度なセットアップ) をクリックします。

参考： [Advanced Setup] (高度なセットアップ) のアイコンが見つからない場合には、[Design Wizard] (設計ウィザード) アイコンの下にある矢印をクリックして、[Set Up] (セットアップ) メニューを全画面します。

3. セットアップ画面の入力を完了して、新しい実験をセットアップします。
 - a.  [Experiment Properties] (実験プロパティ) (デフォルト) をクリックしてから、実験名を入力した後、実験例のプロパティを選択します。
 - b.  [Plate Setup] (プレートセットアップ) をクリックします。

実験タイプ	操作
ジェノタイピング実験	SNP アッセイを定義した後、反応プレートの各ウェルに割り当てます。
その他の実験	ターゲットを定義した後、反応プレートの各ウェルに割り当てます。

- c.  [Run Method] (測定方法) をクリックしてから、反応容量とサーマルプロファイルを確認し、必要に応じて変更します。
- d.  [Reaction Setup] (反応セットアップ) をクリックし、PCR 反応のコンポーネントと容量計算値を確認し、必要に応じて変更します。
- e. (オプション)  [Materials List] (物品リスト) をクリックして物品リストを確認し、反応プレートの準備に必要な物品を注文します。

4. PCR 反応を調製します。

実験タイプ	操作
相対標準曲線法	a. テンプレートを調製します。 b. サンプル希釈液を調製します。 c. スタンダード希釈シリーズを調製します。 d. 反応ミックスを調製します。 e. 反応プレートを調製します。
標準曲線法	

ノート

実験タイプ	操作
比較 C_T 法	a. テンプレートを調製します。
ジェノタイピング実験	b. サンプル希釈液を調製します。
有無実験	c. 反応ミックスを調製します。
	d. 反応プレート調製します。

5. 実験を測定します。

- a. 反応プレートを装置にロードします。
- b. 測定を開始します。
- c. (オプション) 測定を監視します。
- d. 装置から反応プレートを取り出します。

6. データを解析します。

- a. StepOne ソフトウェアで実験を開きます。
- b. [Experiment Menu] (実験メニュー) で、[Analysis] (解析) を選択します。
- c. データが解析されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。
- d. ナビゲーション欄で解析画面を選択し、データを表示します (例えば、[QC Summary] (QC サマリー) を選択して、データクオリティーに関する要約を表示します)。

[QuickStart] (クイックスタート) ワークフロー

[QuickStart] (クイックスタート) を使って実験を作成すると、反応プレートセットアップ情報なしに装置による反応の測定が可能になります。

1. PCR 反応を調製します。

実験タイプ	操作
相対標準曲線法	a. テンプレートを調製します。
標準曲線法	b. サンプル希釈液を調製します。
	c. スタンダード希釈シリーズを調製します。
	d. 反応ミックスを調製します。
	e. 反応プレート調製します。
比較 C_T 法	a. テンプレートを調製します。
ジェノタイピング実験	b. サンプル希釈液を調製します。
有無実験	c. 反応ミックスを調製します。
	d. 反応プレート調製します。

ノート

2. 実験をクイックスタートします。

- a.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。

ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

- b. [Home] (ホーム) 画面で、 [QuickStart] (クイックスタート) をクリックします。
- c. [Experiment Properties] (実験プロパティ) タブ (デフォルト) をクリックしてから、実験名を入力した後、実験プロパティを選択します。
- d. [Run Method] (測定方法) タブをクリックしてから、反応容量とサーマルプロファイルを確認し、必要に応じて変更します。

3. 実験を測定します。

- a. 反応プレートを装置にロードします。
- b. 測定を開始します。
- c. (オプション) 測定を監視します。
- d. 装置から反応プレートを取り出します。

4. StepOne ソフトウェアでプレートセットアップを入力します。

実験タイプ	操作
ジェノタイピング実験	a. [Define SNP Assays and Samples] (SNP アッセイとサンプルの定義) タブを選択し、入力します。 b. [Assign SNP Assays and Samples] (SNP アッセイとサンプルの割り当て) タブを選択し、入力します。
その他の実験	a. [Define Targets and Samples] (ターゲットとサンプルの定義) タブを選択し、入力します。 b. [Assign Targets and Samples] (ターゲットとサンプルの割り当て) タブを選択し、入力します。

5. データを解析します。

- a. StepOne ソフトウェアで実験を開きます。
- b. [Experiment Menu] (実験メニュー) で、[Analysis] (解析) を選択します。
- c. データが解析されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。
- d. ナビゲーション欄で解析画面を選択し、データを表示します (例えば、[QC Summary] (QC サマリー) を選択して、データクオリティーに関する要約を表示します)。

ノート

[Template] (テンプレート) ワークフロー

テンプレートを使用して新しい実験を作成することができます。同じセットアップ情報により実験を多く作成する場合に、テンプレートは便利です。

テンプレートの作成

1.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。

ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

2. 既存の実験を開くか、新しい実験を作成します。

参考：[Design Wizard] (設計ウィザード) (第 2 章参照) または [Advanced Setup] (高度なセットアップ) (116 ページ参照) を使うと、新しい実験を作成できます。

3. [File] (ファイル) ▶ [Save As Template] (テンプレートとして保存) を選択します。
4. ファイル名を入力し、テンプレートの場所を選択してから、[Save] (保存) をクリックします。
5.  [Close] (閉じる) をクリックします。

テンプレートを 使った実験の作成

1. [Home] (ホーム) 画面で、 [Template] (テンプレート) をクリックします。

参考：[Template] (テンプレート) のアイコンが見つからない場合には、[Design Wizard] (設計ウィザード) アイコンの下にある矢印をクリックして、[Set Up] (セットアップ) メニューを全画面します。

2. ステップ d で作成したテンプレートを指定して選択し、[Open] (開く) をクリックします。テンプレートからのセットアップ情報を使って新しい実験が作成されます。
 - 実験プロパティ
 - プレートセットアップ
 - 測定方法
 - 反応セットアップ
3. (オプション) 実験を変更したい場合には、[Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使用します (116 ページ参照)。
4.  [Save] (保存) をクリックし、ファイル名を入力してから、[Save] (保存) をクリックして実験を保存します。

ノート

5. PCR 反応を調製します。

実験タイプ	操作
相対標準曲線法	a. テンプレートを調製します。 b. サンプル希釈液を調製します。 c. スタンダード希釈シリーズを調製します。 d. 反応ミックスを調製します。 e. 反応プレート調製します。
標準曲線法	
比較 C_T 法	a. テンプレートを調製します。 b. サンプル希釈液を調製します。 c. 反応ミックスを調製します。 d. 反応プレート調製します。
ジェノタイピング実験	
有無実験	

6. 実験を測定します。

- 反応プレートを装置にロードします。
- 測定を開始します。
- (オプション) 測定を監視します。
- 装置から反応プレートを取り出します。

7. データを解析します。

- StepOne ソフトウェアで実験を開きます。
- [Experiment Menu] (実験メニュー) で、[Analysis] (解析) を選択します。
- データが解析されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。
- ナビゲーション欄で解析画面を選択し、データを表示します (例えば、[QC Summary] (QC サマリー) を選択して、データクオリティーに関する要約を表示します)。

ノート

[Export/Import] (エクスポート/インポート) ワークフロー

[Export/Import] (エクスポート/インポート) ワークフローを用いると、他の実験からエクスポートしたセットアップデータを使って、新しい実験をセットアップできます。反応プレートのセットアップデータのみが、インポート/エクスポートの対象となります。

参考： StepOne ソフトウェア v1.0 によりエクスポートした実験のセットアップデータは、v2.0 以降のバージョンの StepOne ソフトウェアで実験にインポート可能です。しかし、StepOne ソフトウェア v2.0 以降によりエクスポートした実験のセットアップデータは、StepOne ソフトウェア v1.0 では実験にインポートできません。

セットアップデータの エクスポート

1.  (StepOne ソフトウェアショートカット) をダブルクリックするか、[Start] (スタート) ▶ [All Programs] (すべてのプログラム) ▶ [Applied Biosystems] ▶ [StepOne Software] ▶ <ソフトウェア名> を選択します。

ここで、<ソフトウェア名> は、StepOne ソフトウェアの最新バージョンです。

2. 既存の実験を開くか、新しい実験を作成します。

参考： [Design Wizard] (設計ウィザード) (第 2 章参照) または [Advanced Setup] (高度なセットアップ) (116 ページ参照) を使うと、新しい実験を作成できます。

3. [File] (ファイル) ▶ [Export] (エクスポート) を選択します。
4. [Export Properties] (エクスポートプロパティ) タブ (デフォルト) を選択した後、
 - a. [Setup] (セットアップ) を選択します。
 - b. ドロップダウンメニューから [One File] (1 ファイル) を選択します。
 - c. ファイル名を入力した後、エクスポートファイルの場所を選択します。
 - d. [File Type] (ファイルタイプ) ドロップダウンメニューから  (*.txt) を選択します。

重要！ *.xml ファイルは、エクスポートできません。

5. (オプション) [Customize Export] (エクスポートのカスタマイズ) タブをクリックし、適切なオプションを選択します。
6. [Start Export] (エクスポート開始) をクリックします。
7. 確認の表示がでたら、[Close Export Tool] (エクスポートツールを閉じる) をクリックします。

エクスポートした テキストファイルを 使った実験の作成

エクスポートしたテキストファイル (*.txt) からプレートセットアップデータをインポートして、実験用の反応プレートセットアップデータを作成できます。

重要！ 選択したエクスポートテキストファイルには反応プレートセットアップデータのみが含まれており、実験タイプが合致することを確認してください。

ノート

1. エクスポートしたテキストファイルから、反応プレートセットアップデータをインポートします。

- a. 表計算ソフト (Microsoft® Excel など) を使って、エクスポートしたテキストファイルを開きます。
- b. 必要に応じて、テキストファイルのパラメータを変更します。終わったら、タブ区切りテキストファイルとしてファイルを保存します。
- c. [Home] (ホーム) 画面で、 [Advanced Setup] (高度なセットアップ) をクリックします。

参考： [Advanced Setup] (高度なセットアップ) のアイコンが見つからない場合には、[Design Wizard] (設計ウィザード) アイコンの下にある矢印をクリックして、[Set Up] (セットアップ) メニューを全画面します。

- d. 新しい実験を作成するか、または既存の実験を開きます。
- e. [File] (ファイル) ▶ [Import] (インポート) を選択します。
- f. [Browse] (参照) をクリックし、テキストファイル (*.txt) を指定し、選択した後、[Select] (選択) をクリックします。
- g. [Start Import] (インポートの開始) をクリックします。エクスポートしたテキストファイルのセットアップデータを、開いている実験にインポートします。

参考： 実験にプレートセットアップ情報があらかじめ入っている場合には、ソフトウェアは、テキストファイルからのデータによりプレートセットアップを書き換えるかどうかを尋ねます。[Yes] (はい) をクリックして、プレートセットアップ情報を書き換えます。

2. [Advanced Setup] (高度なセットアップ) を使用して、実験のセットアップを終了します (116 ページ参照)。

3. PCR 反応を調製します。

実験タイプ	操作
相対標準曲線法	a. テンプレートを調製します。 b. サンプル希釈液を調製します。 c. スタンダード希釈シリーズを調製します。 d. 反応ミックスを調製します。 e. 反応プレートを調製します。
標準曲線法	
比較 C_T 法	
ジェノタイピング実験	
有無実験	a. テンプレートを調製します。 b. サンプル希釈液を調製します。 c. 反応ミックスを調製します。 d. 反応プレートを調製します。

ノート

4. 実験を測定します。
 - a. 反応プレートを装置にロードします。
 - b. 測定を開始します。
 - c. (オプション) 測定を監視します。
 - d. 装置から反応プレートを取り出します。
5. データを解析します。
 - a. StepOne ソフトウェアで実験を開きます。
 - b. [Experiment Menu] (実験メニュー) で、[Analysis] (解析) を選択します。
 - c. データが解析されない場合は、[Analyze] (解析) をクリックしてください。
 - d. ナビゲーション欄で解析画面を選択し、データを表示します (例えば、[QC Summary] (QC サマリー) を選択して、データクオリティーに関する要約を表示します)。

ノート



付録 A 代替実験ワークフロー
[Export/Import] (エクスポート／インポート) ワークフロー

ノート

参考文献

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

用語集

Advanced Setup (高度なセットアップ)	StepOne™ ソフトウェアの機能で、実験を自分の実験設計に従ってセットアップできます。Advanced Setup (高度なセットアップ) により、実験の設計やセットアップが自由に行えます。
AIF	アッセイ情報ファイル (AIF) をご参照ください。
Assay ID (アッセイ ID)	Applied BiosystemsがTaqMan® Gene Expression AssayやTaqMan® SNP Genotyping Assayに割り当てる識別名。
AutoDelta (オートデルタ)	サイクリングステージ内のその後の各サイクルでステップの温度や時間を増減する測定方法の設定。AutoDelta がサイクリングステージで有効の場合、設定はサーマルプロファイル内のアイコンで示されます。 • AutoDelta オン：▲ • AutoDelta オフ：▲
C_T	Threshold cycle (C_T) をご参照ください。
delta Rn (ΔRn)	ベースライン修正したノーマライズ済み レポーター (ΔRn) をご参照ください。
Design Wizard (設計ウィザード)	実験のセットアップを補助する StepOne™ ソフトウェアの機能で、希望の実験設計を入力すると、最良の実施法を表示します。
Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix) (希釈サンプル濃度 (反応ミックスでは 10 倍))	StepOne™ ソフトウェアでは、このソフトウェアフィールドは、[Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面の [Sample Dilution Calculations] (サンプル希釈計算) タブに表示されます。このフィールドに、すべての実験サンプルについて、反応ミックスに添加するサンプルの濃度を入力します。“10× for Reaction Mix” (反応ミックスでは 10 倍) は、反応ミックスのサンプルまたはスタンダード成分が10×濃度であるとソフトウェアが仮定することを示します。例えば、希釈サンプル濃度 50.0 ng/μL (10×) の場合、反応の最終サンプル濃度は 5 ng/μL (1×) です。
EFF%	増幅効率 (EFF%) をご参照ください。
Inventoried アッセイ	過去に製造され、品質管理仕様に合格し、在庫保管される TaqMan® Gene Expression Assays および TaqMan® SNP Genotyping Assays。

IPC	有無実験における内在性ポジティブコントロール (IPC) の略語。StepOne™ ソフトウェアでは、IPC を含むが IPC 遮断剤を含まないウェル内の IPC ターゲットのタスク。内在性ポジティブコントロール (Internal positive control : IPC) をご参照ください。
IPC+	ネガティブコントロール IPC ウェルをご参照ください。
IPC 遮断剤	PCR 反応に添加して内在性ポジティブコントロール (IPC) の増幅をブロックする試薬。
Made-to-order アッセイ	注文後に製造する TaqMan® Gene Expression Assay または TaqMan® SNP Genotyping Assay。製造品質管理仕様に合格したアッセイのみ出荷されます。
PCR 後の読み取り	ジェノタイピングおよび有無実験で使用する装置での測定の一部で、増幅後に行われます。ジェノタイピング実験では、PCR 後の読み取り時に収集した蛍光データをアレル識別プロットに表示し、アレルコールに使用します。有無実験では、PCR 後の読み取り時に収集した蛍光データを有無プロットに表示し、検出コールに使用します。別称「エンドポイント読み取り」。
PCR 前の読み取り	ジェノタイピングおよび有無実験で使用する装置での測定の一部で、増幅前に行われます。PCR 前の読み取りは、オプションですが、選択することをお勧めします。PCR 前の読み取りで収集した蛍光データを使用して、PCR 後の読み取りで収集した蛍光データをノーマライズすることができます。
Pure Dye	カスタム色素およびシステム色素参照。
QuickStart (クイックスタート)	StepOne™ および StepOnePlus™ システムの機能で、プレートセットアップ情報を入力しなくても実験を実施できます。QuickStart には、装置の電源がオンであり、装置コンピュータ間の接続を変更していないコロケーションレイアウトが必要となります。
R ² 値	回帰係数。標準曲線内の回帰直線から計算します。R ² 値は、標準曲線回帰直線と、スタンダード反応の各 C _T データポイントとのフィットの近似を示します。値が 1.00 なら、回帰直線とデータポイントとの完全フィットを示します。
refSNP ID	リファレンス SNP (refSNP) クラス ID を識別する数字。国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) にあるヌクレオチド配列変異の一塩基多型データベース (dbSNP) により作成されます。refSNP ID は、Applied Biosystems Store で Applied Biosystems SNP Genotyping Assay の検索に使用できます。別称「rs 番号」。
Remote Monitor (遠隔監視)	StepOne™ ソフトウェアの機能で、StepOne™ または StepOnePlus™ 装置を監視できます。遠隔監視により、装置のステータスを監視したり、実験を装置に転送したり、リアルタイムで増幅プロットや温度プロットを監視したり、結果をコンピュータにダウンロードできます。StepOne または StepOnePlus 装置は、[Remote Monitor] (遠隔監視) では操作できません。

Rn	ノーマライズ済み レポーター (Rn) をご参照ください。
ROX™ 色素	Applied Biosystems が製造し、StepOne™ および StepOnePlus™ システムで事前キャリブレーションされている色素。ROX 色素は、パッシブリファレンスとして使用されます。
rs 番号	refSNP ID をご参照ください。
Sample Library (サンプルライブラリ)	StepOne™ ソフトウェアでのサンプルのコレクション。サンプルライブラリには、サンプル名とサンプルの色が含まれます。
Sample or Standard (10×) (サンプルまたは スタンダード (10 倍))	StepOne™ ソフトウェアでは、この反応コンポーネントは、[Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面の [Reaction Mix Calculations] (反応ミックス計算) タブに表示されます。本ソフトウェアは、反応ミックスへ添加するサンプルまたはスタンダードが 10× 濃度であると仮定します。例えば、反応量 20 µL の場合、1 反応の計算サンプルまたはスタンダード量は 2 µL です。
SNP	「一塩基多型」の略語。SNP は、一塩基の違いや一塩基の挿入や欠失などです。
SNP Assay Library (SNP アッセイライ ブラリ)	StepOne™ ソフトウェアで、ジェノタイピング実験に追加する SNP アッセイのコレクション。ライブラリの SNP アッセイには、SNP アッセイ名や SNP アッセイカラーの他、各アレルに対してアレル名や塩基、レポーター、クエンチャーおよびアレルカラーが含まれます。ライブラリ中の SNP アッセイには、アッセイ ID や SNP アッセイに関するコメントを追加することができます。
SNP アッセイ	ジェノタイピング実験で使用する、SNP 増幅用プライマーと、異なるアレルの検出用の 2 プローブを含む PCR 反応。
SYBR® Green 試薬	ターゲット増幅用の 2 つのプライマーと、二本鎖 DNA 検出用 SYBR® Green 色素からなる PCR 反応コンポーネント。
TaqMan® 試薬	ターゲット増幅用プライマーと、ターゲット増幅検出用 TaqMan® プローブからなる PCR 反応コンポーネント。
Target Library (ターゲットライブラリ)	StepOne™ ソフトウェアで、実験に追加するターゲットのコレクション。ライブラリのターゲットには、ターゲット名、レポーター、クエンチャーとサンプルの色が含まれます。ライブラリのターゲットには、さらにターゲットに関するコメントを追加することができます。
Threshold cycle (C _T)	蛍光レベルが増幅プロットの閾値と一致する PCR サイクル数。
Tm	融解温度 (Tm) をご参照ください。

VeriFlex™ 技術	StepOnePlus™ 装置には、個別に熱制御可能な VeriFlex™ ブロックが 6 個あり、96 サンプルウェルに対して温度の異なる 6 つのゾーンを設定できます。StepOne™ ソフトウェアで VeriFlex ブロックを有効にすると、各 VeriFlex ブロックに異なる温度を設定できるようになります。
y 切片	標準曲線で、回帰直線が y 軸と交わる点。y 切片は、量が 1 のサンプルに対する期待 Threshold cycle (C_T) を示します。
アッセイ	StepOne™ および StepOnePlus™ システムにおいて、ターゲット増幅用プライマーと、増幅したターゲットを検出する試薬を含む PCR 反応ミックス。
アッセイミックス	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assay や TaqMan® SNP Genotyping Assay に含まれる PCR 反応コンポーネント。アッセイミックスには、ターゲット増幅用プライマーと、ターゲット増幅検出用 TaqMan® プローブが含まれます。
アッセイ情報ファイル (AIF)	各アッセイのご注文ごとに CD で発送されるデータファイル。ファイル名には、プレート上のバーコード番号が含まれます。AIF 内の情報は、タブ区切りフォーマットで提供されます。
アレル	あるターゲットで、集団内に見られる異なる複数のシーケンス。
アレル識別プロット	PCR 後の読み取りで収集したデータの表示。アレル識別プロットはアレル 1 プローブからのノーマライズ済みレポーター信号を、アレル 2 プローブからのノーマライズ済みレポーター信号に対してプロットしたグラフです。
アンプリコン	PCR で増幅する DNA セグメント。
域外値	あるデータセットで、その他より有意に小さいか大きいデータポイント。
ウェル拒絶	ソフトウェアが解析時に実行し、特定フラッグがウェルに適用された場合に、それらのウェルを以後の解析から除外する操作。拒絶したウェルは、拒絶の時点までの結果を示します。
ウェル削除	再解析前に、1 つ以上のウェルを解析から削除する操作。削除したウェルにはアルゴリズムが適用されないため、削除したウェルの結果は出ません。
エンドポイント読み取り	PCR 後の読み取り をご参照ください。
温度プロット	StepOne™ ソフトウェアによる、StepOne™ または StepOnePlus™ 装置測定時のサンプル、装置カバー、装置ブロックの温度表示。
回帰係数	標準曲線での回帰直線からの計算値。 R^2 値、傾き、y 切片があります。回帰係数を使用し、スタンダードからの結果品質を評価できます。「標準曲線」も参照。

回帰直線	標準曲線および相対標準曲線実験で、標準曲線の最も良くフィットするライン。回帰直線の計算式： $C_T = m [\log (Qty)] + b$ m は傾き、b は y 切片、Qty はスタンダード量です。 回帰係数をご参照ください。
開始量	StepOne™ ソフトウェアで標準曲線を設定する際の、最大または最小の量に相当します。
解離曲線	融解曲線 をご参照ください。
カスタム色素	提供元が Applied Biosystems でない色素。StepOne™ および StepOnePlus™ システムでは、カスタム色素を実験に使用できます。カスタム色素を使用する場合には、そのカスタム色素を Dye Library に追加し、カスタム Dye キャリブレーションを行う必要があります。 重要！ Applied Biosystems は、TAMRA™ 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne™ システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus™ システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。
傾き	回帰係数。標準曲線内の回帰直線から計算します。傾きは、アッセイの PCR 増幅効率を示します。傾きが -3.32 の場合、100% の増幅効率を示します。 増幅効率 (EFF%) および 回帰直線 をご参照ください。
希釈液	サンプルやスタンダードを PCR 反応に添加する前の希釈に使用する試薬。希釈液には、水やバッファーが使われます。
希釈係数	シリアル係数 をご参照ください。
逆転写酵素	RNA を cDNA に変換する酵素。逆転写酵素の PCR 反応への添加により、1 ステップ RT-PCR を実施できます。
キャリブレータ	リファレンスサンプル をご参照ください。
空間キャリブレーション	StepOne™ および StepOnePlus™ システムのキャリブレーションの 1 タイプで、システムがサンプルブロック中のウェル位置をマッピングします。空間キャリブレーションのデータによって、ソフトウェアは測定中に、蛍光の増加を反応プレートの特定期間に関連付けできます。

クエンチャー	TaqMan [®] プローブの 3' 末端に結合する分子。これにより、レポーターの蛍光信号放射は、プローブがインタクトな時は阻止されます。TaqMan [®] 試薬には、非蛍光クエンチャー - マイナージェループバインダー (NFQ-MGB) をクエンチャーとして使用できます。SYBR [®] Green 試薬には、クエンチャーは使用しません。
	重要！ Applied Biosystems は、TAMRA [™] 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne [™] システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus [™] システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。
ケミストリ	試薬 をご参照ください。
コロケーション レイアウト	このシステムレイアウトでは、StepOne [™] または StepOnePlus [™] 装置を黄色いケーブルで、近接するコンピュータに直接接続します。このレイアウトでは、近接するコンピュータや装置のタッチスクリーンから StepOne [™] ソフトウェアによる装置のコントロールができます。
サーマルプロファイル	StepOne [™] または StepOnePlus [™] 装置測定のすべてのステップおよびステージにおける温度、時間、ランプ、データ収集ポイントを指定する測定方法の一部。
サイクリングステージ	サーマルプロファイル内で繰り返されるステージ。増幅ステージとも呼ばれます。サイクリングステージでは、AutoDelta 設定が可能です。 増幅ステージ をご参照ください。
サイクル閾値	Threshold cycle (C_T) をご参照ください。
サンプル	テストするテンプレート。
サンプル DNA (10×)	StepOne [™] ソフトウェアでは、この反応コンポーネントは、[Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面の [Reaction Mix Calculations] (反応ミックス計算) タブに表示されます。本ソフトウェアは、反応ミックスへの添加サンプル DNA が 10× 濃度であると仮定します。例えば、反応量 20 µL の場合、1 反応の計算サンプル量は 2 µL です。
サンプル／SNP アッセイ反応	ジェノタイピング実験の 1 つの PCR 反応でテストするサンプルと実施する SNP のアッセイの組み合わせ。各 PCR 反応には、サンプルと SNP の各 1 アッセイのみ含めることができます。
サンプル／ターゲット 反応	定量実験の 1 つの PCR 反応でテストするサンプルと実施する SNP のアッセイの組み合わせ。[Design Wizard] (設計ウィザード) で、1 回の PCR 反応には、1 つのターゲットのみ検出と定量ができます。[Advanced Setup] (高度なセットアップ) により、1 回の PCR 反応において、複数のターゲットの検出と定量ができます。

閾値

1. 増幅プロットでベースラインよりも高く、指数増幅領域内の蛍光レベル。閾値は、自動で（自動 C_T 参照）、また手動で（手動 C_T 参照）設定できます。
2. 有無実験で、StepOne™ ソフトウェアが検出コールを発信する蛍光レベル。

システム色素

Applied Biosystemsが製造し、StepOne™またはStepOnePlus™システムで事前キャリブレーションされている色素。実験にシステム色素を使用する前に、[Instrument Maintenance Manager]（装置メンテナンスマネージャ）でシステム Dye キャリブレーションが最新であることを確認してください。

StepOne システム用システム色素：

- FAM™ 色素
- JOE™ 色素
- ROX™ 色素
- SYBR® Green 色素
- VIC® 色素

StepOnePlus システム用システム色素：

- FAM™ 色素
- JOE™ 色素
- NED™ 色素
- ROX™ 色素
- SYBR® Green 色素
- TAMRA™ 色素
- VIC® 色素

重要！ Applied Biosystems は、TAMRA™ 色素をレポーターやクエンチャーとして StepOne™ システムで使うことはお勧めしません。TAMRA 色素は、StepOnePlus™ システムでレポーターやクエンチャーとして使えます。

実験

StepOne™ または StepOnePlus™ システムでの測定実施のプロセス全体を指し、セットアップ、測定、解析を含みます。StepOne and StepOnePlus システムを用いて実施できる実験のタイプ：

- 定量 - 標準曲線
- 定量 - 相対標準曲線
- 定量 - 比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- 融解曲線
- ジェノタイピング実験
- 有無実験

実験タイプ

StepOne™ または StepOnePlus™ システムを用いて実施できる実験のタイプ：

- 標準曲線法
- 比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$)
- 相対標準曲線法
- 融解曲線（[Design Wizard]（設計ウィザード）では使用できません）
- ジェノタイピング実験
- 有無実験

実験タイプの選択は、セットアップ、測定、解析の画面に影響します。

実験名

実験セットアップ時に入力する名前、実験の識別に使用します。実験名は 100 文字以内とし、下記の文字は使用できません。スラッシュ (/)、バックスラッシュ (\)、大なり記号 (>)、小なり記号 (<)、アスタリスク (*)、クエスチョンマーク (?)、引用符 (")、パー (|)、コロン (:)、セミコロン (;)

自動 C_T

この解析設定では、ソフトウェアが、増幅プロットのベースラインの開始および終了値や閾値を計算します。ソフトウェアは、ベースラインと閾値を使用して Threshold cycle (C_T) を計算します。Threshold cycle (C_T) をご参照ください。

自動ベースライン

この解析設定では、ソフトウェアが、増幅プロットのベースラインの開始および終了値を計算します。反応プレート中の特定のウェルに対して自動ベースライン設定を行えます。ベースラインをご参照ください。

試薬

ターゲット増幅と増幅検出に使用する PCR 反応コンポーネント。StepOne™ および StepOnePlus™ システムで使用する試薬のタイプ：

- TaqMan® 試薬
- SYBR® Green 試薬
- その他の試薬

手動 C_T

この解析設定では、ユーザーが閾値を入力し、自動ベースラインまたは手動ベースライン値のどちらかを選択します。ソフトウェアは、ベースラインと閾値を使用して Threshold cycle (C_T) を計算します。

手動ベースライン

この解析設定では、ユーザーが、増幅プロットのベースラインの開始および終了値を入力します。反応プレート中の特定のウェルに対して手動ベースライン設定を行えます。

シリーズ

スタンダード 希釈シリーズをご参照ください。

シリアル係数

StepOne™ ソフトウェアで、標準曲線における量のシーケンスを設定する数値。シリアル係数と開始量から、標準曲線の各ポイントのスタンダード量が計算されます。例えば、標準曲線の定義シリアル係数が 1:10 か 10× のときは、曲線での隣接 2 ポイント間の差は 10 倍です。

スタンダード	既知の標準量を含むサンプル。スタンダード反応は、定量実験で使用して標準曲線を作成します。 標準曲線 および スタンダード 希釈シリーズ をご参照ください。
スタンダード 希釈シリーズ	標準曲線および相対標準曲線実験で、ある範囲の既知量を含むスタンダードのセット。スタンダード希釈シリーズは、スタンダードを連続的に希釈して調製されます。例えば、スタンダード原液から第一希釈ポイントを調製し、第一希釈ポイントから第二希釈ポイントを調製します。スタンダード希釈シリーズの調製に必要な量は、StepOne™ ソフトウェアによって、希釈ポイント数、スタンダードの反復数、開始量、シリアル係数、スタンダード原液濃度から計算されます。 標準曲線 をご参照ください。
スタンドアロン レイアウト	このシステムレイアウトでは、StepOne™ または StepOnePlus™ 装置は、黄色いケーブルでコンピュータに接続されません。このレイアウトの場合、装置のコントロールは、装置のタッチスクリーンのみ可能です。USB ドライブやネットワーク接続により装置とコンピュータ間のデータ転送を行います。
ステージ	サーマルプロファイル内で、1 つ以上のステップを含むステージ。3 種類のステージがあります。ホールディングステージ（PCR 前の読み取りおよび PCR 後の読み取りを含む）、サイクリングステージ（増幅ステージとも呼ばれる）および融解曲線ステージです。
ステップ	サーマルプロファイルのコンポーネント。サーマルプロファイル中の各ステップでは、ランプ速度（融解曲線ステップのランプ増分）、ホールド温度、ホールド時間（時間幅）の設定ができ、ステップのランプまたはホールド部分に関しデータ収集をオンまたはオフに設定できます。サイクリングステージのステップは AutoDelta ステータスによっても定義されます。StepOnePlus™ システムには、VeriFlex™ ブロックが含まれており、各ステップで 6 種類の温度（各 VeriFlex ブロックに一つ）を設定できます。
生データプロット	各光学フィルタの（ノーマライズしていない）生の蛍光シグナルによるプロット。
ゾーン	StepOnePlus™ 装置での測定中、個別に熱制御可能な VeriFlex™ ブロックに設定できる、96 ウェル内の最高 6 つのサンプル温度領域の一つ。VeriFlex ブロックはそれぞれ異なる温度設定をすることも、すべての VeriFlex ブロックを同じ温度にすることも可能です。
	参考： 溶解曲線ステップでは、すべての VeriFlex ブロックを同じ温度に設定する必要があります。
ゾーン境界線	個別に熱制御可能な 6 つの VeriFlex™ ブロックによって形成されるサンプルのゾーンの境界。ゾーン境界線は、StepOne™ ソフトウェアのプレートレイアウトに濃赤色で表示されます。
相対標準曲線法	サンプル中ターゲットの相対量を決定する方法。相対標準曲線法では、StepOne™ ソフトウェアにより、サンプル、リファレンスサンプル、標準希釈シリーズ中に含まれるターゲットや内在性コントロールの増幅を測定します。測定結果は、内在性コントロールによりノーマライズされます。標準希釈シリーズのデータを使用して標準曲線を作成します。ソフトウェアは、標準曲線を用いて、サンプルおよびリファレンスサンプル中のターゲット量を外挿します。ソフトウェアは、各サンプル中のターゲット量とリファレンスサンプル中のターゲット量とを比較することにより、各サンプル中ターゲットの相対量を決定します。

増幅	装置での測定の一部で、PCR によりターゲットを増幅します。定量実験では、増幅時に収集した蛍光データを増幅プロット表示し、データを結果計算に使用します。ジェノタイピング実験や有無実験では、増幅時に収集した蛍光データを増幅プロット表示し、データを結果計算に使用することができます。
増幅効率 (EFF%)	PCR 増幅の効率計算。増幅効率は、標準曲線での回帰直線の傾きを使って計算します。傾きが -3.32 に近いとき、最適な 100% PCR 増幅効率を示します。増幅効率に影響する要因には、次のものがあります。 • 標準量の範囲 – より精密度・正確度の高い効率測定を行うには、広範囲の標準量すなわち $5 \sim 6 \log (10^5 \sim 10^6)$ をご使用ください。 • スタンダードの反復数 – 不正確な分注の影響を低減し、より正確な効率測定を行うためには、反復を行います。 • PCR 阻害剤 – 反応中の PCR 阻害剤により、増幅効率が低下し、効率測定に影響が生じる可能性があります。
増幅しないコントロール (NAC : No amplification control)	「ネガティブコントロールブロック済み IPC ウェル」参照。
増幅ステージ	装置での測定の一部で、PCR によりターゲットを増幅します。増幅ステージは、サーマルプロファイルのサイクリングステージとも呼ばれ、変性、プライマーのアニールリング、重合反応の各ステップを繰り返します。 定量実験では、増幅ステージで収集した蛍光データを増幅プロット表示し、データを結果計算に使用します。ジェノタイピング実験や有無実験では、増幅ステージで収集した蛍光データを増幅プロット表示し、データを結果計算に使用することができます。サイクリングステージをご参照ください。
増幅プロット	PCR 増幅のサイクリングステージで収集したデータの表示。以下の形で表示できます。 • ベースライン修正したノーマライズ済みレポーター (ΔR_n) 対サイクル • ノーマライズ済みレポーター (R_n) 対サイクル • Threshold cycle (C_T) 対ウェル
測定方法	StepOne™ または StepOnePlus™ 装置が実行する反応量とサーマルプロファイルの定義。
ターゲット	増幅および検出の対象となる核酸配列。
ターゲットカラー	StepOne™ システムで、ターゲットに割り当て、ターゲットをプレートレイアウトや解析プロットで同定する色。

タスク	StepOne™ ソフトウェアで、ターゲット／ SNP アッセイのウェルで実施する反応のタイプ。実施可能なタスク： • 未知のサンプル • ネガティブコントロール • スタンダード（標準曲線および相対標準曲線実験） • ポジティブコントロール（ジェノタイピング実験） • IPC（有無実験） • ブロック IPC（有無実験）
タッチスクリーン	StepOne™ または StepOnePlus™ 装置をコントロールするためにタッチする装置のディスプレイ。
定量方法	定量実験で、サンプルに含まれるターゲットの量を特定する方法。StepOne™ および StepOnePlus™ システムでは、3 種類の定量方法が可能です。標準曲線法、相対標準曲線法および比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 法。
テンプレート	StepOne™ ソフトウェアの [Design Wizard]（設定ウィザード）（および定量実験の [QuickStart]（クイックスタート））で、PCR 反応に追加する核酸の種類。推奨テンプレートは、実験タイプにより異なります。 • 定量実験（標準曲線法、相対標準曲線および比較 C_T 法）－ cDNA（相補 DNA）、RNA、gDNA（ゲノム DNA）。 定量実験では、テンプレートの選択により、測定方法、反応セットアップ、物品リストが変わります。 • ジェノタイピング実験－ 湿潤 DNA (gDNA もしくは cDNA) または乾燥 DNA (gDNA もしくは cDNA)。 ジェノタイピング実験では、テンプレートの選択により、反応セットアップが変わります。 • 有無実験－ DNA Applied Biosystems は、有無実験で、DNA テンプレートを PCR 反応に添加することをお勧めします。
テンプレートを含まないコントロール（NTC：No template control）	ネガティブコントロール（NC） をご参照ください。
データ収集	装置のコンポーネントが、反応プレートの各ウェルからの蛍光データを検出する装置の測定プロセス。装置が信号を電子データに変換し、データは実験ファイルに保存されます。StepOne™ システムでは、データ収集ポイントは、サーマルプロファイル内のアイコンで示されます。 • データ収集がオン： • データ収集がオフ：

内在性コントロール	実験中のすべての試験サンプルで、同様のレベルで発現すべきターゲットまたは遺伝子。相対標準曲線および比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 実験では、内在性コントロールを用いて定量中のターゲットの蛍光シグナルをノーマライズします。ハウスキーピング遺伝子は、内在性コントロールとして使用できます。 ハウスキーピング 遺伝子 をご参照ください。
内在性ポジティブコントロール (Internal positive control : IPC)	有無実験で、PCR 反応に添加する短い合成 DNA テンプレート。IPC を使用して、真の陰性結果（すなわち、サンプル中にターゲットが存在しない）と、PCR 阻害剤や不適切なアッセイセットアップ、試薬や装置の不具合が影響した反応とを区別できます。
ネガティブコントロール IPC ウェル	有無実験で、IPC テンプレートおよびバッファーまたは水をサンプルの代わりに含むウェル。ネガティブコントロール IPC ウェルでは、IPC テンプレートのみが増幅します。反応にサンプルが含まれないからです。別称「IPC+」。
ネガティブコントロール (NC)	StepOne™ ソフトウェアで、サンプルの代わりに水やバッファーを含むウェル内のターゲットや SNP アッセイに割り当てられるタスク。ターゲットの増幅は、ネガティブコントロールウェルでは起こりません。別称、「テンプレートを含まないコントロール (NTC : No template control)」。
ネガティブコントロールブロック済み IPC ウェル	有無実験で、PCR 反応のサンプルの代わりに IPC 遮断剤を含むウェル。増幅はネガティブコントロールブロック済み IPC ウェルでは起きません。反応にサンプルが含まれず、IPC の増幅が遮断されるからです。別称「増幅しないコントロール (NAC : No amplification control)」。
ノーマライズ済みレポーター (Rn)	パッシブリファレンスの蛍光信号にノーマライズした、レポーター色素からの蛍光信号。
ノーマライズ量	ターゲット量を内在性コントロールの量で除したものの。
ハウスキーピング遺伝子	細胞の基本的な機能に関与し構成的に発現する遺伝子。ハウスキーピング遺伝子は、内在性コントロールとして使用できます。 内在性コントロール をご参照ください。
パッシブリファレンス	蛍光シグナルを生成する色素。パッシブリファレンス信号はすべてのウェルで一定なので、レポーター色素信号をノーマライズし、わずかなウェル間の濃度や量の違いによる PCR に関連しない蛍光変動を補正するために使用されます。パッシブリファレンス信号への正規化により、データ精度が高まります。
反応ミックス	テンプレート（サンプル、スタンダード、またはコントロール）以外のすべての PCR 反応測定コンポーネントを含む溶液。
反復グループ	実験での同一反応のセット。
反復数	同一コンポーネントを同一量含む同一反応の総数。

比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 法	サンプル中ターゲットの相対量を決定する方法。比較 C_T ($\Delta\Delta C_T$) 法では、StepOne™ ソフトウェアにより、サンプルやリファレンスサンプル中のターゲットや内在性コントロールの増幅を測定します。測定結果は、内在性コントロールによりノーマライズされます。ソフトウェアは、各サンプル中のターゲット量とリファレンスサンプル中のノーマライズ済みターゲット量とを比較することにより、各サンプル中ターゲットの相対量を決定します。
非蛍光クエンチャー - マイナーグループバインダー (NFQ-MGB)	TaqMan® プローブの 3' 末端に結合する分子。プローブがインタクトな時は、非蛍光クエンチャー (NFQ) は、レポーター色素からの蛍光信号の放射を阻止します。NFQ は蛍光を出さないで、生成されるバックグラウンド信号は低く、その結果、定量精度が向上します。マイナーグループバインダー (MGB) は融解温度 (T_m) を上げますが、プローブ長は増えません。また、短いプローブも設計できます。
微分レポーター (-Rn')	PCR 増幅でレポーターが生成したノーマライズ済み蛍光シグナル強度の負の一次微分。微分レポーター (- Rn') vs 温度融解曲線では、ノーマライズした、微分レポーターシグナルは y 軸に表示されます。
標準曲線	標準曲線および相対標準曲線実験で： - 標準量に対してプロットしたスタンダード反応からの C_T 値のプロットで最も良くフィットするライン。「回帰直線」も参照。 - ある範囲の既知量を含むスタンダードのセット。標準曲線反応からのデータを使用して標準曲線を作成します。標準曲線は、希釈シリーズのポイント数、スタンダードの反復数、開始量、シリアル係数で定義されます。「スタンダード希釈シリーズ」も参照。
標準曲線法	サンプル中ターゲットの絶対量を決定する方法。標準曲線法では、StepOne™ ソフトウェアにより、サンプル、リファレンスサンプル、標準希釈シリーズ中に含まれるターゲットの増幅を測定します。標準希釈シリーズのデータを使用して標準曲線を作成します。ソフトウェアは、標準曲線を用いて、サンプル中ターゲットの絶対量を外挿します。 スタンダード および 標準曲線 をご参照ください。
標準量	PCR 反応での既知量。 - 標準曲線実験では、スタンダードにおけるターゲット量。StepOne™ ソフトウェアでは、標準量の単位は、質量、コピー数、ウイルス量、その他のターゲット量などの測定単位です。 - 相対標準曲線実験では、スタンダードにおける既知量。例えば、標準量は、cDNA 量や PCR 反応中の標準原液量などです。単位は相対標準曲線実験では無関係で、計算では無効です。
フォワードプライマー	アンプリコンの 5' 末端に隣接するオリゴヌクレオチド。PCR 反応ではリバースプライマーとフォワードプライマーを併用してターゲットを増幅します。
ブロックされた IPC	有無実験で、IPC 遮断剤 (内在性ポジティブコントロール、IPC の増幅を遮断する) を含む反応。StepOne™ ソフトウェアでは、IPC 遮断剤を含むウェル内の IPC ターゲットのタスク。 ネガティブコントロールブロック済み IPC ウェル をご参照ください。
プライマー/プローブ ミックス	ターゲット増幅用プライマーと、ターゲット増幅検出用 TaqMan® プローブからなる PCR 反応コンポーネント。

プライマーミックス	ターゲットを増幅するよう設計されたフォワードプライマーとリバースプライマーを含む PCR 反応コンポーネント。
プレートレイアウト	反応プレートのグリッドの各ウェルと、割り当てられた内容物の図。StepOne™ システムの場合、グリッドは 6 行 8 列です。StepOnePlus™ システムの場合、グリッドは 8 行 12 列です。 StepOne™ ソフトウェアでは、プレートレイアウトを選択ツールとして使用し、ウェル内容物を割り当てたり、ウェル割り当ての表示や結果の表示ができます。プレートレイアウトは、印刷、レポートへの表示、エクスポートや、プレゼンテーション用のスライドとしての保存ができます。
ベースライン	増幅プロットにおいて、蛍光シグナルの変化が小さい PCR 初期サイクル中の蛍光レベルに該当するライン。
ベースライン修正した ノーマライズ済み レポーター (ΔRn)	レポーターが生成したノーマライズ済み蛍光シグナルの強度。 - リアルタイム PCR データを含む実験では、PCR 増幅の各サイクルでレポーターが生成したノーマライズ済み蛍光シグナルの強度。ΔRn vs. Cycle 増幅プロットでは、各サイクルの ΔRn は次式により計算されます。 $\Delta Rn (\text{サイクル}) = Rn (\text{サイクル}) - Rn (\text{ベースライン})$ で、Rn = ノーマライズ済みレポーター。 - ジェノタイピング実験や有無実験では、ノーマライズしたレポーター蛍光シグナル値の、PCR 前読み取りと PCR 後読み取り間の差。アレル識別プロット（ジェノタイピング実験）や有無プロット（有無実験）では、ΔRn は、次式で計算します。 $\Delta Rn = Rn (\text{PCR 後読み取り}) - Rn (\text{PCR 前読み取り})$ で、Rn = ノーマライズ済みレポーター。 ノーマライズ済み レポーター (Rn) をご参照ください。
ホールディング ステージ	サーマルプロファイル内で、1 つ以上のステップを含むステージ。ホールディングステージは、酵素の活性化や不活性化、反応物の培養のためサーマルプロファイルに追加できます。
ポイント	標準曲線内の 1 つのスタンダード。標準曲線の各ポイントのスタンダード量は、開始量とシリアル係数に基づいて計算されます。
ポジティブコントロール	ジェノタイピング実験で、ジェノタイプが既知であるホモ接合性またはヘテロ接合性の DNA サンプル。StepOne™ ソフトウェアで、既知ジェノタイプのサンプルを含むウェル内の SNP アッセイに割り当てたタスク。
マルチコンポーネント プロット	指定したウェル内の各色素の全スペクトル構成を PCR 測定中表示するプロット。
未知 – IPC ウェル	有無実験で、未知のサンプルと内在性ポジティブコントロール (IPC) を含むウェル。

未知の	StepOne™ ソフトウェアで、テストするサンプルを含むウェル内のターゲットまたは SNP アッセイに割り当てたタスク。 - 定量実験では、ターゲット量不明のサンプルを含むウェル内のターゲット用のタスク。 - ジェノタイピング実験では、ジェノタイプが不明のサンプルを含むウェル内の SNP アッセイ用のタスク。 - 有無実験では、ターゲットの有無不明のサンプルを含むウェル内のターゲット用のタスク。
融解温度 (Tm)	融解曲線実験で、DNA の 50% が二本鎖であり、50% が一本鎖に解離する温度。Tm は溶解曲線に表示されます。
融解曲線	融解曲線ステージで収集したデータのプロット。融解曲線のピークはターゲットの融解温度 (Tm) を示す場合があります、非特異的 PCR 増幅を特定できる場合もあります。StepOne™ ソフトウェアでは、融解曲線は、ノーマライズ済みレポーター (Rn) 対温度か、微分レポーター (-Rn') 対温度で表示できます。別称「解離曲線」。
融解曲線ステージ	サーマルプロファイル内で、温度を段階的に上げて融解曲線を作成するステージ。
ランプ	装置実行時の温度変更レート。融解曲線ステップ以外では、ランプはパーセントで定義します。融解曲線ステップでは、ランプは温度増分で定義します。サーマルプロファイルのグラフィック表示では、ランプは対角線で示されます。
ランプ速度	装置実行中に発生する温度ランプの速度。使用できるランプ速度は Fast (高速) とスタンダードです。 - Fast ランプ速度により最適な結果を得るために、Applied Biosystems は、TaqMan® Fast 試薬を PCR 反応に使用することをお勧めします。 - 標準ランプ速度で最適な結果を得るためには、Applied Biosystems は、標準試薬を PCR 反応に使用することをお勧めします。
重要！ ジェノタイピングまたは有無実験では、TaqMan Fast 試薬は使用できません。	
リアルタイム PCR	PCR 時の蛍光データの収集プロセス。リアルタイム PCR データは、定量実験の結果計算や、ジェノタイピング／有無実験結果のトラブルシューティングに使用します。
リバースプライマー	アンプリコンの 3' 末端に隣接するオリゴヌクレオチド。PCR 反応ではリバースプライマーとフォワードプライマーを併用してターゲットを増幅します。
リファレンスサンプル	相対標準曲線および比較 C _T (ΔΔC _T) 実験で、相対定量結果の基礎とするサンプル。別称「キャリブレータ」。
量	定量実験でサンプルに含まれるターゲットの量。絶対量には、コピー数、質量、モル濃度、またはウイルス量があります。相対量は、サンプル中ノーマライズ済みターゲット量と、リファレンスサンプル中ノーマライズ済みターゲット量との発現差です。
レポーター	増幅を検出する蛍光色素。TaqMan® 試薬では、レポーター色素は 5' 末端に結合します。SYBR® Green 試薬では、レポーター色素は SYBR® Green 色素です。

数字

- 1 ステップ RT-PCR 7, 24, 32, 37
- 2 ステップ RT-PCR 7, 11, 24

A

- Advanced Setup (高度なセットアップ) 9, 10, 24, 30, 56, 116
- [Advanced Setup] (高度なセットアップ) 24
- [Amplification Plot] (増幅プロット) 画面
 - 測定後の表示 92
 - 測定中の監視 70
- AMPNC フラッグ 107
- Applied Biosystems
 - テクニカルサポート xii
 - 文書に関するユーザーのフィードバック xii
 - 問い合わせ xii
- Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System
 - 「StepOne システム」参照。

B

- BADROX フラッグ 107
- BLFAIL フラッグ 107

C

- CT 101
- CTFAIL フラッグ 107
- Custom assays 37

D

- Design Wizard (設計ウィザード)
 - [Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面 20
 - [Materials List] (物品リスト) 画面 38
 - [Methods & Materials] (方法と物品) 画面 22
 - [Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面 33
 - [Run Method] (測定方法) 画面 31
 - [Samples] (サンプル) 画面 29
 - [Standards] (スタンダード) 画面 27
 - [Targets] (ターゲット) 画面 25
 - 終了 42
 - ソフトウェアのエLEMENT 18

E

- EMC 規格 xxii
- [Experiment Properties] (実験プロパティ) 画面 20
- EXPFAIL フラッグ 107
- Export/Import (エクスポート/インポート) 10, 121

H

- HIGHSD フラッグ 107

I

- Inventoried アッセイ 37

M

- Made to Order アッセイ 37
- [Materials List] (物品リスト) 画面 38
- [Methods & Materials] (方法と物品) 画面 22
- MSDS
 - 説明 xviii
 - 入手 xviii
- MSDS, 入手 xii
- MTP フラッグ 107
- [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット)
 - 画面 109
- [Multiple Plots] (複数プロット) 画面 89

N

- NOAMP フラッグ 107
- NOISE フラッグ 107
- NOSIGNAL フラッグ 107

O

- OFFSCALE フラッグ 107
- OUTLIERRG フラッグ 107

Q

- [QC Summary] (QC サマリー) 画面 106
- QuickStart (クイックスタート) 117, 10

R

- [Raw Data Plot] (生データプロット) 画面 112
- [Reaction Setup] (反応セットアップ) 画面 33
- [Run Method] (測定方法) 画面 31
 - 測定中の監視 72
- Run Method ライブラリ 32

S

- [Samples] (サンプル) 画面 29
- SPIKE フラッグ 107
- [Standards] (スタンダード) 画面 27
- StepOne システム
 - 試薬 8
 - 消耗品 4
 - データ収集 2
 - フィルタ 3, 113
 - レイアウト 65, 69, 76
- SYBR Green 試薬 3, 8, 24, 26, 37, 113

T

- TaqMan 試薬 3, 8, 23, 24, 26, 37, 113

[Targets] (ターゲット) 画面 25
[Temperature Plot] (温度プロット) 画面 71
Template (テンプレート) 119
THOLDFAIL フラッグ 107

W

Well Table (ウェルテーブル) 99

あ

安全上のマーク、装置 xv
安全上のラベル、装置 xvi
安全性
移動／持ち上げ xvii
ガイドライン xviii, xix, xx
化学廃棄物 xix
規格 xxii
繰り返し動作 xxii
装置の移動と持ち上げ xvii
装置の操作 xvii
装置の操作前 xvii
電気 xx
人間工学 xxii
バイオハザード xxi
表記法 xiii
薬品 xviii
ワークステーション xxii
安全性規格 xxii

い

域外値。「ウェルの選択削除」参照。
一般的な xxi
移動と持ち上げ、安全性 xvii

う

ウェル
削除 108
スタンダード 29, 42, 53
選択 88
ネガティブコントロール 29, 42, 53
未知の 29, 42, 53
ウェル削除 108
ウェルの選択 88

お

オンラインヘルプ。「ヘルプシステム」参照。

か

解析画面
[Amplification Plot] (増幅プロット) 画面 92
[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面 109
[Multiple Plots] (複数プロット) 画面 89
[QC Summary] (QC サマリー) 画面 106
[Raw Data Plot] (生データプロット) 画面 112
[Standard Curve] (標準曲線) 画面 90
Well Table (ウェルテーブル) 99
ソフトウェアの要素 85
ナビゲーションのヒント 88

解析設定
CT 105
閾値 105
詳細 105
表示 104
フラッグ 105
ベースライン 105
ガイドライン
解析 85, 92, 96, 101, 105, 107, 109, 111, 113
化学廃棄物に関する安全性 xix
化学廃棄物の廃棄 xix
準備 48, 50, 52, 56
設計 21, 23, 26, 28, 30, 32, 37, 41, 44
測定 64
薬品に関する安全性 xviii
化学廃棄物に関する安全性 xix
過電圧カテゴリ (定格) xxi

き

規格
EMC xxii
安全性 xxii
「危険アイコン」の「安全上のマーク」参照。
危険。「安全性」参照。
危険、説明 xiii
危険マーク。「安全上のマーク、装置」の「危険アイコン」参照。

く

繰り返し動作、安全性 xxii

け

警告、説明 xiii
結果、解釈 83

こ

コロケーションレイアウト
監視 69
スタートアップ 65
データの転送 77

さ

サンプル
希釈液 47
サンプル反応液 (未知) 55
設計ガイドライン 30
セットアップ 29
サンプル希釈液
準備 47
容量計算値 36, 47

し

閾値
手動で調整 105
正しい数値 96
例 97
実験の解析
[Amplification Plot] (増幅プロット) 画面 92
[Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面 109

- [Multiple Plots] (複数プロット) 画面の表示 89
- [QC Summary] (QC サマリー) 画面の表示 106
- [Raw Data Plot] (生データプロット) 画面の表示 112
- [Standard Curve] (標準曲線) 画面の表示 90
- [Well Table] (ウェルテーブル) の表示 99
- ウェル削除 108
- 解析 84
- 解析設定の表示 104
- ガイドライン 85, 92, 96, 101, 105, 107, 109, 111, 113
- 詳細について 92, 98, 101, 105, 107, 109, 111, 113
- データのパブリッシュ 102
- ワークフロー 82
- 実験の準備
 - ガイドライン 48, 50, 52, 56
 - サンプル希釈液 47
 - 詳細について 48, 53, 57
 - スタンダード希釈シリーズ 49
 - 反応プレート 53
 - 反応ミックス
 - 準備 51
 - ワークフロー 46
- 実験の設計
 - [Design Wizard] (設計ウィザード) の終了 42
 - ガイドライン 21, 23, 26, 28, 30, 32, 37, 41, 44
 - サンプルのセットアップ 29
 - 実験プロパティの定義 20
 - 詳細について 22, 24, 26, 28, 31, 33, 38, 41, 44
 - 新規作成 17
 - スタンダードのセットアップ 27
 - 測定方法のセットアップ 31
 - ソフトウェアの要素 18
 - ターゲットのセットアップ 25
 - 反応セットアップの確認 33
 - 物品の注文 38
 - 方法と物品の定義 22
 - ワークフロー 16
- 実験の測定
 - 開始 65
 - ガイドライン 64
 - 監視 69
 - 警告 72
 - 詳細について 63, 72, 73
 - 通知設定の有効化 63
 - データの転送 76
- 実験例
 - 解析 82
 - 準備 46
 - 設計 16
 - 説明 10
 - 測定 60
 - データ 12
 - データの場所 12
 - 名称 20
 - ワークフロー 13
- 試薬
 - SYBR Green 8
 - TaqMan 8
 - その他の蛍光ベース 9
- 消耗品
 - 使用可能な 4
 - 「必要な物品」も参照。 4
- 新規実験の作成 17
- シングルプレックス PCR 6, 24

す

スタンダード

[Set Up Standards] (スタンダードのセットアップ)
 チェックボックス 25, 26

希釈 49

実験のコンポーネント 6

スタンダード反応 55

設計ガイドライン 28

セットアップ 27

スタンダード希釈シリーズ

実験のコンポーネント 6

準備 49

容量計算値 35

スタンドアロンレイアウト

Remote Monitor (遠隔監視) 73

遠隔データ転送 77

監視 75

スタートアップ 66

データの転送 78

せ

設置カテゴリ xxi

そ

装置の操作、安全性 xvii

増幅効率 28, 92

増幅プロット、典型的 96

測定の開始

コロケーションレイアウト 65

スタンドアロンレイアウト 66

測定の監視

[Amplification Plot] (増幅プロット) 画面 70

[Run Method] (測定方法) 画面 72

[Temperature Plot] (温度プロット) 画面 71

コロケーションレイアウト 69

スタンドアロンレイアウト 75

スタンドアロンレイアウト (リモート) 73

測定の実施

準備 61

ワークフロー 60

測定の準備 61

その他の蛍光ベース試薬 9

ソフトウェアの要素

Design Wizard (設計ウィザード) 18

解析画面 85

た

ターゲット

設計ガイドライン 26

セットアップ 25

代替実験ワークフロー。「ワークフロー」参照。

ち

注意、説明 xiii

つ

通知設定 63

て

データ
 実験例 9, 84
 データ収集について 2
 転送 76
 パブリッシュ 102
データの転送 76
データのパブリッシュ 102
テキスト表記法 viii
テクニカルサポート、問い合わせ xii
電気に関する安全性 xx
電磁環境適合性規格。「EMC 規格」参照。
テンプレート 10
テンプレート。「サンプル」参照。

と

トラブルシューティング
 [Multicomponent Plot] (マルチコンポーネントプロット) 画面の表示 109
 [QC Summary] (QC サマリー) 画面の表示 106
 [Raw Data Plot] (生データプロット) 画面の表示 112
 ウェル削除 108
 解析設定の表示 104
 閾値の調整 105
 フラッグ 107
 ベースラインの調整 105
トレーニング、情報 xii

な

ナビゲーションのヒント
 ウェルの選択 88
 複数プロット表示 89

に

人間工学、安全性 xxii

ね

ネガティブコントロール、実験のコンポーネント 6

は

バイオハザード廃棄物、取扱い xx
廃棄物の廃棄、ガイドライン xx
廃棄物プロファイル、説明 xx
反応セットアップ手順の印刷 36
反応プレート
 準備 53
 装置からの取り出し 76
 レイアウト 42
 ロード 62
反応プレートのロード 62
反応ミックス
 容量 51
 容量計算値 34
反復、実験のコンポーネント 6

ひ

必要な物品 47, 49, 51, 54
標準曲線実験
 説明 6
標準偏差、Threshold の影響 97

ふ

物品の注文 38
フラッグ 101
 解析設定 105
 標準曲線実験で 107
プレートの取り出し 76
文書、関連 ix

へ

ベースライン
 手動で調整 105
 正しい数値 96
 例 98
ヘルプシステム、アクセス xi
偏差、標準 97

ほ

放射性廃棄物、取扱い xx
本ガイドを使用する際の前提 viii
本書で使用する表記法 viii
本書の使用
 実際の実験に 9
 チュートリアルとして 9

ま

マーク、安全上の xv
マルチプレックス PCR 6, 24

や

薬品に関する安全性 xviii

ゆ

ユーザーの注意を促す語句、説明 viii
ユーザーのフィードバック、Applied Biosystems の文書に
 関する xii

ら

ライブラリ 32
ランプ速度 22, 24

わ

ワークステーションに関する安全性 xxii
ワークフロー
 Advanced Setup (高度なセットアップ) 116
 Export/Import (エクスポート／インポート) 10, 121
 QuickStart (クイックスタート) 117, 10
 Template (テンプレート) 119
 実験例 13
 テンプレート 10

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at www.appliedbiosystems.com.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

Headquarters

850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

お問い合わせ先

本社：

〒 104-0032
東京都中央区八丁堀 4-5-4
TEL. 03 (5566) 6100 FAX. 03 (5566) 6501

大阪：

〒 564-0052
大阪府吹田市広芝町 10-28
TEL. 06 (6389) 1201 FAX. 06 (6389) 1206

06/2010

