



CFX Maestro™ ソフトウェア
ユーザーガイド
バージョン 1.0

CFX Maestro™ ソフトウェア

ユーザーガイド

バージョン 1.0

バイオ・ラッド テックコール

製品の学術的お問い合わせ並びに修理・メンテナンスに関するお問い合わせは弊社テックコールにお問い合わせください。

受付時間:月曜日～金曜日(祝祭日を除く)

AM9:00～PM5:00

電話: 03-6404-0331

Fax: 03-6404-0334

Email: life_ps_jp@bio-rad.com

以下の Web でオンラインでのテクニカルサポート並びに製品情報等をご参照頂けます。

Web: www.bio-rad.com.

日本以外での技術サポートについては、お近くのテクニカルサポート事務所までお問い合わせください。

注意

本書の内容は、電子形態、または印刷、記録、またはあらゆる情報記憶または検索システムを含む機械的形態のいかなる形式または手段によっても、バイオ・ラッド社の書面による許可なしに複製や送信することを禁じます。

バイオ・ラッド社は、製品およびサービスをいつでも修正する権利を留保します。本ユーザーガイドは予告なしに変更されることがあります。精度を保証する態勢は整っていますが、バイオ・ラッド社は誤記や脱落、または本情報の適用または使用により生じるいかなる損害について一切の責任を負いません。

以下は、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社の登録商標です: Bio-Rad、CFX Maestro、CFX384、CFX384 Touch、CFX96 Touch、CFX Connect、C1000 Touch および iProof と iTaq。

Adobe、Acrobat、および Reader は Adobe Systems Incorporated 社の商標です。Cy は GE Healthcare グループ企業の商標です。CAL Fluor および Quasar は Biosearch Technologies, Inc.社の商標です。SYBR および Texas Red は Life Technologies 社の商標です。バイオ・ラッド ラボラトリーズ社は、研究目的のみでリアルタイム PCR に使用する SYBR Green を含有する試薬を販売するため、Life Technologies 社の認可を受けています。Excel、Microsoft、PowerPoint、および Windows は、Microsoft 社の商標です。Pentium は Intel 社の商標です。EvaGreen は Biotium, Inc.社の商標です。FAM、ROX および VIC は Applera 社の商標です。バイオ・ラッド ラボラトリーズ社は、研究目的のみでリアルタイム PCR に使用する EvaGreen 色素を含有する試薬を販売するため、Applera 社の認可を受けています。

バイオ・ラッド社のサーマルサイクラーとリアルタイムシステムは、1つ以上の以下の米国特許または Eppendorf AG: 米国特許番号 6,767,512 および 7,074,367 によって所有される外国語の複製の適用を受けます。

Hard-Shell プレートは、1つ以上の以下の米国特許または Eppendorf AG: 米国特許番号 7,347,979; 6,340,589; および 6,528,302 によって所有される外国語の複製の適用を受けます。

Copyright©2017 Bio-Rad Laboratories, Inc. 無断複写・転載を禁じます。

本書の内容は、印刷または電子形態などのいかなる形式によっても、バイオ・ラッド・ラボラトリー株式会社書面による許可なしに複製することを禁じます。

マニュアルの内容は予告なしに変更されることがあります。また、本マニュアルに誤記や不正確な記述があった場合、バイオ・ラッドラボラトリーズはいかなる責任も負いません

目次

製品を安全にご使用いただくために	11
安全確保のための警告表示	11
標準的な安全性に関する警告	11
機器安全性に関する警告	12
安全にご使用頂くための注意事項	13
安全規格への順守	13
危険性	14
バイオハザード	14
化学物質的危険	15
爆発または燃焼性の危険	15
電氣的危険	15
輸送	16
保管	16
廃棄	16
第1章 はじめに	17
CFX Maestro ソフトウェアの主な特徴	18
もっとよく知るには	18
第2章 CFX Maestro ソフトウェアのインストール	19
システムの使用条件	20
CFX Maestro ソフトウェアのインストール	21
接続機器の検出	22
ソフトウェアファイル	23
第3章 ワークスペース	25
Home ウィンドウ	26
Startup Wizard	27
Protocol Editor ウィンドウ	28
Plate Editor ウィンドウ	29
Data Analysis ウィンドウ	30
第4章 Home ウィンドウ	31
Home ウィンドウ	32
File メニューコマンド	33
View メニューコマンド	33
User メニューコマンド	34
Run メニューコマンド	34
Tools メニューコマンド	35
Help メニューコマンド	35
Toolbar コマンド	36
Startup Wizard	37
ステータスバー	37
Detected Instruments ペイン	38
機器の特性を表示	42

はじめる前に.....	44
ソフトウェアと機器のアップデート	44
User Preferences の設定	45
マスターミックス反応液の調製	59
新しい色素のキャリブレーション.....	61
第5章 プロトコールの作成	65
Protocol Editor ウィンドウ	66
File メニューコマンド.....	66
Settings メニューコマンド.....	66
Tools メニューコマンド	67
Toolbar コマンド.....	67
プロトコール編集用コントロールボタン	68
Protocol Editor でプロトコールを作成	70
Protocol Editor で新しいプロトコールファイルを開く	70
Protocol Editor で既存のプロトコールを開く	71
新しいプロトコールの設定	72
プロトコールへのステップの追加.....	74
グラジェントステップを挿入.....	74
GOTO ステップを挿入.....	75
融解曲線ステップを挿入.....	76
プレートリードステップの追加または削除	77
ステップオプションの変更	77
ステップの削除	77
プロトコールのコピー、エクスポート、または印刷.....	78
Protocol AutoWriter を使用したプロトコールの作成.....	79
T _a Calculator の使用.....	82
T _a Calculator について.....	82
第6章 プレートの作製	87
Plate Editor ウィンドウ	88
File メニューコマンド.....	88
Edit メニューコマンド.....	88
Settings メニューコマンド.....	89
Editing Tools メニューコマンド	89
Plate Editor ツールバーコマンド.....	89
Plate Editor を使用したプレートファイルの作成	91
Plate Editor で新しいプレートファイルを開く	91
Plate Editor で既存のプレートファイルを開く	92
新しいプレートファイルの設定	93
プレートファイルへのオプションのパラメータの割り当て.....	99
ウェルへのターゲットの割り当て.....	99
ウェルへのサンプル名の割り当て.....	101
ウェルへの生物学的グループの割り当て	102
ウェルへの技術リプリケート番号の割り当て	104

標準サンプルタイプへの希釈系列の割り当て	106
別のウェルへのウェル内容の複製	107
ウェルへのメモの追加	107
ウェルからすべての内容を消去	108
Experiment Settings の変更	109
ウェルグループの作成	111
トレーススタイルの変更	113
スプレッドシートフォーマットで表示	114
Setup Wizard を使用したプレートレイアウトの作成	116
Setup Wizard の使用	116
第7章 実験のラン	119
Run Setup ウィンドウ	120
Run Setup ウィンドウへのアクセス	121
Protocol タブ	121
Plate タブ	123
Start Run タブ	125
実験のラン実行	126
Run Details ダイアログボックス	128
Run Status タブ	128
Real-time Status タブ	130
Time Status タブ	132
PrimePCR 実験の実施	133
解析用のスタンドアロンデータの転送	134
CFX Maestro ソフトウェアを介した転送	134
Eメールを介した転送	134
USB ドライブを使用したデータ転送	134
データファイルの作成	135
第8章 データ解析について	137
Data Analysis ウィンドウ	137
Data Analysis ツールバー	138
Data Analysis メニューバー	138
タブの詳細	140
Step Number (ステップ番号) セレクター	141
Data Analysis ウィンドウでのウェルグループの表示	141
ラン実行後のウェル内容の変更	141
データ解析設定	142
閾値の調整	142
ベースラインの設定	142
解析モード	143
解析するサイクル数	144
ウェルセレクター	145
ウェルセレクターの右クリックメニュー項目	146
解析からの一時的なウェルの除外	146

グラフ	147
グラフのツール	147
グラフを拡大	153
Microsoft ファイルへのグラフのコピー	154
グラフの共通右クリックメニュー項目	154
スプレッドシート	155
スプレッドシートの共通右クリックメニュー項目	155
エクスポート	156
Export All Data Sheets to Excel (すべてのデータシートを Excel にエクスポート)	156
Export RFML Files (RDML ファイルのエクスポート)	156
カスタムエクスポート	157
LIMS フォルダへのエクスポート	157
第9章 データ解析の詳細	159
Quantification タブ	160
蛍光色素のオプション	160
トレーススタイル	161
対数スケールのオプション	162
検量線グラフ	163
Amplification グラフのメニューオプション	164
Quantification タブのスプレッドシート	164
Quantification Data タブ	165
Results スプレッドシート	165
Standard Curve Results スプレッドシート	166
Plate スプレッドシート	167
RFU スプレッドシート	168
Melt Curve タブ	169
Melt Curve Data タブ	171
Melt Peaks スプレッドシート	171
Plate スプレッドシート	172
RFU スプレッドシート	173
-d(RFU)/dT スプレッドシート	173
End Point タブ	174
Results (結果) データ	175
エンドポイントデータ解析の調整	175
エンドポイント解析用の RFU スプレッドシート	176
Allelic Discrimination (対立遺伝子識別) タブ	177
対立遺伝子識別データの調整	178
グラフのメニューオプション	179
Allelic Discrimination (対立遺伝子識別) スプレッドシート	179
Custom Data View タブ	180
QC タブ	181
QC 基準の変更	181
QC 不合格のウェルの排除	181

Run Information (ラン情報) タブ	182
データ解析レポート	183
データ解析レポートの作成	184
データ解析レポートのカテゴリ	185
ウェルグループのレポート	187
第 10 章 遺伝子発現解析	189
遺伝子発現解析用のプレート設定	190
プレート設定ガイド	190
遺伝子発現グラフ	191
グラフ化	192
グラフ表示の変更および注釈	194
遺伝子発現データの調整	199
Experiment Settings (実験の設定)	202
右クリックメニューのオプション	203
データスプレッドシート	204
Show Details (詳細情報の表示) オプション	205
クラスタグラム	206
設定	206
右クリックメニューオプション	206
データスプレッドシート	206
散布図	207
設定	207
右クリックメニューオプション	207
データスプレッドシート	207
Volcano プロット	208
設定	208
右クリックメニューオプション	208
データスプレッドシート	208
ヒートマップ	209
設定	209
右クリックメニューオプション	209
データスプレッドシート	209
Well Results (ウェル結果) スプレッドシート	210
ANOVA 計算	211
設定	212
結果の表	213
右クリックメニューオプション	215
Gene Study (Gene Study)	216
インターランキャリブレーション	216
Gene Study ダイアログボックス	217
Study Setup (研究設定) タブ	217
Gene Study の作成	218
Study Analysis (研究解析) タブ	218

Gene Study レポート	219
Gene Study レポートのカテゴリ	220
付録 A データ解析の計算	223
P 値	223
P 値の結果の差異	224
反応効率	225
相対量	225
対照を選択した場合の相対量	226
相対量の標準偏差	226
効率校正 C_q (C_{qE})	226
平均効率校正 C_q (MC_{qE})	227
正規化係数	227
正規化発現	227
平均発現	228
対照選択時の正規化発現	229
正規化発現の標準偏差	229
平均発現の標準偏差	230
平均発現の平均標準誤差	230
最高発現レベルに基準化した正規化発現	231
最低発現レベルで基準化した正規化発現	231
平均発現レベルで基準化した正規化発現	231
基準化した正規化発現の標準偏差	232
レギュレーション	232
補正値の計算式	233
付録 B CFX Maestro のユーザーおよび役割の管理	235
ユーザーの管理	236
ユーザーの追加および削除	236
役割の権限の管理	237
CFX Maestro ソフトウェアへのログイン	238
ユーザーの変更	238
ユーザーパスワードの変更	239
役割と権限を表示	239
付録 C LIMS 統合	241
LIMS 互換データファイルの作成	241
LIMS フォルダおよびデータエクスポートオプションの設定	241
LIMS プロトコールの作成	242
LIMS ファイルの作成	243
LIMS ランの開始	245
LIMS へのデータのエクスポート	246
付録 D CFX Maestro ソフトウェアの接続問題に関するトラブルシューティング	247
アプリケーションログ	247
トラブルシューティング	248
電源トラブル	248

USB フラッシュドライブへのデータファイルのリカバリー	249
CFX Maestro コンピュータへのファイルの回収	249
CFX Maestro ソフトウェアの手動インストール	249
ドライバの再インストール	250
付録 E References	251

製品を安全にご使用いただくために




C1000™ Touch、CFX96 Touch™、CFX96 Touch™ Deep Well、CFX Connect™、CFX384™ Touchの各システムを安全にお使いいただくため、本節および本書中に記載する安全仕様を順守することを強くお勧めします。

安全確保のための警告表示

機器本体および本書に表示される警告表示は、使用者に感電の危険性といった傷害または損害の原因について警告するためのイラストです。表 1 に、安全性に関する警告マークを説明します。

標準的な安全性に関する警告





表 1 安全性に関する警告表示の意味

アイコン	説明
	注意：バイオハザード! このマークは、バイオハザード物質に汚染されている可能性があるコンポーネントを示しています。
	注意：危険のおそれあり! このマークは、正しく取り扱わなかった場合に、使用者に傷害が生じるおそれのある機器部分を示します。このマークが表示される場合は、必ず本書を読んで内容をよく確認したうえで操作を進めてください。
	注意：表面が加熱されている! このマークは、正しく取り扱わなかった場合、加熱した機器によって使用者に傷害が生じるおそれのある機器部分を示します。

機器安全性に関する警告

表2に示す警告ラベルも機器に表示されるものであり、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各システムの安全使用に直接関係します。

表2 機器の安全性に関する警告マーク

アイコン	説明
	人体や機器本体に傷害を与えるおそれがあることの警告 本書の解説を読まずに CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect または CFX384 Touch リアルタイム PCR 解析システムを操作すると、使用者が傷害を受けるおそれがあります。安全に使用するため、本書に記載されていない方法によって機器を操作しないでください。電気機器を安全に使用するための研修を受け、正式な承認を得ている研究スタッフが本機器を使用してください。本機器の各部品については、手指を洗浄して水気を十分に拭き取ったうえで、丁寧に取り扱いってください。
	バイオハザード物質の取り扱いについての警告 バイオハザードサンプルを取り扱う際、推奨される注意事項やガイドラインに従うことと、実験室および施設に固有のローカルなガイドラインに準拠してください。
	火傷リスクの警告 サーマルサイクラーを操作すると、重度の火傷を生じるほどに加熱されます。操作時は、必ず保護用ゴーグルやそれに準じる眼部保護用具を装着してください。サンプルブロックの温度が十分に下がっていることを確認したうえで、リッドを開け、サンプルを取り出してください。火傷を避けるため、非操作時には本機器から十分離れてください。
	爆発リスクの警告 サンプルブロックは、その正常な操作によってサンプル液体を沸騰・爆発させる程度まで加熱させることが可能となります。

注意： C1000 Touch サーマルサイクラーの取り扱い方法については、C1000 Touch サーマルサイクラーおよび CFX リアルタイム PCR 解析システムの取扱説明書を参照してください。

安全にご使用頂くための注意事項

表 3 に、C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムを安全に使用していただくための動作環境条件を示します。クラス A FCC 規制に準拠するため、同梱のシールドケーブルを必ず使用してください。

表 3 安全にご使用いただくための動作環境条件

安全な使用要件	仕様
使用温度	屋内使用のみ。環境温度は 15～31 °C。最大相対湿度は 80 %（ただし結露のないこと）
高度	2,000 m 以下

* 注意: 本ユニットを水がかかる可能性のある場所に保管したり、使用したりしないでください。感電の原因となることがあります。またユニットを、実験台の端で保管したり、使用したりしないでください

安全規格への順守

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは、以下に記載する安全性および電磁場に関する基準の該当要件に適合していることが試験により確認されています。

- IEC 61010-1:2001（第 2 版）、EN61010-1:2001.（第 2 版）. 測定、制御および研究室用電気機器、第 1 部：一般的要求事項。
- IEC 61010-2-010:2005, EN61010-2-010:2003. 測定、制御および研究室用電気機器に関する安全性要件、第 2 部-010：材料加熱用実験機器に関する特別要求事項。
- EC 61010-2-081:2001+A1, EN61010-2-081:2002+A1. 測定、制御および研究室用電気機器に関する安全性要件、第 2 部-081：分析用および他目的用の自動および半自動実験機器に関する特別要求事項（改訂 1 を含む）。
- EN 61326-1:2006（クラス A）. 測定、制御および研究室用電気機器. EMC 要求事項、第 1 部：一般的要求事項。

前記の安全性と電磁場に関する基準に加え、CFX Connect システムについては、測定、制御および研究室用電気機器に関する安全要件、第 2 部-101：体外診断用（IVD）医療機器に関する特別要求事項に準拠することが、試験により確認されています。

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは、高周波エネルギーを発生し、それを使用し、放出することを可能とする機器であるため、本取扱説明書の記載事項に準拠して設置・使用されない場合には、無線通信において有害な干渉を生じるおそれがあります。一般住宅地域で本システムを稼働させた場合には、有害な干渉を生じる可能性が高く、その場合には、使用者が自費によってその干渉を補正しなければなりません。

危険性

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch リアルタイム PCR 解析の各システムは、製造業者によって規定された方法で使用したときに、安全に動作するように設計されています。C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムまたはその関連コンポーネントのいずれかを製造業者が指定した以外の方法で使用されている場合は、機器によって提供される固有の保護機能が損なわれる可能性があります。バイオ・ラッド ラボラトリーズ社は、指定しない方法でのこの装置の使用によるいかなる怪我、またはバイオ・ラッド社または認定代理店によって行われていない機器への改造によって生じた損害について責任を負うものではありません。C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムに関わる修理サービスは、バイオ・ラッド担当者が実施する必要があります。

バイオハザード

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは研究室向けの製品です。バイオハザードのサンプルが存在する場合、次のガイドラインに従って、そして研究室や施設に固有のローカルなガイドラインに準拠してください。

注意： バイオハザード物質は、本機器の通常運転中に一切排出されません。

一般的な予防策

- 常に実験用白衣、実験用手袋、横がシールされた安全グラスまたはゴーグルを着用する。
- 手は口、鼻、目に触れないようにする。
- 潜在的な感染性物質を扱う前に、切り傷や擦り傷は保護しておく。
- 潜在的な感染性物質を扱った後、実験室を出る前に石鹸と水でよく手を洗う。
- ベンチで作業する前に、腕時計や宝飾品をはずす。
- 割れない漏れ防止のコンテナ内ですべての感染性物質、潜在的な感染性物質を保管する。
- 実験室を離れる前に、保護服は脱ぐ。
- 手袋をつけた手で、書いたり、電話に出たり、ライトのスイッチをつけたり、他の誰かが手袋無しで触る可能性のあるものに触らないようにする。
- 手袋は頻繁に変える。手袋が目に見えて汚染されているときには、すぐに手袋をはずす。
- 潜在的な感染性物質として適切に汚染除去できない物質は露出させない。
- バイオハザード物質が関与する操作が完了したら、適切な消毒剤で作業領域を除染する（例えば、1:10 希釈の市販漂白剤）。

表面の汚染

警告! 感電事故を防ぐために、常に汚染除去の手順を実行する前には機器の電源をオフにして電源コードを抜いてください。

次の部分は、病院用殺菌剤、殺ウイルス剤、または殺菌消毒剤で洗浄することができます。

- リッドと本体の外部
- 内部のリアクションブロック表面とリアクションブロックのウェル
- コントロールパネルとディスプレイ

消毒剤の準備し、適用するには、製品の製造業者が提供する手順を参照してください。常に消毒剤を適用した後のリアクションブロックとリアクションブロックのウェルは水で数回すすいでください。徹底的に水で洗浄した後、リアクションブロックとリアクションブロックのウェルを乾燥させます。

警告! 研磨剤や腐食性の洗剤または、強いアルカリ性溶液を使用しないでください。これらの溶液は、表面に傷を付けると正確な熱制御が失われるような損傷をリアクションブロックに与える可能性があります。

バイオハザード物質の廃棄

以下に示す潜在的な汚染物質の廃棄は研究室、地域、そして国内の規制に準拠してください。

- 臨床サンプル
- 試薬
- 使用した汚染されている可能性がある反応容器または他の消耗品

化学物質的危険

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは、潜在的な化学物質を含んでいません。

爆発または燃焼性の危険

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社で指定された適切な方法で使用される限り、可燃性または爆発に関する一切の異常な危険をもたらすものではありません。

電氣的危険

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムが物理的な改良を加えることなく、適切な仕様の電源に接続されていて、適切に設置、操作されている場合には、異常な電氣的危険をもたらすものではありません。

製品を安全にご使用いただくために

輸送

C1000 Touch、CFX Connect サーマルサイクラー、CFX96、CFX96 Deep Well、CFX Connect、CFX384 オプティカルリアクションモジュールを移動または出荷する前に、汚染除去の作業を実施する必要があります。C1000 Touch または CFX Connect サーマルサイクラー本体と、CFX96、CFX96 Deep Well、CFX Connect または CFX384 オプティカルリアクションモジュールを別々の容器で付属の梱包材で常に損傷から機器を保護して、移動または輸送してください。適切な容器が見つからない場合には、お近くのバイオ・ラッドの営業所にお問い合わせください。

保管

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムは、以下の条件下で保管してください。

- 温度範囲：-20～60 °C
- 相対湿度：最大 80 %

廃棄

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch リアルタイム PCR 解析の各システムは電氣的物質を含んでいます。European Union Directive 2002/96/CE on waste and electronic equipment (WEEE Directive)に従って、それは分別廃棄物として処分されるべきであり、別々に収集する必要があります。廃棄する前に、国固有の指示についてお近くのバイオ・ラッド代理店にお問い合わせください。

第1章 はじめに

バイオ・ラッド社の高性能 PCR 増幅システムは最新の技術を利用し、ゲノム実験のための核酸増幅の精度と再現性を高めます。バイオ・ラッド社の PCR 製品ラインは、リアルタイム PCR システムと従来型の PCR システムを含んでいます。

リアルタイム PCR システム

- C1000 Touch™
- CFX96 Touch™
- CFX384 Touch™
- CFX Connect™
- CFX96 Touch™ Deep Well
- CFX Automation System II

従来型 PCR システム

- C1000™
- S1000™

バイオ・ラッド社の CFX Maestro™ ソフトウェアは、すべての CFX システムと互換性があり、バイオ・ラッド社の Prime PCR™ プライマーとプローブアッセイ用に最適化されたランファイルを取り込みことができるという特長を有しています。

CFX Maestro ソフトウェアを使用すれば、複雑なデータを理解して遺伝子解析に関する説得力のある分析を行うことができます。t-test、一元配置および二元配置 ANOVA、PrimePCR 解析、およびリファレンス遺伝子セレクターツールなどのツールを使用すれば、各種方法で遺伝子発現実験を解析することが可能です。

CFX Maestro ソフトウェアの主な特徴

CFX Maestro ソフトウェアを使用すれば、以下を行うことが可能です。

- スタートアップウィザードを使用して、リアルタイム PCR 実験を迅速かつ容易に設定する。
- 棒グラフ、クラスター解析図、散布図、Volcano プロット、またはヒートマップを使用してデータを解析し、結果を素早く解釈・理解する。
- データ表示をカスタマイズして、発行物やレポートの作成用に高解像度のグラフをエクスポートする。
- PrimePCR 解析コントロールで、RNA の品質を判定し、実験の問題を解決する。
- 適切なリファレンス遺伝子を選択し、その安定性をリファレンス遺伝子選択ツールで解析する。
- 一元配置 (one-way) および二元配置 (two-way) ANOVA を含む統計的解析を遺伝子発現解析で行う。
- 生物学的グループ名を付けて多変量実験を設定する。
- 各基準の合否結果を含む PDF レポートを自動的に作成し、実験結果を評価しやすくする。

このユーザーガイドでは、これらの機能とその使用方法について説明します。

もっとよく知るには

バイオ・ラッド社のリアルタイム PCR サーマルサイクラーと CFX Maestro ソフトウェアの設置後、このガイドにアクセスでき、また、あらゆる画面のヘルプメニューからも詳細なソフトウェアのヘルプピックにアクセスできます。

アドバイス: ウィンドウの右上隅にあるバイオ・ラッド社のロゴをクリックして、バイオ・ラッド社のウェブサイトを立ち上げます。このサイトは、テクニカルノート、マニュアル、製品情報およびテクニカルサポートへのリンクを含んでいます。また、PCR、リアルタイム PCR および遺伝子発現に関する多様な方法と適用について数多くの技術参考資料も提供しています。

第2章 CFX Maestro ソフトウェアのインストール

本章では、CFX Maestro ソフトウェアのインストール方法について説明します。対応するバイオ・ラッド社製リアルタイム PCR サーマルサイクラーの設定に関する詳細については、該当するガイドを参照してください。

C1000 Touch、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、CFX384 Touch の各システムからリアルタイム PCR データを解析するには、CFX Maestro ソフトウェアが必要です。また、本ソフトウェアを使用してソフトウェア制御モードでこれらのシステムを制御することも可能です。

CFX96、CFX96 Deep Well、CFX Connect、CFX384 オプティカルリアクションモジュールの梱包セットには、以下の品目が含まれます。

- オプティカルリアクションモジュール
- USB ケーブル
- CFX Maestro ソフトウェアのインストール用 USB ドライブ
- qbase⁺ソフトウェア設定用クイックガイド

全てを開梱し、箱を保管しておくことをお勧めします。もし欠品、破損がありましたら、バイオ・ラッドまでご連絡ください。

システムの使用条件

表 1 に、CFX Maestro ソフトウェアを実行するコンピュータ（CFX Maestro コンピュータと呼ぶ）の最低動作条件および推奨動作条件を示します。

表 1 CFX Maestro ソフトウェアに関するコンピュータの動作環境

システム	最低動作条件	推奨動作条件
オペレーティングシステム	Microsoft Windows 7 SP1 Pro	以下のいずれか： <ul style="list-style-type: none"> ■ Microsoft Windows 7 SP2 Pro (32 ビットおよび 64 ビット) ■ Microsoft Windows 10 Pro (64 ビットのみ) ■ Microsoft Windows 10 Enterprise (64 ビットのみ)
	重要 ：Microsoft Windows 10 Pro および Microsoft Windows 10 Enterprise の両方でセキュアブートを無効にしておく必要があります。	
ポート	2 個の USB 2.0 (高速ポート)	2 個の USB 2.0 (高速ポート)
ハードディスク容量	128 GB	128 GB
プロセッサ速度	2.4 GHz、デュアルコア	2.4 GHz、クアッドコア
RAM	4GB RAM	8GB RAM
画面解像度	1024 × 768 ピクセル (トゥルーカラーモード)	1280 × 1024 ピクセル (トゥルーカラーモード)
PDF リーダー		対応する Microsoft Office Suite のいずれかの Adobe PDF Reader または Windows PDF Reader <ul style="list-style-type: none"> ■ 2007 ■ 2010 ■ 2013
ローカライズ	対応する Microsoft Windows 32 ビット版および 64 ビット版 OS (英語、中国語、ロシア語)	対応する Microsoft Windows 32 ビット版および 64 ビット版 OS (英語、中国語、ロシア語)

注意：CFX Maestro と同じコンピュータ上で CFX Automation Control ソフトウェアを実行する場合には、画面解像度を 1280 × 1024 ピクセル (トゥルーカラーモード) に設定してください。

注意：MiniOpticon™ システムは、Microsoft Windows 7 のオペレーティングシステムを実行できるコンピュータでのみ動作可能です (ただし MiniOpticon での CFX Maestro の使用はお勧めしません)。CFX Maestro は、Microsoft Windows 10 のオペレーティングシステムのどのバージョンを実行するコンピュータでも MiniOpticon を認識しません。

CFX Maestro ソフトウェアのインストール

重要：ソフトウェアのインストールやアップグレードを行う前に、CFX Maestro コンピュータに接続されているすべての機器の接続を解除する必要があります。ソフトウェアのインストール中、リアルタイム PCR サーマルサイクラーの電源を切る必要はありません。

注意：どのバージョンの Windows 10 に CFX Maestro ソフトウェアをインストールする場合でも、インストール手順を開始する前にセキュアブートを必ず無効にしてください。

以下の手順にて、CFX Maestro ソフトウェアをインストールしてください。

1. 必要に応じて、コンピュータから接続されているすべての機器の接続を解除しておいてください。CFX Maestro コンピュータにある機器の USB ケーブルを見つけて、接続を解除します。装置に差し込まれているケーブルはそのままにしておくことができます。
2. 管理者権限で CFX Maestro コンピュータにログインします。
3. CFX Maestro ソフトウェアの USB ドライブをコンピュータの USB ポートに挿入します。
4. Windows Explorer で、CFX Maestro ソフトウェアの USB ドライブにナビゲートし、これを開きます。
USB ドライブには、Readme ファイル、CFX_Documentation インストーラ、および以下のフォルダが含まれます。
 - CFX
 - Drivers
 - Firmware
5. CFX フォルダを開き、Setup.exe をダブルクリックして CFX Maestro ソフトウェアをインストールします。
6. 画面上のインストール手順に従ってください。
完了すると、バイオ・ラッド CFX Maestro ソフトウェアのスプラッシュ画面がコンピュータ画面に表示され、バイオ・ラッド CFX Maestro のアイコンがデスクトップに表示されます。
7. CFX_Documentation.exe をダブルクリックして CFX Maestro ソフトウェア文書をインストールします。
8. インストールの完了後、ソフトウェアの USB ドライブを安全に取りはずすことができます。

接続機器の検出

インストール中、CFX Maestro ソフトウェアのインストーラは CFX Maestro コンピュータに機器のドライバを自動的にインストールします。CFX Maestro は、ソフトウェアの起動時に接続されている機器を検出します。

接続機器の検出方法

1. 同梱の USB ケーブルをサーマルサイクラーのベースの後ろにある USB B ポートに差し込んでいない場合には、USB ケーブルの一端を差し込んでください。
2. もう一端を CFX Maestro コンピュータの USB ポートに差し込みます。
3. リアルタイム PCR サーマルサイクラーがまだ起動していない場合には、機器の後ろにある電源スイッチを押して電源を入れます。
4. CFX Maestro を起動します。

接続されている機器がソフトウェアによって自動的に検出され、Home ウィンドウの Detected Instruments ペインにその名前が表示されます。

注意：機器が Detected Instruments ペインに表示されない場合には、USB ケーブルが正しく設置されているかを確認してください。ドライバを再インストールするには、CFX Maestro の Home ウィンドウで Tools > Reinstall Instrument Drivers を選択します。

ソフトウェアファイル

表 2 は、CFX Maestro ソフトウェアファイルのタイプを示します。

表 2 CFX Maestro ソフトウェアファイルのタイプ

ファイルタイプ	拡張子	詳細
プロトコール	.prcl	PCR ランを実施するためのプロトコール設定の詳細を含む
プレート	.pltd	PCR ランを実施するためのプレート設定の詳細を含む
データ	.pcrd	実験ランと PCR 解析の結果を含む
PrimePCR™ ラン	.csv	PrimePCR プレート用のプロトコールとプレートレイアウト情報を含む
Gene Study	.mgxd	複数の PCR ランを統合した遺伝子発現解析のデータファイル
スタンドアローンのプレデータファイル	.zpcr	スタンドアローンによる取得した蛍光データを含んでおり、データファイルに変換可能
LIMS	.plrn	LIMS 準拠のランを処理するのに必要なプレート設定、プロトコール情報を含む

第3章 ワークスペース

CFX Maestro ソフトウェアは、プレートの設定、PCR プロトコールの設定、これらの CFX 機器での実行、および PCR ランからのデータの解析のためのインタフェースを提供します。

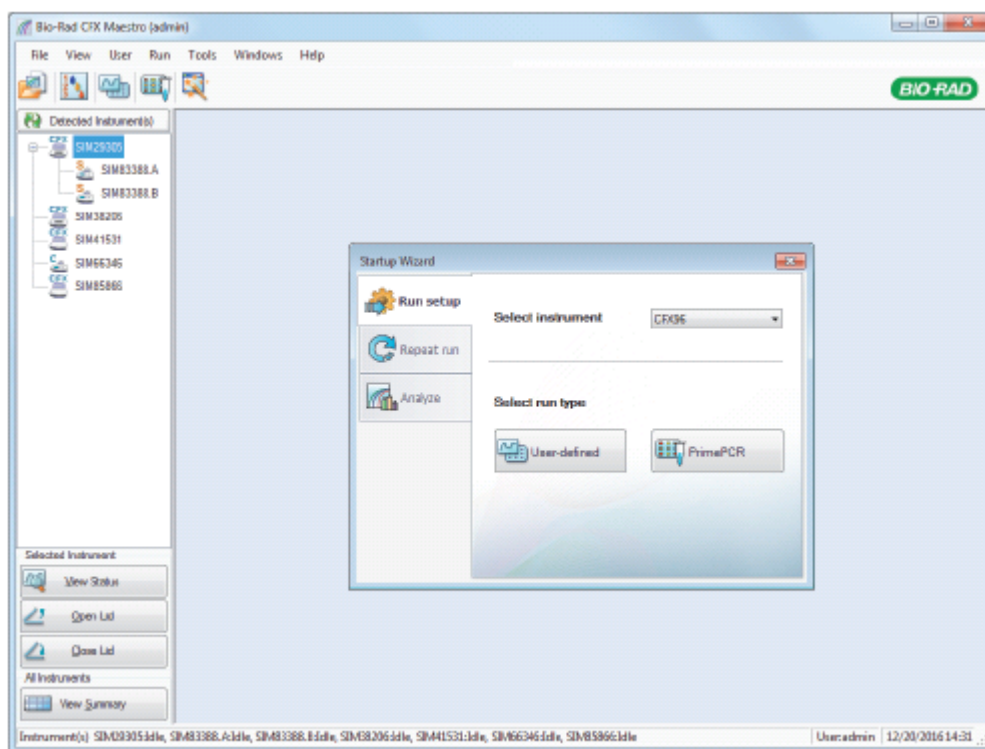
CFX Maestro ソフトウェアには、5つの主要ワークスペースがあります。

- Home ウィンドウ
- Startup Wizard
- Protocol Editor ウィンドウ
- Plate Editor ウィンドウ
- Data Analysis ウィンドウ

本章では、各ワークスペースについて表示と共に簡単に説明します。

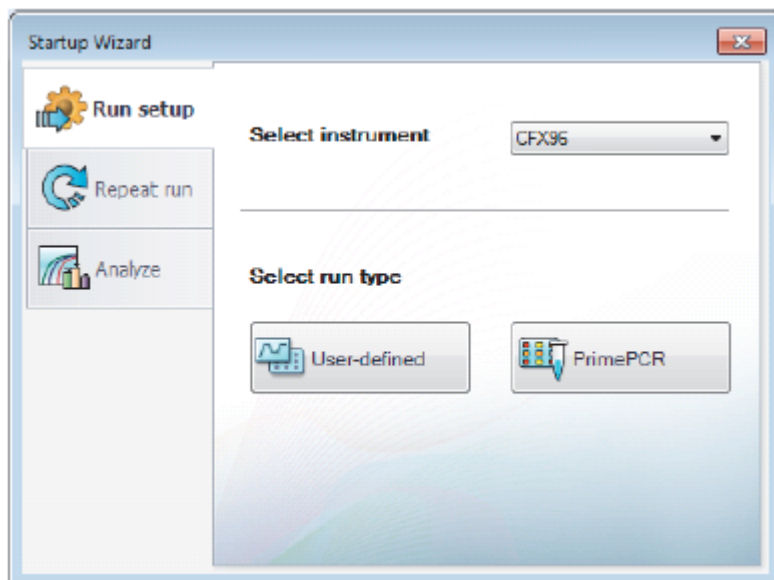
Home ウィンドウ

CFX Maestro ソフトウェアの Home ウィンドウを開くと Startup Wizard が表示されます。ここから、実験の設定、ランの実行または繰り返し、あるいは既存のランの解析を行うことが可能です。Home ウィンドウでは、アプリケーションや機器のログを表示し、ユーザーの作成や管理を行い、複数の便利なツールにアクセスすることもできます。詳細については、第4章の「Home ウィンドウ」を参照してください。



Startup Wizard

Startup Wizard を使用して、ユーザー定義の実験の設定やランを、または PrimePCR™ 実験の選択やランを迅速に行います。また、このウィザードを使用すると、ランの繰り返しやランデータの解析を行えます。



Protocol Editor ウィンドウ

Protocol Editor では、プロトコルを作成し、開き、レビューし、さらに編集することができます。また、特殊なプロトコル用にリッド温度を修正することもできます。Protocol Editor 機能については、第5章の「プロトコルの作成」で詳述します。

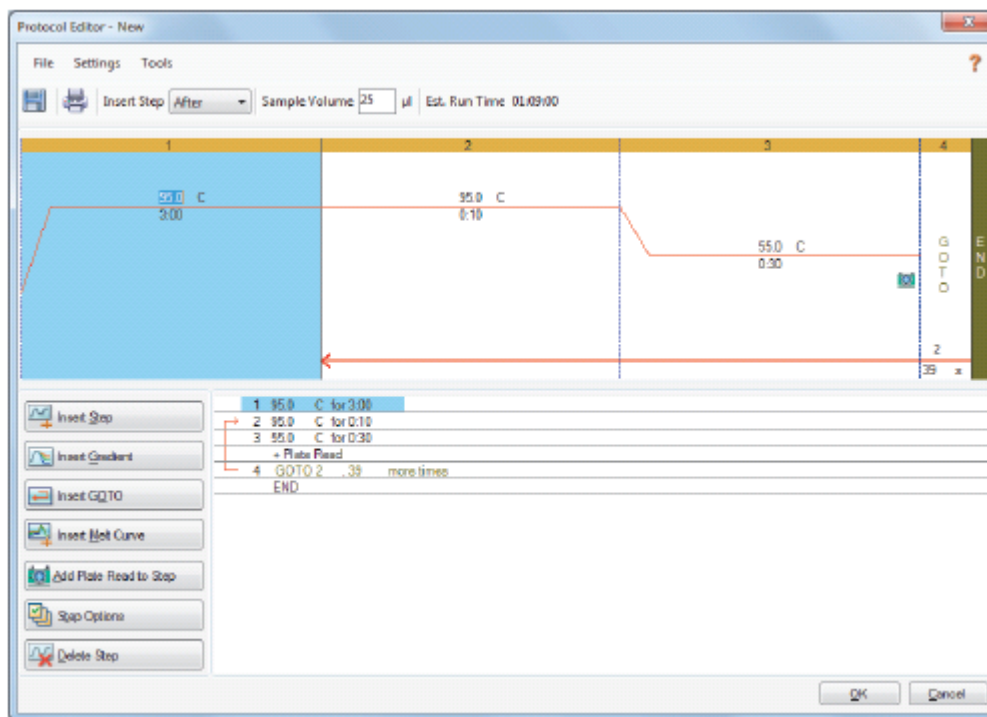
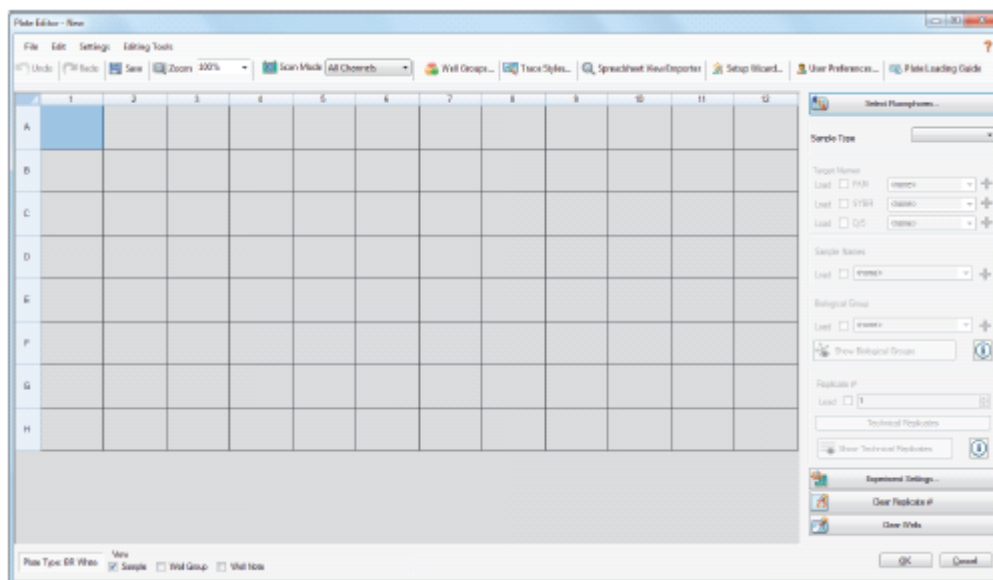


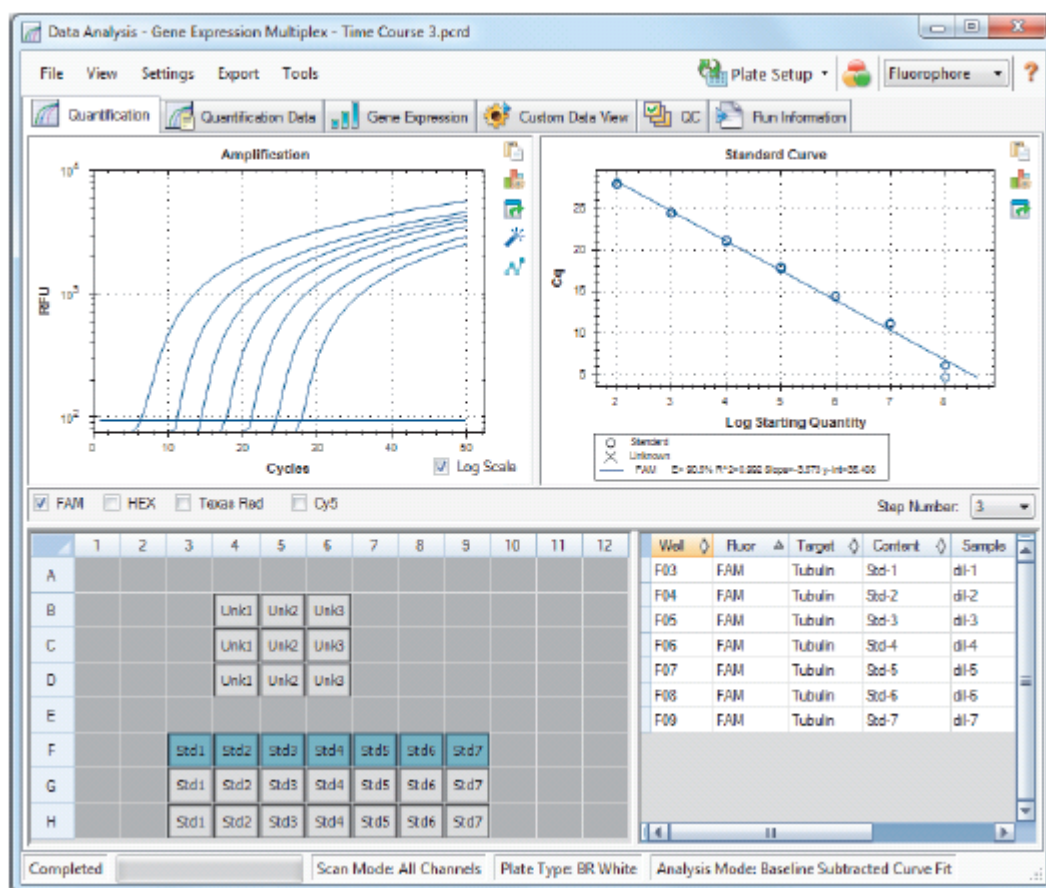
Plate Editor ウィンドウ

Plate Editor では、プレートを作成し、開き、レビューし、さらに編集することができます。Plate Editor 機能については、第 6 章の「プレートの」で詳述します。



Data Analysis ウィンドウ

Data Analysis では、ランデータの表示や比較、統計解析の実施、データのエクスポート、および発表用レポートの作成が可能です。Data Analysis 機能については、第8章の「データ解析について」で詳しく説明します。また、第9章の「データ解析の詳細」も参照してください。



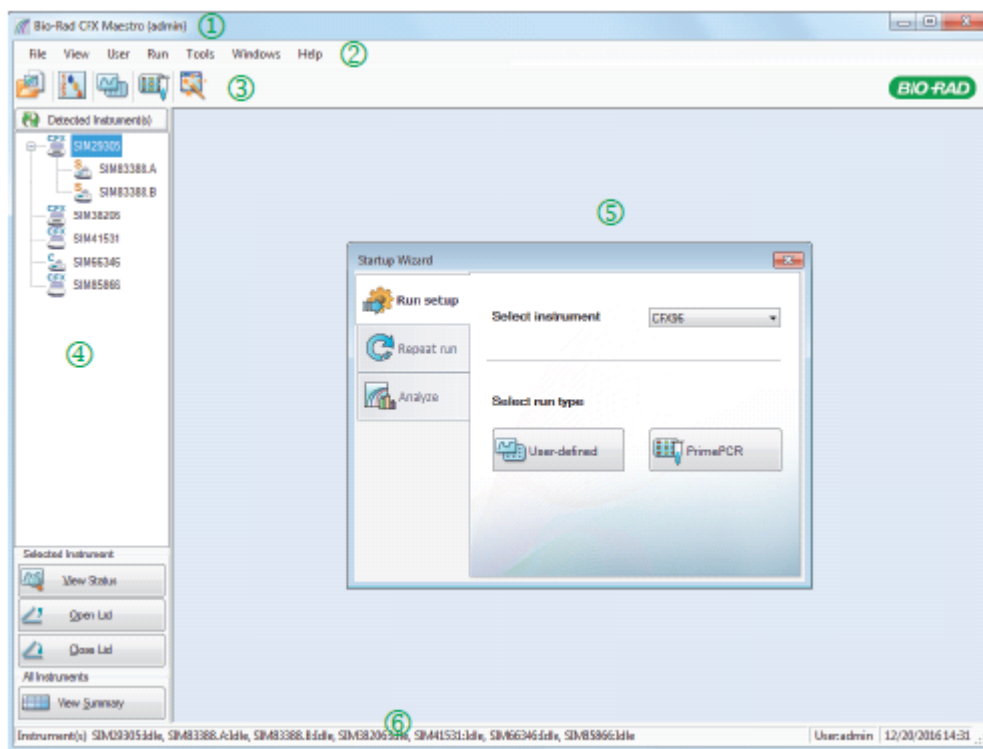
第4章 Home ウィンドウ

CFX Maestro ソフトウェアは、PCR プロトコールを設定し、これらを CFX 機器で実行し、PCR ランデータを解析するためのインタフェースを提供します。

本章では、CFX Maestro ソフトウェアについて紹介し、Home ウィンドウからアクセスできる機能について説明します。

Home ウィンドウ

CFX Maestro の Home ウィンドウには Startup Wizard が表示され、ここでランの設定、ランの実行または繰り返し、あるいは既存のランの解析を行います。Home ウィンドウからは、アプリケーションや機器のログの表示、ユーザーの作成や管理、さらに複数の便利なツールへのアクセスも可能です。



説明

- 1 ソフトウェアのタイトルバーには、ソフトウェアのバージョン番号とログインしているユーザーの名前が表示されます。
- 2 メニューバーは、File、View、User、Run、Tools、Windows および Help のメニューコマンドへの迅速なアクセスを提供します。
- 3 ツールバーコマンドは、メニューのオプションへの迅速なアクセスを提供します。
- 4 左側のペインには、CFX Maestro コンピュータに接続されている機器が表示され、リッドを操作して機器の状態を表示するためのボタンが用意されています。
- 5 メインペインには、作業用ウィンドウが表示されます。Home 画面のデフォルトの作業用ウィンドウは Startup Wizard になっています。
- 6 ステータスバーには、接続されている機器とログインしているユーザーの名前が表示されます。

File メニューコマンド

New (新規) — 新しいプロトコール、プレート、または Gene Study の作成を選択できるダイアログボックスを開く。

Open (開く) — 既存のプロトコール、プレート、データファイル、Gene Study、LIMS ファイル、スタンドアローン機器によるラン (スタンドアローンラン)、または PrimePCR ランファイルヘナビゲートしてこれらを開くことができるダイアログボックスを開く。

Recent Data Files (最近のデータファイル) — 最近開いた PCR ファイルのリストを表示する。

Repeat a Run (ランを繰り返す) — 保存済みの PCR ファイルの場所を Windows Explorer で開く。ここでランを見つけて繰り返すことができる。

Exit (終了) — CFX Maestro を終了する。

View メニューコマンド

Application Log (アプリケーションのログ) — 初回インストール時から現時点までの CFX Maestro ソフトウェアの使用ログを表示する。

Run Reports (ランレポート) — ランレポートのリストを表示する。

Startup Wizard (起動ウィザード) — メインペインに Startup Wizard を表示する。

Run Setup (ラン設定) — メインペインに Run Setup ウィンドウを表示する。

Instrument Summary (機器の概要) — メインペインに Instrument Summary ウィンドウを表示する。

Detected Instruments (検出された機器) — 接続されている機器の、左側のペインにおける表示と非表示を切り替える。デフォルトでは、接続されている機器が左側のペインに表示される。

Toolbar (ツールバー) — 画面上部のツールバーの表示と非表示を切り替える。デフォルトでは、ツールバーが表示されている。

Status Bar (ステータスバー) — 画面下部のステータスバーの表示と非表示を切り替える。デフォルトでは、ステータスバーが表示されている。

Show (表示) — 以下を行えるダイアログボックスを開く。

- Status ログの表示または非表示
- CFX Maestro データフォルダを開いて表示
- ユーザーのデータフォルダを開いて表示
- LIMS ファイルフォルダを開いて表示
- PrimePCR フォルダを開いて表示
- ラン履歴の表示
- 接続されているすべての機器の特性を表示

User メニューコマンド

Select User (ユーザーを選択) — Login 画面が開き、User Name ドロップダウンリストからユーザーを選択してアプリケーションにログインできる。

Change Password (パスワードを変更) — Change Password ダイアログボックスが開き、CFX Maestro ソフトウェアのユーザーパスワードを変更できる。

User Preferences (ユーザー基本設定) — User Preferences ダイアログボックスが開き、以下のデフォルト設定をユーザーが変更できる。

- ラン完了時のメール通知の送受信
- データファイルの保存
- Protocol Editor または Protocol AutoWriter によるプロトコールの作成
- プレートの作成
- データの解析
- 遺伝子発現解析の実施
- データの品質の判定
- CFX データのエクスポート

User Administration (ユーザー管理者) — User Administration ダイアログボックスが開き、管理者はユーザーを作成し、役割許可を変更し、役割をユーザーに割り当てることができる。

Bio-Rad Service Login (バイオ・ラッド社サービスログイン) — バイオ・ラッド社の技術サービス担当者のみが使用。このコマンドを選択しないでください。

Run メニューコマンド

User-defined Run (ユーザー定義のラン) — Run Setup ウィンドウが開き、ユーザー定義のプロトコールやプレートを設定し、選択した機器で PCR 実験を実施できる。

PrimePCR Run (PrimePCR ラン) — デフォルトの PrimePCR プロトコールと選択した機器に基づきロードされるプレートレイアウト設定の Run Setup ウィンドウに Start Run タブを開く。

End-Point Only Run (エンドポイントのみのラン) — デフォルトのエンドポイントプロトコールと選択した機器に基づきロードされるプレートレイアウト設定の Run Setup ウィンドウに Start Run タブを開く。

Qualification Run (適正ラン) — デフォルトのバイオ・ラッド社適正プロトコールと選択した機器対応したプレートレイアウトが設定され、Run Setup ウィンドウの Start Run タブを開く。

Tools メニューコマンド

Master Mix Calculator (マスターミックス計算機能) — Master Mix Calculator が開き、反応混合液を作成して計算値を印刷できる。

Protocol AutoWriter — Protocol AutoWriter ダイアログボックスが開き、新しいプロトコールを簡単に作成できる。

T_a Calculator (T_a 計算機能) — T_a Calculator が開き、プライマーのアニーリング温度を簡単に計算できる。

Dye Calibration Wizard(色素キャリブレーションウィザード) — Dye Calibration ウィザードが開き、新しい蛍光色素について機器のキャリブレーションを行える。

Reinstall Instrument Drivers (機器の再インストールドライバ) — バイオ・ラッド社のリアルタイム PCR との接続をコントロールするドライバを再インストールする。

Zip Data and Log Files (データとログの Zip 圧縮) — 保管用に ZIP ファイルに圧縮および保存するかまたはメール送信するファイルを選択できるダイアログボックスが開く。

Batch Analysis (バッチ解析) — Batch Analysis ダイアログボックスが開き、一度に2つ以上のデータファイルを解析するためのパラメータを設定できる。

Options (オプション) — 以下を行うためのダイアログボックスが開く。

- メールサーバーの設定
- LIMS およびその他のデータファイルのエクスポート設定

Help メニューコマンド

アドバイス : Help メニューは、CFX Maestro ソフトウェアのすべてのウィンドウのメニューバーで使用できます。

Contents (内容) — CFX Maestro の Help システムの Contents タブを表示する。

Index (索引) — CFX Maestro の Help システムの Contents タブを表示する。

Search (検索) — CFX Maestro の Help システムの Contents タブを表示する。

Open User Guide (ユーザーガイドを開く) — 本ガイドの PDF を開く。

Additional Documentation (追加文書) — 他の CFX Maestro の PDF 文書や CFX 機器ガイドへのアクセスを提供する。

qPCR Applications and Technologies Web Site (qPCR アプリケーションと技術ウェブサイト) — バイオ・ラッド社の qPCR Applications & Technologies ウェブサイトが開き、リアルタイム PCR (qPCR) に関する詳しい情報を得ることができる。

qPCR Reagents Web Site (qPCR 試薬ウェブサイト) — バイオ・ラッド社の PCR および qPCR 用試薬に関するウェブサイトが開き、PCR 用試薬、スーパーミックス、色素、およびキットを注文できる。






qPCR Plastic Consumables Web Site (qPCR プラスチック製消耗品ウェブサイト) — バイオ・ラッド社の PCR プラスチックおよび消耗品に関するウェブサイトが開き、PCR 用プレート、プレートシール、チューブとキャップ、およびその他のプラスチック製の付属品を注文できる。

Software Web Site (ソフトウェアウェブサイト) — バイオ・ラッド社の PCR 解析ソフトウェアのウェブサイトが開き、バイオ・ラッド社の最新版 CFX Maestro ソフトウェアを注文できる。

Check For Updates (アップデートの確認) — ソフトウェアと機器の Updates ダイアログボックスを開く。CFX Maestro コンピュータがインターネットに接続されている場合、ソフトウェアは新しいソフトウェアまたは機器のアップデートが可能であることを検出し、必要なアップデートを自動的に実施する。

About (情報) — CFX Maestro の商標とバージョン情報を表示する。

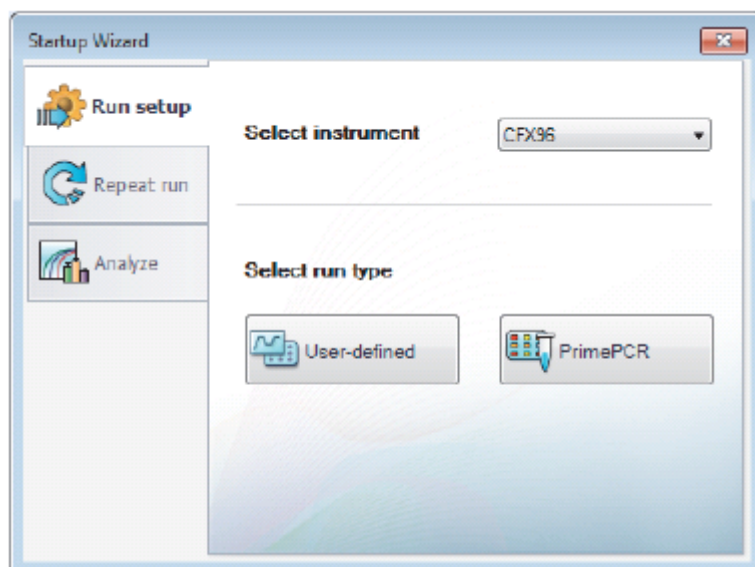
Toolbar コマンド

-  — Windows Explorer が開き、データファイルや Gene Study ファイルにナビゲートして開くことができる。
-  — Master Mix Calculator を開く。
-  — Run Setup ウィンドウを開く。
-  — デフォルトの PrimePCR プロトコールと選択した機器に基づくプレートレイアウト設定の Run Setup ウィンドウを開く。
-  — Startup Wizard を開く。

Startup Wizard

CFX Maestro を起動すると、作業用ペインに Startup Wizard が表示されます。Startup Wizard から、以下を行えます。

- 検出された機器のうちの1つを選択し、ユーザー定義のランまたは PrimePCR ランを設定する。
- 過去のデータファイルを指定して同じ条件でのランを繰り返す。
- 一回のランの結果を解析するためのデータファイル、もしくは複数の遺伝子発現解析ランからの結果をまとめた Gene Study ファイルを開く。



これらのタスクについては、後続の各章で詳述します。

ステータスバー

ソフトウェアのメインウィンドウ下部にあるステータスバーの左側には、検出された機器の現在のステータスが表示されます。ステータスバーの右側には、現在のユーザー名、日付、時刻が表示されます。

Detected Instruments ペイン

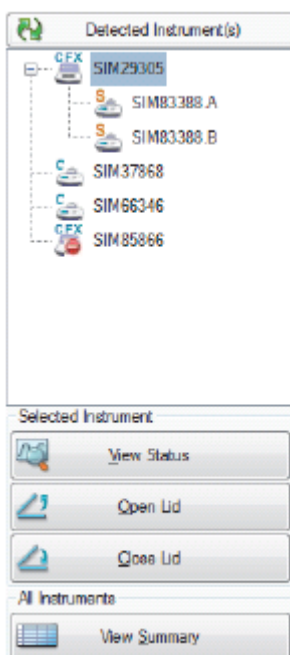
Detected Instruments ペインには、CFX Maestro コンピュータに接続されている各機器が表示されます。デフォルトでは、各機器はアイコンとして示され、そのシリアル番号が機器の名称として表示されます。機器のリストには、C1000 Touch または S1000 サーマルサイクラーにセットされているデュアルブロックリアクションモジュール毎にブロック（ブロックAおよびブロックB）が別々に表示されます。

システムのアップデートが必要な機器には赤色の警告が表示されます。システムがアップデートされるまではその機器を使用することができません。システムのアップデートに関する詳細については、44ページの「ソフトウェアと機器のアップデート」を参照してください。

例えば、以下の画像は検出された5つの機器が接続されています。

- CFX96 リアクションモジュールを付属した C1000 Touch サーマルサイクラー（SIM29305）
- デュアル 48-ウェルブロックを付属した S1000 サーマルサイクラー（SIM83388.A および SIM83388.B）。これは C1000 Touch サーマルサイクラーに接続されている。
- CFX96 Deep Well リアクションモジュールを付属した C1000 サーマルサイクラー（SIM66346）
- CFX Connect サーマルサイクラー（SIM85866）

アドバイス：本機器はアップデートする必要があります。システムをアップデートするまで、ユーザーは本機器を使用できません。



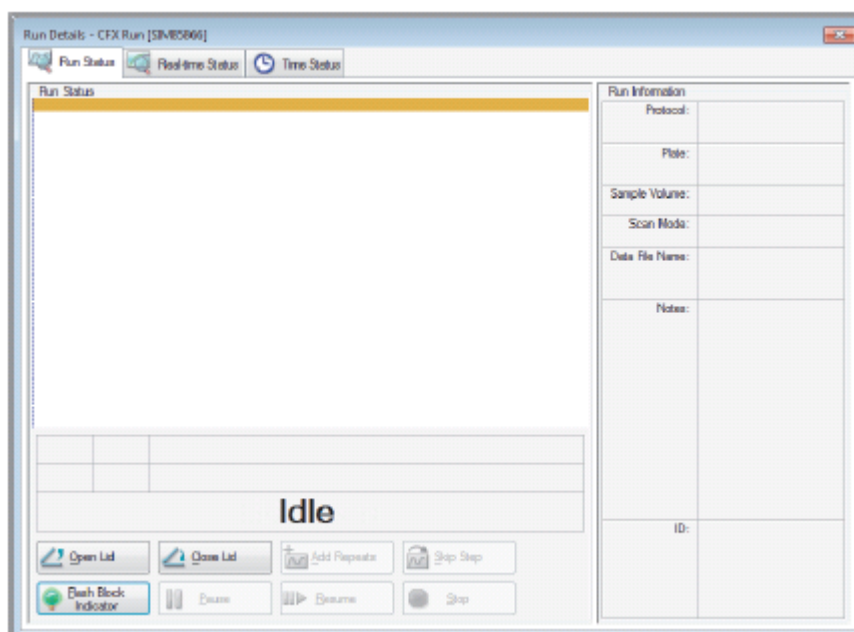
このペインでは以下を行えます。

- 選択した機器の特性やキャリブレーションした色素の表示。
- 機器の特性に関する詳細については、42 ページの「[機器の特性を表示](#)」を参照してください。
- 接続されている機器のステータスを表示。
- 選択した機器の電動リッドを開く。
- 選択した機器の電動リッドを閉じる。
- 接続されているすべての機器のステータスを表示。

接続されている機器のステータスの表示方法

- ▶ Detected Instruments ペインで、対象の機器を選択して以下のいずれかを行います。
 - Selected Instrument セクションで View Status をクリックする。
 - 右クリックして表示されるメニューで View Status を選択する。

Run Details ダイアログボックスが現れ、Run Status タブが表示されます。選択した機器のステータスは、例えば下図のようにランステータスペインの下に表示されます。



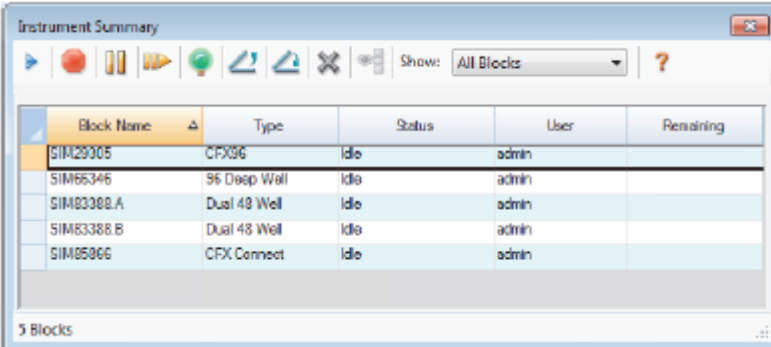
機器のリッドの開閉方法

- ▶ Detected Instruments ペインで、対象の機器を選択して以下のいずれかを行います。
 - Selected Instrument セクションで Open Lid または Close Lid をクリックする。
 - 右クリックして表示されるメニューで適切な操作を選択する。
 - Run Details ダイアログボックスを開いて Run Status タブを選択し、Open Lid または Close Lid をクリックする。

検出されたすべての機器のステータスの表示方法

- ▶ 以下のいずれかを行います。
 - Detected Instruments ペインの All Instruments セクションで、View Summary をクリックする。
 - メニューバーで、View > Instrument Summary を選択する。

Instrument Summary ダイアログボックスが表示されます。



The screenshot shows a window titled "Instrument Summary" with a toolbar and a table. The table has columns for Block Name, Type, Status, User, and Remaining. The data rows are as follows:

Block Name	Type	Status	User	Remaining
SIM29305	CFX96	Idle	admin	
SIM65346	96 Deep Well	Idle	admin	
SIM83388.A	Dual 48 Well	Idle	admin	
SIM83388.B	Dual 48 Well	Idle	admin	
SIM85966	CFX Connect	Idle	admin	

At the bottom left of the window, it says "5 Blocks".

アドバイス：システムが検出した接続機器が1つだけの場合、All Instruments セクションは Detected Instruments ペインには表示されません。単一機器の場合に機器の概要を表示するには、View > Instrument Summary を選択してください。

Instrument Summary ツールバーのコントロールボタン

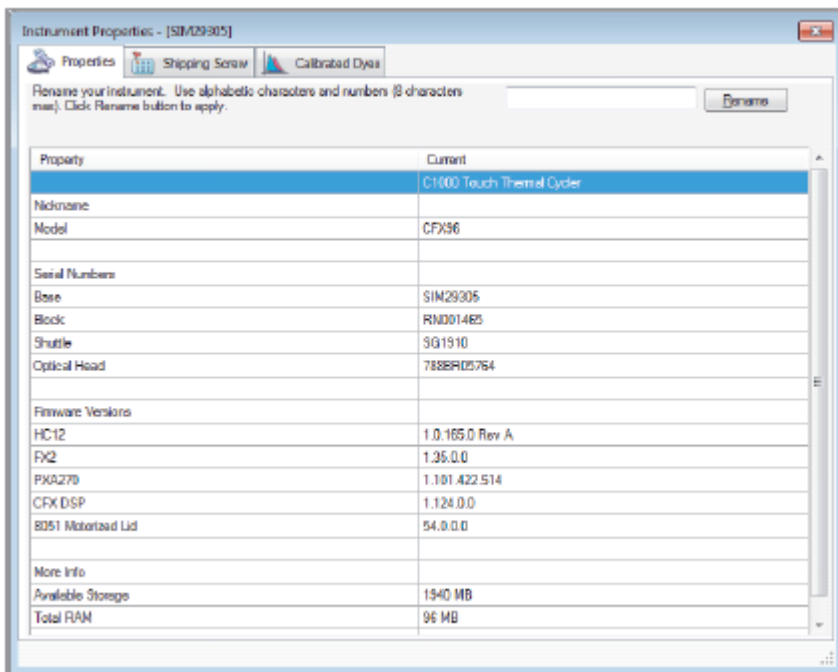
表 3 は、Instrument Summary ツールバーのコントロールボタンと機能を記載しています。

表 3 Instrument Summary ツールバーのツールバーボタン

ボタン	ボタン名称	機能内容
	Create a new Run	Run Setup ウィンドウを開いて選択されているブロックにランを設定します。
	Stop	選択されているブロックの現在のランを停止します。
	Pause	選択されているブロックの現在のランを一時中断します。
	Resume	選択されているブロックのランを再開します。
	Flash Block Indicator	選択されているブロックのリッドのインジケータ LED を点灯します。
	Open Lid	選択されているブロックの電動リッドを開きます。
	Close Lid	選択されているブロックの電動リッドを閉じます。
	Hide Selected Blocks	Instrument Summary リスト内で選択されているブロックを非表示にします。
	Show All Blocks	Instrument Summary リスト内で選択されているブロックを表示します。
	Show	リスト内で表示するブロックを選択します。検出されたすべてのブロック、すべての待機ブロック、現ユーザーで実行中のすべてのブロック、または実行中のすべてのブロックから、表示オプションを 1 つ選択します。

機器の特性を表示

Detected Instruments ペインでは、選択した機器とその特性、輸送用ネジのステータス、およびキャリブレーション済みの色素（蛍光色素）のリストに関する詳細を表示できます。



機器の特性の表示方法

- ▶ Detected Instruments ペインで、対象の機器を右クリックして表示されるメニューの Properties を選択します。

Properties タブ

Properties タブは、モデル、構成要素のシリアル番号、およびファームウェアのバージョンを含む選択されている機器に関する技術詳細を記載します。機器（およびそのシリアル番号）のデフォルトの名称が、Detected Instruments ペインや Instrument Properties ダイアログボックスのヘッダーバーを含む多くの場所に表示されます。識別しやすくするように、機器の名称を変更できます。

機器の名称変更方法

- ▶ Instrument Properties タブで、Properties タブの上部にある Rename ボックス内に名称を入力し、Rename をクリックします。

新しい名称が Properties タブの Nickname 列に表示され、さらに Instrument Properties ヘッダーバーと Detected Instruments ペインにも表示されます。

Shipping Screw タブ

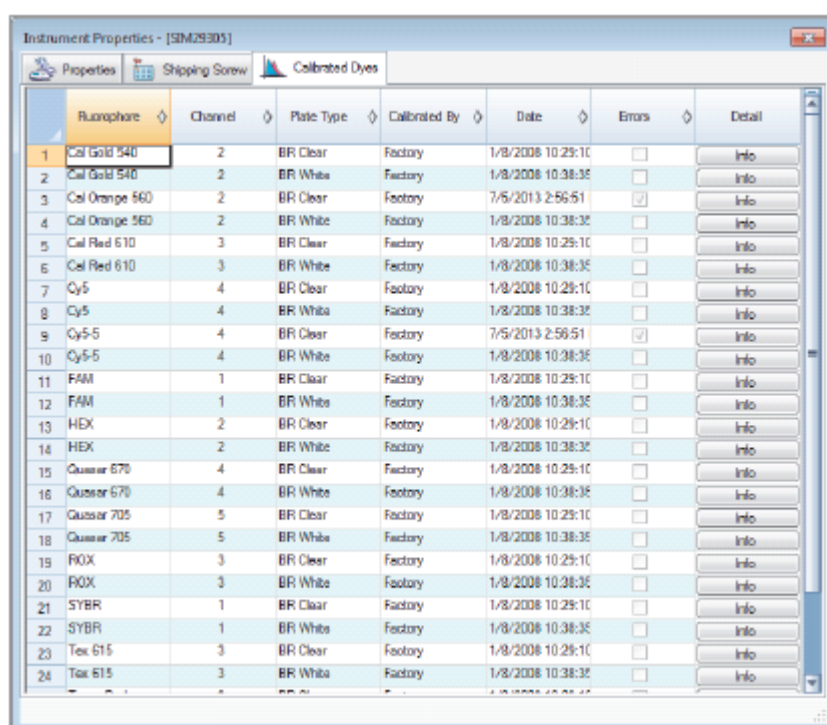
Shipping Screw タブは、選択されている機器の輸送用ネジに関する現在のステータスを表示します（取りはずされているか設置されているか）。さらにこのタブは、赤色の輸送用ネジの取り付けまたは取りはずし方法の説明を含んでいます。

アドバイス：ソフトウェアで輸送用ネジが検出されると、Instrument Properties ダイアログボックスには Shipping Screw タブが自動的に表示されます。指示に従ってネジを取りはずしてください。

注意：機器を使用する前に輸送用ネジを取りはずしてください。詳細については、選択されている機器に関する「機器のガイド」を参照してください。

Calibrated Dyes タブ

Calibrated Dyes タブは、キャリブレーション済みの蛍光色素と選択されている機器のプレートを表示します。



	Runopore	Channel	Plate Type	Calibrated By	Date	Errors	Detail
1	Cal Gold 540	2	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
2	Cal Gold 540	2	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
3	Cal Orange 560	2	BR Clear	Factory	7/5/2013 2:56:51	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
4	Cal Orange 560	2	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
5	Cal Red 610	3	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
6	Cal Red 610	3	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
7	Cy5	4	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
8	Cy5	4	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
9	Cy5-5	4	BR Clear	Factory	7/5/2013 2:56:51	<input checked="" type="checkbox"/>	Info
10	Cy5-5	4	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
11	FAM	1	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
12	FAM	1	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
13	HEX	2	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
14	HEX	2	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
15	Quasar 670	4	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
16	Quasar 670	4	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
17	Quasar 705	5	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
18	Quasar 705	5	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
19	ROX	3	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
20	ROX	3	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
21	SYBR	1	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
22	SYBR	1	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info
23	Tox 615	3	BR Clear	Factory	1/8/2008 10:29:10	<input type="checkbox"/>	Info
24	Tox 615	3	BR White	Factory	1/8/2008 10:38:35	<input type="checkbox"/>	Info

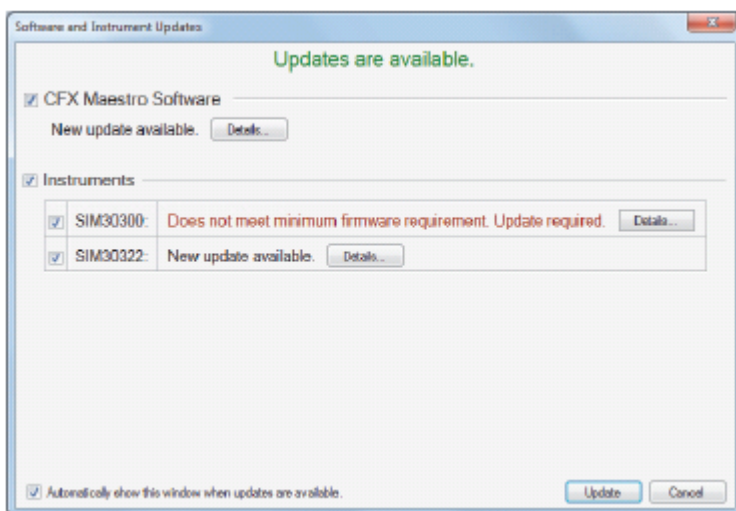
キャリブレーションの詳細については、Detail 列内にある Info ボタンをクリックしてください。

はじめる前に

ソフトウェアと機器のアップデート

インターネットに接続すると、CFX Maestro ソフトウェアは起動のたびにアップデートを自動的に確認します。また、接続されている機器がアップデート可能かどうかも判定します。アップデートが検出されると、CFX Maestro は自動的にアップデートすることができます。

アップデート可能な場合、Software and Instruments Updates ダイアログボックスが自動的に表示されます。



重要: アップデートが必要なシステムには、赤色で警告表示されます。必要なアップデートを行うまでは、そのシステムを使用できません。

ソフトウェアとシステムの両方のアップデートを実行する場合、ソフトウェアが先にアップデートされます。最新のアップデートをダウンロードするには、CFX Maestro ソフトウェアを実行しているコンピュータをインターネットに接続する必要があります。アップデートを開始する前に、すべてのデータ解析ウィンドウを閉じて、すべての機器がアイドル状態であることを確認してください。

ソフトウェアのアップデートが完了すると、CFX Maestro は再起動した後に機器のアップデートを開始します。CFX Maestro では、機器のソフトウェアが、インストールされている CFX Maestro ソフトウェアのバージョンと互換性があるかどうかを判定します。機器のソフトウェアに互換性がない場合、そのアップデートを自動的に開始します。この操作にはインターネット接続は必要ありません。

注意: アップデートの完了後に機器を再起動する必要があります。

ソフトウェアとシステムのアップデート方法

- ▶ Software and Instrument Updates ダイアログボックスで、以下のいずれかを行います。
 - ソフトウェアまたはシステムのアップデートが可能な場合、いずれか適切なチェックボックスを選択して Update をクリックする。
 - ソフトウェアとシステムの両方のアップデートが可能な場合、両方のチェックボックスを選択して Update をクリックする。

アドバイス：この場合、適切な通信を確保するため、ソフトウェアのアップデートには接続されているすべての機器のアップデートが必要です。

Software and Instrument Updates ダイアログボックスの警告を非表示にする方法

- ▶ 新しいアップデートが可能な場合に Updates ダイアログボックスを非表示にするには、Automatically show this window when updates are available チェックボックスを解除します。

重要：取り付けられた機器のアップデートが必要な場合、Software and Instrument Updates ダイアログボックスは、このチェックボックスが解除されていても、自動的に表示されます。その機器で実験を行うために、必要なアップデートを実行してください。

Updates ダイアログボックスを表示するには、Home ウィンドウで Help > Check for Updates を選択し、Notify when updates are available チェックボックスを選択してください。

User Preferences の設定

アドバイス：CFX Maestro ソフトウェアを使用するためにこれらのタスクを行う必要はありません。本節を飛ばしても差し支えなく、また、これらのタスクはいつでも行えます。

CFX Maestro では、作業環境をカスタマイズできます。管理者がソフトウェアユーザーを作成した場合、各ユーザーは各自の作業環境をカスタマイズできます。管理者がユーザーを作成しなかった場合、基本設定の変更は CFX Maestro にログインする全員に適用されます。（CFX Maestro ユーザーの作成に関する詳細については、付録B「CFX Maestro のユーザーおよび役割の管理」を参照。）

例えば、Users > User Preferences メニューでは以下を行えます。

- ラン完了時のEメール通知の設定。
- 以下のデフォルト設定を変更。
 - ファイルの保存先
 - ランの設定ファイル
 - ファイルのネーミング用接頭語
- 新しいプロトコールとプレートを作成する場合に使用するデフォルトパラメータの設定。
- デフォルトのデータ解析および遺伝子発現パラメータの設定。
- デフォルトの品質管理パラメータのカスタマイズ。
- データエクスポート用のデータパラメータのカスタマイズ。

Tools メニューでは以下を行えます。

- マスターミックスの作成。
- 特定機器用の色素のキャリブレーション。

注意： マスターミックスと色素のキャリブレーションは、CFX Maestro にログインする全員が利用できます。

本節では、これらのタスクの実施方法を詳述します。

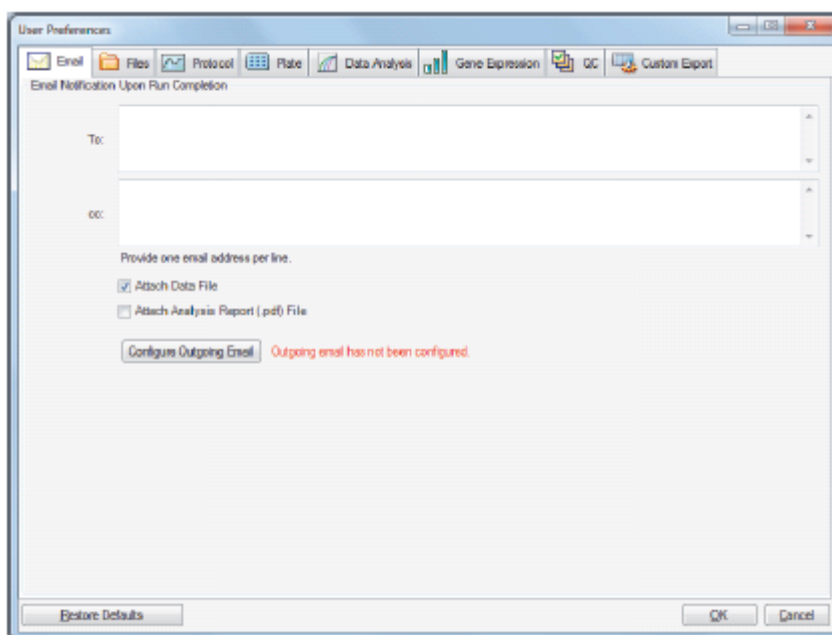
Eメール通知の設定

CFX Maestro を発信用Eメールサーバーに接続して、ラン完了のEメール通知をリストにあるユーザーに送信することができます。また、データファイルや解析レポートを添付して送信することも選択できます。CFX Maestro とご使用の SMTP サーバーの接続方法については、47 ページの「[CFX Maestro と SMTP サーバーの接続](#)」を参照してください。

Eメール通知の設定方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。

User Preferences ダイアログボックスが現れ、Email タブが表示されます。



注意： CFX Maestro 用の有効な SMTP サーバーが設定されていないことをシステムが検出した場合には、通知されます。Configure Email をクリックして Options ダイアログボックスを開き、Eメール用の SMTP サーバーを設定してください。詳細については、47 ページの「[CFX Maestro と SMTP サーバーの接続](#)」を参照してください。

2. To: テキストボックスに、ラン完了を通知する個人のEメールアドレスを入力します。受信者は全員、ラン完了後にEメールを受信することになります。
注意：各自のEメールアドレスは改行して入力してください。各アドレスの後に Enter または Return を押してください。
3. (オプション) cc: テキストボックスに、各Eメール通知のコピーを送信先のEメールアドレスを入力します。
4. (オプション) デフォルトでは、すべての受信者がデータファイルのコピーを添付ファイルとして受信します。データファイルのコピーを添付したくない場合には、このチェックボックスを解除してください。
5. (オプション) Eメールに解析レポートのPDF ファイルを添付するには、Attach Analysis Report を選択します。
6. OK をクリックして変更を保存し、User Preferences ダイアログボックスを閉じます。

受信者のEメールアドレスの編集方法

- ▶ 必要に応じてEメールアドレスを修正し、OK をクリックします。

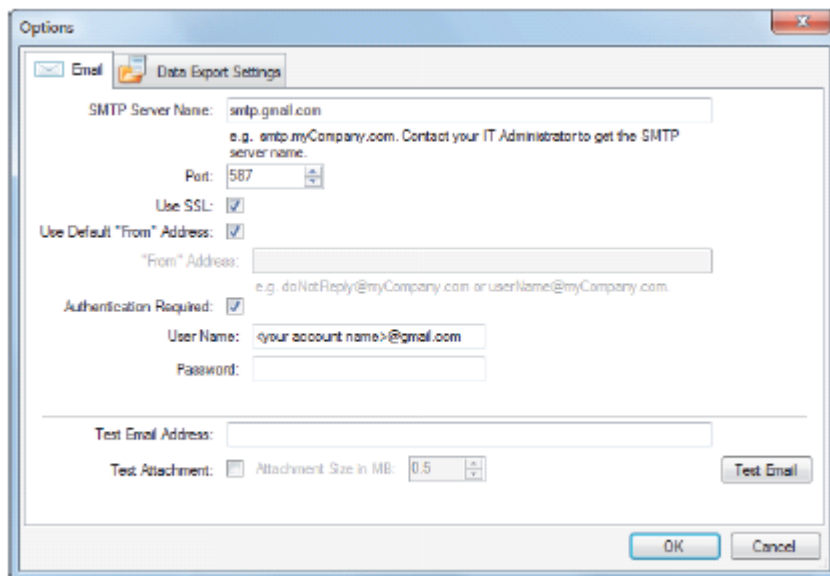
Eメール受信者の削除方法

1. Eメール受信者を選択して、Delete キーを押します。
2. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

CFX Maestro と SMTP サーバーの接続

1. 以下のいずれかを行います。
 - User > User Preferences を選択して Email タブの Configure Outgoing Email をクリックする。
 - Tools > Options を選択する。Options ダイアログボックスが現れ、Email タブが表示されます。



2. 以下の情報を団体全員に提供します。
 - **SMTP Server Name (SMTP サーバー名)** — ご所属の発信用Eメールサーバーの名称。
 - **Port (ポート)** — 使用するSMTPサーバーのポート番号。通常25。
 - **Use SSL (を使用)** — セキュアソケットレイヤー (SSL) のオプション。一部のSMTPサーバーではこの設定が必要になります。ご所属が必要がなければ、このチェックボックスを解除してください。
 - **Use Default "From" Address (デフォルトの送信元アドレスを使用)** — ご所属のEメールサーバーの名称。一部のSMTPサーバーではすべての送信メールに特定のドメイン (例えば、<名前>@YourCompany.com) からの「from (送信元)」アドレスを含める必要があります。その場合には、このチェックボックスを解除して、有効なEメールアドレスを用意してください。
 - **Authentication Required (認証が必要)** — サイトでアカウント認証が必要な場合、このチェックボックスが選択されていることを確認してください。
 - **User Name (ユーザー名)** — 認証済みアカウントの名称。これは、Authentication Required が選択されている場合にのみ必要です。
 - **Password (パスワード)** — 認証済みアカウントのパスワード。これは、Authentication Required が選択されている場合にのみ必要です。
3. SMTPサーバーの設定が正しいことを確認するため、Test Email Address テキストボックスに有効なEメールアドレスを入力して Test Email をクリックします。

注意：一部のSMTPサーバーでは添付ファイルが認められず、またそれ以外では一定サイズまでの添付ファイルしか認められません。CFX Maestro でデータファイルおよび/またはレポートをEメール送信する場合には、Test Attachment を選択して Attachment Size をMB単位で5メガバイト (MB) 以上に設定してください。
4. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

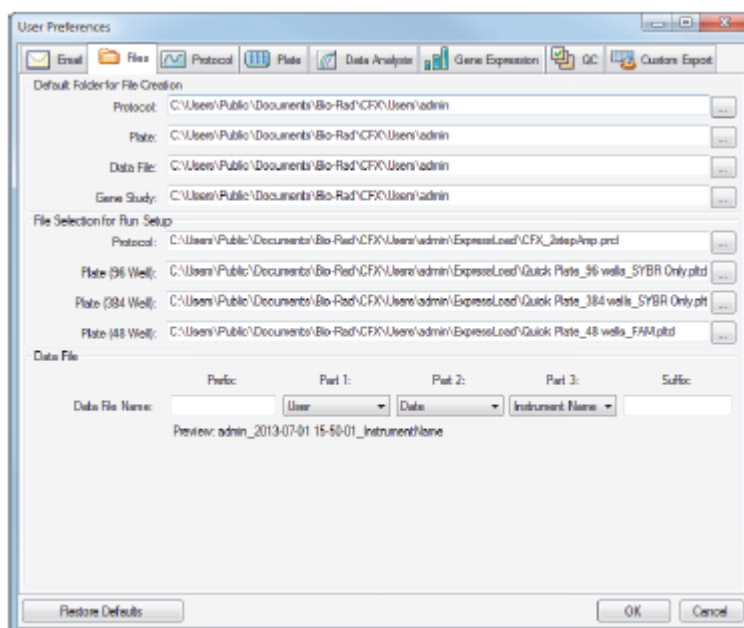
デフォルトのファイル設定を変更

User Preference ダイアログボックスの Files タブで、以下の変更を行えます。

- CFX Maestro ファイルのデフォルト保存先。
- ラン設定のデフォルトファイル。
- デフォルトのファイルネーミング用パラメータ。

デフォルトのファイル設定の変更方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Files タブを選択します。



3. Default Folder for File Creation セクションでナビゲートして、新しいファイルの保存先になるデフォルトフォルダを選択します。以下のようなファイルタイプごとに異なる保存先を選択することができます。
 - Protocol (プロトコール)
 - Plate (プレート)
 - Data File (データファイル)
 - Gene Study (Gene Study)
4. File Selection for Run Setup セクションでナビゲートして、Experiment Setup ウィンドウを開いた時に表示する対象のプロトコールファイルとプレートファイルを選択します。

5. Data File セクションで、データファイルの接頭語および/または接尾語を定義します。それぞれの部分で新しい値をドロップダウンリストから選択します。また、Prefix テキストボックスと Suffix テキストボックスでカスタムの接頭語と接尾語を用意することも可能です。

CFX Maestro の選択ボックスの下に、ファイル名のプレビューが表示されます。

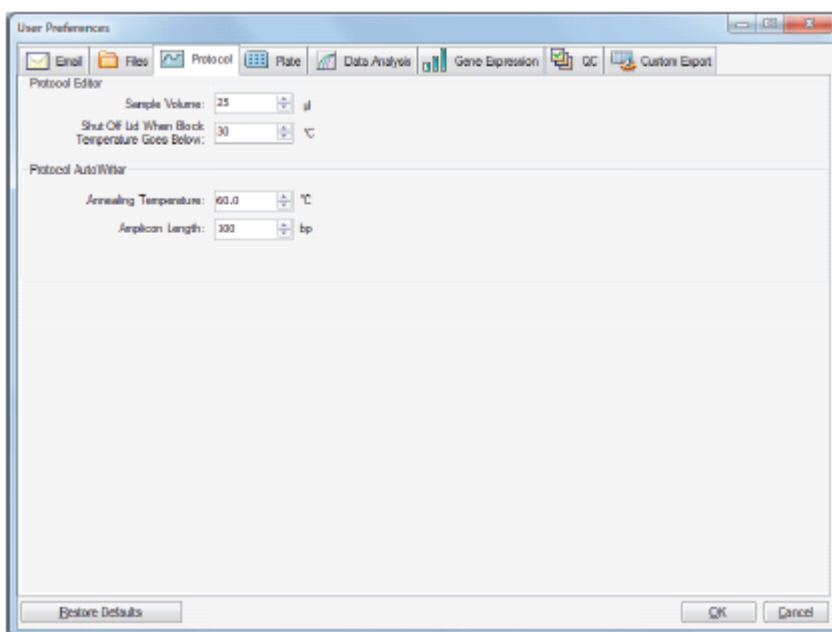
6. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

デフォルトのプロトコールパラメータの設定

Protocol Editor と Protocol AutoWriter のデフォルトのプロトコールパラメータの設定方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Protocol タブを選択します。



3. Protocol Editor セクションで、Protocol Editor に表示される以下の設定の値を指定します。
 - Sample Volume (サンプル容量) — ウェル内のサンプルの容量 (単位は µL)。
 - Lid Shutoff Temperature (リッドのヒーターシャットオフ温度) — ラン実行時にリッドヒーターが切れるブロック温度 (単位は °C)。

4. Protocol AutoWriter セクションで、Protocol AutoWriter に表示される以下の設定の値を指定します。
 - Annealing Temperature (アニーリング温度) — iProof DNA ポリメラーゼ、iTaq DNA ポリメラーゼ、またはその他のポリメラーゼを使用した実験時の温度 (単位は°C)。
 - Amplicon Length (アンプリコン長さ) — アンプリコンの長さ (単位は bp)。
5. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

デフォルトのプレートパラメータの設定

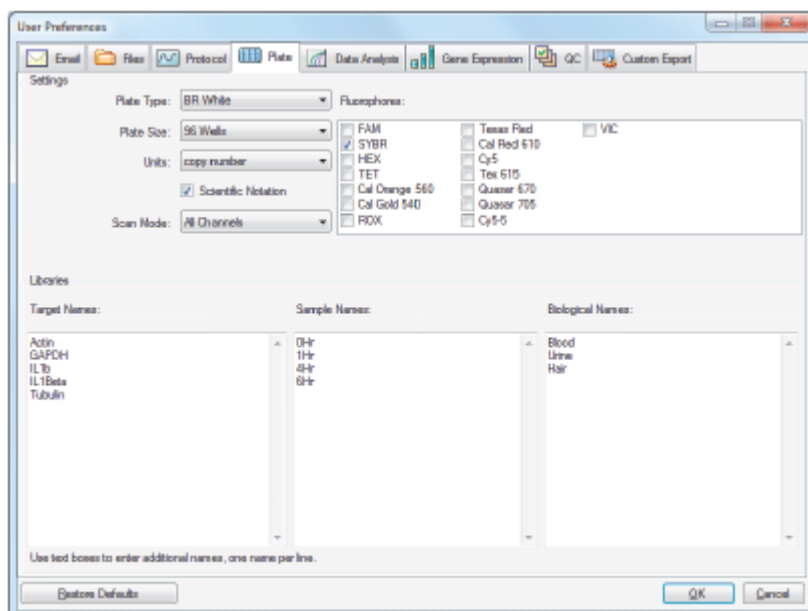
Plate タブへの変更を、ソフトウェアのすべてのユーザーが利用できます。プレート設定中に行う変更は、保存してプレートファイルを閉じた後に、ユーザーが利用できます。

User Preferences ダイアログボックスでは、以下を行えます。

- デフォルトのプレートパラメータの設定。
- 各ライブラリへの新しいターゲット名、サンプル名、および生物学的グループ名の追加。
- 各ライブラリからのターゲット名、サンプル名、および生物学的グループ名の削除。

デフォルトのプレートパラメータの設定方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Plate タブを選択します。



3. 新しいプレートファイルに関する以下の設定の値を指定します。これらの値は、Plate Editor ウィンドウに表示されます。

- **Plate Type (プレートタイプ)**

- **Plate Size (プレートサイズ)**

- **Units (単位)** — 標準物質を含むウェルの初期鑄型濃度。

CFX Maestro では、これらの単位を使用して Data Analysis Quantification タブに検量線を作成します。

- **Scientific Notation (指数表記)** — これを選択すると、CFX Maestro は指数表記で濃度の単位を表示します。

- **Scan Mode (スキャンモード)** — ラン実行時にスキャンするチャンネル数またはチャンネルのタイプ。

- **Fluorophores (蛍光色素)** — Plate Editor のウェルのロードコントロールに表示されるデフォルトの蛍光色素。

- **Libraries (ライブラリ)** — 実験で主に使用するターゲット、サンプル、および生物学的グループ。

- Target Names (ターゲット名)** — ターゲット遺伝子と配列の名称。

- Sample Names (サンプル名)** — 実験サンプルの名称またはサンプルの識別特性（例えば、1Hr）。

- Biological Names (生物学的グループ名)** — 同一の処理状態または条件（例えば、治療済み、未治療、正常、腫瘍）を備えた同様のサンプル群の名称。

4. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

新しいターゲット名、サンプル名、または生物学的グループ名の追加方法

- ▶ 該当するライブラリボックスにターゲット、サンプル、または Biological Group の名称を入力して OK をクリックします。

ターゲット名、サンプル名、または生物学的グループ名の削除方法

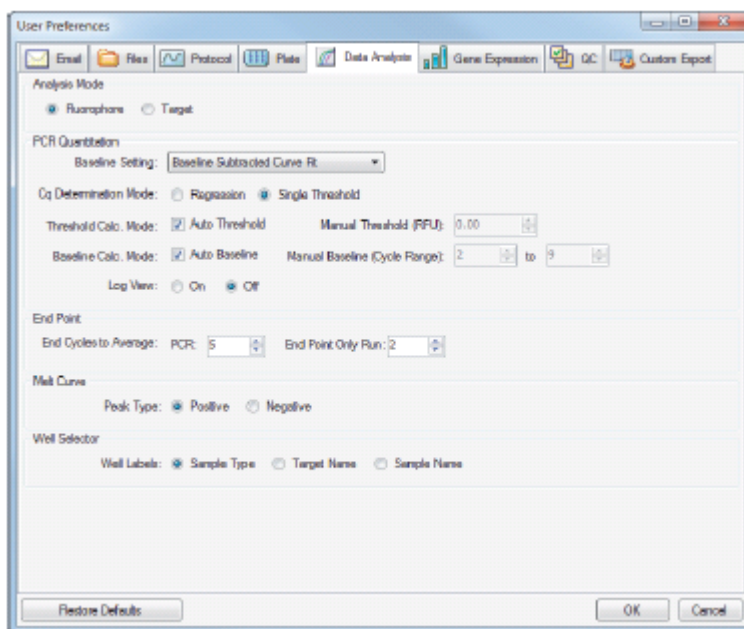
- ▶ 該当するライブラリボックスで名称を選択して Delete キーを押し、OK をクリックします。

重要: ライブラリから削除した名称はソフトウェアから削除されるため、ユーザーは使用できなくなります。デフォルトの CFX Maestro の名称を復元するには、Restore Defaults をクリックします。User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。デフォルトの CFX Maestro の名称を削除する場合およびこのボタンをクリックする場合には注意してください。

デフォルトのデータ解析パラメータの設定

デフォルトのデータ解析パラメータの設定方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Data Analysis タブを選択します。



3. Analysis Mode セクションで、データを解析するためのモードを選択します（Fluorophore（蛍光色素別）または Target（ターゲット））。
4. PCR Quantitation セクションで、以下のオプションのデフォルトパラメータを設定します。
 - **Baseline Setting（ベースライン設定）** — 解析モード用のベースライン手法。
 - **C_q Determination Mode（C_q 計算モード）** — 各蛍光トレースについて C_q 値を計算するモード（回帰法または単一閾値）。
 - **Threshold Calc. Mode（閾値計算モード）** — エンドポイントターゲット量。
デフォルトは Auto です。すなわち、ソフトウェアはエンドポイントターゲットを自動的に計算します。特定の閾値を設定するには、Auto チェックボックスを解除して、相対蛍光単位（または RFU）で計算された指定のエンドポイント量を入力します。最大値は 65000.00RFU です。その後のランのデータファイルでは、この閾値設定が適用されます。
 - **Baseline Calc. Mode（ベースライン計算モード）** — すべてのトレースのベースライン値。
デフォルトは Auto です。すなわち、ソフトウェアはすべてのトレースのベースラインを自動的に計算します。特定のベースライン値を設定するには、Auto チェックボックスを解除して、サイクルレンジ（1～9999）の最小値と最大値を入力します。その後のランのデータファイルでは、このサイクルレンジが適用されます。

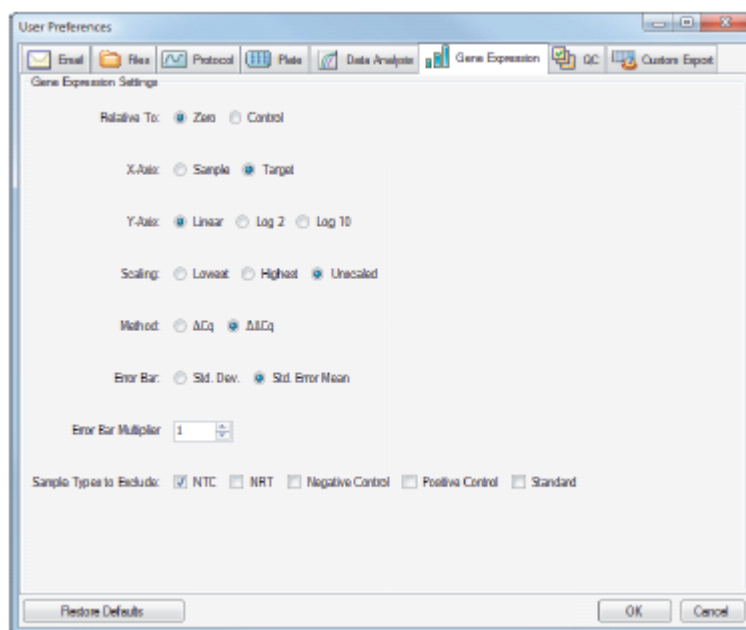
- **Log View (ログ表示)** — ソフトウェアによる増幅データの表示方法を決定する。
 - On (オン)** — 増幅データは片対数グラフで表示される。
 - Off (オフ)** — (デフォルト) 増幅データは線形グラフで表示される。
- 5. End Point セクションで、エンドポイント計算を行う場合に平均化するためのエンドサイクルの数を選択します。
 - **PCR (PCR ラン)** — 定量化データを平均化するためのエンドサイクルの数 (デフォルトは5)。
 - **End Point Only Run (エンドポイントのみのラン)** — エンドポイントデータを平均化するためのエンドサイクルの数 (デフォルトは2)。
- 6. Melt Curve セクションで、検出するピークのタイプを選択します (正または負)。
- 7. Well Selector セクションで、ウェルラベルの表示方法を選択します (サンプルタイプ、ターゲット名称、またはサンプル名称より)。
- 8. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

デフォルトの遺伝子発現データファイルパラメータの設定

新しい遺伝子発現データファイルのデフォルトパラメータの設定方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Gene Expression タブを選択します。



3. 以下の設定の値を指定します。

- **Relative To (相対)** — 対照（1を始点とする）またはゼロに対する遺伝子発現データをグラフ化します。
 - Zero(ゼロ)** — ソフトウェアは対照を無視します。これは、対照サンプルが Experiment Settings ウィンドウで割り当てられていない場合のデフォルトです。
 - Control (対照)** — ソフトウェアは、Experiment Setup ウィンドウで割り当てられている対照サンプルに相対的なデータを計算します。
- **X-Axis (X 軸)** — グラフ x 軸上にサンプルまたはターゲットを選択します。
- **Y-Axis (Y 軸)** — グラフ y 軸上に線形、log2 または log10 のスケールを選択します。
- **Scaling (基準化)** — グラフの基準化オプション。（デフォルトは Unscaled（非基準化）です）
 - Highest (最高点)** — ソフトウェアはグラフをデータの最高点で基準化します。
 - Lowest (最低点)** — ソフトウェアはグラフをデータの最低点で基準化します。
 - Unscaled (非基準化)** — ソフトウェアはグラフの基準化されていないデータを提示します。
- **Method (解析法)** — 正規化発現 ($\Delta\Delta C_q$) または相対発現 (ΔC_q) のいずれかより解析モードを選択します。
- **Error Bar (エラーバー)** — 標準偏差 (Std.Dev.) または平均値の標準誤差 (Std. Error Mean) としてデータの変動を示します。
- **Error Bar Multiplier (エラーバー乗数)** — エラーバーのグラフ化に使用する標準偏差の乗数（デフォルトは1）。

乗数は2または3に変更できます。
- **Sample Types to Exclude (除外するサンプルタイプ)** — 解析から除外するサンプルタイプ。

1つ以上のサンプルを解析から除外することができます。すべてのサンプルタイプを除外するには、選択されているサンプルタイプのチェックボックスを解除します。

4. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

品質管理（QC）ルールのカスタマイズ

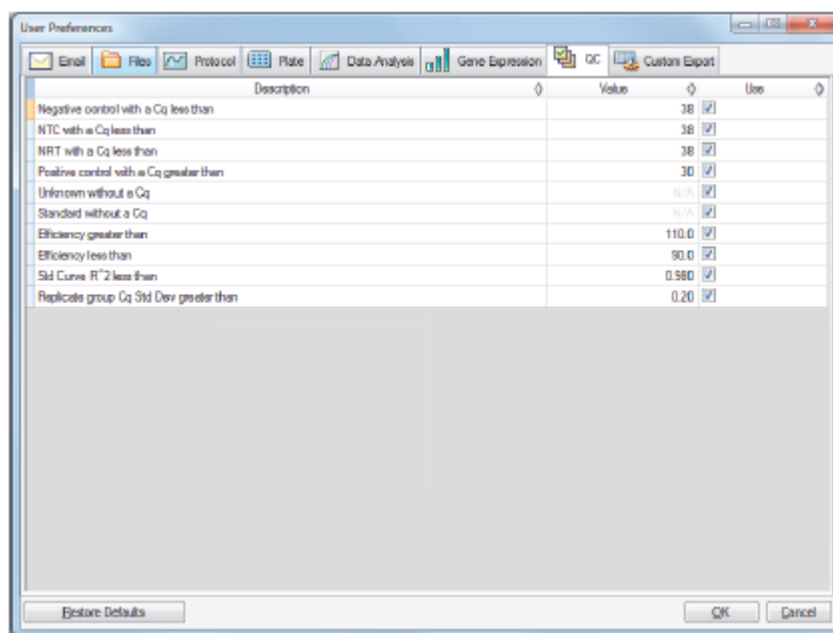
CFX Maestro では、Data Analysis ウィンドウ内のデータに適用される品質管理ルールを設定できます。設定されたルールに反するデータが、ソフトウェアにより検証されます。

注意： デフォルトでは、すべての品質管理ルールが有効です。

アドバイス： QC パラメータを満たさないウェルを、Data Analysis ウィンドウの QC モジュールにおける解析から容易に除外できます。

品質管理ルールのカスタマイズ方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの QC タブを選択します。



ここで、

- **NTC (No Template Control)** — テンプレート無しコントロール
- **NRT (No Reverse transcription Control)** — 逆転写反応無しコントロール
- **Efficiency (効率)** — PCR 効率
- **Std Curve R² (検量線 R²)** — 検量線の R 二乗値 (相関係数)
- **Replicate group Cq Std Dev (リプリケートグループの Cq 標準偏差)** — 各リプリケートグループについて算定される標準偏差。

3. 各 QC ルールについて、以下のいずれかを行います。
 - デフォルト値を使用する場合には、何も行わない。
 - 値を変更する場合、Value テキストボックスをクリックして新しい値を入力し、Enter キーを押す。
 - ルールを無効にする場合には、Use チェックボックスを解除する。
4. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要 : User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

データエクスポートパラメータのカスタマイズ

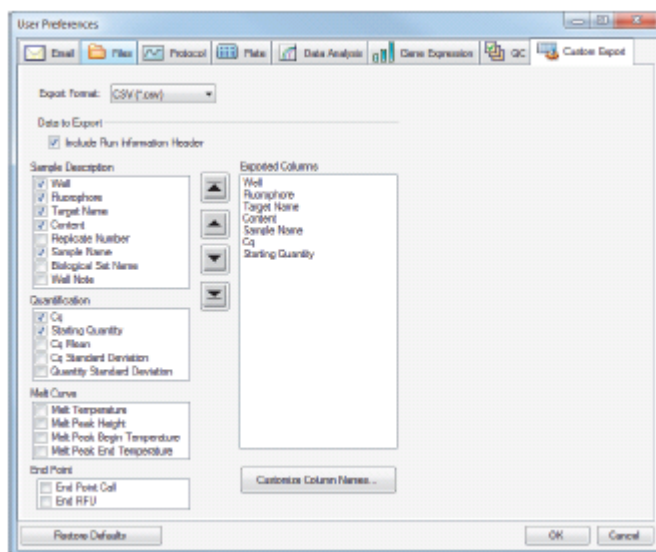
CFX Maestro のデータは以下のフォーマットでエクスポートできます。

- Text (.txt)
- CSV (.csv)
- Excel 2007 (.xlsx)
- Excel 2003 (.xls)
- XML (.xml)
- HTML (.html)

エクスポートするデータのタイプを指定して、エクスポートされるデータの出力をカスタマイズすることができます。

データエクスポートパラメータのカスタマイズ方法

1. Users > User Preferences を選択して User Preferences ダイアログボックスを開きます。
2. User Preferences ダイアログボックスの Custom Export タブを選択します。



3. Export Format ドロップダウンリストから、データをエクスポートするフォーマットを選択します。
4. Data to Export セクションで、エクスポートするデータのタイプに関するチェックボックスを選択または解除します。選択した項目が Exported Columns リストボックスに表示されます。

注意： デフォルトでは、ラン情報がヘッダーに含まれます。ラン情報を含めたくない場合には、このチェックボックスを解除してください。

5. 選択した項目の出力表示順序を変更できます。

Exported Columns リストボックス内の項目を強調表示して、リストの左側にある矢印ボタンをクリックし、それを上下に移動させます。

6. 任意で、選択した項目の出力カラムの名称を以下の手順で変更できます。
 - a. Customize Column Names をクリックします。
Column Name Customizer ダイアログボックスが表示されます。
 - b. 変更したい各デフォルトカラム名について、Custom Name フィールドに新しい名称を入力します。
 - c. 以下のいずれかを行います。
 - OK をクリックして変更を保存し、Custom Export タブに戻る。新しい名称が Exported Columns リストボックス内のデフォルトカラム名の横にある括弧内に表示されます。
 - Cancel をクリックして変更を行わずに Custom Export タブに戻る。

7. OK をクリックして変更を保存し、ダイアログボックスを閉じます。

重要： User Preferences ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、すべてのタブのすべての基本設定が工場出荷時の設定へとリセットされます。このボタンをクリックする際には注意してください。

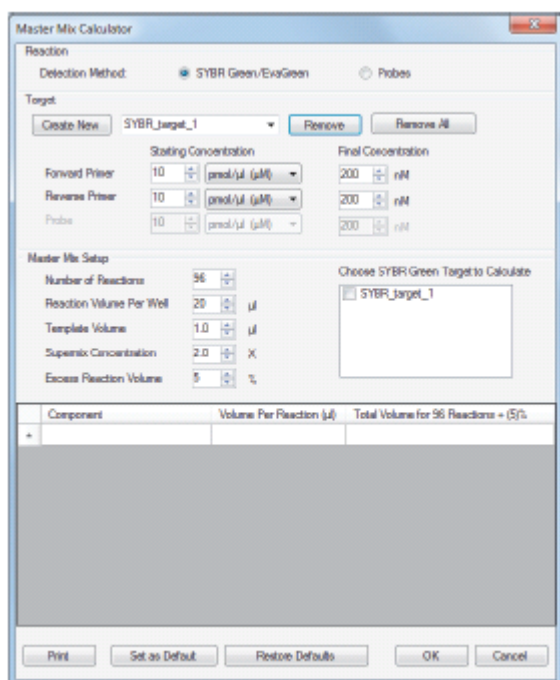
マスターミックス反応液の調製

CFX Maestro の Master Mix Calculator を使用すると、マスターミックス内の必要な各成分量を容易に計算することができます。マスターミックス計算表をデフォルトのプリンターで印刷し、後の使用のために各ターゲットの計算値を保存しておくことができます。

Master Mix Calculator を使用したマスターミックス反応液の調製

- Master Mix Calculator を以下のいずれかの方法で開きます。
 - Tools > Master Mix Calculator を選択する。
 - ツールバーの Master Mix Calculator をクリックする。

Master Mix Calculator が表示されます。



- Reaction セクションで、検出方法を選択します。
 - SYBR[®] Green/EvaGreen
 - Probes (プローブ)
- 新しいターゲットを作成するには、Target セクションの Create New をクリックします。新しいターゲット名がターゲットのドロップダウンリストに表示されます。

4. (オプション) デフォルトのターゲット名を変更するには以下を行います。
 - a. ドロップダウンのターゲットリストにあるターゲット名を強調表示する。
 - b. Target ボックスに新しいターゲット名を入力する。
 - c. Enter キーを押す。
5. フォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブの初期濃度と最終濃度を調節します。
6. Master Mix Setup セクションで以下の値を調節します。
 - ランする反応数
 - 1 ウェルあたりの反応液量
 - 各ウェルに加えるテンプレート液量
 - 1 ウェルあたりのスーパーミックス濃度
 - 1 ウェルあたりの余剰反応液量
7. (オプション) 必要な数のターゲットについて手順2~6を行います。
8. Choose Target to Calculate セクションで計算するターゲットを選択します。

アドバイス: ターゲットの計算は、1つだけ、あるいは同時に複数またはすべてのターゲットについて可能です。

選択したターゲットそれぞれに必要な成分について計算した液量が、マスターミックス表に表示されます。
9. Set as Default をクリックして、各液量の入力を新しいデフォルト値として Target and Master Mix Setup セクションに設定します。
10. OK をクリックして Master Mix Calculator ダイアログボックスの内容を保存します。

マスターミックス計算表の印刷方法

- ▶ マスターミックス計算表を印刷するには、Print をクリックします。

計算表は、デフォルトのプリンターに印刷されます。

マスターミックス計算表を PDF ファイルに保存する方法

- ▶ お使いのデフォルトのプリンターを PDF ドライバに変更し、Master Mix Calculator の Print をクリックします。

ターゲットの削除方法

- ▶ ターゲットのドロップダウンリストでターゲットを選択して Remove をクリックします。

重要: ターゲットは、ターゲットリストから削除されると、そのターゲットを使用しているマスターミックス計算からも削除されます。ターゲットを削除する際は注意してください。

新しい色素のキャリブレーション

CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well および CFX Connect の各システムは、白色ウェルプレートおよび透明ウェルプレートで高頻度に使用される蛍光色素に対し工場出荷時にキャリブレーションされています。CFX384 Touch システムは、白色ウェルプレートのみ工場でのキャリブレーション処理済みです。表 4 に、各機器のキャリブレーションを要する蛍光色素とチャンネルを記載します。

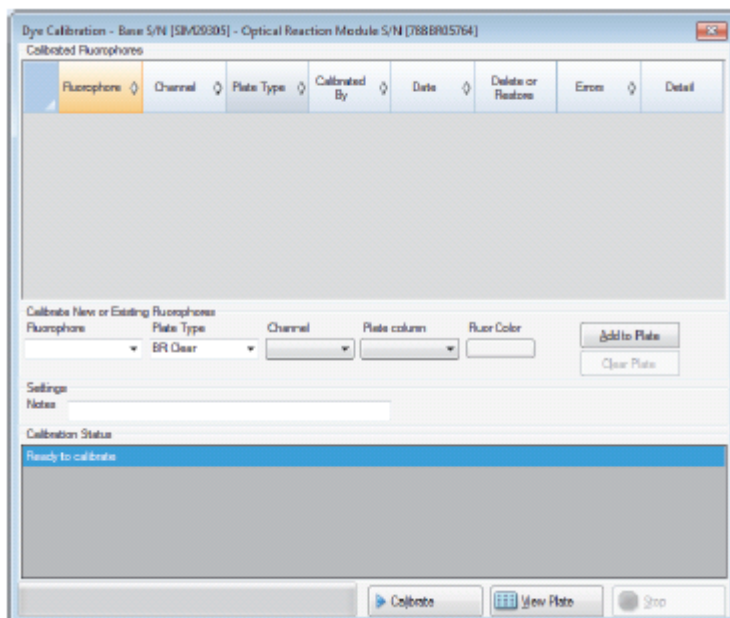
注意：CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各システムは、FRET ケミストリーに適したチャンネルを含みます。このチャンネルに対しては、特定の色素のキャリブレーションが不要です。

表 4 工場でのキャリブレーション済みの蛍光色素、チャンネルおよび機器

蛍光色素	チャンネル	励起 (nm)	検出 (nm)	機器
FAM, SYBR [®] Green I	1	450~490	515~530	CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各システム
VIC, HEX, CAL Fluor Gold 540, Cal Fluor Orange 560	2	515~535	560~580	CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各システム
ROX, Texas Red, CAL Fluor Red 610, TEX 615	3	560~590	610~650	CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well および CFX384 Touch の各システム
CY5, Quasar 670	4	620~650	675~690	CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well および CFX384 Touch の各システム
Quasar 705, Cy5.5	5	672~684	705~730	CFX96 Touch および CFX96 Touch Deep Well の 2 システムのみ

CFX システム用の新しい色素のキャリブレーション方法

1. Home ウィンドウの Detected Instruments ペインでターゲットの機器を選択します。
2. Tool > Calibration Wizard を選択して Dye Calibration ウィザードを開きます。



ターゲット機器についてすでにキャリブレーションされている蛍光色素が Calibrated Fluorophores 表に表示されます。

3. Calibrate New または Existing Fluorophores セクションで、ドロップダウンリストからキャリブレーションする蛍光色素を選択します。

蛍光色素の名称がリストに含まれていない場合には、テキストボックスに名称を入力してリストに追加してください。

4. 蛍光色素のプレートタイプを選択します。

プレートタイプがリストに含まれていない場合には、テキストボックスに名称を入力してリストに追加してください。

5. 蛍光色素のチャンネルを選択します。
6. 蛍光色素のプレートカラムを選択します。
7. (オプション) 蛍光色素に関連付ける色を入力します。

8. Add to Plate をクリックして蛍光色素を追加します。

9. (オプション) 手順 3 ~ 8 を繰り返し行い、プレートに対してキャリブレーションしたい蛍光色素を追加します。

10. 蛍光色素の追加を完了したら、View Plate をクリックして Pure Dye Plate Display ウィンドウを開きます。

このウィンドウは、プレートに色素を設定する際のガイドとなります。

11. 色素のキャリブレーション用に 96 ウェルプレートまたは 384 ウェルプレートの調製を行います。
 - a. Pure Dye Plate Display に示すパターンにしたがい、色素溶液を各ウェルに分注する。
 - b. 蛍光色素ごとに、50 μ L (96 ウェルプレート) または 30 μ L (384 ウェルプレート) の 300 nM 色素溶液を 4 つのウェルに注入します。なお、プレート内の半分以上は空のウェルを含めてください。
 - c. 実験に使用する方法でプレートをシーリングします。
12. ブロック内にキャリブレーションプレートをセットして、リッドを閉じます。
13. Dye Calibration ウィザードの Calibrate をクリックした後、OK をクリックしてプレートがブロック内にあることを確認します。
14. CFX Maestro ソフトウェアによってキャリブレーションのランが完了すると、ダイアログボックスが表示されます。Yes をクリックすると、キャリブレーションが終了し、Dye Calibration Viewer が表示されます。
15. OK をクリックしてウィンドウを閉じます。

第5章 プロトコールの作成

プロトコールは、特定の配列で実行されるステップのセットです。CFX Maestro ソフトウェアでは、すべてのステップが機器のオプションに関連付けられています。例えば、ステップは機器にブロックとリード温度の制御を指示し、ブロック間の温度差を適用し、プレートリード、あるいは融解曲線の解析を実施します。各オプションは、各種プレートおよびランタイプについて指定されます。

CFX Maestro では、Protocol Editor と Protocol AutoWriter の2つのプロトコール作成用オプションをご提供します。

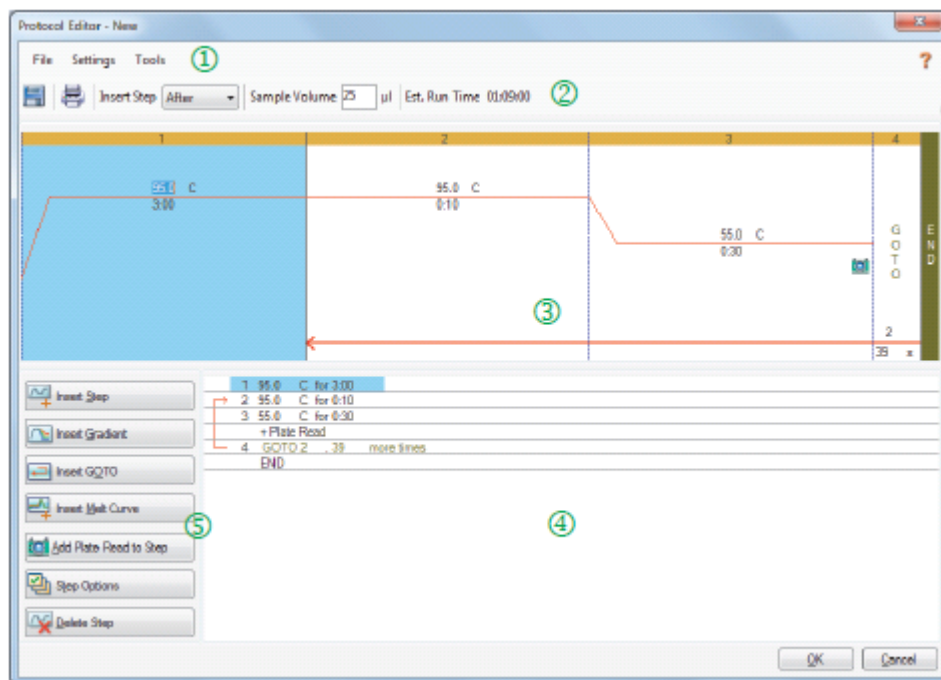
Protocol Editor は、以下を含むことを特徴としています。

- プロトコールを迅速に作成するための標準プロトコールコントロールボタン
- 温度グラジェントを迅速に計算する機能
- 選択したプレートタイプのラン時間を迅速に計算する機能
- プロトコールのステップを編集する機能
- 再使用のためにプロトコールを保存する機能
- プロトコールをデフォルトのプリンターに印刷する機能

Protocol AutoWriter は、提供されるパラメータを使用して、ホットスタート、初期変性、アニーリング、および伸長の各ステップを含むカスタマイズされた PCR プロトコールを自動的に生成します。これにより、推奨されるプロトコールをグラフィックで表示でき、さらにプロトコールの編集、ラン、または保存を行えます。

Protocol Editor ウィンドウ

Protocol Editor を使用して、プロトコールを作成し、開き、レビューし、さらに編集します。デフォルトでは、Protocol Editor が開くと 96 ウェルプレート用の一般的なリアルタイム 2 ステッププロトコールが表示されます。



説明

- | | |
|---|--|
| 1 | メニューバーは、File、Settings および Tools の各メニューコマンドへの迅速なアクセスを提供します。 |
| 2 | ツールバーは、プロトコールの保存と印刷、ステップを挿入する場所の決定、サンプル容量の設定、および推定されるプロトコールのラン時間の表示を迅速に行います。 |
| 3 | メインペインには、プロトコールのグラフィック表現が表示されます。 |
| 4 | 下部のペインには、プロトコールのアウトラインが表示されます。 |
| 5 | 左側のペインには、プロトコールをカスタマイズするために追加できるプロトコールコントロールボタンが表示されます。 |

File メニューコマンド

Save (保存) — 現在のプロトコールを保存します。

Save As (別名で保存) — 現在のプロトコールを新しい名前または新しい場所に保存します。

Close (閉じる) — Protocol Editor を閉じます。

Settings メニューコマンド

Lid Settings (リッドの設定) — Lid Setting ダイアログボックスを開きます。ここではリッド温度の変更や設定を行えます。

Tools メニューコマンド

Gradient Calculator (グラジエント計算機) — このダイアログボックスでは、グラジエントステップを行うブロックタイプを選択できます。デフォルトは 96 ウェルです。

Run time Calculator (ラン時間計算機) — このダイアログボックスでは、Run Setup ウィンドウの推定ラン時間を計算するための、プレートタイプとスキャンモードを選択できます。デフォルトは 96 ウェルとすべてのチャンネルになっています。

Toolbar コマンド



— 現在のプロトコールファイルを保存します。



— 選択しているウィンドウを印刷します。

Insert Step

— このコマンドを使用して、現在選択しているステップのどちら側にステップを挿入するかを選択します。

Sample Volume μL

— このコマンドを使用して、 μL 単位でサンプル容量を入力します。サンプル容量はブロックのタイプによって異なります。

- 96 ディープウェルブロックの場合、0~125 μL の範囲
- 96 ウェルブロックの場合、0~50 μL の範囲
- 384 ウェルブロックの場合、0~30 μL の範囲

サンプル容量の詳細については、73 ページの「[サンプル容量の設定](#)」を参照してください。

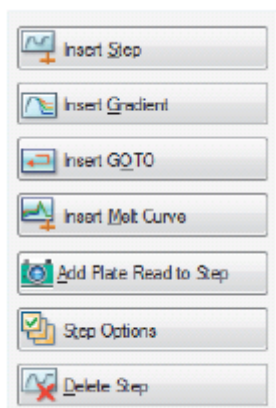
Est. Run Time 01:39:00 — プロトコールのステップ、加温・冷却速度、および選択しているブロックのタイプから推定されたラン時間を表示します。



— プロトコールに関する Help 情報を表示します。

プロトコール編集用コントロールボタン

Protocol Editor ウィンドウの左側のペインには、プロトコール作成用のコントロールボタンが含まれます。



各コントロールボタンは、プロトコール内の1ステップを示すパラメータセットからなります。各パラメータを修正し、それを追加または削除してプロトコールをカスタマイズすることができます。本節では、各コントロールボタンのオプションについて説明します。

- **Insert Step (ステップの挿入)** — 選択しているステップの前または後にステップを挿入します。温度と保持時間の値をプロトコールのグラフィック表示またはプロトコールのアウトラインで編集することができます。
- **Insert Gradient (グラジェントの挿入)** — グラジェント計算機で選択されたウェルブロックのタイプに基づき、グラジェントステップを挿入します。グラジェントステップを挿入すると表示される Gradient ペインで、グラジェント範囲を編集することができます。
- **Insert GOTO (GOTO の挿入)** — ソフトウェアに、指定のサイクル数だけ指定のステップを順次反復させるサイクリング (ループ) ステップを挿入します。反復は、最初のサイクル完了後に始まります。例えば、ソフトウェアにステップ 2~4 を 39 回反復させることができます。最後の反復後、ソフトウェアはステップ 2~4 を合計 40 回行ったこととなります。グラフィック表示またはプロトコールのアウトラインで return-to (GOTO) ステップとサイクル数を編集することができます。
- **Insert Melt Curve (融解曲線を挿入)** — 融解曲線の読み取りステップを挿入します。
- **Insert Plate Read to Step (プレートリードステップを挿入)** — 選択しているステップにプレートリードコマンドを追加します。プレートリードでは、サイクルの最後における蛍光色素の量を測定します。プレートリードステップは一般に、GOTO ループの最後のステップになっています。

アドバイス: プレートリードコマンドをステップに追加した後、そのステップを選択するとボタンが Remove Plate Read に変わります。
- **Remove Plate Read (プレートリードを削除)** — 選択しているステップからプレートリードコマンドを削除します。

アドバイス: プレートリードコマンドをステップから削除した後、そのステップを選択するとボタンが Add Plate Read to Step に変わります。

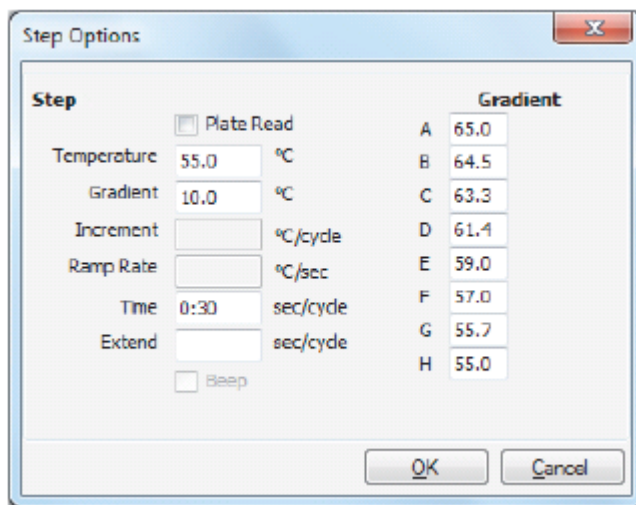
- **Step Options (ステップのオプション)** — Step Options ダイアログボックスを開くと、選択しているステップで使用できるオプションが表示されます。ステップのオプションに関する詳細については、69 ページの「[ステップのオプション](#)」を参照してください。

アドバイス : Step Options へのアクセスは、グラフィック表示内のステップを右クリックしても行えます。

- **Delete Step (ステップの削除)** — プロトコールから選択しているステップを削除します。

ステップのオプション

Step Options ダイアログボックスを開くと、ステップに追加、変更、またはステップから削除できるオプションが表示されます。



- **Plate Read (プレートリード)** — これを選択すると、ステップにプレートリードが追加されます。

- **Temperature (温度)** — 選択しているステップにおけるターゲット温度を設定します。

- **Gradient (グラジェント)** — ステップのグラジェント範囲を設定します。範囲は1~24 °Cです。

注意 : グラジェントのランは、ブロックの前方 (画像では列 H) では最低温度、ブロックの後方 (画像では列 A) では最高温度で実行されます。

- **Increment (増分)** — 選択しているステップの温度の増加 (または減少) 量。この値は、各サイクルでターゲット温度に追加されます。範囲は±0.1~10 °Cです。

注意 : 温度を低下させるには、数値の前にマイナス記号 (-) を入力してください (例えば、-5 °C)。

- **Ramp Rate (加温・冷却速度変化)** — 選択しているステップの加温・冷却速度変化。範囲はブロックサイズによって異なります。

- **Time (時間)** — 選択しているステップの保持時間です。

- **Extend (延長)** — 選択しているステップを延長または短縮する時間 (秒単位)。このオプションは各サイクルの保持時間に追加されます。範囲は1~60 秒です。

- **Beep (ピープ音)** — これを選択すると、ステップの最後にピープ音が鳴ります。

アドバイス : オプションの範囲外の数値を入力すると、ソフトウェアは範囲内でその値に最も近い値へ変更します。

Protocol Editor でプロトコールを作成

Protocol Editor を使用してカスタムプロトコールファイルを作成することができます。また、以前保存したプロトコールファイルや CFX Maestro ソフトウェアと同梱されたサンプルプロトコールファイルの編集や保存も可能です。

新しいプロトコールファイルを作成するには、以下を行います。

- Protocol Editor でプロトコールファイルを開く。
アドバイス : Protocol Editor で、新規または既存のプロトコールを開くことができます。
- 新しいプロトコールの設定。
- プロトコールコントロールボタンのペインからプロトコールにステップを追加する。
- ステップのプロパティの編集。
- プロトコールの保存。

アドバイス : 以前保存したプロトコールファイルまたはサンプルプロトコールファイルから新しいプロトコールを作成するには、71 ページの「[Protocol Editor で既存のプロトコールを開く](#)」を参照してください。

Protocol Editor で新しいプロトコールファイルを開く

CFX Maestro は、新しいプロトコールファイルを開くための以下の複数のオプションをご提供します。

- Home ウィンドウから開く。
- Startup Wizard ダイアログボックスから開く。
- Run Setup ダイアログボックスから開く。

Home ウィンドウから新しいプロトコールファイルを開く方法

- ▶ File > New > Protocol を選択します。

Protocol Editor ウィンドウが開き、デフォルトのプロトコールファイルが表示されます。

アドバイス : デフォルトのプロトコールの設定に関する詳細については、49 ページの「[デフォルトのファイル設定の変更方法](#)」を参照してください。

Startup Wizard から新しいプロトコールファイルを開く方法

1. Startup Wizard が見当たらない場合には、Home ウィンドウで以下のいずれかを行い、Startup Wizard を開きます。
 - View > Startup Wizard を選択する。
 - ツールバーの Startup Wizard をクリックする。デフォルトでは、Startup Wizard には CFX96 が選択されている Run Setup タブが表示されます。
2. 必要に応じて、ドロップダウンリストから機器タイプを選択します。
3. ランタイプとして User-defined をクリックします。
Run Setup ダイアログボックスで Protocol タブが開き、デフォルトのプロトコールファイルが表示されます。

4. Create New をクリックします。

Protocol Editor ウィンドウが開き、デフォルトのリアルタイムプロトコールが表示されます。

Run Setup ダイアログボックスから新しいプロトコールを開く方法

1. Home ウィンドウで以下のいずれかを行い、Run Setup ダイアログボックスを開きます。

- Run > User-defined Run を選択する。
- ツールバーで User-defined Run Setup をクリックする。

Run Setup ダイアログボックスで Protocol タブが開かれ、デフォルトのプロトコールファイルが表示されます。

2. Create New をクリックします。

Protocol Editor ウィンドウが開き、デフォルトのリアルタイムプロトコールが表示されます。

Protocol Editor で既存のプロトコールを開く

CFX Maestro は、カスタムの新規プロトコールとして編集と保存が可能なサンプルプロトコールファイルをご提供します。また、既存のカスタムプロトコールから新規プロトコールを作成することも可能です。

サンプルプロトコールファイルを開く方法

1. Home ウィンドウで File > Open > Protocol を選択します。

デフォルトでは、Windows Explorer で CFX Maestro の Sample ファイルフォルダの場所が開かれます。

2. Sample ファイルフォルダを開くと、以下のフォルダが見つかります。

- **ConventionalProtocols** — 従来の PCR 解析用のプロトコールファイルの例を含む。
- **DataFiles** — CFX Maestro の機能を探索するために使用できるデータファイルの例を含む。
- **MeltCalibration** — パイオ・ラッド社の Precision Melt Analysis ソフトウェアで使用するプロトコールファイルの例を含む。
- **Plates** — プレートファイルの例を含む。
- **RealTimeProtocols** — リアルタイム PCR 解析用のプロトコールファイルの例を含む。

3. ConventionalProtocols または RealTimeProtocols のいずれか実行したいランタイプのプロトコールフォルダを開きます。

4. 最適なプロトコールを選択して Open をクリックします。

サンプルプロトコールが Protocol Editor ウィンドウで開かれます。

5. File > Save As を選択して、新しい名称で、または新しいフォルダ内にプロトコールを保存します。

既存のプロトコールを開く方法

- Home ウィンドウで以下のいずれかを行います。
 - File > Open > Protocol を選択してナビゲートし、ターゲットプロトコールを選択して Open をクリックする。
 - Startup Wizard を開き、以下のいずれかを行う。
 - 表示されたプロトコールを編集するには、Edit Selected をクリックする。
 - 別の既存のプロトコールを編集するには、Select Existing をクリックしてターゲットファイルにナビゲートする。
- Protocol Editor ウィンドウでプロトコールが開きます。
- File > Save As を選択して、新しい名称で、または新しいフォルダ内にプロトコールを保存します。

新しいプロトコールの設定

アドバイス: お使いのプロトコールファイルが必要なパラメータを含んでいる場合（例えば、既存のプレートファイルを編集している場合）、本節をスキップすることができます。その場合には 74 ページの「[プロトコールへのステップの追加](#)」に進んでください。

新しいプロトコールファイルには以下のパラメータが必要です。

- ブロックタイプ
- 選択したブロックタイプのスキャンモード
- リッド温度
- サンプル容量

ブロックタイプの設定

CFX Maestro では、ブロックタイプに基づき、グラジェントステップ用の温度増減を自動的に計算します。

注意: Protocol Editor で設定されるプレートタイプは、リアクションモジュールのプレートと同一とします。

ブロックタイプの設定方法

- ▶ Protocol Editor ウィンドウで Tools > Gradient Calculator を選択し、表示されるドロップダウンリストから該当するプレートタイプを選びます。

選択したブロックタイプのスキャンモードを選択

プロトコールのラン時間を求めるため、ターゲットのブロックタイプとスキャンモードを選択します。

ブロックタイプとスキャンモードの選択方法

- ▶ Protocol Editor ウィンドウで Tools > Run time Calculator を選択し、表示されるドロップダウンリストから該当するプレートタイプとスキャンモードを選びます。

リッド温度の調節

CFX Maestro では、デフォルトのリッド温度を以下のように設定します。

- 96 ウェル機器 — 105.0 °C
- 384 ウェル機器 — 95.0 °C
- 48 ウェル機器 — 100.0 °C

必要に応じてプロトコルのリッドヒーターに関するデフォルト設定を変更し、またはリッドヒーターを切ることができます。

アドバイス：デフォルトのリッド温度は、User Preferences ダイアログボックスで変更できます。50 ページの「[デフォルトのプロトコルパラメータの設定](#)」を参照してください。

リッド温度の調節方法

1. Plate Editor ウィンドウで Settings > Lid Settings を選択します。
Lid Settings ダイアログボックスが表示されます。
2. 以下のいずれかを行います。
 - User Defined を選択してテキストボックスに温度値を入力する。
 - Turn Off Lid Heater を選択する。
3. OK をクリックして変更を受け入れ、ダイアログボックスを閉じます。

サンプル容量の設定

デフォルトでは、CFX Maestro は各ウェルのサンプル容量を 25 µL に設定します。サンプル容量は、例えば以下のようにブロックのタイプによって異なります。

- 96 ディープウェルブロックの場合は 0~125 µL
- 96 ウェルブロックの場合は 0~50 µL
- 384 ウェルブロックの場合は 0~30 µL

機器では、以下の 2 つの温度制御モードを使用して、いつサンプルがプロトコル内のターゲット温度に到達するかを判定します。

- **Calculated (計算) モード** — サンプル容量がブロックに適した容量に設定される場合、サーマルサイクラーはサンプル容量に基づいてサンプル温度を計算します。このモードが標準モードとなります。
- **Block (ブロック) モード** — サンプル容量がゼロ (0) µL に設定される場合、サーマルサイクラーはサンプル温度を測定ブロック温度と同等であると記録します。

特定ブロックのサンプル容量の設定方法

- ▶ Plate Editor ウィンドウのツールバーにある Sample Volume テキストボックスに正しい値を入力します。

アドバイス：User Preferences ダイアログボックスでデフォルトのサンプル容量を変更できます。51 ページの「[デフォルトのプレートパラメータの設定方法](#)」を参照してください。

プロトコールへのステップの追加

プロトコールにステップを追加する方法

1. Protocol Editor ウィンドウでプロトコールを開きます。
2. 新しいステップを挿入する位置を決めます。ツールバーの Step ドロップダウンリストで Before または After を選択します。
3. グラフ上で、新しいステップが前か後に挿入されるステップを選択します。
4. 左側のペインで Insert Step をクリックします。
5. 温度または保持時間を変更するには、グラフまたはプロトコールのアウトラインのデフォルト値をクリックして新しい値を入力してください。
6. (オプション) 左側のペインの Step Options をクリックして Step Options ダイアログボックスを表示し、選択しているステップで使用できるオプションを変更します。

アドバイス： グラフペインまたはプロトコールのアウトラインのペインの右クリックメニューでも、Step Options ダイアログボックスにアクセスすることができます。

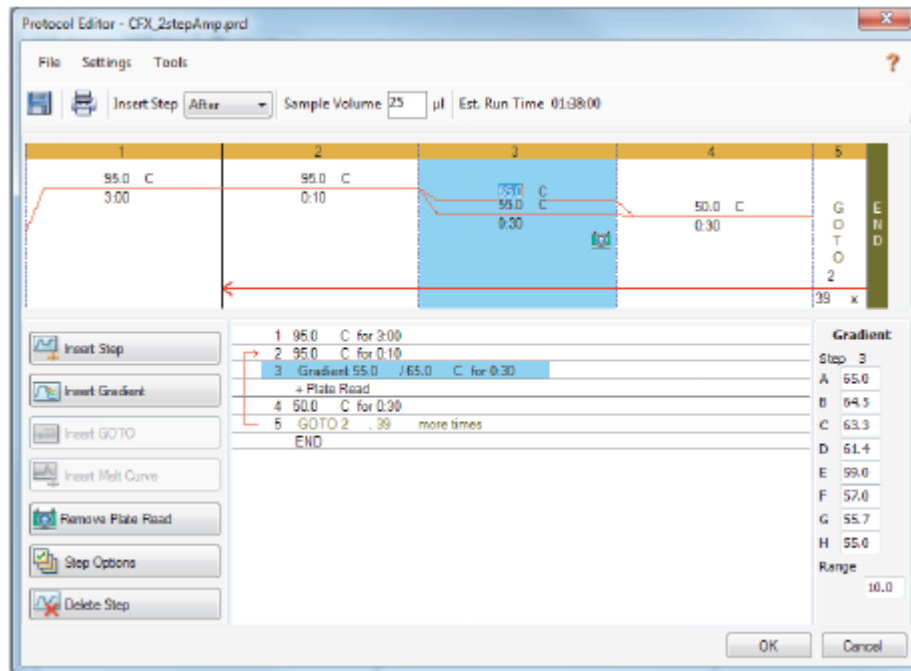
7. OK をクリックした後で Yes をクリックし、プロトコールへの変更を保存します。Save As ダイアログボックスが表示されます。
8. Save As ダイアログボックスで、新しいプロトコールファイルの名称を入力し、Save をクリックします。

グラジェントステップを挿入

グラジェントステップの挿入方法

1. グラジェント用のプレートサイズが、機器のブロックタイプと同じであることを確認してください (96 ウェルまたは 384 ウェル)。
2. プレートサイズをまだ選択していない場合には、グラジェント用のプレートサイズを選択してください。

Tools > Gradient Calculator を選択して、ドロップダウンリストから該当するウェルタイプを選択します。
3. ツールバーの Insert Step ドロップダウンリストから Before または After を選択します。
4. グラフまたはアウトラインのペインで、グラジェントステップが挿入される前か後のステップを選択します。
5. 左側のペインで Insert Gradient をクリックします。新しいグラジェントステップが、例えば以下のようにグラフまたはアウトラインのペインで強調表示されます。



グラジェントの各列の温度が、右側のペインの Gradient 表に表示されます。

- グラジェント温度の範囲を編集するには、以下のいずれかを行います。
 - グラフまたはアウトラインペインのデフォルトの温度をクリックし、新しい温度を入力する。
 - Step Options をクリックし、Step Options ウィンドウにグラジェント範囲を入力する。
 - Gradient 表の Range 値を変更する。
- 保持時間を編集するには、グラフィック表示またはテキスト表示内のデフォルト時間をクリックして新しい時間を入力します。
- OK をクリックした後に Yes をクリックし、変更を保存します。

GOTO ステップを挿入

注意: GOTO セット内に GOTO ステップを挿入することはできません。入れ子型の GOTO ループを作成することはできません。

GOTO ステップの挿入方法

- ツールバーの Insert Step ドロップダウンリストから Before または After を選択します。
- グラフで、GOTO ステップが挿入される前または後のステップを選択します。
- 左側のペインで Insert GOTO をクリックします。
- GOTO ステップ番号または GOTO の反復回数を編集するには、グラフまたはアウトラインペインのデフォルトの数値を選択して新しい値を入力してください。
- OK をクリックした後に Yes をクリックし、変更を保存します。

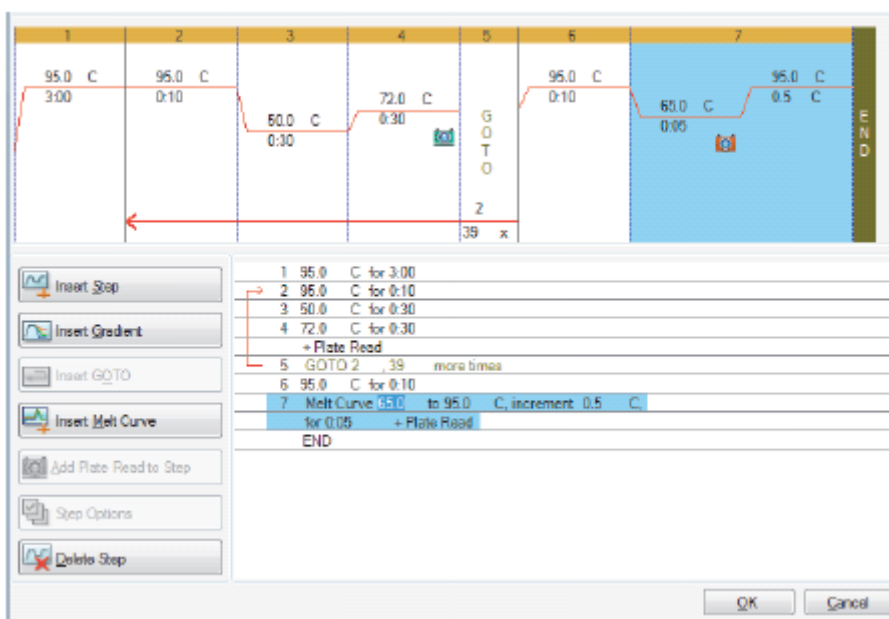
融解曲線(Melt Curve)ステップを挿入

アドバイス : GOTO ループ内には融解曲線ステップを挿入することができません。

注意 : 融解曲線(Melt Curve)ステップには、ステップの最初に、プロトコールには表示されない 30 秒間の待機時間が含まれます。

融解曲線ステップの挿入方法

1. ツールバーの Insert Step ドロップダウンリストから、Before または After を選択します。
2. グラフで、融解曲線ステップが挿入される前または後のステップを選択します。
3. 左側のペインで Insert Melt Curve をクリックします。新しい融解曲線ステップが、例えば以下のように、グラフまたはアウトラインペイン内で強調表示されます。



4. 融解温度範囲または増加時間を編集するには、グラフまたはアウトラインペイン内のデフォルトの数値を選択し、新しい値を入力してください。
5. OK をクリックした後で Yes をクリックし、変更を保存します。

プレートリードステップの追加または削除

アドバイス：ステップにプレートリードコマンドを追加した後、このステップを選択するとボタンは Remove Plate Read に変わります。

ステップにプレートリードを追加する方法

1. ツールバーの Insert Step ドロップダウンリストから、Before または After を選択します。
2. グラフで、プレートリードステップが挿入される前または後のステップを選択します。
3. 左側のペインで、Add Plate Read to Step をクリックしてプレートリードを選択しているステップに追加します。
4. OK をクリックした後で Yes をクリックし、変更を保存します。

プレートリードをステップから削除する方法

- ▶ グラフでプレートリードを含むステップを選択し、左側のペインにある Remove Plate Read をクリックします。

ステップオプションの変更

選択しているステップのステップオプションの変更方法

1. グラフまたはアウトラインペインのターゲットステップを選択します。
2. 左側のペインの Step Options をクリックし、Step Options ダイアログボックスを開きます。代替的に、いずれかのペインのターゲットステップを右クリックして、表示されるメニューの Step Options を選択することもできます。
3. オプションの追加、修正、または削除の方法：
 - 該当するテキストボックスに値を入力する。
 - 特定のテキストボックス内の値を編集する。
 - チェックボックスを選択または解除する。
4. OK をクリックして変更を保存し、Step Options ダイアログボックスを閉じます。
5. OK をクリックした後で Yes をクリックし、プロトコールを保存します。

ステップの削除

重要：この機能を元に戻すことはできません。ステップを削除する際には注意してください。

プロトコール内のステップの削除方法

1. グラフまたはアウトラインペイン内のステップを選択します。
2. 左側のペインの Delete Step をクリックして、選択しているステップを削除します。
3. OK をクリックした後で Yes をクリックし、プロトコールを保存します。

プロトコールのコピー、エクスポート、または印刷

プロトコールのコピー方法

- ▶ プロトコールのアウトラインを右クリックして Copy Protocol を選択します。
アウトラインは、.txt、.xls、.doc または .ppt などのファイルにペーストできます。

プロトコールのエクスポート方法

1. プロトコールのアウトラインを右クリックし、Export Protocol を選択します。
Save As ダイアログボックスが表示されます。
2. (オプション) Windows Explorer で、プロトコールファイルを保存するフォルダにナビゲートします。
3. File name にエクスポートされるプロトコールファイルの名称を入力します。
4. Save をクリックします。

プロトコールの印刷方法

- ▶ プロトコールのアウトラインを右クリックし、Print を選択します。
プロトコールのアウトラインは、デフォルトのプリンターに印刷できます。

Protocol AutoWriter を使用したプロトコールの作成

重要 : バイオ・ラッド社は、Protocol AutoWriter で作成したプロトコールの実行によって常に PCR 生成物が得られることを保証しません。

CFX Maestro の Protocol AutoWriter は、以下の入力パラメータに基づいて PCR サイクルプロトコールを自動的に生成します。

- **Amplicon Length (アンプリコン長さ)** — PCR 生成物の予測される長さ

- **Annealing Temperature (アニーリング温度)** — 使用するプライマーの反応 T_a

T_a が未知の場合、 T_a 計算機を使用すれば、プライマー配列に基づいて自動的に計算できます。

注意 : T_a は、選択している酵素およびプロトコール速度に基づくプライマーの融解温度 (T_m) 情報により調節されます。

- **Enzyme type (酵素タイプ)** — DNA ポリメラーゼ酵素 (iTaQ、iProof DNA ポリメラーゼまたはその他)

iTaQ や iProof DNA ポリメラーゼ以外の酵素を使用する場合には、グラジェント範囲、Hot Start 活性化時間 (秒単位)、および最終的な延長時間 (秒単位) を含む追加情報を入力できます。

- **Run speed (ラン速度)** — 反応速度 (標準、高速、または超高速)

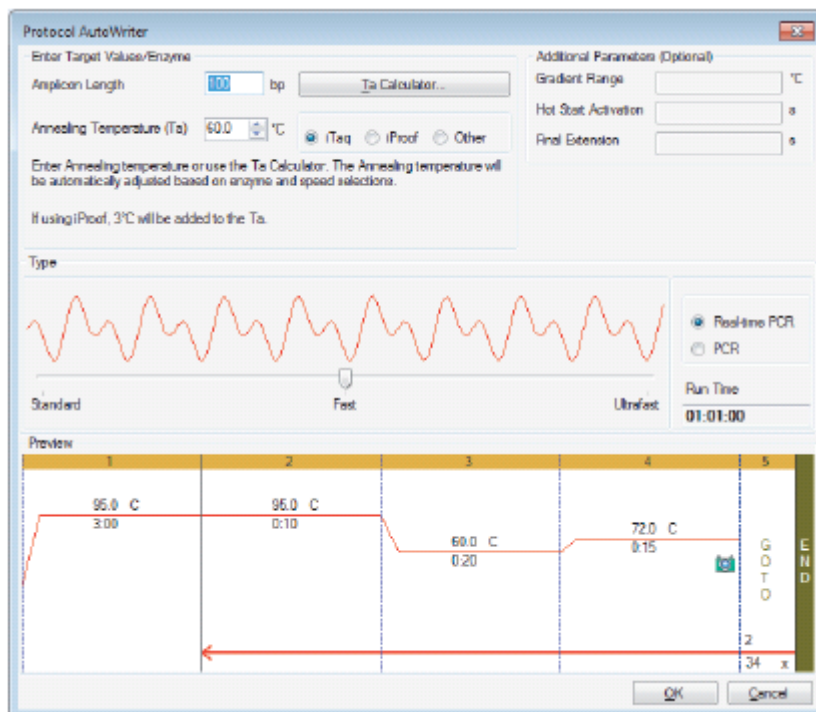
Protocol AutoWriter では、選択される速度設定に応じてプロトコールを最適化します。合計のラン時間は、ステップやサイクルの数、各ステップのインキュベーション時間、およびターゲット温度に均一になるまでの時間により決まります。

入力したパラメータと標準 PCR ガイドラインを使用することで、Protocol AutoWriter は、Hot Start、初期変性、アニーリング、および延長の各ステップを含むカスタマイズされた PCR プロトコールを自動的に生成します。これにより、推奨されるプロトコールのグラフィック表現を表示でき、さらにプロトコールの編集、実行、または保存が可能です。

CFX Maestro の Protocol AutoWriter を使用した新しいプロトコルの作成方法

1. Home ウィンドウの Tools > Protocol AutoWriter を選択します。

Protocol AutoWriter ダイアログボックスが表示されます。



2. Enter Target Values/Enzyme セクションで以下を行います。

- わかっている場合には、プライマーのアニーリング温度 (T_a) を入力する。

アドバイス : プライマーのアニーリング温度がわからない場合には、T_a Calculator をクリックしてください。T_a Calculator で、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの各配列を入力してアニーリング温度が計算されます。詳細については、82 ページの「Ta Calculator の使用」を参照してください。

注意 : T_a Calculator で使用する計算の詳細については、Breslauer et al. 1986 を参照してください。

- 塩基ペア (bp) にアンプリコン長さを入力する。
- オプションのリストから酵素タイプを選択する (iTaQTM DNA ポリメラーゼ、iProofTM DNA ポリメラーゼ、またはその他)。

アドバイス : 酵素タイプで Others (その他) を選択すると、Additional Parameters (オプション) セクションのパラメータがアクティブ状態になります。

3. 酵素タイプで Other を選択した場合、以下のパラメータのいずれかまたはすべてをプロトコールに追加します。
 - グラジェント範囲
 - Hot Start 活性化温度
 - 最終伸長時間
4. Type セクションでスライダーを移動してプロトコール速度を選択します（Standard、Fast または Ultrafast [標準、高速、または超高速]）。CFX Maestro が合計ラン時間を調節します。
5. 実施する PCR のタイプを選択します（デフォルトはリアルタイム PCR になっています）。リアルタイム PCR を使用すると、CFX Maestro はプレートリードステップを追加して蛍光データを収集します。
6. Preview セクションでプロトコールのレビューを行います。必要に応じて変更することができます。
7. 以下のいずれかを行ってください。
 - OK をクリックして新しいプロトコールを保存する。保存後、Startup Wizard にプロトコールが開きます。Edit Selected をクリックしてプロトコールの変更を行ってください。例えば、リッド温度やサンプル容量を変更が必要な場合があります。
 - Cancel をクリックして、プロトコールを保存せずにウィンドウを閉じる。

T_a Calculator の使用

プライマーのアニーリング温度が不明である場合は、T_a Calculator を使用して値を計算することができます。この値を Protocol AutoWriter または Protocol Editor で使用して、独自のプロトコールを作成することが可能です。

T_a Calculator について

T_a Calculator は、プライマーごとの T_m 値のほか、標準速度におけるプロトコールの T_a 値も計算します。

プロトコールの T_a は、以下のルールを適用した平均プライマー T_m 値に基づいています。

- プライマー T_m 値間の差が 4 °C を超える場合、T_a = (2つのプライマー T_m 値の低い方 + 2) - 4 °C
- T_m 値間の差が 4 °C 以下の場合、T_a = (プライマー T_m 値の平均値) - 4 °C

塩基ペアのカウント方法

各プライマーについて、T_a Calculator は 14 個以下の塩基ペア (bp) 配列に以下の塩基ペアカウント方法を使用します。

$$T_m = ((w*A + x*T)*2) + ((y*G + z*C)*4)$$

ここで、w、x、y、z はそれぞれ、配列内の塩基 A、T、G、C の数です。

最近傍法

14 bp より長い配列の場合、最近傍法を使用します。最近傍法では、融解温度の計算は、エントロピー（オリゴヌクレオチドのランダム性のオーダーまたは尺度）、エンタルピー（オリゴヌクレオチドにより放出または吸収される熱量）、自由エネルギー、および温度の間の熱力学的関係に基づいています。

$$\Delta H = \Delta G + T*\Delta S$$

ここで、

- ΔH = エンタルピー値 (Cal/Mole*K)
- T = 温度 (ケルビン)
- ΔS = エントロピー値 (Cal/Mole*K)
- ΔG = ギブス自由エネルギー (Cal/Mole*K)

エントロピーとエンタルピーの変化は、83 ページの表 5 に示すヌクレオチドペアの値を足し合わせるにより直接計算されます (Breslauer et al. 1986 年)。

平衡状態の自由エネルギーと反応物および生成物の濃度の間の関係は、次式で与えられます。

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{\text{DNA} \cdot \text{プライマー}}{\text{DNA} + \text{プライマー}} \right)$$

ここで、Rは気体定数（1.986 Cal/Mole*K）です。

Gを2つの式に代入すると、Tは次式で与えられます。

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \cdot \ln \left(\frac{\text{DNA} \cdot \text{プライマー}}{\text{DNA} + \text{プライマー}} \right)}$$

ここでは、DNAの濃度とDNA-プライマー複合体の濃度は等しいと仮定しています。

単鎖からB型構造DNAへの移行時、5 kcalの自由エネルギー（3.4 kcal）の変化があることが実験的にわかっています（Sugimoto et al. 1996年）。これは、ヘリックス開始エネルギーであると推定されます。最後に、塩の調整を追加するとTa Calculatorが使用する式は次のようになります。

$$T = \frac{(\Delta H - 5(\text{Kcal/K} \cdot \text{Mole}))}{(\Delta S + (R \cdot \ln(1/(\text{プライマー}))))} + 16.6 \log_{10}(\text{塩のモル濃度})$$

多様なパラメータが1 M NaClで得られ、また1のlog₁₀はゼロであることから、塩の濃度に調整用定数は必要ありません。

熱力学的計算では、アニーリングはpH 7.0で生じると仮定しています。T_m計算では、配列は対称的ではなくGまたはCの少なくとも一方を含むと仮定しています。

オリゴヌクレオチドの配列は、妥当なT_m値を得るためには少なくとも14個の塩基からなるものとします。塩基が14個未満の場合には、塩基ペアカウント方法を使用します（下記の表5を参照）。

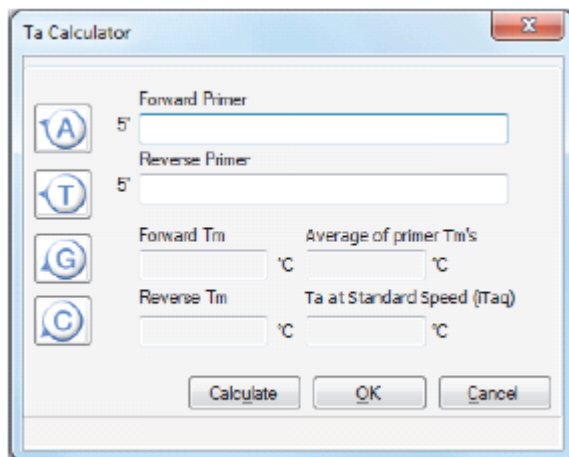
表5 Breslauerの相互作用定数

相互作用		ΔH	ΔS	ΔG
AA	TT	9.1	24	1.5
AT	TA	8.6	23.9	1.5
AC	TG	6.5	17.3	1.3
AG	TC	7.8	20.8	1.6
TA	AT	6	16.9	0.9
TT	AA	9.1	24	1.9
TC	AG	5.6	13.5	1.6
TG	AC	5.8	12.9	1.9
CA	GT	5.8	12.9	1.9
CT	GA	7.8	20.8	1.6
CC	GG	11	26.6	3.1
CG	GC	11.9	27.8	3.6
GA	CT	5.6	13.5	1.6
GT	CA	6.5	17.3	1.3
GC	CG	11.1	26.7	3.1
GG	CC	11	26.6	3.1

T_a Calculator の使用方法

1. T_a Calculator を開くには、以下のいずれかを行います。
 - 現在 Protocol AutoWriter を使用している場合、T_a Calculator をクリックする。
 - Home ウィンドウの Tools > T_a Calculator を選択する。

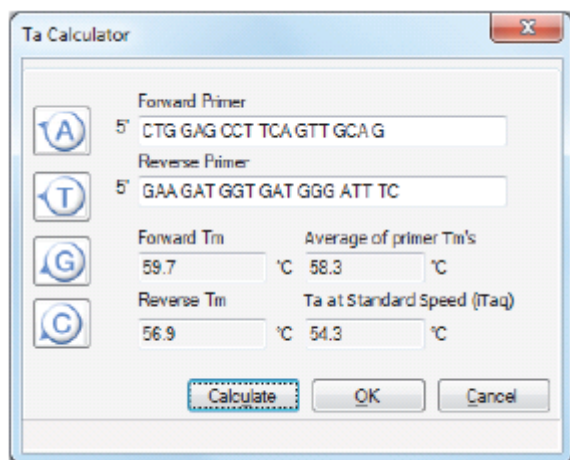
T_a Calculator ダイアログボックスが表示されます。



2. Forward Primer テキストボックスに、フォワードプライマーの配列を入力するかペーストします。

アドバイス : ダイアログボックスの左側にある A、T、G、C の各ボタンを使用して配列を入力することもできます。
3. Reverse Primer テキストボックスにリバースプライマーの配列を入力するかペーストします。
4. Calculate をクリックします。

T_a Calculator は各プライマーの T_m と、平均 T_m と T_a 値を計算し、これを下記のように表示します。



プライマー-T_m 値が 4 °C 以上異なる場合、Protocol AutoWriter では低い方のプライマー-T_m 値+2 °C を T_a 値の計算の基礎として使用します。この値はさらに、酵素と反応速度を変更することにより修正できます。

T_a Calculator は、iTaQ DNA ポリメラーゼの標準速度のアニーリング温度を生成します。異なる酵素を使用する場合には、速度設定は自動的に T_a に調節されます。

5. 以下のいずれかを行います。
 - Protocol AutoWriter から T_a Calculator を開いた場合、OK をクリックすれば Protocol AutoWriter に戻ります。アニーリング温度は自動的に修正されます。
 - Tools メニューから T_a Calculator を開いた場合、計算結果を記録して Cancel をクリックすると計算機が閉じます。

第6章 プレートの作成

Plate ファイルには、スキャンモード、蛍光色素、およびウェル内容物などのランパラメータに関する情報が含まれます。ラン実行後、CFX Maestro ソフトウェアはウェル内容物をラン実行中に収集した蛍光色素データとリンクさせ、Data Analysis ウィンドウで適切な解析を行います。例えば、標準サンプルタイプがロードされたウェルが、検量線の生成に使用されます。

CFX Maestro ソフトウェアでは、リアルタイム PCR ラン用の Plate Editor と正規化遺伝子発現解析用の Setup Wizard の2つのオプションをプレート作成用に用意しています。

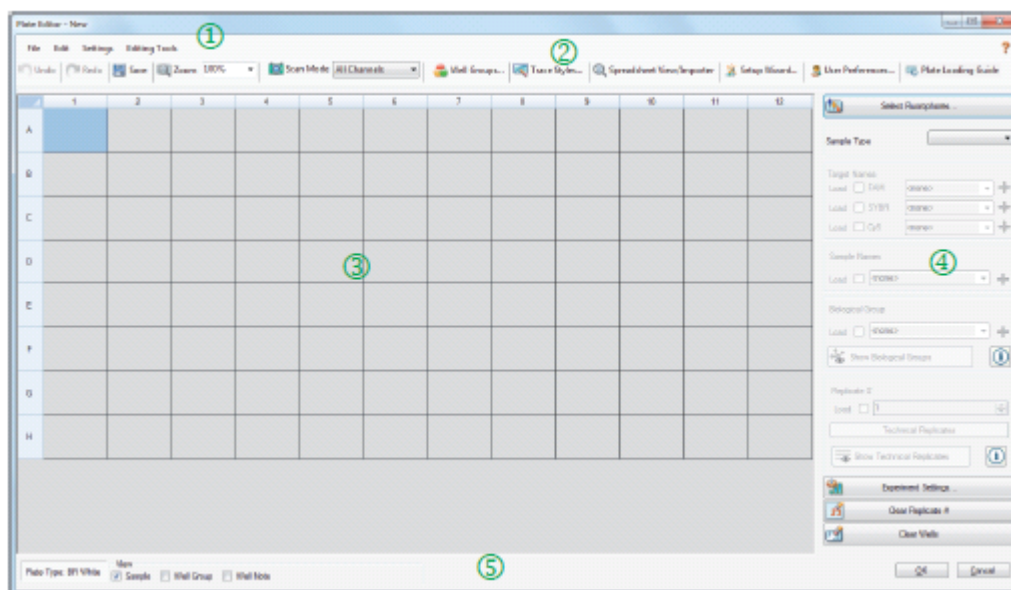
Plate Editor は以下の機能を含みます。

- プレートのウェルに割り当てる標準蛍光色素とサンプルタイプ
- 遺伝子発現解析用にリファレンスターゲットとコントロールサンプルを設定する機能
- ランの前、ランの最中、またはランの後にプレート設定を編集する機能
- 再使用のためにプレートファイルを保存する機能
- プレートファイルをデフォルトのプリンターに印刷する機能

Setup Wizard のガイドにより、正規化遺伝子発現解析用のプレートレイアウトを作成することができます。ランの前、ランの実行中、またはランの後で Setup Wizard を使用できます。

Plate Editor ウィンドウ

Plate Editor を使用して、カスタムプレートの作成や既存のプレートの修正を行えます。



説明

- 1 メニューバーは、File や Settings といったメニューコマンドの他にプレートの Editing Tools オプションへの迅速なアクセスと提供します。
- 2 ツールバーは、重要なプレートローディング機能への迅速なアクセスを提供します。
- 3 メインペインは、照会に応じてプレートアウトラインやプレートオプションを表示します。
- 4 右側のペインは、プレートのカスタマイズに使用するオプションを表示します。
- 5 下部のペインは、プレートタイプを表示し、表示オプションへの迅速なアクセスを提供します。

File メニューコマンド

Save (保存) — User Preferences ダイアログボックス内の File タブで指定した場所にプレートデータファイルを保存します。詳細については、49 ページの「[デフォルトのファイル設定を変更](#)」を参照してください。

Save As (別名で保存) — 開いているプレートデータファイルを新しい名称で保存します。

Print (印刷) — 開いているプレートデータファイルを印刷します。

Close (閉じる) — Plate Editor を閉じます。

Edit メニューコマンド

Undo (元に戻す) — プレートファイルが保存されるまで、プレートファイルへの変更を戻します。

Redo (やり直し) — プレートファイルが保存されていない限り、最新の Undo 動作を取り消します。

Settings メニューコマンド

Plate Size (プレートサイズ) — ラン用のプレートサイズを選択するダイアログボックスを開きます。

注意： プレートサイズは、ランを実行する機器のブロックサイズと同一であるものとします。CFX384 Touch システムの場合には 384 ウェルを、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well または CFX Connect システムの場合には 96 ウェルを選択してください。

Plate Type (プレートタイプ) — サンプルを入れるプレート内のウェルのタイプとして、BR White か BR Clear を選択するためのダイアログボックスを開きます。厳密なデータ解析を行うため、選択するプレートタイプはランで使用するプレートタイプと同一とします。

注意： 新しいプレートタイプはキャリブレーションが必要となります。詳細については、61 ページの「[新しい色素のキャリブレーション](#)」を参照してください。

Number Convention (数値表記) — 単位を表示する方法を選択できるダイアログボックスを開きます。デフォルトでは、指数表記で単位を表示します。

Units (単位) — 検量線から不明サンプルの定量を行う際にスプレッドシートに表記する単位を選択するためのダイアログボックスを開きます。

Editing Tools メニューコマンド


Setup Wizard (設定ウィザード) — 現在のプレートのレイアウトと解析パラメータを定義する Setup Wizard を開きます。ランの前、ランの実行中、またはラン完了後に Setup Wizard を使用できます。


Spreadsheet View/Importer (スプレッドシートの表示/インポート) — スプレッドシートのフォーマットのテンプレートとしてプレートレイアウトを表示する View ダイアログボックスを開きます。このダイアログボックスを使用して、.csv フォーマットでプレートテンプレートデータのエクスポートまたはインポートを行えます。


Flip Plate (プレートをフリップ) — プレート情報を 180 度回転させます。


Plate Editor ツールバーコマンド

 **Undo** — プレートへの変更を元に戻します。CFX Maestro ソフトウェアでは最大 10 個の Undo 操作に対応します。

 **Redo** — 最新の Undo 操作を取り消します。CFX Maestro ソフトウェアでは最大 10 個の Redo 操作に対応します。

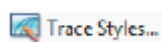
 **Save** — 現在のプレートファイルを保存します。

 **Zoom 100%** — プレート表示を拡大・縮小できるドロップダウンリストを表示します。

 **Scan Mode All Channels** — スキャンモードを選択できるドロップダウンリストを表示します。これは、どのチャンネルでラン実行中に蛍光色素データを収集するかを機器が識別するものです。



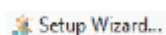
— 現在のプレート用のウェルグループ作成に使用できる Well Groups Manager を開きます。



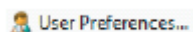
— 増幅トレースの色とシンボルを選択できるダイアログボックスを表示します。



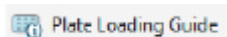
— プレートレイアウトをテンプレートとしてスプレッドシートフォーマットで表示する View ダイアログボックスを開きます。このダイアログボックスを使用して、.csv フォーマットでプレートテンプレートデータをエクスポートまたはインポートすることができます。



— 現在のプレートのレイアウトおよび解析パラメータを定義できる Setup Wizard を開きます。ランの前、ランの最中、またはランの後に Setup Wizard を使用できます。



— プレートレイアウトパラメータを定義し、またターゲット名、サンプル名、および生物学的グループ名を作成または削除することが可能な User Preferences ダイアログボックスの Plate タブを開きます。Plate タブへの変更は、次回 Plate Editor を開くときにも有効です。



— プレートの設定とウェルのロードに必要なステップを表示します。

Plate Editor を使用したプレートファイルの作成

Plate Editor を使用すると、カスタムプレートファイルを作成することができます。また、以前保存したプレートファイルまたは CFX Maestro ソフトウェアに同梱されるサンプルプレートファイルの編集や保存も可能です。

新しいプレートファイルを作成するには、以下を行ってください。

- Plate Editor のプレートファイルを開く。

- プレートタイプを選択する。

注意：プレートファイルのプレートタイプは、リアクションモジュールのプレートと同じものとします。

- プロトコールで使用するスキャンモードを選択する。
- プレートで使用する蛍光色素を選択する。
- サンプルタイプ、ターゲット、およびサンプルを選択する。
- 必要に応じて技術リプリケートを選択する。
- プレートレイアウトを保存する。

アドバイス：以前保存したプレートファイルまたはサンプルプレートファイルから新しいプレートを作成する場合は、92 ページの「[Plate Editor で既存のプレートファイルを開く](#)」を参照してください。

Plate Editor で新しいプレートファイルを開く

CFX Maestro ソフトウェアでは、新しいプレートファイルを開くためのオプションを複数ご提供します。

- Home ウィンドウから開く
- Startup Wizard ダイアログボックスから開く
- Run Setup ダイアログボックスから開く

Home ウィンドウから新しいプレートファイルを開く方法

- ▶ File > New > Plate を選択します。

Plate Editor ウィンドウが開き、選択している機器のデフォルトのプレートファイルが表示されます。

アドバイス：デフォルトのプレートファイルの設定に関する詳細については、49 ページの「[デフォルトのファイル設定を変更](#)」を参照してください。

Startup Wizard から新しいプレートファイルを開く方法

1. 見当たらない場合には、Home ウィンドウで以下のいずれかを行って Startup Wizard を開きます。
 - View > Startup Wizard を選択する。
 - ツールバーの Startup Wizard をクリックする。

デフォルトでは、Startup Wizard には、選択されている CFX96 の Run 設定タブが表示されます。

2. 必要に応じて、ドロップダウンリストから機器のタイプを選択してください。
3. 新しいプレートを作成するには、ランタイプとして User-defined をクリックしてください。
Run Setup ダイアログボックスが開き、Protocol タブが表示されます。
4. Plate タブをクリックして Create New をクリックします。
Plate Editor ウィンドウが開き、選択している機器のデフォルトのプレートレイアウトが表示されます。

Run Setup ダイアログボックスから新しいプレートファイルを開く方法

1. Home ウィンドウで以下のいずれかを行い、Run Setup ダイアログボックスを開きます。
 - Run > User-defined Run を選択する。
 - ツールバーの User-defined Run Setup をクリックする。Run Setup ダイアログボックスに Protocol タブが開きます。
2. 新しいプレートを作成するには、Plate タブをクリックし、Create New をクリックします。
Plate Editor ウィンドウが開き、選択している機器のデフォルトのプレートレイアウトが表示されます。

Plate Editor で既存のプレートファイルを開く

CFX Maestro ソフトウェアは、新しいプレートとして編集や保存が可能なサンプルプレートファイルを用意しています。また、以前保存したプレートファイルから新しいプレートファイルを作成することも可能です。

サンプルプレートファイルを開く方法

1. Home ウィンドウの File > Open > Plate を選択します。
Windows Explorer で CFX Maestro の Sample ファイルフォルダの場所が開かれます。
2. Sample ファイルフォルダを開いて、Plates フォルダを開きます。
3. 最適なプレートを選択して Open をクリックします。
Plate Editor ウィンドウにサンプルプレートファイルが開きます。
4. File > Save As を選択して、プレートファイルを新しい名称で、または新しいフォルダに保存します。

以前保存したプレートファイルを開く方法

1. Home ウィンドウで以下のいずれかを行います。
 - File > Open > Plate を選択してナビゲートし、ターゲットプレートを選択して Open をクリックする。
 - Startup Wizard を開き、以下のいずれかを行う。
 - 既存のプレートファイルを編集するには、Select Existing をクリックしてターゲットファイルにナビゲートする。
 - 表示されているプレートファイルを編集するには、Edit Selected をクリックする。
Plate Editor ウィンドウにターゲットプレートが開きます。
2. File > Save As を選択して、プレートファイルを新しい名称で、または新しいフォルダに保存します。

新しいプレートファイルの設定

アドバイス: ご使用のプレートファイルに必要なパラメータが含まれている場合（例えば、サンプルまたは既存のプレートファイルを編集する場合）、本節をスキップすることができます。99 ページの「[プレートファイルへのオプションのパラメータの割り当て](#)」に進んでください。

新しいプレートファイルには、以下のパラメータが必要です。

- プレートサイズ
- プレートタイプ
- スキャンモード
- 1 蛍光色素（色素）
- 1 サンプルタイプ

プレートサイズとタイプの選択

重要: プレート設定時にプレートサイズを選択する必要があります。ランの実行中やランの後でプレートサイズを変更することはできません。

ソフトウェアはプレートサイズとタイプを、ラン実行中すべてのウェルに適用します。選択するプレートサイズはランで使用するプレートと必ず同一としてください。

CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各機器は、工場出荷時に多くの蛍光色素とプレートの組み合わせに対してにキャリブレーションされています。こうしたキャリブレーション処理については、機器、色素、およびプレートタイプを特定して行われます。使用する予定の蛍光色素が、選択するプレートタイプ用に必ずキャリブレーションされていることを確認してください。

アドバイス: 機器で色素とプレートタイプの新しい組み合わせをキャリブレーションする場合は、Tools > Calibration Wizard を選択してください。色素とプレートタイプのキャリブレーションに関する詳細については、61 ページの「[新しい色素のキャリブレーション](#)」を参照してください。

スキャンモードの選択

CFX96 Touch および CFX96 Touch Deep Well の各システムでは、6 チャンネルでの蛍光色素の励起・検出となります。CFX Connect システムでは、3 チャンネルでの蛍光色素の励起・検出となります。CFX384 Touch システムでは、5 チャンネルでの蛍光色素の励起・検出となります。すべてのシステムで、ラン実行中に蛍光色素データを収集するために複数のデータ取得スキャンモードが使用されます。

CFX Maestro ソフトウェアでは以下の 3 つのスキャンモードを用意しています。

- All Channels（全チャンネル）
 - CFX96 Touch および CFX96 Touch Deep Well の各システムでチャンネル 1～5 をスキャン
 - CFX Connect システムでチャンネル 1 と 2 をスキャン
 - CFX394 Touch システムでチャンネル 1～4 をスキャン

- SYBR[®]/FAM
 - チャンネル1のみをスキャン
 - 高速スキャンを提供
- FRET
 - FRET チャンネルのみをスキャン
 - 高速スキャンを提供

蛍光色素を選択

重要: ランを実行する前に、CFX Maestro ソフトウェアはプレートに指定した蛍光色素がその機器でキャリブレーションされているかを検証します。キャリブレーションされていない蛍光色素が含まれている場合、プレートによるランを実行することはできません。

ランを実行する前に、1つ以上の蛍光色素をプレートレイアウトにロードする必要があります。このとき、必要な限り多くの蛍光色素を加えることができますが、プレートは1つ以上の蛍光色素を含む必要があります。選択した蛍光色素は、Target Names にターゲットのオプションとして表示されます。

蛍光色素(またはプレート色素)を Plate Editor のウェルローディングコントロールにロードするには、Select Fluorophores ダイアログボックスを使用します。Select Fluorophores ダイアログボックスに表示される蛍光色素は、選択するスキャンモードによって異なります。

- All Channels (全チャンネル)

使用可能なすべての蛍光色素が表示されます。

アドバイス: 必要な限り多くの蛍光色素を追加できますが、各ウェルの1つのチャンネルにつき1つの蛍光色素しかロードできません。

- SYBR[®]/FAM

チャンネル1の蛍光色素のみが表示されます。

- FRET

チャンネル6の蛍光色素のみが表示されます。

アドバイス: FRET が選択されたスキャンモードの場合にのみ、チャンネル6の FRET 蛍光色素が表示されます。All Channels スキャンモードでは使用できません。

注意: Select Fluorophore ダイアログボックスに直接蛍光色素を追加したり、ここから削除したりすることはできません。Calibration Wizard を使用して、機器で新しい蛍光色素をキャリブレーションする必要があります。キャリブレーション後、新しい蛍光色素がこのリストの自動的に追加されます。詳細については、61 ページの「[新しい色素のキャリブレーション](#)」を参照してください。

サンプルタイプの選択

重要: ラン実行前に、プレートウェルに割り当てるサンプルタイプを1つ以上選択する必要があります。

CFX Maestro ソフトウェアでは、以下の5個のサンプルタイプをご提供します。

- Unknown (不明)
- Standard (標準)
- NTC (テンプレート無しコントロール)
- Positive Control (陽性コントロール)
- Negative Control (陰性コントロール)
- NRT (逆転写無しコントロール)

サンプルタイプをプレートウェルに割り当ててください。

新しいプレートの設定

新しいプレートを設定するには、

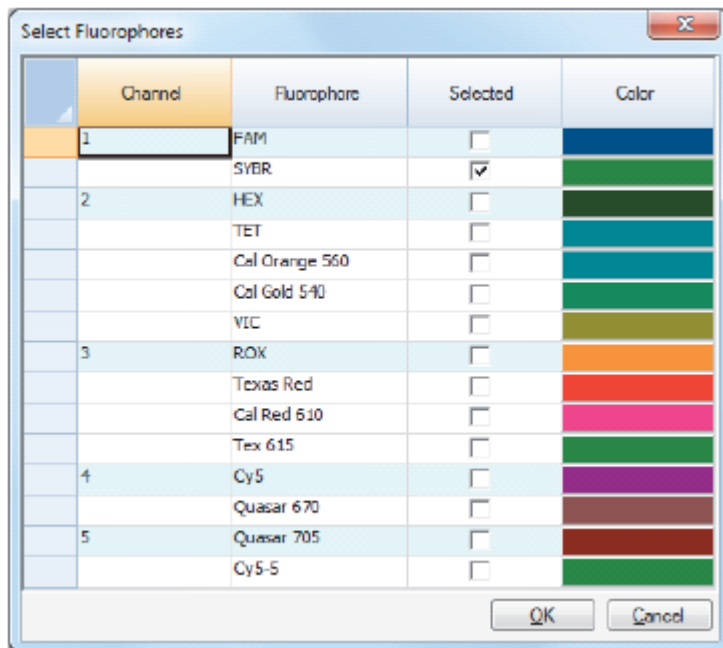
1. Plate Editor ウィンドウで新しいプレートを開きます。
2. プレートサイズを設定するには、Settings > Plate Size を選択し、ドロップダウンメニューから適当なプレートサイズを選択します。
3. プレートタイプを設定するには、Settings > Plate Type を選択し、ドロップダウンメニューから BR White または BR Clear を選択します。
4. 任意に、Settings メニューから、数値表記と表示単位を変更できます。
 - 数値表記を変更するには、Settings > Number Convention を選択し、Scientific Notation を選択する。

アドバイス: デフォルトでは Scientific Notation が選択されます。この場合、Scientific Notation を選択することによりデフォルトが解除され、数値表記が標準形式に設定されます。
 - 表示単位を変更するには、Settings > Units を選択し、新しい単位の値を選択する。
5. スキャンモードを設定するには、Plate Editor ウィンドウのツールバーにある Scan Mode ドロップダウンリストから適切なスキャンモードを選択します。

6. プレートに必要な蛍光色素を選択します。

- a. 右側のペインの Select Fluorophores をクリックします。

Select Fluorophores ダイアログボックスが表示されます。手順5で選択したスキャンモードのタイプで使用できる蛍光色素がわかります（下図のとおり）。



- b. 蛍光色素を選択するには、Selected チェックボックスをクリックします。

アドバイス: リストから蛍光色素を削除するには、Selected チェックボックスを解除します。

- c. 蛍光色素の表示色を変更するには、Color ボックスをクリックします。

注意: 選択する色は、Plate Editor ウィンドウと Data Analysis グラフの両方の蛍光色素を表します。

- d. Color ダイアログボックスで、希望の色を選択するか、Define Custom Colors をクリックして蛍光色素を表す新しい色を作成します。

- e. OK をクリックして変更を保存し、Select Fluorophores ダイアログボックスを終了します。

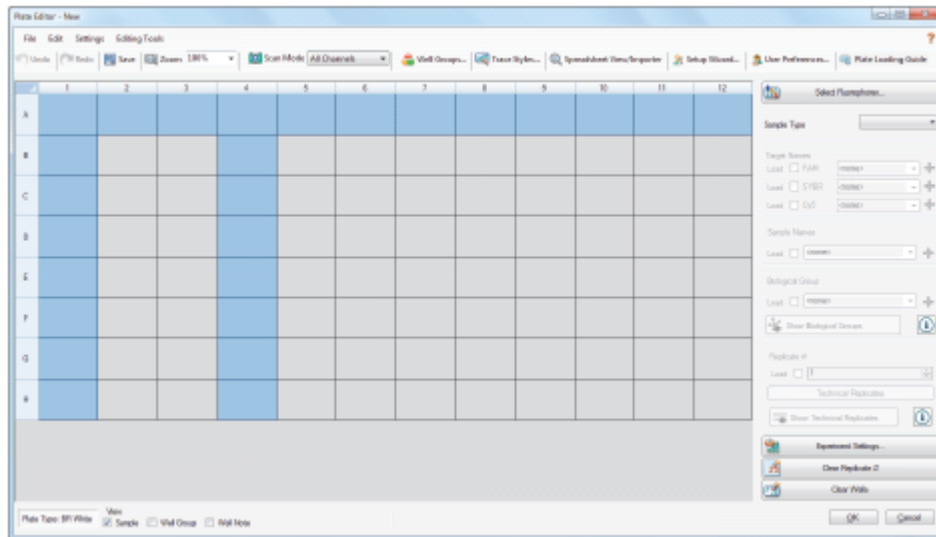
7. サンプルタイプをロードする1つ以上のウェルを選択する必要があります。デフォルトでは、ウェル A1 が選択されています。

プレートペインで、以下のいずれかを行います。

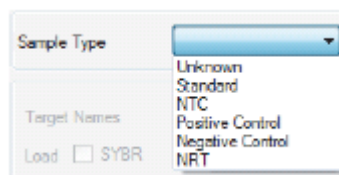
- 複数の隣接するウェルをロードするには、1つのウェルをクリックしてターゲットウェルへとドラッグする。
- 複数の隣接しないウェルをロードするには、Ctrl キーを押したまま各ウェルをクリックする。
- 同じサンプルタイプの列全体をロードするには、列番号をクリックする。

- 行全体をロードするには、その行番号をクリックする。
- プレート全体をロードするには、プレートの左上隅をクリックする。

例：



8. サンプルタイプを右側のペインにある Sample Type ドロップダウンメニューから選択しているウェルへと割り当てます。

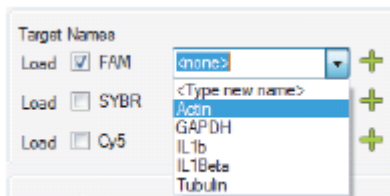


9. 1つ以上の蛍光色素を、サンプルタイプを含むすべてのウェルに割り当てます。ウェルまたはウェル群には、2つ以上の蛍光色素を割り当てることができます。

注意：1つのチャンネルには1つの蛍光色素しか割り当てることができません。同じチャンネルから同じウェルに2つ以上の蛍光色素を割り当てることができません。

アドバイス：現時点では、ターゲットを蛍光色素に関連付けるか、または蛍光色素のみをウェルに割り当てて、実験のラン実行後にターゲットを蛍光色素に関連付けることができます。

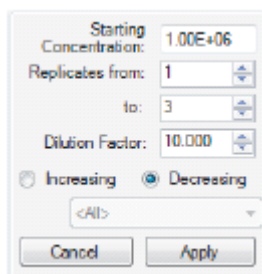
- 選択しているウェルに蛍光色素のみを割り当てするには、右側のペインの Target Names セクションで特定の蛍光色素の Load チェックボックスを選択します。
- ターゲットを蛍光色素に関連付けるには、Target Names セクションで特定の蛍光色素に関してドロップダウンリストからターゲット名を選択します。ソフトウェアはその Load チェックボックスを自動的に選択します。



10. Standard サンプルタイプを含むウェルについては、濃度をロードする必要があります。各ウェルは異なる濃度値をもつことが可能です。デフォルトでは、CFX Maestro ソフトウェアは Standard サンプルタイプのすべてのウェルに 1.00E+06 の濃度をロードします。必要に応じて値を変更することが可能です。
 - a. プレートペインで、ターゲットの Standard ウェルを選択します。
 - b. (オプション) 別の濃度をロードするには、Concentration テキストボックスに新しい値を入力して Enter を押します。
 - c. Load をクリックして、選択しているウェルに値をロードします。
 - d. Standard サンプルタイプのすべてのウェルについて、この手順を実施します。

アドバイス : 同じ濃度をすべての Standard ウェルにロードするには、<All>がドロップダウンリストの Concentration 値の下に表示されていることを確認してください。同じ濃度値を特定の蛍光色素のすべてのウェルにロードするには、ドロップダウンリストをクリックして蛍光色素を選択します。

- e. (オプション) Standard サンプルの濃度に関して希釈系列を入力して検量線をロードするには、Dilution Series をクリックしてください。



ダイアログボックスで以下を行った後に Apply をクリックして Plate Editor に戻ってください。

- 希釈系列用の新しい開始濃度を入力する。
- Replicates from (開始リプリケート番号) と Replicates to (終了リプリケート番号) の各値を設定する。
- Dilution Factor 値 (これは各リプリケートグループ内の濃度変化) を設定する。
- 希釈系列の濃度を増やすか減らすかを選択する。
- ドロップダウンリストから、希釈系列に使用する蛍光色素を選択する。

11. OK をクリックして新しいプレートを保存する。

プレートファイルへのオプションのパラメータの割り当て

プレートファイルは、ラン用サンプルがロードされた各ウェルの内容に関する情報を含みます。ラン実行後、CFX Maestro ソフトウェアはプロトコール中に収集された蛍光データにウェルの内容をリンクさせ、Data Analysis ウィンドウにおいて該当の解析を適用します。

CFX Maestro ソフトウェアでは、実験のランの前、ラン実行中、またはランの後でも、プレート内の各ウェルにパラメータを割り当てることができます。また、既存のプレートファイルまたは新しいプレートファイルにパラメータを割り当てることが可能です。これらのパラメータとして以下が含まれます。

- **Target Names (ターゲット名)** — ロードされた各ウェルの対象ターゲット (遺伝子または配列)。
- **Sample Names (サンプル名)** — 0 Hr または dil-1 など、ロードされた各ウェル内のサンプルに対応する識別名称または条件。
- **Biological Group (生物学的グループ)** — マウス 1、マウス 2、またはマウス 3 など、ウェルのグループに対応する識別名称または条件。

アドバイス: ターゲット名、サンプル名、および生物学的グループは、Data Analysis ウィンドウの Gene Expression タブ内のデータを比較するため、ウェル間で一致させてください。各名称とも、大文字使用や句読点およびスペースが同じであるものとします。例えば、“Actin”と”actin”、“2Hr”と”2 hr”、さらに”Mouse 1”と”mouse 1”はそれぞれ同一ではありません。名称の一貫性を得るために、Home ウィンドウで使用できる User > User Preferences > Plate の Libraries セクションで名称を入力してください。

- **Technical Replicates (技術的リプリケート)** — 同じサンプルを解析する回数。
- **Dilution series (希釈系列)** — 解析用の検量線データを作成するため、リプリケートグループ内の Standard サンプルタイプの濃度を变化させる量。

ウェルへのターゲットの割り当て

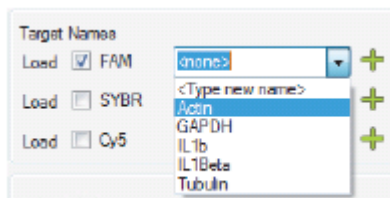
アドバイス: 単一または複数のウェルに同じターゲット名を割り当てることができます。また、複数のターゲットを同じウェルに割り当てることも可能です。

重要: ターゲットを割り当てた後に OK をクリックすると変更が保存され、Plate Editor ツールバーの Undo が無効になります。OK をクリックする際には注意してください。

ウェルまたはウェルグループへのターゲットの割り当て方法

1. Plate Editor で、ウェルまたはウェルグループがサンプルタイプに割り当てられていることを確認してください。
ウェルへのサンプルタイプの割り当てに関する詳細については、95 ページの「[サンプルタイプの選択](#)」を参照してください。
2. プレートペインで、ウェルまたはウェルグループを選択します。
 - 単一のウェルを選択する場合には、そのウェルをクリックする。
 - 複数の隣接するウェルを選択する場合には、1つのウェルをクリックしてターゲットのウェルまでドラッグする。
 - 複数の隣接しないウェルを選択する場合には、Ctrl キーを押したままそれぞれのウェルをクリックする。

- 同じサンプルタイプを含むカラム全体を選択するには、カラム番号をクリックする。
 - 列全体を選択するには、その列番号をクリックする。
3. 右側のペインで、Target Name ドロップダウンリストから、選択している各蛍光色素の名称を選択します。



4. ターゲットを割り当てなければならない各ウェルまたはウェルグループについて、手順3を繰り返し行ってください。

アドバイス： 選択している各蛍光色素に割り当てるターゲット名は同じであっても異なっても良いです。

5. OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存します。

注意： 誤ってプレートを変更した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に、Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

ターゲット名の削除方法

- ▶ 選択しているウェルまたはウェルグループからターゲット名を削除するには、Load チェックボックスを解除します。

重要： ウェルからターゲット名を削除すると、関連する蛍光色素も削除されます。ウェルからターゲット名を削除する際には注意してください。

リストにターゲット名を追加する方法

- ▶ ターゲット名をドロップダウンリストに追加するには、以下のいずれかを行います。

- Target Name ドロップダウンリストに名称を入力して、Enter キーを押す。

アドバイス： 1つのリストに追加するターゲット名は、その他すべてのターゲットリストに表示されます。

- ドロップダウンリストの右側にある緑色の+記号をクリックし、ターゲット名を入力して Enter キーを押す。
- ツールバーの User Preferences をクリックし、Plate タブの Target Names に名称を追加する。

重要： ドロップダウンリストに追加するターゲット名は、現在のプレートについてのみ、さらに名称をウェルに割り当ててプレートレイアウトを保存した場合にのみ使用できます。ウェルに名称を割り当てずにプレートレイアウトを保存した場合には、名称は保存されないため後で使用できません。ターゲット名を永久に追加するには、User Preferences ダイアログボックスを使用して Target Names ライブラリにもターゲット名を追加します。ライブラリに追加する名称は、Plate Editor を再び開いた後に使用できます。詳細については、50 ページの「[デフォルトのプロトコールパラメータの設定](#)」を参照してください。

リストからターゲット名を削除する方法

1. ツールバーの User Preferences をクリックします。
User Preferences ダイアログボックスが現れ、Plate タブが表示されます。
2. Plate タブの Target Names ライブラリで、削除する名称を選択して Delete キーを押します。
3. OK をクリックして変更を保存し、User Preferences ダイアログボックスを閉じます。

重要：プレートファイルに保存したターゲット名を削除することはできません。Target Names ドロップダウンリストに追加して使用せずにプレートに保存したカスタム名は、リストから自動的に削除されます。Target Names Library から削除するカスタム名は、ソフトウェアから永久に削除されるため、ユーザーは使用できなくなります。ターゲット名を削除する際には注意してください。

ウェルへのサンプル名の割り当て

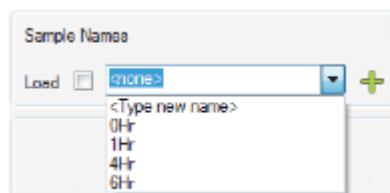
注意：サンプル名を割り当てるには、選択しているウェルに少なくとも 1 つの蛍光色素を割り当てる必要があります。選択しているウェルに蛍光色素が割り当てられていない場合には、Sample Names ドロップダウンリストが無効になります。蛍光色素の割り当てに関する詳細については、99 ページの「[ウェルへのターゲットの割り当て](#)」を参照してください。

アドバイス：各ウェルまたはウェルグループに割り当てることができるサンプル名は 1 つだけです。

ウェルまたはウェルグループへのサンプル名の割り当て方法

1. Plate Editor で、ウェルまたはウェルグループが蛍光色素に割り当てられていることを確認してください。
2. プレートペインで、ウェルまたはウェルグループを選択します。
3. 右側のペインで、Sample Names ドロップダウンリスト内の名称を選択します。

ソフトウェアは Load チェックボックスを自動的に選択します。



4. サンプル名を割り当てなければならない各ウェルまたはウェルグループに関して、手順 3 を繰り返します。
5. OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存します。

注意：誤ってプレートを変更した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に、Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

サンプル名の削除方法

- ▶ 選択されているウェルまたはウェルグループからサンプル名を削除するには、Load チェックボックスを解除します。

リストにサンプル名を追加する方法

- ▶ ドロップダウンリストにサンプル名を追加するには、以下のいずれかを行います。
 - Sample Names ドロップダウンリストに名称を入力し、Enter キーを押す。
 - ドロップダウンリストの右側にある緑色の+記号をクリックし、サンプル名を入力する。
 - ツールバーの User Preferences をクリックし、Plate タブの Sample Names ライブラリに名称を追加する。

重要：ドロップダウンリストに追加するサンプル名は、現在のプレートについてのみ、さらに名称をウェルに割り当ててプレートレイアウトを保存した場合にのみ使用できます。ウェルに名称を割り当てずにプレートレイアウトを保存した場合、名称は保存されないため後で使用できません。サンプル名を永久に追加するには、User Preferences ダイアログボックスを使用して Sample Names ライブラリにサンプル名を追加してください。ライブラリに追加した名称は、Plate Editor を再び開いた後に使用できます。詳細については、51 ページの「[デフォルトのプレートパラメータの設定](#)」を参照してください。

リストからサンプル名を削除する方法

1. ツールバーの User Preferences をクリックします。
User Preferences ダイアログボックスが現れ、Plate タブが表示されます。
2. Plate タブの Sample Names ライブラリで、削除する名称を選択して Delete キーを押します。
3. OK をクリックして変更を保存し、User Preferences ダイアログボックスを閉じます。

重要：プレートファイルに保存したサンプル名は削除できません。Sample Names リストに追加し使用せずにプレートに保存したカスタム名は、ドロップダウンリストから自動的に削除されます。Sample Names Library から削除するカスタム名は、ソフトウェアから削除されるため、ユーザーは使用できなくなります。サンプル名を削除するには注意してください。

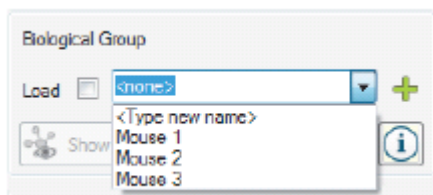
ウェルへの生物学的グループの割り当て

重要：生物学的グループを割り当てるには、選択しているウェルに1つ以上の蛍光色素を割り当てる必要があります。蛍光色素を割り当てることにより、Biological Groups ドロップダウンリストが有効になります。蛍光色素の割り当てに関する詳細については、99 ページの「[ウェルへのターゲットの割り当て](#)」を参照してください。

アドバイス：各ウェルまたはウェルグループに割り当てることができる生物学的グループは1つです。

ウェルまたはウェルグループへの生物学的グループの割り当て

1. Plate Editor で、ウェルまたはウェルグループに蛍光色素が割り当てられていることを確認してください。
2. プレートペインで、ウェルまたはウェルグループを選択します。
3. 右側のペインで、Biological Group ドロップダウンリスト内の名称を選択します。
CFX Maestro ソフトウェアは、Load チェックボックスを自動的に選択します。



4. 生物学的グループを割り当てなければならないウェルまたはウェルグループについて、手順3を繰り返し行います。
5. OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存します。

注意：誤ってプレートを変更した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

アドバイス：ウェルに生物学的グループ名を割り当てることにより、Experiment Settings ダイアログボックスの Biological Group Analysis オプションが有効になり、4つの設定のいずれかでサンプルの解析を行うことができます。詳細については、109ページの「[Experiment Settings の変更](#)」を参照してください。

生物学的グループの削除方法

- ▶ 選択しているウェルまたはウェルグループから生物学的グループを削除するには、Load チェックボックスを解除します。

生物学的グループ名をリストに追加する方法

- ▶ ドロップダウンリストに生物学的グループ名を追加するには、以下のいずれかを行います。
 - Biological Group ドロップダウンボックスに名称を入力し、Enter キーを押す。
 - ドロップダウンリストの右側にある緑色の+記号をクリックし、生物学的グループの名称を入力する。
 - ツールバーの User Preferences をクリックし、Plate タブの Biological Names ライブラリに名称を追加する。

重要：ドロップダウンリストに追加する生物学的グループ名は、現在のプレートについてのみ、さらに名称をウェルに割り当ててプレートレイアウトを保存した場合にのみ使用できます。ウェルに名称を割り当てずにプレートレイアウトを保存した場合、名称は保存されないため後で使用できません。生物学的グループ名を永久に追加するには、User Preferences ダイアログボックスを使用して Biological Names ライブラリに生物学的グループ名を追加してください。ライブラリに追加した名称は、Plate Editor を再び開いた後に使用できます。詳細については、51ページの「[デフォルトのプレートパラメータの設定](#)」を参照してください。

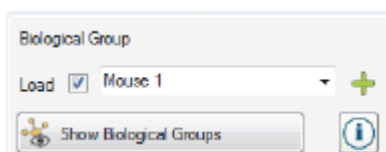
リストから生物学的グループ名を削除する方法

1. ツールバーの User Preferences をクリックします。
User Preferences ダイアログボックスが現れ、Plate タブが表示されます。
2. Plate タブの Biological Names ライブラリで、削除する名称を選択して Delete キーを押します。
3. OK をクリックして変更を保存し、User Preferences ダイアログボックスを閉じます。

重要：プレートファイルで保存した生物学的グループ名を削除することができません。Biological Group Names ドロップダウンリストに追加し使用せずにプレートに保存したカスタム名は、リストから自動的に削除されます。Biological Names Library から削除する名称は、ソフトウェアから永久に削除されるため、ユーザーは使用できなくなります。生物学的名称を削除する際には注意してください。

プレートのすべての生物学的グループを表示

- ▶ プレートのすべての生物学的グループを表示するには、Show Biological Groups をクリックします。



各グループが特定の色で識別され、Show Biological Groups ボタンが Hide Biological Groups に切り替わります。

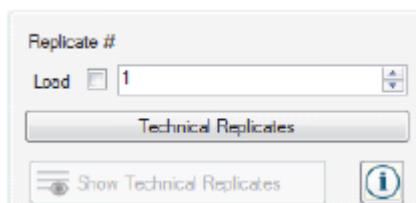
ウェル内の色を解除するには、Hide Biological Groups をクリックします。代替的に、プレート内の任意のウェルをクリックして、生物学的グループを非表示にすることも可能です。

ウェルへの技術リプリケート番号の割り当て

重要: 技術リプリケート番号を割り当てるには、選択しているウェルは同一のウェル内容物を含んでいなければなりません。すなわち、選択しているウェルは、同一のサンプルタイプと蛍光色素を含んでいる必要があります。適切であれば、これらには同じターゲットとサンプル名、さらに同じ生物学的グループも割り当てられるものとします。これらが異なる場合には、CFX Maestro ソフトウェアではこのオプションが無効になります。

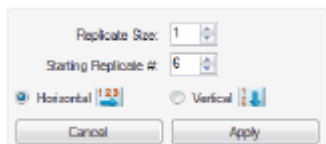
ウェルグループへの技術リプリケート番号の割り当て方法

1. Plate Editor で、ウェルグループの内容物が同一であることを確認します。
2. プレートペインで、ウェルのターゲットグループを選択します。
3. 右側のペインにある Replicate #セクションで、選択しているウェルの数と同じになるまでリプリケート番号を増やします。



4. (オプション) リプリケートシリーズを選択しているウェルのセットに適用するには以下を行います。

- a. Technical Replicates をクリックする。Replicate #セクションが展開され、以下のオプションが表示されます。



- **Replicate Size (リプリケートサイズ)** — リプリケートの各グループ内のウェル数を示す数値。

- **Starting Replicate # (開始リプリケート番号)** — 選択しているリプリケートグループのリプリケートシリーズの最初の番号。

重要: デフォルトでは、CFX Maestro ソフトウェアはプレートに割り当てられている最後の技術リプリケート番号よりも 1 大きい開始リプリケート番号を表示します。例えば、プレートの最後の技術リプリケート番号が 5 の場合、次の開始番号は 6 になります。開始番号は、まだ割り当てられていない任意の数に変更できます。

- **ロード方向 (水平 [Horizontal] または垂直 [Vertical])**

- b. Apply をクリックしてシリーズにパラメータを適用し、Replicate #表示に戻る。

5. OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存します。

注意: 誤ってプレートを変更した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

リプリケートシリーズからウェルを削除する方法

- ▶ 削除するウェルまたはウェルグループを選択し、Replicate # Load チェックボックスを解除します。

代替的に、Clear Replicate #をクリックして、選択しているウェルまたはウェルグループからリプリケート番号を解除することもできます。

プレートのすべての技術リプリケートを表示する方法

- ▶ プレートのすべての技術リプリケートを表示するには、Show Technical Replicates をクリックします。

各グループが特定の色で識別され、Show Technical Replicates ボタンが Hide Technical Replicates に切り替わります。

Hide Technical Replicates をクリックすると、ウェル内の色が解除されます。代替的に、プレート内の任意のウェルをクリックして、技術リプリケートを非表示にすることも可能です。

Standard サンプルタイプへの希釈系列の割り当て

前述のとおり、Standard サンプルタイプのすべてのウェルには、濃度値を割り当てなければなりません。Standard サンプルタイプの複数のウェルに希釈系列を割り当てることが可能です。

注意：希釈系列をウェルグループに割り当てるには、ウェルは技術リプリケートシリーズに含まれている必要があります。ウェルをリプリケートシリーズに追加する方法に関する詳細については、104 ページの「ウェルへの技術リプリケート番号の割り当て」を参照してください。

Standard サンプルウェルのグループに希釈系列を割り当てる方法

1. Plate Editor で、以下の要件が満たされていることを確認してください。
 - ウェルのグループのサンプルタイプが Standard であること。
 - グループ内のすべてのウェルに 1 つ以上の蛍光色素が割り当てられており、同一蛍光色素が含まれていること。
 - グループ内のすべてのウェルが、同じ技術リプリケートシリーズに含まれていること。

注意：CFX Maestro ソフトウェアでは、選択しているすべてのウェルが基準を満たしている場合にのみ Dilution Series（希釈系列）オプションが有効になります。
2. プレートペインで、ウェルのターゲットグループを選択します。
3. 右側のペインの Concentration セクションで、Dilution Series をクリックします。Concentration セクションが展開され、以下のオプションが表示されます。

- **Starting Concentration（開始濃度）** — 希釈系列を開始する濃度値。
 - **Replicates from and to（開始リプリケート番号から終了リプリケート番号まで）** — 希釈係数が適用される希釈系列内のリプリケート。
 - **Dilution Factor（希釈係数）** — リプリケートグループごとの濃度の変化量。
4. オプションの値を設定するか、またはデフォルト値を確定します。
 5. デフォルトでは、Decreasing が選択されており、希釈系列は希釈係数ずつ減少します。Increasing を選択すると、希釈系列が増加します。

6. (オプション) デフォルトでは、希釈係数はリプリケートシリーズ内のすべての蛍光色素に適用されます。シリーズが2つ以上の蛍光色素を含み単一の蛍光色素に希釈を適用したい場合には、その蛍光色素をドロップダウンリストから選択してください。
7. Apply をクリックして希釈系列をウェルグループに適用し、Concentration 画面に戻ります。
8. OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存します。

注意: 誤ってプレートを変更した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に、Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

別のウェルへのウェル内容の複製

ウェルの内容をコピーし、それを単一または複数のウェルにペーストすることができます。しかし、単一ウェルの内容しか複製できません。複数のウェルを選択してその内容を複製することはできません。

別のウェルへのウェル内容の複製方法

1. プレートペインで、複製するウェルを選択します。
2. ウェルを右クリックして Copy Well を選択します。
3. 内容をペーストするウェルを選択します。
 - 単一ウェルを選択する場合、そのウェルをクリックする。
 - 複数の隣接するウェルを選択する場合、1つのウェルをクリックしてターゲットのウェルまでドラッグする。
 - 複数の隣接しないウェルを選択する場合、Ctrl キーを押したまま各ウェルをクリックする。
4. 選択しているターゲットウェルで右クリックして、Paste Well を選択します。

CFX Maestro ソフトウェアは選択したウェルに最初のウェルの内容をペーストします。

ウェルへのメモの追加

ウェルに説明のメモを追加することができます。このウェルのメモは、Data Analysis ウィンドウの Quantification タブで見ることができます。

ウェルにメモを追加する方法

1. プレートペインで、メモを追加したいウェルを選択します。
2. 下部のペインにある View セクションで、Well Note を選択します。

Well Note ダイアログボックスが右側のペインに表示されます。



3. テキストボックスにメモの内容を入力し、Enter キーを押します。

選択しているウェルの下部にテキストが表示されます。

アドバイス：ウェルのメモを前にも作成している場合には、それをドロップダウンリストから選び、選択しているウェルに適用することが可能です。

ウェルからすべての内容を消去

個々のウェル、ウェルグループ、またはプレート全体からすべての内容を消去することができます。ウェル内容の消去によって、プレートリード中に収集された蛍光データが削除されることはありません。

注意：ウェルの内容を消去することにより、ウェルから内容が永久に削除されます。ウェルの内容を消去した後に OK をクリックしてプレートを保存すると、この消去操作を取り消すことはできません。ウェルの内容を消去する際には注意してください。

ウェルからすべての設定を消去する方法

1. Plate Editor で、プレートペインのウェルまたはウェルグループを選択します。
 - 単一ウェルを選択する場合、そのウェルをクリックする。
 - 複数の隣接するウェルを選択する場合、1つのウェルをクリックしてターゲットのウェルまでドラッグする。
 - 複数の隣接しないウェルを選択する場合、Ctrl キーを押したまま各ウェルをクリックする。
 - 同一のサンプルタイプのカラム全体を選択する場合、カラム番号をクリックする。
 - 列全体を選択する場合、その列番号をクリックする。
2. 右側のペインで、Clear Wells をクリックします。

CFX Maestro ソフトウェアは、選択しているウェルのすべての設定を消去します。
3. 以下のいずれかを行います。
 - 誤ってウェルの内容を消去した場合には、OK をクリックして変更を確定する前に、Plate Editor ツールバーの Undo をクリックしてください。

重要：Undo をクリックする前に OK をクリックすると変更が保存され、Plate Editor ツールバーの Undo が無効になります。
 - OK をクリックして変更を確定し、プレートを保存する。

Experiment Settings の変更

Experiment Settings ダイアログボックスを使用して、ターゲットやサンプルのリストを表示または変更し、生物学的グループをプレート内のウェルに割り当てた場合には、解析用の遺伝子発現解析サンプルグループを設定することができます。

Experiment Settings ダイアログボックスの Targets タブには、ターゲット遺伝子または対象の遺伝子配列などの、各 PCR 反応用のターゲット名のリストが表示されます。

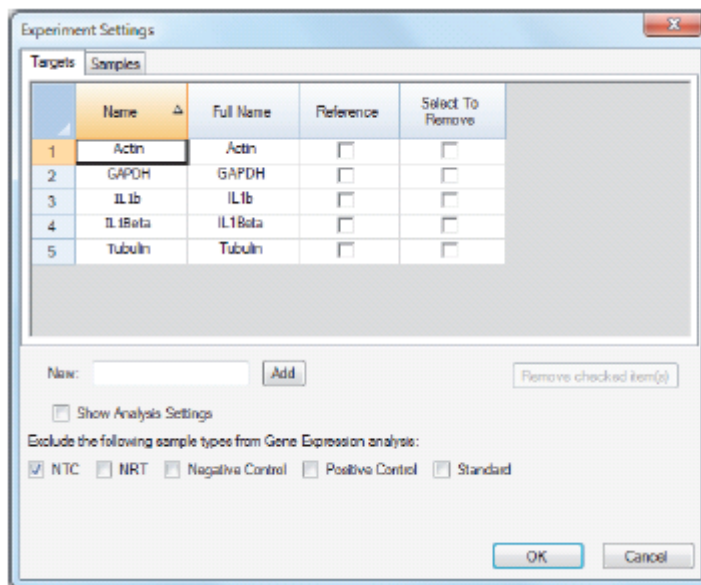
Samples タブには、1 時間 (1 Hr) で得られるサンプルまたは特定の個体 (マウス 1) より得られるサンプルなど、ターゲットのソースを示すサンプル名のリストが表示されます。

デフォルトで、CFX Maestro ソフトウェアには各ターゲットとサンプル名に関するすべての解析設定が表示されます。設定パラメータ調節すれば、Data Analysis ウィンドウの情報を変更することが可能です。

Experiment Settings ダイアログボックスを使用したプレート設定の変更方法

1. Experiment Settings ダイアログボックスを開くには、以下のいずれかを行います。
 - Plate Editor の右側のペインで、Experiment Settings をクリックする。
 - Data Analysis ウィンドウの Gene Expression タブで、Experiment Settings をクリックする。

Experiment Settings ダイアログボックスが現れ、Targets タブの内容が表示されます。



2. 新しいターゲットまたはサンプル名を追加するには、該当するタブの New テキストボックスに名称を入力して Add をクリックします。
3. リストから 1 つ以上のターゲットまたはサンプル名を削除するには、該当するタブの Select to Remove カラムで項目のチェックボックスを選択して、Remove checked item(s) をクリックします。

4. CFX Maestro では、遺伝子発現解析からの NTC（対照テンプレートなし）サンプルタイプは除外されます。

NTC サンプルタイプを含めるには、Exclude the following sample types（以下のサンプルタイプを除外）セクションのチェックボックスを解除します。以下から該当するチェックボックスを選択して、除外するサンプルタイプを選択できます。

- NRT（逆転写なし）
- Negative Control（陰性対照）
- Positive Control（陽性対照）
- Standard（標準）

5. Targets タブでは以下を行えます。
 - a. 遺伝子発現データ解析用の基準としてターゲットを選択する場合、Reference カラムからターゲットを選択する。
 - b. Analysis Settings ウィンドウの Gene Expression タブに適用される解析パラメータを非表示にする場合、Show Analysis Settings を解除する。

ソフトウェアは以下のカラムを非表示にします。

- Color（色）
- Show Chart（グラフを表示）
- Auto Efficiency（自動効率）
- Efficiency（効率）（%）

- c. Gene Expression グラフに描かれるターゲットの色を変更する場合、Color カラム内の該当するセルをクリックし、表示される Color ダイアログボックスで新しい色を選択して OK をクリックする。
- d. 選択した色で Gene Expression グラフにターゲットを表示する場合、Show Graph カラムのチェックボックスを選択する。
- e. デフォルトでは、データが検量線を含む場合に CFX Maestro ソフトウェアは、ターゲットの相対効率を自動的に計算する。

以前得た効率値を使用する場合には、その値を Efficiency（%）カラムの該当するセルに入力して Enter キーを押してください。CFX Maestro ソフトウェアが Auto Efficiency チェックボックスを解除します。

6. Samples タブでは以下を行えます。
 - a. 遺伝子発現データ解析用のコントロールサンプルとしてサンプルを選択する場合、Control カラム内の該当するチェックボックスを選択する。
 - b. ラン用のサンプルにコントロール条件を割り当てる場合、Control カラム内の該当するチェックボックスをクリックする。
 - c. まだ選択していない場合には、Show Analysis Settings を解除して Gene Expression タブに適用される解析パラメータを非表示にするか変更する。ソフトウェアが Color カラムと Show Chart カラムを非表示にします。
7. OK をクリックして Experiment Settings ダイアログボックスにパラメータを保存し、Plate Editor ウィンドウに戻ります。

ウェルグループの作成

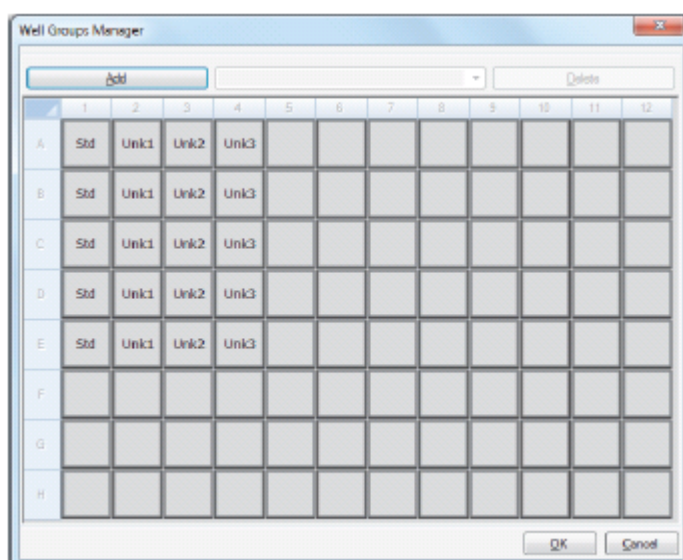
ウェルグループは単一プレートを、Data Analysis ウィンドウで個別に解析できるウェルのサブセットへと分割します。ウェルグループの設定後、独立グループとしてデータ解析するため Data Analysis ウィンドウから1つ選びます。例えば、1つのプレートで複数の実験ランを解析するため、または異なる検量線を含む各ウェルグループを解析するために、ウェルグループを設定します。

注意：デフォルトのウェルグループは All Wells（すべてのウェル）です。

ウェルグループの作成方法

- Well Groups Manager を開くには、以下のいずれかを行います。
 - Plate Editor ツールバーの Well Groups をクリックする。
 - Data Analysis ウィンドウの Manage Well Groups をクリックする。

Well Groups Manager ダイアログボックスが表示されます。



- Add をクリックして新しいグループを作成します。ドロップダウンメニューには、最初のグループのグループ名が Group 1（グループ 1）と表示されます。
- ウェルグループをクリック & ドラッグして、プレート内のウェルグループ用のウェルを選択します。選択したウェルが青色で Manager に表示されます。
- （オプション）ウェルグループの名称を変更するには、その名称をドロップダウンメニューから選択して新しい名称を入力します。
- （オプション）ウェルグループを削除するには、その名称をドロップダウンから選択して Delete をクリックします。
- 終了するには OK をクリックしてウィンドウを閉じるか、Cancel をクリックして変更を行わずにダイアログボックスを閉じます。

Well Groups Manager ダイアログボックスの右クリックメニュー項目

表6は、ウェルを右クリックしたときに Well Groups Manager ダイアログボックスで使用できるメニュー項目です。

表6 Well Groups Manager ダイアログボックスの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	後に別のウェルにペーストできるウェルの内容をコピーします。
Copy as Image	ウェルセクター画面を画像としてコピーします。
Print	ウェルセクター画面を印刷します。
Print Selection	現在の選択肢を印刷します。
Export to Excel	データを Excel のスプレッドシートにエクスポートします。
Export to Csv	データをカンマ区切り文書としてエクスポートします。
Export to Xml	データを.xml 文書としてエクスポートします。
Export to Html	データを.html 文書としてエクスポートします。

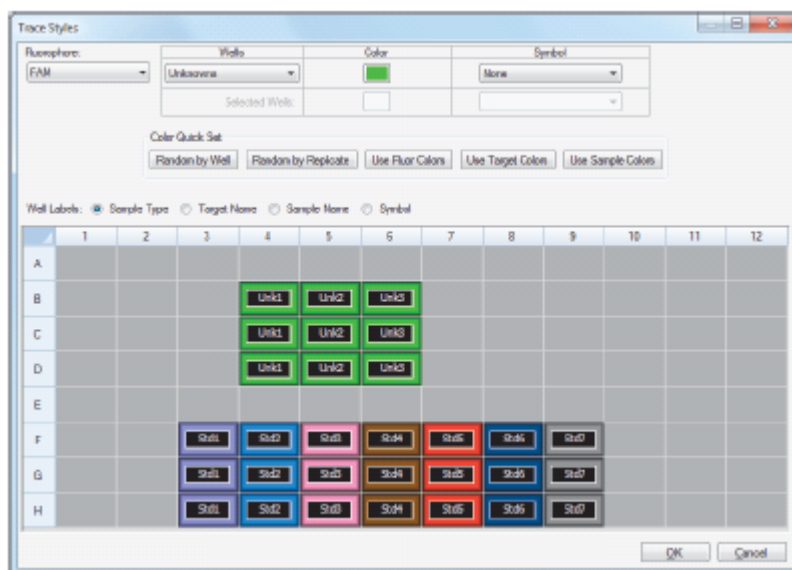
トレーススタイルの変更

プレートセットアップ中とランの進行中、増幅トレースの色とスタイルを変更することができます。そして、データの収集に応じて Real-time Status ウィンドウでトレースを簡単に表示することができます。

トレーススタイルの変更方法

1. Plate Editor ツールバーの Trace Styles をクリックします。

開いているプレートの Trace Styles ダイアログボックスが、下図のように表示されます。



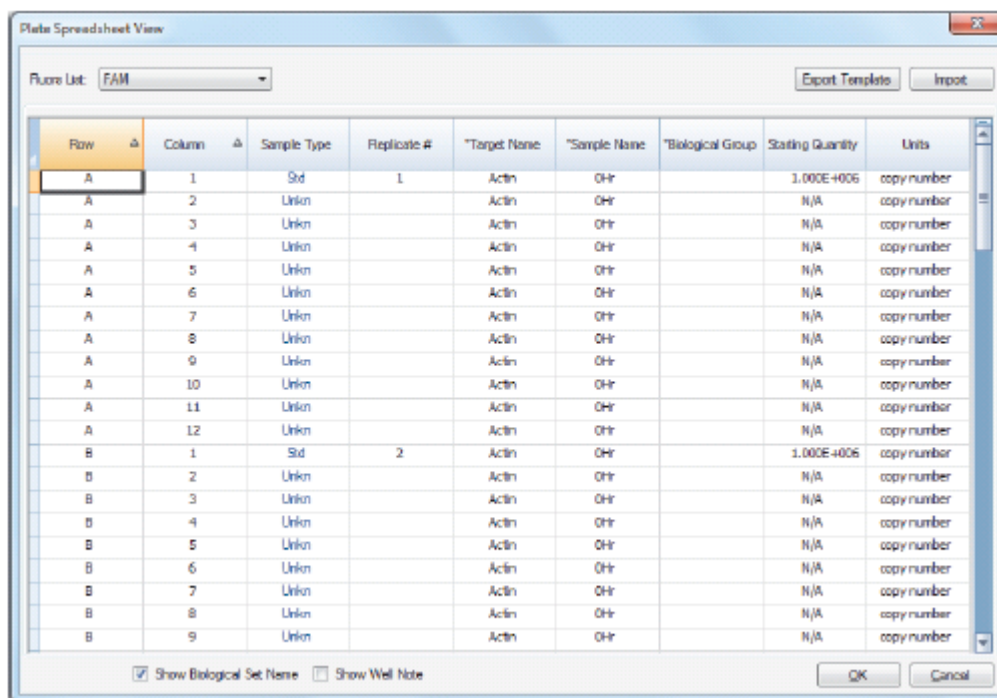
2. 特定の蛍光色素でトレーススタイルを表示するには、その蛍光色素を Fluorophores ドロップダウンリストから選択します。
3. トレース表示を変更するには、以下を行います。
 - a. Wells ドロップダウンリストからトレースタイプを選択する。
 - b. Color カラムでトレースの色をクリックする。
 - c. 表示される Color ダイアログボックスで、トレース用の別の色を選び OK をクリックする。
ウェルタイプの変化が下のグリッドに表示されます。
 - d. (オプション) Symbols ドロップダウンリストからトレース用の記号を選択する。
4. 色のセットを迅速に変更するには、Color Quick Set セクションで該当する選択肢をクリックします。
5. グリッド内のウェルラベルを表示するには、Well Labels セクションのラベルタイプを選択します。
6. OK をクリックして変更を保存するか、Cancel をクリックして変更をキャンセルします。

スプレッドシートフォーマットで表示

Spreadsheet View/Importer ツールには、プレートの内容がスプレッドシートフォーマットで表示されます。Spreadsheet View/Importer ツールを使用して、タブ区切りフォーマットのウェルの内容を Microsoft Excel などのアプリケーションにエクスポートすることができます。また、タブ区切りのアプリケーションからウェルの内容をインポートすることも可能です。

Spreadsheet View/Importer ツールの使用方法

1. Plate Editor ツールバーの Spreadsheet View/Importer をクリックして、Plate Spreadsheet View ダイアログボックスを開きます。



2. Spreadsheet View ダイアログボックスには、単一の蛍光色素に関するプレートの内容が表示されます。別の蛍光色素に関するプレートの内容を表示するには、Fluors List ドロップダウンリストから選択します。
3. プレートのスプレッドシートのテンプレートを Excel ファイル (.csv フォーマット) にエクスポートするには、Export Template をクリックします。このテンプレートを編集して、ウェルの内容情報をインポートできます。
4. (オプション) カンマ区切りファイルからウェルの内容をインポートするには、Import をクリックします。
5. 特定の列のデータに応じてスプレッドシートをソートするには、列名の隣にある三角をクリックします。

アドバイス: 列名そばにアスタリスク (*) がある列 (例えば *Target Name) 内のあらゆるセルの内容は編集可能です。

注意: Plate Editor を開いてメニューバーの Settings > Units を選択して、Quantity 列内の検量線データの単位を選択してください。プレートのラン完了後、この検量線データが、選択した単位で Data Analysis ウィンドウの Quantification タブの Standard Curve グラフに表示されます。

Spreadsheet View/Importer ツールの右クリックメニュー項目

表 7 は、ツール内のウェルで右クリックしたときに使用できる Spreadsheet View/Importer ツールのメニュー項目を記載しています。

表 7 Spreadsheet View/Importer ツールの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	スプレッドシート全体をコピーします。
Copy as Image	スプレッドシートを画像ファイルとしてコピーします。
Print	スプレッドシートを印刷します。
Print Selection	選択したセルのみを印刷します。
Export to Excel	ファイル Excel のスプレッドシートにエクスポートします。
Export to Text	ファイルをテキストファイルにエクスポートします。
Export to Xml	ファイル.xml ファイルとしてエクスポートします。
Export to Html	ファイル.html ファイルとしてエクスポートします。
Find	スプレッドシート内のテキストを検索します。
Sort	Sort ウィンドウ内のデータを最大 3 カラムまで選択してスプレッドシートをソートします。

Setup Wizard を使用したプレートレイアウトの作成

Setup Wizard を使用すると、正規化遺伝子発現解析に必要なプレートレイアウト情報を入力することができます。この情報は以下を含みます。

- ターゲット名
- サンプル名
- プレートにおけるターゲットとサンプルの位置
- リファレンス遺伝子
- コントロールサンプル

ランの前、ラン実行中、またはランの後に Setup Wizard を使用できます。

Setup Wizard の使用

本節では、プレートの Setup Wizard を使用したプレートレイアウトの作成方法について説明します。プレート内の各ウェルの内容をより見やすくするには、Setup Wizard の上部にある Zoom plate をクリックしてください。

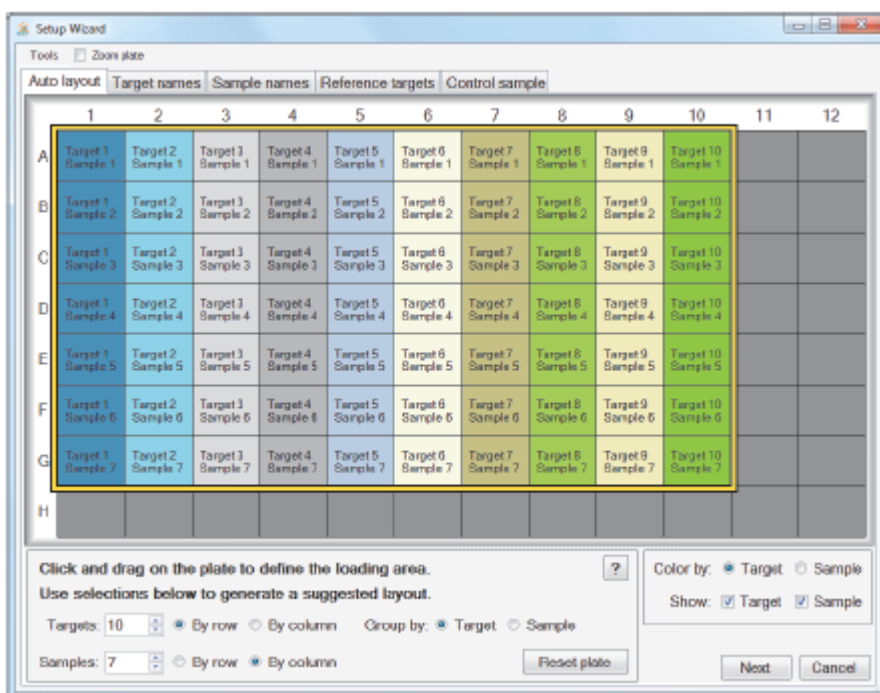
重要 : Setup Wizard の他のタブにいる間に Auto layout タブに戻ると、プレートレイアウトがリセットされます。このタブを選択する際には注意してください。

アドバイス : Setup Wizard の Tools > Clear Plate を選択すると、レイアウトをリセットできます。

Setup Wizard の使用方法

1. Plate Editor を開きます。
2. Setup Wizard を開くには、以下のいずれかを行います。
 - Editing Tools > Setup Wizard を選択する。
 - Plate Editor ツールバーの Setup Wizard をクリックする。

Setup Wizard が現れ、Auto layout タブが表示されます。



3. Auto layout タブで以下を行います。

- a. グリッド内のウェルをクリックして横方向と下方にドラッグし、サンプルをロードしたいプレート上の領域を指定する。
- b. ロードするターゲットとサンプルの数を入力する。

アドバイス： ターゲットとサンプルの数は、選択しているセルの数を同じである必要があります。入力した数値が選択した領域に一致しない場合、数値かプレートの選択領域を修正してください。プレート上のアイテムの方向やグルーピングを指定できます。

- c. (オプション) プレートの方向を変更する。例えば、列内のターゲットや行内のサンプル、またはサンプルのグループを設定できます。
- d. Next をクリックして Target names タブに移る。

注意： プレートレイアウトに一定のパターンがない場合には、Target names タブを使用してターゲットを手動で配置するか、Sample names タブを使用してプレート上にサンプルを手動で配置してください。クリック&ドラッグして、複数のウェルを選択してください。

4. Target names タブで、ターゲットグループのターゲット名を定義します。

- a. 以下のいずれかを行う。
 - グループごとのターゲット名を変更する場合、Select by を Target に設定する。
 - ウェルごとのターゲット名を変更する場合、Select by を Well に設定する。

- b. グリッド内のターゲットグループまたはウェルを選択して、Target name ドロップダウンリストに名称を入力する。

アドバイス： 右側にある次のグループまたはウェルを選択するには Tab を押し、下にある次のグループまたはウェルを選択するには Enter を押ししてください。代替的に、Target name タブと Sample name タブで、Ctrl キーを押したままウェルをクリックして、隣接していない複数のウェルを選択できます。

- c. Next をクリックして Sample names タブに移る。
5. Sample names タブで、サンプルグループ用のサンプル名を定義します。
6. Next をクリックして Reference targets タブに移ります。
7. Reference targets タブで、正規化遺伝子発現用のリファレンスとして使用する 1 つ以上のターゲットを選択し、Next をクリックして Control sample タブに移ります。
8. Control sample タブで、相対遺伝子発現計算用のコントロールとして使用するサンプルを 1 つ選択します。
9. OK をクリックしてプレートレイアウトを保存し、Plate Editor に戻ります。ここではさらに、プレートパラメータを定義できます。詳細については、99 ページの「[プレートファイルへのオプションのパラメータの割り当て](#)」を参照してください。

代替的に、Previous をクリックすると、前のタブに戻って変更を行えます。

注意： Auto layout タブに戻ると、プレートが自動的にリセットされます。Previous をクリックする際には注意してください。

第7章 実験のラン

本章では、CFX Maestro ソフトウェアを使用した、カスタム（ユーザー設定）または PrimePCR アッセイ実験のランの方法について説明します。

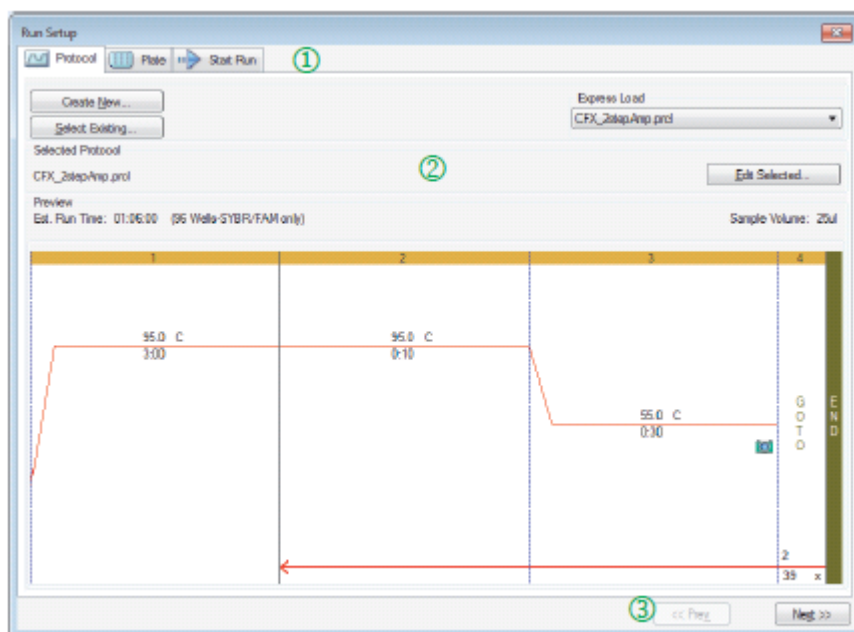
ランのデータファイルには、ラン用のプロトコールとプレート情報が含まれます。また、ラン完了後に CFX Maestro が実施する解析から得られるデータも含まれます。

CFX Maestro ソフトウェアにより、ユーザー定義または PrimePCR 実験の設定とランが容易になります。Run Setup ウィンドウが実験の設定に関する共通手順を Start Run ダイアログボックスまでガイドします。そしてそこからランを開始します。

Run Setup ウィンドウ

Run Setup ウィンドウは、実験の設定とランに必要なファイルと設定への迅速なアクセスを提供します。ユーザー定義の実験のランを実行したい場合、Run Setup ウィンドウを開いて Protocol タブを表示します。PrimePCR 実験のランを実行したい場合には、Run Setup ウィンドウを開いて Start Run タブを表示します。

アドバイス : PrimePCR の詳細については、133 ページの「PrimePCR 実験の実施」を参照してください。また、Start Run タブの詳細については、125 ページの「Start Run タブ」を参照してください。



説明

- 1 タブは、実験の設定とラン実行の際のガイドになります。
 - Protocol タブ — ランまたは編集する既存のプロトコールを選択し、または Protocol Editor 内に新しいプロトコールを作成します。
 - Plate タブ — ランまたは編集する既存プレートを選択し、または Plate Editor 内に新しいプレートを作成します。
 - Start Run タブ — 実験の設定の表示、1つ以上の機器ブロックの選択、およびランの開始を行います。
- 2 メインウィンドウには、適用する各タブのオプションが表示されます。
- 3 ナビゲーションボタンにより Start Run タブへ導かれます。

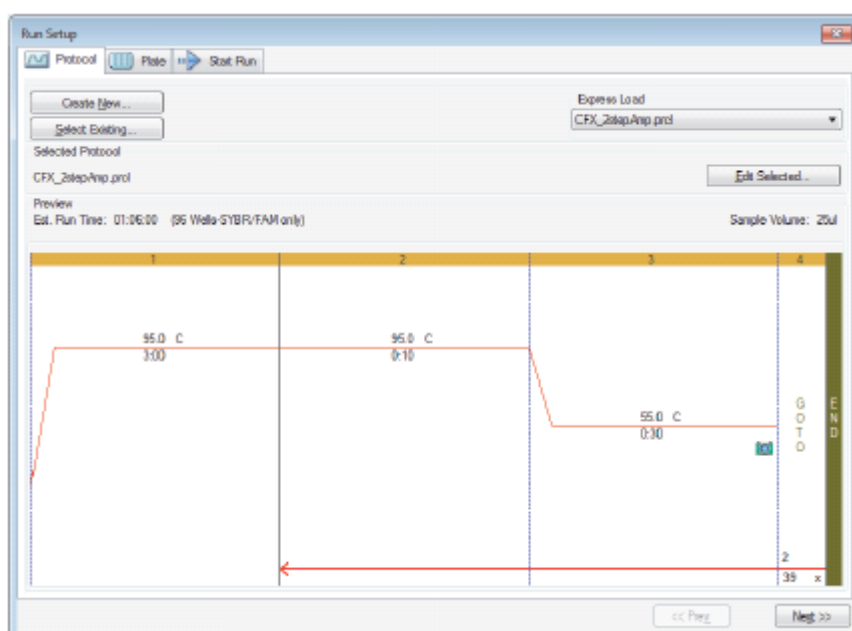
Run Setup ウィンドウへのアクセス

Run Setup ウィンドウへのアクセス方法

- ▶ 以下のいずれかを行います。
 - Startup Wizard 内の Run setup タブの User-defined または PrimePCR をクリックする。
 - Home ウィンドウのツールバーの User-defined Run Setup または PrimePCR Run Setup をクリックする。
 - Home ウィンドウで Run > User-definedRun または PrimePCR Run のいずれかを選択する。

Protocol タブ

Protocol タブには、ランを実行するプロトコルファイルのプレビューが表示されます。プロトコルファイルには、機器温度ステップに関する指示に加え、ランプレート、サンプル容量、およびリッド温度を制御する機器のオプションが含まれます。



デフォルトで、ソフトウェアは User > User Preferences ダイアログボックスの Files タブにある Run Setup セクションで File Selection に定義されるプロトコルを表示します。User Preferences ダイアログボックス内でデフォルトのプロトコルを変更できます。詳細については、49 ページの「[デフォルトのファイル設定の変更方法](#)」を参照してください。

Protocol タブでは以下を行えます。

- ランを実行する新規プロトコルの作成
- ランまたは編集する既存のプロトコルを選択

プロトコルの作成や修正の詳細については、第 5 章の「[プロトコルの作成](#)」を参照してください。

新しいプロトコールの作成方法

1. Protocol タブの Create New をクリックします。
Protocol Editor が表示されます。
2. Protocol Editor を使用して新しいプロトコールを作成します。
3. OK をクリックしてプロトコールを保存し、Run Setup の Protocol タブに戻ります。
4. プロトコールの詳細を表示し、以下のいずれかを行います。
 - 詳細が正しい場合、Next をクリックして Plate タブに移る。
 - 詳細が正しくない場合、Edit Selected タブをクリックして Protocol Editor ウィンドウに戻る。プロトコールを訂正して変更を保存した後、Protocol タブの Next をクリックして Plate タブに移る。

既存のプロトコールの選択方法

1. Protocol タブで、以下のいずれかを行います。
 - Select Existing をクリックして既存のプロトコールヘナビゲートする。
 - Express Load をクリックし、プロトコールのドロップダウンリストからプロトコールを1つ選択する。
アドバイス : Express Load ドロップダウンリストへのプロトコールの追加、またはドロップダウンリストからのプロトコールの削除を行えます。詳細については、「Express Load のプロトコール追加および削除」を参照してください。
2. プロトコールの詳細を表示し、以下のいずれかを行います。
 - 詳細が正しい場合、Next をクリックして Plate タブに移る。
 - 詳細が正しくない場合、Edit Selected をクリックして Protocol Editor を開く。プロトコールを訂正して変更を保存した後、Protocol タブの Next をクリックして Plate タブに移る。

Express Load のプロトコールの追加および削除

Protocol Editor に表示される Express Load ドロップダウンリストの内容を修正することができます。このリストのプロトコールは、下記のフォルダに保存されます。

C:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\<user_name>\ExpressLoad\

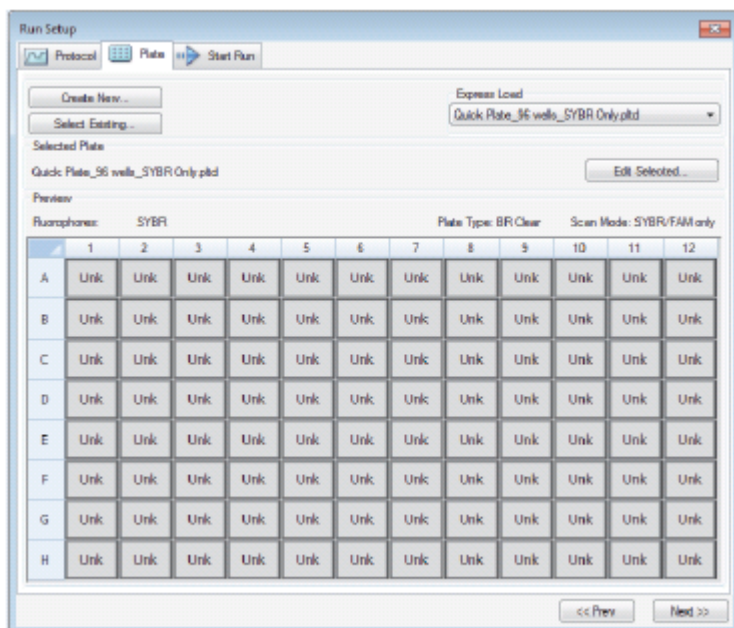
Express Load リストのプロトコールの修正方法

1. ExpressLoad フォルダにナビゲートして、これを開きます。
2. フォルダ内のプロトコールファイル (.pcri) を訂正します。
3. 以下のいずれかを行います。
 - フォルダからプロトコールを削除して、ドロップダウンリストから削除する。
 - フォルダ内のプロトコールをコピーして、ドロップダウンリストに追加する。

Plate タブ

注意 : Protocol タブで選択したプロトコルがリアルタイム PCR 解析用のプレートリードステップを含まない場合には、Plate タブが非表示になります。Plate タブを表示するには、プロトコルに少なくとも 1 つのプレートリードを追加してください。

Plate タブには、ロードするプレートファイルのプレビューが表示されます。リアルタイム PCR ランでは、プレートファイルは、蛍光色素、スキャンモード、およびプレートタイプを含む各ウェルの内容の説明を含みます。CFX Maestro ソフトウェアではこれらの説明を使用してデータ収集と解析を行います。



デフォルトで、ソフトウェアは User > User Preferences ダイアログボックス内の Files タブの Run Setup セクションで File Selection に定義されたプレートを表示します。User Preferences ダイアログボックス内のデフォルトのプレートを変更できます。詳細については、49 ページの「[デフォルトのファイル設定の変更方法](#)」を参照してください。

Plate タブでは、以下を行えます。

- ロードする新しいプレートの作成
- ロードまたは編集する既存のプレートの選択

プレートの作成と修正に関する詳細については、「[プレートの作成](#)」を参照してください。

新しいプレートの作成方法

1. Plate タブの Create New をクリックします。
Plate Editor が表示されます。
2. Plate Editor を使用して、新しいプレートを作成します。
3. OK をクリックしてプレートを保存し、Run Setup の Plate タブに戻ります。
4. プレートの詳細を表示して以下のいずれかを行います。
 - 詳細が正しい場合、Next をクリックして Start Run タブに移る。
 - 詳細が正しくない場合、Edit Selected をクリックして Plate Editor に戻る。プレートファイルを訂正して変更を保存した後、Plate タブの Next をクリックして Start Run タブに移る。

既存のプレートファイルの選択方法

1. Plate タブで以下のいずれかを行います。
 - Select Existing をクリックして既存のプレートファイルへナビゲートする。
 - Express Load をクリックしてドロップダウンリストからプレートファイルを選択する。
アドバイス : Express Load ドロップダウンリストにプレートを追加し、またはドロップダウンリストからプレートを削除することができます。詳細については、「[Express Load のプロトコルの追加および削除](#)」を参照してください。
2. プレートの詳細を表示して以下のいずれかを行います。
 - 詳細が正しい場合、Next をクリックして Start Run タブに移る。
 - 詳細が正しくない場合、Edit Selected をクリックして Plate Editor ウィンドウを開く。プレートファイルを訂正して変更を保存した後、Plate タブの Next をクリックして Start Run タブに移る。

Express Load のプレートファイルの追加および削除

Plate Editor に表示される Express Load ドロップダウンリストの内容を修正することができます。このリストに表示されるプレートは、以下のフォルダに保存されます。

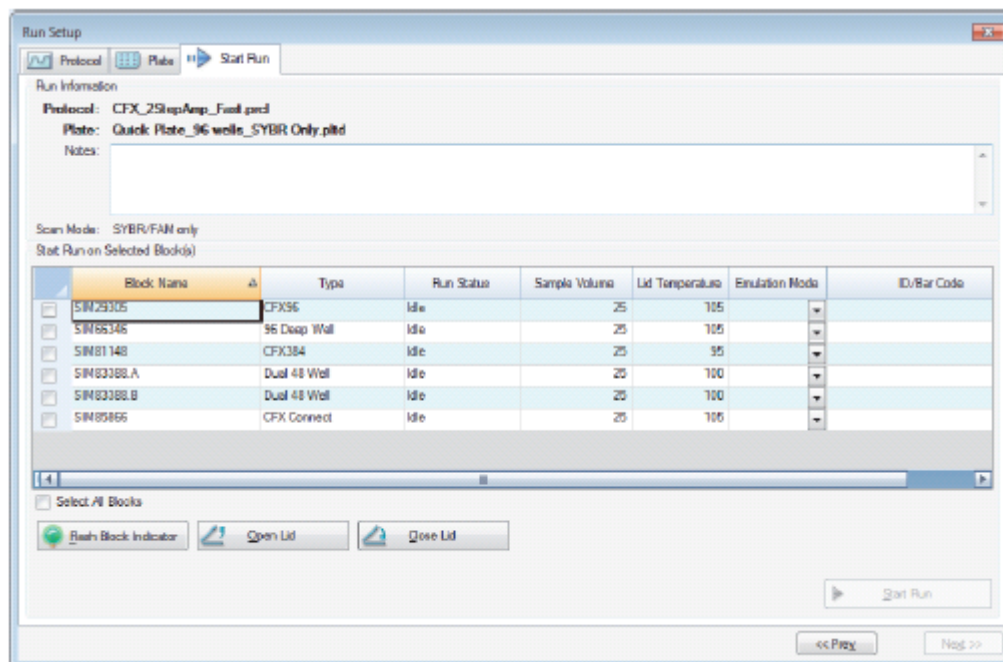
```
c:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFX\User\<user_name>\ExpressLoad\
```

Express Load リストのプレートファイルの修正方法

1. ExpressLoad フォルダにナビゲートして、これを開きます。
2. フォルダ内のプレートファイル (.pltd) を訂正します。
3. 以下のいずれかを行います。
 - フォルダからプレートファイルを削除し、ドロップダウンリストからプレートファイルを削除する。
 - フォルダにプレートファイルをコピーし、ドロップダウンリストにプレートファイルを追加する。

Start Run タブ

Start Run タブには、ランを実行する実験に関する情報が表示されます。また、実験のランを実行できる接続機器、ブロックが表示されます。



Start Run タブでは以下を行えます。

- 選択しているプロトコールファイル、プレートファイル、およびスキャンモードを含む詳細なラン情報の表示。
- ランに関するメモの追加。
- ランのステータス（実行中または待機中）、 μL 単位のサンプル容量、リッド温度、エミュレーションモード、および ID またはバーコード（可能な場合）を含む、接続されているすべての機器に関する詳細の表示。

注意：Selected Blocks 表の Start Run に表示されるカラムを修正できます。詳細については、126 ページの「[Selected Blocks 表における詳細の修正](#)」を参照してください。

- ランを実行するブロックの選択。
- 選択している各機器のリッドの開閉の遠隔制御。
- ランの開始。

Selected Blocks 表における詳細の修正

Selected Block(s)表の Start Run に表示されるカラムを修正することができます。また、この表のデフォルトのサンプル容量やリッド温度の値も修正できます。設定の変更は、実行するランに適用されます。

Selected Blocks 表の Start Run にカラムを追加する方法

- ▶ 表を右クリックし、表示されるメニュー内のオプションを選択します。

Selected Blocks 表の Start Run からカラムを削除する方法

- ▶ 表を右クリックし、表示されるメニュー内のオプションを解除します。

ブロックのサンプル容量またはリッド温度の値を編集する方法

- ▶ ターゲットブロックのサンプル容量またはリッド温度セルを選択し、新しい値をセルに入力します。

ブロックのラン ID またはバーコードの追加方法

- ▶ ターゲットブロックの ID/Bar Code セルを選択し、ID を入力するかバーコードリーダーでスキャンします。

実験のラン実行

実験のラン実行方法

1. Start Run タブの Run Information セクションで、プレートとプロトコールの詳細を検証します。
2. (オプション) Notes テキストボックスに、ランまたは実験に関するメモを追加します。
3. ランを実行する 1 つ以上のブロックのチェックボックスを選択します。

アドバイス：すべてのブロックの実験ランを実行するには、Selected Blocks 表の下にある Select All Blocks を選択してください。

4. (オプション) Flash Block Indicator をクリックすると、選択している各機器ブロックのインジケータ LED が点灯します。
5. ブロックに実験プレートを挿入します。
 - a. Open Lid をクリックする。選択している各ブロックの自動リッドが開きます。
 - b. 選択している各ブロックに実験ブロックを挿入する。
 - c. Close Lid をクリックする。

アドバイス：各ブロックの前方にあるボタンを押しても、リッドを開閉することができます。

6. Open Lid および Close Lid をクリックして、選択している各機器ブロックの自動リッドを開閉させます。

7. ランの詳細を表示して、以下のいずれかを行います。
 - 詳細が正しい場合、Start Run をクリックする。
 - 詳細が正しくない場合:
 - Selected Blocks タブの詳細を修正し、Start Run をクリックする。
 - 正しいタブに戻って適正な変更を行い、変更を保存した後に Next をクリックして Start Run タブに戻り、ランを開始する。

以前のランから新しいランを開始する方法

- ▶ 以下のいずれかを行います。
 - ソフトウェアのメインメニューバーで File > Repeat a Run を選択し、繰り返したいランのランデータファイルにナビゲートしてそれをダブルクリックする。
 - Startup Wizard の Repeat Run タブを選択して、繰り返したいランのランデータファイルをダブルクリックする。
- 任意に、Repeat Run タブで Browse をクリックすると、繰り返したいランデータファイルにナビゲートしてそれをダブルクリックすることが可能です。

Run Details ダイアログボックス

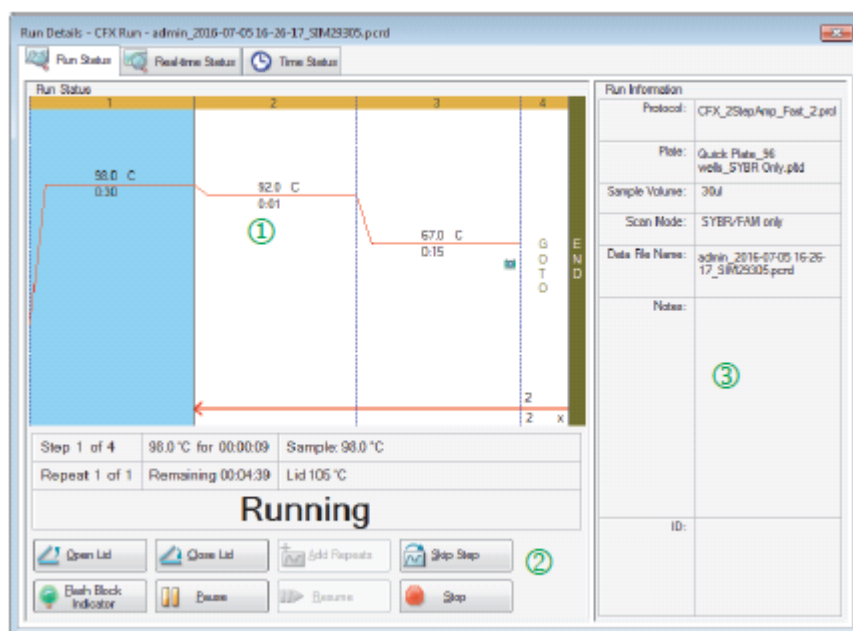
Start Run をクリックすると、CFX Maestro ソフトウェアはデータファイル (.pcrd) の保存を促し、ランを開始し、Run Details ダイアログボックスを開きます。Run Details ダイアログボックスは以下の3つのタブを含みます。

- **Run Status (ランのステータス)** — このタブは、プロトコルの現在のステータスの表示、リッドの開閉、ランの一時停止、繰り返しの追加、ステップのスキップ、またはランの中止などをおこないます。
- **Real-time Status (リアルタイムステータス)** — このタブは、収集したリアルタイム PCR 蛍光データを表示します。
- **Time Status (時間のステータス)** — このタブは、プロトコル用の全画面カウントダウンタイマーを表示します。

これらのタブについては、後続の節で詳述します。

Run Status タブ

Run Status タブには、現在進行中のランのステータスが表示されます。この画面では、リッドの制御や進行中のランの変更も可能です。



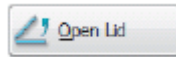
説明

- 1 Run Status (ランのステータス) ペイン — プロトコルの現在の進捗状況を表示します。
- 2 Run Status (ランのステータス) コントロールボタン — 機器の操作または現在のプロトコールの中断が可能です。
- 3 Run Information (ラン情報) ペイン — ランの詳細を表示します。

Run Status コマンド

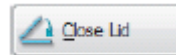
Run Status タブのコマンドを使用すると、ソフトウェアから機器を操作し、または進行中のランを変更することができます。

注意：ラン実行中に、繰り返しを追加するなど、プロトコールを変更しても、ランに関連するプロトコールファイルは変更されません。この操作は、Run Log に記録されます。

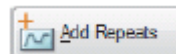


— 選択している機器の自動リッドを開きます。

重要：ランの実行中にリッドを開くと、現ステップ中のランが一時停止し、データが変更されるおそれがあります。

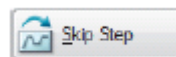


— 選択している機器の自動リッドを閉じます。



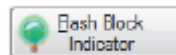
— プロトコールの現在の GOTO ステップにさらに多くの繰り返しを追加します。

このオプションは、GOTO ステップの実行中にのみ使用できます。

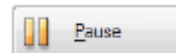


— プロトコールの現在のステップをスキップします。

注意：GOTO ステップをスキップすると、ソフトウェアは GOTO ループ全体をスキップすることの確定を促し、プロトコールの次のステップに進みます。

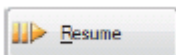


— 選択している機器の LED を点灯し、選択しているブロックを識別します。



— プロトコールを一時中断します。

注意：この操作は Run Log に記録されます。



— 一時中断していたプロトコールを再開します。

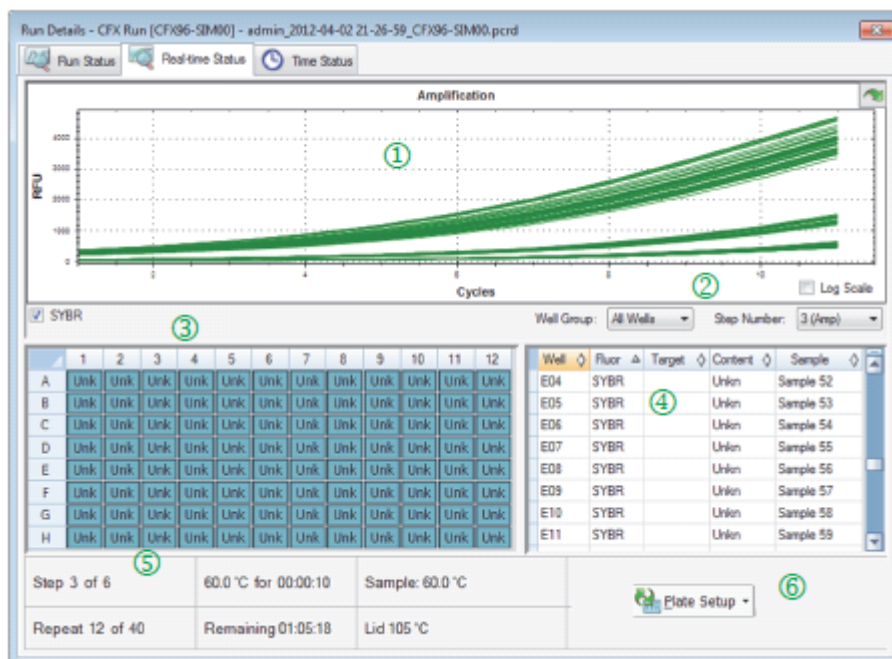


— プロトコールが終了する前にランを中止します。

注意：プロトコールの終了前にランを中止すると、データが変更されるおそれがあります。

Real-time Status タブ

Real-time Status タブには、ランでの最初の2回のデータ読み取り後に、各サイクルで収集されたリアルタイム PCR データが表示されます。



説明

- 1 Amplification trace (増幅トレース) ペイン — ラン実行中のリアルタイム増幅データを表示します。
- 2 Well group identifier (ウェルグループ識別名称) — ウェルグループがプレート設定で識別された場合、ユーザーはトレース、ウェル、および表形式の情報を表示する特定のウェルグループを選択できます。
Step number identifier (ステップ数識別名称) — プロトコールが2つ以上のステップでデータ収集する場合 (例えば、増幅と融解曲線の最中)、ユーザーは特定のステップを選択してそのステップで収集されるトレースを見ることができます。
- 3 Well selector (ウェルセレクター) ペイン — プレート内の、アクティブウェル、非アクティブウェル、および空のウェルを表示します。
- 4 Plate setup table (プレート設定表) ペイン — プレート設定を表形式で表示します。
- 5 Run details (ランの詳細) ペイン — 以下を含むランのリアルタイムの状況を表示します。
 - 現在のステップ
 - 現在のレポート数
 - 現在の温度
 - 残り時間
 - サンプル温度
 - リッド温度
- 6 Plate Setup (プレート設定) — Plate Setup ダイアログボックスを開きます。ここではラン実行中に現在のプレート設定を修正することができます。

Real-time Status タブでは、以下を行えます。

- ウェルセクターペインまたはプレート設定表で選択することにより、リアルタイムトレースを表示または非表示にする。
- ウェルグループドロップダウンリストで選択することにより、単一トレースまたはトレースグループを表示する。
- プレートを編集、またはプレートファイルを入れ替える。
- ランに PrimePCR ファイルを適用する。

リアルタイムトレースの表示または非表示

デフォルトでは、充填されたすべてのウェルはアクティブであり、プレート設定表に表示されます。アクティブなウェルは、ウェルセクターペインに青色で表示されます。非表示のウェルはウェルセクターペインに薄いグレー色で表示され、使用されないウェルは濃いグレー色で表示されます。

ランの実行中にアクティブウェルからのトレースを非表示にすることができます。CFX Maestro はすべてのウェルに関するデータ収集を継続します。ウェルを非表示にすると、プレート設定表にはデータが表示されません。

リアルタイムトレースを非表示にする方法

- ▶ ウェルセクターペインで、非表示にしたいアクティブ（青色）ウェルをクリックします。

リアルタイムトレースを表示する方法

- ▶ ウェルセクターペインで、表示したい非表示（薄いグレー色）ウェルをクリックします。ウェルセクターの詳細については、145 ページの「[ウェルセクター](#)」を参照してください。

Plate Setup の編集

プレート設定の編集方法

- ▶ Plate Setup をクリックした後に、View/Edit Plate を選択します。

Plate Editor ウィンドウが表示されるので、ここで、ランの進行中にプレートを編集できます。プレートの編集に関する詳細については、「[プレートの](#)」を参照してください。

注意 : Plate Editor ウィンドウからトレース形式を編集することもできます。変更が Real-time Status タブの増幅トレースプロットに表示されます。

プレートファイルの入れ替え

アドバイス：プレートファイルの入れ替えは、ExpressLoad フォルダ内の Quick Plate ファイルでランを開始する場合に特に便利です。

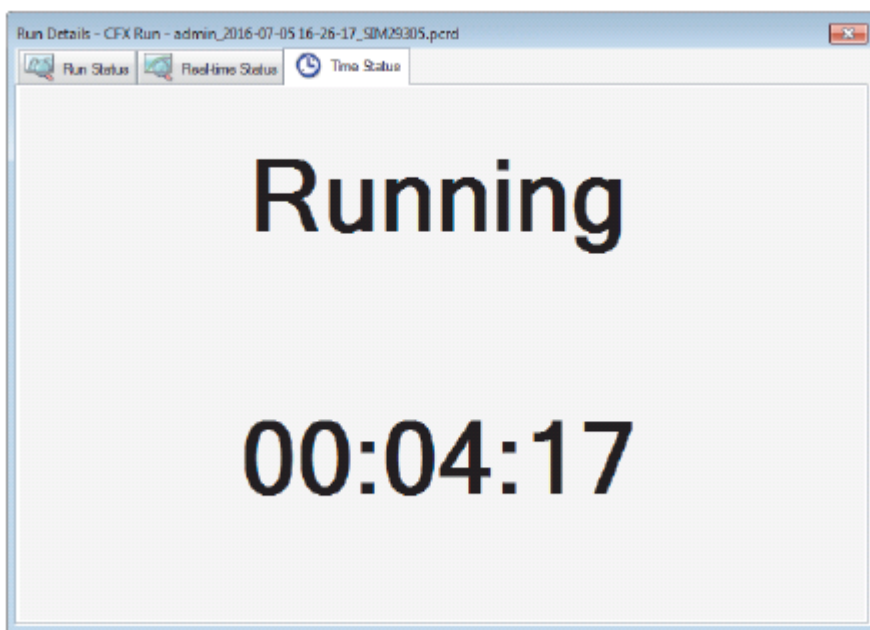
プレートファイルの入れ替え方法

- ▶ Plate Setup をクリックした後に以下のオプションのいずれかを選択します。
 - Replace Plate file (プレートファイルの入れ替え) — ブラウザウィンドウ内のリストから新しいプレートファイルを選択します。
 - Apply PrimePCR file (PrimePCR ファイルを適用) — Smart 検索を使用してプレートレイアウトが得られるランファイルを検索するか、バイオ・ラッド社のウェブサイトからダウンロードされ PrimePCR フォルダ内に含まれていないファイルを検索するのに Browse をクリックします。

注意：CFX Maestro では、プレートファイルのスキャンモードとプレートサイズを確認します。これらは、ランを開始したラン設定と同じものとします。

Time Status タブ

Time Status タブには、現時点でのランを完了するまでの残余時間が表示されます。



PrimePCR 実験の実施

PrimePCR 実験では、バイオ・ラッド社がウェットラボにて検証済みかつ最適化済みのパスウェイや疾患特異的なアッセイを使用でき、以下のフォーマットで使用できます。

- Preplated panels (プリプレートパネル) — 生物学的パスウェイまたは疾患に特有のアッセイを含んだプレート。これらは PrimePCR コントロールと対照遺伝子を含みます。
- Custom configured plates (カスタム設定プレート) — 対象のターゲット、コントロール、およびリファレンスのアッセイを選択するオプションを含むユーザー決定レイアウトで設定されるプレート。
- Individual assays (独立アッセイ) — リアルタイム反応で使用する独立したプライマーセットを含むチューブ。

全体的なラン時間を縮小するため、プロトコル内の融解ステップを削除することができます。バイオ・ラッド社は、PrimePCR ランプロトコルにはこれ以外の変更を加えることをお勧めしません。デフォルトのプロトコルが、アッセイの検証に使用されます。これを逸脱すると、結果に影響がおよぶ可能性があります。プロトコルの変更は、結果として生じるデータファイルの Run Information タブや作成されるレポートに記録されます。

PrimePCR ランの開始方法

- ▶ PrimePCR ランを開始するには、以下のいずれかを行います。
 - Startup Wizard の Run Setup タブで PrimePCR を選択し、該当するケミストリー (SYBR または Probe) を選択する。
 - Startup Wizard にある Repeat run タブの Recent Runs リストから PrimePCR ランを選択する。
 - Home ウィンドウで File > New > PrimePCR Run を選択する。
 - Home ウィンドウで File > Open > PrimePCR Run File を選択する。
 - PrimePCR ランファイル Home ウィンドウにドラッグ&ドロップする。

PrimePCR ランの選択後、Start Run タブに Run Setup ウィンドウが開き、ここには、選択している機器に基づきデフォルトの PrimePCR プレートレイアウトがロードされています。

プロトコルにおける融解ステップの削除方法

- ▶ Protocol タブで、Include Melt Step の隣のボックスを解除します。

PrimePCR プレートのターゲット情報をプレートレイアウトにインポートする方法

1. 以下のいずれかを行います。
 - Run Details ダイアログボックスの Real-time Status タブで、Plate Setup > Apply PrimePCR File を選択する。
 - Data Analysis ウィンドウで、Plate Setup > Apply PrimePCR File を選択する。
2. PrimePCR run file ダイアログボックスで、Browse をクリックして該当する PrimePCR ファイル (.csv) にナビゲートします。
3. ターゲットの PrimePCR ファイルを選択して Open をクリックします。

CFX Maestro はターゲット情報をプレートレイアウトにインポートします。

解析用のスタンドアローンデータの転送

ランが完了すると、CFX Maestro は蛍光データを解析します。ランをスタンドアローンモードで実行し、機器自体に保存する場合、データを解析用の CFX Maestro コンピュータに転送する必要があります。

C1000 Touch サーマルサイクラーでは、最大 100 のリアルタイム PCR ランを格納できます。ランの完了後、スタンドアローンデータファイルをサーマルサイクラーから E メール、USB ドライブ、あるいはソフトウェア自体を通じて CFX Maestro コンピュータに転送できます。

本節では、CFX Maestro コンピュータへのスタンドアローンデータファイルの転送方法について説明します。

CFX Maestro ソフトウェアを介した転送

重要 : CFX Maestro を通じてデータファイルを転送する場合、サーマルサイクラー部に保存されているすべてのファイルが転送されます。データを安全に転送するため、ディスク容量が十分であることを確認してください。

CFX Maestro を介してデータを転送する方法

1. Home ウィンドウの Detected Instruments ペインで、ターゲット機器を右クリックして Retrieve Data Files を選択します。

Browse For Folder ダイアログボックスが表示されます。

2. Browse For Folder ダイアログボックスで、データファイルを保存したい場所にブラウズして OK をクリックします。

転送プロセスにより、選択した場所に Real-Time Data というラベルのついたフォルダが作成されます。ランデータが別個の .zpcr ファイルとして Real-Time Data フォルダに保存されます。

E メールを介した転送

ランの最後にデータファイルをEメール送信する方法

1. C1000 Touch サーマルサイクラーで E メール通知を設定します。

46 ページの「[Eメール通知の設定](#)」または C1000 Touch サーマルサイクラーおよび CFX リアルタイム PCR 検出システムの機器ガイドを参照してください。

2. E メール通知の設定時に、必ず Attach Data File を選択してください。

ランデータが .pcrd ファイルとして E メール送信されます。

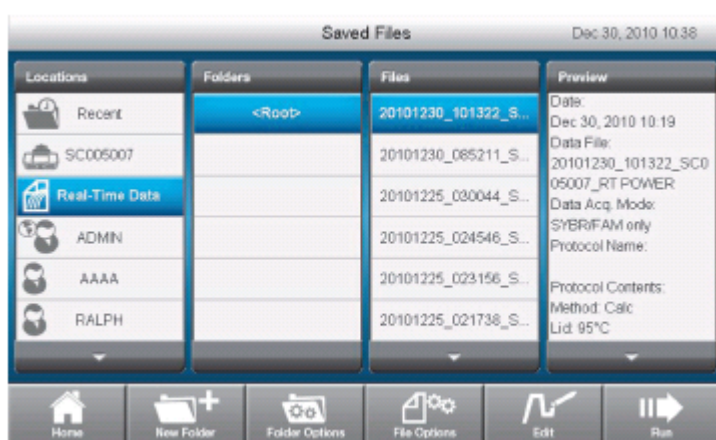
USB ドライブを使用したデータ転送

アドバイス : USB ドライブを C1000 Touch サーマルサイクラーの USB ポートに挿入すると、ラン完了時に、データファイルが USB ドライブのルートディレクトリに自動保存されます。

また、サーマルサイクラーに以前保存されたデータファイルを見つけて、取り付けられた USB ドライブに保存することもできます。

データファイルの検索と USB ドライブへの保存方法

1. C1000 Touch の Home 画面で、Saved Files をタッチしてファイルフォルダにアクセスします。
2. Location カラムで、Real-Time Data をタッチします。
3. File カラムで、エクスポートするファイルを選択します。
選択したファイルに関する情報が、Preview ペインに表示されます。
4. ファイルをエクスポートするには、File Options にタッチします。
5. OK にタッチして、取り付けられている USB ドライブにファイルを保存します。



ランデータは.zpcr ファイルとして USB ドライブに保存されます。

データファイルの作成

機器から CFX Maestro コンピュータに転送されるデータを解析するため、圧縮データファイル (.zpcr ファイル) をデータファイル (.pcrd ファイル) に変換する必要があります。CFX Maestro では、.zpcr ファイルから.pcrd ファイルへの変換を行った後、スキャンモードとプレートサイズが同じであるプレートファイルを選択し、それを.pcrd ファイルに適用します。

スタンドアローンデータファイルからデータファイルを作成する方法

1. CFX Maestro で、以下のいずれかを行います。
 - ターゲットの.zpcr ファイルを見つけて CFX Maestro の Home ウィンドウにドラッグする。
 - File > Open > Stand-alone Run を選択し、ターゲットファイルにナビゲートしてそれを選択する。

CFX Maestro には、Save As ダイアログボックスが表示されます。

2. .pcrd ファイルを保存するフォルダにナビゲートして、Save をクリックします。
.pcrd ファイルの保存後、Data Analysis ウィンドウが開き、結果のデータがそこに表示されます。

第8章 データ解析について

CFX Maestro ソフトウェアは、各ランの最後にリアルタイム PCR データを自動的に処理し、Data Analysis ウィンドウを開いてデータ (.pcrd ファイル) を表示します。

CFX Maestro ソフトウェアでは、データファイルを開いて表示するためのいくつかの方法を提供します。

- データファイル（拡張子は.pcrd）を Home ウィンドウにドラッグしてそこでリリースする。
- Home ウィンドウの File > Open > Data File を選択し、ターゲットの.pcrd ファイルにブラウズする。
- Home ウィンドウの File > Recent Data Files を選択し、最近開いた 10 個のデータファイルのリストから選択する。
- Startup Wizard の Analyze タブを選択し、Recent Files から選ぶか Browse をクリックしてデータファイルを見つける。

Data Analysis ウィンドウ

Data Analysis ウィンドウには複数のタブが表示され、各タブは特定の解析手法のための解析データまたはラン固有の情報を表示します。タブは、ランで収集されたデータがその解析のタイプで使用できる場合にのみ表示されます。



アドバイス: 表示するタブを選択するには、Data Analysis ウィンドウの View メニューから選択します。元のタブのレイアウトに戻るには、Settings > Restore Default Window Layout を選択してください。

Data Analysis ツールバー

Data Analysis ウィンドウのツールバーは、重要なデータ解析機能への迅速なアクセスを提供します。

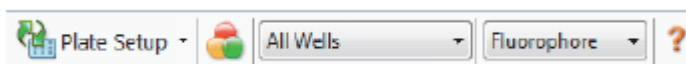





表8は、ツールバーにある各ボタンの機能を記載します。

表8 Data Analysis ウィンドウのツールバー

ツールバーボタン	名称	機能内容
 Plate Setup ▾	Plate Setup	View/Edit plate : ウェルの内容を閲覧、編集するため Plate Editor を開きます。 Replace Plate file : プレートレイアウトを入れ替えるためのプレートファイルを選択します。 Apply PrimePCR file : PrimePCR™ ランのためのプレートレイアウトに入れ替えるためのランファイルを選択します。
	Manage Well Groups	Well Groups Manager ウィンドウを開きます。ここでは、ウェルグループの作成、編集、および削除を行います。
All Wells ▾	Well Group	ドロップダウンメニューから既存のウェルグループ名を選択します。デフォルトの選択は、All Wells です。このボタンは、ウェルグループが作成されている場合にのみ表示されます。
Fluorophore ▾	Analysis Mode	Fluorophore モードまたは Target モードのいずれかでデータを解析します。
	Help	データ解析に関する詳細について、ソフトウェアヘルプを開きます。

Data Analysis メニューバー

表9は、Data Analysis ウィンドウのメニューバーの項目を記載します。

表9 Data Analysis ウィンドウのメニューバーの項目

メニュー項目	コマンド機能	機能内容
File	Save	ファイルを保存します。
	Save As	現在のプロトコールを別名で保存します。
	Repeat Run	現在のランからプロトコールとプレートファイルを抽出し、繰り返しランを実行します。
	Close	Data Analysis ウィンドウを閉じます。

表9 Data Analysis ウィンドウのメニューバーの項目 (つづき)

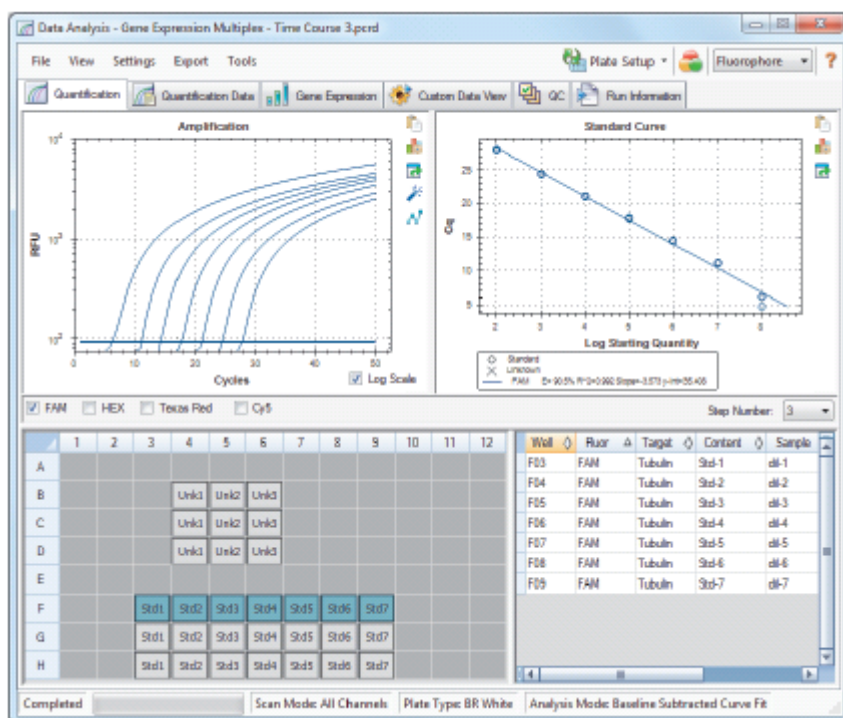
メニュー項目	コマンド機能	機能内容
View	Run Log	Run Log ウィンドウを開いて現在のデータファイルのランの記録を表示します。
	Quantification, Melt Curve, Gene Expression, End Point, Allelic Discrimination, Custom Data View, QC, Run Information	Data Analysis ウィンドウで選択しているタブの解析データを表示します。少なくとも1つ以上のタブを選択するものとします。
Settings	C _q Determination Mode	各曲線で計算されるC _q 値の算出法、Regression または Single Threshold を選択します。
	Baseline Setting	選択したウェルグループの Baseline Substraction 法を選択します。
	Analysis Mode	データ解析のため、Fluorophore または Target を選択します。
	Cycles to Analyze	解析するサイクルを選択します。
	Baseline Thresholds	Baseline Thresholds ウィンドウを開き、ベースラインまたは閾値を調整します。
	Trace Styles	Trace Styles ウィンドウを開きます。
	Plate Setup	プレートの閲覧、編集するための Plate Editor を開きます。現在のプレートをユーザー設定のプレートファイルまたは PrimePCR ランファイルにプレートを入れ替えます。
	Include All Excluded Wells	除外されているウェルを解析に含めます。
	Mouse Highlighting	マウスポインターでデータの同時的に強調表示のオン・オフを行います。 アドバイス : Mouse Highlighting がオフの場合、Control キーを押すと強調表示が一時的にオンになります。
	Restore Default Window Layout	ウィンドウの配置をデフォルトの設定に戻します。
Export	Export All Data Sheets to Excel	タブ毎に全てのスプレッドシート表示を別の Excel ファイルにエクスポートします。
	Export RDM File	RDML のバージョン (1.1 または 1.0) を選択して Save As ウィンドウを開き、RDML ファイル名とロケーションを指定します。
	Custom Export	エクスポートするフィールドとファイルフォーマットを指定できる Custom Export ウィンドウを開きます。
	Export to LIMS Folder	前もって決めていたフォーマットで LIMS フォルダにデータを保存するためのウィンドウを開きます。

表9 Data Analysis ウィンドウのメニューバー項目 (つづき)

メニュー項目	コマンド	機能内容
Tools	Reports	このデータファイルに関するレポートを開きます。
	Well Group Reports	特定のウェルグループについてのレポートを作成するための Well Group Report ウィンドウを開きます。
	Import Fluorophore Calibration	現在のデータファイルに適用するキャリブレーションファイルを選択します。
	qbase+	インストールされている場合には、現在の.pcrdファイルから直接 qbase+ v2.5 を立ち上げます。

タブの詳細

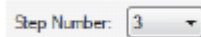
Data Analysis ウィンドウの各タブは、特定の解析手法によるグラフおよびスプレッドシートでデータを表示し、表示したいデータを選択するためのウェルセクターを含んでいます。Data Analysis が開くと、デフォルトで Quantification タブが表示されます。Quantification タブの Amplification グラフのデータを使用して、ランに適した解析設定を決定することができます。



注意： ソフトウェアは、Data Analysis の各タブのペインにあるデータをリンクします。例えば、ウェルセクター内のウェル上にマウスポインターを配置してウェルを強調表示すると、他のすべてのペインのデータが強調表示されます。

Step Number（ステップ番号）セレクター

CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect および CFX384 Touch の各システムは、複数のプロトコルステップで蛍光データを取得できます。ソフトウェアは各ステップで得られるデータを個別に維持します。Step Number セレクターは、Quantification タブの Standard Curve グラフの下に表示されます。プロトコルに少なくとも1つデータ収集ステップが含まれる場合、CFX Maestro ソフトウェアは最初の収集ステップからのデータを表示します。プロトコルが2つ以上の収集ステップを含む場合、例えば下記のように、ドロップダウンリストから別のステップを選択できます。



ステップを選択すると、その選択肢が Data Analysis ウィンドウに表示されるすべてのデータに適用されます。

Data Analysis ウィンドウでのウェルグループの表示

プレート内のウェルは、ウェルグループを使用する独立した解析用にサブセットへとグループ分けされます。ウェルグループを作成すると、そのグループ名が Data Analysis ウィンドウにあるツールバーの Well Groups ドロップダウンリストに表示されます。

ウェルグループを作成すると、Data Analysis ウィンドウを開いたときにデフォルトのウェルグループの All Wells が表示され、グラフとスプレッドシートに示される内容を含むすべてのウェルのデータが表示されます。該当するウェルグループ内のウェルのみが、ウェルセレクターの内容を含んでロードされ、そのウェルのデータのみがデータ解析計算に使用されます。

アドバイス: ウェルグループの作成、編集、および削除を行うには、ツールバーの Manage Well Groups をクリックしてください。

注意: ウェルグループを作成していない場合には、Well Groups ドロップダウンリストはツールバーに表示されません。

ラン実行後のウェル内容の変更

データ解析中に、Plate Editor 内のウェルの内容を変更することによりデータの表示方法を変更しても、ラン実行中に各ウェルから収集された蛍光データが変更されることはありません。モジュールによる蛍光データの収集後、これらのデータを削除することはできませんが、画面表示と解析からデータを削除することは可能です。

ラン実行後にウェルの内容を変更する方法

- ▶ Data Analysis ウィンドウの Plate Setup をクリックし、以下のオプションから1つ選びます。
 - **Edit/View Plate（プレートの編集／表示）** — 手動によるレイアウト変更を行うための Plate Editor を開きます。
 - **Replace Plate file（プレートファイルの入れ替え）** — Select Plate ブラウザを開き、ここで、現在のプレートレイアウトと入れ替える以前に保存したプレートファイルにナビゲートします。

- **Apply PrimePCR file (PrimePCR ファイルの適用)** — Select PrimePCR file ダイアログボックスを開き、ここで PrimePCR ランファイルにナビゲートしてそれをプレートレイアウトに適用します。

アドバイス: ランの前、ラン実行中、または PCR のラン完了後に、ウェルの内容に関する情報を追加または編集することができます。ランの前にスキャンモードとプレートサイズを割り当てる必要があります。ランの実行後にこれらのパラメータを変更することはできません。

データ解析設定

Quantification タブの Amplification グラフのデータは、サイクル毎の各ウェルでの相対蛍光強度 (RFU) を示します。グラフ内の各トレースは、1つのウェルでの単一蛍光色素から得たデータを示します。このようなデータを用いて、1種類の蛍光色素ベースでの各ウェルの C_q 値が計算されます。ソフトウェアでは、 C_q 値の算定に以下の2つのモードの一方を使用します。

- **Regression (回帰法)** — 各ウェルのトレースに多変数非線形回帰モデルを適用し、このモデルから最適な C_q 値を計算します。
- **Single Threshold (単一閾値)** — 単一閾値を用い、各ウェルの蛍光強度トレースの交差閾値ポイントに基づいて C_q 値を計算します。

C_q 値算定モードを選択するには、Settings > C_q Determination Mode を選びます。

閾値の調整

Single Threshold モードでは、Amplification グラフの閾値線をクリックし、マウスポインターを上下に移動させることで、蛍光色素の閾値を調整できます。代替的に、選択している蛍光色素の正確な交差閾値を指定することもできます。

ベースラインの設定

ソフトウェアにより、ウェル別にベースラインが自動設定されます。ベースライン設定では、すべての蛍光強度トレースのベースライン補正方法を決定します。ソフトウェアにより以下の3つのベースライン補正オプションが提供されます。

- **No Baseline Subtraction (ベースライン補正なし)** — 相対蛍光強度トレースとしてデータを表示します。この解析モードでは一部の解析を行うことができません。そのため、Gene Expression タブ、End Point タブ、Allelic Discrimination タブは表示されません。
- **Baseline Subtraction (ベースライン補正あり)** — ウェルの各蛍光色素のベースライン補正されたトレースとしてデータを表示します。ソフトウェアは、定量化サイクルの決定、検量線の作成、濃度不明サンプルの濃度測定を行うために、データをベースライン補正する必要があります。ベースライン補正トレースを作成するため、ベースラインサイクル中に記録された各ウェルの蛍光強度を通して最良の直線が適用されます。その後、各サイクルで背景補正データから最適データが差し引かれます。
- **Baseline Subtracted Curve Fit (ベースライン補正曲線フィット)** — ベースライン補正トレースとしてデータを表示するほか、中心化平均フィルター用いたベースライン補正曲線がスムーズ化します。このプロセスにより、 C_q 値はそれぞれ不変値となります。

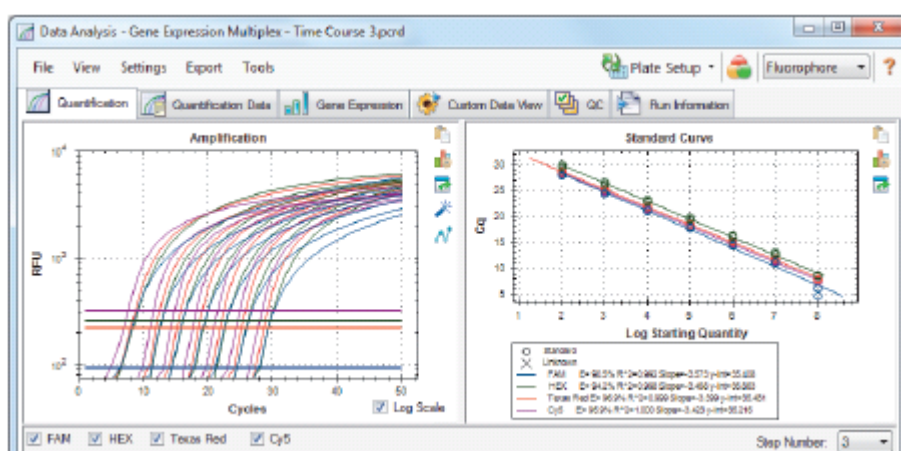
これらのオプションに加え、Apply Fluorescent Drift Correction（蛍光ドリフト補正適用）も選択できます。ランの初期の数サイクル中に RFU 値が異常にドリフトしているウェルに対して、ソフトウェアは、水平ベースラインが無事に生成されている近接するウェルから、予想されるベースラインを引き出します。

ベースライン補正設定の変更方法

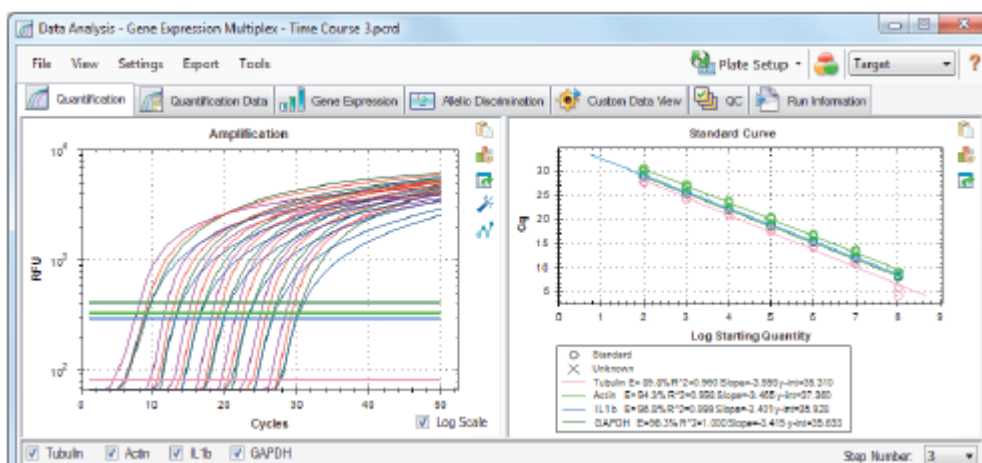
- ▶ Settings > Baseline Setting を選択します。

解析モード

データは、蛍光色素またはターゲット名でグループ化され解析されます。蛍光色素でグループ分けされると、データトレースはそのラン用のプレート設定に示されるように、蛍光色素で表示されます。増幅グラフの下にある該当する蛍光色素セレクターチェックボックスを選択すると、個々の蛍光色素データが増幅および検量線グラフ（可能な場合）に表示されます。



ターゲットごとにグループ分けされると、データトレースはそのラン用のプレート設定で入力されるターゲット名で表示されます。



データ解析モードの選択方法

- ▶ 以下のいずれかを行います。
 - Settings > Analysis Mode を選択する。
 - ツールバーの Analysis Mode ドロップダウンメニューからモードを選択する。

解析するサイクル数

解析するサイクル数を制限することができます。また、特定のサイクルセットからのデータを解析することも可能です。解析できる最大サイクル数は 50 です。

注意： ランの開始時からサイクルを削除すると、ベースラインに顕著な影響を与えることがあります。

特定のサイクルレンジにデータ解析を制限する方法

1. Settings > Cycles to Analyze を選択します。
Cycles to Analyze ダイアログボックスが表示されます。
2. 開始サイクル値と終了サイクル値を入力して、OK をクリックします。

Cycles to Analyze ダイアログボックスの Restore Defaults をクリックすると、解析に使用していた元のサイクルに戻ります。

ウェルセクター

ウェルセクターを使用して、Data Analysis ウィンドウに表示されるグラフまたはスプレッドシートのウェルデータの表示または非表示することができます。サンプルがロードされているウェルのみ、ウェルセクターで選択できます。ソフトウェアは、ウェルセクター内のウェルを色付けします。

- **青色** — 選択しているウェルを示します。選択しているウェルのデータは Data Analysis ウィンドウに表示されます。
- **薄いグレー色** — 選択していないウェルを示します。選択していないウェルのデータは Data Analysis ウィンドウに表示されません。
- **濃いグレー色** — 空のウェルを示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				Unk1	Unk2	Unk3						
C				Unk1	Unk2	Unk3						
D				Unk1	Unk2	Unk3						
E												
F			Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7			
G			Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7			
H			Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7			

ウェルデータの表示・非表示

- ▶ ウェルセクターで以下のいずれかを行います。
 - 1つのウェルを非表示にする場合、そのウェルのみをクリックする。このウェルを表示するには、再度クリックする。
 - 複数のウェルを非表示にする場合、選択したいウェル群をドラッグする。このウェル群を表示するには、再度ドラッグする。
 - すべてのウェルを非表示にするには、プレートの左上隅をクリックする。再度左上隅をクリックすると、すべてのウェルが表示される。
 - ウェル列またはウェル行を非表示にする場合は、列または行の最初の部分をクリックする。表示するには、同部位を再度クリックする。

ウェルセレクトターの右クリックメニュー項目

ウェルセレクトター画面のウェルを右クリックすると、表 10 に記載される項目を選択できます。

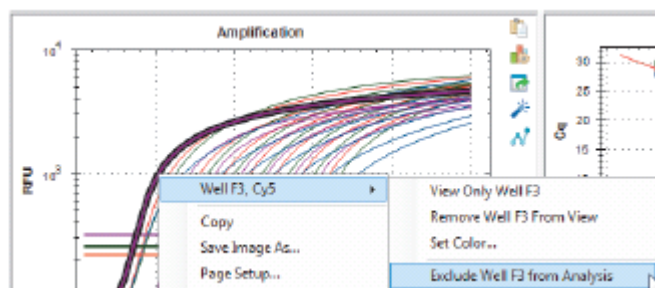
表10 ウェルセレクトターの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Well XX	このウェルだけを表示、このウェルを表示から削除、このウェルの色を設定、または解析からこのウェルを除外
Selected Wells (右クリック & ドラッグ)	これらのウェルだけを表示、これらのウェルを表示から削除、これらのウェルの色を設定、または解析からこれらのウェルを除外
Copy	クリップボードに、サンプルタイプや任意の複製番号を含むウェルの内容情報をコピーする。
Copy as Image	ウェルセレクトター表示を画像としてコピーする。
Print	ウェルセレクトター表示を印刷する。
Print Selection	現在の選択を印刷する。
Export to Excel	Excel スプレッドシートにデータをエクスポートする。
Export to Csv	.csv 文書としてデータをエクスポートする。
Export to Xml	.xml 文書としてデータをエクスポートする。
Well labels	ウェルのラベルをサンプルタイプ、ターゲット名、またはサンプル名に変更する。

解析からの一時的なウェルの除外

データ解析から一時的にウェルを除外する方法

1. 蛍光データのトレース上、または検量線にプロットされたポイント上で、ウェルセレクトターに表示されるウェルを右クリックします。複数のウェルを除外する場合には、右クリック & ドラッグで複数のウェル、トレース、ポイントを強調表示します。
2. 右クリックメニューから、該当するオプションを選択します。
 - Well > Exclude Well
 - Selected Wells > Exclude from Analysis
 - Selected Traces > Exclude these wells from Analysis



代替法として、解析から永久にウェルを削除するには、Clear Wells ボタンをクリックして Plate Editor 内のウェルから内容を消去してください。

重要：消去されたウェル内容は、再入力する必要があります。

除外ウェルを含める方法

- ▶ ウェルセレクターの該当するウェルを右クリックし、Well > Include Well in Analysis を選択します。

グラフ

Data Analysis ウィンドウの各グラフには、各種グラフのデータが表示され、これにはデータ補正用のオプションが含まれます。

グラフのツール

グラフのツールは、Data Analysis ウィンドウの各グラフに表示されます。すべてのグラフには、以下のツールが表示されます。

Copy to Clipboard (クリップボードにコピー) — グラフ表示の内容をクリップボードにコピーします。

Chart Settings (グラフ設定) — Chart Settings ダイアログボックスが開き、ここで以下のグラフ表示オプションを修正できます。

- グラフと軸のタイトル
- グラフと軸のフォントとサイズ
- 軸の目盛り
- 説明の位置

Export (エクスポート) — Export Options ダイアログボックスが開き、ここでグラフの解像度とサイズを修正して以下のファイルタイプのいずれかとして指定の場所に保存できます。

- .bmp
- .gif
- .jpg
- .png
- .tif

棒グラフのツール

グラフのツールに加え、棒グラフでは以下のツールが表示されます。

Sort (ソート) — ターゲットとサンプルをアルファベット順または逆アルファベット順に並べ替えます。

Color Settings (色設定) — Color Settings ダイアログボックスが開き、ここでターゲットとサンプルの色を変更できます。

これらのツールの詳細については、194 ページの「[グラフ表示の変更および注釈](#)」を参照してください。

増幅グラフのツール

前記のツールに加え、増幅グラフでは以下のツールが表示されます。

Trace Styles (トレーススタイル) — Trace Styles ダイアログボックスが開き、ここで増幅グラフのトレースの外観を修正できます。

Baseline Threshold (ベースライン閾値) — Baseline Threshold ダイアログボックスが開き、ここで選択しているウェルのデフォルトのベースラインの修正や、増幅グラフ内の各蛍光曲線の閾値の変更が可能です。

クリップボードへのグラフデータのコピー

グラフ表示の内容をコピーし、ビットマップ画像ファイルを受け入れるアプリケーションにペーストすることができます。

クリップボードにグラフデータをコピーする方法

1. グラフのツールから、Copy to Clipboard を選択します。
2. ビットマップ画像を受け入れるアプリケーション（例えば Microsoft Word）を開きます。
3. 右クリックして Paste を選択して、ビットマップ画像をクリップボードからアプリケーションにペーストします。

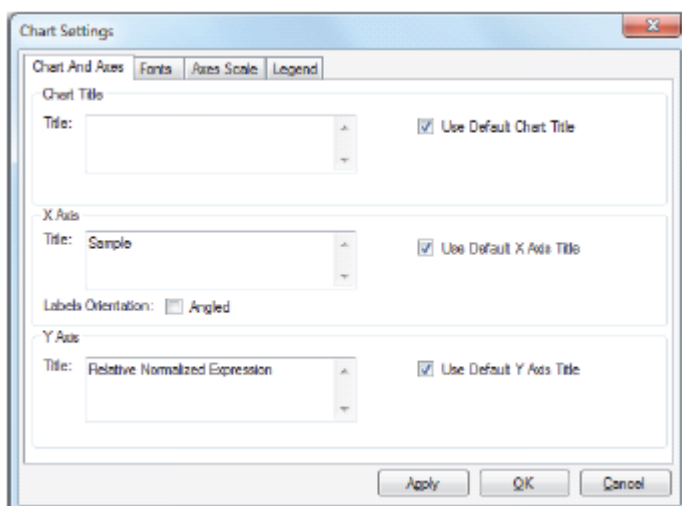
グラフ表示設定の変更

Chart Settings ダイアログボックスを使用して、表示されるグラフのタイトル、フォントとサイズ、軸の目盛り、および説明の場所を変更します。変更は表示されるグラフにのみ適用され、グラフと共に保存されます。

グラフ表示設定の変更方法

1. グラフのツールから、Chart Settings をクリックします。

Chart Settings ダイアログボックスが表示されます。



2. Chart And Axes タブを選択して以下を行います。

- グラフのタイトルを入力する。
- x 軸の新しいタイトルを入力し、ラベルの角度を決める。
- y 軸の新しいタイトルを入力する。

3. Fonts タブを選択してグラフのフォントとフォントサイズを変更します。

アドバイス： デフォルトでは、フォントサイズはグラフサイズの変更と共にオートスケールでサイズが変わります。ラベルタイプ毎に固定のフォントサイズを設定するには、Change Font Size を選択してください。

4. Axes Scale タブを選択して以下を行います。

- x 軸と y 軸のオートスケールを解除し、最小目盛りと最大目盛りを指定する。
- グラフにグリッドラインまたは目盛マークを表示する。

5. Legend タブを選択して以下を行います。

- グラフの説明を非表示にします。
- グラフの説明のデフォルト位置を変更します。

注意： 説明がグラフの左側または右側に配置されると、グラフには最初の 10 個の蛍光色素のみが表示されます。

6. いつでも Apply をクリックすれば、変更を保存せずにグラフ設定の変更を見ることができます。

7. OK をクリックして変更を保存し、グラフに戻ります。

グラフのエクスポート

このダイアログボックスを使用して、以下のファイルフォーマットのいずれかでエクスポートするためにグラフの幅、高さおよび解像度を修正します。

- .bmp
- .gif
- .jpg
- .png
- .tif

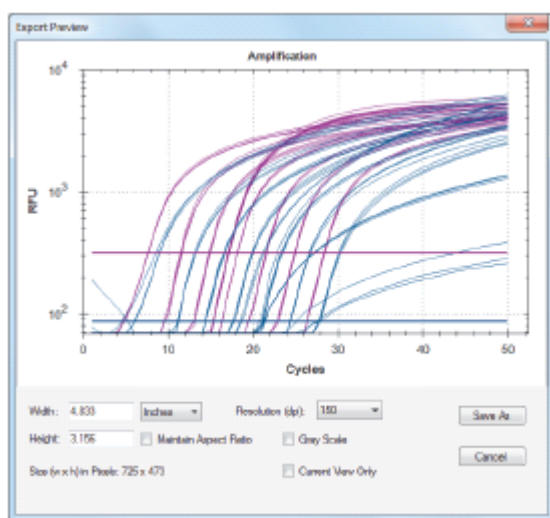
エクスポートしたグラフは、結果をポスターセッション、Microsoft PowerPointのプレゼンテーション、およびジャーナルへの掲載用に使用することができます。

注意： 設定を修正する際には、以下を考慮してください。

- 最大幅と最小幅および高さ制限
 - 72 dpi の場合 : 0.1~83 in
 - 96 dpi の場合 : 0.1~62 in
 - 150 dpi の場合 : 0.1~40 in
 - 300 dpi の場合 : 0.1~20 in
 - 600 dpi の場合 : 0.1~10 in
 - すべての解像度 : 2~6,000 画素
- アスペクト比は幅を基準とする。

グラフのエクスポート方法

1. グラフのツールから、Export をクリックします。
Export Preview ダイアログボックスが表示されます。



2. 必要に応じて、ディスプレイの設定を修正します。
3. Export をクリックします。

4. Export ダイアログボックスで、以下を行います。
 - a. (オプション) グラフのファイルの保存先フォルダにナビゲートする。
 - b. ファイルの名称を入力し、ドロップダウンリストからファイルのタイプを選択する。
5. Save をクリックしてグラフのファイルを保存します。

ベースライン閾値設定の修正

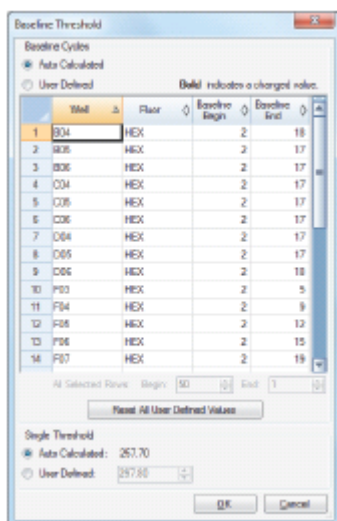
Single Threshold (単一閾値) モードでは、増幅グラフの閾値線をクリックしてマウスポインターを上下に移動させて蛍光色素の閾値を調整できます。代替的に、選択している蛍光色素の正確な交差閾値を指定することも可能です。

アドバイス: サイクルレンジを指定して、User > User Preferences 内の Data Analysis タブにあるすべてのデータファイルについてベースラインを決定することができます。

各ウェルの開始および終了ベースラインサイクルの調整方法

1. Quantification タブで、増幅グラフ下の単一蛍光色素を選択します。
2. グラフツールから、Baseline Threshold を選択します。

Baseline Threshold ダイアログボックスが表示されます。



3. Baseline Cycles セクションで、以下を行います。
 - ウェルを1つ選び、その行番号をクリックする。
 - 複数の隣接するウェルを選び、最初のウェルの行番号をクリックしたまま最後のウェルのコラムまでドラッグする。

- 複数の隣り合っていないウェルを選択するには、Ctrl キーを押したまま各ターゲットウェルの行番号をクリックする。
 - すべてのウェルを選択するには、表の左上隅をクリックする。
4. 選択しているすべてのウェルに対して Baseline Begin サイクルと Baseline End サイクルを調整するか、スプレッドシートの下部にある Begin と End のサイクル数を変更します。

アドバイス：設定を最後に保存した値に戻すには、Reset All User Defined Values をクリックしてください。

5. OK をクリックして変更を保存し、グラフに戻ります。

すべてのデータファイルに関するサイクルレンジを指定する方法

- ▶ Home ウィンドウまたは Plate Editor ウィンドウの User > User Preferences を選択し、Data Analysis タブを選びます。

ターゲットとサンプルのデータの並べ替え

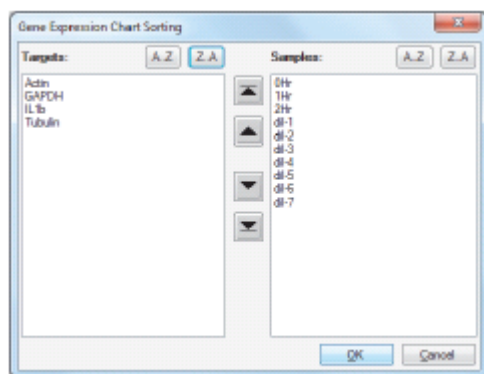
注意：このオプションは、遺伝子発現グラフでのみ使用できます。

デフォルトでは、Targets リストと Samples リストがアルファベット順に表示されます。Sort ダイアログボックスを使用すると、この表示を逆アルファベット順に並べ替え、または1つの項目をリスト内の別の位置に手動で移動することができます。

ターゲットとサンプルのデータの並べ替え方法

1. グラフツールから Sort をクリックします。

Gene Expression Chart Sorting ダイアログボックスが表示されます。



2. ダイアログボックスで Z-A をクリックすると、リストが逆アルファベット順に並べ替えられます。
3. 1つの項目を手動で移動するには、その項目を選択してグラフ間の該当するボタンをクリックします。
 - 上矢印または下矢印をクリックすると、選択した項目が1つ分移動する。
 - バー付き上矢印またはバー付き下矢印をクリックすると、選択した項目がリストの最上部または最下部に移動する。
4. OK をクリックして変更を保存し、Gene Expression タブに戻ります。

ターゲットとサンプルの色設定の変更

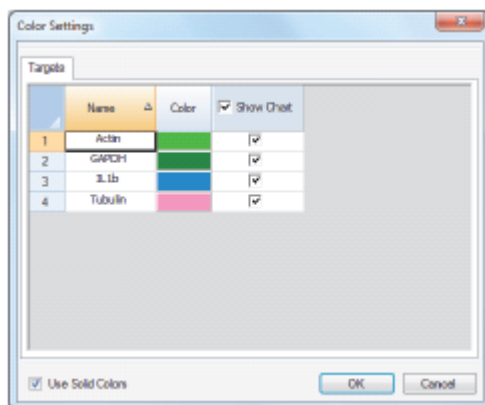
注意： このオプションは遺伝子発現グラフでのみ使用できます。

Color Settings ダイアログボックスを使用して、ターゲットまたはサンプルの色を変更し、または項目をグラフから削除します。

色設定の変更方法

1. グラフツールから、Color Settings を選択します。

Color Settings ダイアログボックスが表示されます。



2. ターゲットまたはサンプルの表示色を変更するには、Color カラムの該当色をクリックします。
3. 表示される Color ダイアログボックスで、新しい色を選択して OK をクリックします。
4. 項目を遺伝子発現グラフから削除するには、Show Chart カラムの該当するチェックボックスを解除します。

アドバイス： すべての項目を遺伝子発現グラフから解除するには、カラムの見出しの Show Chart チェックボックスを解除します。

5. (オプション) デフォルトでは棒グラフの色がグラデーション状に表示されます。固定色で色を表示するには、Use Solid Colors を選択します。
6. OK をクリックして変更を保存し、Gene Expression タブに戻ります。

グラフを拡大

グラフを拡大する方法

- ▶ グラフ全体をクリック & ドラッグします。ソフトウェアがグラフのサイズを変更し、選択している領域の中心に配置します。

グラフを全画面表示にリセットする方法

- ▶ グラフを右クリックし、Set Scale to Default を選択します。

Microsoft ファイルへのグラフのコピー

データグラフを Microsoft Word、Excel、または PowerPoint 文書へコピーすることができます。画像の解像度は、画像を得た画面の解像度に対応します。

Microsoft ファイルへのグラフのコピー方法

1. Data Analysis ウィンドウで、グラフのペインの右上隅にある Copy To Clipboard をクリックします。
2. 空の Microsoft ファイルを開き、クリップボードから内容をペーストします。

グラフの共通右クリックメニュー項目

表 11 は、グラフで使用できる右クリックメニュー項目を記載しています。使用可能な項目のうちいくつかは、すべてのグラフに向けたものであり、これらの項目はデータの表示方法を変更するため、またはグラフからデータを容易にエクスポートするために使用できます。

表11 グラフの右クリックメニュー項目

項目	機能
Copy	グラフをクリップボードにコピーします。
Save Image As	画像を指定のサイズ、解像度、およびファイルタイプで保存します。使用できる画像フォーマットは、PNG（デフォルト）、GIF、JPG、TIF および BMP です。
Page Setup	印刷用のプレビューとページ設定を選択します。
Print	グラフを印刷します。
Set Scale to Default	グラフの拡大後、デフォルト表示に戻します。
Chart Options	Chart Options ウィンドウを開き、タイトルの変更、x 軸および y 軸の限界値の選択、グリッドラインの表示、および軸の小目盛の表示を含む、グラフの変更を行います。

注意: 特定のグラフに適用するメニュー項目については、第9章の「[データ解析の詳細](#)」で説明します。

スプレッドシート

Data Analysis に示されるスプレッドシートには、データの並べ替えと転送のためのオプションが含まれます。以下のいずれかの方法でカラムを並べ替えます。

- カラムを、選択している表の新しい場所へクリック & ドラッグする。
- カラムの見出しをクリックし、データを昇順または降順に並べ替える。

Sort ウィンドウで最大 3 カラムのデータを並べ替える方法

1. スプレッドシートを右クリックして Sort を選択します。
2. Sort ダイアログボックスで、並べ替える最初のカラムのタイトルを選択します。データを昇順または降順で並べ替えます。
3. 並べ替える 2 番目または 3 番目のカラムを選択し、Ascending または Descending を選びます。
4. OK をクリックしてデータを並べ替えるか、Cancel をクリックして並べ替えを中止します。

マウスポインターをセルの上に置いて関連するグラフとウェルセレクターのデータを強調表示します。セルをクリックすると、その内容をコピーして別のソフトウェアプログラムにペーストすることができます。

スプレッドシートの共通右クリックメニュー項目

表 12 は、あらゆるスプレッドシート画面で使用できる右クリックメニュー項目を記載しています。

表12 スプレッドシートの右クリックメニュー項目

項目	機能
Copy	選択しているウェルの内容をクリップボードにコピーした後、その内容を Excel などのスプレッドシートにペーストします。
Copy as Image	スプレッドシート表示を画像ファイルとしてコピーし、それをテキスト、画像、またはスプレッドシートファイルなど、画像ファイルを受け入れるファイルにペーストします。
Print	現在の表示を印刷します。
Print Selection	現在の選択部分を印刷します。
Export to Excel	データを Excel のスプレッドシートにエクスポートします。
Export to Text	データをテキストファイルとしてエクスポートします。
Export to Xml	データを.xml ファイルとしてエクスポートします。
Export to Html	データを.html ファイルとしてエクスポートします。
Find	テキストを検索します。
Sort	最大 3 カラムのデータを並べ替えます。
Select Columns	スプレッドシートに表示されるカラムを選択します。

エクスポート

CFX Maestro ソフトウェアでは、Export ドロップダウンメニューから以下の4つのエクスポート用オプションを提供します。

- Export All Data Sheets to Excel (すべてのデータシートを Excel にエクスポート)
- Export RDML Files (RDML ファイルのエクスポート)
- Custom Export (カスタムエクスポート)
- Export to LIMS (LIMS にエクスポート)

Export All Data Sheets to Excel (すべてのデータシートを Excel にエクスポート)

CFX Maestro ソフトウェアのすべてのタブから、すべてのスプレッドシート表示を個々の Excel ファイルへエクスポートすることができます。

すべてのデータシートを Excel にエクスポートする方法

- ▶ Export > Export All Data Sheets to Excel を選択します。

Export RDML Files (RDML ファイルのエクスポート)

RDML は、定量的 PCR (qPCR) データを交換するための構造的かつ一般的なデータ規格です。データ規格は、拡張マークアップ言語 (.xml) フォーマットのテキストファイルです。RDML データ交換フォーマットに関する追加情報については、国際 RDML コンソーシアムのウェブサイト (www.rdml.org) を参照してください。

注意: バージョン 2.3 以降の qbase+ソフトウェアをお使いの場合には、RDML ファイルをバージョン 1.1 として保存してください。

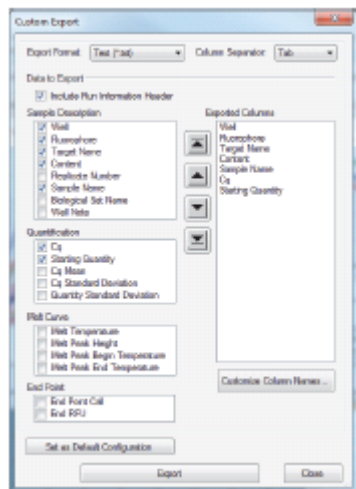
RDML ファイルのエクスポート方法

1. Export > Export RDML Files を選択し、表示されるリストから RFML v1.1 または RDML v1.0 を選択します。
Save As ダイアログボックスが表示されます。
2. Save As ダイアログボックスで、RDML ファイルの保存先ファイル名とその場所を指定します。
3. OK をクリックしてエクスポートファイルを保存します。

カスタムエクスポート

カスタムエクスポートファイルの作成方法

1. Export > Custom Export を選択すると、Custom Export ダイアログボックスが表示されます。



2. 表示されるドロップダウンリストからエクスポートのフォーマットを選択します。
3. エクスポートする項目のチェックボックスを選択します。
4. (オプション) Customize Column Names をクリックしてカラム名を変更できます。
5. Export をクリックします。

Save As ダイアログボックスが表示されます。

6. Save As ダイアログボックスで、エクスポートするファイルの保存先ファイル名とその場所を指定します。
7. OK をクリックしてエクスポートファイルを保存します。

LIMS フォルダへのエクスポート

データは、LIMS 対応のファイルフォーマットへエクスポートすることが可能です。LIMS ファイルの作成、管理、および使用に関する詳細については、付録Cの「LIMS 統合」を参照してください。

LIMS フォーマットへのデータのエクスポート方法

1. Export > Export to LIMS Folder を選択します。

Save As ダイアログボックスが表示されます。

2. Save As ダイアログボックスで、エクスポートするファイルを保存先ファイル名とその場所を指定します。
3. OK をクリックしてエクスポートファイルを保存します。

第9章 データ解析の詳細

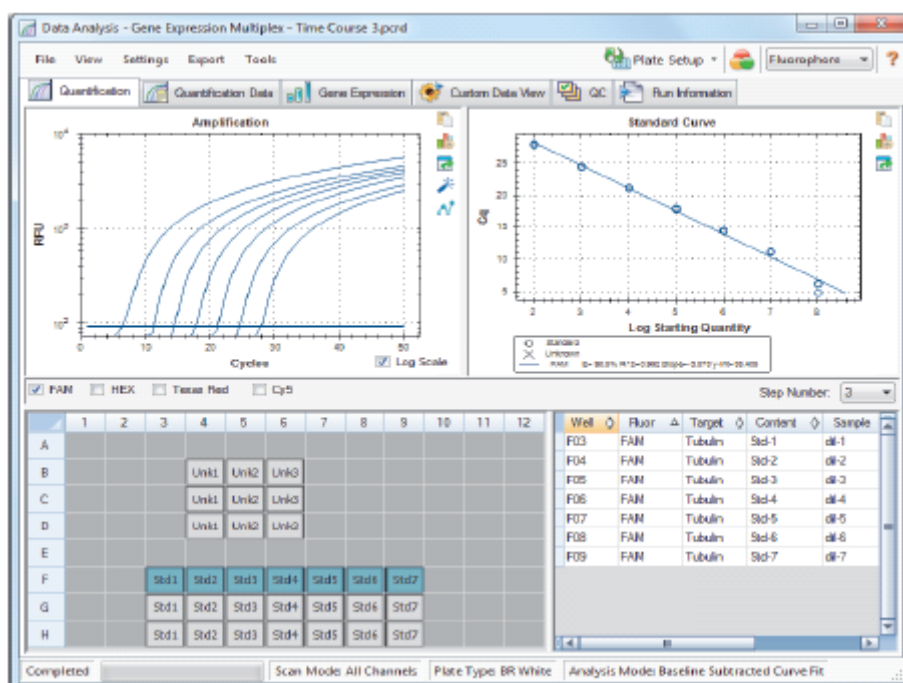
Data Analysis ウィンドウには、データを表示するための複数のタブが含まれます。本章では、9つのタブについて詳述します。

アドバイス : View メニューを使用して、Data Analysis ウィンドウでどのタブを表示するかを選択できます。カスタマイズしたレイアウトはデータファイルに保存されます。

Quantification タブ

Quantification タブのデータを使用して、個々のウェルのベースライン設定や閾値設定を含むデータ解析条件を設定します。Quantification タブには、以下の4画面にデータが表示されます。

- **Amplification (増幅) グラフ** — サイクルごとの各ウェルの相対蛍光強度 (RFU) が表示されます。グラフ内の各トレースは、1つのウェルにおける単一蛍光色素のデータを示します。
- **Standard curve (検量線)** — ランが標準 (Std) サンプルタイプとして指定されたウェルを含む場合にのみ表示されます。検量線は、初期量の対数に対してプロットした閾値サイクルを表示します。説明部分には、Std サンプルタイプのウェルにおける各蛍光色素の反応効率 (E) が表示されます。
- **Well selector (ウェルセレクター)** — 表示したい蛍光データを含むウェルを選択します。
- **Spreadsheet (スプレッドシート)** — 選択したウェルで収集されたデータのスプレッドシートを表示します。



蛍光色素のオプション

Quantification タブのグラフとスプレッドシートに蛍光色素データを表示するには、Amplification グラフの下のターゲット蛍光色素を選択します。データ解析ウィンドウの蛍光色素データを非表示にするには、そのチェックボックスを解除します。

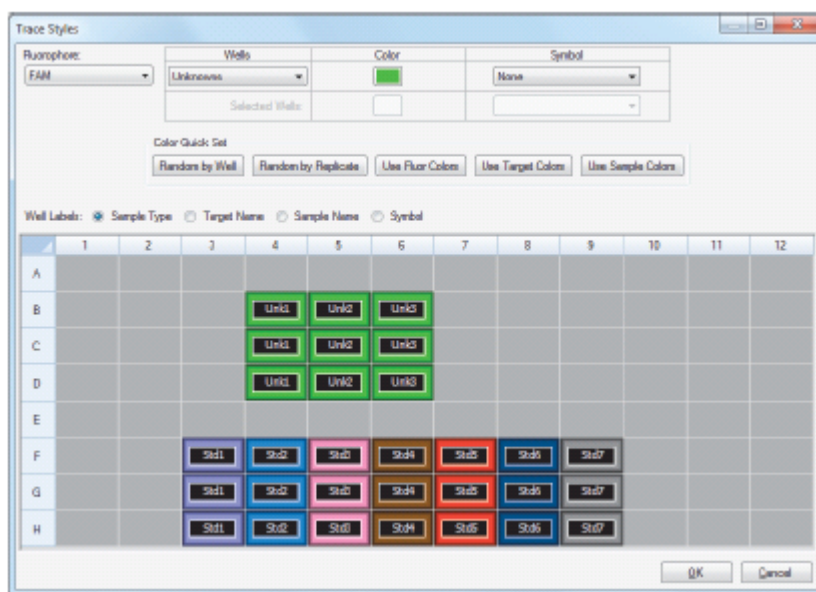
トレーススタイル

Trace Styles ダイアログボックスを使用すると、Quantification タブと Melt Curve タブの増幅グラフと融解曲線グラフ内のトレースの外観を調整できます。その後、Trace Styles ダイアログボックスに表示されるウェルセクターで変更点のプレビューが可能です。

トレーススタイルの調整方法

1. Amplification グラフ下の蛍光色素を 1 つだけ選択します。
2. Trace Styles ダイアログボックスを開き、以下のいずれかを行います。
 - Amplification グラフの Trace Styles をクリックする。
 - Data Analysis メニューバーの Settings > Trace Styles を選択する。
 - トレースを右クリックして Trace Styles を選択する。

Trace Styles ダイアログが表示されます。

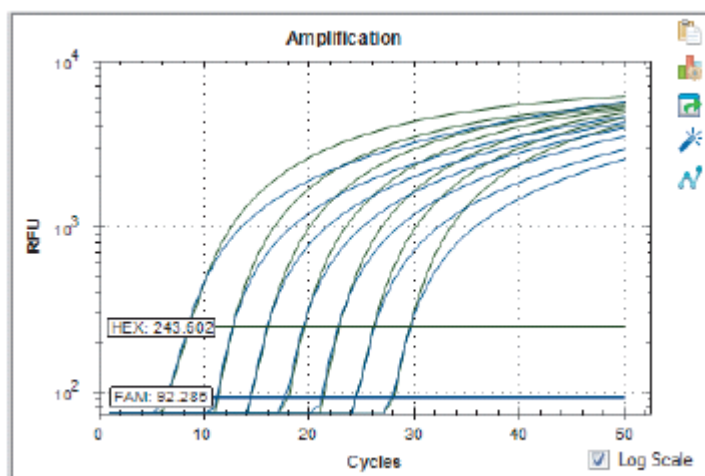


3. Trace Styles ダイアログボックス内の下部にあるペインのウェルセクターで、特定のウェルのセットを選択します。代替的に、Wells カラム内のドロップダウンメニューで 1 つのサンプルタイプを含むウェルを選択します。
4. 以下のいずれかを行います。
 - 選択しているウェルの色を選ぶ場合、Color カラム内のボックスをクリックする。
 - 選択しているウェルに記号を割り当てる場合、Symbol ドロップダウンリストから記号を選択する。

- ボタンラベルでウェルに素早く色付けする場合、該当するクイック設定をクリックする。
 - Random by Well (ウェルごとにランダム)
 - Random by Replicate (リプリケートごとにランダム)
 - Use Fluor Colors (蛍光色素ごと)
 - Use Target Colors (ターゲットごと)
 - Use Sample Colors (サンプルごと)
- ウェルにラベルを割り当てるには、Sample Type、Target Name、Sample Name、または Symbol のいずれかを選択する。

対数スケールのオプション

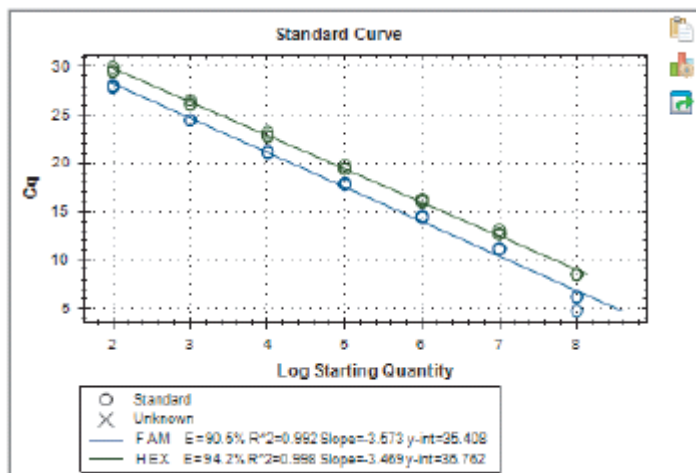
Amplification グラフ下の Log Scale を選択して、片対数スケールで蛍光トレースを表示します。



アドバイス: グラフのいずれかの領域を拡大する場合には、対象の領域をマウスでドラッグしてください。全画面表示に戻すには、グラフを右クリックして Set Scale to Default を選択してください。

検量線グラフ

ソフトウェアでは、ランで1つの蛍光色素に対して Std サンプルタイプがデータに含まれている場合には、Quantification タブに Standard Curve グラフが作成されます。



Standard Curve グラフは、以下の情報を表示します。

- 各曲線の名称（蛍光色素またはターゲット）
- 各蛍光色素またはターゲットの色
- 反応効率（E）。この統計値を使用してマルチプレックスリアクションを最適化し、さらに検量線のデータを均等化します。
注意：反応効率は、ターゲットがプロトコル内の各サイクルでどれほど生成されるかを説明するものです。100%効率の場合、各サイクルでターゲットが2倍になることを示します。
- 相関係数、 R^2 （ R^2 として記載）。この統計値を使用して、検量線がどの程度データとしての信頼性を備えているかを判定します（直線性）。
- Slope（勾配）
- y-intercept（y 切片）

Amplification グラフのメニューオプション

グラフのコピー、印刷、およびエクスポートのための共通の右クリックメニューオプションに加え、表 13 は Amplification グラフでのみ使用できるメニューオプションを記載します。

表13 Amplification グラフの右および左クリックメニュー項目

メニューオプション	機能内容
Well XX, Fluor Target	このウェルのみを表示、表示からこのウェルを削除、このトレースの色を設定、または解析からこのウェルを排除する。
Selected Traces	これらのウェルのみを表示、表示からこれらのウェルを削除、これらのトレースの色を設定、または解析からこれらのウェルを排除する。
Show Threshold Values	グラフ上に各増幅曲線の閾値を表示する。
Trace Styles	Trace Styles ウィンドウを開き、Quantification タブと Melt Curve タブに表示されるトレーススタイルを変更する。
Baseline Thresholds	Baseline Thresholds ウィンドウを開き、各蛍光色素のベースラインまたは閾値を変更する（変更点は Quantification タブの Amplification グラフに現れる）。

Quantification タブのスプレッドシート

表 14 は、Quantification タブのスプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表14 Quantification タブのスプレッドシートの内容

情報	説明
Well	プレート内でのウェルの位置
Fluor	検出された蛍光色素
Target	Plate Editor ウェルに割り当てられた Target Name
Content	Plate Editor で割り当てられた Sample Type (必須) および Replicate # (オプション) の組み合わせ
Sample	Plate Editor ウェルに割り当てられた Sample Name
C _q	各トレースの定量化 (Quantification) サイクル

Target、Content または Sample Data の変更

Target、Content、および Sample の各カラムのデータは、実験のランの後であっても Plate Editor を使用してプレートファイルを編集することにより変更できます。

Content、Target および Sample の各カラムのデータ変更方法

- ▶ Plate Setup をクリックし、View/Edit Plate を選択して Plate Editor を開きます。

Quantification Data タブ

Quantification Data タブには、各ウェルで収集した定量化データが表示されます。CFX Maestro ソフトウェアは、以下の4つの異なるスプレッドシート画面にデータを表示します。

- **Results (結果)** — データのスプレッドシートを表示します。これはデフォルト画面です。
- **Standard Curve Results (検量線結果)** — 検量線データのスプレッドシートを表示します。
- **Plate (プレート)** — 各ウェルのデータをプレートマップとして表示します。
- **RFU (相対蛍光強度)** — サイクルごとの各ウェルの RFU 定量値を表示します。

Quantification Data タブの下に表示されるドロップダウンリストから、それぞれのスプレッドシートを選択します。

Results スプレッドシート

Results スプレッドシートには、プレート内の各ウェルのデータが表示されます。

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Scaling Quantity (SQ)	Log Scaling Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
B04	Cy5	GAPDH	Unkn-1	6H	17.14	17.13	0.003	1.911E+05	5.281	1.91E+05	4.49E+02
B05	Cy5	GAPDH	Unkn-2	7H	17.07	17.89	0.024	1.930E+05	5.300	1.97E+05	3.11E+03
B06	Cy5	GAPDH	Unkn-3	8H	17.08	17.88	0.025	1.988E+05	5.297	1.98E+05	4.68E+03
C04	Cy5	GAPDH	Unkn-1	6H	17.13	17.13	0.003	1.917E+05	5.283	1.91E+05	4.49E+02
C05	Cy5	GAPDH	Unkn-2	7H	17.12	17.89	0.024	1.927E+05	5.287	1.97E+05	3.11E+03
C06	Cy5	GAPDH	Unkn-3	8H	17.12	17.88	0.025	1.930E+05	5.285	1.98E+05	4.68E+03
D04	Cy5	GAPDH	Unkn-1	6H	17.14	17.13	0.003	1.908E+05	5.281	1.91E+05	4.49E+02

注意： Plate Editor ウィンドウのウェルに割り当てられたリプリケートグループに、すべての Std. Dev (標準偏差) 計算が適用されます。リプリケートグループの各ウェルに対する C_q 値の平均値が得られます。

表 15 に、Results スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表15 Results スプレッドシートの内容

情報	説明
Well	プレート内でのウェルの位置
Fluor	検出された蛍光色素
Target	増幅ターゲットの名称 (遺伝子)
Content	サンプルタイプおよびリプリケート番号
Sample	サンプル内容
Biological Set Name	生物学的セットの名称
C _q	定量化サイクル
C _q Mean	リプリケートグループでの定量化サイクルの平均値
C _q Std. Dev	リプリケートグループでの定量化サイクルの標準偏差

表 15 Results スプレッドシートの内容 (つづき)

情報	説明
Starting Quantity (SQ)	ターゲットの予想初期量
Log Starting Quantity	初期量の対数値
SQ Mean	初期量の平均値
SQ Std. Dev	リプリケート全体の初期量の標準偏差
Set Point	リプリケート全体におけるグラジェントステップのウェルでのサンプルの温度

Standard Curve Results スプレッドシート

Standard Curve Results スプレッドシートには、算出された検量線のパラメータが表示されます。

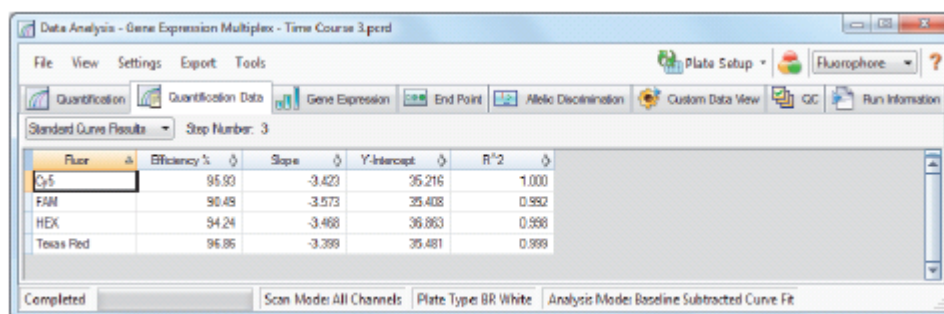


表 16 に、Standard Curve Results スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表16 Standard Curve Results スプレッドシートの内容

情報	説明
Fluor (または Target)	検出した蛍光色素 (またはターゲット)
Efficiency %	反応効率
Slope	検量線の傾き
Y-intercept	検量線が y 軸と交差する点
R^2	相関係数

Plate スプレッドシート

Plate スプレッドシートには、1種類の蛍光色素に関するデータがプレートマップで一度に表示されます。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Content							
	Sample							
	Cq							
	copy number							
B	Content			Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample			6hr	7hr	8hr		
	Cq			26.43	21.33	18.67		
	copy number			6.21e+02	8.73e+03	4.83e+04		
C	Content			Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample			6hr	7hr	8hr		
	Cq			27.92	21.41	18.89		
	copy number			1.24e+02	8.26e+03	4.19e+04		
D	Content			Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample			6hr	7hr	8hr		
	Cq			28.39	21.48	20.99		
	copy number			9.21e+01	7.92e+03	1.09e+04		
E	Content							
	Sample							
	Cq							
	copy number							
F	Content			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample			dil-1	dil-2	dil-3	dil-4	dil-5
	Cq			6.22	11.14	14.40	17.76	21.10
	copy number			1.00e+08	1.00e+07	1.00e+06	1.00e+05	1.00e+04
G	Content			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Cq							
	copy number							

特定の蛍光色素のデータを表示する方法

- ▶ スプレッドシートの下部にあるタブをクリックします。

RFU スプレッドシート

RFU スプレッドシートには、ランの各サイクルで取得した各ウェルの相対蛍光強度（RFU）の値が表示されます。ウェル番号は、各列の一番上に表示され、サイクル番号は各行の左に表示されます。

Cycle	B4	B5	B6	C4	C5	D4	D5	D6	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	
1	45.6	11.6	10.0	5.48	7.14	23.6	1.35	-17.5	192	39.9	20.6	35.5	41.2	40.2	35.1	39.5
2	29.9	5.01	5.65	0.0416	-0.989	12.4	-0.689	-17.2	157	39.4	20.4	15.2	18.0	24.9	12.5	17.8
3	15.0	0.779	6.65	-2.41	-0.154	9.63	-3.27	-6.84	133	44.9	13.8	8.62	7.36	12.4	19.3	9.96
4	6.29	3.24	5.62	-0.119	-1.37	7.70	2.58	-3.87	112	47.9	6.28	4.95	5.61	10.9	7.19	8.84
5	5.02	2.96	3.65	1.75	3.86	4.31	-3.29	0.9588	92.1	63.4	1.48	3.80	1.72	6.62	6.11	6.58
6	-2.71	2.83	0.862	3.84	3.17	7.76	2.50	8.79	65.9	84.3	-4.18	1.53	-2.32	2.20	7.94	4.37
7	-9.01	-0.390	1.51	-0.979	4.06	3.31	-0.340	5.18	45.7	121	-8.35	-4.28	-5.28	0.737	-1.28	-0.8503
8	-8.61	-1.25	-2.64	3.65	-0.896	-2.34	1.59	-2.17	17.9	198	-7.20	-6.99	2.37	-4.38	-0.484	-1.12
9	-8.98	1.89	-1.85	1.74	-2.87	-0.928	1.39	6.71	-1.55	324	-2.63	-7.14	-3.13	-2.30	-3.19	-2.39
10	-8.74	-7.74	-3.72	-2.78	-2.18	-5.78	1.94	1.28	-23.7	467	24.4	-10.4	0.268	-7.77	-4.67	-7.62

Melt Curve タブ

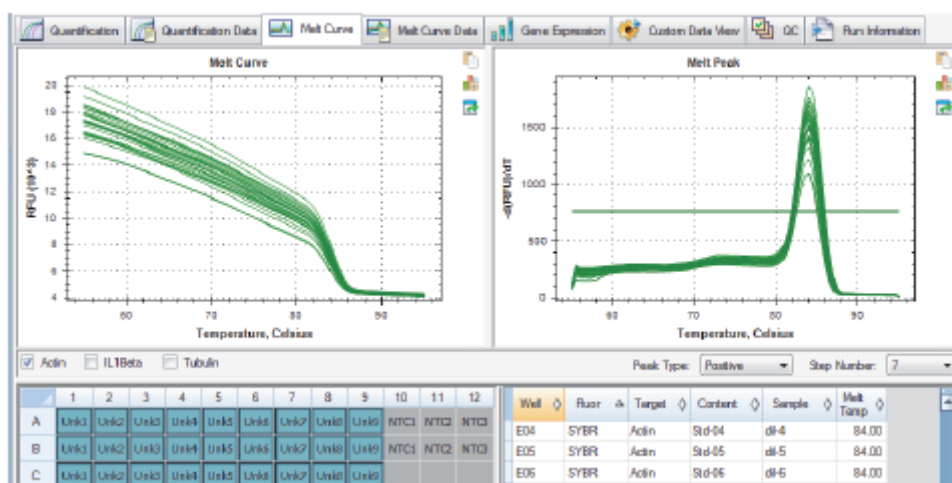
DNA 結合する蛍光標識試薬および非結合ハイブリダイゼーションプローブに関しては、DNA が二本鎖になるアニーリング時に最も強い蛍光発色が得られます。このため、融解温度 (T_m) に向けて温度が上昇すると、蛍光強度は一定の程度で減少します（一定の勾配）。 T_m では、蛍光強度が大幅に低下するため、勾配は大幅に変化します。この変化の程度は、マイナスの蛍光強度導関数 ($-d(RFU)/dT$) と温度をプロットすることにより求められます。蛍光強度の最大変化は、グラフ上でピークとして見受けられ、二重鎖 DNA 複合体の T_m を表します。

ソフトウェアにより、融解曲線から収集した RFU データが温度の関数としてプロットされます。融解曲線のピークデータを解析するために、ソフトウェア上で閾値ラインを上下させることにより、開始温度と終了温度が割り当てられます。ピーク領域の底面ラインは、融解閾値ラインの位置によって特定されます。ピークが有効となるには、少なくとも閾値ラインと最大ピーク地点間の距離に適合する高さにしなければなりません。

Melt Curve タブには、以下の 4 つの画面に増幅 PCR 生成物の T_m が表示されます。

- **Melt Curve (融解曲線)** — 各ウェルの温度ごとの RFU として各蛍光色素のリアルタイムデータを表示します。
- **Melt Peak (融解曲線ピーク)** — 各ウェルの温度ごとの RFU データのマイナス導関数を表示します。
- **Well selector (ウェルセレクター)** — ウェルを選択することで、そのデータの表示・非表示が可能です。
- **Peak spreadsheet (ピークスプレッドシート)** — 選択しているウェルで収集されたデータを表示します。

注意：このスプレッドシートには、各トレースにつき最大 2 カ所のピークが表示されます。さらに多くのピークを表示したい場合には、Melt Curve Data タブをクリックしてください。



Melt Curve データの調整方法

- ▶ 以下のいずれかを行います。
 - Melt Peak グラフの閾値ラインをクリック & ドラッグして、データ解析にピーク値を追加または削除します。
 - Peaks ドロップダウンメニューの Positive を選択して、融解曲線閾値ラインを上回るピークのスプレッドシートデータを表示します。または、Negative を選択して、融解曲線閾値ラインを下回るピークのスプレッドシートデータを表示します。
 - Trace Styles ウィンドウを開き、Melt Curve および Melt Peak グラフのトレースの色を変更します。
 - Step Number セレクターの数字を選択して、プロトコール内の別のステップにおける融解曲線データを表示します。プロトコールが2つ以上の融解曲線ステップにプレートリードを含む場合には、2つ以上のステップがリストに表示されます。
 - ウェルセレクター内のウェルを選択し、データのサブセットに集中します。
 - ウェルグループを選択して、プレート内のウェルのサブセットを表示・解析します。ツールバーの Well Group ドロップダウンメニューの名称ごとに、ウェルグループを選択できます。

Melt Curve Data タブ

Melt Curve Data タブは、各トレースのすべての融解曲線のピークを含む複数のスプレッドシートに、Melt Curve タブからのデータを表示します。CFX Maestro ソフトウェアは、融解曲線データを表示するための以下の4つのスプレッドシートのオプションを提供します。

- **Melt Peaks (融解曲線ピーク)** — 各トレースに関するすべての融解曲線ピークを含むすべてのデータを表示します。これはデフォルトの表示です。
- **Plate (プレート)** — データ画面とプレートの各ウェルの内容を表示します。
- **RFU (相対蛍光強度)** — 各ウェルについて各温度における RFU 量を表示します。
- **-d(RFU)/dT** — 温度 (T) の変化に伴う RFU のマイナスの変化率を表示します。これは、プレート内の各ウェルに関する第一導関数プロットです。

Melt Curve Data タブ下に表示されるドロップダウンリストから、それぞれのスプレッドシートを選択します。

Melt Peaks スプレッドシート

Melt Peaks スプレッドシートには、すべての融解曲線データが表示されます。

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temperature	Peak Height	Begin Temperature	End Temperature
A01	SYBR	Actin	Unkn-01	0Hr	84.00	1497.19	78.00	88.50
A02	SYBR	Actin	Unkn-02	1Hr	84.00	1426.57	78.50	94.00
A03	SYBR	Actin	Unkn-03	2Hr	84.00	1492.53	78.50	91.00
A04	SYBR	Tubulin	Unkn-04	0Hr	84.50	1750.14	78.50	94.00
A05	SYBR	Tubulin	Unkn-05	1Hr	84.50	1797.53	80.50	91.00
A06	SYBR	Tubulin	Unkn-06	2Hr	84.50	1724.08	80.00	92.00
A07	SYBR	IL1Beta	Unkn-07	0Hr	83.50	1343.53	79.50	88.50

表 17 は、Melt Peaks スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表17 Melt Peaks スプレッドシートの内容

情報	説明
Well	プレート内のウェルの位置
Fluor	検出した蛍光色素
Content	Plate Editor ウィンドウに表示される Sample Type (サンプルタイプ)
Target	増幅ターゲット (遺伝子)
Sample	Plate Editor ウィンドウに表示される Sample Name (サンプル名)
Melt Temperature	各生成物の融解温度。スプレッドシートには、各行につき 1 ピーク (最高点) として表示される。
Peak Height	融解曲線のピークの高さ
Begin Temperature	ピーク開始時の温度
End Temperature	ピーク終了時の温度

Plate スプレッドシート

Plate スプレッドシートには、融解曲線データがプレートフォーマットで表示されます。

	1	2	3	4	5	6
A	Content	Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample	0Hr	1Hr	2Hr		
	Peak 1	84.00	84.00	84.00		
	Peak 2	None	None	None		
B	Content	Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample	0Hr	1Hr	2Hr		
	Peak 1	84.00	84.00	84.00		
	Peak 2	None	None	None		
C	Content	Unkn-1	Unkn-2	Unkn-3		
	Sample	0Hr	1Hr	2Hr		
	Peak 1	84.00	84.00	84.00		
	Peak 2	None	None	None		
D	Content	Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample	oil-1	oil-2	oil-3	oil-4	oil-5
	Peak 1	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00
	Peak 2	None	None	None	None	None

注意：ソフトウェアが判定するピークに調整するには、Melt Curve タブから Melt Peak グラフ内の閾値ライン位置を調整してください。

表 18 は、Plate スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表18 Plate スプレッドシートの内容

情報	説明
Content	Sample Type (必須) と Replicate # (オプション) の組み合わせ
Sample	サンプル名
Peak 1	第一融解曲線ピーク (最高点)
Peak 2	第二 (より低い) 融解曲線ピーク

RFU スプレッドシート

RFU スプレッドシートには、融解曲線から得られた各サイクルにおける各ウェルの蛍光データが表示されます。

Temperature	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	D4
55.00	17243	16043	16541	16440	17362	17038	17387	18303	17813	14914	16441	16356	17906
55.50	17138	15948	16440	16340	17243	16823	17280	18178	17593	14836	16337	16252	17784
56.00	17033	15853	16339	16241	17124	16908	17173	18053	17574	14758	16233	16149	17663
56.50	16929	15738	16238	16141	17005	16693	17067	17928	17454	14681	16130	16046	17542
57.00	16824	15663	16136	16042	16885	16579	16960	17802	17334	14603	16026	15942	17420
57.50	16719	15568	16035	15942	16766	16464	16833	17677	17214	14525	15922	15839	17289
58.00	16614	15473	15934	15843	16647	16349	16746	17552	17094	14447	15819	15736	17178
58.50	16505	15375	15831	15740	16524	16232	16637	17423	16971	14360	15707	15628	17064

表 19 は、RFU スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表19 RFU スプレッドシートの内容

情報	説明
Well number (A1, A2, A3, A4, A5...)	取り込まれたウェルのプレート内での位置
Temperature	増幅ターゲットの融解温度。各列に1つのウェルとしてプロットされる。同一ウェル内の複数の生成物に関しては複数のウェルとしてプロットされる。

-d(RFU)/dT スプレッドシート

-d(RFU)/dT スプレッドシートには、温度 (T) の変化に伴う RFU のマイナスの変化率が表示されます。

Temperature	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	D4
55.00	105	95.0	101	99.5	119	115	107	125	120	77.8	104	103	121
55.50	227	206	219	215	258	248	231	271	260	169	225	224	263
56.00	210	190	202	199	238	230	214	250	240	156	207	207	243
56.50	210	190	202	199	238	230	214	250	240	156	207	207	243
57.00	210	190	202	199	238	230	214	250	240	156	207	207	243
57.50	209	189	202	198	238	229	213	250	239	154	206	206	242
58.00	214	193	204	202	242	232	215	253	243	164	214	210	245
58.50	222	200	210	209	247	237	221	260	249	184	228	219	249
59.00	226	207	215	214	251	241	227	264	253	199	238	226	254

表 20 は、-d(RFU)/dT スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表20 -d(RFU)/dT スプレッドシートの内容

情報	説明
Well number (A1, A2, A3, A4, A5)	取り込まれたウェルのプレート内での位置
Temperature -d(RFU)/dT	温度 (T) の変化に伴う RFU のマイナス変化率

End Point タブ

End Point タブを開くと、サンプルウェルの最終相対蛍光強度（RFU）を解析します。ソフトウェアでは、不明サンプルを含むウェルの RFU レベルを陰性対照のウェルの RFU レベルが比較され、不明サンプルウェルが陽性または陰性として判定されます。陽性サンプルの RFU 値は、陰性対照 RFU 平均値 + カットオフ値よりも高くなります。

エンドポイントデータを解析するには、プレートには必ず陰性対照を含めてください。陰性対照が含まなければ、ソフトウェアによってデータが判定されません。以下の2種類のプロトコルのいずれかを行います。

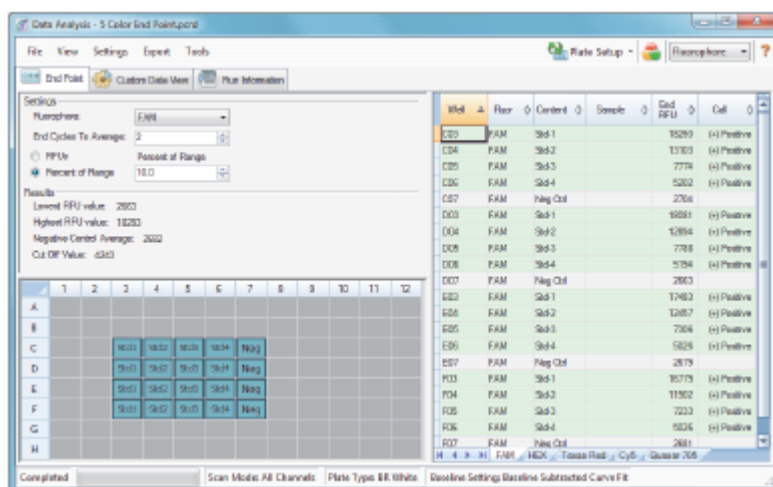
- Run a Quantification（定量化のラン）プロトコル — 通常のプロトコルを設定します。ランの完了後、Data Analysis ウィンドウを開いて、Quantification タブでデータ解析設定を調整します。その後、End Point タブをクリックしてエンドポイントサイクルを選択します。
- Run an End Point Only（エンドポイントのみのラン）プロトコル — Run Setup ウィンドウの Plate タブで End Point Only プロトコルを設定後、プレートを選擇・作成してランを開始します。

End Point タブ画面には、最終（エンド）サイクルでターゲットが増幅されたかどうかを判定する平均 RFU 値が表示されます。これらのデータを使用して、サンプルに特異的なターゲット配列が存在しているか（陽性であるか）どうかを判定します。陽性の場合には、定義したカットオフレベルよりも RFU 値が高くなります。

アドバイス： エンドポイントプロトコルを作成するには、Protocol タブ（Run Setup ウィンドウ）を開いて Run > End Point Only Run を選択します。

ランが完了すると、データファイルが End Point タブ画面に開きます。これには以下のセクションが含まれます。

- **Settings（設定）** — データ解析設定を調整します。
- **Results（結果）** — 設定の調整直後に結果を表示します。
- **Well Selector（ウェルセレクター）** — 表示したいエンドポイントデータを含むウェルを選択します。
- **RFU spreadsheet（RFU スプレッドシート）** — 選択しているウェルで収集されたエンド RFU を表示します。



Results（結果）データ

Results セクションには、以下のデータが表示されます。

- **Lowest RFU value（RFU 最低値）** — データ内での RFU 最低値
- **Highest RFU value（RFU 最高値）** — データ内での RFU 最高値
- **Negative Control Average（陰性対照平均）** — 陰性対照を含むウェルの RFU 平均値
- **Cut Off Value（カットオフ値）** — 許容値（RFU または Settings（設定）に示される Percentage of Range（範囲率））と陰性対照平均値を加えて算定される。カットオフ値よりも大きい RFU を含むサンプルは、「陽性」と判定されます。カットオフ値を調整するには、RFU または範囲率を変更してください。

カットオフ値の計算式は以下のとおりです。

$$\text{カットオフ値} = \text{陰性対照平均値} + \text{許容値}$$

許容値は、以下のいずれかの方法で選択します。

- **RFU（初期設定）** — RFU 絶対値を許容値に使用する場合には、この方法を選択します。最小 RFU 許容値は 2 です。最大値は、RFU 最大値の絶対値 - 最小 RFU 値の絶対値になります。初期設定の RFU 許容値は、RFU 全範囲の 10 % となります。
- **Percent of Range** — RFU 許容値範囲率を使用する場合には、この方法を選択します。最小範囲率は 1 % です。最大範囲率は 99 % です。初期設定の範囲率は 10 % です。

エンドポイントデータ解析の調整

End Point タブにおけるデータの調整方法

- ▶ 以下を行います。
 - ドロップダウンリストから蛍光色素を選択します。
 - End Cycle to Average 値を選択して、エンドポイント RFU 平均値を計算するサイクル数を設定します。
 - RFU を選択して、相対蛍光強度データを表示します。
 - Percentage of Range を選択して、RFU 範囲率としてデータを表示します。
 - ウェルセレクターのウェルを選択して、データのサブセットにまとめます。
 - ウェルグループを選択して、プレート内のウェルのサブセットの表示・解析を行います。ツールバーの Well Group ドロップダウンメニューにある名称ごとに各ウェルグループを選択します。

エンドポイント解析用の RFU スプレッドシート

表 21 は、End Point タブ画面の RFU スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表21 End Point スプレッドシートの内容

情報	説明
Well	プレート内のウェルの位置
Fluor	検出した蛍光色素
Content	Sample Type と Replicate #の組み合わせ
End RFU	エンドポイントサイクルでの RFU
Call	Positive (陽性) または Negative (陰性) の判定。サンプルが陽性である場合は、その RFU 値が陰性対照の RFU 平均値+カットオフ値を上回る。
Sample	Plate Editor に読み込まれるサンプル名

Allelic Discrimination（対立遺伝子識別）タブ

Allelic Discrimination タブは未知のサンプルが入ったウェルに Genotype（遺伝子型）を割り当てます。このデータをもとにアレル1、アレル2、ヘテロ接合体、無コール（増幅無し）、不明といった様々な遺伝子型を有するサンプルを特定します。

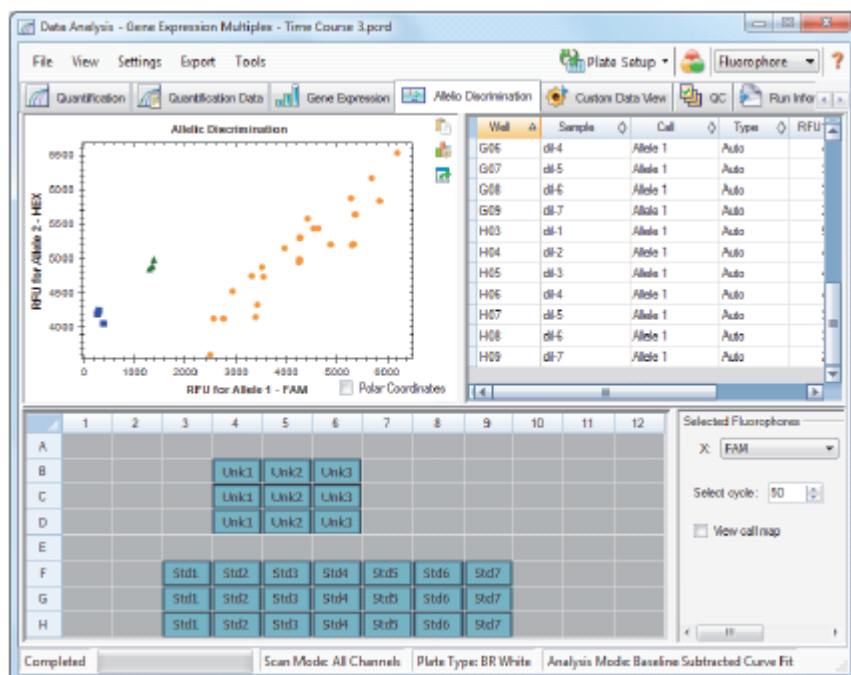
注意: 対立遺伝子識別のためのデータは2つ以上の蛍光色素を用いたマルチプレックスランから得る必要があります。それぞれの蛍光色素により全サンプルで1つの対立遺伝子が特定されます。

対立遺伝子識別解析にあたっては最低でも以下に記すウェル内容が必要となります。

- 各ウェルに2つの蛍光色素
- 最適化データ解析のための NTC（No Template Control）サンプル

CFX Maestro ソフトウェアでは4通りの方法で対立遺伝子識別データを見ることができます。

- **Allelic Discrimination（対立遺伝子識別）グラフ** — アレル1／アレル2の RFU のグラフでデータを表示します。グラフの中の各点は1ウェル内の2蛍光色素からのデータを表します。Polar Coordinates チェックボックスを選択／解除することでデカルト座標（直交座標）を極座標に切り替えることができます。デカルト座標の x 軸はアレル1の RFU を表し、y 軸はアレル2の RFU を表します。極座標の x 軸は角度を表し、y 軸は原点（全 NTC の中央値）からの RFU 距離を表します。
- **Well spreadsheet（ウェルスプレッドシート）** — プレートの各ウェルで収集された対立遺伝子識別データを表示します。
- **Well selector（ウェルセレクター）** — 表示したい対立遺伝子データがあるウェルを選択します。
- **Selected Fluorophores（選択蛍光色素）パネル** — 対立遺伝子識別グラフの x 軸と y 軸のラベルを変えたり、解析サイクルを変えたり、コールマップを表示するかどうか指定します。



対立遺伝子識別データの調整

ソフトウェアでは、NTC の位置と NTC から不明データポイントまでの距離と角度に基づき、不明サンプルを含むウェルに遺伝子型が自動的に割り当てられます。

対立遺伝子識別データの調整方法

▶ 以下を行います。

- 極座標を表示するには、対立遺伝子識別グラフのチェックボックスを選択します。
- 別の蛍光色素を表示するには、Selected Fluorophores パネルのドロップダウンリストから選びます。
- 判定を変更するには、対立遺伝子識別グラフ内のデータポイントをドラッグして Selected Wells リスト内のオプションを選択します。
 - Allele 1 (アレル 1)
 - Allele 2 (アレル 2)
 - Heterozygote (ヘテロ接合体)
 - Undetermined (不明)
 - No Call (無コール)
 - Auto Call (自動コール)

アドバイス： デフォルトのコールに戻すには、Auto Call を選択してください。

グラフのメニューオプション

グラフのコピー、印刷、およびエクスポートのための共通右クリックメニューオプションに加え、表 22 は対立遺伝子識別グラフで使用できるメニューオプションを示しています。

表22 対立遺伝子識別グラフの右クリックおよび左クリックメニューオプション

メニューオプション	機能
Zoom	2 つ以上のデータポイントを選択した場合に選択領域を拡大する。
Well	このウェルのみを表示、画面からこのウェルを削除、このトレースの色を設定、または単一トレースをクリックした場合に解析からこのウェルを除外する。
Selected Wells	これらのウェルのみを表示、画面からこれらのウェルを削除、これらのトレースの色を設定、または複数のトレースを選択した場合に解析からこれらのウェルを除外する。

Allelic Discrimination（対立遺伝子識別）スプレッドシート

表 23 は、Allelic Discrimination スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

表23 Allelic Discrimination スプレッドシートの内容

情報	説明
Well	プレート内でのウェルの位置
Sample	サンプル名の説明
Call	自動でのアレル 1、アレル 2、ヘテロ接合体、無コール、または不明を含む対立遺伝子の識別
Type	Auto（自動）または Manual（手動）。判定方法について説明する。Auto とは、ソフトウェアによって選択されたコール。Manual とは、ユーザーによって選択されたコールを意味する。
RFU1	アレル 1 の RFU
RFU2	アレル 2 の RFU

Custom Data View タブ

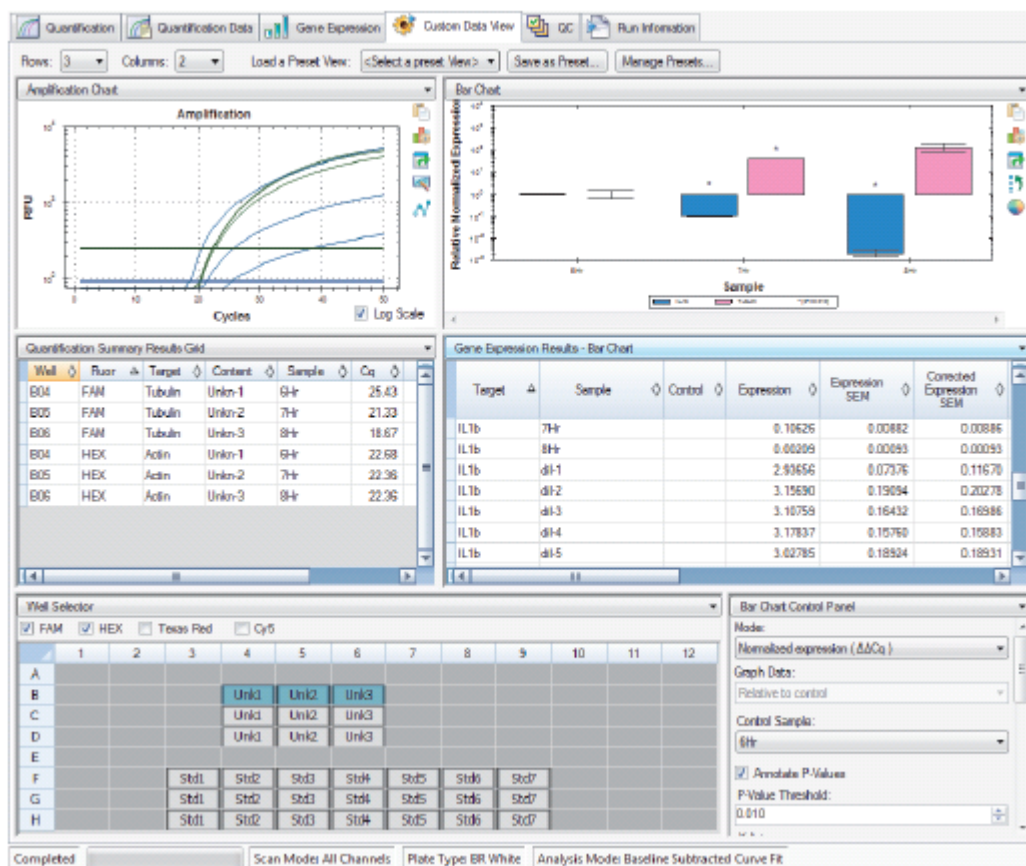
Custom Data View タブは、カスタマイズ可能なフォーマットで複数のペインを同時に表示します。

Load a Preset View ドロップダウンリストから、表示フォーマットのテンプレートを選択できます。表示されるデフォルト画面は、解析されるファイルによって異なります。例えば、融解曲線データがある場合、Amp+Melt デフォルト画面が表示されます。

デフォルト画面のカスタマイズ方法

- ▶ 以下を行います。
 - ドロップダウンリストから代替のプリセット画面を選択する。
 - 個々のペインの上にあるドロップダウンリストから別のグラフ表示を選択する。
 - タブの行数と列数を変更する。
 - 個々のペインの寸法を変更する。各ペインの外周のバーをドラッグする。

Save as Preset をクリックして、カスタマイズした画面をプリセットのテンプレートとして保存します。Manage Presets をクリックすると、既存のプリセット画面の削除、名称変更、または復元を行えます。

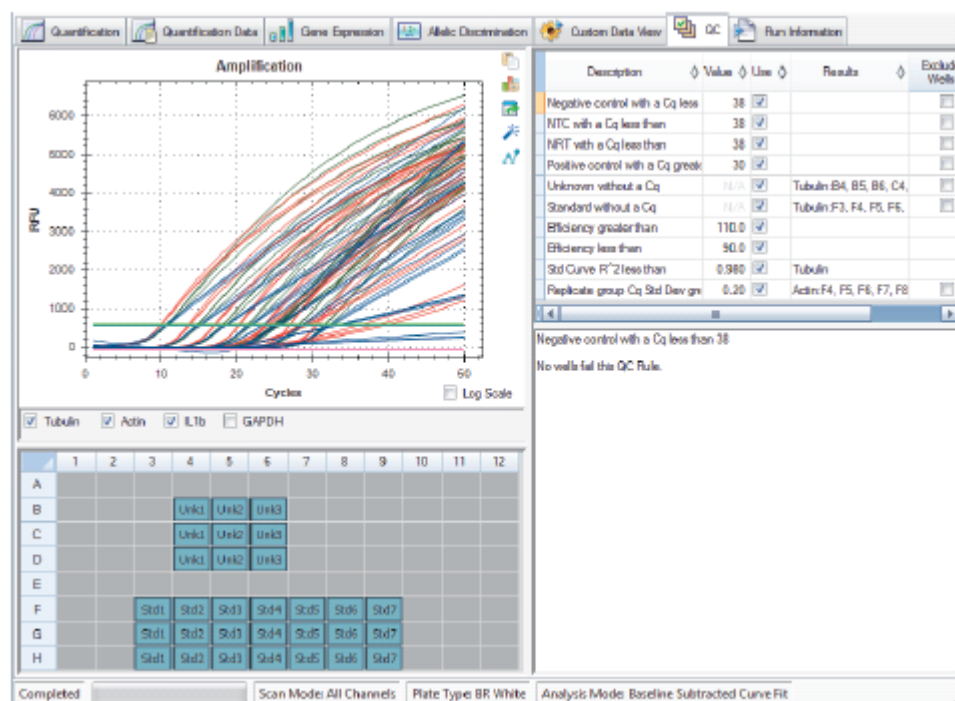


QC タブ

QC タブを使用すると、User Preferences ウィンドウの QC タブで定義される規定に基づき、ランダータの品質を迅速に評価できます。

CFX Maestro ソフトウェアでは、QC データを表示するための以下の 4 つのオプションをご提供します。

- **Amplification (増幅) グラフ** — サイクルごとの各ウェルの RFU を表示します。グラフ内の各トレースは、1 個のウェルの単一蛍光色素から得られたデータを示します。
- **QC rules (QC 規定) 表** — 適用可能な QC 規定および各規定を定義する設定を表示します。適用する QC 規定には、チェックマークが付いています。
- **Well selector (ウェルセレクター)** — 表示したい蛍光データを含むウェルを選択します。
- **QC rule summary (QC 規定サマリー) ペイン** — 選択した QC 規定を表示し、規定を満たさないウェルを強調表示します。



QC 基準の変更

QC 基準の変更方法

- ▶ 規定を QC に含める場合には Use チェックボックスを選択し、QC から除外する場合には Use チェックボックスを解除します。

QC 不合格のウェルの排除

CFX Maestro ソフトウェアでは、QC 基準に不合格のウェルを QC 規定表の Results カラムとサマリーペインに表示します。

QC 基準に不合格のウェルの排除方法

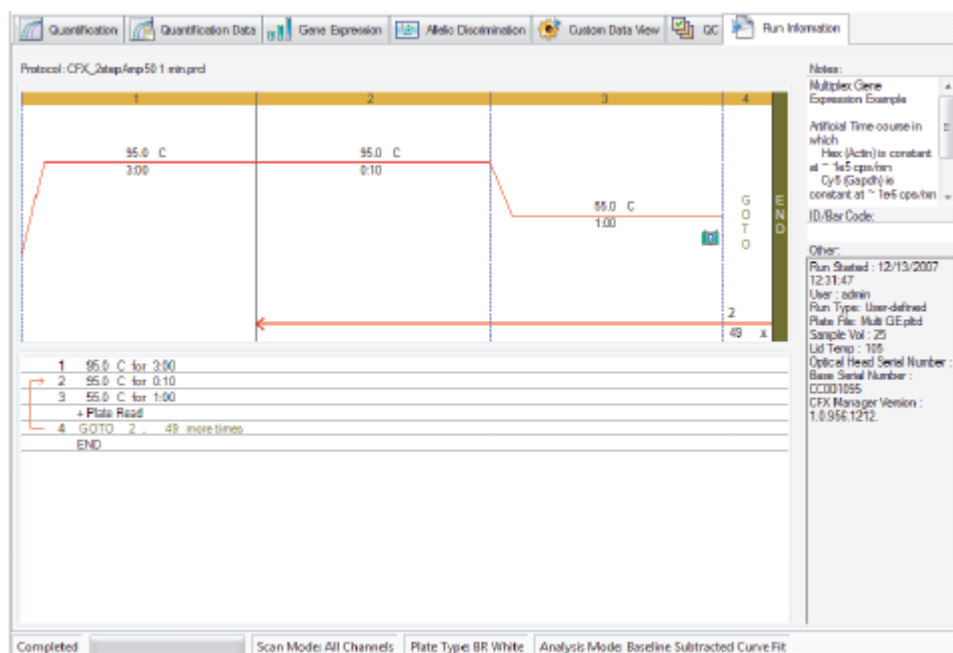
- ▶ 排除する各ウェルについて Exclude Wells を選択します。

Run Information (ラン情報) タブ

Run Information タブでは、各ランに関するプロトコールとその他の情報が表示されます。このタブを使用して、以下を行えます。

- プロトコールの表示。
- ランに関するメモの入力または編集。
- ランの ID またはバーコードの入力または編集。
- ランの実行中に発生する可能性があるイベントの表示。このメッセージの表示は、ランのトラブルシューティング時に有用です。

アドバイス: プロトコールを右クリックすると、コピー、エクスポート、または印刷が可能になります。また、メモ、ID/バーコード、またはその他のペインを右クリックすると、テキストの取り消し、カット、コピー、ペースト、削除、または選択を行うことができます。

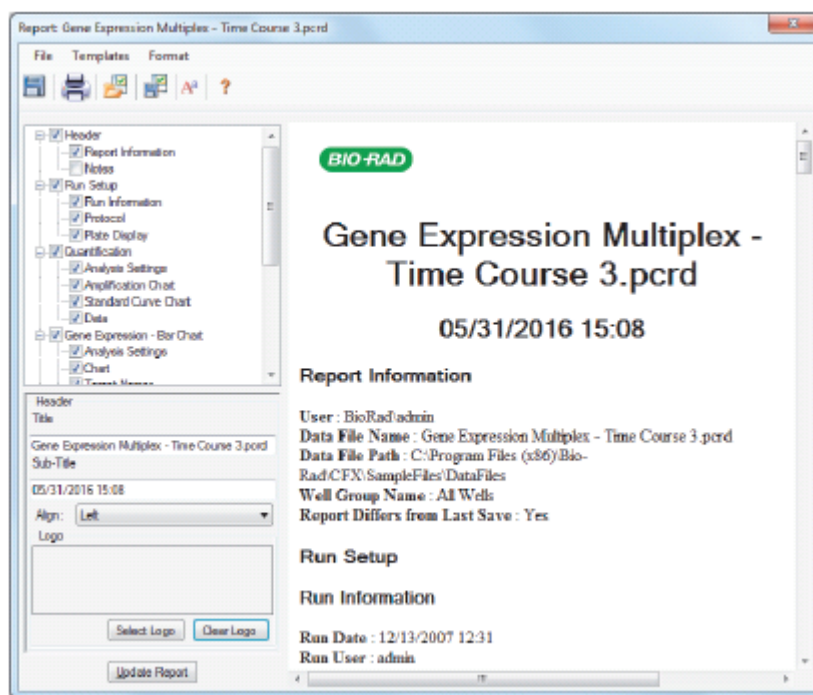


データ解析レポート

Report ダイアログボックスには、Data Analysis ウィンドウ内の現在のデータファイルに関する情報が表示されます。レポートを開くには、Tools > Reports を選択するか、ツールバーの Reports をクリックします。

Report ダイアログは、以下のセクションで構成されます。

- メニューおよびツールバー — レポートまたはテンプレートのフォーマット、保存、および印刷のためのオプションを提供します。
- Options (オプション) リスト (ウィンドウの左上) — レポートに表示するオプションを提供します。
- Options (オプション) ペイン (ウィンドウの左下) — 選択したオプションに関する情報を入力するためのテキストボックスを表示します。
- Preview (プレビュー) ペイン (ウィンドウの右側) — 現時点でのレポートがプレビュー表示されます。



データ解析レポートの作成

レポートのレイアウトをテンプレートとして保存できます。これは、同様のレポート用に再度使用できます。

データ解析レポートの作成方法

1. レポート作成前に、Data Analysis ウィンドウにてウェル内容、選択しているウェル、グラフ、およびスプレッドシートについて最終調整します。
2. Data Analysis メニューバーの Tools > Reports を選択し、Report ダイアログボックスを開きます。
3. レポートに含めたいオプションを選択します。選択したデフォルトのオプションを含むレポートが開きます。チェックボックスを選択または解除すると、カテゴリ全体または1つのカテゴリ内の個々のオプションを変更できます。

表 24 は、表示できるオプションを示しています。

注意： レポートに表示されるデータは、Data Analysis ウィンドウのタブ内の現選択肢によって異なります。例えば、定量化ランの場合には、検量線が含まれない可能性があるため、Data Analysis ウィンドウやデータレポートにはその曲線データは表示されません。

4. レポート内のカテゴリやアイテムの順番を変更します。オプションを必要な場所にドラッグします。アイテムはそれらが属するカテゴリ内でのみ並べ替えることができます。
5. Update Report をクリックし、変更箇所を含む Report Preview を更新します。
6. レポートを印刷または保存します。ツールバーの Print Report ボタンをクリックすると、原レポートが印刷されます。File > Save を選択すると、レポートが PDF (Adobe Acrobat Reader ファイル)、MHT (Microsoft 文書)、または MHTML (Microsoft 文書) ファイルフォーマットで保存でき、ファイルの保存場所を選択できます。File > Save As を選択すると、レポートに新しい名称を付けて、または新しい場所に保存できます。
7. (オプション) 希望する情報を含んだレポートテンプレートを作成できます。現在のレポート設定をテンプレートに保存するには、Template > Save または Save As を選択します。その後、新規のレポート作成時に、保存したテンプレートが画面に読み込まれます。

データ解析レポートのカテゴリ

表 24 は、Data Analysis ウィンドウ内のデータタイプごとの、データ解析レポートで使用できるすべてのオプションを表示します。

表24 オプションリスト内のデータ解析レポートのカテゴリ

カテゴリ	オプション	説明
Header		レポートのタイトル、サブタイトル、およびロゴ
	Report Information	ラン実行日、ユーザー名、データファイル名、データファイルパス、および選択しているウェルグループ
	Audit Information	署名を含む監査に必要な補足情報
	Notes	データレポートに関するメモ
Run Setup	Run Information	ラン実行日、ユーザー、データファイル名、データファイルパス、および選択しているウェルグループを含む
	Protocol	プロトコールのステップとオプションのテキスト表示
	Plate Display	プレートの各ウェルでの情報をプレートビューで表示
Quantification	Analysis Settings	データ収集時のステップ番号、解析モード、およびベースライン補正法を含む
	Amplification Chart	定量化データを含むランの増幅グラフのコピー
	Standard Curve Chart	検量線グラフのコピー
	Data	各ウェル内のデータを示すスプレッドシート
Gene Expression – Bar Chart	Analysis Settings	解析モード、グラフデータ、スケーリングオプション、およびグラフエラーを含む
	Chart	棒グラフのコピー
	Target Names	ターゲット名
	Sample Names	サンプル名
	Data	各ウェル内のデータを示すスプレッドシート
	Target Stability	ターゲット遺伝子の安定性の値のグラフ
	Box-And-Whisker Chart	箱髭グラフ
	Dot Plot Chart	ドットプロットグラフ
Gene Expression – Clustergram, Scatter Plot, Volcano Plot, Heat Map	Analysis Settings	各グラフタイプの設定を含む
	Chart	グラフ

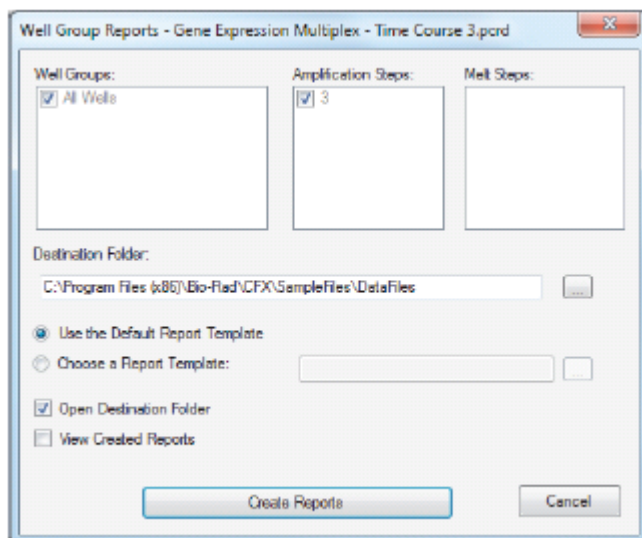
表 24 オプションリスト内のデータ解析レポートのカテゴリ (つづき)

カテゴリ	オプション	説明
	Data	各ターゲット内のデータを表示するスプレッドシート
Gene Expression - ANOVA Data		
	ANOVA Settings	実施する ANOVA のタイプ、独立変数と従属変数、および解析に使用する P 値閾値
	ANOVA Results	平方和、自由度 (df)、二乗平均、F 統計値、および ANOVA 試験の P 値データを含む
	Tukey's HSD	調整された平均差、std エラー、P 値、P 値ボンフェローニ法、P 値 BH、ANOVA 検定の下限值と上限値を含む
	Data Descriptives	解析におけるターゲットおよび標準遺伝子の係数、カウント、平均、および標準偏差を含む。
	ANOVA Errors	ANOVA 計算中に特定されるエラー
Melt Curve		
	Analysis Settings	融解ステップ番号および閾値線の設定を含む
	Melt Curve Chart	融解曲線グラフ
	Melt Peak Chart	融解曲線ピークグラフ
	Data	各ウェル内のデータを示すスプレッドシート
Allelic Discrimination		
	Analysis Settings	蛍光色素、サイクル、および表示コールマップを含む
	Allelic Discrimination Chart	対立遺伝子識別グラフ
	Data	各ウェル内のデータを示すスプレッドシート
End Point		
	Analysis Settings	蛍光色素、最終サイクルの平均、モード、最小 RFU 値、最大 RFU 値、およびカットオフ値を含む
	Data	各ウェル内のデータを示すスプレッドシート
QC Parameters		
	Data	各 QC 規定のパラメータを示すスプレッドシート

ウェルグループのレポート

ウェルグループのレポートの作成方法

1. Data Analysis ウィンドウの Tools > Well Group Reports を選択します。



2. Well Groups Reports ダイアログボックスで、レポートに含めるウェルグループ、増幅ステップ、および融解ステップを選択します。
3. レポートを保存する宛先フォルダへのパスを入力するか、そのフォルダにナビゲートします。
4. (オプション) Choose a Report Template を選択し、テンプレートのファイルフォルダにナビゲートします。
5. (オプション) Open Destination Folder を選択してフォルダを開き、生成されたレポートを表示します。
6. Create Reports をクリックします。

第 10 章 遺伝子発現解析

厳密な条件を満たしている対照物質を使用することによって、サンプル間でのターゲット遺伝子濃度の相対差を正規化するための遺伝子発現ランを実施することが可能です。通常、対象の遺伝子の発現レベルを正規化するためには、1種類以上のリファレンス遺伝子の発現レベルを適用します。こうしたリファレンス遺伝子の適用によって、各サンプルに示される取り込み差やその他の変動が考慮され、その発現レベルはアッセイ系の影響を受けずに定量することが可能になります。

Data Analysis ウィンドウの Gene Expression タブを選択すると、2つ以上のウェルにおける PCR サンプル間の相対値を評価できます。たとえば、PCR サンプルでのウイルスゲノム相対数またはトランスフェクト遺伝子の相対値の評価が可能です。遺伝子発現実験の最も一般的な応用例としては、定常状態の mRNA レベルを推定するために、複数の反応で得られた cDNA 濃度を比較評価することです。

ソフトウェアでは、以下のシナリオのいずれかによるターゲットの相対発現レベルが計算されます。

- ターゲット配列（遺伝子 1）に対するあるターゲット配列（遺伝子 2）の相対発現レベル。たとえば、同一のサンプル処理条件における、ある遺伝子に対する別の遺伝子の相対量
- 異なるサンプル処理条件における同一ターゲットに対する 1 サンプル内での 1 ターゲット配列の相対発現レベル。たとえば、異なる時間、場所、または発現条件下におけるある遺伝子の同一遺伝子に対する相対量。

遺伝子発現解析用のプレート設定

遺伝子発現解析を実施するため、ウェルに必ず以下を含むものとします。

- 複数のターゲット — サンプル内で異なる増幅遺伝子または増幅配列を示す 2 タイプのターゲット
- 1 タイプ以上のリファレンス遺伝子 — 少なくとも 1 タイプのターゲットは、正規化発現解析用のリファレンスのターゲットとします。Experiment Settings ウィンドウにすべてのリファレンスターゲットを割り当て、Normalized Expression (正規化発現) モード ($\Delta\Delta C_q$) でデータを解析します。リファレンスターゲットを含まないランは、Relative Expression (相対発現) モード (ΔC_q) で解析するものとします。
- 共通サンプル — Gene Expression タブ画面にプロットされたデータを表示するために、反応には必ず共通サンプル (少なくとも 2 タイプ以上) を含めるものとします。このようなサンプルは、ターゲット配列ごとに処理または条件が異なります。Experiment Settings ウィンドウに対照サンプル (オプション) を割り当ててください。対照サンプルが選択されていない場合、ソフトウェアは最小 C_q を対照サンプルとして使用します。

Plate Editor の Gene Expression 設定の要件は、反応の内容が、1 タイプの蛍光色素を用いるシングルプレックス PCR であるか、または 2 タイプ以上の蛍光色素を用いるマルチプレックス PCR であるかによって異なります。

プレート設定ガイド

データファイルのプレート設定が解析に必要な情報を含んでいないで Gene Expression タブを選択すると、通常棒グラフが表示される空間に情報入力のための指示が表示されます。正規化遺伝子発現解析のため、以下のステップを完了させてください。

1. 以下を使用してターゲット名とサンプル名を定義します。
 - Plate Setup (プレート設定) — Plate Editor ウィンドウを開きます。
 - Replace Plate File (プレートファイルの入れ替え) — 現在のプレートレイアウトと入れ替える、以前保存したプレートファイルにナビゲートするため、Select Plate ブラウザを開きます。
 - Replace PrimePCR File (PrimePCR ファイルの入れ替え) — Select PrimePCR ファイルダイアログボックスを開きます。ここで PrimePCR ランファイルにナビゲートし、それをプレートレイアウトに適用します。
2. Experiment Settings ダイアログボックスを使用して 1 つ以上のリファレンスターゲットとコントロールサンプルを選択します。

プレートレイアウトが既にターゲットとサンプルの情報を含んでいる場合には、2 番目のステップのみを行い、これがオレンジ色に強調表示されます。正規化遺伝子発現解析を行う前にこのステップを完了しなければなりません。

注意： クラスタグラム、散布図、ヒートマップ、および Volcano プロットのデータは、遺伝子発現解析用のプレート設定に示される正規化遺伝子発現の要件をすべて満たした場合にのみ表示されます。

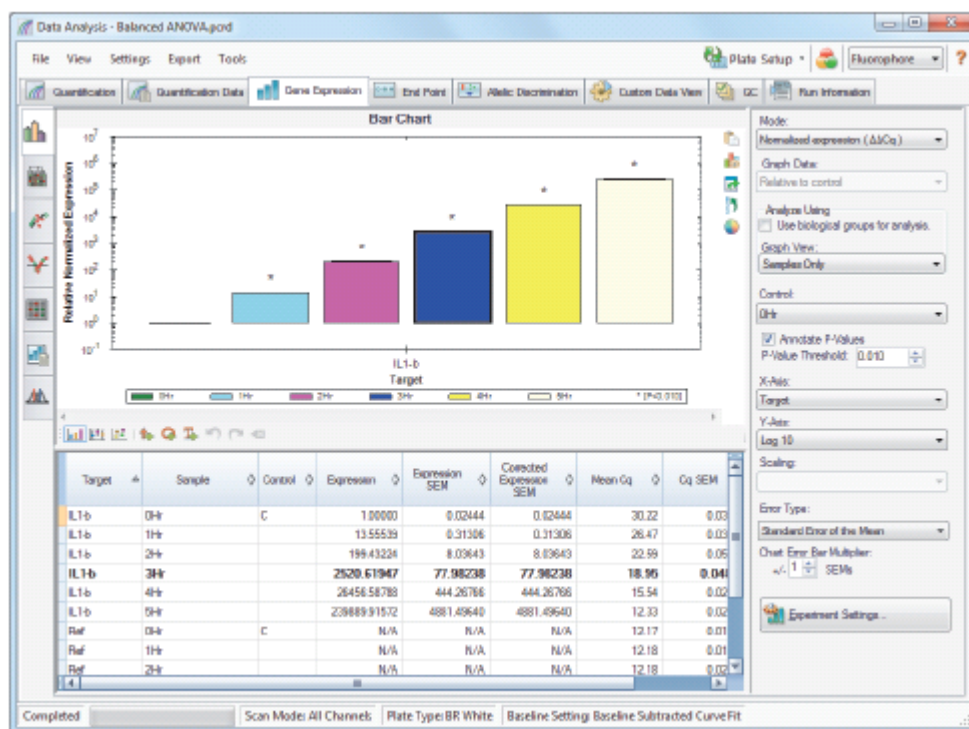
遺伝子発現グラフ

CFX Maestro ソフトウェアでは、遺伝子発現データを複数の画面に表示します。表 25 は、ソフトウェアで使用できるグラフのオプションを示しています。

表25 遺伝子発現グラフのオプション

ボタン	名称	機能
	Graphing	以下のいずれかの画面に正規化遺伝子発現データを表示します。 <ul style="list-style-type: none"> ■ 棒グラフ (Bar chart) (デフォルト) ■ 箱髭グラフ (Box and whisker chart) ■ ドットプロットグラフ (Dot plot chart)
	Clustergram	異なるターゲットおよびサンプルの発現の類似度に基づき、正規化発現データを階層構造で表示します。
	Scatter Plot	ターゲットの正規化発現をコントロールサンプル vs. 実験サンプルで表示します。
	Volcano Plot	コントロールサンプルと比較した実験サンプルのターゲットの発現 (レギュレーション) における変化を表示し、P 値に基づく重要度を示します。
	Heat Map	相対的正規化発現とそのプレート上の位置に基づき、コントロールサンプルと比較した実験サンプルのターゲットのレギュレーションを視覚的に描写します。
	Well Results	すべてのグラフからのウェルのデータをまとめます。
	ANOVA	ANOVA を実施し、不均衡データ結果を処理するため、応用回帰への手引 (Companion to Applied Regression) (car) および最小二乗手段 (lsmeans) R パッケージを使用して、正規化遺伝子発現データの一元配置および二元配置 ANOVA の結果を表示します。
	Reference Gene Selection Tool	(Gene Study ウィンドウの Study Analysis タブで使用可能) 試験した標準遺伝子を識別し、それぞれの安定性に基づき Ideal (理想的)、Acceptable (可)、または Unstable (不安定) に分類します。
	PrimePCR Controls Anlaysis	(Gene Study ウィンドウの Study Analysis タブで使用可能) 試験したサンプルの結果を表示します。

グラフ化



ターゲットの相対的発現は、以下の 2 つの画面に示されます。

- Gene Expression（遺伝子発現）グラフ — リアルタイム PCR データを以下のいずれかとして表示します。
 - $\Delta\Delta C_q$ — コントロールサンプルと標準ターゲットを使用して算定される相対的正規化発現。
 - ΔC_q — コントロールサンプルに対するサンプル内のターゲット遺伝子の相対量。

遺伝子発現グラフのデータは、3 つの画面のいずれかに表示することができます。詳細については、194 ページの「[グラフ表示の変更および注釈](#)」を参照してください。

- Spreadsheet（スプレッドシート） — 遺伝子発現データのスプレッドシートを表示します。

アドバイス： グラフのどこかまたはスプレッドシートを右クリックするとオプションを表示できます。Plate Setup ドロップダウンメニューから View/Edit Plate を選択して Plate Editor を開き、プレートのウェル内容を変更します。

アドバイス： 右クリックメニューから Sort を選択すると、グラフのターゲット名とサンプル名の順番を並べ替えることができます。

正規化遺伝子発現 (Normalized Gene Expression)

データを正規化するには、測定される1つ以上のリファレンス遺伝子の発現レベルを正規化因子として使用します。リファレンス遺伝子としては、評価対象となる生物系で調節されていない（変動しない）ターゲット、たとえばアクチン、GAPDH、またはチューブリンなどが挙げられます。

正規化遺伝子発現 ($\Delta\Delta C_q$) 解析の設定方法

1. データファイル（拡張子は.pcrd）を開きます。
2. Data Analysis ウィンドウの Quantification タブでデータを再チェックします。閾値や解析モードの変更を行ってデータを補正します。
3. Gene Expression タブを選択します。
4. Gene Expression タブで、Experiment Settings をクリックします。
5. Experiment Settings ダイアログボックスで以下を行います。
 - a. Samples タブを選び対照を1つ選択します。対照が割り当てられると、CFX Maestro ソフトウェアはすべての遺伝子の相対量を1に設定される対照発現量へと正規化します。
 - b. Target タブを選び標準遺伝子を選択します。遺伝子発現解析には、サンプル内のターゲットのうち1つの標準ターゲットが必要です。
6. まだ選択していない場合には Normalized Expression ($\Delta\Delta C_q$) を選択します。その後、Gene Expression タブ画面で発現レベルを確認します。

注意: 正規化遺伝子発現解析用のプレートレイアウトを設定するために Setup Wizard を使用することもできます。

相対量 (Relative Quantity)

定義によって、相対量 (ΔC_q) データは正規化されません。この方法は、リファレンス遺伝子（ターゲット）を含まないサンプルを定量化する場合に使用されます。一般に、ランの設定時に以下の点が考慮されます。

- 各サンプルは、同一のテンプレート量を示す。各ウェルでの RNA または cDNA の質量と同一になると考えられる。
- 生物サンプル量のばらつきは、ソフトウェアのデータ解析以外の方法によってラン実行後に正規化される。たとえば、各サンプルに添加される核酸質量、または核酸が単離された細胞数などの正規化係数によって相対量を単に除算する方法が選択される可能性がある。

相対量 (ΔC_q) 解析のラン方法

- ▶ Gene Expression タブ画面の右側のペインにある Mode ドロップダウンリストから、Relative Quantity (相対量) (ΔC_q) を選択します。

アドバイス: 結果を他の遺伝子発現ランによるデータと比較するには、新しい Gene Study 画面を開くか、あるいは既存の Gene Study 画面にデータファイルを追加します。

グラフ表示の変更および注釈

グラフのツールバーメニューコマンドとデータ解析グラフツールを使用すれば、グラフ画面の変更、各グラフの注釈、およびグラフ表示の変更が可能です。グラフのツールバーは、グラフと画面下部のデータ解析スプレッドシートの間に表示されます。

グラフのツールバーツール










アドバイス: データ解析グラフの右側に表示されるグラフツールに関する詳細については、147 ページのグラフを参照してください。

グラフの下にあるツールバーによって、注釈ツールへ迅速にアクセスできます。



表 26 は、グラフのツールバーにあるボタンの機能を示しています。

表26 グラフのツールバー

ボタン	名称	機能
	Bar chart (デフォルト)	ターゲットの相対的発現を表示します。
	Box-and Whisker chart	25%と75%の四分位、中央値、およびデータの最も遠いはずれ値を表示します。
	Dot Plot chart	箱髭グラフから個々のターゲットデータポイントを表示します。
	Add Arrow	アクティブなグラフに矢印を描画します。
	Add Circle	アクティブなグラフに丸を描画します。
	Add Text	アクティブなグラフにテキストボックスを挿入します。ここでテキストを追加してグラフ内の対象アイテムを特定することができます。
	Undo	アクティブなグラフへの最後の注釈を削除するか、または元に戻します。
	Redo	アクティブなグラフへの最後の Undo 操作を戻します。
	Clear All	アクティブなグラフのすべての注釈を消去します。

ターゲットとサンプルデータの並べ替え

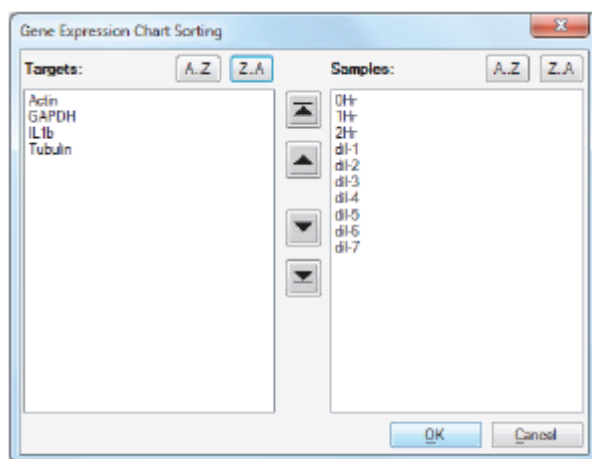
注意：このオプションは、遺伝子発現グラフでのみ使用できます。

デフォルトでは、ターゲットとサンプルの各リストはアルファベット順で表示されます。Sort ツールを使用すると、表示を逆順に並べ替えることができ、また、項目をリスト内の別の位置に手動で移動することができます。

ターゲットとサンプルデータの並べ替え方法

1. Chart ツールで Sort をクリックします。

Gene Expression Chart Sorting ダイアログボックスが表示されます。



2. 特定のリストで、Z-A をクリックすると逆順に並べ替わります。
3. 項目を手動で移動するには、項目を選択してグラフ間の該当するボタンをクリックします。
 - 上下矢印をクリックすると、選択した項目の位置が1つ移動します。
 - バー付き上下矢印をクリックすると、選択した項目がリストの最上部または最下部に移動します。
4. OK をクリックして変更を保存し、Gene Expression タブに戻ります。

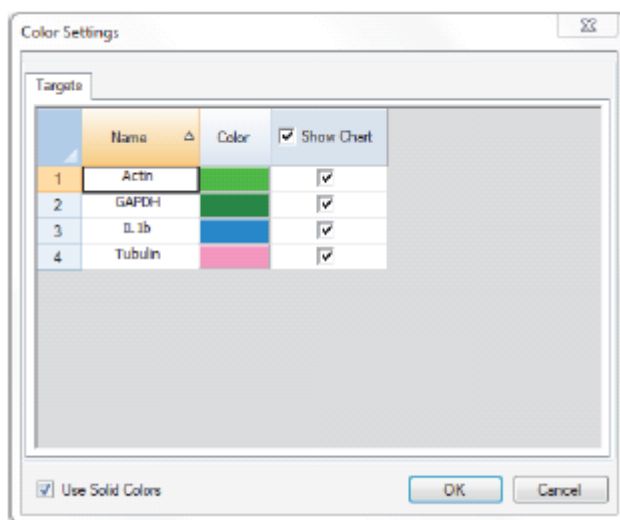
ターゲットおよびサンプルの色設定の変更

Color Settings ダイアログボックスを使用して、ターゲットまたはサンプルの色を変更し、またはグラフからアイテムを削除できます。

ターゲットの色設定の変更方法

1. Gene Expression ダイアログボックスの右側のペインで、サンプルが X-Axis ドロップダウンリストに表示されていることを確認します。
2. グラフのツールで、Color Settings（色設定）を選択します。

Color Settings ダイアログボックスが表示されます。



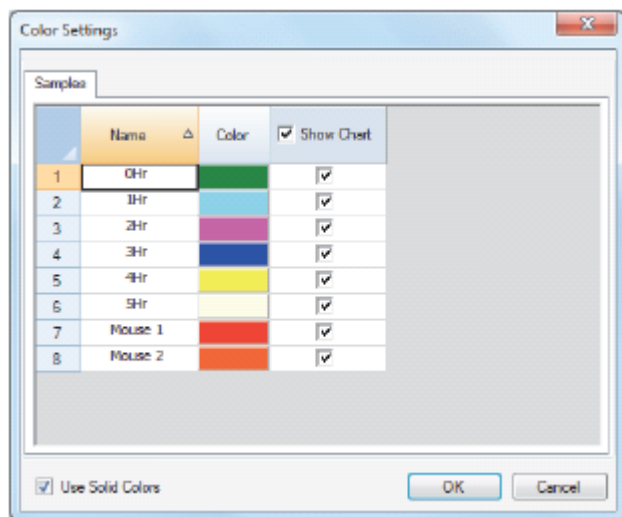
3. ターゲットの表示色を変更するには、Color カラム内でその色をクリックします。
4. 表示される Color ダイアログボックスで新しい色を選択し、OK をクリックします。
5. ターゲットを遺伝子発現グラフから削除するには、Show Chart カラムの該当するチェックボックスを解除します。

アドバイス：すべてのターゲットを解除するには、カラムの見出しにある Show Chart を解除します。

6. （任意）デフォルトでは、バーが固定色で表示されます。バーをグラデーション色で表示するには、Use Solid Colors を解除します。
7. OK をクリックして変更を保存し、Gene Expression タブに戻ります。

サンプルの色設定の変更方法

1. Gene Expression ダイアログボックスの右側のペインで、X-Axis ドロップダウンリストにターゲットが表示されていることを確認します。
2. 196 ページの「ターゲットの色設定の変更方法」の手順を実行してください。



グラフ画面の変更

現在のグラフ画面の変更方法

- ▶ ターゲット画面に関するツールバーメニューのコマンドを選択します。

注意： Gene Expression タブは常に開いており、最後に選択した画面にデータを表示します。

はずれ値のデータポイントの除外

ドットプロットグラフでは、はずれ値を容易に表示でき、また解析から除外することができます。

はずれ値のデータポイントの除外方法

- ▶ ドットプロットグラフのターゲットはずれ値を右クリックし、Exclude Well from Analysis を選択します。

データポイントがドットプロットグラフから削除され、ウェルは Quantification タブ画面のウェルセクター内でグレー表示に変わります。

除外されたはずれ値データポイントを含める方法

- ▶ Quantification タブ画面のウェルセクター内のウェルを右クリックし、Well > Include in Analysis を選択します。

グラフの注釈

データを明確に伝えるため、矢印、丸、およびテキストをそれぞれの棒グラフに加えることができます。注釈は棒グラフと共に保存され、エクスポートファイルや印刷ファイルに表示されます。しかし、1つのグラフ画面について作成された注釈は、他のグラフ画面には追加されません。

グラフに矢印または丸を描画する方法

1. 棒グラフのツールバーで、特定のツールをクリックします。
2. 棒グラフをクリックし、必要に応じてグラフ内にカーソルをドラッグします。

グラフにテキストを追加する方法

1. 棒グラフのツールバーの Add Text をクリックします。
2. 棒グラフをクリックすると、その場所にテキストボックスが表示されます。
3. テキストボックスにテキストを入力します。
4. グラフ内のどこかをクリックしてテキストボックスを終了します。

アドバイス：テキストボックスの複数の行を追加するには、Enter キーを押してください。

注釈の移動方法

1. 注釈の上にカーソルを重ねます。アイコンが指差し形状に変わり、注釈の縁が強調表示されます。
2. 注釈をクリックしたまま別の位置までドラッグします。
3. クリックを解除して注釈をその位置に固定します。

注釈の取り消し方法

- ▶ Undo をクリックします。

最も新しく追加した注釈が削除されます。

アドバイス：新しく追加した注釈は、1 個ずつ、最大 10 個まで取り消すことができます。

注釈の再実行方法

- ▶ Redo をクリックします。

最も新しく削除した注釈が再び戻ります。

アドバイス：新しい注釈は、1 個ずつ最大 10 個まで再実行することが可能です。

注釈の削除方法

- ▶ 注釈を右クリックし、Delete を選択します。

遺伝子発現データの調整

解析モードの選択後、Gene Expression タブ画面の右側のペインにある設定オプションを変更して、表示データを調整します。

Graph Data (グラフデータ)

Y 軸の値を線形目盛りに設定し、グラフデータのオプションを有効にします。グラフデータのオプションでは、以下のオプションのいずれかでグラフのデータを表示することができます。

- **Relative to control (対照との相対)** — 座標軸を 0 から 1 へスケール変更したデータグラフ。実行したランで対照 (control) を割り当てた場合には、このオプションを選択してターゲット遺伝子のアップレギュレーションとダウンレギュレーションを迅速に視覚化します。
- **Relative to zero (ゼロとの相対)** — ゼロを基点とするデータグラフ。

アドバイス : User Preferences ダイアログボックスの Gene Expression タブでグラフデータオプションを設定します。

Analyze Using (解析に使用)

CFX Maestro ソフトウェアでは、遺伝子発現計算を実施するためにプレート設定に示される各独立変数を自動的に考慮します。しかし、解析設定を変更することにより、使用する変数を指定することが可能です。たとえば、プレート設定に生物学的グループとサンプルが含まれる場合、サンプルデータのみ、生物学的グループデータのみ、サンプルと生物学的グループデータ、または生物学的グループとサンプルデータを選び、棒グラフに結果を表示できます。

注意 : Use biological groups for analysis (解析に生物学的グループを使用) チェックボックスは、データが生物学的グループを含む場合にのみ有効です。データに生物学的グループが含まれる場合、チェックボックスは初期設定では選択されていないため、棒グラフにはサンプルデータしか表示されません。

解析の変更方法

- ▶ Analyze Using セクションで、User biological groups for analysis チェックボックスを選択・解除します。

グラフに特定データを表示する方法

- ▶ Graph View ドロップダウンリストから、以下のオプションのいずれかを選択します。
 - **Samples Only (サンプルのみ)**
 - Use biological groups for analysis チェックボックスを選択していない場合、ターゲットごとにサンプルのみが計算に使用されます。
 - Use biological groups for analysis チェックボックスを選択している場合、CFX Maestro ソフトウェアはサンプルと生物学的グループをそれぞれ独立して正規化します。グラフには、各生物学的グループについて平均化された正規化サンプルデータが表示されます。

- Biological Groups Only (生物学的グループのみ)
 - Use biological groups for analysis チェックボックスを選択していない場合、ターゲットごとに生物学的グループのみが計算に使用されます。
 - Use biological groups for analysis チェックボックスを選択している場合、CFX Maestro ソフトウェアはサンプルと生物学的グループをそれぞれ独立して正規化します。グラフには、各サンプルについて平均化された正規化生物学的グループデータが表示されます。
- Sample Biological Group (サンプル 生物学的グループ) — 各ターゲットについて、CFX Maestro ソフトウェアは対照として使用する最小 C_q 値を探します。各ターゲットの対照を基準としてサンプルと生物学的グループの相対量を計算し、その後、正規化発現を計算します。グラフには、同様のサンプルがそれぞれの生物学的グループと相互に隣り合わせて並べられます。
- Biological Group Sample (生物学的グループ サンプル) — 各ターゲットについて、CFX Maestro ソフトウェアは対照として使用する最小 C_q 値を探します。各ターゲットの対照を基準として生物学的グループとサンプルの相対量を計算し、その後、正規化発現を計算します。グラフには、同様の生物学的グループがそれぞれのサンプルと相互に隣り合わせて並べられます。

Control (対照)

注意: 一度に 1 対照のみ選択できます。Experiment Settings ダイアログボックスで対照を選択した場合、Control ドロップダウンリストにはデフォルトでその対照が表示されます。Experiment Settings ダイアログボックスで複数の対照を選択すると、Control ドロップダウンリストには何も表示されません。別の対照を Control ドロップダウンリストから選択でき、選択すると Experiment Settings ダイアログボックスの対照設定は自動的に更新されます。

すべてのターゲットの相対量を正規化するための対照のタイプを選択します。

- サンプルのみを使用して解析する場合、Control ドロップダウンリストには実験に使用するすべてのサンプルが表示されます。
- 生物学的グループのみを使用して解析する場合、Control ドロップダウンリストには実験に使用するすべての生物学的グループが表示されます。
- Sample Biological Group または Biological Group Sample のいずれかを使用して解析する場合、Control ドロップダウンリストには Not Available (使用不可) と表示されます。正規化に使用する特定の対照を選択することはできません。

アドバイス: 対照を None (なし) (サンプルと生物学的グループで使用可能) または Not Available (使用不可) に設定することにより、スケーリングオプションが有効になり、ここではデータを Average (平均)、Lowest (最低)、Highest (最高)、または Unscaled (非基準化) としてスケーリング可能です。

Annotate P-Values (P 値の注釈) および P 値閾値

Annotate P-Values (P 値の注釈) を選択すると、ソフトウェアでは、選択した閾値よりも P 値が低い場合にターゲットを上回る棒グラフにアスタリスク (*) を表示します。ソフトウェアは標準の t 検定を使用してサンプルの発現レベルを選択した対照サンプルの発現レベルと比較することにより、自動的に P 値を算定します。P 値の閾値範囲は、0.000~1.000 です。

X-Axis (X 軸オプション)

x 軸オプションでは、遺伝子発現グラフの x 軸データを選択できます。

- **Target (ターゲット)** — ターゲット名を x 軸に表示します。
- **Sample (サンプル)** — サンプル名を x 軸に表示します。

Y-Axis (Y 軸オプション)

Y 軸オプションでは、以下の 3 つのスケールのいずれかで遺伝子発現グラフを表します。

- **Linear (線形)** — このオプションは線形スケールを表します。

アドバイス : y 軸を Linear に設定すると、Graph Data ドロップダウンリストが有効になり、ここから Relative to control のデータまたは Relative to zero のデータをグラフにすることができます。

- **Log 2 (対数 2)** — このオプションは広範なダイナミックレンジでサンプルを評価します。
- **Log 10 (対数 10)** — このオプションは極めて広範なダイナミックレンジでサンプルを評価します。

Scaling (スケーリングオプション)

Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta C_q$) を選択し、Control Sample を None に設定して、遺伝子発現グラフのスケーリングオプションを有効にします。以下のスケーリングオプションのいずれかを選択して、実行するラン設計に最適な方法でデータを算定・表示します。

- **Unscaled (非基準化)** — 非基準化の正規化遺伝子発現を示します。
- **Highest (最高)** — 各サンプルの発現レベルを全サンプルにおける最高発現レベルで除算することにより、各ターゲットで最高レベルとなる正規化遺伝子発現をスケール化します。
このスケーリングオプションでは、最高レベルにスケール化される計算式が適用されます。
- **Lowest (最低)** — 各サンプルの発現レベルを全サンプルにおける最低発現レベルで除算することにより、各ターゲットの正規化遺伝子発現をスケール化します。
このスケーリングオプションでは、最低レベルにスケール化される計算式が適用されます。
- **Average (平均)** — 各サンプルの発現レベルを全サンプルの発現レベルの幾何平均で除算することにより、各ターゲットの正規化遺伝子発現をスケール化します。

このスケーリングオプションでは、平均にスケール化される計算式が適用されます。

Error Type (誤差タイプ)

遺伝子発現グラフにおいて、誤差タイプ (エラーバー) の計算のオプションを選択します。

- 平均標準誤差 (デフォルト、SEM)
- 標準偏差 (Std Dev)

Chart Error Bar Multiplier (グラフのエラーバー乗数)

遺伝子発現グラフのエラーバーの乗数を選択します。 ± 1 (デフォルト)、2、または3の整数のうちのいずれかを選択してください。以下の誤差タイプを選択すると、乗数のタイプが変更されます。

- 平均標準誤差として SEM
- 標準偏差として Std Dev

Experiment Settings (実験の設定)

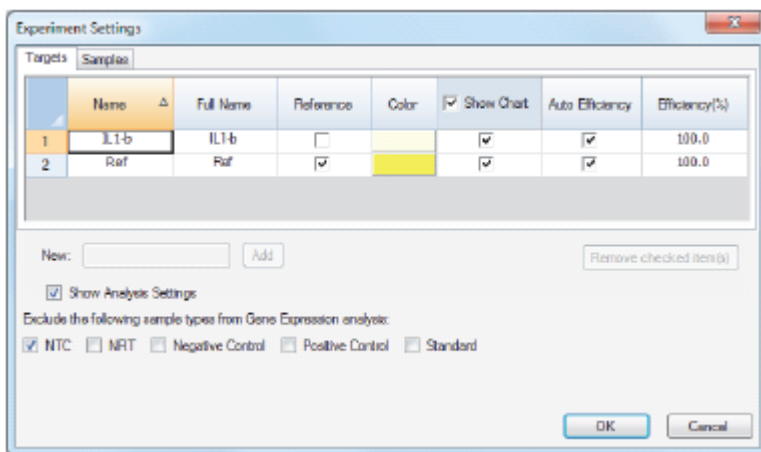
アドバイス: このダイアログボックスは Plate Editor でも使用できます。詳細については、109 ページの「[Experiment Settings の変更](#)」を参照してください。

Experiment Settings ダイアログボックスでは、ターゲットやサンプルのリストの表示または変更が可能であり、さらにリファレンス遺伝子や対照サンプルを選ぶことができます。

Experiment Settings ダイアログボックスの開き方

- ▶ Graphing タブ画面で、右側のペイン下部にある Experiment Settings をクリックします。

Experiment Settings ダイアログボックスが現れ、Targets タブが表示されます。



Targets 設定の調整方法

- ▶ Targets タブで、以下を行います。
 - 遺伝子発現データ解析用のリファレンスとしてターゲットを選択するには、Reference カラム内の名称を選択します。
注意: リファレンス遺伝子として複数のターゲットを選択できます。しかし、すべてのターゲットをリファレンス遺伝子として選択すると、ソフトウェアでは正規化遺伝子発現を実施できません。
 - ターゲットの色を変更するには、Color カラム内の該当するセルをクリックし、表示される Color ダイアログボックスで色を変更します。
色の変更が、遺伝子発現グラフに表示されます。

- 以前得られた効率値を使用するには、Auto Efficiency カラム内のターゲットのチェックボックスを解除し、ターゲットの効率割合の数値を入力します。

ソフトウェアでは、ターゲットのデータに検量線が含まれる場合には、Auto Efficiency を使用してターゲットの相対効率が計算されます。

Sample 設定の調整方法

- ▶ Samples タブで以下を行います。
 - 遺伝子発現データ解析用の対照サンプルを選択するには、その名称を Control カラムから選びます。

重要：ウェルグループごとに選択できる対照は1つだけです。複数の対照を選択すると、ソフトウェアは棒グラフデータに対照サンプルとして「None（なし）」と表示します。棒グラフのこの設定を変更するには、Control ドロップダウンメニューから対照サンプルを選択してください。

- サンプルの色を変更するには、Color カラム内の該当セルをクリックし、表示される Color ダイアログボックスで色を変更します。

色の変更は、遺伝子発現グラフに表示されます。

- サンプルを遺伝子発現グラフに表示するには、Show Chart カラム内で選択します。

サンプルは Color カラムで選択した色でグラフに表示されます。

- サンプルを遺伝子発現グラフから削除するには、Show Chart カラム内で解除します。

アドバイス：サンプルの名称は Results（結果）表に残ります。

サンプルタイプを解析計算から除外する方法

- ▶ Experiment Settings ダイアログボックスの下部で該当するチェックボックスを選択します。

右クリックメニューのオプション

遺伝子発現グラフを右クリックすると、表 27 の項目を選択できます。

表27 遺伝子発現グラフの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	グラフをクリップボードにコピーします。
Save Image As	グラフを画像ファイルとして保存します。画像の解像度と寸法を設定し、ファイルタイプ（PNG、GIF、JPG、TIF または BMP）を選択します。
Page Setup	印刷用のページ設定を選択します。
Print	グラフを印刷します。
Set Scale to Default	Show All（すべて表示）により、すべてのデータが棒グラフに表示されず、Scroll Bar（スクロールバー）により、グラフのフレームに表示するサンプルが多すぎる場合にはスクロールバーを表示し、その一方でバーの幅を最小限に維持します。
Chart Settings	Chart Settings ウィンドウを開きグラフを調整します。

表 27 遺伝子発現グラフの右クリックメニュー項目（つづき）

項目	機能内容
Sort	グラフの x 軸に表示されるサンプルまたはターゲットの順番を並べ替えます。
Color Settings	Color Settings ウィンドウを開きます。ここではグラフの表示に応じてグラフ内のターゲットまたはサンプルの色を変更できます。
User Corrected Std Devs	補正した標準偏差式を使用してエラーバーを算定します。
Use Solid Bar Colors	グラフを固定色のバーで表示します。
X-Axis Labels	x 軸のラベルを水平に、または角度を付けて表示します。

データスプレッドシート

表 28 はグラフ化したデータスプレッドシートに表示されるデータを定義します。

注意：データスプレッドシート内の値は、グラフタイプと右側のペインで選択される設定に基づき算定されます。

表 28 グラフのタブのスプレッドシート内の情報の説明

項目	説明
Target	Experiment Settings ウィンドウで選択したターゲット名（増幅遺伝子）
Sample	Experiment Settings ウィンドウで選択したサンプル名
Control	Experiment Settings ウィンドウでサンプル名を対照として選択した場合の対照サンプル
Expression	選択したモードにより、正規化遺伝子発現 ($\Delta\Delta C_q$) または相対量 (ΔC_q) のいずれか。 重要： データに生物学的グループが含まれ Use biological groups for analysis チェックボックスが選択されている場合、ソフトウェアは、全生物学的グループの重み付き平均を得るために各生物学的グループの発現を平均化したものとして Expression（発現）値を算定します。
Expression SEM（または SD）	選択したオプションにより、平均標準誤差 (SEM) または標準偏差 (SD) のいずれか。
Corrected Expression SEM（または SD）	選択したオプションにより、相対発現の SEM または SD の補正值計算。
Mean C_q	C_q の平均
C_q SEM（または SD）	選択したオプションにより、 C_q の標準誤差 (SEM) または標準偏差 (SD) のいずれか
P-Value	選択したターゲットの発現の差が有意である確率 注意： 棒グラフで報告される P 値は、選択している対照に基づきます。P 値がユーザー指定の閾値未満であるグラフに注釈をつけることが可能です。

Show Details（詳細情報の表示）オプション

表 29 は、Show Details が遺伝子発現グラフのスプレッドシートの右クリックメニューから選択された場合に表示されるデータを定義します。

表29 Show Details が選択された棒グラフのスプレッドシートの情報

情報	説明
Data Set	データファイル内の 1 つの蛍光色素による蛍光データ
Relative Quantity	算定されたサンプル相対量
Relative Quantity SD	算定された相対量の標準偏差
Corrected Relative Quantity SD	補正された相対量について算定された標準偏差
Relative Quantity SEM	算定された相対量の平均標準誤差
Corrected Relative Quantity SEM	補正された相対量について算定された平均標準誤差
Unscaled Expression	算定された非基準化発現
Unscaled Expression SD	算定された非基準化発現の標準偏差
Corrected Unscaled Expression SD	算定された非基準化発現の標準偏差（補正済）
Unscaled Expression SEM	算定された非基準化発現の平均標準誤差
Corrected Unscaled Expression SEM	算定された非基準化発現の平均標準誤差（補正済）
Expression	選択したモードにより、正規化遺伝子発現または相対量発現レベルのいずれか
Expression SD	選択したモードの標準偏差
Corrected Expression SD	選択したモードについて算定された標準偏差
Expression SEM	選択したモードの平均標準誤差
Corrected Expression SEM	選択したモードについて算定された平均標準誤差
Wells	プレート内のウェル番号
Mean C _q	C _q の平均
C _q SD	C _q の標準偏差
C _q SEM	C _q の平均標準誤差
P-Value	選択したターゲットのサンプル発現の差が有意である確率

Clustergram (クラスタグラム)

クラスタグラムでは、異なるターゲットやサンプルの発現の類似度に基づき、データを階層構造で表示します。

注意: 棒グラフ用の相対発現以外のデータプロットを表示するため、標準ターゲットを選択する必要があります。

クラスタグラムの画像は、以下のようにサンプルまたはターゲットの相対発現を示します。

- アップレギュレーション (赤) — 高発現
- ダウンレギュレーション (緑または青) — 低発現
- レギュレーションなし (黒)
- 算出値なし (黒地に白のx印)

色の色合いが明るいほど、相対発現の差がより大きいことを示します。正規化 C_q 値が算出されていない場合、四角部分が黒字に白のx印になります。

データプロットの外縁は、クラスタ階層を示す樹状図になります。類似の発現パターンのターゲットまたはサンプルが隣り合った枝を持つ一方で、類似しないパターンの場合はより離れた位置になります。

設定

以下のオプションを設定できます。

- Cluster By (クラスタ方法) — ターゲット、サンプル、両方、もしくは無しから選びます。
- Size (サイズ) — スライダーを使用して、明瞭化するために画像サイズを調整しグラフの拡大率を変更します。
- Split Out Replicates (リプリケートの分割) — 個々のリプリケートの値を表示します。

アドバイス: クラスタグラム、散布図、ヒートマップ、および Volcano プロットのカラースキムは各グラフの右クリックメニューにあるオプションを選択することにより、初期設定の Red/Green (赤/緑) から Red/Blue (赤/青) に変更できます。

右クリックメニューオプション

クラスタグラムの右クリックメニューオプションは、棒グラフの場合と同じです。使用可能なオプションについては、203 ページの表 27 を参照してください。さらに、ダウンレギュレーションの発現をグラフ上で初期設定の Red/Green (赤/緑) から Red/Blue (赤/青) に変更するには Color Scheme を選択してください。

データスプレッドシート

スプレッドシートには、ターゲット、サンプル、および正規化発現の値が表示されます。

Scatter Plot (散布図)

散布図には、対照 vs. 実験サンプルでのターゲットの正規化発現が表示されます。

散布図の画像は、閾値セットに基づくターゲット遺伝子発現の以下の変化を示します。

- アップレギュレーション (赤丸) — 相対的に高発現
- ダウンレギュレーション (緑または青丸) — 相対的に低発現
- 変化なし (黒丸)

閾値線をクリック&ドラッグして、レギュレーションの閾値を調整します。

設定

以下のオプションを設定できます。

- Control Sample (対照サンプル)
- Experimental Sample (実験サンプル)
- Regulation Threshold (レギュレーション閾値)

この値を増加または減少すると、プロット内の閾値線が適切に移動します。

右クリックメニューオプション

散布図の右クリックメニューオプションは、棒グラフの場合と同じです。使用可能なオプションについては、203 ページの表 27 を参照してください。追加として以下があります。

- Symbol (記号) — このオプションを選択すると、プロットに使用する記号を初期設定の丸から以下のいずれかへ変更できます。
 - 三角
 - 十字
 - 四角
 - ひし形
- Color Scheme (カラースキム) — このオプションを選択すると、グラフのダウンレギュレーションの発現を初期設定の Red/Green (赤/緑) から Red/Blue (赤/青) に変更できます。

データスプレッドシート

スプレッドシートには、ターゲットの値と、対照サンプルと実験サンプルの正規化発現が表示されます。また、閾値設定と比較してターゲットがアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションしているかどうかを示します。

Volcano プロット

Volcano プロットには、対照 vs. 実験サンプルでのターゲットの発現（レギュレーション）の変化とP値を基にした有意差の程度が表示されます。

プロットの画像は、閾値設定に基づくレギュレーションの以下の変化を表示します。

- アップレギュレーション（赤丸） — 高発現
- ダウンレギュレーション（緑または青丸） — 低発現
- 変化なし（黒丸）

閾値線をクリック&ドラッグしてレギュレーションの閾値を調整します。

設定

以下のオプションを設定できます。

- Control Sample（対照サンプル）
- Experimental Sample（実験サンプル）
- Regulation Threshold（レギュレーション閾値）
- P-Value Threshold（P値閾値）

Regulation Threshold または P-Value Threshold の値を増加または減少すると、プロットの閾値線が適切に移動します。

右クリックメニューオプション

Volcano プロットの右クリックメニューオプションは、棒グラフの場合と同じです。使用可能なオプションについては、203 ページの表 27 を参照してください。追加として以下があります。

- Symbol（記号） — このオプションを選択すると、プロットに使用する記号を初期設定の丸から以下のいずれかへ変更できます。
 - 三角
 - 十字
 - 四角
 - ひし形
- Color Scheme（カラースキム） — このオプションを選択すると、グラフのダウンレギュレーションの発現を初期設定の Red/Green（赤/緑）から Red/Blue（赤/青）に変更できます。

データスプレッドシート

スプレッドシートには、ターゲット、サンプル、レギュレーション、およびP値の値が表示されます。また、P値が閾値を超えるかどうか、閾値設定と比較してアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションしているかどうかを示します。

ヒートマップ

ヒートマップは、相対的正規化発現に基づき対照サンプルと比較した実験サンプルのターゲットのレギュレーションとそのプレート上の位置を視覚的に描写します。

ヒートマップ下の凡例は、正規化発現の範囲を表示し、これは以下に対応します。

- アップレギュレーション（赤丸） — 高発現
- ダウンレギュレーション（緑または青丸） — 低発現
- 変化なし（黒丸）

色の色合いが明るいほど、相対的正規化発現の差が大きくなります。正規化発現値が算出されていない場合には、四角部分が黒地に白の×印で表示されます。

設定

以下のオプションを設定できます。

- Control Sample（対照サンプル）
- Experimental Sample（実験サンプル）
- Size（サイズ） — グラフの拡大率を変更するため、スライダーを使用して画像サイズを調整できます。
- Split Out Replicates（リプリケートの分割） — 個々のリプリケートの値を表示します。

右クリックメニューオプション

ヒートマップの右クリックメニューオプションは棒グラフの場合と同じです。使用可能なオプションについては 203 ページの表 27 を参照してください。さらに、Color Scheme（カラースキム）を選択すると、グラフのダウンレギュレーションの発現を初期設定の Red/Green（赤／緑）から Red/Blue（赤／青）に変更できます。

データスプレッドシート

スプレッドシートには、ターゲット、サンプル、およびレギュレーションの値が表示されます。

Well Results（ウェル結果）スプレッドシート

Well Results スプレッドシートは、すべてのグラフのウェルデータをまとめています。表 30 は、Well Results スプレッドシートに表示されるデータを定義します。

注意： Well Results 表のデータは個々のウェルを基に計算されます。

表30 Results タブの情報

情報	説明
Target	ターゲット名（増幅遺伝子）
Sample	サンプル名
Mean C _q	C _q の平均
Mean Efficiency Corrected C _q	反応効率の調整後の C _q の平均
Normalized Expression	リファレンスターゲットに正規化したターゲット発現（ $\Delta\Delta C_q$ ）
Relative Normalized Expression	対照サンプルと比較した正規化発現。Fold Change（倍率変化）とも呼称。
Regulation	対照サンプルと比較した発現における変化。
Compared to Regulation Threshold	閾値設定に基づく実験サンプルのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション
P-Value	発現の差が有意である確率
	注意： P 値は、対照サンプル vs. 試験サンプルについてウェルごとの正規化発現（NE）値の分布を比較する独立 t 検定の結果です。
Exceeds P-Value Threshold	閾値を超えたターゲットの P 値であるかどうかを表示

注意： リプリケートのデータは、Split Out Replicates が選択されているデータ解析タブ（すなわち、クラスタグラムとヒートマップ）のスプレッドシートにのみあります。棒グラフで対照サンプルとして none（無し）を選択すると、遺伝子発現解析スプレッドシートの発現データ間に矛盾が生じる可能性があります。

ANOVA 計算

ANOVA タブ画面には、分散 (ANOVA) の一元配置または二元配置解析の結果が表示されます。ANOVA は、2 つ以上の因子 (独立変数) の平均が等しいという仮定について試験します。帰無仮説では、すべての因子の平均が等しいとし、その一方で代替的な仮説では少なくとも 1 つの因子レベルの平均は異なるとしています。

一元配置 ANOVA は、1 つの因子に基づき複数の個体群平均を比較します。二元配置 ANOVA は、2 つの因子 (2 つの独立変数) に基づき複数の個体群平均を比較します。

ANOVA データは、均衡がとられるか (同数の観測結果がある)、または不均衡 (観測数が等しくない) になります。

不均衡な場合を対処するため、平方和を計算する以下の 3 つのアプローチを採用します (Fox, 2008)。

■ タイプ I (階層的アプローチ)

タイプ I では、因子 A の主な効果を試験した後に、A の主な効果が生じた後の因子 B の主な効果を試験し、さらに主な効果を生じた後の相互作用の効果 AB を試験します。

- 因子 A の SS(A)
- 因子 B の SS(B | A)
- 相互作用 AB の SS(AB | B, A)

■ タイプ II (従来の実験アプローチ)

タイプ II では、他の主な効果が生じた後のそれぞれの主な効果について試験します。相互作用がない場合には、タイプ II はタイプ III よりも統計的に強力です。

- 因子 A の SS(A | B)
- 因子 B の SS(B | A)

■ タイプ III (完全回帰アプローチ)

このタイプでは、他の主な効果と相互作用が生じた後の主な効果の存在について試験します。このアプローチは、有意な相互作用が存在する場合に有効です。

- 因子 A の SS(A | B, AB)
- 因子 B の SS(B | A, AB)

注意: データの均衡がとられると、すべてのタイプで同じ結果を生じます。

CFX Maestro ソフトウェアを使用すると、実験データセットに対して一元配置および二元配置の ANOVA を実施できます。CFX Maestro ソフトウェアは、平均が相互に著しく異なる場合の ANOVA 試験の Tukey HSD 事後結果を自動的に得て、Bonferroni 法と Benjamini-Hochberg 法の調整を使用して family-wise error rate (FWER) を得ます。

不均衡な二元配置 ANOVA の結果について、CFX Maestro ソフトウェアはまず、タイプ III のアプローチを使用して ANOVA を計算します。相互作用が有意でない場合には、タイプ II のアプローチを使用して ANOVA を計算します。

注意： 不均衡な一元配置 ANOVA データセットは、平方和の結果に影響を及ぼしません。したがって、平方和に対処するためのアプローチはしません。

CFX Maestro ソフトウェアは以下の R パッケージを使用して ANOVA を実施し、不均衡なデータ結果を処理します。

- car (companion to applied regression)
- lsmeans (least-square means)

設定

以下のオプションを設定できます。

- ANOVA
 - 一元配置 ANOVA
 - 二元配置 ANOVA
- 独立変数 (一元配置 ANOVA を選択した場合にのみ使用可能)
 - サンプル
 - 生物学的グループ
- 従属変数
 - C_q
 - 発現レベル
- P 値閾値

ドロップダウンリストから値を選択します。

ANOVA の計算

ANOVA タブを初めて選択すると、CFX Maestro ソフトウェアは以下の初期設定を使用して一元配置 ANOVA を自動的に計算し、結果表にデータを表示します (213 ページの表 31 を参照)。

- 独立変数 : Sample (サンプル)
- 従属変数 : C_q
- P 値閾値 : 0.05

成功すると、データは下部のペインの Results 表にある ANOVA タブ画面に表示されます。

注意: ANOVA を実施できない場合、ソフトウェアは Errors タブを自動的に表示します。ここには、ANOVA 解析で報告されるエラーとして考えられる理由が示されます。

設定を変更するか、または二元配置 ANOVA を選択して、結果を再計算できます。.pcrd ファイルを終了すると、CFX Maestro ソフトウェアは変更と結果を保存します。

ANOVA の再計算方法

- ▶ ANOVA タブの上部ペインで新しいオプションを選択し、Not current をクリックします。再計算をクリックします。

このファイルを次回開いて ANOVA タブを選択すると、CFX Maestro ソフトウェアは保存済みの設定を使用して ANOVA を再計算します。

R スクリプトのエクスポート

ANOVA の計算後、結果と R スクリプトをエクスポートし、スタンドアロン R アプリケーションで.r ファイルを開くことができます。.r スクリプトには、car パッケージと lsmeans パッケージが必要です。エクスポートする.r スクリプトには、必要なパッケージのコードが含まれ、スタンドアロン R アプリケーションにインストールされていない場合にはインストールします。

R スクリプトのエクスポート方法

- ▶ ダイアログボックスの右上隅にある Export R Script をクリックし、表示される Save As ダイアログボックスに.r ファイルの名称と位置を入力します。

結果の表

ANOVA のデータは結果表のタブに表示されます。表 31 は、表の各タブのカラムを定義します。

表31 ANOVA 結果表のカラムの説明

タブ	見出し	説明
ANOVA	Target	PCR で増幅される対象の遺伝子／領域
	Source	<p>変化が派生する場所を説明します。以下の3つのソースが使用されます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Within groups (グループ内) — グループ (たとえば、サンプルまたは生物学的グループ) 内の変動性を参照 ■ Between groups (グループ間) — (二元配置 ANOVA のみで使用) 対象 (たとえば、サンプル生物学的グループ) の因子による変動性を参照 ■ Residuals (残差) — 解析における独立変数の結果として変動性を考慮した後の従属変数における変動性の差の数値を参照。残差値が小さいほど、独立変数と従属変数の関連性が強い。

表 31 ANOVA 結果表のカラムの説明 (つづき)

タブ	見出し	説明
	Sum of squares	<p>ソースによる平方和 (グループ間または因子、グループ内または誤差、合計または全変動) :</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ within mean squares (平均平方の範囲内) を計算するために within sum of squares (平方和の範囲内) (グループ内) を使用する。within sum of squares をその自由度 (df) で除算すると、within mean square (平均平方の範囲内) に等しくなる。 ■ between mean squares (平均平方の間) を計算するために between sum of squares (平方和の間) (グループ間) を使用する。between mean squares は、between sum of squares をその df で除算した値に等しい。
	df	最終的な計算で変動しても差し支えない値の個数
	Mean square	<p>ソースによる平均平方和:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ within mean square (平均平方の範囲内) (グループ内) は、複数のサンプル内のすべての平方和の平均に基づく母集団分散の推定値。 ■ between mean square (平均平方の間) (グループ間) は、サンプル平均の平方和にサンプルサイズを乗じた値に基づく母集団分散の推定値。
	F statistic	グループ平均が著しく異なるかどうかを評価する。平均平方の回帰和の平均平方和の誤差に対する比率。
	P-Value	<p>帰無仮説が真であると仮定し、帰無仮説が拒絶される最小限の有意度 (観測される有意度)。</p> <p>注意: この表の P 値は、F 統計値に基づき、全体として平均値間に差異があるかどうかを示します。ANOVA の P 値が有意である場合、事後 Tukey HSD (Honest Significant Difference) 検定を使用してどのペアが P 値で示される有意差を示すかを判定します。</p>
Tukey HSD (テューキー-HSD)		
	Target	PCR により増幅される対象の遺伝子/領域
	Variable (二元配置 ANOVA の場合のみ)	平均値の差 (サンプルまたは生物学的グループ) の比較に使用する独立変数。結果が Contrast カラムに表示される。
	Contrast	比較される独立変数の個々のセット
	Mean difference	2 つの独立変数間の平均値の差

表 31 ANOVA 結果表のカラムの説明 (つづき)

タブ	見出し	説明
	Std. Error	平均の標準誤差は、サンプル平均の標準偏差
	P-Value	帰無仮説が真であると仮定し、帰無仮説が拒絶される最小限の有意度 (観測される有意度)。
	P-Value Bonferroni	複数の比較における問題を抑制するために P 値に適用されるタイプの補正法。
	P-Value BH	P 値 Benjamini-Hochberg 法。複数の比較における問題を抑制するために P 値に適用される別のタイプの補正法。
	Lower Bound (X %)	所定の確率で確信間隔が真の母平均を含むことになる、確信間隔に関連する下限値。
	Upper Bound (Y %)	所定の確率で確信間隔が真の母平均を含むことになる、確信間隔に関連する上限値。
Descriptives		
	Target	PCR により増幅される対象の遺伝子/領域
	Factor (一元配置 ANOVA の場合のみ)	平均値の差を比較するために ANOVA の計算で使用される独立変数
	Sample (二元配置 ANOVA の場合のみ)	実験サンプル、またはサンプルの識別用特性
	Biological Group (二元配置 ANOVA の場合のみ)	同じ処理または条件を備えた同様のサンプルのグループ
	Count	実験サンプルの個数
	Mean	各ターゲット-因子の組み合わせについて実施される N 個の比較の、従属変数の平均値
	Std. Deviation	各ターゲット-因子の組み合わせについて実施される N 個の比較の、従属変数の標準偏差
Errors		
	Message	ANOVA 解析で報告されるエラーの理由

右クリックメニューオプション

ANOVA の結果のグラフに関する右クリックメニューオプションは、棒グラフの場合と同じです。使用可能なオプションについては、203 ページの表 27 を参照してください。

Gene Study (Gene Study)

インターランキャリブレーターを用いて複数のリアルタイム PCR 実験による遺伝子発現データを比較する Gene Study を作成することにより、各実験間で正規化を行います。複数のデータファイル（拡張子は.pcrd）からのデータを Gene Study に加えて Gene Study を作成します。ソフトウェアはこれらのデータをまとめて 1 つのファイル（拡張子は.mgxd）とします。

注意： Gene Study で解析できる最大サンプル数は、コンピュータの RAM や仮想メモリのサイズによって制限されます。

インターランキャリブレーション

インターランキャリブレーションは、個別のリアルタイム PCR ラン（すなわち、異なるプレートより生成された、異なる.pcrd ファイル）でアッセイされたターゲット間のラン間変動を補正するための各ターゲットでのすべての Gene Study で自動的に適用されます。

サンプルをインターランキャリブレーターとしてソフトウェアが認識するためには、ターゲット名、サンプル名、およびもし使用していれば生物学的セット名が比較するすべてのプレートにまたがって合致している必要があります。

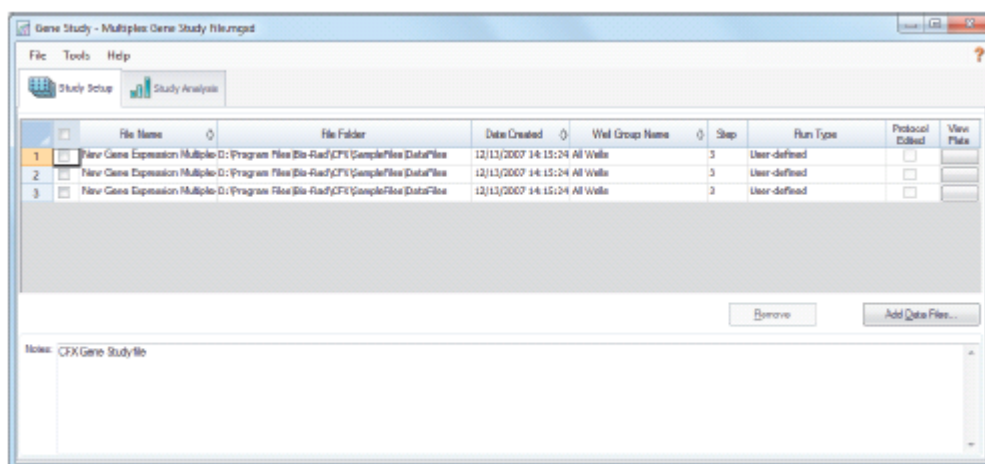
注意： 少なくとも 1 つのインターランキャリブレーターサンプルは、インターランキャリブレーションのための Gene Study では必要です。適切なインターランキャリブレーターサンプルのないターゲットは、Gene Study での補正なしで処理されることとなります（非推奨）。

インターランキャリブレーターは、以下の 2 つの方法で適用されます。

- ターゲットごと — 異なる PCR プライマーは異なる効率を備えています。デフォルトでは、インターランキャリブレーターは、同じターゲット名を持つ同じプレートのすべてのウェルに適用されます（たとえば、同じアッセイで生成される C_q）。
- 研究全体 — 1 つのインターランキャリブレーターがユーザーによって選択され、Gene Study 全体に適用されます。

詳細については、バイオ・ラッド社の技術サポートまでご連絡ください。

Gene Study ダイアログボックス



Gene Study ダイアログボックスには以下の2つのタブが含まれます。

- **Study Setup タブ** — Gene Study のランを管理します。

重要 : Gene Study 内のデータファイルの追加または削除によって、元のファイルのデータは変更されません。

- **Study Analysis タブ** — 組み合わせランの遺伝子発現データを表示します。

Study Setup タブ

表 32 は Study Setup タブに表示されるデータを定義します。

表32 Gene Study ダイアログボックスの Study Setup タブ

カラムのタイトル	説明
File Name	ランのデータファイルの名称 (拡張子は.pcrd)
File Folder	Gene Study の各ランのデータファイルを格納するディレクトリ
Date Created	ランデータが収集された日付
Well Group Name	ファイルを Gene Study に追加したときに選択したウェルグループの名称
Step	アドバイス : Gene Study 内の1つのウェルを解析するには、データファイルを Gene Study にインポートする前に Data Analysis ウィンドウで該当するウェルグループを選択する必要があります。 リアルタイム PCR データを収集するためプレートリードを含むプロトコルステップ
Run Type	ユーザー定義または PrimePCR ランのいずれか
Protocol Edited	これを選択すると、PrimePCR ランに使用されるプロトコルが編集されたことを示します。
View Plate	Gene Study に含まれる各ランのデータと共にプレートのプレートマップを開きます。

Gene Study の作成

Gene Study の作成方法

1. Gene Study にデータをインポートする前に、Data Analysis ウィンドウで以下を行います。
 - 同じ内容を含むサンプルが同じ名称であることを確認します。Gene Study では、ソフトウェアは同じターゲット名またはサンプル名のウェルは同じサンプルを含むと仮定します。
 - Quantification タブでベースラインと閾値 (C_q) を調整し、各ランのデータを最適化します。
 - Gene Study に含めたいウェルグループを選択します。

Gene Study 内の 1 つのウェルグループからのデータを表示するには、データファイルをインポートする前にそのグループを選択しておく必要があります。

Study Setup タブ画面は、Gene Study 内のすべてのランのリストを表示します。

2. Gene Study ダイアログボックスで、Study Setup タブを選択します。
3. Add Data Files をクリックして、ブラウザウィンドウからファイルを選択します。データファイル（拡張子は.pcrd）を Study Setup ダイアログボックスにドラッグすると、ランを Gene Study に迅速に追加することができます。
4. CFX Maestro ソフトウェアでは、データファイルが追加されると自動的に Gene Study 解析が実行されます。結果を表示するには、Study Analysis タブを選択します。

Gene Study からランを削除する方法

- ▶ リスト内の 1 つ以上のファイルを選択して Remove をクリックします。

Gene Study に関するメモの追加方法

- ▶ ファイルや解析に関するメモを Notes テキストボックスに入力します。

Study Analysis タブ

Study Analysis タブは、Gene Study 内のすべてのランによるデータを表示します。遺伝子発現データ解析のオプションは、単一データファイル用のオプションと同じですが、以下の例外があります。

- 棒グラフの場合、（もし計算される場合）インターランキャリブレーションの値は、Inter-run Calibration をクリックすると表示されます。

注意：以下のサンプルタイプのみがインターランキャリブレーターとして使用されます。

- Unknown（不明）
- Standard（標準）
- Positive Control（陽性対照）

Negative Control（陰性対照）、No Template Control（NTC）、および No Reverse Transcriptase Control（NRT）のサンプルタイプはインターランキャリブレーターとして使用できません。

- ヒートマップについて、サンプルターゲットが複数のプレート上の同じ位置にあって異なるサンプルを含む場合、ドロップダウンメニューから解析用の特定のプレートを選択します。
- Reference Gene Selection (リファレンス遺伝子選択) ツールは、試験するリファレンス遺伝子を特定し、それぞれの安定性に基づき、Ideal (理想的)、Acceptable (可)、または Unstable (不安定) に分類します。
 - Ideal (理想的) リファレンス遺伝子は安定しており、試験サンプル全体での変動が最小限です。
 - Acceptable (可) リファレンス遺伝子の安定性は理想的ではなく、試験サンプル全体での変動は中程度です。Ideal リファレンス遺伝子がない場合は、このリファレンス遺伝子を使用してください。
 - Unstable (不安定) リファレンス遺伝子は、試験サンプル全体にわたり過剰な変動が見られます。このような遺伝子は解析から除外することをお勧めします。
- PrimePCR Controls ツールは、試験サンプルの結果を表に示します。
 - Summary タブは、すべての試験サンプルの概要を表示します。すべてのコントロールアッセイに合格したサンプルは緑色で表示されます。1つ以上のコントロールアッセイで不合格だったサンプルは黄色で表示されます。
 - PCR タブは、陽性 PCR コントロールアッセイの結果を表示します。このアッセイは遺伝子発現に影響を及ぼす抑制問題または実験上の問題を検出します。
 - RT タブは、逆転写コントロールアッセイの結果を表示します。このアッセイは、RT 性能を定性的に評価し、RT 性能が遺伝子発現を損なう可能性のあるサンプルを特定します。
 - gDNA タブは、DNA 汚染コントロールアッセイの結果を表示します。このアッセイは、ゲノム DNA (gDNA) が qPCR 結果に影響を及ぼす可能性のあるレベルでサンプル内に存在するかどうかを判定します。
 - RQ タブは、RNA 品質アッセイ (RQ1 および RQ2) の結果を表示します。このアッセイは、RNA の完全性が遺伝子発現に悪影響を及ぼす可能性があるかどうかを定性的に評価します。

Gene Study レポート

Gene Study Report ダイアログボックスを使用して、Gene Study データをレポートに配置します。

Gene Study レポートの作成方法

1. レポートを作成する前に、必要に応じて Gene Study レポートのデータとグラフを調整します。
2. Gene Study メニューの Tools > Reports を選択して Report ダイアログボックスを開きます。
3. レポートに含めたいオプションを選択します。レポートは選択している初期設定のオプションで開きます。カテゴリー全体または 1 カテゴリー内の個々のオプションを変更するには、チェックボックスの選択・解除を行ってください。

220 ページの表 33 は、表示に使用できるオプションを示しています。

4. レポート内のカテゴリーや項目の順序を変更します。オプションを必要な位置にドラッグします。項目は、その属するカテゴリー内でのみ記録されます。

5. Update Report をクリックして、変更を行った Report Preview を更新します。
6. レポートを印刷・保存します。ツールバーの Print Report ボタンをクリックすると、現在のレポートが印刷されます。File > Save を選択すると、レポートを PDF (Adobe Acrobat Reader ファイル)、MHT (Microsoft 文書)、または MHTML (Microsoft 文書) のファイルフォーマットで保存し、ファイルを保存する場所を選択できます。File > Save As を選択すると、レポートを新しい名称で、または新しい場所に保存できます。
7. (オプション) 必要な情報を含むレポートのテンプレートを作成します。現在のレポートの設定をテンプレートに保存するには、Template > Save または Save As を選択します。その後、次回新しいレポートを作成したい場合に、レポートテンプレートをロードします。

Gene Study レポートのカテゴリ

表 33 は Gene Study レポートで使用できるすべてのオプションを示します。

表33 Gene Study レポートのカテゴリ

カテゴリ	オプション	説明
Header		タイトル、サブタイトル、およびレポートのロゴ
	Report Information	日付、ユーザー名、データファイル名、データファイルパス、および選択しているウェルグループ
	Gene Study File List	Gene Study 内の全データファイルのリスト
	Notes	データレポートに関するメモ
Study Analysis: Bar Chart	Analysis Settings	選択している解析パラメータのリスト
	Chart	データを表示する遺伝子発現グラフ
	Target Names	Gene Study 内のターゲットのリスト
	Sample Names	Gene Study 内のサンプルのリスト
	Data	データを表示するスプレッドシート
	Target Stability	ターゲットの安定性データ
	Inter-run Calibration	インターランキャリブレーションのデータ
	Box-And-Whisker Chart	遺伝子発現の箱髭グラフ
	Dot Plot Chart	遺伝子発現のドットプロットグラフ
Study Analysis: Clustergram, Scatter Plot, Volcano Plot, Heat Map	Analysis Settings	各グラフタイプの設定を含む
	Chart	データを表示する遺伝子発現グラフ
	Data	各ターゲットのデータを示すスプレッドシート
Study Analysis: ANOVA Data		

表 33 Gene Study レポートのカテゴリ (つづき)

オプション	説明
ANOVA Settings	実施する ANOVA のタイプ、独立変数と従属変数、および解析に使用する P 値閾値を含む
ANOVA Results	平方和、df、平均平方、F 統計値、および ANOVA 試験の P 値データを含む
Tukey's HSD	調整した平均値の差、std.誤差、P 値、P 値 Bonferroni 法、P 値 BH、ANOVA 検定の下限データと上限データを含む
Data Descriptives	因子、カウント、平均値、および解析におけるターゲットとリファレンス遺伝子の標準偏差を含む
ANOVA Errors	ANOVA 計算中に特定されるエラー

付録A データ解析の計算

CFX Maestro ソフトウェアでは、自動的に計算式が算定され、結果が Data Analysis タブ画面に表示されます。本付録では、CFX Maestro ソフトウェアにおける計算式の算定方法を詳述します。

P 値 (P-value)

P 値は、対照と比較した場合の実験サンプルデータポイントの統計的優位性の尺度です。

注意: P 値を求めるために対照サンプルと実験サンプルの両方につき少なくとも2つのリプリケートが必要です。リプリケートの数が多いほど、精度は高くなります。

P 値の式は、

$$P \text{ 値} = 1 - A$$

となり、ここで

$$A = \int_{x=-t}^t = \frac{\Gamma\left(\frac{v+1}{2}\right)}{\sqrt{v\pi}\Gamma\left(\frac{v}{2}\right)} \left(1 + \frac{x^2}{v}\right)^{-\frac{v+1}{2}}$$

ここで

- $v = \text{Count}(\text{NE}_{\text{sample (Experimental)}}) + \text{Count}(\text{NE}_{\text{sample (Control)}}) - 2$
- $\Gamma = \text{ガンマ関数}$
- $t = t \text{ 統計値}$

$$t = \frac{\left| \text{Mean}(\text{NE}_{\text{sample(expt)}}) - \text{Mean}(\text{NE}_{\text{sample(control)}}) \right|}{\sqrt{\frac{(\text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(expt)}}) - 1) * \text{SD}(\text{NE}_{\text{sample(expt)}})^2 + (\text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(control)}}) - 1) * \text{SD}(\text{NE}_{\text{sample(control)}})^2}{\text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(expt)}}) + \text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(control)}}) - 2}} * \sqrt{\left(\frac{1}{\text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(expt)}})} + \frac{1}{\text{Count}(\text{NE}_{\text{sample(control)}})}\right)}}$$

ここで、

- Mean=算術平均
- NE=正規化発現 (Normalized expression)
- Count (x) =リスト x のサイズ
- SD=サンプルの標準偏差

P 値の結果の差異

P 値の結果は、表示するグラフに応じて異なる場合があります。

Charts (グラフ) タブ

Chart 表で報告される P 値は、選択している対照に基づいています。ユーザー指定の閾値未満の P 値を含むグラフに注釈をつけることができます。

Results (結果) タブ

Results (結果) 表で報告される P 値は、ウェルごとの正規化発現 (NE) 値の分布を対照サンプル vs. 試験サンプルについて比較する、独立 t 検定の結果です。

ANOVA タブ

ANOVA 表で報告される P 値は、F 統計値に基づき、平均値間に差があるかどうかを全体的に示します。ANOVA の P 値が有意な場合、事後 Tukey HSD (Honest Significant Difference) 検定により、どのペアが P 値で示されるような有意差を示すかを判定します。

反応効率 (Reaction Efficiency)

プライマーとプローブセットのそれぞれで正確な効率の程度を使用することにより、遺伝子発現データの解析時に精度の高い結果が得られることがわかっています。遺伝子発現計算に使用する効率の初期設定値は 100 % です。反応効率を評価するには、関連するダイナミックレンジにわたる代表的なサンプルの系列希釈液を使用して検量線を生成したうえで、その後の遺伝子発現解析の効率を記録します。ランに検量線を用いる場合、Experiment Settings ウィンドウの Targets タブ画面にある Auto Efficiency を選択していれば、ソフトウェアによって効率が自動的に算出され、Quantification タブ画面の Standard Curve に表示されます。

効率の計算式にある効率 (E) は、Pfaffl (2001) および Vandesompele et al. (2002) の論文に記載される "efficiencies" から引用しています。この文献では、効率 2 (各サイクルの正味倍) が本ソフトウェアの 100 % の効率と同等です。以下の数式を適用すれば、ユーザーが利用する効率を本ソフトウェアで適用する計算式に転換することが可能です。

- $E = (\% \text{効率} \times 0.01) + 1$
- $\% \text{効率} = (E - 1) \times 100$

相対量 (Relative Quantity)

サンプル (GOI) の相対量 (ΔC_q) は次式により計算します。

$$\text{相対量}_{\text{sample (GOI)}} = E_{\text{GOI}}^{(C_q(\text{MIN}) - C_q(\text{sample}))}$$

ここで、

- E = プライマーおよびプローブセットの効率。この効率は、 $(\% \text{効率} \times 0.01) + 1$ の式で計算されます。この場合、100 % 効率 = 2。
- $C_q(\text{MIN})$ = GOI の平均 C_q 最低値にあるサンプル平均 C_q
- $C_q(\text{sample})$ = サンプルの平均 C_q
- GOI = 対象の遺伝子 (1 ターゲット)

対照を選択した場合の相対量 (Relative Quantity When a Control Is Selected)

対照サンプル（対照）を指定している場合は、次式によって対照の遺伝子を含むサンプル（GOI）の相対量（RQ）が計算されます。

$$\text{相対量}_{\text{sample (GOI)}} = E_{\text{GOI}}^{(Cq(\text{control})-Cq(\text{sample}))}$$

ここで、

- E = プライマーおよびプローブセットの効率。この効率は、 $(\% \text{効率} \times 0.01) + 1$ の式で計算されます。この場合、100 % 効率 = 2。
- $Cq(\text{control})$ = 対照サンプルの平均 Cq
- $Cq(\text{sample})$ = GOI を含むサンプルの平均 Cq
- GOI = 対象の遺伝子（1 ターゲット）

相対量の標準偏差 (Standard Deviation of Relative Quantity)

相対量の標準偏差は次式により計算されます。

$$\text{SD 相対量} = \text{SD } Cq_{\text{GOI}} \times \text{相対量}_{\text{sample}} \times \text{Ln}(E_{\text{GOI}})$$

ここで、

- SD 相対量 = 相対量の標準偏差
- $\text{SD } Cq_{\text{sample}}$ = サンプル（GOI）の Cq の標準偏差
- 相対量 = サンプルの相対量
- E = プライマーおよびプローブセットの効率。この効率は、 $(\% \text{効率} \times 0.01) + 1$ の式で計算されます。この場合、100 % 効率 = 2。
- GOI = 対象の遺伝子（1 ターゲット）

効率補正 Cq (C_{qE}) (Efficiency Corrected)

効率補正 Cq は次式により計算されます。

$$C_{qE} = Cq \times (\log(E) / \log(2))$$

ここで、

- E = 効率

平均効率補正 C_q (MC_{qE}) (Mean Efficiency Corrected)

平均効率補正 C_q は次式により計算されます。

$$MC_{qE} = \frac{C_{qE(Rep\ 1)} + C_{qE(Rep\ 2)} + \dots + C_{qE(Rep\ n)}}{n}$$

ここで、

- C_{qE} = 効率校正 C_q
- n = リPLICATE 数

正規化係数 (Normalization Factor)

正規化発現の等式の分母は、正規化係数として引用されます。次式に記載されるとおり、この正規化係数は、一定サンプルの標準ターゲット（遺伝子）前例の相対量の相乗平均となります。

$$\text{正規化係数}_{\text{sample (GOI)}} = (RQ_{\text{sample (Ref1)}} \times RQ_{\text{sample (Ref2)}} \times \dots \times RQ_{\text{sample (Ref n)}})^{1/n}$$

ここで、

- RQ = 相対量
- n = 標準ターゲット数
- GOI = 対象遺伝子（1ターゲット）

正規化発現 (Normalized Expression)

正規化発現 ($\Delta\Delta C_q$) とは、生物系におけるリファレンスターゲット（遺伝子または配列）の量を正規化したターゲット（遺伝子）の相対量です。リファレンスターゲットを選択するためには、Experiment Settings ウィンドウを開き、リファレンス遺伝子として使用する各ターゲットの Reference カラムをクリックします。

正規化発現の計算式は、算定相対量（RQ）の計算式を適用した次の式で表すことができます。

$$= \frac{RQ_{\text{sample (GOI)}}}{(RQ_{\text{Ref 1}} \times RQ_{\text{Ref 2}} \times \dots \times RQ_{\text{Ref n}})^{1/n}}$$

ここで、

- RQ = サンプルの相対量
- Ref = 各サンプルに 1 つ以上の標準ターゲットを含むランの標準ターゲット
- GOI = 対象遺伝子（1ターゲット）

リファレンスターゲットが生物系の発現レベルを変化させないものと仮定すると、正規化発現の計算により、各サンプルに示されるセル数の取り込み差やそのばらつきが明らかとなります。

平均発現 (Averaged Expression)

重要：平均発現値は、データに生物学的グループが含まれており、Charts タブ画面で Use biological groups for analysis チェックボックスが選択されている場合に計算されます。

各生物学的グループの発現は共に平均化され、全生物学的グループの重み付け平均が得られます。

平均正規化発現は次式により計算されます。

$$NE_{avg} = \frac{(Exp_1 \times n_1) + (Exp_2 \times n_2) + \dots + (Exp_j \times n_j)}{(n_1 + n_2 + \dots + n_j)}$$

ここで、

- Exp_1 = 生物学的グループの正規化発現
- n_1 = 生物学的グループ内のウェル数

対照選択時の正規化発現 (Normalized Expression When a Control Is Selected)

Experiment Settings ウィンドウで対照サンプルを選択している場合、ソフトウェアは対照サンプルの発現レベルを 1 に設定します。この条件において、ソフトウェアは全ターゲット (遺伝子) 発現の相対量を対称発現量 (1 の値) に正規化します。この正規化発現は、対照が選択されている場合の非基準化正規化発現解析値と同等となります。

注意: これは相対正規化発現 (RNE) と倍率変化 (Fold Change) として知られています。

正規化発現の標準偏差 (Standard Deviation for the Normalized Expression)

正規化発現値の再基準化は、選択した基準化オプションに応じて、正規化発現の標準偏差を最大レベルまたは最低レベルの個々の正規化発現レベルで除算して得られます。正規化係数の標準偏差 (SD) は次式によって計算されます。

$$SD NF_n = NF_n \times \sqrt{\left(\frac{SD RQ}{n \times RQ} \frac{(Ref 1)}{(Ref 1)}\right)^2 + \left(\frac{SD RQ}{n \times RQ} \frac{(Ref 2)}{(Ref 2)}\right)^2 + \dots + \left(\frac{SD RQ}{n \times RQ} \frac{(Ref n)}{(Ref n)}\right)^2}$$

ここで、

- RQ=サンプルの相対量
- SD=標準偏差
- NF=正規化係数
- Ref=標準ターゲット
- n=標準ターゲット数

対照サンプルを指定している場合、次式に示す標準偏差の再基準化機能を適用する必要はありません。

$$SD NE_{(GOI)} = NE_{(GOI)} \times \sqrt{\left(\frac{SD NF}{NF}\right)^2 + \left(\frac{SD RQ}{RQ} \frac{(GOI)}{(GOI)}\right)^2}$$

ここで、

- NE=正規化発現
- RQ=サンプルの相対量
- SD=標準偏差
- GOI=対象遺伝子 (1 ターゲット)

平均発現の標準偏差 (Standard Deviation for the Averaged Expression)

平均発現の標準偏差 (SD) は次式によって計算されます。

$$NE_{avg}SD = \sqrt{\frac{((n_1 - 1) \times SD_1^2) + ((n_2 - 1) \times SD_2^2) + \dots + ((n_i - 1) \times SD_i^2)}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_i - 1)}}$$

ここで、

- NE_{avg} = 平均正規化発現
- SD = 生物学的グループの発現の標準偏差
- n = 生物学的グループ内のウェル数

平均発現の平均標準誤差 (Standard Error of the Mean for the Averaged Expression)

平均発現の平均標準誤差 (SEM) は次式によって計算されます。

$$NE_{avg}SEM = \frac{Exp_{avg}SD}{\sqrt{n_1 + n_2 + \dots + n_i}}$$

ここで、

- n_i = 生物学的グループ

最高発現レベルに基準化した正規化発現 (Normalized Expression Scaled to Highest Expression Level)

ランに対照が含まれない場合、全サンプルでの最高発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除算することにより、各ターゲット（遺伝子）の正規化発現（NE）を基準化します。ソフトウェアでは、最高発現レベルが1に設定され、全サンプル発現レベルが再基準化されます。最高発現レベルでの基準化は、次式から計算します。

$$\text{基準化した正規化発現}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{\text{正規化発現}_{\text{sample (GOI)}}}{\text{正規化発現}_{\text{Highest sample (GOI)}}}$$

ここで、

- GOI=対象遺伝子（ターゲット）

最低発現レベルで基準化した正規化発現 (Normalized Expression Scaled to Lowest Expression Level)

ランに対照が含まれない場合、全サンプルでの最低発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除算することにより、各ターゲット（遺伝子）の正規化発現（NE）を基準化します。ソフトウェアでは、最低発現レベルが1に設定され、全サンプル発現レベルが再基準化されます。最高発現レベルでの基準化は、次式から計算します。

$$\text{基準化した正規化発現}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{\text{正規化発現}_{\text{sample (GOI)}}}{\text{正規化発現}_{\text{Lowest sample (GOI)}}}$$

ここで、

- GOI=対象遺伝子（ターゲット）

平均発現レベルで基準化した正規化発現 (Normalized Expression Scaled to Average Expression Level)

ランに対照が含まれない場合、全サンプルでの相乗平均発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除算することにより、各ターゲット（遺伝子）の正規化発現（NE）を基準化します。ソフトウェアでは、相乗平均発現レベルが1に設定され、全サンプル発現レベルが再基準化されます。最高発現レベルでの基準化は、次式から計算します。

$$\text{基準化した正規化発現}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{\text{正規化発現}_{\text{sample (GOI)}}}{\text{正規化発現}_{\text{GM (GOI)}}}$$

ここで、

- GOI=対象遺伝子（ターゲット）
- GM=全サンプルの正規化発現の相乗平均

基準化した正規化発現の標準偏差 (Standard Deviation for the Scaled Normalized Expression)

基準化した正規化発現 (NE) 値の再基準化は、選択した基準化オプションに応じて、正規化発現の標準偏差 (SD) を最高 (MAX) または最低 (MIN) の発現レベルにある正規化発現地で除算して得られます。

注意: 対照サンプルを指定している場合には、標準偏差に対してこの再基準化機能を適用する必要がありません。

この計算式は次のとおりです。

$$\text{SD 基準化 NE}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{\text{SD NE}_{\text{sample (GOI)}}}{\text{NE}_{\text{MAX or MIN (GOI)}}$$

ここで、

- NE=正規化発現
- SD=標準偏差
- GOI=対象遺伝子 (ターゲット)
- MAX=最高発現レベル
- MIN=最低発現レベル

レギュレーション (Regulation)

レギュレーションは実験サンプル vs.対照サンプルのターゲットの発現における増加または減少の尺度で、以下のように決定します。

RNE \geq 1 の場合、レギュレーション=RNE

RNE $<$ 1 の場合、レギュレーション=(-1)/RNE

ここで、

- RNE=相対正規化発現。これは、対照が選択されている場合の正規化発現と同じです。

補正值の計算式 (Corrected Values Formulas)

補正值と非補正值の間の差は、リアルタイム PCR ランの一部として検量線を作成した場合にのみ見られます。ソフトウェアでは、誤差拡散を測定するうえで以下に関する式が適用されます。

- 標準誤差 (Standard Error)
- 正規化発現の標準誤差 (Standard Error for Normalized Expression)
- 対象の正規化遺伝値 (ターゲット) の標準誤差 (Standard Error for the Normalized Gene of Interest)

標準誤差の計算式は次のとおりです。

$$= \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

ここで、

- n = リファレンスターゲット (遺伝子) 数
- SD = 標準偏差

正規化発現計算式における正規化係数の標準誤差は、次式で示されます。

$$SE NF_n = NE_n \times \sqrt{\left(\frac{SE RQ_{(Ref 1)}}{n \times SE RQ_{(Ref 1)}}\right)^2 + \left(\frac{SE RQ_{(Ref 2)}}{n \times SE RQ_{(Ref 2)}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{SE RQ_{(Ref n)}}{n \times SE RQ_{(Ref n)}}\right)^2}$$

ここで、

- n = リファレンスターゲット数
- SE = 標準誤差
- NE = 正規化発現
- RQ = 相対量

対象の正規化遺伝子 (GOI) の標準誤差の計算式は、次式で示されます。

$$SE GOI_n = GOI_n \times \sqrt{\left(\frac{SE NF_n}{NF_n}\right)^2 + \left(\frac{SE GOI}{GOI}\right)^2}$$

ここで、

- SE = 標準誤差
- GOI = 対象遺伝子 (1 ターゲット)
- NF = 正規化係数
- n = 標準ターゲット数

付録B CFX Maestro のユーザーおよび役割の管理

CFX Maestro ソフトウェアでは、ユーザーを作成して各ユーザーに役割を割り当てることができます。役割によって、CFX Maestro の機能へのアクセスが制限されます。ユーザーには、一回に1つの役割が割り当てられます。しかし、CFX Maestro ソフトウェアの管理者はいつでもユーザーの役割を変更できます。

アドバイス : CFX Maestro の使用にはユーザーの作成は必ずしも必要ではありません。ユーザーを作成しなくても、初期設定のユーザーアカウント *admin* を使用してすべての作業を行えます。

重要 : ユーザー *admin* は、初期設定の管理者 (Administrator) アカウントで、最初に CFX Maestro にログインする際に使用します。特定のユーザーを CFX Maestro の管理者として作成することをお勧めします。このユーザーに管理者権限を割り当て、このユーザーがすべての管理タスクを実施します。

ユーザーの管理

標準版の CFX Maestro ソフトウェアでは、ユーザーアカウントには名称またはパスワードが含まれません。

各ユーザーに役割を割り当てるには、User Administration ウィンドウにあるリストから役割を選択します。本例では、Guest ユーザーにファイルを保存する権限が追加されています。

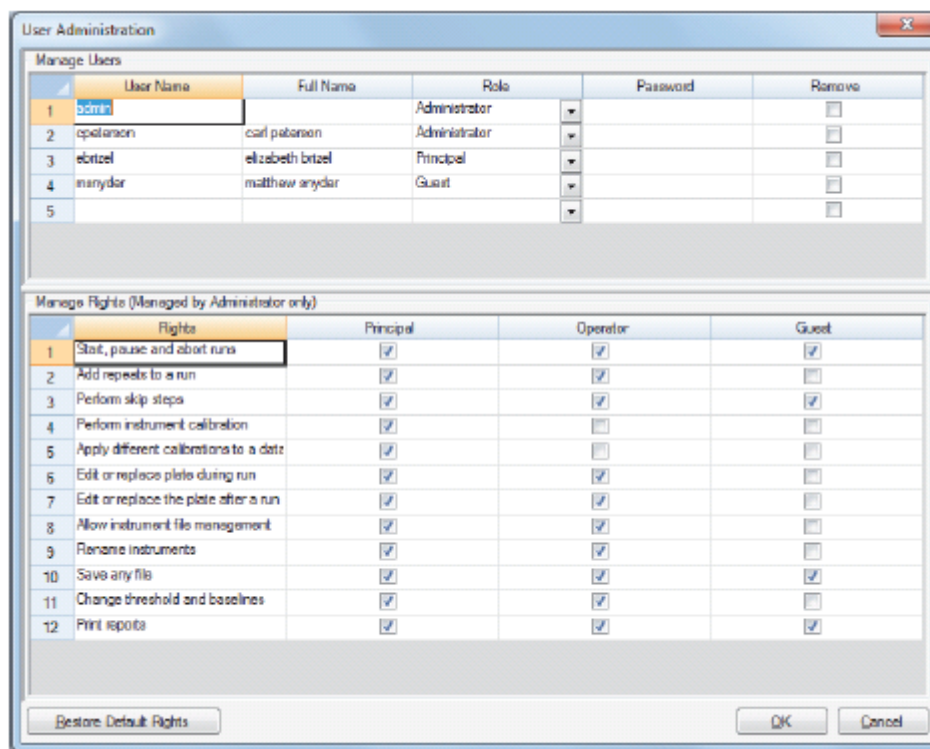
ユーザーの追加および削除

注意 : CFX Maestro 管理者のみがユーザーの追加および削除を行えます。

CFX Maestro へのユーザーアカウントの追加方法

1. Home ウィンドウの User > User Administration を選択します。

User Administration ダイアログボックスが表示されます。



2. Manage Users ペインに、ユーザーの User Name (ユーザー名) を入力します。
3. ユーザーの Role (役割) を選択します。

役割によりユーザーの権限が制限されます。初期設定では Principal (代表ユーザー) になっています。

アドバイス : 各役割の権限を変更することができます。役割に対する権限の変更は、その役割を割り当てられている全ユーザーが対象となります。詳細については、237 ページの「[役割の権限の管理](#)」を参照してください。

4. (オプション) ユーザーの名前とパスワードを入力します。
5. OK をクリックしてダイアログボックスを開き、ウィンドウを閉じることを確認します。
6. Yes をクリックしてダイアログボックスとウィンドウを閉じます。

ユーザーの削除方法

1. Manage Users ペインで、削除したい各ユーザーについて Remove (削除) を選択します。
2. OK をクリックしてダイアログボックスを開き、ウィンドウを閉じることを確認します。
3. Yes をクリックしてダイアログボックスとウィンドウを閉じます。

注意: ソフトウェアユーザーのリストには、必ず 1 人の管理者が含まれているものとします。

役割の権限の管理

CFX Maestro には、以下の 4 つの役割が含まれます。

- Administrator (管理者) (必須) — 管理者には、すべての権限が与えられており、その内容を変更することができません。管理者は、ユーザーの追加や削除、各役割の権限の変更を行うことも可能です。

注意: 管理者のみが役割の権限を変更できます。

- Principal (代表ユーザー) — 初期設定では、すべての権限が与えられます。
- Operator (オペレーター) — 初期設定では、サイクルのスキップを除いたすべての権限が与えられます。
- Guest (ゲスト) — 初期設定では、ファイルの閲覧のみが可能です。

重要: 役割の権限の変更は、その役割を割り当てられているすべてのユーザーが対象になっています。特定のユーザーの役割をカスタマイズすることはできません。役割の権限を修正する際には注意してください。

各役割の権限を指定する方法

1. Home ウィンドウの User > User Administration を選択します。
2. Manage Rights (権限の管理) ペインで、以下のいずれかを行います。
 - 役割から権限を削除するには、そのチェックボックスを解除します。
 - 役割に権限を追加するには、そのチェックボックスを選択します。
3. OK をクリックしてダイアログボックスを開き、ウィンドウを閉じることを確認します。
4. Yes をクリックしてダイアログボックスとウィンドウを閉じます。

全役割の全権限をリセットする方法

- ▶ User Administration ダイアログボックスで Restore Default Rights (初期設定の権限を復元) をクリックしてください。

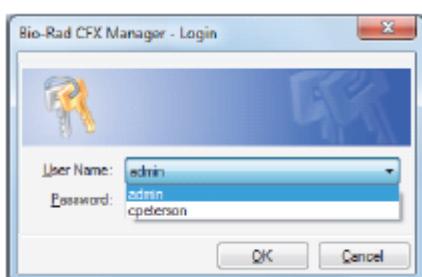
CFX Maestro ソフトウェアへのログイン

CFX Maestro ソフトウェアは、Login ダイアログボックスからソフトウェアにログインする者を管理します。ソフトウェアの起動時、User Administration ウィンドウに2人以上のユーザーが記載されている場合には Login ダイアログボックスが自動的に表示されます。

CFX Maestro の Home ウィンドウ上部に、ログインユーザーの名前が表示されます。

CFX Maestro へのログイン方法

1. Login ダイアログボックスで、User Name ドロップダウンリストから名前を選択します。
2. パスワードを入力します。
3. OK をクリックして Login ダイアログボックスを閉じ、ソフトウェアを開きます。



ユーザーの変更

ソフトウェアの実行中にユーザーを変更することができます。

ユーザーの切り替え方法

1. Home ウィンドウの User > Select User を選択して、Login ダイアログボックスを開きます。
2. User Name ドロップダウンリストから名前を選択します。
3. 新しいユーザーのパスワードを入力します。
4. OK をクリックして Login ダイアログボックスを閉じ、ソフトウェアを開きます。

ユーザーパスワードの変更

CFX Maestro ユーザーはいつでも自身のパスワードを変更できます。

ユーザーパスワードの変更方法

1. Home ウィンドウの User > Change Password を選択して Change Password ダイアログボックスを開きます。



2. Old Password に現在のパスワードを入力します。
3. New Password に新しいパスワードを入力し、そのパスワードを Confirm New Password に再入力します。
4. OK をクリックして変更を確定します。

役割と権限を表示

アドバイス : Principal (代表ユーザー)、Operator (オペレーター)、または Guest (ゲスト) のユーザー役割を割り当てられたユーザーは、それぞれのユーザー設定、権限、および役割のみを閲覧できます。

現在のユーザーの役割と権限の表示方法

- ▶ Home ウィンドウの User > User Administration を選択します。

User Administration ウィンドウに記載されているユーザー設定、権限、および役割を変更する場合には、担当の CFX Maestro 管理者にご連絡ください。

付録C LIMS 統合

CFX Maestro ソフトウェアは実験室情報管理システム（LIMS）での使用のために構成することができます。LIMS 統合のために、CFX Maestro は、LIMS プラットフォーム（LIMS ファイル、*.plrn）によって生成されるプレート設定情報、CFX Maestro ソフトウェアを使用して作成されるプロトコールファイル（*.prcl）、定義されたデータエクスポート場所、および定義されたエクスポートフォーマットを必要とします。

ランの終了後、CFX Maestro はデータ（.pcrd）ファイルを生成し、それを定義されたデータエクスポートフォルダの場所に保存します。CFX Maestro はさらに.csv フォーマットの LIMS 互換データファイルを作成し同じ場所に保存します。

LIMS 互換データファイルの作成

本付録では、LIMS 互換データファイルの作成、保存、およびエクスポートのための CFX Maestro ソフトウェアの設定方法について説明します。

LIMS フォルダおよびデータエクスポートオプションの設定

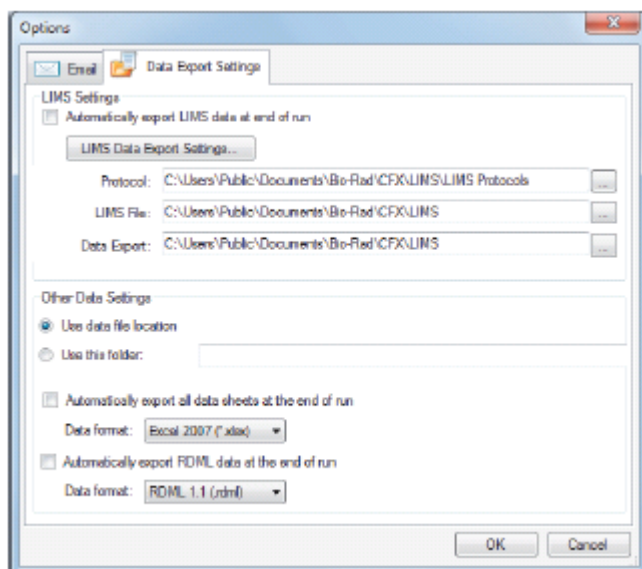
初期設定で、CFX Maestro は LIMS プロトコール、ファイル、およびデータエクスポートファイルを以下のフォルダに保存します。

C:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFX\LIMS

ファイルを別のフォルダに保存するために CFX Maestro を構成し、LIMS データのエクスポートオプションを変更することができます。

LIMS フォルダおよびデータエクスポートオプションの設定方法

1. Home ウィンドウで Tools > Options を選択します。
2. Options ダイアログボックスで Data Export Settings を選択します。



3. (オプション) ランの最後に Automatically export LIMS data (LIMS データを自動的にエクスポート) を選択します。

ソフトウェアは各ランの終了後に LIMS データを自動的にエクスポートし、それを特定の場所に保存します。

4. LIMS データのデフォルトのエクスポートオプションを変更するには、LIMS Data Export Settings をクリックします。

重要: LIMS データは.csv ファイルでないとエクスポートできません。エクスポートフォーマットを変更しないでください。

5. LIMS Data Export Format Settings ダイアログボックスで、必要なエクスポートオプションを選択して OK をクリックします。
6. Options ダイアログボックスで LIMS データファイルを保存したいデフォルトのフォルダにナビゲートしてそれを選択します。次のようなファイルタイプごとに別の場所を選択することが可能です。

- プロトコール
- LIMS ファイル
- データエクスポート

7. OK をクリックして変更を保存し、Options ダイアログボックスを閉じます。

LIMS プロトコールの作成

LIMS ランを開始するには、CFX Maestro プロトコールファイル (*.prcl) を作成してそれを指定の LIMS プロトコールフォルダの場所に保存します。

詳細については、第 5 章の「[プロトコールの作成](#)」を参照してください。

LIMS ファイルの作成

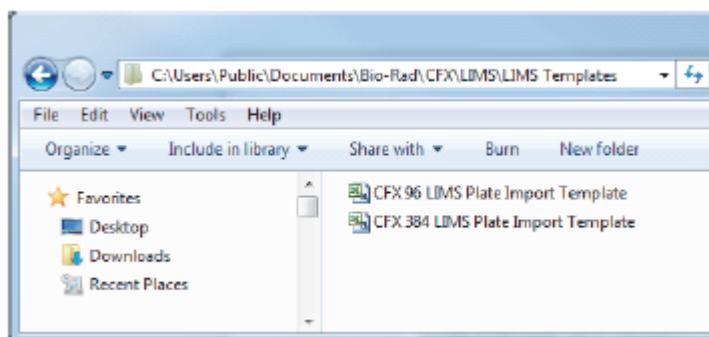
LIMS ファイル (*.plrn) は、プレート設定詳細とプロトコルファイル名を含んでいます。このファイルはインターナル LIMS によって生成されます。CFX Maestro は LIMS ファイルを使用して、プロトコルファイルに使用するプレートファイルを作成します。

CFX Maestro は、カスタム LIMS プレートファイルを作成するために編集できる 2 つのプレートインポートテンプレートファイルを用意しています。

アドバイス：このタスクは、LIMS 専門家が実施するものとします。

LIMS ファイルの作成方法

1. Home ウィンドウで View > Show > LIMS File Folder を選択します。
2. LIMS Template フォルダを開き、.csv ファイルを選択してインターナル LIMS にインポートします。



3. LIMS を使用して、表 34 に記載された必要なフィールドを埋めてテンプレートファイルを編集します。
4. 拡張子.plrn の付いたファイル名でテンプレートを LIMS File フォルダに保存します。

重要：CFX Maestro は.plrn ファイルのみを開くことができます。LIMS ランを開始するには、.csv ファイルを.plrn として保存する必要があります。

表 34 LIMS .csv ファイル内容の定義

	行	説明	内容	目的
A	1	Plate Header	編集不可	定義済
A,B,C	2	Field/Data/Instruction	編集不可	定義済
B	3	Version	編集不可	定義済
B	4	Plate Size	編集不可	定義済
B	5	Plate Type	“BR White”、“BR Clear”、または他のキャリブレーション済プレートタイプを入力	必須
B	6	Scan Mode	“SYBR/FAM Only”、“All Channels”、または“FRET”を入力	必須

表 34 LIMS .csv ファイル内容の定義 (つづき)

列	行	説明	内容	目的
B	7	Units	以下のいずれかを入力。“copy number”、“fold dilution”、“micromoles”、“nanomoles”、“picomoles”、“femtomoles”、“attomoles”、“milligrams”、“micrograms”、“nanograms”、“picograms”、“femtograms”、“attograms”、または“percent”	必須
B	8	Run ID	今回のランを特定する短い説明もしくはバーコードを入力	任意
B	9	Run Note	ランの説明を入力	任意
B	10	Run Protocol	プロトコルファイル名を記載のとおり正確に入力	必須
A	11-15	TBD/Empty	編集不可	定義済
A	16	Plate Data	編集不可	定義済
A	14-110	Well Position	編集不可	定義済
B-G		Ch1 Dye, Ch2 Dye, Ch3 Dye, Ch4 Dye, Ch5 Dye, FRET	使用する各チャンネルでのキャリプレートされた色素名 (例、“FAM”)を入力	必須
H		Sample Type	“Unknown”、“Standard”、“Positive Control”、“Negative Control”、“NTC”、または“NRT”のサンプルタイプのいずれかを入力	必須
I		Sample Name	サンプル名を入力	任意
J-O		CH1 Target, CH2 Target, CH3 Target, CH4 Target, CH5 Target, FRET Target	使用する各チャンネルのターゲット名を入力	任意
P		Biological Set Name	生物学的セット名を入力	任意
Q		Replicate	リプリケートの各セットの正整数を入力。ゼロにすることはできない。	任意
R-W		CH1 Quantity, CH2 Quantity, CH3 Quantity, CH4 Quantity, CH5 Quantity, FRET Quantity	標準の量の値を入力。10 進法で濃度を入力。	すべての標準で必須
X		Well Note	ウェルのメモを入力	任意

表 34 LIMS .csv ファイル内容の定義 (つづき)

列	行	説明	内容	目的
Y-AD	14-110	Ch1 Well Color, Ch2 Well Color, Ch3 Well Color, Ch4 Well Color, Ch5 Well Color, FRET Well Color	32 ビット整数 (argb) 10 進法 フォーマットでユーザー定義の トレーススタイルの色を入力	任意

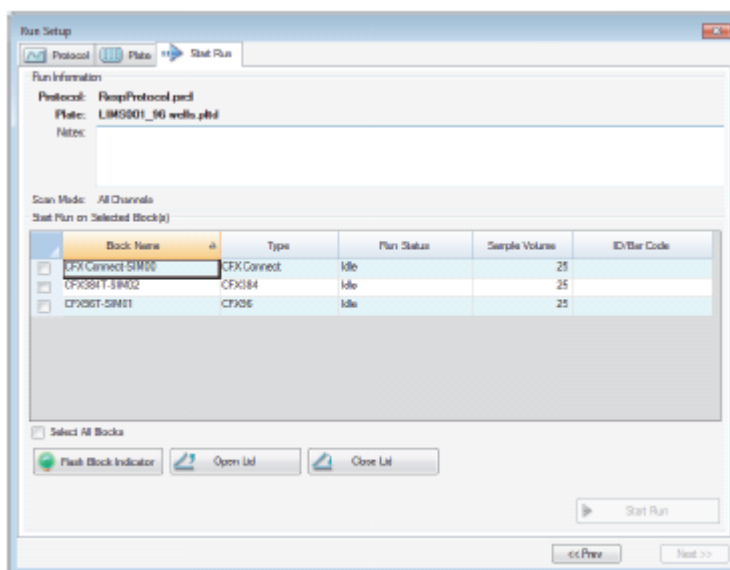
LIMS ランの開始

LIMS ランの開始

- 以下のいずれかを行い LIMS .plrn ファイルを開きます。
 - Home ウィンドウで View > Show > LIMS File Folder を選択してターゲットの.plrn ファイルを開く。
 - Home ウィンドウで File > Open > LIMS File を選択してターゲットの.plrn ファイルを開く。

ファイルは、Run Setup ウィザードの Start Run タブ画面に開きます。Start Run タブ画面には、ランを行う実験に関する情報が表示されます。また、実験のランを行う接続機器のブロックも表示されます。

- Start Run タブ画面で、機器を選択して Start Run をクリックします。



LIMS へのデータのエクスポート

ランが完了すると、CFX Maestro はデータ (.pcrd) ファイルを生成してそれを定義されたデータエクスポートフォルダの場所に保存します。

LIMS へのデータファイルのエクスポート方法

- ▶ .pcrd ファイルを開いて Export > Export to LIMS Folder を選択します。

アドバイス : LIMS のオプションで Automatically Export Data after Run (ラン後にデータを自動的にエクスポート) を選択している場合、CFX Maestro は LIMS 互換データファイルを .csv フォーマットで作成して同じフォルダに保存します。

付録D CFX Maestro ソフトウェアの接続問題に関するトラブルシューティング

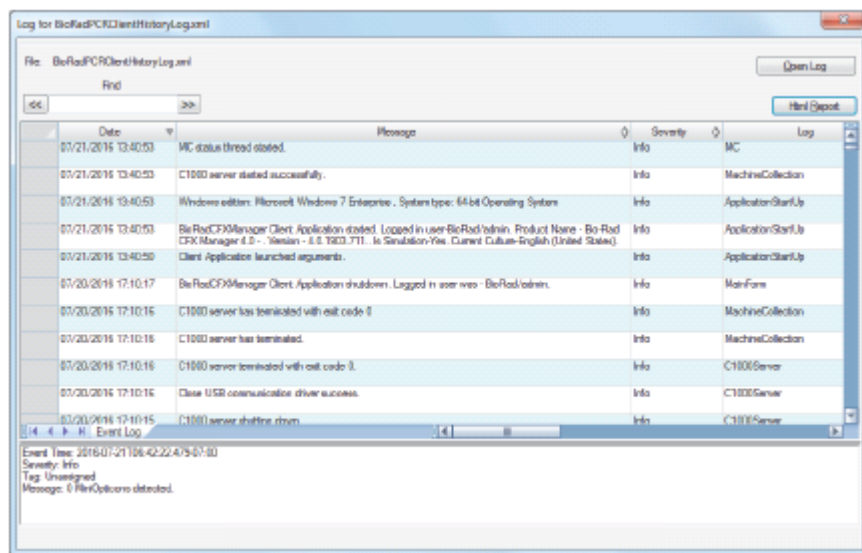
アプリケーションログ

新しいランを開始する前に、CFX96 Touch、CFX96 Touch Deep Well、CFX Connect、および CFX384 Touch の各機器は自己診断テストを開始し、仕様範囲内で動作していることを確認します。ソフトウェアは、この試験の結果をランおよびアプリケーションの記録ファイルに記録します。1つ以上の実験で問題が生じた場合には、ランとアプリケーションの記録を開いて問題の発生時期を確認してください。

CFX Maestro ソフトウェアでは、Application Log にラン実行中の機器の状態に関する情報が記録されます。こうした記録を用いて、機器やソフトウェアに生じた事象をトラブルシューティング時に追跡することができます。

アプリケーションログを開く方法

- ▶ Home ウィンドウの View > Application Log を選択します。



トラブルシューティング

一般に、ソフトウェアと機器の通信問題は、コンピュータとシステムを再起動すると解決できます。再起動する前に進行中の作業を必ず保存してください。

注意：使用するコンピュータの RAM に余裕があり、ハードディスクドライブに十分な空きがあることを確認してください。RAM は 2GB 以上、ハードディスク空き容量は 10GB 以上が推奨されます。

電源トラブル

電源不良が生じた場合、機器とコンピュータはシャットダウンします。電源不良状態が短時間で回復すれば、機器はプロトコルのランを再開しますが、アプリケーションログには電源不良が記録されます。コンピュータの設定および電源の遮断時間に応じて、機器とソフトウェアはプロトコルステップごとのランの継続を試行します。

- プロトコルがプレートリードを含まないステップにある場合、プロトコルは機器に電源が回復した時点でランを再開します。
- プロトコルがプレートリードを含むステップにある場合、機器はソフトウェアが再起動しデータ収集の通信を再開するまで待機します。この状況において、ソフトウェアがコンピュータによりシャットダウンされていないければ、プロトコルが継続されます。コンピュータとソフトウェアが再起動すると、プロトコルによるランが続けられます。

停電中におけるリアクションモジュールからのサンプルの取り出し

電源不良中にロックされているリアクションモジュールの電動リッドを開いてサンプルを取り出すことができます。

ロックされたプレートの取り出し方法

1. ロッキングバーを押し下げて、C1000 Touch または CFX Connect からリアクションモジュールを取り出します。
2. リアクションモジュールを机または実験台に慎重に置きます。
3. モジュールの前面が机や台の縁部から 2 インチ飛び出すように、モジュールを配置します。
4. アレンレンチで、リアクションモジュールの前縁部の下（リッドを開けるためのボタンの下）から 2 本の大型ネジを取り外します。

ネジが外れると、モジュール内部から固定具が外れる音が聞こえます。

重要：モジュールの前縁部にある 2 本の小型ネジは外さないでください。

5. リアクションモジュールのリッドを押し開きます。固定具（濃い色のプラスチック部品）が付着していないことを確認します。ブロックからサンプルを取り出します。
6. 固定具を元の位置に戻し、大型ネジ 2 本を締めてリッドが開いた状態でリアクションモジュールを組み立てます。

USB フラッシュドライブへのデータファイルのリカバリー

注意：最新の5個のランファイルのみ復元できます。

スタンドアロンランからのデータファイルのリカバリー方法

1. USB フラッシュドライブをサーマルサイクラーベースにある USB ポートに差し込みます。
2. Tools をタップして Tools ダイアログボックスを開きます。
3. Run Reports をタップします。
4. リストから復元するファイルを選択します。
5. Recover Data をタップします。システムは新しいデータファイル (.zpcr) を作成し、それを USB フラッシュドライブにエクスポートします。

CFX Maestro コンピュータへのファイルの回収

サーマルサイクラーベースにあるデータとログファイルを、接続しているコンピュータのハードドライブに回収することができます。

注意：サーマルサイクラーベースのリアルタイムデータフォルダ内にあるすべてのファイルは、コンピュータに回収されます。

サーマルサイクラーベースからのファイルの回収方法

1. Home ウィンドウの Detected Instruments ペインで、対象の機器を右クリックして以下のいずれかを選択します。
 - Retrieve Log Files (ログファイルの回収)
 - Retrieve Data Files (データファイルの回収)
2. 回収したファイルを保存するフォルダの場所を選択します。
3. Okay をクリックします。

CFX Maestro ソフトウェアの手動インストール

CFX Maestro ソフトウェアの手動インストール方法

1. 必要に応じて、コンピュータに接続されている機器の接続を断ちます。

CFX Maestro コンピュータの機器の USB ケーブルを見つけて接続を断ちます。機器に挿入されている端部はそのままにしておくことができます。
2. 管理者権限で CFX Maestro コンピュータにログインします。
3. CFX Maestro ソフトウェアの USB ドライブをコンピュータの USB ポートに挿入します。
4. Windows Explorer で、CFX Maestro ソフトウェアの USB ドライブにナビゲートしてそれを開きます。
5. CFX フォルダを開いて Setup.exe をダブルクリックし、CFX Maestro ソフトウェアをインストールします。
6. 画面上の指示に従ってソフトウェアをインストールします。

完了したら、バイオ・ラッド社 CFX Maestro ソフトウェアのスプラッシュ画面がコンピュータの画面に表示され、Bio-Rad CFX Maestro アイコンがデスクトップに現れます。

7. CFX_Documentation.exe をダブルクリックして CFX Maestro ソフトウェアの文書をインストールします。
8. インストールの完了後、ソフトウェアの USB ドライブを安全に取り外して CFX Maestro ソフトウェアを起動します。

ドライバの再インストール

機器のドライバを再インストールする方法

- ▶ Home ウィンドウの Tools > Reinstall Instrument Drivers を選択します。

注意：ドライバの再インストールし USB 接続を確認した後にリアルタイムシステムとのソフトウェア通信に問題がある場合には、バイオ・ラッド社のテクニカルサポートにご連絡ください。

付録E References

1. Sugimoto et al. (1996). Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Research* 24, 4,501–4,505.
2. Breslauer KJ et al. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Nat Acad Sci* 83, 3,746–3,750.
3. Hellemans J et al. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19.
4. Livak JL et al. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* 9, 341–342.
5. Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2,002–2,007.
6. Vandesompele J et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 1–12.
7. Fox J (2006). *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*. 2nd ed (New York: SAGE Publications, (Inc.).

Minpack Copyright Notice (1999) University of Chicago. All rights reserved

Redistribution and use in source and binary forms, with or without modification, are permitted provided that the following conditions are met:

1. Redistributions of source code must retain the above copyright notice, this list of conditions, and the following disclaimer.
2. Redistributions in binary form must reproduce the above copyright notice, this list of conditions, and the following disclaimer in the documentation and/or other materials provided with the distribution.
3. The end-user documentation included with the redistribution, if any, must include the following acknowledgment:

"This product includes software developed by the University of Chicago, as Operator of Argonne National Laboratory."



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス www.bio-rad.com

本 社	〒140-0002	東京都品川区東品川2-2-24	天王洲セントラルタワー	FAX: 03-5463-8480	TEL: 03-6361-7000
大阪営業所	〒532-0025	大阪市淀川区新北野1-14-11	大阪新北野第一ビル	FAX: 06-6308-3064	TEL: 06-6308-6568
福岡営業所	〒812-0013	福岡市博多区博多駅東2-5-28	博多偕成ビル	FAX: 092-475-4858	TEL: 092-475-4856
		※学術のお問い合わせは	Email: life_ps_jp@bio-rad.com	FAX: 03-6404-0334	TEL: 03-6404-0331

※価格（税抜き）、仕様は2017年8月現在のものです。予告なく変更することがあります。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

M11331L 1708A