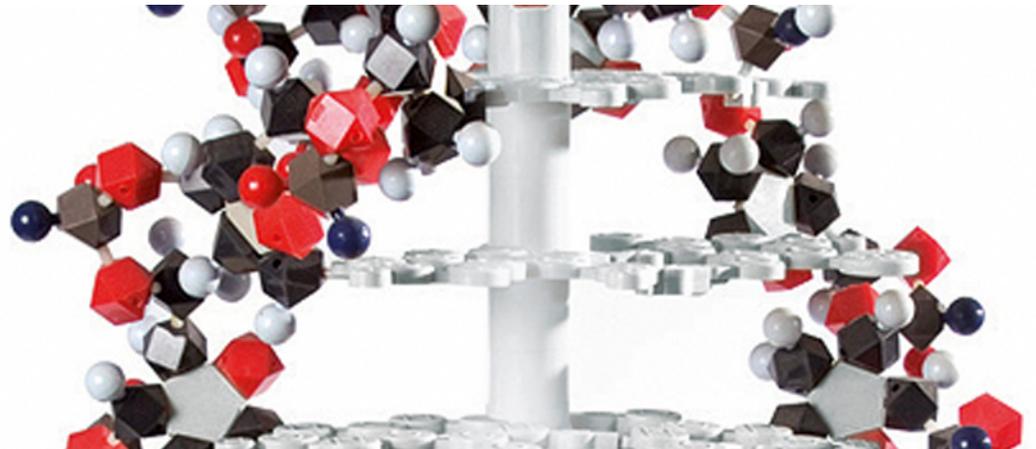


リアルタイムPCRのPointとTips

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

AS事業部

長谷麻樹子

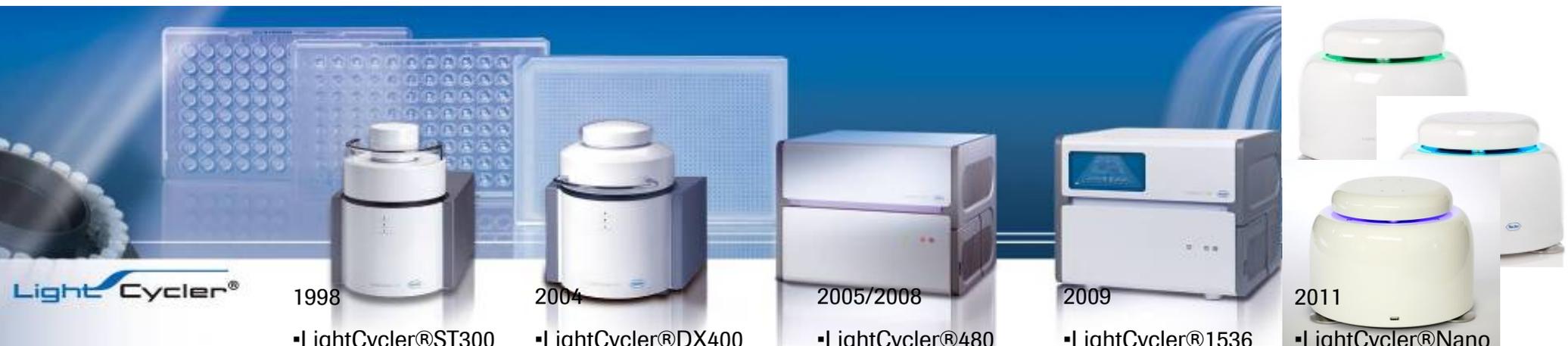


はじめに

定量PCR実験のデザイン

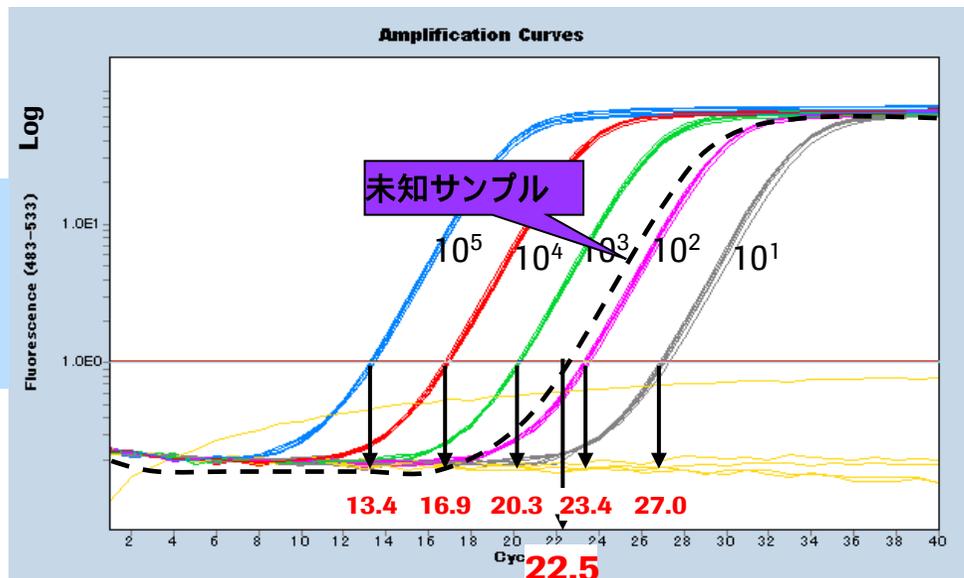
サンプルの準備

融解曲線分析



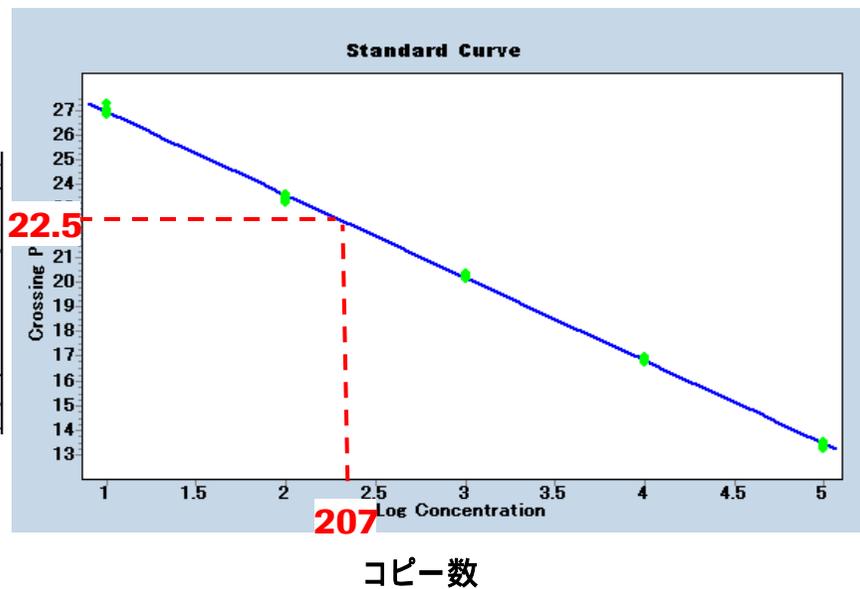
リアルタイムPCRにおける定量の原理

蛍光強度



増幅曲線

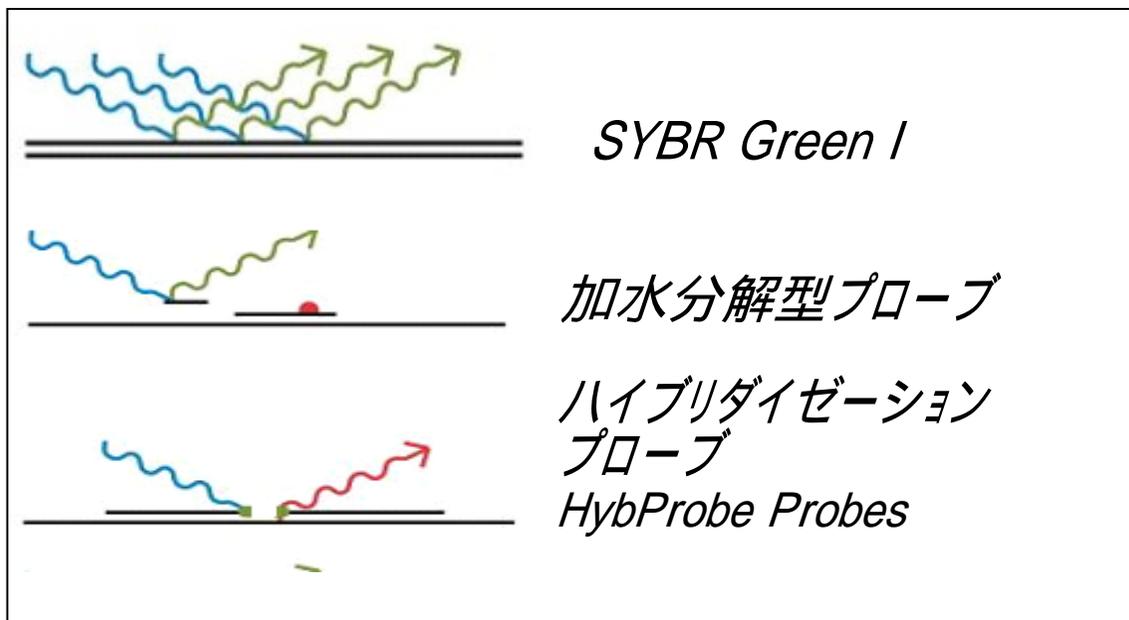
検出サイクル数



標準曲線

PCRの増え方や蛍光の光り方は、PCRセットごとに異なる
 3 PCRセット毎に検量線を作成する必要がある！！

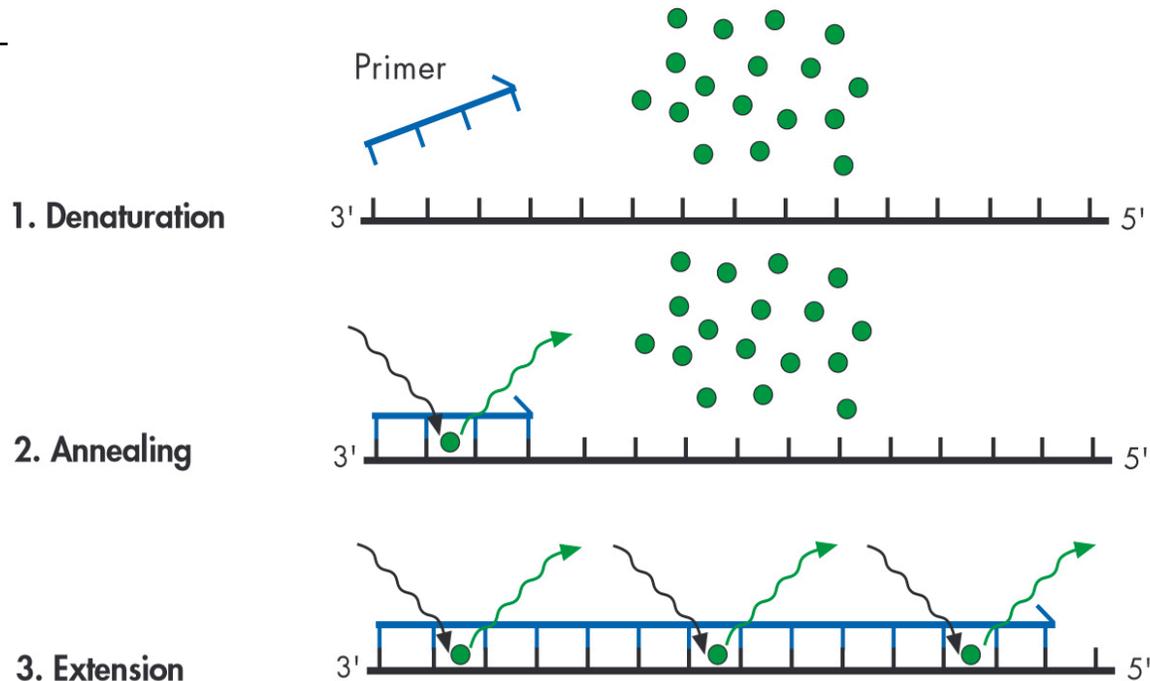
LightCycler® システム 検出フォーマット



LightCycler® 検出フォーマット



DNA結合蛍光色素法(SYBR Green I)

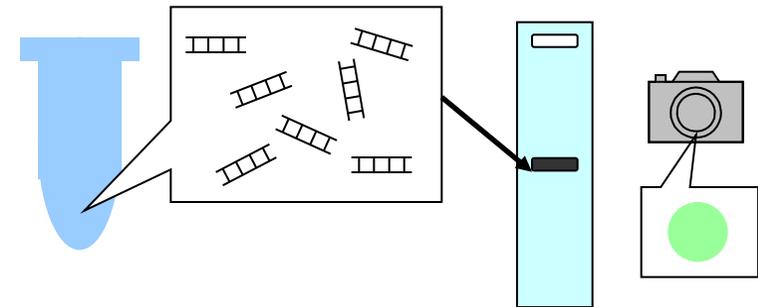


à 二本鎖DNAに結合する

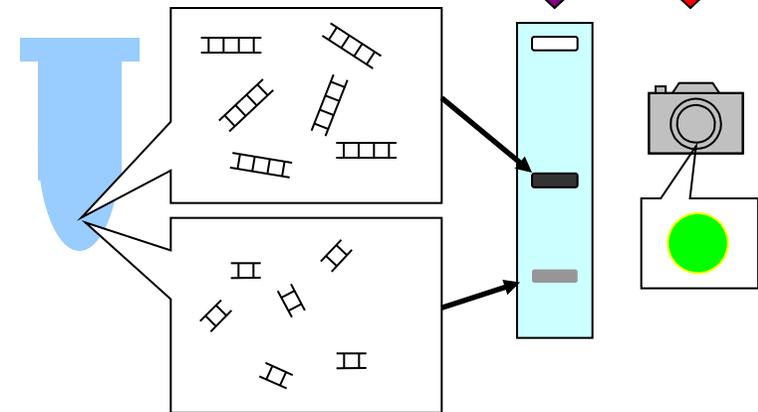
à プライマーの準備で用意に実験開始できる

à 非特異的なシグナルも検出する 検証が必要

目的のPCR産物のみ

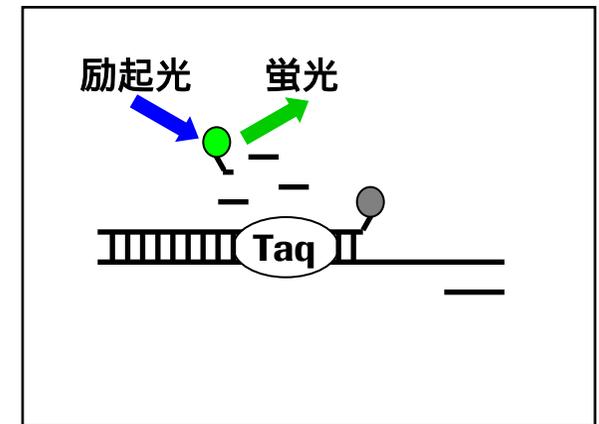
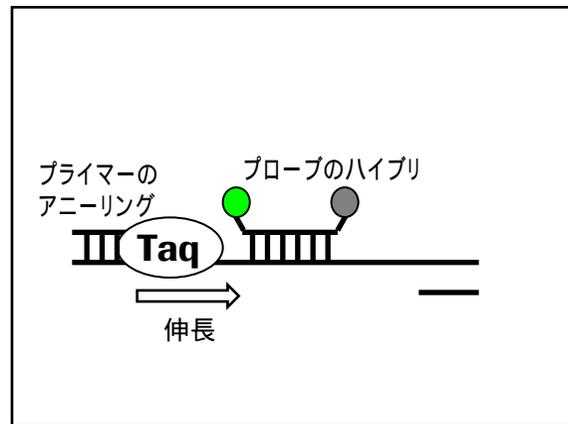
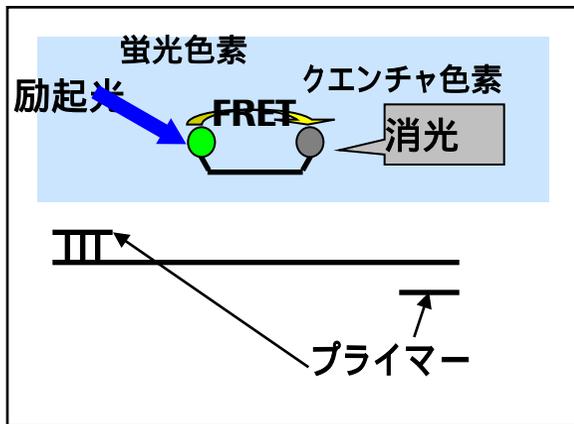


非特異的PCR産物含む



LightCycler® 検出フォーマット 加水分解プローブ (UPL, TaqMan)

- Taq DNAポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性を利用したプローブアッセイ法 (Universal Probe (Library) , TaqMan® Probe)

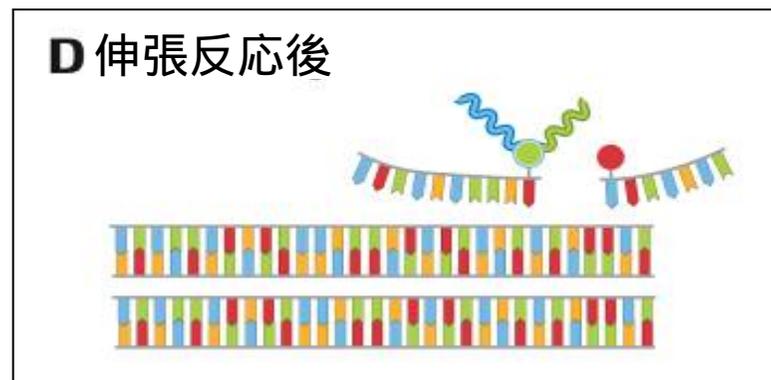
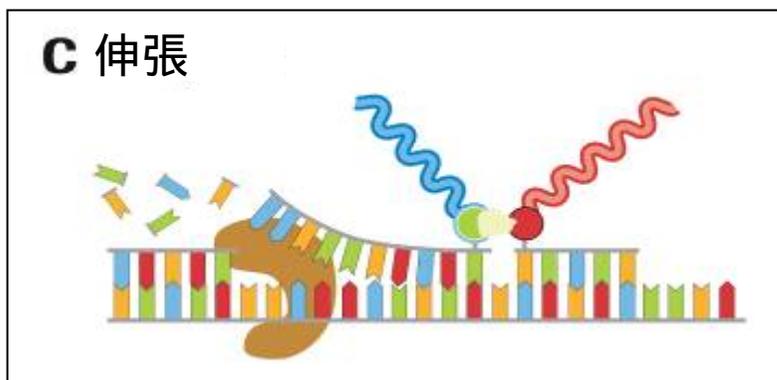
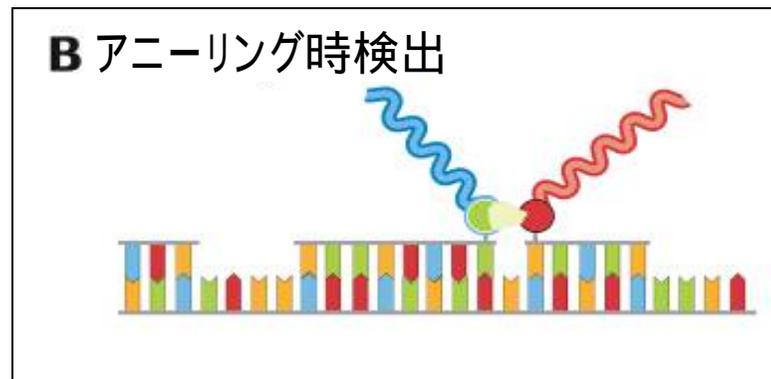
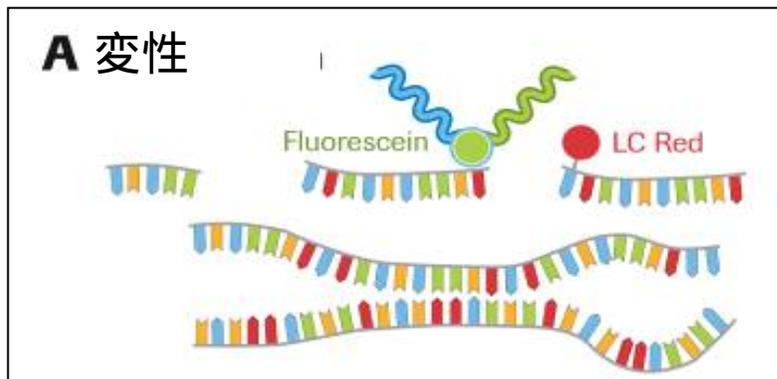


- à プライマー間にプローブが存在しないと蛍光が発せられない (特異性が高い)
- à 蛍光で標識した配列特異的プローブの準備が必要
- à SYBRよりもコストがかかる (20 ~ 120円 ~ /反応)

LightCycler® 検出フォーマット

ハイブリダイゼーションプローブフォーマット

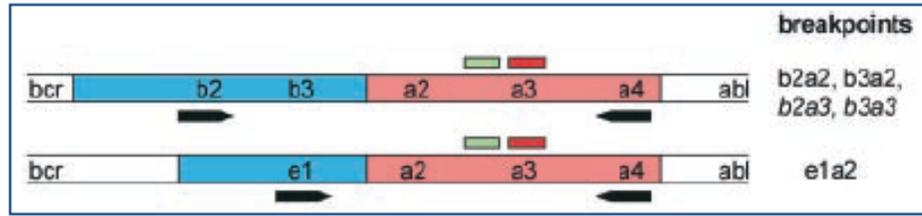
HybProbe プローブ



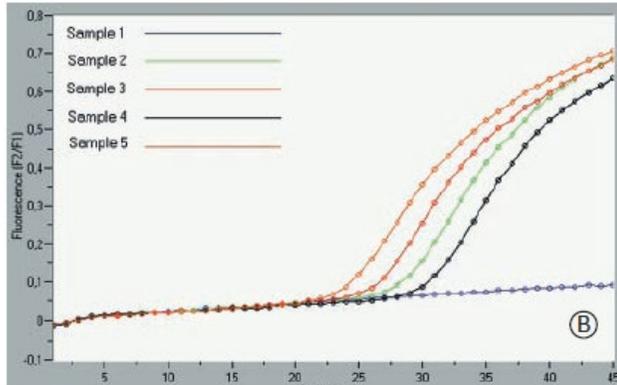
	DNA結合色素 (SYBR Green)	加水分解プローブ法 (UPL/TaqMan)	ハイブリプローブ
	プライマー	プライマー & プ ローブ	プライマー & プローブ
デザイン簡便性			
実験立ち上げの 簡便性			
特異性			
安定性、正確性			
マルチプレックス	×		
融解曲線解析		×	
特徴	プライマーダイマ ーに弱い	特異性が高い	有名ではない

定量的リアルタイムPCRの例

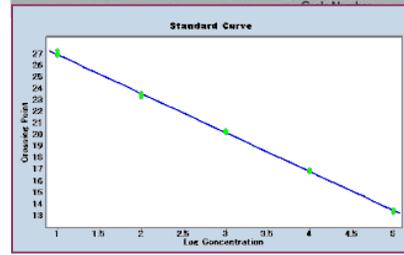
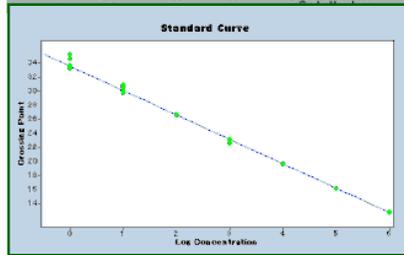
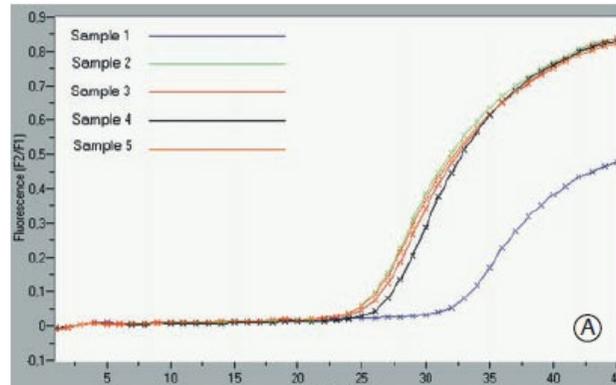
bcr-abl t(9;22)転座



BCR-ABL



G6PDH



Sample	Calculated concentrations in pg		
	BCR-ABL	G6PDH	BCR-ABL/G6PDH
Blood sample 1	n.d.	0.438	-
Blood sample 2	6.95	72.7	0.096
Blood sample 3	37.5	49.8	0.753
Blood sample 4	2.02	28.4	0.071
Blood sample 5	205	66.7	3.07



血液



RNA抽出 (40分)



MagNA Pure Compact System



cDNA合成



リアルタイムPCR

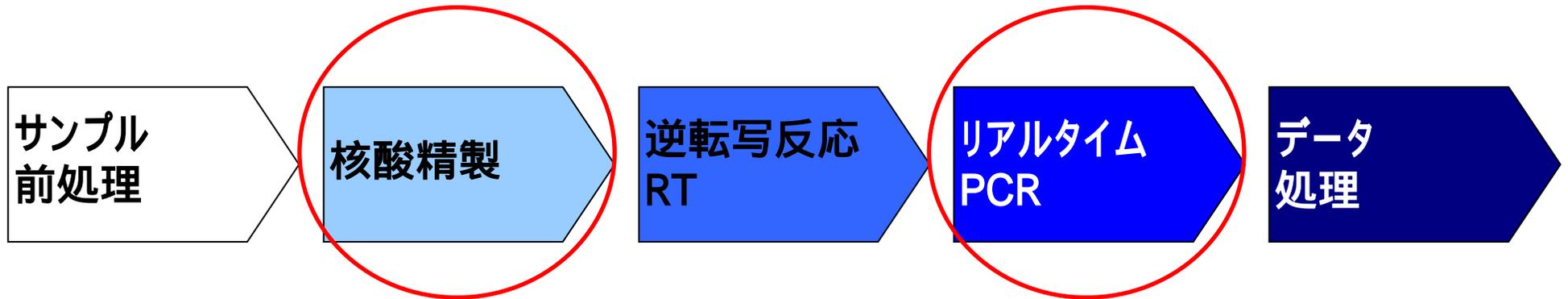
はじめに

定量PCR実験のデザイン

サンプルの準備

融解曲線分析

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (リアルタイムPCRに必要なデータ)

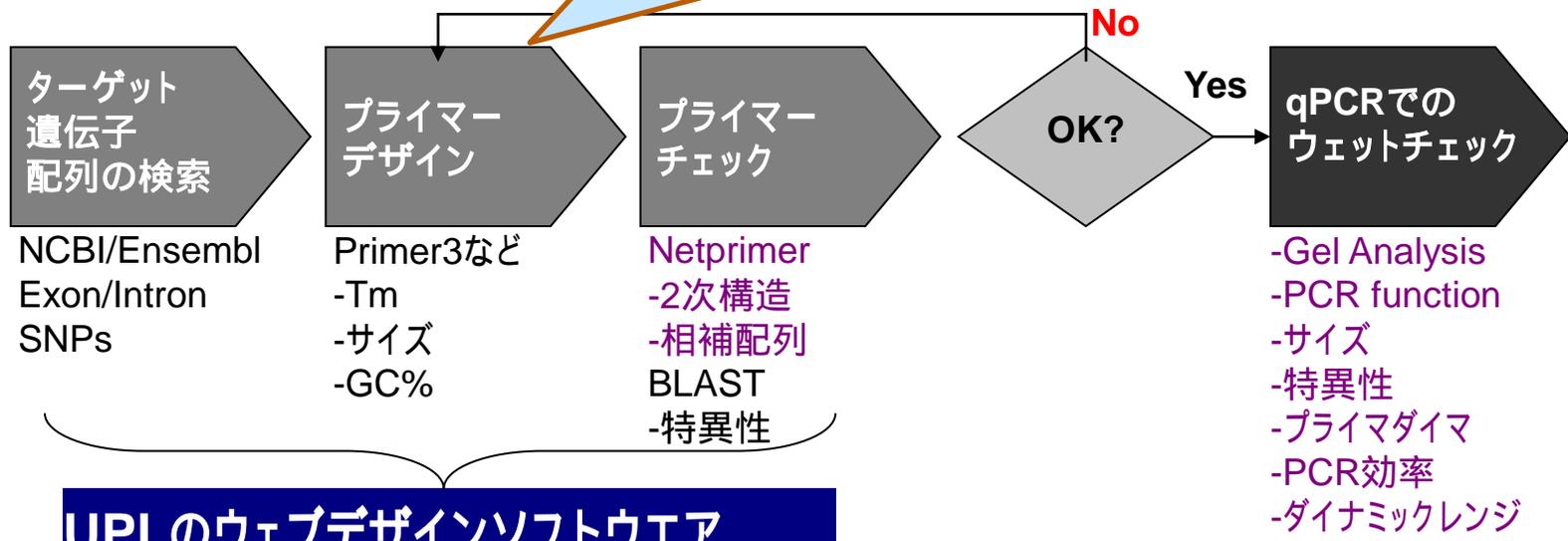


ステップ	必要なデータ
サンプル前処理 サンプル記述 処理過程 凍結方法・処理までにかかった時間 固定方法・処理までにかかった時間 保存状態・期間	核酸精製 処理過程 (使用機器) ・使用キット (改変法の場合は詳細) ・DNase/RNase処理の詳細 夾雑の評価 (RNA/DNA) 核酸量の定量 ・機器・方法 ・純度 (A260/280) ・回収量 ・RIN (バイオアナライザーの場合) PCR阻害剤のチェック
逆転写反応 RT テンプレートRNA量 反応液量 RTプライマーの種類とその濃度 RT酵素の種類とその濃度 RT反応条件 (温度・時間)	リアルタイム PCR 目的遺伝子情報 ・名称 ・アクセッション番号 アンプリコン情報 ・アンプリコン長 ・In silicoチェック (Blastなど) 各プライマー・プローブのデザイン位置 スプライトバリエーション情報 プライマー配列 PCR反応液量とテンプレート量...
	データ処理 解析ソフトウェアの種類とバージョン Cp値の決定方法 異常値の同定 NTCの結果 選択したリファレンス遺伝子の数とその判断基準 標準化方法 テクニカルレプリケートの段階と設定数 アッセイ内の再現性 結果出力に用いた統計解析方法

Stephen A. Bustin *et al.* 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin.Chem.* 55(4); 611-622

プライマー・プローブデザインフローチャート

- プライマーペア (DNA結合蛍光色素法・プローブ法)
 - アンプリコンサイズ：60-150塩基
 - Tm値：59-61
 - プライマーサイズ：18-27塩基
 - GC含有比率：20-80%
 - プライマーペアの3'末端部に相補的な配列を持たない
- 加水分解プローブ (プローブ法)
 - プローブTm値：68-70
 - プローブGC含有比率：30-70%
 - プライマーとの相補的な配列を避ける



**UPLのウェブデザインソフトウェア
フリーアクセス**

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/adc.jsp>

- 自動サンプル抽出
- 細胞・組織分散用酵素**
- 増幅用ツール
- リアルタイムPCRシステム
- Universal ProbeLibrary
- MagNA Pure 96 システム
- RealTime ready
- タンパク質発現
- トランスクリプター ハイファイデリティ
- トランスフェクション試薬
- プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビター
- ラベリングと検出

研究用試薬・機器事業

ゲノミクスから、プロテオミクス、サイトミクスまで豊富な製品ラインナップで、お客様のニーズにお応えします。

[> さらに詳しく](#)

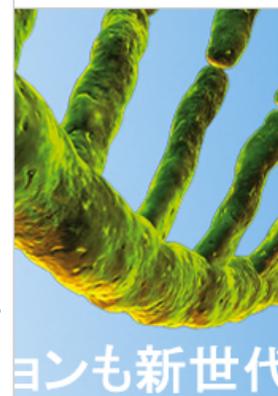
診断薬・医薬品原料事業 (カスタムバイオテック事業) について

診断薬を中心に、医薬品、食品、化粧品など、さまざまな分野の原材料を提供しています。

[> さらに詳しく](#)

顧客サポート

学術的なご相談、資料請求、機器サポートなど、お客様のさまざまなニーズに対応します。



スペシャルサイト

タンパク質発現や、リアルタイムPCR、ゲノムシークエンシングなど、研究テーマごとの特集ページです。具体的な実験例を掲載したアプリケーションノートや、関連参考文献もご参照いただけます。

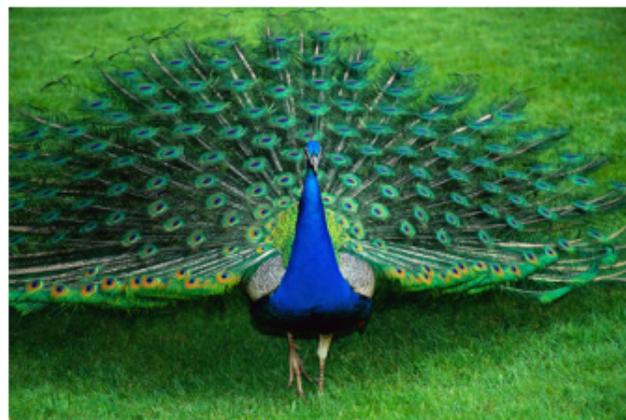
[> さらに詳しく](#)

東日本大震災に関する弊社の対応について

製品供給、保守修理サービス、コールセンター対応などについてご案内しております。

[> さらに詳しく](#)

Universal ProbeLibrary (UPL)



リアルタイムPCR を用いた - 簡便かつ迅速な - 遺伝子発現定量

- ◆ わずかな時間で、リアルタイム定量PCRのアクセイをデザイン アクセイデザインセンターはこちら(無料オンラインツール)
- ◆ アクセイデザインガイド(日本語版PDF)はこちら
- ◆ 製品一覧(オンラインカタログ)はこちら
- ◆ UPLシステム概要はこちら
- ◆ Universal ProbeLibrary スペシャルサイト(英語)
- ◆ 多種多様な生物種に対して、500万を超えるqPCRアクセイが可能なプレリバリデートされた信頼できる165種類ののプローブ
- ◆ Universal ProbeLibrary ヒトリファレンス遺伝子アクセイで、マルチプレックスqPCRアクセイを実施すれば、遺伝子発現解析のコストを削減できます。
- ◆ あらゆるリアルタイムPCR機器上で、標準プロトコルを用いて、リアルタイムPCRを実施可能です。
- ◆ **New!** LightCycler® 480 システムで、すぐに使用できる Universal ProbeLibraryアクセイ充填済みプレート新登場!

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>

Universal ProbeLibrary Assay Design Center

Roche Applied Science

The ProbeFinder software allows you to perform a fast and easy design of real-time PCR assays for your targets of choice.

It will select an optimal combination of a Universal ProbeLibrary probe and a gene-specific primer set.

To start the design process, select an organism

- enter the gene accession number, gene name, or
- paste a sequence in the appropriate field

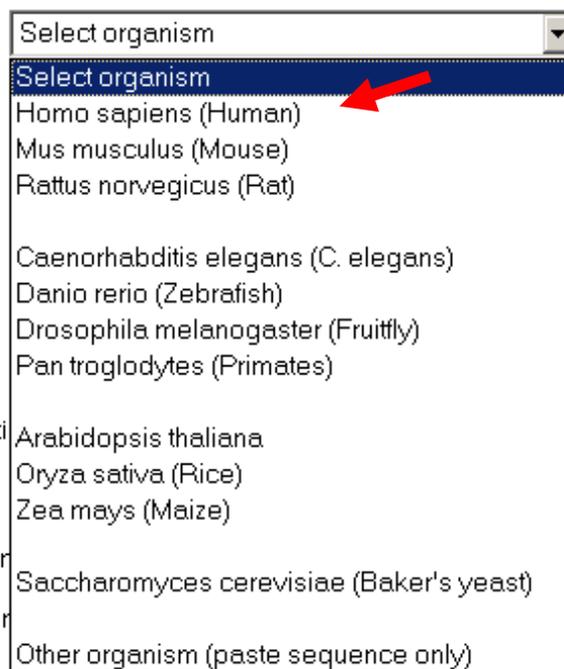
Assays for Human, Mouse or Rat targets can now be combined with a reference gene assay.

Need more information?

- ① Design [batch assays](#) for up to 10 independent assays at a time
- ① Find [common assays](#) for all members of a gene family or
- ① Discriminate them as well as [splice variants](#) of a gene

The [ProbeFinder Quick reference](#) gives you a short guidance on

For a detailed description of all features of ProbeFinder, you can read the [Guide](#).



Select organism

- Select organism
- Homo sapiens (Human)
- Mus musculus (Mouse)
- Rattus norvegicus (Rat)
- Caenorhabditis elegans (C. elegans)
- Danio rerio (Zebrafish)
- Drosophila melanogaster (Fruitfly)
- Pan troglodytes (Primates)
- Arabidopsis thaliana
- Oryza sativa (Rice)
- Zea mays (Maize)
- Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)
- Other organism (paste sequence only)

Universal ProbeLibrary for Human

Roche Applied Science

Specify your target(s):

[Advanced primer3 settings](#)

By sequence ID, gene name or keyword

e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin

X00351

or

By sequence

e.g.

>part of X00351 Human mRNA for beta-actin

```
CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC
AAGGCCAACCCGAGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG
TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCCTCTGGCCGTACCACCTGGCATCGTG
ATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCATCTACGAGGGGATGCCCTCCCC
```

Automatically select an intron spanning assay. Design multiplex PCR with reference gene.

Preferred Reference Gene: Any

Design

[Primer Finder Version: 2.45](#)

Any
Any
ACTB
B2M
G6PD
GAPD
GUSB
HPRT
PBGD
PGK1
PPIA
TBP

Exon/intron構造を考慮してデザインします

サーチが始まります

チェックを入れると、プルダウンからリファレンス遺伝子を選択できます。UPLでマルチプレックスで行う際に交差しない候補が選択されます。

Universal ProbeLibrary for Human

Roche Applied Science

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[X00351.1|X00351:EMBL|HIT000320859:H-InvDB](#) Human mRNA for beta-actin

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probe: #64, cat.no. 04688635001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	382 - 399	60	56	ccaaccgcgagaagat ga
Right Primer	20	459 - 478	59	60	ccagaggcgtacagggat ag

Amplicon (97 nt)

ccaaccgcgagaagat gaccagatcat gtt gagacct caacacccagccat gtacg
ttgctatccaggctgtgctatccctgtacgcctctgg

Download pack insert

PDF report

Text report

Order probes or set

Multiplex details:

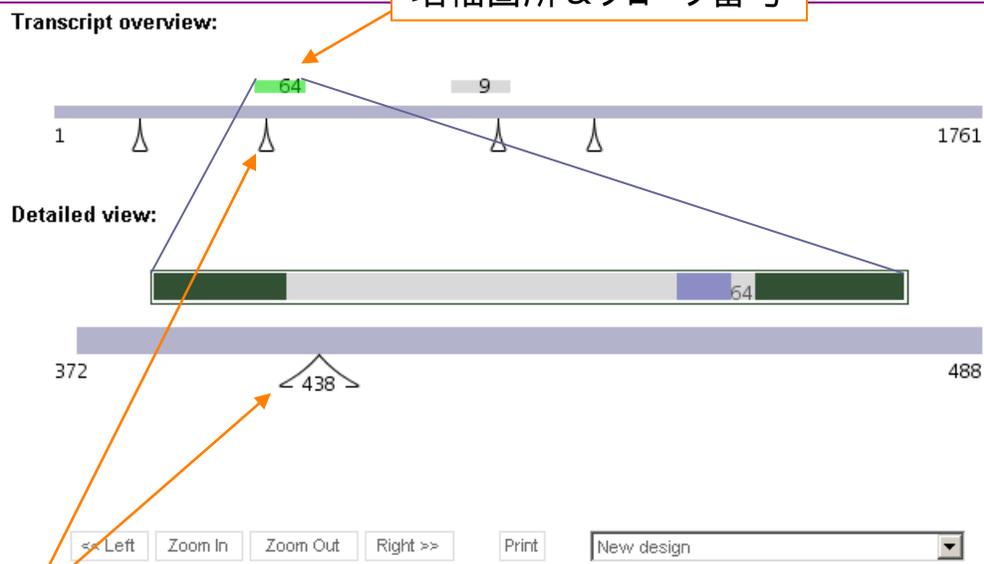
Run in multiplex PCR with

B2M

UPLプローブの番号

プライマー配列: SYBR Greenの反応に利用できます。

増幅箇所 & プローブ番号



Intronの位置

その他の候補のリスト

Figure legend

Probe	Rank	Position	Score (mouse over for details)	Multiplex PCR with
#64	1	449	All criteria met	B2M
#9	2	782	All criteria met	B2M

プライマー・プローブデザインフロー

qPCRでのウェットチェック



反応条件の検討:

プライマー 500nM(100-1000nM)

Probe 200nM(50-200nM)

DNA(50pg-50ng)

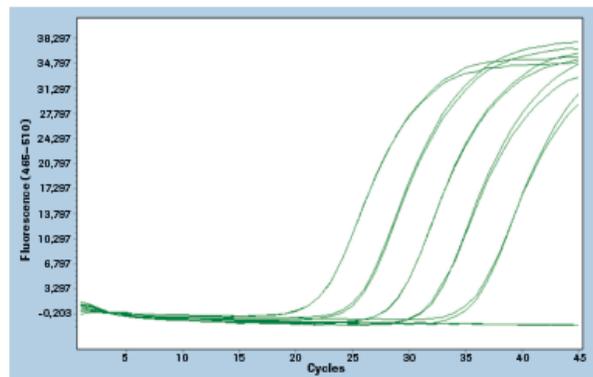


Figure 2: Amplification curves of human peroxiredoxin 3 gene assay evaluation. Dilution series: 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, and a no template control.

Concentration	Mean Cq	SD Cq
50 ng	22.14	0.019
5 ng	25.42	0.054
0.5 ng	28.69	0.030
0.05 ng	31.86	0.050
0.005 ng	35.62	0.043
NTC	-	-

Table 1: Mean Cq and standard deviation of the different dilutions of peroxiredoxin 3.

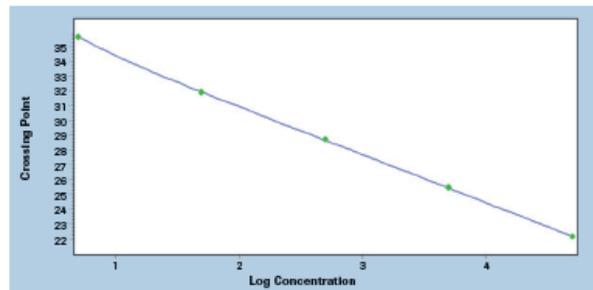


Figure 3: Standard curve of peroxiredoxin 3. 10-fold dilution series from 50 ng to 5 pg.

Slope	- 3.25
r ²	- 1.00
Efficiency	2.03
Mean Cq 50 ng	22.14
Mean Fluo Hub 50 ng	35.25
Overall Score	Pass

Table 2: Amplification efficiency and related data.

- 増幅特異性
- シグナル強度(S/N)
- ダイナミックレンジ
- PCR効率

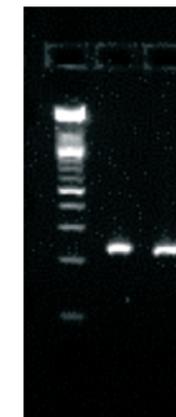
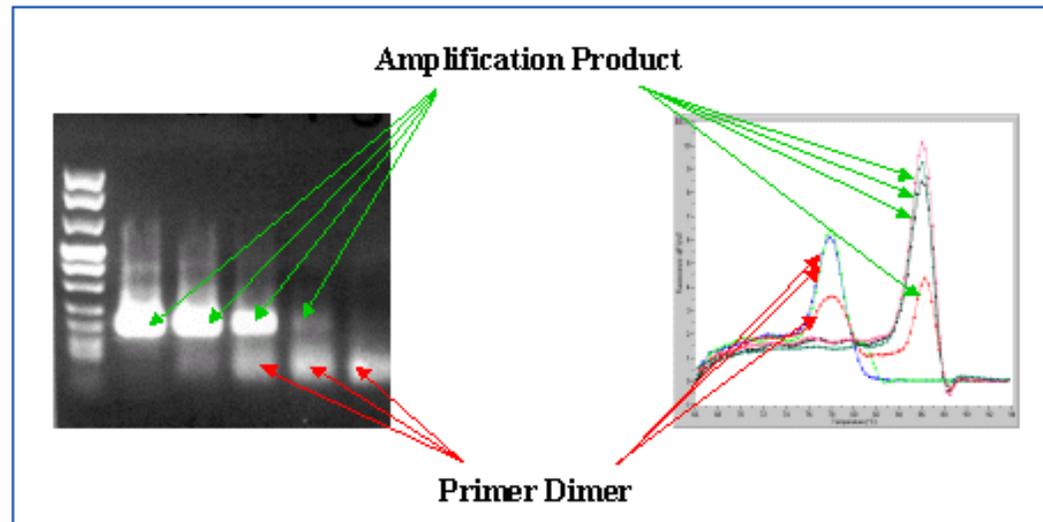
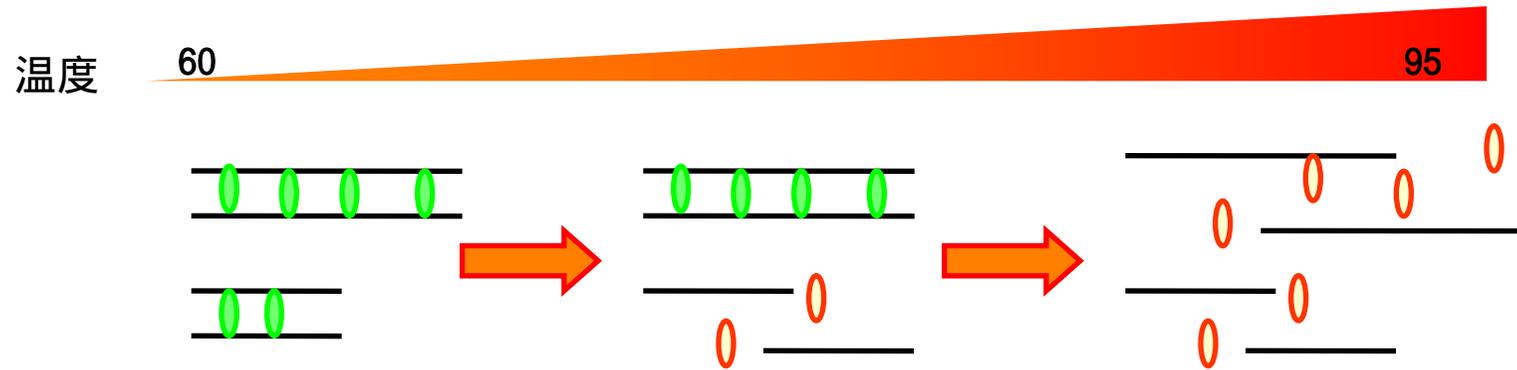


Figure 4: Gel analysis of peroxiredoxin 3 assay: 4% agarose gel. Right lane: an aliquot of the 50 pg dilution is applied to the gel. Middle lane: aliquot of 50 ng dilution. Left lane: 50 bp ladder.

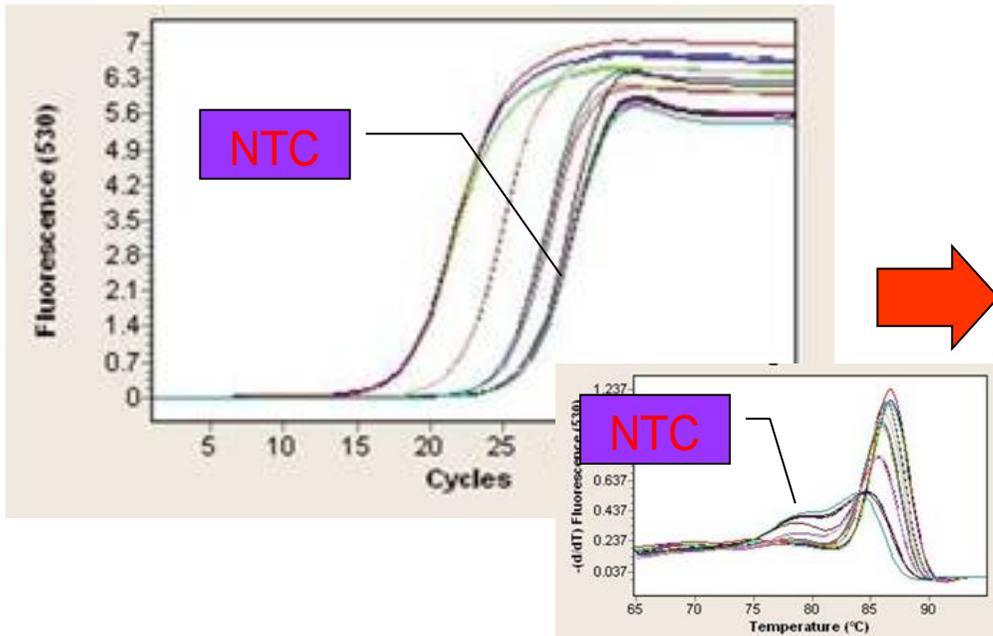
SYBR Green の場合 融解曲線分析

- 目的遺伝子のみを増幅していることを確認
 - 融解温度曲線の原理

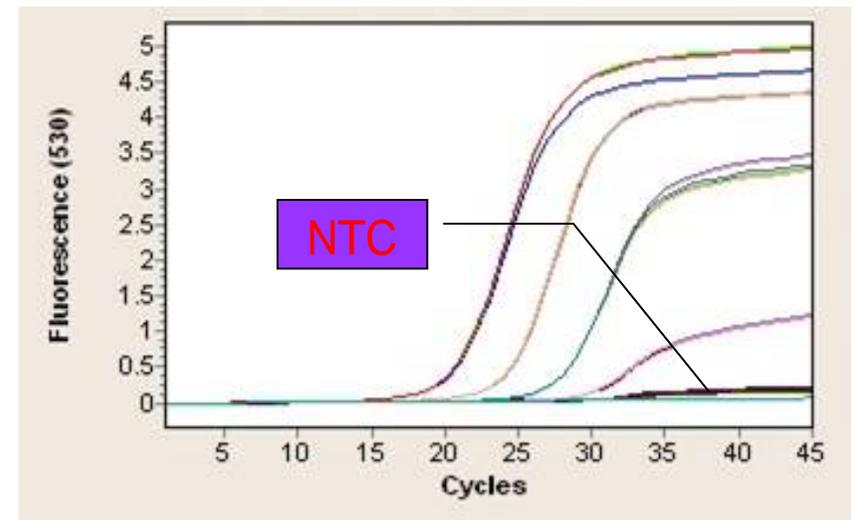


実験データ (SYBR UPL)

SYBR Green I



UPL



目的遺伝子: GAPDH

テンプレート: インハウスでRNAより逆転写されたcDNA: 希釈系列 (3重測定)

PCR 試薬: LightCycler® TaqMan Master (UPL アッセイ用)

LightCycler® Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I (SYBR Green I アッセイ用)

データは Amy Jassen, Ph.D., New England Primate Research Center, Harvard Medical School, Boston, USA より提供

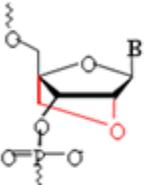
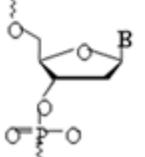
Universal ProbeLibrary (UPL)

ユニバーサル プロブライブラリー



n 8 ~ 9merの加水分解プローブ (LNA: Locked Nucleic Acids 技術によりT_m値 68-70 に)

n 高い特異性: ミスマッチ塩基配列への結合を排除できる

	Perfect Match	Single Mismatch	ΔT_m
 LNA 8-mer 5'-TGCIGGTG-3'	3'-ACGACCAC-5' 71°C	3'-ACGGCCAC-5' 45°C	26°C
 DNA 8-mer 5'-TGCIGGTG-3'	35°C	25°C	10°C

n コンピュータ上で反復配列、単純配列、ヘアピン等の問題が無い165種類のプローブを選択

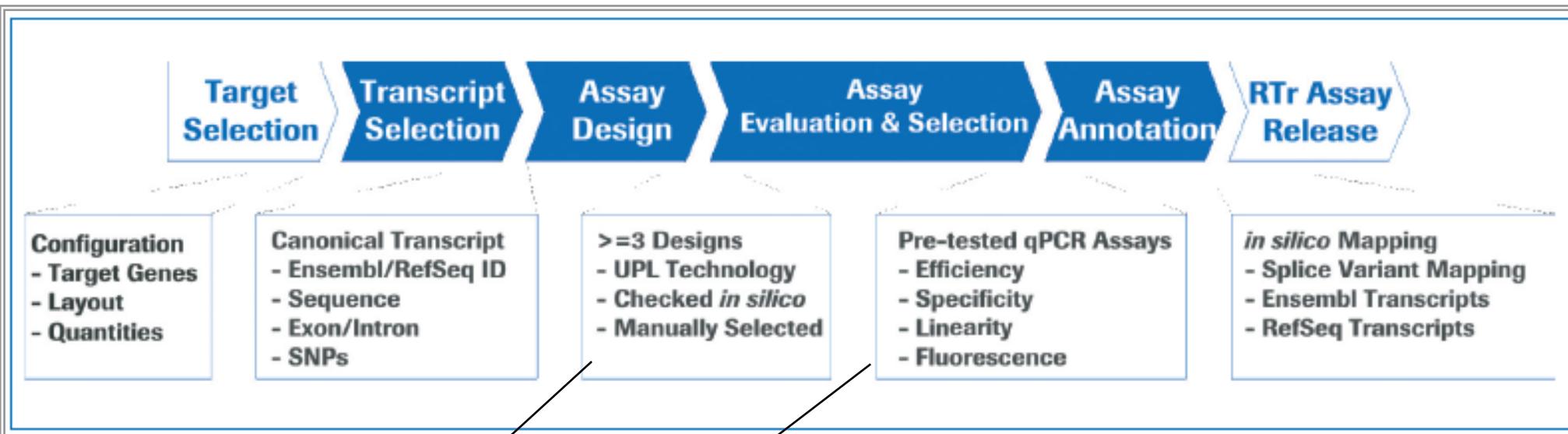
n 11種の生物種をカバー

- ・ 約90種のプローブで、各生物種のcDNA配列の95 ~ 99%をカバー

n 価格が安価なためSYBR-Green並みの料金で系の構築が可能

n 目的の遺伝子ごとにウェブよりプライマーとセットでデザインされる

RealTime ready アッセイ/パネル ウェットテスト済のアッセイ



- 各ターゲット遺伝子に対して三つのアッセイを設計、合成

最も優れたアッセイが選択される
各アッセイに対して、

- 50 ng - 5 pg cDNAの10倍希釈系列、およびNTCをデュプリケート
- ü PCR効率が2.0 +/- 0.2(つまり100 +/- 10%)
 - ü もっとも濃いcDNA濃度のCqが34以下になる
 - ü リニアダイナミックレンジが最低 3 log
 - ü 4%アガロースゲル電気泳動で副産物が検出されない
 - ü 増幅曲線がシグモイドカーブを描く
 - ü 増幅曲線の蛍光強度が5-50蛍光強度の範囲内である

MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment

E: Essential, D: Desirable

チェック項目	重要度	UPL
qPCR ターゲット情報		
アクセッション番号	E	
アンプリコンの位置	D	
アンプリコンの長さ	E	
<i>In silico</i> での特異性チェック (BLASTなど)	E	
Pseudogenes、retropseudogenes やその他のホモロジーについて	D	
配列アライメント	D	
アンプリコンの2次構造解析	D	
エクソンまたはイントロンによる各プライマーの位置	E	
どのスプライスバリエントがターゲットか？	E	
qPCR オリゴヌクレオチド		
プライマー配列	E	
RTPrimerDBの識別番号	D	-
プローブ配列	D	
各種修飾の位置、同定	E	-
オリゴヌクレオチドの製造元	D	
精製方法	D	



はじめに

定量PCR実験のデザイン

サンプルの準備

融解曲線分析

組織の破碎



破碎方法	器具	対象サンプル
ビーズ式		比較的柔らかい組織(肝臓、脳など) 比較的柔らかい微生物(バクテリア、放線菌) 比較的弾力のある組織(皮膚、腸、筋肉など) 比較的硬い組織(植物、骨、髪など)
超音波		比較的柔らかい組織(肝臓、脳など) 比較的柔らかい微生物(バクテリア、放線菌) DNAの剪断
回転刃 (ポリトロン)		比較的弾力のある組織(皮膚、腸、筋肉など) 比較的硬い組織(植物、骨、髪など)
乳鉢/乳棒		

MagNa Lyser

- 完全な破碎
- あらゆるサンプルタイプに対応
- コタミの心配が要らない
- 動物組織、植物、食物などのホモジナイズに最適
- 一度に多検体を迅速にホモジナイズ可能
- 手技者によらず常に同クオリティー

MagNA Pure Compact System



1サンプル分のバーコード付試薬カートリッジ



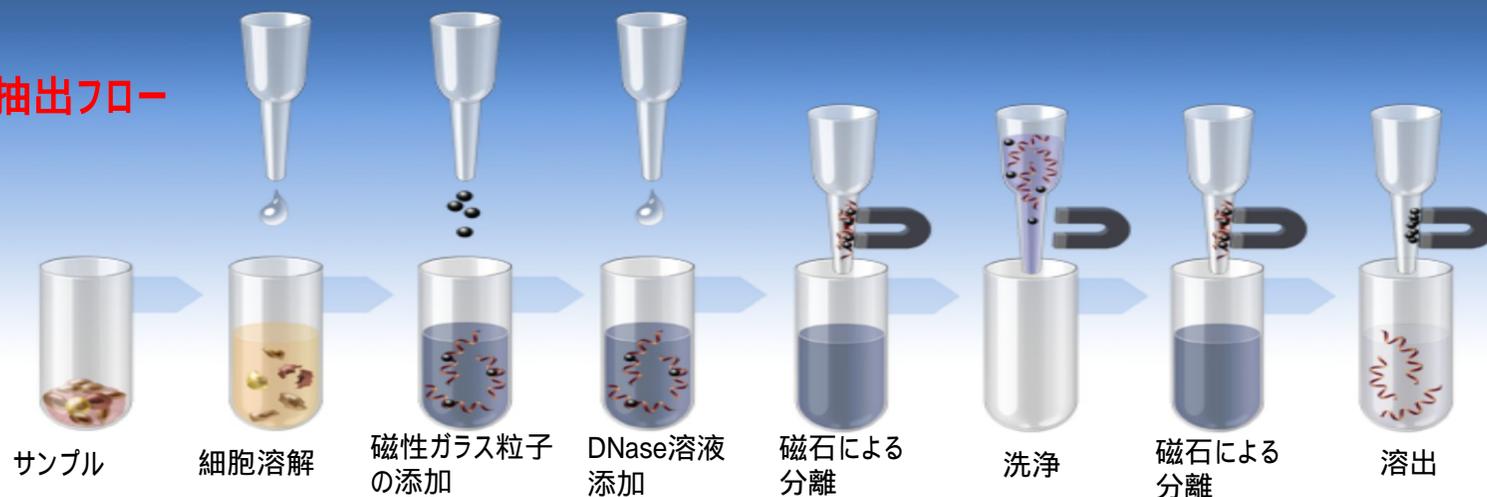
チップトレイ・フィルター付チップ・ピアッシングツール



	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume	MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit I
サンプル	100, 200, 300, 400 μ l 血液, 血清, 血漿, 5x10 ⁵ - 1x10 ⁶ cells	500, 1,000 μ l 血液, 血清, 血漿, 1x10 ⁶ - 2x10 ⁶ cells	10mgまでの ・動物組織 ・凍結動物組織 ・RNA later固定組織
核酸	血液 DNA 血清, 血漿 DNA, RNA 細胞 DNA	血液 DNA 血清, 血漿 DNA, RNA 細胞 DNA	total RNA
溶出	血液 100, 200 μ l 血清, 血漿 50, 100 μ l 細胞 200 μ l	血液 (500 μ l) 100, 200 μ l 血液 (1000 μ l) 200 μ l 血清, 血漿 50, 100 μ l 細胞 200 μ l	50, 100 μ l 例 Mouse Liver(10mg) 30-50 μ g Human placenta(10mg) 8-15 μ g

MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit

RNA 抽出フロー



各種プレパックカートリッジをサンプルをセットしたらプログラム 45分でDnase 処理済RNAの抽出が完了

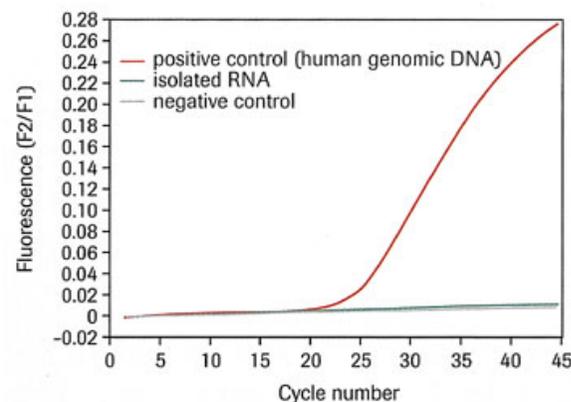
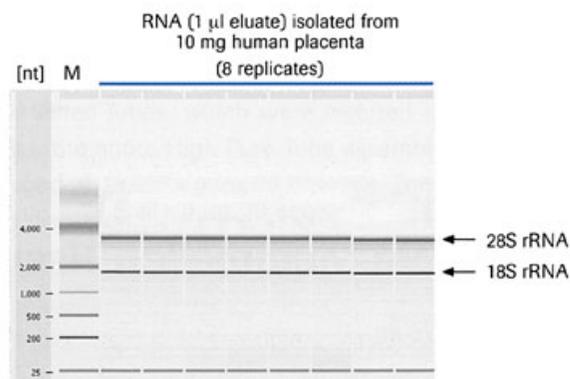


図1: RNAの完全性とアッセイの再現性。

RNAは10 mgのヒト胎盤から分離精製されました; 1 μ lの各溶出液を、Agilent 2100 Bioanalyser を使用しRNA 6000 Nano Chipで解析しました (M, Ambion RNA 6000ラダー)。

図5: DNA混入の確認。

ヒト胎盤からのRNA溶出液中におけるゲノムDNAの残存について、ライトサイクラーによるcycA特異的PCRでチェックしました。2 ngのヒトゲノムDNAを陽性コントロールとし、水を陰性コントロールとしました。

はじめに

定量PCR実験のデザイン

サンプルの準備

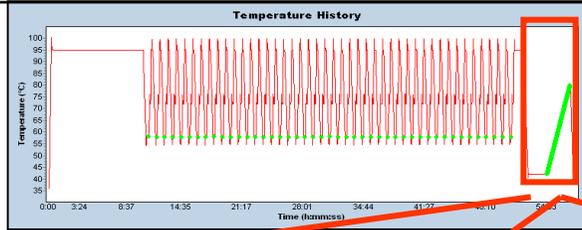
融解曲線分析

融解曲線分析 (Melting Curve Analysis) の機能拡張

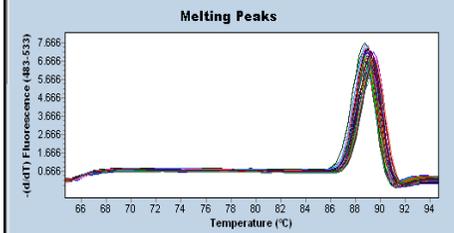
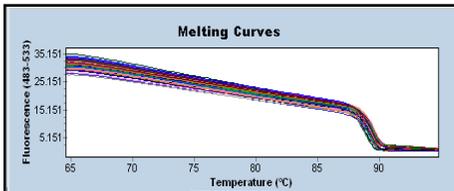
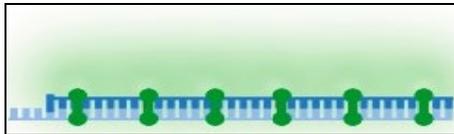
～ 遺伝子バリエーションのスクリーニング～



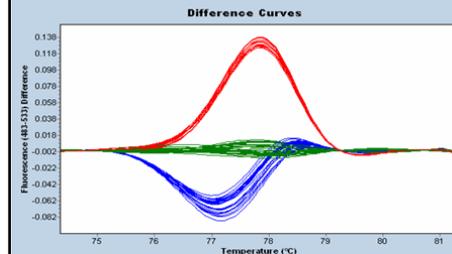
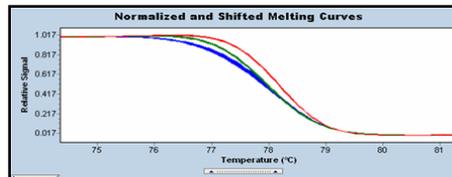
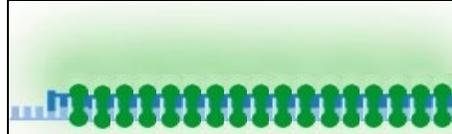
ライトサイクラーはすべてのアプリケーションに対応！！



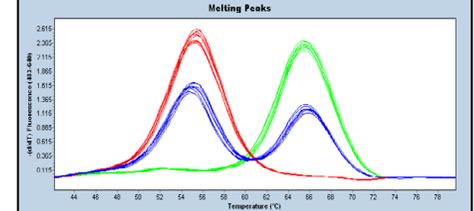
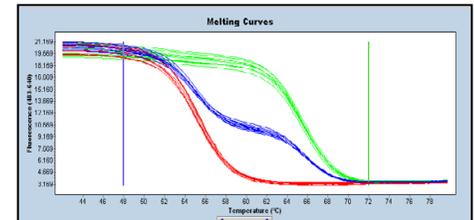
SYBR Green I による
PCR産物の同定



High Resolution Melting Dye
による遺伝子スクリーニング



蛍光標識したProbeによる
既知のSNPタイピング



High Resolution Melting “HRM” Analysisとは？



2本鎖DNA特異的結合色素を使用して、2本鎖DNAが1本鎖に解離する温度(T_m 値)を測定し、その融解曲線の温度プロファイル解析すること

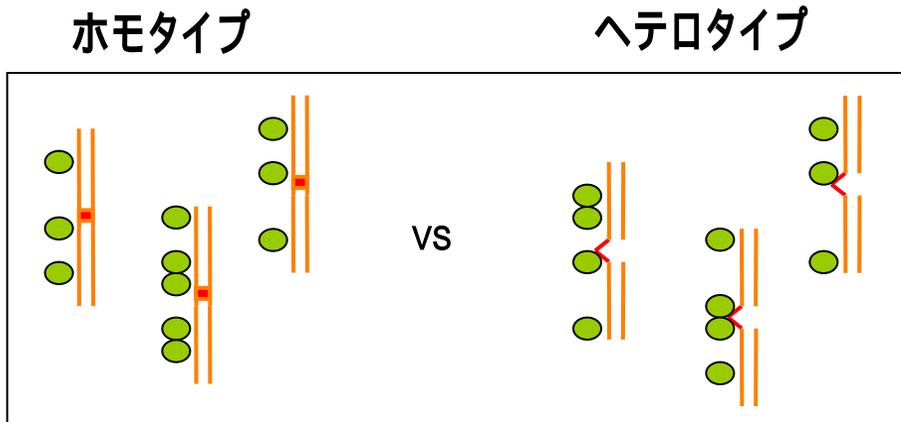


・フラグメントの長さ
・GC含量
・温度率上昇と取得シグナル数
などの要因によって T_m 値は決まります

LightCycler 480の誇る均一で正確な温度制御能が
正確なアッセイを可能にします！！

HRMの原理：なぜSYBR Green IではHRMが出来ないのか？

dsDNA特異的な新規 飽和型蛍光色素 (HRM Dye)

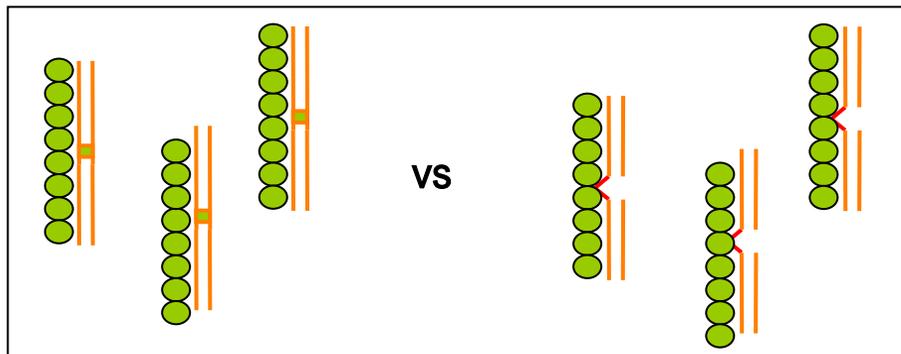


不飽和型 蛍光色素

融解時に蛍光色素が移動し、安定しません。

e.g., SYBR Green I

- 融解ピークがシャープではない。
- 解像度が不十分



飽和型 蛍光色素 (HRM Dye)

Reso LightDye など

PCR産物に対して飽和した状態で結合

- 均一なシャープなシグナルが得られる
- ホモタイプとヘテロタイプの識別が可能

1塩基の違いでも識別可能に！

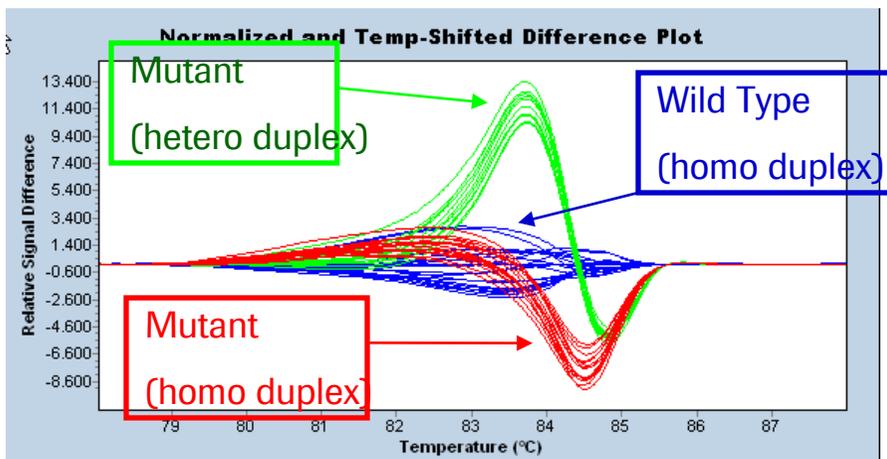
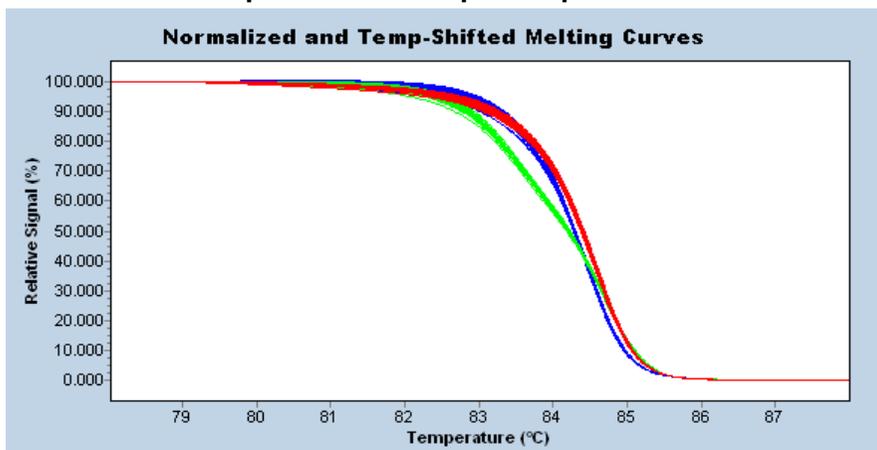
HRM解析



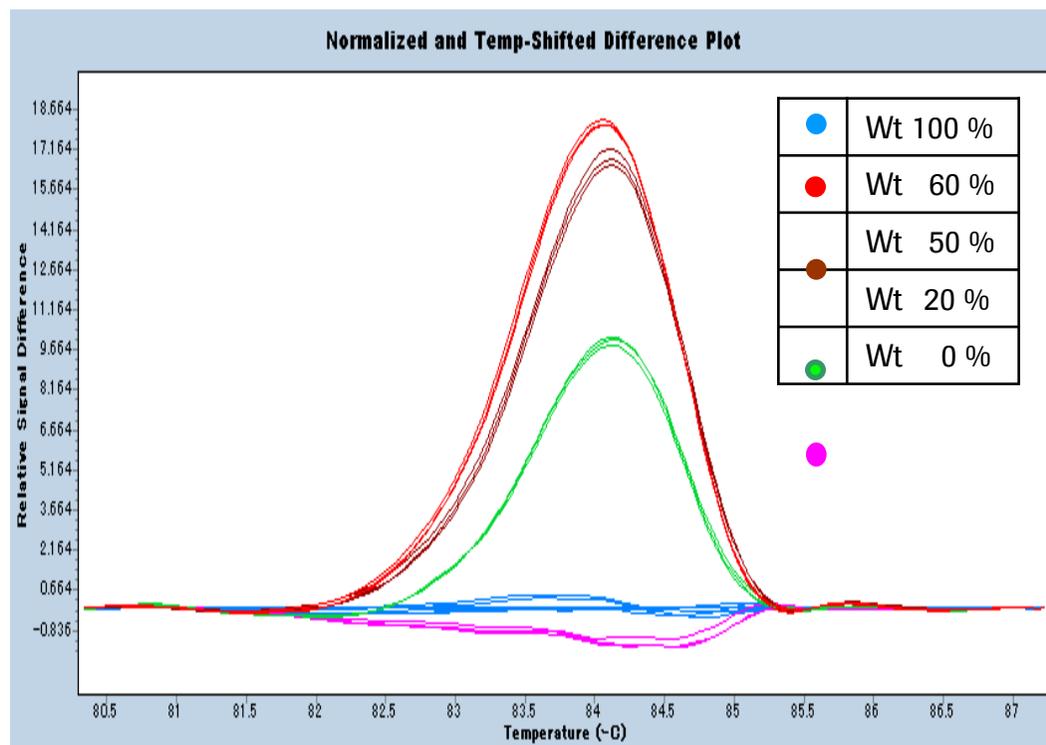
例1: LPLH3

Sequence variations
(SNP G® T)

72 samples, 164 bp amplicon



例2: 1塩基置換DNAの混合比の違い



HRM解析を用いた研究例

乳がん・卵巣がん関連遺伝子 BRCA1 遺伝子の変異解析例～

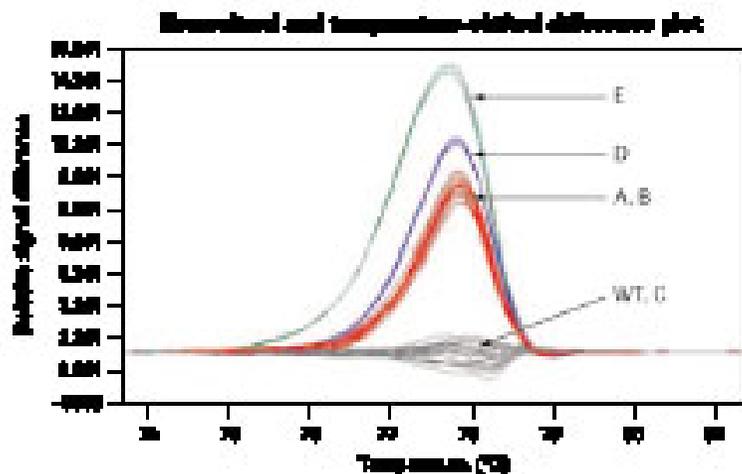


図2：BRCA1 フラグメント 1 の解析。

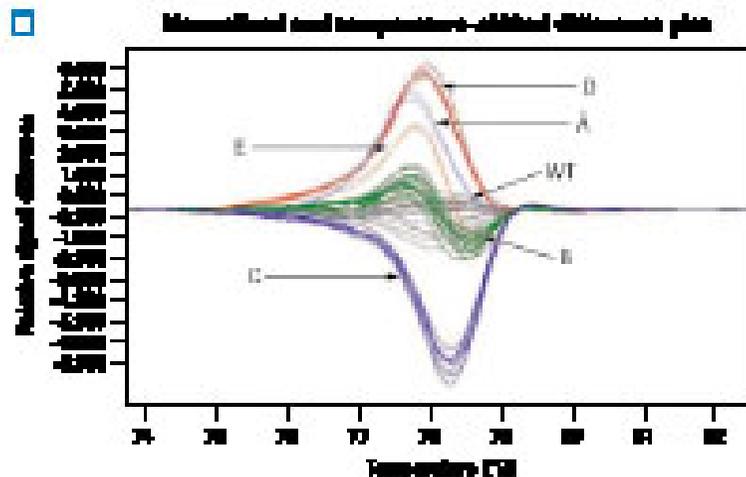


図3：BRCA1 フラグメント 3 の解析

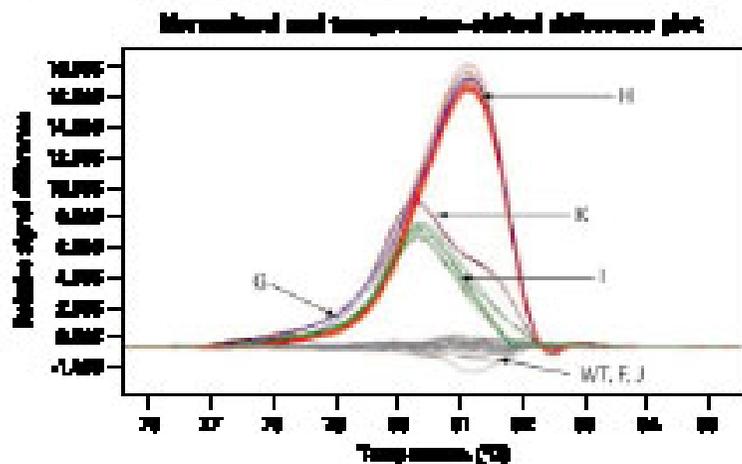


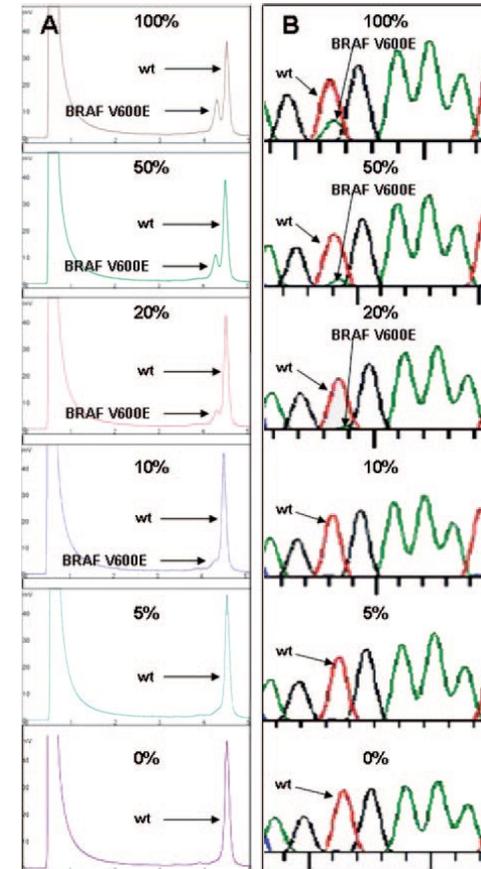
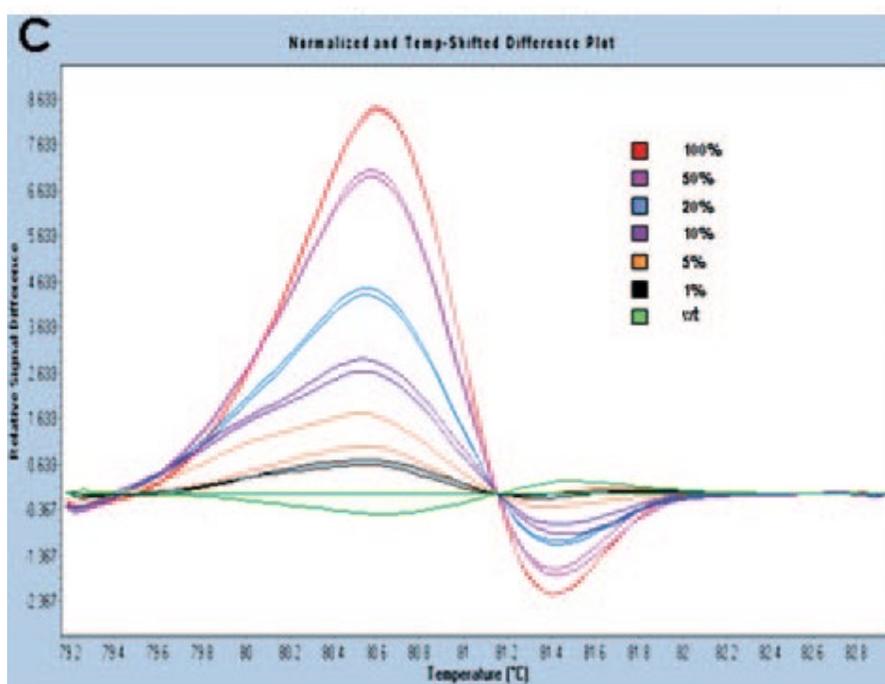
図3：BRCA1 フラグメント 2 の解析。

200 μ L の血液サンプルからMgaNA Pure LC 全自動核酸抽出機を用いてゲノムDNA抽出。HRM解析を行った。

すべてのヘテロ接合体のバリエーションが、良好な感度で野生型と区別して解析することができたため、未知のヘテロ接合体のバリエーションが高感度に検出できると期待されます。

HRM解析を用いた研究例

～ 大腸腫瘍における BRAF V600E 遺伝子変異の検出への応用 ～



野生型に対して、0%、1%、5%、10%、20%、50%、100% の変異型サンプルをスパイクインして、DuplicateでHRM解析の検出限界を確認。20%以下では融解曲線の差分プロットはばらついたものの、99%の野生型のバックグラウンドから1%の変異型の存在を検出可能であった。

本変異のアッセイでは、dHPLCでは10%、シーケンスでは20%以下の変異型の存在比率では、検出不能であった。

出展: Evaluation of High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool to Detect the BRAFV600E Mutation in Colorectal Tumors

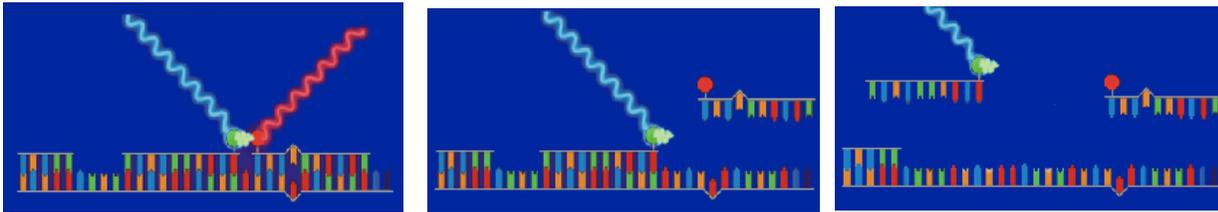
HRMは融解曲線分析の機能拡張:

- シーケンス解析の代わり、あるいはその前段階としてのSNPsやMutation、Deletion、Insertionなどの遺伝子バリエーションをスクリーニング
- 優れた温度均一性を持つThermal Block、飽和型の特別な蛍光色素とHRMに特化した特別な解析アルゴリズムが必要
- ゲル解析に基づいた従来法と比較して特異性、感度、簡便性、スループット、スピード、コストパフォーマンスなどの点で優れた方法

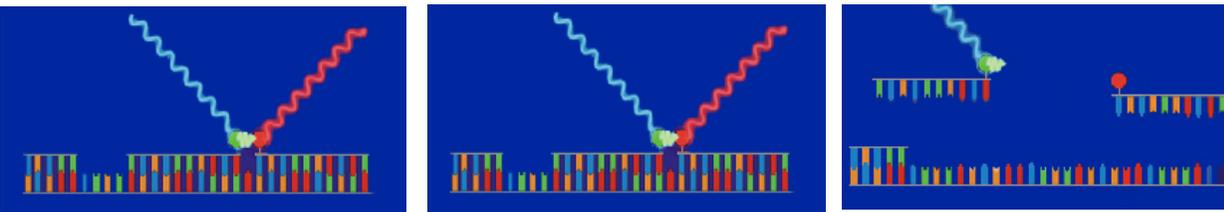
ハイブリダイゼーション プローブによる変異解析 融解曲線分析を用いたSNP解析



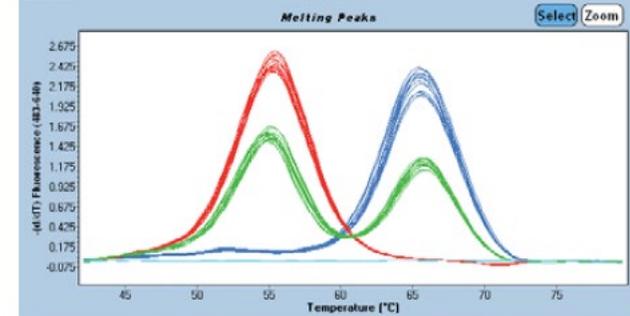
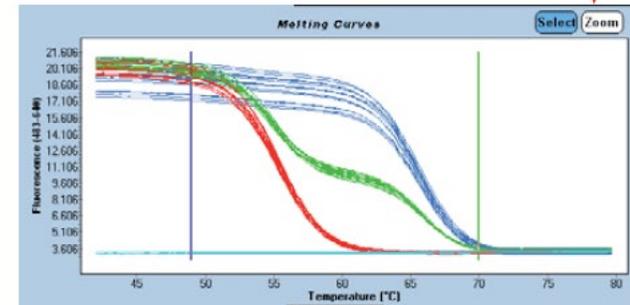
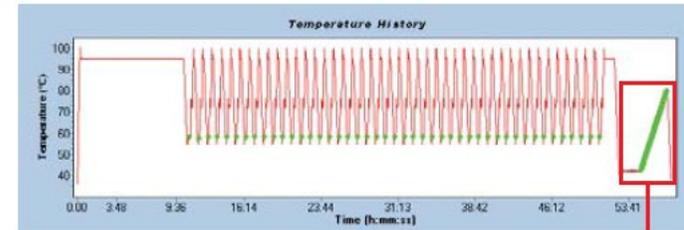
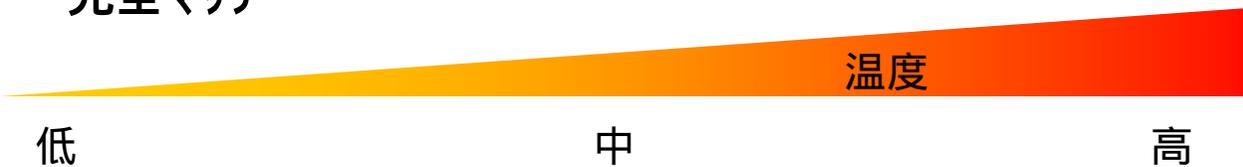
ワイルドタイプにマッチするプローブセットを利用
ミスマッチがあると解離温度が低くなる



ミスマッチ



完全マッチ



- allele x
- heterozygous
- allele y

高

安定性

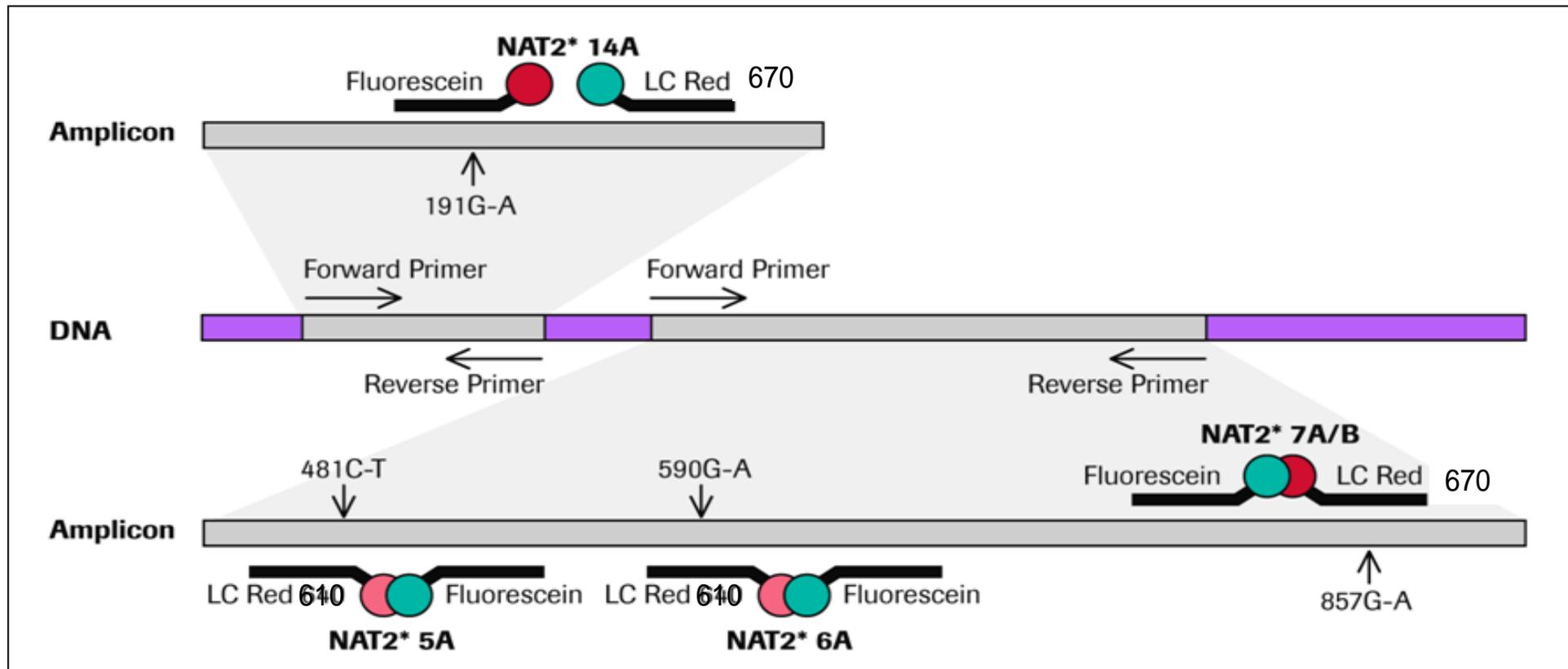
低

35

G:C > A:T > G:G > G:T = G:A > T:T = A:A > T:C > A:C > C:C

マルチプレックスジェノタイピング

2個の増幅産物, 4個のSNPs, 2色測定

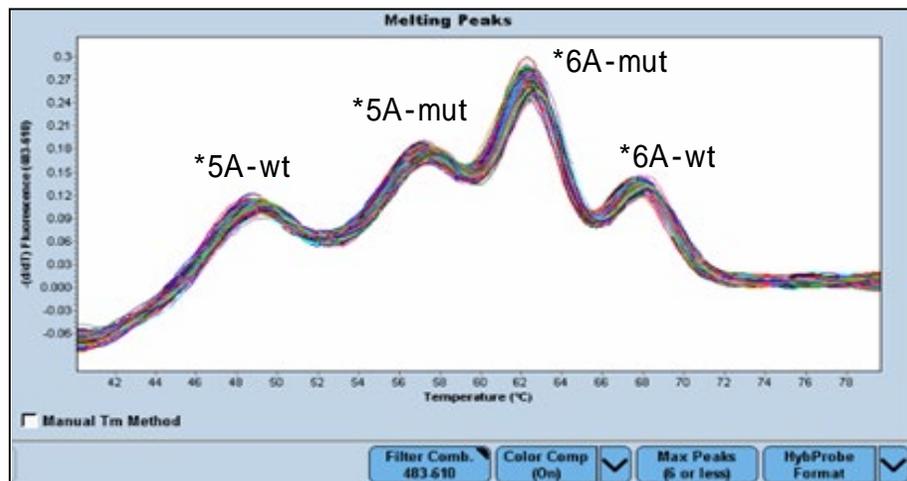


4 NAT-2 SNPsのジェノタイピング



Dual-Colorのハイブリダイゼーションプローブでの検出

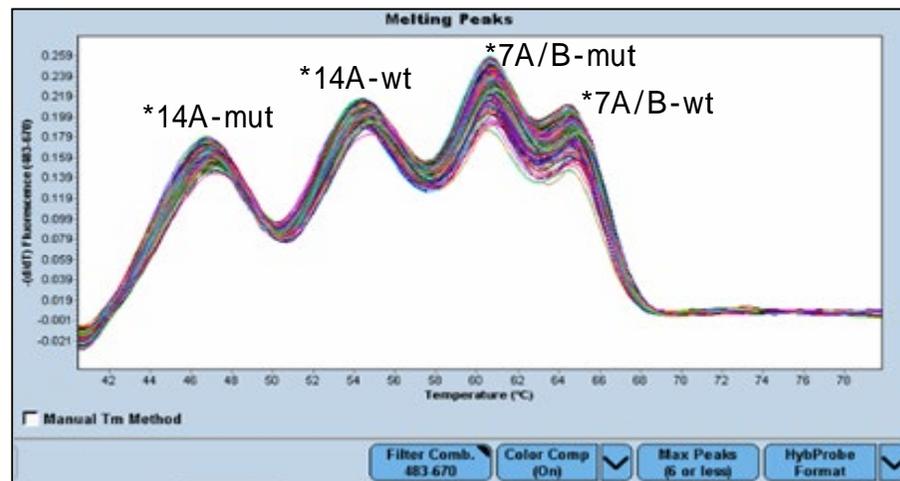
384 重測定の概要



チャンネル 610

Position 481 (NAT2*5A): C/T ヘテロ接合

Position 590 (NAT2*6A): G/A ヘテロ接合



チャンネル 670

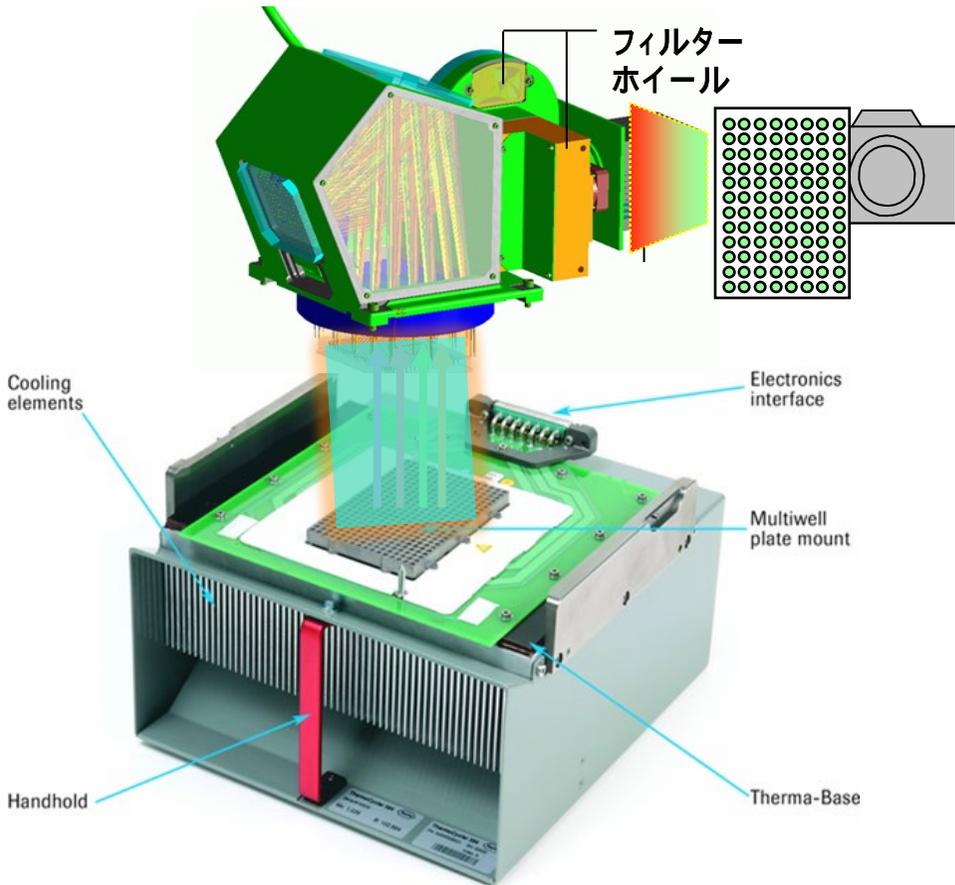
Position 191 (NAT2*14A): G/A ヘテロ接合

Position 857 (NAT2*7A/B): G/A ヘテロ接合

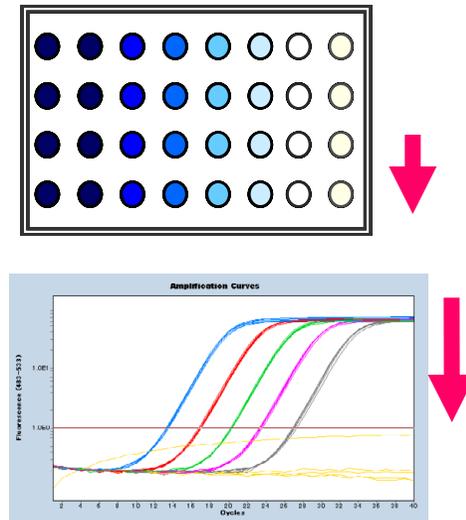
リアルタイムPCRシステムに求められるもの



LightCycler® 480を例に



PCR中、システムは各サイクルの蛍光量を自動的に取得する。これにより、PCR産物の増えていく様子をモニターすることが可能となる。



研究者はPCRをかけるだけで定量結果を得ることが出来る

システムに求められること:

- サーマルサイクラー部分の温度均一性
- 蛍光検出部分の光学均一性

温度均一性 -LightCycler 480-



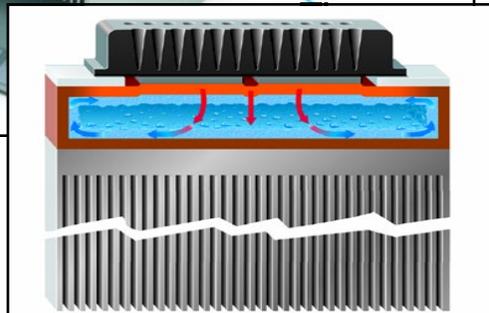
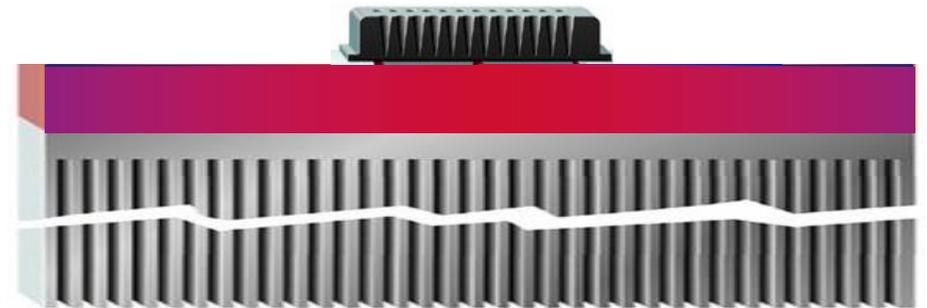
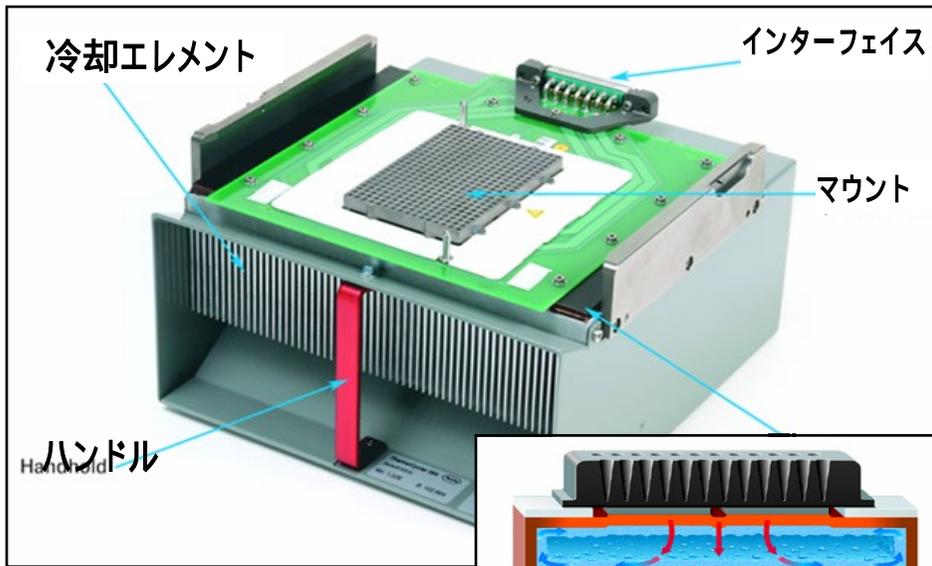
精密な温度制御のサーマルブロック：シルバーストリップサイクラーとTherma-Base テクノロジー

LightCycler® 480

特許取得

LightCycler480

Therma-Base !



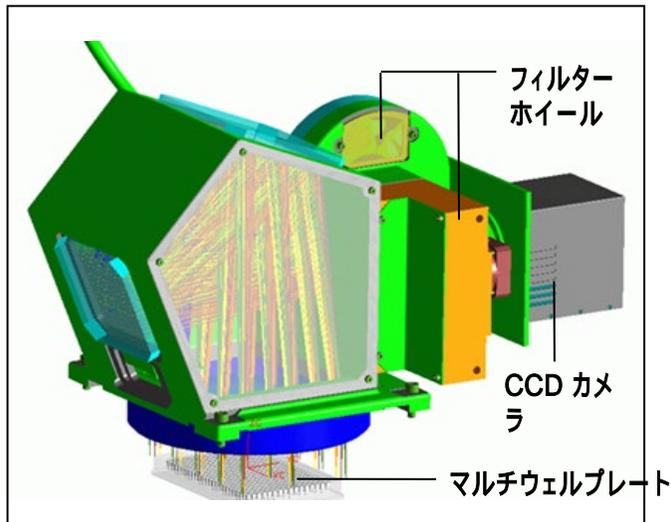
Therma-Base !

熱伝導率：約100,000 w/m
(全ての冷却フィンを活用)
迅速・正確な温度制御が可能！

参考：銀 (412 W/m) アルミニウム (195 W/m)

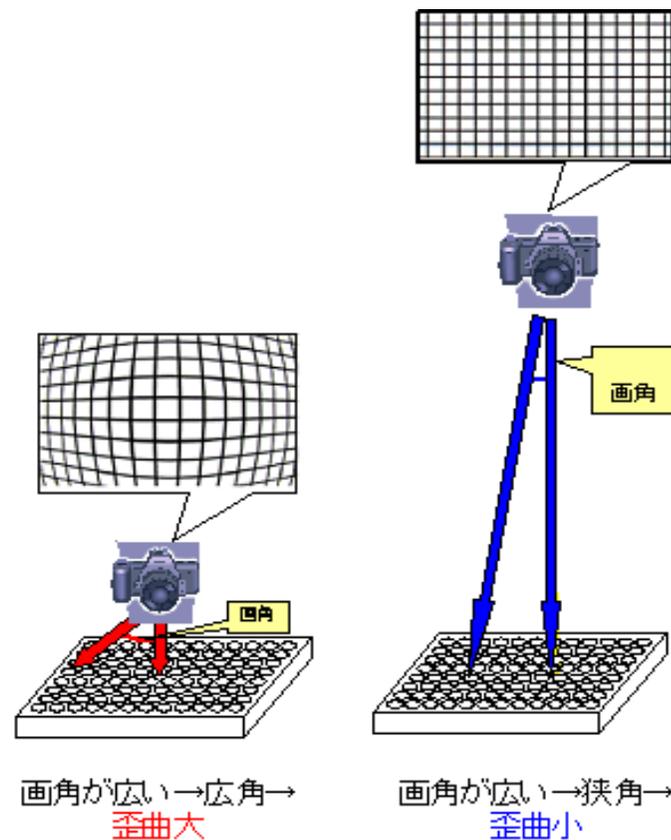
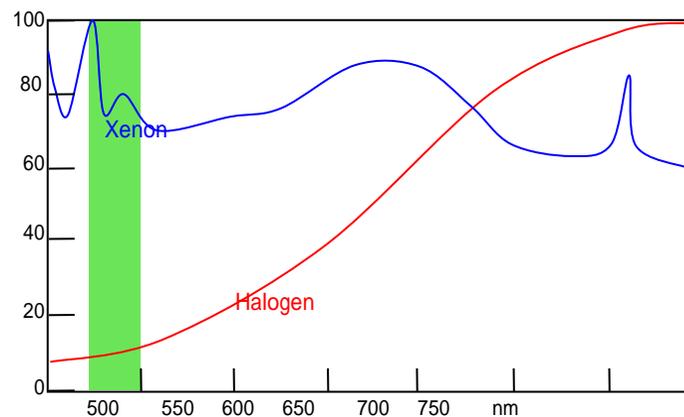
光学均一性 -LightCycler 480-

LightCycler® 480 高感度で均一



- ・ 光源:キセノンランプ
 - 高輝度
 - 幅広いスペクトル

SYBR Green^(%), FAMの励起波長



ROX等の機器補正試薬不要!

生データで定量PCRができる!

温度均一性

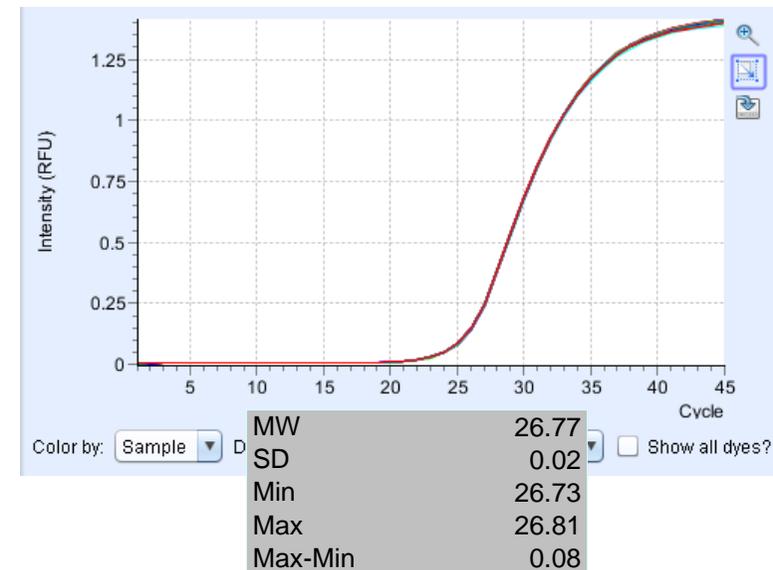
LightCycler® Nano

高い温度均一性

Hardware Specifications – Thermal Block Cycler



温度均一性: ± 0.1

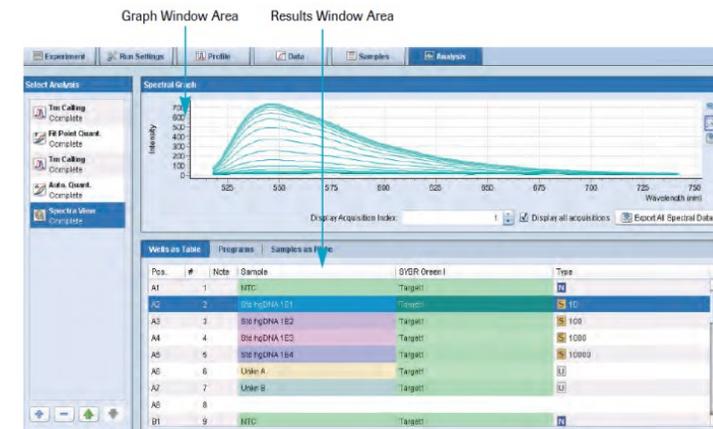
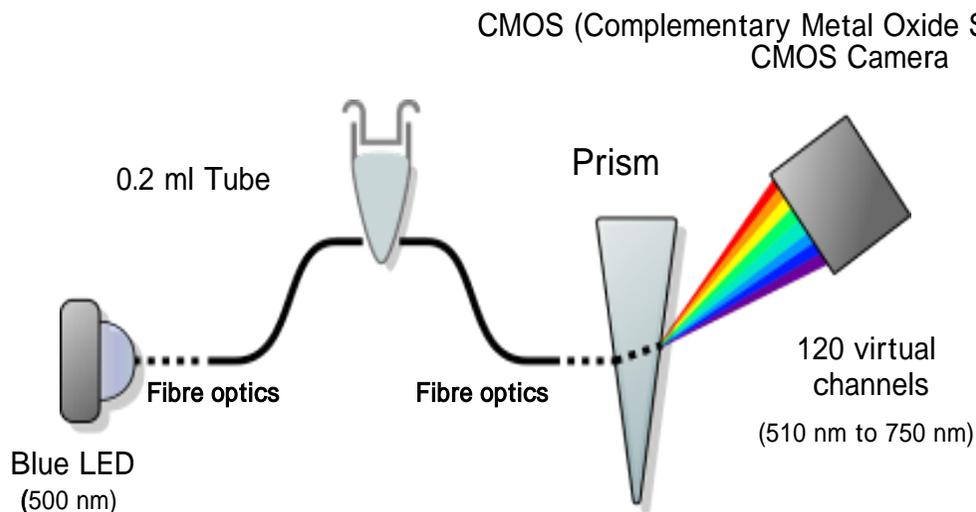


32ウェル同一サンプルを増幅した際の極めて高い再現性

光学均一性 LightCycler® Nano 蛍光検出均一性



Hardware Specifications – Optical Unit



フルスペクトルの光学系

- 32本のファイバーを各ウェルに接続(むらなく蛍光を検出)
- 120の”バーチャルチャンネル”のシグナルを一度に取得
- 通常使用される蛍光色素に関しては製造時にキャリブレーション済み
 - インターカラーター: SYBR Green, ResoLight dye
 - プローブ用: FAM, VIC, HEX, Yellow 555, Red 610, Texas Red, Cy5



核酸抽出から検出まで

サンプル
前処理

核酸精製

逆転写反応
RT

リアルタイム
PCR

データ
処理



We Innovate Healthcare