

LightCycler96

Roche Diagnostics

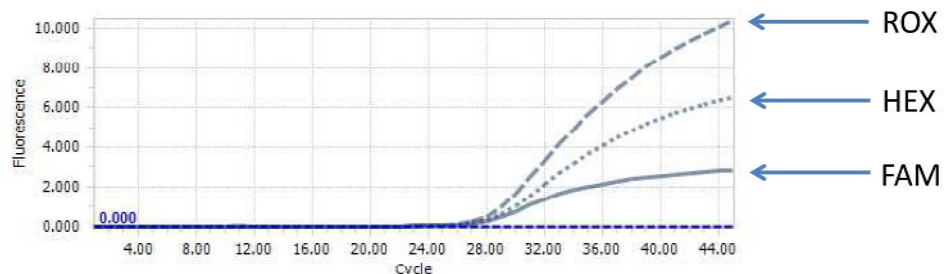
重要

Lightcycler96の解析の注意点

マルチプレックス (FAM, HEX, ROX) リアルタイムPCRでは、それぞれの蛍光強度にばらつきがあります。そのためFAM, HEX, ROXを同時に解析するとFAMやHEXの増幅曲線の立ち上がりを見落とす可能性がありますので注意してください。LC96は解析ソフトの特性で、FAMの蛍光が低く計算されます (Raw dataとAnalysisで見え方が異なる)。

そのため解析する際は、以下の手順で解析をしてください。

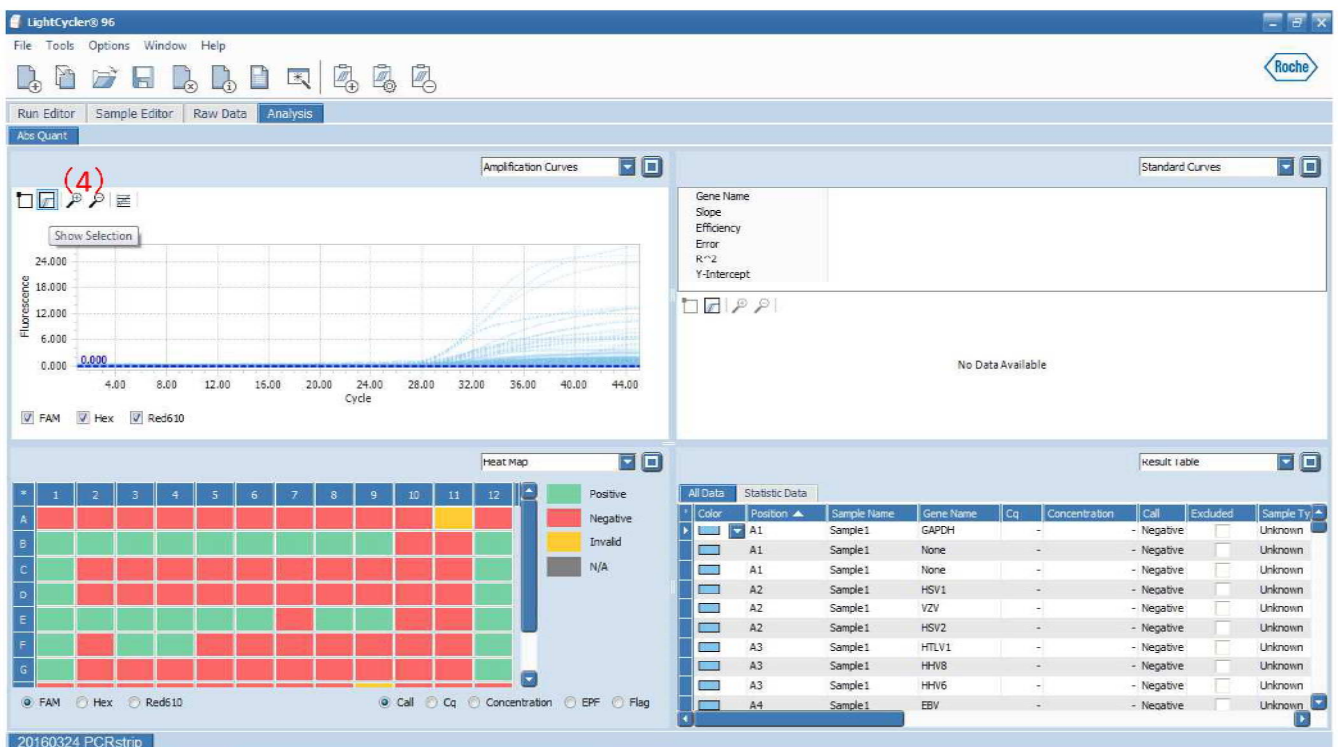
1. Add Analysisで、Abs Quantを選択し、Analysisタブを新たに作成する (Raw dataとAnalysisでグラフの蛍光強度が異なることを確認できます)。
2. グラフウィンドウ内左上左から2番目のアイコン (Show Selection) をクリックして、選択したウェルのみが表示されるようにする。
3. グラフウィンドウ内の下に表示されるそれぞれの蛍光を選択して、各項目の増幅曲線を確認する (ROXの蛍光強度が強く、FAMやHEXの増幅曲線の立ち上がりを見落とさないように、注意してください。Heat Mapウィンドウに表示される結果は概ね良好ですが、増幅曲線を必ず確認してください)。





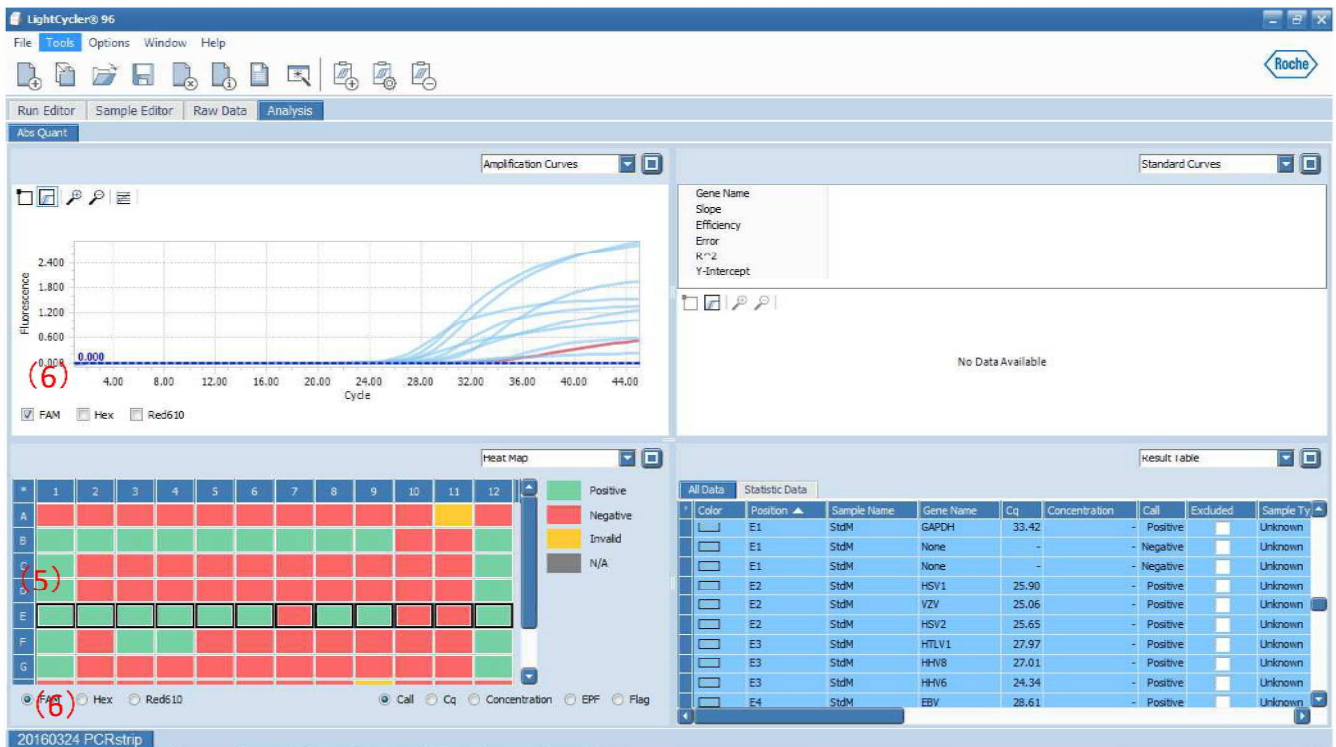
- (1) Analysisタブを選択
- (2) Analysisタブの上に新たに表示されるAdd Analysisボタンをクリック
- (3) 表示されたCreate New Analysisウィンドウで「Abs Quant」を選択しOK

LC96解析法例



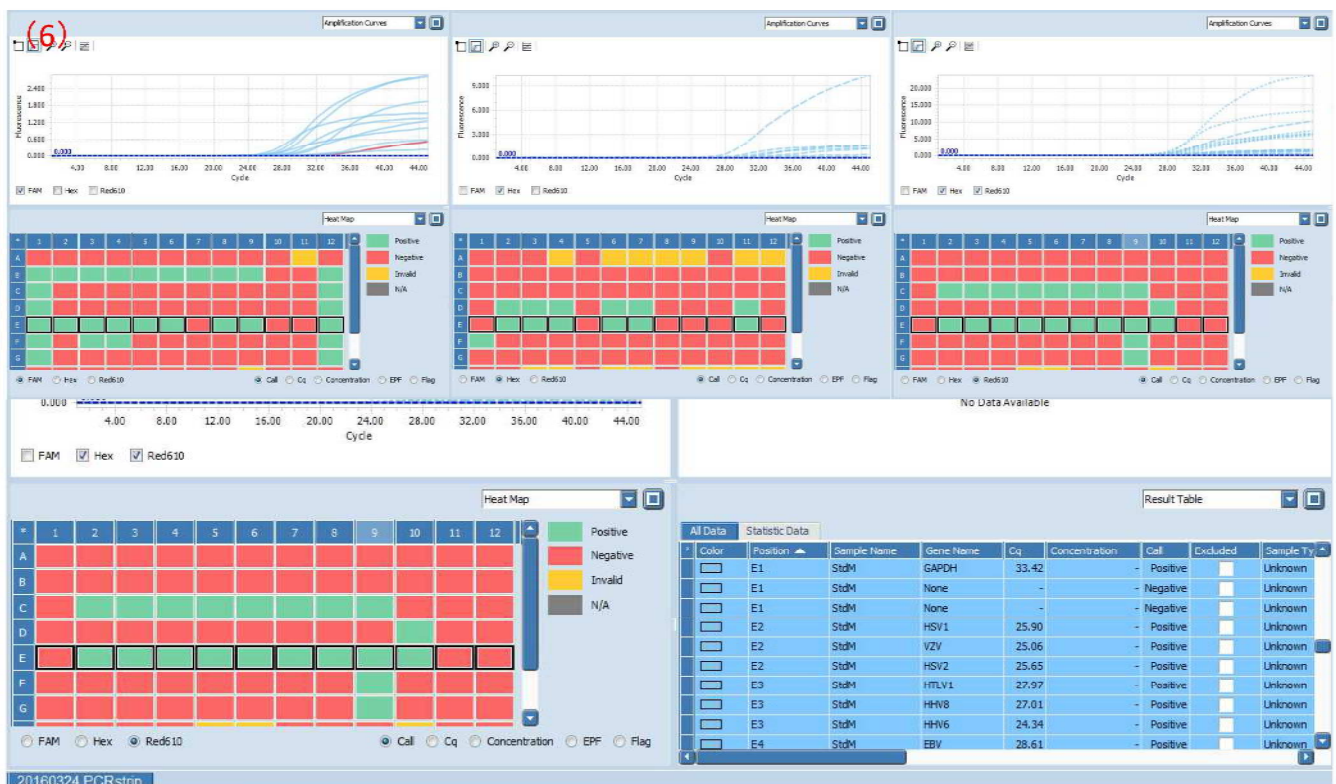
- (4) グラフウィンドウ左上から2番目のボタン「Show Selection」をクリックし、選択されたレーン(ウェル)のみのグラフが表示されるようにする。

LC96解析法例



- (5) 解析するレーンを選択し、グラフに表示させる。
- (6) グラフ下およびHeat Map下で、個別の蛍光FAM(HEX or ROX)を選択する
(グラフとHeat Mapは連動していないので、それぞれ選択する必要があります)。

LC96解析法例

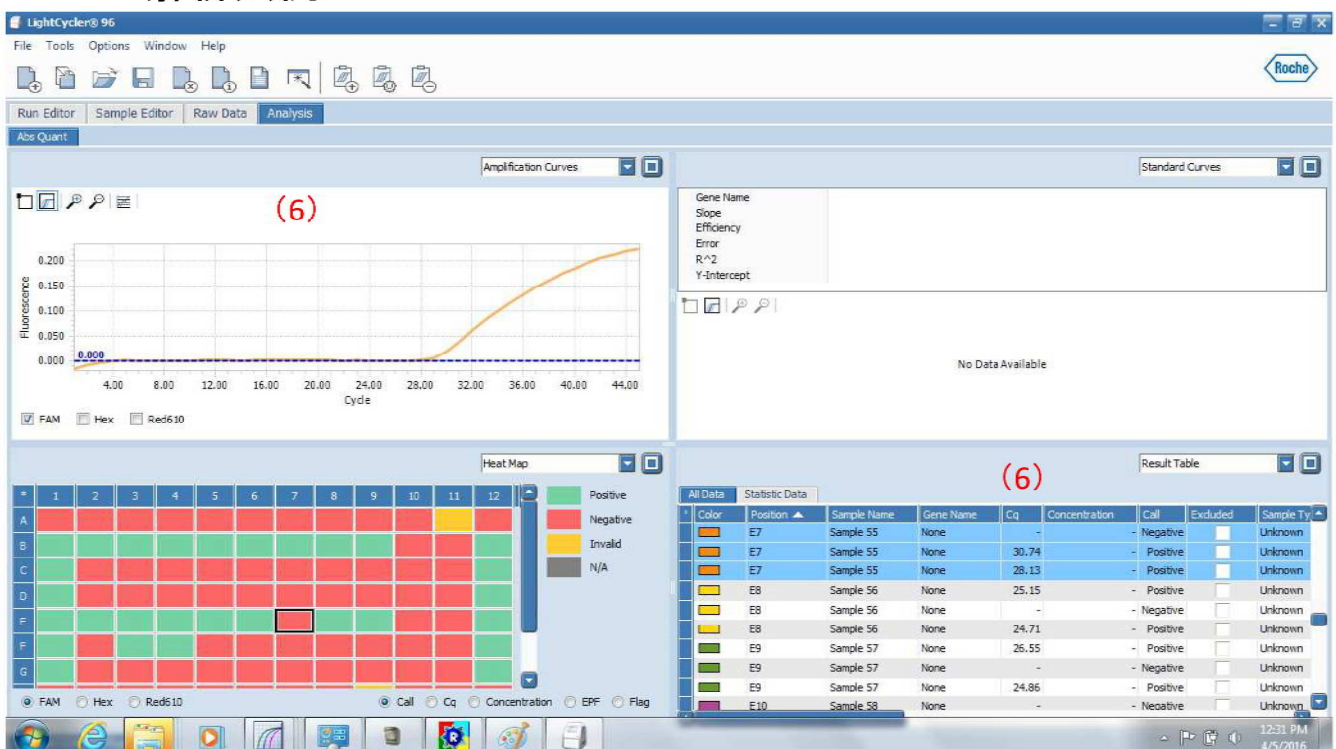


- (6) 各蛍光のグラフを確認し、Heat Mapと増幅曲線が相関していることを確認する。
概ね相関しているが、明らかに陽性のグラフでも陰性になっていることがあるので注意する。

LC96解析時の注意点

1. FAMの蛍光強度が低く計算される傾向があります。
2. 解析の設定を変更することが基本的にできません(解析ソフトによって自動で行われる)。
3. 自動で解析されたものは概ね正しいが、100%ではないので目視で確認する必要があります。
4. したがってHeat Mapの結果は必ずしも正しくはありません。
5. 明らかに増幅曲線の立ち上がりがあるにもかかわらず、Cq値が算出されていない場合は、グラフから目視でおおよそのCq値を記録してください。

LC96解析法例



(6)「明らかに陽性のグラフでも陰性になっている例」
こうなると、Cq値が算出されないため、目視で算出する。