

HRM v3.0 ソフトウェア

HRM解析を行うためのキャリブレーションの実施

HRM解析を行うためには、まずはじめにご利用いただく蛍光色素のキャリブレーションを、ご利用いただく機器で行っていただく必要があります。

ライフテクノロジーズではご利用いただく試薬と蛍光色素毎にキャリブレーションを行うことを推奨します。

この資料ではMeltDoctor™ HRM Reagentsを用いてStepOne™ Real-Time PCRシステム、StepOnePlus™ Real-Time PCRシステム及び7500 Fast Real-Time PCRシステム(ソフトウェア v2.0以降)で実験を行うためのキャリブレーション方法についてご説明します。

重要！ DNAの増幅反応と機器のキャリブレーション、及びHRM Calibration Fileを作成するためのMelt Curveのランは必ず同一日中に行ってください。

バックグラウンドキャリブレーションの実行

1. バックグラウンドキャリブレーションプレートの作成
2. バックグラウンドキャリブレーションプレートのラン
3. バックグラウンドキャリブレーションの結果の検証



MeltDoctor™ HRM Calibration PlateのDNA増幅

4. MeltDoctor™ HRM Calibration Plateの準備
5. MeltDoctor™ HRM Calibration Plateのラン
6. 増幅結果の検証



MeltDoctor™ HRM 蛍光色素のキャリブレーション

7. MeltDoctor™ HRM 蛍光色素のキャリブレーションプレートのラン
8. キャリブレーションの結果の検証



HRM Calibration Fileを作成するためのMelt Curveのラン

9. HRM Calibration File作成のためのMeltDoctor™ HRM Calibration Plateのラン
10. Melt Curveがシングルピークになっているか検証

バックグラウンドキャリブレーションの実施

重要！ HRM蛍光色素のキャリブレーションを行う前に、必ずバックグラウンドキャリブレーションを行うことが必要です。バックグラウンドキャリブレーションのデータは反応プレート由来のバックグラウンドの蛍光シグナルの補正のために用いられます、96ウェル全てでほぼ同じデータになります。

バックグラウンドキャリブレーションを行うために必要な試薬・消耗品等

・ご利用の機種に対応する反応プレートとシール

StepOne™ Real-Time PCRシステム

- MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp® Optical 48-Well Adhesive Film

StepOnePlus™ Real-Time PCRシステム及び7500Fast Real-Time PCRシステム

- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate
- MicroAmp® Optical Adhesive Film

- ・脱イオン水
- ・ピペッター及びチップ（20μLにセットできるもの）
- ・プレート用遠心機

バックグラウンドキャリブレーションプレートの準備

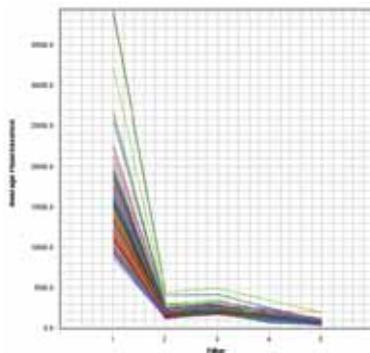
1. 反応プレートの全てのウェルに脱イオン水を20μLずつ分注します。
2. Optical Adhesive Filmでシールをし、遠心機で軽くスピンドウンします。

バックグラウンドキャリブレーションのラン

1. ソフトウェアを起動し、**Instrument Instrument Maintenance Manager**を選択し、それからNavigation画面内の**Background**を選択します。
2. Start Calibrationをクリックすると、キャリブレーション作業を行うためのSetup画面が表示されます。
3. Run画面にてSTART RUNをクリックします。ランが終了するとAnalysis画面が自動的に表示されます。

バックグラウンドキャリブレーション結果の検証

1. Analysis画面でバックグラウンドキャリブレーションがパスしているか確認します。



2. バックグラウンドキャリブレーションを終了し、Instrument Maintenance Manager画面を閉じます。ソフトウェアはバックグラウンドキャリブレーションファイルを保存します。

3. バックグラウンドキャリブレーションプレートを機器から取り出します。

重要！もしバックグラウンドキャリブレーションが失敗した場合、機器のメンテナンスガイドに従ってサンプルブロックの洗浄を行ってください。HRM用の蛍光色素のキャリブレーションを行う前に、バックグラウンドキャリブレーションをパスさせることが必須です。

HRMキャリブレーションプレートのDNA増幅

HRMキャリブレーションを行うために必要な試薬・消耗品等

・ご利用の機種に対応する反応プレート

StepOne™ Real-Time PCRシステム

- 自分で調整した48ウェルHRMキャリブレーションプレート
 - >調整するために下記の試薬が必要です。
 - MeltDoctor™ HRM Master Mix
 - Melt Doctor™ HRM Calibration Standard (20x)
 - 脱イオン水
 - MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate
 - MicroAmp® Optical 48-Well Adhesive Film
 - ピペッターとチップ(1000µLと100µL及び20µLにセットできるもの)
 - 2mLの試薬が入るチューブ
 - 上記チューブを遠心できる遠心機

StepOnePlus™ Real-Time PCRシステム及び7500Fast Real-Time PCRシステム

- MeltDoctor™ HRM Calibration Plate, Fast 96-Well

・プレート用遠心機

HRMキャリブレーションプレートの準備

StepOne™ Real-Time PCRシステム

1. 下表に従って試薬をチューブ内で混合します。

試薬	容量
脱イオン水	900µL
2X MeltDoctor™ HRM Master Mix	1000µL
20X MeltDoctor™ HRM Calibration Standard	100µL
Total volume	2000µL

ボルテックスはしないで下さい。ピペティングで静かに混ぜ、軽くスピンドアウンします。

2. MicroAmp® 48-Well Reaction Plateの全てのウェルに20µLずつ1.の試薬を分注します。

3. Optical Adhesive Filmでシールをし、遠心機で軽くスピンドウンします。

StepOnePlus™ Real-Time PCRシステム及び7500Fast Real-Time PCRシステム

1. Fast 96-Well MeltDoctor™ HRM Calibration Plateを冷凍庫から出し、室温で完全に溶解します。

2. 完全に溶解したら、遠心機でプレートを軽くスピンドウンします。

HRMキャリブレーションプレートのラン

1. ソフトウェアを起動し、Advanced Setupをクリックします。開いたファイル内のExperiment Propertiesで下記項目を以下のように設定します。

- Experiment Name : **Amplification_<作成した日付>**
- Experiment type : **Quantitation – Standard Curve**
- Reagents – **SYBR® Green Reagents**
- **Include Melt Curve**のチェックがあるので、**チェックを外して下さい。**
- Ramp speed : **Standard (~2 hours to complete a run)**

2. **Setup Plate Setup Define Targets and Samples**タブで、Target 1のreporterがSYBRになっていることを確認します。

Target Name	Reporter	Quencher	Color
Target 1	SYBR	None	Blue

3. **Assign Targets and Samples**タブに切り替え、下記の設定を行います。

a. 全てのウェルを選択します。

b. Target 1の**Assign**のチェックボックスにチェックを入れます。

Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	Target 1	[U] [S] [N]	

c. Sample 1の**Assign**のチェックボックスにチェックを入れます。

Assign	Sample
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 1

c. Passive Referenceプルダウンメニューから**None**を選択します。

None

4. Setup Run Methodを選択し、サーマルサイクラー条件を設定します。

- 反応ボリューム : 20 μ L
- 温度条件:

	Hold	40 Cycles	
Step	Enzyme Activation	Denature	Anneal / Extend
温度	95	95	60
時間	10:00	0:15	1:00

5. HRMキャリブレーションプレートを機器にセットし、**START RUN**をクリックしてランを開始します。

6. ファイルを保存するように指示する画面が表示されるので、以下の場所にファイルを保存します。

- 場所: HRMCalibrationFilesという名称のフォルダを作成し、指定します。
- ファイル名: **Amplification_<作成した日付>**
(Experiment Nameが自動的に表示されるので、そのまま結構です)

ファイルの保存が終了すると、自動的にランが始まります。

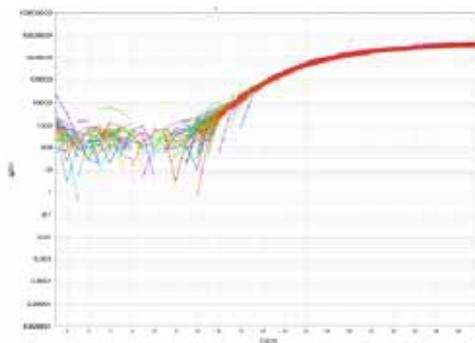
7. ランが終了すると、自動的にAnalysis画面が表示されます。

8. プレートを機器から取り出します。

HRMキャリブレーションプレートの増幅結果の検証

1. Amplification Plot画面が正常に増幅しているか確認します。

- 8サイクルから35サイクルの間に、Threshold lineを超える蛍光値が検出されていること
- 蛍光が指数関数的に増幅していること
- C_T 値の標準偏差が0.25以下であること (View Well Tableタブで確認)



注記: もしAmplification Plotが正常でない場合、問題の特定及び解決するためにアプライドバイオシステムズにご連絡下さい。

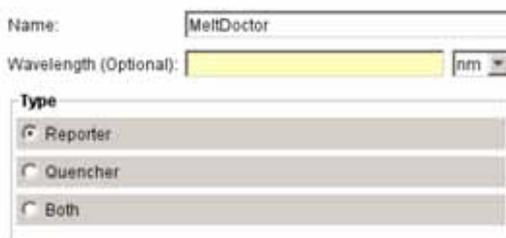
2. ファイルを保存して閉じます。

MeltDoctor™ HRM蛍光色素のキャリブレーション

前節で増幅したHRMキャリブレーションプレートを用いてMeltDoctor™ HRM蛍光色素のキャリブレーションを行います。

HRM蛍光色素のキャリブレーションのためのHRMキャリブレーションプレートのラン

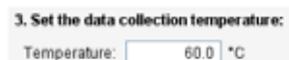
1. ソフトウェアを起動し、**Instrumentメニュー** **Instrument Maintenance Manager**を選択し、それからNavigation画面の**Dye**を選択します。
2. **Dye**画面で**Custom Dye Calibration**を選択します。
3. **Start Dye Calibration**をクリックします。
4. **Dye Library**にHRM蛍光色素を登録します。
 - a. **New Dye**をクリックします。
 - b. **Name**に**MeltDoctor**と入力します。
 - c. **Type**は**Reporter**を選択します。
 - d. **OK**をクリックします。



5. Step 2でDye Nameプルダウンメニューから**MeltDoctor**を選択します。



6. Step 3で、**Temperature**を**60** に設定します (初期設定通り)。



7. HRMキャリブレーションプレートを軽く遠心し、機器にセットしたら、**The custom dye plate is loaded into the instrument**のチェックボックスにチェックを入れ、**Next**をクリックします。
8. Run画面上で、**START RUN**をクリックします。
9. ランが終了したら、HRMキャリブレーションプレートを取り出し、**Next**ボタンをクリックしてAnalysis画面に移ります。

蛍光色素のキャリブレーション結果の確認

1. Analysis画面上で蛍光色素キャリブレーションがパスしていることを確認します。

注記: 蛍光色素キャリブレーションが失敗したときには、ご利用機器のガイドラインに従ってください。蛍光色素キャリブレーションがパスするまではHRMキャリブレーションを終了することできません。

2. カスタム蛍光キャリブレーションを終了し、Instrument Maintenance Managerを閉じます。ソフトウェアはカスタム蛍光キャリブレーションファイルを保存します。

HRM Calibration Fileを作成するためのMelt Curveのラン

HRMキャリブレーションプレートを用いて3回目のランを行います。ここではMelt Curveのランを行い、HRMソフトウェアに必要なHRM Calibration Fileを作成します。

HRM Calibration Fileを作成するためのHRMキャリブレーションプレートのラン

1. ソフトウェアを起動し、Advanced Setupをクリックします。開いたファイル内のExperiment Propertiesで下記項目を以下のように設定します。

- Experiment Name : **HRMCalibration_MeltDoctoreDye_<作成した日付>**
- Experiment type : **Melt Curve**
- Reagents – **Other**
- Ramp speed : **Fast**

2. **Setup Plate Setup Define Targets and Samples**タブで、Target 1のreporterを**MeltDoctor**に変更します。

3. **Assign Targets and Samples**タブに切り替え、下記の設定を行います。

- 全てのウェルを選択します。
- Target 1の**Assign**のチェックボックスにチェックを入れます。



c. Passive Referenceプルダウンメニューから**None**を選択します。



4. **Setup Run Method**を選択し、サーマルサイクラー条件を設定します。

- 反応ボリューム : 20 μ L
- 温度条件:

	Melt Curve			
Step	Denature	Anneal	HRM	Anneal
温度	95	60	95	60
時間	0:10	1:00	0:15	0:15

- StepOne™ / StepOnePlus™システム
> ramp modeを**Continuous**に設定し、ramp rateを**0.3%**に設定します。
- 7500 Fastシステム
> **Expert Mode**のチェックボックスにチェックを入れます。
> **Select/View Filters**をクリックし、**Filter-1**のみを選択します。

5. HRMキャリブレーションプレートを機器にセットし、**START RUN**をクリックしてランを開始します。

6. ファイルを保存するように指示する画面が表示されるので、以下の場所にファイルを保存します。

- 場所: HRMCalibrationFilesのフォルダを作成し、指定します。
- ファイル名: **HRMCalibration_MeltDoctoreDye_<作成した日付>**
(Experiment Nameが自動的に表示されるので、そのまま結構です)

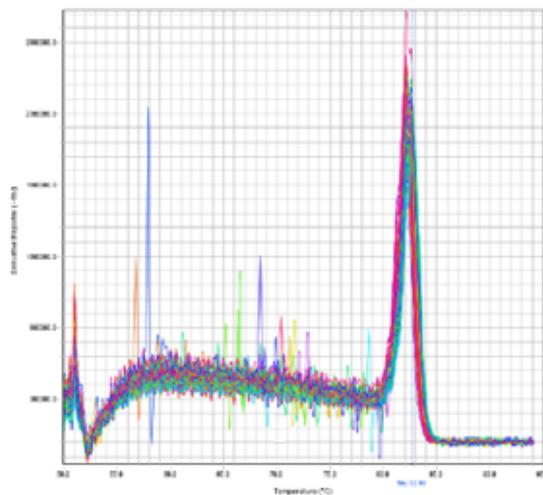
ファイルの保存が終了すると、自動的にランが始まります。

7. ランが終了すると、自動的にAnalysis画面が表示されます。

8. プレートを機器から取り出します。

Melt Curveの波形の検証

1. Melt CurveでTmピークが単独であることを確認します(下図参照)。



注記: もしMelt CurveのTmピークが複数あった場合、PCR産物が複数増幅しています。この問題を特定及び解決するためにアプライドバイオシステムズにご連絡下さい。

2. HRMキャリブレーションプレートを取り出して、ファイルを閉じます。

重要! HRMソフトウェアを起動し、初めてファイルを作成する際に、初期設定のHRM Calibration Fileを選択する作業を行います。このときに今回作成した**HRMCalibration_MeltDoctoreDye_<作成した日付>**を選択してください。

For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

NOTICE TO PURCHASER: PLEASE REFER TO THE HRM EXPERIMENTS USING MELTDOCTOR™ HRM REAGENTS AND HIGH RESOLUTION MELT SOFTWARE v3.0 USER GUIDE FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

© 2010 Life Technologies. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies or their respective owners.