

January 2013

PyroMark Q24 Software クイックマニュアル

PyroMark Q24 システムで使用



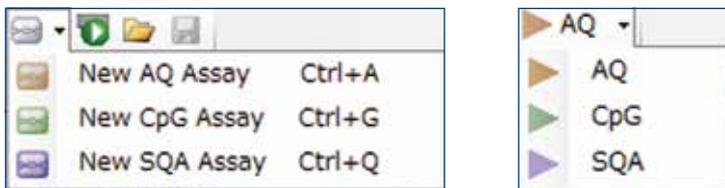
Sample & Assay Technologies

目次

1	PyroMark Q24 Software	3
2	アッセイセットアップ	4
2.1	AQ アッセイ / CpG アッセイ	4
2.1.1	ヒストグラムの高さの調整	8
2.2	SQA アッセイ	9
3	ランセットアップ	10
4	解析	15
4.1	ランファイルの解析	15
4.2	AQ アッセイ / CpG アッセイの解析	17
4.2.1	パイログラムの解析	17
4.2.2	パイログラム解析結果の編集	18
4.2.3	パイログラムの比較	21
4.2.4	解析条件の変更	22
4.2.5	アッセイファイルへの変更の保存	23
4.3	SQA アッセイの解析	24
4.3.1	パイログラムの解析	24
4.3.2	解析条件の変更 (SQA)	26
5	解析レポート	28

1 PyroMark Q24 Software

PyroMark Q24 Software は、以下の3つの解析モードがあります。



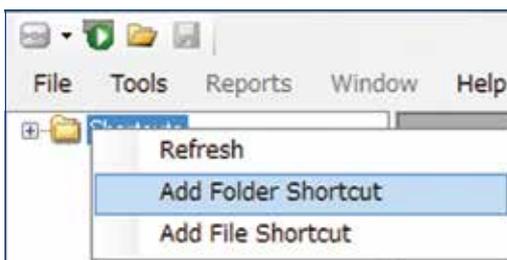
- **AQ** : 定量解析および SNP 解析
- **CpG** : DNA メチル化比率解析
- **SQA** : ショートシーケンス解析

AQ、CpG、SQA は、同じプレート上で解析可能です。

ファイル保存用フォルダの作成

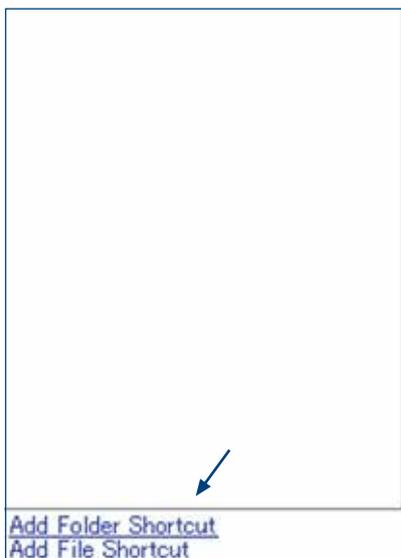
PyroMark Q24 Software では、解析ターゲット毎の塩基を添加する順序を決定するアッセイファイル、およびランファイルは任意のフォルダ中に保存します。

ソフトウェアをインストールしたコンピューター上に任意のフォルダを作成しておき、以下の手順で、ショートカットブラウザを作成してください。



ショートカットブラウザを作成 :

- “Add Folder Shortcut”をクリック。もしくは、“Shortcuts”フォルダ上を右クリックして、“Add Folder Shortcut” をメニューより選択する。
- フォルダを削除する場合は、右クリックして “Remove Shortcut” を選択する。
- フォルダ内の名称等を変更したい場合は、実際に作成したフォルダから変更する。

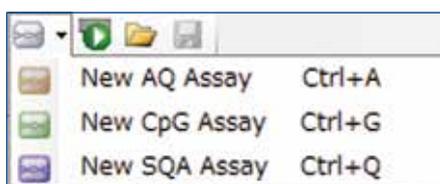


2 アッセイセットアップ

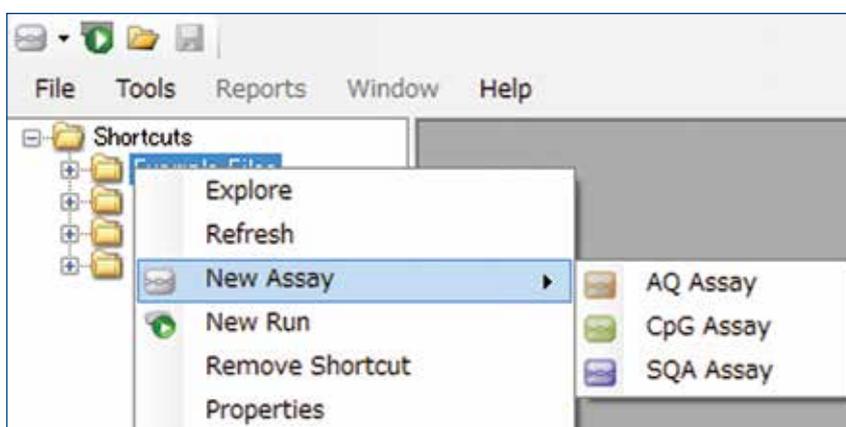


2.1 AQ アッセイ / CpG アッセイ

1. ツールバー上の  をクリックして、“New AQ Assay” または “New CpG Assay” を選択する。



もしくは、データを保存する先のフォルダ上を右クリックして、“Assay” から、“AQ Assay” または “CpG Assay” を選択する。



2. “Sequence to Analyze” にシーケンシングプライマー下流の配列をマニュアルで入力、もしくはコピーペーストする。

注意：Forward アッセイであればセンス鎖の配列、Reverse アッセイであればアンチセンス鎖の配列を入力します。

SNPまたはメチル化サイトは、C/T、A/Gのようにスラッシュで区切るか、あるいはIUPACコード表記（C/TはY、A/GはR）で入力する。

Sequence to Analyze 入力例

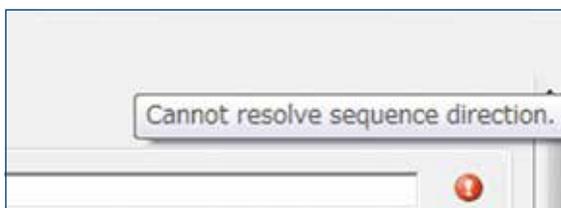
- SNP（配列中に1SNPのみの場合）
GT/ACGTATTCA SNPは“/”、またはIUPACコードで入力
- 複数SNP（近傍に複数のSNPsがある場合）
GT/ATAG/CAAGTCA 配列どおりに、複数のSNPsを入力
- マルチアリルSNP
GT/A/C/GTACTTCA 可能性のある塩基を全て“/”、またはIUPACコードで入力
- 挿入・欠失多型
GT[AC]GTAGCCG 挿入／欠失している塩基を“[]”で囲む

IUPAC Codes

Code	Description	Code	Description
A	Adenine	K	T or G
C	Cytosine	W	T or A
G	Guanine	S	C or G
T	Thymine	B	C, T, or G (not A)
U	Uracil	D	A, T, or G (not C)
R	Purine (A or G)	H	A, T, or C (not G)
Y	Pyrimidine (C or T)	V	A, C, or G (not T)
M	C or A	N	Any base (A, C, G, or T)

注意：S、B、VとNは、CpGモードではエラーがでます。

配列中に、Forward/Reverse解析の方向が分からないSNPを含むアッセイをする場合、下記のようなエラーが出るので、その場合はAQモードで解析してください。



CpGメチル化解析のForwardアッセイで可能な解析のターゲット：

CpG部位：C/TG

SNPs：A/T, A/G, G/T, A/T/G（Cを含むことはできない）

CpGメチル化解析のReverseアッセイで可能な解析ターゲット：

CpG部位：CG/A

SNPs：A/T, A/C, C/T, A/T/C（Gを含むことはできない）

3. “Generate Dispensation Order” をクリックすると dNTPs の添加順序が自動的に決定される。

Generate Dispensation Order

Dispensation Order の欄には塩基添加順序が、ヒストグラムの欄には予測波形パターンが表示されます。

ヒストグラムの中で背景がグレーになっている箇所がターゲット位置です。全くピークが無い箇所は、ネガティブコントロールです。それ以外のピークはターゲット周辺の塩基配列パターンを示します。

入力内容に問題がある場合は、Dispensation order 欄の右横にエラーマークが表示されます。

The generated dispensation order contains less reference peaks than required.

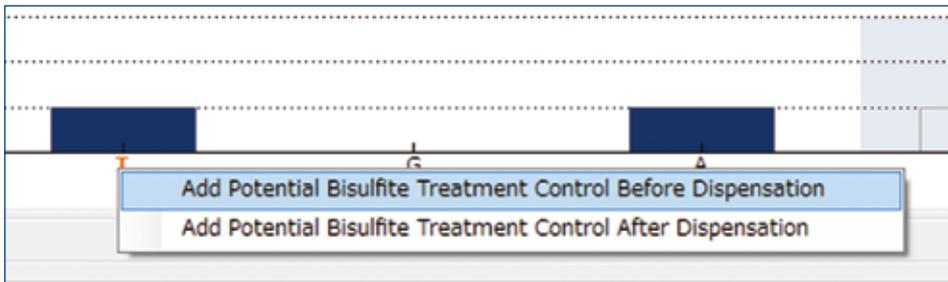
パイロシーケンス測定では、解析ターゲット部位の周辺のピークも最低 5 塩基（3 塩基以下のホモポリマー配列）は、リファレンスとして必要になるため、less reference peaks というエラーが出た場合は、後半の配列を追加で入力することにより、解消されます（lack of terminal sequence information と表示された時も同様に配列情報をさらに追記する）。

4. CpG モードの場合、Bisulfite 処理チェック用のネガティブコントロールを設定する。

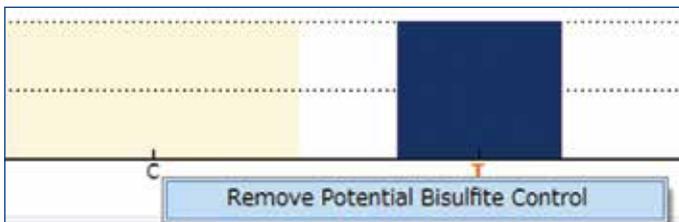
通常 CG と配列が続く場合を除いては、配列中の C はメチル化されないため、Bisulfite 処理により T ピークとして検出される。ここに、ネガティブコントロールとして C を添加してピークが検出されないことを確認する。予測波形パターン中の候補となる塩基がオレンジ色の太字で表示されるので（Forward アッセイでは T、Reverse アッセイでは A が候補となる）、文字の上でクリックし、前後のどちらかにコントロールを挿入するかを選択する。

注意：Bisulfite 処理チェック用に T（Reverse では A）を使用する場合、変換前 C（Reverse では G）であることを確認してください。ホモポリマー箇所を使用する場合、配列の前半もしくは後半のどちらかに C（Reverse では G）があるかで、挿入する場所を選択します。

例；CCT の場合 before を選択後 C を挿入。TCC の場合 after を選択後 C を挿入。



Bisulfite 処理チェック用の dispense を削除するには、黒色の太字の文字上でクリックをし、“Remove Bisulfite control” を選択します。



5. **Variable Positions** タブには **Sequence to Analyze** 中に含まれる **SNP**、メチル化サイトが表示される。

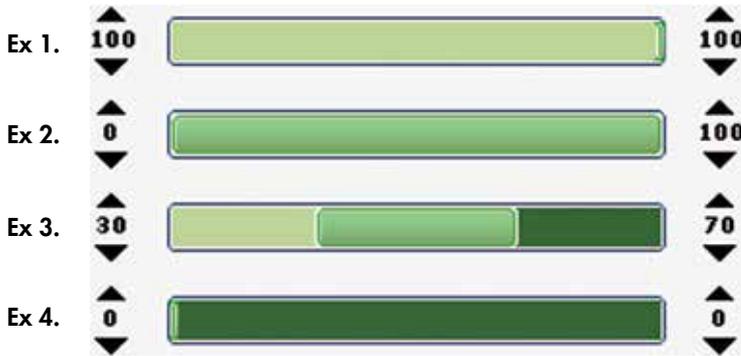
CpG モードの場合、“Methylation Ranges” で、各メチル化サイトのメチル化率が、想定するメチル化率より低いか高いか色が濃淡で表示されるように設定できます。

■ 明るいグリーンの領域は、メチル化率が想定以下にあることを示す。

■ 中間色のグリーンの領域は、メチル化率が想定メチル化率の範囲にあることを示す。

■ 濃いグリーンの領域は、メチル化率が想定以上にあることを示す。

Methylation Ranges の設定例：



Ex 1. 想定されるメチル化率 = 100%

Ex 2. 想定されるメチル化率 = 0 ~ 100%

Ex 3. 想定されるメチル化率 = 30 ~ 70% (default)

Ex 4. 想定されるメチル化率 = 0%

オプション：Methylation Ranges は以下の方法で設定できます。

5a. 各領域の縁でマウスのポインターを  に変えて、左または右に位置をずらす。

5b. 各メチル化率のレンジを表すグラフの両端にある  で数値を調整して設定する。

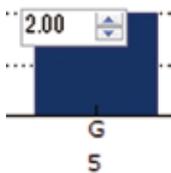
全てのメチル化サイトの Methylation Ranges を同時に変更する際は、Shift キーを押しながら、数字を変更します。

6. アッセイファイルができたなら  (**Save**) をクリックしファイルを保存する。

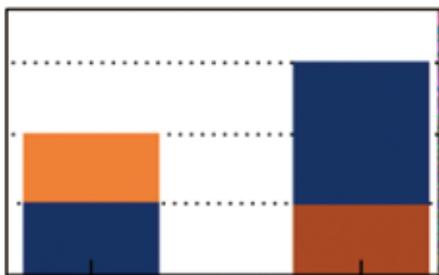
2.1.1 ヒストグラムの高さの調整

実測のピークパターンが、ノイズピークが加算されることなどにより予測と異なる場合、予測のピークパターンを変更することができます。

1. **Ctrl** キーを押しながら予測のピーク高を調整したいヒストグラムの頂上をクリックするとピーク高の数値を変更できるボックスが開く。



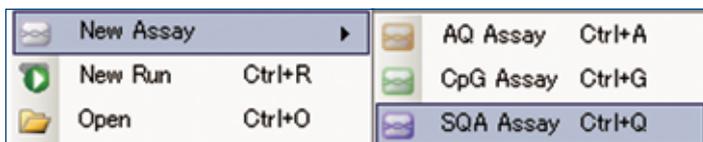
2. 変更するピーク高の数値を入力する。
3. **Enter** ボタンを押す。



注意：CG の並びにない CpH のメチル化率を解析する場合、AQ モードで解析することも可能です。CpG モードで解析をする場合は、CpH 配列をターゲットとして認識しないため、Sequence to Analyze に YG と入力して G 塩基を削除する代わりに、ヒストグラムの高さ調節の機能を使用して、G の予測ピーク高を “0” に設定することで解析可能です。

2.2 SQA アッセイ

1. ツールバー上の  をクリックして、“New SQA Assay” を選択するか、データを保存する先のフォルダを右クリックして、“New Assay” から、“SQA Assay” を選択する。



2. “Dispensation Order” に塩基添加順序を入力する。任意の順序の場合は配列通りに、4 種類の dNTP を順番に添加する場合は繰返し回数（塩基順序）の書式で入力する。

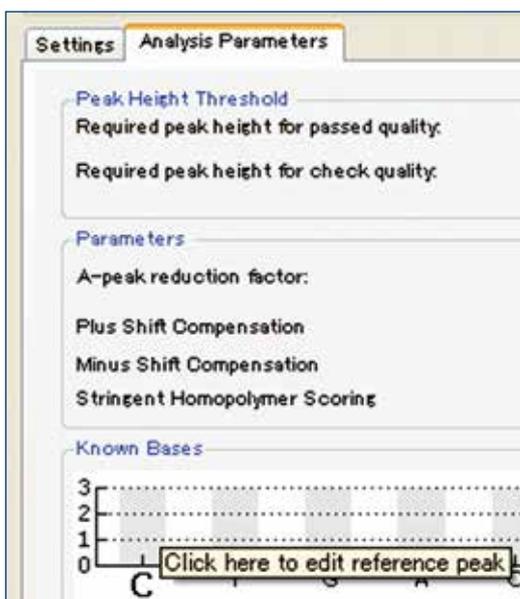
例 1 : GATC の順番を 5 回繰返し → 5(GATC)

例 2 : 初めは任意の順序 (ATACG)、その後 ATGC を 3 回 → ATACG3(ATGC)

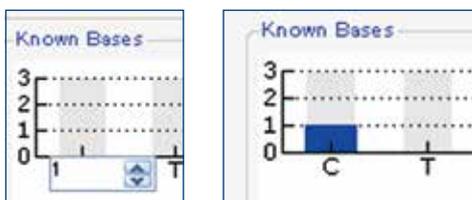
例 3 : 初めは TCGA を 5 回繰返し、その後任意順序 (GATAGT) → 5(TCGA)GATAGT

3. シークエンシングプライマー直下流に既知の配列情報がある場合は、解析精度を上げるためにリファレンスとして入力しておく（推奨）。

“Analysis Parameters” を開いて既知配列上の塩基をクリックします。



指定した塩基が存在する数を上下の矢印で指定して Enter を押すと予測のピーク高が青色のヒストグラムとして表示されます。



4. “Expanded dispensation order” に塩基添加順序が表示される。
5. 確認後、 (Save) をクリックしアッセイファイルを保存する。

3 ランセットアップ



1. ツールバー上の  をクリックする。もしくは、新しいランファイルを作成したいショートカットブラウザ上で、右クリックして“New Run”メニューを選択する。ファイル名を入力しEnterキーを押すと新しいランファイルを作成することができる。

注意：以前のランファイルの内容と同じアッセイ条件（Assay、Sample ID等）で測定する場合は、目的のランファイルを右クリックし“Copy and Rerun”を選択すると同じランファイルが作成されます。

2. Run Parametersを入力する。

必須入力項目を設定します。Plate ID / Barcode / Regent ID は任意です。

【必須入力項目】

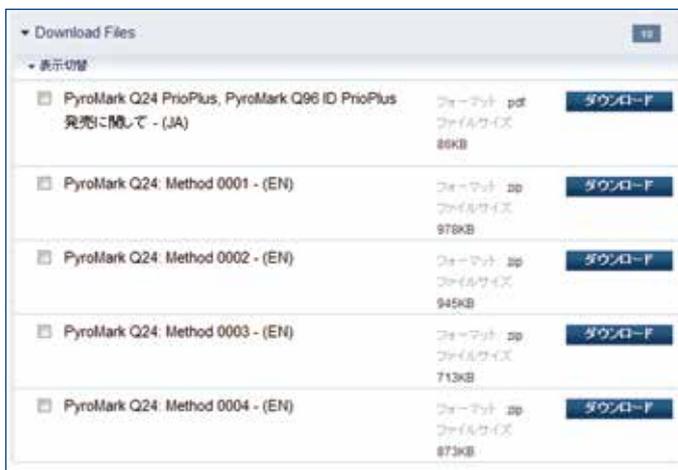
- Run Name 測定の日付などランの名前を任意で入力
- Instrument Method

カートリッジのラベルに記載されている Method を選択



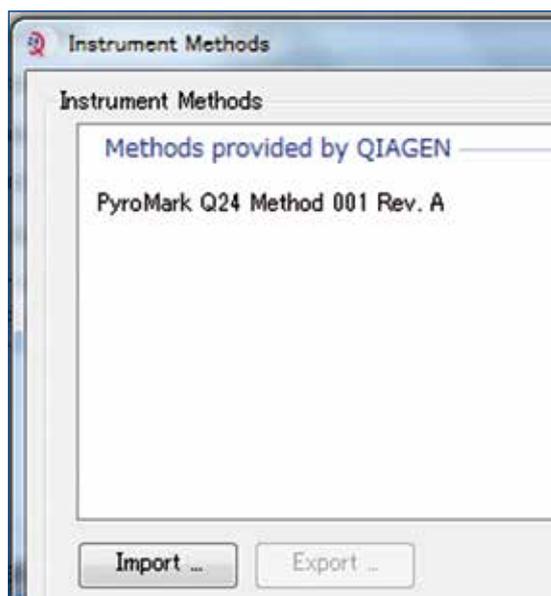
使用するカートリッジに対応する Method が無い場合、下記の手順で新しい Method を追加します。

- 2a. 以下のウェブサイト（PyroMark Q24 製品の関連製品ページ）から対応する Parameter ファイルをダウンロードする。
<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Automated-Solutions/Pyrosequencing/PyroMark-Q24#resources>
- 2b. ダウンロードした Method の圧縮ファイルを解凍してコンピューターに保存する。

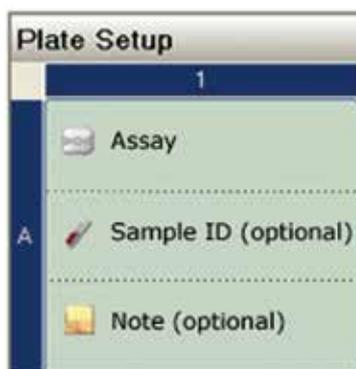


- 2c. “Tool” から “Instrument Method” を選択する。

- 2d. “Import” ボタンをクリックし、インポートする Method ファイルを選択する。



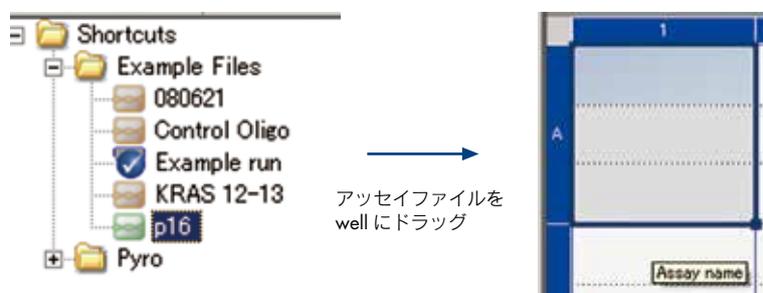
3. 測定するプレートのセットアップ (Assay、Sample ID、Note) を行なう。上からアッセイファイル、Sample ID、Note を設定する。



- 3a. アッセイファイルを設定する。

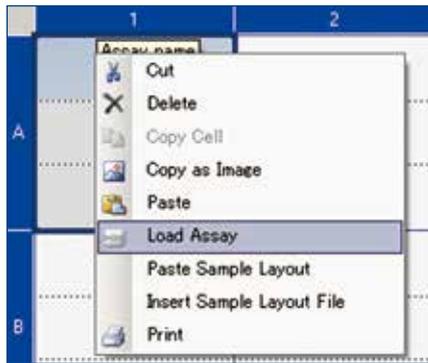
下記もしくは次ページの方法で well を選択して、アッセイを設定します。

- “Shortcuts” フォルダから目的のアッセイファイルを選択し、対象となる well の Assay のセルにドラッグする。



複数の well に同じアッセイを指定する場合は、先に同じアッセイをする well の Assay のセルを複数選択しておき、目的のアッセイをドラッグします。

- well を右クリックし、メニューから “Load Assay” を選択して設定する。



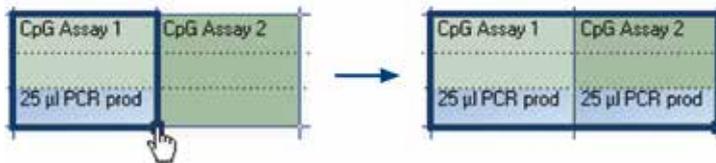
各 well に別々のアッセイを指定して測定することも可能です。

Plate Setup		1	2	3	4	5	6
A		AQ assay 1	AQ assay 2	CpG assay 1	CpG assay 2	SQA assay 1	SQA assay 2

3b. Sample ID と Note を設定する (オプション)。

- セルを選択して Sample ID と Note を直接入力

セルの内容は、マニュアルで入力する以外に、ドラッグ・コピーすることが可能です。コピーしたいセルを選択し、セルの右下にマウスポインターを置きコピー先のセルまでドラッグします。

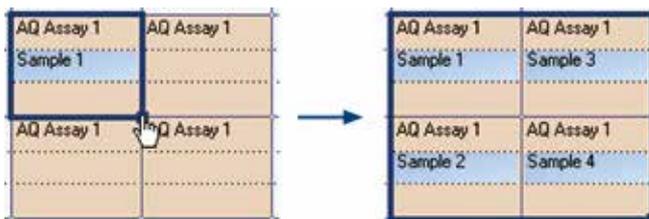


入力した Sample ID の最後の文字が数字である場合、以下の方法で Sample ID の番号を連番の数字として入力させることが可能です。

一つの well のセルの Sample ID を選択して、以下の方法でドラッグ・コピーします。

- 横方向に番号を増加させるとき
マウスポインターを選択したセルの右下の上におき、Ctrl キーを押しながら、連番をつける well までクリックしながらドラッグする。クリックを離してから、Ctrl キーを離す。
- 縦方向に番号を増加させるとき
マウスポインターを選択したセルの右下の上におき、shift + Ctrl キーを押しながら、連番をつける well までクリックしながらドラッグする。クリックを離してから、Shift + Ctrl キーを離す。

マウスの左ボタンを離したとき最初に選択した Sample ID の番号から連番となって選択したセル内に貼り付けられます。

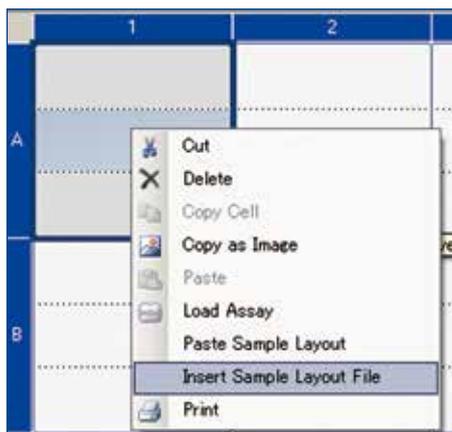


■ テキストファイルからレイアウトをインポート

Sample ID と Note は、あらかじめ作成しておいたレイアウトファイル（Microsoft® Excel®、Notepad 等）をインポートすることが可能です。レイアウトファイルは “Well”、“Sample ID”、“Note” など 2 つ以上の情報を入力して、カンマ、セミコロンで区切ったテキストファイル（.tsv、.text もしくは .csv）で保存したものを使用できます（以下、レイアウトの例）。

	A	B	C	D	E
1	Well	Sample ID	Note		
2	A1	Sample 1	25ul PCR		
3	A2	Sample2	50ul PCR		
4	A3	Sample 3	50ulPCR		
5	A4	Sample4	25ul PCR		

Well の中段または下段を右クリックし、メニューから “Insert Sample Layout File” を選択します。



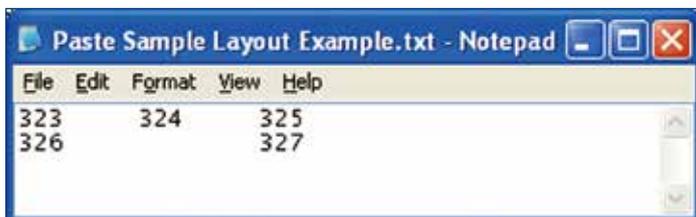
レイアウトファイルがインポートされます。

Plate Setup		1	2	3	4
A	Sample 1 25ul PCR	Sample2 50ul PCR	Sample 3 50ulPCR	Sample4 25ul PCR	

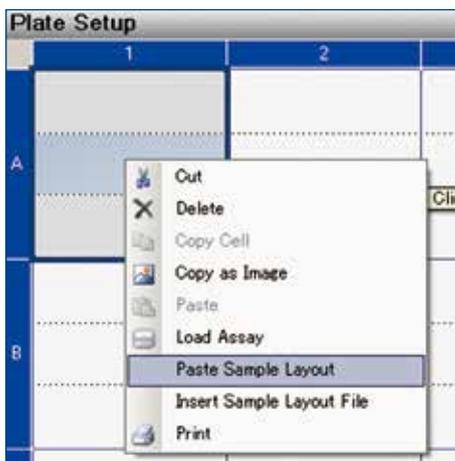
ランセットアップ

- クリップボードから貼付けて Sample ID を入力

Excel、Word、Notepad 等で Sample ID のレイアウトを作成します。Sample ID の名前は、縦列はタブ区切り、横列はスペースで区切ります。

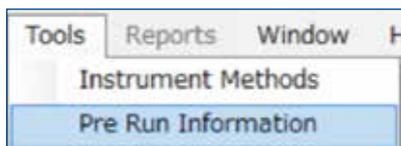


作成したレイアウトをコピーして、貼り付け先の well を右クリックし、“Paste Sample Layout” をメニューから選択します。



Sample ID のレイアウトが貼り付けられます。

4. すべての情報の入力完了したら、ツールバー上の  アイコンをクリックすると、ランファイルを作成する際に指定したフォルダ内にランファイルが保存される。保存されたランファイルをコンピューターに差し込んだ USB メモリにドラッグしてコピーする。
5. 必要な試薬量は、ソフトウェア上のランファイルにある “Tools” メニューの “Pre Run Information” から確認することができる。



4 解析

アッセイセットアップ

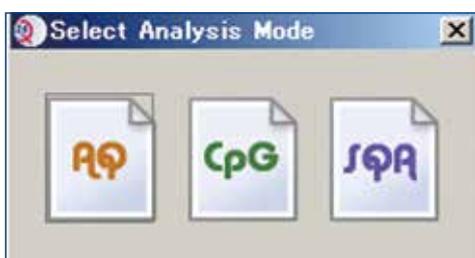
ランセットアップ

解析

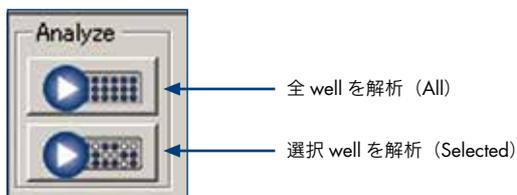
解析レポート

4.1 ランファイルの解析

1. USB メモリに保存したランファイルを PyroMark Q24 Software がインストールされているコンピューターの保存フォルダ内に移動する。
2. ショートカットブラウザにあるランファイル () をダブルクリックして開く。
3. 1 枚のプレートを複数の解析モードで測定した場合、解析モードの選択画面が表示されるので、AQ (定量解析および SNP 解析)、CpG (DNA メチル化比率解析)、SQA (シーケンス) のどのモードでのデータを開くかを選択する。



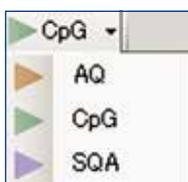
4. 解析する well を選択して、クリックする。



5. 解析結果を保存するには、ツールバー上の  をクリックする。

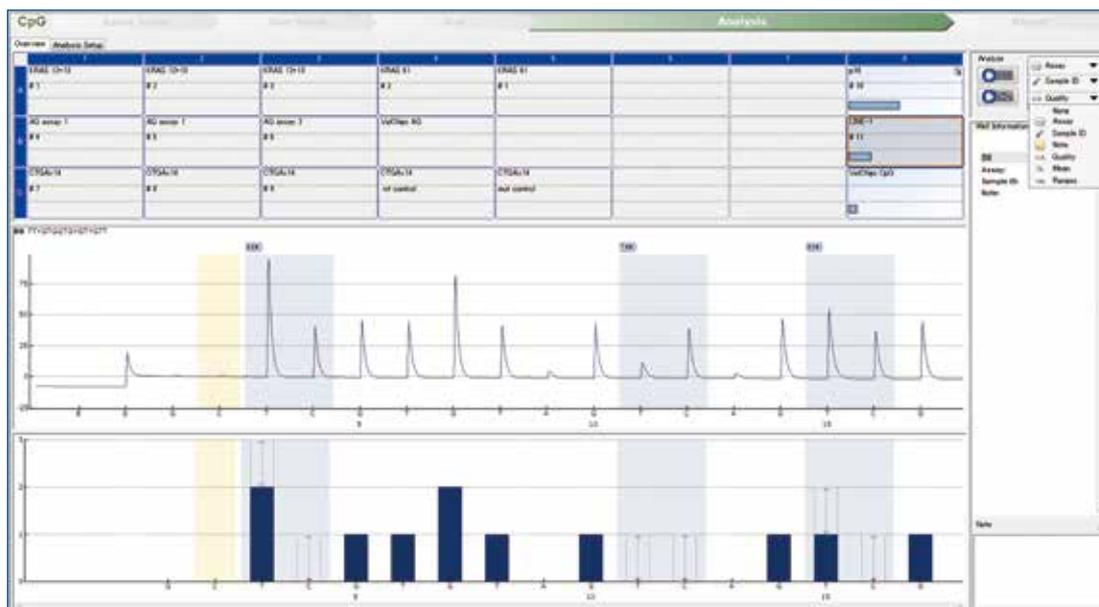
解析モードの変換

AQ アッセイ (定量解析および SNP 解析) で測定したデータは、AQ モードで解析され、CpG アッセイで測定したデータは、CpG モードで解析されます。モードを変換するには、ツールバー上の "AQ"、"CpG"、または "SQA" を改めて選択します。



注意：CpG アッセイの配列に含まれる SNPs 解析をする場合は、ツールバー上の "AQ" を選択後  をクリックします。

Plate Overview の表示内容



well の色は、解析済みか否かを示します。

-  Beige = not analyzed (or not used)
-  Light blue = analyzed

plate overview では、以下のような well info を見ることができます。

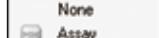
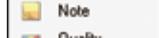
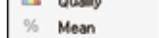
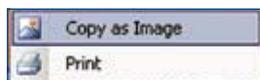
		assay name
		sample ID
		well note
		解析クオリティ
		Off-white = 未解析
		Blue = passed 問題なし 実測パターンが予測パターンと一致し、良好に解析
		Yellow = check データの確認を推奨 ピークにばらつきが見られる場合など
		Red = failed 解析失敗 ピークが全く検出されない、ピークが予測パターンと全く異なる場合など
		% 解析配列中のすべての CpG sites のメチル化率の平均
		メチレーションバー。それぞれのメチル化サイトのメチル化率のレベルを表示

Plate Overview の画像のエクスポートと保存

Plate Overview を右クリックし、メニューから “Print” または “Copy as Image” を選択すると Plate Overview を印刷あるいは画像イメージとしてコピーすることができます。画像イメージは Enhanced Metafile (EMF) をサポートするアプリケーションに貼り付けることができます。



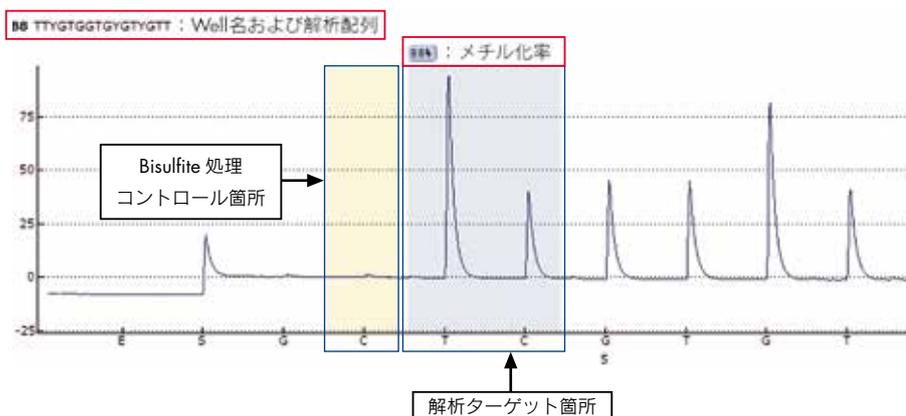
4.2 AQ アッセイ / CpG アッセイの解析

Plate Overview にある well を選択すると、パイログラム（実測ピークの波形パターン）が表示されます。解析ターゲット箇所（AQ/CpG）のピークの背景色はグレー、Bisulfite 処理コントロールのピーク（CpG のみ）の背景色は黄色でハイライトされます。

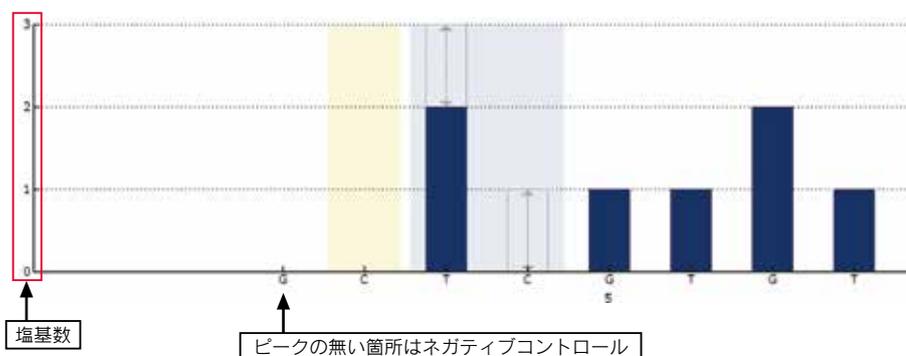
4.2.1 パイログラムの解析

パイログラムエリアには、以下の情報が表示されています。

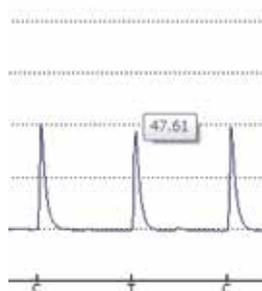
- well の名称と解析する配列が左上に表示
- メチル化率の結果が CpG サイトの上に表示
- メチル化率の背景色は、結果のクオリティを示す



- パイログラムの下段には、予測のピークパターンがヒストグラムのパターンで表示



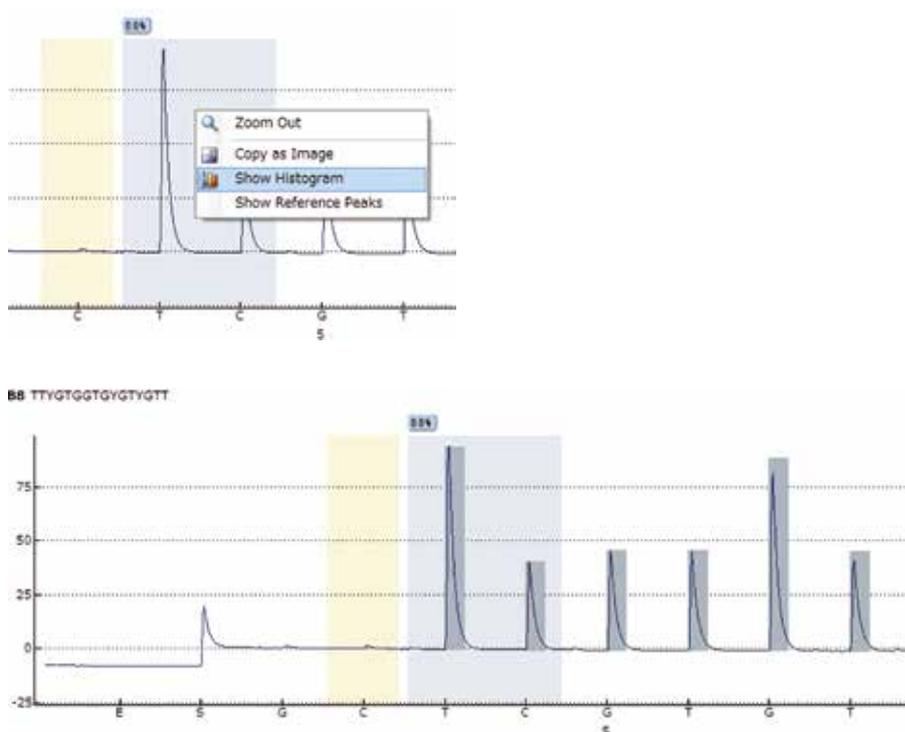
注意: **N/A** が表示された場合は、ピークが無い等、データの欠落のために解析できなかったことを意味します。



ピークの頂点にカーソルを合わせるとピーク高レベル（RLU）が表示されます。

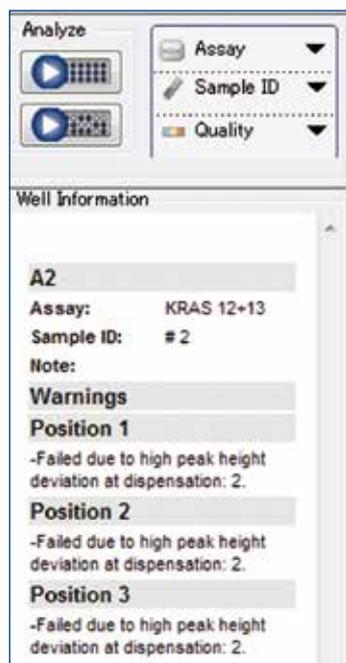
注意: CpG/AQ モードでは、1 塩基あたりの高さが 20RLU 以上あると Passed 判定され、解析可能です。より低い混合比率の定量解析をする場合などで S/N を上げる必要がある場合は、1 塩基あたりの高さが 40RLU 以上になるように PCR 産物量を調製することを推奨します。

- パイログラム上を右クリックしてメニューの中の“Show Histogram”を選択すると、予測のヒストグラム（グレー）がピークに重ねて示されます。



実測ピークとヒストグラムの重なりが無い箇所が出てきた場合は、予測と実測のデータが合っていないことが考えられます。

4.2.2 パイログラム解析結果の編集



測定済みのランファイル右欄に、“Well Information”が表示されます。結果の判定が“Passed”ではない場合は、Warningの欄に何が問題となっているか記載されています。

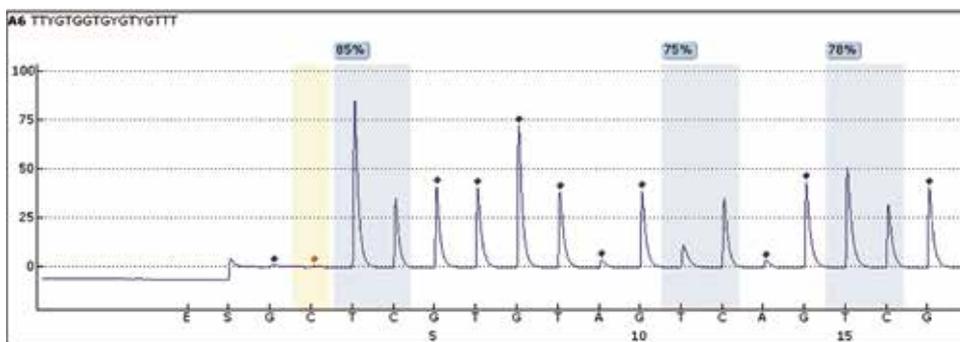
例；

- **Failed due to high peak height deviation at dispensation: XX.**
特定の番号 XX のピークパターンが予測と不一致
- **Failed bisulfite conversion at dispensation: XX.**
Bisulfite 処理コントロールのネガティブピークが出ている（ノイズピークが出ているだけの場合もあるが、相対的に T ピークが低くなっている場合は Bisulfite 処理からサンプルを再調製）
- **Uncertain due to low signal-to-noise ratio**
全体にピークが低い（例；PCR 条件を見直すか PCR 産物量を増やす）
- **Wide Peaks**
全体にピークが高い（例；PCR 産物量を減らす）

特定のピークを Reference から外す方法

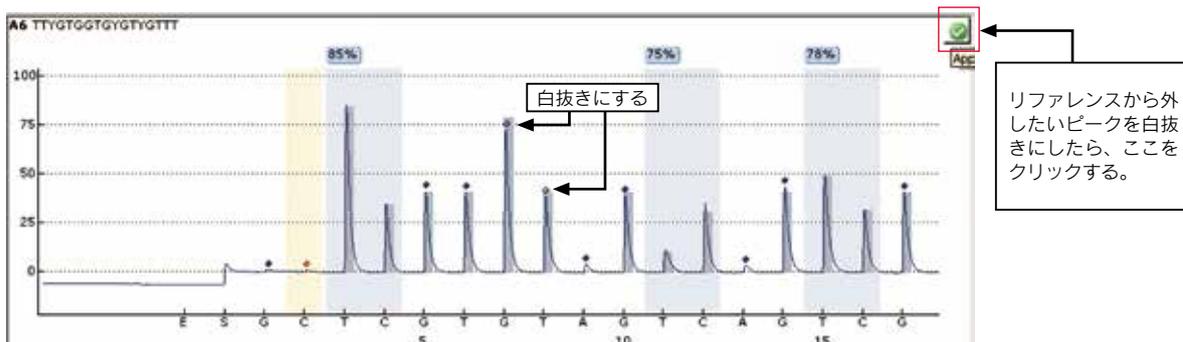
Warning Messages のうち、特定の番号のピークパターンが予測と一致していないことにより、全体的な結果のクオリティが下がっている場合、解析の Reference から外すことが可能です。

パイログラム上を右クリックして、メニューの中の“Show Reference Peaks”を選択すると、解析のクオリティに反映されている Reference ピーク（解析の参考となるターゲット周辺のピーク）がブルーの菱形で表示されます。Bisulfite 処理のコントロールは、ピークの上にオレンジの菱形でマークされます。

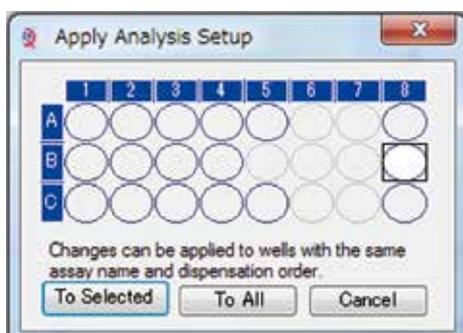


Reference ピークを変更（リファレンスから外す）するには、以下の手順を行ないます。

- Reference から外したい Reference ピークをクリックして、Reference ピークのマークを白抜きにして表示させる。
- パイログラムの右上のチェック をクリックする。



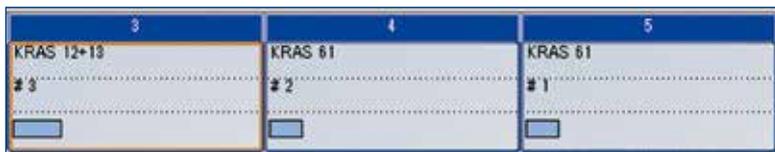
Apply Analysis Setup ダイアログが表示されます。同じアッセイファイルで測定した全ての well において適用する場合は、“To All” をクリックします。選択している well だけに適用する場合は、“To Selected” をクリックします。



4.2.3 パイログラムの比較

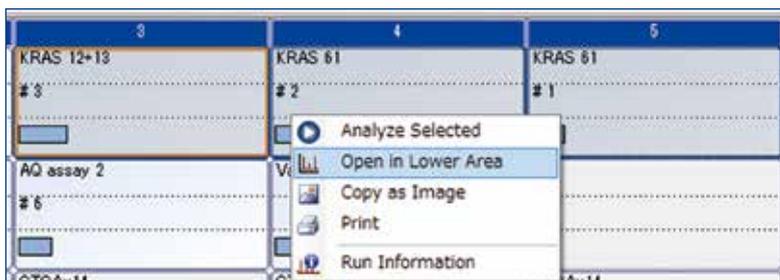
特定のパイログラムを他のパイログラムと比較するには、以下の方法があります。

1. 比較したい一つ、または複数の well を選択する。



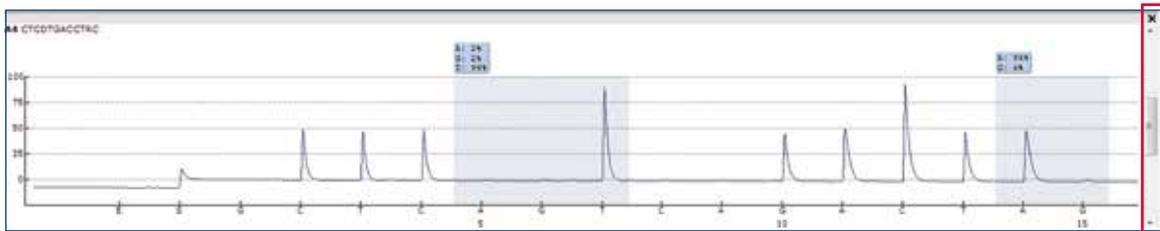
クリックして well を選択します。並んでいる well を選択するときは、Shift キーを押さえながらドラックし、離れている複数の well を選択するときは、Ctrl キーを押しながら well をクリックします。

2. well を選択したら、右クリックして、メニューから“Open in Lower Area”を選択する（一番下段に表示される）。



3. 対象とした well のパイログラムをクリックして選択する（中段に表示される）。

なお、下段に複数 well を選択した場合、パイログラムの右側にスクロールバーが表示されます。バーを上下にスライドさせることで、各パイログラムを表示させることができます。



4.2.4 解析条件の変更

Analysis Parameters Tab で変更できる条件は、以下のとおりです。

1. Plate 上の解析条件を変更したい well を選択する。

1 Unsuccessful Bisulfite Treatment

Bisulfite チェック用のピークが検出されると結果のクオリティに影響します。“Passed” または “check” と判定される Bisulfite チェック用のピーク検出割合 (%) の上限をここで決定します (**Allowed Percentage for passed quality** または **Allowed Percentage for check quality** にそれぞれ値を入力できます)。デフォルトでは、5%以下であれば “passed”、7.0%以下であれば “check” と判定されます。ただし、“Passed” の上限値は “check” の上限値より高くすることはできません。

2 Peak Height Threshold

ピーク高が低いと結果のクオリティに影響します。“passed” または “check” と判定される 1 ピーク分の高さの下限値をここで決定します (**Required peak height for passed quality** または **Required peak height for check quality** にそれぞれ値を入力できます)。

デフォルトでは、passed: 20(CpG/AQ)、Check: 10(CpG/AQ) のように設定されています。

3 Stringency Levels

メチル化サイトにおけるピークの偏りなどが判定に与える影響レベルを決めることができます。“Low”、“Normal”、“High” の基準で変えられますが、“High” にすると許容範囲が狭くなります。

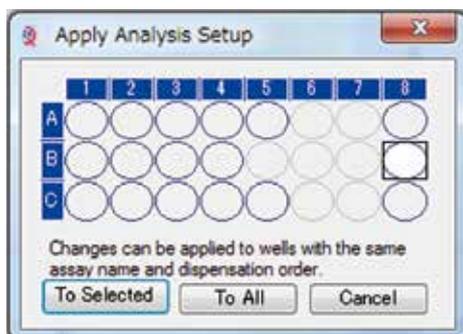
- **Pattern deviation in variable position** : 各ターゲットサイトにおけるピークのパターンが予測パターンと異なる場合、判定に与える影響のレベルを決定します。
- **Sum deviation in variable position** : 各ターゲットサイトにおけるピークの高さの合計が予測と異なる場合、判定に与える影響のレベルを決定します。

4 Parameters

A-peak reduction factor : パイロシーケンス測定に用いられる dATP は修飾されているため、A ピークは他の塩基に比べてわずかにピークが高くなります。そこで A のピークには補正がかけられます。デフォルトの値は 0.9 です。

2. 目的とする解析条件の変更後、“Apply” をクリックする。

3. **Apply Analysis Setup** ダイアログが表示されるので、同じアッセイファイルで測定した全ての well において適用する場合は、“**To All**” をクリックする。選択している well にのみ適用する場合は、“**To Selected**” をクリックする。



注意：リファレンスの変更作業は、同じアッセイファイル（dispensation order）である well にのみ同時に設定できます。

4.2.5 アッセイファイルへの変更の保存

Analysis Setup タブで変更した解析条件は、アッセイファイルには反映されていません。変更した解析条件を保存する場合は、以下の方法があります。

- 解析条件を変更した well を選択し、“**Save Assay**” をクリック。
- ダイアログボックスが表示されるので、既存のアッセイファイル名で上書きするか新しいファイル名で保存する。

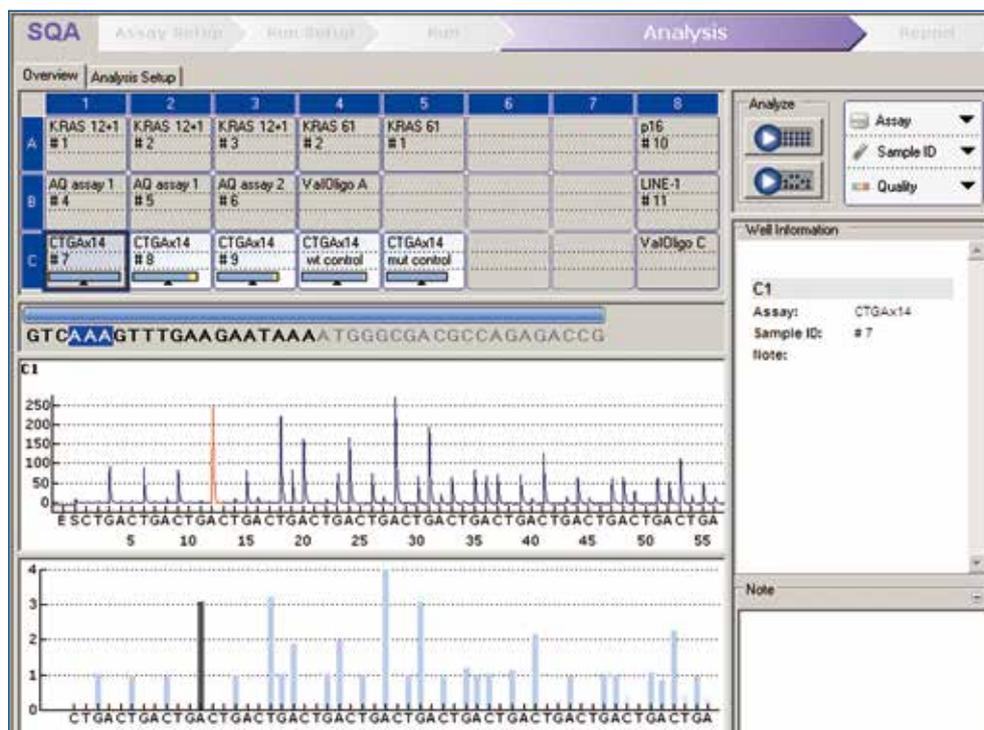


4.3 SQA アッセイの解析

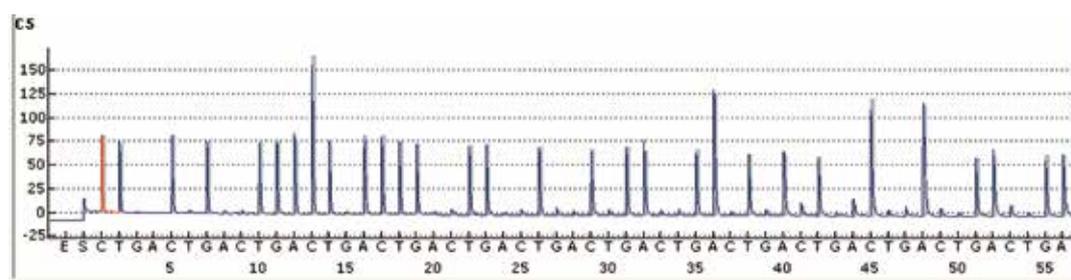
全ての well を判定する場合は “Analyze” の “Analyze All Wells”、指定した well のみを判定する場合は “Analyze Selected Wells” をクリックすると以下のような解析ウィンドウが展開されます。

4.3.1 パイログラムの解析

- 配列はパイログラムの上部に表示される。パイログラム中のピークをクリックすると、どのピークがどの塩基に対応しているかを確認することができる。

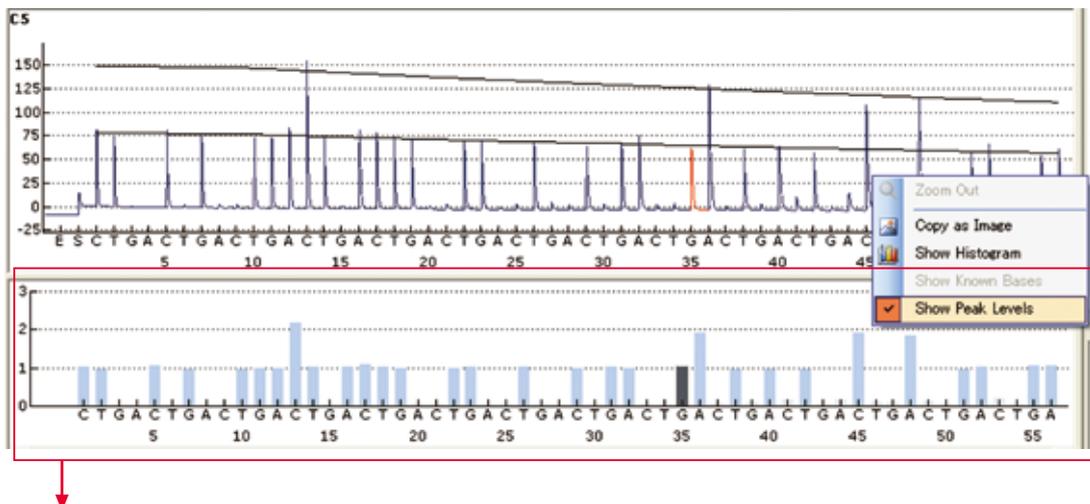


- パイログラム上を右クリックしてメニューの中の “Show Histogram” を選択すると、予測される理論上のヒストグラムがピークと重なってグレーで表示される。下の枠には、ソフトウェアが補正した後のピークパターンが表示される。



ベースコーリングのためのピークレベル補助線の表示方法

パイログラム上で右クリックし、“Show Peak Levels” を選択します。



上段のパイログラムの縦軸数値は、**Peak Levels**（ピークレベル補助線）の信号強度を示しており、下段のヒストグラムの縦軸数値は、実際のパイログラム数値から導かれたピーク高を表している。

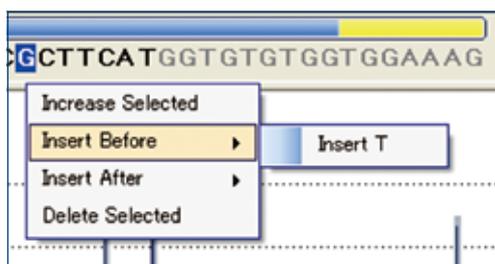
解析のクオリティをマニュアルで変更する方法

ベースコールした配列のクオリティを変更するには、“Passed”、“Check”、“Failed” で判定されたエリア上の端にマウスのポインターを置き、左右にクオリティを変更したい配列位置まで動かすとクオリティを変更することができます。



配列情報の変更方法

ベースコールした配列情報を変更するには、変更したい配列を右クリックして、配列情報を変更します。



Increase Selected : 指定の塩基配列の数を増やす

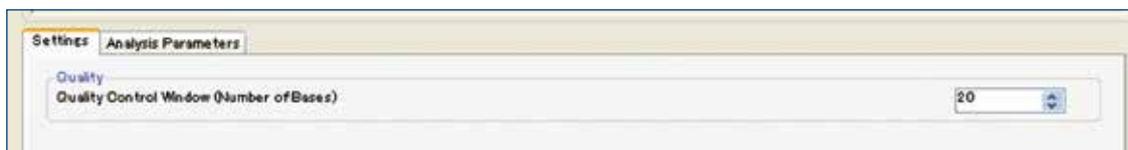
Insert Before : 指定の塩基配列の前に配列を入力する

Insert After : 指定の塩基配列の後に配列を入力する

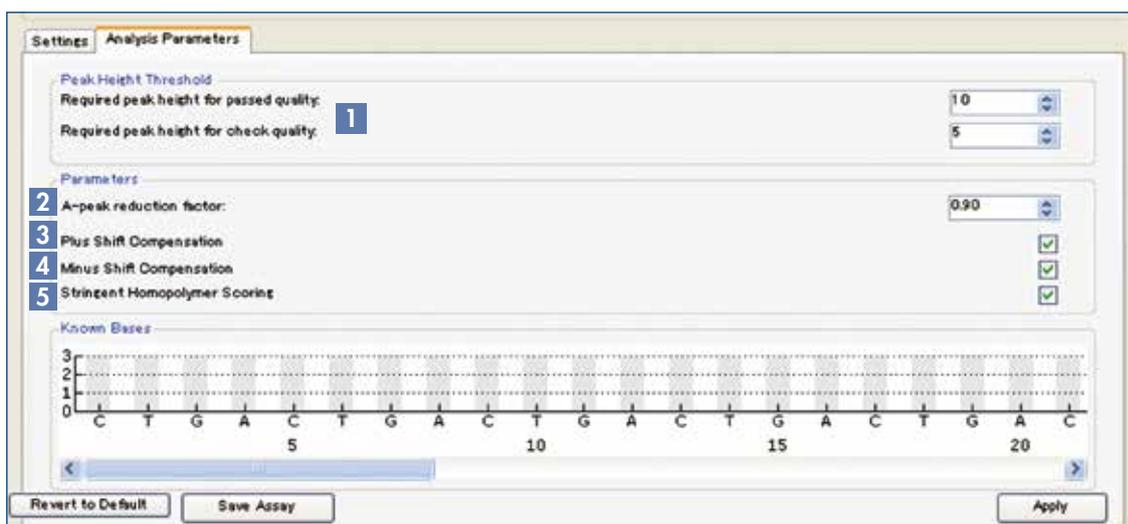
Delete Selected : 指定の塩基配列を削除する

4.3.2 解析条件の変更 (SQA)

1. Plate 上の解析条件を変更したい well を選択する。
2. “Settings Tab” では、“Quality Control Window” は 20 塩基になっているので、必要であれば数値を変更する。データ出力を Quality Control Window で指定している塩基数に限定することが可能。



Analysis Parameters Tab で変更できる条件は、以下のとおりです。



1 Peak Height Threshold

ピークの高さが低いと結果のクオリティに影響します。Passed または check と判定される 1 ピーク分の高さの下限値をここで決定します。デフォルトでは、passed: 10(SQA)、check: 5(SQA) に設定されています。

2 A-peak reduction factor

パイロシーケンス測定に用いられる dATP は修飾されているため、他の dNTPs に比べてわずかにピークが高くなります。そこで A のピークには補正がかけられます。デフォルトは 0.9 です。

以下の 3 ~ 5 の欄に ✓ がされていると、それぞれの要因が考慮された上で結果を解析します。

3 Plus Shift Compensation

先に添加された塩基が Apyrase 酵素により完全に分解されていない場合、ピークが予測の位置より前に検出されます。

4 Minus Shift Compensation

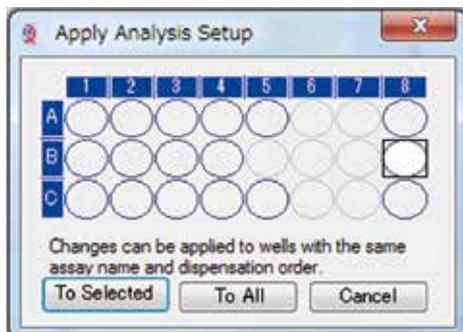
ホモポリマーとして塩基が存在する場合、ポリメラーゼの伸長が不十分となることがあり、ピークが予測の位置より後に検出されます。

5 Stringent Homopolymer Scoring

ホモポリマー部分の結果について判定に与える影響を示します。

3. 目的とする解析条件の変更後、“Apply” をクリックする。

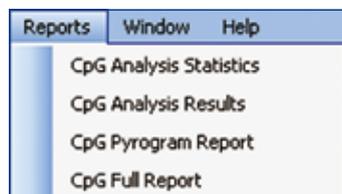
4. **Apply Analysis Setup** ダイアログが表示されるので、同じアッセイファイルで測定した全ての well において適用する場合は、“**To All**” をクリックする。選択している well にのみ適用する場合は、“**To Selected**” をクリックする。



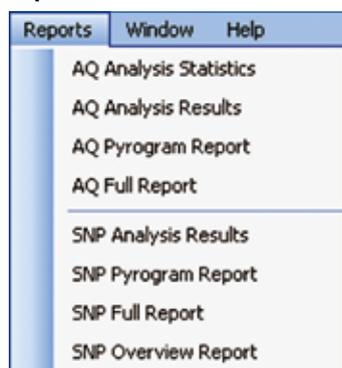
5 解析レポート



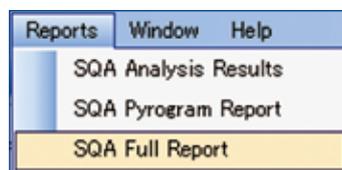
Reports menu for CpG runs



Reports menu for AQ runs



Reports menu for SQA runs

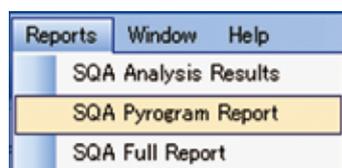
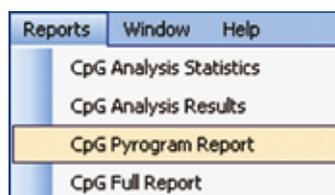
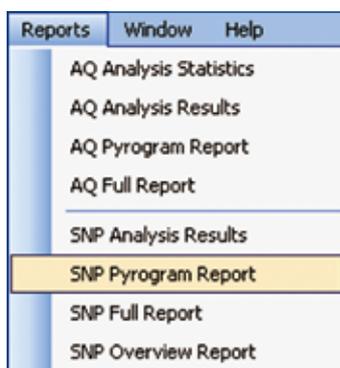
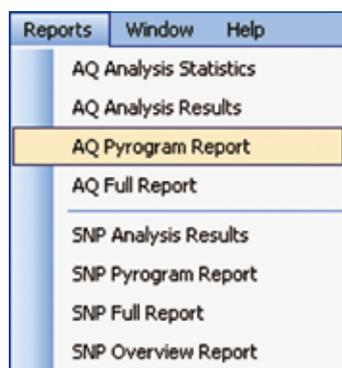


PyroMark Q24 Software では、以下のようにレポートとして出力が可能です。

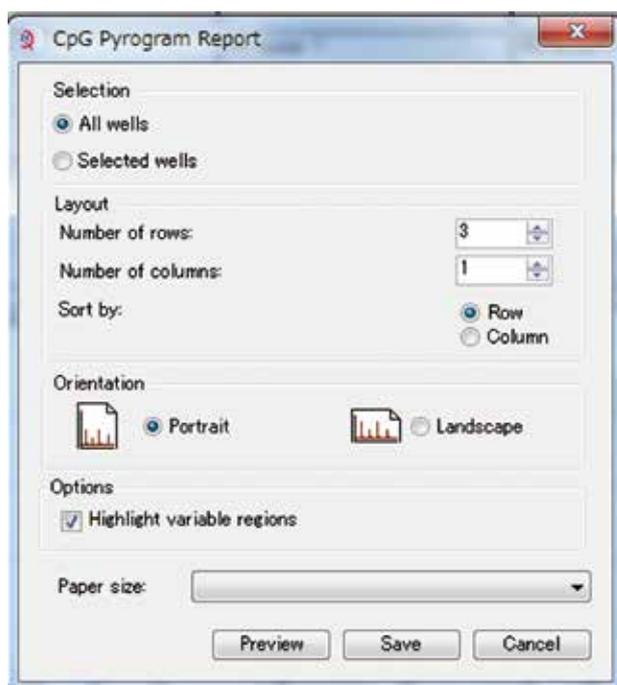
- **Analysis Statistics Report**
選択 well（または全 well）における統計データを出力します。
- **Pyrogram Report**
選択 well（または全 well）におけるパイログラムデータを出力します。
- **Analysis Results Report**
選択 well（または全 well）におけるテキストデータを出力します。
- **Full Report**
選択 well（または全 well）における run parameters、run log、well information、テキストデータ、パイログラムデータを出力します。
- **SNP Overview Report**
SNP genotypes と結果のクオリティを plate overviews の形式で出力します。

注意：Full Report、Pyrogram Report および SNP Overview Report を見るためには、Adobe® Acrobat® Reader が必要です。Adobe Acrobat Reader は www.adobe.com から入手可能です。

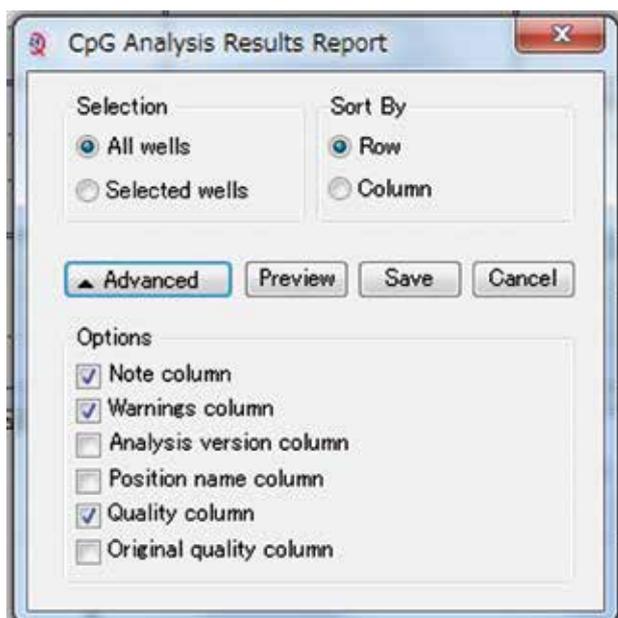
- **Pyrogram Report**：全ての well あるいは選択した well のパイログラムを出力します。レポートは PDF として保存されます。ここでパイログラムを印刷することも可能です。



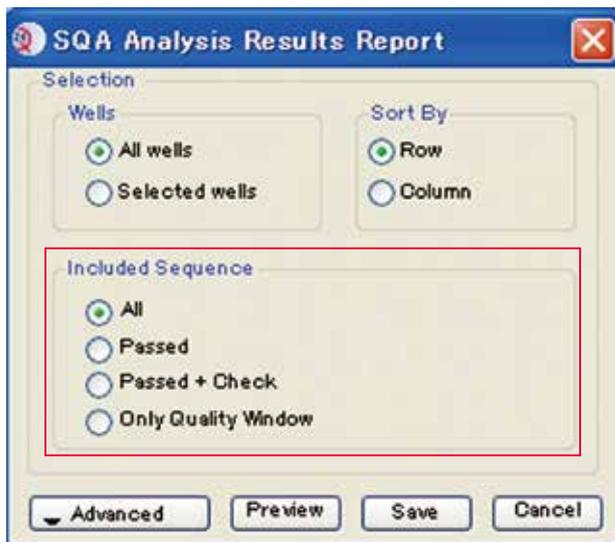
- Pyrogram Report ダイアログでは以下のオプションが設定できます。



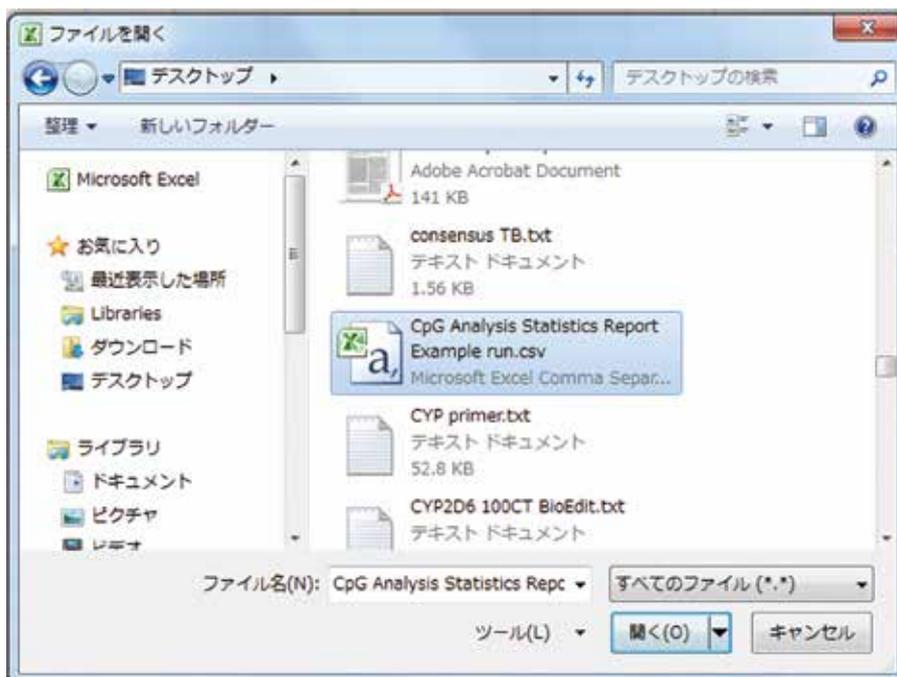
- **All wells/Selected wells** : 全ての well または、選択した well のパイログラムを出力
 - **Number of rows/columns** : 一枚のシートに入れる行 (rows) および列数 (columns)
 - **Sort by rows/columns** : データをソートする方向、横方向 (rows) か縦方向 (columns)
 - **Portrait/Landscape** : 紙の方向を縦書き (Portrait) にするか横書き (Landscape)
 - **Highlight variable regions** : 解析サイトが、グレーの背景色でハイライトされる
- **Analysis Results Report** : 全ての well あるいは選択した well におけるテキストデータを出力します。レポートはテキストファイル (.tsv あるいは .csv) で保存してください。Excel で、セミコロン、カンマで分離したデータを展開することができます。



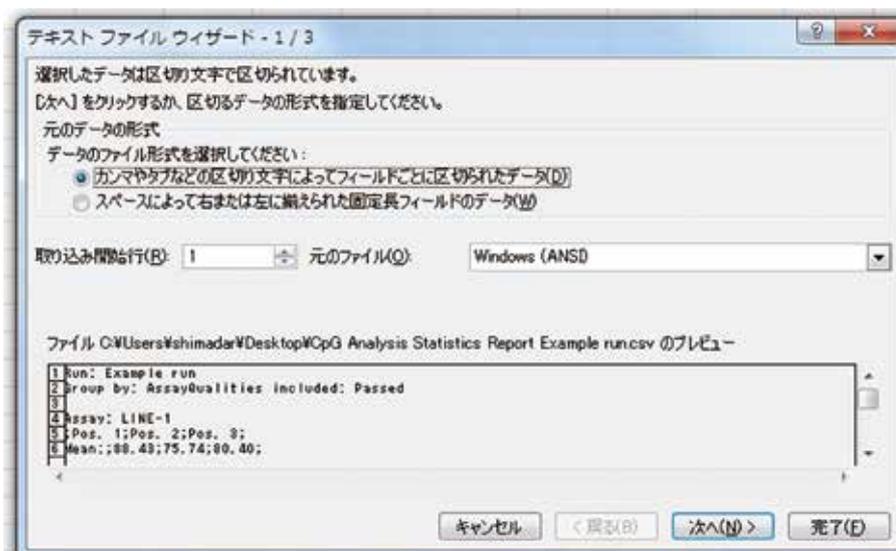
- SQA の Analysis Results では、クオリティの精度によって出力するテキストデータの範囲を選択することも可能です。



Excel を立ち上げて保存したテキストファイル (.tsv あるいは .csv) を開きます。



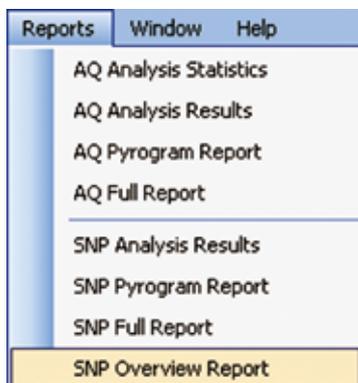
カンマ、タブで区切ったデータ (delimited) を指定します。



セミコロンを区切り文字として選択すると、各項目がセルに収納されるので解析が容易です。



- **SNP Overview report** : SNP genotypes と結果のクオリティを plate overviews の形式で出力します。



各 well の解析のクオリティも同時に表示します。なお、Genotypes は、それぞれのポジション毎に一つずつ表示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C/T							
B	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/G
C	C/T							

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C/T							
B	--			A/G	A/G	A/G		
C	C/T							

PyroMark Q24 ファイルのバックアップ

PyroMark Q24 Software で作成されたデータは、次のような拡張子を持つファイルとして PC に保存されます。

- *.pyrorun (ランファイル)
- *.pyrosetup (アッセイファイル)

データのバックアップは頻繁に行なってください。データのバックアップは PyroMark Q24 ファイル (*.pyrorun および *.pyrosetup) を別の場所にコピーすることで可能です。他の物理ドライブや永久記憶装置に保存することもできます。

バックアップに関する詳細は、システム管理者にお問い合わせください。

本マニュアルは QIAGEN 社の PyroMark Q24 システムで使用する PyroMark Q24 Software の使用方法を簡易的に解説するものです。使用方法の詳細は、ソフトウェア上で F1 ボタンを押した際に出力される User Manual をご参照ください。

Trademarks: QIAGEN®, PyroMark™ (QIAGEN Group); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); Adobe®, Acrobat® (Adobe Systems Inc.).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。
QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

© 2013 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

