

Real -Time RT-PCR

本稿では、マイクロアレイセンターで行っている iCycler iQ (Bio Rad) を用いたリアルタイム RT-PCR 法のプロトコルを紹介する。

RT-PCR を行うにあたり必要な機器・事柄等

(1) 使用する機器

- ・ iCycler iQ (Bio Rad)

(iCycler iQ は、使用 30 分以上前に必ず立ち上げておく)

(2) 使用キット名及び試薬

- ・ Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit (amersham pharmacia biotech)
Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit は、室温のデシケーター中で保存する
- ・ QuantiTect™ SYBR®Green PCR (QIAGEN)
QuantiTect™ SYBR®Green PCR (QIAGEN)は、-20 凍結保存
- ・ 10 × External Well Factor Solution (Bio Rad)
10 × External Well Factor Solution は、-20 凍結保存

(3) PCR 用 Primer Mix (マイクロアレイセンターで使用しているプライマー)

Primer Mix : イネ 9000 アレイ上にスポットされている独立 EST クローンの 3' UTR (3' UTR : 3' 側非翻訳領域) 内に設計された、各クローン特異的 (=gene specific) な PCR 用プライマーセット (Upper Primer+Lower Primer) の溶液をそれぞれ等濃度で等量ずつ混合したプライマー水溶液

(4) 使用する 96 Well Plate 類

- ・ iCycler iQ™ PCR Plate(Bio Rad)
- ・ Optical Cap Strip (Bio Rad)
- ・ キャップシーラー (Bio Rad)

(5) フィルター付きピペットチップ

- ・ PipetTips:Aerosol Resistant Tips (Molecular Bio products) など

(6) ピペットチップ

- ・ PipetTips(Molecular Bio products) など

(7) 使用する水

- ・ 滅菌済みの DEPC 処理水
- ・ 滅菌済みの dH₂O (以下 dH₂O と略す)

(8) その他

- ・ アルミシール (Thermowell™ Thermowell sealers(aluminum) (costar)) など

(9) ヒートブロックは、あらかじめ 37 と 65 にセットしておく

(10) 作業中は、手袋をすること

(11) リアルタイム RT-PCR 実験を行う際には、予め下記のような表、或いは“ (image) ”を作り、各 Primer Mix を iCycler iQ™ PCR Plate 上のどの Well に分注するかを明らかにしておくとう便利である。

例： 2 種類のサンプル (サンプル D と F) を比較する場合の実験

サンプル D：ホルモン処理区

サンプル F：コントロール区

- ・ サンプル D は、太字
- ・ サンプル D のネガティブコントロールは、
プライマー番号の下に = (二重線のアンダーバー)
- ・ サンプル F は、細字
- ・ サンプル F のネガティブコントロールは、
プライマー番号の下に ~ (波線)
- ・ サンプル D、サンプル F の 09H05 のネガティブコントロールは、
プライマー番号の下に ---- (点線)
- ・ ネガティブコントロール：プライマー有り、テンプレート (First Strand cDNA)
なし
- ・ その他：プライマー有り、テンプレート (First Strand cDNA) 有り

	サンプルD						サンプルF					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	02 A 05	<u>02 A 05</u>	09 H 03	<u>09 H 03</u>	24 G 01	<u>24 G 01</u>	02 A 05	<u>02 A 05</u>	09 H 03	<u>09 H 03</u>	24 G 01	<u>24 G 01</u>
B	03 C 05	<u>03 C 05</u>	16 F 10	<u>16 F 10</u>			03 C 05	<u>03 C 05</u>	16 F 10	<u>16 F 10</u>		
C	05 D 11	<u>05 D 11</u>	18 B 08	<u>18 B 08</u>			05 D 11	<u>05 D 11</u>	18 B 08	<u>18 B 08</u>		
D	06 H 08	<u>06 H 08</u>	18 G 09	<u>18 G 09</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>	06 H 08	<u>06 H 08</u>	18 G 09	<u>18 G 09</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>
E	07 C 12	<u>07 C 12</u>	19 C 09	<u>19 C 09</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>	07 C 12	<u>07 C 12</u>	19 C 09	<u>19 C 09</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>
F	08 G 10	<u>08 G 10</u>	20 D 12	<u>20 D 12</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>	08 G 10	<u>08 G 10</u>	20 D 12	<u>20 D 12</u>	09 H 05	<u>09 H 05</u>
G	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05	09 H 05
H	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>	<u>09 H 05</u>

*リアルタイム RT-PCR では、検量線を作製して定量的な比較を行う。この実験例では、D5・6、D11・12、E5・6、E11・12、F5・6、F11・12、G1～12、H1～12 を検量線作製のための Standard として使用している（プライマーとしては、或る遺伝子特異的な Primer Mix である 09H05 を用いている）。

*09H05 には、First Strand cDNA がある一定の割合で希釈され、それぞれ必要な Well に分注される。

（希釈率：×1、×10、×50、×100、×500、×1000、×5000、×10000、×50000 など）

*Primer Mix:イネ 9000 アレイ上にスポットされている独立 EST クローンの 3'UTR（3'UTR：3'側非翻訳領域）内に設計された、各クローン特異的（=gene specific）な PCR 用プライマーセット（Upper Primer+Lower Primer）の混合物。これらプライマーセットのうち、6606 セットは STAFF 研究所の呉主任研究員ら (Wu et al、2002)によって作製され、残りのプライマーセットは、当研究グループで作製された。

.RT-PCR をするための準備

- ・RT-PCR を始める前日に “ Primer Mix が入っている 96Well プレート ” を-80 のフ

リーザーから-20 のフリーザーへ移し、数時間したら 4 の冷蔵庫へ移す。実験を始める前に “ Primer Mix が入っている 96Well プレート ” を 4 の冷蔵庫から出し、1 枚ずつ重ねずに置き、室温にもどす。

- Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit の “ First Strand Reaction Mix が入ったチューブ ” は、購入時のアルミ袋にいれたまま室温のデシケーター中で保存する。使用時に必要な本数だけ取り出す。(その際に付属の “ チューブ用ラベル ” も取り出す) 使用しないチューブは、アルミ袋の空気を抜いてから密封し、デシケーターに戻す。
- First Strand Reaction Mix は、完全な乾燥状態 (透明なペレット状) でチューブに入っている。このペレットは、ふたや壁面に付着していることもあるので、使用前にタッピングでチューブの底に落としておくこと。
- 付属のラベルには、「 First Strand cDNA 」、「 日付 」、「 サンプル名 」、「 作製者名 」を記入し、“ First Strand Reaction Mix ” の入ったチューブに貼る。

.First Strand cDNA の作製

1.RNA サンプルの調製

- (1).RNA サンプルを 33 μ l の滅菌済み DEPC 処理水に溶解させる($\circ \mu$ g /33 μ l)
我々は通常、 mRNA を 1 μ g 用いているが total RNA も用いることが出来る。
mRNA と total RNA の 1 反応分の使用量は、下記の通りである。

mRNA	10n g ~ 2 μ g
total RNA	100n g ~ 5 μ g

- (2). 65 のヒートブロックで、 5 分間インキュベートする。
(3). 37 のヒートブロックで、 5 分間インキュベートする (この間に “ First Strand Reaction Mix の入ったチューブ ” も一緒に 37 のヒートブロックで、 5 分間インキュベートする) 。

2.First Strand cDNA 合成

- (1).RNA サンプル水溶液を “ First Strand Reaction Mix の入ったチューブ ” へ入れる (入れるだけで混ぜないこと。チューブの底付近の壁面に沿って入れると良い)
(2). 37 のヒートブロックで、 5 分間インキュベートする。
(3). 穏やかに混和 (粘性で混合しにくいのでゆっくりピペティングしながら、良く混ぜること)
(4). 37 のヒートブロックで、 60 分インキュベートする。この反応で First Strand cDNA が合成される。

* 合成された First Strand cDNA を保存する場合は、-20 のフリーザーで凍結保存する。

.Well Factor Plate の作製

- 1.未使用の 15ml 遠心チューブ（ポリ製、滅菌済み）を用意し、その中に 10 × External Well Factor Solution 600 μ l と d H₂O 5.4ml を入れてよく混合する。作製後は、アルミホイル等に包んで遮光する。
 - 2.iCycler iQ™ PCR Plate（以下、プレートと略す）を用意し、使用前に埃等が付着してないことを確認しておくこと。
 - 3.プレートの側面には、「Well Factor Plate」と記入し「日付」も明記する。 .1.で作製した Well Factor Solution を 50 μ l ずつ、プレートの 96well すべてに分注する（チップの先は、Well に入れて分注すること。理由：プレートは静電気を帯びているため、試薬の液滴が Well に入らないことがあるため）。
 4. プレートにキャップをかぶせるため、Optical Cap Strip の両端を持ち、プレートの Well にかかるくセットし、キャップシーラーをもちいて完全に Well を密閉する。この際、キャップシーラーで Optical Cap Strip を上から押さえつけるようにする。（キャップシーラーを Optical Cap Strip の上で滑らせるだけでは Well を密閉出来ない）この過程では、Optical Cap Strip の表面に素手で触れないこと。
 - 5.プレート遠心器でプレートを低速短時間で遠心し、壁面についた Well Factor Solution をチューブの底に集める。
 - 6.プレートを遮光するためにアルミホイル等で包み、そこに「Well Factor Plate」と記入し、「日付」を明記して 4 の冷蔵庫で保存。
- * 作製した Well Factor Plate は、4 ・遮光条件下で 2 週間程度保存できるため再使用が可能。使用前に必ずスピンドウンする（スピンドウンによって、Cap 内側の水滴を Well 内に落とし、液量を確認すること）。
- * 使用前のスピンドウンは、必ず行うこと。このスピンドウンを怠ると Cap 内に水滴がついたままの状態となり、正確な定量が出来なくなる。

.検量線を作製するために First Strand cDNA を希釈して、下記のような Dilution Series を調製する（各希釈倍率につき 10 μ l ずつ作製する）。

例：

× 1	→	そのまま使用する
× 10	→	× 1 を 1 μ l dH ₂ O 9 μ l
× 50	→	× 10 を 2 μ l dH ₂ O 8 μ l
× 100	→	× 50 を 5 μ l dH ₂ O 5 μ l
× 500	→	× 100 を 2 μ l dH ₂ O 8 μ l
× 1000	→	× 500 を 5 μ l dH ₂ O 5 μ l
× 5000	→	× 1000 を 2 μ l dH ₂ O 8 μ l
× 10000	→	× 5000 を 5 μ l dH ₂ O 5 μ l
× 50000	→	× 10000 を 2 μ l dH ₂ O 8 μ l

.PCR Plate の調製（これ以降、フィルター付きのチップを使用する）

1. 室温で放置していた “ Primer Mix の入った 96well プレート ” をプレート遠心器で 2000rpm、1 分程度遠心する。
2. 新しいプレートを出し、プレートの側面に「日付」、「サンプル名」を記入する（こ

のとき、インクが Well の縁などにつかないように気をつける。Well の縁にインクが付着すると、蛍光測定に悪影響を及ぼす。

3. 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix、RNase-free Water、Primer Mix（Primer Mix は、前もって必要量をチューブに分注しておく和良好的）を下記の表に従って必要量ずつ Well に分注する。（Master Mix 中の HotStarTaq DNA Polymerase は不活性状態にあるため、室温での非特異的な DNA 合成は生じない。したがって Polymerase の入ったチューブを氷上で保存する必要はない）。

* 本稿で記述する例では、我々が使用している Primer Mix(Upper Primer+Lower Primer)の中から、検量線作製用の Primer Mix、09H05 を用いた。

反応/容量 (μ l)	First Strand cDNA を 加える Well (μ l)	First Strand cDNA を 加えない Well (μ l)
2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	25	25
RNase- free Water	22.5	23.5
Primer Mix 20pM(Upper+Lower)	1.5	1.5
Total /Well	49	50

4. ネガティブコントロール用として用いる Well には、First Strand cDNA を分注しない。その他の Well には First Strand cDNA を 1 μ l ずつ分注する。
例：（11）に示した表では、“下線のない Primer Mix の Well ”に First Strand cDNA を分注する。
5. プレートにキャップをかぶせるため、Optical Cap Strip の両端を持ち、プレートの Well にかかるくセットし、キャップシーラーをもちいて完全に Well を密閉する。この際、キャップシーラーで Optical Cap Strip を上から押さえつけるようにする。（キャップシーラーを Optical Cap Strip の上で滑らせるだけでは Well を密閉出来ない）この過程では、Optical Cap Strip の表面に素手で触れないこと。
6. プレート遠心器でプレートを低速短時間で遠心し、壁面についた試薬をチューブの底に集める。

.iCycler iQ へのセッティング

* iCycler iQ は、CCD カメラのウォーミングアップを行うため、PCR 開始の 30 分以上前に電源を入れておくこと。

電源は、下記の順番に入れていく。

- 1.iCycler Optical System Power Supply? 機械本体（iCycler iQ）? パソコンの順で電

源を入れ、約 30 分待つ (CCD カメラのウォーミングアップ)

- 2.電源を ON すると機械本体の画面上に「Registered User」が点滅して表示されるので、操作パネルで「Enter」ボタンを押す。次に画面が換わり機械本体の画面上に「bio」と表示されるので、同様に操作パネルで「Enter」ボタンを押す。
- 3.Well Factor Plate を機械本体にセットする(左上に A 1 がくるようにセットすると良い)。エアードスター等を用いてプレート上部の埃等を除去する。
- 4.次に、“ 機械本体を操作するパソコン ” で画面上のアイコン「iCycler」(iCycler iQ Real-Time Detection System Software Ver.2.3) をダブルクリックする。「iCycler Log On Screen」が現れるので、「Yes」をクリックし、次に同じ画面左下の「OK」をクリックする。これで、「iCycler iQ Real-Time Detection System Software Ver.2.3」が立ち上がる。
- 5.初期設定で自動的に「Protocol Library Module」の「View Protocols Window」が現れる。既に存在しているプロトコールを利用する場合は、同じ Window の上部中央やや左寄りの“ Protocol Files ” から、使用する PCR Protocol を選択する。
我々は、下記のプロトコールを用いている (プロトコールを新規に作製する方法については、次節 で記述する)

-PCR サイクル-

95 ・15min → (94 ・30sec、60 ・30sec、72 ・60sec) × 55cycle → end 10
↑ (このステップで蛍光データの収集をするように設定)

- 6.同じ「Protocol Library Module」画面上部のタブをクリックして「View Plate Setup Window」を開く。この Window の上部やや左の“ Plate Setup Files ” から、使用する Plate Setup を選択する。
- 7.同じ画面の“ Run ” ボタンをクリックする。自動的に「Protocol Library Module」から「Protocol Workshop Module」に切り換わり、「Run Prep Window」が表示される。
8. .5.で選択した PCR Protocol、及び .6.で選択した Plate Setup が、同じ Window 右上の“ Ready to run Thermal Protocol ” と “ using Optical Plate Setup ” にそれぞれ表示されていることを確認する (必要な PCR Protocol または、Plate Setup が表示されていない場合は、「Protocol Library Module」のアイコンをクリックし、.5 から選択し直す)
- 9.同じ Window 画面左上の“ Identify Protocol Analysis ” では、“ PCR Quantification

Melt Curve ”を選択する。

10. そのすぐ下にある “ Temperature Method ” には、サンプル量を “ 50 μ l ” と入力する。
11. 同じ Window の中央の “ Well Factor Source ” では、 “ Well Factor Plate ” を選択する。
12. “ Begin Run ” ボタンをクリックすると、「 Select Optical Data File Name 」ダイアログが表示される。
13. File name をつけ、 “ Save ” をクリックする。そのまま PCR Protocol が実行され、終了まで約 5 分間待つ。
(キャリブレーション用プロトコールと Well Factor を収集するための PCR Protocol が自動的に挿入される。これらの Protocol を開始すると、自動的に「 RunTime Central Module 」の「 Thermal Cycle Window 」における「 Running Protocol 」設定になっており、同 Window 下部に Running の状態 (温度と経過時間) が表示され、Well Factor の取り込みが行われる) 。
14. 機械本体画面上の Rem.Time が 00 : 00 になったら、Well Factor Plate を機械本体から取り出し (この時パソコンの画面上には、エラーメッセージが現れる) アルミホイル等に包んで遮光し、 . で準備した PCR Plate を機械本体にセットする。この時、プレートの方向や位置に注意する。**必ず、左上に A 1 がくるようにセットしなければならない。** エアードスター等を用いてプレート上部の埃等を除去する。
15. パソコン画面のエラーメッセージの「 OK 」をクリックし、画面右上部の “ Continue Running Protocol ” をクリックしてプロトコールを再開させる。(機械本体の画面には、PCR 終了予定時間が表示される) 。
16. Well Factor Plate は、熱が冷めるまでまち、4 の冷蔵庫で保存する。
17. 反応が終了したら本体から PCR Plate をとりだし、-20 のフリーザーで凍結保存する (電気泳動で各 PCR 産物のバンドが 1 本であるかどうかを確認しておくこと) 。
18. 機械本体、iCycler Optical System Power Supply、パソコンの電源を OFF する (順番に OFF する必要は無い) 。

iCycler iQ Real-Time Detection System Software Ver.2.3での新しい Protocol の作製方法
iCycler iQ の電源の入れ方や、当ソフトウェアの立ち上げ方法については、前節 の 1 ~ 4 を参照のこと。

1. 「 Protocol Library Module 」の「 View Protocols Window 」の画面が現れる。
2. 画面右上の “ Custom ” ボタンをクリックする。
3. 「 Protocol Workshop Module 」の「 Edit protocol Window 」に切り換わる。

4.同じ Window の左下に下記のような表があらわれる。この表を用いて PCR 条件を設定する。表のすぐ上には、下記に示すような 4 つのボタン（Cycle の “ Insert ” ボタンと “ Delete ” ボタン、Step の “ Insert ” ボタンと “ Delete ” ボタン）がある。

以下に、次の PCR サイクルを設定する方法について説明する。

95 ・15min → (94 ・30sec、60 ・30sec、72 ・60sec)×55cycle → end10

↑（このステップで蛍光データの
収集をするように設定）

Cycle		Step			
Insert ボタン	Delete ボタン	Insert ボタン	Delete ボタン		
Cycle	Repeats	Step	D Well Time	Hold	Setpoint
1	11	1	00:30 C		95.0
D	L	2 B	00:30		55.0 E
		3 A F	00:30 G		72.0 H
			I J		K
M				P	N

* 表の数字は、初期設定値

* A ~ P (O を除く) は、クリックする順序を示す。これらの A ~ P は、画面には表示されていない。例えば、「A をクリックする」とは、「上記の表で A のセルをクリックする」という意味である。

- (1) .Step の “ Delete ” ボタンを押し、A をクリックする。
- (2) .Step の “ Delete ” ボタンを押し、B をクリックする。
- (3) .C をダブルクリックして D Well Time に 15:00 と入力する。

- (4) .Cycle の “ Insert ” ボタンを押し、D をクリックして、E の Setpoint の温度をダブルクリックして 94.0 と入力する。
- (5) .Step の “ Insert ” ボタンを押し、F をクリックして、G の D Well Time の時間と H の Setpoint の温度をそれぞれダブルクリックし、それぞれの欄に 00 : 30、60.0 と入力する。
- (6) .Step の “ Insert ” ボタンを押し、I をクリックして、J の D Well Time の時間と K の Setpoint の温度をそれぞれダブルクリックし、それぞれの欄に 00 : 60、72.0 と入力する。

よいが、

- 1.の画面中央の Protocol Files;から編集する PCR Protocol を選択し、
2. で “ Custom ” ボタンではなく、“ Edit ” ボタンをクリックする点が異なっている。

(17) .Melt Curve 作製手順は、以下の通り

Melt Curve を作製することによりプライマーダイマーや非特異的 PCR 産物を確認することができる。

例：下記の PCR サイクルで Melt Curve を作製する手順を以下に記述する場合

95 ・ 15min → (94 ・ 30sec、60 ・ 30sec、72 ・ 60sec) × 55cycle →
↑(このステップで蛍光データの収集をするように設定)

→ (55 → +0.5 ・ 60sec) × 80 cycle → end10
 ↑ (このステップで蛍光データの収集をするように設定)

- 1) . (. (11) . から続く) 同じ画面の中央付近にある “ Protocol Options ” で “ Melt Curve ” にチェックを入れる。
- 2) . 下記の様に、表に新たな列 (カラム) が 3 つ (Melt Curve、+Temp、? Temp) が現れる。
- 3) . 下記の表を利用する場合、以下に記す様に . (8) 以降の手順と同様の操作を行う。
- 4) . Cycle の “ Insert ” ボタンを押し、M をクリックする (最終 Cycle (10 で Hold) の前に Melt Curve 作製用 Cycle を新たに設ける)
- 5) . N の Setpoint の温度をダブルクリックして、55.0 と入力する。
- 6) . P の Melt Curve をクリックし、この欄にチェックを入れる。
- 7) . Q の +Temp をダブルクリックし、0.5 と入力する (このとき、同じ画面の右側にある “ Optical Data Collection ” で Cycle 3 の Step 1 のカメラが緑色になっていることを確認する)
- 8) . R の Repeats をダブルクリックし、80 と入力する。
- 9) . S の Hold にチェックがついている事を確認する。
- 10) . T の Setpoint が 10.0 であることを確認する。
- 11) . 画面左上の “ Plate Setup ” 欄 で保存用ファイル名を入力し、その右側にある “ SAVE ” ボタンをクリックする。 “ Save Protocol As ” という Window が現れる。保存フォルダーが User1 (初期設定であることを確認し) を確認し “ Save ” をクリックする。

Cycle	Repeats	Step	D Well Time	Hold	Setpoint	Melt Curve	+ Temp	? Temp
1	11		15 00		95.0			
2	551		00:30		94.0			
		2	00:30		60.0			
		3	01 00		72.0			
3 M	R				N	P	Q	
4	1	1		S 1	T 10.0			

リアルタイム RT-PCR による定量は、standards によって作製された検量線（standards curve）を利用する。使用する検量線の良否（相関係数を目安とする）は、定量の正確さを左右する重要な要素である。

Threshold データごとに設定される、或る RFU(Relative Fluorescent Unit) Threshold 閾値のこと。RFU 値とは、測定された蛍光量である。各々のウェルの RFU 値がこの値を越えた時点で、そのウェルの PCR 産物が一定以上増加したとみなす。

Threshold Cycle・・・各々のウェルの RFU 値が Threshold を超えたときの Cycle 数のこと。テンプレートの量と相関関係がある。

Baseline Cycles・・・すべてのウェルの PCR 産物が一定量以上増加する前の Cycle のこと。

- 1.リアルタイム RT-PCR のデータが保存されているパソコンの電源を ON する。パソコンの画面上の アイコン「iCycler」(iCycler iQ Real-Time Detection System Software Ver.2.3) をダブルクリックする。
- 2.「iCycler Log On Screen」が現れる。「Yes」をクリックし、左下の「OK」をクリックする。
- 3.同じ画面上に 2 回エラーメッセージが現れるので、それぞれ“ OK ”をクリックする。
- 4.初期設定で自動的に「Protocol Library Module」の「View Protocols Window」が現れる。
- 5.右上の「View Post-Run Data Window」をクリックし、同画面中央から必要なデータを選択して“ Analyze Data ” ボタンをクリックする。「Data Analysis Module」の「PCR Quantification Window」が表示される。
- 6.画面右中央の“ Analysis Mode ”は、初期設定の“ Background Subtracted ”から“ PCR Base Line Subtracted ”に変更する。Threshold は、自動的に表示されている。

7. (Threshold を独自で設定する場合 :

Threshold Line を設定する前に処理区/コントロール区のそれぞれの S 字曲線を画面上に出し、Threshold をどの“ Background Subtracted RFU 値 ” に設定するかについておおよその検討をしておくこと。)

画面左下の“ Threshold Cycle Calculation ” では、“ Baseline Cycles ” には、“ ☐ through ☐ ” と入力し、“ Or use this threshold ” にチェックをいれる。その下の欄に任意の値 を入力し“ Recalculate ” をクリックする。)

- 8.画面右下に各 Well の番号と、それぞれの Well ごとに計算された‘Threshold Cycle Ct’の数値の表が表示される。‘ Well 番号の列’と‘ Threshold Cycle Ct’の列をコピーしてエクセルの { sheet 1 } にペーストする。(このとき { sheet 1 } の名前を【Threshold】と入力する)

- 9.「PCR Quantification Window」のグラフ上でマウスの右ボタンをクリックし、

Display Data をクリックする。画面右下に各 Well の ' Raw Data ' の表が表示される。これをすべて選択し、コピーして、エクセルの { sheet 2 } にペーストする。このとき { sheet 2 } の名前を【Raw Data】と入力する。

- 10.【Threshold □】と【Raw】のデータがはいったエクセルをフロッピーディスク（現段階では、フロッピーディスクでのデータのやり取りが可能）に保存する。
- 11.データの入ったフロッピーディスクを持ち帰り、手持ちのパソコンでデータ解析することが出来る。
- 12.エクセルにコピーしたデータファイル【Threshold □】から、検量線作製用 Well 番号とそれらの Well の 'Threshold Cycle Ct' をコピーして、新規のエクセルファイルに貼り付ける。(このとき、検量線作製用ネガティブコントロールの Well をチェックし、コンタミしていないことを確認しておく)。
- 13.12 のエクセルファイルに新たな列を設け、「Dilution Ratio」と入力して、Dilution Series の希釈倍率の値を入力する。
- 14.前項 13 の希釈倍率の「 Log_{10} 」値を新たな列に計算する。
- 15.各「Threshold Cycle Ct」の数字を y 軸の値とし、「Dilution Ratio の Log_{10} 」の数値を x 軸の値とし、Excel の関数機能 fx の「Slope」と「Intercept」を用いて、1 次方程式: $y=ax+b$ の傾き(a)と y 切片(b)をそれぞれ求める。
- 16.15 で求められた 1 次式を用いて、各サンプルの「Threshold Cycle Ct」を y に代入し、各サンプル毎に x の値を計算する。
- 17.16 で求められた x の値（ Log_{10} 値）を用いて、各サンプル毎に 10^x の値を新たな列に計算する。
- 18.17 で得られた値を用いてコントロール区と処理区の値の「Ratio」を求める。
- 19.18 で得られたリアルタイム RT-PCR による Ratio、即ち、発現比とマイクロアレイ実験で得られた発現比を比較して、マイクロアレイ実験結果の正確さを確認する。