

LightCycler®

LightCycler® 96 Real-Time PCR System
ハイエンドの性能を、もっと身近に。





新しいリアルタイムPCR システム *LightCycler® 96* —研究者のためコンパクトでスマートなパートナー—

LightCycler® 96 システムは、ロシュ・ダイアグノスティックス社が10年以上の長きにわたり蓄積した知識と経験に基づいて開発されました。この最新のリアルタイムPCR 装置は、研究を成功に導くために十分なパフォーマンスを発揮します。

LightCycler® 96 は、トップリサーチャーがリアルタイムPCR 装置に期待するすべてを持ち合わせています。正確性、温度均一性、再現性の全てにおける高い機器性能と、誰もが直観的に使用できるソフトウェアとのコンビネーションで構成されています。

相対定量や絶対定量、エンドポイントジェノタイピングなどのスタンダードな解析法に加え、定性検出 (+/- 判定) プログラムとHigh Resolution Melting (HRM) のような応用的解析法にも対応しました。

信頼性が高く高機能なハイエンドクラスのリアルタイムPCR システムが、すべての研究者にとって身近な存在になりました。

新たな高みへ導くオールインワンシステム

そのクオリティとパフォーマンスが、あなたをヒーローにします。

実験データは補正不要の高い品質で信頼性の高い結果を導きます。

- スピーディで正確な温度制御と、グラスファイバーを用いた革新的な光学ユニットにより、96ウェルのデータがバイアス無く得られます。
- LightCycler® という名にふさわしい正確性の高い結果が得られます。
- マルチプレックス遺伝子発現解析やHRM解析でもパッシブリファレンスダイを添加する必要はありません。また、ユーザーによる定期的な色補正や温度補正も全く不要です。

アッセイフォーマットとスループットに応じて、柔軟な実験デザインが可能になるので、経済的です。

- 最適化された試薬と消耗品からなる、コストパフォーマンスの高いバリューパックをご用意しました。
- 実験に応じて96ウェルプレートと8連チューブが選択可能です。
- ラン予約機能により装置がスタンバイ状態でもヒートリッドのプレヒート完了を待つ必要はありません。



ビギナーからエキスパートまでストレスなく使い、スピーディに結果が得られます。

- 直観的に操作できるタッチスクリーンインターフェイスと強力なデータ解析ソフトウェアが研究をサポートします。
- ネットワークやUSBスティック、e-mailなど、仕様スタイルに合わせて様々な接続方法が選択できます。
- e-mail経由で簡単にデータを取得し、すぐに解析できます。
- 自動バックアップ機能を利用して、ランが完了した実験データをネットワーク上で共有できます。



LightCycler® 96 System ハードウェア

qPCRのヒーローが好むキャリブレーションフリーの革新的なツール

LightCycler® 96の革新的な光学系とサーマルブロックが、多くの実験に求められるバイアスの無い結果を導きます。

96の全ウェルにおいて、同時に励起し、同時にデータ検出を行います。

LightCycler® 96の高輝度LEDと96×2本のガラスファイバー(励起用と検出用のペア)が実現します(図1)。

- エッジ効果を排除します。
- 光学スキャニングを用いる他の装置では発生しがちな、データ取得時間のタイムラグによるデータ誤差を防止します。
- パッシブリファレンスダイが不要です。

ウェル間の温度均一性の向上

エレクトロフォーミング製法のシルバーブロックとヒートリッドにより温度均一性が最大化されます(図2)。

- 温度均一性に優れ、ウェル間差が最少になりました。
- 20℃の温度幅をもつグラジエント機能を用いることで、アッセイを最適化できます。

蛍光色素	励起 フィルタ	検出 フィルタ	検出フォーマット
SYBR Green I ResoLight FAM	470 nm	514 nm	インターカレータ High Resolution Melting 加水分解プローブ
VIC HEX Yellow555	533 nm	572 nm	加水分解プローブ /Universal ProbeLibrary
Red610 Texas Red	577 nm	620 nm	加水分解プローブ
Cy5	645 nm	697.5 nm	加水分解プローブ

表 1: LightCycler® 96 搭載フィルタセットと対応蛍光フォーマットの概要



図 1: 革新的な光学ユニット

特許出願中の LightCycler® 96 光学システムは、96本のガラスファイバ2セットからなります。1セット(緑)は各ウェルに励起光を供給し、もう1セット(赤)は各ウェルから蛍光を検出します。黄色で示しているのはリファレンスチャンネルです。

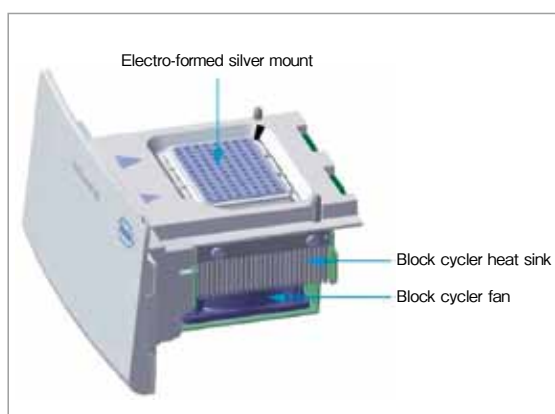


図 2: ブロックサイクラーユニット

このユニットはシルバーサーマルブロックとブロックサイクラーファン、エレクトロフォーミング製法のシルバーマウントからなります。

LightCycler® 96 System ソフトウェア

誰もが望むスマートで直観的なソフトウェア

ビギナーからエキスパートまで、LightCycler® 96 ソフトウェアは直観的に簡単に操作できます。これからリアルタイムPCRを始める方でも、一般的な遺伝子発現解析や遺伝子変異解析などは簡単にスタートできます。また、エキスパートは、このシステムが持つ強力な解析機能を最大限に活用できます。

- プリセットされているプロトコールを利用することで、より簡単に実験を開始できます。
- スタートアップウィザードとショートカットを用いることで、ルーチンの実験や応用的な実験も、最少の手順で実行できます。
- 使い易い操作画面で柔軟性の高い設定が可能です。
- MIQE* に準拠したRDML フォーマットのデータが得られます。
- ランが終了すると、データはすぐにリモートフォルダに自動保存されます。動的ネットワーク上のフォルダであっても可能です。

初級者	中級者	上級者
ガイドとナビゲーションに従って簡単にインプットできます。	サンプル情報にコンディションを設定できるため、より詳細なグラフを作成できます。	オートスタンダードカーブと増幅効率の補正で、より正確な解析が可能です。
解析結果が1つの画面に表示されるため、結果の把握が簡単です。	ワンクリックで、外部の表計算ソフトに対応したファイルをエクスポートできます。	生データや統計データが得られます。

研究のペースを加速します。

- **接続タイプの選択**：本体のタッチパネルからランの開始やランの進捗のモニタリングを行うことができます。また、LAN 接続したPC でもランの進捗のモニタリングが可能です。
- **遠隔環境下でのデータ解析**：ネットワークPC やUSB メモリスティックでランが終わったデータファイルをダウンロードしたり、ランニング終了直後にe-mail でリモート環境にあるPC へ送信したりできます。
- **実験経過をすばやく確認**：本体に搭載のタッチパネルでラン中でも蛍光ヒートマップ（蛍光強度を色で表示したもの）を確認できます。

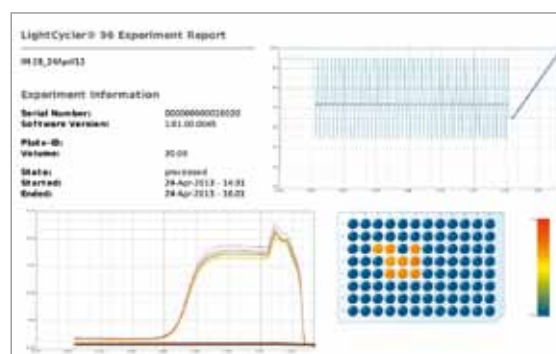


図3：装置側ソフトウェアで生成された PDF リポート

リポートは実験情報と検出フォーマット、温度プロファイル、解析前の増幅曲線とヒートマップを含んでいます。このファイルは e-mail に添付したり、専用実験ファイルとして提供できます。

* The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Bustin S.A. et al. (2009). Clin Chem. 55(4) : 611-22.

LightCycler® 96 パフォーマンスデータ

畏怖の念さえ抱かせる高品質データ

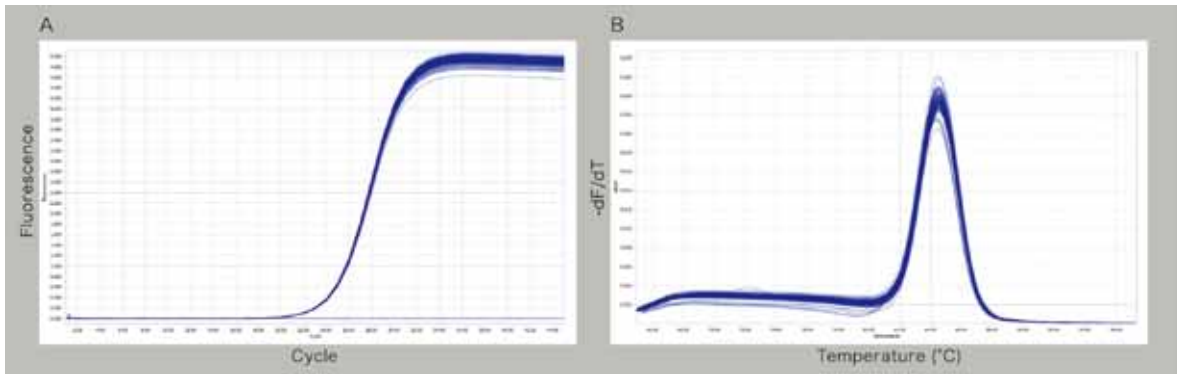


図4：優れた再現性と増幅産物の均一性

30ng のヒト DNA をテンプレートに、全 96 ウェルで同一のリアルタイム PCR を行いました。(A) β -globin 遺伝子(増幅鎖長110bp)を増幅し、SYBR Green I で検出しました。(B) 続いて、増幅産物を融解曲線解析しました。96 サンプルの C_q 値は均一な値(レンジ:0.16 サイクル、SD:0.033)を示しました。増幅産物の融解曲線も全サンプルで近似した温度での融解温度(レンジ: 0.28°C、SD: 0.063)を示しました。これらのデータから、ブロック上のサンプルポジションにかかわらず、均一な温度で均一なサンプル処理がなされていることが分かります。

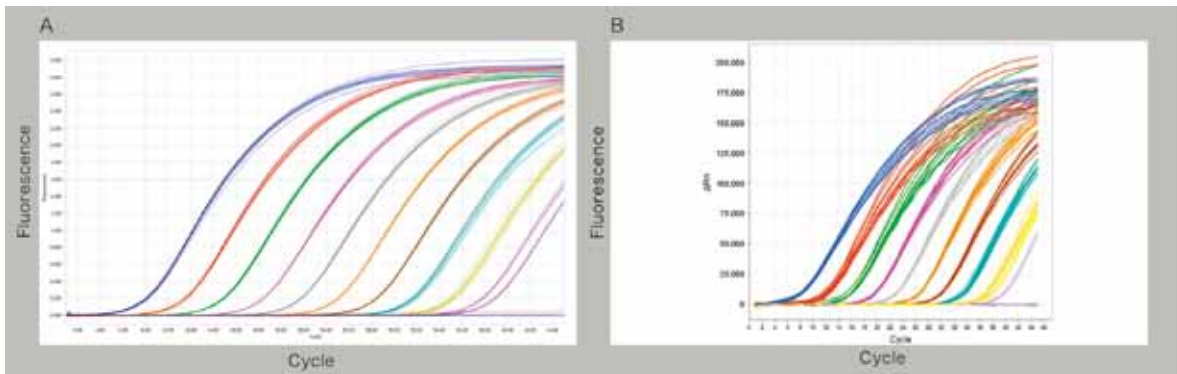


図5：低コピーの定量 PCR におけるダイナミックレンジ

Parvo B19 遺伝子を用いた 10 段階の 1:10 希釈系列を作成し、 10^9 から 10^0 コピーのレンジで増幅しました。増幅産物の検出には Universal ProbeLibrary(UPL) #137 を用いました。各希釈段階において、10 回の反復を設定しました(高濃度の 4 段階は 9 回の反復)。(A) 各増幅曲線は高い再現性を示し、低コピー側でも優れた分解能を示しました。(B) 他社装置では、一定の濃度において C_q 標準偏差が高くなり、全希釈域に渡り希釈系列間の C_q の差が異なりました。

定性検出

遺伝子検出に新しく品質チェック機能が加わりました。

LightCycler® 96 ソフトウェアの定性検出モジュールは2色、もしくはそれ以上の蛍光を用いてターゲット遺伝子とコントロールの信頼性の高い解析を可能にします。ターゲット遺伝子と同じウェル、もしくは異なるウェルにインターナルコントロール (IC) を用いることで、PCR が阻害 (精製が十分でないなどの理由で) されているかどうかをモニタリングできます。

IC としては、内在性遺伝子 (ヒト β -globin)、もしくは外来遺伝子 (ウイルス核酸や合成ターゲット) を用いることができます。

簡単に分析するために、定性検出モジュールは以下のコントロールコンセプトを含みます。ターゲット遺伝子、およびIC の個々のコールに基づき、それらを組み合わせたコールを自動的に生成します。それらのコールは直感的にわかりやすいヒートマップで表示されます (図6)。



図6: ターゲット遺伝子とインターナルコントロール (IC) それぞれのコールを組み合わせる定性検出モジュール以下の3種類の結果タイプが報告されます。

- Positive: ターゲットは positive、IC は positive あるいは negative (A2、A3、B2 ウェルなど、ポジション [1][2][4])
- Negative: ターゲットは negative、IC は positive (F2 ウェルなど、ポジション [6])
- Invalid: ターゲットは negative、IC も negative (G2 ウェルなど、ポジション [7])

High Resolution Melting 解析

既知あるいは未知の変異を簡単に検出

High Resolution Melting (HRM) は、遺伝的多様性 (SNPs、挿入、欠損、メチル化など) を素早く効率的に検出できる post-PCR 技術です。

LightCycler® を用いる HRM 実験では、まず LightCycler® 480 High Resolution Melting Master に含まれる専用の飽和型 DNA 結合色素 ResoLight 存在下でサンプル DNA を増幅します。

LightCycler® 96 の高いデータ取得率を利用して書かれた融解曲線データは4ステップで解析されます(図7左)。選択したリファレンスと他の曲線のシグナルの違いをプロットし、各サンプルを同じ融解曲線形状を持つ個別のグループへ自動的に振り分けます (ヘテロ接合体とホモ接合体など)。

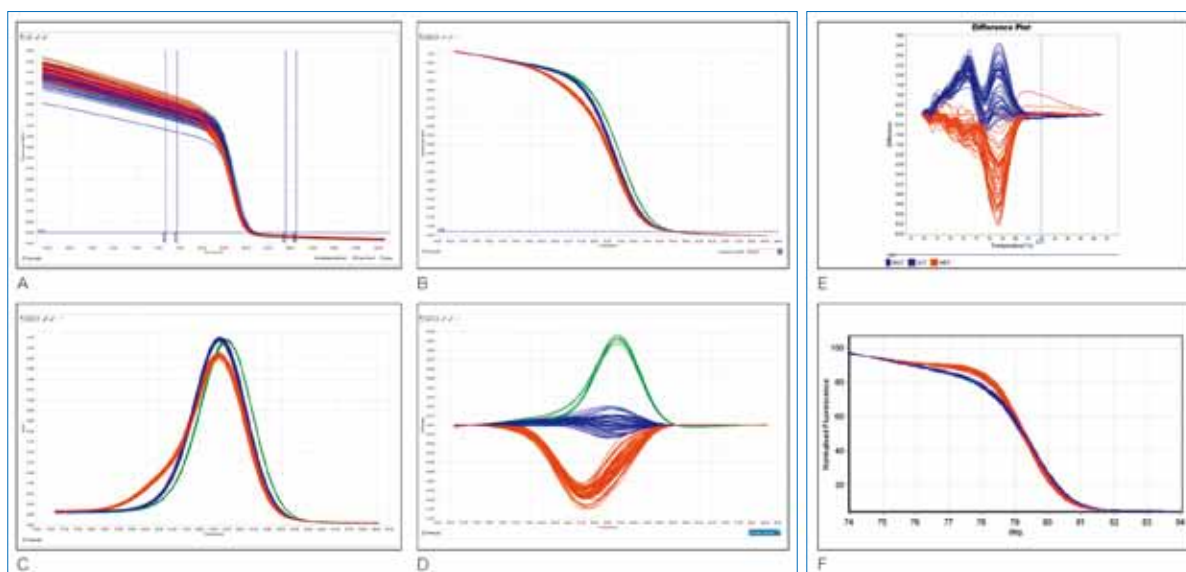


図7: LightCycler® 96 System の High Resolution Melting

左: 10 ng のヒトゲノム DNA をテンプレートにして、クラスIII SNP を含む HFE 遺伝子の 72bp 断片を増幅しました。PCR の試薬には、ResoLight 色素を含む LightCycler® 480 High Resolution Melting Master を用いました。A: オリジナルの Melting Curves、B: Normalized Melting Curves のグラフ、C: Normalized Melting Peaks のグラフ、D: Difference plot
右: 他社装置 2 機種で同様の実験を検証しました。その際、存在するグループ全てを検出することはできませんでした (D で見られる緑線のグループは、E と F では見られませんでした)。

特に、LightCycler® 96 ソフトウェアのHRM モジュールでは、

- 解析は常に遺伝子様式ごと生成されます（複数遺伝子が同一ランの異なるウェルに含まれる場合）。
- 自動化されたアルゴリズムは、自動化したノーマライゼーションスライダーと感度セッティングに基づいてグループを算出します。

- "Normalized Melting Peak" グラフは、プロットのように複雑なグルーピングの識別をディファレンスプロットに比べてより容易にします(図8C:TNF α の6つの遺伝子型)。
- 自動と手動の機能アノテーションをサポートしています。
- オプションとして、結果を視覚化するためのヒートマップも表示されます(図8D)。

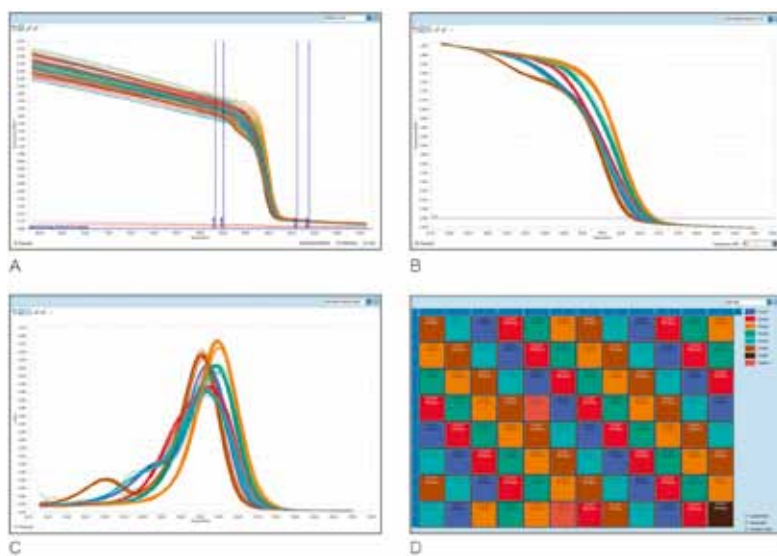


図 8：ヒト TNF α 遺伝子の 111bp 断片における 6 種の変異の HRM 分析

様々なドナーのヒトゲノム DNA を抽出し、反復実験のテンプレートにしました。ResoLight 色素を含む LightCycler® 480 High Resolution Melting Master で PCR を行い、色素で HRM 解析を行いました。A：オリジナルの Melting Curves、B：Normalized Melting Curves のグラフ、C：Normalized Melting Peaks のグラフ、D：検出された各種変異の色分け図

仕様

概要	
重量	約27 kg
サイズ	幅40 cm×奥行40 cm×高さ53 cm
作動ノイズ	43 dB以下
電源	AC100 - 125 V±10%、600 W、50/60 Hz
反応液量	10 - 50 µl
サンプルフォーマット	96ウェルプレート、8連チューブ
PCR反応時間	3ステップ40サイクル:40分以内 HRM:90分以内

ハードウェア

温度制御方式	ペルチェ素子、96ウェルブロック HRMにおいてもキャリブレーション不要
加熱速度	4.4°C/sec.
冷却速度	2.2°C/sec.
温度制御レンジ	37 - 98°C
温度正確性	±0.2°C
温度均一性	±0.4°C (平均0.1°C以下)
グラジエント機能	搭載
グラジエント制御レンジ	37 - 98°C
グラジエント設定範囲	最大20°C
蛍光励起光源	High-power broad spectrum LED
測定時間 (インテグレーションタイム)	全ウェル同時データ取得(10 - 1,000ミリ秒)
検出器	CCDカメラ
光学システム	・光ファイバースystem ・4励起波長/4検出波長 ・非可動方式
メンテナンスとサポート	日常的なメンテナンスは不要 オプションでのIQOQサービス完備

解析ソフトウェア

OS	Windows XP、7および8
データ解析	・絶対定量 ・相対定量 ・Tmコーリング ・エンドポイントジェノタイプピング ・HRM ・定性的検出
データエクスポート	・Result table:テキストファイル ・Charts:テキストファイル、イメージファイル
データのインポートとエクスポート	txtおよびcsv
エラーフラグ	・オートフラグ機能 (ポジティブコントロール/ネガティブコントロール) ・ユーザー定義可能 (スタンダードカーブのエラー等)

ランモード	
スタンドアローン	タッチスクリーンで可能な操作:プログラミング、ランニング、装置設定、リアルタイムモニタリング
PC接続	PCで可能な操作:Cq値を標準偏差と併せた棒グラフとして表示
LAN接続	オンラインモニタリング可能
外部デバイス	USB接続バーコードスキャナ利用可能
アクティブコミュニケーション	機器からのEmail通知機能:ラン成否および実験結果ファイル添付

アプリケーション

ダイナミックレンジ	10 log
励起/検出波長 (nm)	470/514 (SYBR Green I, FAM, ResoLight) 533/572 (VIC, Hex, Yellow555) 577/620 (Red610, Texas Red) 645/697 (Cy5)
検出フォーマット	インターカラーター (SYBR Green I, ResoLight) 加水分解プローブ (UPLプローブ, TaqMan [®] プローブ)
マルチプレックス	4チャンネルキャリブレーション済み (ユーザー操作不要) チャンネル別あるいは1画面で同時にすべてのチャンネルの確認が可能
その他の色素	・モノカラーでは、検出波長500 - 720 nm ・デュアルカラーでは、キャリブレーション済みの色素のみ使用可能
バッシュプリファレンスダイ (ROXなど)	不要

オーダーインフォメーション

製品名	製品番号	包装単位
LightCycler® 96 Instrument	5 815 916 (05 815 916 001)	1 台
LightCycler® 480 Multiwell Plates	4 729 692 (04 729 692 001)	10 × 5 plates (Sealing Foils 含む)
LightCycler® 8-Tube Strips (white)	6 612 601 (06 612 601 001)	12 × 10 strips (clear caps 含む)
FastStart Essential DNA Green Master	6 402 712 (06 402 712 001)	5 × 1 ml (500 反応分 /20µl 反応)
	6 924 204 (06 924 204 001)	10 × 5 ml (5,000 反応分 /20µl 反応)
FastStart Essential DNA Probes Master	6 402 682 (06 402 682 001)	5 × 1 ml (500 反応分 /20µl 反応)
	6 924 492 (06 924 492 001)	10 × 5 ml (5,000 反応分 /20µl 反応)
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	4 909 631 (04 909 631 001)	5 × 1 ml (500 反応分 /20µl 反応)
LightCycler® 96 DNA Green Value Pack S	6 713 092 (06 713 092 001)	5 packs FastStart Essential DNA Green Master (25 ml); 1 pack LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, white (50 plates)
LightCycler® 96 DNA Green Value Pack L	6 713 106 (06 713 106 001)	20 packs FastStart Essential DNA Green Master (100 ml); 2 packs LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, white (100 plates)
LightCycler® 96 DNA Probes Value Pack S	6 713 076 (06 713 076 001)	5 packs of FastStart Essential DNA Probes Master (25 ml); 1 pack LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, white (50 plates)
LightCycler® 96 DNA Probes Value Pack L	6 713 122 (06 713 122 001)	20 packs of FastStart Essential DNA Probes Master (100 ml); 2 packs LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, white (100 plates)

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

FASTSTART, LIGHTCYCLER, RESOLIGHT and TAQMAN are trademarks of Roche. EXQON and PROBELIBRARY are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark. SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

For patent license limitation for individual products please refer to: www.technical-support.roche.com

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

AS事業部(研究用試薬・機器)

〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
TEL. 03-5443-5287 FAX. 03-5443-7098

www.roche-biochem.jp

© 2013 Roche Diagnostics. All rights reserved

1307N100-1



www.lightcycler96.com

