

Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

ノロウイルス検便検査のための操作マニュアル

－TaKaRaノロウイルスGI/GII検出キットVer.2（RR297A）専用－

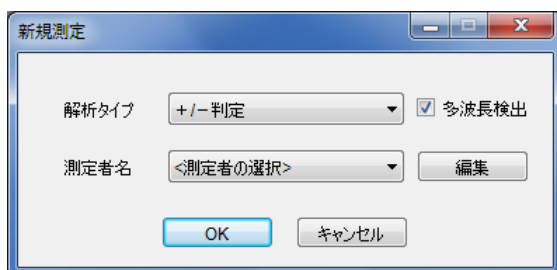
このマニュアルでは、TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.2(製品コード RR297A) を用いてリアルタイム PCR を実施する際の操作方法を説明します。

装置とソフトウェアの起動

- 1 Thermal Cycler Dice Real Time System 本体の電源を ON にする。
- 2 コンピューターの電源を ON にする。
- 3 食品環境検査用ソフトウェアを起動する。

ランファイルの作成とランの開始

- 1 ランファイルを新規作成する。
 - 1.1 解析タイプから＋／－判定を選択する。
 - 1.2 多波長検出にチェック✓を入れる。
 - 1.3 OK ボタンをクリックする。



- 2 反応条件設定画面で PCR 条件を設定する。
 - 2.1 検出フィルターの FAM、ROX、Cy5 にチェック✓を入れる
(4色搭載機の場合は、HEX のチェック✓を外す)。
 - 2.2 Hold のパターンを追加し、42℃、5 分の設定にする。
 - 2.3 2つ目の Hold は、94℃、30 秒の設定にする。
 - 2.4 3 Step PCR のパターンを削除して、2 Step PCR のパターンを追加する。
 - 2.4.1 サイクル数は 5 にする。
 - 2.4.2 セグメント 1 は、94℃、5 秒の設定にする。

2.4.3 セグメント 2 は、以下のように設定する。

- Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 : 56°C、40 秒
- Thermal Cycler Dice Real Time System III/Lite の場合 : 56°C、30 秒

2.4.4 セグメント 2 のデータ取得のチェック をはずす。

2.5 2 step PCR パターンを追加する。

2.5.1 サイクル数は、35 にする。

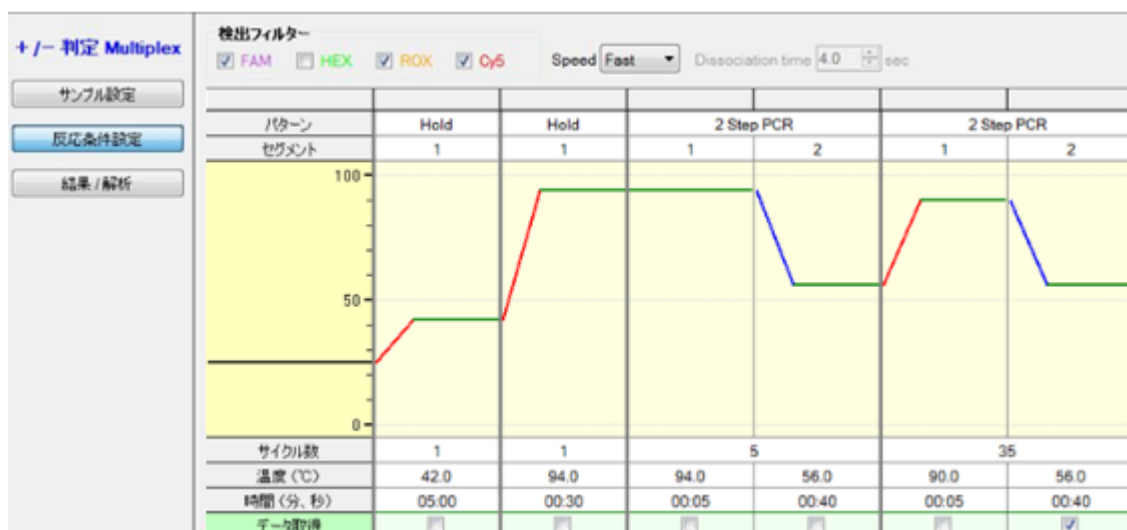
2.5.2 セグメント 1 は、90°C、5 秒の設定にする。

2.5.3 セグメント 2 は、以下のように設定する。

- Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 : 56°C、40 秒
- Thermal Cycler Dice Real Time System III/Lite の場合 : 56°C、30 秒

2.5.4 セグメント 2 のデータ取得にチェック が入っていることを確認する。

2.5.5 Speed の設定は、Fast を選択する。



※上図は、Thermal Cycler Dice Real Time PCR System III の設定例です。

■他のランファイルからの設定読み込み

以前と同じ PCR 条件でランを行う場合には、他のランファイルから設定を読み込むことができます。画面右上の“反応条件読み込み”ボタンをクリックすると、ランファイルを選択するブラウザが開きますので、目的のファイルを選択して“開く”をクリックします。PCR 条件の他に蛍光フィルターの選択 (“データ取得”) なども読み込まれます。



3 サンプル設定画面でサンプル情報を入力する（ラン終了後に行っても良い）。

3.1 インターナルコントロールとして **FAM** を選択する。

3.2 画面右上の入力ボタンをクリックする。

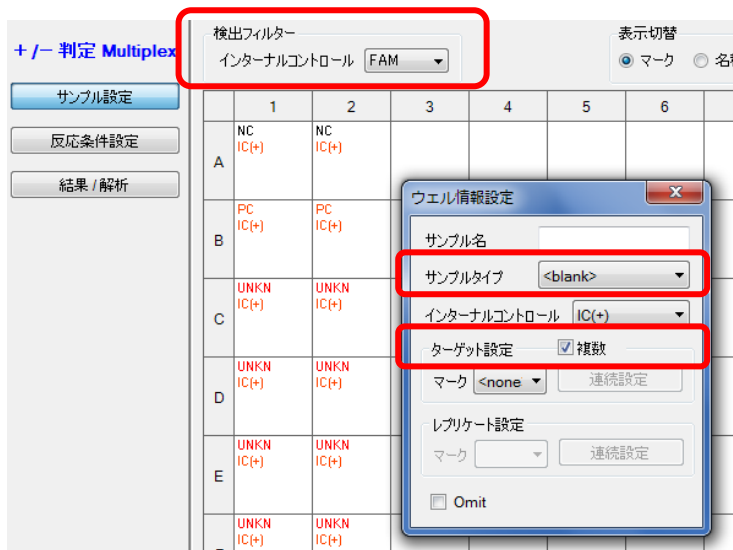
3.3 該当するウェルを選択し、サンプルタイプを選択する。

NC : 陰性コントロール

PC : 陽性コントロール

UNKN : 検査対象サンプル

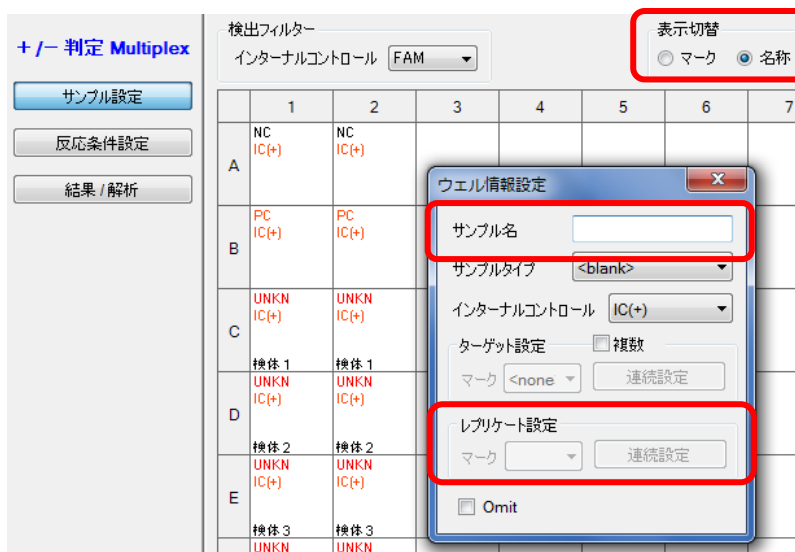
3.4 ターゲット設定の複数のチェック を外す。



3.5 必要に応じてレプリケート設定を行う（省略可能）。

3.6 必要に応じてサンプル名を入力する（省略可能）。

表示切替の「名称」を選択すると下図のような表示になる。



■他のランファイルからの設定読み込み

以前と同じ条件でサンプル設定をしたい場合は、他のランファイルから設定を読み込むことができます。画面右上の“読み込み”ボタンをクリックすると、ランファイルを選択するブラウザが開きますので、目的のファイルを選択して“開く”をクリックします。



4 反応条件設定画面でランを開始する。

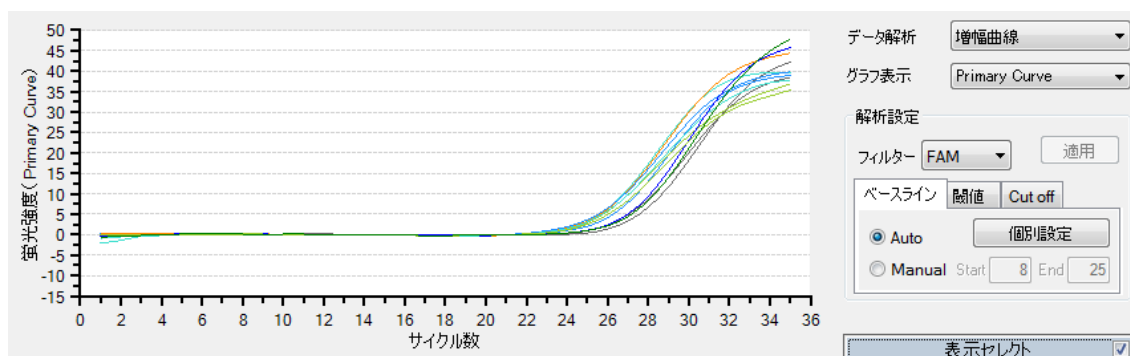
- 4.1 反応用のチューブ（またはプレート）を本体にセットする。
- 4.2 画面右下の反応開始ボタンをクリックしてランを開始する。

結果の解析

解析パラメーターの確認

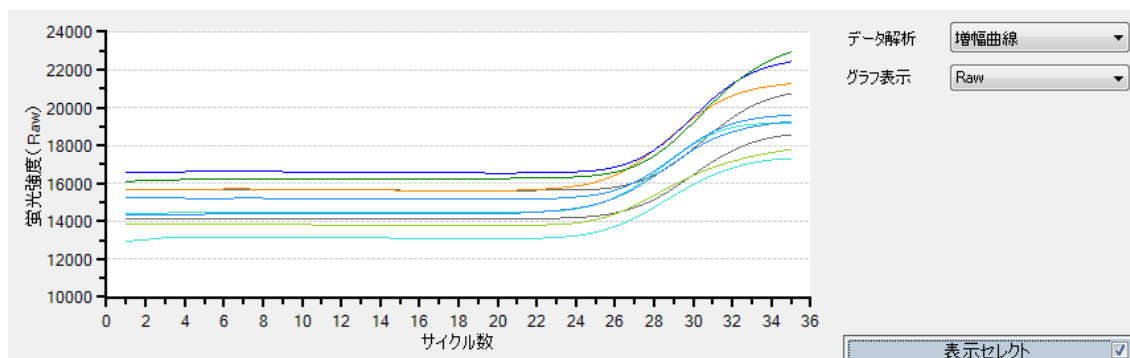
1 増幅曲線を表示させる

- 1.1 検出フィルターの **FAM** ボタンをクリックする。
- 1.2 データ解析から増幅曲線を選択する。
- 1.3 表示セレクトで解析対象のウェルを選択する。

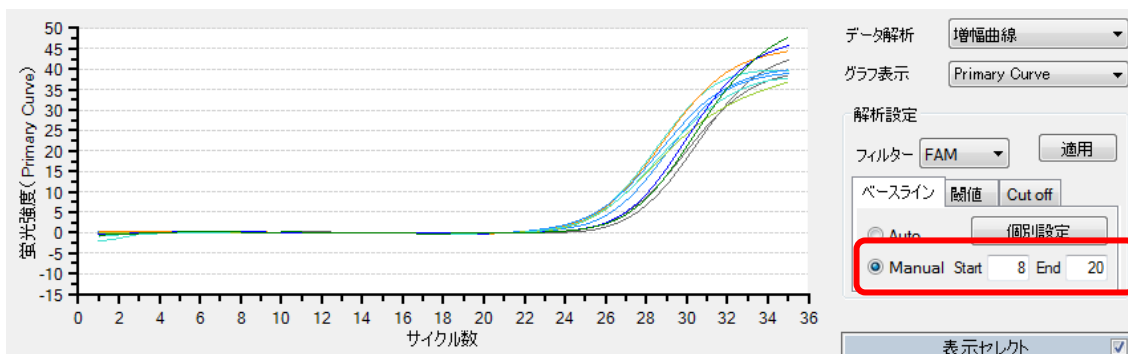


2 ベースライン領域の確認

- 2.1 ベースライン領域が適切に設定されていることを確認する。
- 2.2 ベースライン領域が不適切と思われる場合には、グラフ表示から **Raw** を選択し、正しいベースライン領域を確認する。

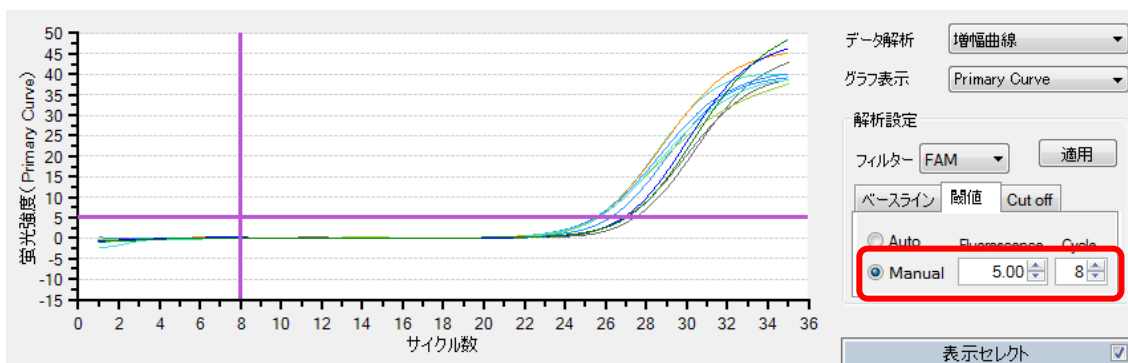


- 2.3 グラフ表示を **Primary Curve** に戻し、ベースラインタブの **Manual** をクリックして適切なベースライン領域を設定し、適用ボタンをクリックする。



3 閾値の確認

- 3.1 閾値タブをクリックし、閾値が適切に設定されていることを確認する。
 3.2 閾値を修正する場合には、**Manual** をクリックして、適切な数値を入力する。
 3.3 適用ボタンをクリックする。

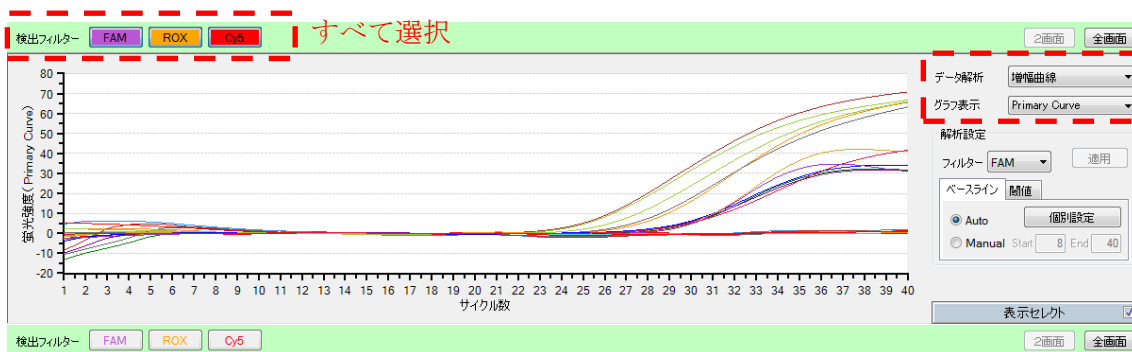


- 4 ROX と Cy5 の結果についても同様に確認する。

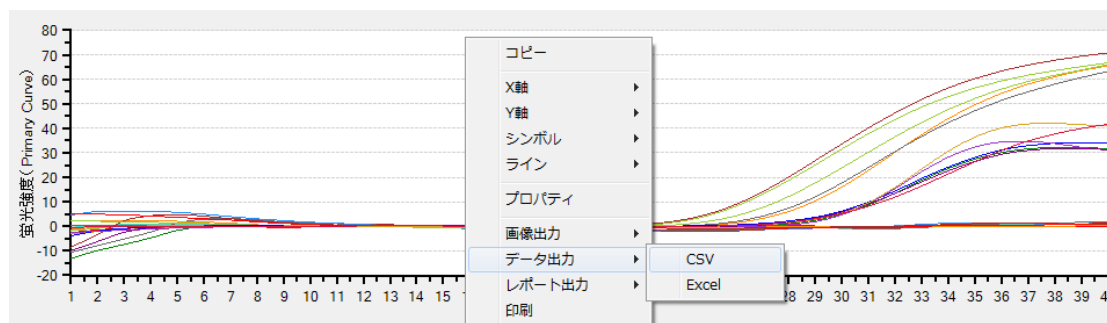
解析結果の出力

TaKaRa_RR297A 判定用ツールに読み込ませるための Amplification Plot データを出力します。

- 1 表示されているすべての検出フィルターのボタンをクリックする。
- 2 データ解析から増幅曲線を選択する。



- 3 「表示セレクト」から出力するウェルを選択する（測定時に使用していないウェルは omit しておく）
- 4 表示されたグラフ画面上で右クリックする。
- 5 データ出力から CSV を選択する。



- 6 保存場所とファイル名を指定して保存する。

ソフトウェアと装置の終了

- 1 食品環境検査用ソフトウェアを終了させる。
- 2 コンピューターを終了させて、電源を切る。
- 3 Thermal Cycler Dice Real Time System 本体の電源を切る。