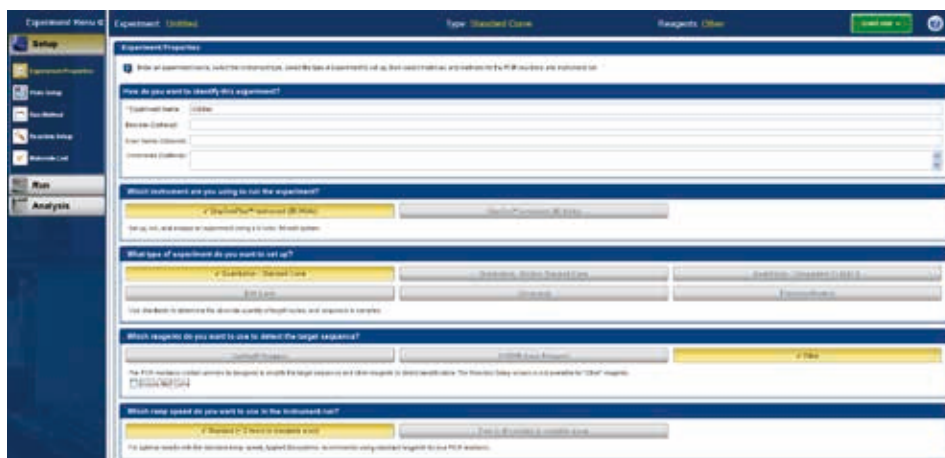


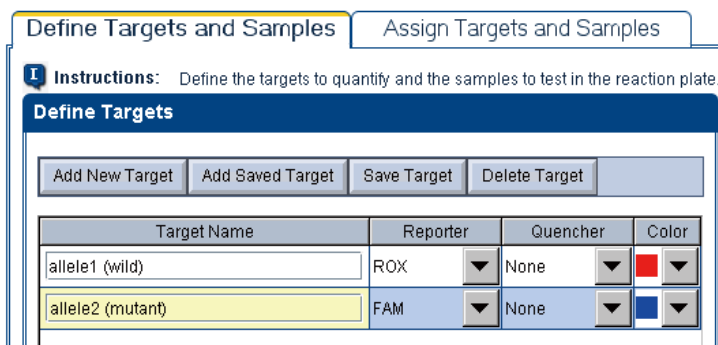
## < Applied Biosystems StepOnePlus リアルタイム PCR システムの操作方法 > Cycleave Human ALDH2 Typing Probe/Primer Set Ver.2 (製品コード CY403)

詳細は、装置に付属の取扱説明書をご確認ください。

- (1) Experiment Properties 画面の設定を行う。
  - Experiment Type : Quantification-Standard Curve
  - Reagent : Other
  - Include Melt Curve を外す。



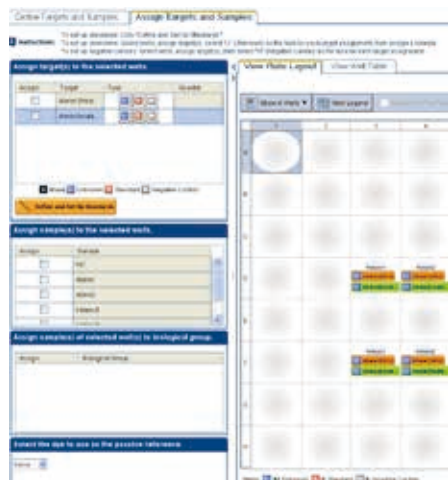
- (2) Plate Setup の Define Target で Target Name を 2 種設定する。



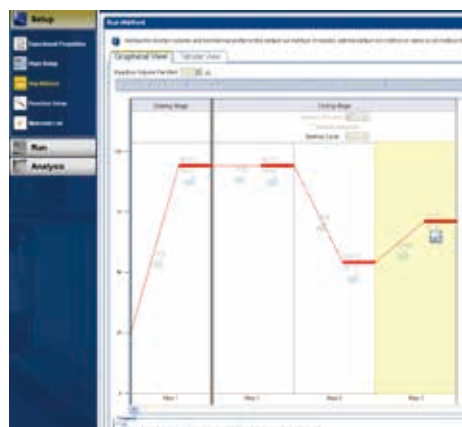
- FAM 標識プローブ検出は、Reporter を FAM、Quencher を None
  - ROX 標識プローブ検出は、Reporter を ROX、Quencher を None
- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| <u>ROX 標識プローブ</u> | <u>FAM 標識プローブ</u> |
| 検出塩基              | 検出塩基              |
| G (allele 1)      | A (allele 2)      |

- (3) Define Sample にて NC、2 種類の PC とサンプルを設定する。

- (4) 作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。  
 全ウェルに Allele 1 と Allele 2 の 2 Target を設定する。  
 各ウェルに該当する Sample を設定する。  
 Passive Reference は (none) にする。



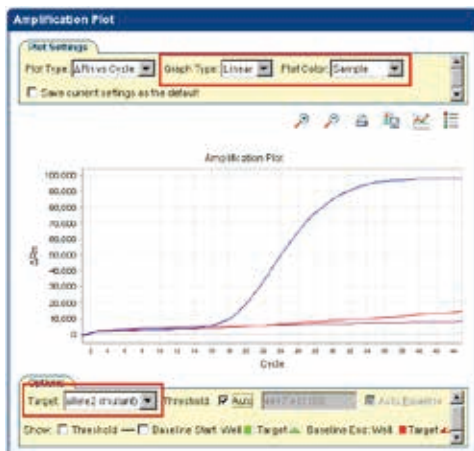
- (5) Instrument タブを選択し、反応条件を設定する。  
 Sample Volume を 25  $\mu$ l に変更する。



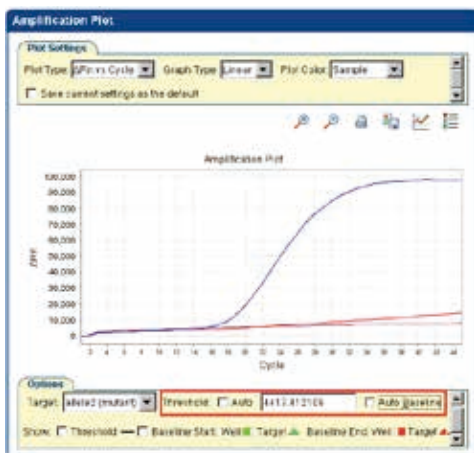
初期変性 (Hold)  
 Cycle : 1  
 95°C 10 秒  
 3 step PCR  
 Cycle : 45  
 95°C 5 秒  
 55°C 15 秒  
 72°C 20 秒 (データ取得)

- (6) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。  
 ※ 以降の操作で解析パラメータなどの設定変更を行ったら、Analyze ボタンをクリックしてください。再解析が行われ、変更が反映されます。(設定変更だけで Analyze ボタンをクリックしないと変更が反映されません。)
- (7) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認する。
- (8) Baseline がフラットになるように必要に応じて、Threshold を下記手順に従い、Manual で設定する。
1. View Plate Layout で、NC、allele1 PC、allele2 PC 反応ウェルを選択する。
  2. Amplification Plot 画面上部の Plot Setting において、Graph Type : Linear、Plot Color : Sample を選択する。

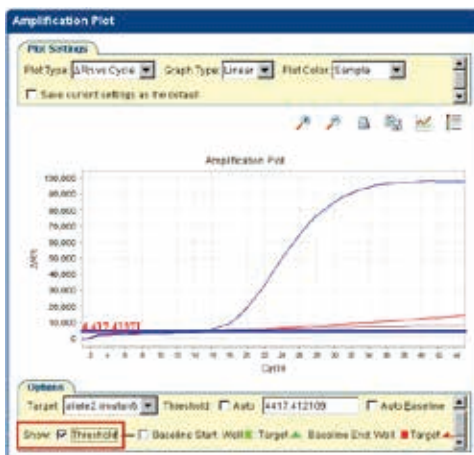
- Amplification Plot 画面下部の Options において、Target: allele2 (mutant) を選択し、FAM の増幅曲線を表示する。



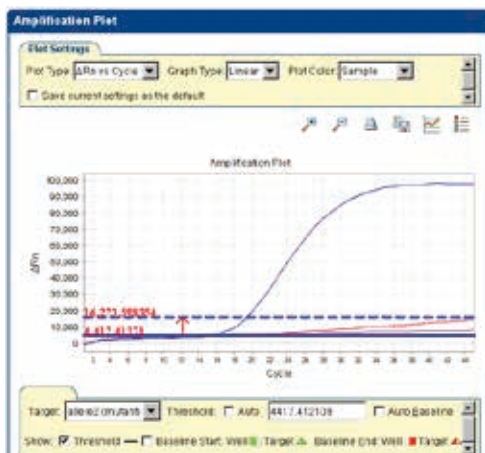
- Threshold  Auto、 Auto Baseline の  を外す。



- Show :  Threshold に  を入れ、増幅曲線に Threshold を表示する。

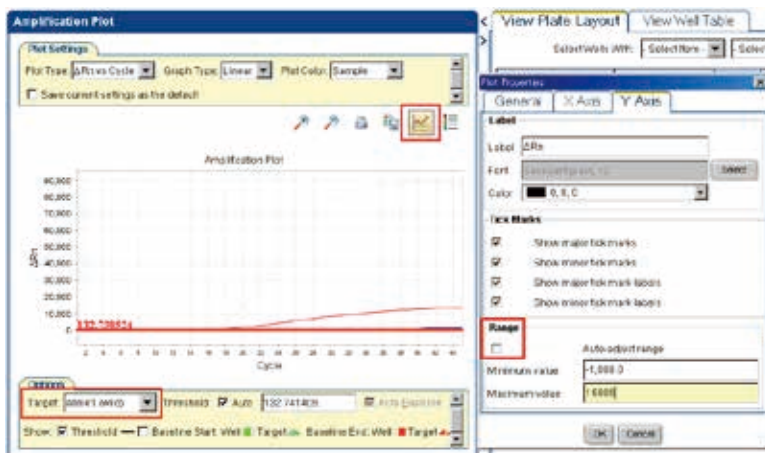


6. Graph に表示された Threshold にカーソルをあわせ、ドラッグしながら Threshold を非対応の Positive Control (allele1) \* のシグナル以上になるように設定する。



\*:左図の赤ライン

7. Amplification Plot 画面下部の Options において、Target : allele1 (wild) を選択し、ROX の増幅曲線を表示する。  
ROX のシグナルが FAM に比べ低く検出されるため、Plot Properties より Y Axis の Range  を外し、Scale を適宜調整する。



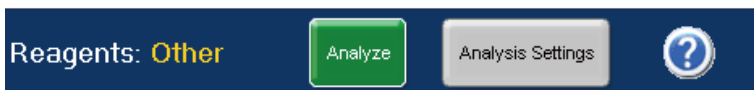
8. FAM と同様に、4～6 と同様の操作を行う。



Threshold は、非対応の Positive Control (allele 2)\* のシグナル以上に設定する。

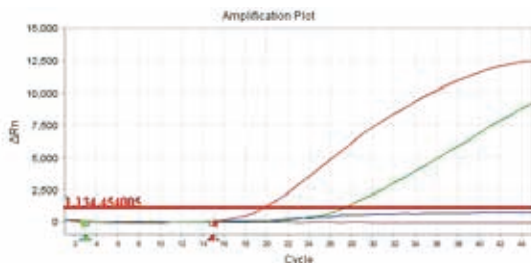
\*:左図青ライン

9. Analyze ボタンをクリックし、設定した Threshold で再解析を行う。

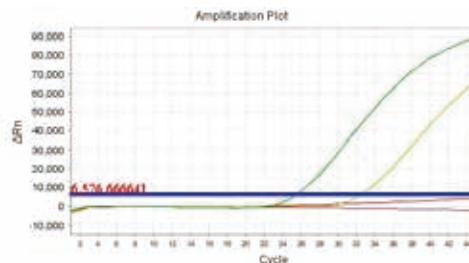


<検出例>

アレル 1 検出 (ROX)



アレル 2 検出 (FAM)



赤；アレル 1 Positive Control  
 青；アレル 2 Positive Control  
 緑；ヘテロ  
 紫；NC

(9) View Well Table タブをクリックし、結果のデータを参照できる。

#	Well	Omit	Flag	Sample N...	Target Na...	Task	Dyes	CT	CT Mean	CT SD
63	F3	<input type="checkbox"/>		Sample no.3	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	27.382	27.382	
64	F3	<input type="checkbox"/>		Sample no.3	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	25.921	25.921	
65	F4	<input type="checkbox"/>		Sample no.2	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	34.509	34.509	
66	F4	<input type="checkbox"/>		Sample no.2	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	33.404	33.404	
67	F5	<input type="checkbox"/>		Sample no.1	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	42.191	42.191	
68	F5	<input type="checkbox"/>		Sample no.1	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	40.686	40.686	
69	F6	<input type="checkbox"/>		Allele2	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi...		
70	F6	<input type="checkbox"/>		Allele2	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	18.974	18.974	
71	F7	<input type="checkbox"/>		Allele1	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	19.853	19.853	
72	F7	<input type="checkbox"/>		Allele1	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...		
73	F8	<input type="checkbox"/>								
74	F9	<input type="checkbox"/>		NC	Allele1 (Wild)	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi...		
75	F9	<input type="checkbox"/>		NC	Allele2 (Mut...	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...		

判定方法の詳細は装置の取扱説明書をご確認ください。

【Applied Biosystems7500 Fast Real-Time System を使用する場合】

Applied Biosystems7500 Fast Real-Time System を使用する場合は、StepOnePlus リアルタイム PCR システムの操作方法を、参考にご使用ください。

<変更点>

- ・ (5) の反応条件設定で、伸長時間を 25 秒に変更してください。(72°C、25 秒)
- ・ (8) の操作を参考にして、Threshold、Baseline の Auto を解除して Threshold を非対応の Positive Control のシグナル以上に設定してください。なお、7500 Fast Real-Time System では、FAM と ROX のシグナルがほぼ同じであるため、(8) の 7. Sale 調整の操作は不要です。