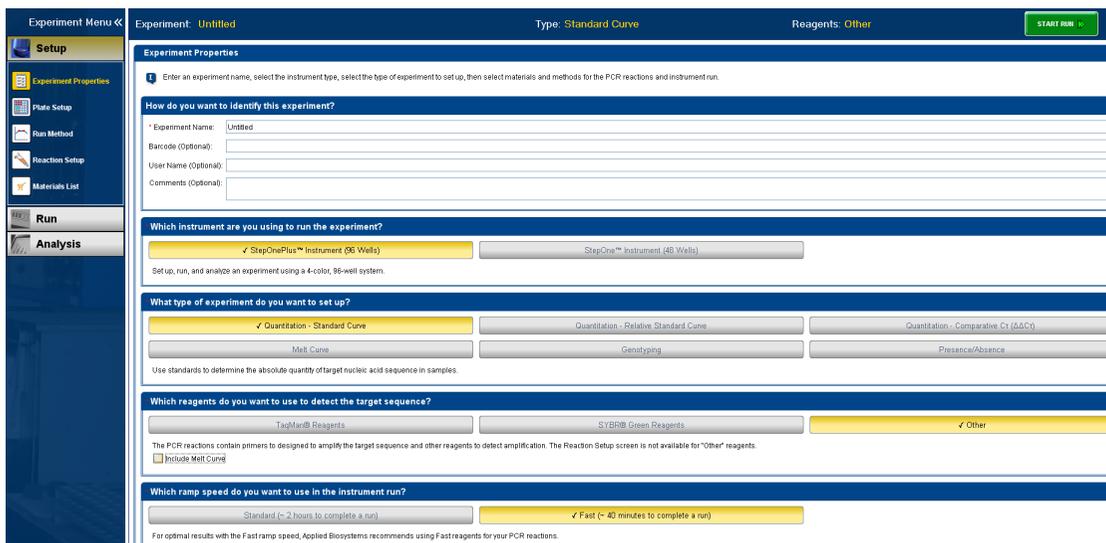


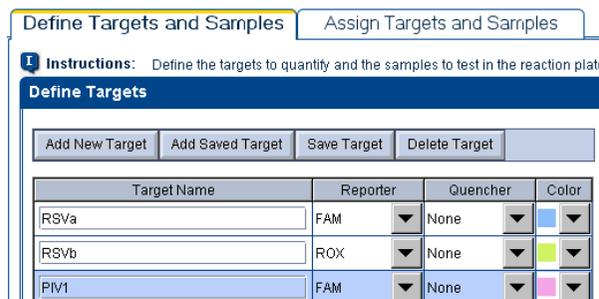
CycleavePCR™ 呼吸器系感染症起因ウイルス検出キット Ver.2 (製品コード CY216) 補足 < Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System の操作方法 >

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 Targets で Target Name を設定する。
 - 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



	ターゲットウィルス	Probe 蛍光標識
Probe/Primer Mix-1	RS ウィルス A 型 Human respiratory syncytial virus subtype A	FAM
	RS ウィルス B 型 Human respiratory syncytial virus subtype B	ROX
Probe/Primer Mix-2	パラインフルエンザウィルス 1 Human parainfluenza virus 1	FAM
	パラインフルエンザウィルス 2 Human parainfluenza virus 2	ROX
Probe/Primer Mix-3	メタニューモウィルス Human metapneumovirus	FAM
	パラインフルエンザウィルス 3 Human parainfluenza virus 3	ROX
Probe/Primer Mix-4	インフルエンザウィルス A Influenza A virus	FAM
	インフルエンザウィルス B Influenza B virus	ROX
Probe/Primer Mix-5	アデノウィルス Human adenovirus	FAM
	ボカウィルス Human bocavirus	ROX
Probe/Primer Mix-6	ライノウィルス Human rhinovirus	FAM

(3) Define Samples にて、Positive Control 名とサンプル名を設定する。

Define Samples	
Add New Sample	Add Saved Sample
Save Sample	Delete Sample
Sample Name	Color
PC_RSVa	Blue
PC_RSvb	Cyan
Sample 1	Yellow

- (4) 作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
 passive reference は (none) にする。
 Probe/Primer Mix-1 から Mix-5 のウェルには 2 種類の Target を設定し、Probe/Primer Mix-6 のウェルには 1 種類の Target を設定する。
 各ウェルに該当する Positive Control または Sample を設定する。

Define Targets and Samples
Assign Targets and Samples

Instructions:
 To set up standards: Click "Define and Set Up Standards."
 To set up unknowns: Select wells, assign target(s), select "U" (Unknown) as the task for each target assignment, then assign quantity.
 To set up negative controls: Select wells, assign target(s), then select "N" (Negative Control) as the task for each target assignment.

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	RSVa	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input checked="" type="checkbox"/>	RSVb	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input type="checkbox"/>	PIV1	<input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input type="checkbox"/>	PIV2	<input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input type="checkbox"/>	Mep	<input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input type="checkbox"/>	PIV3	<input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	

Mixed U Unknown S Standard N Negative Control

Define and Set Up Standards

Assign sample(s) to the selected wells.

Assign	Sample
<input type="checkbox"/>	PC-RSVa
<input type="checkbox"/>	PC_RSVb
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 1

Assign sample(s) of selected well(s) to biological group.

Assign	Biological Group

Select the dye to use as the passive reference.

None

View Plate Layout

View Well Table

Show in Wells
View Legend
Enable

	1	2	3
A			
B			<input type="checkbox"/> N RSVa <input type="checkbox"/> N RSVb
C			PC-RSVa <input type="checkbox"/> U RSVa <input type="checkbox"/> U RSVb
D			PC_RSVb <input type="checkbox"/> U RSVa <input type="checkbox"/> U RSVb
E			Sample 1 <input type="checkbox"/> U RSVa <input type="checkbox"/> U RSVb
F			
G			
H			

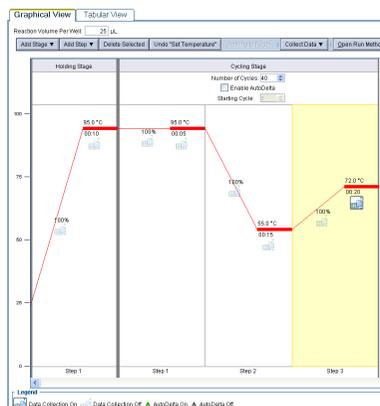
Wells: 3 Unknown 0 Standard 1 Negative Control

タカラバイオ株式会社

3

製品コード CY216 (補足プロトコール)

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



初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 40
95°C 5 秒
55°C 15 秒
72°C 20 秒 (データ取得)

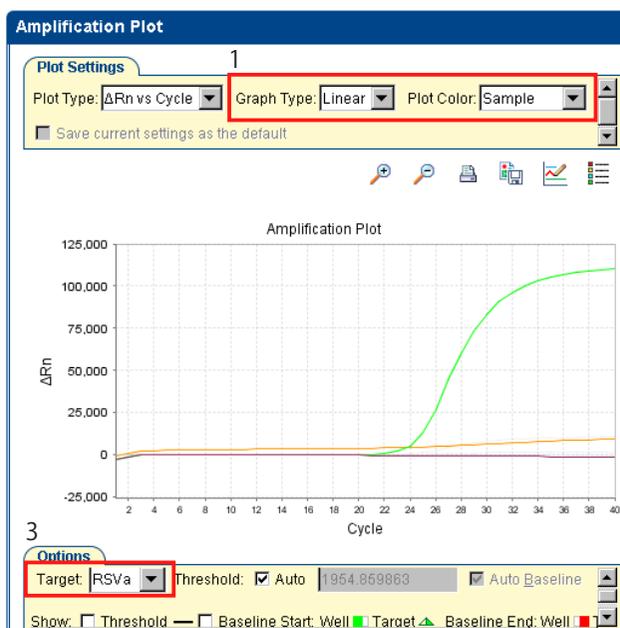
- (6) 反応チューブをセットし、START RUN ボタンをクリックして反応を開始する。
* 以降の操作で解析パラメータなどの設定変更を行ったら、Analyze ボタンをクリックしてください。再解析が行われ、変更が反映されます。
- (7) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認する。
- (8) ターゲットごとに、Threshold を確認する。
ターゲットに対応する Positive Control のみが検出され、非対応の Positive Control および NC を検出しない位置に Threshold を設定する。
FAM 検出と ROX 検出は、個別に設定が必要です。

1. Amplification Plot 画面上部の Plot Setting において、Graph Type : Linear、Plot Color : Sample を選択する。
2. Probe/Primer Mix ごとに、View Plate Layout において NC 反応ウェルと Positive Control 反応ウェルを選択する。ターゲットが 2 種の Mix-1 から Mix-5 は NC 反応と各 Positive Control 反応の合計 3 ウェル、1 ターゲットの Mix-6 は合計 2 ウェルを選択する。
3. 以下では Probe/Primer Mix-1 の場合を例として示す。
まず、蛍光標識 FAM の Threshold を設定する。Amplification Plot 画面下部の Options から FAM で検出する Target 名を選択し、増幅曲線を表示する。ウェルと選択した Target が不一致の場合、増幅曲線が表示されないので注意する。

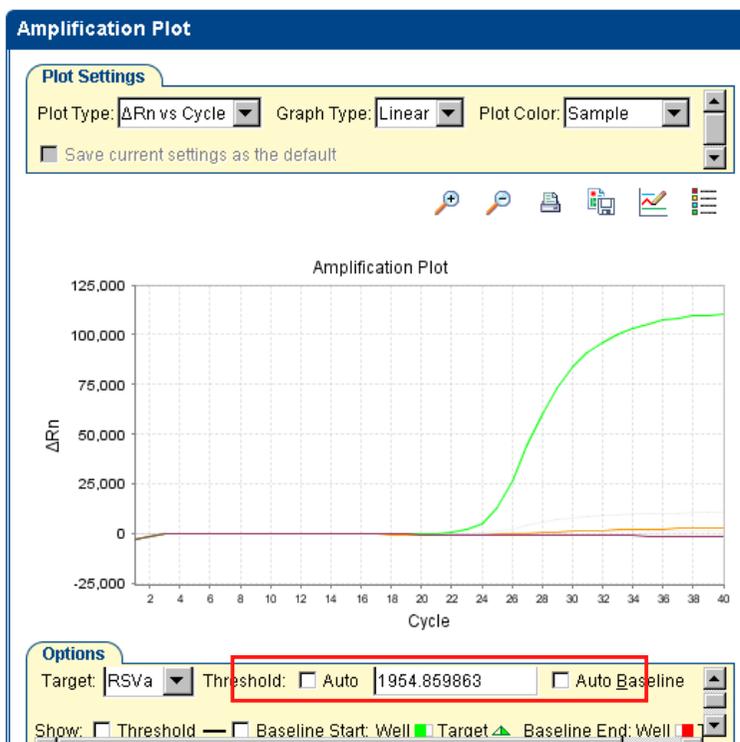
例) Probe/Primer Mix-1 の場合

NC、RS ウイルス A 型 Positive Control (FAM 検出)、および RS ウイルス B 型 Positive Control (ROX 検出) の 3 ウェルを選択し、Target は RS ウイルス A 型を選択して 3 本の Amplification Plot を表示する。(RS ウイルス A 型 Positive Control: 緑、RS ウイルス B 型 Positive Control: オレンジ、NC: 紫*)
* : Assign target(s) to the selected wells. の Task で Negative Control とした場合は、グレーで表示されますが、説明のため紫で表示しています。

FAM 検出ではない RS ウイルス B 型 Positive Control や NC のウェルで Baseline の上昇や不一致が見られなければ、5. に進む。
次の図のように、Baseline の上昇が見られる場合は、4. の操作を行う。

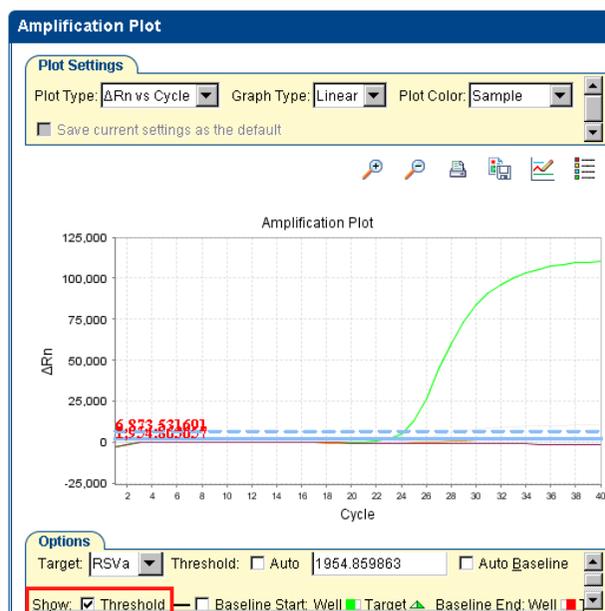


4. Baseline が上昇、またはウェルによって Baseline が一致していない場合は、Options の Threshold: Auto Auto Baseline の をはずし、Baseline をフラットにする。



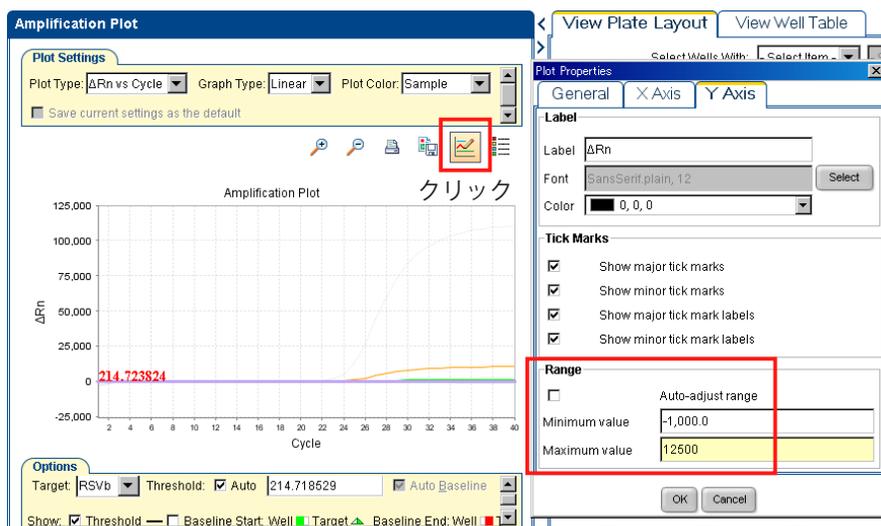
5. Show : Threshold に を入れ、増幅曲線に Threshold を表示する。

- Threshold を変更する場合は、Threshold Auto の を外し、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 のシグナルより上に設定する。

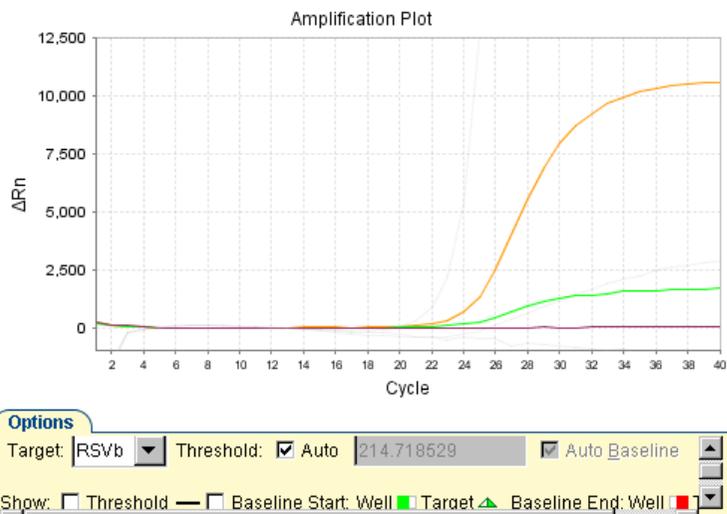


上記の Threshold を実線から破線の位置に変更

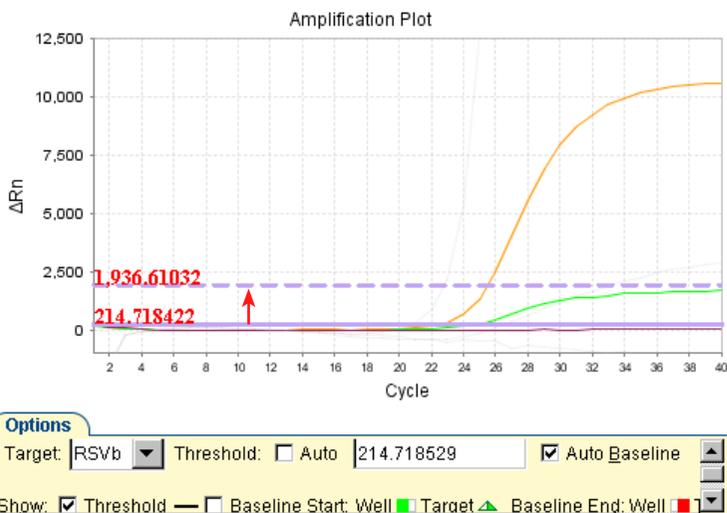
- Analyze ボタンをクリックし、再解析を行う。
- 蛍光標識 ROX ターゲットの Threshold を設定する。Options の Target より ROX 検出する Target 名を選択して増幅曲線を表示する。（例；Probe/Promer Mix-1 では RS ウイルス B 型を選択する。）蛍光標識が ROX のターゲットは、FAM の検出に比べてシグナルが低く検出されるため、Plot Properties の Y Axis、Range を外し、Scale を適宜調整する。



9. OK をクリックし、Amplification Plot を表示する。



10. 4. ~ 6. と同様の操作により、Baseline をフラットとし Threshold を非対応の Positive Control のシグナルより上に設定する。
 ※ 装置の特性上、例えば Probe/Primer Mix-1 検出で、ROX 検出 (RS ウイルス B 型) 側に FAM 検出 (RS ウイルス A 型、Amplification Plot 緑) のシグナルがもれこむ場合があります。



RS ウイルス B 型 Positive Control: オレンジ、RS ウイルス A 型 Positive Control: 緑、NC: 紫
 上図の Threshold を実線から破線の位置に変更

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

#	Sample N...	Target Na...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean
14						
15	NC	RSVa	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...	
16	NC	RSVb	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi...	
17	PC_RSVa	RSVa	UNKNOWN	FAM-None	25.072	24.601
18	PC_RSVa	RSVb	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi...	
19	PC_RSVb	RSVa	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...	
20	PC_RSVb	RSVb	UNKNOWN	ROX-None	26.617	26.261

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 Biosystems 7500 Fast Real-Time System を使用する場合 >

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time System を使用する場合は、StepOnePlus Real-Time PCR System の操作方法を参考にしてください。

<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、Threshold、Baseline の Auto を解除して Threshold を非対応の Positive Control のシグナルより上に設定してください。なお、Applied Biosystems 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 8. Scale 調整の操作は不要です。