

Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

食品環境検査用ソフトウェアQuick Manual

—QuickPrimerシリーズ用—

目次

1. 起動と終了	
(1) Thermal Cycler Dice Real Time System IIIの場合	2
(2) Thermal Cycler Dice Real Time System <i>II/ Lite</i> の場合	4
2. 初期画面と解析タイプの選択	5
3. 実験ファイルの画面構成	5
4. 反応条件設定	
(1) PCR条件の設定	6
(2) ランの開始と進行状況の確認	8
5. サンプル設定	
(1) サンプル情報の入力	9
(2) 補足	10
6. 結果/解析	
(1) 基本操作	11
(2) データの種類と解析法	11
(3) QuickPrimerシリーズの解析手順	13
7. 結果の出力	16
8. トラブルシューティング	18
9. リアルタイムPCR装置関連製品	19

1. 起動と終了

(1) Thermal Cycler Dice Real Time System IIIの場合

■ 起動

① 本体とコンピューターがLANケーブルで接続されていることを確認します。

(注意) 本体とコンピューターの接続はLANクロスケーブルをご使用ください。

② 本体背面の主電源をONにします。

③ 本体前面の電源ボタンを押します。

④ 本体が完全に起動後、LCDにホーム画面が表示されます。

(補足) 本体の電源を入れるとリッドヒーターが約102°Cを超えるまではウォーミングアップの状態となります。

ウォーミングアップ中は、LCDの"スタンバイ"状態表示が点滅します。ウォーミングアップが完了し 使用可能な状態になると点灯に変わります。



⑤ コンピューターの電源をONにします。

⑥ デスクトップ上のアイコンをダブルクリックして、ソフトウェアを起動します。



⑦ 画面右下の 機器 と カメラ が“接続”になっていることを確認します。

リッド:開 温度:107.7°C	機器 接続	カメラ 接続
リッド: 温度:	機器:未接続	カメラ:未接続

※ 本体とコンピューターが接続されていないときは、機器とカメラに“未接続”と表示されます。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

■ 終了

- ① ソフトウェアを終了します。
- ② コンピューターをシャットダウンします。
- ③ 本体LCDのホーム画面に表示されているシャットダウンボタンをタップし、本体を待機状態にします。
- ④ 本体背面の主電源をOFFにします。

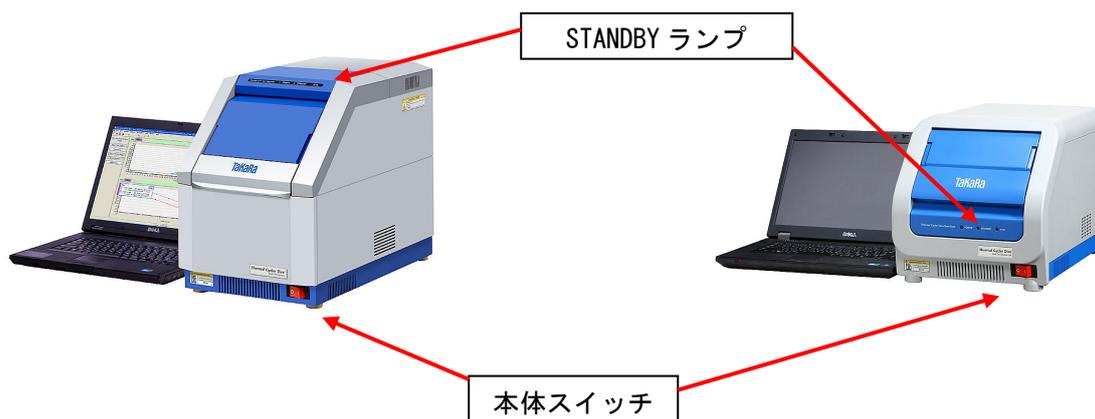


(2) Thermal Cycler Dice Real Time System II / Liteの場合

■ 起動

- ① 本体の電源をONにします。

本体の電源を入れると、ランプやリッドヒーターのウォーミングアップを行います。ウォーミングアップ中は、“STANDBY”ランプが点滅し、ウォーミングアップが完了すると“STANDBY”ランプが点灯に変わります。



- ② コンピューターの電源をONにします。
- ③ デスクトップ上のアイコンをダブルクリックして、ソフトウェアを起動します。



96 ウェルタイプ



48 ウェルタイプ

■ 終了

- ① ソフトウェアを終了します。
- ② コンピューターの電源をOFFにします。
- ③ 本体の電源をOFFにします。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

2. 初期画面と解析タイプの選択

■ 初期画面

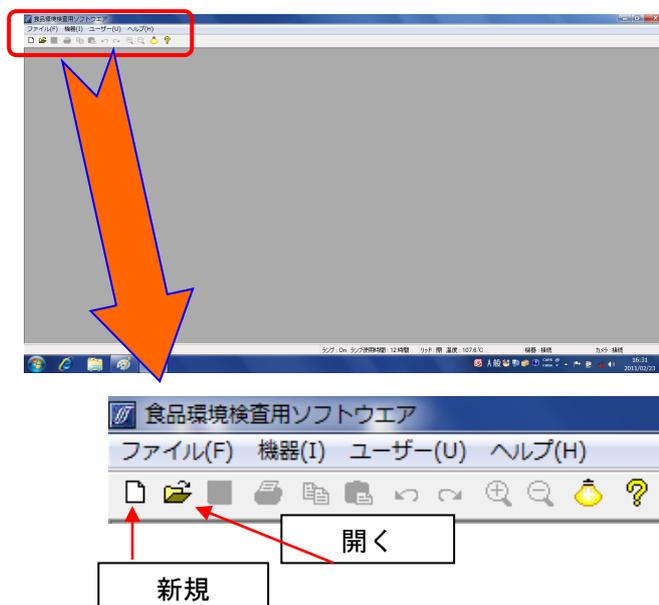
ソフトウェアを立ち上げると右図のような初期画面となります。新しい実験を行うときは実験ファイルを新規作成し、以前に行った実験データの解析をするときは既存の実験ファイルを開きます。

実験ファイルの新規作成

“新規”アイコンをクリック、またはメニューバーから[ファイル]→[新規]を選択。

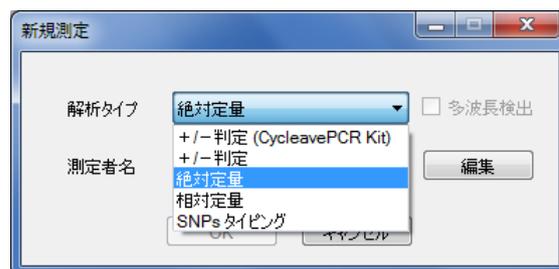
既存の実験ファイルを開く

“開く”アイコンをクリック、またはメニューバーから[ファイル]→[開く]を選択。



■ 解析タイプの選択

実験ファイルを新規作成すると、“新規測定”ウィンドウが表示されます。ここで解析タイプから“絶対定量”を選択します。



3. 実験ファイルの画面構成

実験ファイルは、3つの画面で構成されており、画面左側のボタンで表示を切り換えます。



サンプル設定： サンプル情報を入力する画面です。反応を開始した後でも設定を行うことができます。

反応条件設定： PCR条件の設定と検出する蛍光フィルターの選択を行います。

結果／解析： 結果の確認と解析パラメータの設定を行う画面です。図やグラフの出力もこの画面で行います。

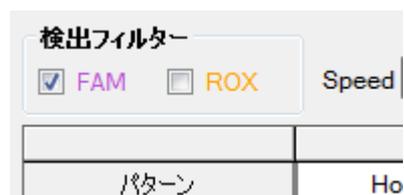
4. 反応条件設定

反応条件設定画面では、測定に使用する蛍光フィルターの選択とPCR反応条件の設定を行います。ラン開始もこの画面で行い、ラン実行中はランの進行状態を確認できます。

(1) PCR条件の設定

■ 蛍光検出フィルターの選択

測定に使用する蛍光検出フィルターの選択は、画面左上の“検出フィルター”で行います。デフォルトでは、FAMとROXの両方のフィルターが選択されていますが、TB Green検出の場合は、ROXのチェックをはずし、FAMのみの検出とします。

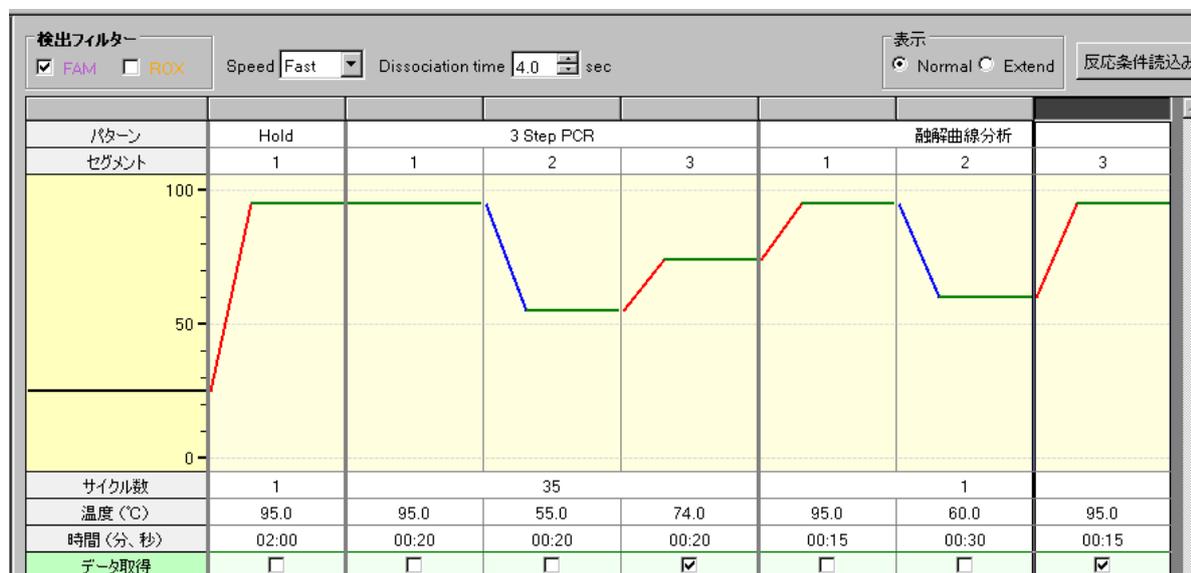


■ PCR条件の設定

各検出系に適したPCR条件を設定します。

QuickPrimerシリーズを使用する場合は、以下のようなPCR条件を設定します。

“speed”は、Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コードTP950）の場合はNormalに、Thermal Cycler Dice Real Time System III/ Lite（製品コードTP900/TP700）ではFastに設定します。



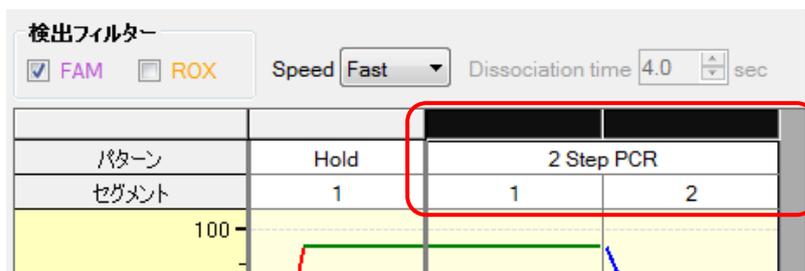
タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

【パターンの変更および追加】

① 2 Step PCRのパターンを選択し、画面下の“削除”ボタンをクリックします。



② 画面下の“パターン” から3 Step PCRを選択し、“パターン追加”をクリックします。



③ 続いて、“パターン” から融解曲線分析を選択し、“パターン追加”をクリックします。

【温度、時間、サイクル数の変更】

変更したい数字をダブルクリックして、数値を入力します。

サイクル数	1	35		
温度(℃)	95.0	95.0	55.0	74.0
時間(分、秒)	02:00	00:20	00:20	00:20
データ取得	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

■ 既存ファイルからの設定読み込み

以前と同じ条件でランを行う場合には、他のファイルから反応条件設定や後述のサンプル設定を読み込むことができます。画面右上のウェル情報“読み込み”または、“反応条件読み込み”ボタンをクリックすると、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。



※反応条件を読み込むと、PCR条件の他に蛍光フィルターの選択なども読み込まれます。



※ウェル情報を読み込むと、サンプル情報が読み込まれます。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

(2) ランの開始と進行状況の確認

■ ランの開始

PCR反応液を分注したチューブ（またはプレート）を装置にセットし、画面右下の“反応開始” ボタンをクリックします。ファイル名と保存場所を指定し、保存ボタンをクリックします。



■ ラン進行状況の確認

ランを開始すると、画面左側にランの進行状況が表示されます。デフォルトでは、ランの残り時間と温度が表示されますが、“経過”に切り換えると、現在実行中のパターン、セグメント、サイクル数を確認できます。



■ ラン実行中の制御

“装置制御”には、ラン実行中に操作可能な制御ボタンがあります。

- ・ サイクル追加（サイクル数の追加を行います）
- ・ 一時停止（ランを一時停止します）
- ・ 再開（一時停止中のランを再開します）
- ・ スキップ（実行中のパターンを途中で終了して、次のパターンに移ります）
- ・ ストップ（ランを強制的に終了します）

■ ラン終了後のランプ自動消灯

“自動ランプ Off” をチェックしておくと、ラン終了後にランプが自動的に消灯します。次にランを行う予定のないときは、ここをチェックしておくとランプ寿命の節約になります。

※ 光源としてハロゲンランプを使用しているTP800/TP900シリーズのみの機能です。LEDランプを使用しているTP950/TP700シリーズには、この機能はありません。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

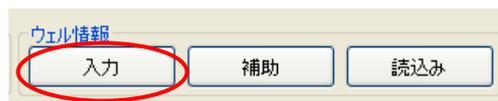
食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

5. サンプル設定（サンプル情報の入力）

サンプル設定画面では、サンプル情報の入力を行います。サンプル設定画面での設定は、ラン開始前・ラン実行中・ラン終了後のいずれの時点でも行うことができ、設定内容を変更して再解析することもできます。

(1) サンプル情報の入力

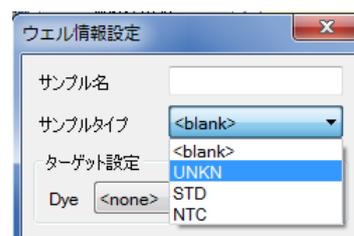
- ① 画面右上のウェル情報の“入力”ボタンをクリックすると“ウェル情報設定”が表示されます。“ウェル情報設定”の上の項目から順番に設定していくと入力作業がスムーズに行えます。



- ② サンプル名の設定
入力は任意ですが、ここに入力した内容がテキストレポートのサンプル名に反映されます。

- ③ サンプルタイプの設定
サンプルタイプを設定するウェルを選択し、サンプルタイプをプルダウンメニューから選択します。

UNKN (Unknown) : 測定対象である未知サンプル
STD (Standard) : 標準サンプル (陽性コントロール)
NTC (No Template Control) : 陰性コントロール



- ④ ターゲットの設定
“複数”にを入れます。同一遺伝子を測定するウェルを選択し、マーク (A, B, C...) を設定し、Dyeを“FAM”に設定します。

(QuickPrimerシリーズを使用する場合は、1ターゲットの測定でもマークの設定が必須です。)



- ⑤ レプリケートの設定
同一サンプルを測定するウェルを選択して、レプリケートマーク 1, 2, 3, 4... を指定します。連続設定機能により、連続入力が可能です。同じサンプルでも異なる遺伝子を検出する場合は、異なるレプリケートを設定します。

- (1) 最初のレプリケートのウェルを選択し、“マーク”プルダウンメニューから番号を選択。

- (2) “連続設定”ボタンをクリック。(緑色に変わる)

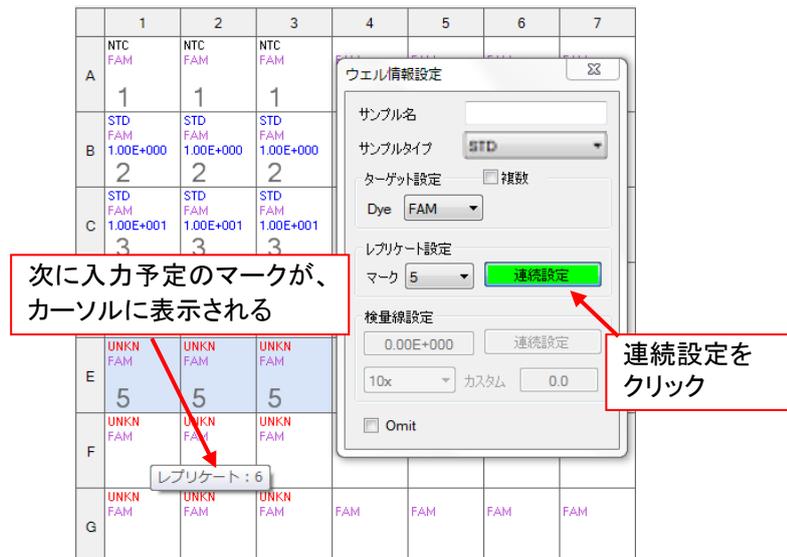
- (3) 次のレプリケートのウェルを選択すると、次の数字が繰り上げ入力される。

- (4) 設定を解除するには、再度“連続設定”ボタンをクリックする。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-



⑥ 検量線設定

QuickPrimerシリーズではこの設定は不要です。

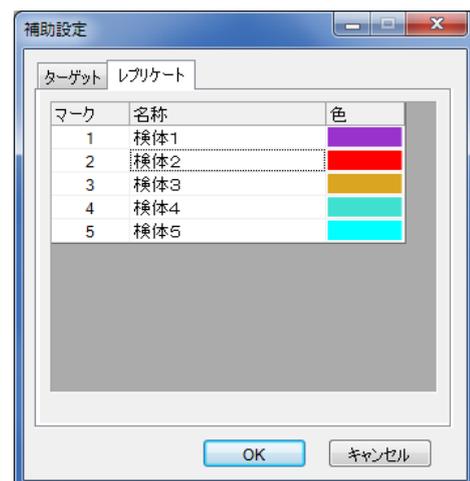
⑦ Omitの設定

反応に使用しないウェルは、Omitにチェックを入れることで、解析から除外することができます。

(2) 補足

■ ウェル情報 補助による名称設定

画面右上のウェル情報“補助”ボタンをクリックすると“補助設定”が表示されます。サンプル設定画面で設定したターゲットやレプリケートの名称を入力できます。



タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

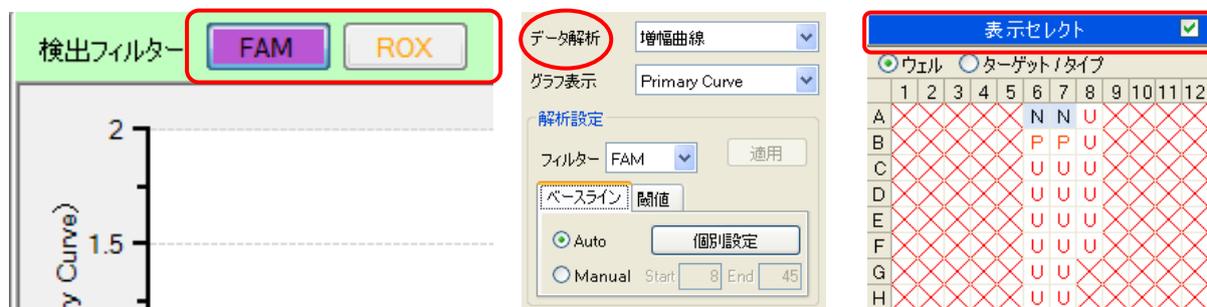
食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

6. 結果/解析

結果/解析画面では、結果の表示や解析パラメータの設定を行います。画面は、上下二画面に分かれており、それぞれに任意の図を表示させることができます。

(1) 基本操作

- ① 検出フィルターボタンをクリックするとそのフィルターのグラフが表示されます。
QuickPrimerシリーズでは、FAMを選択します。
- ② データ解析のプルダウンメニューからデータの種類を選択します。
上の画面に増幅曲線を、下の画面に融解曲線を表示させると便利です。
- ③ 表示セレクトで表示/解析するウェルを選択します。表示セレクトは、表示セレクトタブのクリックで表示/非表示を切り替えます。



①検出フィルターの選択

②データの種類の選択

③表示するウェルの選択

(2) データの種類と解析法

■ 増幅曲線

増幅曲線には、グラフ表示の種類としてPrimary CurveやRawがあります。

Primary Curve : 通常の一次曲線です。

Crossing Point法 (CP法) によるCt値の算出に用います。

Raw : 蛍光値の生データです。

バックグラウンドなど、測定結果の確認が必要なときに参照します。

【解析パラメータの設定変更の仕方】

増幅曲線を表示させると、グラフの右側には解析パラメータの設定項目が表示されます。閾値のタブをクリックするとグラフに閾値が表示されます。デフォルトのAuto設定が適切でない場合は、Manualを選択し、解析パラメータを変更してから“適用”ボタンをクリックしてください。

※ 複数のターゲットを測定する場合は、ターゲットごとに解析パラメータを設定します。複数のターゲットのウェルを選択すると、解析



タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

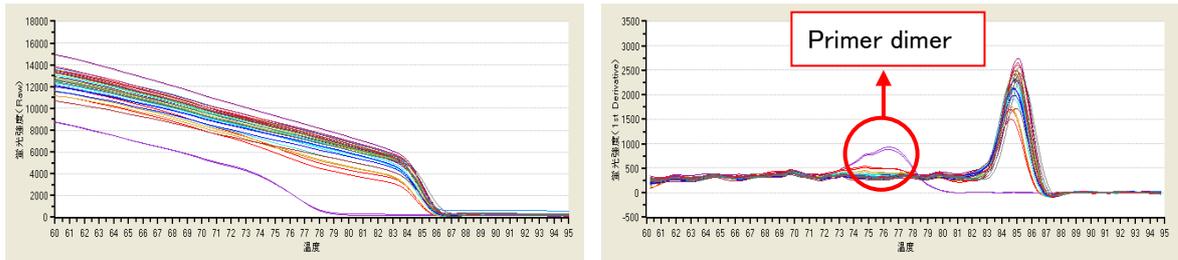
パラメータ情報は表示されません。

■ 融解曲線分析

縦軸を蛍光値、横軸を温度とした融解曲線を表示します。

Raw : 蛍光値の生データです。(左図)

1st Derivative : 生データを一次微分して、プラスマイナスを反転させた曲線です。このピーク位置をTm値として算出します。(右図)



■ テキストレポート

Ct値や定量値などの数値データを表形式で表示します。表示形式から“レプリケート”を選択すると、レプリケートごとの平均値を表示します。表示項目では、通常“CP法データ”に✓を入れます。また、表示させる項目は、“詳細項目”のリストの中から選択します。

サンプルタイプ	レプリケートマーク	検出フィルター	平均Ct値(CP)	Ct値SD(CP)	標準サンプル濃	定量平均値(C)
UNKN	7	FAM	--	--	--	--
UNKN	8	FAM	37.95	1.061E+000	--	7.347E+000
UNKN	9	FAM	34.98	4.242E-002	--	7.049E+001
UNKN	10	FAM	32.59	1.838E-001	--	5.048E+002
UNKN	11	FAM	30.09	0.000E+000	--	3.914E+003
UNKN	12	FAM	26.65	8.485E-002	--	6.612E+004
UNKN	13	FAM	25.17	1.838E-001	--	2.240E+005
UNKN	14	FAM	18.59	7.071E-003	--	4.979E+007

検出フィルター: FAM ROX

データ解析: テキストレポート

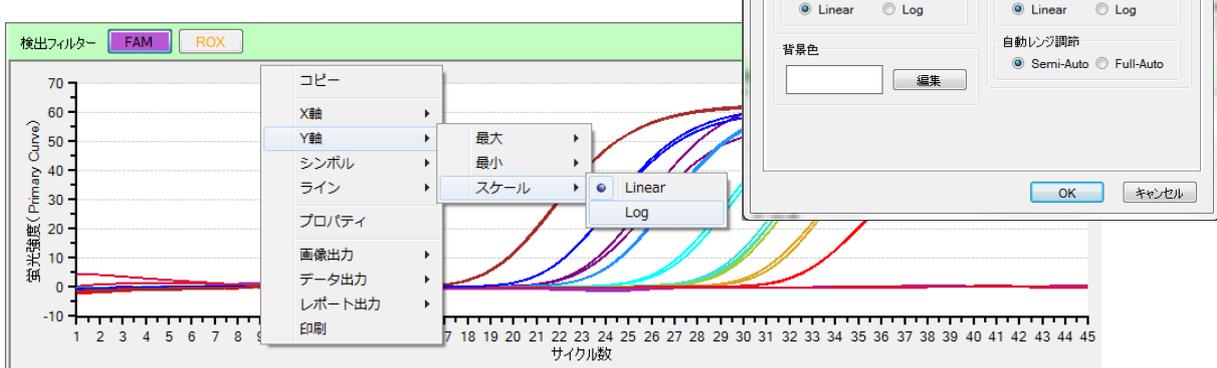
表示形式: レプリケート

表示項目: 解析条件, CP法データ, SDM法データ

詳細項目: サンプルタイプ, レプリケートマーク, レプリケート名, 検出フィルター, 平均Ct値(CP), Ct値SD(CP)

(補足) グラフ表示形式の変更

グラフ上でダブルクリックすると、“プロパティ”ウィンドウが表示されます。軸目盛りの変更やLinear、Logスケールの切り換え、ラインやシンボルのデザインの変更ができます。なお、これらのグラフ表示の変更は、右クリックのショートカットでも選択できます。変更内容がひとつだけの場合には、この方法が便利です。



(3) QuickPrimerシリーズの解析手順

■ グラフによる結果の確認

① 陰性コントロールの反応結果確認

表示セレクトで《N》のウェルを選択し、ベースラインの蛍光シグナルに変化がなく閾値を超えないことを確認します。(閾値を超えた場合でも、その時のT_m値が判定基準T_m値に含まれていなければ問題ありません。)

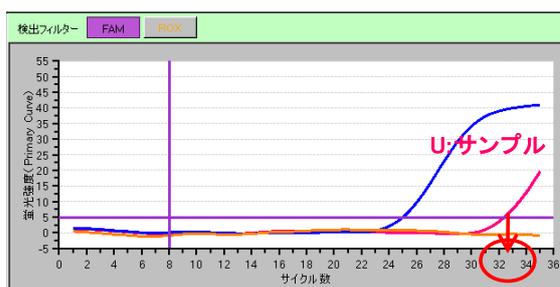
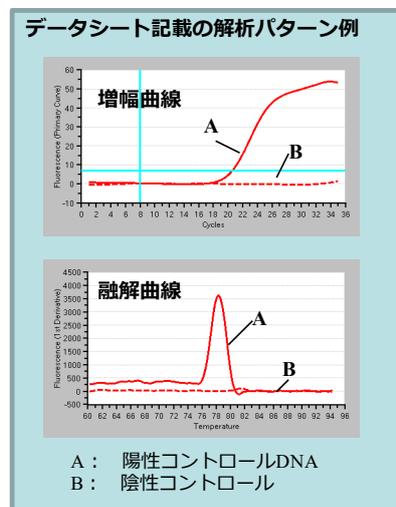
② 陽性コントロールの増幅曲線の確認

表示セレクトで《S》のウェルを選択し、増幅曲線が閾値を超えていることを確認します。

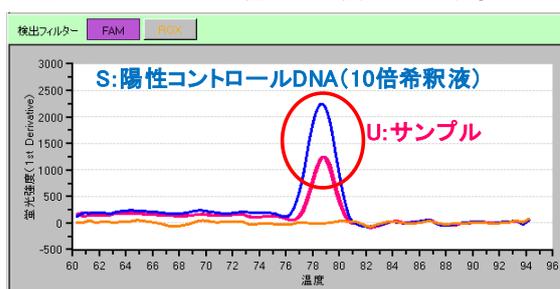
③ 陽性コントロールの融解曲線の確認

表示セレクトで《S》のウェルを選択し、融解曲線の波形が、データシート記載のパターンと一致し、得られたT_m値がデータシート記載の標準T_m値とほぼ同等であることを確認します。

④ サンプルのCt値 (増幅曲線と閾値の交点) が35より小さい値であることを確認します。



⑤ サンプルの融解曲線が、陽性コントロールDNAの波形と同じパターンを示し、かつピークが重なっているか否かを確認します。



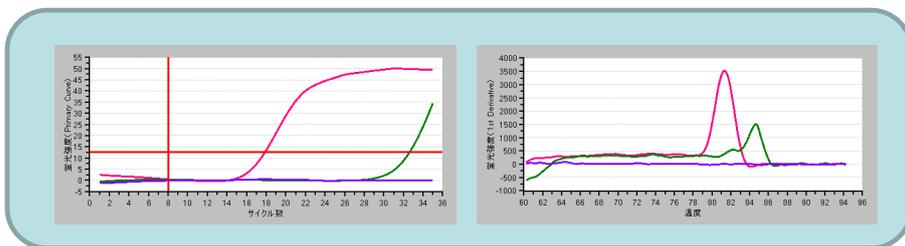
タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

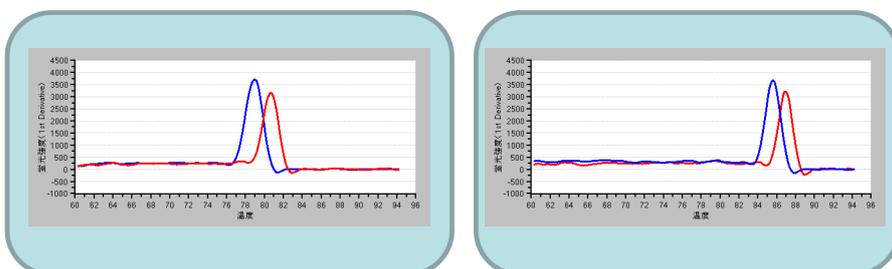
食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

< サンプルの増幅曲線は得られたが、陽性判定にはならない場合 >

1. サンプル (緑) のCt値は35より小さいが、融解曲線の波形が陽性コントロールDNA (赤) と異なる例



2. サンプル (黄色) のCt値は35より小さく、融解曲線の波形も陽性コントロールDNA (青) と同じパターンであるが、判定基準Tm値が±1.5℃以上離れている例



■数値データによる結果の確認

- ① テキストレポート表示

上下いずれかの画面のデータ解析のプルダウンメニューよりテキストレポートを選択します。

- ② 表示項目の選択

QuickPrimerシリーズの場合、以下のように選択してください。

Analysis Data : Text Report

表示形式 : CP法データ

詳細項目 : ウェル

サンプル名

サンプルタイプ

ターゲットマーク

Ct値 (CP)

Tm#1

Tm#2 *

* 融解曲線分析より得られたTm値は、ピークの蛍光強度が高い順に#1、#2値となります。夾雑物質により目的とするTm値が他のピークより蛍光強度が低くなる場合がありますので、必ず#2の値も含めて表示してください。

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

③ 陽性コントロールDNA (10倍希釈液) 反応の結果確認

陽性コントロールDNA (10倍希釈液) の反応(サンプルタイプ:STD) で得られたTm値が、データシート記載の標準Tm値とほぼ同等であることを確認する。

検出フィルター		FAM	ROX				
ウェル	サンプル名	サンプルタイプ	ターゲットマーク	Ct値(CP)	Tm #1	Tm #2	
A6	NC	NTC	A	-	64.87	69.76	
H6	PC	STD	A	24.97	78.67	69.55	

④ 陰性コントロール反応の結果確認

陰性コントロール反応(サンプルタイプ: NTC) のCt値は、数値表示がないか、もしくは Ct値の数値表示があっても陽性コントロールDNA (10倍希釈液) より得られたTm値 $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ の範囲(判定基準Tm値) に含まれないことを確認する。

検出フィルター		FAM	ROX				
ウェル	サンプル名	サンプルタイプ	ターゲットマーク	Ct値(CP)	Tm #1	Tm #2	
A6	NC	NTC	A	-	64.87	69.76	
H6	PC	STD	A	24.97	78.67	69.55	

上記モデル実験の判定基準Tm値は、77.17~80.17 ($78.67 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$)

⑤ サンプルの結果確認

サンプル(サンプルタイプ: U) のCt値が得られているか、Tm#1またはTm#2のいずれかが、判定基準Tm値内に含まれているか否かを確認する。

判定基準Tm値 : 陽性コントロールDNA (10 倍希釈液) より得られたTm値 $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$

7. 結果の出力

■ グラフ等の出力

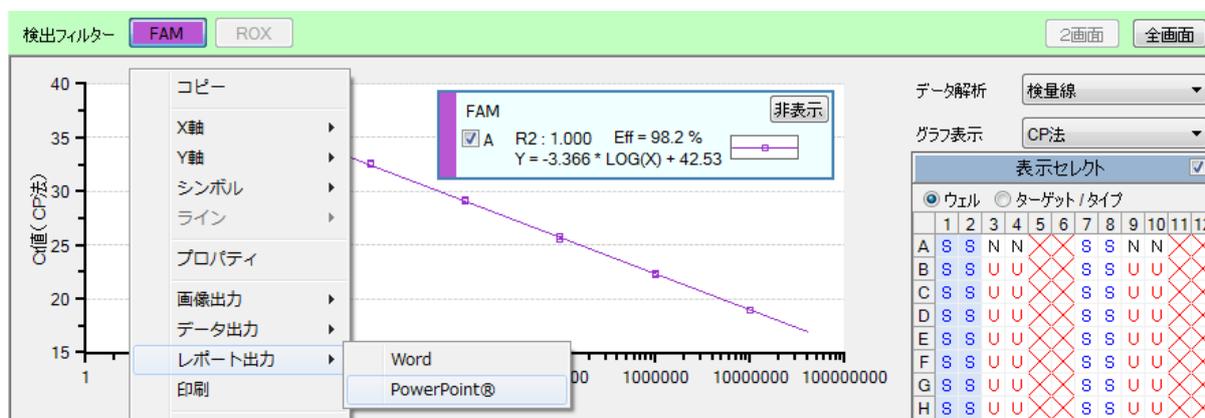
出力したいグラフ上で右クリックし、ショートカットメニューの中から出力形式を選択します。数値データあるいはレポートとして出力できます。

【データ出力】

右クリックでショートカットを表示させ、[データ出力]→[CSV]または[Excel]を選択してください。

【レポート出力】

右クリックでショートカットを表示させ、[レポート出力]→[Word]または[Power Point]を選択してください。



■ テキストレポートの出力

テキストレポートの内容は、CSV形式またはExcel形式のファイルとして出力できます。右クリックでショートカットを表示させ、[データ出力]→[CSV]または[Excel]を選択してください。

サンプル名	サンプルタイプ	レプリケートマ	検出フィルター	Ct値/CP
滅菌水	NC	1	FAM	
滅菌水	NC	1	FAM	
コントロールDNA	PC		FAM	
コントロールDNA	PC		FAM	
サンプル1	UNKN		FAM	
サンプル1	UNKN		FAM	
サンプル2	UNKN	4	FAM	
サンプル2	UNKN	4	Excel	
サンプル3	UNKN	5	FAM	
サンプル3	UNKN	5	FAM	
サンプル4	UNKN	6	FAM	
サンプル4	UNKN	6	FAM	
サンプル5	UNKN	7	FAM	

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-

■ レポート作成機能

いくつかの図をまとめてレポートを作成することもできます。

【レポート作成（Word, Power Point）】

ファイルメニューからフルレポート作成を選択すると、“フルレポート設定”画面が表示されます。必要な図とファイル形式を選択して、“OK”ボタンをクリックするとレポートが作成されます。



【レポート印刷（PDF ファイル）】

レポートをPDFファイルとして保存することもできます。ファイルメニューから印刷を選択すると、“フルレポート”画面が表示されます。必要な図とファイル形式を選択して、“OK”ボタンをクリックすると”Print Preview”画面が表示され、ここのFileメニューからsaveを選択するとPDFファイルとして保存されます。

8. トラブルシューティング

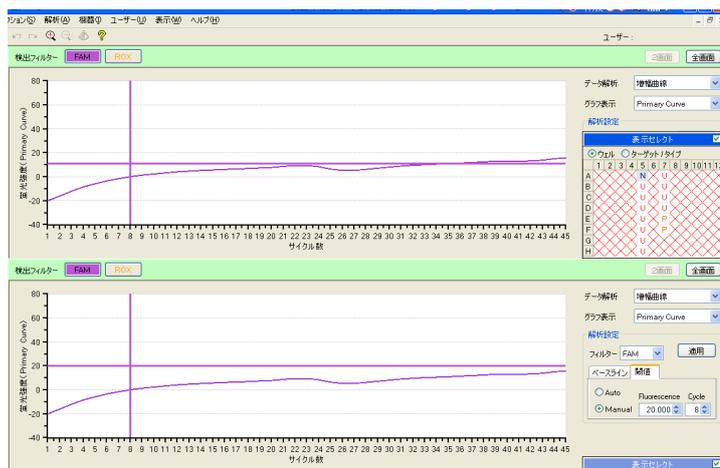
◆ 陰性コントロール反応においてベースラインが閾値を超えた場合

- 1 データ解析から“増幅曲線”を選択し、グラフ表示から“Raw”を選択する。表示セレクトで《N》のウェルを選択し、検出フィルター《FAM》を選択する。
- 2 増幅曲線（Raw）の形状を確認する。

2.1 ベースラインが不安定で閾値を超えたと判断される場合

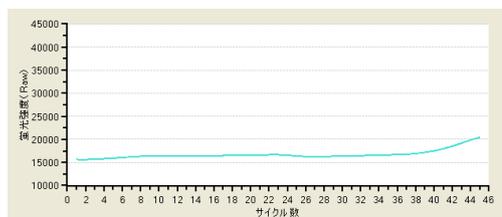
閾値をManual設定に変更する。

ベースラインより上に閾値を移動させて“適用”ボタンを押す。



2.2 PCR増幅によるシグナル増加と判断される場合

コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用機器を除染する。



9. リアルタイムPCR装置関連製品

■消耗品

製品名	用途	製品コード	容量	価格
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	独立型キャップ付き 8 連チューブ	NJ902	120 strips	¥22,000
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set	8 連チューブ	NJ907	120 strips	¥22,000
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	独立型キャップ付き 8 連チューブ	NJ600	120 strips	¥29,000
0.2 ml Hi-8-Tube	8 連チューブ	NJ300	125 strips	¥21,000
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	8 連チューブキャップ	NJ302	125 strips	¥6,000
FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate	96well プレート	NJ904	10 枚	¥13,000
Sealing Film for Real Time	96 well プレート用のシー ル(圧着タイプ)	NJ500	100 枚	¥41,000
Plate Sealing Pads	圧着用パッド	9090	5 個	¥11,000
Sealing Film for Real Time (Adhesive) Ver.2	96 well プレート用のシー ル	NJ502	100 枚	¥32,000
48 well snap plate	48wel プレート	NJ700	20plates	¥11,000
Flat cap for snap plate	48wel プレート用のフラッ トキャップ	NJ720	120 strips	¥9,000

表示価格はすべて税別です。

- 最新のライセンス情報に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- 本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することをご遠慮ください。
- 本冊子に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本冊子記載の価格は2023年5月15日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL. 03-3271-8553 FAX. 03-3271-7282
 関西支店・営業第2部 TEL. 077-565-6969 FAX. 077-565-6995
 テクニカルサポートライン TEL. 077-565-6999 FAX. 077-565-6995

2303

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual- QuickPrimer シリーズ用-