Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

ノロウイルス拭き取り検査のための操作マニュアル

-TaKaRaノロウイルス拭き取り検査用キット(製品コード RR242A)専用-

このマニュアルでは、TaKaRa ノロウイルス拭き取り検査用キット(製品コード RR242A) 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。

※本製品を弊社リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズで ご使用になる場合には、装置にデフォルトで設定されている正規化補正を解除したのち 解析を行ってください。正規化補正を設定している場合と解除した場合では、増幅曲線の 形状や Ct 値にわずかに差が生じることがあります。 解除方法は巻末の「Appendix: Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化 補正解除方法」をご確認ください。

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。

新規測定	
解析タイプ	+/-判定 ▼
測定者名	≪測定者の選択> ▼ 編集
	OK キャンセル

- 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2つ追加する。
 - 2.3 1つ目の Hold は、90°C、3 分の設定にする。
 - 2.4 2つ目の Hold は、58℃、5分の設定にする。
 - 2.5 3 つ目の Hold は、94℃、30 秒の設定にする。
 - 2.6 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。
 2.6.1 サイクル数は5にする。
 2.6.2 セグメント1は、94℃、5秒の設定にする。
 2.6.3 セグメント2は、56℃、30秒の設定にする。
 2.6.4 セグメント2のデータ取得のチェック✔をはずす。
 - 2.7 2 step PCR パターンを追加する。
 2.7.1 サイクル数は、40 にする。
 2.7.2 セグメント1は、90℃、5 秒の設定にする。
 2.7.3 セグメント2は、56℃、21 秒の設定にする
 2.7.4 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。
 2.7.5 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 PCR 条件設定読み込み 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。

	検出フィルター		表示	
ex	FAM ROX	Speed Fast Dissociation time 4.0 sec	Normal O Extend	反応条件読込み

- 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」を選択すると次のような表示になる。

+ /- 判定 Multiplex	- 検J イ	出フィルター — ンターナルコン	ר⊐−ル FA	M 🔻			表示切替 D マーク (@)名称
サンプル設定		1	2	3	4	5	6	7
反応条件設定	A	NC IC(+)	NC IC(+)	_				
結果/解析				ウェル情	報設定		×	
	в	PC IC(+)	PC IC(+)	サンプル	名 [
				サンプル	ゆイブ 📔	<blank></blank>	•	
	C	UNKN IC(+)	UNKN IC(+)	インター	ナルコントロー	ıc(+) ال	•	
		<u>検体 1</u>	検体 1	- ターゲ: - マーカ	>ト設定 <nonei th="" ▼<=""><th></th><th>錠</th><th></th></nonei>		錠	
		IC(+)	IC(+)					
		検体2	検体2	ーレプリク	「一ト設定」	演会	2÷	
	F	UNKN IC(+)	UNKN IC(+)			」 (二) (単) (元)	ix.re	
		検体3	検体3	Or	nit			
		UNKN	UNKN					ſ

■他のランファイルからのサンプル設定読み込み

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。

	検出フィルター	表示切替				ウェル情報		
lex	インターナルコントロール FAM 👻	◎ マーク	◎ 名称	FAM	-		補助	読込み

- 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、設定する。

解析結果の出力

- 1 検出フィルターの FAM ボタンをクリックする。
- 2 データ解析から判定結果を選択する。
- 3 総合判定に↓を入れると判定結果が表示される。
- 4 テキストレポートの表上で右クリックし、出力形式を選択する(Excel など)。
- 5 保存場所とファイル名を指定して保存する。
- 6 ROX と Cy5 の結果についても同様に確認する。

検出	レイルター	FAM	R	ox [Cy5	▼ 総合	合判定							2画面	全画面
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	データ解析	判定結果	•
Α						+	+								
в						+	+						刊定方法	Ctle(CP)	
С						+	+								
D						+	+								
Е						+	+	画像	出力	•			L		
F						+	+	デー	夕出力	•		CSV			
0						+	+	レボ	一卜出力	,		Excel	_		
-								Finel			J.,				
Н						+	+							·	

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。

Thermal Cycler Dice Real Time System 本体の電源を切る。

Appendix: Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法

A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C/3.10A)
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 設定(S)をクリックする。



2. ユーザ設定内の解析タブを選択し、正規化補正のチェックを外す(赤矢印)。

Software Ver. 3.01C

Software Ver. 3.10A



3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

- B. Thermal Cycler Dice Real Time System *II/Lite* の場合 (Software Ver. 2.11C)
 - 1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。

ファイル(F) 機器(I) ユーザー(U) ヘルプ(H) □ 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
□ ☞ ● ● 変更(C) ● ● ● 設定(S)
登録(M)

 新規 → 適当なユーザー名を入力(例:正規化補正 OFF) → 追加の順に操作し、 上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックし ウインドウを閉じる。

登録		
名前	XE	
<u>正規1比補正 OF</u>	F	
ユーザー	Torr	
大名正規に補	EOFF	新規
		道流
	OK キャンセル]

3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。

絶対定量
正規化補正OFF 编集
OK キャンセル

📝 食品環境検査用ソフトウエア - [NewDocument_6] Zアイル(E) 編集(E) セクション(S) 解析(A) 機器(I) ユーザー(U) 表示(W) ヘルプ(H) D 🗲 🖬 🎒 🗈 🗠 က ଲ 🔍 🔍 🕭 💡 変更(C) ۲ 設定(S) 検出フィルターー 絶対定量 Multiplex 登録(M) FAM HEX サンブル設定 2 4 1 3 5 6 反応条件設定 FAM FAM FAM FAM FAM FAM А 結果/解析 |_.... I..... I..... **_**___

J J

4. ソフトウェア画面上部のユーザー(U) → 設定(S)をクリックする。

5. ユーザ設定内の解析タブを選択し、正規化補正のチェックを外す(赤矢印)。

解析 レポート作成 / 印刷 ガラフのプロパティ テキストレポート ランプ	全てリセット
解析 増幅曲線 🛛 各ターゲットごとにパラメータを設定	リセット
ベースライン 💿 Auto 🔘 Manual	
關値 ● Auto ○ Manual	
➡ □ 正規化補正	
1	
▶ ■ ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	
測定値分布 🛛 各ターゲットごとにパラメータを設定	
關値 ● Auto ● Manual	
	1510 1711

6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解 析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態とな る。

 C. 上記以外の Software Ver.の場合(III/II/Lite 共通
 ※Software Ver. 2.11C/3.01C/3.10A 以外は Run file ごとに正規化補正を解除する 必要がある。

1. Run file を開いた状態で、解析(A) → 基本設定(S)をクリックする。

- 🔟 食品環境検査用ソフトウエア [C:¥Users¥t21804¥Downloads¥2018年度¥ソフトウェア¥RunFile¥TP900¥R-20: ☑ ファイル(F) 編集(E) セクション(S) 解析(A) 機器(I) ユーザー(U) 表示(W) リモート(R) ヘルプ(H) 🗋 🚅 📕 🎒 🛍 🛍 က က 🔍 🤤 データ概要(P) データ取得選択(D) 検出フィルター 絶対定量 Single 基本設定(S) ✓ FAM Speed Fast Dissociation tim サンブル設定 Τ パターン Hold Hold 2 Step PCR 反応条件設定 セグメント 1 1 1 100-結果/解析
- 2. 正規化補正のチェックを外す(赤矢印)。

基本設定 — — — — — — — — — — — — — — — — — — —
スムージング
Amplification Averaging Points 5
Dissociation Averaging Points 5
正規化補正
Amplification Plots 🔲 🖛
OK キャンセル

3. 左下の OK をクリックしウインドウを閉じる。