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.3(RR298A)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.3(製品コード RR298A) 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 ▼ Ӯ 多波長検出
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 A	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 イ	出フィルター ンターナルコン	י⊦ם−ル FA	M 🔻			表示切替 ① マーク (名称
サンブル設定		1	2	3	4	5	6	7
反応条件設定	A	NC IC(+)	NC IC(+)	(1+D =0		X	
結果 / 解析	В	PC IC(+)	PC IC(+)	サンプル サンプル	1戦設定 1/名 [1/タイプ [<blank></blank>		
	с	UNKN IC(+) 検体 1	UNKN IC(+) 検体 1 IINKN		-ナルコントロー ット設定	ール IC(+) 図 複数 連続	▼	L
	D	IC(+) 検体 2	IC(+) 検体 2	ע יל ער ל-ד) 	設定	
	E	IC(+) 検体 3 UNKN	IC(+) 検体 3 UNKN	0	mit]

■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 -	入力 補助	読込み

★テンプレートファイルの利用も可能です。

上記の PCR 反応条件設定、サンプル設定を行った状態のファイルを 「テンプレートファイル」としてデスクトップに保存しておくと 便利です。



新規ランファイルを作成する際は、まずテンプレートファイルを開き、ファイルメニュ ーから「別名で保存」を選択し、適切な保存先とファイル名を入力して保存してくださ い。

必要に応じて設定を変更したうえでランを開始します。



- ※テンプレートファイルは、使用する Thermal Cycler Dice Real Time System を制御 する PC のみで利用可能です。別の装置制御用の PC へのファイル移動は避けてくだ さい。
- 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 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

タカラバイオ遺伝子検査キット判定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。

ҟ±±コィレター FAM ROX 05 ↓ すべて選択	2画面 全画面
F ⁰⁸	データ解析 増幅曲線 🔹
	グラフ表示 Primary Curve - 解析設定
	7ィルター FAM ▼ 通用 ペースライン 耐値
	Auto 個別規定 Manual Start 8 End 40
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 4 サイクル酸	■ 10 表示セレクト 🔍
検出フィルター FAM ROX Cy5	2画面 全画面

- 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。

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。

📝 食品環境検討	査用ソフ	トウエア		
ファイル(F)	機器(I)	[ユーザー(U)]	へレプ(H)	
	6 h	変更(C) 設定(S)	• 🔿	?

 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>止 規1ビ補止 OFF</u>		
ユーザー		
氏名 正規化補正	EOFF	新規
J.F.		追加
		自抑策
	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。

新規測定		_ _ x
解析タイプ	絶対定量	▼ 🔽 多波長検出
測定者名	正規化補正OFF	編集
	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..... I..... **_**___
- 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)。

	ーザ設定						
	解析 レポート作成	(1印刷 グラフク)วือパティ :	テキストレポート ランプ	9	全てリセット	
	解析	🗊 々ち 岸。	L -"b(-18=.1.	b+ 라		リセット	
	78川周田14後	▲ 各タークッ ベースライン	Auto	⊖ Manual			
		閾値	Auto	Manual			h
	-	🕨 🔲 正規化補	Ε				
	F#27## 40	💷 쇼토 램.		b.+.=‰			h
		▼ 各ターケッ	NUZIU/17X1	「外を設定			
	測定10分布	図 各ターケッ 閾値	िट्टीट/\७४°	- ダを設定 〇 Manual			b
							1
	۶Ł				ОК	キャンセル	
L			_				J

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) \rightarrow 基本設定(S)をクリックする。



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。