Cycleave®PCR 呼吸器系感染症起因菌検出キット Ver.2(製品コード CY214) 補足

< Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System の操作方法>

詳細は、装置に付属の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。

Experiment Marris &	Experiment Hidden	Type: Shidnest Core.	Respects CODE	Sector Res
Setup	Experiment Properties			
Distant Street Transford	🕼 linterek kommentnisse, keisiste kunsterentsise, solentistear et kom	encodes let us, the select memory and watches to the PUR Automation and interaction		
iner see	Here do you want to identify this experiment?			
The Ballet	-Lasener See. Sector			
Canada and States	Januar (atoos)			
and the local data	Carry and Colorad			
Rat	Which instrument are gan unleg to risk the experiment?			
Analysis	2 Starbartaneour (Kinda)	Salar Insurance of sold		
	Services and an electric an experiment young a finance, Rowell system.			
	What type of experiment do you must be set up?			
100	Vision Revisit Low	Scattered Action Control Sec.	Sector 4	Second Cold Cold
	C Intel Care		1	of States and Sta
	the detraded second an airplite acade the phases and acpen	a in a male .		
	Which respects do you want to use to detect the target because	eed.		
	The start filleness -	CONTRACTOR CONTRACTOR		1100
	Development and an and the party water to be a series	girl alter megeris is datas anto frador. Sin Fraskor Basa rosen is na andasie Se "Straf way	*	
1.00	Which ramp speed do you want to use in the instrument run?			
	Same 2 hour interaction and	2 Party: All worder to complete a we		
	For spatiant anode, who has fails and speed, Applied Reservoirs an anomali	a county if and reasons for proc PEPE reactions		

- (2) Plate Setup の Define Target 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

efine Targets	Assign Targets and Samples					
Instructions: [Define the targets to g	uantity and	the sa	mples to te	st in the	e reactio
efine Targets						
Add New Target	Add Saved Target	Save Ta	inget	Delete Ta	rgét	
Targe	et Name	Rep	orter	Guen	cher	Color
Spne		FAM	+	None	•	•
Hinflu		FAM	-	None	-	-
Mpne		EAM .	-	None	-	-

1

	ターゲット		Probe 蛍光標識
Probe / Primer Mix - 1	肺炎球菌 Streptococcus pneumoniae	LytA 遺伝子	FAM
Probe / Primer Mix - 2	インフルエンザ菌 <i>Haemophilus influenzae</i>	16S rRNA 遺伝子	FAM
Probe / Primer Mix - 3	マイコプラズマ・ニューモニエ <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rRNA 遺伝子	FAM
Probe / Primer Mix - 4	クラミドフィラ・ニューモニエ <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	16S rRNA 遺伝子	FAM
Drobo / Drimor Mix 5	レジオネラ・ニューモフィラ	mip 遺伝子	FAM
FIDDE / FIIIIel Mix - 5	Legionella pneumophila	16S rRNA 遺伝子	ROX
Brobo / Brimor Mix 6	A 群溶血性レンサ球菌	16S rRNA 遺伝子	FAM
	Streptococcus pyogenes	SLO 遺伝子	ROX

(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	1				
	Sample Name							
PC_Spne					Ŧ			
PC_Hinflu					Ŧ			

(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 Mi - 1 から Mix - 4 のウェルには 1 種類の Target を設定し、Probe/Primer Mix - 5 および Mix - 6 のウェルには 2 種の 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。

	rail Test		9,047	- P					
	nine 🛄				1				
1 9 1 4	erza 🔲	Rent Lines		8	Ditter	aven . The		-	
□ ₩									
	raes, refer					2	1	- E -	
EI 14	neu 1815 (00								
E N	NU 188 (1)	0	1		^				
R **	enc III	00							
D Horn	Linknows 🔯 Ib	nite 1 tie	ative Coldrol			+1.5240	These literatures		-
Averan	Eastern Contraction	et wellt.		8	c.	15.00 ⁴			-
0	PG_Latera 188				D.	PC_ROM	-		1
11	PS_BINITE INC SPECIAL								1
0	Barrate 1					15,5pm	Clare		h
						The state	and the second s		. 6
ssign sample	(s) of selected u	witten to be	logical grou	e .	-				
nsign 6 sinple Antiqu	(1) of selected w Bridges Cro	will(n) to be	ningtest grou		r	N. Law	ng Pigenski Hann Hill Hann Hill		-

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



- (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。 <u>FAM 検出と ROX 検出は、個別に設定が必要です。</u>

- 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。
- 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。1 ターゲットの Mix 1 から Mix 4 は合計 2 ウェルを選択し、ターゲットが 2 種の Mix 5 と Mix 6 は NC 反応と各 Posotive Control 反応の合計 3 ウェルを選択する。

- 3. 以下では Probe/Primer Mix 5 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 5 の場合

NC、*mip* 遺伝子 Positive Control (FAM 検出)、および 16S rRNA 遺伝子 Positive Control (ROX 検出)の3ウェルを選択し、Target は *mip* 遺伝子を 選択して3本の Amplification Plotを表示する。(*mip* 遺伝子 Positive Control:青、16S rRNA 遺伝子 Positive Control:赤、NC:緑*)

*: 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、説明のため緑で表示しています。

FAM 検出ではない 16S rRNA 遺伝子 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。 下図のように、Baseline の上昇が見られる場合は、4. の操作を行う。

Plot Set	ABIN VI CYCLE THE Grant Type & Instant THE Plot Color Sample	Ţ
E Save	convert services and the default	-
	声音感	1
125.0	Amplification Plot	
100.0		-
75.0		
64 to.0	»	
25.0		
	0	
3	тааасыныныныныныныны Сусн	

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。
- 6. 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。



上図の Threshold を実線から破線の位置に変更

- 7. Analyze ボタンをクリックし、再解析を行う。
- 3. 蛍光標識 ROX 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/Primer Mix - 5 では 16S rRNA 遺伝子ターゲットを選択する。)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。

mplification Plot	View Plate Layout View Well Table Select Wells With: Select Wells
Plot Type: ARn vs Cycle 💌 Graph Type: Linear 💌 Plot Color: Sample 💌	General X Axis Y Axis
P P B R 🔣	Label ARin Fort SameEmitplair(12
125.000 100.000 75.000 25.000	Color 0, 0, 0 S Tick Marks Show major tick marks Show minor tick marks Show major tick mark labels Show minor tick mark labels Show minor tick mark labels
0 z * e e u u w w w z z z z z z z z z z z z z z z	Range Auto-adjust range Minimum value 15,000.0

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。
 - <u>※ 装置の特性上、例えば Probe/Primer Mix 5検出で、ROX検出(16S rRNA遺伝子)</u> <u>側に FAM 検出 (*mip* 遺伝子、Amplification Plot 青) のシグナルがもれこむ 場合があります。</u>



16S rRNA 遺伝子 Positive Control:赤、*mip* 遺伝子 Positive Control:青、NC:緑* 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。

Vie	ew Plate Layo	ut Vie	w Well Ta	ble					
	Select Wells With: - Select Item - 💌 - Select Item - 💌								
Sho	Show in Table V Group By V Expand All Collapse All								
				1					
#	Sample Name	Target N a .!.	Task	Dyes	Ст	Ст Mean			
84	NC	Lone 16S	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi	20.1			
85	PC Lpne 16S	Lpne 16S	UNKNOWN	ROX-None	18.827	18.82			
86	PC_Lpne_Mip	Lpne 16S	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi				
87	NC	Lpne-Mip	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi				
88	PC_Lpne_16S	Lpne-Mip	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi				
89	PC Lpne Mip	Lpne-Mip	UNKNOWN	FAM-None	20.702	20.70			

判定方法の詳細は装置の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℃、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のシグナルより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8. Scale 調整の操作は不要です。