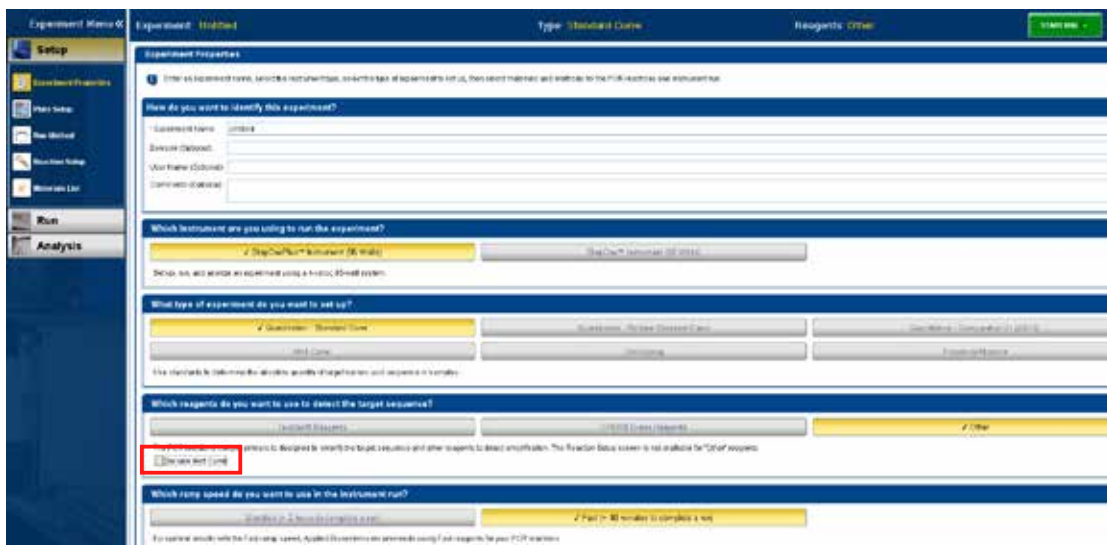


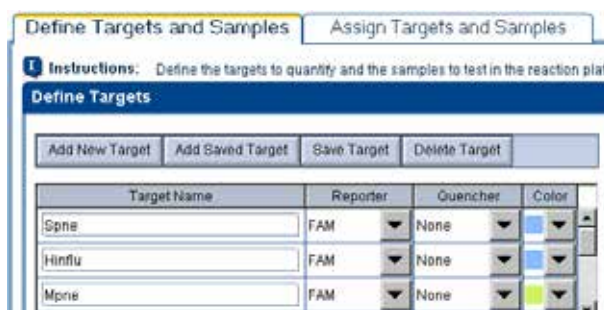
< Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System の操作方法 >

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。

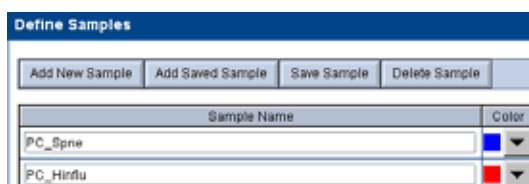


- (2) Plate Setup の Define Target で Target Name を設定する。
  - FAM 標識プローブ検出は、Reporter を FAM、Quencher を None
  - ROX 標識プローブ検出は、Reporter を ROX、Quencher を None



	ターゲット		Probe 蛍光標識
Probe / Primer Mix - 1	肺炎球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>LytA</i> 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>Chlamydomphila pneumoniae</i>	16S rRNA 遺伝子	FAM
Probe / Primer Mix - 5	レジオネラ・ニューモフィラ <i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i> 遺伝子	FAM
		16S rRNA 遺伝子	ROX
Probe / Primer Mix - 6	A 群溶血性レンサ球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	16S rRNA 遺伝子	FAM
		<i>SLO</i> 遺伝子	ROX

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

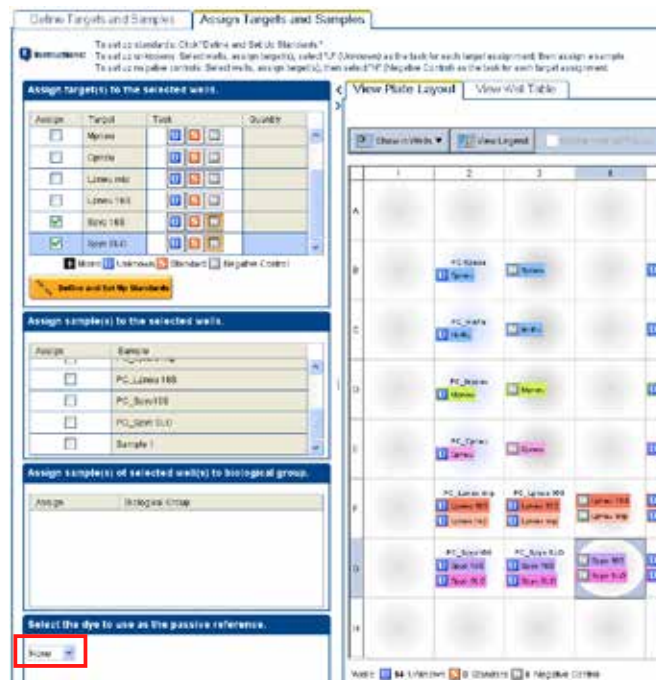


(4) 作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。

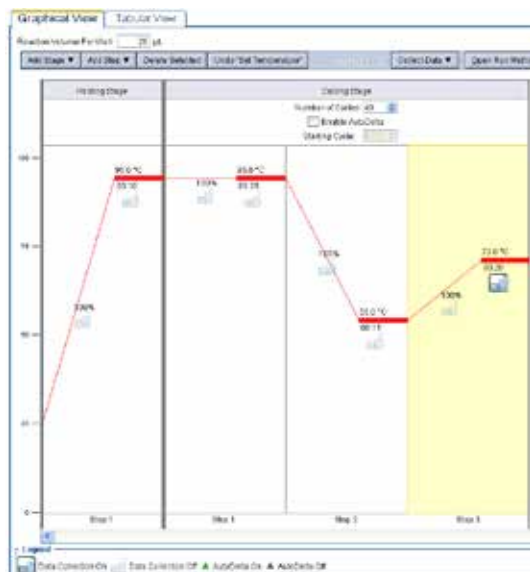
passive reference は (none) にする。

Probe/Primer Mix - 1 から Mix - 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。



- (5) Instrument タブを選択し、反応条件を設定する。  
Sample Volume を 25  $\mu$ 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。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 Positive 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。

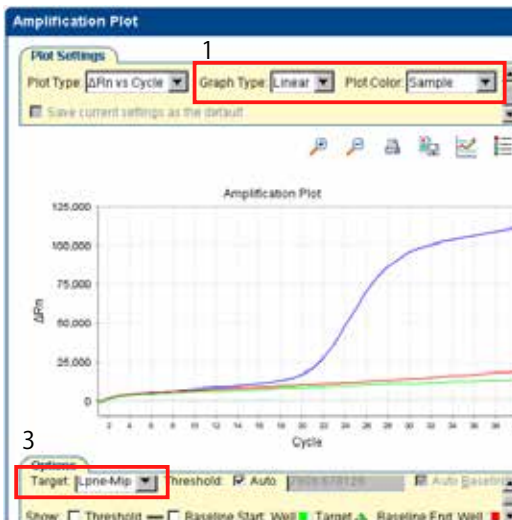
例) Probe/Primer Mix - 5 の場合

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\*)

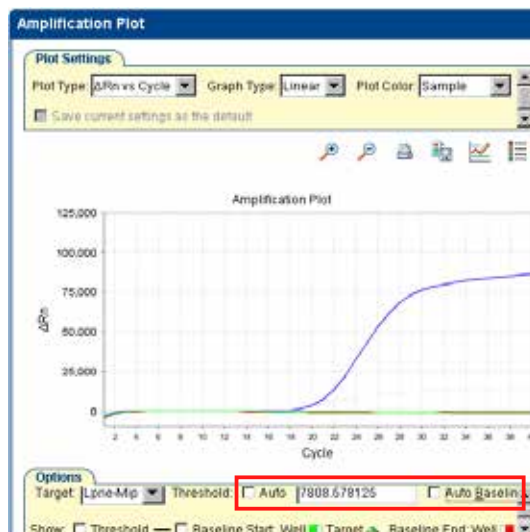
\* : Assign target(s) to the selected wells. の Task で Negative Control とした場合は、グレーで表示されますが、説明のため緑で表示しています。

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。

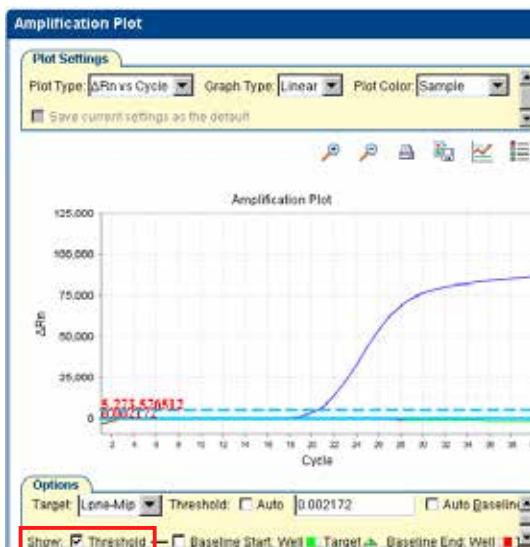
下図のように、Baseline の上昇が見られる場合は、4. の操作を行う。



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。

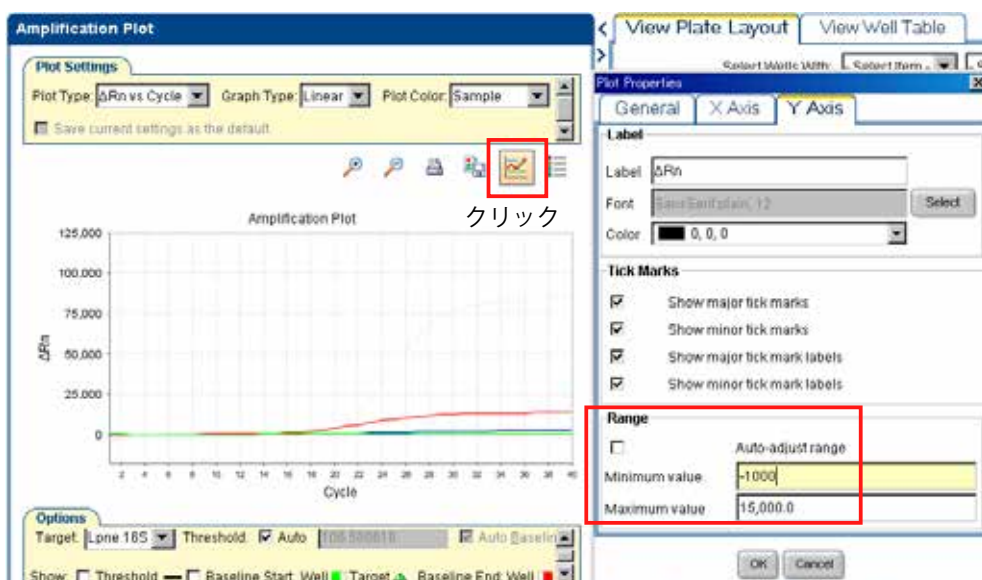


- Show :  Threshold に  を入れ、増幅曲線に Threshold を表示する。
- Threshold を変更する場合は、Threshold  Auto の  を外し、Graph に表示された Threshold にカーソルをあわせ、ドラッグしながら Threshold を非対応の Positive Control のシグナルより上に設定する。

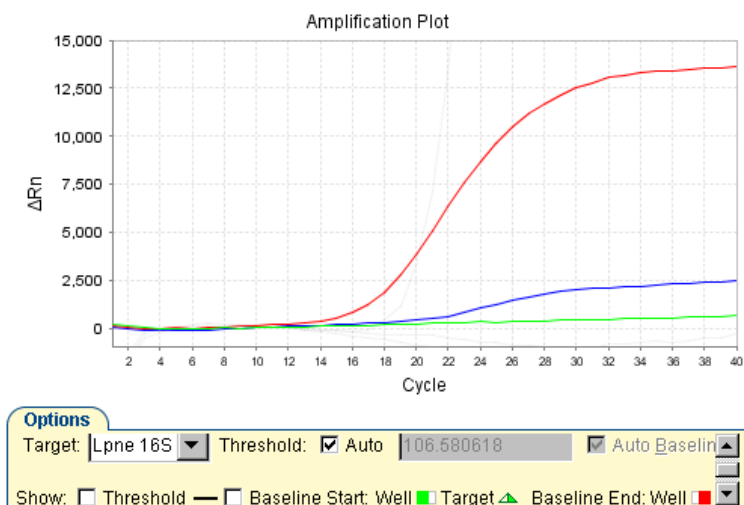


上図の Threshold を実線から破線の位置に変更

- Analyze ボタンをクリックし、再解析を行う。
- 蛍光標識 ROX 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。

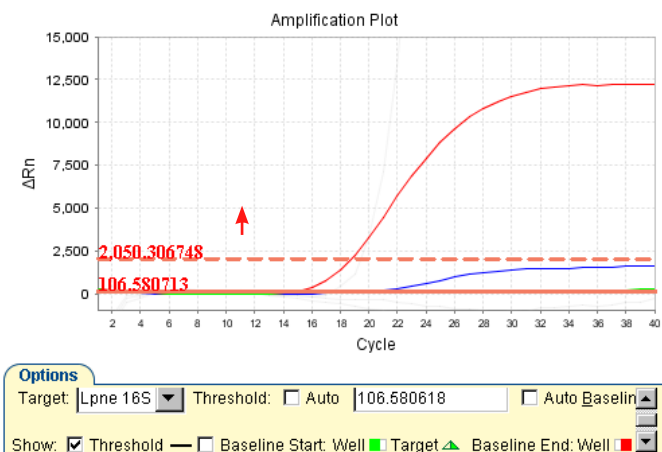


9. OK をクリックし、Amplification Plot を表示する。



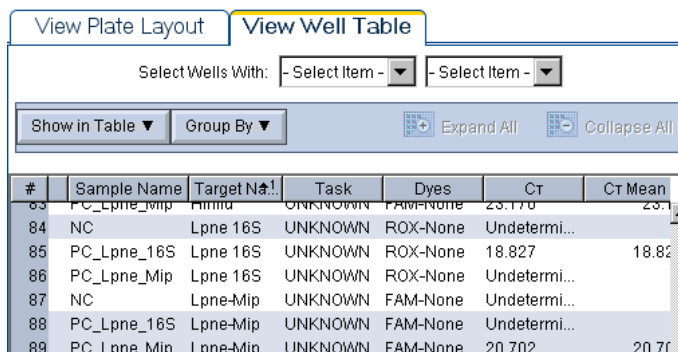
10. 4. ~ 6. と同様の操作により、Baseline をフラットとし Threshold を非対応の Positive Control のシグナルより上に設定する。

※ 装置の特性上、例えば Probe/Primer Mix - 5 検出で、ROX 検出 (16S rRNA 遺伝子) 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。



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。



The screenshot shows the 'View Well Table' interface. At the top, there are two tabs: 'View Plate Layout' and 'View Well Table'. Below the tabs, there is a 'Select Wells With:' section with two dropdown menus, both currently set to '- Select Item -'. Below this, there are buttons for 'Show in Table', 'Group By', 'Expand All', and 'Collapse All'. The main part of the interface is a table with the following data:

#	Sample Name	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean
83	PC_Lpne_Mip	Lpne-Mip	UNKNOWN	FAM-None	23.170	23.170
84	NC	Lpne 16S	UNKNOWN	ROX-None	Undetermi...	
85	PC_Lpne_16S	Lpne 16S	UNKNOWN	ROX-None	18.827	18.827
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	20.702

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°C、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。