# Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

## 豚熱ウイルス・アフリカ豚熱ウイルス検査のための操作マニュアル

## -CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe(製品コード RC211A)専用-

このマニュアルでは、CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe(製品コード RC211A)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。 実験操作に関しては、本キットの取扱説明書に従ってください。

※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、巻末の「Appendix: Thermal Cycler Dice Real Time System シリー ズの正規化補正解除方法」に従って、正規化補正を解除したのち解析を行ってください。正 規化補正の有無により、増幅曲線の形状や Ct 値に差が生じることがあります。

## <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 先頭に RT のパターンを追加する。
  - 2.3 RTは、52℃、5分の設定にする。
  - 2.4 Hold は、95℃、10 秒の設定にする。
  - 2.5 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。
    2.5.1 サイクル数は 45 にする。
    2.5.2 セグメント 1 は、95℃、5 秒の設定にする。
    2.5.3 セグメント 2 は、56℃、30 秒の設定にする。
    2.5.4 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。
  - 2.6 Speed を Fast に設定する。



Thermal Cycler Dice Real Time PCR System III の設定例

■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	
FAM HEX ROX Cy5	Speed Fast V Dissociation time 4.0 🕏 sec	O Normal  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(<u>ラン途中またはラン終了後に行っても</u> <u>良い</u>)。
  - 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。
    - PC: 陽性コントロール
    - NC: 陰性コントロール
    - **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 NC に関しては、該当するウェルを選択し、インターナルコントロールを「IC(-)」 に設定する。



- 3.6 必要に応じてレプリケート設定を行う(省略可能)。
- 3.7 必要に応じて表示切替の「名称」を選択し、サンプル名を入力する(省略可能)。
- 3.8 反応に使用しないウェルは Omit 設定する(省略可能)。



■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上でランを開始します。

Ø	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(F	R) ヘルプ(H)	
	新規(N)	Ctrl+N	0 ?				
	開<(O)	Ctrl+0	h.				
	閉じる(C) データ管理(M)	Ctrl+M		✓ ROX ✓ Cy5	Speed Fast	♥ Dissociat	ion time 4.0 🔹 se
	保存(S)	Ctrl+S					
	別名で保存(A)	Ctrl+A	マーン	RT	Hold	2 Ste	p PCR
	読込み(T)		100-	1	1	1	2
	フルレポート作成(R) 印刷(P)	Ctrl+P	-				$\setminus$
	終了(X)				/		
			50 - - - - - 0 -				
		ť	イクル数	1	1	4	15
		ž	昰度 <mark>(℃</mark> )	52.0	95.0	95.0	56.0
		時	間(分、秒)	05:00	00:10	00:05	00:30
		7	一久取得				<ul><li>✓</li></ul>
		Ramp	Rate(℃ / 秒)	Default	Default	Default	Default
		Increm	ent Temp(°C)	0.0	0.0	0.0	0.0
		Increm	nent Time(秒)	0.0	0.0	0.0	0.0

※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>

反応終了後、増幅曲線を確認する。CSF ウイルス(CSFV)遺伝子陽性の場合は Cy5、ASF ウイルス(ASFV)遺伝子陽性の場合は ROX での蛍光シグナルの増大が認められる。

解析パラメーターの確認

- 1 増幅曲線を表示させる
  - 1.1 結果/解析画面において、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。
- **4** 結果の判定

結果/解析画面において、検出フィルターで「Cy5」または「ROX」を選択後、「デー タ解析」から「判定結果」を選択し、総合判定にチェック↓を入れることでインターナ ルコントロール(GAPDH遺伝子)の結果を踏まえた総合判定結果が表示される。

検出	コフィルター	FAM	HEX	ROX	Cy5	☑総	合判定					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ОК											
в	ОК											
С	Posi.											
D	Posi.											
Е	Nega.											
F	Posi.											
G	Posi.											
н	Posi.											

コントロール反応の判定結果

**OK**: コントロール反応:正常

**OUT**: コントロール反応:異常

検体の判定結果

- Posi.: 【Cy5】CSFV 遺伝子陽性、【ROX】ASFV 遺伝子陽性
- Nega.:
   【Cy5】CSFV 遺伝子陰性(検出限界以下)、【ROX】ASFV 遺伝子 陰性(検出限界以下)
- ND: 判定不能 (インターナルコントロール及び CSFV または ASFV 遺 伝子がともに検出されていない場合)
- ERROR: エラー(同一レプリケート内で判定結果が異なる場合)

「データ解析」を「テキストレポート」とし、必要な項目を選択することで各サンプルの Ct 値などの情報を得ることができる。

## <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/3.01D)
  - 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. ユーザー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



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 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	査用ソフ	トウエア		
ファイル(F)	機器(I)	(ユーザー(U)	ヘルプ(H)	
D 🚅 🔳	<b>8</b> h	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 正規	メモ 化補正 OFF	
-ユーザー		
氏名	正規化補正OFF	新規
		」 同時
	OK キャンセノ	L

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		_ <b>_</b> X
解析タイプ	絕対定量	▼ 📝 多波長検出
測定者名	正規化補正OFF	▼ 編集
	<b>OK</b> キャンセル	

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。

◎ 食品環境検査用ソフトウ:	エア・	[NewDocume	ent_6]					1.0
	セク	ション( <u>S</u> ) 觡	新( <u>A</u> ) 機器(	I) [ユーt	f−( <u>∪</u>	」)表示( <u>₩</u> )	ヘルプ(出)	
🗅 🗲 📙 🎒 🛍 💼	K) I		ð ?	-	変更((	⊂) ►		
	検	出フィルター			设定(9	5)		
絶対定量 Multiplex		FAM HI	X ROX	:	登録()	ч)		
サンプル設定		1	2	3		4	5	6
反応条件設定		FAM	FAM	FAM	F	AM	FAM	FAM
結果/解析								
				<b>_</b>				I

3 4 3 0 7 0 9 10

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)。

	ユーザ設定	
	解析 レポート作成 / 印刷 グラフのプロパティ 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	
L	閾値 💿 Auto 🔘 Manual	
	➡▶ 🔲 正規化補正	
1		
L	融解曲線 🛛 各ターゲットごとにパラメータを設定	
	測定値分布 🛛 各ターゲットごとにパラメータを設定	
L	闞値 💿 Auto 💿 Manual	
	×Ŧ	
	ОК	キャンセル
6		

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 共通)

**※Software Ver. 2.11C/3.01C/3.01D** 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 同 ←
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。