

# 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 シリーズでご利用になる場合には、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。



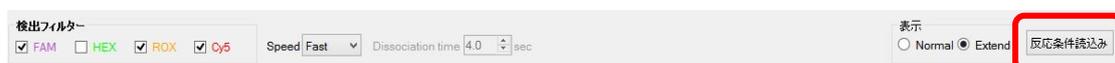
- 2 反応条件設定画面で PCR 条件を設定する。
  - 2.1 検出フィルターの FAM、ROX、Cy5 にチェック✓を入れる  
(4色搭載機の場合は、HEX のチェック✓を外す)。
  - 2.2 先頭に RT のパターンを追加する。
  - 2.3 RT は、52°C、5 分の設定にする。
  - 2.4 Hold は、95°C、10 秒の設定にする。
  - 2.5 3 Step PCR のパターンを削除して、2 Step PCR のパターンを追加する。
    - 2.5.1 サイクル数は 45 にする。
    - 2.5.2 セグメント 1 は、95°C、5 秒の設定にする。
    - 2.5.3 セグメント 2 は、56°C、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“反応条件読み込み”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。



3 サンプル設定画面でサンプル情報を入力する（ラン途中またはラン終了後に行っても良い）。

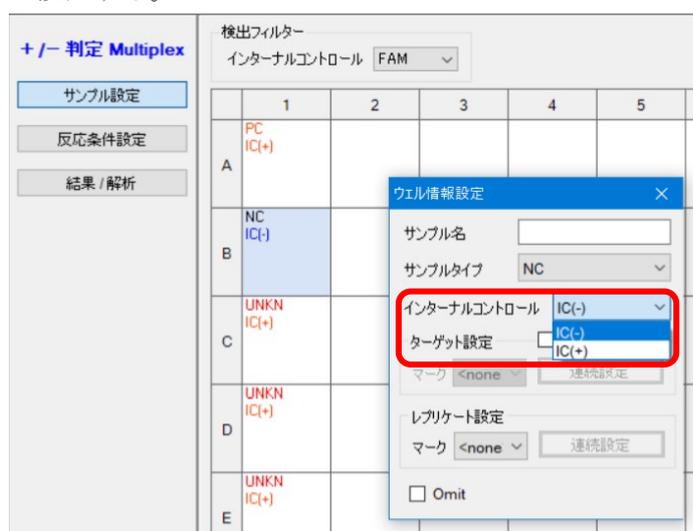
- 3.1 インターナルコントロールとして **FAM** を選択する。
- 3.2 画面右上の入力ボタンをクリックする。
- 3.3 該当するウェルを選択し、サンプルタイプを選択する。

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

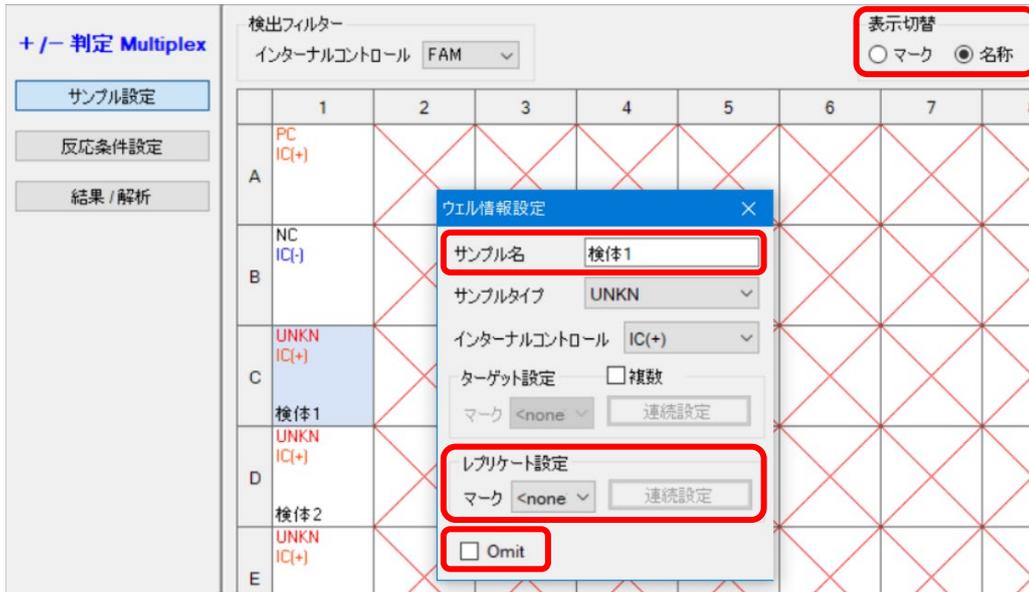
3.4 ターゲット設定の複数のチェック  を外す。



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“読み込み”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。



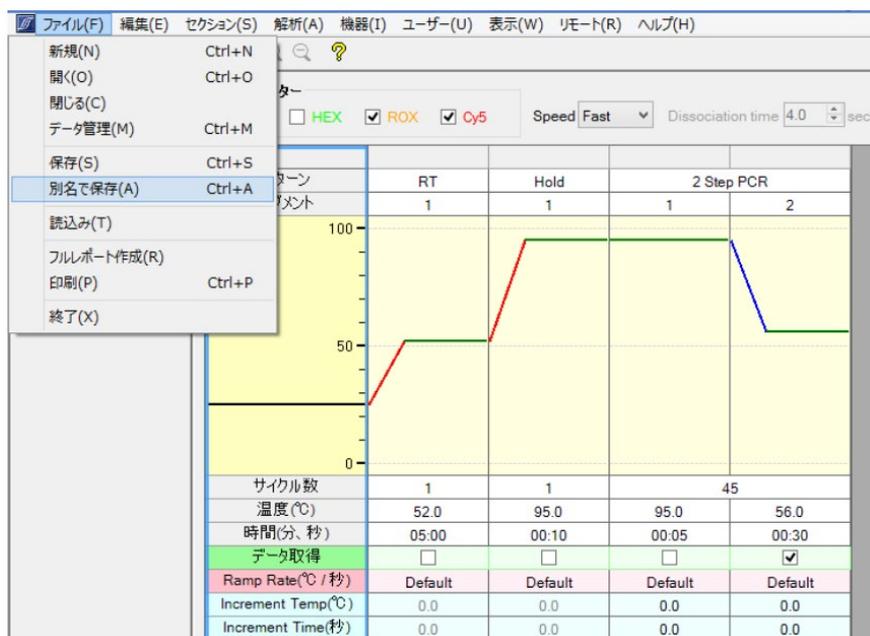
#### ★テンプレートファイルの利用も可能です。

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う便利です。



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。



※テンプレートファイルは、使用する Thermal Cyclers 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 反应用的チューブ（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。

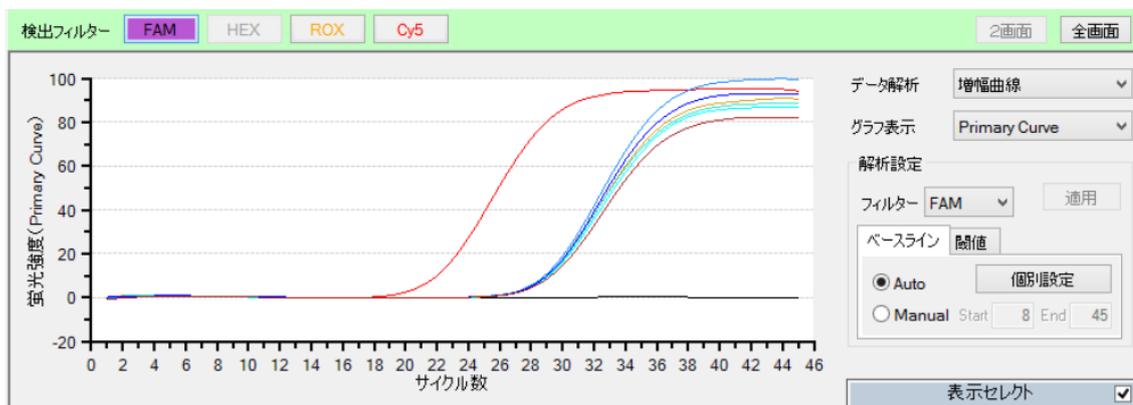
## <結果の解析>

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

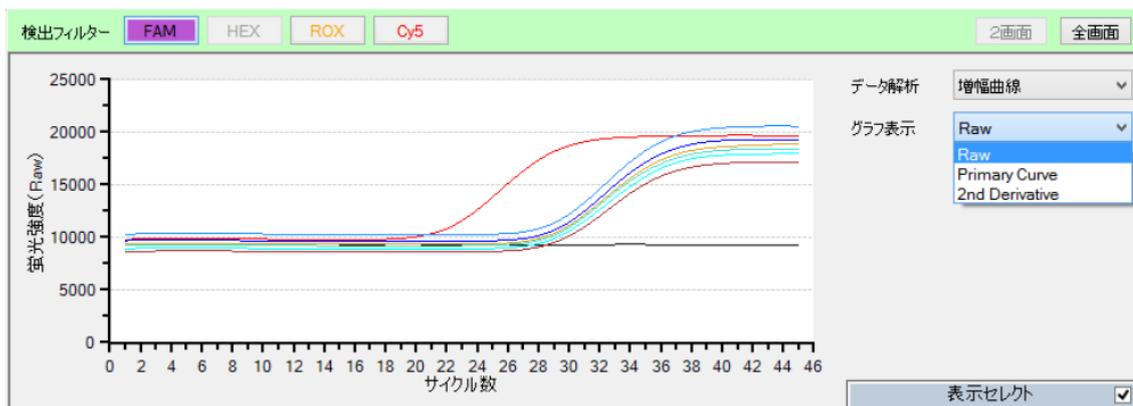
### 1 増幅曲線を表示させる

- 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。

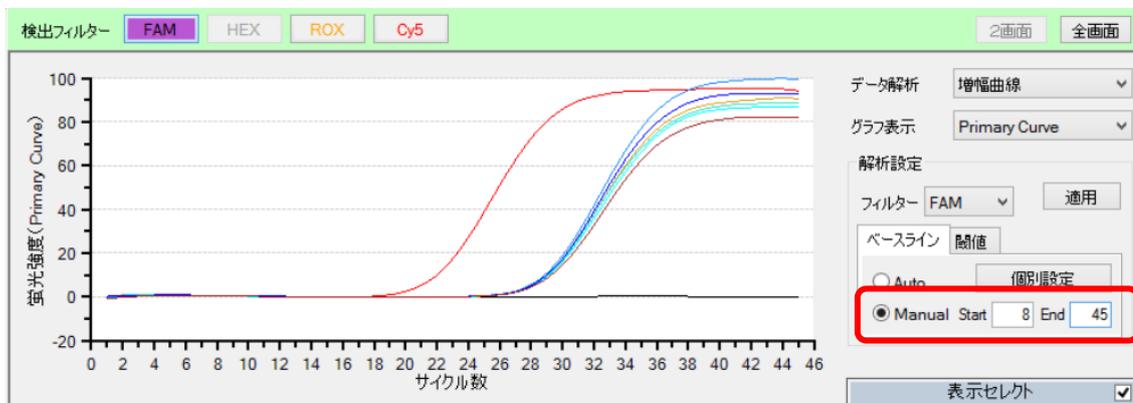


### 2 ベースライン領域の確認

- 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。

検出フィルター		FAM	HEX	ROX	Cy5	総合判定
A	OK					
B	OK					
C	Posi.					
D	Posi.					
E	Nega.					
F	Posi.					
G	Posi.					
H	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。

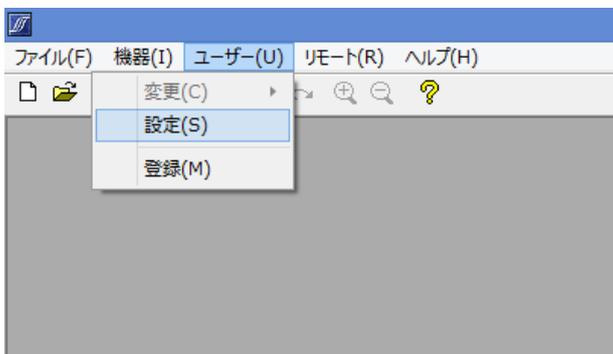
### <ソフトウェアと装置の終了>

- 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

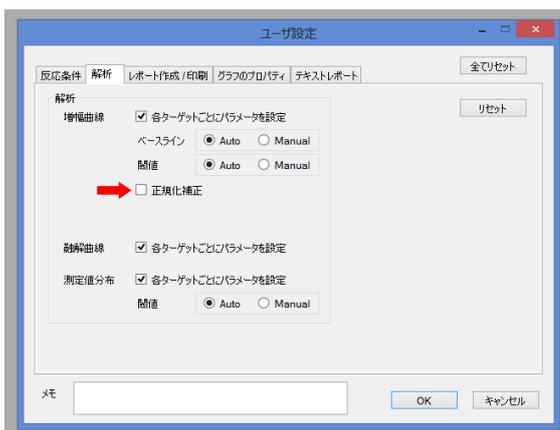
### A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C/3.01D)

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)。

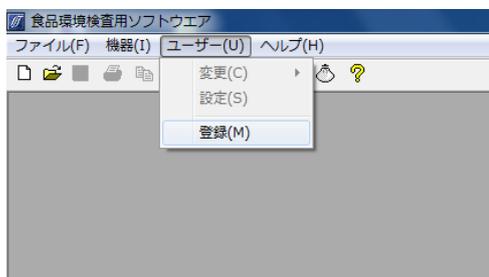
#### Software Ver. 3.01C



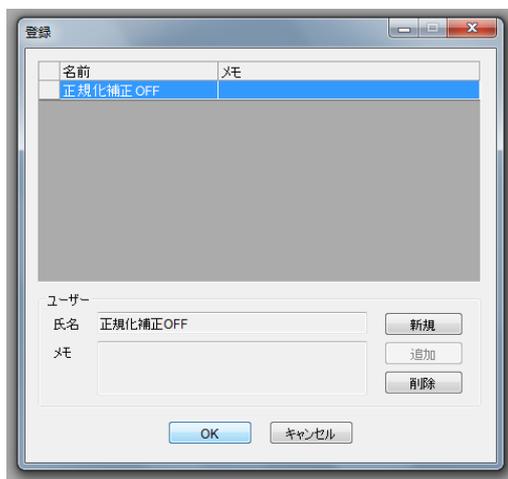
3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

## B. Thermal Cycler Dice Real Time System II の場合 (Software Ver. 2.11C)

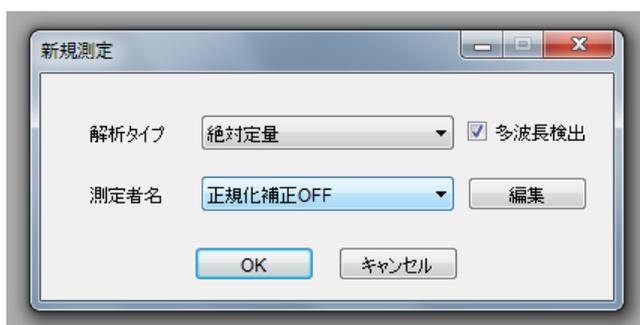
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



2. 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。



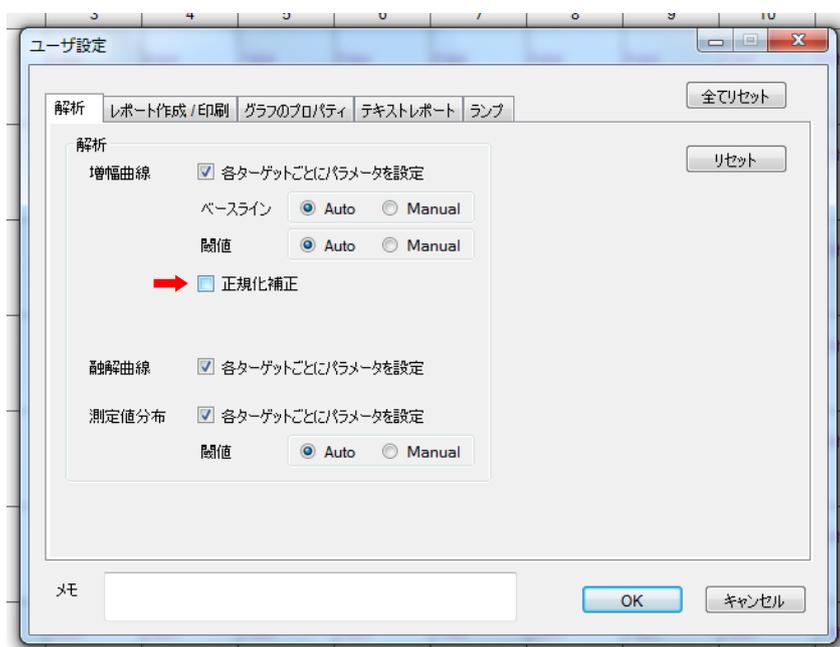
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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)。

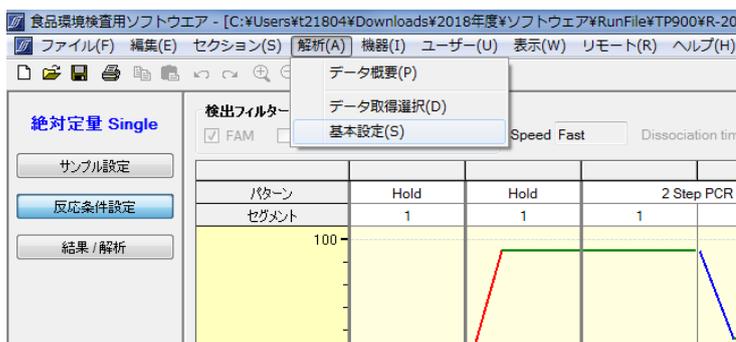


6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

### C. 上記以外の Software Ver.の場合 (III// 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) → 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)。



3. 左下の OK をクリックしウインドウを閉じる。