

Thermal Cyclers Dice Real Time Systemシリーズ

新型コロナウイルス検査のための操作マニュアル

—SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit （製品コード RC330A） Primer/Probe E484K (SARS-CoV-2) （製品コード RC345A）専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit （製品コード RC330A）、Primer/Probe E484K (SARS-CoV-2) （製品コード RC345A）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。

また、本装置は研究用機器であり、医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

※本製品を弊社リアルタイム PCR 装置 Thermal Cyclers Dice Real Time System シリーズでご利用になる場合には、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。

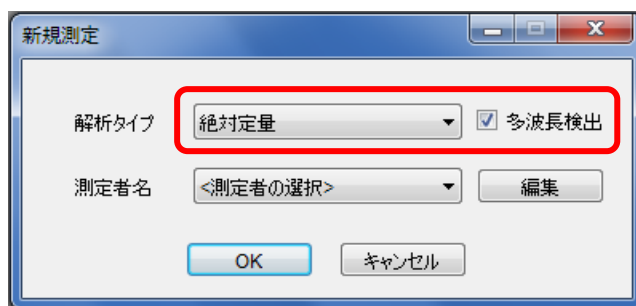
解除方法は巻末の「Appendix : Thermal Cyclers Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法」をご確認ください。

<装置とソフトウェアの起動>

- 1 Thermal Cyclers 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 解析タイプから絶対定量を選択する。
 - 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。

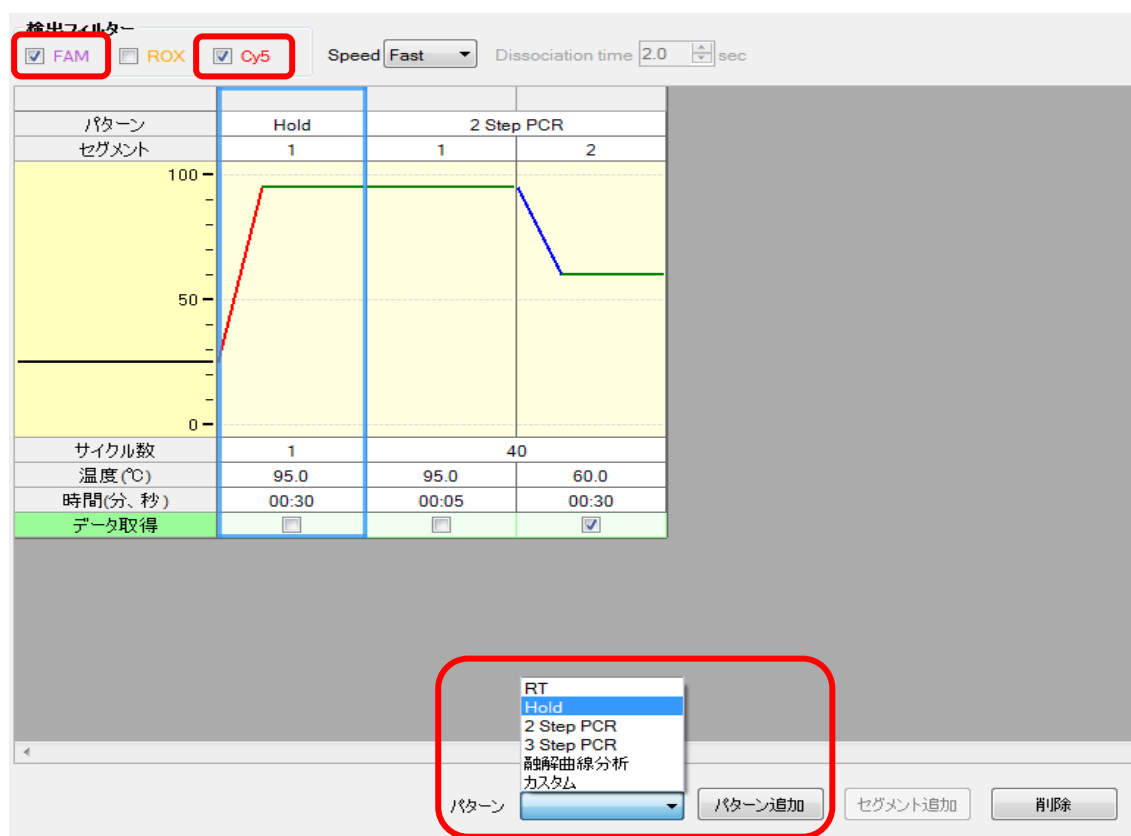


2 反応条件設定画面で PCR 条件を設定する。

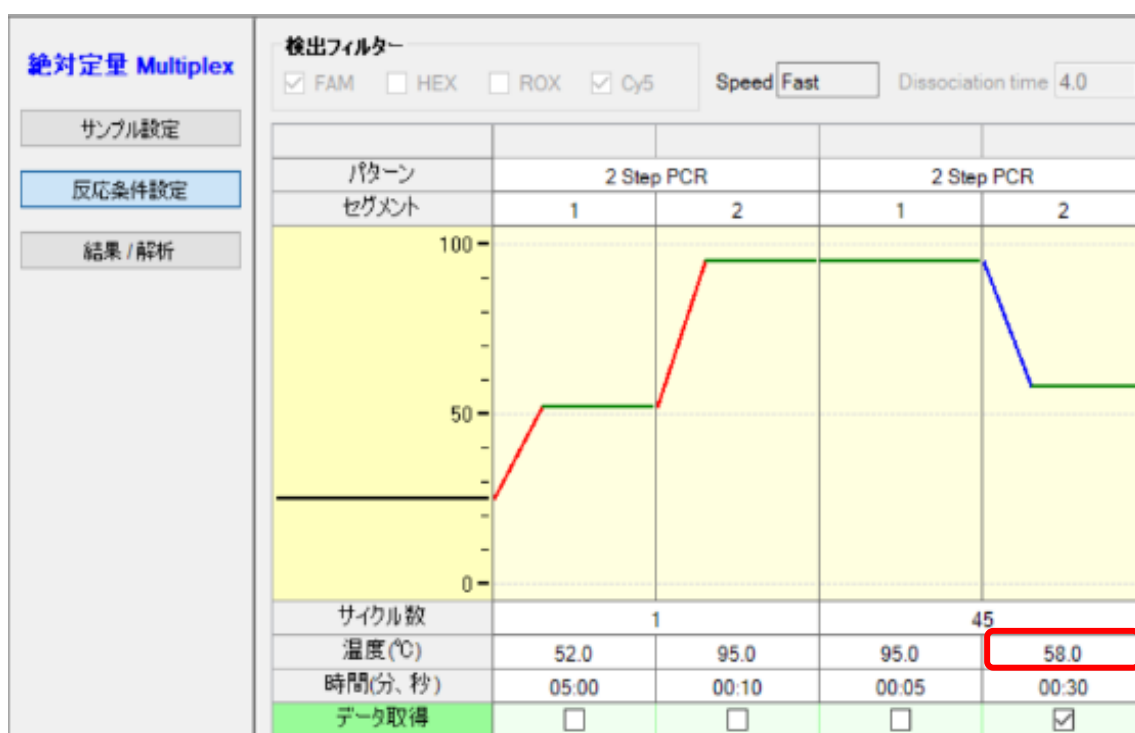
2.1 検出フィルターの「FAM」と「Cy5」にチェック✓を入れる

(ROX のチェック✓は外す)

2.2 Hold のパターンを 1 つ追加する。



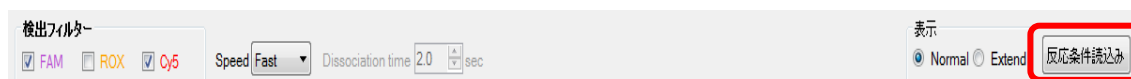
- 2.3 1つ目の Hold は、52℃、5 分の設定にする。
- 2.4 2つ目の Hold は、95℃、10 秒の設定にする。
- 2.5 2 Step PCR の条件が、95℃、5 秒と 58℃、30 秒である事を確認する。
- 2.6 2 Step PCR のサイクル数は 45 にする。
- 2.7 Speed の設定は、Fast を選択する。



※上図は、Thermal Cycler Dice Real Time PCR System III の設定例です。

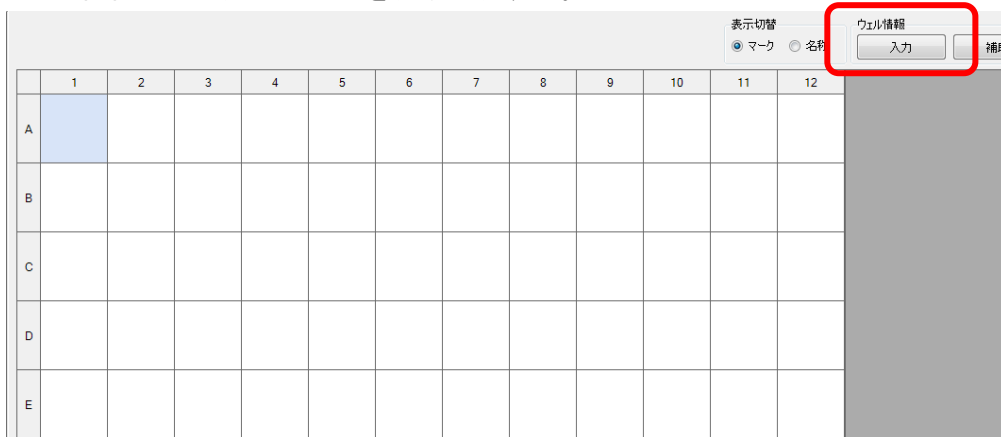
■他のランファイルからの設定読み込み

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。



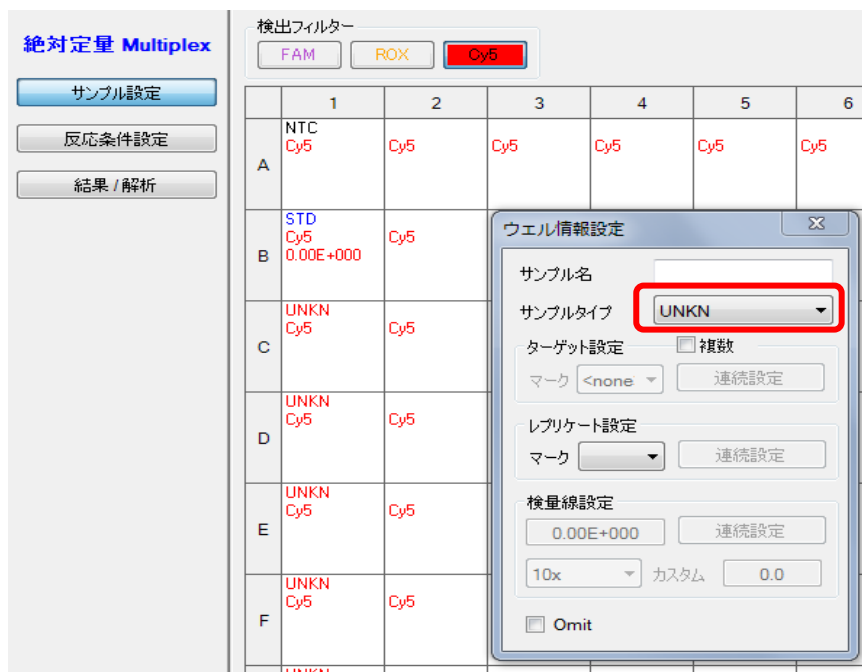
3 サンプル設定画面でサンプル情報を入力する (ラン途中またはラン終了後に行っても良い)。

3.1 画面右上の入力ボタンをクリックする。

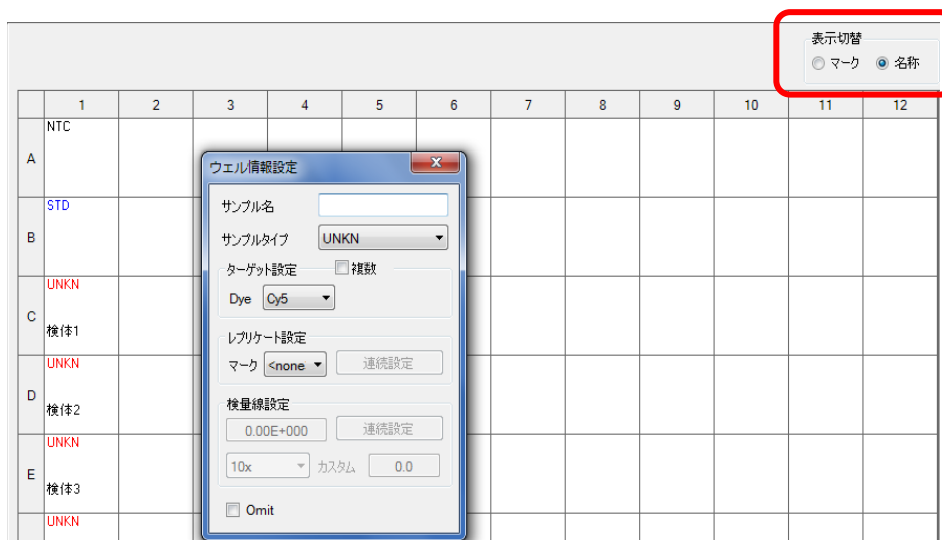


3.2 該当するウェルを選択し、サンプルタイプを選択する。

NTC : 陰性コントロール
 STD : 陽性コントロール
 UNKN : 検査対象サンプル



- 3.3 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。



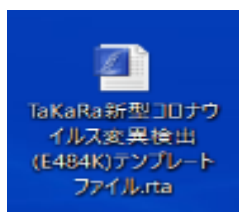
■他のランファイルからの設定読み込み

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。

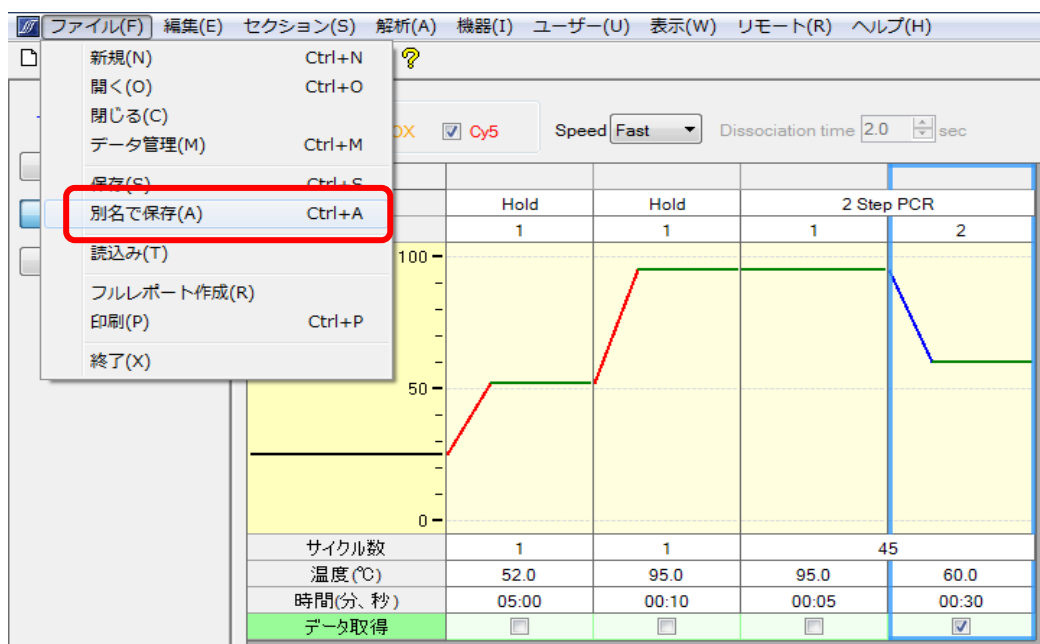


★テンプレートファイルの利用も可能です。

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下さい。必要に応じて設定を変更したうえでランを開始します。

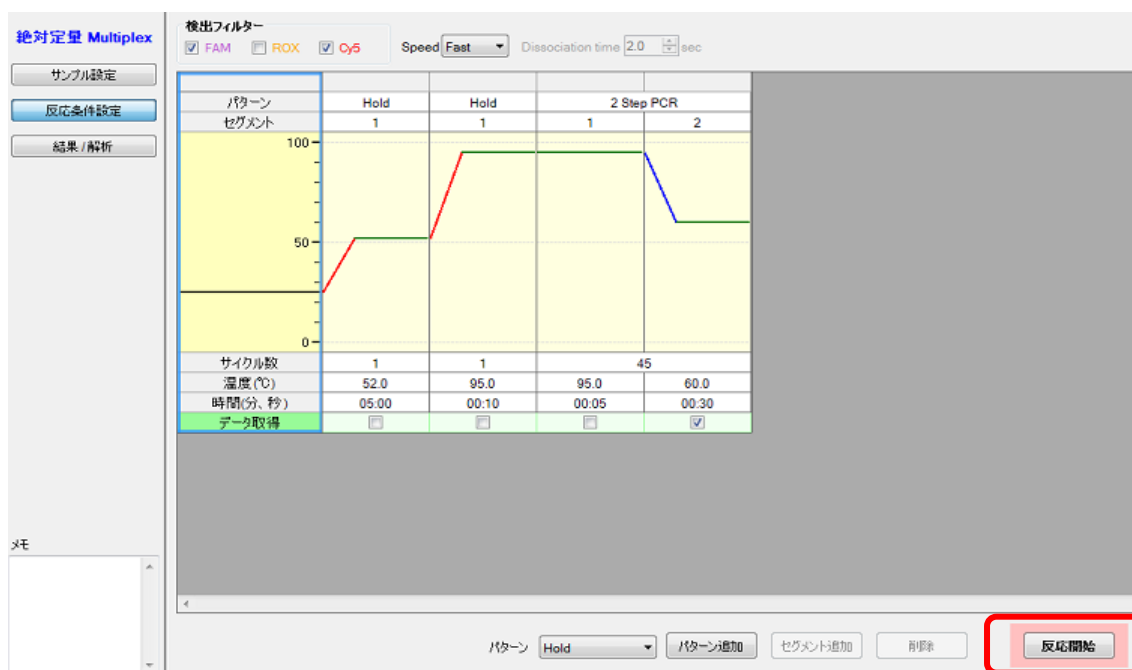


※テンプレートファイルは、使用する Thermal Cycler Dice Real Time System を制御する PC のみで利用可能です。別の装置制御用の PC へのファイル移動は避けてください。

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。

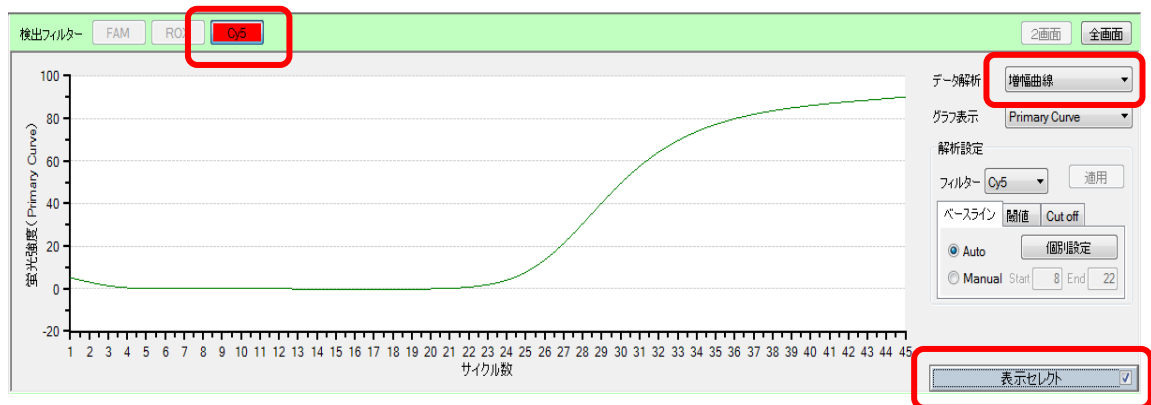
4.2 画面右下の反応開始ボタンをクリックしてランを開始する。



<結果の解析>

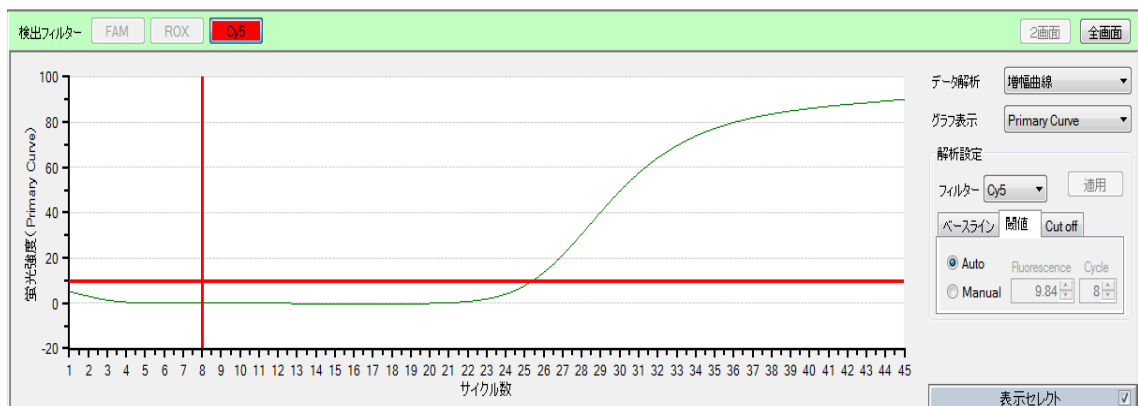
解析パラメーターの確認

- 1 増幅曲線を表示させる (E484K Mutant 検出系 (Cy5))
 - 1.1 検出フィルターの Cy5 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。

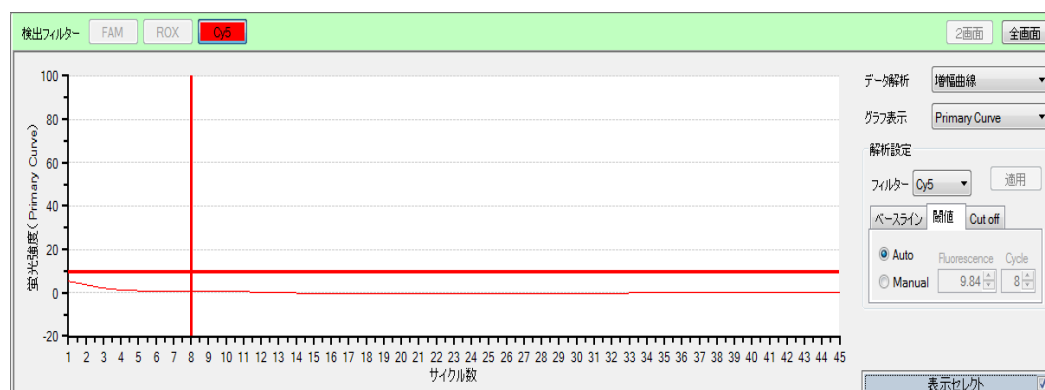


- 2 Positive Control (E484K Mutant、484E Wild) ・ Negative Control の確認 (Cy5)

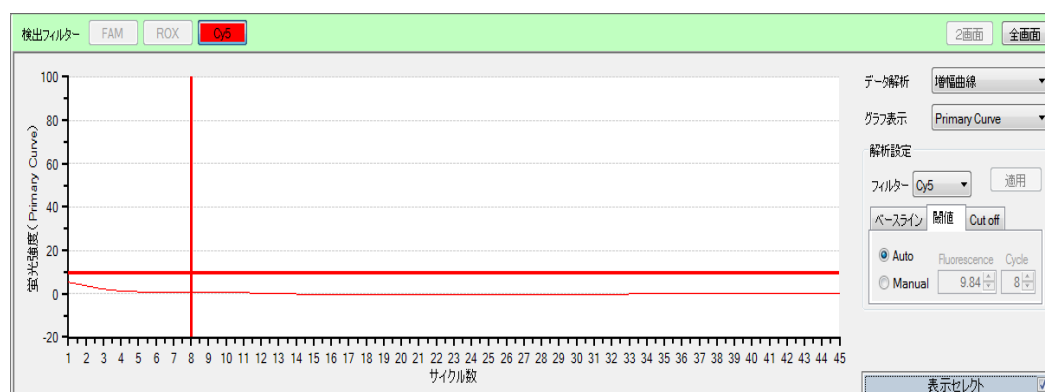
Positive Control (E484K Mutant)



Positive Control (484E Wild)



Negative Control



2.1 データ解析からテキストレポートを選択する。

検出フィルター

FAMHEXROXCy5

2.2 以下を確認する。

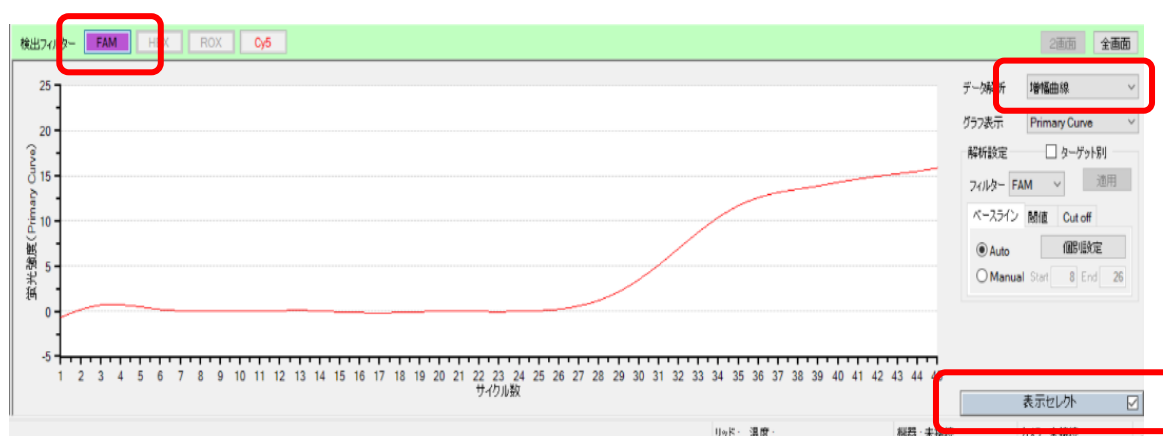
	Cy5 (E484K Mutant 検出系)
Negative Control	不検出
484E Wild Template	不検出
E484K Mutant Template	Ct $\leq$ 30

3 増幅曲線を表示させる (484E Wild 検出系 (FAM))

3.1 検出フィルターの FAM ボタンをクリックする。

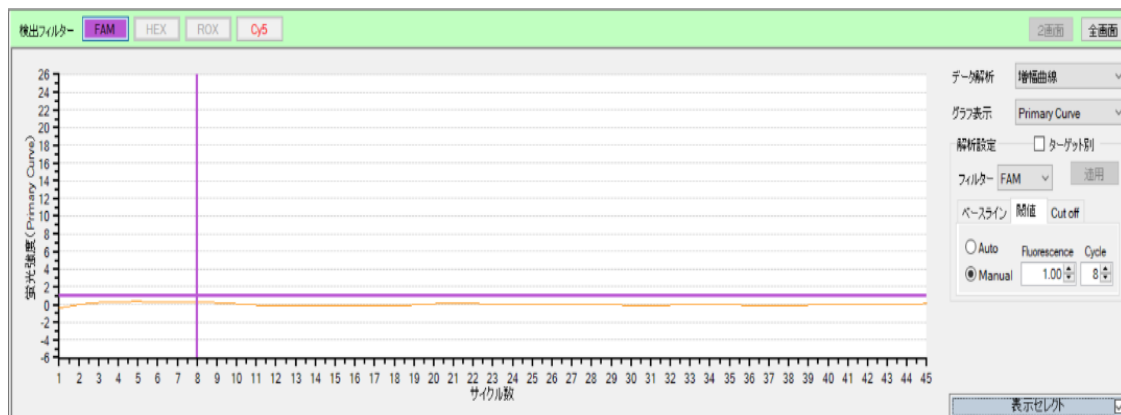
3.2 データ解析から増幅曲線を選択する。

3.3 表示セレクトで解析対象のウェルを選択する。

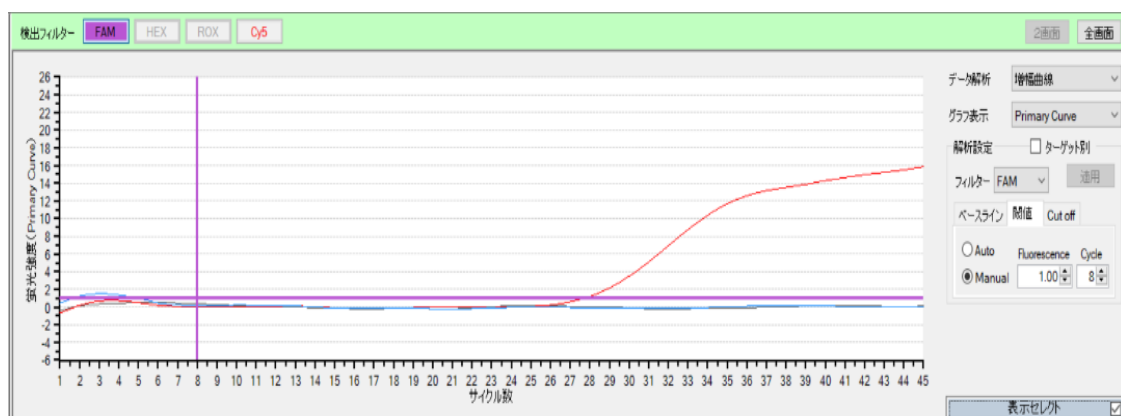


4 Positive Control (E484K Mutant、484E Wild)・Negative Control の確認 (FAM)

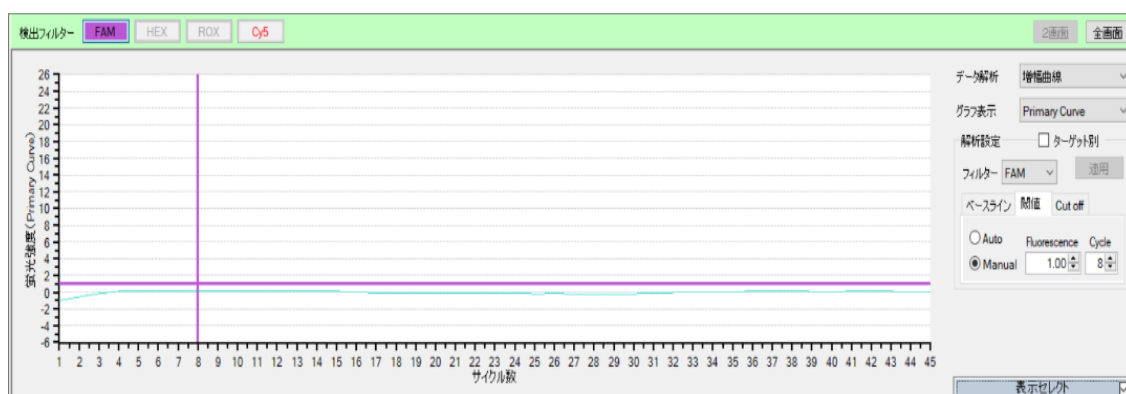
Positive Control (E484K Mutant)



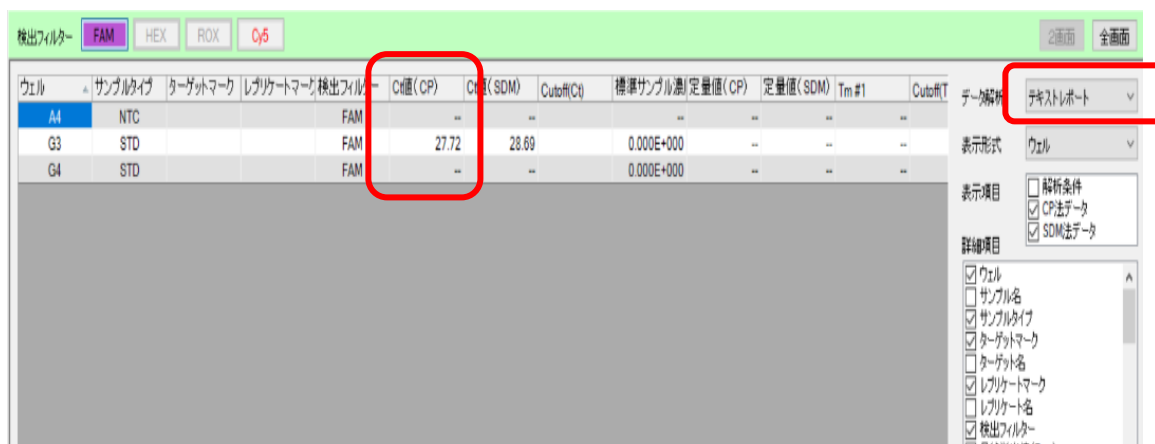
Positive Control (484E Wild)



Negative Control



4.1 データ解析からテキストレポートを選択する。

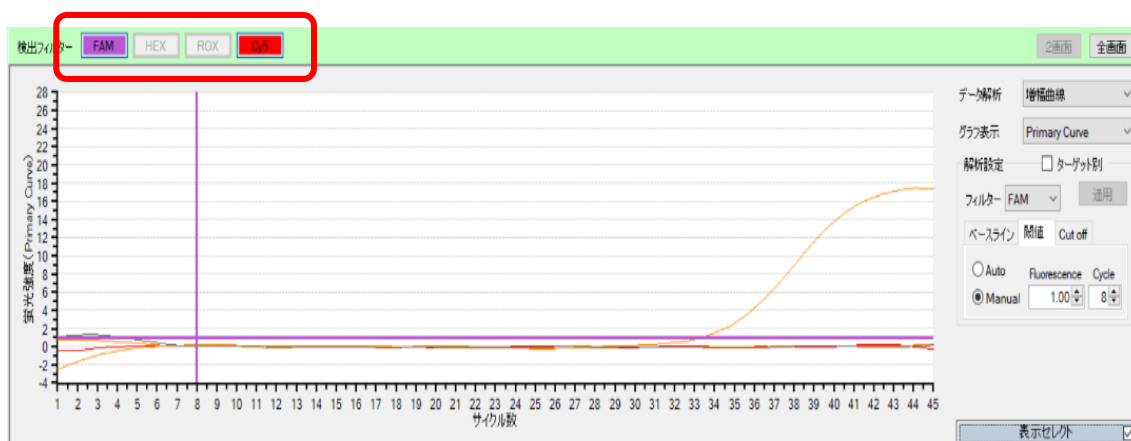


4.2 以下を確認する。

	FAM (484E Wild 検出系)
Negative Control	不検出
484E Wild Template	Ct ≤ 30
E484K Mutant Template	不検出

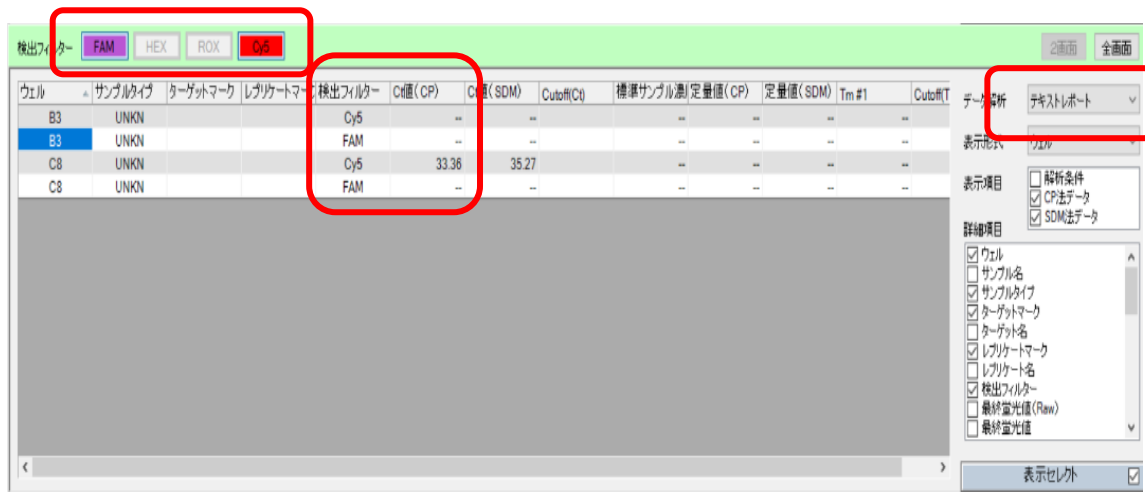
5 検体の結果確認

5.1 検体の増幅を確認する。



5.2 データ解析からテキストレポートを選択する。

5.3 Ct 値（CP）を確認する。



6 結果判定

以下のような判定を行う。

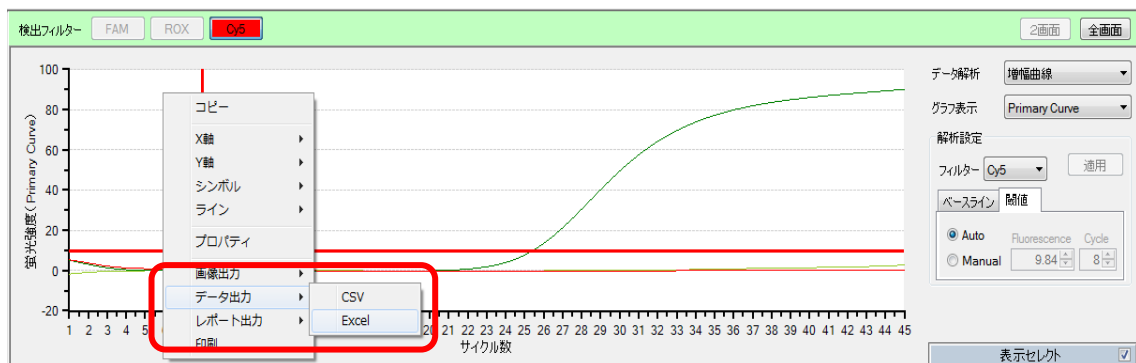
FAM (484E Wild 検出系)	Cy5 (E484K Mutant 検出系)	判定
Ct>40 または不検出	Ct≤40	E484K 変異あり
Ct≤40	Ct>40 または不検出	E484K 変異なし (Wild Type(484E))
Ct>40 または不検出	Ct>40 または不検出	判定不能

- 484E Wild 検出系、E484K Mutant 検出系共に Ct>40 または不検出であった場合は、判定不能です。予め PCR 検査で SARS-CoV-2 陽性であることを確認したサンプルを使用した場合、検出限界以下あるいは他の変異の可能性があります。SARS-CoV-2 の有無が未確認のサンプルを使用した場合、SARS-CoV-2 陰性の可能性があります。

7 解析結果の出力

(増幅曲線)

- 1 出力したいサンプルを選択し、画面上で、右クリックする。
- 2 データ出力から Excel か、レポート出力から Word・PowerPoint を選択する。



(テキストレポート)

- 1 出力したいサンプルを選択し、画面上で、右クリックする。
- 2 データ出力から Excel を選択する。

The screenshot shows a table with columns: 'ウェル' (Well), 'サンプルタイプ' (Sample Type), 'レプリケートマーク' (Replicate Mark), '検出フィルター' (Detection Filter), 'Ct値 (CP)' (Ct Value (CP)), 'Ct値 (SDM)' (Ct Value (SDM)), '結果 (F)' (Result (F)), '判定 (F)' (Judgment (F)), '結果 (CP)' (Result (CP)), '判定 (CP)' (Judgment (CP)), and '結果 (SD)' (Result (SD)). The table contains data for samples D5, D6, and D7. A context menu is open over the table, showing options like 'コピー', 'ウェルの並べ方' (Well Arrangement), 'データ出力' (Data Output), and 'レポート出力' (Report Output). The 'データ出力' option is highlighted, and a sub-menu is open showing 'CSV' and 'Excel'.

ウェル	サンプルタイプ	レプリケートマーク	検出フィルター	Ct値 (CP)	Ct値 (SDM)	結果 (F)	判定 (F)	結果 (CP)	判定 (CP)	結果 (SD)
D5	UNKN		Cy5	--	--	--	Nega.	--	Nega.	--
D6	PC		Cy5	25.42	25.37	+	OK	+	OK	+
D7	NC		Cy5	--	--	--	OK	--	OK	--

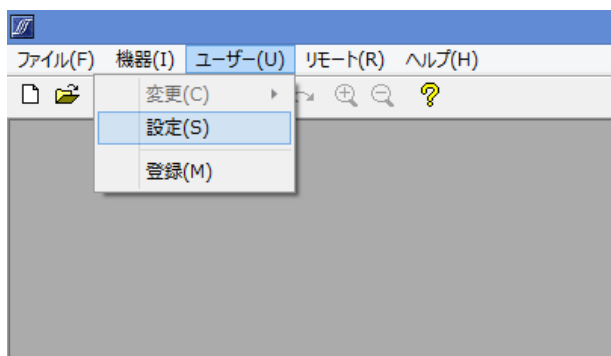
<ソフトウェアと装置の終了>

- 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。

Appendix1 : Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法

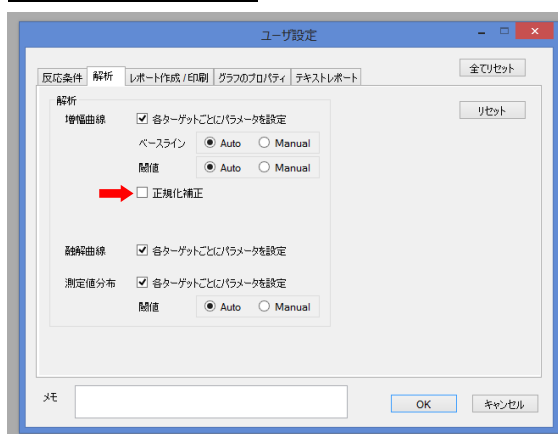
A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C/3.01D)

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)。

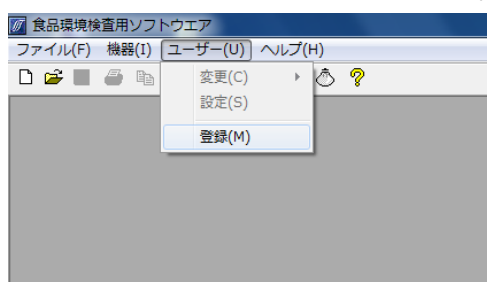
Software Ver. 3.01C



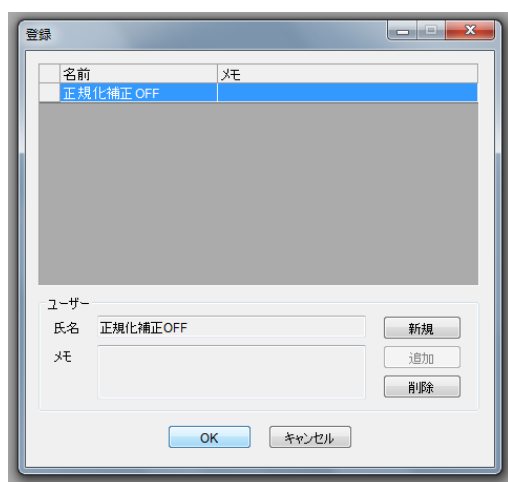
3. 右下の OK をクリックしウィンドウを閉じる。

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

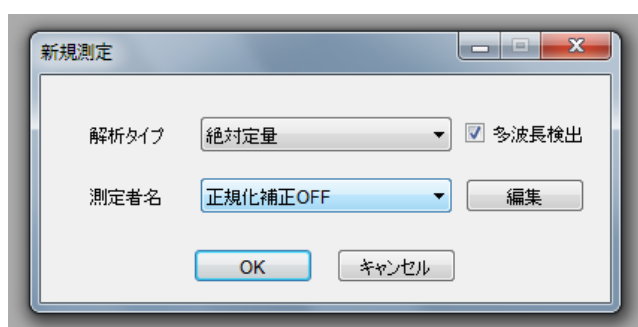
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



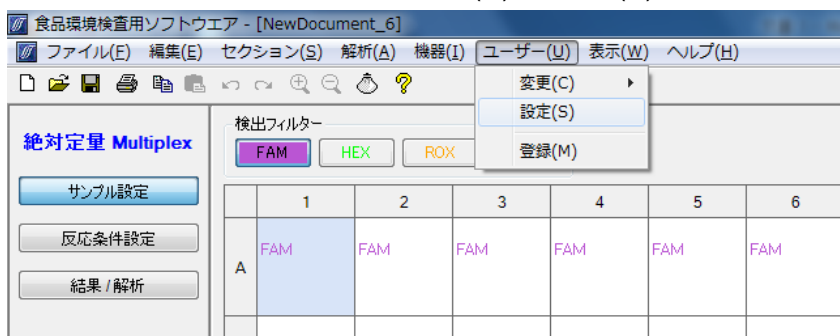
2. 新規 → 適当なユーザー名を入力（例：正規化補正 OFF）→ 追加の順に操作し、上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックしウィンドウを閉じる。



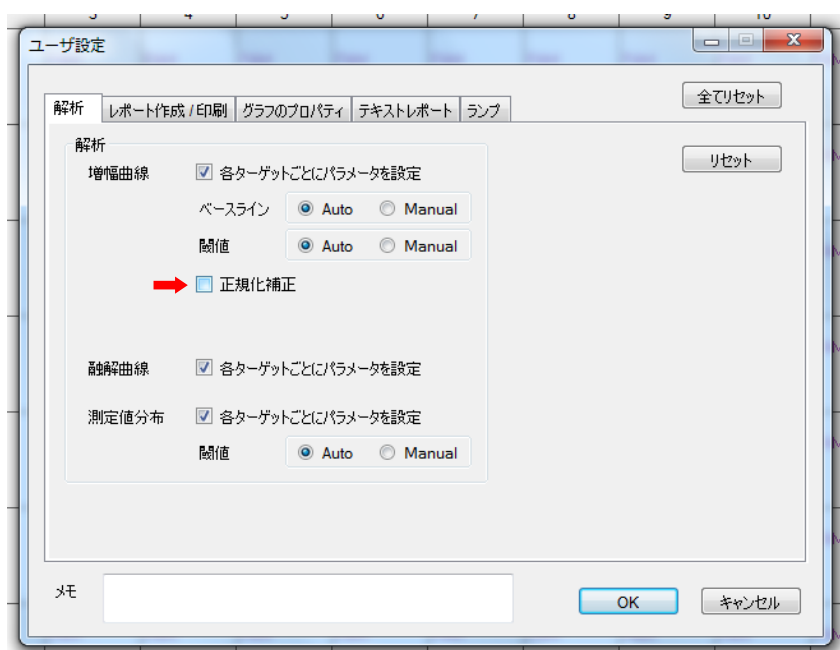
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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）。

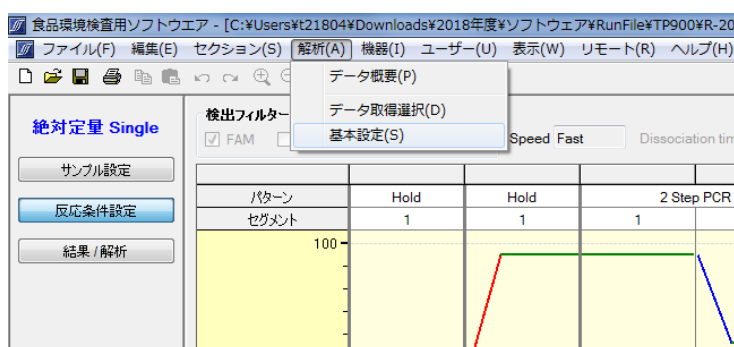


6. 右下の OK をクリックしウィンドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

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) → 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。