Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ 操作マニュアル

ーSARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（RC390A）専用ー

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater（製品コードRC390A、以下本製品）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。

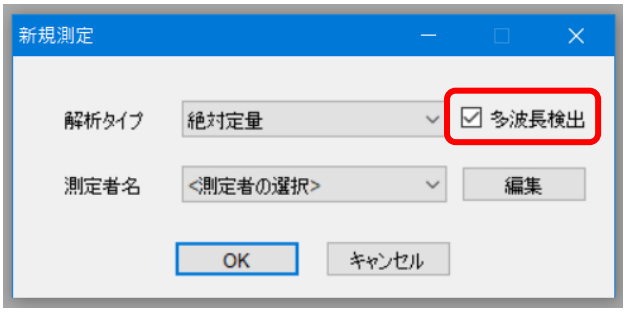
※本製品を弊社リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズでご使用になる場合には、巻末の「Appendix：Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法」に従って、正規化補正を解除したのち解析を行ってください。正規化補正の有無により、増幅曲線の形状や Ct 値に差が生じることがあります。

＜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＞

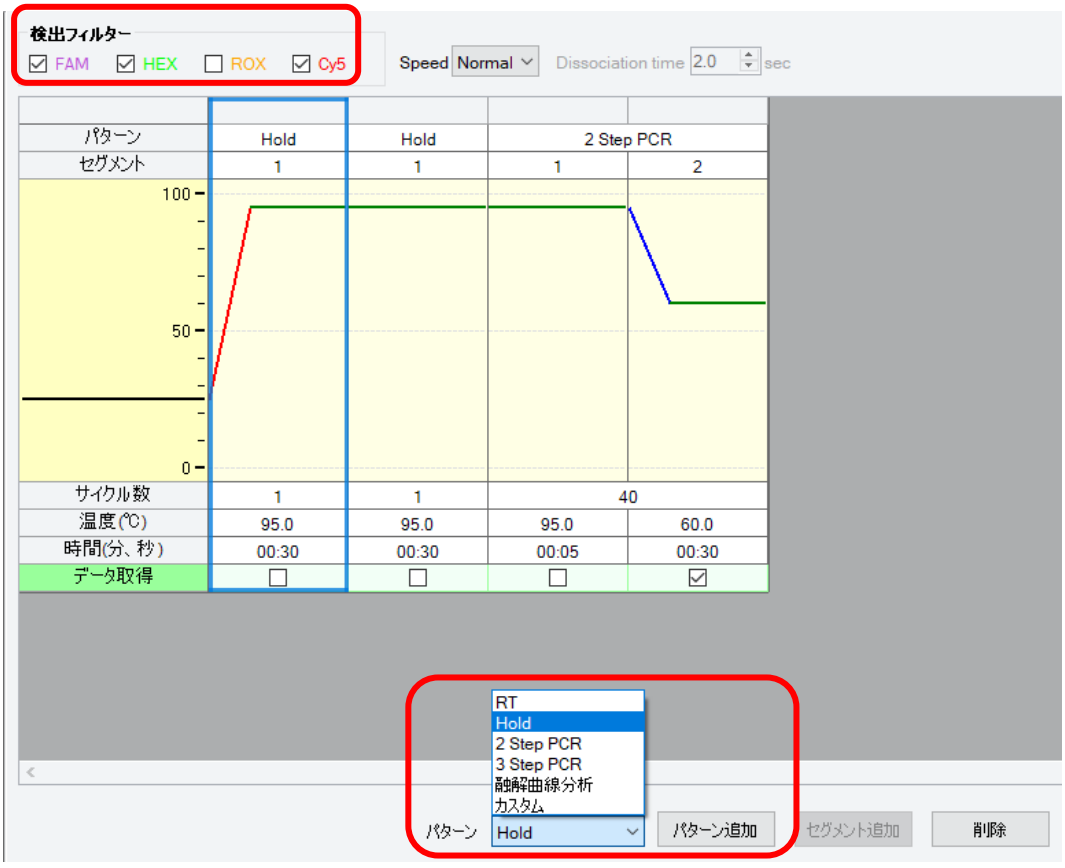
1　ランファイルを新規作成する。
　1.1　解析タイプから絶対定量を選択する。
　1.2　多波長検出にチェック✔を入れる。
　1.3　OK ボタンをクリックする。



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、HEX、Cy5 にチェック✔を入れる。

2.2　Hold のパターンを 1 つ追加する（下図参照）。



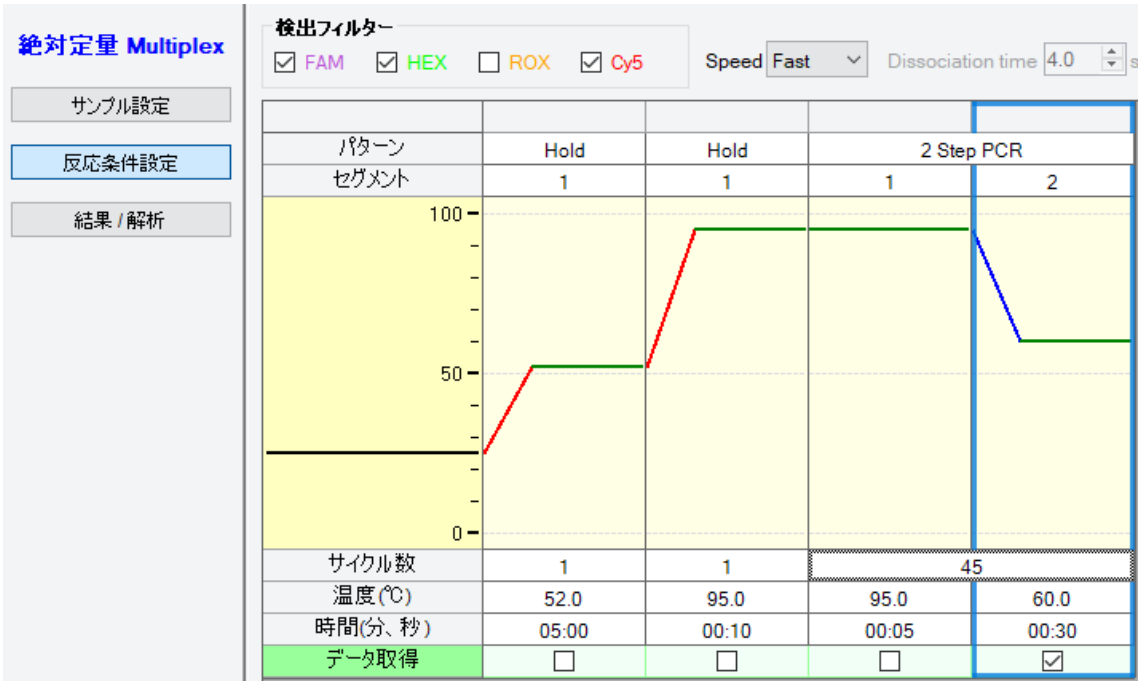
2.3　1 つ目の Hold は、52℃、5 分の設定にする。

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 60℃、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。



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。

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）。

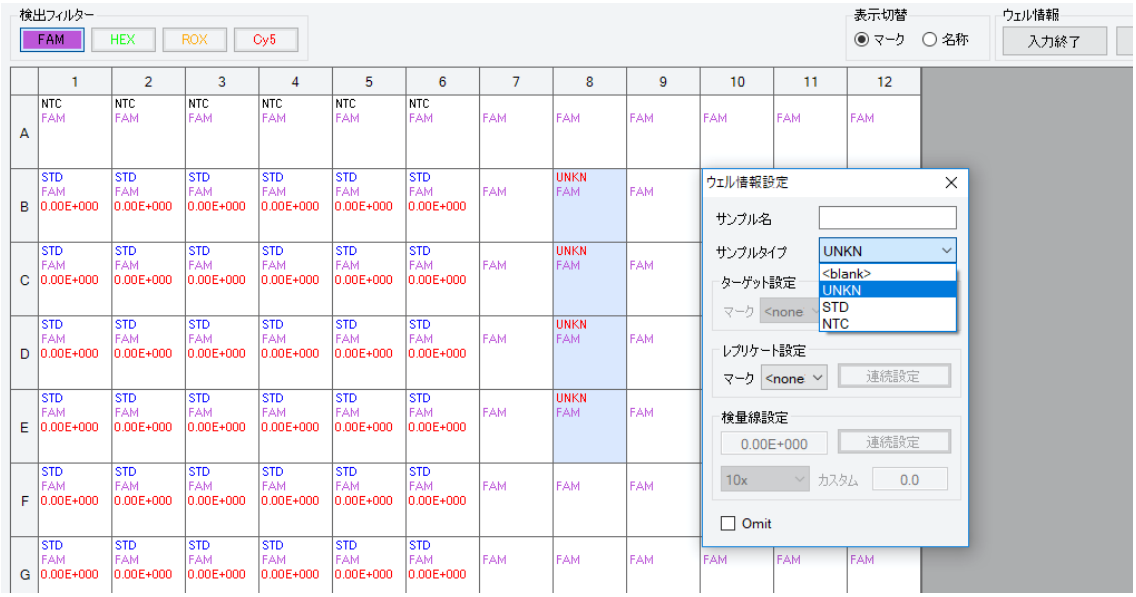
3.1　画面右上の入力ボタンをクリックする。

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

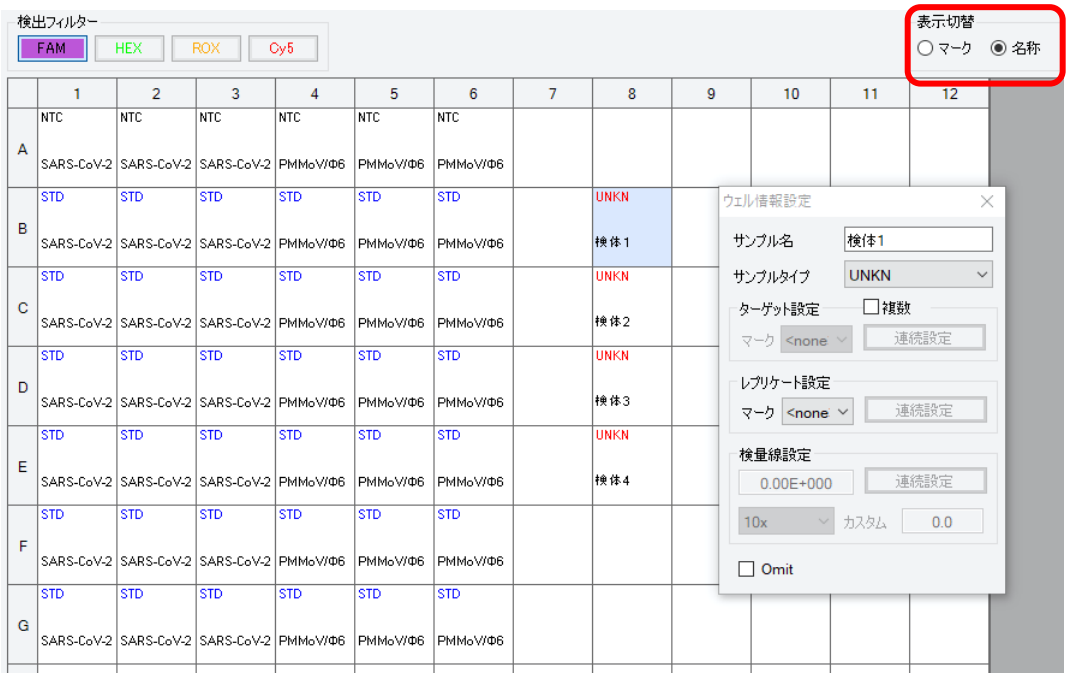
STD：　　陽性コントロール

UNKN：　　検査対象サンプル



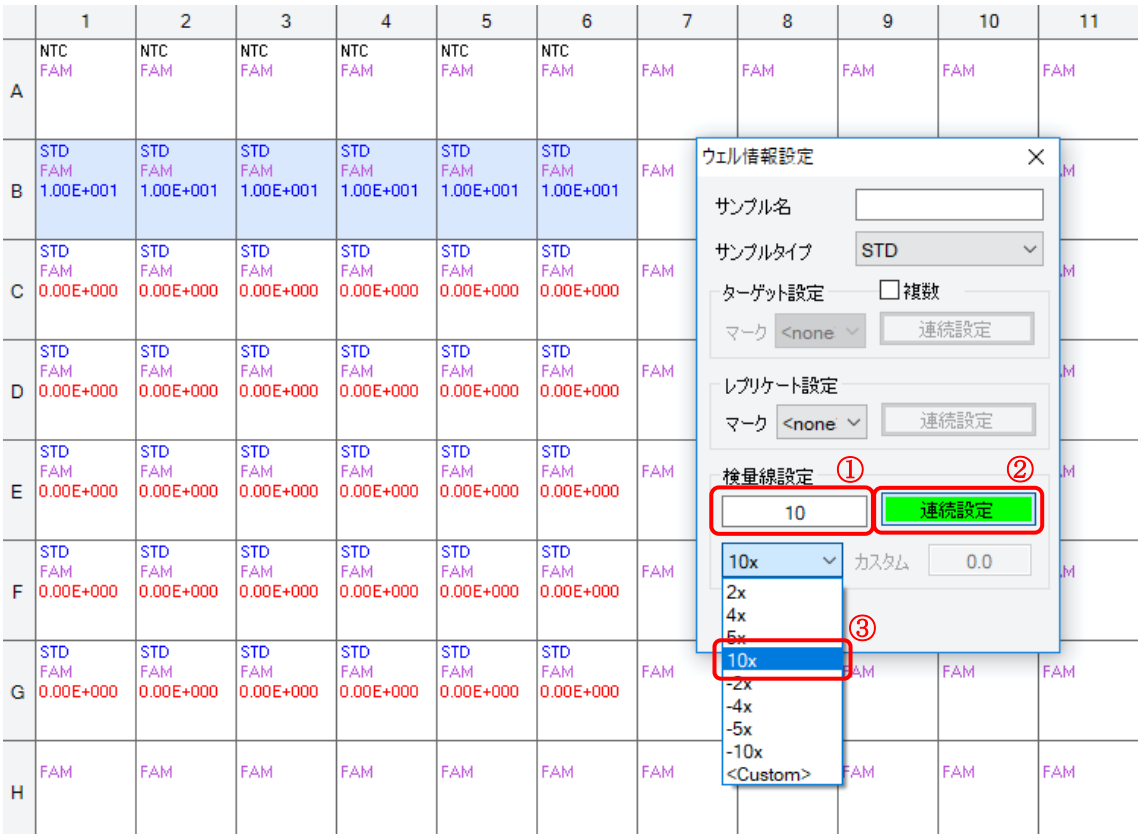
3.3　必要に応じてサンプル名を入力する（省略可能）。

表示切替の「名称」を選択すると下のような表示になる。

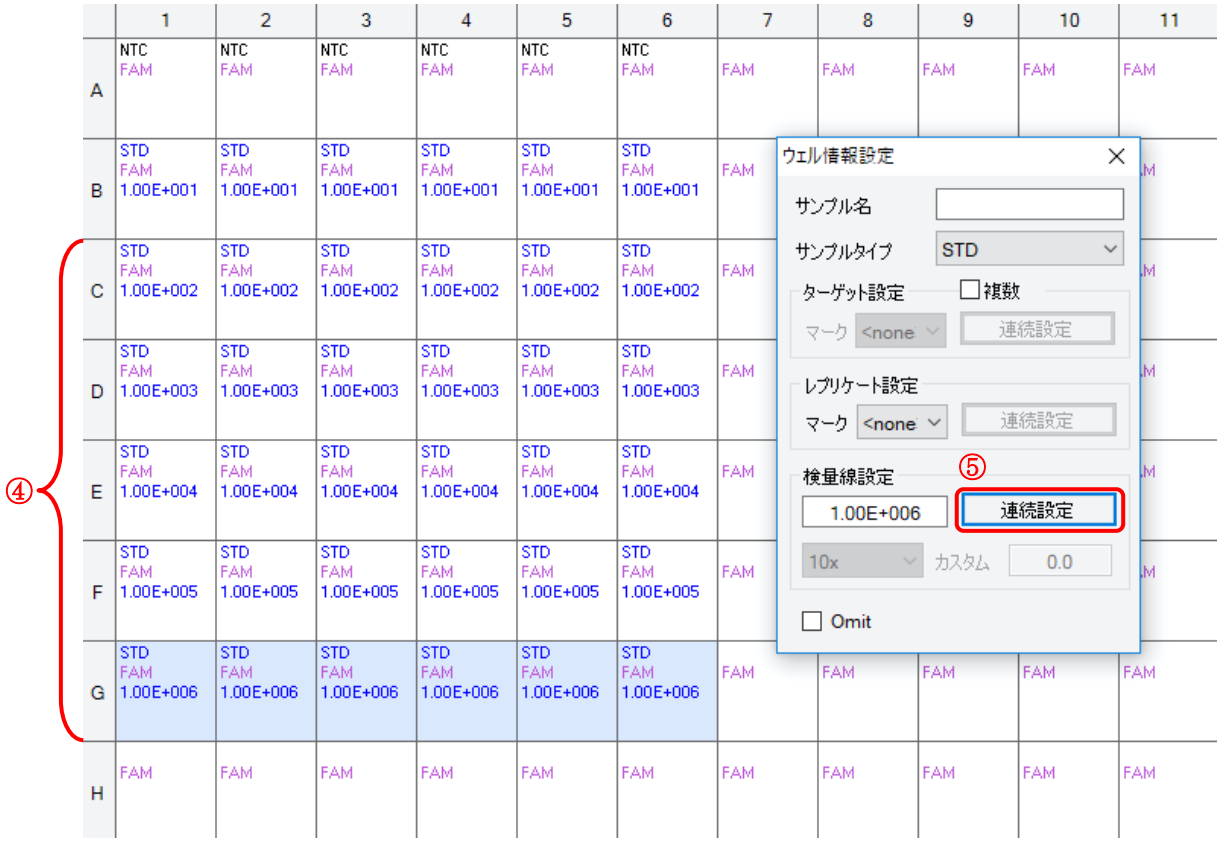


＜検量線を設定する場合の手順＞

1) STD としたウェルのうち、2×10^0 copies/μl の陽性コントロールを添加するウェルを選択し、「10」（1 反応当たりのコピー数）を入力する（①）。
2) 「連続設定」をクリックする（②）。
3) プルダウンより「10x」を選択する（③）。



4) 2×10^1 copies/μl の陽性コントロールを添加するウェルを選択する。
5) 続けて、2×10^5 copies/μl まで順番に 6 段階の鋳型濃度を設定する（④）。
6) 「連続設定」をクリックし、解除する（⑤）。



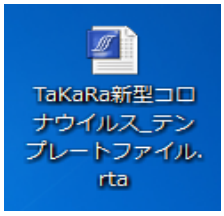
■他のランファイルからの設定読み込み

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。

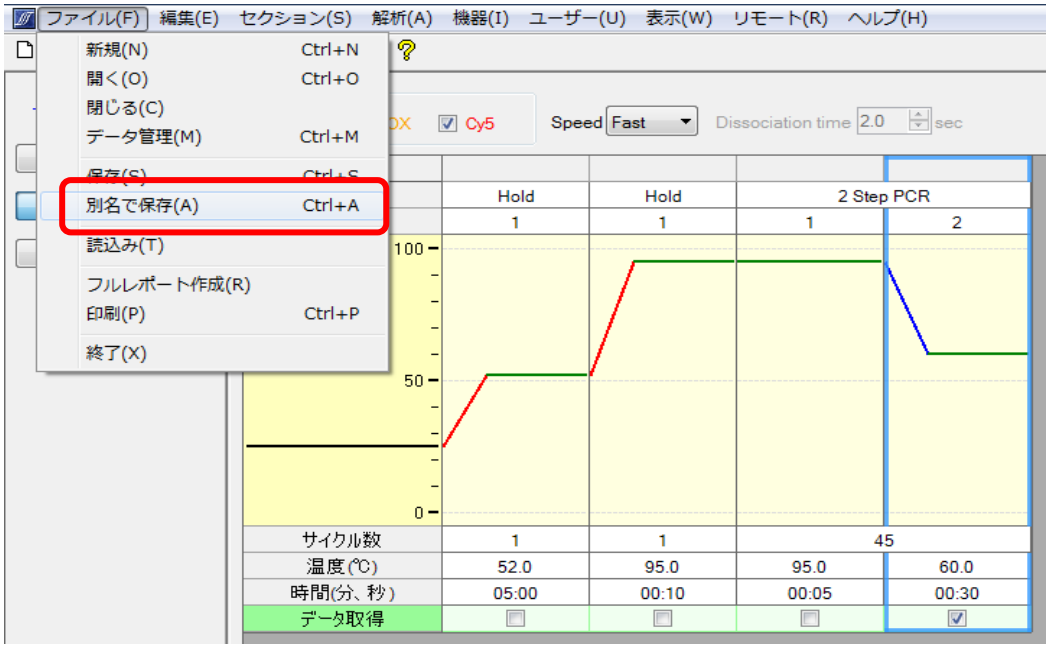
★テンプレートファイルの利用も可能です。

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。

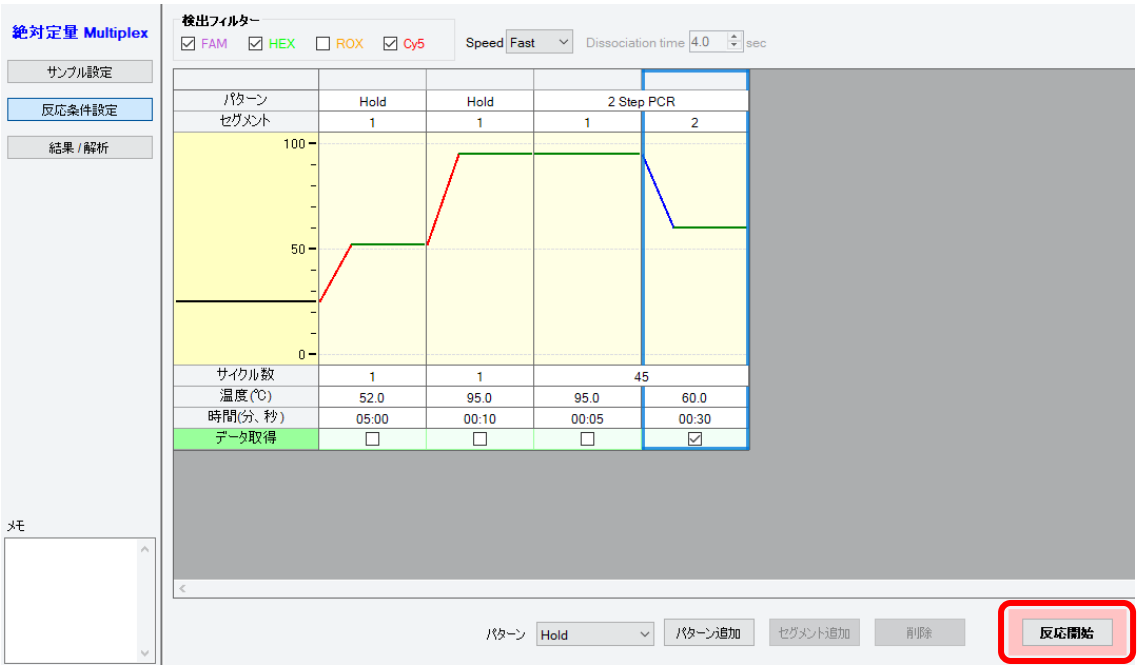


※テンプレートファイルは、使用する Thermal Cycler Dice Real Time System を制御する PC のみで利用可能です。別の装置制御用の PC へのファイル移動は避けてください。

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＞

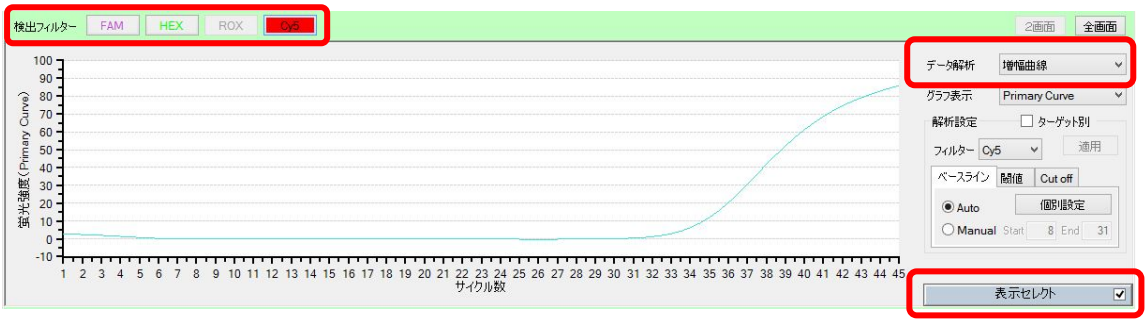
解析パラメーターの確認

1　増幅曲線を表示させる

1.1　検出フィルターの FAM、HEX、Cy5 ボタンのいずれかをクリックする。

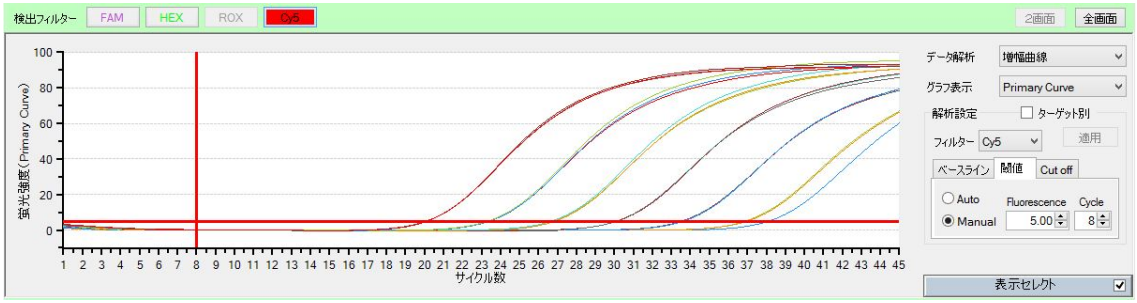
1.2　データ解析から増幅曲線を選択する。

1.3　表示セレクトで解析対象のウェルを選択する。

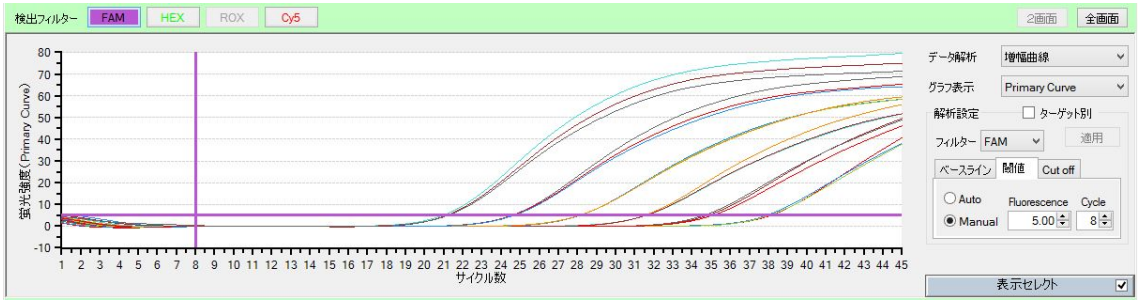


2　陽性コントロール・陰性コントロールの確認

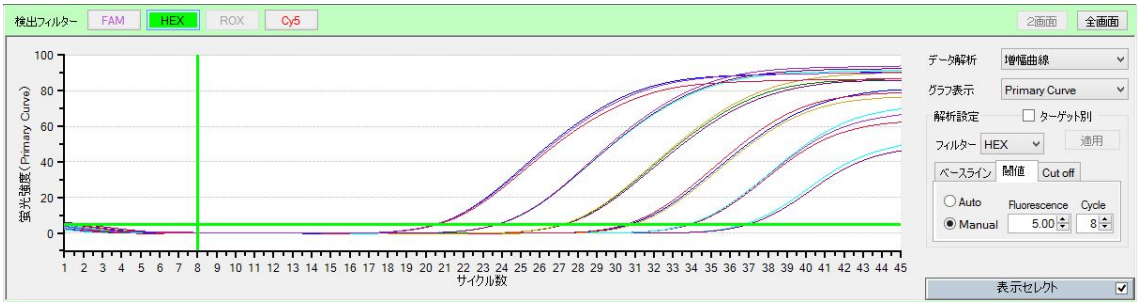
Cy5：陽性コントロール（SARS-CoV-2）



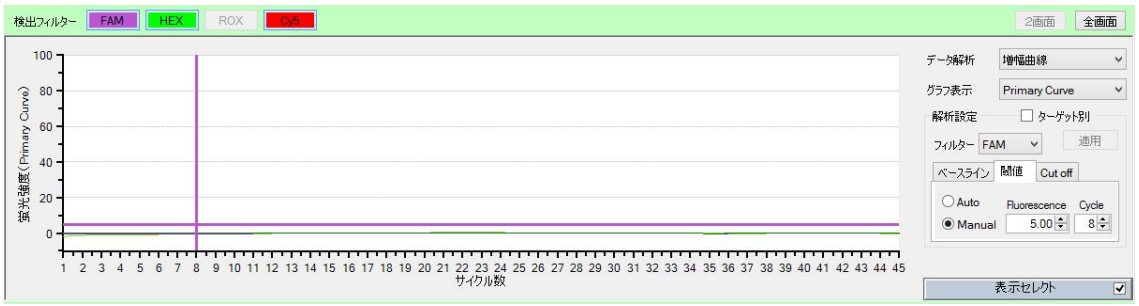
FAM：陽性コントロール (PMMoV)



HEX：陽性コントロール (φ6)



陰性コントロール

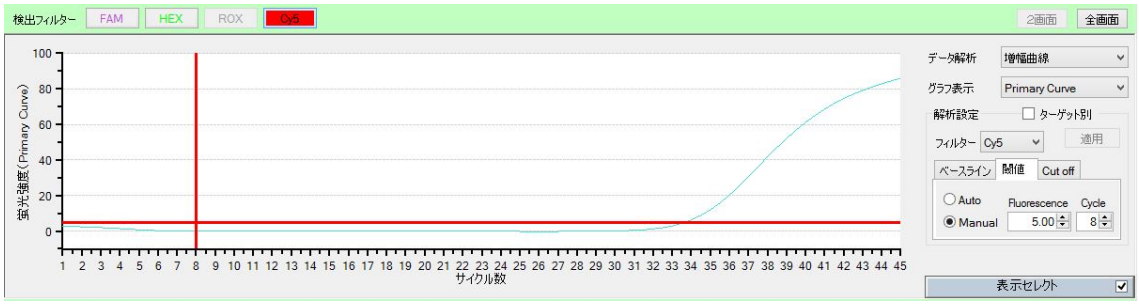


2.1　データ解析からテキストレポートを選択する。

2.2　検出フィルターを適宜選択し、それと対応する陽性コントロールの Ct 値 (CP) が得られていること、さらに陰性コントロールは、(Ct ≧ 40 または) 不検出であることを確認する。詳細は取扱説明書を参照のこと。

3　検体の結果確認

3.1　データ解析から増幅曲線を選択し、検体の増幅を確認する。



3.2　データ解析からテキストレポートを選択する。

3.3　Ct 値（CP）を確認する。

4　結果判定

＜定量解析の場合＞

・各種スタンダード（陽性コントロール段階希釈液）の Ct 値を基に、N 遺伝子および PMMoV（／φ6）の検量線をそれぞれ作成する。サンプル RNA を添加した各ウェルの Ct 値と、作成した検量線から定量値を算出する。その他、詳細は「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」（公益社団法人日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース、2021 年 3 月発行）を参照のこと。

＜定性解析の場合＞

Cy5（N 遺伝子）	FAM（PMMoV）	HEX（φ6）*	判定結果（SARS-CoV-2）
＋	＋／－	＋／－	陽性
－	＋	＋	検出限界以下
－	－	－	判定不能

・N 遺伝子が検出された場合は、PMMoV（／φ6）の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。詳細は取扱説明書を参照のこと。

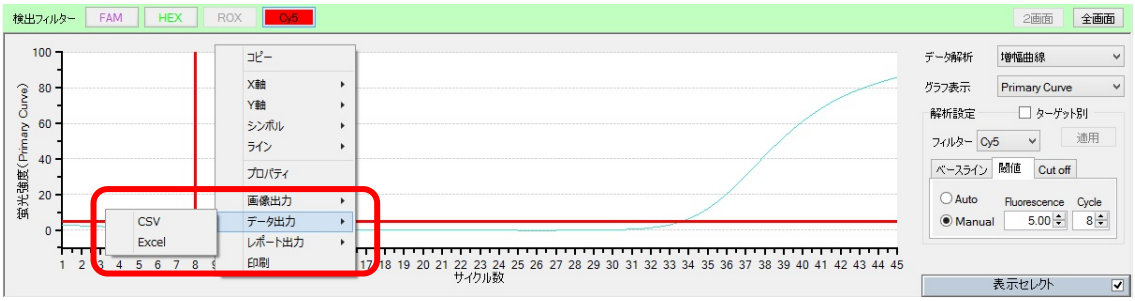
＊：HEX（φ6）はφ6 を下水試料にスパイクした場合に確認する。

5　解析結果の出力

（増幅曲線）

5.1　出力したいサンプルを選択し、画面上で、右クリックする。

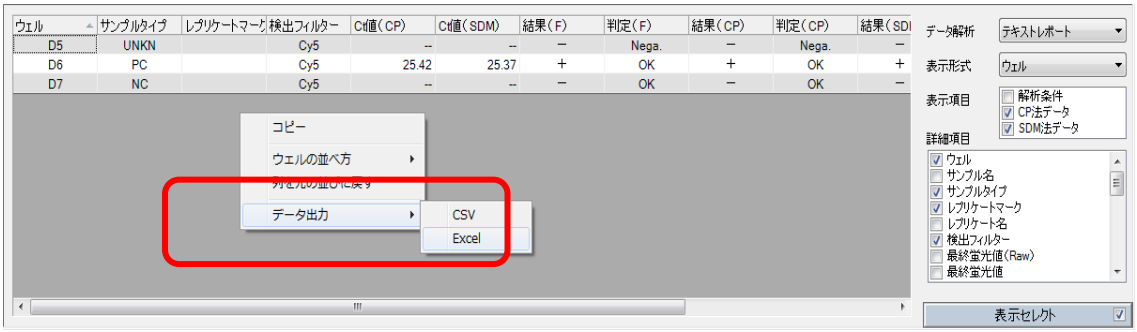
5.2　データ出力から Excel か、レポート出力から Word・PowerPoint を選択する。



（テキストレポート）

5.3　出力したいサンプルを選択し、画面上で、右クリックする。

5.4　データ出力から Excel を選択する。



＜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。

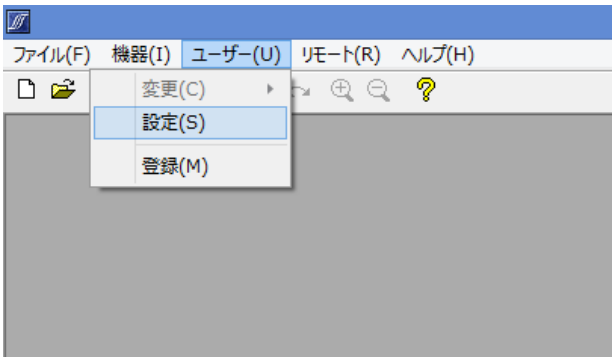
2　コンピューターを終了させて、電源を切る。

3　Thermal Cycler Dice Real Time System 本体の電源を切る。

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

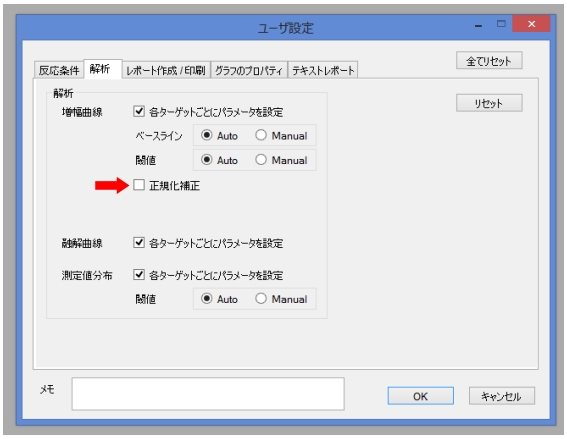
A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合（Software Ver. 3.01C/3.01D）

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）。

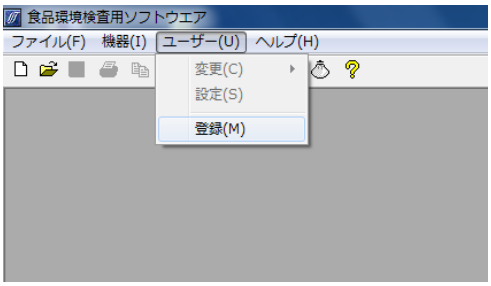
Software Ver. 3.01C



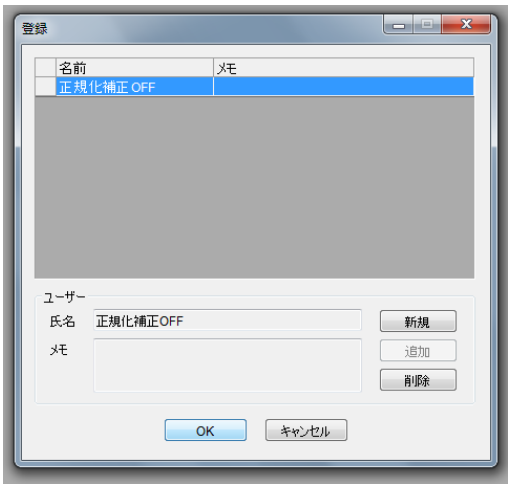
3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

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

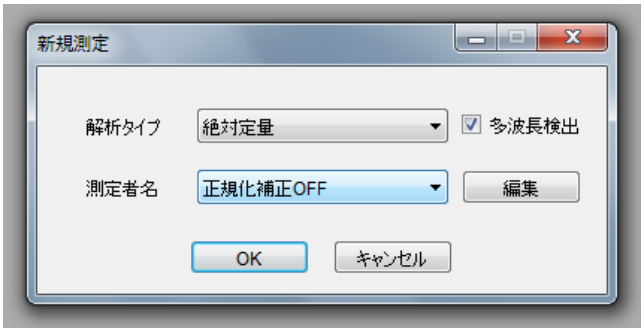
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



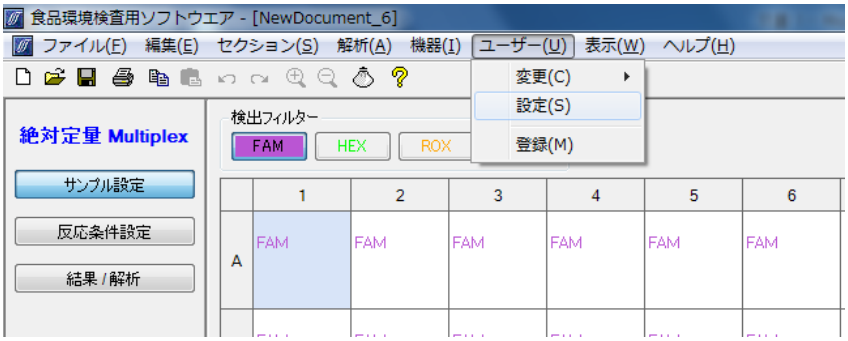
2. 新規 → 適当なユーザー名を入力（例：正規化補正 OFF）→ 追加の順に操作し、上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックしウインドウを閉じる。



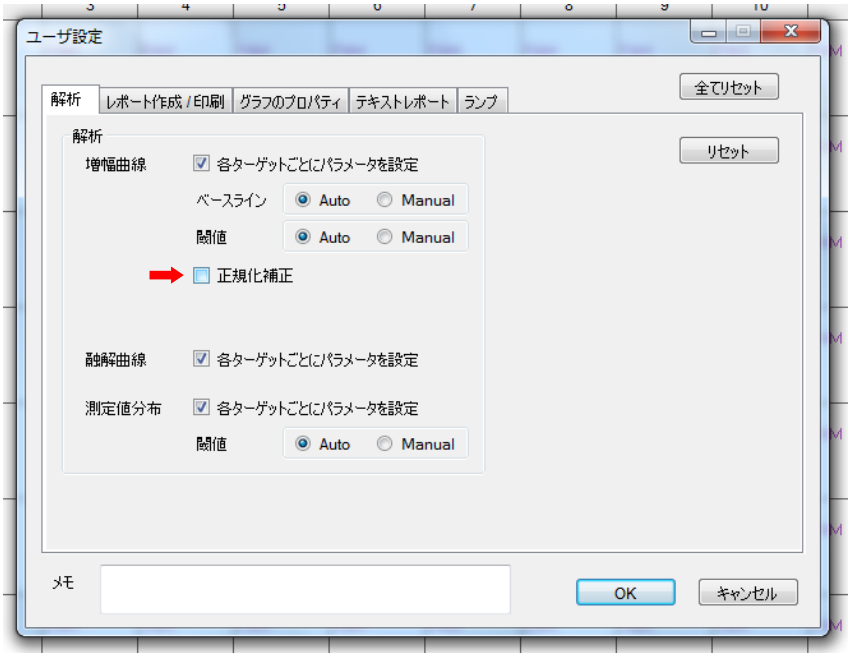
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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）。

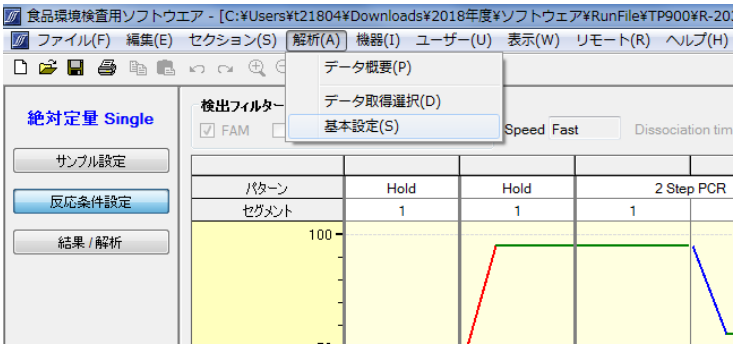


6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

C. 上記以外の Software Ver.の場合（III／*II*／*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。