Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ 腸管系病原細菌検査のための操作マニュアル – TaKaRa 腸管系病原細菌検出キット Ver.3 (RR177A) 専用 –

このマニュアルでは、TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット Ver.3 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。

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 OK ボタンをクリックする。

新規測定	_ _ X
解析タイプ	〔絶対定量 ▼〕 🔲 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 にチェック ✔ を入れる (ROX のチェック ✔ を外す)。
 - 2.2 Speed は Fast を選択する。
 - 2.3 Hold は、94℃、30秒の設定にする。
 - 2.4 2 Step PCR のサイクル数を 45 に変更する。
 - 2.5 2 Step PCR のセグメント1を 90°C、1 秒に設定する。
 - 2.6 <Thermal Cycler Dice Real Time System III / *Lite* の場合> 2 Step PCR のセグメント 2 を 63℃、10 秒に設定する。
 - <Thermal Cycler Dice Real Time System IIの場合>

```
2 Step PCR のセグメント 2 を 63℃、5 秒に設定し、<u>データ取得のノを外す</u>。
```

2.7 融解曲線分析のパターンを追加する。

タカラバイオ(株)

- 2.8 融解曲線分析のセグメント2の温度を68℃に変更する。
- 2.9 融解曲線分析のセグメント3の温度を90℃に変更する。



<Dice III/Liteの場合の設定>





■他のランファイルからの PCR 条件設定読み込み

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	
ex	FAM ROX	Speed Fast Dissociation time 4.0 sec	Normal O 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(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

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NTC	STD 0.00E+000	STD 0.00E+000	STD 0.00E+000	・ ウェル情 ーサンプル	報設定	1	
в	NTC	STD 0.00E+000	STD 0.00E+000	STD 0.00E+000	ー サンブル ーターゲッ	タイプ < 小設定	blank> □ 複数	
с	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	Dye ーレプリク	<none> ▼</none>		÷
D	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	·検量約	武定 10E+000 10E+000		定

- 3.3 必要に応じてレプリケート設定を行う(省略可能)。
- 3.4 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」を選択すると下図のような表示になる。

						₹	示切替			、つう
						C) マーク	۲	名称	
	1	2	3	4	5	6	7		8	
_	NTC	STD	STD	STD	ウェル情	報設定			X	
		VT PC	invA PC	ipaH PC	サンプル名					ן
	NTC	STD	STD	STD	サンプル	タイプ <	blank>		•	
B		VT PC	invA PC	ipaH PC	ーターゲッ	ット設定	□ 複数	t –		
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN	Dye	<none> •</none>				
С	検体1	検体2	検体3	検体4	- レプリケ - マーク	ii	(注言)	÷	٦	
	UNKN	UNKN	UNKN	UNKN		L		507680		J
D	検体1	検体2	検体3	検体4	○検量線 0.0	設定 00E+000	j	(続設)	Ē)	

■他のランファイルからのサンプル設定読み込み

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。



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。

~反応時間は、約45分です。~

結果の解析

解析パラメーターの確認

- 1 融解曲線を表示させる
 - 1.1 検出フィルターの FAM ボタンをクリックする。
 - 1.2 データ解析から融解曲線を選択する。
 - 1.3 表示セレクトで解析対象のウェルを選択する。
- 3 閾値の設定
 - 2.1 縦と横の閾値をノイズレベルの小さなピークがない範囲に設定する。
 - 2.2 適用ボタンをクリックする。



融解曲線データの出力

- 1 上記の要領で融解曲線を表示させる。
- 2 融解曲線のグラフ上で右クリックし、データ出力から CSV を選択する。



3 保存場所とファイル名を指定して保存する。

テキストレポートの出力

- 1 検出フィルターの FAM ボタンをクリックする。
- 2 データ解析からテキストレポートを選択する。
- 3 詳細項目のサンプル名とTm #2とTm #3 にチェック✔を入れる(その他は変更不要)。
- 4 テキストレポートの表上で右クリックし、データ出力から CSV を選択する。
- 5 保存場所とファイル名を指定して保存する。

Tm #1	Tm #2	Tm #3		Cutoff(Tm)	データ解析	テキストレポート ▼
	72.30				5 511101	
			75.74		表示形式	ウェル 🔻
	76-					27+C-\$ /#
	ウェルの並べ方	•			表示項目	■ 静切栄性
	利を一の並びに戻す					▼ SDM法データ
	列を九の並びに戻す		75.48		詳細項目	
	データ出力	•	CS	iv III	🔽 Tm #1	*
	00.10 /0.90		Fx	cel 📃	✓ Im #2	
					III #3 III #1 ₩2	F值
					■ Tm #2蛍光	····
					📃 Tm #3蛍光	ビ値 📃
					Cutoff(Tm)	·

~結果の解析には、専用の解析ツールを使用します。~

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。