

Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

ノロウイルス検便検査のための操作マニュアル

－TaKaRaノロウイルスGI/GII検出キットVer.3（RR298A）専用－

このマニュアルでは、TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3(製品コード RR298A)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。

※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、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。

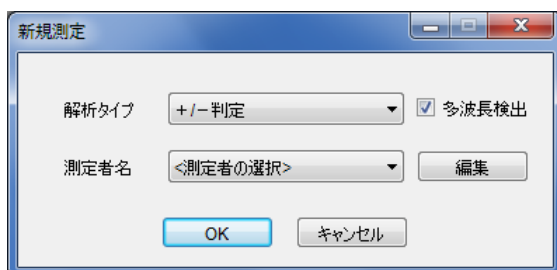
解除方法は巻末の「Appendix : Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法」をご確認ください。

装置とソフトウェアの起動

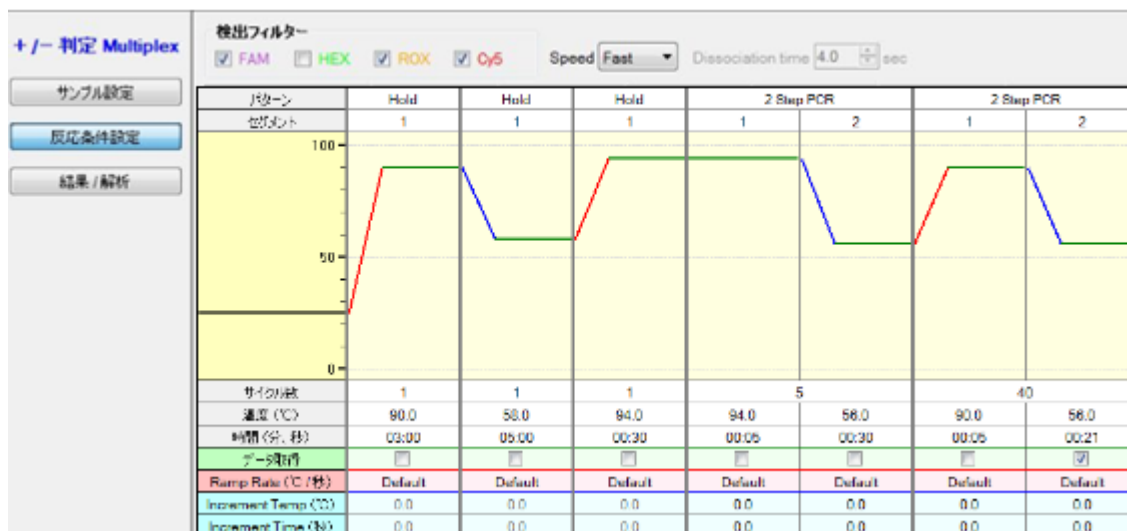
- 1 Thermal Cycler Dice Real Time System 本体の電源を ON にする。
- 2 コンピューターの電源を ON にする。
- 3 食品環境検査用ソフトウェアを起動する。

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。



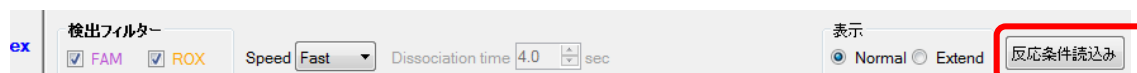
- 2 反応条件設定画面で PCR 条件を設定する。
 - 2.1 検出フィルターの FAM、ROX、Cy5 にチェック✓を入れる
(4色搭載機の場合は、HEX のチェック✓を外す)。
 - 2.2 Hold のパターンを 2 つ追加する。
 - 2.3 1 つ目の Hold は、90℃、3 分の設定にする。
 - 2.4 2 つ目の Hold は、58℃、5 分の設定にする。
 - 2.5 3 つ目の Hold は、94℃、30 秒の設定にする。
 - 2.6 3 Step PCR のパターンを削除して、2 Step PCR のパターンを追加する。
 - 2.6.1 サイクル数は 5 にする。
 - 2.6.2 セグメント 1 は、94℃、5 秒の設定にする。
 - 2.6.3 セグメント 2 は、56℃、30 秒の設定にする。
 - 2.6.4 セグメント 2 のデータ取得のチェック✓をはずす。
 - 2.7 2 step PCR パターンを追加する。
 - 2.7.1 サイクル数は、40 にする。
 - 2.7.2 セグメント 1 は、90℃、5 秒の設定にする。
 - 2.7.3 セグメント 2 は、56℃、21 秒の設定にする
 - 2.7.4 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。
 - 2.7.5 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）。

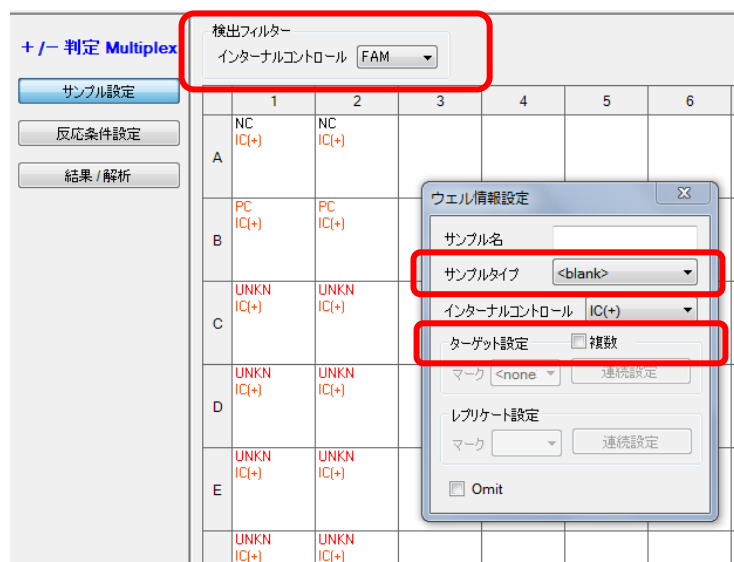
- 3.1 インターナルコントロールとして **FAM** を選択する。
- 3.2 画面右上の入力ボタンをクリックする。
- 3.3 該当するウェルを選択し、サンプルタイプを選択する。

NC : 陰性コントロール

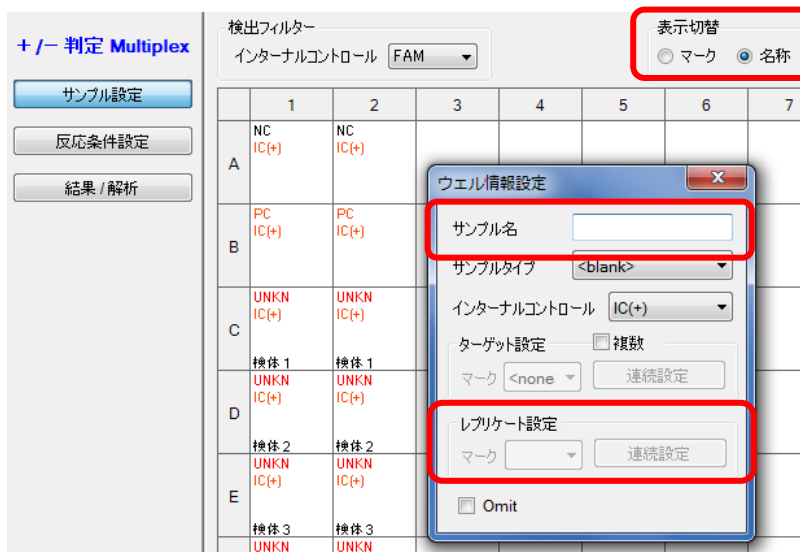
PC : 陽性コントロール

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。

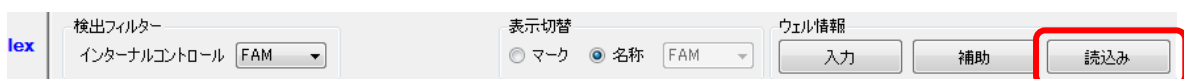


- 3.5 必要に応じてレプリケート設定を行う（省略可能）。
- 3.6 必要に応じてサンプル名を入力する（省略可能）。
表示切替の「名称」を選択すると次のような表示になる。



■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。

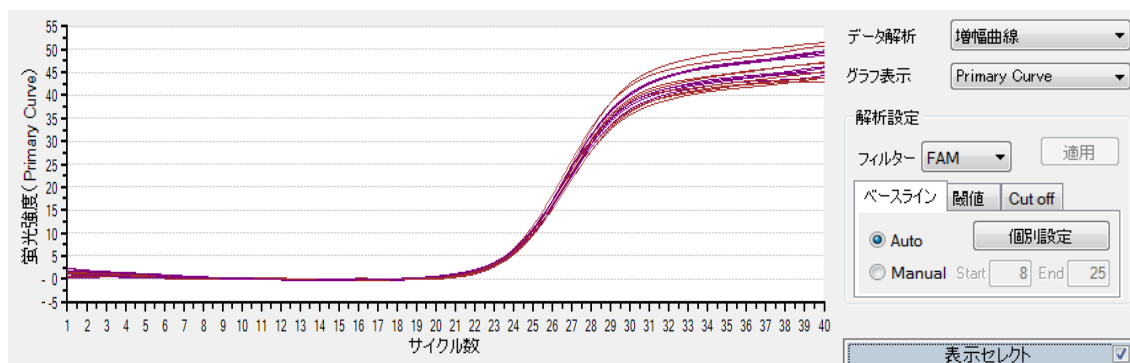
- 4 反応条件設定画面でランを開始する。
 - 4.1 反應用のチューブ（またはプレート）を本体にセットする。
 - 4.2 画面右下の反応開始ボタンをクリックしてランを開始する。

結果の解析

解析パラメーターの確認

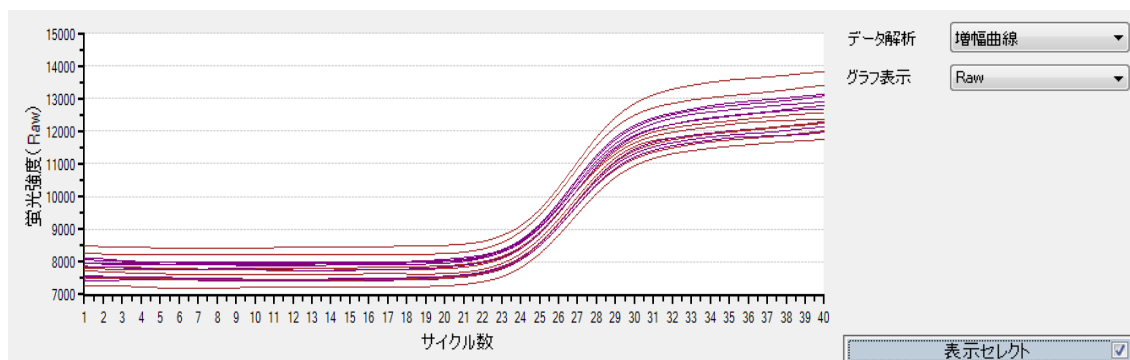
1 増幅曲線を表示させる

- 1.1 検出フィルター内の **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。

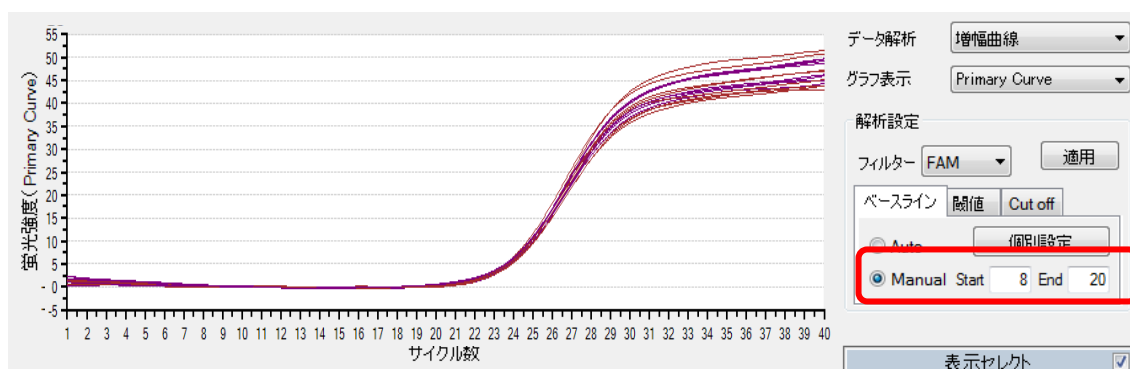


2 ベースライン領域の確認

- 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。

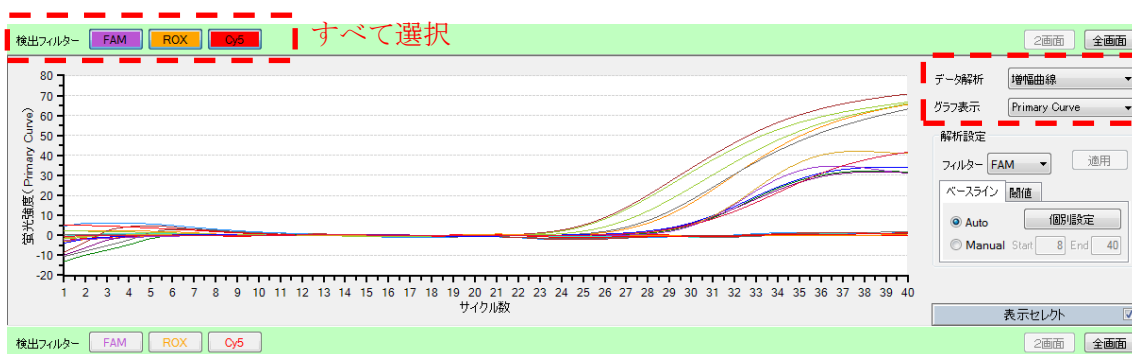


- 3 ROX と Cy5 の結果についても同様に確認、設定する。

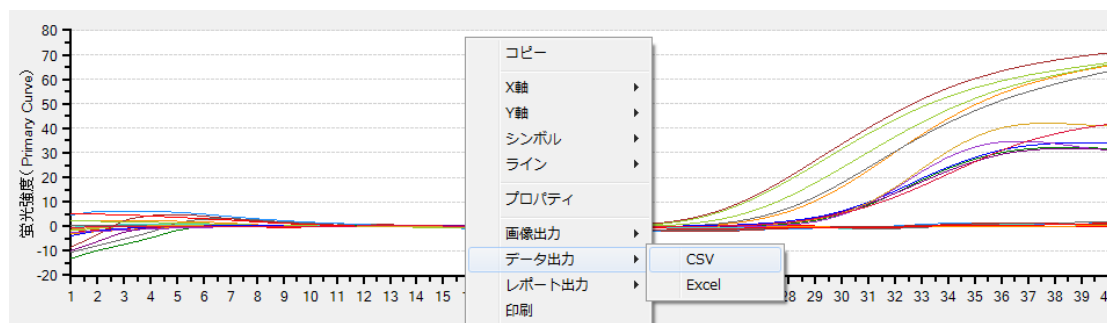
解析結果の出力

タカラバイオ遺伝子検査キット判定ツールに読み込ませるための Amplification Plot データを出力します。

- 1 表示されているすべての検出フィルターのボタンをクリックする。
- 2 データ解析から増幅曲線を選択する。



- 3 「表示セレクト」から出力するウェルを選択する（測定時に使用していないウェルは omit しておく）
- 4 表示されたグラフ画面上で右クリックする。
- 5 データ出力から CSV を選択する。



- 6 保存場所とファイル名を指定して保存する。

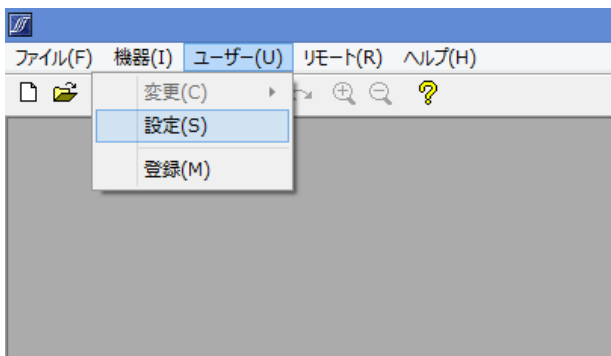
ソフトウェアと装置の終了

- 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。

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

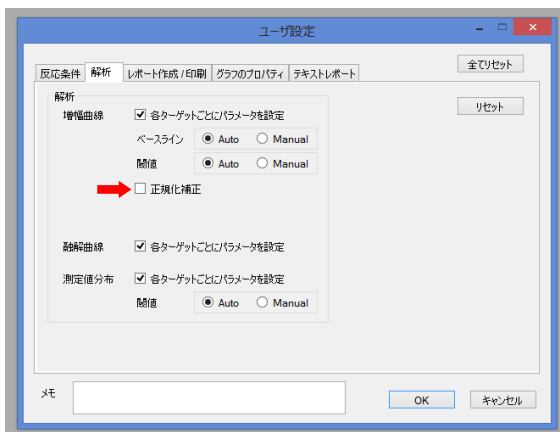
A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C/3.10A)

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。

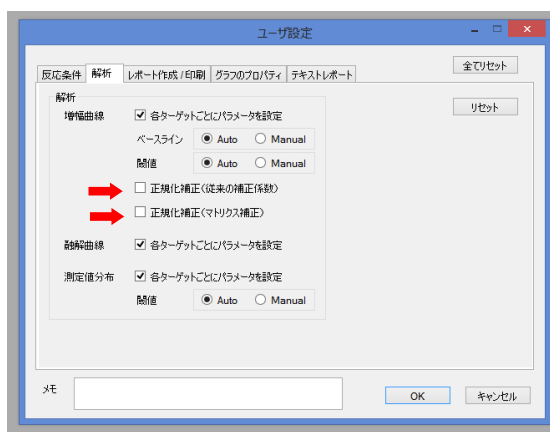


2. ユーザ設定内の解析タブを選択し、正規化補正のチェックを外す (赤矢印)。

Software Ver. 3.01C



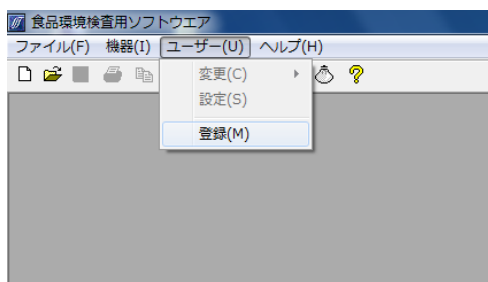
Software Ver. 3.10A



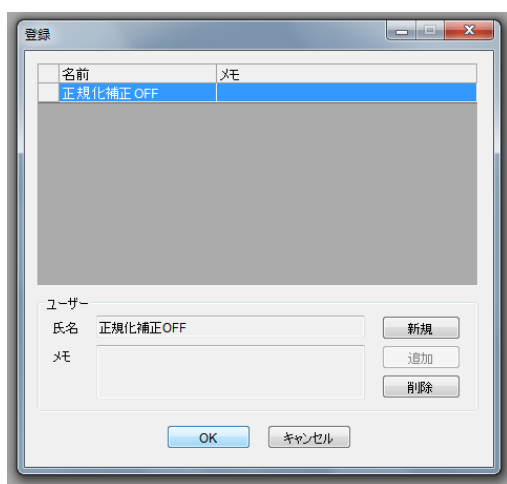
3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

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

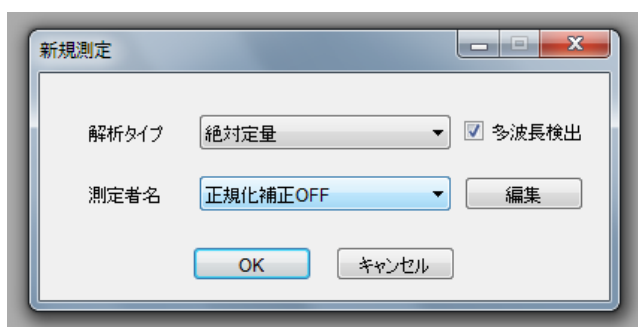
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



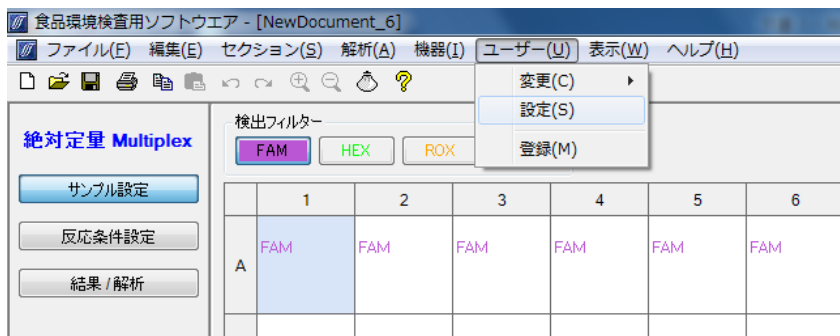
2. 新規 → 適当なユーザー名を入力 (例：正規化補正 OFF) → 追加の順に操作し、上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックしウインドウを閉じる。



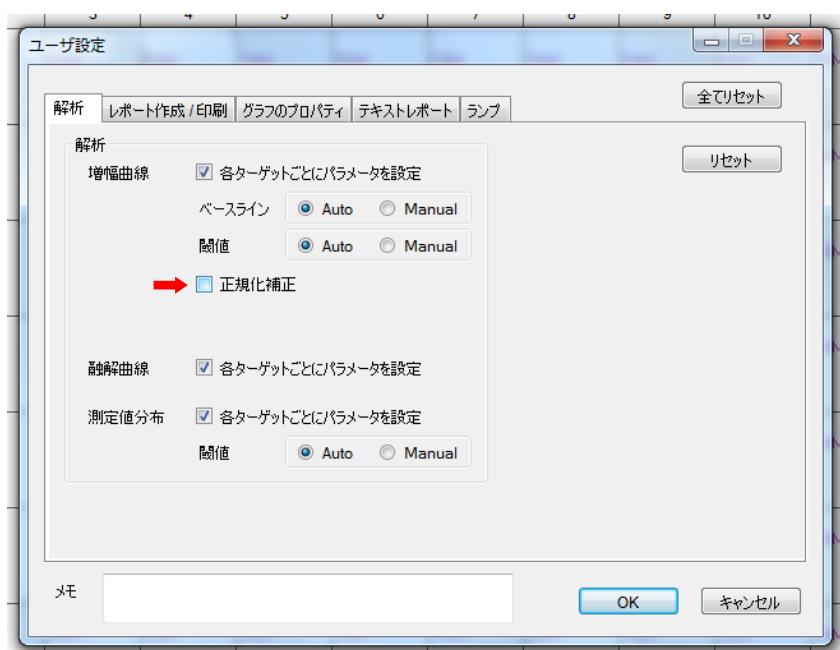
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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)。

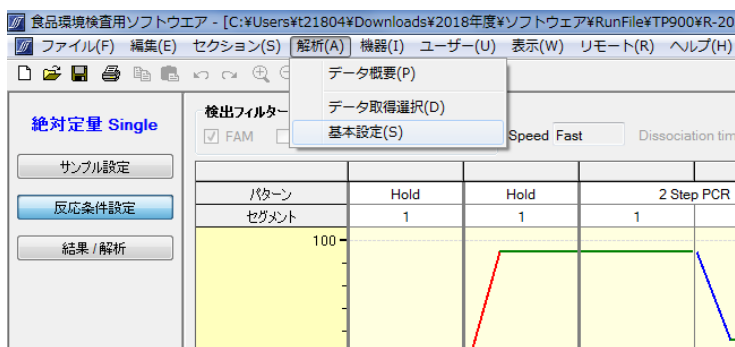


6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

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。