

Thermal Cycler 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 Kit Ver.2 (XA0203/XA0191) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit Ver.2 (製品コード XA0203/XA0191) 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。

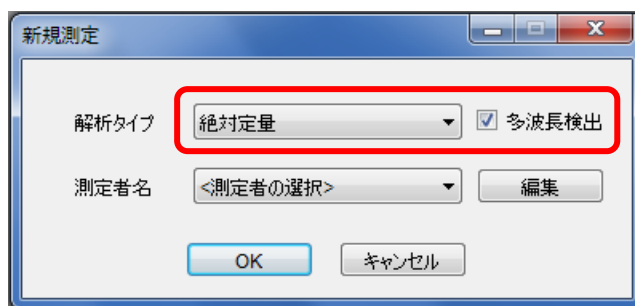
解除方法は巻末の「Appendix : Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法」をご確認ください。

<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。

パターン	Hold	2 Step PCR	
セグメント	1	1	2
サイクル数	1	40	
温度(°C)	95.0	95.0	60.0
時間(分、秒)	00:30	00:05	00:30
データ取得	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

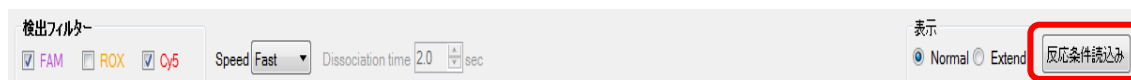
- 2.3 1つ目の Hold は、52℃、5 分の設定にする。
- 2.4 2つ目の Hold は、95℃、10 秒の設定にする。
- 2.5 2 Step PCR の条件が、95℃、5 秒と 60℃、30 秒である事を確認する。
- 2.6 2 Step PCR のサイクル数は 45 にする。
- 2.7 Speed の設定は、Fast を選択する。



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

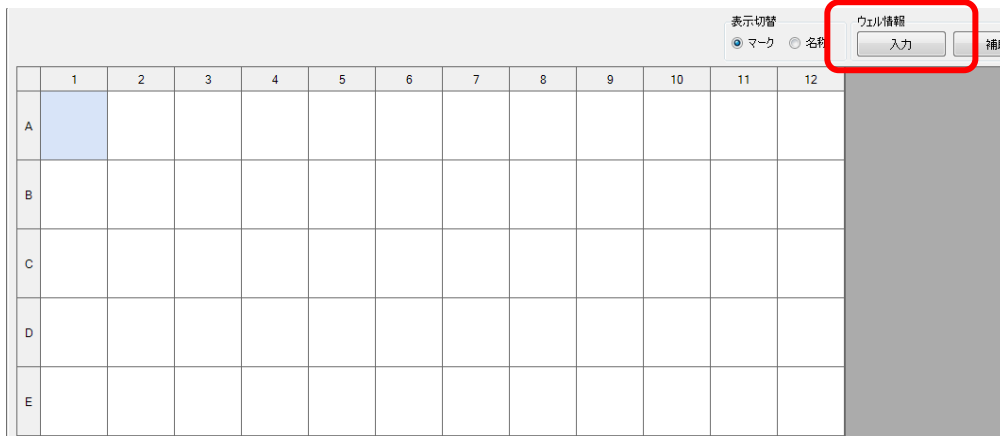
■他のランファイルからの設定読み込み

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。



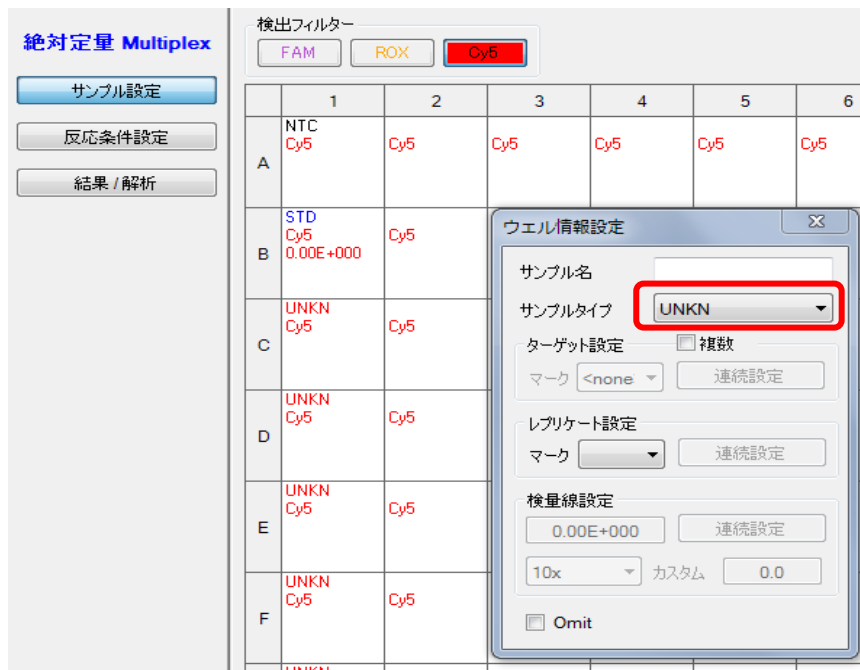
- 3 サンプル設定画面でサンプル情報を入力する
(ラン途中またはラン終了後に行っても良い)。

3.1 画面右上の入力ボタンをクリックする。

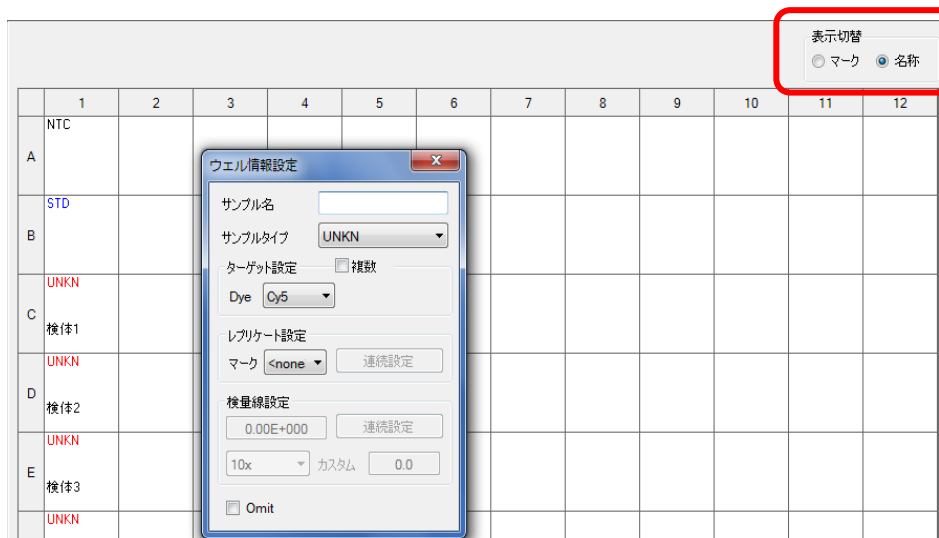


3.2 該当するウェルを選択し、サンプルタイプを選択する。

- 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。

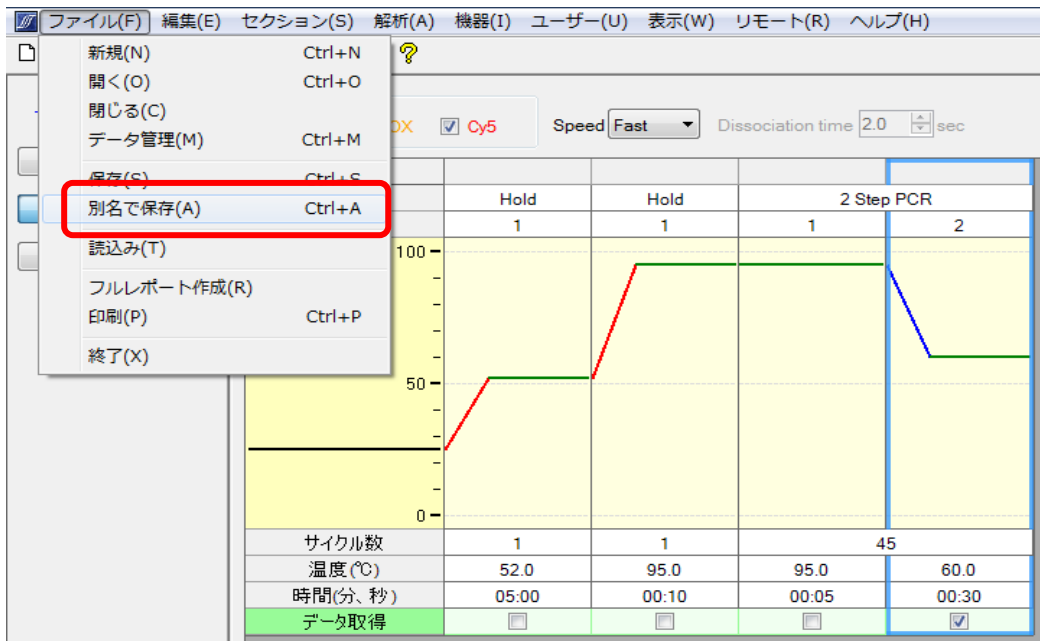


★テンプレートファイルの利用も可能です。

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。

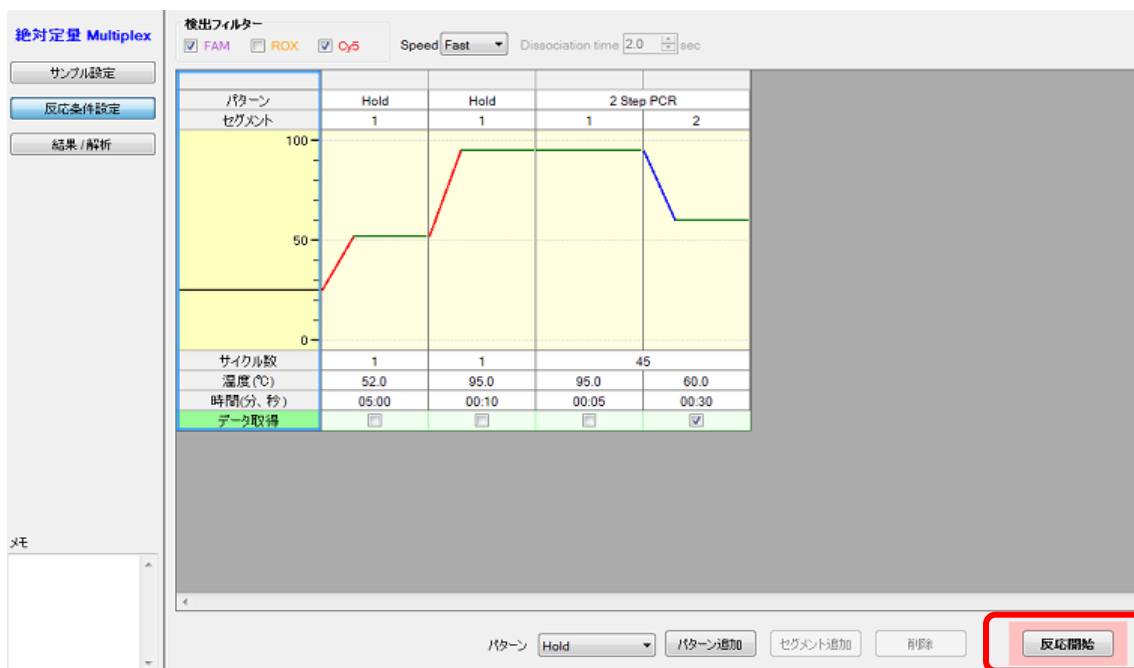


新規ランファイルを作成する際は、まずテンプレートファイルを開き、ファイルメニューから「別名で保存」を選択し、適切な保存先とファイル名を入力して保存して下さい。必要に応じて設定を変更したうえでランを開始します。



※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。

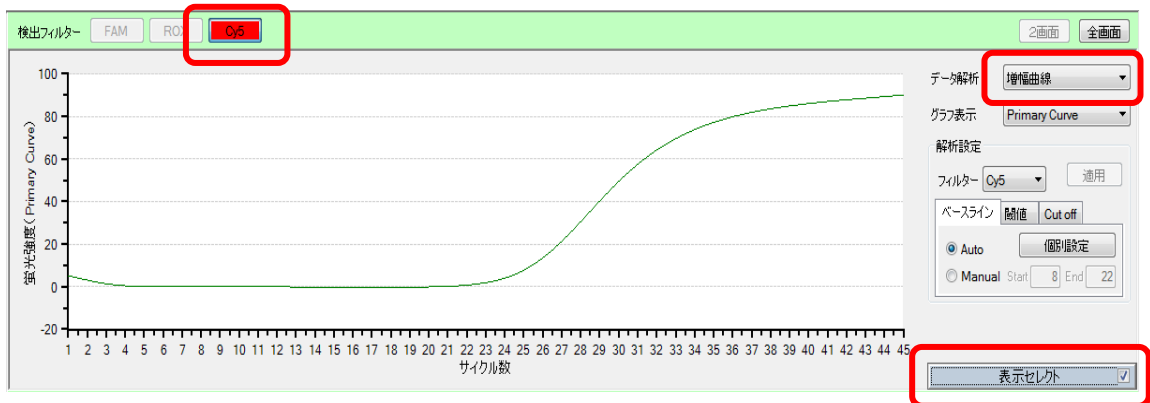


<結果の解析>

解析パラメーターの確認

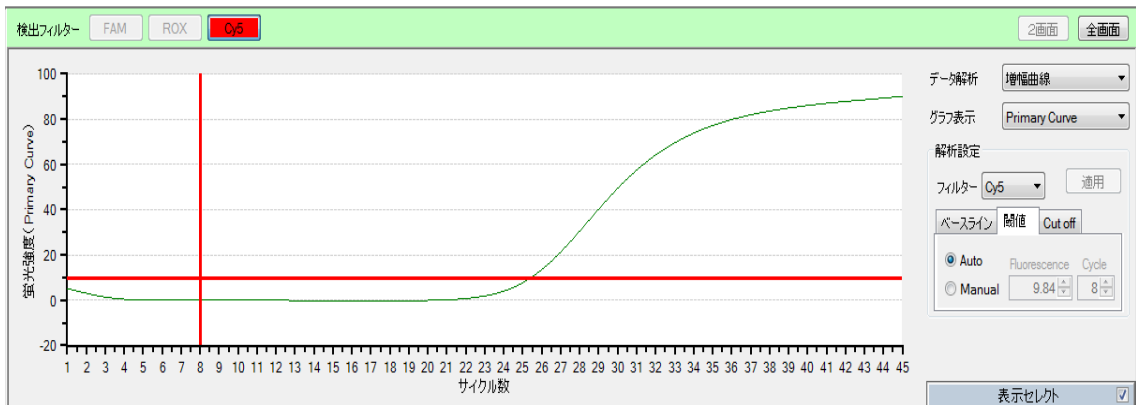
1 増幅曲線を表示させる

- 1.1 検出フィルターの **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。

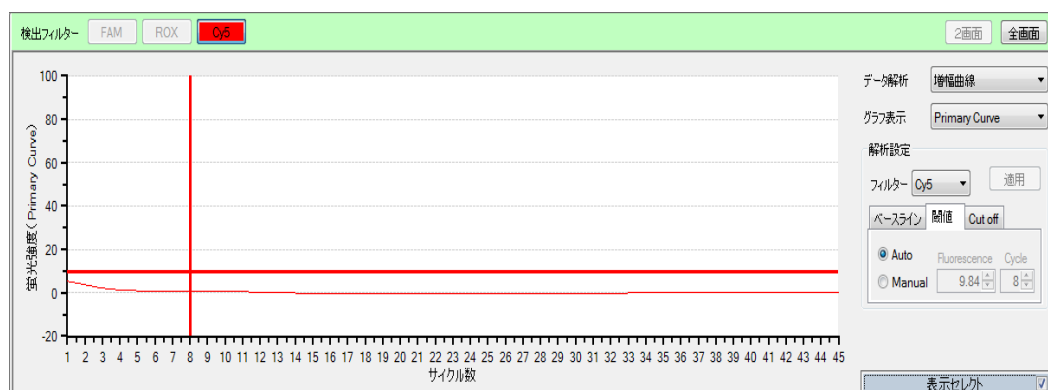


2 陽性コントロール・陰性コントロールの確認

(陽性コントロール)



(陰性コントロール)



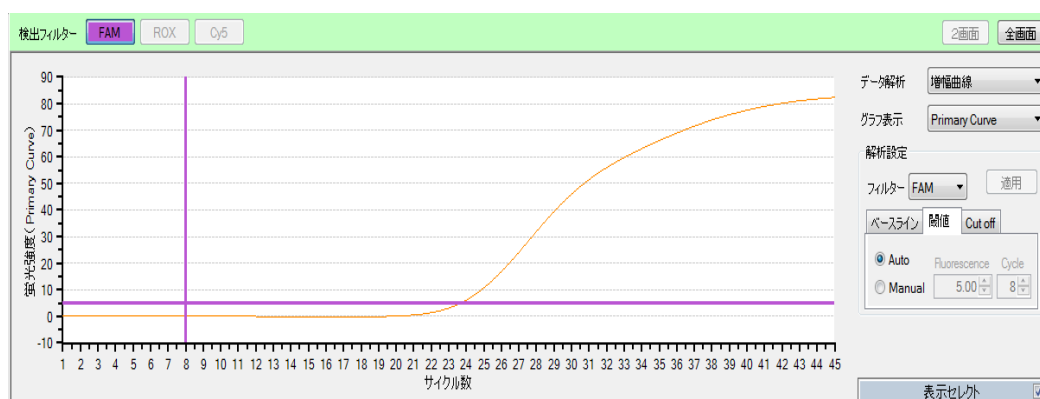
- 2.1 データ解析からテキストレポートを選択する。
- 2.2 陽性コントロールの Ct 値 (CP) が 30 以下かつ、陰性コントロールが、増幅していない事を確認する。

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)	C値(SDM)	Cutoff(Ct)	標準サンプル濃度	定量値(CP)	定量値(SDM)	Tm #1
D6	STD		Cy5	25.42	25.37		0.000E+000	--	--	
D7	NTC		Cy5	--	--		--	--	--	

3 インターナルコントロールの確認

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 データ解析からテキストレポートを選択する。

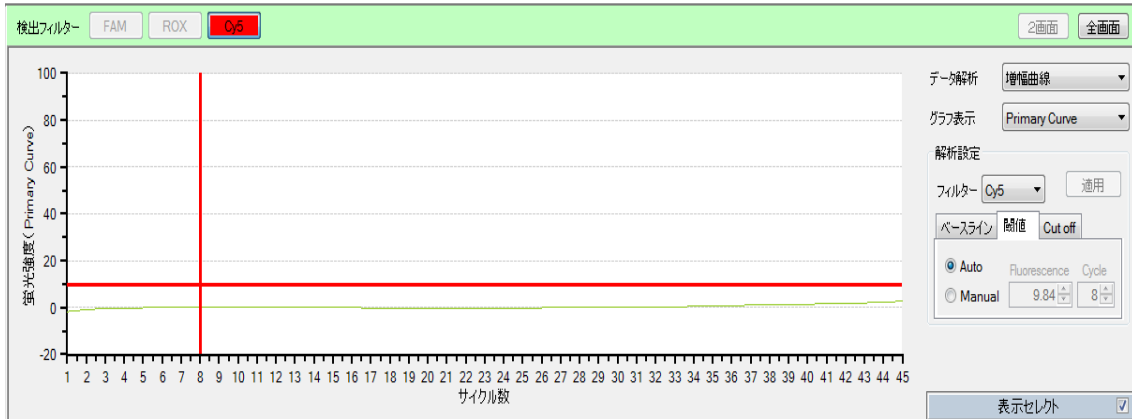
3.4 検体のインターナルコントロールの Ct 値 (CP) が 40 以下である事を確認する。
(但し、陽性コントロールは、30 以下、陰性コントロールは不検出)

ウェル	サンプルタイプ	レプリケート名	検出フィルター	Ct値 (CP)	Ct値 (SDM)	Cutoff (Ct)	標準サンプル濃度 (CP)	定量値 (SDM)	Tm #1
D6	NTC		FAM	--	--	--	--	--	--
C6	UNKN		FAM	24.38	24.06	--	--	--	--
B6	STD		FAM	22.97	21.87	0.000E+000	--	--	--

	検体	陽性コントロール	陰性コントロール
インターナルコントロール (IC)	Ct ≤ 40	Ct ≤ 30	不検出

4 検体の結果確認

4.1 検体の増幅を確認する。



4.2 データ解析からテキストレポートを選択する。

4.3 Ct 値 (CP) を確認する。

検出フィルター: FAM ROX **Cy5** 2画面 全画面

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)	Cutoff(Ct)	標準サンプル測定値(CP)	定量値(SDM)	Tm #1
D5	UNKN		Cy5	--	--	OUT	--	--	--
D6	STD		Cy5	25.42	25.37	OK	0.000E+000	--	--
D7	NTC		Cy5	--	--	OUT	--	--	--

データ解析: テキストレポート

表示形式: リンガ

表示項目: 解析条件 CP法データ SDM法データ

詳細項目: ウェル サンプル名 サンプルタイプ レプリケートマーク レプリケート名 検出フィルター 最終蛍光値(Raw) 最終蛍光値

表示せしめ

5 結果判定

Cy5 (SARS-CoV2) と FAM (IC) の結果より、以下のような判定を行う。

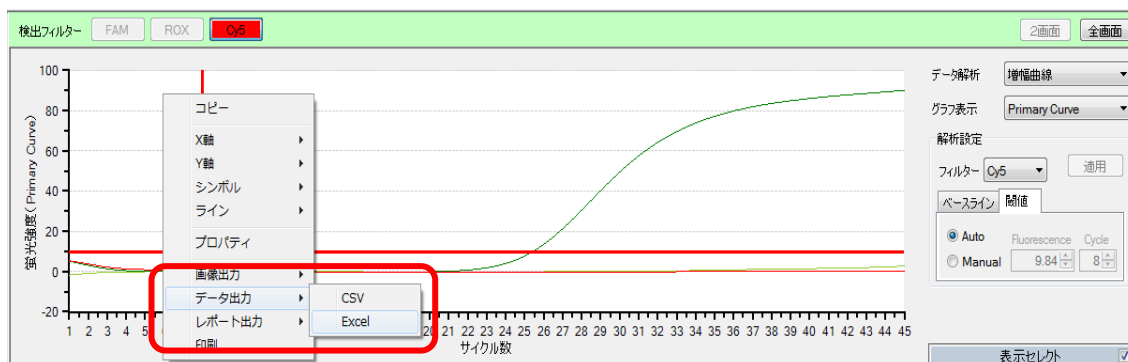
		SARS-CoV-2 (Cy5)	
		Ct ≤ 40	Ct > 40 または不検出
IC (FAM)	Ct ≤ 40	陽性	陰性
	Ct > 40 または不検出	陽性	別法での 再測定を推奨*

* : IC (FAM)の Ct 値が 40 より大きい場合、検体量の不足や劣化または PCR 阻害の疑いがあります。国立感染症研究所 「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」に記載された RNA 精製を行う手法等の別法での再測定により判定することを推奨します。

6 解析結果の出力

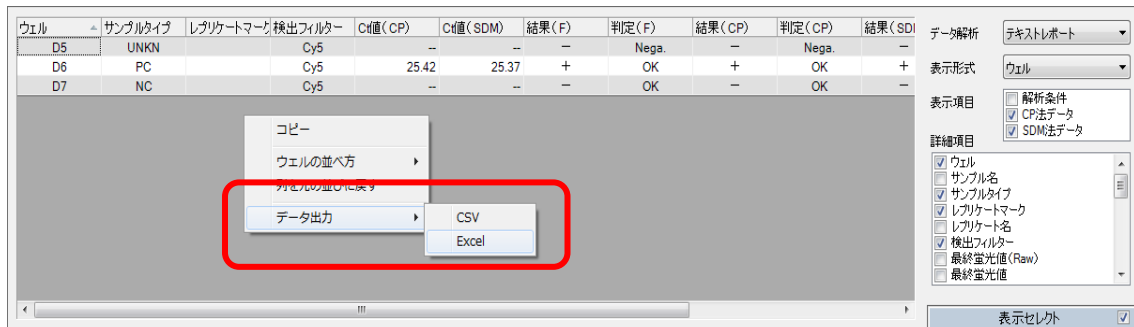
(増幅曲線)

- 出力したいサンプルを選択し、画面上で、右クリックする。
- 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。



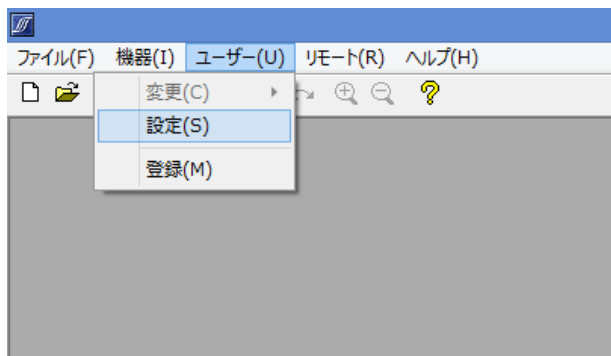
<ソフトウェアと装置の終了>

- 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

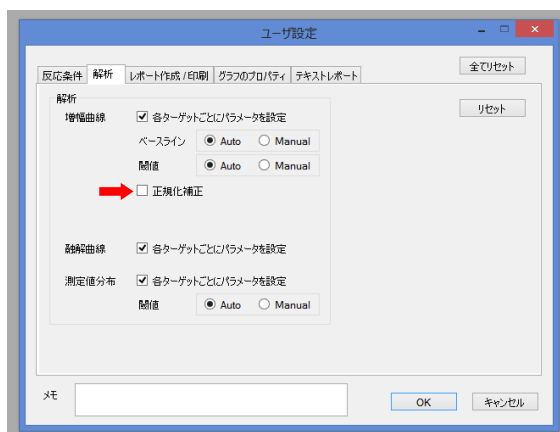
A. Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C)

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)。

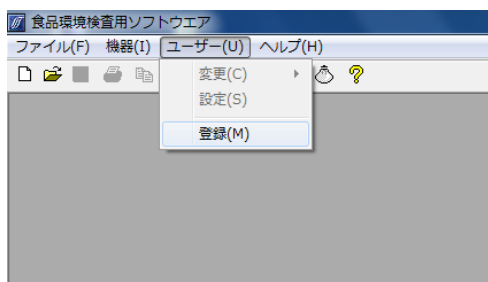
Software Ver. 3.01C



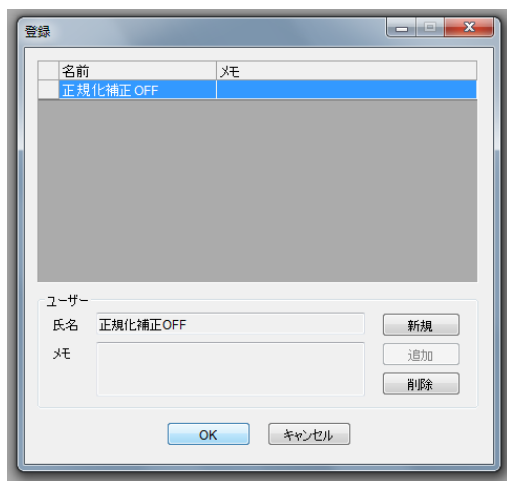
3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

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

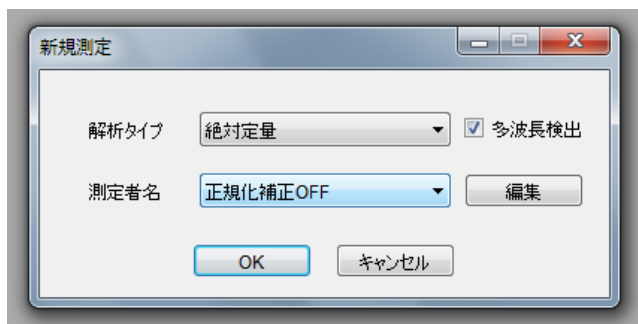
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



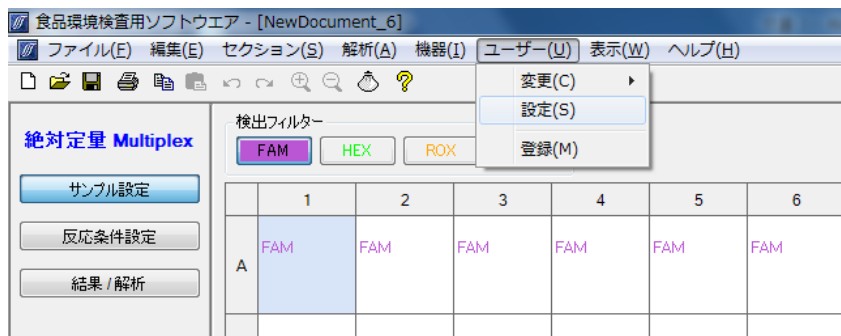
2. 新規 → 適当なユーザー名を入力 (例：正規化補正 OFF) → 追加の順に操作し、上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックしウインドウを閉じる。



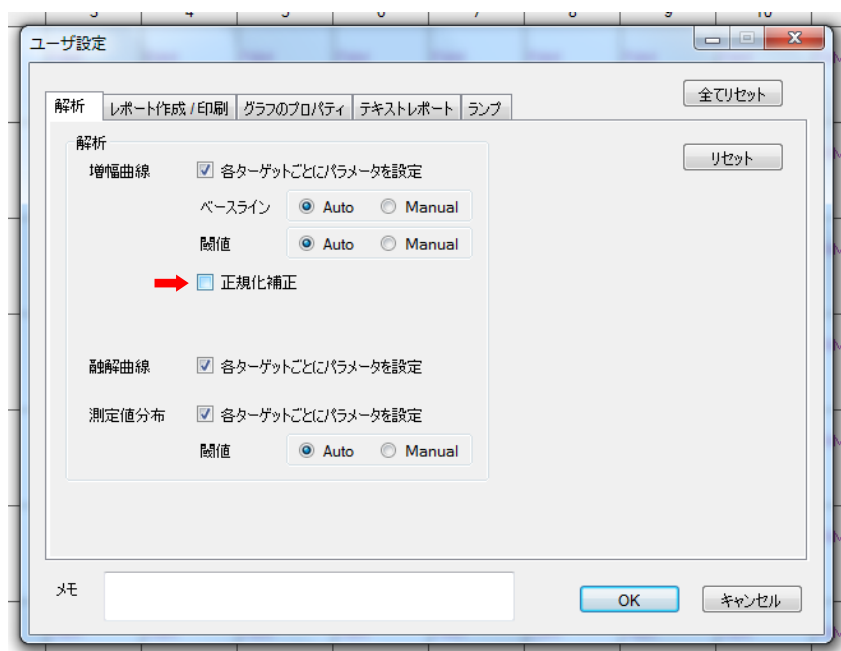
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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)。

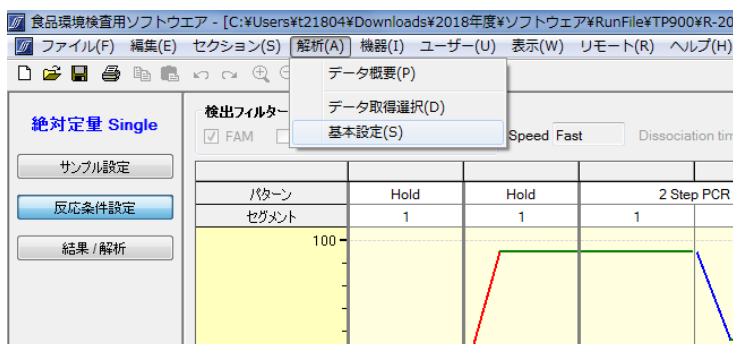


6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

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。