

Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

牛伝染性リンパ腫ウイルス検査のための操作マニュアル

—Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit（製品コード RC201A）専用—

このマニュアルでは、Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit（製品コード RC201A）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には、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。

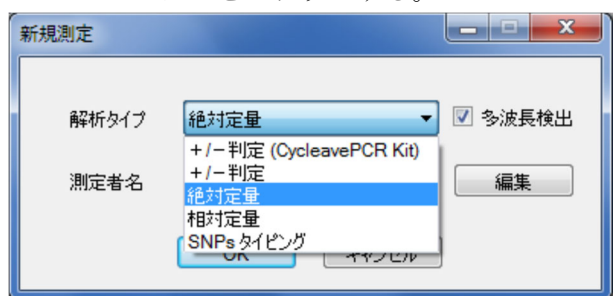
解除方法は巻末の「Appendix : Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの正規化補正解除方法」をご確認ください。

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 解析タイプからは絶対定量（定量解析の場合）もしくは+/-判定（定性判定の場合）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。



※ 「絶対定量」、「+／－判定」は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。
Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、「**Absolute Quantification (Multiplex)**」「**Plus/Minus Assay (Multiplex)**」をそれぞれ使用します。

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** にチェック✓を入れる

(3色搭載機の場合は、**Cy5** のチェック✓を外す)。

2.2 **Hold** は、**95℃**、**30 秒**の設定にする。

2.3 **2 Step PCR** は、以下の設定にする。(定性判定の場合は、デフォルトで設定されている **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。)

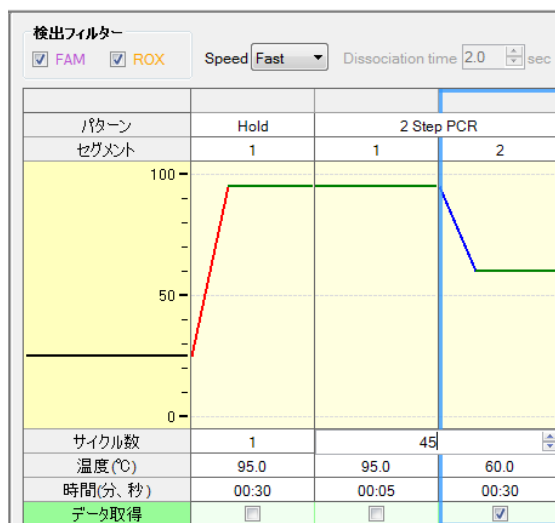
2.3.1 サイクル数は、**45**にする。

2.3.2 セグメント 1 は、**95℃**、**5 秒**の設定にする。

2.3.3 セグメント 2 は、**60℃**、**30 秒**の設定にする

2.3.4 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。

2.3.5 **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 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）。

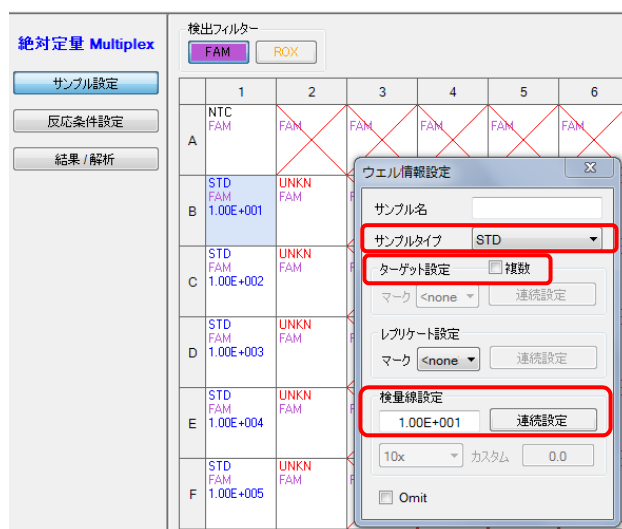
【定量解析の場合】

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 UNKN、STD、NTC から選択する。
（必須）

3.3 ターゲット設定の複数のチェック✓が外れていることを確認する。

3.3 サンプルタイプを STD としたウェルについては、鑄型量を設定する。連続設定を使用すると入力容易。



3.4 同じサンプルを 2 連 (n=2) 以上で反応する場合は各々をレプリケートとして設定する。(n=2 以上の設定では必須、n=1 では任意。)

3.5 反応に使用しないウェルは Omit 設定する。(省略可能)

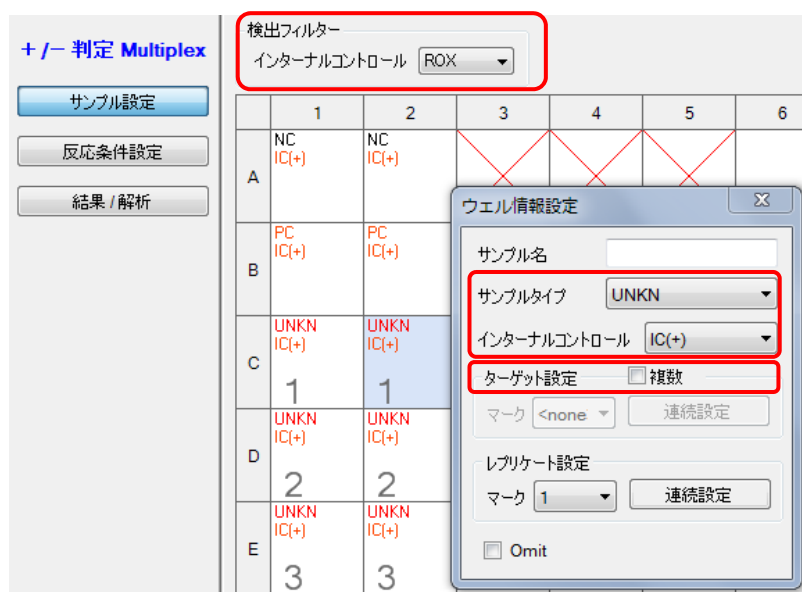
3.5 必要に応じてサンプル名を入力する (省略可能)。

表示切替の「名称」を選択すると次のような表示になる。

	1	2	3
A	NTC		
B	STD	UNKN 検体1	
C	STD	UNKN 検体2	
D	STD	UNKN 検体3	
E	STD	UNKN 検体4	
F	STD	UNKN 検体5	

【定性判定の場合】

- 3.1 インターナルコントロールは **ROX** 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 **UNKN**、**PC**、**NC** から選択する（必須）。
サンプルタイプ **NC** の場合、インターナルコントロールは **IC(-)** を選択する。
- 3.4 ターゲット設定の複数のチェック を外す。



- 3.5 同じサンプルを 2 連 ($n=2$) 以上で反応する場合は各々をレプリケートとして設定する。($n=2$ 以上の設定では必須、 $n=1$ では任意。)
- 3.6 反応に使用しないウェルは **Omit** 設定する。(省略可能)
- 3.7 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。

	1	2	3
A	NC IC(+)	NC IC(+)	X
B	PC IC(+)	PC IC(+)	X
C	UNKN IC(+) 検体1 UNKN	UNKN IC(+) 検体1 UNKN	X
D	UNKN IC(+) 検体2 UNKN	UNKN IC(+) 検体2 UNKN	X
E	UNKN IC(+) 検体3 UNKN	UNKN IC(+) 検体3 UNKN	X

■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。



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。

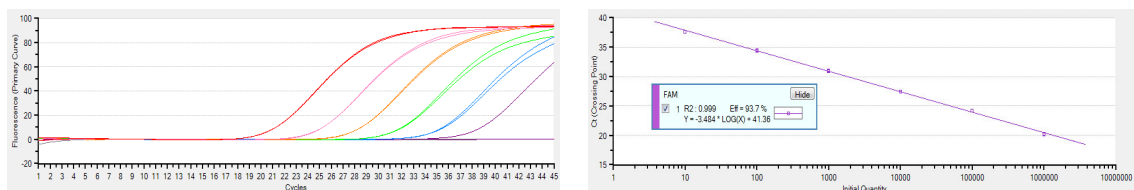
結果の解析

反応終了後、増幅曲線を確認する。BLV 遺伝子 (*pol* 遺伝子) 陽性の場合、FAM での蛍光シグナルの増大が認められる。

【定量解析の場合】

結果／解析画面において、“データ解析” から“検量線”を選択し、検出フィルターの《FAM》または《ROX》ボタンをクリックすると、サンプルと同時に反応を行ったスタンダード (STD) の結果より BLV 遺伝子 (*pol* 遺伝子)、ウシゲノム *RPPH1* 遺伝子それぞれについて作成された検量線が表示される。

< Positive Control DNA 希釈系列を使用した増幅曲線、検量線の例 >



これらの検量線から、検体サンプルについて BLV 遺伝子、ウシゲノム *RPPH1* 遺伝子の定量値が算出される。

結果／解析画面において、“データ解析”を”テキストレポート”とし、詳細項目より必要な項目を選択することで各サンプルの Ct 値、定量値などの情報を得ることができる。

ウシゲノム *RPPH1* 遺伝子に対する BLV 遺伝子の相対量 (BLV 感染率) を算出する場合は、各サンプルで得られた定量値から、以下の数式により相対定量値を求める。

$$\text{BLV 感染率 (\%)} = [\text{pol 遺伝子定量値} \div (\text{RPPH1 遺伝子定量値} / 2)] \times 100$$

【定性判定の場合】

結果／解析画面において、“データ解析” から “判定結果” を選択し、総合判定にチェック を入れることでインターナルコントロール（ウシゲノム *RPPH1* 遺伝子）の結果をふまえた総合判定結果が表示される。

The screenshot shows a software interface with a table of results and control data. The table has columns 1-12 and rows A-H. The results are as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					OK	OK	Nega.	Nega.				
B							Posi.	Posi.				
C							Posi.	Posi.				
D							Posi.	Posi.				
E							Posi.	Posi.				
F							OK	OK				
G												
H												

Below the table, there are control results for wells A-H:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							N	N	U	U		
B									U	U		
C									U	U		
D									U	U		
E									U	U		
F									P	P		
G												
H												

コントロール反応の判定結果

OK : コントロール反応 : 正常

OUT : コントロール反応 : 異常

検体サンプルの判定結果

Posi. : BLV 遺伝子陽性

Nega. : BLV 遺伝子陰性（検出限界以下）

ND : 偽陰性、判定不能

（インターナルコントロール、BLV 遺伝子ともに検出されていない場合）

ERROR : エラー（同一レプリケート内で判定結果が異なる場合）

検出フィルター《FAM》または《ROX》を選択すると、それぞれの検出フィルターでの検出結果が+、-で表示される。

“データ解析”を”テキストレポート”とし、必要な項目を選択することで各サンプルの Ct 値などの情報を得ることができる。

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。

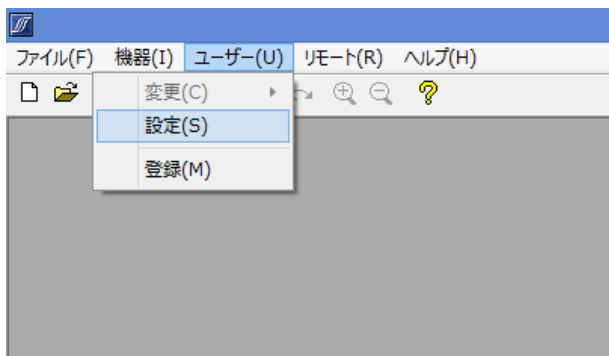
2 コンピューターを終了させて、電源を切る。

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

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

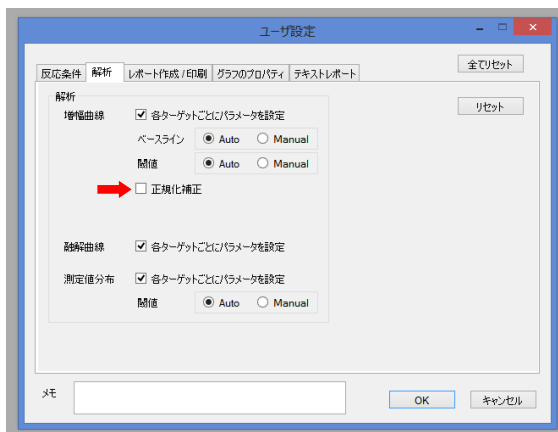
A. Thermal Cyclers Dice Real Time System III の場合 (Software Ver. 3.01C/3.10A)

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。

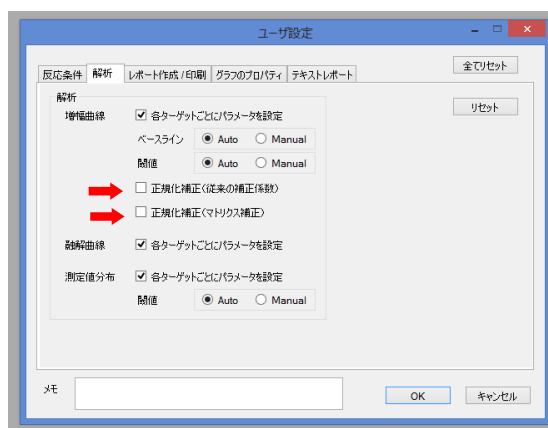


2. ユーザ設定内の解析タブを選択し、正規化補正のチェックを外す (赤矢印)。

Software Ver. 3.01C



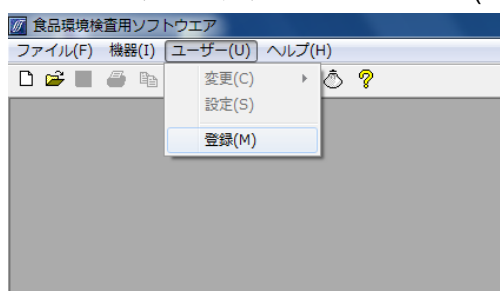
Software Ver. 3.10A



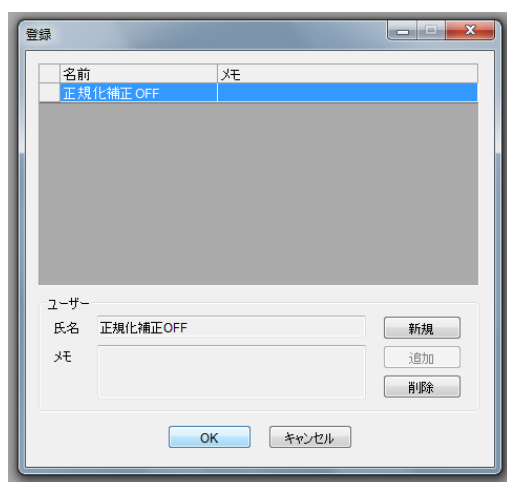
3. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。

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

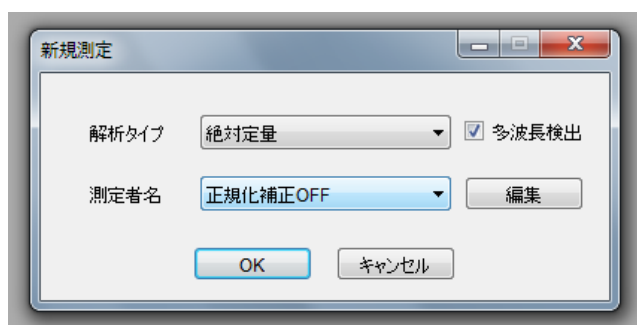
1. ソフトウェア画面左上のユーザー(U) → 登録(M)をクリックする。



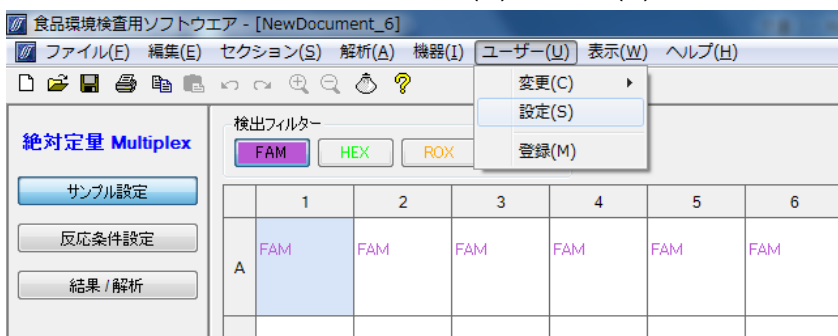
2. 新規 → 適当なユーザー名を入力 (例: 正規化補正 OFF) → 追加の順に操作し、上部リストにユーザー名が追加されたのを確認したのち、下部の OK をクリックしウィンドウを閉じる。



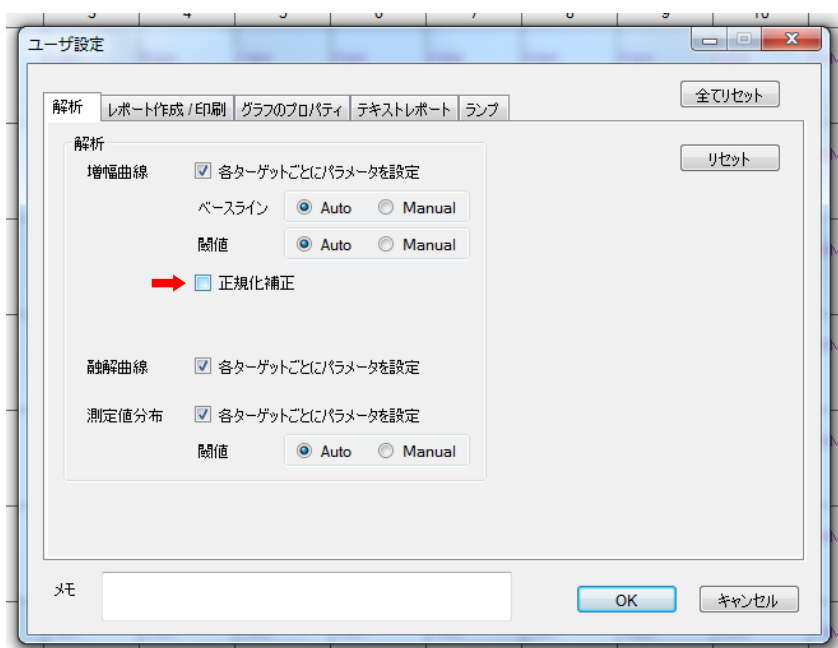
3. 新規 Run file を作成する際に、前項で登録したユーザー名を選択し OK をクリック。



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)。

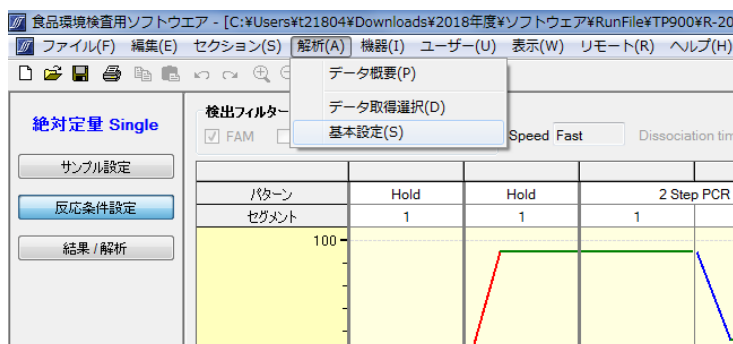


6. 右下の OK をクリックしウインドウを閉じる。これ以降は Run file を作成または解析する際に、同じユーザー名を選択すれば、常に正規化補正が解除された状態となる。

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。