

Thermal Cycler Dice Real Time Systemシリーズ

食品環境検査用ソフトウェアQuick Manual

— 定量解析（絶対定量モード）用 —

—— 目次 ——

1. 起動と終了	
(1) Thermal Cycler Dice® Real Time System IIIの場合	2
(2) Thermal Cycler Dice® Real Time System II/Liteの場合	4
2. 初期画面と解析タイプの選択	5
3. 実験ファイルの画面構成	5
4. 反応条件設定	
(1) PCR条件の設定	6
(2) ランの開始と進行状況の確認	8
5. サンプル設定	
(1) サンプル情報の入力	10
(2) 補足	12
6. 結果/解析	
(1) 基本操作	13
(2) データの種類と解析法	13
7. 結果の出力	18
8. トラブルシューティング	20
9. リアルタイムPCR装置関連製品	21

1. 起動と終了

(1) Thermal Cyclers Dice® Real Time System IIIの場合

■ 起動

① 本体とコンピュータがLANケーブルで接続されていることを確認します。

(注意) 本体とコンピュータの接続はLANクロスケーブルをご使用ください。

② 本体背面の主電源をONにします。

③ 本体前面の電源ボタンを押します。

④ 本体が完全に起動後、LCDにホーム画面が表示されます。

(補足) 本体の電源を入るとリッドヒーターが約102℃を超えるまではウォーミングアップの状態となります。ウォーミングアップ中は、LCDの“スタンバイ”状態表示が点滅します。ウォーミングアップが完了し使用可能な状態になると点灯に変わります。



⑤ コンピューターの電源をONにします。

⑥ デスクトップ上のアイコンをダブルクリックして、ソフトウェアを起動します。



⑦ 画面右下の 機器 と カメラ が“接続”になっていることを確認します。

リッド:開 温度:107.7℃	機器:接続	カメラ:接続
リッド: 温度:	機器:未接続	カメラ:未接続

※ 本体とコンピュータが接続されていないときは、機器とカメラに“未接続”と表示されます。

■ 終了

- ① ソフトウェアを終了します。
- ② コンピュータをシャットダウンします。
- ③ 本体LCDのホーム画面に表示されているシャットダウンボタンをタップし、本体を待機状態にします。
- ④ 本体背面の主電源をOFFにします。

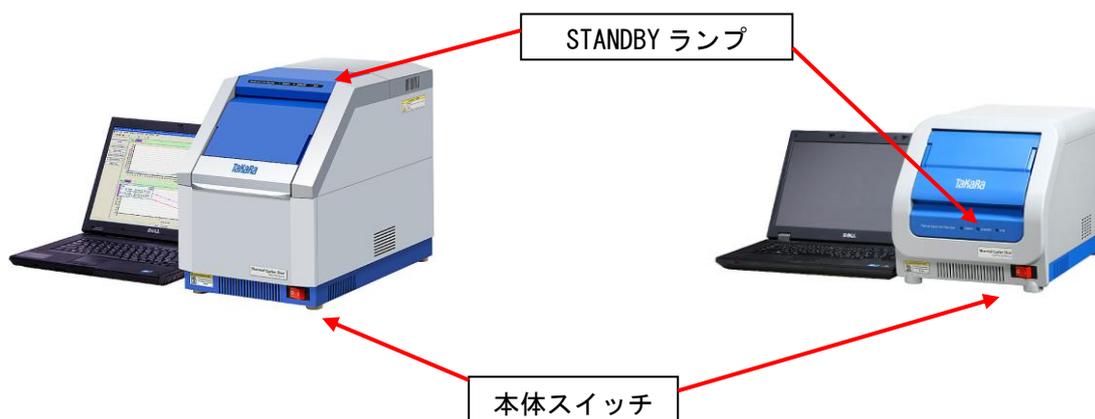


(2) .Thermal Cycler Dice® Real Time System II/Liteの場合)

■ 起動

- ① 本体の電源をONにします。

本体の電源を入れると、ランプやリッドヒーターのウォーミングアップを行います。ウォーミングアップ中は、“STANDBY”ランプが点滅し、ウォーミングアップが完了すると“STANDBY”ランプが点灯に変わります。



- ② コンピューターの電源をONにします。
- ③ デスクトップ上のアイコンをダブルクリックして、ソフトウェアを起動します。



96 ウェルタイプ



48 ウェルタイプ

■ 終了

- ① ソフトウェアを終了します。
- ② コンピューターの電源をOFFにします。
- ③ 本体の電源をOFFにします。

2. 初期画面と解析タイプの選択

■ 初期画面

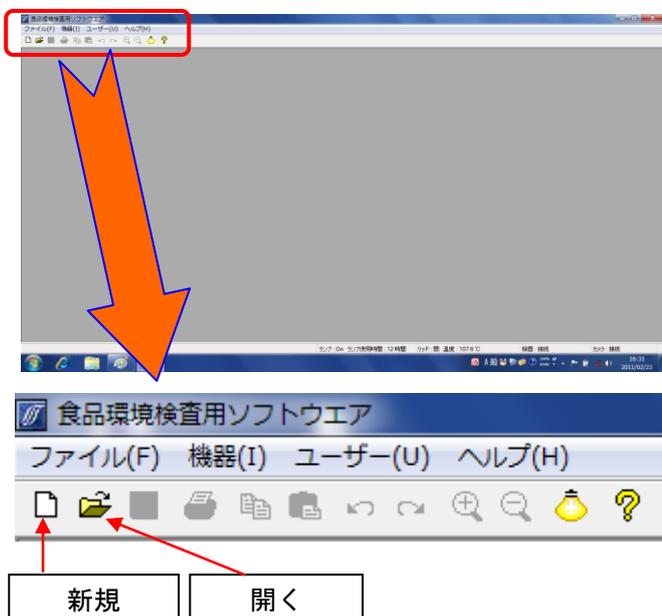
ソフトウェアを立ち上げると右図のような初期画面となります。新しい実験を行うときは実験ファイルを新規作成し、以前に行った実験データの解析をするときは既存の実験ファイルを開きます。

実験ファイルの新規作成

“新規”アイコンをクリック、またはメニューバーから[ファイル]→[新規]を選択。

既存の実験ファイルを開く

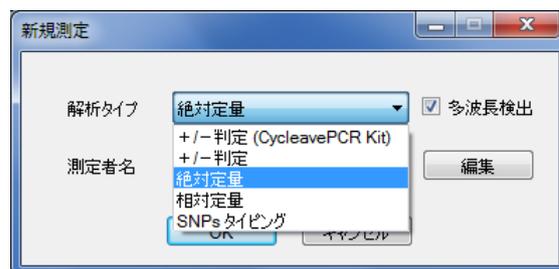
“開く”アイコンをクリック、またはメニューバーから[ファイル]→[開く]を選択。



■ 解析タイプの選択

実験ファイルを新規作成すると、“新規測定”ウィンドウが表示されます。

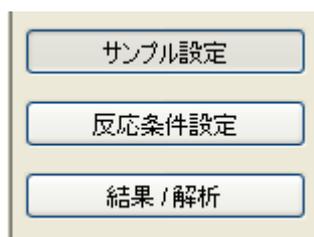
- ① 解析タイプの中から“絶対定量”を選択します。
- ② FAMとROXの同時検出を行う場合は、“多波長検出”に✓を入れます。



※ 検出波長は、各製品の取扱説明書でご確認ください。タカラバイオの検査用キットの多くは、FAMとROXの同時検出系を採用しています。

3. 実験ファイルの画面構成

実験ファイルは、3つの画面で構成されており、画面左側のボタンで表示を切り換えます。



サンプル設定： サンプル情報を入力する画面です。反応を開始した後でも設定を行うことができます。

反応条件設定： PCR条件の設定と検出する蛍光フィルターの選択を行います。

結果/解析： 結果の確認と解析パラメータの設定を行う画面です。図やグラフの出力もこの画面で行います。

4. 反応条件設定

反応条件設定画面では、測定に使用する蛍光フィルターの選択とPCR反応条件の設定を行います。ラン開始もこの画面で行い、ラン実行中はランの進行状態を確認できます。

(1) PCR条件の設定

■ 蛍光検出フィルターの選択

測定に使用する蛍光検出フィルターの選択は、画面左上の“検出フィルター”で行います。デフォルトでは、FAMとROXの両方のフィルターが選択されています。FAMとROXの同時検出を行う場合は、変更の必要はありません。FAMのみの検出を行う場合は、ROXのチェックをはずしてください。



■ PCR条件の設定

デフォルトでは、以下の温度条件が表示されます。サイクル数などを必要に応じて変更します。

Hold (初期変性)

95°C、30 sec.

3 Step PCR : 40 cycles

95°C、5 sec.

60°C、30 sec. (データ取得)

注：“Speed”は、Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970) の場合はNormal に、Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900) やLite (製品コード TP700) ではFast に設定します。

食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合、Speed の設定は各装置のデフォルト条件のままなので、設定の変更は不要です。

【パターンの変更】

① 削除するパターンを選択し、画面下の“削除”ボタンをクリックします。

The screenshot shows the software interface with a table of PCR patterns. The '2 Step PCR' pattern is highlighted with a red box. Below the table, the 'Delete' button is also circled in red.

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 画面下の“パターン” から目的のパターンを選択し、“パターン追加”をクリックします。

The screenshot shows the 'Pattern' dropdown menu open, with '3 Step PCR' selected. The 'Add Pattern' button is visible next to it.

※デフォルトは2 Step PCRのパターンになっています。3 Step PCRに変更する場合は、一旦、2 Step PCRのパターンを削除してから3 Step PCRのパターンを追加します。

【温度、時間、サイクル数の変更】

変更したい数字をダブルクリックして、数値を入力します。

サイクル数	1	45		
温度(°C)	95.0	95.0	55.0	72.0
時間(分, 秒)	00:10	00:05	00:10	00:20
データ取得	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

■ 既存ファイルからの設定読み込み

以前と同じ条件でランを行う場合には、他のファイルから反応条件設定や後述のサンプル設定を読み込むことができます。画面右上のウェル情報“読み込み”または、“反応条件読み込み”ボタンをクリックすると、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。



※反応条件を読み込むと、PCR条件の他に蛍光フィルターの選択なども読み込まれます。



※ウェル情報を読み込むと、サンプル情報が読み込まれます。

(2) ランの開始と進行状況の確認

■ ランの開始

PCR反応液を分注したチューブ（またはプレート）を装置にセットし、画面右下の“反応開始”ボタンをクリックします。ファイル名と保存場所を指定し、保存ボタンをクリックします。



■ ラン進行状況の確認

ランを開始すると、画面左側にランの進行状況が表示されます。デフォルトでは、ランの残り時間と温度が表示されますが、“経過”に切り換えると、現在実行中のパターン、セグメント、サイクル数を確認できます。



■ ラン実行中の制御

“装置制御”には、ラン実行中に操作可能な制御ボタンがあります。

- ・ サイクル追加（サイクル数の追加を行います）
- ・ 一時停止（ランを一時停止します）
- ・ 再開（一時停止中のランを再開します）
- ・ スキップ（実行中のパターンを途中で終了して、次のパターンに移ります）
- ・ ストップ（ランを強制的に終了します）

■ ラン終了後のランプ自動消灯

“自動ランプ Off”をチェックしておくこと、ラン終了後にランプが自動的に消灯します。次にランを行う予定のないときは、ここをチェックしておくことランプ寿命の節約になります。

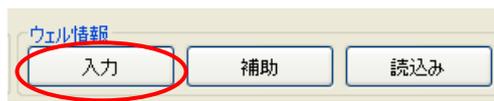
※ 光源としてハロゲンランプを使用しているTP800/TP900シリーズのみの機能です。LEDランプを使用しているTP700/TP970シリーズには、この機能はありません。

5. サンプル設定

サンプル設定画面では、サンプル情報の入力を行います。サンプル設定画面での設定は、ラン開始前・ラン実行中・ラン終了後のいずれの時点でも行うことができ、設定内容を変更して再解析することもできます。

(1) サンプル情報の入力

- ① 画面右上のウェル情報の“入力”ボタンをクリックすると“ウェル情報設定”が表示されます。“ウェル情報設定”の上の項目から順番に設定していくと入力作業がスムーズに行えます。



- ② サンプルタイプの設定
該当するウェルを選択し、サンプルタイプをプルダウンメニューから選択します。

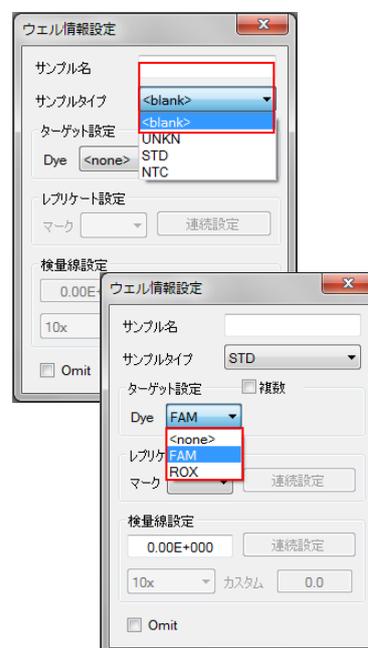
UNKN (Unknown) : 測定対象である未知サンプル

STD (Standard) : 検量線作成用の標準サンプル

NTC (No Template Control) : 陰性コントロール反応

- ③ ターゲットの設定

同一遺伝子を測定するウェルを選択し、次に、検出に使用する蛍光物質名を“Dye”プルダウンメニューから選択します。



④ レプリケートの設定

同一サンプルを測定するウェルを選択して、レプリケートマーク 1, 2, 3, 4・・・を指定します。連続設定機能により、連続入力が可能です。

- (1) 最初のレプリケートのウェルを選択し、“マーク”プルダウンメニューから番号を選択。
- (2) “連続設定” ボタンをクリック。(緑色に変わる)
- (3) 次のレプリケートのウェルを選択すると、次の数字が繰り上げ入力される。
- (4) 設定を解除するには、再度“連続設定” ボタンをクリックする。

次に入力予定のマークが、カーソルに表示される

連続設定をクリック

	1	2	3	4	5	6	7
A	NTC FAM 1	NTC FAM 1	NTC FAM 1				
B	STD FAM 1.00E+000 2	STD FAM 1.00E+000 2	STD FAM 1.00E+000 2				
C	STD FAM 1.00E+001 3	STD FAM 1.00E+001 3	STD FAM 1.00E+001 3				
E	UNKN FAM 5	UNKN FAM 5	UNKN FAM 5				
F	UNKN FAM	UNKN FAM	UNKN FAM				
G	UNKN FAM	UNKN FAM	UNKN FAM	FAM	FAM	FAM	FAM

ウェル情報設定

サンプル名

サンプルタイプ STD

ターゲット設定 複数

Dye FAM

レプリケート設定

マーク 5 **連続設定**

検量線設定

0.00E+000 連続設定

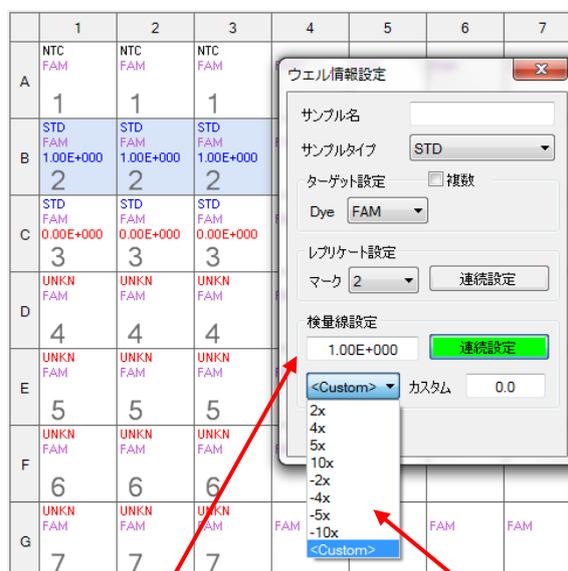
10x カスタム 0.0

Omit

⑤ 検量線設定

初期鋳型量（コピー数や濃度）を入力します。入力は常数でも指数でも可能ですが、ウェルには指数で表示されます。連続設定機能により、任意の希釈率で連続入力できます。

- (1) 最小または最大の初期鋳型量のウェルを選択し、ボックス内に初期鋳型量を入力。
- (2) “連続設定” ボタンをクリック。
- (3) プルダウンメニューから、希釈倍率を選択。
- (4) 次の濃度のウェルをクリックすると、最初の数値に倍率を掛けた数値が入力される（レプリケートが設定されている場合は、レプリケートの内ひとつのウェルをクリックすればよい）。
- (5) 設定を解除するには、再度“連続設定” ボタンをクリックする。



初期鋳型量を入力

希釈率を選択

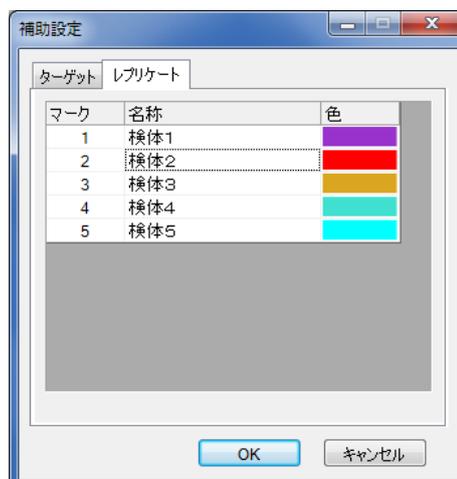
⑤ Omitの設定

反応に使用しないウェルは、Omitにチェックを入れることで、解析から除外することができます。

(2) 補足

■ ウェル情報 補助による名称設定

画面右上のウェル情報“補助”ボタンをクリックすると“補助設定”が表示されます。レプリケートのタブをクリックすると、サンプル設定画面で設定したレプリケートの名称を入力できます。



6. 結果/解析

結果/解析画面では、結果の表示や解析パラメータの設定を行います。画面は、上下二画面に分かれており、それぞれに任意の図を表示させることができます。

(1) 基本操作

- ① 検出フィルターボタンをクリックするとそのフィルターのグラフが表示されます。
- ② データ解析のプルダウンメニューからデータの種類を選択します。
- ③ 表示セレクトで表示/解析するウェルを選択します。表示セレクトは、表示セレクトタブのクリックで表示/非表示を切り替えます。



①検出フィルターの選択

②データの種類の選択

③表示するウェルの選択

(2) データの種類と解析法

■ 増幅曲線

増幅曲線には、グラフ表示の種類としてPrimary CurveやRawがあります。

Primary Curve: 通常の一次曲線です。

Crossing Point法 (CP法) によるCt値の算出に用います。

Raw: 蛍光値の生データです。

バックグラウンドなど、測定結果の確認が必要なときに参照します。

【解析パラメータの設定変更の仕方】

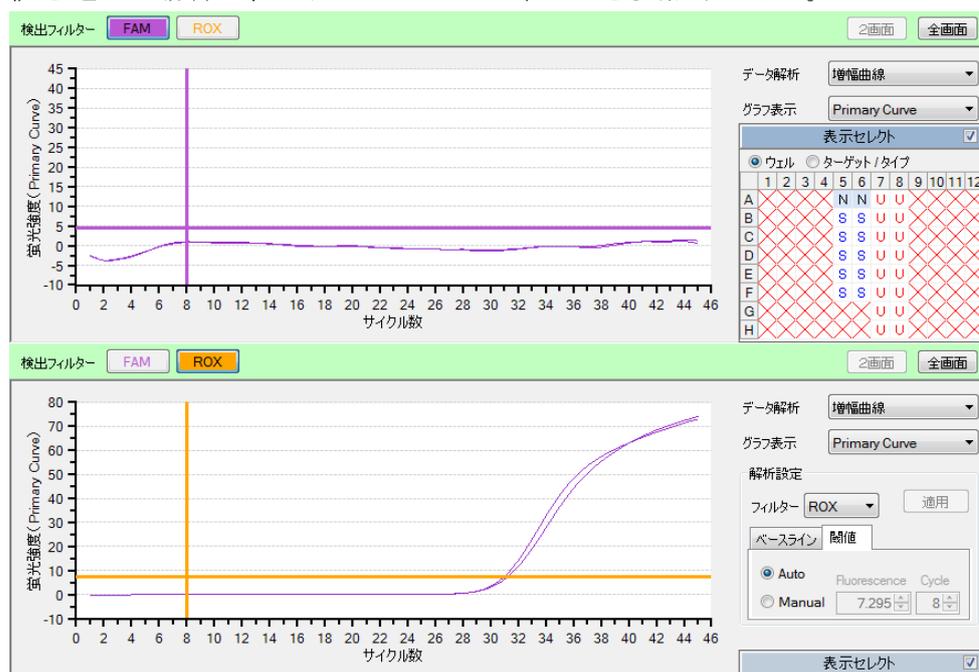
増幅曲線を表示させると、グラフの右側には解析パラメータの設定項目が表示されます。閾値のタブをクリックするとグラフに閾値が表示されます。デフォルトのAuto設定が適切でない場合は、Manualを選択し、解析パラメータを変更してから“適用”ボタンをクリックしてください。



【解析の手順】

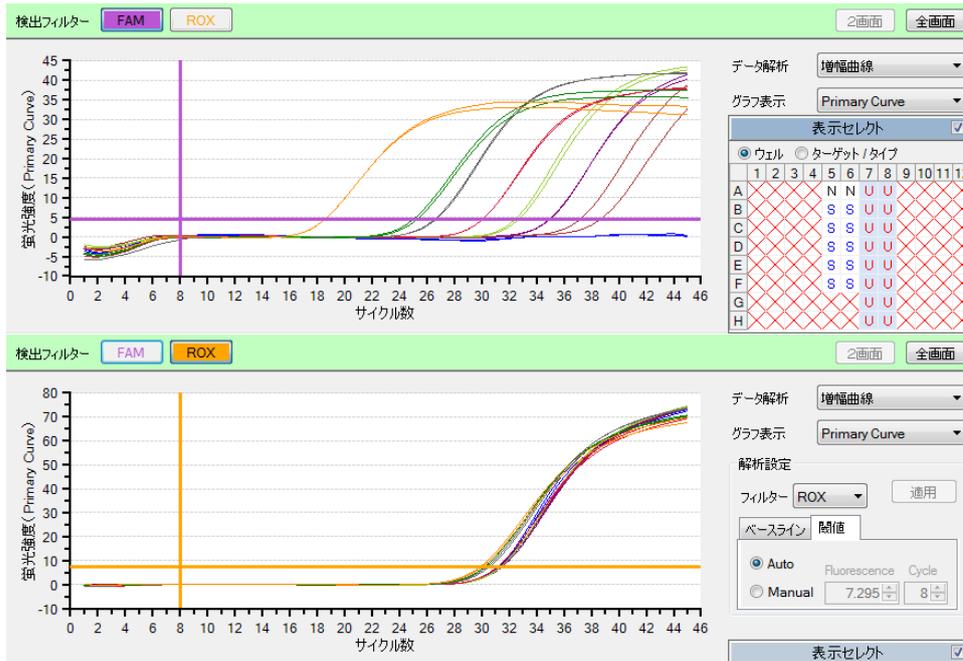
① NCの反応結果確認

表示セレクトで《N》のウェルを選択し、検出フィルター《FAM》においてベースラインの蛍光シグナルに変化がなく閾値を超えないこと、および検出フィルター《ROX》で増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認します。《FAM》においてベースラインが安定せず、閾値を超えた場合は、トラブルシューティングを参照ください。



② 検体サンプルの反応結果確認

表示セレクトで《U》のウェルを選択し、検出フィルター《FAM》で増幅曲線やベースラインが正常に描かれていることを確認します。



※以上の操作は、ターゲットをFAMで、インターナルコントロールをROXで検出する場合の確認方法です。

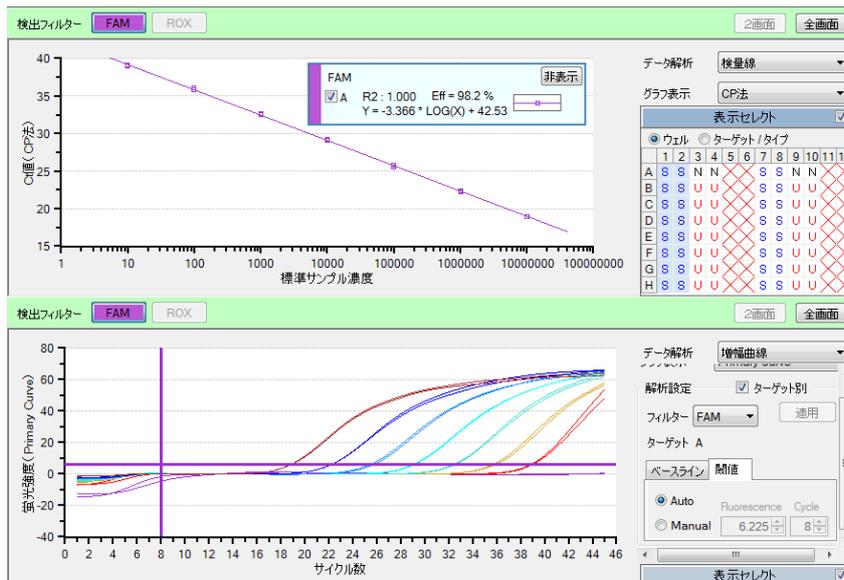
■ 検量線

縦軸をCt値、横軸をスタンダードサンプルの初期鋳型量とした各ターゲットの検量線を表示します。

【解析の手順】

上の画面では、データ解析から“検量線”を選択し、検量線を表示させます。

下の画面では、データ解析から“増幅曲線”を選択し、増幅曲線やベースラインが正常に描かれていることを確認します。



■ テキストレポート

Ct値や定量値などの数値データを表形式で表示します。表示形式から“レプリケート”を選択すると、レプリケートごとの平均値を表示します。表示項目では、通常“CP法データ”に✓を入れます。また、表示させる項目は、“詳細項目”のリストの中から選択します。

The screenshot shows a software interface with a table of data and a control panel on the right. The table has columns for sample type, replicate mark, filter, average Ct value, Ct value SD, standard sample concentration, and quantitative average value. The control panel includes buttons for filters (FAM, ROX), view options (2画面, 全画面), and a list of items to display (Data Analysis, Display Format, Display Items, Detailed Items).

サンプルタイプ	レプリケートマーク	検出フィルター	平均Ct値(CP)	Ct値SD(CP)	標準サンプル濃	定量平均値(C)
UNKN	7	FAM	--	--	--	--
UNKN	8	FAM	37.95	1.061E+000	--	7.347E+000
UNKN	9	FAM	34.98	4.242E-002	--	7.049E+001
UNKN	10	FAM	32.59	1.838E-001	--	5.048E+002
UNKN	11	FAM	30.09	0.000E+000	--	3.914E+003
UNKN	12	FAM	26.65	8.485E-002	--	6.612E+004
UNKN	13	FAM	25.17	1.838E-001	--	2.240E+005
UNKN	14	FAM	18.59	7.071E-003	--	4.979E+007

検出フィルター: **FAM** **ROX** 2画面 全画面

データ解析: テキストレポート

表示形式: レプリケート

表示項目: 解析条件 CP法データ SDM法データ

詳細項目: 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 平均Ct値(CP) Ct値SD(CP)

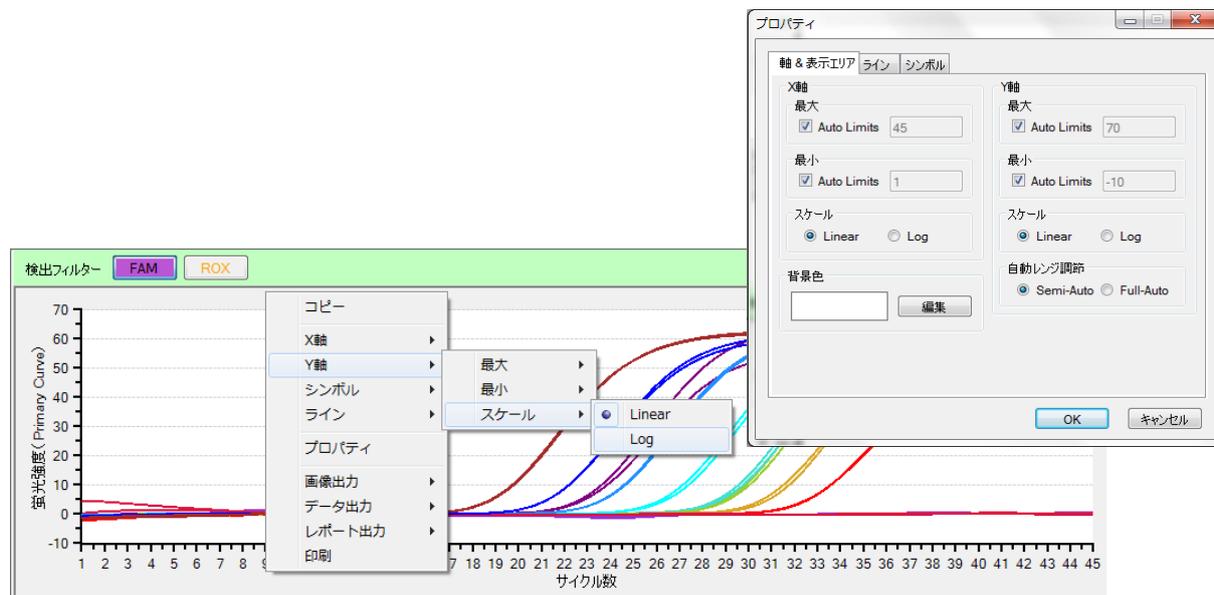
判定結果についての注意

(インターナルコントロールを含むキットの場合)

- 陰性コントロール反応で、FAMフィルターにおいて増幅が認められた場合
→ コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用する機器を除染する。
- 陽性コントロール反応で、FAM、ROX両方のフィルターで増幅が認められなかった場合
→ 何らかの原因でPCR反応またはプローブ検出が正常に行われていない。
→ サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再反応を行う。または検体の再調製を行い、再反応を行う。
- 陽性コントロール反応で、ROXフィルターでは増幅が認められ、FAMフィルターでは増幅が認められなかった場合
→ Primer/Probe Mixに問題があるか、陽性コントロールが分解している可能性がある。

(補足) グラフ表示形式の変更

グラフ上でダブルクリックすると、“プロパティ” ウィンドウが表示されます。軸目盛りの変更や Linear、Log スケールの切り換え、ラインやシンボルのデザインの変更ができます。なお、これらのグラフ表示の変更は、右クリックのショートカットでも選択できます。変更内容がひとつだけの場合には、この方法が便利です。



7. 結果の出力

■ グラフ等の出力

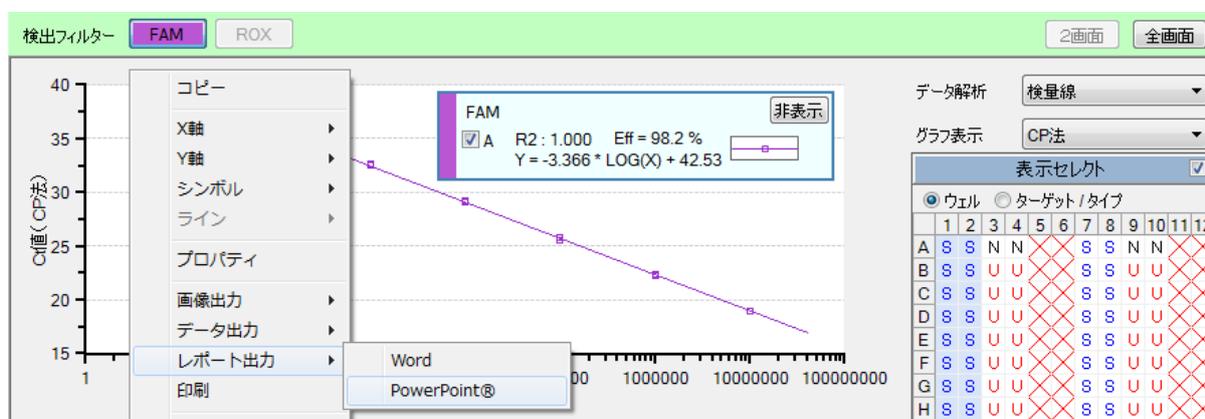
出力したいグラフ上で右クリックし、ショートカットメニューの中から出力形式を選択します。数値データあるいはレポートとして出力できます。

【データ出力】

右クリックでショートカットを表示させ、[データ出力]→[CSV]または[Excel]を選択してください。

【レポート出力】

右クリックでショートカットを表示させ、[レポート出力]→[Word]または[Power Point]を選択してください。



■ テキストレポートの出力

テキストレポートの内容は、CSV形式またはExcel形式のファイルとして出力できます。

右クリックでショートカットを表示させ、[データ出力]→[CSV]または[Excel]を選択してください。

サンプル名	サンプルタイプ	レプリケートマ	検出フィルター	Ct値/CP
滅菌水	NC	1	FAM	
滅菌水	NC	1	FAM	
コントロールDNA	PC		FAM	
コントロールDNA	PC		FAM	
サンプル1	UNKN		FAM	
サンプル1	UNKN		FAM	
サンプル2	UNKN	4	FAM	
サンプル2	UNKN	4	FAM	
サンプル3	UNKN	5	FAM	
サンプル3	UNKN	5	FAM	
サンプル4	UNKN	6	FAM	
サンプル4	UNKN	6	FAM	
サンプル5	UNKN	7	FAM	

■ レポート作成機能

いくつかの図をまとめてレポートを作成することもできます。

【レポート作成 (Word, Power Point)】

ファイルメニューからフルレポート作成を選択すると、“フルレポート設定”画面が表示されます。必要な図とファイル形式を選択して、“OK” ボタンをクリックするとレポートが作成されます。



【レポート印刷 (PDF ファイル)】

レポートをPDFファイルとして保存することもできます。ファイルメニューから印刷を選択すると、“フルレポート”画面が表示されます。必要な図とファイル形式を選択して、“OK” ボタンをクリックすると”Print Preview”画面が表示され、ここのFileメニューからsaveを選択するとPDFファイルとして保存されます。

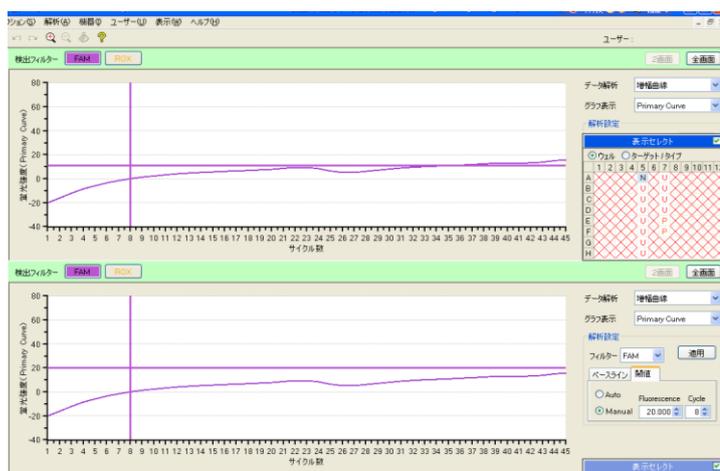
8. トラブルシューティング

◆ 陰性コントロール反応においてベースラインが閾値を超えた場合

- 1 データ解析から“増幅曲線”を選択し、グラフ表示から“Raw”を選択する。表示セレクトで《N》のウェルを選択し、検出フィルター《FAM》を選択する。
- 2 増幅曲線 (Raw) の形状を確認する。

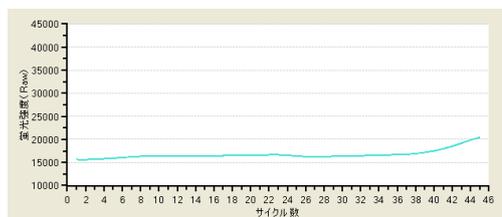
2.1 ベースラインが不安定で閾値を超えたと判断される場合

閾値をManual設定に変更し、閾値をベースラインを超えない位置に設定して“適用”ボタンを押す。



2.2 PCR増幅によるシグナル増加と判断される場合

コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用機器を除染する。



9. リアルタイムPCR装置関連製品

■ 消耗品

製品名	用途	製品コード	容量	価格
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps	独立型キャップ付き 8 連チューブ	NJ600	120 strips	¥19,800
0.2 ml Hi-8-Tube	8 連チューブ	NJ300	125 strips	¥16,500
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	8 連チューブキャップ	NJ302	125 strips	¥4,400
96well Hi-Plate for Real Time	96 well プレート	NJ400	10 枚	¥6,050
Sealing Film for Real Time	96 well プレート用のシール	NJ500	100 枚	¥31,900
48 well snap plate	48 well プレート	NJ700	20 枚	¥9,350
Flat cap for snap plate	48 well プレート用のフラットキャップ	NJ720	120 strips	¥6,380

表示価格はすべて税別です。

【ライセンスについて】

[L47]Real-Time PCR Quantification Method : The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary *in vitro* diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627, 6,303,305, and 6,503,720, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH.

最新のライセンス情報に関しては弊社ウェブサイトにてご確認下さい。

- 本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することをご遠慮ください。
- 本冊子に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本冊子記載の価格は2016年11月14日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

TaKaRa テクニカルサポートライン

TEL. 077-565-6999 FAX. 077-565-6995

東京支店 TEL. 03-3271-8553 FAX. 03-3271-7282

関西支店 TEL. 077-565-6969 FAX. 077-565-6995

1611