

TaqMan® Pathogen Detection Kit

簡易操作ガイド

Sep, 2006

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

本ガイドは TaqMan® Pathogen Detection Kitの操作を行う際に必要となる部分のみを記載している簡易操作ガイドです。

詳細は TaqMan® Pathogen Detection Kitおよび装置付属の英文ユーザーガイドをご確認下さい。また本ガイドには知的財産に関するいかなる情報も含んでおりません。知的財産に関する情報は英文ユーザーガイドに記載されておりますのでご参照ください。

目次

• 実験手順の概要	3
• 製品概要	4
• 前培養後のDNAサンプルの調整	6
• Applied Biosystems 7300・7500 Real-Time PCR システムユーザー : Rapid Finder™ソフトウェア	
– ソフトウェアの起動	7
– サンプルシートの作成	8
– 試薬の調整、反応プレートの作成	11
– 反応の開始	16
– 解析結果の確認	18
• Applied Biosystems 7900 HT FAST Real-Time PCR システムユーザー、その他ユーザー	
– PCR反応溶液の調整	20
– プレートドキュメントの作成	22
– サーマルサイクリング条件の指定とランの開始	23
– データ解析	24
– 結果の表示	28

実験手順の概要

TaqMan® Pathogen Detection kit を用いた実験手順のフロー

サンプル

前培養

(必要な場合)各種目的の菌に標準的な培養条件で前培養を行います。

DNAの調製

PrepMan® Ultra Sample Reagents (商品番号: 4318930)

TaqMan® Pathogen Detection PCR反応溶液の調製

リアルタイムPCR

結果の判定

製品概要

TaqMan® Pathogen Detection kit は特定の病原菌検出の為に、シンプルで信頼性が高く迅速な手段を提供します。このキットはPCR法を利用した方法で、目的の微生物特有のターゲット遺伝子配列を増幅し、TaqMan® Probeにより特定の微生物の有無を蛍光検出します。全てのターゲットが同一PCR反応条件で反応できるように設計されていますので、いくつかの菌を同時に反応・判定する事が可能です。

検出感度

PCRにより検出感度は反応あたり、ターゲットDNA1～10コピーです。TaqMan® Pathogen Detection Kit は前培養したサンプルを用い、25gの食品あたり1CFUまでの感度で検出が可能です。

検出特異性

各キットは高精度のバイオフィーマティクステクノロジーにより近縁菌との交差なく検出できるようにデザインされています。各キットの検出特異性に付きましてはそれぞれのプロトコールをご参照下さい。

キットの内容

TaqMan® Pathogen Detection kitは100反応分の試薬を含みます。

名称	内容	容量	保存
10x Target Assay Mix (1本)	ターゲット遺伝子のプライマーとプローブ IPCの鋳型とプライマーとプローブ	300uL	-20 遮光
2x Environmental Master Mix (2本)	DNAポリメラーゼ、PCRバッファー、リファレンスROX	750uL (2本)	2～8 遮光
Negative Control (1本)	RNaseフリー水	1000uL	2～8

陽性コントロールはキットには含まれていません。陽性コントロールは必須ではありません。陽性コントロールはクロスコンタミネーションを引き起こす可能性があるため扱いには十分に注意が必要です。

インターナルポジティブコントロール(IPC)

アプライドバオシステムズではTaqMan® Pathogen Detection kit にIPCを含めています。IPCによりPCRの反応を阻害する物質の存在による偽陰性の判定を回避する事ができます。又、PCRに使用試した試薬が滞りなく正しく働いて増幅が起こっているかどうかを確認することも出来ます。IPCを使用することにより、ポジティブコントロールを使用する必要がなくなり、測定サンプルのクロスコンタミネーションによるリスクを減らす事ができます。

試薬の保管

TaqMan® Pathogen Detection kit の保管は以下のガイドラインに従ってください：

- 製品が到着したら、10x Target Assay Mix は遮光して、-20 で保存してください。強い光線に当たると蛍光色素に影響を与える可能性があります。
- Negative Controlと2x Environmental Master Mix は遮光して、2～8 で保存してください。
- 凍結融解を繰り返すことはできるだけ避けてください。

商品名	サイズ	商品番号
TaqMan® <i>Campylobacter jejuni</i> Detection Kit	100反応分	4368733
TaqMan® <i>E. coli</i> O157:H7 Detection Kit	100反応分	4368735
TaqMan® <i>Listeria Monocytogenes</i> Detection Kit	100反応分	4368734
TaqMan® <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit	100反応分	4368721
TaqMan® <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Detection Kit	100反応分	4370500
TaqMan® <i>Staphylococcus aureus</i> Detection Kit	100反応分	4370568
PrepMan® Ultra Sample Reagent	100検体分	4318930
PrepMan® Ultra Protocol	1冊	4318925
PrepMan® Quick Start Card	1枚	4318924
PrepMan® Quick Starter Package	100検体分	4322547
Rapid Finder™ Software v1.0 for 7300		4370199
Rapid Finder™ Software v1.0 for 7300 with RQS		4370200
Rapid Finder™ Software v1.0 for 7500		4370202

前培養後のDNAサンプルの調製

PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagentは広範囲のグラム陽性菌およびグラム陰性菌で有効です。前培養後の試料からのサンプル調整における検討を行う際の出発点としておすすめしてします。液体培地や固体培地で培養したバクテリアからサンプルを調整する方法に関する詳細な情報はPrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocolをご覧ください。

1. 1 mlの前培養後のサンプルを滅菌した(リード付)スクリーキャップ式マイクロチューブに移し、キャップを閉めます。
2. 遠心機を用いて、16,000gで3分間遠心し内容物を沈殿させます。
3. 上清を捨て、ペレットを残します。上清はバイオハザード廃棄物の廃棄手順に従って処理します。
注:上清を取り除く時にペレットを乱さないようにします。
4. ペレットを100 μ lのPrepMan® Ultra Sample Preparation Reagentに再懸濁し、内容物を混合する為に軽くボルテックスにかけます。
5. 4を95-100 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した後、軽くボルテックスにかけます。
6. 遠心機を用いて、16,000gで3分間遠心し内容物を沈殿させます。
7. 上清50 μ lを新しいチューブに移しサンプルとします。サンプルは4 $^{\circ}$ Cで約1ヶ月保存が可能です。
注:上清を取り除く時にペレットを乱さないようにします。
8. サンプルのうち10 μ lを新しいチューブに移し、RNase free水を90 μ l加えます。
9. 8を軽くボルテックスにかけて、これでPCRの為のサンプルDNAの準備は完了です。

RapidFinder™ Software

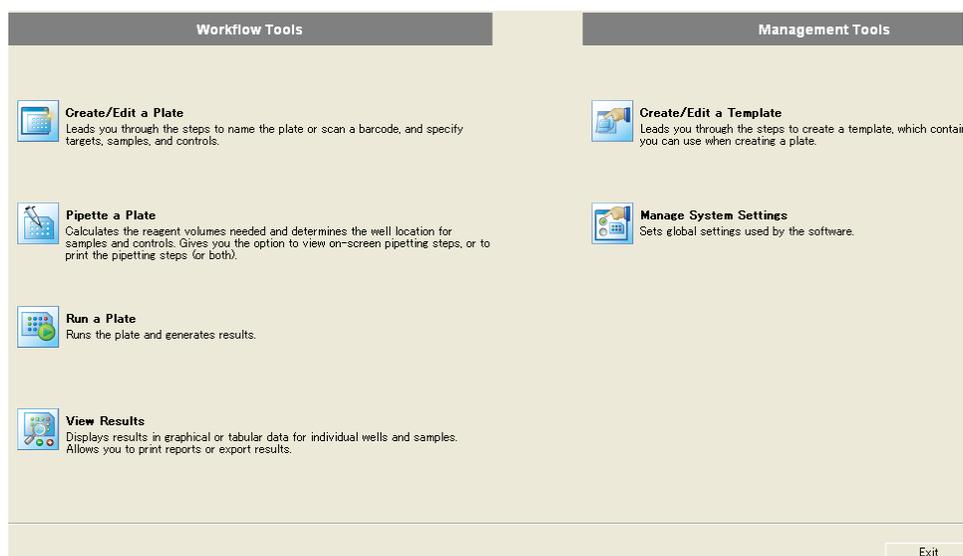
- **Rapid Finder ソフトウェアは、病原菌検出の為のグラフィカルで使いやすいツールです**
 - 測定サンプル数やコントロールサンプル数、ターゲット遺伝子の種類などの入力をガイドします
 - 反応に必要な各試薬の量を自動計算します
 - サンプルやコントロールを分注する最適なウェルを決定します
 - 試薬の調製からプレートに分注するまでの各ステップを案内します
 - 標準的な反応温度条件を使用して反応を開始します
 - 反応後自動的にデータを解析します
 - 結果(+ , - , !)を表示します

ソフトウェアの起動

1. デスクトップにあるRapid Finderソフトウェアをダブルクリックして開きます。

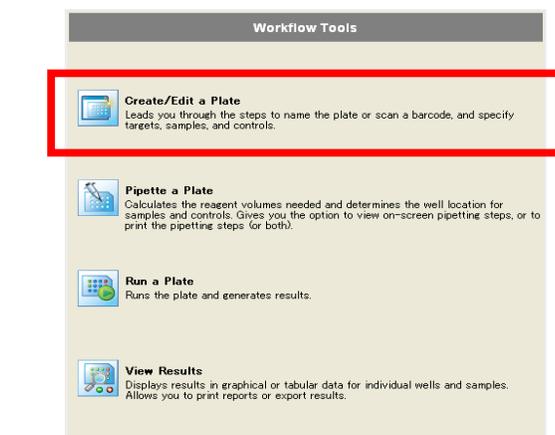


2. メインページが表示されます。



サンプルシートの作成

1. メインページで[Create/Edit a Plate]を選択します。



2. [Create New Plate]を選択し[Next]ボタンをクリックします。
 - Templateが有る場合は、Use Existing Plate Templateから開きます。



3. 必要に応じて、プレートの名前を[Plate Name]変更します。
 - オペレーターの名前[Setup Operator]やコメント[Comment]があれば入力します。
4. [Next]ボタンをクリックします。

The screenshot shows a form titled 'Enter Plate Information'. It contains several input fields: 'Plate Name' (with 'Plate_02142006_1' entered), 'Barcode', 'Setup Operator', and 'Comments' (a large text area). A note next to the Barcode field says 'To scan the barcode, click the Barcode field, then press the trigger on the scanner.'

5. 対象菌を選択しサンプル数、反応反復数、ネガティブコントロールの反応数を入力します。
 - ネガティブコントロールは3反応以上行われることをお勧めいたします。
 - 陽性コントロールは特に推奨しません。
6. [Next]ボタンをクリックします。

Select Target(s)
Select the target pathogens to test for, then enter the number of samples, replicates, and positive and negative controls for each required for each target pathogen. Click Next to continue.

Plate Name: Plate_02142006_1

Target Information

Target	# Samples	# Replicates	# Negative Controls	# Positive Controls
<input type="checkbox"/> C. jejuni				0
<input checked="" type="checkbox"/> E. coli O157:H7	5	3	3	0
<input type="checkbox"/> L. mono.				0
<input checked="" type="checkbox"/> S. enterica	5	3	3	0

サンプル数 ネガティブ反応数

反応反復数

トータル反応ウェル数が緑で示されます。

This illustration shows the number of wells containing samples
Wells Used: 36 / 96

7. サンプルの名前を入力します。
8. [Next]ボタンをクリックします。

Enter Sample Names
Enter or import sample names and information for each target. To change the number of samples or replicates for a target, click

Plate Name: Plate_02142006_1

Target/Sample Information

To add additional targets or samples, click Back to return to the previous page.

Target	Sample Name	Replicates	User Defined #1	User Defined #2	User Defined #3
2	E. coli O157:H7	No.2			
3	E. coli O157:H7	No.3			
4	E. coli O157:H7	No.4			
5	E. coli O157:H7	No.5			
6	S. enterica	No.1			
7	S. enterica	No.2			
8	S. enterica	No.3			
9	S. enterica	No.4			
10	S. enterica	No.5			

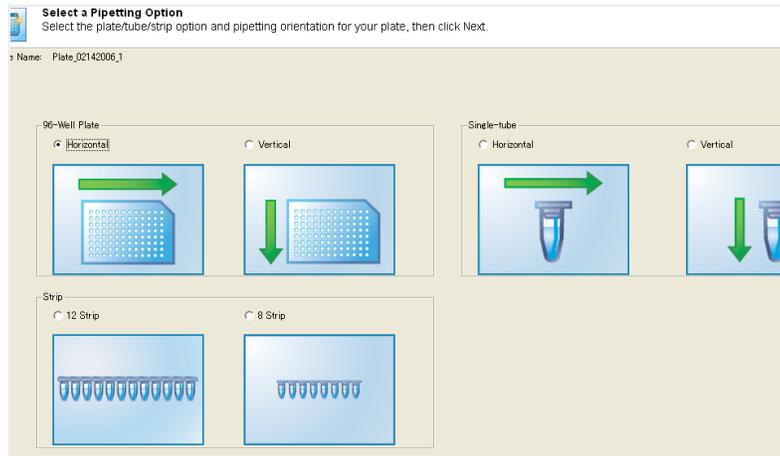
Fill Down Delete Selected

Target/Control Information

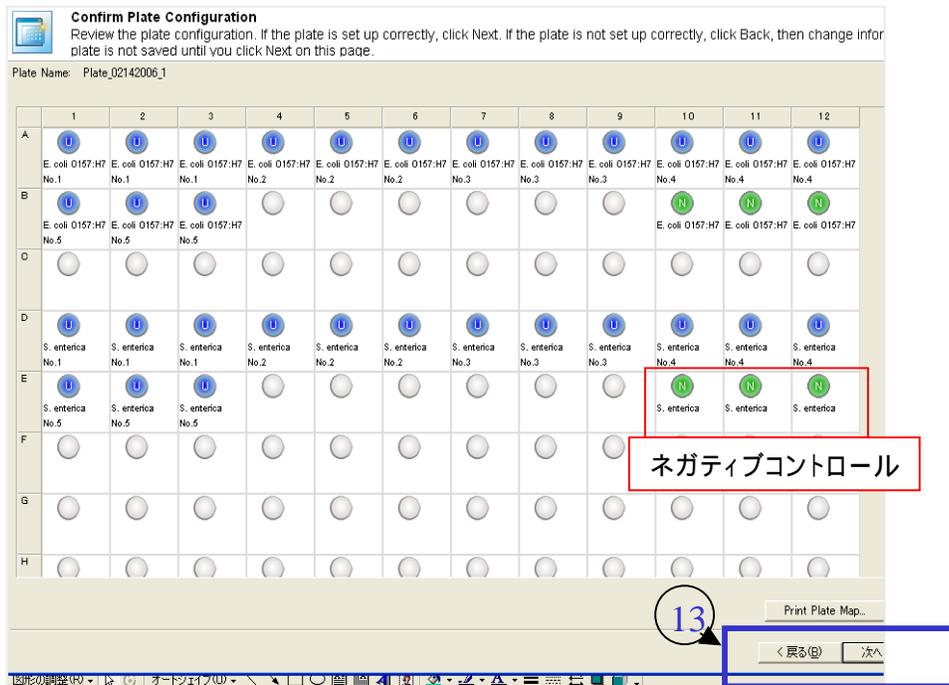
Target	Control	Replicates	
1	E. coli O157:H7	Negative	3
2	S. enterica	Negative	3

This illustration shows the number of wells containing samples
Wells Used: 36 / 96

9. 反応に使用するチューブの形状と、分注方向を選びます。
10. [Next]ボタンをクリックします。

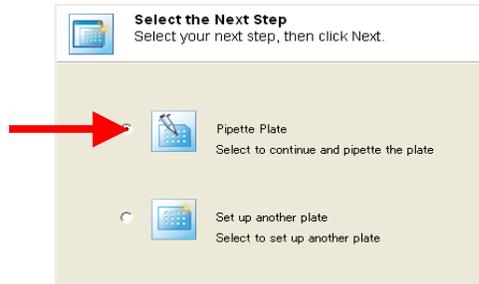


11. プレートマップが表示されます。
12. 必要であればプレートマップをプリントアウトできます。
13. 設定を確認して問題なければ[Next]ボタンをクリックします。このときサンプルセットアップ情報が保存されます。修正したい時にはBackボタンでページを戻って書き換えます。

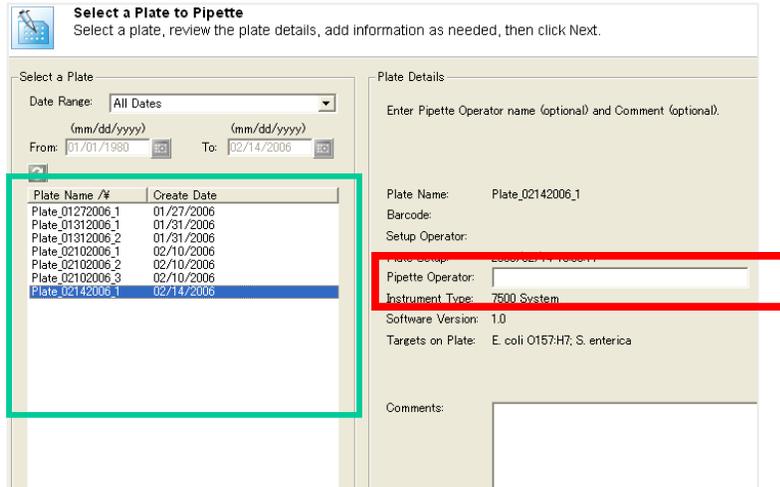


試薬の調製、反応プレートの作成

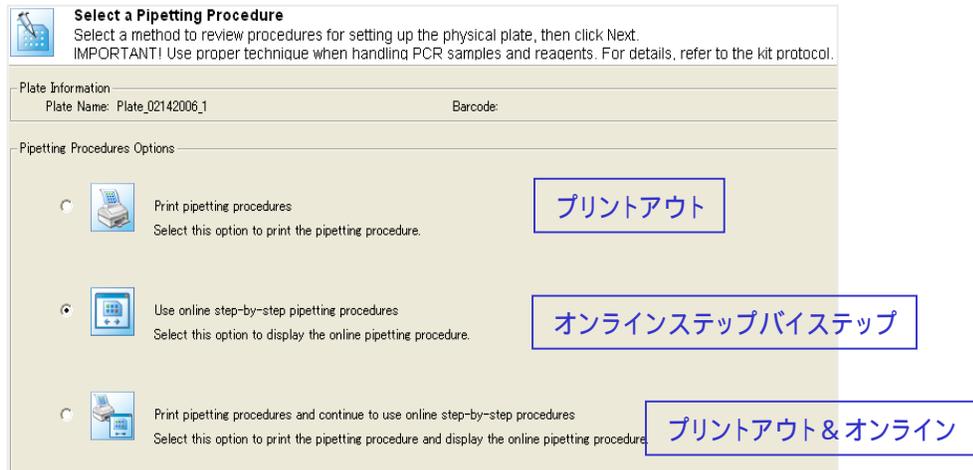
1. 引き続き分注を行う場合は、[Pipette Plate]を選択します。終了する場合は[Close]をクリックします。
2. [Next]ボタンをクリックします。



3. Plate Nameよりプレートを選択します。
4. 分注担当者の名前などを入力します。
5. [Next]ボタンをクリックします。



6. プリントアウトするか、コンピュータを動かしながらウィザードに沿って分注を行うかを選択します。
7. [Next]ボタンをクリックします。



ステップバイステップ

8. 分注でロスする分の試薬の余裕を何%に設定するかを選択します。
9. 各試薬及びサンプルの必要量が示されますので、準備します。
10. 確認したら左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。

Review Reagent and Sample Information
Review the information listed for reagents and samples. Ensure that you have the indicated volume of all items, check the box at the bottom

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode: Created: 2006/02/14 15:58

Reagents

Pipette Overage: 5 %

	Name	Kit Part Number	Volume
1	E. coli O157:H7	4366100	
2	EMM	kit component	283.50 uL
3	TAM	kit component	56.70 uL
4	Negative Control	kit component	36.00 uL
5	S. enterica	4366104	
6	EMM	kit component	283.50 uL
7	TAM	kit component	56.70 uL
8	Negative Control	kit component	36.00 uL

Samples

	Name	Volume
1	No.1	72 uL
2	No.2	72 uL
3	No.3	72 uL
4	No.4	72 uL
5	No.5	72 uL

10

Ensure all reagents and samples are available

11. 常温に戻した試薬をそれぞれ指示された量ミックスします。
12. 十分に攪拌した後、スピンドウンします。
13. 左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。

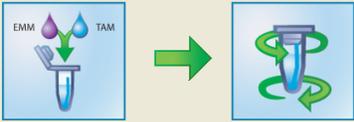
Prepare Premix Solutions
Follow the directions below to prepare the needed premix solutions, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode: Created: 2006/02/14 15:58:11

Premix Directions

1. Thaw all reagents completely, mix (by gently aspirating/dispensing a few times or by vortexing briefly), then centrifuge briefly.
2. Label a tube with target name.
3. Combine the volumes listed of 2x Environmental Master Mix (EMM) and 10x Target Assay Mix (TAM). Use a new tip when pipetting EMM and TAM.
4. Mix reagents (by aspirating/dispensing a few times or by vortexing briefly).
5. Close the tube.
6. Repeat steps 1 through 5 for each target assay.
7. When all premix solutions are prepared, check the box at the bottom of the page, then click Next.

	Target Name	2x EMM Vol	10x TAM Vol
1	E. coli O157:H7	283.50 uL	56.70 uL
2	S. enterica	283.50 uL	56.70 uL



Select to confirm that this step has been completed

1. 全ての試薬を解凍し十分に攪拌し、軽くスピンドウンします
2. ターゲットごとにチューブを準備し、名前を書きます。
3. 10xTAMと2xEMMを表に示された量をとります。EMMとTAMを分注する際は新しいチップを使用します
4. 3を十分に攪拌します。
5. スピンドウンします。
6. ターゲットごとに1から5を繰り返します。

14. 各ウェルに反応プレミックスを18 μ lずつ分注します。
15. 分注できたら対応するターゲットのチェックボックスにチェックします。
16. 分注が終了したら左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。

Pipette Premix
Follow the directions below to pipette premix solutions, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode: Created: 2006/02/14 15:58:11

Pipette Premix
1. Click a Target Name in the table at the right to highlight the wells reserved for the premix solution for the selected target.
2. Pipette the indicated volume of premix solution for the selected target into the highlighted wells.
3. (optional) When all wells for the selected target are pipetted check the Pipetted box in the table at the right.
4. Change the pipette tip, then repeat steps 1 through 3 for the next target.
5. When all premix solutions are pipetted, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Pipetted	Target Name	Volume/W
<input checked="" type="checkbox"/>	E. coli O157:H7	18.00 μ L
<input checked="" type="checkbox"/>	S. enterica	18.00 μ L

Select to confirm that this step has been completed

1. 表中のターゲット名をクリックするとウェルの色が反転します。
2. ハイライトされたウェルに示された量のプレミックスを分注します。
3. 分注したプレミックスのチェックボックスにチェックを入れ、次のターゲット名をクリックします。

17. 対応するチェックボックスにチェックを入れながら各ウェルにサンプルDNAを12 μ lずつ分注します。このとき1ウェルごとにチップを交換します。
18. 分注が終了したら左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。
19. 上記の要領でターゲットごとにウィザードの指示に従って分注していきます。

Pipette Unknown Samples
Follow the directions below to pipette unknown samples, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode: Created:

Pipette Unknowns
Target (1 of 2): E. coli O157:H7
The unknown sample wells reserved for the target above are highlighted below.

1. Click a Well Number in the table at right, then pipette the indicated volume of an unknown into the indicated well.
2. Mix by gently aspirating and dispensing a few times. IMPORTANT! Mix very gently with the pipette tip at the bottom of the tube to minimize aerosol formation and cross-contamination.
3. (optional) Check the Pipetted box.
4. Change the pipette tip, then repeat steps 1 through 4 for the next unknown.
5. When all unknown samples for the target are pipetted, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Pipetted	Well Number	Sample No
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	No.1
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	No.1
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	No.1
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	No.2
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	No.2
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	No.2
<input type="checkbox"/>	A7	No.3
<input type="checkbox"/>	A8	No.3
<input type="checkbox"/>	A9	No.3

Select to confirm that this step has been completed

1. 表中のウェルナンバーをクリックするとウェルの色が反転します。ハイライトされたウェルに指示された量のサンプルを分注します。
2. ピペッティングによってゆっくりと攪拌します。飛沫が飛んでコンタミしないように十分注意します。
3. 分注したチェックボックスにチェックを入れます。
4. チップを変えて、1～3を繰り返します。
5. 全ての分注が済んだら、左下のチェックボックスにチェックをした後、Nextをクリックし次のページに進みます。

20. ポジティブコントロールを設定した時は、ポジティブサンプルを分注する前に既にサンプルを分注したウェルにフタをして、コンタミネーション汚染から守ります。(ポジティブコントロールを設定していない場合はステップ24.へ)

- オプティカルフィルムを使用している場合は、アルミホイルなどを使ってカバーし、コンタミネーション汚染から守ります。

Close Pipetted Tubes Before Pipetting Positive Controls
Follow the directions below to close tubes, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_07052006_1 Barcode: Created: 2006/07/05 11:31

Close Tubes
Close all unknown sample and negative control tubes.
IMPORTANT! If you are using an optical cover on a plate, skip this step, and be extremely careful to avoid contamination when pipetting positive controls.

21. 対応するチェックボックスにチェックを入れながら各ウェルにポジティブサンプルを12 μlずつ分注します。1ウェルごとにチップを交換します。
22. 分注が終了したら左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。
23. 上記の要領でターゲットごとにウィザードの指示に従って分注します。

Pipette Positive Controls
Follow the directions below to pipette positive controls, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_07052006_1 Barcode:

Pipette Positive Controls
IMPORTANT! When pipetting positive control, be extremely careful. Contamination of unknown wells with positive control will affect results.

1. Click a Well Number in the table at the right, then pipette the indicated volume of the positive control for the target into the indicated well.
2. Mix by gently aspirating and dispensing a few times. **IMPORTANT!** Mix very gently with the pipette tip at the bottom of the tube to minimize aerosol formation and cross-contamination.
3. (optional) Check the Pipetted box.
4. Change the pipette tip, then repeat steps 1 through 3 for the next positive control well.
5. When all positive controls are pipetted, check the check box at the bottom of the page, then click Next.

Pipetted	Well Number
<input checked="" type="checkbox"/>	B11
<input type="checkbox"/>	B12
<input type="checkbox"/>	E11
<input type="checkbox"/>	E12

1. 表中のウェルナンバーをクリックするとウェルの色が反転します。ハイライトされたウェルに指示された量のサンプルを分注します。

2. ピペティングによってゆっくりと攪拌します。**飛沫が飛んでコンタミしないように十分注意します。**

3. 分注したチェックボックスにチェックを入ます。

4. チップを変えて、1～3を繰り返します。

5. 全ての分注が済んだら、左下のチェックボックスにチェックをした後、Nextをクリックし次のページに進みます。

24. 全てのウェルにフタをします。又はオプティカルシールを貼ります。
25. ウェルのそこの泡が無いが確認します。必要に応じて、遠心によりスピンドダウンします。(< 1500 g)
26. 左下のチェックボックスにチェックを入れ[Next]ボタンをクリックします。

Close Tubes
Follow the directions below to close tubes, check the box at the bottom of the page, then click Next.

Plate Information
Plate Name: Plate_07052006_1 Barcode: Created: 2006/07

Close Tubes

1. Close all tubes or apply an optical cover to the plate.
2. Make sure reagents are in the bottom of the wells. If available, use a centrifuge with a plate adapter to briefly centrifuge the plate (<1500g).
3. Check the check box at the bottom of the page, then click Next.





27. プレートマップが表示されます。
28. [Next]ボタンをクリックします。

Confirm Plate Map
Review the plate map, then click Next to confirm.

Plate Name: Plate_02142006_1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E. coli O157:H7 No.1	E. coli O157:H7 No.1	E. coli O157:H7 No.1	E. coli O157:H7 No.2	E. coli O157:H7 No.2	E. coli O157:H7 No.2	E. coli O157:H7 No.3	E. coli O157:H7 No.3	E. coli O157:H7 No.3	E. coli O157:H7 No.4	E. coli O157:H7 No.4	E. coli O157:H7 No.4
B	E. coli O157:H7 No.5	E. coli O157:H7 No.5	E. coli O157:H7 No.5							E. coli O157:H7	E. coli O157:H7	E. coli O157:H7
C												
D	S. enterica No.1	S. enterica No.1	S. enterica No.1	S. enterica No.2	S. enterica No.2	S. enterica No.2	S. enterica No.3	S. enterica No.3	S. enterica No.3	S. enterica No.4	S. enterica No.4	S. enterica No.4
E	S. enterica No.5	S. enterica No.5	S. enterica No.5							S. enterica	S. enterica	S. enterica
F												
G												
H												

Print Plate Map...

反応の開始

1. 続けて反応を行う場合は、[Run plate]に進みます。

Select the Next Step
Select your next step.

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode:

Next Step Options

- Run plate**
Select this option to run a plate.
- Print pipetting procedures**
Select this option to print the pipetting procedure you just performed.
- Pipette another plate**
Select this option to pipette another plate.

2. 反応を行うプレートを選択し担当者の名前を入力します。
3. [Next]ボタンをクリックします。

Select a Plate to Run
Select a plate, review the plate details, and add information as needed.
Load the plate in the instrument (click Help for information), then click Next.

Select a Plate
Date Range: All Dates
(mm/dd/yyyy) (mm/dd/yyyy)
From: 01/01/1980 To: 02/14/2006

Plate Name /#	Last Modified
Plate_01272006_1	01/31/2006
Plate_01312006_1	01/31/2006
Plate_01312006_2	01/31/2006
Plate_02102006_1	02/10/2006
Plate_02102006_2	02/10/2006
Plate_02102006_3	02/10/2006
Plate_02142006_1	02/14/2006

Plate Details
Enter Run Operator name (optional) and Comment (optional).

Plate Name: Plate_02142006_1
Barcode:
Setup Operator:
Plate Setup: 2006/02/14 15:58:11
Pipette Operator:
Run Operator:
Instrument Type: 7500 System
Software Version: 1.0
Targets on Plate: E. coli O157:H7; S. enterica
Comments:

4. リアルタイムPCRシステムに反応チューブをセットします。
5. サイクル数を40, 45, 50の中から選択します。
6. [start]をクリックして反応を開始します。終了までの時間が表示されます。(増幅曲線のリアルタイム画像は表示されません)

 **Run a Plate**
Change the Number of PCR Cycles as needed, then click Start.

Plate Information
Plate Name: Plate_02142006_1 Barcode:

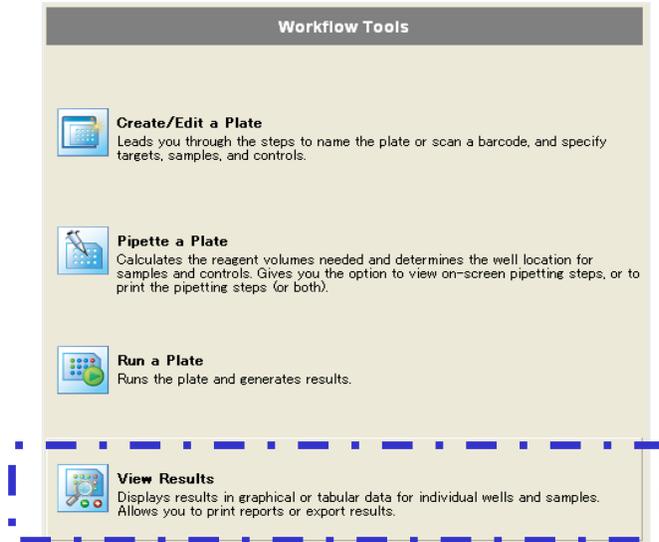
Run Options
Number of PCR cycles:

Run Plate
Estimated Time Remaining: 00:00:00 (h:mm:ss)

7. ランが終了したらCloseします。

解析結果の確認

1. 各ステップはメイン画面からも進む事ができます。
2. ランが終了した解析データを見るには[View Results]を選択します。



3. Plate Nameをクリックすると結果が表示されます。[Results by Well]タブ内で、結果はウェルごとに[+]、[-]、[!]で示されます。[!]は、反応に問題があります。再反応を行ってください。(詳細は各キットプロトコルのAppendixをご参照下さい。)
4. 増幅曲線を見るには[View in SDS]をクリックします。(注!!:編集を加えると結果レポートを得る事が出来なくなります。)

View Results
Select a plate, then click the tabs below to view results for wells or samples. To print or export results, click the Report tab.

Plate: Complete Runs

Range: All Dates

(mm/dd/yyyy) (mm/dd/yyyy)
01/01/1980 To: 02/14/2006

Name / #	Crt Date	Run Date
ple_Ecoli_Sal	02/14/20...	07/29/2005
02142006_1	02/14/20...	02/14/2006
	01/27/20...	07/29/2005

Results by Well | Results By Sample | Plate Information | Report

Grid View | Table View

Key

- Positive Result
- Negative Result
- Result Warning
- Positive Control
- Negative Control
- Control Warning

View in SDS...

5. [Report]タブからデータをエクセルシートフォーマットでエクスポートする事ができます。

	A	B	C	D	E	F
8	Serial Number	173000007				
9	Pipette Operator					
10	Software Version	1				
11	Run Operator					
12	Run Start Date	2006/2/14 11:15				
13	Barcode					
14	Comments	SAKSTSUME Sample TEST				
15		20060214				
16						
17	Run Conditions					
18	PCR Volume	30.0 ml				
19	Data Collection					
20	Stage		3			
21	Step		2			
22						
23	Thermal Cycler Protocol					
24	Stage	Step	Temp(-C)	Time(mm:ss)	Repeat	Ramp Rate
25		1	1	50	02:00.0	1 Auto
26		2	1	95	10:00.0	1 Auto
27		3	1	95	00:15.0	45 Auto
28			2	60	01:00.0	Auto
29						
30	Kit Names and Part Numbers					
31	Kit Name	Part Number				
32	E. coli O157:H7	4366100				
33	EMM	kit component				
34	TAM	kit component				
35	Negative Control	kit component				
36	S. enterica	4366104				
37	EMM	kit component				
38	TAM	kit component				
39	Negative Control	kit component				
40						
41	By Sample Results					
42	Sample Name	Target Name	Replicates	Result	Assmt	ABJ
43		2 E. coli O157:H7	1	Positive		
44		4 E. coli O157:H7	1	Positive		
45		5 E. coli O157:H7	1	Positive		
46		7 E. coli O157:H7	1	Positive		

14 ← → | Plate 021420061 /

コマンド

Rapid Finder™ソフトウェアを使用しない場合

PCR反応溶液の調製

1. 全ての試薬を冷蔵、冷凍庫から出して完全に溶解します。
2. ターゲット毎に以下の表に従い、プレミックス溶液を作成します。(ア)～(ウ)の総和にピペティングでロスする分を考慮して作成します。
 - a. サンプルの本数 × 反復反応数
 - b. ネガティブコントロールウェル数(必須)
 - c. ポジティブコントロールウェル数(推奨しません)

[注記: アプライドバイオシステムズでは1サンプルあたり、3反復で実験を行うことを推奨しています。又、各ターゲットに対し少なくとも1つのネガティブコントロールが必要となります。]

コンポーネント	1反応(30uL)に必要な容量(uL)	4反応に必要な容量(*) (uL)	
2x Environmental Master Mix (EMM)	15.0	66.0	
10x Target Assay Mix (TAM)	3.0	13.2	
総容量	18.0	79.2	

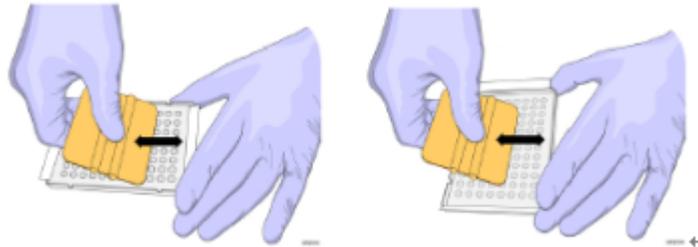
(*) ピペティングエラーを考慮して10%増やして(x4 . 4で)計算しています。

3. 十分に混和します。
4. 使用する反応ウェルの底に18uLづつ静かにプレミックス溶液を分注します。クロスコンタミネーション防止の為に以下の点等に注意してください。
 - a. ウェルに余裕のある場合はターゲット毎に列を分けます。
 - b. 同一ターゲットに対して、同じサンプルの反復は隣同士に配置します。
 - c. 可能であれば、コントロールと未知サンプルの間は1ウェル以上空けます。
 - d. 可能であれば、ネガティブコントロールとポジティブコントロールの間は1ウェル空けます。
 - e. ポジティブコントロールは1番外側に配置します。

[サンプル配置の例]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UNKN1			UNKN2				NEG CTRL	NEG CTRL			POS CTRL
B												
C	UNKN1			UNKN2				NEG CTRL	NEG CTRL			POS CTRL
D												
E	UNKN1			UNKN2				NEG CTRL	NEG CTRL			POS CTRL
F												
G	UNKN1			UNKN2				NEG CTRL	NEG CTRL			POS CTRL
H												

5. 12uLの未知サンプルを分注します。ピペティングにより静かに混和します。1ウェルごとにチップを交換します。
6. 12uLのネガティブコントロールを分注します。ピペティングにより静かに混和します。1ウェルごとにチップを交換します。
7. 全ての未知サンプルとネガティブコントロールにフタをしてから、12uLのポジティブコントロールを分注します。ピペティングにより静かに混和します。1ウェルごとにチップを交換します。
8. キャップ又はオプティカルシールを貼ります。
 - Optical adhesive cover を貼る場合は、アプリケーターの平らなエッジでプレート表面を縦横方向にこずります。96ウェルの円周に十分にシールがついていることを確認します。



- キャップの場合、toolなどを用いて十分な圧力をかけてください。



Cap installing tool (P/N:4330015)



Rolling capping tool

9. ウェルの底に気泡が入っていないか確認します。必要に応じてスピンドウンします。

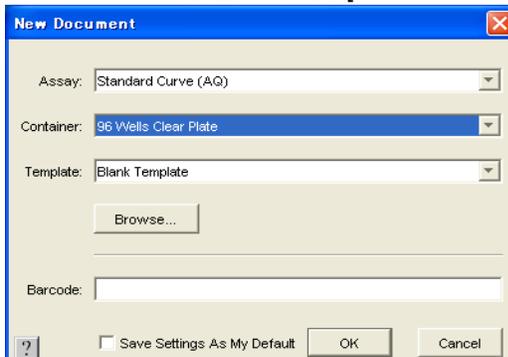
Applied Biosystems 7900 HT FAST Real-Time PCR Systemを用いた場合

* PRISM7000をご使用の場合はこちらに準じて行ってください。

- コンピューターを起動します。
- 7900HTシステム本体の電源を入れます。

新規プレートドキュメントの作成:

1.  デスクトップ上の[SDS Software]を、起動します。
2. **File** メニューより、**New**を選択します。[New Document]が表示されます。



3. **Assay:** のドロップダウンリストより**Standard Curve(AQ)**を、 **Container:**より正しいブロックを選択し**OK**をクリックします。
4. **Add Detector**をクリックしDetector Managerを表示させます。
5. 使用したい**Detector**を選択し、 **Copy to Plate Document**をクリックします。
 - a. 使用したいDetectorが無い場合は、左下[New...]より 新しいDetectorを作成します。
 - b. Detector nameに検出する菌(又はIPC)の名前を入力し、各ターゲットは[Reporter:FAM, Quencher:none]、IPCは[Reporter:VIC, Quencher:none]に設定します。

Group	Name	Reporter	Quencher	Color	AIF Assay ID	Modification Date	Owner	Creation Date
kinki	actin	FAM	Non Fluores...			Mon Nov 28 17:54:55 JST 2005		Mon Nov 28 17:54:55 JS
Default	GAP	VIC	TAMRA			Wed May 18 12:44:05 JST 2005		Wed May 18 12:44:05 JS
Default	GAPDH	VIC	Non Fluores...			Mon May 23 15:10:28 JST 2005		Mon May 23 15:10:28 JS
Default	IL4	FAM	Non Fluores...			Thu Jun 30 16:01:45 JST 2005		Thu Jun 30 16:01:45 JS1
Default	IL8	FAM	Non Fluores...			Mon May 23 15:11:25 JST 2005		Mon May 23 15:11:25 JS
Default	IPC	VIC	Non Fluores...			Thu Jul 13 11:18:56 JST 2006		Thu Jul 13 11:18:56 JST
Default	Listeria	FAM	Non Fluores...			Thu Jul 13 11:20:24 JST 2006		Thu Jul 13 11:20:24 JST
GMO	Myc3	FAM	TAMRA			Sat May 28 14:13:47 JST 2005		Sat May 28 14:13:47 JS
GMO	NK603	FAM	TAMRA			Sat May 28 14:13:04 JST 2005		Sat May 28 14:13:04 JS
Default	NOS	SYBR	Non Fluores...			Tue Dec 20 13:17:12 JST 2005		Tue Dec 20 13:16:52 JS
Default	Salmonella	FAM	Non Fluores...			Thu Jul 13 11:20:03 JST 2006		Thu Jul 13 11:20:03 JST
GMO	SS1b	FAM	TAMRA			Sat May 28 14:12:30 JST 2005		Sat May 28 14:12:30 JS
GMO	T25b	FAM	TAMRA			Sat May 28 14:13:58 JST 2005		Sat May 28 14:13:58 JS
GMO	TC1507	FAM	TAMRA			Sat May 28 14:13:33 JST 2005		Sat May 28 14:13:33 JS
GMO	Trp	FAM	Non Fluores...			Wed May 18 12:43:32 JST 2005		Wed May 18 12:43:32 JS

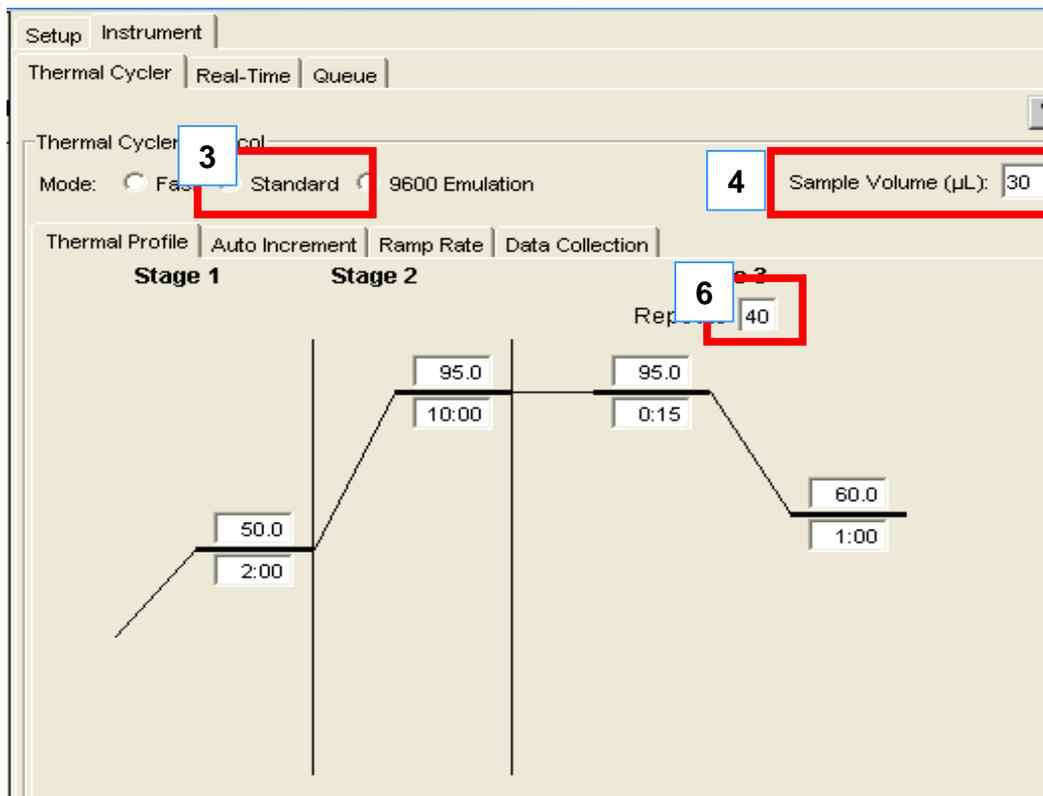
6. 各ウェルに**Detector**と**Task**を指定しサンプル名を入力します。
 - a. 使用するウェルを選択します。(例: リステリア反応のウェルを選択)
 - b. **Detector**名の**Use**にチェックを入れます。 ウェルには各ターゲットとIPCの2つの**Detector**が含まれます。(例: リステリアとIPCのUseにチェックを入れる)
 - c. 各DetectorのTaskがUnknownになっているか確認します。
 - d. サンプルごとにSample Name欄に名前を入力します。入力しない場合ウェルの番号がそのままサンプル名となります。

The screenshot displays the '7900 pathogen picture.sds - Absolute Quantification' software interface. The main area is a 4x10 grid of wells (A-D, 1-10). Each well contains a colored box with a 'U' and a detector name. For example, well A1 has 'U IPC' and 'U Liste'. The right panel shows the configuration for the selected wells. The 'Sample Name' field is set to '* Mixed *'. Below it is a table with the following columns: Use, Detector, Reporter, Task, Quantity, and Color.

Use	Detector	Reporter	Task	Quantity	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	IPC	VIC	Unkno...	0	Blue
<input checked="" type="checkbox"/>	Listeria	FAM	Unkno...	0	Red
<input type="checkbox"/>	Salmonella	FAM		0	Yellow

サーマルサイクリング条件の指定とランの開始:

1. [Instrument]タブをクリックします。



2. 標準的なPCR 条件がデフォルトで表示されています。
 3. Mode: はStandardを選択します。
 4. [Sample Volume]を30に変更します。
 5. サイクル数を40から45に変更します。
 6. [File]メニューより[Save As]を選び、AQプレートドキュメントの名前をタイプ入力してから、[Save]をクリックし保存します。
 7. Open/Closeボタンを押してトレイを出し、プレート装置にセットします。
 8. [Start]をクリックします。
- ◇ ランが終了すると、ステータス情報とボタンはグレイ表示になり、[Analysis]ボタンが有効になり、ランが成功したか否かを示すメッセージが表示されます。
 - ◇ ランの終了後、プレートドキュメントの設定を変更して解析することもできます。

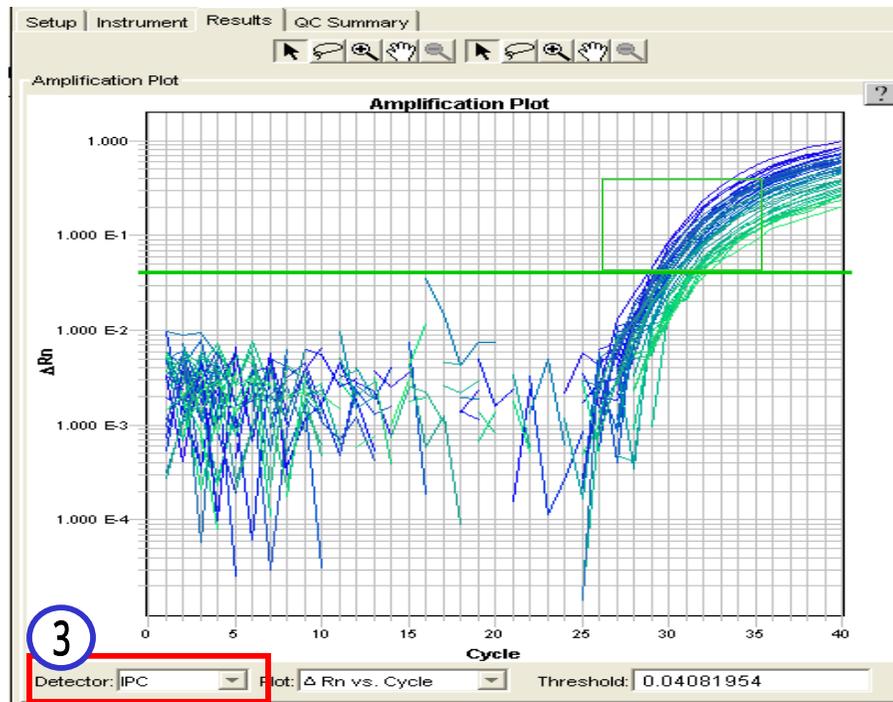
データ解析:

- 各サンプルのVIC®色素のシグナル(IPC)とFAM™色素のシグナル(ターゲットに特異的なシグナル)を確認します。結果の判定に関する基本的なガイドは以下の表をご参照下さい。

FAM™色素のシグナル	VIC®色素のシグナル	判定
+	+ , -	陽性
-	+	陰性
-	-	キットプロトコールのAppendixのトラブルシューティングの項をご覧下さい

- 解析の詳細についてはご利用機器の取扱説明書をご参照下さい。

- ▶ ; 又はAnalyzeボタンをクリックします。
- Well gridのAと1の間のコーナーをクリックして全てのウェルを選択し増幅曲線を表示します。(選択しないと、プロットは空白のままになります。)



▶ IPC増幅の確認

- [Detector] ドロップダウンリストでDetectorにIPC選びます。
- 指数関数的増幅領域(直線的に増えている部分)にThreshold Lineが設定されていることを確認します。Analysis SettingsでManual Ctにチェックをすると、直接Threshold Lineを動かす事ができます。

5. 全てのウェルからIPCが検出されていることを確認します。
 - a. 画面左下のResult tableを確認します。
 - b. Taskが[IPC]のカラムのCtを確認します。Undet.と表示されている場合は検出されていません。

重要! :IPCの増幅が認められない場合や、他のウェルと比較して著しく検出サイクルが遅れる場合は、PCR反応が正常に行われなかった事が疑われます。そのサンプルについては、反応を始めからやりなおします。

Table Settings: None 						
Position	Flag	Sample	Detector	Task	Ct	Ct Median
A1	↑	v10	IPC	Unknown	29.463003	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A2	↑	v10	IPC	Unknown	29.806858	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A3	↑	v10	IPC	Unknown	29.591623	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A4	↑	v9f1	IPC	Unknown	29.870174	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A5	↑	v9f1	IPC	Unknown	29.947983	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A6	↑	v9f1	IPC	Unknown	29.713703	
	↑		Listeria	Unknown	Undetermined	
A7	↑	v8f2	IPC	Unknown	29.965462	
	↑		Listeria	Unknown	39.508835	
A8	↑	v8f2	IPC	Unknown	29.636406	
	↑		Listeria	Unknown	37.977654	

➤ NTCの増幅確認

1. [Detector]ドロップダウンリストからターゲットのDetectorを1つ選びます。Well gridのAと1の間のコーナーをクリックして全ての増幅曲線を表示します。
 - a. PCR増幅している陽性検体の指数関数的増幅領域(直線的に増えている部分)にThreshold Lineが設定されていることを確認します。
 - b. IPC確認の要領で今度は、NTCからのPCR増幅が認められないことを確認します。Undet.と表示されていること。
 - c. Taskが[NTC]のカラムのCtを確認します。数値が表示されている場合は増幅が認められません。

重要! :NTCから増幅が認められる場合は、汚染の可能性があるので反応を始めからやり直します。

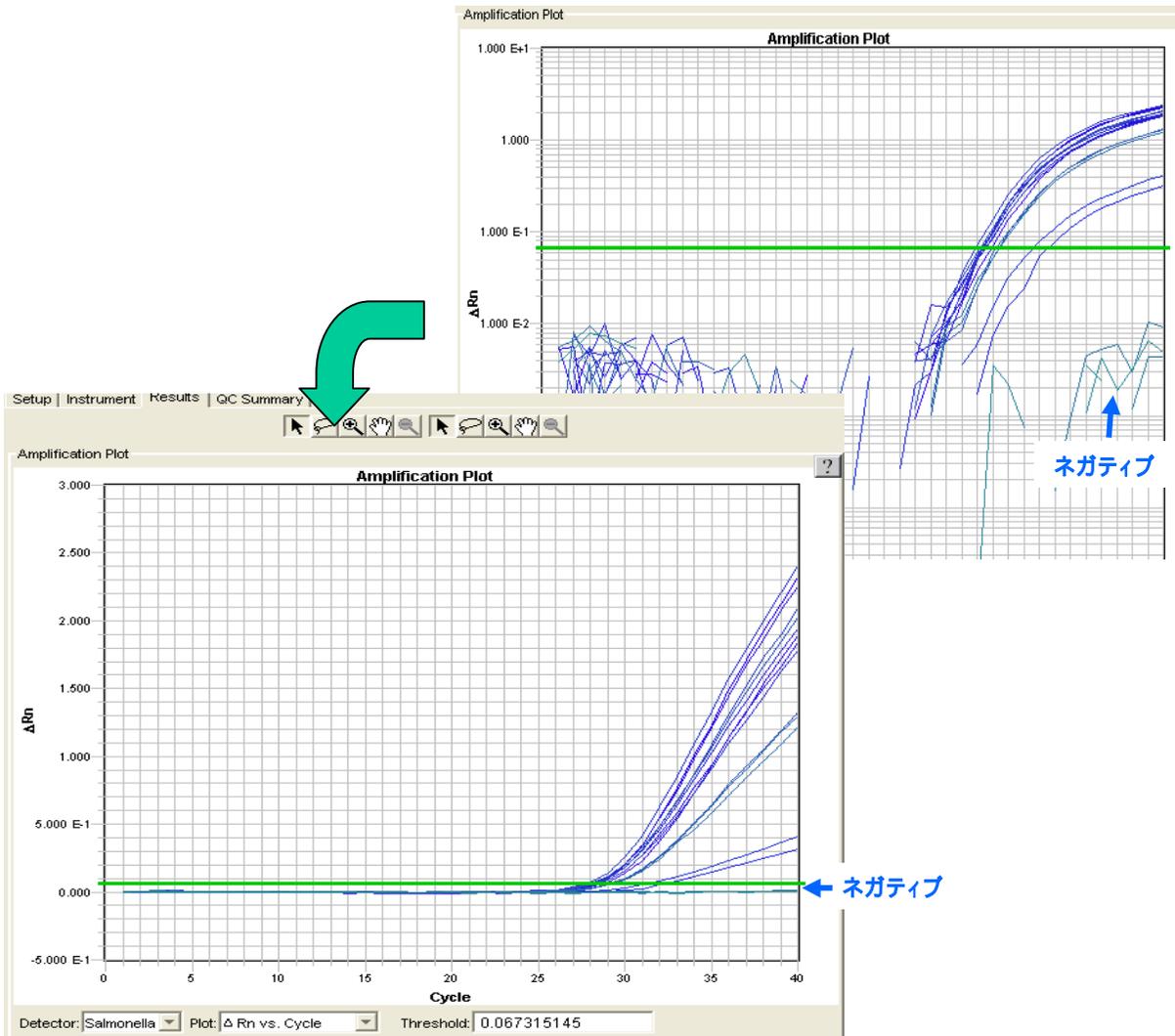
2. NTCからの増幅が起こっていないことを確認できたら、次ページ「ターゲットの増幅確認」に進みます。

➤ ターゲットの増幅確認

！！前ページのNTCからの増幅が無い事が確認された場合にのみ対応します。！！

PCR増幅している陽性検体の指数関数的増幅領域(直線的に増えている部分)にThreshold Lineが設定するか又は、以下の方法でThreshold Lineの設定を行います。

1. マウスを右クリックし**Display Settings**を表示します。ScaleのY-AxisでLinearにチェックを入れ、**[OK]**をクリックします。
2. グラフが表示されます。画面に十分に増幅曲線が見えるようにDisplay Settings からY-Axisのスケールを変更します。minは-0.5とします。



3. Threshold Lineがネガティブのバックグラウンドより上に来るように設定します。Analysis Settings内でManual Ctにチェックをすると、Threshold Lineを直接移動させる事ができます。
4. [Analyze]をクリックします。
5. ターゲット毎に「NTCの確認」と「ターゲットの増幅確認」を繰り返します。

結果の表示:

Report (レポート): 選択されたウェルのデータが表形式で表示されます。
検出されたウェルにはCtの欄に数値 (Ct値) が表示されています。未検出のウェルにはUndet.Resultを表示されます。

Table Settings: Untitled1

Position	Sample	Detector	Task	Ct	Quantity	Qty mean	?
A1	v10	IPC	Unknown	29.463003			陽性
		Listeria	Unknown	35.013767			
A2	v10	IPC	Unknown	29.806858			陰性
		Listeria	Unknown	35.92602			
A3	v10	IPC	Unknown	29.591623			陰性
		Listeria	Unknown	Undetermined			
A4	v9f1	IPC	Unknown	29.870174			偽陰性
		Listeria	Unknown	32.275635			
A5	v9f1	IPC	Unknown	29.947983			偽陰性
		Listeria	Unknown	33.06794			
A6	v9f1	IPC	Unknown	29.713703			偽陰性
		Listeria	Unknown	33.159763			
A7	v8f2	IPC	Unknown	29.965462			偽陰性
		Listeria	Unknown	32.226265			
D13	D13	IPC	Unknown	Undetermined			偽陰性
		Salmonella	Unknown	Undetermined			
D14	D14	IPC	Unknown	Undetermined			偽陰性
		Salmonella	Unknown	Undetermined			
D15	D15	IPC	Unknown	Undetermined			偽陰性
		Salmonella	Unknown	Undetermined			

解析結果データのエクスポート:

データはテキストファイルにエクスポートしてから、Microsoft Excelなどの表計アプリケーションにインポートできます。

1. [File]メニューから[Export]を選んでから、[ResultsTable]を選びます。
2. エクスポートファイルのファイル名を入力します。
3. [Save]をクリックします。

研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

The PCR process and 5' nuclease process are covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Applied Biosystems, PrepMan and VIC are registered trademarks and AB (Design), Applera, FAM and are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

Rapid Finder is a trademark of Applied Biosystems/MDS SCIEX, which is a joint venture between Applera Corporation and MDS Inc.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

© 2006 Applied Biosystems Japan Ltd. All rights reserved.

当社ホームページ: www.appliedbiosystems.co.jp
アプリケーションサポートへのお問い合わせ
フリーダイヤル TEL: 0120-477-392 FAX: 0120-477-120
電子メール : jptechsupport@appliedbiosystems.com