

EasyAmp *Kudoa septempunctata* Detection Kit (Code No. 391-5210)

蛍光検出装置の詳細な設定方法

Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System の設定方法例

装置の取扱説明書に従って操作を行って下さい。

1. 装置の設定 (SDS version 1.4.1)

- (1) Create New Document を押します。
- (2) Assay: Isothermal、Container: 96 well clear、Template: Blank Document、Run Mode: Standard 7500 を選択し、「次へ」を押します。
- (3) Reporter に「SYBR」、Quencher に「(none)」の Detector を選択し、Add を押します。また、Passive Reference は、「(none)」を選択します。
- (4) 使用するウェルを選択し、Detector の Use にチェックを入れ、「完了」を押します。
- (5) ランファイルを開いたら、Instrument のタブを開き、Thermal Cycler Protocol の「Add Dissociation Stage」を押して融解曲線解析を加え、Stage 2 を削除します。
- (6) Stage 1 を Raps: 30、温度を 63°C、1 分 (1:00) に設定し、Sample Volume を 25 μ L に設定します。
- (7) 反応液を添加した 96 ウェルプレートを設定し、Instrument Control エリアの「Start」を押して、反応を開始します。

2. 判定の方法

- (1) 使用したウェルを選択し、「Analysis」の「Analyze」を押します。
- (2) Results のタブを選択し、Amplification Plot のタブを選択します。
- (3) Analysis Settings で「Manual Ct」、「Auto Baseline」を選択します。Threshold Line の設定は、*Kudoa* 陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりから、プラトーに達するまでの区間の中間位に設定します。
- (4) その後、「Analyze」を押すと、増幅曲線が確認出来、Dissociation のタブを選択することで融解曲線解析の結果が確認できます。
- (5) Report のタブで増幅時間と Tm 値を確認することが出来、サンプルの Tm 値が、*Kudoa* 陽性コントロールの Tm 値 $\pm 2^{\circ}\text{C}^{\dagger}$ の範囲の場合、陽性と判定とします。

[†]この機種は、融解曲線解析結果がばらつき易いので陽性判定の温度を広く設定している。