



Technical Data

DNAの低吸着性試験

評価製品

FastGene™ 96well PCR プレート Ultra Easy Cut
(0.2mL/ ノンスカート) (Cat No. FG-1702)

目的

FastGene™ 96well PCR プレート Ultra Easy Cut (0.2mL/ ノンスカート)について、
qPCRでの性能を評価した。

背景

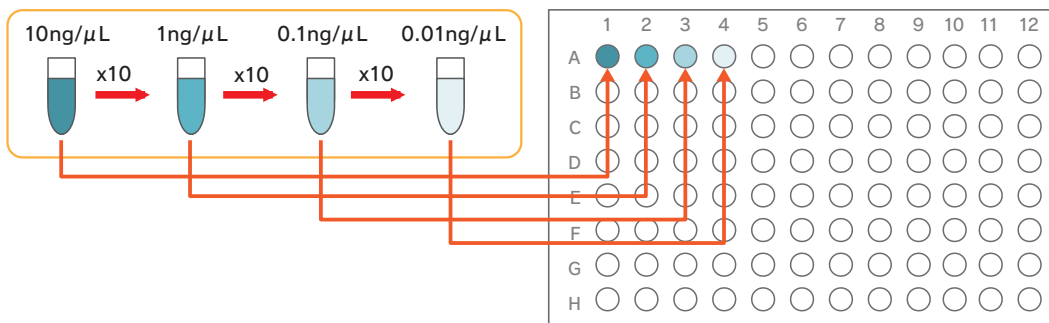
96 well プレートは、一般的に PCR 反応など DNA を取り扱うアプリケーションで使用されている。
近年 NGS (Next Generation Sequencing) や Single cell などのアプリケーションにより、DNA が吸着しづらい低吸着タイプのプレートが必要とされている。そこで、弊社では、まず現状のプレートにどの程度 DNA が吸着するかを下記の評価方法により確かめた。

実験条件

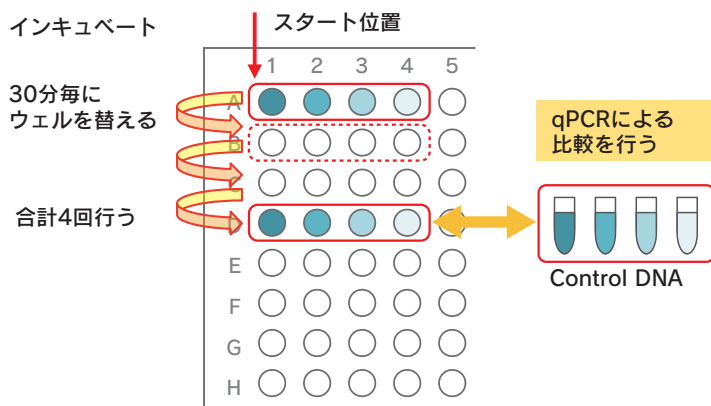
- サーマルサイクラー : Life Eco (Bioer) - インキュベーションに使用
- qPCR 装置 : LifeTechnologies StepOnePlus™
- qPCR 試薬 : KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (2x) (Cat.No. KK4600)
- テンプレート DNA : Mouse Genomic DNA (Clontech Cat.No. #636402) in 5mM Tris-HCl pH 8.0

実験手順

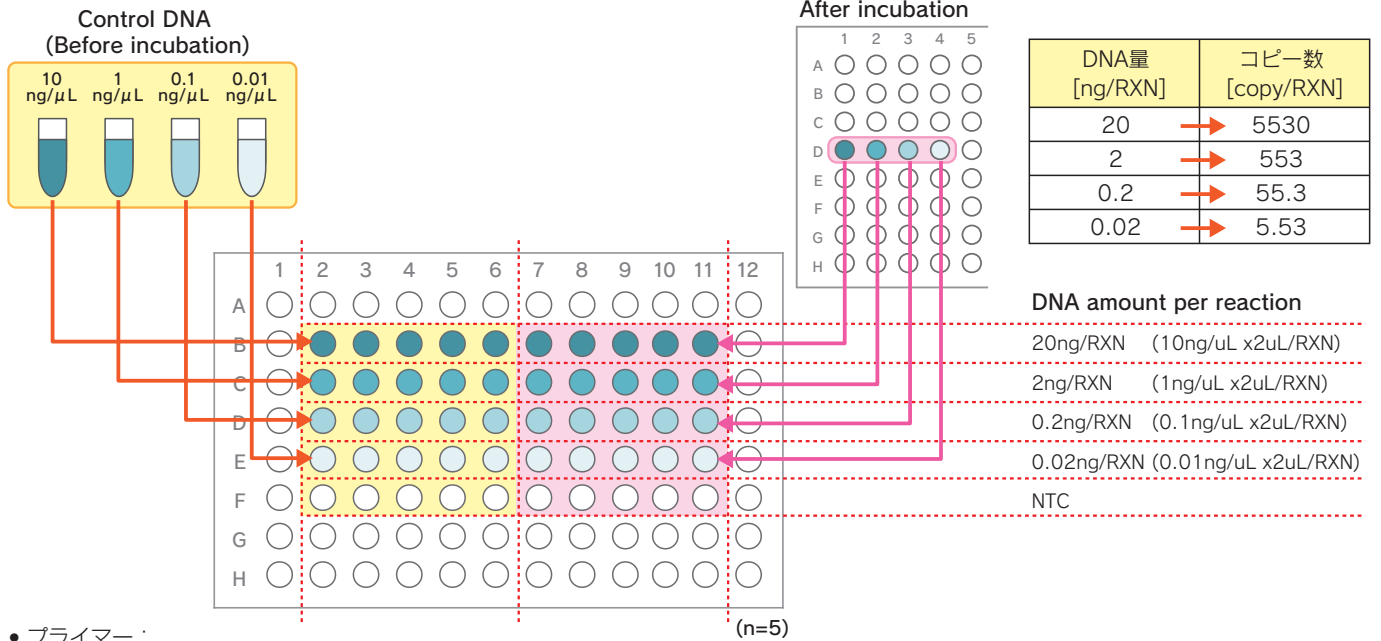
- 下図のように Mouse Genomic DNA を用いて作成した希釈系列を、50 μ L ずつ各ウェルに分注した



- それぞれ、以下の条件でインキュベートした
インキュベーション条件
a) 4℃, 30min (反応液保存温度)
b) 37℃, 30min (一般的な酵素の反応至適温度)
c) 65℃, 30min (酵素不活化温度)
* これらのパラメーターは標準的な酵素のインキュベート条件である
- 同じチップでインキュベート毎にウェルを変えて、合計 4 回インキュベートした



4. qPCR の定量を用いてインキュベート前のサンプルとの比較を行った



- プライマー :
 HRPT-gDNA-F : CCACTTGTGACGAAAGCACC (HPLC grade)
 HRPT-gDNA-R : GTTGTCTACGCTCTGGCAGT (HPLC grade)
 (ターゲット : single copy gene)

• 反応組成 :

KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (2x)	10 μ L
Forward Primer (10uM)	0.4 μ L
Reverse Primer (10uM)	0.4 μ L
Template (incubated DNA or Control DNA)	2 μ L
Nuclease Free PCR water	7.2 μ L
	20 μ L/RXN

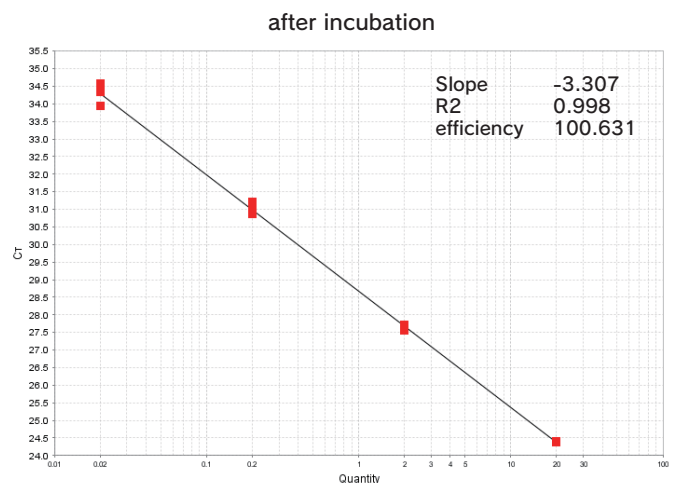
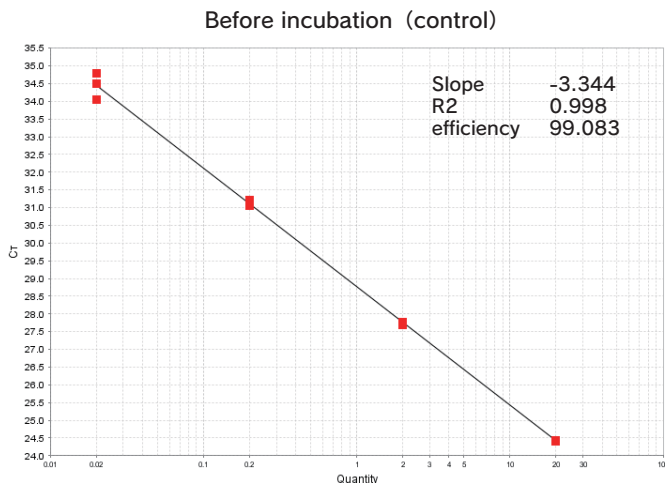
• qPCR プログラム

Step	Temp.	Duration	Cycles
Enzyme Activation	95°C	3min	
Denature	95°C	5sec	
Anneal/Extended	62°C	40sec	40cycles
Dissociation*	95°C	15sec	
	60°C	1min	+0.3°C stepwise
	up to 95°C	15sec	

* default Melt Curve setting of StepOne Plus

結果

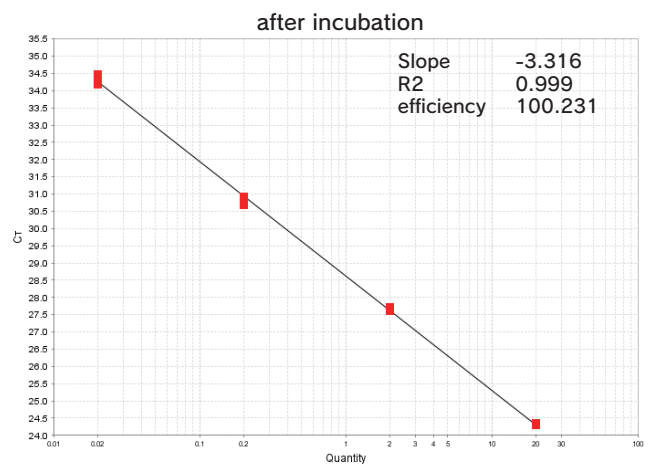
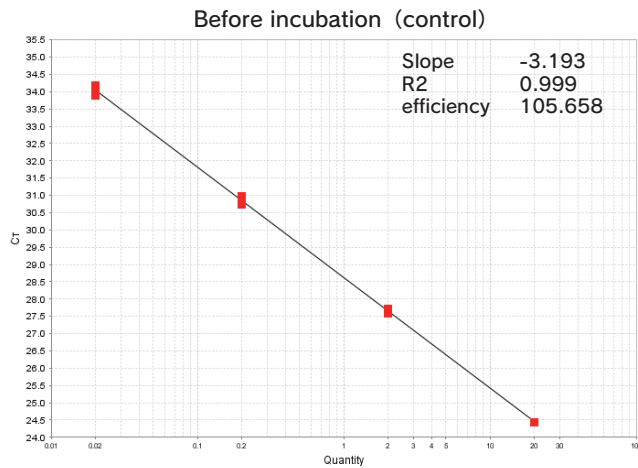
インキュベート温度 : 4°C



	Ct value (before incubation)	Ct SD	Ct value (after incubation)	Ct SD	Difference*
20 ng / rxn	24.43	0.017	24.39	0.018	-0.04
2 ng / rxn	27.74	0.036	27.64	0.078	-0.1
0.2 ng / rxn	31.13	0.079	31.02	0.181	-0.11
0.02 ng / rxn	34.45	0.38	34.28	0.318	-0.16

* Difference = (The Ct value after incubation) - (The Ct value before incubation)

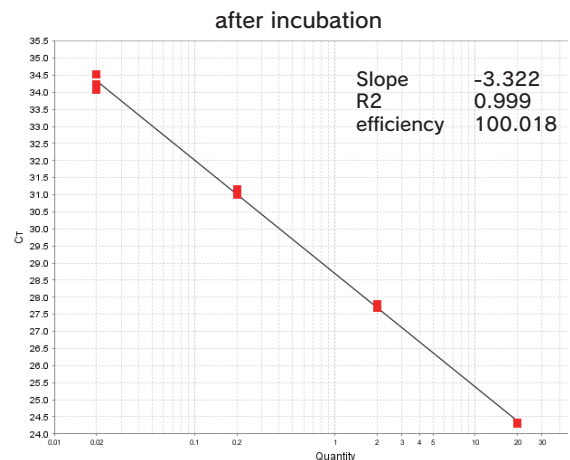
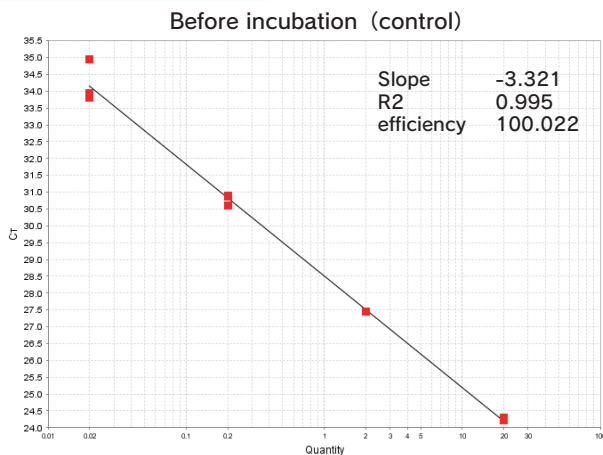
4°Cでインキュベートをした前後間のCt値にほとんど差は見られなかった。これらの結果から、プレートにDNAは吸着していないと考えられる。

インキュベート温度：37℃


	Ct value (before incubation)	Ct SD	Ct value (after incubation)	Ct SD	Difference*
20 ng / rxn	24.43	0.01	24.32	0.027	-0.11
2 ng / rxn	27.66	0.062	27.68	0.046	0.01
0.2 ng / rxn	30.89	0.131	30.77	0.132	-0.12
0.02 ng / rxn	34	0.15	34.35	0.158	0.34

* Difference = (The Ct value after incubation) - (The Ct value before incubation)

37℃でインキュベートをした前後間のCt値にほとんど差は見られなかった。これらの結果から、プレートにDNAは吸着していないと考えられる。

インキュベート温度：65℃


	Ct value (before incubation)	Ct SD	Ct value (after incubation)	Ct SD	Difference*
20 ng / rxn	24.26	0.037	24.32	0.012	0.05
2 ng / rxn	27.46	0.007	27.75	0.053	0.29
0.2 ng / rxn	30.79	0.154	31.08	0.087	0.29
0.02 ng / rxn	34.23	0.619	34.28	0.235	0.05

* Difference = (The Ct value after incubation) - (The Ct value before incubation)

65℃でインキュベートをした前後間のCt値にほとんど差は見られなかった。これらの結果から、プレートにDNAは吸着していないと考えられる。

まとめ

今回の評価では、どのインキュベート温度においてもプレートにDNAが吸着していないと考えられた。
以上の結果により、FastGene™ 96well PCRプレート Ultra Easy Cut (0.2mL/ノンスカート) (FG-1702) はDNAに対して低吸着の性能が示唆された。