

Technical Data

超微量化リアルタイムPCRに適した試薬の評価 (6社7試薬)

評価製品

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit
 Biorline SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit
 TA社 SYBR®系 qPCR マスターミックス
 R社 SYBR®系 qPCR マスターミックス

A社 SYBR®系 qPCR マスターミックス P
 A社 SYBR®系 qPCR マスターミックス F
 TO社 SYBR®系 qPCR マスターミックス

目的

リアルタイムPCRアプリケーションでの微量化を検討し、検量線の相関係数 (R^2) とPCRの反応効率 (Eff%) で評価を行った。

評価方法

KAPA SYBR® FAST qPCR Kitを用いて、1 μ L, 3 μ L, 5 μ L, 20 μ L反応系における増幅曲線・融解曲線の評価を行った。
 さらに、下記6社7試薬に関して3 μ L, 5 μ L, 20 μ L反応系において増幅曲線・融解曲線・検量線の評価を行った。

テストに用いた当社取扱製品



KAPA
 KAPA SYBR® FAST qPCR Kit
 (ABI Prism qPCRキット)
 Cat.No. KK4603 1×1 mL
 Cat.No. KK4604 1×5 mL
 Cat.No. KK4605 2×5 mL



Biorline
 SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit
 Cat.No. BIO-92002 2×1 mL
 Cat.No. BIO-92005 5×1 mL
 Cat.No. BIO-92020 20×1 mL



4titude
 FrameStar® 96
 ファストPCRプレート
 Cat.No. 4ti-0912



4titude
 セミオートヒートシーラー
 Cat.No. 4ti-0655

実験条件

〈qPCR条件〉

qPCR装置 : LifeTechnologies (Thermo) StepOnePlus™
 96well Fast-PCRプレート : 4titude (4ti-0912) (FRAMESTAR®・FastPlate 96)
 シール : 4titude (4ti-0541) ヒートシール (クリア) 175°C, 3 sec
 テンプレートDNA : Roche Human Genomic DNA (#11 691 112 001)
 プライマー : Act-F1, Act-R1 (10 μ M) \langle β -actin: 294 bp amplicon
 Act-F1 : TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
 Act-R1 : CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
 Passive Reference Dye : ROX

〈反応組成〉 (例) 20 μ L反応系

qPCR Master Mix (×2)	10.0 μ L
SDW	7.6 μ L
Primer F (10 μ M)	0.2 μ L
Primer R (10 μ M)	0.2 μ L
Template DNA	2.0 μ L
total	20.0 μL

上記の反応組成となるようにプレミックスを調製し、それぞれ20 μ L, 5 μ L, 3 μ L, 1 μ Lの反応量となるように分注した。

〈サイクルプログラム〉 (StepOnePlus™デフォルト Fastサイクル)

Initial Denature : 95°C 20 sec
 Denature : 95°C 3 sec
 Anneal/Extension : 60°C 30 sec (detection)
 Melting Curve : 95°C 15 sec
 60°C 1 min
 95°C 15 sec (+0.3°C step detection)

※サイクルシミュレーション設定 : 20 μ L

↳ (同一Runで設定しているため)

A社SYBR®系qPCRマスターミックスP,R社SYBR®系qPCRマスターミックスは酵素活性化のため Initial Denatureを95°C 10 minに設定

FRAMESTAR®の特徴

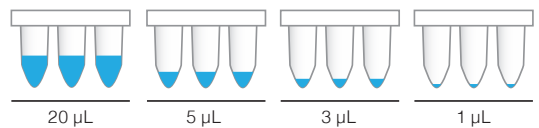


FRAMESTAR®ポリカーボネートを含む特殊樹脂製の『丈夫なフレーム』とポリプロピレン製の『肉薄なウェル』を組み合わせて成型しています。
 (FrameStar PCR plates are covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts, owned by Eppendorf AG: US Patent Nos. 7,347,977 and 6,340,589.)

実験フロー

Step 1

まずは、弊社取扱製品の1つであるKAPA SYBR® Fastを用いてどの程度まで試薬量を減らしても問題なくリアルタイムPCRができるかどうかの評価を行った。



Step 2

次に、KAPA SYBR® Fastを用いて、試薬量を減らしても検量線が描けるかどうかの評価を行った。

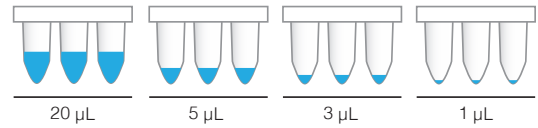
Step 3

KAPA SYBR® Fast以外の試薬でも同様に検量線が描けるかどうかの評価を行った。

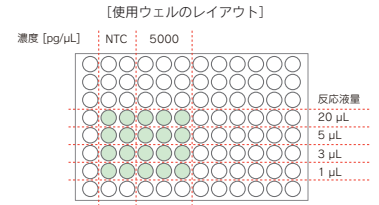
結果

Step1

まずは、弊社取扱製品の1つであるKAPA SYBR® Fastを用いてどの程度まで試薬量を減らしても問題なくリアルタイムPCRができるかどうかの評価を行った。

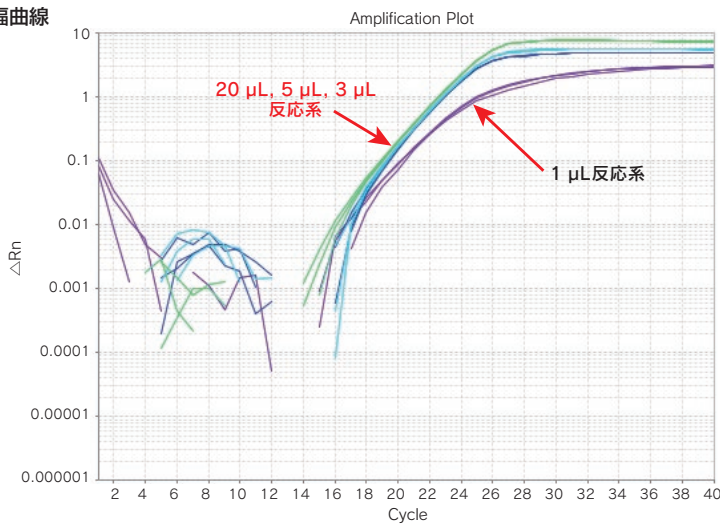


テンプレートDNA：Roche Human Genomic DNA (#11 691 112 001) 5000 pg/ µLを用いて、20 µL, 5 µL, 3 µL, 1 µLと反応量を下げてCt値の評価を行った。

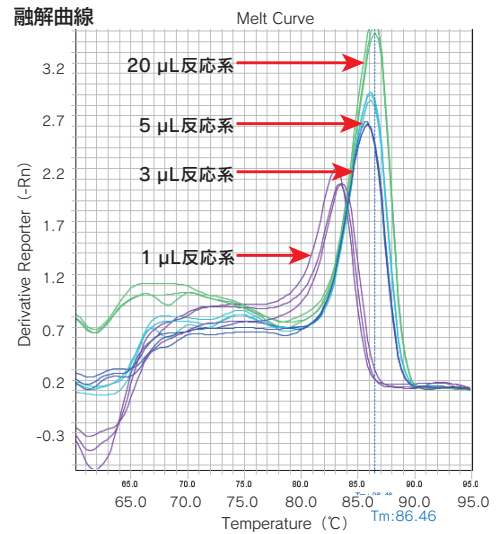


KAPA SYBR® FAST qPCR Kit

増幅曲線



融解曲線

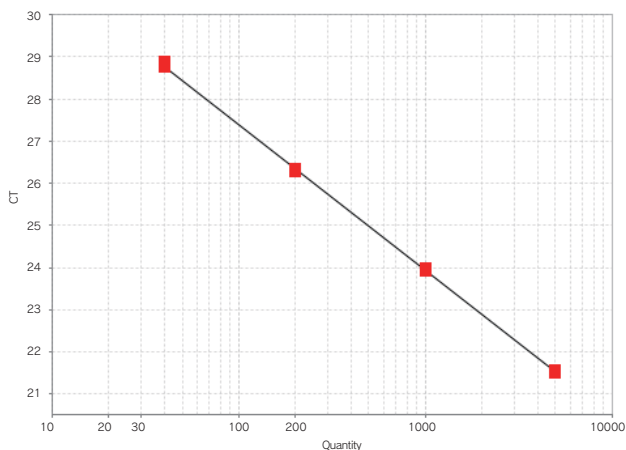


KAPA SYBR® FAST qPCR Kitを用いると、3 µL反応系まで20 µL反応系と同様の傾向が得られることがわかった。

Step2

次に、KAPA SYBR® Fastを用いて、試薬量を減らしても検量線が描けるかどうかの評価を行った。

本実験では、微量のリアルタイムPCRが問題なく可能かどうかの判断基準を検量線で評価した。



一般的にリアルタイムPCRにおける検量線の評価ポイントは、直線性と傾き (Slope) で評価できる。
 直線性：相関係数 (R^2) で評価し、その値が1に近いほど信頼性の高い検量線
 傾き (Slope)：PCR増幅効率 (Eff%) を計算することができる

$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{Slope})} - 1$$

本実験では、微量リアルタイムPCRの評価に関して R^2 と Eff% の Data を下記のように定義した。

〈Dataが良いと定義した値〉

$R^2 \geq 0.999$
 Eff% 95%-105%

〈Dataが悪いと定義した値〉

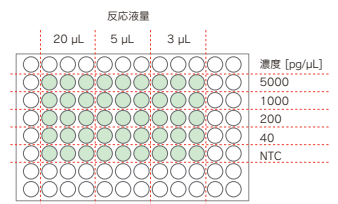
$R^2 < 0.96$
 Eff% < 90%,
 > 110%

この定義を元に、試薬の評価を行った。

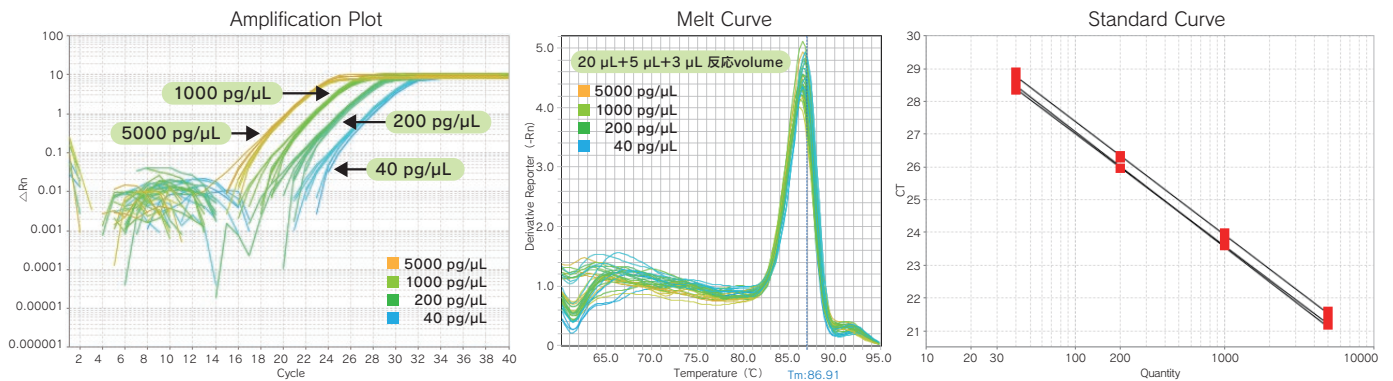
次ページ

テンプレートDNA : Roche Human Genomic DNA (#11 691 112 001) 5000 pg/μL, 1000 pg/μL, 200 pg/μL, 40 pg/μLを用いた増幅曲線・融解曲線・検量線の評価

[使用ウェルのレイアウト]



KAPA SYBR® FAST qPCR Kit



どの反応 volumeでも
ほぼ同じ増幅曲線を描いた

どの反応volumeでも
シングルピークを示した

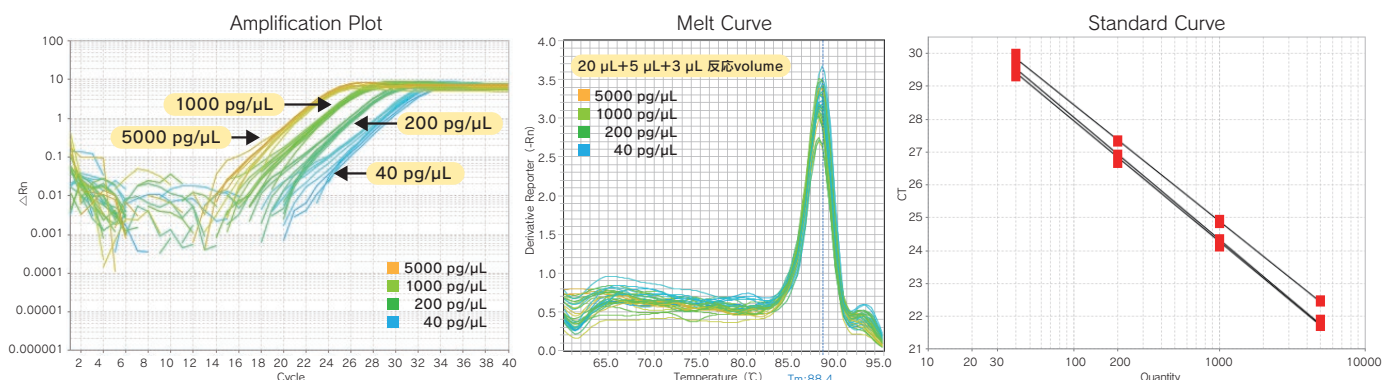
KAPA	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.453	34.306	1	94.791
5 μL	-3.416	33.863	1	96.222
3 μL	-3.505	34.091	0.998	92.896

どの反応volumeでもSlopeは、ほぼ同じ値だった。
それに伴い、Eff%も同様の値を示した。
R²も1に近い値を示し、信頼性の高い検量線が得られた。

Step3

その他の5社6試薬でも同様に検量線が描けるかどうかの評価を行った。

Bioline SensiFAST™ SYBR®



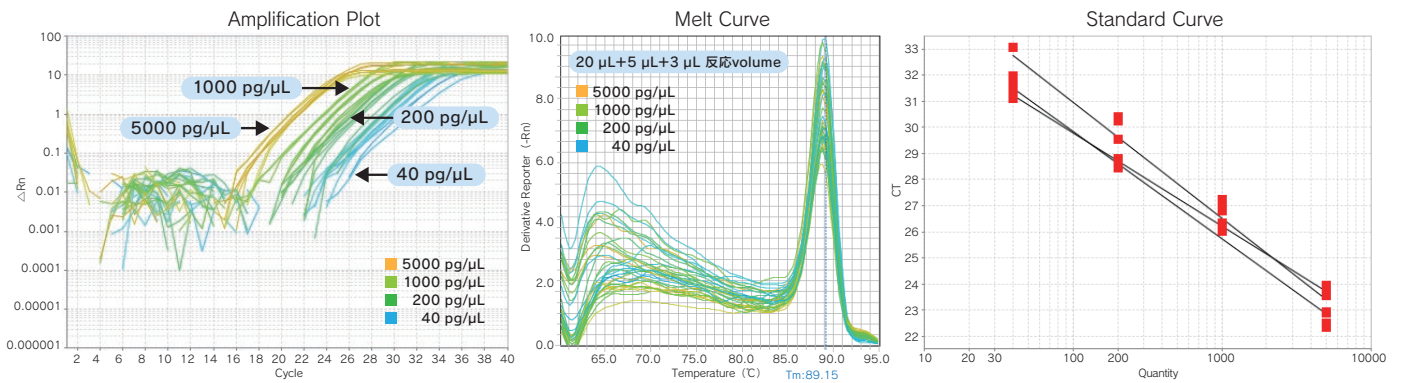
どの反応 volumeでも
ほぼ同じ増幅曲線を描いた

どの反応volumeでも
シングルピークを示した

Bioline	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.54	35.538	0.999	91.636
5 μL	-3.664	35.277	0.999	87.474
3 μL	-3.717	35.508	0.995	85.792

20 μL, 5 μL, 3 μLとSlopeの値は徐々に小さくなった。
それに伴い、Eff%の値も徐々に小さくなった。
ただし、R²の値は1に非常に近い値を示し、十分な信頼性の検量線が得られた。

TA社SYBR®系 qPCRマスターミックス



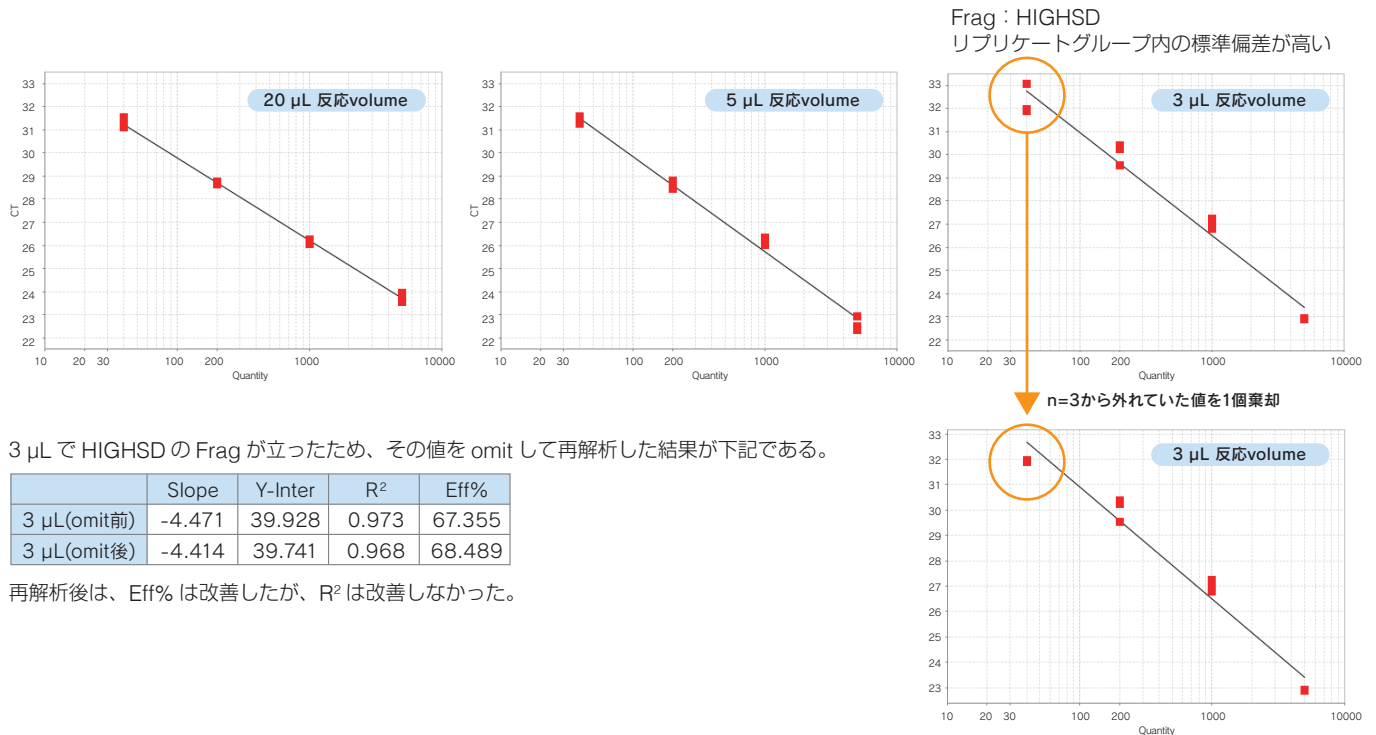
5 μLおよび3 μL反応volumeでは
20 μL反応volumeとは異なる増幅曲線を描いた

どの反応volume でも
シングルピークを示した

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.591	37.003	0.997	89.878
5 μL	-4.121	38.1	0.99	74.857
3 μL	-4.471	39.928	0.973	67.355

20 μLと5 μL, 3 μLのSlopeの値は大きく異なっていた。
それに伴い、Eff%の値も大きく変化した。
R²の値も微量化に伴い、1より小さくなり、信頼性のある検量線が得られなかった。

反応volumeごとに異なる検量線を描いたため、それぞれの検量線における詳細な解析を行った結果が下記である。
Frag : HIGHSD (リプリケートグループ内の標準偏差が高い) が出たサンプルに関してはomit (棄却) を行った。

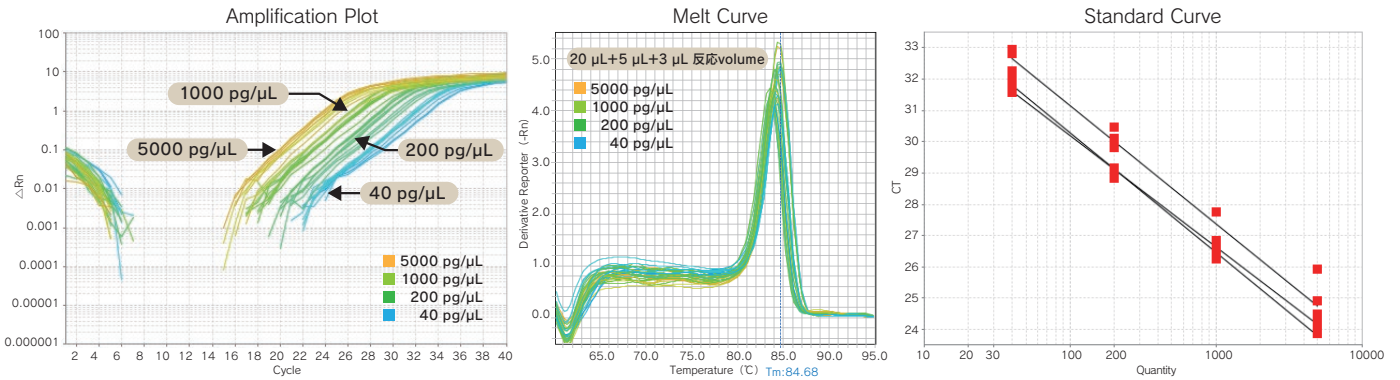


3 μLでHIGHSDのFragが立ったため、その値をomitして再解析した結果が下記である。

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
3 μL(omit前)	-4.471	39.928	0.973	67.355
3 μL(omit後)	-4.414	39.741	0.968	68.489

再解析後は、Eff%は改善したが、R²は改善しなかった。

データの棄却を行っても、R²の値は改善しなかった。

R社SYBR®系 qPCRマスターミックス


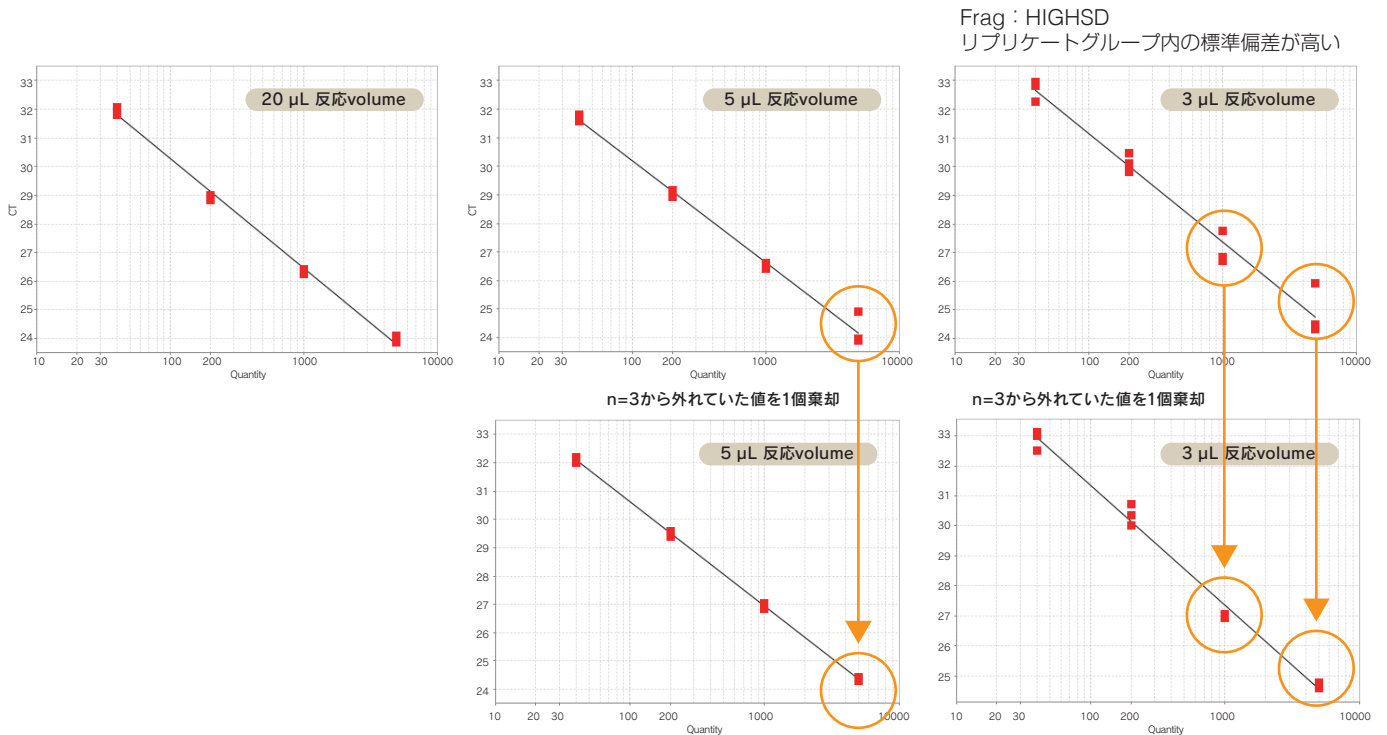
5 μLおよび3 μL反応volumeでは
20 μL反応volumeとは異なる増幅曲線を描いた

どの反応volume でも
シングルピークを示した

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.813	37.901	0.996	82.923
5 μL	-3.551	37.297	0.991	91.261
3 μL	-3.762	38.676	0.972	84.429

どの反応volumeでもSlopeの値はほぼ同じ値だった。
ただし、20 μLでもEff%の値が82.923%と良いと定義した95%よりも小さい値を示した。
この理由は、R社SYBR®系qPCRマスターミックスがFast PCR用ではないことが原因の可能性が考えられた。

反応 volume ごとに異なる検量線を描いたため、それぞれの検量線における詳細な解析を行った結果が下記である。
Frag : HIGHSD (リプリケートグループ内の標準偏差が高い) が出たサンプルに関しては omit (棄却) を行った。



5 μLでHIGHSDのFragが立ったため、
その値をomitして再解析した結果が下記である。

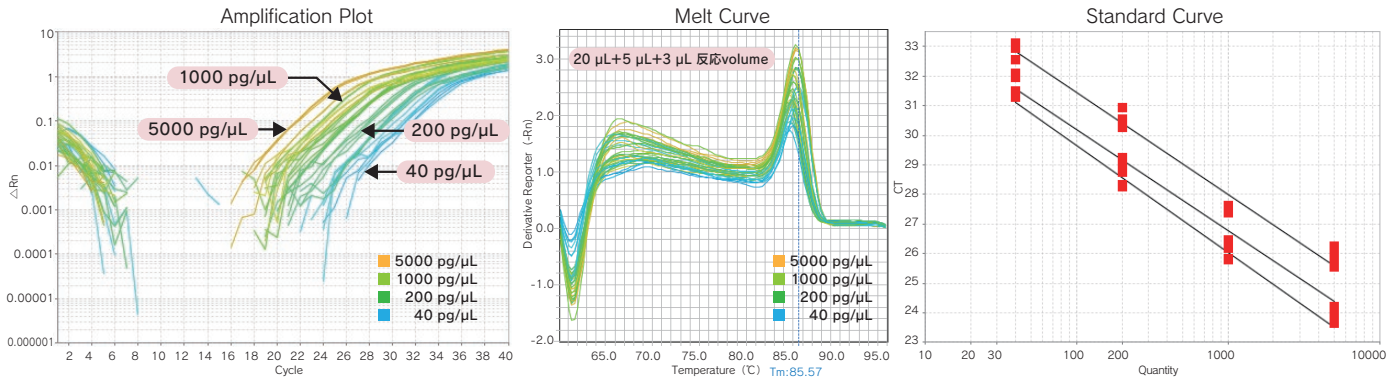
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μL(omit前)	-3.551	37.297	0.991	91.261
5 μL(omit後)	-3.684	37.994	0.999	86.813

3 μLでHIGHSDのFragが立ったため、
その値をomitして再解析した結果が下記である。

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
3 μL(omit前)	-3.762	38.676	0.972	84.429
3 μL(omit後)	-4.006	39.363	0.99	77.667

再解析後は、Eff%は改善しなかったが、R²は改善した。再解析後は、Eff%は改善しなかったが、R²は改善した。

データの棄却を行うことで、5 μLのR²の値が改善した。
ただし、Eff%の値により、反応volumeを下げることで、反応効率が悪くなることがわかった。

A社SYBR®系 qPCRマスターミックスP


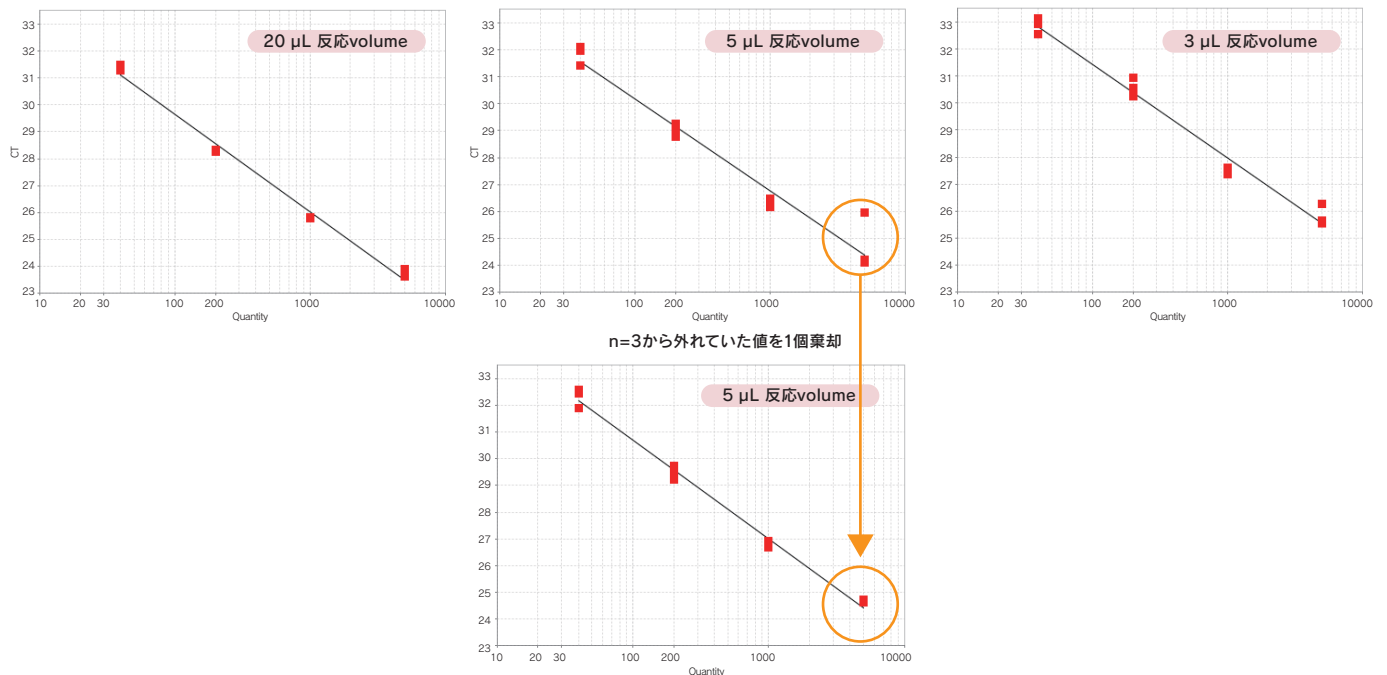
5 μL および3 μL 反応volumeでは20 μL 反応volumeとは異なる増幅曲線を描いた

どの反応volumeでもシングルピークを示した

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.625	36.911	0.991	88.749
5 μL	-3.423	37.049	0.956	95.941
3 μL	-3.462	38.372	0.981	94.469

20 μL でもR², Eff%ともに良いと定義した値よりも小さな値を示した。
この理由は、A社SYBR®系qPCRマスターミックスPがStandard PCR用のためFast PCRでの微量化には適していない可能性が考えられる。

反応 volume ごとに異なる検量線を描いたため、それぞれの検量線における詳細な解析を行った結果が下記である。
Frag : HIGHSD (リプリケートグループ内の標準偏差が高い) が出たサンプルに関しては omit (棄却) を行った。

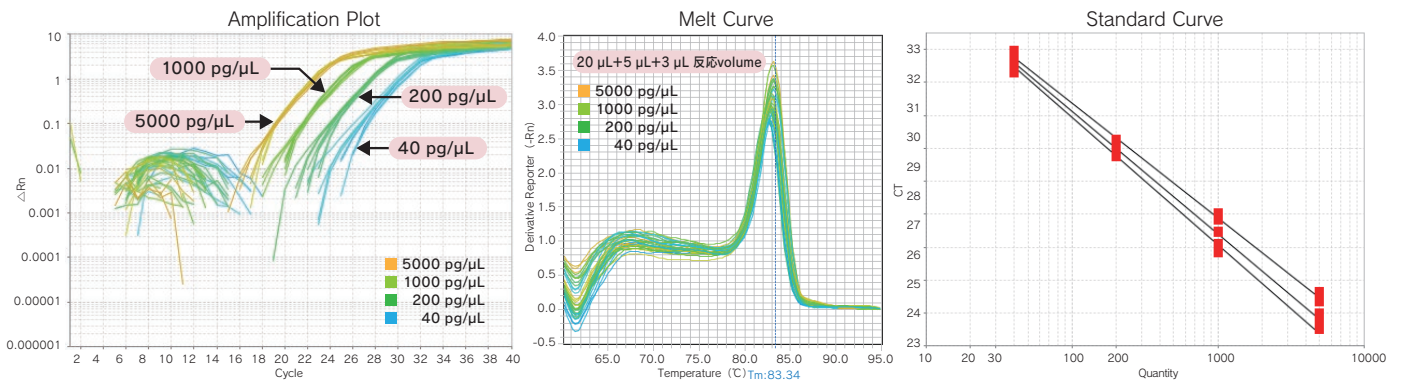


5 μL でHIGHSDのFragが立ったため、その値をomitして再解析した結果が下記である。

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μL (omit前)	-3.423	37.049	0.956	95.941
5 μL (omit後)	-3.696	38.092	0.99	86.438

再解析後は、Eff%は改善しなかったが、R²は改善した。

データの棄却を行うことで、5 μL のR²の値が改善した。
ただし、Eff%の値により、反応volumeを下げることで、反応効率が悪くなるのがわかった。

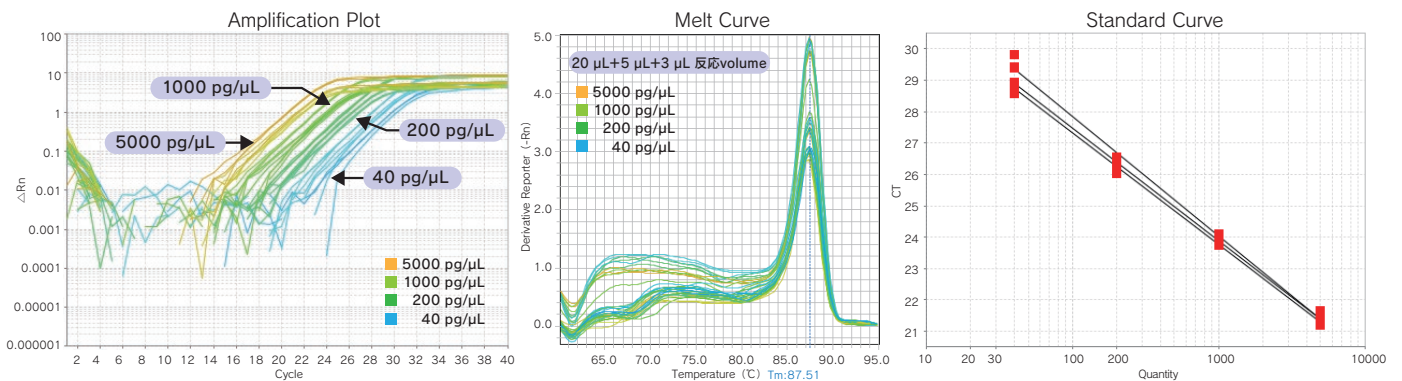
A社SYBR®系 qPCRマスターミックスF


どの反応 volumeでも
ほぼ同じ増幅曲線を描いた

どの反応volumeでも
シングルピークを示した

	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.476	35.315	0.998	93.967
5 μL	-3.719	35.575	0.997	85.742
3 μL	-3.852	35.646	0.997	81.808

20 μL, 5 μL, 3 μLとSlopeの値は徐々に小さくなった。
それに伴い、Eff%の値も徐々に小さくなった。
ただし、R²の値は1に非常に近い値を示し、信頼性の高い検量線が得られた。

TO社SYBR®系 qPCRマスターミックス


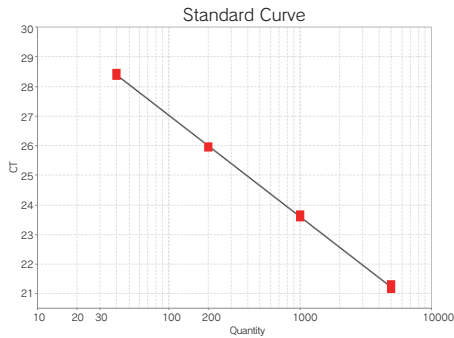
5 μLおよび3 μL反応volumeでは
20 μL反応volumeとは異なる増幅曲線を描いた

どの反応volumeでも
シングルピークを示した

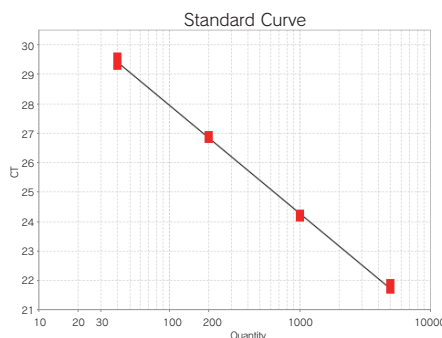
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
20 μL	-3.569	34.612	0.999	90.623
5 μL	-3.543	34.404	0.997	91.517
3 μL	-3.793	35.426	0.994	83.506

20 μL, 5 μL, 3 μLとSlopeの値は徐々に小さくなった。
それに伴い、Eff%の値も徐々に小さくなった。
ただし、R²の値は1に非常に近い値を示し、信頼性の高い検量線が得られた。

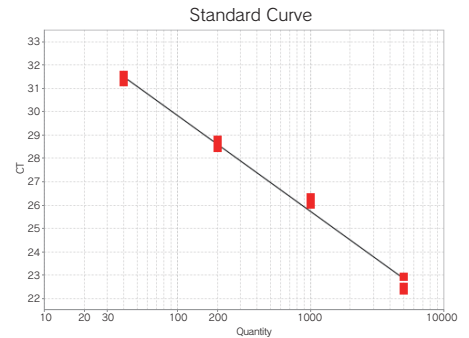
5 μ L反応系での各社試薬における検量線の結果が下記である。

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit


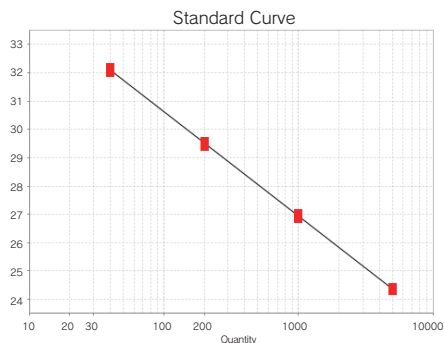
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.416	33.863	1	96.222

Bioline SensiFAST™ SYBR®


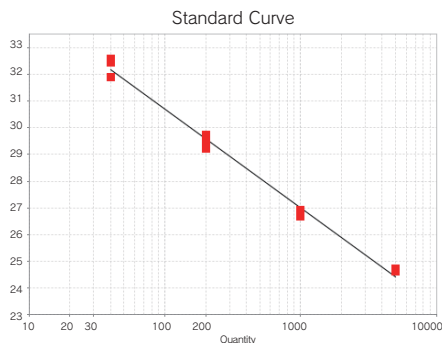
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.664	35.277	0.999	87.474

TA社SYBR®系 qPCRマスターミックス


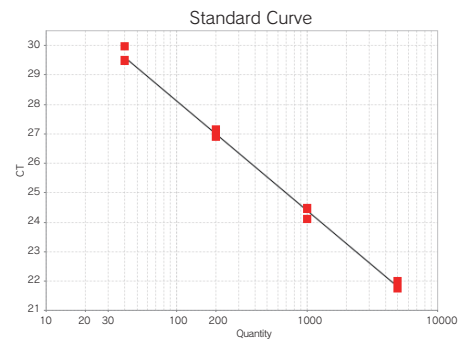
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-4.121	38.1	0.990	74.857

R社SYBR®系qPCRマスターミックス


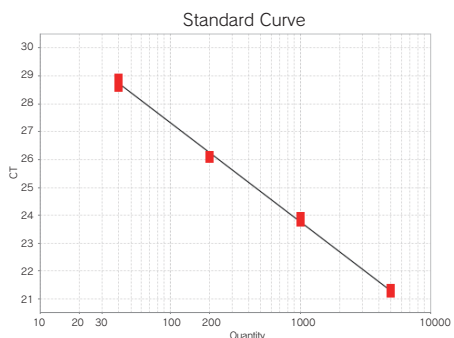
	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.684	37.994	0.999	86.813

A社SYBR®系qPCRマスターミックスP


	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.423	37.049	0.956	95.941

A社SYBR®系qPCRマスターミックスF


	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.719	35.575	0.997	85.742

TO社SYBR®系qPCRマスターミックス


	Slope	Y-Inter	R ²	Eff%
5 μ L	-3.543	34.404	0.997	91.517

本条件では5 μ L反応系でのリアルタイムPCRの評価に関して、R²とEff%のDataを下記のように定義した。

〈Dataが良いと定義した値〉
 R² \geq 0.999
 Eff% 95%-105%

〈Dataが悪いと定義した値〉
 R² < 0.96
 Eff% < 90%
 > 110%

この定義を元に、5 μ L反応量における試薬のランク分けした結果は以下のとおりである。

ランク	R ² Eff%	試薬名	評価
ランク 1	R ² Eff%	KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	安定的に微量化可能
ランク 2	R ² Eff%		
ランク 3	R ² Eff%	Bioline SensiFAST™ SYBR® R社SYBR®系qPCRマスターミックス	実用範囲で微量化可能
ランク 4	R ² Eff%		
ランク 5	R ² Eff%	TO社SYBR®系qPCRマスターミックス	
ランク 6	R ² Eff%	TA社SYBR®系 qPCRマスターミックス A社SYBR®系qPCRマスターミックスF	
ランク 7	R ² Eff%	A社SYBR®系qPCRマスターミックスP	微量化には不適
ランク 8	R ² Eff%		
ランク 9	R ² Eff%		

※このランクは、今回の評価テストにおける5 μ L反応量での試薬ランクであり、標準プロトコルの20 μ L反応量での試薬ランクではありません。

まとめ

以上の結果により、本実験条件では、試薬ごとに安定的に微量化が可能な試薬と、微量化には不適な試薬があることがわかった。KAPA SYBR® FAST qPCR Kitは、本実験条件における微量化において、Eff%とR²の値が安定しており、ランク1の試薬に分類された。Bioline SensiFAST™ SYBR®とR社SYBR®系qPCRマスターミックスは、実用範囲内で微量化が可能な試薬に分類された。(ただし、R社SYBR®系qPCRマスターミックスに関しては、Dataをomitしている)

StepOne™ は LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION の商標です。
 SYBR® は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。
 FRAMESTAR® は 4titude Ltd. の登録商標です。
 SensiFAST™ は Bioline Reagents Limited の商標です。