

Technical Data

モバイル型リアルタイムPCR装置「Franklin™」を用いた インターカレーター法での定量測定

評価製品

Biomeme Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler (Cat.No.1000005/SET)
 KAPA SYBR Fast qPCRキット (Cat.No.KK4600)

目的

KAPA SYBR Fastを用いてFranklin™ (モバイル型) で測定し、定量測定の評価を行った。
 また、LightCycler® 96 (ベンチトップ型) との検出比較を行い、機器の性能評価を行った。

背景

インターカレーター法で使用するSYBR®色素は、PCR中に形成される二本鎖DNAに結合することにより、増幅産物の蛍光を検出することができる。TaqMan法に比べ、蛍光プローブを作成する必要がなく、所有しているプライマーを用いて簡単にリアルタイムPCRが可能となり、コストも抑えられることから手軽に目的産物の増幅を確認することができる手法として広く使用されている。

またMelting Curveで非特異的増幅の有無の確認もできるため、実施したPCRの信頼性もその場で確認が可能である。

屋外でモバイル型リアルタイムPCR装置を使用する上で、コストや手間を軽減できることは非常に有用であるため、今回の検証ではインターカレーター法を用いてFranklin™での検証を実施した。

実験条件

● テンプレート

Human Genomic DNA (Roche : Cat.No. 11 691 112 001)

Standard dilution series

- a. 5 ng/μL
- b. 1 ng/μL
- c. 0.2 ng/μL
- d. 0.04 ng/μL
- e. 0 ng/μL (Non Template Control : NTC)

● プライマー

Primer Act-F1, Act-R1 (10μM) <beta-actin: 294bp amplicon>

Act-F1 : TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA

Act-R1 : CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

● 反応組成

Distilled water	7.6 μL
KAPA SYBER FAST qPCR Master Mix (2x)	10.0 μL
PrimerF : Act-F1 (10 μM each)	0.2 μL
PrimerR : Act-R1 (10 μM each)	0.2 μL
Human Genomic DNA (a ~ e)	2.0 μL
Total	20.0 μL

● 反応条件

Step	Temp	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	20 sec	
Cycle Reaction	95°C	3 sec	40 cycles
	60°C	30 sec	
Melting Curve	95°C	15 sec	
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

融解プログラムの設定

ほとんどのリアルタイムPCR装置では解離曲線解析を行うために、サーマルサイクリングプロトコルの直後に融解プログラムを組むようにリアルタイムPCR装置を設定することが可能である。

Franklinの場合は通常のqPCR反応を行ったのち、別のプログラムでMELTプログラムを作成して解離曲線解析を実施する。

[qPCRプログラム]

INITIAL DENATURE

Set Temperature 95 °C

Set Time 20 secs

CYCLING DENATURE

Set Temperature 95 °C

Set Time 3 secs

CYCLING ANNEAL

Set Temperature 60 °C

Set Time 30 secs

Cycles 40

➔

[MELTプログラム]

ACTIVE CHANNELS

Green

Amber

Red

HEATING MELT

Heating Melt

Set Start Temperature 60 °C

Set End Temperature 95 °C

Steps 71

°C Per Step 0.5 °C

【通常のqPCRプログラム】

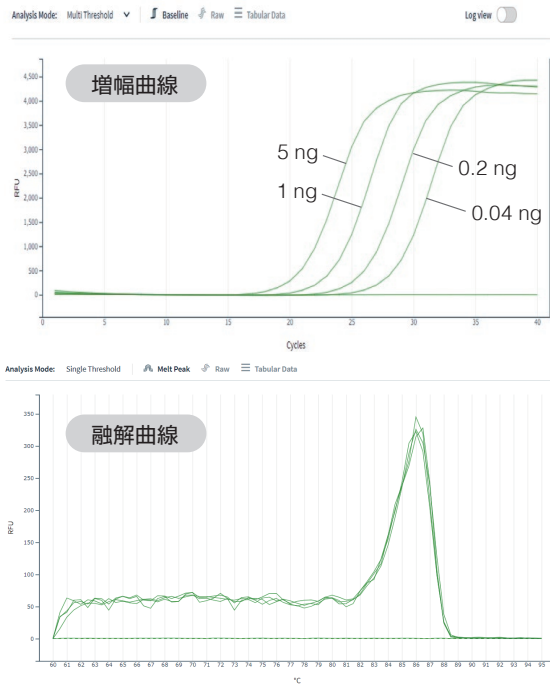
Step	Temp	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	20 sec	
Cycle Reaction	95°C	3 sec	40 cycles
	60°C	30 sec	
Melting Curve	95°C	15 sec	
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

- ① Step : 36, °C Per Step : 1°C
 ② Step : 71, °C Per Step : 0.5°C
 上記固定値。
 今回は②の設定を選択した。

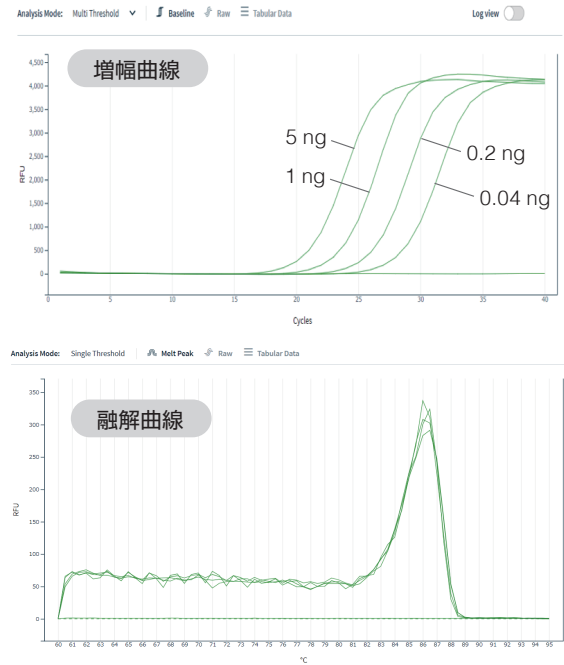
測定結果（再現性試験）

n=2で測定を行い、再現性を確認した。

【1回目】



【2回目】



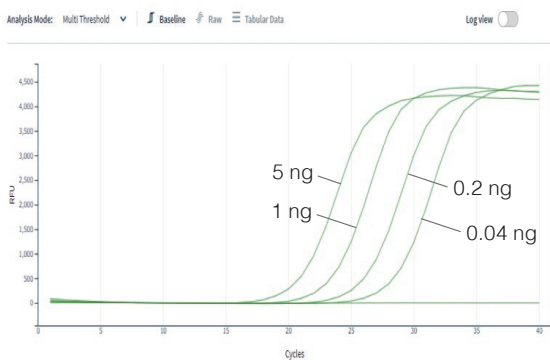
	5 ng	1 ng	0.2 ng	0.04 ng
1回目	18.58	21.29	24.26	26.16
2回目	18.31	21.31	24.27	26.18
Ave	18.45	21.30	24.26	26.17

再現性が高い事が確認できた。

測定結果（機種間比較）

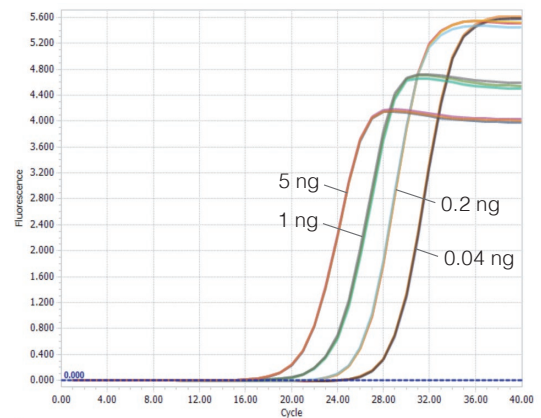
LightCycler® 96との比較 (Cq)

Franklin™



	5 ng	1 ng	0.2 ng	0.04 ng
Ave	18.45	21.30	24.26	26.17

LightCycler®96



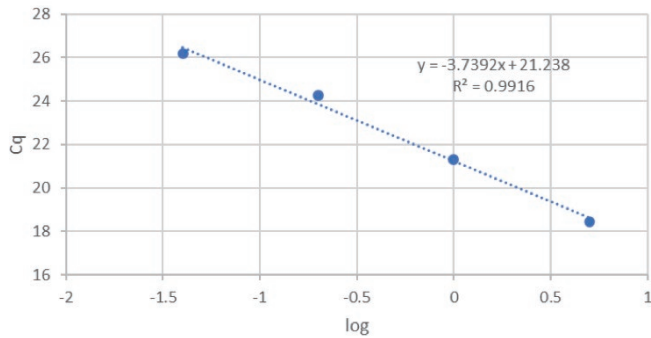
	5 ng	1 ng	0.2 ng	0.04 ng
Ave	19.69	22.04	25.16	27.67

Franklin™とLight Cycler®96と比較して同じような値となった。

LightCycler® 96との比較 (Standard Curve)

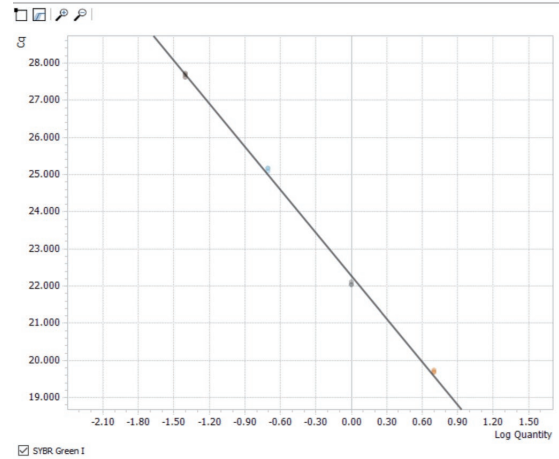
Franklin™

Standard Curve



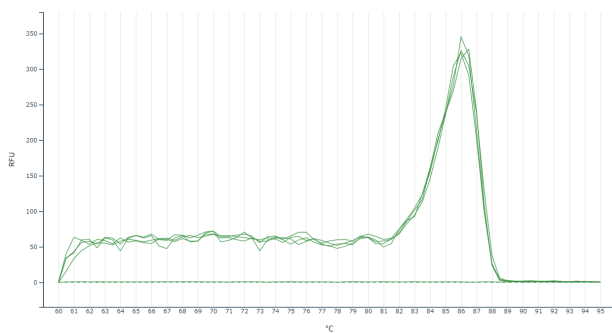
LightCycler®96

Gene Name	None
Slope	-3.8604
Efficiency	1.82
Error	0.17
R ²	1.00
Y-Intercept	22.29

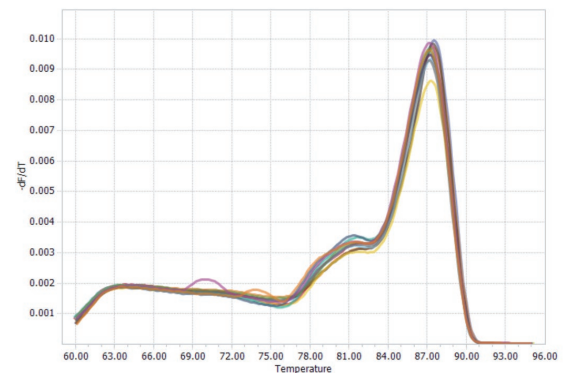


LightCycler® 96との比較 (Melting Curve)

Franklin™

 Analysis Mode: Single Threshold Melt Peak Raw Tabular Data


LightCycler®96



まとめ

- 実験の再現性が高いため、信頼性がある。
- LightCycler® 96と比較しても同等の結果が得られた。
- インターカレーター法が使用できることでスクリーニング目的でのリアルタイム PCR 測定が利用可能であり、より広いアプリケーションに対応できる。