

Technical Data

超微量リアルタイムPCRでの 検量線の評価

KAPA SYBR® FAST qPCR Kitと
Bioline SensiFAST™ SYBR®
Hi-ROX Kitは反応液量を20μLから
3μLまで減らしても信頼性の高い
検量線が得られました。



評価製品

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit, Bioline SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit, TA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、問題なく検量線が描けるかどうかの評価を行った。

評価方法

KAPA SYBR® FAST qPCR Kitを用いて、1μL, 3μL, 5μL, 20μL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、KAPA, Bioline, TA社に関して3μL, 5μL, 20μL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 1×1mL
Cat.No. KK4604 1×5mL
Cat.No. KK4605 2×5mL



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



FrameStar 96
ファストPCRプレート
(FRAMESTAR® ·
FastPlate 96)
Cat.No. 4Ti-0910/C



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-0910/C) (FRAMESTAR® · FastPlate 96)
シール : 4titude (4Ti-0541) ヒートシール (クリア)
テンプレートDNA : Roche Human Genomic DNA (#11 691 112 001)
プライマー : Act-F1, Act-R1 (10μM) β-actin: 294bp amplicon
Act-F1 : TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
Act-R1 : CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

〈反応組成〉(例) 20μL反応系

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

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

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

※サイクルシミュレーション設定 : 20μL

↳ (同一Runで設定しているため)

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20μL, 5μL, 3μL, 1μLの反応量となるように分注した。

FRAMESTAR®の特徴

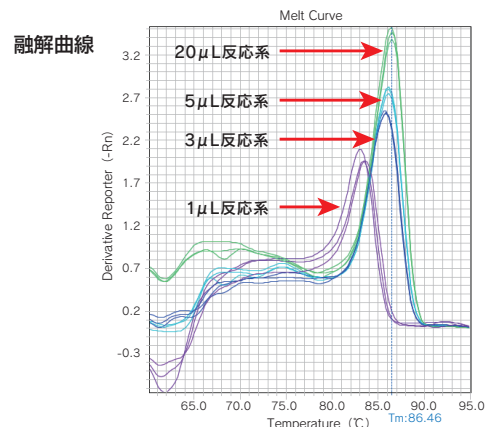
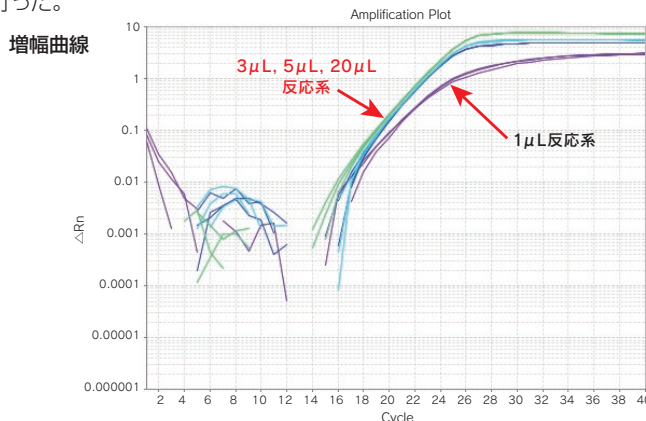


FRAMESTAR®ポリカーボネートを含む特殊樹脂製の『丈夫なフレーム』とポリプロピレン製の『肉薄なウェル』を組み合わせて成型しています。
(FrameStar PCR plates are covered by one or more of the following U.S.patents or their foreign counterparts, owned by Eppendorf AG: US Patent Nos. 7,347,977 and 6,340,589.)

結果

KAPA SYBR® FAST qPCR Kit

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



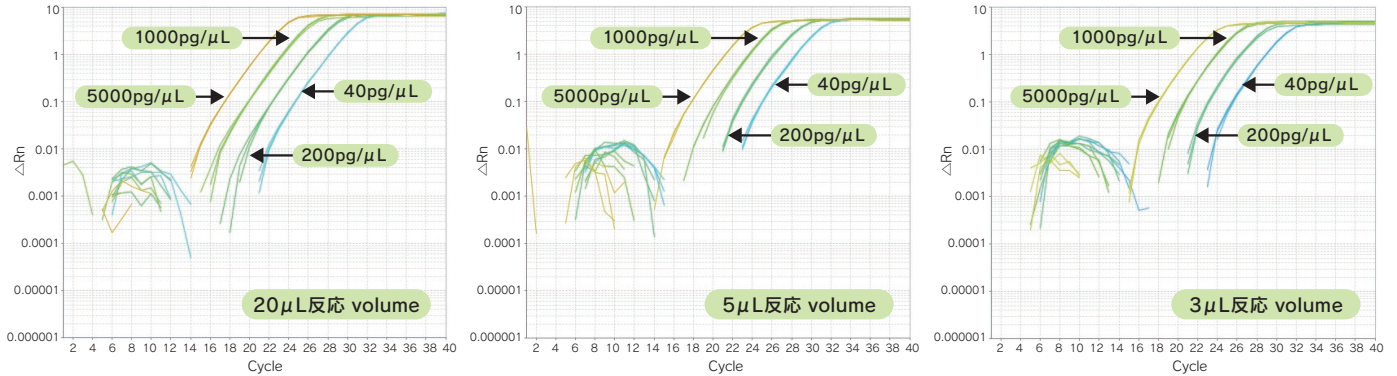
KAPA SYBR® FAST qPCR Kitを用いると、3μL反応系まで20μL反応系と同様の傾向が得られることがわかった。

次のページで検量線の評価!

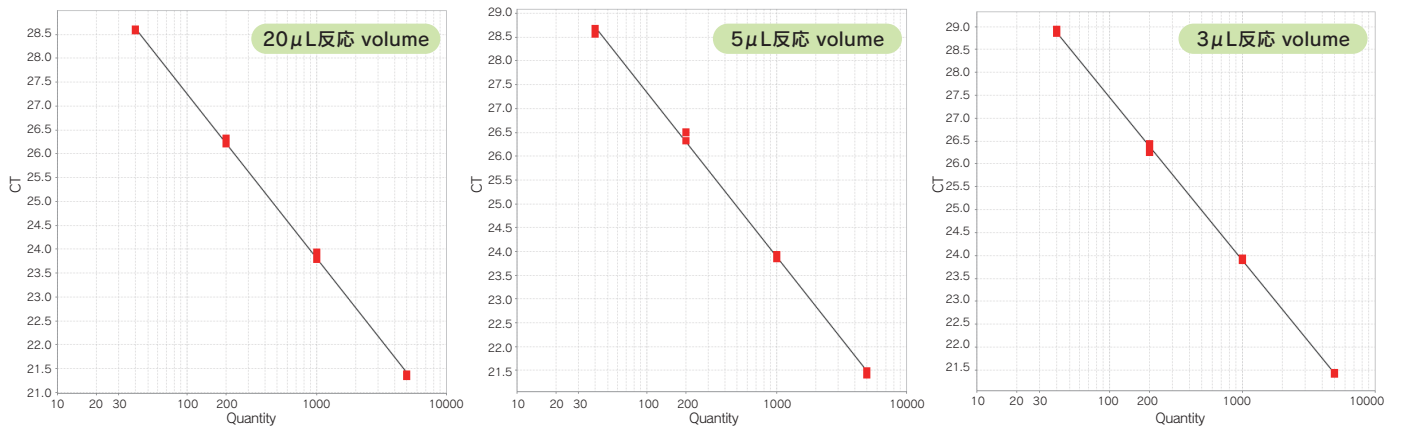
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit

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

1. 各反応volumeに対する増幅曲線



2. 各反応volumeに対する検量線

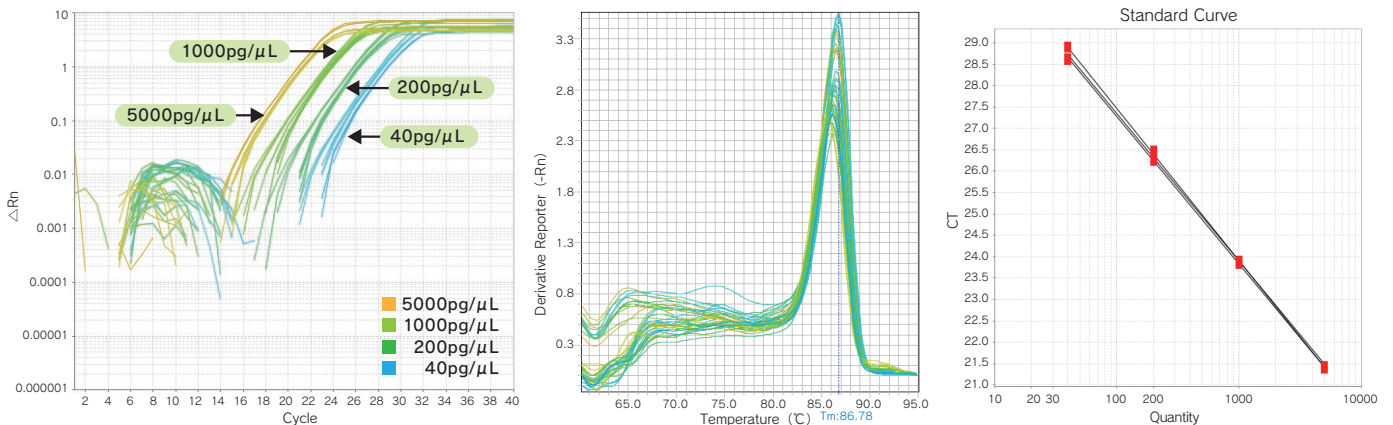


slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.442	34.146	1	95.222

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.448	34.242	0.999	95.014

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.555	34.571	1	91.115

3. 増幅曲線・融解曲線・検量線の解析結果



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

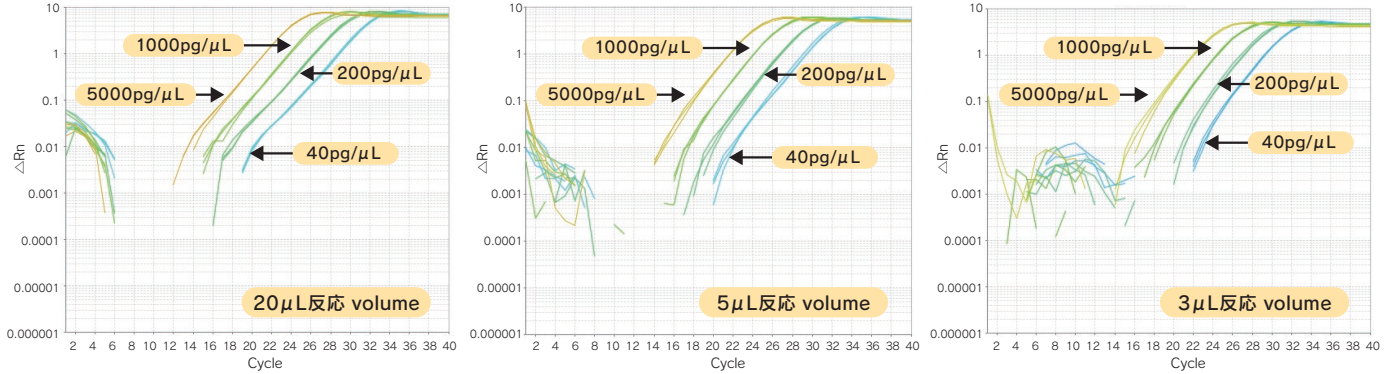
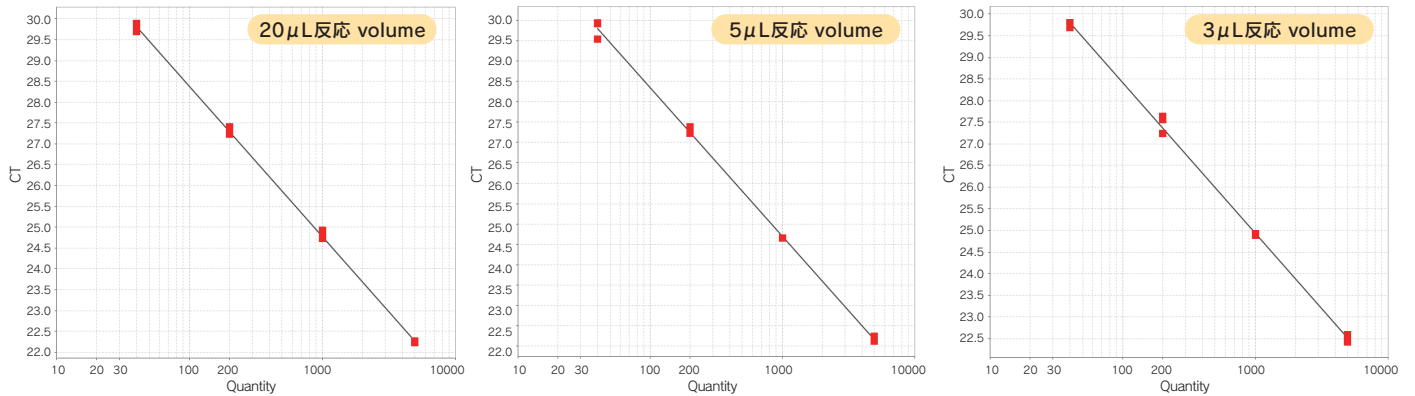
どの反応 volume でも
ほぼ同じ検量線を描いた

まとめ

KAPA SYBR® FAST qPCR Kitを用いると、3μL反応volumeでも20μL反応volumeと同様の増幅曲線・融解曲線・検量線を描いた。融解曲線に関しては、シングルピークを示し、検量線に関しては、R²の値がほぼ1であり、信頼性の高い検量線が得られている。

Bioline SensiFAST™

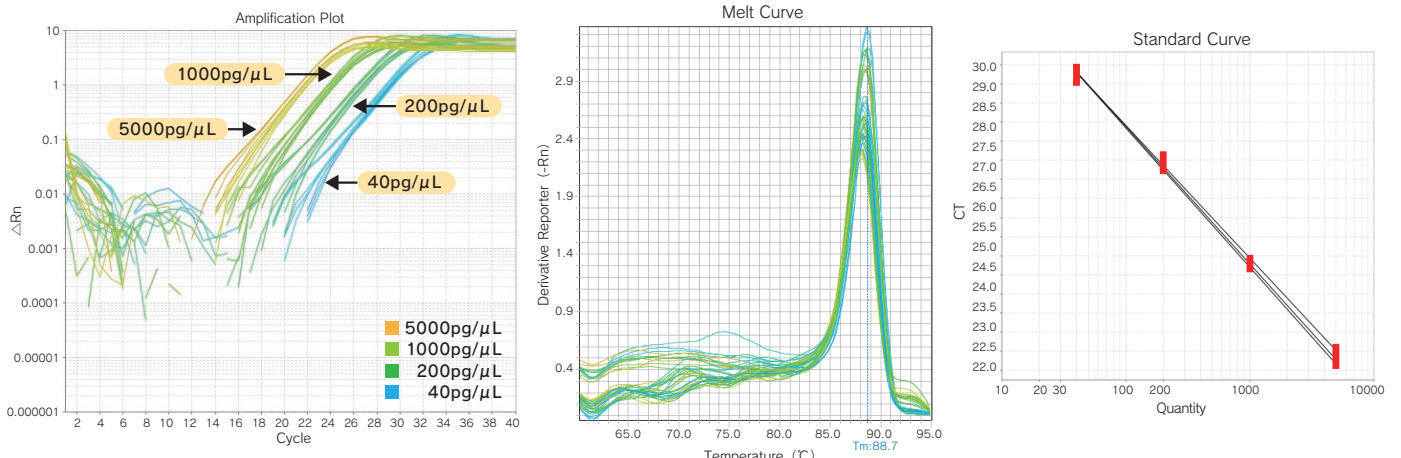
テンプレートDNA：Roche Human Genomic DNA (#11 691 112 001) 5000pg/μL, 1000pg/μL, 200pg/μL, 40pg/μLを用いた増幅曲線・融解曲線・検量線の評価

1. 各反応volumeに対する増幅曲線

2. 各反応volumeに対する検量線


slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.599	35.586	0.999	89.617

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.648	35.652	0.999	87.978

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.479	35.381	0.998	93.831

3. 増幅曲線・融解曲線・検量線の解析結果


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

どの反応 volume でも
ほぼ同じ検量線を描いた

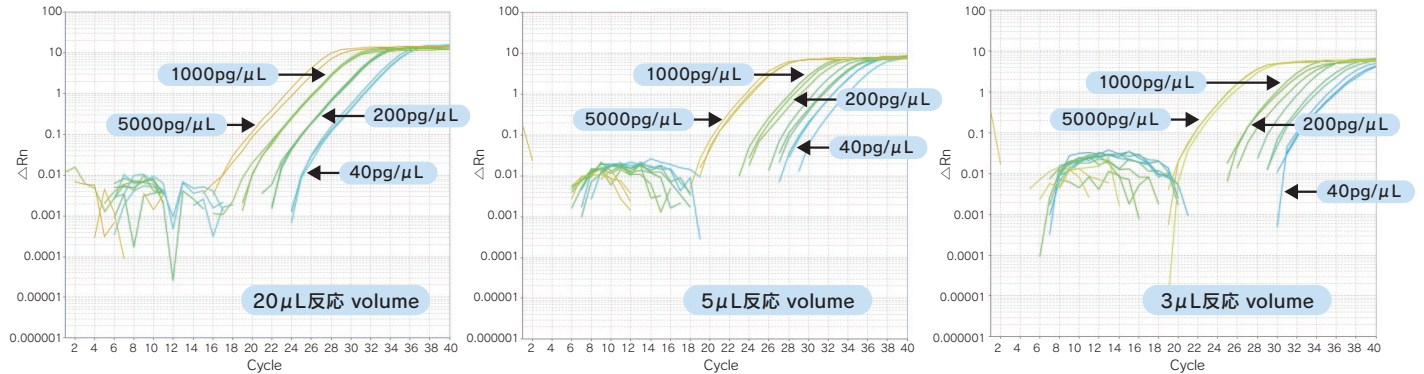
まとめ

Bioline SensiFAST™を用いると、3μL反応volumeでも20μL反応volumeと同様の増幅曲線・融解曲線・検量線を描いた。融解曲線に関しては、シングルピークを示し、検量線に関しては、R²の値がほぼ1であり、信頼性の高い検量線が得られている。

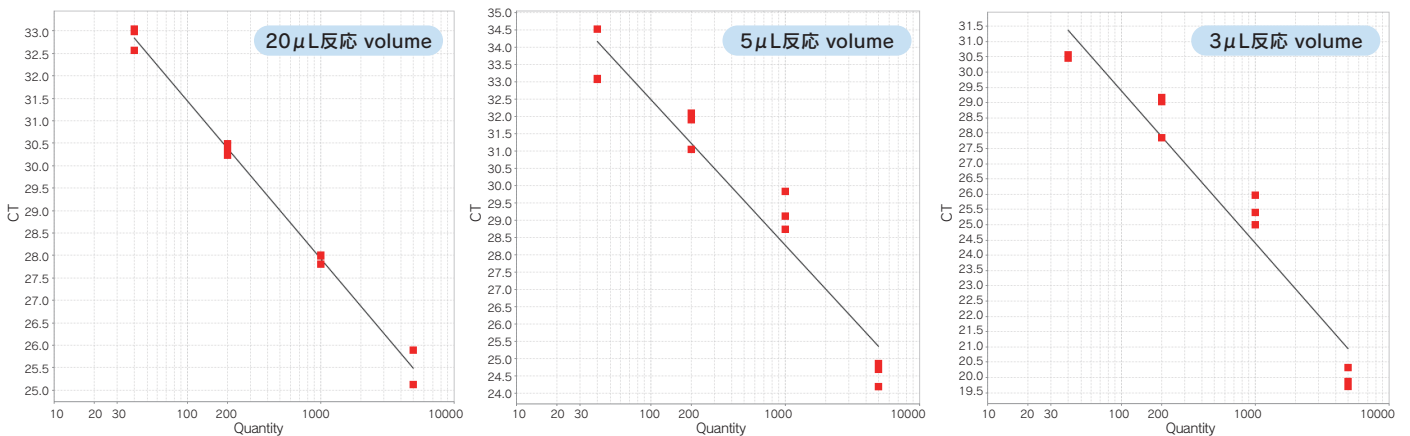
TA社SYBR®系 qPCRマスターミックス

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

1. 各反応volumeに対する増幅曲線



2. 各反応volumeに対する検量線

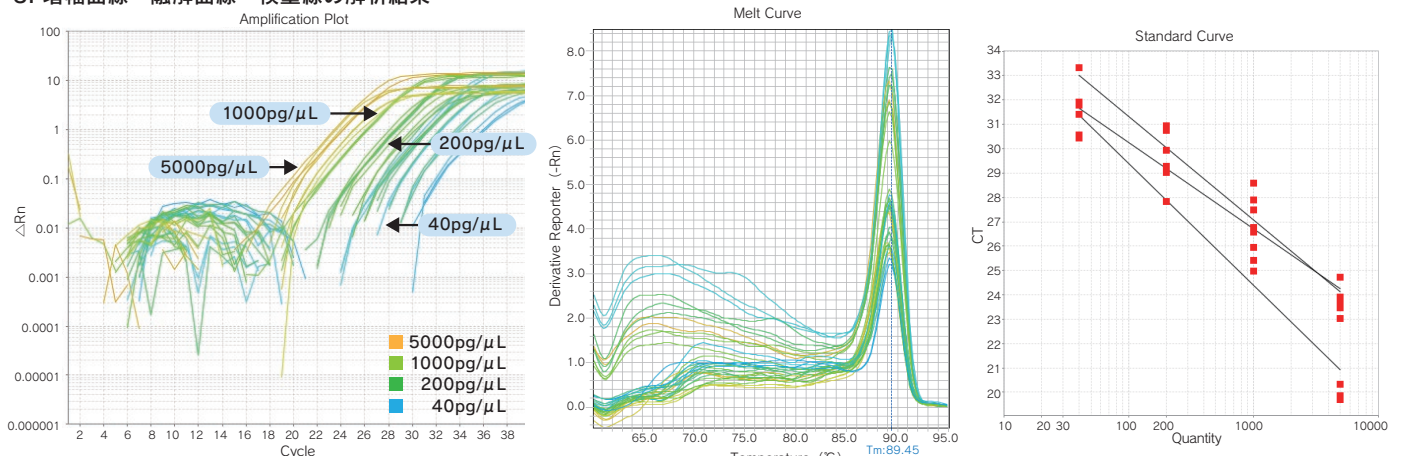


slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-3.507	38.462	0.994	92.827

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-4.209	40.92	0.935	72.826

slope	Y-Inter	R ²	Eff%
-4.982	39.354	0.938	58.753

3. 増幅曲線・融解曲線・検量線の解析結果



5μLおよび3μL反応volumeでは20μL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

5μLおよび3μL反応volumeでは20μL反応volumeとは異なる検量線を描いた

まとめ

TA社SYBR®系 qPCRマスターミックスを用いると、20μL反応volumeの検量線に関してはR²の値がほぼ1であり、信頼性の高い検量線が得られている。

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。

補足資料

微量分注のフローと注意点

● 目的

試薬の量を20 μ Lから5 μ Lに減らすことで、微量分注をする必要がでてきます。そこで、精度よく微量分注を行うためのポイントを提案します。

● 微量分注に用いた当社取扱商品



Sorenson
10uL ワンタッチフィルター
Cat.No. 10320



エスケーパイオ・インターナショナル
アイスオン 2 型 (ICE ON)
Cat.No. SKIO-2

- ・装着部がゴムのように柔らかいプラスチック (TPE=Thermo Plastic Elastomer)を採用。(特許出願中)
- ・マルチチャンネルピペットに一発フィットします。
- ・ピペットに軽く、ソフトに"ワンタッチ"装着できます。
- ・サンプルの入ったチューブをアイスオンにセットし、氷の上に置いて使用します。
- ・チューブは、水や氷には触れません。
- ・通常の小型アイスパケツに入るように、コンパクトな設計になっています。
- ・積み重ねが可能で、冷蔵庫でのサンプル収納ラックとしても使用できます。
- ・1.5/0.5mlチューブから0.2mlチューブへの分注が容易です (SKIO-2)

● 1反応5 μ LのqPCRの事例

20 μ L反応系での反応組成から単純に比計算で5 μ L反応系での反応組成にすると、下記ようになります。

20 μ L反応系での反応組成

反応組成:	1sample
2xMaster Mix	10.0 μ L
PCR grade water	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 μ L

微量化

5 μ L反応系での反応組成

反応組成:	1sample	
2xMaster Mix	2.5 μ L	} 4.5 μ L
PCR grade water	1.9 μ L	
Primer F (10 μ M)	0.05 μ L	
Primer R (10 μ M)	0.05 μ L	
template DNA	0.5 μ L	} 0.5 μ L
total	5.0 μ L	

0.5 μ Lを
分注するのは
大変です。



PCR grade
waterの
量を調整

一般的に、上記④ (2xMaster Mix, SDW, Primer) は、プレミックスとして数サンプル分作成し、分注するため、問題なく分注できますが、テンプレートDNAは0.5 μ L分注する必要があります。

そこで、PCR grade waterの量を調整し、テンプレートDNAの分注量を2.0 μ Lにすることで、精度よく分注することができます。

5 μ L反応系での反応組成

反応組成:	1sample	
2xMaster Mix	2.5 μ L	} 3.0 μ L
PCR grade water	0.4 μ L	
Primer F (10 μ M)	0.05 μ L	
Primer R (10 μ M)	0.05 μ L	
template DNA	2.0 μ L	} 2.0 μ L
total	5.0 μ L	

分注しやす
くなりました。



※ ただし、テンプレートDNAの溶液量が全反応量の10分の1を超える場合、テンプレートDNA由来の成分が希釈されず、PCRに影響を与える可能性が出ています。

テンプレートDNAは、できるだけ高純度に精製し、EDTAなどの酵素活性阻害剤などが含まれていない溶液 (例: 5mM Tris-HCl pH8.0) をご使用ください。

● 実際の評価方法のフロー 5 μ L反応系 96sample

① 下記の反応組成のプレミックスを100sample分作成する

反応組成:	1sample	100sample
2xMaster Mix	2.5 μ L	250 μ L
PCR grade water	0.4 μ L	40 μ L
Primer F (10 μ M)	0.05 μ L	5 μ L
Primer R (10 μ M)	0.05 μ L	5 μ L
total	3.0 μ L	300 μ L

② ①のプレミックスをリバースピペティングを用いて各ウェルあたり3 μ L分注する

<リバースピペティング操作方法>

① ピペットのピストンを2段目まで押し切ります。



↓ 2段目まで

② そのまま溶液を吸引します。



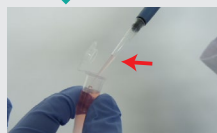
↓ 吸引量多い

③ 吐出の際は、1段目まで押し分注します。



↓ 1段目まで

④ 吐出後も、チップ内には溶液が残っています(右図矢印)。連続分注の場合はそのまま続けて溶液を吸引します。



残液あり

<通常のピペティング(参考)>



↓ 1段目まで



↓ 吸引量少ない



↓ 2段目まで



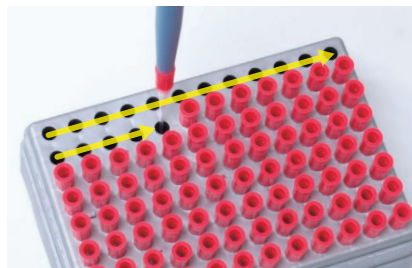
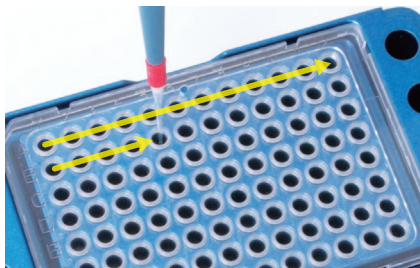
吐き切り

ポイント

微量分注を精度よく行うため
リバースピペティング

③ テンプレートDNAをそれぞれ2 μ L分注する

(リバースピペティングではなく、通常のピペティング(吐き切り)で行ってください。)



ポイント

サンプルを確実に目的ウェルに
分注するため96プレートと同じ
場所のチップを使用する

