



Technical Data

KAPA SYBR® Fast qPCR Kitと 各社SYBR Green I 試薬との比較試験

評価製品

KAPA SYBR® Fast qPCR Kit
(KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No. KK4600, KK4601, KK4602)

目的

KAPA SYBR® Fast qPCR Kitは、SYBR Green Iの酵素反応阻害性に耐性のある独自酵素（エンジニアリング酵素）を採用したマスターミックスである。また、高濃度のSYBR Green Iが含まれており、今までにない超高感度の検出が可能という特徴がある。そこで、KAPA SYBR® Fast qPCR Kitと他社SYBR Green I 試薬と比較試験を行った。

実験条件

● 比較試薬

KAPA SYBR® Fast qPCR Kit (以下KAPA) , A社PU, A社P, B社T, B社TN, C社L, D社TG, E社G, F社

● 使用機器

- LightCycler® 96 System (Roche, Cat No. 05815916001)
- QuantStudio® 5 リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- CFX Opus 96 リアルタイムPCRシステム (BIO-RAD)

● サンプル

- Mouse Genomic DNA (Promega, Cat.No. G3091)

● qPCRでのサンプル添加量

10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、0 pg (NTC) の各3重測定

● ターゲット遺伝子

murine bACT (232bp)

Forward:5'-CCAAACCAGAGACGACAAG-3'

Reverse:5'-GTAACCCCAGGACAGTGTAG-3'

● 反応組成

それぞれ試薬の取扱説明書に従い調製した

反応組成を共通化する為、機器側の必要性にかかわらず、すべてのマスターミックスはパッシブリファレンス色素 (ROX) を含む状態で使用した

● 反応プログラム

KAPA, A社PU, B社T, TN, C社L, D社TG, F社

Step	Temperature	Time	Cycle
Pre-incubation	95 °C	2 min	40 cycles
Denaturation	95 °C	15 sec	
Annealing/Extention	60 °C	30 sec	
Melting*			

*Melting Stepは各機器プロトコルに従い行った

KAPA, A社P, E社G**

Step	Temperature	Time	Cycle
Pre-incubation	95 °C	10 min	40 cycles
Denaturation	95 °C	30 sec	
Annealing/Extention	60 °C	60 sec	
Melting*			

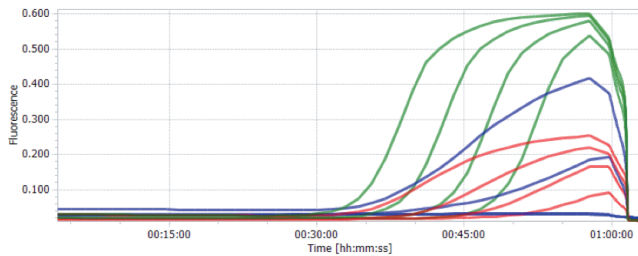
* Melting Stepは各機器プロトコルに従い行った

** A社P, E社GはPCR酵素の熱活性化の時間が長い為、別プログラムで実施した。また、比較するため、KAPA SYBR® Fast qPCR Kitは推奨外とはなるが、同じプログラムで実施した

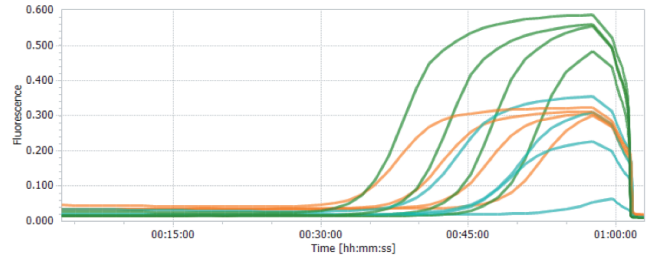
結果

LightCycler 96

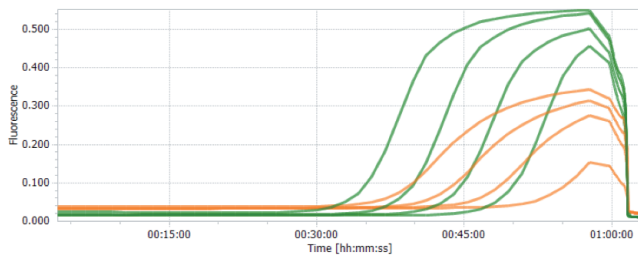
<RAWデータ>



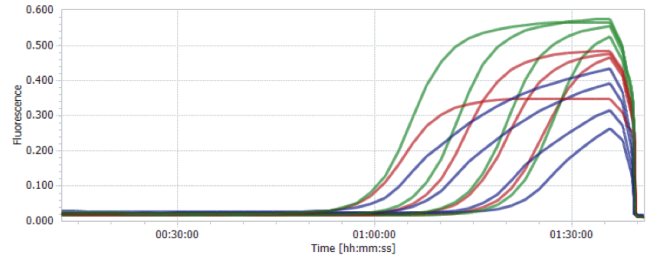
—:KAPA —:B社TN —:B社T



—:KAPA —:C社L —:D社TG



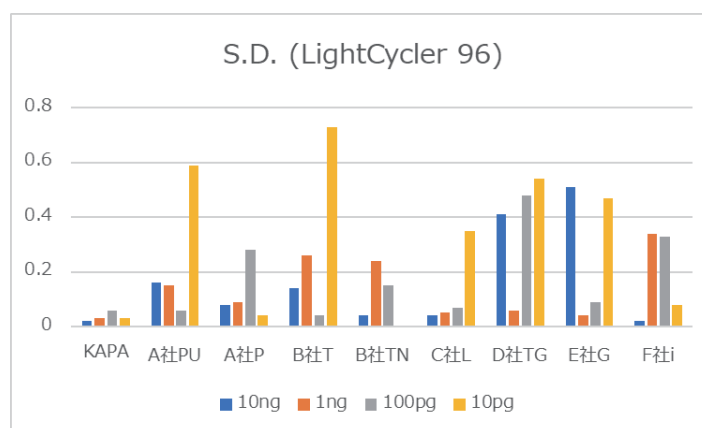
—:KAPA —:A社PU



—:KAPA —:A社P —:E社G

<Cq値>

	KAPA		A社PU		A社P		B社T		B社TN		C社L		D社TG		E社G		F社i	
	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.
10 ng	21.52	0.02	24.40	0.16	22.48	0.08	22.96	0.14	23.02	0.04	21.73	0.04	25.00	0.41	21.16	0.51	22.61	0.02
1 ng	24.78	0.03	27.42	0.15	25.68	0.09	25.85	0.26	26.21	0.24	24.94	0.05	28.67	0.06	24.95	0.04	25.78	0.34
100 pg	28.28	0.06	31.43	0.06	29.78	0.28	29.98	0.04	30.28	0.15	28.32	0.07	33.47	0.48	28.09	0.09	29.72	0.33
10 pg	31.65	0.03	34.51	0.59	32.16	0.04	33.78	0.73	-	-	31.71	0.35	36.04	0.54	31.35	0.47	32.30	0.08



<検量線>

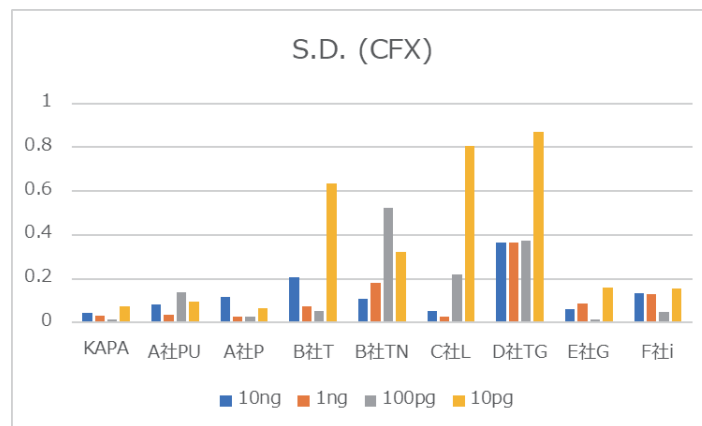
	KAPA	A社PU	A社P	B社T	B社TN	C社L	D社TG	E社G	F社i
Slope	-3.3853	-3.4279	-3.3592	-3.6377	-3.5923	-3.3333	-3.7905	-3.3825	-3.302
Efficiency	1.97	1.96	1.98	1.88	1.9	2	1.84	1.98	2.01
Error	0.07	0.34	0.42	0.43	0.29	0.17	0.64	0.34	0.38
R ²	1	0.99	0.99	0.99	0.99	1	0.98	0.99	0.99
y-intercept	24.86	27.71	25.88	26.31	26.48	25.01	28.9	24.71	25.95

結果

CFX

〈Cq値〉

	KAPA		A社PU		A社P		B社T		B社TN		C社L		D社TG		E社G		F社i	
	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.
10 ng	24.33	0.043	26.17	0.081	24.51	0.117	23.89	0.207	24.95	0.109	23.66	0.052	24.72	0.364	24.36	0.061	24.33	0.135
1 ng	27.56	0.031	29.37	0.034	28.02	0.029	27.09	0.075	28.56	0.183	26.99	0.026	28.59	0.366	27.74	0.085	27.75	0.128
100 pg	31.02	0.012	32.89	0.138	32.00	0.029	30.83	0.053	32.33	0.525	30.44	0.221	32.61	0.375	31.30	0.014	31.17	0.047
10 pg	34.11	0.076	37.11	0.094	34.4	0.067	34.52	0.634	35.34	0.322	33.16	0.807	37.61	0.870	35.26	0.160	33.65	0.157



〈検量線〉

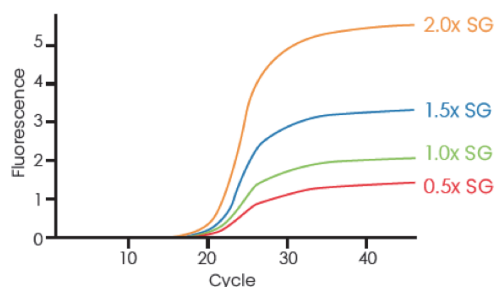
	KAPA	A社PU	A社P	B社T	B社TN	C社L	D社TG	E社G	F社i
Effeciency	101.7	89.6	97.4	91.3	93.0	104.5	72.4	89.1	106.6
R ²	1.000	0.995	0.992	0.995	0.995	0.992	0.989	0.998	0.994
Slope	-3.281	-3.598	-3.385	-3.551	-3.502	-3.219	-4.227	-3.615	-3.173
y-intercept	27.615	29.555	28.024	27.299	28.535	26.976	28.734	27.860	27.668

KAPA SYBRの特長

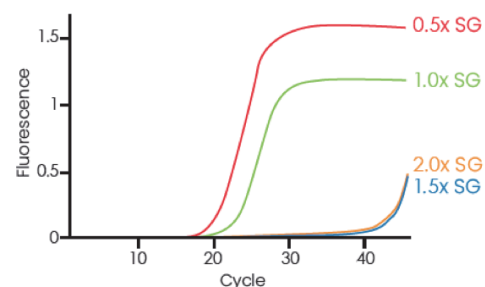
 今までにない超高感度なSYBR GreenフォーマットのqPCRマスターミックス
 KAPA SYBR® Fast qPCR Kit

SYBR Green Iの酵素反応阻害性に耐性のある独自酵素（エンジニアリング酵素）を採用したマスターミックスです。高濃度のSYBR Green Iが含まれており、今までにない超高感度の検出が可能です。

KAPA酵素



通常の酵素

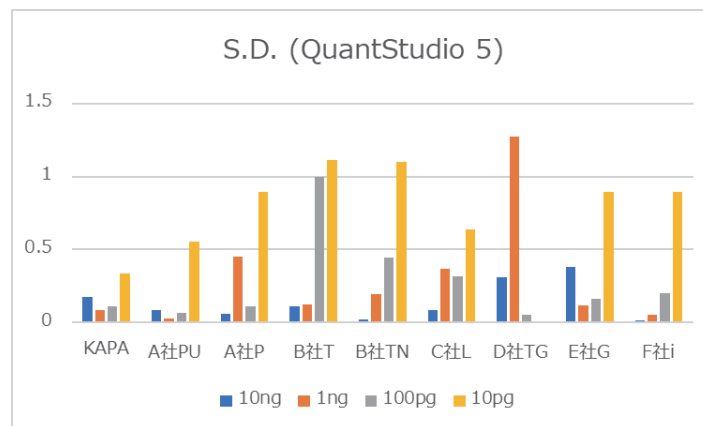


結果

QuantStudio 5

〈Cq値〉

	KAPA		A社PU		A社P		B社T		B社TN		C社L		D社TG		E社G		F社i	
	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.	Cq Mean	S.D.
10 ng	23.079	0.173	25.234	0.086	23.126	0.062	23.163	0.111	23.959	0.023	21.630	0.086	26.558	0.308	22.836	0.379	22.849	0.016
1 ng	26.268	0.083	28.488	0.028	25.996	0.451	26.769	0.127	27.166	0.193	24.762	0.365	32.473	1.273	26.457	0.117	26.040	0.054
100 pg	29.653	0.111	31.913	0.066	29.852	0.112	29.944	0.998	30.707	0.442	28.517	0.318	37.886	0.053	29.743	0.161	29.868	0.203
10 pg	33.313	0.333	36.346	0.556	34.166	0.894	35.436	1.110	35.402	1.099	32.983	0.638	-	-	33.153	0.897	33.158	0.897



〈検量線〉

	KAPA	A社PU	A社P	B社T	B社TN	C社L	D社TG	E社G	F社i
Slope	-3.393	-3.697	-3.676	-3.999	-3.787	-3.781	-5.664	-3.424	-3.476
y-intercept	26.369	26.436	28.657	26.828	27.415	25.082	32.285	26.335	26.241
Effeciency	97.125	86.406	87.08	77.846	83.674	83.851	50.155	95.921	93.967
R ²	0.998	0.983	0.991	0.966	0.979	0.988	0.990	0.988	0.990
Error	0.056	0.156	0.109	0.235	0.176	0.132	0.230	0.117	0.113

まとめ

KAPA SYBR® Fast qPCR Kitは、いずれの機種においても感度、安定性が高く、特に低濃度サンプルでの安定性は高く、検量線の精度も一番よい結果となった。

昨今の実験ではサンプルの微量化が進み、qPCRにおいても低濃度サンプルの測定の安定度がより一層求められる為、様々な場面でKAPA SYBR® Fast qPCR Kitの有用性を発揮する事が期待できる。