

●GenNext[®] NGS Library Quantification Kit の使用条件 [タカラバイオ Thermal Cycler Dice]

(1) 1 × Dilution Bufferの調製

50 × Dilution Bufferを滅菌水で50倍に希釈し1 × Dilution Bufferを調製します。
この1 × Dilution Bufferを使用し、Standard DNA1~6の範囲内(20~0.0002 pM
≒5.5~0.000055 pg/μL)に入るようにライブラリーサンプルを希釈します。

(2) ライブラリーの希釈

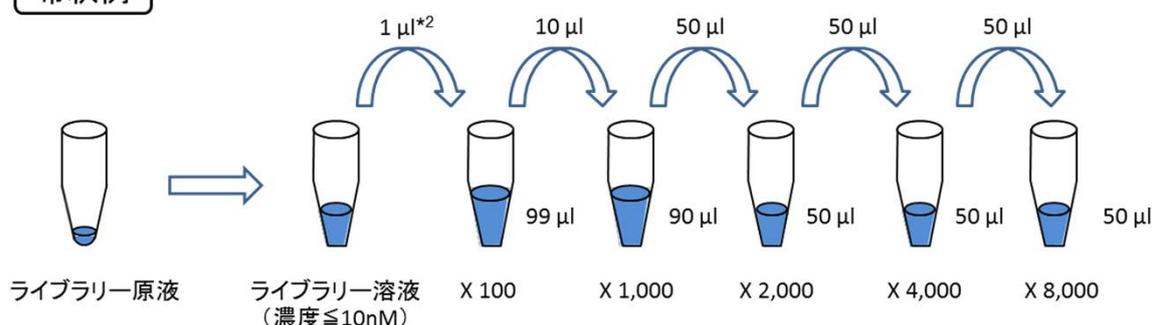
ライブラリーはあらかじめ1 × Dilution Bufferで10nM 以下(または2.7ng/μL以下)
に希釈してください。

10nM以下に希釈したライブラリーは1 × Dilution Bufferを用いて100倍、続いて1,000倍に
希釈した後に、2倍希釈を繰り返し、2,000倍、4,000倍、8,000倍まで希釈します。

1,000、2,000、4,000、8,000倍希釈したライブラリーを定量に使用します。

また、状況に応じて、これら倍率の前後の希釈系列を作製して、定量にご使用ください。

希釈例



(3) 反応液の調製

以下に、20 μL反応時の調製例を示します。

| 試薬 | 20 μL 反応 |
|--------------------------------|----------|
| 滅菌水 | 2 μL |
| KOD SYBR [®] qPCR Mix | 10 μL |
| 5 × Primer Mix | 4 μL |
| 希釈したライブラリー / Standard DNA | 4 μL |
| 合計液量 | 20 μL |

(4) qPCRプレートへの分注
以下に、分注例を示します。

※n=3で6ライブラリーを測定する場合

STD:スタンダード
NTC: Non Template Control
Lib :ライブラリー

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | STD-1 | STD-1 | STD-1 | Lib x1000 |
| B | STD-2 | STD-2 | STD-2 | Lib x2000 |
| C | STD-3 | STD-3 | STD-3 | Lib x4000 |
| D | STD-4 | STD-4 | STD-4 | Lib x8000 |
| E | STD-5 | STD-5 | STD-5 | Lib x1000 |
| F | STD-6 | STD-6 | STD-6 | Lib x2000 |
| G | NTC | NTC | NTC | Lib x4000 |
| H | | | | Lib x8000 |

(5)PCRサイクル条件設定

| ステップ | 温度 | 時間 | 昇降速度 |
|--|--------|-------|-------|
| 初期変性 | 98° C | 2分*1 | 最大 |
| PCR | 変性 | 98° C | 10秒 |
| (35 cycles)*4 | アニーリング | 65° C | 10秒 |
| | 伸長 | 68° C | 30秒*2 |
| (Data Collectionは伸長ステップに設定します) | | | |
| 融解曲線分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis) | | | |

*1: 本製品では抗体を用いるホットスタートシステムを採用しているため、98° C、2min.の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

*2: 600bp以上のライブラリーの場合、45 sec.に設定ください。