

●GenNext® NGS Library Quantification Kit の使用条件 [Roche LightCycler 2.0]

(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

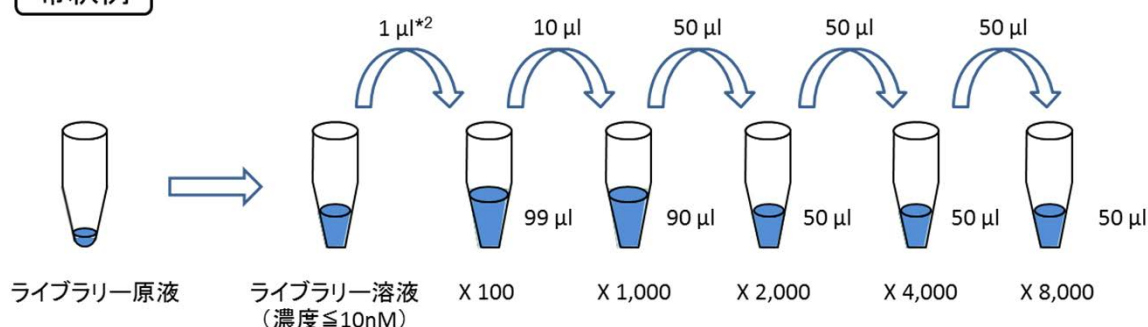
ライブラリーはあらかじめ1 × Dilution Bufferで10nM 以下(または2.7ng/μL以下)
に希釈してください。

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	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000
B	STD-2	STD-2	STD-2	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000
C	STD-3	STD-3	STD-3	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000
D	STD-4	STD-4	STD-4	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000
E	STD-5	STD-5	STD-5	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000
F	STD-6	STD-6	STD-6	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000
G	NTC	NTC	NTC	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000
H				Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	Lib x8000	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。