

●GenNext[®] NGS Library Quantification Kit の使用条件 [Qiagen RotorGene]

(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。

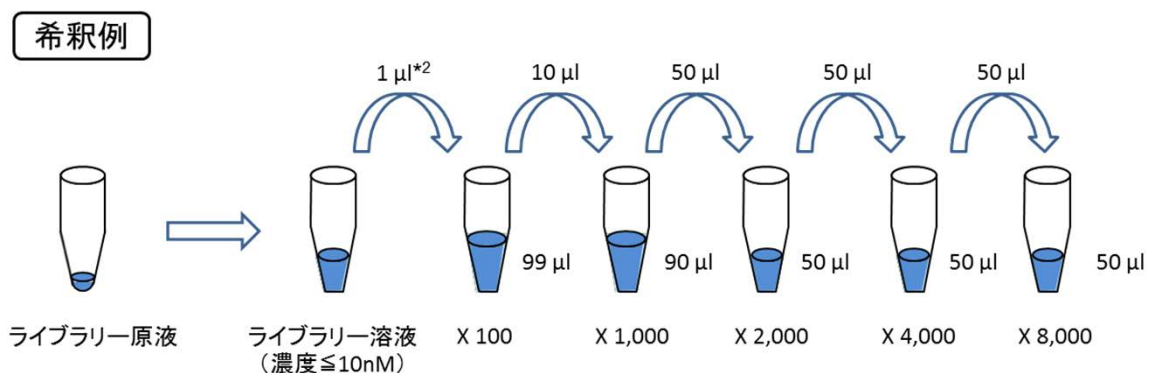
(2) ライブラリーの希釈

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。



(3)反応液の調製

以下に、25 μ L反応時の調製例を示します。

試薬	25 μ L 反応
滅菌水	2.5 μ L
KOD SYBR [®] qPCR Mix	12.5 μ L
5 \times Primer Mix	5 μ L
希釈したライブラリー / Standard DNA	5 μ L
合計液量	25 μ L

(4)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 $^{\circ}$ C	2分 ^{*1}	最大	
PCR (35 cycles) ^{*4}	変性	98 $^{\circ}$ C	10秒	最大
	アニーリング	65 $^{\circ}$ C	10秒	最大
	伸長	68 $^{\circ}$ C	30秒 ^{*2}	最大
(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 $^{\circ}$ 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。