

●KOD SYBR[®] qPCR Mixの使用条件 [ABI QuantStudio[™] 5]

(1)反応液の調製

以下に、20 μ L反応時の調製例を示します。

試薬	20 μ L反応	最終濃度
滅菌水	X μ L	
KOD SYBR [®] qPCR Mix	10 μ L	1x
Forward Primer	4 pmol	0.2 μ M*1
Reverse Primer	4 pmol	0.2 μ M*1
50X ROX reference dye	0.04 μ L	0.1x
DNA溶液	Y μ L	
合計液量	20 μ L	

*1: 増幅効率が不十分な場合は、プライマー濃度を増やすことで、また非特異反応が発生する場合は、プライマー濃度を減らすことで、反応結果が改善することがあります。
プライマー濃度は、最終濃度0.05~1.0 μ Mを目安にご検討ください。

(2)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	最大
PCR	変性 98° C	10秒	最大
(40 cycles)*4	アニーリング 60° C*2	10秒	最大
	伸長 68° C	30秒/500bp*3	最大
		(500bp以下は30秒)	
(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)*5			

*2: 十分な増幅効率が得られない場合は、アニーリング温度を低め(~50° C)に、非特異反応が生じる場合はアニーリング温度を高め(~68° C)に設定する、あるいは2ステップに変更することで、反応が改善されることがあります。

*3: 増幅曲線のがたつきや、ウェル間の変動が大きい場合には、長めの時間(45~60秒/500bp)を設定してください。

*4: クールドサンプルからの検出の場合、サイクル数(~50 cycles)を増やすことで、検出感度が改善されることがあります。

*5: GC含有率が80%を超えるようなターゲットでは、融解曲線が途中で切れてしまう場合があります。
この場合、融解温度の上限を99°Cに設定することで解決する場合があります。