

●KOD SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI StepOnePlus]

(1)反応液の調製

以下に、25 μ Lおよび20 μ L反応時の調製例を示します。

試薬	25 μ L反応	20 μ L反応	最終濃度
滅菌水	X μ L	X μ L	
KOD SYBR® qPCR Mix	12.5 μ L	10 μ L	1x
Forward Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 μ M*1
Reverse Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 μ M*1
50X ROX reference dye	0.5 μ L	0.4 μ L	1x
DNA溶液	Y μ L	Y μ L	
合計液量	25 μ L	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)*3 伸長	68° C	30秒/500bp*2 (500bp以下は30秒)	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)*4			

*2: 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)を設定してください。

*3: 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。

*4: 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。