

## ●KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixの使用条件 [Bio-Rad CFX Connect]

### (1)反応液の調製

以下に、25  $\mu$ Lおよび20  $\mu$ L反応時の調製例を示します。

試薬	25 $\mu$ L反応	20 $\mu$ L反応	最終濃度
滅菌水	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
KOD SYBR <sup>®</sup> qPCR Mix	12.5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1x
Forward Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
Reverse Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
DNA溶液	Y $\mu$ L	Y $\mu$ L	
合計液量	25 $\mu$ L	20 $\mu$ 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  $\mu$ 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	10秒	最大
(40 cycles) <sup>*4</sup>	アニーリング	10秒	最大
	伸長	30秒/500bp <sup>*3</sup>	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) <sup>*5</sup>			

\*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)を設定してください。

\*4: クロー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。