

●KOD SYBR® qPCR Mixの使用条件 [Stratagene(Agilent Technologies) Mx3005P]

(1)反応液の調製

以下に、50 μLおよび20 μL反応時の調製例を示します。

| 試薬 | 50μL反応 | 20μL反応 | 最終濃度 |
|-----------------------|---------|---------|----------|
| 滅菌水 | X μL | X μL | |
| KOD SYBR® qPCR Mix | 25 μL | 10 μL | 1x |
| Forward Primer | 10 pmol | 4 pmol | 0.2 μM*1 |
| Reverse Primer | 10 pmol | 4 pmol | 0.2 μM*1 |
| 50X ROX reference dye | 0.1 μL | 0.04 μL | 0.1x |
| DNA溶液 | Y μL | Y μL | |
| 合計液量 | 50 μL | 20 μL | |

*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 μM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 (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)*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。