

## ●KOD SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ Analytikjena TOptical 96 ]

### (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	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。

## TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部 (大阪)  
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号  
大阪梅田ツインタワーズ・サウス  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

バイオプロダクト営業部 (東京)  
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号  
住友商事京橋ビル  
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン  
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
開設時間 : 9:00~12:00 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)  
e-mail: tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL]https://lifescience.toyoobo.co.jp/