

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI 7500 Fast]

(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	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	25 µL	10 µL	1x
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 µM*1
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 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0.2~0.6 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	95° C	20秒	最大
PCR 変性	95° C	3秒	最大
(40 cycles) アニリング	60° C*2	5~15秒	最大
伸長	72° C	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)

*2:十分な増幅効率が得られない場合は温度を低めに、非特異的の反応が発生する場合(鑄型濃度が低いサンプルで、増幅曲線の形状がゆがむ場合)は温度を高めに設定することで、反応が改善されることがあります。56~64° Cの範囲を目安にご検討ください。