

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI QuantStudio™ 12K Flex]

(1)反応液の調製

以下に、50 µLおよび25 µL反応時の調製例を示します。

試薬	50µL反応	25µL反応	最終濃度
滅菌水	X µL	X µL	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	25 µL	12.5 µL	1x
Forward Primer	15 pmol	7.5 pmol	0.3 µM*1
Reverse Primer	15 pmol	7.5 pmol	0.3 µM*1
50X ROX reference dye	0.1 µL	0.05 µL	0.1x
DNA溶液	Y µL	Y µL	
合計液量	50 µL	25µL	

*1:プライマー・プローブの発売元から、添加濃度が指定されている場合は、発売元の指定条件に従ってください。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(低濃度の鋳型での反応で増幅曲線の立ち上がりが悪くなる場合)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	94° C	60秒	最大
PCR 変性	95° C	15秒	最大
(40 cycles) アニール	55~65° C*2	15秒	最大
伸長	72° C	60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:アニール温度の設定は、プライマーのTmと同じ温度からTm-5° Cの範囲に設定してください。非特異反応が多い場合は温度を上げることで改善される場合があります。