

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI QuantStudio™ 3 Flex] (Fast mode)

(1)反応液の調製

以下に、20 μ L反応時の調製例を示します。

| 試薬 | 20 μ L反応 | 最終濃度 |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| 滅菌水 | X μ L | |
| THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix | 10 μ L | 1x |
| Forward Primer | 6 pmol | 0.3 μ M*1 |
| Reverse Primer | 6 pmol | 0.3 μ M*1 |
| 50X ROX reference dye | 0.04 μ L | 0.1x |
| DNA溶液 | Y μ L | |
| 合計液量 | 20 μ L | |

*1:プライマーの発売元から、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 μ 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 | 94° C | 20秒 | 最大 | |
| PCR (40 cycles) | 変性 | 95° C | 1~3秒 | 最大 |
| | 伸長 | 60° C*2 | 20~30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(鋳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。