

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI QuantStudio™ 5] (Fast mode)

(1)反応液の調製

以下に、20 μL反応時の調製例を示します。

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

*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 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	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。