

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI ViiA7]

(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 (40 cycles) | 変性 | 95° C | 15秒 | 最大 |
| | 伸長 | 60° C*2 | 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) | | | | |

*2:十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。