

## ●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件[Bio-Rad CFX Connect](Fast mode)

### (1)反応液の調製

以下に、25  $\mu$ Lおよび20  $\mu$ L反応時の調製例を示します。

試薬	25 $\mu$ L反応	20 $\mu$ L反応	最終濃度
滅菌水	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	12.5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1x
Forward Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 $\mu$ M*1
Reverse Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 $\mu$ M*1
DNA溶液	Y $\mu$ L	Y $\mu$ L	
合計液量	25 $\mu$ L	20 $\mu$ L	

\*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  $\mu$ 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	30~60秒	最大
PCR 変性	95° C	5~10秒	最大
(30~40 cycles) アニリング	55~60° C*2	5~10秒	最大
伸長	72° C	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。55~64° Cの範囲を目安にご検討ください。