

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [Qiagen RotorGene]

(1)反応液の調製

以下に、25 µL反応時の調製例を示します。

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

*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 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	95° C	60秒	最大	
PCR (35~40 cycles)	変性	95° C	5~15秒	最大
	アニーリング	55~65° C*2	15秒	最大
	伸長	72° C	10~30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: アニーリング温度の設定は、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。