

# ●THUNDERBIRD® Probe qPCR Mixの使用条件 [ABI StepOnePlus™]

## (1)反応液の調製

以下に、25 µLおよび20 µL反応時の調製例を示します。

| 試薬                          | 25µL反応   | 20µL反応 | 最終濃度     |
|-----------------------------|----------|--------|----------|
| 滅菌水                         | X µL     | X µL   |          |
| THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix | 12.5 µL  | 10 µL  | 1x       |
| Forward Primer              | 7.5 pmol | 6 pmol | 0.3 µM*1 |
| Reverse Primer              | 7.5 pmol | 6 pmol | 0.3 µM*1 |
| TaqMan® Probe               | 5 pmol   | 4 pmol | 0.2 µM*1 |
| 50 × ROX reference dye      | 0.5µL    | 0.4 µL | 1x       |
| DNA溶液                       | Y µL     | Y µL   |          |
| 合計液量                        | 25µL     | 20 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 (40 cycles) | 変性 95° C<br>伸長 60° C*2 | 15秒<br>60秒 | 最大<br>最大 |

(Data Collectionは伸長ステップに設定します)

\*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。56~64° Cの範囲を目安にご検討ください。