

●THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixの使用条件 [Bio-Rad iCycler IQ]

(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® SYBR® 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
50X 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 伸長 60° C* ²	15秒 60秒	最大 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℃の範囲を目安にご検討ください。