

●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	94° C	60秒	最大
PCR (40 cycles)	変性 95° C	15秒	最大
	アニーリング* 60° C*2	15秒	最大
	伸長 72° C	45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(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)は温度を高めを設定することで、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。