

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

(1)反応液の調製

以下に、50 μLおよび20 μL反応時の調製例を示します。

| 試薬 | 50μL反応 | 20μL反応 | 最終濃度 |
|--------------------------------|---------|--------|----------|
| 滅菌水 | X μL | X μL | |
| THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix | 25 μL | 10 μL | 1x |
| Forward Primer | 15 pmol | 6 pmol | 0.3 μM*1 |
| Reverse Primer | 15 pmol | 6 pmol | 0.3 μM*1 |
| DNA溶液 | Y μL | Y μL | |
| 合計液量 | 50 μL | 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 変性 | 95° C | 15秒 | 最大 |
| (40 cycles) アニール | 55~65° C*2 | 15~30秒 | 最大 |
| 伸長 | 72° C | 60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: アニール温度の設定は、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。。