

●THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mixの使用条件 [Roche LightCycler 480 : 通常サイクル]

(1)反応液の調製

以下に TaqMan® Probe を用いた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® Next Probe 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 |
| TaqMan® Probe (Uracil-N-Glycosylase) | 10 pmol (0.4 unit) | 4 pmol | 0.2 µM*1 |
| DNA溶液 | Y µL | Y µL | |
| 合計液量 | 50 µL | 20 µL | |

*1:プライマー・プローブの発売元から、添加濃度が指定されている場合は、発売元の指定条件に従ってください。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(低濃度の鋳型での反応で増幅曲線の立ち上がりが悪くなる場合)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 |
|--------------------|------------------------|-----------|----------|
| (UNG反応) | (20~25° C) | (10分) | (最大) |
| 初期変性 | 95° C | 30秒 | 最大 |
| PCR (40 cycles) | 変性 95° C 伸長 60° C*2 | 5秒 30秒 | 最大 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、非特異的の反応が発生する場合(鋳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。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部 (大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

バイオプロダクト営業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号
住友商事京橋ビル

TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 : 9:00~12:00 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)

e-mail: tech_osaka@toyobo.jp

[URL]https://lifescience.toyobo.co.jp/

