

●THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mixの使用条件 [Stratagene(Agilent Technologies) Mx3005P: 高速サイクル]

(1)反応液の調製

以下に、25 μ Lおよび20 μ L反応時の調製例を示します。

| 試薬 | 25 μ L反応 | 20 μ L反応 | 最終濃度 |
|------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| 滅菌水 | X μ L | X μ L | |
| THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix*1 | 12.5 μ L | 10 μ L | 1x |
| Forward Primer | 7.5 pmol | 6 pmol | 0.3 μ M*2 |
| Reverse Primer | 7.5 pmol | 6 pmol | 0.3 μ M*2 |
| DNA溶液 | Y μ L | Y μ L | |
| 合計液量 | 25 μ L | 20 μ L | |

*1: マスターミックスに補正用色素を含んでいますので、ROXの添加は不要ですが、解析の際はPassive referenceとして「ROX」を選択したままにしてください。

*2: 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 μ M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*3 | 5秒 10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) | | | |

*3: 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°Cの範囲を目安にご検討ください。