

●THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mixの使用条件 [QuantStudio™ 12K Flex: 通常サイクル]

(1)反応液の調製

以下に、50 μ Lおよび20 μ L反応時の調製例を示します。

試薬	50 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	25 μ L	10 μ L	1x
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μ M*2
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μ M*2
DNA溶液	Y μ L	Y μ L	
合計液量	50 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 30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。