

## ●THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mixの使用条件 [ABI StepOnePlus™ :通常サイクル]

### (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® Next SYBR® qPCR Mix*1	12.5 μL	10 μL	1x
Forward Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 μM*2
Reverse Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 μM*2
DNA溶液	Y μL	Y μL	
合計液量	25 μL	20 μL	

\*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 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*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。