

●RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix の使用条件 [ABI StepOnePlus]

(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	
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	12.5 μ L	10 μ L	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1.25 μ L	1 μ L	2.5 mM
Forward Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 μ M* ¹
Reverse Primer	7.5 pmol	6 pmol	0.3 μ M* ¹
TaqMan® Probe	5 pmol	4 pmol	0.2 μ M* ¹
Total RNA sample	<1.25 μ g	<1 μ g	
	(mRNAは250 ng) (mRNAは200 ng)		
合計液量	25 μ L	20 μ L	

*1: 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)RT-PCR条件設定

ステップ	温度	時間	昇降速度
逆転写反作用変性	90° C	30秒	最大
逆転写反応	61° C	20分	最大
PCR初期変性	95° C	60秒	最大
PCR 変性	95° C	15秒	最大
(45 cycles) 伸長	60° C* ²	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: 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(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)は温度を高めを設定することで、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。