

## ● RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix の使用条件 [Roche LightCycler 480 II]

### (1) 反応液の調製

以下に、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	
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	25 μL	10μL	1x
50mM Mn(OAc) <sub>2</sub>	2.5μL	1μL	2.5 mM
Forward Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μM* <sup>1</sup>
Reverse Primer	15 pmol	6 pmol	0.3 μM* <sup>1</sup>
TaqMan® Probe	10 pmol	4 pmol	0.2 μM* <sup>1</sup>
Total RNA sample	<2.5 μg (mRNAは500 ng)	<1μg (mRNAは200 ng)	
合計液量	50 μL	20μL	

\*1: 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) RT-PCR条件設定

ステップ	温度	時間	昇降速度
逆転写反应用変性	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* <sup>2</sup>	60秒	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、非特異的反応が発生する場合(鑄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。