

●RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mixの 使用条件 [Stratagene(Agilent Technologies) Mx3005P]

(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	
RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	12.5 μL	10μL	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1.25μL	1μL	2.5 mM
Forward Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 μM*1
Reverse Primer	5 pmol	4 pmol	0.2 μM*1
Total RNA sample	<1.25 μg (mRNAは250 ng)	<1μg (mRNAは200 ng)	
合計液量	25 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) アニーリング	55~65° C*2	15秒	最大
伸長	74° C	45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:アニーリング温度の設定は、プライマーのTmと同じ温度からTm-5° Cの範囲に設定してください。
非特異反応が多い場合は温度を上げることで改善される場合があります。