

## ● RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix の 使用条件 [Qiagen Rotor Gene Q]

### (1) 反応液の調製

以下に、25 µL 反応時の調製例を示します。

試薬	25µL反応	最終濃度
滅菌水	X µL	
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	12.5 µL	1x
50mM Mn(OAc) <sub>2</sub>	1.25 µL	2.5 mM
Forward Primer	7.5 pmol	0.3 µM* <sup>1</sup>
Reverse Primer	7.5 pmol	0.3 µM* <sup>1</sup>
Total RNA sample	<1.25 µg (mRNAは250 ng)	<1µg
合計液量	25 µL	

\*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* <sup>2</sup>	30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: 十分な増幅効率を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。