

● THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitの使用条件  
[Bio-Rad CFX96]

(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	
2 × Reaction Buffer	12.5 μL	10 μL	1x
DNA Polymerase	0.625μL	0.5μL	
RT Enzyme Mix	0.625μL	0.5μL	
Forward Primer	12.5 pmol	10 pmol	0.5 μM <sup>*1</sup>
Reverse Primer	12.5 pmol	10 pmol	0.5 μM <sup>*1</sup>
TaqMan® Probe	5 pmol	4 pmol	0.2 μM <sup>*2</sup>
50 × ROX Reference dye	0.5μL	0.4μL	1x
(Uracil-N-Glycosylase[UNG])	0.5unit <sup>*3</sup>	0.4unit <sup>*3</sup>	
RNA sample	YμL <sup>*4</sup>	YμL <sup>*4</sup>	
合計液量	25 μL	20 μL	

\*1・2 検出感度が低い場合、TaqMan® probe濃度を0.2μMで固定し、プライマー濃度を、0.5~0.8μMを目安に上げてください。非特異反応が生じる場合、TaqMan® probe濃度を0.2μMで固定し、プライマー濃度を、0.2~0.5μMを目安に下げてください。

\*3 UNG処理を実施する場合は、熱感受性(heat-labile)UNGを使用してください。各社の推奨条件に従って、酵素量を調整することができます。

\*4 過剰量の添加は反応効率低下の原因となり、十分な直線性が得られない場合があります。Total RNAは反応液中に25ng/μl以下を目安に添加してください。

(2) RT-PCR条件設定

ステップ	温度	時間	昇降速度
(UNG反応)	(20~25° C <sup>*1</sup> )	(10分 <sup>*1</sup> )	(最大)
逆転写反応	50° C	10分	最大
PCR初期変性	95° C	1分	最大
PCR 変性	95° C	15秒	最大
(40~45 cycles) <sup>*2</sup> 伸長	60° C	45秒	最大

(Data Collectionは伸長ステップに設定します)

\*1 UNG処理を行う場合は、逆転写反応の前に、UNG反応のステップを設定してください。

上記の表に一般的な温度条件および反応時間を示しましたが、各社の推奨条件に従って調整してください。

\*2 サイクル数は40サイクルで実施し、増幅が不十分な場合は45サイクルまで上げてください。