

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

### (1) 反応液の調製

以下に 25  $\mu$ L および 20  $\mu$ L 反応時の調製例を示します。

試薬	25 $\mu$ L反応	20 $\mu$ L反応	最終濃度
滅菌水	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
2 $\times$ Reaction Buffer	12.5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1x
DNA Polymerase	0.625 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	
RT Enzyme Mix	0.625 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	
Forward Primer	12.5 pmol	10 pmol	0.5 $\mu$ M*1
Reverse Primer	12.5 pmol	10 pmol	0.5 $\mu$ M*1
TaqMan® Probe	5 pmol	4 pmol	0.2 $\mu$ M*2
50 $\times$ ROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase[UNG])	0.5 $\mu$ L 0.5unit*3	0.4 $\mu$ L 0.4unit*3	1x
RNA sample	Y $\mu$ L*4	Y $\mu$ L*4	
合計液量	25 $\mu$ L	20 $\mu$ L	

\*1・2 検出感度が低い場合、TaqMan® probe濃度を0.2 $\mu$ Mで固定し、プライマー濃度を、0.5~0.8 $\mu$ M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0.2 $\mu$ Mで固定し、プライマー濃度を、0.2~0.5 $\mu$ M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/ $\mu$ L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*1)	(10分*1)	(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)*2 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。