

● THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitの使用条件 [ABI StepOnePlus™]

(1) 反応液の調製

以下に 25 μ L および 20 μ L 反応時の調製例を示します。

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

*1・2 検出感度が低い場合、TaqMan® probe濃度を0.2 μ Mで固定し、プライマー濃度を、0.5~0.8 μ 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 μ Mで固定し、プライマー濃度を、0.2~0.5 μ 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/ μ 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。