

●RNA-direct® SYBR™ Green Realtime PCR Master Mix の 使用条件 [ABI 7300]

(1)反応液の調製

以下に、50 μ L および20 μ L 反応時の調製例を示します。

試薬	50 μ L 反応	20 μ L 反応	最終濃度
滅菌水	X μ L	X μ L	
RNA-direct® SYBR™ Green Realtime PCR Master Mix	25 μ L	10 μ L	1x
50mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ L	1 μ L	2.5 mM
Forward Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 μ M*1
Reverse Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 μ M*1
Total RNA sample	<2.5 μ g (mRNAは500 ng)	<1 μ g (mRNAは200 ng)	
合計液量	50 μ L	20 μ L	

*1: プライマー濃度は、最終濃度0.2~0.6 μ M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。

TOYOBO 東洋紡株式会社

遺伝子試薬・診断薬事業部 (大阪)

〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号

大阪梅田ツインタワーズ・サウス

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

遺伝子試薬・診断薬事業部 (東京)

〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号

京橋 One Terrace

TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 : 9:00~12:00 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)

e-mail: tech_osaka@toyobo.jp

[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>

