

●THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4 × Mix の 使用条件[ABI QuantStudio 12K Flex : 通常サイクル]

(1)反応液の調製

以下に 50μL および 20 μL 反応時の調製例を示します。

試薬	50 μL 反応	20 μL 反応	最終濃度
滅菌水	X μL	X μL	
THUNDERBIRD® Next Probe			
One-step qRT-PCR 4 × Mix	12.5 μL	5 μL	1 x
Forward Primer	25 pmol	10 pmol	0.5 μM ^{*1}
Reverse Primer	25 pmol	10 pmol	0.5 μM ^{*1}
TaqMan® Probe	10 pmol	4 pmol	0.2 μM ^{*2}
50 × ROX Reference dye	0.1 μL	0.04 μL	0.1 x
(Uracil-N-Glycosylase[UNG])	1 unit ^{*3}	0.4 unit ^{*3}	
RNA sample	Y μL ^{*4}	Y μL ^{*4}	
合計液量	50 μL	20 μL	

*1 0.5μM で良好な結果が得られない場合は、0.2μM から 0.5μM を目安にご検討ください。

*2 0.2μM で良好な結果が得られない場合は、0.2μM から 0.4μM を目安にご検討ください。

*3 Uracil-N-Glycosylase (UNG)処理を実施する場合、熱感受性(heat-labile) UNG を使用してください。
別売りのUracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile [Code No. UNG-101]をご使用になれます。

*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 ^{*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。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部 (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

バイオプロダクト営業部 (東京)

〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号

住友商事京橋ビル

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/

