

● THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4 × Mixの 使用条件 [ABI StepOnePlus : 高速サイクル]

(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 | 25 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 | 6.25 μL | 5 μL | 1x |
| Forward Primer | 12.5 pmol | 10 pmol | 0.5 μM ^{*1} |
| Reverse Primer | 12.5 pmol | 10 pmol | 0.5 μM ^{*1} |
| TaqMan® Probe | 5 pmol | 4 pmol | 0.2 μM ^{*2} |
| 50 × ROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase[UNG]) | 0.5 μL 0.5 unit ^{*3} | 0.4 μL 0.4 unit ^{*3} | 0.1x |
| RNA sample | Y μL ^{*4} | Y μL ^{*4} | |
| 合計液量 | 25 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 | 30秒 | 最大 |
| PCR 変性 | 95° C | 5秒 | 最大 |
| (40~45 cycles) ^{*2} 伸長 | 60° C | 10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/

