

Roche LightCycler™ 2.0 (ソフトウェアバージョン 4.0)

反応液調製とソフトウェア設定方法

反応液調製

反応液量は20 μlで実施してください。

※少ない液量で反応を行った場合、ラン開始直後のサンプルチェックにおいてエラーが発生する場合があります。

	20 μl反応	最終濃度
滅菌水	to 20 μl	
THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix	10 μl	1X
フォワードプライマー(10 μM, 10 pmol/μl)	0.6 μl	0.3 μM
リバースプライマー(10 μM, 10 pmol/μl)	0.6 μl	0.3 μM
DNAテンプレートサンプル	X μl	

※製品添付の50X ROX reference dyeは使用しません。

ソフトウェア設定

1. ソフトウェアを起動し、4種類のステージ(「Denature」「PCR」「Melting」「Cooling」)を設定し、各ステップごとに温度条件を入力します。最初の「Denature」ステップでは、Analysis Modelは「None」を選択し、温度および時間は以下のように入力してください。

※以下、特記以外の全てのステップでTemperature Transition Rate (°C/s)を20.00 (最高速)に設定してください。

Programs							
Program Name	Cycles	Analysis Mode					
Denature	1	None					
PCR	40	Quantification					
Melting	1	Melting Curves					
Cooling	1	None					

Denature Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:30	20	0	0	0	None

2. 続くPCRステップでは、Analysis Modelは「Quantification」を選択し、温度および時間を以下のように入力してください。伸長反応(60 °C)のAcquisition ModelはSINGLEに設定します。

◆PCRサイクル設定◆

PCR 変性 95 °C 5秒 40サイクル
 伸長 60 °C 30秒

※本サイクルは、プライマーのTm値が60°C以上の場合の推奨条件を示しています。プライマーのTm値が60°C未満の場合や上記サイクルで結果が思わしくない場合は、取扱説明書をご覧ください。

PCR Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:05	20	0	0	0	None
60	00:00:30	20	0	0	0	Single

3. (融解曲線解析を実施する場合)融解曲線ステップでは、Analysis Modelは「Melting Curves」を選択し、温度および時間は以下のように設定してください。最終段の95 °Cの位置では、Temperature Transition Rateを0.1に、Acquisition ModeをContinuousに設定します。

Melting Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
65	00:00:15	20	0	0	0	None
▶ 95	00:00:01	0.1	0	0	0	Continuous

4. 反応終了後にチャンバー内を冷却するため、冷却ステップを追加します。Analysis Modelは「None」を選択し、温度および時間は右図のように入力してください。

Cooling Temperature Targets						
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
▶ 40	00:00:30	20	0	0	0	None

5. カローセルにキャピラリーをセットし、プログラムをスタートします。