



Roche Applied Science

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)

簡易マニュアル

May, 2009

⚠ 製品に添付される最新バージョンのマニュアル（英語版）を必ずご確認ください。本マニュアルと製品に添付されるマニュアル（英語）の内容に相違のある場合、製品に添付されるマニュアル（英語）の内容が優先されます。

製品番号：4 913 922 (04 913 922 001) 非売品 (1.25 ml ; 30 反応分/50 µl 反応)
製品番号：4 913 850 (04 913 850 001) 5 ml (4 x 1.25 ml ; 200 反応分/50 µl 反応)
製品番号：4 913 914 (04 913 914 001) 50 ml (10 x 5 ml ; 2000 反応分/50 µl 反応)

保存温度：-15 ~ -25

⚠ 避光して保存してください。凍結融解を繰り返さないでください。

1. 製品について

この製品は、特殊な ROX リファレンス色素を含んだ 2x 濃度のリアルタイム PCR 用マスターミックスです。プライマー、テンプレート以外の必要な試薬が含まれています。ROX リファレンス色素による補正を必要とするあらゆるリアルタイム PCR 機器に対応しています。

2. 反応溶液の調製

反応溶液の調製の一例を示します。実験に合わせてプライマー、プローブの濃度や量を調整してください。

| コンポーネント | 液量 | 最終濃度 |
|---|---------|--|
| FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) [2x 濃度] | 25.0 µl | 1x 濃度 |
| Forward プライマー (30µM) | 0.5µl | Final 300 nM の場合 |
| Reverse プライマー (30µM) | 0.5µl | Final 300 nM の場合 |
| H ₂ O, PCR グレード | 19.0µl | 最終液量調整 |
| テンプレート (DNA や cDNA) | 5.0µl | ・ゲノム DNA : < 250 ng ・cDNA : < 50 ng RNA |
| Total 液量 | 50.0µl | |

⚠ プライマーやテンプレートの希釈は、PCR グレードの H₂O または Tris-HCl (5-10mM, pH 7.5-8.0) でおこなってください (TE の使用は溶液中の Mg²⁺ 濃度が変化してしまいますのでできるだけ避けてください)。

⚠ cDNA は適宜希釈したものの使用してください。cDNA 量が反応液量の 10% を超えると、PCR を阻害することがあります。まずは、10 倍、100 倍などと段階希釈したもので阻害がないかを確認することを推奨いたします (阻害がかかっている場合は、増幅が 1 本が等間隔で得られません)。

3. 反応プロトコル

反応温度プロトコルの一例を示します。装置や系に合わせて適宜変更してください。温度プロトコルには、温度変化が 2 段階(2step)のもの、3 段階(3step)のものがありますが、デザインにあわせてどちらでも良好な結果が得られます。アンプリコンは 150 bp 以下でアニーリング温度を 60 に設定できるようなデザインが理想的です。参考：ABI 7500 Fast や ABI 7900HT の FastPlate を用いて反応をおこなう場合は、カラム内の数字を参考にしてください。

| サイクル数 | 解析モード | ターゲット温度 | 保持時間 | 備考 |
|----------|----------------|---------|-----------------|--------------------|
| 1(オプション) | None | 50 | 2 min | UNG 処理をおこなう場合のみ |
| 1(必須) | None | 95 | 10 min | Taq DNA ポリメラーゼの活性化 |
| 40 | None | 95 | 15 sec (10 sec) | 増幅反応 |
| | Quantification | 60 * | 1 min (30 sec) | |

*3step で行う場合、Annealing 温度を適宜変更して、伸長反応 (72 [増幅サイクル/25base] sec) を加えてください。

4. よくある質問

Q1. 増幅されません。
 A1-1. サンプルが cDNA の場合、cDNA 原液が反応液量の 10% を超えて持ち込まず、PCR を阻害することがあります。まずは、10 倍、100 倍... などと段階希釈したもので阻害がかわらないかを確認し (阻害がかかっている場合は、増幅が 1 本が等間隔で得られません) 適切なサンプル濃度をご確認ください。

A1-2. サンプルがゲノム DNA の場合、1 反応あたり 250 ng を超えないようにしてください。サンプルが過剰量の場合、反応効率が落ちたり阻害されることがあります。

A1-3. 温度プロトコルをご確認ください。特に酵素活性化に必要な Pre-Incubation 時間 (95 10min) が設定されているかどうかをご確認ください。また、増幅反応の時間が短すぎないか、アニーリング・増幅の温度が適切にご確認ください。

2step 法に適さないデザインの場合、3step 法(95 -15sec, アニーリング 温度*-10sec, 72 -[Amplicon の bp/25]sec-蛍光取得)で増幅すると良い場合があります。
 *アニーリング 温度は、[プライマー Tm 値-5]程度で検討を始めることを推奨いたします。

*弊社製リアルタイム PCR 装置『LightCycler』には専用試薬をご用意しております。

詳しくは、弊社ウェブサイトをご覧ください。 <http://www.roche-biochem.jp>

5. オーダー情報・関連製品

| 製品名 | 包装単位 | 製品番号 |
|--|------------------------|-----------|
| FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) | 4 x 1.25 ml (200 反応分) | 4 913 850 |
| | 10 x 5 ml (2000 反応分) | 4 913 914 |
| FastStart SYBR Green Master *ROX 不含 | 4 x 1.25 ml (200 反応分) | 4 673 484 |
| | 10 x 5 ml (2000 反応分) | 4 673 492 |
| FastStart Universal Probe Master (ROX) | 2 x 1.25 ml (100 反応分) | 4 913 949 |
| | 10 x 1.25 ml (500 反応分) | 4 913 957 |
| FastStart Universal Probe Master (ROX) | 10 x 5 ml (2000 反応分) | 4 914 058 |
| | 1 x 50 ml (2000 反応分) | 4 914 066 |
| FastStart TaqMan Probe Master *ROX 不含 | 2 x 1.25 ml (100 反応分) | 4 673 409 |
| | 10 x 1.25 ml (500 反応分) | 4 673 417 |
| FastStart TaqMan Probe Master *ROX 不含 | 10 x 5 ml (2000 反応分) | 4 673 433 |
| | 50 反応分 | 4 379 012 |
| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit | 100 反応分 | 4 896 866 |
| | 200 反応分 | 4 897 030 |
| LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase | 100 U | 3 539 806 |
| High Pure PCR Template Preparation Kit | 100 回分 | 1 796 828 |
| Water, PCR-grade | 25 ml (25x1ml) | 3 315 932 |
| | 25 ml (1x25ml) | 3 315 959 |
| | 100 ml (4x25ml) | 3 315 843 |

TAQMAN, FASTSTART, LIGHTCYCLER, MAGNA PURE and HIGH PURE are trademarks of Roche. PROBELIBRARY is a registered trademark of Exqon A/S, Vedbaek, Denmark. SYBR is a trademark of Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA. SYBR Green I is manufactured by Molecular Probes, Inc., and is provided under license from Molecular Probes, Inc., for direct research use for PCR, where the dye is present during the PCR. Other brands or product names are trademarks of their respective holders.

お問い合わせやご質問は・・・
ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
 AS 事業部(研究用機器・試薬)
 Tel : 03-5443-5287 / Fax : 03-5443-7098
 Mail : tokyo.biochemicals@roche.com

より詳しい情報は・・・
<http://www.roche-biochem.jp>