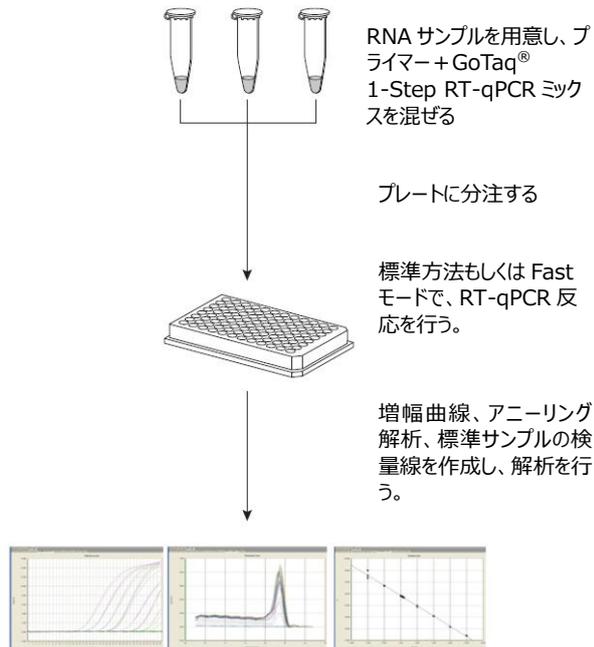


**プロトコル概要**



**プロトコル**

1. リアルタイム機器のプログラム、フィルターを設定します。

**プログラムの設定 (標準法と Fast 法)**

ステージ	サイクル数	標準または Fast モード
1.逆転写	1	≥37°C、15 分
2.RT 不活性化/ホットスタート活性化	1	95°C、10 分
3.3-ステップ qPCR		
a.変性		95°C、10 秒
b.アニーリング/データ収集	40	60°C、30 秒
c.伸長		72°C、30 秒
4.解離	1	60-95°C

**機器のフィルター設定**

検出フィルター:	FAM™, SYBR® (BRYT®)
リファレンス波長:	ROX™ (CXR)

- GoTaq® 1-Step RT-qPCR Systemの構成物を溶解し、RNAと、プライマーを用意します。それぞれ溶解した後、軽くボルテックスを行い、混ぜておきます。
- 準備:
  - RNAサンプル (Total RNA, mRNA, viral RNAなど [500fg-100ng]) を水もしくは、qPCRに影響を与えない希釈液で溶解します。
  - コントロール、定量スタンダードを用意します。

- プライマー濃度: 1 Xの濃度はおよそ50-300nMで反応します。
- 表にしたがって、構成物を氷上の滅菌済みチューブで用意して、プレートに分注します。プレートに分注後、低速で1分間遠心します。
  - プレートを機器にセットして、スタートします。
  - 反応終了後に解析を行います。

**GoTaq® 1-Step RT-qPCR 反応の調製**

構成成分	容量 (20µlあたり)	容量 (50µlあたり)	終濃度
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10µl	25µl	1X
Forward Primer, 10X	2µl	5µl	50-300nM
Reverse Primer, 10X	2µl	5µl	50-300nM
GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 50X Nuclease-Free Water for Minus-RT Control	0.4µl	1.0µl	1X
RNA Template (500fg-100ng) Nuclease-Free Water for No-Template Control	4µl	10µl	variable
オプション: MgCl <sub>2</sub> , 25mM*	___µl	___µl	≥2mM
オプション: CXR Reference Dye, 30µM**	___µl	___µl	≥33nM
Nuclease-Free Water	to 20µl	to 50µl	—

注1: CXRの添加が必要な機器を利用する場合、100×CXR reference dye をあらかじめ2×GoTaq® qPCR Master Mixに1mlに対して100×CXR reference dye 20µl を先に加えてください。その後、1 サンプルあたり25.5µl 分注するなどの方法で行ってください。  
注2: MgCl<sub>2</sub>を追加しない場合の最終濃度は2mMです。

**CXR リファレンスダイの添加が不要な機種**

Applied Biosystems 7500 & 7500 Fast Real Time PCR Systems  
Stratagene Mx3000P® and Mx3005P® Quantitative PCR Systems  
Roche LightCycler® 480  
Roche LightCycler 1.5 and 2.0 systems  
BioRad Chromo4™ Real-Time Detector  
BioRad CFX Real-Time PCR Detection Systems  
BioRad iCycler iQ5™ and MyCycler™  
Eppendorf Mastercycler® ep realplex4 and realplex4 S  
Qiagen Rotor-Gene™ Q, 3000, and 6000

**CXR リファレンスダイの添加が必要な機種 (終濃度 1X)**

Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System  
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System  
Applied Biosystems 7700 Sequence Detection System  
Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System  
Applied Biosystems StepOne® and StepOne®Plus Real-Time PCR Systems

