

タイトル: 逆転写反応時間の影響(2)

カテゴリ: リアルタイムPCR (定量PCR、qPCR)

キーワード: 逆転写、cDNA

データソース: タカラバイオ株式会社

方法:Total RNAを鋳型としPrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) ([製品コード RR036](#))を用いて、逆転写反応の時間とcDNA合成量を確認した。

●逆転写反応 (20 µl反応系)

鋳型 : Human Placental total RNA 2 pg ~ 2 µgおよび滅菌水

反応条件 : 37 °C 15、30、60分 → 85 °C 5秒 → 4 °C

●リアルタイムPCR (25 µl反応系)

試薬 : SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)

鋳型 : 上記の逆転写反応液 各2 µl

測定遺伝子 : ACTB

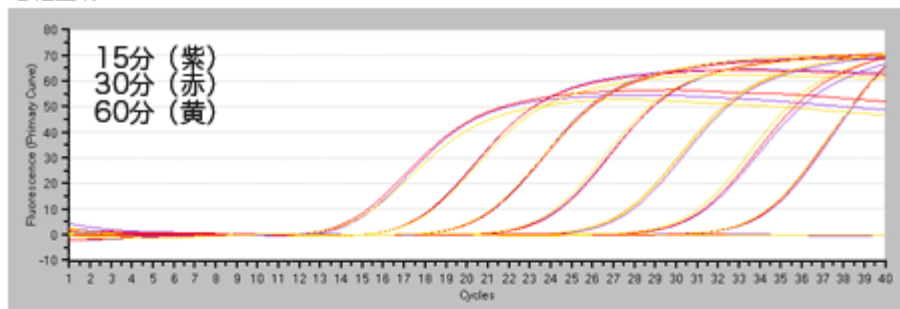
プライマー : Perfect Real Time サポートシステム設計プライマーを使用

反応条件 : Thermal Cycler Dice® Real Time System標準プロトコール

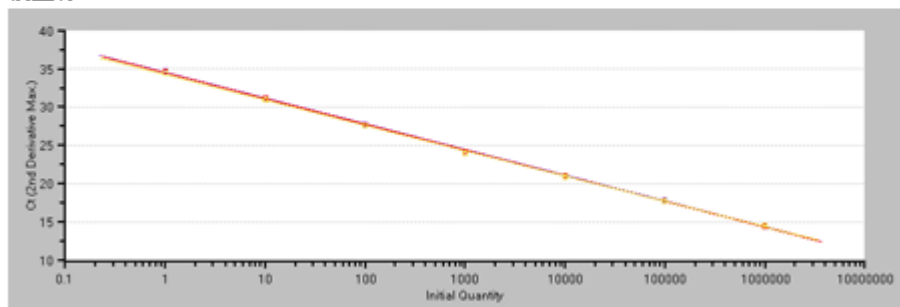
結果:

反応時間15分、30分、60分のいずれでも、広い鋳型濃度範囲にわたって同等な効率で反応できた。

増幅曲線



検量線

15分(紫) Rsq: 0.999 Eff= 99.0% $Y = -3.346 \cdot \text{LOG}(X) + 34.52$ 30分(赤) Rsq: 1.000 Eff= 98.9% $Y = -3.349 \cdot \text{LOG}(X) + 34.46$ 60分(黄) Rsq: 0.999 Eff= 100.9% $Y = -3.301 \cdot \text{LOG}(X) + 34.24$

備考: EASY Dilution (for Real Time PCR) ([製品コード 9160](#)) SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) ([製品コード RR820](#))、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) ([製品コード RR420](#))、SYBR® Premix DimerEraser® (Perfect Real Time) ([製品コード RR091](#))、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) ([製品コード RR037](#))、PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) ([製品コード RR047](#))