

酵素濃度変更



目的 酵素濃度による反応の影響を見る

反応組成

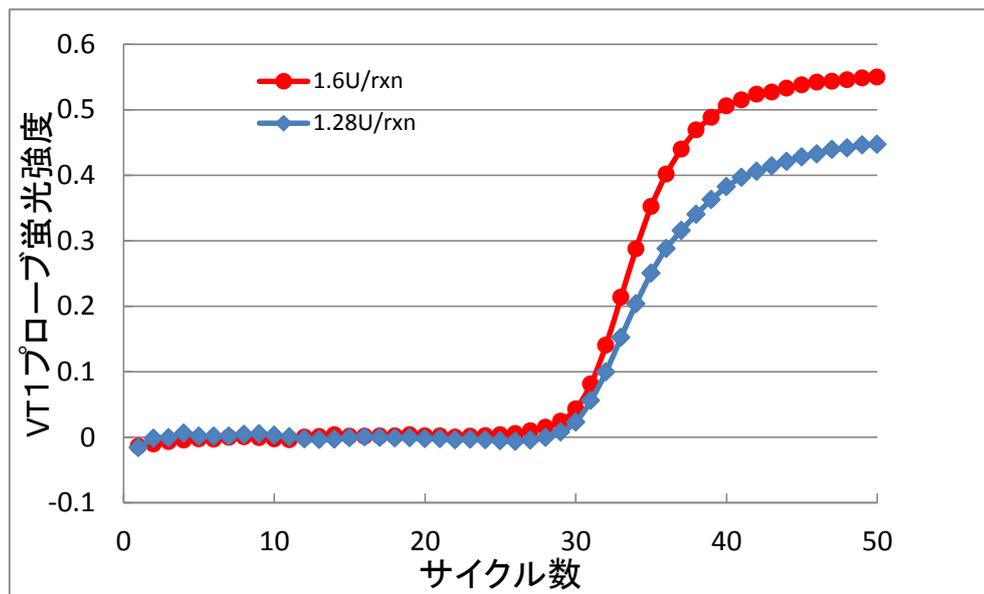
コンポーネント	最終濃度	単位	備考
KAPA 3G Plant polymerase	1.6 or 1.28	U/rxn	KAPA 3G plant
Buffer (×2)	2倍希釈		KAPA 3G plant
F-Primer (VT1、VT2)	各 720	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
R-Primer (VT1、VT2)	各 720	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Probe (VT1、VT2)	各 240	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
追加Mg ²⁺	1.25	mM	KAPA 3G plant
Template (cDNA)	2 × 10 ⁴	copies/rxn	
PCR grade water	α		

反応試料Total 16 μL

プログラム

工程	温度	時間	
初回変性	97°C	15sec	
アニーリング・伸長	63°C	15sec	50cycle
変性	97°C	3.5sec	

結果



測定はVT1,VT2のマルチプレックスで実施

※1

VT1-F: 5'-GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'
 VT1-R: 5'-CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'
 VT1-P: 5'-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-3'
 VT2-F: 5'-GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA-3'
 VT2-R: 5'-GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA-3'
 VT2-P: 5'-ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT-3'

Tm値

64.7
 64.0
 73.9
 66.4
 65.0
 73.3

Tm値計算は最近接塩基法による。

プライマー・プローブ濃度変更

目的 プライマー・プローブ濃度による反応の影響を見る

反応組成

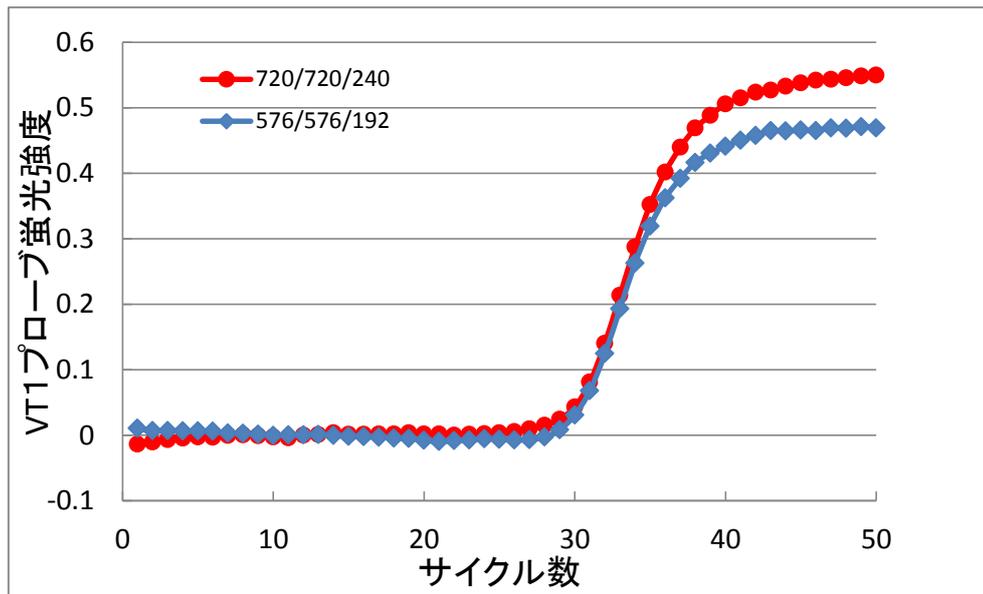
コンポーネント	最終濃度	単位	備考
KAPA 3G Plant polymerase	1.6	U/rxn	KAPA 3G plant
Buffer (×2)	2倍希釈		KAPA 3G plant
F-Primer (VT1、VT2)	各720 or 576	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
R-Primer (VT1、VT2)	各720 or 576	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Probe (VT1、VT2)	各240 or 192	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
追加Mg ²⁺	1.25	mM	KAPA 3G plant
Template (cDNA)	2 × 10 ⁴	copies/rxn	
PCR grade water	α		

反応試料Total 16 μL

プログラム

工程	温度	時間	
初回変性	97°C	15sec	
アニーリング・伸長	63°C	15sec	50cycle
変性	97°C	3.5sec	

結果



測定はVT1,VT2のマルチプレックスで実施

※1

VT1-F: 5'-GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'
 VT1-R: 5'-CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'
 VT1-P: 5'-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-3'
 VT2-F: 5'-GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA-3'
 VT2-R: 5'-GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA-3'
 VT2-P: 5'-ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT-3'

Tm値

64.7
 64.0
 73.9
 66.4
 65.0
 73.3

Tm値計算は最近接塩基法による。

鋳型濃度変更



目的 鋳型濃度を変更し感度を確認する

反応組成

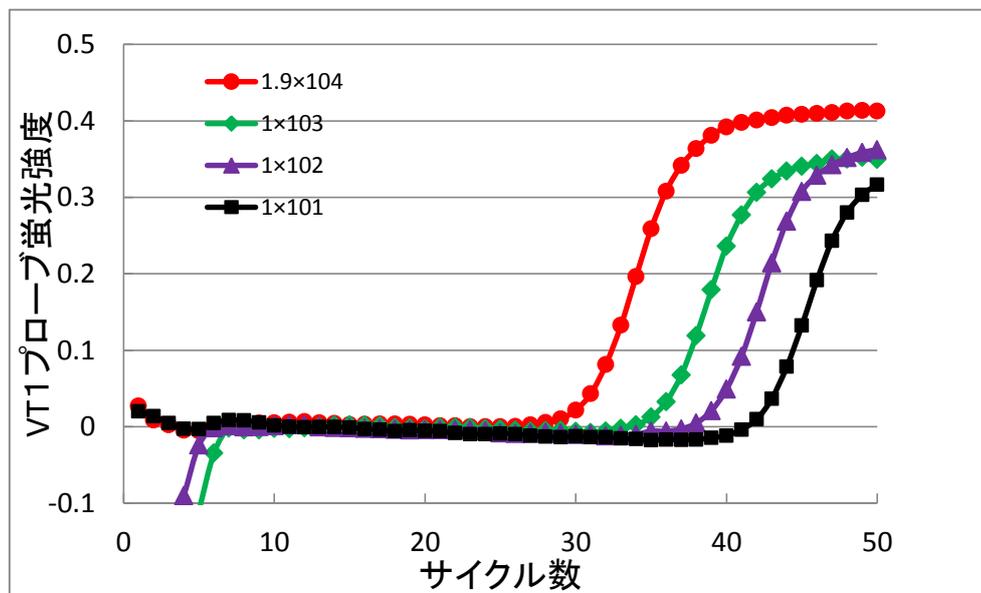
コンポーネント	最終濃度	単位	備考
KAPA 3G Plant polymerase	1.6	U/rxn	KAPA 3G plant
Buffer (×2)	2倍希釈		KAPA 3G plant
F-Primer (VT1)	7206	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
R-Primer (VT1)	720	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Probe (VT1)	240	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
追加Mg ²⁺	1.25	mM	KAPA 3G plant
Template (cDNA)	2 × 10 ⁴ 1 × 10 ³ 1 × 10 ² 1 × 10 ¹	copies/rxn	
PCR grade water	α		

反応試料Total 16 μL

プログラム

工程	温度	時間	
初回変性	97°C	15sec	
アニーリング・伸長	63°C	15sec	50cycle
変性	97°C	3.5sec	

結果



※1

VT1-F: 5'-GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'

VT1-R: 5'-CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'

VT1-P: 5'-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-3'

Tm値計算は最近接塩基法による。

Tm値

64.7

64.0

73.9

酵素比較



目的 KAPAとSpeedSTARを比較する

KAPA反応組成

コンポーネント	最終濃度	単位	備考
KAPA 3G Plant polymerase	1.6	U/rxn	KAPA 3G plant
Buffer (×2)	2倍希釈		KAPA 3G plant
F-Primer (VT1)	720 or 576	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
R-Primer (VT1)	720 or 576	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Probe (VT1)	240 or 192	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
追加Mg ²⁺	1.25	mM	KAPA 3G plant
Template (cDNA)	2 × 10 ⁴	copies/rxn	
PCR grade water	α		

反応試料Total 16 μL

SpeedSTAR反応組成

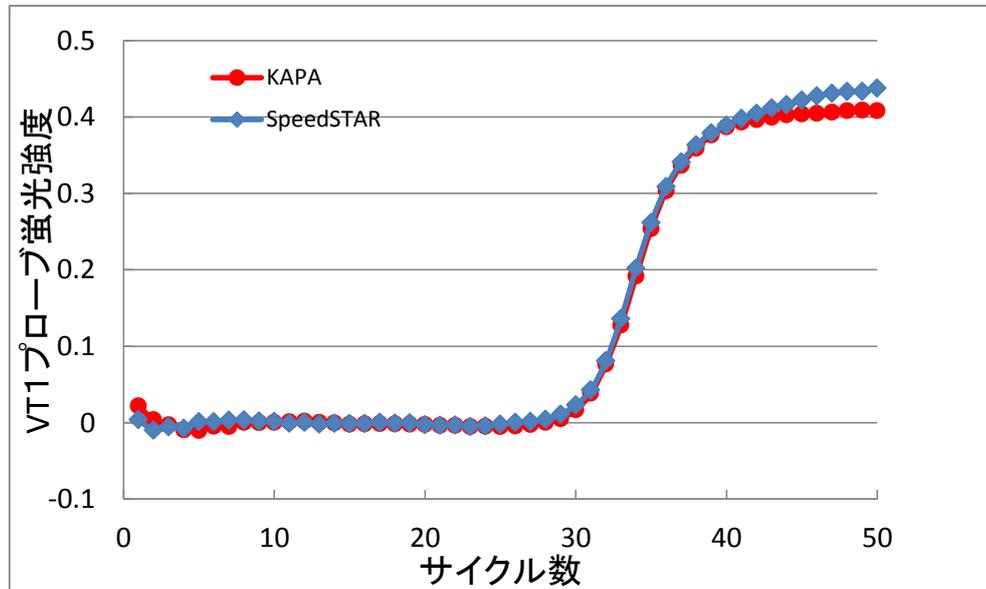
コンポーネント	最終濃度	単位	備考
Speed STAR HS DNA Polyr	1.6	U/rxn	タカラバイオ
Buffer (×10)	10倍希釈		タカラバイオ
dNTP	0.2	nM	タカラバイオ
F-Primer (VT1)	720	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
R-Primer (VT1)	720	nM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Probe (VT1)	240	mM	(株)日本遺伝子研究所 ※1
Template (cDNA)	2 × 10 ⁴	copies/rxn	
PCR grade water	α		

反応試料Total 16 μL

プログラム

工程	温度	時間	
初回変性	97°C	15sec	
アニーリング・伸長	63°C	15sec	50cycle
変性	97°C	3.5sec	

結果



※1

VT1-F: 5'-GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'

VT1-R: 5'-CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'

VT1-P: 5'-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-3'

Tm値計算は最近接塩基法による。

Tm値

64.7

64.0

73.9