

## 【ReverTra Ace® qPCR RT Kit トラブルシューティング】

### 1. リアルタイム PCR でシグナルが出ない、あるいは遅れて検出される

原因	対策
RNA の純度が低い	RNA 調製時に残留した不純物によって逆転写反応が阻害されている可能性があります。鋳型 RNA を再精製してください。
RNA が分解している	RNase の混入によって RNA が分解している可能性があります。RNA の再調製を行ってください。また RNA を低濃度で保存した場合、RNase による分解をより受けやすくなるほか、反応容器への吸着によって実質的な RNA 量が減少する場合があります。希釈した RNA は、使用後に凍結保存して再使用することは避け、毎使用時に高濃度保存液から調製することをおすすめします。
RNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、0.5pg から 1µg までの RNA を用いた場合で安定的な効率で逆転写が可能であることを確認していますが、RNA の種類や品質によっては、反応可能な RNA 量は変動する可能性があります。鋳型 RNA の添加量を増減させてください。
反応温度が不適切	反応条件の変更は、プライマーのアニーリング効率、酵素活性、逆転写反応後の酵素失活、鋳型 RNA の除去効率など広範囲に影響します。反応温度は必ず本説明書に記載の条件に従って実施してください。
逆転写反応液の添加量が多すぎる	本製品では、逆転写反応液を PCR 反応液へ最大 20% 添加しても直線性には問題がないことを確認していますが、使用する PCR 試薬の性質によっては、この値は低下する可能性があります。逆転写反応液の添加量を減らしてください。

### 2. リアルタイム PCR で非特異的シグナルが検出される

原因	対策
プライマーの非特異的アニーリングが発生している (遺伝子特異的プライマー使用時)	遺伝子特異的プライマーを使用した逆転写では、プライマーの非特異的アニーリングが PCR における非特異的シグナルの発生要因となる場合があります。アニーリングの特異性を向上させるためには、逆転写反応温度を上げることが効果的な場合があります。42°C から 50°C の範囲を目安として反応温度を設定してください。