【ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix シリーズ トラブルシューティング】

現象	原因	対策
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	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、およそ 0.5pg から 0.5μg までの RNA(10μl反応系)を用いた場合に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。
	RNA が立体構造を取り易い	高次構造を取り易い RNA の場合、逆転写が阻害される場合があります。逆転写反応を行う前に、RNA を 65℃で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷してから使用してください。また(あるいは)、37℃, 15 分間の逆転写反応の後に、50℃, 5 分間の反応を追加してください。
	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	添加量が多すぎる場合、PCR 反応が阻害される可能性があります。逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、PCR 反応液の液量の 10%以下にしてください。
リアルタイムPCR でno-RT Control を用いた反応液に増幅が見られる	RNAに過剰のゲノムDNAが混入している	本製品では、およそ 50ng までのゲノムDNAの除去が可能であることを確認しています(10μl 反応系)が、鋳型RNAに過剰のゲノムDNAが混入している場合には、完全には除去できない可能性があります。別途、DNase I 処理を行い、鋳型RNAの再精製を行ってください。
	プライマーダイマーの発生	融解曲線分析において、no-template control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列のほか、プライマーの品質不良によっても発生する可能性があります。まず PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。

TOYOBO

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/