

【Marker Gene Detection Kit トラブルシューティング】

現象	原因	対策
ポジティブコントロールの増幅が見られない。増幅が弱い。	PCR がうまく進んでいない。	PCR 反応液の調製をもう一度お試しください。 PCR 反応液を調製後は放置せず、直ちに検体の添加を実施してください。 また、推奨の PCR サイクル条件で行われているかご確認ください。
	反応液量が少ない。	推奨液量 (50 μ L) よりも少ない液量で反応を行うと、マルチプレックス PCR の効率が低下したり、ターゲット間で増幅に偏りが生じたりすることがあります。正しい結果を得るため、推奨液量で反応を行ってください。
内部標準の増幅が見られない。増幅が弱い。	サンプルが適切でない。	サンプル量を増やして実施し、改善されない場合は再度サンプルを調製してください。また、精製 DNA を用いて確認することをお勧めします。
	テンプレート量が極端に多い。	アルカリ溶解で調整したライセートを更に 5~10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。 精製ゲノムをご使用の場合は 10~30 ng/ μ L 程度に希釈してご使用ください。
	テンプレート量が少ない。	テンプレート量を増やす方向で検討してください。
	アルカリ溶解する際の加熱処理が十分でない。	ヒートブロックの温度、加熱時間をご確認ください。
	アニーリング温度が高い。	アニーリング温度が 65°Cであることをご確認ください。
検出対象マーカ―遺伝子の増幅が見られるが、ポジティブコントロールや内部標準に比べてバンドがうすい。	検出対象配列と配列が異なる部分がある。	説明書 表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象遺伝子の配列をご確認ください。 部分配列の挿入やコドンユースージが変更されている場合は検出できない場合があります。
	非特異増幅が発生している。	推奨とは異なるサイクル条件を用いたり、テンプレート量が多い場合、紛らわしい領域にエキストラバンドが生じた可能性があります。 ^{*1} 推奨された条件を用いているかご確認ください。
ネガティブコントロールに増幅が見られる。	キャリアオーバー汚染が発生している。	キャリアオーバー汚染が発生している可能性があります。汚染源を特定し、汚染されていない試薬をご使用ください。また、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
エキストラバンドが見られる。	テンプレート量が極端に多い。	テンプレート量を減らす、またはサイクル数を 30~35 サイクルの間で検討してください。
	アニーリング温度が低い。	アニーリング温度が 65°Cであることをご確認ください。

現象	原因	対策
100 bp 以下にバンドが見える。	プライマーダイマーの発生している。	プライマーダイマーが発生したと考えられますが判定には問題ありません。推奨条件で実験を行っているかご確認ください。
予測されるマーカー遺伝子が検出されない。	検出対象配列でない。	説明書 表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象遺伝子の配列をご確認ください。 部分配列の挿入やコドンユースが変更されている場合は検出できない場合があります。
	バリエーションの可能性が ある。	説明書 表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象バリエーションをご確認ください。
バンドが重なり判別しにくい。	電気泳動の条件が悪い。	アガロースゲルの濃度を最適化するか、バンドの判別がしやすい標準プロトコールをお試しください。
	電気泳動へのアプライ量が多い。	PCR 反応液 2~3 μ Lを用いて電気泳動解析することをお勧めします。多くアプライするとバンドが重なり判別しにくくなる場合があります。

*1 推奨量のテンプレートを用いて説明書 表2 (p2) の対象配列を増幅した際、サンプルとポジティブコントロールの増幅量が同程度になるようにControl templateのコピー数が調整されています。よって、ターゲット領域付近に微弱な増幅が認められるような場合は、非特異増幅である可能性が考えられます。そのような場合、内部標準(IC)の増幅強度なども考慮に入れて、総合的に判定してください。

全体的に増幅量が多い場合、微弱な非特異増幅が生じることがあります。その場合、サイクル数を30~35の間で調整することで非特異増幅を抑えることが可能です。