

【GenNext® NGS Library Quantification Kitトラブルシューティング】

現象	原因	対策
次世代シーケンサーでのクラスター密度が低い、もしくは高い	検量線の作成方法に問題がある	・明らかに異常値と考えられるような Ct 値は外して計算を行ってください。 ・適切な Threshold を設定してください。
	反応液の調製方法に問題がある	反応液調製時および Standard DNA 添加時にピペティングを十分行ってください。
	ライブラリーの希釈が不適切	Standard DNA1~6 の範囲内(20~0.0002pM)に入るようにライブラリーを希釈してください。 Standard DNA1~6 の範囲から外れた Ct 値を定量値の算出に利用した場合、定量値の正確性が担保されません。
	非特異増幅が生じている	説明書 p.8 [6] データ解析 (2) 融解曲線解析を参照してください。
	アダプターダイマーが含まれている	説明書 p.8 [6] データ解析 (2) 融解曲線解析を参照してください。アダプターダイマーがある場合、定量値のずれが生じ、定量値の正確性が担保されません。
Standard DNA のみ増幅され、ライブラリーの増幅がみられない	本製品がライブラリーに適さない	本製品は illumina® P5、P7 アダプター配列を含むライブラリーのみ定量することができます。 illumina®以外の次世代シーケンサー用に調製されたライブラリーは定量することができません。

現象	原因	対策
増幅曲線の蛍光シグナルが弱い、または増幅曲線の形状が滑らかでない	ROX reference dye の量が過剰	パッシブリファレンスを使用する機器において、ROX reference dye の量が過剰である場合、蛍光量補正時に SYBR® Green I の蛍光値が低く見積もられることがあります。説明書 p.6 [5] 使用方法 (1) 反応液の調製に従い、50×ROX reference dye の添加量を確認してください。
	蛍光測定時間が短い	一部の機器では、PCR の伸長時間が短すぎる場合、蛍光測定が不十分になる場合があります。増幅曲線のがたつきが目立つ場合には、伸長時間を長め(45~60 秒)に設定することで、改善される場合があります。
	反応液量が少ない	機器の推奨反応液量以下の液量で反応を行った場合、蛍光測定値の誤差が増大する傾向があります。液量を増やして反応を行ってください。