

## 【RT-PCR Quick Master Mix トラブルシューティング】

## 1. 電気泳動で目的のバンドが検出できない。

原因	対策
鋳型 RNA の純度が悪い、または分解している	鋳型 RNA を再調製してください。
鋳型 RNA の量が少ない	鋳型 RNA の添加量を増やしてください。
プライマーの Tm 値と PCR 条件とが合っていない	アニーリング温度を変更します。一般的に Tm 値より 5°C 低い温度が適切とされていますが、Tm 値は計算方法や PCR のバッファー組成によって変わることがありますので、アニーリング温度の条件を十分検討することをお勧めします。
プライマー濃度が低い	0.2~0.6 $\mu$ M の範囲を目安としてプライマー濃度を検討してください。また、Reverse Primer のみ濃度を 1 $\mu$ M 程度まで上げることにより、逆転写効率が改善される場合があります。
Mn(OAc) <sub>2</sub> 濃度が低い	通常は 2.5mM を反応系に添加しますが、濃度を上げることにより PCR 効率が上がる場合があります。

## 2. 非特異反応が多い

原因	対策
プライマーの濃度が高い	プライマーの濃度を 0.2 $\mu$ M まで、場合によってはそれ以下に下げてください。
プライマーの特異性が低い	プライマーを再設計してください。プライマーの GC 含量は 40~60% が適切です。プライマー内に相補的な配列がないこと、2つのプライマーの 3'末端同士が相補的な配列でないことを確認してください。
Mn(OAc) <sub>2</sub> 濃度が高い	通常は 2.5mM を反応系に添加しますが、濃度を下げることにより非特異反応が減少することがあります。

## 3. ブランクサンプルでバンドが検出される

原因	対策
陽性サンプルや PCR 産物のコンタミネーション	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を更新してください。それでも発生する場合は、使用する蒸留水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。