

【ReverTra Dash® トラブルシューティング】

1. 増幅バンドが確認できない、または、増幅効率が悪い。

原因		対策
鋳型RNA	<ul style="list-style-type: none"> ・純度が悪い ・鋳型量が少ない ・劣化している ・高次構造を有する 	<ul style="list-style-type: none"> ・再調製する ・PCRのサイクル数を増やす ・鋳型量を増やす ・再調製する。 ・使用頻度が高い場合は、あらかじめ少量ずつ分注しておく ・RTにRandom Primerを使用する ・酵素以外を入れたRT反応液を65°Cで5分間、氷上で5分間置いた後、RTを行う
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・T_m値が低い ・配列が適切でない ・プライマー量が少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を下げる、またはプライマーを再設計する ・poly (A) tail を持たないRNAをRTのテンプレートとする場合、Oligo(dT)20は使用できない ・配列が正しいことを確認する ・プライマー内、あるいはプライマー間に相補的な領域がないことを確認する ・PCRのプライマー2つが同一鎖にアニールしないことを確認する ・1反応当り、10 pmol 以上使用する
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が高い ・伸長時間が短い ・サーマルサイクラーの作動が適切でない 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR条件を検討する ・PCR条件を検討する ・動作が正常であるかを確認する
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・RNaseのコンタミ ・酵素の失活 	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型RNAを再調製する ・コントロールRNAで確認する ・新しい酵素を使用する

2.非特異的なバンドが多い

原因		対策
鋳型RNA	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型量が多すぎる ・ゲノムDNAのコンタミ 	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型量を減らす ・DNase I 処理を行う ・逆転写反応を行っていないNegative Control も同時にPCRを行う
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・配列が適切でない ・プライマー量が多すぎる 	<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲット領域以外にもアニーリングしやすい領域がある→プライマーを再設計する ・プライマー量を検討する
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を上げる
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプル間のコンタミネーション 	<ul style="list-style-type: none"> ・チップをこまめに交換する ・フィルターチップを用いる