

【ReverTra-Plus-™ トラブルシューティング】

1. 増幅産物のバンドを確認できない、または増幅効率が悪い

	原因	対策
鋳型 RNA	・純度が悪い	・再調製する。
	・鋳型量が少ない	・鋳型量を増やす。 ・PCR のサイクル数を増やす。
	・劣化している	・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。
	・高次構造を有する	・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 5min 加熱後、そのまま 42°C へ移し、酵素を添加して RT 反応を行う。
プライマー	・Tm 値が低い	・アニーリング温度を下げる。 ・プライマーを再設計する。
	・配列が適切でない	・Poly(A) tail を持たない RNA を鋳型とする場合、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、或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 プライマー対が同一鎖にアニーリングしないことを確認する。
	・プライマー量が少ない	・それぞれの RT primer にあった適正量を使用する。
PCR 条件	・Mg 濃度が低い	・Mg 濃度を上げる。(例えば 2mM)
	・アニーリング温度が高い	・アニーリング温度を下げる。(2~5°C)
	・伸長時間が短い	・伸長時間を 1min/kb で設定する。
	・サーマルサイクラーの動作が適切でない	・動作が正常であるかを確認する。
その他	・RNase のコンタミネーション	・Control RNA で確認する。 ・鋳型 RNA を再調製する。 ・鋳型 RNA の変性の際に予め RNase Inhibitor を添加する。 ・新しい試薬を使用する。
	・逆転写酵素量が多い	・1 反応当り、添付の ReverTra Ace [®] を 1 μl 使用する。
	・酵素の失活	・Control RNA で確認する。 ・新しい試薬を使用する。

2. 非特異的なバンドが多い

原因		対策
鋳型 RNA	・鋳型量が多すぎる	・鋳型量を減らす。
	・ゲノム DNA のコンタミネーション	・逆転写反応を行っていない Negative Control RNA も同時に PCR を行う。 ・DNase I 処理を行う。
プライマー	・他にプライマーがアニーリングし易い領域がある	・プライマーを再設計する。
	・プライマーが適量でない	・プライマー量を検討する。
PCR 条件	・Mg 濃度が高い	・Mg 濃度を下げる。(例えば 1mM)
	・アニーリング温度が低い	・アニーリング温度を上げる。(2~5°C) ・2ステップ、ステップダウン PCR を検討する。
その他	・サンプル間のコンタミネーション	・チップをこまめに交換する。 ・フィルターチップを用いる。 ・RT-PCR 反応液を調製する器具と電気泳動を行う器具を区別する。 ・RT-PCR 反応液を調製する場所と電気泳動を行う場所を区別する。