

【KOD SYBR® qPCR Mix トラブルシューティング】

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	サンプル DNA への SYBR® Green I の結合によるベースラインの上昇	SYBR® Green I は全ての二本鎖 DNA に結合し、蛍光を発する性質を持つため、サンプルに高濃度の二本鎖 DNA が含まれる場合、ベースラインが上昇し、正確な Ct 値を算出できなくなることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行ってください。
	サンプル溶液中の不純物による反応阻害	サンプル中に多くの不純物を含む場合、PCR が阻害されることがあります。また、リアルタイム PCR 用に設計されていない逆転写反应用試薬により合成した cDNA をご使用の場合、逆転写反応液に含まれる物質によって、反応が阻害されることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。また、逆転写反応にはリアルタイム PCR 用に設計された試薬を用いてください。
低濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	標的 DNA のコピー数が少なすぎる	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピーしか含まれない場合、確率的にコピー数のばらつきが大きくなり、直線性が乱れやすくなります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。
	DNA の反応チューブへの吸着	使用したサンプルの DNA 量が少ない場合、またはサンプルを希釈して長時間放置した場合、DNA が反応チューブへ吸着するなどの原因で実質的な鋳型量が減少することがあります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。また、サンプルを希釈して反応を行う場合は、希釈は反応直前に行ってください。
	プライマーダイマーの同時発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線解析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。鋳型量を阻害のかからない最大量にし、サイクル数を少なくすることでエンドポイントアッセイでは問題を回避できる場合があります。
希釈系列サンプルの増幅曲線の間隔が揃わない	非特異反応との競合	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線解析によって複数のピークが確認される場合は、反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
	プラスミドを鋳型としている場合	鋳型として環状プラスミドを使用している場合、ばらつきが生じやすくなります。制限酵素で切断し、直鎖状にしたものをご使用ください。

現象	原因	対策
PCR 効率が 80%を下回る (slope < -3.95)	反応条件の不適合	標的配列によっては、標準の反応条件で十分な PCR 効率が得られない場合があります。説明書 [4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定に従って、PCR 反応条件の再検討を行ってください。
	プライマーの Tm 値が通常よりも低い (60°C 以下)	Tm 値が低いプライマーを用いた場合、標準のサイクル条件では十分にアニーリングが行われなことがあります。説明書 [4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定に従って、アニーリング温度の再検討を行ってください。
	プライマーの劣化	プライマーの劣化により、PCR 効率が大きく低下することがあります。プライマーの原液からの再希釈、またはプライマーの再合成を行ってください。
	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
	プライマー量が少ない	プライマー量を増やすことで、増幅効率が改善する場合があります。
PCR 効率が 110%を上回る (slope > -3.1)	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出から外し、再計算を行ってください。
	非特異反応の発生	非特異反応の発生により、PCR 効率が 110%を超えることがあります。融解曲線解析により特異性の確認を行ってください。
再現性が悪い	サンプル中に不純物が多い	サンプル中に不純物を多く含む場合、PCR への阻害が発生し、再現性が低下することがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。
	希釈後、長時間放置したサンプルを使用	濃度が薄い DNA 溶液は、容器への吸着によって実効濃度が低下することがあります。原液から再希釈を行ってください。また、希釈系列による標準サンプルは、希釈後の保存は避け、毎回反応時に原液から都度作製してください。
	鋳型に精製プラスミド DNA や PCR 増幅産物を使用	精製プラスミド DNA 溶液や PCR 増幅産物を鋳型として使用する場合、希釈して用いることがあります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、特に低濃度域の直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(yeast RNA など)を希釈液に混合することで低濃度域の直線性が改善される場合があります。
	プライマーの品質差	同一の配列を持つプライマーでも、合成時毎に品質差が発生することがあります。新規に合成を行った際は、従来用いていたものと比較実験を行って、品質差の確認を行ってください。

現象	原因	対策
no-template control (NTC)で増幅が見られる	プライマーダイマーの発生	融解曲線解析において、no-template control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列のほか、プライマーの品質によっても発生程度が異なります。まず説明書[4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定に従って、PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。
	コンタミネーションの発生	融解曲線解析において、no-template control のピークが標的配列とほぼ同じ位置に存在する場合は、増幅産物のキャリーオーバーが疑われます。再試時にも再現する場合には、試薬類や滅菌水へのコンタミネーションが発生している可能性がありますので、試薬類や滅菌水の更新を行ってください。
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ギザギザになる	50× ROX reference dye の添加量が過剰	パッシブリファレンスを使用する機器において、50× ROX reference dye の添加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[4] 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、蛍光測定が十分に完了しない場合があります。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	機器の標準条件よりも少ない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。
融解曲線解析で複数のピークが見られる	非特異反応の発生	プライマーの特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生し、純粋な標的配列のみの増幅曲線が検出できなくなることがあります。反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
	プライマーダイマーの発生	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生することがあります。反応条件の再検討を行い、プライマーダイマーの発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更や、精製グレードを上げた再合成を検討してください。

現象	原因	対策
プライマーに GC tail を付加したが、Tm 値に差が認められない	増幅長が長い	増幅長が長い場合、GC tail が Tm 値に与える影響が小さくなります。増幅長を 100bp 以下になるようにプライマーを設計してください。なお、増幅産物の Tm 値を計算上求めることで、Tm 値の差を推測することができます。
	増幅産物の GC 含有率が高い	増幅産物の GC 含有率が高い場合、GC tail を付加しない状態でも Tm 値が著しく高くなります。そのため、GC tail が Tm 値に与える影響が小さくなります。この場合は、別の領域にプライマーを設計してください。
マルチプレックス検出において、Tm 値が分かれにくい	増幅長が長い	増幅産物の Tm 値は、増幅長が短い範囲では、増幅長に比例し Tm 値が上昇しますが、ある一定以上の長さになると、Tm 値が一定になります。計算上、増幅産物の Tm 値を求め、差が生じる増幅長の範囲でプライマーを再設計してください。
	増幅産物の GC 含有率が高い	増幅産物の GC 含有率が高い場合、短鎖ターゲットにおいても、Tm 値が高くなるため、Tm 値に差が生じにくくなります。短鎖の範囲内で計算上、Tm 値に差が生じるようにプライマーを設計してください。Tm 値が変わらない場合は、別の領域での設計を検討してください。
	スムージング機能による影響	機種によっては、スムージング機能により、近接する 2 つのピークを幅広い一本のピークとして表示する場合があります。この場合、融解曲線サイクルの温度上昇速度を下げ、融解曲線解析を行うことで、解決できる場合があります。改善されない場合は、Tm 値の差が 5°C 以上になるようにプライマーを再設計してください。
マルチプレックス検出において、ピークのバランスが悪い	2 種類のターゲットで増幅長が著しく異なる	SYBR® Green I アッセイでは、増幅長に比例し、蛍光強度が強くなります。そのため、増幅長が著しく異なる場合は、増幅量が同じでもピークの高さが異なります。ターゲット長に大きな差が生じないようにプライマーを設計し直してください。また、ピークが高いターゲットを増幅するプライマー量を減らすことで改善することがあります。
	アニーリング効率が異なる	2 種類のプライマーの Tm 値が大きく異なる場合、アニーリング効率が異なるため、増幅量のバランスが悪くなります。まず、ピークが高い方のプライマー量を減らす検討を行ってください。改善されない場合は、2 種類のプライマーの Tm 値が同じになるようにプライマーを再設計してください。

TOYOBO

<製品の内容・技術に関するお問合せ>

東洋紡 テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)

E-mail: tech_osaka@toyobo.jp

 [URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>