## 【THUNDERBIRD<sup>®</sup> Probe qPCR Mix トラブルシューティング】

※THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mixのトラブルシューティングは、p4 へ。

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反	サンプル溶液中の不純	サンプルの純度が低い場合、不純物によって
応で直線性が乱れる	物による反応阻害	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応用試
		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	標的 DNA のコピー数が	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピー
応で直線性が乱れ	少なすぎる	しか含まれない場合、確率的にコピー数のばらつ
る、または増幅曲線		きが大きくなり、直線性が乱れやすくなります。サ
の蛍光強度が低くな		ンプル濃度を上げて反応を行ってください。
る	DNA の反応チューブへ	用いたサンプルの DNA 量が少ない場合、または
	の吸着	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との	一般的に、蛍光プローブを用いたアッセイでは、標
	競合	的以外の増幅産物に由来するシグナルは検出さ
		れませんが、標的配列の増幅と、プライマーダイ
		マーの増幅とが同時に発生した場合、競合によっ
		て標的配列の増幅反応が弱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。
希釈系列サンプルの	非特異反応との競合	一般的に、蛍光プローブを用いたアッセイでは、標
増幅曲線の間隔が揃		的以外の増幅産物に由来するシグナルは検出さ
わない、または形状		れませんが、プライマー配列の特異性が十分でな
が不揃い		い場合、標的以外の増幅反応が同時発生するこ
		とで、競合によって標的配列の増幅反応が弱くな
		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
		UN₀ .

現象	原因	対策
PCR 効率が 90%を下 回る (slope < -3.6)	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。
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 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
再現性が良くない	サンプルの純度が低い	サンプルの純度が低いと、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、全 DNA 量に対する標的配列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への添加量は少なくする必要があります。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。
	反応条件の不適合 プライマー・プローブの 品質差	反応条件が至適からずれている場合、反応の再 現性が低下することがあります。説明書[4] 使用 方法 (2) PCRサイクル条件設定に従っ て、PCR反応条件の再検討を行ってください。 同一の配列を持つプライマーやプローブでも、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	コンタミネーションの発	再試時も再現する場合には、試薬類や滅菌水へ
· (NTC)で増幅が見ら	生	のコンタミネーションが発生している可能性があり
れる		ますので、試薬類や滅菌水の更新を行ってくださ
		l,°
	<u></u> 蛍光測定の設定の誤り	複数種の蛍光プローブを用いた multiplex PCR に
	(multiplex PCR 実施時	おいて、蛍光測定の設定が正しく行われていない
	など)	場合、異なる色素のクロストークによるシグナルを
		誤って検出してしまう場合があります。反応系に含
		まれる全ての蛍光色素に対して、機器の設定を再
		確認してください。
増幅曲線の蛍光シグ	50X ROX reference	パッシブリファレンスを使用する機器において、
ナルが弱い、または	dye の添加量が過剰	50X ROX reference dye の添加量が過剰である
増幅曲線の形状がギ		場合、蛍光量補正時に蛍光値が低く見積もられる
ザギザになる		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、50X ROX reference dye の添加
		量を確認してください。
	蛍光測定の設定の誤り	蛍光色素の設定に誤りがあると、正しい検出が行
		われませんので、機器の取扱説明書をご参照の
		上、設定を再確認してください。
	蛍光プローブの純度が	蛍光プローブの純度が十分でない場合、合成時に
	低い	残存した未結合の蛍光色素が、ベースライン上昇
		の原因となり、増幅産物由来の蛍光値が低く見積
		もられる場合があります。HPLC 精製グレード以上
		のプローブを用いてください。
	クエンチャー色素の蛍	TAMRAなどの蛍光を発するクエンチャーを用いて
	光強度が過剰	いる場合、クエンチャーが発する蛍光によってベー
		スラインが上昇し、増幅産物由来の蛍光値が低く
		見積もられる場合があります。non-fluorescent
		quencher を用いたプローブを使用することで改善
		される場合があります。
	プローブの劣化	プローブ溶液の保存上の問題により、プローブが
		分解し、ベースラインが上昇することがあります。
		また、一部の蛍光色素は、EDTA により劣化する
		性質を持つものがあります。プローブの合成元推
		奨の保存条件をご確認ください。
	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。

## 【THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix トラブルシューティング】

※THUNDERBIRD® Probe qPCR Mixのトラブルシューティングは、p1 へ。

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反	サンプル DNA への	SYBR <sup>®</sup> Green I は全ての二本鎖 DNA に結合し、
応で直線性が乱れる	SYBR <sup>®</sup> Green I の結合	蛍光を発する性質を持つため、サンプルに高濃度
	によるベースラインの上	の二本鎖 DNA が含まれる場合、ベースラインが
	昇	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	サンプルの純度が低い場合、不純物によって
	物による反応阻害	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応用試
		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	標的 DNA のコピー数が	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピー
応で直線性が乱れる	少なすぎる	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	用いたサンプルの DNA 量が少ない場合、または
	の吸着	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	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅と
	時発生	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。融解曲線分析によ
		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。
希釈系列サンプルの	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
増幅曲線の間隔が揃		の増幅反応が同時発生し、標的配列のみの増幅
わない		曲線が検出できなくなることがあります。融解曲線
		分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
		一配列の変更を検討してください。

現象	原因	対策
PCR 効率が 90%を下	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
回る		PCR 効率が得られない場合があります。説明書
(slope < -3.6)		[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 が通常	Tm が低いプライマーを用いた場合、標準のサイク
	よりも低い(60°C 以下)	ル条件では十分にアニーリングが行われないこと
		があります。伸長温度を下げるか(説明書p.7、*3
		)、3 ステップ PCR(説明書p.12)をお試しください。
	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	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した
	線から外れた Ct 値を含	場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れ
	めた	た Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってくだ
		さい。
PCR 効率が 110%を	PCR 効率算出時に、直	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した
上回る	線から外れた Ct 値を含	場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れ
(slope > -3.1)	めた	た Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってくだ
		さい。
再現性が良くない	サンプルの純度が低い	サンプルの純度が低いと、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	濃度が薄い DNA 溶液は、容器への吸着によって
	たサンプルを使用	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	精製プラスミド DNA 溶液や PCR 増幅産物を鋳型
	DNA や PCR 増幅産物	として使用する場合、全 DNA 量に対する標的配
	を使用	列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への
		添加量は少なくする必要があります。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	プライマーダイマーの発	融解曲線分析において、no-template controlのピ
(NTC)で増幅が見ら	生	ークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、
れる		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	融解曲線分析において、no-template controlのピ
	生	一クが標的配列とほぼ同じ位置に存在する場合
		は、反応系へのコンタミネーションが疑われます。
		再試時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
		[\\]
増幅曲線の蛍光シグ	50X ROX reference	パッシブリファレンスを使用する機器において、
ナルが弱い、または	dye の添加量が過剰	50X ROX reference dye の添加量が過剰である
増幅曲線の形状がギ		場合、蛍光量補正時に SYBR® Green I の蛍光
ザギザになる		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、50X ROX
	<u> </u>	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	1100%日かめりより。   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。
  融解曲線分析で複数	   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
のピークが見られる	为F1寸 <del>人</del> 人人心()无工	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	標的 DNA の増幅と、プライマーダイマーの増幅と
	生	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。



<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/