

【ReverTra Ace®  $\alpha$ 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"> <li>・純度が悪い</li> <li>・鋳型量が少ない</li> <li>・劣化している</li> <li>・高次構造を有する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・再調製する</li> <li>・PCRのサイクル数を増やす</li> <li>・鋳型量を増やす</li> <li>・再調製する。</li> <li>・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</li> <li>・RTにRandom Primerを使用する</li> <li>・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</li> </ul>
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> <li>・T<sub>m</sub>値が低い</li> <li>・配列が適切でない</li> <li>・プライマー量が少ない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・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</li> <li>・配列が正しいことを確認する</li> <li>・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</li> <li>・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</li> <li>・1反応当り、10 pmol 以上使用する</li> </ul>
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アニーリング温度が高い</li> <li>・伸長時間が短い</li> <li>・サーマルサイクラーの作動が適切でない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR条件を検討する</li> <li>・PCR条件を検討する</li> <li>・動作が正常であるかを確認する</li> </ul>
その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>・RNaseのコンタミ</li> <li>・酵素の失活</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・鋳型RNAを再調製する</li> <li>・新しい酵素を使用する</li> </ul>

## 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"> <li>・鋳型量が多すぎる</li> <li>・ゲノムDNAのコンタミ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・鋳型量を減らす</li> <li>・DNase I 処理を行う</li> <li>・逆転写反応を行っていないNegative Control も同時にPCRを行う</li> </ul>
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> <li>・配列が適切でない</li> <li>・プライマー量が多すぎる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・プライマー量を検討する</li> </ul>
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アニーリング温度が低い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アニーリング温度を上げる</li> </ul>
その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>・サンプル間のコンタミネーション</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・チップをこまめに交換する</li> <li>・フィルターチップを用いる</li> </ul>