

# トラブルシューティング

miRNAAssay<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix[Code No. MIR-101]

現象	原因	対策
リアルタイム PCR でシグナルが出ない、あるいは遅れて検出される	RNA の純度が低い	RNA 調製時に残留した不純物によって逆転写反応が阻害されている可能性があります。鋳型 RNA を再精製してください。
	RNA が分解	RNase の混入によって RNA が分解している可能性があります。RNA の再調製を行ってください。また、RNA を低濃度で保存した場合、RNase による分解を受けやすくなるほか、反応容器への吸着によって実質的な RNA 量が減少する場合があります。希釈した RNA は、使用後に凍結保存して再使用することは避け、毎使用時に高濃度保存液から調製することをお勧めします。
	RNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、およそ 1pg から 100ng までの RNA (10 $\mu$ L 反応系)を用いた場合に安定的な効率で逆転写が可能であることを確認していますが、RNA の種類や品質によっては、反応可能な RNA の量は変動する可能性があります。鋳型 RNA の添加量を増減させてください。
	ターゲットの発現量が低すぎる、あるいは多すぎる	本製品では、逆転写反応時にターゲットとする miRNA のみを逆転写します。そのため、ターゲットの発現量によって最適な RNA 量が増減する可能性があります。鋳型 RNA 量を増減させ、予備検討を行ってください。
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	本製品では、逆転写反応液をリアルタイム PCR 反応液へ最大 10%添加しても直線性には問題がないことを確認していますが、使用するリアルタイム PCR 試薬の性質によっては、この値は低下する可能性があります。逆転写反応液の添加量を減らしてください。
	RT プライマーが適切でない	RT プライマーの設計が適切でない可能性があります。参考文献 3, 4 を参照して設計いただくか、市販品の TaqMan <sup>®</sup> MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific <sup>®</sup> 社)をご使用になることをお勧めします。
リアルタイム PCR で no-RT Control を用いた反応液に増幅が見られる	プライマーダイマーの発生	融解曲線分析において、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、プライマー配列の他、プライマーの品質不良によっても発生する可能性があります。まず、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。

SuperPrep® miRNAAssay® Cell Lysis & RT Kit for qPCR[Code No. MIR-201]

現象	原因	対策
リアルタイム PCR でシグナルが出ない、あるいは遅れて検出される	細胞数が多すぎる	過剰の細胞由来成分により RT 反応や qPCR 反応が阻害される場合があります。溶解する細胞数を減少させてください。
	RNA が分解している	<ul style="list-style-type: none"> <li>細胞の種類によっては RNase の活性が強く、ライセート中の RNase を完全に失活できない場合があります。このような細胞では、Lysis Solution 添加を行い、室温・70℃でのインキュベート後、ライセートを氷上に移し、速やかに RT 反応を行い、cDNA 化することをお勧めいたします。</li> <li>ライセートを保存する場合は-80℃で凍結し、凍結融解はできる限り少なくしてください。</li> <li>細胞は用時調製したものをご使用ください。アッセイ用に凍結保存しておく場合は、培養後、PBS(-)で洗浄した細胞から PBS(-)を除去し、-80℃で凍結してください。</li> </ul>
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	<ul style="list-style-type: none"> <li>本製品の RT 反応液を qPCR 反応液へ最大 10%添加しても直線性には問題ないことを確認していますが、使用する qPCR 試薬の性質によっては、この許容量が低下する可能性があります。逆転写反応液の添加量を減らしてください。</li> <li>本製品以外の RT 試薬をご使用の場合、リアルタイム PCR 試薬への持込許容量が変わる可能性があります。予備実験をしてご使用ください。</li> </ul>
	RT プライマーが適切でない	RT プライマーの設計が適切でない可能性があります。参考文献 3, 4 を参照して設計いただくか、市販品の TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific®社)をご使用になることをお勧めします。
定量性が低い	細胞溶解が不十分	Lysis Solution 添加後に攪拌ムラが生じないように十分攪拌してください。