

【Realtime PCR Master Mix トラブルシューティング】

※ SYBR®Green Realtime PCR Master Mix (-Plus-) トラブルシューティング は p3 へ

1. 増幅曲線がみられない、乱れる

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
ディテクターの設定などが使用したプローブに適合していない	ディテクターの設定を適正化して再解析してください。
データコレクトの設定が不適切	設定を適正化して再実験してください。
サンプル位置の設定ミス	適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験してください。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
PCRサイクル条件・プライマー・プローブの濃度・配列などが不適切	プライマー・プローブ濃度の変更、サイクル条件の変更により改善する場合があります。これらの検討方法はアッセイ手法により異なりますので、各プロトコールをご参照ください。これらを検討してもなお良い結果が得られない場合は、再設計をお薦めします。
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

2. 定量値がばらつく

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により、温度管理や検出にばらつきが生じる場合があります。各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。
PCRサイクル条件・プライマー・プローブの濃度・配列などが不適切	増幅効率の悪いPCR系は、ばらつきが大きい傾向があります。プライマー・プローブ濃度の変更、サイクル条件の変更をご検討ください。これらの検討方法はアッセイ手法により異なりますので、各プロトコールをご参照ください。これらを検討してもなお良い結果が得られない場合は、再設計をお薦めします。

原因	対策
分注量のばらつき	所定よりも小さい反応スケールで実施している場合、分注誤差が大きくなることがあります。反応スケールを上げて再実験してください。

SYBR®Green Realtime PCR Master Mix (-Plus-) トラブルシューティング

※ Realtime PCR Master Mix トラブルシューティング は p1 へ

1. 増幅曲線がみられない、乱れる

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
ディテクターの設定などがSYBR® Green IIに適合していない	ディテクターの設定を適正化して再解析してください。
データコレクトの設定が不適切	設定を適正化して再実験してください。
サンプル位置の設定ミス	適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験してください。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
PCR反応条件・プライマーの濃度・配列などが不適切	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。まれに、逆にアニール温度を上げることや、伸長時間の延長などで向上することもあります。また、GC含量の高いターゲットでは、変性時間を延長することで、改善することもあります。それでも良い結果が得られない場合は、プライマー再設計をお勧めします。
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

2. 定量値がばらつく

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により、温度管理や検出にばらつきが生じている場合があります。各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

原因	対策
PCR反応条件・プライマーの濃度・配列などが不適切	増幅効率の悪いPCR系は、ばらつきが大きい傾向があります。プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。伸長時間の延長などでも向上することがあります。また、GC含量の高いターゲットでは、変性時間を長くすることで、改善することがあります。それでも、ばらつきが大きい場合は、プライマー再設計をお勧めします。
分注量のばらつき	所定よりも小さい反応スケールで実施している場合、分注誤差が大きくなることがあります。反応スケールを上げて再実験してください。

3. ブランクサンプルにシグナルがみられる

融解曲線分析を実施した上で、ご判断ください。

(1) 融解曲線のピークが陽性サンプルと同じ温度である

原因	対策
陽性サンプルやPCR産物のコンタミネーション	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を新しいものに交換してください。それでも改善が見られない場合は、使用するプライマーや試薬などを新しいものに交換して再検討してください。

(2) 融解曲線のピークが陽性サンプルと異なる(低い)

原因	対策
プライマーダイマーなど非特異反応の発生	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。非特異反応が出る場合は、アニール温度を上げる、アニール時間、伸長時間を短くするか、プライマー濃度を下げてみます。それでも発生する場合は、プライマー再設計をお勧めします。