

## 【THUNDERBIRD® 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応で直線性が乱れる	サンプル溶液中の不純物による反応阻害	サンプルの純度が低い場合、不純物によって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、または増幅曲線の蛍光強度が低くなる	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	用いたサンプルの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増幅曲線の間隔が揃わない、または形状が不揃い	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、プライマー配列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場合があります。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。

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 <b>[4] 使用方法 (2) PCRサイクル条件設定</b> 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	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 <b>[4] 使用方法 (2) PCRサイクル条件設定</b> 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・プローブの品質差	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 (NTC)で増幅が見られる	コンタミネーションの発生	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い。
	蛍光測定の設定の誤り (multiplex PCR 実施時など)	複数種の蛍光プローブを用いた multiplex PCR において、蛍光測定の設定が正しく行われていない場合、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ナルが弱い、または増幅曲線の形状がギザギザになる	50X 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、50X ROX reference dye の添加量が過剰である場合、蛍光量補正時に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、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低い	蛍光プローブの純度が十分でない場合、合成時に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光強度が過剰	TAMRAなどの蛍光を発するクエンチャーを用いている場合、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	サンプルの純度が低い場合、不純物によって 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	用いたサンプルの 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、プライマー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 <b>[4] 使用方法 (2) PCRサイクル条件設定</b> 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 が通常よりも低い(60°C 以下)	Tm 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。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。
	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	融解曲線分析において、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、反応系へのコンタミネーションが疑われます。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	50X 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、50X 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、50X 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。
融解曲線分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。

---

**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](mailto:tech_osaka@toyobo.jp)

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