

【RNA-direct™ Realtime PCR Master Mixトラブルシューティング】

※RNA-direct™ SYBR™Green Realtime PCR Master Mixトラブルシューティングはp3へ

1. 増幅がみられない、乱れる

原因	対策
検出機器の設定などが蛍光色素に適合していない	標識に用いられている蛍光色素の種類によって、検出機器の設定を変更する必要があります。設定を適正化して再解析してください。
data collection の設定が不適切	蛍光標識プローブや、蛍光標識プライマーを用いた各種アッセイでは、アッセイ法により data collection の推奨設定位置が異なります。設定を確認し、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	入力したサンプル番号と、機器にセットしたサンプルの位置が合っているか確認し、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。
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、一般的にアニーリング温度を下げる、アニーリング時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。まれに、逆にアニーリング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。ランプ速度を遅くすることで感度が改善される場合があります。また、GC 含量の高いターゲットでは、変性時間を延長することで、改善することもあります。それでも不良の場合は、プライマー再設計をおすすめします。
サンプルの純度が悪い	RNase の作用により鋳型 RNA が分解されている可能性があります。ピペット等の器具類は RNA 取扱専用のもを使用し、RNA を再調製してください。

2. 定量値がばらつく

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。
サンプルの純度が悪い	純度が悪いサンプルは、ばらつきの原因となります。均質なサンプルをご使用ください。また、サンプル中のゲノム DNA の残留により、ゲノム DNA 由来の増幅産物が検出されることがあります。DNase I 処理によりゲノム DNA の除去を行ってください。

2. 定量値がばらつく(つづき)

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	PCR の増幅効率が悪い場合は、ばらつきも大きくなる傾向があります。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、一般的にアニーリング温度を下げる、アニーリング時間を長くするか、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、改善されることがあります。それでも、ばらつきが大きい場合は、プライマーおよびプローブの再設計をおすすめします。
計量のばらつき	多くのリアルタイム PCR 装置では、推奨反応スケールよりも少量の液量で検出が可能ですが、検出感度や正確性が低下する場合があります。反応スケールを上げて推奨液量で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。

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)を更新してください。それでも発生する場合は、使用する蒸留水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。

【RNA-direct™ SYBR™ Green Realtime PCR Master Mixトラブルシューティング】

※RNA-direct™ Realtime PCR Master Mixトラブルシューティングはp1へ

1. 増幅がみられない、乱れる

原因	対策
検出機器の設定などがSYBR™ Green Iに適合していない	検出機器の設定を適正化して再解析してください。
data collection の設定が不適切	SYBR™ Green アッセイでは通常、伸長ステップの最後に data collection を設定します。設定を確認し、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	入力したサンプル番号と、機器にセットしたサンプルの位置が合っているか確認し、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。
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、一般的にアニーリング温度を下げる、アニーリング時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。まれに、逆にアニーリング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。ランプ速度を遅くすることで感度が改善される場合があります。また、GC 含量の高いターゲットでは、変性時間を延長することで、改善することもあります。それでも不良の場合は、プライマー再設計をお勧めします。
サンプルの純度が悪い	RNase の作用により鋳型 RNA が分解されている可能性があります。ピペット等の器具類は RNA 取扱専用のもを使用し、RNA を再調製してください。

2. 定量値がばらつく

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。
サンプルの純度が悪い	純度が悪いサンプルは、ばらつきの原因となります。均質なサンプルをご使用ください。また、サンプル中のゲノム DNA の残留により、ゲノム DNA 由来の増幅産物が検出されることがあります。DNase I 処理によりゲノム DNA の除去を行ってください。

2. 定量値がばらつく(つづき)

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	PCR の増幅効率が悪い場合は、ばらつきも大きくなる傾向があります。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、一般的にアニーリング温度を下げる、アニーリング時間を長くするか、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、プライマーの再設計をおすすめします。
計量のばらつき	多くのリアルタイム PCR 装置では、推奨反応スケールよりも少量の液量で検出が可能ですが、検出感度や正確性が低下する場合があります。反応スケールを上げて推奨液量で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てご判断ください)。

原因	対策
陽性サンプルや PCR 産物のコンタミネーション (ターゲットと同じピークの増幅産物がブランクサンプルで検出される場合)	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を更新してください。それでも発生する場合は、使用する蒸留水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。
プライマーダイマーなど非特異反応の発生 (ターゲットと異なるピークの増幅産物がブランクサンプルで検出される場合)	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。3 ステップ化も効果があることがあります。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。