

【THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitトラブルシューティング】

1. PCR 効率が低い、検出感度が低い、検出結果が乱れる

(1)機器の設定の不具合

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	各種アッセイ法により 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。

(2)RNA サンプルの不具合

原因	対策
RNA が分解されている	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。RNA 抽出の工程を見直し、ピペットなどの器具類は RNA 取扱専用のもを使用して RNA を再調製してください。

(3)サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合

原因	対策
伸長(アニーリング)温度・時間が適していない	説明書「[6]最適な反応条件の検討方法」を参考に、伸長(アニーリング)温度および時間を検討してください。
プライマー・TaqMan® probe 濃度が適していない	伸長(アニーリング)温度・時間の調整で改善しない場合は、プライマー・TaqMan® probe 濃度を検討してください。 説明書「[6]最適な反応条件の検討方法」を参考に、プライマー・TaqMan® probe 濃度を検討してください。
プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある	サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度を見直しても、改善しない場合は、プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある可能性があります。プライマー・TaqMan® probe を検討してください。

(4)ROX 濃度の不具合

原因	対策
50×ROX Reference dye 濃度が不適切	50×ROX Reference dye の最適な添加量は機種により異なります。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。50×ROX Reference dye 濃度が適切か確認してください。

2. 定量値がばらつく

(1)機器の設定の不具合

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)RNA サンプルの不具合

原因	対策
サンプルの純度が低い	サンプル中の不純物は、ばらつきの原因となる可能性があります。精製度が高い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。その場合、説明書「[4]使用方法 1.プライマーおよび TaqMan®probe の設計方法と性能の確認」を参考にプライマーおよび TaqMan®probe の設計を見直してください。さらに、サンプルを DNase I で処理し、ゲノム DNAを除去してください。
サンプルの吸着	RNA サンプルがマイクロチューブに吸着している可能性があります。低吸着チューブを使用し、RNA を再調製してください。
鋳型 RNA のコピー数が少ない、または多い	鋳型 RNA の3段階以上の希釈系列を調製して検量線を作製し、検量線の直線域で定量してください。

(3)サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合

原因	対策
伸長(アニーリング)温度・時間が適していない	説明書「[8]トラブルシューティング 1. PCR 効率が低い、検出感度が低い、検出結果が乱れる (3) サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合」と同様の操作を実施してください。
プライマー・TaqMan® probe 濃度が適していない	
プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある	

(4)反応液量の不具合

原因	対策
試薬分注のばらつき	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。検出感度や再現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. 陰性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、陰性サンプルを更新してください。それでも発生する場合は、使用する滅菌水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。
TaqMan® probe の設計に問題がある	TaqMan® probe が非特異的な結合をしている可能性があります。TaqMan® probe を再設計することにより改善する場合があります。