

トラブルシューティング

【はじめに確認すること】

- ・ 試薬の入れ忘れはないか？
- ・ プライマー、プローブの組合せは正しいか？配列は間違っていないか？
- ・ PCR 条件や蛍光データ取得のステップは正しく設定されているか？
- ・ total RNA が分解されていないか？

これまでに正しく反応した実績のある鑄型（ポジティブコントロール）があれば、これらの項目の確認は容易である。初めて使用するプライマー（およびプローブ）で使用実績がない場合には、実績のある系と並行してリアルタイム RT-PCR を行うことにより、試薬の入れ忘れなどの操作ミスを確認できる。total RNA の分解が疑われる場合には、アジレント 2100 バイオアナライザなどで total RNA の質と量を再確認する。

【反応阻害物質】

total RNA や cDNA サンプルに逆転写反応や PCR 反応を阻害するような物質が含まれている場合がある（RNA 抽出で使用した有機溶媒など）。そのような反応阻害物質の有無を確認するには、比較的高濃度な鑄型を 3、4 段階に希釀して、それぞれ逆転写反応あるいは PCR 反応を行ってみる。反応阻害物質がなければ、濃度依存的に検出されるはずだが、反応阻害物質が存在する場合には、鑄型が高濃度であるほど反応性が低下する現象が見られる。

【增幅曲線の蛍光値が低い】

增幅曲線に問題があるときには、まず、ベースライン補正や ROX 補正を行う前の生データを確認してみる。增幅曲線の蛍光値が低くなるのは、ベースラインが高いことが原因である場合が多い。インターラーカレーター法では、鑄型 DNA にもインターラーカレーターが取り込まれて蛍光を発するので、鑄型 DNA 量が多すぎると、ベースラインが高くなってしまう。プローブアッセイでベースラインが高くなるときは、プローブの設計が悪いことが原因として疑われる。例えば、クエンチャーによる消光が不十分なケースなどが考えられる。また、プローブの蛍光標識効率が悪い場合にも蛍光値が低くなる。

【プローブの確認】

プローブの標識効率は、プローブを DNase I で切断し蛍光値を測定することにより調べることができる。 DNase I で切断すると、蛍光物質とクエンチャーが離れるため、強い傾向を発するはずである。

【増幅曲線が右下がりになる】

ベースライン補正が適切に行われていない。生データでベースラインとなる領域を確認し、ベースラインの設定をやり直して再解析する。なお、鑄型量が多すぎると、増幅曲線の立ち上がりが早いため適切なベースライン補正ができない場合がある。10 サイクル以内に増幅曲線が立ち上がるようなら、鑄型量を 1/100～1/1000 程度に減らす。

【PCR 増幅効率が低い（検量線の傾きが悪い）】

検量線の傾きから算出した PCR 増幅効率が低い場合、以下のような原因が考えられる。

- PCR の反応性が悪い（→プライマー、試薬、PCR 条件の再検討）
- PCR 阻害物質の混入（→鑄型調製方法の再検討）
- スタンダードサンプルが正しく希釈されていない

スタンダードサンプルを希釈する際には、核酸が非常に薄い濃度となりヌクレアーゼによる分解を受けやすく不安定になるという問題が生じる。これを防ぐためには、実験対象とは異なる生物種の tRNA や rRNA などをキャリアとして添加した溶液で希釈することが望ましい。なお、タカラバイオから販売されている EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160) は鑄型 DNA や RNA を希釈するための溶液であり、これを使用することもできる。この試薬には tRNA や rRNA などの核酸は含まれていないので、それらの配列に起因する問題も生じないのが特長である。

【PCR 増幅効率が高すぎる】

PCR 増幅効率が理論値より高い場合には、PCR 阻害物質の混入が疑われる。また、インターラーカーター法の場合には、非特異的増幅を検出したために、見かけ上 PCR 増幅効率が高くなっていることもある。融解曲線の結果を確認する。

【融解曲線分析で複数のピークが出る】

目的の断片以外のものが増幅していると疑われる。

- プライマーダイマーなどの非特異的増幅が起こっている
- 目的遺伝子にバリアントが存在する
- ゲノム DNA 由来の増幅が起こっている

非特異的増幅が起こっている場合には、プライマーの再設計か PCR 反応条件の最適化を行う。目的遺伝子にバリアントが存在する場合やゲノム DNA 由来の増幅が起こっている場合には、サイズの異なる断片が増幅することがある。バリアントやゲノム構造の情報を考慮してプライマーを再設計する。なお、融解曲線がきれいなシングルピークにならなくても、電気泳動でシングルバンドであることが確認できれば、多くの場合、目的の断片が正しく増幅されているので問題ない。