

**Q1 どのような反応容器なのか？**

A1 専用ディスクチップに16ulの反応液を封入し、反応を行います。

**Q2 一度に解析できるサンプル数は？**

A2 8サンプル(UR-104MK3)または12サンプル(UR-104MK4)です。

**Q3 装置をパソコンに接続するにはどうしたら良いか？**

A3 本機のパソコンへの接続にはUSBポートを使用します。

**Q4 プライマー設計で注意することは？**

A4 以下の点を考慮してプライマーを設計してください。  
 ・ForwardプライマーとReverseプライマーがアニーリングしないように設計してください。  
 特に3'末端で3塩基以上が相補的な配列にならないように注意してください。  
 ・ForwardプライマーとReverseプライマーのTm値をなるべく揃えて設計してください。  
 ・プライマー内での二次構造形成を避けるため、自己相補的な配列を含まないように注意してください。  
 ・GCリッチなターゲットの場合、Tm値が60 を超えるプライマーを推奨します。

**Q5 最適な増幅サイズは？**

A5 本機の高速性を生かすためにも、200bp以下にして下さい。  
 長鎖増幅の場合、伸長ステップの時間を延ばすことで対応は可能です。

**Q6 反応の正確性は？**

A6 使用する酵素の正確性に依存します。

**Q7 超高速PCRに適した酵素は？**

A7 伸長反応速度が速い酵素を使用して下さい。

**Q8 最適な鋳型量は？**

A8 ゲノムDNAやプラスミドDNA、逆転写産物など用いる鋳型の種類、質によって、PCRに適した鋳型量は異なります。  
 過剰量の鋳型が増幅を阻害する場合がありますので、ご注意下さい。  
 鋳型DNAの希釈系列を作成し、最適量を求めてください。

**Q9 PCR条件で注意することは？**

A9 以下の点を考慮してください。  
 ・PCRサイクル前の初期熱変性(プレヒート)について  
 使用する酵素がホットスタート型のときは、要求する温度、時間を設定してください。  
 ゲノムDNA等の複雑な鋳型に設定する際も、95 1分で十分です。  
 過度の加熱処理は酵素失活の原因となります。  
 ・変性条件について  
 まずは95 の設定で検討してください。  
 ゲノムDNA等の複雑な鋳型の場合は98 の高温の変性条件をお勧めします。  
 酵素失活の原因となりますので、短時間の設定をお勧めします。  
 ・アニーリング条件について  
 アニーリング条件は増幅効率と増幅の特異性に大きく影響します。  
 プライマーのTm値に対して低すぎるアニーリング温度を設定すると、  
 非特異的増幅産物やスミアが増加し、目的増幅産物が減少する場合があります。  
 プライマーのTm値に対して高すぎるアニーリング温度を設定すると、  
 アニーリング効率が低下し、目的増幅産物が減少します。  
 プライマーのTm値を考慮してアニーリング温度を調整することで、  
 増幅の効率と特異性が改善される場合があります。  
 非特異的増幅産物等が無いアニーリング温度では、設定時間を長く設定することで  
 増幅効率が良くなる傾向にあります。  
 ・伸長条件について  
 1.00sec/100bpを目安として設定してください。  
 非特異的増幅産物やスミアが見られる場合は、設定時間を短くすることで  
 改善される場合があります。

**Q10 解析ソフトでデータの収集ができない(Startが押せない)のですが？**

A10 解析ソフト立上げ時に、エクセルのマクロを有効にしてください。  
 また、マクロのセキュリティを「中」以下にしてください。

**Q11 解析ソフトで「COM のオープンに失敗しました。」と表示されるのですが？**

A11 接続しているCOMの値を選択してください。  
 接続の確認  
 Windowsの場合  
 デバイスマネージャーを開きます。  
 「ポート(COMとLPT)」をクリックし、接続している  
 USBケーブルのCOMの値を確認してください。

**Q12 解析ソフトで蛍光チャートが出てこないのですが？**

A12 本機と解析用パソコンのUSBケーブルの接続を確認してください。  
 接続状態でこの現象が起こる場合は、当社までご連絡ください。

**Q13 反応開始後にサイクル数を追加することは可能か？**

A13 可能です。反応中も10サイクル単位でサイクル数の追加が可能です。

**Q14 増幅産物が得られない。何を検討すればいいか？**

A14 本機は高速PCR実現のため、薄膜内でPCRを行っています。  
 薄膜にすることで、熱伝導性に優れ、高速温度サイクリングを可能としました。  
 そのため従来と比較して、大幅に設定時間を短縮することができました。  
 条件検討については、以下の点を考慮してください。  
 【プライマーの要因】  
 ・プライマーの配列、長さ、GC含量を再検討してください  
 ・ForwardとReverseのプライマーのTm値が5 以上異なる場合、  
 うまく増幅しない場合があります。低い方のプライマーのTm値を基準として  
 アニーリング温度を設定し直すことで改善できる場合があります。  
 【試薬の要因】  
 ・試薬の劣化を検討してください。  
 【鋳型の要因】  
 ・純度の低い鋳型や阻害物質を含む鋳型は避けてください。  
 ・鋳型量を増やして検討してください。  
 【反応条件の要因】  
 ・伸長時間を1.00sec/100bp以上に設定してお試し下さい。  
 ・プライマー濃度を上げることで改善される場合があります。  
 ・使用酵素量を増やすことで改善される場合があります。  
 ・熱変性温度を確認してください。  
 通常のPCRであれば、95 で十分です。  
 ゲノムDNA等の複雑な鋳型の場合は98 の高温の変性条件をお勧めします。  
 酵素失活の原因となりますので、短時間の設定をお勧めします。  
 ・初期熱変性時間を検討してください。  
 酵素によっては、ポリメラーゼ活性を抑える抗体は  
 PCRの最初の熱変性ステップで速やかに失活するものがあります。  
 この場合、長時間の初期熱変性時間は必要ありません。  
 ・アニーリング条件を検討してください。  
 アニーリング温度を下げる方向で検討してください。  
 プライマーダイマーが形成される場合は、形成しない設定温度で  
 設定時間を長く設定してください。  
 ・サイクル数を増やして検討してください。  
 非特異的増幅がない場合は、サイクル数を増やして検討してください。  
 リアルタイム解析中にサイクルを追加することも可能です。  
 その場合は、「Cycle 10 Add」キーを押してください。

**Q15 非特異的増幅やスミアが見られる。何を調べればいいのか？**

A15 プライマー使用量、酵素量、鋳型量は適切か、伸長時間の設定が  
 長すぎないかを確認してください。  
 【プライマーの要因】  
 ・特異性の高いプライマーを使用して下さい。  
 【鋳型の要因】  
 ・鋳型の純度をご確認下さい。  
 ・鋳型量が多すぎる恐れがあります。  
 鋳型の希釈系列を作成し、各希釈サンプルでPCRを行い、  
 最適濃度を決定してください。  
 【反応条件の要因】  
 ・伸長時間を必要以上に長く設定すると、スミアが生じる場合があります。  
 1.00sec/100bpを目安に設定してください。増幅量が少ない場合には、  
 サイクル数を5サイクル程度増やして検討してください。  
 ・アニーリング条件を検討してください。  
 設定時間を短くしてください。それでも非特異的増幅が見られる場合は、  
 設定温度を高くしてください。

**Q16 リアルタイムPCRのベースラインが高いのですが？**

A16 反応液中に添加している鋳型量が多いと考えられます。  
 鋳型量を少なくして検討してください。

**Q17 ディスクが取り出せない(装置の蓋が開閉できない)のですが？**

A17 電源投入時にOpenボタンで装置のロックのロックを開けてください。  
 ただし、システムチェック中はロックを外せませんのでご了承ください。

**Q18 ネガティブコントロールからPCR産物が得られるのですが？**

A18 サンプルのコンタミネーションが考えられます。  
 ・すべての試薬を新しいものに換えてください。  
 ・フィルター付きピペットチップを使用してください  
 ・エアロゾルの発生を防いでください。

**Q19 SYBR Green検出で検出されたが、電気泳動してみると増幅を確認できないのですが？**

A19 SYBR Green検出は増幅されたDNAを非特異的に検出する方法です。  
 非特異的な増幅やプライマーダイマーも検出されます。  
 初めて増幅を行うターゲットについては、電気泳動等で、  
 目的のターゲットが増幅されているか確認する必要があります。

**Q20 融解曲線分析で単一ピークが得られていたサンプルを電気泳動するとバンドが2本確認できたのですが？**

A20 融解曲線分析では、ターゲットと増幅長が近い非特異的増幅については  
 区別が難しい場合があります。初めて使用するプライマーについては、  
 一度電気泳動を行い、増幅の確認をしておく必要があります。

**用語説明**

・ホットスタートPCR(Hot Start PCR)  
 抗体や化学修飾でポリメラーゼ活性を抑制したPCR酵素を使用するPCR。  
 PCRの前に活性化ステップ(初期熱変性)を設けることにより、ポリメラーゼ活性が  
 回復するため、PCRサイクル前のミスアニーリングやプライマーダイマーを  
 抑制することが出来ます。

・融解曲線分析(Melting Curves)  
 PCR反応後に、PCR反応液温度を上げていき、SYBR Greenの蛍光をモニタリングする。  
 温度が低い間は、PCR増幅産物が2本鎖を形成し蛍光量が強いが、  
 ある温度に達すると1本鎖に解離し、急激に蛍光量が低下する。  
 このときの温度が融解温度(Tm値)であり、増幅産物に固有の値をとる。