

## 【KOD -Multi & Epi-トラブルシューティング】

### (1) シングルプレックス PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		3 ステップサイクルで行う。 アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
		縮重プライマーを使用している場合、アニーリング時間を 10 sec. から 30 sec. に伸ばす。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する（特に、テンプレートに過剰の RNA 等がコンタミしていないか確認する）。	テンプレートの量を増やす。
		テンプレートの調製法を検討する。
		テンプレートを精製する。
		RNA による阻害をなくすため、cDNA サンプル量を減らす。 RNA を分解もしくは除去する。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマー濃度を 0.3 μM から 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する（特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある）。
		縮重プライマーを使用している場合はプライマー濃度を上げる。[5.(1)オプション参照]
		プライマーを再調製、再合成する。
	プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3.(1)参照]
使用酵素量を増やす。	標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
スメア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルで行っている場合、2 ステップサイクルに変更する。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマー濃度を 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する。
プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する（長めのプライマーを設計するとスメア、エキストラバンドが解消する場合がある）。[3.(1)参照]	
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	
TA クローニングできない。	専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）」を用いる（KOD -Multi & Epi® の増幅産物の末端は平滑化されている）。

## (2) マルチプレックス PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		3 ステップサイクルで行う。
		3 ステップサイクルでアニーリング温度を下げ、Tm から Tm-5°C の間で検討する。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する（特に、テンプレートに過剰の RNA 等がコンタミしていないか確認する）。	テンプレートの量を増やす。
		テンプレートの調製法を検討する。
		テンプレートを精製する。
		RNA による阻害をなくすため、cDNA サンプル量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	RNA を分解もしくは除去する。
		プライマーを再調製、再合成する。
使用酵素量を増やす。	プライマーを再設計する。[3. (2) 参照]	
標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。		
各ターゲットの増幅が不均一である。	サイクル条件を変更する。	アニーリング温度を下げ、Tm から Tm-5°C の間で検討する。
	使用しているプライマーの量、品質を変更する。	他のターゲットと比較し増幅効率の低いターゲットに対してプライマー濃度を高める。または、増幅効率の高いターゲットに対してプライマー濃度を下げる。
	プライマー配列を変更する。	使用するプライマーの Tm をなるべく揃えるようにする。
スミア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルで行っている場合、2 ステップサイクルに変更する。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマー濃度を 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する。
プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (2) 参照]	
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	

## (3) バイサルファイト処理 DNA を用いる PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する。	テンプレートの量を増やす(1 kb 以上のターゲットではより多くのテンプレートを必要とする)。
		バイサルファイト処理を行うキットを変更する。
		再度バイサルファイト処理した鋳型 DNA を調製する。
		使用しているプライマーの量、品質を確認する。
プライマーの配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (3) 参照]	
使用酵素量を増やす。	標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
スミア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	アニーリング温度を上げて Tm から Tm+5°C の間で検討する。
		サイクル数を 40 サイクルから 30~35 サイクル程度に減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマー濃度を 0.1 μM (終濃度) まで段階的に減らして検討する。
	プライマーの配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (3) 参照]
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	
変換効率が低い。	変換効率を確認する。	人工的にメチル化された DNA をポジティブコントロールとしてバイサルファイト処理に使用して確認する。
TA クローニングできない。	専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TArget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いる (KOD -Multi & Epi® の増幅産物の末端は平滑化されている)。