

【KOD Long PCR Master Mix トラブルシューティング】

問題	対策	具体例・目安
増幅産物が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 10~30 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アニーリング温度を $T_m-7\sim T_m-10^{\circ}\text{C}$ に下げる。
	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。
		阻害物質の影響を減らすため、テンプレート量を減らす。
		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 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。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマーを再設計する。
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、アニーリング温度を上げる。もしくは 2 ステップサイクルに変更する。
		2 ステップサイクルで行っている場合、伸長温度を 72°C にする。もしくはステップダウンのサイクルで行う。
		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。
		プライマーを再設計する（長めのプライマーを設計するとスミア、エキストラバンドが解消する場合がある）。
TA クローニングができない。	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 Long PCR Master Mix の増幅産物の末端は平滑化されています。）