

# 【KOD FLEX 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。[p4 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]	
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）。[p2 参照]
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（本製品の増幅産物の末端は平滑化されている）。