

【KOD -Plus- Mutagenesis Kit トラブルシューティング】

トラブル	考えられる原因	コメント
コロニーが得られない、少ない。	Inverse PCR がうまくいっていない。	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
	目的とする断片の増幅量が少ない	Inverse PCR のサイクル数を増やしてください。
	コンピテントセルの形質転換効率が低い。	10 ⁸ cfu/μg-pBR322 以上の形質転換効率を持ったコンピテントセルをご使用ください。
コロニーがプレート一面に出る。 (予想よりコロニー数が多い。)	鑄型 Plasmid がメチル化されていない。	<i>In vitro</i> にて dam methylase 処理を行うか、あるいは、dam プラス株にて鑄型 Plasmid を調製し直してください。(詳細は[4](1)をご参照ください。)
	寒天培地プレートの抗生物質量が不足している	適切な抗生物質を含む寒天培地プレートを再調製してください(アンピシリンを含むプレートは4°Cで約1ヶ月保存できます)。
目的の変異体を得られない。 (短いサイズの Plasmid しか取得できない。)	Inverse PCR がうまくいっていない。(ミスプライミングにより短い PCR 断片が生じている)	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
目的の変異体を得られない。 (変異の入っていない Plasmid しかとれない。)	Inverse PCR がうまくいっていない。	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
	鑄型 Plasmid がメチル化されていない。	<i>In vitro</i> にて dam methylase 処理を行うか、あるいは、dam プラス株にて鑄型 Plasmid を調製し直してください。(詳細は[4](1)をご参照ください。)
コントロール反応において、ほとんどの、あるいは全部のコロニーが白コロニーになる。	IPTG、X-gal が低濃度で青/白コロニーの判定ができていない。	LB/アンピシリン(カナマイシン)/IPTG/X-gal プレートの性能をご確認ください。また、アンピシリン(カナマイシン)、IPTG、X-gal の使用濃度を確認してください。
	青白判定ができない大腸菌を使用している。	DH5 α、JM109 などの青白判定が可能なコンピテントセルを使用してください。