

## 【TArget Clone™/TArget Clone™ -Plus- 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                              | コンピテントセルの能力が不足している         | ・ $10^8$ cfu/ $\mu$ g-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。  |
|   | プレートの抗生物質濃度が高すぎる           | ・プレートに終濃度50–100 $\mu$ g/mLのアンピシリンを入れてください。   |
| コロニーがプレート一面に出る                          | プレートの抗生物質量が不足している          | ・プレートに50–100 $\mu$ g/mLのアンピシリンを入れてください(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)。  |
| 白コロニーがほとんど得られない<br>あるいは<br>白コロニーがかなり少ない | PCR産物中に3'-dA-overhangsが少ない | <ul style="list-style-type: none"> <li>・Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼをご使用の際は、3'-dA付加活性があることをご確認ください。</li> <li>・Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼをご使用の際も、PCR産物の3'-dA-overhangsを確実に起こすためにPCRの最後のステップで72°C、5-10分の伸長反応を追加してください。</li> <li>・3'-dA-overhangsは不安定なので、PCR産物はPCR後すぐに使用するか-20°Cで保存し、室温での放置は避けてください。</li> <li>・10x A-attachment MixによるdA付加反応は、KODシリーズで増幅されたPCR産物のみに対応しています。その他のPCR酵素で増幅されたPCR産物に対してdA付加反応を行う場合には、あらかじめ、PCR産物を精製してからdA付加反応を実施してください(p.4参照)。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR &amp; Gel Clean up-”をお薦めします。</li> </ul> |
|   | ベクターのdT突出末端が分解している         | ・pTA2 Vectorの室温での放置や凍結融解は、できるだけ避けてください。  |
|   | ライゲーション反応の時間が短い            | ・ライゲーション反応時間を30分以上2時間まで延ばしてください。または、4°Cで一晩(12~18時間程度)反応を行ってください。   |
|   | 反応温度が高すぎる                  | ・反応温度は25°C以下で行ってください。25°Cを超えると白コロニーの取得効率が低下します。  |

|   |  |   |
|---|--|---|
| 白コロニーがほとんど得られない<br>あるいは<br>白コロニーがかなり少ない | 挿入DNAの濃度が低い                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>・挿入DNAの濃縮を行なってください。</li> <li>・ベクター使用量を1/2～1/5に調節してライゲーション反応を行ってください。</li> </ul>  |
|   | PCR産物量が不足している                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR産物の濃度、純度、サイズ、DNA配列等により至適な液量は変わりますが、モル比として、pTA2 : PCR産物 = 1 : 3 以上になるようにしてください。</li> </ul>  |
|   | PCR産物に含まれるきょう雑物の持込みにより、TAライゲーション反応が阻害されている | <ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR産物の精製を行ってください。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR &amp; Gel Clean up-”をお勧めします。</li> </ul>  |
|   | PCR産物へのUVの過照射によりピリミジンダイマーが形成している           | <ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR産物をゲルから切出す時にはUVの過照射にご注意ください。PCR産物の確認は長波長のUV光源を用いることをお勧めします。</li> </ul>   |
|   | PCR産物が挿入されてもlacZが発現している                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>・薄い青コロニーをチェックすることにより組換え体が得られることがあります。</li> </ul>   |
| ほとんど或は全部が白コロニー                          | IPTG、X-gal が低濃度で青/白コロニーの判定ができていない          | <ul style="list-style-type: none"> <li>・LB/アンピシリン/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、IPTG、X-galの使用濃度を再確認してください。</li> </ul>   |
| 白コロニーを拾っても、目的の長さの断片が挿入されていない            | 目的とする断片の増幅量が少ない                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ライゲーションに使用するPCR産物の液量を増やしてください。本製品は最大3μLのPCR産物を使用することができます。</li> <li>・目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR条件を検討してください。</li> </ul>   |
|   | PCR産物にプライマーダイマーが多く含まれている                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR産物の精製を行ってください。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR &amp; Gel Clean up-”をお勧めします。本キットは、プライマーダイマーなどの短鎖DNA(およそ50bp以下)の除去に有効です。</li> <li>・コロニーダイレクトPCRを利用して、目的の長さの断片が含まれるコロニーを選別してください。</li> </ul> |