

PCR がかからない！ トラブルシューティング

< プライマー配列のチェック >

配列自体

- ・回文構造の多い部位に設計していませんか。
- ・配列は鋳型と一致しますか。
- ・プライマー配列(特に RV プライマー)の向き(5' 3')はありますか。
- ・塩基数は適切ですか、18~30mer が適切とされています。
- ・GC 含量が高い場合には反応が進みにくい場合があります。GC 含量は 40%~60%が適切です。
- ・T_m 値は適切ですか、増幅産物の T_m 値にもよりますが、55 ~65 が適切とされています。
(T_m 値は次の式で概算できます。 $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$)
(詳細には弊社 HP をご参考ください：http://www.hssnet.co.jp/2/2_1_1_5.html#3)
- ・プライマーペアの T_m 値は離れすぎていませんか。

目的の鋳型とのアニール部分の長さは充分ですか

- ・短すぎる場合(目安:18mer 未満)、目的の配列にアニールできないことがあります。

3'末端の安定性

- ・鋳型 DNA とのアニールの安定性を高めるため、プライマーの 3'末端は G(グアニン)あるいは C(シトシン)であることが望ましいといわれています。

プライマー自身、あるいはプライマーペアはダイマーを形成しませんか

- ・PCR に用いるプライマーに相補的配列が多い場合(目安:3base 以上)プライマー同士が安定な二本鎖(プライマーダイマー)を形成し、その部分だけが PCR で増幅され、目的の DNA 断片が得られない場合があります。

プライマー自身がヘアピンループを形成しませんか

- ・プライマー内(特に 3'末端付近)に相補的配列が多い場合(目安 2base 以上)そのプライマーは PCR 反応に関与できない可能性があります。

< PCR 反応条件のチェック >

変性温度・時間は適切ですか

- ・鋳型を充分に変性させられる条件ですか。
(目安:初回は 95℃, 5分程度、サイクル中は 95℃, 30秒程度)
- ・ホットスタート酵素をお使いの場合、酵素活性化の時間は十分ですか。
(酵素の説明書をご確認ください。)

アニール温度は適切ですか

- ・アニール温度は通常、プライマーの T_m 値 - 5℃ に設定しますが、増幅が見られない場合、アニール温度の設定を変えることで、反応が改善される場合があります。

伸長温度・時間は適切ですか

- ・伸長温度は各酵素の説明書に従い、適温にて行ってください。

また、伸長時間は目的配列の長さに合わせて調節してください。

例：弊社 LaboPass G-Taq の場合、1Kb/30sec

サイクル数は適切ですか

- ・通常 25-35 サイクル程度で行います。
- ・サイクル数が少ないと目的配列の増幅が確認できない場合があります。

< PCR に用いる試薬、反応液状態のチェック >

試薬購入後、期間が経過した場合や、保存条件が適切でない場合には、どの試薬も十分に機能を発揮しない場合があります。
また、試薬の入れ忘れがあれば反応は進みません。

水

- ・PCR に適したもの（例：ヌクレアーゼフリーウォーターなど）をお使いですか。
研究室で汎用している場合、コンタミネーションはありませんか。

反応バッファー

- ・酵素に添付のバッファーをお使いですか。また、量は適切ですか。
（酵素の説明書通りの希釈をしていますか）

ポリメラーゼ

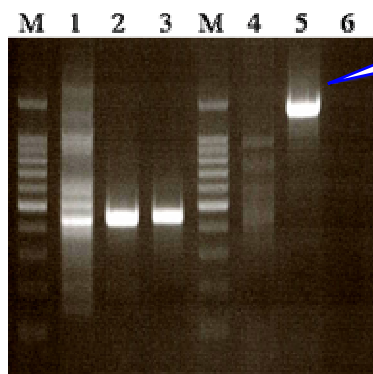
- ・失活していませんか。（室温で長時間放置すると失活することがあります）
長鎖の場合、酵素の種類によっては増幅できないことがあります。
酵素の特性をご確認の上、ご利用なされていますか。
変異導入などでは、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性がある酵素を利用した場合、プライマーが分解され、変異が導入されないことがあります。

dNTP

- ・dNTP 量は適切ですか。

鋳型 DNA

- ・精製度は充分ですか、夾雑物が多いと反応を阻害します。
- ・鋳型量は酵素の説明書に従ってください。少なすぎても多すぎても反応がうまくいかない原因となります。
- ・ゲノムや GC リッチな配列などの場合は、変性剤を用いると反応が向上する場合があります。
例)弊社 LaboPass G-Taq の場合、Tuning Buffer
製品情報：http://www.hssnet.co.jp/2/2_7_9.html#2



CG リッチテンプレートに
効果的！

M : 100bp Ladder Marker
1 : Tuning Buffer なし(GC70%)
2 : 1×Tuning Buffer (GC70%)
3 : 2×Tuning Buffer (GC70%)
4 : Tuning Buffer なし(GC68%)
5 : 1×Tuning Buffer (GC68%)
6 : 2×Tuning Buffer (GC68%)

Template : Human Genomic DNA TGF 1

また TE バッファーで溶解している場合には鋳型 DNA が多すぎると反応液中の Mg²⁺濃度が下がり、反応しにくくなる場合があります。

FW/RV プライマー

- ・凍結・融解を繰り返し、分解してはいませんか。
プライマー量は適切ですか。酵素の説明書をご確認ください。

その他お問い合わせ等ございましたら下記ご連絡先までお願いいたします。

バイオ製造チーム

TEL : 0120-613-190 (代表)

E-mail : bio@hssnet.co.jp
