



Cold fusion cloning kit trouble shooting

문제점	보편적 원인	해결방법
1. Transformation 후 colony 수가 적거나 없는 경우.	Primer sequence가 맞지 않는 경우	Insertion 부위의 vector와 homologous 한 시퀀스 15bp를 primer의 부위와 맞는지 한번더 확인한다.
	PCR product의 문제점.	최적의 PCR조건을 확립하여, 순수한 PCR product를 얻으려 노력해야 하고, Gel purification 순도를 높여야 한다.
	낮은 Insert DNA 농도.	Kit manual에 나와있는 권장 농도에 맞게 insert DNA 및 vector를 준비한다.
	너무 많은 양의 reaction mixture를 com-cell에 transformation 하였을 때.	Com-cell 50ul에 reaction mixture 10ul 이상을 넣지 않는다. 많은 양의 reaction mixture는 transformation을 저해함.
	낮은 품질, 잘못된 방법으로 com-cell을 사용했을 경우.	Com-cell은 부드럽게 다루며, 한번 녹여 사용한 com-cell은 다시 동결시키지 않는다. Com-cell의 문제를 확인하려면, circular plasmid를 cell에 transformation하여 colony 수가 1×10^9 cfu/ug 이상이 되면 com-cell의 효율에 문제가 있는 것은 아님.



Cold fusion cloning kit trouble shooting

문제점	보편적 원인	해결방법
2. Colony형성은 되나 insert 삽입이 안 되는 경우.	Vector의 형태가 완벽한 linear상태가 아닐 경우.	Linear form으로 안 된 vector를 제거 하는 것이 가장 중요함. Enzyme을 처리하여 vector를 얻었으면 재 처리를 해 보고, PCR로 얻었으면 재 PCR을 하여 gel purify를 진행-순도 높은 product를 얻는다.