

مشکل	دلیل	راه حل
۱: محصول وجود ندارد	یک یا تعداد بیشتری از مواد فراموش شده یا معیوبند	هنگام کار یک لیست تهیه نمایید برای اطمینان از وارد کردن همه مواد، غلظت همه واکنشگرها کنترل شود، اگر از یک مخلوط اولیه برای جلوگیری از چند بار پیپت کردن استفاده شود بهتر است، همیشه یک کنترل مثبت برای نشان دادن کارایی عمل واکنش گرها استفاده شود.
۲: محصول وجود ندارد	کم بودن تعداد چرخه ها	تعداد چرخه ها را افزایش دهید به ازای هر ۵ چرخه در یک واکنش ۴۰ چرخه ای (۲۵، ۳۰ و ۳۵) از محصول نمونه برداری نمایید (۱). حجم اولیه مثلا ۵ میکرو از حجم ۵۰ میکرو ( تا تعداد مناسب چرخه ها مشخص گردد.
۳: محصول وجود ندارد	طراحی ضعیف پرایمر	مجدداً به طراحی پرایمر نگاه کنید و توالی DNA را کنترل نمایید، اگر مقدر باشد عملکرد پرایمر را در یک واکنش توالی یابی DNA آزمایش نمایید تا مطمئن شوید به صورت منفرد به محل مورد نظر متصل میشوند. سپس پرایمر های طولانی تری بسازید و مطمئن شوید که انتهای ۳' آنها کاملاً با الگو هم خوانی دارد
۴: محصول وجود ندارد	کیفیت و مقدار الگو	مقدار بسیار کم الگو یا الگوی آلوده با مهار کننده ها یا کیفیت ضعیف آن (نگه داری طولانی مدت در محیط محلول) موجب از دست رفتن محصول میشود. انسجام الگو را با الکتروفورز روی ژل آگاروز کنترل نمایید. رقت های سریالی از یک الگوی تازه، شامل غلظت های بالاتر یا پائین تر از آن را بسازید، غلظت های بالاتر برای موارد رقیق و غلظت های پائین تر برای رقیق سازی مواد مهارکننده مفید است. به صورت جایگزین یک نمونه تازه از DNA الگو تهیه نمایید

<p>به وسیله یک ترموکوپل ارزان قیمت، ترموسایکلر را از لحاظ رسیدن به دماهی مورد نیاز چک نمائید تا دمای لوله ها و چرخه ها صحیح باشد.</p>	<p>عملکرد نامناسب ترموسایکلر</p>	<p>۵: محصول وجود ندارد</p>
<p>گرماگذاری ۹۵ به مدت ۵ دقیقه برای دناتوره کردن الگو کافی میباشد، ممکن است افزودن ترکیباتی که به دناتوره شدن کمک مینمایند و موجب ناپایداری DNA دو رشته ای میشوند برای الگوهای بسیار غنی از GC ضروری باشند. <b>*****A</b></p>	<p>دناتوره شدن نا کارآمد یا الگوی های سرسخت</p>	<p>۶: محصول وجود ندارد</p>
<p>به عنوان یک قاعده کلی یک دقیقه برای هر کیلو باز استفاده میشود. اگر محصولی مشاهده نشد زمان را در اندازه های ۱ دقیقه افزایش دهید</p>	<p>زمان بسیار کوتاه طویل شدن</p>	<p>۷: محصول وجود ندارد</p>
<p>این موضوع باید از روی کنترل مثبت مشخص گردد. معمولا ۱ یا ۲ واحد آنزیم برای اغلب کارها کافی است اگر آنزیم کهنه شده یا نگهداری آن نامناسب باشد ممکن است غیر بهینه شود. یک نمونه یا سری دیگر از آنزیم را آزمایش نمائید. یه ندرت ممکن است که افزودن واحد های بیشتر مفید باشد اما موجب افزایش پس زمینه نیز میشود.</p>	<p>مشکل آنزیم</p>	<p>۸: محصول وجود ندارد</p>
<p>اگر از بافر ۱۰X تامین شده توسط سازنده آنزیم استفاده شود این مشکل وجود نخواهد داشت، در غیر این صورت یک سری بافر دیگر را آزمایش نمائید. اگر غلظت یون منیزیم افزوده شده نادرست باشد، روی بازده محصول اثر میگذارد. به خاطر داشته باشید که بافر بسیاری از شرکت ها بدون منیزیم تولید میشوند، بنابر این کنترل کنید که مقدار صحیحی از منیزیم استفاده شود تا معنولا غلظت نهائی ۱/۵ میلی مولار (عموما بین ۱-۵ میلی مولار) بدست آید.</p>	<p>اجزا بافر</p>	<p>۹: محصول وجود ندارد</p>

<p>محلول های خالص خیلی خوب عمل میکنند و dNTP های وکنش خیلی زیادتر از نیاز هستند. بنابراین حتی در غلظت های کمتر نیز وجود برخی محصولات انتظار میرود. غلظت را کنترل نمائید و مطمئن شوید که کنترل مثبت، محصول دارد یک نمونه جدید یا سری جدید از dNTP ها را آزمایش نمائید.</p>	<p>دزوکسی نوکلئوتیدها</p>	<p>۱۰: محصول وجود ندارد</p>
<p>از روش داغ استفاده کنید، و دمای جفت شدن را در مراحل، ۲ درجه ای افزایش دهید. به کار بردن ترموسایکلر گرا دیان توصیه میشود. به صورت جایگزین از روش touchdown استفاده کنید.</p>	<p>دمای پائین جفت شدن</p>	<p>۱۱: چندین محصول تولید شده است</p>
<p>تعداد چرخه های بکار رفته را کاهش دهید. به ازای هر ۵ چرخه در یک واکنش ۴۰ چرخه ای (در چرخه های ۲۵، ۳۰ و ۳۵) از محصول نمونه برداری نمائید (۱/ حجم، برای مثال ۵ul از ۵۰ul) ته تعداد مناسب چرخه ها پیدا شود</p>	<p>تعداد چرخه های بسیار زیاد</p>	<p>۱۲: چندین محصول تولید شده است</p>
<p>مجدداً به طراحی پرایمرها توجه نمائید و اطلاعات توالی را کنترل نمائید. اگر مقدور باشد عملکرد پرایمر را در واکنش توالی یابی دستی یا چرخه ای آزمایش کنید. مجدداً و با دقت زیاد پرایمر های طولانی تری بسازید و مطمئن شوید که انتهای ۳ آنها کاملاً با الگو همخوانی دارد.</p>	<p>طراحی ضعیف پرایمر</p>	<p>۱۳: چندین محصول تولید شده است</p>
<p>زمان طویل شدن را به ازای هر دقیقه، ۳۰ ثانیه کم کنید.</p>	<p>زمان طویل شدن خیلی زیاد است</p>	<p>۱۴: اسمیر تولید شده است</p>
<p>تعداد چرخه ها را در مراحل ۵ تایی کم کنید یا از روش نمونه برداری که در بالا توضیح داده شده است استفاده نمائید</p>	<p>تعداد بسیار زیاد چرخه ها</p>	<p>۱۵: اسمیر تولید شده است</p>

۱۶: اسمیر تولید شده است	دمای دناتوره	به وسیله یک ترموکوپل، ترمم سایکلر را از نظر رسیدن به دمای دناتوره کردن کنترل نمائید و اگر لازم باشد دمای دناتوره کردن را در مقادیر ۱C افزایش دهید.
۱۷: اسمیر تولید شده است	پلیمرز خیلی زیاد	مقدار مصرف را کاهش دهید
۱۸: اسمیر تولید شده است	الگوی خیلی فراوان	به صورت ایده آل با ساخت رقت های سریالی، مقدار الگوی اضافه شده را کاهش دهید.
۱۹: باند ضعیف محصول	کیفیت یا مقدار الگو	مقدار بسیار اندک الگو یا آلودگی با مهارکننده ها. یک نمونه تازه از DNA الگو را رقیق نمائید و یکسری غلظت از آن بسازید که شامل غلظت های بالاتر و پائین تر شود. غلظت بالاتر برای مواردی است که مقدار الگو بسیار پائین بوده است. و غلظت پائین تر به منظور رقیق ساختن هر گونه مواد مهارکننده میباشد.
۲۰: باند ضعیف محصول	ناکافی بودن تعداد چرخه ها	تعداد چرخه ها را افزایش دهید. به ازای هر ۵ چرخه در یک واکنش ۴۰ چرخه ای (در چرخه های ۲۵، ۳۰ و ۳۵) از محصول نمونه برداری نمائید. (۱). حجم، برای مثال ۵ul از ۵۰ul تا تعداد مناسب چرخه هامشخص گردد.
۲۱: باند ضعیف محصول	زمان طویل شدن خیلی کم	به عنوان یک قانون یک دقیقه برای ۱kb هدف. اگر محصول مشاهده نمیشود زمان را در اندازه های ۱ دقیقه ای افزایش دهید
۲۲: باند ضعیف محصول	افزودنی مورد نیاز است	ترکیبات کمک کننده به PCR بیفزائید.

غلظت یون منیزیم: غلظت یون منیزیم باید بین ۵/ تا ۵ میلی مولار باشد (معمولا با فواصل ۵/ یا ۱ میلی مولاری) تغییر نماید. اغلب یک غلظت خاص، بهبود معنی داری در الگوی محصول PCR نشان خواهد داد. به خاطر داشته باشید که اگر بخواهید غلظت dNTP ها را در واکنش تغییر دهید باید غلظت یون منیزیم را نیز تغییر دهید. اگر غلظت یون منیزیم خیلی کم باشد احتمالا بازده بسیار پائین خواهد بود. در حالی که غلظت اضافی یون منیزیم موجب کاهش صحت عملکرد DNA پلیمرز و تکثیر محصولات غیر اختصاصی میشود.