

شرایط نگهداری و ذخیره سازی:

۱. در دمای -۲۰°C بمدت یک سال نگهداری شود.
۲. در دمای ۴°C بمدت یک هفته نگهداری شود.
۳. در تاریکی نگهداری شود.
۴. مخلوط واکنش را به اندازه حجم‌های مصرفی برای هر بار استفاده تقسیم‌بندی کنید تا از Freeze/Thaw جلوگیری شود.
۵. ذوب شدن مخلوط روی یخ صورت بگیرد در غیر این صورت باعث کاهش راندمان میشود.

مواد و دستگاه مورد نیاز:

۱. پرایمرها
۲. DNA الگو
۳. پیپتور فاقد نوکلئاز
۴. سرسمپل استریل و فاقد نوکلئاز
۵. دستگاه ترموسایکلر

مقادیر:

طبق جدول زیر تمامی موارد زیر را به آرامی باهم میکس و پیپت کنید.
بمنظور عدم ایجاد حباب به هیچ وجه ورتکس نکنید (حباب در عملکرد واکنش PCR اختلال ایجاد میکند).

جدول ۱: مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR

محتویات	حجم	غلظت نهایی
مخلوط واکنش Master Mix (2X)	۱۰ μl	
هر پرایمر فوروارد ۱۰ μM	0.6 - 1.2	200-400 nM
هر پرایمر ریورس ۱۰ μM	0.6 - 1.2	200-400 nM
الگو	۵ μl	
آب فاقد نوکلئاز	تا ۲۰ μl	
حجم کل	۲۰ μl	

آب مقطر باید فاقد RNase و DNase باشد درغیراینصورت باعث آلودگی می‌شود.

پروتکل:

حجم کلی این واکنش PCR ۲۰ μl است.

۱. ابتدا بگذارید تمامی محتویات داخل ویال به آرامی ذوب شود (مخلوط را در دمای بالا ذوب نکنید).
۲. مخلوط پروب را بمدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس کنید.
۳. مخلوط واکنش را با پرایمرها و آب فاقد نوکلئاز طبق جدول بالا مخلوط کنید.
۴. حجم مناسب مخلوط آماده را به تیوب‌ها یا پلیت PCR اضافه کنید.
۵. DNA الگو (یا آب برای NTC) را به تیوب‌ها اضافه کنید.

عنوان محصول: مخلوط واکنش

Super PCR Master Mix with Red dye

حجم محلول: ۱ میلی لیتر

رنگ محلول: قرمز

معرفی محصول:

مخلوط واکنش قرمز رنگ ۲x Super PCR Master Mix with Red dye حاوی بافر بهینه شده، dNTPs، منیزیم کلراید (۲mM)، پایدارکننده‌ها و رنگ قرمز PCR می‌باشد. یکی دیگر از محتویات حیاتی این مخلوط واکنش آنزیم Hot start DNA Polymerase می‌باشد که جهت جلوگیری از واکنش غیراختصاصی و افزایش کارایی و حساسیت و با تکرارپذیری بالا تغییر یافته است. این مخلوط واکنش به جهت داشتن GC Enhancer قادر به تکثیر و گسترش ژن‌های با درصد بالای GC می‌باشد. میزان سایز تکثیر ۲۰۰۰ جفت باز در هر دقیقه است و طول قطعه قابل تکثیر ۴۰۰۰ جفت باز می‌باشد. این مخلوط واکنش از اختصاصیت و قابلیت تکرارپذیری بالایی برخوردار می‌باشد. این مخلوط واکنش تمام مواد مورد نیاز برای واکنش ریل تایم بجز پرایمر و الگو را دارا می‌باشد.

از جمله ویژگی‌های این محصول می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بدلیل استفاده از آنزیم Hot Start اتصال پرایمرها بصورت کاملاً اختصاصی صورت می‌گیرد.
۲. در حین استفاده از این مخلوط واکنش هیچ گونه محصول غیراختصاصی در اثر اتصال غیراختصاصی تولید نخواهد شد.
۳. آنزیم بکار رفته در این مخلوط واکنش دارای پایداری بسیار بالا در مقایسه با سایر محصولات مشابه می‌باشد.
۴. این مخلوط واکنش بصورت Ready to use دارای رنگ قرمز اسپایک شده حاوی تمامی موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش (بجز پرایمرها و الگو) در یک ویال می‌باشد، تا با کم شدن مراحل حجم برداری از بروز آلودگی احتمالی جلوگیری کند.
۵. در یک واکنش قادر به تشخیص و تکثیر همزمان ۲ تا ۳ ژن با سایز مختلف می‌باشد.
۶. سایز آمپلیکون قابل قبول در این آزمایش باید بین ۱۰۰ تا ۴۰۰۰ bp باشد.

۶. در تیوب‌ها را ببندید و بمدت کوتاهی سانتریفیوژ کنید تا محتویات تیوب‌ها به انتهای آن بیایند.

جدول ۲: برنامه دمایی

مرحله	دما	زمان	سیکل
فعالسازی اولیه	۹۵ °C	۲-۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۴۰
انلینگ / گسترش	۵۵-۶۰ °C	۳۰-۶۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۳۰-۶۰ ثانیه	

توجه :

- ◀ دمای Annealing / Extension با توجه به دمای Tm پرایمرها و ساینز آمپلیکون متفاوت است.
- ◀ بهینه ترین دما را توسط PCR گاردایانت می‌توانید انتخاب کنید.
- ◀ زمان Annealing / Extension بهتر است برای واکنشهای چند ژن بیشتر از ۳۰ ثانیه باشد.

میکرولیتر) از واکنش را روی ژل بارگذاری کنید. بارگذاری حجمهای واکنش ناکافی ممکن است به اشتباه در صورت بازده پایین به عنوان عدم بازده تفسیر شود. بارگذاری حجمهای واکنش بیش از حد ممکن است در صورت بازده بالا باعث مشکلات اندازه‌گیری و تعیین مقدار شود.

مهارکننده‌های ناشی از الگو، پرایمرها و واکنشگرهای بی‌کیفیت می‌توانند بازده PCR را کاهش دهند. DNA الگو را خالص سازی کنید و واکنشگرهای با بالاترین کیفیت برای PCR، به ویژه dNTP ها و پرایمرها، از یک تأمین‌کننده معتبر استفاده کنید.

مقادیر ناچیزی از آلاینده‌هایی که گاهی اوقات پس از خالص‌سازی DNA باقی می‌مانند، مانند فنول، EDTA یا پروتئیناز K، می‌توانند PCR را مهار کنند. آلاینده‌ها را با رسوب اتانول از بین ببرید و رسوب DNA را با اتانول ۷۰٪ بشویید.

برای هر آزمایش، یک واکنش کنترل مثبت در نظر بگیرید تا به شناسایی منبع ناخالصی‌های بازدارنده کمک کند. برای تعیین اینکه آیا یک الگوی مشکوک، PCR را مهار می‌کند یا خیر، الگو و پرایمرهایی را اضافه کنید که برای یک واکنش جدید مؤثر شناخته شده‌اند. نتیجه را با واکنش کنترلی که حاوی الگوی مشکوک نیست مقایسه کنید. از کنترل‌های مشابه می‌توان برای آزمایش پرایمرها و سایر معرف ها برای مهار PCR استفاده کرد.

در صورت امکان، از نرم‌افزار اختصاصی برای طراحی پرایمر استفاده کنید. نرم‌افزار به شما کمک می‌کند تا از خود-مکمل سازی پرایمر، مکمل‌سازی‌های چندگانه الگو-پرایمر و تکرارهای مستقیم در پرایمر جلوگیری کنید تا از تشکیل سنجاق سر و پرایمر-دایمر جلوگیری شود. مکمل سازی در انتهای ۳' باعث تشکیل پرایمر-دایمر می‌شود و یکی از رایج‌ترین مشکلات PCR است.

پرایمرهایی به طول ۲۵ تا ۳۵ نوکلئوتید طراحی کنید. در حالت ایده‌آل، از پرایمرهایی با حدود ۵۰٪ محتوای GC استفاده کنید. در صورت امکان، پرایمرهایی با یک یا دو G یا C در انتهای ۳' انتخاب کنید.

خلوص و سلامت شیمیایی پرایمرها برای نتایج خوب PCR بسیار مهم است. پرایمرها همیشه باید به مقدار اضافی در مخلوط واکنش و با غلظت‌های مساوی، معمولاً در محدوده ۰٫۱- میکرومولار تا ۱

ناخالصی‌های بازدارنده
PCR

پرایمر نامناسب یا بی
کیفیت

مشکلات	علل ایجاد	راه حل
محصول PCR وجود ندارد یا بازده بسیار پایینی دارد	عدم موفقیت در تشخیص	شرایط الکتروفورز و عملکرد رنگ مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی ژل را دوباره بررسی کنید. اگر مشکوک به مشکل تشخیص هستید، یک بار دیگر ژل را اجرا کنید، در صورت امکان محصول PCR بیشتری روی ژل قرار دهید. مطمئن شوید که ژل به درستی رنگ‌آمیزی شده و نردبان DNA به خوبی قابل مشاهده است.
		برای تعیین تقریبی کمیت محصول PCR، معمولاً از الکتروفورز استاندارد ژل آگارز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم پروماید استفاده می‌شود. با استفاده از نردبان‌های DNA مناسب و رنگ‌های بارگذاری DNA، می‌توان هم اندازه محصول PCR را تعیین کرد و هم با مقایسه شدت باند با نزدیکترین اندازه باند DNA نردبانی از کمیت شناخته شده، تقریباً کمیت DNA را تعیین کرد.
		اگر PCR با معرف‌های استاندارد که حاوی رنگ نیستند انجام می‌شود، رنگ بارگذاری DNA را قبل از بارگذاری روی ژل به واکنش‌ها اضافه کنید. برای صرفه‌جویی در زمان و تلاش، می‌توان از آنزیم‌های ویژه، بافر و فرمولاسیون‌های مخلوط اصلی که حاوی رنگ‌های بارگذاری الکتروفورز هستند، برای بارگذاری مستقیم محصولات PCR روی ژل استفاده کرد.
		هنگام انجام الکتروفورز، معمولاً توصیه می‌شود حجم‌های مختلفی (۲ تا ۱۵

میکرومولار، وجود داشته باشند. غلظت بهینه پرایمرها به صورت تجربی تعیین می‌شود. غلظت بیش از حد پرایمرها می‌تواند به دلیل افزایش پرایمینگ ناقص، اختصاصیت PCR را کاهش دهد.	
الگوی بی‌کیفیت، فراوانی کم یا الگوی پیچیده DNA ژنومی را با دقت خالص‌سازی کنید و از به اشتراک گذاشتن آن خودداری کنید. از کیت‌های خالص‌سازی طراحی‌شده برای نوع DNA الگو استفاده کنید. مقادیر بهینه DNA الگو برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر: پلاسمید یا فاز: ۰.۰۱ تا ۱ نانوگرم ژنومی: ۰.۱ تا ۱ میکروگرم مقادیر بیش از حد الگو، PCR غیر اختصاصی را افزایش می‌دهد. مقادیر ناکافی الگو، دقت را کاهش می‌دهد. برای حساسیت بالاتر، زمانی که فراوانی الگو کم است، از آنزیم‌های شروع داغ استفاده کنید. برای الگوهای پیچیده یا غنی از GC، از افزودنی‌ها و آنزیم بیشتری استفاده کنید یا از محصولات کیت برای PCR غنی از GC تولید شده‌اند، استفاده کنید.	
dNTPS با کیفیت پایین، غلظت نادرست dNTP ها برای بهترین نتایج PCR، فقط از dNTP های با بالاترین کیفیت، با خلوص ۹۹٪ استفاده کنید. خلوص dNTP به ویژه برای PCR با برد طولانی و دقت بالا مهم است. غلظت‌های نامتعادل dNTP می‌تواند منجر به کاهش دقت شود. غلظت نهایی توصیه شده برای هر dNTP، ۰.۲ تا ۰.۷۵ میلی‌مولار است. غلظت بالاتر (تا ۰.۴ میلی‌مولار) ممکن است بازده را افزایش دهد. با توجه به اتصال ۲+ Mg به dNTP ها، غلظت ۲+ Mg باید متناسب با آن تنظیم شود. غلظت بیش از حد dNTP و منیزیم، دقت PCR را کاهش می‌دهد. قبل از استفاده، هر محلول dNTP را یخ‌زدایی و مخلوط کنید. این امر به ویژه برای محلول های با غلظت بالا اهمیت دارد.	
غلظت منیزیم کمتر از حد مطلوب یون‌های منیزیم کمپلیکس‌های پرایمر-الگو را تثبیت می‌کنند. برخی از بافرهای PCR برای Taq DNA Polymerase حاوی ۲+ Mg در غلظت بهینه هستند. سایر بافرها حاوی منیزیم نیستند (Taq DNA Polymerase). نوترکیب (اما با یک ویال جداگانه از کلرید منیزیم ارائه می‌شوند که امکان تهیه غلظت‌های مختلف منیزیم را فراهم می‌کنند.	
۲+ Mg به dNTP ها، پرایمرها و الگوی DNA متصل می‌شود. اکیده توصیه می‌شود که غلظت ۲+ Mg (در محدوده ۱ تا ۴ میلی‌مولار) برای هر PCR بهینه شود. منیزیم ناکافی، بازده محصول PCR را	

کاهش می‌دهد. غلظت بیش از حد منیزیم باعث تولید محصولات PCR غیر اختصاصی و کاهش دقت PCR می‌شود.

نسبت dNTP ها و منیزیم در PCR معمولاً باید ۱:۲ باشد. وقتی غلظت dNTP افزایش می‌یابد، غلظت منیزیم نیز باید متناسباً افزایش یابد.

اگر نمونه‌های DNA حاوی EDTA یا سایر متصل شونده های فلزی باشند، غلظت یون منیزیم باید به طور متناسب افزایش یابد، زیرا یک مولکول EDTA به یک مولکول Mg^{2+} متصل می‌شود.

بسیاری از کاربردها در غلظت استاندارد ۱.۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ کار می‌کنند. با این حال، کاربردهای پیشرفته‌تر با استفاده از DNA ژنومی به غلظت‌های بالاتر $MgCl_2$ (۲ تا ۴ میلی‌مولار) نیاز دارند. غلظت منیزیم PCR را با مخلول $MgCl_2$ ارائه شده طبق جدول زیر تنظیم کنید:

Final concentration of $MgCl_2$ in a 50 μ L reaction, mM	Volume of the 50 mM $MgCl_2$ solution to add to add, μ L	Volume of the 25 mM $MgCl_2$ solution to add to add, μ L
1.5	1.5	3
1.75	1.75	3.5
2	2	4
2.5	2.5	5
4	4	8

دناوراسیون اولیه کامل DNA برای بازده خوب PCR ضروری است. معمولاً ۱ تا ۳ دقیقه دناوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد کافی است. برای الگوهای غنی از GC، ممکن است ۱۰ تا ۱۵ دقیقه زمان لازم باشد. اگر مرحله دناوراسیون اولیه بسیار طولانی انجام شود، توصیه می‌شود آنزیم را فقط پس از اتمام دناوراسیون اضافه کنید.

در طول چرخه، دناوراسیون معمولاً ۳۰ ثانیه تا ۲ دقیقه در دمای ۹۴-۹۵ درجه سانتیگراد در هر چرخه انجام می‌شود. برای الگوهای غنی از GC، این مرحله می‌تواند تا ۳-۴ دقیقه طولانی‌تر شود. به عنوان یک جایگزین، دناوراسیون DNA را می‌توان با استفاده از افزودنی‌هایی مانند گلیسرول، DMSO یا فرامید افزایش داد. هنگام استفاده از افزودنی‌ها، دمای اتصال باید تنظیم شود، زیرا دمای ذوب کمپلیکس‌های پرایمر-الگو ممکن است به طور قابل توجهی کاهش یابد.

دمای ذوب پرایمر را با استفاده از نرم‌افزار مناسب محاسبه کنید. دمای اتصال پرایمر باید ۵ درجه سانتیگراد کمتر از کمترین دمای ذوب پرایمر باشد. مدت زمان اتصال

معمولاً ۳۰ ثانیه تا ۲ دقیقه است.	محصولات	دایمرهای پرایمر،	در صورت امکان، از نرم‌افزار اختصاصی برای طراحی پرایمر استفاده کنید. نرم‌افزار به شما کمک می‌کند تا از خود-مکمل سازی پرایمر، مکمل‌سازی‌های چندگانه الگو-پرایمر و تکرارهای مستقیم در پرایمر جلوگیری کنید تا از تشکیل سنجاق سر و پرایمر-دایمر جلوگیری شود. مکمل سازی در انتهای ۳' باعث تشکیل پرایمر-دایمر می‌شود و یکی از رایج‌ترین مشکلات PCR است.
در حضور افزودنی‌ها (گلیسرول، DMSO، فراماید و بتائین)، ممکن است نیاز به تنظیم دمای Annealing باشد.	نماتخص	طراحی پرایمر معیوب	پرایمرهایی به طول ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید طراحی کنید. در حالت ایده‌آل، از پرایمرهایی با حدود ۵۰% محتوای GC استفاده کنید. در صورت امکان، پرایمرهایی با یک یا دو G یا C در انتهای ۳' انتخاب کنید.
در طول مرحله تکثیر PCR، واکنش تکثیر پرایمر معمولاً به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، دمای بهینه برای آنزیم Taq DNA Polymerase، برای محصولات PCR تا ۲ Kb انجام می‌شود.	کوتاه یا بلند		خصوص و سلامت شیمیایی پرایمرها برای نتایج خوب PCR بسیار مهم است. پرایمرها همیشه باید به مقدار اضافی در مخلوط واکنش و با غلظت‌های مساوی، معمولاً در محدوده ۰٫۱-۱ میکرومولار تا میکرومولار، وجود داشته باشند. غلظت بهینه پرایمرها به صورت تجربی تعیین می‌شود. غلظت بیش از حد پرایمرها می‌تواند به دلیل افزایش پرایمینگ ناقص، اختصاصیت PCR را کاهش دهد.
برای PCR با برد طولانی، زمان تکثیر ۱ دقیقه بر کیلوپایت افزایش می‌یابد و دمای تکثیر پایین‌تر (۶۸- درجه سانتیگراد) است تا از دست رفتن فعالیت آنزیم به حداقل برسد.		منیزیم بیش از حد	از آنزیم‌های شروع سریع (Hot Start Enzymes) برای به حداقل رساندن تشکیل دایمر پرایمر در طول آماده‌سازی واکنش در دمای اتاق استفاده کنید.
از آنجایی که Pfu کندتر از Taq DNA Polymerase است، از یک مرحله گسترش ۲ دقیقه‌ای به ازای هر کیلوپایت در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد استفاده می‌شود.			غلظت بیش از حد منیزیم باعث تولید محصولات PCR غیر اختصاصی و کاهش دقت PCR می‌شود.
مرحله نهایی تکثیر معمولاً طولانی‌تر است تا از تکمیل محصولات PCR اطمینان حاصل شود. این مرحله نهایی، که معمولاً ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد طول می‌کشد، به ویژه زمانی اهمیت دارد که محصول PCR در بافل T کلون شود.			برخی از بافرهای PCR برای Taq DNA Polymerase حاوی ۲+ Mg در غلظت بهینه هستند. منیزیم بیشتری به چنین بافرهایی اضافه نکنید.
تعداد بهینه چرخه‌ها باید با توجه به کمیت و پیچیدگی الگو و طول قطعه تکثیر شده تعیین شود. به طور معمول، ۲۵ تا ۳۰ چرخه برای بازده خوب کافی است.			بافرهای دیگر حاوی منیزیم نیستند (Taq DNA Polymerase) اما یک ویال جداگانه از کلرید منیزیم دارند که امکان تهیه غلظت‌های مختلف منیزیم را فراهم می‌کند.
تعداد ناکافی چرخه‌ها ممکن است منجر به عملکرد ضعیف شود.			تأکید توصیه می‌شود که غلظت ۲+ Mg (در محدوده ۱ تا ۴ میلی‌مولار) برای هر PCR بهینه شود.
چرخه‌های زیاد می‌توانند باعث ایجاد پس‌زمینه بالا شوند.			بسیاری از کاربردها در غلظت استاندارد ۱٫۵ میلی‌مولار MgCl۲ کار می‌کنند. با این حال، کاربردهای پیشرفته با استفاده از DNA ژنومی به غلظت‌های بالاتر (۲-۳ تا ۴ میلی‌مولار) نیاز دارند.
زمانی که تعداد template کم است، مثلاً ۱۰ کپی، ۴۰ چرخه پیشنهاد می‌شود.			غلظت منیزیم PCR با محلول MgCl۲ ارائه شده مطابق آنچه در بالا در این جدول توضیح داده شده است، تنظیم کنید.
راه‌نمای انتخاب تکنیک PCR نقطه پایانی برای کاربردهای مرتبط با کلونینگ و راه‌نما و مرور کلی کاربرد PCR استاندارد			
راه‌نمای انتخاب محصول و مروری بر کاربرد PCR در حالت شروع داغ			
راه‌نمای انتخاب محصول و مروری بر کاربرد PCR با وفاداری بالا، طولانی و غنی از GC			
راه‌نمای انتخاب محصول و مروری بر کاربرد رونویسی معکوس و RT PCR			
چرخه‌های PCR ناکافی			
محصولات نادرست			
مورد استفاده برای			
یک محصول			
بهینه برای رفع نیازهای PCR خود انتخاب کنید.			
برای انتخاب محصول مناسب، راه‌نمای انتخاب محصول را			
دنبال کنید:			

الگوی بیش از حد	مقادیر بهینه DNA الگو در حجم واکنش ۵۵ میکرولیتر عبارتند از: در محدوده ۰.۰۱-۱ نانوگرم برای DNA پلاسمید یا فاژ در محدوده ۰.۱-۱ میکروگرم برای DNA ژنومی مقدار مناسب الگو را برای هر واکنش به صورت تجربی انتخاب کنید. مقادیر خیلی زیاد الگو، PCR غیر اختصاصی را افزایش می‌دهد، مقادیر خیلی کم الگو، دقت را کاهش می‌دهد.
واکنش در دمای اتاق، تنظیم شد	واکنش PCR را روی یخ انجام دهید، تمام معرف‌ها را روی یخ نگه دارید. برای تنظیم دمای اتاق، فقط از آنزیم‌های شروع داغ (Hot Start Enzymes) استفاده کنید. پلیمرازهای گرمادوست در دمای اتاق فعال هستند که منجر به تکثیر اهداف نامشخص به دلیل اتصال تصادفی پرایمر می‌شود. آنزیم‌های شروع داغ در طول تنظیم واکنش در دمای اتاق کاملاً غیرفعال هستند و تنها پس از گرم شدن فعال می‌شوند. بنابراین، تکثیر بدون پرایمر و تشکیل پرایمر-دایمر رخ نمی‌دهد و پس زمینه PCR را کاهش می‌دهد.
شرایط Annealing زیر بهینه	دمای اتصال پرایمر باید ۵ درجه سانتیگراد کمتر از پایین‌ترین دمای ذوب پرایمر (Tm) باشد. زمان اتصال ۳۰ ثانیه تا ۲ دقیقه است. دمای اتصال خیلی پایین منجر به تولید زیاد پس زمینه می‌شود و دمای خیلی بالا ممکن است منجر به عدم تولید محصول در PCR شود.
نوار پخش شده و آغشته به ژل	شرایط الکتروفورز و عملکرد رنگ مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی ژل را دوباره بررسی کنید. ممکن است آلودگی نوکلئاز در بافر الکتروفورز یا رنگ‌آمیزی وجود داشته باشد. اگر مشکوک هستید که این می‌تواند مشکل تشخیص باشد، یک بار دیگر ژل را اجرا کنید، در صورت امکان محصول PCR بیشتری را روی ژل قرار دهید. مطمئن شوید که ژل به درستی رنگ‌آمیزی شده و نردبان DNA به خوبی قابل مشاهده است.
	هنگام انجام الکتروفورز، معمولاً توصیه می‌شود حجم‌های مختلفی (۲ تا ۱۰ میکرولیتر) از واکنش را روی ژل بارگذاری کنید. بارگذاری حجم‌های واکنش ناکافی ممکن است به اشتباه در صورت بازده پایین به عنوان عدم بازده تفسیر شود.
	بارگذاری حجم‌های واکنش بیش از حد ممکن است در صورت بازده بالا باعث مشکلات اندازه‌گیری و تعیین مقدار شود.

الگوی ناخالص و تخریب شده	DNA ژنومی را با دقت خالص‌سازی کنید و از به اشتراک گذاشتن آن خودداری کنید. ناکت‌های خالص‌سازی طراحی‌شده برای نوع DNA الگو استفاده کنید. مقادیر بهینه DNA الگو برای حجم واکنش ۵۵ میکرولیتر: پلاسمید یا فاژ: ۰.۰۱ تا ۱ نانوگرم ژنومی: ۰.۱ تا ۱ میکروگرم مقادیر بیش از حد الگو، PCR غیر اختصاصی را افزایش می‌دهد. مقادیر ناکافی الگو، دقت را کاهش می‌دهد.
اختصاصیت پایین PCR	برای افزایش اختصاصیت PCR از آنزیم‌های Hot Start استفاده کنید و همان توصیه های بالا را برای محصولات کوتاه یا بلند غیر اختصاصی دنبال کنید.
کنترل منفی «مثبت» است	آلودگی PCR محیط کار را تمیز نگه دارید. هنگام آماده سازی PCR، باید مراقب باشید تا احتمال آلودگی با الگوهای DNA خارجی از بین برود. از مناطق تمیز و جداگانه برای آماده‌سازی نمونه، آماده‌سازی مخلوط واکنش و چرخه استفاده کنید. قبل از راه‌اندازی PCR، فضای کاری خود را با اتانول ۷۰٪ یا با اسبیری مخصوص پاک کنید DNA تمیز کنید. همیشه دستکش‌های تو بیوшید. برای آماده‌سازی PCR از نوله‌ها و سرپیپت های استریل دارای فیلترهای آتروسل استفاده کنید. بیشتر الگوهای آلوده از پیپت‌های کثیف ناشی می‌شوند. از معرف‌های عاری از DNA و نوکلئاز، از جمله آ.پ، استفاده کنید. از مزایای آنزیم اوراسیل-DNA گلیکوزیلاز استفاده کنید: تکثیر الگوهای آلوده کننده‌ای که از آزمایش‌های قبلی در محیط کار باقی مانده‌اند، یکی از رایج‌ترین مشکلات آلودگی است. استفاده از اوراسیل-DNA گلیکوزیلاز (UDG یا UNG) و dUTP (مخلوط dUTP/dNTP) به جلوگیری از انتقال آلودگی کمک می‌کند. روند کار معمول به شرح زیر است: آنزیم اوراسیل-DNA گلیکوزیلاز، DNA حاوی اوراسیل را تجزیه می‌کند. برای جلوگیری از آلودگی انتقالی، برای PCR از dUTP به جای dTTP، به جای dTTP به dUTP استفاده کنید. DNA پلیمرازهای Taq به طور مؤثر dUTP را ترکیب می‌کنند. با این حال، با پلیمرازهای تصحیح‌کننده، مانند DNA Pfu یا Long and High Fidelity PCR Master Mix، استفاده از dUTP منجر به بازده PCR پایین‌تری خواهد شد. dUTP، تحرک الکتروفورتیک یا راندمان رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید DNA را تغییر

با فرم‌هایی اضافه نکنید. با فرم‌های دیگر حاوی منیزیم نیستند (Taq Polymerase DNA) اما یک ویال جداگانه از کلرید منیزیم دارند که امکان تهیه غلظت‌های مختلف منیزیم را فراهم می‌کند. اکیداً توصیه می‌شود که غلظت 2 Mg (در محدوده 4 تا 4 میلی‌مولار) برای هر PCR بهینه شود. بسیاری از کاربردها در غلظت استاندارد 1.5 میلی‌مولار MgCl_2 کار می‌کنند. با این حال، کاربردهای پیشرفته با استفاده از DNA ژنومی به غلظت‌های بالاتر 2 MgCl_2 تا 4 میلی‌مولار نیاز دارند. غلظت منیزیم PCR را با محلول MgCl_2 ارائه شده مطابق آنچه در بالا در این جدول توضیح داده شده است، تنظیم کنید.			نمی‌دهد. پس از PCR یا dUTP، محصولات PCR سوسپنشن‌هایی برای UDG هستند و هر DNA حاوی اوارسیل در طول انکوباسیون کوتاه با اوارسیل-DNA-گلیکوزیل‌از تجزیه می‌شود. این مرحله، الگوهای DNA آلوده از آزمایش‌های قبلی را حذف می‌کند.		
dNTP های نامتعادل و با کیفیت پایین های با بالاترین کیفیت، با خلوص 99% استفاده کنید. خلوص dNTP به ویژه برای PCR با برد طولانی و دقت بالا مهم است. غلظت‌های نامتعادل dNTP می‌تواند منجر به کاهش دقت شود. غلظت نهایی توصیه شده برای هر dNTP، 2 تا 0.2 میلی‌مولار است، غلظت بالاتر (تا 0.4 میلی‌مولار) ممکن است بازده را افزایش دهد. با توجه به اتصال 2 Mg به dNTP ها، غلظت 2 Mg باید متناسب با آن تنظیم شود. غلظت بیش از حد dNTP و منیزیم، دقت PCR را کاهش می‌دهد. قبل از استفاده، هر محلول dNTP را یخ‌زدایی و مخلوط کنید. این امر به ویژه برای محلول های با غلظت بالا اهمیت دارد.			همیشه قبل از کلونینگ، محصولات PCR را از ژل خالص‌سازی کنید؛ در غیر این صورت، پرایمر-دایمر و محصولات غیر اختصاصی ممکن است کلون شوند. هنگام برش باند PCR از ژل، از قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش و رنگ آمیزی بیش از حد با اتیدیوم بروماید خودداری کنید. این عوامل باعث افزایش فراوانی جهش و آسیب به یکپارچگی DNA می‌شوند. ژل را در طول قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش روی صفحه شیشه‌ای یا پلاستیکی نگه دارید یا از رنگ هایی استفاده کنید که برای تشخیص به اشعه ماوراء بنفش نیاز ندارند. فقط از معرف‌های با کیفیت بالا برای کلونینگ، لیگاز خاص، و وکتور قابل اعتماد، سلول‌های با کارایی بالا و مناسب استفاده کنید.	کلونینگ ناموفق محصول PCR آماده‌سازی نادرست محصول PCR برای کلونینگ معرف‌های کلونینگ بی کیفیت	
فالب خیلی کم مقادیر بهینه DNA الگو برای حجم واکنش 50 میکرولیتر؛ پلاسمید یا فآژ: 0.01 تا 1 نانوگرم ژنومی: 0.1 تا 1 میکروگرم مقادیر بیش از حد الگو، PCR غیر اختصاصی را افزایش می‌دهد. مقادیر ناکافی الگو، دقت را کاهش می‌دهد.			آنزیم‌های DNA Taq پرایمر، محصولات PCR با دنباله‌های A تولید می‌کنند که برای کلونینگ TA مناسب هستند و می‌توانند بدون نیاز به عملیات ویژه در ناقل های T کلون شوند. برای کلونینگ TA کارآمدتر، مرحله طول‌سازی نهایی PCR را طولانی‌تر (تا 30 دقیقه) در دمای 72 درجه سانتیگراد انجام دهید. آنزیم DNA Polymerase Pfu یا Long and High Fidelity PCR Master Mix محصولات PCR با انتهای صاف و آویزان تولید می‌کنند. این محصولات باید قبل از کلونینگ در ناقل‌های با انتهای صاف، صاف شوند. محصولات PCR با انتهای صاف برای کلونینگ TA مناسب نیستند.	استراتژی کلونینگ نادرست	
یابی زیاد در محصول PCR خطاهای توالی انتخاب نادرست آنزیم			آنزیم PCR مناسب را برای میزان خطای مورد نظر انتخاب کنید. برای دقت بالاتر، از Pfu DNA Polymerase یا Long and High Fidelity PCR Master Mix استفاده کنید. میزان خطای مورد انتظار معمولاً در توضیحات آنزیم ذکر شده است.		
منیزیم بیش از حد در واکنش غلظت بیش از حد منیزیم باعث تولید محصولات PCR غیر اختصاصی و کاهش دقت PCR می‌شود. برخی از بافرهای PCR برای Taq DNA Polymerase حاوی 2 Mg در غلظت بهینه هستند. منیزیم بیشتری به چنین		آسیب DNA ناشی از قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش هنگام برش باند PCR از ژل، از قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش و رنگ آمیزی بیش از حد با اتیدیوم بروماید خودداری کنید. این کار باعث افزایش فراوانی جهش و آسیب به یکپارچگی DNA می‌شود. ژل را در طول قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش روی صفحه شیشه‌ای یا پلاستیکی نگه دارید یا از رنگ هایی استفاده کنید که برای تشخیص به			

جدول نمادها:

	Catalog number	شماره رفرنس
	Batch code	سری ساخت
	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
	Data of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions befor use	مطالعه بروشور
	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	آدرس شرکت
	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود

اشعه ماوراء بنفش نیاز ندارند.		
واکنش تعیین توالی را تکرار کنید، در صورت وجود DNA پیچیده و غنی از GC، از معرف‌های تعیین توالی اختصاصی استفاده کنید.	خطاهای توالی‌یابی	
برای بهترین نتایج PCR از معرف‌های با کیفیت بالا استفاده کنید	ریجننت‌های بی‌کیفیت	نتایج تکراری‌پذیر نیستند
مجموعه‌ها و مخلوط‌های dNTP که شامل ۹۹% dNTP‌های خالص هستند.		
برای PCR از آنزیم‌های با خلوص بالا و بافرهای بدون نوکلئاز استفاده کنید.		
در صورت امکان، قبل از هر PCR، کیفیت و سلامت الگو را دوباره بررسی کنید.		
فقط از پیپت‌ها و لوله‌های مخصوص از جنس پلاستیک با کیفیت بالا استفاده کنید که به DNA یا پروتئین‌ها متصل نمی‌شوند.		
قبل از هر بار استفاده، تمام معرف‌ها را خوب مخلوط کنید.	خطاهای راه‌اندازی	
هر زمان که ممکن است، مسترمیکس درست کنید تا خطاهای پیپتینگ کاهش یابد.		
هر تغییر در معرف‌ها یا موادی که برای PCR استفاده می‌کنید را زیر نظر داشته باشید. هر تغییری می‌تواند بر نتایج PCR تأثیر بگذارد.	تغییرات کامیوننت	
محیط کار را تمیز نگه دارید. هنگام آماده‌سازی PCR، باید مراقب باشید تا احتمال آلودگی با نوکلئازها از بین برود.	آلودگی نوکلئاز	
از مناطق تمیز و جداگانه برای آماده‌سازی نمونه، آماده‌سازی مخلوط واکنش و چرخه استفاده کنید.		
قبل از راه‌اندازی PCR، فضای کاری خود را با اتانول ۷۰% یا با اسپری مخصوص تمیز کنید.		
همیشه دستکش‌های نو بپوشید.		
برای انجام PCR از لوله‌ها و سرپیپت‌های استریل دارای فیلتر آئروسول استفاده کنید.		
از معرف‌های عاری از DNA و نوکلئاز، از جمله آب، استفاده کنید.		