

TROUBLESHOOTING – PCR

| PROBLEM | ÅRSAK | LØSNING |
|---|---|---|
| Det er lite væske i PCR-røret etter PCR-reaksjonen | Prøven har fordampet | Se til at lokket på PCR-maskinen varmes opp og når riktig temperatur |
| | | Dersom PCR-maskinen ikke har oppvarmet lokk (heated lid) må PCR-prøven dekkes med voks |
| | Pipetteringsfeil | Sørg for at korrekte mengder av de ulike reagensene tilsettes PCR-røret (1 PCR EdvoBead, 20 µl primer-mix og 5 µl DNA for 778333 og 778371) |
| Verken DNA-standardmarkøren, kontroll-DNA eller PCR-produkter er synlig på gelen | Feil i forbindelse med forberedelse av elektroforese eller tillaging av gelen | Forsikre deg om at elektroforesebufferen har korrekt fortynning |
| | | Se til at agaroseløsningen er fullstendig klar uten glassaktige klumper/partikler før den helles i støpeformen. Geler med høyere konsentrasjon (> 1 %) krever lengre oppvarming for at agarosen skal smelte |
| | Gelen ble ikke farget tilstrekkelig | Gjenta fargingsprosessen |
| | Feil med elektroforesekaret eller spenningskilden | Se til at det bobler ved den positive elektroden når elektroforesen startes |
| Svake DNA-bånd etter farging av gelen | Gelen ble ikke farget tilstrekkelig lenge før avfarging | Gjenta fargingsprosedyren |
| DNA-standard, men ingen PCR-produkter er synlige i gelen etter farging | PCR-amplifikasjonen var mislykket | Sett opp PCR-reaksjonen på nytt med ferske reagenser |
| | | Se til at PCR-maskinen er programmert riktig og korrekt program er valgt (se veiledningen) |
| DNA-standard og PCR-produktene fra kontrollreaksjonen er synlige på gelen etter farging, men enkelte elevprøver syns ikke | PCR-reaksjonene er tilsatt feil volumer av DNA eller primere, eller enkelte reagenser er uteglemt | Øv på pipetteringsteknikk (f. eks. med 7782.82 Øvelse i mikropipettering) og rutiner for oppsett av PCR-reaksjoner (tips: kryss av for hver reagens som er tilsatt reaksjonen) |
| DNA-båndene er ikke separert | Fargefronten skal migrere minst 3,5 cm (kort gel) eller 6 cm (lang gel) fra brønnene for å sikre tilstrekkelig separasjon | Sørg for at gelen er kjørt lenge nok før farging (generell anbefaling: 30-45 min ved 90-150 V) |
| DNA-båndene blir utydelige når gelene oppbevares i kjøleskap | DNA farget med FlashBlue vil utviskes med tiden | Gjenta fargingsprosedyren med den aktuelle gelen for å synliggjøre DNA på nytt |