



## Návod k použití pro soupravy Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Verze ze 4. června 2011.

### 1. Použití

Biofortuna HLA SSPGo Kits jsou kvalitativní soupravy založené na analýze DNA pro stanovení HLA alel buď pomocí soupravy s „vysokým rozlišením“, nebo pomocí soupravy pro skupinově specifickou amplifikaci alel se „středním rozlišením“. Běžná definice střední úrovně rozlišení je taková, že většina výsledků je při něm jasně určena na úrovni dvou číslic; např. DQB1\*02, DQB1\*05 atd. Vysoké rozlišení je obecně definováno tak, že je většina alel určena na úrovni čtyř číslic, jako např. DQB1\*02:01, DQB1\*05:01 atd. Tento produkt je určen pro diagnostické účely *in vitro* a používat ho mohou pouze vyškolení pracovníci.

### 2. Úvod

Molekuly HLA hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi a rozpoznávání vlastních a cizích molekul, a v důsledku toho je genotypizace HLA a určení HLA shody povinné před většinou prováděných transplantací. Antigeny HLA omezují specifitu T-buňkami přenášené imunitní odpovědi a genotypizace HLA je přínosným vyhledávacím nástrojem mnoha imunitních poruch nebo imunitních odpovědí na patogeny, vakcinaci nebo medikamentózní léčbu. Genotypizaci HLA lze také použít k potvrzení diagnózy onemocnění, u kterých alely HLA významným způsobem souvisejí se stavem onemocnění.

Většina genů HLA je vysoce polymorfních a pro přesné stanovení antigenů HLA se obecně vyžaduje DNA genotypizace. Genotypizace pomocí PCR reakce využívající primery specifické pro sekvenci (SSP - Sequence-Specific Primers)<sup>1</sup> je rychlá metoda genotypizace HLA vhodná zejména v situacích, kdy je požadována střední úroveň rozlišení. U souprav Biofortuna SSP jsou všechny reakce prováděny v suchém stavu, včetně polymerázy, takže jediné, co musí uživatel před PCR udělat, je přidat DNA.

Věnujeme maximální úsilí tomu, aby byly soupravy aktualizovány v souladu s IMGT HLA. Aktualizace souprav jsou k dispozici na webové stránce [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

### 3. Popis testu

PCR SSP je založena na principu, že k amplifikaci dojde pouze u primerů, které se budou zcela shodovat s 3' koncem cílové sekvence. Neshodné primery neposkytnou pozitivní produkt amplifikace.<sup>2</sup> Pár primerů interní kontroly, který amplifikuje konzervovanou oblast housekeeping genu, je obsažen v každé PCR reakční směsi; pár primerů interní kontroly je indikátorem integrity PCR reakce. Genotypizace SSP obecně využívá několikanásobných reakcí, které při společné analýze indikují genotyp. Vizualizace produktů amplifikace lze dosáhnout pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, která separuje fragmenty DNA podle velikosti.

#### 4. Obsah soupravy

- 10–40x polypropylenové PCR panely nebo proužky, které obsahují 1–96 PCR jamek (podle typu soupravy), každá jamka obsahuje 10 µl předem nadávkovaných lyofilizovaných primerů, polymerázy, dNTP\* a pufru. Testy nebo proužky jsou baleny jednotlivě ve fólii.
- 1x návod k použití.
- Interpretační tabulky, MSDS (bezpečnostní listy) a šaržový certifikát vydaný výrobcem (Certificate of Analysis) lze získat na webové stránce společnosti Biofortuna [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Pokud nemáte možnost tyto dokumenty stáhnout z webové stránky, kontaktujte prosím lokálního distributora.

\*CleanAmp™ dNTP podléhají licenci společnosti Trilink Biotechnologies Inc se svolením k použití v produktech Biofortuna SSPGo.

#### 5. Reagencie a vybavení, které nejsou součástí dodávky

- Vhodné pipety a sterilní špičky, např. pipeta P10 s 10µl filtračními špičkami.
- Souprava / vybavení pro izolaci DNA.
- UV spektrofotometr.
- Polypropylenové zkumavky.
- Sterilní voda pro molekulárně-biologické aplikace.
- Uzávěry nebo fólie pro uzavření PCR. (Uzávěry proužků jsou dodávány v soupravách se stripy zkumavek)
- 96 jamkový termocykler s vyhříváním víkem. Destičky a zkumavky PCR použité v soupravách společnosti Biofortuna byly validovány pro použití s většinou termocyklerů na trhu, včetně termocyklerů MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Jiné modely mohou vyžadovat další validaci uživatelem.
- Reagencie pro gelovou elektroforézu [agaróza, 0,5x TBE pufr, 1 000bp DNA ladder (velikostní marker), roztok ethidiumbromidu 10 mg/ml].
- Vybavení pro gelovou elektroforézu (elektroforetické vany a rámečky s gelem, síťový zdroj, gelový dokumentační systém s UV transluminátorem).

#### 6. Bezpečnost a varování

- Pro diagnostické účely *in vitro*.
- Test může provádět pouze náležitě vyškolený pracovník.
- Všechny výsledky typizace musí ověřit kvalifikovaný pracovník, a pokud jsou výsledky použity pro klinické rozhodování, musí být potvrzeny pomocí jiných metod typizace.
- Se všemi reagensy zacházejte v souladu se zásadami Správné laboratorní praxe.
- Oblasti k provádění postupu před a po PCR musí být odděleny. Materiál používaný po PCR nevnášejte zpět do oblasti pro postup před PCR.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Se všemi produkty krevního původu zacházejte jako s potenciálně infekčními.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Ethidiumbromid je potenciální karcinogen. Při jeho použití vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Při používání zdrojů UV záření postupujte opatrně - vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Nikdy se nedívejte přímo do zdroje UV záření.
- Bezpečnostní listy jsou k dispozici na webové stránce [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

#### 7. Skladování a stabilita

Soupravy Biofortuna SSPGo skladujte při teplotě 4–30 °C. Jakmile jsou PCR jamky vyjmuty z fólie, reagencie rehydratujte pomocí DNA do 3 hodin. Datum expirace je uvedeno na obalu. Po uvedeném datu produkt nepoužívejte.

Soupravy, jejichž obal je poškozený, nepoužívejte.

Zajistěte, aby byly PCR jamky po nadávkování DNA důkladně utěsněny, neboť během PCR amplifikace by mohlo dojít k odpařování. Zvláštní pozornost věnujte okrajům a rohům.

## 8. Pokyny k použití

### Požadavky na vzorky DNA

Všechny reakce testu se optimálně používají s 50–100 ng DNA, ale rehydrataci každé reakce je nezbytné provést přesně s 10 µl kapaliny. Test lze tedy provést tak, že se použije 10 µl DNA o koncentraci 5–10 ng/µl nebo lze nejdříve nadávkovat objem vody, který umožní nadávkovat DNA o vyšší koncentraci, např. se nadávkuje 9 µl vody a poté se přidá 1 µl DNA o koncentraci 50–100 ng/µl. Jelikož heparin může inhibovat PCR reakci, nedoporučuje se provádět extrakci DNA z heparinizovaných vzorků krve. Hodnota OD<sub>260/280</sub> vzorku DNA se musí nacházet v rozmezí 1,6–2 naměřeném UV spektrofotometrií.

### Pokyny pro postup před PCR

- i. Vyjměte panel nebo proužek SSPGo z uzavřeného obalu.
- ii. Poznamenejte si číslo šarže, číslo produktu a verzi metody.
- iii. První reakce každého testovaného lokusu má vždy červenou barvu v porovnání se zbytkem soupravy.
- iv. Některé PCR panely obsahují v poslední jamce integrovanou fialově zbarvenou „kontrolu bez templátu“ - negativní kontrolu.
- v. Pomocí sterilního vybavení napipetujte 10 µl roztoku DNA do jednotlivých reakcí v panelu nebo proužku. Viz poznámka v oddílu 8 - Požadavky na vzorky DNA. Pokud panel obsahuje integrovanou fialově zbarvenou „kontrolu bez templátu“, napipetujte do něj 10 µl roztoku na ředění vzorků (bez DNA). Viz oddíl 8 - Poznámka pro kontrolu bez templátu.
- vi. Zajistěte, aby v každé reakci byla DNA před teplotním cyklem v kontaktu s reagensy v suchém stavu. Je možné, že bude nutné provést krátké odstředění, aby bylo zajištěno, že veškerý roztok DNA byl v kontaktu s reagensy v suchém stavu.
- vii. Utěsněte reakce krycí fólií nebo uzávěry pro PCR zkumavky. Fólie co nejlépe utěsněte, abyste předešli odpařování. Zvláštní pozornost věnujte okrajům a rohům.
- viii. Vložte panel nebo proužky přímo do termocykleru. Ujistěte se, že jamky jsou zcela vloženy do bloku a víko je zcela stlačeno. V opačném případě může dojít k individuálnímu selhání PCR reakce. U některých modelů přístrojů pro PCR reakci může být pro efektivní stlačení produktu v bloku nutné použít kompresní podložky nebo bloky.
- ix. Spusťte program pro PCR reakci (viz parametry PCR).

**POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE RESUSPENZE:** Zajistěte, aby směsi pro PCR reakci byly resuspendovány pomocí vzorku DNA do 3 hodin od vyjmutí panelu z fólie.

**POZNÁMKA PRO KONTROLU BEZ TEMPLÁTU:** Některé soupravy obsahují kontrolu bez templátu (NTC - No Template Control) jako poslední reakci destičky. Tato reakce obsahuje fialové barvivo, aby ji bylo možné rozeznat od ostatních reakcí, a její přítomnost v soupravě je také uvedena v příložených interpretačních tabulkách. NTC je navržena pro detekci kontaminace reakce PCR nebo genomové DNA v soupravách Biofortuna SSPGo, která může být přítomna ve vodě používané k resuspenzi DNA. V případě kontaminace PCR reakce budou pozorovány amplikony různých velikostí. Pokud bude kontaminována genomová DNA, bude pozorován amplikon o velikosti 187 bp.

**POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE VÝŠKY PROFILU DESTIČEK / PROUŽKŮ PCR:** Doporučuje se, aby výška profilu destiček a proužků byla shodná, pokud jsou vloženy ve stejném přístroji pro PCR reakci. Rozdíl výšky profilů může mít za následek nedostatečný kontakt s vyhřívaným víkem přístroje pro PCR reakci. Může tak dojít k nedostatečné amplifikaci PCR nebo k jejímu selhání.

## Parametry PCR reakce

Používejte následující parametry PCR reakce. Ujistěte se, že rychlost náběhu je nejméně 1 °C za sekundu, a zapněte výhřev víka. Kompletní pokyny k použití jsou uvedeny v uživatelské příručce od výrobce termocykleru. Termocyklery kalibrujte podle akreditačních pravidel vydaných organizací American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) nebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturace	při teplotě 94 °C	po dobu 5 minut	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	← 10 cyklů
Anelace	při teplotě 66 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	← 20 cyklů
Anelace	při teplotě 64 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	

UDRŽUJTE PŘI TEPLITĚ 15 °C

## Gelová elektroforéza

Tyto pokyny jsou platné pro horizontální elektroforézu na agarózovém gelu: Připravte 2% agarózový gel v 0,5x TBE pufru. Jakmile je gel schlazen přibližně na 60 °C, přidejte ethidiumbromid, aby jeho konečná koncentrace byla 0,5 µg/ml. Nalijte gel a vložte hřebeny pro vytvoření mikrotitračních jamek (např. 12 x 8 jamek s 9mm mezerami). Po ztuhnutí vyjměte hřebeny a ponořte gel do roztoku 0,5x TBE pufru. Přeneste minimálně 5 µl a maximálně 10 µl z každé reakce na panelu nebo proužku do příslušné jamky v gelu a poznamenejte si pozici každé reakce. Pro určení velikosti může být užitečný 100bp ladder (velikostní marker). Gelovou elektroforézu provádějte po dobu 20 minut rychlostí 10 V/cm.

Podrobnosti týkající se specifického vybavení jsou uvedeny v návodu k použití od výrobce elektroforetického systému. Gel zobrazte pomocí UV dokumentačního systému pro gel s UV transluminátorem.

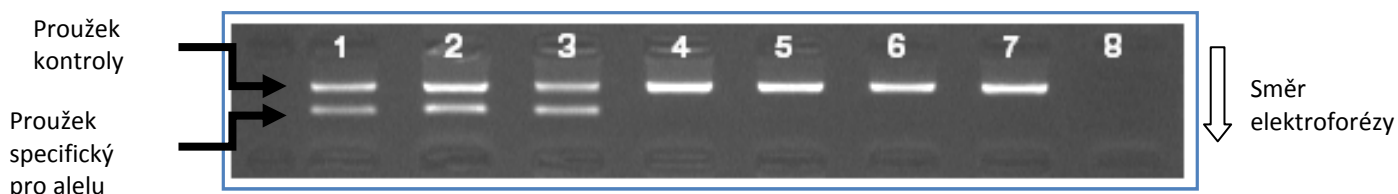
## 9. Interpretace

Soupravy SSPGo byly navrženy tak, aby bylo možné stanovit výsledky manuálně pomocí interpretačních tabulek, které jsou k dispozici na webové stránce [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Pokud máte potíže s přístupem na webovou stránku, kontaktujte prosím lokálního distributora.

Připojte snímek gelu k odpovídající interpretační tabulce tak, aby souhlasilo číslo a verze soupravy. Vyhodnoťte zobrazení gelu. Každá reakce by měla obsahovat pozitivní kontrolní proužek. Používejte interpretační tabulky, neboť u různých produktů SSPGo může mít různou velikost. Proužky interních kontrol se mohou objevit jako mnohem slabší než přítomné proužky specifické pro alely. Pokud je přítomen proužek specifický pro alelu, nikoli však proužek kontroly, je třeba výsledek také považovat za pozitivní. Proužkům menším než 70 bp nevěnujte pozornost, neboť se jedná o volné primery.

Určete pozitivní reakce. Pozitivní reakce jsou indikovány přítomností proužků očekávané velikosti, které jsou uvedeny v interpretačních tabulkách. V dané reakci může být více než jedna velikost produktu - jedná se o multiplexní reakce, které jsou uvedeny v interpretačních tabulkách.

Pozitivní reakce porovnejte s interpretačními tabulkami. Pozitivní výsledek v reakci indikuje přítomnost nejméně jedné z alel uvedených u této reakce v interpretační tabulce. Daná alela může být amplifikována v několika zkumavkách - pokud je alela přítomna, měly by být pozitivní všechny relevantní reakce.



Obr. 1 Příklad pozitivních reakcí indikovaných přítomností proužků specifických pro alely a proužků kontrol (reakce 1–3); negativních reakcí indikovaných přítomností proužků kontrol, ale nepřítomností proužků specifických pro alely (reakce 4–7) a selhání reakce indikované nepřítomností jakéhokoli proužku (reakce 8).

**Ujistěte se, že verze soupravy odpovídá verzi interpretační tabulky.**

## 10. Zajištění a kontrola kvality

Kvalita každé šarže SSPGo je kontrolována před uvolněním produktu společnosti Biofortuna z výroby. Vzorky jednotlivých šarží souprav jsou kontrolovány vzhledem k definovanému panelu se vzorky DNA lidského původu, aby byla zajištěna správná funkčnost. Každá reakce byla validována nejméně se 48 vzorky dobře charakterizovaných buněčných linií DNA. Společnost Biofortuna doporučuje, aby každá laboratoř provedla interní validaci nových produktů používaných k typizaci před jejich použitím pro klinické vzorky. Typizaci pro diagnostické účely může provádět pouze plně vyškolený a kvalifikovaný pracovník a výsledky musí být zkontrolovány jiným vyškoleným pracovníkem.

## 11. Literatura

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

## 12. Vysvětlivky k používaným symbolům

- ▽ Počet testů
- CE REP Zástupce v zemích Evropského společenství
- 📖 Prostudujte si návod k použití
- 🏭 Místo výroby
- IVD Diagnostický prostředek *in vitro*
- 🕒 Datum expirace
- 4°C → 30°C Teplota skladování
- LOT Číslo šarže

## 13. Kontaktní údaje výrobce

Biofortuna Ltd  
 1 Hawkshead Road  
 Croft Business Park  
 Bromborough, CH62 3RJ, UK  
 T: +44 (0) 151 334 0182  
 E: [info@biofortuna.com](mailto:info@biofortuna.com)  
 W: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)



**14. Překlady**

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россия:	Переводы доступны
Slovensky:	Překlady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

[www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)

## 15. Řešení problémů při použití produktu SSPGo

Problém	Pravděpodobná příčina	Nápravné opatření
Při žádné reakci nedošlo k amplifikaci	Nesprávná koncentrace použité DNA	Změřte množství DNA a zajistěte, aby bylo při každé reakci přidáno v objemu 10 µl celkem 50–100 ng DNA.
	Ve vzorku DNA jsou přítomny inhibitory PCR reakce	Nepoužívejte heparinizovanou krev, a pokud tak nelze učinit, extrahujte DNA z promytých intaktních lymfocytů, takže heparin nebude v kontaktu s DNA.  Byly popsány postupy pro použití heparinázy k odstranění heparinu ze vzorků DNA.  Proveďte znovu extrakci DNA. Viz návod k použití od výrobce soupravy k extrakci DNA.
	Nízká kvalita použitých vzorků DNA	Změřte kvalitu DNA. Hodnota poměru A260/A280 při UV spektrofotometrii se musí nacházet v rozmezí 1,6–2,0.  Zajistěte, aby byla DNA před použitím zcela resuspendována.
	Reagencie nejsou zcela resuspendovány	Zajistěte, aby byly pelety před přidáním DNA zcela rehydratovány. V případě potřeby destičku krátce odstředte.  Zajistěte, aby bylo pro každou reakci použito 10 µl roztoku DNA.
	Termocykler nebyl správně nastaven	Zajistěte, aby byl program PCR zadán správně podle návodu k použití.  Ujistěte se, že vyhřívané víko termocyklu je usazeno a dostatečně utěsněno.  Další pokyny jsou uvedeny v návodu k použití termocyklu.
	Problémy týkající se elektroforézy	Ujistěte se, že je do elektroforetické komory přiváděn elektrický proud - zkontrolujte síťový zdroj a vyčistěte elektrody.  Použijte gel v 0,5x TBE pufru.  Zajistěte, aby byl používán čerstvý roztok 0,5 µg/ml ethidiumbromidu. Ověřte, že je při zobrazení gelů UV záření dostatečné.  Pro další pokyny nahlédněte do návodů od výrobce elektroforetické vany a rámečků s gelem a síťového zdroje.

Problém	Pravděpodobná příčina	Nápravné opatření
<b>Při žádné reakci nedošlo k amplifikaci</b>	Panely nejsou správně utěsněny	<p>Nedostatečné utěsnění panelů může vést k odpařování během PCR. Společnost Biofortuna dodává doporučené krycí fólie (číslo produktu BF-40-11).</p> <p>Ujistěte se, že všechny jamky jsou náležitě utěsněné. Zvláštní pozornost věnujte utěsnění jamek na okrajích PCR panelu nebo proužku.</p>
<b>Náhodné chyby při záznamu kontrol a/nebo amplikonů specifických pro alely</b>	Chyby týkající se gelu	<p>Ujistěte se, že všechny jamky byly do gelu nadávkovány ve správném pořadí a do všech jamek byl nadávkován stejný objem PCR reakcí.</p> <p>Nakalibrujte pipety podle návodu k použití od výrobce.</p> <p>Zkontrolujte, že se jamky v gelu náležitě vytvořily. Hřebeny odstraňujte opatrně, abyste neroztrhli dna jamek.</p> <p>Před nanesením gelu se ujistěte, že agaróza je zcela rozpuštěná.</p> <p>Ujistěte se, že elektroforéza v gelu neprobíhá příliš dlouho, neboť menší amplikony by mohly přetéct přes konec.</p> <p>Zajistěte dostatečně dlouhou elektroforézu v gelu, aby mohlo dojít k separaci proužků.</p> <p>Použijte čerstvý roztok ethidiumbromidu.</p>
	Problémy týkající se termocyklieru	<p>Selhání metody, zejména podél okrajů, může být způsobeno nedostatečným utěsněním víka. To může vést k odpaření a kondenzaci PCR reakce v horní polovině nádoby pro PCR reakci, takže je PCR reakce nedostatečná.</p> <p>Při údržbě a kalibraci termocyklieru postupujte přesně podle pokynů od výrobce.</p> <p>Podle návodu k použití zkontrolujte, zda jsou parametry PCR správné.</p>
	Problémy týkající se odpařování	<p>Ujistěte se, že všechny jamky jsou náležitě utěsněné. Zvláštní pozornost věnujte utěsnění jamek na okrajích PCR panelu nebo proužků.</p> <p>Ujistěte se, že je zapnut výhřev víka a že je víko dostatečně stlačeno. Společnost Biofortuna dodává doporučené krycí fólie (číslo produktu BF-40-11).</p>

Problém	Pravděpodobná příčina	Nápravné opatření
Náhodné chyby při záznamu kontrol a/nebo amplikonů specifických pro alely	Sporadická selhání způsobená problémy s DNA	DNA není přítomna: Zajistěte, aby byla DNA přítomna ve všech jamkách.  Nesprávný objem: Zajistěte, aby bylo do každé reakce přidáno 10 µl roztoku DNA.  Přidáno příliš mnoho DNA: Koncentrace vyšší než 200 ng může způsobit selhání PCR reakce.  Kontaminace DNA může způsobit sporadické nebo rozsáhlé selhání amplifikace.
Rozmazané zobrazení gelu	DNA	Zkontrolujte koncentraci a čistotu DNA. Přídavek velkého množství DNA do PCR reakcí může způsobit rozmazané zobrazení gelu.
Slabá amplifikace	Problémy týkající se koncentrace DNA	Zkontrolujte, zda koncentrace DNA není příliš vysoká nebo příliš nízká. Nadávkujte 100 ng DNA v 10 µl na reakci.
	Problémy týkající se termocykleru	Při údržbě a kalibraci termocykleru postupujte přesně podle pokynů od výrobce.  Podle návodu k použití zkontrolujte, zda jsou parametry PCR správné.
	Chyby týkající se gelu	Zajistěte, aby byl nadávkován stejný objem v rozmezí 5–10 µl pro každou reakci.  Nakalibrujte pipetu podle návodu k použití od výrobce.  Použijte čerstvý roztok ethidiumbromidu.
Nespecifická amplifikace	Problémy týkající se koncentrace DNA	Zkontrolujte, zda koncentrace DNA není příliš vysoká nebo příliš nízká. Nadávkujte 50–100 ng DNA v 10 µl na reakci.
	Reakce jsou v nesprávném pořadí	Zkontrolujte pořadí PCR a pořadí řad v gelu.  Předejděte fyzickému přetečení sousedících jamek při elektroforéze tím, že je nebudete přeplňovat, a před vyjmutím hřebenu se ujistíte, že gel je již pevný.
	Byla identifikována nová alela	V nových amplifikačních vzorech (pattern) mohou být přítomny alely, které dosud nebyly sekvenovány. Pokud používáte k interpretaci předchozí verze interpretačních tabulek, stáhněte si aktuální verze z webových stránek <a href="http://www.biofortuna.com">www.biofortuna.com</a> . Pokud nový vzor neobsahují, použijte jinou soupravu Biofortuna nebo potvrďte identifikaci sekvence pomocí typizace na základě sekvencí. Další informace vám poskytne technický zástupce společnosti Biofortuna.

Problém	Pravděpodobná příčina	Nápravné opatření
<b>Amplifikační vzor (pattern) nelze interpretovat</b>	Nesprávná interpretace artefaktu jako specifického proužku	V interpretačních tabulkách specifických pro verzi zkontrolujte správnou velikost proužku.  Zkontrolujte, zda všechny specifické amplifikace mají správnou velikost nebo zda byl jako amplifikace chybně interpretován artefakt (přenos, primer dimer).
	Reakce jsou v nesprávném pořadí	Zkontrolujte pořadí PCR a pořadí řad v gelu.
	Individuální selhání reakce PCR	Zkontrolujte, že jsou přítomny všechny interní pozitivní kontroly. Proveďte interpretaci znovu bez chybějících reakcí.
	Chybí malé amplikony	Jsou elektroforézou zaneseny příliš daleko, malé amplikony přetekly přes konec gelu nebo mimo dosah ethidiumbromidu nebo jsou rozptýleny vniknutím do předchozího vzorku v gelu. Použijte podmínky pro elektroforézu, které jsou vhodné pro gelový systém.
	Ve vzorku byla identifikována nová alela	Příležitostně se mohou objevit nové alely poskytující amplifikační vzor (pattern), který nesouhlasí s existujícími alelami. Kontaktujte prosím lokálního distributora.