



Gebrauchsanweisung für Biofortuna SSPGo™ HLA Typisierungskits Version 4. Juni 2011.

1. Verwendungszweck

Biofortuna HLA SSPGo Kits sind qualitative DNA-basierte Kits zur Bestimmung von HLA-Allelen in Kits mit 'hoher Auflösung' oder zur gruppenspezifischen Amplifikation von Allelen in Kits mit 'mittlerer' Auflösung. Als allgemeine Definition für eine mittlere Auflösung gilt, dass die meisten Ergebnisse mit einer zweistelligen Nummer eindeutig definiert werden; z. B. DQB1*02, DQB1*05, etc. Als allgemeine Definition für eine hohe Auflösung gilt, dass die meisten Allele mit vierstelligen Nummern definiert werden, wie z. B. DQB1*02:01, DQB1*05:01, etc. Dieses Produkt ist ein In-vitro-Diagnostikum, das nur zur Verwendung durch qualifiziertes Fachpersonal vorgesehen ist.

2. Einführung

HLA-Moleküle spielen eine zentrale Rolle für die Immunität sowie die Selbst- und Fremderkennung. Daher sind bei den meisten Transplantationsarten zuvor eine HLA-Genotypisierung und ein HLA-Matching zwingend notwendig. Da HLA-Antigene die Spezifität von T-Zell-vermittelten Immunantworten einschränken, ist die HLA-Genotypisierung ein nützliches Instrument bei der Untersuchung von Immunstörungen oder der Immunantwort auf Krankheitserreger, Impfungen oder medizinische Behandlungen. Darüber hinaus kann die HLA-Genotypisierung als Hilfsmittel bei der Diagnose von Krankheiten verwendet werden, bei denen bestimmte HLA-Allele maßgeblich mit dem Krankheitszustand im Zusammenhang stehen.

Die meisten HLA-Gene sind hochgradig polymorph, weshalb zur richtigen Bestimmung von HLA-Antigenen in der Regel eine DNA-Genotypisierung erforderlich ist. Die PCR-Genotypisierung mittels sequenzspezifischer Primer (SSP)¹ ist eine schnelle Methode zur HLA-Genotypisierung, die insbesondere für Situationen geeignet ist, in denen eine mittlere Auflösung erforderlich ist. Alle Biofortuna SSP-Kits beinhalten komplette Reaktionsmischungen in trockener Form, einschließlich Polymerase, sodass der Benutzer vor der PCR lediglich die DNA hinzufügen muss.

Es wird alles unternommen, um die Kits gemäß den neuen IMGT-Veröffentlichungen zu HLA-Alignments auf dem aktuellen Stand zu halten. Aktualisierungen des Kits finden Sie unter www.biofortuna.com.

3. Erläuterung des Tests

Die SSP-PCR basiert darauf, dass nur Primer mit einem exakt an eine Zielsequenz passenden 3'-Ende amplifizieren. Mit nicht passenden Primern lassen sich keine positiven Amplifikationsprodukte erzeugen². Ein Primerpaar der internen Kontrolle, das eine konservierte Region eines Housekeeping-Gens amplifiziert, ist in jeder PCR-Reaktionsmischung enthalten; das Primerpaar der internen Kontrolle ist ein Indikator für die Integrität der PCR-Reaktion. Bei der SSP-Genotypisierung werden in der Regel mehrere Reaktionen verwendet, die, wenn sie zusammen analysiert werden, den Genotyp anzeigen. Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte kann mittels Agarosegel-Elektrophorese-Geräten erreicht werden, die die DNA-Fragmente nach ihrer Größe trennen.

4. Inhalt des Kits

- 10 - 40 PCR-Platten oder PCR-Streifen aus Polypropylen mit 1 bis 96 PCR-Gefäßen (je nach Kit); jedes Gefäß enthält 10 µl vorpipettierte gefriergetrocknete Primer, Polymerase, dNTPs* und Puffer. Alle Tests oder Streifen sind einzeln in einem Folienbeutel verpackt.
- 1 Gebrauchsanweisung.
- Interpretationstabellen, Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, MSDS) und Analysenzertifikat (Certificate of Analysis) können von der Biofortuna Internetseite www.biofortuna.com heruntergeladen werden. Sollte das Herunterladen nicht möglich sein, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

*CleanAmp™ dNTPs stehen unter der Lizenz von Trilink Biotechnologies Inc zur Verwendung in Biofortuna SSPGo Produkten.

5. Nicht mitgelieferte Reagenzien und Laborausstattung

- Geeignete Pipetten und sterile Pipettenspitzen, z. B. P10-Pipette mit 10-µl-Filterspitzen.
- DNA-Isolierungskit/-materialien.
- UV-Spektralphotometer.
- Polypropylen-Röhrchen.
- Steriles Wasser (Molecular Grade).
- PCR-Abdichtungsfolien oder -verschlüsse. (Bei den Kits mit Streifenröhrchen werden Streifenverschlüsse mitgeliefert)
- 96-Well-Thermocycler mit beheiztem Deckel. Die in Biofortuna Kits verwendeten PCR-Platten und Röhrchen wurden für die Verwendung mit den meisten im Handel erhältlichen Thermocyclern validiert, einschließlich MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS und Techne TC-512 Thermocyclern. Für andere Modelle ist unter Umständen eine weitere Validierung durch den Benutzer erforderlich.
- Gelelektrophorese-Reagenzien (Agarose, 0,5x TBE, DNA-Molekulargewichtsmarker (1.000 bp), 10 mg/ml Ethidiumbromid).
- Gelelektrophorese-Ausrüstung (Geltanks, Netzanschluss, Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator).

6. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- Zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Die Tests sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden.
- Alle Typisierungsergebnisse sollten von qualifiziertem Fachpersonal überprüft werden. Für eine klinische Entscheidung sollten die Ergebnisse darüber hinaus mit einem anderen Typisierungsverfahren bestätigt werden.
- Alle Reagenzien gemäß den Richtlinien der guten Laborpraxis handhaben.
- Den prä-PCR-Bereich vom post-PCR-Bereich trennen. Keine Materialien vom post-PCR-Bereich zurück in den prä-PCR-Bereich bringen.
- **Biogefährdung:** Alle Blutprodukte als potentiell infektiös behandeln.
- **Biogefährdung:** Ethidiumbromid ist potentiell karzinogen. Bei der Verwendung stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- **Biogefährdung:** Vorsicht beim Umgang mit UV-Quellen - stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Nie direkt in das UV-Licht schauen.
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets) finden Sie unter www.biofortuna.com.

7. Lagerung und Haltbarkeit

Biofortuna SSPGo Kits sollten bei 4 - 30 °C gelagert werden. Sobald PCR-Gefäße aus den Folienbeuteln entnommen wurden, sollten die Reagenzien innerhalb von 3 Stunden mit DNA rehydratisiert werden. Das Verfallsdatum entnehmen Sie bitte der Verpackung. Die Produkte nicht über das aufgedruckte Datum hinaus verwenden.

Die Kits nicht verwenden, wenn der Folienbeutel gerissen ist oder Löcher enthält.

Sicherstellen, dass die PCR-Gefäße nach Zugabe von DNA dicht verschlossen sind, da andernfalls während der PCR-Amplifikation Verdunstung auftreten kann. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.

8. Anweisungen zur Verwendung

Anforderungen an DNA-Proben

Jede Reaktion im Test wurde für die Verwendung von 50 - 100 ng DNA optimiert. Jede Reaktion sollte jedoch unbedingt mit exakt 10 µl Flüssigkeit rehydratisiert werden. Daher kann der Test mit 10 µl DNA bei 5 - 10 ng/µl durchgeführt werden; alternativ zuerst eine Menge an Wasser zugeben, damit DNA in einer höheren Konzentration hinzugefügt werden kann, z. B. durch Zugabe von 9 µl Wasser gefolgt von 1 µl DNA mit 50 - 100 ng/µl. Da Heparin die PCR hemmen kann, sollte keine DNA aus heparinisierten Blutproben extrahiert werden. Die $OD_{260/280}$ der DNA-Probe sollte bei Messung durch UV-Spektralphotometrie zwischen 1,6 und 2 liegen.

Prä-PCR - Anweisungen

- i. Eine(n) SSPGo Platte oder Streifen aus einem verschlossenen Beutel nehmen.
- ii. Chargenbezeichnung, Bestellnummer und Version des/der Assays notieren.
- iii. Bitte beachten Sie, dass die erste Reaktion jedes Test-Abschnitts im Gegensatz zum restlichen Kit immer rot ist.
- iv. Einige PCR-Platten enthalten eine violett gefärbte Negativkontrolle (Kontrolle ohne Template) in der letzten Vertiefung der Platte.
- v. Mit einer sterilen Pipette 10 µl DNA-Lösung in jede Vertiefung der Platte bzw. des Streifens pipettieren. Siehe hierzu den Hinweis in Abschnitt 8 zu Anforderungen an DNA-Proben. Wenn die Platte eine violett gefärbte, integrierte Negativkontrolle enthält, 10 µl Probenverdünnungsmittel (ohne DNA) hinzupipettieren. Siehe Hinweis zur Negativkontrolle in Abschnitt 8.
- vi. Sicherstellen, dass die Trockenreagenzien in jeder Vertiefung vor dem Thermocycler-Schritt mit der DNA in Berührung kommen. Um sicherzustellen, dass die Trockenreagenzien mit der gesamten DNA-Lösung in Berührung kommen, kann ein kurzer Zentrifugationsschritt durchgeführt werden.
- vii. Die Reaktionsgefäße mit einer Abdichtungsfolie oder PCR-Röhrchenverschlüssen verschließen. Sicherstellen, dass die Reaktionsgefäße möglichst dicht verschlossen sind, um eine Verdunstung zu verhindern. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.
- viii. Die Platte bzw. Streifen direkt in den Thermocycler geben. Sicherstellen, dass die Gefäße vollständig im Block eingesetzt sind und der Deckel vollständig geschlossen ist. Anderenfalls kann es in einzelnen Fällen zu einer fehlerhaften PCR kommen. Bei einigen Modellen von PCR-Geräten ist unter Umständen die Verwendung von Kompressionsmatten oder -blöcken erforderlich, um ein effektives Eindrücken des Produkts in den Block zu erreichen.
- ix. PCR-Programm durchführen (siehe "PCR-Parameter").

HINWEIS ZUR RESUSPENSION: Sicherstellen, dass die PCR-Mischungen innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme der Platte aus dem Folienbeutel mit der DNA-Probe resuspendiert werden.

HINWEIS ZUR NEGATIVKONTROLLE: Einige Kits enthalten eine Negativkontrolle (NTC - No Template Control) als letzte Reaktion in der Platte. Diese Reaktionsmischung enthält einen violetten Farbstoff zur Unterscheidung von den restlichen Reaktionen. In den entsprechenden Interpretationstabellen ist ebenfalls angegeben, ob der Kit diese Reaktionsmischung enthält. Die NTC dient zur Erkennung einer PCR-Kontamination oder einer Kontamination durch genomische DNA aus den Biofortuna SSPGo Kits, die im Wasser enthalten sein kann, das zur Resuspension der DNA verwendet wurde. Liegt eine PCR-Kontamination vor, werden Amplifikate unterschiedlicher Größe festgestellt. Liegt hingegen eine Kontamination durch genomische DNA vor, wird ein 187-bp-Amplifikat festgestellt.

HINWEIS ZUR HÖHE DER PCR-PLATTE/STREIFEN: Es wird empfohlen, dass die Platten und Streifen dieselbe Höhe aufweisen, wenn sie im selben PCR-Gerät verwendet werden. Bei unterschiedlicher Höhe kann es zu unzureichendem Kontakt mit dem beheizten Deckel des PCR-Gerätes kommen. Dies kann zu einer schwachen oder fehlerhaften PCR-Amplifikation führen.

PCR-Parameter

Die folgenden PCR-Parameter sollten verwendet werden. Sicherstellen, dass die Temperaturerhöhungsgeschwindigkeit (ramp speed) mindestens 1 °C pro Sekunde beträgt, und den beheizten Deckel aktivieren. Eine vollständige Gebrauchsanweisung zum Thermocycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsrichtlinien der "American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI)" oder "European Federation of Immunogenetics (EFI)" kalibriert werden.

Denaturierung	94°C	5 Minuten	
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	10 Zyklen
Anlagerung	66°C	50 Sekunden	
Extension	72°C	30 Sekunden	
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	20 Zyklen
Anlagerung	64°C	50 Sekunden	
Extension	72°C	30 Sekunden	
HALTEN	15°C		

Gelelektrophorese

Diese Anweisungen gelten für die horizontale Agarose-Gelelektrophorese: Ein 2%iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer herstellen. Wenn das Gel bis auf ca. 60 °C abgekühlt ist, Ethidiumbromid in einer End-Konzentration von 0,5 µg/ml zugeben. Das Gel gießen und Kämme im Mikrotiter-Format einsetzen (z. B. 12x8 Vertiefungen mit 9 mm Abstand). Sobald das Gel erstarrt ist, die Kämme entnehmen und das Gel in 0,5x TBE-Puffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Mindestens 5 µl und höchstens 10 µl aus jeder Platten- bzw. Streifenreaktion in die entsprechende Vertiefung im Gel transferieren und die Position jeder Reaktion notieren. Eine 100-bp-Leiter kann zur Größenbestimmung hilfreich sein. Das Gel 20 Minuten bei 10 V/cm laufen lassen.

Genauere Angaben zur Ausrüstung entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des Herstellers Ihres Elektrophorese-Gerätes. Die Betrachtung des Gels sollte mit einem UV-Dokumentations-System mit UV-Transilluminator erfolgen.

9. Interpretation

SSPGo Kits sind so konzipiert, dass die Ergebnisse manuell anhand von Interpretationstabellen, die Sie unter www.biofortuna.com finden, bestimmt werden können. Wenn Sie Probleme beim Zugriff auf die Internetseite haben, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

Das Gelfoto unter Berücksichtigung der passenden Kit- und Versionsnummern an das entsprechende Interpretationsformular heften. Das Gelbild untersuchen. Jede Reaktion sollte eine positive Kontrollbande enthalten. Hierzu die Interpretationstabellen zu Hilfe nehmen, da bei verschiedenen SSPGo Produkten die Größe unterschiedlich sein kann. Interne Kontrollbanden können wesentlich schwächer erscheinen, wenn allelspezifische Banden vorhanden sind. Ist eine allelspezifische Bande, jedoch keine Kontrollbande vorhanden, sollte dies dennoch als positives Ergebnis betrachtet werden. Alle Banden unter 70 bp ignorieren, da es sich hierbei um freie Primer handelt.

Die positiven Reaktionen bestimmen. Positive Reaktionen sind durch Banden in erwarteter Größe gekennzeichnet, wie in den Interpretationstabellen angegeben. Beachten Sie, dass in einer bestimmten Reaktion mehr als eine Produktgröße vorliegen kann – hierbei handelt es sich um Multiplexreaktionen, die in den Interpretationstabellen angegeben sind.

Die positiven Reaktionen mit den Interpretationstabellen vergleichen. Ein positives Ergebnis in einer Reaktion deutet darauf hin, dass mindestens eines der Allele vorhanden ist, die in der Interpretationstabelle hierzu angegeben sind.

Jedes beliebige Allel kann in mehreren Röhrcchen amplifiziert sein – ist das Allel vorhanden, sollte in allen relevanten Reaktionen eine positive Reaktion vorliegen.

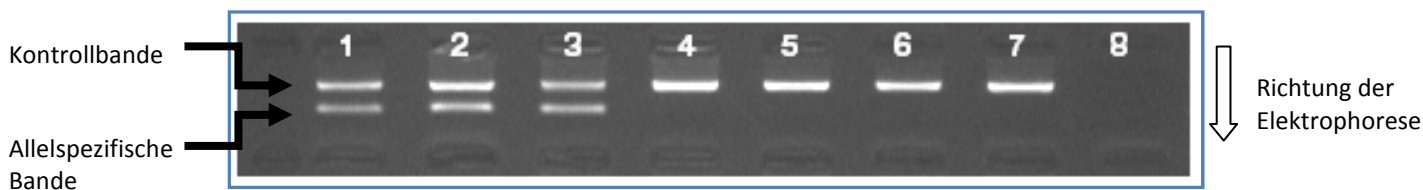


Abb. 1 Beispiele für positive Reaktionen, gekennzeichnet durch vorhandene allelspezifische Banden und Kontrollbanden (Reaktionen 1 - 3); negative Reaktionen, gekennzeichnet durch vorhandene Kontrollbanden und nicht vorhandene allelspezifische Banden (Reaktionen 4 - 7); sowie eine fehlgeschlagene Reaktion, gekennzeichnet durch nicht vorhandene Banden (Reaktion 8).

Stellen Sie sicher, dass die Version des Kits zu der Version in der Interpretationstabelle passt.

10. Qualitätssicherung und -kontrolle

Bevor Biofortuna ein Produkt versendet, wird für jede Charge SSPGo eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Aus jeder Kitcharge werden Proben gegen ein festgelegtes Panel mit humanen DNA-Proben getestet, um die ordnungsgemäße Leistung sicherzustellen. Jede Reaktion wurde gegen mindestens 48 DNA-Proben aus einer gut charakterisierten Zelllinie validiert. Biofortuna empfiehlt allen Labors, für alle neuen Typisierungsprodukte vor der Verwendung mit klinischen Proben eine interne Validierung durchzuführen. Die diagnostische Typisierung sollte nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt und die Ergebnisse von einem anderen qualifizierten Mitarbeiter überprüft werden.

11. Literatur

- 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. Erläuterung der verwendeten Symbole

▽	Anzahl der Tests
EC REP	Bevollmächtigter (EG)
i	Gebrauchsanleitung beachten
🏭	Herstellungsort
IVD	In-vitro-Diagnostikum
🕒	Verfallsdatum
4°C ↕ 30°C	Lagertemperatur
LOT	Chargenbezeichnung

13. Kontaktinformationen des Herstellers

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



14. Übersetzungen

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

www.biofortuna.com

15. SSPGo Anleitung zur Fehlersuche

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
Keine Amplifikation im Reaktionsgefäß	Falsche DNA-Konzentration verwendet	Die DNA-Menge bestimmen und sicherstellen, dass pro Reaktion insgesamt 50 - 100 ng DNA in einem Volumen von 10 µl zugegeben wurde.
	DNA-Probe enthält PCR-Inhibitoren	Kein heparinisiertes Blut verwenden; lässt sich dies nicht vermeiden, DNA aus gewaschenen intakten Lymphozyten extrahieren, damit das Heparin nicht in Berührung mit der DNA kommt. Verfahren unter Verwendung von Heparinase zum Entfernen des Heparins aus DNA-Proben wurden beschrieben. DNA erneut extrahieren. Informationen zur Verwendung des DNA-Extraktionskits entnehmen Sie bitte den Richtlinien des Herstellers.
	Schlechte Qualität der verwendeten DNA-Probe	Die DNA-Qualität bestimmen. Das A260/A280-Verhältnis sollte gemäß UV-Spektralphotometrie 1,6 – 2,0 betragen. Sicherstellen, dass die DNA vor der Verwendung vollständig in der Lösung resuspendiert ist.
	Reagenzien sind nicht vollständig resuspendiert	Sicherstellen, dass die Pellets nach Zugabe der DNA vollständig rehydratisiert sind. Gegebenenfalls die Platte kurz zentrifugieren. Sicherstellen, dass pro Reaktion 10 µl DNA-Lösung verwendet werden.
	Thermocycler ist nicht richtig eingestellt	Sicherstellen, dass das PCR-Programm gemäß der Gebrauchsanweisung richtig eingegeben wurde. Sicherstellen, dass der beheizte Deckel des Thermocyclers aktiviert und ausreichend fest verschlossen ist. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung zum Thermocycler.
	Probleme bei der Elektrophorese	Sicherstellen, dass der Elektrophoresetank mit Strom versorgt wird – das Netzteil überprüfen und die Elektroden reinigen. Das Gel in 0,5X TBE-Puffer laufen lassen. Sicherstellen, dass 0,5 µg/ml frisches Ethidiumbromid verwendet wird. Überprüfen, dass bei der Betrachtung des Gels eine ausreichende UV-Beleuchtung gegeben ist. Weitere Informationen zum Geltank und zum Netzteil entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
		Herstellers.
	Platten nicht richtig verschlossen.	<p>Unzureichend verschlossene Platten können während der PCR zu Verdunstung führen. Über Biofortuna sind empfohlene Abdichtungsfolien erhältlich (Bestellnummer BF-40-11).</p> <p>Sicherstellen, dass alle Vertiefungen ausreichend abgedeckt und verschlossen sind. Achten Sie dabei besonders auf die Vertiefungen in der Nähe der Ränder der PCR-Platten bzw. Streifen.</p>
Einzelne Ausfälle bei allelspezifischen oder Kontroll-Amplifikaten.	Gelfehler	<p>Sicherstellen, dass alle Vertiefungen in der richtigen Reihenfolge auf das Gel geladen wurden, und dass in jede Vertiefung dasselbe Volumen an PCR-Reaktion gegeben wurde.</p> <p>Die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibrieren.</p> <p>Überprüfen, dass die Vertiefungen im Gel korrekt geformt sind. Beim Entfernen der Kämmen vorsichtig vorgehen, da ansonsten unter Umständen der Boden der Vertiefungen reißen kann.</p> <p>Sicherstellen, dass sich die Agarose vor dem Gießen des Gels vollständig aufgelöst hat.</p> <p>Sicherstellen, dass das Gel nicht zu lange laufen gelassen wird, da kleinere Amplifikate aus dem Gel herauswandern können.</p> <p>Sicherstellen, dass das Gel lange genug laufen gelassen wurde, um die Trennung der Banden zu ermöglichen.</p> <p>Frische Ethidiumbromid-Lösung verwenden.</p>
	Probleme mit dem Thermocycler	<p>Fehler können insbesondere im Randbereich des Assays dadurch auftreten, dass der Deckel nicht fest genug verschlossen wurde. Dies kann auf halber Höhe des PCR-Gefäßes zu Verdunstung und Kondensation der PCR-Reaktion führen und ein Fehlschlagen der PCR verursachen.</p> <p>Bitte unbedingt die Anweisungen des Herstellers zur Wartung und Kalibrierung des Thermocyclers befolgen.</p> <p>Überprüfen, dass die PCR-Parameter gemäß der Gebrauchsanweisung richtig sind.</p>
	Probleme aufgrund von Verdunstung	Sicherstellen, dass alle Vertiefungen ausreichend abgedeckt und verschlossen sind. Achten Sie dabei besonders auf die Vertiefungen in der Nähe der Ränder

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
		<p>der PCR-Platten bzw. Streifen.</p> <p>Sicherstellen, dass der beheizte Deckel aktiviert ist und ausreichend Kompressionsdruck vom Deckel ausgeht. Über Biofortuna sind empfohlene Abdichtungsfolien erhältlich (Bestellnummer BF-40-11).</p>
	Vereinzelt auftretende Fehler aufgrund von Problemen mit der DNA	<p>Keine DNA vorhanden: Sicherstellen, dass in allen Vertiefungen DNA vorhanden ist.</p> <p>Falsches Volumen: Sicherstellen, dass zu jeder Reaktion 10 µl DNA-Lösung hinzugefügt wurden.</p> <p>Zu hohe Menge an DNA hinzugefügt: Bei einer Konzentration von über 200 ng kann es zu einer fehlerhaften PCR kommen.</p> <p>Durch Verunreinigungen in der DNA kann es vereinzelt oder in verstärktem Maße zu fehlgeschlagenen Amplifikationen kommen.</p>
Verschmiertes Gelbild	DNA	Die Konzentration und Reinheit der DNA überprüfen. Die Zugabe von zu hohen Mengen an DNA zu den PCR-Reaktionen kann zu verschmierten Gelbildern führen.
Schwache Amplifikation	Problem mit der DNA-Konzentration	Überprüfen, dass die DNA-Konzentration weder zu hoch noch zu niedrig ist. Sollkonzentration: 100 ng DNA pro Reaktion, in 10 µl.
	Probleme mit dem Thermocycler	<p>Bitte unbedingt die Anweisungen des Herstellers zur Wartung und Kalibrierung des Thermocyclers befolgen.</p> <p>Überprüfen, dass die PCR-Parameter gemäß der Gebrauchsanweisung richtig sind.</p>
	Gelfehler	<p>Sicherstellen, dass in jede Vertiefung dasselbe Volumen an Reaktionsprodukt gegeben wurde, d. h. zwischen 5 µl und 10 µl.</p> <p>Die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibrieren.</p> <p>Frische Ethidiumbromid-Lösung verwenden.</p>
Unspezifische Amplifikation	Problem mit der DNA-Konzentration	Überprüfen, dass die DNA-Konzentration weder zu hoch noch zu niedrig ist. Sollkonzentration: 50 - 100 ng DNA pro Reaktion, in 10 µl.
	Reaktionen wurden in der falschen Reihenfolge geladen	<p>Anordnung der PCR- und Gelspuren überprüfen.</p> <p>Ein Überlaufen aus den benachbarten Vertiefungen bei der Elektrophorese vermeiden, indem die Vertiefungen nicht überladen werden und sichergestellt wird, dass das Gel erstarrt ist, bevor die Kämme entfernt werden.</p>
	Neues Allel wurde identifiziert	Zuvor nicht sequenzierte Allele können mit einem neuen Amplifikationsmuster vorhanden sein. Bei Verwendung

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Lösung
		von alten Interpretationsblättern ein aktuelleres Alignment-Update von www.biofortuna.com herunterladen. Wenn das neue Muster hierdurch nicht interpretiert werden kann, sollten Sie mit einem anderen Biofortuna Kit eine erneute Überprüfung durchführen oder versuchen, die Sequenz mittels sequenzbasierter Typisierung zu identifizieren. Wenn Sie weitere Informationen oder Hilfe benötigen, wenden Sie sich bitte an den Biofortuna-Kundendienst.
Amplifikationsmuster kann nicht interpretiert werden	Ein Artefakt wurde fälschlicherweise als spezifische Bande interpretiert	Entnehmen Sie die richtige Bandengröße den versionsspezifischen Interpretationstabellen. Überprüfen, ob alle spezifischen Amplifikationen die richtige Größe aufweisen oder ob ein Artefakt (Verschleppung, Primer-Dimer) fälschlicherweise als Amplifikation interpretiert wurde.
	Reaktionen wurden in der falschen Reihenfolge geladen	Anordnung der PCR- und Gelspuren überprüfen.
	Eine einzelne PCR ist fehlgeschlagen	Überprüfen, ob alle internen positiven Kontrollen vorhanden sind. Wenn keine Reaktionen fehlen, erneut interpretieren.
	Keine kleinen Amplifikate vorhanden	Wird die Elektrophorese zu lange durchgeführt, wandern kleine Amplifikate aus dem Gel heraus oder an der Ethidiumbromid-Front vorbei, oder sie werden beim Eintritt in die vorherige Gelvertiefung zerstreut. Die für Ihr Gelsystem geeigneten Elektrophoresebedingungen verwenden.
	In der Probe wurde ein neues Allel identifiziert	Gelegentlich können neue Allele entdeckt werden, die auf ein Amplifikationsmuster schließen lassen, das keinen/m bestehenden Allel(en) entspricht. Bitte wenden Sie sich diesbezüglich an Ihren zuständigen Kundendienst.