



Használati utasítás a Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits-hez (tipizáló készletek) 4. verzió; 2011. június

1. Rendeltetés

A Biofortuna HLA SSPGo készletek kvalitatív DNS alapú készletek, amelyek a HLA allélok „nagy felbontású” készletekkel vagy az allélok csoportspecifikus amplifikációjának „közepes felbontású” készletekkel való meghatározására szolgálnak. A közepes felbontású készletek általános definíciója szerint az eredmények többsége két számjeggyel egyértelműen meghatározható; pl. DQB1*02, DQB1*05, stb. A nagy felbontás általában azt jelenti, hogy az allélok nagy része négy számjeggyel határozható meg, pl. DQB1*02:01, DQB1*05:01, stb. A készlet olyan *in vitro* diagnosztikai termék, amelyet kizárólag képzett szakszemélyzet használhat.

2. Bevezetés

A HLA molekulák fontos szerepet játszanak az immunitásban, és ezen belül a szervezet saját és nem saját antigénjeinek felismerésében; a legtöbb szervátültetés előtt el kell végezni a HLA-genotipizálást és a HLA-egyeztetést. A HLA antigének meghatározzák a T-sejt-mediált immunválasz specificitását, ezért a HLA-genotipizálás hasznos vizsgálati eszköz az immunrendszer rendellenességeinek vagy a patogénekre, vakcinákra vagy orvosi kezelésre adott immunválasznak a kimutatásában. A HLA-genotipizálás olyan betegségek diagnosztizálására is alkalmas, amelyekben kimutatták, hogy a HLA allélokról kóroki tényezők lehetnek.

A legtöbb HLA gén igen polimorf, és általában DNS-genotipizálás szükséges a HLA antigén pontos meghatározásához. A szekvensspecifikus primereket (SSP) használó PCR genotipizálás¹ a HLA-genotipizálás egy olyan gyors módszere, amely kifejezetten a közepes felbontást igénylő esetek vizsgálatára alkalmas. A Biofortuna SSP készletek teljesen kiszárított reakciókomponenseket tartalmaznak, ideértve a polimerázt is, így a felhasználónak a PCR elvégzése előtt mindössze a DNS-t kell hozzáadnia.

Minden tőlünk telhetőt megteszünk azért, hogy a készletfrissítések összhangban legyenek az IMGT adatbázisban szereplő új HLA összehangolt eredményekkel. A készletfrissítések az alábbi weboldalról tölthetők le: www.biofortuna.com.

3. A teszt leírása

A PCR SSP azon az elven alapul, hogy csak azok a primerek amplifikálódnak, amelyek esetében a 3' terminus teljesen megegyezik a célszekvenciával. Az eltérő (*mismatched*) primerek nem adnak pozitív amplifikációs terméket². Az ún. „housekeeping” gén konzervált régióját amplifikáló belső kontroll primerpár minden PCR-reakciókeverékben szerepel; a belső kontroll primerpár a PCR-reakció megfelelőségét jelzi. Az SSP genotipizálás általában több reakciót alkalmaz, melyek – együtt vizsgálva – jelzik a genotípust. Az amplifikált termékek vizualizálása agaróz gél-elektroforézis rendszerekkel történik, amelyek méretük alapján elkülönítik a DNS-fragmentumokat.

4. A készlet tartalma

- 10-40 db polipropilén PCR tálca vagy csík, amely 1-96 PCR edényből áll (a készlet típusától függően), minden egyes edény 10 µl előre kimért fagyasztva szárított primert, polimerázt, dNTP-eket* és puffert tartalmaz. A tesztek vagy csíkokat egyenként, fóliatasakban csomagolva szállítjuk.
- 1 db használati utasítás.
- Az értelmezési táblázatok, az anyagbiztonsági adatlap (MSDS) és az analitikai bizonylat a Biofortuna weboldaláról tölthetők le: www.biofortuna.com. Amennyiben nem tudja letölteni a weboldalról a dokumentumokat, kérjük, lépjen érintkezésbe területi képviselőjével.

*A CleanAmp™ dNTP-k licence a Biofortuna SSPGo termékekben való használatra a Trilink Biotechnologies Inc.-től származik.

5. Nem mellékelte reagensek, berendezések és eszközök

- Megfelelő pipettázók és steril pipettahegyek, pl. P10 pipettázó 10 µl-es szűrővel ellátott pipettahegyekkel.
- DNS izolációs készlet/eszköz.
- UV spektrofotométer.
- Polipropilén csövek.
- Steril, molekuláris tisztaságú víz.
- PCR zárólapok vagy -kupakok. (A csőcsíkokat tartalmazó készletekhez mellékeljük a csőcsíkokhoz tartozó kupakokat is.)
- 96 cellás termocycler fűtött fedéllel. A Biofortuna készletekhez használt PCR-tálcákat és -csöveket érvényesítették a legtöbb forgalomban lévő termocyclerrel való használatra, ideértve az MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS és Techne TC-512 termocyclereket is. Előfordulhat, hogy a különböző modellek esetében a felhasználónak további validálást kell végeznie.
- Gél-elektroforézis reagensek (agaróz, 0,5x TBE, 1000 bázispáros DNS molekulatömeg-marker, 10 mg/ml etídium-bromid).
- Gél-elektroforézis berendezés (géltartályok, tápegység, géldokumentációs rendszer UV-transzilluminátorral).

6. Biztonság és figyelmeztetések

- *In vitro* diagnosztikai alkalmazásra.
- A vizsgálatokat kizárólag megfelelően képzett szakszemélyzet végezheti.
- A tipizálási eredményeket megfelelő képesítéssel rendelkező személyzetnek kell ellenőriznie, és amennyiben az eredményeket klinikai döntéshozáshoz használják, másik tipizálási módszerrel meg kell erősíteni.
- A reagenseket a jó laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően kell kezelni.
- Különítse el a pre- és a poszt-PCR munkaterületeket! Ne vigye vissza a poszt-PCR anyagokat a pre-PCR munkaterületre!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** kezeljen minden vérterméket fertőzésveszélyesként!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** az etídium-bromid potenciális karcinogén anyag. Használata során mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** gondossággal járjon el az UV-források kezelése során – mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget! Soha ne nézzen közvetlenül UV-fényforrásba!
- Az anyagbiztonsági adatlapok a www.biofortuna.com weboldaláról tölthetők le.

7. Tárolás és stabilitás

A Biofortuna SSPGo készletek 4 és 30 Celsius-fokos hőmérsékleten tárolandók. Miután a PCR-edényeket kivette a fóliatasakból, a reagenseket 3 órán belül DNS-sel rehidrálni kell. A lejáratási időpontot lásd a csomagoláson! Ne használja fel a terméket a csomagoláson feltüntetett időponton túl!

Ne használja fel a terméket, ha a fóliatasak sérült!

Ügyeljen arra, hogy a PCR-edények a DNS hozzáadása után szorosan le legyenek zárva, mivel a nem megfelelően lezárt edényekből a PCR-amplifikáció során párolgás léphet fel. Fordítson különös figyelmet az edény széleinek, sarkainak lezárására!

8. Használati utasítások

A DNS-mintára vonatkozó követelmények

A vizsgálat egyes reakcióit úgy optimalizálták, hogy 50-100 ng DNS-t használjanak fel, alapvető fontosságú azonban, hogy az egyes reakciókat pontosan 10 µl folyadékkal rehidrálják. Ezért a vizsgálatot 5-10 ng/µl koncentráció esetén 10 µl DNS-sel kell végezni, vagy először a vízmennyiséget kell hozzáadni a nagyobb koncentrációban való DNS-hozzáadás lehetővé tétele érdekében, pl. 9 µl víz hozzáadása, majd 50-100 ng/µl koncentráció esetén 1 µl DNS hozzáadása. Mivel a heparin gátolhatja a PCR-t, azt ajánljuk, hogy a DNS-t ne extrahálják a heparinizált vérmintákból. A DNS-minta OD_{260/280}-értéke UV-spektrofotometriával mérve 1,6 és 2 közé kell, hogy essen.

Pre-PCR utasítások

- i. Vegyen ki egy SSPGo tálcát vagy csíkot a fóliatasakból!
- ii. Jegyezze fel a tételszámot, a termékszámot és a teszt(ek) verziószámát!
- iii. Kérjük, vegye figyelembe, hogy az egyes tesztlókuszok esetében az első reakció mindig vörös színű a készlet többi részével ellentétben.
- iv. Egyes PCR-tálcák tartalmaznak egy bíbor színű integrális „templát nélküli kontroll” reakciót a tálca utolsó cellájában.
- v. Steril eszközzel pipetázzon 10 µl DNS-oldatot a tálca vagy csík minden egyes reakciócellájába! Lásd A DNS-mintára vonatkozó követelmények című 8. pont megjegyzését! Amennyiben a tálca tartalmazza bíbor színű integrális „templát nélküli kontrollt”, pipetázzon a cellába 10 µl mintahígítót (DNS nélkül)! Lásd a Templát nélküli kontrollra vonatkozó megjegyzést a 8. pontban!
- vi. Gondoskodjon arról, hogy a DNS minden egyes reakciócellában még a hőkezelés előtt hozzákapcsolódjanak a száraz reagensekhez! Beiktathat egy rövid centrifugálási lépést is annak biztosítása érdekében, hogy a DNS-oldatok hozzákapcsolódjanak a száraz reagensekhez.
- vii. Zárja le a reakciócellákat egy zárólappal vagy PCR-cső-kupakkal! A párolgás megelőzése érdekében szorosan zárja le a cellákat! Fordítson különös figyelmet a cella széleinek, sarkainak lezárására!
- viii. Helyezze a tálcákat vagy a csíkokat a közvetlenül a termocyclerbe! Ügyeljen arra, hogy az edények teljesen egészükben a tartóban legyenek, és a fedél megfelelően zárjon! Amennyiben nem tartja be az itt közölt utasításokat, ez az egyes PCR-reakciók hibáját okozhatja. Előfordulhat, hogy egyes PCR-készülékmodellek esetében kompressziós tömítést vagy blokkot kell használni a tartóban lévő termék megfelelő lezárása érdekében.
- ix. Futtassa a PCR-programot (lásd a PCR-paramétereket)!

ÚJRASZUSZPENDÁLÁSRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS: ügyeljen arra, hogy a PCR-keverékeket a tálca fóliatasakból való kivétele után 3 órán belül újraszuszpendálja a DNS mintával!

TEMPLÁT NÉLKÜLI KONTROLLRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS: egyes készletek a tálca utolsó reakciócellájában tartalmaznak egy templát nélküli kontrollt (NTC) is. Ez a reakciócella bíbor színű festéket tartalmaz annak érdekében, hogy megkülönböztethető legyen a többi reakciócellától; a cella a mellékelt értelmezési táblázatokban is szerepel. Az NTC-t úgy tervezték, hogy kimutassa a PCR szennyeződését, illetve a Biofortuna SSPGo készletekből származó genom-DNS-szennyeződést, amely esetlegesen jelen lehet a DNS újraszuszpendálásához felhasznált vízben. Amennyiben a PCR-szennyeződés fennáll, különféle méretű amplikon(ok) jelennek meg. Ha a szennyeződés genom DNS eredetű, 187 bp amplikon jelenik meg.

PCR TÁLCA/CSÍK MAGASSÁGI PROFILJÁRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS: javasoljuk, hogy a tálcák és a csíkok magassági profilja egyenlő legyen, ha ugyanabba a PCR-készülékbe helyezi őket. Az eltérő magassági profilok esetében nem megfelelő az érintkezés a PCR-készülék fűtött fedelével, ami gyenge vagy sikertelen PCR-amplifikációt okozhat.

PCR-paraméterek

Az alábbi PCR-paramétereket kell használni. Gondoskodjon arról, hogy a ramp- (*felfűtési/hűtési*) sebesség legalább másodpercenként 1 Celsius-fok legyen, és kapcsolja be a fedélfűtési funkciót! A teljes használati utasításért lásd a termocycler gyártójának felhasználói kézikönyvét! A termocyclereket az American Society of Histocompatibility and Immunogenetics ([*Amerikai Hisztokompatibilitási és Immunogenetikai Társaság*], ASHI) vagy a European Federation of Immunogenetics ([*Európai Immunogenetikai Társaság*], EFI) akkreditációs szabályainak megfelelően kell kalibrálni.

Denaturálás	94 °C	5 perc		
Denaturálás	96 °C	15 másodperc	←	10 ciklus
Kapcsolódás (<i>annealing</i>)	66 °C	50 másodperc		
Meghosszabítás	72 °C	30 másodperc		
Denaturálás	96 °C	15 másodperc	←	20 ciklus
Kapcsolódás (<i>annealing</i>)	64 °C	50 másodperc		
Meghosszabítás	72 °C	30 másodperc		
TARTÁS („HOLD”)	15°C			

Gél-elektroforézis

A következő utasítások a horizontális agaróz gél-elektroforézisre vonatkoznak. Készítsen el 2% agaróz gélt 0,5x TBE (Tris/borát/EDTA) pufferben! Amikor a gél lehűlt kb. 60 Celsius-fokra, adjon hozzá etídium-bromidot a 0,5 µg/ml-es végső koncentráció elérése céljából! Töltse ki a gélt, és helyezze be a mikrotiter fésűket (pl. 12x8 cella 9 mm-es sortávolsággal)! A gél megszilárdulása után vegye ki a fésűket, és öntsön a géltre 0,5x TBE puffert, úgy, hogy az befedje a gélt! A tálcákon vagy a csíkokon lévő reakciócellákból tegyen át minimum 5, maximum 10 µl-t a gélen lévő megfelelő cellába; jegyezze fel az egyes cellák pozícióját! 100 bp létra hasznos lehet a méretmeghatározáshoz. Futtassa a gélt 20 percig 10 V/cm feszültség mellett!

A készülékre vonatkozó részleteket lásd az elektroforézis készülék gyártójának használati utasításait! A gélek megjelenítéséhez kárpalkotó berendezésként UV-transzilluminátoros UV-géldokumentációs rendszert kell használni.

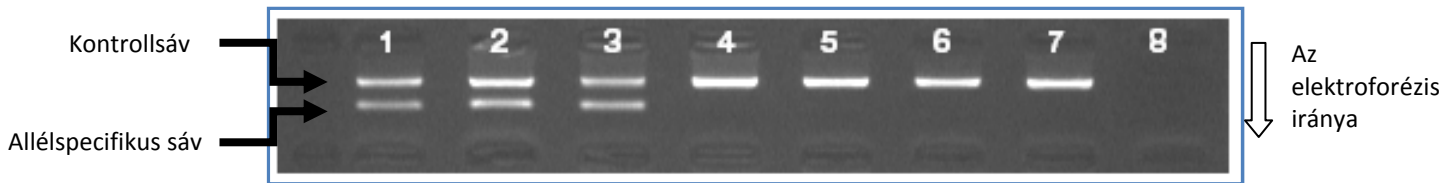
9. Értelmezés

Az SSPGo készleteket úgy tervezték, hogy az eredményeket manuálisan is meg lehessen határozni a www.biofortuna.com weboldaltól letölthető értelmezési táblázatok segítségével. Amennyiben nem tudja elérni a weboldalt, kérjük, lépjen érintkezésbe területi képviselőjével.

A készlet- és a verziószám egyeztetése után rögzítse a gél fényképét a megfelelő értelmező sablonhoz! Vizsgálja meg a gél képét! Minden egyes reakció esetében egy pozitív kontrollsávnak is meg kell jelennie. Lásd az értelmezési táblázatokat, mivel az eltérő méretű lehet a különböző SSPGo termékek esetében. Előfordulhat, hogy a belsőkontrollsavok halványabban jelennek meg, amikor az allélspecifikus sávok is láthatók. Ha a képen látható egy allélspecifikus sáv, ám kontrollsáv nem, ezt ennek ellenére is pozitív eredményként kell értelmezni. Ne vegye figyelembe a 70 bp-nál rövidebb sávokat, mert ezek nem kapcsolódott primereket jelölnek!

Határozza meg a pozitív reakciókat! A pozitív reakciókat a várt méretű sávok megjelenése jelzi, ahogyan ezt az értelmezési táblázatok is mutatják. Kérjük, vegye figyelembe, hogy egy adott reakcióban akár többféle méretű termékek is lehetnek; ezek multiplex reakciók eredményei, és az értelmezési táblázatokban szerepelnek.

Hasonlítsa össze a pozitív reakciókat az értelmezési táblázatokban szereplő ábrákkal! Egy reakció pozitív eredménye legalább egy, az értelmezési táblázatban szereplő, vonatkozó allél jelenlétét jelzi. Az allélok több csőben is amplifikálhatók – amennyiben az allél jelen van, minden vonatkozó reakció esetében pozitív eredményt kell adnia.



1. ábra: Példák pozitív reakciókra, amelyeket allélspecifikus sávok és kontrollsávok jelenléte jelez (1-3. reakció); negatív reakciókra, amelyeket a kontrollsávok jelenléte és az allélspecifikus sávok hiánya jelez (4-7. reakció); valamint sikertelen reakcióra, amelyet a sávok hiánya jelez (8. reakció).

Ügyeljen arra, hogy a készlet verziószáma egyezzen az értelmezési táblázat verziószámával!

10. Minőségbiztosítás és minőség-ellenőrzés

Minden egyes SSPGo tételt minőség-ellenőrzésnek vetünk alá, mielőtt a termék elhagyná a Biofortuna gyárát. Az egyes készlettételekből származó mintákat meghatározott humán DNS-mintapanel alapján ellenőrizzük a megfelelő teljesítmény biztosítása érdekében. Minden egyes reakciót legalább 48 cellás jól-karakterizált sejtvonal DNS-minta alapján érvényesítünk. A Biofortuna azt ajánlja, hogy a laboratóriumok maguk is érvényesítsék az új tipizáló termékeket, mielőtt klinikai mintákkal használnák azokat. Kizárólag megfelelően oktatásban részesült és képzett szakszemélyzet végezhet diagnosztikai tipizálást, és az eredményeket a személyzet egy másik tagjának ellenőriznie kell.

11. Irodalomjegyzék

- 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. Jelmagyarázat

▽	Vizsgálatok száma
EC REP	Képviselő az Európai Közösségben
📖	Tekintse át a használati utasítást
🏠	Gyártás helye
IVD	<i>In vitro</i> diagnosztikum
🕒	Lejárat napja
4°C → 30°C	Tárolási hőmérséklet
LOT	Tételszám

13. A gyártó kapcsolattartási információi

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. Fordítások

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

www.biofortuna.com

15. SSPGo hibaelhárítás útmutató

Probléma	Lehetséges ok	Megoldás
Nincs amplifikáció a reakciókban	Nem megfelelő DNS-koncentrációt használtak	Mérje meg a DNS mennyiségét, és ügyeljen arra, hogy reakciónként összesen 50-100 ng DNS-t adjon 10 µl-es mennyiséghez!
	PCR-inhibitorok vannak a DNS-mintában	Kerülje a heparinizált vér használatát, illetve ha ez nem lehetséges, extrahálja a DNS-t a mosott intakt limfocitákból, így a heparin nem érintkezik a DNS-sel. Rendelkezésre állnak a heparin DNS-mintákból való eltávolítására szolgáló, heparináz alkalmazó protokollok. Extrahálja újra a DNS-t! Lásd a gyártó DNS-extraháló készletek használatára vonatkozó útmutatásait!
	Nem megfelelő minőségű DNS-mintát használtak	Ellenőrizze a DNS minőségét! Az A260/A280 aránynak 1,6 és 2,0 között kell lennie az UV-spektrofotométer adatai alapján. Gondoskodjon arról, hogy a DNS teljesen újrasszuszpendálódjon az oldatban használat előtt!
	A reagensek nem teljesen szuszpendálódtak újra	Gondoskodjon arról, hogy a pelletek teljesen rehidrált állapotban legyenek a DNS hozzáadásakor! Ha szükséges, rövid ideig centrifugálja a tálcát! Ügyeljen arra, hogy reakciónként 10 µl DNS-oldatot használjon!
	A termocycler nem megfelelően van beállítva	Gondoskodjon arról, hogy a PCR-programot helyesen állítsa be – a használati utasításoknak megfelelően! Ügyeljen arra, hogy a termocycler fűtött fedele megfelelően legyen rögzítve és lezárva! További útmutatásért lásd a termocycler használati utasításait!
	Elektroforézissel kapcsolatos problémák	Gondoskodjon arról, hogy az elektroforézis tartály áram alatt legyen; ellenőrizze a tápegységet, és tisztítsa meg az elektródákat! Futtassa a gélt 0,5X TBE pufferben! Ügyeljen arra, hogy 0,5 µg/ml friss etídium-bromidot használjon! Ellenőrizze, hogy a gélcsíkok megjelenítésekor az UV-illumináció megfelelő mértékű-e! További útmutatásért lásd a gyártó géltartályra és tápegységre vonatkozó használati utasítását!
Nem megfelelően zárták le a tálcákat	A nem megfelelően lezárt tálcák párologhatnak a PCR során. A Biofortuna az ajánlott zárólapokat (termékszám: BF-40-11) szállítja. Ügyeljen arra, hogy az összes cellát megfelelően lezárja! Fordítson különös figyelmet a cellák PCR-tálcához vagy -csíkhöz közeli széleinek, sarkainak lezárására!	
Véletlenszerű kontroll-	Gélhibák	Gondoskodjon arról, hogy minden cellát – helyes sorrendben – a gélbe töltsön, és a cellákba a PCR-reakcióhoz szükséges, azonos

Probléma	Lehetséges ok	Megoldás
és/vagy allélspecifikus-amplikon-kiesés		<p>mennyiséget is beletegye!</p> <p>A gyártó utasításai szerint kalibrálja a pipettázókat!</p> <p>Ellenőrizze, hogy a cellák megfelelően ki legyenek alakítva a gélben! Gondossággal járjon el a fésűk kivételekor, mivel azok felszakíthatják a cellák alját.</p> <p>Ügyeljen arra, hogy az agaróz teljesen fel legyen oldódva a gél kitöltése előtt!</p> <p>Ügyeljen arra, hogy a gélt ne futassa túl sokáig, mivel a kisebb amplikonok túlfuthatnak a végén!</p> <p>Ügyeljen arra, hogy a gélt elég sokáig futtassa ahhoz, hogy a sávok elkülönüljenek!</p> <p>Használjon friss etídium-bromid oldatot!</p>
Termocyclerrel kapcsolatos problémák		<p>A hibák – különösen a vizsgálati készlet szélén előfordulók – abból fakadhatnak, hogy a fedél nem elég szorosan lett rögzítve. Ez a PCR-reakció során a PCR-edényben az edény felétől felfelé eső részen párolgáshoz és kondenzációhoz, valamint PCR-hibához vezethet.</p> <p>Kérjük, kövesse a gyártó termocycler karbantartására és kalibrálására vonatkozó útmutatását.</p> <p>A használati utasítások alapján ellenőrizze, hogy a PCR-paraméterek helyesek-e!</p>
Párolgással kapcsolatos problémák		<p>Ügyeljen arra, hogy az összes cella megfelelően le legyen zárva! Fordítson különös figyelmet a cellák PCR-tálcához vagy -csíkhöz közeli széleinek, sarkainak lezárására!</p> <p>Ügyeljen arra, hogy a fedélfűtés be legyen kapcsolva, és a fedél által kifejtett nyomás megfelelő legyen! A Biofortuna-tól beszerezhető az ajánlott zárólapok (termékszám: BF-40-11).</p>
DNS-problémák következtében fellépő, szórványos hibák		<p>Nincs DNS: gondoskodjon arról, hogy minden cellában legyen DNS!</p> <p>Helytelen mennyiség: gondoskodjon arról, hogy minden egyes reakció esetében 10 µl DNS-oldat kerüljön hozzáadásra!</p> <p>Túl sok hozzáadott DNS: 200 ng feletti koncentráció PCR-hibát okozhat.</p> <p>A DNS-ben lévő szennyeződés ritka vagy gyakori amplifikációs problémákhoz vezethet.</p>
Elmosódott gélkép	DNS	Ellenőrizze a DNS koncentrációját és tisztaságát! Túl sok DNS hozzáadása a PCR-reakcióhoz elmosódott gélképet eredményezhet.
Gyenge amplifikáció	DNS-koncentrációval kapcsolatos problémák	Ellenőrizze, hogy a DNS-koncentráció nem túl magas, vagy alacsony-e! Optimális: reakciónként 100 ng DNS 10 µl-ben.

Probléma	Lehetséges ok	Megoldás
	Termocyclerrel kapcsolatos problémák	Kérjük, kövesse a gyártó termocycler karbantartására és kalibrálására vonatkozó útmutatását. A használati utasítások alapján ellenőrizze, hogy a PCR-paraméterek helyesek-e!
	Gélhibák	Ügyeljen arra, hogy az egyes cellákba azonos reakciómennyiséget töltsön (5 µl és 10 µl között)! A gyártó utasításai szerint kalibrálja a pipettázókat! Használjon friss etídium-bromid oldatot!
Nem specifikus amplifikáció	DNS-koncentrációval kapcsolatos problémák	Ellenőrizze, hogy a DNS-koncentráció nem túl magas vagy alacsony-e! Optimális: reakciónként 50-100 ng DNS 10 µl-ben.
	A reakciócellákat nem a helyes sorrendben töltötték be	Ellenőrizze a PCR- és a gélsávok helyes sorrendjét! Előzze meg a gél túlfolyását a szomszédos cellákból oly módon, hogy megfelelő gélmennyiséget tölt be, és ügyeljen arra, hogy a fésűk eltávolítása előtt a gél megszilárduljon!
	Új allélt azonosítottak	Korábban nem szekvenált allélok jelentkezhetnek új amplifikáció mintázattal. Ha régi értelmező mintát használ, tölts le az aktuális mintát a www.biofortuna.com weboldalról! Amennyiben ez sem tartalmazza az új mintázatot, ismételje meg a vizsgálatot egy másik Biofortuna készlet használatával, vagy szekvenciánként azonosítsa a tipizálási információkat! További segítségért, kérjük, lépjen érintkezésbe a Biofortuna szerviz részlegével.
Nem értelmezhető amplifikációs mintázat	Az információt helytelenül specifikus sávként értelmezik	Ellenőrizze az adott verzióhoz tartozó Értelmezési táblázatokat a helyes sávméret tekintetében! Ellenőrizze, hogy a specifikus amplifikációk mérete helyes-e, illetve, hogy az információt (átszennyezés, primer dimer) helytelenül amplifikációként értelmezték-e!
	A reakciócellákat nem a helyes sorrendben töltötték be	Ellenőrizze a PCR- és a gélsávok helyes sorrendjét!
	Egyedi PCR-hiba	Ellenőrizze, hogy minden belső pozitív kontroll jelen van-e! Végezze el újra az értelmezést úgy, hogy ne legyenek hiányzó reakciók!
	Hiányzó kis amplikonok	Túl hosszú elektroforézis, a kis amplikonok túlfutottak a gél végén vagy az etídium-bromid elválasztón, illetve szétterjedtek, és bejutottak az előző gélüregbe. Végezzen az Ön gélrendszerének megfelelő elektroforézist!
	Új allélt azonosítottak a mintában	Előfordulhat, hogy új allélokat fedeznek fel, ami olyan amplifikációs mintázatot eredményezhet, amely nem egyezik a jelenlegi alléllal (allélekkel). Kérjük, lépjen érintkezésbe területi képviselőjével.