



**Instrukcja używania zestawów do typowania antygenów zgodności tkankowej HLA SSPGo™ firmy Biofortuna (Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits)
wersja 4, czerwiec 2011**

1. Przeznaczenie

Zestawy HLA SSPGo firmy Biofortuna opierają się na badaniu na poziomie genomowego DNA i służą do jakościowego oznaczania alleli HLA na poziomie wysokiej rozdzielczości (*high resolution*) lub do amplifikacji określonych grup alleli na poziomie pośredniej rozdzielczości (*medium level resolution*). Badanie na pośrednim poziomie rozdzielczości jest powszechnie definiowane jako badanie, w którym większość uzyskanych wyników można jednoznacznie przedstawić w postaci dwucyfrowej; np. DQB1*02, DQB1*05, itd. Badanie na wysokim poziomie rozdzielczości definiuje się jako badanie, w którym większość określonych alleli można przedstawić w postaci czterocyfrowej, jak np. DQB1*02:01, DQB1*05:01, itd. Jest to produkt do badań diagnostycznych *in vitro*, przeznaczony do użytku wyłącznie przez przeszkolony personel.

2. Wprowadzenie

Cząsteczki HLA odgrywają kluczową rolę w układzie odpornościowym oraz odróżnianiu antygenów własnych od obcych (*self/non-self*), w związku z tym przed dokonaniem większości transplantacji konieczne jest przeprowadzenie genotypowania oraz dobór pod względem HLA. Jako że antygeny HLA ograniczają swoistość odpowiedzi immunologicznych przez komórki T, genotypowanie HLA jest przydatnym narzędziem badawczym w każdym zaburzeniu układu odpornościowego lub każdej odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez patogeny, szczepionki lub leczenie. Genotypowanie HLA może być także przydatne w potwierdzeniu rozpoznania choroby, jeśli wykaże się, iż niektóre allele HLA są znacząco powiązane z danymi stanami chorobowymi.

Większość genów HLA jest wysoce polimorficzna i zazwyczaj do dokładnego określenia antygenów HLA wymagane jest przeprowadzenie genotypowania DNA. Typowanie metodą PCR-SSP przy użyciu primerów o sekwencjach specyficznych dla badanych alleli (ang. *Sequence-Specific Primers, SSP*)¹ jest szybką metodą typowania HLA, szczególnie przydatną w sytuacjach, gdzie wymagane jest badanie na pośrednim poziomie rozdzielczości. Wszystkie zestawy Biofortuna SSP zawierają kompletne wysuszone reakcje, w tym polimerazę, a więc przed wykonaniem reakcji PCR osoba przeprowadzająca badanie musi jedynie dodać próbkę DNA.

Podejmowane są wszelkie starania, aby zestawy te były aktualizowane względem publikowanych w bazie IMGT HLA nowych informacji o dopasowaniach sekwencji. Aktualne dane o zestawach są dostępne na stronie www.biofortuna.com.

3. Opis testu

Metoda PCR SSP opiera się o zasadę, że do amplifikacji dochodzi tylko wtedy, gdy primery przy końcach 3' będą całkowicie dopasowane do sekwencji docelowej. W przypadku złego dopasowania primerów amplifikacja nie jest wydajna². Do każdej mieszaniny reakcyjnej PCR dołączana jest para primerów kontroli wewnętrznej, która powoduje amplifikację konserwatywnego regionu genu metabolizmu podstawowego (tzw. *housekeeping*); para primerów kontroli wewnętrznej jest wskaźnikiem prawidłowego przebiegu reakcji PCR. W typowaniu metodą SSP zazwyczaj wykorzystuje się wiele reakcji, które po wspólnym przeanalizowaniu, wskazują na dany genotyp. Wizualizacja zamplifikowanych produktów jest możliwa przy użyciu systemów, które oddzielają fragmenty DNA według ich rozmiarów z wykorzystaniem elektroforezy na żelu agarozowym.

4. Zawartość zestawu

- 10-40 polipropylenowych płytek lub pasków do PCR, zawierających od 1 do 96 naczynek PCR (w zależności od rodzaju zestawu), z których każde zawiera 10 µl uprzednio dodanych primerów poddanych suszeniu sublimacyjnemu, polimerazę, dNTP* oraz bufor. Każdy test lub paski są pakowane osobno w woreczki foliowe.
- 1 instrukcja używania
- Tabele interpretacyjne, karty charakterystyk (MSDS) oraz certyfikat badania (*Certificate of Analysis*) można pobrać ze strony firmy Biofortuna www.biofortuna.com. Jeśli pobranie tych danych ze strony internetowej nie powiedzie się, prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem.

* CleanAmp™ dNTP zostały wykorzystane w produktach SSPGo firmy Biofortuna na mocy licencji udzielonej przez firmę Trilink Biotechnologies Inc.

5. Niedostarczone odczynniki i sprzęt

- odpowiednie pipety i jałowe końcówki, np. pipety P10 z końcówkami o obj. 10 µl wyposażonymi w filtry
- zestaw/sprzęt do izolacji DNA
- spektrofotometr UV
- probówki polipropylenowe
- jałowa woda o stopniu czystości Molecular Biology Grade
- arkusze folii lub wieczka do zamykania probówek PCR (wieczka połączone w paski dostarczane są z zestawami z paskami probówek)
- 96-dołkowy termocykler z pokrywą grzejącą. Płytki i probówki PCR stosowane w zestawach firmy Biofortuna posiadają walidację do stosowania w większości termocyklierów dostępnych na rynku, jak np. w termocyklierach MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS oraz Techne TC-512. Inne modele mogą wymagać dalszej walidacji przez użytkownika.
- odczynniki do elektroforezy żelowej (agarozą, 0,5x TBE, marker masy cząsteczkowej do analizy fragmentów DNA o wielkości 1000 pz, 10 mg/ml bromku etydyny)
- sprzęt do elektroforezy żelowej (aparat do elektroforezy, saneczki na żel, zasilacz, system do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV)

6. Środki bezpieczeństwa i ostrzeżenia

- Do diagnostyki *in vitro*
- Testy powinny być wykonywane wyłącznie przez odpowiednio przeszkolony personel.
- Wszystkie uzyskane wyniki typowania powinny być zweryfikowane przez wykwalifikowany personel, zaś w przypadku ich wykorzystania przy podejmowaniu decyzji klinicznych, wyniki te powinny być potwierdzone przy użyciu innej metody typowania.
- Ze wszystkimi odczynnikami należy obchodzić się zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Czynności poprzedzające reakcję PCR oraz następujące po niej należy wykonywać w osobnych pomieszczeniach. Nie należy przenosić materiałów używanych po reakcji PCR z powrotem do pomieszczenia, gdzie wykonywane były czynności poprzedzające PCR.

- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Wszystkie preparaty krwiopochodne traktować jako potencjalnie zakaźne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Bromek etydyny jest substancją potencjalnie rakotwórczą. W przypadku jego stosowania należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Zachować ostrożność podczas stosowania źródeł promieniowania UV – należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne. Nigdy nie patrzeć bezpośrednio w źródło światła UV.
- Karty charakterystyk substancji niebezpiecznych (*Material Safety Data Sheets*) są dostępne na stronie internetowej www.biofortuna.com.

7. Przechowywanie i stabilność

Zestawy Biofortuna SSPGo powinny być przechowywane w temp. 4-30°C. Odczynniki powinny być ponownie nawodnione poprzez dodanie próbek DNA w ciągu 3 godzin od wyjęcia naczynek PCR z foliowych woreczków. Data ważności jest podana na opakowaniu. Nie stosować produktów po upływie daty ważności podanej na opakowaniu.

Nie stosować zestawów, jeśli woreczki foliowe są rozdarte lub podziurawione.

Należy upewnić się, czy po dodaniu DNA naczynka PCR są szczelnie zamknięte, w przeciwnym razie może dojść do parowania próbek podczas amplifikacji metodą PCR. Należy zwracać szczególną uwagę na krawędzie i rogi naczynek.

8. Sposób użycia

Wymogi dotyczące próbek DNA

Każda reakcja stosowana w badaniu w sposób optymalny wykorzystuje 50 - 100 ng DNA, aczkolwiek najistotniejszą kwestią jest to, aby każda reakcja była ponownie nawodniona poprzez dodanie dokładnie odmierzonych 10 µl płynu. A zatem badanie można wykonać z użyciem 10 µl DNA o stężeniu 5-10 ng/µl lub najpierw można dodać określoną objętość wody, aby umożliwić dodanie DNA o wyższym stężeniu, np. dodając 9 µl wody, a następnie 1 µl DNA o stężeniu 50-100 ng/µl. Jako że heparyna może hamować reakcję PCR zaleca się, aby nie przeprowadzać ekstrakcji DNA z heparynizowanych próbek krwi. OD_{260/280} próbki DNA powinno mieścić się w zakresie od 1,6 do 2 zgodnie z pomiarem spektrofotometru UV.

Wskazówki dotyczące czynności poprzedzających reakcję PCR

- Wyjąć płytkę lub pasek probówek SSPGo z zamkniętego woreczka.
- Zapisać numer partii, numer produktu oraz wersję testu(ów).
- Należy zauważyć, że pierwsza reakcja każdego locus testu ma zawsze kolor czerwony w odróżnieniu od pozostałych składników zestawu.
- Niektóre płytki PCR w ostatnim zagłębieniu zawierają „kontrolę bez matrycy” (ang. *no template control*) o zabarwieniu purpurowym, stanowiącą integralną część reakcji.
- Przy użyciu wyjąłowego sprzętu odmierzyć po 10 µl roztworu DNA do każdej reakcji na płytce lub w pasku probówek. Patrz komentarz w rozdziale 8 w części „Wymogi dotyczące próbek DNA”. Jeśli płytka zawiera kontrolę bez matrycy o purpurowym zabarwieniu, odmierzyć do niej 10 µl rozcieńczalnika próbki (bez DNA). Patrz komentarz dotyczący kontroli bez matrycy w rozdziale 8.
- Upewnić się, czy przed wykonaniem cyklu termicznego w każdej reakcji DNA ma styczność z suchymi odczynnikami. Można przeprowadzić krótkie wirowanie, aby upewnić się, że wszystkie roztwory DNA miały kontakt z suchymi odczynnikami.
- Reakcje zabezpieczyć za pomocą arkuszy folii lub wieczek do probówek PCR. Upewnić się, czy folia ściśle przylega, aby zapobiec parowaniu. Należy zwracać szczególną uwagę na krawędzie i rogi.
- Wstawić płytkę lub paski probówek bezpośrednio do termocyklera. Upewnić się, czy naczynka są całkowicie osadzone w bloku, a pokrywa jest w pełni dociśnięta. Jeśli któryś z tych warunków nie zostanie spełniony,

poszczególne reakcje PCR mogą się nie powieść. W niektórych modelach aparatów do PCR może być konieczne zastosowanie mat lub bloczków dociskających, aby mocno docisnąć produkt do bloku.

- ix. Uruchomić program PCR (patrz „Parametry reakcji PCR”).

KOMENTARZ DOTYCZĄCY TWORZENIA ZAWIESINY: Upewnić się, czy mieszaniny PCR utworzyły zawiesinę z próbką DNA w ciągu 3 godzin od wyjęcia płytki z foliowego woreczka.

KOMENTARZ DOTYCZĄCY KONTROLI BEZ MATRYCY: Niektóre zestawy zawierają kontrolę bez matrycy (NTC) jako ostatnią reakcję na płytce. Reakcja ta zawiera purpurowy barwnik, który pozwala na jej odróżnienie od pozostałych reakcji. Jej obecność w zestawie jest również odnotowana w dołączonych tabelach interpretacyjnych wyników. Kontrola NTC służy do wykrywania kontaminacji produktem PCR lub kontaminacji genomowym DNA pochodzącym z zestawów Biofortuna SSPGo, jaka może występować w wodzie użytej do utworzenia zawiesiny z DNA. W przypadku kontaminacji produktem PCR można zaobserwować obecność amplikonu(ów) o różnej wielkości, zaś w przypadku kontaminacji genomowym DNA obserwuje się obecność amplikonów o wielkości 187 pz.

KOMENTARZ DOTYCZĄCY WYSOKOŚCI PŁYTKI PCR/PROBÓWEK W PASKU: Zaleca się, aby wysokość płytek oraz probówek w paskach była taka sama, jeśli są one wkładane do tego samego urządzenia do przeprowadzania reakcji PCR. Różne wysokości mogą spowodować niewystarczający kontakt płytek lub probówek z pokrywą grzejną aparatu do przeprowadzania reakcji PCR. Może to przyczynić się do zmniejszenia wydajności amplifikacji metodą PCR lub też jej braku.

Parametry reakcji PCR

Dla reakcji PCR należy stosować poniższe parametry. Upewnić się, czy parametr szybkości zmiany temperatury (ang. *ramp speed*) jest ustawiony na co najmniej 1°C na sekundę, a następnie włączyć pokrywą grzejną. Pełne instrukcje dotyczące sposobu użycia, patrz instrukcja obsługi termocyklera. Termocyklery powinny być skalibrowane zgodnie z regułami akredytacyjnymi Amerykańskiego Towarzystwa Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki (*American Society of Histocompatibility and Immunogenetic, ASHI*) lub Europejskiej Federacji Immunogenetyki (*European Federation of Immunogenetics, EFI*).

Denaturacja	94°C	5 minut		
Denaturacja	96°C	15 sekund	←	10 cykli
Annealing	66°C	50 sekund		
Polimeryzacja	72°C	30 sekund		
Denaturacja	96°C	15 sekund	←	20 cykli
Annealing	64°C	50 sekund		
Polimeryzacja	72°C	30 sekund		

HOLD (utrzymanie temperatury) 15°C

Elektroforeza żelowa

Poniższe wskazówki dotyczą elektroforezy poziomej na żelu agarozowym: Przygotować 2% żel agarozowy w buforze 0,5x TBE. Po schłodzeniu żelu do temperatury ok. 60°C dodać bromek etydyny do uzyskania końcowego stężenia wynoszącego 0,5 µg/ml. Wylać żel i umieścić w nim grzebienie standardu *microtitre* (np. 12 x 8 zagłębień w odstępach 9 mm). Po zastygnięciu żelu wyjąć grzebienie i zalać żel buforem 0,5x TBE. Przenieść co najmniej 5 µl, lecz nie więcej niż 10 µl każdej reakcji z płytki lub paska probówek do odpowiedniego zagłębienia na żelu, zapisując położenie każdej reakcji. Do określania wielkości cząsteczek można skorzystać ze wzorca masy 100 pz. Prowadzić rozdział przez 20 minut w polu elektrycznym o natężeniu 10 V/cm.

Szczegółowe informacje na temat poszczególnych urządzeń/wyposażenia, patrz instrukcje użytkownika wytwórcy aparatu do elektroforezy. Obrazowanie żeli powinno być przeprowadzone z użyciem systemu do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV.

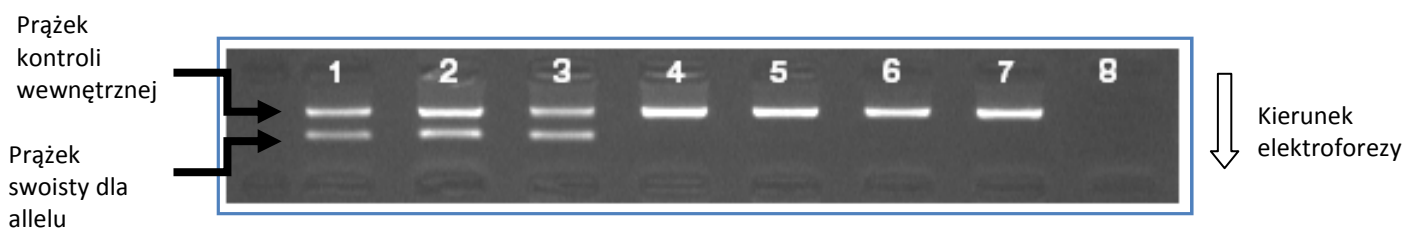
9. Interpretacja

Zestawy SSPGo są opracowane w taki sposób, aby wyniki można było uzyskać ręcznie w oparciu o tabele interpretacyjne dostępne na stronie www.biofortuna.com. W przypadku problemów z dostępem do strony prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem.

Przyłożyć obraz żelu do odpowiedniego formularza interpretacyjnego, dopasowując numery zestawu i wersji. Obejrzeć obraz żelu. Każda reakcja powinna zawierać prążek kontroli dodatniej. Należy korzystać z tabeli interpretacyjnej, bowiem prążki te mogą mieć różne rozmiary w zależności od produktu SSPGo. Prążki kontroli wewnętrznej mogą być mniej intensywne, jeśli obecne są prążki swoiste dla alleli. Jeśli obecny jest prążek swoisty dla danego allelu, lecz brak jest prążka kontroli wewnętrznej, taki wynik nadal powinno się uważać za dodatni. Należy zignorować wszelkie prążki mniejsze niż 70 pz, bowiem są to nieprzyłączone primery.

Określić ilość dodatnich reakcji. Na reakcje dodatnie wskazuje obecność prążków o oczekiwanej wielkości, zgodnie z tabelami interpretacyjnymi. Należy pamiętać, że w danej reakcji można uzyskać produkty o więcej niż jednej wielkości - są to tzw. reakcje *multiplex* (z dodatkiem większej ilości primerów) i są one odnotowane w tabelach interpretacyjnych.

Porównać dodatnie reakcje z tabelami interpretacyjnymi. Wynik dodatni w reakcji wskazuje na obecność co najmniej jednego z alleli, podanych dla niej w tabeli interpretacyjnej. Każdy określony allel można zamplifikować w kilku próbkach – jeśli dany allel jest obecny, wszystkie te reakcje powinny dać wynik dodatni.



Rys. 1 Przykłady reakcji dodatnich - obecność prążków swoistych dla danych alleli oraz prążków kontroli wewnętrznej (reakcje 1-3); reakcje ujemne - obecność prążków kontroli wewnętrznej i brak prążków swoistych dla danych alleli (reakcje 4-7) oraz brak reakcji - brak jakichkolwiek prążków (reakcja 8).

Należy upewnić się, czy wersja zestawu odpowiada wersji podanej w tabeli interpretacyjnej.









10. Procedury zapewnienia i kontroli jakości

Jakość każdej serii zestawu SSPGo jest sprawdzana przed jej wprowadzeniem do sprzedaży przez firmę Biofortuna. Próbkę każdej serii zestawu są sprawdzane względem zdefiniowanego panelu składającego się z próbek ludzkiego DNA w celu zapewnienia prawidłowego działania. Każda reakcja przeszła walidację względem co najmniej 48 dobrze scharakteryzowanych próbek DNA pochodzących z linii komórkowych. Firma Biofortuna zaleca, aby laboratoria przeprowadzały wewnętrzną walidację wszystkich nowych produktów do typowania przed ich użyciem do badania próbek klinicznych. Typowanie diagnostyczne powinno być przeprowadzane wyłącznie przez wysoce wykwalifikowany i w pełni przeszkolony personel, zaś uzyskane wyniki powinny być sprawdzane przez innego przeszkolonego pracownika.

11. Bibliografia

- 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. Objasnienia użytych symboli

	Liczba testów
	Przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej
	Sprawdzić w instrukcji użycia
	Miejsce produkcji
	Do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Data ważności
 4°C → 30°C	Temperatura przechowywania
	Numer partii

13. Dane kontaktowe wytwórcy

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



14. Tłumaczenia

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:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Wskazówki dotyczące wykrywania i rozwiązywania problemów z zestawami SSPGo

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
Brak amplifikacji	Nieprawidłowe stężenie użytego DNA	Zmierzyć ilość DNA oraz upewnić się, czy dodano łącznie 50 - 100 ng DNA w objętości 10 µl na każdą reakcję.
	Inhibitory PCR obecne w próbce DNA	Unikać stosowania heparynizowanej krwi, lub jeśli jest to niemożliwe, wyizolować DNA z przemytych nienaruszonych limfocytów tak, aby nie dopuścić do kontaktu heparyny z DNA. Opisano protokoły wykorzystujące heparynazę do usuwania heparyny z próbek DNA. Ponownie wyizolować DNA. Informacje dotyczące zastosowania zestawu do ekstrakcji DNA, patrz wytyczne producenta.
	Słaba jakość użytej próbki DNA	Zbadać jakość DNA. Wartość współczynnika A260/A280 powinna wynosić 1,6 – 2,0 według pomiaru spektrofotometrycznego UV. Upewnić się, czy DNA jest w pełni zawieszony w roztworze.
	Odczynniki nie tworzą zawiesiny	Upewnić się, czy peleciki są ponownie w pełni nawodnione po dodaniu DNA. Jeśli to konieczne, krótko odwirować płytkę. Upewnić się, czy do każdej reakcji dodano 10 µl roztworu DNA.
	Nieprawidłowe ustawienia termocyklera	Upewnić się, czy program PCR został prawidłowo wprowadzony zgodnie z instrukcją. Upewnić się, czy pokrywa grzejna termocyklera jest włączona i wystarczająco mocno dociśnięta. Dalsze informacje, patrz instrukcja obsługi termocyklera.
	Problemy podczas elektroforezy	Upewnić się, czy do aparatu do elektroforezy jest podłączone zasilanie - sprawdzić zasilacz i oczyścić elektrody. Zanurzyć żel w buforze 0,5X TBE. Upewnić się, czy użyto 0,5 µg/ml świeżego bromku etydyny. Sprawdzić, czy podczas obrazowania żeli natężenie światła UV było wystarczające. Dalsze informacje, patrz instrukcja obsługi aparatu do elektroforezy oraz zasilacza.
	Płytki nieprawidłowo zamknięte	Niedokładne zabezpieczenie płytek może doprowadzić do parowania próbek podczas reakcji PCR. Firma Biofortuna dostarcza zalecane arkusze folii zabezpieczającej (numer produktu BF-40-11). Upewnić się, czy wszystkie zagłębienia są odpowiednio

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
Losowe wypadanie (ang. <i>drop-out</i>) amplikonów specyficznych dla kontroli i/lub alleli	Błędy dotyczące żelu	<p>zabezpieczone. Zwrócić szczególną uwagę na zagłębienia znajdujące się blisko krawędzi płytki lub paska PCR.</p> <p>Upewnić się, czy wszystkie zagłębienia na żelu zostały zapełnione w prawidłowej kolejności i czy jednakowa objętość reakcji PCR została dodana do każdego zagłębienia.</p> <p>Przeprowadzić kalibrację pipet zgodnie z instrukcjami wytwórcy.</p> <p>Sprawdzić, czy zagłębienia zostały prawidłowo uformowane w żelu. Zachować ostrożność podczas wyjmowania grzebieni, bowiem można naruszyć dno zagłębień.</p> <p>Upewnić się, czy przed wylaniem żelu agarozu uległa całkowitemu rozpuszczeniu.</p> <p>Upewnić się, czy rozdział nie trwał zbyt długo, bowiem krótsze amplikony mogą „wypadać” z żelu na końcach.</p> <p>Upewnić się, czy rozdział trwał wystarczająco długo, aby doszło do separacji prążków.</p> <p>Używać świeżego roztworu bromku etydyny.</p>
	Problemy dotyczące termocyklera	<p>Niepowodzenie reakcji, szczególnie w pozycjach skrajnych, może być spowodowane niewystarczającym dociśnięciem pokrywy. Może to być przyczyną parowania oraz kondensacji reakcji PCR od połowy naczynka PCR, prowadząc do błędów lub braku reakcji PCR.</p> <p>Przestrzegać wytycznych wytwórcy dotyczących konserwacji oraz kalibracji termocyklera.</p> <p>Sprawdzić, czy parametry reakcji PCR są prawidłowo ustawione zgodnie z instrukcją używania.</p>
	Problemy dotyczące parowania	<p>Upewnić się, czy wszystkie zagłębienia są odpowiednio zamknięte. Zwrócić szczególną uwagę na zagłębienia znajdujące się blisko krawędzi płytki lub pasków PCR.</p> <p>Upewnić się, czy pokrywa grzejna jest włączona i czy siła docisku jest wystarczająca. Firma Biofortuna dostarcza zalecane arkusze folii zabezpieczającej (numer produktu BF-40-11).</p>
	Sporadyczne błędy spowodowane przez problemy dotyczące próbek DNA	<p>Brak DNA: Upewnić się, czy DNA jest obecne we wszystkich zagłębieniach.</p> <p>Nieprawidłowa objętość: Upewnić się, czy do każdej reakcji dodano po 10 µl roztworu DNA.</p> <p>Zbyt dużo DNA: Ilość powyżej 200 ng może spowodować błędy reakcji PCR.</p>

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
		Zanieczyszczenia obecne w próbkach DNA mogą sporadycznie lub w dużym stopniu uniemożliwić amplifikację.
Rozmazany obraz żelu	DNA	Sprawdzić stężenie i czystość DNA. Dodanie zbyt dużej ilości DNA do reakcji PCR może przyczynić się do uzyskania rozmazanych obrazów żeli.
Słaba amplifikacja	Problem dotyczący stężenia DNA	Sprawdzić, czy stężenie DNA nie jest zbyt wysokie ani zbyt niskie. Docelowe stężenie DNA w każdej reakcji powinno wynosić 100 ng DNA w roztworze 10 µl.
	Problemy dotyczące termocyklera	Przestrzegać wytycznych wytwórcy dotyczących konserwacji oraz kalibracji termocyklera. Sprawdzić, czy parametry reakcji PCR są prawidłowo ustawione zgodnie z instrukcją używania.
	Błędy dotyczące żelu	Upewnić się, czy do każdego zagłębienia dodano jednakową objętość reakcji - pomiędzy 5 µl a 10 µl. Przeprowadzić kalibrację pipet zgodnie z instrukcjami wytwórcy. Używać świeżego roztworu bromku etydyny.
Nieswoista amplifikacja	Problem dotyczący stężenia DNA	Sprawdzić, czy stężenie DNA nie jest zbyt wysokie ani zbyt niskie. Docelowe stężenie DNA w każdej reakcji powinno wynosić od 50 do 100 ng DNA w roztworze 10 µl.
	Reakcje wstawione w nieprawidłowej kolejności	Sprawdzić ustawienie ścieżek w reakcji PCR oraz w żelu. Starać się nie dopuścić do przelania się produktów z sąsiednich zagłębień podczas elektroforezy poprzez ich odpowiednie napełnienie oraz wyjęcie grzebieni dopiero po zastygnięciu żelu.
	Zidentyfikowany nowy allel	Mogą być obecne allele uprzednio niewykryte podczas sekwencjonowania, tworząc nowy wzór amplifikacji. W przypadku stosowania starych arkuszy interpretacyjnych należy pobrać bardziej aktualny arkusz ze strony www.biofortuna.com . Jeśli zaktualizowane dane nie pasują do nowego wzoru, należy go sprawdzić, stosując inny zestaw firmy Biofortuna lub podjąć próbę zidentyfikowania metodą sekwencjonowania. Ewentualnie można skontaktować się z działem serwisu technicznego firmy Biofortuna w celu uzyskania pomocy i porady technicznej.
Wzór amplifikacji niemożliwy do zinterpretowania	Niewłaściwa interpretacja artefaktu jako specyficznego prążka.	Sprawdzić prawidłowy rozmiar prążka w tabelach interpretacyjnych odpowiednich dla danej wersji zestawu. Sprawdzić, czy wszystkie specyficzne produkty amplifikacji mają prawidłową wielkość lub czy artefakt (przeniesienie, primer-dimer) nie został błędnie zinterpretowany jako produkt amplifikacji.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
	Reakcje wstawione w nieprawidłowej kolejności	Sprawdzić ustawienie ścieżek w reakcji PCR oraz w żelu.
	Błędy poszczególnych reakcji PCR	Sprawdzić, czy obecne są wszystkie wewnętrzne kontrole dodatnie. Ponownie zinterpretować wyniki, pomijając wszelkie brakujące reakcje.
	Brak krótkich amplikonów	Rozdział elektroforetyczny zbyt długi, krótkie amplikony przesunęły się poza warstwę żelu lub ominęły bromek etydyny lub uległy rozproszeniu, przenikając do poprzedniego zagłębienia w żelu. Przeprowadzać elektroforezę w warunkach odpowiadających danemu systemowi żeli.
	Zidentyfikowany nowy allel w próbce	Sporadycznie może dojść do odkrycia nowych alleli, w wyniku czego możliwe jest uzyskanie takiego wzoru amplifikacji, który nie odpowiada istniejącym allelom. Prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem.