



Návod na použitie pre typizačné kity Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Verzia zo 4. jún 2011.

1. Použitie

Biofortuna HLA SSPGo Kits sú kvalitatívne súpravy založené na DNA na určenie HLA alel buď pomocou kitu „s vysokým rozlíšením“ alebo pomocou kitu pre skupinovo špecifickú amplifikáciu alel „so stredným rozlíšením“. Všeobecná definícia strednej úrovne rozlíšenia je taká, že väčšina výsledkov je pri ňom jasne určená na úrovni dvoch číslic, napr. DQB1*02, DQB1*05 atď. Vysoké rozlíšenie je všeobecne definované tak, že väčšina alel je určená na úrovni štyroch číslic, ako napr. DQB1*02:01, DQB1*05:01 atď. Tento produkt je určený len pre diagnostické účely *in vitro* a používať ho môžu iba vyškolené osoby.

2. Úvod

Molekuly HLA hrajú kľúčovú úlohu pri imunite a rozpoznávaní molekúl vlastných a cudzích a v dôsledku toho je genotypizácia HLA a párovanie HLA povinné pred väčšinou typov transplantácií. Antigény HLA ohraničujú špecifitu T-bunkami sprostredkovanej imunitnej odpovede a genotypizácia HLA je užitočným vyhľadávacím nástrojom množstva imunitných porúch alebo imunitných odpovedí na patogény, vakcináciu alebo liečbu medikamentmi. Genotypizáciu HLA možno použiť na pomoc pri diagnostikovaní ochorení, u ktorých sú alely HLA významným spôsobom spojené so stavom ochorenia.

Väčšina HLA génov je vysoko polymorfných a na presné stanovenie HLA antigénov sa všeobecne vyžaduje genotypizácia DNA. Genotypizácia pomocou PCR reakcie využívajúca priméry špecifické pre sekvenciu (SSP - Sequence-Specific Primers)¹ je rýchla metóda genotypizácie HLA vhodná najmä v situáciách, kedy je požadovaná stredná úroveň rozlíšenia. U kitov Biofortuna SSP sú všetky reakcie v suchom stave, vrátane polymerázy, takže jediné, čo musí užívateľ pred PCR urobiť, je pridať DNA.

Tomu, aby boli kity aktualizované v súlade novým usporiadaním IMGT HLA, je venované náležité úsilie. Aktualizácie kitu sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com.

3. Popis testu

PCR SSP je založená na princípe, že k amplifikácii dôjde iba u primérov, ktoré sa budú úplne zhodovať 3' koncom s cieľovou sekvenciou. Zamenené priméry neposkytnú pozitívny produkt amplifikácie². Pár primérov internej kontroly, ktorý amplifikuje zachovaný región prevádzkového génu, je obsiahnutý v každej PCR reakčnej zmesi; pár primérov internej kontroly je indikátorom integrity PCR reakcie. Genotypizácia SSP všeobecne využíva viacnásobné reakcie, ktoré pri spoločnej analýze indikujú genotyp. Vizualizáciu produktov amplifikácie možno dosiahnuť pomocou elektroforetického delenia na agarózovom géle, ktorý separuje fragmenty DNA podľa veľkosti.

4. Obsah kitu

- 10 – 40x polypropylénové PCR platne alebo stripy, ktoré obsahujú 1 – 96 PCR jamiek (závisí od typu kitu), každá jamka obsahuje 10 µl dopredu nadávkovaných mrazených primérov v suchom stave, polymerázu, dNTP* a pufer. Každý test alebo stripy sú individuálne balené vo fólii.
- 1 x návod na použitie.
- Interpretačné tabuľky, MSDS (karty bezpečnostných údajov) a šaržový certifikát vydaný výrobcom (Certificate of Analysis) možno získať z webovej stránky spoločnosti Biofortuna www.biofortuna.com. Ak nemáte možnosť získať ich z webovej stránky, kontaktujte prosím distribútora.

*CleanAmp™ dNTP podliehajú licencií spoločnosti Trilink Biotechnologies Inc so zvoľením na použitie v produktoch Biofortuna SSPGo.

5. Reagencie a vybavenie, ktoré nie sú súčasťou dodávky

- Vhodné pipety a sterilné špičky, napr. pipeta P10 s 10µl filtračnými špičkami.
- Súprava/vybavenie na izoláciu DNA.
- UV spektrofotometer.
- Polypropylénové skúmavky.
- Sterilná voda s molekulárnym stupňom čistoty.
- Uzávery alebo fólie na uzavretie PCR. (Uzávery stripov sú dodávané v súpravách so stripmi)
- Termocyklér s 96 jamkami a vyhrievaným vekom. Platničky a skúmavky PCR použité v kitoch spoločnosti Biofortuna boli validované pre použitie s väčšinou termocyklérov na trhu, vrátane termocyklérov MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Rôzne modely môžu vyžadovať ďalšiu validáciu užívateľom.
- Reagencie pre gélovú elektroforézu (agaróza, 0,5x TBE pufer, 1 000bp DNA marker molekulovej hmotnosti, roztok etídiumbromidu 10 mg/ml).
- Vybavenie pre gélovú elektroforézu (gélová aparátúra, sieťový zdroj, dokumentačný systém pre gél s UV transluminátorom).

6. Bezpečnosť a varovania

- Pre diagnostické účely *in vitro*.
- Testy musí vykonávať iba náležite vyškolený personál.
- Všetky výsledky typizácie musí overiť kvalifikovaný člen personálu, a ak sú použité na klinické rozhodovanie, výsledky musia byť potvrdené pomocou iných metód typizácie.
- So všetkými reagentami zaobchádzajte v súlade so zásadami Správnej laboratórnej praxe.
- Oblasti, kde sa vykonáva postup pred a po PCR musia byť oddelené. Žiadny materiál používaný po PCR nevášajte späť do oblasti pred PCR.
- **Varovanie týkajúce sa biorizika:** So všetkými produktmi krvného pôvodu zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými.
- **Varovanie týkajúce sa biorizika:** Etídiumbromid je potenciálny karcinogén. Pri jeho použití vždy noste ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare.
- **Varovanie týkajúce sa biorizika:** Budte opatrní pri používaní zdrojov UV žiarenia - noste vždy ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare. Nikdy sa nepozerajte priamo do zdroja UV svetla.
- Karty bezpečnostných údajov sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com.

7. Skladovanie a stabilita

Kity Biofortuna SSPGo skladujte pri teplote 4 – 30 °C. Hneď po vybratí PCR jamiek z obalu je potrebné reagencie rehydratovať pomocou DNA do 3 hodín. Dátum expirácie je uvedený na obale. Po dátume vytlačennom na obale produkt nepoužívajte.

Nepoužívajte súpravy, ak je fóliový obal natrhnutý alebo prepichnutý.

Zaistite, aby boli PCR jamky po nadávkovaní DNA tesne uzavreté, pretože by mohlo dôjsť k vyparovaniu počas PCR amplifikácie. Zvláštnu pozornosť venujte okrajom a rohom.

8. Pokyny pre používanie

Požiadavky na vzorku DNA

Všetky reakcie testu sú optimalizované na 50 – 100 ng DNA, ale kritickým bodom je potreba rehydratovať každú reakciu presne 10 µl kvapaliny. Preto možno test uskutočniť tak, že sa použije 10 µl DNA s koncentráciou 5 – 10 ng/µl alebo možno najskôr pridať objem vody, ktorý umožní prídanie DNA s vyššou koncentráciou, napr. sa pridá 9 µl vody a potom sa pridá 1 µl DNA s koncentráciou 50 – 100 ng/µl. Keďže heparín môže PCR reakciu inhibovať, neodporúča sa extrahovať DNA z heparinizovaných vzoriek krvi. Hodnota $OD_{260/280}$ vzorky DNA by pri meraní UV spektrofotometrom mala spadať do rozmedzia 1,6 – 2.

Pokyny pre postup pred PCR

- i. Vyberte platňu alebo strip SSPGo z uzavretého sáčku.
- ii. Poznamenajte si číslo šarže, číslo produktu a verziu metódy.
- iii. Prvá reakcia každého testovaného lokusu má vždy červenú farbu v porovnaní so zvyškom kitu.
- iv. Niektoré PCR platne obsahujú v poslednej jamke integrovanú fialovo sfarbenú „kontrolu bez matrice“.
- v. Pomocou sterilného vybavenia napipetujte 10 µl roztoku DNA do každej reakcie na platni alebo stripe. Pozri poznámku v oddiele 8 - Požiadavky na vzorky DNA. Ak platňa obsahuje integrovanú fialovo zafarbenú „kontrolu bez matrice“, napipetujte do nej 10 µl roztoku na riedenie vzoriek (bez DNA). Pozri poznámku v oddiele 8 - Kontrola bez matrice.
- vi. Zaistite, aby bola DNA v kontakte s reagentami v suchom stave v každej reakcii pred vystavením teplotnému cyklu. Krátka centrifugácia zaistí, že všetok roztok DNA bude v kontakte s reagentami v suchom stave.
- vii. Utesnite reakcie uzatváracou fóliou alebo uzávermi pre PCR skúmavky. Uistite sa, že fólia je čo najlepšie utesená, aby sa predišlo odparovaniu. Zvláštnu pozornosť venujte okrajom a rohom.
- viii. Umiestnite platňu alebo stripy priamo do termocykléru. Uistite sa, že jamky sú úplne vložené do bloku a veko je úplne stlačené. Ak tak neurobíte, môže dôjsť k individuálnemu zlyhaniu PCR reakcie. U niektorých modelov prístrojov pre PCR reakciu môže byť nevyhnutné použiť kompresné podložky alebo bloky, aby bolo dosiahnuté efektívne stlačenie produktu v bloku.
- ix. Spustíte program pre PCR reakciu (pozri Parametre PCR).

POZNÁMKA K RESUSPENZII: Zaistite, aby zmesi pre PCR reakciu boli resuspendované so vzorkou DNA do 3 hodín od vybratia platne z obalu.

POZNÁMKA KU KONTROLE BEZ MATRICE: Niektoré kity obsahujú kontrolu bez matrice (NTC - No Template Control) ako poslednú reakciu platničky. Táto reakcia obsahuje fialové farbivo, aby ju bolo možné odlišiť od ostatných reakcií a jej prítomnosť v súprave je uvedená v priložených interpretačných tabuľkách. NTC je v kitoch Biofortuna SSPGo navrhnutá na detekciu kontaminácie PCR reakcie alebo detekciu genomickej DNA, ktorá môže byť prítomná vo vode používanej na resuspenziu DNA. Ak je PCR reakcia kontaminovaná, budú pozorované amplikóny rôznych veľkostí, ak bude kontaminovaná genomickou DNA, bude pozorovaný amplikón s veľkosťou 187 bp.

POZNÁMKA TÝKAJÚCA SA VÝŠKY PROFILU PCR PLATNIČIEK/STRIPOV: Odporúča sa, aby výška profilu platničiek a stripov bola zhodná, ak sú umiestnené v rovnakom prístroji pre PCR reakciu. Rozdielne výšky profilov môžu mať za

následok nedostatočný kontakt s vyhrievaným vekom prístroja pre PCR reakciu. Výsledkom môže byť nedostatočná amplifikácia PCR alebo jej zlyhanie.

Parametre PCR

Pre PCR je potrebné použiť nasledujúce parametre. Uistite sa, že rýchlosť stúpania/klesania je najmenej 1 °C za sekundu a zapnite vyhrievanie veka. Kompletný návod na použitie je uvedený v užívateľskej príručke výrobcu termocykléru. Termocykléry musia byť kalibrované podľa akreditačných pravidiel vydaných organizáciou American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) alebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturácia	94 °C	po dobu 5 minút		
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	←	10 cyklov
Anelácia	66 °C	po dobu 50 sekúnd		
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd		
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	←	20 cyklov
Anelácia	64 °C	po dobu 50 sekúnd		
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd		

UDRŽIAVAJTE PRI TEPLOTE 15 °C

Gélová elektroforéza

Tieto pokyny aplikujte pri horizontálnej elektroforéze na agarózovom géle: Pripravte 2% agarózový gél v 0,5x TBE pufri. Keď je gél ochladený na približne 60 °C, pridajte etídiumbromid tak, aby konečná koncentrácia bola 0,5 µg/ml. Nalejte gél a vložte hrebene na vytvorenie mikrotitračných jamiek (napr. jamiek 12 x 8 s 9mm medzerami). Po stuhnutí vyberte hrebene a ponorte gél do roztoku 0,5x TBE pufri. Preneste 5 – 10 µl z každej reakcie platne alebo stripu do príslušnej jamky v géle a poznamenajte si pozíciu každej reakcie. Na určenie veľkosti môže byť vhodný 100 bp ladder (veľkostný marker). Elektroforetickú separáciu nechajte prebiehať 20 minút pri 10 V/cm.

Podrobnosti týkajúce sa špecifického vybavenia sú uvedené v návode na použitie od výrobcu vášho elektroforetického systému. Gél je potrebné zobrazit pomocou UV dokumentačného systému pre gél s UV transluminátorom.

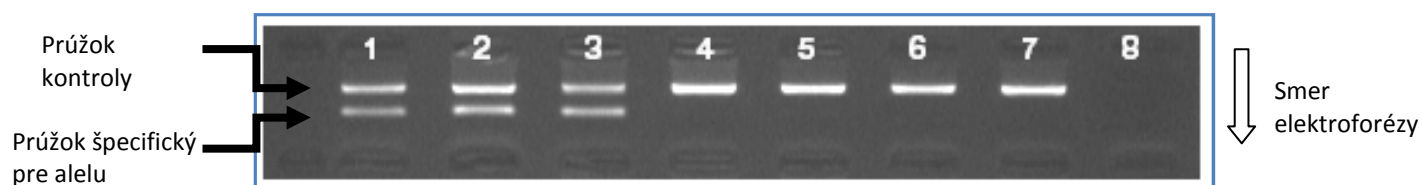
9. Interpretácia

Kity SSPGo boli navrhnuté tak, aby výsledky mohli byť stanovené manuálne pomocou interpretačných tabuliek, ktoré sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com. Ak máte problémy s prístupom na webovú stránku, kontaktujte prosím distribútora.

Pripojte snímku gélu k zodpovedajúcemu interpretačnému formuláru tak, aby súhlasili čísla súpravy a verzie. Vyhodnoťte zobrazenie gélu. Každá reakcia by mala obsahovať pozitívny kontrolný prúžok. Pozri interpretačné tabuľky, keďže v rôznych produktoch SSPGo môže mať rôznu veľkosť. Prúžky interných kontrol sa môžu objaviť ako oveľa slabšie ako prúžky špecifické pre alely. Ak je prítomný prúžok špecifický pre alelu, ale nie prúžok pre kontrolu, výsledok sa tiež považuje za pozitívny. Prúžkom menším ako 70 bp nevenujte pozornosť, keďže ide o neinkorporované priméry.

Určite pozitívne reakcie. Pozitívne reakcie sú indikované pomocou prúžkov očakávanej veľkosti, ktoré sú uvedené v interpretačných tabuľkách. V danej reakcii môže byť viac ako jedna veľkosť produktu - ide o multiplexné reakcie a v interpretačných tabuľkách sú uvedené.

Pozitívne reakcie porovnajte s interpretačnými tabuľkami. Pozitívny výsledok v reakcii indikuje prítomnosť najmenej jednej z alel uvedenej pri tejto reakcii v interpretačnej tabuľke. Daná alela môže byť amplifikovaná v niekoľkých skúmavkách - ak je alela prítomná, mali by byť pozitívne všetky relevantné reakcie.



Obr. 1 Príklady pozitívnych reakcií, indikovaných prítomnosťou prúžkov špecifických pre alelu a prúžkov kontrol (reakcie 1 – 3); negatívnych reakcií, indikovaných prítomnosťou prúžkov kontrol, ale neprítomnosťou prúžkov špecifických pre alelu (reakcie 4 – 7); a zlyhania reakcie, indikovanej neprítomnosťou akéhokoľvek pásu (reakcia 8).

Uistite sa, že verzia súpravy zodpovedá verzii interpretačnej tabuľky.

10. Zaistenie a kontrola kvality

Kvalita každej šarže SSPGo sa kontroluje pred uvoľnením produktu z výroby spoločnosti Biofortuna. Vzorky každej šarže kitu sú kontrolované vzhľadom na definovaný panel so vzorkami DNA ľudského pôvodu, aby bola zaistená správna funkčnosť. Každá reakcia bola validovaná najmenej so 48 vzorkami dobre charakterizovaných DNA bunkových línií. Spoločnosť Biofortuna odporúča, aby každé laboratórium interne validovalo akékoľvek nové produkty určené na typizáciu predtým, ako ich použije s klinickými vzorkami. Typizáciu pre diagnostické účely môže vykonávať iba úplne vyškolený a kvalifikovaný pracovník a výsledky musia byť krížovo skontrolované iným vyškoleným členom personálu.

11. Literatúra

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

12. Vysvetlivky k používaným symbolom

▽	Počet testov
EC REP	Zástupca v krajinách Európskeho spoločenstva
📖	viď návod na použitie
🏭	Miesto výroby
IVD	Diagnostické pomôcky <i>in vitro</i>
🕒	Dátum expirácie
4°C ↕ 30°C	Teplota skladovania
LOT	Číslo šarže

13. Kontaktné údaje výrobcu

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. Preklady

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
Россию:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Riešenie problémov pri používaní produktu SSPGo

Problém	Pravdepodobná príčina	Nápravné opatrenia
Pri žiadnej reakcii nedošlo k amplifikácii	Nesprávna koncentrácia použitej DNA	Zmerajte množstvo DNA a zaistite, aby bolo do každej reakcie pridaných celkovo 50 – 100 ng DNA v objeme 10 μ l.
	Vo vzorke DNA sú prítomné inhibítory PCR reakcie	Vyhňte sa použitiu heparinizovanej krvi, ak to nie je možné, extrahujte DNA z premytých intaktných lymfocytov, takže heparín nebude s DNA v kontakte. Boli popísané postupy pre použitie heparinázy na odstránenie heparínu zo vzoriek DNA. DNA extrahujte znovu. Pozri návod na použitie od výrobcu súpravy na extrakciu DNA.
	Nízka kvalita použitých vzoriek DNA	Zmerajte kvalitu DNA. Hodnota pomeru A260/A280 nameraná UV spektrofotometrom musí byť v rozmedzí 1,6 – 2,0. Uistite sa, že bola DNA pred použitím úplne resuspendovaná.
	Reagencie nie sú úplne resuspendované	Uistite sa, že boli pelety pred pridaním DNA úplne rehydratované. V prípade potreby platničku krátko centrifugujte. Uistite sa, že bolo pre každú reakciu použitých 10 μ l DNA roztoku.
	Termocyklér nebol nastavený správne	Uistite sa, že bol program PCR zadaný správne podľa návodu na použitie. Uistite sa, že vyhrievané veko termocykléru je usadené a dostatočne utesnené. Ďalšie pokyny sú uvedené v návode na použitie termocykléru.
	Problémy týkajúce sa elektroforézy	Uistite sa, že do elektroforetickej aparatúry ide elektrický prúd - skontrolujte sieťový zdroj a vyčistite elektródy. Použite 0,5x TBE pufer pre separáciu. Uistite sa, že sa používal čerstvý roztok 0,5 μ g/ml etídiumbromidu. Skontrolujte, či je pri zobrazení gélov UV žiarenie dostatočné. Ďalšie pokyny sú uvedené v návode od výrobcu elektroforetickej aparatúry a sieťového zdroja.

Problém	Pravdepodobná príčina	Nápravné opatrenia
	Platničky nie sú správne utesnené	<p>Nedostatočné utesnenie platničiek môže viesť k odparovaniu počas PCR. Spoločnosť Biofortuna dodáva odporúčané tesniace fólie (číslo produktu BF-40-11).</p> <p>Uistite sa, že všetky jamky sú náležite utesnené. Zvláštnu pozornosť venujte utesneniu jamiek na okrajoch PCR platne alebo stripu.</p>
Náhodné chyby pri zázname kontrol a/alebo amplikónov špecifických pre alely	Chyby týkajúce sa gélu	<p>Uistite sa, že všetky jamky boli nanosené do gélu v správnom poradí a do všetkých bol pridaný rovnaký objem PCR reakcie.</p> <p>Nakalibrujte pipety podľa pokynov výrobcu.</p> <p>Skontrolujte, či sa jamky v géle vytvorili správne. Hrebene odstraňujte opatrne, pretože môže dôjsť k roztrhnutiu dna jamiek.</p> <p>Pred nanosením gélu sa uistite, že agaróza je úplne rozpustená.</p> <p>Uistite sa, že elektroforéza v géle neprebíha príliš dlho, pretože menšie amplikóny by mohli prebehnúť cez koniec gélu.</p> <p>Uistite sa, že elektroforéza v géle prebiehala dostatočne dlho, aby mohlo dôjsť k separácii amplikónov.</p> <p>Použite čerstvý roztok etídiumbromidu.</p>
	Problémy týkajúce sa termocykléru	<p>Zlyhanie metódy, najmä pozdĺž okrajov, môže byť spôsobené nedostatočným utesnením veka. To môže viesť k odpareniu a kondenzácii PCR reakcie v hornej polovici mikroskúmavky pre PCR reakciu, takže PCR reakcia je nedostatočná.</p> <p>Pri údržbe a kalibrácii termocykléru postupujte presne podľa pokynov výrobcu.</p> <p>Podľa návodu na použitie skontrolujte, či sú parametre PCR správne.</p>
	Problémy týkajúce sa odparovania	<p>Uistite sa, že všetky jamky sú náležite utesnené. Zvláštnu pozornosť venujte utesneniu jamiek na okrajoch PCR platne alebo stripu.</p> <p>Uistite sa, že je zapnuté vyhrievanie veka a že veko je dostatočne stlačené. Spoločnosť Biofortuna dodáva odporúčané tesniace fólie (číslo produktu BF-40-11).</p>

Problém	Pravdepodobná príčina	Nápravné opatrenia
	Sporadické zlyhanie kvôli problémom týkajúcich sa DNA	<p>DNA nie je prítomná: Uistite sa, že je DNA prítomná vo všetkých jamkách.</p> <p>Nesprávny objem: Uistite sa, že je do každej reakcie pridaných 10 µl roztoku DNA.</p> <p>Pridané príliš veľa DNA: Koncentrácia vyššia ako 200 ng môže spôsobiť zlyhanie PCR reakcie.</p> <p>Kontaminácie DNA môžu viesť k sporadickému alebo rozsiahlemu zlyhaniu amplifikácie.</p>
Rozmazané zobrazenie gélu	DNA	Skontrolujte koncentráciu a čistotu DNA. Pridanie príliš veľkého množstva DNA do PCR reakcií môže spôsobiť rozmazané zobrazenie gélu.
Slabá amplifikácia	Problémy týkajúce sa koncentrácie DNA	Skontrolujte, či koncentrácia DNA nie je príliš vysoká ani príliš nízka. Dávkujte 100 ng DNA na reakciu v 10 µl.
	Problémy týkajúce sa termocykléru	<p>Pri údržbe a kalibrácii termocykléru postupujte presne podľa pokynov výrobcu.</p> <p>Podľa návodu na použitie skontrolujte, či sú parametre PCR správne.</p>
	Chyby pri príprave gélu	<p>Uistite sa, že bol do každej jamky pridaný rovnaký objem v rozmedzí 5 – 10 µl.</p> <p>Nakalibrujte pipetu podľa pokynov výrobcu.</p> <p>Použite čerstvý roztok etídiumbromidu.</p>
Nešpecifická amplifikácia	Problémy s koncentráciou DNA	Skontrolujte, či koncentrácia DNA nie je príliš vysoká ani príliš nízka. Dávkujte 50 – 100 ng DNA na reakciu v 10 µl.
	Reakcie sú v nesprávnom poradí	<p>Skontrolujte poradie PCR a poradie riadkov v géle.</p> <p>Zamedzte fyzickému pretečeniu susediacich jamiek pri elektroforéze tým, že ich nebudete prepíňať a predtým, ako vyberiete hrebene sa uistíte, že gél je už pevný.</p>
	Bola identifikovaná nová alela	Alely, ktoré neboli doposiaľ sekvenované, môžu byť prítomné v nových amplifikačných vzoroch (pattern). Ak používate na interpretáciu staré návody, aktuálnejšie sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com . Ak tieto neobsahujú nový vzor, použite na kontrolu inú súpravu Biofortuna, alebo sa pokúste identifikovať sekvenciu pomocou typizácie na základe sekvencií. Môžete tiež kontaktovať technického zástupcu spoločnosti Biofortuna, ktorý vám môže poskytnúť viac informácií.

Problém	Pravdepodobná príčina	Nápravné opatrenia
Amplifikačný vzor (pattern) nemožno interpretovať	Nesprávna interpretácia artefaktu ako špecifického prúžku	Skontrolujte správnu veľkosť prúžkov v interpretačných tabuľkách špecifických pre verziu. Skontrolujte, či všetky špecifické amplifikácie majú správnu veľkosť alebo či bol ako amplifikácia chybné interpretovaný artefakt (carry-over, primer dimer).
	Reakcie sú v nesprávnom poradí	Skontrolujte poradie PCR a poradie riadkov v géle.
	Individuálne zlyhanie reakcie PCR	Skontrolujte, či sú prítomné všetky interné pozitívne kontroly. Zopakujte interpretáciu bez chýbajúcich reakcií.
	Chýbajú malé amplikóny	Elektroforézou zanesené príliš ďaleko, malé amplikóny pretiekli cez koniec gélu alebo mimo dosahu etídiumbromidu alebo sú rozptýlené vniknutím do predchádzajúcej vzorky v géle. Použite podmienky pre elektroforézu vhodné pre váš gélový systém.
	Bola identifikovaná nová alela	Príležitostne sa môžu objaviť nové alely poskytujúce amplifikačný vzor (pattern), ktorý nesúhlasí s existujúcimi alelami. Kontaktujte prosím distribútora.